



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101970491 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 200880110659. 5

地址 澳大利亚维多利亚

(22) 申请日 2008. 08. 29

申请人 伯内特研究所

(30) 优先权数据

60/969, 118 2007. 08. 30 US

61/052, 865 2008. 05. 13 US

(72) 发明人 M·H·拉霍德 A·I·普罗耶托

I·卡明斯基 K·肖特曼 A·M·卢

L·吴 M·D·赖特

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 04. 08

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2008/001294 2008. 08. 29

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

C12N 5/22 (2006. 01)

C12N 15/09 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

W02009/026660 EN 2009. 03. 05

(83) 生物保藏信息

ECACC 08042903 2008. 04. 29

ECACC 08042902 2008. 04. 29

ECACC 08042901 2008. 04. 29

ECACC 07121104 2007. 12. 11

ECACC 07121103 2007. 12. 11

ECACC 07121102 2007. 12. 11

ECACC 07121101 2007. 12. 11

ECACC 08042904 2008. 04. 29

(71) 申请人 沃尔特及伊莱萨霍尔医学研究院

权利要求书 8 页 说明书 56 页 序列表 36 页

附图 13 页

(54) 发明名称

树突状细胞标记物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及位于树突状细胞及其前体,特别是抗原呈递树突状细胞的细胞表面上的蛋白质鉴定。特别地,本发明涉及结合这些蛋白质的化合物例如抗体。这些化合物可以用于检测和/或富集树突状细胞的子集或其前体。这些化合物还可以用于使抗原靶向树突状细胞或其前体,以调节针对抗原的体液和/或T细胞介导的免疫应答,或用于将细胞毒素剂靶向涉及疾病状态的树突状细胞或其前体。

1. 结合多肽的化合物,所述多肽包括:
 - i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列;
 - ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50%等同的氨基酸序列;和 / 或
 - iii) i) 或 ii) 的生物学活性和 / 或抗原片段。
2. 权利要求 1 的化合物,其结合包括氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 90%等同。
3. 权利要求 1 或权利要求 2 的化合物,其是多肽。
4. 权利要求 3 的化合物,其是抗体或其抗原结合片段。
5. 权利要求 4 的化合物,其中所述抗体是单克隆抗体、人源化抗体、单链抗体、双抗体、三抗体或四抗体。
6. 权利要求 4 或权利要求 5 的化合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包括至少一个互补决定区(CDR),所述至少一个互补决定区包括与 SEQ ID NO 44 至 46 或 49 至 51 中任何一个至少 90%等同的氨基酸序列。
7. 根据权利要求 4 至 6 中任一项的化合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包括包含 3 个 CDR 的免疫球蛋白重链或其片段,并且其中
 - i) CDR1 包括与 SEQ ID NO :44 至少 90%等同的氨基酸序列,
 - ii) CDR2 包括与 SEQ ID NO :45 至少 90%等同的氨基酸序列,和
 - iii) CDR3 包括与 SEQ ID NO :46 至少 90%等同的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 4 至 7 中任一项的化合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包括包含 3 个 CDR 的免疫球蛋白轻链或其片段,并且其中
 - i) CDR1 包括与 SEQ ID NO :49 至少 90%等同的氨基酸序列,
 - ii) CDR2 包括与 SEQ ID NO :50 至少 90%等同的氨基酸序列,和
 - iii) CDR3 包括与 SEQ ID NO :51 至少 90%等同的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 4 至 8 中任一项的化合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包括
 - i) 包括包含如下氨基酸序列的可变区的免疫球蛋白重链或其片段,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO :43 至少 90%等同,和 / 或
 - ii) 包括包含如下氨基酸序列的可变区的免疫球蛋白轻链或其片段,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO :48 至少 90%等同。
10. 根据权利要求 4 至 9 中任一项的化合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包括
 - i) 包括如下氨基酸序列的免疫球蛋白重链或其片段,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO :42 至少 90%等同,和 / 或
 - ii) 包括如下氨基酸序列的免疫球蛋白轻链或其片段,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO :47 至少 90%等同。
11. 权利要求 4 或权利要求 5 的化合物,其中所述抗体是 24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4 或 23/05-4C6,或包括 24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4 或 23/05-4C6 的至少一个互补决定区的抗体。
12. 权利要求 3 的化合物,其是多肽的可溶性片段,所述多肽包括:
 - i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 和 58 至 61 中任何一个中提供的氨基酸序列;或
 - ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 和 58 至 61 中任何一个或多个至少 50%等同的氨基酸序列,

其中所述可溶性片段不包括 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个的至少约 40 个 N 末端残基。

13. 与结合多肽的抗体竞争性结合所述多肽的化合物,其中所述多肽包括如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列。

14. 权利要求 13 的化合物,其中所述抗体是 24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4 和 / 或 23/05-4C6。

15. 根据权利要求 1 至 14 中任一项的化合物,其与治疗剂缀合。

16. 权利要求 15 的化合物,其中所述治疗剂是抗原。

17. 权利要求 16 的化合物,其中所述抗原是癌抗原、自身抗原、变应原和 / 或来自致病性和 / 或传染性生物体的抗原。

18. 权利要求 17 的化合物,其中所述致病性和 / 或传染性生物体是恶性疟原虫或间日疟原虫。

19. 权利要求 15 的化合物,其中所述治疗剂是细胞毒素剂。

20. 权利要求 15 的化合物,其中所述治疗剂是药物和 / 或药理学试剂。

21. 根据权利要求 1 至 20 中任一项的化合物,其是可检测标记的。

22. 稳定的抗体产生细胞系,其能够产生权利要求 4 的抗体。

23. 权利要求 22 的细胞系,其是于 2008 年 4 月 29 日以保藏参考 08042901 保藏于欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC) 的 24/04-10B4,于 2008 年 4 月 29 日以保藏参考 08041902 保藏于欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC) 的 42/04-42D2,于 2008 年 4 月 29 日以保藏参考 08042903 保藏于欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC) 的 20/05-3A4,或于 2008 年 4 月 29 日以保藏参考 08042904 保藏于欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC) 的 23/05-4C6。

24. 组合物,其包括根据权利要求 1 至 21 中任一项的化合物和药学上可接受的载体。

25. 权利要求 24 的组合物,其进一步包括佐剂。

26. 权利要求 24 或权利要求 25 的组合物,其中所述化合物封装在脂质体中或暴露于脂质体表面上。

27. 调节受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括给所述受试者施用根据权利要求 1 至 21 中任一项的化合物和 / 或根据权利要求 24 至 26 中任一项的组合物。

28. 权利要求 27 的方法,其中诱导和 / 或增强针对抗原的免疫应答。

29. 权利要求 28 的方法,其中给所述受试者施用根据权利要求 16 至 18 中任一项的化合物。

30. 权利要求 27 的方法,其中减少针对自身抗原或变应原的免疫应答。

31. 调节受试者中针对抗原的免疫应答的方法,所述方法包括使树突状细胞或其前体在体外暴露于根据权利要求 1 至 21 中任一项的化合物和 / 或根据权利要求 24 至 26 中任一项的组合物,并且将所述细胞施用于所述受试者。

32. 权利要求 31 的方法,其中所述细胞已从所述受试者中分离。

33. 根据权利要求 27 至 32 中任一项的方法,其包括调节体液和 / 或 T 细胞介导的应答。

34. 权利要求 33 的方法,其包括调节幼稚 CD8+T 细胞激活和 / 或幼稚 CD4+T 细胞激活。

35. 治疗和 / 或预防涉及树突状细胞或其前体的疾病的方法,所述方法包括给所述受试者施用根据权利要求 1 至 21 中任一项的化合物和 / 或根据权利要求 24 至 26 中任一项

的组合物。

36. 权利要求 35 的方法,其包括施用权利要求 19 或权利要求 20 的化合物。

37. 治疗和 / 或预防涉及树突状细胞或其前体的疾病的方法,所述方法包括给所述受试者施用分离的多核苷酸和 / 或编码所述多核苷酸的构建体,当其存在于所述受试者的细胞中时,与缺乏所述多核苷酸的细胞相比较时,其调节所述细胞中多肽的活性水平,所述多肽包括:

i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列;和 / 或

ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述多核苷酸下调所述细胞中所述多肽的活性水平,并且其中所述多核苷酸选自:反义多核苷酸、有义多核苷酸、催化多核苷酸、微小 RNA 和双链 RNA。

39. 根据权利要求 35 至 38 中任一项的方法,其中涉及树突状细胞或其前体的所述疾病是癌症、感染、自身免疫疾病或过敏症。

40. 权利要求 39 的方法,其中所述自身免疫疾病是红斑狼疮。

41. 权利要求 39 的方法,其中所述感染是疟原虫属物种感染。

42. 根据权利要求 1 至 21 中任一项的化合物和 / 或根据权利要求 24 至 26 中任一项的组合物,在制造用于调节受试者中的免疫应答的药物中的用途。

43. 在体外暴露于根据权利要求 1 至 21 中任一项的化合物和 / 或根据权利要求 24 至 26 中任一项的组合物的树突状细胞或其前体,在制造用于调节受试者中针对抗原的免疫应答的药物中的用途。

44. 根据权利要求 1 至 21 中任一项的化合物和 / 或根据权利要求 24 至 26 中任一项的组合物,在制造用于治疗 / 或预防受试者中涉及树突状细胞或其前体的疾病的药物中的用途。

45. 富集来自样品的树突状细胞或其子集或前体的方法,所述方法包括:

i) 使包括树突状细胞或其前体的样品与根据权利要求 1 至 18、20 或 21 中任一项的化合物接触,和

ii) 分离与所述化合物结合的细胞。

46. 富集来自样品的树突状细胞或其子集或前体的方法,其包括:

i) 使包括树突状细胞或其前体的样品与可检测标记的第一种多核苷酸接触,所述第一种多核苷酸与编码多肽的第二种多核苷酸杂交,所述多肽包括

a) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列;和 / 或

b) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列,和

ii) 分离所述可检测标记的细胞。

47. 权利要求 45 或权利要求 46 的方法,其中将得自步骤 ii) 的所述细胞施用于受试者。

48. 权利要求 47 的方法,其中施用所述细胞以治疗和 / 或预防选自癌症、感染、自身免疫疾病或过敏症的疾病。

49. 检测样品中的树突状细胞或其子集或前体的方法,其包括:

i) 使包括树突状细胞或其前体的样品与根据权利要求 1 至 18、20 或 21 中任一项的化

合物接触，

ii) 检测与所述化合物结合的细胞。

50. 检测样品中的树突状细胞或其子集或前体的方法，其包括；

i) 使包括树突状细胞或其前体的样品与可检测标记的第一种多核苷酸接触，所述第一种多核苷酸与编码多肽的第二种多核苷酸杂交，所述多肽包括

a) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列；和 / 或

b) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列，和

ii) 检测所述可检测标记的细胞。

51. 检测受试者中的树突状细胞或其子集或前体的方法，其包括；

i) 给所述受试者施用根据权利要求 1 至 18、20 或 21 中任一项的化合物，

ii) 检测与所述化合物结合的细胞。

52. 权利要求 49 或权利要求 51 的方法，其中所述化合物是可检测标记的。

53. 检测受试者中的树突状细胞或其子集或前体的方法，其包括；

i) 给所述受试者施用可检测标记的第一种多核苷酸，所述第一种多核苷酸与编码多肽的第二种多核苷酸杂交，所述多肽包括

a) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列；和 / 或

b) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列，和

ii) 检测所述可检测标记物的细胞。

54. 根据权利要求 45 至 53 中任一项的方法，其中所述树突状细胞表达一种或多种下述标记物，CD8、CD24、Nectin-2、CD11c、HLADR 和 BDCA3。

55. 基本上纯化的和 / 或重组的多肽，其包括：

i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列；

ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列；和 / 或

iii) i) 或 ii) 的生物学活性和 / 或抗原片段。

56. 权利要求 55 的多肽，其是树突状细胞或其前体标记物。

57. 权利要求 55 或权利要求 56 的多肽，其包括与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 90% 等同的氨基酸序列。

58. 根据权利要求 55 至 57 中任一项的多肽，其包括至少一个 C 型凝集素样结构域。

59. 根据权利要求 55 至 58 中任一项的多肽，其缺乏跨膜结构域。

60. 根据权利要求 55 至 59 中任一项的多肽，其中所述生物学活性和 / 或抗原片段是可溶性片段，其包括：

i) 如 SEQ ID NO 58 至 61 中任何一个中提供的氨基酸序列；或

ii) 与 SEQ ID NO 58 至 61 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列，

其中所述可溶性片段不包括 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个的至少约 40 个 N 末端残基，并且其中所述可溶性片段能够结合包括如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列的多肽。

61. 根据权利要求 55 至 58 中任一项的多肽，其包括跨膜结构域。

62. 根据权利要求 55 至 61 中任一项的多肽，其与至少一种其他多肽融合。

63. 分离的和 / 或外源多核苷酸，其包括：

- i) 如 SEQ ID NO 9 至 16 中任何一个中提供的核苷酸序列；
- ii) 与 SEQ ID NO 9 至 16 中任何一个或多个至少 50% 等同的核苷酸序列；
- iii) 编码根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽的核苷酸序列，
- iv) 编码权利要求 3 至 21 中任一项的化合物的核苷酸序列；和 / 或
- v) 与 i) 至 iv) 中任何一个或多个或其互补体杂交的序列核苷酸。

64. 权利要求 63 的多核苷酸，其中所述多核苷酸包括与 SEQ ID NO 9 至 16 中任何一个或多个至少 90% 等同的核苷酸序列。

65. 权利要求 63 的多核苷酸，其包括在严格条件下与 SEQ ID NO 9 至 16 中任何一个或多个杂交的核苷酸序列。

66. 根据权利要求 63 至 65 中任一项的多核苷酸，其与能够指导所述多核苷酸在细胞中的表达的启动子可操作地连接。

67. 分离的多核苷酸，当其存在于受试者的细胞中时，与缺乏所述多核苷酸的细胞相比较时，其调节所述细胞中根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽的活性水平。

68. 权利要求 67 的多核苷酸，其与能够指导所述多核苷酸在动物的细胞中的表达的启动子可操作地连接。

69. 权利要求 67 或权利要求 68 的多核苷酸，其下调来自编码所述多肽的基因的 mRNA 水平。

70. 根据权利要求 67 至 69 中任一项的多核苷酸，其中所述多核苷酸选自：反义多核苷酸、有义多核苷酸、催化多核苷酸、微小 RNA 和双链 RNA (dsRNA)。

71. 权利要求 70 的多核苷酸，其为在生理条件下与包括如 SEQ ID NO 9 至 16 中提供的任何一个或多个核苷酸序列的多核苷酸杂交的反义多核苷酸。

72. 权利要求 70 的多核苷酸，其为能够切割包括如 SEQ ID NO 9 至 16 中提供的任何一个或多个核苷酸序列的多核苷酸的催化多核苷酸。

73. 权利要求 70 的多核苷酸，其为包括这样的寡核苷酸的 ds RNA 分子，所述寡核苷酸包括如 SEQ ID NO 9 至 16 中提供的任何一个或多个核苷酸序列的至少 19 个邻接核苷酸，其中 T 由 U 替换，其中其为双链的分子的部分的长度是至少 19 个碱基对，并且包括所述寡核苷酸。

74. 权利要求 73 的多核苷酸，其从单个启动子表达，其中所述双链部分的链通过单链部分连接。

75. 载体，其包括根据权利要求 63 至 74 中任一项的至少一种多核苷酸。

76. 权利要求 75 的载体，其是表达载体。

77. 宿主细胞，其包括权利要求 63 至 74 中任一项的至少一种多核苷酸和 / 或权利要求 75 或权利要求 76 的至少一种载体。

78. 权利要求 77 的宿主细胞，其是细菌、酵母、动物、昆虫或植物细胞。

79. 转基因植物，其包括权利要求 63 至 74 中任一项的外源多核苷酸。

80. 权利要求 79 的转基因植物，其中所述多核苷酸编码根据权利要求 16 至 18 中任一项的化合物。

81. 转基因非人动物，其包括权利要求 63 至 74 中任一项的外源多核苷酸。

82. 权利要求 77 或权利要求 78 的宿主细胞、权利要求 79 或权利要求 80 的植物和 / 或

权利要求 81 的动物的提取物,其中所述提取物包括根据权利要求 1 至 21 中任一项的化合物、根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽和 / 或根据权利要求 63 至 74 中任一项的多核苷酸。

83. 用于制备根据权利要求 3 至 21 中任一项的化合物或根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽的方法,所述方法包括在允许编码所述化合物或多肽的所述多核苷酸表达的条件下,培养根据权利要求 77 或权利要求 78 的宿主细胞、权利要求 75 或权利要求 76 的载体、权利要求 79 或权利要求 80 的植物和 / 或权利要求 81 的非人动物,并且回收所述所表达的化合物或多肽。

84. 化合物或多肽,其使用 83 的方法产生。

85. 树突状细胞和 / 或其前体的富集的群体,其通过根据权利要求 45 至 48 中任一项的方法获得。

86. 表达多肽的树突状细胞和 / 或其前体的富集的群体,所述多肽包括

- i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列;
- ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列;和 / 或
- iii) i) 或 ii) 的生物学活性和 / 或抗原片段。

87. 扩增的树突状细胞群体和 / 或其前体,其通过培养根据权利要求 85 或权利要求 86 的树突状细胞和 / 或其前体的富集的群体获得。

88. 组合物,其包括根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽、根据权利要求 63 至 74 中任一项的多核苷酸、权利要求 75 或权利要求 76 的载体、权利要求 77 或权利要求 78 的宿主细胞、权利要求 79 或权利要求 80 的转基因植物、权利要求 82 的提取物和 / 或根据权利要求 85 至 87 中任一项的细胞群体,和药学上可接受的载体。

89. 鉴定与根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽结合的分子的方法,所述方法包括:

- i) 使根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽与候选化合物接触,
- ii) 测定所述化合物是否结合所述多肽。

90. 鉴定与权利要求 55 至 62 中任一项的多肽结合的分子的方法,所述方法包括:

a) 使权利要求 55 至 62 中任一项的多肽暴露于结合所述多肽的结合配偶体和候选试剂,和

b) 评估所述候选试剂与所述结合配偶体竞争结合所述多肽的能力。

91. 权利要求 90 的方法,其中所述结合配偶体是抗体。

92. 权利要求 90 或权利要求 91 的方法,其中所述结合配偶体是可检测标记的。

93. 根据权利要求 89 至 92 中任一项的方法,其中所述多肽在细胞中表达。

94. 筛选与根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽结合的化合物的方法,所述方法包括使用所述多肽晶体的结构坐标就其与所述多肽结合的能力计算评估候选化合物。

95. 化合物,其使用根据权利要求 89 至 94 中任一项的方法进行鉴定。

96. 调节受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括给所述受试者施用根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽、根据权利要求 63 至 74 中任一项的多核苷酸、权利要求 75 或权利要求 76 的载体、权利要求 77 或权利要求 78 的宿主细胞、权利要求 79 或权利要求 80 的转基因植物、权利要求 82 的提取物、根据权利要求 85 至 87 中任一项的细胞群体和 / 或权利要求 88 的组合物。

97. 权利要求 96 的方法,其中给所述受试者施用包括多核苷酸的 DNA 疫苗,所述多核苷酸编码根据权利要求 16 至 18 中任一项的化合物,其中在施用于所述受试者后产生所述化合物并且产生针对所述抗原的免疫应答。

98. 权利要求 96 的方法,其中给所述受试者经口施用权利要求 79 或权利要求 80 的转基因植物或其提取物。

99. 权利要求 98 的方法,其中所述转基因植物或其提取物包括根据权利要求 16 至 18 中任一项的化合物。

100. 调节受试者中对抗原的免疫应答的方法,所述方法包括使树突状细胞或其前体在体外暴露于根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽、根据权利要求 63 至 74 中任一项的多核苷酸、权利要求 75 或权利要求 76 的载体、权利要求 77 或权利要求 78 的宿主细胞、权利要求 79 或权利要求 80 的转基因植物、权利要求 82 的提取物、根据权利要求 85 至 87 中任一项的细胞群体和 / 或权利要求 88 的组合物,并且将所述细胞施用于所述受试者。

101. 治疗和 / 或预防涉及树突状细胞或其前体的疾病的方法,所述方法包括给所述受试者施用根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽、根据权利要求 63 至 74 中任一项的多核苷酸、权利要求 75 或权利要求 76 的载体、权利要求 77 或权利要求 78 的宿主细胞、权利要求 79 或权利要求 80 的转基因植物、权利要求 82 的提取物、根据权利要求 85 至 87 中任一项的细胞群体和 / 或权利要求 88 的组合物。

102. 根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽、根据权利要求 63 至 74 中任一项的多核苷酸、权利要求 75 或权利要求 76 的载体、权利要求 77 或权利要求 78 的宿主细胞、权利要求 79 或权利要求 80 的转基因植物、权利要求 82 的提取物、根据权利要求 85 至 87 中任一项的细胞群体和 / 或权利要求 88 的组合物,在制造用于调节受试者中的免疫应答的药物中的用途。

103. 在体外暴露于根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽、根据权利要求 63 至 74 中任一项的多核苷酸、权利要求 75 或权利要求 76 的载体、权利要求 77 或权利要求 78 的宿主细胞、权利要求 79 或权利要求 80 的转基因植物、权利要求 82 的提取物、根据权利要求 85 至 87 中任一项的细胞群体和 / 或权利要求 88 的组合物,在制造用于调节受试者中对抗原的免疫应答的药物中的用途。

104. 根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽、根据权利要求 63 至 74 中任一项的多核苷酸、权利要求 75 或权利要求 76 的载体、权利要求 77 或权利要求 78 的宿主细胞、权利要求 79 或权利要求 80 的转基因植物、权利要求 82 的提取物、根据权利要求 85 至 87 中任一项的细胞群体和 / 或权利要求 88 的组合物,在制造用于治疗 / 或预防受试者中涉及树突状细胞或其前体的疾病的药物中的用途。

105. 产生根据权利要求 4 至 10 中任一项的化合物的方法,所述方法包括给动物施用根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽、根据权利要求 63 至 74 的多核苷酸、或权利要求 75 或权利要求 76 的载体和 / 或权利要求 77 或权利要求 78 的宿主细胞。

106. 权利要求 105 的方法,其进一步包括从所述动物中分离结合所述多肽的抗体。

107. 权利要求 105 的方法,其进一步包括使来自所述动物的细胞与骨髓瘤肿瘤细胞融合,以产生杂交瘤,所述动物产生结合所述多肽的抗体。

108. 试剂盒,其包括根据权利要求 1 至 21 中任一项的化合物、权利要求 22 或权利要求

23 的细胞系、根据权利要求 55 至 62 中任一项的多肽、根据权利要求 63 至 74 中任一项的多核苷酸、权利要求 75 或权利要求 76 的载体、权利要求 77 或权利要求 78 的宿主细胞、权利要求 79 或权利要求 80 的转基因植物、权利要求 82 的提取物、根据权利要求 85 至 87 中任一项的细胞群体和 / 或权利要求 24 至 26 或 88 中任一项的组合。

树突状细胞标记物及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及位于树突状细胞及其前体,特别是抗原呈递树突状细胞的细胞表面上的蛋白质鉴定。特别地,本发明涉及结合这些蛋白质的化合物例如抗体。这些化合物可以用于检测和/或富集树突状细胞的子集或其前体。这些化合物还可以用于使抗原靶向树突状细胞或其前体,以调节针对抗原的体液和/或T细胞介导的免疫应答,或用于将细胞毒素剂靶向涉及疾病状态的树突状细胞或其前体。

[0002] 发明背景

[0003] 树突状细胞是在淋巴样器官、血液和外周组织中稀疏分布的骨髓衍生的细胞,其在免疫应答起始和维持中是关键。DC 分享共同性质例如抗原 (Ag) 加工和激活幼稚 T 细胞 (naïve T cell) 的能力。然而,DC 是异源的,在小鼠中检测出至少 7 种不同亚型 (Shortman 和 Liu, 2002)。

[0004] DC 可以广泛分成常规 DC (cDC) 和类浆细胞 DC 前体 (pDC)。pDC 能够分泌高水平的 IFN α 并且仅在激活后发育成 DC (O' Keefe 等人, 2002; Hochrein 等人, 2001)。cDC 可以分成经由淋巴从淋巴结 (LN) 迁移到外周组织的常规“迁移”或间质 DC (例如朗格罕氏 (Langerhans') 细胞), 和不以这种方式迁移而是产生于血液传播前体的“淋巴样组织驻留”DC (在脾、胸腺和 LN 中发现)。

[0005] 小鼠的淋巴样组织驻留 DC 依次可以分成 CD4 $^{-}$ 8 $^{-}$ (DN)、CD4 $^{+}$ 8 $^{-}$ (CD4 $^{+}$) 和 CD4 $^{-}$ 8 $^{+}$ (CD8 $^{+}$) cDC 子集, 其中 CD4 和 DN 统称为 CD8 $^{-}$ DC。此外, 存在由于感染或炎症而发展的炎性 DC (Shortman 和 Naik, 2007)。这些 DC 亚型共享许多功能, 特别是将抗原 (Ag) 摄取、加工和呈递给幼稚 T 细胞。

[0006] 重要的是, DC 还显示子集特异性作用。不同 DC 亚型表达不同模式的 Toll 样受体 (TLR), 并且随后在其对不同感染应答的能力方面不同 (Proietto 等人, 2004, Takdea 等人, 2003)。尽管趋化因子产生主要由 CD8 $^{-}$ DC 执行, 但 CD8 $^{+}$ DC 是指导 Th1 T 细胞应答的 IL-12 的主要生产者。经由 MHC I 类分子交叉呈递外源 Ags 的能力是由 CD8 $^{+}$ DC 子集非常有效执行的活性 (Pooley 等人, 2001; den Haan 等人, 2000), 这允许这些 DC 成为病毒 Ag 对 CD8 $^{+}$ T 细胞的主要呈递者 (Belz 等人, 2004; Smith 等人, 2003)。相比之下, CD8 $^{-}$ DC 看起来更好地为起始 MHC II 类限制应答作准备 (Dudziak 等人, 2007; Schnorrer 等人, 2006)。

[0007] DC 表面上的分子在 DC 的识别、通讯和激活功能中是重要的。在 DC 亚型之间不同的分子是有利的, 因为它们可以支持在这些亚型之间观察到的功能差异。此外, 在 DC 类型之间不同的表面分子是特别有利的, 因为它们可以充当用于将 Ag 或治疗剂选择性递送给 DC 的信标 (beacon), 以便处理免疫应答。

[0008] 针对 DC 细胞表面分子的抗体 (Ab) 已用于将 Ag 递送给 DC, 并且诱导耐受 (Bonifaz 等人, 2002; Finkelman 等人, 1996)。对所靶向 Ag 的免疫也已得到诱导, 尽管在大多数研究中仅在抗体-抗原复合物与 DC 成熟试剂或佐剂共施用 (Bonifaz 等人, 2002; Carter 等人, 2006)。重要的是, 使用细胞表面分子靶向 Ag 且产生免疫的功效将依赖于几个因素: (i) 所靶向 DC 的子集; (ii) 与所靶向分子的表达水平相关的剂量依赖性效应; (iii) 所靶向分

子在除 DC 外的细胞类型上的表达,这可能限制靶向的有效性或潜在地引入由这些非 DC 产生的贡献;(iv) 所靶向分子的功能,这可能影响 Ag 加工或递送诱导或损害 DC 成熟的信号;(v) 所靶向 DC 子集的 TLR 谱,特别是在共施用 TLR 配体时。所有上述因素将影响在临床背景中产生免疫应答的能力。必要时,在移植给人前,这些细节必须首先用实验动物例如小鼠确定。因此,对于将 Ag 靶向 DC 和有效疫苗接种所需的是在小鼠和人之间保守的 DC 表面分子,就分子和功能特征以及限制表达模式而言。

[0009] 看起来人包含鼠类 DC 子集的等价物。因为朗格罕氏细胞的存在,所以分成 cDC 和 pDC 是良好确定的。当从相同组织来源(胸腺)中提取时(O' Keeffe 等人,2003; Vandenabeele 等人,2001),小鼠和人 DC 之间的紧密相似性暗示紧密相似性。然而,大多数鼠类“淋巴样器官驻留”DC 子集的人等价物仍是未知的,这是由于缺乏物种之间的保守表面标记物(即 CD8 标记物在人 DC 上不表达)和获得人淋巴样器官样品用于分析的困难。促进小鼠生物学转变成人临床应用所需的是在小鼠、人和其他物种之间保守的 DC 子集特异性标记物分子的鉴定。此种表面分子可能允许通过利用不同 DC 亚型的特异性免疫功能修改免疫应答。

[0010] 需要鉴定可以用于将治疗例如疫苗靶向树突状细胞的树突状细胞标记物。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明人已鉴定了新的表面 C 型凝集素样分子,5B6,其由小鼠 pDC、CD8⁺cDC 以及人 DC 亚型和树突状细胞前体优先表达。发现抗原经由 5B6 分子靶向递送给 DC 增强针对抗原的免疫应答。即使在不存在另外佐剂的情况下也获得这点。因此,本发明人已鉴定了新的表面标记物,其尤其可以用于鉴定小鼠 CD8⁺DC 及其人配对物,并且将抗原递送给 DC 或其前体,以处理免疫应答且增强疫苗有效性。

[0013] 因此,在第一个方面,本发明提供了结合多肽的化合物,所述多肽包括:

[0014] i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列;

[0015] ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列;和 / 或

[0016] iii) i) 或 ii) 的生物学活性和 / 或抗原片段。

[0017] 在一个实施方案中,化合物是多肽。

[0018] 在一个优选实施方案中,化合物是抗体或其抗原结合片段。此种抗体的例子包括但不限于,单克隆抗体、人源化抗体、单链抗体、双抗体、三抗体或四抗体。

[0019] 在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段包括至少一个互补决定区(CDR),其包括与 SEQ ID NO 44 至 46 或 49 至 51 中任何一个至少 90% 等同的氨基酸序列。

[0020] 在一个进一步的实施方案中,抗体或其抗原结合片段包括包含 3 个 CDR 的免疫球蛋白重链或其片段,并且其中

[0021] i) CDR1 包括与 SEQ ID NO :44 至少 90% 等同的氨基酸序列,

[0022] ii) CDR2 包括与 SEQ ID NO :45 至少 90% 等同的氨基酸序列,和

[0023] iii) CDR3 包括与 SEQ ID NO :46 至少 90% 等同的氨基酸序列。

[0024] 在另一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段包括包含 3 个 CDR 的免疫球蛋白轻链或其片段,并且其中

[0025] i) CDR1 包括与 SEQ ID NO :49 至少 90% 等同的氨基酸序列,

[0026] ii) CDR2 包括与 SEQ ID NO :50 至少 90% 等同的氨基酸序列,和

[0027] iii) CDR3 包括与 SEQ ID NO :51 至少 90% 等同的氨基酸序列。

[0028] 在一个进一步的实施方案中, 抗体或其抗原结合片段包括

[0029] i) 包括可变区的免疫球蛋白重链或其片段, 所述可变区包括与 SEQ ID NO :43 至少 90% 等同的氨基酸序列, 和 / 或

[0030] ii) 包括可变区的免疫球蛋白轻链或其片段, 所述可变区包括与 SEQ ID NO :48 至少 90% 等同的氨基酸序列。

[0031] 在另外一个进一步的实施方案中, 抗体或其抗原结合片段包括

[0032] i) 包括可变区的免疫球蛋白重链或其片段, 所述可变区包括与 SEQ ID NO :42 至少 90% 等同的氨基酸序列, 和 / 或

[0033] ii) 包括可变区的免疫球蛋白轻链或其片段, 所述可变区包括与 SEQ ID NO :47 至少 90% 等同的氨基酸序列。

[0034] 在一个实施方案中, 抗体是 24/04-10B4 (在本文中也称为 10B4)、42/04-42D2 (在本文中也称为 42D2)、20/05-3A4 (在本文中也称为 3A4) 或 23/05-4C6 (在本文中也称为 4C6), 或包括 24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4 或 23/05-4C6 的至少一个互补决定区的抗体。抗体 24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4 和 23/05-4C6 通过杂交瘤细胞系 24/04-10B4-24-8、42/04-42D2-66-4-1、20/05-3A4-26-16、23/05-4C6-29-3 产生, 所述杂交瘤细胞系于 2007 年 12 月 11 日分别以保藏参考号 07121101、07121102、07121103 和 07121104 保藏于欧洲动物细胞保藏中心 (European Collection of Cell Cultures, ECACC)。这些杂交瘤的更高抗体分泌亚克隆 (24/04-10B4-24-8-FACS9-5、42/04-42D2-66-4-1-Clone 4、20/05-3A4-26-16-Clone 5、23/05-4C6-29-3-Clone 5) 于 2008 年 4 月 29 日分别以保藏参考号 08042901、08041902、08042903 和 08042904 保藏于 ECACC。

[0035] 本发明人也已发现 5B6 的可溶性片段能够与全长膜结合 5B6 结合。因此, 在一个备选实施方案中, 化合物是多肽的可溶性片段, 所述多肽包括:

[0036] i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列; 或

[0037] ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列,

[0038] 其中可溶性片段不包括 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个的至少约 40、至少约 50、至少约 55、或至少约 100 个 N 末端残基。

[0039] 优选地, 可溶性片段包括多肽的 C 型凝集素样结构域, 所述多肽包括:

[0040] i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列; 或

[0041] ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列。

[0042] 在一个进一步的实施方案中, 可溶性片段包括:

[0043] i) 如 SEQ ID NO 58 至 61 中任何一个中提供的氨基酸序列; 或

[0044] ii) 与 SEQ ID NO 58 至 61 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列,

[0045] 其中可溶性片段不包括 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个的至少约 40 个 N 末端残基, 并且其中可溶性片段能够结合包括如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列的多肽。

[0046] 优选地, 化合物特异性结合蛋白质。

[0047] 优选地, 化合物结合除 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个的至少约 40、至少约 50、至少

约 55、或至少约 100 个 N 末端残基外的多肽区域。

[0048] 在另一个方面,本发明提供了与结合多肽的抗体竞争性结合所述多肽的化合物,其中多肽包括如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列。

[0049] 在一个优选实施方案中,抗体是 24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4 和 / 或 23/05-4C6。

[0050] 本发明的化合物可以用于将治疗剂递送给树突状细胞或其前体,特别是抗原呈递树突状细胞。因此,在一个进一步的实施方案中,化合物与治疗剂缀合。此种试剂的例子包括但不限于抗原、细胞毒素剂、药物和 / 或药理学试剂。

[0051] 抗原可以是在动物中诱导免疫应答的任何分子。例子包括但不限于癌抗原、自身抗原、变应原和 / 或来自致病性和 / 或传染性生物体的抗原。

[0052] 在一个实施方案中,来自致病性和 / 或传染性生物体的抗原可以来自但不限于恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 或间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)。

[0053] 在另一个实施方案中,化合物是被可检测标记的。

[0054] 在一个实施方案中,化合物是分离和 / 或重组化合物。

[0055] 还提供的是能够产生本发明的抗体的稳定抗体产生细胞系。此种细胞系的例子是于 2007 年 12 月 11 日以保藏参考 07121101 保藏于欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC) 的 24/04-10B4,及其于 2008 年 4 月 29 日以保藏参考 08042901 保藏于 ECACC 的更高生产亚克隆,于 2007 年 12 月 11 日以保藏参考 07121102 保藏于 ECACC 的 42/04-42D2,及其于 2008 年 4 月 29 日以保藏参考 08041902 保藏于 ECACC 的更高生产亚克隆,于 2007 年 12 月 11 日以保藏参考 07121103 保藏于欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC) 的 20/05-3A4,及其于 2008 年 4 月 29 日以保藏参考 08042903 保藏于 ECACC 的更高生产亚克隆,和于 2007 年 12 月 11 日在保藏参考 07121104 保藏于欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC) 的 23/05-4C6,及其于 2008 年 4 月 29 日以保藏参考 08042904 保藏于 ECACC 的更高生产亚克隆。

[0056] 在一个进一步方面,本发明提供了包括本发明的化合物和药学上可接受的载体的组合物。

[0057] 在一个实施方案中,组合物进一步包括佐剂

[0058] 在另一个实施方案中,化合物封装在脂质体中或暴露于脂质体表面上。

[0059] 在另一个方面,本发明提供了调节受试者中的免疫应答的方法,该方法包括给受试者施用本发明的化合物和 / 或本发明的组合物。

[0060] 在一个实施方案中,诱导和 / 或增强针对抗原的免疫应答。

[0061] 在一个特别优选的实施方案中,通过增强辅助性 T 细胞应答来调节免疫应答。

[0062] 在一个进一步优选的实施方案中,通过 CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺T 细胞激活来调节免疫应答。

[0063] 在另一个特别优选的实施方案中,通过增强 B 细胞抗体产生来调节免疫应答。所产生抗体的例子包括但不限于 IgG1、IgG2b、IgG2c 和 / 或 IgG3 抗体同种型。

[0064] 在一个进一步优选的实施方案中,通过产生记忆应答来调节免疫应答。

[0065] 在一个特别优选的实施方案中,给受试者施用与抗原缀合的本发明的化合物。

[0066] 在另一个实施方案中,针对自身抗原或变应原的免疫应答是减少的。在这个实施方案中,优选通过抑制 T 细胞应答和 / 或 B 细胞抗体应答来调节免疫应答。

[0067] 在一个进一步方面,本发明提供了调节受试者中针对抗原的免疫应答的方法,该方法包括使树突状细胞或其前体在体外暴露于本发明的化合物和 / 或本发明的组合物,并且将所述细胞施用于受试者。

[0068] 在一个实施方案中,细胞已从受试者中分离。

[0069] 优选地,调节体液和 / 或 T 细胞介导的应答。

[0070] 在一个进一步的实施方案中,调节幼稚 CD8+T 细胞激活和 / 或幼稚 CD4+T 细胞激活。

[0071] 在另外一个实施方案中,体液应答包括 IgG1、IgG2b、IgG2c 和 / 或 IgG3 抗体同种型的产生。在另一个实施方案中,体液应答至少包括 IgG1 抗体同种型的产生。

[0072] 优选地,树突状细胞是动物树突状细胞或动物树突状细胞的前体。更优选地,树突状细胞是人树突状细胞。更加优选地,人树突状细胞是 Nec1-2+、HLA DR+ 和 / 或 BDCA-3+。

[0073] 在另外一个方面,本发明提供了治疗和 / 或预防涉及树突状细胞或其前体的疾病的方法,该方法包括给受试者施用本发明的化合物和 / 或本发明的组合物。

[0074] 优选地,该方法施用与细胞毒素剂、药物和 / 或药理学试剂缀合的化合物。

[0075] 在一个进一步方面,本发明提供了治疗和 / 或预防涉及树突状细胞或其前体的疾病的方法,该方法包括给受试者施用分离的多核苷酸和 / 或编码所述多核苷酸的构建体,当其存在于受试者的细胞中时,与缺乏所述多核苷酸的细胞相比较时,其调节细胞中多肽的活性水平,所述多肽包括:

[0076] i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列;和 / 或

[0077] ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列。

[0078] 在一个实施方案中,所述多核苷酸下调细胞中多肽的活性水平。此种多核苷酸的例子包括但不限于,反义多核苷酸、有义多核苷酸、催化多核苷酸、微小 RNA 和双链 RNA。

[0079] 在一个备选实施方案中,所述多核苷酸上调多肽的活性水平。例如,多核苷酸编码包括如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列的多肽。

[0080] 涉及树突状细胞或其前体的疾病例子包括但不限于癌症、感染、自身免疫疾病或过敏症。

[0081] 在一个实施方案中,自身免疫疾病是红斑狼疮。

[0082] 在另一个实施方案中,感染是疟原虫属物种 (*Plasmodium* sp.), 例如恶性疟原虫或间日疟原虫感染。

[0083] 在另一个方面,本发明提供了本发明的化合物和 / 或本发明的组合物在制造用于调节受试者中的免疫应答的药物中的用途。

[0084] 在一个进一步方面,本发明提供了关于在体外暴露于本发明的化合物和 / 或本发明的组合物的树突状细胞或其前体在制造用于调节受试者中针对抗原的免疫应答的药物中的用途。

[0085] 在另外一个方面,本发明提供了本发明的化合物和 / 或本发明的组合物在制造用于治疗 / 或预防受试者中涉及树突状细胞或其前体的疾病的药物中的用途。

[0086] 在一个进一步方面,本发明提供了富集来自样品的树突状细胞或其子集或前体的方法,所述方法包括:

[0087] i) 使包括树突状细胞或其前体的样品与本发明的化合物接触,和

[0088] ii) 分离与化合物结合的细胞。

[0089] 在另一个方面,本发明提供了富集来自样品的树突状细胞或其子集或前体的方法,其包括:

[0090] i) 使包括树突状细胞或其前体的样品与可检测标记的第一种多核苷酸接触,所述第一种多核苷酸与编码多肽的第二种多核苷酸杂交,所述多肽包括

[0091] a) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列;和 / 或

[0092] b) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列,和

[0093] ii) 分离可检测标记的细胞。

[0094] 在一个优选实施方案中,将从上述 2 种方法的步骤 ii) 中获得的细胞施用于受试者。在一个实施方案中,施用细胞以治疗和 / 或预防选自癌症、感染、自身免疫疾病或过敏症的疾病。

[0095] 在一个进一步方面,本发明提供了检测样品中的树突状细胞或其子集或前体的方法,其包括:

[0096] i) 使包括树突状细胞或其前体的样品与本发明的化合物接触,

[0097] ii) 检测与化合物结合的细胞。

[0098] 在另外一个方面,本发明提供了检测样品中的树突状细胞或其子集或前体的方法,其包括:

[0099] i) 使包括树突状细胞或其前体的样品与可检测标记的第一种多核苷酸接触,所述第一种多核苷酸与编码多肽的第二种多核苷酸杂交,所述多肽包括

[0100] a) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列;和 / 或

[0101] b) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列,和

[0102] ii) 检测可检测标记的细胞。

[0103] 在另一个方面,本发明提供了检测受试者中的树突状细胞或其子集或前体的方法,其包括:

[0104] i) 给受试者施用本发明的化合物,

[0105] ii) 检测与化合物结合的细胞。

[0106] 在一个实施方案中,化合物是可检测标记的。然而,如技术人员应当理解的,可以使用其他操作,例如使用结合化合物的可检测标记的第二种抗体。

[0107] 在一个进一步方面,本发明提供了检测受试者中的树突状细胞或其子集或前体的方法,其包括:

[0108] i) 给受试者施用可检测标记的第一种多核苷酸,所述第一种多核苷酸与编码多肽的第二种多核苷酸杂交,所述多肽包括

[0109] a) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列;和 / 或

[0110] b) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列,和

[0111] ii) 检测可检测标记的细胞。

[0112] 在一个优选实施方案中,树突状细胞表达一种或多种下述标记物, CD8、CD24、Nec1-2、CD11c、HLADR 和 BDCA3。

[0113] 优选地,树突状细胞是人树突状细胞,其表达一种或多种下述标记物, Nec1-2、HLADR 和 BDCA 3。

[0114] 在一个备选实施方案中,树突状细胞是鼠类树突状细胞,其表达一种或多种下述标记物,CD24、Nec1-2、CD11c 和 CD8。

[0115] 优选地,前体树突状细胞是中期或晚期前体树突状细胞,其能够在培养中分化成树突状细胞和 / 或转移到受辐射的接受者内。

[0116] 优选地,受试者是动物。更优选地,受试者是哺乳动物例如人、犬、猫、马、牛或绵羊。最优选地,受试者是人。

[0117] 本发明人也已鉴定某些 B 细胞表达本发明的多肽。可以通过靶向本领域已知的任何 B 细胞标记物例如 CD19,将此种细胞与树突状细胞或其前体区分和 / 或分离。

[0118] 在另一个方面,本发明提供了基本上纯化和 / 或重组多肽,其包括:

[0119] i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列;

[0120] ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列;和 / 或

[0121] iii) i) 或 ii) 的生物学活性和 / 或抗原片段。

[0122] 优选地,多肽是树突状细胞或其前体标记物。

[0123] 优选地,多肽包括至少一个 C 型凝集素样结构域。更优选地,多肽包括单个 C 型凝集素样结构域。

[0124] 在一个实施方案中,多肽缺乏跨膜结构域。在本文中提供了此种可溶性片段的例子。在一个实施方案中,生物学活性和 / 或抗原片段是可溶性片段,其包括:

[0125] i) 如 SEQ ID NO 58 至 61 中任何一个中提供的氨基酸序列;或

[0126] ii) 与 SEQ ID NO 58 至 61 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列,

[0127] 其中可溶性片段不包括 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个的至少约 40 个 N 末端残基,并且其中可溶性片段能够结合包括如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列的多肽。

[0128] 在另一个实施方案中,多肽包括跨膜结构域。

[0129] 优选地,多肽可以从树突状细胞或其前体纯化。

[0130] 优选地,多肽可以从动物或由其而来的细胞纯化。更优选地,多肽可以从哺乳动物例如人、犬、猫、马、牛或绵羊纯化。最优选地,多肽可以从人纯化。

[0131] 在另一个实施方案中,多肽与至少一种其他多肽融合。至少一种其他多肽可以是增强本发明多肽的稳定性的多肽,或帮助纯化或检测融合蛋白的多肽。

[0132] 在另一个方面,本发明提供了分离的和 / 或外源的多核苷酸,其包括:

[0133] i) 如 SEQ ID NO 9 至 16 中任何一个中提供的核苷酸序列;

[0134] ii) 与 SEQ ID NO 9 至 16 中任何一个或多个至少 50% 等同的核苷酸序列;

[0135] iii) 编码本发明的多肽的核苷酸序列,

[0136] iv) 编码本发明的化合物的核苷酸序列;和 / 或

[0137] v) 与 i) 至 iv) 中任何一个或多个或其互补体杂交的核苷酸序列。

[0138] 在一个实施方案中,多核苷酸包括在严格条件下与 SEQ ID NO 9 至 16 中任何一个或多个杂交的核苷酸序列。

[0139] 优选地,多核苷酸与能够指导多核苷酸在细胞中的表达的启动子可操作地连接。

[0140] 在一个进一步方面,本发明提供了分离的多核苷酸,当其存在于受试者的细胞中时,与缺乏所述多核苷酸的细胞相比较,其调节细胞中本发明的多肽的活性水平。

[0141] 在一个实施方案中,多核苷酸与能够指导多核苷酸在动物的细胞中的表达的启动子可操作地连接。

[0142] 在一个优选实施方案中,多核苷酸下调来自编码多肽的基因的 mRNA 水平。此种多核苷酸的例子包括但不限于,反义多核苷酸、有义多核苷酸、催化多核苷酸、微小 RNA 和双链 RNA (dsRNA)。

[0143] 在一个实施方案中,反义多核苷酸在生理条件下与包括如 SEQ ID NO 9 至 16 中提供的任何一个或多个核苷酸序列的多核苷酸杂交。

[0144] 在另一个实施方案中,催化多核苷酸能够切割包括如 SEQ ID NO 9 至 16 中提供的任何一个或多个核苷酸序列的多核苷酸。

[0145] 在一个进一步的实施方案中,dsRNA 分子包括寡核苷酸,其包括如 SEQ ID NO 9 至 16 中提供的任何一个或多个核苷酸序列的至少 19 个邻接核苷酸,其中 T 由 U 替换,其中其为双链的分子部分的长度是至少 19 个碱基对,并且包括所述寡核苷酸。

[0146] 在另外一个进一步的实施方案中,dsRNA 分子从单个启动子表达,其中双链部分的链通过单链部分连接。

[0147] 在一个备选实施方案中,多核苷酸上调来自编码多肽的基因的 mRNA 水平。例如,多核苷酸编码多肽。

[0148] 还提供的是包括本发明的至少一种多核苷酸的载体。优选地,载体是表达载体。

[0149] 在一个进一步方面,本发明提供了包括本发明的至少一种多核苷酸、和 / 或本发明的至少一种载体的宿主细胞。细胞可以是任何细胞类型,例如但不限于细菌、酵母、动物、昆虫或植物细胞。

[0150] 在一个进一步方面,本发明提供了包括本发明的外源多核苷酸的转基因植物。

[0151] 优选地,外源多核苷酸编码本发明的多肽或本发明的化合物。

[0152] 在一个实施方案中,多核苷酸编码与抗原缀合的本发明的化合物。

[0153] 在另一个方面,本发明提供了包括本发明的外源多核苷酸的转基因非人动物。

[0154] 在一个进一步方面,本发明提供了本发明的宿主细胞、本发明的植物和 / 或本发明的动物的提取物,其中提取物包括本发明的化合物、本发明的多肽和 / 或本发明的多核苷酸。

[0155] 还提供的是用于制备本发明的化合物或本发明的多肽的方法,该方法包括在允许编码化合物或多肽的多核苷酸表达的条件下,培养本发明的宿主细胞、本发明的载体、本发明的植物和 / 或本发明的非人动物,并且回收所表达的化合物或多肽。

[0156] 在另一个方面,本发明提供了使用本发明的方法产生的化合物或多肽。

[0157] 在一个进一步方面,本发明提供了通过本发明的方法获得的树突状细胞和 / 或其前体的富集的群体。

[0158] 在一个进一步方面,本发明提供了表达多肽的树突状细胞和 / 或其前体的富集的群体,所述多肽包括

[0159] i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列;

[0160] ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列;和 / 或

[0161] iii) i) 或 ii) 的生物学活性和 / 或抗原片段。

[0162] 在一个进一步方面,本发明提供了通过培养本发明的树突状细胞和 / 或其前体的

富集的群体获得的, 扩增树突状细胞群体和 / 或其前体。

[0163] 在另一个方面, 本发明提供了包括本发明的多肽、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞、本发明的转基因植物、本发明的提取物和 / 或本发明的细胞群体, 和药学上可接受的载体的组合物。

[0164] 在另外一个方面, 本发明提供了鉴定与本发明的多肽结合的分子的方法, 该方法包括:

[0165] i) 使本发明的多肽与候选化合物接触,

[0166] ii) 测定化合物是否结合多肽。

[0167] 在一个进一步方面, 本发明提供了鉴定与本发明的多肽结合的分子, 该方法包括:

[0168] a) 使本发明的多肽暴露于结合所述多肽的结合配偶体和候选试剂, 和

[0169] b) 评估候选试剂与结合配偶体竞争结合所述多肽的能力。

[0170] 在一个实施方案中, 结合配偶体是抗体。在另一个实施方案中, 结合配偶体是多肽的可溶性片段, 所述多肽包括:

[0171] i) 如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个中提供的氨基酸序列; 或

[0172] ii) 与 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个至少 50% 等同的氨基酸序列,

[0173] 其中可溶性片段不包括 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个的至少约 40、至少约 50、至少约 55 个 N 末端残基。

[0174] 在另一个实施方案中, 结合配偶体是可检测标记的。

[0175] 在一个进一步的实施方案中, 多肽在细胞中表达。

[0176] 在另一个方面, 本发明提供了筛选与本发明的多肽结合的化合物的方法, 该方法包括使用多肽晶体的结构坐标 (coordinate) 就其与多肽结合的能力计算评估候选化合物。

[0177] 还提供的是使用本发明的方法鉴定的化合物。

[0178] 在一个进一步方面, 本发明提供了调节受试者中的免疫应答的方法, 该方法包括给受试者施用本发明的多肽、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞、本发明的转基因植物、本发明的提取物、本发明的细胞群体和 / 或本发明的组合物。

[0179] 在一个实施方案中, 给受试者施用包括多核苷酸的 DNA 疫苗, 所述多核苷酸编码与抗原缀合的本发明的化合物, 其中在施用于受试者后产生化合物并且产生针对抗原的免疫应答。

[0180] 在另一个实施方案中, 给受试者经口施用本发明的转基因植物或其提取物。优选地, 转基因植物或其提取物包括与抗原缀合的本发明的化合物。

[0181] 在另一个方面, 本发明提供了调节受试者中针对抗原的免疫应答的方法, 该方法包括使树突状细胞或其前体在体外暴露于本发明的多肽、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞、本发明的转基因植物、本发明的提取物、本发明的细胞群体和 / 或本发明的组合物, 并且将所述细胞施用于受试者。

[0182] 在另外一个方面, 本发明提供了治疗和 / 或预防涉及树突状细胞或其前体的疾病的方法, 该方法包括给受试者施用本发明的多肽、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞、本发明的转基因植物、本发明的提取物、本发明的细胞群体和 / 或本发明的

组合物。

[0183] 还提供的是本发明的多肽、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞、本发明的转基因植物、本发明的提取物、本发明的细胞群体和 / 或本发明的组合物, 在制造用于调节受试者中的免疫应答的药物中的用途。

[0184] 还提供的是在体外暴露于本发明的多肽、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞、本发明的转基因植物、本发明的提取物、本发明的细胞群体和 / 或本发明的组合物的树突状细胞或其前体, 在制造用于调节受试者中针对抗原的免疫应答的药物中的用途。

[0185] 还提供的是本发明的多肽、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞、本发明的转基因植物、本发明的提取物、本发明的细胞群体和 / 或本发明的组合物, 在制造用于治疗 and / 或预防受试者中涉及树突状细胞或其前体的疾病的药物中的用途。

[0186] 在另一个方面, 本发明提供了产生本发明的化合物的方法, 该方法包括给动物施用本发明的多肽、本发明的多核苷酸、本发明的载体和 / 或本发明的宿主细胞。

[0187] 优选地, 该方法进一步包括从动物中分离结合多肽的抗体。

[0188] 在一个实施方案中, 该方法进一步包括使来自动物的细胞与骨髓瘤肿瘤细胞融合, 以产生杂交瘤, 所述动物产生结合多肽的抗体。

[0189] 在另外一个实施方案中, 本发明提供了试剂盒, 其包括本发明的化合物、本发明的细胞系、本发明的多肽、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞、本发明的转基因植物、本发明的提取物、本发明的细胞群体和 / 或本发明的组合物。

[0190] 如显而易见的, 本发明的一个方面的优选特征和特性可应用于本发明的许多其他方面。

[0191] 本说明书自始至终单词“包括”或其变化“包含”、“含有”应理解为暗示包括所述元素、整数或步骤, 或元素、整数或步骤的组, 但不排除任何其他元素、整数或步骤, 或元素、整数或步骤的组。

[0192] 本发明在下文中通过下述非限制性实施例和参考附图进行描述。

[0193] 附图简述

[0194] 图 1. 由小鼠 (m) 和人 (h) 5B6 基因编码的基因组结构和预测的蛋白质结构。编码 (A) 小鼠和 (B) 人 5B6 的全长 cDNA。(C) 由小鼠和人 5B6 编码的预测的蛋白质序列的蛋白质序列比对。序列同一性以深灰色突出显示, 相似性以浅灰色显示。箭头指示外显子边界。(D) 示意性表示通过 cDNA 分别与 C57BL/6J 小鼠的基因组序列数据库 (2006 年 2 月的 UCSC 集合) 和人数据库 (2006 年 3 月的 UCSC 集合) 比对测定的小鼠和人 5B6 的基因结构。编码 5B6 基因的编码区的外显子由黑框指示, 并且外显子和内含子的大小 (bp) 在下面显示。(E) 小鼠和人 5B6 蛋白质的图示。

[0195] 图 2. 小鼠和人 5B6 (C1ec9A) 的 CTLD 与共享序列同源性的蛋白质的比对。包括大鼠甘露糖结合蛋白 A (MBP-A) 用于作为常规 C 型凝集素结构域比较, 所述常规 C 型凝集素样结构域具有功能性碳水化合物识别结构域。灰色框指示保守残基, (+) 指示可能涉及蛋白质同二聚化的另外一对半胱氨酸残基, (*) 标记预测形成二硫键的保守半胱氨酸残基。MBP-A 中连接的 Ca^{2+} 的残基指定为 1 和 2。

[0196] 图 3. 小鼠 5B6 的基因表达谱。实时 RT-PCR 用于研究相对于在 (A) 淋巴样器官

稳态 DC 包括脾 cDC 子集 ;DN、CD4⁺ 和 CD8⁺、胸腺 cDC 子集 ;CD8⁻ 和 CD8⁺、LN cDC 子集 ;CD8⁻、CD8⁺、皮肤和朗格罕氏细胞 (LC) 中以及在胸腺和脾 pDC 中的 Gapdh 的 5B6 基因表达谱。(B) 造血细胞包括胸腺细胞 (thym)、淋巴结 (LN)B 和 T 细胞、脾 (spl)B 和 T 细胞、NK 细胞、未成熟巨噬细胞 (im mac)、成熟巨噬细胞 (mat mac)、脾 pDC 和 cDC。(C) 从稳态 (静止) 小鼠和在体内用 LPS 和 CpG 激活 3 小时后分离的脾 cDC。

[0197] 图 4. m5B6(Clec9A) 蛋白质在 DC 和其他造血细胞上的表面表达。(A) 对 DC 进行纯化且通过 4 色免疫荧光染色进行表面标记。DC 用针对 CD11c(N418-PeCy7)、CD45RA(14.8-APC)、CD8(53-6.7-APC-Cy7) 和 m5B6(10B4-生物素) 的 mAb 染色。脾 DC 还用 CD4(GK1.5-FITC) 染色, 胸腺 DC 用 Sirp α (p84-FITC) 染色, 并且皮下 LN DC 用 CD205(NLDC-145-FITC) 染色。脾 cDC 分成 CD4⁺cDC(CD11^{hi}CD45RA⁻CD4⁺CD8⁻)、DN cDC(CD11^{hi}CD45RA⁻CD4⁻CD8⁻) 和 CD8⁺cDC(CD11^{hi}CD45RA⁻CD8⁺CD4⁻); 胸腺 cDC 分成 CD8⁻cDC(Sirp α ^{hi}CD8^{lo}) 和 CD8⁺cDC(Sirp α ^{lo}CD8⁺); 并且 LN cDC 分成 CD8⁻cDC(CD11c⁺CD205⁻CD8⁻)、皮肤 cDC(CD11c⁺CD205^{int}CD8⁻)、朗格罕氏细胞(CD11c⁺CD205^{hi}CD8⁻) 和 CD8⁺cDC(CD11c⁺CD205^{hi}CD8⁺), 如先前描述的 (Lahoud 等人, 2006)。pDC 鉴定为 CD11c^{int}CD45RA⁺。脾细胞用针对 CD3(KT3-1.1-FITC)、CD19(1D3-PeCy7)、NK1.1(PK136-PeCy7)、CD49b(Hm α 2-APC) 的 mAb 染色, 并且鉴定了 B 细胞 (CD19⁺CD3⁻)、T 细胞 (CD19⁻CD3⁺) 和 NK 细胞 (NK1.1⁺CD49b⁺CD3⁻)。脾巨噬细胞如材料与方法中所示进行富集, 并且用 CD11b(M1/70-Cy5) 和 F4/80-FITC 染色, 并且鉴定为 CD11b^{hi}F4/80⁺。骨髓细胞和脾细胞用针对 CD11b(M1/70-Cy5) 和 Ly6C(5075-3.6-FITC) 的 mAb 染色, 并且单核细胞鉴定为侧面散射^{lo}Ly6C^{hi}CD11b^{hi}。骨髓巨噬细胞是 Ly6C^{int}CD11b^{hi}。细胞群体用 SA-PE 进行复染色, 并且就 m5B6 表达进行分析。实线表示在门控细胞上的 m5B6 染色, 虚线表示用同种型匹配对照对门控细胞的染色。(B) 脾 DC 的富集制备物用针对 m5B6(10B4-生物素)、CD11c(N418-量子点 655)、CD8 α (YTS-169-PercepCy5.5) 和 CD24(M1/69-Alexa 633) 和 120G8-FITC 的 mAb 染色, 随后用 SA-PE 进行复染色。pDC(CD11c^{int}120G8⁺) 和 cDC(CD11c^{hi}120G8⁻) 就 m5B6 的表达进行分析。m5B6 表达与在 cDC 上的 CD8 α 和 CD24 表达相关。大多数脾 pDC 表达 m5B6。(C) 血液 DC 的富集制备物与脾 DC(B) 使用相同 mAb 平行染色, 并且使用等同门控策略进行分析。血液 DC 不表达 CD8 α , 但表达 CD24。类似于脾 DC, 表达 CD24 的血液 DC 还共表达来自血液的 5B6pDC, 如同其脾配对物, 表达 m5B6。

[0198] 图 5. 5B6(CLEC9A) 在人和猕猴 DC 和造血细胞上的表达。(A) 分离人和猕猴外周血单核细胞 (PBMC), 并且用针对 HLADR、BDCA3、5B6 以及包括 CD3(T 细胞)、CD14(单核细胞)、CD19(B 细胞) 和 CD56(自然杀伤细胞) 的 PE 缀合谱系混合物 (cocktail) 的 mAb 进行表面免疫荧光标记。对血液 DC 进行门控为 HLADR⁺ 谱系 (PE)⁻, 并且就其 5B6(人和猕猴) 和 BDCA3(人) 的表达进行进一步分析。(B) 人 PBMC 用针对所需的表面标记物和 5B6 的 mAb 进行表面免疫荧光标记。对单核细胞 (CD14⁺)、NK 细胞 (NKp46⁺)、T 细胞 (CD3⁺) 和 B 细胞 (CD19⁺) 进行门控, 并且就其 5B6 的表达进行分析 (实线)。虚线表示用同种型匹配对照对所门控的细胞进行染色。(C) 5B6 在人血液 DC 上的表达。分离人外周血单核细胞 (PBMC), 并且使用小鼠抗人抗体的混合物 (FMC17(CD14)、FMC63 和 B1(CD19 和 CD20) 和 BC3(CD3)) 耗尽单核细胞、B 细胞和 T 细胞, 随后去除抗小鼠磁珠 (Biomag)。细胞的富集制备物用针对 HLADR(L243-APCCy7)、5B6(10B4-APC 或 4C6-APC) 和 BDCA-3(AD5-14H12-FITC) 的 mAb 进行

表面免疫荧光标记。对血液 DC 进行门控为 HLADR⁺, 并且就其 BDCA3 和 5B6 的表达进行进一步分析。虚线表示门控细胞的本底染色。

[0199] 图 6. 使用抗 m5B6 mAb 10B4(在该图中称为抗 Clec9A) 靶向 DC 诱导了有效的体液应答。(A, B) 小鼠用 2 μ g (n = 5)、0.4 μ g (n = 5)、0.08 μ g (n = 5) 或 0.016 μ g (n = 4) 抗 m5B6mAb(10B4), 或用 50 μ g (n = 5) 和 10 μ g (n = 5) 非靶向同种型对照 mAb-1(eBioscience), 或用 50 μ g (n = 2) 内部同种型对照 mAb-2(GL117) 进行 i. v. 注射。在 (A) 第 2 周和 (B) 第 4 周时, 通过 ELISA 测量血清抗大鼠反应性。描绘了平均滴度 \pm SEM。滴定实验执行 2 次, 并且显示了一次代表性实验。10 μ g 剂量应答表示 5 次实验的累积数据 (第 2 周; n = 20, 第 4 周; n = 19)。(C) 小鼠 (n = 5) 用 10 μ g 抗 m5B6mAb 或非靶向同种型对照 mAb-1(eBioscience) 进行 i. v. 注射。在第 2、4 和 6 周时收集血清样品, 这之后小鼠用 10 μ g 非靶向同种型对照 mAb-2(GL117) 进行注射。在第 2、4、6、8 周时, 通过 ELISA 测量血清抗大鼠 Ig 反应性, 并且呈现为平均滴度 \pm SEM。(D) 小鼠用 10 μ g 抗 m5B6mAb (n = 7) 或非靶向同种型对照 mAb-2(GL117; n = 4) 进行 i. v. 注射。在第 4 周时, 通过 ELISA 测量血清抗大鼠 Ig 反应性的同种型。条形图描绘了平均滴度 \pm SEM。滴定实验执行 2 次, 并且呈现了代表性数据。

[0200] 图 7. 通过使用抗 m5B6 mAb 10B4(在该图中称为抗 Clec9A) 靶向 DC 诱导的体液免疫的性质。C57BL/6 或 (A) C57BL/6TRIF^{-/-}MyD88^{-/-} 或 (B) C57/BL6FcR γ ^{-/-} 或 (C) C57/BL6nu/nu 小鼠用 10 μ g 抗 m5B6mAb(10B4) 或非靶向同种型对照 mAb-2(GL117) 进行 i. v. 注射。(D) C57BL/6 小鼠用 10 μ g 抗 m5B6mAb 或非靶向同种型对照 mAb-2(GL117), 连同或连同 LPS(10ng) 进行 i. v. 注射。(E) 10 μ g OVA 缀合的抗 m5B6mAb 或 OVA 缀合的非靶向同种型对照 mAb-2(GL117) 或 (F) 升高剂量的游离 OVA i. v. 注射到 C57BL/6 小鼠内。在第 4 周时通过 ELISA 测量血清抗大鼠 Ig Ab 滴度。每个圆圈表示个别小鼠, 组的几何平均值由线描绘。实验执行 2-4 次, 具有相似结果, 除执行 1 次的 (C) 和 (E) 外。

[0201] 图 8. 使用 m5B6-OVA 10B4(在该图中称为抗 Clec9A-OVA) 将 Ag 靶向 DC 引发了 CD4 和 CD8T 细胞增强应答。将 OVA 特异性转基因 CD8(OT-I) 或 CD4(OT-II)T 细胞 (10⁶) 过继转移到首次用于实验的 C57/BL6Ly5.1 小鼠内。1 天后, 小鼠用 2.5 μ g 抗 m5B6-OVA (n = 3) 或非靶向同种型对照 OVA mAb-2(GL117; n = 3) 进行 i. v. 注射, 或不进行免疫 (n = 2)。mAb 注射后 3 天, 处死小鼠并且收获脾。细胞用针对 Ly5.2(S. 450-15.2-PE) 和 CD4(GK1.5-APC) 或 CD8(YTS169-APC) 的 mAb 染色, 并且通过流式细胞术计数增殖 CFSE 标记的转基因 T 细胞, (A) OT-I (Ly5.2⁺CD8⁺) 或 (B) OT-II (Ly5.2⁺CD4⁺)。OVA 特异性 T 细胞的增殖应答作为通过流式细胞术的 CFSE 荧光丧失而可见。如材料与方法中所述计数增殖 OT-I 细胞和 OT-II 细胞总数目 / 脾, 并且数据呈现 \pm SEM。实验用 2.5 μ g OVA 缀合的 mAb 执行 2 次, 并且用 5 μ g OVA 缀合的 mAb 执行 1 次, 具有相似结果。

[0202] 图 9. 用抗 m5B6-Ova(在该图中称为 10B4) 10B4-OVA 缀合物注射小鼠将 Ag 递送给 CD8⁺DC 和引发的 OVA 特异性 CD8T 细胞。3 只小鼠用 10 μ g OVA 缀合的 10B4(抗 5B6mAb) 或 OVA 缀合的同种型对照 mAb(GL117) 进行皮下免疫。1 天后, 处死小鼠, 从脾中分离 DC, 并且通过流式细胞术分选成 CD8⁺、CD4⁺ 或 CD4⁻CD8⁻(DN)DC 子集。使分级剂量的 DC 与 CFSE 标记的 OT-I 细胞一起温育, 并且培养 3 天。通过流式细胞术计数增殖 OT-I 细胞。仅由 5B6 特异性 mAb 靶向的 CD8⁺DC 诱导显著 OT-I 细胞增殖。数据是 2 次独立实验的代表。

[0203] 图 10. 抗 5B6 Ab(10B4) 经由不同施用途径和在佐剂的存在或不存在下在抗原递送方面高度有效。(A). 10B4 抗体经由不同施用途径诱导强体液应答。C57/BL6 小鼠组 ($n = 5$) 用 $10 \mu\text{g}$ 10B4mAb 或同种型对照 mAb(GL117) 进行 i. v.、s. c. 或 i. p. 注射。2 周收集血清样品, 并且通过 ELISA 定量血清抗大鼠 Ig 反应性。(B). 10B4 抗体连同或不连同佐剂诱导强体液应答。在不存在或存在 LPS($1 \mu\text{g}$) 或 CpG($10 \mu\text{g}$) 下, C57/BL6 小鼠组 ($n = 5$) 用 $2 \mu\text{g}$ 10B4mAb 或同种型对照 mAb(GL117) 进行 i. v. 注射。阳性对照小鼠用 GL117 和铝进行 i. p. 注射。在初始注射后 2、4 和 6 周获得血清样品。小鼠随后用 $10 \mu\text{g}$ 同种型对照 mAb(GL117) 进行加强, 并且 2 周后获取血清样品。通过 ELISA 定量血清抗大鼠 Ig 反应性。

[0204] 图 11. 5B6 的可溶性片段与膜结合 5B6 结合。(A). 对于小鼠和人 5B6 产生的可溶性蛋白质的氨基酸序列。对于小鼠 5B6 和人 5B6 各自产生 2 种构建体, 包括茎和 C 型凝集素样结构域两者的原始构建体, 和包括 C 型凝集素样结构域但不包括茎区的可溶性蛋白质 2/3 构建体。在该图中, IL3 前导序列是斜体且单下划线的, 生物素化共有序列是斜体且双下划线的, FLAG 标签是斜体且具有波浪线下划线的。5B6 序列以红色显示。(B). 可溶性 5B6 与在瞬时转染的 293T 细胞上的膜结合 5B6 结合。293T 细胞用编码全长未标记 m5B6(293T-m5B6)、h5B6(293T-h5B6) 或不含 DNA(293T) 的表达构建体进行瞬时转染, 以产生表达膜结合 m5B6 或 h5B6 的转染子细胞。2 天后, 收获细胞并且使用可溶性 FLAG 标记的 m5B6 和 h5B6(具有来自原始构建体的茎) 和可溶性 FLAG 标记的 Cire 进行表面免疫荧光标记。使用生物素化抗 FlagmAb 9H10 和链霉亲和素 PE 检测结合。活细胞在前向散射和碘化丙啶排除上进行门控, 并且相对于用抗 Flag Ab 和链霉亲和素 -PE 染色的对照(虚线), 就其可溶性 5B6(实线) 的表面结合进行分析。(C). 可溶性 5B6 与膜结合 5B6 的结合不依赖于茎。未转染或用编码全长未标记的膜结合 m5B6(CH0-m5B6) 的表达构建体稳定转染的 CHO 细胞, 使用生物素化的可溶性 FLAG 标记的 m5B6 和 h5B6(包括或不包括茎, 如指示的) 以及生物素化的可溶性 FLAG 标记的 Cire 进行表面免疫荧光标记。使用链霉亲和素 PE 检测结合。活细胞在前向散射上进行门控, 并且相对于用链霉亲和素 -PE 染色的对照(虚线), 就其生物素化可溶性 5B6(实线) 的表面结合进行分析。

[0205] 图 12. 如所述的分离 DC 前体或 Flt3 配体产生的 DC(FL DC)。多潜能前体(MPP) 鉴定为 $\text{lin}^- \text{CD117}^+ \text{sca-1}^+ \text{CD34}^+$ 。体外产生的 Pre-DC 鉴定为来自培养的 CFSE^{low} $\text{lin}^- \text{CD11c}^+$ 细胞。FL DC 如下定义; 对 pDC 门控为 $\text{CD11c}^+ \text{CD45RA}^+$; Sirp α^+ cDC 门控为 $\text{CD11c}^+ \text{CD45RA}^- \text{Sirp}\alpha^+$, 并且 Sirp α^- cDC 门控为 $\text{CD11c}^+ \text{CD45RA}^- \text{Sirp}\alpha^-$ 。本底染色水平(由折线指示) 通过用所需抗体染色的细胞的荧光强度进行测定, 以限定细胞群体。5B6 表达(由实线指示) 通过用上述抗体以及针对 5B6 的抗体(10B4-APC) 染色进行测定。

[0206] 图 13. 使用基因融合产生重组抗 Clec9A-Ova(抗 5B6-Ova)。通过质粒瞬时转染到自由式 293F 细胞内产生重组抗 Clec9A(5B6)Ab10B4, 所述质粒编码与 Ova 融合的 10B4 κ 链和 10B4 重链。48 小时后, 收获来自瞬时转染的上清液, 并且通过用重组 Ab(来自 293F 瞬时转染) 免疫荧光标记 CHO-5B6 转染子细胞和流式细胞术分析来检查抗 5B6-Ova Ab 识别 5B6 的能力。稳定表达全长膜结合 5B6 的 CHO 细胞与转染上清液(包含重组抗 Clec9A-OvaAb) 一起温育, 并且使用生物素化的抗 ova Ab 和链霉亲和素 -PE(上图) 或抗大鼠 Ig PE(下图) 检测结合。实线指示用重组抗 Clec9A-Ova Ab(转染上清液) 染色的 CHO-5B6 细胞, 虚线指示用次级 Ab(抗 Ova-生物素和链霉亲和素 -PE 用于上图, 和抗大鼠 Ig PE 用于下图)

染色的 CHO-5B6 细胞。

[0207] 序列表的索引

- [0208] SEQ ID NO :1- 人 5B6。
- [0209] SEQ ID NO :2- 鼠类 5B6。
- [0210] SEQ ID NO :3- 黑猩猩 5B6。
- [0211] SEQ ID NO :4- 恒河猴 5B6。
- [0212] SEQ ID NO :5- 犬 5B6。
- [0213] SEQ ID NO :6- 牛 5B6。
- [0214] SEQ ID NO :7- 马 5B6。
- [0215] SEQ ID NO :8- 大鼠 5B6。
- [0216] SEQ ID NO :9- 编码人 5B6 的开放阅读框。
- [0217] SEQ ID NO :10- 编码鼠类 5B6 的开放阅读框。
- [0218] SEQ ID NO :11- 编码黑猩猩 5B6 的开放阅读框。
- [0219] SEQ ID NO :12- 编码恒河猴 5B6 的开放阅读框。
- [0220] SEQ ID NO :13- 编码犬 5B6 的开放阅读框。
- [0221] SEQ ID NO :14- 编码牛 5B6 的开放阅读框。
- [0222] SEQ ID NO :15- 编码马 5B6 的开放阅读框。
- [0223] SEQ ID NO :16- 编码大鼠 5B6 的开放阅读框。
- [0224] SEQ ID NO 17 至 28- 寡核苷酸引物。
- [0225] SEQ ID NO :29- 鼠类 5B6 的抗原片段。
- [0226] SEQ ID NO :30- 人 5B6 的抗原片段。
- [0227] SEQ ID NO :31- 生物素化共有序列。
- [0228] SEQ ID NO :32- 小鼠 Clec12a 的部分序列。
- [0229] SEQ ID NO :33- 小鼠 Dectin-1 的部分序列。
- [0230] SEQ ID NO :34- 小鼠 Clec8a 的部分序列。
- [0231] SEQ ID NO :35- 小鼠 NKG2D 的部分序列。
- [0232] SEQ ID NO :36- 人 NKG2D 的部分序列。
- [0233] SEQ ID NO :37- 大鼠 MBP-A 的部分序列。
- [0234] SEQ ID NO :38- 包括茎的可溶性 flag 标记的小鼠 5B6。
- [0235] SEQ ID NO :39- 包括茎的可溶性 flag 标记的人 5B6。
- [0236] SEQ ID NO :40- 不包括茎的可溶性 flag 标记的小鼠 5B6。
- [0237] SEQ ID NO :41- 不包括茎的可溶性 flag 标记的人 5B6。
- [0238] SEQ ID NO :42-10B4 抗 5B6 抗体的重链的氨基酸序列。
- [0239] SEQ ID NO :43-10B4 抗 5B6 抗体的重链可变区的氨基酸序列。
- [0240] SEQ ID NO :44-10B4 抗 5B6 抗体的重链 CDR1 的氨基酸序列。
- [0241] SEQ ID NO :45-10B4 抗 5B6 抗体的重链 CDR2 的氨基酸序列。
- [0242] SEQ ID NO :46-10B4 抗 5B6 抗体的重链 CDR3 的氨基酸序列。
- [0243] SEQ ID NO :47-10B4 抗 5B6 抗体的轻链的氨基酸序列。
- [0244] SEQ ID NO :48-10B4 抗 5B6 抗体的轻链可变区的氨基酸序列。

[0245] SEQ ID NO :49-10B4 抗 5B6 抗体的轻链 CDR1 的氨基酸序列。

[0246] SEQ ID NO :50-10B4 抗 5B6 抗体的轻链 CDR2 的氨基酸序列。

[0247] SEQ ID NO :51-10B4 抗 5B6 抗体的轻链 CDR3 的氨基酸序列。

[0248] SEQ ID NO 52 至 57- 寡核苷酸引物。

[0249] SEQ ID NO :58- 包括茎的可溶性小鼠 5B6。

[0250] SEQ ID NO :59- 包括茎的可溶性人 5B6。

[0251] SEQ ID NO :60- 不包括茎的可溶性小鼠 5B6。

[0252] SEQ ID NO :61- 不包括茎的可溶性人 5B6。

[0253] 发明详述

[0254] 一般技术和定义

[0255] 除非另有具体定义,本文使用的所有技术和科学术语应理解为具有与本领域普通技术人员通常理解相同的含义(例如,在细胞培养、分子遗传学、分子生物学、树突状细胞生物学、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学中)。

[0256] 除非另有说明,在本发明中利用的重组蛋白质、细胞培养和免疫学技术是本领域技术人员众所周知的标准操作。此种技术在资源中的参考文献自始至终描述且说明,例如, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons(1984), J. Sambrook 等人, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989), T. A. Brown(编辑), Essential Molecular Biology :A Practical Approach, 第 1 和 2 卷, IRL Press(1991), D. M. Glover 和 B. D. Hames(编辑), DNA Cloning :A Practical Approach, 第 1-4 卷, IRL Press(1995 和 1996), 和 F. M. Ausubel 等人(编辑), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience(1988, 包括迄今的所有更新), Ed Harlow 和 David Lane(编辑) Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 和 J. E. Coligan 等人(编辑) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons(包括迄今的所有更新)。

[0257] 如本文所使用的,术语“5B6”指包括如 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个或多个中提供的氨基酸序列的多肽,来自其他物种的其直向同源物,其功能变体或突变体,以及其生物学活性和 / 或抗原片段。术语“5B6”和“CLEC9A”在本文中可互换使用。

[0258] 如本文所使用的,术语“C 型凝集素样结构域”或“CTL D”指如下蛋白质结构域家族,其在从许多动物物种中分离的许多蛋白质中已得到鉴定,参见例如,由 Drickamer(1999) 的综述。最初,CTL D 结构域鉴定为对所谓的 C 型凝集素(钙依赖性碳水化合物结合蛋白质)共有的结构域且命名为“碳水化合物识别结构域”(“CRD”)。最近,已变得显而易见的是,这个结构域在许多真核生物蛋白质中共享,其中数种不结合糖部分,并且因此经典结构域已命名为 CTL D。已报告 CTL D 结合广泛多样的化合物,包括碳水化合物、脂质和蛋白质。CTL D 由约 120 个氨基酸残基组成,并且特有地包含 2 个或 3 个链内二硫桥。尽管在来自不同蛋白质的 CTL D 之间的氨基酸序列水平上的相似性相对很低,但已发现许多 CTL D 的 3D 结构是高度保守的,其中结构变异性基本上限制于所谓的环区域,通常由多至 5 个环限定。本发明多肽的 CTL D 的例子在图 1C 中突出显示。

[0259] 如本文所使用的,术语“治疗”或“处理”包括施用治疗有效量的本发明的化合物、

本发明的多肽、本发明的多核苷酸等,其足以减少或消除指定病状的至少一个症状。

[0260] 如本文所使用的,术语“预防”包括施用治疗有效量的本发明的化合物、本发明的多肽、本发明的多核苷酸等,其足以阻止或阻碍指定病状的至少一个症状的发展。

[0261] 如本文所使用的,“样品”可以是怀疑包括树突状细胞或其前体的任何生物材料。例子包括但不限于,血液,例如全部外周血、脐带血、胎儿血,骨髓,血浆,血清,尿,培养细胞,唾液或尿道拭子,淋巴样组织,例如扁桃体、派伊尔斑、盲肠、胸腺、脾和淋巴结。样品可以直接进行测试或在测试前可能需要某些形式的处理。例如,活组织检查样品在测试前可能需要均质化,以产生细胞悬浮液。此外,至生物样品并非液体形式(例如,它可以是固体、半固体或脱水液体样品)的程度,它可能需要添加试剂例如缓冲剂以使样品移动。移动试剂可以在使样品与例如本发明的化合物接触前与样品相混合。

[0262] 如本文所使用的,术语“免疫应答”指受试者的免疫系统响应抗原的反应性中的变化,并且可能涉及抗体产生、细胞介导免疫的诱导、补体激活和/或免疫耐受的发展。

[0263] 如本文所使用的,术语“缀合”、“缀合的”或其变化广泛用于指本发明的化合物和治疗剂之间任何形式的共价或非共价结合,或使本发明的化合物和治疗剂置于彼此紧密接近例如在脂质体中。在一个实施方案中,本发明的缀合化合物通过表达多核苷酸来产生,所述多核苷酸包括编码缀合化合物的单个开放阅读框,例如编码在C和/或N末端与抗原融合的抗体的重链或轻链的单个开放阅读框。

[0264] 如本文所使用的,术语“提取物”指本发明的宿主细胞、植物或非人转基因动物的任何部分。部分可以是完整实体例如植物种子,或通过至少部分均质化和/或纯化而获得。这个术语包括由宿主细胞分泌的部分,并且因此包含培养上清液。

[0265] 化合物

[0266] 本发明人目前已首次显示5B6(在本领域中也称为CLEC9A和HEEE9341)在树突状细胞子集和或其前体中表达。这使得结合5B6的化合物能够在广泛多样的诊断和治疗操作中使用。例如,抗体-抗原缀合物可以用于将抗原递送给树突状细胞和/或其前体,以诱导免疫应答。在另一个例子中,可检测标记的化合物可以用于检测样品中的树突状细胞或其前体。在一个进一步的例子中,抗体-细胞毒素剂缀合物可以用于靶向有害树突状细胞或其前体。

[0267] 本发明的化合物可以是任何类型的分子,所述分子结合优选特异性结合5B6。化合物可以是例如纯化的和/或重组的天然存在的配体或合成配体。化合物和5B6之间的结合可以由共价或非共价相互作用或者共价和非共价相互作用的组合来介导。当化合物和5B6的相互作用产生非共价结合复合物时,发生的结合一般是静电、氢键合、或亲水/疏水相互作用的结果。在一个优选实施方案中,化合物是纯化的和/或重组的多肽。特别优选的5B6结合化合物是纯化的和/或重组的抗5B6抗体或其抗原结合片段。

[0268] 尽管不是必需的,但化合物可以与5B6特异性结合。短语“特异性结合”意指在特定条件下,化合物结合5B6且不与显著量的其他例如蛋白质或碳水化合物结合。优选地,化合物特异性结合得自受试者的样品中的5B6而不是其他分子,所述样品包括树突状细胞或其前体。在此种条件下与5B6的特异性结合可能需要就其特异性选择的抗体。在另一个实施方案中,当与另一种蛋白质特别是包括CTLD的蛋白质相比较时,如果在化合物与5B6的结合之间存在超过10倍差异,并且优选25、50或100倍更大的差异,那么该化合物视为与

5B6 “特异性结合”。

[0269] 抗体

[0270] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”指由 2 对多肽链组成的一类结构上相关的糖蛋白，一对轻 (L) 低分子量链和一对重 (H) 链，所有 4 条链通过二硫键互联。免疫球蛋白的结构已得到充分表征，参见例如 *Fundamental Immunology* 第 7 章 (Paul, W., 编辑, 第 2 版 Raven Press, N. Y. (1989))。简言之，每条重链一般包括重链可变区 (本文缩写为 V_H) 和重链恒定区 (本文缩写为 C_H)。重链恒定区一般包括 3 个结构域， C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链一般包括轻链可变区 (本文缩写为 V_L) 和轻链恒定区 (本文缩写为 C_L)。轻链恒定区一般包括 1 个结构域， C_L 。 V_H 和 V_L 区可以进一步再分成高变异性区域 (或在序列和 / 或结构上限定环形式中可以是高变的高变区)，也称为互补决定区 (CDR)，由称为构架区 (FR) 的更保守的区域点缀。

[0271] 每个 V_H 和 V_L 一般由 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成，从氨基末端到羧基末端以下述次序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 (还参见 Chothia 和 Lesk, 1987)。一般地，这个区域中的氨基酸残基编号通过 Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 中描述的方法来执行 (短语例如如 Kabat 中或根据 Kabat 的可变结构域残基编号在本文中指用于重链可变结构域或轻链可变结构域的这种编号系统)。使用这种编号系统，肽的实际线性氨基酸序列可以包含与可变结构域的 FR 或 CDR 的缩短或插入片段相对应的较少或另外氨基酸。

[0272] 如本文所使用的，术语“人源化抗体”在本文中指衍生自非人抗体一般是鼠类的抗体，其保留或基本上保留亲本抗体的抗原结合性质但在人中更少免疫原性。

[0273] 如本文所使用的，术语互补决定区 (CDR) 指一起限定免疫球蛋白结合位点的可变片段 (Fv) 区的结合亲和力和特异性的氨基酸序列。

[0274] 如本文所使用的，术语构架区 (FR) 指在 CDR 之间插入的氨基酸序列。这些抗体部分作用于使 CDR 保持在合适定向中 (允许 CDR 结合抗原)。轻或重的可变区包括构架和一般 3 个 CDR。

[0275] 如本文所使用的，术语恒定区 (CR) 指赋予效应子功能的抗体分子的部分。主题人源化抗体的恒定区衍生自人免疫球蛋白。重链恒定区可以选自 5 种同种型中的任何： α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。此外，各个亚类的重链 (例如重链的 IgG 亚类) 负责不同效应子功能，并且因此通过选择所需重链恒定区，可以产生具有所需效应子功能的抗体。优选的重链恒定区是 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3) 和 $\gamma 4$ (IgG4)，更优选 $\gamma 4$ (IgG4)。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 类型，优选 κ 类型。

[0276] 抗体可以作为完整免疫球蛋白，或各种形式中的修饰存在，包括例如但不限于，包括 VH 或 VL 结构域的结构域抗体，重链可变区的二聚体 (VHH，如对于骆驼科动物描述的)、轻链可变区的二聚体 (VLL)，仅包含轻链和重链可变区的 Fv 片段，或包含重链可变区和 CH1 结构域的 Fd 片段。由连接在一起以形成单链抗体的重链和轻链可变区组成的 scFv (Bird 等人, 1988 ;Huston 等人, 1988) 和 scFvs 的寡聚物例如双抗体和三抗体也包括术语“抗体”内。还包括的是包含可变区和部分恒定区的抗体片段，例如 Fab、(Fab')₂ 和 FabFc₂ 片段。还包括了 CDR 移植抗体片段和抗体片段的寡聚物。Fv 的重链和轻链组分可以衍生自相同抗

体或不同抗体,从而产生嵌合 Fv 区。抗体可以是动物(例如小鼠、兔或大鼠)或人起源或可以是嵌合的(Morrison 等人,1984)或人源化的(Jones 等人,1986)和 UK 8707252)。如本文所使用的,术语“抗体”包括这些各种形式。使用本文提供的指导以及在上文引用的参考文献和此种出版物如 Harlow & Lane(同上)中描述的本领域技术人员众所周知的那些方法,可以容易地制备用于在本发明的方法中使用的抗体。

[0277] 不是来自天然来源的本发明的抗体或其抗原结合片段,例如人源化抗体,优选保留亲本抗体例如 24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4 和 / 或 23/05-4C6 的显著比例的结合性质。特别地,本发明的此种抗体或片段保留特异性结合由亲本抗体识别的抗原的能力,所述亲本抗体用于产生抗体或片段例如人源化抗体。优选地,抗体或片段显示与亲本抗体相同或基本上相同的抗原结合亲和力和亲合性。理想地,抗体或片段的亲和力将不小于亲本抗体亲和力的 10%,更优选地不小于约 30%,并且最优选地亲和力将不小于亲本抗体的 50%。用于测定抗原结合亲和力的方法是本领域众所周知的,并且包括半最大结合测定法、竞争测定法和 Scatchard 分析。

[0278] 各种免疫测定法形式可以用于选择与 5B6 特异性免疫反应的抗体或片段。例如,表面标记物和流式细胞术分析或固相 ELISA 免疫测定法常规上用于选择与蛋白质或碳水化合物特异性免疫反应的抗体。关于可以用于测定特异性免疫反应性的免疫测定法形式和条件的描述,参见 Harlow & Lane(同上)。

[0279] 5B6 结合抗体可以是包括可变轻(V_L)和可变重(V_H)链的 Fv 区。轻链和重链可以直接连接或通过接头进行连接。如本文所使用的,接头指与轻链和重链共价连接的分子,并且在 2 条链之间提供足够间隔和弹性,从而使得它们能够实现其中它们能够特异性结合它们所导向的表位的构象。蛋白质接头是特别优选的,因为它们可以表示为融合多肽的 Ig 部分的固有组分。

[0280] 在另一个实施方案中,在本发明的方法中使用重组产生的单链 scFv 抗体,优选人源化 scFv。

[0281] 单克隆抗体

[0282] 针对 5B6 表位的单克隆抗体可以由本领域技术人员容易地产生。使用 5B6 表位 RVLWQDGSSPGLLPAERSQSANQVC-OH)(SEQ ID NO :30)用于产生此种抗体的方法的例子在实施例部分中提供。

[0283] 用于通过杂交瘤制备单克隆抗体的一般方法是众所周知的。永生的抗体产生细胞系可以通过细胞融合来产生,并且还通过其他技术例如用致癌 DNA 直接转化 B 淋巴细胞或用 EB 病毒转染来产生。针对 5B6 表位产生的单克隆抗体的实验对象组可以就各种性质;即就同种型和表位亲和力进行筛选。

[0284] 动物衍生的单克隆抗体可以用于直接体内和体外免疫疗法。然而,已观察到当例如小鼠衍生的单克隆抗体在人中用作治疗剂时,患者产生人抗小鼠抗体。因此,动物衍生的单克隆抗体不优选用于治疗,特别是用于长期使用。然而,用已建立的基因工程技术可以产生嵌合或人源化抗体,其具有动物衍生和人衍生的部分。动物可以是例如小鼠或其他啮齿类动物例如大鼠。

[0285] 如果嵌合抗体的可变区是例如小鼠衍生的,而恒定区是人衍生的,那么嵌合抗体一般将比“纯”小鼠衍生的单克隆抗体具有更少免疫原性。这些嵌合抗体将可能更适合于

治疗用途,结果是“纯”小鼠衍生的抗体是不合适的。

[0286] 用于产生嵌合抗体的方法可应用于本领域的那些。例如,使用例如在分开质粒中的免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链可以分开表达轻链和重链。这些随后可以在体外纯化并装配成完全抗体;用于实现此种装配的方法已得到描述(参见例如,Sun 等人,1986)。此种 DNA 构建体可以包括与编码人恒定区的 DNA 连接的 DNA,其编码关于抗 5B6 抗体的轻链或重链的可变区的功能上重排基因。用关于轻链和重链的 DNA 构建体转染的淋巴样细胞例如骨髓瘤或杂交瘤,可以表达并装配抗体链。

[0287] 用于从还原分离的轻链和重链形成 IgG 抗体的体外反应参数也已得到描述。轻链和重链在相同细胞中共表达以实现重链和轻链的细胞内结合和连接而成为完全 H2L2 IgG 抗体也是可能的。此种共表达可以使用相同或不同质粒在相同宿主细胞中完成。

[0288] 在本发明的另一个优选实施方案中,抗 5B6 抗体是人源化的,即通过分子建模技术产生的抗体,其中抗体的人内容物达到最大,同时引起可归于例如亲本大鼠、兔或鼠类抗体可变区的结合亲和力的很少丧失或无丧失。

[0289] 下文描述的方法可应用于抗 5B6 抗体的人源化。

[0290] 存在在决定人源化过程中使用何种人抗体序列中考虑的数种因素。轻链和重链的人源化视为不依赖于彼此,但原因对于各自是基本上相似的。

[0291] 这种选择过程基于下述原理:给定抗体的抗原特异性和亲和力主要由可变区 CDR 的氨基酸序列决定。可变结构域构架残基具有很少贡献或无直接贡献。构架区的主要功能是使 CDR 保持在其合适空间定向中,以识别抗原。因此,如果人可变结构域构架与它们所起源的动物可变结构域高度同源,那么动物例如啮齿类动物 CDR 置换到人可变结构域构架内最可能导致其正确空间定向的保留。因此应优选选择与一个或多个动物可变结构域高度同源的人可变结构域。合适的人抗体可变结构域序列可以如下选择。

[0292] 步骤 1. 使用计算机程序,就与动物衍生的抗体可变结构域最同源的那些人抗体可变结构域序列搜索所有可获得的蛋白质(和 DNA)数据库。合适程序的输出是与动物衍生抗体最同源的序列、与每种序列的同源性百分比、和每种序列与动物衍生序列的比对的列表。这不依赖于重链和轻链可变结构域序列而完成。如果仅包括人免疫球蛋白序列,那么上述分析更容易完成。

[0293] 步骤 2. 列出人抗体可变结构域序列且就同源性进行比较。主要地,比较在 CDR 长度上执行,除非常可变的重链的 CDR3 外。人重链以及 κ 和 λ 轻链分成亚组;重链 3 个亚组、 κ 链 4 个亚组、 λ 链 6 个亚组。在每个亚组内的 CDR 大小是相似的,但在亚组之间不同。通常可以使动物衍生的抗体 CDR 与人亚组之一匹配作为同源性的第一近似值。具有相似长度 CDR 的抗体随后就特别在 CDR 内以及在周围构架区中的氨基酸序列同源性进行比较。选择最同源的人可变结构域作为用于人源化的构架。

[0294] 实际人源化方法 / 技术

[0295] 根据 EP-A-0239400,通过将所需 CDR 移植到人构架上可以使抗体人源化。编码所需重构抗体的 DNA 序列因此可以从希望重构其 CDR 的人 DNA 开始进行制备。将包含所需 CDR 的动物衍生的可变结构域氨基酸序列与所选择的人抗体可变结构域序列的那种相比较。标记出需要改变成动物中的相对应残基的人可变结构域中的残基,已制备掺入动物衍生 CDR 的人可变区。人序列中还可以存在需要置换、添加或缺失的残基。

[0296] 合成可以用于使人可变结构域构架诱变以包含所需残基的寡核苷酸。这些寡核苷酸可以具有任何方便的大小。长度通常仅通过已获得的具体合成仪的能力限制。寡核苷酸指导的体外诱变的方法是众所周知的。

[0297] 备选地,可以使用 WO 92/07075 的重组聚合酶链反应 (PCR) 方法来达到人源化。使用这种方法,CDR 可以在人抗体的构架区之间进行剪接。一般而言,WO 92/07075 的技术可以使用包括 2 个人构架区的模板 AB 和 CD 以及在它们之间被供体 CDR 替换的 CDR 来执行。引物 A 和 B 用于扩增构架区 AB,并且引物 C 和 D 用于扩增构架区 CD。然而,引物 B 和 C 在其 5' 末端处各自还包含另外序列,所述另外序列与全部或至少部分供体 CDR 序列相对应。引物 B 和 C 重叠的长度足以允许其 5' 末端在允许执行 PCR 的条件下彼此退火。因此,扩增区域 AB 和 CD 可以通过重叠延伸经历基因剪接,以在单反应中产生人源化产物。

[0298] 在重构抗体的诱变反应后,诱变的 DNA 可以与编码轻链或重链恒定区的合适 DNA 连接,克隆到表达载体内,并且转染到宿主细胞优选哺乳动物细胞内。这些步骤可以以常规方式执行。重构抗体因此可以通过如下过程进行制备,所述过程包括:

[0299] (a) 制备包括与 DNA 序列可操作地连接的合适启动子的第一种可复制表达载体,所述 DNA 序列至少编码 Ig 重链或轻链的可变结构域,所述可变结构域包括来自人抗体的构架区和本发明的人源化抗体所需的 CDR;

[0300] (b) 制备包括与 DNA 序列可操作地连接的合适启动子的第二种可复制表达载体,所述 DNA 序列分别至少编码互补 Ig 重链或轻链的可变结构域;

[0301] (c) 用第一种或两种制备的载体转化细胞系;和

[0302] (d) 培养所述转化的细胞系以产生所述改变的抗体。

[0303] 优选地,步骤 (a) 中的 DNA 序列编码人抗体链的可变结构域和每个恒定结构域。可以使用任何合适的重组表达系统制备人源化抗体。进行转化以产生改变的抗体的细胞系可以是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系或永生化哺乳动物细胞系,其有利地具有淋巴样起源,例如骨髓瘤、杂交瘤、三源杂交瘤或四源杂交瘤细胞系。细胞系还可以包括正常淋巴样细胞,例如 B 细胞,其已通过用病毒例如 EB 病毒转化而被永生化。最优选地,永生化细胞系是骨髓瘤细胞系或其衍生物。

[0304] 用于表达抗体的 CHO 细胞可以是二氢叶酸还原酶 (dhfr) 缺陷的,并且因此依赖于胸苷和次黄嘌呤用于生长。亲本 dhfr⁻CHO 细胞系用编码抗体和 dhfr 基因的 DNA 进行转染,这使得能够选择 dhfr 阳性表型的 CHO 细胞转化体。通过在缺乏胸苷和次黄嘌呤的培养基上培养集落来执行选择,胸苷和次黄嘌呤的不存在阻止未转化的细胞生长,并且阻止转化的细胞再挽救 (resalvaging) 叶酸途径且因此绕过选择系统。由于目的转染 DNA 和编码 dhfr 的 DNA 的共整合,这些转化体通常表达低水平的目的 DNA。编码抗体的 DNA 的表达水平可以通过使用氨甲蝶呤 (MTX) 的扩增得到增加。这种药物是酶 dhfr 的直接抑制剂,并且允许分离抗性集落,所述抗性集落扩增足以在这些条件下存活的其 dhfr 基因拷贝数。因为编码 dhfr 和抗体的 DNA 序列在原始转化体中紧密连接,所以通常存在伴随扩增,并且因此增加所需抗体的表达。

[0305] 用于与 CHO 或骨髓瘤细胞一起使用的另一种优选表达系统是在 WO87/04462 中描述的谷氨酰胺合成酶 (GS) 扩增系统。这种系统涉及用编码酶 GS 的 DNA 和编码所需抗体的 DNA 转化细胞。随后选择在没有谷氨酰胺的培养基中生长,并且因此可以假定为已整合编码

GS 的 DNA 的细胞。随后使用甲硫氨酸砒亚胺 (Msx) 对这些所选择的克隆实施酶 GS 的抑制。为了存活,细胞将扩增编码 GS 的 DNA 并且伴随扩增编码抗体的 DNA。

[0306] 尽管用于产生人源化抗体的细胞系优选是哺乳动物细胞系,但可以备选使用任何其他合适的细胞系,例如细菌细胞系或酵母细胞系。特别地,设想可以使用大肠杆菌衍生的细菌菌株。所获得的抗体就功能性进行检查。如果丧失功能性,那么必须返回步骤 (2) 并且改变抗体的构架。

[0307] 表达后,根据本领域的标准操作,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析法、凝胶电泳等(一般参见, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N. Y. (1982)), 可以回收且纯化完整抗体、其二聚体、个别轻链和重链、或其他免疫球蛋白形式。对于医学用途,至少约 90 至 95% 同质性的基本上纯的免疫球蛋白是优选的,并且 98 至 99% 或更多同质性是最优选的。纯化后,部分或需要时同质性,人源化抗体随后可以在治疗上使用或在开发且执行测定法操作、免疫荧光染色等中使用(一般参见, Lefkovits 和 Pernis (编辑), Immunological Methods, 第 I 和 II 卷, Academic Press, (1979 和 1981))。

[0308] 由 Greenwood 等人 (1993) 执行的研究已证实抗体的 Fc 区被人效应子细胞的识别可以通过改造免疫球蛋白分子的恒定区得到最佳化。这可以通过使具有所需特异性的抗体的可变区基因与编码免疫球蛋白同种型的人恒定区基因融合来达到,已证实所述免疫球蛋白同种型在人受试者中的有效抗原依赖性细胞细胞毒性 (ADCC), 例如 IgG1 和 IgG3 同种型 (Greenwood 和 Clark, Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man. Mike Clark (编辑), Academic Titles, 部分 II, 第 85-113 页, (1993))。所得到的针对 5B6 的嵌合或人源化抗体应在调节体液免疫和 / 或 T 细胞介导免疫方面特别有效。

[0309] 还可以通过给转基因动物施用抗原制备针对 5B6 的具有完全人可变区的抗体,所述转基因动物已改良以响应抗原攻击产生此种抗体,但其内源基因座已丧失功能。可以执行各种后续操作,以获得抗体本身或其类似物(参见例如, US 6, 075, 181)。

[0310] 编码抗体或其片段的基因的制备

[0311] 编码抗体的基因,轻链和重链基因或其部分,例如单链 Fv 区,可以由杂交瘤细胞系进行克隆。它们可以全部使用相同的一般策略例如 RACE 使用商购可得试剂盒进行克隆,所述试剂盒例如如由 Clontech 生产的。一般地,例如,使用随机六聚体作为引物逆转录从杂交瘤细胞中提取的聚 (A)⁺mRNA。对于 Fv 区,通过 2 种聚合酶链反应 (PCR) 分别扩增 V_H 和 V_L 结构域。使用 5' 末端引物和 3' 末端引物可以扩增重链序列,所述 5' 末端引物根据抗 5B6 重链的氨基末端蛋白质序列进行设计,所述 3' 末端引物根据共有免疫球蛋白恒定区序列进行设计 (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第 5 版 U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。使用 5' 末端引物与引物 C-κ 相组合扩增轻链 Fv 区,所述 5' 末端引物根据抗 5B6 轻链的氨基末端蛋白质序列进行设计。本领域技术人员应认识到可以采用许多合适引物以获得 Fv 区。

[0312] 将 PCR 产物亚克隆到合适的克隆载体内。通过 DNA 限制鉴定包含正确大小插入片段的克隆。使用与克隆位点相邻的测序引物,随后可以由双链质粒 DNA 测定重链或轻链编码区的核苷酸序列。商购可得的试剂盒(例如, Sequenase™ 试剂盒, United States

Biochemical Corp., Cleveland, Ohio, USA) 可以用于促进 DNA 测序。可以通过任何合适方法制备编码 Fv 区的 DNA, 包括例如扩增技术例如 PCR 和 LCR。

[0313] 化学合成产生单链寡核苷酸。这可以通过与互补序列杂交, 或通过使用单链作为模板用 DNA 聚合酶进行聚合而转变成双链 DNA。尽管可以化学合成整个单链 Fv 区, 但优选合成许多较短序列 (约 100 至 150 个碱基), 随后连接在一起。

[0314] 备选地, 可以克隆亚序列, 并且使用合适的限制性酶切割合适的亚序列。随后可以连接片段以产生所需 DNA 序列。

[0315] 获得 Fv 可变轻链和重链 DNA 后, 使用本领域技术人员众所周知的技术, 将序列直接连接在一起或通过编码肽接头的 DNA 序列连接在一起。在一个实施方案中, 重链和轻链区域通过弹性肽接头 (例如 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$) 连接, 所述弹性肽接头在重链 Fv 结构域的羧基末处开始并在轻链 Fv 结构域的氨基末端处结束。整个序列编码以单链抗原结合蛋白质形式的 Fv 结构域。

[0316] 治疗剂

[0317] 结合 5B6 的本发明的化合物可以用于递送治疗剂。治疗剂的例子包括但不限于, 抗原、细胞毒素剂、药物和 / 或药理学试剂。

[0318] 在某些实施方案中, 治疗剂可以是与结合 5B6 的化合物融合的多肽。包括结合 5B6 的化合物的融合多肽可以通过本领域技术人员已知的方法进行制备。例如, 使编码 Fv 区的基因与编码治疗剂的基因融合。任选地, 使 Fv 基因与编码肽连接体的区段连接。肽连接体可以存在, 仅仅以提供结合 5B6 的化合物和治疗剂之间的间隔, 或促进这些区域之间的移动以使得它们各自能够达到其最佳构象。包括连接体的 DNA 序列还可以提供序列 (例如引物位点或限制位点) 以促进克隆, 或可以保留编码结合部分的序列与编码治疗剂的序列之间的阅读框。此种连接体肽的设计是本领域技术人员众所周知的。

[0319] 一般地产生融合多肽涉及例如, 分开制备 Fv 轻链和重链以及编码它们与之融合的任何其他蛋白质的 DNA, 并且在质粒或其他载体中重组 DNA 序列, 以形成编码特别需要的融合多肽的构建体。然而, 更简单的方法涉及将编码特定 Fv 区的 DNA 插入已编码所需第二种多肽的构建体内。使用本领域技术人员众所周知的技术, 将编码 Fv 区的 DNA 序列插入构建体内。

[0320] 通过本领域技术人员已知且可获得的任何方法, 可以使结合 5B6 或其片段的化合物例如 Ab 重组单链抗体的重链与治疗剂融合或以其他方式结合。2 种组分可以通过各种众所周知的化学操作中的任何而化学键合在一起。例如, 连接可以经由异双功能交联剂, 例如 SPDP、碳化二亚胺、戊二醛等。各种免疫毒素的产生以及化学缀合方法是本领域众所周知的 (参见例如, " Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet, " Thorpe 等人, *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, 第 168-190 页 (1982); Waldmann, 1991; Vitetta 等人, 1987; Pastan 等人, 1986; 和 Thorpe 等人, 1987)。

[0321] 药物和 / 或药理学试剂的例子包括但不限于促进 DC 激活的试剂 (例如 TLR 配体)、抑制 DC 激活或功能的试剂 (例如 DC 信号传导分子的特异性抑制剂或启动子例如激酶和磷酸酶)、和调节 DC 死亡的试剂 (例如凋亡启动子或抑制子)。此种药物和 / 或药理学试剂是本领域技术人员众所周知的。

[0322] 技术人员应当理解存在许多细菌或植物多肽毒素,其适合于在本发明的方法中用作细胞毒素剂。这些多肽包括但不限于,多肽例如天然或修饰的假单胞菌外毒素、白喉毒素、蓖麻蛋白、相思豆毒素、白树毒素、木鳖子苷 II、细菌 RIP 例如志贺和志贺样毒素 a- 链、丝瓜素、天花粉素 (atrichosanthin)、木鳖子苷 I、紫茉莉属抗病毒蛋白质、美洲商陆抗病毒蛋白质、byodin 2 (U. S. 5, 597, 569)、gaporin、及其基因工程变体。天然假单胞菌外毒素和白喉毒素是高毒性的化合物,其一般通过肝毒性造成死亡。优选地,假单胞菌外毒素和白喉毒素经修饰成去除毒素的天然靶向组分的形式,所述组分例如假单胞菌外毒素的结构域 Ia 和白喉毒素的 B 链。本领域技术人员应当理解本发明并不限于具体细胞毒素剂。

[0323] 在本发明中使用的其他合适的细胞毒素剂包括但不限于,试剂例如细菌或植物毒素、药物例如环磷酰胺 (CTX ; 癌得星)、苯丁酸氮芥 (CHL ; 瘤可宁)、顺铂 (CisP ; CDDP ; 顺氯氨铂)、白消安 (马利兰)、美法仑、卡莫司汀 (BCNU)、链脲霉素、三乙撑蜜胺 (TEM)、丝裂霉素 C 和其他烷化剂 ; 氨甲蝶呤 (MTX)、依托泊苷 (VP-16 ; 凡毕士)、6- 巯基嘌呤 (6MP)、6- 硫鸟嘌呤 (6TG)、阿糖胞苷 (Ara-C)、5- 氟尿嘧啶 (5FU)、达卡巴嗪 (DTIC)、2- 氯脱氧腺苷 (2-CdA)、及其他抗代谢药 ; 抗生素包括放线菌素 D、多柔比星 (DXR ; 阿霉素)、柔红霉素 (道诺霉素)、博来霉素、光辉霉素以及其他抗生素 ; 生物碱例如长春花新碱 (VCR)、长春碱等 ; 以及其他抗癌剂包括细胞生长抑制剂糖皮质激素例如氟美松 (DEX ; 地塞米松) 和皮质类固醇例如泼尼松、核苷酸酶抑制剂例如羟基脲等。

[0324] 本领域技术人员应认识到存在众多其他放射性同位素和化学细胞毒素剂,其可以通过众所周知的技术与结合 5B6 的化合物偶联,并且递送给特异性破坏树突状细胞或其前体 (参见例如 U. S. 4, 542, 225)。光激活毒素的例子包括二氢吡啶和 Ω - 芋螺毒素。可以使用的细胞毒素剂的例子包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 ^{32}P 。抗体可以使用本领域已知的技术由此种试剂进行标记。例如,关于涉及抗体放射性标记物的技术,参见 Wenzel 和 Mearns, *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, N. Y. (1983) (还参见 Colcher 等人, 1986 ; " Order, Analysis, Results and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, Baldwin 等人 (编辑), Academic Press, 第 303-16 页, (1985))。

[0325] 在一个例子中,通过稳定硫脲共价键使接头 - 螯合剂 tiuexutan 与结合 5B6 的化合物缀合,以提供关于镭 -111 或钷 -90 的高亲和力螯合位点。

[0326] 抗原

[0327] 术语“抗原”进一步意欲包括已知的或野生型抗原例如上文描述那些的肽或蛋白质类似物。类似物可以比野生型抗原更可溶或更稳定,并且还可以包含使得抗原更多免疫学活性的突变或修饰。在本发明中还有用的是如下肽或蛋白质,其具有与所需抗原的氨基酸序列同源的氨基酸序列,其中同源抗原诱导针对分别肿瘤或生物体的免疫应答。

[0328] 如本文所使用的,“癌抗原”是与肿瘤或癌细胞相关的分子或化合物 (例如,蛋白质、肽、多肽、脂质、糖脂、碳水化合物和 / 或 DNA),并且当在 MHC 分子背景中在抗原呈递细胞表面上表达时,其能够引发免疫应答。癌抗原包括自身抗原以及其他抗原,所述其他抗原可能并不与癌症特异地相关,然而当施用于动物时,诱导和 / 或增强针对肿瘤或癌细胞的免疫应答和 / 或减少肿瘤或癌细胞的生长。

[0329] 如本文所使用的,“来自致病性和 / 或传染性生物体的抗原”是任何生物体的抗原,

并且可以包括但不限于,传染性病毒、传染性细菌、传染性寄生虫包括原生动动物(例如疟原虫属物种)和蠕虫以及传染性真菌。一般地,对于在本发明中的使用,抗原是来自生物体的蛋白质或其抗原片段,或与天然存在的抗原等同或相似的合成化合物,其诱导对于相对应生物体特异的免疫应答。与天然存在的生物体抗原相似的化合物或抗原是本领域技术人员众所周知的。与天然存在的生物体抗原相似的化合物的非限制性例子是多糖抗原的肽模拟物。

[0330] 癌抗原的特定实施方案包括例如诱变的抗原例如 Ras p21 原癌基因、肿瘤抑制基因 p53 和 HER-2/neu 以及 BCR-ab1 癌基因的蛋白质产物,以及 CDK4、MUM1、半胱天冬酶 8 和 β 连环蛋白;过表达抗原例如半乳凝素 4、半乳凝素 9、碳酸酐酶、醛缩酶 A、PRAME、Her2/neu、ErbB-2 和 KSA,癌胚抗原 (oncofetal antigen) 例如甲胎蛋白 (AFP)、人绒毛膜促性腺激素 (hCG);自身抗原例如癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 和黑色素细胞分化抗原例如 Mart1/Melan A、gp100、gp75、酪氨酸酶、TRP1 和 TRP2;前列腺相关抗原例如 PSA、PAP、PSMA、PSM-P1 和 PSM-P2;再活化胚胎基因产物例如 MAGE 1、MAGE 3、MAGE 4、GAGE 1、GAGE 2、BAGE、RAGE,以及其他癌睾丸抗原例如 NY-ES01、SSX2 和 SCP1;粘蛋白例如 Muc-1 和 Muc-2;神经节苷脂例如 GM2、GD2 和 GD3,中性糖脂和糖蛋白例如 Lewis (y) 和 globo-H;和糖蛋白例如 Tn、Thompson-Freidenreich 抗原 (TF) 和 sTn。

[0331] 癌抗原及其分别的肿瘤细胞靶包括例如细胞角蛋白,特别是细胞角蛋白 8、18 和 19,作为关于癌的抗原。上皮膜抗原 (EMA)、人胚胎抗原 (HEA-125)、人乳脂肪球、MBr1、MBr8、Ber-EP4、17-1A、C26 和 T16 也是已知的癌抗原。结蛋白和肌特异性肌动蛋白是肌性肉瘤的抗原。胎盘碱性磷酸酶、 β -人绒毛膜促性腺激素和甲胎蛋白是滋养层和生殖细胞肿瘤的抗原。前列腺特异性抗原是前列腺癌的抗原、结肠腺癌的癌胚抗原。HMB-45 是黑素瘤的抗原。在宫颈癌中,有用的抗原可以由人乳头状瘤病毒编码。嗜铬粒蛋白-A 和突触囊泡蛋白是神经内分泌和神经外胚瘤的抗原。特别有利的是形成具有坏死区域的实体瘤团块的侵袭性肿瘤。

[0332] 衍生自己知诱发特定癌症的病原体的抗原也可以在本发明中有利地使用。对于在本文提供的癌症疫苗中使用特别有利的病原体包括乙型肝炎病毒(肝细胞癌),丙型肝炎病毒(肝瘤 (heptomas)),EB 病毒 (EBV) (伯基特淋巴瘤,鼻咽癌,免疫抑制个体中的 PTL),HTLV (成人 T 细胞性白血病),致癌人乳头状瘤病毒 16、18、33、45 型 (成人宫颈癌),以及细菌幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) (B 细胞胃淋巴瘤)。可以在哺乳动物且更特别在人中充当抗原的其他医学相关微生物在参考文献中广泛描述,例如 C. G. A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, (1983)。

[0333] 示例性病毒病原体包括但不限于感染哺乳动物且更特别是人的传染性病毒。传染性病毒的例子包括但不限于:逆转录病毒科 (Retroviridae) (例如,人免疫缺陷病毒,例如 HIV-1 (也称为 HTLV-III、LAV 或 HTLV-III/LAV 或 HIV-III;及其他分离物,例如 HIV-LP);细小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) (例如,脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒;肠道病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、埃可病毒);杯状病毒科 (Caliciviridae) (例如,引起胃肠炎的毒株);披膜病毒科 (Togaviridae) (例如,马脑炎病毒、风疹病毒);黄病毒科 (Flaviridae) (例如,登革热病毒、脑炎病毒、黄热病病毒);冠状病毒科 (Coronaviridae) (例如,冠状病毒例如 SARS 冠状病毒);弹状病毒科 (Rhabdoviridae) (例如,水疱性口炎

病毒、狂犬病病毒)；纤丝病毒科 (Rhabdoviridae) (例如,埃波拉病毒)；副粘液病毒科 (Paramyxoviridae) (例如,副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒)；正粘液病毒科 (Orthomyxoviridae) (例如,流感病毒)；布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) (例如,汉坦病毒、布尼亚 (bunga) 病毒、白蛉病毒和内罗病毒)；沙粒病毒科 (Arenaviridae) (出血热病毒)；呼肠病毒科 (Reoviridae) (例如,呼肠病毒、环状病毒 (orbiviruses) 和轮状病毒)；双 RNA 病毒科 (Birnaviridae)；嗜肝病毒科 (Hepadnaviridae) (乙型肝炎病毒)；细小病毒科 (Parvoviridae) (细小病毒)；乳多空病毒科 (Papovaviridae) (乳头状瘤病毒、多瘤病毒)；腺病毒科 (Adenoviridae) (大多数腺病毒)；疱疹病毒科 (Herpesviridae) 单纯疱疹病毒 (HSV) 1 和 2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒 (CMV)、疱疹病毒；痘病毒科 (Poxviridae) (天花病毒、痘苗病毒、痘病毒)；和虹彩病毒科 (Iridoviridae) (例如,非洲猪瘟病毒)；和未分类病毒 (例如,海绵样脑病的病原学因子、丁型肝炎的因子 (尽管认为是乙型肝炎病毒的缺陷卫星)、非甲型、非乙型肝炎的因子 (1 类=内部传播的；2 类=肠胃外传播的 (即丙型肝炎)；诺瓦克和相关病毒、和星状病毒属)。

[0334] 此外,革兰氏阴性和革兰氏阳性菌可以通过主题组合物和方法在脊椎动物中被靶向。此种革兰氏阳性菌包括但不限于巴斯德氏菌属物种 (*Pasteurella* sp.)、葡萄球菌属物种 (*Staphylococci* sp.) 和链球菌属物种 (*Streptococcus* sp.)。革兰氏阴性菌包括但不限于大肠埃希杆菌 (*Escherichia coli*)、假单胞菌属物种 (*Pseudomonas* sp.) 和沙门菌属物种 (*Salmonella* sp.)。传染性细菌的具体例子包括但不限于：幽门螺杆菌、伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌属物种 (*Mycobacteriasp.*) (例如结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌 (*M. avium*)、细胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*)、戈登分枝杆菌 (*M. goodii*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A 组链球菌)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B 组链球菌)、链球菌属 (*Streptococcus*) (草绿色组)、粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌 (*Streptococcus bovis*)、链球菌属 (厌氧物种)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、致病性弯曲杆菌属物种 (*Campylobacter* sp.)、肠球菌属物种 (*Enterococcus* sp.)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)、白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌属物种 (*Corynebacterium* sp.)、丹毒杆菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、产气荚膜杆菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、多杀性巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*)、拟杆菌属物种 (*Bacteroides* sp.)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、细弱密螺旋体 (*Treponema pertenuis*)、钩端螺旋体属 (*Leptospira*)、立克次氏体属 (*Rickettsia*) 和 *Actinomyces israeli* (疑为 *Actinomyces israeli*, 以色列放线菌)。

[0335] 可以在主题组合物中用作抗原来源的细菌病原体的多肽包括但不限于铁调节外膜蛋白质 (“IROMP”)、外膜蛋白质 (“OMP”)、和引起疝病的杀鲑气单胞菌 (*Aeromonis*

salmonicida) 的 A- 蛋白质、引起细菌性肾病 (“BKD”) 的鲑鱼肾菌 (*Renibacterium salmoninarum*) 的 p57 蛋白质、主要表面相关抗原 (“msa”)、表面表达的细胞毒素 (“mpr”)、表面表达的溶血素 (“ish”) 和耶尔森菌病的鞭毛抗原;细胞外蛋白质 (“ECP”)、铁调节外膜蛋白质 (“IROMP”)、和巴斯德氏菌病的结构蛋白质;鳎弧菌 (*Vibrosis anguillarum*) 和奥氏弧菌 (*V. ordalii*) 的 OMP 和鞭毛蛋白质;鲑鱼爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 和迟钝爱德华氏菌 (*E. tarda*) 的鞭毛蛋白质、OMP 蛋白质、aroA 和 purA;和小瓜虫属 (*Ichthyophthirius*) 的表面抗原;和柱状嗜纤维菌 (*Cytophaga columnari*) 的结构和调节蛋白质;以及立克次氏体属的结构和调节蛋白质。此种抗原可以重组或通过本领域已知的其他方法进行分离或制备。

[0336] 病原体的例子进一步包括但不限于,感染哺乳动物且更特别是人的传染性真菌和寄生虫。传染性真菌的例子包括但不限于:新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*)。

[0337] 寄生虫的例子包括细胞内寄生虫和专性细胞内寄生虫。寄生虫的例子包括但不限于恶性疟原虫、卵形疟原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)、间日疟原虫、诺氏疟原虫 (*Plasmodium knowlesi*)、果氏巴贝虫 (*Babesia microti*)、分歧巴贝虫 (*Babesia divergens*)、克鲁斯锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、鼠弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、旋毛线虫 (*Trichinella spiralis*)、硕大利什曼原虫 (*Leishmania major*)、杜氏利什曼原虫 (*Leishmaniadonovani*)、巴西利什曼原虫 (*Leishmania braziliensis*)、热带利什曼原虫 (*Leishmania tropica*)、冈比亚锥虫 (*Trypanosoma gambiense*)、罗德西亚锥虫 (*Trypanosoma rhodesiense*)、班氏吴策线虫 (*Wuchereria bancrofti*)、马来丝虫 (*Brugia malayi*)、帝汶布鲁丝虫 (*Brugia timori*)、人蛔虫 (*Ascaris lumbricoides*)、旋盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*) 和曼森血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)。

[0338] 在哺乳动物且更特别是人中充当抗原的其他医学相关微生物在参考文献中广泛描述,例如参见 C. G. A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, (1983)。除传染性人疾病和人病原体的治疗外,本发明的组合物和方法用于治疗非人哺乳动物的感染。示例性非人病原体包括但不限于小鼠乳房肿瘤病毒 (“MMTV”)、劳斯肉瘤病毒 (“RSV”)、禽白血病病毒 (“ALV”)、禽成髓细胞瘤病毒 (“AMV”)、鼠白血病病毒 (“MLV”)、猫白血病病毒 (“FeLV”)、鼠肉瘤病毒 (“MSV”)、长臂猿白血病病毒 (“GALV”)、脾坏死病毒 (“SNV”)、网状内皮组织增殖病病毒 (“RV”)、猿猴肉瘤病毒 (“SSV”)、梅森-菲舍 (Mason-Pfizer) 猴病毒 (“MPMV”)、猿猴逆转录病毒 1 型 (“SRV-1”)、慢病毒例如 HIV-1、HIV-2、SIV、维斯那病毒、猫免疫缺陷病毒 (“FIV”)、和马传染性贫血病毒 (“EIAV”)、T 细胞白血病病毒例如 HTLV-1、HTLV-II、猿猴 T 细胞白血病病毒 (“STLV”)、和牛白血病病毒 (“BLV”)、和泡沫病毒例如人泡沫病毒 (“HFV”)、猿猴泡沫病毒 (“SFV”) 和牛泡沫病毒 (“BFV”)。

[0339] 可检测标记物

[0340] 结合 5B6 的化合物可以在一系列检测系统中采用。例如,化合物可以在用于使受试者的内部区域成像和 / 或诊断受试者中疾病的存在或不存在的方法中使用。例如,结合 5B6 的化合物可以用于诊断其中 5B6 表达细胞起作用的疾病。

[0341] 对于本领域技术人员显而易见的是,本发明的诊断或预测方法涉及定量程度,以测定患者样品中存在的 5B6 水平或 5B6 表达细胞水平。此种定量通过包括合适对照样品容易地提供。

[0342] 优选地,在本发明的方法中包括内部对照。优选内部对照是取自一个或多个健康个体的一种或多种样品。

[0343] 当在诊断上使用时,结合 5B6 的化合物可以与诊断剂例如可检测标记连接,以允许容易地检测在体外或在体内的结合事件。合适的标记包括放射性同位素或非放射性标记,例如生物素、酶、化学发光分子、荧光团、染料标记物或其他显像剂,用于检测和 / 或定位靶分子。备选地,结合化合物的第二种标记的抗体或抗生物素蛋白(例如)可以用于检测。

[0344] 在酶免疫测定法的情况下,酶可以与第二种抗体缀合,一般借助于戊二醛或高碘酸盐。然而,如容易认识到的,存在技术人员容易获得的广泛多样的不同缀合技术。常用酶尤其包括辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶。在通过相对应酶水解后,一般选择与特定酶一起使用的底物,用于产生可检测的颜色改变。合适酶的例子包括碱性磷酸酶和过氧化物酶。还可以采用荧光底物,其产生荧光产物而不是上文指出生色底物。

[0345] 在另一个例子中,荧光化合物例如但不限于尤其是荧光素和罗丹明,可以与例如抗体化学偶联而不改变其结合能力。当通过用特定波长的光照射而被激活时,荧光染料标记的抗体吸收光能,诱导在分子中应激性的状态,随后发出用光学显微镜可视觉检测的特征性颜色下的光。

[0346] 作为进一步的非限制性例子,与显像剂偶联的、结合 5B6 的化合物可以用于检测在组织化学组织切片中的 5B6 表达。化合物可以与合适的超磁性、顺磁、电子密度、发生回波、放射性或非放射性标记例如生物素或抗生物素蛋白共价或非共价偶联。

[0347] 标记的树突状细胞或其前体检测和分离

[0348] 如本文所使用的,术语“富集”和“富集的”以其最广泛含义使用,以包括树突状细胞或其前体的分离,从而使得在处理样品中树突状细胞或其前体与非树突状细胞或其前体的相对浓度大于可比较的未处理样品。优选地,富集的树突状细胞和 / 或其前体与得自原始样品的样品中的至少 10%、更优选至少 20%、更优选至少 30%、更优选至少 40%、更优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 90%、更优选至少 95%、且更加优选至少 99% 的非树突状细胞或其前体分开。最优选地,富集细胞群体不包含非树突状细胞或其前体(即,纯的)。术语“富集”及其变化在本文中术语“分离”及其变化可互换使用。此外,使用本发明的方法富集的细胞群体可以仅包括单个树突状细胞或其前体。此外,本发明的富集方法可以用于分离单个树突状细胞或其前体。

[0349] 树突状细胞或其前体可以通过本领域众所周知的各种技术从样品中富集,所述技术包括细胞分选,特别是荧光激活细胞分选(FACS),通过使用与底物(例如,塑料表面,如在淘选中)结合的亲和试剂,或通过使用与固相颗粒结合的亲和试剂,所述固相颗粒可以基于珠(例如,有色胶乳珠或磁性颗粒)的性质进行分离。天然地,用于富集树突状细胞和 / 或其前体的操作将依赖于细胞如何进行标记。

[0350] 在一个例子中,可以使用具有用于细胞分选器的合适特征的任何可检测物质(例如,在荧光染料的情况下,可以由分选器的光源激发的染料、和可以由细胞分选器的检测器检测出的发射谱)。在流式细胞术中,通过包含细胞的液流或其他颗粒投射激光束,当被聚焦光撞击时,所述液流或其他颗粒发出由检测器选出的信号。这些信号随后经转变用于计算机存储和数据分析,并且可以提供关于各种细胞性质的信息。用合适染料标记的细胞通过激光束激发,并且在特征性波长下发光。这种发射的光由检测器选出,并且这些模拟信号转变成数字信号,允许其存储、分析和显示。

[0351] 许多更大型的流式细胞仪也是“细胞分选器”,例如荧光激活细胞分选器(FACS),并且是具有将来自特定群体的细胞选择性沉积到管或其他收集容器内的能力的仪器。在一个特别优选的实施方案中,细胞使用FACS进行分离。这种操作是本领域众所周知的,并且通过例如Melamed等人,Flow Cytometry and Sorting, Wiley-Liss, Inc., (1990); Shapiro, Practical Flow Cytometry, 第4版, Wiley-Liss, Inc., (2003);和Robinson等人, Handbook of Flow Cytometry Methods, Wiley-Liss, Inc. (1993)描述。

[0352] 为了分选细胞,该仪器电子解释对于每种细胞收集的信号,因为它通过激光束询问并且将信号与计算机上的分选标准组进行比较。如果细胞符合所需标准,那么将电子电荷应用于液流,所述液流精确地分裂成包含细胞的小滴。在目的细胞将从流中脱落的那个时刻,将这种电荷应用于流,随后当荷电小滴已从流中脱落时去除。当小滴落下时,它们经过带强正或负电的2块金属板之间。荷电小滴被拉向相反极性的金属板,并且沉积在收集容器中,或显微镜载玻片上,用于进一步检查。

[0353] 细胞可以作为单种细胞或多种细胞自动沉积在收集容器中,例如使用激光器例如氩激光器(488nm)和例如用于配备Autoclone单元的流式细胞仪(Coulter EPICS Altra, Beckman-Coulter, Miami, Fla., USA)。用于本发明的方法的合适FACS机器的其他例子包括但不限于, MoFlo™ 高速细胞分选器(Dako-Cytomation Ltd)、FACS Aria™(Becton Dickinson)、FACS Diva(Becton Dickinson)、ALTRA™ Hyper sort(Beckman Coulter)和CyFlow™分选系统(Partec GmbH)。

[0354] 使用固相颗粒从样品中富集树突状细胞和/或其前体,可以利用具有所需性质的任何颗粒。例如,大颗粒(例如,直径大于约90-100 μm)可以用于促进沉淀。优选地,颗粒是“磁性颗粒”(即可以使用磁场进行收集的颗粒)。标记的细胞保留在柱(由磁场保持)中,而未标记的细胞直接通过并且在另一个末端处洗脱。磁性颗粒目前通常可从各个制造商获得,包括DynaL Biotech(Oslo, Norway)和Milteni Biotech GmbH(Germany)。磁性细胞分选(MACS)的例子由Al-Mufti等人(1999)提供。

[0355] 激光捕获显微切割也可以使用本发明的方法用于在载玻片上选择性富集标记的树突状细胞或其前体。使用激光捕获显微切割的方法是本领域已知的(参见例如, U. S. 20030227611和Bauer等人,2002)。

[0356] 在富集后,细胞可以立即使用,或使用本领域已知的技术在体外培养以扩增树突状细胞和/或其前体数目。此外,可以培养树突状细胞前体,以产生成熟树突状细胞。

[0357] 结合5B6的化合物的鉴定

[0358] 描述了筛选测试化合物的方法,其可以鉴定与5B6结合且因此用作例如用于与治疗剂结合的靶向试剂的化合物,和/或与5B6直接结合且抑制或拮抗5B6的生物学活性的

化合物。

[0359] 通过求助于测定法和技术筛选 5B6 活性的抑制剂,所述测定法和技术用于鉴定能够与 5B6 多肽结合且因此抑制其在树突状细胞或其前体的生物学活性的药物。此种测定法包括使用哺乳动物细胞系(例如,CHO 细胞或 293T 细胞)用于噬菌体展示用于表达 5B6 多肽,且使用原代细胞或亲本细胞系或转染哺乳动物或大肠杆菌或其他微生物的培养物,以产生用于潜在结合化合物的结合研究的蛋白质。

[0360] 采用使用本发明的蛋白质、抗体或多核苷酸序列的其他常规药物筛选技术。作为一个例子,用于鉴定与本发明的 5B6 多肽特异性结合的化合物的方法可以简单地包括下述步骤:使所选择的表达 5B6 的细胞与测试化合物接触,以允许测试化合物与 5B6 的结合,并且测定与 5B6 结合的测试化合物(如果存在)的量。此种方法涉及测试化合物与固定在固体载体上的 5B6 多肽的温育。一般地,允许包含固定的化合物的表面与包含蛋白质的溶液接触,并且使用合适的检测系统测量结合。合适的检测系统是本领域已知的,其中某些在本文中描述。

[0361] 用于产生结合 5B6 的抗体或其片段的方法在上文描述。

[0362] 计算机建模和搜索技术允许鉴定可以结合本发明的多肽的化合物。可以测定 5B6 或其活性位点的三维几何结构。这可以通过已知方法完成,所述方法包括可以测定完整分子结构的 X 射线晶体学。

[0363] 基于计算机的数字建模方法可以用于完成结构(例如,在其中测定不完整或不够精确的结构实施方案中)或改善其精确度。可以使用本领域公认的任何方法,包括但不限于,对特定生物聚合物例如蛋白质或核酸特异的参数化模型,基于计算分子运动的分子动力学模型,基于热总体的统计力学模型,或组合模型。

[0364] 通过使用计算机建模,使用对接程序例如 GRAM、DOCK 或 AUTODOCK (Dunbrack 等人,1997),5B6 的三维结构可以用于鉴定拮抗剂或激动剂。计算机程序也可以用于评估候选化合物与多肽的吸引、排斥和立体阻碍。一般地,拟合越紧密(例如,更低的立体阻碍、和/或更大的吸引力),潜在激动剂或拮抗剂将更有效,因为这些性质与更紧密的结合常数一致。此外,在潜在激动剂或拮抗剂的设计中越特异,它将越不可能干扰其他蛋白质。

[0365] 最初,例如使用本发明的方法可以获得潜在化合物,例如通过筛选由重组噬菌体产生的随机肽文库或化学文库。随后可以通过计算机建模程序系统性修饰以这种方式选择的化合物,直至鉴定一种或多种有希望的潜在化合物。

[0366] 此种计算机建模允许选择有限数目的合理化学修饰,与可以制备并且其中任何一种都可能产生有用激动剂或拮抗剂的无限数目的基本上随机的化学修饰相对比。每种化学修饰需要另外的化学步骤,这对于合成有限数目的化合物虽然是合理的,但如果需要合成所有可能修饰,很快变得势不可挡的。因此通过使用三维结构和计算机建模,在计算机监视屏上可以快速筛选大量这些化合物,并且可以确定少数可能候选物而无需费力合成无数数目的化合物。

[0367] 对于大多数类型的模型,代表组成成分原子和基团之间的力的标准分子力场是必需的,并且可以选自物理化学中已知的力场。本领域已知且可以在此种方法中使用的示例性力场包括但不限于,恒定价力场(CVFF)、AMBER 力场和 CHARM 力场。不完整或较不精确的实验结构可以充当关于由这些建模方法计算的完整和更精确结构的约束。

[0368] 分子建模系统的进一步例子是 CHARMM 和 QUANTA 程序 (Polygen Corporation, Waltham, MA)。CHARMM 执行能量最低化和分子动力学功能。QUANTA 执行分子结构的构建、图形建模和分析。QUANTA 允许分子相互的交互构建、修饰、显现和行为分析。

[0369] 微生物保藏细节

[0370] 杂交瘤 20/05-3A4-26-16-Clone 5 和杂交瘤 23/05-4C6-29-3-Clone 5 是分泌针对人 C 型凝集素克隆 5B6 的单克隆 Ab 的杂交瘤。

[0371] 杂交瘤 24/04-10B4-24-8-FACS 9-5 和杂交瘤 42/04-42D2-66-4-1-Clone 4 是分泌针对小鼠 C 型凝集素克隆 5B6 的单克隆 Ab 的杂交瘤。杂交瘤 24//04-10B4-24-8-FACS 9-5 也分泌针对人 C 型凝集素克隆 5B6 的单克隆抗体。

[0372] 抗体 24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4 和 23/05-4C6 通过杂交瘤细胞系产生,所述杂交瘤细胞系于 2007 年 12 月 11 日分别以保藏参考号 07121101、07121102、07121103 和 07121104 保藏于欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC) 24/04-10B4-24-8、42/04-42D2-66-4-1、20/05-3A4-26-16、23/05-4C6-29-3。

[0373] 上述杂交瘤的更高抗体分泌亚克隆 (24/04-10B4-24-8-FACS 9-5、42/04-42D2-66-4-1-Clone 4、20/05-3A4-26-16-Clone 5、23/05-4C6-29-3-Clone 5) 于 2008 年 4 月 29 日保藏于 ECACC,并且指定下述编号;

[0374] • 杂交瘤 24/04-10B4-24-8-FACS 9-5- 登记号 08042901

[0375] • 杂交瘤 42/04-42D2-66-4-1CLONE 4- 登记号 08041902

[0376] • 杂交瘤 20/05-3A4-26-16-CLONE 5- 登记号 08042903,和

[0377] • 杂交瘤 23/05-4C6-29-3-CLONE 5- 登记号 08042904。

[0378] 根据国际承认用于专利程序以及其实实施细则的微生物保藏布达佩斯条约进行这些保藏。这确保活培养物从保藏日期起维持 30 年。生物体将通过 ECACC 根据布达佩斯条约可获得。

[0379] 本申请的受让人已同意,如果在合适条件下培养时,培养物保藏死亡或丢失或破坏,它将在通知后立即用相同培养物的活样本替换。保藏菌株的可用性不应解释为违背根据任何政府当局依照其专利法授予的权利实践本发明的许可。

[0380] 多肽

[0381] “基本上纯化的”或“纯化的”意指已与它在其天然状态下与之结合的一种或多种脂质、核酸、其他多肽或其他污染分子分离的多肽。优选基本上纯化的多肽是至少 60% 不含、更优选至少 75% 不含、且更优选至少 90% 不含它与之天然结合的其他组分。

[0382] 在多肽的背景中,术语“重组”指当通过细胞或在无细胞表达系统中产生时,与其天然状态相比较,以改变的量或以改变的速率的多肽。在一个实施方案中,细胞是并非天然产生多肽的细胞。然而,细胞可以是包括非内源基因的细胞,所述非内源基因引起改变的,优选增加量的待生产多肽。本发明的重组多肽包括未与它在其中产生的转基因(重组)细胞或无细胞表达系统的其他组分分开多肽,以及在此种细胞或无细胞系统中产生的基本上纯化掉至少某些其他组分的多肽。

[0383] 术语“多肽”和“蛋白质”一般可互换使用并且指单条多肽链,其可以通过添加非氨基酸基团进行修饰或不修饰。应当理解此种多肽链可以与其他多肽或蛋白质或其他分子例如辅因子结合。如本文所使用的,术语“蛋白质”和“多肽”还包括本文描述的多肽的变体、

突变体、生物学活性片段、修饰、类似物和 / 或衍生物。

[0384] 多肽的同一性%通过GAP (Needleman和Wunsch, 1970) 分析 (GCG 程序) 进行测定, 其中缺口产生罚分 = 5, 并且缺口延长罚分 = 0.3。查询序列的长度是至少 25 个氨基酸, 并且 GAP 分析在至少 25 个氨基酸的区域上比对 2 个序列。更优选地, 查询序列的长度是至少 50 个氨基酸, 并且 GAP 分析在至少 50 个氨基酸的区域上比对 2 个序列。更优选地, 查询序列的长度是至少 100 个氨基酸, 并且 GAP 分析在至少 100 个氨基酸的区域上比对 2 个序列。更加优选地, 查询序列的长度是至少 200 个氨基酸, 并且 GAP 分析在至少 200 个氨基酸的区域上比对 2 个序列。更加优选地, GAP 分析在其完整长度上比对 2 个序列。

[0385] 如本文所使用的, “生物学活性片段” 是如本文所描述的多肽的部分, 其维持全长多肽的所定义活性。生物学活性片段可以是任何尺寸, 只要它们维持所定义的活性。优选地, 生物学活性片段长度是至少 100 个氨基酸。在一个优选实施方案中, 生物学活性片段能够与由细胞例如树突状细胞表达的全长 5B6 蛋白质结合。在一个特别优选的实施方案中, 生物学活性片段是能够与由细胞例如树突状细胞表达的全长 5B6 蛋白质结合的可溶性片段。此种可溶性生物学活性片段的例子包括如下所述的这些, 其包括 5B6 的 CTLD 区域, 但缺乏 SEQ ID NO 1 至 8 中任何一个的至少约 40、至少约 50、至少约 55、或至少约 100 个 N 末端残基。此外, 本发明多肽的可溶性生物学活性片段的例子作为 SEQ ID NO 58 至 61 提供。此外, 包括本发明多肽的可溶性生物学活性片段的融合蛋白的例子在图 11A 中提供 (SEQ ID NO 38 至 41)。

[0386] 如本文所使用的, “抗原片段” 是如本文所描述的多肽的蛋白质, 其可以施用于动物例如小鼠、兔或人, 以诱导将结合全长天然多肽的抗体产生。

[0387] 如本文所使用的, “抗原结合片段” 指如本文限定的抗体的部分, 其能够结合与全长分子相同的抗原。

[0388] 就所限定的多肽而言, 应当理解高于上文提供那些的同一性%数字将包括优选实施方案。因此, 当可应用时, 根据最小同一性%数字, 优选多肽包含这样的氨基酸序列, 其与相关提名的 SEQ ID NO 至少 50%、更优选至少 55%、更优选至少 60%、更优选至少 65%、更优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、更优选至少 91%、更优选至少 92%、更优选至少 93%、更优选至少 94%、更优选至少 95%、更优选至少 96%、更优选至少 97%、更优选至少 98%、更优选至少 99%、更优选至少 99.1%、更优选至少 99.2%、更优选至少 99.3%、更优选至少 99.4%、更优选至少 99.5%、更优选至少 99.6%、更优选至少 99.7%、更优选至少 99.8%、且更加优选至少 99.9% 等同。

[0389] 本发明的多肽包括 5B6 及其片段和变体, 以及结合 5B6 的多肽例如抗体、天然或重组配体 / 结合配偶体, 其可以与可检测标记或其他多肽例如抗原或蛋白质毒素缀合 / 融合或不缀合 / 融合。

[0390] 本文描述的多肽的氨基酸序列突变体可以通过下述进行制备: 将合适的核苷酸改变引入本文限定的核酸内, 或通过所需多肽的体外合成。此种突变体包括例如在氨基酸序列内的残基缺失、插入或置换。可以进行缺失、插入和置换的组合以取得最终构建体, 条件是最终多肽产物具有所需特征。

[0391] 突变体 (改变的) 多肽可以使用本领域已知的任何技术进行制备。例如, 可以对本文描述的多核苷酸实施体外诱变。此种体外诱变技术可以包括将多核苷酸亚克隆到合适

载体内,将载体转化到“诱变”株例如大肠杆菌 XL-1 红色 (Stratagene) 内,并且使转化的细菌繁殖合适数目的代。在另一个例子中,对本发明的多核苷酸实施如由 Harayama (1998) 广泛描述的 DNA 改组技术。衍生自诱变的 / 改变的 DNA 的产物可以使用本文描述的技术容易地筛选,以测定它们是否能够赋予所需表型。

[0392] 在设计氨基酸序列突变体中,突变位点的定位和突变的性质将依赖于待修饰的一种或多种特征。用于突变的位点可以个别地或系列地进行修饰,例如通过 (1) 首先用保守氨基酸选择进行置换,随后依赖于达到的结果用更激烈的选择进行置换, (2) 缺失靶残基,或 (3) 插入与定位位点相邻的其他残基。

[0393] 氨基酸序列缺失一般范围为约 1 至 15 个残基,更优选约 1 至 10 个残基并且一般是约 1 至 5 个邻接残基。

[0394] 置换突变体具有在多肽分子中去除的至少一个氨基酸残基,以及在其位置中插入的不同残基。对于置换诱变最有利的位点包括鉴定为对于功能重要的位点。其他有利位点是其中得自各种菌株或物种的特定残基是等同的那些 (参见例如,图 1),和 / 或其中得自相关蛋白质的特定残基是等同的那些 (参见例如,图 2)。这些位置对于生物学活性可能是重要的。这些位点特别是包括在至少 3 个其他等同保守位点序列内的那些,优选以相对保守方式进行置换。此种保守置换显示于表 1 中。

[0395] 表 1- 示例性置换。

[0396]

原始残基	示例性置换
Ala (A)	val ;leu ;ile ;gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln ;his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn ;his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn ;gln
Ile (I)	leu ;val ;ala

Leu (L)	ile ;val ;met ;ala ;phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu ;phe
Phe (F)	leu ;val ;ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp ;phe
Val (V)	ile ;leu ;met ;phe ;ala

[0397] 在一个优选实施方案中,当与天然存在的多肽相比较时,突变体 / 变体多肽具有 1 或 2 或 3 或 4 个保守氨基酸改变。保守氨基酸改变的细节在表 1 中提供。在一个优选实施方案中,改变不在一个或多个基序中,所述基序在随同提供的不同多肽之间是高度保守的。如技术人员应当理解的,当在重组细胞中表达时,此种较小改变可以合理地预测为不改变多肽的活性。

[0398] 此外,需要时,可以引入非天然氨基酸或化学氨基酸类似物作为在本文描述的多肽内的置换或添加。此种氨基酸包括但不限于,普通氨基酸的 D- 同分异构体、2,4- 二氨基丁酸、 α - 氨基异丁酸、4- 氨基丁酸、2- 氨基丁酸、6- 氨基己酸、2- 氨基异丁酸、3- 氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、丙氨酸环己酯、 β - 丙氨酸、氟- 氨基酸、设计的氨基酸例如 β - 甲基氨基酸、 $C\alpha$ - 甲基氨基酸、 $N\alpha$ - 甲基氨基酸、和一般而言的氨基酸类似物。

[0399] 在本发明的范围内还包括的是在合成过程中或在合成后进行差异修饰的本发明的多肽,例如通过生物素化、苄化、糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护 / 阻断基团的衍生化、蛋白酶解切割、与抗体分子或其他细胞配体连接等。这些修饰可以作用于增加多肽的稳定性和 / 或生物学活性。

[0400] 本文描述的多肽可以以各种方式产生,包括天然多肽的产生和回收、重组多肽的产生和回收、以及多肽的化学合成。在一个实施方案中,本发明的分离的多肽通过下述产生:在有效产生多肽的条件下培养能够表达多肽的细胞,并且回收多肽。待培养的优选细胞是本发明的重组细胞。有效培养条件包括但不限于,允许多肽产生的有效培养基、生物反应器、温度、pH 和氧条件。有效培养基指其中培养细胞以产生本发明的多肽的任何培养基。此种培养基一般包括具有可同化碳、氮和磷源,以及合适盐、矿物质、金属和其他营养素例如

维生素的水性培养基。可以在常规发酵生物反应器、组织培养瓶、摇瓶、试管、微量滴定皿和培养皿中培养本发明的细胞。培养可以在对于重组细胞合适的温度、pH 和氧含量下进行。此种培养条件在本领域普通技术人员的专业知识内。

[0401] 多核苷酸

[0402] “分离多核苷酸”包括 DNA、RNA 或这些的组合，单链或双链，以有义或反义方向或两者的组合，dsRNA 或以其他方式，意指与它在其天然状态中与之结合或连接的多核苷酸序列至少部分分开的多核苷酸。优选地，分离的多核苷酸至少 60% 不含、优选至少 75% 不含、且最优选至少 90% 不含它们与之天然结合的其他组分。此外，术语“多核苷酸”在本文中可与术语“核酸”互换使用。

[0403] 在多核苷酸的背景下，术语“外源的”指当存在于细胞或在无细胞表达系统中时，与其天然状态相比较，以改变量的多核苷酸。在一个实施方案中，细胞是非天然地包括多核苷酸的细胞。然而，细胞可以是包括非内源多核苷酸的细胞，导致改变的、优选增加量的编码多肽产生。本发明的外源多核苷酸包括未与它在其中存在的转基因（重组）细胞或无细胞表达系统的其他组分分开的多核苷酸，以及在此种细胞或无细胞系统中产生的基本上纯化掉至少某些其他组分的多核苷酸。

[0404] 多核苷酸的同源性%通过 GAP (Needleman 和 Wunsch, 1970) 分析 (GCG 程序) 进行测定，其中缺口产生罚分 = 5，并且缺口延长罚分 = 0.3。除非另有说明，查询序列的长度是至少 45 个核苷酸，并且 GAP 分析在至少 45 个核苷酸的区域上比对 2 个序列。更优选地，查询序列的长度是至少 150 个核苷酸，并且 GAP 分析在至少 150 个核苷酸的区域上比对 2 个序列。更优选地，查询序列的长度是至少 250 个核苷酸，并且 GAP 分析在至少 250 个核苷酸的区域上比对 2 个序列。更加优选地，GAP 分析在其完整长度上比对 2 个序列。

[0405] 就所限定的多核苷酸而言，应当理解高于上文提供那些的同源性%数字将包括优选实施方案。因此，当可应用时，根据最小同源性%数字，优选本发明的多核苷酸包含这样的序列，其与相关提名的 SEQ IDNO 至少 50%、更优选至少 55%、更优选至少 60%、更优选至少 65%、更优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、更优选至少 91%、更优选至少 92%、更优选至少 93%、更优选至少 94%、更优选至少 95%、更优选至少 96%、更优选至少 97%、更优选至少 98%、更优选至少 99%、更优选至少 99.1%、更优选至少 99.2%、更优选至少 99.3%、更优选至少 99.4%、更优选至少 99.5%、更优选至少 99.6%、更优选至少 99.7%、更优选至少 99.8%、且更加优选至少 99.9% 等同。

[0406] 如本文所使用的，术语“杂交”指 2 个单链核酸分子能够通过氢键合形成至少部分双链核酸的能力。

[0407] 如本文所使用的，短语“严格条件”指在其下多核苷酸、探针、引物和 / 或寡核苷酸将与其靶序列而不与其他序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的并且在不同环境中将是不同的。更长序列在比更短序列更高的温度下特异性杂交。一般地，严格条件选择为比在限定离子强度和 pH 下关于特定序列的热解链温度 (T_m) 低约 5°C。 T_m 是在其下与靶序列互补的 50% 探针与靶序列平衡杂交的温度（在限定离子强度、pH 和核酸浓度下）。因为靶序列一般过量存在，所以在 T_m 下，50% 的探针平衡占据。一般地，严格条件将是这样的，其中在 pH7.0 至 8.3 下，盐浓度小于约 1.0M 钠离子、一般约 0.01 至 1.0M 钠离子（或其他盐），

并且温度对于短探针、引物或寡核苷酸（例如，10nt 至 50nt）是至少约 30°C，并且对于较长探针、引物或寡核苷酸是至少约 60°C。严格条件还可以通过添加去稳定剂例如甲酰胺来实现。

[0408] 严格条件是本领域技术人员已知的，并且可以在 Ausubel 等人（同上），6.3.1-6.3.6 以及本文描述的实施例中找到。优选地，所述条件是这样的，使得彼此至少约 65%、70%、75%、85%、90%、95%、98% 或 99% 同源的序列一般保持彼此杂交。严格杂交条件的非限制性例子是在高盐缓冲液中在 65°C 下杂交，所述高盐缓冲液包括 6xSSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA 和 500mg/ml 变性鲑精 DNA，随后为在 0.2xSSC、0.01% BSA 中在 50°C 下的一次或多次洗涤。在另一个实施方案中，提供了在中等严格条件下，可与包括 SEQ ID NO 9 至 16 的核苷酸序列的一种或多种核酸分子杂交的核酸序列。中等严格杂交条件的非限制性例子是在 6xSSC、5xDenhardt' s 溶液、0.5% SDS 和 100mg/ml 变性鲑精 DNA 中在 55°C 下杂交，随后为在 1xSSC、0.1% SDS 中在 37°C 下的一次或多次洗涤。可以使用的其他中等严格条件是本领域众所周知的，参见例如 Ausubel 等人（同上），和 Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, (1990)。在另外一个实施方案中，提供了在低严格条件下，可与包括 SEQ ID NO 9 至 16 的核苷酸序列中任何一个或多个的核酸分子杂交的核酸。低严格杂交条件的非限制性例子是在 35% 甲酰胺、5xSSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100mg/ml 变性鲑精 DNA、10% (wt/vol) 硫酸葡聚糖中在 40°C 下杂交，随后为在 2xSSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTA 和 0.1% SDS 中在 50°C 下的一次或多次洗涤。可以使用的其他低严格条件是本领域众所周知的，参见例如 Ausubel 等人（同上）和 Kriegler（同上）。

[0409] 当与天然存在的分子相比较时，本发明的多核苷酸可以具有一个或多个突变，其是核苷酸残基的缺失、插入或置换。突变体可以是天然存在的（即，从天然来源中分离）或合成的（例如，通过对核酸执行定向诱变）。

[0410] 通常，多核苷酸或寡核苷酸的单体通过磷酸二酯键或其类似物连接，以形成大小从相对短的单体单位例如 12-18 个到数百个单体单位的寡核苷酸。磷酸二酯键的类似物包括：硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、phosphoroanilothioate、phosphoranilidate 和氨基磷酸酯。

[0411] 反义多核苷酸

[0412] 术语“反义多核苷酸”应理解为意指 DNA 或 RNA 或其组合，其与编码本发明的多肽的至少部分特定 mRNA 分子互补，并且能够干扰转录后事件例如 mRNA 翻译的分子。反义方法的使用是本领域众所周知的（参见例如 G. Hartmann 和 S. Endres, Manual of Antisense Methodology, Kluwer (1999)）。反义技术在植物中的使用已由 Bourque, 1995 和 Senior, 1998 综述。Bourque, 1995 列出了反义序列如何用作基因灭活方法的大量例子。她还阐述了可能不需要达到任何酶活性的 100% 抑制，因为部分抑制将更可能导致系统中的可检测改变。Senior (1998) 阐述了反义方法目前是非常良好确定的用于操纵基因表达的技术。

[0413] 本发明的反义多核苷酸将在生理条件下与靶多核苷酸杂交。如本文所使用的，术语“在生理条件下将杂交的反义多核苷酸”意指在细胞优选人细胞中的正常条件下，多核苷

酸（其是全部或部分单链的）至少能够与编码蛋白质的 mRNA 形成双链多核苷酸，所述蛋白质例如 SEQ ID NOs 1 至 8 中任何一个中提供的那些。

[0414] 反义分子可以包括与结构基因相对应的序列，或实现对基因表达或剪接事件的控制的序列。例如，反义序列可以与本发明的基因的所靶向编码区、或 5' 非翻译区 (UTR) 或 3' -UTR 或这些的组合相对应。它可以与靶基因的内含子序列，优选仅与外显子序列部分互补，所述内含子序列可以在转录过程中或在转录后剪接掉。考虑到 UTR 一般更大的趋异性，靶向这些区域提供了基因抑制的更大特异性。

[0415] 反义序列的长度应是至少 19 个邻接核苷酸，优选至少 50 个核苷酸，并且更优选至少 100、200、500 或 1000 个核苷酸。可以使用与完整基因转录物互补的全长序列。长度最优选是 100-2000 个核苷酸。反义序列与靶向转录物的同一性程度应是至少 90% 和更优选 95-100%。反义 RNA 分子当然可以包括无关序列，其可以作用于稳定分子

[0416] 催化多核苷酸

[0417] 术语催化多核苷酸和 / 或核酸指 DNA 分子或含 DNA 分子（在本文中也称为“脱氧核酶”）或 RNA 或含 RNA 分子（也称为“核酶”），其特异性识别独特的底物并且催化这种底物的化学修饰。催化核酸中的核酸碱基可以是碱基 A、C、G、T（和 U 对于 RNA）。

[0418] 一般地，催化核酸包含用于特异性识别靶核酸的反义序列，和核酸切割酶促活性（在本文中也称为“催化结构域”）。在本发明中特别有用的核酶类型是锤头核酶 (Haseloff 和 Gerlach, 1988 ; Perriman 等人, 1992) 和发夹核酶 (Shippy 等人, 1999)。

[0419] 本发明的核酶和编码核酶的 DNA 可以使用本领域众所周知的方法进行化学合成。核酶还可以从与 RNA 聚合酶启动子可操作地连接的 DNA 分子（其在转录后产生 RNA 分子）进行制备，所述启动子例如关于 T7RNA 聚合酶或 SP6RNA 聚合酶的启动子。因此，本发明还提供的是编码本发明的催化多核苷酸的核酸分子，即 DNA 或 cDNA。当载体还包含与 DNA 分子可操作地连接的 RNA 聚合酶启动子时，核酶可以在体外与 RNA 聚合酶和核苷酸一起温育后产生。在一个分开实施方案中，DNA 可以插入表达盒或转录盒内。在合成后，RNA 分子可以与具有稳定核酶的能力的 DNA 分子连接进行修饰，并且使得它对 RNA 酶有抵抗力。

[0420] 与本文描述的反义多核苷酸一样，在“生理条件”下，即在细胞内的那些（特别是在动物细胞例如人细胞中的条件），本发明的催化多核苷酸也应能够与靶核酸分子（例如，编码 SEQ ID NO 1 至 8 中提供的任何多肽的 mRNA）杂交。

[0421] RNA 干扰

[0422] RNA 干扰 (RNAi) 特别用于特异性抑制特定蛋白质的产生。尽管不希望受理论限制，Waterhouse 等人 (1998) 已提供关于通过其 dsRNA (双链体 RNA) 可以用于减少蛋白质产生的机制的模型。这种技术依赖于 dsRNA 分子的存在，所述 dsRNA 分子包含与目的基因或其部分的 mRNA 基本上等价的序列，在本发明情况下，所述 mRNA 是编码根据本发明的多肽的 mRNA。方便地，dsRNA 可以在重组载体或宿主细胞中由单个启动子产生，其中有义和反义序列邻侧为无关序列，所述无关序列使得有义和反义序列能够杂交，以形成具有形成环序列的无关序列的 dsRNA 分子。关于本发明的合适 dsRNA 分子的设计和产生完全在本领域技术人员的能力内，特别考虑 Waterhouse 等人 (1998)，Smith 等人 (2000)，WO 99/32619、WO 99/53050、WO 99/49029 和 WO 01/34815。

[0423] 在一个例子中，引入 DNA，其指导与待灭活的靶基因具有同源性的一种或多种至少

部分双链 RNA 产物的合成。DNA 因此包括有义和反义序列,当转录成 RNA 时,其可以杂交以形成双链 RNA 区域。在一个优选实施方案中,有义和反义序列通过包括内含子的间隔区分开,当转录成 RNA 时,所述内含子剪接掉。已显示这种安排导致更高效率的基因沉默。双链区域可以包括由一个或两个 DNA 区域转录的一种或两种 RNA 分子。双链分子的存在被认为触发来自单子叶植物系统的应答,这破坏来自靶植物基因的双链 RNA 以及同源 RNA 转录物,有效减少或消除靶基因的活性。

[0424] 杂交的有义和反义序列的长度应各自是至少 19 个邻接核苷酸,优选至少 30 或 50 个核苷酸,并且更优选至少 100、200、500 或 1000 个核苷酸。可以使用与完整基因转录物相对应的全长序列。长度最优选是 100-2000 个核苷酸。有义和反义序列与靶向转录物的同一性程度应是至少 85%、优选至少 90% 且更优选 95-100%。RNA 分子当然可以包括无关序列,其可以作用于稳定分子。RNA 分子可以在 RNA 聚合酶 II 或 RNA 聚合酶 III 启动子的控制下进行表达。后者的例子包括 tRNA 或 snRNA 启动子。

[0425] 优选的小干扰 RNA(‘siRNA’)分子包括与靶 mRNA 的约 19-21 个邻接核苷酸等同的核苷酸序列。优选地,靶 mRNA 序列从二核苷酸 AA 开始,包括约 30-70% 的 GC 含量(优选 30-60%、更优选 40-60% 且更优选约 45% -55%),并且与它待引入其中的动物(优选人)基因组中除靶外的任何核苷酸序列不具有高同一性百分比,例如,如通过标准 BLAST 搜索测定的。

[0426] 微小 RNA

[0427] 微小 RNA 调节是 RNA 沉默途径的明显特化分支,其朝向基因调节进化,与常规 RNAi/PTGS 相异。微小 RNA 是特定的一类小 RNA,其在以特征性反向重复结构的基因样元件中编码。当转录时,微小 RNA 基因产生茎-环前体 RNA,随后由其加工微小 RNA。微小 RNA 长度一般是约 21 个核苷酸。释放的 miRNA 掺入包含 Argonaute 蛋白质的特定子集的 RISC 样复合物内,其发挥序列特异性基因阻遏(参见例如 Millar 和 Waterhouse, 2005 ;Pasquinelli 等人, 2005 ;Almeida 和 Allshire, 2005)。

[0428] 共抑制

[0429] 可以使用的另一种分子生物学方法是共抑制。共抑制的机制并未充分理解,但被认为涉及转录后基因沉默(PTGS),并且在这点上可能与反义阻遏的许多例子非常相似。它涉及以就启动子而言的有义方向将基因或其片段的额外拷贝引入植物内用于其表达。有义片段的大小、其与靶基因区域的对应性、及其与靶基因的序列同一性程度是关于上文描述的反义序列。在某些情况下,基因序列的另外拷贝干扰靶植物基因的表达。关于实现共抑制途径的方法,参考 WO 97/20936 和 EP 0465572。

[0430] 重组载体

[0431] 本发明的一个实施方案包括重组载体,其包括被插入到能够将多核苷酸分子递送到宿主细胞内的任何载体内的本文描述的至少一种分离多核苷酸分子,和/或编码如本文所描述的多肽或化合物(例如抗体)的多核苷酸。此种载体包含异源多核苷酸序列,其是未天然发现与本发明的多核苷酸分子相邻,并且优选衍生自除一种或多种多核苷酸分子由其衍生的物种外的物种的多核苷酸序列。载体可以是 RNA 或 DNA,原核生物或真核生物的,并且一般是转座子(例如 US 5,792,294 中描述的)、病毒或质粒。

[0432] 一种类型的重组载体包括与表达载体可操作地连接一种或多种多核苷酸。短语可

操作地连接指多核苷酸分子以这样的方式插入表达载体内,使得当转化到宿主细胞内时所述分子能够被表达。如本文所使用的,表达载体是 DNA 或 RNA 载体,其能够转化宿主细胞且实现特定多核苷酸分子的表达。优选地,表达载体还能够在宿主细胞内复制。表达载体可以是原核生物或真核生物的,并且一般是病毒或质粒。表达载体包括在重组细胞中起作用(即指导基因表达)的任何载体,包括在细菌、真菌、内寄生虫、节肢动物、动物和植物细胞中。本发明的载体还可以用于在无细胞表达系统中产生多肽,此种系统是本领域众所周知的。

[0433] 如本文所使用的,“可操作地连接”指 2 个或更多个核酸(例如 DNA)区段之间的功能关系。一般地,它指转录调节元件与转录序列的功能关系。例如,启动子与编码序列例如本文限定的多核苷酸可操作地连接,如果它在合适宿主细胞和/或在无细胞表达系统中刺激或调节编码序列的转录。一般地,与转录序列可操作地连接的启动子转录调节元件与转录序列在物理上邻接,即它们是顺式作用的。然而,某些转录调节元件例如增强子无需与它们增强其转录的编码序列在物理上邻接或位于紧密接近中。

[0434] 特别地,本发明的表达载体包含调节序列,例如转录控制序列、翻译控制序列、复制起点、和其他调节序列,其与重组细胞相容并且控制本发明的多核苷酸分子的表达。特别地,本发明的重组分子包括转录控制序列。转录控制序列是控制转录起始、延伸和终止的序列。特别重要的转录控制序列是控制转录起始的那些,例如启动子、增强子、操纵子和抑制子序列。合适的转录控制序列包括可以在本发明的至少一种重组细胞中起作用的任何转录控制序列。各种此类转录控制序列是本领域技术人员已知的。优选的转录控制序列包括在细菌、酵母、节肢动物、线虫动物、植物或动物细胞中起作用的那些,例如但不限于 tac、lac、trp、trc、oxy-pro、omp/lpp、rrnB、噬菌体 λ 、噬菌体 T7、T7lac、噬菌体 T3、噬菌体 SP6、噬菌体 SP01、金属硫蛋白、 α -交配因子、毕赤酵母属醇氧化酶、甲病毒属亚基因组启动子(例如辛德比斯病毒亚基因组启动子)、抗生素抗性基因、杆状病毒、玉米夜蛾(*Heliothis zea*)昆虫病毒、痘苗病毒、疱疹病毒、浣熊痘病毒、其他痘病毒、腺病毒、巨细胞病毒(例如立即早期启动子)、猿猴病毒 40、逆转录病毒、肌动蛋白、逆转录病毒长末端重复、劳斯肉瘤病毒、热休克、磷酸盐和硝酸盐转录控制序列以及能够控制原核生物或真核生物细胞中的基因表达的其他序列。

[0435] 宿主细胞

[0436] 本发明的另一个实施方案包括重组细胞或其后代细胞,所述重组细胞包括由本文描述的一种或多种重组分子转化的宿主细胞。多核苷酸分子转化到细胞内可以通过将多核苷酸分子插入细胞内的任何方法来完成。转化技术包括但不限于转染、电穿孔、显微注射、脂质转染、吸附和原生质体融合。重组细胞可以保持单细胞的,或可以生长成组织、器官或多细胞生物体。本发明的转化的多核苷酸分子可以保持为染色体外的,或可以以这样的方式整合到转化(即重组)细胞染色体内的一个或多个位点内,使得保留它们待表达的能力。

[0437] 对于转化的合适宿主细胞包括可以用本发明的多核苷酸转化的任何细胞。本发明的宿主细胞可以内源地(即天然)能够产生本文描述的多肽,或可以在用如本文所描述的至少一种多核苷酸分子转化后能够产生此种多肽。本发明的宿主细胞可以是能够产生本文限定的至少一种蛋白质的任何细胞,并且包括细菌、真菌(包括酵母)、寄生虫、线虫动物、节肢动物、动物和植物细胞。宿主细胞的例子包括沙门菌属、埃希氏菌属(*Escherichia*)、

芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、李斯特菌属 (*Listeria*)、酵母菌属 (*Saccharomyces*)、斜纹夜蛾属 (*Spodoptera*)、分枝杆菌属、粉纹夜蛾 (*Trichoplusia*)、BHK(幼仓鼠肾)细胞、CHO细胞、293细胞、EL4细胞、MDCK细胞、CRFK细胞、CV-1细胞、COS(例如COS-7)细胞和Vero细胞。宿主细胞的进一步例子是大肠杆菌,包括大肠杆菌K-12衍生物;伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi*);鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*)包括减毒株;草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*);粉纹夜蛾;和非致瘤性小鼠成肌细胞G8细胞(例如ATCC CRL 1246)。

[0438] 重组DNA技术可以用于改善转化的多核苷酸分子的表达,通过操纵例如多核苷酸分子在宿主细胞内的拷贝数、这些多核苷酸分子的转录效率、所得到的转录物的翻译效率、和翻译后修饰的效率。用于增加本发明的多核苷酸分子表达的重组技术包括但不限于,使多核苷酸分子与高拷贝数质粒可操作地连接、多核苷酸分子整合到一个或多个宿主细胞染色体、给质粒添加载体稳定性序列、转录控制信号(例如,启动子、操纵子、增强子)的置换或修饰、翻译控制信号(例如,核酶结合位点、夏因-达尔加诺(Shine-Dalgarno)序列)的置换或修饰、本发明的多核苷酸分子的修饰以与宿主细胞的密码子使用相对应、和使转录物去稳定的序列的缺失。

[0439] 转基因植物

[0440] 术语“植物”指全植物、植物器官(例如叶、茎、根等)、种子、植物细胞等。考虑在本发明的实践中使用的植物包括单子叶植物和双子叶植物。靶植物包括但不限于下述:谷类植物(小麦、大麦、黑麦、燕麦、稻、高粱和相关农作物);甜菜(糖甜菜和饲料甜菜);梨果、核果和浆果(苹果、梨、李子、桃、扁桃、樱桃、草莓、覆盆子和黑莓);豆科植物(豆、小扁豆、豌豆、大豆);油料植物(油菜、芥末、白罂粟、橄榄、向日葵、椰子、蓖麻油植物、可可豆、落花生);黄瓜植物(葫芦、黄瓜、甜瓜);纤维植物(棉花、亚麻、大麻、黄麻);柑橘类水果(橙、柠檬、葡萄柚、桔);蔬菜(菠菜、莴苣、芦笋、甘蓝、胡萝卜、洋葱、番茄、马铃薯、红辣椒);樟科(鳄梨、肉桂、樟脑);或植物例如玉蜀黍、烟草、坚果、咖啡、甘蔗、茶、葡萄、蛇麻草、草坪草、香蕉和天然橡胶植物,以及观赏植物(花、灌木、阔叶树和常绿植物,例如针叶树)。

[0441] 如在本发明的背景中限定的转基因植物包括植物(以及所述植物的部分和细胞)及其后代,其已使用重组技术进行遗传修饰,以引起本发明的至少一种多肽和/或多核苷酸在所需植物或植物器官中的产生。转基因植物可以使用本领域已知的技术产生,例如A. Slater等人, *Plant Biotechnology-The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press(2003),和P. Christou和H. Klee, *Handbook of Plant Biotechnology*, John Wiley and Sons(2004)中一般描述的那些。

[0442] 本发明的多核苷酸可以在发育的所有阶段期间在转基因植物中组成性表达。依赖于植物或植物器官的使用,多核苷酸可以以阶段特异性方式表达。此外,多核苷酸可以组织特异性表达。

[0443] 已知或发现引起目的多核苷酸在植物中表达的调节序列可以在本发明中使用。所使用的调节序列的选择依赖于目的靶植物和/或靶器官。此种调节序列可以得自植物或植物病毒,或可以是化学合成的。此种调节序列是本领域技术人员众所周知的。

[0444] 组成型植物启动子是众所周知的。除先前提及的启动子外,某些其他合适的启动子包括但不限于胭脂碱合酶启动子、章鱼碱合酶启动子、CaMV 35S启动子、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶启动子、基于Adh1的pEmu、Act1、SAM合酶启动子和Ubi启动子和叶绿素a/b结

合蛋白质的启动子。备选地,可能希望具有以调节方式表达的一种或多种转基因。多核苷酸的调节表达可能是通过将编码序列置于启动子的控制下,所述启动子是组织特异性、发育特异性或诱导型的。已报告了植物中的数种组织特异性调节基因和 / 或启动子。这些包括编码种子储藏蛋白(例如油菜籽蛋白、十字花科蛋白(cruciferin)、 β -伴大豆球蛋白、大豆球蛋白和菜豆球蛋白)、玉米蛋白或油体蛋白(例如油质蛋白)的基因,或涉及脂肪酸生物合成(包括酰基载体蛋白质、硬脂酰-ACP 去饱和酶、和脂肪酸去饱和酶(fad 2-1))的基因,和在胚胎发育过程中表达的其他基因(例如 Bce4)。对于种子特异性表达特别有用的是豌豆球蛋白启动子。用于在成熟叶中表达的其他有用启动子是在衰老发作时开启的启动子,例如来自拟南芥属(Arabidopsis)的 SAG 启动子。在开花时或在开花期间直到果实发育时,至少直至成熟开始时表达的一类果实特异性启动子,在 US 4,943,674 中讨论。组织特异性启动子的其他例子包括这样的启动子,其在对叶的损害(例如,来自咀嚼昆虫)后在叶细胞、在块茎(例如,patatin 基因启动子)和在纤维细胞(发育调节的纤维细胞蛋白质的例子是 E6 纤维)中指导表达。

[0445] 数种技术可用于将包含目的核酸序列的表达构建体引入靶植物内。此种技术包括但不限于使用钙 / 聚乙二醇方法的原生质体转化、电穿孔和显微注射或(包被)粒子轰击。除这些所谓的直接 DNA 转化方法外,涉及载体的转化系统是广泛可用的,例如病毒和细菌载体(例如,来自土壤杆菌属(Agrobacterium))。在选择和 / 或筛选后,使用本领域已知的方法,已转化的原生质体、细胞或植物部分可以再生成全植物。转化和 / 或再生技术的选择对于本发明不是关键的。

[0446] 为了证实转基因在转基因细胞和植物中的存在,可以使用本领域技术人员已知的方法执行聚合酶链反应(PCR)扩增或 Southern 印迹分析。依赖于产物性质,转基因的表达产物可以以各种方法中的任何进行检测,并且包括 Western 印迹和酶测定法。定量表达且检测不同植物组织中的复制的一种特别有用的方法是使用报道基因,例如 GUS。获得转基因植物后,可以使它们生长,以产生具有所需表型的植物组织或部分。可以收获植物组织或植物部分,和 / 或收集种子。种子可以充当资源用于生长具有所需特征的组织或部分的另外植物。

[0447] 转基因非人动物

[0448] 本发明的转基因非人动物可以广泛分类为 2 个类型:“敲除”和“敲入”。“敲除”经由引入转基因序列具有靶基因中的改变,这导致靶基因功能的降低,优选使得靶基因表达是不明显或无法检测的。“敲入”是在宿主细胞基因组中具有改变的转基因动物,这导致靶基因的增强表达,例如通过引入靶基因的另外拷贝或通过可操作地插入调节序列,所述调节序列提供靶基因的内源拷贝的增强表达。就靶基因而言,敲入或敲除转基因动物可以是异源或同源的。

[0449] 用于产生转基因动物的技术的本领域众所周知的。关于这个主题有用的一般课本是 Houdebine, Transgenic animals-Generation and Use, Harwood Academic, (1997)。

[0450] 异源 DNA 可以引入例如受精哺乳动物卵内。例如,通过显微注射、磷酸钙介导的沉淀、脂质体融合、逆转录病毒感染、电穿孔或其他方法,可以转化胚胎全能或多能干细胞,随后将转化细胞引入胚胎内,并且胚胎随后发育成转基因动物。在高度优选的方法中,用包含所需 DNA 的逆转录病毒感染发育中的胚胎,并且从受感染胚胎产生转基因动物。在另一种

优选方法中,然而,将合适 DNA 共注射到胚胎的原核或细胞质内,优选在单细胞阶段时,并且允许胚胎发育成成熟转基因动物。

[0451] 用于产生转基因动物的另一种方法涉及通过标准方法将核酸显微注射到原核阶段的卵内。随后在转移到假孕接受者的输卵管内前培养经注射的卵。

[0452] 还可以通过核转移技术来产生转基因动物。使用这种方法,用质粒稳定转染来自供体动物的成纤维细胞,所述质粒掺入在调节序列的控制下的关于目的结合结构域或结合配偶体的编码序列。随后使稳定转染子与无核卵母细胞融合,培养且转移到雌性接受者内。

[0453] 基因疗法

[0454] 可以依照本发明采用本文描述的转录多核苷酸分子,通过以通常称为“基因疗法”的治疗模式表达此种多核苷酸。例如,编码人 5B6 的多核苷酸(例如,SEQ ID NO:1)或其片段可以在基因疗法技术中采用而用于治疗疾病。因此,来自患者的细胞可以用多核苷酸例如 DNA 或 RNA 进行改造,以离体编码多肽。随后将经改造的细胞提供给待用多肽治疗的患者。在这个实施方案中,细胞可以离体进行改造,例如,通过使用包含编码本文所述多肽的 RNA 的逆转录病毒质粒载体,可以用于转化例如干细胞或分化的干细胞。此种方法是本领域众所周知的,并且根据本文教导,它们在本发明中的使用将是显而易见的。

[0455] 进一步地,细胞可以通过本领域已知的操作在体内进行改造,用于在体内表达多肽。例如,编码如本文所描述的多肽的多核苷酸可以进行改造,用于在复制缺陷型逆转录病毒载体或腺病毒载体或其他载体(例如,痘病毒载体)中表达。随后可以分离表达构建体。用包含编码如本文所述多肽例如人 5B6 的 RNA 的质粒载体转导包装细胞,从而使得包装细胞目前产生包含目的基因的感染性病毒颗粒。这些生产细胞可以施用于患者,用于在体内改造细胞和在体内表达多肽。根据本发明的教导,用于施用多肽的这些和其他方法对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0456] 衍生出上文提及的逆转录病毒质粒载体的逆转录病毒包括但不限于,莫洛尼鼠白血病毒、脾坏死病毒、劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病毒、长臂猿白血病毒、人免疫缺陷病毒、腺病毒、骨髓组织增生肉瘤病毒、和乳腺癌病毒。在一个优选实施方案中,逆转录病毒质粒载体衍生自莫洛尼鼠白血病毒。

[0457] 此种载体将包括一种或多种启动子用于表达多肽。可以采用的合适启动子包括但不限于,逆转录病毒 LTR;SV40 启动子;和人巨细胞病毒(CMV)启动子。还可以使用细胞启动子例如真核细胞启动子,包括但不限于,组蛋白、RNA 聚合酶 III、金属硫蛋白启动子、热休克启动子、白蛋白启动子、5B6 启动子、人珠蛋白启动子和 β -肌动蛋白启动子。可以采用的另外病毒启动子包括但不限于,腺病毒启动子、胸苷激酶(TK)启动子、和 B19 细小病毒启动子。根据本文包含的教导,合适启动子的选择对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0458] 逆转录病毒质粒载体可以用于转导包装细胞系,以形成生产细胞系。可以转染的包装细胞系的例子包括但不限于,PE501、PA317、Y-2、Y-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、YCRE、YCRIP、GP+E-86、GP+envAm12、和 DAN 细胞系,如由 Miller(1990)描述。载体可以通过本领域已知的任何方法转导到包装细胞内。此种方法包括但不限于,电穿孔、脂质体的使用、和 CaPO_4 沉淀。在一种备选方法中,可以将逆转录病毒质粒载体封装在脂质体内,或与脂质偶联,并且随后施用于宿主。

[0459] 生产细胞系将产生感染性逆转录病毒载体颗粒,其包括编码多肽的一种或多种核

酸序列。此种逆转录病毒载体颗粒随后可以用于在体外或在体内转导真核细胞。经转导的真核细胞将表达编码多肽的一种或多种核酸序列。可以转导的真核细胞的例子包括但不限于，胚胎干细胞、胚胎癌细胞、以及造血干细胞、肝细胞、成纤维细胞、成肌细胞、角化细胞、肌细胞（特别是骨骼肌细胞）、内皮细胞和支气管上皮细胞。

[0460] 依照本发明的基因疗法可以涉及基因疗法多核苷酸在患者中的瞬时（短暂）存在或多核苷酸永久引入患者内。

[0461] 基因疗法如同本文讨论的试剂的直接施用，依照本发明可以单独使用或与其他治疗模式结合使用。

[0462] 药物组合物、剂量和施用途径

[0463] 包括结合 5B6 的化合物连同可接受的载体或稀释剂的组合物在本发明的方法中。还提供的是包括本发明的多肽、多核苷酸、载体、植物、提取物、细胞系和 / 或宿主细胞的组合物。

[0464] 治疗组合物可以通过下述进行制备：使具有合适纯度的所需组分（例如结合 5B6 的化合物）与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂（Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编辑 (1980)）相混合，以冻干制剂、水溶液或水悬浮液的形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂优选在所采用的剂量和浓度下对于接受者是无毒的，并且包括缓冲剂例如 Tris、HEPES、PIPES、磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂（例如十八基二甲基苄基氯化铵；氯化六甲双铵；苯扎氯铵、苄索氯铵；苯酚；丁醇或苯甲醇；烷基对羟基苯甲酸酯例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚）；低分子量（小于约 10 个残基）多肽；蛋白质例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或糊精；糖例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐抗衡离子例如钠；和 / 或非离子型表面活性剂例如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

[0465] 此种载体的另外例子包括离子交换剂、铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白质例如人血清白蛋白、缓冲物质例如甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和蔬菜脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐、或电解质例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、硫酸氢钾、氯化钠、胶体硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮和基于纤维素的物质。

[0466] 用于在体内施用的治疗组合物应是无菌的。这经由在冻干和重构前或后通过无菌滤膜过滤容易地完成。如果全身性施用，那么组合物可以以冻干形式和在溶液中贮藏。如果以冻干形式，那么它一般与其他成分相组合进行配制，用于在使用时用合适稀释剂进行重构。液体制剂的例子是填入用于皮下注射的单次剂量小瓶中的无菌、澄清、无色的无防腐剂溶液。

[0467] 治疗组合物一般置于具有无菌接入口的容器内，例如具有可通过皮下注射针穿透的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。组合物优选例如作为静脉内注射或输注以皮下、静脉内、腹膜内、肌肉或肠胃外施用，或施用到体腔内。

[0468] 化合物可以以约 0.001 至 2000mg/kg 体重 / 剂量的量施用，并且更优选约 0.01 至 500mg/kg 体重 / 剂量。重复剂量可以如由治疗医生开处方地施用。

[0469] 依赖于如由患者需要且耐受的剂量和频率，施用组合物的单次或多次施用。剂量

和频率一般将根据对于每个患者特异的因素而改变,依赖于所施用的特定治疗或预防剂,疾病严重度和类型或所需免疫应答,施用途径,以及患者的年龄、体重、应答和既往病史。合适方案可以由本领域技术人员通过考虑这些因素且通过下述进行选择,例如在参考文献中报告且在 Physician' s Desk Reference, 第 56 版, (2002) 中建议的剂量。一般地,剂量是足以治疗或改善疾病症状或体征,而不产生对患者无法接受的毒性。

[0470] 在本发明的另一个例子中,结合 5B6 的化合物与抗原缀合,所述抗原例如癌或者病原体或传染性生物体的抗原,并且作为疫苗通过肌内、皮下或静脉内注射或经口递送,以增强体液和 / 或 T 细胞介导的免疫应答。在另一个例子中,与自身抗原或变应性抗原缀合的、结合 5B6 的化合物可以用于递送抗原,以便减少与对于 33D1 和 DEC-205 描述 (Bonifaz 等人, 2002 ;Finkelman 等人, 1996) 的那种相似的免疫应答。

[0471] 在本发明的另一个例子中,将放射性标记物形式的结合 5B6 的化合物作为治疗剂,通过静脉内注射递送给表达 5B6 的靶细胞。放射性标记的抗体的先前例子和关于其作为治疗剂施用于患者的方法是本领域技术人员已知的。例子包括针对 HLA-DR 的 β 亚单位的碘 ¹³¹ 标记的 Lym-1 和抗 CD20 钢 ¹¹¹ 以及钷 ⁹⁰ 标记的替伊莫单抗 Tiuxetan (IDEC-Y2B8, **ZEVALIN**[®]) 和碘 I 131 托西莫单抗 (**BEXXAR**[®])。

[0472] 在一个实施方案中,组合物不包括佐剂。在另一个实施方案中,组合物的确包括佐剂。佐剂的例子包括但不限于,氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝钾 (明矾)、胞壁酰二肽、细菌内毒素、脂质 X、聚核糖核苷酸、海藻酸钠、羊毛脂、溶血卵磷脂、维生素 A、皂苷、脂质体、左旋咪唑、DEAE- 葡聚糖、嵌段共聚物或其他合成佐剂。此种佐剂从各种来源商购可得,例如 Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N. J.) 或弗氏不完全佐剂和完全制剂 (Difco Laboratories, Detroit, Mich.)。

[0473] 在一个实施方案中,组合物包括脂质体或膜囊。此种脂质体的例子在 US 2007/0026057, Leserman (2004) 和 van Broekhoven 等人 (2004) 中描述。在这些情况下,本发明的化合物可以用于将脂质体靶向树突状细胞或其前体,和 / 或用于增强例如化合物 - 抗原缀合物向树突状细胞或其前体的递送。如 US 2007/0026047 中概述的,用于制备在本发明中使用的膜囊的过程在 WO 00/64471 中描述。

[0474] 用于诱导 / 增强免疫应答的组合物通常以肠胃外、通过注射例如皮下、肌内或静脉内进行施用。适合于其他施用方式的另外制剂包括栓剂,并且在某些情况下口服制剂。对于栓剂,传统粘合剂和载体可以包括例如聚烷撑二醇或甘油三酯;此种栓剂可以由混合物形成,所述混合物包含 0.5% 至 10%, 优选 1% 至 2% 范围中的活性成分。口服制剂包括此种通常采用的赋形剂,如例如药物级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采取溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂或粉剂的形式,并且包含 10% 至 95% 活性成分, 优选 25% 至 70%。如果疫苗组合物是冻干的,可以在施用前重构冻干材料,例如作为悬浮液。重构优选在缓冲液中实现。用于经口施用于患者的胶囊、片剂和丸剂可以与肠包衣一起提供,所述肠包衣包括例如 Eudragit" S"、Eudragit" L"、乙酸钠纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素或羟丙基甲基纤维素。

[0475] 在任何治疗方案中,治疗组合物都可以单独或在包含其他治疗剂、组合物等的混合物中施用于患者。

[0476] 在一个实施方案中,通过使用编码与抗原缀合的本发明的化合物的 DNA 疫苗调节

免疫应答。DNA 疫苗接种涉及将编码抗原的 DNA 直接在体内引入受试者的组织内,用于由受试者组织的细胞表达抗原。此种疫苗在本文中命名为“DNA 疫苗”或“基于核酸疫苗”。DNA 疫苗在 US 5,939,400、US 6,110,898、WO 95/20660、WO 93/19183、Demangel 等人 (2005) 和 Nchinda 等人 (2008) 中描述。

[0477] 迄今为止,在哺乳动物系统中的大多数 DNA 疫苗已依赖于衍生自巨细胞病毒 (CMV) 的病毒启动子。这些在许多哺乳动物物种中在肌肉和皮肤接种中具有良好的功效。已知影响由 DNA 免疫接种引发的免疫应答的因素是 DNA 递送的方法,例如肠胃外途径可以产生低基因转移率,并且产生相当大的基因表达变异性。使用基因枪的质粒高速接种增强小鼠的免疫应答,推测是由于更大的 DNA 转染效率和由树突状细胞的更有效抗原呈递。还可以通过本领域已知的其他方法将包含本发明的基于核酸疫苗的载体引入所需宿主内,例如转染、电穿孔、显微注射、转导、细胞融合、DEAE 葡聚糖、磷酸钙沉淀、脂质转染 (脂质体融合) 或 DNA 载体转运蛋白。

[0478] 可以使用本领域众所周知的操作构建产生抗原多肽的转基因植物。目前对于动物和人病原体开发了许多植物衍生的可食用疫苗。免疫应答也已起因于用产生病毒样颗粒 (VLP) 的转基因植物,或展示抗原表位的嵌合植物病毒的经口免疫。已提出颗粒形式的这些 VLP 或嵌合病毒可以导致抗原在胃中更大的稳定性,有效增加可用于摄取到肠中的抗原量。

[0479] 实施例

[0480] 材料与方法

[0481] 小鼠

[0482] 在 The Walter and Eliza Hall Institute (WEHI) 在无特异病原体条件下繁殖 C57BL/6J Wehi、C57/BL6Ly5.1 和 OVA- 特异性 CD8 (OT-I) 和 CD4 (OT-II) TCR- 转基因 C57BL/6 背景小鼠。使在 C57BL/6 上回交的 TRIF^{-/-} (Yamamoto 等人,2003) 和 MyD88^{-/-} (Adachi 等人,1998) 杂交繁殖,以衍生 TRIF^{-/-} MyD88^{-/-} 双重敲除小鼠。在 C57BL/6 上回交的 FcR γ 链^{-/-} 小鼠 (Van de Velde 等人,2006) 得自 Burnet Institute, Austin。使用在 6-12 周龄的雌性小鼠;备选地,产生性别年龄匹配同期组群。动物根据 National Health and Medical Research Council of Australia 的指导进行处理。实验操作得到 Animal Ethics Committee, WEHI 批准。

[0483] 5B6 的序列鉴定

[0484] 使用 Big Dye Terminator 版本 3.1 (Applied Biosystems, Victoria, Australia) 和 200ng 质粒 DNA 执行测序,并且在 ABI 3730x196- 毛细管自动化 DNA 测序仪上实施电泳。使用 National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), 通过基本局部比对搜索工具 (BLAST) 执行序列与已表达序列标签、cDNA 和蛋白质数据库的比较。使用 University of California Santa Cruz, Genome Browser (www.genome.ucsc.edu/), 通过 BLAT 比对执行对小鼠集合 (2006 年 2 月) 和人集合 (2006 年 3 月) 的基因组定位。定量 RT-PCR

[0485] RNA (多至 1 μ g) 用 RQ1 DNA 酶 (Promega) 进行 DNA 酶处理,并且随后使用随机引物 (Promega) 和 Superscript II 逆转录酶 (GibcoBRL, Geithersburg, MD) 逆转录成 cDNA。使用 Quantitect SYBR Green PCR 试剂盒 (Qiagen) 和 Light 循环仪 (Roche, Victoria; Australia), 执行实时逆转录 PCR (RT-PCR), 以测定造血细胞中的 5B6 和 Gapdh 表达。关于

实时 RT-PCR 的特定引物如下:5B6 ;5' -TGTGACTGCTCCCACAACCTGGA-3' (SEQ ID NO :17) ;5' -TTTGCACCAATCACAGCACAGA-3' (SEQ ID NO :18),Gapdh ;5' -CATTTCAGTGGCAAAGTGGAG-3' (SEQ ID NO :19) ;5' -GTCTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3' (SEQ ID NO :20)。于 95°C 15 分钟的起始活化步骤随后为 40 个循环:于 94°C 15 秒(变性)、于 50-60°C 20-30 秒(退火)和于 72°C 10-12 秒(延伸),随后解链温度分析。使用由 10^{-2} - 10^{-6} pg 特定 DNA 片段制备的标准曲线测定关于每种基因的表达水平,并且表示为相对于 Gapdh 的比。

[0486] 5B6 的重组表面表达

[0487] 使用 Advantage cDNA 聚合酶(Clontech)和下述引物,通过 PCR 扩增从脾 DC cDNA 分离全长小鼠和 5B6(m5B6 和 h5B6):[5B6 ;5' -GCCATTTCTTGTACCAACCTACTCCT-3' (SEQ ID NO :21) ;5' -CGGTGTGGTATGGATCGTCACTT-3' (SEQ ID NO :22)], [h5B6 ;5' -AGCCTCCTGTGTGGA CTGCTTT-3' (SEQ ID NO :23) ;5' -TTCATGGCCCACATTTTGGTTT-3' (SEQ ID NO :24)], 并且将所得到的产物亚克隆到 pGemT esay 质粒(Promega)内。m5B6 和 h5B6 在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的表面上作为 C 末端(细胞外)FLAG 标签的蛋白质进行表达,并且在小鼠 EL4 细胞的表面上作为融合蛋白进行表达,其中绿色荧光蛋白(GFP)与 5B6 的 N 末端细胞质结构域融合。为了产生 FLAG 标签的蛋白质,使用 Advantage 高保真度聚合酶(Clontech)扩增 5B6 编码 cDNA,用 AscI 和 Mlu-1 进行限制性消化,并且亚克隆 pEF-Bos 载体内,所述 pEF-Bos 载体经修饰以包含 FLAG 表位(由 Dr T. Willson ;WEH I 友情捐赠)。

[0488] CHO 细胞通过电穿孔(Gene Pulsar, Biorad, NSW, Australia)用 pEF-Bos-5B6 凝集素和 pGK-neo 质粒进行共转染,所述 pGK-neo 质粒包含新霉素磷酸转移酶基因,并且用 1mg/ml G418(Geneticin, Life Technologies)选择转染子。5B6 凝集素阳性细胞用大鼠抗 FLAGmAb,随后为抗大鼠 Ig-PE(Caltag)进行染色,并且随后通过流式细胞术分选进行分离。在电穿孔到 EL4 细胞内且用 1mg/ml G418 选择前,通过下述产生 GFP 标记物的蛋白质:扩增 5B6 凝集素编码 cDNA、用 EcoRI 限制性消化且亚克隆到 pEGFP-C2 载体(Clontech)内。通过 GFP 阳性细胞的流式细胞术分选来分离 5B6 阳性细胞。在电穿孔到 CHO 细胞内且用 1mg/ml G418 选择前,通过下述产生全长未标签的蛋白质:扩增 5B6 凝集素编码 cDNA、用 EcoRI 限制性消化且亚克隆到 pIRES-Neo 载体内。

[0489] 针对 C 型凝集素的 mAb 的产生

[0490] Wistar 大鼠用 50 μ g 钥孔血蓝蛋白(KLH)缀合的下述肽或表达 5B6-FLAG 的 1×10^7 个 CHO 细胞,以 4 周间隔免疫接种 3 至 4 次:5B6 小鼠肽(H-DGSSPLSDLLPAERQRSAGQIC-OH)(SEQ ID NO :29)、人肽(H-RWLWQDGSSPSPGLLPAERSQSANQV C-OH)(SEQ ID NO :30),并且在与 Sp2/0 骨髓瘤细胞融合前 4 天给予最后一次加强。使用表达 C 型 5B6-FLAG 的 CHO 细胞和表达 GFP-5B6 的 EL4 细胞,通过上清液的流式细胞术分析鉴定分泌特异性 mAb 的杂交瘤。产生对小鼠 5B6 和人 5B6 各自显示特异性反应性的杂交瘤。

[0491] 总之,产生下述 mAb 且在本研究中利用,2 种大鼠 mAb 24/04-10B4(来自肽免疫)和 42/04-42D2(来自 CHO-5B6-FLAG 免疫)针对小鼠 5B6(m5B6)产生。2 种大鼠抗体 20/05-3A4 和 23/05-4C6(来自 h5B6 肽免疫)针对 h5B6 产生。还发现大鼠 mAb 24/04-10B4 识别人 5B6。抗 5B6 抗体 10B4 的克隆、表达和测序

[0492] 根据制造商的建议,使用 Qiagen RNeasy 微型试剂盒(Qiagen)与柱上 DNA 酶消化,从杂交瘤 24/04-10B4-24-8-FACS9-5 中分离总 RNA。根据制造商的建议,使

用 SMART RACE cDNA Amplification 试剂盒 (Clontech) 制备 5' RACE ready cDNA, 并且使用制造商建议的通用引物和下述基因特异性引物扩增抗体的重链和轻链序列: (IgG2a 基因特异性引物:CCAGGGCAGTGCTGGGTGCTT (SEQ ID NO:52), κ 基因特异性引物:ACGGGTGAGGATGATGTCTTATGAACAA) (SEQ ID NO:53)。将所得到的 PCR 片段亚克隆到 pGemTeasy 质粒 (Promega) 内并且进行测序。使用 [TAGTAGGAATTCAGCACTGACAACAGAACCTTAA GCAGTATG (SEQ IDNO:54); TAGTAGCGCGCCGCTTACCAGGAGAGTGGGAGAGACTCTTCTC (SEQ IDNO:55)] 扩增全长 IgG2a 重链, 并且使用 [TAGTAGGAATTCGGCGCGCTCAAACAGGCAGGAGCAAGATG (SEQ ID NO:56); TAGTAGCGCGCCGACGCGTCTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGACGACGGGTGAGGA TGATGTCTTATGAACAA (SEQ ID NO:57)] 和 Hotstar DNA 聚合酶 (Qiagen) 扩增全长 κ 链。

[0493] PCR 产物使用 Qiaquick spin Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen) 进行凝胶切割并纯化, 用 EcoRI 和 NotI 酶消化, 并且使用 Minelute PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 再次纯化。将 κ 链亚克隆 pcDNA 3.1 (Invitrogen) 内。将重链亚克隆到 pcDNA 3.1 载体内, 所述 pcDNA 3.1 载体经修饰以在 pcDNA 3.1 的 NotI-XbaI 区域中包含与可溶性 Ova cDNA 插入片段融合的 Ala-Ala-Ala 接头 (内部产生)。这种构建体使得能够产生单个融合蛋白, 其中重链的 C 末端区域与丙氨酸接头和 ova 融合。使用 Endo-free Plasmid DNA 提取试剂盒 (Qiagen) 制备质粒 DNA, 并且根据制造商的建议, 将编码 κ 链和与 Ova 连接的重链的质粒瞬时共转染到自由式 293F 细胞 (Invitrogen) 内。瞬时转染后 48 小时收获上清液, 并且就抗 Clec9A-Ova Ab 的存在进行检查。重组 Ab 就其与 CHO 细胞结合的能力进行检查, 所述 CHO 细胞稳定表达全长 (膜结合) 5B6, 并且使用 2 种方法检测结合: (1) 生物素化 Ova 特异性血清 (Calbiochem) 与链霉亲和素 PE, 和 (2) 抗大鼠 Ig PE (Caltag)。

[0494] DC 的分离和流式细胞术分析

[0495] 如先前所述 (Vremec 等人, 2000) 执行来自淋巴样器官的 DC 分离。简言之, 组织进行机械剁碎, 用胶原酶和 DNA 酶进行消化, 并且用乙二胺四乙酸 (EDTA) 进行处理。通过密度离心 ($1.077\text{g}/\text{cm}^3$ Nycodenz, Axis-Shield, Oslo, Norway) 富集低密度细胞。用 mAb (KT3-1.1, 抗 CD3; T24/31.7, 抗 Thy1; TER119, 抗红细胞; ID3, 抗 CD19; 和 1A8, 抗 Ly6G) 包被非 DC 谱系细胞, 并且随后使用抗大鼠 Ig 磁珠 (Biomag beads, QIAGEN, Victoria, Australia) 去除。通过去除红血细胞 (RBC) ($0.168\text{M NH}_4\text{Cl}$; 在 4°C 下 5 分钟) 和如上耗尽无关细胞来富集血液 DC, 除 mAb 混合物还包含 mAb F4/80 外。使用大鼠 Ig 和抗 FcR mAb (2.4G2) 阻断 DC 富集群体, 随后用针对 CD11c (N418)、CD205 (NLDC-145)、CD4 (GK1.5)、CD8 (YTS169.4)、CD24 (M1/69)、120G8 或 CD45RA (14.8)、Sirp α (p84) 和 m5B6 (24/04-10B4-生物素) 的荧光物缀合的 mAb 染色。

[0496] cDC 选择为 $\text{CD11c}^{\text{hi}}\text{CD45RA}^-$ 或 $\text{CD11c}^{\text{hi}}120\text{G8}^-$; 脾 cDC 进一步再分成 $\text{CD4}^+\text{cDC}$ ($\text{CD11c}^{\text{hi}}\text{CD45RA}^-\text{CD4}^+\text{CD8}^-$)、双阴性 (DN) cDC ($\text{CD11c}^{\text{hi}}\text{CD45RA}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^-$) 和 $\text{CD8}^+\text{cDC}$ ($\text{CD11c}^{\text{hi}}\text{CD45RA}^-\text{CD8}^+\text{CD4}^-$); 胸腺 DC 再分成 $\text{CD8}^-\text{cDC}$ (Sirp $\alpha^{\text{hi}}\text{CD8}^{10}$) 和 $\text{CD8}^+\text{cDC}$ (Sirp $\alpha^{10}\text{CD8}^{\text{hi}}$); 并且 LN cDC 再分成 $\text{CD8}^-\text{cDC}$ ($\text{CD11c}^{\text{hi}}\text{CD205}^-\text{CD8}^-$)、皮肤 DC ($\text{CD11c}^+\text{CD25}^{\text{int}}\text{CD8}^-$)、朗格罕氏细胞 ($\text{CD11c}^+\text{CD205}^{\text{hi}}\text{CD8}^-$) 和 $\text{CD8}^+\text{cDC}$ ($\text{CD11c}^+\text{CD205}^{\text{hi}}\text{CD8}^+$), 如先前所述 (Lahoud 等人, 2006)。pDC 分离为 $\text{CD11c}^{\text{int}}\text{CD45RA}^+$ 或 $\text{CD11c}^{\text{int}}120\text{G8}^+$ 。使用链霉亲和素 (SA)-藻红蛋白 (PE) 检测生物素染色。分析在各种 DC 群体上的 m5B6 表达, 并且与同种型对照染色 (IgG2a, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) 相比较。在 LSR II (Becton

Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 上执行流式细胞术分析,排除自体荧光和碘化丙啶(PI) 阳性死细胞。

[0497] 人血液 DC 和造血细胞的分离和流式细胞术分析

[0498] 使用 Ficol1-Pacque-PLUS(GE Healthcare, Rydalmere, NSW, Australia) 密度分离,从人血液中分离外周血单核细胞(PBMC)。血液供体出知情同意书,并且收集得到了 Human Research Ethics Committee, Melbourne Health 的批准。使用大鼠 Ig 和抗 FcR mAb(2.4G2) 阻断 PBMC,随后用针对 HLA-DR 的 mAb(L243 ;Becton Dickinson) 以及针对谱系标记物的 PE 缀合的 mAb 混合物染色,所述 mAb 混合物即 CD3(BW264156 ;T 细胞)、CD14(Tuk4 ;单核细胞)、CD19(6D5 ;B 细胞) 和 CD56(AF12-7H3 ;NK 细胞)。血液 DC 门控为 HLA-DR^{hi}、谱系⁻细胞,并且基于其 BDCA-1(ADJ-8E3)、BDCA-3(AD5-14H2)、BDCA-4(AD5-17F6) 和 CD16(VEP13) 表达进行进一步分离。PBMC 还用作其他造血细胞的来源,所述其他造血细胞使用针对 CD3(BW264156 ;T cells)、CD19(6D5 ;B 细胞)、CD56(AF12-7H3) 和 NKp46(9E2) (CD56⁺NKp46⁺ ;NK 细胞) 和 CD14(Tuk4 ;单核细胞) 的 mAb 进行分离。执行关于 h5B6(20/05-3A4) 表达的染色和流式细胞术分析,排除 PI 阳性死细胞。除非另有说明,所有抗人 mAb 都购自 Miltenyi Biotec(North Ryde, NSW, Australia)。

[0499] 在小鼠造血细胞上的 5B6 的分离和分析

[0500] 制备脾细胞上清液用于 DC 分离(Vremec 等人,2000)。细胞用针对 CD3(KT3-1.1)、CD19(ID3)、NK1.1(PK136)、CD49b(Hm α 2 ;eBioscience, San Diego, CA, USA) 的 mAb 染色,随后选择 B 细胞(CD19⁺CD3⁻)、T 细胞(CD19⁻CD3⁺) 和 NK 细胞(CD49b⁺NK1.1⁺CD3⁻)。首先通过 1.082g/cm³ 密度离心(Nycodenz) 以及 CD3⁺T 细胞和 CD19⁺B 细胞的免疫磁珠耗尽来富集脾巨噬细胞;富集的细胞用针对 CD11b(M1/70) 和 F4/80 的 mAb 进行染色,随后巨噬细胞门控为 CD11b^{hi}F4/80⁺。首先富集关于脾的骨髓巨噬细胞和单核细胞,随后用 CD11b(M1/70) 和 Ly6C(5075-3.6) 染色;单核细胞随后门控为侧面散射^{1o}Ly6C^{hi}CD11b^{hi},并且巨噬细胞门控为 Ly6C^{int}CD11b^{hi}。在用包括抗 5B6mAb(10B4-生物素) 的各种 mAb 混合物免疫荧光染色前,所有细胞使用大鼠 Ig 和抗 FcR mAb(2.4G2) 进行封闭。使用链霉亲和素-PE 检测生物素染色。样品在 LSR II(Becton Dickinson) 上就其 5B6 的表达进行分析,排除 PI 阳性死细胞。

[0501] 使用抗 5B6 mAb 的免疫接种

[0502] 小鼠(C57BL6 或 TRIF^{-/-}MyD88^{-/-} 小鼠) 用 10 μ g 大鼠抗 5B6mAb(10B4) 或同种型对照 mAb 1(IgG2a, eBioscience) 或同种型对照 mAb 2(IgG2a, -抗 β -Gal, GL117) 进行皮下(s. c.) 或静脉内(i. v.) 免疫。在 2-8 周时获得血清样品,并且通过 ELISA 测定抗大鼠 Ig 反应性水平。抗 5B6mAb 和 GL117 对照 mAb 也与卵白蛋白(OVA) 进行化学缀合。缀合物进行层析法纯化,以去除游离 OVA 和未缀合的 mAb。mAb 与 OVA 的所需比是 1 : 1,这通过 SDS-PAGE 和考马斯蓝染色加以验证。它们识别靶 Ag 的连续能力通过下述加以验证:用缀合物染色转染的细胞系,并且使用生物素化的 OVA 特异性血清(Calbiochem) 随后为链霉亲和素-PE 检测结合。C57BL6 小鼠用 2.5-10 μ g 10B4-OVA(与 OVA 缀合的抗 5B6mAb) 或对照 -OVA(与 OVA 缀合的同种型对照 GL117mAb) 进行免疫。

[0503] 用于检测血清 Ab 的 ELISA

[0504] ELISA 平板(Costar, Broadway, Cambridge, UK) 用 2 μ g/ml 大鼠 GL117mAb 于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。洗掉未结合的 mAb(PBS, 0.05% Tween-20)。使系列稀释的血清样品铺平

板 (PBS/5%奶粉) 且于 4°C 温育过夜。使用驴抗小鼠 IgG HRP (Chemicon International, Temecula, CA, USA) 检测结合的小鼠抗大鼠 Ig 抗体, 并且使用 ABTS 显现。当光密度超过 0.1 时, 滴度视为阳性的。如上测定抗大鼠同种型应答, 但使用抗小鼠 IgG1-、IgG2b-、IgG2c- 和 IgG3-HRP 缀合物 (1/4000) (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) 进行检测。通过用 10 μ g/ml OVA 包被平板测定抗 OVA 应答, 并且如上检测抗大鼠 Ig 抗体。

[0505] 抗原呈递测定法

[0506] 小鼠用 10 μ g 10B4-OVA (与 OVA 缀合的抗 5B6mAb) 和 GL117-OVA 进行免疫, 并且在 1 天后处死且提取脾。如其他地方所述 (Vremec 等人, 2000) 从脾中分离 DC, 并且通过流式细胞术纯化 CD8⁺ 或 CD8⁻ DC。

[0507] 转基因 T 细胞的纯化和体内增殖测定法

[0508] 纯化转基因 T 细胞, 并且用羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯 (CFSE) (Caminschi 等人, 2006) 进行标记。将 CFSE 标记的细胞 (10^6) i. v. 注射到 C57BL/6Ly5.1 小鼠内。3 天后, 取出脾, 制备细胞悬浮液并且清除 RBC, 随后用针对 CD4 (GK1.5-APC) 或 CD8 (YTS169-APC) 和 Ly5.2 (S. 450-15.2-PE) 的 mAb 进行染色。通过 CFSE 荧光的丧失显现增殖 OT-II (CD4⁺Ly5.2⁺) 或 OT-I (CD8⁺Ly5.2⁺) 细胞, 并且通过加入固定数目的校准珠 (BD Pharmingen) 进行计数。使用 PI 排除死细胞。在 FACSCalibur 仪器 (Becton Dickinson) 上执行分析。

[0509] CFSE 标记的 T 细胞增殖测定法

[0510] 纯化的 OT-I 细胞在 0.1% BSA/PBS 中洗涤 1 次, 随后以 1×10^7 个细胞/ml 重悬浮。加入 CFSE (5mM) (1μ l/ 10^7 个细胞), 并且使细胞于 37°C 温育 10 分钟。加入包含 2.5% FCS 的 RPMI-1640 的培养基, 并且将细胞洗涤 2 次。T 细胞 (5×10^4 个细胞/孔) 与 DC (10^4 个细胞, 或如以其他方式阐述的) 在 U 型底 96 孔板中在 200 μ l DC 培养基 (包含 10% FCS、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、 10^{-4} M 巯基乙醇的改良 RPMI-1640 培养基) 中一起温育。为了在培养后计数 T 细胞, 加入 2.5×10^4 个校准珠 (BD Bioscience Pharmingen)/孔, 并且通过用合适标记物 (抗 TCR-V α 2mAb (B20.1-PE, Pharmingen) 的染色来显现 T 细胞。使用碘化丙啶排除死细胞。在 FACScan 或 FACSCalibur (Becton Dickinson) 上执行分析。通过 CFSE 荧光的丧失鉴定增殖 T 细胞, 并且相对于珠进行计数, 因此允许总增殖 T 细胞/孔的计数。

[0511] 可溶性 5B6 的重组表达

[0512] 为了产生可溶性 5B6, 使用 Advantage 高保真度 2 聚合酶 (Clontech) 和下述引物扩增包含铰链和胞外域区的 cDNA: [m5B6: 5'-TAGTAGACGCGTGAGCAGCAGGAAAGACTCATC-3' (SEQ ID NO:25); 5'-TAGTAGACGCGTTCAGATGCAGGATCCAAATGC-3'] (SEQ ID NO:26), [H5B6: 5'-TAGTAGACGCGTCAGCAGCAAGAAAACTCATC-3' (SEQ IDNO:27); 5'-TAGTAGACGCGTTCAGACAGAGGATCTCAACGC-3'] (SEQ IDNO:28)。扩增的 cDNA 用 Mlu-1 进行限制性消化, 并且亚克隆到 pEF-Bos 载体的 Mlu-1 位点内, 所述 pEF-Bos 载体经修饰以包含由大肠杆菌生物素全酶合成酶 BirA 特异性识别的生物素化共有序列 (肽共有序列 NSGLHHILDAQKMVWNHR (SEQ ID NO:31) 和 FLAG 表位。所得到的凝集素融合构建体因此包括 (以 N 末端次序): IL3 信号序列 (以确保分泌)、生物素化共有肽序列、FLAG 标签、铰链区和凝集素结构域。通过使用 Fugene 在含 8 微克 DNA 的 DMEM-10% FCS/75cm² 烧瓶中瞬时转染 293T 细胞 (由多瘤/SV40 大 T 抗

原稳定转染的人肾上皮细胞系)来表达重组蛋白质。在8小时后,去除培养基,将细胞洗涤2次,随后在10ml X-Vivo-10无蛋白质/无血清培养基(BioWhittaker,Walkersville,MD)中温育36-60小时。收获包含分泌的重组蛋白质的培养基,并且使用10,000mwt截断离心装置(Nanosep 10K Omega, PALL Life Sciences),使来自培养上清液的重组蛋白质浓缩100倍。浓缩蛋白质随后直接使用或使用BIR酶(Avidity, Denver, CO)进行酶促生物素化。

[0513] 使用可溶性5B6的结合测定法

[0514] 用在pIRES Neo中编码全长未标签5B6的表达构建体瞬时转染293T细胞。2-3天后,收获细胞,并且使用(1)可溶性FLAG标签的生物素化m5B6、h5B6和Cire进行表面的免疫荧光标记,且用链霉亲和素PE进行检测,或(2)可溶性FLAG标签的5B6、生物素化抗FLAGmAb 9H10和链霉亲和素-PE进行表面的免疫荧光标记。活细胞在前向和侧面散射上进行门控,或通过碘化丙啶排除,并且就其可溶性5B6的表面结合进行分析。通过与其他可溶性FLAG标签的C型凝集素例如Cire的结合比较证实可溶性5B6的结合特异性。

[0515] ELISA

[0516] 通过捕获/双位点ELISA测定重组可溶性蛋白质分泌。简言之,用纯化的捕获mAb,即抗FLAG 9H10 12.5ug/ml(内部产生)包被96孔聚氯乙烯微量滴定板(Costar, Broadway, Cambridge, UK)。使用生物素化抗m5B6抗体(24/04-10B4)-(2ug/ml)、链霉亲和素-HRP和ABTS底物检测培养上清液。通过捕获/双位点ELISA测定生物素化重组可溶性蛋白质。简言之,用纯化的捕获mAb,即抗FLAG 9H10 12.5ug/ml(内部产生)包被96孔聚氯乙烯微量滴定板(Costar, Broadway, Cambridge, UK)。使用链霉亲和素-HRP和ABTS底物检测培养上清液。

[0517] Flt3配体培养的DC的产生

[0518] 从股骨和胫骨中冲洗出骨髓(BM)细胞,并且通过短暂暴露于0.168M NH₄Cl使红细胞裂解。使细胞重悬浮于10mL DC培养基(包含10% FCS、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、10⁻⁴M巯基乙醇的改良RPMI-1640培养基)中,并且通过离心2-3次进行洗涤。使细胞悬浮液通过筛。使细胞离心并且以1.5×10⁶个细胞/mL重悬浮于DC培养基中。以200-300ng/mL浓度加入Flt3L(FL)。在培养8天后,收获细胞,并且用针对CD11c(N418-PE. Cy7)、Sirpα(p84-FITC)、CD45RA(14.8-PE)和5B6(10B4-APC)的抗体染色。

[0519] 来自骨髓的前体分离

[0520] 如上所述制备BM细胞,并且以1.086g/cm³重悬浮于5mL Nycodenz培养基(Nycomed Pharma)中。细胞悬浮液在5mL相同密度的新鲜培养基上成层,并且进一步的2mL FCS在细胞悬浮液上成层。在2900rpm下离心10分钟后,分离轻密度细胞,并且用针对谱系抗原-CD2、CD3、CD8、CD45R、CD11b、TER119和Ly6G-的抗体进行包被,并且与多克隆绵羊抗大鼠IgG磁珠(Qiagen)以8粒珠/细胞的比一起温育。使用磁铁(Dynal)去除珠,并且用针对CD117(ACK-2-FITC)、干细胞抗原-1(sca-1;E13 161-7-Alexa Fluor 680)和CD34(RAM34-生物素;用链霉亲和素-PE显现)或CD117(ACK-2-FITC)、CD135(A2F10-PE)和CD115(AFS98-生物素;用链霉亲和素-PerCP. Cy5.5显现)的单克隆抗体(mAb)染色未结合的部分。将多潜能前体分离为CD117⁺Sca-1⁺CD34⁺级分。

[0521] 来自培养的DC前体分离

[0522] 如上所述以3×10⁶个细胞/mL浓度提取且培养BM。在培养前,用CFSE(Molecular

Probes) 标记细胞。如先前所述执行 CFSE 标记。简言之,通过在 PBS-BSA 中离心,将细胞洗涤 2 次,并且以 1×10^7 个细胞 /mL 浓度重悬浮。将 CFSE 加入细胞悬浮液中至 $0.5 \mu\text{M}$ 的终浓度,并且使溶液于 37°C 温育 10 分钟伴随间歇混合。细胞随后洗涤 2 次并且重悬浮于 DC 培养基中。

[0523] 在培养 3.5 天后,收获细胞,并且如上所述通过在 Nycodenz 培养基 ($1.086\text{g}/\text{cm}^3$) 中离心分离轻密度细胞。用针对谱系抗原的生物素化抗体 (CD19、CD127、MHC II 类、Ly6G 和 TER119) 包被这些细胞,并且与抗生物素磁珠一起温育。使用 MACS 磁柱 (Myltenyi) 分离结合细胞。耗尽的级分与链霉亲和素-PerCP. Cy5.5 一起温育,以显现任何其余谱系⁺细胞。在洗涤后,细胞用针对 CD11c (N418-PE. Cy7) 和 5B6 (10B4-APC) 的 mAb 组合进行染色。Pre-DC 前体分离为 CFSE^{low} lin⁻CD11c⁺ 细胞。

[0524] 结果

[0525] 脾 DC 子集之间的基因表达模式的比较

[0526] 基因表达谱分析鉴定鼠类 cDNA 克隆,相对于 CD8⁻cDC,其由 CD8⁺cDC 子集优先表达。命名为 5B6 的这种克隆代表在染色体 6 上发现的基因——“假定 C 型凝集素”的片段,其在 CD8⁻DC 中差异表达 (Riken9830005G06,近来命名为 C 型凝集素结构域家族 9、成员 A (Clec9a) Genbank 登记 AK036399.1, Unigene ID Mm.391518)。此外,公众数据库的分析揭示关于 5B6 (HEEE9341) 在染色体 12 上的人直向同源物,近来重命名为 CLEC9A (Genbank 登记 NM_207345)。已鉴定直向同源物存在于其他动物中,例如黑猩猩 (Genbank 登记 XP_001143778)、恒河猴 (XP_001114857)、犬 (Genbank 登记 XP_854151)、牛 (XP_873119)、马 (XP_001493987) 和大鼠 (Genbank 登记 XP_578403)。

[0527] C 型凝集素的鉴定、表在和克隆

[0528] 本发明人通过 PCR 扩增编码小鼠和人 5B6 的全长 cDNA,并且测序基因 (图 1A 和 1B)。

[0529] 由跨越 13.4kb 基因组 DNA 的 7 个外显子编码的小鼠 5B6 的全长编码序列 (图 1D),包含编码 264 氨基酸 (aa) 的蛋白质的单个开放阅读框 (ORF) (795bp) (图 1C)。人 5B6 编码序列由跨越 12.9kb 基因组 DNA 的 6 个外显子编码 (图 1D),类似地包含编码 241aa 的蛋白质的单个 ORF (图 1C)。

[0530] 小鼠和人 5B6 基因各自编码假定跨膜蛋白质,具有在其细胞外区域中的单个 C 型凝集素结构域、胞质尾区和包含 YXXL 残基的跨膜区,这是潜在的信号传导基序 (Fuller 等人,2007) (图 1C)。人 5B6 具有比小鼠更短的铰链区。小鼠和人蛋白质序列的比对在图 1C 中表示 (53%等同;69%相似)。提议的小鼠和人 5B6 蛋白质结构的图示显示于图 1E 中。

[0531] 使用 NCBI Blast 蛋白质分析,测定 m5B6 与小鼠 Dectin-1 (Clec7A)、Clec12B 和 NKG2D 共享最大的序列相似性,而 h5B6 与 LOX-1 (Clec8A)、Clec12B 和 DCAL-2 (Clec12A) 最相似。5B6 的 CTLD,如同常规 C 型凝集素大鼠甘露糖结合蛋白 A (MBP-A),具有形成 2 个二硫键的 4 个保守半胱氨酸残基 (图 2)。此外,5B6 在颈区中具有 2 个另外的半胱氨酸残基,其可以使得蛋白质能够同二聚化 (Weis 等人,1998)。关键的是,涉及常规 C 型凝集素中的 Ca^{2+} 结合的残基不存在于小鼠和人 5B6 中 (图 2)。

[0532] 小鼠 5B6 的基因表达

[0533] 微阵列分析预测相对于 CD8⁻DC,5B6 在 CD8⁺DC 中以 3.5 倍高的水平表达,并且相

对于 DN⁺ DC, 在 CD8⁺ DC 中以 2.6 倍高的水平表达。因此, 本发明人设计引物并且通过定量 RT-PCR, 研究在小鼠脾 cDC 子集中的 5B6 表达。证实 5B6 由 CD8⁺ cDC 优先表达; 脾 CD8⁺ DC 表达的 mRNA 是脾 CD4⁺ cDC 表达的 22 倍 (图 3A)。

[0534] 本发明人通过定量实时 RT-PCR 检查了小鼠和人 5B6 基因在造血细胞类型实验对象组中的表达。5B6 mRNA 表达对 DC, cDC 和 pDC 特异, 在 NK 细胞中具有中等水平的 mRNA 表达 (图 3B)。相对于 CD8⁻ cDC, 它在脾 CD8⁺ DC 中优先表达。它还在胸腺 CD8⁺ cDC 和 LN CD8⁺ DEC205^{hi} cDC 中差异表达 (图 3A)。此外, 在用 CpG 和 LPS, 分别针对 Toll 样受体 9 和 4 的配体在体内活化后 3 小时, 在所有 3 种脾 cDC 群体中的基因表达减少 (图 3C)。

[0535] 小鼠 5B6 蛋白质的表面表达

[0536] 为了研究 m5B6 和 h5B6 的蛋白质表达, 本发明人产生通过流式细胞术识别在 5B6 转染细胞表面上的蛋白质的 mAb。新鲜分离的小鼠造血细胞实验对象组用 mAb 10B4 的染色指出 m5B6 在 cDC 子集和大多数 pDC 上表达 (图 4A)。显著地, m5B6 蛋白质在研究的大多数其他造血细胞上未检测出, 包括 T 细胞、大多数 B 细胞、单核细胞和巨噬细胞。它在表达某些 mRNA 的 NK 细胞上也未检测出 (图 4A)。然而, 小 (3%) 比例的 B 细胞展示对于 m5B6 明确的阳性染色。仅约 3% 骨髓细胞显示用 10B4 的任何染色, 并且大多数染色很弱。因此, 在造血系统中, m5B6 表面表达看起来主要限制于 DC (图 4A)。此外, 冷冻切片用 mAb10B4 的染色未揭示除归于 DC 外的染色 (数据未显示)。

[0537] m5B6 的表面水平随后在脾、LN 和胸腺 cDC 上进行比较。m5B6 由脾、胸腺和 LN 的 CD8⁺ cDC 表达 (图 4A)。大多数脾、胸腺和 LN CD8⁻ cDC 以及迁移 cDC (皮肤 DC 和朗格罕氏细胞) 对于 m5B6 表达是阴性的 (图 4A, B)。然而, 小比例的 CD8⁻ cDC 显示超过本底的染色; 这可以归因于的 CD8⁺ cDC 谱系的小比例 DC 尚未表达 CD8 α , 所述 CD8 α 已知存在于这种 CD8⁻ cDC 门控内。在来自发炎小鼠脾的炎性 CD11^{int}CD11b^{hi} DC 的制备物上未检测出 m5B6 染色 (Naik 等人, 2006) (数据未显示)。这些 DC 表面表达谱与通过定量 RT-PCR 观察到的基因表达一致 (图 3)。

[0538] m5B6 在小鼠血液 DC 上的表面表达

[0539] 与在脾内发现的 DC 相比较, 小鼠血液包含极少成熟 DC (CD11c^{hi}), 并且这些少数血液 DC 缺乏 CD8 的表达 (O' Keefe 等人, 2003)。然而, 在小鼠中, CD24 表达已与 CD8 的表达相关。在血液内小比例的成熟 DC 表达这种标记物; 推测这些细胞在其成为 CD8⁺ 的途中。为了测定 5B6 在血液 DC 上的表达, 本发明人分离它们且用 CD24 和 5B6 对其进行染色。表达 CD24 的 DC (其注定成为 CD8⁺ DC) 也表达 5B6 (图 4C)。

[0540] 猕猴和人 5B6 的表面表达

[0541] 为了研究人 5B6 (h5B6) 的表面表达, 本发明人产生了 2 种单克隆抗体 (20/05-3A4; 23/05-4C6), 其识别在 h5B6 转染子细胞表面上的天然蛋白质, 如通过流式细胞术测量的 (数据未显示)。来自人或来自猕猴的新鲜分离外周血细胞的染色指出 5B6 在 DC 子集上表达 (图 5)。特别地, HLADR⁺ DC 的小子集对于 h5B6 是阳性的 (图 5A)。大多数其他人血液细胞不显示阳性染色, 但在人血液 B 细胞上获得低水平染色 (图 5B)。为了测定表达 5B6 的 DC 是否类似在小鼠血液中可见的那些, 血液 DC 也用 BDCA-1、BDCA-3 和 BDCA-4 进行染色。用 mAb3A4 或 4C6 的染色限制于次要 BDCA-3⁺ DC 子集 (提出的小鼠 CD8⁺ cDC 的等价物), 并且在 BDCA-4⁺ 子集中不存在 (数据未显示)。这暗示 h5B6 存在于与小鼠 CD24⁺、CD8⁺ DC 谱系相似

的 cDC 类型上 (Galibert 等人, 2005), 但与小鼠形成对比, 不在 pDC 上。

[0542] 此外, 发现抗小鼠 5B6 Ab (10B4) 与 h5B6 结合。在转染子细胞表面上 (数据未显示) 和人 BDCA-3+DC 上的 h5B6 都可以使用抗小鼠 5B6mAb (10B4) 进行检测, 尽管处于比用抗 h5B6Ab (4C6) 观察到的更低水平上 (图 5C)。

[0543] 5B6 在免疫调节中的作用

[0544] 使 Ag 靶向特定 DC 表面分子的 Ab 可以调节免疫应答 (Bonifaz 等人, 2002; Finkelman 等人, 1996; Carter 等人, 2006)。先前已证实针对在 CD8⁺DC 上表达的表面分子 Fire 的 Ab 增强体液免疫, 并且与关于 DC 靶向的其他研究形成对比, 这种增强不需要另外佐剂或危险信号 (Corbett 等人, 2005)。不幸的是, Fire 不具有在细胞表面上表达的人配对象 (Caminschi 等人, 2006), 但小鼠和人共同的 5B6 的确提供人应用的可能性。因此, 研究了经由 5B6 将抗原靶向 DC 的效应。为了排除污染 LPS (内毒素) 在免疫接种中充当佐剂的可能性, 在这些实验中使用的的所有 mAb 就 LPS 污染进行测试, 并且发现低于检测极限 (1EU/ml)。这比增强对于同种型对照 mAb 的免疫所需的 20ngLPS 低超过 1 个对数 (数据未显示)。

[0545] 为了测定针对 5B6 的 Ab 是否可以用于调节体液应答, 小鼠用 10 μ g 抗 5B6 (10B4) 或用非靶向同种型对照 (GL117) mAb 进行静脉内免疫。大鼠 IgG2a 在小鼠中是抗原性的, 因为靶向 mAb 其自身包括外源抗原决定簇。因此, 通过在 ELISA 测定法中测量抗大鼠 IgG 应答可以评估 DC 靶向对免疫应答的作用。在这种测定法中, 非靶向的 Ab (GL117) 用作包被 Ag, 因此任何非特异性结合偏差将是对于非靶向免疫原的。

[0546] 不含任何另外 DC 激活试剂的抗 m5B6mAb 10B4 单独的注射, 产生显著和延长的抗大鼠 Ig 应答 (图 6)。约 2 μ g 10B4 产生最佳应答, 但少至 16ng 给出可检测滴度 (图 6A, B)。针对 10 μ g 靶向 mAb 的应答是 10 μ g 非靶向同种型对照 mAb 的约 5000 倍高。为了获得显著的抗大鼠 Ig 滴度, 与靶向 mAb 相比较, 需要至少 3000 倍高水平的非靶向大鼠 Ig (图 6A, B)。此外, 使用靶向抗 5B6mAb 建立抗大鼠反应性后, 非靶向同种型对照大鼠 Ig 给出显著加强, 暗示记忆应答已产生 (图 6C)。由 5B6 靶向诱导的抗大鼠 Ig 应答由 IgG1 同种型占优势, 但涉及其他同种型包括显著的 IgG2c 组分 (图 6D)。

[0547] 抗 5B6mAb 可以用于将 Ag 递送给 CD8⁺DC

[0548] 通过将 Ag 靶向 DC 上的 m5B6 获得的增强抗体应答的显著特征是不采用另外的 DC 激活试剂或佐剂 (图 6, 7A, B, C)。所使用的 10B4mAb 在“无内毒素”条件下进行制备, 并且浓缩的 mAb 不包含可检测的内毒素 (小于 1EU/ml)。为了证实增强的抗体应答不是由于痕量内毒素或其他微生物产物, 使用无法响应 Toll-样受体 (TLR) 配体的 MyD88^{-/-}TRIF^{-/-} 小鼠来重复实验。在这些小鼠中也可见通过注射针对 m5B6 的 mAb 诱导的针对大鼠 Ig 的等价、有效抗体应答 (图 7A), 指出应答不依赖于由 TLR 配体介导的“危险”信号。当脂多糖 (LPS) 连同靶向抗 5B6mAb 一起有意注射时, 抗体应答有时得到进一步增强 (图 7D), 但有时则不是 (图 7E)。

[0549] 关于增强应答的可能原因可能是抗 m5B6mAb 与 FcR 的结合, 以及与 m5B6 其自身的结合。这种可能性通过将 10B4mAb 注射到 FcR γ 链缺陷小鼠内得到消除, 所述小鼠无法通过激活 Fc γ RI 或 Fc γ RIII34 发信号 (图 7B)。这些产生与对照小鼠等同的抗大鼠 Ig 应答。

[0550] 因为通过经设计将 Ag 递送给 DC 的靶向策略获得体液应答的增强, 所以假定增强

主要是由于 Ag 特异性、CD4⁺ 辅助性 T 细胞的活化。然而,因为某些 B 细胞表达很少 5B6,所以无法排除对 B 细胞的直接靶向。T 细胞的作用通过将抗 5B6mAb 10B4 注射到裸鼠内进行测试,所述裸鼠缺乏胸腺衍生的 T 细胞。消除针对大鼠 Ig 的增强抗体应答(图 7C),显示它依赖于辅助性 T 细胞。

[0551] 抗 5B6mAb 还可以作用于递送化学连接的 OVA Ag 且增强抗 OVA 抗体应答;需要注射 400 倍高水平的游离 OVA,以产生阳性抗 OVA 滴度,并且这仍比经由抗 5B6mAb 通过将 OVA 靶向 DC 诱导的滴度低数个数量级(图 7E, F)。

[0552] 抗 5B6 经由不同施用途径和在佐剂的存在或不存在下在抗原递送方面高度有效

[0553] 本发明人比较了经由不同施用途径将抗原靶向 5B6 (C1ec9A) 对体液应答的作用。抗 5B6Ab (10B4) 的静脉内、皮下和腹膜内施用都显著增强针对大鼠 Ig 的体液应答,而使用同种型对照 Ab (GL117) 观察到最低限度的应答(图 10A)。此外,将抗原靶向 5B6 在不存在佐剂的情况下诱导有效体液应答。为了测定佐剂的共施用是否可以进一步增加产生的抗体应答,小鼠用抗 5B6 (10B4) mAb 或同种型对照 (GL117) 和 LPS (1 μ g)、或 CpG (10 μ g) 进行静脉内注射。发现用 10B4 靶向抗原连同或不连同佐剂诱导强体液应答,然而,佐剂的添加看起来增强初次体液应答和后续记忆应答,尽管仅是轻微地(图 10B)。因此,使用抗 5B6mAb 将抗原靶向 5B6 可以连同或不连同佐剂成功地使用。根据/依赖于待针对其疫苗接种的病原体或抗原材料和所需应答类型可以设计疫苗策略。

[0554] 关于靶向 m5B6 的增强的 T 细胞应答

[0555] 为了直接测定针对特异性 Ag 的 T 细胞应答是否通过将 Ag 靶向 5B6 得到增强,将少数目的 CFSE 标记的、OVA 特异性、CD8 (OT-I) 或 CD4 (OT-II) 转基因 T 细胞过继转移到 C57BL/6 小鼠内,所述 C57BL/6 小鼠随后用 OVA 缀合的抗 m5B6 (10B4) 或用 OVA 缀合的同种型对照 mAb (GL117) 进行免疫。3 天后,根据 CFSE 荧光中的减少计数转移的 Ag 特异性 T 细胞的增殖应答。用非靶向对照 OVA 缀合的 mAb 免疫小鼠无法诱导 OT-I 或 OT-II 增殖,指出呈递不足够的 Ag 以激活这些 T 细胞。相比之下,用抗 m5B6-OVA mAb 缀合物免疫小鼠诱导 OT-I 和 OT-II T 细胞的广泛增殖(图 8)。针对 m5B6 的 Ag 靶向导致 CD4 和 CD8T 细胞的增强活化。

[0556] 在其细胞表面上表达 5B6 分子的 CD8⁺DC 激活幼稚 OT-I 细胞增殖,而 CD8⁻DC 则不是(图 9),条件是用抗 5B6mAb (10B4-OVA) 的免疫将 OVA Ag 成功穿梭至 CD8⁺DC 子集。

[0557] 与 m5B6 的结合的确激活 DC

[0558] 因为对于用抗 m5B6 将 Ags 靶向 DC 不需要另外的 DC 激活试剂或佐剂,以获得增强的抗体应答或 T 细胞应答,所以可能 DC 激活信号可以由 5B6 其自身提供。为了检查 DC 是否是激活的,从用靶向抗 5B6mAb 10B4 免疫的小鼠的脾和 LN 中以及从非免疫接种的对照小鼠中分离 DC。DC 用 DC 子集分离标记物连同关于 DC 成熟标记物 MHC II 类、CD80、CD86 和 CD40 的抗体进行染色。不存在这些 DC 活化标记物中的任何在任何 DC 子集包括 CD8⁺cDC 中的任何增加的证据,所述 CD8⁺cDC 是关于 mAb 的主要靶(数据未显示)。将 Ags 靶向 5B6 看起来增强免疫应答,无需 DC 活化的正常信号。

[0559] 可溶性 5B6 可以以交叉种属方式与膜结合的 5B6 相互作用

[0560] 为了鉴定关于 5B6 分子的结合配偶体,本发明人产生可溶性 FLAG 标签的 m5B6 和 h5B6,其包括 5B6 的胞外域包括茎区和 C 型凝集素样结构域 (CTLD),在图 11A 中指定为“原

始的（具有茎）”。还产生了可溶性 FLAG 标签的胞外域形式的 C 型凝集素 Cire 作为对照分子。用在 pIresNeo 载体中的全长未标签 5B6 构建体瞬时转染后，可溶性 5B6（具有茎和 CTLD）就与 293T 细胞的结合进行筛选，所述 293T 细胞表达膜结合 m5B6 和 h5B6。可溶性小鼠 5B6 能够与活 293T 细胞结合，所述 293T 细胞表达膜结合小鼠 5B6 和人 5B6，但显示与模拟（无 DNA）转染的 293T 细胞的最低限度结合或无结合（图 11B）。相似地，可溶性人 5B6 能够与活 293T 细胞结合，所述 293T 细胞表达膜结合小鼠 5B6 和人 5B6，但显示与模拟转染的 293T 细胞无结合。相比之下，对照可溶性分子 Cire 仅显示与对照或转染子细胞系的最低限度结合。因此，可溶性 5B6 可以以交叉种属方式与膜结合 5B6 相互作用。

[0561] 为了进一步表征这种相互作用，本发明人产生了生物素化可溶性 FLAG 标签的 m5B6 和 h5B6，其包括 5B6 的 CTLD，但不包括茎区，在图 11A 中指定为“可溶性蛋白质 2/3（不包括茎）”。可溶性小鼠和人 5B6 都能够与表达膜结合小鼠 5B6 的活 CHO 细胞结合，但显示与未转染的 CHO 细胞的最低限度结合或无结合（图 11C）。相比之下，对照可溶性分子 Cire 仅显示与对照或转染子细胞系的最低限度结合。使用原始 5B6 蛋白质（茎+CTLD）和可溶性 2/3 蛋白质（仅 CTLD，不包括茎）检测出可溶性 5B6 与膜结合 5B6 的结合，指出 5B6 的 CTLD 可以介导与膜结合 5B6 的交叉种属相互作用。

[0562] 小鼠 5B6 在 DC 前体上的表面表达

[0563] 本发明人研究了在造血和 DC 前体实验对象组上的表面表达。在早期、未定型多潜能祖先上未检测出 5B6 的表面表达，所述祖先保留关于所有造血谱系的发育潜力。相比之下，在培养中或在转移到受辐射接受者内后能够产生 DC 的立即前体——pre-DC 显示低水平的 5B6 表达。在 Flt3 配体产生的 $\text{Sirp}^{\alpha^{-}}\text{cDC}$ （与离体 $\text{CD8}^{\text{+}}\text{cDC}$ 功能等价（Naik 等人，2005））上和 pDC 上检测出 5B6 表达，但在来自相同培养物的 $\text{Sirp}^{\alpha^{+}}\text{cDC}$ 上则不是（图 12）。

[0564] 抗 5B6 抗体 10B4 的克隆、表达和测序

[0565] 本发明人克隆了抗 5B6 抗体 10B4 的重链和轻链，并且将重链和轻链进一步亚克隆到个别表达载体内。这允许产生 κ 链和单条融合蛋白重链，其中重链的 C 末端区域与丙氨酸接头和 ova 融合。通过自由式 293F 细胞的瞬时转染产生重组 Ab。

[0566] 通过测序相对应基因来测定 mAb 24/04-10B4 的重链（SEQ ID NO :42）和轻链（SEQ ID NO :47）的氨基酸序列。

[0567] 抗 5B6-Ova 重组 Ab 识别 5B6 的能力通过下述加以证实：用重组 Ab 标记 CHO-5B6 转染子细胞，并且使用抗 Ova 和抗大鼠 Ig 试剂检测。证实重组 Ab 与 CHO-5B6 细胞结合（图 13），而使用亲本（未转染）CHO 细胞观察到最低限度染色至无染色。

[0568] 本领域技术人员应当理解，可以对如具体实施方案中显示的本发明进行众多改变和 / 或修饰，而不背离如广泛描述的本发明的精神或范围。呈现的实施方案因此视为在所有方面中是举例说明性的而不是限制性的。

[0569] 本申请要求来自 US 61/052, 865 和 US 60/969, 118 的优先权，其完整内容通过引用合并入本文。

[0570] 本文讨论和 / 或参考的所有出版物整体合并入本文。

[0571] 在本说明书中已包括的文件、行为、材料、装置、物品等的任何讨论仅用于提供关于本发明的背景的目的。它不理解为承认任何或所有这些物质构成现有技术基础的部分，

或如在本申请的每项权利要求的优先权日期前存在的在与本发明相关领域中的共同一般知识。

[0572] 参考文献

- [0573] Adachi 等人 (1998) *Immunity* 9 :143-150.
- [0574] Almeida 和 Allshire (2005) *TRENDS Cell Biol* 15 :251-258.
- [0575] Al-Mufti 等人 (1999) *Am. J. Med. Genet.* 85 :66-75.
- [0576] Bauer 等人 (2002) *Int J Legal Med* 116 :39-42.
- [0577] Belz 等人 (2004). *Proc Natl Acad Sci USA* 101 :8670-8675.
- [0578] Bird 等人 (1988) *Blood* 80 :1418-1422.
- [0579] Bonifaz 等人 (2002) *J Exp Med* 196 :1627-1638.
- [0580] Bourque (1995) *Plant Sci.* 105 :125-149.
- [0581] Caminschi 等人 (2006). *DNA Seq.* 17 :8-14.
- [0582] Carter 等人 (2006) *J Immunol* 177 :2276-2284.
- [0583] Chothia 和 Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196 :901-917.
- [0584] Colcher 等人 (1986) *Methods Enzymol.* 121 :802-816.
- [0585] Corbett 等人 (2005) *Eur J Immunol* 35 :2815-2825.
- [0586] Demangel 等人 (2005) *Mol Immunol* 42 :979-985.
- [0587] den Haan 等人 (2000) *J Exp Med* 192 :1685-1696.
- [0588] Drickamer (1999) *Cur. Opin Struct Biol* 9 :585-590.
- [0589] Dudziak 等人 (2007) *Science* 315 :107-111.
- [0590] Dunbrack, 等人 (1997) *Folding and Design*, 2 :R27-42.
- [0591] Finkelman 等人 (1996). *J Immunol* 157 :1406-1414.
- [0592] Fuller 等人 (2007) *J Biol Chem* 282 :12397-12409.
- [0593] Galibert 等人 (2005) *J Biol Chem* 280 :21955-21964.
- [0594] Greenwood 等人 (1993) *Eur J Immunol* 23 :1098-1104.
- [0595] Haseloff 和 Gerlach (1988) *Nature* 334 :585-591.
- [0596] Harayama (1998) *Trends Biotechnol.* 16 :76-82.
- [0597] Hochrein 等人 (2001) *J Immunol* 166 :5448-5455.
- [0598] Huston 等人 (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85 :5879-5883.
- [0599] Jones 等人 (1986) *Nature* 321 :522-525.
- [0600] Lahoud 等人 (2006) *J Immunol* 177 :372-382.
- [0601] Leserman (2004) *J Liposome Res* 14 :175-189.
- [0602] Miller (1990) *Blood* 76 :271-278.
- [0603] Millar 和 Waterhouse (2005) *Funct Integr Genomics* 5 :129-135.
- [0604] Morrison 等人 (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81 :6851-6855.
- [0605] Naik 等人 (2005) *J Immunol* 174 :6592-6597.
- [0606] Naik 等人 (2006) *Nat Immunol* 7 :663-671.
- [0607] Nchinda 等人 (2008) *J Clin Investig* 118 :1427-1436.
- [0608] Needleman 和 Wunsch. (1970). *J. Mol. Biol.* , 48, 443-453.

- [0609] O' Keeffe 等人 (2002) *J Exp Med* 196 :1307-1319.
- [0610] O' Keeffe 等人 (2003) *Blood* 101 :1453-1459.
- [0611] Pasquinelli 等人 (2005) *Curr Opin Genet Develop* 15 :200-205.
- [0612] Pastan 等人 (1986) *Cell* 47 :641-648.
- [0613] Perriman 等人 (1992) *Gene* 113 :157-16.
- [0614] Pooley 等人 (2001) *J Immunol* 166 :5327-5330.
- [0615] Proietto 等人 (2004) *Immunobiology* 209 :163-172.
- [0616] Schnorrer 等人 (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103 :10729-10734.
- [0617] Senior (1998) *Biotech. Genet. Engin. Revs.* 15 :79-119.
- [0618] Shippy 等人 (1999) *Mol. Biotech.* 12 :117-129.
- [0619] Shortman 和 Liu (2002) *Nat Rev Immunol* 2 :153-163.
- [0620] Shortman 和 Naik (2007). *Nat Rev Immunol* 7 :19-30.
- [0621] Smith 等人 (2003) *J Immunol* 170 :4437-4440.
- [0622] Smith 等人 (2000) *Nature* 407 :319-320.
- [0623] Sun 等人 (1986) *Hybridoma* 5S1 :517-520.
- [0624] Takeda 等人 (2003) *Annu Rev Immunol* 21 :335-376.
- [0625] Thorpe 等人 (1987) *Cancer Res* 47 :5924-31.
- [0626] Van Broekhoven 等人 (2004) *Cancer Res* 64 :4357-4365.
- [0627] Vandenaabeele 等人 (2001) *Blood* 97 :1733-1741.
- [0628] Van de Velde 等人 (2006) *Springer Semin Immunol* 28 :329-338.
- [0629] Vitetta 等人 (1987) *Science* 238 :1098-1104.
- [0630] Vremec 等人 (2000) *J Immunol* 164 :2978-2986.
- [0631] Waldmann (1991) *Science* 252 :1657-1662.
- [0632] Waterhouse 等人 (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 :13959-13964.
- [0633] Weis 等人 (1998) *Immunol Rev.* 163 :19-34.
- [0634] Yamamoto 等人 (2003) *Science* 301 :640-643.

序列表

<110>Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research
The Burnet Institute

<120> 树突状细胞标记物及其用途

<130>507216

<150>60/969, 118

<151>2007-08-30

<150>61/052, 865

<151>2008-05-13

<160>61

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>241

<212>PRT

<213> 人

<400>1

```

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

```

Gln Ala Phe Met Gln Asn Ser Leu Ser Ser Ala His Asn Ser Ser Pro
 100 105 110
 Cys Pro Asn Asn Trp Ile Gln Asn Arg Glu Ser Cys Tyr Tyr Val Ser
 115 120 125
 Glu Ile Trp Ser Ile Trp His Thr Ser Gln Glu Asn Cys Leu Lys Glu
 130 135 140
 Gly Ser Thr Leu Leu Gln Ile Glu Ser Lys Glu Glu Met Asp Phe Ile
 145 150 155 160
 Thr Gly Ser Leu Arg Lys Ile Lys Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Val Gly
 165 170 175
 Leu Ser Gln Asp Gly His Ser Gly Arg Trp Leu Trp Gln Asp Gly Ser
 180 185 190
 Ser Pro Ser Pro Gly Leu Leu Pro Ala Glu Arg Ser Gln Ser Ala Asn
 195 200 205
 Gln Val Cys Gly Tyr Val Lys Ser Asn Ser Leu Leu Ser Ser Asn Cys
 210 215 220
 Ser Thr Trp Lys Tyr Phe Ile Cys Glu Lys Tyr Ala Leu Arg Ser Ser
 225 230 235 240
 Val

<210>2

<211>264

<212>PRT

<213> 小家鼠

<400>2

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

Leu Leu Gln Arg Ser Leu His Ser Gly Thr Asp Ala Ser Thr Gly Pro
 100 105 110
 Val Leu Leu Thr Ser Pro Gln Met Val Pro Gln Thr Leu Asp Ser Lys
 115 120 125
 Glu Thr Gly Ser Asp Cys Ser Pro Cys Pro His Asn Trp Ile Gln Asn
 130 135 140
 Gly Lys Ser Cys Tyr Tyr Val Phe Glu Arg Trp Glu Met Trp Asn Ile
 145 150 155 160
 Ser Lys Lys Ser Cys Leu Lys Glu Gly Ala Ser Leu Phe Gln Ile Asp
 165 170 175
 Ser Lys Glu Glu Met Glu Phe Ile Ser Ser Ile Gly Lys Leu Lys Gly
 180 185 190
 Gly Asn Lys Tyr Trp Val Gly Val Phe Gln Asp Gly Ile Ser Gly Ser
 195 200 205
 Trp Phe Trp Glu Asp Gly Ser Ser Pro Leu Ser Asp Leu Leu Pro Ala
 210 215 220
 Glu Arg Gln Arg Ser Ala Gly Gln Ile Cys Gly Tyr Leu Lys Asp Ser
 225 230 235 240
 Thr Leu Ile Ser Asp Lys Cys Asp Ser Trp Lys Tyr Phe Ile Cys Glu
 245 250 255
 Lys Lys Ala Phe Gly Ser Cys Ile
 260

<210>3

<211>241

<212>PRT

<213> 黑猩猩

<400>3

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

	85	90	95
Ile Leu Met Lys Asn Ser Leu Asn Ser Ala His His Cys Ser Pro Cys			
	100	105	110
Pro Asp Asn Trp Ile Gln Asn Gly Glu Ser Cys Tyr Tyr Val Phe Glu			
	115	120	125
Asn His Lys Thr Trp His Thr Ser Lys Gln Val Cys Leu Lys Glu Gly			
	130	135	140
Ser Asn Leu Leu Gln Ile Asp Asn Lys Glu Glu Met Asp Phe Ile Thr			
145	150	155	160
Gly Ser Leu Lys Arg Ile Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Trp Val Gly Leu			
	165	170	175
Ser Gln Asp Gly Leu Ser Gly Pro Trp Leu Trp Gln Asp Gly Ser Ser			
	180	185	190
Leu Ser Pro Asp Leu Trp Pro Val Gln Arg Pro Gln Ser Pro Asn Leu			
	195	200	205
Val Cys Gly Tyr Leu Lys Asn Lys Ile Leu Phe Ser Ala Asn Cys Ser			
	210	215	220
Ser Trp Lys His Phe Ile Cys Glu Lys Tyr Ala Leu Arg Ser Cys Ile			
225	230	235	240

<210>8

<211>241

<212>PRT

<213> 褐家鼠

<400>8

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

Gln Ala Ser Leu Gln Arg Ser Leu Arg Ser Gly Ser Asn Cys Asn Pro
 100 105 110
 Cys Pro Pro Asn Trp Ile Gln Asn Gly Lys Ser Cys Tyr Tyr Ala Phe
 115 120 125
 Asp Arg Trp Glu Thr Trp Asn Asn Ser Lys Lys Ser Cys Leu Lys Glu
 130 135 140
 Gly Asp Ser Leu Leu Gln Ile Asp Ser Lys Glu Glu Met Glu Phe Ile
 145 150 155 160
 Asn Leu Ser Ile Trp Lys Leu Lys Gly Gly Tyr Glu Tyr Trp Val Gly
 165 170 175
 Val Phe Gln Asp Gly Pro Ser Gly Ser Trp Phe Trp Glu Asp Gly Ser
 180 185 190
 Ser Pro Leu Ser Asp Leu Leu Pro Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Ser
 195 200 205
 Gln Ile Cys Gly Tyr Leu Lys Asp His Thr Leu Ile Ser Asp Asn Cys
 210 215 220
 Ser Asn Trp Lys Tyr Phe Ile Cys Glu Lys Lys Ala Phe Gly Ser Cys
 225 230 235 240
 Ile

<210>9

<211>726

<212>DNA

<213>人

<400>9

atgcacgagg aagaaatata cacctctctt cagtgggata gcccagcacc agacacttac 60
 cagaaatgtc tgtcttccaa caaatgttca ggagcatgct gtcttgtgat ggtgatttca 120
 tgtgttttct gcatgggatt attaacagca tccattttct tgggcgtcaa gttgttgcag 180
 gtgtccacca ttgcgatgca gcagcaagaa aaactcatcc aacaagagag ggcaactgeta 240
 aactttacag aatggaagag aagctgtgcc cttcagatga aatattgcca agccttcattg 300
 caaaactcat taagtccagc ccataacagc agtccttgtc caaacaattg gattcagaac 360
 agagaaagtt gttactatgt ctctgaaatt tggagcattt ggcacaccag tcaagagaat 420
 tgtttaaagg aaggttccac gctgctacaa atagagagca aagaagaaat ggattttatc 480
 actggcagct tgaggaagat taaaggaagc tatgattact ggggtgggggtt gtctcaggat 540
 ggacacagcg gacgctggct ttggcaagat ggctcctctc cttctcctgg cctgttgcca 600
 gcagagagat cccagtcagc taaccaagtc tgtggatacg tgaaaagcaa ttcccttctt 660
 tcgtctaact gcagcacgtg gaagtatctt atctgtgaga agtatgcgtt gagatcctct 720
 gtctga 726

<210>10

<211>795

<212>DNA

<213> 小家鼠

<400>10

atgcatgcbg	aagaaatata	tacctctctt	cagtgggaca	ttcctacctc	agaggcctct	60
cagaagtgcc	aatcccctag	caaatgttca	ggagcatggc	gtgttgtagc	gatgatttcc	120
tgtgtggtct	gtatgggctt	gtagcaacg	tccatcttct	tgggcatcaa	gttcttccag	180
gtatcctctc	ttgtcttggc	gcagcaggaa	agactcatcc	aacaggacac	agcattggcg	240
aaccttacac	agtggcagag	gaaatacaca	ctggaatact	gcccaagcctt	actgcagaga	300
tctctccatt	caggcacaga	tgcttctact	ggaccagttc	ttctgacctc	tccacagatg	360
gttccacaga	ccctggacag	caaggaaaca	ggtagtgcct	gcagcccttg	tccacacaac	420
tggattcaga	atggaaaaag	ttgttactat	gtctttgaac	gctgggaaat	gtggaacatc	480
agtaagaaga	gctgtttaaa	agagggcgct	agtctcttct	aaatagacag	caaagaagaa	540
atggagttca	tcagcagtat	agggaaactc	aaaggaggaa	ataaatattg	ggtgggagtg	600
tttcaagatg	gaatcagtg	atcttggctc	tgggaagatg	gctcttctcc	tctctctgac	660
ttgttgccag	cagaaagaca	gcgatcagcc	ggccagatct	gtggatacct	caaagattct	720
actctcatct	cagataagtg	cgatagctgg	aaatatttta	tctgtgagaa	gaaggcattt	780
ggatcctgca	tctga					795

<210>11

<211>726

<212>DNA

<213> 黑猩猩

<400>11

atgcacgagg	aagaaatata	cacctctctt	cagtgggata	gcccagcacc	agacaacttac	60
cagaaatgtc	tgtcttccaa	caaatgttca	ggagcatgct	gtcttgtgat	ggtgatttca	120
tgtgttttct	gcatgggatt	attaacagca	tccatcttct	tgggctgcaa	gttgttgtag	180
gtgtccacca	ttgcgatgca	gcagcaagaa	aaactcatcc	aacaagagag	ggcaactgcta	240
aactttacag	aatggaagag	aagctgtgcc	cttcagatga	aatattgcca	agccttcatg	300
caaaactcat	taagtccagc	ccataacagc	agtccttgtc	caaacagttg	gattcagaac	360
agagaaagtt	gttactatgt	ctctgaaatt	tggagcattt	ggcacaccag	tcaagagaat	420
tgtttaaagg	aaggttccac	gctgctacaa	atagagagca	aagaagaaat	ggattttatc	480
actggcagtt	tgagaaagat	taaaggaagc	tatgattact	gggtgggggt	gtctcaggat	540
ggacacagcg	gacgctggct	ttggcaagat	ggctcctctc	cttctcctgg	cctgttgcca	600
gtagagagat	cccagtcagc	taaccaagtc	tgtggataca	tgaaaagcaa	ttcccttctt	660

tcgtctaact gcagcacttg gaagtatfff atctgtgaga agtatgcgtt gagatcctct 720
gtctga 726

<210>12

<211>726

<212>DNA

<213> 恒河猴

<400>12

atgcatgagg aagaaatata cacctctctt cagtgggata gtccagcacc aaacacttac 60
cagaaatgtc tgtcttctaa caaatgttca ggagcatggt gtcttgtgat ggcgatttca 120
tgtatfffct gcatggggtt attaacagca tccatfffct tgggcgtcaa gttgttgcag 180
gtgtccacca ttgcaatgca gcagcaagaa aaactcatcc aacaagagag ggcactgcta 240
aactttacag aatggaagag aagccatgtc cttcagatga aatfffgtca aaccttcatg 300
caaagctctt ttagttcagc ccataactgc agtccttgtc caaacaattg gattcagaac 360
agagaaagct gttactatgt ctctgaacat tggaaaatff ggcacaccag tcaagagaat 420
tgfftaaagg aaggttccac gctgctacaa atagagagcg aagaagaaat ggatffttatc 480
actggcagct tgaggaagat tagaggaagc tacgattact ggggtggggtt gtctcaggat 540
ggacacagcg gacgctggct ttggcaagat ggctcctctc cttctcctgg cctgttgcca 600
gtagagatat cccagtcaac caaccaagtc tgtggataca tcaaaaacag ttcccttctt 660
tcgtctaact gcagcacttg gaagtatfff atctgcgaga agtatgcatt aagatcctct 720
gtctga 726

<210>13

<211>726

<212>DNA

<213> 家犬

<400>13

atgcaggagg aagaaacata cacctctctt cgttgggata gtccaacacc aagctffttac 60
cagaaacacc tatcttccac caaatattca ggagcatggt gtctgggtgac ggtgattaca 120
tgtattctct gcgtgggctc aatagcaacc tctgffttct tgggcctcaa gttgttccag 180
gtatctacca ttgcaatgaa acagcgagaa aagctcatcc ttcaggacag agcaactgtt 240
aatttcacac aatgggagag aaaccataac cttcagatga aatattgcca aaccttgatg 300
caaaactctt tcagttcagc ccacaactgc agcccttgtc ctgacaactg gattcagaat 360
ggagaaagtt gttaccatgt cfftgaaaac tggaaaatff ggcacaccag taaggaggac 420
tgfftgagg agggctctaa tcttctacaa atagacagca aagaagaaat ggactffttatc 480
actggcagcc tgaagaaggt caaaagtggc tffgattact ggggtgggact gtctcaagac 540
ggactcagca aaccttggct ttggcaagat ggffcctctc cctcccttga cctgtcgcca 600

gtacagacat	tgcaatcaac	taaccagctc	tgtggatatac	taaaggacaa	gttcctttct	660
tctgctaact	gcagcatttg	gaaatatttt	atctgtgaga	agtatgcatt	gagatcctct	720
aactga						726

<210>14

<211>726

<212>DNA

<213> 牛

<400>14

atgcaagagg	atgaaatata	cacctctctt	cagtgggata	ctccaacatc	aaacccttat	60
cagaaacatc	tgtctttctac	caaaaattca	ggagtatggg	gtcttgtgat	ggtgatctta	120
tgtattttct	gcattggctc	attagcaacc	tctattttct	tgggcatcaa	attgtttcag	180
atgtccacta	ctataatgaa	gcagcaagaa	aaactcatcc	aacaggagag	agcactgctc	240
aacttcacac	agtggaagag	aaaccccaac	ctacagatga	catattgcca	aaccttaatg	300
cagaagtctc	tcagttcagc	ctataactgc	agcccttgtc	cagacaactg	gattcagaat	360
ggagaaagtt	gttatcatgt	ctttgaaagc	tggacattct	ggcacactag	tagaaaggat	420
tgttgggaaga	agggctctga	tcttctgcaa	atagagagca	aagaagaaat	ggactttatc	480
acgggcagcc	tgaagaagat	caagagaaac	tatgattact	gggtaggact	gtcacagaat	540
gggtccaacc	aaccttggct	ttggcaggat	ggctcctctc	cttctgctga	cctgttgcca	600
agacagggac	cccagtcaac	aaatcaggtc	tgtggatacc	tcagagacaa	cgacctttct	660
tctgctaact	gcagcgtttg	gaaatatttc	atctgtgaga	agtacgcact	aagatcttct	720
acctga						726

<210>15

<211>723

<212>DNA

<213> 马

<400>15

atgcaggagg	aagaaatgta	cacctctctc	caatgggata	acccaacatc	aaacccttac	60
cagaaaaate	tgccttccaa	atgttcagga	acacgggtgc	ttgtgatagt	gatttcatgt	120
atcttctgca	tgggcttggt	aacaacgtcc	atcttcttgg	gcatcaagtt	gttccaggtg	180
tctgctattg	cagtgaagca	gcaagaaaaa	ctcatccaac	aggagagAAC	actgttgaac	240
ttcacacagt	gtaatagaaa	ccatgacttc	cagatgaaat	gctgtcaaat	cctcatgaaa	300
aactcattaa	attcagecca	tcactgcagc	ccttgtccag	acaactggat	tcagaatgga	360
gaaagtgtgt	actatgtctt	tgaaaatcac	aaaacttggc	ataccagtaa	acaggtttgt	420
ttgaaggagg	gctctaatct	tctacaaata	gacaacaaag	aagaaatgga	ctttatcaca	480
ggcagcctga	agaggatcaa	aagcagctat	gattactggg	tgggactgtc	tcaggacgga	540

ctcagcggac cttggctttg gcaagatggt tcttctcttt ccccagacct gtggccagta	600
cagagaccgc aatcacctaa cctgggtctgt ggatacctca aaaacaagat ccttttttca	660
gctaactgca gcagttggaa acatthttate tgtgagaagt atgcattaag atcttgcac	720
tga	723

<210>16

<211>726

<212>DNA

<213> 褐家鼠

<400>16

atgcatgagg aagaaatata cacctctctt cagtgggaca ttccaacctc agaggcctct	60
cagaagtgtc catcccttag caaatgtcca ggaacatggt gtattgtgac ggtgatttcc	120
tgtgtggctt gtgtgggctt actagcagca tccatthttct tgggcatcaa gttctcccag	180
gtgtcctctc ttgtaatgga gcagcgggaa aggctcatcc gacaggacac agcattgtctg	240
aacctcacag agtggcagag gaaccataca ctgcagttaa aaagctgcca agcctcacta	300
caaagatctc tccgttcagg cagtaactgc aacccttgct caccgaactg gattcagaat	360
ggaaaaagtt gttactatgc ctttgaccgc tgggaaacgt ggaacaacag taagaagagt	420
tgtttaaaag agggcgatag tctccttcaa atagacagca aagaagaaat ggagthttatc	480
aacctcagta tatggaagct caaaggagga tatgaatact gggthggagt gthtcaagat	540
ggaccagtg gatcttggtt ttgggaagat ggctcttctc ctctctctga cttgttgcca	600
acagacagac agctatcagc cagccagatc tgtggatacc tcaaagacca tactctcatc	660
tcggataact gcagtaactg gaaatthttt atctgtgaga agaaggcatt tggatcctgc	720
atctga	726

<210>17

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>17

tgtgactgct cccacaactg ga	22
--------------------------	----

<210>18

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>18

tttgcaccaa tcacagcaca ga 22

<210>19

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>19

catttgcagt ggcaaagtgg ag 22

<210>20

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>20

gtctcgtcc tggaagatgg tg 22

<210>21

<211>26

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>21

gccatttctt gtaccaacct actcct 26

<210>22

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>22

cgggtgtggta tggatcgtca ctt 23

<210>23

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>23

agcctcctgt gtggactgct tt 22

<210>24

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>24

ttcattgccc acattttggt tt 22

<210>25

<211>33

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>25

tagtagacgc gtgagcagca ggaaagactc atc 33

<210>26

<211>33

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>26

tagtagacgc gttcagatgc aggatccaaa tgc 33

<210>27

<211>33

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>27

tagtagacgc gtcagcagca agaaaaactc atc 33

<210>28

<211>33

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>28

tagtagacgc gttcagacag aggatctcaa cgc 33

<210>29

<211>22

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠类 5B6 的抗原片段

<400>29

Asp Gly Ser Ser Pro Leu Ser Asp Leu Leu Pro Ala Glu Arg Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Ala Gly Gln Ile Cys
 20

<210>30

<211>27

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人 5B6 的抗原片段

<400>30

Arg Trp Leu Trp Gln Asp Gly Ser Ser Pro Ser Pro Gly Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Ala Glu Arg Ser Gln Ser Ala Asn Gln Val Cys
 20 25

<210>31

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 生物素化共有序列

<400>31

Asn Ser Gly Leu His His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Met Val Trp Asn

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

<210>34

<211>130

<212>PRT

<213> 小家鼠

<400>34

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

<210>35

<211>119

<212>PRT

<213> 小家鼠

<400>35

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

<210>36

<211>119

<212>PRT

<213> 人

<400>36

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

<223> 包括茎的可溶性 flag 标签的小鼠 5B6

<400>38

Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30
 Gln Asn Ser Gly Leu His His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Met Val Trp
 35 40 45
 Asn His Arg Gly Ala Arg Gln Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr
 50 55 60
 Arg Glu Gln Gln Glu Arg Leu Ile Gln Gln Asp Thr Ala Leu Val Asn
 65 70 75 80
 Leu Thr Gln Trp Gln Arg Lys Tyr Thr Leu Glu Tyr Cys Gln Ala Leu
 85 90 95
 Leu Gln Arg Ser Leu His Ser Gly Thr Asp Ala Ser Thr Gly Pro Val
 100 105 110
 Leu Leu Thr Ser Pro Gln Met Val Pro Gln Thr Leu Asp Ser Lys Glu
 115 120 125
 Thr Gly Ser Asp Cys Ser Pro Cys Pro His Asn Trp Ile Gln Asn Gly
 130 135 140
 Lys Ser Cys Tyr Tyr Val Phe Glu Arg Trp Glu Met Trp Asn Ile Ser
 145 150 155 160
 Lys Lys Ser Cys Leu Lys Glu Gly Ala Ser Leu Phe Gln Ile Asp Ser
 165 170 175
 Lys Glu Glu Met Glu Phe Ile Ser Ser Ile Gly Lys Leu Lys Gly Gly
 180 185 190
 Asn Lys Tyr Trp Val Gly Val Phe Gln Asp Gly Ile Ser Gly Ser Trp
 195 200 205
 Phe Trp Glu Asp Gly Ser Ser Pro Leu Ser Asp Leu Leu Pro Ala Glu
 210 215 220
 Arg Gln Arg Ser Ala Gly Gln Ile Cys Gly Tyr Leu Lys Asp Ser Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Ser Asp Lys Cys Asp Ser Trp Lys Tyr Phe Ile Cys Glu Lys
 245 250 255
 Lys Ala Phe Gly Ser Cys Ile
 260

<210>39

<211>240

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包括茎的可溶性 flag 标签的人 5B6

<400>39

```

Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
1           5           10           15
Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
           20           25           30
Gln Asn Ser Gly Leu His His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Met Val Trp
           35           40           45
Asn His Arg Gly Ala Arg Gln Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr
           50           55           60
Arg Gln Gln Gln Glu Lys Leu Ile Gln Gln Glu Arg Ala Leu Leu Asn
65           70           75           80
Phe Thr Glu Trp Lys Arg Ser Cys Ala Leu Gln Met Lys Tyr Cys Gln
           85           90           95
Ala Phe Met Gln Asn Ser Leu Ser Ser Ala His Asn Ser Ser Pro Cys
           100          105          110
Pro Asn Asn Trp Ile Gln Asn Arg Glu Ser Cys Tyr Tyr Val Ser Glu
           115          120          125
Ile Trp Ser Ile Trp His Thr Ser Gln Glu Asn Cys Leu Lys Glu Gly
           130          135          140
Ser Thr Leu Leu Gln Ile Glu Ser Lys Glu Glu Met Asp Phe Ile Thr
145           150          155          160
Gly Ser Leu Arg Lys Ile Lys Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Val Gly Leu
           165          170          175
Ser Gln Asp Gly His Ser Gly Arg Trp Leu Trp Gln Asp Gly Ser Ser
           180          185          190
Pro Ser Pro Gly Leu Leu Pro Ala Glu Arg Ser Gln Ser Ala Asn Gln
           195          200          205
Val Cys Gly Tyr Val Lys Ser Asn Ser Leu Leu Ser Ser Asn Cys Ser
           210          215          220
Thr Trp Lys Tyr Phe Ile Cys Glu Lys Tyr Ala Leu Arg Ser Ser Val
225           230          235          240

```

<210>40

<211>199

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 不包括茎的可溶性 flag 标签的小鼠 5B6

<400>40

```

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

```

<210>41

<211>198

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 不包括茎的可溶性 flag 标签的人 5B6

<400>41

```

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

```

<210>42

<211>460

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>10B4 抗 5B6 抗体的重链的氨基酸序列

<400>42

```

Met Leu Val Leu Gln Trp Val Leu Val Thr Ala Leu Phe Gln Gly Val
1           5           10           15
His Cys Ala Val Gln Ile Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
           20           25           30
Lys Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
           35           40           45
Asn Ala Ala Ile Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu
           50           55           60
Trp Val Gly Arg Ile Arg Thr Arg Pro Ser Lys Tyr Ala Thr Asp Tyr
65           70           75           80
Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
           85           90           95
Ser Met Val Tyr Leu Gln Met Asp Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala
           100          105          110
Met Tyr Tyr Cys Thr Pro Arg Ala Thr Glu Asp Val Pro Phe Tyr Trp
           115          120          125
Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Glu Thr Thr Ala Pro
           130          135          140
Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn Ser Met
145          150          155          160
Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
           165          170          175
Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
           180          185          190
Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Thr Ser Ser Val Thr Val
           195          200          205
Pro Ser Ser Thr Trp Ser Ser Gln Ala Val Thr Cys Asn Val Ala His
           210          215          220
Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Glu Cys
225          230          235          240
Asn Pro Cys Gly Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
           245          250          255

```

Pro Pro Lys Thr Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 260 265 270
 Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asn Asp Pro Glu Val Arg Phe
 275 280 285
 Ser Trp Phe Ile Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr His Ala
 290 295 300
 Pro Glu Lys Gln Ser Asn Ser Thr Leu Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 305 310 315 320
 Ile Val His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Cys Lys Val
 325 330 335
 Asn Ser Gly Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Ser Ile Ser Lys Pro
 340 345 350
 Glu Gly Thr Pro Arg Gly Pro Gln Val Tyr Thr Met Ala Pro Pro Lys
 355 360 365
 Glu Glu Met Thr Gln Ser Gln Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly
 370 375 380
 Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Thr Glu Trp Lys Met Asn Gly Gln Pro
 385 390 395 400
 Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser
 405 410 415
 Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Thr Trp Gln Gln
 420 425 430
 Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 435 440 445
 His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210>43

<211>118

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>10B4 抗 5B6 抗体的重链可变区的氨基酸序列

<400>43

Gln Ile Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Glu Ser Leu
 1 5 10 15
 Lys Ile Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Ala Ile

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

<210>44

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>10B4 抗 5B6 抗体的重链 CDR1 的氨基酸序列

<400>44

Asn Ala Ala Ile Tyr

1 5

<210>45

<211>19

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>10B4 抗 5B6 抗体的重链 CDR2 的氨基酸序列

<400>45

Arg Ile Arg Thr Arg Pro Ser Lys Tyr Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Arg Gly

<210>49

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>10B4 抗 5B6 抗体的轻链 CDR1 的氨基酸序列

<400>49

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asp Glu Asn Lys Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210>50

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>10B4 抗 5B6 抗体的轻链 CDR2 的氨基酸序列

<400>50

Trp Ala Ser Thr Gly Glu Ser
1 5

<210>51

<211>6

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>10B4 抗 5B6 抗体的轻链 CDR3 的氨基酸序列

<400>51

Tyr Tyr Asp Phe Pro Pro
1 5

<210>52	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400>52	
ccagggcagt gctgggtgct t	21
<210>53	
<211>28	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400>53	
acgggtgagg atgatgtctt atgaacaa	28
<210>54	
<211>42	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400>54	
tagtaggaat tcagcactga caacagaacc ttaagcagta tg	42
<210>55	
<211>45	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 寡核苷酸引物

<400>55

tagtagcgcg gccgctttac caggagagtg ggagagactc ttctc

45

<210>56

<211>45

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>56

tagtaggaat tcggcgcgcc tcaaacaggc aggaggagca agatg

45

<210>57

<211>79

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>57

tagtaggcgg ccgcacgcgt ctaaacactca ttccctgttga agctcttgac gacgggtgag
gatgatgtct tatgaaca

60

79

<210>58

<211>198

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包括茎的可溶性小鼠 5B6

<400>58

Glu Gln Gln Glu Arg Leu Ile Gln Gln Asp Thr Ala Leu Val Asn Leu

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

<210>59

<211>175

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包括茎的可溶性人 5B6

<400>59

Gln Gln Gln Glu Lys Leu Ile Gln Gln Glu Arg Ala Leu Leu Asn Phe
 1 5 10 15
 Thr Glu Trp Lys Arg Ser Cys Ala Leu Gln Met Lys Tyr Cys Gln Ala

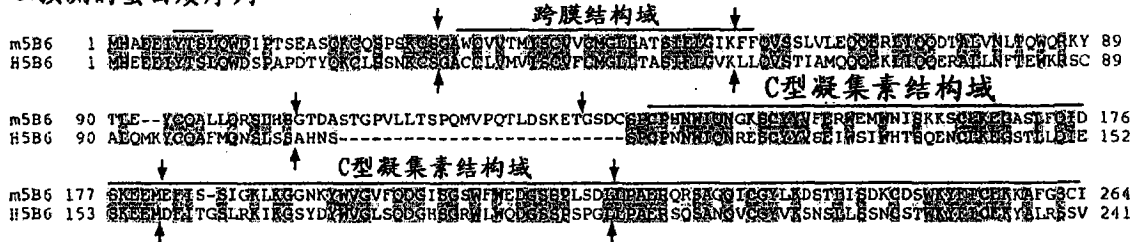
A.小鼠5B6的编码序列

ATGCATGCGGAAGAAATATACCTCTCTTCAGTGGGACATTCCTACCTCAGAGGCCTCTCAGAAGTGCCAAATCCCCTAGCAAAATGTTCC
AGGAGCATGGTGTGTGTGACGATGATTTCCCTGTGGTCTGTATGGCTTGTAGCAACGTCATTTTCTTGGGCATCAAGTTCTTCC
AGGTATCCTCTCTTGTCTGGAGCAGCAGGAAAGACTCATCCAACAGGACACAGCATTGGTGAACCTTACACAGTGGCAGAGGAAATAC
ACACTGGAAATACTGCCAAGCCTTACTGCAGAGATCTCTCCATTCAGGCACAGATGCTTCTACTGGACCAGTTCTTCTGACCTCTCCACA
GATGGTTCACAGACCCCTGGACAGCAAGGAAACAGGTAGTGACTGCAGCCCTTGTCCACACAACTGGATTCAAGATGGAAGAAAGTTGTT
ACTATGCTTTGAACGCTGGGAAATGTGGAACATCAGTAAGAAGAGCTGTTTAAAGAGGGCGCTAGTCTCTTCAAAATAGACAGCAAA
GAAGAAATGGAGTTTCATCAGCAGTATAGGGAACTCAAGGAGGAAATAAATATTTGGTGGGAGTGTTCAGATGGAATCAGTGGATC
TTGGTTCGGGAAGATGGCTCTTCTCTCTCTCTGACTTGTGCCAGCAGAAAGACAGCGATCAGCCGGCCAGATCTGTGGATACCTCA
AAGATTCTACTCTCATCTCAGATAAGTGCAGATAGCTGGAATATTTTATCTGTGAGAAGAAGGCATTTGGATCCTGCATCTGA

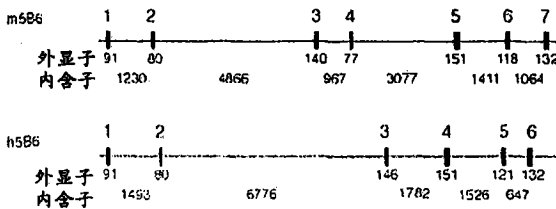
B.人5B6的编码序列

ATGCACGAGGAAGAAATATACACCTCTCTTCAGTGGGATAGCCAGCACCAGACACTTACCAGAAATGTCTGTCTTCCAACAAATGTTCC
AGGAGCATGCTGTCTTGTGATGGTGATTTTCATGTGTTTCTGCAATGGGATTTAATACAGCATCCATTTTCTTGGCGTCAAGTTGTTGC
AGGTGTCACCATTTGCGATGCAGCAGCAAGAAAACCTCATCCAACAAGAGAGGGCACTGCTAAACTTTACAGAATGGAAGAGAAAGCTGT
GCCCTTCAGATGAAATATTTGCCAAGCCTTCATGCAAACTCATTAAAGTTACGCCATAACAGCAGTCCCTTGTCCAAAACAAATGGATTCA
GAACAGAGAAAGTTGTTACTATGTCTCTGAAATTTGGAGCATTGGGCACACCAGTCAAGAGAATTTGTTAAAGGAAGGTTCCACGCTGC
TACAAATAGAGAGCAAGAAAGAAATGGATTTTATCACTGGCAGCTTGAGGAAGATTAAGGAAGCTATGATTACTGGTGGGTTGTCT
CAGGATGCACACCGGACCGTGGCTTTGGCAAGATGGCTCCTCTCTCTCTGCGCTTGTGCCAGCAGAGATCCAGTCAAGCTAA
CCAAGTCTGTGGATACGTGAAAAGCAATTCCTCTCTTCTGCTCAACTGCAGCACGTTGGAAGTATTTTATCTGTGAGAAGTATGCGTTGA
GATCCTCTGTCTGA

C.预测的蛋白质序列



D.基因组结构



E.蛋白质的图示

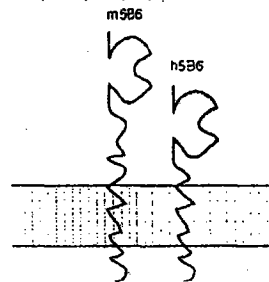


图 1

```

mClec9A P C P H N W I O N G K S C V Y V F E R W E M W N I S K K S C K E I G A S L F O I
nCLEC9A P C P N N N W I O N R E I S C V Y V S E I W S I W H T S Q E N C L K E I O I S I L T U Q I
mClec12A P C P K K G S E W Y K D S C V Y S O L N O Y G S W Q E S V M A C S A R N A S L L K Y
mDectn-1 S C L P N W I M H G R S C V Y L F H G P P F S W I E K N R R O T C O S L G G O L L O I
mClec8A P C P Q D W L W H K E N N C Y I O F F H G P P F S W I E K N R R O T C O S L G G O L L O I
mNKG2D P C P P N N W I C H K E N N C Y I O F F H G P P F S W I E K N R R O T C O S L G G O L L O I
nNKG2D P C P S S M C K K S O K K F F V T N H D E R R M P F S R S Q A S F C M S O N T S L L K V
MBP-A H A F S K M C K K S O K K F F V T N H D E R R M P F S R S Q A S F C M S O N T S L L K V

mClec9A D S K E E M E F R S S I G K K K G G N K Y W V G V F O D D G I S T S R W F W E E D G
nCLEC9A E S K E E M E F R S S I G K K K G G N K Y W V G V F O D D G I S T S R W F W E E D G
mClec12A K N K D V L E F E K S L R K I K G S Y D Y W V G V F O D D G I S T S R W F W E E D G
mDectn-1 D N S K E E F E F E S O T S Y K R I N A F W I G L S R R N Q S E G P W F W E E D G
mClec8A N G A D D F L L Q A I S S H T S P F W I G L S R R N Q S E G P W F W E E D G
mNKG2D Y S K E E O D F L K I S H T S P F W I G L S R R N Q S E G P W F W E E D G
nNKG2D Y S K E E O D F L K I S H T S P F W I G L S R R N Q S E G P W F W E E D G
MBP-A R N A E E N K A L O S E V A K T S A F L G T I D E V T E G J O F M Y V T I G

mClec9A S S P L S D L P A E R Q R S A G I O I C G V L K D S T L I S D K C I O S W
nCLEC9A S S P S D G L L P A E R Q R S A N O V C G V V K S E N S L L S S N C I O S W
mClec12A W F L S E F S E R S T D O I D R K Y C G V V K S E N S L L S S N C I O S W
mDectn-1 S A F F P N S S F O V R N A V P O E S L L H N C V W L H G S E V Y N Q I C I L I
mClec8A T P N F D F F K T R R O V S L O L Y S S I G N C A V L O D C A V F A E N C I L I
mNKG2D S S L S Y N Q L I V E I P K S I G S C A V Y G S S K A G S D C I A N L
nNKG2D S S L S Y N Q L I V E I P K S I G S C A V Y A S S K A G S D C I A N L
MBP-A G R L T Y S N W K K D E S P N D H G S G E D N C V T S V D N G L W N D S C Q A S

mClec9A K Y F L C E K K A F G S S C I
nCLEC9A K Y F L C E K K Y A L R R S S V
mClec12A N N I K O E E T A L S K V Q L E S V L N G L P E D S R
mDectn-1 S Y S C E K K E L
mClec8A A F S C Q K K T N H L O I
mNKG2D N T Y C M K R A V
nNKG2D N T Y C M Q R T V
MBP-A H A V I C E F P A

```

图 2

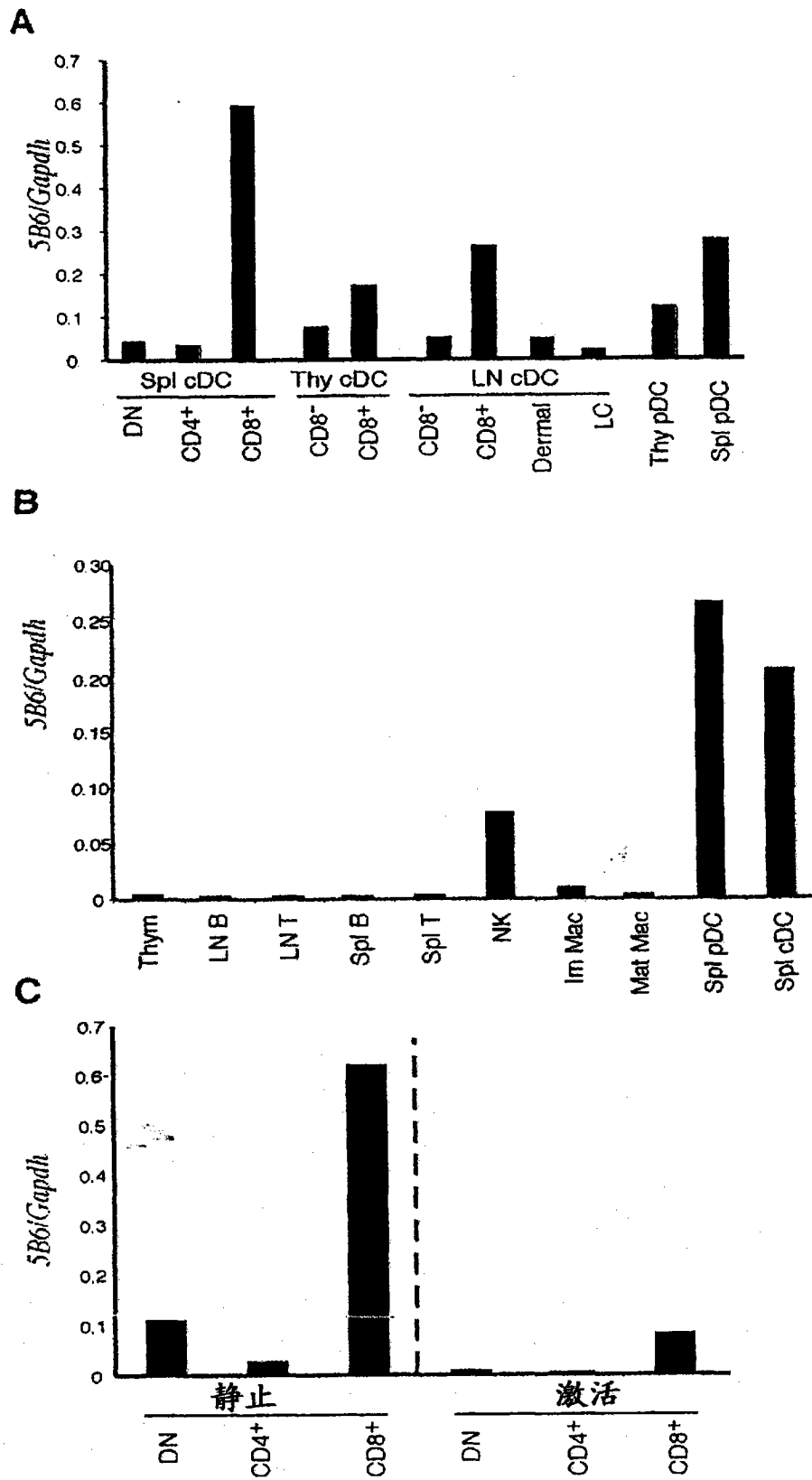


图 3

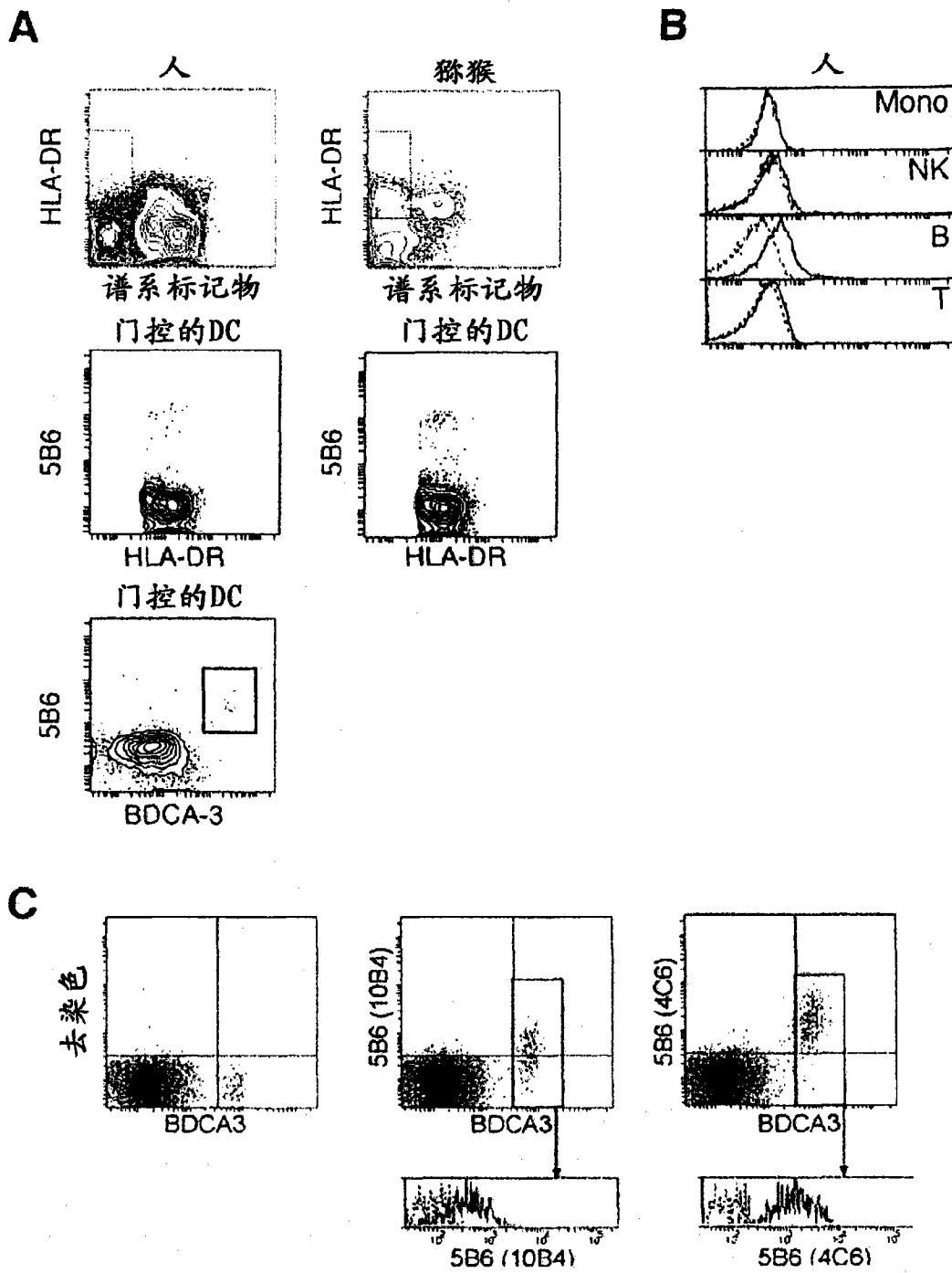


图 5

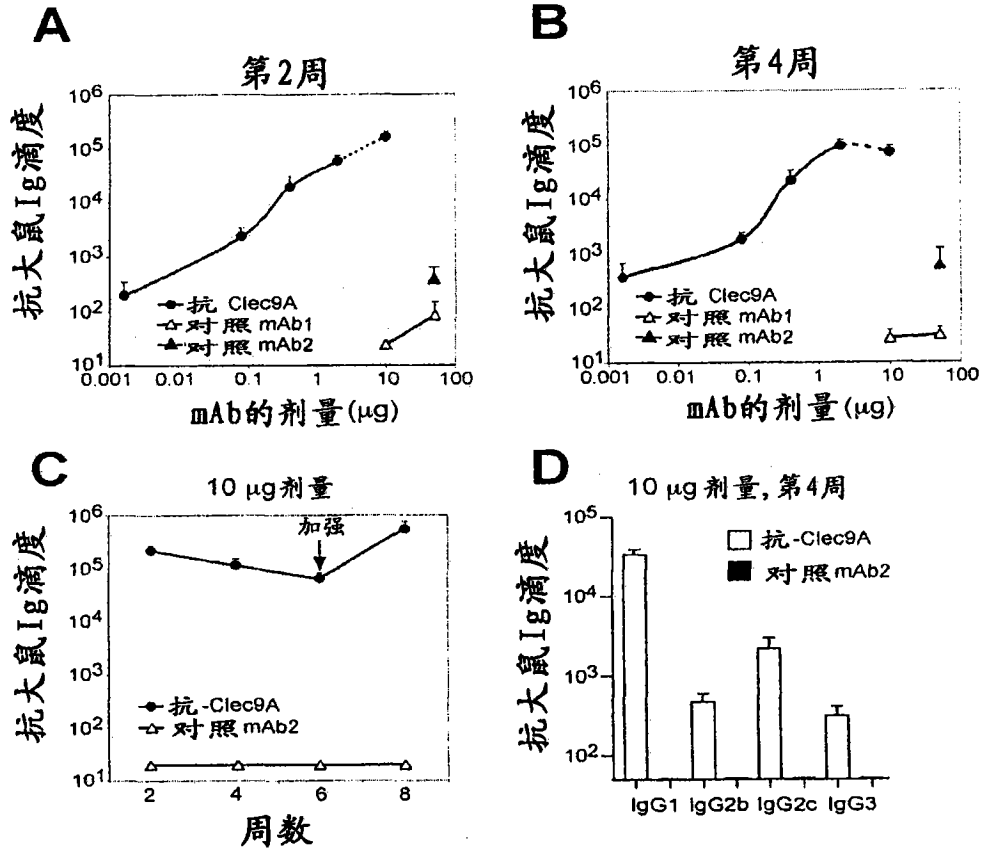


图 6

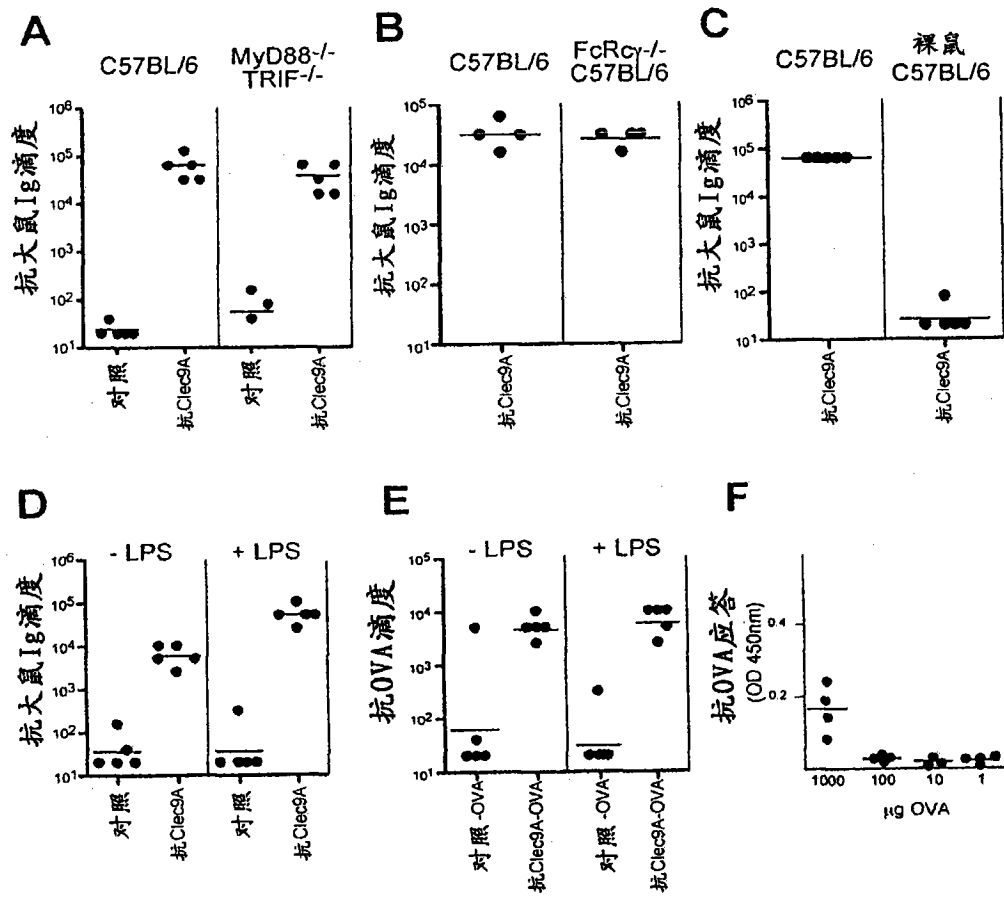


图 7

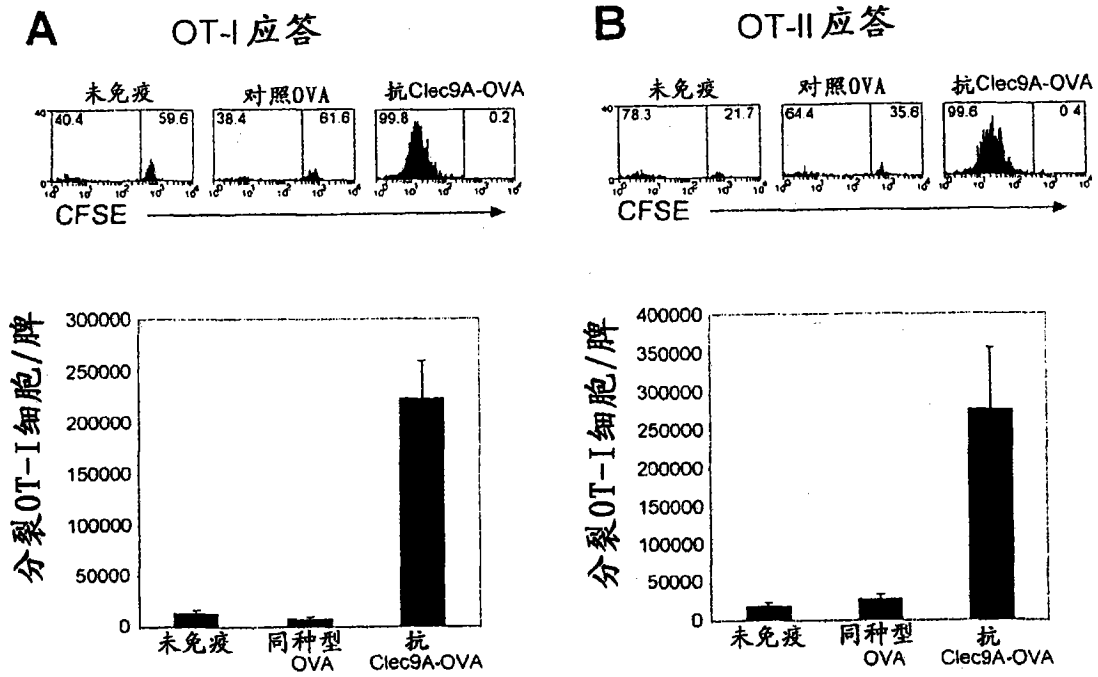


图 8

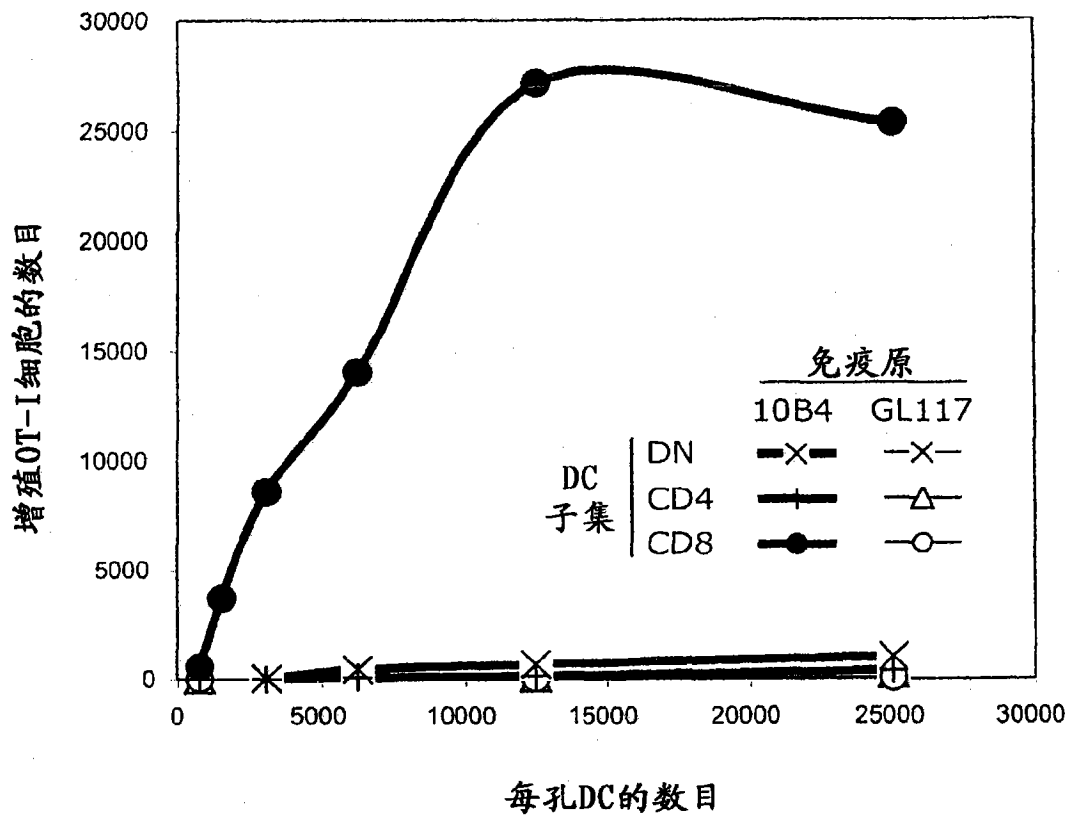


图 9

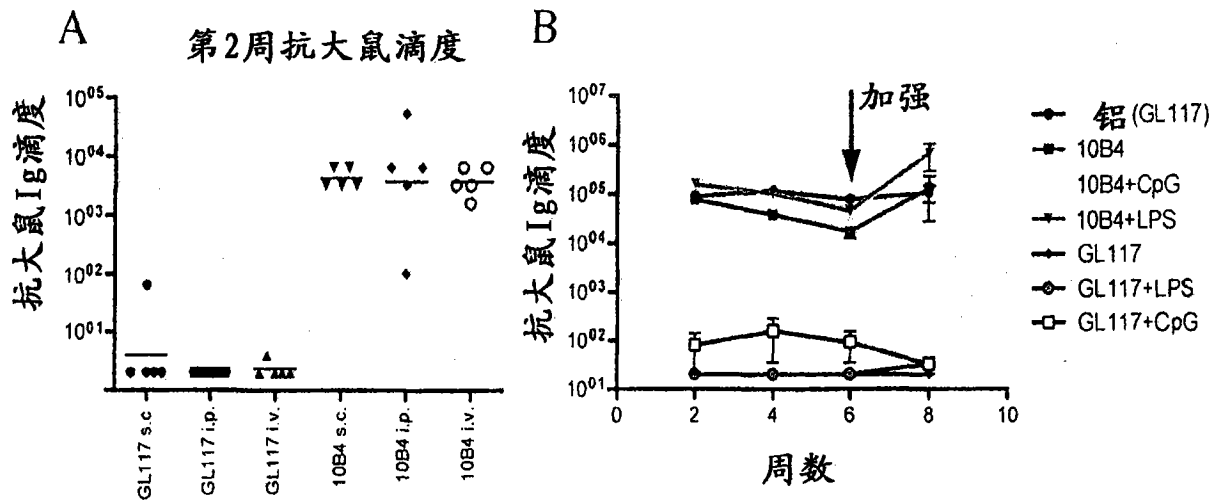


图 10

A 小鼠5B6可溶性蛋白质-原始(包括茎)

MVLASSTTSIHTMLLLLMLFHLGLQASISARQNSGLHHILDAQKMVWNHRGARQDYKDDDDKTR
 EQQERLIQDQDTALVNLQWQRKYTLEYCQALLQRSLSHSGTDASTGPVLLTS PQMVPQTLDSKETGSDCSPC
 PHNWIQNGKSCYYVFERWEMWNISKKSCLKEGASLFQIDSKEEMEFISSIGKLGKNKYWGVFQDGISGS
 WFWEDGSSPLSDLLPAERQRSAGQICGYLKDSTLISDKCDSWKYFICEKKAFGSCI.

人5B6可溶性蛋白质-原始(包括茎)

MVLASSTTSIHTMLLLLMLFHLGLQASISARQNSGLHHILDAQKMVWNHRGARQDYKDDDDKTR
 QQQEKLIQQERALLNFTWKRSCALQMKYCOAFMQNSLSSAHNSSPCPNWIQNRESCYYVSEIWSIWHTS
 QENCLKEGSTLLQIESKEEMDFITGSLRKIKGSYDYWVGLSQDGHSGRWLWQDGSSPS PGLLPAERSQSAN
 QVCGYVKSNSLLSSNCSTWKYFICEKYALRSSV.

小鼠5B6可溶性蛋白质-2/3(不包括茎)

MVLASSTTSIHTMLLLLMLFHLGLQASISARQNSGLHHILDAQKMVWNHRGARQDYKDDDDKTR
 GSDCSPC PHNWIQNGKSCYYVFERWEMWNISKKSCLKEGASLFQIDSKEEMEFISSIGKLGKNKYWGVF
 QDGISGSWFWEDGSSPLSDLLPAERQRSAGQICGYLKDSTLISDKCDSWKYFICEKKAFGSCI.

人5B6可溶性蛋白质-2/3(不包括茎)

MVLASSTTSIHTMLLLLMLFHLGLQASISARQNSGLHHILDAQKMVWNHRGARQDYKDDDDKTR
 NSSPCPNWIQNRESCYYVSEIWSIWHTSQENCLKEGSTLLQIESKEEMDFITGSLRKIKGSYDYWVGLSQ
 DGHSGRWLWQDGSSPS PGLLPAERSQSANQVCGYVKSNSLLSSNCSTWKYFICEKYALRSSV.

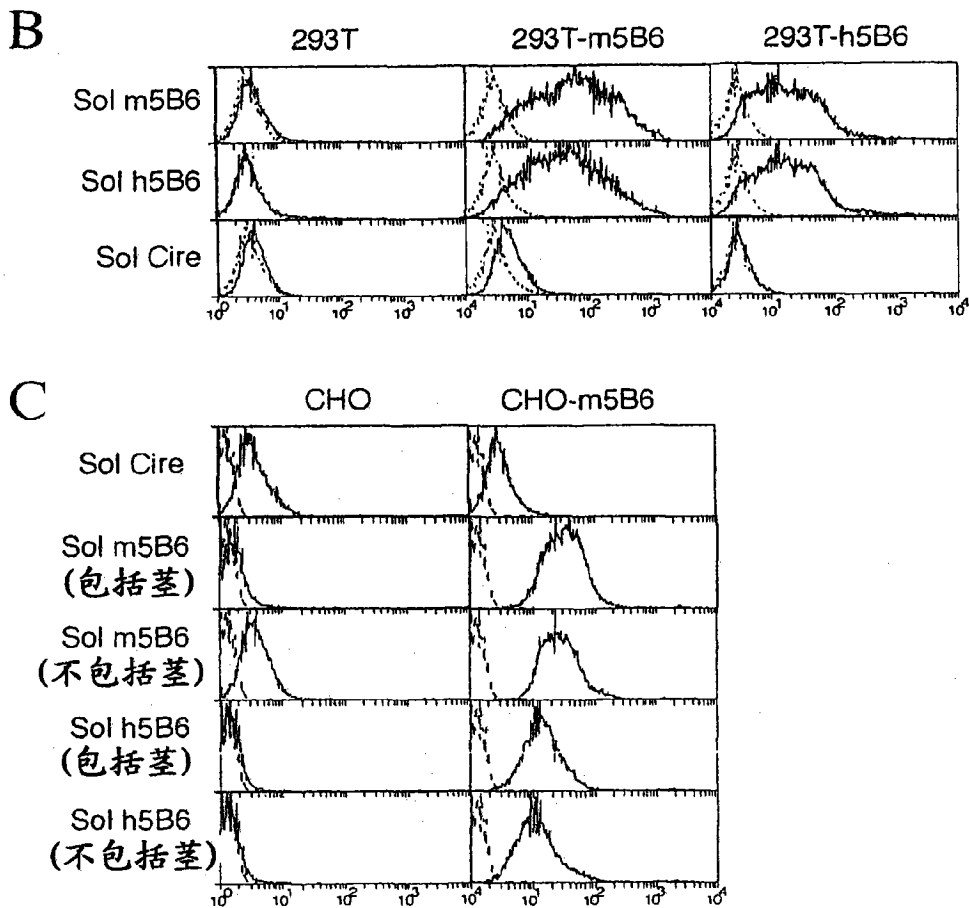


图 11

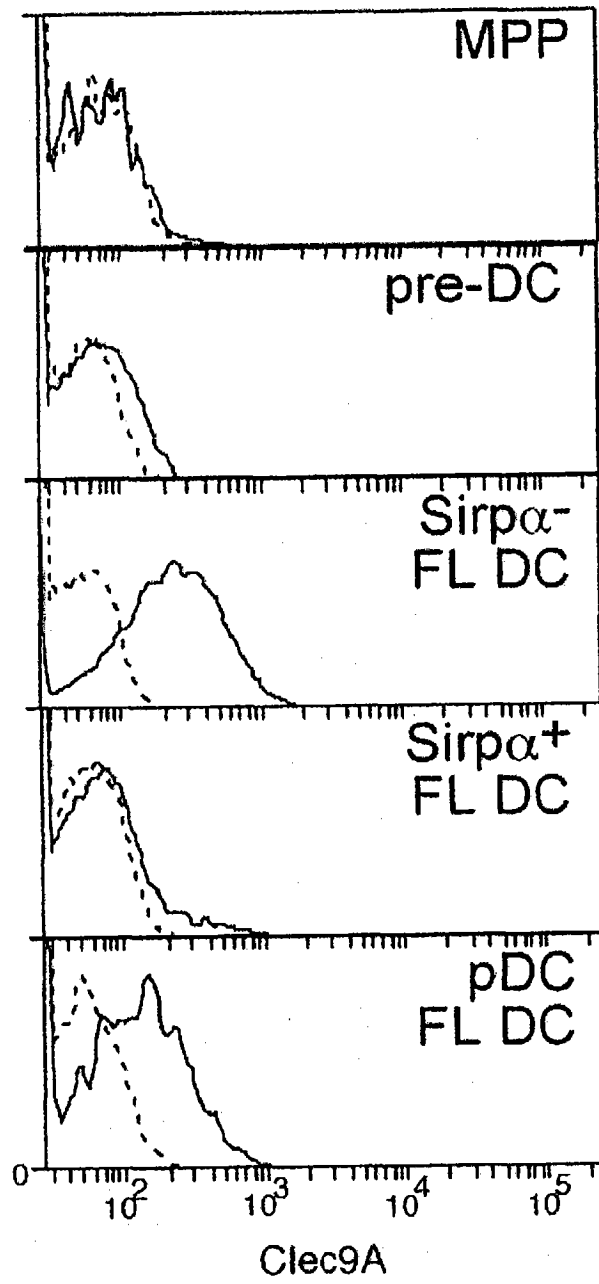


图 12

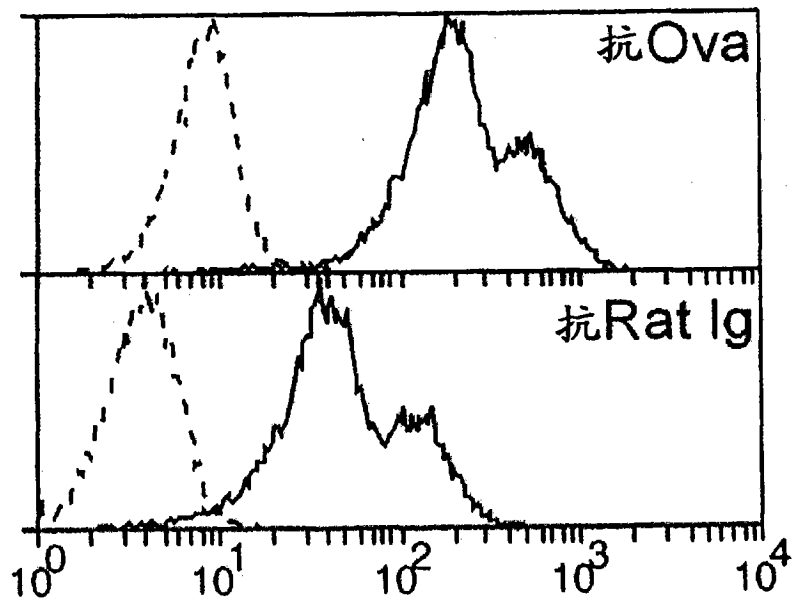


图 13

