

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 02816094.0

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010 年 2 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 100590131C

[22] 申请日 2002.8.14 [21] 申请号 02816094.0

[30] 优先权

[32] 2001.8.17 [33] US [31] 60/313,159

[32] 2001.12.26 [33] US [31] 60/343,991

[86] 国际申请 PCT/EP2002/009108 2002.8.14

[87] 国际公布 WO2003/016522 英 2003.2.27

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.17

[73] 专利权人 埃克索泰拉有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 阿兰·德尔凯尔

珍-柏纳德·莱佩克

[56] 参考文献

EP1004664A 2000.5.31

审查员 李 伟

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 6 页 说明书 82 页 附图 5 页

[54] 发明名称

用于将蛋白定向到胞外体的方法和化合物

[57] 摘要

本发明涉及用于将多肽在膜囊泡中进行选择性表达的组合物和方法。本发明还涉及了适合于生产这种膜囊泡的遗传结构和重组细胞。本发明还涉及了这样的功能化膜囊泡以及生产抗体的方法、产生或调节免疫反应的方法、以及使用它们筛选或鉴定结合配偶体的方法。更具体来说,本发明使用了天然或合成来源的 lactadherin 或其部分用于在膜囊泡中选择性表达多肽。本发明可用于实验、研究、治疗、预防或诊断领域。

1. 一种将多肽定位到胞外体的方法，包括：

(1) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码与定位多肽融合的该多肽，该定位多肽的组成如下：

- 选自 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-225、SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 229-387 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-387 的人乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域，或者

- 选自 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-266、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 271-426、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 109-426 或 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-426 的鼠乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域；

(2) 离体将该结构引入胞外体产生细胞以产生重组胞外体。

2. 一种在胞外体表面选择性表达多肽的方法，包括：

a) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码与定位多肽融合的该多肽，该定位多肽的组成如下：

- 选自 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-225、SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 229-387 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-387 的人乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域，或者

- 选自 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-266、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 271-426、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 109-426 或 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-426 的鼠乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域；

b) 离体将该结构引入胞外体产生细胞以产生重组胞外体；以及

c) 收集该重组胞外体，其中该胞外体在其表面上带有由该嵌合的遗传结构编码的多肽。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中嵌合的遗传结构含有前导信号序列，以便将编码的嵌合多肽分泌到该胞外体产生细胞的内质网中。

4. 权利要求 1 或 2 的方法，其中该多肽被融合在定位多肽的上游、

下游或任何内部结构域的连接处。

5. 权利要求 1 或 2 的方法，其中该多肽从抗原、细胞因子、配体、受体、免疫球蛋白、标记多肽、酶和离子通道或其部分中选择。

6. 权利要求 1 或 2 的方法，其中几种编码不同多肽的独特嵌合遗传结构被引入到该胞外体产生细胞中。

7. 权利要求 1 或 2 的方法，其中该胞外体产生细胞是哺乳动物细胞。

8. 一种制备功能化胞外体的方法，包括：

a) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码与定位多肽融合的多肽，该定位多肽的组成如下：

- 选自 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-225、SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 229-387 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-387 的人乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域，或者

- 选自 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-266、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 271-426、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 109-426 或 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-426 的鼠乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域；

b) 离体将该结构引入胞外体产生细胞以产生在它们的表面上带有该多肽的功能化胞外体，以及

c) 收集和/或纯化该功能化胞外体。

9. 一种功能化的胞外体，其由权利要求 8 的方法制备。

10. 一种组合物，其含有权利要求 9 的功能化胞外体以及可药用的赋形剂或载体。

11. 一种生产与多肽结合的抗体的方法，包括：

(a) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码与定位多肽融合的该多肽或其一种表位，该定位多肽的组成如下：

- 选自 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-225、SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 229-387 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-387 的人乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域，或者
- 选自 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-266、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 271-426、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 109-426 或 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-426 的鼠乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域；

(b) 离体将该结构引入胞外体产生细胞以产生在其表面呈递该多肽或表位的重组胞外体；

(c) 收集该重组胞外体并用该胞外体或其一部分免疫非人类的哺乳动物以产生可结合该多肽或表位的抗体；以及

(d) 从该哺乳动物收集抗体或抗体产生细胞。

12. 由细胞产生的胞外体或其一部分在制备用于免疫受试对象抵抗抗原的药物中的应用，所述细胞中导入了嵌合的遗传结构，该遗传结构编码与定位多肽融合的所述抗原，该定位多肽的组成如下：

- 选自 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-225、SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 229-387 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-387 的人乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域，或者
- 选自 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-266、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 271-426、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 109-426 或 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-426 的鼠乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域。

13. 权利要求 12 的应用，其中抗原是肿瘤、病毒或微生物抗原。

14. 一种选择或鉴定多肽的配体或结合配偶体的方法，包括：

(a) 提供一种嵌合遗传结构，它编码与定位多肽融合的该多肽，该定位多肽的组成如下：

- 选自 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-225、SEQ ID NO:7 的氨基

酸残基 229-387 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-387 的人乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域, 或者

- 选自 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-266、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 271-426、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 109-426 或 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-426 的鼠乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域;

(b) 将该结构引入胞外体产生细胞以产生在其表面呈递该多肽的重组胞外体;

(c) 将 (b) 中的重组胞外体与侯选化合物接触, 并测定该侯选化合物与该胞外体上的该多肽结合的能力。

15. 接触过的树突状细胞或其一部分在制备用于免疫受试对象抵抗抗原的药物中的应用, 所述接触过的树突状细胞的制备步骤包括:

(a) 提供一种嵌合的遗传结构, 它编码与定位多肽融合的该抗原, 该定位多肽的组成如下:

- 选自 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-225、SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 229-387 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-387 的人乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域, 或者

- 选自 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-266、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 271-426、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 109-426 或 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-426 的鼠乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域;

(b) 将该结构引入胞外体产生细胞以产生在它们的表面上带有该抗原的重组胞外体; 以及

(c) 收集该重组胞外体, 并且将其与来自该受试对象的树突状细胞离体接触。

16. 接触过的树突状细胞或其一部分在制备用于免疫受试对象抵抗抗原的药物中的应用, 所述接触过的树突状细胞制备步骤包括:

● 提供一种嵌合分子, 它包含与定位多肽融合的抗原, 该定位多肽的组成如下:

- 选自 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-225、SEQ ID NO:7 的氨基

酸残基 229-387 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-387 的人乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域, 或者

- 选自 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-266、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 271-426、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 109-426 或 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-426 的鼠乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域;

● 将该嵌合分子与含有磷脂酰丝氨酸或其它在胞外体中天然存在的脂类的脂质囊泡接触, 以产生在它们的表面上呈递该抗原的功能化脂质囊泡; 以及

● 在存在乳粘素的情况下, 将该功能化脂质囊泡与来自该受试对象的树突状细胞离体接触。

17. 功能化脂质囊泡或其一部分在制备用于免疫受试对象抵抗抗原的药物中的应用, 其中功能化脂质囊泡的制备步骤包括:

● 提供一种嵌合分子, 它包含与定位多肽融合的抗原, 该定位多肽的组成如下:

- 选自 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-225、SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 229-387 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-387 的人乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域, 或者

- 选自 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-266、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 271-426、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 109-426 或 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-426 的鼠乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域;

● 将该嵌合分子与含有磷脂酰丝氨酸或其它在胞外体中天然存在的脂类的脂质囊泡接触, 以产生在它们的表面上呈递该抗原的功能化脂质囊泡。

18. 一种生产与定位多肽融合的多肽的方法, 包括:

a) 提供一种遗传结构, 它编码与定位多肽融合的该多肽, 该定位多肽的组成如下:

- 选自 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-225、SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 229-387 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 69-387 的人乳粘素

C1 和/或 C2 功能结构域，或者

- 选自 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-266、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 271-426、SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 109-426 或 SEQ ID NO:10 的氨基酸残基 111-426 的鼠乳粘素 C1 和/或 C2 功能结构域，其中将该多肽通过一个含有切割位点的间隔序列融合到该定位多肽上；

b) 离体将该结构引入胞外体产生细胞以产生在其表面呈递该多肽的功能化胞外体；

c) 任选收集和/或纯化该功能化胞外体；

d) 用一种切割该切割位点的试剂处理该功能化胞外体，以及

e) 回收和/或纯化该多肽。

用于将蛋白定向到胞外体的方法和化合物

技术领域

本发明涉及用于将多肽在膜囊泡中进行选择性表达的组合物和方法。本发明还涉及适合于生产这样的膜囊泡的遗传结构和重组细胞。本发明还涉及这样的功能化膜囊泡以及生产抗体的方法、产生或调节免疫反应的方法、以及筛选和鉴定使用它们的结合配偶体的方法。具体来说，本发明使用天然或合成来源的乳粘素(lactadherin)或其部分用于在膜囊泡中选择性表达多肽。本发明可以用于实验、研究、治疗、预防或诊断领域。

背景技术

胞外体是来源于胞内体的囊泡，在后胞内体多囊泡体与细胞质膜融合后被分泌到细胞外环境中（4）。已知多种组织类型的细胞可以分泌胞外体，例如树枝状细胞、B淋巴细胞、肿瘤细胞和肥大细胞。不同来源的胞外体表现出含有不同类型的蛋白和脂类部分（5，6）。它们都显著地含有参与抗原呈递和免疫调节的蛋白，表明胞外体在引起调节免疫反应的细胞-细胞传递过程中发挥作用。事实上，用来自肿瘤抗原的肽刺激树枝状细胞（DC）分泌的胞外体，可以在使用匹配的肿瘤的动物模型中引发抗肿瘤反应（7，8）。生产、纯化胞外体的方法或使用胞外体用于治疗或作为研究工具已经有所描述，例如在 WO99/03499、WO00/44389 和 WO97/05900 中，在此引为参考。

考虑到它们的免疫原性和治疗性质，能够修饰胞外体的成分以改变它们的性质将是特别有用的。在这一方面，在本技术领域已经描述了重组的胞外体，它来自于用编码重组蛋白的质粒转染的细胞。这些重组胞外体含有质粒编码的重组蛋白（WO00/28001）。

发明概述

本发明现在公开生产重组胞外体的新方法。本发明还公开在胞外体中选择性表达多肽的方法。本发明还描述新的嵌合分子以及含有它们的重组细胞，可用于生产这些重组胞外体。本发明还涉及这样的功能化膜囊泡以及生产抗体的方法、产生或调节免疫反应的方法以及使用它们筛选和鉴定结合配偶体的方法。

本发明是基于意外的发现，即 Lactadherin 在许多产胞外体的细胞中表达，并且在这些细胞中，发现 Lactadherin 几乎专一地与胞外体相关（图 1）。这种高度特异性的亚细胞定位不仅在内源的 Lactadherin 上发生，而且在用编码 Lactadherin 的质粒转染胞外体产生细胞后得到的外源 Lactadherin 上也发生（图 2）。我们发现，通过删除 Lactadherin 的 C1/C2 结构域上的特定的短部分，Lactadherin 的亚细胞定位被改变了（图 2）。这些发现强烈地支持 Lactadherin 的 C1/C2 结构域含有高度特异性的定位于胞外体表面的定位基元，对 Lactadherin 的 C1/C2 结构域的修饰改变了定位到其它表面上的特异性。我们发现这种现象在几个种间是保守的，因为用编码人重组 Lactadherin 的质粒体外转染来自小鼠和仓鼠的胞外体产生细胞系，产生的人重组 Lactadherin 也几乎分别专一地结合于小鼠和仓鼠的胞外体中（图 3）。此外，在仓鼠细胞系中表达的小鼠重组 Lactadherin 也在仓鼠胞外体中发现（图 3）。

由此分析出，在一个蛋白中引入 Lactadherin 的部分或全部 C1 和/或 C2 结构域或其功能等价物可以使产生的嵌合蛋白定位于胞外体和其它脂质结构上。

本发明还公开允许鉴定其它的定位多肽或基因的方法，这可以用于构建嵌合基因或蛋白用于定位胞外体或在胞外体中表达。这些嵌合蛋白可以用于产生重组的囊泡，它们被定制后获得新的所需功能。由于胞外体内在的性质，即免疫原性和无毒性，得到的重组胞外体代表了一种新的工具，在研究和医学领域有广泛的用途。值得注意的是，

胞外体诱导强烈的免疫反应的潜力使它们成为理想的工具，用于制备针对在重组胞外体中表达的抗原的抗体。同样，具有生物活性的嵌合蛋白也可用于产生重组胞外体，它们被定制后获得新的治疗性质。Lactadherin 这种意外的定位多肽以及在胞外体中选择性表达的能力也提供了新的方法，以纯化这些多肽，包括 Lactadherin 本身。

因此，本发明的一个目的在于将多肽定位于胞外体的方法，包括：

- a) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码融合了定位多肽的所述多肽，该定位多肽包含了 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分；以及
- b) 在体内或离体将该结构引入胞外体产生细胞以产生重组胞外体。

本发明的另一个目的是在胞外体表面选择性表达多肽的方法，包括：

- a) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码融合了 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的部分的所述多肽；
- b) 将该结构引入胞外体产生细胞以产生重组胞外体；以及
- c) 收集该重组胞外体，其中该胞外体在其表面上带有由该嵌合的遗传结构编码的多肽。

本发明的另一个目的是制备功能化胞外体的方法，包括：

- a) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码一种融合了 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的部分的多肽；
- b) 将该结构引入胞外体产生细胞以产生功能化的胞外体，在它们的表面上呈递该多肽，以及
- c) 收集和/或纯化该功能化胞外体。

本发明的另一个目的是生产含有 Lactadherin 或其一部分的多肽的方法，该方法包括：

- a) 提供一种编码该多肽的遗传结构;
- b) 将该遗传结构引入胞外体产生细胞以产生功能化的胞外体, 在它们的表面上呈递该多肽;
- c) 收集和/或纯化该功能化胞外体, 以及
- d) 从该功能化胞外体中回收和/或纯化该多肽或其片段。

本发明的另一个目的是通过上述方法制备的功能化胞外体以及含有这样的功能化胞外体和可药用的赋形剂或载体的组合物。

本发明还涉及嵌合的遗传结构, 它编码了一个目的多肽, 该多肽与一个含有 Lactadherin 的 C1 和/或 C2 结构域的定位部分或下面鉴定的另一种定位多肽融合。目的多肽可以是例如抗原、细胞因子、配体、受体、免疫球蛋白、标记多肽、酶、离子通道或其一部分。这样的嵌合基因的特定例子编码从 SEQ ID NO:22-27、32 或 33 中选择的多肽或其缺失了 C 末端 8 个氨基酸残基的片段。

本发明还包括了含有上述的嵌合遗传结构的载体, 以及含有嵌合遗传结构或上述载体的重组细胞。

本发明还提供了鉴定或筛选胞外体定位多肽的方法, 以及产生能够选择性定位到膜囊泡(例如胞外体)上的嵌合蛋白的方法。嵌合蛋白一般是由一个多肽序列(例如天然存在的蛋白如抗原、细胞因子、配体、受体或免疫球蛋白的完整的或部分序列)融合到一个定位多肽的序列上而组成的, 定位多肽通常是 Lactadherin 或其包括 C1 和/或 C2 功能结构域的部分, 优选为 C1 / C2 功能结构域。

因此, 本发明的另一个方面在于一种筛选、鉴定或选择胞外体定位多肽的方法, 该方法包括:

- 提供第一个遗传结构, 它编码一种候选多肽, 优选为候选的跨膜多肽;

- 将第一个遗传结构引入胞外体产生细胞，并测试候选多肽在胞外体中的表达；
- 选择一个在胞外体中表达的侯选多肽，以及制备第二个遗传结构，它编码与跨膜抗原或受体融合的该选择的多肽；
- 将第二个遗传结构引入胞外体产生细胞并测试融合多肽在胞外体中的表达；以及
- 选择引起跨膜抗原或受体在胞外体中有效表达的多肽。

我们的结果显示，使用上述的方法，可以鉴定、选择和/或改进不同的含有指导在胞外体中表达的特异性定位信号的蛋白或多肽。这些多肽需要在胞外体中表达和将其他分子定位到这些囊泡的能力。这些多肽可以是从小膜蛋白衍生的，并且可以包括这样的蛋白的全部或其一部分，一般为含有至少是跨膜区的部分。这些结构特别适合于将抗原投送到胞外体中，特别是受体和跨膜蛋白。该方法可以用于选择特异性的单个定位多肽，或用于筛选遗传结构的文库。

获得的重组胞外体可用于许多研究和治疗用途，包括培养抗体、产生具有改进的治疗性质的胞外体、抗原递送以及文库筛选以鉴定蛋白-蛋白相互作用的相对物。

本发明还可有利地用于产生合成的脂质囊泡。事实上，本发明可用于将分子定位到胞外体之外的脂质结构中，例如任何天然存在的囊泡或含有质膜双层的细胞器、以及合成的含有脂的囊泡如脂质体或任何具有疏水性质的合成微粒。这样的脂质囊泡优选被改造成含有（或富集有）磷脂酰丝氨酸和/或其它的天然包含在胞外体中的脂类，以便允许嵌合分子的有效定位和结合。

此外，本发明可用于投送任何选定的与 Lactadherin 或其一部分人工融合分子。在这一点上，本发明不限于遗传融合，还包含了化学融合，即任何 Lactadherin 与一个分子的化学（共价）复合物。

附图说明

图 1: Lactadherin 到胞外体的定位。

图 2: 外源的 Lactadherin 到胞外体的定位。

图 3: Lactadherin 的选择性表达在种间是保守的。

图 4: 与 Lactadherin 融合的生物活性的 IL-2 在胞外体中的选择性表达。

图 5: 重组人 Lactadherin 的纯化。

图 6: 免疫接种 DNA 时 APC 的交叉引发。

图 7: 重组的候选跨膜多肽在胞外体中的表达。在胞外体及转化细胞的细胞裂解物中检测到重组的 MelanA/MART1 (组 A)、CD40L (组 B) 和 CD81 (组 C)。

图 8: 在胞外体中重组嵌合蛋白的表达。

图 9: 在用含 Lactadherin 的胞外体免疫的小鼠的血清中检测抗 Lactadherin 抗体。

发明详述

本发明公开生产重组胞外体的新方法及其应用。更具体来说, 本发明使用一种定位多肽, 例如 Lactadherin 或其部分, 来选择性表达天然或合成来源的多肽或将此多肽定位到膜囊泡中。本发明可以用于实验、研究、治疗、预防或诊断领域。

本发明源自于发现了 Lactadherin 的新的意外的性质。具体来说, 本发明显示 Lactadherin 在胞外体中选择性表达, 并可以用于在这样的囊泡中选择性表达多肽。

正如上面指出的, 本发明提供了在胞外体中定位或(选择性)表达多肽的方法、功能化胞外体的方法以及生产多肽的方法, 这些方法使用了一个编码嵌合多肽的嵌合基因或遗传结构。嵌合多肽包含了与 Lactadherin 或其功能结构域融合的目的多肽。

Lactadherin

Lactadherin 是一种首先在乳腺组织中被鉴定的蛋白。它是乳汁的成分，在乳汁脂肪球的表面与几种其他的蛋白相结合。Lactadherin 在其 N 末端含有表皮生长因子样 (EGF-like) 区域，其中含有在整合蛋白配体中发现的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (R-G-D) 序列基序。该基序介导了 Lactadherin 与 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 整合蛋白的结合。Lactadherin 的 C 末端含有一个 C1/C2 结构域，其参与了 Lactadherin 与乳汁脂肪球的相互作用。几种结合于其它细胞表面的其它蛋白也有相关的 C1/C2 结构域。Lactadherin 的 C1/C2 结构域已经显示出倾向于结合到含有磷脂酰丝氨酸脂质的表面 (参考文献 1 到 3)。已经发现 Lactadherin 出现在由鼠科动物树突状细胞产生的胞外体的表面。在这一方面，WO00/30667 涉及了使用 Lactadherin 或其变体将抗原投送到树突状细胞或在体内介导免疫反应。US5455031 公开了长形式的人 Lactadherin 的克隆。

本发明源自于发现了 Lactadherin 的新的意外的性质，即 Lactadherin 在胞外体中选择性表达或定位多肽的能力。

在本发明的上下文中，术语“选择性”表明细胞表达的 Lactadherin (或嵌合多肽) 几乎专一地出现在胞外体的表面，尽管可以观察到有残余或少量的 Lactadherin 出现在其它的细胞区室或膜中。本发明部分基于意外地确定了 Lactadherin 主要表达在胞外体的表面，并可用于生产其中富集了与 Lactadherin 结合的所需分子的胞外体或脂质囊泡。

在本发明的上下文中，术语在其表面“带有”分子的胞外体 (或囊泡) 被定义为含有与它们的膜结合的这类分子的囊泡。分子可以暴露在囊泡外面，也可以包含在囊泡内部 (即与膜的内侧结合)。一般来说，本发明允许在囊泡的表面有效地呈递分子，即在囊泡的外面暴露它们。

在执行本发明中可以使用不同来源或起源的 Lactadherin。一般来说，优选使用哺乳动物的 Lactadherin 或其部分。哺乳动物 Lactadherin 包括例如人、鼠科动物、大鼠、牛、猪和马的 Lactadherin。最优选的 Lactadherin 是人或鼠科动物的 Lactadherin 或其片段或其功能等价物。

在这方面，本发明优选使用：

- (1) 人的 Lactadherin 或鼠的 Lactadherin,
- (2) 人或鼠的 Lactadherin 片段，其中含有 C1 和/或 C2 功能结构域，更优选为 C1/C2 功能结构域，或
- (3) 与 (1) 或 (2) 中的多肽具有至少 50%一级结构同一性的多肽。

人的 Lactadherin 的氨基酸序列描述在 SEQ ID NO:7 (长形式) 和 8 (短形式) 中。相应的核酸分子的例子分别由 SEQ ID NO:5 和 6 代表。鼠的 Lactadherin 的氨基酸序列描述在 SEQ ID NO:10 中。也可参见 Stubbs 等(PNAS 87(21), 1990, 8417), 以及 Genbank 登录号 M38337。

在本发明的一个特定实施方案中，嵌合基因含有一种 Lactadherin，其氨基酸序列包含了 SEQ ID NO:7、8、10 或其含有 C2 功能结构域的片段。

在本发明的另一个特定实施方案中，嵌合基因含有一种 Lactadherin，其氨基酸序列包含了 SEQ ID NO:7、8、10 或其含有 C1 功能结构域的片段。

在另一个特定实施方案中，嵌合基因含有一种 Lactadherin，其氨基酸序列包含了 SEQ ID NO:7、8、10 的 C1/C2 功能结构域。

人 Lactadherin 的 C2 结构域含有 SEQ ID NO:7 的 229 到 387 位氨

氨基酸残基。人 Lactadherin 的 C1 结构域含有 SEQ ID NO:7 的 69 到 225 位氨基酸残基。在一个典型的例子中，嵌合结构编码 SEQ ID NO:7 的至少 229 到 387 位或 69 到 225 位氨基酸残基。在另一个特定的实施方案中，嵌合结构编码了 SEQ ID NO:7 的至少 69 到 387 位氨基酸。

鼠 Lactadherin 的 C2 结构域含有 SEQ ID NO:10 的 271 到 426 位氨基酸残基。鼠 Lactadherin 的 C1 结构域含有 SEQ ID NO:10 的 111 到 266 位氨基酸残基。在一个典型的例子中，嵌合结构编码 SEQ ID NO:10 的至少 271 到 426 位或 111 到 266 位氨基酸残基。在另一个特定的实施方案中，嵌合结构编码 SEQ ID NO:10 的至少 111 到 426 位氨基酸。在其他特定的实施方案中，嵌合结构编码 SEQ ID NO:10 的至少 109 到 426 位氨基酸。

如上所述，定位部分可以是与上述 (1) 或 (2) 中的多肽具有至少 50% 一级结构同一性的多肽。同一性可以按照各种已知的技术来确定，例如通过计算机程序，优选为 CLUSTAL 方法。在更优选的情况下，定位多肽与 (1) 或 (2) 中的多肽具有至少 60%，优选至少 70% 的同一性。这样的 Lactadherin 变体（或功能等价物）应保留将多肽定位到胞外体中的能力。这个性质可以被证实，如同在实施例中所描述的那样，例如通过产生一个嵌合基因，它含有与标记多肽融合的该变体，将这个嵌合基因在胞外体产生细胞中表达，然后确定标记多肽在胞外体表面的存在。优选的 Lactadherin 变体与上述的 (1) 或 (2) 中的多肽具有至少 85% 的同一性。可能的变体包括氨基酸缺失、取代、突变和/或添加。

这样的变体或功能等价物的具体的例子包括其它含有 C1/C2 结构域的多肽或蛋白或其片段。具体来说，这样的功能性变体的具体例子包括 Del-1、Neuropilin-1、凝集因子 5 和凝集因子 8 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的片段。

定位多肽的筛选

本发明还公开了可加以生产、筛选和/或分离的其它有效的定位多肽。具体来说，本发明显示了可以根据它们在胞外体中的表达和它们将其它多肽投送到这样的囊泡中的能力来筛选多肽。本发明表明，在胞外体中天然表达的多肽并不一定代表了有效的定位多肽，而并不在这些囊泡中天然表达的多肽可以人工地产生并能够有效地投送目的的多肽。本发明还表明，一般在胞外体中不表达的多肽可以通过重组 DNA 技术被迫进入这些区室中。

尽管唯一在胞外体中被发现的胞外体特异性蛋白例如 Lactadherin 被优选用来将蛋白定位到胞外体中，但在胞外体中富集或不是专门在胞外体中存在的蛋白，对于将其它蛋白定位到胞外体中来说也是潜在的候选者。本发明提供了鉴定和使用这种候选者的方法。为了说明这一点，我们已经发现重组的 MelanA/MART1、CD40L 和 CD81，在用编码这些跨膜分子的质粒转染细胞后在胞外体中得到表达。这些结果在实施例 6 中描述。MelanA/MART1 是一种肿瘤相关的胞内膜蛋白，最近在来自肿瘤细胞的胞外体中被发现。提示这种情况的发生反映了胞外体将全长的肿瘤抗原传递到 APC 的能力 (9)。我们的发现表明 MelanA/MART1 事实上是来自 MelanA/MART1⁺肿瘤胞外体的胞外体的一个整合成分。CD40L 是一种重要的免疫反应刺激剂，是我们的发现首次表明它可以在胞外体中检测到。与之相反，CD81 是一种已知的胞外体的成分，先前已知它在来自 B 细胞的胞外体中富集。我们构建了包含与一个 7-跨膜受体 CCR7 融合的 MelanA/MART1 或 CD81 的嵌合蛋白，发现 MelanA/MART1-CCR7 嵌合蛋白几乎专一地在胞外体中表达，而单独的 CCR7 只在细胞表面上检测到。相比之下，令人吃惊的是，尽管 CD81 由胞外体天然表达，CD81 与 CCR1 的嵌合结构不产生任何可检测到的蛋白（见实施例 6）。因此我们的方法表明存在有效的胞外体定位多肽，并允许鉴定和选择这样的多肽，用于将抗原、重要的跨膜抗原和受体定位到胞外体中。

因此，本发明的另一方面在于筛选、鉴定或选择胞外体定位多肽的方法，该方法包括：

- 提供第一个遗传结构，它编码一个候选多肽，优选为候选的跨膜多肽；
- 将第一个遗传结构引入胞外体产生细胞，并测试候选多肽在胞外体中的表达；
- 选择一个在胞外体中表达的候选多肽，以及制备第二个遗传结构，它编码与被定位多肽融合的所述选定的多肽；
- 将第二个遗传结构引入胞外体产生细胞并测试融合多肽在胞外体中的表达；以及
- 选择引起被定位多肽在胞外体中有效表达的多肽。

我们的结果显示，使用上述的方法，可以鉴定、选择和/或改进不同的含有指导在胞外体中表达的特异性定位信号的蛋白或多肽。这些多肽需要在胞外体中表达和将其他分子定位到这些囊泡的能力。这些多肽可以是跨膜蛋白衍生的，并且可以包括这样的蛋白的全部或其一部分，一般为含有至少是跨膜结构域的部分。这些结构特别适合于将抗原投送到胞外体中，特别是受体和跨膜蛋白。

在优选情况下，定位多肽是或者含有一个跨膜结构域。候选定位多肽实际上可以来自任何含有这样的跨膜结构域的蛋白，例如受体、通道等。这样的定位多肽的具体例子包括 MelanA/MART1、CD40L、CD81 等或其一部分。定位多肽可以含有整个的跨膜蛋白，或仅仅是其含有至少一个跨膜结构域的部分。

由于候选定位多肽的本质，本方法基本上适合于鉴定多肽，所述多肽适用于将跨膜多肽投送到胞外体或将多肽投送到胞外体内。最优选的定位多肽因此是那些跨膜的多肽，例如受体、跨膜抗原或其一部分。本发明具有特别的优势，因为它允许筛选能够在特定的囊泡中有效表达复合分子，例如具有几个跨膜结构域的受体（例如 G 蛋白偶联

受体或“GPCR”)的定位多肽。

候选定位多肽或融合多肽在胞外体中的表达可以根据多种技术进行检测,这些技术公开于本申请的整个说明书中。在一个优选实施方案中,将遗传结构引入胞外体产生细胞,从这种修饰的细胞中制备胞外体,然后测量在该胞外体中表达的多肽。可以使用多种技术测量表达,包括使用定位或被定位多肽的特异性配体。在一个特定的实施例中,使用特异性针对定位部分或在融合多肽中引入的标记序列的抗体来测定表达。

在制备融合多肽时,可以将被定位的部分放置在定位多肽的上游或下游,即C端或N端。融合的方向决定了被定位多肽的表达类型。具体来说,将被定位多肽偶联到定位多肽的细胞内部分会导致被定位多肽在囊泡内部表达(对可溶性抗原而言)。另一方面,对于表达跨膜的受体,可以由专业技术人员根据结构调整偶联的类型,以允许适当的折叠并插入到胞外体膜中。

如同后面将公开的那样,偶联可以是直接的,也可以通过一个间隔分子,胞外体产生细胞可以有各种不同的来源和起源。

此外,不同的融合可以平行方式,也可以在同样的囊泡内加以表达和试验。在这一点上,本方法可以用于选择特异性的单个定位多肽或者用于筛选遗传结构文库。

本方法允许生产改进的定位多肽和能够高度有效地在胞外体中表达的融合分子。

在这一方面,本发明还涉及生产能够表达选定的跨膜多肽的胞外体的方法,该方法包括:

- 如上所述选择一种定位多肽,

- 提供一种编码了与定位多肽融合的选定的跨膜多肽的遗传结构，
- 将该遗传结构在胞外体产生细胞中表达，以及
- 从该修饰细胞中生产和分离胞外体。

本发明还涉及生产表达 GPCR 或其含有至少一个跨膜结构域的部分的胞外体的方法，该方法包括：

- 提供一种遗传结构，该结构编码了与含有跨膜结构域和/或如上所述选定的定位多肽融合的 GPCR 或其部分，
- 将该遗传结构在胞外体产生细胞中表达，并且
- 从该表达 GPCR 或其部分的修饰细胞中生产和分离胞外体。

本发明还涉及表达重组 GPCR 或其一部分的胞外体。

本发明还涉及含有从 Melan/MART1、CD40L 和 CD80 中选择的定位多肽以及被定位多肽的融合多肽。在更优选情况下，被定位多肽含有一个跨膜结构域。本发明还涉及任何编码这样的融合多肽的多核苷酸序列。具体来说，这样融合的说明性例子以 SEQ ID NO:32 和 33 提供。

目的多肽

本发明可用于在（从）胞外体或其它脂质结构中定位、选择性表达或生产（例如纯化）各种多肽，例如抗原、细胞因子、配体、受体、免疫球蛋白、标记多肽（例如标记蛋白，如绿色荧光蛋白或酶）、酶、离子通道等，或其一部分。一般来说，本发明可以与任何目的多肽一起使用，例如任何具有生物学或免疫学性质的多肽。此外，本发明可用于同时在胞外体中表达或定位几个不同的编码不同多肽的嵌合遗传结构，以进一步扩展活性范围或重组复合分子。

优选的多肽的例子是抗原，例如肿瘤抗原、病毒抗原和微生物抗

原。肿瘤抗原的说明性例子是 MAGE、BAGE、前列腺肿瘤抗原、癌基因等。这些抗原的氨基酸序列本身已知，并可以通过重组技术或通过合成来生产。本发明中被定位或呈递的特定的抗原包括可溶性抗原和受体的胞外结构域。

其它目的多肽的例子包括淋巴因子（IL-2、IL-4、IL-13）、营养因子（TNF、INF、GM-CSF、G-CSF 等）、酶、凝集因子、激素、脂蛋白等。

另一种类型的目的多肽是具有至少一个跨膜结构域，更优选为 GPCR 或其部分的受体。事实上，本发明现在允许使用定位多肽将跨膜多肽在特定的囊泡中定位和表达。GPCR 在囊泡中的表达允许它们对配体（无论是合成的还是天然的）、生产抗体等进行纯化、研究性质、筛选。GPCR 的一个具体的例子是例如 CCR7，尽管本发明也可以与其它受体一起使用。

其它的特定的例子是免疫球蛋白和其片段，例如免疫球蛋白的 Fc 片段。这样的 Fc 片段当在胞外体表面中表达时，可以将胞外体导向表达这些 Fc 片段的受体的细胞，例如抗原呈递细胞。这样的 Fc 片段的表达，不论是单独表达还是与抗原结合表达，都有利于并增强抗原呈递细胞，特别是树突状细胞对胞外体的识别，并增加了这些抗原的交叉引发。

本发明也明显地适合于投送治疗用蛋白或多肽。可以使用功能化的重组胞外体或脂质体，任选与在它们表面上的组织特异性配体一起，将这样的蛋白投送到特定的细胞。藉此，治疗用蛋白可以被表达在缺少内源蛋白，或表达了非功能性的内源蛋白从而产生了病理状态的细胞的表面。在这一方面，本发明的一个特定的目的是将治疗用蛋白投送到受试对象中的方法，包括：

(a) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码与 Lactadherin 或其含有

C1 和/或 C2 功能结构域的片段或使用上面公开的方法所鉴定的一种定位多肽相融合的该蛋白；

(b) 将该结构引入胞外体产生细胞，以在其表面产生带有该嵌合蛋白的重组胞外体；

(c) 收集该重组胞外体，并将该胞外体或其部分注射到该病人中。

此外，因为本发明也允许将分子化学偶联到 Lactadherin 或其功能等价物上，本发明还扩展到非多肽化合物例如小分子、核酸、脂、多糖、糖脂等。

正如所指出的，本发明现在使通过利用 Lactadherin 或其功能等价物定位而将多种分子结合起来表达在胞外体中，以重构具有增强的免疫原性的人工微粒成为可能。一个典型的例子是将抗原、Lactadherin、定位多肽（例如 Fc 片段）和/或佐剂（例如细胞因子、包括 GM-CSF 等）组合在一起。

融合

嵌合的多肽或化合物可以通过遗传或化学融合来制备。

对于遗传融合，编码目的多肽的嵌合基因区域可以被融合在 Lactadherin 或定位多肽的上游、下游或任何内部的结构域连接处。在这一点上，实施例证明与 Lactadherin 的上游融合以及与定位多肽的 N-端和 C-端融合是有功能的。此外，结构域彼此之间可以直接融合，也可以被不改变嵌合多肽的性质的间隔区域所分隔开。这样的间隔区域包括克隆位点、切割位点、挠性结构域等。此外，嵌合的遗传结构还可以包含一个前导的信号序列以有利于将编码的嵌合多肽分泌到胞外体产生细胞的内质网中。一般来说，嵌合基因包含 Lactadherin 的前导序列。然而，也可以插入异源的前导序列，特别是如果利用 Lactadherin 的部分。此外，嵌合基因还可以含有一个标记以便于纯化或监测，例

如一个 myc 标记、一个多聚组氨酸标记等。

对于化学融合，可以对部分或全长的 Lactadherin 序列进行选择或修饰，以使其末端出现一个游离的活性基团，例如巯基、氨基、羧基以交联一个可溶性的多肽、糖脂或任何小分子。在一个优选实施方案中，Lactadherin 结构编码了 SEQ ID NO:7 的至少 1 到 230 位氨基酸，其中 C1 结构域（60 到 225 位氨基酸）提供了定位到胞外体的基序，230 位的半胱氨酸提供了与其它分子进行化学交联的游离巯基残基。将肽和化学物质交联到 SH 基团可以通过已经建立好的方法来进行（参见 G. T Hermanson(1996) 生物结合技术, San Diego 科学出版社, 785 页）。本方法的优点是将本发明的范围扩展到了可以制备针对多肽以外的化合物，如糖脂、药物和有机化合物的抗体。它还提供了无需引入假定的新的表位就将多肽和化合物定位到胞外体的方法。所选的交联试剂已显示是免疫原性沉默的（上面引用的 G. T Hermanson(1996)）。新的表位有时在嵌合基因连接处出现，并可能会限制嵌合基因产物在特定的预防和治疗人类应用中的使用。

因此，修饰的胞外体或脂囊泡（例如脂质体）可以通过产生呈递相关的 Lactadherin 结构如 SEQ ID NO:7 的胞外体（脂质体），然后将它们与将要连接的产物进行反应来制备。另外，交联到产物上的 Lactadherin 片段也可以先被制备，然后加入到纯化的胞外体或脂质体中。

载体

本发明还包括了含有上述的嵌合遗传结构的载体以及含有如上所述的嵌合遗传结构或载体的重组细胞。载体可以是质粒、噬菌体、病毒、人工染色体等。典型的例子包括质粒，例如那些从商业可获得的质粒，特别是 pUC、pcDNA、pBR 等衍生的质粒。其它的优选载体从病毒衍生，例如复制缺陷的逆转录病毒、腺病毒、AAV、杆状病毒或痘苗病毒。对载体的选择可以由专业技术人员根据将要使用该载体的

重组宿主细胞进行调整。在这一点上，优选使用能够转染或感染哺乳动物细胞的载体。事实上，优选的重组宿主细胞是哺乳动物细胞。它们可以是原始的细胞或建立的细胞系。说明性例子包括成纤维细胞、肌肉细胞、肝细胞、免疫细胞等以及它们的先祖细胞或前体细胞。最优选的哺乳动物细胞是产生胞外体的哺乳动物细胞。这些细胞包括例如肿瘤细胞、树突状细胞、B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞或肥大细胞。

胞外体产生细胞

胞外体产生细胞包括任何生产和分泌胞内体源的膜囊泡的细胞，优选为哺乳动物源的细胞，其中的膜囊泡是由后期的胞内体多囊泡体与质膜融合产生的（4）。来自多种组织类型的细胞已经表明能够分泌胞外体，例如树突状细胞、B 淋巴细胞、肿瘤细胞、T 淋巴细胞和肥大细胞。生产、纯化胞外体的方法或使用胞外体用于治疗目的或作为研究工具已经有所描述，例如在 WO99/03499、WO00/44389 和 WO97/05900 中，在此引为参考。本发明的优选胞外体产生细胞是哺乳动物肿瘤细胞、哺乳动物 T 淋巴细胞和哺乳动物树突状细胞，一般为鼠或人来源的。在这一方面，细胞优选为永生化的树突状细胞（WO94/28113）、幼树突状细胞或肿瘤细胞（WO99/03499）。此外，为了生产抗体，使用 B 淋巴细胞作为胞外体产生细胞可能是有优势的，因为产生的胞外体含有附加的功能和分子，例如促进抗体产生的 MHC II 类分子。此外，已经表明 B 细胞衍生的胞外体能够结合到滤泡树突状细胞，这是抗体诱导的另一个重要特点（10）。

细胞可以在任何合适的培养基中培养和维持，例如 RPMI、DMEM 等。培养可以在任何合适的装置中进行，例如平板、碟子、试管、摇瓶等。

可以使用任何常规的方法将遗传结构（或载体）引入胞外体产生细胞，例如通过裸露 DNA 技术、阳离子脂质介导的转染、聚合物介导的转染、肽介导的转染、病毒介导的转染、物理或化学试剂或处理、

电穿孔等。在这一方面，应该注意到短暂的转染足以表达相关的嵌合基因，因此不需要产生稳定的细胞系或优化转染条件。由这样的细胞产生的胞外体可以按照本领域熟知的技术收集和/或纯化，例如通过离心、层析等。优选的技术已经在 WO00/44389 和 US09/780748 中描述，在此引为参考。

本发明重组的功能化的胞外体可以用于生产抗体、调节免疫反应、投送生物活性和/或作为筛选工具以及选择任何选定的多肽的配体。

抗体的制备

在一个特定的实施方案中，本发明涉及使用上述的重组胞外体生产特异性针对任何多肽或其它抗原的抗体。

本发明的一个值得考虑的优点是在重组胞外体上抗原与免疫刺激成分相结合，这就允许针对免疫原性弱的抗原产生抗体，在这种情况下经典的制备抗体的方法都是失败的。具体来说，从 B 淋巴细胞产生的胞外体含有 MHC II 类分子，可以刺激抗体的产生。此外，不需要纯化大量的抗原就可以制备抗体。事实上，不论在其表面上表达的外源抗原的本质是什么，都可以使用单一的小规模的纯化方法分离胞外体（US09/780748）。因此，可以非常快地完成抗原制备步骤，即一般可以在少于 12 个小时之内。这种方法快速，可以平行处理许多样品，允许同时制备多种抗原用于免疫。在天然存在的囊泡中表达抗原，再结合温和的纯化步骤，可以帮助保护抗原的天然构象，能够产生具有潜在的治疗用途的相关抗体。此外，本发明产生在其表面含有高密度嵌合分子（例如抗原）的脂质囊泡。这样的高密度可以与聚合状态相比，通过增加抗原的亲合力极为有利于抗体的生产。本发明的另一个优点是多肽可以被胞外体产生细胞表达，因而易于进行天然的加工和翻译后修饰（糖基化等）途径。

因此本发明还涉及产生结合了多肽的抗体的方法，该方法包括用上述的表达了该多肽或其一个表位的功能化胞外体免疫非人类的哺乳动物，然后从该哺乳动物收集抗体或抗体产生细胞。该方法特别适合于生产针对上述的与 Lactadherin 融合的抗原的抗体，或者与定位多肽融合的跨膜受体的抗体。

本发明还涉及生产与多肽结合的抗体的方法，包括：

- (a) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码与 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的部分融合的该多肽或其一种表位；
- (b) 将该结构引入胞外体产生细胞以产生在其表面上呈递该多肽或表位的重组胞外体；
- (c) 收集该重组胞外体并将该胞外体或其一部分注射到非人类的哺乳动物中以产生结合了该多肽或表位的抗体；以及
- (d) 从该哺乳动物收集抗体或抗体产生细胞。

本发明还涉及生产与受体例如 GPCR 结合的抗体的方法，包括：

- (a) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码与定位多肽融合的该受体或其一种表位；
- (b) 将该结构引入胞外体产生细胞以产生在其表面上呈递该受体或表位的重组胞外体；
- (c) 收集该重组胞外体并将该胞外体或其一部分注射到非人类的哺乳动物中以产生结合了该受体或表位的抗体；以及
- (d) 从该哺乳动物收集抗体或抗体产生细胞。

抗体可以是多克隆的也可以是单克隆的。从不同的物种，包括小鼠、啮齿动物、灵长动物、马、猪、兔、禽类等生产多克隆抗体的方法可以在例如 Vaitukaitis 等 1971 年的文献中发现。简单来说，抗原（在本发明中为重组胞外体）可以在含或不含佐剂（完全或不完全佐剂，例如弗氏佐剂）的情况下注射，并一般通过皮下、腹膜内、静脉内或肌肉内注射的方式给药到动物。可以进行重复注射。收集血液样品，

分离免疫球蛋白或血清。

生产单克隆抗体的方法可以在例如 Harlow 等（抗体：实验室手册，CSH 出版社，1988）或 Kohler 等（Nature 256(1975) 495）的文献中发现，在此引为参考。简单来说，这些方法包括用抗原（在本发明中为重组胞外体）免疫动物，接着回收脾或淋巴结细胞，然后与永生的细胞如骨髓瘤细胞融合。得到的杂交瘤产生单克隆抗体，并可以通过有限的稀释分离单独的克隆加以选择。

在一个特定的实施方案中，胞外体产生细胞是 B 淋巴细胞。

在另一个特定的实施方案中，胞外体产生细胞和/或 Lactadherin 和/或定位多肽来自与被免疫接种的哺乳动物相同的物种。事实上，在这样的系统中，胞外体和 Lactadherin 不具有免疫原性，产生的抗体基本上只针对选定的抗原。

在一个特定的实施方案中，胞外体产生细胞是鼠细胞，Lactadherin 是鼠 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的部分或变体，非人类的哺乳动物是小鼠，抗原或表位来自不同的物种，例如是人类来源的。更为优选的情况下，小鼠是人源化小鼠，允许产生人源化的抗体。

为此，蛋白（抗原或表位）的核苷酸序列可以融合到小鼠 Lactadherin 的 C1 和/或 C2 结构域，将得到的嵌合序列使用标准的分子生物学技术克隆到一个真核表达载体中。编码嵌合蛋白的质粒被转染进一个产生胞外体的小鼠细胞系中，并在转染的细胞培养几天后收获重组胞外体，然后通过蔗糖密度梯度离心纯化重组胞外体（US09/780748）。嵌合蛋白在重组胞外体上的存在使用抗 C1/C2 结构域的单克隆抗体通过 Western 印迹分析来建立。然后将带有嵌合蛋白的重组胞外体注射到同源的小鼠中产生抗体。就此而论，只有包含在

用于产生嵌合蛋白的蛋白序列中的表位才代表被免疫小鼠中的外源抗原。抗体的产生在根据抗原的本质所设计的筛选分析中被证实。如果将重组胞外体应用在筛选分析中，则需要制备第二个嵌合蛋白，其中相同的蛋白抗原序列与 Lactadherin 序列的扩展的 C1/C2 结构域融合。此外，也可以使用表达与来自不同物种的 Lactadherin C1/C2 结构域融合的蛋白抗原的重组胞外体。这些新的结构产生具有新的连接序列的嵌合蛋白，因此避免了检测/选择针对用于免疫的嵌合蛋白的连接处的抗体。

正如上面指出的，本方法非常具有优势，可以用于在各种不同的物种中产生针对任何选定的抗原或表位，包括肿瘤抗原、细菌抗原或病毒抗原的抗体。

展示新的生物活性的重组胞外体的制备

本发明可用于生产能够表现任何选定的生物活性的重组胞外体。它们可以通过将一个（或几个）具有特定生物学活性的多肽定位到胞外体的表面而产生，如上所述。

本发明的一个优点是，在重组胞外体上生物活性成分可以达到高的局部浓度，这就能够使胞外体获得潜在的新的生物活性，具有在靶细胞上交联受体的可能性。这种高的局部浓度也允许增加被运送分子的亲和性，因此改善了胞外体的潜力。此外，本发明还允许在胞外体上重建生物活性多组分的实体，由此将重组胞外体的应用领域扩展到多链的蛋白，而经典的方法操作这样的蛋白是困难的。

可以使用的生物活性蛋白的一个例子是白细胞介素-2（IL-2），其是一种激活 T 细胞的细胞因子，用在癌症的免疫治疗中以刺激 T 细胞针对肿瘤细胞的反应。这种免疫学确定的佐剂与肿瘤抗原同时出现在胞外体上可以改善胞外体的效率。在这种情况下，证实重组胞外体上的 IL-2 是有生物活性的功能性分析需要使用一种 IL-2 依赖性细胞系。

另一个生物活性蛋白的例子是 CD40 配体 (CD40L)，它诱导辅助信号，而这是 DC 启动针对被捕获抗原的免疫反应所需要的。辅助信号与肿瘤抗原同时出现在胞外体上可以改善胞外体的效率。在这种情况下，监测在 DC 上诱导活化标记的功能性分析将被用来证实重组胞外体上的 CD40L 是有生物活性的。

其它的例子包括其它的淋巴因子 (IL-4、IL-13)、营养因子 (TNF、IFN、GM-CSF、G-CSF 等)、酶、凝集因子、激素、脂蛋白等。

其它的特定的例子是能够促进胞外体定位或与特定细胞，优选为与树突状细胞相互作用的多肽。这样的定位多肽包括例如免疫球蛋白的 Fc 片段。这样的 Fc 片段当在胞外体表面表达时，可以用于将胞外体导向抗原呈递细胞。这样的 Fc 片段的表达与抗原（和任选上面公开的佐剂分子）的表达相结合，促进并增强了抗原呈递细胞、特别是树突状细胞对胞外体的识别，并增加了这些抗原的交叉引发。

为了生产这样的功能化的胞外体，生物活性蛋白的全长或部分 cDNA 序列可以融合在编码定位多肽的序列的上游或下游，将得到的嵌合序列使用标准的分子生物学技术克隆到一个真核表达载体中。定位多肽可以选自或来自人类 Lactadherin 序列的 C1 和/或 C2 结构域或其等价物，也可以来自使用上面公开的筛选方法鉴定的定位多肽，例如 MART1/MelanA 或其片段。编码嵌合蛋白的质粒被转染到一个胞外体产生细胞系中，在对转染的细胞培养几天后收获重组胞外体。然后通过蔗糖密度梯度离心纯化重组胞外体。嵌合蛋白在重组胞外体上的存在使用抗原特异性抗体（如果可以得到）和/或抗定位多肽的抗体通过 Western 印迹分析来建立。然后进行功能分析以证实与定位多肽融合的蛋白的生物活性得到保留。接着可以将功能化胞外体体内给药到任何需要它的哺乳动物受试对象，特别是人类受试对象。给药可以采取各种不同的途径，例如通过全身性注射，如静脉内、肌肉内、腹膜

内、肿瘤内、皮下等。

使用重组胞外体将全长抗原投送到 DC

除了由重组胞外体诱导的体液或抗体反应外，也可以产生针对在胞外体上表达的抗原的细胞免疫反应。如上所述制备包括编码肿瘤或微生物抗原和定位多肽的全长 cDNA 的嵌合序列。然后可以使用重组胞外体直接接种个体或者在体外间接脉冲 DC。将全长抗原投送到 DC 中缓和了疫苗使用的单倍型限制。此外，通过抗原吸收和转移到 DC 的自然途径投送，会使抗原得到有效的加工，并对 I 类和 II 类表位均能够呈递。因此，表达全长的肿瘤或微生物抗原的重组胞外体可以有助于改进针对癌症和传染病的疫苗。

本发明的另一个目的是一种将抗原投送到受试对象的方法，包括：

(a) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码融合了 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分的该抗原；

(b) 将该结构引入胞外体产生细胞以产生在它们的表面上带有该抗原的重组胞外体；

(c) 收集该重组胞外体，并将该胞外体或其一部分注射到该受试对象中。

本发明的另一个目的是一种将抗原投送到受试对象的方法，包括：

(a) 提供一种嵌合的遗传结构，它编码融合了 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分的该抗原；

(b) 将该结构引入胞外体产生细胞以产生在它们的表面上带有该抗原的重组胞外体；

(c) 收集该重组胞外体，并将其离体与来自该受试对象的树突状细胞接触；以及

(d) 将该接触过的树突状细胞或其一部分注射到该受试对象

中。

树突状细胞的一“部分”是指可以将所有接触过的 DC 都注射，或者如果需要，也可以注射一部分，而将其余的保留以备进一步注射或使用。此外，术语“部分”还表明尽管完整的细胞可以施用，但其中衍生的制剂也可以注射，例如由这样的树突状细胞产生的膜提取物或胞外体。

树突状细胞或其部分可以通过几种途径注射，例如通过静脉内、动脉内、腹膜内、肿瘤内、肌肉内等，例如在 WO99/03499 中所描述的，在此引为参考。

正如上面指出的，在特定的实施方案中，胞外体产生细胞可以与其它嵌合遗传结构接触，这些嵌合遗传结构编码了与 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分融合的另一（附加的）分子，从而产生在其表面上带有除了抗原外的该分子的重组胞外体。该分子可以是佐剂、定位多肽、Lactadherin 等。具体的例子包括免疫球蛋白的 Fc 片段、CD40 配体、细胞因子和 GM-CSF。多种遗传结构可以被包含在一个载体中或在几个分开的载体中，它们可以同时或连续地与胞外体产生细胞接触。

功能化合成脂质囊泡的生产

此外，正如上面指出的，本发明可以与多种膜囊泡一起使用，包括天然的囊泡（例如胞外体）或合成的囊泡，例如脂质体。脂质体在研究和医药中是有广泛用途的工具。它们是从天然的磷脂和胆固醇生产的小人工囊泡。这种囊泡现在正被用作药物载体，运载各种分子，包括小药物分子、蛋白、核苷酸和质粒。因此，脂质体可以有大量的应用。在本发明中，有可能通过上述的嵌合分子将分子（例如多肽、抗原、小分子等）定位到脂质体，并在受试对象中给药这样的功能化囊泡。

一般来说，脂质体应含有磷脂酰丝氨酸或其它在胞外体中天然含有的脂类，以利于对 Lactadherin 嵌合多肽的定位。

关于这一点，本发明涉及一种生产抗体的方法，包括：

- 提供一种嵌合分子，它包含融合了 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分的抗原；
- 将该嵌合分子与含有磷脂酰丝氨酸或其它在胞外体中天然存在的脂类的脂质囊泡接触，以产生在它们的表面上呈递该抗原的功能化脂质囊泡；
- 用这种功能化脂质囊泡免疫非人类的哺乳动物以产生结合了该抗原的抗体。

本发明的另一个目标是一种将抗原投送到受试对象的方法，包括：

- 提供一种嵌合分子，它包含融合了 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分的抗原；
- 将该嵌合分子与含有磷脂酰丝氨酸或其它在胞外体中天然存在的脂类的脂质囊泡接触，以产生在它们的表面上呈递该抗原的功能化脂质囊泡；以及
- 在存在 Lactadherin 的情况下，离体将该功能化脂质囊泡与来自该受试对象的树突状细胞接触；以及
- 将该接触过的树突状细胞或其部分注射到该受试对象。

本发明的另一个目标是一种将抗原投送到受试对象的方法，包括：

- 提供一种嵌合分子，它包含融合了 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分的抗原；
- 将该嵌合分子与含有磷脂酰丝氨酸或其它在胞外体中天然存在的脂类的脂质囊泡接触，以产生在它们的表面上呈递该抗原的功能

化脂质囊泡；以及

- 在存在 Lactadherin 的情况下将该功能化脂质囊泡或其一部分注射到该受试对象中。

本发明还涉及一种含有上述的功能化脂质囊泡和 Lactadherin 的组合物。

脂质囊泡优选为脂质体。脂质体可以按照常规的技术生产，在优选情况下，对磷脂酰丝氨酸或其它在胞外体中天然含有的脂类进行富集。抗原可以是任何有机化合物，例如多肽、核酸、脂类、多糖、糖脂等。嵌合分子可以含有遗传（当抗原是多肽时）或化学偶联到 Lactadherin 的抗原，如上所述。

在另一个实施方案中，本发明涉及一种生产功能化脂质囊泡的方法，包括：

- 提供含有磷脂酰丝氨酸或其它在胞外体中天然含有的脂类的脂质囊泡，该囊泡带有一个活化的 Lactadherin，其包括 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分，被一个反应性化学基团所活化；

- 将该脂质囊泡与同该反应性化学基团相互作用的化合物接触以产生功能化的脂质囊泡，以及

- 任选纯化该功能化的脂质囊泡。

如上所述，活化的 Lactadherin 可以是在其一端具有半胱氨酸残基的 Lactadherin 的一部分，因此产生了反应性的 SH 基团。这样一种活化的 Lactadherin 可以含有，例如 SEQ ID NO:7 的 1-230 位氨基酸。此外，活化的 Lactadherin 可以通过化学方法在 Lactadherin 的一端加上一个活性基团如巯基、氨基或羧基来制备。带有该活化 Lactadherin 的脂质囊泡可以是胞外体或合成的囊泡例如脂质体。关于这一点，在一个特定的实施方案中，本发明涉及一个呈递上述的活化 Lactadherin

的脂质体。在另一实施方案中，本发明涉及带有如上所述的活化 Lactadherin 的脂质体。这样的胞外体或合成脂质囊泡可以如上所述生产。化合物可以是任何有机分子，例如多肽、核酸、脂类、糖脂、多糖、小分子、药物（例如医药）、毒素等。此外，如上所述，脂质囊泡可以用各种多肽功能化，例如采用抗体、定位部分和/或佐剂和/或 Lactadherin。典型的例子包括含有与 Lactadherin 或其 C1 和/或 C2 功能结构域融合的各种多肽的脂质囊泡，该多肽从抗原、定位多肽（例如免疫球蛋白的 Fc 片段）和佐剂（例如 CD40 配体、细胞因子、GM-CSF 等）中选择。

基因和 DNA 疫苗接种

本发明也可用于在体内直接进行 DNA 或基因疫苗接种，使用上面公开的编码嵌合抗原分子的遗传结构。

针对基因和 DNA 免疫的抗原可以产生体液或抗体反应和细胞免疫反应。包括编码肿瘤或微生物抗原和定位多肽的部分或全长 cDNA 的嵌合序列如上所述制备。然后编码这些嵌合蛋白的病毒、非病毒载体或 DNA 可以被用于直接接种个体或动物。已经表明基因和 DNA 免疫可以诱导潜在的免疫反应，导致宿主针对微生物感染产生保护和肿瘤消退（参见 Hasan 等, J. Immunol. Methods 229, 1-22, 1999）。最近的发现表明，抗原呈递细胞（APC）的交叉引发，即 APC 吸收由 DNA 转染的非 APC 产生的外源抗原，是在基因和 DNA 接种中诱导强烈免疫反应的主导机制（Jae Ho Cho 等, J. Immunol. 167, 5549-5557, 2001）。此外，也已经发现细胞相关的抗原交叉呈递比可溶性抗原的交叉呈递要有效得多（Ming Li 等, J. Immunol. 166, 6099-6103, 2001）。从这些发现出发，相信在体内将抗原从 DNA 转染的非 APC 转移到 APC 的适当的方法是设计最适的基因和 DNA 疫苗的关键。在这一方面，根据本发明的基因疫苗接种方法为直接阐明这个判据提供了相当多的优点，因为它可以在体内产生与胞外体结合的抗原，然后被转移到 APC。

因此本发明的另一个目的在于一种将抗原投送到受试对象的方法，包括给该受试对象注射一种编码了与上述的定位多肽，特别是与 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分融合的该抗原的遗传结构。

本发明的另一个目的是一种在受试对象中产生针对特定抗原的免疫反应的方法，该方法包括给该受试对象注射一种编码了与上述的定位多肽，特别是与 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分融合的该抗原的遗传结构。

基因疫苗接种可以使用多种病毒载体，例如痘苗病毒、痘病毒、腺病毒、腺伴随病毒等，非病毒载体，例如与各种脂或肽成分结合的 DNA，或使用纯的（例如裸露的）DNA 来进行。接种可以通过多种注射途径进行，包括肌肉内、静脉内、皮下或皮内。多种多样载体投送装置或技术可用于基因疫苗接种，包括基因枪或电穿孔。动物和个体也可以使用在体外用载体转染的细胞系来免疫。选择能够释放大量的胞外体的细胞系将特别有利。

在一个特定的实施方案中，该方法包括直接注射编码了嵌合多肽的裸露的 DNA 或 RNA。裸露意味着注射的成分中不含任何帮助转染的试剂。在另一个优选实施方案中，遗传结构以裸露的形式通过肌肉内注射给药，更优选使用基因枪。

该方法允许通过胞外体交叉呈递非可溶形式的抗原，胞外体的功能是从 APC 周围的细胞转移抗原（交叉引发）（Wolfers 等，Nature Medicine 7, 297-303, 2001）。图 6 显示了该方法的示意图。用编码含有 Lactadherin 的 C1/C2 结构域的嵌合蛋白的病毒、非病毒或裸露 DNA 载体免疫使得嵌合蛋白被多种多样的细胞在体内表达，包括胞外体产生细胞（步骤 1）。然后重组蛋白被释放到细胞外与胞外体相关的环境（步骤 2）。当带有嵌合蛋白的胞外体结合到 APC 时，APC 的交叉引

发发生（步骤3）。

在一个特定的实施方案中，抗原到 APC 的交叉呈递（步骤3）还可以通过编码嵌合蛋白的遗传结构（例如 DNA）、编码 Lactadherin 的遗传结构（例如 DNA）一起给药来增强，因为结合到 DC 的胞外体含有 Lactadherin。此外，遗传结构还可以制备成抗原的序列被插入在全长的 Lactadherin 序列中介于 EGF 结构域和 C1/C2 结构域之间。因此，注射一种单一的结构就可以产生通过 Lactadherin 的 C1/C2 结构域定位到胞外体的抗原，并且其中含有 Lactadherin 的受体结合结构域可以指导胞外体特异性投送到 DC。

此外，为了进一步增强免疫反应，编码抗原以及任选 Lactadherin 的遗传结构可以与编码佐剂，例如促进免疫反应的因子或分子的遗传结构共同给药。这样的佐剂的例子包括 CD40 配体、GM-CSF、细胞因子等。

此外，为了进一步增强免疫反应，编码抗原、Lactadherin 和/或佐剂的遗传结构可以与编码定位多肽，例如指导胞外体到抗原呈递细胞的因子或分子的遗传结构一起给药。这样的定位多肽的例子包括免疫球蛋白的 Fc 片段。

在这一方面，在一个特定的实施方案中，该方法包含了给受试对象注射编码嵌合抗原的遗传结构和编码 Lactadherin 或与 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分融合的辅助分子的遗传结构。编码 Lactadherin 或嵌合辅助分子的结构可以与编码嵌合抗原的结构同时注射，也可以分开注射。当进行分开注射时，它们可以在几乎同样的时间进行，也可以不这样。具体来说，可以首先注射编码嵌合抗原的结构，然后注射编码 Lactadherin 或嵌合辅助分子的结构。但是优选的是各种各样嵌合蛋白同时在体内出现并被同样的胞外体表达。在一个特定的实施方案中，蛋白从包含在单个载体如病毒载体（如痘

苗病毒)的遗传结构上表达。

在这一方面,本发明还包含了一种组合物,它含有一种编码与定位多肽融合的抗原的遗传结构,该定位多肽选自(1) Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分;以及(2)通过上述方法鉴定的定位多肽,和(a)一种编码与定位多肽融合的免疫辅助分子(例如一个佐剂或细胞定位多肽)的遗传结构,该定位多肽选自(1) Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分;和(2)通过上述方法鉴定的定位多肽,和/或(b)一种编码 Lactadherin 的遗传结构。事实上,本发明允许在直接体内表达与 Lactadherin 或其部分融合的各种功能分子的基础上,在胞外体的表面有效地组合这些功能分子。这种组合的表达使得免疫反应得到增强,它模拟了抗原微粒或免疫复合物。

优选的例子是包含下列成分的组合物:

(a) 一种编码与定位多肽融合的抗原的遗传结构,该定位多肽选自(1) Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分;和(2)通过上述方法鉴定的定位多肽,

(b) 一种编码与定位多肽融合的辅助多肽的遗传结构,该定位多肽选自(1) Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分;和(2)通过上述方法鉴定的定位多肽,该辅助多肽是一个细胞因子,如 GM-CSF 或 IL-2 或 CD40L,和/或

(c) 一种编码与定位多肽融合的免疫球蛋白的 Fc 片段的遗传结构,该定位多肽选自(1) Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分;和(2)通过上述方法鉴定的定位多肽,和/或

(d) 一种编码 Lactadherin 的遗传结构

如上所述,遗传结构可以是任何 DNA 或 RNA 分子,一般为质粒、病毒载体、病毒粒子、裸露的 DNA 或任何含有它们的细胞。不同的遗传结构可以被包含在单个载体中,也可以在分别的载体中或其任意

的组合。组合物一般还含有可药用的赋形剂或载体，例如稀释剂、缓冲剂、等渗溶液等。组合物还可以包括协助转染的试剂，如上所述。

按照本发明将全长或部分的抗原投送到 DC 缓和了疫苗使用的单倍型限制。此外，通过抗原吸收和转移到 DC 的自然生理途径投送，会使抗原得到有效的加工，并对 I 类和 II 类表位均能够呈递。因此，使用编码定位到胞外体的肿瘤或微生物抗原的载体进行基因和 DNA 疫苗接种有助于改进针对癌症和传染病的基因和 DNA 疫苗。

一个具体的针对 HIV 的 DNA 疫苗组合物的例子包括了一种遗传结构，它编码了与 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分融合的抗原，该抗原从逆转录酶、gag、env、nef 和 tat 多肽或其部分中选择。

此外，除了基因疫苗之外，蛋白疫苗也可以以同样的方式使用。在这一方面，可以使用纯化形式的重组嵌合抗原给药到病人。在给药之后，具有 Lactadherin 的 C1 和/或 C2 结构域的嵌合抗原将在体内被装载进病人自己的循环胞外体中，从而产生免疫反应。

因此本发明的另一个目的包括了一种在受试对象中产生针对一个特定抗原的免疫反应的方法，该方法包括给该受试对象注射含有与定位多肽融合的该抗原的嵌合多肽，该定位多肽选自（1）Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分；和（2）通过上述方法鉴定的定位多肽。

本发明的另一个目的是一种将抗原投送到受试对象中的方法，包括：

（a） 提供一种编码了与 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分融合的该抗原的嵌合遗传结构；

（b） 将该结构引入胞外体产生细胞以产生在其表面上带有该

嵌合抗原的重组胞外体；

- (c) 收集该重组胞外体并纯化该嵌合抗原；以及
- (d) 给该病人注射纯化的嵌合抗原。

重组胞外体作为蛋白-蛋白相互作用研究的工具

随着基因组测序计划提供的信息的丰富，正在开发基因组范围内的基因发现和功能确定的方法。重组胞外体构成了一种新的研究蛋白-蛋白相互作用的技术，可以允许对文库进行高通量的筛选以鉴定每一种蛋白-蛋白相互作用的对应物。

对于这样的应用，蛋白被表达在两个具有不同蛋白图谱的重组胞外体物种中。来自每个重组胞外体物种的嵌合蛋白彼此间的相互作用可以使用重组胞外体上的特殊标记通过标准的基于 ELISA 的分析方法来检测。该方法可以用于鉴定一个已知的配体或受体的对应物。

因此，在一个特定的实施方案中，本发明提供了一种选择或鉴定一个多肽的配体或结合配偶体的方法，包括：

- (a) 提供一种嵌合遗传结构，它编码与上述的定位多肽，特别是与 Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分融合的该多肽；
- (b) 将该结构引入胞外体产生细胞以产生在其表面上呈递该多肽的重组胞外体；
- (c) 将 (b) 中的重组胞外体与候选化合物接触，并测定该候选化合物与该胞外体上的该多肽结合的能力。

候选化合物可以是一个被分离的产物、产物的混合物或化合物的文库。候选化合物的例子包括小分子（例如有机产物）及其文库、DNA 文库、蛋白文库、可以被噬菌体或其它展示系统展示的抗体（或其片段）文库等，但不限于此。候选化合物可以平行方式或作为复合混合物测试。

测定候选化合物结合该多肽（或抗原）的能力的方法包括，例如分离胞外体并用其免疫非人类的哺乳动物。在该哺乳动物中抗体的产生表明候选化合物与胞外体复合，并允许对该分子进行鉴定。

该技术可用于产生针对一个分子的配体的抗体。例如，根据本发明，将需要抗体的受体的配体表达在脂质囊泡的表面。这样的囊泡与含有该受体的制剂（例如生物样品）接触。对胞外体进行清洗和纯化，然后注射到非人类的哺乳动物中。可以从该哺乳动物中分离出针对受体的抗体。这种策略对于生产针对复合分子、不稳定的分子或甚至那些不能得到分离形式的分子的抗体是非常有利的。

重组多肽的纯化

本发明还提供了一种从上述的功能化胞外体中生产多肽的方法。该方法是源于 Lactadherin 令人意外地在胞外体中选择性表达或定位多肽的性质。因此，胞外体构成了一个重要的 Lactadherin 或各种含有 Lactadherin 片段的嵌合多肽的来源，从中可以回收和/或纯化这些蛋白。这种方法的一个特别的优势是胞外体的制备为相对富集和浓缩需要纯化的蛋白提供了一种快速的手段，允许从大规模的细胞培养物中以小的样品体积纯化蛋白。在这种方法中，可以生产 Lactadherin 或含有 Lactadherin 的 C1 和/或 C2 功能结构域的嵌合多肽，它们可以使用标准的生物化学方法从胞外体中直接提取出来，例如包括用去污剂或盐裂解胞外体以及用脂类或肽特异性释放蛋白。此外，当在蛋白含 C1-C2 结构域间插入了特异性位点时，在对嵌合多肽进行蛋白水解切割后可以从胞外体中直接释放（天然的）蛋白。将这样的位点加以充分表征，包括例如 furin、肠激酶、因子 X 等的切割位点。然后可以使用标准的层析方法，包括阴离子或疏水层析和/或在共价结合了凝集素、特异性抗体、受体或配体和标记对应物的柱上进行亲和层析来纯化提取出的蛋白。该技术也适合于纯化与上述方法鉴定的定位多肽融合的多肽。

因此本发明的另一个目的在于一种生产含有 Lactadherin 或其一部分的多肽的方法，该方法包括：

- a) 提供一种编码了该多肽的遗传结构；
- b) 将该结构引入胞外体产生细胞以产生在其表面上呈递该多肽的功能化胞外体；
- c) 任选收集和/或纯化该功能化胞外体，以及
- d) 从该功能化胞外体中回收和/或纯化该多肽或其片段。

正如已经指出的，多肽可以是 Lactadherin，例如野生型的 Lactadherin 或其片段。在这一方面，本发明提供了一种有效的生产（和纯化）Lactadherin 的方法，包括将编码 Lactadherin 的遗传结构引入胞外体产生细胞以产生在其表面上呈递该多肽的功能化胞外体，任选收集和/或纯化该功能化胞外体，以及从该功能化胞外体中回收和/或纯化 Lactadherin。

多肽可以是一种由嵌合遗传结构编码的嵌合多肽，其中嵌合多肽含有一种与 Lactadherin 的 C1 和/或 C2 功能结构域融合的多肽。在这种情况下，可以从胞外体中回收整个的嵌合多肽或仅仅是其一部分，例如多肽与 Lactadherin 的 C1 和/或 C2 功能结构域分开后被释放。在这一方面，本发明的另一个目的是一种生产多肽的方法，包括：

- a) 提供一种遗传结构，它编码了与定位多肽融合的该多肽，其中该定位多肽选自（1）Lactadherin 或其含有 C1 和/或 C2 功能结构域的一部分；和（2）通过上述公开的方法鉴定的定位多肽，其中该多肽通过一种含有切割位点的间隔序列融合到该定位多肽上；
- b) 将该结构引入胞外体产生细胞以产生在其表面上呈递该多肽的功能化胞外体；
- c) 任选收集和/或纯化该功能化胞外体；
- d) 用一种切割该切割位点的试剂处理该功能化胞外体，以及
- e) 回收和/或纯化该多肽。

下面提供的实施例作为说明而不是作为任何限制。

实施例 1：肿瘤细胞系表达的人类 Lactadherin 几乎专一地在胞外体中被发现

人源的肿瘤细胞以大约 80%汇合被接种到 175cm² 的三角瓶中，然后在完全培养基（添加了 2mM L-谷氨酰胺、100U/ml 青霉素、0.1mg/ml 链霉素、1mM 丙酮酸钠和 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640）中于 37℃ 5% CO₂ 气氛下培养 4 天。在培养的第 4 天，对于每个培养物如下制备胞外体裂解液和细胞裂解液：

收获培养上清液，依次以 200g 离心和通过 0.2μm 的滤器过滤以除去细胞碎片。然后将澄清的上清液在 4℃ 以 100000g 离心 90 分钟以使胞外体沉淀。将沉淀重新悬浮在 100μl 冰冷的 PBS 中，获得的组分被留做胞外体 (E)。

肿瘤细胞在 10ml Versene (Invitrogen)中于室温保温 10 分钟后从培养平板上分离下来。然后在 4℃ 以 200g 离心 10 分钟以使细胞沉淀。沉淀在由 50mM 磷酸钠 pH8.0、200mM NaCl、10mM 咪唑和 0.5% Tween 20 以及混合蛋白酶抑制剂 (Sigma) 组成的 100μl 冰冷的裂解缓冲液 (LB) 中重新悬浮和裂解。裂解液在冰上保温 10 分钟，然后通过 4℃ 以 10000g 离心 10 分钟来除去不溶物质。得到的上清液被留做细胞裂解液 (CL)。

在 32μl E 和 CL 中加入 8μl 5X SDS-PAGE 样品缓冲液 (SB)，在 100℃保温 5 分钟，然后通过 SDS-PAGE 进行分析。通过半干电转移后胶上的蛋白被转移到 PVDF 膜上，然后使用稀释 2500 倍的针对人 Lactadherin 的 RGD 基元的多克隆抗体 (Sebastian Amigorena 博士馈赠) 通过免疫检测来证实样品中人 Lactadherin 的存在。与 Lactadherin 结合的抗体使用稀释 5000 倍的与辣根过氧化物酶 (Jackson ImmunoResearch) 结合的第二个抗兔 IgG 抗体和生色底物 (CN/DAB,

Pierce) 来检测。

CL 和 E 样品的分析分别显示在图 1 的板 A 和板 B 中。在这个分析中, 来自胚胎的肾细胞 293 (第 1 道)、黑素瘤细胞 FON-T1 (第 2 道) 和 M10 (第 3 道)、肺癌细胞 NCI-N226 (第 4 道) 和 NCI-H520 (第 5 道)、黑素瘤细胞 FM3 (第 6 道)、B 类淋巴瘤细胞 Raji (第 7 道) 的 CL 和 E 被试验。

来自乳汁的部分纯化的人 Lactadherin 被用做阳性对照 (第 9 道), 而来自 CHO (仓鼠卵巢细胞系) 的 E 和 CL 被用做阴性对照 (分别为板 A 和板 B 中的第 8 道)。

结果: 来自 293 (第 1 道)、FON-T1 (第 2 道)、M10 (第 3 道)、NCI-H520 (第 5 道) 和 FM3 (第 6 道) 的 E 中检测到了 Lactadherin (板 B), 但是在来自同样细胞系的 CL 中没有检测到特异的带 (板 A)。在来自 NCI-N226 (第 4 道)、Raji (第 7 道) 和阴性对照 CHO (第 9 道) 的 E 和 CL 中均没有检测到 Lactadherin。

结论: 来自多种不同肿瘤组织的细胞系能表达 Lactadherin。这些细胞系表达的 Lactadherin 主要被发现在胞外体中。

实施例 2: 重组人 Lactadherin 几乎专一地表达在被转染细胞产生的胞外体中, 并且这种高度特异性的定位加密在 C1/C2 结构域中

从来自血液的总 cDNA, 分别使用引物对 LTDNf15/LTDNr8 和 LTDNf2/LTDNr13 (分别为 SEQ ID NO:1-4) 扩增了两个重叠的人 Lactadherin cDNA 片段。LTDNf15 和 LTDNr13 从它们的 5'端延伸, 包括了一个 HindIII 和一个 AgeI 限制性位点。用 LTDNf2/LTDNr13 扩增 Lactadherin cDNA 的 3'端产生了多个产物, 其中最长的对应于已知的 Lactadherin cDNA (Lactlf, SEQ ID NO:5)。较短的形式的序列 (Lactsf, SEQ ID NO:6) 缺少一段 153 个核苷酸, 导致在 Lactadherin 的 C2 结

构域缺失了 51 个氨基酸。5'端 cDNA 用 HindIII 和 EcoRI 消化, Lactlf 和 Lactsf cDNA 都用 EcoRI 和 AgeI 消化。将 5'端和 3'端 cDNA 一起连接到事先用 HindIII 和 AgeI 酶切的 pcDNA6A-His (Invitrogen)。得到的质粒 (pcDNA6hLactlf/His 和 pcDNA6hLactsf/His) 编码与(His)₆ 标记融合的全长重组人 Lactadherin (分别为 SEQ ID NO:7 和 8)。使用脂质转染胺试剂 (Invitrogen) 将它们转染到 293 细胞, 一株人类胚胎肾细胞系 (ATCC)。在完全培养基中培养的第 4 天 (培养条件和培养基的描述参见实施例 1), 如实施例 1 描述的那样从每个培养物中制备 EL 和 CL (EL 是通过将胞外体重新悬浮于 LB 而不是 PBS 中而制备的)。在这个实验中, 在 100000g 离心沉淀胞外体的步骤后获得的上清液 (S) 也被保留。Ni-NTA 琼脂糖珠 (Qiagen) 被加到所有的组分中以仅分离含有组氨酸标记的重组蛋白。在摇动平台上于 4℃保温 2 小时后, 在 4℃以 200g 下离心沉淀珠子。用调整到 20mM 咪唑的 LB 清洗 3 次后, 珠子被重新悬浮在 40μl 1X SB 中, 并在 100℃保温 5 分钟。收集 SB, 用图 1 描述的 SDS-PAGE 和免疫印迹来分析。

CL、S 和 EL 样品分别分析在图 2 的板 A、B 和 C 中。来自用 pcDNA6hLactsf/His 和 pcDNA6hLactlf/His 转染的 293 的 CL、S 和 EL 分别被显示在每个板的第 1 和 2 道。

来自乳汁的部分纯化的人 Lactadherin 被用做阳性对照 (第 4 道), 而来自用空的 pcDNA6 质粒转染的 293 细胞的 CL、S 和 EL 被用做阴性对照 (每个板的第 3 道)。

结果: 在 EL 中检测到了 Lactadherin 的长形式 (板 C 的第 2 道), 但是在从同样培养物中获得的 S 和 CL 中只检测到背景水平 (分别为板 A 和 B 的第 2 道)。相反, 只在 CL 中检测到了在其 C2 结构域中缺失了 51 个氨基酸的 Lactadherin 的短形式 (板 A 第 1 道), 而在 S 和 EL 中没有检测到 (分别为板 B 和 C 的第 1 道)。

结论：在 293 细胞中表达的重组 Lactadherin 几乎专一地被发现存在于胞外体中。重组 Lactadherin 到胞外体的这种高度特异性定位可能是由这个蛋白的 C2 结构域介导的，因为在 C2 结构域中的缺失废止了胞外体定位，并且可能也影响了 C1 结构域的构象。事实上，缺少功能性胞外体定位信号的重组短形式的 Lactadherin 被发现在不同的细胞区室中。

实施例 3：Lactadherin 的 C2 结构域中的胞外体定位信号在多种哺乳动物物种之间是保守的

以小鼠 Lactadherin cDNA (Sebastian Amigorena 博士馈赠) 为模板，使用引物 LTDNf20 (SEQ ID NO:9) 和 LTDNr13 (SEQ ID NO:4) 扩增了小鼠 Lactadherin 的全长 cDNA。这些引物在它们的 5'端延伸，对于 LTDNf20 和 LTDNr13 引物分别包括了一个 HindIII 和一个 AgeI 限制性位点。扩增产物用 HindIII 和 AgeI 消化，然后连入事先用 HindIII 和 AgeI 酶切的 pcDNA6A-His (Invitrogen)。得到的质粒 (pcDNA6mLact/His) 编码与(His)₆ 标记融合的重组小鼠 Lactadherin (SEQ ID NO:10)。完全按照实施例 2 中描述的方法将该质粒和 pcDNA6hLactlf/His (按照实施例 2 中的描述制备) 转染到 293、CHO 和 WEHI (小鼠纤维肉瘤) 细胞中，并从每个培养物中制备 EL。样品的制备和 Lactadherin 表达的监测如实施例 1 中所述。来自表达小鼠 Lactadherin 的人 293 细胞的 EL 表示在图 2 的板 A 中，来自表达人 Lactadherin 的小鼠 WEHI 细胞的 EL 表示在板 B 中，以及来自表达人 Lactadherin 的仓鼠 CHO 细胞的 EL 表示在板 C 中。来自用编码 Lactadherin 的质粒转染的细胞的 EL 表示在每个板的第 2 道。来自用空的 pcDNA6 质粒转染的细胞的 EL 被用做阴性对照 (每个板的第 1 道)。来自乳汁的部分纯化的人 Lactadherin 被用做阳性对照 (板 C 第 3 道)。

结果：在小鼠细胞和仓鼠细胞中表达的人 Lactadherin 被发现于由这些细胞产生的胞外体中 (分别为板 B 和 C 的第 2 道)。小鼠

Lactadherin 也被发现在由来自不同的物种即人类细胞产生的胞外体中（板 A，第 2 道）。

结论：在几种哺乳动物种间胞外体定位信号是保守的。

实施例 4：嵌合蛋白的制备

嵌合蛋白是通过将一个蛋白的核苷酸序列与 Lactadherin 的全长或部分序列融合而产生的。

Lactadherin 的全长序列一般被融合在蛋白序列的上游。只包含 C1 结构域、只包含 C2 结构域或同时包含 C1 和 C2 结构域的部分 Lactadherin 序列一般被融合在蛋白序列的下游。不含有内在前导序列的蛋白可以被插入到 Lactadherin 的前导序列和 C1/C2 结构域之间。

通过将一个蛋白的核苷酸序列与一个 C 结构域和在其 N 端至少延伸了 10 个氨基酸的匹配的 C 结构域的核苷酸序列进行融合，可以制备具有不同连接的嵌合蛋白。或者，也可以使用 Lactadherin 的 C1 和 C2 结构域或使用来自两个物种的 C 结构域来制备具有不同连接的嵌合蛋白。例如，含有蛋白 X 和人源的 C1、或人源的延伸的 C1、或人源的 C2、或鼠源的 C1 作为融合配偶体的嵌合蛋白具有不同的连接。

C1/C2 片段的制备

以 pcDNA6-hLacI^f/His 为模板，使用引物对 LTDNf24 (SEQ ID NO:13) /LTDNr26 (SEQ ID NO:15)、LTDNf22 (SEQ ID NO:11) /LTDNr26、LTDNf25 (SEQ ID NO:14) /LTDNr13、LTDNf23 (SEQ ID NO:12) /LTDNr13、LTDNf24/LTDNr13 和 LTDNf22/LTDNr13 分别扩增了编码 C1、延伸的 C1、C2、延伸的 C2、C1/C2 和延伸的 C1/C2 结构域的 Lactadherin DNA 片段。以 pcDNA6-mLact/His 为模板，使用引物对 LTDNf30 (SEQ ID NO:16) /LTDNr26、LTDNf31 (SEQ ID NO:17) /LTDNr26、LTDNf33 (SEQ ID NO:19) /LTDNr13、LTDNf32 (SEQ ID

NO:18) /LTDNr13、LTDNf30/LTDNr13 和 LTDNf31/LTDNr13 扩增了来自小鼠 Lactadherin 的匹配的 C1/C2 片段。所有的正向引物 (LTDNf) 在其 5'端被磷酸化, 而所有的反向引物 (LTDNr) 在其 5'端延伸以包含一个 AgeI 限制性位点。扩增产物在与融合配偶体连接 (见下) 前用 AgeI 消化。

白细胞介素-2-C1/C2 嵌合体的制备

以人活化的 T 细胞 cDNA 为模板, 使用引物 IL2f1 (SEQ ID NO:20) 和 IL2r2 (SEQ ID NO:21) 扩增了全长的 IL-2 cDNA。IL2f1 在其 5'端延伸以包括一个 HindIII 限制性位点, 而 IL2r2 在其 5'端被磷酸化。扩增产物用 HindIII 消化, 并与上述制备的每种 C1/C2 DNA 片段一起连入事先用 HindIII 和 AgeI 酶切的 pcDNA6A-His (Invitrogen)。IL2 片段的磷酸化的 3'端和 C1/C2 片段的磷酸化的 5'端之间的平末端连接产生了 IL2-C1/C2 嵌合序列。IL2 片段 5'端的 HindIII 位点和 C1/C2 片段 3'端的 AgeI 位点使得嵌合序列可以插入到 pcDNA6His 中, 得到的质粒 (pcDNA6-His/IL2-C1、IL2-延伸的 C1、IL2-C2、IL2-延伸的 C2、IL2-C1/C2 和 IL2-延伸的 C1/C2) 编码了与 (His)₆ 标记融合的重组嵌合蛋白 (含有人源的 C1/C2 结构域的嵌合蛋白序列为 SEQ ID NO:22-27)。在 SEQ ID NO:22-27 中, 1-153 位的残基对应于嵌合多肽的 hIL2 部分的氨基酸序列, 嵌合多肽的 C 端最后 8 个氨基酸残基 (TGHHHHHH) 对应于组氨酸标记。其余的残基对应于来自 Lactadherin 的序列。

在胞外体中表达生物活性的 IL-2

将上述编码 SEQ ID NO:22-27 的质粒转染到 WEHI 细胞。如实施例 1 所述制备 EL、CL 和 S 组分。重组蛋白的表达通过实施例 1 中所述的 Western 印迹进行评估, 只是在此所用的检测抗体是兔抗 IL2 抗体。

CL、S 和 EL 样品分别分析在图 4 的板 A、B 和 C 中。来自用

pcDNA6IL2-延伸的 C1/His、pcDNA6IL2-延伸的 C2/His、pcDNA6IL2-延伸的 C1/C2/His、pcDNA6IL2-C1/His、pcDNA6IL2-C2/His 和 pcDNA6IL2-C1/C2/His 转染的细胞的 CL、S 和 EL 分别被显示在每个板的第 1 到 6 道。

重组 IL2 被用做阳性对照（板 C 的第 8 道），而来自未转染的细胞的 CL、S 和 EL 被用做阴性对照（每个板的第 7 道）。

结果：所有制备的嵌合 IL-2-C1/C2 基因都表达了能够与抗 IL-2 抗体反应的重组蛋白（板 C 的第 1 到 6 道）。此外，这些蛋白几乎被专一地发现在 EL 中，而在 S 和 CL 中只检测到低的表达或背景表达（分别为板 A 和 B 的第 1 到 6 道）。为了确定在胞外体中检测到的 IL2-C1/C2 嵌合蛋白是否表现 IL-2 活性，将 CTLL-2（一株 IL-2 依赖性细胞系）与带有 IL2-C1/C2 嵌合蛋白的重组胞外体或来自未转染细胞的胞外体一起保温。我们发现与重组胞外体保温的细胞掺入了 3H-胸腺嘧啶，而与来自未转染细胞的胞外体保温的细胞则没有掺入（数据未显示）。

结论：将 IL-2 与 Lactadherin 的 C1/C2 结构域融合导致了 IL-2 在胞外体中的表达，这表明这些结构域能够特异性地指导抗原表达达到胞外体中。C1 和 C2 结构域在功能上是独立的。含有单个 C 结构域的嵌合蛋白的产量高于同时含有 C1 和 C2 结构域的嵌合蛋白。最后，融合产生了含有生物活性的 IL2 的嵌合蛋白，表明 IL2 维持了天然的构象。因此，使用 Lactadherin 的 C1/C2 结构域将蛋白定位到胞外体，事实上可以导致产生具有新的生物功能的重组胞外体。

实施例 5：重组人 Lactadherin 的纯化

按照实施例 2 中的描述制备编码了与(His)₆ 标记融合的全长人重组 Lactadherin 的质粒 pcDNA6hLactlf/His (SEQ ID NO:7)。使用脂质转染胺试剂 (Invitrogen) 将该质粒转染到 CHO 细胞（一株仓鼠卵巢

细胞系) (ATCC)。在完全培养基 (添加了 2mM L-谷氨酰胺、100U/ml 青霉素、0.1mg/ml 链霉素和 2%胎牛血清 (FBS) 的 CHO-SFM) 中于 37°C 5% CO₂ 气氛下培养的第 1 天, 在添加 2µg/ml 灭瘟素的培养基中选择稳定转染的细胞。在培养 4 天后, 通过有限稀释技术分离出稳定的克隆。通过使用实施例 2 中描述的 Western 印迹方法分析在胞外体中表达的重组 Lactadherin 以选择能够大量生产 Lactadherin 的克隆。将克隆 CHO-3.2 在 1 升旋转摇瓶中扩培, 并在不含 FBS 的完全培养基中培养以大量生产 Lactadherin。细胞培养 7 天后, 上清液被转移到 250ml 离心瓶中, 2000rpm 离心 5 分钟以沉淀细胞。然后将上清液通过 0.2µm 的抽滤瓶过滤, 使用截留分子量为 500K 的纤维芯将其浓缩到 100ml。然后将浓缩的上清液于 4°C 在 100000xg 下离心 1 小时 15 分钟。含有胞外体的沉淀被重新悬浮在 1ml MLBII (50mM NaPO₄ pH8/ 300mM NaCl/ 10mM 咪唑/ 0.5% Tween) 中, 然后转移到含有 2ml Ni-NTA 浆液 (预先离心以除去乙醇) 的试管中。在 4°C 在摇床上保温 2 到 3 小时后, 将样品注入一根 BioRad 的柱子, 并在 4°C 放置。柱子先用 10ml MWBI (50mM NaPO₄ pH8/ 300mM NaCl/ 20mM 咪唑/ 0.5% Tween), 然后用 20ml MWBII (50mM NaPO₄ pH8/ 500mM NaCl/ 10mM 咪唑) 清洗。结合在柱子上的蛋白用 8ml MEBII (50mM NaPO₄ pH8/ 300mM NaCl/ 250mM 咪唑) 洗脱。使用截留分子量为 10000 的 Millipore Ultrafree-4 装置将洗脱蛋白浓缩并将缓冲液更换为 pH7.4 的 PBS。蛋白样品分成等份保存在 -20°C。对 SDS-PAGE 进行考马斯染色以分析纯度。图 5 显示了两个重组 Lactadherin 制备液 (分别为 A 和 B) 在浓缩前和浓缩后的分析 (分别为第 1 道 50µl 和第 2 道 1µg)。

总而言之, 在此描述的步骤产生了高纯度的重组 Lactadherin。

实施例 6: 筛选用于将抗原定位到胞外体的胞外体蛋白

使用 MelanA/MART1、CD40L 和 CD81 评估了胞外体定位结构域在其它蛋白中的存在及它们在将抗原定位到胞外体中的应用。

在第一组实验中，使用特异的引物，从 FM3 细胞 cDNA (MelanA/MART1) 和小鼠脾细胞 cDNA (Clonetech; CD40L, CD81) 上扩增了编码 MelanA/MART1、CD40L 和 CD81 的 cDNA。为了克隆的目的，引物在其 5'端延伸至包含一个限制性位点。扩增产物用限制性酶消化，分别连入预先用匹配的酶消化过的 pCDNA6A-His (Invitrogen)。得到的质粒(分别为 pcDNA6-MART1、pcDNA6-CD40L 和 pcDNA6-CD81) 编码重组的 MelanA/MART1 (SEQ ID NO:28)、CD40L (SEQ ID NO:29) 和 CD81 (SEQ ID NO:30)。重组的 MelanA/MART1 和 CD81 被融合到 Myc 标记上，其后是载体上所提供的 His 标记。更具体来说，在 SEQ ID NO:28 中，1-118 位的残基对应于 MelanA/MART1，120-129 位的残基对应于 Myc 标记，以及 133-140 位的残基对应于 His 标记。同样，在 SEQ ID NO:30 中，1-236 位的残基对应于 CD81，238-247 位的残基对应于 Myc 标记，以及 251-258 位的残基对应于 His 标记。

分别用编码 SEQ ID NO:28-30 的质粒通过电穿孔(对于 EL4 用 220V、950 μ F；对 293F 用 400V、200 μ F) 转染 EL4 和 293F 细胞。按照实施例 1 中的方法制备 EL 和 CL 组分，除了将胞外体和细胞沉淀直接重悬浮于 1X SB 中用于 SDS-PAGE。也按照实施例 1 中描述的 Western 印迹方法评估重组蛋白的表达，除了这里用的检测抗体对 MelanA/MART1 和 CD81 来说是鼠抗 Myc 标记的抗体，而对 CD40L 来说是抗 CD40L 抗体。MelanA/MART1、CD40L 和 CD81 样品分别分析在图 7 的板 A、B 和 C 中。转染和未转染的细胞的 EL 和转染和未转染的细胞的 CL 分别显示在每个板的第 1 到 4 道。

在第二组实验中，使用特异引物，从活化的树突状细胞中扩增了编码 7-跨膜受体 CCR7 的 cDNA。两个引物都在其 5'端延伸至包含一个 AgeI 限制性位点。扩增产物用 AgeI 消化，并连入预先用 AgeI 消化过的编码 SEQ ID NO:29 的质粒。AgeI 消化的产物也被连接到一个编码 CD81 的截短形式的质粒中 (pcDNA6-CD81E, SEQ ID NO:31)，

它使用特定引物制备而来，象 SEQ ID NO:30 一样。SEQ ID NO:31 中 CD81 的 C 端跨膜区域被截短是维持 CCR7 在细胞膜脂双层中的适当定向所需要的。在 SEQ ID NO:31 中，1-200 位的残基对应于 CD81E，202-211 位的残基对应于 Myc 标记，以及 215-222 位的残基对应于 His 标记。将编码 SEQ ID NO:28 和 31 的质粒连接导致 CCR7 cDNA 插入到受体质粒的 Myc 标记和 His 标记之间。通过 PCR 筛选方法选择出其中 CCR7 插入方向为 5' 到 3' 的质粒。选定的质粒（pcDNA6-MART1/CCR7 和 pcDNA6-CD81E/CCR7）编码与 His 标记融合的重组嵌合蛋白（分别为 SEQ ID NO:32 和 33）。在 SEQ ID NO:32 中，1-118 位的残基对应于 MelanA/MART1，120-129 位的残基对应于 Myc 标记，135-488 位的残基对应于 CCR7，以及 489-496 位的残基对应于 His 标记。在 SEQ ID NO:33 中，1-200 位的残基对应于 CD81E，202-211 位的残基对应于 Myc 标记，217-570 位的残基对应于 CCR7，以及 571-578 位的残基对应于 His 标记。

分别用编码 SEQ ID NO:32 和 33 的质粒通过电穿孔转染 EL4 细胞，并按照上述的方法制备 EL 和 CL 组分。也按照上述的 Western 印迹方法评估重组蛋白的表达。EL 和 CL 样品分别分析在图 8 的板 A 和 B 中。来自用 pcDNA6-MART1/CCR7 和 pcDNA6-CD81E/CCR7 转染的细胞和未转染的细胞的样品分别显示在每个板的第 1 到 3 道。

结果：在转染细胞的胞外体和细胞裂解液（分别为每个板的第 1 到 3 道）中检测到了重组的 MelanA/MART1（图 7 板 A）、CD41L（图 7 板 B）和 CD81（图 7 板 C）。值得注意的是，预期的长形式的 CD40L（跨膜形式）在 CL 中被检测到（板 B 的第 3 道），而大多数的短形式（可溶形式）在胞外体中被检测到（板 B 的第 1 道）。在板 B 的第 3 道中检测到分子量较小的产物，极可能是由于在细胞裂解液中 CD81 的未被控制的蛋白水解作用。在转染细胞的胞外体中检测到了重组的嵌合 MelanA/MART1-CCR7，但是在其细胞裂解液中没有检测到（分别为图 8 的板 A 和 B 的第 1 道）。使用 FACS 分析，我们证实了仅仅

编码 CCR7 的对照结构产生了预期的能够在转染细胞的表面但不能在其胞外体中检测到的重组受体（数据未显示）。最后，编码嵌合蛋白 CD81E/CCR7 的质粒在任何测试的组分中均不能产生可检测到的蛋白水平（图 8 板 A 和 B 的第 2 道）。在来自未转染细胞的组分中没有检测到蛋白（图 7 板 A 到 C 的第 2 和 4 道，图 8 板 A 和 B 的第 3 道）。

结论：如同使用 Lactadherin 所证明的，其它的胞外体蛋白也可以被鉴定并用于定位抗原和重要的受体。事实上，MelanA/MART1 被鉴定为主要表达在胞外体中，它与 7-跨膜受体 CCR7 的融合触发了 CCR7 在胞外体中的表达。这种现象是融合配偶体特异性的，因为使用其它的胞外体蛋白如 CD81E 作为融合配偶体时不能检测到 CCR7。因此，对胞外体蛋白将其它蛋白定位到胞外体中的能力进行筛选，将导致鉴定出新的象 MelanA/MART1 那样的候选物，可用于与使用 Lactadherin 的 C1C2 结构域相同的应用。应该注意到，尽管事实上没有检测到 CD81E/CCR7，CD81 仍然可能适合于将 CCR7 之外的其它抗原定位到胞外体中。

实施例 7：展示在胞外体上的重组蛋白的免疫原性

按照实施例 3 中的描述制备来自用 pcDNA6hLactlf/His 转染的 WEHI 细胞的小鼠胞外体。按照实施例 5 中的描述制备纯化的人重组 Lactadherin。9 只 Balb/C 小鼠被安排成 3 个免疫组，每组 3 只。对每只小鼠进行腹膜内注射免疫，使用大约 20ng 重组人 Lactadherin 的 PBS（第 1 组）、大约 20ng 重组人 Lactadherin 的 1:1 的 PBS/完全弗氏完全佐剂混合物（第 2 组）或含有大约 20ng 的人 Lactadherin 的重组 WEHI 胞外体的 PBS（第 3 组）。在第一次注射后两个星期对动物进行一次加强免疫，使用同样的样品，除了在第 2 组中抗原被悬浮于 1:1 的 PBS/不完全弗氏佐剂混合物中。第二次免疫后对动物取血，通过 ELISA 测试抗人 Lactadherin 抗体。在 ELISA 中，50ng 人 Lactadherin 的 PBS 被包被在微量滴定板的孔中，于 37℃保温 1 小时。含有 0.05% Tween-20 和 6%脱脂奶粉的 PBS 的封闭缓冲液被加到孔中，室温放置 1 小时

以饱和剩余的游离结合位点。然后在孔中加入用封闭缓冲液稀释 1000 倍的免疫小鼠的血清，室温保温 1 小时。用封闭缓冲液清洗孔 3 次后，使用稀释 10000 倍的与辣根过氧化物酶（Jackson ImmunoResearch）偶联的第二个抗小鼠 IgG 抗体和化学发光底物（Amersham）检测结合的抗体。结果显示在图 9 中。

结果：在用含 Lactadherin 的胞外体免疫的小鼠的血清中检测到了抗 Lactadherin 抗体，但是当 Lactadherin 单独或作为弗氏佐剂乳液中给药时没有产生抗体反应。当使用弗氏佐剂时即使在 4 次注射接种后也没有检测到抗体，但是在接受带有 Lactadherin 的胞外体的小鼠的血清中抗体的滴度随着连续的注射而增加（数据未显示）。

结论：带有抗原的胞外体在不存在任何佐剂的情况下是强有力的免疫原，可以使用非常低的抗原量诱导抗体反应，所述量对经典和已经潜在的佐剂如弗氏佐剂是无效的。

参考文献

1. Couto, J. R., Taylor, M. R., Godwin, S. G., Ceriani, R. L.和 Peterson, J. A.

人乳腺上皮抗原 BA46 的克隆和序列分析发现了一个在上皮生长因子样结构域上呈递的 RGD 细胞粘附序列（Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain）。

DNA CELL BIOL 15, 281-6, 1996。

2. Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T.和 Petersen, T. E.

牛 PAS-6/7 通过两个结构域结合 α V β 5 整合蛋白和阴离子型磷脂（Bovine PAS-6/7 binds alpha v beta 5 integrins and anionic phospholipids through two domains）。

Biochemistry 36, 5441-6, 1997。

3. Andersen M. H., Graversen, H., Fedosov, S. N., Petersen, T. E.和 Rasmussen, J. T.

牛 lactadherin 的两个细胞结合结构域的功能分析 (Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin)。

Biochemistry 39, 6200-6, 2000。

4. Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C.和 Desjardins, M.

吞噬体的蛋白质组：对吞噬体功能的了解 (The phagosome proteome: insight into phagosome functions)。

J Cell Biol. 152, 165-80, 2001。

5. Thery, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G.和 Amigorena, S.

来自树突状细胞的胞外体的分子表征。热休克蛋白 hsc73 的选择性积累 (Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73)。

J Cell Biol. 147, 599-610, 1999。

6. Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J.和 Amigorena, S.

来自树突状细胞的胞外体的蛋白质组分析：一种不同于凋亡囊泡的分泌的亚细胞区室 (Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles)。

J Immunol. 166, 7309-18, 2001。

7. Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C.,

Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S.和 Zitvogel, L.

肿瘤衍生的胞外体是用于 CTL 交叉引发的共享的肿瘤排斥抗原的一个来源 (Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming)。

Nat Med. 7, 297-303, 2001。

8. Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G.和 Amigorena, S.

使用一种新的无细胞疫苗根除建立的鼠肿瘤：树突状细胞衍生的胞外体 (Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes)。

Nat Med. 4, 594-600, 1998。

9. Thery C., Zitvogel L.和 Amigorena S.

胞外体：组成、生物发生和功能 (Exosomes: composition, biogenesis and function)。

Nat Rev Immunol. 2, 569-79, 2002。

10. Denzer K., van Eijk M., Kleijmeer M. J., Jakobson E., de Groot C. 和 Geuze H. J.

滤泡树突状细胞在它们的表面带有表达 II 类 MHC 的微囊泡 (Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface)。

J. Immunol. 165 (2000), 1259-1265。

序列表

<110> 阿诺塞斯公司 (ANOSYS, INC.)

<120> 用于将蛋白定向到胞外体的方法和化合物
(Methods and Compounds for the Targeting of Protein to Exosomes)

<130> SCT040192-47

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人 Lactadherin cDNA 的正向引物

<400> 1

tataagctta gcatgccgcg cccccgcctg

30

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人 Lactadherin cDNA 的反向引物

<400> 2

ggattggcgc atccgttcag c

21

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人 Lactadherin cDNA 的正向引物

<400> 3	
gccctggata tctgttcc	18
<210> 4	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于扩增人 Lactadherin cDNA 的反向引物	
<400> 4	
ataaccggta cagcccagca gctccaggcg	30
<210> 5	
<211> 1164	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 5	
atgccgcgcc cccgcctgct ggccgcgctg tgcggcgcgcg tgctctgcgc cccagcctc	60
ctcgtcgcgc tggatatctg ttccaaaaac ccctgccaca acggtggttt atgcgaggag	120
atttcccaag aagtgcgagg agatgtcttc ccctcgtaca cctgcacgtg ccttaagggc	180
tacgcgggca accactgtga gacgaaatgt gtgcagccac tgggcatgga gaatgggaac	240
attgccaaact cacagatcgc cgctcatct gtgcgtgtga ctttcttggg ttgcagcat	300
tgggtcccgg agctggcccc cctgaaccgc gcaggcatgg tcaatgcctg gacaccagc	360
agcaatgacg ataaccctg gatccagggtg aacctgctgc ggaggatgtg ggtaacaggt	420
gtggtgacgc agggtgccag ccgcttgccc agtcatgagt acctgaaggc cttcaagggtg	480
gcctacagcc ttaatggaca cgaattcgat ttcattcatg atgttaataa aaaacacaag	540
gagtttgttg gtaactggaa caaaaacgcg gtgcattgtca acctgtttga gaccctgtg	600
gaggctcagt acgtgagatt gtacccacg agctgccaca cggcctgcac tctgcgcttt	660

gagctactgg gctgtgagct gaacggatgc gccaatcccc tgggcctgaa gaataacagc 720
 atccctgaca agcagatcac ggcctccagc agctacaaga cctggggctt gcatctcttc 780
 agctggaacc cctcctatgc acggctggac aagcagggca acttcaacgc ctgggttgcg 840
 gggagctacg gtaacgatca gtggctgcag gtggacctgg gctcctcgaa ggaggtgaca 900
 ggcatcatca cccagggggc ccgtaacttt ggctctgtcc agtttggtgc atcctacaag 960
 gttgcctaca gtaatgacag tgogaactgg actgagtacc aggaccccag gactggcagc 1020
 agtaagatct tccctggcaa ctgggacaac cactcccaca agaagaactt gtttgagacg 1080
 cccatcctgg ctcgctatgt gcgcacctg cctgtagcct ggacaaccg catcgccctg 1140
 cgccctggagc tgctgggctg ttag 1164

<210> 6

<211> 1008

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 6

atgccgcgcc cccgcctgct ggccgcgctg tgcggcgcgc tgctctgcgc ccccagcctc 60
 ctcgctgccc tggatatctg ttccaaaaac ccctgccaca acggtggttt atgcgaggag 120
 atttcccaag aagtgcgagg agatgtcttc ccctcgta ca cctgcacgtg ccttaagggc 180
 tacgcgggca accactgtga gacgaaatgt gtcgagccac tgggcatgga gaatgggaac 240
 attgccaact cacagatcgc cgccatcatc gtgcgtgtga ccttcttggg tttgcagcat 300
 tgggtcccgg agctggcccc cctgaaccgc gcaggcatgg tcaatgcctg gacaccagc 360
 agcaatgacg ataaccctg gatccagggtg aacctgctgc ggaggatgtg ggtaacaggt 420
 gtggtgacgc aggggtgccag ccgcttgcc agtcatgagt acctgaaggc cttcaagggt 480
 gcctacagcc ttaatggaca cgaattcgat ttcattcatg atgttaataa aaaacacaag 540

```

gagtttgtgg gtaactggaa caaaaacgcg gtgcatgtca acctgtttga gaccctgtg 600
gaggctcagt acgtgagatt gtacccacg agctgccaca cggcctgcac tctgcgttt 660
gagctactgg gctgtgagct gaacggatgc gccaatcccc tgggcctgaa gaataacagc 720
atccctgaca agcagatcac ggctccagc agctacaaga cctggggctt gcattcttc 780
agctggaacc cctcctatgc acggctggac aagcaggga acttcaacgc ctgggttgcg 840
gggagctacg gtaacgatca gtggctgcag atcttccctg gcaactggga caaccactcc 900
cacaagaaga acttgtttga gacgccatc ctggctcgt atgtgcgat cctgcctgta 960
gcctggcaca accgcatcgc cctgcgcctg gagctgctgg gctgttag 1008

```

<210> 7

<211> 395

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 7

```

Met Pro Arg Pro Arg Leu Leu Ala Ala Leu Cys Gly Ala Leu Leu Cys
1           5           10          15

```

```

Ala Pro Ser Leu Leu Val Ala Leu Asp Ile Cys Ser Lys Asn Pro Cys
          20           25           30

```

```

His Asn Gly Gly Leu Cys Glu Glu Ile Ser Gln Glu Val Arg Gly Asp
          35           40           45

```

```

Val Phe Pro Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Lys Gly Tyr Ala Gly Asn
          50           55           60

```

```

His Cys Glu Thr Lys Cys Val Glu Pro Leu Gly Met Glu Asn Gly Asn
          65           70           75           80

```

Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser Ser Val Arg Val Thr Phe Leu
85 90 95

Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly
100 105 110

Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser Asn Asp Asp Asn Pro Trp Ile
115 120 125

Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr Gly Val Val Thr Gln
130 135 140

Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu Tyr Leu Lys Ala Phe Lys Val
145 150 155 160

Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe Asp Phe Ile His Asp Val Asn
165 170 175

Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn Trp Asn Lys Asn Ala Val His
180 185 190

Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr
195 200 205

Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly
210 215 220

Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser
225 230 235 240

Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly
245 250 255

Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln
 260 265 270

Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp
 275 280 285

Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys Glu Val Thr Gly Ile Ile Thr
 290 295 300

Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val Gln Phe Val Ala Ser Tyr Lys
 305 310 315 320

Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn Trp Thr Glu Tyr Gln Asp Pro
 325 330 335

Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro Gly Asn Trp Asp Asn His Ser
 340 345 350

His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg
 355 360 365

Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu
 370 375 380

Leu Gly Cys Thr Gly His His His His His His
 385 390 395

<210> 8

<211> 343

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 8

Met Pro Arg Pro Arg Leu Leu Ala Ala Leu Cys Gly Ala Leu Leu Cys

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

	180		185		190
Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr					
195		200		205	
Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly					
210		215		220	
Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser					
225		230		235	240
Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly					
	245		250		255
Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln					
	260		265		270
Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp					
	275		280		285
Leu Gln Ile Phe Pro Gly Asn Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn					
	290		295		300
Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val					
305		310		315	320
Ala Trp His Asn Arg Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr					
	325		330		335
Gly His His His His His His					
	340				

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增小鼠 Lactadherin cDNA 的正向引物

<400> 9

ataaagctta gcatgcaggt ctcccgtgtg

30

<210> 10

<211> 434

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 10

Met Gln Val Ser Arg Val Leu Ala Ala Leu Cys Gly Met Leu Leu Cys

1

5

10

15

Ala Ser Gly Leu Phe Ala Ala Ser Gly Asp Phe Cys Asp Ser Ser Leu

20

25

30

Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Leu Thr Gly Gln Asp Asn Asp Ile Tyr

35

40

45

Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Thr Gly Leu Val Cys Asn Glu Thr Glu

50

55

60

Arg Gly Pro Cys Ser Pro Asn Pro Cys Tyr Asn Asp Ala Lys Cys Leu

65

70

75

80

Val Thr Leu Asp Thr Gln Arg Gly Asp Ile Phe Thr Glu Tyr Ile Cys

85

90

95

Gln Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Ile His Cys Glu Thr Gly Cys Ser

100

105

110

Thr Gln Leu Gly Met Glu Gly Gly Ala Ile Ala Asp Ser Gln Ile Ser
115 120 125

Ala Ser Tyr Val Tyr Met Gly Phe Met Gly Leu Gln Arg Trp Gly Pro
130 135 140

Glu Leu Ala Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Ile Val Asn Ala Trp His Ala
145 150 155 160

Ser Asn Tyr Asp Ser Lys Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Lys
165 170 175

Met Arg Val Ser Gly Val Met Thr Gln Gly Ala Ser Arg Ala Gly Arg
180 185 190

Ala Glu Tyr Leu Lys Thr Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asp Gly Arg
195 200 205

Lys Phe Glu Phe Ile Gln Asp Glu Ser Gly Gly Asp Lys Glu Phe Leu
210 215 220

Gly Asn Leu Asp Asn Asn Ser Leu Lys Val Asn Met Phe Asn Pro Thr
225 230 235 240

Leu Glu Ala Gln Tyr Ile Arg Leu Tyr Pro Val Ser Cys His Arg Gly
245 250 255

Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu His Gly Cys Leu
260 265 270

Glu Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Thr Ile Pro Asp Ser Gln Met Ser
275 280 285

Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Asn Leu Arg Ala Phe Gly Trp Tyr
290 295 300

Pro His Leu Gly Arg Leu Asp Asn Gln Gly Lys Ile Asn Ala Trp Thr
305 310 315 320

Ala Gln Ser Asn Ser Ala Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Thr
325 330 335

Gln Arg Gln Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asp Phe Gly
340 345 350

His Ile Gln Tyr Val Glu Ser Tyr Lys Val Ala His Ser Asp Asp Gly
355 360 365

Val Gln Trp Thr Val Tyr Glu Glu Gln Gly Ser Ser Lys Val Phe Gln
370 375 380

Gly Asn Leu Asp Asn Asn Ser His Lys Lys Asn Ile Phe Glu Lys Pro
385 390 395 400

Phe Met Ala Arg Tyr Val Arg Val Leu Pro Val Ser Trp His Asn Arg
405 410 415

Ile Thr Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His
420 425 430

His His

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人 Lactadherin C1/C2 cDNA 的正向引物

<400> 11

ccctcgtaga cctgcacgtg cc

22

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人 Lactadherin C2 cDNA 的正向引物

<400> 12

cccacgagct gccacacggc c

21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人 Lactadherin C1/C2 cDNA 的正向引物

<400> 13

aaatgtgtcg agccactggg c

21

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人 Lactadherin C2 cDNA 的正向引物

<400> 14

ggatgcgcca atcccctgg

19

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人 Lactadherin C1 cDNA 的反向引物

<400> 15

gaaggaaccg gtacagccca gtagctcaaa gcg

33

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增小鼠 Lactadherin C1/C2 cDNA 的正向引物

<400> 16

ggatgttcta cacagctggg ca

22

<210> 17
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增小鼠 Lactadherin C1/C2 cDNA 的正向引物

<400> 17

accgaataca tctgcca

17

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增小鼠 Lactadherin C2 cDNA 的正向引物

<400> 18

cctgtttcgt gccaccgcgg c

21

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增小鼠 Lactadherin C2 cDNA 的正向引物

<400> 19

ggatgtctcg agcccctgg

19

<210> 20

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人白介素-2 cDNA 的正向引物

<400> 20

aggaggaagc ttatgtacag gatgcaactc c

31

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人白介素-2 cDNA 的反向引物

<400> 21

agtcagtgtt gagatgatg

19

<210> 22

<211> 318

<212> PRT

<213> 人工分子

<220>

<221> MISC_特征

<223> 人 IL2-人 Lactadherin C1 结构域嵌合蛋白

<400> 22

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Lys Cys Val Glu Pro Leu Gly
145 150 155 160

Met Glu Asn Gly Asn Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser Ser Val
165 170 175

Arg Val Thr Phe Leu Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu Ala Arg
180 185 190

Leu Asn Arg Ala Gly Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser Asn Asp
195 200 205

Asp Asn Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr
210 215 220

Gly Val Val Thr Gln Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu Tyr Leu
225 230 235 240

Lys Ala Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe Asp Phe
245 250 255

Ile His Asp Val Asn Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn Trp Asn
260 265 270

Lys Asn Ala Val His Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln
275 280 285

Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg
290 295 300

Phe Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His His His
305 310 315

<210> 23
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> 人工分子

<220>
 <221> MISC_特征
 <223> 人 IL2-人 Lactadherin C1 结构域嵌合蛋白

<400> 23

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Pro Ser Tyr Thr Cys Thr Cys
145 150 155 160

Leu Lys Gly Tyr Ala Gly Asn His Cys Glu Thr Lys Cys Val Glu Pro
165 170 175

Leu Gly Met Glu Asn Gly Asn Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser
180 185 190

Ser Val Arg Val Thr Phe Leu Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu
195 200 205

Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser
210 215 220

Asn Asp Asp Asn Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp
225 230 235 240

Val Thr Gly Val Val Thr Gln Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu
245 250 255

Tyr Leu Lys Ala Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe
260 265 270

Asp Phe Ile His Asp Val Asn Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn
275 280 285

Trp Asn Lys Asn Ala Val His Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu
290 295 300

Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr
305 310 315 320

Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His His His
325 330 335

<210> 24

<211> 320

<212> PRT

<213> 人工分子

<220>

<221> MISC_特征

<223> 人 IL2-人 Lactadherin C2 结构域嵌合蛋白

<400> 24

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly
145 150 155 160

Leu Lys Asn Asn Ser Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser
165 170 175

Tyr Lys Thr Trp Gly Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala
180 185 190

Arg Leu Asp Lys Gln Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr
195 200 205

Gly Asn Asp Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys Glu Val
210 215 220

Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val Gln Phe
225 230 235 240

Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn Trp Thr
245 250 255

Glu Tyr Gln Asp Pro Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro Gly Asn
260 265 270

Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu
275 280 285

Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg Ile Ala
290 295 300

Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His His His
305 310 315 320

<210> 25

<211> 340

<212> PRT

<213> 人工分子

<220>

<221> MISC_特征

<223> 人 IL2-人 Lactadherin C2 结构域嵌合蛋白

<400> 25

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala
145 150 155 160

Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala
165 170 175

Asn Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr
180 185 190

Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly Leu His Leu Phe Ser Trp Asn
195 200 205

Pro Ser Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val
210 215 220

Ala Gly Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser
225 230 235 240

Ser Lys Glu Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly
245 250 255

Ser Val Gln Phe Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser
260 265 270

Ala Asn Trp Thr Glu Tyr Gln Asp Pro Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile
275 280 285

Phe Pro Gly Asn Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn Leu Phe Glu
290 295 300

Thr Pro Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val Ala Trp His
305 310 315 320

Asn Arg Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His
325 330 335

His His His His
340

<210> 26

<211> 480

<212> PRT

<213> 人工分子

<220>

<221> MISC_特征

<223> 人 IL2-人 Lactadherin C1/C2 结构域嵌合蛋白

<400> 26

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Lys Cys Val Glu Pro Leu Gly
 145 150 155 160

Met Glu Asn Gly Asn Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser Ser Val
 165 170 175

Arg Val Thr Phe Leu Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu Ala Arg
 180 185 190

Leu Asn Arg Ala Gly Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser Asn Asp
 195 200 205

Asp Asn Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr
210 215 220

Gly Val Val Thr Gln Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu Tyr Leu
225 230 235 240

Lys Ala Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe Asp Phe
245 250 255

Ile His Asp Val Asn Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn Trp Asn
260 265 270

Lys Asn Ala Val His Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln
275 280 285

Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg
290 295 300

Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly
305 310 315 320

Leu Lys Asn Asn Ser Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser
325 330 335

Tyr Lys Thr Trp Gly Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala
340 345 350

Arg Leu Asp Lys Gln Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr
355 360 365

Gly Asn Asp Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys Glu Val
370 375 380

Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val Gln Phe
385 390 395 400

Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn Trp Thr
405 410 415

Glu Tyr Gln Asp Pro Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro Gly Asn
420 425 430

Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu
435 440 445

Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg Ile Ala
450 455 460

Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His His His
465 470 475 480

<210> 27

<211> 498

<212> PRT

<213> 人工分子

<220>

<221> MISC_特征

<223> 人 IL2-人 Lactadherin C1/C2 结构域嵌合蛋白

<400> 27

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Pro Ser Tyr Thr Cys Thr Cys
145 150 155 160

Leu Lys Gly Tyr Ala Gly Asn His Cys Glu Thr Lys Cys Val Glu Pro
165 170 175

Leu Gly Met Glu Asn Gly Asn Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser
180 185 190

Ser Val Arg Val Thr Phe Leu Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu
195 200 205

Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser
210 215 220

Asn Asp Asp Asn Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp
225 230 235 240

Val Thr Gly Val Val Thr Gln Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu
245 250 255

Tyr Leu Lys Ala Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe
260 265 270

Asp Phe Ile His Asp Val Asn Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn
275 280 285

Trp Asn Lys Asn Ala Val His Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu
290 295 300

Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr
305 310 315 320

Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro
325 330 335

Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser
340 345 350

Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser
355 360 365

Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly
370 375 380

Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys
385 390 395 400

Glu Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val
405 410 415

Gln Phe Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn
420 425 430

Trp Thr Glu Tyr Gln Asp Pro Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro
435 440 445

Gly Asn Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro
450 455 460

Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg
465 470 475 480

Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His
485 490 495

His His

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人 CD40L cDNA 的正向引物

<400> 28

ggaaggaccg gtcatagaag gttggacaag

30

<210> 29
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增人 CD40L cDNA 的反向引物

<400> 29

ggaaggaccg gtgagtttga gtaagccaaa gg

32

<210> 30
<211> 612
<212> PRT
<213> 人工分子

<220>

<221> MISC_特征

<223> 人 Lactadherin-人 CD40L 嵌合蛋白

<400> 30

Met Pro Arg Pro Arg Leu Leu Ala Ala Leu Cys Gly Ala Leu Leu Cys
1 5 10 15

Ala Pro Ser Leu Leu Val Ala Leu Asp Ile Cys Ser Lys Asn Pro Cys
20 25 30

His Asn Gly Gly Leu Cys Glu Glu Ile Ser Gln Glu Val Arg Gly Asp
35 40 45

Val Phe Pro Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Lys Gly Tyr Ala Gly Asn
50 55 60

His Cys Glu Thr Lys Cys Val Glu Pro Leu Gly Met Glu Asn Gly Asn
65 70 75 80

Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser Ser Val Arg Val Thr Phe Leu
85 90 95

Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly
100 105 110

Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser Asn Asp Asp Asn Pro Trp Ile
115 120 125

Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr Gly Val Val Thr Gln
130 135 140

Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu Tyr Leu Lys Ala Phe Lys Val
145 150 155 160

Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe Asp Phe Ile His Asp Val Asn
165 170 175

Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn Trp Asn Lys Asn Ala Val His
180 185 190

Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr
195 200 205

Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly
210 215 220

Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser
225 230 235 240

Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly
245 250 255

Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln
260 265 270

Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp
275 280 285

Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys Glu Val Thr Gly Ile Ile Thr
290 295 300

Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val Gln Phe Val Ala Ser Tyr Lys
305 310 315 320

Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn Trp Thr Glu Tyr Gln Asp Pro
325 330 335

Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro Gly Asn Trp Asp Asn His Ser
340 345 350

His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg
355 360 365

Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu
370 375 380

Leu Gly Cys Thr Gly His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg
385 390 395 400

Asn Leu His Glu Asp Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn
405 410 415

Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser
420 425 430

Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr
435 440 445

Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln
450 455 460

Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val
465 470 475 480

Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val
485 490 495

Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr
500 505 510

Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser
515 520 525

Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe
530 535 540

Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro
545 550 555 560

Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro
565 570 575

Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His
580 585 590

Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Thr Gly His His
595 600 605

His His His His
610

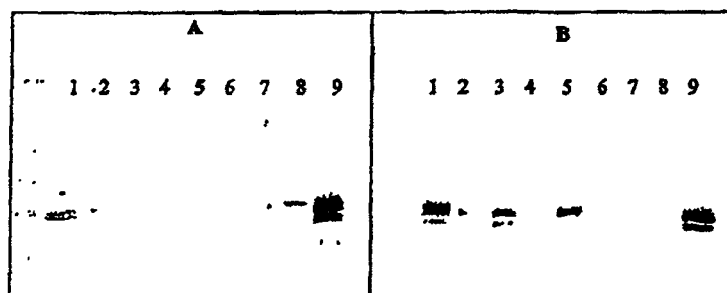


图1

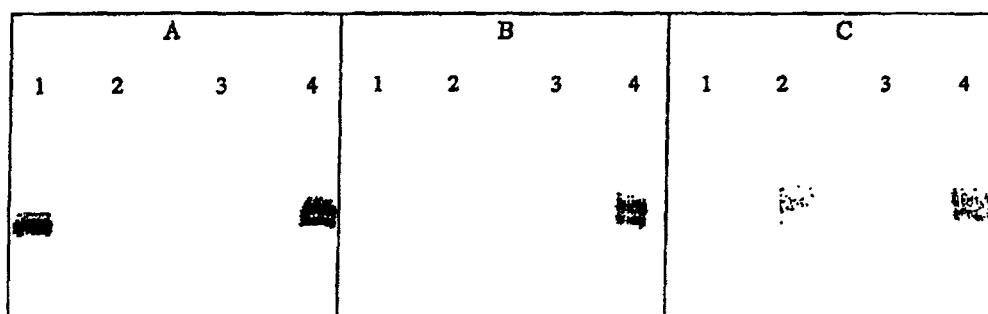


图2

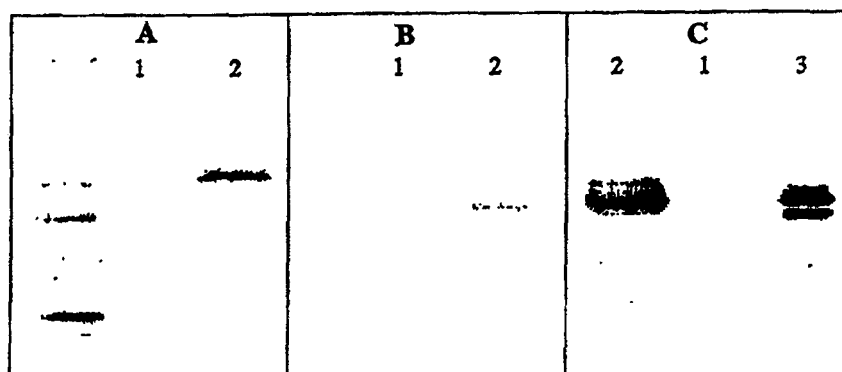


图3

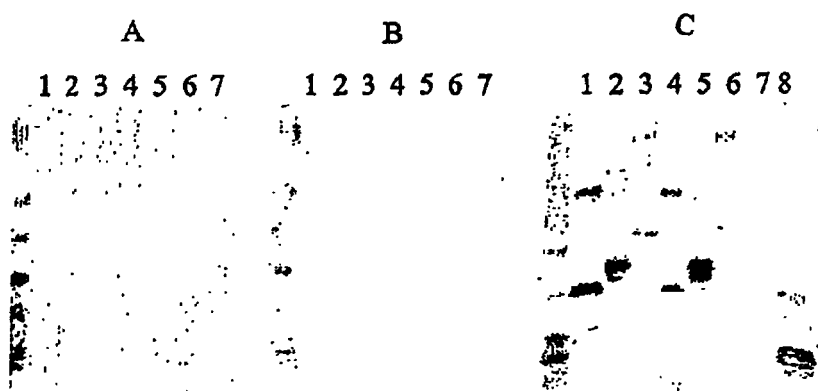


图4

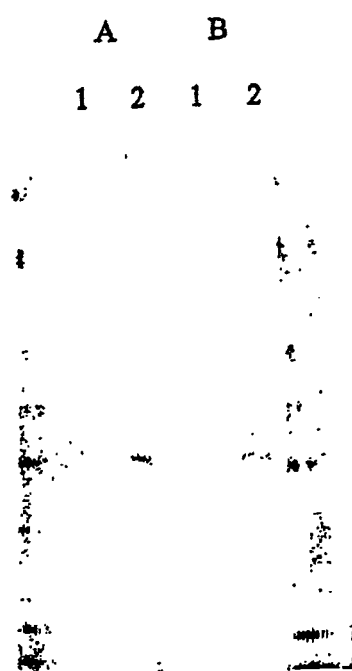
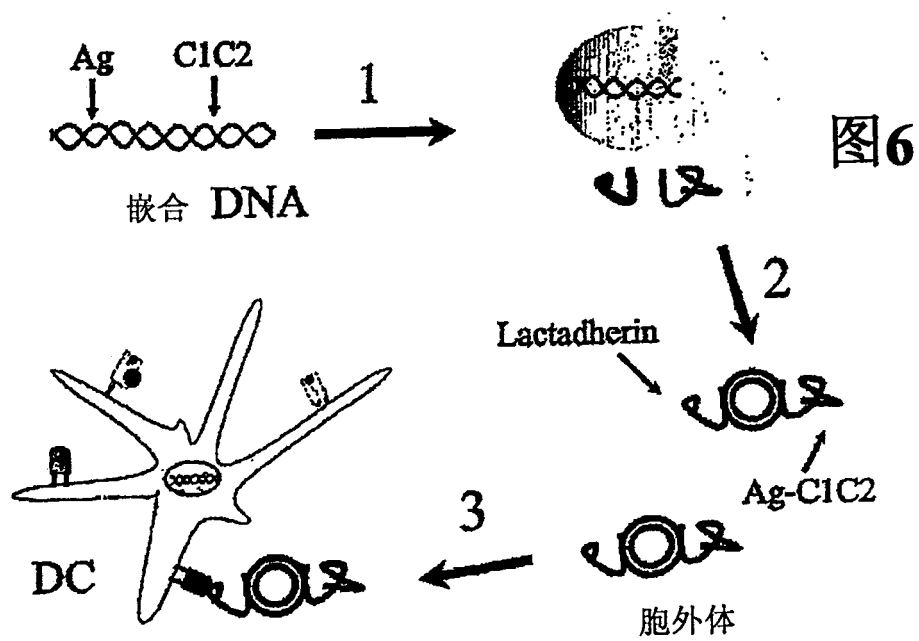


图5



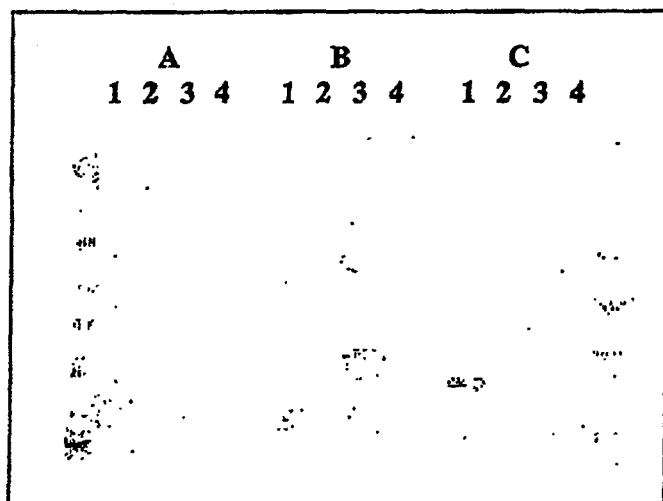


图7

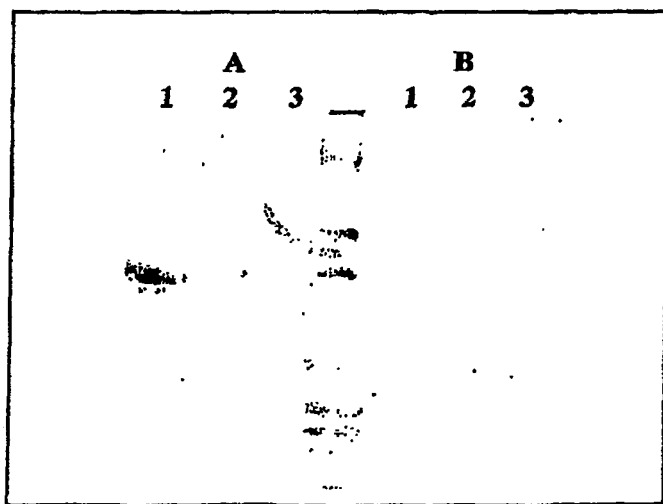


图8

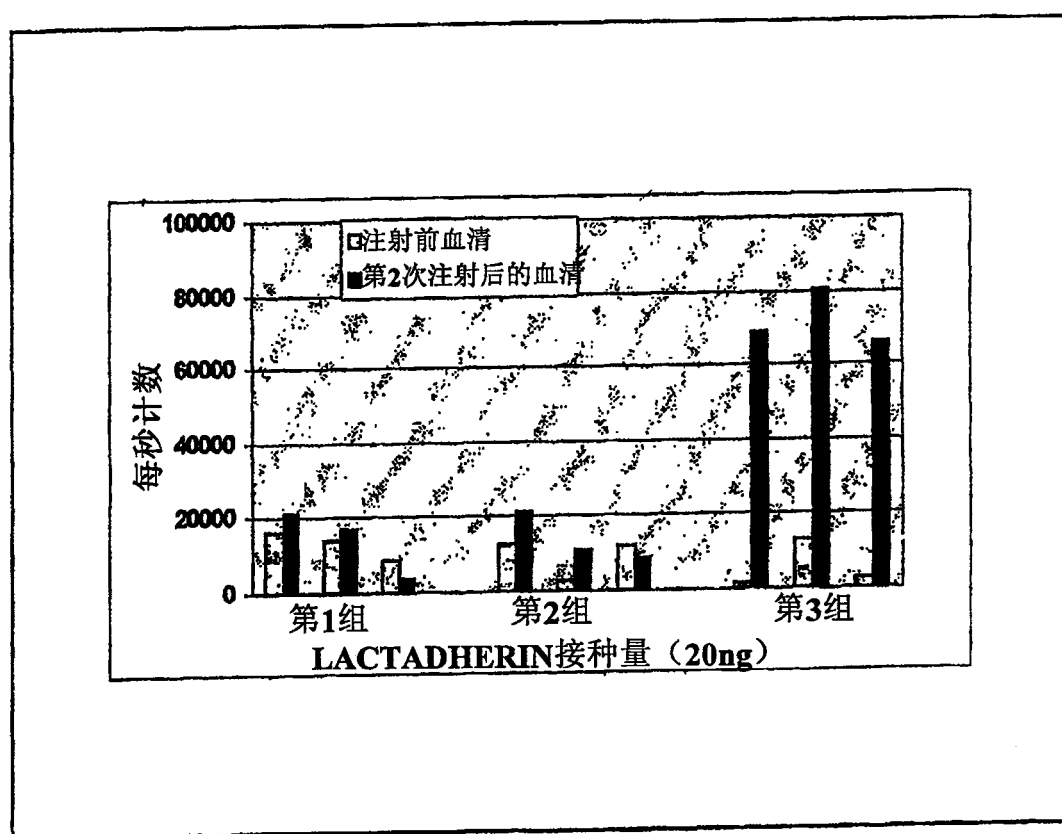


图9

专利名称(译)	用于将蛋白定向到胞外体的方法和化合物		
公开(公告)号	CN100590131C	公开(公告)日	2010-02-17
申请号	CN02816094.0	申请日	2002-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	阿诺塞斯公司		
申请(专利权)人(译)	阿诺塞斯公司		
[标]发明人	阿兰德尔凯尔		
发明人	阿兰·德尔凯尔 珍·柏纳德·莱佩克		
IPC分类号	C07K14/47 C12N15/62 G01N33/543 A61K9/127 A61K39/39 A61K47/48 G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/12 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/55 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K47/48776 C07K2319/00 C07K14/55 C07K14/47 A61K47/48246 C07K2319/75 C07K2319/41 C12N15/62 C07K2319/01 A61K47/64 A61K47/6901 A61P35/00 A61P43/00		
代理人(译)	杨青		
审查员(译)	李伟		
优先权	60/313159 2001-08-17 US 60/343991 2001-12-26 US		
其他公开文献	CN1543476A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于将多肽在膜囊泡中进行选择性表达的组合物和方法。本发明还涉及了适合于生产这种膜囊泡的遗传结构和重组细胞。本发明还涉及了这样的功能化膜囊泡以及生产抗体的方法、产生或调节免疫反应的方法、以及使用它们筛选或鉴定结合配偶体的方法。更具体来说，本发明使用了天然或合成来源的lactadherin或其部分用于在膜囊泡中选择性表达多肽。本发明可用于实验、研究、治疗、预防或诊断领域。

