

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 38/00

A61K 35/34 A61K 38/24

C12P 21/06



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02810609.1

[43] 公开日 2004 年 7 月 7 日

[11] 公开号 CN 1511040A

[22] 申请日 2002.5.28 [21] 申请号 02810609.1

[30] 优先权

[32] 2001. 5. 25 [33] US [31] 60/293,791

[86] 国际申请 PCT/US2002/016707 2002. 5. 28

[87] 国际公布 WO2002/097044 英 2002. 12. 5

[85] 进入国家阶段日期 2003. 11. 25

[71] 申请人 托马斯杰斐逊大学

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 艾伯特·J·黄

[74] 专利代理机构 北京金信联合知识产权代理有  
限公司  
代理人 张金海

权利要求书 13 页 说明书 63 页 序列表 27 页  
附图 5 页

[54] 发明名称 作为多种治疗模式基础的蛋白质的  
选择性剪接形式

[57] 摘要

来源于与疾病或生理状态相关的蛋白质选择性剪接形式的多肽或抗体被作为治疗或预防药物。来源于血管内皮生长因子(VEGF)家族蛋白质的选择性剪接形式的多肽或抗体在预防或诱导肿瘤的消退中是特别有用的。

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

1. 一种含有独特于选择性剪接形式的氨基酸序列的多肽。
2. 如权利要求 1 的多肽，其中多肽的长度为 4 到 50 个氨基酸。
3. 如权利要求 2 的多肽，其中多肽的长度为 7 到 15 个氨基酸。
- 5 4. 如权利要求 2 的多肽，其中多肽的长度为 8 或 9 个氨基酸。
5. 如权利要求 1 的多肽，其中的多肽含有至少一个正常的氨基酸序列，其含有 7 个或更少的毗临的氨基酸。
6. 如权利要求 5 的多肽，其中的多肽含有至少一个正常的氨基酸序列，其含有 6、5、4、3、2 或 1 个毗临的氨基酸。
- 10 7. 如权利要求 5 的多肽，其中的多肽含有至少一个正常的氨基酸序列，其含有 5 或 6 个毗临的氨基酸。
8. 如权利要求 5 的多肽，其中的多肽含有一个剪接接头，第一个正常的氨基酸序列含有 7 个或更少的毗临氨基酸，第二个正常的氨基酸序列含有 7 个或更少的毗临氨基酸，其中第一个和第二个正常的氨基酸序列位于选择性剪接接头的两侧。
- 15 9. 如权利要求 8 的多肽，其中第一个正常的氨基酸序列具有 6、5、4、3、2、或 1 个毗临的氨基酸，第二个正常的氨基酸序列具有 6、5、4、3、2、或 1 个毗临的氨基酸。
10. 如权利要求 8 的多肽，其中第一个和第二个正常的氨基酸序列每  
20 分别具有 3 或 4 个毗临的氨基酸。
11. 如权利要求 1 的多肽，其中的多肽含有为将多肽与多价平台相偶联或者与另一个蛋白相偶联的至少一种修饰。

12. 如权利要求 11 的多肽，其中的修饰包括在多肽的 C-末端或 N-末端添加额外的氨基酸。
13. 如权利要求 12 的多肽，其中添加到多肽 C-末端或 N-末端的氨基酸从包括酪氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸及天冬氨酸的组中选择。  
5
14. 如权利要求 13 的多肽，其中添加到多肽的 C-或 N-末端的氨基酸是半胱氨酸。
15. 如权利要求 11 的多肽，其中的修饰从包括通过末端氨基乙酰化引入偶联位点、巯基乙酸酰胺化、羧基末端酰胺化、和生物素化的组中选择。  
10
16. 如权利要求 1 的多肽，其包括至少一个 D -氨基酸。
17. 如权利要求 1 的多肽，从包括 SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、和 SEQ ID NO:79 的组中选择。
18. 一种含有两个或多个权利要求 1 的多肽的多聚体。
- 15 19. 如权利要求 18 的多聚体，其中的多聚体是同聚体。
20. 如权利要求 19 的多聚体，从包括二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、和六聚体的组中选择。
21. 如权利要求 20 的多聚体，其中的多聚体是二聚体。
22. 如权利要求 21 的二聚体，包含 SEQ ID NO:81 的两条多肽。
- 20 23. 如权利要求 18 的多聚体，其中的多聚体是异聚体。
24. 如权利要求 23 的多聚体，其从包括二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、和六聚体的组中选择。

25. 一种鉴别用于治疗受试者的免疫原性多肽的方法，所述受试者患有疾病或状况、或有患病的危险，其中患病或异常的细胞产生至少一种选择性剪接形式，该选择性剪接形式在正常细胞中基本上不存在。该方法包括以下步骤：
- 5           1) 鉴别编码至少两种选择性剪接形式的至少一种 mRNA。
- 2) 鉴定至少一种选择性剪接形式的至少部分的氨基酸序列；和
- 3) 产生至少一个含有独特于选择性剪接形式的氨基酸序列的多肽。
26. 一种治疗受试者的方法，所述受试者患有疾病或状况、或存在患病的风  
10           险，其中患病的或异常的细胞产生至少一种选择性剪接形式，所述选择性剪接形式在正常细胞中基本上不存在，所述方法包括将有效量的如权利要求 1 中至少一个多肽用于受试者，以产生针对疾病或异常细胞的免疫应答。
27. 如权利要求 26 的方法，其中的免疫应答是一种 MHC-I 类或 II 类  
15           限制的细胞毒 T 淋巴细胞应答，或是一种抗体应答。
28. 如权利要求 27 的方法，其中的细胞毒 T 淋巴细胞应答是 CD8<sup>+</sup> T  
            淋巴细胞应答，其中 CD8<sup>+</sup>、MHC I 类限制的 T 淋巴细胞被激活。
29. 如权利要求 27 的方法，其中的细胞毒 T 淋巴细胞应答是 CD4<sup>+</sup> T  
            淋巴细胞应答，其中 CD4<sup>+</sup>、MHC II 类限制的 T 淋巴细胞被激活。
- 20   30. 如权利要求 26 的方法，其中的受试者是人类。
31. 如权利要求 26 的方法，其中至少一种多肽是从包括 SEQ ID NO:3、  
            SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ

ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79 的组中选择。

32. 如权利要求 26 的方法，其中针对患病或异常细胞而产生的免疫  
5 应答通过在将多肽用于受试者之前对多肽进行修饰得到增强。
33. 如权利要求 32 的方法，其中多肽的修饰通过提高多肽 N-末端的疏水性而实现。
34. 如权利要求 32 的方法，其中的多肽采用至少一个氨基酸的插入、缺失或置换进行修饰，这提高了多肽与 MHC 分子结合的亲合力。
- 10 35. 如权利要求 32 的方法，其中多肽的稳定性是通过将多肽用于受试者之前进行修饰而提高。
36. 如权利要求 35 的方法，其中多肽的修饰通过用 D-氨基酸对多肽进行加帽，用 D-氨基酸替换多肽的至少一个 L-氨基酸，或者将多肽的氨基酸序列反转并用 D-氨基酸替换至少一个 L-氨基酸实  
15 现。
37. 如权利要求 26 的方法，其中两个或多个多肽被应用于受试者。
38. 如权利要求 37 的方法，其中的两个或多个多肽包括一个多聚体。
39. 如权利要求 38 的方法，其中的多聚体是一种同聚体。
40. 如权利要求 39 的方法，其中的多聚体从包括二聚体、三聚体、  
20 四聚体、五聚体及六聚体的组中选择。
41. 如权利要求 40 的方法，其中的多聚体是二聚体。
42. 如权利要求 41 的方法，包含二个 SEQ ID NO: 81 的多肽。

43. 如权利要求 38 的方法，其中的多聚体是一种异聚体。
44. 如权利要求 43 的方法，其中的多聚体从包括二聚体、三聚体、四聚体、五聚体及六聚体的组中选择。
45. 如权利要求 37 的方法，其中的两个或多个多肽组成混合物。
- 5 46. 如权利要求 37 的方法，其中的两个或多个多肽含有来自一个或多个选择性剪接形式的重叠表位。
47. 如权利要求 26 的方法，其中的至少一种多肽与提呈 T 辅助细胞表位的多肽组合应用于受试者。
48. 如权利要求 26 的方法，其中的至少一种多肽与至少一个诱导细胞毒 T 淋巴细胞的成分组合应用于受试者。
- 10 49. 如权利要求 48 的方法，其中的至少一种诱导细胞毒 T 淋巴细胞的成分包括三棕榈酰-S-甘氨酸半胱氨酸-丝氨酸-丝氨酸。
50. 如权利要求 26 的方法，其中的有效剂量是每 70kg 受试者大约 1  $\mu$ g 到大约 2000mg 的至少一种多肽。
- 15 51. 如权利要求 26 的方法，其中的有效量是每 70kg 受试者大约 1  $\mu$ g 到大约 500mg 的至少一种多肽。
52. 如权利要求 26 的方法，其中的有效量是每 70kg 受试者大约 10  $\mu$ g 到大约 200mg 的至少一种多肽。
53. 如权利要求 26 的方法，其中的有效量是每 70kg 受试者大约 50  $\mu$ g 到大约 100mg 的至少一种多肽。
- 20 54. 如权利要求 26 的方法，其中至少一种多肽的有效量是以单剂量给药。

55. 如权利要求 26 的方法，其中至少一种多肽的有效量是以多剂量给药。
56. 如权利要求 26 的方法，其中至少一种多肽的有效量是通过肠道给药。
- 5 57. 如权利要求 56 的方法，其中肠道给药途径从包括口服、直肠、鼻腔给药的组中选择。
58. 如权利要求 26 的方法，其中至少一种多肽的有效剂量是采用肠道外给药。
59. 如权利要求 58 的方法，其中的肠道外给药途径是从包括静脉内、  
10 肌肉内、动脉内、腹膜内、阴道内、囊内、真皮内、肺内、吸入、局部、皮下和滴注到体内的组中选择。
60. 如权利要求 26 的方法，其中的至少一种多肽与载体或佐剂结合应用到受试者。
61. 如权利要求 60 的方法，其中的载体是从包括钥孔血兰素、甲状  
15 球蛋白、白蛋白、破伤风类毒素、聚氨基酸的组中选择的。
62. 如权利要求 60 的方法，其中的佐剂是从包括弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、磷酸铝、氢氧化铝、聚卵磷脂、乳化油及明矾的组织选择。
63. 如权利要求 26 的方法，其中的至少一种多肽与一种免疫刺激化  
20 合物联合应用于受试者。
64. 如权利要求 63 的方法，其中的免疫刺激化合物氏从包括细胞因子和半抗原的组中进行选择。

65. 如权利要求 64 的方法，其中的细胞因子从包括 GM-CSF、IL-12、IL-2、 IL-4、IL-1 $\alpha$  和 IL-18 的组中选择。
66. 如权利要求 26 的方法，其中的至少一种多肽的有效量通过在受试者细胞内表达编码至少一种多肽的至少一种核酸序列。
- 5 67. 如权利要求 66 的方法，其中用包括至少一种核酸的减毒的病毒宿主感染受试者的细胞。
68. 如权利要求 67 的方法，其中的减毒的病毒宿主是痘病毒。
69. 如权利要求 66 的方法，其中含有至少一种核酸的细菌宿主被导入到受试者中。
- 10 70. 如权利要求 69 的方法，其中的细菌宿主氏从包括卡介苗、沙门氏菌、及李斯特氏单核细胞增生菌的组中选择。
71. 如权利要求 66 的方法，其中包括至少一种核酸的酵母宿主被导入到受试者中。
72. 如权利要求 71 的方法，其中的酵母宿主是酿酒酵母或裂殖酵母。
- 15 73. 如权利要求 26 的方法，其中的疾病或状况从包括应激反应、癌症、免疫系统疾病或状况、代谢疾病、结缔组织疾病、动脉疾病、遗传性红细胞膜疾病、胸腺激素抑制、子宫内膜增生、阿尔海默氏病、及酒精中毒的组中选择。
74. 如权利要求 73 的方法，其中的癌症氏从包括急性前髓细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、髓母细胞白血病、子宫癌、甲状腺癌、胃肠道癌、发育不良及致瘤性颈部上皮癌、黑色素瘤、子宫内膜癌、恶性畸胎癌、结肠癌、结缔组织圆状细胞瘤、胃癌、乳
- 20

腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、皮肤癌、淋巴瘤、膀胱癌、和胰腺癌的组中选择。

75. 如权利要求 26 的方法，其中的疾病或异常是从包括变态反应、X-连锁无丙种球蛋白血症、免疫性/炎症、系统性红斑狼疮、Goodpasture 病、苯丙酮尿症、非胰岛素依赖的糖尿病、骨发生不良、动脉粥样硬化、及遗传性椭圆形红细胞增多症的组中选择。
- 5
76. 如权利要求 26 的方法，其中的选择性剪接形式是由 CD44 基因、雌激素受试者基因或 FHIT 基因产生的。
77. 如权利要求 26 的方法，其中将至少一种多肽应用到受试者中包括以下步骤：
- 10
- 1) 从受试者中分离免疫系统效应细胞；
  - 2) 在受试者的体外的培养基中维持免疫系统效应细胞；
  - 3) 选择性地富集免疫系统效应细胞以获得特定类型的免疫系统效应细胞；
  - 15 4) 用至少一种多肽处理培养的免疫系统效应细胞；
  - 5) 可选择地，检查一部分经处理的免疫系统效应细胞，以确定细胞内至少存在一种多肽，和；
  - 6) 将处理过的免疫系统效应细胞重新导入受试者体内；
78. 如权利要求 77 的方法，其中的免疫系统效应细胞从包括树突状细胞、被淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤细胞、T-细胞、巨噬细胞、及其组合物的组中选择。
- 20
79. 如权利要求 77 的方法，其中用至少一种多肽处理免疫系统效应

细胞，包括将细胞真核暴露于至少一种多肽。

80. 如权利要求 77 的方法，其中用至少一种多肽处理免疫系统效应细胞，包括将至少一种多肽的至少一种编码核酸导入到细胞中。

81. 如权利要求 77 的方法，其中通过静脉注射或直接注射到骨髓中  
5 将处理过的免疫系统效应细胞重新导入到患者体内。

82. 如权利要求 77 的方法，其中每公斤受试者的体重大约  $10^5$  到  $10^8$  处理过的效应细胞被重新导入到受试者体内。

83. 一种在存在肿瘤患病危险的受试者中预防和延迟肿瘤发生的方法，其中的肿瘤细胞至少产生一种选择性剪接形式，选择性剪接  
10 形式在非肿瘤细胞种基本上不存在，该方法包括将有效量的如权利要求 1 的至少一种多肽应用到受试者，使产生针对肿瘤细胞的免疫应答。

84. 如权利要求 83 的方法，其中的肿瘤从包括子宫癌、甲状腺癌、  
胃肠道癌、发育不良及致瘤性颈部上皮癌、黑色素瘤、子宫内膜  
15 癌、恶性畸胎瘤、结肠癌、结缔组织圆状细胞瘤、胃癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、皮肤癌、淋巴瘤、膀胱癌、和胰腺癌的组中选择。

85. 如权利要求 83 的方法，其中的受试者是人。

86. 如权利要求 83 的方法，其中将两个或多个多肽应用到受试者上。

20 87. 如权利要求 86 的方法，其中的两或多个多肽含有多聚体。

88. 如权利要求 87 的方法，其中的多聚体从包括二聚体、三聚体、  
四聚体、五聚体及六聚体的组中选择。

89. 如权利要求 87 的方法, 其中的多聚体是二聚体并含有两个 SEQ ID NO:81 的多肽。
90. 如权利要求 86 的方法, 其中的两个或多个多肽组成混合物。
91. 如权利要求 83 的方法, 其中至少一个多肽是从包括 SEQ ID NO:8、  
5 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:73、  
SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、和 SEQ ID NO:79 的组中选择。
92. 一种在患肿瘤的受试者体内肿瘤消退的方法, 其中肿瘤细胞产生至少一种选择性的剪接形式, 所述的选择性剪接形式在非肿瘤细胞种基本上不存在, 该方法包括将有效量的如权利要求 1 的至少  
10 一种多肽应用到受试者, 以产生针对肿瘤细胞的免疫应答。
93. 如权利要求 92 的方法, 其中的肿瘤从包括子宫癌、甲状腺癌、胃肠道癌、发育不良及致瘤性颈部上皮癌、黑色素瘤、子宫内膜癌、恶性畸胎瘤、结肠癌、结缔组织形成圆状细胞瘤、胃癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、皮肤癌、淋巴瘤、膀胱癌、和  
15 胰腺癌的组中选择。
94. 如权利要求 92 的方法, 其中的受试者是人。
95. 如权利要求 88 的方法, 其中将两个或多个多肽应用到受试者。
96. 如权利要求 95 的方法, 其中的 2 或多个多肽含有多聚体。
97. 如权利要求 96 的方法, 其中的多聚体从含有二聚体、三聚体、  
20 四聚体、五聚体及六聚体的组中选择。
98. 如权利要求 97 的方法, 其中的多聚体是二聚体并含有两个 SEQ ID NO:81 的多肽。

99. 如权利要求 95 的方法，其中的两个或多个多肽组成混合物。
100. 如权利要求 92 的方法，其中至少一个多肽是从包括 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、和 SEQ ID NO:79 的组中选择。
- 5 101. 一种鉴别能够在受试者内诱导 MHC-限制的细胞毒 T 淋巴细胞应答的多肽的方法，包括以下步骤：
- 1) 获得外周血淋巴细胞；
  - 2) 将外周血淋巴细胞暴露于至少一种如权利要求 1 中的多肽，以刺激使外周血淋巴细胞；
  - 10 3) 将刺激过的外周血淋巴细胞与靶细胞或者由作为多肽来源的选择性剪接形式内源性合成，或者用多肽进行过脉冲处理；
  - 4) 检测靶细胞的裂解。
102. 如权利要求 101 的方法，其中的靶细胞被自体标记，而且对靶细胞裂解的检测包括检测从裂解的靶细胞中释放出的自体标记。
- 15 103. 如权利要求 101 的方法，其中对靶细胞裂解的检测包括测定至少一种在靶细胞裂解时从激活的外周血淋巴细胞中释放的细胞因子。
104. 如权利要求 102 的方法，其中的至少一种细胞因子是  $\gamma$  干扰素。
105. 一种与多肽中特异性表位结合的抗体或抗体片段，所述多肽从包
- 20 括 SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、和 SEQ ID NO:79 的组中选择。
106. 如权利要求 105 的抗体，其是人源化的。

107. 如权利要求 105 的抗体，其是多克隆抗体。
108. 如权利要求 105 的抗体，其是单克隆抗体。
109. 一种生产如权利要求 108 的单克隆抗体的杂交瘤。
110. 一种治疗患有疾病或状况、或存在患病的危险的受试者的方法，  
5 其中患病或异常的细胞至少产生一种选择性剪接形式，所述选择性剪接形式在非肿瘤细胞种基本上不存在，所述方法包括给受试者使用有效量的至少一种的抗体，该抗体对独特于选择性剪接形式的氨基酸序列具有特异性，从而使受试者中的一个或多个临床症状得到改善，或者使受试者内患病细胞或异常细胞的数量减少。  
10
111. 如权利要求 110 的方法，其中的至少一种抗体是单克隆抗体。
112. 如权利要求 110 的方法，其中的至少一种抗体是人源化的。
113. 如权利要求 111 的方法，其中的单克隆抗体与多肽的特异性表位相结合，所述多肽从包括 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、  
15 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:35、和 SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79 的组中选择。
114. 如权利要求 110 的方法，其中的有效量是从大约 0.1 mg/kg 到大约 100 mg/kg 体重。  
20
115. 如权利要求 110 的方法，其中的有效量是从大约 50 mg/kg 到大约 100 mg/kg 体重。

- 
116. 如权利要求 110 的方法，其中的有效量是从大约 10 mg/kg 到大约 20 mg/kg 体重。
117. 一种药物组合物，包含至少一种权利要求 1 的多肽和药学上可接受的载体。
- 5 118. 如权利要求 117 的药物组合物，其被包裹在脂质体中。

---

作为多种治疗模式基础的蛋白质的选择性剪接形式

5 相关文献

本申请要求 2001 年 5 月 25 日递交的、尚未授权的美国临时申请序列号 60/293,791 的优先权。

政府资助的说明

10 这里所描述的发明得到了国立卫生研究院的部分支持，资助号为 CA69495。政府对本发明享有一定的权利。

发明领域

15 本发明涉及蛋白质的选择性剪接形式在肿瘤或其它疾病状态的预防或治疗中的鉴别和应用。

发明背景

传统上讲，疫苗来源于与被接种生物体完全外源的物质。尽管如此，人们还是希望用源于生物体自身蛋白质的疫苗来免疫生物体。

20 例如，感染的控制、抑制排卵或其它形式的避孕、阿尔海默氏 (Alzheimer's) 病的抑制、肿瘤生长的预防与抑制都是受益于内源性“自体蛋白”免疫的疾病和状况。

多肽疫苗可用于治疗患有疾病或异常细胞的受试者。例如，感染了病毒、细胞内细菌或寄生虫的细胞，以及肿瘤细胞等。多肽疫苗可以诱导细胞毒 T 淋巴细胞（CTL）对疾病或异常细胞的应答。细胞毒 T 淋巴细胞（CTLs）通过直接的细胞毒性，并通过对其它免疫细胞如巨嗜细胞、B 细胞和其它类型的 T 细胞提供特异性和非特异性的帮助，而摧毁疾病或异常的细胞。多肽疫苗也可以诱导抗体应答，这对疾病或病况的预防和治疗种是有用的。

目前的多肽疫苗技术包括对与特定病况的发病机制有关的内源性正常蛋白质的鉴定。正常的总蛋白质可以作为疫苗的基础。或者，对预测与组织相容性复合物类型 I 或类型 II 的基序相结合的内源性蛋白质进行鉴定，并以之来生产疫苗。见 Falk 等，Nature 351: 290, 1991。但是，仅用部分或全部的正常蛋白质序列制成的多肽疫苗对疾病或不正常细胞是弱的免疫原，而且还可以诱发针对表达正常蛋白质细胞的免疫反应。

以前提高多肽疫苗的特异免疫原性的努力主要集中在各种类型癌细胞来源的内源性蛋白质的点突变上。这些点突变表现为在大的内源性蛋白质序列中的小部分“非自身”区域，它可以用于引起免疫应答。但是，这些点突变并不能被免疫系统有效识别，并且使用这种技术的多肽疫苗还不能产生强的免疫应答。

多肽疫苗也以有时出现在癌细胞中的基因重排（例如缺失、染色体重排）中产生的蛋白质产物为基础。在慢性骨髓性白血病细胞中染色体 9: 22 易位产生 BCR/Ab1 融合蛋白。该蛋白在 BCR/Ab1 融合接头处含有一个“非自身”区域，并且在患病人体中引发了免疫应答。

然而这种基因重排是很少的，并且仅知道染色体易位在癌症中发生。因

此，从染色体重排产生的蛋白质产物制备疫苗的有用性受到了限制。

因此，希望找到在一种特定的疾病状态下特异存在于某些组织中内源性蛋白质，它们也含有产生强免疫应答例如细胞毒 T 淋巴细胞或抗体应答的“非自身”免疫区域。理想的是这些改变了的内源性蛋白质是普遍存在的，并且很少或不会诱发针对相应正常蛋白质的交叉反应。

某些基因的初级 RNA 转录物可以进行选择性剪接以产生信使 RNA(mRNA)，它们与该基因产生的大部分 mRNA 是不同的。这些选择性剪接的 mRNA 翻译成选择性剪接形式的蛋白质，它们含有与相应的正常剪接 mRNA 产生的蛋白质不同的氨基酸序列。选择性剪接形式的蛋白质通常在一定生理或病理状态下以组织特异性的方式表达。这样，这些选择性剪接的 mRNA 在患有特定疾病或病况的病人体内仅存在于少量的细胞中。例如，我们知道许多类型的癌症细胞产生的选择性剪接形式在同一病人的正常细胞中并未发现。其它特异性地产生选择性剪接形式的疾病包括糖尿病、阿尔海默氏病和全身性红斑狼疮。迄今为止，这种选择性剪接形式还未被认作为能够针对产生选择性剪接形式、来自于疾病或异常组织的细胞的疫苗来源。

### 发明概述

现在已经发现来自患病或异常细胞的蛋白质选择性剪接形式具有高的免疫原性。这种多肽引发针对多肽的“非自身”区域的强免疫应答，特别是这些多肽可以引发特异性的 CTL 应答。这些多肽可用于以某些细胞中存在选择性剪接形式为特征的疾病或状况的治疗或预防。

因此，本发明提供了一种多肽，其包含独特于一种选择性剪接形式的氨

基酸序列，其中由受试者的患病或异常细胞产生的选择性剪接形式在受试者的正常细胞中基本上不存在。

本发明还提供了一种鉴别免疫原性多肽的方法，用来治疗患有，或存在患有疾病或病况风险的受试者，其中患病或异常的细胞产生至少一种选择性剪接形式，该选择性剪接形式在正常细胞中基本上不存在。该方法包括：鉴别至少一种 mRNA，其编码至少一种选择性剪接形式；确定至少一种选择性剪接形式的至少一部分氨基酸序列；并产生至少一种多肽，其包含独特于选择性剪接形式的氨基酸序列。

本发明还提供了一种治疗患有，或存在患病或病况风险的受试者的方法，其中患病或异常的细胞产生至少一种选择性剪接形式，该选择性剪接形式在正常细胞中基本上不存在。该方法包括对受试者给予有效量的至少一种多肽，其包含独特于选择性剪接形式的氨基酸序列，以产生针对疾病或异常细胞的免疫应答。

本发明还提供了一种在具有肿瘤患病风险的主体中预防或延缓肿瘤发生的方法，其中的肿瘤细胞产生至少一种选择性剪接形式，该剪接形式在非肿瘤细胞中基本上不存在。该方法包括给予受试者有效量的至少一种多肽，其包含独特于选择性剪接形式的氨基酸序列，以产生针对肿瘤细胞的免疫应答。

本发明还提供了一种在患肿瘤受试者中使肿瘤消退的方法，其中的肿瘤细胞产生至少一种选择性剪接形式，该剪接形式在非肿瘤细胞中基本上不存在。该方法包括给予受试者有效量的至少一种多肽，其包含独特于选择性剪接形式的氨基酸序列，以产生针对肿瘤细胞的免疫应答。

本发明还提供了一种鉴别本发明多肽的方法，所述多肽在受试者中诱导 MHC-限制的细胞毒 T 淋巴细胞应答，包括：获取外周血淋巴细胞（PBLs），使 PBLs 暴露于一种或多种多肽以刺激 PBL；将刺激过的 PBLs 与靶细胞共同孵育，靶细胞或者内源地合成作为多肽来源的选择性剪接形式，或者用多肽脉冲处理过；以及检测靶细胞的裂解。

例如，可以用放射性或荧光物质自体标记靶细胞，可以通过测定从被激活的 PBLs 裂解的靶细胞中释放的自体标记物的量实现对靶细胞裂解的检测。也可以通过酶联斑点免疫（“ELISPOT”）方法来检测靶细胞的裂解。

本发明还提供了能够与选择性剪接形式上的特异性表位、或与包含独特于选择性剪接形式的氨基酸序列的多肽相结合的抗体。抗体可以是单克隆的或是多克隆的，或者是可以与一种选择性剪接形式的表位特异性结合的抗体片段。

本发明还提供了一种能够产生单克隆抗体的杂交瘤，该单克隆抗体与选择性剪接形式、或与包含独特于选择性剪接形式的氨基酸序列的多肽特异性结合。

本发明进一步提供了一种治疗患有、或具疾病或病况患病风险的受试者的方法，其中患病的或异常的细胞产生至少一种选择性剪接形式，该选择性剪接形式在正常细胞中基本上不存在。该方法包括给予受试者有效量的至少一种抗体，该抗体对独特于选择性剪接形式的氨基酸序列是特异性的，以使受试者的一个或多个临床症状得以改善，或者使受试者体内患病或异常的细胞数量减少。

## 氨基酸缩写

用于描述本发明中多肽化合物的命名法遵循传统习惯，其中氨基位于每个氨基酸残基的左侧而羧基位于右侧。在本发明中代表挑选的特殊具体实施方案的公式中，尽管没有特别地指出，氨基和羧基-末端的基团应被理解为它们在生理 pH 值下存在的形式，除非另外指明。在氨基酸结构式中，对应于该氨基酸的普通名称，每个残基通常用一个单字母或三字母名称表示，按见下表：

A	丙氨酸	Ala
C	半胱氨酸	Cys
D	天冬氨酸	Asp
E	谷氨酸	Glu
F	苯丙氨酸	Phe
G	甘氨酸	Gly
H	组氨酸	His
I	异亮氨酸	Ile
K	赖氨酸	Lys
L	亮氨酸	Leu
M	甲硫氨酸	Met
N	天冬酰胺	Asn
P	脯氨酸	Pro
Q	谷氨酰胺	Gln

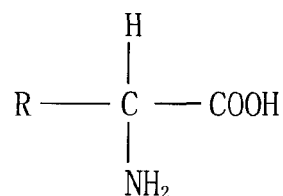
R	精氨酸	Arg
S	丝氨酸	Ser
T	苏氨酸	Thr
V	缬氨酸	Val
W	色氨酸	Trp
Y	酪氨酸	Tyr

## 定义

本文采用的“氨基酸”的表述是指包括天然或合成的氨基酸，以及D型和L型氨基酸。“标准氨基酸”指通常存在于天然多肽中的20种L-氨基酸。

5 “非标准氨基酸”指除标准氨基酸以外的任何氨基酸，无论是合成制备的还是自然来源的。如这里使用的，“合成的氨基酸”也包括化学修饰的氨基酸，包括但不限于盐、氨基酸衍生物（例如酰胺），及其取代物。本发明的多肽中包含的氨基酸，以及特别是羧基-或氨基末端的氨基酸，可以被甲基化、酰胺化、乙酰化或被其它可以改变多肽的循环半衰期而不负面影响其生物活性的化学基团所取代。此外，本发明中的多肽中可以存在或不存在二硫键。

氨基酸具有以下基本结构：



15

根据其侧链 R 将氨基酸分为 7 组：（1）亲水侧链；（2）含有羟基（OH）的侧链；（3）含有硫原子的侧链；（4）含有一个酸或酰胺基团的侧链；（5）含有一个碱性基团的侧链；（6）含有一个芳香环的侧链；以及（7）脯氨酸，  
5 一个侧链与氨基基团融合的氨基酸。

本文使用的“抗体”包括多克隆抗体及单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、嵌合和人源化抗体，以及 Fab 片段，包括 Fab 或其它免疫球蛋白表达文库的产物。

术语“人源化”抗体指具有来自于非人类物种的免疫球蛋白互补决定区  
10 （CDRs）的抗体，抗体分子的其它部分来自于人的免疫球蛋白。

术语“嵌合抗体”是指一种包括来自不同物种的可变区和恒定区的抗体。

术语“嵌合人源化抗体”是指一种至少恒定区是人类来源的嵌合抗体。

“多肽”和“蛋白质”是可以互换使用的，指的是一种包含至少 2 个由肽键或修饰的肽键（如多肽等排体（isosteres））共价连接的氨基酸残基。  
15 对于可能组成蛋白质或多肽的氨基酸的最大数目没有限制。本文及其后权利要求书中所述的组成多肽或蛋白质的氨基酸可以理解 D 型或 L 型氨基酸，优选 L 氨基酸。本文描述的组成多肽或蛋白质的氨基酸可以被自然过程例如翻译后加工修饰，或被专业人士公知的化学修饰技术所修饰。修饰可以发生在多肽内的任何地方，包括多肽主链，氨基酸侧链，以及氨基端或羧基端。可  
20 以理解相同类型的修饰可能以相同或不同的程度存在于给定的多肽中。而且，一个给定的多肽可能含有多种类型的修饰。修饰包括乙酰化、酰基化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、部分血红素的共价连接、核苷酸

或核苷酸衍生物的共价连接、脂或脂的衍生物的共价连接、phosphatidylinositol 的共价连接、交联、环化、形成二硫键、脱甲基化、形成共价交联、形成胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 $\gamma$ -羧基化、糖基化、形成 GPI 锚体、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻基化 (myristoylation)、氧化、蛋白水解处理、磷酸化、异戊烯化、消旋化、selenoylation、硫酸盐化、转运 RNA 介导的将氨基酸添加到蛋白质上，如精氨酰化和泛酰化。例如，参见“蛋白质—结构和分子特性”，第 2 版，T. E. Creighton, 纽约 W. H. 自由人公司出版，1993 年，和 Wold F 所著：蛋白质的翻译后修饰的第 1-12 页：翻译后蛋白质的修饰：前景和展望，B. C. Johnson 编辑，纽约学术出版社，1983 年；Seifter 等，蛋白质修饰和非蛋白辅因子的分析，*Meth. Enzymol.* (1990) 182: 626-646，以及 Rattan 等，1992 年，“蛋白合成：翻译后修饰和衰老”，*Ann NY Acad Sci* 663: 48-62。

本文所述的“阅读框”是指核酸中的一系列特定的密码子，例如翻译时产生特定多肽的 mRNA。

15

### 附图的简要说明

图 1A 是琼脂糖凝胶电泳的照片，显示了代表 VEGFD 中选择性剪接形式 #1 的 PCR 产物 (SEQ ID NO: 77)。显示的是用第 3 套引物做的第三轮 PCR。300 bp 的强的条带 (标记为“VEGFD#1”) 代表 SEQ ID NO:77; 1082 bp 条带 (标记为“VEGFD”) 代表预期的正常剪接的 mRNA。M: 以 bp 表示的分子量; HC2: 从 HC2 20 d2/c 细胞进行的 PCR 扩增。

图 1B 是显示 NIH-3T3 细胞 PCR 扩增结果的琼脂糖凝胶电泳照片。显示

的是用第 3 套引物进行的第 3 轮 PCR。只存在一个条带对应于预期的正常剪接的 mRNA (标记为“VEGFD”)。M: 以 bp 表示的分子量标准; NIH: 从 NIH-3T3 细胞做的 PCR 扩增。

图 2 表示用来源于 VEGF 家族的选择性剪接形式的各种免疫原性多肽预防接种 NIH-Swiss 小鼠后, 平均肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ ) 与时间 (天数) 的关系图。

图 3A 及 3B 分别是用源于 VEGF 家族成员选择性剪接形式的免疫原性多肽处理的 MMTV-neu 小鼠后, 每只小鼠的肿瘤数目与出生后天数间关系的存活曲线, 以及每只小鼠的全部肿瘤体积与出生后天数的关系曲线。对于两个图, 9 窝配对的雌性小鼠或者没有进行给药 (“未经给药”), 只给予 GM-CSF (“GM-CSF”), 或者将基于 VEGF 家族的选择性剪接形式的疫苗与 GM-CSF 联合给药 (“Combo”)。生存曲线上的每个曲线代表单个一只动物。

图 4 是检测 MMTV-Neu 小鼠中抗体应答的斑点杂交放射自显影图, A) 未给药 (“未给药”)、B) 只给予 GM-CSF (“GM-CSF”), 或 C) 用 SEQ ID NO:73, SEQ ID NO: 77 及 SEQ ID NO:81 及 GM-CSF 联合接种。

小鼠中的抗体应答是对通过点在硝酸纤维素膜上的  $1\ \mu\text{g}$  的 BSA、SEQ ID NO: 82 (“EGFRvIII”), SEQ ID NO : 73 (“R-pep”), SEQ ID NO: 81 同二聚体 (“RC-pep”), SEQ ID NO: 77 (“H-pep”), SEQ ID NO: 79 (“L-pep”), 或 SEQ ID NO: 75 (“V-pep”) 进行检测的。

图 5 是表示以抗- $\gamma$  干扰素抗体用 ELISPOT 分析鉴定的裂解反应图。在该试验中, 用 HC2 20d2/c 肿瘤细胞接种小鼠, 随后用 SEQ ID NO:73 (“R-pep”), SEQ ID NO: 75 (“V-pep”) 或 SEQ ID NO: 82 (“EGFRvIII”) + GM-CSF 免疫的小鼠表现为肿瘤消退, 而用 SEQ ID NO: 75: (“V-pep”) 及 GM-CSF 接种的小鼠

没有表现出肿瘤消退，分析中，用从表现为肿瘤消退的小鼠，或者从没有表现出肿瘤消退的小鼠中分离出的脾脏细胞进行检测。用 GM-CSF 接种的小鼠做为对照（“对照”）。

## 5 发明详述

选择性剪接形式（又称“选择性剪接形式的蛋白质”）包括在相应的正常蛋白质中没有的氨基酸序列。只存在于选择性剪接形式中而在正常的蛋白质中不存在的氨基酸序列被认为是“独特”于该选择性剪接形式的。

因此包含独特于选择性剪接形式中的氨基酸序列的多肽是高度免疫原性的。如这里使用的，“正常”的蛋白质是由一个给定基因产生的全部 mRNA 转录物中的大多数 mRNA 转录物产生的任意蛋白质。

例如，如果两个 mRNA 由一个基因产生，由该基因产生的包括超过 50% 的总 mRNA 转录物被认为是正常剪接的 mRNA 转录物，该正常转录物翻译成“正常”的蛋白质。由该基因产生的包括少于 50% 的总 mRNA 的 mRNA 转录物被认为是选择性剪接的 mRNA，其翻译成选择性剪接形式。如果一个基因产生 3 个或更多的 mRNA 转录物，相对于其他 mRNA 转录物以最大比例存在的 mRNA 转录物被认为是正常剪接的 mRNA 转录物，它被翻译成“正常”的蛋白质。与正常剪接的 mRNA 相比占较少比例的 mRNA 转录物被认为是选择性剪接的 mRNA，它们被翻译成选择性剪接形式。举例来说，如果一个基因产生相对比例 20 例为 40: 35: 25 的三个 mRNA 转录物，那么占总 mRNA 转录物 40% 的 mRNA 被认为是正常的剪接 mRNA。两个分别占全部转录物 35% 和 25% 的 mRNA 转录物被认为是选择性剪接的 mRNA。

对于本发明的目的，假定一个基因产生的正常或选择性剪接的 mRNA 的水平与从 mRNA 产生的蛋白质的水平直接成比例。选择性剪接的量和选择性剪接形式，通常在细胞中占该基因产生的总 mRNA 转录物相对较小的比例。例如，选择性剪接形式可以占一个给定基因总产量的 10% 或更少，5% 或更少，1% 或更少，0.5%-0.1% 或更少。

来源于一个基因的 mRNA 转录物的相对量可以通过本领域公知的技术进行检测，例如象在 Siebert PD, 1993 年, “定量 RT-PCR”, Clontech 实验室, 帕洛阿尔托, 加州; Carango P 等, 1995 年, *Ann. Neurol.* 38 : 610-617; 和 Grove DS , 1999 年, *分子生物学技术杂志*, 10: 11-16 中介绍的定量逆  
10 转录多聚酶链式反应 (RT-PCR)。其中公开的全部内容在此以参考文献的方式引用。mRNA 转录物的量通常以相对单位的方式表示(例如, 相对荧光单位), 但是也可以用质量的方式表示(例如, 微克)或摩尔数(例如克分子量)。

在患病的或异常的细胞(在蛋白质或 mRNA 水平评价的)中的选择性剪接形式的量可以至少比正常细胞中的相同的选择性剪接形式的水平高 50%。  
15 采用一些表型异常来鉴定“患病”的或“异常”的细胞, 这些可以通过对细胞或组织的检查由本领域技术人员方便地识别。例如, 在癌症: 肿瘤学原理和实践(第 3 版, DeVita VT, Hellman S, 和 Rosenberg SA 编辑), 1989 年, J. B. Lipincott 公司, 费城, PA 中公开了不同癌症的病理学和组织病理学, 这些公开的全部内容在此以参考文献的方式引用。

20 通过在细胞培养中表现的一些生长特性和形态学也可以鉴别致肿瘤或致瘤的细胞。致肿瘤或致瘤的细胞对接触诱导的生长抑制不敏感, 并且这些细胞在培养一段时间后在培养容器中形成团状物(foci)。致肿瘤或致瘤的

细胞也表现出特征性的形态学改变、无组织的集落生长形式并且形成不依赖于固定位置的生长。致肿瘤或致瘤的细胞还具有在易感动物中形成侵入性肿瘤的能力，这可以通过本领域公知的技术，例如将这些细胞注射到无胸腺小鼠或同种的新生动物中的方法来评价。例如，参见 Combes 等，1999 年，作为人类致癌性预警器的细胞转化分析：ECVAM 工作组的报告和建议，39, *ATLA* 27, 745-767, 该文章可在 <http://altwebjhsph.edu/science/pubs/ECVAM/ecvam39.htm> 获得。这些公开的全部内容在此以参考文献的方式引用。

组织学的、基于细胞培养的及其他用于鉴定其他患病或异常细胞的技术对于本领域人士也是公知的。

如这里使用的，一个“在正常细胞中基本上不存在”的选择性剪接形式表示该选择性剪接形式在正常细胞中不存在，或者以可忽略的量存在，并且在任何情况下，不会以超过患病的或异常细胞的水平 66% 的数量存在。因此可以通过将含有独特于选择性剪接形式的氨基酸序列的一种或几种多肽给予受试者，来产生特异性地针对患病的或异常细胞的免疫应答。用这样的多肽进行免疫的好处是不会引起针对正常细胞的免疫应答。

一种类型的选择性剪接形式包含两个通常距离比较远的氨基酸序列结合形成的新的氨基酸序列。这种选择性剪接形式是在当一个 mRNA 在剪接中要跳过一个正常情况下翻译为蛋白质的外显子序列的全部或部分，但又没有影响正常阅读框的时候形成的。这样通过两个在此之前不相邻的“正常”氨基酸的相邻排列而在“剪接接头”处形成了新的氨基酸序列。来自正常蛋白质的氨基酸序列排列在剪接接头的两侧。外显子序列的略过也会在不改变

mRNA 阅读框架的情况下产生新的密码子。这种情况下，在剪接接头处插入了一个新的氨基酸，其两侧是正常的氨基酸序列。两种类型的剪接接头被认为是免疫学上的“非自身”序列。

5 另外一种类型的选择性剪接形式包括从正常在 mRNA 中不存在的编码序列的翻译形成的新的氨基酸序列。这种选择性剪接形式由选择性剪接事件产生，其中内含子序列或通常不翻译为正常蛋白质的外显子序列被包含在 mRNA 中。编码序列也可以由改变了 mRNA 的天然的阅读框的选择性剪接事件产生，这会导致在选择性剪接位点的下游产生“错义”氨基酸序列的翻译。新的氨基酸序列被认为是免疫学上的“非自身”序列。

10 参与特定疾病过程的基因、容易产生选择性剪接 mRNAs 的基因，与正常组织的细胞相比，在患病的或异常的细胞中在通常表现为表达模式的改变。

例如，血管形成（形成新的血管）是肿瘤连续生长的重要过程。在肿瘤中发现的一些血管形成最重要的因子是血管内皮生长因子（VEGF）蛋白家族的成员。它们在肿瘤细胞中是上调的。VEGF 蛋白包括 VEGF, VEGF-B, VEGF-C,  
15 VEGF-D 和胎盘生长因子（PlGF）。产生 VEGF 蛋白质的 mRNA 可以发生多种剪接事件。

许多以疾病特异性的方式产生选择性剪接 mRNA 的其它基因是本领域公知的，并可以被用于本发明的实践中。表 1 是一个代表性列表，其包括这些基因、与之相关的疾病或状况，由这些基因产生的选择性剪接形式以及由这  
20 些选择性剪接形式产生的本发明的多肽。

表1

疾病	参考文献	受影响的基因 (蛋白质分类)	选择性剪接的实质和 来源于选择性剪接的 多肽序列	基因或基因产物的 GenBank 注册 号和选择性剪接形式的 SEQ ID NO. (全序列或部分序列)
急性前中幼粒细胞白血病	Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 99:7640-7645 (2002)	$\alpha$ 视黄酸受体 (信号转导 蛋白)	包括 RAR- $\alpha$ 基因的第 二个内含子, 阅读框架 内 (下划线) NSNHVASGAPVCHN PNLPSWQGALGP YGVVLLAPDIWLSL RLSSSPGVEGRS CSARETQA [SEQ ID NO: 3]	AC090426
中幼粒细胞白血病	J. Biol. Chem., Vol. 275, Issue 33, 25255-25261	MCL-1 (转录因子)	连接后的新序列: RNHETAFQ^GWVCG VLPCR [SEQ ID NO: 2]	AF203373 [SEQ ID NO: 1]
应激反应和对感染的反 应	J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 31, 29037-29044	与白介素-1 受体相关的 激酶 (信号传导)	阅读框架内删除 30 个 氨基酸 (残基 514-543)。删除的区域 是: VYERLEKLQAVVAG VPGHLEAA SCIPP SRQ [SEQ ID NO 5]	U52112 [SEQ ID NO: 4]

甲状腺激素抑制	J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 51, 48196-48205	侧链氨基酸转移酶(代谢)	靠近羧基端 36 个碱基对的缺失 (对应于 BCA Tm 1030-1065 位核酸)	U68418 [SEQ ID NO: 6]
免疫性炎症	J. Biol. Chem., Vol. 274, Issue 39, 27857-27866	人肾上腺受体 $\beta$ 异构体 (信号转导)	人肾上腺 $\beta$ 受体的 C 端具有额外的 15 个非同源的氨基酸	
致瘤性发展	J. Biol. Chem., Vol. 273, Issue 43, 28208-28218	胆汁盐依赖型的脂肪酶 (BSDL) (身体代谢)	划线部分是新序列: APVPTGDSGAPPVP P [SEQ ID NO: 8]	AF081673 [SEQ ID NO: 7]
内皮细胞激活	J. Biol. Chem., Vol. 274, Issue 3, 1415-1422	<i>H0XA9</i> 的变体 (转录因子)	阅读框架内的接头序列: DKPPIDP^NNPAAN W [SEQ ID NO: 8]	U82759 [SEQ ID NO: 9]
叶酸盐调节	J. Biol. Chem., 271, 23820-23827	叶酰聚谷氨酸合酶基因 (代谢)	交替的外显子: AVSARGATTEGPAR RGMS [SEQ ID NO:12]	U33557 [SEQ ID NO: 11]
癌症	J. Biol. Chem., 267: 4732-4739, 1992	CD44 剪接变体 (细胞粘连/信号转导)	插入 CD44 编码序列的 5 个不同的剪接突变体, 均在阅读框架内。	M83324 [SEQ ID NO: 13&14] M83325 [SEQ ID NO: 15&16] M83326 [SEQ ID NO: 17&18] M83327 [SEQ ID NO: 19&20] M83328 [SEQ ID NO: 21&22]
子宫癌	Cancer Research, Vol. 54, Issue 13 3337-3341	CD44	含变异体的外显子 v3-v10, 包括 v7/v8 转变表位	

甲状腺癌	Cancer Research, Vol. 56, Issue 5 1037-1042	CD44	包含外显子 4 的部分片段 与外显子 13 (v8) 的部分 片段接合, 其后为外显子 14 和 15 的全序列	
肠胃癌	Cancer Research, Vol. 55, Issue 19 4273-4277	CD44	保留内含子 9	
发育不良的和成瘤的颈 部上皮细胞	Clinical Cancer Research, Vol. 1, Issue 10 1125-1132	CD44 变异体		
黑色素瘤	Clinical Cancer Research, Vol. 2, Issue 3 447-456	CD44 变异体		
动脉硬化	J Biol Chem 268:17528-17538,1993	人 VLDL 受体的变异体脂 肪代谢)	缺少 84 个核苷酸	
变态反应	J Biol Chem 264:5912-5915	IgE 受体 $\alpha$ 链的变异体 (受体/信号转导)	外显子 2 或外显子 4 部分 缺失	

心脏功能	J. Biol. Chem. In press	肌/内质网状组织 Ca <sup>2+</sup> ATP 酶 (SERCA) 3 的 异构体 (离子通道)	三个新的剪接型	AF458230 [SEQ ID NO: 23] AF458229 [SEQ ID NO: 24] AF458228 [SEQ ID NO: 25]
乳腺癌	Cancer Research, Vol. 59, 2546-2550	<i>BRCA2</i> (DNA 修复)	外显子 11 和 13 接合在阅 读框架内 LILYGEPSI <sup>+</sup> STPDGTIK [SEQ ID NO: 26] 4 变异体缺失整个外显子 4	U43746 [SEQ ID NO:27]
前列腺癌	Cancer Research, Vol. 54, Issue 5 1190-1193	雌激素受体		
乳腺癌	Cancer Research, Vol. 53, Issue 24 5934-5939	基本上有活性的雌激素 受体 (代谢/信号传导)	缺失外显子 5	
乳腺癌	Cancer Research, Vol. 56, Issue 19 4324-4327	外显子 4 缺失的雌激素受 体 mRNA, 在外显子 2-4 内 或外显子 3-7 区域内删除		
小细胞肺癌	Cancer Research 60, 1840-1844	限制性神经原沉默子因 子抑制物 (转录调节)	新的外显子插入 VGYGYHLVIFTRV [SEQ ID NO:29]	AF228045 [SEQ ID NO: 28]

肺癌	Cancer Research, Vol. 57, Issue 11 2256-2267	FHIT 基因 (核苷代谢)	各种编码外显子的缺失或新外显子的插入	
乳腺癌	Cancer Research, Vol. 56, Issue 21 4871-4875	FHIT 基因 (核苷代谢)	由剪接引起的氨基端增加 32 个氨基酸	
乳腺癌	Cancer Research 59,4190-4193	类固醇受体 RNA 激活剂 (激素调节)	在 155-357 位删除 203 个碱基对 [SEQ ID NO:31]	AF092038 [SEQ ID NO:30]
急性成淋巴细胞白血病	Cancer Research, Vol. 56, Issue 9 2171-2177	ALL-1 基因 (转录因子)	删除外显子 8	
子宫内膜增生	Cancer Research, Vol. 58, Issue 12 2500-2503	PTEN 基因 (信号转导)	外显子 8 中 4 个碱基对缺失	
子宫内膜癌	Cancer Research, Vol. 57, Issue 24 5579-5583	性激素结合球蛋白 (激素代谢)	缺失整个外显子 VII	
畸胎瘤	Cancer Research, Vol. 54, Issue 1 220-225	PDGF- $\alpha$ 受体 (受体/信号转导)	缺失外显子 14	
结肠癌	Cancer Research, Vol. 56, Issue 8 1731-1736	DT-心肌黄酶 (药物解毒)	缺失外显子 4	
乳腺癌	Clinical Cancer Research, Vol. 6, 1135-1139		P66 异构体	

结缔组织圆形细胞癌	Clinical Cancer Research, Vol. 6, 3522-3529	EWS 基因 (转录因子)	缺失外显子 5、6、7 或 8	
肌肉发展	Proc. Natl Acad Sci 92:2686-2690	烟碱乙酰胆碱受体 (神经传递/信号转导)	阅读框架内缺失外显子 5	
表皮瘤	Cell Growth&Differentiation, Vol.6, Issue 9 1185-1191	结节性硬化症基因 (信号转导)	缺失氨基酸 947-990, (129 个碱基对的外显 子的缺失), 包括单独的 编码富含丝氨酸氨基酸 序列的、含 69 个碱基对 的外显子 (1272-1295)	
胃癌	Molecular and Cellular Biology, Oct. 1996,p. 5518-5526	Ron(酪氨酸激酶受体/信 号转导)	连接 2677-2825 (阅读框 架内缺失 147 个碱基对 的外显子)	
乳腺癌和子宫癌	Molecular and Cellular Biology, 17:444-452	BRCA1 (DNA repair) BRCA1 (DNA 修复)	阅读框架内缺失外显子 11	
苯丙酮尿症	J. Biol. Chem. 266:9351-9354,1991	苯氨基丙酸羟化酶 (代 谢)	在 94 或 95 位缺失 Ile	
X-连锁血中丙球蛋白缺 乏	J. Biol. Chem. 271:30303-30306	Bruton's 酪氨酸激酶(信 号转导)	缺失 33 个氨基酸 (氨基 酸残基 48-80)	

(免疫缺陷)						
遗传性红细胞增多症(贫血)	J. Biol. Chem. 266:15154-15159,1991	缺失外显子 X, 连接后在 阅读框架之外。			J05500 [SEQ ID NO: 37]	
不完全骨生成	J. Biol. Chem. 266, No. 33, Issue of November 25, pp. 22370-22374	胶原 Pro- $\alpha$ 1(I) (结缔组织)	阅读框架内 9 个碱基对 (3 氨基酸) 缺失 GPPGA6PGAPG [SEQ ID NO: 38]			
细胞凋亡缺陷	J. Biol. Chem. 273: 30139-30146	与 Bcl-2-相关的卵巢杀 伤细胞 (细胞凋亡调节)	缺失氨基酸 76-118 TVLLRLG <sup>^</sup> ITWGKVV [SEQ ID NO: 39]			
阿尔海默氏疾病	J. Biol. Chem. 267:10804-10809	Beta-A4 淀粉前体蛋白 (淀粉蛋白)	阅读框架内缺失外显子 15			
酒精中毒	J. Biol. Chem. 276:29764-29771	N-甲基-D-天冬氨酸 R1 (神经传导/信号转导)	选择性剪接外显子 5、 21、和 22 得到的 8 个异 构体			

Goodpasture 病 (自身免疫)	J. Biol. Chem. 275:40392-40399	Goodpasture 抗原结合蛋白 (丝氨酸/苏氨酸激酶, 信号转导)	缺失 1519-1596 (氨基酸 371-396)  AF232930 [SEQ ID NO: 32](normal) and [SEQ ID NO: 33](alternative splice form)  AF232935 [SEQ ID NO: 34] (alternative splice form partial sequence)
诱导凋亡	J. Biol. Chem. 273:11930-11936	BXA (调节细胞凋亡)	在 C 末端插入 49 个新碱基对 GLPLAESLKRRLMSLSP GRPPLLWDAH VADRDLCCGGSAHRL THHLEEDGLRP PAALDCVFPP [SEQ ID NO: 35]
系统性红斑狼疮	Biochemical and Biophysical Research Communications 272:877-881	Caspase-8 (调节细胞凋亡)	内含子 8 的选择性剪接, 连接后发生移码 (划线部分) <u>HLDAGTVEPKREK</u> [SEQ ID NO: 36]
糖尿病 (非胰岛素依赖型糖尿病)	Biochemical and Biophysical Research Communications 181:1419-1424	胰岛素受体 (受体/信号转导)	外显子 11 的选择性剪接导致在 C 末端多出 12 个氨基酸

Pelizaeus-Merzbacher 病	Annals of Neurology 1995,38,pp.610-617	DM 髓磷脂元件	DM20 的两种选择性剪接形式 Alt-1 是 224 个碱基对的片段, 含第-20 至+369 位核苷酸, 其中 162 个碱基对的外显子 II (从+4--+166) 被去除, 除了以 Gly2 酸 2 取代 Asp 氨基酸之外, 保留完整的阅读框架。 Alt-2 是包括从-20 至+369 位的 253 个碱基对的片段, 其中 133 个碱基对 (从+33 至--+166) 被从外显子 II 中剪切掉, 剪接后改变了 mRNA 的阅读框架。	[SEQ ID NOS: 40&41](nucleotide sequence of splice junctions)
---------------------------	---	----------	--	---

<sup>1</sup>每一篇期刊文献的全部公开内容在此以参考文献的方式引用。

<sup>2</sup>每一 GenBank 记录的全部公开内容在此以参考文献的方式引用。

从表 1 中可以看出, 几种类型的疾病或状况容易产生含有选择性剪接形式的患病或异常的细胞。例如, 选择性剪接形式存在于由感染或应激引起的疾病或异常的细胞中; 癌症 (例如急性前髓细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、髓母细胞白血病、子宫癌、甲状腺癌、胃肠道肿瘤、发育不良及成瘤的颈部上皮细胞、黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、子宫内膜癌、恶性畸胎瘤、结肠癌、结缔组织圆形细胞癌、表皮瘤、胃癌、卵巢癌); 免疫系统疾病或状况 (例如过敏反应、x-连锁的血中丙球蛋白贫乏、免疫性/炎症、系统性红斑狼疮、Goodpasture 疾病); 代谢疾病 (例如苯丙酮尿症、非胰岛素依赖的糖尿病); 胶原疾病 (例如骨发生异常); 动脉疾病 (动脉粥样硬化); 遗传性红细胞膜疾病 (例如遗传性椭圆形红细胞增多症); 甲状腺激素抑制; 子宫内膜增生; 阿尔海默氏病; 和酒精中毒。

在一种特定类型的疾病或状况中, 选择性剪接形式倾向于由某些基因产生。例如, 在癌症中, CD44 基因; 类固醇受试者基因 (例如雌激素受试者基因) 及 FHIT 基因产生多种选择性剪接形式, 从中可以产生本发明的多肽。

本领域的普通技术人员采用公知的技术可以鉴定其它可能产生选择性剪接形式的基因。这些技术包括连锁分析, 基因表达阵列分析, 同源性搜索及点突变分析, 以及用于预测给定核苷酸序列中外显子用途的商业化的计算机软件。

可以用本领域内公知的技术对特定疾病过程中涉及的基因转录的 mRNA 进行分析, 检测选择性剪接形式的存在。这些技术包括逆转录聚合酶链式反应 PCR (RT-PCR), Northern 杂交和原位杂交。分析 mRNA 序列的技术在诸如 Busting SA, 2000 年, *J. Mol. Endocrinol.* 25: 169-193 中作了介绍,

其中公开的全部内容在此以参考文献的方式引用。下面也对鉴定选择性剪接 mRNAs 的代表性技术进行介绍。

例如，含有与给定疾病的基因相关的核苷酸序列的数据库可以被用来鉴定选择性剪接的 mRNA。包括核苷酸序列的数据库包括 GenBank, Embase 和  
5 癌症基因组解剖计划 (CGAP) 数据库。例如，CGAP 数据库含有各种类型人类癌症的表达序列标签 (EST)。可以用一个 mRNA 或基因序列对这样的数据库进行检索，以确定对于特定疾病状态下表达的特定基因，是否已经发现了代表选择性剪接 mRNAs 的 ESTs。

一种称作“RNA 酶保护”的技术也被用来鉴定选择性剪切 mRNA。RNA 酶  
10 保护包括将一个基因序列转录成合成的 mRNA，将该 RNA 与来自于患病或异常细胞的 RNA 杂交，杂交的 RNA 随后与识别 RNA：RNA 杂交不匹配的酶孵育。如果比预计的片断小则表明由选择性剪切 mRNA 的存在。可以用本领域技术人员公知的方法对可能的选择性剪切 mRNA 进行克隆和测序。

与反转录偶联的聚合酶链式反应技术 (“RT-PCR”) 也被用来鉴定选择性  
15 剪切的 mRNAs。在 RT-PCR 中，采用本领域普通技术人员公知的方法，用逆转录酶将来自疾病组织的 mRNA 转变成 cDNA。随后通过 PCR 用位于 3'非翻译区的正向引物与 5'非翻译区的反向引物将 cDNA 的全部编码序列扩增出来。扩增的产物可以用来分析选择性剪切形式，例如，可以将扩增产物的大小与来自于正常剪接的 mRNA 的预期产物进行比较。确定扩增产物相对大小的优选  
20 的方法是琼脂糖凝胶电泳。扩增产物大小的任何改变可能指示选择性剪接的存在。

例如当用琼脂糖凝胶电泳分析时，如果第一轮 PCR 产生部清晰的条带，

可以将第一轮 PCR 反应的一部分用于第二轮扩增。第二轮扩增优选采用第一套引物以内的一套引物，这一过程被称作“巢式 PCR”，对本领域的技术人员是公知的。如果在第二轮扩增后扩增产物在琼脂糖电泳中仍然出现部清晰的条带，可以进行第三轮巢式 PCR。一旦产生了代表扩增产物的清晰的条带，

5 将该条带从凝胶中切割下来，按照已知的技术（例如双脱氧-链终止方法，Sanger 等，1977 年，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463，其中公开的全部内容在此作为参考文献引用）。抽提 DNA 并测序。

一旦鉴定了选择性剪接的 mRNA，可以按照已知技术翻译该 mRNA 序列，来确定由该 mRNA 编码的全部或部分选择性剪接形式的氨基酸序列。也可以用标准密码子使用表来预测由该选择性剪接的 mRNA 编码的氨基酸序列。例

10 如，参见“基因 VI”第 214 页的图 9.1，Lewin B 著，哈佛大学出版社，纽约，1997 年。其中公开的全部内容在此作为参考文献引用。随后可以产生基于该序列的多肽并用于本发明的实践中。

来自于部分测序的选择性剪接 mRNA（或来源于一种选择性剪接形式的部分氨基酸序列的核酸序列）的核酸序列可以用来鉴定本发明的多肽。例如，

15 可以从一个选择性剪接 mRNA 或选择性剪接形式的部分序列产生一个探针或引物。该探针或引物可以用已知的分子生物学技术，例如引物延伸、核酸测序、或核酸杂交以获得与部分测序的选择性剪接 mRNA 有关的额外的序列数据。本发明的多肽可以从额外的选择性剪接 mRNA 序列合成得到。

20 本发明的多肽必须至少含有一个对应于选择性剪接形式的正常蛋白质中没有的氨基酸或氨基酸序列，或者至少含有一个新的氨基酸序列的并置，它们通常位于正常蛋白质的不同部分。在一个具体的实施方案中，本发明的

多肽只能包含独特于选择性剪接形式的氨基酸序列。本发明的多肽可以是任意长度，但优选地是在 4-50 个氨基酸。特别优选的本发明的多肽是 7-25 个氨基酸，例如，8 或 9 个氨基酸长度。

为了使与之相应的正常蛋白质的免疫交叉反应最小。优选的是本发明多肽中含有的正常氨基酸的数量是有限的。多肽抗原加工过程中必需的 MHC-I 类分子递呈识别位点是 8-9 个氨基酸长度。不希望受任何理论的限制，含有长度在 8 个或更多个氨基酸的正常氨基酸序列的本发明的多肽可能引起不希望的针对正常蛋白质的免疫反应。因此，本发明的多肽中含有的相邻正常序列的长度优选地是 7 个氨基酸或更少。更优选的，相邻氨基酸序列的长度是 6、5、4、3、2、1 个氨基酸。预测本发明的多肽可以包括多于一个相邻的正常氨基酸的序列。

对于由通常情况下远离的氨基酸序列融合而形成的选择性剪接形式衍生的本发明多肽，优选的是，在剪接接头两侧相邻的正常氨基酸序列在长度上不超过 7 个氨基酸。更优选的，选择性剪接的接头两侧相邻的正常氨基酸序列分别为 6、5、4、3、2、或 1 个氨基酸。在一个具体的实施方案中，本发明的多肽可以在剪接接头两侧包括长度为 5 个或 6 个氨基酸的相邻的正常氨基酸序列。不希望受任何理论的束缚，相信这样的多肽与对应的正常蛋白质可以产生显著较少的交叉反应，同时仍然保持用于 MHC I 类抗原提呈的最佳长度。

本发明的多肽可以用任何多肽合成的方法制备。例如，该多肽可以由体外翻译相应的 mRNA 而获得。这些多肽也可以按照传统的技术在溶液中或在固相支持物上合成。

自动合成仪是可以商业获得的，并可以按照已知的方法使用。例如，参见 Stewart 和 Young 所著“固相多肽合成”，第二版，Pierce 化学公司，1984 年；Tam 等，*J. Am. Chem. Soc.* 105: 6442, 1983 年；Merrifield 著“科学”，232: 341-347, 1986 年；以及 Barany 和 Merrifield 所著“多肽”，Gross & Meienhofer, eds., 纽约学术出版社，1-284 页，1979 年，其中公开的全部内容在此作为参考文献引用。

另外，可以采用重组 DNA 技术生产本发明的多肽。例如，可以将选择性剪接的 mRNA 逆转录来合成编码多肽的核酸，或者采用本领域公知的化学合成技术。随后可以提供适当的连接序列与核酸编码序列相连，并连接到本领域可普遍获得的表达载体中。

表达载体可以含有调控序列，例如起始密码子和终止密码子，启动子及终止子区域和复制起点。例如，含有用于插入需要的编码序列的方便的限制性位点的质粒中可以包括与细菌宿主相容的启动子序列。

按照已知技术，含有编码本发明免疫原性多肽的核酸的表达载体优选地被转染到合适地细菌宿主中，以表达多肽。也可以采用酵母或哺乳动物宿主，只要该表达载体含有相容的调控序列。大量的表达载体及宿主系统是业内公知的，并且可以商品化获得。

编码本发明多肽的核酸可以与表达载体上额外的蛋白质编码序列相连接。连接的编码序列的表达产生含有本发明多肽的融合蛋白。额外的编码序列可以含有编码本发明其他多肽的序列，或者编码其他类型蛋白质的序列。

其它克隆及表达的技术在下文中有介绍，例如，Sambrook 等所著，*分子克隆：实验室手册*，冷泉港出版社出版，纽约，1982 年，和 Ausubel 等所

著, (ed.) *分子生物学现行协*, John Wiley and Sons 公司出版, 纽约, 1987年, 和 美国专利号 4,237,224、4,273,875、4,431,739、4,363,877 和 4,428,941。其中公开的全部内容在此作为参考文献引用。

本发明的多肽可以包括额外的氨基酸, 即不是由相应的 mRNA 编码的氨基酸, 例如, 一个或多个氨基酸, 例如酪氨酸、]半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸或天冬氨酸, 可以被添加到这些多肽的 C-或 N-末端。这些额外的氨基酸可以用于: 将二个或多个本发明的多肽连接在一起, 将本发明的一个或多个多肽偶联在仪器形成一个多价平台, 以增强这些多肽向免疫系统的递呈 (例如, 多聚赖氨酸, 聚乙二醇及诸如此类), 将一个或多个本发明的多肽与其它

5

10

它的蛋白质或分子偶联起来; 或者用来修饰本发明多肽的物理或化学性质。

用于将本发明的多肽与多价平台或者与其它蛋白质或分子相连接的位点, 也可以通过多肽末端-NH<sub>2</sub>的酰化 (例如乙酰化)、巯基乙酸酰胺化、末端羧基酰胺化 (例如用铵或甲胺), 或生物素化而引入。

优选地, 本发明地多肽被连在一起形成同- 或异-多聚体。同-或异-多聚体可以包括二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体或更多的聚体。可以理解, 本发明的多肽形成多聚体不会实质影响被连接多肽的期望的功能。

15

例如, 作为细胞毒 T 细胞的决定者或抗体应答的激活者。

在优选的方法中, 本发明多肽的同-或异-多聚体通过添加到多肽 N-和/或 C 末端的半胱氨酸残基而形成。这些多肽随后通过半胱氨酸残基的控制氧化形成多聚体。

20

在另一种方法中, 使用一种形成异双功能试剂的二硫键/酰胺, 如 N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶-二硫代)propionate (SPDP), 来形成本发明多肽的多

聚体。例如，可以通过在第一个 SPDP 功能集团与一个多肽的半胱氨酸残基之间形成二硫键，而在 SPDP 的第二个功能集团与另一个多肽的自由胺基之间形成酰胺的方式将多肽连接起来。已知有其他合适的形成异双功能试剂的二硫键/酰胺，例如，参见 *Immun. Rev.* 62: 185, 1982 年，其中公开的全部内容在此作为参考文献引用。

也可以采用形成硫醚连接的双功能偶联剂，将本发明的多肽连接形成多聚体。合适的硫醚形成试剂是可以商品化得到的，包括：6 马来酰亚胺己酸；2-溴乙酸；2-碘乙酸；及 4-(N 马来酰亚胺-甲基) 环己胺-1-羧酸。为了使多肽发生偶联作用，用琥珀酰亚胺或 1-羟基-2-硝基-4-磺酸的钠盐激活硫醚形成试剂的羧基基团。优选的活化的硫醚偶联剂是琥珀酰亚胺 4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己胺-1-羧酸 (SMCC)。

可以理解，本发明多肽的单体或多聚体可以用上述技术和试剂连接到其它的蛋白质上。

本发明的多肽在必要时可以被修饰以产生一些期望的特性，例如改善的药理学或免疫学作用，或用来促进多肽进入细胞。

可以改进本发明多肽的免疫学效果的修饰包括能够增强 CTL 或抗体诱导活性的修饰。例如，可以提高多肽的 N-末端疏水性，特别是当 N-末端的第二个残基已经是疏水的，并且可能与 HLA 限制分子相结合的时候。不希望受任何理论的限制，相信提高本发明多肽的 N-末端的疏水性提高了对 T 细胞提呈的效率。因此，含有宿主不能对其产生明显的 CTL 活性的表位的本发明的多肽，可以通过在多肽的 N-端替换疏水性残基的方法使多肽具有 CTL-诱导功能。

提高本发明多肽的免疫学效果的修饰包括：氨基酸插入、缺失和置换（保守或非保守的），后者可以提高免疫原性多肽与 MHC 分子结合的亲合性，用于后续的对细胞毒 T-淋巴细胞的递呈。“保守性置换”表示一个氨基酸残基被另一个生物学和/或化学相似的氨基酸所替换。例如用一个疏水性残基替换另一个，或用一个极性残基替换另一个。生物学/化学上相似的氨基酸组合包括：Gly/Ala;Val/Ile/Leu; Asp/Glu; Asn/Gln; Ser/Thr; Lys/Arg; 和 Phe/Tyr。

影响可被置换或删除的氨基酸残基的数量及类型的因素包括免疫原性多肽的必需表位点间的距离、一定构型的及可能被识别的功能性特点（例如疏水性与亲水性）。因此在给定的组合内用一个氨基酸替换另一个氨基酸是保守性置换。其它的保守性置换对本领域技术人员将是显而易见的。

此外，可以通过系统性地用一种特定的氨基酸（如 Ala）替换多肽中的氨基酸，可以解析本发明多肽中氨基酸侧链的贡献。

可以在体外或体内修饰本发明的多肽以提高其稳定性。这样的修饰包括合成包含至少一个 D-氨基酸的多肽，与它们对应的 L-多肽相比，含 D-氨基酸的多肽能更好地对抗肽酶，而且在血清合组织中更稳定。可以预期，以含 D-氨基酸的方式合成的本发明的多肽将与相应的 L-多肽具有相同的作用。但是，任何 MHC 分子亲合性的损失可以用增加 D-氨基酸多肽在体内的稳定性来弥补。本发明中含 L-氨基酸的多肽的稳定性也可以通过用 D-氨基酸“加帽”的方法来增强，这可以抑制外肽酶对多肽的破坏。

含有 D-氨基酸的多肽也可以被合成为“倒转”或“逆向倒装”的形式，即：将一个序列的所有的 L-氨基酸用 D-氨基酸置换，或者将氨基酸的序

列倒转，并用 D-氨基酸置换所有的 L-氨基酸。

可以想到对本发明中多肽的修饰不会影响其引发免疫应答的能力。例如对于保持免疫原活性没有作用的氨基酸残基可以被替换或删除。本领域的技术人员容易鉴别出那些氨基酸可以被替换或删除，例如，用现有技术中已知的点突变分析技术。一般来说，任何在表位和/或构象学上重要的残基上做的替换、添加合缺失，都将选择避免立体空间及电荷干扰的氨基酸或其一部分，空间及电荷干扰可能导致多肽与 MHC 分子的结合被破坏。其它形式的不影响本发明多肽引发免疫应答能力的修饰，在上文“蛋白质”合“多肽”定义部分进行了讨论。

本发明的一个或几个多肽可以被应用到受试者中，来刺激针对选择性剪切形式的免疫应答，该选择性剪接形式是这些多肽的来源。由多肽刺激的免疫反应包括细胞毒 T 淋巴细胞和/或抗体应答。例如，本发明多肽的应用可以产生对靶抗原特异的 MHC HLA-I 类限制的 T 淋巴细胞应答，包括对靶抗原特异的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的应答，其中 CD8<sup>+</sup>、MHC I 类限制的 T 淋巴细胞被激活。本发明多肽的应用还可以产生 MHC HLA-II 类限制的细胞毒 T 淋巴细胞应答，包括对靶抗原特异的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞应答，其中 CD4<sup>+</sup>、MHC II 类限制的 T 淋巴细胞被激活。

如这里所描述的，“受试者”包括动物，优选的是哺乳动物，更优选的是人类。他们患有一种疾病或状况，或有患病的危险，疾病或状况中患病或异常细胞产生了形成免疫原性多肽的选择性剪接形式。作为本发明多肽来源的选择性剪接形式在受试者体内的正常细胞中基本上不存在。用这种多肽在宿主中产生免疫反应可以治疗或预防与选择性剪接产物表达相关的疾病或

状况。

优选地，将二种或多种本发明的多肽给予受试者。例如，可以用二种或多种多肽代表一种或多种选择性剪接形式的不同表位。二种或多种多肽可以按上述技术连接起来形成多聚体，或者可以不形成多聚体而制成一种组合物；例如，作成一种混合物。不同多聚体、或者多聚体与单体多肽的混合物也是本发明的一部分。本发明的混合物可以包含 1、2、3、4、5 个或更多个不同的本发明多肽的单体或多聚体。

如果本发明的一种类型的多肽作为同聚体给药，就可以将多个重复的表位提呈给受试者的免疫系统。如果将本发明的二或多种不同的多肽进行给药，或者作为异多聚体或者多肽的混合物，多个不同的表位就被提呈给受试者的免疫系统。提呈多个相同或不同的表位对受试者的免疫系统产生协同作用。因此，本发明的多肽以多聚体或混合物方式给药，产生的免疫反应要比预期的多聚体或混合物种的每一种多肽单独给药的加和作用大。

本发明的多肽也可以与其它向“T-辅助”细胞提呈表位（这些表位刺激 T 细胞，后者在针对目标抗原的细胞毒 T 淋巴细胞反应中参与协作）的多肽组合应用到受试者。向“T-辅助”细胞提呈表位的多肽在 Ferrari 等人, *J. Clin. Invest.* 88: 214-222, 1991 年, 和美国专利号 4882145 中进行了介绍，其中公开的内容在此作为参考文献引用。

如这里使用的，与本发明的多肽“结合”应用的物质可以与这种多肽在相同的时间和相同的部位使用（即作为一种复合物或一种混合物），或者可以在与该多肽不同的时间和/或不同的部位使用。例如，该物质可以在本发明的一种多肽使用前或后在同一部位使用。或者可以与本发明中的一种多肽

同时应用于不同的部位（例如，如果多肽采用注射方式，该物质则可以口服，反之亦然；或者如果多肽和该物质都采用肠道外给药，可以将该物质给予到相对一侧的肢体）。正如这里使用的，与本发明中的多肽“复合”的物质可以共价或非共价地与多肽相结合。

- 5           本发明的多肽也可以与至少一种可以诱导 CTLs 的成分联合给予受试者。例如，一些已知可以在体内诱导针对抗病毒的 CTLs 脂类。适用于诱导 CTLs 的脂类包括三棕榈酰-S-甘油基半胱氨酰基-丝氨酰-丝氨酸 (P<sub>3</sub>CSS)，当其与多肽共价结合后可以有效地诱导病毒特异性地细胞毒淋巴细胞。参见 Deres 等，*自然*，342: 561-564, 1989 年，其中公开的全部内容在此以参考文献的
- 10 形式引用。在优选的实施方案中，本发明的多肽与 P<sub>3</sub>CSS 相复合，得到的脂多肽给予受试者可以特异性地诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的应答。与多肽结合的 P<sub>3</sub>CSS 也可以诱导中和性抗体的产生。因此，与 P<sub>3</sub>CSS 偶联的本发明的多肽也可引起体液免疫反应。

- 在本发明的实践中，本发明的至少一种多肽以足够引起免疫反应的剂量
- 15 (“有效量”) 给予患者来引发免疫反应，即针对患病或异常细胞的抗体或细胞毒 T 淋巴细胞应答。其中本发明的多肽以多聚体或混合物的形式应用。有效量代表累计给予的全部多肽。可以检测受试者中的免疫反应的存在，例如，通过测定在治疗中从受试者中得到的外周血淋巴细胞 (PBLs) 中抗原特异性的 CTL 的活性来确定。此外，可以通过测定针对本发明多肽的特异性抗体的
- 20 滴度，或者通过皮内注射本发明的多肽，随后测定迟发型超敏反应 (DTH)，来确定受试者体内免疫应答的存在

          本发明的多肽对特定受试者给药的有效剂量要视各种因素而定，例如多

肽的组成、给药的方式、治疗疾病的阶段和严重程度、受试者的体重及总体健康状况、和处方医师的判断等。一般来说，本发明多肽对一名 70 kg 的受试者给药的有效的剂量是从大约 1  $\mu$ g 到大约 2000 mg。优选的是从大约 1  $\mu$ g 到大约 500 mg 的多肽，更优选的是从大约 10  $\mu$ g 到大约 200 mg 的多肽，特别优选的是从大约 50  $\mu$ g 到大约 100 mg 的多肽。一种理想的剂量是约 500  $\mu$ g 多肽/70 kg 受试者。

可以理解本发明的多肽通常用于严重的疾病状况；也就是说，病人的生命受到威胁的时候。在这样的情况下，特别是考虑到免疫原性多肽相对无毒的特点，有可能对受试者给予实质过量的多肽；也就是说，超过 2000 mg/20 kg 受试者的有效剂量。

本发明多肽的有效量的单次或多次给药可以由治疗医师选择剂量水平及形式。就治疗应用而言，最好在当受试者第一次出现临床症状时，或在疾病和病况诊断刚刚结束时第一次使用这些多肽，使用“增加剂量”直到观察到至少部分症状得到缓和。优选的治疗剂量方案包括给予受试者至少一种本发明的多肽，起始剂量从大约 10  $\mu$ g 到大约 100  $\mu$ g，然后根据受试者免疫反应或程度或在 6 周到 3 个月之间，每 2—4 周用至少一种本发明多肽约 1  $\mu$ g—10 mg 的增强剂量进行给药。还有其它的治疗剂量方案。

就预防用途而言，有效剂量的至少一种本发明的多肽优选地，以固定剂量在几周或几个月时间内以规定的间隔给药。一个优选的预防用治疗方案是将本发明的至少一种多肽从约 10  $\mu$ g—约 100 mg 的剂量，每 2—4 周治疗 1 次，持续 6—8 个月。其它的预防用剂量方案也可以考虑。

对于治疗或预防用途，本发明的多肽可以以任何途径给药，只要能将这

些多肽与受试者的免疫系统接触。给药途径包括肠道给药（例如口服、肛门、鼻腔内等）和胃肠道以外给药。胃肠道以外给药包括静脉内、肌肉内、动脉内、腹膜内、阴道内、膀胱内（例如插入到膀胱中）、皮内、肺内、吸入、局部或皮下给药。在本发明的范围内还考虑到将这些多肽以控释剂型输入到受试者体内，使得在较晚的时间内发生多肽的全身或局部释放。优选的给药途径释肌肉、鼻腔、皮肤和皮下给药。

就治疗和预防用途而言，至少一种本发明的多肽也可以通过在受试者细胞内表达编码该多肽的核酸序列而给药。例如，可以用表达至少一种本发明的多肽的编码核酸的工程减毒的病毒宿主感染受试者的细胞。一种优选的减毒的病毒宿主是痘病毒。在本发明的实践中，含有编码本发明的一个或多个多肽的核酸序列的病毒宿主被导入受试者体内，使得受试者的部分细胞被该病毒载体感染。感染的细胞在病毒宿主的控制下，表达本发明的多肽，从而引发受试者的免疫反应，即细胞毒 T 淋巴细胞反应或抗体应答。用作减毒的病毒宿主的痘病毒载体及将这些载体导入到受试者体内的方法是业内公知的，例如在美国专利号 4722848 中所描述的，其中公开的全部内容在此作为参考资料引用。

就治疗或预防治疗而言，通过在细菌宿主中表达编码多肽的核酸，可以将本发明的多肽应用于受试者。在本发明的实践中，含有编码本发明的一个或多个多肽的核酸序列的细菌宿主被导入到受试者体内，例如通过皮内或膀胱内滴注。细菌宿主表达本发明的多肽，然后在受试者中引发免疫反应；即细胞毒 T 淋巴细胞反应或抗体应答。一种优选的细菌宿主是卡介苗（BCG），Stover 等人（*自然*，351：456-560，1991 年）对其进行了介绍，其中公开的

全部内容在此作为参考资料应用。其它适用于本发明实践的细菌宿主，例如伤寒沙门氏菌、李斯特菌等等，是本领域技术人员已知的。

就治疗或预防性治疗而言，也可以通过将编码多肽的核酸序列在酵母中表达，而将本发明的多肽应用到受试者。在本发明的实践中，含有编码本发明多肽的一个或多个核苷酸序列的酵母宿主被导入到受试者体内，例如口服、或通过皮内或膀胱内滴注。酵母宿主表达本发明的多肽，并在受试者中引发免疫反应；即细胞毒 T 淋巴细胞反应或抗体应答。优选的酵母宿主是酿酒酵母或裂殖酵母。

本发明的多肽可以与任何已知的载体或佐剂结合应用于受试者。合适的载体包括栓孔青贝血蓝蛋白；甲状腺球蛋白；白蛋白例如人血清白蛋白；破伤风类毒素；多聚氨基酸例如多聚（D-赖氨酸；D-谷氨酸）等等。合适的佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂，磷酸铝，氢氧化铝，多聚卵磷脂，乳化油及明矾。

本发明的多肽也可以与免疫刺激化合物组合应用到受试者，例如，免疫原性多肽可以与粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）一同应用。GM-CSF 是一种加工并向免疫系统提呈的细胞因子，已知它能够增强多肽向树突状细胞的提呈。其它合适的免疫刺激分子包括其它的细胞因子例如 IL-12、IL-2、IL-4、IL-5、IL-1 alpha 和 IL-18；以及半抗原例如二硝基苯酚。

也可以通过将一种或多种多肽在体外暴露给受试者免疫系统效应细胞的方法应用本发明的多肽。如这里使用的，“免疫系统效应细胞”或者是引导免疫系统靶向其它细胞进行消除，或发挥去除靶细胞的作用（例如“杀伤”细胞）。免疫系统效应细胞包括树突状细胞、淋巴因子激活的杀伤细胞（LAK）、

自然杀伤细胞 (NK)、T-细胞及巨噬细胞。获得免疫系统效应细胞的方法和体外对这些细胞进行处理的方法是现有技术已知的, 例如, 在以下文献中描述的, Blaese 等, 1995 年, *科学*, 270: 475-80; Kohn 等, 1985 年, *自然医学*, 1(10):1017-23; 及 Ferrari 等, 1992 年, *血液*, 80: 1120-24, 其中公开的全部内容在此作为参考文献引用。

例如, 可以从受试者中取出免疫系统细胞或其混合物, 并维持在培养物中。免疫系统效应细胞可以通过培养, 或者从受试者中取出, 而选择性地富集得到特定的细胞类型。随后用免疫原性多肽处理培养的免疫系统细胞。用本发明的多肽处理细胞, 包括直接将细胞暴露给多肽, 或者将编码多肽的核  
10 酸导入细胞中。对于直接与本发明的多肽接触的细胞, 可以采用远远超过体内应用时可以耐受的浓度。例如, 可以用 10 微摩尔本发明多肽的溶液处理细胞, 或者用终浓度约为 5 mg/ml—约 10 mg/ml 的本发明的多肽处理细胞, 优选地, 约为 0.1 ng/ml—约 5 mg/ml。

免疫系统效应细胞通常可以在培养时直接与本发明的多肽接触, 而将它们内化。但是, 本发明的多肽可以被修饰, 以使进入免疫系统的效应细胞的能力得到增强。例如, 多肽在给药前可以被包裹在一个脂质体中, 下文有更加详细的介绍。包裹的多肽通过脂质体与细胞膜的融合而直接导入到细胞内。用脂质体包裹本发明多肽的试剂和技术是现有技术已知的, 包括诸如来自 Imgenex 公司的 ProVectinz™ 蛋白质递送试剂。

20 也可以通过将多肽与已知的多肽引导序列复合的办法, 如“蛋白质转导结构域”或“PTD”, 对本发明的多肽进行修饰以增强其进入细胞的能力。

“PTDs”通过一种叫做“蛋白质转导”的过程指引化合物进入细胞。参见

Schware 等, 1999 年, “科学”, 285: 1569-1572。PTDs 现有技术已知的, 其可以包括任何已知的 PTD 序列, 例如, 包括富含精氨酸的序列, 如 Guis 等人在 1999 年的“癌症研究”, 59: 2577-2580 中介绍的 9-11 个精氨酸残基组成的多肽选择性地与一个或两个赖氨酸或谷胺酰胺组合的序列, 其中公开  
5 的全部内容在此作为参考文献引用。优选的 PTDs 是 11 个精氨酸残基组成的序列, 或者是来自人免疫缺陷病毒 TAT 蛋白质的氨基末端的 11 个氨基酸的蛋白质转导结构域 (SEQ ID NO:42)。其它合适的 PTD 序列包括其它富含精氨酸的序列, 例如 9 或 10 个的精氨酸, 或 6 个或更多个精氨酸与一个或多个赖氨酸或谷胺酰胺的组合序列。这样的引导序列是现有技术已知的; 参见  
10 上文 Guis 等, 1999 年的文章。PTD 可以位于本发明多肽的任何位置, 只要它不影响多肽引发免疫反应的能力, 但是, 优选地是位于 C-末端。

用于构建含有本发明多肽和 PTD 的融合蛋白的试剂盒与方法是现有技术已知的。例如“Trans Vector™”系统 (Q-Biogene 公司), 其中采用一个叫做“Penetratina™”的 16 个氨基酸的多肽, 它对应于果蝇 *antennapedia* 的  
15 DNA-结合结构域, 和 Voyager 系统 (Invitrogen Life Technologies 公司), 它采用了来自单疱疹病毒-1 的 38kDa 的 VP22 蛋白。

也可以采用将本发明的多肽与热休克蛋白 (HSP) 复合的方法增强其进入细胞的能力。例如 Srivastava 在美国专利号 5, 935, 576 中介绍的方法 (多肽与 HSP 非共价连接)。或 Suzue K 等, 1997 年, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,  
20 94: 13146-13151 (多肽与 HSP 共价连接), 其中公开的全部内容在此作为参考文献引用。也可以根据标准技术制备含有 HSP 序列和本发明多肽的融合蛋白。

编码本发明多肽的一种核酸可以通过任何已知的方法导入免疫系统  
的效应细胞中。例如用表达载体转染的细胞，或用上述减毒的病毒宿主感染  
细胞。构建含有编码本发明多肽的核酸序列的表达载体的技术在前面进行了  
介绍。

5 在用至少一种本发明的多肽处理后，可以通过检查一部分体外处理的免  
疫系统的效应细胞，确认细胞内存在适当水平的多肽，然后将剩余的处理过  
的细胞重新导入受试者体内。处理过的细胞可以采用肠道外的方法重新导入  
到受试者体内，包括静脉注射和直接注射到骨髓中。优选地是采用盐溶液或  
其它药学上可接受的载体将处理的细胞重新导入受试者。重新导入的处理细  
10 胞的数量与细胞群体的纯度有关。但是典型的剂量是每千克受试者体重在  $10^5$   
到  $10^8$  个细胞的范围。在用本发明的多肽处理之前，可以通过培养扩增细胞  
的办法增加可以得到的用于重新导入的细胞的数量。

本发明还提供了一种鉴别能够诱导MHC-限制的细胞毒T淋巴细胞反应的  
本发明多肽的方法。例如，可以得到外周血淋巴细胞（PBLs）并与一种或多  
15 种本发明的多肽接触，通过将刺激过的PBL与放射性标记的（例如 $^{51}\text{Cr}$ ）、能  
够内源性合成靶抗原的靶细胞（例如HLA匹配的巨噬细胞、T细胞、成纤维  
细胞或B淋巴母细胞）共同孵育，（或者，可选择地，用感兴趣的多肽对细  
胞进行脉冲处理）来确定多肽诱导特异性细胞毒活性的能力，并测定标记物  
的特异性释放。优选地，PBLs与本发明的多肽池接触，其中每个多肽为大约  
20 8至20个氨基酸长度，优选的是9—12个氨基酸长度。诱导细胞毒性T淋巴  
细胞活性的本发明多肽可以从池中筛选。

一旦鉴别出能够刺激细胞毒T淋巴细胞反应的本发明的多肽，就可以确

定反应的 MHC 限制成分。这包括将刺激过的 PBL（或其短期培养物）与一系列标记的已知 HLA 类型的靶细胞共同孵育，这些细胞已经用感兴趣的多肽或者适当的对照进行过脉冲处理。

将被刺激的 PBL 裂解的细胞的 HLA 等位基因与未裂解细胞的 HLA 等位基因相比较，来自于裂解的靶细胞的 HLA 等位基因代表了对多肽应答的细胞毒 T 淋巴细胞的 MHC 限制成分。

可以通过检测从放射标记的靶细胞释放的标记物，或用酶联免疫斑点分析（“ELISPOT”）方法来检测刺激的 PBLs 靶细胞的裂解。“ELISPOT”方法是现有技术已知的。进行该方法的试剂盒及试剂可以从 BD Bioscience Pharmigen 公司（圣何塞市 95131-1807，加州）购买。ELISPOT 分析可以在单细胞水平检测从 PBL 释放的细胞因子，这可以对产生细胞因子的细胞的频率进行直接检测。

简单地说，ELISPOT 方法是通过用细胞因子捕获抗体对细胞培养皿或孔进行包被，例如一种抗  $\gamma$  干扰素的抗体。用非特异性的结合蛋白封闭培养皿或孔中未被包被的点。内源地合成用于刺激 PBLs 的靶细胞，如肿瘤细胞，被加入到培养皿或孔中。或者，用感兴趣的多肽脉冲处理靶细胞，激活的 PBLs 随后被加入到培养皿或孔中。如果激活的 PBLs 特异性地裂解靶细胞，PBLs 分泌细胞因子例如  $\gamma$  干扰素，就会被包被在培养皿或孔中的细胞因子捕获抗体所捕获。随后用识别干扰素  $\gamma$  不同表位的二级抗体来检测由 PBLs 分泌的、并被细胞因子捕获抗体所捕获的  $\gamma$  干扰素的存在。二级抗体可与能够检测的标记物如荧光或放射性的标记物相结合。在下面的实施例 5 中介绍了用 ELISPOT 方法鉴定可以诱导 MHC-限制的细胞毒 T 淋巴细胞应答的本发明多

肽的方法。

按照本领域已知的技术，可以将本发明的多肽制成药物组合物，也称作疫苗组合物。本发明的药物组合物的特点是至少为无菌和无热原的。如这里使用的，“药物组合物”包括人及兽用的制剂。本发明的药物组合物可以包  
5 括至少一种本发明的多肽与一种生理学上可接受的载体介质相混合，以形成溶液、悬液或分散体。优选的生理学上可接受的载体介质有水、缓冲水、生理盐水、0.4%盐水，0.3%甘油、透明质酸等等。

本发明的药物组合物还可以包括传统的药用敷料和/或添加剂。合适的药用敷料包括稳定剂、抗氧化剂、渗透压调节剂、缓冲液，以及 pH 调节剂。  
10 合适的添加剂包括生理学上生物相容的缓冲液（例如，盐酸氨丁三醇），螯合剂（例如，DTPA 或 DTPA-二酰胺）的添加剂（例如 0.01 至 10 摩尔百分比），或者钙螯合复合物（例如，钙 DTPA，CaNaDTPA-二酰胺），或者，可选择的，钙或钠盐（例如，氯化钙、抗坏血酸钙、葡萄糖酸钙或乳酸钙）的添加剂（例如 1 至 5 摩尔百分比）。本发明的药物组合物可以包装用于液体形  
15 式或冻干。

对于固体组合物，可以使用传统的无毒性的固体载体，例如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等等。

制备本发明药物组合物的方法是本领域技术人员已知的。例如在  
20 Remington 的药物科学（第 17 版），宾夕法尼亚州伊斯顿市，Mack 出版公司，1985 年出版，其中公开的全部内容在此作为参考资料引用。

例如，用于口服的固体药物制剂可以包含上面列出的任何载体及敷料，

和 10—95%，优选 25%—75%的本发明的一个或多个多肽，用于气雾剂给药的药物组合物可以包含 0.01%—20%重量、优选包含 1%—10%重量的、以与表面活性剂及推进剂细密分开形式的本发明的一个或多个多肽。合适的表面活性剂包括酯或含有 6—22 个碳原子的脂肪酸的部分酯。（例如，己酸、辛酸、月桂酸、棕榈酸、亚油酸、亚麻酸、olestERIC 或油酸以及一种两性的多羟基醇，或它的环状酞）；以及混合酯，例如混合或天然的甘油酯。表面活性剂可以包含气雾剂药物组合物重量的 0.1—20%，优选的是重量的 0.25—5%，其平衡物为推进剂。如果需要还可以包含一种载体，例如用于鼻腔内给药的卵磷脂。

10 本发明的多肽或本发明的药物组合物可以被包裹在脂质体中。脂质体帮助免疫原性多肽进入特定的组织，例如淋巴样组织，还可以提高多肽或制剂的血液半衰期。适于本发明的脂质体是用标准的形成载体的脂制备的。通常包括中性的或带负电荷的磷脂及固醇，例如胆固醇。脂的选择通常考虑以下因素作为指导，例如需要的脂质体大小和血液中的半衰期等因素。已知许多  
15 用来制备脂质体的方法，例如 Szoka 等，*Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467, 1980 年；美国专利号 4,235,871、4,501,728、4,837,028 和 5,019,369，其中公开的全部内容在此作为参考文献引用。优选地，本发明的多肽单独地，或与能够将脂质体靶向到特定细胞或组织的配体相结合，而掺入到脂质体中。优选的是与淋巴样细胞中普遍存在的受体相结合的配体，  
20 例如，与 CD45 抗原相结合的单克隆抗体。

本发明还提供了针对选择性剪接形式或本发明的多肽的抗体。本发明的抗体与正常蛋白质中不存在选择性剪接形式或本发明的多肽的表位特异性

地结合。抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体或能够与抗原结合地抗体片段。本发明的抗体包括嵌合的、单链的、和人源化的抗体，以及 Fab 片断与 Fab 表达文库的产物。抗体片段，例如 Fab 抗体片段来自于抗原的抗体，保留了选择性结合抗原的能力，它可以采用本领域已知的方法制备。该方法在美国专利 5,876,997 中作了一般性的介绍，其中公开的全部内容在此作为参考资料引用。

本发明中的多克隆抗体可以采用本领域已知的技术，用相当基本上纯的选择性剪接形式或本发明的多肽免疫宿主而制备。可以采用标准技术，例如，采用免疫多肽的酶联免疫吸附分析（ELISA）在不同时间检测免疫宿主的抗体滴度。如果需要，抗体分子可以从宿主中收获或分离，进而用已知技术纯化（例如蛋白质 A 的色谱）获得来获得 IgG 片段。

在免疫后的适当时间，例如，当特异性的抗体滴度最高的时候，可以从宿主中获得产生抗体的细胞并采用标准的技术制备单克隆抗体。例如下列文献描述的杂交瘤技术：Kohler 和 Milstein, 1975 年，自然，256: 495-497，以及 Mishell, B. B. 等, 细胞免疫中精选的方法 (Freeman WH 编辑)，旧金山，1980 年；人 B 细胞杂交瘤技术 (kozbor 等, (1983 年)，今日免疫，4:72)；EBV 杂交瘤技术 (Cole 等, 1985 年, 单克隆抗体和癌症治疗，Alan R. Liss 公司出版，77-96 页)；或者 trioma 技术，亦参见 免疫学现行协定 (1994 年)，Coligan 等编辑，纽约 John Wiley & Sons 公司出版)。本段落中所有引述文献公开的内容在此作为参考文献引用。

通过杂交瘤培养的上清液筛选出与感兴趣的多肽结合的抗体，例如采用标准的 ELISA 分析方法，可以检测本发明的产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。

或者，也可以采用感兴趣的多肽对重组组合免疫球蛋白文库（例如，噬菌体抗体展示文库）进行筛选，来鉴定并分离针对选择性剪接形式或本发明多肽的单克隆抗体。产生及筛选噬菌体抗体展示文库的试剂盒可以商品化地获得（如：Pharmacia 公司重组噬菌体抗体系统，产品目录号 27-9400-01；和  
5 Stratagene 公司 SurfZAP 噬菌体展示试剂盒，产品目录号 240612）。此外，可从下列文献查找出产生和筛选抗体展示文库的方法和试剂，例如，美国专利号 5,223,409；PCT 公开号 WO 92/18619；PCT 公开号 WO 91/17271；PCT 公开号 WO 92/20791；PCT 公开号 WO 92/15679；PCT 公开号 WO 93/01288；PCT 公开号 WO 92/01047；PCT 公开号 WO 92/09690；PCT 公开号 WO  
10 90/02809；Fuchs 等，（1991 年），*生物技术*，9：1370-1372；Hay 等，（1992 年），*人抗体杂交瘤细胞*，3：81-85；Huse 等，（1989 年），*科学*，246：1275-1281；Griffiths 等，（1993 年），*EMBO 杂志*，12：725-734。其中公开的全部内容在此作为参考资料引用。

重组抗体，例如嵌合抗体和/或人源化单克隆抗体也在本发明的范围之  
15 中。这些嵌合及人源化（包括嵌合人源化）的单克隆抗体可以用本领域已知的重组 DNA 技术制备，例如采用下列文献描述的方法：美国专利号 5,225,539；PCT 公开号 WO 87/02671；欧洲专利申请 184,187；欧洲专利申请 171,496；欧洲专利申请 173,494；PCT 公开号 WO 86/01533；美国专利号 4,816,567；欧洲专利申请 125,023；Better 等，（1988），*科学*，240：1041-1043；Liu  
20 等，（1987 年）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84：34393443；Liu 等，（1987 年），*免疫学杂志*，139：3521-3526；Sun 等，（1987 年），*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 84：214-218；Nishimura 等，（1987 年），*癌症研究*，47：999-1005；

Wood 等, (1985 年), *自然*, 314: 446-449; Shaw 等, (1988 年), *J Natl. Cancer Inst.*, 80: 1553-1559; Morrison, (1985 年), *科学*, 229: 1202-1207; Oi 等, (1986 年), *生物技术*, 4: 214; Jones 等, (1986 年), *自然*, 321: 552-525; Verhoeyan 等, (1988 年), *科学*, 239: 1534; 以及 Beidler 等 (1988 5 年), *免疫学杂志*, 141: 4053-4060。其中公开的全部内容在此作为参考资料引用。

采用标准技术例如亲和层析、免疫沉淀, 可以用抗体来分离本发明的多肽, 或者分离作为其来源的选择性剪接形式。此外, 这些抗体可以用来检测选择性剪接形式 (例如在细胞裂解液或细胞上清), 以评价一种选择性剪接 10 形式的表达丰度和模式。

这些抗体也可被用于临床作为临床检测方法的一部分, 用来检测组织中的蛋白质水平, 例如用来确定给药治疗方案的疗效。可以通过将抗体与可检测物质的偶联而方便地使用本发明的抗体进行蛋白质水平的检测。合适的可检测物质包括各种酶, (例如: 辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$  一半乳糖苷 15 酶、及乙酰胆碱酯酶) 的人工基团复合物 (例如抗生蛋白链菌素/生物素, 亲和素/生物素); 荧光物质 (例如伞形酮、荧光素、荧光素异硫氰酸盐, 罗丹明, dichlorotriazinylamine 荧光素, 丹磺酰氯和藻红蛋白); phycoerythrin; 发光物质 (如发光氨); 生物发光物质 (例如萤光素酶, 萤光素及水母素); 以及放射性物质 (例如  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  或  $^3\text{H}$ )。

20 本发明的抗体也可以用于治疗或预防性治疗患有疾病状况的受试者。其中患病或异常的细胞产生含有可以与抗体结合表位的选择性剪接形式。这种选择形剪接形式在受试者的正常细胞中基本是没有的。在本发明的实践中,

本发明的至少一种抗体的有效剂量被应用于受试者。优选地，至少一种对选择性剪接形式或本发明的多肽有特异性的单克隆抗体被用于受试者。

本发明抗体的“有效量”指的是能够改善受试者的一个或多个临床症状的抗体剂量，或者是引起受试者中患病或异常细胞数量下降的剂量。对于普通的医师来说，临床症状的改善将是明显易知的。受试者体内患病或异常细胞的数量也易于测定。用于检测患病或异常细胞地合适的技术包括直接测定（例如计算血液或骨髓中淋巴细胞的浓度）或从组织群集的大小进行估算。如这里使用的，“组织群集”是受试者体内患病或异常细胞的局部化的集合，例如肿瘤。组织群集的大小可以用直接视觉观察或诊断成像方法如 X-射线、磁共振、超声及闪烁扫描来确定。如本领域已知的，用来确定组织群集的诊断成像方法可以采用或不采用反差试剂。组织群集的大小也可以用物理方法确定。例如组织量的触诊或用检测组织量的仪器例如弯角规测量。本发明抗体的有效量可以是，例如，从大约 0.1mg/kg 到大约 100 mg/kg 体重。优选地，从大约 50 mg/kg 到大约 100 mg/kg 体重。更优选地，是从大约 10 mg/kg 到大约 20 mg/kg 体重。

本发明的抗体优选地以胃肠道以外的方法用于受试者。例如通过血管内（例如动脉或静脉内）注射或输液。

以说明性的而不是限制性的方式提供以下实施例。

## 20 实施例 1—VEGF 免疫原性多肽的鉴定

血管内皮生长因子蛋白质的选择性剪接形式是在 HC2 20d2/c 细胞中发现的，这种细胞是转染了组成性活性形式的 EGF 受试者 EGFR VIII 的 NIH-3T3

细胞。按照标准技术培养 HC2 20d2/c 细胞, 从 HC2 20d2/c 细胞中分离总 RNA, 然后分离 poly A<sup>+</sup>RNA。poly A<sup>+</sup>RNA 用来作为寡聚 dT 引物第一链合成的模板。用来自于 VEGF 异构体的引物进行 PCR。下面提供了用于 PCR 的引物序列。引物从 5'到 3'方向表示, 在每条引物左侧列出了对应于正常 cDNA 序列的核苷酸序号。

### 鼠 VEGF

#### 第 1 套

79-99 CCG AAA CCA TGA ACT TTC TGC (SEQ ID NO: 43)  
 10 936-916 CTT GGC GAT TTA GCA GCA GAT (SEQ ID NO: 44)

#### 第 2 套

117-137 ACC CTG GCT TTA CTG CTG TAC (SEQ ID NO: 45)  
 909-888 AAA TGG CGA ATC CAG TCC CAC (SEQ ID NO: 46)

15

#### 第 3 套

126-146 TTA CTG CTG TAC CTC CAC CAT (SEQ ID NO: 47)  
 815-795 GAA GGA TCT CCT CTT CCT TCA (SEQ ID NO: 48)

### 20 鼠 VEGFB:

#### 第 1 套

119-139 CTG CTT GTT GCA CTG CTG CAG (SEQ ID NO: 49)  
 778-758 TCT GGA AAG CAG CTT GTC ACT (SEQ ID NO: 50)

## 第2套

155-175 GCC CCT GTG TCC CAG TTT GAT (SEQ ID NO: 51)

739-719 TAC AGG TGA CTG GGT TGA GCT (SEQ ID NO: 52)

5

## 第3套

182-202 AGC CAC CAG AAG AAA GTG GTG (SEQ ID NO: 53)

733-713 TGT CTG GGT TGA GCT CTA AGC (SEQ ID NO: 54)

10 鼠 VEGFC:

## Set 1

151-171 AAC ATG CAC TTG CTG TGC TTC (SEQ ID NO: 55)

1559-1539 CTC TCC CGC AGT AAT CCA CAT (SEQ ID NO: 56)

15 Set 2

292-312 GAG GTC AAG GCT TTT GAA GGC (SEQ ID NO: 57)

1521-1501 CTT GGG CCT CTG TTA CCA TGT (SEQ ID NO: 58)

## Set 3

20 301-321 GCT TTT GAA GGC AAA GAC CTG (SEQ ID NO: 59)

1509-1489 TTA CCA TGT GGT CCC ACA GAG (SEQ ID NO: 60)

鼠 VEGFD:

第 1 套

15-35 GGA GAA TGC CTT TTG CAA CAC (SEQ ID NO: 61)

1343-1323 GCC ATT GCA TGG AAA TGT GGC (SEQ ID NO: 62)

5

第 2 套

57-77 CAA CTG CTT AGT CAT CGG TAG (SEQ ID NO: 63)

1234-1214 ACT TGA CAA AGC AGT GAG CTG (SEQ ID NO: 64)

10

第 3 套

96-116 ATG TAT GGA GAA TGG GGA ATG (SEQ ID NO: 65)

1178-1158 GTT GAA TCA AGG GTT CTC CTG (SEQ ID NO: 66)

鼠 P1GF:

15

第 1 套

TCT CCT CTG GTA TCA GCG TCT (SEQ ID NO: 67)

GCA CTG AAT TCC TGA GTG TCT (SEQ ID NO: 68)

第 2 套

TGG TGA TTG TGC CTT GAA GGA (SEQ ID NO: 69)

20

763-743 TCC ATG CCC CTT ATC ATG GAG (SEQ ID NO: 70)

第 3 套

88-108 TGA AGG ACC TTG GCT CTG GAT (SEQ ID NO: 71)

AAT AGA GGG TAG GTA CCA GCA (SEQ ID NO: 72)

用每组第一套引物做 PCR，如果在这轮 PCR 中看到一条清楚的带，则将这条带切下，用 5'引物对 PCR 产物测序。如果带不清楚，将它切下，对 PCR 产物进行纯化，用第 2 套引物对纯化的 PCR 产物的 10%做进一步扩增。

或者，如果有多条不清楚的带，用商品化的试剂盒 (Qiagen) 从反应管中纯化 PCR 产物，将纯化产物的 10%用第 2 套引物做另一轮 PCR。如果条带仍不清楚，将 PCR 产物纯化，将纯化产物的 10 用第 3 套引物做进一步扩增。用合适的 5'引物对第 2 轮或第 3 轮扩增的清楚的条带进行测序。将序列于已知的基因序列相比较，鉴别选择性剪接形式。

在 VEGF 和 VEGFB 中鉴定出 1 种选择性剪接产物，VEGFD 中发现了 2 个 (VEGFD #1 的鉴定见图 1；见后文 SEQ ID NO:77)。这些序列翻译成氨基酸后形成 4 种 VEGF 多肽，它们含有 VEGF 选择性剪接形式的独特序列 (这里称“VEGF”多肽)。下面列出了选择性剪接的 VEGF mRNA 的部分编码序列以及这些 mRNA 部分序列编码的 VEGF 肽。

VEGF Alt. splice #1

R T K P E K C D K P R R (SEQ ID NO : 73)

AGA ACA AAG CCA GAAAA^A TGT GAC AAG CCA AGG CGG (SEQ ID NO : 74)

505^637

SEQ ID NO: 73 代表了经剪接在核苷酸 505 和 637 之间连接形成的选择性剪接 mRNA (SEQ ID NO: 74) 编码的多肽。它将两个正常情况下远离的序

列连到一起。mRNA 的阅读框架仍得以保持，在剪接接头处形成了一个新的密码子（编码赖氨酸残基的 AAA）。

VEGFB Alt. 剪接 #1

5 V V K Q L V Q T P P L P P (SEQ ID NO : 75)

GTG GTC AAA CAA CTA GT<sup>^</sup>G CAG ACG CCG CCG CTT CCT CCA (SEQ ID NO : 76)

300<sup>^</sup>678

SEQ ID NO:75 代表了在 300 和 678 位置的核苷酸之间剪接形成的选择性剪接 mRNA (SEQ ID NO:76) 所编码的多肽。剪接接头在这个位置自然形成了  
10 缬氨酸。但随后的密码子偏离了正常 VEGFB 的天然阅读框架。因此从核苷酸 679 处以后形成了性的氨基酸序列。

VEGFD Alt. 剪接 #1

H G P V K M S S F Q E T (SEQ ID NO : 77)

15 CAT GGA CCA GTGAAG<sup>^</sup>ATG TCC TCA TTC CAA GAA ACT (SEQ ID NO : 78)

185<sup>^</sup>752

SEQ ID NO:77 代表了连接核苷酸 185 和 752 的剪接形成的选择性剪接 mRNA (SEQ ID NO:78) 编码的多肽。与 VEGFD 的天然阅读框相比，剪接接头在核苷酸 752 处将密码子读框移位，因此在这一点之后形成了新的氨基酸序  
20 列。

VEGFD Alt. 剪接 #2

L E R S E S C E D R C P (SEQ ID NO : 79)

TTG GAA CGA TCT GAA<sup>^</sup>AGC TGT GAG GAC AGA TGT CCT (SEQ ID NO : 80)

238<sup>^</sup>1047

5 SEQ ID NO: 79 代表了连接核苷酸 238 和 1047 的剪接形成的选择性剪接 mRNA (SEQ ID NO: 80) 所编码的多肽, 与 VEGFD 的天然阅读框架相比, 剪接接头在核苷酸 1047 处将密码子读框移位, 因此在这一点之后形成了新的氨基酸序列。

可以证实 VEGF 的选择性剪接形式是肿瘤特异性的, 在正常组织中没有  
10 发现。对于 HC2 20d2/c 细胞模型, 将来自 NIH-3T3 细胞的 mRNA 用前述的 3 套巢式引物在相同的 PCR 条件下扩增, NIH3T3 细胞是 HC2 20d2/c 细胞系的来源细胞, 没有带, 或者只检测出鼠 VEGF、VEGFB 或 VEGFD 的正常剪接的 mRNA。结果实例如图 1 B 所示, 表明 NIH-3T3 细胞中只存在正常剪接的 VEGFD mRNA。

对于 MMTV-neu 小鼠肿瘤模型 (见下面的实施例 3), 如下采用移植培养  
15 分离正常细胞 (成纤维细胞)。从小鼠中切下皮肤, 用胰酶消化, 然后放到含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基的细胞培养液中, 使成纤维细胞从切下的皮肤中迁移出来并贴附到培养皿上。然后将细胞繁殖 5-7 代, 从培养的成纤维细胞中收获 mRNA, 与 MMTV 鼠肿瘤细胞的 mRNA PCR 扩增相同的条件下, 采用前述的三套巢式 PCR 引物进行扩增。来自正常 MMTV-neu 的鼠细胞 mRNA 的 PCR  
20 扩增没有出现 VEGFB 选择性剪接形式的条带。只有与图 1B 中类似的代表正常剪接 mRNA 的天然 VEGFD 条带。

采用常规方法合成了上面列出的 VEGF 多肽。为了避免对 VEGF 家族成员

的可能的免疫识别，VEGF 肽中对应于正常蛋白质的连续氨基酸不超过 6 个。多肽的同二聚体采用在 SEQ ID NO:73 的 C 末端添加一个半胱氨酸的办法得到 RTKPEKCDKPRRC (SEQ ID NO: 81)。二聚体化通过对 SEQ ID NO:81 添加的 C-末端半胱氨酸的控制氧化完成。

5

### 实施例 2—用 VEGF 多肽治疗使肿瘤消退

在鼠肿瘤模型中评价 VEGF 多肽及 SEQ IAD NO:85 同二聚体诱导抗肿瘤免疫应答的能力。共有 112 只同系小鼠被分为 8 个治疗组，每组 14 只小鼠。用 HC2 20d2/c 肿瘤细胞注射，注射后 4 天，第 1 组到第 5 组在左侧腹股沟  
10 处用 100 pg 的 SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ IDNO: 77, SEQ ID NO: 79 或 SEQ ID NO: 81 二聚体进行免疫接种，多肽用混合有 45 ng 鼠 GM-CSF 助剂的 100  $\mu$  l PBS 稀释。磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 的总体积使 150  $\mu$  l，含有 2 mg/ml 的鼠血清白蛋白作为载体。六个治疗组用上述所有四种 VEGF 多肽的  
15 组合物及 SEQ ID NO:81 同聚体(每种 60  $\mu$  g)在含有 45 ng GM-CSF 及 2 mg/ml 鼠血清白蛋白的总体积 200  $\mu$  l 的 PBS 中进行免疫接种。第七个治疗组用 100  $\mu$  g 来自 EGFR VIII (SEQ ID NO:82) 的表皮生长因子受试者 (EGFR) 突变体以上述方法免疫接种。该疫苗组分中也含有 45ng 鼠 GM-CSF 和 2 mg/ml 鼠血清白蛋白。EGFR VIII 突变使 EGFR 基因的基因组重排的结果。而且有报道 EGFR VIII 多肽 (SEQ ID NO:82) 可以诱导针对表达该突变受试者的肿瘤细  
20 胞的免疫应答。作为对照，第 8 个资料组用不含多肽的 GM-CSF 及 2 mg/ml 鼠血清白蛋白的 PBS 免疫接种。所有治疗组在此后的每天在开始接种的地方注射一次 45 ng 的 GM-CSF。

单独注射 GM-CSF 的小鼠在接种后 5 天平均表现处肿瘤的生长，然后出现中等水平的消退（图 2，只有“HC<sub>2</sub>”）。这种消退很可能于 HC2 20d2/c 肿瘤细胞表达的 EGFR VIII 突变体蛋白有关。

注射 EGFR VIII 多肽的小鼠在 5 天也表现处肿瘤的生长，但与对照小鼠相比肿瘤的生长速度没那么快。而且以后出现明显的消退（图 2，“APLEEK”）。EGFR VIII 免疫观察到的肿瘤消退模式与此前用这个多肽进行的研究结果相似。（Moscatello, D. K., *癌症研究*, 57: 1419-1424, 1997）。

图 2 表明所有人格 VEGF 多肽及 SEQ 81 的同二聚体在一定程度上诱导肿瘤的消退。在免疫后 12 天最明显。对 2 个多肽 SEQ ID NO: 75 和 SEQ ID NO: 81（图 2，“VVKQL”和“HGPVK”），直到免疫后 20 天仍能开导肿瘤的消退，但是肿瘤从那时以后开始生长。用合成的没有添加半胱氨酸的 SEQ ID NO: 73 多肽免疫的小鼠（图 2，“RTKPEK 不含 C”）表现出与 EGFR VIII 类似的消退模式。用 SEQ ID NO: 81 同二聚体或 SEQ ID NO: 79 多肽（图 2，“RTKPEK 含 C”和“LERSE”）免疫的小鼠，在研究结束时尽管 SEQ ID NO:81 同二聚体开始出现肿瘤的生长，但是二者还是表现出肿瘤体积很大程度的减小。用所有 4 种 VEGF 多肽及 SEQ ID NO:81 同二聚体的组合物免疫小鼠，表现出肿瘤停止生长，并且在所有的治疗组种表现出肿瘤体积缩小的程度最大（图 2，“Combo 5”）。

这些结果表明含有基于 VEGF 家族的选择性剪接多肽的疫苗成分给药，可以引发有效的抗肿瘤免疫反应，并且可以引起肿瘤的消退。而且，使用 VEGF 多肽多价体或混合物，可以更加增强抗肿瘤的效果。

### 实施例 3—用 VEGF 多肽治疗延缓乳腺癌肿瘤的发作

在 MMTV-neu 小鼠中评价了 VEGF 多肽防止或延缓肿瘤发作的能力。

MMTV-neu 小鼠是携带 MMTV 启动子控制下的 neu 癌基因的致癌形式的转基因小鼠。该启动子在乳腺组织中驱动该基因的表达。100%的雌性 MMTV-neu 小鼠在出生后 5—6 个月出现多样乳腺肿瘤，最后需要处死该动物。对 MMTV-neu 小鼠乳腺肿瘤分析 VEGF 家族成员选择性剪接形式表明，其中含有 VEGF 多肽 SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:77 的选择性剪接形式。

在实验中采用 9 只同窝 MMTV-neu 雌性小鼠。用每种 60  $\mu$ g 的 SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 77, 及 SEQ ID NO: 81 同二聚体的组合物加 45 ng 的 GM-CSF 作为佐剂进行初始免疫，接种到 6 周龄的一个处理组的 3 只小鼠。小鼠随后用相同的组合物在 5、6、7 月龄免疫接种。对照组的三只小鼠只接受 45 ng 的 GM-CSF 佐剂。含三只雌性鼠的对照组只接受 45 ng 的 GM-CSF。两组小鼠用 45 ng 的 GM-CSF 在原来的注射位点继续注射 3 天。在 5、6、7 月龄时重复相同的免疫接种疗程。第二个对照组的三只雌鼠没有接受任何处理。

结果如图 3 所示，表明未处理的小鼠或只接受 GM-CSF 的小鼠在出生后 158 天出现肿瘤。两个对照组的所有动物在出生后 192 天出现肿瘤。（图 3 A, “GM-CSF” 及 “未处理”）。相反，处理组的小鼠在出生后 192 天没有出现肿瘤，并且治疗组的所有动物在出生后 226 天均没有肿瘤（图 3A, “Combo”）。每只动物的总的肿瘤体积也显示处理组与对照组的全部肿瘤负荷有差异。在 240 天，未处理组中的 2 只小鼠和仅接受 GM-CSF 组中的 1 只小鼠由于总的肿瘤体积大于 3000  $\text{mm}^3$ ，使得必须将这些动物处死。（图 3B, “GM-CSF” 及 “未处理”）。但是，在处理组中，240 天时最大的肿瘤负荷小于 1200 $\text{mm}^3$ 。

因此，用含有 VEGF 多肽组合物免疫延缓了人乳腺癌小鼠模型中肿瘤的发作的时间。并且结果显示肿瘤负荷显著降低。

#### 实施例-4 用 VEGF 多肽组合物免疫接种 MMTV-neu 小鼠的抗体应答

5 采用“斑点”杂交分析对用 VEGF 多肽组合物免疫接种的 MMTV-neu 小鼠是否产生抗体应答进行评价。在实施例 3 中，给三只雌性 MMTV 小鼠注射 SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:77, 及 SEQ ID NO:81 同二聚体各 60  $\mu$ g 的组合物以及作为佐剂的 45 ng GM-CSF。三只未处理的雌性 MMTV-neu 小鼠及三只注射 45 ng GM-CSF 的雌性 MMTV-neu 小鼠作为对照。斑点杂交中，分别将 1  $\mu$ g BSA、  
10 SEQ ID NO: 82 (“EGFRvIII”), SEQ ID NO: 73 (“R-pep”), SEQ ID NO: 81 同二聚体 (“RCpep”), SEQ ID NO: 81 (“H-pep”), SEQ ID NO: 79 (“L-pep”) 或 SEQ ID NO: 75 (“V-pep”) 单独点到硝酸纤维素膜上。为每个实验及对照动物准备一张膜。在最后一次注射后 2 个月，用从对照组或实验组采集并以 1: 100 稀释的血清与膜孵育，随后用  $^{125}$ I 抗鼠二抗洗膜，在洗一次，并对 X-  
15 光片曝光。

未处理的动物（未处理；Fig. 4A）或仅接受 GM-CSF (GM-CSF; Fig. 4B) 的动物没有出现针对任何 VEGF 或对照多肽的抗体应答。相反，所有用 SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 77 和 SEQ ID NO: 85 (COMBO; Fig. 4C) 接种的三只动物都显示有强的针对 SEQ ID NO: 77 的抗体应答。此外，其中的两只动物  
20 显示有针对 SEQ ID NO: 73 和 SEQ ID NO:81 的抗体应答。但是，免疫接种组的动物对 BSA 对照或三种对照多肽 (EGFRvIII, L-pep, and V-pep) 均无抗体应答，其中动物没有接种这三种对照多肽。

### 实施例 5 一用 VEGF 多肽产生细胞毒 T 淋巴细胞活性

采用 ELISPOT 分析显示 VEGF 家族多肽引发了细胞毒 T 淋巴细胞活性，如下所述。用 HC2 20d/c 肿瘤细胞接种小鼠并随后用 SEQ ID NO: 73 (“R-pep”),  
5 SEQ ID NO: 75 (“V-pep”) 或 SEQ ID NO: 82 (“EGFRvIII”) 加 GM-CSF 进行免疫接种结果出现肿瘤的消退；或者用 SEQ ID NO: 75 (“V-pep”) 加 GM-CSF 免疫接种，结果没有出现肿瘤消退。采集这两组小鼠的脾细胞用于分析评价。以从只用 GM-CSF 接种的小鼠中分离的脾细胞作为对照(“control”)。用 10  $\mu$ g/ml 免疫多肽或鼠血清白蛋白（用于只用 GM-CSF 处理的动物的脾细胞）脉  
10 冲处理的 HC2 20 d2/c 肿瘤细胞，被分别用来作为处理组和对照组脾细胞的靶细胞。未处理的 HC2 20 d2/c 作为阴性对照靶细胞。

将脾细胞与靶细胞以各种比例（从 10: 1 到 2: 1 共同孵育，重复 3 次，用 ELISPOT 分析鉴定裂解反应，以抗干扰素  $\gamma$  抗体作为细胞因子捕获的抗体。以未处理的靶细胞的裂解反应作为背景，对每  $10^6$  细胞的的特异性点进行定  
15 量分析。然后进行线性回归分析。

结果如图 5 所示。图 5 显示当用接种的多肽脉冲处理时，用 SEQ ID NO: 73 (“R-pep”) 或 SEQ ID NO: 75 (“V-pep”) 接种的小鼠出现肿瘤的消退并有强的 CTL 应答，这些应答高于用 SEQ ID NO: 82 (“EGFRvIII”) 处理并出现肿瘤消退的小鼠。相反，只用 GM-CSF 处理的小鼠，或用 SEQ ID NO: 73 (“V-pep”) 接种的小鼠，二者均未出现肿瘤的消退，并表现出弱的 CTL 应答。  
20

### 实施例 6 一用 VEGF 多肽混合物产生 CTL 活性

采用 ELISPOT 分析，显示用 VEGF 家族多肽引发了细胞毒 T 淋巴细胞活性，如下。用 HC2 20d/c 肿瘤细胞接种小鼠，随后用每种 60  $\mu$ g 的 of SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 77 及 SEQ ID NO: 81 同二聚体加 45 ng GM-CSF 作为佐剂，或者 SEQ ID NO: 82 (“EGFRvIII”) 加 45 ng GM-CSF；以只用 GM-CSF 5 的小鼠作对照 (“control”)。用 10  $\mu$ g/ml 的接种多肽、鼠血清白蛋白（阳性对照）脉冲处理的（或未处理（阴性对照））的 H2 20 d2/c 肿瘤细胞作为靶细胞。将脾细胞与靶细胞以各种比例孵育（从 10: 1 到 2: 1），重复 3 次，用 ELISPOT 分析鉴定裂解反应。在 ELISPOT 中，以抗干扰素- $\gamma$  抗体作为细胞因子捕获抗体，用来自于为处理的靶细胞的裂解反应为背景，对每 10<sup>6</sup> 细胞 10 的特异性点进行定量分析。然后进行线性回归分析。

用下列每种 60  $\mu$ g 的 VEGF 组合物重复该试验。

- 1) SEQ ID NO: 73 及 SEQ ID NO: 77;
- 2) SEQ ID NO: 77 及 SEQ ID NO: 81 ;
- 3) SEQ ID NO: 73; 及 SEQ ID NO: 81。

15

#### 实施例 7—用多肽、多聚体多肽及多肽混合物预防肿瘤及使肿瘤消退

对来自于与乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、皮肤癌、淋巴瘤、膀胱癌及胰腺癌相关的选择性剪接形式的本发明的多肽，在实验动物模型中检测它们预防肿瘤或诱导肿瘤消退的能力。

20

#### 癌症的小鼠模型

实验中采用的小鼠模型可以内源性地产生相关的癌症或支持相关的肿

瘤来源的细胞系生长及肿瘤发生特性。对于乳腺癌，采用 pten 基因杂合缺失的小鼠或 MMTV-neu 转基因小鼠；对于卵巢癌，采用 BRCA1 或 BRCA2 杂合突变体；对于前列腺癌，采用 probasin 启动子控制下的 SV40 早期基因的转基因小鼠；对于淋巴瘤，采用 p53 orp9ARF 基因的杂合缺失小鼠；对于膀胱癌，采用喂食 N-丁基-(-4-羟基丁基)亚硝胺 (BBN) 的小鼠。肺及膀胱癌模型可以分别将从 Lewis 肺癌细胞系或 PANC02 小鼠胰腺腺癌细胞系导入到适当品系的小鼠上而得到。小鼠皮肤癌的模式可以在小鼠局部应用 DMBA (7,12 二甲基苯[a]蒽) 获得。

## 10 肿瘤的预防

与上述癌症有关的本发明的多肽按照前面介绍的方法鉴定与合成。

对于采用致癌性化合物诱导或采用肿瘤细胞移植形成的小鼠模型，小鼠开始用与 45 ng GM-CSF 混合的大约 50—500  $\mu$ g 多肽进行接种。以后在 2~4 周间隔时间用相同的组合物对小鼠再注射 2 次。以仅接受 GM-CSF 的小鼠作对照。

在第三次注射后，将小鼠用肿瘤细胞接种或暴露在已知其剂量在该特定宿主中可以导致肿瘤高发率的（即动物的 75%到 90%或更多）致癌化合物中。随后对小鼠进行监测，直到第一次出现肿瘤，每个一天检测肿瘤的大小。对于那些自发产生肿瘤的小鼠模型，开始用与 45 ngGM-CSF 混合的大约 50—500  $\mu$ g 的多肽在 6 周龄（小鼠免疫系统发育成熟的时间）进行免疫接种，然后在 2—4 周间隔时间接种。以只接受 GM-CSF 的小鼠作对照。在肿瘤第一次出现前的时间内对小鼠进行监测，并每天测量肿瘤的大小。

### 肿瘤的消退

与上述癌症有关的本发明的多肽按照前面介绍的方法鉴定及合成。

对于采用致癌性化合物诱导或采用肿瘤细胞移植形成的小鼠模型，小鼠  
5 开始用肿瘤细胞接种或暴露在致癌化合物中。在预计肿瘤将要产生的大约 4  
天时之前的时间，用与 45 ng GM-CSF 混合的相同的组合物注射 2~4 周，以  
只接受 GM-CSF 的小鼠作为对照。在肿瘤第一次出现前的时间内对小鼠进行  
监测，并每天测量肿瘤的大小

对于自发形成肿瘤的小鼠模型，开始在小鼠免疫系统发育成熟的 6 周龄  
10 用与 45 ng GM-CSF 混合的大约 50—500  $\mu$ g 多肽进行免疫接种。然后在 2  
—4 周间隔时间接种。以只接受 GM-CSF 的小鼠做对照。

### 用多聚体预防肿瘤及使肿瘤消退

用与特定肿瘤有关的本发明的 2 聚体、3 聚体、4 聚体、5 聚体或 6 聚体  
15 多肽，重复上述在癌症小鼠模型中用于证明肿瘤预防和使肿瘤消退的试验。

### 用多肽混合物预防肿瘤并使肿瘤消退

用 2、3、4、5 或 6 种本发明的多肽混合物重复上述在癌症的小鼠模型  
中证明肿瘤预防和使肿瘤消退的试验。

20

### 实施例 8—由表达人选择性剪接形式的同系小鼠肿瘤细胞形成的肿瘤的预防和消退

如表 1 中所列，来自与人的本发明的多肽，按照上述方法进行鉴定与合成，按照标准技术构建能够表达一些或所有的作为免疫接种多肽来源的人的选择性剪接形式的表达载体。

## 5 同系小鼠肿瘤模型

用 SV40 T 抗原转染 NIH-3T3 细胞，使它具有肿瘤发生特性，或者在细胞培养中将 NIH-3T3 细胞传代 30—40 代，使之具有肿瘤发生特性。分离并繁殖自发出现的肿瘤发生细胞。

用上述质粒表达载体转染 NIH-3T3 细胞，采用标准技术筛选和繁殖表达  
10 由人选择性剪接形式的细胞。

表达人选择性剪接形式的肿瘤发生性 NIH3T3 细胞被注射到 NIH Swiss 小鼠中，使之形成肿瘤。

肿瘤被从一些动物中切下并在细胞培养中繁殖，在这里细胞保持它们在动物中形成肿瘤的能力。对人序列的表达进行确证。这些细胞然后被用于后  
15 面的预防肿瘤和使肿瘤消退的实验。

## 肿瘤的预防

开始用大约 50—500  $\mu$ g 的一种或几种上述来源于人的本发明的多肽，与 45 mgGM-CSF 混合后，对 NIH Swiss 小鼠进行免疫接种。疑惑在 2—4 周  
20 间隔对小鼠注射另外两次。以只接受 GM-CSF 的小鼠做对照。在第三次注射后，如上所述，用表达人选择性剪接形式序列的同系肿瘤细胞给小鼠接种。对小鼠在第一次出现肿瘤之前进行检测，每隔一天测定肿瘤的大小。

### 肿瘤的消退

如上所述,开始用表达人选择性剪接形式的同系肿瘤细胞接种NIH Swiss  
小鼠。在接种后的第4天,用与45 ng GM-CSF混合的大约50—500  $\mu$ g的  
5 一种或几种本发明的多肽接种小鼠。小鼠在2—4个月间隔用相同的组合物  
再注射2次。以只接受GM-CSF的小鼠作对照。对小鼠在第一次出现肿瘤之  
前进行监测,每隔一天测定肿瘤的大小。

这里引述的所有文献以它们的整体作为参考文献而引用。尽管对本发明  
10 的介绍与优选的具体实施例及各种附图相关。应该看到可以应用其它类似的  
具体实施例,或者在没有偏离本发明的精神下对介绍的具体实施例进行修改  
和添加以实现相同的功能。因此,本发明不被任何单个的具体实施例所限制,  
而应该在符合附加的权利要求的范围和广度内进行解释。

<110> 托马斯杰斐逊大学  
艾伯特. 黄

<120> 作为多种治疗模式基础的蛋白质的选择性剪接形式

<130> 8321-81 PC

<150> US 60/293,791

<151> 2001-05-25

<160> 82

<170> FastSEQ for windows Version 4.0

<210> 1

<211> 271

<212> PRT

<213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 1

```

Met Phe Gly Leu Lys Arg Asn Ala Val Ile Gly Leu Asn Leu Tyr Cys
 1      5      10      15
Gly Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Ser Gly Gly Ala Thr Arg Pro Gly
      20      25      30
Gly Arg Leu Leu Ala Thr Glu Lys Glu Ala Ser Ala Arg Arg Glu Ile
      35      40      45
Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ile Gly Gly Ser Ala Gly Ala Ser
      50      55      60
Pro Pro Ser Thr Leu Thr Pro Asp Ser Arg Arg Val Ala Arg Pro Pro
 65      70      75      80
Pro Ile Gly Ala Glu Val Pro Asp Val Thr Ala Thr Pro Ala Arg Leu
      85      90      95
Leu Phe Phe Ala Pro Thr Arg Arg Ala Ala Pro Leu Glu Glu Met Glu
      100      105      110
Ala Pro Ala Ala Asp Ala Ile Met Ser Pro Glu Glu Glu Leu Asp Gly
      115      120      125
Tyr Glu Pro Glu Pro Leu Gly Lys Arg Pro Ala Val Leu Pro Leu Leu
 130      135      140
Glu Leu Val Gly Glu Ser Gly Asn Asn Thr Ser Thr Asp Gly Ser Leu
 145      150      155      160
Pro Ser Thr Pro Pro Ala Glu Glu Glu Glu Asp Glu Leu Tyr Arg
      165      170      175
Gln Ser Leu Glu Ile Ile Ser Arg Tyr Leu Arg Glu Gln Ala Thr Gly
      180      185      190
Ala Lys Asp Thr Lys Pro Met Gly Arg Ser Gly Ala Thr Ser Arg Lys
 195      200      205
Ala Leu Glu Thr Leu Arg Arg Val Gly Asp Gly Val Gln Arg Asn His
 210      215      220
Glu Thr Ala Phe Gln Gly Trp Val Cys Gly Val Leu Pro Cys Arg Gly
 225      230      235      240
Pro Arg Arg Trp His Gln Glu Cys Ala Ala Gly Phe Cys Arg Cys Cys
      245      250      255
Trp Ser Arg Ser Trp Phe Gly Ile Ser Asn Lys Ile Ala Leu Leu
      260      265      270

```

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 2  
 Arg Asn His Glu Thr Ala Phe Gln Gly Trp Val Cys Gly Val Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Cys Arg

<210> 3  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 3  
 Asn Ser Asn His Val Ala Ser Gly Ala Pro Val Cys His Asn Pro Asn  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Ser Trp Gln Gly Ala Leu Gly Pro Tyr Gly Val Val Val Leu  
 20 25 30  
 Ala Pro Asp Thr Trp Leu Ser Ser Leu Arg Leu Ser Ser Pro Gly  
 35 40 45  
 Val Glu Gly Arg Ser Cys Ser Ala Arg Glu Thr Gln Ala  
 50 55 60

<210> 4  
 <211> 682  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 4  
 Met Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Glu Pro Ala Ala Pro Gly Ala Gln  
 1 5 10 15  
 His Phe Leu Tyr Glu Val Pro Pro Trp Val Met Cys Arg Phe Tyr Lys  
 20 25 30  
 Val Met Asp Ala Leu Glu Pro Ala Asp Trp Cys Gln Phe Ala Ala Leu  
 35 40 45  
 Ile Val Arg Asp Gln Thr Glu Leu Arg Leu Cys Glu Arg Ser Gly Gln  
 50 55 60  
 Arg Thr Ala Ser Val Leu Trp Pro Trp Ile Asn Arg Asn Ala Arg Val  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Leu Val His Ile Leu Thr His Leu Gln Leu Leu Arg Ala Arg  
 85 90 95  
 Asp Ile Ile Thr Ala Trp His Pro Pro Ala Pro Leu Pro Ser Pro Gly  
 100 105 110  
 Thr Thr Ala Pro Arg Pro Ser Ser Ile Pro Ala Pro Ala Glu Ala Glu  
 115 120 125  
 Ala Trp Ser Pro Arg Lys Leu Pro Ser Ser Ala Ser Thr Phe Leu Ser  
 130 135 140  
 Pro Ala Phe Pro Gly Ser Gln Thr His Ser Gly Pro Glu Leu Gly Leu  
 145 150 155 160  
 Val Pro Ser Pro Ala Ser Leu Trp Pro Pro Pro Ser Pro Ala Pro  
 165 170 175 180  
 Ser Ser Thr Lys Pro Gly Pro Glu Ser Ser Val Ser Leu Leu Gln Gly  
 180 185 190  
 Ala Arg Pro Phe Pro Phe Cys Trp Pro Leu Cys Glu Ile Ser Arg Gly  
 195 200 205  
 Thr His Asn Phe Ser Glu Glu Leu Lys Ile Gly Glu Gly Gly Phe Gly  
 210 215 220  
 Cys Val Tyr Arg Ala Val Met Arg Asn Thr Val Tyr Ala Val Lys Arg  
 225 230 235 240  
 Leu Lys Glu Asn Ala Asp Leu Glu Trp Thr Ala Val Lys Gln Ser Phe  
 245 250 255  
 Leu Thr Glu Val Glu Gln Leu Ser Arg Phe Arg His Pro Asn Ile Val  
 260 265 270  
 Asp Phe Ala Gly Tyr Cys Ala Gln Asn Gly Phe Tyr Cys Leu Val Tyr  
 275 280 285  
 Gly Phe Leu Pro Asn Gly Ser Leu Glu Asp Arg Leu His Cys Gln Thr  
 290 295 300

Gln Ala Cys Pro Pro Leu Ser Trp Pro Gln Arg Leu Asp Ile Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Gly Thr Ala Arg Ala Ile Gln Phe Leu His Gln Asp Ser Pro Ser Leu  
 325 330 335  
 Ile His Gly Asp Ile Lys Ser Ser Asn Val Leu Leu Asp Glu Arg Leu  
 340 345 350  
 Thr Pro Lys Leu Gly Asp Phe Gly Leu Ala Arg Phe Ser Arg Phe Ala  
 355 360 365  
 Gly Ser Ser Pro Ser Gln Ser Met Val Ala Arg Thr Gln Thr Val  
 370 375 380  
 Arg Gly Thr Leu Ala Tyr Leu Pro Glu Glu Tyr Ile Lys Thr Gly Arg  
 385 390 395 400  
 Leu Ala Val Asp Thr Asp Thr Phe Ser Phe Gly Val Val Val Leu Glu  
 405 410 415  
 Thr Leu Ala Gly Gln Arg Ala Val Lys Thr His Gly Ala Arg Thr Lys  
 420 425 430  
 Tyr Leu Lys Asp Leu Val Glu Glu Glu Ala Glu Glu Ala Gly Val Ala  
 435 440 445  
 Leu Arg Ser Thr Gln Ser Thr Leu Gln Ala Gly Leu Ala Ala Asp Ala  
 450 455 460  
 Trp Ala Ala Pro Ile Ala Met Gln Ile Tyr Lys Lys His Leu Asp Pro  
 465 470 475 480  
 Arg Pro Gly Pro Cys Pro Pro Glu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Leu  
 485 490 495  
 Ala Cys Cys Cys Leu His Arg Arg Ala Lys Arg Arg Pro Pro Met Thr  
 500 505 510  
 Gln Glu Asn Ser Tyr Val Ser Ser Thr Gly Arg Ala His Ser Gly Ala  
 515 520 525  
 Ala Pro Trp Gln Pro Leu Ala Ala Pro Ser Gly Ala Ser Ala Gln Ala  
 530 535 540  
 Ala Glu Gln Leu Gln Arg Gly Pro Asn Gln Pro Val Glu Ser Asp Glu  
 545 550 555 560  
 Ser Leu Gly Gly Leu Ser Ala Ala Leu Arg Ser Trp His Leu Thr Pro  
 565 570 575  
 Ser Cys Pro Leu Asp Pro Ala Pro Leu Arg Glu Ala Gly Cys Pro Gln  
 580 585 590  
 Gly Asp Thr Ala Gly Glu Ser Ser Trp Gly Ser Gly Pro Gly Ser Arg  
 595 600 605  
 Pro Thr Ala Val Glu Gly Leu Ala Leu Gly Ser Ser Ala Ser Ser Ser  
 610 615 620  
 Ser Glu Pro Pro Gln Ile Ile Ile Asn Pro Ala Arg Gln Lys Met Val  
 625 630 635 640  
 Gln Lys Leu Ala Leu Tyr Glu Asp Gly Ala Leu Asp Ser Leu Gln Leu  
 645 650 655  
 Leu Ser Ser Ser Leu Pro Gly Leu Gly Leu Glu Gln Asp Arg Gln  
 660 665 670  
 Gly Pro Glu Glu Ser Asp Glu Phe Gln Ser  
 675 680

<210> 5  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 5  
 Val Tyr Glu Arg Leu Glu Lys Leu Gln Ala Val Val Ala Gly Val Pro  
 1 5 10 15  
 Gly His Ser Glu Ala Ala Ser Cys Ile Pro Pro Ser Pro Gln  
 20 25 30

<210> 6  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

```

<400> 6
Met Ala Ala Ala Ala Leu Gly Gln Ile Trp Ala Arg Lys Leu Leu Ser
 1      5      10      15
Val Pro Trp Leu Leu Cys Gly Pro Arg Arg Tyr Ala Ser Ser Ser Phe
 20      25      30
Lys Ala Ala Asp Leu Gln Leu Glu Met Thr Gln Lys Pro His Lys Lys
 35      40      45
Pro Gly Pro Gly Glu Pro Leu Val Phe Gly Lys Thr Phe Thr Asp His
 50      55      60
Met Leu Met Val Glu Trp Asn Asp Lys Gly Trp Gly Gln Pro Arg Ile
 65      70      75      80
Gln Pro Phe Gln Asn Leu Thr Leu His Pro Ala Ser Ser Ser Leu His
 85      90      95
Tyr Ser Leu Gln Leu Phe Glu Gly Met Lys Ala Phe Lys Gly Lys Asp
 100     105     110
Gln Gln Val Arg Leu Phe Arg Pro Trp Leu Asn Met Asp Arg Met Leu
 115     120     125
Arg Ser Ala Met Arg Leu Cys Leu Pro Ser Phe Asp Lys Leu Glu Leu
 130     135     140
Leu Glu Cys Ile Arg Arg Leu Ile Glu Val Asp Lys Asp Trp Val Pro
 145     150     155     160
Asp Ala Ala Gly Thr Ser Leu Tyr Val Arg Pro Val Leu Ile Gly Asn
 165     170
Glu Pro Ser Leu Gly Val Ser Gln Pro Arg Arg Ala Leu Leu Phe Val
 180     185     190
Ile Leu Cys Pro Val Gly Ala Tyr Phe Pro Gly Gly Ser Val Thr Pro
 195     200     205
Val Ser Leu Leu Ala Asp Pro Ala Phe Ile Arg Ala Trp Val Gly Gly
 210     215     220
Val Gly Asn Tyr Lys Leu Gly Gly Asn Tyr Gly Pro Thr Val Leu Val
 225     230     235     240
Gln Gln Glu Ala Leu Lys Arg Gly Cys Glu Gln Val Leu Trp Leu Tyr
 245     250     255
Gly Pro Asp His Gln Leu Thr Glu Val Gly Thr Met Asn Ile Phe Val
 260     265     270
Tyr Trp Thr His Glu Asp Gly Val Leu Glu Leu Val Thr Pro Pro Leu
 275     280     285
Asn Gly Val Ile Leu Pro Gly Val Val Arg Gln Ser Leu Leu Asp Met
 290     295     300
Ala Gln Thr Trp Gly Glu Phe Arg Val Val Glu Arg Thr Ile Thr Met
 305     310     315     320
Lys Gln Leu Leu Arg Ala Leu Glu Glu Gly Arg Val Arg Glu Val Phe
 325     330     335
Gly Ser Gly Thr Ala Cys Gln Asn Leu His Ile Pro Thr Met Glu Asn
 340     345     350
Gly Pro Glu Leu Ile Leu Arg Phe Gln Lys Glu Leu Lys Glu Ile Gln
 355     360     365
Tyr Gly Ile Arg Ala His Glu Trp Met Phe Pro Val
 370     375     380

```

```

<210> 7
<211> 612
<212> PRT
<213> 人类(Homo Sapiens)

```

```

<400> 7
Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val
 1      5      10      15
Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly
 20      25      30
Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His
 35      40      45
Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys
 50      55      60
Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys
 65      70      75      80

```

Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg  
 85 90 95  
 Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly  
 100 105 110  
 Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu  
 115 120 125  
 Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg  
 130 135 140  
 Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg  
 165 170 175  
 Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly  
 180 185 190  
 Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr  
 195 200 205  
 Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu  
 210 215 220  
 Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln  
 245 250 255  
 Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val  
 260 265 270  
 Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val  
 275 280 285  
 Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr  
 290 295 300  
 Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp  
 305 310 315 320  
 Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn  
 325 330 335  
 Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr  
 340 345 350  
 Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr  
 355 360 365  
 Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Thr Val  
 370 375 380  
 Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr  
 405 410 415  
 Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly  
 420 425 430  
 Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met  
 450 455 460  
 Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly  
 465 470 475 480  
 Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser  
 485 490 495  
 Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg  
 500 505 510  
 Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala  
 515 520 525  
 Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly  
 530 535 540  
 Asp Ser Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala  
 545 550 555 560  
 Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr  
 565 570 575  
 Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala  
 580 585 590  
 Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala  
 595 600 605  
 Val Ile Arg Phe

610

<210> 8  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 8  
 Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro  
 1 5 10 15

<210> 9  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 9  
 Met Ala Thr Thr Gly Ala Leu Gly Asn Tyr Tyr Val Asp Ser Phe Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Ala Asp Ala Ala Asp Glu Leu Ser Val Gly Arg Tyr Ala Pro  
 20 25 30  
 Gly Thr Leu Gly Gln Pro Pro Arg Gln Ala Ala Thr Leu Ala Glu His  
 35 40 45  
 Pro Asp Phe Ser Pro Cys Ser Phe Gln Ser Lys Ala Thr Val Phe Val  
 50 55 60  
 Ala Ser Trp Asn Pro Val His Ala Ala Gly Ala Asn Ala Val Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Val Tyr His His His His His His Pro Tyr Val His Pro Gln Ala Pro  
 85 90 95  
 Val Ala Ala Ala Ala Pro Asp Gly Arg Tyr Met Arg Ser Trp Leu Glu  
 100 105 110  
 Pro Thr Pro Gly Ala Leu Ser Phe Ala Gly Leu Pro Ser Ser Arg Pro  
 115 120 125  
 Tyr Gly Ile Lys Pro Glu Pro Leu Ser Ala Arg Arg Gly Asp Cys Pro  
 130 135 140  
 Thr Leu Asp Thr His Thr Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Ala Cys Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Pro Pro Val Asp Arg Glu Lys Gln Pro Ser Glu Gly Ala Phe Ser Glu  
 165 170 175  
 Asn Asn Ala Glu Asn Glu Ser Gly Gly Asp Lys Pro Pro Ile Asp Pro  
 180 185 190  
 Asn Asn Pro Ala Ala Asn Trp Leu His Ala Arg Ser Thr Arg Lys Lys  
 195 200 205  
 Arg Cys Pro Tyr Thr Lys His Gln Thr Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe  
 210 215 220  
 Leu Phe Asn Met Tyr Leu Thr Arg Asp Arg Arg Tyr Glu Val Ala Arg  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Asn Leu Thr Glu Arg Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg  
 245 250 255  
 Arg Met Lys Met Lys Lys Ile Asn Lys Asp Arg Ala Lys Asp Glu  
 260 265 270

<210> 10  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 10  
 Asp Lys Pro Pro Ile Asp Pro Asn Asn Pro Ala Ala Asn Trp  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 587

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠(Mus musculus)

&lt;400&gt; 11

```

Met Ser Trp Ala Arg Ser Arg Leu Cys Ser Thr Leu Ser Leu Ala Ala
 1          5          10          15
Val Ser Ala Arg Gly Ala Thr Thr Glu Gly Pro Ala Arg Arg Gly Met
 20          25          30
Ser Ala Gly Pro Ala Pro Gln Glu Pro Gly Met Glu Tyr Gln Asp Ala
 35          40          45
Val Arg Thr Leu Asn Thr Leu Gln Thr Asn Ala Ser Tyr Leu Glu Gln
 50          55          60
Val Lys Arg Gln Arg Ser Asp Pro Gln Ala Gln Leu Glu Ala Met Glu
 65          70          75          80
Met Tyr Leu Ala Arg Ser Gly Leu Gln Val Glu Asp Leu Asn Arg Leu
 85          90          95
Asn Ile Ile His Val Thr Gly Thr Lys Gly Lys Gly Ser Thr Cys Ala
100          105          110
Phe Thr Glu Arg Ile Leu Arg Asn Tyr Gly Leu Lys Thr Gly Phe Phe
115          120          125
Arg Ser Pro His Met Val Gln Val Arg Asp Arg Ile Arg Ile Asn Gly
130          135          140
Lys Pro Ile Ser Pro Glu Leu Phe Thr Lys His Phe Trp Cys Leu Tyr
145          150          155          160
Asn Gln Leu Glu Glu Phe Lys Asp Asp Ser His Val Ser Met Pro Ser
165          170          175
Tyr Phe Arg Phe Leu Thr Leu Met Ala Phe His Val Phe Leu Gln Glu
180          185          190
Lys Val Asp Leu Ala Val Val Glu Val Gly Ile Gly Gly Ala Phe Asp
195          200          205
Cys Thr Asn Ile Ile Arg Lys Pro Val Val Cys Gly Val Ser Ser Leu
210          215          220
Gly Ile Asp His Thr Ser Leu Leu Gly Asp Thr Val Glu Lys Ile Ala
225          230          235          240
Trp Gln Lys Gly Gly Ile Phe Lys Pro Gly Val Pro Ala Phe Thr Val
245          250          255
Val Gln Pro Glu Gly Pro Leu Ala Val Leu Arg Asp Arg Ala Gln Gln
260          265          270
Ile Gly Cys Pro Leu Tyr Leu Cys Pro Pro Leu Glu Ala Leu Glu Glu
275          280          285
Val Gly Leu Pro Leu Ser Leu Gly Leu Glu Gly Ala His Gln Arg Ser
290          295          300
Asn Ala Ala Leu Ala Leu Gln Leu Ala His Cys Trp Leu Glu Arg Gln
305          310          315          320
Asp His Gln Asp Ile Gln Glu Leu Lys Val Ser Arg Pro Ser Ile Arg
325          330          335
Trp Gln Leu Pro Leu Ala Pro Val Phe Arg Pro Thr Pro His Met Arg
340          345          350
Arg Gly Leu Arg Asp Thr Val Trp Pro Gly Arg Thr Gln Ile Leu Gln
355          360          365
Arg Gly Pro Leu Thr Trp Tyr Leu Asp Gly Ala His Thr Thr Ser Ser
370          375          380
Val Gln Ala Cys Val His Trp Tyr Arg Gln Ser Leu Glu Arg Ser Lys
385          390          395          400
Arg Thr Asp Gly Gly Ser Glu Val His Ile Leu Leu Phe Asn Ser Thr
405          410          415
Gly Asp Arg Asp Ser Ala Ala Leu Leu Lys Leu Leu Gln Pro Cys Gln
420          425          430
Phe Asp Tyr Ala Val Phe Cys Pro Asn Val Thr Glu Val Ser Ser Ile
435          440          445
Gly Asn Ala Asp Gln Gln Asn Phe Thr Val Thr Leu Asp Gln Val Leu
450          455          460
Leu Arg Cys Leu Gln His Gln Gln His Trp Asn Gly Leu Ala Glu Lys
465          470          475          480
Gln Ala Ser Ser Asn Leu Trp Ser Ser Cys Gly Pro Asp Pro Ala Gly
485          490          495
Pro Gly Ser Leu Leu Leu Ala Pro His Pro Pro Gln Pro Thr Arg Thr

```

```

                    500                    505                    510
Ser Ser Leu Val Phe Ser Cys Ile Ser His Ala Leu Leu Trp Ile Ser
   515
Gln Gly Arg Asp Pro Ile Phe Gln Pro Gln Ser Leu Pro Arg Asn Leu
   530
Leu Asn His Pro Thr Ala Asn Ser Gly Ala Ser Ile Leu Arg Glu Ala
   545
Ala Ala Ile His Val Leu Val Thr Gly Ser Leu His Leu Val Gly Gly
   565
Val Leu Lys Leu Leu Asp Pro Ser Met Ser Gln
   580
    
```

<210> 12  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

```

<400> 12
Ala Val Ser Ala Arg Gly Ala Thr Thr Glu Gly Pro Ala Arg Arg Gly
   1
Met Ser
   5
   10
   15
    
```

<210> 13  
 <211> 237  
 <212> DNA  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(237)

```

<400> 13
gac aga atc cct gct acc aat agg aat gat gtc aca ggt gga aga aga 48
Asp Arg Ile Pro Ala Thr Asn Arg Asn Asp Val Thr Gly Gly Arg Arg
   1
gac cca aat cat tct gaa ggc tca act act tta ctg gaa ggt tat acc 96
Asp Pro Asn His Ser Glu Gly Ser Thr Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Thr
   20
tct cat tac cca cac acg aag gaa agc agg acc ttc atc cca gtg acc 144
Ser His Tyr Pro His Thr Lys Glu Ser Arg Thr Phe Ile Pro Val Thr
   35
tca gct aag act ggg tcc ttt gga gtt act gca gtt act gtt gga gat 192
Ser Ala Lys Thr Gly Ser Phe Gly Val Thr Ala Val Thr Val Gly Asp
   50
tcc aac tct aat gtc aat cgt tcc tta tca gga gac caa gac aca 237
Ser Asn Ser Asn Val Asn Arg Ser Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr
   65
    
```

<210> 14  
 <211> 79  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

```

<400> 14
Asp Arg Ile Pro Ala Thr Asn Arg Asn Asp Val Thr Gly Gly Arg Arg
   1
Asp Pro Asn His Ser Glu Gly Ser Thr Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Thr
   20
   25
   30
    
```

Ser His Tyr Pro His Thr Lys Glu Ser Arg Thr Phe Ile Pro Val Thr  
 35 40 45  
 Ser Ala Lys Thr Gly Ser Phe Gly Val Thr Ala Val Thr Val Gly Asp  
 50 55 60  
 Ser Asn Ser Asn Val Asn Arg Ser Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr  
 65 70 75

<210> 15  
 <211> 327  
 <212> DNA  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(327)

<400> 15  
 gac aga atc cct gct acc aag cag agt aat tct cag agc ttc tct aca 48  
 Asp Arg Ile Pro Ala Thr Lys Gln Ser Asn Ser Gln Ser Phe Ser Thr  
 1 5 10 15  
 tca cat gaa ggc ttg gaa gaa gat aaa gac cat cca aca act tct act 96  
 Ser His Glu Gly Leu Glu Glu Asp Lys Asp His Pro Thr Thr Ser Thr  
 20 25 30  
 ctg aca tca agc aat agg aat gat gtc aca ggt gga aga aga gac cca 144  
 Leu Thr Ser Ser Asn Arg Asn Asp Val Thr Gly Gly Arg Arg Asp Pro  
 35 40 45  
 aat cat tct gaa ggc tca act act tta ctg gaa ggt tat acc tct cat 192  
 Asn His Ser Glu Gly Ser Thr Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Thr Ser His  
 50 55 60  
 tac cca cac acg aag gaa agc agg acc ttc atc cca gtg acc tca gct 240  
 Tyr Pro His Thr Lys Glu Ser Arg Thr Phe Ile Pro Val Thr Ser Ala  
 65 70 75 80  
 aag act ggg tcc ttt gga gtt act gca gtt act gtt gga gat tcc aac 288  
 Lys Thr Gly Ser Phe Gly Val Thr Ala Val Thr Val Gly Asp Ser Asn  
 85 90 95  
 tct aat gtc aat cgt tcc tta tca gga gac caa gac aca 327  
 Ser Asn Val Asn Arg Ser Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr  
 100 105

<210> 16  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 16  
 Asp Arg Ile Pro Ala Thr Lys Gln Ser Asn Ser Gln Ser Phe Ser Thr  
 1 5 10 15  
 Ser His Glu Gly Leu Glu Glu Asp Lys Asp His Pro Thr Thr Ser Thr  
 20 25 30  
 Leu Thr Ser Ser Asn Arg Asn Asp Val Thr Gly Gly Arg Arg Asp Pro  
 35 40 45  
 Asn His Ser Glu Gly Ser Thr Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Thr Ser His  
 50 55 60  
 Tyr Pro His Thr Lys Glu Ser Arg Thr Phe Ile Pro Val Thr Ser Ala  
 65 70 75 80  
 Lys Thr Gly Ser Phe Gly Val Thr Ala Val Thr Val Gly Asp Ser Asn  
 85 90 95  
 Ser Asn Val Asn Arg Ser Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr  
 100 105

<210> 17  
 <211> 429  
 <212> DNA  
 <213> 人类(Homo Sapiens)  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(429)  
 <400> 17  
 gac aga atc cct gct acc aat atg gac tcc agt cat agt aca acg ctt 48  
 Asp Arg Ile Pro Ala Thr Asn Met Asp Ser Ser His Ser Thr Thr Leu  
 1 5 10 15  
 cag cct act gca aat cca aac aca ggt ttg gtg gaa gat ttg gac agg 96  
 Gln Pro Thr Ala Asn Pro Asn Thr Gly Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg  
 20 25 30  
 aca gga cct ctt tca atg aca acg cag cag agt aat tct cag agc ttc 144  
 Thr Gly Pro Leu Ser Met Thr Thr Gln Gln Ser Asn Ser Gln Ser Phe  
 35 40 45  
 tct aca tca cat gaa ggc ttg gaa gaa gat aaa gac cat cca aca act 192  
 Ser Thr Ser His Glu Gly Leu Glu Glu Asp Lys Asp His Pro Thr Thr  
 50 55 60  
 tct act ctg aca tca agc aat agg aat gat gtc aca ggt gga aga aga 240  
 Ser Thr Leu Thr Ser Ser Asn Arg Asn Asp Val Thr Gly Gly Arg Arg  
 65 70 75 80  
 gac cca aat cat tct gaa ggc tca act act tta ctg gaa ggt tat acc 288  
 Asp Pro Asn His Ser Glu Gly Ser Thr Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Thr  
 85 90 95  
 tct cat tac cca cac acg aag gaa agc agg acc ttc atc cca gtg acc 336  
 Ser His Tyr Pro His Thr Lys Glu Ser Arg Thr Phe Ile Pro Val Thr  
 100 105 110  
 tca gct aag act ggg tcc ttt gga gtt act gca gtt act gtt gga gat 384  
 Ser Ala Lys Thr Gly Ser Phe Gly Val Thr Ala Val Thr Val Gly Asp  
 115 120 125  
 tcc aac tct aat gtc aat cgt tcc tta tca gga gac caa gac aca 429  
 Ser Asn Ser Asn Val Asn Arg Ser Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr  
 130 135 140

<210> 18  
 <211> 143  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 18  
 Asp Arg Ile Pro Ala Thr Asn Met Asp Ser Ser His Ser Thr Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Thr Ala Asn Pro Asn Thr Gly Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg  
 20 25 30  
 Thr Gly Pro Leu Ser Met Thr Thr Gln Gln Ser Asn Ser Gln Ser Phe  
 35 40 45  
 Ser Thr Ser His Glu Gly Leu Glu Glu Asp Lys Asp His Pro Thr Thr  
 50 55 60  
 Ser Thr Leu Thr Ser Ser Asn Arg Asn Asp Val Thr Gly Gly Arg Arg  
 65 70 75 80  
 Asp Pro Asn His Ser Glu Gly Ser Thr Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Thr

```

      85          90          95
Ser His Tyr Pro His Thr Lys Glu Ser Arg Thr Phe Ile Pro Val Thr
      100      105      110
Ser Ala Lys Thr Gly Ser Phe Gly Val Thr Ala Val Thr Val Gly Asp
      115
Ser Asn Ser Asn Val Asn Arg Ser Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr
      130      135      140

```

```

<210> 19
<211> 555
<212> DNA
<213> 人类(Homo Sapiens)

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(555)

```

```

<400> 19
gac aga atc cct gct acc agt acg tct tca aat acc atc tca gca ggc 48
Asp Arg Ile Pro Ala Thr Ser Thr Ser Ser Asn Thr Ile Ser Ala Gly
  1          5          10

tgg gag cca aat gaa gaa agt gaa gat gaa aga gac aga cac ctc agt 96
Trp Glu Pro Asn Glu Glu Ser Glu Asp Glu Arg Asp Arg His Leu Ser
          20          25          30

ttt tct gga tca ggc att gat gat gat gaa gat ttt atc tcc agc acc 144
Phe Ser Gly Ser Gly Ile Asp Asp Asp Glu Asp Phe Ile Ser Ser Thr
          35          40          45

aat atg gac tcc agt cat agt aca acg ctt cag cct act gca aat cca 192
Asn Met Asp Ser Ser His Ser Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ala Asn Pro
          50          55          60

aac aca ggt ttg gtg gaa gat ttg gac agg aca gga cct ctt tca atg 240
Asn Thr Gly Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Thr Gly Pro Leu Ser Met
          65          70          75

aca acg cag cag agt aat tct cag agc ttc tct aca tca cat gaa ggc 288
Thr Thr Gln Gln Ser Asn Ser Gln Ser Phe Ser Thr Ser His Glu Gly
          85          90          95

ttg gaa gaa gat aaa gac cat cca aca act tct act ctg aca tca agc 336
Leu Glu Glu Asp Lys Asp His Pro Thr Thr Ser Thr Leu Thr Ser Ser
          100          105          110

aat agg aat gat gtc aca ggt gga aga aga gac cca aat cat tct gaa 384
Asn Arg Asn Asp Val Thr Gly Gly Arg Arg Asp Pro Asn His Ser Glu
          115

ggc tca act act tta ctg gaa ggt tat acc tct cat tac cca cac acg 432
Gly Ser Thr Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Thr Ser His Tyr Pro His Thr
          130          135          140

aag gaa agc agg acc ttc atc cca gtg acc tca gct aag act ggg tcc 480
Lys Glu Ser Arg Thr Phe Ile Pro Val Thr Ser Ala Lys Thr Gly Ser
          145          150          155

ttt gga gtt act gca gtt act gtt gga gat tcc aac tct aat gtc aat 528
Phe Gly Val Thr Ala Val Thr Val Gly Asp Ser Asn Ser Asn Val Asn
          165          170          175

cgt tcc tta tca gga gac caa gac aca 555
Arg Ser Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr
          180          185

```

<210> 20  
 <211> 185  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 20  
 Asp Arg Ile Pro Ala Thr Ser Thr Ser Ser Asn Thr Ile Ser Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Pro Asn Glu Glu Ser Glu Asp Glu Arg Asp Arg His Leu Ser  
 20 25 30  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ile Asp Asp Glu Asp Phe Ile Ser Ser Thr  
 35 40 45  
 Asn Met Asp Ser Ser His Ser Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ala Asn Pro  
 50 55 60  
 Asn Thr Gly Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Thr Gly Pro Leu Ser Met  
 65 70 75 80  
 Thr Thr Gln Gln Ser Asn Ser Gln Ser Phe Ser Thr Ser His Glu Gly  
 85 90 95  
 Leu Glu Glu Asp Lys Asp His Pro Thr Thr Ser Thr Leu Thr Ser Ser  
 100 105 110  
 Asn Arg Asn Asp Val Thr Gly Gly Arg Arg Asp Pro Asn His Ser Glu  
 115 120 125  
 Gly Ser Thr Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Thr Ser His Tyr Pro His Thr  
 130 135 140  
 Lys Glu Ser Arg Thr Phe Ile Pro Val Thr Ser Ala Lys Thr Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Phe Gly Val Thr Ala Val Thr Val Gly Asp Ser Asn Ser Asn Val Asn  
 165 170 175  
 Arg Ser Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr  
 180 185

<210> 21  
 <211> 561  
 <212> DNA  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(561)

<400> 21  
 gac aga atc cct gct acc aca gcc tca gct cat acc agc cat cca atg 48  
 Asp Arg Ile Pro Ala Thr Thr Ala Ser Ala His Thr Ser His Pro Met  
 1 5 10 15  
 caa gga agg aca aca cca agc cca gag gac agt tcc tgg act gat ttc 96  
 Gln Gly Arg Thr Thr Pro Ser Pro Glu Asp Ser Ser Trp Thr Asp Phe  
 20 25 30  
 ttc aac cca atc tca cac ccc atg gga cga ggt cat caa gca gga aga 144  
 Phe Asn Pro Ile Ser His Pro Met Gly Arg Gly His Gln Ala Gly Arg  
 35 40 45  
 agg atg gat atg gac tcc agt cat agt aca acg ctt cag cct act gca 192  
 Arg Met Asp Met Asp Ser Ser His Ser Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ala  
 50 55 60  
 aat cca aac aca ggt ttg gtg gaa gat ttg gac agg aca gga cct ctt 240  
 Asn Pro Asn Thr Gly Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Thr Gly Pro Leu  
 65 70 75 80  
 tca atg aca acg cag cag agt aat tct cag agc ttc tct aca tca cat 288  
 Ser Met Thr Thr Gln Gln Ser Asn Ser Gln Ser Phe Ser Thr Ser His  
 85 90 95

gaa ggc ttg gaa gaa gat aaa gac cat cca aca act tct act ctg aca 336  
 Glu Gly Leu Glu Glu Asp Lys Asp His Pro Thr Thr Ser Thr Leu Thr  
 100 105 110  
 tca agc aat agg aat gat gtc aca ggt gga aga aga gac cca aat cat 384  
 Ser Ser Asn Arg Asn Asp Val Thr Gly Gly Arg Arg Asp Pro Asn His  
 115 120 125  
 tct gaa ggc tca act act tta ctg gaa ggt tat acc tct cat tac cca 432  
 Ser Glu Gly Ser Thr Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Thr Ser His Tyr Pro  
 130 135 140  
 cac acg aag gaa agc agg acc ttc atc cca gtg acc tca gct aag act 480  
 His Thr Lys Glu Ser Arg Thr Phe Ile Pro Val Thr Ser Ala Lys Thr  
 145 150 155 160  
 ggg tcc ttt gga gtt act gca gtt act gtt gga gat tcc aac tct aat 528  
 Gly Ser Phe Gly Val Thr Ala Val Thr Val Gly Asp Ser Asn Ser Asn  
 165 170 175  
 gtc aat cgt tcc tta tca gga gac caa gac aca 561  
 Val Asn Arg Ser Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr  
 180 185

<210> 22  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 22  
 Asp Arg Ile Pro Ala Thr Thr Ala Ser Ala His Thr Ser His Pro Met  
 1 5 10 15  
 Gln Gly Arg Thr Thr Pro Ser Pro Glu Asp Ser Ser Trp Thr Asp Phe  
 20 25 30  
 Phe Asn Pro Ile Ser His Pro Met Gly Arg Gly His Gln Ala Gly Arg  
 35 40 45  
 Arg Met Asp Met Asp Ser Ser His Ser Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ala  
 50 55 60  
 Asn Pro Asn Thr Gly Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Thr Gly Pro Leu  
 65 70 75 80  
 Ser Met Thr Thr Gln Gln Ser Asn Ser Gln Ser Phe Ser Thr Ser His  
 85 90 95  
 Glu Gly Leu Glu Glu Asp Lys Asp His Pro Thr Thr Ser Thr Leu Thr  
 100 105 110  
 Ser Ser Asn Arg Asn Asp Val Thr Gly Gly Arg Arg Asp Pro Asn His  
 115 120 125  
 Ser Glu Gly Ser Thr Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Thr Ser His Tyr Pro  
 130 135 140  
 His Thr Lys Glu Ser Arg Thr Phe Ile Pro Val Thr Ser Ala Lys Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Phe Gly Val Thr Ala Val Thr Val Gly Asp Ser Asn Ser Asn  
 165 170 175  
 Val Asn Arg Ser Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr  
 180 185

<210> 23  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> 大鼠(Rattus Norvegicus)

<400> 23  
 Gln Leu Arg Asn Phe Leu Lys Cys Ser Glu Asp Asn Pro Leu Phe Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Ile Asp Cys Glu Val Phe Glu Ser Arg Phe Pro Thr Thr Met Ala  
 20 25 30

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

<210> 24  
 <211> 161  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 24  
 Glu Ser Arg Phe Pro Thr Thr Met Ala Leu Ser Val Leu Val Thr Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Met Cys Asn Ala Leu Asn Ser Val Ser Glu Asn Gln Ser Leu Leu  
 20 25 30  
 Arg Met Pro Pro Trp Met Asn Pro Trp Leu Leu Val Ala Val Ala Met  
 35 40 45  
 Ser Met Ala Leu His Phe Leu Ile Leu Leu Val Pro Leu Pro Leu  
 50 55 60  
 Ile Phe Gln Val Thr Pro Leu Ser Gly Arg Gln Trp Val Val Val Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Ile Ser Leu Pro Val Ile Leu Leu Asp Glu Ala Leu Lys Tyr Leu  
 85 90 95  
 Ser Arg Asn His Met His Ala Cys Leu Tyr Pro Gly Leu Leu Arg Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Gln Ala Trp Ser Arg Gln Pro Leu Thr Thr Ser Trp Thr Pro  
 115 120 125  
 Asp His Thr Gly Leu Ala Ser Leu Gly Gln Gly His Ser Ile Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Ser Glu Leu Leu Arg Glu Gly Gly Ser Arg Glu Glu Met Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Lys

<210> 25  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 25  
 Glu Ser Arg Phe Pro Thr Thr Met Ala Leu Ser Val Leu Val Thr Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Met Cys Asn Ala Leu Asn Ser Val Ser Glu Asn Gln Ser Leu Leu  
 20 25 30  
 Arg Met Pro Pro Trp Met Asn Pro Trp Leu Leu Val Ala Val Ala Met  
 35 40 45  
 Ser Met Ala Leu His Phe Leu Ile Leu Leu Val Pro Pro Leu Pro Leu

```

      50              55              60
Ile Phe Gln Val Thr Pro Leu Ser Gly Arg Gln Trp Val Val Val Leu
65      70      75
Gln Ile Ser Leu Pro Val Ile Leu Leu Asp Glu Ala Leu Lys Tyr Leu
      85      90
Ser Arg Asn His Met His Ala Cys Leu Tyr Pro Gly Leu Leu Arg Thr
      100      105      110
Val Ser Gln Ala Trp Ser Arg Gln Pro Leu Thr Thr Ser Trp Thr Pro
      115      120      125
Asp His Thr Gly Ala Arg Asp Thr Ala Ser Ser Arg Cys Gln Ser Cys
      130      135      140
Ser Glu Arg Glu Glu Ala Gly Lys Lys
145              150
    
```

<210> 26  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

```

<400> 26
Leu Ile Leu Val Gly Glu Pro Ser Ile Ser Thr Pro Asp Gly Thr Ile
1              5              10              15
Lys
    
```

<210> 27  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

```

<400> 27
Met Glu Asp Asp Glu Leu Thr Asp Ser Lys Leu Pro Ser His Ala Thr
1              5              10              15
His Ser Leu Phe Thr Cys Pro Glu Asn Glu Glu Met Val Leu Ser Asn
      20      25      30
Ser Arg Ile Gly Lys Arg Arg Gly Glu Pro Leu Ile Leu Val Gly Glu
      35      40      45
Pro Ser Ile Ser Thr Pro Asp Gly Thr Ile Lys Asp Arg Arg Leu Phe
      50      55      60
Met His His Val Ser Leu Glu Pro Ile Thr Cys Val Pro Phe Arg Thr
65      70      75      80
Thr Lys Glu Arg Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asn Phe Thr Ala Pro Gly
      85      90      95
Gln Glu Phe Leu Ser
      100
    
```

<210> 28  
 <211> 149  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

```

<400> 28
Ala Glu Lys Gln Ala Lys Ala Arg Glu Ser Gly Ser Ser Thr Ala Glu
1              5              10              15
Glu Gly Asp Phe Ser Lys Gly Pro Ile Arg Cys Asp Arg Cys Gly Tyr
      20      25      30
Asn Thr Asn Arg Tyr Asp His Tyr Thr Ala His Leu Lys His His Thr
      35      40      45
Arg Ala Gly Asp Asn Glu Arg Val Tyr Lys Cys Ile Ile Cys Thr Tyr
      50      55      60
Thr Thr Val Ser Glu Tyr His Trp Arg Lys His Leu Arg Asn His Phe
65      70      75      80
Pro Arg Lys Val Tyr Thr Cys Gly Lys Cys Asn Tyr Phe Ser Asp Arg
      85      90      95
    
```

Lys Asn Asn Tyr Val Gln His Val Arg Thr His Thr Gly Glu Arg Pro  
 100 105 110  
 Tyr Lys Cys Glu Leu Cys Pro Tyr Ser Ser Ser Gln Lys Thr His Leu  
 115 120 125  
 Thr Arg His Met Arg Thr His Ser Val Gly Tyr Gly Tyr His Leu Val  
 130 135 140  
 Ile Phe Thr Arg Val  
 145

<210> 29  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 29  
 Val Gly Tyr Gly Tyr His Leu Val Ile Phe Thr Arg Val  
 1 5 10

<210> 30  
 <211> 875  
 <212> DNA  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 30  
 cgcttgccgg agctgtacgt gaagccgggc aacaaggaac gcggctggaa cgaccgccg 60  
 cagttctcat acgggctgca gaccagggc ggcggaccca ggcgctcgct gcttaccag 120  
 agggtagccg caccagga tggatcccc agagtcccc catcagagac ttctcctgg 180  
 cctccccaa tggggcctcc acctccttca agtaaggctc ccaggctccc acctgtggg 240  
 agtggtcctg cctctggcgt ggagcccaca agtttcccag tccagctctga ggctgtgat 300  
 gaggatgtgc tgagacctt ggaacaggca ttggaagact gccgtggcca cacaaggaag 360  
 caggtatgtg atgacatcag ccgacgcctg gcactgctgc aggaacagtg ggctggagga 420  
 aagtgtgcaa tacctgtaa gaagagaatg gctctactgg tgcaagagct ttcaagccac 480  
 cgggtgggacg cagcagatga catccaccgc tccctcatgg ttgacctgt gactgaggtc 540  
 agtcagtggg tggtaggagt taaaagatta attgcagaaa agaggagtct gttttcagag 600  
 gaggcagcca atgaagagaa atctgcagcc acagctgaga agaaccatac cataccaggc 660  
 ttccagcagg ctccataatc ctcggttccc cagactcacc ggacaccatc tcctatgctc 720  
 tggagacctt ctgtcacttg gctcccttct taccaccacc aagactgtcc cactgggctc 780  
 gaccaccta tgagggaga agtcccacct gggccagagg gagttcatgt gttactcata 840  
 acatgcattt caataaaaac atctctgcgg tgggtg 875

<210> 31  
 <211> 672  
 <212> DNA  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 31  
 cgcttgccgg agctgtacgt gaagccgggc aacaaggaac gcggctggaa cgaccgccg 60  
 cagttctcat acgggctgca gaccagggc ggcggaccca ggcgctcgct gcttaccag 120  
 agggtagccg caccagga tggatcccc agagaagcag gtatgtgatg acatcagccg 180  
 acgcctggca ctgctgcagg aacagtgggc tggaggaaag ttgtcaatac ctgtaaagaa 240  
 gagaatggct ctactggtgc aagagctttc aagccaccgg tgggacgcag cagatgacat 300  
 ccaccgctcc ctcatggtg accatgtgac tgaggtcagt cagtggatgg taggagttaa 360  
 aagattaatt gcagaaaaga ggagtctgtt ttcagaggag gcagccaatg aagagaaatc 420  
 tgcagccaca gctgagaaga accataccat accaggcttc cagcaggctt cataatcctc 480  
 ggttccccag actcaccgga caccatctcc tatgccttgg agaccttctg tcacttggct 540  
 cccttcttac caccaccaag actgtcccac tgggcctgac ccacctatga gggaagaagt 600  
 cccacctggg ccagagggag ttcattgtgtt actcataaca tgcatttcaa taaaacatc 660  
 tctgcgggtgg tg 672

<210> 32  
 <211> 598  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 32

```

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
1 5 10 15
Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
20
Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
35 40 45
Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
50 55 60
Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
65 70 75 80
Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
85 90 95
Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
100 105 110
Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
115 120 125
Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
130 135 140
Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
145 150 155 160
Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
165 170 175
Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
180 185 190
Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
195 200 205
Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys
210 215 220
Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
225 230 235 240
Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
245 250 255
Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
260 265 270
Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
275 280 285
Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe
290 295 300
Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
305 310 315 320
Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
325 330 335
Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
340 345 350
Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
355 360 365
Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln
370 375 380
Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu
385 390 395 400
Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp
405 410 415
Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val
420 425 430
Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr
435 440 445
Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile
450 455 460
Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val
465 470 475 480
Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp
485 490 495
Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala
500 505 510
Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile
515 520 525
Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg

```

```

      530
Asp Asn Ile Leu Cys Lys 535 Ile Thr Tyr Val Ala 540 Asn Val Asn Pro Gly
545 550 Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu 560
Gly Trp Ala Pro Ala 565 Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala
Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala
575 580 585 590
Gly Lys Pro Ile Leu Phe
595

```

```

<210> 33
<211> 572
<212> PRT
<213> 人类(Homo Sapiens)

```

```

<400> 33
Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
1 5 10 15
Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
20 25 30
Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
35 40 45
Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
50 55 60
Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
65 70 75 80
Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
85 90 95
Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
100 105 110
Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
115 120 125
Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
130 135 140
Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
145 150 155 160
Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
165 170 175
Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
180 185 190
Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
195 200 205
Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys
210 215 220
Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
225 230 235 240
Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
245 250 255
Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
260 265 270
Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
275 280 285
Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe
290 295 300
Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
305 310 315 320
Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
325 330 335
Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
340 345 350
Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
355 360 365
Gln Lys Glu Glu Gly Glu Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu
370 375 380
Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly
385 390 395 400

```

Val Thr Gly His Glu Val Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg  
 405 410 415  
 Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu  
 420 425 430  
 Ala Asp Asn Ala Ile Ile Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro  
 435 440 445  
 Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro  
 450 455 460  
 Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser  
 465 470 475 480  
 Val Asp His Asp Ser Ala Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys  
 485 490 495  
 Ile Asn Val Ala Met Ile Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly  
 500 505 510  
 Asn Gln Glu Ile Ser Arg Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val  
 515 520 525  
 Ala Asn Val Asn Pro Gly Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala  
 530 535 540  
 Val Ala Lys Arg Glu Tyr Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr  
 545 550 555 560  
 Val Gln Glu Lys Thr Ala Gly Lys Pro Ile Leu Phe  
 565 570

<210> 34  
 <211> 89  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 34  
 Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser Leu Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val Gln Lys Pro  
 20 25 30  
 Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Met Ser Ser Ile Asp Leu Val Ser Ala Ser  
 35 40 45  
 Asp Asp Val His Arg Phe Ser Ser Gln Val Glu Glu Met Val Gln Asn  
 50 55 60  
 His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln  
 65 70 75 80  
 Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met Lys  
 85

<210> 35  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 35  
 Gly Leu Pro Leu Ala Glu Ser Leu Lys Arg Leu Met Ser Leu Ser Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Pro Pro Leu Leu Leu Trp Asp Ala His Val Ala Asp Arg Asp  
 20 25 30  
 His Leu Cys Gly Gly Ser Ala His Arg Leu Thr His His Leu Glu Glu  
 35 40 45  
 Asp Gly Leu Arg Pro Pro Ala Ala Leu Asp Cys Val Phe Pro Pro  
 50 55 60

<210> 36  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 36  
 His Leu Asp Ala Gly Thr Val Glu Pro Lys Arg Glu Lys

<210> 37  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)  
 <400> 37  
 Ile Glu Thr Arg Ser Lys Asn Phe Ser Ala Cys Leu Glu Leu Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Leu Gln Arg Gln His Gln Ala Ser Glu Glu Ile Arg Gly Lys  
 20 25 30  
 Leu Gln Gln Val Met Ser Arg Arg Lys Glu Met Asn Glu Lys Trp Glu  
 35 40 45  
 Ala Arg Trp Glu Arg Leu Arg Met Ser  
 50 55

<210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 38  
 Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly  
 1 5 10

<210> 39  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人类(Homo Sapiens)

<400> 39  
 Thr Val Leu Leu Arg Leu Gly Ile Thr Trp Gly Lys Val Val  
 1 5 10

<210> 40  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> 人类(Homo Sapiens) - Alt1

<400> 40  
 tctgtacctg atactc 16

<210> 41  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> 人类(Homo Sapiens) - Alt2

<400> 41  
 ctacagactg atactc 16

<210> 42  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 蛋白质转导区域(Protein Transduction Domain)

<400> 42  
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10

<210> 43  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 43  
 ccgaaacat gaactttctg c 21  
  
 <210> 44  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 44  
 cttggcgatt tagcagcaga t 21  
  
 <210> 45  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 45  
 accctggctt tactgctgta c 21  
  
 <210> 46  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 46  
 aaatggcgaa tccagtccca c 21  
  
 <210> 47  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 47  
 ttactgctgt acctccacca t 21  
  
 <210> 48  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 48  
 gaaggatctc ctcttccttc a 21

<210> 49  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 49  
 ctgcttggtg cactgctgca g 21  
  
 <210> 50  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 50  
 tctggaaagc agcttgctcac t 21  
  
 <210> 51  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 51  
 gcccctgtgt cccagtttga t 21  
  
 <210> 52  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 52  
 tacaggtgac tgggttgagc t 21  
  
 <210> 53  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 53  
 agccaccaga agaaagtggt g 21  
  
 <210> 54  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 54  
 tgtctgggtt gagctctaag c 21  
  
 <210> 55

<211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 55  
 aacatgcact tgcttgctt c 21  
  
 <210> 56  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 56  
 ctctcccgca gtaatccaca t 21  
  
 <210> 57  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 57  
 gaggtcaagg cttttgaagg c 21  
  
 <210> 58  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 58  
 cttgggcctc tgttaccatg t 21  
  
 <210> 59  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 59  
 gcttttgaag gcaaagacct g 21  
  
 <210> 60  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 60  
 ttaccatgtg gtcccacaga g 21  
  
 <210> 61  
 <211> 21

<212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 61  
 ggagaatgcc ttttgcaaca c 21  
  
 <210> 62  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 62  
 gccattgcat ggaaatgtgg c 21  
  
 <210> 63  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 63  
 caactgctta gtcacgta g 21  
  
 <210> 64  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 64  
 acttgacaaa gcagtggct g 21  
  
 <210> 65  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 65  
 atgtatggag aatggggaat g 21  
  
 <210> 66  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 66  
 gttgaatcaa gggttctcct g 21  
  
 <210> 67  
 <211> 21  
 <212> DNA

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 67	
tctcctctgg tatkagcgtc t	21
<210> 68	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 68	
gcactgaatt cctgagtgtc t	21
<210> 69	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 69	
tggtgattgt gccttgaagg a	21
<210> 70	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 70	
tccatgcccc ttatcatgga g	21
<210> 71	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 71	
tgaaggacct tggctctgga t	21
<210> 72	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 72	
aatagagggt aggtaccagc a	21
<210> 73	
<211> 12	
<212> PRT	
<213> 人工序列	

<220>  
<223> VEGF alt splice #1

<400> 73  
Arg Thr Lys Pro Glu Lys Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
1 5 10

<210> 74  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VEGF alt splice #1 核酸

<400> 74  
agaacaaagc cagaaaaatg tgacaagcca aggcgg 36

<210> 75  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VEGFB alt splice #1 多肽

<400> 75  
Val Val Lys Gln Leu Val Gln Thr Pro Pro Leu Pro Pro  
1 5 10

<210> 76  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VEGFB alt splice #1 核酸

<400> 76  
gtggtcaaac aactagtgca gacgccgccg cttcctcca 39

<210> 77  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VEGFD alt splice #1 多肽

<400> 77  
His Gly Pro Val Lys Met Ser Ser Phe Gln Glu Thr  
1 5 10

<210> 78  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VEGFD alt splice #1 核酸

<400> 78  
catggaccag tgaagatgtc ctcattccaa gaaact 36

<210> 79  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> VEGFD alt splice #2 多肽

<400> 79  
 Leu Glu Arg Ser Glu Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro  
 1 5 10

<210> 80  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> VEGFD alt splice #2 核酸

<400> 80  
 ttggaacgat ctgaaagctg tgaggacaga tgtcct 36

<210> 81  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> VEGF alt splice #1 多肽 + c

<400> 81  
 Arg Thr Lys Pro Glu Lys Cys Asp Lys Pro Arg Arg Cys  
 1 5 10

<210> 82  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 表皮生长因子受体 VIII 肽 (EGFRvIII peptide)

<400> 82  
 Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Cys  
 1 5 10

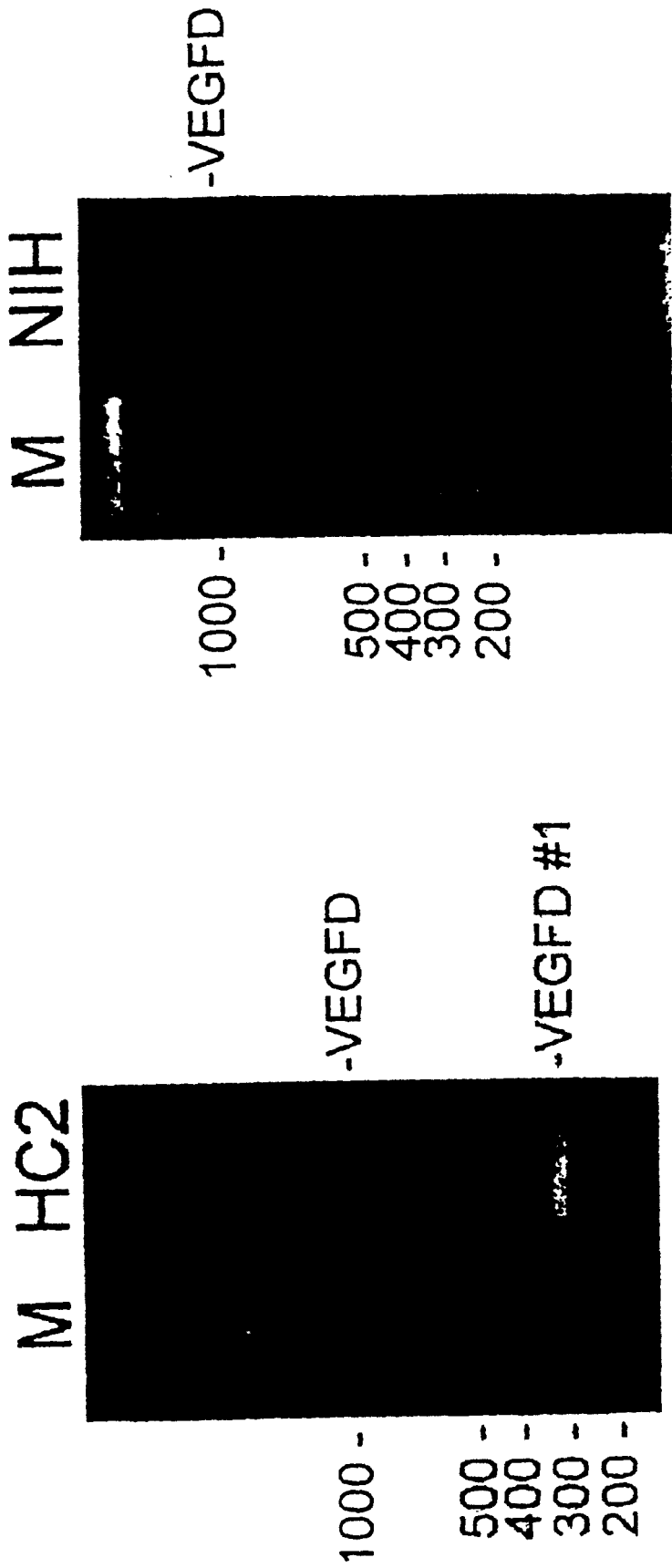


图 1B

图 1A

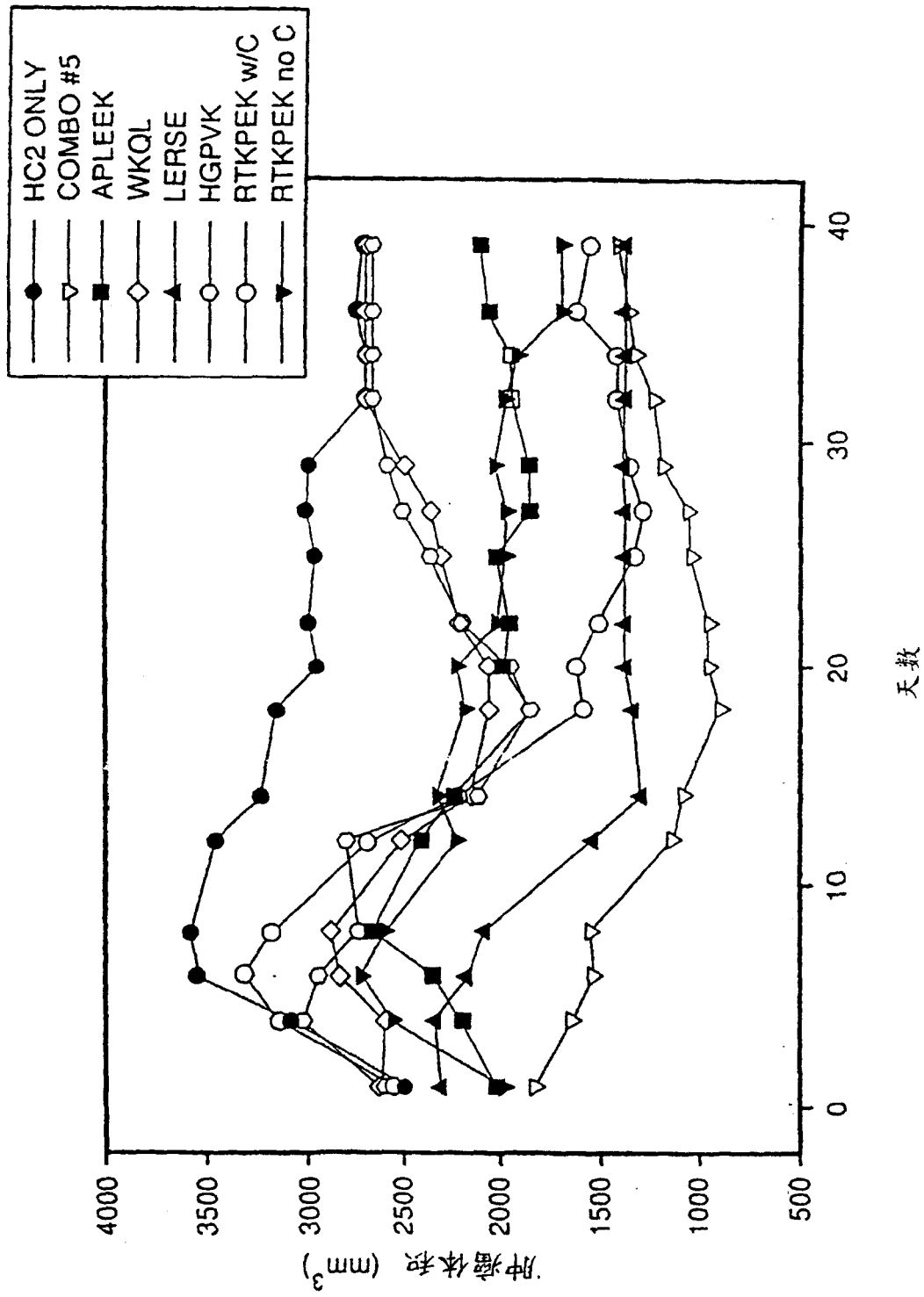


图 2

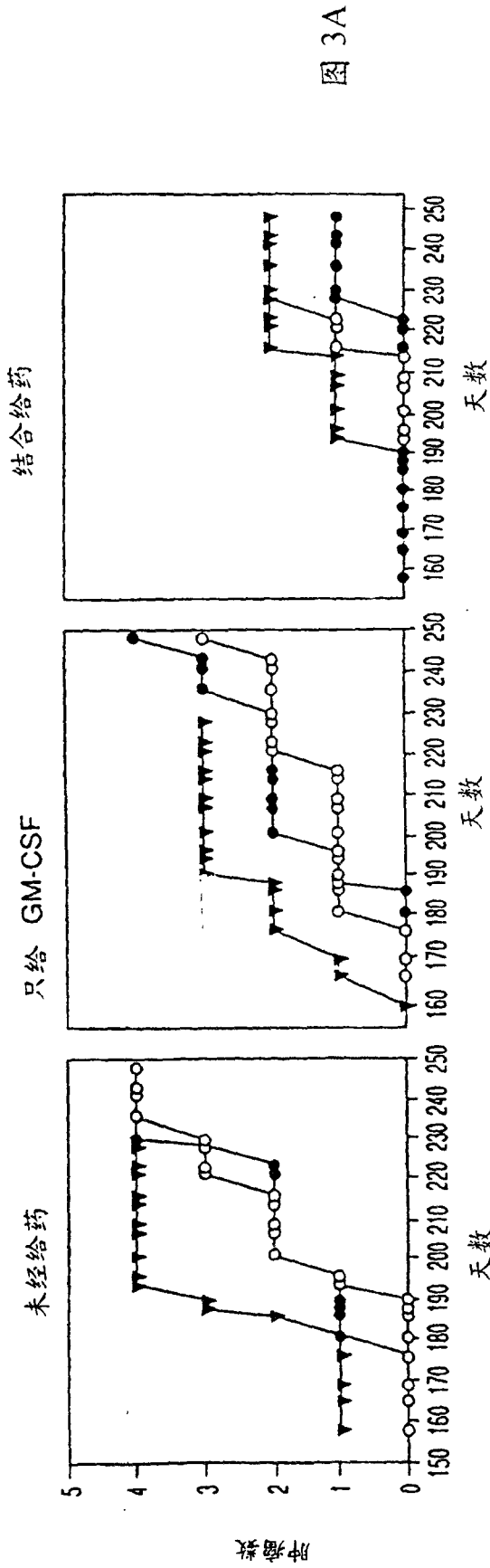


图 3A

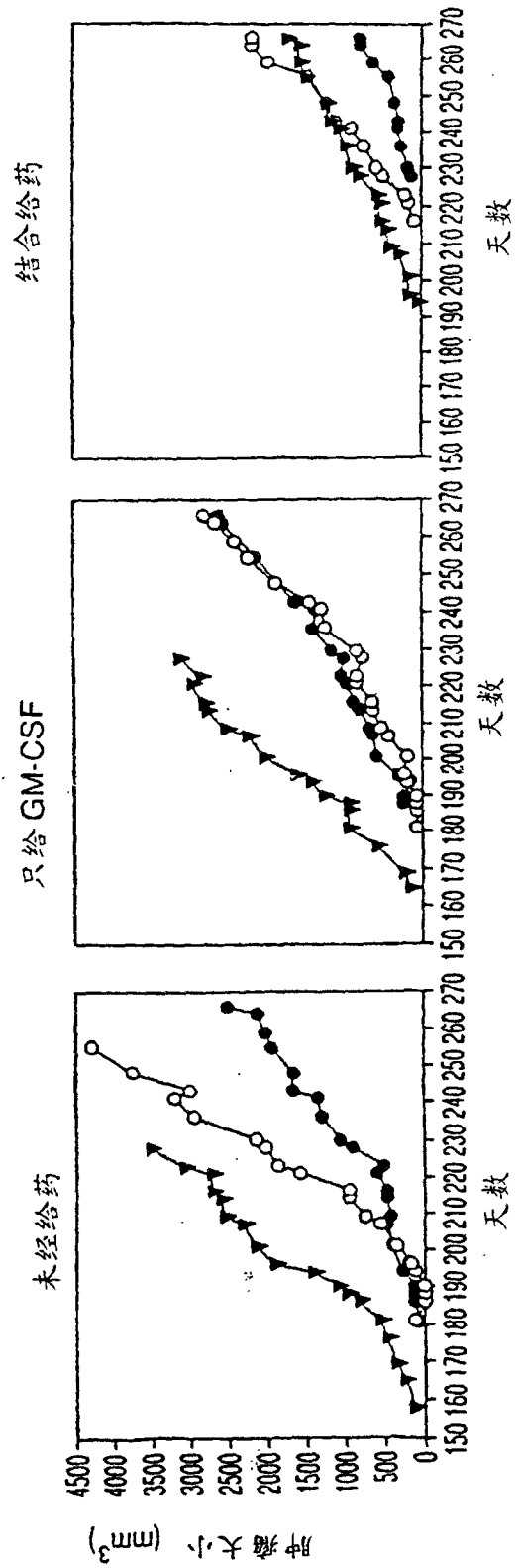


图 3B

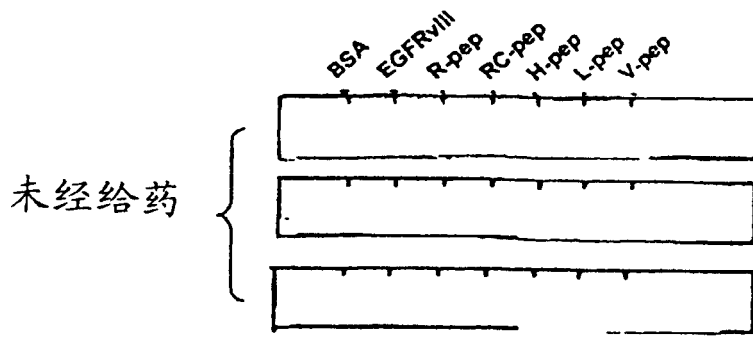


图 4A

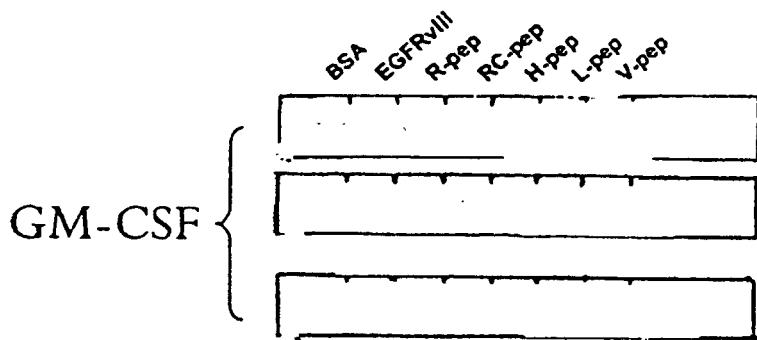


图 4B

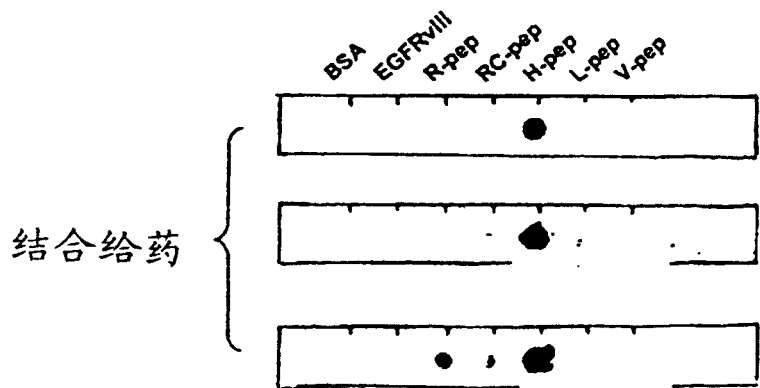


图 4C

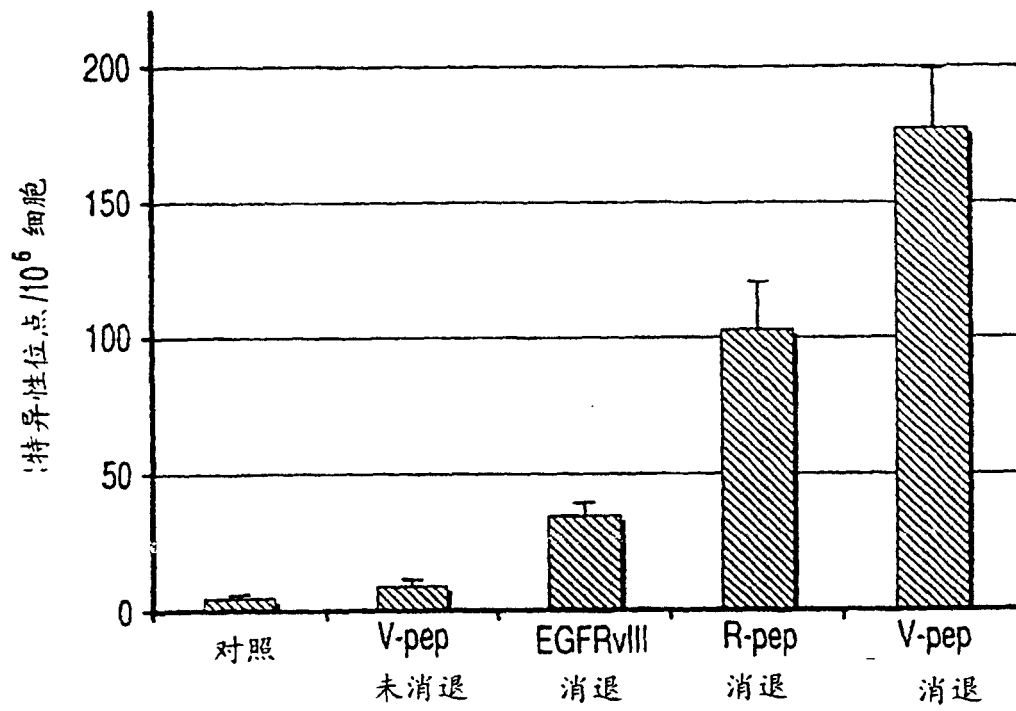


图 5

专利名称(译)	作为多种治疗模式基础的蛋白质的选择性剪接形式		
公开(公告)号	<a href="#">CN1511040A</a>	公开(公告)日	2004-07-07
申请号	CN02810609.1	申请日	2002-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	托马斯杰斐逊大学		
申请(专利权)人(译)	托马斯杰斐逊大学		
当前申请(专利权)人(译)	托马斯杰斐逊大学		
发明人	艾伯特·J·黄		
IPC分类号	G01N33/50 A61K9/127 A61K35/12 A61K35/74 A61K35/76 A61K36/06 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K39/395 A61K48/00 A61P3/00 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P15/00 A61P19/04 A61P19/08 A61P25/28 A61P25/32 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K5/00 C07K5/10 C07K7/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/47 C07K14/475 C07K14/52 C07K14/705 C07K14/82 C07K16/22 C07K19/00 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 A61K35/34 A61K38/24 C12P21/06		
CPC分类号	C07K14/52 A61K38/00 A61P3/00 A61P3/10 A61P5/14 A61P5/16 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P15/00 A61P19/04 A61P19/08 A61P25/28 A61P25/32 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00		
代理人(译)	张金海		
优先权	60/293791 2001-05-25 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

来源于与疾病或生理状态相关的蛋白质选择性剪接形式的多肽或抗体被作为治疗或预防药物。来源于血管内皮生长因子(VEGF)家族蛋白质的选择性剪接形式的多肽或抗体在预防或诱导肿瘤的消退中是特别有用的。

