



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102084250 A

(43) 申请公布日 2011. 06. 01

(21) 申请号 200880129343. 0

(22) 申请日 2008. 05. 29

(30) 优先权数据

12/079, 576 2008. 03. 27 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 11. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/065166 2008. 05. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02009/120225 EN 2009. 10. 01

(71) 申请人 中央研究院

地址 中国台湾地区台北市南港区研究院路  
2 段 129 号

(72) 发明人 谢世良 翁启惠 徐翠玲 陈斯婷

(74) 专利代理机构 北京连和连知识产权代理有限公司 11278

代理人 贺小明

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 49 页 附图 31 页

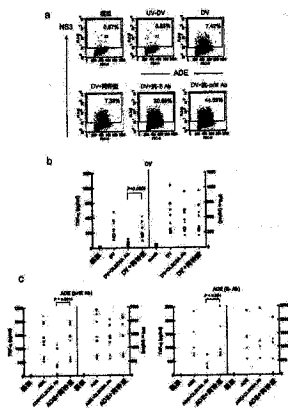
## (54) 发明名称

用于检测目标反应与治疗黄病毒感染症状之组合物及方法

## (57) 摘要

本发明辨识出在受到黄病毒(诸如, 登革热病毒(Dengue virus)或日本脑脊髓炎病毒(Japanese encephalomyelitis virus))感染时会诱发细胞渗漏及其它副作用之细胞受体。使用本发明所揭示之融合蛋白, 其判定出病原体(诸如, 黄病毒)会经由糖苷键结而结合之受体。一旦判定出该等受体, 即可判定结合特定受体之作用, 其中可藉由能阻断病原体与受体结合之试剂, 找出目标为造成特定症状之受体。因此, 就登革热病毒及日本脑脊髓炎病毒而言, TNF- $\alpha$  会在病原体结合 DLVR1/CLEC5A 受体时释出。以单株抗体阻断 DLVR1/CLEC5A 受体可减少 TNF- $\alpha$  之分泌, 且同时不会影响负责进行病毒清除之细胞激素的分泌, 因而使经感染小鼠之存活率由零增加至约 50%。

CN 102084250 A



1. 一种方法,其包含:  
取得融合蛋白质族群 (complement), 其中各融合蛋白质包含受体的结合区域 (domain) 以及提供受质 (substrate) 固定之区域;  
使融合蛋白质与病原体接触以确认该病原体是否可与该融合蛋白质族群中至少一融合蛋白质上之结合区域结合;  
检测该病原体是否与该融合蛋白质结合;  
其中该融合蛋白质族群代表至少一受体的许多不同结合区域。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,该融合蛋白质族群之结合区域包含细胞膜受体胞外部份之聚糖结合位点。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,该提供受质固定之区域为免疫球蛋白之 Fc 部分。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,该检测方法为酶键连免疫吸附检定分析。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,该病原体为黄病毒。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,该黄病毒为登革热病毒。
7. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,该黄病毒为日本脑脊髓炎病毒。
8. 一种方法,其包含:  
取得易受病原体感染之细胞;  
剔除至少一细胞受体基因;  
使该等细胞与该病原体接触;  
测量该等细胞之细胞激素分泌量。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于,还包含使该分泌测量值产生关连,以测定可影响细胞激素释出之受体。
10. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于,该细胞激素分泌测量值系 TNF- $\alpha$  之分泌。
11. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于,该病原体为黄病毒。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于,该黄病毒为登革热病毒。
13. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于,该黄病毒为日本脑脊髓炎病毒。
14. 一种方法,其包含:  
鉴定至少一可结合病原体所展示之配体 (ligand) 的细胞受体;  
对经该病原体感染之动物投予试剂以阻断该配体与该受体之结合而调控该病原体之作用。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于,该病原体为黄病毒。
16. 根据权利要求 15 所述的方法,其特征在于,该黄病毒为登革热病毒。
17. 根据权利要求 16 所述的方法,其特征在于,该受体为 DVLRI/CLEC5A 受体。
18. 根据权利要求 17 所述的方法,其特征在于,该作用为自细胞之 TNF- $\alpha$  释出。
19. 根据权利要求 15 所述的方法,其特征在于,该黄病毒为日本脑脊髓炎病毒。
20. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于,该试剂为对抗该受体之抗体,其可降低该受体对于该病原体之亲和力。
21. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于,该作用为自细胞之细胞激素释出。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其特征在于,该细胞激素为 TNF- $\alpha$ 。

23. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于,该受体为 DLVR1/CLEC5A 受体。

24. 一种方法,其包含:

提供有效量的试剂,以调节感染动物之病原体的作用,以调节该病原体对该动物上的作用;

其中该试剂系针对该感染动物原有细胞之至少一细胞受体,以防止该受体与该病原体所展示之配体结合。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其特征在于,该配体为聚糖。

26. 根据权利要求 24 所述的方法,其特征在于,该试剂为可结合该受体之抗体。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,其特征在于,该抗体为抗 DLVR1/CLEC5A 抗体且该受体为 DLVR1/CLEC5A 受体。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其特征在于,该病原体为黄病毒。

29. 根据权利要求 28 所述的方法,其特征在于,该黄病毒为登革热病毒或日本脑脊髓炎病毒之其中一者。

30. 一种方法,其包含:

提供有效量之抗 DLVR1/CLEC5A 抗体予受登革热病毒感染之动物,其中该抗 DLVR1/CLEC5A 抗体能防止由登革热病毒颗粒所呈现之配体与 DLVR1/CLEC5A 受体结合;

其中 TNF- $\alpha$  之分泌可受到抑制。

31. 根据权利要求 30 所述的方法,其特征在于,该抗 DLVR1/CLEC5A 抗体包含可变轻链,其包含选自由序列编号:66、序列编号:67、及序列编号:68 所组成之群的氨基酸序列。

32. 根据权利要求 30 所述的方法,其特征在于,该抗 DLVR1/CLEC5A 抗体包含可变重链,其包含选自由序列编号:69、序列编号:70、及序列编号:71 所组成之群的氨基酸序列。

33. 一种方法,其包含:

提供有效量之抗 DLVR1/CLEC5A 抗体予受日本脑脊髓炎病毒感染之动物,其特征在于,该抗 DLVR1/CLEC5A 抗体能防止由日本脑脊髓炎病毒所呈现之配体与 DLVR1/CLEC5A 受体结合;

其中 TNF- $\alpha$  之分泌可受到抑制。

34. 根据权利要求 30 所述的方法,其特征在于,该抗 DLVR1/CLEC5A 抗体包含可变轻链,其包含选自由序列编号:66、序列编号:67、及序列编号:68 所组成之群的氨基酸序列。

35. 根据权利要求 30 所述的方法,其特征在于,该抗 DLVR1/CLEC5A 抗体包含可变重链,其包含选自由序列编号:69、序列编号:70、及序列编号:71 所组成之群的氨基酸序列。

36. 一种方法,其包含:

提供有效量之试剂予受登革热病毒感染之动物,其中该试剂可至少部分抑制至少一种促发炎症性细胞激素之分泌,且不影响干扰素- $\alpha$  (Interferon- $\alpha$ ) 之分泌。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其特征在于,该促发炎症性细胞激素为 TNF- $\alpha$ 。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其特征在于,该试剂为抗 DLVR1/CLEC5A 抗体。

39. 根据权利要求 36 所述的方法,其特征在于,该试剂可抑制聚糖配体对于 DLVR1/CLEC5A 之结合,但无法抑制聚糖配体对于类铎受体 (TOLL-like receptor)7 或 MyD88 受体之结合。

40. 根据权利要求 39 所述的方法,其特征在于,该试剂为可干扰聚糖受体对于 DLVR1/CLEC5A 之结合的抗 DLVR1/CLEC5A 抗体。

41. 一种小鼠,其包含:

易受登革热病毒感染之小鼠;

sh-RNA 颗粒以剔除该小鼠体内之 DLVR1/CLEC5A 受体。

42. 根据权利要求 41 所述的方法,其中该 sh-RNA 颗粒包含序列编号:39。

43. 一种组合物,其包含:

医药制备物,含有有效量之抗体,该抗体系对抗动物体内至少一细胞受体,以调节该动物体内病原体感染之作用;

其中该调节至少包含抑制该动物细胞之促发炎症性细胞激素的分泌,且不影响可造成病毒清除之细胞激素的分泌。

44. 根据权利要求 43 所述的组合物,其特征在于,该病毒为肝炎病毒。

45. 根据权利要求 43 所述的组合物,其特征在于,该病原体为黄病毒。

46. 根据权利要求 45 所述的组合物,其特征在于,该黄病毒为登革热病毒。

47. 根据权利要求 46 所述的组合物,其特征在于,至少一细胞受体至少包含 DLVR1/CLEC5A 受体。

48. 根据权利要求 47 所述的组合物,其特征在于,该促发炎症性细胞激素包含 TNF- $\alpha$ ,且该可造成病毒清除之细胞激素至少包含干扰素- $\alpha$ 。

49. 根据权利要求 45 所述的组合物,其特征在于,该黄病毒为日本脑脊髓炎病毒。

50. 根据权利要求 43 所述的组合物,其特征在于,该促发炎症性细胞激素至少包含 TNF- $\alpha$ 。

51. 根据权利要求 43 所述的组合物,其特征在于,该可造成病毒清除之细胞激素至少包含干扰素- $\alpha$ 。

52. 一种组合物,其包含:

医药制备物,含有有效量之抗体,该抗体系抗受登革热病毒感染之动物之 DLVR1/CLEC5A 受体,以调节该动物体内登革热病毒感染之作用;

其中该调节至少包含抑制该动物细胞之促发炎症性细胞激素的分泌,且不影响可造成病毒清除之细胞激素的分泌。

53. 根据权利要求 52 所述的组合物,其特征在于,至少一促发炎症性细胞激素为 TNF- $\alpha$ 。

54. 根据权利要求 52 所述的组合物,其特征在于,至少一可造成病毒清除之细胞激素为干扰素- $\alpha$ 。

## 用于检测目标反应与治疗黄病毒感染症状之组合物及方法

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请案主张美国专利申请案第 12/079,576 号 (2008 年 3 月 27 日申请) 及美国专利申请案第 11/469,270 号 (2006 年 8 月 31 日申请) 之巴黎公约优先权,其主张美国临时申请案第 60/713,463 号 (2005 年 8 月 31 日申请) 之巴黎公约优先权,上述各申请案之揭示内容全文皆以参考数据方式纳入本说明书中。

[0003] 本发明由台湾国家科学委员会 94F008-5、NSC 95-2320-B-010010 及 NSC 95-3112-B-010-017 之计划所支持。本发明亦由台湾中央研究院 94M002-1 与国立阳明大学 95A-CT8G02 之计划所支持。

### 背景技术

[0004] 在本说明书中所参照之任何先前技术皆不或不应被视做承认或以任何形式暗示该先前技术在任何国家构成通识之一部分。本文所引用之所有文献,其全文皆以参考数据方式具体纳入本说明书中。

[0005] 免疫系统能使宿主生物区辨本身及非本身抗原,以及识别及清除侵入之病原体。后天性免疫系统 (adaptive immunity system) 依存于高度多形 (highly polymorphic) 分子,诸如主要组织相容性复合体 (MHC) 之第 I 类及第 II 类抗原、T 细胞受体及 B 细胞受体,以向 T 细胞及 B 细胞呈递抗原,因而导致免疫系统之活化。先天免疫系统识别此等多样性抗原之机制未明,直到 Janeway 提出模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 之观念 (Janeway,1989,Cold Spring Harb Symp Quant Biol 54Pt 1,1-13)。该假说后来藉由鉴定出由下列受体识别之病原体相关性分子模式 (PAMPs) 而证明为正确,该等受体为:类铎受体 (TOLL-like receptors) (Aderem and Ulevitch,2000Nature 406,782-7; Akira and Takeda,2004,Nat Rev Immunol 4,499-511;Athman and Philpott,2004,Curr Opin Microbiol 7,25-32)、凝集素 (lectin) 受体 (Cambi and Figdor,2003,Curr Opin Cell Biol 15,539-46)、类免疫球蛋白 (类 Ig) 受体 (Daws et al.,2003,J Immunol 171,594-9)、及 NOD 蛋白 (Athman and Philpott,2004,Curr Opin Microbiol 7,25-32)、以及其它 (Liu et al.,2001,J Biol Chem 276,34686-94;McDonald et al.,2005,J Biol Chem 280,20177-80)。

[0006] 除了由类铎受体所识别且经充分鉴定特征之 PAMPs (Akira and Takeda,2004,Nat Rev Immunol 4,499-511) 之外,新近之研究显示宿主免疫系统可经由特异性碳水化合物抗原而识别侵入之病原体。举例言之,甘露糖受体可识别在病原体表面表现之具高甘露糖分子部分 (Stahl and Ezekowitz,1998,Curr Opin Immunol 10,50-5),同时树状细胞凝集素-1 (Dectin-1) 受体可特异性地与  $\beta$ -葡聚糖结合,该  $\beta$ -葡聚糖为真菌壁表面之多醣体之主要骨架 (Brown and Gordon,2001,Nature 413,36-7;Herre et al.,2004,Mol Immunol 40,869-76)。此等结果暗示与病原体相关之碳水化合物结构为由免疫细胞之先天性免疫受体所识别之标靶之一。

[0007] 灵芝类 (Ganoderma) 及冬虫夏草类 (Cordyceps) 真菌为在中国为最盛行服用之草

药。自灵芝 (*Ganoderma lucidum*, 亦称为 Ling zhi、Reishi) 萃取出之多醣体曾被用于传统中药而作为抗肿瘤剂及免疫调节剂 (Lien, 1990, *Prog Drug Res* 34, 395-420; Wang et al., 2002, *Bioorg Med Chem* 10, 1057-62; Shiao, 2003, *Chem Rec* 3, 172-80), 而从冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) (*Cordyceps*, *Caterpillar fungus*) 萃取出者则显示会改变细胞凋亡自稳态 (apoptotic homeostasis), 并会改善呼吸、肾脏、及心血管功能 (Buenz et al., 2005, *J Ethnopharmacol* 96, 19-29; Zhu et al., 1998, *J Altern Complement Med* 4, 289-303; Zhu et al., 1998, *J Altern Complement Med* 4, 429-57), 以及增加全身对于胰岛素之敏感性 (Balon et al., 2002, *J Altern Complement Med* 8, 315-23)。不过, 萃取物之多醣体组成于多醣体系萃取自不同来源、不同菌株、及于不同生长条件下培养时皆会发生变化。

[0008] 仰赖高效液相层析 (HPLC) 及质子-核磁共振之分析方法曾被用于研究单离自灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 及冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 之多醣体之成分 (He and Seleen, 2004, *Int. J. Med. Mushrooms* 6, 253)。不过, 高效液相层析图系基于与灵芝酸 (ganoderic acid) A 及 C (灵芝之二种主要三萜化合物) 或腺苷之比较。依据质谱仍难以知道萃取物是否含有多醣体之活性成分。

[0009] 本发明辨识出在受到黄病毒 (诸如, 登革热病毒 (*Dengue virus*) 或日本脑脊髓炎病毒 (*Japanese encephalomyelitis virus*)) 感染时会诱发细胞渗漏及其它负作用之细胞受体。使用本发明所揭露之融合蛋白, 其判定出病原体 (诸如, 黄病毒) 会经由糖苷键结而结合之受体。一旦判定出该等受体, 即可判定结合特定受体之作用, 其中对于造成特定症状之受体的寻靶可由能够阻断病原体与受体结合之试剂靶向。因此, 就登革热病毒及日本脑脊髓炎病毒而言, TNF- $\alpha$  会在病原体结合 DLVR1/CLEC5A 受体时释出。以单株抗体阻断 DLVR1/CLEC5A 受体可减少 TNF- $\alpha$  之分泌, 且同时不会影响负责进行病毒清除之细胞激素的分泌, 因而使经感染小鼠之存活率由零增加至约 50%。

## 发明内容

[0010] 根据本说明书揭示之特征, 本发明提供一种方法, 其包含取得融合蛋白质族群 (complement) (其中各融合蛋白质包含受体的结合区域 (domain) 以及提供受质 (substrate) 固定之区域), 使融合蛋白质与病原体接触以确认该病原体是否可与该融合蛋白质族群中至少一融合蛋白质上之结合区域结合, 及检测该病原体是否与该融合蛋白质结合。「融合蛋白质族群」乙辞代表至少一受体的许多不同结合区域。

[0011] 根据本说明书揭示之特征, 本发明提供一种方法, 其包含取得易受病原体感染之细胞, 剔除至少一细胞受体基因, 使该等细胞与该病原体接触, 及测量该等细胞之细胞激素分泌量。

[0012] 根据本说明书揭示之特征, 本发明提供一种方法, 其包含鉴定至少一可结合病原体所展示之配体 (ligand) 的细胞受体, 以及对经该病原体感染之动物投予试剂, 以阻断该配体与该受体之结合而调控该病原体之作用。

[0013] 根据本说明书揭示之特征, 本发明提供一种方法, 其包含提供有效量的试剂, 以调节感染动物之病原体的作用, 以调节该病原体对该动物上的作用。该试剂系针对至少一该感染动物原有细胞之细胞受体, 以防止该受体与该病原体所展示之配体结合。

[0014] 根据本说明书揭示之特征,本发明提供一种方法,其包含提供有效量之抗 DLVR1/CLEC5A 抗体给予受登革热病毒感染之动物,其中该抗 DLVR1/CLEC5A 抗体能防止由登革热病毒颗粒所呈现之配体与 DLVR1/CLEC5A 受体结合,其中 TNF- $\alpha$  之分泌可受到抑制。

[0015] 根据本说明书揭示之特征,本发明提供一种方法,其包含提供有效量之抗 DLVR1/CLEC5A 抗体给予受日本脑脊髓炎病毒感染之动物,其中该抗 DLVR1/CLEC5A 抗体能防止由日本脑脊髓炎病毒所呈现之配体与 DLVR1/CLEC5A 受体结合,其中 TNF- $\alpha$  之分泌可受到抑制。

[0016] 根据本说明书揭示之特征,本发明提供一种方法,其包含提供有效量之试剂给予受登革热病毒感染之动物,其中该试剂可至少部分抑制至少一种促发炎症性细胞激素之分泌,且不影响干扰素- $\alpha$  (Interferon- $\alpha$ ) 之分泌。

[0017] 根据本说明书揭示之特征,本发明提供一种小鼠,其包含易受登革热病毒感染之小鼠,以及 sh-RNA 颗粒以剔除该小鼠体内之 DLVR1/CLEC5A 受体。

[0018] 根据本说明书揭示之特征,本发明提供一种组合物,其包含医药制备物,包含有效量之抗体,该抗体系抗动物体内至少一细胞受体,以调节该动物体内病原体感染之作用。该调节至少包含抑制该动物细胞之促发炎症性细胞激素的分泌,且不影响可造成病毒清除之细胞激素的分泌。

[0019] 根据本说明书揭示之特征,本发明提供一种组合物,其包含医药制备物,包含有效量之抗体,该抗体系对抗受登革热病毒感染之动物之 DLVR1/CLEC5A 受体,以调节该动物体内登革热病毒感染之作用。该调节至少包含抑制该动物细胞之促发炎症性细胞激素的分泌,且不影响可造成病毒清除之细胞激素的分泌。

## 附图说明

[0020] 本专利或专利申请档案含有至少一张以彩色制成之图式。本专利或专利申请公开案(含彩色图式)之复印件将依请求及缴付必要费用后由智财局提供。本说明书揭示之上述特征及目的将可在参照下列之叙述并结合附呈之图式阅读时更为明了,该等图式中之类似参照数目代表类似之组件,且其中:

[0021] 图 1A 显示藉由 RT-PCR 扩增,然后在 0.8% 琼脂糖上分成各部分及藉由溴化乙锭染色而显现之先天性免疫受体之 DNA 片段。图 1B 为经表现之重组受体 .Fc 融合蛋白质在 12% SDS-PAGE 凝胶上之电泳图谱。

[0022] 图 2A 显示固定于膜上之生物素化 GLPS F3 与缀合有辣根过氧化酶 (HRP) 之链霉抗生物素接触后之点渍图。图 2B 显示固定于膜上之生物素化 GLPS F3 与树状细胞凝集素-1 (Dectin-1).Fc 融合蛋白质接触,继而与缀合有 HRP 之山羊抗 IgG1 抗体一起培育后之点渍图。图 2C 显示图 2B 之吸渍图之点密度分析。图 2D 显示竞争者  $\beta$ -葡聚糖对于树状细胞凝集素-1.Fc 融合蛋白质与固定于膜之 GLPS F3 之结合之点密度之影响。图 2E 显示固定之 GLPS F3 与树状细胞凝集素-1.Fc 融合蛋白质接触,继而于存在各种量之竞争者多醣体 ( $\beta$ -葡聚糖、D-葡萄糖及 D-半乳糖) 下与缀合有 HRP 之山羊抗 IgG1 抗体一起培育后之点渍图。

[0023] 图 3 显示固定于膜之 GLPS F3 及 GLPS F3C 与 27 种不同的融合蛋白质接触后之点渍之半定量分析,其中该等融合蛋白质各包含所列之先天性免疫受体之细胞外区域且该细

胞外区域与 IgG1 Fc 偶合。

[0024] 图 4A 显示用图 3 所列之 27 种融合蛋白质检测固定于膜之 GLPS F3 及 GLPS F3C 之点渍图。图 4B 显示 EDTA 对于树状细胞凝集素 -1 (Dectin-1).Fc、DC-SIGNR.Fc、KCR.Fc 及 TLT-2.Fc 与固定于膜之 GLPS F3 之结合之影响。图 4C 显示用树状细胞凝集素 -1 (Dectin-1).Fc、DC-SIGNR.Fc、KCR.Fc 及 TLT-2.Fc 融合蛋白质检测固定于膜之  $\beta$ -葡聚糖之点渍图。

[0025] 图 5A 显示用树状细胞凝集素 -1.Fc、DC-SIGNR.Fc、KCR.Fc 及 TLT-2.Fc 融合蛋白质检测多醣体样品之点渍图。图 5B 显示样品编号之名称及以半定量形式提供图 5A 之点密度。

[0026] 图 6A 显示包覆在微量滴定平皿上之生物素化 GLPS-F3 之量,其系使用过氧化酶-抗生物素蛋白缀合物检定分析法测量及在 OD 450nm 读数,以检测黄色反应产物。图 6B 系以图之方式描述各种受体.Fc 融合蛋白质对固定于微量平皿上之 GLPS-F3 之亲和性。各受体.Fc 融合蛋白质之绝对结合率记载在左侧 Y 轴(以 OD 450nm 读数表示),以及右侧 Y 轴记载与树状细胞凝集素 -1.Fc 之结合率相较下之相对结合率。

[0027] 图 7 系以图说明在与为多醣体之甘露聚糖及  $\beta$ -葡聚糖,以及与为单醣之 D-甘露糖 (Man)、D-葡萄糖 (Glc)、N-乙酰基-葡萄糖胺 (GlcNAc)、D-半乳糖 (Gal)、N-乙酰基-半乳糖胺 (GalNAc)、L-岩藻糖 (Fuc) 及唾液酸之竞争性检定分析中,各种受体.Fc 融合蛋白质与 GLPS-F3 之结合百分率。

[0028] 图 8A 系以图说明在与人类 IgG 阴性对照组相较下,受体.Fc 融合蛋白质与登革热病毒之结合率。图 8B 显示登革热病毒与三种受体.Fc 融合蛋白质及人类 IgG 阴性对照组之免疫复合物之西方转渍图,其中使用对抗登革热病毒 E 蛋白质之抗体检测。图 8C 以图显示 EDTA 抑制登革热病毒与 DC-SIGN.Fc 融合蛋白质之结合,但不会抑制登革热病毒与 DVL1.Fc 融合蛋白质之结合。图 8D 显示 DVL1.Fc 融合蛋白质与用 PNGaseF、二硫苏糖醇 (DTT)、热或 UV 照射处理之登革热病毒之结合率以及未经处理之登革热病毒 (non) 之结合率。

[0029] 图 9A 显示 DVL1 在各种免疫细胞类型中之表现,其藉由使用抗 -DVL1 抗体之流式细胞计量术测量。DVL1 之表现被示出,其中 DVL1 之图形轮廓(如虚线所示)与抗体同种型 (isotype) 对照组(阴影区)不相符。图 9B 显示 DC-SIGN 在各种免疫细胞类型中之表现,其藉由使用抗 -DC-SIGN 抗体之流式细胞计量术测量。DC-SIGN 之表现被示出,其中 DC-SIGN 曲线(虚线)与抗体同种型对照组(阴影区)不相符。

[0030] 图 10A 显示在与活登革热病毒或经 UV 照射之登革热病毒 (UV-DV) 接触之 CD14+ 巨噬细胞中 NS3 蛋白质表现之流式细胞计量分析(其中使用抗 -NS3 抗体)结果,并与匹配之抗体同种型对照组(阴影区)比较。图 10B 图示在以不同感染重复数 (multiplicities of infection, MOI) 之登革热病毒感染之 CD14+ 巨噬细胞中或以经 UV 照射之登革热病毒感染之 CD14+ 巨噬细胞中,细胞外登革热病毒滴度之经时变化。图 10C 系说明在以不同感染重复数 (MOI) 登革热病毒感染之 CD14+ 巨噬细胞中全部 DAP12 及磷酸化 DAP12 之免疫转渍图。图 10D 系说明用活登革热病毒或经 UV 照射之登革热病毒以 MOI = 5 感染后,于不同时间在该等经登革热病毒感染之 CD14+ 巨噬细胞中所有 DAP12 及磷酸化 DAP12 之免疫转渍图。

[0031] 图 11 系例示说明用活登革热病毒感染之前,藉由电穿孔导入 pLL3.7 载体(对照

组) 或 DVL1-shRNA 之 CD14+ 巨噬细胞中, 所有 DAP12 及磷酸化 DAP12 之免疫转渍图。

[0032] 图 12A 显示用活登革热病毒或经 UV 照射之登革热病毒以指定之 MOI 感染 CD14+ 巨噬细胞后 6 小时, TNF- $\alpha$  之分泌。图 12B 显示用活登革热病毒或经 UV 照射之登革热病毒以指定之 MOI 感染 CD14+ 巨噬细胞后 12 小时, TNF- $\alpha$  之分泌。图 12C 显示 CD14+ 巨噬细胞感染后 TNF- $\alpha$  分泌随时程之测量值。

[0033] 图 13A 显示在 DC-SIGN-shRNA 或 DVL1-shRNA、或者载体对照组 (pWTS1 及 pLL3.7) 转染之 CD14+ 巨噬细胞中, 藉由西方转渍测得之 DC-SIGN 及 DVL1 之表现。图 13B 显示在用登革热病毒感染之前, 藉由电穿孔导入 DC-SIGN-shRNA、DVL1-shRNA、或者 pLL3.7 载体对照组之 CD14+ 巨噬细胞中, NS3 表现之流动式细胞计量分析 (使用抗 -NS3 抗体)。阴影区为 NS3 抗体之同种型对照组。图 13C 系例示说明在用登革热病毒感染之前 ( $t = 0$ ), 藉由电穿孔导入 DC-SIGN-shRNA、DVL1-shRNA 或载体对照组之 CD14+ 巨噬细胞之上清液中病毒滴度之时程分析。

[0034] 图 14A 显示用登革热病毒感染之前 ( $t = 0$ ), 藉由电穿孔导入 DC-SIGN-shRNA、DVL1-shRNA 或载体对照组之 CD14+ 巨噬细胞中各种细胞激素之之分泌之时程分析。图 14B 显示于相同条件下细胞激素 IFN- $\alpha$  之时程分析。

[0035] 图 15 显示由感染有登革热病毒且用对抗 DVL1 之指定单株抗体以指定浓度治疗之 CD14+ 巨噬细胞分泌入培养上清液中之 TNF- $\alpha$  之 ELISA 测量值。

[0036] 图 16a 图式说明各种受体 .Fc 融合蛋白对于登革热病毒之结合。图 16b 显示登革热病毒与三种受体 .Fc 融合蛋白及一种人类 IgG 阴性控制组之免疫复合物的西方转渍, 以对抗登革热病毒 E 蛋白之抗体探测。图 16c 图标由 EDTA 可抑制登革热病毒对 DC-SIGN. Fc 融合蛋白之结合, 但不会抑制对于 DLVR1/CLEC5A 融合蛋白之结合。图 16d 显示藉由添加 DC-SIGN. Fc 及 DLVR1/CLEC5A 融合蛋白而产生登革热病毒对人类 293T 细胞结合之增加。16e 图示各种糖之添加可抑制登革热病毒对 DC-SIGN. Fc 融合蛋白之结合。16f 图标 PNGaseF 对于登革热病毒对 DLVR1/CLEC5A 融合蛋白之结合的效应。

[0037] 图 17a 说明 DC-SIGN 在人类 PBMCs 中之表现模式。图 17b 说明 DVL1/CLEC5A 在人类 PBMCs 中之表现模式。

[0038] 图 18a 显示免疫转渍, 其说明使用针对磷酸酪胺酸及 DAP12 之抗体, 测定人类巨噬细胞中之登革热病毒诱导之 DAP12 磷酸化 (2h p. i.)。图 18b 显示免疫转渍, 其说明由登革热病毒及经 UV- 失活之登革热病毒诱导之 DAP12 磷酸化的动力学。图 18c 显示免疫转渍, 其说明 shRNAs 使 DVL1/CLEC5A 及 DC-SIGN. Fc 融合蛋白之表现下降 (knock down) 以及抑制登革热病毒 (m. o. i. = 5)- 媒介之 DAP12 磷酸化的能力。图 18d 显示 shRNAs 对于巨噬细胞中之登革热病毒进入及复制的效应。图 18e 显示抗 -DVL1/CLEC5A mAb、抗 -DC-SIGN mAb、及小鼠 IgG 对于非结构蛋白质 NS3 表现的效应。图 18f 图示说明 shRNAs 对于经感染巨噬细胞之登革热病毒滴度的效应之时程检定分析。

[0039] 图 19a 图标说明巨噬细胞之登革热病毒及经 UV 失活之登革热病毒诱导性 TNF- $\alpha$  分泌的剂量 - 相关性。图 19b 说明登革热病毒感染 (m. o. i. = 5) 后之 TNF- $\alpha$  表现的动力学。图 19 图示说明 DVL1/CLEC5A 及 DC-SIGNshRNA 对于 TNF- $\alpha$ 、IL-6、MIP1- $\alpha$ 、IL-8、IP-10 及 INF- $\alpha$  自经登革热病毒感染 (m. o. i. = 5) 之巨噬细胞分泌的效应。在图 19d 图示说明以特异性 shRNA 对于登革热病毒诱导性 TNF- $\alpha$  及 INF- $\alpha$  分泌之各种分泌途径所进

行之下降 (knock down) 实验效应。图 19e 图示说明拮抗性抗 -DVL1/CLEC5A mAbs 可抑制反应登革热病毒血清型 1-4 之 TNF- $\alpha$  分泌。使用 M. R. mAb (抗 -甘露糖受体 mAb, mIgG1) 及小鼠 IgM (mIgM) 作为阴性控制组。

[0040] 图 20a 说明经登革热病毒、登革热病毒 / 抗 -E、及登革热病毒 / 抗 -prM 免疫复合物感染之巨噬细胞的 NS3 表现。图 20b 说明经 DV2 感染之巨噬细胞的 TNF- $\alpha$  及 INF- $\alpha$  分泌量。图 20c 说明经抗 -prM / 登革热病毒及抗 -E / 登革热病毒免疫复合物感染之巨噬细胞的 TNF- $\alpha$  及 INF- $\alpha$  分泌量。

[0041] 图 21a 图示说明 HMEC-1 单层之通透性以及上清液中之 TNF- $\alpha$  含量的时程分析。图 21b 图示说明 TNFR2. Fc 及抗 -DVL1/CLEC5A 对于内皮细胞单层通透化的抑制作用。

[0042] 图 22a 图标说明登革热病毒与人类及小鼠 DVL1/CLEC5A. Fc 融合蛋白的结合亲和力。图 22b 显示 mDVL1/CLEC5A 在小鼠脾细胞中之表现。图 22c 显示 mDVL1/CLEC5A 在小鼠骨髓 (BM) - 衍生性巨噬细胞及小鼠似巨噬细胞 Raw264. 7 细胞系中之表现。

[0043] 图 23a 图标说明由登革热病毒与小鼠巨噬细胞细胞系 Raw264. 7 及稳定表现人类 DC-SIGN 之 Raw264. 7 细胞之结合所产生之 TNF- $\alpha$  释出比较。图 23b 图示说明在 mAb 之存在下使稳定表现人类 DC-SIGN 之 Raw264. 7 细胞与 DV2 共同进行培育所产生之 TNF- $\alpha$  分泌。图 23c 图示说明抗 -DVL1/CLEC5A mAbs (3D2H6 及 10D7H3) 可以剂量 - 相关性之方式抑制 DV2- 诱导之 TNF- $\alpha$  释出。

[0044] 图 24 说明经 DV2/PL046 或 DV2/NGC-N 系挑战之 STAT1<sup>-/-</sup> 小鼠的 Kaplan-Meier 存活曲线。

[0045] 图 25a 说明对抗小鼠 DVL1/CLEC5A 培育之 mAb 3D2H6 及 10D7H3 对于经登革热病毒挑战之 STAT1<sup>-/-</sup> 小鼠的皮下及肠道出血之效应。图 25b 说明对抗 DVL1/CLEC5A 之 mAb (3D2H6 及 10D7H3) 对于经登革热病毒挑战之 STAT1<sup>-/-</sup> 小鼠的血浆渗漏进入生命器官之效应。图 25c 图示说明借着自器官萃取 Evans 蓝显示之生命器官血管通透性。图 25d 说明于有及无抗 -DVL1/CLEC5A mAbs 或 TNFR2. Fc 存在下, 经登革热病毒挑战之 STAT1<sup>-/-</sup> 小鼠之 TNF- $\alpha$  及 IP-10 之血清含量以及病毒滴度。图 25e 图示说明在拮抗性抗 - 小鼠 DVL1/CLEC5A mAbs 或 TNFR2. Fc 存在下, 经 DV2 挑战之 STAT1 缺陷小鼠的存活。

[0046] 图 26 说明 DVL1/CLEC5A 涉及 JEV 媒介之 DAP12 磷酸化作用及自人类巨噬细胞之 TNF- $\alpha$  分泌。在图 26a 中, 分别以 ELISA 测定 DVL1/CLEC5A (1  $\mu$ g) 与 JEV 及登革热病毒 (DV) ( $5 \times 10^6$  PFU) 之交互作用。DV 与人类 DVL1/CLEC5A (长度 188 氨基酸) 具交互作用, 但与可变剪接形式 sDVL1/CLEC5A (aa 43-65 缺失) 则否。相对的, JEV 仅与 sDVL1/CLEC5A 具交互作用, 但与全长 DVL1/CLEC5A 则否。在图 26b 中, 登革热病毒可在人类巨噬细胞中诱导 DAP12 磷酸化作用 (在 2h p. i.)。以抗 -DAP12 mAb 沉淀经 DV 感染之巨噬细胞中的 DAP12, 在 SDS-PAGE 分离后将其转渍至硝基纤维素膜上, 接着再与对抗磷酸酪氨酸及 DAP12 之抗体分别进行培育。JEV 诱导之 DAP12 磷酸化作用 (m. o. i. = 5) 由 pLL3. 7/DVL1/CLEC5A 抑制。在图 26c 中, 其显示人类巨噬细胞反应 JEV 感染之 TNF- $\alpha$  分泌的动力学 (左)。JEV 诱导之 TNF- $\alpha$  分泌由 pLL3. 7/DVL1/CLEC5A mAb 抑制 (右)。数据系以三次独立试验之平均值  $\pm$  s. d. 表示。

## 具体实施方式

[0047] 在下列本发明具体例之详述中,其参照附呈之图式阅读时更为明了,其中类似之参照数目代表类似之组件,且其中系以说明方式显示可实施本发明之特定具体例。此等具体例系以足够之细节进行叙述,以使所属技术领域的技术人员可据以实施本发明,且需明了者,可使用其它具体例,且可在不偏离本发明范围之情形下进行逻辑、机械、生物、电学、功能、及其它之改变。下文之详述因此不应被视为任何限制,而本发明之范围仅由附呈之申请专利范围定义。在本文中,「或」一辞应可被理解为定义一种论理上之选言,且不应被视为一种排他性选言,除非其被标示为「或不」(xor)一辞。

[0048] 在一具体例中,本发明提供一种融合蛋白质,其包含先天性免疫受体之碳水化合物识别区域及异源多肽。先天性免疫受体意指:

[0049] 1) 由白血球受体复合物(LRC)中之基因及人类染色体19上之LRC-相关基因所编码之受体,其包括,但不限于CD66家族(CEACAM1及PSG1)、SIGLEC家族、NGK7、FCGRT、ILT/LILRA/LILRB(CD85)家族、LAIR家族、KIR(CD158)家族(包括KIR2DL亚家族、KIR2DS亚家族及KIR3DL亚家族)、FCAR(CD89)、NKp46(NCR1)及GPVI(GP6);以及

[0050] 2) 由在人类染色体12上之天然杀手受体复合物(NKC)中之基因所编码之受体,其包括,但非限于,MAFA-L(KLRG1)、A2M、NKR-P1A(KLRB1)、LLt1(CLEC2D)、CD69(CLEC2C)、KLRF1、AICL(CLEC2B)、CLEC-2(CLECFS2)、Lox-1(OLR1)、CD94(KLRD1)、NKG2-D(KLRK1)、NKG2-F(KLRC4)、NKG2-E(KLRC3)、NKG2-C(KLRC2)、NKG2-A(KLRC1)、Ly49L(KLRA1)及PRB3;以及

[0051] 3) 所有人类及小鼠C-型凝集素(CLEC)家族基因、所有人类之类唾液酸结合性Ig(SIGLEC)基因、所有人类之在骨髓细胞上表现之激发受体(TREM)基因、所有人类之类TREM(TREML/TLT)基因、所有人类之类铎受体(TLR)基因以及所有在人类染色体发现之人类之类Fc受体(包括FCRL1至FCLR6,亦包括FCLRM1及FCLRM2)基因。

[0052] 使用人类基因组组织(Human Genome Organization, HUGO)搜索引擎网站可以查到能应用于本发明方法中之此等分类中的其它基因。亦可参考Immunological Reviews 2001Vol. 181:20-38中之基因座说明,该文全文以参考数据方式纳入本文。

[0053] 来自非人类物种之任何上述基因之直系同源物(orthologues)亦可用于本发明之方法中。

[0054] 可被考虑用于本发明之C-型凝集素基因包括,但不限于,下列人类基因:ASGR1、ASGR2(CLEC4H2)、CD207(CLEC4K/郎罕细胞特异性蛋白)、CD209(DC-SIGN/CLEC4L)、CD302(CLEC13A)、CLEC1A、CLEC1B(CLEC-2)、CLEC2A、CLEC2B、CD69、CLEC2D、CLEC2L、CLEC3A、CLEC3B、CLEC30、CLEC3Q、CLEC4A、CLEC4C、CLEC4D(CLEC-6)、CLEC4E、CLEC4F(KCLR)、CLEC4G、CLEC4M(DC-SIGNR)、CD209、DLVR1/CLEC5A、CLEC6A(树状细胞凝集素-2)、CLEC7A(树状细胞凝集素-1)、CLEC9A、CLEC10A、CLEC11A、CLEC12A、CLEC14A、FCER2、KLRB1、KLRF1、LY75(DEC205)、MRC1、MRC1L1、MRC2(Endo180)、OLR1、PLA2R1、DCAL1及COLEC10。此等基因之任一者之同源物(homologues)亦在考虑之列,来自其它种动物诸如小鼠(mice)及大鼠(rats)之直系同源物(orthologues)亦同。同源物(homologues)及直系同源物(orthologues)与列举之C-型凝集素(lectin)基因之任一者之相同性可为50%、70%、80%、80.6%、83%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%。被特别考虑之

直系同源物为小鼠中之库佛氏 (Kupffer) 细胞受体 (mKCR) 基因 (与人类 CLEC4F 同源)。

[0055] 被考虑用于本发明之 TREM 基因及 TREML 基因包括,但非限于,下列人类基因:类 CD300 抗原家族成员 B (CD300LB)、类 CD300 抗原家族成员 G (CD300LG)、TREM1、TREM2、TREML1 (TLT1)、TREML2 (TLT2)、TREML3 (TLT3) 及 TREML4 (TLT4)。此等基因之任一者之同源物亦在考虑之列,来自其它种动物诸如小鼠及大鼠之直系同源物亦同。同源及直系同源物与此等列举之 TLR 基因之任一者之相同性可为 50%、70%、80%、80.6%、83%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8% 或 99.9%。被特别考虑之直系同源物包括来自小鼠之 mTREM1、mTREM2、mTLT1 及 mTLT4。

[0056] 被考虑用于本发明之 TLR 基因包括,但不限于,下列人类基因:TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12 及 TLR13。此等基因之任一者之同源物亦在考虑之列,来自其它种动物诸如小鼠及大鼠之直系同源物亦同。同源物及直系同源物与所列举之 TLR 基因之任一者之相同性可为 50%、70%、80%、80.6%、83%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8% 或 99.9%。

[0057] 被考虑用于本发明之 SIGLEC 基因包括,但不限于,下列人类基因:CD22、CD33、髓鞘相关糖蛋白 (MAG)、SIGLEC5、SIGLEC6、SIGLEC7、SIGLEC8、SIGLEC9、SIGLEC10、SIGLEC11、SIGLEC12、SIGLEC13 及唾液酸黏附素 (SN)。此等基因之任一者之同源物亦在考虑之列,来自其它种动物诸如小鼠及大鼠之直系同源物亦同。同源物及直系同源物与所列举之 SIGLEC 基因之任一者之相同性可为 50%、70%、80%、80.6%、83%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8% 或 99.9%。

[0058] 适用于本发明之其它先天性免疫受体包括在下述实施例中所记载者。

[0059] 融合蛋白质可包含先天性免疫受体之整个细胞外区域,该细胞外区域包括碳水化合物识别区域;或者融合蛋白质可包含该细胞外区域之一部分,包括碳水化合物识别区域;或者融合蛋白质可仅包含碳水化合物识别区域。

[0060] 异源多肽可包含能与先天性免疫受体之碳水化合物识别区域融合,以致该异源多肽在活体内或试管中皆不会干扰碳水化合物区域与其同系 (cognate) 特异性碳水化合物之结合之任何多肽。异源多肽较佳为免疫球蛋白,诸如人类 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgM、IgE、IgD、IgAa 及 IgA2 或者来自其它种动物之免疫球蛋白。较佳以免疫球蛋白之片段,例如 IgG 之 Fc 片段,做为异源多肽。在较佳之具体例中,该异源多肽为不会与人类 Fc 受体结合之免疫球蛋白变型。该等变型在本技术中已为熟知。举例言之,可使用包含下列突变之人类 IgG1 Fc 变型:L234A、L235E、G237A 及 P331S。

[0061] 该异源多肽尚可包含一个或一个以上允许融合多肽固定在固体支撑物上或从复合物混合物中纯化之功能区域。举例言之,该异源多肽可包含 His6tag 以允许融合蛋白质依照本技术中所熟知之方法附接在 Ni-NTA 固体支撑物上。再举例言之,该异源多肽可包含麸胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase) 区域,以致生成之融合蛋白质可吸附在,例如,麸胱甘肽珠粒或由麸胱甘肽衍生之微量滴定皿中。

[0062] 该异源多肽亦可包含一分子或一分子以上之生物素或生物素衍生物。以此方式,

融合蛋白质可固定在缀合有链霉抗生物素蛋白之固体支撑物上,或者可使缀合有链霉抗生物素蛋白之酶与融合蛋白质结合。

[0063] 融合蛋白质视需要在异源多肽与先天性免疫受体之碳水化合物识别区域之间复可包含连结子(linker)。该连结子可为肽类连结子,或者其可为非肽类连结子,诸如聚乙二醇。

[0064] 在融合蛋白质中,碳水化合物识别区域可为相对于异源多肽之 C-端或者可为相对于异源多肽之 N-端。

[0065] 本发明之融合蛋白质可藉由蛋白质制造技术中已知之任何方法制备。融合蛋白质较佳使用本技术熟知之重组 DNA 技术及蛋白质表现技术制备。举例言之,编码先天性免疫受体之碳水化合物识别区域之 DNA,可藉由使用对该特定目标先天性免疫受体之碳水化合物识别区域具特异性之引物进行 mRNA 之反录酶 PCR(RT-PCR) 而制备。然后可将生成之 DNA,连同编码异源多肽序列之 DNA,以可译读之方式选殖入表现载体中。本发明所使用之表现载体典型地含有复制源、位于 5'端(即其上游)之启动子、并接续编码融合蛋白质之 DNA 序列、转录终止序列及剩余之载体。该等表现载体亦可包括本技术已知之其它 DNA 序列,例如提供表现产物安定性之安定性前导序列、提供表现产物之分泌之分泌前导序列以及允许调节或诱发融合蛋白质表现之序列。表现载体亦可含有允许使用病毒表现系统,诸如本技术熟知之杆状病毒(baculovirus)表现系统,来表现融合蛋白质之病毒序列。可将表现载体引进宿主细胞,诸如微生物细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞或昆虫细胞。可将表现载体以裸 DNA 之形式引进细胞中,或者其可被包封在病毒(诸如杆状病毒)中。可将表现载体保持在宿主细胞内,或者将表现载体整合入宿主细胞基因组中。

[0066] 表现载体较佳包含能使分泌前导序列加至融合蛋白质上之 DNA 序列,藉此使得融合蛋白质分泌至环绕宿主细胞之培养基中。然后可用本技术已知之技术将融合蛋白质从培养基中纯化。举例言之,若融合蛋白质包含 IgG 以做为异源多肽,则蛋白质 A 管柱可用于结合融合蛋白质,以允许融合蛋白质与周围培养基中之其它蛋白质分离。

[0067] 融合蛋白质亦可藉由使用试管内表现系统诸如爪蟾卵母细胞表现系统,在试管中转译编码融合蛋白质之 mRNA 而制造。

[0068] 在一具体例中,融合蛋白质系分开制造,然后使用本技术已知之化学技术将该等偶合在一起。举例言之,可将碳水化合物识别区域及异源多肽分开制造,然后藉由使用戊二醛而将彼此偶合。

[0069] 制造融合蛋白质之后,融合蛋白质可用可检测之标记诸如荧光物质、放射线标记、酶、酶受质、染剂、化学发光剂、磁珠、量子点或其它任何能直接或间接产生可检测信号之部分予以标帜。本技术已知许多使此等可检测标记与蛋白质缀合之方法。举例言之,可将经 N-羟基琥珀酰亚胺活化之染料,最佳为经 N-羟基琥珀酰亚胺活化之荧光物质,藉由与融合蛋白质上之一级胺反应而与融合蛋白质缀合。

[0070] 在一些具体例中,使用本技术已知之方法将融合蛋白质生物素化,以致该融合蛋白质包含一个或多个生物素分子,或者一个或多个生物素衍生物分子。藉此方式,该融合蛋白质可附接于链霉抗生物素蛋白可检测部分缀合物,诸如酶-链霉抗生物素蛋白缀合物。

[0071] 在一系列之具体例中,本发明之融合蛋白质可被用于测定在包含多醣体之组合物中是否存在特异性碳水化合物成分。该方法涉及使多醣体与能和多醣体之特异性碳水化合

物成分结合之融合蛋白质接触,然后测定融合蛋白质是否与组合物中之多醣体结合。举例言之,已知 CLEC7A(亦称为树状细胞凝集素-1)之碳水化合物识别区域可与  $\beta$ -1,3-D-葡聚糖交互作用(参见 Brown, G. D. and Gordon, S., 2001, Nature 413, 36-7, 该文献全文以参考数据方式纳入本文)。所以包含 CLEC7A 之碳水化合物识别区域之融合蛋白质结合至多醣体组合物表示该多醣体组合物包含  $\beta$ -1,3-D-葡聚糖。同样地,既然嚙齿动物之库佛氏(Kupffer)细胞受体(KCR;与人类 CLEC4F 同源)对于 D-半乳糖及 N-乙酰基半乳糖胺具有高亲和性,并能从血清中清除以 D-半乳糖及 D-岩藻糖为终端之醣蛋白(参见 Fadden, A. J., Holt, O. J. and Drickamer, K. (2003); Glycobiology 13, 529-37, 该文献全文以参考数据方式纳入本文),包含 KCR 之碳水化合物识别区域之融合蛋白质结合至多醣体组合物表示该多醣体组合物包含 D-半乳糖或 N-乙酰基半乳糖胺或以 D-半乳糖为终端之醣蛋白或以 D-岩藻糖为终端之醣蛋白。此外,CD209(亦称为 DC-SIGN 及 CLEC4L)以及 CLEC4M(亦称为 DC-SIGNR 及 L-SIGN)皆可结合至  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$  醣肽,但只有 CD209 可结合至具有终端岩藻糖残基之聚糖,而 CLEC4M 则否(参见 Guo et al (2004) Nat Struct Mol Biol 11, 591-8);所以 CD209 及 CLEC4M 之融合蛋白质可区分包含此等碳水化合物成分之多醣体组合物。所以本发明之方法及试剂可用于鉴定多醣体组合物之碳水化合物成分以及此等碳水化合物成分之相对量,例如,以「指纹辨识(fingerprint)」多醣体组合物之独特细微特征。举例言之,本发明之方法及试剂可用于测定具有免疫调节活性之多醣体组合物之碳水化合物成分。

[0072] 此外,若已知表现融合蛋白质之碳水化合物识别区域所来自之先天性免疫受体之细胞为何种类别,则本发明之检定分析(assay)将能显示在身体内与所探讨之多醣体结合之细胞之类别。该知识,例如,有助于揭示特定多醣体组合物(诸如单离自灵芝之多醣体)对于与该多醣体接触之生物施予有利或有害作用之机制。在该具体例中,非必须知道该碳水化合物识别区域所结合之碳水化合物成分之类别。

[0073] 本发明之融合蛋白质与其同系(cognate)碳水化合物成分之结合,可藉由将包含多醣体之组合物固定于固体支撑物,然后使该固体支撑物与融合蛋白质接触而进行。融合蛋白质之结合可藉由检测在固体支撑物之表面是否存在融合蛋白质,例如,藉由检测固体支撑物之表面是否存在异源多肽或检测固体支撑物之表面是否存在碳水化合物识别区域而检测。例如,若异源多肽与荧光物质缀合,则冲洗后固体支撑物之表面存在荧光物质表示融合蛋白质存在,其最终表示存在包含由融合蛋白质之碳水化合物识别区域所识别之特异性碳水化合物成分之多醣体。

[0074] 在本文中,「固体支撑物」被界定为分子可经由共价键或非共价键附接之任何表面。该固体支撑物包括,但不限于,膜(例如,聚偏二氟乙烯(PVDF)膜)、塑料(例如微量滴定皿)、顺磁珠(paramagnetic beads)、带电纸、尼龙、Langmuir-Bodgett 薄膜、官能化玻璃、锆、硅、PTFE、聚苯乙烯、砷化镓、金及银。在本技术中任何已知之在表面能纳入胺基、羧基、硫醇基或羟基之其它材料亦可列入考虑。此包括具有任何拓朴结构之表面,该拓朴结构包括,但不限于,球表面、有沟槽表面及圆柱形表面,例如管柱。

[0075] 包含多醣体之组合物(在本文中亦称为多醣体组合物)可非限定地为包括多醣体之任何组合物,该多醣体包括,例如,醣蛋白(包括蛋白多醣(proteoglycan))、醣脂质、肽醣(peptidoglycan)、微生物细胞壁、病毒粒子及真菌细胞壁。在其它具体例中,包含多醣体

之组合物为在溶液中之游离多醣体,例如未附接于蛋白质或脂质之多醣体。在本文中,「多醣体」意指包含 2 个或 2 个以上单醣之碳水化合物分子。

[0076] 包含多醣体之组合物在固体支撑物上之固定化例如可藉由将组合物中之多醣体生物素化,然后将其固定在缀合有链霉抗生物素蛋白之固体支撑物上而达成。此外,可将多醣体固定在,例如,经甲醇活化之 PVDF 膜上。尤被列入考虑者为以「转渍」之方式进行本发明之方法,其中使用固定在 PVDF 膜上之多醣体点。

[0077] 在一些具体例中,融合蛋白质与固定之多醣体之结合可藉由下法检测:使第二试剂 (secondary reagent) 结合至融合蛋白质,较佳结合至异源多肽,继而检测第二试剂之存在。举例言之,可将生物素化融合蛋白质附接于缀合有链霉抗生物素蛋白之酶,并藉由加入能得到可检测产物之受质来检测酶之存在。未生物素化之融合蛋白质可用例如可结合至异源多肽之抗体 (若异源多肽为 IgG 或 IgG Fc,则抗体为诸如抗 -IgG 抗体) 而检测,其中二次抗体与酶缀合。举例言之,若酶为辣根过氧化酶 (HRP),则融合蛋白质结合之检测可用本技术已知之加强化学发光 (ECL) 技术进行。可将第二试剂复缀合至或改为缀合至可检测标记,诸如荧光物质或放射性核。在本技术中尚知道许多可用于检测所揭示之融合蛋白质与固体支撑物之结合之其它技术。

[0078] 尤被考虑者为上述检定分析可以多任务化数组模式进行。例如固体支撑物可被分隔成复数个空间上分离之地址,在该等地址上可结合有多个不同的组合物。然后将该固体支撑物与融合蛋白质接触并检测该融合蛋白质之结合。以此方式可以测定被固定之多醣体组合物中何者 (若有) 包含可与融合蛋白质之碳水化合物识别区域结合之特异性碳水化合物成分。

[0079] 在另一具体例中,单一组合物被固定在固体支撑物上,该固体支撑物被分隔成复数个在空间上分离之地址。各地址然后与不同的融合蛋白质接触,各不同的融合蛋白质包含不同的碳水化合物识别区域。冲洗以移除非特异性结合之材料后,然后可如上述检测融合蛋白质之结合:检测到之各结合反应之空间地址揭示所结合之融合蛋白质之类别。以此方式,可同时使用许多不同的融合蛋白质检测组合物。在该具体例中,各融合蛋白质可包含相同的异源多肽,藉此允许使用单一第二试剂同时检测在各地址之结合。例如,若各融合蛋白质包含 IgG Fc 以做为异源多肽,则可使用抗 -IgG 抗体或蛋白质 A 或蛋白质 G 检测融合蛋白质之结合。

[0080] 本发明之融合蛋白质及方法可用于「指纹辨识 (fingerprint)」任何包含多醣体之组合物之独特细微特征,该等组合物包括,但不限于得自草药制剂之多醣体组合物,诸如单离自真菌:灵芝 (*Ganoderma lucidum*)、冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 及蘑菇 (*Lentinus edodes*) 以及得自植物霍山石斛 (*Dendrobium huoshanense*) 之含多醣体部分。特定而言,尤被考虑者为使用本文所述之方法测定灵芝多醣体之 F3 多醣体部分之碳水化合物成分 (参见 Wang, et al (2002) *Bioorg Med Chem* 10,1057-62; Chen, et al (2004) *Bioorg Med Chem* 12,5595-601; Chien, et al (2004) *Bioorg Med Chem* 12,5603-9. ;以及 Hsu et al (2004) *J Immunol* 173,5989-99,各文献全文以参考数据方式纳入本文)。

[0081] 本文提供之方法可被用于指纹辨识复合物混合物之独特细微特征,该复合物混合物包括许多不同的多醣体组合物,或者可用于只含单一多醣体种类,例如单一醣蛋白或单一多醣体之制剂。

[0082] 若已知表现碳水化合物识别区域所来自之先天性免疫受体之细胞之类别,则上述检定分析将可揭示当将多醣体组合物引进体内时,体内会与多醣体结合之细胞。然后亦可能得到调节所鉴定之先天性免疫受体之活性之药剂。例如,若先天性免疫受体与多醣体之交互作用在体内造成有益之作用,则可以制造拟似该多醣体之结构或加强该多醣体与该先天性免疫受体间之交互作用之药剂。参见下文以「调节剂」为标题之段落。

[0083] 在另一系列具体例中,本发明之方法及融合蛋白质被用于测定在病原体表面展示之多醣体之类别(identity),该等病原体诸如真菌细胞、细菌细胞或病毒(诸如具套膜病毒;且病毒亦非限定性地包括来自黄热病毒科之病毒)。适用于本发明方法之黄热病毒科病毒非限定性地包括黄热病毒属成员(诸如登革热病毒(DV)、西尼罗热病毒(WNV)、日本脑脊髓炎病毒(JEV)、黄热病毒(YFV)及蜱传脑脊髓炎病毒)或肝炎病毒属成员(诸如C型肝炎病毒)。在一该具体例中,将融合蛋白质固定在固体支撑物上(例如若异源多肽为IgG或其片段,则使用由蛋白质A所衍生之固体支撑物),然后使固体支撑物与包含所探究病原体之组合物接触。冲洗后,使用例如第二试剂检测病原体之结合,该第二试剂可以不会与融合蛋白质之结合竞争之方式,与病原体特异性地结合。举例言之,可使用对病原体具特异性之二次抗体。然后第二试剂之结合可如上述检测(例如使用缀合有HRP之二次抗体)或者使用与第二试剂结合之第三试剂进行检测(举例言之,若第二试剂为抗-病原体IgG,则使用与HRP缀合之抗-IgG抗体)。若检测到二次试剂之结合,其显示该病原体包含多醣体且该多醣体包含融合蛋白质之碳水化合物识别区域所识别之特异性碳水化合物成分。

[0084] 或者,该检定分析可藉由将与病原体特异性结合之试剂固定在固体支撑物上而进行。例如将可与病原体结合之抗体固定在固体支撑物上,继而与包含病原体之组合物接触。然后使固体支撑物与融合蛋白质接触,并如上述检测融合蛋白质之结合(该融合蛋白质较佳不会和病原体竞争与固定试剂之结合)。举例言之,若融合蛋白质之异源多肽为IgG Fc,则抗-IgG抗体可检测融合蛋白质与病原体之结合;或者若融合蛋白质与可检测之标记缀合,则该标记之检测被用于检测结合。

[0085] 被经常列入考虑者为上述病原体检定分析,例如同时使用复数种不同的融合蛋白质以多重方式进行。举例言之,将可与病原体结合之抗体固定在固体支撑物上之复数个分开的地址;然后使固体支撑物与包含病原体之组合物接触;接着使各特异性地址与不同的融合蛋白质接触,各不同的融合蛋白质包含不同的碳水化合物识别区域。若各融合蛋白质包含相同的异源多肽,则融合蛋白质之结合可用能与异源多肽结合之单一试剂检测。举例言之,若异源多肽为IgG Fc,则抗-IgG抗体可被用于检测融合蛋白质之结合。各结合反应之空间地址即可揭示出融合蛋白质之种类。或者,可使用固定在固体支撑物之空间分离地址上之复数种不同融合蛋白质进行多重检定分析,其中使固体支撑物与包含病原体之组合物接触,继而使固体支撑物与能和病原体特异性结合之第二试剂接触。举例言之,若病原体为登革热病毒,则第二试剂可为对抗E套膜蛋白质之抗体。如在上述所有检定分析中者,可进行冲洗以从固体支撑物移除非特异性结合之物质。

[0086] 使用本文揭示之方法时,已发现登革热病毒会与CD14+巨噬细胞表面上之DVL1/CLEC5A结合。参见实施例11。再者,已证明DVL1/CLEC5A结合于登革热病毒造成DAP12之活化,其最终导致促发炎症性细胞激素TNF- $\alpha$ 、MIP-1 $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 及IL-8从巨噬细胞之释放。参见实施例12。此等细胞激素之释放参与出血性登革热(DHF)及登革热休克症候群(DSS)

之发展。

[0087] 根据本文揭示方法之具体例,其已明确显示 DVL1/CLEC5A 可与登革热病毒作用。参见实施例 16-18。此外,其显示 DVL1/CLEC5A 可调节 DAP12 之磷酸化作用,咸信该磷酸化作用可至少部分调节诸如 TNF- $\alpha$  之促发炎症性细胞激素的释出。参见实施例 18。当经登革热病毒感染之细胞中的 DVL1/CLEC5A 表现下降 (knock down) 时,DAP12 之磷酸化作用会降低,且包括 TNF- $\alpha$  之促发炎症性细胞激素之分泌会减少,同时并不会影响诸如干扰素 - $\alpha$  之负责进行病毒清除之细胞激素的分泌。参见实施例 18-19。根据具体例,DVL1/CLEC5A 之下降 (knock down) 可使用习知之 RNA-干扰技术完成,包括 si-RNA 及 sh-RNA 两者之使用。参见实施例 18-19。

[0088] 对于会与病原体交互作用之先天性免疫受体之类别 (identity) 之认知,继而可被用于开发能调节先天性免疫受体之活性之药剂。例如,可以获取能活化所鉴定出之先天性免疫受体之调节剂,以加强对于特定病原体之免疫反应。若先天性免疫受体与特定多醣体组合物之交互作用对于身体有害(例如当病原体引起过度发炎时),则可获取能降低先天性免疫受体之活性之调节剂。例如可使用能封阻病原体结合于先天性免疫受体之药剂(诸如抗体),以防止该病原体感染所造成之不期望促发炎症反应之发生。同样地,若本发明之筛选方法揭示特定病原体(诸如病毒)利用先天性免疫受体而获取进入细胞之管道,则封阻该病原体结合于先天性免疫受体之药剂将会防止病原体进入细胞。

[0089] 根据本文揭示方法之具体例,其显示投与能够减少可用 DVL1/CLEC5A 结合位点之干扰药剂可增加经登革热病毒感染小鼠之存活率。根据具体例,其显示投与能够干扰 DVL1/CLEC5A 与 DVL1/CLEC5A 配体结合之 DVL1/CLEC5A 抗体可增加小鼠之存活率。参见实施例 25。

[0090] 在另一系列具体例中,本发明之融合蛋白质被用于干扰或防止多醣体与细胞表面上之先天性免疫受体间之交互作用。在该系列之具体例中,融合蛋白质包含在细胞表面上表现之先天性免疫受体之碳水化合物识别区域。然后使该表现先天性免疫受体之细胞与融合蛋白质在活体内或试管中接触,藉此融合蛋白质和多醣体竞争与先天性免疫受体之结合。

[0091] 若多醣体与细胞表面上之先天性免疫受体间之交互作用对于生物产生有害的作用,可将治疗有效量之融合蛋白质以医药组合物之形式投与至生物,以防止或减轻该交互作用。所投与之融合蛋白质之异源多肽较佳不会与任何细胞表面受体结合。例如,异源多肽可包含 IgG Fc 之突变型,该突变型不会与细胞表面上之 Fc 受体结合。

[0092] 纯化

[0093] 在另一系列具体例中,融合蛋白质被用于至少部分纯化或单离包含融合蛋白质之碳水化合物识别区域所识别之特异性碳水化合物成分之多醣体。举例言之,可将融合蛋白质固定在固体支撑物上,并使疑似含有或已知含有多醣体组合物之组合物与固体支撑物接触。若该组合物包含可与融合蛋白质之碳水化合物识别区域结合之多醣体,则该多醣体会与融合蛋白质结合。然后可冲洗固体支撑物以移除组合物之非特异性结合成分,而结合之多醣体可藉由解开与融合蛋白质之交互作用而溶析,然后将其收集。举例言之,若融合蛋白质包含凝集素受体之碳水化合物识别区域,则可使用 EDTA 螯合  $\text{Ca}^{2+}$  以解开交互作用。以此方式,可以从复合物混合物纯化出特异性多醣体组合物。在较佳具体例中,其使用该方法纯

化单离自灵芝之多醣体。

[0094] 就上述纯化方法而言,该固体支撑物可包含例如结合有融合蛋白质之管柱。适当的管柱包括琼脂糖 (Sephарose) 蛋白质 A 管柱,其中包含 IgG 以做为异源多肽之融合蛋白质可经由融合蛋白质之 IgG 区域与蛋白质 A 之交互作用而结合在该管柱上。或者,可以经 CNBr 活化之管柱介质而与融合蛋白质结合。

[0095] 本发明亦提供可用于上述方法之任一者之套组。在一具体例中,套组包含本发明之融合蛋白质,其装在一个或多个容器中。该套组亦可包含第二试剂,诸如与融合蛋白质之异源多肽区域特异性结合之抗体,举例言之,若异源多肽为 IgG 或其片段,该第二试剂为抗 -IgG 抗体。该套组亦可包含检测融合蛋白质与多醣体结合用之试剂及缓冲液。例如,在使用缀合有 HRP 之二次抗体检测融合蛋白质与多醣体之结合之具体例中,该套组可包含建立增强之化学发光反应所需之试剂,例如一个或一个以上容器包含鲁米诺 (luminol)、对 - 香豆酸 (p-coumaric acid)、Tris 缓冲液及过氧化氢。该套组亦可包含一个或一个以上阳性对照多醣体。该套组亦可包含一个或一个以上用于上述方法之固体支撑物,例如,一个或一个以上 PVDF 膜或者一个或一个以上多孔微量滴定平皿。

#### [0096] 调节剂

[0097] 如上述,本发明之方法鉴定出会与特定多醣体交互作用之先天性免疫受体。该等数据使吾等得以得到所鉴定出之先天性免疫受体之调节剂。调节剂可为先天性免疫受体之催动剂、拮抗剂 (包括竞争性或非竞争性拮抗剂) 或逆向催动剂。调节剂可 (但非限于此) 抑制多醣体与先天性免疫受体之结合;加强多醣体与先天性免疫受体之结合;或者做为可与先天性免疫受体结合之多醣体之拟似剂,藉此甚至在缺乏多醣体时亦可活化先天性免疫受体。

[0098] 先天性免疫受体之调节剂包括抗体。举例言之,对抗先天性免疫受体之拮抗性抗体可防止病原体与先天性免疫受体之结合。在一些情况,该抗体为中和抗体,因其会防止病原体进入表现该先天性免疫受体之细胞。或者,催动性抗体可做为对于细胞施予有益作用之多醣体组合物之拟似物。拮抗性抗体与先天性免疫受体之结合方式亦可封阻受体于病原体结合时所进行之下游信号传导。抗体可为 (但非限于此) 多株抗体、单株抗体、单价抗体、双特异性抗体、杂缀合型抗体、多特异性抗体、人类抗体、人型化抗体或嵌合抗体;单链抗体;Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、由 Fab 表现库产生之片段;抗基因型 (anti-idiotypic, anti-Id) 抗体;以及上述抗体之任一种之抗原决定部位-结合性片段。本文所用之术语「抗体」系指免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子之免疫活性部分,亦即含有可与抗原免疫特异性地结合之抗原结合部位之分子。该免疫球蛋白分子可为免疫球蛋白分子之任何类型 (例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 及 IgY)、类别 (例如、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2) 或亚类。再者,术语「抗体」(Ab) 或「单株抗体」(Mab) 意欲包括完整的分子以及能与蛋白质特异性地结合之抗体片段 (诸如 Fab 及 F(ab')<sub>2</sub> 片段)。Fab 及 F(ab')<sub>2</sub> 片段缺乏完整抗体之 Fc 片段,因而可较快速地从动物或植物之循环清除,且其与完整的抗体相较,具有较少的非特异性组织结合性 (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24 :316-325(1983))。制造抗体催动剂之方法例如记载于 PCT 公开号 WO 96/40281;美国专利第 5,811,097 号;Deng et al., Blood 92(6):1981-1988(1998);Chen et al., Cancer Res. 58(16):3668-3678(1998);Harrop et al., J. Immunol. 161(4):1786-1794(1998);Zhu et al., Cancer Res. 58(15):

3209-3214(1998); Yoon et al., J. Immunol. 160(7):3170-3179(1998); Prat et al., J. Cell. Sci. 111(Pt2):237-247(1998); Pitard et al., J. Immunol. Methods 205(2):177-190(1997); Liautard et al., Cytokine 9(4):233-241(1997); Carlson et al., J. Biol. Chem. 272(17):11295-11301(1997); Taryman et al., Neuron 14(4):755-762(1995); Muller et al., Structure 6(9):1153-1167(1998); Bartunek et al., Cytokine 8(1):14-20(1996); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981) (所有文献全文以参考数据之方式纳入本文)。

[0099] 本发明提供可在 DV 感染后防止 TNF- $\alpha$  从巨噬细胞释出之抗 -DVL1/CLEC5A 单株抗体之非限定特异性实施例。参见实施例 15。此等抗体可用于本文所指定之医药组合物及治疗方法, 尤其是用于治疗或预防人类 DV 感染之组合物及方法。

[0100] 本发明亦提供可在 DV 或 JEV 感染后防止 TNF- $\alpha$  从巨噬细胞释出之人型化抗 -DVL1/CLEC5A 抗体。参见实施例 20-26。在特定具体例中, 该人型化抗体系选自由人型化抗体 9B12、3E12A2、3E12C1、3E12G9、及 8H8F5 所组成之群。此等抗体可用于本文所指定之医药组合物及治疗方法, 尤其是用于治疗或预防人类 DV 感染之组合物及方法。特定之治疗包括抑制 DV- 诱发性血浆渗漏以及皮下及生命器官 (vital organ) 出血。该等人型化抗体可作为 DV- 诱发性出血休克及败血症之治疗方法。尤被考虑者, 本文所述有关由病毒所造成之细胞激素刺激减轻可应用于所有可结合并调节细胞之刺激性受体的病毒。

[0101] 再者, 病毒之发现及治疗原则可以类似方式延伸至细胞侵入受体以及细菌、真菌、及寄生物之作用。本发明之方法将可使一般精于本技术者能够判断病原体之结合特性 (亦即, 其与何种受体结合), 判断与该受体之结合具有何种作用, 并提供诸如抗体之干扰剂以干扰病原体结合目标受体之能力。

[0102] 根据具体例, 藉由融合小鼠脾细胞及 NS1 骨髓配对细胞而产生之单株抗体 (mAbs) 抗 -DVL1/CLEC5A mAb 可以噬菌体展示技术产生, 以产生单链人类抗 - 人类 DVL1/CLEC5A mAbs。催化性及拮抗性 mAbs 可根据实例 19-25 所揭示之筛选方法而选择。

[0103] 为降低现有小鼠抗 - 人类 DVL1/CLEC5A mAbs 之抗原性, 根据具体例, 以人类免疫球蛋白 G1 (IgG1) 取代野生型 Fc 部分。为进一步废除 Fc 与 Fc 受体之结合并防止补体活化, 可使用人类 IgG1 之突变 Fc 片段 (L234A、L235E、G237A、及 P331S) 取代野生型 Fc 部分以产生人型化 mAbs。为进一步降低抗原性, 可以人类序列取代抗体 V 区域之框架区域。

[0104] 先天性免疫受体之调节剂亦包括由高通量筛选方法所鉴定出之小分子。该高通量筛选方法典型地提供含有大量潜在治疗化合物 (例如配体或调节剂化合物) 之组合化学品或肽库。然后在一个或一个以上检定分析中筛选该等组合化学品库或配位体库, 以鉴定出此等可与所探究之先天性免疫受体结合之库成员 (例如特定的化学品种类或亚类)。如此鉴定出之化合物可做为习知之引导化合物 (lead compound), 或者本身可做为潜在的或实际的治疗剂。

[0105] 组合化学品库为藉由化学合成或生物合成, 或者藉由组合许多化学建构基块 (即试剂, 诸如氨基酸) 所产生之在化学上分歧之化合物之集合物。举例言之, 线性组合库, 例如多肽或肽库, 藉由以对既定化合物长度 (即多肽或肽化合物中氨基酸之数目) 而言每

种可能的方式,组合一套化学建构基块而形成。数以百万计之化合物可经由组混化学建构基块而合成。

[0106] 组合化学品库之制备及筛选为精于相关技术者所熟知。该组合库包括,但非限于肽库(例如美国专利第 5,010,175 号;Furka,1991, Int. J. Pept. Prot. Res.,37,487-493;以及 Houghton et al.,1991, Nature,354 :84-88)。亦可使用其它产生化学上分歧之化学品库之化学方法。化学上分歧之化学品库之化学类别之非限定性例子包括肽(PCT 公开号 WO 91/019735),经编码之肽(PCT 公开号 WO 93/20242),随机生物寡聚物(PCT 公开号 W092/00091),苯并二吡啶类(benzodiazepines)(美国专利第 5,288,514 号),分歧异构物(diversomers)诸如海因类(hydantoins)、苯并二吡啶类(benzodiazepines)及二肽类(Hobbs et al.,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,90 :6909-6913),类乙烯多肽(Hagihara et al.,1992, J. Amer. Chem. Soc.,114 :6568),具葡萄糖框架(glucose scaffolding)之非肽类拟肽(Hirschmann et al.,1992, J. Amer. Chem. Soc.,114 :9217-9218),小型化合物库(Chen et al.,1994, J. Amer. Chem. Soc.,116 :2661),寡聚胺基甲酸酯(Cho et al.,1993, Science,261 :1303),及/或膦酸肽酯(Campbell et al.,1994, J. Org. Chem.,59 :658)之类似有机合成,核酸库(例如参见美国专利第 5,270,163 号,其述及核酸配体(亦称为“aptamers”)之产生),肽-核酸库(美国专利第 5,539,083 号),抗体库(例如 Vaughn et al.,1996, Nature Biotechnology,14(3) :309-314)及 PCT/US96/10287),碳水化合物库(例如参见 Liang et al.,1996, Science,274-1520-1522)及美国专利第 5,593,853 号),小型有机分子库(例如,苯并二吡啶类, Baum C&EN, Jan. 18,1993, page 33;以及美国专利第 5,288,514 号;类异戊二烯类,美国专利第 5,569,588 号;噻唑啉酮类(thiazolidinones)及间全氢噻口井酮类(metathiazanones),美国专利第 5,549,974 号;吡咯啉类(pyrrolidines),美国专利第 5,525,735 号及第 5,519,134 号;吗啉类化合物,美国专利第 5,506,337 号;以及类似者)。

[0107] 制备组合库之装置可从市面购得(例如 357MPS,390MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky.;Symphony, Rainin, Woburn, Mass.;433 AApplied Biosystems, Foster City, Calif.;9050Plus, Millipore, Bedford, Mass.)。此外,许多组合库可从市面购得(例如, ComGenex, Princeton, N. J.;Asinex, Moscow, Russia;Tripos, Inc., St. Louis, Mo.;ChemStar, Ltd., Moscow, Russia;3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.;Martek Biosciences, Columbia, Md.,以及类似者)。

#### [0108] 医药组合物

[0109] 本发明亦提供医药组合物。在一些具体例中,医药组合物包含本发明之融合蛋白质。在其它具体例中,医药组合物包含先天性免疫受体之调节剂(例如对抗先天性免疫受体诸如 DVLRI/CLEC5A 之抗体,包括实施例 15 所例示之抗体)。在该等医药组合物中,融合蛋白质或先天性免疫受体调节剂构成「活性化合物」。在一些具体例中,其将医药组合物投与至病患,以治疗或预防以多醣体结合至病患细胞表面之先天性免疫受体为特征之疾病或失调。在其它具体例中,其系于增加先天性免疫受体之活性对于病患有帮助之情况,将该等医药组合物投与至病患以活化该先天性免疫受体。在另一些具体例中,其将医药组合物投与至病患,以加强多醣体组合物与先天性免疫受体之结合。

[0110] 医药组合物除了包含活性化合物之外,较佳复包含至少一种医药上可接受之载

剂。本文所用之术语「医药上可接受之载剂」包括与医药投与相容之溶剂、分散体介质、包衣、抗细菌剂及抗真菌剂、等张剂及吸收延迟剂以及类似物。亦可将辅助的活性化合物纳入组合物中。将医药组合物调配成与其意欲的投与途径兼容。投与途径之例子包括肠道外投与,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、穿皮(外用)、穿黏膜及直肠投与。用于肠道外、皮内或皮下投与之溶液或悬浮液可包括下列成分:无菌稀释液诸如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂诸如苯醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲液诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及等张性调整剂诸如氯化钠或葡萄糖。pH值可用酸或碱诸如盐酸或氢氧化钠调整。肠道外制剂可密封在玻璃或塑料制之安瓿、可抛弃式注射筒或多剂量小瓶中。

[0111] 本文中用之术语「病患」系指人类及非人类灵长类(例如猩猩、猕猴、狨猴),家畜(例如绵羊、牛、马、驴子、猪),宠物(例如狗、猫),实验室试验动物(例如小鼠、兔子、大鼠、天竺鼠、仓鼠),圈养之野生动物(例如狐狸、鹿)以及任何可从本发明药剂获益之其它生物。对于可从本文所述之药剂获益之动物类型没有限制。在本发明中最佳之病患为人类。不论是人类或非人类生物皆可被称为病患(patient)、个体(individual)、动物、宿主(host)或接受者(recipient)。

[0112] 适合注射用之医药组合物包括无菌水溶液(在可溶于水之情况)或分散体以及无菌注射溶液或分散液之实时调配制剂用之无菌粉末。就静脉内投与而言,适当的载剂包括生理食盐水、抑菌水、Cremophor EL. TM. (BASF, Parsippany, N. J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况,组合物必须为无菌以及具有某种程度之流体性,以易于注射。组合物在制造及贮存条件下应当安定且必须对抗微生物诸如细菌及真菌之污染作用而进行防腐。载剂可为溶剂或分散体介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液体聚乙二醇以及类似物)以及其适当的混合物。适当的流体性例如可以藉由使用涂膜诸如卵磷脂而维持,在分散体之情况藉由保持所需之粒度而维持以及藉由使用界面活性剂而维持。防止微生物之作用可藉由各种抗细菌剂及抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗坏血酸、乙汞硫柳酸钠(thimerosal)及类似物而达成。在许多情况,组合物较佳包括等张剂,例如,糖、多元醇诸如甘露醇及山梨醇、或氯化钠。可注射组合物之延长吸收可藉由在组合物中包括延迟吸收之药剂例如单硬脂酸铝及明胶而达成。

[0113] 无菌注射溶液可藉由将所需量之活性化合物引进适当的溶剂中,视需要同时引进上文列举之成分之一种或组合物,继而过滤灭菌而制备。一般而言,分散液藉由将活性化合物引进无菌载剂而制备,该无菌载剂含有基本分散介质及上文列举者中之所需其它成分。制备无菌注射溶液所用之无菌粉末之情况,较佳之制备方法为真空干燥及冷冻干燥,其可从先前经无菌过滤之溶液得到活性成分加上任何其它期望成分之粉末。

[0114] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用之载剂。就口服治疗投与之目的而言,活性化合物可与赋形剂混合并以锭剂、含锭或胶囊剂(例如明胶胶囊剂)之形式使用。口服组合物亦可用流体载剂制备,以做为漱口水。医药兼容性结合剂或佐剂物质可被纳入做为组合物之一部分。锭剂、丸剂、胶囊剂、含锭剂及类似制剂可含有下列成分之任一种或具有相似性质之化合物:黏合剂诸如微晶形纤维素、西黄耆胶或明胶;赋形剂诸如淀粉或半乳糖;崩散剂诸如藻胶酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂诸如硬脂酸镁或Sterotes;滑剂诸

如胶体二氧化硅；甜味剂诸如蔗糖或糖精；或调味剂诸如薄荷 (peppermint)、水杨酸甲酯或橙类调味剂。

[0115] 就藉由吸入之投与而言，化合物以气溶胶喷雾剂 (aerosol spray) 之形式从含有适当推进剂 (例如气体诸如二氧化碳) 之加压容器或分配器输出，或由雾化器 (nebulizer) 输出。

[0116] 全身性投与亦可经由穿过黏膜 (transmucosal) 或穿皮投与。就穿过黏膜或穿皮投与而言，在调配物中使用适于透过障壁之渗透剂。此等渗透剂在本技术中为众所周知，例如就穿过黏膜投与而言，包括清洁剂、胆盐及褐霉酸 (fusidic acid) 衍生物。穿过黏膜投与可经由使用鼻喷雾剂或栓剂而达成。就穿皮投与而言，活性化合物被调配成本技术所周知之软膏、油膏、凝胶或乳霜。

[0117] 该等化合物亦可被制成供直肠输送用之栓剂 (例如使用习用之栓剂基剂诸如可可油脂及其它甘油酯) 或滞留性灌肠剂。

[0118] 在一具体例中，活性化合物藉由使用能保护该化合物使其免于从身体快速清除之载剂，而制备成例如控制释放调配物，该控制释放调配物包括植入物、显微包胶输送系统。可以使用生物可降解、生物相容性聚合物诸如乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、聚酸酐、聚羧乙酸、胶原、聚原酯 (polyortho-ester) 及聚乳酸。该等调配物之制法对精于本技术者而言为显而易见。该等物质亦可从 Alza 公司及 Nova 药品公司获得。微脂粒悬浮液 (包括具有针对细胞-特异性抗原之单株抗体而可标定于感染细胞之微脂粒) 亦可被用做医药上可接受之载剂。此等微脂粒悬浮液可依照精于本技术者已知之方法制备，例如美国专利第 4, 522, 811 号所述者。

[0119] 将口服或肠道外组合物调配成单位剂型系为有利，因为便于投与及剂量均匀。本文所称之「单位剂型」系指适于做为待治疗病人之单位剂量之物理上分离之单位；各单位含有经计算能产生期望治疗作用之预定量活性化合物以及所需之医药载剂。

[0120] 该等化合物之毒性及治疗效力可在细胞培养物或实验动物中藉由标准医药方法测定，例如测定 LD50 (使群体之 50% 死亡之剂量) 以及 ED50 (在 50% 群体中治疗有效之剂量)。毒性作用与治疗作用间之剂量比称为治疗指数且系以 LD50/ED50 比表示。以显示高治疗指数之化合物为较佳。虽然可以使用显示毒性副作用之化合物，但应小心设计将该等化合物标定于受犯组织部位之输送系统，以使对于未感染细胞之潜在伤害减至最低，藉此减少副作用。

[0121] 从细胞培养物检定分析及动物研究得到之数据可用于调配某范围之剂量以供病患使用。该等化合物之剂量较佳在包括 ED50 且引起极微或未引起毒性之循环浓度范围内。剂量可在该范围内，视所用剂型及投与途径而变化。对于本发明方法所用之任何化合物而言，治疗有效剂量初始可从细胞培养物检定分析评估。在动物模型中调制能达到包括 IC50 (即受试化合物达到症状之最大抑制之一半之浓度，该 IC50 如在细胞培养物中测得者) 之循环血浆浓度范围之剂量。该数据可被用于更精确地测定在病患中之有用剂量。血浆浓度例如可藉由高效液相层析测量。

[0122] 如在本文中所定义，本发明之活性化合物之治疗有效量可为约 0.001 至 30 毫克/公斤体重，较佳约 0.01 至 25 毫克/公斤体重，更佳约 0.1 至 20 毫克/公斤体重，甚至更佳约 1 至 10 毫克/公斤，2 至 9 毫克/公斤，3 至 8 毫克/公斤，4 至 7 毫克/公斤，或者 5 至

6 毫克 / 公斤体重。活性化合物可以每星期 1 次至每天 3 次或 3 次以上之频率投与, 总计投与约 1 至 10 星期, 较佳 2 至 8 星期, 更佳约 3 至 7 星期, 甚至更佳约 4、5 或 6 星期, 但非限于此。精于本技术人士当了解某些因子会影响有效治疗病患所需之剂量及给药时间, 该等因子包括, 但不限于, 疾病或失调之严重度、先前之治疗、病患之一般健康状况或年龄以及其它存在之疾病。再者, 病患以治疗有效量之本发明医药组合物之治疗可包括单一治疗或较佳包括一系列之治疗。

#### [0123] 基因治疗及 RNAi

[0124] 编码本发明之融合蛋白质之构筑体可被用作基因治疗规程之一部分, 以将治疗有效剂量之受体融合蛋白质输送至病患。在活体中将核酸引进细胞之较佳途径为藉由使用含有编码本发明之融合蛋白质之核酸之病毒载体。以病毒载体感染细胞具有下述优点: 高比例之标定细胞可接受核酸。此外, 病毒载体中所编码之分子, 例如藉由病毒载体所含之 cDNA 所编码之分子, 在摄入病毒载体核酸之细胞中能有效率地表现。

[0125] 反录病毒 (retrovirus vectors) 及腺病毒相关性病毒载体可做为在活体中移转编码融合蛋白质之外源核酸分子之重组基因输送系统。此等载体将核酸有效率地输送入细胞中且所移转之核酸被安定地整合入宿主之染色体 DNA 中。只制造复制 - 缺陷型反录病毒之特异化细胞系 (称为「套装细胞」) 之开发使反录病毒在基因治疗之利用性上更为增加, 且缺陷型反录病毒经特征定性而应用于基因治疗目的之基因转移中 (该法之评介可参考 Miller, A. D. (1990) Blood 76 :271)。复制用缺陷型病毒可被组装入病毒粒子中, 该病毒粒子可藉由标准技术及使用辅助病毒感染标定细胞。产生重组反录病毒之规程以及在试管中或活体中用该等病毒感染细胞之规程可记载于分子生物学之现有规程 (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14) 以及其它标准实验室手册中。

[0126] 另一有用的病毒基因输送系统系使用衍生自腺病毒之载体。可将腺病毒之基因组加以处理, 以致其编码及表现所探讨之基因产物, 但在正常溶裂病毒生命循环中之复制能力则丧失。例如参见 Berkner et al., BioTechniques 6 :616(1988); Rosenfeld et al., Science 252 :431-434(1991); 以及 Rosenfeld et al., Cell 68 :143-155(1992)。衍生自腺病毒 Ad 株 5 型 d1324 或腺病毒之其它株之适当腺病毒载体 (例如 Ad2, Ad3, Ad7 等) 为精于本技术者所已知。重组腺病毒在某些情况下为有利, 因其不会感染未分裂细胞且可被用于感染广泛种类之细胞类型, 包括上皮细胞 (Rosenfeld et al., (1992), 如上文所引用者)。再者, 该病毒粒子相对安定及可进行纯化及浓缩, 且如上述可加以修改, 以影响感染力之范围。此外, 引进之腺病毒 DNA (以及其所含之外来 DNA) 未被整合入宿主细胞之基因组而保持为游离基因体 (episomal), 藉此可避免引进之 DNA 整合入宿主基因组 (例如反录 DNA) 时于整合位置发生插入性突变所引起之潜在问题。再者, 腺病毒基因组携带外来 DNA 之能力比其它基因输送用载体大 (高达 8 仟碱基) (Berkner et al., 上文所引用者; Haj-Ahmand et al., J. Virol. 57 :267(1986))。

[0127] 在另一具体例中, 本发明之非病毒基因输送系统依赖细胞吞噬途径 (endocytic pathways) 而使标定细胞摄入目标核苷酸分子。例示之此型基因输送系统包括衍生自微脂粒之系统、聚离胺酸缀合物及人造病毒套膜。在代表性具体例中, 编码本发明之融合蛋白质之核酸分子可封入表面带正电之微脂粒 [例如亲脂质 (lipofectins)] 中且 (视需要) 核酸

分子可用对抗目标组织之细胞表面抗原之抗体加以标记 (Mizuno et al. (1992) No Shinkei Geka20 :547-551 ;PCT 公开 W091/06309 ;日本专利申请案第 1047381 号 ;以及欧洲专利公开 EP-A43075)。

[0128] 编码本发明融合蛋白质之基因所用之基因输送系统可藉由许多方法之任一者引进病患中。举例言之,基因输送系统之医药制剂可全身性地,例如藉由静脉注射引进,而在目标细胞中蛋白质之特异性转导主要系基于基因输送载体所提供之特异性转染、由转录调节序列控制之受体基因表现所造成之细胞型或组织型表现、或其组合。在其它具体例中,重组基因之初始输送较为局限,在动物中之引进十分局部化。举例言之,基因输送载体可经由导管(参见美国专利第 5,328,470 号)或经由立体定向注射(例如 Chen et al. (1994) PNAS 91 :3054-3057) 引进。基因治疗构筑体之医药制剂可主要由在可接受稀释剂中之基因输送系统组成,或者可包含包埋有基因输送载剂之缓释基质。在融合蛋白质可由重组细胞例如反录病毒载体完整产生之情况,医药组合物可包含一种或一种以上会产生融合蛋白质之细胞。

[0129] 在另一具体例中,使用 RNA 干扰 (RNAi) 降低或完全抑制先天性免疫受体之表现,其中该先天性免疫受体依照本文揭示之方法被鉴定为参与致病过程。RNAi 为本技术所熟知且可藉由使用小型干扰性 RNA (siRNA) 达成。依照本发明之 siRNAs 具有达 29bps、25bps、22bps、21bps、20bps、15bps、10bps、5bps 或在上述数值附近或之间之任何整数。该等 siRNAs 可以例如载体(例如编码小型发夹状 RNA (shRNA) 之载体)所编码之形式或以微脂粒核酸复合物投与。脂质:核酸复合物(包括标定之微脂粒诸如免疫脂质复合物)之制备为精于本技术者所熟知(例如参见 Crystal, Science270 :404-410(1995);Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2 :291-297(1995);Behr et al., Bioconjugate Chem. 5 :382-389(1994);Remy et al., Bioconjugate Chem. 5 :647-654(1994);Gao et al., Gene Therapy 2 :710-722(1995);Ahmad et al., Cancer Res. 52 :4817-4820(1992);美国专利第 4,186,183 号、第 4,217,344 号、第 4,235,871 号、第 4,261,975 号、第 4,485,054 号、第 4,501,728 号、第 4,774,085 号、第 4,837,028 号及第 4,946,787 号)。所以,本发明亦提供包含 RNA 分子之医药组合物,该 RNA 当投与至病患时,能媒介先天性免疫受体之 RNA 干扰。

[0130] 根据具体例,本文提供在巨噬细胞中由 RNAi 所媒介之 DVL1/CLEC5A 基因表现下降 (knock down) 的非限定性实例。以此方式产生之 DVL1/CLEC5A 减活 (attenuation) 显著降低感染登革热病毒 (DV) 之巨噬细胞中促发炎症细胞激素之分泌,因而表示 RNAi 所媒介之 DVL1/CLEC5A 减活在治疗登革热病毒上有用。

[0131] 减少 DVL1/CLEC5A 表现之 siRNA 或 shRNA 被特别考虑用于登革热患者之 RNAi-媒介治疗。设计、合成及投与 shRNA 及 siRNA 以减少特异性基因表现之方法为本技术所熟知且记载于,例如,美国专利第 7,022,828 号。适于与本发明之 shRNA 构筑体及 siRNA 分子一起调配之药剂之非限定性例子包括:与 PEG 缀合之核酸、与磷脂缀合之核酸、含有亲脂部分之核酸、硫代磷酸酯 (phosphorothioates)、P- 糖蛋白抑制剂(诸如 Pluronic P85) [其可促进药物进入各种组织,例如 CNS (Jolliet-Riant and Tillement, 1999, Fundam. Clin. Pharmacol., 13, 1626)];生物可降解聚合物,诸如植入后持续释放输送用之聚 (DL- 丙交酯 - 乙交酯) 微球囊 (Emerich, DF et al, 1999, Cell Transplant, 8, 4758) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; 以及有负载之奈米粒子诸如由聚氰基丙烯酸丁酯制成者,其可将

药物输送通过血脑障壁且可改变神经元摄取机制 (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941949, 1999)。输送手段 (包括本发明之核酸分子之 CNS 输送) 之其它非限定性例子包括下列文献所述之材料: Boado et al., 1998, J. Pharm. Sci., 87, 1308 1315; Tyler et al., 1999, FEBS Lett., 421, 280 284; Pardridge et al., 1995, PNAS USA., 92, 55925596; Boado, 1995, Adv. Drug Delivery Rev., 15, 73107; Aldrian-Herrada et al., 1998, Nucleic Acids Res., 26, 49104916; 及 Tyler et al., 1999, PNAS USA., 96, 70537058。所有此等文献以参考数据方式纳入本文。此外, 包含表面经修改之微脂粒之组合物, 其中该表面经修改之微脂粒含有聚(乙二醇)脂质, 即经 PEG 修改或长时间循环之微脂粒或长命微脂粒 (stealth liposomes), 亦可与本发明之核酸合用。本发明之核酸分子亦包含共价连接之具有各种分子量之 PEG 分子。此等调配物提供在目标组织中增加药物蓄积之方法。该类药物载剂可阻止药物被单核吞食系统 (MPS 或 RES) 调理 (opsonization) 及清除, 藉此使得经包纳之药物在血液循环中之时间增长及组织暴露增加 (Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601 2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 10051011)。已证明该等微脂粒会选择性地蓄积在肿瘤中, 此可能系经由在血管新生化目标组织中之血管外渗及摄取而产生 (Lasic et al., Science 1995, 267, 12751276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 8690)。长时间循环微脂粒, 尤其当与已知会蓄积在 MPS 组织中之习知阳离子性微脂粒相较时, 会促进 DNA 及 RNA 之药品动力及药品静力性质 (Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 2486424870; Choi et al., 国际 PCT 公开号 W096/10391; Ansell et al., 国际 PCT 公开号 W0 96/10390; Holland et al., 国际 PCT 公开号 W0 96/10392; 所有此等文献皆以参考数据方式纳入本文)。长时间循环微脂粒由于能避免蓄积在代谢旺盛之单核吞食系统 (MPS) 组织诸如肝及脾, 因此与阳离子性微脂粒相较, 对于药物可能有较大的保护作用, 使其免于被核酸酶降解。

[0132] 实施例

[0133] 本发明藉由下列非限定性实施例进一步说明:

[0134] 实施例 1: 先天性免疫受体: Fc 融合蛋白质之制备

[0135] 细胞培养物

[0136] 将 293F 细胞 (Invitrogen, R790-07) 在置于回转式振荡器 (125rpm) 上之 125mL 烧瓶内, 于不含血清之 293FREESTYLE 203 表现培养基 (Invitrogen, 12338-018) 中, 于 37°C 在 CO<sub>2</sub> 培育器内培养。

[0137] 受体 Fc 融合基因之构筑

[0138] 凝集素受体之细胞外区域, TREMs 及 TLTs, 藉由反录酶聚合酶连锁反应 (RT-PCR) 选殖, 继而次选殖入 yT&A 载体, 然后选殖入 pcDNA3.1(+)-hIgG1.Fc 表现载体。生成之受体.Fc 构筑体编码与经突变之人类 IgG1Fc 部分 (其不会与人类 Fc 受体结合) 融合之重组蛋白质。在 IgG1Fc 部分中之突变为 L234A、L235E、G237A 及 P331S。用于以 RT-PCR 扩增细胞外区域之引物之序列如下 (或者可自表 2 所列之序列选择引物):

[0139] CLEC1A/CLEC-1

[0140] 意义引物

[0141] 5' -GAATCCTTTCAGTACTACCAGCTCTCC-3'

[0142] 序列编号: 1

- [0143] 反义引物  
[0144] 5' -GAATTCTCAGTCACCTTCGCCTAATGT-3'  
[0145] 序列编号 :2  
[0146] CLEC1B/CLEC-2  
[0147] 意义引物  
[0148] 5' -GGATCCCTGGGGATTTGGTCTGTC-3'  
[0149] 序列编号 :3  
[0150] 反义引物  
[0151] 5' -GAATTCTTAAGGTAGTTGGTCCAC-3'  
[0152] 序列编号 :4  
[0153] CLEC2B/AICL  
[0154] 意义引物  
[0155] 5' -GGATCCTCTCAGAGTTTATGCCCC-3'  
[0156] 序列编号 :5  
[0157] 反义引物  
[0158] 5' -GGATCCCCCATTATCTTAGACAT-3'  
[0159] 序列编号 :6  
[0160] CLEC4A/DCIR  
[0161] 意义引物  
[0162] 5' -GGATCCTTTCAAAAATATTCTCAGCTT CTT-3'  
[0163] 序列编号 :7  
[0164] 反义引物  
[0165] 5' -GAATTCTCATAAGTGGATCTTCATCATC-3'  
[0166] 序列编号 :8  
[0167] CLEC4C/BDCA-2  
[0168] 意义引物  
[0169] 5' -GGATCCTTTATGTATAGCAAACTGTCAAG-3'  
[0170] 序列编号 :9  
[0171] 反义引物  
[0172] 5' -GAATTCTTATATGTAGATCTTCTTCATCTT-3'  
[0173] 序列编号 :10  
[0174] CLEC4D/CLEC-6  
[0175] 意义引物  
[0176] 5' -GAATCCCATCACAACTTTTCACGCTGT-3'  
[0177] 序列编号 :11  
[0178] 反义引物  
[0179] 5' -GAATTCCTAGTTCAATGTTGTTCCAGG-3'  
[0180] 序列编号 :12  
[0181] CLEC4E/MINCLE

- [0182] 意义引物
- [0183] 5' -GAAGATCTACATTTTCGCATCTTTCAAACC-3'
- [0184] 序列编号 :13
- [0185] 反义引物
- [0186] 5' -GCGGTTAAAGAGATTTTCCTTTGTTCA-3'
- [0187] 序列编号 :14
- [0188] CLEC4K/ 郎罕细胞特异蛋白
- [0189] 意义引物
- [0190] 5' -GGATCCCGGTTTATGGGCACCATA-3'
- [0191] 序列编号 :15
- [0192] 反义引物
- [0193] 5' -GGATCCTCACGGTTCTGATGGGAC-3'
- [0194] 序列编号 :16
- [0195] CLEC4L/DC-SIGN
- [0196] 意义引物
- [0197] 5' -GGATCCAAGGTCCCCAGCTCCATAAG-3'
- [0198] 序列编号 :17
- [0199] 反义引物
- [0200] 5' -GAATTCCTACGCAGGAGGGGGGT-3'
- [0201] 序列编号 :18
- [0202] CLEC4M/DC-SIGNR/L-SIGN
- [0203] 意义引物
- [0204] 5' -GGATCCTCCAAGGTCCCCAGCTCC-3'
- [0205] 序列编号 :19
- [0206] 反义引物
- [0207] 5' -GAATTCCTATTCGTCTCTGAAGCAGG-3'
- [0208] 序列编号 :20
- [0209] DLVR1/CLEC5A (MDL-1)
- [0210] 意义引物
- [0211] 5' -AGATCTAGTAACGATGGTTTCACCAC-3'
- [0212] 序列编号 :21
- [0213] 反义引物
- [0214] 5' -GAATTCCTGTGATCATTGGCATTCTT-3'
- [0215] 序列编号 :22
- [0216] CLEC6A/ 树状细胞凝集素 -2
- [0217] 意义引物
- [0218] 5' -GGATCCACATATGGTGAAACTGGC-3'
- [0219] 序列编号 :23
- [0220] 反义引物

- [0221] 5' -GAATTCATCAGTCGATGGGC-3'  
[0222] 序列编号 :24  
[0223] CLEC7A/ 树状细胞凝集素 -1  
[0224] 意义引物  
[0225] 5' -GGATCCACCATGGCTATTTGGAGATCC-3'  
[0226] 序列编号 :25  
[0227] 反义引物  
[0228] 5' -GAATCCTTACATTGAAACTTCTTCTCACA-3'  
[0229] 序列编号 :26  
[0230] CLEC10A/ML2  
[0231] 意义引物  
[0232] 5' -GGATCCTCCAAATTTTCAGAGGGACCTG-3'  
[0233] 序列编号 :27  
[0234] 反义引物  
[0235] 5' -GAATTCCTCAGTGACTCTCCTGGCTG-3'  
[0236] 序列编号 :28  
[0237] CLEC12A/CLL-1  
[0238] 意义引物  
[0239] 5' -GGATCCGTAACCTTTGAAGATAGAAATGAAA-3'  
[0240] 序列编号 :29  
[0241] 反义引物  
[0242] 5' -GAATCCTCATGCCTCCCTAAAATATGTA-3'  
[0243] 序列编号 :30  
[0244] CLEC13A/BIMLEC  
[0245] 意义引物  
[0246] 5' -GGATCCTCATGCTCCGGGCCGCG-3'  
[0247] 序列编号 :31  
[0248] 反义引物  
[0249] 5' -GAATTCGCTAGCAATCACCAATGCTGA-3'  
[0250] 序列编号 :32  
[0251] COLEC12/CL-P1  
[0252] 意义引物  
[0253] 5' -AGAGGTGACAGAGGATCCCA-3'  
[0254] 序列编号 :33  
[0255] 反义引物  
[0256] 5' -GAATTCGTGATCCCATCACAGTCC-3'  
[0257] 序列编号 :34  
[0258] MAFA-L/KLRG-1  
[0259] 意义引物

[0260] 5' -GGATCCTGCCAGGGCTCCAAC-3'

[0261] 序列编号 :35

[0262] 反义引物

[0263] 5' -ATGACAGATCTGAGGGTCA-3'

[0264] 序列编号 :36

[0265] 重组受体 Fc 融合蛋白质之表现及纯化

[0266] 受体 Fc 蛋白质藉由使用 FREESTYLE 293 表现系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 过度表现并在蛋白质 A 管柱上纯化。简言之,将  $3 \times 10^7$  293-F 细胞以 1,500rpm 旋转沉淀,继而重新悬浮于 28ml FREESTYLE 293 表现培养基中。然后将 40  $\mu$ l 之 293FECTIN 与 1ml OPTI-MEM (Invitrogen, 31985-062) 于室温混合 5 分钟,然后与 30  $\mu$ g 质体 DNA 在 1ml OPTI-MEM (Invitrogen, 31985-062) 中再培育 20 分钟后,加至 293-F 细胞中。48 小时后,收取上清液并藉由蛋白质 A 管柱纯化重组融合蛋白质。

[0267] 实施例 2 :多醣体萃取物之制备

[0268] 灵芝之粗制萃取物

[0269] 粗制灵芝萃取物 (经由碱性萃取,中和及乙醇沉淀而制备) 得自 Pharmanex 公司 (CA, USA)。除非另有指示,分子量排除界线 (MWC0) 为 6000-8000 道尔顿之 Spectrapor® 管状透析膜、Thermo bio-basic SEC-1000 管柱、Tosoh TSK G5000PWx1SEC 管柱,以及所有化学品及试剂得自 Sigma 或 Aldrich 公司。

[0270] 灵芝萃取物之纯化

[0271] 将粗制灵芝粉末 (6g) (得自 Pharmanex 公司) 溶于 120ml 之 ddH<sub>2</sub>O,于沸水 (100°C) 中搅拌 2 小时并离心 (1000rpm) 1 小时,以移除不溶的物质。将生成之溶液在约 40°C 与约 50°C 之间浓缩以得到小体积,然后冷冻干燥,产生 5g (83%) 暗褐色之粉末 (灵芝多醣体; GLPS)。将该水溶性残余物贮存于 -20°C 直至进一步纯化。

[0272] 灵芝多醣体之 F3 部分之标准化 - 单离

[0273] 自灵芝多醣体之水溶性残余物之暗色粉末单离灵芝多醣体部分 3 (下文称为 "GLPS F3" 及 "F3")。所有层析步骤在冷冻室中于 4°C 进行。将样品 (2.1g) 溶于小体积之含 0.1N 迭氮化钠之 Tris 缓冲液 (pH 7.0, 0.1N) 中,并藉由凝胶过滤层析纯化,其中使用 Sephacryl S-500 管柱 (95X2.6cm) 及以 0.1N Tris 缓冲液 (pH 7.0) 做为溶剂。将流速设定为 0.6mL/分钟并每管收集 6.0mL。层析后,各部分以酚-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 法检测各试管中之糖含量。收集 5 部分 (部分 1-5)。将部份 3 (F3) 在旋转蒸发器中于约 40 至 50°C 浓缩以得到小体积,然后将其用 6000-8000 道尔顿 MWC0 膜进行透析,以移除过多的盐及迭氮化钠。透析后,将 F3 冷冻干燥,得到 520mg 固体。

[0274] 来自冬虫夏草之多醣体之制备

[0275] 为了纯化来自冬虫夏草之多醣体,将样品切成 0.2cm<sup>3</sup> 片,在去离子化沸水 (100°C) 中培育 60 分钟,然后冷却至室温,接着通过 0.2  $\mu$ m 滤器,继而藉由加入等体积之乙醇以沉淀出多醣体。将沉淀物用冷冻干燥器干燥并贮存于 4°C。多醣体之总糖分析藉由酚-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 法,测量 485nm 之 OD 而测定;而多醣体之纯度藉由使用 Thermo Bio-Basic SEC-1000 管柱进行 HPLC 而测定,其中使用 RI 检测器于 280nm 进行 UV 检测。

[0276] 来自霍山石斛之多醣体之制备

[0277] 将风干之霍山石斛压碎、磨成粉末、在蒸馏水中均质化并于 4℃ 搅拌整夜。不溶之物质藉由离心收集。将上清液浓缩成小体积, 然后加入 1 体积乙醇, 以得到沉淀物 (O) 及上清液 (N)。将 TSK G-5000PW 尺寸排除管柱用于高效液相层析以进行多醣体分析, 并使用具有界定分子量之标准普鲁蘭多醣 (pullulan) 部分。据评估, 上清液 (N) 中之多醣体之分子量在  $1.2 \times 10^5$  至  $4.1 \times 10^5$  道尔顿之间, 而沉淀物 (O) 中多醣体之分子量在  $1.0 \times 10^6$  至  $2.2 \times 10^5$  道尔顿之间。碳水化合物总含量藉由酚-硫酸法测量。在沉淀物 (O) 中之多醣体为 83%, 而在上清液 (N) 中之多醣体为 77%。沉淀物 (O) 及上清液 (N) 二者之碘反应试验皆为阳性 ( $\lambda_{\max}$  440nm, 深蓝色), 此暗示在此等部分中之多醣体主要为  $\alpha$ -D- 葡聚糖。

[0278] 来自蘑菇之多醣体之制备

[0279] 将风干之蘑菇 (*Lentinus edodes*) 压碎、磨成粉末、在蒸馏水中均质化及于 4℃ 搅拌整夜。残余物藉由离心移除并将上清液浓缩成小体积, 然后冷冻干燥, 得到粗制之多醣体 L。之后, 将 0.25N NaOH 溶液加至不溶于水之残余物中 (该残余物藉由离心单离), 将该混合物于室温搅拌整夜, 之后加入 2 体积之乙醇以沉淀出多醣体。然后将蒸馏水加至沉淀出之多醣体中, 接着加入乙酸中和 pH 值。将生成之溶液离心及冷冻干燥, 得到多醣体 M。然后使用 TSK G-5000PW 尺寸排除管柱进行 HPLC, 以分析多醣体。碳水化合物总含量藉由酚-硫酸法测量, 结果 L 包含 79% 碳水化合物且 M 包含 90% 碳水化合物。与来自蘑菇之多醣体部分之数据之比较暗示多醣体 L 及 M 主要为  $\beta$ -1,3-D- 葡聚糖。

[0280]  $\beta$ -1,3- 葡聚糖、D- 葡萄糖及 D- 半乳糖之制备

[0281] 为了制备竞争性检定分析用之样品, 将 100mg 之  $\beta$ -1,3- 葡聚糖 (Fluka, Japan) 悬浮于 7.5ml 水中, 并加入 50  $\mu$ l 之 40% (w/w) 氢氧化钠水溶液。将该混合物回流加热 1.5 小时并冷却。然后加入甲醇以沉淀出  $\beta$ -1,3- 葡聚糖。将  $\beta$ -1,3- 葡聚糖沉淀物溶于水, 对 4L dd-H<sub>2</sub>O 透析 4 次, 并于减压下浓缩, 得到水溶性  $\beta$ -1,3- 葡聚糖。将 D- 葡萄糖 (Sigma) 及 D- 半乳糖 (Sigma) 溶于 dd-H<sub>2</sub>O (100mg/ml) 并贮存于 4℃。

[0282] 生物素基 -F3 之制备

[0283] 将灵芝多醣体 -F3 使用生物素以「单槽」(one pot) 反应标记。特定而言, 使在 0.2N NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10mL) 中之灵芝多醣体 -F3 (100mg) 与在 DMF (1mL) 中之生物素酰胺基己酰基-6- 胺基己酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (生物素-XX-NHS) 1.0mg 反应。将该混合物于室温搅拌 12 小时。反应完成后, 使用 MWC0 为 6000-8000 道尔顿之管状膜于 4℃ 透析 48 小时 (5x500mL)。透析后, 将生物素基 -F3 冷冻干燥, 得到褐色粉末 90mg (90%)。生物素基 -F3 之纯化藉由 HPLC 监测并使用链霉抗生物素蛋白 -FITC 进行结合检定分析。

[0284] 实施例 3: 纯化受体:Fc 融合蛋白质之西方转渍分析

[0285] 使实施例 1 之纯化受体:Fc 融合蛋白质进行电泳, 移至硝基纤维素膜上 (Hybond-C extra, Amersham Pharmacia Biotech), 并与 (1 : 3000) 之在 TBST 缓冲液 (5% 脱脂干燥牛奶, 在含有 0.02% Tween 20 之 Tris 缓冲盐水中) 中之缀合有过氧化酶之山羊抗人类 IgG Ab (Jackson, PA, USA) 反应。用 TBST 冲洗后, 将吸渍物与强化化学发光试剂 (Amersham Pharmacia Biotech) 一起培育以显现。

[0286] 实施例 4: 免疫吸附点结合检定分析

[0287] 生物素化 F3 于 5 倍系列稀释后, 使用 Bio-Dot 显微过滤装置 TM (Bio-Rad, CA, USA) 将其转渍在经甲醇活化之 PVDF 膜 (2  $\mu$ l/ 点) 上。在空气中干燥后, 将转渍片在 TBST

中培育,继而与 100  $\mu$ L 缀合有链霉抗生物素蛋白之辣根过氧化酶 (HRP) (1 : 2000 稀释) (Chemicon, CA, USA) 一起培育。结合反应用强化化学发光 (ECL) 试剂 (Amersham Pharmacia Biotech) 来显现。

[0288] 亦将未生物素化之多糖体固定在经甲醇活化之 PVDF 膜上,继而与 100  $\mu$ L 受体 .Fc 融合蛋白质 (1  $\mu$ g/ml, 在 2mM  $\text{CaCl}_2$ /TBST 中) 在 Bio-Dot 显微过滤装置 TM (Bio-Rad, CA, USA) 上于室温培育 1 小时,然后与 (1 : 3000) 之在 TBST 缓冲液 (5% 脱脂干燥牛奶, 在含有 0.02% Tween 20 之 Tris 缓冲盐水中) 中之缀合有 HRP 之山羊抗-人类 IgG 抗体 (Jackson, PA, USA) 反应。用 TBST 冲洗后,将吸渍物与强化化学发光试剂 (Amersham Pharmacia Biotech) 一起培育以显现。

#### [0289] 实施例 5:重组受体 .Fc 融合蛋白质之表现

[0290] 来自免疫细胞之多种先天性免疫受体之细胞外区域依照实施例 1 之方法藉由反录聚合酶连锁反应 (RT-PCR) 选殖。将经扩增之 DNA 片段与 pcDNA3/hIgG1-突变质体所含之人类 IgG1 之 Fc 部分融合。将经选殖之融合基因转入 293FREESTYLE 哺乳动物细胞中,而分泌之蛋白质依照实施例 1 之方法藉由蛋白质珠粒纯化。如图 1 所示,选殖 16 种 C-型凝集素基因 (图 1A)。特定而言,图 1A 显示藉由 RT-PCR 扩增,然后在 0.8% 琼脂糖上分成各部分并藉由溴化乙锭染色而显现之先天性免疫受体之 DNA 片段。图 1B 显示在 12% SDS-PAGE 凝胶上电泳后之经表现之重组受体 .Fc 融合蛋白质。在图 1A 及图 1B 二者中,使用下列行之命名:第 1 行:CLEC2B/AICL,第 2 行:CLEC4C/BDCA-2,第 3 行:CLEC13A/BIMLEC,第 4 行:CLEC1A/CLEC-1,第 5 行:CLEC4D/CLEC-6,第 6 行:CLEC12A/CLL-1,第 7 行:CLEC4A/DCIR,第 8 行:CLEC4L/DC-SIGN,第 9 行:CLEC4M/DC-SIGNR,第 10 行:CLEC7A/树状细胞凝集素-1,第 11 行:CLEC6A/树状细胞凝集素-2,第 12 行:CLEC4H2/HBVxAgBP,第 13 行:CLEC4K/郎罕细胞特异蛋白 (Langerin),第 14 行:KLRG/MAFAL,第 15 行:DLVR1/CLEC5A (MDL-1),第 16 行:CLEC4E/MINCLE。此外,亦以类似策略选殖及表现人类 TREM (在骨髓细胞上表现之激发受体)-1、-2 及类 TREM 转录体 (TLT)-1、-2 (Bouchon et al., 2000, J Immunol 164, 4991-5; Daws et al., 2003, J Immunol 171, 594-9; Washington et al., 2002, Blood 100, 3822-4)。

#### [0291] 实施例 6:固定之多糖体与受体 .Fc 融合蛋白质间之剂量相关性交互作用

[0292] 多糖体与受体 .Fc 融合蛋白质间之交互作用依照实施例 4 之方法使用点-结合检定分析测试。灵芝多糖体之水溶性部分 3 (F3) (参见实施例 3) 含有活性成分以刺激产生细胞激素之细胞 (Wang et al., 2002, Bioorg Med Chem 10, 1057-62; Chen et al., 2004, Bioorg Med Chem 12, 5595-601; Chien et al., 2004, Bioorg Med Chem 12, 5603-9; Hsu et al., 2004, J Immunol 173, 5989-99)。已知灵芝糖类含有具  $\beta$ -1,3-键结之多糖体骨架及具  $\alpha$ -1,4-键结之聚甘露糖骨架中之任一者 (Usui et al., 1983, Carbohydr. Res., 273; Miyazaki and Nishijime, 1982, Carbohydr. Res. 109, 290; Bao et al., 2002, Phytochemistry 59, 175-81)。已证明树状细胞凝集素-1 (Dectin-1) 受体 (C 型凝集素家族之成员) 会与  $\beta$ -1,3-D-葡聚糖交互作用 (Brown and Gordon, 2001, Nature 413, 36-7)。已证明树状细胞凝集素-1 受体媒介  $\beta$ -葡聚糖之生物作用 (Brown et al., 2003, J Exp Med 197, 1119-24)。因此使用实施例 4 之点-结合检定分析测试灵芝之 F3 部分是否会与树状细胞凝集素-1 受体交互作用。

[0293] 将生物素化 F3 部分 (图 2A 中之“生物素-GLPS F3”) (依照实施例 2 制备) 于

5 倍系列稀释后固定在 PVDF 膜上并与缀合有链霉抗生物素蛋白之辣根过氧化物酶 (HRP) 一起培育,再使用强化的化学发光试剂检测生成之结合反应(参见实施例 4)。如图 2A 所示,点-结合检定分析之灵敏度高于约  $0.08 \mu\text{g}$ 。图 2A 亦显示当未生物素化之 F3(图 2A 中之“GLPS-F3”)固定在 PVDF 膜上,然后与缀合有链霉抗生物素蛋白之辣根过氧化物酶 (HRP) 接触时,未见到背景值。

[0294] 将未生物素化之 F3 部分于系列稀释后亦固定在 PVDF 膜上,并与  $100 \mu\text{L}$  之  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  树状细胞凝集素-1.Fc 融合蛋白质或人类 IgG1(做为阴性对照组)一起培育,继而与缀合有 HRP 之山羊抗-人类 IgG 一起培育(参见实施例 4)。如图 2B 所示,树状细胞凝集素-1.Fc 在点-结合检定分析中可检测到低于约  $1\text{ng}$  之 F3 之存在。在与人类 IgG1 而非树状细胞凝集素-1.Fc 接触之转渍区无可见到之背景值。

[0295] 图 2B 之转渍片 (blot) 之点密度藉由密度计 (ImageQuant) 测定,而该结果显示树状细胞凝集素-1.Fc 结合信号以剂量依存方式增加(参见图 2C)。

[0296] 为了测定其它多醣体是否抑制 F3 与树状细胞凝集素-1 间之交互作用,将 F3( $10 \mu\text{g}/\text{点}$ ) 固定在 PVDF 膜上,然后于  $\beta$ -葡聚糖、D-葡萄糖及 D-半乳糖 ( $0.1 \mu\text{g}$ - $1000 \mu\text{g}$ ) 之系列稀释溶液存在下,与  $100 \mu\text{L}$  树状细胞凝集素-1.Fc ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 接触,继而与缀合有 HRP 之山羊抗-人类 IgG 一起培育。图 2D 显示就竞争者  $\beta$ -葡聚糖而言之转渍片之点密度,图 2E 显示所有竞争者之转渍像。由此等可见到树状细胞凝集素-1.Fc 与 F3 部分间之交互作用被  $\beta$ -1,3-葡聚糖抑制,但不会被 D-葡萄糖或 D-半乳糖抑制。此表示树状细胞凝集素-1.Fc 与 F3 间之交互作用系经由  $\beta$ -1,3-葡聚糖识别。

#### [0297] 实施例 7:能与 F3 部分交互作用之受体之鉴定

[0298] 检定分析 F3 与 C-型凝集素家族之其它成员或与类 Ig 受体之交互作用。将未生物素化之 F3 及未生物素化之 F3C(衍生自通过  $100\text{kDa}$  MWC0 离心管之 F3) ( $10 \mu\text{g}/\text{点}$ ) 固定在 PVDF 膜上(参见实施例 4),然后与  $100 \mu\text{L}$  之 25 种不同重组受体.Fc 融合蛋白质(包括 19 种凝集素受体及 8 个 TREM 及 TLT 家族成员)以及做为对照之人类 IgG1 的  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  溶液一起培育。使用缀合有 HRP 之山羊抗-IgG 抗体及 ECL 试剂检测结合。结果以表格形式示于图 3 中(相对点强度以“+”记号表示,而未检测到结合以“-”记号表示)而转渍片之影像示于图 4A 中。图 3 中之探针编号系统保留于图 4A 中。

[0299] 此等结果显示除了树状细胞凝集素-1.Fc(图 3 及图 4A 中之 14 号探针)之外,F3 亦与 KCR.Fc(图 3 及图 4A 中之 7 号探针)、DC-SIGNR.Fc(图 3 及图 4A 中之 11 号探针)及 TLT-2.Fc(图 3 及图 4A 中之 21 号探针)交互作用。有趣的是,F3C(其系衍生自通过  $100\text{kDa}$  MWC0 离心管之 F3) 却具有较低之对于 TLT2 之结合亲和力。此暗示 TLT2 可区辨 F3 与 F3c 间之微小差异。

[0300] 凝集素受体家族成员在交互作用上依存于  $\text{Ca}^{++}$ ;所以研究 EDTA(乙二胺四乙酸)抑制与 F3 结合之能力。已发现 EDTA( $10\text{mM}$ ,在 TBST 中)完全去除 F3 与 KCR.Fc 及与 DC-SIGNR.Fc 之交互作用,但不会去除 F3 与树状细胞凝集素-1.Fc 及 TLT2.Fc 之交互作用。图 4B 系图示存在及不存在  $\text{Ca}^{++}$  下所制得之转渍片之影像(左格只有 TBST;右格为  $10\text{mMEDTA}+\text{TBST}$ )。使用缀合有 HRP 之山羊抗-IgG 抗体及 ECL 试剂检测结合。该结果与先前观察到之配体与 KCR 间之交互作用一致(Hoyle and Hill,1988, J Biol Chem 263, 7487-92),且 DC-SIGNR 为  $\text{Ca}^{++}$ -相关性(Soilleux et al.,2000, J Immunol 165,2937-42),

而  $\text{Ca}^{++}$  对于树状细胞凝集素 -1 与  $\beta$ -1,3- 葡聚糖间之交互作用而言非为必要 (Herre et al., 2004, Mol Immunol 40, 869-76)。因此, F3 显然含有丰富的葡聚糖, 其可与免疫细胞上之多个受体同时交互作用。

[0301] 图 4C 图示使用  $\beta$ - 葡聚糖做为多醣体 ( $10 \mu\text{g}/\text{点}$ ) 及使用  $100 \mu\text{L}$  之  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  树状细胞凝集素 -1. Fc、DC-SIGN. Fc、mKCR. Fc 及 TLT2. Fc 之转渍点。使用缀合有 HRP 之山羊抗 -IgG 抗体及 ECL 试剂检测结合。四种受试之受体 .Fc 融合蛋白质中, 只有树状细胞凝集素 -1. Fc 可与  $\beta$ -1,3- 葡聚糖结合。此表示其它三种受体 .Fc 融合蛋白质结合于  $\beta$ -1, 3- 葡聚糖以外之糖成分。

[0302] 实施例 8: 来自各种来源之多醣体之独特细微特征 (fingerprints)

[0303] 用树状细胞凝集素 -1. Fc、mKCR. Fc、DC-SIGN. Fc 及 TLT2. Fc 融合蛋白质进行实施例 4 之点 - 结合检定分析, 以指纹辨识单离自冬虫夏草及市场上之其它来源之多醣体之独特细微特征。如上所述将各多醣体组合物固定在 PVDF 膜上, 然后与  $100 \mu\text{L}$  之  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  融合蛋白质溶液接触。使用缀合有 HRP 之山羊抗 -IgG 抗体及 ECL 试剂检测结合。图 5A 显示各融合蛋白质之个别转渍点而图 5B 以表格形式显示样品编号及相对点强度。灵芝粗制萃取物 (图 5 中之 5 号点) 只与树状细胞凝集素 -1. Fc 及 DC-SIGN. Fc 交互作用, 而来自粗制萃取物之纯化 F3 (1 号点) 与所有四种受体交互作用。此表示 F3 纯化过程可使能与免疫受体交互作用之成分富化。来自冬虫夏草之多醣体 (7 号点) 会与树状细胞凝集素 -1. Fc 强力地交互作用, 此表示该多醣体含有  $\beta$ -1,3 葡聚糖, 但与其它三种受体之交互作用与 F3 相较则弱许多。单离自霍山石斛之多醣体在碘试验反应 (见实施例 2) 中为阳性, 此暗示此等部分主要包含  $\alpha$ -D- 葡聚糖。与单离自真菌者相反, 霍山石斛之多醣体之混合物 (6 号点) 不会与四种受体 .Fc 融合蛋白质之任一种反应。藉由  $\text{ddH}_2\text{O}$  自蘑菇多醣体单离之多醣体 (部分 L, 8 号点) 及用  $0.25\text{N NaOH}$  自蘑菇多醣体单离而得之多醣体 (部分 M, 9 号点) 与树状细胞凝集素 -1. Fc 及 DC-SIGN. Fc 之结合程度不同。因此, 该法可查明单离自不同来源及制备之多醣体之独特细微特征 (fingerprints)。

[0304] 实施例 6-8 说明 F3 与树状细胞凝集素 -1. Fc、mKCR. Fc、DC-SIGN. Fc 及 TLT2. Fc 之交互作用。库佛氏 (Kupffer) 细胞受体 (KCR) 对于 D- 半乳糖及 N- 乙酰基半乳糖胺具有高亲和力 (Fadden et al., 2003, Glycobiology 13, 529-37), 并能清除血清之以 D- 半乳糖或 D- 岩藻糖为终端之醣蛋白 (Lehrman et al., 1986, J Biol Chem 261, 7426-32)。F3 之免疫调节功能依存于岩藻糖之存在, 且藉由  $\alpha$ 1,2- 岩藻糖苷酶进行之醣裂解会使 F3 失去活性。因此该四种受体是否可与醣裂解后之 F3 交互作用令人感到兴趣。DC-SIGN/L-SIGN 在结构上与 DC-SIGN 近似 (77% 相同), 但其只在肝窦、淋巴结及胎盘之内皮细胞中表现 (Van Liempt et al., 2004, J Biol Chem 279, 33161-7)。DC-SIGN 及 DC-SIGNR 二者皆可与 N- 键结有少量甘露糖之寡糖 ( $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$  醣肽) 结合。不过, 只有 DC-SIGN 可与具终端岩藻糖残基之聚醣结合, 而 DC-SIGNR 则否 (Guo et al., 2004, Nat Struct Mol Biol 11, 591-8)。纵使与 DC-SIGN 相较, DC-SIGNR 系与较窄范围之配体结合, 但只有 DC-SIGNR 可与 F3 交互作用。此暗示 F3 可能含有与  $\text{Fuc } \alpha$  1-4GlcNAc、 $\text{Lewis}^X$ 、 $\text{Lewis}^a$  及血型糖抗原决定部位 (blood group sugar epitopes) (DC-SIGN 之已知配体) 不同之独特结构。

[0305] TLT-2 为类 TREM 转录体家族之成员, 其含有独特的单一 V- 组免疫球蛋白 (Ig) 区域及细胞质长尾部, 该细胞质长尾部含脯氨酸富化区及免疫受体酪氨酸系抑制性基序

(immune receptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM), 已知该 ITIM 用于与蛋白质酪氨酸磷酸酶之交互作用 (Washington et al., 2002, Blood 100, 3822-4; Washington et al., 2004, Blood 104, 1042-7)。既然 F3 具有强力的免疫刺激功能, 因而在未来研究是否藉由亲和性层析从 F3 移除 TLT2. Fc. 结合性成分可进一步增强 F3 之刺激功能将可能为有趣的。或者可藉由使用树状细胞凝集素 -1. Fc、KCR. Fc 及 DC-SIGNR. Fc 进行亲和性层析进一步纯化 F3, 以移除 F3 中之其它成分。

[0306] F3 与 F3c 之间、F3 与灵芝 1-3 之间、以及蘑菇多醣体部分 L 及 M 之间之微细差异暗示本文所例示之此四种受体 .Fc 融合蛋白质可被用于使纯化步骤达优化并监测来自不同来源或来自不同发酵条件之多醣体之差异。

[0307] 实施例 9 : 可与 GLPS-F3 交互作用之人类凝集素受体在微量滴定平皿上藉由酶键连免疫检定分析之鉴定

[0308] 多醣体与受体 .Fc 融合蛋白质间之交互作用藉由进行酶 - 键连免疫检定分析 (EIA) 而进一步研究, 其系依据将 GLPS-F3 经由亲水力量及疏水力量固定于微量滴定平皿 (聚苯乙烯) 上。以此方式, 供剖析之不同受体 .Fc 融合蛋白质之数目与实施例 7 相较增加。为了使 GLPS-F3 之固定量优化, 将各种量 (3-1000ng/孔, 用 100mM Tris 缓冲液 (pH9.5) 稀释) 之生物素化 GLPS-F3 (生物素 -GLPS-F3) 涂布在 MaxiSorp StarWell 微量滴定平皿 (50  $\mu$  L/孔; Nunc) 上。将该等平皿于 4°C 培育整夜, 然后将此等孔用 TBST 冲洗二次, 继而用 200  $\mu$  L 封阻缓冲液 (2% BSA/TBST) 于室温封阻 1 小时。然后使用缀合有过氧化酶之抗生物素蛋白 (稀释度 1 : 5000, Vector Laboratories) 及 TMB (四甲基联苯胺) 受质来检测经固定之生物素化 GLPS-F3。如图 6A 所示, 涂布平皿之生物素 -GLPS-F3 之量为 100ng/孔时达到恒稳状态, 所以在 EIA 中选用该量进行未生物素化之 GLPS-F3 之固定。

[0309] 然后测试 GLPS-F3 与受体 .Fc 间之交互作用。如上所述以 100ng/孔将未生物素化之 GLPS-F3 固定, 再将 100  $\mu$  L 受体 .Fc 融合蛋白质 (1  $\mu$  g/ml, 在 2mM MgCl<sub>2</sub>/2mM CaCl<sub>2</sub>/1% BSA/TBST 中) 加至各孔中并于室温培育 1 小时。用 TBST 冲洗后, 将此等孔与缀合有过氧化酶之山羊抗 - 人类 IgGAb 在封阻缓冲液中于室温一起培育 30 分钟 (稀释度为 1 : 5000, Jackson ImmunoResearch Laboratories)。此等孔用 TBST 冲洗后, 与 100  $\mu$  L TMB 受质一起培育 15 分钟并在融合平皿读数器 (Perkin Elmer) 中于 450nm 测量。将结果用 Fc. 树状细胞凝集素 -1 结合度为基准予以归一化 (树状细胞凝集素 -1 为已知能与  $\beta$ -1,3- 葡聚糖结合之凝集素受体, 该  $\beta$ -1,3- 葡聚糖为在 GLPS-F3 中所发现之骨架)。图 6B 图示相较于树状细胞凝集素 -1, 各受体对于 GLPS-F3 之亲和力。结果显示观察到 Fc. 郎罕细胞特异蛋白、Fc. DC-SIGN、MMR. Fc、TLR2. Fc、TLR4. Fc、Fc. CLEC-2 (CLEC1B) 及 Fc. CLEC-6 (CLEC4D) 对于 GLPS-F3 有高亲和力 (在本检定分析中, 高亲和力被定义与 Fc. 树状细胞凝集素 -1 相较, 结合强度 > 50%)。值得注意的是 TLR2 及 TLR4 [已证明其在 GLPS- 诱生之细胞活化上扮有角色 (Hsu et al., J Immunol 173 :5989-5999 (2004); Shao et al., Biochem Biophys Res Commun 323 :133-141 (2004))] 在 EIA 中亦会与 GLPS-F3 结合。在 Fc. NKG2D、Fc. MINCLE、Fc. mKCR、DCAL1. Fc、DEC205. Fc、Endo180. Fc 及 NKp30 (NCR3). Fc 中亦发现较弱, 但为阳性之 GLPS-F3 结合能力 (与 Fc. 树状细胞凝集素 -1 相较, 结合强度为 25-50%)。其它凝集素受体, 包括 Fc. AIICL、Fc. BDCA2、Fc. CLEC1、Fc. CLL1、Fc. DCIR、Fc. DC-SIGNR、Fc. 树状细胞凝集素 -2、Fc. MDL-1 及 Fc. ML2, 如同对照组人类 IgG1, 对于 GLPS-F3 具有极小的结合能力。

**[0310] 实施例 10 :与先天性免疫受体交互作用之 GLPS-F3 之竞争性检定分析**

[0311] 为了解 GLPS-F3 与特异性先天性免疫受体之交互作用,将多醣体甘露聚糖及  $\beta$ -葡聚糖以及单醣体 D-甘露糖 (Man)、D-葡萄糖 (Glc)、N-乙酰基-葡萄糖胺 (GlcNAc)、D-半乳糖 (Gal)、N-乙酰基-半乳糖胺 (GalNAc)、L-岩藻糖 (Fuc) 及唾液酸用于竞争性检定分析。检定对于 GLPS-F3 显示较高结合能力之先天性免疫受体,包括 Fc. 树状细胞凝集素 -1、Fc. 郎罕细胞特异蛋白、Fc. DC-SIGN、TLR4. Fc、MMR. Fc、Fc. CLEC-2 (CLEC1B) 及 Fc. CLEC-6 (CLEC4D)。检定分析如同实施例 9 进行,其中加入 1mg/ml 之各多醣体或单醣体。

[0312] 如图 7(图示各受体/醣组合,相对于醣不存在时所见到之结合度之结合%)及表 1(以表格形式提供来自图 7 之数据)所示, GLPS-F3 与 Fc. 树状细胞凝集素 -1 间之交互作用可被  $\beta$ -葡聚糖封阻,其抑制度为 58%,此符合已发表之结果 (Palma et al., J Biol Chem 281:5771-5779(2006); Willment et al., J Biol Chem 276:43818-43823(2001))。唾液酸之加入(抑制度 83%)会干扰 Fc. 树状细胞凝集素 -1 与 GLPS-F3 之结合。Fc. 郎罕细胞特异蛋白与 GLPS-F3 间之交互作用会被甘露聚糖、Man 及 GlcNAc 阻扰(抑制度分别为 95%, 26% 及 84%),据报告该等为郎罕细胞特异蛋白之糖配体 (Stambach & Taylor, Glycobiology 13:401-410(2002));亦观察到唾液酸(抑制度为 95%)会干扰 Fc. 郎罕细胞特异蛋白与 GLPS-F3 之结合。至于 Fc. DC-SIGN 与 GLPS-F3 之结合,甘露聚糖、Man、Fuc 及唾液酸显示强力的封阻活性(抑制度 98%, 72%, 92% 及 90%),而 Glc 及 GlcNAc 在封阻交互作用上具有较弱的作用(抑制度分别为 45% 及 27%)。甘露聚糖、Man、Glc、GlcNAc、Gal、Fuc 及唾液酸封阻 GLPS-F3 与 MMR. Fc 间之交互作用(抑制度分别为 98%, 87%, 45%, 78%, 36%, 88% 及 93%),其中该 MMR. Fc 已知为会与 Man、Fuc、GlcNAc 及唾液基 Lewis x (sLex) 结合之重要凝集素受体 (Letuex et al., J Exp Med 191:1117-1126(2000); Stahl, Am J Respir Cell Mol Biol 2:317-318(1990))。Fc. CLEC-2 与 GLPS-F3 间之交互作用会藉由加入唾液酸而封阻(抑制度 55%)。对 Fc. CLEC-6 而言,未观察到受试之糖显示明显之封阻作用。显然地,甘露聚糖及 Fuc 对于 TLR4. Fc 与 GLPS-F3 之交互作用显示封阻作用(抑制度分别为 72% 及 44%)。此处得到之数据与对于树状细胞凝集素 -1、郎罕细胞特异蛋白、DC-SIGN 及 MMR 所报告之糖配体研究之结果一致。亦显示许多凝集素受体可经由不同的糖成分以多价与 GLPS-F3 结合。

[0313]

糖	先天性免疫受体						
	树状细胞凝集素-1	郎罕细胞特异蛋白	DC-SIGN	TLR4.Fc	MMR.Fc	CLEC-2	CLEC-6
无	100±7.6	100±1.0	100±0.1	100±4.5	100±2.2	100±8.0	100±0.8
甘露聚糖	82±0.2	5±0.9	2±0.5	28±6.3	2±0.5	88±6.3	75±0.8
Man	89±0.5	74±2.1	28±1.3	89±2.6	13±6.4	95±9.1	98±3.7
β-葡聚糖	42±0.3	77±3.2	81±1.4	96±4.0	100±4.2	95±5.1	98±7.3
Glc	86±1.5	87±2.0	55±5.4	101±4.7	55±2.9	108±6.8	100±5.3
GlcNAc	91±2.6	16±2.7	73±8.6	99±4.7	22±3.4	103±10.2	99±8.5
Gal	88±0.4	92±0.9	82±4.0	100±2.7	64±4.2	104±5.1	90±3.7
GalNAc	88±2.6	97±0.7	110±3.1	95±4.1	80±4.2	110±11.4	96±2.4
Fuc	92±5.2	76±1.9	8±1.8	56±1.9	12±2.0	91±8.5	82±6.5
唾液酸	17±0.3	5±0.3	10±1.0	77±3.1	7±2.4	45±6.2	94±13.0

[0314] 表 1 :于存在糖竞争者下,先天性免疫受体 .Fc 融合蛋白质与 CLPS-F3 之结合度,相对于不存在糖竞争者下所见到之结合度之百分率。

[0315] 实施例 7 至 10 所呈现之系统为以高通量剖析 (profiling)GLPS 以及其它糖蛋白混合物 (包括目前使用之许多中药)之有用工具。藉由使用不同表面 (PVDF 及聚苯乙烯)进行多糖体之固定,得到 GLPS-F3 的不同剖析结果。此可能系由于混合物中某些多糖体偏好结合于不同表面。从该二互补形式 (format) 得到之结果提供多糖体混合物之「指纹 (独特细微特征)」。可将此等指纹辨识多糖体混合物之独特细微特征之方法用于,例如,监测在不同条件下,来自不同来源或来自不同批号之草药萃取物之含量。再者,从特定多糖体混合物之剖析收集到之资料在了解其于活体内之生物作用之分子机制上具有重要性。

[0316] 实施例 11 :DVL1/CLEC5A(MDL-1) 与登革热病毒之交互作用之检测

[0317] 下列实施例显示本发明之融合蛋白质及方法如何用于鉴定可与病原体交互作用之先天性免疫受体,以及该等数据如何随后用于测定与先天性免疫受体结合之病原体之下游作用,并亦用于设计治疗病原体感染之治疗剂。

[0318] 登革热为侵犯人类之最重要蚊传病毒疾病之一。其全球分布与疟疾之分布相当,且据估计活在有流行传染之虞地区之人达 2.5 亿。登革热病毒 (DV) 感染后之临床症候群包括登革热 (DF) 及出血性登革热 (DHF) / 登革热休克症候群 (DSS)。不过,导致 DHF 及 DSS 之分子机制仍未获得充分厘清。

[0319] 已知 DC-SIGN 媒介人类树状细胞之登革热 (DV) 感染 (Tassaneetrihetpet al., J Exp Med, 2003. 197(7) :p. 823-9)。为了解 DV 之致病原因,测定 DV 是否与来自树状细胞、巨噬细胞、天然杀手细胞及周围血液单核细胞 (PBMCs) 之其它膜 - 结合性 C- 型凝集素受体及类 C 型凝集素受体交互作用颇为重要。为达成此,将 DVL1/CLEC5A(MDL-1)、树状细胞凝集素 -1、KCR 及 DC-SIGN(做为阳性对照阻)之细胞外区域与人类 IgG1 之 Fc 部分融合。更特定而言,使用 DC-SIGN 之引物 (序列编号 :17 及序列编号 :18)、DVL1/CLEC5A 之引物 (序列编号 :21 及序列编号 :22)、树状细胞凝集素 -1 之引物 (序列编号 :25 及序

列编号:26) 以及 KCR 之引物(前向:5' -CAGCCTTGGAGACCTGAGT-3' 序列编号:37; 逆向 5' -TAGCCTACTCTGGCCGC-3' 序列编号:38) 产生经扩增之 cDNA 片段。各前向引物具有额外的 BamH1 部位, 且各逆向引物具有额外的 EcoRI 部位, 以加速经扩增之 cDNA 次选殖入含人类 IgG1Fc 部分之 pCDNA3.1 (Invitrogen) 哺乳动物表现载体。然后将生成之载体转染入 293FreeStyle 细胞 (Invitrogen), 以产生可溶性重组蛋白质。所有重组受体.Fc 融合蛋白质藉由蛋白质 A 琼脂糖 (Sephacrose) 珠粒 (Pharmacia) 纯化并用 0.1M 甘氨酸-HCl (pH0.3) 溶析。

[0320] 将 1  $\mu$ g 各受体.Fc 融合蛋白质涂布在微量滴定平皿上并置于 4°C 整夜。然后将结合缓冲液 (1% BSA, 2mM  $\text{CaCl}_2$ , 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl) 中之 DV 病毒株 16681 (DEN2 系) ( $5 \times 10^6$  个粒子) 加至平皿中以及将该平皿培育 2 小时。冲洗除去未结合之病毒后, 施用生物素化抗-DEN2 套膜蛋白质抗体 (Wu et al., J Virol, 2002. 76(8) : p. 3596-604), 使其与病毒进行结合 1 小时。然后将经稀释之缀合有辣根过氧化酶之链霉抗生物素蛋白加至平皿中, 继而进行 1 小时之培育。然后加入 TMB 受质并将平皿用 ELISA 读数器在 OD450nm 测量。

[0321] 结果示于图 8A 中 (\*\* 表示  $p < 0.01$ ; \*\*\* 表示  $p < 0.001$  (学生 t 试验))。结果显示除了 DC-SIGN (阳性对照组) 之外, DV 亦与 DVL1/CLEC5A 结合。为了确证该结果, 用人类 IgG1 (阴性对照组)、DC-SIGN.Fc、KCR.Fc 及 DVL1.Fc 进行免疫沉淀研究。更特定而言, 将  $5 \times 10^6$  个登革热病毒粒子与 5  $\mu$ g 之各蛋白质一起培育, 然后加入蛋白质 A 珠粒。将生成之免疫复合物冲洗, 藉由 SDS-PAGE 分离并移至硝基纤维素膜上。然后将该膜用生物素化之抗-DEN2 套膜蛋白质抗体检测并用缀合有辣根过氧化酶之链霉抗生物素蛋白显色。此等结果示于图 8B 中。此等结果显示只有 DC-SIGN.Fc 即及 DVL1/CLEC5A.Fc 能免疫沉淀登革热病毒。

[0322] 于存在能螯合  $\text{Ca}^{++}$  阳离子之 EDTA (10mM) 下重复进行微量滴定平皿之检定分析。此等结果 (图 8C) 显示与登革热病毒之 DVL1/CLEC5A 结合为  $\text{Ca}^{++}$  非相关性, 而 DC-SIGN 结合为  $\text{Ca}^{++}$  相关性 (\*\* 表示  $p < 0.001$ , 学生 t 试验)。

[0323] 亦反复进行微量滴定平皿检定分析, 以测定 DVL1/CLEC5A.Fc 融合蛋白质与 DV 粒子 ( $5 \times 10^6$ ) 之结合, 其中该 DV 粒子曾接受下列处理: 1) 与 500U 糖苷酶 PNGaseF (New England Biolabs, Inc.) 于 37°C 预处理整夜; 或 2) 用二硫苏糖醇 (DTT) (0.1M) 处理; 或 3) 于 95°C 预培育 5 分钟; 或 4) 进行 UV 照射 5 分钟。结果显示于图 8D 中 (星号表示 DVL1/CLEC5A.Fc 融合蛋白质之结合亲和力藉由病毒之修改, 而与未经处理之病毒相较发生改变); \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , 学生 t 试验)。结果显示 DV 用 PNGase F 预处理会显著抑制与 DVL1/CLEC5A.Fc 之交互作用, 以及用热或二硫苏糖醇之任一者预处理几乎会完全抑制 DVL1/CLEC5A.Fc 结合, 但不会抑制 DC-SIGN.Fc 与 DV 之结合。此暗示 DV 之糖抗原决定部位及三次元组态对于与 DVL1/CLEC5A 之结合颇为重要。

[0324] 为了评估在免疫细胞上 DVL1/CLEC5A 之表现, 对于人类多核 (PMN) 细胞 (嗜中性球)、PBMCs、巨嗜细胞及树状细胞进行流动式细胞计数。PMNs 及 PBMCs 分别藉由先前所述之聚葡萄糖 (dextran) 沉降 (Kuan et al., Br. J. Pharmacol., 2005, 145(4) :460-468) 并用 Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 进行标准密度梯度离心而自健康人类捐血者之全血单离。将纯化嗜中性球再悬浮于磷酸盐水缓冲液 (PBS, pH 7.4)

中,以使红血球低张溶裂。继而藉由采用抗-CD14 微珠 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) 之 VARIOMACS 技术进行高梯度磁性筛选,以从 PBMCs 纯化 CD14+ 细胞,然后在添加有 10ng/ml 人类 M-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN) 之完全 RPMI-1640 培养基 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 中培养 6 日 (Chang et al., J. Leukoc Biol, 2004, 75 (3) :486-494)。藉由在添加 10% 牛胎血清、800U/ml 人类 GM-CSF (Leucomax ; Schering-Plough, Kenilworth, NJ) 及 500U/ml 人类 IL-4 (R&D Systems) 之 RPMI 1640 培养基中培养 6 日,从吸附之 PBMCs 产生树状细胞 (DC) (不成熟 DCs)。为了制备成熟的经活化 DCs,将不成熟的 DCs 与经  $\gamma$  射线照射 (5500rad) 之 CD40 配体 (CD40L)-表现性 L 细胞 (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA) 以 3 : 1 之比率一起培育 36 小时 (Hsu et al., J Immunol., 2002, 168 (10) :4846-4853)。

[0325] 对于上述细胞类型进行流动式细胞计数,其中使用缀合有 FITC 之抗-DVLR1/CLEC5A 单株抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 或缀合有 FITC 之抗-DC-SIGN 单株抗体 (ED Pharmingen),连同缀合有藻红素 (PE) 之抗 CD3、CD19、CD56、CD14 及 CD66 抗体,以进行双重染色 (BD Pharmingen)。亦对相配之同种型 (isotype) 对照组 (就 DVLR1 mAb 而言为 IgG2b ;就 DC-SIGN 而言为 IgG1 ;Sigma) 进行该表面染色,以提供背景值资料。藉由 FACSCalibur 流动式细胞计数器 (Becton Dickinson) 及 CellQuest 软件 (Becton Dickinson) 来分析荧光,选通 (gate) CD 标记阳性细胞以测定 DVLR1/CLEC5A 或 DC-SIGN 之表现。该等结果示于图 9A (DVLR1/CLEC5A) 及图 9B (DC-SIGN) (阴影区域代表同种型对照组)。此等结果表明 DC-SIGN 主要在不成熟树状细胞上表现以及在巨噬细胞上微弱表现。该等结果亦显示 DVLR1/CLEC5A 在 CD14+ 衍化之巨噬细胞 (M $\Phi$ )、CD66+PMNs 及刚单离之 CD14+PBMCs 之表面上检测到,但未在 CD14+ 衍化的不成熟及成熟树状细胞上检测到。此与先前所观察到之「DVLR1/CLEC5A mRNA 在人类单核球及巨噬细胞中表现,但在树状细胞中表现」一致 (Bakker et al., Proc. Natl. Acad Sci USA, 1999, 96 (17) :9792-9796)。

[0326] 在该实施例中呈现之结果显示本文所揭示之以受体 .Fc 融合蛋白质为主体之方法可用于测定能与特异性病原体诸如登革热病毒结合之先天性免疫受体之种类。其最终允许鉴定可与病原体交互作用之细胞类型,并进一步提供治疗或预防病原体感染之新颖标的。举例言之,本文所揭示之结果暗示防止 DV 与 DVLR1/CLEC5A 结合之药剂可用于预防或治疗目的。举例言之,对抗 DVLR1/CLEC5A 之单株抗体可由熟悉本技术人士制造,以防止 DV 与 DVLR1/CLEC5A 结合。再者,既然 DV 为黄病毒科家族之成员,该结果暗示 DVLR1/CLEC5A 可与在相同家族中之其它病毒交互作用,该等病毒例如为黄热病毒属中之病毒 (诸如西尼罗热病毒、日本脑脊髓炎病毒 (JEV)、黄热病毒及蜱传脑脊髓炎病毒) 或肝炎病毒属中之病毒 (诸如 C 型肝炎病毒)。所以 DVLR1/CLEC5A 亦可做为此等病毒之治疗或预防标的。此外,既然 DVLR1/CLEC5A 为模式识别受体, DVLR1/CLEC5A 可做为其它具套膜病毒之治疗或预防标靶。

[0327] 实施例 12 :登革热病毒诱导之 DAP12 磷酸化由 DVLR1/CLEC5A 媒介

[0328] DVLR1/CLEC5A (MDL-1) 为包含 187 个氨基酸长之第 II 型穿膜蛋白质,其包括在穿膜区能使其与 DAP12 (具 12kDa 之 DNAX 活化蛋白质) 配对之带电残基 (Bakker et al., Proc. Natl. Acad Sci USA, 1999, 96 (17) :9792-9796)。DAP12 为以二硫键键结之同元二聚穿膜蛋白质,其具有极小的细胞外区域,在穿膜区域具有带电的天冬胺酸以及在其细胞质尾

部具有 ITAM(免疫受体酪氨酸系活化基元)。由于在 CD14+ 巨噬细胞上 DV 与 DVL1/CLEC5A 结合且由于 DAP12 具有 ITAM,因此引发测定在 CD14+ 巨噬细胞中 DV 是否会诱生 DAP12 磷酸化之兴趣。所以,在使用 Chen 等人(J. Virol. 2002,76(19):9877-9887)所揭示之方法并经略微修改下,将 CD14+ 巨噬细胞以 DV 感染。简言之,将终末分化之巨噬细胞用不完全的 RPMI 培养基冲洗一次,以移除培养基中之牛胎血清。然后将细胞用 DV 以不同的感染重复数(MOI)感染。将该等病毒与细胞在不含血清之 RPMI 中于 37°C 培育 2.5 小时,以允许病毒吸附。将培养平皿每 30 分钟温和搅动 1 次,以达成最佳的病毒-细胞接触。之后,未吸收的病毒藉由用不含血清之 RPMI 冲洗细胞单层 2 次,然后进行培育 1 次而移除,分别收取不含细胞之上清液并分成数份贮存于 -80°C,直至进行感染病毒制造及细胞激素分泌之检定分析(见实施例 13)。感染病毒滴度藉由在 BHK-21 细胞上之成斑检定分析而测定。于结晶紫覆盖后 7 日,藉由目视检查计算斑数目,以测定每毫升上清液中之成斑单位(PFU)之数目(Lin et al., J. Virol., 1998,72(12):9729-9737)。为了检测细胞内之 DV 抗原,将经感染之细胞用 1%三聚甲醛固定并用 0.1%皂素可通透化,继而用 NS3 mAb(Lin et al., J. Virol., 1998,72(12):9729-9737)或相配之同种型对照组(IgG1;Sigma)染色。培育 1 小时后,加入缀合有 PE 之山羊 F(ab)' 抗-鼠 IgG 二次抗体以进行荧光检测,并藉由 FACSCalibur 流动式细胞计数器及 CellQuest 软件来分析荧光。

[0329] 结果示于图 10A-D 中。于以 MOI = 5 感染后 48 小时,在巨噬细胞之细胞溶质中 DV 非结构性蛋白质 3(NS3)藉由流动式细胞计数法检测(图 10A;灰色组织图为同种型抗体对照组)。细胞外病毒滴度于感染后各种时间测量,且其显示当巨噬细胞以活 DV 感染时,病毒粒子释出至培养上清液,但以经 UV-照射之 DV(UV-DV;于相距 5 至 10cm 处,在冰上接受 254nm 辐射照射 15 分钟)感染时则否(图 10B)。

[0330] 以各种 MOIs 感染后 2 小时(MOI = 0.05-30,感染后 2 小时),以及以固定 MOI(MOI = 5)感染一段时程(感染后 2 至 48 小时)后,研究 DAP12 之磷酸化。特定而言,为了检测磷-DAP12,将巨噬细胞用 DV 以适当的 MOI 刺激一段适当的时间,然后在溶裂缓冲液(50mM Tris-HCl[pH7.5]、150mM NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS、5mM EDTA、10mM NaF、1mM 原钒酸钠及蛋白酶抑制剂混合锭[Roche])中进行溶裂。将等量的全细胞萃取物用 DAP12 兔多株抗体(Santa Cruz Biotechnology Inc, CA)及蛋白质 A 琼脂糖(Sepharose)(Amersham Biosciences AB)于 4°C 进行免疫沉淀 4 小时。培育后,将免疫复合物冲洗 3 次以及藉由 SDS-PAGE 分离,继而移至硝基纤维素膜及用抗-磷酸酪氨酸抗体(4G10;Upstate Biotechnology, Inc)检测。将免疫转渍片用缀合有 HRP 之二次抗体及增强之化学发光(Amersham)显色。为了进行再检测,将膜用强再检测套组剥除并用 DAP12 抗体转渍。

[0331] 将在各种 MOIs 下得到之结果示于图 10C 中,而时程实验结果示于图 10D 中。此等结果显示在 DV 感染后 2 小时,DAP12 磷酸化强度之增加自 MOI = 0.05 开始升高,在 MOI = 5 时到达尖峯值(图 10C)。于 DV 感染后 2 小时检测 DAP12 磷酸化,于 12 小时达到峯值,并持续至少 48 小时(图 10D)。纵使 UV-DV 在 CD14+ 巨噬细胞中无法复制且在斑检定分析中显示没有活性(图 10B),DAP12 于 2 小时亦被磷酸化,且磷酸化之 DAP12 于 12 小时仍可检测得到,惟其强度远比活 DV 所诱生者弱许多(图 10D;UV-DV)。此暗示 DV 所诱生之 DAP12 磷酸化具有二期:第 I 期(最初 6 小时)为复制-非相关性,而第 II 期(12 小时后)为复制-相关性。

[0332] 为了确证 DAP12 磷酸化系经由 DVL1/CLEC5A,用短发夹状 RNA (shRNA) 进行之 RNA 干扰 (RNAi) 抑制在 CD14+ 巨噬细胞中 DVL1/CLEC5A 之表现并如上述检定分析 DAP12 之磷酸化。特定而言,人类 DVL1/CLEC5A 之编码区用下列 DVL1/CLEC5A siRNA 定标:

[0333] 5' -TTGTTGGAATGACCTTAT-3'

[0334] 序列编号 :39

[0335] 此段系用取自 Brummelkamp et al., Science, 2002, 296 (5567) :550-553 之环形序列 (TTCAAGAGA) 修改以建立 shRNA。此处所使用之聚合酶 III 终止子段为 TTTTTT。将 shRNA 选殖入 pLL3.7 基因沉默载体 (Rubinson et al., Nat. Genet., 2003, 33 (3) :401-406), 该载体含有 loxP 部位、驱动增强之绿色荧光蛋白质 (EGFP) 之表现之 CMV (巨细胞病毒) 启动子以及具有下游限制部位 (HpaI 及 XhoI) 之 U6 启动子。DC-SIGN shRNA 构筑体亦藉由将构筑体 pSUPER-siDC-SIGN (Tassaneetrithep et al., 如同上文) 所含之 shRNA 次选殖入经 HpaI/XhoI 消化之 pLL3.7 载体而构筑。依照制造商之说明书,将构筑体用 Amaxa 套组 (Gaithersburg, MD) 电穿孔入巨噬细胞中。简言之,将巨噬细胞 ( $6 \times 10^6$ ) 如上述收取并再悬浮于 100  $\mu$ L 之核因子溶液。加入 siRNA (5  $\mu$ g) 或载体对照组后,将细胞用 Amaxa 程序 Y-001 电穿孔并经 16 小时让其复原。藉由分别使用抗 -DVL1/CLEC5A 及 DC-SIGN 单株抗体 (R&D Systems) 进行免疫转渍而转染后 24 小时,分析 DVL1 及 DC-SIGN 沉默之效率。

[0336] 结果示于图 11 中。藉由电穿孔导入对照载体 pLL3.7 或 DC-SIGN-shRNA 之 CD14+ 巨噬细胞以 DV 感染后,未显示 DAP12 磷酸化降低。相对照地,在 DV 感染之前先藉由电穿孔导入 DVL1/CLEC5A-shRNA 之 CD14+ 巨噬细胞中, DAP12 磷酸化急遽降低。所以,可以获得下述结论:DV- 诱导之 DAP12 磷酸化系经由 DVL1 而发生。

[0337] 实施例 13 :DVL1/CLEC5A 涉及 DV- 媒介之 TNF- $\alpha$  释出,但不涉及进入 CD14+ 巨噬细胞

[0338] 于 DV 感染时, CD14+ 巨噬细胞分泌促发炎症性细胞激素及化学激素,包括肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、 $\alpha$ -干扰素 (IFN- $\alpha$ )、MIP-1 $\alpha$  及 IL-8 (Chen et al, 如同上文)。使用市售 ELISA 套组测量经 DV- 感染之 CD14+ 巨噬细胞之培养上清液中之 TNF- $\alpha$  浓度。针对活 DV 及 UV-DV 二者,于不同 MOIs 及于感染后不同时间进行测量。结果示于图 12A-C (误差长条图代表与复制三份之平均值之标准误差,而星号表示细胞激素产量之统计学上差异值, \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ )。此等结果显示感染后 6 小时,活 DV 及 DV-UV 二者在 0.05-30 之 MOI 范围内对于 TNF- $\alpha$  分泌具有相似的作用 (图 12A)。于感染后 12 小时,只有活 DV 之 TNF- $\alpha$  分泌以剂量依存 (增加 MOI) 方式增加。就感染后 12 小时之感染有 UV-DV 之细胞而言, TNF- $\alpha$  浓度在所有 MOIs 均保持相同 (图 12B)。图 12C 显示 TNF 随着时程之测量值。此等值显示当用活 DV 以 MOI = 5 感染时, TNF- $\alpha$  分泌量由于 6 小时之 8pg/ml 迅速增至于 12 小时之 85pg/ml, 并在 48 小时达到高峰 (350pg/ml)。不过,当与 UV-DV 一起培育时, TNF- $\alpha$  分泌从 8pg/ml (于 6 小时) 降至 5pg/ml (于 12 小时)。此暗示初始反应 (于 6 小时) 与病毒复制无关,而 TNF- $\alpha$  分泌之较后期 (12 小时后) 与 DV 复制有关。

[0339] 先前已证明 DC-SIGN 会与 DV 交互作用,以媒介病毒进入树状细胞。使用先前实施例之 RNAi 方法及试剂,研究在经 DV- 感染之 CD14+ 巨噬细胞中 DC-SIGN-shRNA 及 DVL1/CLEC5A-shRNA 对于 NS3 表现之作用。图 13A 显示 DC-SIGN-shRNA 及 DVL1/CLEC5A-shRNA

可分别使其对应蛋白质表现减少 (knock down) (pWTS1 及 pLL3.7 为无插子对照组)。图 13B 图示流动式细胞计数分析之结果并例示说明只有 DC-SIGN-shRNA 能使 CD14+ 巨噬细胞中之 DV NS3 表现减少。该结果藉由使用抗 -DS3 抗体进行免疫荧光共轭显微镜检而确证。图 13C 例示说明在藉由电穿孔导入 shRNA 构筑体之细胞之上清液中, 病毒滴度之实时 PCR 分析。该等结果表明只有 DC-SIGN-shRNA 能减少经 DV 感染之细胞之上清液中之病毒滴度。

**[0340] 实施例 14 : DVL1/CLEC5A 涉及 DV 所诱导之促发炎症性细胞激素从 CD14+ 巨噬细胞之释出**

[0341] 就以 DV (MOI = 5) 感染之 CD14+ 巨噬细胞而言, 于依照先前实施例之方法 (2.5 小时转染) 使 DVL1/CLEC5A 及 DC-SIGN 基因表现下调 (knock down) 后, 使用 ELISA 评估细胞激素释出模式。在最初 12 小时, DC-SIGN-shRNA 不会影响 TNF- $\alpha$ 、MIP-1 $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 、IL-6 或 IL-8 之分泌。参见图 14A-B (误差长条图代表与复制三份之平均值之标准误差, 而星号表示与对照实验相较, 在统计学上有显著之差异; \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ )。48 小时后, DC-SIGN-shRNA 对于 TNF- $\alpha$ 、MIP-1 $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  及 IL-6 分泌具有轻微的抑制作用 (少于 20%); IL-8 分泌则不受影响。既然 DC-SIGN 参与病毒进入及复制, 该观察暗示初始细胞激素分泌 (最初 12 小时) 与 DV 复制无关。相对地, DVL1/CLEC5A 基因表现下调急遽地压制 ( $p < 0.005$ ) TNF- $\alpha$ 、MIP-1 $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  及 IL-8 之分泌, 但不会压制 IL-6 之分泌。此暗示 DVL1/CLEC5A 主导 DV 所诱导之细胞激素来自 CD14+ 巨噬细胞之释放。所以防止 DV 与 DVL1/CLEC5A 结合之治疗剂可用于在人类中防止 DV 所诱导之细胞激素释放之不良作用。举例言之, 防止 DVL1/CLEC5A 与 DV 交互作用之单株抗体将可用于预防或治疗 DV 所诱导之登革热休克症候群 (DSS) 或出血性登革热 (DHF)。

**[0342] 实施例 15 : 拮抗性抗 -DVL1/CLEC5A 单株抗体 (mAbs) 遏止因登革热病毒 (DV) 血清型 1、2、3 及 4 造成之发炎症性细胞激素释出**

[0343] 用标准技术产生对抗 DVL1/CLEC5A 之单株抗体。简言之, 将小鼠用 DVL1-Fc 融合蛋白质免疫, 且杂交瘤藉由将得自小鼠之脾脏细胞与 P3/NS1/1-Ag4-1 [NS-1] 骨髓瘤细胞 (ATCC TIB-18) 融合而形成。在所产生之 mAbs 中, 9B12 株、3E12 亚株 (3E12A2 株、3E12C1 株、3E12G9 株) 及 8H8F5 株于用 DEN1 (766733A 系)、DEN2 (PL046 系)、DEN3 (H-87 系) 及 DEN4 (866146A 系) 感染后, 会以剂量-依存方式压制 TNF- $\alpha$  从巨噬细胞之释出。参见图 15, 其显示由感染 DV 之 CD14+ 巨噬细胞分泌入培养上清液之 TNF- $\alpha$  之 ELISA 测量值。依照标准命名法, 各抗体以分泌其之杂交瘤之株编号称之。所以本发明亦提供分泌上述单株抗体之杂交瘤。

[0344] 该等结果证明抗 -DVL1/CLEC5A 抗体在人类中将可做为治疗剂, 防止促发炎症性细胞激素从 DV 所感染之 CD14+ 巨噬细胞释出。特定而言, 但非限制性地, 本实施例之单株抗体、或其片段、或与本实施例之抗体结合相同抗原决定部位之抗体 (或其片段) 可被调配成医药组合物, 然后依照本文所提供之方法投与, 以用于治疗或预防人类 DV 感染。

**[0345] 实施例 16 : 测定免疫细胞上由登革热病毒活化之模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs)**

[0346] 树状细胞 (DC) 及巨噬细胞系 DV 感染之主要标靶 (Halstead et al., J. Exp. Med. 1977, 146 : 201-217; Palucka, Nat. Med. 2000, 6 : 748-749; Wu et al., Nat. Med. 2000, 6 : 816-820)。虽然经感染之 DCs 会进行脱噬 (任凭旁观之 DCs 分泌促发炎症性细胞激素)

(Palmer et al., J. Virol. 2005, 79, 2432-2439), 经感染之巨噬细胞却会存活至少 45 天并自感染后 6 小时起分泌多种细胞激素及化学激素 (Chen et al., J. Virol. 2002, 76: 9877-9887)。此种情形暗示巨噬细胞为 DV 感染后之促发炎症性细胞激素的主要来源, 其中病毒粒子可能会藉由活化模式识别受体 (PRRs) 而启动发炎反应。在此内容中, 类铎受体 (TLRs)、C- 型凝集素及类免疫球蛋白 (类 Ig) 受体 (如 TREMs 及类 TREM 受体 (TLT)) 已经暗示为潜在之 PRRs (Cook et al., Nat. Immunol. 2004, 5, 975-979; Klesney-Tait et al., Nat. Immunol. 2006, 7, 1266-1273; Rovinson et al., Nat. Immunol. 2006, 7, 1258-1265)。

[0347] 为判定登革热病毒是否可结合并活化免疫细胞上之后选 PRRs, 使二十二种融合蛋白质在哺乳动物细胞中表现, 并筛选其与 DV2 之交互作用 (表 2)。该等融合蛋白包含人类 IgG1. Fc 片段结合 C- 型凝集素及类 Ig 受体之胞外域。

[0348]

基因 记号	别名	前向引物	逆向引物
CLEC1A	CLEC1	<u>GGATCC</u> TTTCAGTACTACCAGCTCTCC (序列编号: 40)	<u>GAATTC</u> TCAGTCACCTTCGCCTAATGT (序列编号: 2)
CLEC1B	CLEC2	<u>GGATCC</u> CTGGGGATTGGTCTGTC (序列编号: 3)	<u>GAATTC</u> TTAAGGTAGTTGGTCCAC (序列编号: 4)
CLEC2B	AICL	<u>GGATCC</u> TCTCAGAGTTTATGCCCC (序列编号: 5)	<u>GGATCCCCC</u> ATTATCTTAGACAT (序列编号: 6)
CLEC4A	DCIR	<u>GGATCC</u> TTTCAAAAATATCTCAGCTT CTT (序列编号: 7)	<u>GAATTC</u> CATAAAGTGGATCTTCATCATC (序列编号: 8)
CLEC4C	BDCA2	<u>GGATCC</u> TTTATGTATAGCAAACTGTCAAG (序列编号: 9)	<u>GAATTC</u> TTATATGTAGATCTTCTTCATCTT (序列编号: 10)
CLEC4D	CLEC6	<u>GGATCC</u> CATCACAACTTTTCACGC'GT (序列编号: 41)	<u>GAATTC</u> CTAGTTC AATGTTGT'CCAGG (序列编号: 12)
CLEC4E	Mincle	<u>GAAGATCT</u> TACATTTCGCATCTTTCAAACC (序列编号: 13)	<u>GAATTC</u> CTAGTTC AATGTTGT'CCAGG (序列编号: 42)
CLEC4F	KCLR	<u>AGATCT</u> TACAGCAGACAAGACCTG (序列编号: 43)	<u>AGATCT</u> AGCGCCAGGAGCGCCCTCTG (序列编号: 44)
CLEC4K	郎罕细胞 特异蛋白 (Langerin)	<u>GGATCC</u> CGGTTTATGGGCACCATA (序列编号: 17)	<u>GGATCC</u> TCACGGTTCTGA'GGGAC (序列编号: 18)
CLEC4L	DC- SIGN	<u>GGATCC</u> AAGGTCCCCAGCTCCATAAG (序列编号: 19)	<u>GAATTC</u> CTACGCAGGAGGGGGGT (序列编号: 20)
CLEC4M	DC- SIGNR	<u>GGATCC</u> AAGGTCCCCAGCTCCCTAA (序列编号: 45)	<u>GAATTC</u> CTATTCGTCTCTGAAGCAGG (序列编号: 22)

[0349]

DLVR1/ CLEC5A	MDL-1	<u>AGATCTAGTAACGATGGTTTCACCAC</u> (序列编号: 23)	<u>GAATTCCTGTGATCATTGGCATTCTT</u> (序列编号: 24)
CLEC6A	树状细胞凝 集素-2 (Dectin-2)	<u>GGATCCACATATGGTGAAACTGGC</u> (序列编号: 25)	<u>GGATCCAGCTTCTACTCATAGGTA</u> (序列编号: 26)
CLEC7A	树状细胞凝 集素-1 (Dectin-1)	<u>GGATCCACCATGGCTATTTGGAGATCC</u> (序列编号: 27)	<u>GAATTCCTTACATTGAAAACCTCTTCTCAC</u> (序列编号: 46)
CLEC10A	HML2	<u>GGATCCTCCAAATTCAGAGGGACCTG</u> (序列编号: 29)	<u>GAATTCCTCAGTGACTCTCTGGCTG</u> (序列编号: 30)
CLEC12A	CLL-1	<u>GGATCCGTAACTTGAAGATAGAAATGAAA</u> (序列编号: 31)	<u>GAATTCCTCATGCCTCCCTAAAATATGTA</u> (序列编号: 47)
CLEC13B	DEC- 205	<u>GCCCAGTGCACCTACTATAG</u> (序列编号: 48)	<u>GTGCAC TGGGCTGTCTGGGTCC</u> (序列编号: 49)
NKG2D		<u>GGAGTGCTGTATTCCTAAAC</u> (序列编号: 50)	<u>GAATTCCTGGCTTTTATTGAGATGG</u> (序列编号: 51)
TREM1		<u>GAAGGATGAGGAAGACCAGGC</u> (序列编号: 52)	<u>CATCGGCAGTTGACTTGGGTG</u> (序列编号: 53)
TREM2		<u>AGGGTGGCATGGAGCCTCTC</u> (序列编号: 54)	<u>GAATTCACATGGGCATCCTCGAA</u> (序列编号: 55)
TLT1		<u>CAGCCATGGGCCTCACCTG</u> (序列编号: 56)	<u>GAATTCCTGGCTGGGTTCCAAAGGG</u> (序列编号: 57)
TLT2		<u>GAATTCCTGGCTGGGTTCCAAAGGG</u> (序列编号: 58)	<u>GAATTCCTGGTGCCTGATGGAGGGC</u> (序列编号: 59)

### [0350] 表 2 :重组受体 Fc 融合蛋白质之构筑

[0351] 如图 16 所示, DV 与 DLVR1/CLEC5A 具有交互作用。特定言之, 图 16a 显示由 ELISA 所测定之 DV ( $5 \times 10^6$  PFU) 与 DLVR1/CLEC5A ( $1 \mu\text{g}$ ) 之交互作用。在图 16b 中, 其以对抗 DV 套膜 (E) 蛋白质之 mAb 对 DV ( $5 \times 10^6$  PFU) 与受体 .Fc ( $5 \mu\text{g}$ ) 之复合物进行免疫沉淀并以西方转渍检测。图 16c 显示由 ELISA 所测定之 EDTA (10mM) 对 DLVR1/CLEC5A-DV 交互作用的抑制。图 16d 及 16e 显示糖竞争检定分析, 其中 DC-SIGN (CLEC4L) 及 DLVR1/CLEC5A 两者皆可增加 DV 对于人类 293T 细胞的结合 (图 16d), 而糖之添加则以剂量-相关性之方式抑制生物素化 DV 对于经 DC-SIGN-(左格) 或 DLVR1/CLEC5A-(右格) 转染之 293T 细胞的结合, 如以流动式细胞计量术测定 (图 16e)。根据图 16e, MFI 表示平均荧光强度。单糖体 (甘露糖及岩藻糖) 及多糖体 (甘露聚糖) 之单位 (U) 分别为 mM 及 mg/ml。图 16f 显示 PNGaseF (500U)、DTT (0.1M)、热 ( $95^\circ\text{C}$  5 分钟) 或 UV ( $10\text{J}/\text{cm}^2$ ) 对于 DLVR1/CLEC5A-DV 交互作用的效应, 如以 ELISA 所测定。数据系以三次独立试验之平均值  $\pm$  s. d. 表示。进行双尾学生 t 试验。

[0352] 在所试验之受体中, DC-SIGN 已于先前显示可与位于 DV 套膜 (E) 蛋白质上之聚糖产生交互作用 (Pokidysheva, E. et al., Cell 124 :485-93 (2006))。使用 ELISA, DLVR1/CLEC5A. Fc (在 DC-SIGN. Fc 及 DC-SIGNR. Fc 之外) 显示可捕捉 DV2 (图 16a)。为确认 DLVR1/CLEC5A 与 DV 间交互作用之特异性, 以蛋白质 A 琼脂糖 (Sepharose) 珠粒免疫沉淀复合物, 接着以抗 -DV 套膜 (抗 -E) 单株抗体 (mAb) 进行探测。在 DC-SIGN. Fc 及 DLVR1/CLEC5A. Fc 之免疫沉淀物中检测到 E 蛋白, 因此确认 DLVR1/CLEC5A 可与登革热病毒粒子产生交互作用

(图 16b)。然而,尽管 DC-SIGN 对 DV 之结合为  $\text{Ca}^{++}$ -相关性,EDTA(一种  $\text{Ca}^{++}$  螯合剂)对于 DLVR1/CLEC5A-DV 交互作用则并无效应(图 1c)。再者,以 DC-SIGN 及 DLVR1/CLEC5A 转染 293T 细胞造成生物素化 DV 对该等细胞的结合增加(图 1d)。

[0353] 在 E 蛋白质之 Asn-67 及 Asn-153 共有两个保守性之 N-连结性糖基化位点(Pokidysheva, E. et al., Cell 124:485-93(2006)),且该等连附之聚糖已被证实涉及细胞连附及病毒进入(Modis, Y. et al., J. Virol. 79:1223-2131(2005))。为研究聚糖在 DLVR1/CLEC5A 与 DV 连结中之参与情形,使病毒粒子与岩藻糖、甘露糖、或甘露聚糖共同培育;其中至少两种糖为 DC-SIGN 之配体(Mitchell et al., J. Biol. Chem. 276:28939-28945(2006))。如所预期,甘露糖及甘露聚糖造成 DC-SIGN-DV 交互作用之剂量-相关性抑制(图 16e),而 DLVR1/CLEC5A 对 DV 之结合则在岩藻糖存在下显着降低( $p < 00001$ ),且在甘露聚糖存在下有较低程度之降低( $p = 0.0005$ )。以 PNGaseF 对 DV 进行预处理亦显着降低 DLVR1/CLEC5A-DV 交互作用(图 16f),其建议存在于病毒 E 蛋白上之聚糖为结合所必要者。亦发现热处理或二硫苏糖醇(DTT)可遏止 DLVR1/CLEC5A-DV 交互作用(图 16f),此建议聚糖在登革热病毒粒子上之正确拓朴分布系重要的。

#### [0354] 实施例 17:DC-SIGN 及 DVL1/CLEC5A 与登革热病毒之交互作用

[0355] 图 17 显示 DC-SIGN 及 DVL1/CLEC5A 在人类 PBMCs 中之表现模式。以缀合有 PE 之抗-CD 标记抗体(BD PharMingen)以及缀合有 FITC 之抗-DC-SIGN mAb(根据图 17a 所示之具体例)或缀合有 FITC 之抗-DVL1/CLEC5A mAb(R&D Systems)(根据图 17b 所示之具体例),对刚单离之 PBMCs 进行双重染色。选通(gate)CD 标记阳性细胞以测定 DC-SIGN 及 DVL1/CLEC5A(虚线)之表现。阴影区域代表同种型对照组。

[0356] DC-SIGN(其系表现于 DCs 及巨噬细胞上(图 17a))在其细胞质尾部含有三种基序,该等基序咸信涉及细胞吞噬作用或胞内运输(Lozach et al., J. Biol. Chem. 2005, 280, 2369823708)。相对的, DVL1/CLEC5A 则原始经辨识为仅表现在单核细胞及巨噬细胞上之 DAP12-相关分子(图 17b),然其配体及生物功能仍待测定(Bakker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 97929796)。

#### [0357] 实施例 18:DVL1/CLEC5A 对于 DV 诱导之 DAP12 磷酸化具必要性,但对于登革热病毒之复制则不具必要性

[0358] 根据图 18 所示之具体例, DVL1/CLEC5A 对于 DV 诱导之 DAP12 磷酸化具必要性,但对于登革热病毒之复制则不具必要性。特定言之,在图 18 中,其在西方转渍分析上使用针对磷酸酪氨酸及 DAP12 之抗体,测定人类巨噬细胞中之 DV 诱导之 DAP12 磷酸化(2h p. i.)。图 18b 说明由 DV 及经 UV-失活之 DV(UV-DV)诱导之 DAP12 磷酸化的动力学。图 18c 说明 shRNAs 使 DVL1/CLEC5A 及 DC-SIGN 之表现下降(knock down)以及抑制 DV-媒介(m. o. i. = 5)之 DAP12 磷酸化的能力。图 18d 显示 shRNAs 对于巨噬细胞中之 DV 进入及复制的效应,如以流动式细胞计量术所测定。图 18e 说明以共轭焦显微镜所检验到之抗-DVL1/CLEC5A mAb、抗-DC-SIGN mAb、及小鼠 IgG(50  $\mu$ g/ml)对于非结构蛋白质 NS3(红色;经 Cy3 标记)表现的效应(Tassaneetrithep, B. et al., J. Exp. Med. 197:823-29(2003))。以 Hoechst 33342(蓝色)对比染色细胞。在图 18d 及图 18e 两者中,巨噬细胞经 DV 感染(m. o. i. = 5)以测定感染后 48 小时之 NS3 表现。图 18f 显示 shRNAs 对于经感染巨噬细胞之 DV 滴度的效应。

[0359] 发现以 DV 感染巨噬细胞可以剂量 - 相关性之方式诱发 DAP12 磷酸化 (图 18a)。在活 DV 存在下, DAP12 磷酸化在感染后 (p. i.) 12 小时达到峰值并持续至少 48 小时, 而经 UV- 失活之登革热病毒 (UV-DV) 则只可启动仅持续 12 小时之有限 DAP12 磷酸化 (图 18b), 此指出在感染最初之 2-6 小时, DAP12 磷酸化系与 DV 复制无关。DVL1/CLEC5A 之下降 (knock down) (使用 shRNA pLL3.7/DVL1/CLEC5A 会造成 DAP12 磷酸化之显著减少, 但 DC-SIGN 之下降 (由 pLL3.7/DC-SIGN 造成) 则否 (图 18c), 此建议由 DV 引发之 DAP12 磷酸化系经由 DVL1/CLEC5A 媒介。

[0360] 已知 DC-SIGN 涉及 DV 对于 DCs 之感染 (Navarro-Sanchez et al., EMBO Rep. 4 : 723-28(2003); Tassanetrothep et al., J. Exp. Med. 197 :823-829(2003))。因此, 藉由监测 DV 非结构蛋白质 3(NS3) 之表现 (其系在 DV 于巨噬细胞中复制时表现), 试验 DVL1/CLEC5A 是否涉及 DV 进入巨噬细胞。与 DC-SIGN 相反, 以 shRNA 使 DVL1/CLEC5A 下降 (图 18d) 或是以抗-DVL1/CLEC5AAb 阻断 DVL1/CLEC5A-DV 交互作用 (图 18e) 并不会抑制巨噬细胞中之 NS3 表现, 如以流动式细胞计量术及共轭焦显微镜检所分别检验。shRNA pLL3.7/DVL1/CLEC5A 亦无法抑制登革热病毒粒子释出至经感染巨噬细胞之上清液中, 如以成斑检定分析而测定 (图 18f)。此等结果指出, DC-SIGN 会中介 DV 感染及复制, 而 DV 与 DVL1/CLEC5A 之交互作用则会启动细胞信号传导。

[0361] 实施例 19 :DVL1/CLEC5A- 登革热病毒交互作用之抑制可压抑经感染巨噬细胞之发炎反应而不影响病毒清除反应

[0362] 为测定 DVL1/CLEC5A 是否涉及 DV 诱导之发炎反应, 检验巨噬细胞在 DV 感染后之发炎性细胞激素分泌。

[0363] 根据图 19 所示之具体例, DVL1/CLEC5A 对于 DV- 媒介之 TNF- $\alpha$  分泌相当必要, 但对 INF- $\alpha$  分泌则否。更特定言之, 图 19a 说明巨噬细胞之 DV 及 UV-DV 诱导性 TNF- $\alpha$  分泌的剂量 - 相关性, 如以 ELISA 在 6h 及 12h p. i. 测量。图 19b 说明 DV 感染 (m. o. i. = 5) 后之 INF- $\alpha$  表现的动力学。图 19c 说明 DVL1/CLEC5A 及 DC-SIGN shRNA 对于 TNF- $\alpha$ 、IL-6、MIP1- $\alpha$ 、IL-8、IP-10 及 INF- $\alpha$  自经 DV 感染 (m. o. i. = 5) 之巨噬细胞分泌的效应。在图 19d 中, 以受体特异性 shRNA 所进行之下降 (knock down) 实验说明, DV 诱导之 INF- $\alpha$  分泌系经由 TLR7-MyD88 途径而 TNF- $\alpha$  分泌系经由 DVL1/CLEC5A-TLR7-MyD88 途径。图 19e 说明可抑制反应 DV 血清型 1-4 之 TNF- $\alpha$  分泌的拮抗性抗-DVL1/CLEC5A mAbs 受到抑制 (参见表 3)。

[0364]

纯系	同种型	ELISA	W.B.	FACS	拮抗性				催动性
					DV1	DV2	DV3	DV4	
3E12C1	1gG1	+	+	+	**	**	**	*	-
3E12A2	1gG1	+	+	+	**	**	**	*	-
3E12G9	1gG1	+	+	+	-	**	**	-	-
8H8F5	1gG1	+	+	+	*	***	**	*	-
2H11	1gM	+	-	+	-	-	-	-	+
9B12H4	1gM	+	-	+	***	***	-	-	-

[0365] 表 3: 抗-人类 DVL1/CLEC5A mAbs 之特征。" \*"  $-p < 0.05$ ; " \*\* "  $-p < 0.01$ ; " \*\*\* "  $-p < 0.001$ 。抗体 ( $10 \mu\text{g}$ /样本) 可抑制由人类巨噬细胞之 DV 诱导性 TNF- $\alpha$  分泌。进行双尾学生 t 试验并将数据与各个适当之同种型控制组抗体比较。可启动由人类巨噬细胞之 TNF- $\alpha$  分泌 (相较于同种型控制组) 的抗体定义为催动性。特异性由使用 pLL3.7/DVL1/CLEC5A-shRNA 遏止 TNF- $\alpha$  分泌而确认 (pLL3.7 载体及 pLL3.7/DC-SIGN 对于抗体-媒介之 TNF- $\alpha$  分泌并无效应)。ELISA, 酶键连免疫吸附检定分析; WB, 西方转渍; FACS, 荧光活化细胞分选。抗体系不含迭氮化物、经无菌过滤、且具有低于每毫克 0.1EU 之内毒素量。

[0366] 使用 M. R. mAb (抗-甘露糖受体 mAb; mIgG1) 及小鼠 IgM (mIgM) 作为阴性控制组。在图 19d 及图 19e 两者中, 以 DV 感染巨噬细胞 (m. o. i. = 5), 并在 36h p. i. 收集进行细胞激素检定分析。数据系以三次独立试验 (使用来自至少三位不同捐血者之材料进行) 之平均值  $\pm$  s. d. 表示。进行双尾学生 t 试验。" ND " 表示未检测。

[0367] 在 6h p. i., 检测到剂量-相关性之 TNF- $\alpha$  分泌, 其中经 DV 或 UV-DV 感染之巨噬细胞分泌类似量之细胞激素 (图 19a, 左格)。然而, 在 12h p. i., DV 会进一步增加 TNF- $\alpha$  分泌, 而 UV-DV 则不会 (图 19a, 右格)。在 48h 之时程中, 经 DV 感染之巨噬细胞的 TNF- $\alpha$  分泌持续增加, 而在以 UV-DV 感染后 24h-48h, 此种细胞激素几乎无法检测到 (图 19b)。此等数据符合 DAP12 之动力学 (图 18b), 因而建议 DV 媒介之 TNF- $\alpha$  分泌系与 DAP12 之活化相关。其亦观察到, DVL1/CLEC5A 下降 (knock down) 会以大于 DC-SIGN 下降之程度, 抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、MIP1- $\alpha$ 、及 IP-10 自经 DV 感染之巨噬细胞释出 (图 19c)。然而, pLL3.7/DC-SIGN 可轻微抑制 TNF- $\alpha$  之分泌 ( $p = 0.048$ ), 而 pLL3.7/DVL1/CLEC5A 则对 TNF- $\alpha$  无作用 (图 19c)。

[0368] 为进一步了解导致细胞激素分泌之由 DV 活化之信号传导途径, 在 DV 感染之前, 以 shRNAs 转染巨噬细胞, 以使 DVL1/CLEC5A、DC-SIGN、TLR4、TLR7 或 MyD88 下降。所得之数据指出, DV 诱导之 TNF- $\alpha$  分泌系经由 TLR7-MyD88 途径产生 ( $p = 0.0016$ ), 而 TNF- $\alpha$  分泌则系由 DVL1/CLEC5A ( $p = 0.0013$ ) 及 TLR7-MyD88 ( $p = 0.013$ ) 两者媒介 (图 19d)。产生一组抗-DVL1/CLEC5A mAbs, 其对于 DV 之四种血清型具有不同之拮抗效应 (见上文表 3), 如以自经 DV 感染之巨噬细胞之 TNF- $\alpha$  分泌的抑制所测定 (图 3e)。此等数据指出, 尽管 DVL1/CLEC5A 之不同抗原决定部位似乎媒介个别之交互作用, 能够抑制 DVL1/CLEC5A 之抗体却可压抑经相关 DV 血清型感染之巨噬细胞的发炎反应。抗-DVL1/CLEC5AmAbs 之

不同拮抗效应可能系与各 DV 血清型系和 DVL1/CLEC5A 之迥异抗原决定部位结合的事实有关,而抗 -DVL1/CLEC5AmAb 可抑制结合位点与抗 -DVL1/CLEC5A mAb 之结合位点重叠之特异 DV 血清型的结合。

**[0369] 实施例 20 :由抗体相关性增强 (antibody-dependent enhancement, ADE) 媒介之 INF- $\alpha$  分泌与 DVL1/CLEC5A 无相关性**

**[0370]** 先前已经证明,非中和性抗 -DV Abs 可促进 DV 经由 FcR 受体进入靶细胞,并因而增进细胞激素释放 (Halstead et al., J. Exp. Med. 146 :201-217(1977);Goncalvez et al., Proc Natl Acad Sci USA 104 :9422-9427(2007)),此系称为感染之抗体相关性增强 (ADE) 的现象。举例而言,抗 -prM 及抗 -EmAb 已经显示可在试管内诱导此效应 (Huang et al., J. Immunol 176 :2825-2832(2006))。在此,针对 DVL1/CLEC5A-DV 交互作用之封阻是否可抑制 ADE 而进行研究。

**[0371]** 根据图 20 所示之具体例,DVL1/CLEC5A 对于 ADE 媒介之 TNF- $\alpha$  分泌具必要性,但对于 INF- $\alpha$  分泌则不具必要性。更特定言之,在图 20a 中,其以 DV (m. o. i. = 5)、DV/抗 -E、或 DV/抗 -prM 免疫复合物 (ADE) 感染巨噬细胞 36h,接着以抗 -NS3mAb 检测 DV 复制。在拮抗性抗 -DVL1/CLEC5A mAb (1  $\mu$ g; 纯系 9B12H4) 或同种型控制组存在下,以 DV2 (图 20b)、或是 DV/抗 -prM 或 DV/抗 -E 复合物 (图 20c) 感染取自 10 名个体之巨噬细胞。以 ELISA 测定 TNF- $\alpha$  及 INF- $\alpha$  分泌。进行双尾学生 t 试验。

**[0372]** 在抗 -DVL1/CLEC5A mAb (或同种型控制组) 存在下,单以 DV 或是结合抗 -prM/DV 或抗 -E/DV 免疫复合物而感染原代人类巨噬细胞 36h。发现相较于仅使用 DV 者,抗 -prM/DV 或抗 -E/DV 免疫复合物 (ADE) 可增加 NS3 之表现 (图 20a) 以及 TNF- $\alpha$  及 INF- $\alpha$  之分泌量 (图 20b 及 20c)。然而,在抗 -DVL1/CLEC5A mAb 显著抑制由经 DV、抗 -prM/DV、及抗 -E/DV 免疫复合物感染之巨噬细胞的 TNF- $\alpha$  分泌时 (图 20c), INF- $\alpha$  之分泌却不受影响,因此建议由 ADE 媒介之 INF- $\alpha$  分泌与 DVL1/CLEC5A 无相关性 (与上文关于 DV 诱导之 INF- $\alpha$  生产所注记者相同)。

**[0373] 实施例 21 :DVL1/CLEC5A 在登革热病毒诱导之血管渗漏中的参与**

**[0374]** DHF 及 DSS 之特点系血浆渗漏以及皮下及生命器官 (vital organ) 出血。此等症状系由免疫细胞释出诸多可溶性媒介分子及细胞激素而增加血管通透性所造成 (Green et al., Curr. Opin. Infect. Dis. 19 :429-436(2006))。为测定 DVL1/CLEC5A 是否涉及 DV 诱导之血管渗漏,将人类真皮微血管内皮细胞 (HMEC-1) 之单层用于通透性检定分析中 (Carr et al., J. Med. Virol. 69 :521-528(2003))。

**[0375]** 根据图 21 所示之具体例,拮抗性抗 -DVL1/CLEC5A mAbs 可拯救经 DV 感染之巨噬细胞上清液对内皮细胞单层所造成之通透化。更特定言之,图 21a 说明在与取自经 DV 或 DV/抗 -prM 复合物 (ADE) 感染之巨噬细胞的上清液进行培育后,由 HRP 迁移测量所测定之 HMEC-1 单层之通透性随时间之变化。上清液中之 TNF- $\alpha$  含量以 ELISA 测量。如图 21b 所示,测定 TNFR2. Fc (5  $\mu$ g/ml) 及抗 -DVL1/CLEC5A (纯系 9B12H4 ;5  $\mu$ g/ml) 对于内皮细胞单层通透化之抑制作用。数据系以三次独立试验之平均值  $\pm$  s. d. 表示。进行双尾学生 t 试验。

**[0376]** 发现取自经 DV 或抗 -prM/DV 免疫复合物感染之巨噬细胞的上清液可诱导 HMEC-1 单层之通透性;其中在感染之最初 36h-48h,免疫复合物 (ADE) 可产生较单独之 DV 更为显

着之效应 (图 21a, 左)。再者, 尽管重组 TNFR2. Fc 之 TNF- $\alpha$  中和亦可部分抑制由 DV 或抗 -prM/DV 所启动之通透性诱导 ( $p < 0.005$ ) (图 21b), 抗 -DVL1/CLEC5A 在此方面却更为有效 (图 21b)。其观察到, 在 TNF- $\alpha$  之外, 抗 -DVL1/CLEC5A 尚可封阻巨噬细胞之其它炎性细胞激素分泌, 此可能可解释此种现象。

**[0377] 实施例 22 :拮抗性 mAbs 与登革热病毒诱导之 TNF- $\alpha$  分泌间的剂量 - 相关性交互作用**

[0378] 针对 DV-CLEC5A 交互作用的封阻是否可在活体内拯救小鼠不受 DV 诱导之死亡而进行进一步之研究。根据图 22 所示之具体例, 其显示 mDVL1/CLEC5A 与 DV 之交互作用 (图 22a) 以及 mDVL1/CLEC5A 在小鼠细胞中之表现模式 (图 22b 及 22c)。更特定言之, 图 22a 显示由 ELISA 所测定之 DV ( $5 \times 10^6$  PFU) 与人类及小鼠 DLVR1/CLEC5A. Fc ( $1 \mu$ g) 的交互作用。选通 (gate)F4/80 及 CD 标记阳性细胞以测定 mDVL1/CLEC5A 在小鼠脾细胞 (图 22b)、小鼠骨髓 (BM) - 衍生性巨噬细胞及小鼠似巨噬细胞 Raw264. 7 细胞 (图 22b 及 22c) 中之表现。

[0379] 发现小鼠 DVL1/CLEC5A (mDVL1/CLEC5A) 可以类似人类 DVL1/CLEC5A 之亲和力结合 DV (图 22a), 且 mDVL1/CLEC5A 表现于骨髓细胞谱系 (CD11b+, F4/80+)、骨髓衍生性巨噬细胞及小鼠似巨噬细胞 Raw264. 7 细胞 (图 22b 及 22c)。

**[0380] 实施例 23 :mDVL1/CLEC5A-DV 交互作用之封阻可压抑自 Raw264. 7 细胞之 DV 诱导性 TNF- $\alpha$  分泌**

[0381] 根据图 23 所示之具体例, mDVL1/CLEC5A-DV 交互作用之封阻可压抑自 Raw264. 7 细胞之 DV 诱导性 TNF- $\alpha$  分泌。更特定言之, 图 23a 显示人类 DC-SIGN 可增加 DV 与小鼠巨噬细胞细胞系 Raw264. 7 之结合, 并增强 DV 感染之刺激效应。以 ELISA 测定 TNF- $\alpha$  之释出。图 23b 显示拮抗性 mAbs 对于小鼠 DVL1/CLEC5A 之辨识。在 mAbs 之存在下, 使之存在下, 使稳定表现人类 DC-SIGN 之 Raw264. 7 细胞与 DV2 (PL046 ;m. o. i. = 30) 共同进行培育。以 ELISA 测定上清液中之 TNF- $\alpha$  量 (在 48h p. i.)。图 23c 显示抗 -DVL1/CLEC5A mAbs (纯系 :3D2H6 及 10D7H3) 可以剂量 - 相关性之方式抑制 DV2-(NGC-N ;m. o. i. = 30) 诱导之 TNF- $\alpha$  释出。以 mIgG1 作为同种型相符之阴性控制组。

[0382] DV 会刺激稳定表现人类 DC-SIGN 之 Raw264. 7 细胞 (Raw264. 7/DC-SIGN) 分泌 TNF- $\alpha$  (图 23a), 而以拮抗性 mAbs (表 4) 封阻 mDVL1/CLEC5A-DV 交互作用可以剂量 - 相关性之方式遏止 Raw264. 7/DC-SIGN 细胞之 DV 诱导性 TNF- $\alpha$  分泌 (图 23b 及 23c)。

	纯系	同种型	ELISA	FACS	拮抗效应	
					DV2	DV2(NGC-N)
	3D2H6	1gG1	+	+	*	**
[0383]	9D8E9	1gG1	+	ND	*	ND
	9D9F9	1Gg1	+	ND	-	ND
	1A10F9	1gG1	+	ND	-	ND
	10D7G4	1Gg1	+	ND	-	ND
	10D7H3	1Gg1	+	+	*	*

[0384] 表 4 : 抗 - 小鼠 DVL1/CLEC5A mAbs 之特征。 " \* " - $p < 0.05$  ; " \*\* " - $p$

$< 0.01$ ; "ND" - 未进行。抗体可抑制由小鼠巨噬细胞细胞系 Raw264.7/DC-SIGN 之 DV 诱导性 TNF- $\alpha$  分泌。进行双尾学生 t 试验并将数据与各个适当之同种型控制组抗体比较。ELISA, 酶键连免疫吸附检定分析; FACS, 荧光活化细胞分选。抗体系不含迭氮化物、经无菌过滤、且具有低于每毫克 0.1EU 之内毒素量。

[0385] 实施例 24: 登革热病毒 (NGC-N) 可诱导 STAT1<sup>-/-</sup> 小鼠之死亡

[0386] 根据图 24 所示之具体例, 以一剂量范围 (自 102 至 105PFU) 之 DV2/PL046 或 DV2/NGC-N 系 (i. p. 及 i. c 途径) 挑战 STAT1<sup>-/-</sup> 小鼠 (n = 5/组) 4 周。数据以 Kaplan-Meier 存活曲线表示。

[0387] INF- $\alpha$  可作用而抑制经感染及未经感染细胞两者中之病毒复制, 而对于 DV 感染之 INF 媒介性反应同时涉及 STAT1- 相关性途径 (对于病毒复制之控制为必要) 及 STAT1- 无相关性途径 (对于感染之消散为必要) 两者 (Shresta et al., J. Immunol. 175: 3946-3954(2005))。尽管野生型之小鼠对于 DV 感染具有抗性, STAT1 缺陷 (STAT1<sup>-/-</sup>) (Durbin et al., Cell 84:443-450(1996)) 小鼠对于 DV2-9 (New Guinea C-N 系) 诱导之死亡则为敏感 (图 24)。

[0388] 实施例 25: 拮抗性 mAbs 对抗 DVL1/CLEC5A 之潜在治疗效应

[0389] 针对拮抗性 mAbs 对 STAT1<sup>-/-</sup> 小鼠之潜在治疗效应进行进一步试验。根据图 25 所示之具体例, 抗 -DVL1/CLEC5AmAbs 可在 STAT1 缺陷小鼠体内预防 DV 诱导之血管渗漏及死亡。更特定言之, 在图 25a 中, 对抗小鼠 DVL1/CLEC5A 培育之 mAb 3D2H6 可抑制经 DV 挑战之 STAT1<sup>-/-</sup> 小鼠的皮下及肠道出血。在图 25b 中, 对抗 DVL1/CLEC5A 之 mAb (3D2H6 及 10D7H3) 可减少经 DV 挑战之 STAT1<sup>-/-</sup> 小鼠的血浆渗漏进入生命器官, 如以 Evans 蓝检定分析所测定。图 25c 说明借着自器官萃取 Evans 蓝而进行之血管通透性定量。数据系以三次独立试验之平均值  $\pm$  s. d. 表示: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (学生 t 试验)。图 25d 说明于有及无抗 -DVL1/CLEC5A mAbs 或 TNFR2. Fc 存在下, 经 DV 挑战之 STAT1<sup>-/-</sup> 小鼠在 p. i. 第 7 天之 TNF- $\alpha$  及 IP-10 之血清含量 (n = 8; 上及中) 以及病毒滴度 (n = 4; 下)。进行双尾学生 t 试验。图 25e 说明在拮抗性抗 -DVL1/CLEC5AmAbs 或 TNFR2. Fc 存在下, 经 DV2 (New Guinea C-N 系,  $1 \times 10^5$  PFU/小鼠, i. p. 加 i. c 途径) 挑战之 STAT1 缺陷小鼠的存活曲线。数据系取自四次独立试验 (每组各 17 只小鼠), 并以 Kaplan-Meier 存活曲线并使用指数系列法 (log rank test) 表示。指出对于 DVL1/CLEC5A mAbs 及小鼠 IgG 治疗间之显著差异的 p 值。

[0390] 在 p. i. 第 8 天, 除皮下及肠道出血之外, 经 DV 挑战之 STAT1<sup>-/-</sup> 小鼠尚有毛发折皱 (Ruffled fur) 及轻微之瘫痪 (图 25a), 且在感染 7-14 天内皆死亡 (图 25e)。在 p. i. 第 0、1、3、5 及 7 天, 投与 5 剂之 Abs (100  $\mu$  g/小鼠, i. p.) 或 TNFR2. Fc (100  $\mu$  g/小鼠, i. p.)。在 p. i. 第 9 天, 经抗 -DVL1/CLEC5AmAbs 治疗小鼠体内渗漏进入经 DV 挑战小鼠肾脏、肝脏、胃、小肠、大肠、及胰脏之 Evans 蓝量相较于控制组显著减少 (图 25b 及 25c)。抗 -DVL1/CLEC5A mAbs 亦显著降低 TNF- $\alpha$  及 IP-10 之血清含量 (图 25d; 上及中), 且在 p. i. 第 7 天未压抑病毒复制 (图 25d; 下), 并在 p. i. 第 14 天保护小鼠不会死亡 (70% 保护率)。在 p. i. 第 21 天所观察到之经抗 -DVL1/CLEC5A mAbs 治疗小鼠的整体存活率为 48% (图 25e), 且在 p. i. 第 23 天 DV 自存活小鼠之血清中清除 (数据未示)。因此, DVL1/CLEC5A-DV 交互作用之封阻似乎可防止与 DV 相关之出血及血浆渗漏并发症, 并可压抑巨噬细胞发炎

反应,且不会损害适应性免疫系统之病毒清除。相对的, TNFR2. Fc 既不可降低血管通透性(图 25c),亦不可保护小鼠不会死亡(图 25e),尽管其可有效降低 TNF- $\alpha$  之血清含量(图 25d)。

**[0391] 实施例 26 :DVL1/CLEC5A 涉及 JEV 媒介之 DAP12 磷酸化作用及自人类巨噬细胞之 TNF- $\alpha$  分泌**

[0392] 和 DV 相似, JEV 具有类似之病毒感染反应模式,其咸信在所有黄病毒中皆为相同或相似。如图 26a 所示,分别以 ELISA 测定 DVL1/CLEC5A (1  $\mu$  g) 与 JEV 及 DV ( $5 \times 10^6$  PFU) 之交互作用。DV 与人类 DVL1/CLEC5A (长度 187 氨基酸) 序列编号 :72 具交互作用,但与可变剪接形式 sDVL1/CLEC5A (aa 43-65 缺失) 序列编号 :73 则否。相对的, JEV 仅与 sDVL1/CLEC5A 具交互作用,但与全长 DVL1/CLEC5A 则否。如图 26b 所示,其显示 DV 可在人类巨噬细胞中诱导 DAP12 磷酸化作用(在 2h p. i.)。以抗 -DAP12mAb 沉淀经 DV 感染之巨噬细胞中的 DAP12,在 SDS-PAGE 分离后将其转渍至硝基纤维素膜上,接着再与对抗磷酸酪氨酸及 DAP12 之抗体分别进行培育。JEV 诱导之 DAP12 磷酸化作用 (m. o. i. = 5) 由 pLL3.7/DVL1/CLEC5A 抑制。如图 26c 所示,其显示人类巨噬细胞反应 JEV 感染之 TNF- $\alpha$  分泌的动力学(左)。JEV 诱导之 TNF- $\alpha$  分泌由 pLL3.7/DVL1/CLEC5A mAb 抑制(右)。数据系以三次独立试验之平均值  $\pm$  s. d. 表示。

**[0393] 实施例 27 :mAb 3E12A2 之可变重及轻链序列**

[0394] mAb 3E12A2 之可变重链序列示于下文(序列编号 :60) :

[0395] 1 CAGGTGCAGC TCGAGGAGTC AGGACCTGAG CTGGTGAAAC CCGGGGCATC AGTGAAGCTG  
TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACCTTCACT GAGTATATTA

[0396] 101 TACACTGGGT AAAGCAGAGG TCTGGACAGG GTCTTGAGTG GATTGGGTGG TTTTACCCTG  
GAAGTGGTAG TATAAAGTAC AATGAGAAAT TCAAGGACAA

[0397] 201 GGCCACATTG ACTGCCGACA AATCCTCCAG CACAGTCTAT ATGGAGCTTA GTGGATTGAC  
ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTGC AAGACACGAT

[0398] 301 GGTTACTCCT ACTTTGACTA CTGGGGCCAA GGCACCACTC TCACAGTCTC CTCAGCCAAA  
ACGACACCCC CATCTGTCTA TCCACTGGCC CCTGGATCTG

[0399] 401 CTGCCCAAAC TAACTCCATG GTGACCCTGG GATGCCTCGT CAAGGGCTAT TTCCCTGAGC  
CAGTGACAGT GACCTGGAAC TCTGGATCCC TGTCCAGCGG

[0400] 501 TGTGCACACC TTCCAGCTG TCCTGCAGTC TGACCTCTAC ACTCTGAGCA GCTCAGTGAC  
TGTCCCCTCC AGCACCTGGC CCAGCGAGAC CGTCACCTGC

[0401] 601 AACGTTGCC ACCCGGCCAG CAGCACCAAG GTGGACAAGA AAATTGTGCC CAGGGATTGT  
ACTAGTAAGC CT

[0402] mAb 3E12A2 之可变轻链序列示于下文(序列编号 :61) :

[0403] 1 CCAGTTCCGA GCTCGTGACA CAGTCTCCAT CCTCCCTGGC TGTGTCAGCA GGAGAGAAGG  
TCACTATGAG CTGCAAATCC AGTCAGAGTC TGCTCAACAG

[0404] 101 TAGAACCCGA AAGAACTACT TGGCTTGGTA CCAGCAGAAA CCAGGGCAGT CTCCTAAACT  
GCTGATCTAC TGGGCATCCA CTAGGGAATC TGGGGTCCCT

[0405] 201 GATCGCTTCA CAGGCAGTGG ATCTGGGACA GATTTCACTC TCACCATCAG CAGTGTGCAG  
GCTGAAGACC TGGCAGTTTA TTA CTGCAAG CAATCTTATA

[0406] 301 ATCTGTACAC GTTCGGAGGG GGGACCAAGC TGGAAATAAA ACGGGCTGAT GCTGCACCAA  
CTGTATCCAT CTTCCCACCA TCCAGTGAGC AGTTAACATC

[0407] 401 TGGAGGTGCC TCAGTCGTGT GCTTCTTGAA CAACTTCTAC CCCAAAGACA TCAATGTCAA  
GTGGAAGATT GATGGCAGTG AACGACAAAA TGGCGTCCTG

[0408] 501 AACAGTTGGA CTGATCAGGA CAGCAAAGAC AGCACCTACA GCATGAGCAG CACCCTCAGC  
TTGACCAAGG ACGAGTATGA ACGACATAAC AGCTATACCT

[0409] 601 GTGAGGCCAC TCACAAGACA TCAACTTCAC CCATTGTCAA GAGCTTCAAC AGGAATGAGT  
GTTAATTCTA GACGGCGC

[0410] 实施例 28 :mAb 3E12G9 之可变重及轻链序列

[0411] mAb 3E12G9 之可变重链序列示于下文 (序列编号 :62) :

[0412] 1 CAGGTGCAGC TCGACCAGTC AGGACCTGAG CTGGTGAAAC CCGGGGCATC AGTGAACCTG  
TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACCTTCACT GAGTATATTA

[0413] 101 TACACTGGGT AAAGCAGAGG TCTGGACAGK GTCTTGAGTG GATTGGGTGG TTTTACCCTG  
GAAGTGGTAG TATAAAGTAC AATGAGAAAT TCAAGGACAA

[0414] 201 GGCCACATTG ACTGCGGACA AATCCTCCAG CACAGTCTAT ATGGAGCTTA GTGGATTGAC  
ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTGC AAGACACGAT

[0415] 301 GGTTACTCCT ACTTTGACTA CTGGGGCCAA GGCACCACTC TCACAGTCTC CTCAGCCAAA  
ACGACACCCC CATCTGTCTA TCCACTGGCC CCTGGATCTG

[0416] 401 CTGCCCAAAC TAACTCCATG GTGACCCTGG GATGCCTGGT CAAGGGCTAT TTCCCTGAGC  
CAGTGACAGT GACCTGGAAC TCTGGATCCC TGTCACGCGG

[0417] 501 TGTGCACACC TTCCAGCTG TCCTGCAGTC TGACCTCTAC ACTCTGAGCA GCTCAGTGAC  
TGTCCCCTCC AGCACCTGGC CCAGCGAGAC CGTCACCTGC

[0418] 601 AACGTTGCC ACCCGGCCAG CAGCACCAAG GTGGACAAGA AAATTGTGCC CAGGGATTGT  
ACTAGTAAGC CT

[0419] mAb 3E12G9 之可变轻链序列示于下文 (序列编号 :63) :

[0420] 1 CCAGTTCCGA GCTCGTGACA CAGTCTCCAT CCTCCCTGGC TGTGTCAGCA GGAGAGAAGG  
TCACTATGAG CTGCAAATCC AGTCAGAGTC TGCTCAACAG

[0421] 101 TAGAACCCGA AAGAACTACT TGGCTTGTA CCAGCAGAAA CCAGGGCAGT CTCCTAAACT  
GCTGATCTAC TGGGCATCCA CTAGGGAATC TGGGGTCCCT

[0422] 201 GATCGCTTCA CAGGCAGTGG ATCTGGGACA GATTTCACTC TCACCATCAG CAGTGTGCAG  
GCTGAAGACC TGGCAGTTTA TTA CTGCAAG CAATCTTATA

[0423] 301 ATCTGTACAC GTTCGGAGGG GGGACCAAGC TGGAAATAAA ACGGGCTGAT GCTGCACCAA  
CTGTATCCAT CTTCCCACCA TCCAGTGAGC AGTTAACATC

[0424] 401 TGGAGGTGCC TCAGTCGTGT GCTTCTTGAA CAACTTCTAC CCCAAAGACA TCAATGTCAA  
GTGGAAGATT GATGGCAGTG AACGACAAAA TGGCGTCCTG

[0425] 501 AACAGTTGGA CTGATCAGGA CAGCAAAGAC AGCACCTACA GCATGAGCAG CACCCTCAGC  
TTGACCAAGG ACGAGTATGA ACGACATAAC AGCTATACCT

[0426] 601 GTGAGGCCAC TCACAAGACA TCAACTTCAC CCATTGTCAA GAGCTTCAAC AGGAATGAGT  
GTTAATTCTA GACGGCGC

[0427] 实施例 29 :mAb 8H8F5 之可变重及轻链序列

[0428] mAb 8H8F5 之可变重链序列示于下文 (序列编号 :64) :

[0429] 1 GAGGTGAAGC TCGAGGAGTC TGGACGAGGC TTAGTGCAGC CTGGAGGGTC CCGGAAACTC  
TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACTTTCAGT ACCTCTGGAA

[0430] 101 TGCAGTGGGT TCGTCAGGCT CCAGAGAAGG GGCTGGAGTG GGTCGCATAC ATTAGTAGTG  
GCAGCACTAC CATCTACCAT GCAGACACAG

[0431] TGAAGGGCCG

[0432] 201 ATTCACCATC TCCAGAGACA ATCCCAAGAA CACCCTGTTC CTGCAAATGA CCAGTCTAAG  
GTCTGAGGAC ACGGCCATGT ATTACTGTGC AAGATCGGGT

[0433] 101 CAGTTTGGTA ACTACTTTGA CTAAGGGGC CAAGGCACCA CTCTCACAGT CTCCTCAGCC  
AAAACGACAC CCCCATCTGT CTATCCACTG CCCCTGGATC

[0434] 401 TGCTGCCCAA ACTAACTCCA TGGTGACCCT GGGATGCCTG GTCAAGGGCT ATTTCCCTGA  
GCCAGTGACA GTGACCTGGA ACTCTGGATC CCTGTCCAGC

[0435] 501 GGTGTGCACA CCTTCCCAGC TGTCCCTGCAG TCTGACCTCT AACTCTGAG CAGCTCAGTG  
ACTGTCCCCT CCAGCACCTG GCCCAGCGAG ACCGTCACCT

[0436] 601 GCAACGTTGC CCACCCGGCC AGCAGCACCA AGGTGGACAA GAAAATTGTG CCCAGGGATT  
GTACTAGTAA GCCT

[0437] mAb 8H8F5 之可变轻链序列示于下文 (序列编号 :65) :

[0438] 1 CCAGATGTGA GCTCGTCATG ACCCAGTCTC CAAAATTCCT GCTTGTATCA GCAGGAGACA  
GGGTTACCCT AACCTGCAAG GCCAGTCAGA GTGTGAATAA

[0439] 101 TGATGTATAT TGGTACCAAC AGGAGCCAGG TCAGTCTCCT AACTGCTGA TATACTATGC  
ATCCAATCGC TAACTGGAG TCCCTGATCG CTTCCTGGC

[0440] 201 AGTGGATATG GGACGGATTT CACTTTCACC ATCAGCACTG TGCAGTCTGA AGACCTGGCA  
GTTTATTTCT GTCAGCACGA TTATAGCTCT CCGTACACGT

[0441] 301 TCGGAGGGGG GACCAAGCTG CAAATAAAAC GGGCTGATGC TGCACCAACT GTATCCATCT  
TCCCACCATC CAGTGAGCAG TTAACATCTG GAGGTGCCTC

[0442] 401 AGTCGTGTGC TTCTTGAACA ACTTCTACCC CAAAGACATC AATGTCAAGT GGAAGATTGA  
TGGCAGTGAA CGACAAAATG GCGTCCTGAA CAGTTGGACT

[0443] 501 GATCAGGACA GCAAAGACAG CACCTACAGC ATGAGCAGCA CCCTCACGTT GACCAAGGAC  
GAGTATGAAC GACATAACAG CTATACCTGT GAGGCCACTC

[0444] 501 ACAAGACATC AACTTCACCC ATGTCAAGA GCTTCAACAG GAATGAGTGT TAATTCTAGA  
CGGCGC

[0445] 实施例 30 :mAb 8H8F5、3E12A2、及 3E12G9 之可变重及轻链序列排比之比较

[0446] mAb 8H8F5、3E12A2、及 3E12G9 之可变重链排比之比较示于下文 (分

[0447] 10 20 30 40 50

[0448] 8H8F5VH4 ( -----ESGRG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS TSGMHWVRQA PEKGLEWVAY

[0449] 3E12A2VH1 QVQLEESGPE LVKPGASVKL SCKASGYTFT EYIIHWVKQR SGQGLEWIGW

[0450] 3E12G9VH9 QVQLEQSGPE LVKPGASVKL SCKASGYTFT EYIIHWVKQR SGQGLEWIGW

[0451] 60 70 80 90 100

- [0452] 8H8F5VH4( ISSGSTTIYH ADTVKGRFTI SRDNPKNLTF LQMTSLRSED TAMYVCARSG  
 [0453] 3E12A2VH1 FYPGSGSIKY NEKFKDKATL TADKSSSTVY MELSGLTSED SAVYFCARHD  
 [0454] 3E12G9VH9 FYPGSGSIKY NEKFKDKATL TADKSSSTVY MELSGLTSED SAVYFCARHD  
 [0455] 110  
 [0456] 8H8F5VH4( QFGNYFDYWG QGTTLTVSS (序列编号 :66)  
 [0457] 3E12A2VH1 GYS-YFDYWG QGTTLTV-- (序列编号 :67)  
 [0458] 3E12G9VH9 GYS-YFDYWG QGTTLTV-- (序列编号 :68)  
 [0459] 别为序列编号 :66、67、及 68) :  
 [0460] mAb 8H8F5、3E12A2、及 3E12G9 之可变轻链排比之比较示于下文 (分别为序列编号 :69、70、及 71) :

- [0461] 10 20 30 40 50  
 [0462] 8H8F5VL6( MTQSPKFLLV SAGDRVLTLC KASQSVNND- -----VYWYQ QEPGQSPKLL  
 [0463] 3E12A2VL6 --QSPSSLAV SAGEKVTMSC KSSQSLLNSR TRKNYLAWYQ QKPGQSPKLL  
 [0464] 3E12G9VL2 --QSPSSLAV SAGEKVTMSC KSSQSLLNSR TRKNYLAWYQ QKPGQSPKLL  
 [0465] 60 70 80 90 100  
 [0466] 8H8F5VL6( IYYASNRYTG VPDRFTGSGY GTDFTFTIST VQSEDLAVYF CQHDISSPYT  
 [0467] 3E12A2VL6 IYWASTRESG VPDRFTGSGS GTDFTLTISS VQAEDLAVYY CKQSYN-LYT  
 [0468] 3E12G9VL2 IYWASTRESG VPDRFTGSGS GTDFTLTISS VQAEDLAVYY CKQSYN-LYT  
 [0469] 110  
 [0470] 8H8F5VL6( FGGGTKLEIK R(序列编号 :69)  
 [0471] 3E12A2VL6 FGGGTKLEIK -(序列编号 :70)  
 [0472] 3E12G9VL2 FGGGTKLEIK -(序列编号 :71)

[0473] DVL1/CLEC5A 可与登革热病毒直接交互作用,并因而造成 DAP12 磷酸化。DVL1/CLEC5A-DV 交互作用之封阻可压抑促发炎症性细胞激素之分泌,且不影响干扰素- $\alpha$  之释出。再者,抗 -DVL1/CLEC5A 单株抗体可在 STAT1- 缺陷小鼠体内抑制 DV 诱导之血浆渗漏以及皮下及生命器官出血,并可检赏~50%之 DV 感染发生。该等结果建议, DV 启动之巨噬细胞的细胞因子释出涉及 DVL1/CLEC5A 及 TLR7 途径两者,而 DVL1/CLEC5A-DV 交互作用之封阻可使感染减活且不会阻止病毒之清除。然而,TLR7(或 MyD88) 受体之封阻会抑制促发炎症性细胞激素以及病毒清除细胞激素两者之分泌,其最后会阻止病毒清除以及感染。因此,登革热病毒以及诸如日本脑脊髓炎病毒之其它黄病毒的有效治疗需要减活对于 DVL1/CLEC5A 之病毒结合,但不应减活对于 TLR7 或 MyD88 受体之病毒结合。因此,以抗 -DVL1/CLEC5A 抗体封阻登革热病毒之结合可提供一种疗法对抗 DHF/DSS 病患体内之严重登革热进展。

[0474] 上述书面说明被认为足以使熟习本技术人士实施本发明。既然寄存之具体例仅系意欲例示说明本发明之某些态样以及在功能上对等的任何构筑体均在本发明之范围内,本发明在范围上不受寄存之杂交瘤所限。物质之寄存非表示承认本文之书面说明不足以实施本发明之任何态样(包括其最佳方式),亦不表示将申请专利范围限于其所代表之特定例示说明例。事实上,本发明之各种修饰,除了本文所例示及说明者外,其余亦为熟习本技术者所显而易见以及落在附属申请专利范围之范围内。

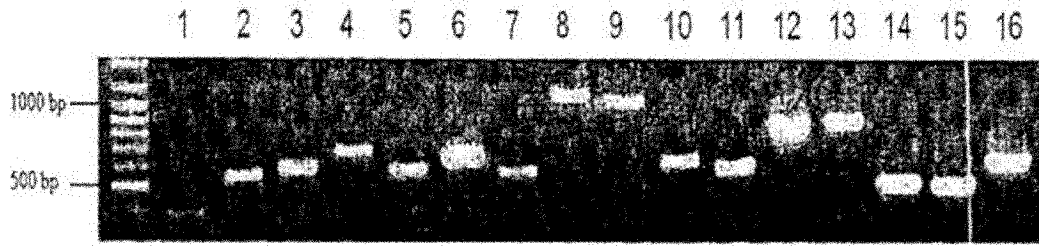


图 1A

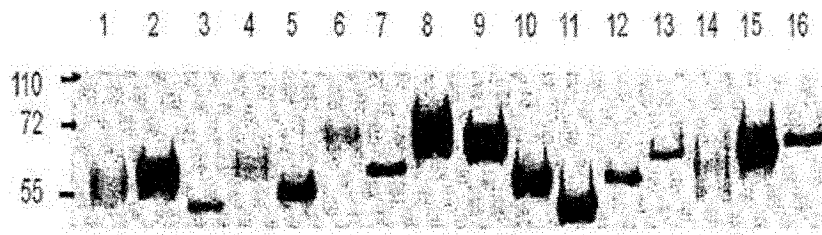


图 1B

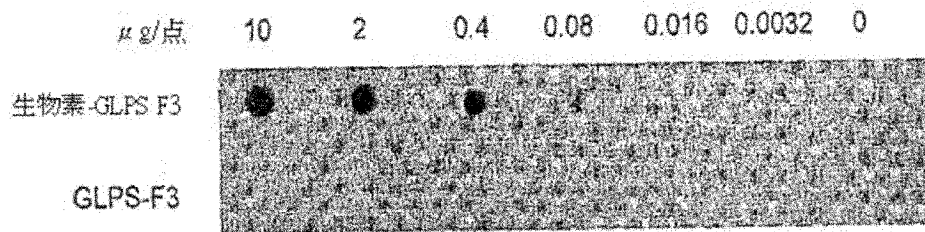


图 2A

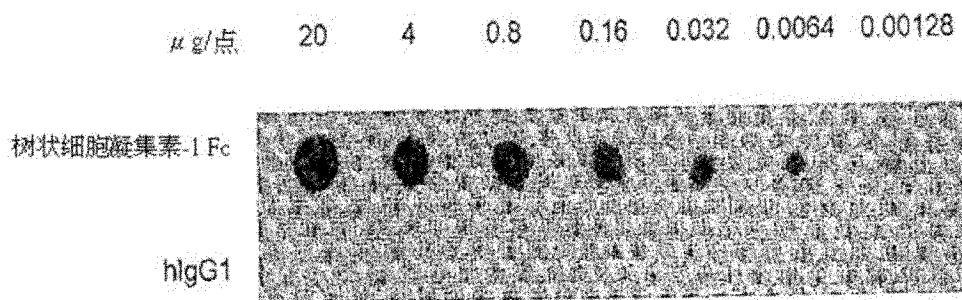


图 2B

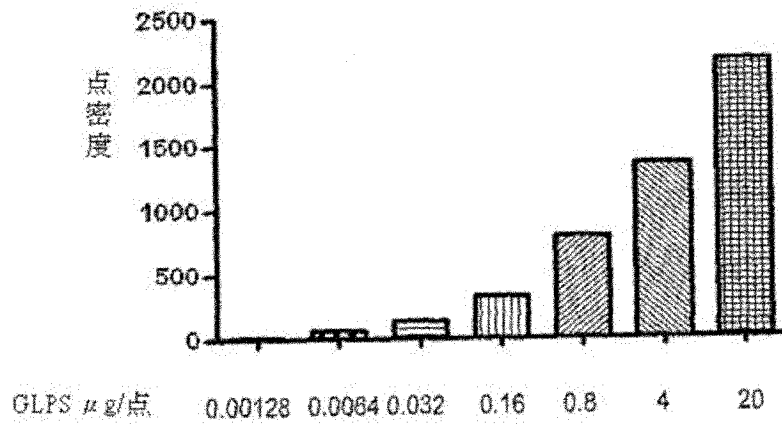


图 2C

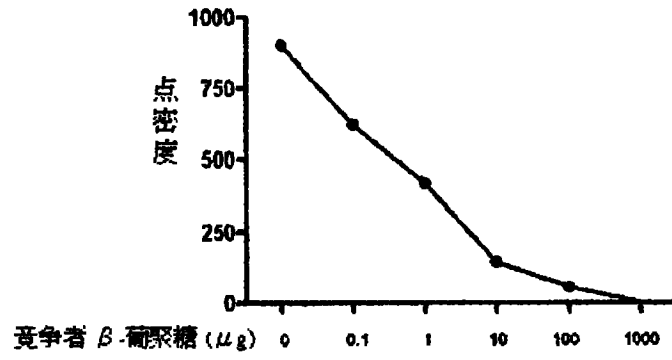


图 2D

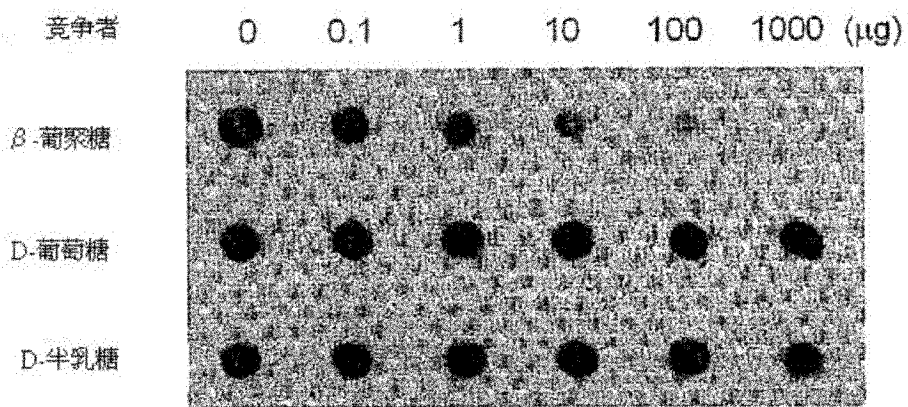


图 2E

No	探针	与GLPS F3 之结合	与GLPS F3C 之结合
1	CLEC1A/CLEC-1	-	-
2	CLEC2B/AICL	-	-
3	CLEC4A/DCIR	-	-
4	CLEC4C/BDCA-2	-	-
5	CLEC4D/CLEC-6	-	-
6	CLEC4E/MINCLE	-	-
7	CLEC4F/KCLR	+++	+++
8	CLEC4H2/HBVxAgBP	-	-
9	CLEC4K/郎罕细胞特异蛋白	-	-
10	CLEC4L/DC-SIGN	-	-
11	CLEC4M/DC-SIGNR	++++	++++
12	CLEC5A/MDL1	-	-
13	CLEC6A/树状细胞凝集素-2	-	-
14	CLEC7A/树状细胞凝集素-1	+++++	+++++
15	CLEC12A/CLL-1	-	-
16	CLEC13A/BIMLEC	-	-
17	MAFAL	-	-
18	NKG2D	-	-
19	Siglec11	-	-
20	TLT-1	-	-
21	TLT-2	+++++	-
22	TREM-1	-	-
23	TREM-2	-	-
24	mTLT1	-	-
25	mTLT4	-	-
26	mTREM1	-	-
27	mTREM2	-	-
28	hIgG1	-	-

图 3

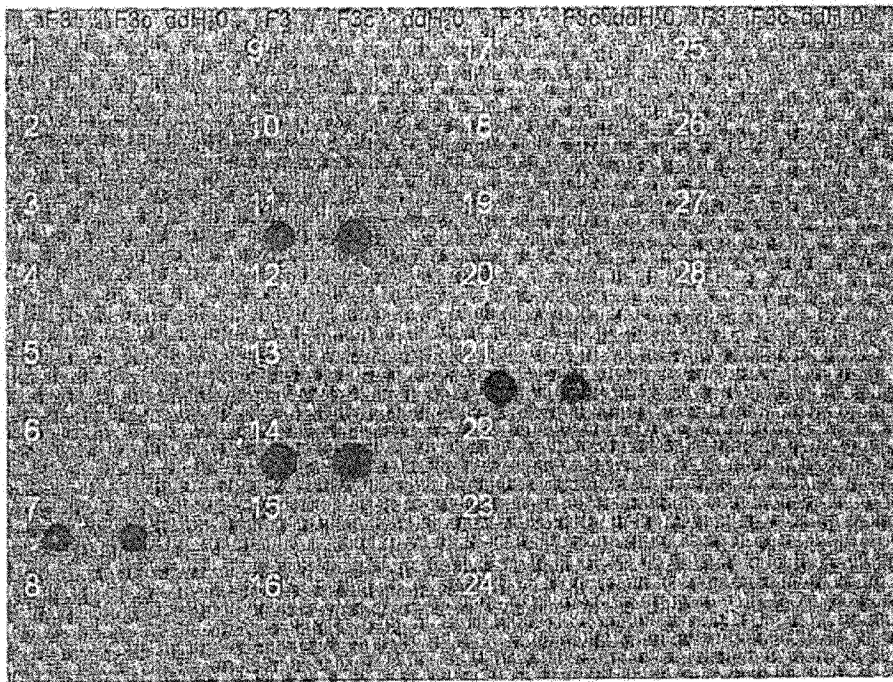


图 4A

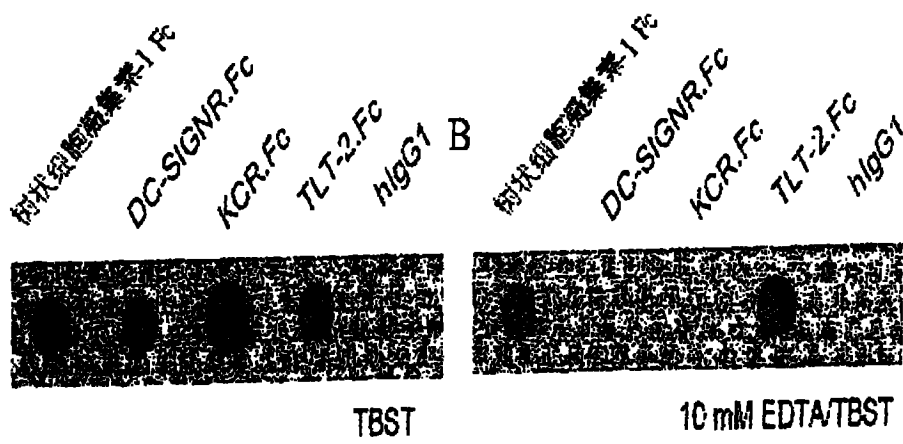


图 4B

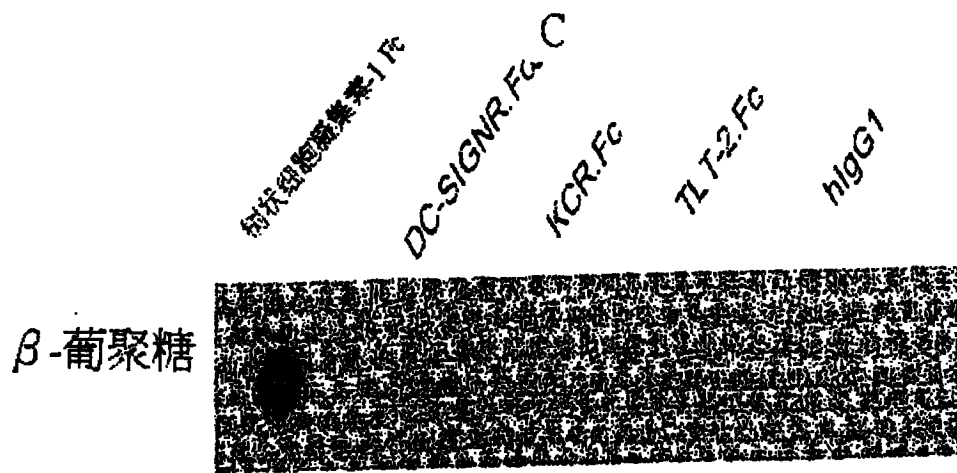


图 4C

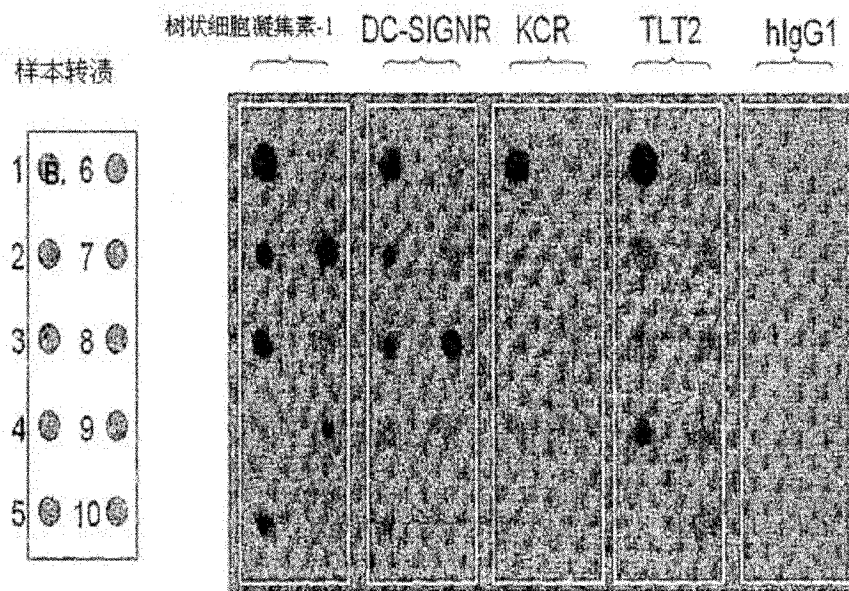


图 5A

No	多糖样本	树状突细胞激活率	DC-APC激活率	mKLRs	TL7-F3	MD1
1	β	++++	++++	++++	++++	-
2	灵芝1	+++	+	.	.	.
3	灵芝2	+++	++	+	.	.
4	灵芝3	+	+	+	++	.
5	灵芝提取物	++	+	.	.	.
6	霍山石斛多糖体	.	.	.	.	.
7	冬虫夏草多糖体	++++	+	+	.	.
8	香菇多糖体L	+	+++	.	.	.
9	香菇多糖体H	++	+	.	.	.
10	β <sub>2</sub> O	.	.	.	.	.

图 5B

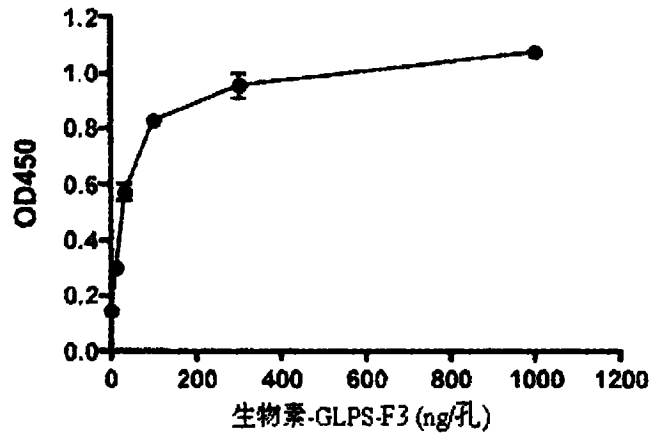


图 6A

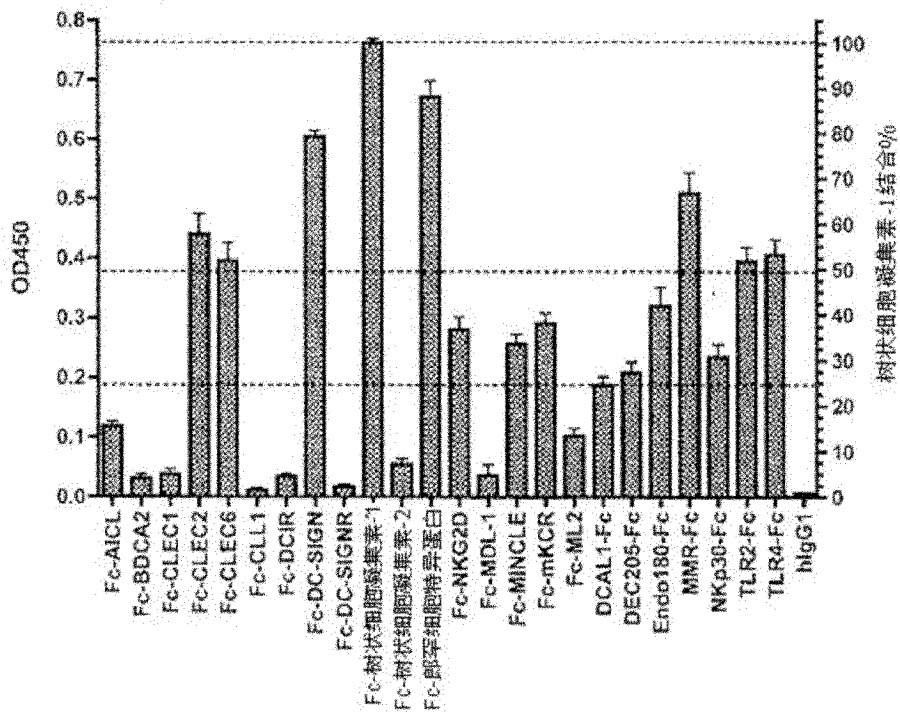


图 6B

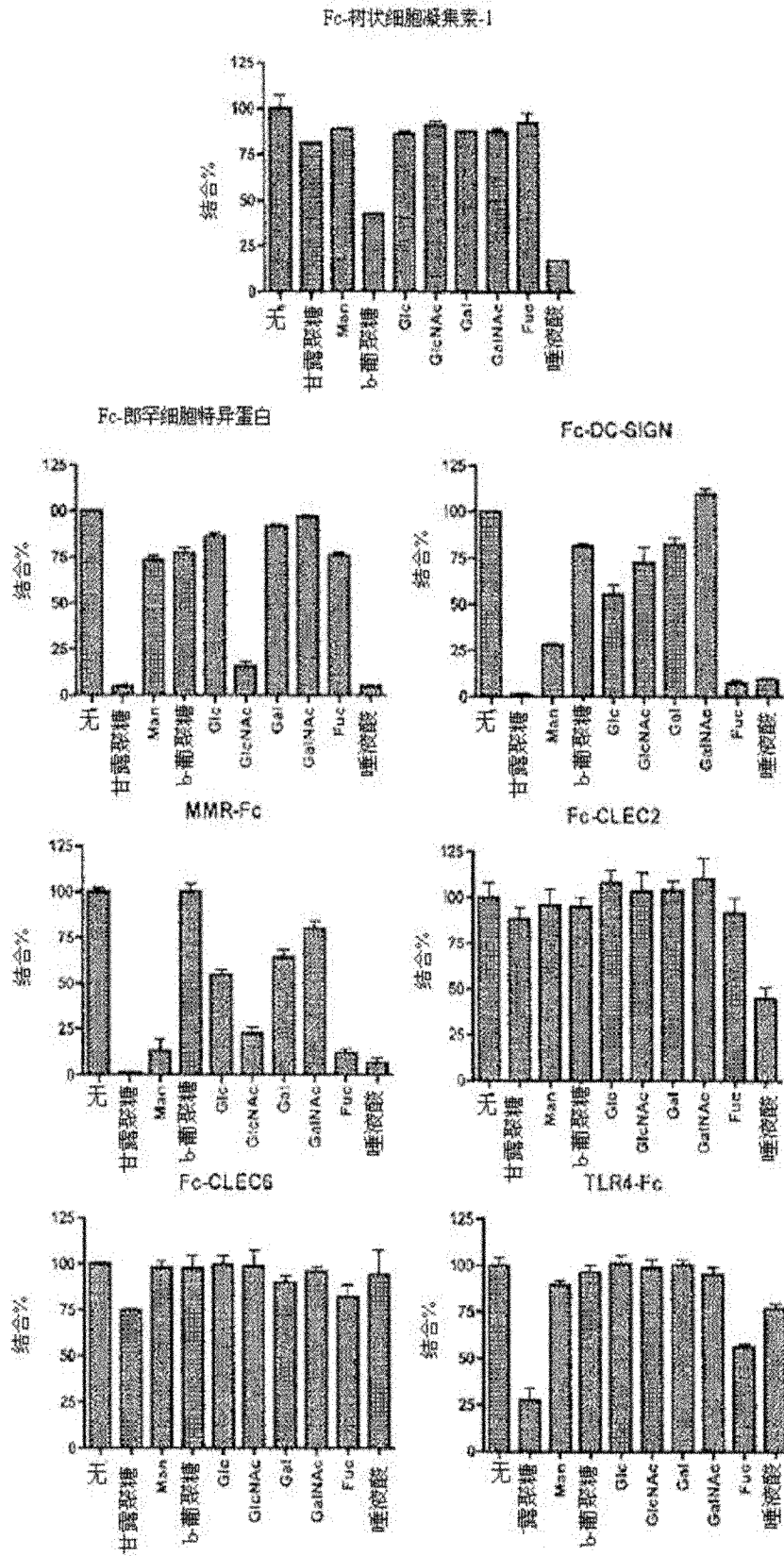


图 7

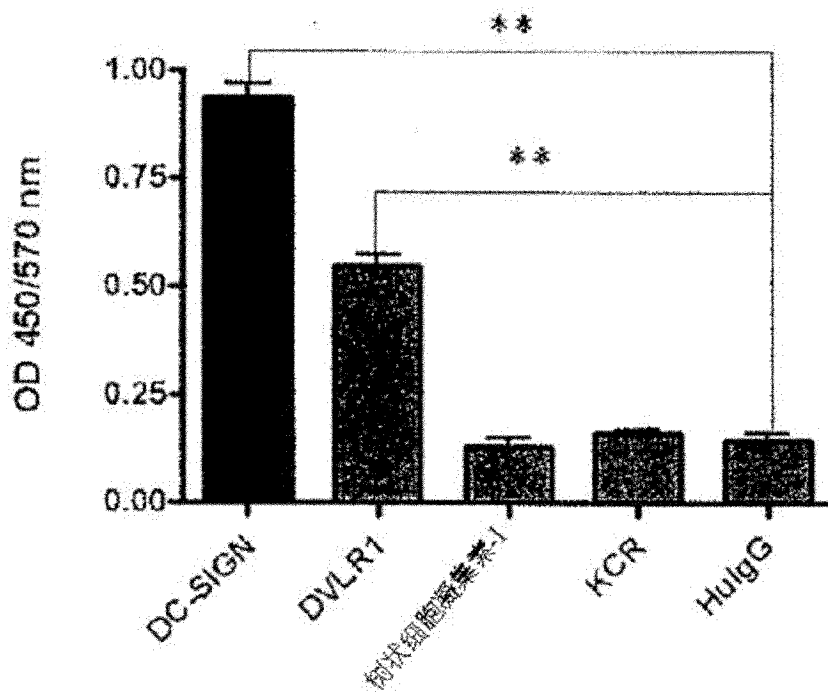


图 8A

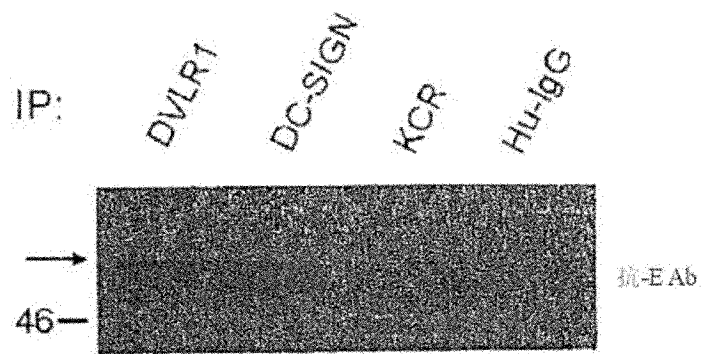


图 8B

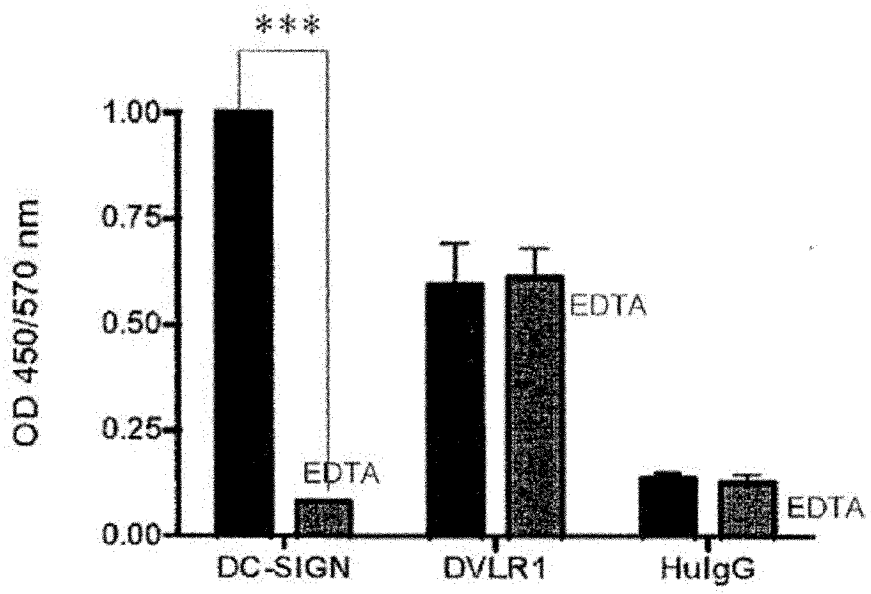


图 8C

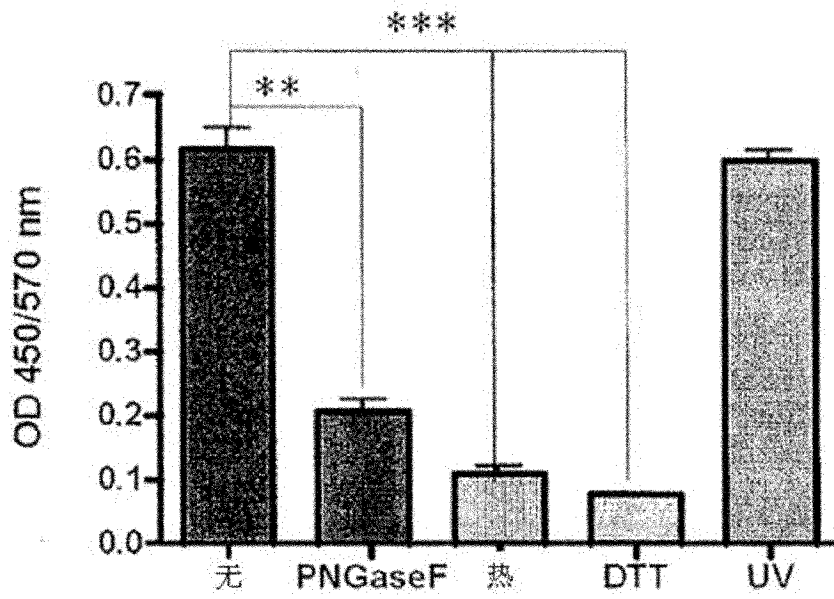


图 8D

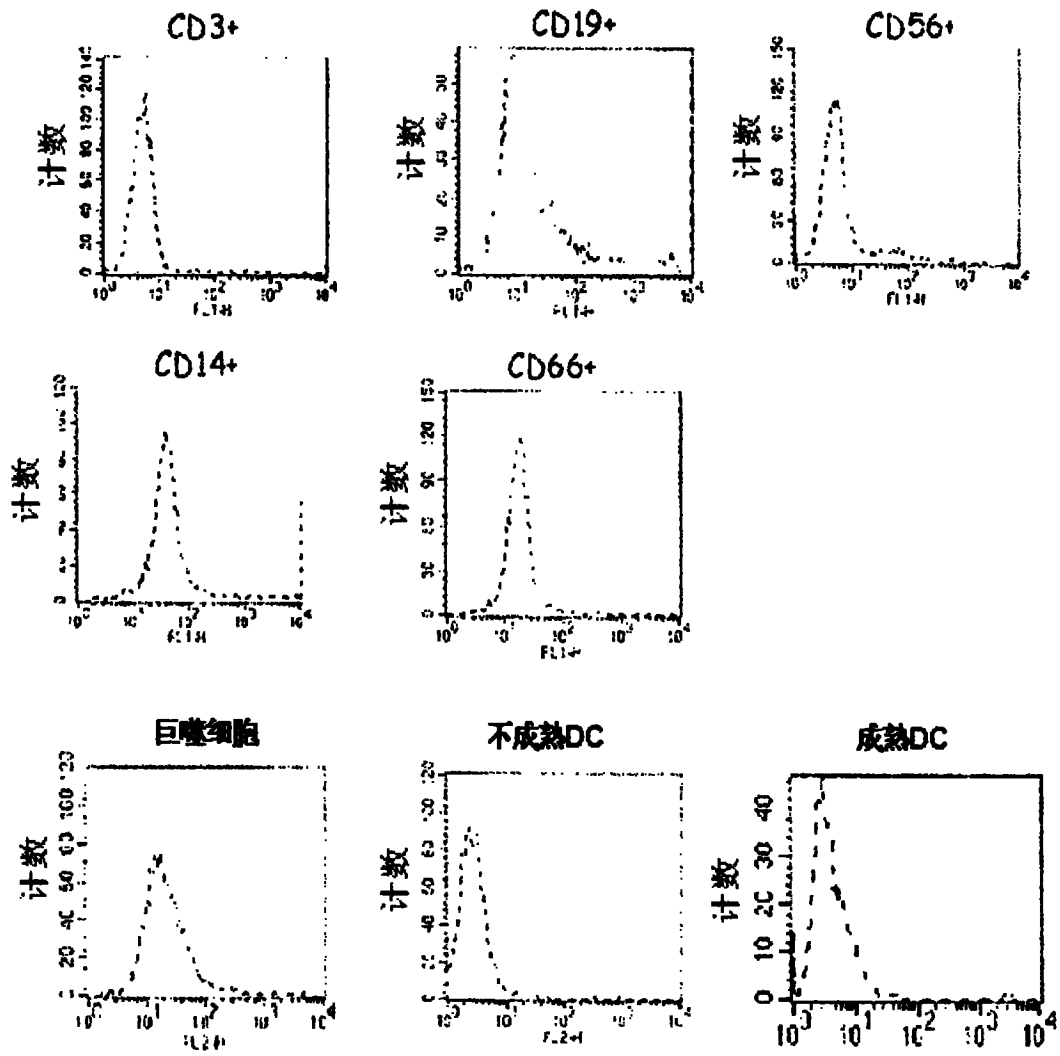


图 9A

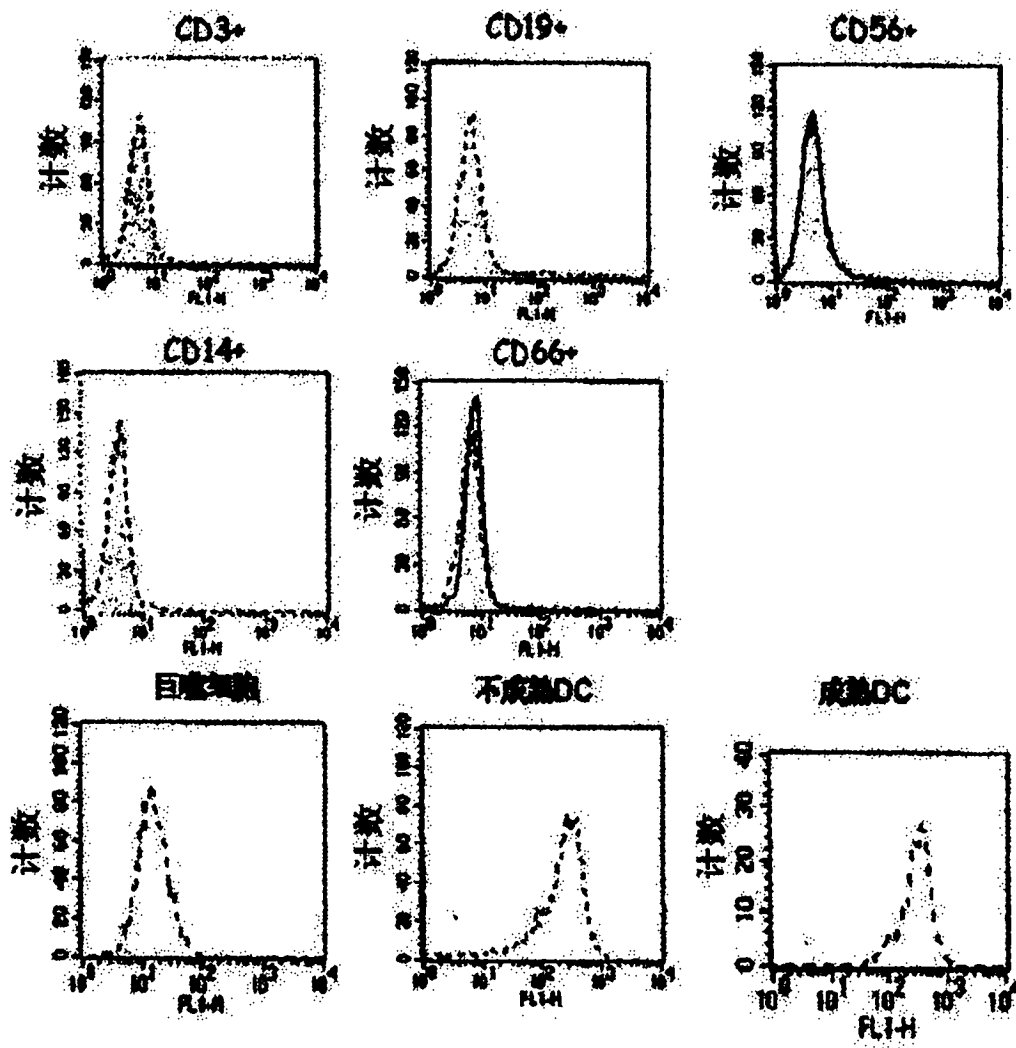


图 9B

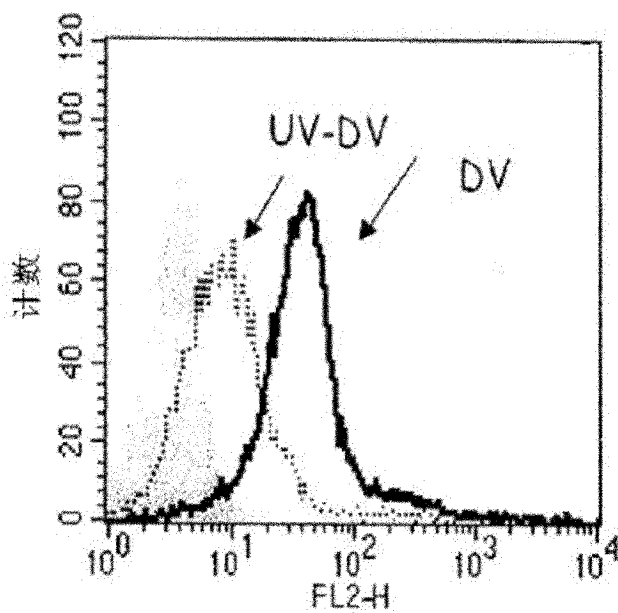


图 10A

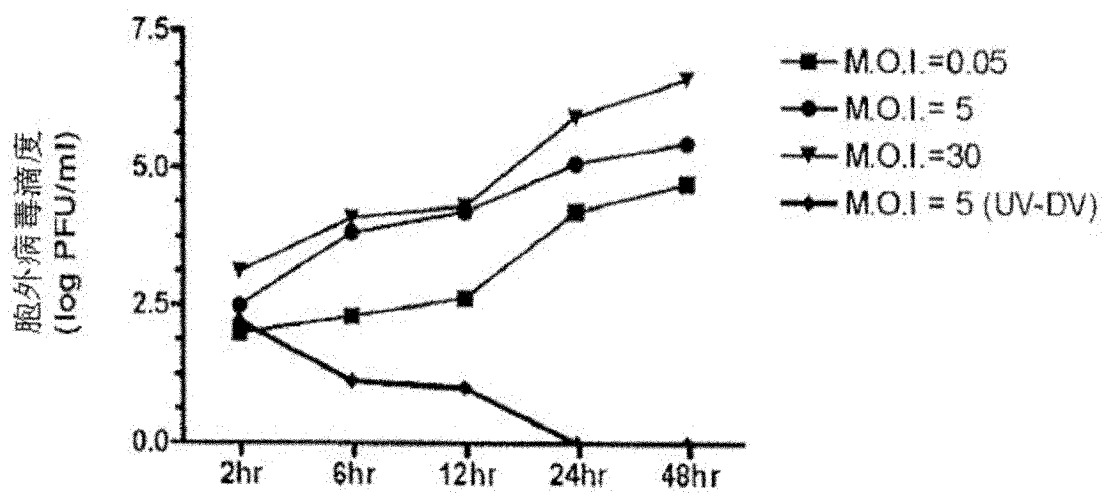


图 10B

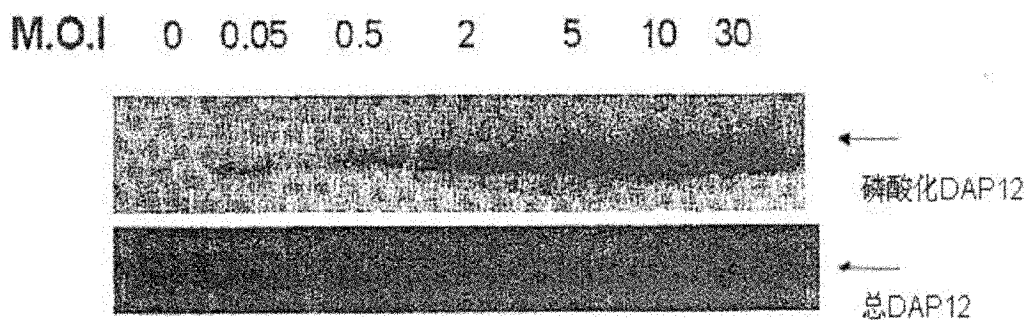


图 10C

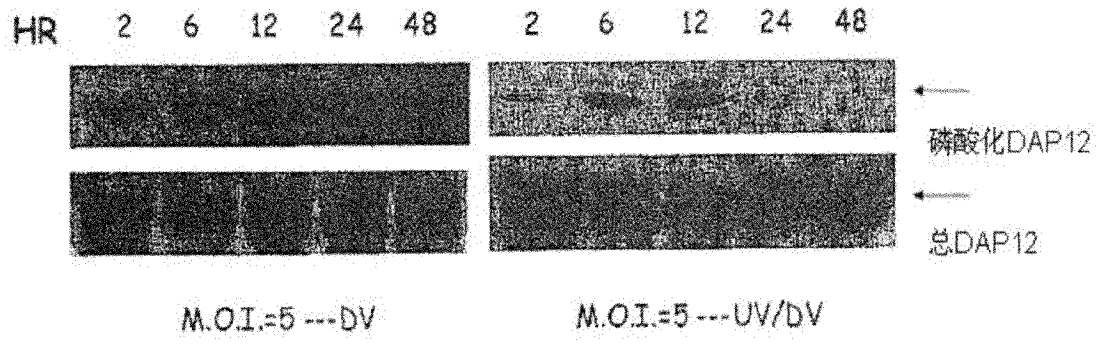


图 10D

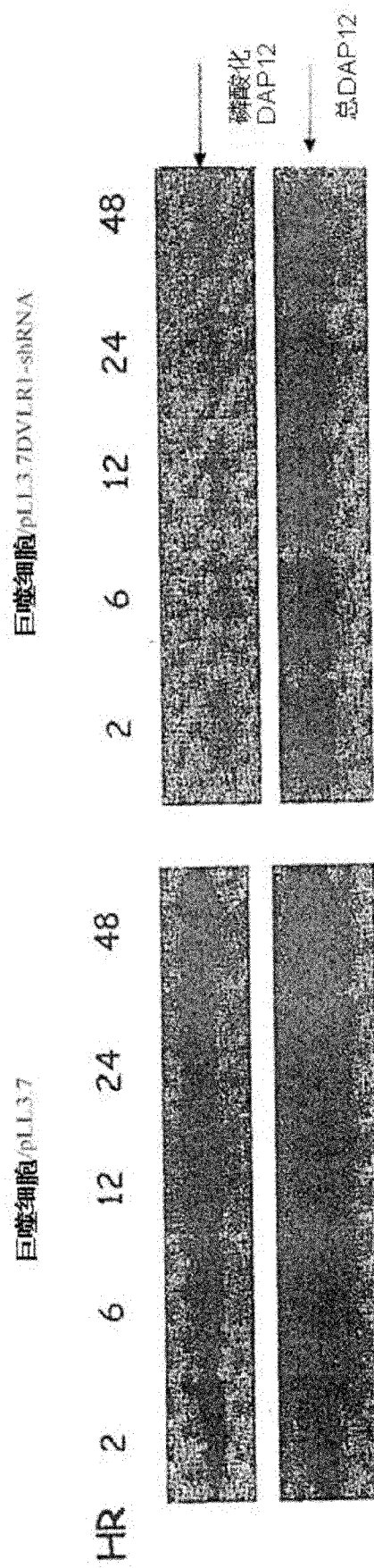


图 11

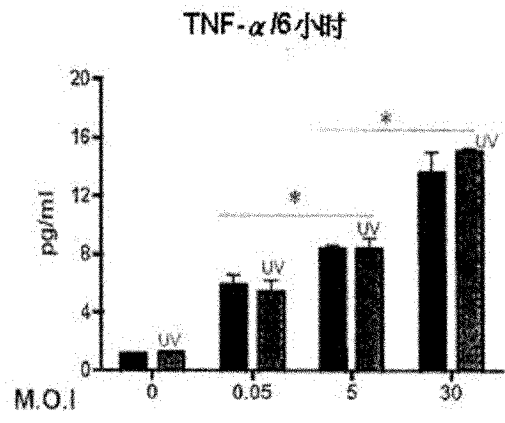


图 12A

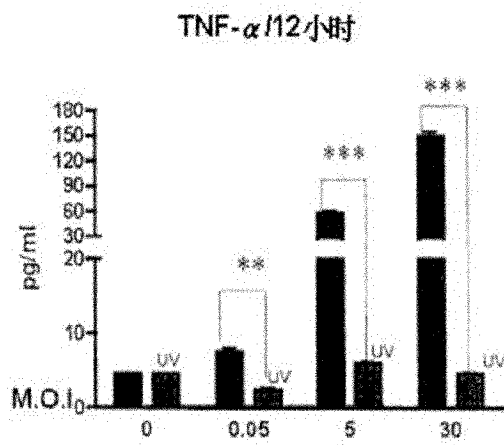


图 12B

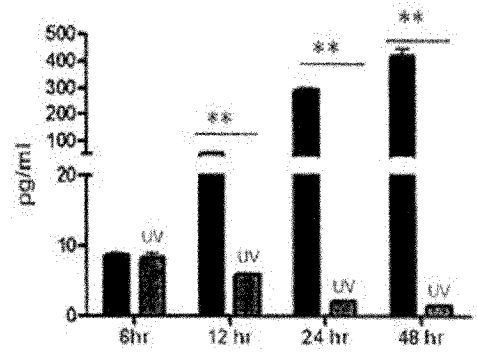


图 12C

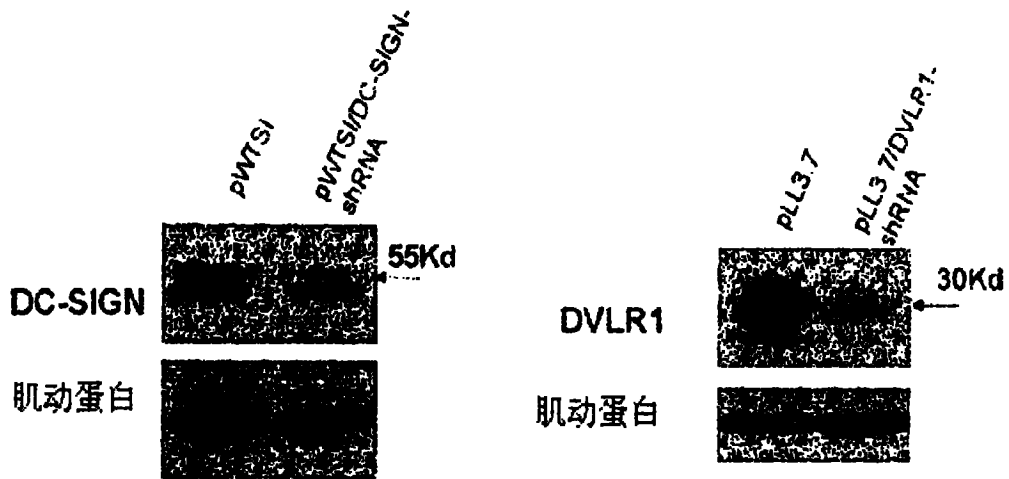


图 13A

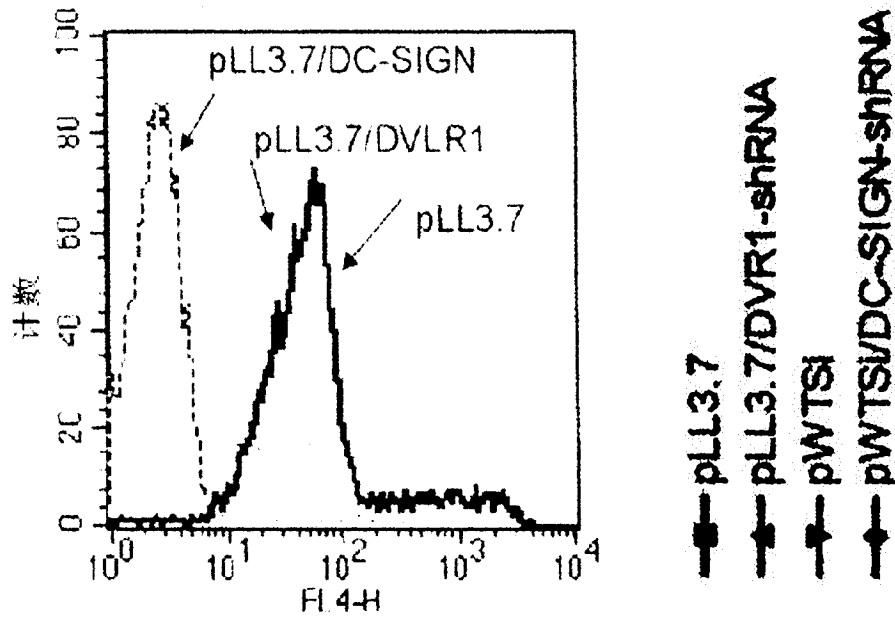


图 13B

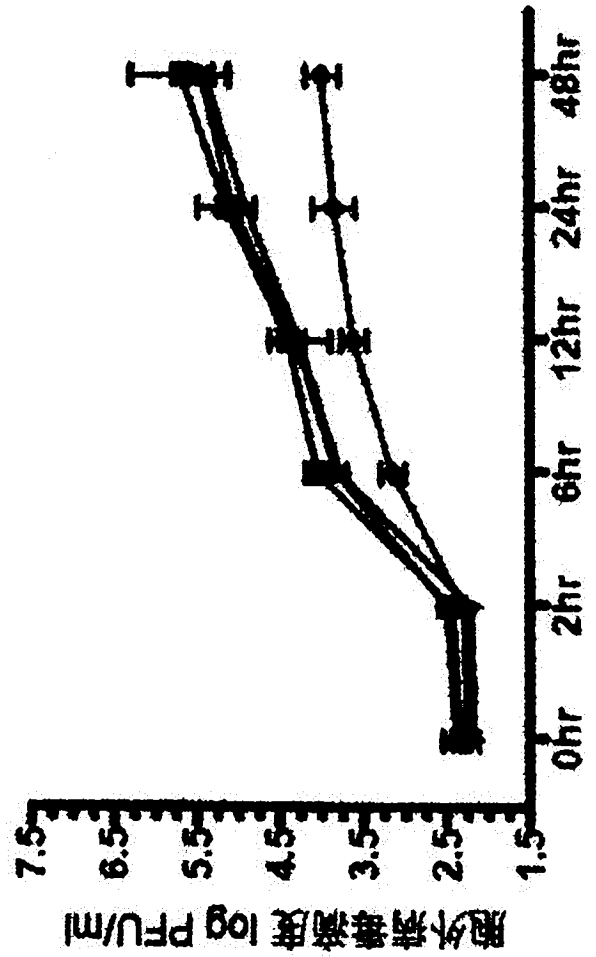


图 13C

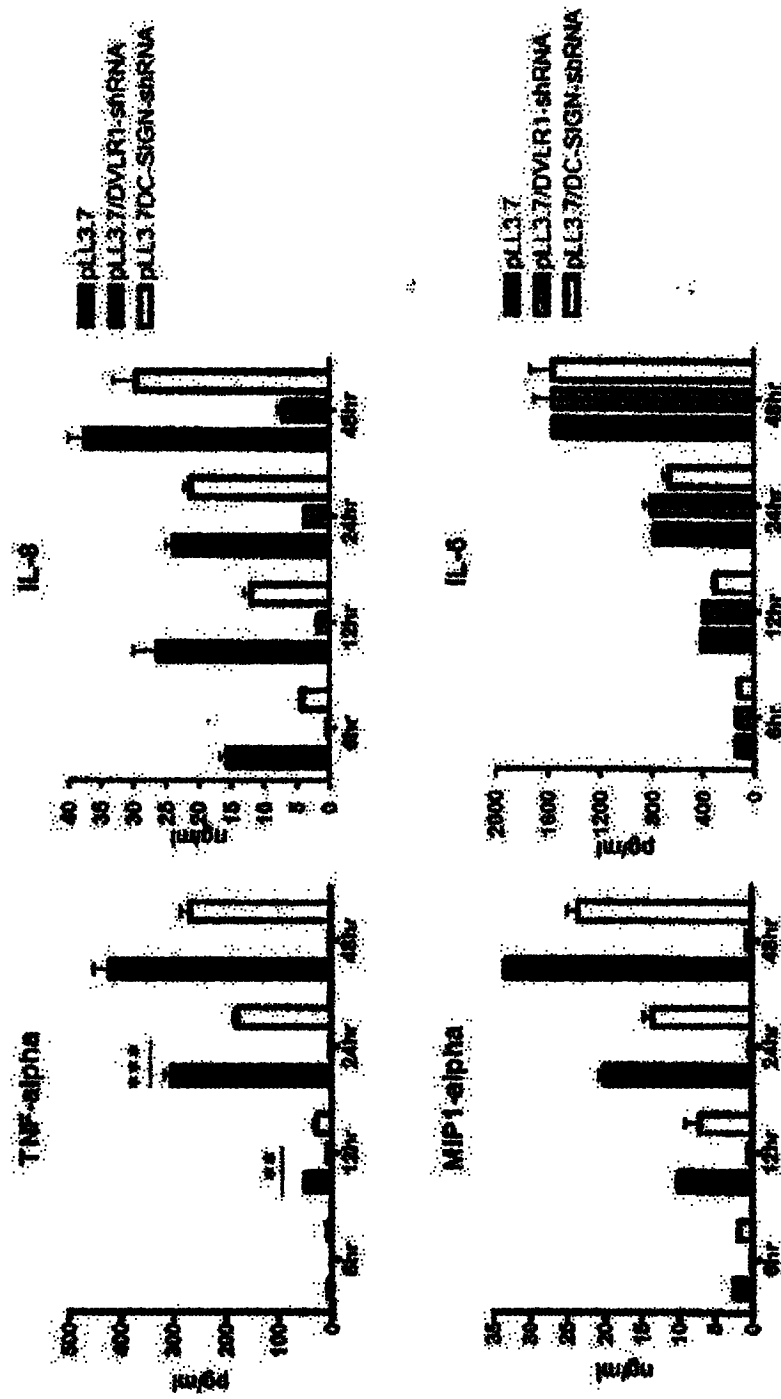


图 14A

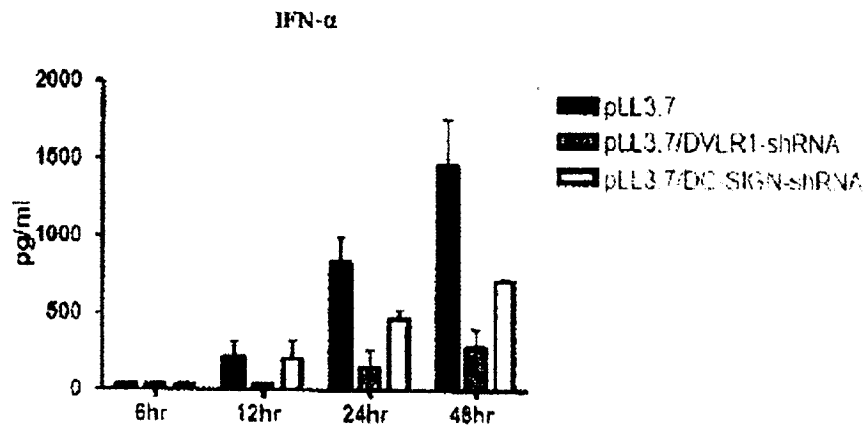


图 14B

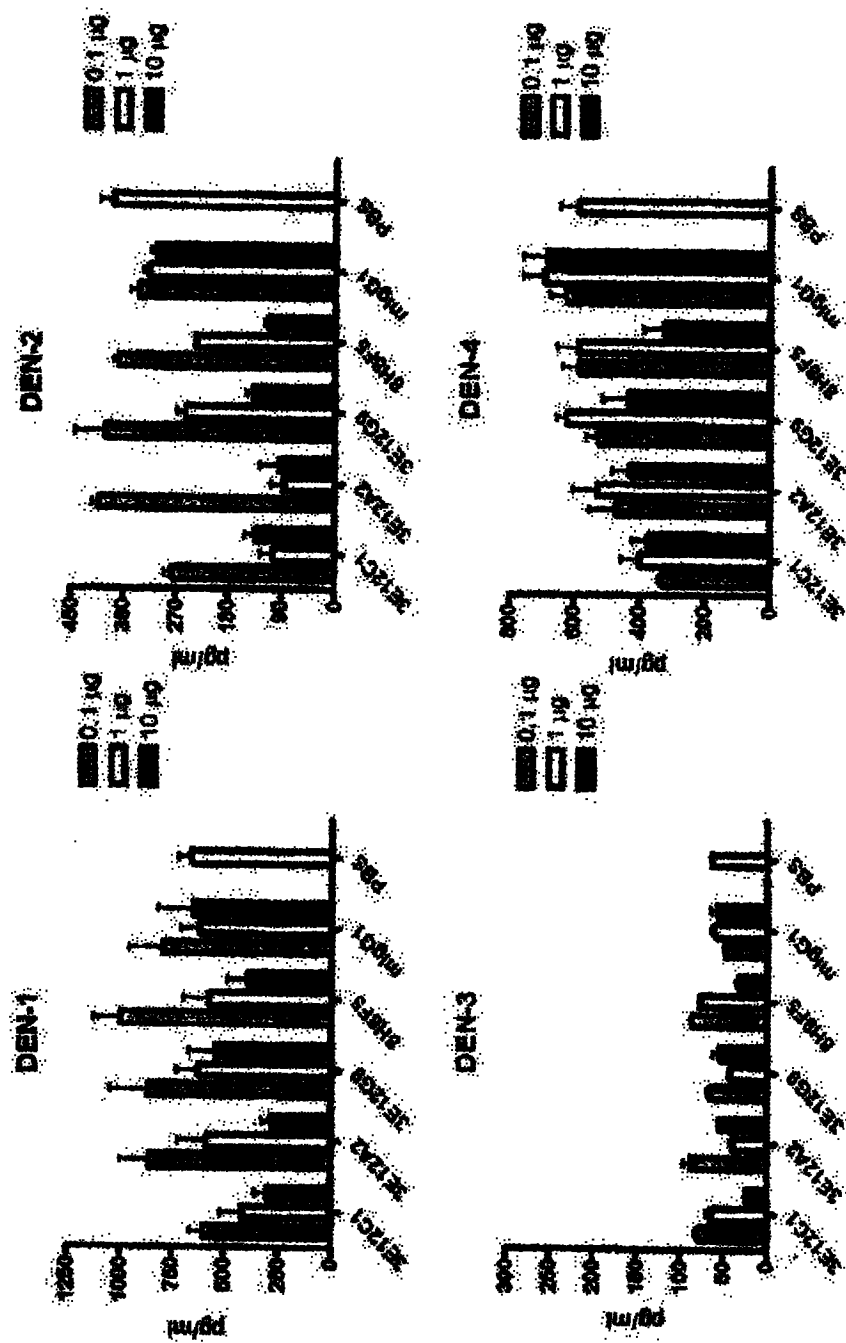


图 15

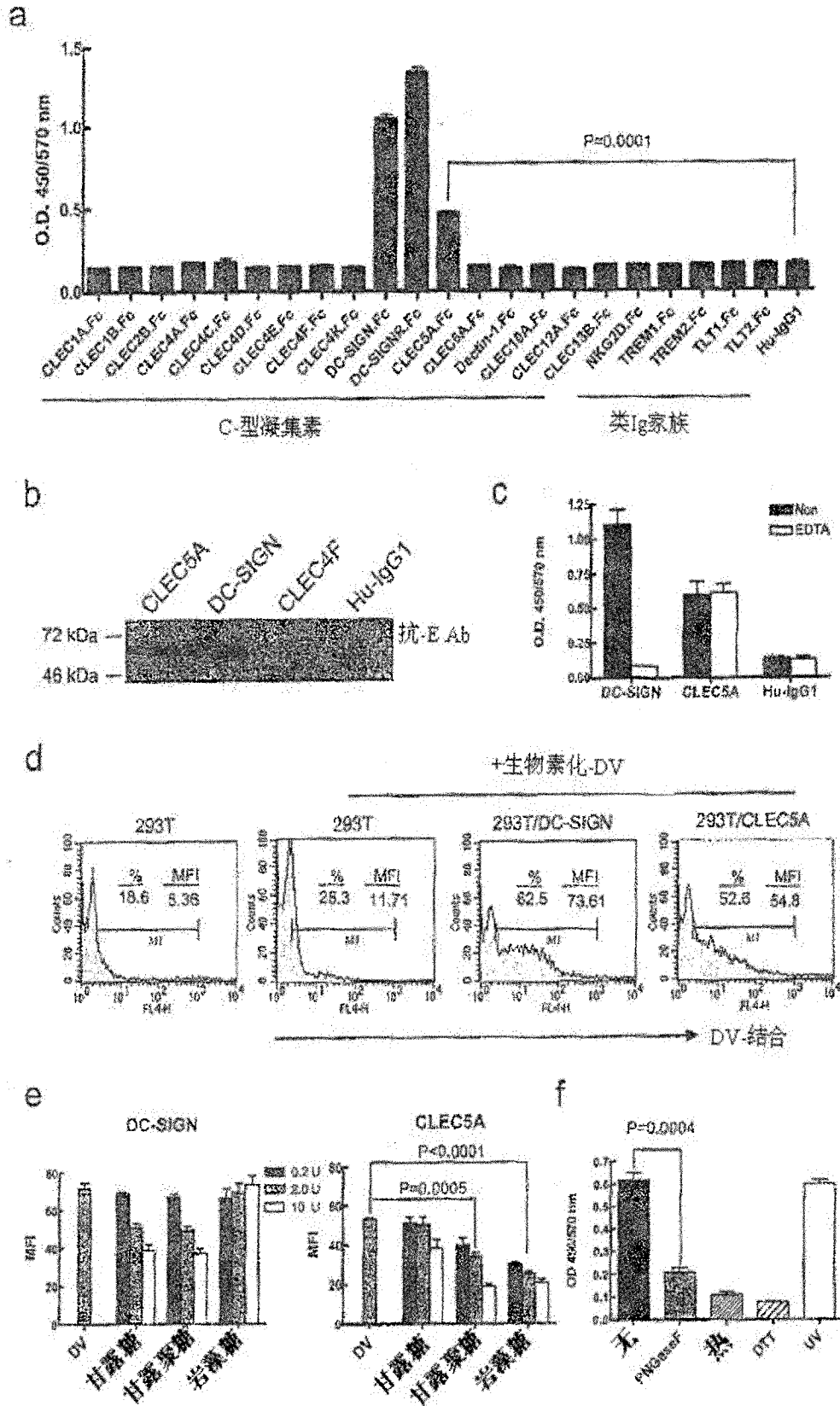


图 16A-F

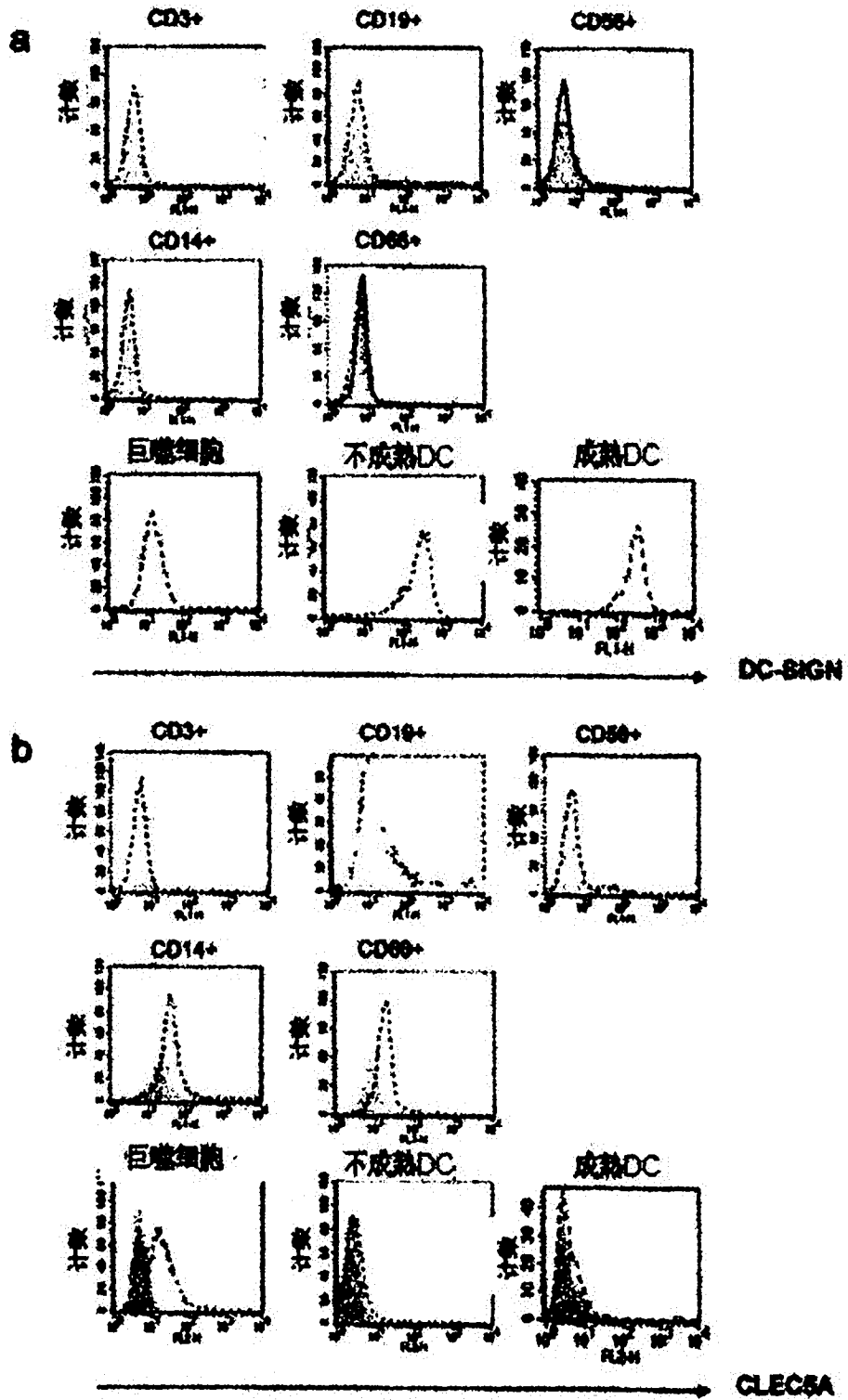


图 17A-B

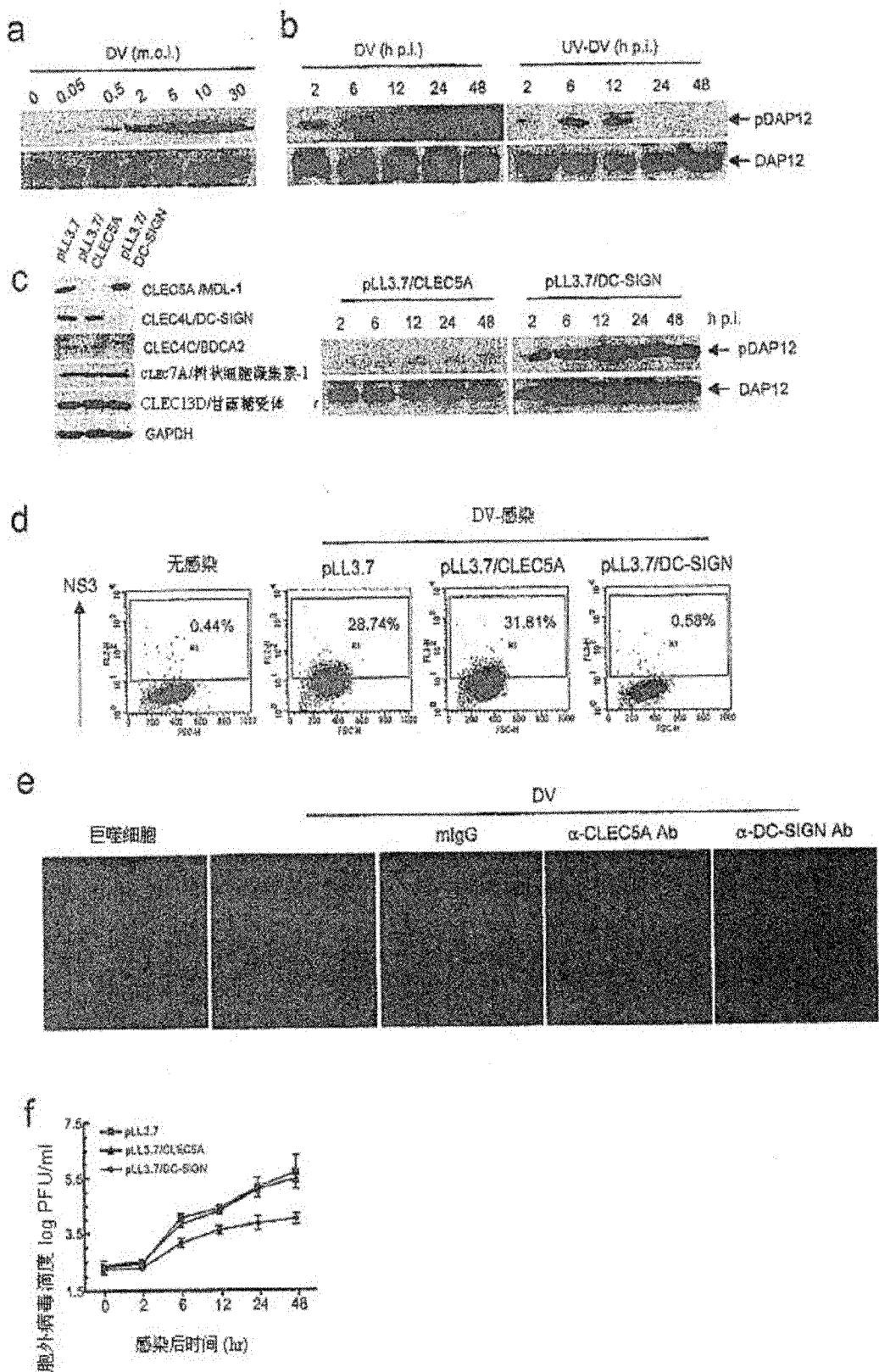


图 18A-F

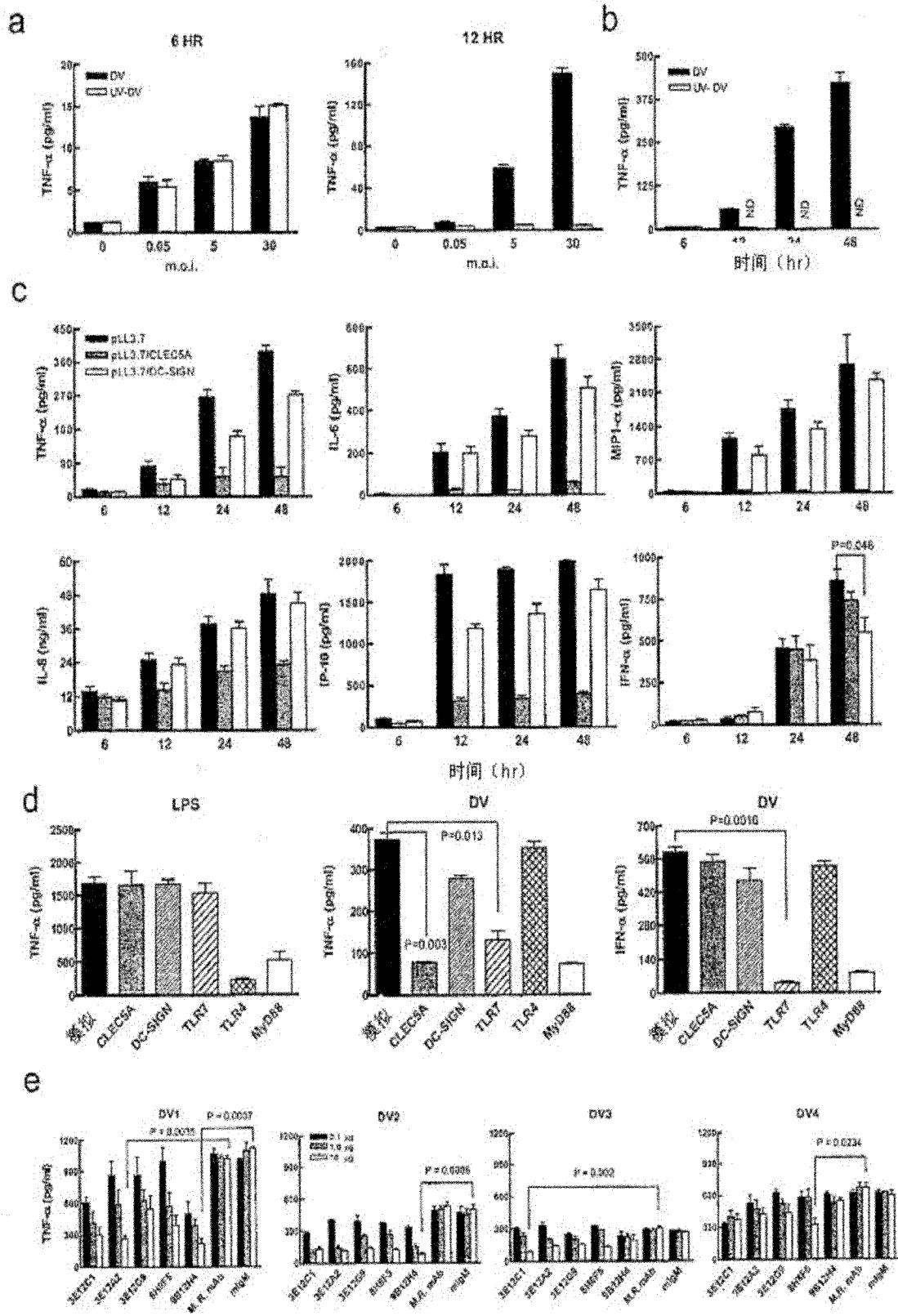


图 19A-E

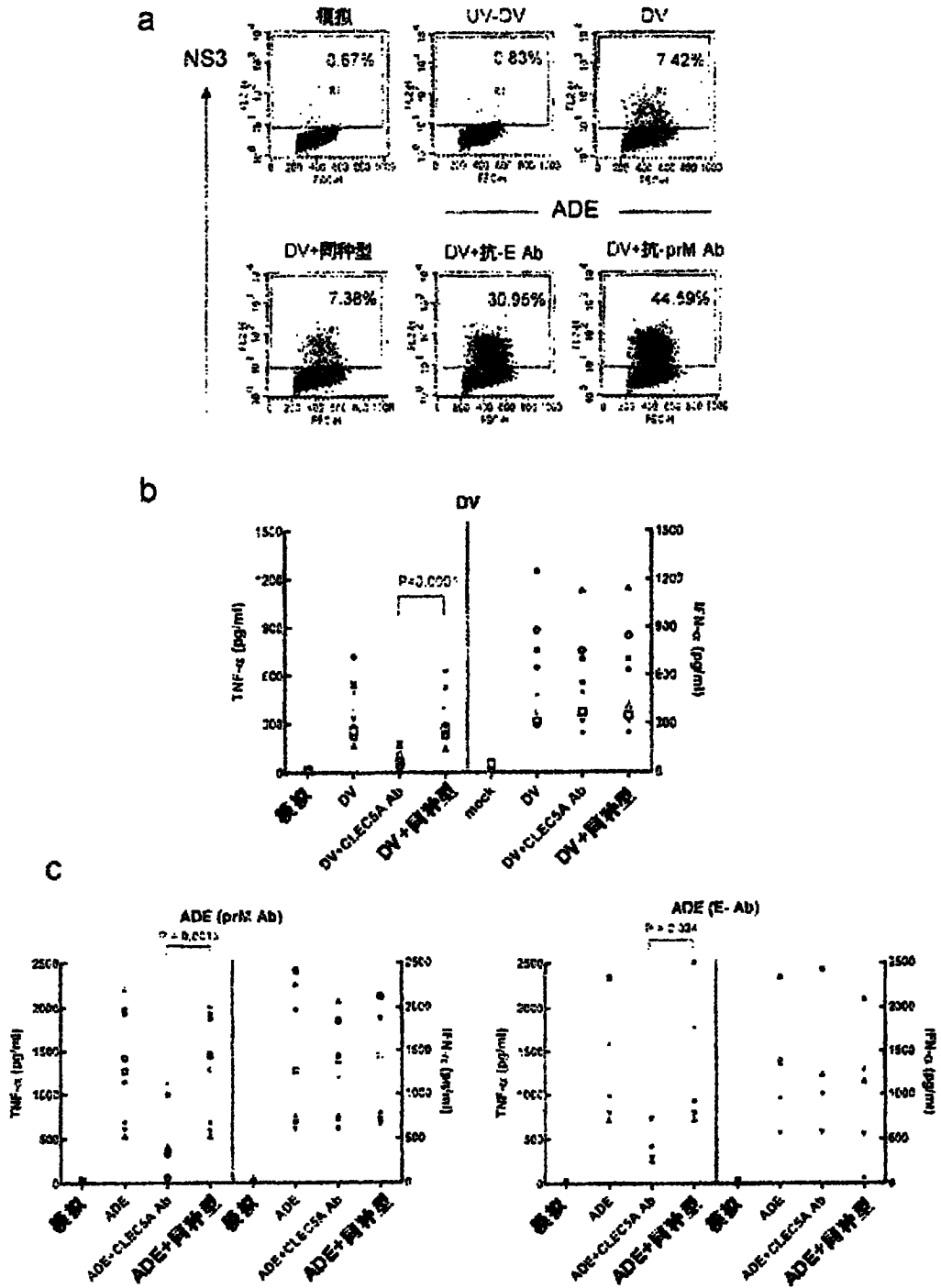


图 20A-C

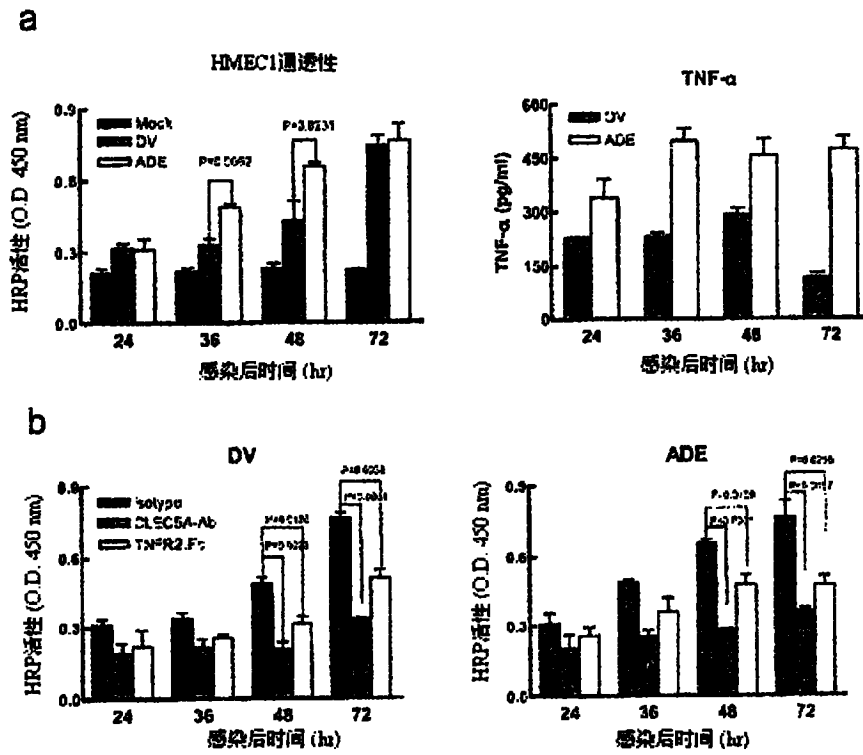


图 21A-B

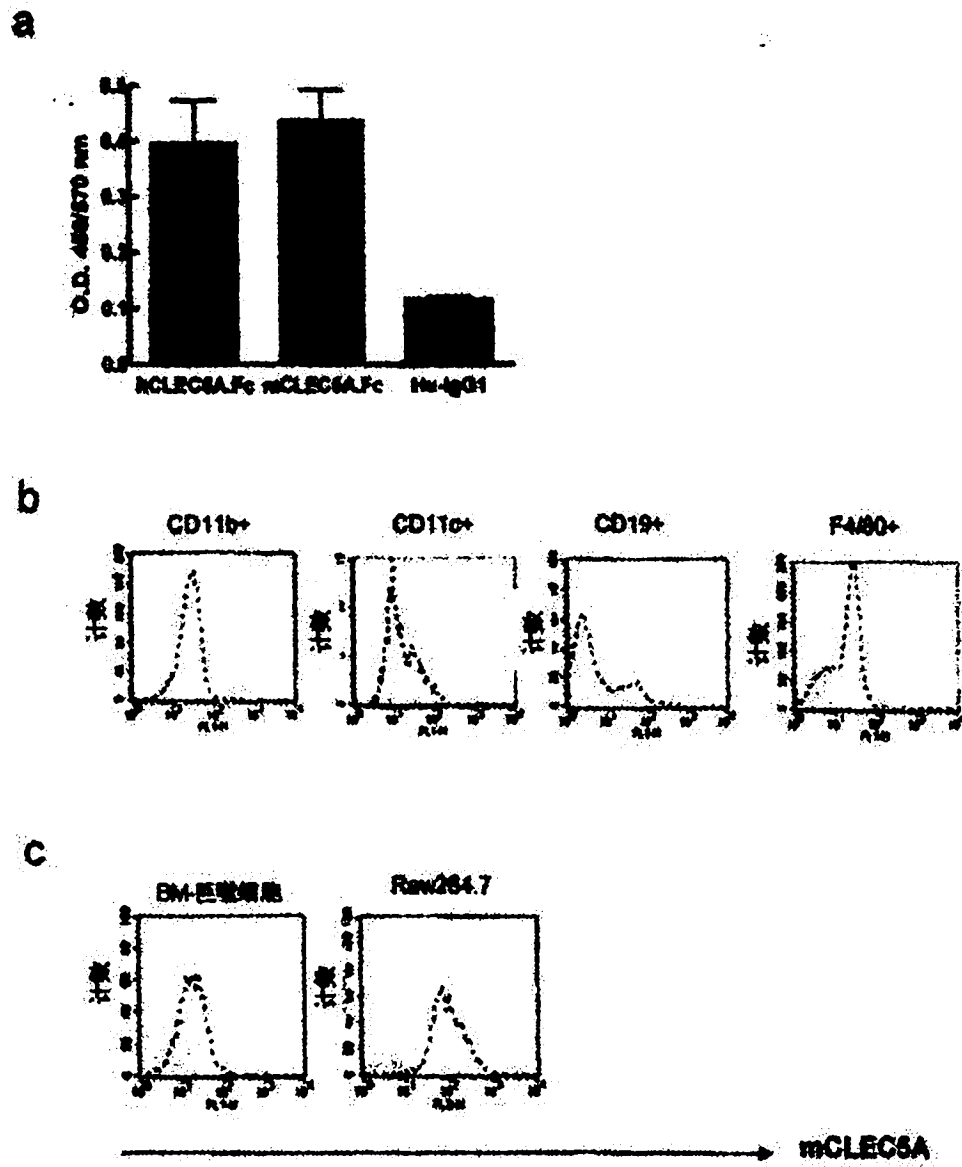


图 22A-C

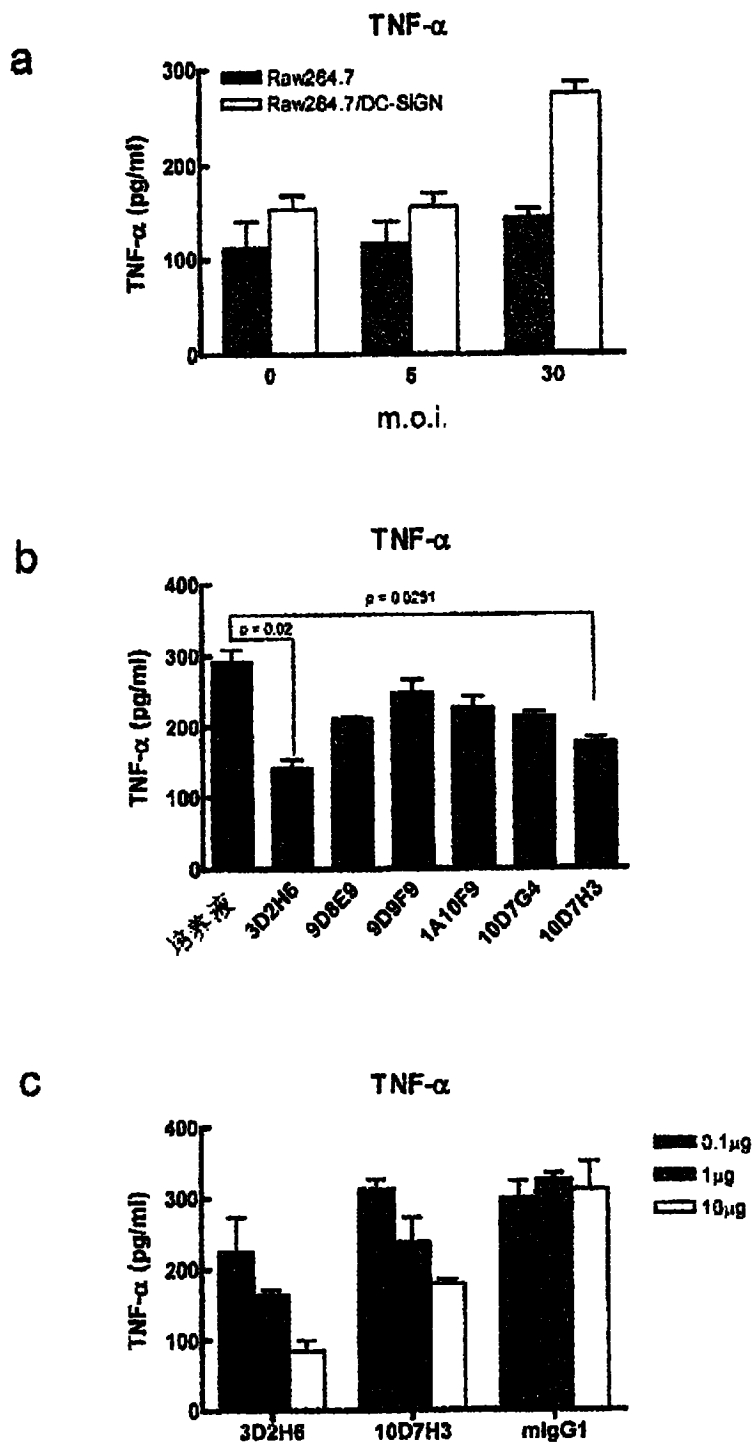


图 23A-C

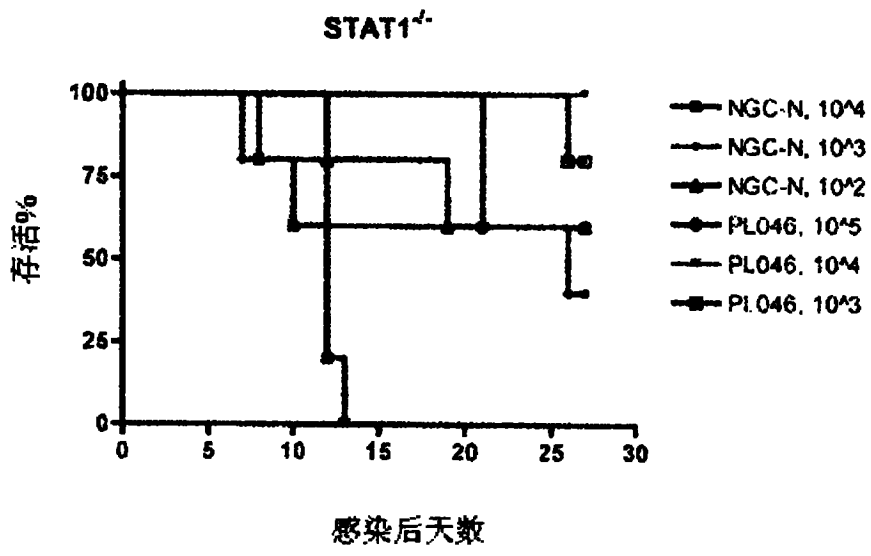


图 24

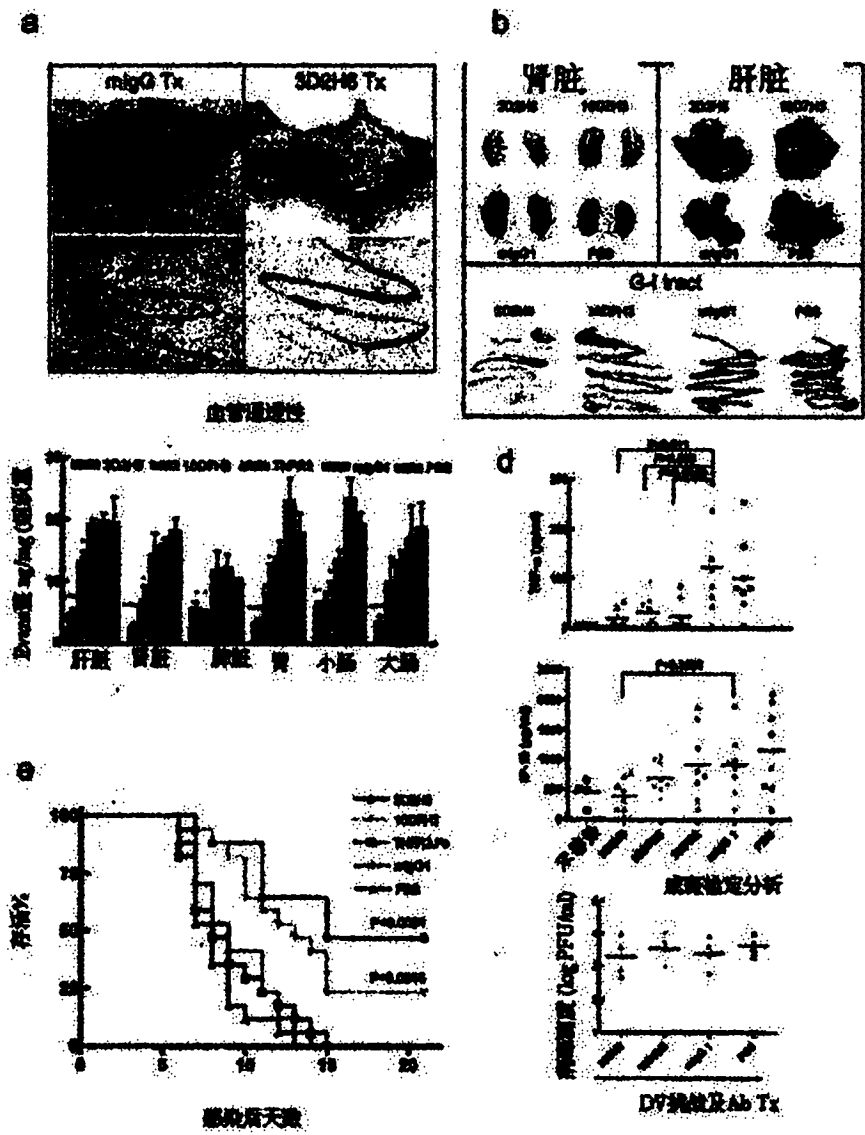


图 25A-E

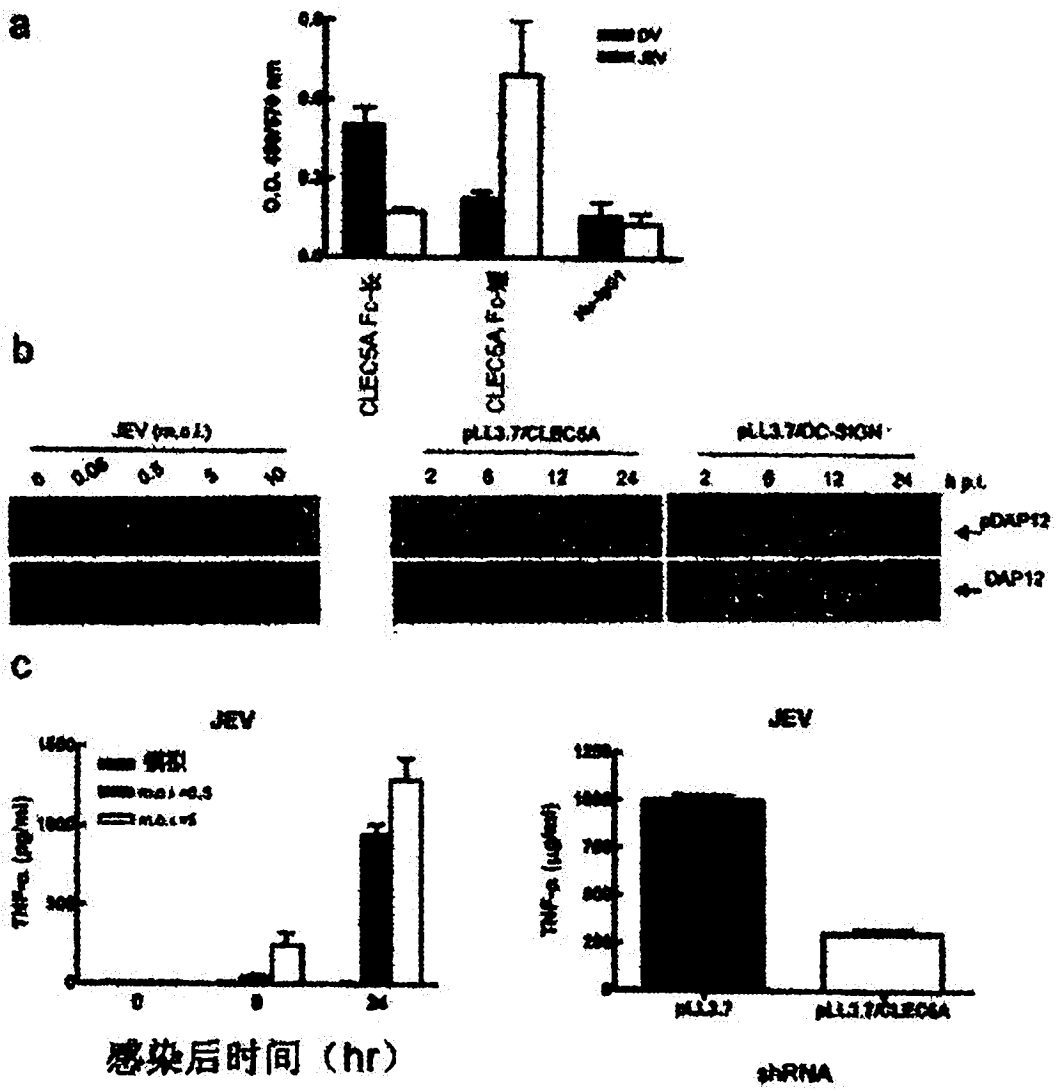


图 26A-C

专利名称(译)	用于检测目标反应与治疗黄病毒感染症状之组合物及方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102084250A</a>	公开(公告)日	2011-06-01
申请号	CN200880129343.0	申请日	2008-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	中央研究院		
申请(专利权)人(译)	中央研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中央研究院		
[标]发明人	谢世良 翁启惠 徐翠玲 陈斯婷		
发明人	谢世良 翁启惠 徐翠玲 陈斯婷		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N2500/02 A61K2039/505 C07K2319/30 C07K2316/96 G01N2333/18 C07K2317/56 G01N2333/185 C07K16/2851 A61P31/12 A61P31/14 C07K2317/76 Y02A50/386 Y02A50/388 Y02A50/39 Y02A50/394 A61K39/39533 A61K39/3955		
代理人(译)	贺小明		
优先权	12/079576 2008-03-27 US		
其他公开文献	CN102084250B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明辨识出在受到黄病毒(诸如, 登革热病毒(Dengue virus)或日本脑脊髓炎病毒(Japanese encephalomyelitis virus))感染时会诱发细胞渗漏及其它副作用之细胞受体。使用本发明所揭示之融合蛋白, 其判定出病原体(诸如, 黄病毒)会经由糖苷键结而结合之受体。一旦判定出该等受体, 即可判定结合特定受体之作用, 其中可藉由能阻断病原体与受体结合之试剂, 找出目标为造成特定症状之受体。因此, 就登革热病毒及日本脑脊髓炎病毒而言, TNF- $\alpha$ 会在病原体结合DLVR1/CLEC5A受体时释出。以单株抗体阻断DLVR1/CLEC5A受体可减少TNF- $\alpha$ 之分泌, 且同时不会影响负责进行病毒清除之细胞激素的分泌, 因而使经感染小鼠之存活率由零增加至约50%。

