



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101678092 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 02

(21) 申请号 200880017669. 4

(22) 申请日 2008. 03. 28

(30) 优先权数据

0706070. 0 2007. 03. 28 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 11. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2008/053761 2008. 03. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/116937 EN 2008. 10. 02

(73) 专利权人 斯堪赛尔有限公司

地址 英国诺丁汉

(72) 发明人 林达·吉利恩·达兰特

瑞切尔·路易斯·麦瑟瑞汉姆

维多利亚·安妮·普德尼

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 武晶晶 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1269804 A, 2000. 10. 11,

WO 9925379 A1, 1999. 05. 27,

刘辉等. 构建免疫球蛋白与细胞因子融合基因表达载体的家族特异性抗淋巴瘤疫苗. 《中华医学杂志》. 2004, 第 84 卷 (第 1 期),

Zaghouni, H et al. Engineered immunoglobulin molecules as vehicles for T cell epitopes. 《International reviews of immunology》. 1993, 第 10 卷 (第 2-3 期),

审查员 李煦颖

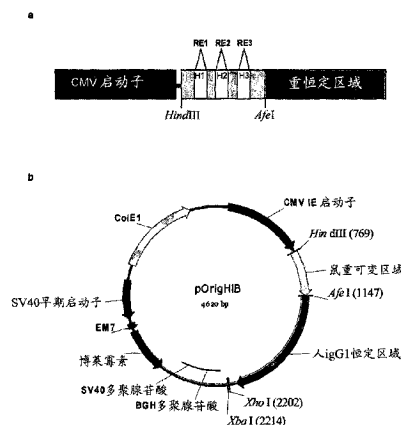
权利要求书1页 说明书45页 附图69页

(54) 发明名称

核酸

(57) 摘要

本发明提供一种核酸, 其包括非特异性启动子和编码多肽的至少一种序列, 其中所述多肽中具有至少一种异源性 T 细胞表位但没有任何调节性 T 细胞表位。所述多肽可以是异二聚体的一条链, 所述异源性 T 细胞表位导致所述异二聚体链的破坏以致于它不能结合所述异二聚体的另一条链。所述核酸能被用于引发针对至少一种异源性 T 细胞表位的 T 细胞应答。



1. 一种核酸,其包括启动子和编码抗体分子的重组重链的序列,所述核酸还包括编码抗体分子的轻链的序列或所述核酸与包括编码抗体分子的轻链的序列相组合,其中所述重链和所述轻链中具有下列异源性 T 细胞表位:

CDRH1 和 CDRL3 中的 GTGRAMLGTHTMEVTVYH,

CDRH2 中的 SVYDFVWL,以及

CDRH3 和 CDRL1 中的 WNRQLYPEWTEAQRLD。

2. 根据权利要求 1 所述的核酸,其中编码所述异源性 T 细胞表位的序列被插入编码所述重链或轻链的序列中。

3. 根据权利要求 1 所述的核酸,其中编码所述异源性 T 细胞表位的序列被取代进编码所述重链或轻链的序列中。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述抗体是单克隆抗体。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述启动子是非特异性的和 / 或导致所述核酸在树突细胞和 / 或胶质细胞中表达。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述抗体具有图 60 的序列。

7. 一种疫苗,其包括前述权利要求中任一项所述的核酸以及佐剂。

8. 一种药物组合物,其包括权利要求 1 至 6 中任一项所述的核酸和药学上可接受的运载体、赋形剂或稀释剂。

9. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的核酸在药物的制备中的用途。

10. 根据权利要求 9 中所述的用途,其中所述核酸用于激发针对 T 细胞表位的免疫应答。

核酸

发明领域

[0001] 本发明涉及核酸和它们作为疫苗的用途,所述核酸编码 T 细胞表位,针对所述表位将会引发一种免疫应答。这种疫苗可被用于治疗肿瘤。

[0002] 发明背景

[0003] 在癌症疫苗和慢性病毒感染的领域,现在变得清楚的是,除了频率之外的因素,例如肿瘤特异性 T 细胞的功能性亲和力和启动途径,是将疫苗效力最大化的主要决定因素。若干小组已经证明,高亲和力的 CD8⁺T 细胞展示优秀的抗肿瘤活性 (Alexander-Miller, Immunologic Research, 2005 ;31 :13-24, Hodge 等, J Immunol 2005 ;174 :5994-6004, Valmori 等, J Immunol 2002 ;168 :4231-40, Zeh 等, J Immunol 1999 ;162 :989-94)。据建议,高亲和力的 T 细胞在患者肿瘤退化中扮演重要角色。这被一项研究例证,其中在所述研究中,高亲和力的抗原特异性的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 在带有显著肿瘤退化的患者中被检测到 (Khong&Rosenberg, J Immunol 2002 ;168 :951-6)。还有证据正在出现以证明在体外被激发的自体肿瘤特异性 T 细胞的过继性转移是成功的,可能是因为在体外的刺激使得选择高亲和力的 T 细胞成为可能 (Vignard 等, J Immunol 2005 ;175 :4797-805, Dudley 等, J Immunother 2001 ;24 :363-73, Morgan 等, J Immunol 2003 ;171 :3287-95, Rosenberg&Dudley, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004 ;101 Suppl 2 :14639-45)。

[0004] 到目前为止,若干小组已经尝试使用一种抗体作为该表位的运载体 (carrier) 来针对预定的表位引发一种细胞免疫应答。例如,WO 96/19584 (Bona 等) 公开了在其中 T 细胞表位被插入抗体的互补决定区域 (CDR) 的嵌合抗体,并提出这种嵌合抗体适合于引发细胞毒性 T 细胞 (CTL) 应答。然而,此文件教导的是 DNA 必须编码功能蛋白。因此在摘要中陈述,“所述表位和母体免疫球蛋白的功能能力被保留”。并且,在第 21 页上陈述,“所期望的表位的插入应该是在编码所述母体免疫球蛋白分子的核酸的区域,其中所述区域对所述母体免疫球蛋白分子的表达或功能不是必要的”。此外,WO 96/19584 中所有实施例显示,完整的免疫球蛋白是在 T 细胞表位的插入之后被产生的。

[0005] 编号为 7,067,110 的美国专利公开了使用抗体的融合蛋白来引起针对抗原的免疫反应的方法,其中所述融合蛋白缺少通过多肽键融合到抗原的免疫球蛋白可变区域结构域。所述融合蛋白保留结合到 Fc 的能力。

[0006] EP0759944 公开了将 T 细胞表位并入抗体分子内的方法,其中所述抗体分子作为完整的免疫球蛋白被分泌,并能将 CTL 表位靶向至肿瘤以使它们成为 CTL 更好的靶。

[0007] WO 00/64488 公开了 CTL 应答可由编码嵌合抗体的核酸引发,其中所述嵌合抗体具有被插入 CDR 而非其可变区域的异源性 T 细胞表位,只要所述核酸被导向在 B 细胞中表达。由于 B 细胞不能激发原初 T 细胞应答,WO 00/64488 中所述疫苗将只在提高预先存在的 T 细胞应答时有用。

[0008] WO 02/092126 公开了 CTL 应答可由包括异源性 T 细胞表位和部分人 Fc 的多肽引发,其中所述多肽结合到高亲和性 CD64 受体。然而,本发明人现在已经证明,通过在例如不

适当的 CDR 或甚至抗体的可变区域内插入 T 细胞表位而破坏抗体序列预防了重链和轻链的缔合,并且没有分泌功能抗体。编码这些错折叠的抗体的 DNA 意外地产生强烈的 T 细胞应答。此外,这不是通过 CD64 介导的,因为不与小鼠或人 CD64 结合的人 IgG2 同人 IgG1 一样有效地工作。

[0009] 发明概述

[0010] 在本发明的一个方面,提供了一种核酸,其包括非特异性启动子和编码多肽的至少一种序列,其中所述多肽中具有至少一种异源性 T 细胞表位但没有任何调节性 T 细胞表位。

[0011] 此多肽优选地是同源的运载体,例如当被用来提高人体中的 T 细胞应答时它可以是人蛋白或外来蛋白或将所有 T 调节性表位鉴定并去除的人 / 外来嵌合蛋白。

[0012] 所述多肽优选地是异二聚体的一条链,所述异源性 T 细胞表位导致所述异二聚体链的破坏以致于它不能结合或缔合所述异二聚体的另一条链。很多分子是异二聚的,其一条链依赖于另一条而折叠并然后分泌。如果所述二级结构由于异源性 T 细胞表位的插入而破裂,那么折叠和分泌就被抑制。在某些实施方案中,一条链被分泌并包含异源性 CTL 表位,而另一条链包含异源性辅助表位,但由于二级折叠的破坏而不被分泌。因此,所述核酸可编码所述异二聚体的两条链,其中一条链包含异源性的细胞毒性 T 细胞 (CTL) 表位并在表达时被分泌,而另一条链包含异源性辅助表位并在表达时不被分泌。可选择地,各自的异二聚体链可在分开的核酸分子上被编码。

[0013] 所述异二聚体可以是免疫球蛋白分子。所述免疫球蛋白分子的重链可包含异源性的细胞毒性 T 细胞 (CTL) 表位并在表达时被分泌,而所述免疫球蛋白分子的轻链可包含异源性辅助表位并在表达时不被分泌。

[0014] 本发明第一个方面中所述的核酸编码不含有任何调节性 T 细胞 (T_{reg}) 表位的多肽。这些多肽作为 T 细胞表位的惰性运载体而起作用,并可以是被免疫系统用来激发免疫应答的分子或分子的一部分,因为根据定义这些分子不表达竞争性 T_{reg} 表位。适合的分子包括 HLA 分子、T 细胞受体、TOL 受体、TOL 配体、细胞因子、细胞因子受体、趋化因子、趋化因子受体。优选地,所述分子是抗体或其一部分。

[0015] 不希望被理论约束,本发明至少部分地基于如下的概念:T 细胞应答可针对特异性的 T 细胞表位(例如 CTL 表位)通过施用编码包括所述 T 细胞表位而非调节性 T 细胞表位的多肽的核酸而被产生。人们相信,核酸或者被抗原呈递细胞 (APC) 吸收,迁移到淋巴结并被直接呈递,或者被表达以产生被分泌然后被其他 APC 吸收的多肽。前一个核酸适合于激发辅助 T 细胞表位,而后一个适合于激发 CTL 应答。由所述核酸编码的多肽理想地不具有任何天然 T 细胞表位。在这点上,适合的多肽是免疫分子,例如抗体。不能缔合以使得轻链留在 APC 中而重链被分泌的抗体重链和轻链适合于本发明的实施,虽然本发明不限于使用抗体作为所述 T 细胞表位的运载体。

[0016] 约 40 年前鉴定了抑制性 T 细胞的群体,但其发展却因鉴定细胞的特殊技术的缺乏和关于阻遏之存在的科学怀疑而被阻碍。然而, Sakaguchi 等在 1995 年复苏了对抑制性细胞的兴趣,他们证明,将耗尽了 CD4⁺CD25⁺T 细胞的淋巴细胞转移进无胸腺小鼠导致了受体小鼠身上各种自身免疫疾病的发生,以及 CD4⁺CD25⁺T 细胞的重建避免了这些小鼠中的自身免疫反应 (Sakaguchi 等 J. Immunol 1995 ;155 :1151-1164)。接着,在小鼠和人身上的许

多研究表明,具有调节活性的各种 T 细胞群体在对自身(控制自身耐受性)(Sakaguchi 等, J. Immunol. 1995 ;155 :1151-1164) 以及外来抗原 (Shevach, Immunity 2006 ;25 :195-201, Coleman 等, J. Cell Mol. Med. 2007 ;11 :1291-1325) 的免疫应答(既是先天的又是适应的)的阻遏上扮演重要角色。小鼠癌症模型中 Treg 细胞的耗尽显示促进内源的免疫介导的肿瘤排斥 (Shimizu, 等, J. Immunol. 1999 ;163 :5211-5218, Onizuka 等, Cancer Research 1999 ;59 :3128-3133) 和抗原特异性的抗肿瘤免疫性 (Tanaka, 等, J. Immunother. 2002 ;25 :207-217)。此外, Treg 细胞的耗尽加强肿瘤的免疫疗法包括疫苗接种 (Tanaka, 等, J. Immunother. 2002 ;25 :207-217, Dannull 等, J. Clin. Invest. 2005 ;115 :3623-3633) 和 CTLA-4 阻断 (Sutmoller 等, J. Exp. Med. 2001 ;194 :823-832)。此外, Treg 细胞的数量在外周血液中增加 (Woo 等, Cancer Research 2001 ;61 :4766-4772, Curiel 等, Nature Medicine 2004 ;10 :942-949, Wolf 等, Clin. Cancer Research 2003 ;9 :606-612, Sasada 等, Cancer 2003 ;98 :1089-1099), 并在患有不同癌症的患者的肿瘤微环境和引流淋巴结中增殖 (Curiel 等, Nature Medicine 2004 ;10 :942-949, Sasada 等, Cancer 2003 ;98 :1089-1099, Liyanage 等, J. Immunology 2002 ;169 :2756-2761, Matsuura 等, Cancer 2006 ;106 :1227-1236, Yang 等, Blood 2006 ;107 :3639-3646, Alvaro 等, Clin. Cancer Research 2005 ;11 :1467-1473)。在患有胃癌 (Sasada 等, Cancer 2003 ;98 :1089-1099, Ichihara 等, Clinical Cancer Research 2003 ;9 :4404-4408) 和卵巢癌 (Curiel 等, Nature Medicine 2004 ;10 :942-949) 的患者中,差的预后和减少的存活率与更高的 Treg 细胞频率有关。Treg 细胞还显示阻遏/抑制肿瘤特异性 CD8⁺ (Liyanage 等, J. Immunology 2002 ;169 :2756-2761, Piccirillo 等, J. Immunology 2001 ;167 :1137-1140, Mempel 等, Immunity 2006 ;25 :129-141, Annacker 等, J. Immunology 2001 ;166 :3008-3018, Woo 等, J. Immunology 2002 ;168 :4272-4276) 和 CD4⁺ (Liyanage 等, J. Immunology 2002 ;169 :2756-2761, Ichihara 等, Clinical Cancer Research 2003 ;9 :4404-4408, Nishikawa 等, Blood 2005 ;106 :1008-1011) T 细胞的增殖、细胞因子的产生 (IFN γ , IL-2) 和细胞溶解活性。此外, Treg 细胞能阻遏树突细胞 (Romagnani 等, Eur. J. Immunol. 2005 ;35 :2452-2458)、NK 细胞 (Rallainirina 等, J. Leukoc. Biol. 2007 ;81 :144-153) 和 B 细胞 (Lim 等, J. Immunology 2005 ;175 :4180-4183) 的功能。合起来看,这些研究表明 Treg 细胞在肿瘤免疫病理学上的重要作用,并指出 Treg 细胞频率和肿瘤生长之间的紧密关联。

[0017] Treg 细胞被分为天然的 CD4⁺CD25⁺T 细胞和多种群体的诱导的/适应性的 Treg 细胞 (Shevach, Immunity 2006 ;25 :195-201, Bluestone 等, Nat. Immunol. 2005 ;6 :345-352) (表 1)。小鼠和人的约 5% -10% 的 CD4⁺T 细胞是天然的 Treg 细胞 (Sakaguchi 等, Nat. Immunology 2005 ;6 :345-352)。天然的 Treg 细胞在胸腺中通过与自体肽的强的 TCR 相互作用产生 (Picca 等, Current Opinion in Immunology 2005 ;17 :131-136, Jordan 等, Nature Immunology 2001 ;2(4) :301-306, Picca 等, Immunological Reviews 2006 ;212 :74-85), 而诱导的 Treg 细胞从外周的非调节性 T 细胞产生。此胸腺外转换需要特殊的免疫条件例如连续暴露于低剂量的抗原,暴露于全身外周抗原或暴露于 TGF β (Shevach, Immunity 2006 ;25 :195-201, Akbar 等, Nat. Rev. Immunol. 2007 ;7 :231-237)。Treg 细胞可通过下面的机制中的一种或其组合来介导它们的阻遏 :i) 细胞-细胞接触依赖的机制, ii) 通过免疫抑制的细胞因子如 IL-10 或 TGF β 的分泌, 或 iii) 直接杀死靶细胞的穿孔素-粒

酶途径 (von Boehmer, Nature Immunology 2005 ;6(4) :338-344)。

[0018] 迄今,人 Treg 细胞的抗原特异性被知道的很少。Wang 等报道了癌症患者中 LAGE-1 特异性的 $CD4^+CD25^+GITR^+$ 功能性 Treg 细胞克隆的鉴定 (Wang 等, Immunity 2004 ;20 :107-118)。Vence 等证明了肿瘤抗原特异性的 $CD4^+$ Treg 细胞在转移性黑素瘤患者外周血液中的存在 (Vence 等, PNAS2007 ;104(52) :20884-20889)。这些 Treg 细胞识别一大批的肿瘤抗原,其包括 TRP1、NY-ESO-1、gp100 和存活蛋白。此外, Vence 等最先证明了 NY-ESO-1 特异性的 Treg 细胞表位在 NY-ESO-1 分子内的存在。此外,据显示,用载有合成肽或肿瘤裂解液的树突细胞对黑素瘤患者的疫苗接种诱导了 Treg 细胞频率的增加,这与肿瘤特异性的 $CD8^+$ T 细胞的扩张伴随 (Chakraborty 等, Hum. Immunology 2004 ;65 :794-802)。这暗示所述疫苗含有未被鉴定的 Treg 细胞表位以及 $CD8^+$ T 细胞表位的可能性,这些表位由通过 Treg 细胞 T 细胞受体 (TCR) 的配体特异性激活而导致 Treg 细胞在体内的扩张。被广泛接受的是, Treg 细胞需要通过 TCR 识别 / 结合的抗原特异性激活,但介导抗原非特异性的旁观者阻遏 (Thorton&Shevach, J. Immunology 2000 ;164 :183190)。此外, Li 等提出了显性的 Treg 表位在丙型肝炎病毒核心蛋白中的存在,其中所述核心蛋白刺激被感染的患者中 HCV 特异性的 Treg 细胞 (Li 等, Immunol. Cell Biol. 2007 ;85(3) :197-204)。总的来说,除了近期关于使用抗内皮 DNA 构建体 C200Fc 对 HHD 转基因小鼠进行免疫的发现,这些研究未能激发显著的 Tie-2₁₋₁₉₆ 特异性的抗肿瘤免疫应答,而且在 C200Fc DNA 免疫之前 (Middleton, 博士论文。诺丁汉大学, 2007 年 11 月) 耗尽 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞 (通过施用 400 μ g 的 PC61 单克隆抗体) 之后来自 HHD 小鼠脾细胞的分泌 Tie-2₁₋₁₉₆ 特异性的 IFN γ 的细胞的提高的频率表明, DNA 疫苗中的 Tie-2₁₋₁₉₆ 含有未被鉴定的 Treg 细胞表位以及 $CD8^+$ 表位。这将解释所述疫苗在打破对自体抗原 Tie-2 的耐受性以及 HHD 小鼠中引出抗肿瘤免疫力的失败原因,这是由于充足的抗原特异性的扩张的 Treg 细胞,其阻遏细胞介导的抗肿瘤免疫应答。因此,使用惰性免疫运载体表达 T 效应表位是有优势的,其中所述惰性免疫运载体不能表达 T reg 表位以将免疫应答导向效应表位并防止占优势的 T reg 应答的激发。

[0019] 有利地,本发明中的核酸包括编码一段序列例如前导序列的序列,其中所述前导序列允许被表达的多核苷酸被分泌。这允许所述多核苷酸被转移到抗原呈递细胞 (APC)。所述序列可以是与所述多核苷酸一起天然表达的前导序列,或可以是异源的前导序列,例如被加入的免疫球蛋白前导序列。在所述多核苷酸编码膜结合分子的情况下,所述后者是特别适合的。

[0020] 根据本发明的另一个方面,提供了一种核酸,其包括非特异性启动子和编码免疫球蛋白分子的重链的至少一种序列,其中所述重链中具有至少一种异源性 T 细胞表位以致于所述重链在所述核酸被表达时不能采取 它的天然构象。

[0021] 本发明这个方面的核酸编码免疫球蛋白分子的重链。这种重链的结构是本领域技术人员已知的,并通常包括可变的和恒定的区域。所述重链可以来自抗体。所述抗体可以是单克隆的或多克隆的,并可以是 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM,虽然 IgG 是优选的。所述 IgG 抗体可以是任何 IgG 亚类,例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4,或小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 或 IgG3。所述 IgG 抗体可以是含有 IgG2 Fc 结合结构域的人 IgG1 抗体,或含有 IgG1 Fc 结合结构域的人 IgG2 抗体。所述重链可能含有人抗体的恒定区域,以及小鼠单克隆抗体的可变的或超可变的 (CDR) 区域,其中所述小鼠单克隆抗体被异源性 T 细胞表位插入。所述可

变区域而非所述超可变区域还可衍生自人抗体的可变区域。当应用于抗体（即包括一条重链和一条轻链）时，据说所述抗体是人源化的。制造人源化抗体的方法是本领域中已知的。方法在例如 Winter 的编号为 5, 225, 539 的美国专利中被描述。在鼠超可变区域外面的重链的可变区域还可衍生自小鼠单克隆抗体。在这种情况下，整个可变区域衍生自鼠单克隆抗体并且当应用于抗体时，所述抗体据说是被嵌合的。制造嵌合抗体的方法是本领域已知的。这种方法包括例如在 Boss (Celltech) 和 Cabilly (Genentech) 的美国专利中所描述的那些。还分别参见编号为 4, 816, 397 和 4, 816, 567 的美国专利。

[0022] 在某些实施方案中，本发明所述核酸还包括编码免疫球蛋白分子的轻链的至少一种序列。可选地，可以提供编码免疫球蛋白分子的轻链的分离的核酸。所述轻链中可具有至少一种异源性 T 细胞表位。所述 T 细胞表位可以使得当所述核酸被表达时所述轻链不能采取它的天然构象。所述轻链可具有本文关于重链所述的任何特性。因此，本发明还提供编码免疫球蛋白分子的重组轻链的核酸，其中所述轻链中具有至少一种异源性 T 细胞表位以致于当核酸被表达时所述轻链不能采取它的天然构象。所述核酸可包括一个非特异性启动子。这种核酸编码免疫球蛋白分子，例如抗体。

[0023] 因此，根据本发明进一步的一个方面，提供了一种核酸，其包括非特异性启动子和编码重组免疫球蛋白分子的至少一种序列，其中所述免疫球蛋白分子中具有至少一种异源性 T 细胞表位以致于当核酸被表达时所述免疫球蛋白分子不能采取它的天然构象。优选地，所述重组的免疫球蛋白分子以及上述的重链和轻链不具有任何调节性 T 细胞表位。

[0024] 本发明还提供：

[0025] • 一种疫苗，其包括本发明的核酸和佐剂；

[0026] • 一种药物组合物，其包括本发明的核酸和药学上可接受的运载体、赋形剂或稀释剂；

[0027] • 本发明的核酸在医学上的用途；

[0028] • 本发明的这种核酸在制造药物方面的用途，其中所述药物激发针对至少一种 T 细胞表位的免疫应答；

[0029] • 本发明的核酸，其激发针对至少一种 T 细胞表位的免疫应答；以及

[0030] • 一种激发针对 T 细胞表位的免疫应答的方法，其包括向需要这种免疫应答的受治疗者施用治疗有效量的本发明的核酸。

[0031] 惊人地，本发明人已经发现，抗体例如单克隆抗体激发强的辅助和抗原特异性 T 细胞应答，其中所述抗体可以是人或非人的，且具有被克隆在它们的可变区域内的预定的 T 细胞表位，以破坏抗体的一级结构，抑制折叠和 / 或限制重链或非常少量的完整抗体的分泌。本发明人还发现，可以使用编码这种抗体的重链的核酸实现这种作用。人们相信，所述 T 细胞表位被加工但未被免疫蛋白体破坏。在某些实施方案中，本发明提供一种呈现变性的免疫球蛋白中预先定义的 T 细胞表位的 DNA 疫苗，其中所述变性的免疫球蛋白提高 T 细胞应答的频率和亲和力。由本发明的核酸编码的多肽在本文中可被称作“免疫体”。

[0032] 据发现，针对 T 细胞表位的免疫应答可以被编码免疫球蛋白分子的至少重链的核酸激发，其中所述免疫球蛋白分子被 T 细胞表位插入以致于免疫球蛋白分子不能采取它的天然构象，此发现与本领域的期望背道而驰，其中被教导的是，抗体必须以功能型被表达。例如，如上所讨论，W096/19584 教导的是，当核酸编码在其中 T 细胞表位被插入其 CDR 的抗

体时,所述核酸必须编码功能性抗体。相似地,EP0759944 描述将 T 细胞表位并入抗体分子内的方法,其中所述抗体分子作为完整的免疫球蛋白被分泌。虽然编号为 7,067,110 的美国专利公开说可以通过抗体和抗原的融合蛋白引发针对抗原的免疫应答,但是据公开所述抗体缺少免疫球蛋白可变区域。此外,此融合蛋白将具有所述抗原中的调节性 T 细胞表位。因此,虽然所述蛋白可以激发抗体应答,但是它将不激发高亲和力的 T 细胞应答,这是由于所述抗原中的调节性 T 细胞表位。

[0033] 如上所讨论,WO 00/64488 公开编码具有被插入 CDR 而非其可变区域的异源性 T 细胞表位的嵌合抗体的核酸,其中所述核酸被导向在 B 细胞中的表达。本发明所述核酸未被导向在 B 细胞中的表达,并因此将不会在体外或体内特异性地靶向 B 细胞。本发明所述核酸可被任何抗原呈递细胞包括树突细胞吸收,并能因此启动原初 CTL 和辅助 T 细胞应答,然而 W000/64488 中所述疫苗将只对增强预先存在的 T 细胞应答有用。

[0034] 根据本发明的核酸所诱导的应答的功能性亲和力分析证明,当与合成肽的免疫比较时可产生高亲和力应答。这还与提高的在体外和体内识别和杀死肿瘤细胞的能力相关。此观察与其他研究中所记载的具有可比性,在所述其他研究中高亲和力的 TRP2 特异性 CTL 显示了更好的抗肿瘤活性(Zeh 等, J Immunol 1999 ;162 :989-94, Harada 等, Immunology 2001 ;104 :67-74)。

[0035] 本发明所述核酸具有一个非特异性启动子,即提高核酸表达但对在其中表达被提高的细胞没有特异性的启动子。所述启动子优选地导致树突细胞和 / 或角质化细胞中核酸的表达。适合的启动子的例子包括 CMV 启动子、SV40 启动子和本领域技术人员已知的其他非特异性启动子。可选地,本发明所述核酸可具有一种或多种启动子,其中所述启动子在树突细胞(例如 Cd11b 启动子)和角质化细胞(例如 MHCII 启动子, Chin 等, 2001 J. Immunol. 167, 5549-5557) 中导致特异性表达。

[0036] 本发明某些方面中所述核酸编码免疫球蛋白分子,优选地为包括抗体所有主要特性的抗体,也就是说包含可变和恒定区域的重和轻链。所述抗体可以是单克隆或多克隆的,并可以是 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM,虽然 IgG 是优选的。所述 IgG 抗体可以是任何 IgG 亚类,例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4,或小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 或 IgG3。所述 IgG 抗体可以是具有 IgG2 Fc 结合结构域的人 IgG1 抗体。所述抗体可具有人抗体的恒定区域,以及小鼠单克隆抗体的可变或超可变区域,在其中异源性 T 细胞表位被插入。所述可变区域而非超可变区域还可衍生自人抗体的可变区域。这种抗体据说是人源化的。制造人源化抗体的方法是本领域中已知的。方法在例如 Winter 的编号为 5,225,539 的美国专利中被描述。在小鼠超可变区域外面的抗体的可变区域还可衍生自小鼠单克隆抗体。在这种情况下,整个可变区域衍生自鼠单克隆抗体并且所述抗体据说是被嵌合的。制造嵌合抗体的方法是本领域已知的。这种方法包括例如在 Boss(Celltech) 和 Cabilly(Genentech) 的美国专利中所描述的那些。还分别参见编号为 4,816,397 和 4,816,567 的美国专利。

[0037] 本发明某些方面中所述核酸是这样的:从其表达的重链、轻链或免疫球蛋白分子中具有至少一种异源性 T 细胞表位,以致于所述重链、轻链或免疫球蛋白分子不能采取它的天然构象。所述 T 细胞表位可破坏被表达的蛋白以致于所述重链或免疫球蛋白分子不能再结合到它的抗原,以致于所述重和轻链(当存在时)不能再缔合,或者以致于所述重链或免疫球蛋白分子不能被适当地分泌,例如。所述破坏可以是在免疫球蛋白分子的三级结构,

其可避免双硫键的形成。

[0038] 如下面更详细的讨论,其中所述免疫球蛋白分子是抗体,T细胞表位可插入或取代所述抗体的CDR1和CDR2区域。CDR1和CDR2形成所述抗体 β 片层构象的一部分,并且被部分地淹没在被折叠的分子中。它们的长度的任何变化、氨基酸组成或变化将破坏此结构并防止重和轻链的折叠与缔合。CDRH3被暴露于免疫球蛋白分子的表面并因此更允许改变。在本发明中,优选的是CDR1和/或CDR2被T细胞表位所取代。的确,在某些实施方案中,在CDRH接合处骨架区域的丧失完全地破坏抗体折叠但在这些区域中表位的插入导致良好的T细胞应答。在CDRH1(5个氨基酸长度)或CDRH2(17个氨基酸长度)中引入任何表位导致充分的破坏以允许重链的分泌,但是只有非常少量的完整抗体被分泌,即使轻链具有它的天然序列。这表明,二级结构对于重和轻链的配对是重要的。在轻链的CDRL1中引入任何表位导致轻链的低水平分泌,即使只将单个表位引入重链的CDRH3。

[0039] “异源性T细胞表位”旨在表示对抗体是异源性的T细胞表位。例如,异源性T细胞表位可以是之前不存在于抗体中的表位。异源性T细胞表位可作为整体被插入,虽然它可以从被插入的氨基酸序列与第二部分的侧翼氨基酸一起被制作。这是为了保证被插入的表位在异源的核酸中具有与原始抗原相似的加工情况。一种或多种CTL/辅助表位可被插入相同的可变区域中。

[0040] 所述T细胞的一个或多个表位可被插入重链或轻链中的任何地方。优选地,表位或每个表位被插入重链和/或轻链的可变区域,虽然编码具有T细胞表位的重链或抗体的核酸被包括进本发明,其中所述T细胞表位被插入重链和/或轻链的仅仅恒定区域或者恒定区域和可变区域。在本发明的核酸中,编码T细胞表位的一条或多条序列可被插入(即添加至)编码重链和/或轻链的序列,或可被取代进编码重链和/或轻链的序列。

[0041] 在可变区域内,所述T细胞的一个或多个表位可插入或取代重链和/或轻链的CDR中任一种或多种,即L1、L2、L3、H1、H2或H3。在这些中,L1、H1和H2目前是优选的。在某些实施方案中,T细胞表位插入或取代CDRL1和/或H1和/或H2。优选地,被引入的T细胞表位与抗体的原始CDR的氨基酸的大小和电荷不相似,以致于所述抗体不采取它的天然构象,例如不正确地折叠和分泌。可选地或另外地,它们可插入或取代环绕CDR的骨架区域。

[0042] 被插入的T细胞表位优选地是细胞毒性T细胞(CTL或CD8)表位。可选地或另外地,辅助T细胞(CD4)表位可被插入。T细胞表位可使用已知的T细胞算法来预测或作为肽被合成,并使用标准的T细胞测定来筛选。T细胞表位可具有范围从5至50、7至40、8至30或9至20个氨基酸的氨基酸长度,例如9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。所述表位可使用编码抗原表位的互补寡核苷酸插入,其中所述抗原表位被退火并克隆进抗体骨架的特定位点,在所述骨架中的CDR(或其他区域)被独特的限制性酶位点所替换。重组抗体激发辅助和细胞毒性T细胞应答的能力可如本文所例证的那样进行筛选。

[0043] 各种组合在本发明中是可能的。在某些实施方案中,一种或多种CD8表位插入和/或取代CDRH1和/或H2,或在重链或抗体的非CDR可变区域中。另外地或可选地,一种或多种CD4表位可插入和/或取代CDRL1,或在轻链或抗体的非CDR可变区域中。当有多个T细胞表位时,所述T细胞表位可以是相同的或不同的。本领域技术人员将了解,许多组合是可能的,其包括:

- [0044] • CDR H1 中的一种 CD8 表位,和 CDR L1 中的一种 CD4 表位;
- [0045] • CDR H2 中的一种 CD8 表位,和 CDR L1 中的一种 CD4 表位;
- [0046] • CDR H1 和 CDR H2 中的一种 CD8 表位,和 CDR L1 中的一种 CD4 表位;
- [0047] • CDR H1 中的 2 种 CD8 表位,和 CDR L1 中的一种 CD4 表位;
- [0048] • CDR H2 中的 2 种 CD8 表位,和 CDR L1 中的一种 CD4 表位;等。

[0049] 本发明的核酸可包括来自单个靶抗原的多个 T 细胞表位,其中所述靶抗原可结合 I 类和 II 类 MHC 分子二者的大多数。这可产生一种能用于广布的人口接种的疫苗。可选地,本发明中有用的核酸可包括来自多个靶抗原的多个 T 细胞表位,其中所述靶抗原可结合最常见的 I 类和 II 类表型。这可产生一种可以预防抗原损失变异体的选择的疫苗。靶抗原可来自单个的病原体或肿瘤类型,或可被选择以针对各种病原体或癌症引发免疫应答。靶向特定的常见 HLA 表型的本发明中有用的核酸可包括来自多种多样的癌症和 / 或病原体的许多 T 细胞表位,其提供单个疫苗以预防疾病。

[0050] 可以插入任何 T 细胞表位,假如它激发辅助和 / 或细胞毒性 T 细胞应答。可以使用来自病原体例如 HIV、丙型肝炎和需要 CTL 以清除潜在感染的其他感染的 T 细胞表位,虽然优选地所述表位是“自体表位”,即相关于与细胞增殖例如癌症相关的状况 / 病症。优选地,该 T 细胞表位使得重链或抗体不能正确折叠并分泌。因此,优选地,被插入的表位具有与原始的可变区域不相似的大小和氨基酸组成。所述核酸可具有多个不同 T 细胞表位以便产生各种各样的 T 细胞应答。所述核酸可包括来自单个抗原的多个表位,从而保证不同 HLA 类型的个体的大多数对单个疫苗进行应答。可选地,可以使用来自靶向受限的一系列 HLA 种类的多个抗原的多个 T 细胞表位。本发明所述核酸分子可包括来自单个病原体或癌症类型的若干抗原,或者它们可包括靶向各种各样实体瘤或病原体的完全不同的抗原。本发明所述核酸分子甚至可被设计成靶向肿瘤中不同细胞群体,例如肿瘤上皮和内皮抗原。

[0051] 意外地,本发明人已经发现,当 T 细胞表位被插入重链的结构限制的 CDR 或非 CDR 区域时,它们引发优良的 CTL 应答。这看上去是由于大量重链的分泌,其中所述重链只能与轻链弱缔合,由于体积大的表位向它们的可变区域的插入。这与定理矛盾,所述定理描述道“只有由抗原呈递细胞内源性合成的蛋白被呈递在 I 类 MHC 分子上并被 CTL 识别”-W096/19584。外源性抗原的吸收和在 I 类 MHC 上的呈递被认为是交叉呈递的过程,并通常需要通过特定的受体进行吸收。这可以是人 Fc γ 1 抗体的 CD64 受体。然而,据预测,大量的完整抗体或抗原-抗体复合物将更善于靶向此受体。相比之下,本文所呈递的结果清楚地显示,不应该结合 CD64 的很低水平的完整抗体和大量的游离重链引出优良的 CTL 应答。的确,据本文所显示,CTL 应答当 CTL 表位被插入不能结合 CD64 的抗体时可被激发,其中所述抗体例如 IgG2 抗体或 IgG1 分子,其中所述 IgG1 分子的 CD64 结合区域被来自 IgG2 的非 CD64 结合区域替换。

[0052] 编码重链的核酸优选地包括前导序列以允许它被分泌。本发明人已经发现,如果重链的前导序列被除去以防止分泌并允许更多内源性蛋白被产生,那么这降低 CTL 应答。这与预期完全相反。虽然不希望受到理论约束,本发明人相信,这意味着核酸在非抗原呈递细胞中表达,其中所述非抗原呈递细胞分泌高水平的重链和然后可被抗原呈递细胞吸收的少量天然蛋白。可选地,核酸可直接转染抗原呈递细胞,其中所述抗原呈递细胞迁移到引流淋巴结并在其中向原始 CTL 分泌少量天然蛋白和大量重链,其中所述重链被相同或相邻的

抗原呈递细胞吸收并被呈递在 I 类 MHC 上。因此,对于激发有效的 CTL 应答的核酸疫苗,其必须优选地在一种蛋白内编码 CTL 表位,其中所述蛋白以很低水平被分泌和 / 或同时分泌大量变性蛋白。然而,在没有辅助应答存在下,CTL 应答不能成熟为高亲和性记忆应答。因此,优选的是,T 辅助表位被插入重链或免疫球蛋白分子,优选地插入抗体轻链的可变区域。再一次,意外地并且与定理相反,轻链只以很低量分泌,其中所述定理描述道“只有被靶细胞外源性吸收的蛋白被 II 类 MHC 分子呈递并被辅助 T 细胞识别”。为了防止轻链分泌而将前导序列移除,对于辅助应答没有作用。因此,本发明所述核酸可以或不可以具有抗体轻链的前导序列。这些结果暗示,核酸被抗原呈递细胞吸收,其中所述抗原呈递细胞可能通过自体吞噬而在来自内源合成的蛋白的 II 类 MHC 的情况下呈递 T 辅助表位。对于协助 CTL 应答的辅助 T 细胞,它们识别的 T 细胞表位二者必须以称作连锁 T 细胞辅助的过程被呈递在相同的抗原呈递细胞上。这暗示,由所述核酸编码的、合成轻链的抗原呈递细胞必须还合成、分泌和交叉呈递 CTL 表位本身,或从相邻的 APC 吸收重链。

[0053] 本发明还提供分离的树突细胞,其呈递来自内源产生的轻链的 II 类 MHC 上的异源辅助 T 细胞表位,以及来自交叉呈递的重链的异源 CTL 表位。这种树突细胞可被用在本文所述疗法中。

[0054] 本发明所述核酸能通过编码一种变性抗体而使存在的 T 细胞表位更具有免疫原性,其中所述变性抗体导致 T 细胞应答频率和亲和力二者的增加。

[0055] 本发明所述核酸可以是 DNA、cDNA 或 RNA 例如 mRNA,其通过克隆获得,或者完全或部分地通过化学合成产生。为了治疗用途,所述核酸优选地是以能够在待治疗的受治疗者体内被表达的形式存在。

[0056] 本发明所述核酸可以是重组的或作为分离物以分离的和 / 或纯化的形式被提供。它可以不含或大致不含在人类基因组的基因两侧的核酸,除了可能地一种或多种表达的调节序列。当根据本发明所述的核酸包含 RNA 时,本文所示的序列参考应该被认为是 RNA 相等物的参考,其中 U 取代 T。

[0057] 本发明所述核酸可由技术人员容易地制备,例如使用本文所含信息和参考文献以及本领域已知技术(例如,参见 Sambrook、Fritsch 和 Maniatis, "Molecular Cloning", A Laboratory Manual (《分子克隆,实验室手册》), ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989 和 Ausubel 等, Short Protocols in Molecular Biology (《精编分子生物学实验指南》), John Wiley 和 Sons, 1992), 假如核酸序列和克隆是可得的。这些技术包括 (i) 使用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增这种核酸例如来自基因组来源的样品, (ii) 化学合成, 或 (iii) 制备 cDNA 序列。编码所述多肽的 DNA 可通过本领域技术人员已知的任何适合途径被生成和使用,其包括取出编码 DNA, 鉴定待表达的部分任一侧的适合的限制性酶识别位点,以及从 DNA 切除所述部分。所述部分然后可在标准的商业可得的表达系统中被可操作地连接到适合的启动子。另一种重组手段是使用适合的 PCR 引物来扩增所述 DNA 的相关部分。可以对所述序列进行修饰,例如使用位点定向诱变,以导致修饰肽的表达或考虑用来表达所述核酸的宿主细胞中的密码子优选。

[0058] 为了获得核酸序列的表达,所述序列可被导入载体,其中所述载体具有可操作地连接到所述核酸以控制其表达的一种或多种控制序列。所述载体可包含驱使被插入的核酸的表达的其他序列例如启动子或增强子、致使所述多肽作为融合蛋白被产生的核酸序列和

/ 或编码分泌信号以使宿主细胞中产生的多肽从细胞分泌的核酸。如果希望, 然后通过如下获得多肽: 将所述载体转化进在其中所述载体是功能性的宿主细胞, 培养所述宿主细胞以使多肽被产生, 以及从宿主细胞或周围培养基中回收所述多肽。原核和真核细胞被用于本领域此目的, 包括大肠杆菌菌株、酵母和真核细胞例如昆虫细胞和动物细胞 (例如, COS、CHO 细胞、Bowes 黑素瘤和其他适合的人细胞)。当本发明涉及编码抗体的重链和轻链的核酸时, 相应的核酸可存在于被相同或不同的启动子驱使的相同表达载体中, 或在分开的表达载体中。

[0059] 本发明所述核酸可被用来激发针对患者中至少一种 T 细胞表位的免疫应答, 其中所述患者例如包括人的哺乳动物。辅助和 / 或细胞毒性 T 细胞应答可被激发。针对本发明中获得的特定表位的 T 细胞应答可具有比较高的亲和力, 这是与由作为简单肽的相同表位的免疫接种或由在抗原内作为肽或核酸被编码的相同表位的免疫接种获得的相比。本发明所述核酸可作为组合疗法被施用, 即编码轻链的核酸与编码重链的核酸。所述核酸可通过静脉内、皮内、肌肉内、口服或其他途径被施用。皮内或肌肉内施用是优选的, 因为这些组织含有树突细胞。

[0060] 如本文所用, 术语“治疗”包括任何能够使人或非人动物获益的疗法。所述治疗可以是对遗传的或后天的疾病。优选地, 所述治疗是针对与细胞增殖例如癌症或传染病相关的状况 / 病症。能够使用核酸治疗的癌症类型的例子包括任何实体瘤、结肠直肠癌、肺、乳腺、胃、卵巢、子宫、肝、肾、胰腺、黑素瘤、膀胱、头颈、脑、食道、胰腺和骨肿瘤, 以及软组织癌症, 以及白血病。能够使用核酸治疗的传染性疾病的例子包括 HIV 感染、丙型肝炎或需要 T 细胞免疫力来清除的任何慢性感染。

[0061] 核酸可以与药学上可接受的一种或多种运载体联合使用。这种运载体可包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、脂质体、水、甘油、乙醇及其组合。

[0062] 佐剂可被用于促使宿主免疫应答的激发, 并可包括氢氧化铝、溶血卵磷脂、普流罗尼 (pluronic)、多元醇、多聚阴离子、肽、蛋白和油乳胶。

[0063] 本发明中有用的核酸可在药物组合物中配制。除了上述物质中的一种, 这些组合物可包括药学上可接受的赋形剂、运载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员众所周知的其他物质。这种物质应该是无毒的并不应该干扰活性成分的效力。所述运载体或其他物质的确切性质可取决于施用途径, 例如皮内、口服、静脉内、皮肤上或皮下、经鼻、肌肉内、腹膜内途径。所述制剂优选地是作为沉淀至极小的金颗粒表面上的稳定干燥粉末的核酸, 并适合于通过基因枪注射。所述制剂可以适合于使用电穿孔进行皮内或肌肉内施用。

[0064] 包括核酸的或用于核酸的递送的组合物优选地以“治疗有效量”施用于个体, 这足以显示对所述个体的益处。所施用的实际量以及施用的速率和时间过程, 将取决于被治疗的状况的性质和严重性。治疗的处方, 例如剂量的决定等, 是在全科医生和其他医学博士的责任范围内, 并通常考虑到待治疗的病症、患者个体的状况、递送位点、施用方法和医师已知的其他因素。本发明所述核酸特别地与存在的癌症的治疗以及对初始治疗或手术后癌症复发的预防相关。上面提到的技术和方案的例子可在 Remington's Pharmaceutical Sciences (《雷明顿药物科学》), 第 16 版, Oslo, A. (编辑), 1980 中找到。

[0065] 优选地, 本发明所述核酸激发辅助和 / 或细胞毒性 T 细胞, 其中所述细胞毒性 T 细胞当以有效量施用于人时能够显著抑制肿瘤细胞的生长。最佳剂量可由医生基于若干参数

来确定,其中所述参数包括,例如,年龄、性别、体重、受治疗状况的严重程度、被施用的活性成分和施用途径。例如,1-1000 μ g 的 DNA 的剂量足以激发辅助和细胞毒性 T 细胞应答二者。

[0066] 本发明所述核酸可与另外的药学上可接受的成分一起施用。这种成分包括,例如,免疫系统刺激剂。

[0067] 组合物可被单独施用,或与其他治疗联合施用,或者同时或者连续地,这取决于受治疗的状况。其他癌症治疗包括本领域已知的其他单克隆抗体、其他化疗剂、其他放射疗法技术或其他免疫疗法。本发明所述组合物的一个特殊应用是作为外科手术的助剂,即在肿瘤被除去之后帮助减少癌症复发的危险。

[0068] 注射(皮内)可能是本发明所述核酸的治疗性施用的首要途径。

[0069] 核酸可以局部地方式被施用于肿瘤部位或其他期望的部位,或可以以靶向肿瘤或其他细胞的方式被递送。

[0070] 核酸的剂量将取决于所使用的试剂的性质,例如它的结合活性和体内血浆半衰期、制剂中多肽的浓度、施用途径、给药部位和速率、所涉及的患者的临床耐受性、折磨患者的病理学状况以及诸如此类,这恰恰是在医生的技术范围内。例如,每位患者每次施用 100 μ g 的核酸的剂量是优选的,虽然每剂的剂量可在约 10 μ g 至 1mg 范围内变动。在一系列的连续接种中使用不同剂量;医师可施用最初的接种,然后追加相对较小剂量的核酸。

[0071] 在某些其他实施方案中,本发明涉及将 T 细胞表位从靶抗原人工引入抗体的可变区域的方法,以及将这种人工的抗体用作疫苗以激发辅助和细胞毒性 T 细胞应答二者。

[0072] 本发明进一步的一个方面提供一种宿主细胞,其含有本文所公开的核酸。本发明所述核酸可被整合入宿主细胞的基因组(例如染色体)。可以通过包含根据标准技术促进与所述基因组重组的序列来促进整合。核酸可 以是在细胞内的外染色体载体上,或否则对所述细胞是可鉴定地异源性的或外源性的。

[0073] 再一个进一步的方面提供一种方法,其包括将本发明所述核酸引入宿主细胞。所述引入可使用任何可得的技术,其通常可以(特别地对于体外引入)没有限制地被称作“转化”。对于真核细胞,适合的技术可包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其他病毒例如牛痘或对于昆虫细胞的杆状病毒的转导。

[0074] 对于细菌细胞,适合的技术可包括氯化钙转化、电穿孔和使用细菌噬菌体的转染。作为备选方案,可以使用核酸的直接注射。

[0075] 标志物基因例如抗生素抵抗或敏感性基因可被用来鉴定含有感兴趣的核酸的克隆,这是本领域众所周知的。

[0076] 所述引入之后可以是导致或允许所述核酸的表达,例如通过在表达所述基因所需条件下培养宿主细胞(其可包括实际上被转化的细胞,虽然所述细胞将更可能是被转化细胞的后代),以致于产生被编码的多肽(或肽)。如果所述多肽偶合在适合的信号前导肽上被表达,它可从细胞分泌至培养基中。在表达的产生之后,多肽或肽可看情况从宿主细胞和/或培养基中分离和/或纯化,并且接下来如所期望的被使用,例如在组合物制剂中,其中所述组合物可包含一种或多种另外的成分,例如包含一种或多种药学上可接受的赋形剂、媒介物或运载体(例如,见下文)的药物组合物。

[0077] 本发明还提供在候选抗原中鉴定 T 细胞表位的方法,其包括:

[0078] 在非人动物中将 T 调节性细胞耗尽；

[0079] 用候选抗原免疫所述非人动物；以及

[0080] 筛选以观察 T 细胞应答的引发是否针对候选抗原上被预测的表位的肽或者候选抗原中所有可能重叠的肽。

[0081] 可以在非人动物例如小鼠或大鼠上实施所述方法。可以使用抗 CD25 抗体或通过化学疗法例如环磷酰胺将 T 调节性细胞在非人动物中耗尽，其中所述抗 CD25 抗体可选地可以与毒素例如 Ontak 偶合，其中所述环磷酰胺优先地杀死 T 调节性细胞。一旦 T 调节性细胞被耗尽，可以使用编码候选抗原的 DNA 或通过候选抗原本身对非人动物进行免疫。优选地，所述候选抗原作为抗原-Fc 融合蛋白被提供。在筛选步骤中，鉴定了在非人动物中激发的任何 T 细胞应答所针对的肽。这能使用例如 ELISPOT 的技术在体外完成。如果 T 细胞应答被引发至候选表位，此表位可被用来免疫非人动物。如果此肽引发 T 细胞应答，可通过在根据本发明所述的核酸中编码所述表位来提高亲和力和频率。此方法可允许由免疫蛋白体加工的 T 细胞表位的鉴定。

[0082] 本发明每个方面的优选的特征与已作必要的修正的每个其他方面是一样的。本文提到的现有技术资料以法律所允许的最完全范围被并入。

[0083] 附图简述

[0084] 现在本发明将在下面非限制性实施例中进一步描述。引用如下附图：

[0085] 图 1：描绘重链载体 pOrigHIB 的特征的图

[0086] 使用与人 IgG1 Fc 恒定区域符合读框的 HindIII/AfeI 来克隆抗体 SC100 的野生型非免疫性重可变区域。Fc 区域包括 CH1、CH2、CH3 结构域和铰链区域。在哺乳动物细胞中的高水平表达由人类细胞巨化病毒的立即早期启动子驱使。BGH 聚腺苷酸化向 Orig HIB 人 IgG1 链的下游发信号以保证 mRNA 的稳定性和有效终止。EM7 是细菌启动子，其控制博莱霉素抗性基因的表达并允许大肠杆菌中的抗生素选择，而抗性基因上游的 SV40 早期启动子允许在哺乳动物细胞中的选择。SV40 聚腺苷酸化向抗性基因的下游发信号以指导 zeo^r mRNA 的 3' 端的适当加工。所述载体还在其主链中包含细菌中繁殖的复制的 ColE1 起点。互补决定的 DNA 序列被有效地去除并单独地或共同地交换限制性位点 RE1、RE2 和 RE3（分别地 FspI、MscI 和 SrfI）。

[0087] 图 2：描绘重链载体 pOrigLIB 的特征的图

[0088] 使用与人 κ 恒定区域符合读框的 BamHI/BsiWI 来克隆抗体 SC100 的野生型非免疫性轻可变区域。在哺乳动物细胞中的高水平表达由人类细胞巨化病毒的立即早期启动子驱使。BGH 聚腺苷酸化向 Orig LIB 链的下游发信号以保证 mRNA 的稳定性和有效终止。所述载体还包括复制的 ColE1 起点和氨苄西林的抗生素抗性基因，其中所述氨苄西林允许细菌的繁殖和选择。互补决定区域被有效地去除并单独地或共同地交换限制性位点 RE4、RE5 和 RE6（分别地 EcoRV、SspI 和 Hpa I）。

[0089] 图 3：野生型免疫体嵌合重链的序列

[0090] 展示了全长嵌合 igG1 重链的核苷酸和翻译中的氨基酸序列。CDR 的位置是在由卡巴特 (kabat) 编号方案所定义的方框中。终止密码子由红色星号所示。HindIII/Afe I 限制性位点被突出显示，其被用在可变重区域的转移中。

[0091] 图 4：野生型免疫体嵌合 κ 链的序列

[0092] 展示了全长嵌合 κ 链的核苷酸和翻译中的氨基酸序列。CDR 的位置是在由卡巴特编号方案所定义的方框中。终止密码子由星号所示。被用在可变轻链区域的转移中的 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0093] 图 5:重叠延伸 PCR

[0094] 通过重叠 PCR, CDR 被移除并被独特的限制性位点替换。正向引物 H1、H2、H3、L1、L2 和 L3(表 2) 被设计成分别替换重和轻链的可变区域中的 CDR1、2 和 3。含有引物的、位于中间的、所选的每个独特的酶识别序列缺少待除去的(绿色部分)CDR 序列,其中所述 CDR 序列被夹在 10-20bp 的野生型序列之间。所述正向引物与普通的反向引物即 huHeClonR 或 huLiClonR(表 2) 一起被用在第一轮 PCR 中,其中所述 huHeClonR 或 huLiClonR 退火至分别在野生型构建体 pOrigHIB 和 pOrigLIB 中的人类重和轻恒定结构域。生成的片段不含野生型 CDR 序列(红色部分),但有效地交换限制性位点。为了扩增整个可变重和轻区域,需要第二轮 PCR,其使用第一轮所产生的 PCR 产物作为反向引物,以及在单个质粒中退火至 CMV 启动子的普通 CMV 正向引物。第二轮 PCR 产物被亚克隆进 pCR2.1(Invitrogen),而且在序列确认之后,含有 H1、H2、H3、L1、L2 和 L3 版本的重/轻(VH 和 VL) 可变区域单独地、组合地和一起被插回单个构建体 pOrigHIB 和 pOrigLIB 中,其分别使用 HindIII/AfeI 和 BamHI/BsiWI 交换野生型区域。

[0095] 图 6:免疫体重链可变区域的序列

[0096] 重可变区域的核苷酸和氨基酸序列,其中 CDR 已经被其相应的酶位点 H1、H2 和 H3 单独地、组合地和一起替换。独特的限制酶位点被突出显示。CDR1、2 和 3 分别被 FspI、MscI 和 SrfI 替换。

[0097] 图 7:免疫体 κ 链可变区域的序列

[0098] 重可变区域的核苷酸和氨基酸序列,其中 CDR 已经被其相应的酶位点 L1、L2 和 L3 单独地、组合地和一起替换。独特的限制酶位点被突出显示。CDR1、2 和 3 分别被 EcoRV、SspI 和 Hpa I 替换。

[0099] 图 8:描绘双表达载体 pDCOrig 的特征的图

[0100] 一旦所有表位已经被并入单个载体中的可变重和可变轻位点,它们被转移到双表达载体中,其使用如突出显示的与其相应的人恒定区域符合读框的 HindIII/AfeI 和 BamHI/BsiWI。重链的 Fc 区域包括 CH1、CH2、CH3 结构域和铰链区域。重和轻链二者在哺乳动物细胞中的高水平表达由人类细胞巨化病毒的立即早期启动子驱使。BGH 聚腺苷酸化向两条链的下游发信号以保证 mRNA 的稳定性和有效终止。EM7 是细菌启动子,其控制博莱霉素抗性基因的表达并允许大肠杆菌中的抗生素选择,而抗性基因上游的 SV40 早期启动子允许在哺乳动物细胞中的选择。SV40 聚腺苷酸化向抗性基因的下游发信号以指导 zeo^r mRNA 的 3' 端的适当加工。所述载体还在其主链中包含细菌中繁殖的复制的 ColE1 起点。

[0101] 图 9:含有避免 Fc 区域合成的终止密码子的免疫体 IB15 重链的序列

[0102] 嵌合重链 pDCOrig IB15 CH1 终止的核苷酸和氨基酸序列。使用位点定向诱变在人 IgG1 Fc 恒定区域的 CH1 结构域之后插入终止密码子,如星号所示。粗体的核苷酸和氨基酸代表 CH1 结构域。在方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100210M 表位(TIMDQVPFSV) 和 H2 中的 TRP2 表位(SVYDFVWL)。HindIII/Afe I 限制性位点被突出显示,其被用在将可变重区域从单个构建体中转移。

[0103] 图 10 :不含前导序列的 DCIB15 重可变区域的核苷酸和氨基酸序列

[0104] 使用正向引物 pOrig 重的不含前导序列和反向引物 huHeClonR(表 2) 通过 PCR 除去前导序列,其中所述反向引物 huHeClonR 有效地结合至人 IgG1 CH1 结构域并再扩增重可变 (V_H) 区域。在序列确认后,减去前导序列的 V_H 区域被克隆回双表达构建体 DCIB15,其使用与人 IgG1 恒定区域符合读框的 HindIII/Afe I。方框内的氨基酸代表 H1 中的 GP100210M 表位 (TIMDQVPFSV) 和 H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL)。被用在可变重区域的转移中的 HindIII/Afe I 限制性位点被突出显示。

[0105] 图 11 :不含前导序列的 DCIB15 κ 可变区域的核苷酸和氨基酸序列

[0106] 使用正向引物 pOrig 轻的不含前导序列和反向引物 huLiClonR(表 2) 通过 PCR 除去前导序列,其中所述反向引物 huLiClonR 再扩增轻可变 (V_L) 区域。在序列确认后,减去前导序列的 V_L 区域被克隆回双表达构建体 DCIB15,其使用与人 κ 恒定区域符合读框的 BamHI/BsiWI。方框内的氨基酸代表 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在可变轻区域的转移中的 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0107] 图 12 :人 IgG2 恒定区域的序列

[0108] 被扩增的重的人 IgG2 恒定区域的核苷酸和氨基酸序列。AfeI 和 SapI 限制性位点被突出显示,其被用在双表达载体 DCIB15 中的 huigG1 恒定区域的转移和替换中。

[0109] 图 13 :人 igG3 恒定区域的序列

[0110] 被扩增的重的人 igG2 恒定区域的核苷酸和氨基酸序列。AfeI 和 SapI 限制性位点被突出显示,其被用在双表达载体 DCIB15 中的 huigG1 恒定区域的转移和替换中。

[0111] 图 14 :免疫体双表达载体的人同种型

[0112] A 双表达载体 pDCOrigIB15 huigG2 的图。

[0113] B 双表达载体 pDCOrigIB15 huigG3 的图。

[0114] 被用在可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0115] 图 15 :含有 G2 基序的 DCIB66 重链的序列

[0116] 嵌合重链的核苷酸和氨基酸序列。在与高亲和性 Fc γ R1 (CD64) 相互作用的关键的结合基序中的氨基酸 E233 L234 L235 被来自人 igG2 的 P233V234 A235 取代,其在方框中被加粗以突出显示。方框中的其他氨基酸代表 H1 中的 GP100210M 表位 (TIMDQVPFSV) 和 H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL)。

[0117] 被突出显示的 AgeI/AhdI 位点被用于将含有所述取代的部分转移至 pDCOrigIB15 huigG1。被用在可变重区域的转移中的 HindIII/Afe I 限制性位点被显示为粗体。

[0118] 图 16 :含有 G1 结合基序的 DCIB67 重链的序列

[0119] 嵌合重链的核苷酸和氨基酸序列。在人 IgG2 恒定区域中的氨基酸 P233V234 A235 被关键的结合基序取代以与来自人 IgG1 的高亲和性 Fc γ R1 (CD64) E233 L234 L235 G236 相互作用,其在方框中被加粗以突出显示。方框中的其他氨基酸代表 H1 中的 GP100210M 表位 (TIMDQVPFSV) 和 H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL)。

[0120] 被突出显示的 AgeI/AhdI 位点被用于将含有所述取代的部分转移至 pDCOrigIB15 huigG2。被用在可变重区域的转移中的 HindIII/Afe I 限制性位点被显示为粗体。

[0121] 图 17 :鼠 IgG2a 免疫体表达载体

[0122] (A) 单链 pMoOrigHIB 载体, (B) 含有 H1 中的 GP100210M 表位 (TIMDQVPFSV)、H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 L1 中的 HepBCD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL) 的双表达载体 DCIB53, 以及 (C) 含有 H1 中的 HLA-DR7 限制的 gp100 CD4 表位 (GTGRAMLGTHMEVTVYH)、H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 H3 中的 HLA-DR4 限制的 gp100 CD4 表位 (WNRQLYPEWTEAQRDL) 的双表达载体 DCIB63 的图。显示了所使用的限制性位点。

[0123] 图 18 :描绘调节性顺应式质粒 pVAXDCIB54 的构建的示意图

[0124] 使用 NruI 将重的单链载体 pVaxIB54 HIB (A) 直链化。使用 NruI 和 HpaI 将轻链表达盒从 pOrigLIB (B) 切除并克隆进被直链化的质粒以生成 双表达载体 pVaxDCIB54 (C)。被用在可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0125] 图 19 :DCIB15 的序列

[0126] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100210M 表位 (TIMDQVPFSV)、H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0127] 图 20 :免疫体构建体产生低水平的完整蛋白。

[0128] A, 通过夹心 Elisa 对来自 CHO-S 细胞上清液的免疫体重链水平的定量, 其中所述 CHO-S 细胞被含有 gp100/H1、TRP2/H2 和 HepB CD4/L1 的免疫体 (DCIB15) 转染。上清液被不掺杂地使用, 用培养基按 1 比 3、1 比 10 和 1 比 30 稀释, 并与人 IgG 阳性对照比较。

[0129] B, 通过夹心 Elisa 对含有 gp100/H1、TRP2/H2 和 HepB help/L1 的纯化的免疫体 (DCIB15) 的分析与阳性对照的比较。

[0130] C 和 D, 通过夹心 Elisa 对来自 CHO-S 转染子上清液的重链和完整免疫体的表达的确定。将抗人 Fc 特异性抗体涂布在板上。为了检测重链, 使用抗人 IgG Fc 特异性 HRP 抗体, 而且为了检测完整的免疫体, 使用抗人 κ 链特异性 HRP 抗体。

[0131] E, 通过夹心 Elisa 对来自 CHO-S 转染子 (DCIB15、DCIB31、DCIB32、DCIB36、DCIB48、DCIB49、DCIB52、DCIB54) 上清液的重链、轻链和完整免疫体的确定。将抗人 Fc 特异性抗体或抗人 κ 链抗体涂布在板上。为了检测重链, 抗人 IgG Fc 特异性 HRP 抗体与抗人 Fc 特异性涂布抗体共同使用。为了检测完整免疫体, 抗人 κ 链特异性 HRP 抗体与抗人 Fc 特异性涂布抗体共同使用。为了检测轻链, 抗人 κ 链特异性 HRP 抗体与抗人 κ 链特异性抗体共同使用。

[0132] 图 21 :DCIB24 的序列

[0133] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H2 中的卵白蛋白表位 (SIINFEKL) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0134] 图 22 :DCIB25 的序列

[0135] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100210M 表位 (TIMDQVPFSV)、H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 L3 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自

单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0136] 图 23 :DCIB31 的序列

[0137] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H3 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0138] 图 24 :DCIB32 的序列

[0139] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H3 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 L3 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0140] 图 25 :DCIB36 的序列

[0141] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 L3 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0142] 图 26 :DCIB48 的序列

[0143] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 H3 中的 HLA-DR4 限制的 gp100 CD4 表位 (WNRQLYPEWTEAQRDL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0144] 图 27 :DCIB49 的序列

[0145] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H3 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0146] 图 28 :DCIB52 的序列

[0147] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 H3 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0148] 图 29 :DCIB54 的序列

[0149] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 HLA-DR7 限制的 gp100 CD4 表位 (GTGRAMLGHTMEVTYH)、H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 H3 中的 HLA-DR4 限制的 gp100 CD4 表位 (WNRQLYPEWTEAQRDL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0150] 图 30 :DCIB18 的序列

[0151] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0152] 图 31:引入免疫体骨架的 CTL 表位被处理和呈递以引起体内的免疫应答。

[0153] A,在第 0、7 和 14 天用含有 CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位的免疫体构建体 (DCIB18) 对 C57BI/6 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽、HepB 辅助肽和培养基对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0154] B,通过测量对 IFN γ 酶联免疫斑点测定中增加的肽浓度的应答而测定了来自被免疫小鼠的脾细胞对 TRP2 表位的亲和力。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答,而亲和力被指定为导致 50%最大效应功能的浓度。

[0155] C,来自被免疫小鼠的脾细胞被耗尽了 CD8 T 细胞,并且针对 TRP2 肽、HepB 辅助肽和培养基对照被分析以确定 IFN γ 酶联免疫斑点测定中表位特异性应答的存在。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0156] D,在 6 天的体外 TRP2 肽激发之后,来自被免疫小鼠的脾细胞在 4 小时的 ^{51}Cr 释放测定中针对 B16F10、B16F10 IFN α 和 B16F10 siKb 黑素瘤细胞系的细胞毒性。

[0157] E,在第 0、7 和 14 天用免疫体 DNA (DCIB15、DCIB31、DCIB32、DCIB36、DCIB48、DCIB52 和 DCIB54) 对 C57BI/6 或 HLA-DR4 转基因小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽和培养基对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0158] F,通过测量对 IFN γ 酶联免疫斑点测定中增加的肽浓度的应答而测定了来自被免疫小鼠的脾细胞对 TRP2 表位的亲和力。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答,而亲和力被指定为导致 50%最大效应功能的浓度。

[0159] G,在第 0、7 和 14 天用免疫体 DNA (DCIB15、DCIB48、DCIB49、DCIB52 和 DCIB54) 对 C57BI/6 或 HLA-DR4 转基因小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 HepB 辅助肽 (DCIB15、DCIB49 和 DCIB52) 或 gp100DR4 辅助肽 (DCIB48 和 DCIB54) 和培养基对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0160] 图 32:免疫体 DNA 的免疫接种优于肽的免疫接种或全抗原的免疫接种。

[0161] A,将免疫体 DNA 的免疫接种 (DCIB18) 与不完全弗氏佐剂中的肽表位的皮下免疫接种或表达 TRP2 抗原的 DNA 的免疫接种进行比较。在第 0、7 和 14 天对 C57BI/6 小鼠进行免疫并在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽 (■)、HepB 辅助肽 (𩇛)和培养基对照 (□) 来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0162] B,通过测量对 IFN γ 酶联免疫斑点测定中增加的肽浓度的应答而测定了来自被免疫体 DNA (◇) 和肽 (◆) 免疫的小鼠的脾细胞对 TRP2 表位的亲和力。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答,而亲和力被指定为导致 50%最大效应功能的浓度。

[0163] C,在 6 天的体外 TRP2 肽激发之后,来自被免疫小鼠的脾细胞在 4 小时的 ^{51}Cr 释放测定中针对 B16F10 (■)、B16F10 IFN α (𩇛)和 B16F10 siKb (□) 黑素瘤细胞系的细胞毒性。

[0164] D,将免疫体 DNA 的免疫接种 (DCIB18) 与 TRP2 肽脉冲的 DC 的免疫接种进行比较。

在第 0、7 和 14 天对 C57BI/6 小鼠进行免疫并在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽的滴定量来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答,而亲和力被指定为导致 50%最大效应功能的浓度。

[0165] E,将免疫体 DNA 的免疫接种 (DCIB18) 与 TRP2 肽脉冲的 DC 的免疫接种进行比较。在第 0、7 和 14 天对 C57BI/6 小鼠进行免疫并在第 19 天用 TRP2 肽脉冲的 LPS 胚细胞在体外刺激脾细胞。刺激之后六天,用铬释放测定来评估 CTL 系溶解 B16F10 或 B16F10 siKb 黑色素瘤系的能力。用 % 细胞毒性来测量应答。

[0166] F,将免疫体 DNA 的免疫接种 (DCIB24) 与 SIINFEKL 肽的免疫接种进行比较。在第 0、7 和 14 天对 C57BI/6 小鼠进行免疫并在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 SIINFEKL 肽和对照肽来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0167] G,将免疫体 DNA 的免疫接种 (DCIB15) 与 gp100 210M 肽的免疫接种进行比较。在第 0、7 和 14 天对 HHDII 小鼠进行免疫并在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 gp100 210M 肽和对照的滴定量来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0168] H,将免疫体 DNA 的免疫接种 (DCIB24) 与 SIINFEKL 肽的免疫接种进行比较。在第 0、7 和 14 天对 C57BI/6 小鼠进行免疫并在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 SIINFEKL 肽的滴定量来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答,而亲和力被指定为导致 50%最大效应功能的浓度。

[0169] I,将免疫体 DNA 的免疫接种 (DCIB15) 与 gp100 210M 肽的免疫接种进行比较。在第 0、7 和 14 天对 HHDII 小鼠进行免疫并在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 gp100 210M 肽的滴定量来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答,而亲和力被指定为导致 50%最大效应功能的浓度。

[0170] 图 33 :DCIB21 的序列

[0171] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H2 中的 HepB S Ag 表位 (IPQSLDSWWTSL) 和 L1 中的 I-Ad 限制的 Flu HA CD4 表位 (FERFEIFPKE)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0172] 图 34 :可从 CDR H2 位点加工多个表位。

[0173] A,在第 0、7 和 14 天用含有 CDR H2 中的 SIINFEKL 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位的免疫体构建体 (DCIB24) 对 C57BI/6 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 SIINFEKL 肽、不相关肽、HepBCD4 肽和培养基对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0174] B,在第 0、7 和 14 天用含有 CDR H2 中的 HepB CD8 表位和 CDR L1 中的 Flu HA CD4 表位的免疫体构建体 (DCIB21) 对 Balb/c 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 HepB CD8 肽、不相关肽、FluHA CD4 肽和培养基对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0175] 图 35 :DCIB17 的序列

[0176] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100210M 表位 (TIMDQVPFSV) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转

移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0177] 图 36 :DCIB26 的序列

[0178] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 Tie-2 Z84 表位 (FLPATLTMV) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0179] 图 37 :可从可变区域加工多个 CTL 表位。

[0180] A, 在第 0、7 和 14 天用含有去掉部分骨架的 CDR H1 中的 gp100IMDQVPFSV 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位的免疫体构建体 (DCIB17) 对 HHDII 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 gp100 IMDQVPFSV 肽、HepB CD4 肽和培养基对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0181] B, 在第 0、7 和 14 天用含有去掉部分骨架的 CDR H1 中的 Tie2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位的免疫体构建体 (DCIB26) 对 HHDII 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 Tie2 肽、HepBCD4 肽和培养基对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0182] 图 38 :可从相同免疫体构建体中不同表位生成多种 CTL 应答。

[0183] HLA-A2 限制的 gp100 表位 IMDQVPFSV 被人工引入 CDR H1 位点并与 CDR H2 中的 TRP2 表位 SVYDFVWL 并排, 而且 HepB CD4 表位存在于 CDR L1 位点 (DCIB15)。

[0184] A, 在第 0、7 和 14 天用免疫体 DNA 对 HHDII 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 gp100 肽、TRP2 肽、HepB 辅助肽和培养基对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0185] B, 通过测量对 IFN γ 酶联免疫斑点测定中增加的肽浓度的应答而测定了来自被免疫的小鼠的脾细胞对 gp100 修饰的 IMDQVPFSV (◆) 表位、gp100 野生型 ITDQVPFSV 表位 (▲) 和 TRP2 表位 (■) 的亲和力。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答, 而亲和力被指定为导致 50% 最大效应功能的浓度。

[0186] C, 来自被免疫小鼠的脾细胞在 4 小时的 ^{51}Cr 释放测定中针对被 gp100IMDQVPFSV 肽、TRP2 肽或对照所脉冲的 T2 细胞和 B16F10 和 B16F10HHD 黑素瘤细胞系的细胞毒性。

[0187] D, 在第 0、7 和 14 天用含有 i) CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位 (DCIB15) 或 ii) CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位 (DCIB18) 的免疫体 DNA 对 HHDII 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 gp100 肽 (■)、TRP2 肽 (▣)、HepB 辅助肽 (▤) 和培养基对照 (□) 来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0188] E, 使用 $10 \mu\text{g}$ DNA 的溶液结合电穿孔通过肌肉内对 C57BI/6 小鼠进行免疫。在胫骨肌中隔周地进行三次免疫接种。单独使用 DCIB24 或 DCIB18, 二者结合地在相同位点或二者同时地但在分开的位点对小鼠进行免疫。在第 19 天分析脾细胞以确定 TRP2、SIINFEKL 肽特异性免疫应答的存在。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0189] 图 39 :DCIB37 的序列

[0190] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100 F7L 表位 (TITDQVPLSV)

和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0191] 图 40 :DCIB40 的序列

[0192] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100 F7I 表位 (TITDQVPISV) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0193] 图 41 :DCIB41 的序列

[0194] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100 野生型表位 (TITDQVPFSV) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0195] 图 42 :DCIB42 的序列

[0196] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100 F7Y 表位 (TITDQVPYSV) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0197] 图 43 :DCIB43 的序列

[0198] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100 V5L 表位 (TITDQLPFSV) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0199] 图 44 :非锚定残基的修饰能提高表位的免疫原性。

[0200] 在第 0、7 和 14 天用含有 CDR H1 区域中被修饰的 gp100 表位的免疫体构建体 (DCIB37、DCIB40、DCIB41、DCIB42 和 DCIB43) 对 HHDII 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 gp100 野生型 表位肽和培养基对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0201] 图 45 :DCIB35 的序列

[0202] 与表达载体 pDC0rig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100210M 表位 (TIMDQVPFSV)、H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 L1 中 HLA-DR4 限制的 gp100 CD4 表位 (WNRQLYPEWTEAQRDL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0203] 图 46 :多个 CD4 辅助应答可被处理和呈递以引发体内的免疫应答。

[0204] A, 在第 0、7 和 14 天用含有 CDR L1 区域中 I-Ab 限制的 HepB CD4 表位的免疫体构建体 (DCIB15) 对 HHDII 或 C57BI/6 小鼠进行免疫。

[0205] B, 在第 0、7 和 14 天用含有 CDR L1 区域中 I-Ad 限制的 Flu HA CD4 表位 (DCIB21) 对 Balb/c 小鼠进行免疫。

[0206] C, 在第 0、7 和 14 天用含有 CDR L1 中 HLA-DR4 限制的 gp100 CD4 表位的免疫体构

建体 (DCIB35) 对 HLA-DR4 转基因小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对相应的肽、不相关肽和培养基对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0207] D, 在第 0、7 和 14 天用含有 CDR L1(DCIB35) 中、CDR H3(DCIB54) 中和 CDR L3(DCIB50) 中 HLA-DR4 限制的 gp100 CD4 表位的免疫体构建体对 HLA-DR4 转基因小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对相应的肽、不相关肽和培养基对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0208] 图 47 :DCIB50 的序列

[0209] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100210M 表位 (TIMDQVPFSV)、H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 L3 中 HLA-DR4 限制的 gp100 CD4 表位 (WNRQLYPEWTEAQRDL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0210] 图 48 :CD8 T 细胞应答部分地依赖于分泌的重链但辅助应答不需要分泌的轻链。

[0211] A, 在第 0、7 和 14 天用含有 i) CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位 (DCIB15), ii) 在重链上不含前导序列的 CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDRL1 中的 HepB CD4 表位, iii) 在轻链上不含前导序列的 CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位的免疫体 DNA 构建体对 HHDII 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 gp100 (■) 和 HepB CD4 (▨) 肽和培养基对照 (□) 来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0212] B, 通过夹心 Elisa 对来自 CHO-S 转染子上清液的重链、轻链和完整免疫体的确定。将抗人 Fc 特异性抗体或抗人 κ 链抗体涂布在板上。为了检测重链, 抗人 IgG Fc 特异性 HRP 抗体与抗人 Fc 特异性涂布抗体共同使用。为了检测完整免疫体, 抗人 κ 链特异性 HRP 抗体与抗人 Fc 特异性涂布抗体共同使用。为了检测轻链, 抗人 κ 链特异性 HRP 抗体与抗人 κ 链特异性抗体共同使用。

[0213] C, 在第 0、7 和 14 天用含有 i) CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位 (DCIB15), ii) 在重链上不含前导序列的 CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDRL1 中的 HepB CD4 表位的免疫体 DNA 构建体对 C57BI/6 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0214] D, 在第 0、7 和 14 天用含有 i) CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位 (DCIB15), ii) 在重链上不含前导序列的 CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDRL1 中的 HepB CD4 表位的免疫体 DNA 构建体对 C57BI/6 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 HepB 辅助肽来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0215] 图 49 :免疫体 Fc 区域有利于建立有效的免疫应答。

[0216] A, 在第 0、7 和 14 天用含有 i) CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位 (DCIB15), ii) 缺少 Fc 区域的 CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位的免疫体 DNA 构建体对 C57BI/6 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 (■) 肽、培养基对照 (□)、B16F10

黑素瘤系 (■) 和 B16F10 siKb 阴性对照细胞系 (𩇔) 来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0217] B, 在第 0、7 和 14 天用含有 i) CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位 (DCIB15), ii) 缺少 Fc 区域的 CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位的免疫体 DNA 构建体对 C57BI/6 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0218] C, 为了 HepB 辅助肽的特异性应答, 分析了相同的小鼠。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0219] D, 通过测量对 IFN γ 酶联免疫斑点测定中增加的肽浓度的应答而测定了来自被 DCIB15 或缺少 Fc 区域的 DCIB15 (DCIB15 FcStop) 免疫的小鼠的脾细胞对 TRP2 表位的亲和力。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答, 而亲和力被指定为导致 50% 最大效应功能的浓度。

[0220] E, 在第 0、7 和 14 天用含有 i) CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 人 IgG1 中的 HepB CD4 表位 (DCIB15), ii) 带有人 IgG2 恒定区域的相同构建体 (DCIB33), iii) 带有人 IgG3 恒定区域的相同构建体 (DCIB65), iv) 带有被人 IgG2 结合基序替换的人 IgG1 结合基序的相同构建体 (DCIB66) 以及 v) 带有被人 IgG1 基序替换的结合基序的 DCIB33 (DCIB67) 的免疫体 DNA 构建体对 C57BI/6 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽 (■)、培养基对照 (□) 和 HepB 辅助肽 (𩇔) 来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0221] F, 通过夹心 Elisa 对来自 CHO-S 转染子 (DCIB15、DCIB33、DCIB65、DCIB66 和 DCIB67) 上清液的重链、轻链和完整免疫体的确定。将抗人 Fc 特异性抗体或抗人 κ 链抗体涂布在板上。为了检测重链, 抗人 IgG Fc 特异性 HRP 抗体与抗人 Fc 特异性涂布抗体共同使用。为了检测完整免疫体, 抗人 κ 链特异性 HRP 抗体与抗人 Fc 特异性涂布抗体共同使用。为了检测轻链, 抗人 κ 链特异性 HRP 抗体与抗人 κ 链特异性抗体共同使用。

[0222] G, 通过夹心 Elisa 对来自被 DCIB53 转染的 CHO-S 的上清液中的重链免疫体的确定。将抗小鼠 Fc 特异性抗体涂布在板上。为了检测重链, 抗小鼠 IgG2a 特异性 HRP 抗体被使用。

[0223] 图 50: 免疫体免疫接种提高免疫应答并克服在全抗原中观察到的调节。

[0224] A, 在第 0、7 和 14 天用免疫体 DNA 构建体 DCIB15 或 pcDNA3 载体中的全 gp100 抗原对 HLA-A2 转基因小鼠 (HHDII) 进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 gp100 肽或对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0225] B, 通过在腹膜内注射 400 μ g 抗 CD25 抗体 (PC61) 使 C57BI/6 小鼠耗尽 CD25 阳性细胞。接下来在第 4、11 和 18 天用免疫体 DNA 构建体 DCIB15 或 pOrig 载体中的全 TRP2 抗原对耗尽 CD25 的小鼠和未耗尽的动物二者进行免疫。在第 23 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽或对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0226] C 和 D, HHDII 小鼠未被处理 (c) 或被腹膜内 400 μ g 的 PC61mAb 处理 (d)。4 天后, 使用 Tie2 C200HFc DNA 构建体对所有小鼠进行免疫。间隔 7 天重复进行 DNA 免疫接种一共 3 次。最后一次免疫接种之后 6 天, 收集脾细胞并通过先体外后体内的 IFN γ 酶联免疫

斑点测定使用 $1\mu\text{g/ml}$ 的来自 Tie-2 的每一个预测的 CTL 表位重新刺激。柱表示每只单个小鼠的被归一化至背景对照的三个值的平均,而误差棒代表与平均值的标准偏差。

[0227] E 和 F, HHDII 小鼠未被处理 (e) ($n = 3$) 或被腹膜内 $400\mu\text{g}$ 的 PC61 抗体处理 (f) ($n = 2$)。4 天后,在 IFA(皮下)中使用按 1 : 1 混合的 $100\mu\text{g}$ Z12 肽和 $100\mu\text{g}$ Z48 肽对所有小鼠进行免疫。第一次肽免疫接种之后 7 天重复施用肽免疫接种。最后一次免疫接种之后 14 天,收集脾细胞并通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定使用 $1\mu\text{g/ml}$ 的 Z12 肽(黑柱)或单独的培养基(空柱)重新刺激。柱表示三个值的平均,而误差棒代表与平均值的标准偏差。

[0228] G,在 IFA(皮下)中使用按 1 : 1 混合的 $100\mu\text{g}$ Z12 肽对 HHDII 小鼠进行免疫。第一次肽免疫接种之后第 7 和 14 天重复施用肽免疫接种。最后一次免疫接种之后 7 天,收集脾细胞并分析以证实对 IFN γ 酶联免疫斑点测定中增加的肽浓度的表位特异性应答的存在。用斑点 / 百万个脾细胞来测量来自单个小鼠的应答,而亲和力被指定为导致 50% 最大效应功能的浓度。

[0229] H,在第 0、7 和 14 天通过基因枪使用免疫体 DNA 构建体 DCIB71 对 HHDII 小鼠进行免疫。最后一次免疫接种之后 7 天,收集脾细胞并分析以证实对 IFN γ 酶联免疫斑点测定中增加的肽浓度的表位特异性应答的存在。用斑点 / 百万个脾细胞来测量来自单个小鼠的应答,而亲和力被指定为导致 50% 最大效应功能的浓度。

[0230] 图 51 :DCIB71 的序列

[0231] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 Tie-2 Z12 表位 (ILINSLPLV) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0232] 图 52 :DCIB72 的序列

[0233] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H2 中的 Tie-2 Z12 表位 (ILINSLPLV) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0234] 图 53 :异种 Fc 在提供 T 细胞辅助方面的角色以及抗原特异性 T 细胞 辅助的要求。

[0235] A,在第 0、7 和 14 天用含有 CDR H1 中的 gp100 表位或 CDR H2 中的 TRP2 表位(相应地,IB17 和 IB18)的重链免疫体 DNA 构建体对 C57BI/6 或 HHDII 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 gp100 肽或 TRP2 肽和对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0236] B,通过测量对 IFN γ 酶联免疫斑点测定中增加的肽浓度的应答而测定了来自被含有 CDR H2 中 TRP2 表位的免疫体重链免疫的小鼠的脾细胞对 TRP2 表位的亲和力。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答,而亲和力被指定为导致 50% 最大效应功能的浓度。

[0237] C,在第 0、7 和 14 天用含有 CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 人 IgG1 中的 HepB CD4 表位 (DCIB15) 或者 CDR H1 中的 gp100 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和带有鼠 IgG2a 恒定区域的 CDRL1 中的 HepB CD4 表位 (DCIB53) 的免疫体 DNA 构建体

对 C57BI/6 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽、HepB 辅助肽和对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0238] D, 通过测量对 IFN γ 酶联免疫斑点测定中增加的肽浓度的应答而测定了来自被 DCIB15 和 DCIB53 免疫的小鼠的脾细胞对 TRP2 表位的亲和力。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答, 而亲和力被指定为导致 50% 最大效应功能的浓度。

[0239] E, 在第 0、7 和 14 天用含有 CDR H1 中的 gp100DR4 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR H3 人 IgG1 中的 gp100DR7 表位 (DCIB54) 或者 CDR H1 中的 gp100DR4 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和带有鼠 IgG2a 恒定区域的 CDR H3 中的 gp100DR7 表位 (DCIB64) 的免疫体 DNA 构建体对 HLA-DR4 转基因小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽、gp100DR4 辅助肽和对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0240] F, 通过测量对 IFN γ 酶联免疫斑点测定中增加的肽浓度的应答而测定了来自被 DCIB54 和 DCIB64 免疫的小鼠的脾细胞对 TRP2 表位的亲和力。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答, 而亲和力被指定为导致 50% 最大效应功能的浓度。

[0241] 图 54 :DCIB53 的序列

[0242] 表达载体 pDCOrig moigG2a 中鼠的重和轻全长链的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 中的 GP100210M 表位 (TIMDQVPFSV)、H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFFVWL) 和 L1 中的 HepB CD4 表位 (TPPAYRPPNAPIL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/HpaI 限制性位点被突出显示。

[0243] 图 55 :DCIB64 的序列

[0244] 表达载体 pDCOrig moigG2a 中鼠的重和轻全长链的核苷酸和氨基酸序列。终止密码子由星号标明。方框中的氨基酸代表 H1 中 HLA-DR7 限制的 gp100 CD4 表位 (GTGRAMLGHTMEVTVYH)、H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFFVWL) 和 H3 中 HLA-DR4 限制的 gp100 CD4 表位 (WNRQLYPEWTEAQRLD)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/HpaI 限制性位点被突出显示。

[0245] 图 56 :免疫蛋白酶体的加工对于免疫体构建体中表位的应答的产生是重要的。

[0246] 在第 0、7 和 14 天用含有 CDR H1 中的 gp100²⁰⁹⁻²¹⁷ 表位 (DCIB41) 或 CDR H1 中修饰版的 gp100210M (DCIB15) 对 HHDII 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 gp100²⁰⁹⁻²¹⁷ 肽或 gp100210M 肽和对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0247] 图 57 :不同免疫接种方法对于从免疫体疫苗引发免疫应答是有效的。

[0248] A, 在第 0、7 和 14 天用免疫体 DNA (DCIB15) 通过基因枪进行肌肉内 +/- 电穿孔或皮内 +/- 电穿孔而对 C57BI/6 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽或 HepB 辅助肽和对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0249] B, 通过测量对 IFN γ 酶联免疫斑点测定中增加的肽浓度的应答而测定了来自被不同途径免疫的小鼠的脾细胞对 TRP2 表位的亲和力。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答, 而亲和力被指定为导致 50% 最大效应功能的浓度。

[0250] 图 58 :免疫体免疫接种诱发类白癜风脱色素作用并保护免受肿瘤的攻击。

[0251] A, 被含有 CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR L1 中的 HepB CD4 表位的免疫体 DNA (DCIB18) 免疫的 C57BI/6 小鼠证明在免疫接种位点的毛发生长中的脱色素作用。

[0252] B, 在第 3 次和第 4 次免疫接种之间通过静脉内注射用 2×10^4 个 B16F10IFN α 细胞攻击被免疫的 C57BI/6 小鼠。在肿瘤攻击之后 49 天评估肺中的肿瘤负荷。肿瘤负荷被表示为平均肿瘤面积所占总肺面积的百分比。在最后一次免疫接种之后 7 天经过皮下用 2×10^4 个 B16F10 IFN α 细胞攻击被免疫的小鼠。以 3-4 天的间隔测量肿瘤尺寸, 而且一旦肿瘤生长超出限制, 就将小鼠安乐死。

[0253] C, 肿瘤注射后第 46 天评估的肿瘤尺寸。

[0254] D, 存活率。

[0255] 图 59 : 免疫体免疫接种显著地推迟肿瘤生长。

[0256] A, 使用 2×10^4 个 B16F10 细胞对 C57BI6 小鼠进行皮下注射。肿瘤注射 4 天后, 使用 DCIB52 免疫体 DNA 对小鼠进行免疫。在肿瘤注射后第 11 和 18 天重复进行免疫接种。以 3-4 天的间隔分析肿瘤负荷, 而且一旦肿瘤生长超出最大的允许限制, 就将小鼠安乐死。绘制肿瘤体积对时间的图表。

[0257] B, 使用 2×10^4 个 B16F10 IFN α 细胞对 C57BI6 小鼠进行皮下注射。肿瘤注射 14 天后, 使用 DCIB52 免疫体 DNA 对小鼠进行免疫。在肿瘤注射后第 21 和 28 天重复进行免疫接种。以 3-4 天的间隔分析肿瘤负荷, 而且一旦肿瘤生长超出最大的允许限制, 就将小鼠安乐死。显示在肿瘤植入后第 47 天的肿瘤体积。

[0258] C, 使用 2×10^4 个 B16F10 细胞在皮下而且在适当情况下使用抗 CD25 抗体在腹膜内对 C57BI6 小鼠进行注射。肿瘤注射 4 天后, 使用 DCIB52 免疫体 DNA 或对照免疫体 DNA 对小鼠进行免疫。在肿瘤注射后第 11 和 18 天重复进行免疫接种。在适当情况下, 在第 11 天将免疫接种与抗 CTLA-4 抗体的腹膜内注射相结合。以 3-4 天的间隔分析肿瘤负荷, 而且一旦肿瘤生长超出最大的允许限制, 就将小鼠安乐死。绘制肿瘤体积对时间的图表。

[0259] 图 60 : DCIB68 的序列

[0260] 与表达载体 pDCOrig 中人 IgG1 Fc 和 κ 恒定区域符合读框的被克隆到重和轻可变区域的核苷酸和氨基酸序列。方框中的氨基酸代表 H1 和 L3 中的 HLA-DR7 限制的 gp100 CD4 表位 (GTGRAMLGHTMEVTYH)、H2 中的 TRP2 表位 (SVYDFVWL) 和 H3 和 L1 中的 HLA-DR4 限制的 gp100CD4 表位 (WNRQLYPEWTEAQRDL)。被用在来自单个构建体可变重和轻区域的转移中的 HindIII/Afe I 和 BamHI/BsiWI 限制性位点被突出显示。

[0261] 图 61 : 免疫应答可由不同载体骨架表达的免疫体构建体生成。

[0262] 在第 0、7 和 14 天用含有 CDR H1 中的 gp100DR4 表位、CDR H2 中的 TRP2 表位和 CDR H3 人 IgG1 中的 gp100DR7 表位的免疫体 DNA 构建体 (DCIB54, B1-3) 和 pVax 载体中的等价构建体 (VaxDCIB54, C1-3) 对 C57BI/6 小鼠进行免疫。在第 19 天通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定针对 TRP2 肽和对照来分析脾细胞。用斑点 / 百万个脾细胞来测量应答。

[0263] 发明详述

实施例

[0264] 方法

[0265] DNA 载体的生成

[0266] 使用 PCR 来扩增 pSVgptHuigG1 和 pSVhygHuCk 载体 (Biovation Ltd) 中的 SC100 克隆 Vhd VKb (W001/88138) 的去免疫鼠重和轻可变区域。使用 HindIII/Afe I 和 BamHI/

BsiWI 位点将 V_H 和 V_L 区域 PCR 产物与人 IgG1 和 κ 恒定区域符合读框地克隆以生成单链构建体 pOrigHIB 和 pOrigLIB(参见图 1 和 2)。通过双脱氧链终止法来确认全长嵌合重和 κ 链的序列 (Sanger 等, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1977 ;74 :5463-7)。嵌合重和轻链的 DNA 和被翻译的蛋白序列分别被显示在图 3 和 4。互补决定区域 (CDR) 的位置被指明。

[0267] 除了保持六个氨基酸的重 CDR2 区域以外,重和轻链的 CDR 被完全除去并交换为独特的限制酶位点。这通过仔细检查序列任一侧的区域以便进行允许限制酶位点生成的切除来实现。这些独特的限制性位点被用来打开 DNA 以使编码抗原表位的寡核苷酸可被插入。通过引入表位引物而将在限制性位点生成中失去的多数骨架序列替换,从而保证氨基酸在翻译时被保持并且所述序列符合读框地保留。表 1 列出所有 CDR 的被选酶位点和表位寡核苷酸序列。

[0268] CDR 区域被除去并用独特的限制性位点通过重叠延伸 PCR 替换,如图 5 所示。对于重可变区域,寡核苷酸 H1、H2 和 H3(参见表 2) 被设计为替换三个 CDR 中的每一个。每个特定的引物含有 10-20bp 的序列,其被并入酶位点的任一侧。与结合至人 IgG1 恒定区域的普通反向引物 huHeClonR(参见表 2) 结合使用,第一轮 PCR 被设置成由 1 μ l 的模板质粒 pOrigHIB、2 μ l 的 dNTPS (2.5mM)、5 μ l 的 10 $\times$ 的 Taq 聚合酶缓冲液、1 μ l 的正向和反向引物 (25pmol)、用无菌蒸馏水配成的终体积为 50 μ l 的 5 个单位的 Taq 聚合酶 (New England Biolabs) 组成。反应经历了在 95 $^{\circ}$ C 下 5 分钟的最初变性,接着是在 95 $^{\circ}$ C 下 30s 的 35 个循环,在 55 $^{\circ}$ C (退火) 下 1 分钟,和在 72 $^{\circ}$ C (延伸) 下 1 分钟。最后一个循环包含使用 Techne PHC-1 可编程循环反应器的 10 分钟的延伸。相似地,对于轻可变区域,寡核苷酸 L1、L2 和 L3 被设计为替换三个 CDR 中的每一个 (参见表 2)。第一轮 PCR 按照上述被设置,但含有结合至人 κ 链的恒定区域以及模板 pOrigLIB 的反向引物 huLiClonR(参见表 2)。

[0269] 表 1. CDR 替换酶和表位寡核苷酸序列的列表

[0270]	<u>CDR</u>	<u>RE 位点</u>	<u>表位寡核苷酸</u>
[0271]			5' NNNNNNTGGGTTCG3'
[0272]	H1	Fsp I	
[0273]			3' NNNNNNACCCAAGC5'
[0274]			5' TNNNNNNCGATTCA3'
[0275]	H2	Msc I	
[0276]			3' ANNNNNNGCTAAGT5'
[0277]			5' GANNNNNNNTG3'
[0278]	H3	Srf I	
[0279]			3' CTNNNNNNAC5'
[0280]			5' CTCTTGCNNNNNNNTGGT3'
[0281]	L1	Eco RV	
[0282]			3' GAGAACGNNNNNNACCA5'
[0283]			5' CTACNNNNNNAG3'
[0284]	L2	Ssp I	
[0285]			3' GATGNNNNNNNTC5'

[0286] 5' TATTACTGCNNNNNTTCGGTGGAGG3'

[0287] L3 Hpa I

[0288] ' ATAATGACGNNNNNAAGCCACCTCC5'

[0289] N 代表表位 DNA 序列

[0290] 余下的字母代表需要被并入的骨架核苷酸

[0291] 1 μ l 的所得 PCR 产物然后被作为反向引物与 CMV 正向引物共同用于之后的 PCR，如上述所设置。450bp 的扩增的 DNA 片段被直接克隆进 TATOPO 载体 pCR2.1 (Invitrogen)，而且被测序以确认 V_H 和 V_L 区域扩增的克隆缺乏 CDR 和限制性位点的替换。

[0292] 在可变重和轻区域中的 CDR 被它们相应的酶位点 H1、H2、H3、L1、L2 和 L3 单独地、组合地和一起替换（图 6 和 7）。然后使用 HindIII/AfeI 和 BamHI/BsiWI 直接替换亲本的野生型去免疫的 SC100 V_H 和 V_L 区域而将不同版本插入 pOrig HIB 和 pOrig LIB。这允许含有单个或多个表位的分子的生成（来自相同或不同抗原）。

[0293] 表 2——引物

[0294]

寡核苷酸	序列
H1	FspI 5'-CCT GAG AAT GTC CTG CTG CGC AGG CTC CGG GGA AG-
H2	MscI 5'-CAT TGG TAG TGG TGG CCA TTT CCA GAG AC-3'
H3	SrfI 5'-CCG TGT ATT ACT GTG CCC GGG CCA AGG AAC CAC GGT C-3'
L1	EcoRV 5'-GGA GCC AGC CTC GAT ATC TGC AGA AAC CAG GC-3'
L2	SspI 5'-CCA CAG CTC CTA ATA TTC AGT GGC AGT GGA TC-3'
L3	HpaI 5'-GCT GAG GAT ACC GGA GTT AAC CAA GGT GGA AAT C-3'
huHeClonR	5'-CGC CTG AGT TCC ACG ACA CC-3'
huLiClonR	5'-CAG GCA CAC AAC AGA GGC-3'
CMV 正向	5'-GGC GTG GAT AGC GGT TTG AC-3'
OrigstophuHeCH 1 正向	5'-CCA AGG TGG ACA AGA AAG TTT GAC CCA AAT CTT GTG ACA
OrigstophuHeCH 1 反向	5'-GAG TTT TGT CAC AAG ATT TGG GTC AAA CTT TCT TGT CCA CCT TGG-3'
无正向前导序列的 pOrig 轻链	5'-AGG ATC CAC CAT GGA TGT GTT GAT GAC CC-3'
无正向前导序列的	5'-AAA GCT TAT GCA GGT GCA GCT GGT G-3'

[0295]

pOrig 重链	
huig3 反向 2	5' -ATC GAT ATC ATT TAC CCG GAG ACA GG-3'
IgG3hu 正向 2	5' -ACT GTC TCC AGC GCT TCC ACC AAG-3'
IgG2 正向	5' -AGT CAC CGT TTC CAG CGC TTC CAC-3'
IgG2 反向	5' -AGT GGA TAT CAT TTA CCC GGA GAC AGG-3'
HIBF	5' -AAC AGT CTG AGG GCT GAG GA-3'
huig1PVA 反向	5' -A GAC TGA CGG TCC CCC CGC GAC TGG AGG TGC TGG-3'
Huig2ELLG 反向	5' -A GAC TGA CGG TCC TCC TAA CAG TTC TGG TGC TGG-3'
SV40premFOR	5' -A GCT AGC ATC AGC ACG TGT TGA CAA TTA ATC ATC-3'
SV40premREV	5' -AAC GAT TCC GAA GCC CAA CCT TTC ATA G-3'
migG2aC1AfeIF2	5' -TTT ACA GCG CTA AAA CAA CAG CCC CAT CGG TC-3'
migG2aXbaRA	5' -TCT AGA TCA TTT ACC CGG AGT CCG GGA GAA GCT C-3'
MolC1BsiF1	5' -TTT CGT ACG GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC-3'
MolCXhoR1	5' -TTT CTC GAG TCA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GC-3'
MoIg2BamHI 正向	5' -CC TTG ACC TGG AAC TCT GGT TCC CTG TCC AGT GGT G-3'
MoigG2BamHI 反向	5' -C ACC ACT GGA CAG GGA ACC AGA GTT CCA GGT CAA GG-3'
MoigG2Xho1 正向	5' -GC AGC TCA GTG ACT GTA ACT TCG AGC ACC TGG CCC AGC-3'
MoigG2Xho1 反向	5' -GCT GGG CCA GGT GCT CGA AGT TAC AGT CAC TGA GCT GC-3'
wtκ varL1 正向	5' -CTCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC CTG GTA CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA GAA TGG T-3'
wtκ varL1 反向	5' -A CCA TTC TAA ATA GGT GTT TCC ATT ACT ATG TAC CAG GCT CTG ACT AGA TCT GCA AGA G-3'
鼠 TRP2 正向	5' -TTT CTA AGC TTA TGG GCC TTG TGG GAT GGG GGC TTC-3'
鼠 TRP2 反向	5' -TTT CTG ATA TCT CAG GCT TCC TCC GTG TAT CTC TTG C-3'
GP100 正向	5' -TTT CTG ATA TCA TGG GTG TCC AGA GAA GGA GCT TC-3'
GP100 反向	5' -TTT CTC TCG AGT CAG ACC TGC TGT CCA CTG AGG AGC-3'

[0296] 抗原表位向单链载体的 CDR 位点中的插入

[0297] 若干 CD8 CTL 和 CD4 辅助表位被列于表 3 中,虽然任何表位可被容易地插入单链载体中任何位点。例如,TRP2 表位向 pOrigHIB 载体的 H2 位点的插入按照如下实现。

[0298] 互补的寡核苷酸被设计为编码在翻译时表达表位的核苷酸序列。编码表位的 DNA 序列两侧有对应的 CDR 核苷酸以保证在翻译时氨基酸被保持而且所述序列被符合读框地保留(参见表 1)。引物被送去合成(MWG)而且 5' 端被磷酸化。

[0299] S V Y D F F V W L

[0300] 5' - 磷酸化的 -T AGT GTT TAT GAT TTT TTT GTG TGG CTC CGA TTC A-3'

[0301] 3' -A TCA CAA ATA CTA AAA AAA CAC ACC GAG GCT AAG T-磷酸化的 -5'

[0302] 互补的寡核苷酸在无菌的双蒸馏水中被再悬浮至终浓度 1mg/ml,并用 TE 缓冲液将 10 μl 的每种引物配制成终体积 50 μl 而设置反应以共同退火。反应被循环在 95℃ 下 5 分钟(0.1℃/秒),在 72℃ 下 20 分钟 0.1℃/秒,在 55℃ 下 20 分钟,然后被保持在 4℃。

[0303] 为了插入 H2 位点,通过设置 MscI 限制性消化(取决于将被用于表位插入的 CDR)将载体 pOrigHIB H2 和/或 pOrigHIB H1H2 直线化,并在 37℃ 孵育过夜。所述消化物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳,而且被切的载体用凝胶提取来纯化。为了避免直线化的载体的自体连接,来自载体 5' 端的磷酸基团通过处理和 37℃ 孵育过夜而被除去,所述孵育是将小牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)5 个单位,10 μl 的 10×NEB 缓冲液 3,用无菌蒸馏水配制成终体积 100 μl。去磷酸化的载体被纯化,而且用不掺杂的、1/100 和 1/200 稀释的退火的寡核苷酸建立的连接作用使用标准技术将其直接克隆进 H2 位点。使用通用的 CMV 正向引物通过在单个载体中测序而确认表位的插入。

[0304] 表 3 CTL 和辅助表位

[0305]

蛋白质	坐标	序列	HLA 限制
-----	----	----	--------

TRP2	180-188	SVYDFFVWL agtgtttatgattttttgtgtggctc	A2, Kb
GP100	209-217	ITDQVPFSV accattactgaccaggtgccttttccgtg	A2
GP100 (210M)	209-217 (M)	IMDQVPFSV accattatggaccaggtgccttttccgtg	A2
GP100 (F7L)	209-217	ITDQVPLSV accattactgaccaggtgccttttccgtg	A2
GP100	44-59	WNRQLYPEWTEAQRDL tggaaacaggcagctgtatccagagtggaacagaagcccagagacttgac	DR0401
HEPBSAG	28-39	IPQSLDSWWTSL ataccgcagagcttagactcgttggtggactttctc	Kd(CTL)
HepB 核蛋白	128-140	TPPAYRPPNAPIL actcctccagcttatagaccaccaaatgcccctatccta	I-Ab(辅 助)
MAGE3	271-279	FLWGPRLV ttcctgtgggtccaaggccctcggt	A2
Tie2(Z83)	124-132	FLPATLMT ttcctaccagctactttaactatgact	A2

[0306]

Tie2(Z84)	124-132	FLPATLMTV ttcctaccagctactttaactatggtt	A2
Tie2(Z9)	431-439	GMVEKPFNI gggatgggtggaaagcccttcaacatt	A2
Tie2(mZ9)	431-439	GMVEKPFNV gggatgggtggaaagcccttcaacgtt	A2
FLUHA	111-120	FERFEIFPKE tttgaaaggttttgatattccccaaggaa	I-Ad(辅 助)
卵白蛋白	258-265	SIINFEKL agtataatcaactttgaaaaactg	Kb
磷酸丙糖异构酶(野生型)	23-37	GELIGTLNAKVPAD ggggagctcatcgccattctgaacgcggccaaggtgccggccgac	DR0101
磷酸丙糖异构酶(mI)	23-37	GELIGILNAKVPAD ggggagctcatcgccactctgaacgcggccaaggtgccggccgac	DR0101
VEGFR2	773-781	VIAMFFWLL gtgattgccatgttcttctggctactt	A2
mVEGFR2	773-781	VLAMFFWLL gtgcttgccatggttcttctggctactt	A2

[0307] 向双表达载体 pDCOrig 中的转移

[0308] 一旦所有表位已经被并入单个载体中的 V_H 和 V_L 位点,使用与其相应的人恒定区域符合读框的 HindIII/AfeI 和 BamHI/BsiWI 将它们转移到双表达载体 pDCOrig 中。为了生成免疫体TM 双表达载体 pDCOrig,使用挨着 CMV 启动子的平端限制性内切酶 NruI 将 pOrigHIB 直线化。用平端 NruI 和 HpaI 内切酶将 pOrigLIB 消化以切除整个轻链表达盒,其中所述轻链表达盒由 CMV 启动子、去免疫的人 κ 链和 BGH 多聚腺苷酸信号组成。在直线化的载体 pOrigHIB 和轻链表达盒的凝胶电泳、分离以及凝胶提取之后,所述载体被去磷酸化而且轻链表达盒被连接以形成构建体 pDCOrig(图 8)。pDCOrig 中轻链盒的方向通过限制性分析被确认。

[0309] pDCOrig 含有在相同构建体中被合并的重和轻链基因编码序列二者,其消除内含子序列和两种载体系统。表达由高水平的 CMV 立即早期启动子和其他 DNA 控制元件例如牛生长激素多腺苷酸化信号驱使。还包括选择标志物博来霉素以将表达和生产效率最大化。该载体的精心设计在可变和恒定区域接合处保持了独特的限制性酶位点,并提供快速和简单的方法以产生可变区域的不同组合(表位插入,参见图 8)。表 4 列出所生成的一些 pDCOrig IB 构建体。

[0310] 表 4. pDCOrig 构建体

[0311]

	H1	H2	H3	L1	L3
DCIB15	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB17	Gp100 210M TIMDQVPFSV			HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB18		TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB21		HepB S Ag IPQSLDSWWTSL		Flu HA FERFEIFPKE	
DCIB24		卵白蛋白 SIINFEKL		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB25	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL			HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL
DCIB26	Tie-2 Z84 FLPATLMTV			HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB30	Gp100 F7L TITDQVPLSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	

DCIB31			TRP2 SVYDFFVWL		
DCIB32			TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL
DCIB33huigG2	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB35	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		G p 1 0 0 WNRQLYPEWTEAQRDL	
DCIB36					TRP2 SVYDFFVWL
DCIB37	Gp100 F7L TITDQVPLSV			HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB40	Gp100 F7I TITDQVPISV			HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB41	Gp100 野生型 TITDQVPFSV			HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB42	Gp100 F7Y TITDQVPYSV			HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB43	Gp100 V5L TITDQLPFSV			HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB48		TRP2 SVYDFFVWL	G p 1 0 0 WNRQLYPEWTEAQRDL		
DCIB49			HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL		
DCIB50	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL			Gp100 WNRQLYPEW TEAQRDL
DCIB52		TRP2 SVYDFFVWL	HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL		
DCIB53MoigG2a	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB54	Gp100 GTGRAMLGTHM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	G p 1 0 0 WNRQLYPEWTEAQRDL		
DCIB64MoigG2a	Gp100 GTGRAMLGTHM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	G p 1 0 0 WNRQLYPEWTEAQRDL		
DCIB65huigG3	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB66huigG1+G2 基序	Gp100 210MTIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB67huigG2+G1 基序	Gp100 210MTIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB68	Gp100 GTGRAMLGTHM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	G p 1 0 0 WNRQLYPEWTEAQRDL	G p 1 0 0 WNRQLYPEWTEAQRDL	Gp100 GTGRAMLGTHM EVTVYH
DCIB69MoigG2a	Gp100 GTGRAMLGTHM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	G p 1 0 0 WNRQLYPEWTEAQRDL	G p 1 0 0 WNRQLYPEWTEAQRDL	Gp100 GTGRAMLGTHM EVTVYH
DCIB71	Tie-2 Z12 ILINSLPLV			HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB72		Tie-2 Z12 ILINSLPLV		HepB 核 蛋 白 TPPAYRPPNAPIL	

[0312] pDcOrig IB15 CH1 终止的生成

[0313] 使用 Quik 变化位点定向诱变试剂盒 (Stratagene) 和互补的寡核苷酸 origstopHuHeCH1 正向和 OrigstopHuHeCH1 反向引物 (参见表 2) 按照制造商的指示将终止密码子并入构建体 pDCOrig IB15 中的人 IgG1 恒定区域的 CH1 结构域之后。通过 DNA 测序确认终止密码子的并入 (图 9)。

[0314] 前导序列从 pDCOrig IB15 中的去除

[0315] 为了从载体 pDCOrig IB15 的重和轻链除去前导序列, 设置了 PCR, 其使用 pDCOrig IB15 模板以及无前导序列的 pOrig 轻链和无前导序列的 pOrig 重链正向引物分别与反向引物 huHeClonR 和 hiLiClonR 的结合 (表 2)。扩增的片段是被连接至载体 pCR2.1 (Invitrogen) 的 TA TOPO, 而且通过测序来确认克隆。缺乏前导序列的 IB15 V_H 和 V_L 区域二者分别通过使用 HindIII/AfeI 和 BamHI/BsiWI 位点被克隆回 pDCOrig IB15。V_H

和 V_L 区域的 DNA 序列和翻译分别被显示在图 10 和 11 中。

[0316] 免疫体TM双表达载体 pDCOrig 的人 IgG2 和 IgG3 同种型的构建

[0317] 人 IgG3 恒定区域通过 PCR 被扩增,其使用分别含有 AfeI 和 EcoRV 并带有模板 pOTB7 huigG3 的 huigG3 正向和反向引物(表 2)(图像克隆 4566267 MGC 45809)。相似地,人 IgG2 恒定区域被扩增,其使用带有 pTOB7 huigG2 模板的 igG2 正向和 igG2 反向引物(表 2)(图像克隆 6281452MGC 71314)。

[0318] 两种片段都是被连接到 pCR2.1 的 TOP0 而且被确认序列(图 12 和 13)。构建体 pDCOrigIB15 中的 huigG1 恒定区域被有效地替换成 huigG2 和 huigG3 二者以产生 pDCOrigIB15 huigG2 和 pDCOrigIB15huigG3(图 14),其中 huigG2 和 huigG3 使用 AfeI 和 SapI 位点与重可变区域符合读框地克隆。两种载体都在可变/恒定区域接合处保持相同的独特限制性位点。这允许在所有的人同种型单和双链免疫载体之间容易地交换可变区域。

[0319] 人 IgG1 Fc γ 和人 IgG2 受体结合结构域的突变

[0320] 为了用 huigG2 的 P233 V234A235 取代 CH2 结构域中 huigG1 结合基序的氨基酸 E233 L234 L235,使用 PCR 重新扩增含有所述突变的短片段。含有所述取代和组成的限制性位点 AhdI 的反向引物 huigG1 PVA 反向与正向引物 HIBF(表 2)和模板 pDCOrig IB15 一起使用。所得片段被连接至载体 pCR2.1(Invitrogen)。在序列确认后,含有所述突变的部分通过向质粒 pDCOrig IB15 huigG1 的单切割 AgeI/AhdI 位点插入而有效地替换野生型序列(图 15)。

[0321] 构建体 pDCOrig IB15 huigG2 的 huigG2 恒定结构域中的氨基酸 P233V234 A235 也被 huigG1 结合基序 ELLG 取代。如前所述,含有所述取代和组成的限制性位点 AhdI 的反向引物 huigG2ELLG 反向(表 2)与正向引物 HIBF 和模板 pDCOrig IB15 人 igG2 一起使用。所述片段是被连接到载体 pCR2.1 的 TATOP0。在序列确认后,含有 huigG1 结合基序的部分使用质粒 pDCOrig IB15 huigG2 的 AgeI/AhdI 位点再次替换野生型序列(图 16)。

[0322] pDCOrig 鼠 IgG2a 质粒 DCIB53 和 DCIB63 的生成

[0323] 为了构建鼠 igG2a 版本的双表达载体 pDCOrig,从分离自杂交瘤细胞系 337 的总 RNA 合成 cDNA。为了扩增鼠 igG2a 恒定区域,含有限制性位点 AfeI 的正向引物 migG2aC1AfeF2 与在终止密码子之后包含 XbaI 位点的反向引物 migG2aXbaRA 共同使用。PCR 片段是被连接到载体 pCR2.1 的 TOP0。在序列确认后,鼠 igG2a 恒定区域被切除并与鼠重可变区域符合读框地被克隆进载体 pOrigHIB 的 AfeI/XbaI 位点以有效地替换人 igG1。通过使用 Quik 变化位点定向诱变试剂盒(Stratagene)以及分别地互补引物 MoigG2BamHI 正向和反向、MoigG2XhoI 正向和反向的位点定向诱变,BamHI 和 XhoI 位点被依次除去而在翻译时不改变来自鼠 igG2a 恒定区域的氨基酸序列。这生成单链免疫载体 pMoOrigHIB(图 17A)。用位于 SV40 启动子的 AfeI 和单切割 AvrII 将含有 MoigG2a 恒定区域的 pMoOrigHIB 的一部分从单个构建体转移到与鼠重可变区域符合读框的双表达载体 pDCOrig IB15 中以生成仍然含有人 κ 区域的中间载体 pDCOrigIB15MoigG2a hu κ 。

[0324] 为了扩增鼠 κ 区域,cDNA 与在终止密码子之后含有 BsiWI 位点的引物 MoLC1BsiF1 与包含 XhoI 位点的引物 MoLCXhoI 一起用作模板。如前所述,被扩增的片段是被克隆到载体 pCR2.1 的 TOP0。使用 BsiWI/XhoI 鼠 κ 区域被切除并连接到免疫载体

pOrigLIB L1 和 pOrigLIB hepB 辅助 /L1 以替换人 κ 恒定区域生成中间载体 pMoLIBL1Bsi 和 pMoLIB HepB 辅助 /L1 Bsi。免疫体系统包括使用在可变和恒定区域接合处的独特限制性位点的可变区域的转移,同时鼠重可变和 moigG2a 恒定区域之间的接合处可容纳 AfeI 位点(存在于所有的人免疫体载体中)而不改变翻译时的氨基酸序列,在鼠可变和 κ 之间的区域是有问题的。在分析此接合处的序列时,不可包括不改变氨基酸序列的独特的限制性位点。在接合处的 BsiWI 位点被移除以恢复野生型序列。这使用重叠 PCR 通过扩增完整的鼠全长链来实现。使用在接合处和两侧区域含有野生型序列并有效地移除 BsiWI 的正向引物 Mo κ SDM 正向来设置第一个 PCR,而 BGH 反向引物和中间轻链载体 pMoLIBL1Bsi 和 pMoLIB hepB 辅助 /L1 Bsi 被分别作为模板。来自第一轮 PCR 的大约 430bp 的扩增片段作为反向引物与含有 BamHI 位点的正向引物 ImmunoLikozFor 一起使用。扩增的全长鼠 κ 链是被连接到 pCR2.1 的 TOP0 而且序列被确认。在 pCR2.1 中的 L1 位点含有 hepB 辅助的全长鼠 κ 链被切除并克隆进中间双表达载体 pDCOrigIB15MoigG2a hu κ 的 BamHI/XhoI 位点以替换人 κ 链而生成鼠双表达载体 pDCOrigIBGP100210m/H1TRP2/H2HepB 辅助 /L1moIgG2a(DCIB53, 图 17B 和 54)。

[0325] 相似地,含有 L1 位点的全长鼠 κ 链被切除并克隆进中间双表达载体 pDCOrigIB15MoigG2a hu κ 的 BamHI/XhoI 位点以替换人 κ 链而生成带有空的 L1 位点的中间鼠双表达载体 pDCOrigIB15moIgG2a。为了生成带有野生型轻可变区域的构建体,互补的 5' 磷酸化引物 wt κ varL1 正向和反向(表 2)如上所述被退火并在用 EcoRV 直线化后插入 L1 位点。最后,使用 HindIII/AfeI 将来自含有 GP100DR7/H1 TRP2/H2 和 GP100DR4/H3 的 DCIB54 的重可变区域转移以生成 pDCOrig GP100DR7/H1 TRP2/H2GP100DR4/H3 moigG2a 野生型 κ (DCIB68, 图 17C 和 60)。

[0326] 为了调节性 DNA 疫苗的需要而从免疫体双表达载体 pDCOrig 将真核 SV40 启动子移除

[0327] 使用包含 NheI 位点的正向引物 SV40PremFOR 和带有模板 pOrigHIB 的 SV40PremREV 反向引物(表 2)将 EM7 细菌启动子和博莱霉素基因扩增。所得的 511bp 的 PCR 片段是连接的 pCR2.1 TOP0 并通过测序而确认。使用来自 pCR2.1 的 NheI 和 FseI 将 EM7 启动子和一部分博莱霉素基因切除并直接克隆进 pOrigHIB H1 而有效地移除 SV40 启动子。NheI 位点残基位于 SV40 启动子之前,而 FseI 识别序列是载体的博莱霉素基因中的单切割。在序列确认后,从单个载体将更大的部分转移到编码 huigG1 尾端、BGH 多聚腺苷酸、EM7 和部分博莱霉素基因的 pDCOrig IB68 载体以用 SapI 和 FseI 消化而有效地将 SV40 启动子从双表达载体移除。

[0328] 对 FDA 法规遵从的一种 pVax1(Invitrogen) 的 pDCOrig 骨架的改变

[0329] 使用 HindIII 和 XbaI 从构建体 DCIB54 将免疫体全长人 igG1 重链切除并插入载体 pVax1 的 MCS 中的这些位点(图 18A)。为了生成双链表达载体的 pVax 版本,使用临近 CMV 启动子的平端限制性内切酶 NruI 将 pVaxIB54HIB 直线化。使用平端 NruI 和 HpaI 内切酶将 pOrigLIB(图 18B)消化以切除整个轻链表达盒,其中所述轻链表达盒由 CMV 启动子、免疫体人 κ 链和 BGH 多聚腺苷酸信号组成。在直线化的载体 pVaxIB54HIB 和轻链表达盒的凝胶电泳、分离以及凝胶提取之后,所述载体被去磷酸化而且轻链表达盒被连接以形成构建体 pVaxDCIB54(图 18C)。pVaxDCIB54 中轻链盒的方向通过限制性分析被确认。

pVaxDCIB54 在可变 / 恒定区域接合处保持相同的独特限制性位点,以允许在所有的人同种型单和双链免疫载体之间容易地交换可变区域。例如,为了生成 pVaxDCIB68(图 60),使用 BamHI/BsiWI 将含有 Gp100DR4/L1 和 Gp100DR7/L3 的鼠轻可变区域从 DCIB68 切除并克隆进 pVaxDCIB54 以有效地替换轻野生型可变区域。

[0330] pOrig 鼠 TRP2 和 pCDNA3 GP100 的生成

[0331] 为了构建 pOrig 鼠 TRP2,由从细胞系 B16F10 分离的 5 μ g 总 RNA 而合成的 cDNA 被用作模板以使用分别包含 HindIII 或 EcoRV 位点的鼠 TRP2 正向和反向引物(表 2)来扩增全长的鼠酪氨酸酶相关蛋白 2(TRP2)。全长 TRP2 被连接至载体 pOrigHIB 的 HindIII/EcoRV 多个克隆位点。还使用被设计为分别含有 EcoRV 和 XhoI 位点的鼠 GP100 正向和反向引物从 cDNA 扩增全长鼠 GP100(表 1)。PCR 产物被克隆进哺乳动物表达载体 pCDNA3(Invitrogen)的 EcoRV/XhoI 位点。通过限制性分析鉴定二种质粒并用 DNA 测序确认。

[0332] 夹心 Elisa

[0333] 使用 50 μ l 溶于 PBS 的 10 μ g/ml 的抗人 IgG、Fc 特异性抗体 (Sigma12136) 或抗人 κ 轻链抗体 (Dako A0191) 涂布 Falcon 96 孔柔性板并在 4°C 过夜。使用 Skan Washer 400 (Molecular Devices) 和 200 μ l/孔 PBS-吐温 20 (0.05%) 将板冲洗三次,并用 PBS 中的 1% 鱼皮明胶 (Sigma) (1% FSG/PBS) 封闭孔。在室温将板孵育 1 小时并用 1% 的 FSG/PBS 冲洗。将含有被表达的免疫体或纯化的免疫体蛋白的组织培养上清液 (50 μ l) 加入孔中,一式三份,并在室温将板孵育 1 小时。用 1% 的 FSG/PBS 将板冲洗,并检测结合的免疫体,其中所述检测是通过加入 50 μ l/孔过氧化物酶耦联的抗人 IgG、Fc 特异性抗体 (Sigma A0170) 或抗人 κ 轻链抗体 (SigmaA7164),在 1% 的 FSG/PBS 中稀释 1/2000,并在室温孵育 1 小时。用 1% 的 FSG/PBS 将板冲洗,并通过加入 50 μ l/孔的 TMB 底物 (R&D Systems) 而显影。在 VERSAmax 微孔板读数仪 (Molecular Devices) 上测量 650nm 的吸光度。

[0334] 小鼠和免疫接种

[0335] 在持有内政部许可的项目许可证下进行动物研究。6 至 12 周大的雄性和雌性 C57BI/6 (Harlan) 或 HLA-A2 转基因 (HHDI) 小鼠 (巴斯德研究所,巴黎) 被使用。使用不完全弗氏佐剂将合成肽 (由英国诺丁汉大学生物医学科学系的 John Keyte 制造) 乳化并通过皮下途径注射。每只小鼠接受 10 μ g 肽 / 免疫接种。使用制造商的指示将 DNA 涂布于 1.0 μ m 金颗粒 (BioRad, Hemel Hempstead, 英国) 并通过 Helios 基因枪 (BioRad) 施用于皮内。每只小鼠接受 1 μ g DNA / 免疫接种。裸露的 DNA 溶液也通过皮内或肌肉内施用 (10 μ g / 免疫接种),并与注射之后立即进行的短的电脉冲结合。在第 0、1 和 2 周将小鼠免疫,并在第 3 周移除脾脏。通过在免疫接种之前四天经腹膜内注射 400 μ g 抗 CD25 抗体 (PC61) 或在第二次免疫接种的同时经腹膜内注射 200 μ g 抗 CTLA-4 抗体来使体内 T 细胞亚群耗尽。

[0336] 体外的再刺激

[0337] 最后一次免疫接种之后五天,在 37°C 将脾细胞 (5×10^6 /ml) 与同基因的被辐射的 (20Gy)、被肽脉冲的脂多糖 (LPS) 胚细胞 (0.5 至 1×10^6 个细胞 /ml) 共同培养在 24 孔板中的含有 10% FBS、2mM 谷氨酰胺、20mMHEPES 缓冲液、100 单位 /ml 青霉素、100 μ g/ml⁻¹ 链霉素和 10^{-5} M 2- 巯基乙醇的 2ml RPMI-1644 中。通过在 37°C 用 25 μ g/ml LPS (Sigma) 和 7 μ g/ml 硫酸葡聚糖 (Pharmacia, Milton Keynes, 英国) 将脾细胞 (1.5×10^6 个细胞 /ml) 活化 3 天而获得 LPS 胚细胞。使用之前,使用 100 μ g/ml 合成肽培养 2×10^7 个 LPS 胚细胞

1 个小时。在第 6 天用 ^{51}Cr 释放测定来测定培养物的细胞毒素活性。

[0338] ^{51}Cr 释放测定

[0339] 在含有或不含有 $100\ \mu\text{g/ml}$ 肽的情况下使用 1.85MBq 铬酸 (^{51}Cr) 钠 (Amersham, Essex, 英国) 将靶细胞标记 1 小时。孵育后在 RPMI 中将它们冲洗 3 次并用 $100\ \mu\text{g/ml}$ 肽再孵育 1 小时。在 V 形底的 96 孔板安放 5×10^3 个靶 / 孔, 并在 $200\ \mu\text{l}$ 的终体积中与不同密度的效应细胞共同孵育。在 37°C 下 4 小时后, 从每孔取出 $50\ \mu\text{l}$ 上清液并转移到固态闪烁定量盘 (Lumaplate) (Packard, Rigaweg, 荷兰)。在 Topcount 微孔板闪烁计数器 (Packard) 上对板读数。使用下面的式计算百分比特异性溶解:

[0340] 特异性溶解 = $100 \times [(\text{实验释放} - \text{自发释放}) / (\text{最大释放} - \text{自发释放})]$

[0341] 先体外后体内的酶联免疫斑点测定

[0342] 根据制造商的指示 (Mabtech, 瑞典) 使用鼠 $\text{IFN}\ \gamma$ 捕捉和检测试剂进行酶联免疫斑点测定。简言之, 将抗 $\text{IFN}\ \gamma$ 抗体涂布于 96 孔 Immobiline-P 板的孔中, 并将 5×10^5 个脾细胞种在重复的孔中。合成肽 (以若干种浓度) 或 5×10^4 个靶黑素瘤细胞被添加到这些孔中并在 37°C 下孵育 40 小时。孵育后, 使用生物素酰化的抗 $\text{IFN}\ \gamma$ 抗体来检测被捕捉的 $\text{IFN}\ \gamma$, 并用链霉抗生素蛋白碱性磷酸酶和显色底物使之显影。使用自动化的板读数器 (CTL) 分析斑点并计数。使用效应功能对肽浓度的图表, 将功能性亲和力按照介导 50% 最大效应功能的浓度而计算。根据制造商的指示使用 CD8 Dynabead (Dyna1) 把来自脾细胞群体的 CD8T 细胞耗尽, 然后将其加入先体外后体内的酶联免疫斑点测定。

[0343] 肿瘤研究

[0344] 随机选择 C57BI/6 小鼠组成治疗组并在五周中隔周进行免疫。在第三和第四次免疫接种之间, 通过静脉内注射向尾静脉注射 1×10^4 个 B16F10 $\text{IFN}\ \alpha$ 黑素瘤细胞来攻击它们。当被静脉内注射时, B16F10 细胞迁移到肺以形成转移瘤。对小鼠的肿瘤生长和痛苦表征进行监测。在肿瘤攻击之后第 49 天, 将小鼠安乐死并分析肺以确定转移瘤的存在。在先体外后体内的酶联免疫斑点测定中分析脾脏以确定表位和肿瘤特异性免疫应答的存在。

[0345] 在三周中隔周对 HHDII 小鼠进行免疫, 并在最后一次免疫之后 7 天在右侧用 2×10^4 个 B16F10 HHD 黑素瘤细胞通过皮下进行攻击。以 3-4 天的间隔监测肿瘤生长, 并使用卡钳测量肿瘤尺寸。

[0346] 实施例 1- 免疫体构建体产生低水平的完整抗体

[0347] 使用含有分别在 CDR H1 和 CDR H2 中的 gp100 表位 IMDQVPFSV 和 TRP2 表位 SVYDFVWL 以及在 CDR L1 中的 HepB CD4 表位 TPPAYRPPNAPIL 的免疫体构建体 (DCIB15 ; 图 19) 制作稳定的 CHO-S 细胞转染子。

[0348] 使用夹心 elisa 分析来自这些转染子的上清液中免疫体蛋白的表达。将抗人 IgG Fc 特异性抗体涂布于板上, 并加入上清液。使用抗人 Fc 特异性 HRP 抗体来识别重链而检测结合的免疫体。与对照相比, 在上清液中检测到的重链浓度为约 $1\ \mu\text{g/ml}$ (图 20a)。使用蛋白 A 亲和柱将免疫体从上清液中提纯并分析免疫体的存在。与对照相比, 免疫体的纯化产生远低于之前预期的量的蛋白 (图 20b)。鉴于可能要纯化如此低产量的完整蛋白, 使用夹心 ELISA 分析在被转染细胞的上清液中的免疫体构建体中重链和完整抗体二者的表达。还测试了含有在 CDR L1 中的 HepB CD4 表位和 CDRH2 中的 SIINFELK 表位 (DCIB24 ; 图 21), 或者分别在 CDR H1 和 CDR H2 中的 gp100 表位 IMDQVPFSV 和 TRP2 表位 SVYDFVWL 以及 CDR

L3 中的 HepB CD4 表位 TPPAYRPPNAPIL(DCIB25 ;图 22) 的构建体。将抗人 IgG Fc 特异性抗体涂布于板上,并加入上清液。使用抗人 Fc 特异性 HRP 抗体来识别重链或使用抗人 κ 链特异性 HRP 抗体来识别完整免疫体而检测结合的免疫体。免疫体转染子显示高水平的重链分泌但是很低水平的完整免疫体(图 20c 和 d)。

[0349] 该数据表明,将 CD8 和 CD4 T 细胞表位并入重和轻链可变区域破坏了免疫体的总体结构从而妨碍了完整抗体的形成。

[0350] 来自被转染的 CHO-S 细胞的上清液的另外的分析数据证明,只有含有被并入 CDRH3 或 CDRL3 的 CTL 表位的构建体作为完整抗体被分泌(图 20e)。与此相反,对 CDRH1 或 CDRH2 中任何表位的并入允许重的完整抗体少量分泌,即使不向轻链中并入任何东西它也分泌。将 CDRL1 中任何表位并入任一轻链导致轻链低水平的分泌,即使只有一种表位被并入重链的 CDRH3。

[0351] 实施例 2- 被并入免疫体骨架的 CTL 表位被加工并呈递以引起体内的免疫应答

[0352] 将之前发表的来自 TRP2 的 CTL 表位氨基酸 280-288(Bloom 等, The Journal of Experimental Medicine 1997 ;185 :453-9) 人工引入与 CDR L1 中的乙型肝炎通用的 CD4 表位并排的免疫体构建体的 CDR H2 区域(DCIB18 ;图 30)。通过基因枪用免疫体 DNA 经皮内对 C57BI/6 小鼠隔周地免疫三次。接下来通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定分析脾细胞的 TRP2 特异性应答。与对照相比,用免疫体 DNA 免疫的小鼠证明了大量的 TRP2 肽特异性应答,但是对 HepB CD4 肽具有特异性的应答的水平较低(图 31a)。还通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定中的肽滴定研究了 TRP2 特异性应答的亲和力。在五个不同实验中测试的超过十五只小鼠中,应答的亲和力在 10^{-9} M 至 10^{-11} M 肽的范围内。一个代表性的例子显示在图 31b 中。

[0353] 为了确认该 TRP2 特异性应答是通过 CD8T 细胞介导的,使用免疫体 DNA 对 C57BI/6 小鼠隔周地免疫三次。最后一次免疫接种之后六天,分离脾细胞并通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定在体外分析特异性应答。为了确定 TRP-2 特异性应答是否由 CD8T 细胞介导,在用酶联免疫斑点测定进行分析前将 CD8T 细胞耗尽。CD8T 细胞的耗尽导致 TRP2 特异性应答的消失;然而,CD8 耗尽没有影响 HepB CD4 肽应答,这表明它非常可能是由 CD4T 细胞介导的(图 31c)。

[0354] 为了确定由免疫体 DNA 免疫接种产生的应答是否能够杀死体外的靶细胞,使用 TRP2 肽脉冲的 LPS 胚细胞在体外刺激脾细胞 6 天,并在针对 B16F10 黑素瘤细胞的铬释放测定中分析。来自免疫体 DNA 免疫的小鼠的脾细胞证明了 B16F10 细胞和 B16F10 IFN α 细胞二者优良的裂解作用,其中所述 B16F10 细胞具有低水平的表面 I 类 MHC,而 B16F10 IFN α 细胞与不表达 H-2Kb 分子(B16F10 siKb)的 B16F10 系相比具有高表达的表面 I 类 MHC。针对 B16F10 siKb 细胞系的杀死的消除证明杀死是依赖于 CD8 的而且是通过 H-2Kb 被限制的(图 31d)。

[0355] 这些结果显示,被并入免疫体骨架 CDR H2 区域的 TRP2(SVYDFFVWL)CD8 表位被加工和呈递以引起由 I 类 MHC 介导的高频率应答。HepB CD4 表位也在 II 类 MHC 的背景下被加工和呈递以由 DNA 免疫接种引起良好的 CD4 介导的应答。

[0356] 使用相同的方法学,还从其他含有 TRP2 表位的构建体分析 TRP2 表位特异性应答。将 TRP2 表位并入重链中的 CDR 导致高频率肽特异性应答(图 31e)。与此相反,将 CTL 表位并入轻链导致 CTL 频率的显著降低(DCIB36)。TRP2 表位特异性应答的亲和力分析揭示,当

从重链中的表位生成时它们具有高亲和力,但在从轻链表达表位时这大大降低(图 31f)。当检查所有构建体时,高频率高亲和力辅助应答(图 31g)。表明,重链的分泌是刺激 CTL 应答而非辅助应答的优势。

[0357] 实施例 3- 免疫体 DNA 免疫接种优于肽免疫接种或全抗原免疫接种

[0358] 为了分析免疫体 DNA 免疫接种的效率,将其与不完全弗氏佐剂中的肽表位的皮下免疫接种或用表达 TRP2 抗原的 DNA 的免疫接种进行对比。

[0359] 用包括连接到 IFA 中通用的辅助表位的 TRP2 表位的 DNA 或肽使 C57BI/6 小鼠接受三次每周一次的免疫接种。在免疫体免疫的小鼠中生成的 TRP2 和辅助肽特异性应答在幅度上远远超过由肽免疫接种或全 TRP2 抗原免疫接种引起的特异性应答(图 32a)。这些肽特异性应答的进一步亲和力分析揭示,由免疫体 DNA 免疫的小鼠生成的应答具有比来自肽免疫的个体生成的应答强得多的亲和力(图 32b)。接下来,分析在 C57BI/6 小鼠中产生的应答以鉴定针对 B16F10 细胞系和作为阴性对照的 B16F10 siKb 细胞系的体外细胞毒性能力。图 32c 显示,免疫体 DNA 免疫的小鼠能够具有 H-2Kb 限制的体外抗肿瘤活性,而且肽免疫的小鼠和全抗原免疫的小鼠二者在杀死相同的黑素瘤细胞系方面是不成功的。

[0360] 还将免疫体免疫接种与 DC+ 肽的免疫接种进行比较。C57BI/6 小鼠接受三次每周一次的 DNA 或 DC+ 肽免疫接种。TRP2 肽特异性应答具有可比的频率,但免疫体免疫的小鼠与 DC+ 肽免疫的那些相比产生了较高的亲和力应答(图 32d)。当这些应答被分析以确定在体外杀死 B16F10 黑素瘤细胞的能力时,这也被证明(图 32e)。由免疫体免疫接种生成的应答在较低的效应对靶的比率下显示了比来自 DC+ 肽免疫的小鼠的应答更强地杀死 B16F10 黑素瘤。它们还显示了 B16F20 siKb 黑素瘤系的较高特异性溶解,其中所述 B16F20 siKb 黑素瘤系已降低 H-2Kb 的水平。

[0361] 将含有 H-2Kb 限制的卵白蛋白表位 SIINFEKL 和锚定物修饰的 HLA-A2 限制的 gp100 表位 IMDQVPFSV(210M) 的免疫体构建体与 C57BI/6 或 HHDII 小鼠中相应的表位肽免疫接种分别进行比较。小鼠接受三次每周一次的免疫接种,其使用 IFA 中的 DNA 或肽。在最后一次免疫接种之后的应答分析揭示,与肽免疫的小鼠相比,免疫体 DNA 免疫的小鼠生成较高频率的肽特异性应答(图 32f 和 g)。还通过肽滴定分析这些应答的亲和力。免疫体免疫接种引起比肽免疫接种显著较高的亲和力应答(图 32h 和 i)。

[0362] 由免疫体 DNA 疫苗生成的 TRP2 特异性应答的幅度远远大于由合成肽或全 TRP2 抗原所生成的特异性应答。然而,临床试验证据表明,肿瘤特异性 CD8T 细胞的高频率的存在不必然导致肿瘤退化,而且通常在疫苗试验中目标临床应答率是非常低的(Rosenberg 等, J Immunol 2005 ;175 :6169-76 ;Rosenberg 等, Nature Medicine 2004 ;10 :909-15)。现在正在变得清楚的是,除了频率之外的因素例如肿瘤特异性 T 细胞的功能性亲和力以及启动途径在将疫苗效力最大化时是主要的决定因素。若干研究组已经证明,高亲和力 CD8 T 细胞显示优秀的抗肿瘤活性(Alexander-Miller, Immunologic research, 2005 ;31 :13-24 ;Hodge 等, J Immunol 2005 ;174 :5994-6004 ;Valmori 等, J Immunol 2002 ;168 :4231-40 ;Zeh 等, J Immunol 1999 ;162 :989-94 ;Alexander-Miller 等, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1996 ;93 :4102-7)。在我们的研究中,对免疫体诱导的 TRP2 特异性应答的功能性亲和力的分析证明,与合成肽免疫接种相比,可生成高亲和力应答。此高亲和力应答还与在体外识别和杀死肿瘤细胞的

能力的提高相关。来自 APC 的信号或应答的启动途径对于高亲和力免疫应答的诱导也是至关重要的 (Oh 等, J Immunol 2003 ;170 :2523-30)。

[0363] 实施例 4- 多个表位可从 CDR H2 位点被加工

[0364] 为了证明多个表位可从 CDR H2 被加工和呈递以引起免疫应答,将来自卵白蛋白的 H-2Kb 限制的表位 SIINFEKL (DCIB24 ;图 21) 和 H-2Kd 限制的乙型肝炎表位 IPQSLDSWWTSL (DCIB21 ;图 33) 人工导入重可变区域中的 H2 位点。这些免疫体构建体还包含轻可变区域中 CDR L1 位点中的 I-Ab 限制的 (TPPAYRPPNAPIL) 表位、乙型肝炎 CD4 表位或 I-Ad 限制的流行性感凝血凝素 (FERFEIFPKE) 表位。

[0365] 用免疫体 DNA 通过基因枪对 C57Bl/6 或 Balb/c 小鼠进行三次隔周的皮内免疫。接下来通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定来分析脾细胞中表位特异性 CD8 和 CD4 应答的存在。

[0366] 被免疫的 C57Bl/6 小鼠证明了高频率 SIINFEKL 特异性应答但对辅助表位较低的特异性应答 (图 34a)。Balb/c 小鼠也产生了高频率乙型肝炎表位特异性 CD8 应答和对辅助表位相似水平的应答 (图 34b)。

[0367] 该数据表明,来自 CDR H2 位点的 CD8 表位的加工和呈递不受特异性表位序列或长度的限制。

[0368] 实施例 5- 多个 CTL 表位可从可变区域被加工

[0369] 为了证明表位可从可变区域而不只是 CDR 区域被加工和呈递,将表位并入 CDR H1 位点并除去部分骨架区域。

[0370] 示例性表位是修饰的 HLA-A2 限制的来自 gp100 的表位 IMDQVPFSV (DCIB17 ;图 35) 和来自 Tie-2 的表位 FLPATLTMV (DCIB26 ;图 36)。免疫体构建体还包含 CDR L1 位点中的乙型肝炎 CD4 表位。

[0371] 用免疫体 DNA 通过基因枪对 HLA-A2 转基因小鼠 (HHDII) 进行三次隔周的皮内免疫。接下来通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定来分析脾细胞中表位特异性 CD8 和 CD4 应答的存在。

[0372] HHDII 小鼠引起高频率的 gp100 210M 表位特异性应答和对 HepB CD4 表位的合理应答 (图 37a)。在用含有 Tie2 表位的构建体免疫的 HHDII 小鼠中的应答不具有同样高的频率,但产生了对 Tie2 表位和 HepB CD4 表位二者都具有特异性的大量应答 (图 37b)。

[0373] 该实施例中的数据表明,被插入可变区域中的表位可被加工和呈递以引起体内的免疫应答。还很明显的是,这不局限于一种表位序列。

[0374] 实施例 6- 多种 CTL 应答可从相同免疫体构建体中不同表位产生

[0375] 将前述 HLA-A2 限制的 gp100 表位 IMDQVPFSV 人工引入 CDR H1 位点,并与 TRP2 表位 SVYDFVWL 并排,其中所述 TRP2 表位也被相同构建体的 CDR H2 位点中的 HLA-A2 所限制。HepB CD4 表位存在于 CDRL1 位点中 (DCIB15 ;图 19)。

[0376] 用免疫体 DNA 通过基因枪对 HHDII 小鼠进行三次隔周的皮内免疫。接下来通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定来分析脾细胞中表位特异性 CD8 和 CD4 应答的存在。

[0377] 图 38a 显示,产生了对 gp100 和 TRP2 表位二者都具有特异性的应答,虽然 TRP2 特异性应答的频率较低。还产生了对 HepB CD4 表位的应答。还通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定中的肽滴定研究了 TRP2 特异性应答的亲和力。对 gp100 表位的应答的亲和力范围是从 10^{-10} M 至 10^{-11} M 的肽,而且对 TRP2 表位是从 10^{-9} M 至 10^{-10} M 的肽。图 38b 显示了代表性的例

子。为了确定所述应答是否能够在体外杀死靶细胞,用 TRP2 和 gp100 肽脉冲的 LPS 胚细胞在体外刺激脾细胞 6 天并在针对肽标记的 T2 细胞和 B16F10HHD 黑素瘤细胞的铬释放测定中进行分析。将 B16F10 HHD 黑素瘤系的特异性杀死与对照 B16F10 黑素瘤系进行对比。应答还证明了与对照相比肽标记的 T2 细胞的特异性溶解(图 38c)。

[0378] 将两个 CD8 表位合并为单个免疫体构建体看来似乎在表位之间导致了某种程度的免疫显性。所述免疫显性的表位是对 I 类 MHC 具有最强亲和性的表位。当用含有 gp100 和 TRP2 CD8 表位二者的构建体免疫的小鼠与用只含有 TRP2 CD8 表位的构建体免疫的小鼠相比较时,TRP2 应答的频率降低(图 38d)。

[0379] 该数据证明,表位特异性免疫应答可由对两种不同 CD8 表位具有特异性的相同 DNA 构建体生成。这些还能够具有体外的抗肿瘤活性。然而,存在某种程度的免疫显性,其支配对于亚显性表位的应答频率。

[0380] 使用含有 CDRH2 中的 TRP2 表位(DCIB18)或 CDRH2 中的 SIINFELK 表位(DCIB24)的分离的免疫体构建体进行相似的研究。使用单独的 DCIB18 或 DCIB24、结合在相同位点中的 DCIB18 和 DCIB24 或者在相同时间但不同位点中的 DCIB18 和 DCIB24 对小鼠进行免疫。进行三次隔周的免疫接种,其通过与电穿孔结合将 DNA 通过肌肉内注射进胫骨肌。所产生的免疫应答的分析显示,当用 DCIB18 或 DCIB24 单独对小鼠免疫时可引起高频率肽特异性应答(图 38e)。用这些构建体在相同位点对小鼠免疫导致 TRP2 肽特异性应答的显著丧失。这表明,SIINFELK 表位与 TRP2 表位相比是支配性的。如果用分离位点的构建体对小鼠免疫,TRP2 特异性应答可被恢复($p = 0.0026$)。此数据表明,免疫显性的确影响由 IB 免疫接种生成的免疫应答,但这能通过空间上分离的位点上的免疫接种来解决。

[0381] 实施例 7- 非锚定残基修饰能增强 T 细胞识别

[0382] 之前的例子显示,修饰的 gp100 表位 IMDQVPFSV 是免疫显性的,并且具有对 HLA-A2 的高亲和性(使用 SYFPEITHI 算法被预测并在 T2 稳定测定中被证明-表 5)。由于野生型 gp100 表位 ITDQVPFSV 不是免疫原性的,所以在非锚定残基进行修饰,其中所述非锚定残基将具有与野生型表位相似的 HLA-A2 结合亲和性,但也提高免疫原性。这些修饰的表位被人工引入免疫体构建体的 CDR H1 位点,并与野生型表位一起被测试(DCIB37、DCIB40、DCIB41、DCIB42、DCIB43;图 39-43)。

[0383] 用单独的免疫体重链 DNA 通过基因枪对 HHDII 小鼠进行三次隔周的皮内免疫。接下来通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定来分析脾细胞中表位特异性 CD8 应答的存在。维持对 HLA-A2 亲和性(表 5)的野生型 gp100 表位的两种修饰(F7L 和 F7I;DCIB37;图 39,DCIB40;图 40)证明了与野生型表位相比更优良的诱导表位特异性免疫应答的能力(图 44a)。

[0384] 表 5

[0385]

抗原	表位	T2 稳定测定 (m. f. i)	SYFPEITHI 分数
Gp100(210M)	IMDQVPFSV	23.1	22
Gp100(野生型)	ITDQVPFSV	18.5	18
Gp100(F7L)	ITDQVPFSV	18	19
Gp100(F7I)	ITDQVPFSV	Nd	18
TRP2	SVYDFVWL	19	21
对照		7.29	-

[0386] 实施例 8- 多种 CD4 辅助应答可被加工和呈递以引起体内的免疫应答

[0387] 为了检验 CD4 辅助表位是否可被加工和呈递以引起体内的免疫应答,将不同表位独立地人工导入免疫体构建体的 CDR L1 位点。这些包括了来自流行性感冒血凝素的 I-Ad 限制的表位 FERFEIFPKE(DCIB21;图 33)、来自 HBcAg 的 I-Ab 限制的表位 TPPAYRPPNAPIL(DCIB15;图 19)和来自 gp100 的 HLA-DR4 限制的表位 WNRQLYPEWTEAQRLD(DCIB35;图 45)。

[0388] 用免疫体 DNA 通过基因枪对 Balb/c、C57BI/6 或 HHDII 和 DR4 转基因小鼠进行三次隔周的皮内免疫。接下来通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定来分析脾细胞中表位特异性 CD4 应答的存在。图 46a、b 和 c 证明,所有三个 CD4 辅助表位可从 CDR L1 位点被加工和呈递以引起体内的表位特异性免疫应答。

[0389] 还测试了 gp100HLA-DR4 限制的表位从不同 CDR 的加工和呈递。使用将所述表位并入 CDRL1(DCIB35;图 45)、CDRH3(DCIB54;图 29)或 CDRL3(DCIB50;图 47)的构建体对 HLA-DR4 转基因小鼠进行三次隔周免疫。图 46d 显示,能从不同 CDR 有效地加工辅助表位以引起高频率辅助应答。

[0390] 实施例 9-CTL 应答部分地依赖于分泌的重链但辅助应答不需要分泌的轻链

[0391] 通常地,CD4T 细胞表位由外源地获得的蛋白加工而来,而 CD8T 细胞表位由内源地产生的蛋白而来。现在有证据表明,外源地获得的抗原的表位的交叉呈递引起 CD8T 细胞介导的应答。还提出,该启动途径在 CD8T 细胞介导的免疫应答的发展中是更有效的。最近,对于 CD4 介导的应答已经有了相似的发现。逐渐增加的证据表明,衍生自细胞内蛋白的 CD4T 细胞表位在 II 类 MHC 的情况下可被加工和呈递。

[0392] 为了确定是否需要分泌的免疫体来诱导 CD8 和 CD4 T 细胞应答,制备了在重链或轻链上不含前导序列的含有 CDR H1 位点中的 HLA-A2 限制的 gp100 表位 IMDQVPFSV 和 CDR L1 位点中的 I-Ab 限制的 HepB 辅助表位 TPPAYRPPNAPIL 的免疫体构建体(图 10 和 11)。

[0393] 用免疫体 DNA 通过基因枪对 HHDII 小鼠进行三次隔周的皮内免疫。接下来通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定来分析脾细胞中表位特异性 CD8 和 CD4 T 细胞应答的存在。当分析所述应答以鉴别 gp100 特异性 CD8 应答时,据观察,将前导序列从免疫体构建体的重链除去导致了表位特异性应答的减少,然而 CD4 应答未受影响(图 48a)。将前导序列从重链除去影响了被转染的 CHO-S 细胞对重链的分泌(图 48b)。将前导序列从轻链除去从而防止轻链的分泌,但看上去未影响表位特异性 CD8 或 CD4 应答(图 48c)。当重链上不存在前导序列时,CD8 应答显著减少,但 CD4 应答保持未受影响(图 48c 和 d)。

[0394] 该数据暗示,重链的分泌对于 CD8 T 细胞应答的有效诱导是重要的,这表明 CD8 表位正在经历交叉呈递。其次,它暗示,CD4 表位衍生自细胞内免疫体以引起免疫应答。

[0395] 实施例 10-不包括 Fc 的 CTL 应答的减少是由于缺乏蛋白分泌

[0396] 本实验检验 Fc 区域的存在是否对建立有效免疫应答有益。通过在 Fc 之前并入终止密码子以防止转录和翻译,将 Fc 区域从免疫体构建体除去,其中所述免疫体构建体含有 CDR H2 中的 H-2Kb 限制的 TRP2 表位 SVYDFVWL 和 CDR L1 中的 I-Ab 限制的 HepB CD4 表位 TPPAYRPPNAPIL(DCIB15)(图 9)。

[0397] 用免疫体 DNA 通过基因枪对 C57BI/6 小鼠进行三次隔周的皮内免疫。接下来通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定来分析脾细胞中表位特异性 CD8 和 CD4T 细胞应答的存在。

[0398] 用缺乏 Fc 区域的免疫体构建体免疫的小鼠生成了低水平的 TRP2 肽特异性应答,

其中所述应答与含有 Fc 区域的构建体相比能够非常低水平地识别肿瘤细胞系 B16F10 (图 49a)。来自若干实验的对 TRP2 和 HepB 辅助肽特异性应答二者的分析证明, 缺乏 Fc 区域的构建体生成显著较低的 TRP2 肽特异性应答 (图 49b)。然而, Fc 区域的去除未影响 HepB 辅助应答 (图 49c)。这与我们之前的结果一致, 其显示, 辅助在轻链中作用最好, 在所述轻链中, 它不被分泌并因此通过直接呈递而起作用。与此相反, CTL 应答是由直接和间接的呈递二者共同激发的, 而且后者可得益于 Fc 靶向作用。可选地, Fc 终止构建体导致截短的重链的较少分泌, 这可为应答的减少提供解释。因此, 将编码 TRP-2 的免疫体人工引入 IgG2 (DCIB33) 和 IgG3 恒定区域 (DCIB65), 其中前者不应该结合至 CD64 但能结合至 CD32, 而且还可以结合至小鼠中的 Fc 受体 IV。人 IgG3 能结合 CD32 和 CD64 两者。两种免疫体都激发强的 CTL 应答 (图 49e)。这表明, Fc 靶向作用不是间接呈递的有力组分。为了进一步证实这个问题, IgG1 的 Fc 靶向结构域被替换为对等的 IgG2 结构域, 反之亦然 (DCIB66、67, 图 15 和 16)。两种构建体都激发强的 CTL 应答 (图 49e)。这可能是由于免疫体[™]疫苗只分泌重链, 其中所述重链可能不缔合并允许 Fc 结合 (图 49f 和 g)。

[0399] 实施例 11- 免疫体免疫接种增强免疫应答并克服从全抗原中观察到的 调节。它还允许鉴定新的异源性 T 细胞表位。

[0400] 这可导致用编码 T 细胞表位的人抗体进行免疫的第二种好处, 其中所述人抗体与多数自体抗原相比是不表达调节性表位的惰性运载体。表达 gp100 表位或 TRP-2 表位的免疫体[™]激发了高频率、高亲和力的 T 细胞应答 (频率 $1/10^3$, 亲和力 10^{-10} M), 而用 TRP-2 抗原的全 gp100 进行的免疫接种激发了具有低频率和亲和力的 T 细胞 (频率 $1/10^5$, 亲和力 10^{-7} M)。CD25 的耗尽部分地恢复了对抗原的应答, 但免疫体仍是超过 100 倍 (图 50a 和 b)。

[0401] 相似地, 用编码连接到 Fc 的 Tie-2 的前 200 个氨基酸的 DNA 的免疫接种未能激发针对最主要的 10 个被预测的表位的免疫应答。将 Tie-2 的前 196 个氨基酸的序列输入 EpiJen 和 NetCTL 在线预测算法。这两种方法除了预测 HLA-A*0201 结合亲和性之外都还考虑蛋白酶体切割和 TAP 转运。还将 MHCpred 和 Syfpeithi 算法用作较老的预测算法的例子, 其中所述较老的预测算法只考虑被预测的 MHC 结合亲和性。全 Tie-2 分子可包含另外的 CTL 表位, 其中所述表位可对存在于前 196 个氨基酸中的那些产生免疫显性作用。因此, 还将 Tie-2 的全序列输入相同的算法以获得来自全分子的每种被预测的表位的排名。在小鼠和人不具有同源性的肽未被计入。使用几种不同的预测算法选择了余下的肽中的六个, 据预测, 它们一致地呈递优良的 CTL 表位。通过不同算法获得的针对这些肽中每种的相关分数, 以及 Z83 (之前鉴定的表位) 的结果, 被总结在表 6 中。

[0402] 来自被转染的 CHO-S 细胞的上清液的另外的分析数据证明, 只有含有被并入 CDRH3 或 CDRL3 的 CTL 表位的构建体作为完整抗体被分泌 (图 20e)。与此相反, 对 CDRH1 或 CDRH2 中任何表位的并入允许重的完整抗体少量分泌, 即使不向轻链中并入任何东西它也分泌。将 CDRL1 中任何表位并入任一轻链导致轻链低水平的分泌, 即使只有一种表位被并入重链的 CDRH3。

[0403] 为了确定 T 细胞库是否存在于识别来自 Tie-2 的任何被预测的 CTL 表位的 HLA-A*0201 转基因小鼠中, 使用天然的 Tie2 C200hFc DNA 构建体对动物进行免疫 (Ramage 等, Int. J. Cancer 2004 ;110 :245-250), 并通过酶联 免疫斑点测定来筛选脾细胞以确认肽特异性 IFN γ 应答。DNA 免疫接种之前 4 天, 在用 PC61 mAb 处理后使用 C200hFc 如前所

述对另一组小鼠进行免疫。

[0404] 用天然的 C200HFc DNA 构建体免疫的小鼠没有产生识别 Z83 的 IFN γ 应答,不管在免疫接种之前动物是否耗尽了 CD25⁺ 调节性 T 细胞。除了 Z284 之外,在免疫接种之前未耗尽调节性 T 细胞的动物身上没有检测到针对任何新肽的显著 IFN γ 应答,其中所述 Z284 看上去在一只动物 (M3) 体内刺激应答,其平均值为 69 SFC/ 百万个脾细胞 (图 50c 和 d)。在 DNA 免疫接种之前耗尽了调节性 T 细胞的动物中,2/3 的动物 (M1 和 M3) 展示了针对 Z282 肽再刺激的 IFN γ 应答,其平均值分别为 320 和 94 SFC/ 百万个脾细胞。M1 还展示了针对 Z285 再刺激的部分应答,其平均值为 85 SFC/ 百万个脾细胞。

[0405] 来自 Tie-2 中被预测的 CD8⁺ 表位体内筛选的明显抵触的结果可能是免疫显性的结果,因为来自用天然的 C200HFc 构建体在不存在 CD25⁺ 细胞时进行免疫的小鼠的 IFN γ 应答看上去倾向于一种主要的肽。为了进一步研究能够对 Z282 表位进行应答的 T 细胞库,在不存在来自其他潜在 CD8⁺ 表位的竞争时,用 IFA 中的 Z282 肽在 CD25⁺ 调节性 T 细胞的存在或不存在下对一组 HHD 小鼠进行免疫。

[0406] 所有用 Z282 免疫的小鼠产生了肽特异性 IFN γ 应答,即使在 CD25⁺ 调节性 T 细胞的存在下被免疫时。未被耗尽的动物中的小鼠 3 产生了最强的应答,其平均值为 215 SFC/ 百万个细胞。来自被耗尽的动物的最强应答在小鼠 2 上被观察到,其平均值为 137 SFC/ 百万个细胞 (图 50e 和 f)。

[0407] 由肽免疫接种诱导的应答保持低频率。为了检测如果表位从全抗原产生的任何调节性影响中被除去,较高频率应答是否能被生成,将 z282 (也被称作 z12) 表位人工引入免疫体构建体的 H1 位点并与 L1 中的 Hep B CD4 并排 (DCIB71, 图 51)。然后用 z12 肽或免疫体 DNA (通过基因枪) 对 HLA-A2 转基因小鼠进行三次隔周的免疫,然后分析表位特异性免疫应答的存在。所有用 z12 肽免疫的小鼠展示低频率和亲和力的表位特异性应答 (图 50g)。然而,当 z12 表位被人工引入免疫体构建体时,在所有小鼠中诱导了更高频率和亲和力的应答 (图 50h)。

[0408] 总结来说,如果 CD25 细胞在免疫接种之前被耗尽,免疫应答则被激发至 Tie2 表位的 3/10。相似地,如果这些表位中的一个被呈递为肽,则可产生微弱的免疫应答。然而,如果该表位被呈递在免疫体TM 构建体中,则产生高频率和高亲和力的 T 细胞应答。这些结果表明,在 Tie-2 的前 200 个氨基酸中有 T-reg 表位,其抑制 CTL 应答。如果将这些 T-reg 或它们的表位除去,则可能揭示对自体抗原的应答,其中所述应答可通过在免疫体中的呈递而被进一步增强。

[0409]

名称 ¹	开始 ²	肽 ³	EpiJen ⁴		NetCTL ⁵		Syfpeithi ⁶		MHCpred ⁷	
			分数 (IC ₅₀ nM)	排名	分数	排名	分数	排名	分数 (IC ₅₀ nM)	排名
Z83	124	FLPATLTMT	---	---	0.73	9 (27)	19	18 (55)	2978	96 (633)
Z282	27	ILINSLPLV	0.05	1	1.39*	1	29	1 (2)	16	2 (6)
Z283	146	VLIKEEDAV	0.23	2 (5)	0.7	10 (31)	24	5 (11)	89	9 (34)
Z284	64	LMNQHQPDL	0.98	3 (7)	0.88*	3 (11)	21	9 (32)	113	11 (51)
Z285	8	VLCGVSLLL	1.19	4 (10)	0.94*	2 (9)	24	4 (10)	242	21 (125)
Z286	34	LVSDAETSL	---	---	0.74	8 (26)	19	15 (52)	887	65 (349)
Z287	26	LILINSLPL	---	---	0.88*	4 (12)	23	7 (16)	607	57 (271)
Z18	(流感)	GILGFVFTL	0.19	(1)	1.29	(2)	30		419	(87)

[0410] 表 6. 来自 Tie-2 的被预测的 HLA-A*0201 限制的 CTL 表位。¹ 肽的名称。² Tie-2 分子中氨基酸残基的开始位置。³ 肽序列。⁴ 使用 EpiJen 网站服务器的预测。以 IC₅₀ nM 的单位给出分数, 较低的分数代表较高亲和性的肽。⁵ 使用 NetCTL 1.2 网站服务器的预测。分数代表三种独立预测方法的加权总和, MHC 结合的相对加权是 1。* 标明高于阈值 0.75 的分数, 其被鉴定为来自为已知表位获得的数据集的 CTL 表位的分界点。⁶ 使用 SYFPEITHI 程序的预测。HLA-A*0201 结合肽的最大分数是 36。⁷ 使用 MHCpred 叠加法的预测, 其用来预测对 MHC 和 TAP 的肽亲和性。再一次以 IC₅₀ nM 的单位给出分数, 较低的分数代表较高亲和性的肽。建议的 IC₅₀ 值是在 0.01 至 5000 nM 之间。对于所有预测方法, 排名值表明从所述 196 个氨基酸的片段中预测表位的顺序, 括号中的值代表来自全 Tie-2 分子的排名预测。为了对比, 包括了为衍生自流行性感 A 病毒基质蛋白的已知 Z18 CTL 表位而获得的值。

[0411] 实施例 12- 异体 Fc 在提供 T 细胞辅助中的作用和抗原特异性 T 细胞辅助的要求

[0412] 高亲和力的 T 细胞应答的激发通常需要在启动中的 T 细胞辅助。根据最初设想, 这将由轻链中编码的 Hep B 外源辅助表位来提供。的确, 针对此表位产生了强的辅助应答。然而, 由于重链被分泌而轻链没有, 即使当两条链都将由相同 APC 产生时 hep B 表位可能已经为直接呈递提供了辅助, 不太可能的是, 它能为间接呈递的重链提供辅助, 因为这不太可能被相同的抗原呈递细胞吸收。因此, 使用只编码重链的 DNA 载体对小鼠进行免疫。高频率、高亲和力 CTL 应答仍被生成 (图 53a 和 b)。这暗示着辅助不被需要或小鼠体内异体的人 Fc 提供被连接的外源辅助。因此, 评估了小鼠 IgG2a 构建体重和轻链的分泌 (图 49g) 并筛选了免疫应答的生成 (DCIB53, 图 54)。虽然它仍然显示高频率高亲和力的 T 细胞应答, 但这些不如对等的人构建体强, 这表明异体的 Fc 提供被连接的辅助 (图 53c 和 d)。然后将 HLA-DR4 gp100 表位并入小鼠 IgG2a 构建体 (DCIB64, 图 55) 以提供 CTL 产生的被连接的辅助还有抗原特异性 T 细胞辅助二者而刺激肿瘤环境中的炎症。这些构建体激发高频率和高亲和力的 CTL 和辅助应答 (图 53e 和 f)。可以在人患者中使用表达相同表位的 hIgG1 构建体。

[0413] 实施例 13- 免疫蛋白酶体的加工在免疫体构建体表位的应答产生中是重要的

[0414] 有人建议, 免疫蛋白酶体具有改变由自体抗原产生的表位的阵列的能力, 因为它具有一种不同样式的切割。在一些情况下, 当对免疫蛋白酶体向上调节时, 新表位被产生, 而在其他情况下表位被破坏。有证据表明, 免疫蛋白酶体不能产生衍生自黑素瘤抗原的几

种表位,即 MelanA/MART-1、gp100²⁰⁹⁻²¹⁷ 和酪氨酸酶³⁶⁹⁻³⁷⁷ (Chapiro 等,2006. J Immunol ;176 : 1053-61)。Chapiro 及其同事已经建议,加工和呈递 gp100 表位的能力与免疫蛋白酶体的向上调节有关。成熟的 DC 被认为是对免疫应答的启动负责的,并且被认为组成性地表达免疫蛋白酶体 (Macagno 等,2001. Eur J Immunol ;31 :3271-80)。因此,将 gp100²⁰⁹⁻²¹⁷ 表位人工引入免疫体构建体的 CDRH1 位点并测试它在 HLA-A2 转基因小鼠中诱导肽特异性免疫应答的能力。未从该构建体观察到肽特异性应答 (图 56)。然而,当修饰表位以使其在位置 210 具有甲硫氨酸 (210M) 而非苏氨酸时,这防止免疫蛋白酶体对它的切割,并观察到表位特异性应答 (图 56)。

[0415] 还测试了衍生自 VEGFR2 的 HLA-A2 限制的肽 (氨基酸 773-781VIAMFFWLL) 和两种修饰的 hTERT 肽 (氨基酸 572-580 YLFFYRKSV 和氨基酸 988-997 YLQVNSLQTV) 以确认免疫体构建体应答的生成。最初通过计算机的表位预测和肽免疫接种来发现这些表位从而否定蛋白酶体加工的需要。然而,它们被呈递在宿主内皮 / 肿瘤细胞的表面上,这表明它们是通过组成性蛋白酶体从全抗原被加工的。当被人工引入免疫体构建体时,这些表位中没有一个是产生应答,这表明由免疫蛋白酶体进行的加工对于免疫应答的有效产生可能是必须的。

[0416] 实施例 14- 不同免疫接种方法对于从免疫体疫苗引起免疫应答是有效的

[0417] 已经显示,免疫体疫苗在通过基因枪施用时对引发高频率和亲和力 CD8 和 CD4 应答是有效的。随后使用其他免疫接种方法测试免疫体疫苗的 T 细胞应答产生。

[0418] 经过皮内或肌肉内途径使用含有 CDRH2 中的 TRP2 表位的免疫体 DNA 对 C57BI/6 小鼠进行免疫。将免疫接种与电穿孔结合或不结合,而且隔周地进行三次。

[0419] 使用基因枪免疫的小鼠显示高频率 TRP2 肽特异性应答。这些与通过和电穿孔结合的肌肉内或皮内途径免疫的小鼠是可比的。在不使用电穿孔时通过肌肉内或皮内途径的免疫接种产生了较低频率的 TRP2 肽特异性应答 (图 57a)。根据肽滴定所测量,所有 TRP2 肽特异性应答都具有高亲和力 (图 57b)。

[0420] 实施例 15- 免疫体免疫接种诱发类白癜风脱色素作用并保护免受肿瘤的攻击

[0421] 既然用免疫体 DNA 免疫的小鼠产生具有针对高转移性的和弱免疫原性的肿瘤细胞系 B16F10 的细胞毒素活性的免疫应答,测试了疫苗在体内的保护效力。

[0422] 使用 IB DNA (DCIB18 ;图 30) 通过基因枪向腹部剃毛的皮肤内对小鼠进行五次隔周的免疫。在免疫接种进行中,将 1×10^4 个表达 IFN α 的 B16F10 细胞通过静脉内注射进小鼠体内,其中所述细胞在肺内形成转移性肿瘤。当最后一次免疫接种后允许毛发再长回来时,在用免疫体 DNA 免疫的小鼠身上免疫接种部位处观察到白色毛发的生长 (图 58a)。在肿瘤细胞注射七周后,将小鼠处死并分析内部和外部肺转移瘤的数量。免疫体 DNA 免疫的小鼠与未处理的对照小鼠相比展现了肺转移瘤数量的显著减少 (图 58b)。

[0423] 还使用 IB DNA (DCIB18) 通过基因枪对小鼠进行三次隔周的免疫。在最后一次免疫接种七天后,用 2×10^4 个表达 IFN α 的 B16F10 细胞通过皮下对小鼠进行攻击。监视小鼠的肿瘤生长和存活。一旦肿瘤达到内政部规定的最大限度,将小鼠安乐死。免疫体 DNA 免疫的小鼠展现了显著地较慢的皮下肿瘤生长和延长的存活 (图 58c 和 d)。

[0424] TRP2 特异性应答是 CD8 介导的,因为 CD8⁺ 细胞的耗尽废除应答。CD8T 细胞已被鉴定为抗肿瘤免疫中主要的参与者,而且我们的结果显示,免疫体 DNA 免疫接种在小鼠模型中引起体内抗肿瘤免疫。所有无疾病迹象的被免疫小鼠在免疫接种部位展现了

类白癜风的皮毛脱色素作用。之前白癜风通常与小鼠体内的肿瘤保护相关,并与患有转移性黑素瘤的患者体内成功的 IL-2 免疫疗法高度相关 (Overwijk 等, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96:2982-7; Lane 等, *Cancer Research* 2004; 64:1509-14; Steitz 等, *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:246-53; Rosenberg & White, *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996; 19:81-4)。

[0425] 实施例 16- 免疫体免疫接种显著地延缓肿瘤生长

[0426] 之前显示,免疫体免疫接种显著地保护免受肿瘤的攻击。随后测试了疫苗在治疗情况中的效力。

[0427] 将 2×10^4 个 B16F10 肿瘤细胞通过皮下注射进 C57BI/6 小鼠。注射四天后,用含有 CDRH2 中的 TRP2 表位的免疫体 DNA 或对照免疫体 DNA 对小鼠进行免疫。在肿瘤注射后第 11 和 18 天进行重复的免疫接种。以 3-4 天的间隔监视肿瘤生长。与对照免疫的小鼠相比,免疫体免疫的小鼠展示了攻击性 B16F10 黑素瘤生长的显著延缓 (图 59a)。

[0428] 还使用攻击性较弱的 B16F10 IFN α 肿瘤系进行了相似的研究。将 2×10^4 个肿瘤细胞通过皮下注射进 C57BI/6 小鼠并在第 14 天用免疫体 DNA 或对照 DNA 进行免疫。在肿瘤注射后第 21 和 28 天进行重复的免疫接种。在肿瘤注射后第 47 天,免疫体免疫的小鼠与对照免疫的小鼠相比展现了显著地较低的肿瘤生长 (图 59b)。之前的数据表明, T 调节性细胞的耗尽促进免疫应答的产生,因此进行了抗肿瘤研究。在此研究中,将 2×10^4 个 B16F10 肿瘤细胞通过皮下注射进小鼠并在第 4、11 和 18 天用免疫体 DNA 或对照 DNA 进行免疫。在第 0 天通过注射抗 CD25 抗体 (PC61) 将小鼠中 T 调节性细胞耗尽。与第二次免疫接种同时,还将抗 CTLA-4 抗体注射进小鼠,因为还显示 CTLA-4 的阻断在调节性 T 细胞的抑制中是有利的。监视肿瘤生长,而且虽然免疫体免疫接种显著地延缓肿瘤生长 ($p = 0.0188$),但使用抗 CD25 和抗 CTLA-4 抗体的治疗使其进一步提高 ($p = 0.001$) (图 59c)。使用抗 CD25 抗体的治疗看上去不显著地延缓在免疫体免疫的小鼠中观察到的肿瘤生长。

[0429] 实施例 17- 免疫应答可由不同载体骨架表达的免疫体构建体产生。

[0430] 当免疫体构建体从不同载体骨架被表达时,分析应答。含有 CDRH1 中的 gp100DR7 表位、CDRH2 中的 TRP2 表位和 CDRH3 中的 gp100DR4 表位的带有野生型轻链的免疫体构建体被人工引入双表达载体 DCOrig 和 DCVax (DCIB54, 图 18 和 29)。通过基因枪对 HLA-DR4 转基因小鼠进行三次隔周免疫,通过 IFN γ 酶联免疫斑点测定先体外后体内地分析应答。

[0431] 使用含有 CDRH1 和 CDRL3 中的 gp100DR7 表位、CDRH2 中的 TRP2 表位、CDRH3 和 CDRL1 中的 gp100DR4 表位的免疫体构建体进行相似的实验 (DCIB68, 图 60)。该构建体被人工引入 DCOrig、缺乏 SV40 启动子 的 DCOrig 和 DCVax 载体骨架二者。

[0432] 用 Orig 载体中的免疫体构建体 (B1-3) 免疫的小鼠与 pVax 载体中的免疫体构建体 (C1-3) 相比展示相似频率的表位应答 (图 61)。

[0433] 总的来说,免疫体技术具有从非免疫原性抗体骨架引起高频率和亲和力 CD8 和 CD4 免疫应答的优秀能力,其能够在体内有效地预防肿瘤生长。它具有同时靶向多达六种不同抗原的能力,并具有避开调节性 T 细胞的问题的能力,其中所述问题当全抗原免疫原被使用时经常发生。该技术提出了一种全新的接种方法,并证明了免疫体系统被用作许多其他癌症类型和微生物相关疾病的多价疫苗的潜力。

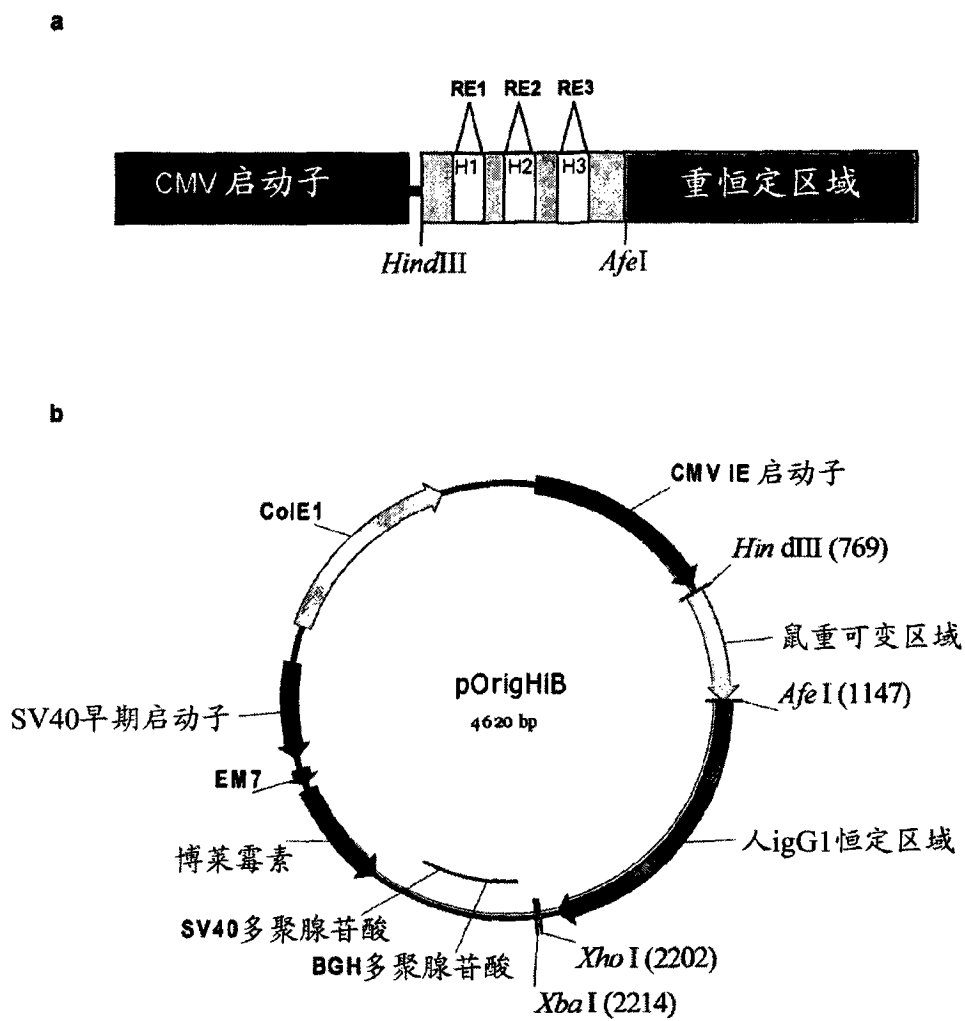


图 1

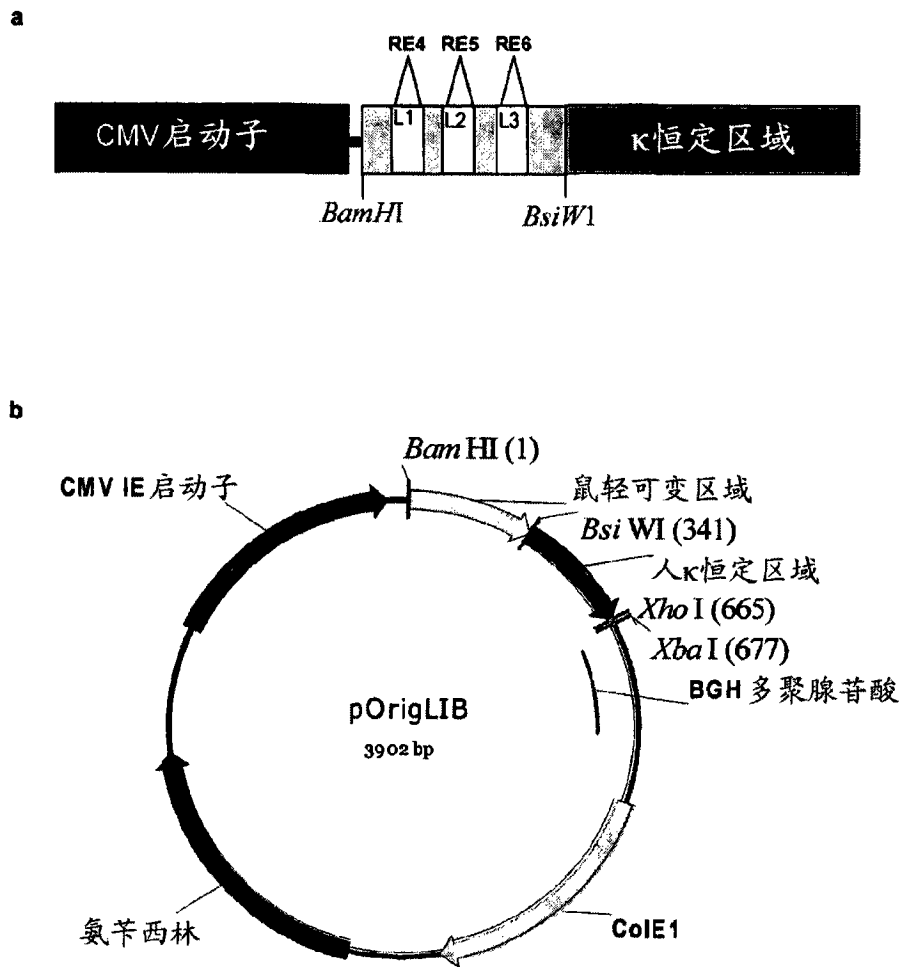


图 2

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

CDR1

G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTCAATACCTATGACATGCTTGGGTTCGC
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

CDR2

Q A P G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F
CAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGGCGATTG
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

T I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R
ACCATTTCCAGAGACAATAGCAAGAACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGA
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

CDR3

H Y G H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S A S T K G P S
CATTATGGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTATGGGGTCAAGGAACCCAGGTACCCGTCTCC**AGCGCT**CCACCAAGGGCCCATCG
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450

V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V
GTCTTCCCGCTGGCACCTCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTG
451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540

T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S
ACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630

V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K
GTGGTGACCGTGCCCTCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA
631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720

V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P
GTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTCTTCTCTTCCCC
721 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 810

P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K
CCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG
811 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 900

F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
901 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 990

V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K
GTCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA
991 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1080

T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC
1081 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1170

L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCGGAGAACAACTACAAGACCACG
1171 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1260

P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S
CCTCCCGTGTGAGTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
1261 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1350

C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATCTAAAGGGCGAATTGCG
1351 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1440

XhoI

CCTTAAGGGCGAATTTTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCC**CTCGAG**
1441 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1489

图 3

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

CDR1

L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTA
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

CDR2

E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGTCCCAGACAGATTCACT
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

CDR3

G S G S G I D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H
GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACAT
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

BsiWI

V P W T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E
GTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450

Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A
CAGTIGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCC
451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540

L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K
CTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA
541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630

A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E
GCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCACCGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720

C * XhoI
TGTTGACTCGAG
721 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 732

图 4

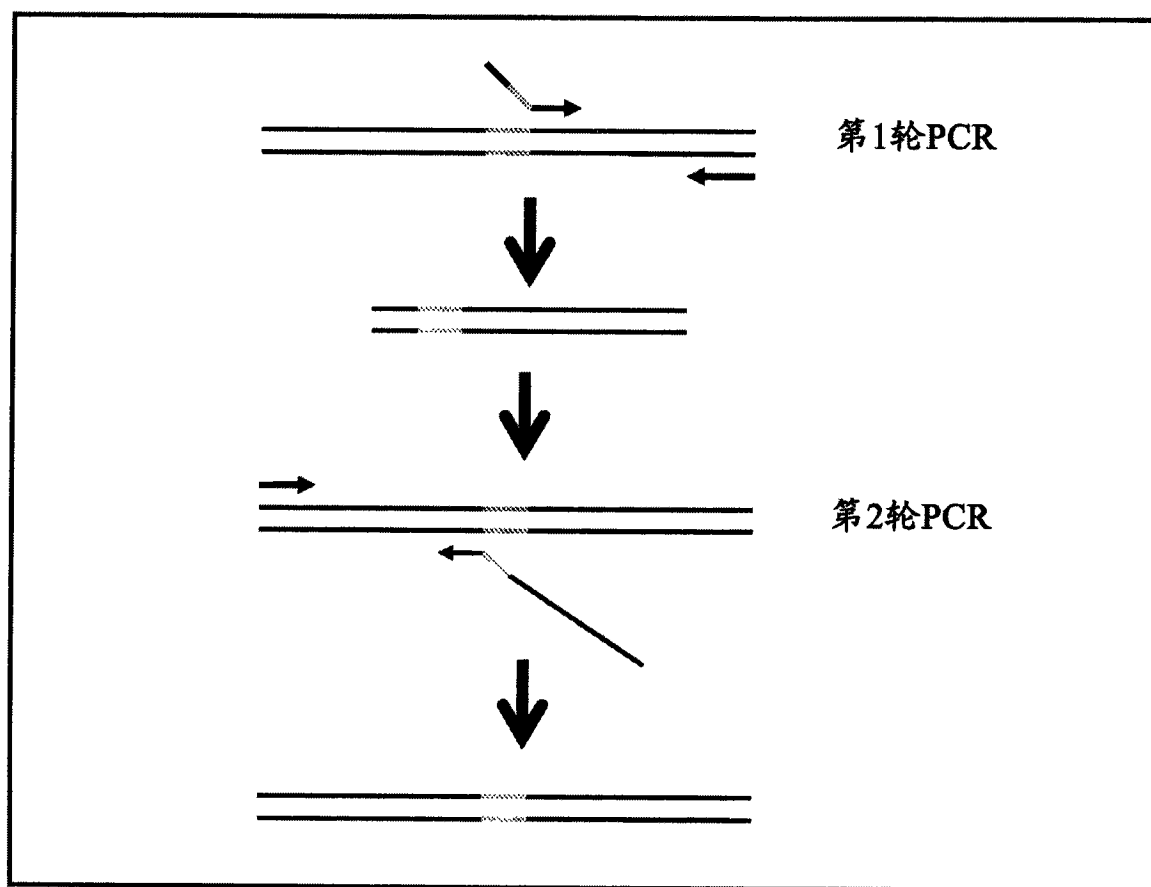


图 5

H1

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT
G G G L I Q P G G S L R M S C Q A P G K G L E W I A
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCT**TGCGCA**GGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCA
Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F T I S R D N S
TACATTGGTAGTGGTGGTGATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCCAGAGACAATAGC
K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G
AAGAACACCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGT
H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S A
CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGICAAGGTACCACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**

H2

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT
G G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTGCAGCCTCTGGATTTCGTTTCAATACCTATGAC
M S W V R Q A P G K G L E W I A Y I G S G I S R D
ATGTCTTGGGTTCCGAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGT**TGGCCA**TTTCCAGAGAC
N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H
AATAGCAAGAACACCCTGTATTTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACAT
Y G H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S A
TATGGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACCACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**

H3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT
G G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTGCAGCCTCTGGATTTCGTTTCAATACCTATGAC
M S W V R Q A P G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y
ATGTCTTGGGTTCCGAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTGATAGAACCTAC
Y P D T V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q L N S
TATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCCAGAGACAATAGCAAGAACACCCTGTATTGCAATTGAACAGT
L R A E D T A V Y Y C A G Q G T T V T V S S A
CTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGT**GCCCCGGC**CAAGGTACCACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**

图 6

H1/H2

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

FspI

G G G L I Q P G G S L R M S C Q A P G K G L E W I A
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCT**TGCGC**AGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCA

MscI

Y I G S G I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E
TACATTGGTAGTGGT**TGGCCA**TTTCCAGAGACAATAGCAAGAACACCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAG

D T A V Y Y C A R H Y G H Y V D Y A V D Y W G Q G T
GACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACC

T V T V S S A
ACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**

H1/H3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

FspI

G G G L I Q P G G S L R M S C Q A P G K G L E W I A
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCT**TGCGC**AGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCA

Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F T I S R D N S
TACATTGGTAGTGGTGGTGATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCAATTCCAGAGACAATAGC

SrfI

K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A G Q G
AAGAACACCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGT**CCCCGGGC**CAAGGT

T T V T V S S A
ACCACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**

H2/H3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

G G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTGCAGCCTCTGGATTTCGCTTTCAATACCTATGAC

MscI

M S W V R Q A P G K G L E W I A Y I G S G I S R D
ATGTCTTGGGTTCCGAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGT**TGGCCA**TTTCCAGAGAC

SrfI

N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A G
AATAGCAAGAACCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGT**CCCCGGGC**

Q G T T V T V S S A
CAAGGTACCACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**

图 6 继续

H1/H2/H3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
AIGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

FspI

G G G L I Q P G G S L R M S C Q A P G K G L E W I A
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCT**TGCGCA**AGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCA

MscI

Y I G S G I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E
TACATTGGTAGTGG**TGGCCA**ATTTCAGAGACAATAGCAAGAACACCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAG

SrfI

D T A V Y Y C A G Q G T T V T V S S A
GACACAGCCGTGIATTACTGT**GCCCCGGGCA**AGGTACCACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**

图 6 继续

L1

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P L
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCACTC

EcoRV

S L P V T P G E P A S L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S
TCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTC**GATATC**TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCC

N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A
AACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT

E D T G V Y Y C F Q G S H V P W T F G G G T K V E I K
GAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGIGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG**CGTACG**

L2

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P L
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCACTC

S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y
TCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTAT

SspI

L E W Y L Q K P G Q S P Q L L F S G S G S G T D F T L
TTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCT**AATATT**CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTC

K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W T F G G G
AAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGIGGACGTTTCGGTGGAGGC

T K V E I K
ACCAAGGTGGAAATCAAG**CGTACG**

L3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P L
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCACTC

S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y
TCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTAT

L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D
TTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGAC

HpaI

R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V T K V
AGATTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAG**GTTA**CCAAGGTG

E I K
GAAATCAAG**CGTACG**

图 7

L1/L2

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P L
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCACTC

EcoRV **SspI**

S L P V T P G E P A S L Q K P G Q S P Q L L F S G S
TCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTC**GATATCT**GCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCT**AATATT**CAGTGGCAGT

G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H
GGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACAT

V P W T F G G G T K V E I K
GTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG**CGTACG**

L1/L3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P L
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCACTC

EcoRV

S L P V T P G E P A S L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S
TCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTC**GATATCT**GCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCC

N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A
AACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT

HpaI

E D T G V T K V E I K
GAGGATACCGGAG**GTTAACCA**AGGTGGAAATCAAG**CGTACG**

L2/L3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P L
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCACTC

S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y
TCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTAT

SspI

L E W Y L Q K P G Q S P Q L L F S G S G S G T D F T L
TTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCT**AATATT**CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTC

HpaI

K I S R V E A E D T G V T K V E I K
AAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAG**GTTAACCA**AGGTGGAAATCAAG**CGTACG**

图 7 继续

L1/L2/L3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P L
 ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAATCTCCACTC

EcoRV **SspI**
 S L P V T P G E P A S L Q K P G Q S P Q L L F S G S
 TCCCTGCCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTC**GATATC**TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCT**AATATT**CAGTGGCAGT

HpaI
 G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V T K V E I K
 GGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAG**TTAACA**AGGTGGAAATCAAG**CGTACG**

图 7 继续

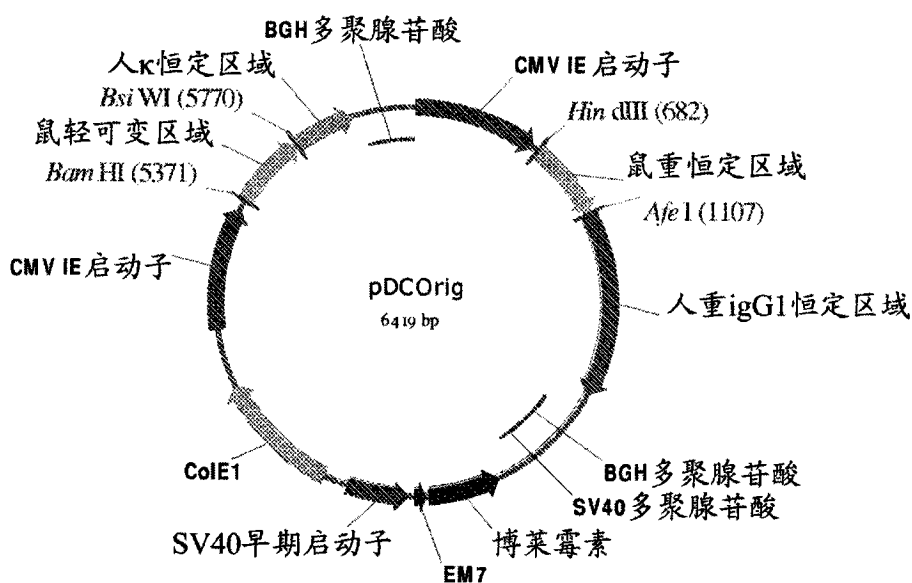


图 8

重链

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I M D Q V P F S V W V R Q A P
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTACCATTATGGACCAGGTGCCCTTCTCCGTGGGTTCCGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W L R F T I S R D
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGTAGTGTTTATGATTTTTTGTGTGGCTCCGATTACCAATTCCAGAGAC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G H Y
 AATAGCAAGAACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGGTCACTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A
 GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACCACGGTCACCGTCTCCAGCGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450

P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
 CCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC
 451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540

S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P
 TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
 541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630

S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V * P K S
 TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTTGACCCAAATCT
 631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720

图 9

重链

HindIII M Q V Q L V E T G G G L I Q P G G S L R M S C T I M D
AAGCTT ACCATGCAGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGCACCATTTATGGAC
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

Q V P F S V W V R Q A P G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D
 CAGGTGCCCTTCTCCGTGTGGGTTCGGCAGGCTCCGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGTAGTGTTTATGAT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

F F V W L R F T I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T
 TTTTTGTGTGGCTCCGATTACCATTTCCAGAGACAATAGCAAGAACACCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACA
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

AfeI
 A V Y Y C A R H Y G H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 GCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACCACGGTCACCGTCTCCAGC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

GCT
 361 --- 363

图 10. DCIB 15

BamHI M D V L M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C T P P
GGATCACCACCATGGAATGTGTGATGACCCAACTCTCCACTTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCACTCCTCCA
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
A Y R P P N A P I L W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R
GCTTATAGACCACCAAATGCCCOATCTCTATTGGTATCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAGTTTCCAACCGA
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G
TTTTCCTGGGGTCCCAGACAGATTCA GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGASTGGAGGCTGAGGATAACCGA
81 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
V Y Y C F Q G S H V P W T F G G G T K V E I K **BsiWI**
GTGTATTACTGCTTCAAGGTTTCATGTTCCTGGGACGTTCCGGTGGAGGCCACCAAGGTGAAAATCAAGCGTAGG
71 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!

图 11

AfeI
S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V
AGCGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
1 90
K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTTACAGTCC
91 180
S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q I Y T C N V D H K P
TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCC
181 270
S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V
AGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTCAGCGCAAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCACGACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCC
271 360
F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
TTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
361 450
P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F
CCCGAGGTCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC
451 540
R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A
CGTGTGGTCAGCGTCTCTACCGTCTGTCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCTCCACGCC
541 630
P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K
CCCATCGAGAAAACCATCTCTCAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAG
631 720
N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N
AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTACCCACGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
721 810
Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
TACAAGACCACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
811 900
SspI
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATCATGAGGCTCTGCACACCCTACACGAGAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGATATCCA
901 990
CTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAG

图 12

AfeI
 S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L G C L V
AGCGCTTCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTTGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTC
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S
 AAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGCTGGAACCTCAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCC
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y T C N V N H K P
 TCAGGACTTACTTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S N T K V D K R V E L K T P L G D T T H T C P R C P E P K S
 AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCTCAAAACCCACTTGGTGACACAACCTCACACATGCCACGGTGCCAGAGCCCAATCT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S
 TGTGACACACCTTCCCGGTGCCACGGTGCCAGAGCCCAATCTTGTGACACACCTTCCCGATGCCACGGTGCCAGAGCCCAATCT
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450

C D T P P P C P R C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D
 TGTGACACACCTTCCCGATGCCACGGTGCCAGCAGCTGAATCTTGGGAGGACCGTCACTTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGAT
 451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540

T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F K W Y V
 ACCCTTATGATTTCCTGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGAGCGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTCAAGTGGTACGTG
 541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630

D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V L
 GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGCTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTG
 631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720

H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T
 CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGTCTCCACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAACCC
 721 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 810

K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V
 AAAGGACAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTC
 811 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 900

K G F Y P S D I A V E W E S S G Q P E N N Y N T T P P M L D
 AAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAGCGGGCAGCCGAGAGACACTACAACACCACGCTTCCATGCTGGAC
 901 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 990

S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H
 TCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
 991 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1080

SapI
 E A L H N R F T Q K S L S L S P G K *
 GAGGCTCTGCACAACCGCTTACGSCAGAGAGCTTCTCCTGTCTCCGGGTAAATGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAG
 1081 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1164

图 13

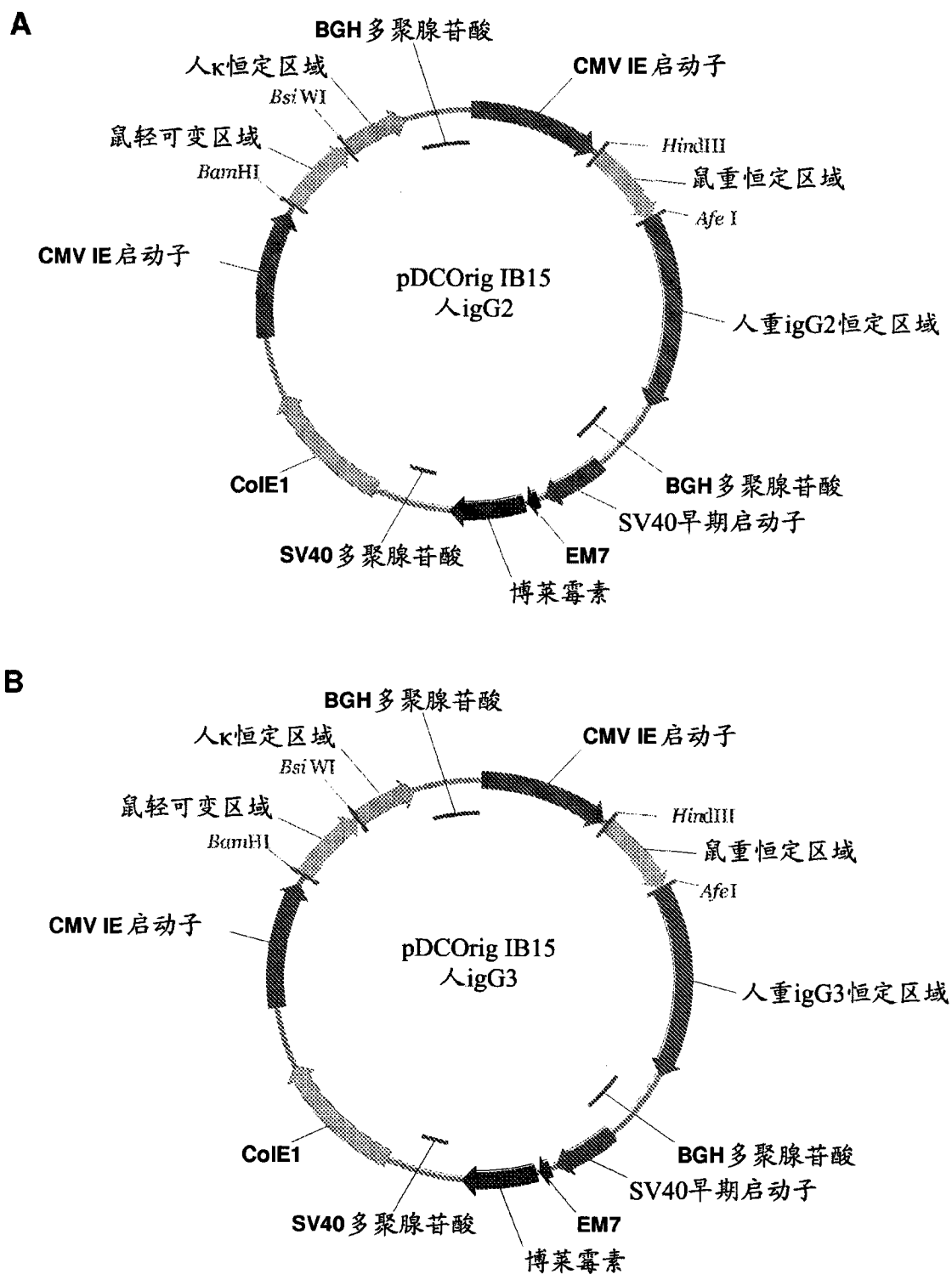


图 14

HindIII M G W S C C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G T G
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I M D Q V P F S V W V R Q A P
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGCAACATTATGGACCAGGTGCCTTTCTCCGTGTGGGTTCGGCAGGCTCCG
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W L R F T I S R D
GGGAAGGGGTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTTATGATTTTTTGTGTGGCTCGGATTACCATTTCCAGAGAC
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G H Y
AATAGCAAGAACACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGGTCACTAC
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A
GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACACGGTACCCGTCTCCAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450

AgeI
P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
CCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGTGCTTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGGAAC
451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540

S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P
TCAGGCGCCTGACACAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGCTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630

S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S
TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCT
631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720

AhdI
C D K T H T C P P C P A P P V A G G P S V F L F P P K P K D
TGTGACAAAATCAGCATGCCACCGTGCACAGCACCTCCAGTCGCGGGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAAACCCAGGAC
721 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 810

T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V
ACCCATCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
811 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 900

D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTCTG
901 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 990

H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCC
991 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1080

K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCGTGACCTGCCTGGTC
1081 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1170

K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
AAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTCTGGAC
1171 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1260

S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H
TCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
1261 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1350

E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATCTAAAGGGCGAATTCGCCCTTAAGGGCGAATT
1351 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1440

重链

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90
 G G L I Q P G G S L R M S C T I M D Q V P F S V W V R Q A P
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGTCCTTGAGAAATGCTCTGGACCATTAATGGACCAGGTGCCTTTCTCCGTGTGGGTTCGGCAGGCTCOG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180
 G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W L R F T I S R D
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTITATGATTTTTTTGTGTGGCTCCGATTACCATTTCCAGAGAC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270
 N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G H Y
 AATAGCAAGAACACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGGTCACTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360
 V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A
 GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGTCAAGGTACCACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450
 P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
 CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGA**ACCGGT**GACGGTGTCTGGGAAC
 451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540
 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P
 TCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTGGCC
 541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630
 S S N F G T Q T Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C
 TCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAATGT
 631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720
 C V E C P P C P A P **E L L G** G P S V F L F P P K P K D T L M
 TGTGTGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTTAGGA**GGACCGTCA**GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATG
 721 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 810
 I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V
 ATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG
 811 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 900
 E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D
 GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGCTTCCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACAGGAC
 901 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 990
 W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q
 TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCTCCAGCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAG
 991 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1080
 P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F
 CCCCAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTACAGCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTC
 1081 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1170
 Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G
 TACCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGTGGACTCCGACGGC
 1171 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1260
 S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L
 TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
 1261 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1350
 H N H Y T Q K S L S L S P G K *
 CACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGATATCCACTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGC
 1351 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1440

图 16

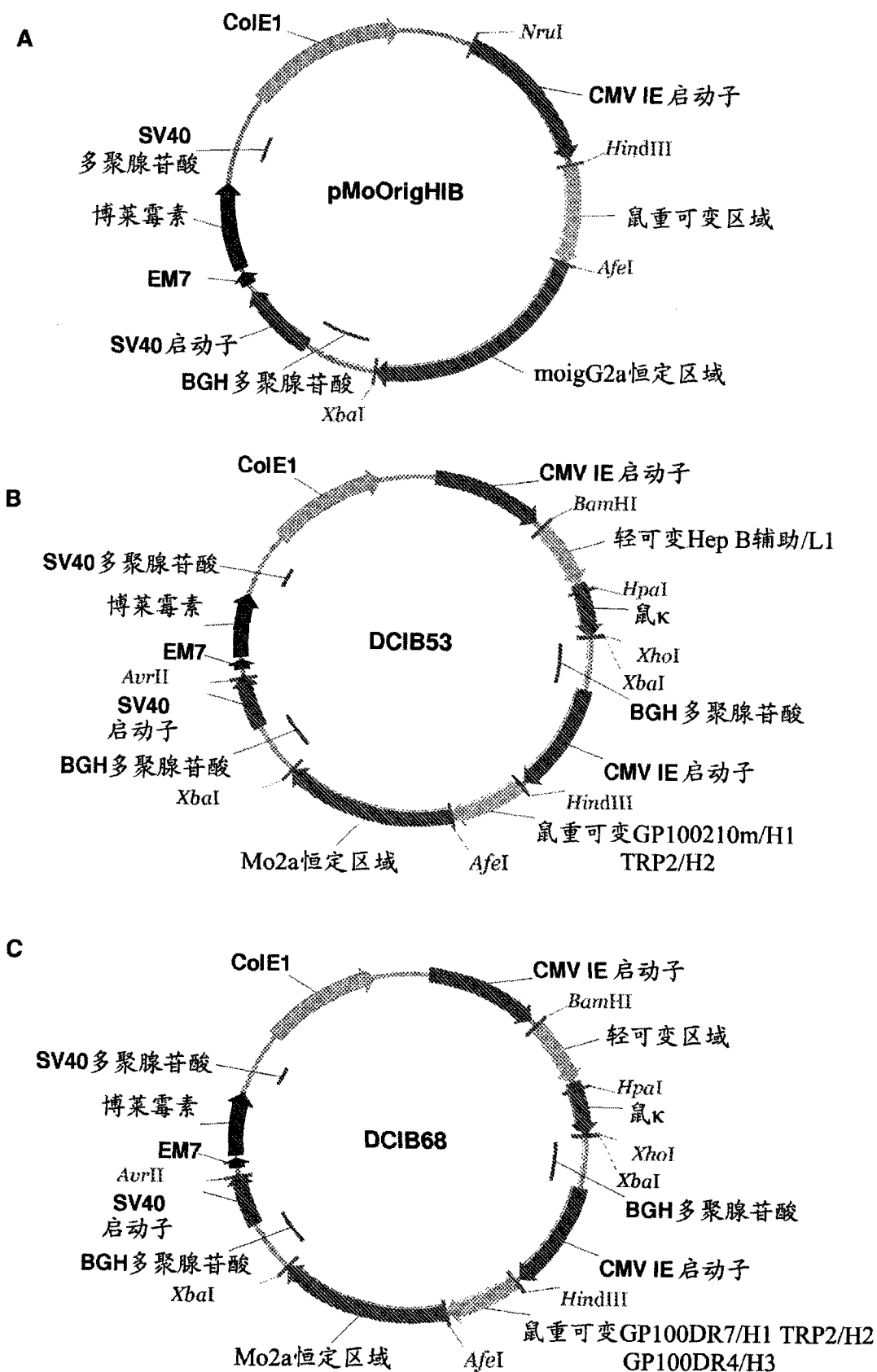


图 17

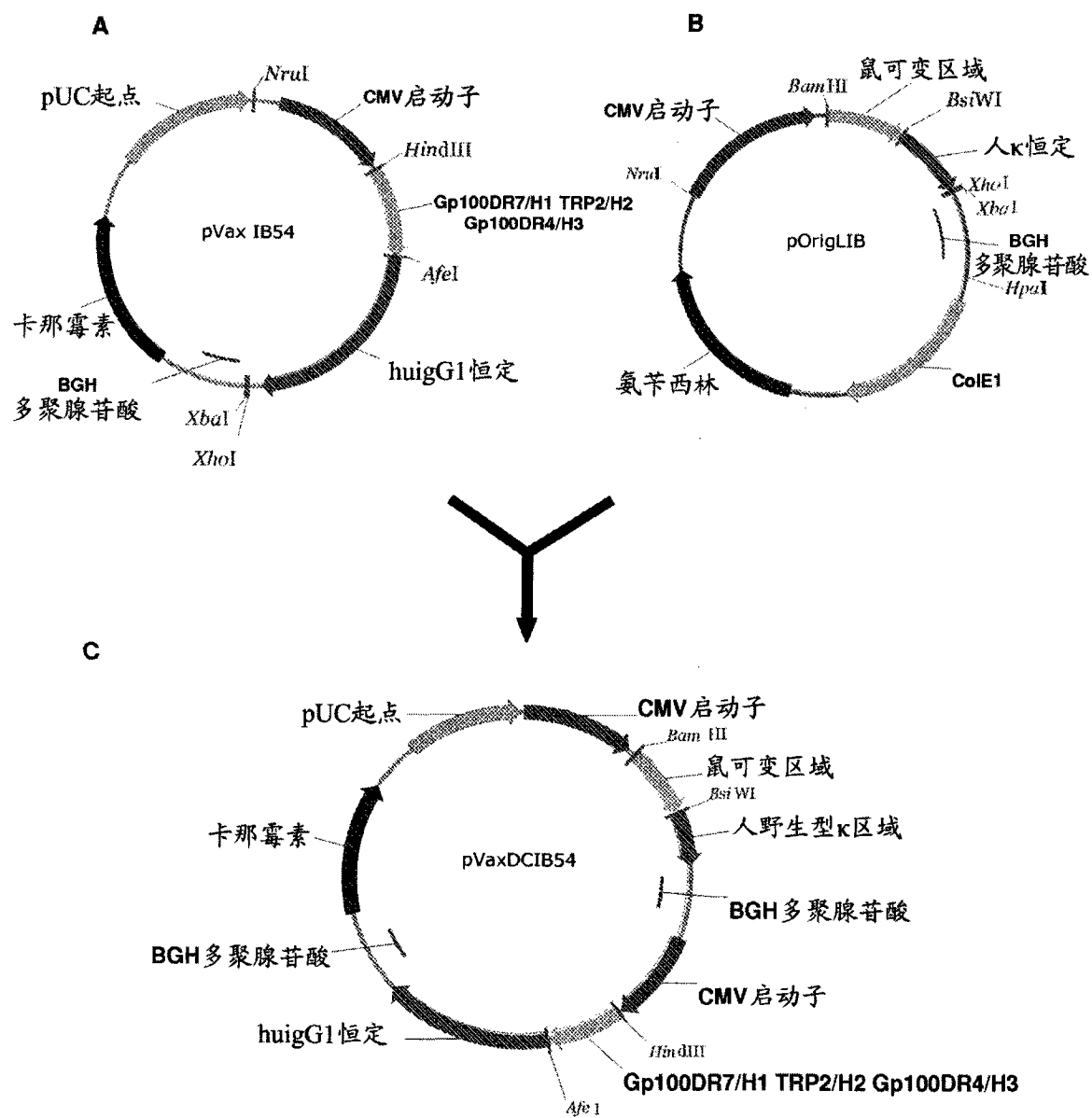


图 18

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I M D Q V P F S V W V R Q A P
 GGAGGCTTAAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGGACCATTAATGGACCAGGTGCCTTTCTCCGTGTGGGTTCCGGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W L R F T I S R D
 GGGAGGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTTTATGATTTTTTGTGTGGCTCCGATTACCATTTCCAGAGAC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G H Y
 AATAGCAAGAACACCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACACCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGGTCACTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI

V D Y A V D Y W G Q G I T V T V S S
 GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACCACGGTCACCGTCTCCAGCGCT
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 417

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCC ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
 CTCCTCCCTGCCTGTCACTCTCTGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGGACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGTAT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

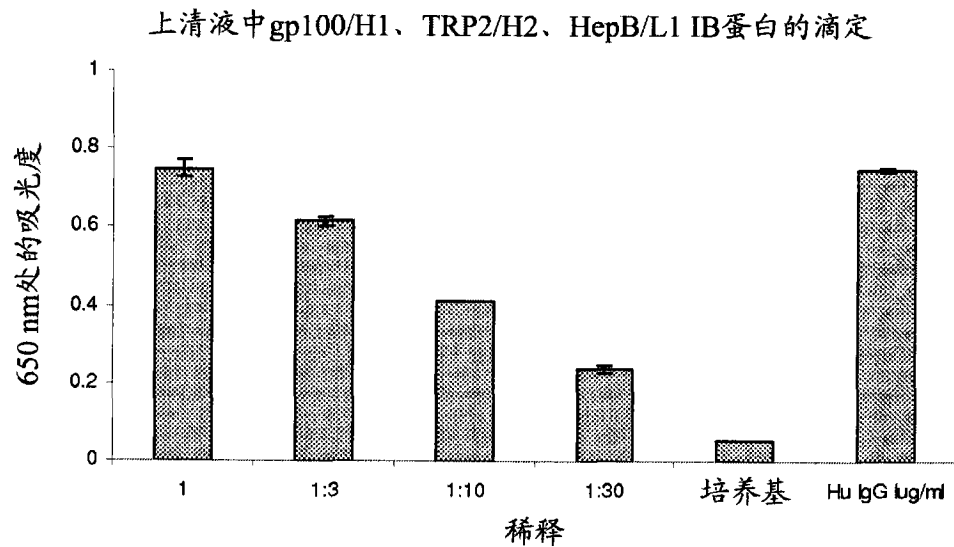
L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
 CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTAGTGGCAGTGGG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
 TCAGGGACAGATTTACACATCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

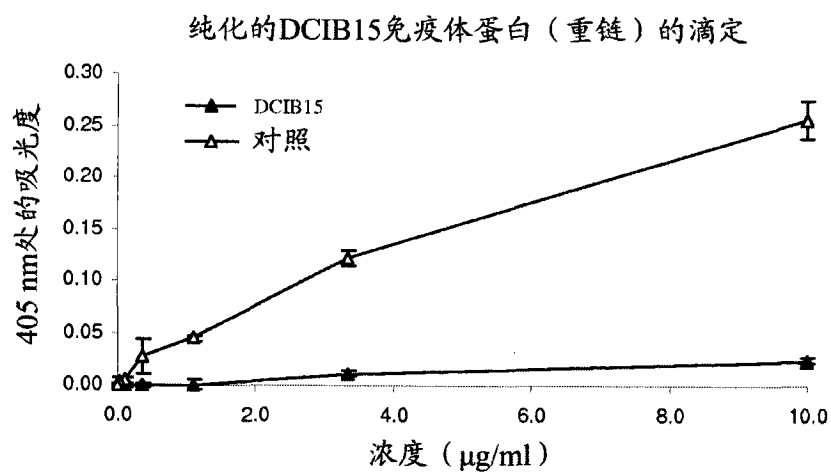
T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 19

a.



b.



c.

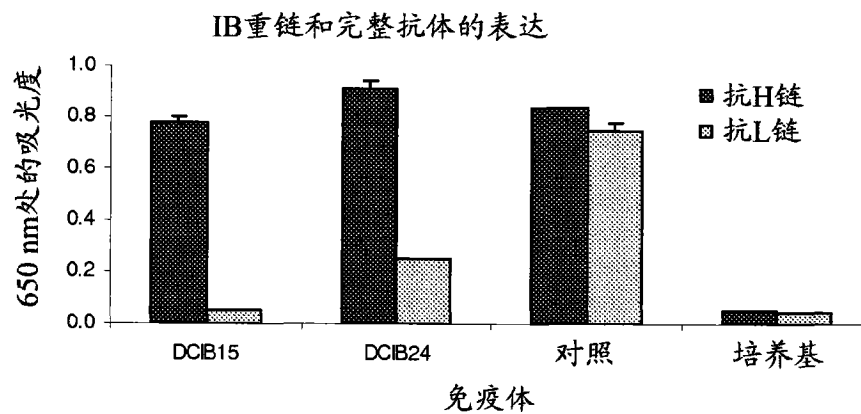
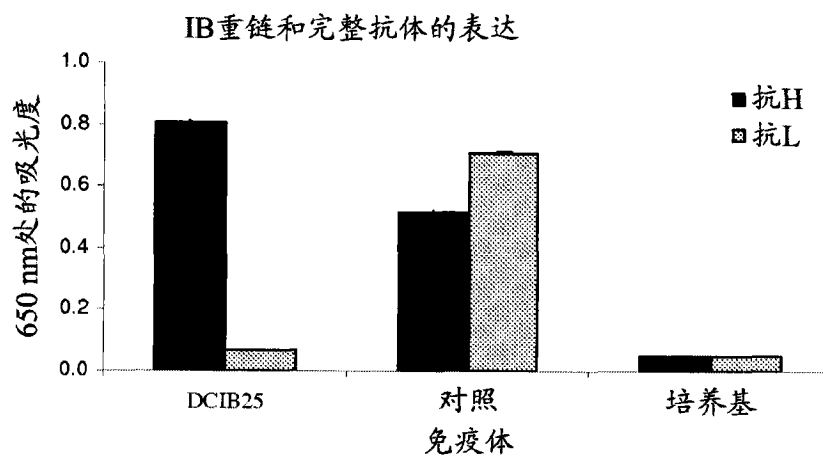


图 20

d.



e.

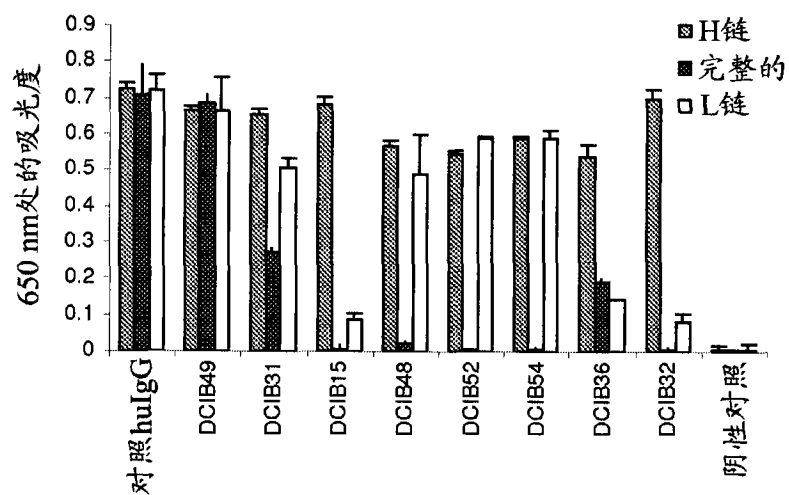


图 20 继续

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCGC
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Q A P G K G L E W I A Y I G S G G S I I N F E K L R F T I S
CAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTATAATCAACTTTGAAAACTGCGATTCCACCATTTCC
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G
AGAGACAATAGCAAGAACACCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGT
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCAGCGCT
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 423

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCAATCTCCA
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
CTCTCCCTGCCTGTCACTCTCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGGTACTCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGTAT
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGGA
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
TCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTTCAGGTTACATGTTCCGTGG
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 21

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I M D Q V P F S V W V R Q A P
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGTCCTGAGAATGTCCTGCAACATTATGGACCAGGTGCCTTCTCCGTGTGGGTTCCGGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W L R F T I S R D
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATIGGTAGTGGTGGTAGTGTITATGATTTTTTGTGTGGCTCCGATTACCATTTCCAGAGAC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G H Y
 AATAGCAAGAACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGGTCACTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 417

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
 CTCCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCACT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C T P P A Y
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCCTCTCCAGCTTAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

R P P N A P I L F G G G T K V E I K **BsiWI**
 AGACCACCAAATGCCCTATCCTATTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 420

图 22

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCA TGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTGCAGCCTCTGGATTTCGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCGC
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Q A P G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F
 CAGGCTCCGGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

T I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R
 ACCATTTCCAGAGACAATAGCAAGAACCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCGA
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI

S V Y D F F V W L W G Q G T T V T V S S
 AGTGTATTATGATTTTTTTGTGTGGCTCTGGGGCCAAGGAACACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 423

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
 CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCA
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

BsiWI

V P W T F G G G T K V E I K
 GTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 408

图 23

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTTACCAIGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACITCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90
 G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCGC
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180
 Q A P G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F
 CAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270
 T I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R
 ACCATTTCAGAGACAATAGCAAGAACACCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCGA
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360
 S V Y D F F V W L W G Q G T T V T V S S
AfeI
 AGTGTTTATGATTTTTTGTGTGGCTCTGGGGCCAAGGAACACCGTCAACCGTCTCC**AGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 423

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90
 L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
 CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180
 E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GAATGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCACT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270
 G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C T P P A Y
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCACTCTCCAGCTTAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360
 R P P N A P I L F G G G T K V E I K **BsiWI**
 AGACCACCAATGCCCTATCCTATTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 420

图 24

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90
 G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCGCTTTCATACCTATGACATGTCTTGGGTTTCGC
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180
 Q A P G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F
 CAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATAACATTGGTAGTGGTGGTGATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270
 T I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R
 ACCATTTCAGAGACAATAGCAAGAACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGA
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360
AfeI
 H Y G H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 CATTATGGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACACGGGTACCGTCTCC**AGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 432

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCC ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90
 L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
 CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180
 E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GAATGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACGATTTCCTGGGGTCCCAGACAGATTCACT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270
 G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C S V Y D F
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCAGTGTATTATGATTIT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360
BsiWI
F V W L F G G G T K V E I K
 TTTGTGGCTCTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 420

图 25

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
 AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTGCAGCCTCTGGATTTCGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCGG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Q A P G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W L R F T I
 CAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTITATGATTTTTTGTGTGGCTCCGATTACCACT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R W N
 TCCAGAGACAATAGCAAGAACACCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCGATGGAAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 R Q L Y P E W T E A Q R L D W G Q G T T V T V S S
 AGGCAGCTGTATCCAGAGTGGACAGAAGCCAGAGACTTGACTGGGGCCAAGGAACCAACCGGTACCGTCTCCAGCGCT
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 438

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
 CTCTCCCTGCTGTCACTCCTGGGAGGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GAATGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCACT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGATTACTGCTTTCAAGGTTACAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

BsiWI
 V P W T F G G G T K V E I K
 GTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 408

图 26

重可变

```

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTTCG
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Q A P G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F
CAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCCTACTATCCAGACACTGTGAAGGCCGATT
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

T I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R
ACCATTTCCAGAGACAATAGCAAGAACACCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCGA
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T P P A Y R P P N A P I L W G Q G T T V T V S S
ACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGGGCCAAGGAACACGGTCACCGTCTCCAGCGCT
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 435

```

轻可变

```

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTATTIA
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
GAATGGTACCTGCAGAAACCGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGATTGAGT
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H
GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACAT
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

V P W T F G G G T K V E I K
GTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 408

```

图 27

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACIGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCGG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Q A P G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W L R F T I
 CAGGCTCCGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTTTATGATTTTTTTGTGTGGCTCCGATTACCACT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R T P
 TCCAGAGACAATAGCAAGAACCCCTGTATTTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCGAACTCCT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 P A Y R P P N A P I L W G Q G T T V T V S S
 CCAGCTTATAGACCACCAAATGCCCTATCCTATGGGGCCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 429

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
 CTCCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAGTTTCCAACCGATTCTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCACT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

BsiWI
 V P W T F G G G T K V E I K
 GTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 408

图 28

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C G T G R A M L G T H T M E V T V
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTTGGGACAGGCAGGCAATGCTGGGCACACACACCATGGAAGTAACTGTG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Y H W V R Q A P G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W
 TACCATTTGGGTTCCGGCAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTITATGATTTTTTGTGTGG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

L R F T I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y
 CTCGATTACCATTTCCAGAGACAATAGCAAGAACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

C A R W N R Q L Y P E W T E A Q R L D W G Q G T T V T V S S
 TGTGCCCCATGGAACAGGCAGCTGTATCCAGAGTGGACAGAAGCCCAGAGACTTGACTGGGGCCAAGGTACCACGGTCACCGTCTCCAGC
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450

AfeI

GCT
 451 --- 453

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
 CTCCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCACT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTTCACAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

BsiNI
 V P W T F G G G T K V E I K
 GTTCCGTTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 408

图 29

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTTACCAATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCGG
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Q A P G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W L R F T I
CAGGCTCCGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTATTATGATTTTTTTGTGTGGCTCCGATTACCATTT
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y
TCCAGAGACAATAGCAAGAACACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTAT
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

G H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
GGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACACGGTCAACCGTCTCCAGCGCT
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 426

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCAATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCAATCTCCA
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGCCTCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCTATGGTAT
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGG
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
TCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K
ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 30

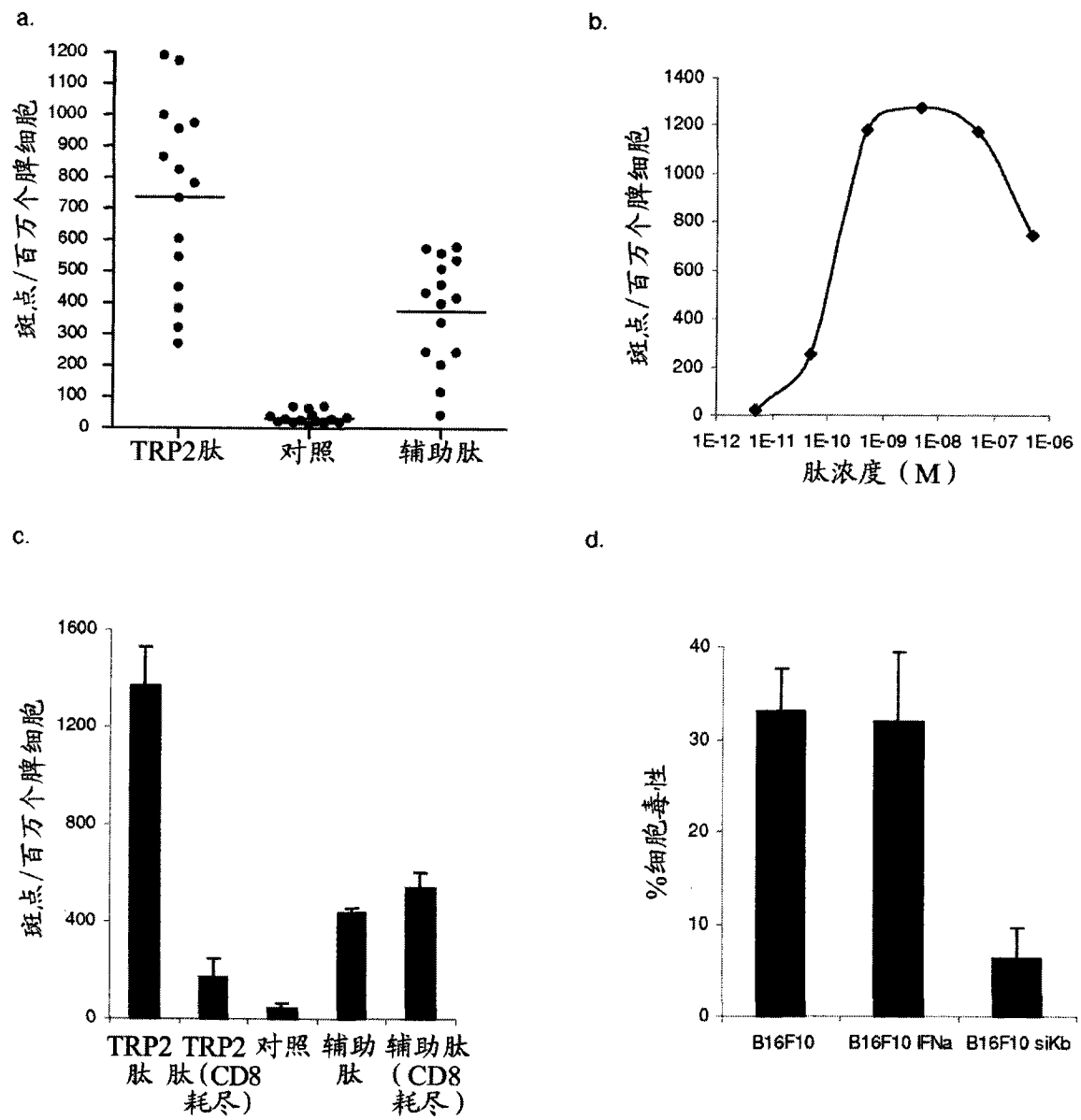


图 31

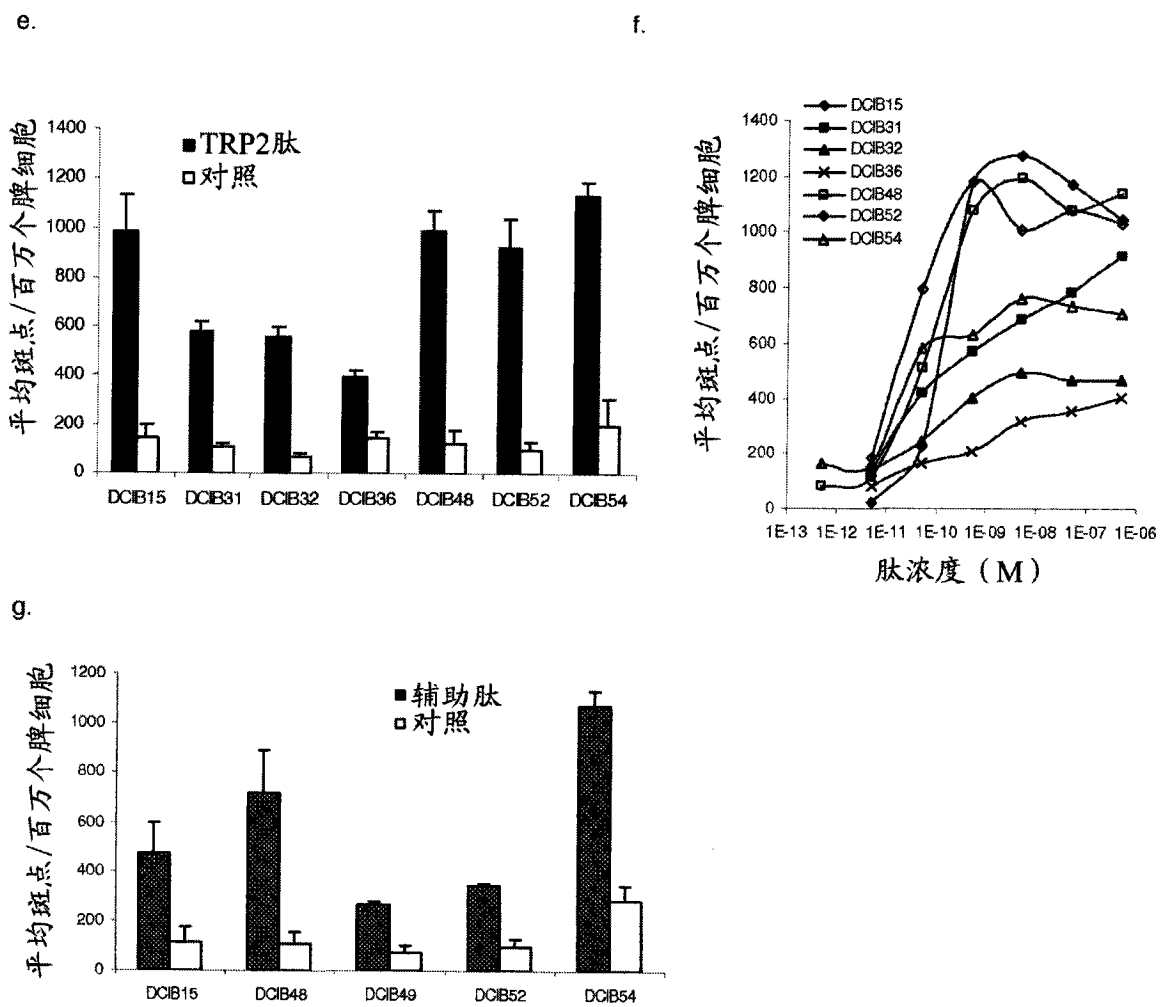


图 31 继续

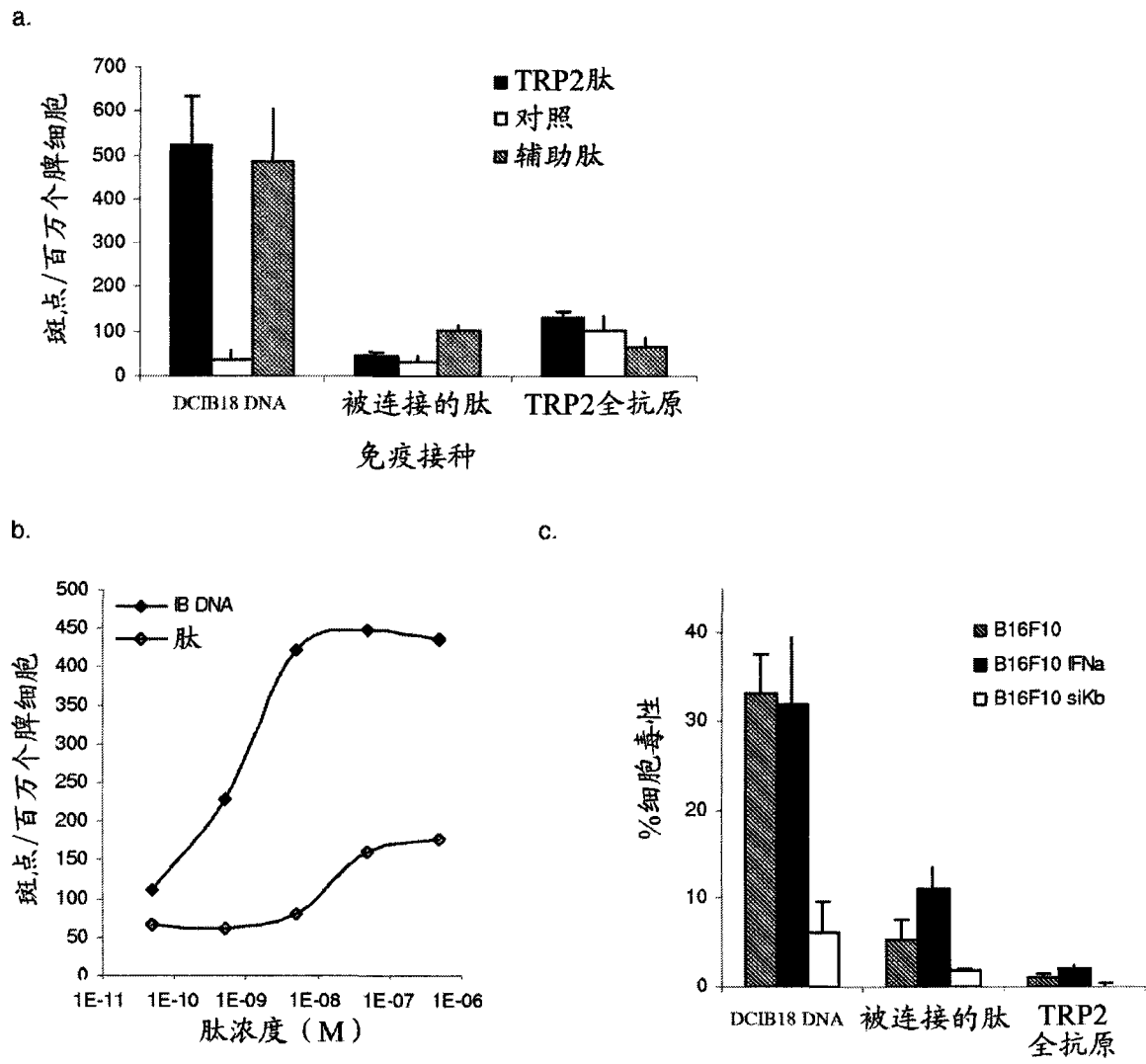


图 32

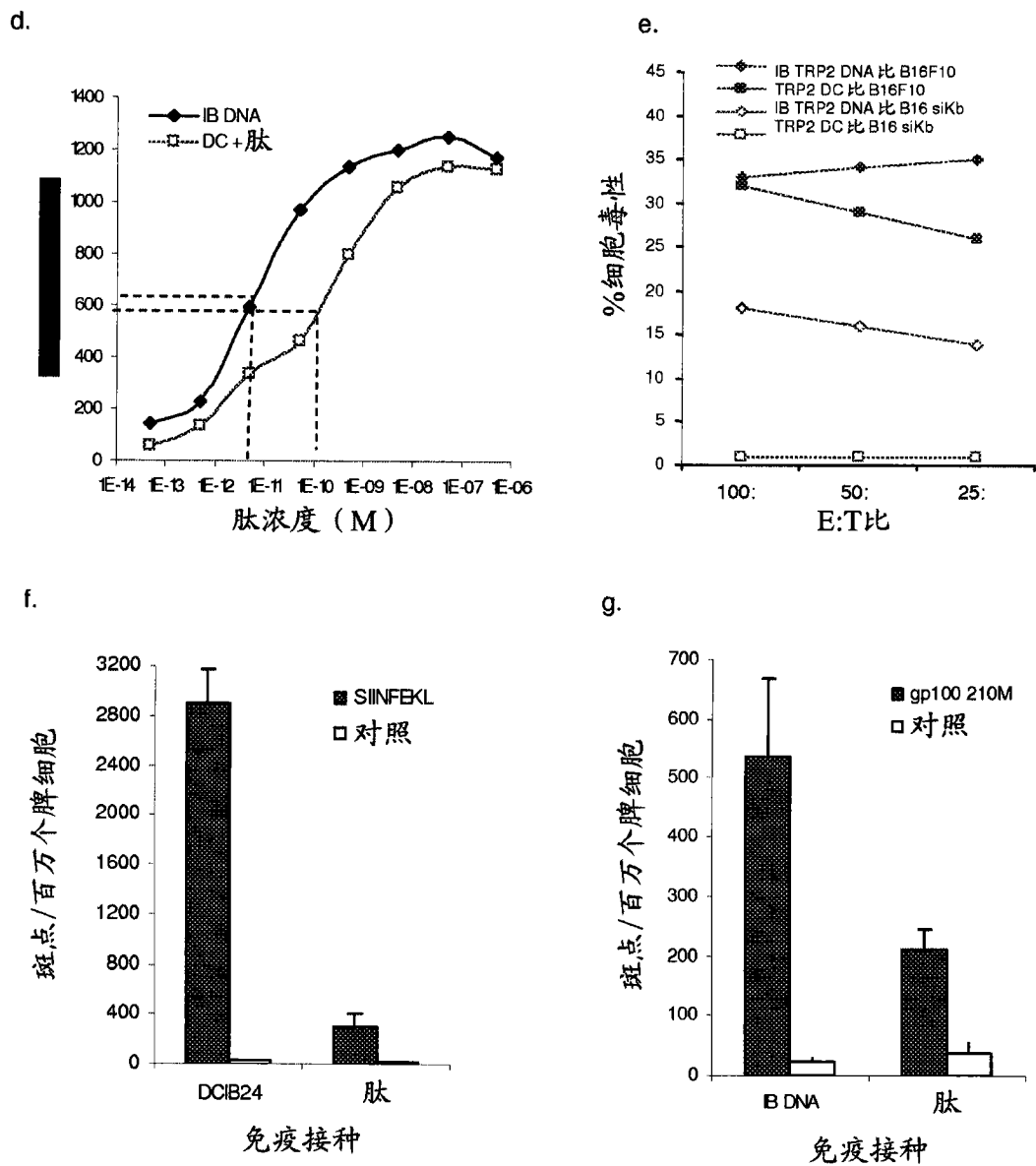
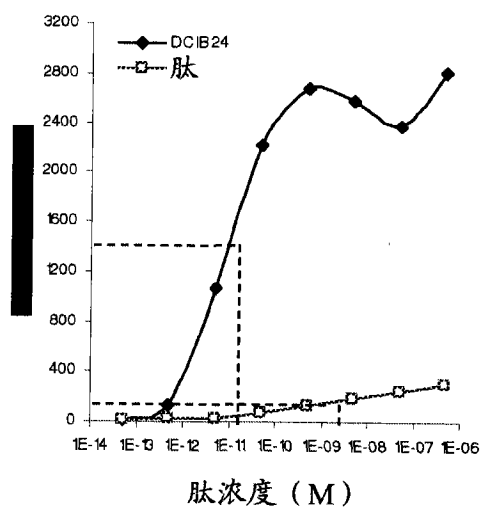


图 32 继续

h.



i.

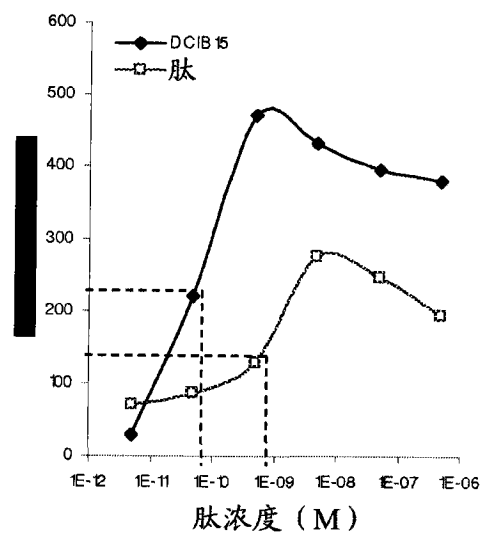


图 32 继续

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

1: G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAAATGTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCGC
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

1: Q A P G K G L E W I A Y I G S G G I P Q S L D S W W T S L R
 CAGGCTCCGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGIATAACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCCGA
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

1: F T I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A
 TTCACCATTTCCAGAGACAATAGCAAGAACACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCA
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfaI
 1: R H Y G H Y V D Y A V D Y W G Q G T I V T V S S
 AGACATTATGGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACACGGTCACCGTCTCC**CAGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 435

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C F E R F E I F P K E W Y L Q K
 CTCTCCCTGCGTCACTCCTGGGAGGCCAGCCTCCATCTCTTGGTTTGAAGGTTTGAGATATTCCCAAGGAATGGTACCTGCAGAAA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T
 CCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGATCAGGGACA
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W T F G
 GATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTCAAGGTTCAATGTTCCGTGGACGTTCCGGT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

G G T K V E I K **BsiWI**
 GGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 390

图 33

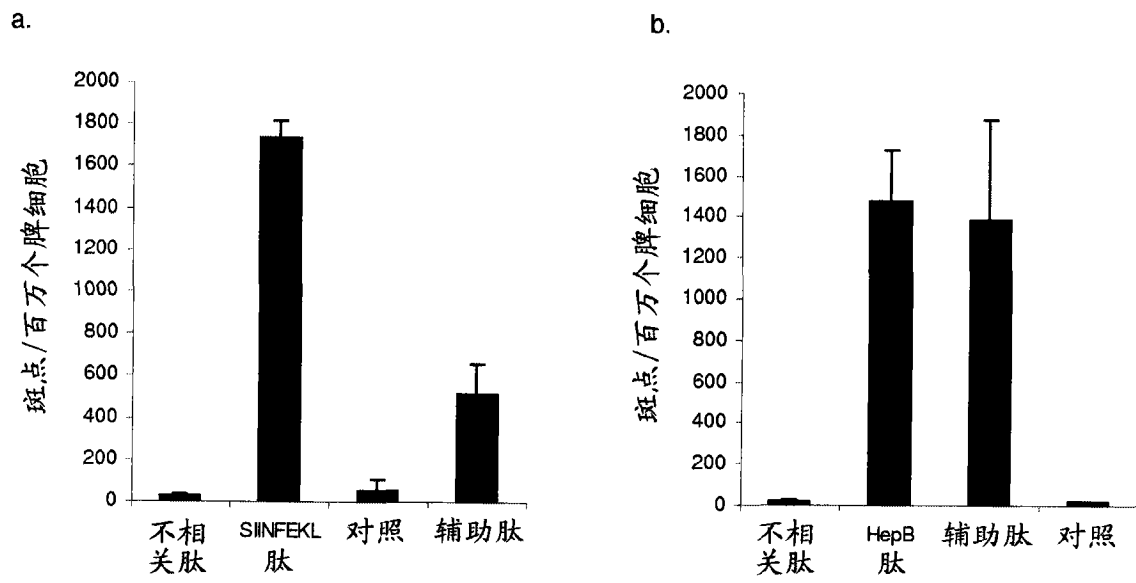


图 34

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I M D Q V P F S V W V R Q A P
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTGACCATTATGGACCAGGTGCCTTTCTCCGTGTGGGTTCCGGCAGGCTCCG
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F T I S
GGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCG
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G
AGAGACAATAGCAAGAACACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGT
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
CACTACGCTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCAGGTACCGTCTCCAGCGCT
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 423

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCAATCTCCA
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
CTCTCCCTGCGTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGCCTCCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGTAT
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTAGTGGCAGTGGG
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L R I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCGGTGG
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 35

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
 AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C F L P A T L T M V W V R Q A P G
 GGAGGCTTAAICCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGCTTCCTACCAGCTACTTTAACTATGGTTTGGGTTCGGCAGGCTCCGGGG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F T I S R
 AAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCCAGA
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G H
 GACAATAGCAAGAACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGTCAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 TACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACACGGTCCCGTCTCCAGCGCT
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 420

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
 CTCICCCCTGCCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGCCTCCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGTAT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGTCTCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
 TCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTTCAATGTTCCGTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 36

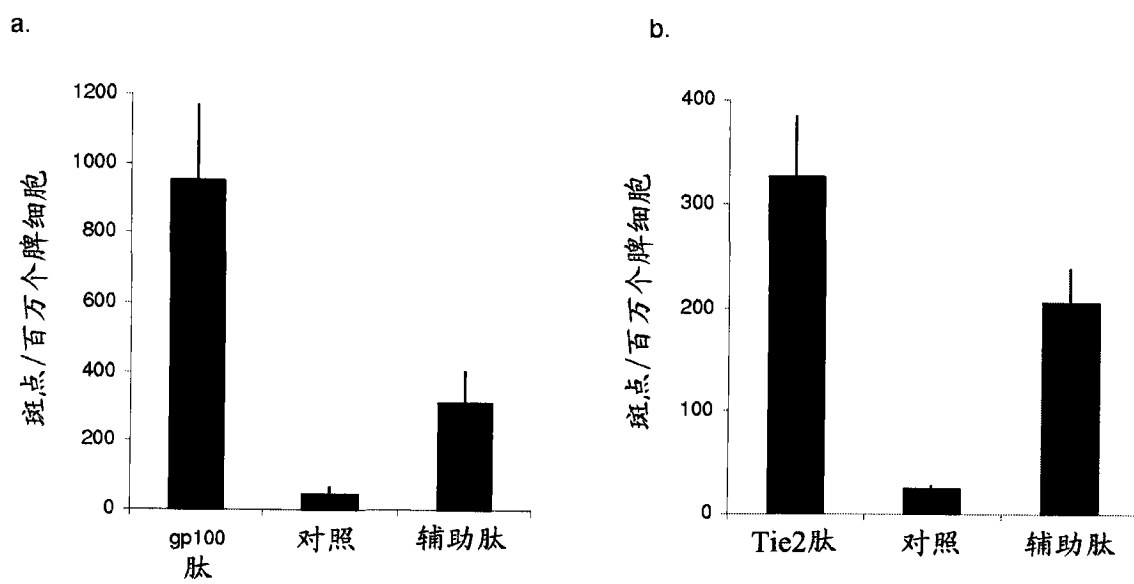


图 37

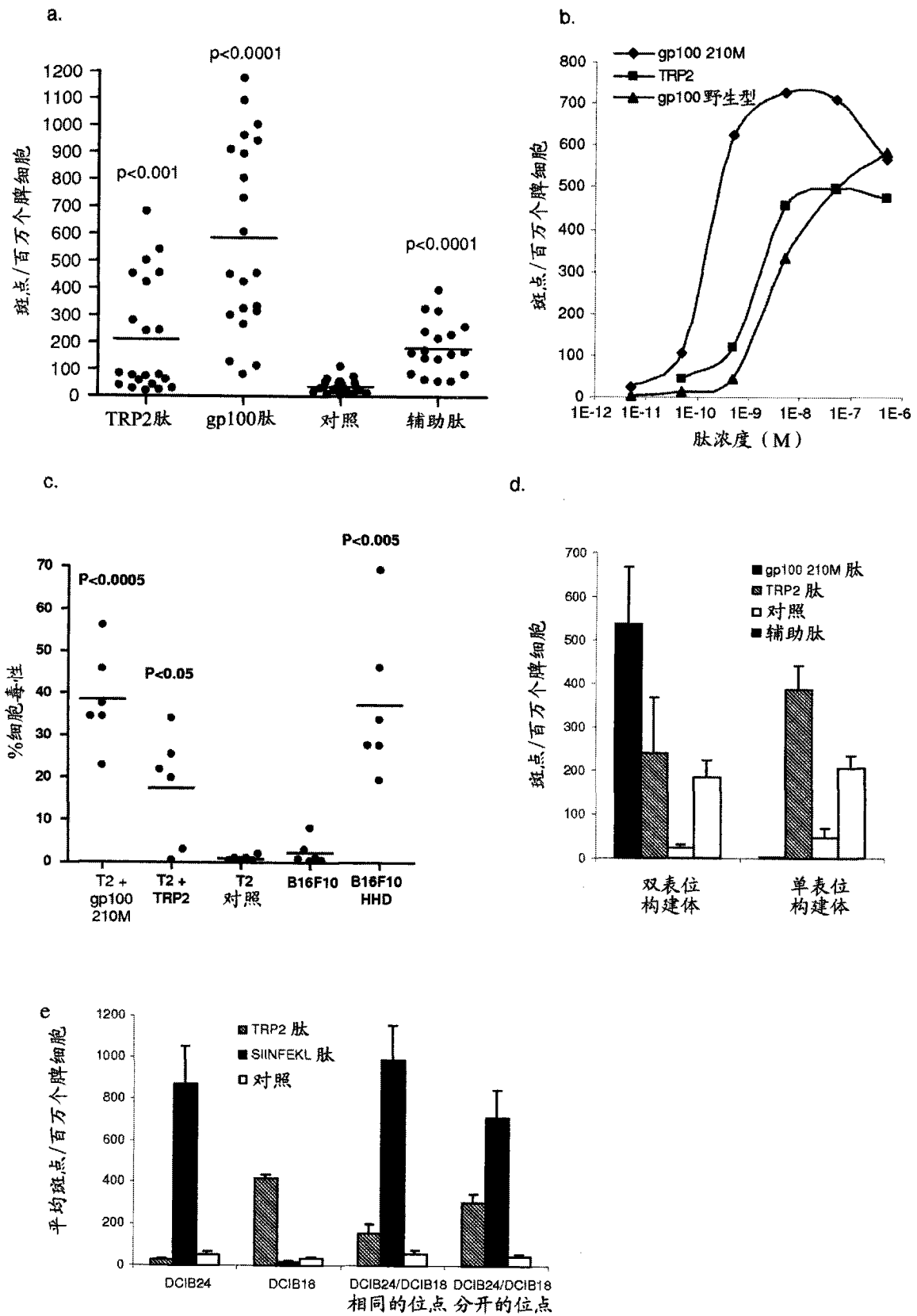


图 38

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I T D Q V P L S V W V R Q A P
 GGAGGCTTAAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTACCACTTACTGACCAGGTGCCTTTGTCCGTGTGGGTTCGGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F T I S
 GGGAAAGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCAATTCC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G
 AGAGACAATAGCAAGAACACCCCTGTATTGTCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 423

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCC ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
 CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGCACCTCCTCCAGCTTATAGACCACCAAAATGCCCTATCCTATGGTAT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
 CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTCCTGGGGTCCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
 TCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCCTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 39

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I T D Q V P I S V W V R Q A P
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAAATGTCCTGCAACCATTAAGTACCAGGTGCCTATCTCCGTGTGGGTTCCGCAGGCTCCG
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F T I S
GGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCC
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G
AGAGACAATAGCAAGAACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGT
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCAGGTACCCGTCTCCAGCGCT
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 423

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGCCTCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGTAT
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGG
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
TCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTCAATGTTCCGTGG
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
ACGTTCCGTTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 40

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I T D Q V P F S V W V R Q A P
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAAATGTCCTG**ACCATTACTGACCAGGTGCCTTTCCTCCGTCTGGGTTGGCAGGCTCCG**
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F T I S
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G
 AGAGACAATAGCAAGAACACCCTGTATTGTCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI

H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 423

轻可变

BanHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCC ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
 CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGG**ACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGTAT**
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
 CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
 TCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCGGTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 41

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I T D Q V P Y S V W V R Q A P
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAAATGTCCTGACCATTACTGACCAGGTGCCTTACTCCGTGTGGGTTCCGGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F T I S
 GGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCAATTTC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G
 AGAGACAATAGCAAGAACACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACACGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 423

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCC ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
 CTCCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGCCTCTCCAGCTTATAGACCACCAAAATGCCCTATCCTATGGTAT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGTCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
 TCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTTCAAGTTTCACATGTTCGGTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 42

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTTACCAIGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C **T I T D Q L P F S V** W V R Q A P
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGCACCATTAAGTACCAGCTGCCITTCCTCCGTGTTGGGTTCCGGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F T I S
 GGGAAAGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G
 AGAGACAATAGCAAGAACACCCCTGTATTTGCAATTGAACAGTGTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACACCGGTACCGTCTCC**AGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 423

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCAIGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C **T P P A Y R P P N A P I L W Y**
 CTCTCCCTGCCTGTCCTCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGCCTCTCCAGCTTATAGACCACCAAATGCCCTATCCTATGGTAT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
 CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
 TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTCAATGTTCCGTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

BsiWI
 T F G G G T K V E I K
 ACGTTCGGTGGAGGCCAAGGTGGAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 43

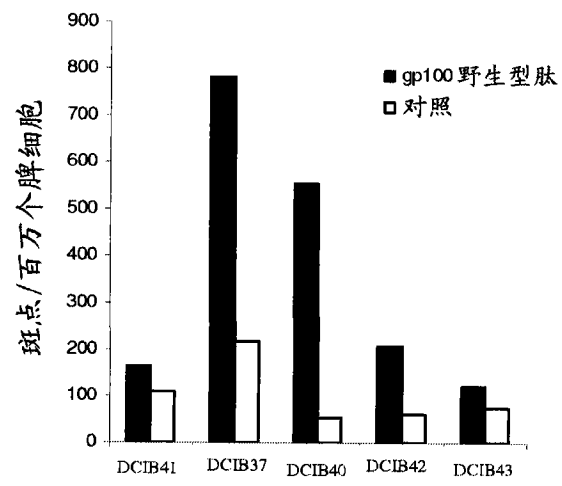


图 44

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I M D Q V P F S V W V R Q A P
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGTCCCTGAGAAATGCTCTGCAACCAATTATGGACCAGGTGCCTTTCTCCGTGTGGGTTCGGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W L R F T I S R D
 GGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTTTATGATTTTTTGTGTGGCTCCGATTACCAATTTCCAGAGAC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G H Y
 AATAGCAAGAACACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGGTCACTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI

V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACCACGGTCACCGTCTCC**CAGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 417

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C W N R Q L Y P E W T E A Q R L
 CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGCTGGAACAGGCAGCTGTATCCAGAGTGGACAGAAGCCAGAGACTT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GACTGGTATCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGATTCACT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

V P W T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 GTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 408

图 45

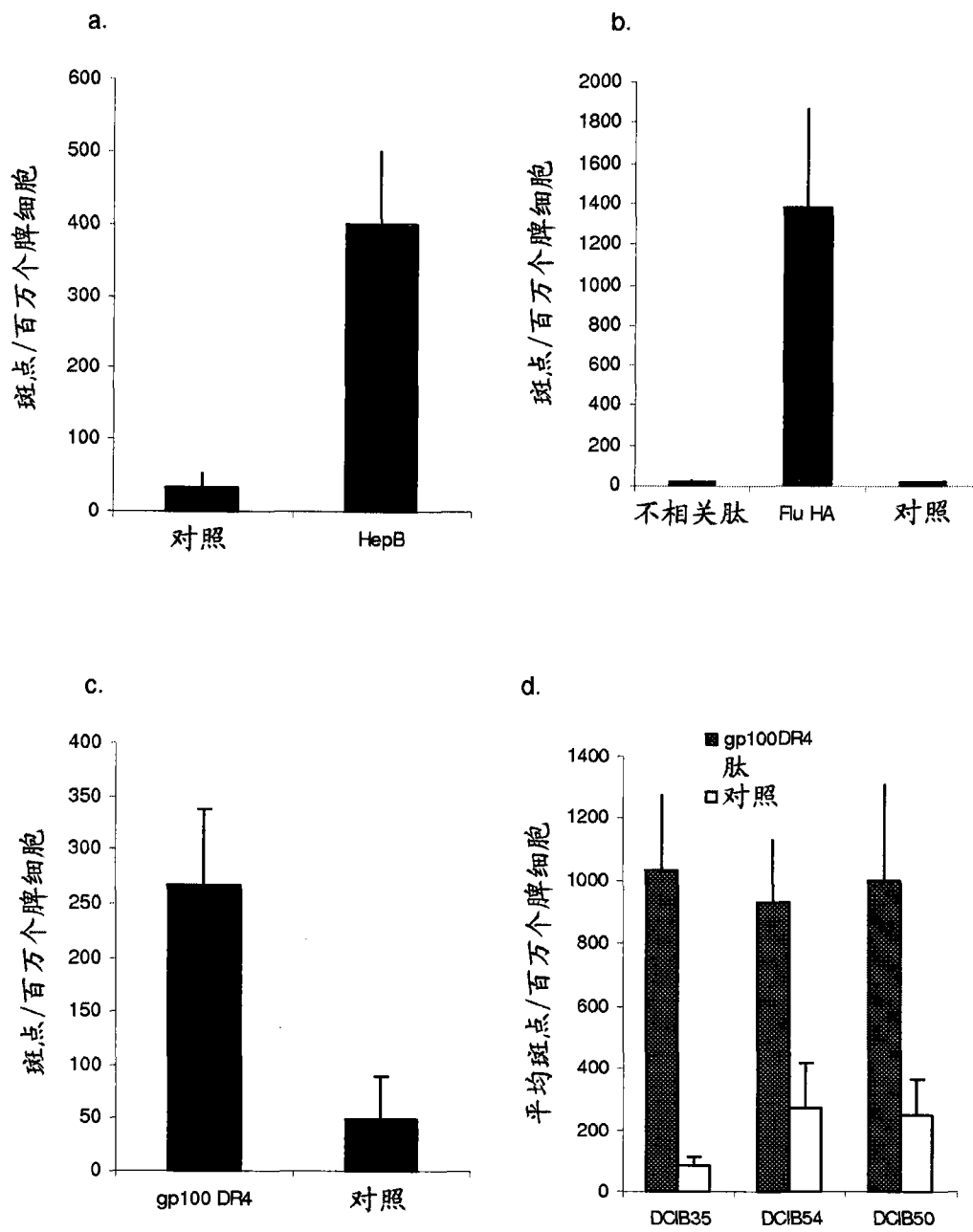


图 46

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I M D Q V P F S V W V R Q A P
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGTCCTGAGAATGTCTGTGACCATTATGGACAGGTGCCCTTCTCCGTGTGGGTTCCGGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W L R F T I S R D
 GGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTITATGATTTTTTTGTGTGGCTCGATTACCATTTCCAGAGAC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G H Y
 AATAGCAAGAACACCCGTGATTTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGGTCACTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI

V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACCACGGTCAACCGTCTCC**AGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 417

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCC ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
 CTCCTCCCTGCTGCTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C W N R Q L
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGATTACTGTGGAAACAGGCAGCTG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

Y P E W T E A Q R L D F G G G T K V E I K **BsiWI**
 TATCCAGAGTGGACAGAAGCCCAGAGACTTGACTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 429

图 47

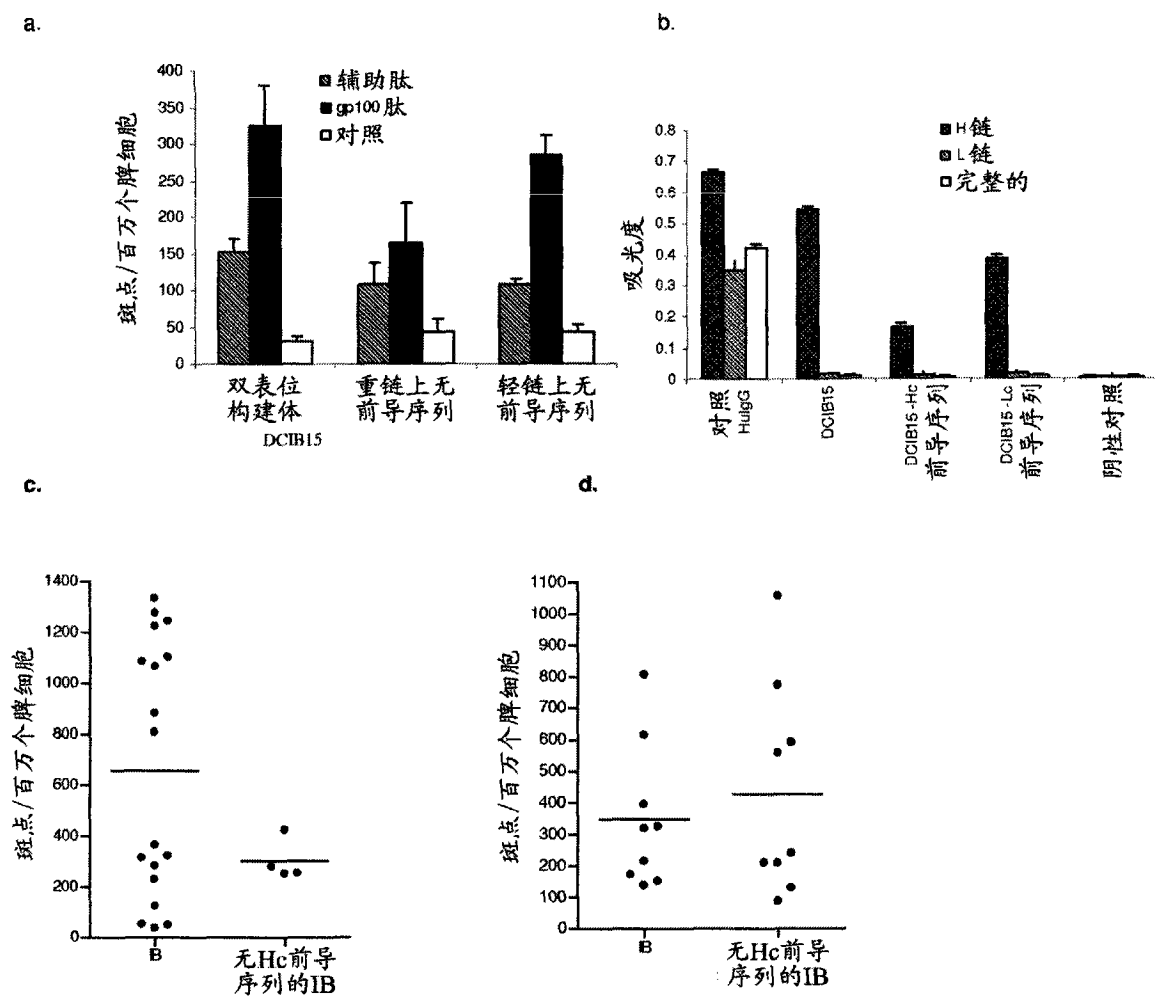


图 48

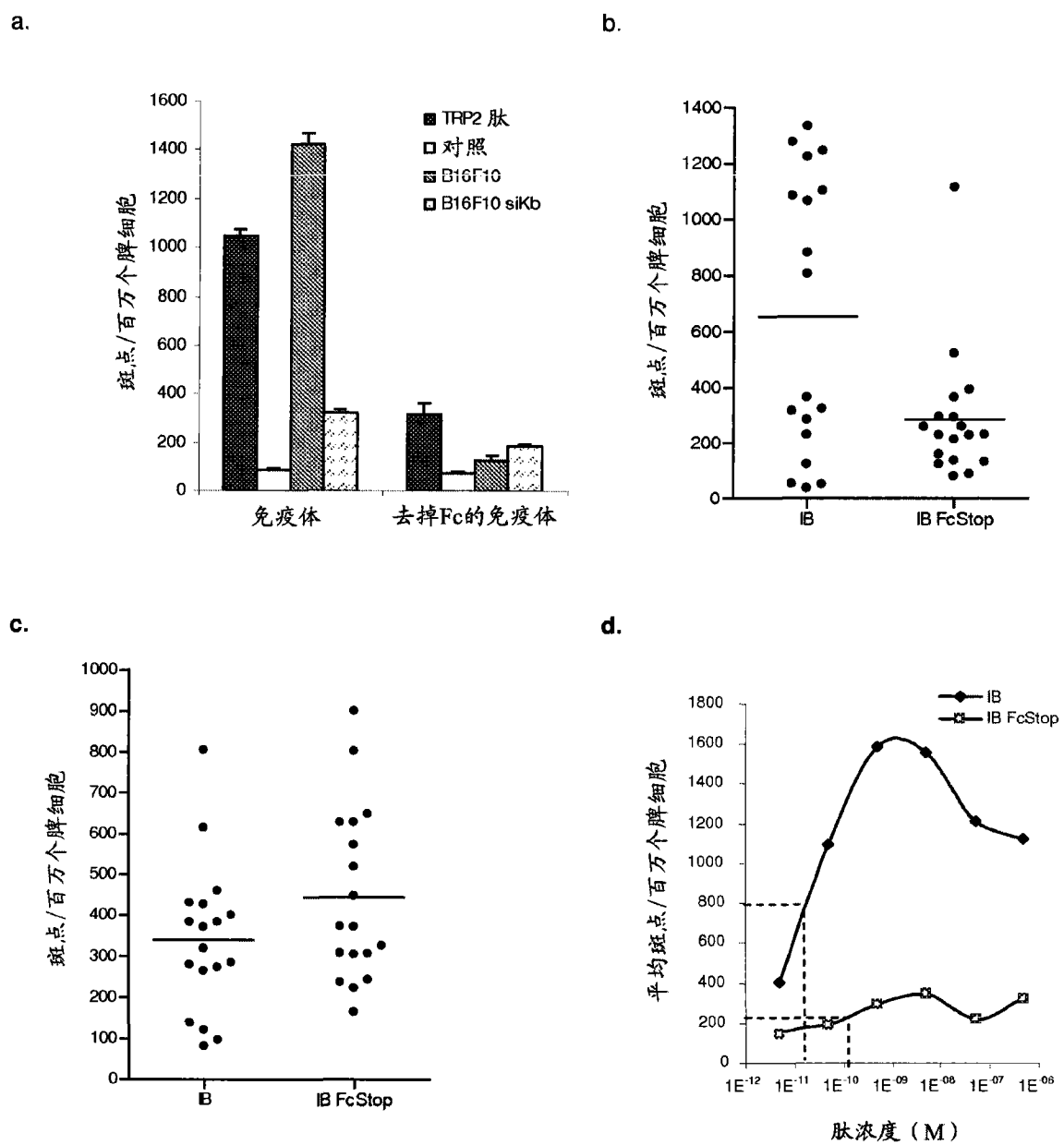


图 49

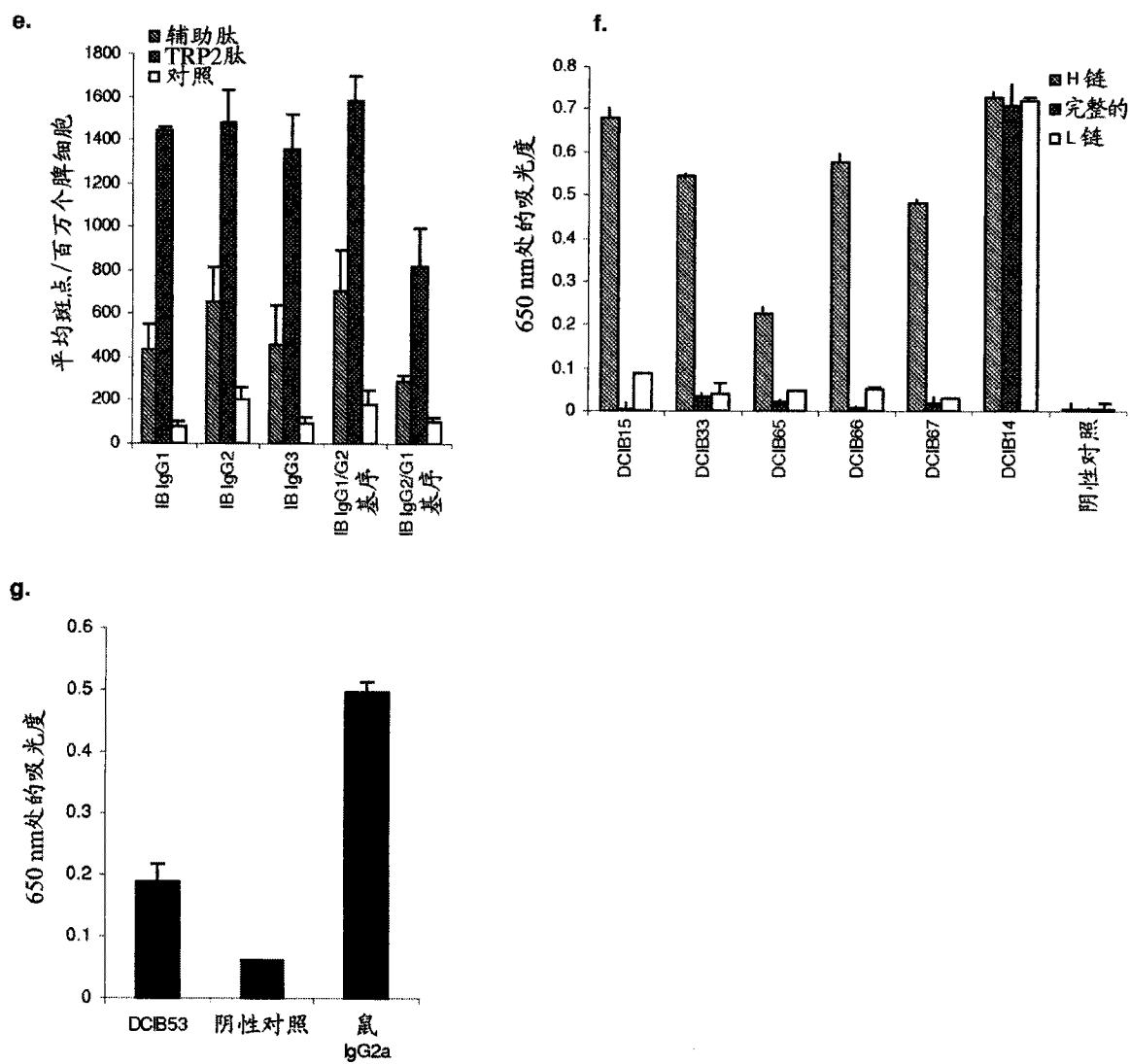


图 49 继续

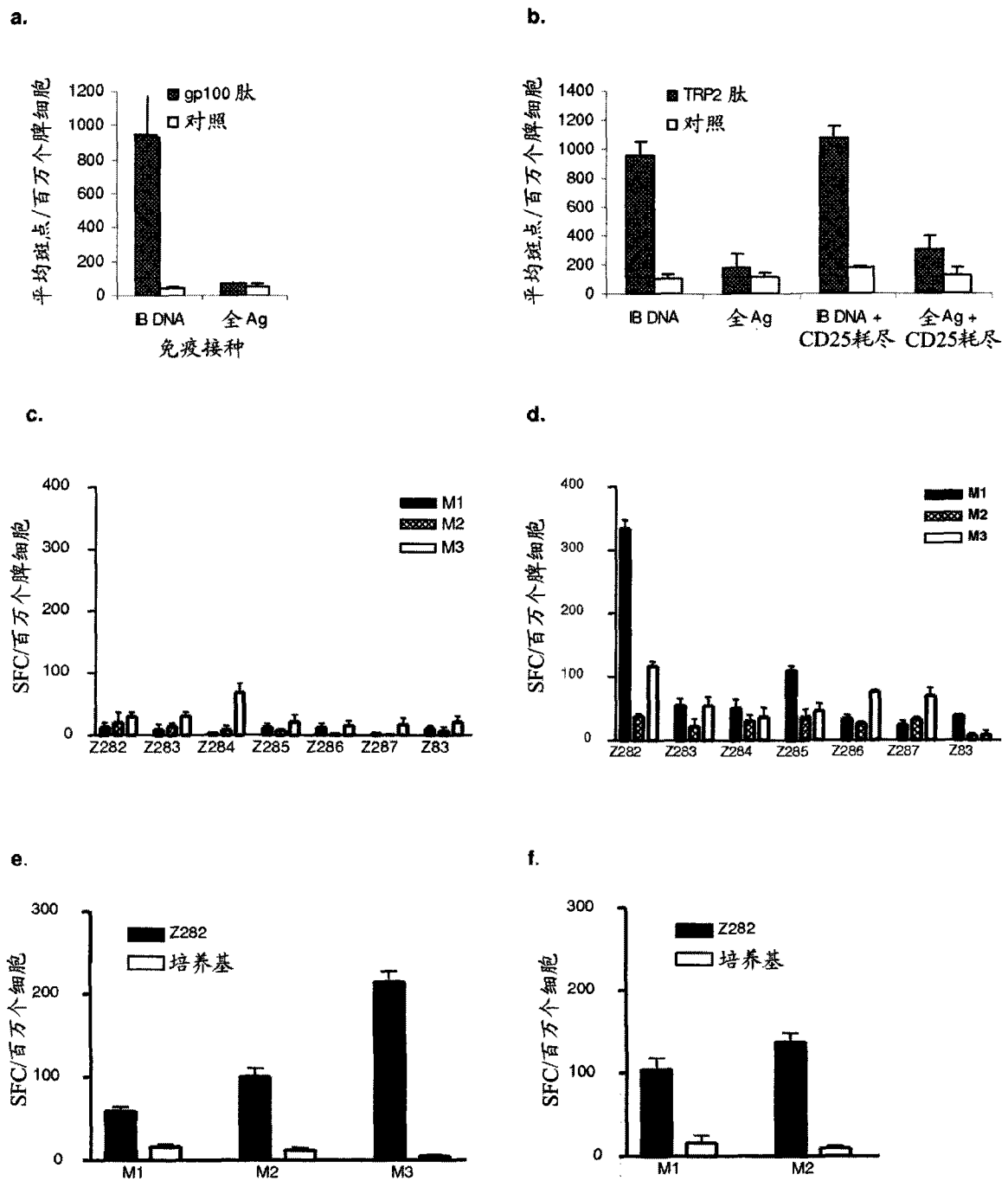


图 50

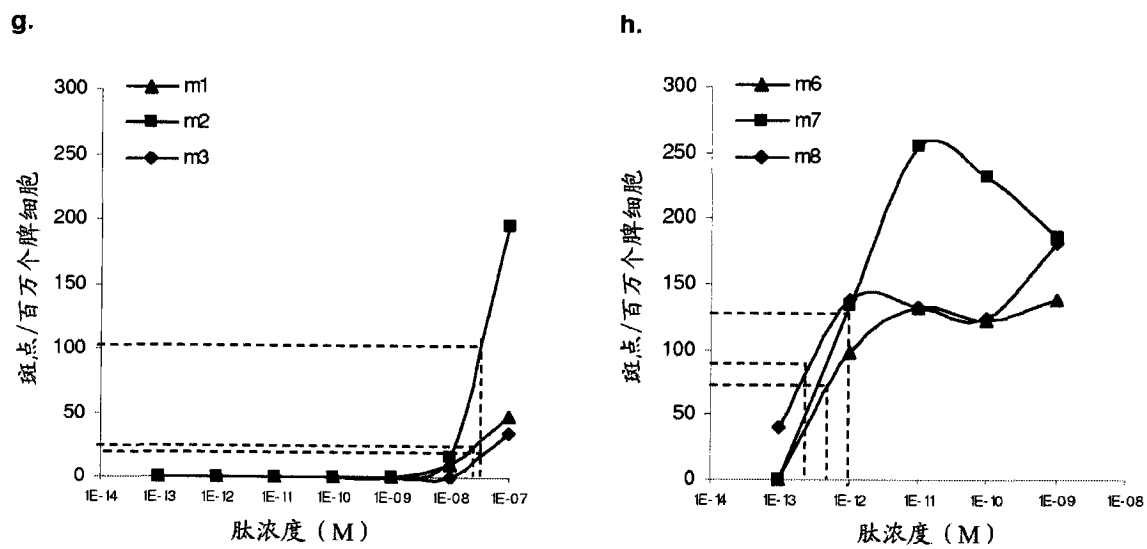


图 50 继续

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
 AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C I L I N S L P L V W V R Q A P G
 GGAGGCTTAAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGCACTCTTGATCAATCCCTACCTCTTGTATGGGTTCGGCAGGCTCCGGGG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

K G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F T I S R
 AAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCCAGA
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G H
 GACAATAGCAAGAACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGTCAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 TACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCAAGGTACCGTCTCCAGCGCT
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 420

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGTGATGACCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
 CTCCTCCCTGCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGGCACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAAAATGCCCTATCCTATGGTAT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
 CTGCAGAAACCAAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGA
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
 TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 51

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGAATGTCTGTGCAGCCTCTGGATTTCGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Q A P G K G L E W I A Y I G S G G I L I N S L P L V R F T I
 CAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATCTTGATCAATTCCCTACCTCTTGTACGATTACCAT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y
 TCCAGAGCAATAGCAAGAACACCCTGTATTTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

G H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 GGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGTCAAGGAACACGGTCAACGCTCTCC**AAGCGT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 426

AfeI

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCC ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
 CTCTCCCTGCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGC**ACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCCATCCTATGGTAT**
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTCTTCTGGGGTCCAGACAGATTAGTGGCAGTGGG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
 TCAGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAG**CGTACG**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图 52

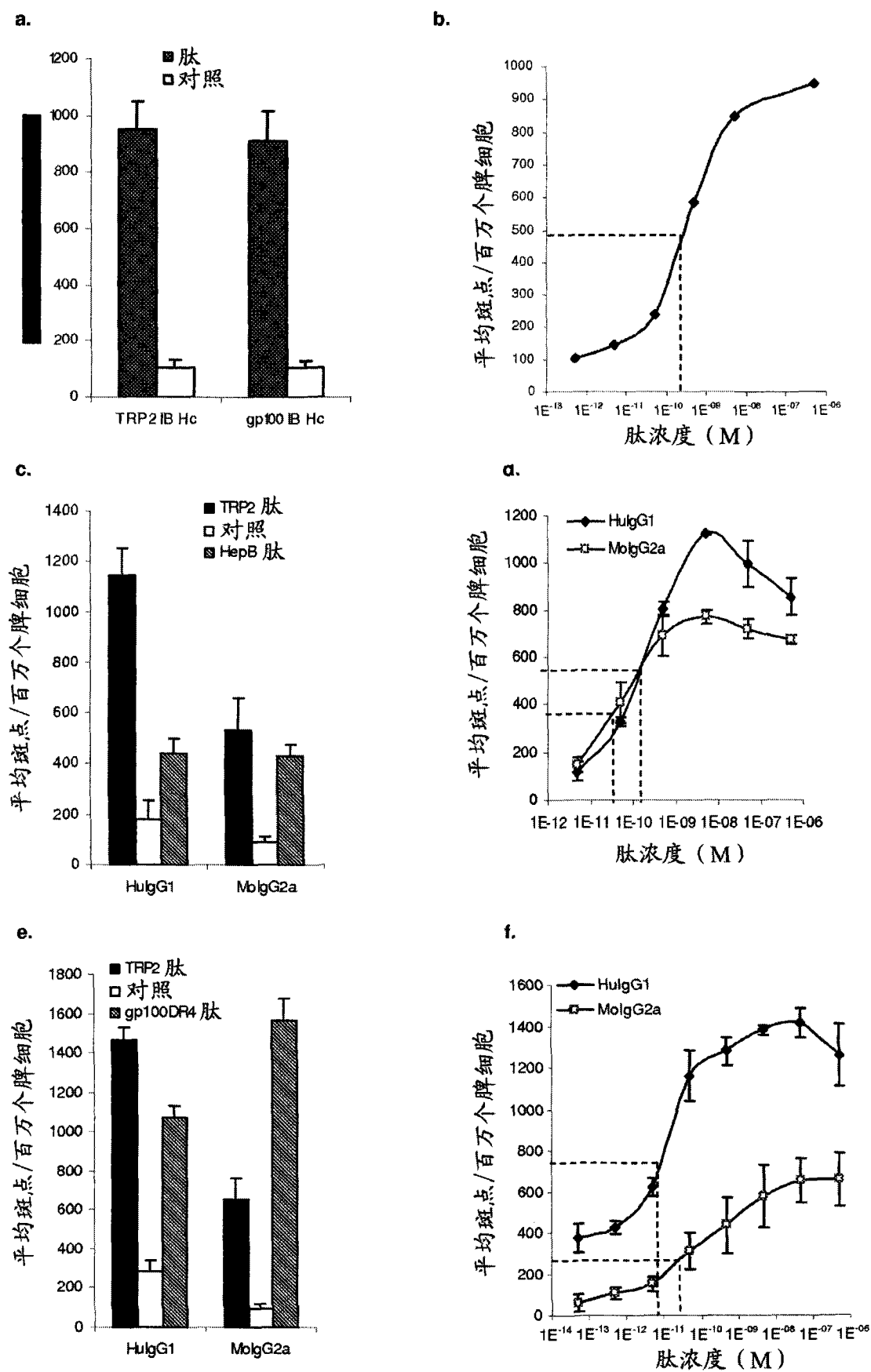


图 53

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G G
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGTTAGCAACAGCTACCCGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I M D Q V P F S V W V R Q A P
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGCCACCATTATGGACCAAGTGCCTTCTCCGCTCGGGTTCGGCAGGCTCCG
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W L R F T I S R D
GGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTITATGATTTTTTGTGTGGCTCCGATTACCACTTCCAGAGAC
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H Y G H Y
AATAGCAAGAACACCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGATTACTGTGCGAGACATTATGGTCACTAC
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI

V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S A K T T A P S V Y P L A
GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGTC AAGGTACCAGGTCACCGTCTCCAGCGCTAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGGC
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450

P V C G D T T G S S V T L G C L V K G Y F P E P V T L T W N
CCTGTGTGTGGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCTGGTCAAGGGTTATTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAAC
451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540

S G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T V T S
ICTGGTTCCTGTCCAGTGGTGTGACACCTTCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACCTCAGCAGCTCAGTACTGTAACCTCG
541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630

S T W P S Q S I T C N V A H P A S S T K V D K K I E P R G P
AGCACCTGGCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCAGAGGGGCC
631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720

T I K P C P P C K C P A P N L L G G P S V F I F P P K I K D
ACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCACTTCTCCCTCCAAGATCAAGGAT
721 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 810

V L M I S L S P I V T C V V V D V S E D D P D V Q I S W F V
GTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTG
811 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 900

N N V E V H T A Q T Q T H R E D Y N S T L R V V S A L P I Q
AACAACGTGGAAGTACACAGCTCAGACACAAACCATAGAGAGGATTACAACTACTCTCCGGTGGTCAGTGCCTCCCCATCCAG
901 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 990

H Q D W M S G K E F K C K V N N K D L P A P I E R T I S K P
CACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCGACGCCCATCGAGAGAACCATTCTCAAAACCC
991 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1080

K G S V R A P Q V Y V L P P P E E E M T K K Q V T L T C M V
AAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACCTGACCTGCATGGTC
1081 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1170

T D F M P E D I Y V E W T N N G K T E L N Y K N T E P V L D
ACAGACTTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCACTCCTGGAC
1171 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1260

S D G S Y F M Y S K L R V E K K N W V E R N S Y S C S V V H
TCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGAAAAAGAAGAACTGGGTGGAAGAABATAGCTACTCTCTGTCAGTGGTCCAC
1261 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1350

E G L H N H H T T K S F S R T P G K * **XbaI**
GAGGGTCTGCAATACCAACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAATGATCTAGA
1351 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1413

轻链

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCAATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P P A Y R P P N A P I L W Y
CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGGACTCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGTAT
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGITTCACACCGATTCTTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGA
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
TCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCCTGG
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L T
ACGTTCCGGTGGAGGCCACCAAGGTGGAATCAAGCGTGCAGATGCTGCACCAACTGTATCGATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACA
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450

S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V K W K I D G S E R Q
TCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAA
451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540

N G V L N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E Y
AATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTAT
541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630

E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S F N R N E C *
GAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCTACTTACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTGATCTC
631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720

XhoI
GAGTCTAGA
721 -----729

图 54 继续

重链

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
 AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGC
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C G T G R A M L G T H T M E V T V
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGCCGGACAGGCAGGGCAATGCTGGGCACACACACCATGGAAGTGACTGTCT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Y H W V R Q A P G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W
 TACCATTGGGTTCCGCAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTATGATTTTTTGTGTGG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

L R F T I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y
 CTCCGATTCAACCATTTCCAGAGACAATAGCAAGAACACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

C A R W N R Q L Y P E W T E A Q R L D W G Q G T T V T V S S
 TGTGCCCGATGGAACAGGCAGCTGTATCCAGAGTGGACAGAAGCCAGAGACTTGACTGGGGCCAAGGAACCCAGGTACCGTCTCCAGC
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450

A K T T A P S V Y P L A P V C G D T T G S S V T L G C L V K
 GCTAAACACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCTGTGTGTGGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAG
 451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540

G Y F P E P V T L T W N S G S L S S G V H T F P A V L Q S D
 GGITATITCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGTTCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCAGCTGAC
 541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630

L Y T L S S S V T V T S S T W P S Q S I T C N V A H P A S S
 CTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGACTGTAACTTCGAGCACCTGGCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCACCCGGGAAGCAGC
 631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720

T K V D K K I E P R G P T I K P C P P C K C P A P N L L G G
 ACCAAGTGGACAAGAAATTGAGCCAGAGGGCCCAACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGA
 721 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 810

P S V F I F P P K I K D V L M I S L S P I V T C V V V D V S
 CCATCCGTCTTCACTCTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGC
 811 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 900

E D D P D V Q I S W F V N N V E V H T A Q T Q T H R E D Y N
 GAGGATACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAAC
 901 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 990

S T L R V V S A L P I Q H Q D W M S G K E F K C K V N N K D
 AGTACTCTCCGGGTGGTCACTGCCCTCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGAC
 991 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1080

L P A P I E R T I S K P K G S V R A P Q V Y V L P P P E E E
 CTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAG
 1081 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1170

M T K K Q V T L T C M V I D F M P E D I Y V E W T N N G K T
 ATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCGTAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAACA
 1171 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1260

E L N Y K N T E P V L D S D G S Y F M Y S K L R V E K K N W
 GAGCTAAACTACAAGAACTGAACCACTGCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGG
 1261 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1350

V E R N S Y S C S V V H E G L H N H H T T K S F S R T P G K
 GTGGAAAGAAATAGCTACTCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAA
 1351 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1440

* **XbaI**
 TGATCTAGA
 1441 ----- 1449

图 55

轻链

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
 CTCTCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GAATGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTTCACAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

ClaI
 V P W T F G G G T K V E I K R A D A A P T V S I F P P S S E
 GTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTGCAGATGCTGCACCAACTGTATCGATCTTCCACCATTCCAGTGAG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450

HpaI
 Q L T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V K W K I D G S
 CAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGT
 451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540

E R Q N G V L N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T I T K
 GAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCAGCTTGACCAAG
 541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630

D E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S F N R N E
 GACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCTACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAG
 631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720

C * **XhoI**
 IGTTAGCTCGAGTCTAGA
 721 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 738

图 55 继续

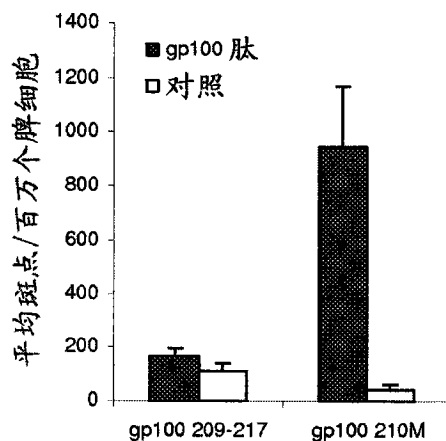


图 56

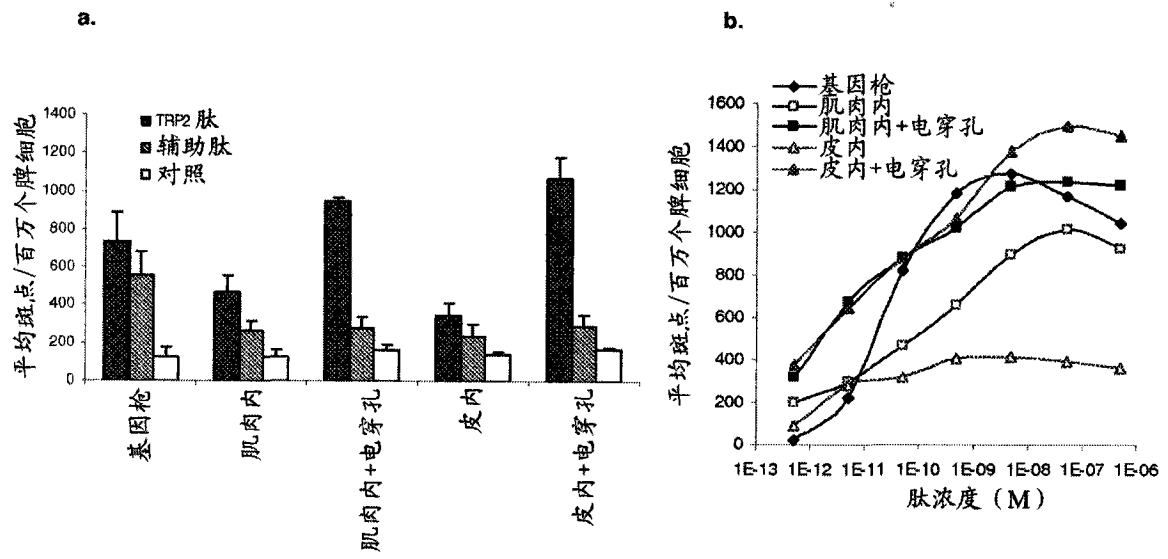
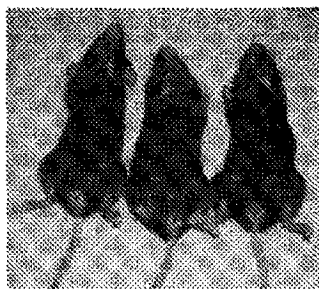
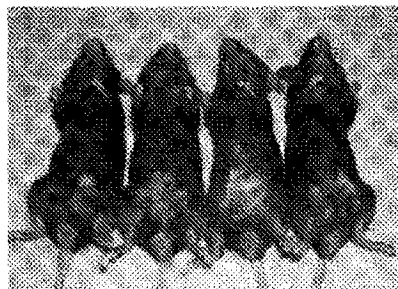


图 57

a.

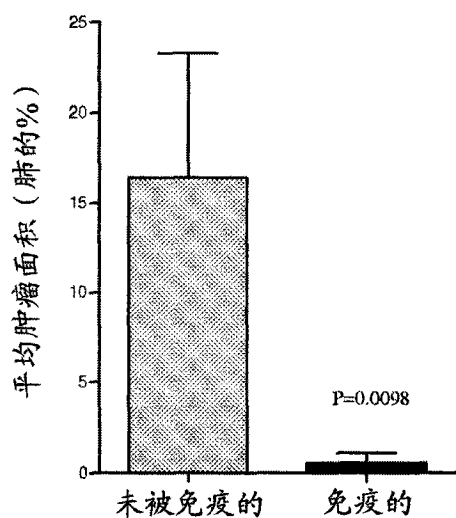


未被免疫的

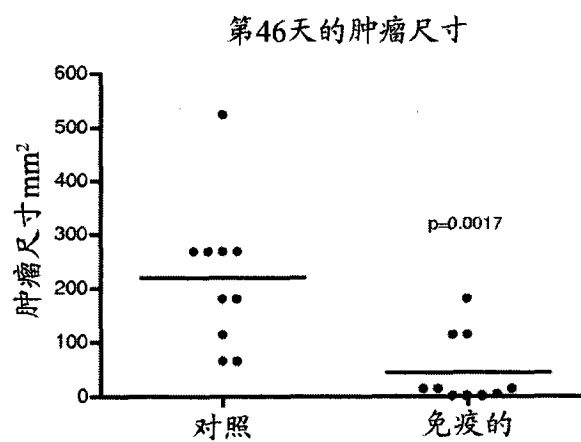


DCIB15 免疫的

b.



c.



d.

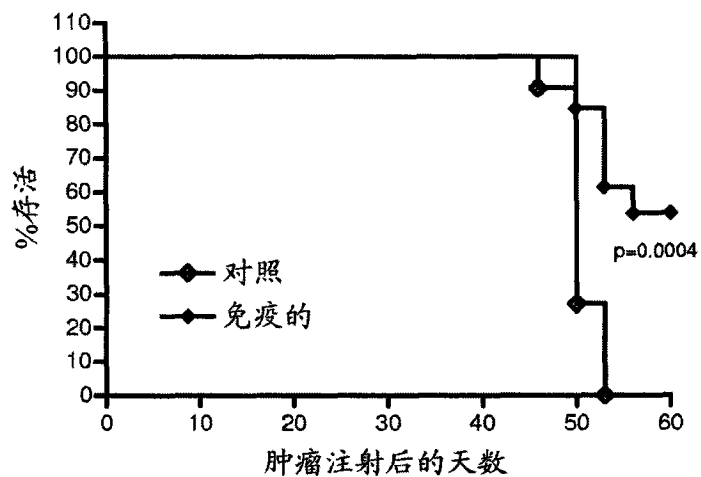


图 58

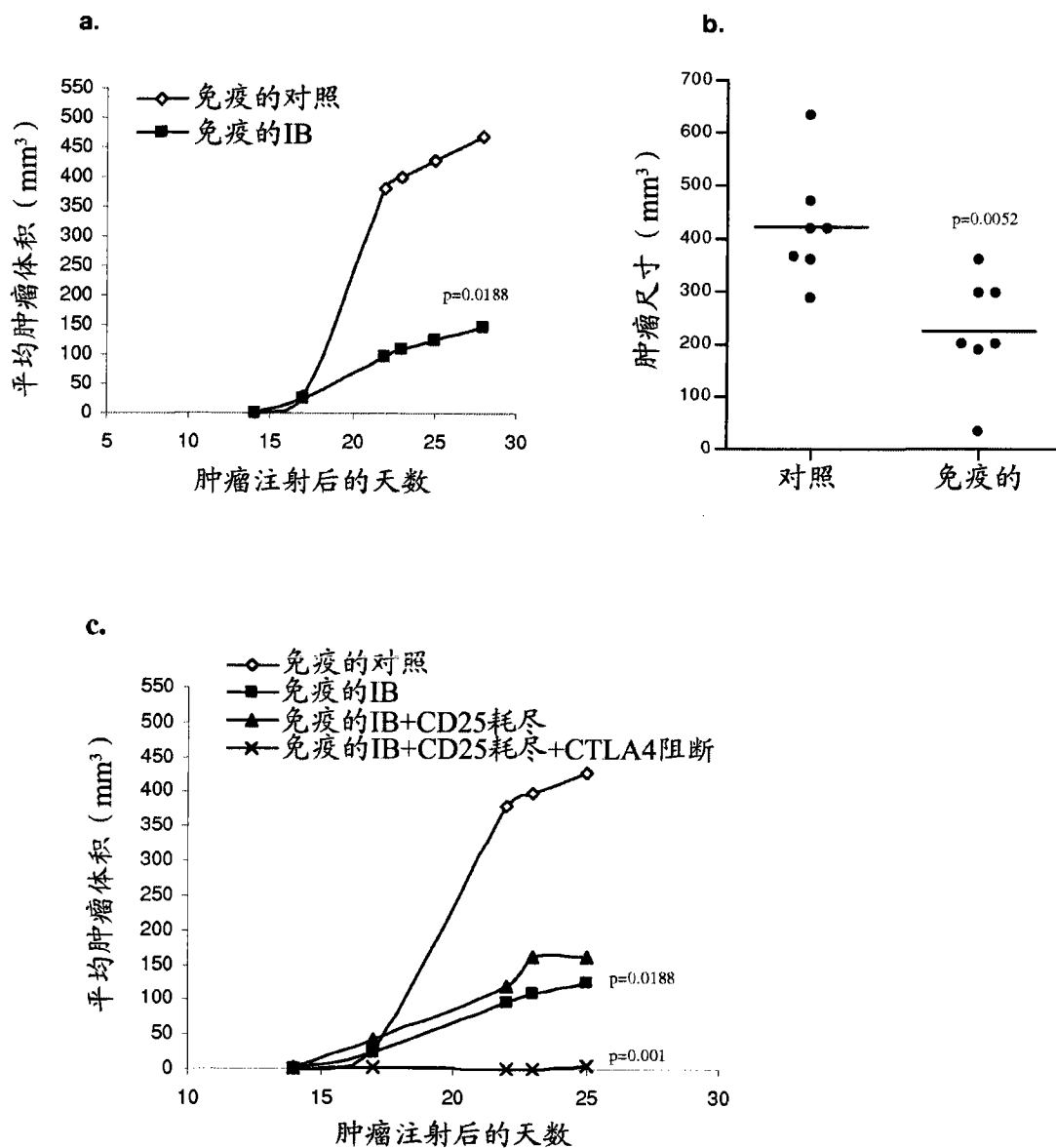


图 59

重可变

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C G T G R A M L G T H T M E V T V
 GGAGGCTTAAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGCGGGACAGGCAGGGCAATGCTGGGCACACACACCATGGAAGTAAGTGTG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Y H W V R Q A P G K G L E W I A Y I G S G G S V Y D F F V W
 TACCATTGGGTTCCGGCAGGCTCCGGGGAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTATTATGATTTTTTTTGTGTGG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

L R F T I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y
 CTCGGATTACCATTTCCAGAGACAATAGCAAGAACACCTGTATTTCGAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

C A R W N R Q L Y P E W T E A Q R L D W G Q G T T V T V S S
 TGTGCCCCATGGAACAGGCAGCTGTATCCAGAGTGGACAGAAGCCACAGAGACTTGACTGGGGCCAAGGTACCACGGTACCCGTCTCCAGC
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450

GCT
 451 --- 453

轻可变

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C W N R Q L Y P E W T E A Q R L
 CTCTCCCTGCCTGCTACTCCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGTGGAACAGGCAGCTGTATCCAGAGTGGACAGAAGCCACAGAGACTT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GACTGGTATCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G S G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C G T G R A
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCGGGACAGGCAGGGCA
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

M L G T H T M E V T V Y H F G G G T K V E I K **BsiWI**
 ATGCTGGGCACACACCATGGAAGTGACTGTCTACCAATTCGGTGAGGCCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 435

图 60

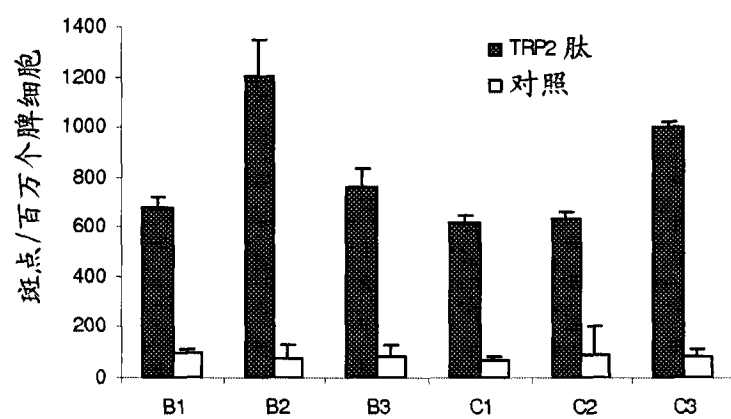


图 61