

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01817065. X

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/866 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 9 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1273191C

[51] Int. Cl. (续)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[22] 申请日 2001.8.10 [21] 申请号 01817065. X

[30] 优先权

[32] 2000. 8. 11 [33] US [31] 60/224,723

[32] 2000. 8. 11 [33] US [31] 60/224,722

[32] 2001. 3. 23 [33] US [31] 60/279,079

[86] 国际申请 PCT/US2001/025204 2001. 8. 10

[87] 国际公布 WO2002/013862 英 2002. 2. 21

[85] 进入国家阶段日期 2003. 4. 8

[71] 专利权人 法弗里尔公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 D·P·戈德 R·J·肖佩斯

审查员 王孟佳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 徐雁漪

权利要求书 4 页 说明书 58 页 附图 27 页

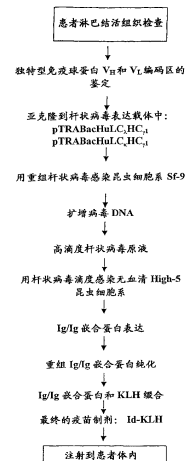
[54] 发明名称

用于改变 B 细胞介导病理的方法和组合物

[57] 摘要

本发明提供一种用于改变患者的 B 细胞介导病理的方法。该方法包括给予包含至少一种和/或两种嵌合蛋白质的组合物。每种嵌合蛋白质包含得自具有 B 细胞介导病理的患者的特定 B 细胞的免疫球蛋白分子的或者 V_H 区或者 V_L 区的至少一部分和免疫球蛋白恒定区。分离编码 V_H 区和/或 V_L 区的基因和编码免疫球蛋白恒定区的基因，将其插入到一种表达载体中。通过将所述表达载体导入昆虫细胞系中，生产所述嵌合蛋白质。用抗体亲和柱纯化所述嵌合蛋白质，然后将其与免疫原性载体匙孔蠍血蓝蛋白(KLH)化学缀合。由于所述缀合物包含从得自具有 B 细胞介导病理的患者的特定 B 细胞特异性制备的嵌合蛋白质，因此当将其单独地或者与细胞因子(例如粒细胞-巨噬细胞-CSF)或趋化因子一起给予这样的患者时，它可以诱导免疫应

答，改变这种 B 细胞介导的病理。



1. 嵌合蛋白在生产用于改变患者的非何杰金氏 B 细胞淋巴瘤的组合物中的应用，其中所述嵌合蛋白包含 V_H 区或 V_L 区的至少一部分和免疫球蛋白恒定区的至少一部分，并且其中所述 V_H 区或 V_L 区与来自具有所述非何杰金氏 B 细胞淋巴瘤的所述患者的 B 细胞克隆相关。

2. 依照权利要求 1 的应用，其中所述组合物还包含第二种嵌合蛋白，所述第二种嵌合蛋白包含 V_H 区或 V_L 区的至少一部分和第二种免疫球蛋白恒定区的至少一部分。

3. 依照权利要求 2 的应用，其中所述第一种嵌合蛋白的所述 V_H 区或 V_L 区包含 V_H 区，而所述第二种嵌合蛋白包含 V_L 区。

4. 依照任一前述权利要求的应用，其中所述 V_H 区或 V_L 区是完整的可变区。

5. 依照任一前述权利要求的应用，其中所述第一种或第二种免疫球蛋白的恒定区为：人 IgG_{γ_1} 恒定区、人 IgG_{γ_2} 恒定区、人 IgG_{γ_3} 恒定区、人 IgG_{γ_4} 恒定区、人 IgA_1 恒定区、人 IgA_2 恒定区、人 IgM 恒定区、人 IgD 恒定区、人 IgE 恒定区、人 κ 链恒定区或人 λ 链恒定区。

6. 依照任一前述权利要求的应用，其中所述组合物还包含与载体蛋白缀合的嵌合蛋白。

7. 依照权利要求 6 的应用，其中所述载体蛋白是匙孔瓣血蓝蛋白(KLH)。

8. 依照任一前述权利要求的应用，其中所述组合物用于与细胞因子或趋化因子一起共同给予。

9. 依照权利要求 8 的应用，其中所述细胞因子是粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

10. 依照权利要求 8 的应用，其中所述细胞因子是单核细胞趋化蛋白 3 (MCR 3)。

11. 依照任一前述权利要求的应用，其中所述组合物用于通过注射、吸入、口服或经皮给药来给予。

12. 依照任一前述权利要求的应用，其中所述嵌合蛋白通过包括下述步骤的方法生产：

5 从具有所述非何杰金氏 B 细胞淋巴瘤的所述患者的 B 细胞中分离出编码 V_H 区或 V_L 区的至少一部分的基因；

将编码所述 V_H 区或 V_L 区的所述基因和编码免疫球蛋白恒定区的至少一部分的基因插入到表达载体中，以允许所述第一种嵌合蛋白表达；

10 通过将所述表达载体导入昆虫细胞系中，生产所述嵌合蛋白；
并且

分离所述嵌合蛋白。

13. 权利要求 12 的应用，所述应用还包括下述步骤：将编码 V_H 区或 V_L 区的至少一部分的基因和编码第二种免疫球蛋白恒定区的至少一部分的基因插入到所述表达载体中，以允许所述第二种嵌合蛋白表达。

14. 依照权利要求 12 或 13 的应用，其中所述表达载体是一种杆状病毒表达载体。

15. 依照权利要求 14 的应用，其中所述杆状病毒表达载体包含蜜蜂蜂毒肽分泌信号序列和人胎盘碱性磷酸酶分泌信号序列。

16. 依照权利要求 15 的应用，其中所述杆状病毒表达载体还包含杆状病毒 AcNPV p10 启动子和 AcNPV 多角体蛋白启动子，其中所述 p10 启动子控制蜜蜂蜂毒肽分泌信号序列，并且其中所述多角体蛋白启动子控制人胎盘碱性磷酸酶分泌信号序列。

25 17. 依照权利要求 16 的应用，其中包含 V_H 区和第一种免疫球蛋白恒定区的嵌合蛋白的编码基因在所述杆状病毒表达载体中受所述 p10 启动子的控制，包含 V_L 区和第二种免疫球蛋白恒定区的嵌合蛋白的编码基因在所述杆状病毒表达载体中受多角体蛋白启动子的控

制。

18. 依照权利要求 16 的应用，其中编码所述 V_H 区或 V_L 区的所述基因和编码所述免疫球蛋白恒定区的所述基因在所述杆状病毒表达载体中或者受所述 p10 启动子的控制或者受所述多角体蛋白启动子的控制。

19. 依照权利要求 12 或 13 的应用，其中所述嵌合蛋白选自：包含所述 V_H 区和人 $IgG_{\gamma 1}$ 恒定区的蛋白；包含所述 V_L 区和人 κ 链恒定区的蛋白；和包含所述 V_L 区和人 λ 链恒定区的蛋白。

20. 依照权利要求 13 的应用，其中所述第一种和第二种嵌合蛋白包括：包含所述 V_H 区和人 $IgG_{\gamma 1}$ 恒定区的蛋白；和包含所述 V_L 区和人 κ 或 λ 链恒定区的蛋白。

21. 依照权利要求 12-20 中任一项的应用，其中所述昆虫细胞系是粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) (Hi-5) 或草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (sf9) 细胞系。

22. 依照权利要求 12-21 中任一项的应用，其中通过 ELISA 分析所述嵌合蛋白的表达。

23. 依照权利要求 12-22 中任一项的应用，其中所述嵌合蛋白用选自 A 蛋白、G 蛋白、L 蛋白和能够与免疫球蛋白结合结构域结合的其它蛋白的蛋白来分离。

24. 依照权利要求 23 的应用，其中所述能够结合免疫球蛋白结合结构域的其它蛋白是一种抗免疫球蛋白抗体。

25. 一种在任一前述权利要求中限定的用于改变患者的非何杰金斯氏 B 细胞淋巴瘤的组合物。

26. 依照权利要求 25 的组合物，其中所述免疫球蛋白恒定区是与所述 V_H 区有效连接的人 $IgG_{\gamma 1}$ 恒定区。

27. 依照权利要求 25 的组合物，其中所述免疫球蛋白恒定区是与所述 V_L 区有效连接的人 κ 或 λ 恒定区。

28. 依照权利要求 25 的组合物，所述组合物包含第一种嵌合蛋

白和第二种嵌合蛋白，其中 V_H 区与人 $IgG_{\gamma 1}$ 恒定区有效连接，而 V_L 区与人 κ 或 λ 恒定区有效连接。

29. 依照权利要求 25-28 中任一项的组合物，其中所述组合物是一种免疫原。

5 30. 一种杆状病毒表达载体，所述杆状病毒表达载体包含：(a) 与分泌信号序列和启动子有效连接的或者 κ 或者 λ 轻链恒定区编码基因的一部分，和 (b) 与分泌信号序列和启动子有效连接的 $IgG_{\gamma 1}$ 重链恒定区编码基因的一部分。

10 31. 依照权利要求 30 的杆状病毒表达载体，其中所述杆状病毒表达载体包含：(a) 编码 V_L 区一部分和 κ 轻链一部分的嵌合基因，所述 V_L 区一部分和 κ 轻链一部分都与分泌信号序列和启动子有效连接，或者编码 V_L 区一部分和 λ 轻链一部分的嵌合基因，所述 V_L 区一部分和 λ 轻链一部分都与分泌信号序列和启动子有效连接；和 (b) 编码 V_H 区一部分和 $IgG_{\gamma 1}$ 重链一部分的嵌合基因，所述 V_H 区一部分和 $IgG_{\gamma 1}$ 重链一部分都与分泌信号序列和启动子有效连接。

15 32. 依照权利要求 30 或 31 的杆状病毒表达载体，其中 (a) 的所述分泌信号序列是人胎盘碱性磷酸酶分泌信号序列，(a) 的所述启动子是多角体蛋白启动子，(b) 的所述分泌信号序列是蜜蜂蜂毒肽分泌信号序列，而 (b) 的所述启动子是 P10 启动子。

20 33. 一种载体，所述载体包含 SEQ ID NO:6、7、89、90 或 91 中所述的核酸序列。

用于改变 B 细胞介导病理的方法和组合物

5

相关申请

本申请要求题为“Method for producing an Idiotypic Vaccine (生产独特型疫苗的方法)”的美国临时申请第 60/224,723 号、题为“Expression Vectors for Production of Recombinant Immunoglobulin (用于生产重组免疫球蛋白的表达载体)”的美国临时申请第 60/224,722 号和题为“Method and Composition for Altering a B Cell Mediated Pathology (用于改变 B 细胞介导病理的方法和组合物)”的美国临时申请第 60/279,079 号的优先权。

15

发明领域

本发明总的来讲涉及免疫学和免疫治疗领域。更具体地讲，本发明涉及用于改变 B 细胞介导病理例如 B 细胞恶性肿瘤和/或自身免疫病的方法和组合物。

20

发明背景

25

免疫系统既产生抗体介导的应答，也产生细胞介导的应答。每种类型的免疫应答由淋巴细胞 B 细胞(对于抗体介导应答而言)和 T 细胞(对于细胞介导应答而言)中的一种类型来调控。B 细胞最初在抗原结合到 B 细胞表面的 IgM 和 IgD 分子上时识别所述抗原。每种 B 细胞克隆由于该克隆的单一独特型，仅识别特定的抗原。当识别所述抗原后，B 细胞将所述抗原内化并且加以加工，以供通过 MHC II 类分子呈递。B 细胞因此可以作为给 T 细胞的抗原呈递细胞(“APC”)起作用。当外源性蛋白质(抗原)的部分与主要组织相容性复合体分子(“MHC”)结合(通常在 APC 上)时(所述抗原在 APC 中被消化为片段，与自身 MHC 结合

呈递到所述 APC 表面), T 细胞与所述蛋白的部分结合。

5 几种类型的癌起源于循环系统。在主要类型中有: 白血病, 一种骨髓和血液肿瘤; 骨髓瘤, 一种 B 细胞癌; 和淋巴瘤, 一类起源于淋巴系统的癌。淋巴瘤可以进一步分为几类; 其中一类是非霍奇金 (Hodgkin) 淋巴瘤, 后者又构成一类多样化的癌。三大类的这些淋巴瘤依照用于肿瘤分类的 the International Working Formulation 被确定为低级、中级和高级, 它们在其可治愈性和攻击性方面有所不同(Cheson 等, “Report of an International Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin’s Lymphomas,” *J. Clin Oncol.* 17 (4):1244,1999)。总的来讲, 在美国这些淋巴瘤总起来说在癌症发生率和死亡率方面排第 10 五, 每年诊断出大约 50,000 个新病例。

在最近检查高级非霍奇金淋巴瘤(NHL)的 51 个病例分离物的一项研究中, 表明 43 个分离物来源于 B 细胞, 而 8 个分离物显示了来源于 T 细胞(Brown 等, *Histopathology* 14: 621-27, 1989)。因此, 特异性针对 15 病理 B 细胞的治疗在非霍奇金淋巴瘤和骨髓瘤治疗方面可能是有价值的。

最初在开发针对由恶性 B 细胞独特产生的抗原的、基于免疫学的疗法领域的尝试, 涉及工作量大的直接从病理 B 细胞中分离和纯化独特型(Id)蛋白。这种纯化的蛋白首先被用于治疗所述相关淋巴瘤的模型 20 系统中。证明了这种针对分离蛋白上独特型决定簇的主动免疫, 在小鼠模型系统中可以产对肿瘤生长的抗性(Daley 等, *J. Immunol.* 120(5): 1620-24, 1978; Sakato 等, *Microbiol. Immunol.* 23(9): 927-31, 1979)。这种抗肿瘤生长的现象后来在许多其它实验肿瘤模型中得到重现 (Stevenson 等, *J. Immunol.* 130(2): 970-03, 1983; George 等, *J. Immunol.* 25 141(6): 2168-74, 1988; Kwak 等, *Blood* 76(11): 2411-17, 1990)。

在将这种理念和技术带进临床的最初的尝试中, 工作量非常大, 并且利用针对在活组织检查后从患者的单个淋巴瘤中分离的蛋白产生的小鼠单克隆抗体。Meeker 及其同事产生了小鼠抗独特型单克隆抗

体，用于治疗其中大多数已经经历了常规的淋巴瘤治疗的 11 位患者 (Meeker 等, *Blood* 65: 1349-63, 1985)。在大约一半的患者中获得阳性结果，其中一个病例明显缓解。然而，在某些患者中，所述淋巴瘤细胞通过转换细胞表面表达的抗体的类别而产生对所述抗体的抗性 (Meeker 等, *N Engl J Med.* 312: 1658-65, 1985)。

B 细胞淋巴瘤克隆产生对抗独特型抗体的抗性的另一种途径，是通过 CDR2 区中的体细胞突变 (Cleary 等, *Cell* 44: 97-106, 1986)，从而避免被识别。尽管这种被动免疫疗法的优点是它仅需要从患者体内分离和纯化相对少量的独特型蛋白，以供在小鼠中产生免疫应答，但用针对独特型的单克隆抗体治疗淋巴瘤的实用性有限。然而，在缺乏坚定而方便的方法产生大量的独特型蛋白时，这可能证明是利用免疫系统直接攻击所述独特型 B 细胞淋巴瘤的能力的唯一实用的方法。

Kwak 等采取一种不同的方法，尝试用从患者自身的独特淋巴瘤纯化的蛋白主动免疫所述患者，尽管在逻辑上需要分离大量的独特型蛋白 (Kwak 等, *N. Engl. J. Med.* 327: 1209-15, 1992)。在化疗后有极少疾病或无病的患者通过接种自体独特型蛋白来治疗。为了获得足量的独特型蛋白进行接种，将通过活检获得的淋巴瘤细胞与已建立的细胞系融合，以促进它们在组织培养物中生长，然后通过色谱纯化所述分泌的独特型蛋白。由于需要极大的工作量、技术障碍和过高的费用，阻碍了这种免疫法的大规模应用。另外，最近引起了对于与用哺乳动物细胞生产蛋白相关的病毒负载的关注。

在以下的论文中，Hsu 等报道了上述利用接种与匙孔蛾血蓝蛋白 (KLH) 缀合的所述独特型来治疗 B 细胞淋巴瘤 I/II 期临床试验 (Hsu 等, *Blood* 89: 3129-35, 1997)。在标准化疗后，给患有顽固性非霍奇金 B 细胞淋巴瘤的 41 位患者接种肿瘤特异性独特型。依照 Kwak 等 (1992) 所述 (参见上文)，通过色谱纯化用患者的杂交瘤产生的蛋白，获得所述肿瘤特异性独特型抗原。因此，这些蛋白由得自患者淋巴瘤的患者自身免疫球蛋白的完整可变区和恒定区构成。结果显示，抗独特型应答

的产生与改善的临床结果相关。与没有建立免疫应答的那些患者相比，建立抗独特型细胞免疫应答的所有患者的无疾病发展的持续时间和总体存活时间显著延长。这项研究证明，B 细胞淋巴瘤患者可以被诱导产生针对肿瘤独特型(Id)蛋白的特异性免疫应答。此外，产生抗独特型免疫应答的能力与更加有利的临床结果相关。然而，为了治疗每位患者，必需将通过活检获得的淋巴瘤细胞与已建立的细胞系融合，以便允许生产足够的蛋白来接种一位典型的患者。这种方法对于商业规模的应用而言可能是困难的，或者是不切实际的。

最近，Bendandi 等证明在滤泡性淋巴瘤患者中患者特异性独特型接种诱发的缓解(Bendandi 等, *Nat. Med.* 5: 1171-77, 1999)。在标准化疗后，表现出完全临床缓解的 20 位患者用患者特异性独特型蛋白以及粒细胞-单核细胞集落刺激因子(GM-CSF; 参见下文)接种。在化疗之前、临床缓解时和接种治疗之后，进行这种淋巴瘤特征性转移的分子分析。发现在化疗诱导的缓解后可检测转移的 11 位患者中的 8 位，在这一接种后经历完全的分子缓解。在 20 位患者中的 19 位中，发现肿瘤特异性细胞毒性 CD8⁺和 CD4⁺ T 细胞。也检测出肿瘤特异性抗体，但发现不是缓解所需的。再者，这项研究使用由发现与患者淋巴瘤相关并且通过异种杂交瘤融合产生的免疫球蛋白的完整可变区和恒定区构成的独特型蛋白。

因此，将免疫应答靶向独特型的细胞是一种有前景的方法，但是上述技术由于要求生产足量的得自每位患者淋巴瘤细胞的独特型蛋白而受到限制。

针对 B 细胞肿瘤的抗独特型免疫的概念也已经应用于多发性骨髓瘤的病例。Kwak 及其同事报道了关于通过用从患者分离的骨髓瘤 IgG 预免疫供者，增强同种骨髓移植物的特异性功效方面的应用结果(Kwak 等, *Lancet* 345(8956): 1016-20, 1995)。此外，Massaia 及其同事为高剂量化疗后缓解的患者进行了接种，然后进行外周血干细胞移植(Massaia 等, *Blood* 94: 673-83, 1999)。

以上在 Bendandi 等的研究中所使用的粒细胞-单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)是一种造血生长因子, 它刺激造血祖细胞增殖和分化。这种细胞因子通过增加 T 细胞增殖(Santoli 等, *J. Immunol.* 141 (2): 519-26, 1988)、增加粒细胞和单核细胞上粘着分子的表达(Young 等, *J. Immunol.* 145(2): 607-15, 1990; Grabstein 等, *Science* 232(4749): 506-08, 1986)以及增加抗原呈递(Morrissey 等, *J. Immunol.* 139(4): 1113-9, 1987; Heufler 等, *J. Exp. Med.* 167(2): 700-05, 1988; Smith 等, *J. Immunol.* 144(5): 1777-82, 1990), 也在使细胞免疫定型方面起作用。

已经表明, 经过遗传工程改造以产生 GM-CSF 的基于细胞的疫苗在临床前模型中诱导能够消除系统性淋巴瘤的细胞免疫应答。这一效应仅通过激活免疫系统的细胞分支来介导(Levitsky 等, *J. Immunol.* 156(10): 3858-65, 1996)。同样, 已经表明低剂量的游离 GM-CSF 增强由独特型蛋白-KLH 免疫诱发的保护性抗肿瘤免疫, 因为它能够通过 CD8 细胞的作用而增强免疫(Kwak 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(20): 10972-77, 1996)。在一项研究中, 表明 GM-CSF 在模型系统中测试的免疫调节剂中是产生抗肿瘤免疫的最佳免疫调节剂(Dranoff, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(8): 3539-43, 1993.)。

GM-CSF 也已经用作在模型系统中用来产生免疫应答的嵌合蛋白的一部分。Chen 和 Levy (Chen 和 Levy, *J. Immunol.* 154(7): 3105-17, 1995; 美国专利第 6,099,846 号)对用嵌合蛋白生产小鼠单克隆抗体进行了研究, 所述嵌合蛋白含有 GM-CSF 的一部分加上感兴趣抗原的一部分(即得自鼠 B 细胞肿瘤 38C13 的独特型区), 这两个部分都与免疫球蛋白链的部分融合。Chen 及其同事也研究了其中所述 GM-CSF 部分被 IL-2 或 IL-4 的部分取代的融合蛋白(Chen 等, *J. Immunol.* 153(10): 4775-87, 1994)。关于需要包括所述 GM-CSF 部分(或白介素部分)的一种解释是增强了哺乳动物细胞表达系统生产的低水平嵌合蛋白的效应。然而, 尚未证明应用与嵌合蛋白共同给予的纯化 GM-CSF 可增强疫苗接种的免疫应答。

随着重组 DNA 技术的出现, 现在可以利用聚合酶链式反应 (PCR), 从杂交瘤或者从组合文库中克隆重链和轻链 cDNA 分子。这种重组 DNA 技术使研究人员可以控制效应子功能或所选单克隆抗体的结合功能。另外, 通过克隆大量的 V_L 和 V_H 基因, 将其随机分类, 产生具有不同结合特异性的文库, 使其在大肠杆菌中表达, 然后筛选所述随机文库中具有所需结合亲和性的克隆, 可以产生免疫球蛋白的组合文库(Huse 等, *Science* 246(4935):1275-81, 1989)。应用这种重组方法, 从在大肠杆菌中表达的随机组合文库中克隆了对破伤风类毒素具有高亲和性和特异性的人抗体(Mullinax 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87(20): 8095-99, 1990)。用聚合酶链式反应(PCR)和特异性引物, 将所述免疫球蛋白基因从活化 B 细胞克隆到噬菌体载体中。将 H 链和 L 链随机组合, 然后在大肠杆菌中共表达, 构成一个有 10^7 成员的文库。用 ^{125}I -破伤风类毒素筛选这种组合文库, 0.2%的克隆表现出结合活性(Mullinax 等, 参见上文)。另外, 用相似的方法也鉴定出鼠单克隆抗体(Huse 等, 参见上文; Caton 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87(16): 6450-54, 1990)。Winter 及其同事用质粒载体通过聚合酶链式反应克隆了多个免疫球蛋白结构域, 以供在细菌中表达用(Orlandi 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(10): 3833-37, 1989)。

新开发的大肠杆菌抗体克隆系统对于鉴定编码所需结合特异性的基因是非常有用的。然而, 用大肠杆菌生产的抗体一般不可用于治疗应用。通常, 在细菌中仅可以以分泌型产物生产抗体的抗原结合片段 - Fab 或 Fv。在用大肠杆菌生产完整链的四聚体 IgG 时, 在极少情况下, C_{H2} 结构域不被糖基化。非糖基化抗体缺乏抗体引导的细胞毒性 (ADCC) 和补体激活的溶细胞活性, 而这些使被动免疫治疗如此有功效。哺乳动物表达系统产生糖基化抗体, 因此绕过细菌系统的这种限制。然而, 最近 FDA CBER 部门的“Points to Consider”的修改明确地表明他们对与用哺乳动物细胞生产的单克隆抗体相关的病毒负载的担心。此外, 预期用哺乳动物表达系统生产的任何工程抗体都将是相

当昂贵的(每剂\$1500-\$5000)。因而非常需要绕过当前哺乳动物系统和细菌系统所遇到的难题的替代的表达系统。

5 杆状病毒表达系统是用大肠杆菌和哺乳动物细胞生产抗体的一种有吸引力的替代方法。用杆状病毒系统表达重组蛋白在过去数年中已经得到证明, 并且已经作为在真核细胞中高产地生产(1-100 mg/L)生物活性蛋白的良好选择。杆状病毒/昆虫细胞系统也绕过了当重组蛋白在原核生物中过量表达时通常遇到的溶解性问题。另外, 昆虫细胞含有在原核生物中不存在的负责正确折叠、二硫键形成、糖基化、 β -羟基化、脂肪酸酰化、异戊烯基化、磷酸化和酰胺化的真核翻译后修饰机器。最近证明了用杆状病毒表达系统生产识别人结肠直肠癌细胞的功能性糖基化单克隆抗体(Nesbit, *J. Immunol. Methods* 151: 201-208, 10 1992)。另外, 在杆状病毒细胞中也证明了重组 IgA 的表达, 这种 IgA 被正确装配为重链/轻链异二聚体, 被 N-糖基化并且是分泌型的(Carayannopoulos 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 8348-52, 1994, PCT 公布号 WO 98/30577, 美国专利第 6,063,905 号)。然而, 尚未证明应用杆状病毒表达用作免疫治疗药来改变 B 细胞病理(例如 B 细胞恶性肿瘤和自身免疫病)的嵌合独特型蛋白。

发明概述

20 本发明提供一种改变患者的 B 细胞介导病理的方法。该方法包括给予一种含有至少一种嵌合蛋白的组合物, 所述嵌合蛋白具有免疫球蛋白可变区 V_H 或 V_L 区的至少一部分和免疫球蛋白恒定区的至少一部分。在该组合物中使用的 V_H 或 V_L 区与来自具有 B 细胞介导病理的患者的 B 细胞所产生的特定免疫球蛋白相关。在将这样的组合物给予患者后, 该患者的 B 细胞介导病理得到改变。

25 本发明也提供通过给予含有两种不同嵌合蛋白的组合物来改变患者的 B 细胞介导病理的方法。每种嵌合蛋白具有与免疫球蛋白恒定区的至少一部分连接的免疫球蛋白链 V_H 和/或 V_L 区的至少一部分。作

为所述嵌合蛋白部分的 V_H 和/或 V_L 区与来自具有 B 细胞介导病理的患者的 B 细胞的特定免疫球蛋白相关。

5 含有患者来源的特有 V_H 和/或 V_L 链的特异性免疫球蛋白链可以被开发成为治疗组合物。它们对于患有各种各样的 B 细胞恶性肿瘤或自身免疫病的患者将具有治疗价值。在可以治疗的主要类型的癌症中有白血病、骨髓瘤和淋巴瘤；在所述淋巴瘤中有非霍奇金淋巴瘤。作为本发明治疗价值的一个实例，已经用来源于 B 细胞淋巴瘤的抗原治疗患者。

10 可以用可疑的自身抗原来亲和纯化参与自身免疫病的 B 细胞，所述自身免疫病例如多发性硬化(MS) (Warren 和 Catz, *Mult. Scler.* 6(5): 300-11, 2000)、系统性红斑狼疮(SLE) (Zhang, J.等, *J. Immunol.* 166(1): 6-10, 2001; Odendahl, M.等, *J. Immunol.* 165(10): 5970-79, 2000)、抗 Hu 相关性副肿瘤性神经病综合征(Rauer, S.和 Kaiser, R., *J. Neuroimmunol.* 111(1-2): 241-44, 2000); 和自身免疫性肝炎(AIH) (Ogawa, S.等, *J. Gastroenterol. Hepatol*(1): 69-75, 2000)。可能涉及 B 细胞的其它自身免疫病包括类风湿性关节炎(RA)、重症肌无力(MG)、自身免疫性甲状腺炎(桥本甲状腺炎)、自身免疫性眼色素层视网膜炎(uveoretinitis)、多肌炎、硬皮病和某些类型的糖尿病。在纯化少量致病性 B 细胞后，可以采用本发明中所述方法，通过 PCR 克隆由这些细胞表达的免疫球蛋白的可变区部分。一旦克隆出所述部分，则可以用具体参与所述 B 细胞病理的免疫球蛋白链的 V_H 和/或 V_L 部分，来制备可以在本文所述的杆状病毒系统中表达的嵌合蛋白。

25 用于上述组合物和嵌合蛋白中的免疫球蛋白恒定区可以来自 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂、IgM、IgD、IgE 重链以及 κ 或 λ 轻链或其部分。在某些实施方案中，所述嵌合蛋白仅含有免疫球蛋白结构域 V_H 和/或 V_L 区中的任一个和免疫球蛋白恒定区。嵌合蛋白的实例包括 V_H -IgG_{γ1}、 V_L - κ 和 V_L - λ 。在另一实施方案中，所述组合物含有两种嵌合蛋白，每种嵌合蛋白分别含有一个 V_H 和 V_L 区与一个免疫球

蛋白恒定区。实例包括 V_H -IgG $_{\gamma 1}$ 和 V_L - κ 、以及 V_H -IgG $_{\gamma 1}$ 和 V_L - λ 。

本发明也提供一种用重组 DNA 技术和一种表达系统生产嵌合蛋白的方法。该方法包括以下步骤：(a)从具有 B 细胞介导病理的患者的 B 细胞中分离出编码免疫球蛋白链的 V_H 或 V_L 区的基因，(b)将编码所述免疫球蛋白链 V_H 或 V_L 区的所述分离的基因和编码所述免疫球蛋白恒定区的基因插入到表达载体中，以允许嵌合蛋白表达，(c)通过将所述表达载体导入昆虫细胞系中并让其表达，生产所述嵌合蛋白，并且 (d)分离所述嵌合蛋白。所述生产嵌合蛋白的方法还包括下述步骤：将编码免疫球蛋白链 V_H 和/或 V_L 区中任一个的基因和编码第二种免疫球蛋白恒定区的基因插入到所述表达载体中，以允许所述第二种嵌合蛋白表达。

本发明还提供一种用于改变患者的 B 细胞介导病理的组合物。该组合物含有至少一种嵌合蛋白，所述嵌合蛋白具有免疫球蛋白链 V_H 和/或 V_L 区的至少一部分和免疫球蛋白恒定区的至少一部分。在优选实施方案中，所述嵌合蛋白可以包含免疫球蛋白链 V_H 区的至少一部分和免疫球蛋白恒定区的至少一部分。作为所述嵌合蛋白部分的 V_H 或 V_L 区与来自具有 B 细胞介导病理的患者的 B 细胞的特定免疫球蛋白链相关。所述组合物还含有第二种嵌合蛋白，所述第二种嵌合蛋白具有免疫球蛋白链 V_H 和/或 V_L 区的至少一部分和第二种免疫球蛋白恒定区的至少一部分。在其它优选实施方案中，所述第二种嵌合蛋白可以包含免疫球蛋白链 V_H 或 V_L 区的至少一部分和免疫球蛋白恒定区的至少一部分。作为所述嵌合蛋白部分的 V_H 或 V_L 区与来自具有 B 细胞介导病理的患者的 B 细胞的特定免疫球蛋白链相关。

在本发明的一个实施方案中，所述组合物包含两种嵌合蛋白。所述第一种嵌合蛋白包含完整的 V_H 区和人免疫球蛋白恒定区 IgG $_{\gamma 1}$ (V_H -IgG $_{\gamma 1}$)，而第二种嵌合包含完整的 V_L 和人 κ 或 λ 恒定区 (V_L -C $_{\kappa}$ 或 V_L -C $_{\lambda}$)。在其它优选实施方案中，所述嵌合蛋白中的任一种或两种可以包含免疫球蛋白链 V_H 和/或 V_L 区的至少一部分、加上一个接头区和免疫球蛋

白恒定区的至少一部分。

在本发明的另一实施方案中，所述组合物含有一种嵌合蛋白，所述嵌合蛋白含有来自患者B细胞特定免疫球蛋白链的 V_H 和/或 V_L 区中的任一个和免疫球蛋白恒定区。实例包括嵌合蛋白 V_H -IgG $_{\gamma 1}$ 、 V_L - κ 、
5 V_L - λ 、 V_L -IgG $_{\gamma 1}$ 、 V_H - κ 和 V_H - λ 。

在本发明的一个实施方案中，用来表达所述嵌合蛋白的表达载体是一种杆状病毒载体。所述载体最好含有两个表达盒，每个表达盒分别具有启动子、分泌信号序列和嵌合蛋白。一个表达盒含有与蜜蜂蜂毒肽分泌信号序列连接的杆状病毒 AcNPV p10 启动子。另一表达盒具有与人胎盘碱性磷酸酶分泌信号序列连接的多角体蛋白启动子。除所列的启动子和信号序列之外，还可以使用本领域技术人员已知的其它启动子和信号序列。在某些优选实施方案中，所述信号序列是与从患者分离的 V_H 和 V_L 基因相关的内源信号序列、或参与抗体产生的其它信号序列。将编码所述免疫球蛋白链 V_H 或 V_L 部分的基因和编码免疫球蛋白恒定区的基因分别地和/或一起插入到所述杆状病毒载体的上述表达盒中，让一种或两种嵌合蛋白表达。在一个优选实施方案中，免疫球蛋白重链的恒定区例如 IgG $_{\gamma 1}$ 与或者 V_H 区或者 V_L 区一起，由多角体蛋白启动子来控制。
10
15

所产生的嵌合蛋白用具有抗免疫球蛋白的抗体或 Ig 结合蛋白和/或与免疫球蛋白结合结构域结合的任何其它蛋白的亲合柱来纯化，所述 Ig 结合蛋白例如用于免疫球蛋白重链恒定区的 A 蛋白和用于 κ 轻链的 L 蛋白。
20

本发明也考虑了将所述嵌合蛋白与载体蛋白例如匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)共价偶联。本发明的组合物也可以与细胞因子例如粒细胞-巨噬细胞-CSF (GM-CSF)或趋化因子例如单核细胞趋化蛋白 3 (MCP 3)一起给予患者。因为含有嵌合蛋白的本发明组合物与来自具有 B 细胞介导病理的患者 B 细胞的特定免疫球蛋白特异性相关，所以给予这种组合物诱发针对涉及特定 V_H 或 V_L 区段的疾病特异性独特型的免疫应
25

答。同样，针对涉及使用免疫球蛋白 V 区区段(例如 V_H 或 V_L 区段)有限组成部分的 B 细胞的自身免疫病相关 B 细胞的应答，可以诱导治疗结果。因此，给予本发明组合物改变患者的 B 细胞介导病理和/或自身免疫病。本发明组合物的给药途径包括但不限于口服给药、吸入给药、
5 注射给药、经皮给药等。

本文提及的所有美国专利和申请；外国专利和申请；科学论文；书籍；和出版物，包括任何附图和图表，都通过引用全部结合到本文中，如同全文叙述一样。

10

附图简述

图 1: 用于生产组合物的总流程，所述组合物包含来自具有 B 细胞介导病理的患者 B 细胞的特定免疫球蛋白 V_H 或 V_L 区的嵌合蛋白。

图 2: 具有多克隆位点的杆状病毒表达载体 p2Bac 的质粒图谱。

图 3: 杆状病毒表达载体 p2Bac 的 DNA 序列(SEQ ID NO:5)。该序列从 5' 至 3' 描述。p2Bac 载体含有 AcNPV 多角体蛋白基因启动子(GenBank 登记号 X06637 的核苷酸 1-120 (SEQ ID NO:92))和 AcMNPV p10 启动子(GenBank 登记号 A28889 的核苷酸 8-237 (SEQ ID NO:93))。
15

图 4: 质粒 pTRABac/9F12 的 DNA 序列。该质粒含有由稳定的人细胞系 9F12 表达的重链和轻链(κ)的基因。该细胞系产生对破伤风类毒素特异性的人 IgG1/ κ 抗体(SEQ ID NO:89)。下划线区分别代表编码成熟 9F12 IgG₁ (TTTACCC...)和 κ (ATCGACA...)链的序列。该序列从 5' 至 3' 描述。
20

图 5a: 具有 IgG_{γ1} 恒定区的重组杆状病毒表达载体 pTRABacHuLC_κHC_{γ1} 的质粒图谱。

图 5b: 具有 IgG_{γ1} 恒定区的重组杆状病毒表达载体 pTRABacHuLC_λHC_{γ1} 的质粒图谱。
25

图 6A: pTRABacHuLC_κHC_{γ1} 的 DNA 序列(SEQ ID NO:6)。该序列从 5' 至 3' 描述。

图 6B: pTRABacHuLC λ HC γ_1 的 DNA 序列(SEQ ID NO:7)。该序列从 5' 至 3' 描述。

图 6C: 利用 κ stuff 引物修饰后的 pTRABacHuLC κ HC γ_1 的 DNA 序列(SEQ ID NO:90)。该序列从 5' 至 3' 描述。

5 图 6D: 利用 λ stuff 引物修饰后的 pTRABacHuLC λ HC γ_1 的 DNA 序列(SEQ ID NO:91)。该序列从 5' 至 3' 描述。

优选实施方案的详细描述

10 诱发将识别并消除肿瘤细胞同时不损伤正常组织的免疫应答的可能性, 代表一种令人兴奋的治疗癌症的方法。通过鉴定特有的肿瘤抗原, 有助于诱发这样的免疫应答。B 细胞恶性肿瘤在其表面上表达一种特有的抗原-免疫球蛋白独特型(Id)。这种抗原含有来自免疫球蛋白重链和轻链可变区(V_H和 V_L)的蛋白序列。每种 B 细胞带有一种用于产生所述免疫球蛋白独特型的特有遗传序列。因此, 因为大多数 B 细胞恶性肿瘤来自一个 B 细胞的克隆扩充, 所以构成一种 B 细胞恶性肿瘤的所有细胞都表达一种特有的 Id 蛋白。因而, 独特型蛋白应该用作任何 B 细胞恶性肿瘤(例如淋巴瘤或白血病)的基于免疫的治疗的理想

15 的靶。

20 被动免疫治疗

早期的免疫治疗策略集中于应用抗肿瘤特异性独特型的单克隆抗体(抗 Id MoAb)。这种方法在一些非霍奇金淋巴瘤患者中引起肿瘤消退和长期持续的缓解。然而, 许多患者经历了最终复发(Miller 等, *N. Engl. J Med.* 306(9): 517-22, 1982; Maloney 等, *Blood* 80(6): 1502-10, 1992; Brown 等, *Blood* 73(3): 651-61, 1989; Brown 等, *Semin. Oncol.* 16(3): 199-210, 1989; Meeker 等, *Blood* 65(6): 1349-63, 1985。

25

在上述研究中出现的一个难题是: 恶性 B 细胞或 T 细胞淋巴瘤的细胞可能改变其独特型免疫球蛋白或 T 细胞受体的表达。在以上所列

的几篇论文中描述了这一问题的两个例子(Cleary 等, 1986, 和 Meeker 等, 1985)。此外表明 T 细胞白血病细胞可能通过减少其表面 T 细胞受体的表达而逃避抗独特型抗体(Maecker 等, *J. Immunol.* 141: 2994-3002, 1985), 就 B 细胞白血病而言这在动模模型中得到了证实(Stevenson 等, *J. Immunol.* 130(2): 970-3, 1983)。其它研究证明, 甚至在特定的人 B 细胞淋巴瘤中也有独特型的变异(Berinstein 等, *J. Immunol.* 144(2): 752-8, 1990; Levy S 等, *J. Exp. Med.* 168(2): 475-89, 1988;)。这类突变看来造成在规定时间内所述抗 Id MoAb 的效力降低(Berinstein 等, 参见上文; Tao 等, *Nature* 362(6422): 755-8, 1993; Chen 等, *J. Immunol.* 153(10): 4775-87, 1994)。

避开这一问题的一种途径是通过产生并应用抗所述独特型蛋白的多克隆抗血清。Caspar 及其同事在小鼠模型系统中研究了基于多克隆抗体的治疗的潜力(Caspar 等, *Blood* 90: 3699-706, 1997)。这些作者用得自在成功的单克隆抗体治疗后复发的非霍奇金白血病患者的独特型蛋白接种小鼠。所产生的多克隆抗体识别来自原始肿瘤以及所有变异体的独特型蛋白。因此, 产生对一种 B 细胞淋巴瘤或白血病独特型特异性的多克隆抗体应答, 可能代表对单克隆抗体治疗的改进。产生足量的蛋白以供接种来产生多克隆抗体, 是这一方法的相当大的负担。

20

主动免疫治疗

主动免疫治疗可以避免用被动免疫策略观察到的突变逃避现象。这种治疗具有产生更广谱免疫应答并且因此识别可以在一定时间内出现的不均一肿瘤细胞群体的潜力。主动免疫治疗的困难在于使患者的免疫系统觉悟, 以便与所述肿瘤所表达的、感知的“自身抗原”反应。正如独特型蛋白的情况一样, 肿瘤所表达的许多抗原是弱免疫原。

25

在本发明中, 改变了免疫系统的独特特异性, 来治疗 B 细胞恶性

肿瘤。在本发明中，用来源于免疫球蛋白轻链和重链每个独特亚家族5'端的引物和恒定区引物，克隆了编码独特型免疫球蛋白可变区的DNA序列。通常，这种方法采用几种合适的克隆技术之一，例如PCR。作为产生包含可变区和恒定区的嵌合蛋白的第一步，可以用这些恒定区引物并结合一种 V_H 区的引物和一种 V_L 区的引物，克隆所述可变区。另一方面，可以使用例如5' RACE的技术。就下文所述的一位患者而言，用5' RACE克隆免疫球蛋白重链和轻链的可变区，以便产生嵌合蛋白。嵌合蛋白的实例包括： V_L/C_k 、 V_L/C_λ 、 $V_L/IgG_{\gamma 1}$ 、 $V_H/IgG_{\gamma 1}$ 、 V_H/C_k 和 V_H/C_λ 。这些嵌合蛋白用杆状病毒载体在昆虫细胞中生产。所述嵌合蛋白因此包含来自患者免疫球蛋白分子的可变区的一个部分，并且也包含来自非所述患者的来源的恒定区的一个部分。在优选实施方案中，所述重链和轻链恒定区来源于9F12细胞。然而，可以使用免疫球蛋白恒定区基因的其它来源。预测这些嵌合蛋白在生产独特型蛋白方面比使用现有系统更为有效地进行生产，将是可供用于疫苗接种方案用的良好的免疫原。

本发明满足了对B细胞介导病理和自身免疫病的有效疗法的迫切要求。本发明利用参与B细胞病理的B细胞表面存在的特有细胞表面抗原，并且以患者特异性方式进行制备。这类疫苗提供根据在特定患者中发现的致病性B细胞所特有的标记而定制的敏锐的选择性。

所述新型杆状病毒/昆虫细胞表达系统已经证明对于从任何给定患者有效生产供免疫治疗用的功能性抗体是有效的。设计这种杆状病毒表达载体，使得仅需要两种定制的基因特异性引物来扩增任何一对抗体可变区，以便容易地亚克隆并作为人 κ 轻链和 $IgG_{\gamma 1}$ 重链表达。加入将重链和轻链引向分泌途径的异源分泌信号序列，以便从昆虫细胞表达大量活性免疫球蛋白。这种载体应该可用于表达与人 κ 恒定区符合读框并且通过人胎盘碱性磷酸酶分泌信号序列分泌的任何 κ 轻链可变区(V_L)；和与人 $IgG_{\gamma 1}$ 恒定区符合读框并且由蜜蜂蜂毒肽分泌信号序列引导的任何重链可变区(V_H)。在其它系统中，用 λ 轻链恒定区取代 κ 恒

定区。然后表达嵌合蛋白，所述嵌合蛋白具有：与人 λ 恒定区符合读框并且通过人胎盘碱性磷酸酶分泌信号序列分泌的 V_L 区；和与人 $IgG_{\gamma 1}$ 恒定区符合读框并由蜜蜂蜂毒肽分泌信号序列引导的任何重链可变区 (V_H)。得自单克隆细胞系、或者通过噬菌体展示克隆鉴定的任何小鼠或人单克隆抗体，在两个简单的亚克隆步骤后，可以容易地作为完整人 $IgG_{\gamma 1}/\kappa$ 或 $IgG_{\gamma 1}/\lambda$ 在该载体中表达。另外，包括 $IgG_{\gamma 2}$ 、 $IgG_{\gamma 3}$ 、 $IgG_{\gamma 4}$ 、 IgA 、 IgA_1 、 IgA_2 、 IgM 、 IgD 、 IgE 重链或其区段在内的不同的免疫球蛋白类型，可以用来取代 $IgG_{\gamma 1}$ 。此外，除上文所述的那些信号序列之外，本发明还可以使用其它分泌信号序列，例如与来源于特定患者的免疫球蛋白基因相连接的内源分泌序列。另外，本领域技术人员能够选择若干可以同等用于该系统以产生同等结果的不同的引物，来扩增任何一对抗体可变区，以便于亚克隆。

在某些情况下，应用所述杆状病毒系统表达生物活性蛋白由于不能在不过度蛋白酶降解的情况下有效地溶解重组蛋白而受到阻碍。为了绕开在昆虫细胞中表达重组蛋白所遇到的溶解性和蛋白水解的问题，开发了可供有效分泌生物活性蛋白的杆状病毒转移载体。通过将功能性分泌前导序列插入到多角体蛋白启动子的下游，构建了这些促进重组蛋白从宿主昆虫细胞中分泌的载体。cDNA 序列符合读框的插入，导致合成含有将重组蛋白引向所述分泌途径的异源信号序列的蛋白。测试了人和昆虫的前导序列，以使得异源蛋白从昆虫细胞的分泌最大化。证明人胎盘碱性磷酸酶信号序列 (SEQ ID NO:1: MLGPCMLLLLLLLGLRLQLSLG; DNA 序列为 SEQ ID NO:2: ATG GTG GGA CCC TGC ATG CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTA GGC CTG AGG CTA CAG CTC TCC CTG GGC) 和蜜蜂蜂毒肽信号序列 (SEQ ID NO:3: MKFLVNVALVFMVVYISYIYA; DNA 序列为 SEQ ID NO: 4: ATG AAA TTC TTA GTC AAC GTT GCA CTA GTT TTT ATG GTC GTG TAC ATT TCT TAC ATC TAT GCG) 对于许多细菌蛋白和人蛋白的分泌都是有效的 (Mroczkowski 等, *J. Biol. Chem.* 269: 13522-28,

1994 和 Tessier 等, *Gene* 98:177-83, 1991)。

为了使本发明适合于特定的患者, 首先需要鉴定和分离编码所述特有抗原的基因, 然后需要生产那些抗原的方法。这可以用本领域技术人员可利用的多种不同方式来完成。例如, 适合于本发明需要的一种新开发的方法, 利用一种新型杆状病毒/昆虫细胞表达系统, 并且最近开发用于有效地生产供免疫治疗用的功能性抗体(参见美国临时申请顺序号 60/244,722, 题为“Expression Vectors for Production of Recombinant Immunoglobulin”)。

使用所述杆状病毒系统表达重组蛋白, 允许生产大量的生物活性蛋白, 而没有与在细菌中制备的蛋白相关的许多缺点, 也避免了使用哺乳动物细胞的复杂情况。例如, 稳定的人细胞系 9F12 (ATCC#HB8177)产生对于破伤风类毒素特异性的人 IgG1/ κ 抗体, 将得自该细胞系的免疫球蛋白基因克隆到杆状病毒双重启动子表达转移载体中。在昆虫细胞中生产完整的 IgG1/ κ 免疫球蛋白, 该免疫球蛋白在 SDS-PAGE 分析和蛋白质印迹中的表现类似于哺乳动物抗体。由昆虫细胞生产的抗体是糖基化的。纯化 Mab9F12 和杆状病毒表达的纯化抗体的结合亲和性经测定是相同的, 测定生产水平大约为 5-10 $\mu\text{g/ml}$ 。

含有特定可变区的特异性表位的可溶性人免疫球蛋白片段, 可以通过基因工程在昆虫宿主细胞中生产。含有患者来源的特定 V_H 和/或 V_L 区的这些可溶性重组免疫球蛋白可以作为治疗组合物使用。当给予所述患者时, 它将在体内特异性地诱发细胞介导免疫应答, 以改变所述 B 细胞介导的病理。

这种技术也已经应用于快速鉴定和克隆由 T 细胞淋巴瘤表达的患者特异性 V_α 和 V_β 基因, 然后将这些基因作为重组 κ/V_α 或 $\text{IgG}_{\gamma 1}/V_\beta$ 分子在昆虫细胞中表达(参见美国临时申请顺序号 60/266,133, 题为“Method and Composition for Altering a T Cell Mediated Pathology”)。可以配制并使用以这种方法生产的分子以患者特异性方式诱发针对淋巴瘤的抗独特型细胞介导的免疫。

术语“改变”是指本发明的化合物或组合物调节 B 细胞介导病理的能力。改变 B 细胞病理的化合物可以通过多种可能的机制做到这一点，包括产生针对所述化合物的抗体，所述抗体进而破坏所述 B 细胞病理的细胞，包括诱导参与所述病理的 B 细胞凋亡、抑制所述 B 细胞病理的细胞进一步生长和分裂、诱发针对所述 B 细胞病理的细胞的细胞介导免疫或者抑制病理性 B 细胞的活性。引起所述改变的实际机制尚有待确定，但是由于添加本发明的分子或组合物，通过某种机制发生所述 B 细胞介导病理的改变。

术语“B 细胞介导病理”或“B 细胞病理”是指由于 B 细胞的不当复制或活性而引起的那些疾病和病症。在优选实施方案中，所述 B 细胞介导病理是由于 B 细胞的不当复制引起的 B 细胞淋巴瘤。B 细胞淋巴瘤用目前可利用的医学方法难以有效地治疗。涉及 B 细胞不当复制的其它类型的 B 细胞病理包括慢性和急性 B 细胞白血病、多发性骨髓瘤和某些非霍奇金淋巴瘤。其它优选实施方案包括越来越多的被分类为自身免疫病的人类疾病，在自身免疫病中宿主自身的免疫系统攻击宿主自身组织，例如多发性硬化(MS) (Warren 和 Catz, *Mult. Scler.* 6(5): 300-11, 2000)、系统性红斑狼疮(SLE) (Zhang, J.等, *J. Immunol.* 166(1): 6-10, 2001; Odendahl, M.等, *J. Immunol.* 165(10): 5970-79, 2000)、抗 Hu 相关性副肿瘤性神经病综合征(Rauer, S.和 Kaiser, R., *J. Neuroimmunol.* 111(1-2): 241-44, 2000); 自身免疫性肝炎(AIH) (Ogawa, S.等, *J. Gastroenterol. Hepatol* (1): 69-75, 2000)。可用本发明治疗的其它候选自身免疫病包括类风湿性关节炎(RA)、重症肌无力(MG)、自身免疫性甲状腺炎(桥本甲状腺炎)、Graves 病、炎性肠病、自身免疫性眼色素层视网膜炎、多肌炎、硬皮病和某些类型的糖尿病。本发明对于这些自身免疫病的治疗不是治愈所述疾病，而是仅缓解症状。

术语“B 细胞”是指生物体免疫系统中参与生物体正常功能中的体液免疫的细胞(即没有经历 B 细胞介导病理的 B 细胞)。B 细胞是从骨髓发育的白细胞，产生抗体；它们也被称为 B 淋巴细胞。一般而言，

B 细胞是参与生物体中抗体产生的细胞。

术语“病理”是指被医学会会员认为异常的生物体(例如人类)的一种状态。在本发明中被治疗的病理的特征为 B 细胞功能异常。

5 术语“患者”是指需要治疗病理、或更具体地讲治疗 B 细胞病理的生物体。该术语是指在临床水平上表现出一种或多种特定症状、表明需要用治疗药治疗的活的受治疗者。所述治疗可以或者被医学会普遍接受，或者可能是实验性的。在优选实施方案中，所述患者是一种哺乳动物，包括诸如狗、猫、猪、牛、绵羊、山羊、马、大鼠和小鼠的动物。在其它优选实施方案中，所述患者是人类。患者的诊断可能
10 在疾病发展过程中自发改变，或者在治疗方案或治疗过程中改变。

“生物体”可以是单细胞生物体或者是多细胞生物体。该术语包括哺乳动物，最优选是人类。优选的生物体包括小鼠，因为治疗或诊断小鼠的能力通常预示着在其它生物体例如人类中发挥作用的能力。其它优选生物体包括灵长类，因为治疗或诊断灵长类的能力通常预示着在其它生物体例如人类中发挥作用的能力。
15

术语“嵌合蛋白”是指包含含有来源于至少两种不同蛋白的区段的单一多肽链的蛋白。嵌合蛋白的区段一定来源于异种蛋白，亦即嵌合多肽的所有区段不是来自同一种蛋白。本发明的嵌合蛋白包括含有免疫球蛋白链 V_H 或 V_L 区的部分、但不包含在所述 V_H 或 V_L 区所来源的 B 细胞克隆中发现的那些链完整 C 区的蛋白。此外，所述 V_H 或 V_L 区可以不包括完整的可变区，而是包括足以引起免疫应答的部分。本发明的嵌合蛋白也可以包括其中天然存在的蛋白区段用等同的天然或非天然存在的区段取代的蛋白。这包括用来自不同来源的 IgG_1 恒定区取代来源于患者的 IgG_1 恒定区，还将包括其中用部分或完全人工制备的接头、区段或结构域取代所述蛋白的区段的免疫球蛋白恒定区。
20 然而，在所有情况下，本发明的嵌合蛋白的基因都将与所述患者中天然存在的免疫球蛋白的基因不同。所述嵌合蛋白的基因由于下述原因之一可与天然存在的蛋白区别：(1)它不是来自所述患者的全长免疫球蛋
25

白基因或 cDNA, (2)它将是与从患者中分离的亚型不同的亚型, 或(3)编码患者的 IgG₁ 恒定区的核酸序列将不同于在所述表达载体中所用的 IgG₁ 基因。

术语“蛋白”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用。

5 术语“天然的”是指从自然界分离出的蛋白。因此, 天然存在的蛋白可以指在自然界中发现的、尚未利用重组技术修饰的基因编码的蛋白。天然蛋白可以指可能在自然界中存在或合成的蛋白。这些术语也适用于由生物系统(例如本发明的杆状病毒系统)或者由来源于患者的细胞培养物所生产的蛋白。另一方面, 天然蛋白可以指未经变性的分离的蛋白。术语“天然”也可以指单独的或者与其它多肽结合的多肽或蛋白折叠、使得它类似自然界中存在的相似蛋白的方式, 或者它在翻译后经修饰(“翻译后修饰”)而使得它类似自然界中存在的相似蛋白的方式。天然存在的蛋白可能仅见于得自一位患者的病理 B 细胞, 然而, 这可以被认为是天然存在的蛋白。

15 术语“区段”或“部分”用来指来源于所述嵌合蛋白所用蛋白的氨基酸序列、其长度小于其所来源的全长多肽的一种多肽。人们会理解, 这类区段可能保留天然多肽的一个或多个特征性部分。这类保留的特征的实例包括: 与对天然多肽或其表位特异性的抗体结合。

20 术语“V_H”和“V_L”是指免疫球蛋白分子多肽链的可变区或者编码这类多肽链的核酸的可变区。本领域技术人员理解这些术语的含义。可变区的实际序列不可预测, 必须通过分离出所述序列来测定。在本发明中使用从特定患者分离的 V_H和 V_L区。κ轻链或λ轻链的实际序列通过轻链基因座的 V 区、J 区和恒定区的克隆重排来测定。(κ和λ基因座是隔开的并且是不同的)。重链的实际序列通过重链基因座的 V 区、D 区、J 区和恒定区的克隆重排来测定。可变区中的额外序列变异是由于重组方法过程中不精确引起的, 也通过在重组方法结束之后的体细胞突变来产生。术语“V_H”和“V_L”也指 V_H和 V_L区的部分或区段。V_H和 V_L区的区段也可以包括全部或基本上全部的所述 V 区。术

语“基本上全部”是指完整可变区的大约 90%，或者完整可变区的大约 80%。存在的 V_H 和 V_L 区的部分必须足以使所述嵌合分子能够在本发明中起作用。术语“ V_H ”和“ V_L ”也指如下所述的这类多肽区的功能衍生物。

5 术语“免疫球蛋白恒定区”是指免疫球蛋白分子中不由免疫球蛋白可变区编码的所有部分或其一部分。术语“免疫球蛋白恒定区”也可以指编码免疫球蛋白恒定区的 DNA 序列。免疫球蛋白恒定区包括区段 C_L 、 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 和铰链区。免疫球蛋白的类型包括 $IgG_{\gamma 1}$ 、 $IgG_{\gamma 2}$ 、 $IgG_{\gamma 3}$ 、 $IgG_{\gamma 4}$ 、 IgA_1 、 IgA_2 、 IgM 、 IgD 、 IgE 重链以及 κ 或 λ 轻链或者它们的区段。任何免疫球蛋白恒定区的区段都可以用于本发明中，条件是所述区段使得免疫球蛋白恒定区对于本发明的目的而言可以起作用，例如，允许通过与 G 蛋白、A 蛋白、L 蛋白或合适的抗体结合来亲和纯化所述嵌合分子。也可以使用如下所述的免疫球蛋白恒定区区段的功能衍生物。

15 术语“免疫球蛋白折叠”或“免疫球蛋白结构域”是指免疫球蛋白超家族的一种结构元件。免疫球蛋白结构域是分别大约 110 个氨基酸的保守的重复结构域。

 免疫球蛋白结构域存在于许多蛋白分子中，包括抗体、T 细胞抗原受体、细胞因子受体(例如具有 5 个 Ig 结构域的血小板衍生生长因子受体)、细胞粘着分子(例如 ICAM-1/CD54)和许多其它蛋白分子。在各种 TCR 中发现两个免疫球蛋白结构域；一个在可变区中，一个在恒定区中。在抗体轻链中发现两个免疫球蛋白结构域，而在 IgG 重链中发现 4 个免疫球蛋白结构域。本发明考虑了用来自一种不同分子(例如一种免疫球蛋白分子)的结构域取代恒定区的一个或两个结构域，产生具有不同特性(例如与其它分子结合)的经修饰(嵌合)的恒定区。

25 术语“ IgG_1 、 IgG_2 、 IgG_3 、 IgG_4 、 IgA 、 IgA_1 、 IgA_2 、 IgM 、 IgD 、 IgE ”是指人免疫球蛋白的类别和亚类。所述术语可以指所述蛋白的 DNA 序列或者氨基酸序列。免疫球蛋白分子的类别和亚类由其重链决

定。IgG 和 IgD 是不同类别的免疫球蛋白；IgG₁ 和 IgG₂ 是不同亚类的免疫球蛋白分子。术语“IgA”可以指任何亚类的 IgA 分子。在优选实施方案中，它是指 IgA₁ 分子。在其它优选实施方案中，它是指 IgA₂ 分子。在某些实施方案中，所用的免疫球蛋白重链可以是含有来自第
5 二种蛋白的氨基酸的嵌合蛋白。

术语“IgG_{γ1}”是指与 IgG₁ 类免疫球蛋白相关的重链。IgG₁ 代表大约 66% 的人 IgG 免疫球蛋白(Roitt 等, *Immunology*, Mosby, St. Louis, 第 4.2 页, 1993)。

术语“kappa 恒定区”、“lamda 恒定区”、“κ恒定区”和“λ
10 恒定区”是指在免疫系统发育期间保持恒定的 kappa (κ) 和 lambda (λ) 轻链的恒定区。所述术语可以指所述蛋白的 DNA 序列或氨基酸序列。在某些实施方案中，免疫球蛋白轻链的部分可以包含在含有来自一种或多种其它蛋白的氨基酸的嵌合蛋白中。

术语“给予”涉及使化合物与生物体的细胞或组织接触的方法。
15 所述 B 细胞介导病理可以在所述生物体的细胞或组织存在于所述生物体内或生物体外时得到预防或治疗。存在于生物体之外的细胞可以在细胞培养皿中保持或生长。对于在生物体体内含有的细胞，本领域中有许多技术可给予化合物，包括(但不限于)口服、胃肠外给药、皮肤应用、注射和气雾剂应用。

20 通过将本发明的化合物或者针对本发明化合物产生的抗体给予表现出病理特征的 B 细胞，也可以预防或治疗 B 细胞介导病理。然后可以监测给予化合物对生物体功能的效应。所述生物体最好是小鼠、大鼠、兔、豚鼠或山羊，更优选是猴或猿猴，最优选是人类。

术语“组合物”是指含有感兴趣蛋白的混合物。在优选实施方案
25 中，所述组合物可以含有额外的组分，例如佐剂、稳定剂、赋形剂等。

涉及可变区与 B 细胞克隆相关时的术语“与...相关”，是指在由特定 B 细胞克隆所产生的免疫球蛋白上发现的可变区。

术语“B 细胞克隆”是指单个 B 细胞的克隆后代。B 细胞的克隆

后代在所产生的抗体中表达与亲代细胞相同的独特型。本领域技术人员会认识到，一个 B 细胞的克隆后代可能经历了免疫球蛋白基因可变区内的体细胞突变，但仍保留所述 B 细胞克隆的部分。

术语“分离”是指将天然存在的核酸序列从其正常细胞环境中取出。因此，所述序列可以在无细胞溶液中，或者被置于不同的细胞环境中。该术语不是暗示所述序列是存在的唯一核苷酸链，而是它基本上无(纯度至少为大约 90-95%)与其天然相连的非核苷酸物质，因此不同于分离的染色体。此外，在提及核酸时利用术语“分离”是指特定的 DNA 或 RNA 序列在感兴趣的溶液中存在的总 DNA 或 RNA 中所占的比率被增加至显著高于(2-5 倍)在从中取出所述序列的细胞中所占的比率。人们可以通过优先降低所存在的其它 DNA 或 RNA 的量，或者通过优先增加所述特定 DNA 或 RNA 序列的量，或者通过这两种方法的组合，做到这一点。然而，应该注意到，富集的不是暗示不存在其它 DNA 或 RNA 序列，而仅仅是感兴趣序列的相对量被显著增加了。术语“显著的”用来指对于制造这种增加的人而言，增加的水平是有效的，一般是指相对于其它核酸而言增加至大约至少 2 倍，更优选至少 5-10 倍或甚至更高。该术语也不是暗示没有来自其它来源的 DNA 或 RNA。来自其它来源的 DNA 可能例如包含来自酵母或细菌基因组的 DNA，或者克隆载体例如 pUC19。该术语不同于天然发生的事件，例如病毒感染或肿瘤型生长，在后两者中，一种 mRNA 的水平可能相对于其它种类的 mRNA 被自然地增加。也就是说，该术语是指仅包括人类干涉从提高所需核酸比例的那些情况。

分离的 DNA 序列比自然环境中相对更纯(该水平应该至少 2-5 倍于天然水平，例如以 mg/ml 计)。通过 PCR 获得的各种序列可以被纯化至电泳均一性。通过这种 PCR 反应获得的 DNA 分子可以得自总 DNA 或者得自总 RNA。这些 DNA 序列不是天然存在的，而是优选通过对部分纯化的天然存在的物质(例如信使 RNA (mRNA))的操作而获得的。例如，从 mRNA 构建 cDNA 文库涉及构建合成物质(cDNA)，

可以通过从携带所述 cDNA 文库的细胞中克隆选择，可以从所述合成文库中分离出单个纯 cDNA 克隆。包括从 mRNA 构建 cDNA 文库和分离不同的 cDNA 克隆的该方法，导致天然信息的大约 10^6 倍纯化。因而，特别考虑了至少一个数量级、优选两个或三个数量级、更优选四个或五个数量级的纯化。

术语“编码...的基因”是指编码感兴趣蛋白或多肽的核酸序列。所述核酸序列可以或者是 DNA 分子或者是 RNA 分子。在优选实施方案中，所述分子是一种 DNA 分子。在其它优选实施方案中，所述分子是一种 RNA 分子。当作为 RNA 分子存在时，它将包括指导宿主细胞的核糖体开始翻译(例如起始密码子 ATG)和指导核糖体结束翻译(例如终止密码子)的序列。在起始密码子和终止密码子之间是一个可读框(ORF)。本领域技术人员非常熟悉这些术语的含义。

术语“昆虫细胞系”是指来源于昆虫并且对杆状病毒感染敏感的细胞系。本领域技术人员熟悉这类细胞系和利用所述细胞系所需的技术。昆虫细胞系的代表性实例包括草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (sf9)和粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*) (Hi-5)细胞系。

术语“粉纹夜蛾(High-5)细胞”和“草地贪夜蛾(sf9)细胞”是指与杆状病毒表达载体结合使用的昆虫细胞系。本领域技术人员熟悉这些细胞系和获得它们的方法。

术语“插入”是指通过利用限制性酶和连接酶对 DNA 序列进行操作，从而通过用合适的限制性酶消化这两种分子产生匹配的突出端，然后用连接酶将所述分子连接在一起，可以将感兴趣的 DNA 序列(通常编码感兴趣的基因)加入到另一种核酸分子中。本领域技术人员非常熟悉这类操作，实例可以在 Sambrook 等(Sambrook, Fritsch, 和 Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)中找到，所述文献通过引用全部(包括任何附图和图表)结合到本文中。

术语“佐剂”是指当人们试图在动物体内产生对所选抗原或免疫

原(例如需要免疫应答针对的蛋白或多肽)的免疫应答时,与所选抗原或免疫原一起提供、以增强所述免疫应答的物质。本领域技术人员熟悉合适佐剂的选择和使用。批准用于人类的佐剂包括铝盐和 MF59 (Singh 和 O'Hagan, *Nature Biotech* 17: 1075-81, 1999)。其它佐剂正在开发之中(出处同上),可以结合本发明使用。

术语“匙孔蠍血蓝蛋白”或“KLH”是指从匙孔蠍(keyhole limpet)分离的、在免疫方法中通常用作载体蛋白的一种蛋白。本领域技术人员熟悉术语匙孔蠍血蓝蛋白的含义。

术语“细胞因子”是指主要从白细胞中分泌的生长因子家族,通常是可溶性(糖)蛋白。细胞因子刺激体液免疫应答和细胞免疫应答以及激活吞噬细胞。细胞因子不仅由免疫系统内的各种细胞类型合成、贮存和转运(淋巴因子、白介素、单核因子、肿瘤坏死因子、干扰素),而且也由与血液学(集落刺激因子)、肿瘤学(转化生长因子)和细胞生物学(肽类生长因子、热激蛋白和其它应激蛋白)研究相关的其它细胞合成、贮存和转运。

从淋巴细胞分泌的细胞因子被称为淋巴因子,而由单核细胞或巨噬细胞分泌的细胞因子被称为单核因子。许多淋巴因子也被称为白介素(IL),因为它们不仅由白细胞分泌,而且它们也能够影响白细胞的细胞应答。具体地说,白介素是靶向造血来源细胞的生长因子。

术语“生长因子”是指结合细胞表面上的受体并且随后激活细胞增殖和/或分化的蛋白质。许多生长因子是相当通用的,可以用来刺激各种各样细胞类型进行细胞分裂,而其它生长因子对特定的细胞类型是特异性的。

术语“趋化因子”是指一类小的促炎细胞因子,它们作为白细胞的化学引诱剂和激活物起作用,代表一个超过 30 种趋化细胞因子的超家族。它们使来自血液或骨髓的免疫系统细胞活化和迁移至感染部位和受伤组织协调进行(orchestrate)。趋化因子在骨髓中存在并且进而发育为成熟免疫细胞的原始干细胞的生长和增殖中也起重要作用。趋化

因子参与各种各样的急性和炎性疾病，并且通过与七跨膜螺旋类受体结合而发挥其作用。

趋化因子的分子量通常在 8-11 kDa 之间变动，在 1-100 ng/ml 的浓度范围内有活性，由各种各样的细胞类型产生。趋化因子的产生通常由外源性刺激物和内源性介质例如 IL-1、TNF- α 和 PDGF 诱导。趋化因子与特定的细胞表面受体结合，可以被认为是看来不如一级促炎细胞因子多效的二级细胞因子，因为它们不是其它细胞因子的有效诱导物，并且在炎症和修复方面表现出更加专化的功能。

术语“粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子”或“GM-CSF”是指小的(小于 20 kDa)的分泌型蛋白。它与特定的细胞表面受体结合，起骨髓细胞的种特异性刺激物的作用。它刺激若干造血细胞谱系(包括树突细胞、粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和红细胞)的生长和分化。特别是,这种细胞因子也通过增加 T 细胞增殖(Santoli 等, *J. Immunol.* 141(2): 519-26, 1988)、增加粒细胞和单核细胞上粘着分子的表达(Young 等, *J. Immunol.* 145(2): 607-15, 1990; Grabstein 等, *Science* 232(4749): 506-08, 1986)和增强抗原呈递(Morrissey 等, *J. Immunol* 139(4): 1113-9, 1986; Heufler 等, *J. Exp. Med.* 167(2): 700-05, 1988; Smith 等, *J. Immunol.* 144(5): 1777-82, 1990), 在使细胞免疫定型方面起作用。

术语“单核细胞趋化蛋白-3”或“MCP-3”是指一种主要由单核细胞产生的趋化因子。MCP-3 具有广谱的趋化活性，吸引单核细胞、树突细胞、淋巴细胞、自然杀伤细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜中性粒细胞。Minty 等, *Eur Cytokine Netw* 4(2): 99-110, 1993 以及 Opdenakker 等, *Biochem Biophys Res Commun.*, 191(2): 535-42, 1993 于 1993 年克隆了所述 cDNA。最近 Proost 等, *J. Leukoc Biol.* 59(1): 67-74, 1996 综述了其特性。

术语“表达载体”是指一种设计用来在表达载体中正确插入所选感兴趣基因时表达所述基因(通常为一种蛋白质)的重组 DNA 构建体。本领域技术人员了解该术语。表达载体通常在插入感兴趣基因的位点

的 5'端包括一个启动子，而在所述位点的 3'端包括一个终止子区。通常，利用所选的限制性酶切位点将感兴趣的基因插入适当的位点。术语“表达载体”也指已经插入了编码感兴趣产物的感兴趣基因的诸如上述的 DNA 构建体。

- 5 术语“杆状病毒表达载体”是指在用于所述杆状病毒系统时设计用来表达所选基因的 DNA 构建体。设计在所述杆状病毒系统中发挥作用的任何潜在的杆状病毒或表达载体都可以用于本发明。同样，术语“表达载体”是一类包括杆状病毒表达载体具体实施方案的表达载体，但“表达载体”可以除了可以在昆虫细胞系中起作用外，还可以在昆虫细胞系之外的细胞和细胞系中起作用。
- 10

- 术语“允许...表达”是指将表达载体置于所述感兴趣基因将在其中表达的环境中。这通常是指将所述表达载体插入到合适的细胞类型中，其中宿主细胞组分将识别所述启动子和基因表达所必需的其它区，并且将引起感兴趣基因的表达。所述表达通常包括两个步骤：转录和翻译。表达也可以用得自细胞的组分而在体外进行。本领域技术人员熟悉这些技术，这些技术在 Sambrook 等(Sambrook, Fritsch, 和 Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)中有叙述。在优选实施方案中，表达产物是一种蛋白质或多肽。在其它优选实施方案中，表达产物是 $V_H/IgG_{\gamma 1}$ 、 V_L/C_{κ} 、 V_L/C_{λ} 或 $V_L/IgG_{\gamma 1}$ 。
- 15
- 20

- 术语“分泌信号序列”是指一种肽序列。当该序列被符合读框地翻译为与所选多肽的氨基末端连接的肽时，所述分泌信号序列将通过与宿主细胞的机器相互作用，而引起所选多肽被分泌。作为分泌过程的一部分，这种分泌信号序列将被切除，在被输出后仅留下感兴趣的多肽。在优选实施方案中，使用蜜蜂蜂毒肽分泌信号序列。在其它优选实施方案中，使用人胎盘碱性磷酸酶分泌信号序列。本发明不受这些分泌信号序列的限制，可以用本领域技术人员熟知的其它分泌信号序列取代这些分泌信号序列，或除此之外可以使用本领域技术人员熟
- 25

知的其它分泌信号序列。术语“分泌信号序列”也指编码所述分泌肽的核酸序列。

5 术语“ELISA”是指“酶联免疫吸附测定”，其中通过使蛋白与ELISA板的塑料孔结合、然后用该蛋白特异性的抗体检测进行蛋白定量或检测，来确定蛋白的存在或浓度。

术语“启动子控制”是指表达载体中DNA的布置，其中启动子被置于感兴趣基因的5'，使得从所述DNA序列转录出mRNA分子。这种mRNA分子然后由宿主细胞机器进行翻译。本领域技术人员非常熟悉这一术语的含义。

10 术语“A蛋白”、“G蛋白”和“L蛋白”是指能够特异性结合免疫球蛋白分子而不与抗原结合位点相互作用的特定细菌蛋白。A蛋白是一种从金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)中分离的、结合免疫球蛋白分子Fc区的多肽。G蛋白是一种从人G组链球菌菌株(G148)中分离的对免疫球蛋白G(IgG)具有亲和性的细菌细胞壁蛋白。L蛋白
15 是一种由厌氧细菌种大消化链球菌(*Peptostreptococcus magnus*)的某些菌株表达的免疫球蛋白轻链结合蛋白。

术语“B细胞淋巴瘤”是指在淋巴系统中来自B细胞的细胞中产生的癌症。B细胞是从骨髓发育并且产生抗体的白细胞。它们也被称为B淋巴细胞。

20 术语“顽固性低级B细胞淋巴瘤”是指对治疗无反应的低级B细胞淋巴瘤。术语“低级B细胞淋巴瘤”是指往往缓慢生长和扩散的淋巴瘤，包括滤泡性小裂开细胞淋巴瘤(follicular small cleaved cell lymphoma)。由于其生长缓慢，也被称为无痛淋巴瘤。

术语“滤泡性B细胞淋巴瘤”是指一种类型的非霍奇金淋巴瘤。
25 它是一种无痛(生长缓慢)类型的淋巴瘤。

低级淋巴瘤的进一步的定义和表征可以在因特网的http://rituxan.com/professional/clinical_information/class/index.html上找到。

术语“分离”当指蛋白或多肽时，是指将天然存在的多肽或蛋白质从其正常细胞环境中取出，或者是指将在表达系统(例如本文所述的杆状病毒系统)中合成的多肽或蛋白质从所述表达系统的其它组分中取出。因此，所述多肽序列可以在无细胞溶液中，或者被置于不同的细胞环境中。该术语不是暗示所述多肽序列是存在的唯一氨基酸链，而是它基本上无(纯度至少大约 90-95%)与其天然相连的基于非氨基酸的物质。

当提及多肽时，利用术语“富集的”意指所述特定的氨基酸序列在感兴趣的细胞或溶液中，在所存在的总氨基酸序列中所占的比率比在正常细胞或患病细胞或者在所述序列从中取出的细胞中所占的比率大得多(2-5 倍)。人们可以通过优先降低所存在的其它氨基酸序列的量，或者通过优先增加所述特定感兴趣氨基酸序列的量，或者通过这两种方法的组合，做到这一点。然而，应该注意到，富集的不是暗示不存在其它氨基酸序列，而仅仅是感兴趣序列的相对量被显著增加了。术语显著的在此用来指对于制造这种增加的人而言，增加的水平是有效的，一般是指相对于其它氨基酸序列而言增加至大约至少 2 倍，更优选至少 5-10 倍或甚至更高。该术语也不是暗示没有来自其它来源的氨基酸序列。其它来源的氨基酸序列可能例如包含由酵母或细菌基因组、或者克隆载体例如 pUC19 编码的氨基酸序列。在优选实施方案中，所述氨基酸序列是一种上述嵌合蛋白。该术语意指仅包括人类干涉以增加所需氨基酸序列比例的那些情况。

对于某些目的而言，氨基酸序列为纯化形式也是有利的。术语“纯化的”当涉及多肽时，并不需要绝对纯(例如均一的制剂)；而是表明所述序列与在天然环境中相比相对的纯。与天然水平相比，该水平应该至少为 2-5 倍(例如以 mg/ml 计)。特别考虑了至少一个数量级、优选两个或三个数量级、更优选四个或五个数量级的纯化。所述物质最好无功能上显著水平的污染，例如纯度为 90%、95%或 99%。

术语“在操作上连接的”是指这样的 DNA 布置，其中控制区(例

如启动子或增强子)与相连的感兴趣 DNA 基因连接, 以便引起其转录, 并因此允许其翻译。术语“在操作上连接的”也可以指编码加工信号的 DNA 序列(例如分泌信号序列)与编码多肽的基因相连, 形成一个可读框。在转录和翻译后, 分泌信号序列具有使已翻译的多肽输出的潜力。本领域技术人员熟悉该术语的含义。

有用嵌合蛋白的功能衍生物

本文也提供本发明多肽或核酸的功能衍生物。所谓“功能衍生物”是指本发明多肽或核酸的“化学衍生物”、“片段”或“变异体”, 下面有这些术语的定义。功能衍生物保留了所述蛋白的至少一部分功能, 例如与所述蛋白特异性的抗体的反应性或通过非催化结构域介导的结合活性, 这使其可按照本发明应用。在本领域中众所周知, 由于遗传密码的简并性, 许多不同的核酸序列可以编码同一种氨基酸序列。同样, 在本领域中也众所周知, 可以进行氨基酸的保守改变, 以得到保留原始功能性的蛋白或多肽。在这两种情况下, 所有的变换都计划包括在本说明书中。

本发明范围内包括本文所述分离的核酸分子的功能等同物。遗传密码的简并性允许某些密码子被决定同一氨基酸的其它密码子所取代, 并且因此可以得到同一种蛋白质。所述核酸序列可以有相当大的改变, 因为除甲硫氨酸和色氨酸之外, 已知的氨基酸都可以由不止一种密码子编码。因此, 可以合成本发明基因的部分或全部, 得到与自然界中发现的序列显著不同的核酸序列。然而, 其所编码的氨基酸序列却将得以保存。

所述复合体的“化学衍生物”含有不是所述蛋白正常部分的额外的化学部分。所述蛋白或肽的共价修饰包括在本发明范围内。如下所述, 这类修饰可以通过使所述肽的靶氨基酸残基与能够与所选侧链或末端残基反应的有机衍生化剂反应, 而被引入到所述分子中。除本发明的杆状病毒表达系统所连接的正常糖类之外, 它也可以包括使糖类

连接到所述蛋白上。

最常使半胱氨酰残基与 α -卤代乙酸(和相应的胺)例如氯乙酸或氯乙酰胺反应,得到羧甲基或羧酰氨基甲基衍生物。也通过与溴代三氯丙酮、氯乙酰磷酸(chloroacetyl phosphate)、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫、甲基•2-吡啶基二硫、对氯汞苯甲酸、2-氯汞-4-硝基苯酚或氯代-7-硝基苯并-2-噁-1,3-二唑反应,使半胱氨酰残基衍生化。

组氨酰残基通过与焦碳酸二乙酯在 pH 5.5-7.0 下反应而衍生化,因为这种试剂对组氨酰侧链具有相对特异性。对溴苯甲酰甲基溴也是有用的;该反应最好在 0.1 M 二甲基胍酸钠中于 pH 6.0 下进行。

使赖氨酰残基和氨基末端残基与琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。用这些试剂衍生化有逆转赖氨酰残基电荷的作用。用于使含伯胺残基衍生化的其它合适试剂包括:亚氨酸酯,例如吡啶甲亚胺酸甲酯(methyl picolinimidate);磷酸吡哆醛;吡哆醛;氯代硼氰化物(chloroborohydride)、三硝基苯磺酸;O-甲基异脲;2,4-戊二酮;和转氨酶催化的与乙醛酸的反应。

精氨酰残基通过与一种或几种常规试剂反应而加以修饰,所述常规试剂中有苯甲酰甲醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和茚三酮。精氨酸残基的衍生化要求反应在碱性条件下进行,因为胍官能团的 pK_a 值高。此外,这些试剂可以与赖氨酸的基团以及与精氨酸的 α -氨基反应。

酪氨酰残基是用于通过与芳族重氮化合物或四硝基甲烷反应而引入波谱标记的众所周知的修饰的靶。最常见的是,用 N-乙酰咪唑(imidazol)和四硝基甲烷来分别生成 O-乙酰酪氨酰种类和 3-硝基衍生物。

羧基侧链(天冬氨酰或谷氨酰)通过与碳二亚胺($R'-N-C-N-R'$)例如 1-环己基-3-(2-吗啉基(4-乙基)碳二亚胺或 1-乙基-3-(4-氮杂-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺反应而被选择性修饰。此外,通过与铵离子反应,使天冬氨酰残基和谷氨酰残基转变为天冬酰胺酰残基和谷氨酰胺酰残基。

通常将谷氨酰胺酰残基和天冬酰胺酰残基分别脱酰胺为相应的

谷氨酰残基和天冬氨酰残基。或者，在温和的酸性条件下将这些残基脱酰胺。任一种形式的这些残基都落入本发明的范围内。

其它修饰包括多肽或蛋白质的体外糖基化。

用双官能试剂衍生化是有用的，例如可用于使所述蛋白的组分肽相互交联，或者与复合体中的其它蛋白交联、与水不溶性支持基质或者与其它大分子载体交联。常用的交联剂包括例如 1,1-双(重氮乙酰)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯(N-hydroxysuccinimide esters) 例如与 4-叠氮水杨酸形成的酯、同双官能亚氨酸酯包括二琥珀酰亚胺基酯例如 3,3'-二硫代双(丙酸琥珀酰亚胺基酯)和双官能马来酰亚胺例如双-N-马来酰亚氨基-1,8-辛烷。衍生化试剂例如甲基-3-[对叠氮苯基]二硫醇丙亚氨酸酯产生能够在光存在时形成交联的光敏中间体。或者，用美国专利第 3,969,287、3,691,016、4,195,128、4,247,642、4,229,537 和 4,330,440 号中所述的反应性水不溶性基质例如溴化氰活化的糖类和反应性基质进行蛋白质的固定化。

其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化；丝氨酰残基或苏氨酰残基的羟基的磷酸化；赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链 α -氨基的甲基化 (Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 第 79-86 页, 1983); N 末端胺的乙酰化以及在某些情况下 C 末端羧基的酰胺化。

这类衍生化部分可以改进稳定性、溶解性、吸收、生物半寿期等。另一方面，所述部分可以消除或减弱所述蛋白复合体的任何不想要的副作用等。能够介导这类效应的部分公开于例如 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)。

氨基酸残基有缺失、插入和/或取代的蛋白质的功能衍生物可以用本领域技术人员熟知的标准技术来制备。例如，所述功能衍生物的经修饰组分可以用定点诱变技术(如 Adelman 等, *DNA 2*: 183, 1983 所列举的)来产生，其中采用例如如上所述的技术，对所述 DNA 编码序列中

的核苷酸进行修饰，使得经修饰的编码序列被修饰，此后在原核或真核宿主细胞中表达这种重组 DNA。或者，用本领域众所周知的方法，通过直接化学合成，可以常规制备氨基酸有缺失、插入和/或取代的蛋白质。所述蛋白质的功能衍生物通常表现出与天然蛋白质相同性质的生物活性。

本发明嵌合蛋白的应用

本发明的其它方面涉及本发明嵌合蛋白的应用。优选的应用包括药物应用和兽医应用，其中将有效量的按照本发明的嵌合蛋白(最好按照本发明的组合物)给予患者。这样，所述嵌合蛋白接触患者的细胞，所述接触此后诱发所需的生物应答。使用本发明嵌合蛋白的方法包括在生物体内诱发免疫应答的方法、在生物体内产生抗体(B细胞免疫应答)的方法、诱导生物体的 T 细胞免疫应答的方法以及治疗 B 细胞病理的方法。本发明也包括通过给予本发明的嵌合蛋白治疗受治疗者以便增强能够改变 B 细胞病理的免疫应答的方法。

通常，这些方法通过给予所述生物体有效量的按照本发明的嵌合蛋白来完成。“有效量”是指导致诱发所需生物应答的量。这种量的构成将所有变化，并且取决于各种各样的因素，包括具体的嵌合蛋白、待诱发的所需生物应答、嵌合蛋白的制剂、待治疗生物体的年龄、体重、性别和健康状况、给药方案、待治疗或预防的病症或疾病等。可以给予本发明嵌合蛋白和组合物的生物体包括哺乳动物，最好是选自牛、犬、马、猫、羊、猪和灵长类动物的哺乳动物。特别优选的生物体是人类。

可以将本文所述的化合物本身给予人类患者，或者所述化合物可以以其中与其它有效成分混合的药用组合物给予人类患者，或者以联合疗法或者在合适的载体或赋形剂中给予人类患者。用于配制和给予本申请化合物的技术可以在 "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版中找到。

1. 给药途径

合适的给药途径可以例如包括口服、直肠、经粘膜或肠溶给药；胃肠外给药，包括肌内、皮下、静脉内、髓内注射以及鞘内、直接室内、腹膜内、鼻内或眼内注射。本领域技术人员会理解可以作出使组
5 合物适合于具体给药途径的各种改变。

另一方面，人们可以以局部方式而非系统性方式给予所述化合物，例如通过将所述化合物通常以缓释制剂的形式直接注射到实体瘤中。

10 2. 组合物/制剂

本发明的药用组合物可以以本身已知的方法生产，例如借助常规混合、溶解、制粒、制糖锭、研磨、乳化、包囊、包藏或冻干法生产。

因此，按照本发明使用的药用组合物可以以常规方式，采用一种或多种生理上可接受的载体包括赋形剂和有助于将所述活性化合物加工为可以药用的制剂的辅料来配制。合适的制剂取决于所选的给药途
15 径。

对于注射而言，本发明的药物可以配制到水溶液中，最好是配制在生理上相容的缓冲液例如 Hank 氏溶液、Ringer 氏溶液或者生理盐水缓冲液中。对于经粘膜给药而言，在制剂中使用适于穿透所述屏障的
20 渗透剂。这类渗透剂是本领域众所周知的。

对于口服给药，可以通过将所述活性化合物与本领域熟知的药学上可接受的载体混合，可以容易地配制所述化合物。这类载体使本发明的化合物能够配制为可供待治疗患者口服摄入的片剂、丸剂、锭剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、糖浆剂、膏剂、混悬剂等。合适的载体包括
25 赋形剂，例如填充剂，诸如糖包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇；纤维素制剂，例如玉米淀粉、小麦淀粉、水稻淀粉、马铃薯淀粉、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要，可以加入崩解剂，例如交联聚乙烯吡

咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐例如藻酸钠。

5 给糖锭核心提供合适的包衣。为此，可以使用浓缩糖溶液，它可以任选地含有阿拉伯胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、卡波泊尔胶(carbopol gel)、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以加入染料或色素至片剂或糖锭包衣中，以供标识或鉴定活性化合物剂量的不同组合。

10 可以口服使用的药用制剂包括用明胶制备的锁口型胶囊以及用明胶和增塑剂例如甘油或山梨醇制备的软密封胶囊。锁口型胶囊可以含有与以下物质混合的所述有效成分：填充剂例如乳糖、粘合剂例如淀粉、和/或润滑剂例如滑石粉或硬脂酸镁、和任选的稳定剂。在软胶囊中，可以将所述活性化合物溶于或悬浮于合适的液体例如脂肪油、液体石蜡或液态聚乙二醇中。另外，可以加入稳定剂。用于口服给药的所有制剂都应该为适合于这类给药的剂量形式。

15 对于口腔含化给药，所述组合物可以采用以常规方式制备的片剂或锭剂形式。

20 对于吸入给药，按照本发明使用的化合物可以以借助于合适的推进剂(例如二氯二氟甲烷、三氯一氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适气体)，从加压包装或雾化器供给的气雾剂喷雾形式方便地给药。就加压气雾剂而言，可以通过提供一个阀以给予一个计量量，来确定剂量单位。可以配制含有所述化合物和合适粉剂基质(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物、供吸入器或吹入器用的例如明胶胶囊和药筒。

25 所述化合物可以配制用于通过注射胃肠外给药，例如通过大剂量注射或连续输注给药。注射用制剂可以以单位剂型存在，例如在安瓿或多剂量容器中，并且加入防腐剂。所述组合物可以采用诸如油性或水性溶媒中的混悬剂、溶液剂或乳剂的形式，并且可以含有配制剂(formulatory agent)，例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

用于胃肠外给药的药用制剂包括水溶性形式的活性化合物的水溶液。另外，所述活性化合物的混悬剂可以配制为适当的油性注射用

混悬剂。合适的亲脂性溶剂或溶媒包括脂肪油例如芝麻油、或合成脂肪酸酯例如油酸乙酯或甘油三酯、或者脂质体。含水注射用混悬剂可以含有提高混悬剂粘度的物质，例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。混悬剂也可以任选地含有合适的稳定剂或提高所述化合物溶解度以允许配制高浓缩溶液的药剂。

或者，所述有效成分可以为粉剂形式，以供在使用前用合适的溶媒例如无菌无热原水重建。

除前述制剂外，所述化合物也可以配制为缓释制剂。这类长效制剂可以通过植入(皮下植入或肌肉植入)或者通过肌肉注射给药。因此，例如所述化合物可以用合适的聚合材料或疏水性材料(例如可接受的油中的乳剂)或离子交换树脂或者作为微溶性衍生物(例如作为微溶性盐)来配制。

本发明疏水性化合物的药用载体是一种包含苯甲醇、非极性表面活性剂、水混溶性有机聚合物和水相的助溶剂体系。所述助溶剂体系可以是 VPD 助溶剂体系。VPD 是一种 3% w/v 苯甲醇、8% w/v 非极性表面活性剂 polysorbate 80 和 65% w/v 聚乙二醇 300、用无水乙醇定容的溶液。VPD 助溶剂体系(VPD:D5W)包含用 5%葡萄糖水溶液以 1:1 稀释的 VPD。这种助溶剂体系很好地溶解疏水性化合物，其自身在系统给药时产生的毒性低。自然，助溶剂体系的比率在不破坏其溶解性和毒性特征的情况下，可以有相当大的变化。此外，所述助溶剂组分的身份可以改变：例如，可以使用其它低毒性非极性表面活性剂来代替 polysorbate 80；聚乙二醇的比率大小可以改变；其它生物相容性聚合物可以代替聚乙二醇，例如聚乙烯吡咯烷酮；以及可以用其它糖或多糖替代葡萄糖。

另一方面，可以使用组合物的其它给药系统。脂质体和乳剂是众所周知用于疏水性药物的给药溶媒或载体的实例。某些有机溶剂例如二甲基亚砷也可以使用，尽管通常以更大的毒性为代价。另外，所述化合物可以用缓释系统来给药，例如含有所述治疗药的固态疏水性聚

合物的半透性基质。各种缓释材料已经很好地确立，并且是本领域技术人员众所周知的。缓释胶囊可以根据其化学性质，在数周至 100 天内释放所述化合物。根据所述治疗药的化学性质和生物稳定剂，可以使用用于稳定蛋白质的其它策略。

- 5 所述药用组合物也可以包含合适的固相或凝胶相载体或赋形剂。这类载体或赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和聚合物例如聚乙二醇。

 本发明的许多化合物可以作为具有药学上相容的相反离子的盐来提供。药学上相容的盐可以用许多酸来形成，所述酸包括但不限于
10 盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。盐在相应的游离碱形式的水性溶剂或其它质子溶剂中往往更易溶解。

3. 有效量

 适用于本发明的药用组合物包括其中包含足以达到其计划目的
15 量的有效成分的组合。更具体地讲，治疗有效量是指化合物有效预防、减轻或缓解病症或延长所治疗的受治疗者的生存的量。治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内，尤其是根据本文提供的详细公开内容。

 本文所述化合物的毒性和疗效可以用标准药学方法用细胞培养
20 物或实验动物来确定，例如确定 LD₅₀ (使群体的 50%致死的剂量)和 ED₅₀ (在群体的 50%中治疗有效的剂量)。毒性和疗效的剂量比是治疗指数，它可以以 LD₅₀ 和 ED₅₀ 之比来表示。优选表现出高治疗指数的化合物。根据这些细胞培养物测定和动物研究获得的数据可以用来制订人用的剂量范围。这类化合物的剂量最好在包括 ED₅₀ 但具有很低毒性或无毒性的循环浓度范围内。所述剂量可以在该范围内变动，这取
25 决于所用的剂型和使用的给药途径。实际的制剂、给药途径和剂量可以由各个医师根据患者的病症来选择(参见例如 Fingl 等, "The Pharmacological Basis of Therapeutics," 第 1 章第 1 页, 1975)。

给药量和给药间隔可以单独进行调整，以提供足以保持所需效应或提供最低有效浓度(MEC)的所述活性部分的血浆水平。MEC对于每种化合物而言会有所变化。达到 MEC 所必需的剂量将取决于各个特征和给药途径。然而，可以用 HPLC 测定或生物测定来测量血浆浓度。

- 5 给药间隔也可以用 MEC 值来确定。应该采用维持血浆水平在上述时间的 10-90%、优选 30-90%、更优选 50-90%内高于 MEC 的给药方案，来给予化合物。

就局部给药或选择性吸收而言，所述药物的有效局部浓度可能与血浆浓度不相关。

- 10 当然，组合物的给药量将取决于所治疗的受治疗者、受治疗者的体重、疾患的严重程度、给药方式和主治医师的判断。

4. 包装

- 15 如果需要，所述组合物可以在可以含有一个或多个单位剂型的包装或分配装置中提供，所述单位剂型含有所述有效成分。所述包装可以例如包含金属箔或塑料箔，例如泡罩片。所述包装或分配装置可以附有给药说明。所述包装或分配器也可以附带与容器相连的、由管理药物生产、使用或销售的政府机构规定形式的、反映出该机构批准所述形式的多核苷酸给予人类或动物的通知。这类通知例如可以是美国
- 20 食品与药品管理局批准的处方药的标签，或者是批准的产品说明书。也可以制备包含在相容药用载体中配制的本发明化合物的组合物，将其置于合适的容器中，并且配有有关治疗所指明病症的标签。标签上指明的合适病症可以包括治疗肿瘤、治疗类风湿性关节炎、治疗糖尿病等。

25

实施例

在以下描述中，将参考免疫学、细胞生物学和分子生物学领域技术人员已知的各种方法。叙述所参考的这类已知方法的出版物和其它

材料通过引用全部结合到本文中，如同全文叙述一样。

1. 组织加工，以便进行非霍奇金淋巴瘤独特型(ID)的鉴定和克隆:

5 在无菌条件下按照临床指定的方法，对得自外周淋巴结的肿瘤样品进行活组织检查，用所述样品产生患者独特型特异性嵌合免疫球蛋白重组蛋白。将剩余的淋巴结活检材料在液氮中贮存于组织细胞库中，以备将来使用。

a. 细胞分离: 通过迫使患者活检淋巴瘤组织通过一次性 0.38 mm 钢筛网并且同时浸入无菌 PBS 中，获得患者淋巴结活检样本的单细胞悬浮液。分散的细胞用 PBS 洗涤 2 次，然后重新悬浮和计数。加工 10% 比率的所述细胞，以进行总 RNA 提取，剩余的细胞在重新悬浮于含有 30%(v/v)胎牛血清和 10%(v/v) DMSO 的 RPMI 1640 组织培养基中之后，在液氮中保存。所有临床样品的加工都在生物安全橱中进行。

15 b. 总 RNA 制备: 用 RNeasy Kit (Qiagen)，按照生产商的说明，分离得自匀浆淋巴结细胞的总 RNA。总 RNA 通过分光光度法定量。

c. cDNA 合成: 用大约 2.0 μ g 总 RNA 作为模板，用 SuperScript Preamplification System (GIBCO BRL)，按照生产商的建议，进行第一链 cDNA 的合成。用试剂盒中所提供的 oligo(dT)来引发所述 cDNA。

20 d. 编码淋巴瘤重链和轻链的基因的 PCR 扩增: 如下鉴定得自淋巴瘤特异性免疫球蛋白的重链和轻链。将等份的单链淋巴瘤 cDNA 与代表表 1 中所列的与 IgM、IgG、IgA 或 Ig κ 和 Ig λ 恒定区特异性反义引物配对的所有已知 V_H、V _{κ} 和 V _{λ} 亚家族的一系列 V_H和 V_L前导序列特异性寡核苷酸有义引物混合。然后这些样品通过 PCR 扩增，并通过琼脂糖凝胶电泳分析。

25 用从患者外周血淋巴细胞制备的 cDNA，进行平行反应。用来源于含有正常 PBL cDNA 或淋巴结活检样品 cDNA 的样品的每对引物所产生的 PCR 产物的比较，将导致鉴定出在所述淋巴瘤中过量表达的 (overrepresented)候选的肿瘤特异性 V_H和 V _{κ} 或 V _{λ} 亚家族以及所述重链

和轻链的同种型。然后切下候选的肿瘤 V 区基因产物,测定其核酸序列以评价克隆性。对于每位患者,从起始细胞部分进行两个独立的分析。

5 在 50 μ l 体积中,用 HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen)对 1 微升所述 cDNA 反应物(代表 5%的总 cDNA 反应体积)进行 35 个循环的扩增。循环条件: 95 $^{\circ}$ C 15 min, 65 $^{\circ}$ C 4 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 后接 94 $^{\circ}$ C 1 min、61 $^{\circ}$ C 30 sec、72 $^{\circ}$ C 1 min 的 34 个循环;和 72 $^{\circ}$ C 7 min 的一个最后延伸步骤。10 μ l 等份的每个反应物通过在含有溴化乙锭的 1%琼脂糖凝胶上电泳进行分析。

表 1. 用于扩增淋巴瘤重链和轻链的引物序列		
'(GA)'是指或者 G 或者 A, '(TC)'是指或者 T 或者 C.		
	引物名称	引物序列(5' 3')
491	V _{H1} L	TCACCATGGACTGGACCTGGAG SEQ ID NO:38
492	V _{H2} L.1	ACCATGGACATACTTTGTTCCACGC SEQ ID NO:39
493	V _{H2} L.2	ACCATGGACACACTTTGCTCCACGC SEQ ID NO:40
494	V _{H3} L.1	ACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTG SEQ ID NO:41
495	V _{H3} L.2	ACCATGGAAGTGGGGCTCCGCTG SEQ ID NO:42
496	V _{H4} L	AAGAACATGAAACACCTGTGGTTCTTC SEQ ID NO:43
497	V _{H5} L	ATCATGGGGTCAACCGCCATCCT SEQ ID NO:44
498	V _{H6} L	ACAATGTCTGTCTCCTTCCTCATC SEQ ID NO:45
516	V _{K1} L	ACATGAGGGTCCCCGCTCAGC SEQ ID NO:46

517	V _{K2} L	TCAGCTCCTGGGGCTGCTAATG SEQ ID NO:47
515	V _{K3} L	CTTCCTCCTGCTACTCTGGCTC SEQ ID NO:48
518	V _{K4} L	GCAGACCCAGGTCTTCATTCTC SEQ ID NO:49
519	V _{K5} L	CCAGGTTACCTCCTCAGCTTC SEQ ID NO:50
520	V _{K6} L	GGTTTCTGCTGCTCTGGGTTC SEQ ID NO:51
522	V _{λ1} L	TCACTG (TC) (GA) CAGGGTCCTGGGC SEQ ID NO:52
523	V _{λ2} L	ACTCAGG (GA) CACAGG (GA) TCCTGG SEQ ID NO:53
524	V _{λ3} L.1	TTGCTTACTGCACAGGATCCGTG SEQ ID NO:54
525	V _{λ3} L.2	CTTGCTCACTTTACAGGTTCTGTG SEQ ID NO:55
526	V _{λ3} L.3	CTCACTCTTTGCATAGGTTCTGTG SEQ ID NO:56
527	V _{λ3} L.4	TCAACCTCTACACAGGCTCTATTG SEQ ID NO:57
528	V _{λ3} L.5	CTCACTCTCTGCACAG (GT) CTCTG (AT) G SEQ ID NO:58
529	V _{λ4} .L1	CATTTTCTCCACAGGTCTCTGTGC SEQ ID NO:59
530	V _{λ4} L.2	CCTCCACTG (GC) ACAGGGTCTCTC SEQ ID NO:60
531	V _{λ5} L	CTCTCACTGCACAGGTTCCCTC SEQ ID NO:61
532	V _{λ6} L	CGCTCACTGCACAGGTTCTTGG SEQ ID NO:62
533	V _{λ7} L	CTTGCTGCCAGGGTCCAATTC SEQ ID NO:63
534	V _{λ8} L	TGCTTATGGATCAGGAGTGGATTC SEQ ID NO:64
535	V _{λ9} L	CAGTCTCCTCACAGGGTCCCTC SEQ ID NO:65
536	V _{λ10} L	TCACTCACTCTGCAGTGTGAGTG SEQ ID NO:66
	IgG 恒定区-E	CTGAGTTCCACGACACCGTCAC SEQ ID NO:69
	IgM 恒定区-E	GGGAATTCTCACAGGAGACGAGG SEQ ID NO:70

	C _κ -E	TTGGAGGGCGTTATCCACCTTC SEQ ID NO:71
	C _λ -E	GAAGTCACTTATGAGACACACCAG SEQ ID NO:72
	IgG 恒定区-I	GGAAGTAGTCCTTGACCAGGCAG SEQ ID NO:73
	IgM 恒定区-I	GGGAAAAGGGTTGGGCCCGATGCAC SEQ ID NO:74
	C _κ -I	GGGAAAAGGGTTGGGCCCGATGCAC SEQ ID NO:75
	C _λ -I	GGAACAGAGTGACACTGGGTGCAGCCTTGGGCTG SEQ ID NO:76
	C _λ 下游引物	TGCCGTCGGCAGGAGGTATTTTCATTATGACTGTCT CCTTGCTATTATGAACATTCTGTAGGGGCCA SEQ ID NO:77
	C _λ - 5'	GTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCC SEQ ID NO:78
	C _λ - 3'	CGTATCAAGCTTTTACTATGAACATTCTGTAGGGGC CAC SEQ ID NO:79
	λ-stuff 1	CCTTTGATAACACCCA SEQ ID NO:80
	λ-stuff 1'	GTGTTATCAAAGG SEQ ID NO:81
	γ1-stuff 1	5'-CTAGTTTGATAAGGGCC-3' SEQ ID NO:82
	γ1-stuff 1'	5'-CTTATCAAA-3' SEQ ID NO:83
	κ-stuff 1	5'-CCTTTGATAACACCAA-3' SEQ ID NO:84
	κ-stuff 1'	5'- -3' SEQ ID NO:85

e. PCR 产物的克隆和测序: 按照生产商的建议, 将得自多个反
 5 应、经测定含有重链和轻链的肿瘤特异性可变区序列的 PCR 产物, 直
 接克隆到质粒 pCR2.1-TOPO 中, 然后导入到 Top10 感受态大肠杆菌(*E.*
coli)细胞(Invitrogen)中。用 QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), 从羧苄
 青霉素抗性菌落制备 24 种小量制备的 DNA 质粒, 并通过分光光度法
 定量。用 Cy5/Cy5.5 染料引物循环测序试剂盒(Dye Primer Cycle
 Sequencing Kit) (Visible Genetics), 对 200 ng 的每种质粒进行测序。在
 10 测序反应完成后, 样品在 OpenGene DNA 自动测序系统(Automated

DNA Sequencing System)上电泳, 数据用 GeneObjects 软件包(Visible Genetics)加工。用 SEQUENCHER Version 4.1.2 DNA 分析软件(GENE Codes Corp.), 进行另外的分析, 包括序列比对。如果一种 V 区衍生序列在 75%的所述样品中存在, 例如当用上述软件利用缺省参数分析时, 所述 24 种中的 18 种或更多种形成一个共有序列组, 则可以认为所述 V 区衍生序列是肿瘤特异性的。当可得到时, 比较两个独立的活检样品。

f. cDNA 合成和 5' RACE 产物的产生: 由于在 V_H 和 V_L 序列中存在突变, 所以有时不可能鉴定出肿瘤特异性免疫球蛋白重排。作为上述序列特异性 PCR 策略的一种替代方法, 人们可以利用 5' RACE PCR 策略来鉴定肿瘤特异性免疫球蛋白(Ig)重排。合成第一链 cDNA 以产生 Ig 特异性 PCR 产物的所有步骤, 按照生产商的指示(用于快速扩增 cDNA 末端的 5' RACE 系统, version 2.0, Gibco BRL)并略加修改进行。用大约 2.5 μ g 总 RNA 作为模板, 在与感兴趣的 B 细胞群体所用的免疫球蛋白重链和轻链恒定区互补的特异性反义引物(对于 IgG 为 SEQ ID NO:69, 对于 IgM 为 SEQ ID NO:70, 对于 C_k 为 SEQ ID NO:71, 而对于 C_λ 为 SEQ ID NO:72)存在下, 分别合成第一链 cDNA。在 GlassMAX 离心柱(spin cartridges)上纯化所述 cDNA 反应物, 分别产生 50 μ l 的终体积。在 25 μ l 体积中, 用末端脱氧核苷酸转移酶给 10 μ l 等份的每种纯化 cDNA 加上 oligo(dC)尾, 产生后续 PCR 反应所用的模板。建立的 PCR 利用生产商提供含有 poly(G)序列段的上游引物和用于 cDNA 第一链合成内部的 Ig 特异性反义引物(对于 IgG 为 SEQ ID NO:73, 对于 IgM 为 SEQ ID NO:74, 对于 C_k 为 SEQ ID NO:75, 而对于 C_λ 为 SEQ ID NO:76)。5 μ l 模板在 50 μ l 体积中如下进行扩增: 95°C 15 min, 55°C 4 min, 72°C 1 min, 然后 94°C 1 min, 55°C 30 sec, 72°C 1 min 进行 34 个循环, 和于 72°C 7 min 的一个最后延伸步骤。所述 PCR 终产物通过在含有溴化乙锭的 1%琼脂糖凝胶上电泳而进行分离, 分离出合适大小(~500-600

bp)的条带，如上文 1e 中所述，将其克隆到 pCR2.1-TOPO 质粒中。

2. 杆状病毒表达载体 pTRABacHuLC_κHC_{γ1} 和 pTRABacHuLC_λHC_{γ1} 的构建

5 a. 将分泌信号序列克隆到 p2Bac 中: pTRABacHuLC_κHC_{γ1} 和 pTRABacHuLC_λHC_{γ1} 构建体的基础载体是 p2Bac (图 2, SEQ ID NO:5, Invitrogen, Carlsbad, CA)。将两种分泌信号序列克隆到该基础载体中，构建第一种中间杆状病毒表达载体 p2BacM。概括地说，首先利用编码定位以置于杆状病毒 AcNPV P10 启动子转录控制下的蜜蜂蜂毒肽
10 分泌信号序列氨基末端结构域的互补寡核苷酸，修饰载体 p2Bac。对于蜂毒肽序列的克隆，2 μg p2Bac 用 Not I 和 Spe I 于 37°C 消化 4 小时。所述线性载体在通过 1%琼脂糖凝胶电泳后用 Qiaex II 树脂(Qiagen, Chatsworth, CA)纯化。然后，经纯化的 DNA 用 50 μl 水洗脱，并测定 DNA 浓度。将引物 MeIS/N (SEQ ID NO:15)和 MeIN/S (SEQ ID NO:16)
15 各 1 μg 与 10 μl 消化缓冲液 M (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)混合，加热至 70°C 达 5 分钟，然后冷却至室温，以使互补引物退火。10%的退火引物用 Not I 和 Spe I 于 37°C，在 20 μl 反应物中消化 4 小时，经消化的引物在通过 15%聚丙烯酰胺凝胶电泳后用 Qiaex H 树脂纯化，然后测定退火引物的 DNA 浓度。p2Bac 载体和
20 退火蜂毒肽片段的 DNA 以 1:10 的载体与插入片段比进行连接。用感受态 XL1-Blue 大肠杆菌(Stratagene, San Diego, CA)，用连接产物进行转化，然后平板接种到 LB-羧苄青霉素琼脂平板上，于 37°C 生长过夜。采用标准方案制备小量制备菌落，对质粒进行测序以检查所述构建。所得的载体 p2BacM 含有所述蜂毒肽分泌信号序列。

25 类似地对 p2BacM 载体进行进一步修饰，以编码 AcNPV 多角体启动子转录控制下的人胎盘碱性磷酸酶分泌信号序列的氨基末端结构域，构建第二种中间杆状病毒表达载体 p2BacMA。用来导入、克隆所述碱性磷酸酶序列方法一般如下所述：用 Bam HI 和 Eco RI 消化 2 μg

- p2BacM 质粒, 线性载体通过琼脂糖凝胶和 Qiaex II 树脂进行凝胶纯化, 并用 50 μ l 水洗脱。测定所述载体的 DNA 浓度。将引物 APB/E (SEQ ID NO:17)和 APE/B (SEQ ID NO:18)各 1 μ g 在 10 μ l 消化缓冲液 M 中混合, 加热至 70 $^{\circ}$ C 达 5 分钟, 然后冷却至室温, 以使互补引物退火。
- 5 10%的退火引物用 Bam HI 和 Eco RI 于 37 $^{\circ}$ C 在 20 μ l 反应物中消化 4 小时。然后经消化的引物通过 15%聚丙烯酰胺凝胶和 Qiaex II 树脂纯化。也测定经消化引物的 DNA 浓度。然后, 使线性 p2BacM 载体和碱性磷酸酶片段以 1:10 的载体与插入片段比进行连接, 用感受态 XL1-Blue 大肠杆菌, 用连接产物进行转化, 然后平板接种到 LB-羧苄青霉素琼脂平板上, 于 37 $^{\circ}$ C 生长过夜。制备小量制备菌落, 对质粒进行测序以检查所述构建。所得的中间载体 p2BacMA 将含有人胎盘碱性磷酸酶的分泌信号序列。再将 p2BacMA 质粒转化到缺乏 *dcm* 甲基化酶活性的 SCS-110 大肠杆菌菌株(Stratagene)中, 以供随后将 κ 恒定区克隆到甲基敏感性 Stu I 位点中。
- 10
- 15 b. IgG $_{\gamma 1}$ 和轻链恒定区的扩增和克隆: 从自人细胞系 9F12 (ATCC#HB8177)中提取的 RNA, 经 PCR 扩增人单克隆抗体 9F12 的人 κ 恒定区和人 IgG $_{\gamma 1}$ 恒定区。将 κ 恒定区克隆到所述碱性磷酸酶信号序列之后。将 IgG $_{\gamma 1}$ 恒定区插入到所述蜂毒肽分泌信号序列的下游, 从而构建载体(pTRABacHuLC $_{\kappa}$ HC $_{\gamma 1}$, 图 5a)。通过用 λ 轻链恒定区取代 κ 轻链恒定区, 产生含有人 λ 轻链恒定区的载体(pTRABacHuLC $_{\lambda}$ HC $_{\gamma 1}$, 图 5b)。从慢性淋巴细胞白血病的细胞 RNA 制剂中, 通过 RT-PCR 分离出所述轻链。克隆程序的详细描述如下。
- 20
- 25 c. 9F12 κ 恒定区片段和 IgG $_{\gamma 1}$ 恒定区片段的扩增: 用 RNeasy Kit (Qiagen), 按照生产商的说明, 从 9F12 细胞(ATCC#HB8177)提取总 RNA。用 SuperScript 反转录酶(GIBCO BRL, Rockville, MD)和 oligo(dT)引物, 合成单链 cDNA。用 1/20 的合成单链 cDNA, 在具有 Expand High Fidelity Taq (Roche)的 100 μ l PCR 反应物中, 使用 κ 和 IgG $_{\gamma 1}$ 特异性寡核苷酸(分别为 SEQ ID NO:21 加上 SEQ ID NO:22 和 SEQ ID NO:19 加上

SEQ ID NO:20)进行扩增。来自扩增 9F12 免疫球蛋白的片段通过 1.5% SeaKem 琼脂糖和 Qiaex II 树脂纯化,并用 50 μ l 水洗脱。测定所述片段的 DNA 浓度。将纯化的 9F12 免疫球蛋白片段分别连接到 TA-II (Invitrogen) PCR 克隆载体中。用感受态 XLI-Blue 大肠杆菌,用所述连接产物进行转化,然后平板接种到 LB-羧苄青霉素琼脂平板上,于 37 $^{\circ}$ C 生长过夜。制备小量制备的菌落,并对质粒 DNA 进行测序。

5 d. 将 9F12 κ 恒定区插入到所述表达载体中: 对于 κ 恒定区,用 Stu I 和 Hind III 消化 5 μ g 含有 κ 恒定区的质粒 DNA 和 2 μ g 从 SCS110 大肠杆菌中纯化的载体 p2BacMA 的 DNA。含有 κ 恒定区的 320 bp 片段和含有 p2BacMA 载体的 7.1 kb 片段用 Quiex II 凝胶纯化,然后用 50 μ l 水洗脱。测定这两种片段的 DNA 浓度。然后用 Rapid Ligation Kit (Roche)连接纯化的片段。用感受态 XL1-Blue 大肠杆菌,用所述连接产物进行转化,然后平板接种到 LB-羧苄青霉素琼脂平板上,于 37 $^{\circ}$ C 生长过夜。制备小量制备的细菌菌落,并对所述重组 DNA 进行测序,以证实 κ 恒定区的正确插入。所得的质粒载体为 pTRABacLC $_{\kappa}$ 。

10 e. 将 IgG $_{\gamma 1}$ 恒定区加入到所述载体中: 通过首先用 Spe I 和 Xba I 消化 5 μ g 含有 IgG $_{\gamma 1}$ 恒定区的质粒 DNA 和 2 μ g 载体 pTRABacLC $_{\kappa}$ 的质粒 DNA,将 IgG $_{\gamma 1}$ 恒定区加入到所述载体中。用琼脂糖填料 (agarose plugs)和 Quiex II 凝胶纯化 IgG $_{\gamma 1}$ 恒定区的 1 kb 片段和 pTRABacLC $_{\kappa}$ 载体的 7.4 kb 片段,并用 50 μ l 水洗脱。测定这两种片段的 DNA 浓度。然后用 Rapid Ligation Kit (Roche)连接纯化的片段。用感受态 XL1-Blue 大肠杆菌,用所述连接产物进行转化,然后平板接种到 LB-羧苄青霉素琼脂平板上,于 37 $^{\circ}$ C 生长过夜。制备小量制备的菌落,通过限制性分析和对限制位点测序,确定连接和 IgG $_{\gamma 1}$ 插入的方向。所得的重组载体为 pTRABacHuLC $_{\kappa}$ HC $_{\gamma 1}$ 。

25 进一步精修该质粒 - pTRABacHuLC $_{\kappa}$ HC $_{\gamma 1}$,以便分别在所述蜂毒肽分泌序列和 C $_{\gamma 1}$ 区序列之间以及在所述碱性磷酸酶分泌序列和 C $_{\kappa}$ 区序列之间加入翻译终止密码子。为了完成这些修饰,采用 Spe I + Apa I

消化,使 pTRABacHuLC_κHC_{γ1} 载体线性化。然后将所述线性化载体与退火的互补引物γ1-stuff 1 (SEQ ID NO:82)和γ1-stuff 1'(SEQ ID NO:83)连接,以引入符合读框的终止密码子。随后采用以 Stu I (AGGCCT) + Dra III (CACnnnGTG)消化,使通过这种修饰得到的载体线性化,然后
5 与退火的互补引物κ-Stuff 1 (SEQ ID No. 84)和κ-stuff 1' (SEQ ID NO:81)连接,以引入符合读框的终止密码子。这些修饰的净效应分别在图 6C 和 6D 中所示的序列中指出。(加入的序列以双下划线和粗体突出。)

f. 将λ恒定区加入到所述载体中: 用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen),从得自表现出λ轻链独特型的慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者的
10 的纯化外周血淋巴细胞(PBL)中获得总 RNA。

用大约 2.0 μg 总 RNA 作为模板,采用 SuperScript Preamplification System (Gibco BRL),按照生产商的建议,进行第一链 cDNA 合成。用 Oligo(dT)进行引发。用 1/20 的所述合成单链 cDNA,用与 Vλ信号序列的一部分相同的上游引物(SEQ ID NO:54)和与λ恒定区的最后几个密码子以及 3'非翻译区的一部分互补的下游引物(SEQ ID NO:77),在
15 PCR 反应中进行扩增。将 PCR 产物克隆到 pCRII 载体(Invitrogen)中,测序以证实身份。选择含有正确λ恒定区序列的质粒作为第二 PCR 的模板。在该反应中,利用一种含有工程 Dra III 限制位点、对应于λ恒定区中紧接 Jλ下游的序列的有义寡核苷酸 Cλ-5' (SEQ ID NO:78)、和
20 一种跨越紧接λ恒定区的终止密码子的含 Hind III 反义寡核苷酸引物 Cλ-3' (SEQ ID NO:79)。将所得的 PCR 产物克隆到 pCR2.1-TOPO 载体中并测序。用 Hind III 限制时,从所述质粒的某些质粒中释放出含所述λ恒定区序列的片段,这取决于所述插入片段的取向。凝胶分离这一限制性片段,在用 Hind III 消化线性化后,将其克隆到
25 pTRABacHuLC_κHC_{γ1} (图 5A)中,产生一种含有λ恒定区和κ恒定区的中间质粒。用 Stu I 和 Dra III 限制这种质粒,导致除去所述κ序列。然后将这种线性化质粒与退火的互补引物λ-stuff 1 (SEQ ID NO:80)和λ-stuff 1'连接,产生最终形式的 pTRABacHuLCλHC_{γ1} (图 5B)。

3. 将患者来源的独特型 V_H和/或 V_L区的基因插入到表达载体中

采用或者 pTRABacHuLC_κHC_{γ1} 或 pTRABacHuLC_λHC_{γ1}, 有可能将含有单一克隆序列 Stu I 和 Dra III 的任何 V_L 区的基因插入到所述碱性磷酸酶信号序列和κ或λ恒定区之间, 以及将含有单一克隆序列 Spe I 和 Apa I 的任何 V_H 区的基因插入到所述蜂毒肽分泌信号序列和 IgG_{γ1} 恒定区之间(参见图 5A 和图 5B)。然后用所得的表达载体, 转导到草地贪夜蛾(Sf-9)昆虫细胞中, 产生出芽的重组杆状病毒。然后将所述重组的杆状病毒在 Sf-9 细胞中连续扩增, 产生高滴度的重组杆状病毒原液。然后用这种高滴度的重组杆状病毒原液感染粉纹夜蛾(High-5)细胞, 以供随后生产 IgG 嵌合蛋白。可以在表 2 中找到用于构建 pTRABacHuLC_κHC_{γ1} 或 pTRABacHuLC_λHC_{γ1} 的所有寡核苷酸引物的一览表。

在如上所述分离 V_H和/或 V_L 区的肿瘤衍生序列之后, 制备包括所述蜂毒肽前导肽的末端 40 个核苷酸的寡核苷酸引物(对于 Ig 重链克隆而言)(SEQ ID NO:8 - CAGATCACTA GTTTTTATGG TCGTGTACAT TTCTTACATC TATGCG]、包括所述碱性磷酸酶前导肽的末端 28 个核苷酸的寡核苷酸引物(对于 Ig 轻链克隆而言) (SEQ ID NO:9 - CTGAGTAGGC CTGAGGCTAC AGCTCTCCCT GGGC)和包括相应的 V_H或 V_L 区蛋白的前 21-24 个核苷酸的寡核苷酸引物。使用来自重链或轻链恒定区的反向寡核苷酸引物(IgG: SEQ ID NO:10 - GGAAGTAGTC CTTGACCAGG CAG; IgM: SEQ ID NO:11 - GGGAAAAGGG TTGGGCCCGA TGCAC; Igκ: SEQ ID NO:12 - GATGAAGACA CTTGGTGCAG CCACAG; Igλ: SEQ ID NO:13: GGAACAGAGT GACACTGGGT GCAGCCTTGG GCTG)。如前所述鉴定为具有克隆 V_H或 V_L 序列的重组质粒用作第二轮 PCR 的模板。循环条件如上所述。

将质粒模板与分别互补于编码氨基酸 141-149、115-123、108-119 和 109-117 的密码子的 IgC_{γ1}、IgM、Igλ或 Igκ恒定区引物和合适的前

导序列/V区融合引物混合。例如，对于一位患者而言，所用的引物是用于V_{H3}的SEQ ID NO:67和用于V_{κ3}的SEQ ID NO:68 (SEQ ID NO:67: CAGATCACTA GTTTTTATGG TCGTGTACAT TTCTTACATC TATGCGGAGA TGAAATTGGT GGAGTCTGGG; SEQ ID NO:68: 5 CTGAGTAGGC CTGAGGCTAC AGCTCTCCCT GGGCGAAGTT GTGTTGACTC AGTCTCC)。循环条件如上所述。

a. 将轻链可变区插入到表达载体中: 用 *Stu* I 和 *Dra* III 消化 PCR 衍生 V_L 产物和 2 μg 对应的 pTRABacHuLC_κHC_{γ1} 或 pTRABacHuLC_λHC_{γ1} 盒载体。用琼脂糖凝胶填料(plug)和 Qiaex II 树脂 10 纯化来自患者来源的 V_L 区的 350 bp DNA 片段和线性 pTRABacHuLC_κHC_{γ1} 或 pTRABacHuLC_λHC_{γ1} 载体的 8.4 kb 片段，并用 50 μl 水洗脱。测定这两种片段的 DNA 浓度，然后用 Rapid Ligation 试剂盒(Roche)连接所述片段。用所述连接产物转化感受态 XL1-Blue 大肠杆菌，随后将其平板接种到 LB-羧苄青霉素琼脂平板上，于 37℃ 生 15 长过夜。制备小量制备的菌落，通过限制性分析和测序，证实所述重组 DNA 质粒。所得的载体命名为 pTRABac(NHL-V_L)LC_κHC_{γ1} 或 pTRABac(NHL-V_L)LC_λHC_{γ1}。

b. 将重链可变区插入到表达载体中: 用 *Spe* I 和 *Apa* I 消化 PCR 衍生 V_H 产物和 2 μg pTRABac(NHL-V_L)LC_κHC_{γ1} 或 20 pTRABac(NHL-V_L)LC_λHC_{γ1} 盒载体。用琼脂糖凝胶填料和 Qiaex II 树脂纯化来自患者来源的 V_H 区的 350 bp DNA 片段和线性 pTRABac(NHL-V_L)LC_κHC_{γ1} 或 pTRABac(NHL-V_L)LC_λHC_{γ1} 载体的 8.8 kb 片段，并用 50 μl 水洗脱。测定这两种片段的 DNA 浓度，然后用 Rapid Ligation 试剂盒(Roche)连接所述片段。用所述连接产物转化感受 25 态 XL1-Blue 大肠杆菌，随后将其平板接种到 LB-羧苄青霉素琼脂平板上，于 37℃ 生长过夜。制备小量制备的菌落，通过限制性分析和测序，证实所述重组 DNA 质粒。所得的载体命名为 pTRABac(NHL-V_L)LC_κ(NHL-V_H)HC_{γ1}、pTRABac(NHL-V_L)LC_λ(NHL-V_H)HC_{γ1}，并且指

定一个对应于一位患者的参考号，例如 FV8786-001。

引物名称	引物序列(5' 3')
1. 蜂毒肽 N 末端引物 (MelS/N 和 MelN/S)	ACTAGTGCAACGTTGACTAAGAATTCATGCGGCCGC (SEQ ID NO:15) GCGGCCGCATGAAATTCCTAGTCAACGTTGCACTAGT (SEQ ID NO:16)
2. 人胎盘碱性磷酸酶 N 末端引物 (APB/E 和 APE/B)	GCGGATCCATGGTGGGACCCTGCATGCTGCTGCTGCT GCTGCTGCTAGGCCTggaattcc (SEQ ID NO:17) GGAATTCAGGCCTAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA TGCAGGGTCCCACCATGGATCCGC (SEQ ID NO:18)
3. IgG _{γ1} 重链恒定区: 上游引物	TGTGACTAGTATGTATCGGCCCATCGGTCTTCCCCCT (SEQ ID NO:19)
下游引物	TTTCTAGACTATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAG (SEQ ID NO:20)
4. κ轻链恒定区: 上游引物	CTAGGCCTATGTATCACCAAGTGTCTTCATCTTCCCGC CATCT (SEQ ID NO:21)
下游引物	CCCAAGCTTCTATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCT (SEQ ID NO:22)

5 4. 用含可变区的表达载体转染昆虫细胞系和产生重组嵌合蛋白:

a. 昆虫细胞的生长: 用经修饰的杆状病毒载体转染两个已建立的昆虫细胞系(*Sf9* 和 High-5), 以产生重组 V_H/免疫球蛋白和/或 V_L/免疫球蛋白嵌合蛋白。所有的昆虫细胞都于 28°C 在 140-150 rpm 下、在一次性无菌通气(vented)摇瓶(Coming)内含有 50 μg/L 庆大霉素的 ESF-921 无血清昆虫培养基(表达系统 LLP)中生长, 液体的体积不超过 50%。每 2-3 天将细胞传代。将来自每批产物工作细胞库的或每 6 周的工作细胞库的冷冻细胞解冻(低温保藏培养基: 10% DMSO, 40% ESF-921 培养基, 50% High-5 条件培养基), 以确保有不因杆状病毒感染而取消(retractile to)的连续的对数生长期细胞原液。

b. *Sf9* 细胞转染和重组测定: 用 BacVector-3000 转染试剂盒(Invitrogen), 将含有 V_H和/或 V_L区的基因和编码免疫球蛋白重链恒定区和/或轻链恒定区的基因的经修饰杆状病毒表达载体, 共转染到 *Sf9*

细胞中。从琼脂糖上层中挑出 10 个单独的噬斑。来自分离的噬斑的病毒用来感染 T-25 烧瓶内 5 ml ESF-921 培养基中接种的 50%融合的 Sf9 细胞。用两种引物(SEQ ID NO:36 - TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTG)和(SEQ ID NO:37 - GGTCGTTAAC AATGGGGAAG CTG) , 通过 PCR 测试在 T-25 烧瓶中扩增的克隆病毒分离物, 以确保分离的噬斑的克隆性和没有野生型病毒污染。概括地说, 按照 Bac Vector 手册 (Novagen)中所述, 用供应的 Eufectin 脂质试剂, 将 200 ng 重组转移载体质粒与三重切割的 Bac-Vector-3000 一起共转染。将该转染混合物连续 5 倍稀释。将 100 微升等份样品接种到含有 2.5×10^6 Sf9 贴壁细胞的 60 mm 组织培养皿中。1 小时后, 在细胞上铺上 4 ml ESF-921 培养基中的 1%琼脂糖溶液。在 t=转染后 144 小时用中性红(Sigma, St. Louis, MO)使活细胞染色后, 从在琼脂糖上层中生长的转染细胞中挑出 10 个单独的克隆。将病毒从噬斑塞状物(plug)中过夜洗脱到 1 ml ESF-921 培养基中。在 T-25 烧瓶中, 接种 5 ml ESF-921 培养基中 50%融合的 Sf-9 细胞, 用 0.5 ml 洗脱的克隆病毒感染。感染后 96 小时, 从 T-25 烧瓶中取出 0.5 ml 培养基; 离心除去细胞, 通过硝化纤维素上的斑点印迹分析, 分析上清液中的免疫球蛋白活性。如下所述, 也通过 PCR 检验出不存在野生型病毒。

将含有重组杆状病毒的感染性上清液(10 μ l)加入到 90 μ l 含有 6 μ g 蛋白酶 K 的裂解缓冲液中, 所述裂解缓冲液含有 10 mM Tris pH 8.3、50 mM KCl、0.1 mg/ml 明胶、0.45% Nonidet P-40 和 0.45% Tween-20。将混合物于 60 $^{\circ}$ C 加热 1 小时, 通过于 95 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟使蛋白酶 K 变性。取出 25 μ l 经加热的混合物, 在冷却后加入到新 PCR 管中, 然后加入另外 25 μ l 混合物, 所述混合物含有 10 mM Tris pH 8.3、50 mM KCl、0.1 mg/ml 明胶、0.45% NP-40、0.45% Tween-20、每种 dNTP 各 400 μ M、5 mM MgCl₂、每种 PCR 引物各 50 pM (终浓度)和 2.5 U Taq 聚合酶(Roche)。将病毒 DNA 扩增 40 个循环: 92 $^{\circ}$ C 1 min, 然后 58 $^{\circ}$ C 1 min 和 72 $^{\circ}$ C 1 min。用重组杆状病毒引物 PH 正向引物(SEQ ID NO:36)

和 PH 反向引物(SEQ ID NO:37), 扩增表达所述轻链基因的多角体基因座。采用琼脂糖凝胶电泳, 分析 PCR 产物。用这些引物组, 重组杆状病毒将扩增一种 1300 bp 的片段, 而野生型杆状病毒将产生一种大约 800 bp 的片段。污染野生型病毒的重组病毒将扩增出这两种大小的片段。

5
c. 在 *Sf9* 昆虫细胞中制备高滴度病毒原液: 将得自 T-25 原代培养物的 2 ml 培养物转移到 T-75 烧瓶内含有 50%融合的 *Sf9* 细胞的 10 ml ESF-921 培养基中, 让细胞于 28°C 生长 120 小时。将 5 ml 第二代 T-75 培养物, 转移到含有 50 ml 2×10^6 细胞/ml 的 *Sf9* 细胞的 150 ml 10
摇瓶中, 让细胞于 28°C 生长 120 小时。将来自 150 ml 摇瓶的 25 ml 培养物转移到 1 升摇瓶中的 500 ml 2×10^6 细胞/ml 的 *Sf9* 细胞中, 于 28°C 生长。当通过锥虫蓝染色(感染后大约 120-144 小时)确定培养物达到 20%活细胞时, 以 $3000 \times g$ 离心收获病毒培养物, 将其分配到 50 ml 无菌管中, 将一半管贮存于 4°C, 而其余管贮存于 -80°C。然后, 用这种所收获的 500 ml 高滴度($>1 \times 10^8$ pfu/ml)病毒原液感染 High-5 昆虫细胞, 以供免疫球蛋白生产用。用 Baculovirus Rapid Titer Kit (杆状病毒快速滴度试剂盒) (Clontech, Palo Alto, CA) 测定病毒滴度(pfu/ml)。

15
d. High-5 昆虫细胞中 Id 的生产: 与 *Sf9* 细胞相比, High-5 昆虫细胞(BTI-TN-5B1-4)分泌更高水平(2-20 \times)的重组免疫球蛋白, 选择 High-5 昆虫细胞用于嵌合蛋白生产。将对数早期的 High-5 细胞($1.0-2.0 \times 10^6$ 细胞/ml)以 5×10^5 细胞/ml 接种到具有通气封口(vented closure)的 1 升一次性培养瓶中的 ESF921 培养基(Expression Systems LLP)中。培养瓶于 28°C 以 140-150 rpm 振摇, 在规定时间内调节培养瓶中培养基的体积, 使其不超过 500 ml。当细胞密度在 500 ml 培养基中达到 1.5-20
25
2.5 细胞/ml 时, 用高滴度重组杆状病毒原液, 以大约 0.5:1 (pfu:细胞)的感染复数(MOI)感染培养瓶中细胞。然后将培养瓶于 28°C 以 140-150 rpm 振摇; 感染后 96 小时收获培养物。

5. 包含 V_H免疫球蛋白和 V_L免疫球蛋白的嵌合蛋白的纯化:

通过以大约 5,000 × g 离心 60 分钟, 然后通过 0.2 μ PES 无菌过滤装置过滤, 除去细胞和碎片。通过用 A 蛋白 High-Trap 柱(Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)亲和色谱, 从澄清的组织培养基中纯化嵌合蛋白, 然后利用 FPLC 技术(Amersham Pharmacia)进行离子交换色谱。纯化的嵌合蛋白经过大小分离, 然后通过 FPLC 色谱法以交换到缓冲液 PBS 中。蛋白纯化所用的所有试剂都是 USP 生物技术级(GenAr, Mallinckrot Baker, Parris, KY), 内毒素由生产商检验。用无菌 USP 级水制备所有缓冲液和其它溶液。缓冲液和其它溶液在生物安全橱中制备, 并且通过 0.2 μm PES 过滤装置过滤除菌。

a. **嵌合蛋白的 A 蛋白 Sepharose 亲和纯化:** 从生长中的培养瓶中取出组织培养基, 以 5,000 × g 离心 60 分钟以沉淀细胞和碎片。用 0.2 μ PES 过滤装置, 将上清液过滤除菌。加入 Tris 缓冲液(1M, pH 7.4)至经过滤的含有 V_H 和/或 V_L-免疫球蛋白嵌合蛋白的培养基中至终浓度为 20 mM。将缓冲的组织培养上清液上样至带有一个 PI 蠕动泵的 5 ml HighTrap 重组 A 蛋白 Sepharose 亲和柱(Amersham Pharmacia), 流速为 1-5 ml/min, 在干净的烧瓶中收集流通液(flow-through)。柱子用 25 ml PBS (pH 7.4)以 5 ml/min 洗涤。逆转流向, 柱子用另外 25 ml PBS 洗涤。用 0.05M 柠檬酸(pH 3.5)以 1 ml/min 反向洗脱柱子, 收集各 1 ml 的流分。可以以相同方式使用包括但不限于 G 蛋白、L 蛋白或能够与免疫球蛋白结合结构域结合的任何蛋白的其它蛋白柱。

b. **离子交换色谱:** 5 ml High Trap SP Sepharose 阳离子交换柱用 50 ml 25 mM 柠檬酸(pH 3.5)和 20 mM NaCl 平衡。用蠕动泵将 A 蛋白洗脱的 V_H 和/或 V_L-IgG 嵌合蛋白直接上样至平衡的 High Trap SP Sepharose 柱上, 流速为 1 ml/min。该柱用 25 ml 50 mM 柠檬酸(pH 3.5)和 20 mM NaCl (缓冲液 A)以 2 ml/min 洗涤。该柱用线性梯度(0%缓冲液 B 至 100%缓冲液 B)以 1 ml/min 洗脱, 收集各 1 ml 的流分。(缓冲液 B = 100 mM 碳酸钠(pH 10.0)和 1M NaCl)。所述离子交换洗脱的含有

V_H和/或 V_L-IgG 嵌合蛋白的流分通过分光光度法根据其 OD₂₈₀ 进行分析。合并峰流分。

5 c. **大小排阻色谱:**然后将得自 SP 离子交换的混合 Ig 流分上样至 Hi Prep Sephacryl 26/60 S200 Hi Resolution column (高分辨柱) (Pharmacia)上, 该柱已经在用 100 ml 无菌水中预洗涤后, 用 5 倍体积 PBS (pH7.2)平衡。将嵌合 Ig 蛋白以 0.5 ml/min 的流速洗脱到 PBS 中, 以 1 ml 的流分收集。Ig 主峰是, 合并, 通过 0.2 μ 滤器过滤除菌。

6. 独特型蛋白和匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)缀合

10 在纯化所述独特型蛋白后, 将其通过戊二醛交联与 GMP 级 KLH (VACMUNE, Biosyn Corporation)缀合。将如上所述的至少 5 mg 纯化的无菌独特型蛋白与等量的 KLH 在 15 ml 无菌圆锥形管中混合, 用 PBS 将终体积调至 9 ml。滴加 1 ml 1%戊二醛(25% 1 级水溶液, Sigma)至终浓度为 0.1%。然后于室温下将管缓慢摇动 4 小时。缀合物在无菌
15 DispoDialyzers (Spectrum Labs)中对 2 升无菌 PBS 透析, 在至少 24 小时内生物安全通风橱中更换 3 次缓冲液。从透析室中无菌取出 PBS 中的最终 IgG/KLH 缀合物, 将其转移至一个无菌管中, 混合, 然后等份分装到管形瓶中。给终产物的每个管形瓶标上批号、患者标识号、瓶号和装瓶日期。用最后一批管形瓶中的 10%检验无菌情况, 测试管
20 形瓶中内毒素的存在。保留一个管形瓶以用于存档。

7. 产品检验

25 a. **含杆状病毒 DNA 序列的生产批料上清液:**收获 1 ml 等份的被感染昆虫细胞生产培养物上清液样品, 通过在台式离心机中以 3000 rpm 离心 5 分钟除去细胞碎片。将至少 0.1 ml 这种含有杆状病毒颗粒的澄清上清液以 1:9 的体积比与裂解缓冲液(10mM Tris pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1 mg/ml 明胶, 0.45% Nonidet P-40 和 0.45% Tween-20)混合, 用蛋白酶 K (终浓度 60 μ g/ml)于 60 $^{\circ}$ C 蛋白水解 1 小时, 然后于 95

℃15分钟使蛋白酶K变性。然后将25 μl这种裂解液与另外25 μl含有
每种dNTP各400 μM、5 mM MgCl₂、25 pmol正向和反向寡核苷酸引
物(参见表3;对于V_H鉴定为SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:31,而对于
V_L鉴定为SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36)和2.5 U Taq聚合酶(Roche)
5 的上述裂解缓冲液混合。V_L PCR的循环条件是:最初于92℃变性2
分钟,然后是92℃、58℃和72℃各1分钟的40个循环,以及于72℃
7分钟的最后延伸。对于V_H PCR而言,循环条件相同,只是退火温度
为64℃。对PCR产物根据预期大小进行评价,并通过琼脂糖凝胶电泳
进行定量。随后,用两种或更多种嵌套引物对PCR产物直接测序。(参
10 见表3;对于V_H鉴定为SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:34,对于V_κ鉴定
为SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:35,而对于V_λ鉴定为SEQ ID NO:88
和SEQ ID NO:35。)用OpenGene Automated DNA Sequencing System
(自动DNA测序系统)(Visible Genetics)和序列分析软件,如上所述测
定完整的V_H和V_L核苷酸序列,并且与pTRABac(NHL-FV-8786-XXX)
15 载体中对应于患者独特型的V基因序列进行比较。

b. Superose 6 凝胶过滤色谱法:进行纯化Id的凝胶过滤色谱,
以评价蛋白纯度。用Superose 6 HR 10/30 FPLC柱(Amersham
Pharmacia),用PBS作为液相,进行凝胶过滤色谱法。用FPLC软件对
20 20个最大的峰进行峰积分,采用以下标准从面积评价中排除所包括的
高度小于0.1 Au、宽度小于0.05 ml、面积小于0.01 Au/ml的峰。收集
分次柱洗脱的流分,通过捕获ELISA评价其人免疫球蛋白比活,将其
与OD₂₈₀色谱图进行比较。

c. 免疫球蛋白测定; 抗人IgG ELISA:微量滴定板的各孔用
100 μl 3 μg/ml山羊抗人IgG重链特异性抗体(Roche)在碳酸盐缓冲液中
25 的稀释液于4℃包被过夜,用100 μl TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, pH
7.5)洗涤2次。各孔用200 μl TBSB (TBS + 1% BSA)于22℃封闭1小
时。

测试TBSB中对应于人峰的每个色谱图部分。将100 μl稀释的样

品以 2 倍连续稀释液以双份重复加入到各孔中，于 22℃保温 1 小时。用纯化的人 IgG1/κ或 IgG1/λ标准(Sigma, St. Louis, MO)重复所述测定。各孔用 200 μl TBST (TBS + 0.1% Tween 20)洗涤 4 次。检测抗体在 TSBS 中以 1:2000 稀释(山羊抗人κ或λ-HRP (Fischer, Pittsburgh, PA)), 5 加入 100 μl 至各孔中并于 22℃保温 1 小时。各孔用 200 μl TBST 洗涤 6 次。加入 100 μl 底物(TMB 1 组分, KPL Inc., Gaithersburg, MD)至各孔中，显色 30 分钟，然后于 OD₆₂₀ 分析。

d. **独特型蛋白释放标准:** (1) 来自生产上清液的杆状病毒中独特型可变区基因的 DNA 序列必需与所述生产载体中的所述 DNA 序列相同。(2) 所述独特型蛋白的浓度基于 OD₂₈₀ 高于 0.5 mg/ml。(3) 在 Superose 6 分析型色谱法中, 主峰面积大于所评价峰面积的 90%。(4) 色谱图主峰对应于人 IgGκ (或λ) ELISA 活性峰。 10

通过动态浊度小平板测定或者鲎变形细胞溶解物(LAL)测定, 测试最终疫苗制品 Id-KLH 的内毒素水平, 其水平低于 350 内毒素单位 (EU)/ml。用一个 14 天试验, 测试该批的 10%制品的无菌情况, 试验 15 为阴性, 否则将其弃去。

表 3 显示了用于确立终产物身份的引物序列的概述。

表3. 用于确立终产物身份的引物序列。

引物名称	引物序列(5' 3')
1. 人胎盘碱性磷酸酶内部引物	AAATGATAACCATCTCGC (SEQ ID NO:25)
2. 人胎盘碱性磷酸酶外部引物	TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG (SEQ ID NO:26)
3. κ 轻链恒定区反义引物	TTGGAGGGCGTTATCCACCTTC (SEQ ID NO:27)
4. κ 轻链恒定区下游内部引物	CTGTAAATCAACAACGCACAG (SEQ ID NO:28)
5. κ 轻链恒定区下游外部引物	CAACAACGCACAGAATCTAG (SEQ ID NO:29)
6. 蜂毒肽内部引物	GGGACCTTTAATTCAACCCAACAC (SEQ ID NO:30)
7. 蜂毒肽外部引物	AAACGCGTTGGAGTCTTGTGTGC (SEQ ID NO:31)
8. IgG _{γ1} 重链恒定区下游内部引物	GGAAGTAGTCCTTGACCAGGCAG (SEQ ID NO:32)
9. IgG _{γ1} 重链恒定区下游中部引物	CTGAGTTCACGACACCGTCAC (SEQ ID NO:33)
10. IgG _{γ1} 重链恒定区下游外部引物	TAGAGTCCTGAGGACTGTAGGAC (SEQ ID NO:34)
11. κ 和 λ 下游引物:	5'-GGTCGTTAACAATGGGGAAGCTG-3' (SEQ ID NO:35)
12. PH 正向引物	5'-TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG-3' (SEQ ID NO:36)
13. PH 反向引物	5'-GGTCGTTAACAATGGGGAAGCTG-3' (SEQ ID NO:37)
14. λ 恒定区内部引物	5'-GAAGTCACTTATGAGACACACCAG-3' (SEQ ID NO:88)

5 8. 应用本发明嵌合蛋白治疗非霍奇金 B 细胞淋巴瘤:

从一位非霍奇金 B 细胞淋巴瘤患者获得 V_H 和 V_L 区。用上述 5' RACE 法, 克隆编码这些区的基因, 按本发明的方法将其插入到所述表达载体中并使其表达。表 5 有所述表达载体所用的 V_H 和 V_L 区的 DNA 序列。用于克隆的 Apa I 和 Dra III 位点以下划线表示。

表 5: 得自一位患者的可变区序列。

VH A / 07

GACATGTTGTTGGTGGAAATCGGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCGGGGGAGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGTGGCCTCTAGATTACCTTTAGAACGTTTTGGATGACCTGGGTCCGGCAAC
 TTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAATATAAATCAAGATGGCAGTCAGACGTAT
 CATGCGGACTCTGTAAAGGGCCGATTTACCATCTCCAGAGACAACGGCAGGAACTCCCT
 ATTTTTACAAATGACAAGTCTGAGAGTCGCGGACACGGCTATATATTACTGTGCGACTA
 ATGAAACGTCCAGTGGCCTGGACTGCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA
 GCTTCCACCAAGGGCCC
 SEQ ID NO:86

VK A / L6

GAAATCGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTCGTCTCCAGGAGACAGAGTCGC
 CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAAAGTACTTAAGTTGGTATCAACAGAAGG
 CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCCATAATGCATCCAGTAGGGCCACTGGCATCCCG
 CCCAGATTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGTCGCCCTAGA
 GACTGAAGATCTGTCAGTTTACTGTTCAGCACTTTATTTCTGGCCTCCGATATTAT
 TTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGAATATCACACGAACTGTGGCTGCACCAAGTG
 SEQ ID NO:87

- 5 将根据以上详述的遗传信息产生的该患者的分离重组的免疫球蛋白嵌合蛋白与 KLH 缀合，并且如上所述在 6 个月期间与 GM-CSF 一起给予 5 次。在给予该治疗之前和 9 个月之后，对该患者的颈部和骨盆区域进行 CT 扫描。6 个肿瘤块直径总和的比较表明，在治疗开始后 9 个月降低 60%。(请注意，这些图未调整以使其适合该疾病诊断之前的淋巴结大小(参见 Cheson 等, *J. Clin. Oncol.*, 17(4): 1244, 1999.)

表 6: 治疗后淋巴结大小的减小。

	TXT.之前 (直径之积; cm^2)	TXT.后 9 个月 (直径之积; cm^2)
淋巴结 1	6.16	2.8
淋巴结 2	5.0	1.6
淋巴结 3	3.3	1.17
淋巴结 4	3.78	1.44
淋巴结 5	1.92	1.0
淋巴结 6	1.08	0.80
直径之和	21.24	8.81

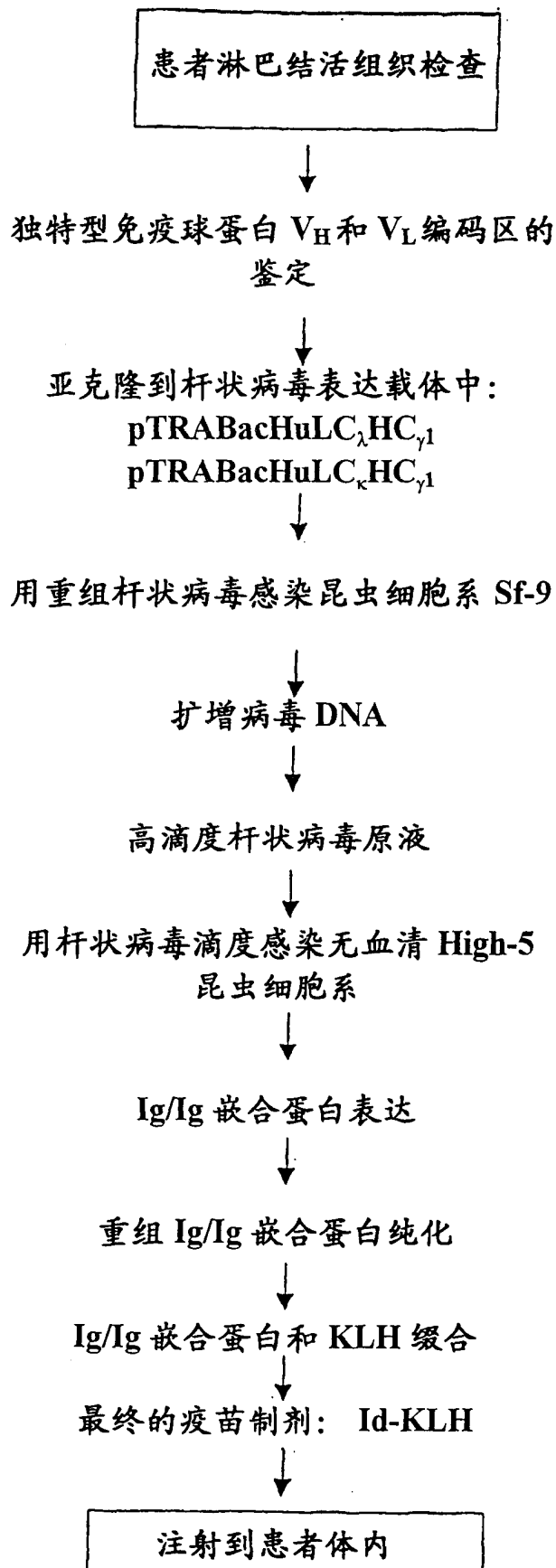


图 1

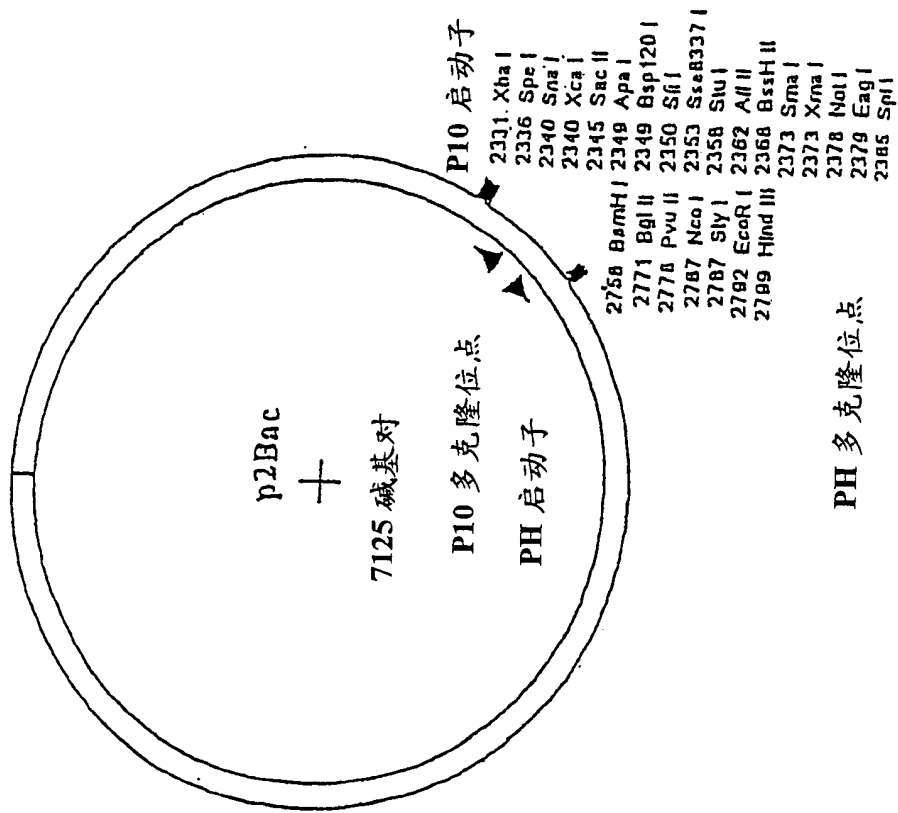
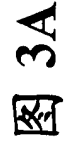


图 2

p2Bac DNA 序列

GCAGTTCCGTTGACGGCTTCCCTCCGTTGCGCCGACACAGGTCGAGCGGGTGGTCGATGACCAGCGGGGTGCGCACCGCGACG
CACAAAGTATCTGTACACCGAAATGATCGTGGCGRAGGCACGTCGGCTCCNAGTGGCAATATTTGGCANNATTCGANNATTA
TATACAGTTGGGTTGTTGGCCATATCTATCTGCGGTGGGCATGTACGTCGMACTGTGATTTGCATTCGACGCGGAA
TTAAATCATTCGGATTAGTCCGATTAANAAGTTGTACATCCTCGCTTTAAATCATGCGGTCGATTAATTCGCGCANTCGA
GTCNAAGTATCAAGTGTGGRATAATGTTTCTTTGATTTCCGAGTCNAAGCGCAGCGGCTATTTTAAACNAACTAGCCAT
CTTGTAGTTAGTTTCAATTAATGCAACTTATCCAAATATAATTAATGATCCGACGTCAAAGNAATTAACNAACTGCGCCCG
TTGTCCGATCTCAACACAGGACTATGATAGAGATCANATAAGCGGAAJTAATAAGCTTCCGACCGCMACTGACGATCTG
TGCACGGCTTCCGGCAGGCTTTGATTTGATTAATGATTAATTAATGATTAATTAATGATTAATTAATGATTAATTAATGATTA
GCCAAAGAATCGCCGACTACAAAATACCGAGTATGTCGGTGACGTTAAACTATTAAGCCATCCANTCGACCGTTAG
TCGAAATCAGGACCGCTGGTGGAGAGCCGGAAGTATGGGAAATGATTAATGATTAATTAATGATTAATTAATGATTAATTAATG
GTCAATGTTAGACAAAGAAAGCTACATATTAATGATTAATTAATGATTAATTAATGATTAATTAATGATTAATTAATGATTA
TATCTACAAATGGCGGGTTTTGGTCAAAAATTTCCGACTCGGATTTACATGCTGTTAAACGGCTCCGCCACTATTAAT
GAAAATTAANAATTCAAATTTTAAANAACGCAAGAGAAACAAATTTGTATGAAGAAATGCTAGMAGGAAAGMAMATGT
CGTCGACATGCTGAACAACAAGATTAATAATGCCCTCCGTGATTAANAANAATTTGAACGATTTGAAMGMAACMAMATGTAC
CGCGCGGGTATGTACAGGAAGGTTTACTAATCTGTTACATTTGCAACTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
CGATGTTAATCAAGGCTCTGACGCTTCTACAACTGTTACATTTGCAACTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
ATCCCAAGATGTGATTAACCAACCAACTGCAAAATGAANAACGTCGACAACTGTCGACAACTGTCGACAACTGTCGACAACTG
AGGGTCTCAATCCATTTGTAAATTTGMAATTAANAACAAATTTTAAATTTCAACATTAACATTAACATTAACATTAACATTA
CAACGCCAACAAGAACATTTGTAGTATTAATGCGACAAATTAATTTTAAATTTCAACATTAACATTAACATTAACATTAACATTA
TTTTCAATGATTCACAGTTAATTTGCGACAAATTAATTTTAAATTTCAACATTAACATTAACATTAACATTAACATTAACATTA
GTATCCCTTCTTTTCAATTTTCCTCATAAANAATTAACATTAACATTAACATTAACATTAACATTAACATTAACATTAACATTA
GAGTAAATTTTGTGTCATAAATAATATATGCTTTTAAATGGGGTATAGTACCGCTGGCATAAGTTTCTGTA
TTTACAACAGTGTATTTCTGGTAGTCTTTCGGAGTGTGTTGCTTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
ATCGTCGGTTTGTACAATATGTTGCCGGCAATAGTACGCGCTTCTTCTAGTTCAMTTACACCAATTTTAAAGCAGCACCG
GATTAACATAACTTCCAAAATGTTGTACGAACTGTAACAAACAGTTTCACTCCCTTTCTATACTAATTTGCTGCGG
AGCAGTTGTTGTTGTTAAANAATACAGCCATTTGTAATGAGACGCAAACTAATTAACNAACTGGAAATGCTAATCA
TATATAGTTGCTGATATCCTCCAGCATGCTGCTATGCTTCCCAATCTCCCAATCTCCCAATCTCCCAATCTCCCAATCTCC
CCCCAGAAATGACACCTAGTCAGACAAJGCGATGCAATTTCCCTCATTTTATTAAGMAGGACAGTGGGAGTGGGAC
CTTCCAGGTCBAAGGACCGGGAGGGGCAACAAACAGATGGCTGGCAACTAGMAGGACAGTGGGAGTGGGAC
CGAGCTAGCTAGCTAGTATACCGGGCCCTGACGGCTTAAGGCGCGCCCGGCGCTGATTTGTAATTA
NAATGTAATTTACAGTATAGTATTTTAAATTAATAACAAATGATTTGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
TTGGGTTGAATTAAGGTCCTCCGCACTCCCAATGCAATTTCAATAGTCCCTTGTJGTAGTGGTATTTCTGTA
ATCTTTGTAAATAGCACAAAGACTCCAAACGGTTTGGCGTTTAAATTTCTTGGCTCGAGGATATCATGGAGATAATTA
AATGATAACCATCTCGCAATTAATATAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTNAATANAACCTAATTAATTAATTC



TAAAGTTGCAGGACCACCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATATGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCCGTG
 GGTCTCGGGTATCATTGACAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAAGACGACGGGGAGTCCAG
 GCACCTATGGATGACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAAGACCCNAAGT
 TTAICTATATATAC TTTAGATTGATTTAAACTTCAATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCCTTTTGGATMAATC
 TCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAAGACCCCGTAGAAAGATCAAAAGGATCTTCTTGA
 GATCCTTTTTCCTGGCGTAATCTGCTGCTTGCANAAANAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTATTGCCGGATCA
 AGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCCAGATACCANAATACTGTCCCTTCTAGTGTAGCCCTG
 AGTTAGGCCACCACTTTCNAGAACTCTGTAGCACCCGCTACNTACCTCGCTCTGCTAATCCCTGTACCAGTGGCTGGCTGCC
 AGTGGCCGATAAGTCCGTGCTTACCCTGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGCCGACGCGTCCGGCTGACGCG
 GGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACCTACACCCGAACTGAGATACCTACAGCGTGGAGCATTGAGGAAAGCG
 CCAAGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGCTCGGNAAGGAGAGCCGACGAGGGAGCTT
 CCAGGGGAAACGCCGTGGTATCTTTATAGTCCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCCGATTTTGTGATGCTC
 GTCAGGGGGGCGGAGCCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCCGCCCTTTTACGGTCCCTGGCTTTTGTGCTGGCCCTTTGCTC
 ACATGTTCTTTCC TGGCTATCCCTGATTCCTGATTAACCGTATTAACCGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGC
 AGCGGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAAGCGAGGAAAGCGGAAAGGCCCCCAATACGCNAAACGCCCTCTCCCGCGCG
 TTGGCCGATTCATTAATGCAGGTTAACCTGGCTTATCGAATAAATACGACTCACATATAGGGAGACCGGCAGATCCGATCT
 GTCGA

图 3C

图 4

pTRABac/9F12 DNA 序列

GCAGTTCGTTGACGCCCTTCTCCGGTGGCCGAACACCGTCCGAGCGGGTGGTTCGATGACCAGCGGGTGCAGCGCGAGC
CACAAAGTATCTGTACACCGAATGATCGTCCGGGGAAGGCACCGTCCGCTCCAAAGTGGCAATATGGCAAATTCGAAAATA
TATACAGTTGGGTTGTTGGCGATATCTATCGTGGCGTTGGCATGTACGTCGGAACGTTGATTTGCATGCAAGCCGAAA
TTAAATCATGGGATTAGTGGGATTAACAGTTGTAATCTCCGCTTTAAATCATGCCGTGATTAATCGCGCAATCGA
GTCAAGTGATCAAAGTGTGGAATAATGTTTTCTTTGATTTCCCGAGTCAAGCGCAGCGGTATTTAACAAACTAGCCAT
CTTGTAAAGTTAGTTTCAATTAATGCAACTTATCCAAATAATATATATGATCGCACGTCAAGAATFAACAACTAGCCCT
TTGTCGCACTCAACACCGACTATGATAGATCAATAAAGCCGGAATTAATAGCTTGCAGCGCAACGTGACGATCTG
TGCACGCGTTCCGGCACCGACTTTGATTTGTAATAAGTTTACGGAAGCATGACATGACCCCGGTAGTGACAAACGATCAC
GCCCAAAGAACTGCCGACTACAAATACCGAGTATGTCGGTGACGTTAAACTATAAGCCATTAAGCCATCCAAATCGA
TCGAATCAGGACCGTGGTGGAGAACGAAAGTATGGCGAATGCATCGTAACTGAGTGGAGTCCCGTCAATTAGAGC
GTCAATGTTAGACAAGAAAGCTACATATTAATGATCCCGATGATTTTATGATAAATGACCTAACCTCCATACACCG
TATTTCAAAATGGCGGGTTTGGTCAAAATTTCCGACTGCCGATGTACATGCTGTTAACGGCTCCGCCACTATTAAT
GAAATTAANAATCCAAATTTAANAACGCAAGAGAAACATTTGTAAGAAGATGCGTAGAAGAAAGAAATAATGT
CGTCGACATGCTGAACAAGATTAATGCTCCGTTGATAAANAATAATGAAACGATTTGAAACGATTTGAAAGAAACAATGTAC
CGCGGGCGGATGTACAGGAAGAGTTTACTAACTGTTACATTCGAAACGTTGGTTTCGTGTCGCAAGTGTGAAAAC
CGATGTTAAATCAAGGCTCTGACGCATTTCTACAAACCGACTCCAAGTGTGGGTGAAGTCAATGCTTTTAATCAA
ATCCCAAGATGTATAAACCCAAACTGCCAANAATGAAACTGTGCAAGCTGTGTCGCTGGCAACTGCA
AGGTCTCAATCCTATTTGTAATATTGAATAATAAACAATAATAATGCTAAATTTGTTTTTATTAACGATACAAAC
CAAACGCAACAAGAACATTTGTAGTATTAATAATGAAACCGCTAGTTATAATCGTGAAGTAAATTTAAATAATCA
TTTTCAAATGATTCACAGTTAATTTGGACAAATAAATTTATTTTCAATAAACTAGACGCCCTTGTCTTCTTCTTC
GTATTCCTTCTTTTTTCAATTTTCTCCTCAATAAATAACATAGTTATACTGATCCATATAATGATCTATCGTATA
GAGTAAATTTTTGTGTCATAAATAATATGCTTTTTTAATGGGTGTAFAGTACCGCTGCCCATAGTTTTTCTGTAA
TTTACACAGTGCATTTCTGTGATGTTCTTGGAGTGTGCTTTTAAATTAATAATTAATAATCAATGAATTTGGG
ATCGTCGGTTTGTACAAATAAGTTGCCGTCATAGTACGAGCTTCTTCTAGTTCAATTAACCAATTTTAGCAGCACCG
GATTAACATAATTTCCAAATGTTGTACGAAACCGTTAAACAAACAGTCCACCTCCCTTTCTACTATTTGTCTGCG
AGCAGTTGTTGTTAAANAATAACAGCCATTTGTAATGAGACGCAAACTAATAATCAACAACCTGGAATGTCTATCAA
TAPATAGTTGCTGATATCTCCCCAGCATGCCCTGCTATTTGTTCTTCCCAATCTTCCCTTGTCTGCTGCCCCACCCACC

图 4 (续)

CCCAGAAATGAAATGACACCTACTCAGACAATGCGATGCAATTTCTCCTCATTTTATTAGAAAGGACAGTGGAGTGGCAC
 CTTCCAGGGTCAAGGAAAGCACGGGGGCAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAAGCCACAGTCGAGGCTGATCAG
 CGAGCTCTAGACTATATATTAACCCGGAGACAGGAGAGGCTCTTCTGCGTGTAGTGGTTGTGCAGAGCCCTCATGC
 ATCACGGAGCATGAAAGACGTTCCCTGCTGCCACCTGCTTTGTGCCACGGTGAGCTTGCCTAGAGGAAGAAGGAGCC
 GTCCGAGTCCAGCACGGGAGGGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCCGGCTGCCATVGTCTCCTCCACTCCACGGCGATGTCCG
 TGGGATAGAAGCCTTTGACCAGGACAGTCCAGGCTGACCTGGTTCCTGGTCCAGCTCATCCCGGATGGGGCAGGGTGTAC
 ACCCTGTGTTCTCCGGGCTGCCCTTGGCTTTGGAGATGGTTTCTCGATGGGGCTGGGAGGGCTTGTGTGAGACCTT
 GCCTCTCCGGGCTTGTCTTGGCAATFATGCACTCCACGGCTCCAGCTGACCTGACCTGACCTCAGGGTCTTCG
 TGGCTACGTCCACCACCGCATGTGACCTCAGGGTCCGGGATCATGAGGTTGCTTTGGGTTTTGGGGGAAGAG
 GAAGACTGACGGTCCCCAGGATTCAGGTGCCGGTCCGGGATGTTGTTGTCACAAGATTTGGGCTCAACTTTCT
 TGTCCACCTTGGTGTGCTGGCTTGTGATTCACGTTGCAGATGTAGGTTGGGTGCCCAAGCTGCTGGAGGCCACGGTC
 ACCACGCTGTGAGGGAGTAGTCTTGAGGACTGTAGGACAGCCGGGAAGGTGTGACGCCCTGGTCCAGGGCCCTGA
 GPTCCACGACACCCGTCAACCGTTCGGGAAGTAGTCCCTTGAACAGGACGCCAGGGCCGCTGTGCCCCAGAGGTTGCT
 TGGAGGAGGTGSCAGGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGCTGAGGAGACGGTGAACAGGGTTCCCTGGCCCCAG
 GAGTCAAAGTAGTAGTGGCCAGCCACTGTTTCCCGCTTTCGCACAGTAAATAACGGCCGTGCTCCGCTCAGGCT
 GTTCAAAGTGCAGATATAGCGTGTTCATGGAAATGTTCTGGAGATGGTCAAATCGGCCCTCAGGATCTGCATAATATG
 TGGTAGTTCTTAGCAATAATAGCCCGACCCACTCCAGCCCCAICCTGGAGCTGGCGGACCCAGCTCATGGCATAG
 CTGCTAAAGCTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGTCTCAGCGACCCCAAGGCTGTACCAAGCTCCCCCAGACTGCAC
 CAGCTGCACCTCGTCCGCATAGATGTAAAGAAATGFACACGACCAATAAAAACTAGTGCAACGTTGACTAAGAAATTCATGC
 GGCCGGTACGATTTGTAATAAAATGTAATTTACGTATAGTATTTTAAATTAATAFACAAATGATTTGATAATAATTCCTT
 APTTAACTATAATAATATTTGTTGGGTTGAAATTAAGGTTCCCGCATCTCAAATGCATAATCATAGTCCCCTTGT
 GTAAGTATGCGGTATTTCTGAATCTTTGTAAATAGCACACAGGACTCCAAACGGTGGCGTTTAAATTTCTTGCCTCGA
 GGATATCATGGAGATAATTAATAATGATAACCAATCTCGCAATAAATAAGTATTTTACTGTCTTTCGTAACAGTTTGTAAAT
 AAAAAACCTATAAATAATCCGGATTAATCAFAACCGTCCACCAATCGGGGTGCTAGCGGATCCATGGTGGGACCCCTGCA
 TGCTGCTGCTGCTGCTGCTAGGCTAGGCTACAGCTCCTCCCTGGGCATCGACATCCAGATGCCAGTCTCCATCC
 TCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGATCATCATCACTTCCCGGCAAGTCAAGATFAGCACCTATTTAAATTTGTTA
 TCAGCAGAAACCGGAAAGCCCTAAAATCTGATCTATATGCAACCAATTCGAAAGTGGGTTCCCATCAAGGTTCA
 GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGGGACTTAATTTATGTCAA
 CAGAGTCCAAACCGTCACTTCCGGCCCTGGGACCAAGTGGATGAAGACTGGCTGCACCAAGTGTCTTCACTT
 CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCTGTGTGTGGCTGTGTAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCCA

图 4 (续)

AAGTACAGTGGAAAGGTGGATAAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCAACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
 ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCGTGAACAAGCAGACTACGAGAAAACAACAAGTCTACGCTGCCAAGTCAACCCCA
 TCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAAATAGAAAGCTTGTCTGGATGGAAGGAA
 AAGAGTCTACAGGAAACTTGGACCCGCTTCAATGGAAGACAGCTTCCCAATGTTAACGACCAAGAAGTGAATGATGTT
 TTCCCTTGTGTTCAACATGCGTCCCACCTAGACCCAAACCGTGTAAACAATTCCTGGCCCAACAACGCTCTGCCGTGCGGACCC
 CGACTATGTACCTCATGACGTGATTAGGATCGTFCGAGCCTTCAATGGGTGGGACAGCAACAACGAGTACCGCATCAGCCCTGG
 CTAAGAAAGGGCGGCTGCCAAATAATGAACCTTCACTCTGAGTACACCAACTCGTTCGAAACAGTTCATCGATCGATCGTGTGTC
 ATCTGGGAGAACTTCTACAAGCCCACTCGTTTACATCGGTACCAGCTTCTGCTGAAGAGGAGGAAATTCCTCTTGAAGTTTC
 CCTGGTGTCAAAAGTAAAGGAGTTTGCACCCAGACCTCTGTTCACTGGTCCGGCTAATAAACAACGATACATTTGTT
 ATTAGTACATTTAATAAGCGCTAGATTCCTGCTGCTTGAATTAACAGACAAATGTTGTACGCTTTTATACTGAAATTTAAATAATTA
 AATTTAATCTTTAGGGTGTAGTTAGAGCGAAATCAAAATGATTTTCAAGCAATGTTGTACGCTTTTATACTGAAATTTAAATAATTA
 ATCCTCAAATAGATTTGTAAATAGGTTTCGATAGTTTCAAAACAAGGTTGTTTTTCCGAACCGATGGCTGGACTATATCA
 ATGGATTTCCGCTCAACGCCCAAAACTTGCCTTCCAAATCTGTAGCAGCAACTAGCTTGTTCGATATTCGTTTGTGTTTTG
 TTTTGTAAATAAAGGTTTCGACTCTCAAAATAATATGCGCTTTTGTATTTCTTTCATCACTGTGTTTGGGCGGTTTTGCGG
 ACTCGACGTAAACACGTTAAATAAAGTAGCTTGGACATAATTAACATCGGGCGTGTAGCTTTATLGGCCGATTTATCG
 TCGTCTCCCAACCTCGTCTGTAGAGTTGCTTCCGAAGACGATTTTGCCATAGCCACACGACGCTTATTAATAATTTGTTGC
 GGCATAACAGCTCCGGATCAAATTTGTAGTTGAGCTTTTGGAAATATTTCTGATTTGCGGCGTTTTTGGGCGGTTTTCA
 AICTAAC'TGTGCCGATTTTAAATTCAGACAACACGTTAGAAGCGATGGTGCAGGCGGTGTTAACAATTCAGACGGCAAA
 TCTACTAAATGGCGCGGTGGTGGAGCTGATGATAAATCTACCACTCGGTGGAGCGCAGCGGGCTGGCGGCGGAGGCGG
 AGGCGGAGGTGGTGGCGGTGATGCAGACGGCGGTTTAGGCTCAAATGTCTTTTAGGCAACACAGTCCGACCTCAAACATA
 TTGTACTGGTTTCGGGCGCGGTTTTGGTTTGACCGGCTGAGACGAGTCCGATTTTTTTCGTTTTTAATAGCTTCCCAAC
 AATTGTTGCTGTTCGTTAAAGGTGCAGCGGTTGAGGTTCCGTCGGCATTGGTGGAGCGGGCGGCAATTCAGACATCGA
 TGGTGGTGGTGGAGGCGCTGGAATGTTAGGCACGGGAGAGGTGGTGGCGGCGGTGGCGGCGGTTAATAATTTGTT
 CTGGTTTAGTTGTTCCGCCACGATTTGGGCAACCGGCGCAGGCGGCTGGCTGCACAACGGAAGGTCGCTGCTGCTTCGA
 GGCAGCGCTGGGGTGGTGGCAATTCATAATTAATAATGGAATACAAATCGTAAATACTGCTATAAGCAATTGTAATTTTC
 GCTATCGTTTACCCTGCCGATATTTAAACCCGCTCAATGTAAGCAATGTAFTGTAAGAGATTTGCTCAAGCTCCGCA
 CCGCATAAACAAGCCCTTTCATTTTACTACAGCATTTGTAGTGGCGAGACACTTCGCTGCTCGACTCGAGTTCTAATAG
 TGTACCTAATACGTTATGTAAGTATACATAAGTTATGATTAATTTAGCCCGTTCTAACGACAAATATGTCATATG
 GTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCGGCAATAGTTAAGCCAGCCCGCACCCCGCAACCCCGTACCGGCGCT
 GACGGCTTGTCTGCTCCCGGATCCGTTACAGACAAGTGTGACCGTCTCCGGGAGTGCATGTTGTCAGAGGTTTTCA
 CCGTCAATCACCGAAACCGCGGAGAGGAAAGGCCCTCGTGATAACGCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATATGTT

第 3 页(共 4 页)

图 4 (续)

TTCTTAGACGTCAGGTGGCACATTTTCGGGGAAAATGTGGCGGGAACCCCTAATTTGTTTATAATTTCTAAATAACATTCAAAATA
 TGTATCCGCTCATGAGACAAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATAATGAAAAGGAAAGAGTATGAGTATTCAAACATTTTC
 CGGTTCGCCCTTATCCCTTTTTCGGGCAATTTGCCCTCCCTGTTTTCGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAGTFAAAAGA
 TGCTGAAGATCAGTTGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAATGGATCTCAACAGCGGTAAAGTCCCTTGAGAGTFTTCGCC
 CCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGGGTATATCCCGTATTGACGCCCGGGCAA
 GAGCAACTCGGTCCCGCATACATCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACCGGA
 TGGCATGACAGTAAGAAATATGACGTGCTGCCATAACCATGAGTGAATAACACTGGCCAACTTACTTCTGACAAACGA
 TCGGAGGACCCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCACAACTGGGGATCATGTAACCTGCTTGTGATCGTTGGAAACCCGGAG
 CTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCCGTGACACCAAGATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAACATAATAC
 TGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGCAACAATAATAGACTGGATGGAGCGGTAAAGTTGCAGGACCACTTCTGC
 GCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAAGCTGGTCTCGCCGTAATCATTGCAGCA
 CTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGCAACTATGGATGAACGAAATAG
 ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGATTTGGTAACCTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
 ATTTAAAACCTTCAATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGT
 GAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCCTTTTTCGCGGTAAT
 CTGCTGCTTGCAAAACAAAACCAACCGCTACCCGCTACCCAGGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTCGGA
 AGGTAACCTGGCTTTCAGCAGGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTCTAGCCGTAGTGGCCACCACTTCAAGAAC
 TCTGTAGCACCCCTACATACCTCGCTCTGTCTGTAACTCCTGT-TACCAGTGGCTGTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTAC
 CCGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGCGCAGCGGTGAAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCCAGCT
 TGGAGCGAACCGACCTACACCGAATGAGATACCTACAGCGTGAAGCAATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGGAGAAAG
 GCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAAGGTCGGAAACAGGAGAGCGGCAAGAGGAGCTTCCAGGGGGAACCGCTGGTATCT
 TTATAGTCTCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCAATTTTGTGATGCTCGTACAGGGGGCGGAGCTATGGA
 AAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTCTTGGCCCTTTGCTGGCCCTTTGCTACATGTTCTTCCGCTGCTTATCC
 CCTGATCTGTGGATAACCGCTTACCGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCCGCAGCCGAAACGACCGGAGCGCAGCGGA
 GTCAGTGAAGCGGAAAGCGGAGAGCGCCCAATACGCAACCGCCCTCCTCCCGCGGCTTGGCCGATTCATTAATGCAGGT
 TAACCTGGCTTATCGAAAATTAATACGACTCATATAGGGAGACCGGCAGATCGATCTGTCTGA

图 5A

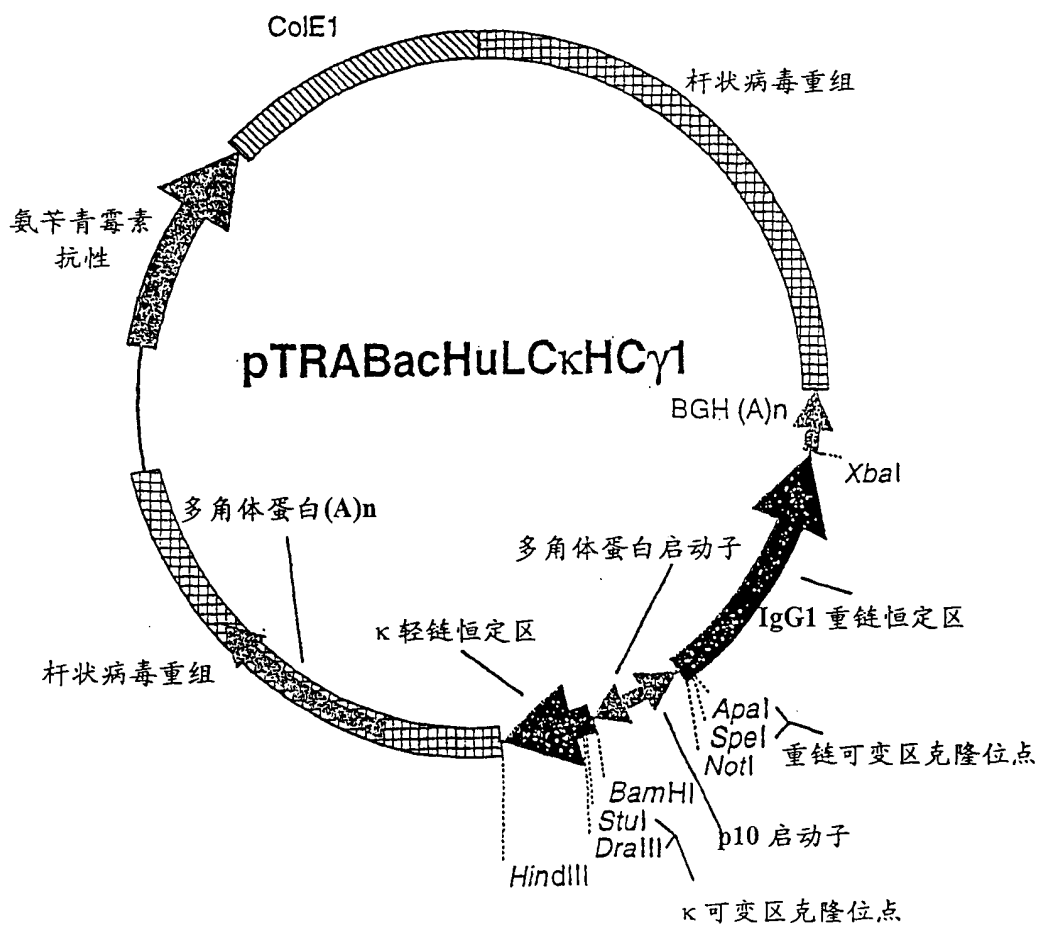


图 5B

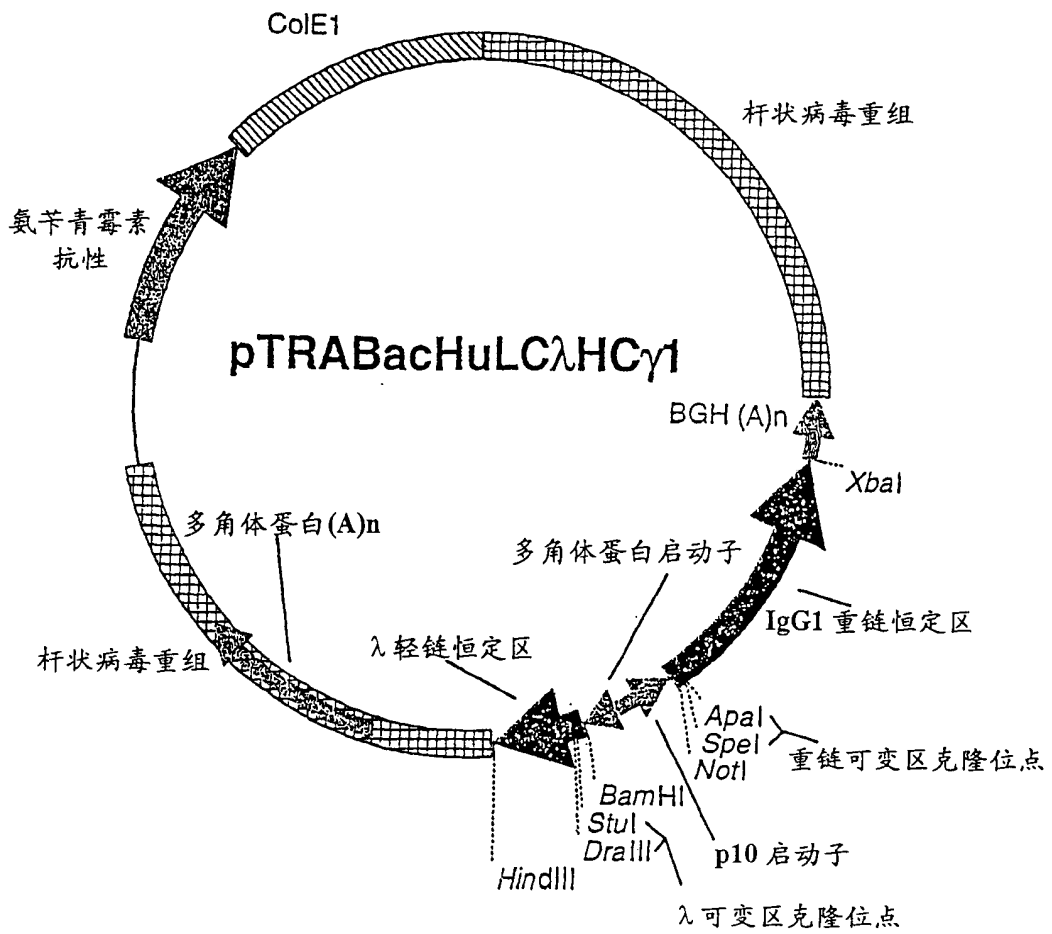


图 6A
pTRABacHuLcKHCλ1 DNA 序列

GCAGTTCGTTGACGCCCTTCCTCCGGTGTGGCCGAACACCGTCGAGCGGGTGGTCGATGACCCAGCGGGCGTCCGCCACGCGCACAAAGTAT
 CTGTACACCGGAATGATCGTCCGGGCGAAGGCACCGTCCGGCTCCAAAGTGGCAATATTTGGCAAATTCGAAATAATATACAGTTGGGTGGTTT
 GCGCATATCTATCGTGGCGTTGGCAATGATCGTCCGAACTGATTTGCAATGCAAGCCGAAATTAATCATTTGCGGATTTAGTGGGATTA
 AACGTTGTACATCCTCCGCTTTAAATCATGCGGTCGATTAATCGGCAATCGAGTCAAGTGTCAAAAGTGTGGAAATAATGTTTCTTTG
 TATTTCCCGAGTCAAGCGGCGGCTATTTTAAACAACCTAGCCACTCTGTAAAGTTAGTTTCATTTAATGCAACTTTATCCAAATAATATAI
 TATGATTCGCACCGTCAAGAATTAAACAATGGCCCCGTGTGCGCATCTCAACACCGACTATGATAGAGATCAAAATAAAGCCGGAATTAATA
 GCTTTGGACCGCAACGTCACGATCTGTGACCGGTTCCGGCACCGAGCTTTGATTTGTAATAAGTTTTCGAAGCGGATGACATGACCCCC
 GTAGTGACAACCGATCACGCCCAAAAGAACTGCCGACTACAAAATTACCAGATGATGCGGTGACGTTAAAACCTATAAGCCATCCAAATCG
 ACCGTTAGTCGAATCAGGACCGCTGGTGGAGAAAGCCGGAAGTATGGCGAATGCACTGTTATAACGTTGAGTCCGCTCATTTAGAGCG
 TCATGTTTAGACAAGAAAGCTACATAATTAATGATCCCGATGATTTTATTTGATAAATGACCCCTAACCTCCATACACGGTATCTACAA
 TGGCGGGGTTTGGTCAAATTTCCGACTGCGGATTTGATCATGCTGTTAAACGGCTCCGCCACTATTAATGAAATTAATAATTCCAAT
 TTAATAACCGCAGCAAGAGAAACATTTGTATGAAGAATGGTAGAAGAAAGAAAATGTCTGTCGACATGCTGAACAACAAGATTAAAT
 ATGCCCTCCGTGATATAAATAAATAATTTGAACGATTTGAAAGAAAACAATGTACCAGCGGCGGTATGTACAGGAAGAGGTTTATACATAAA
 CTGTTACATTTGCAACCGTGGTTTCGTTGTCGCAAGTGTGAAAACCGATGTTAATCAAGGCTCTGACGCAATTTCTACAACCCGACTCCA
 AGTGTGGTGGTGAAGTCATGTCATTTTAAATCAAAATCCCAAGATGTTGATATAAACCCCAAATGATAAATAAATAAATAAATAAATAA
 CTCTGTCCGTTTGTGGCAACTGCAAGGCTCAATCCCTATTTGTAATTAATGAATAATAAACAATATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA
 TATTAACGATACAAACCAACCGCAACAAGAACATTTGTAGTATTAATCAATAAATGAAAACGGCTAGTTATAAATCGCTGAGGTAATAAT
 AAAATCATTTTCAAATGATTCACAGTAAATTTGGACAATAAATTTTATTTTCAACATAAACTAGACCGCTTGTCTCTCTTCTCGT
 ATTCCTTCTCTTTTCAATTTTCTCCATATAAATAAACAATGATTTAATCGTATCCATATATGTA TCTATCGTATAGAGTAAATTTT
 TTGTTGTCAATAATA TATAGTCTTTTAAATGGGGTGTATAGTACCGCTGGCATAAGTTTTCTGTAAATTTTGTACAACAGTGCCTATTTTC
 TGGTAGTCTTCCGGAGTGTGCTTTAATTAATAAATTAATAAATCAATGAAATTTGGGATCGTCCGTTTGTACAATAATGTTGCCCCG
 CATAGTACGCAGCTTCTTAGTCAAATTAACCAATTTTGTAGCAGCACCGGATTAACATAAATTTCCAAAATGTTGTACGAACCGGTTA
 AACAAAACAGTTCACCTCCCTTTCTATACTATTTGCTGCGAGCAGTTGTTGTTGTTAAAATAACAGCCATTGTAATGAGACGCAC
 AAATAATAATCAAAACTGGAAATGTCTAATCAATAAATAGTTGTGATACTCCCGCAGCATGSCCTGCTATTTGCTTTCCCAATCCTCCCC
 CTTGCTGTCTTCCCTCCACCCCAAGAAATAGAAATGACACCTACTCAGACAATGCGATGCAATTTCCCTCATTTTATTAGGAAAGGA

图 6A (续)

GAGCGTGGGTCTCGGGTATCAATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGC
 AACATATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGFAACTGTTCAGACCAAGTTTACTCATATA
 TACTTTAGATGATTTAAAACCTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAC
 GTGAGTTTTCGTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCCTTTTCTGCGGTAATCTGCTGC
 TTGCAAAACAATAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAG
 CAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCCTCG
 CTCTGCTAATCCGTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCCGATAAGTCCGTCTTACCGGGTTGGACTCAAAGACGATAGTTACC GGATAAG
 GCGCAGCCGTCGGCTGAAACGGGGGGTTCGTGCCACAGCCCACTGGAGCGAACTACACCGAACTGAGATACCTACAGCCGTGA
 GCATTGAGAAAGCCCAAGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCCGGA CAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGG
 AGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCCGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCCGATTTTGTGATGCTCGTCA
 GGGGGCGGAGCCATATGGAAAACGCCAGCAACGGCCCTTTTACGGTTCCCTGGCCCTTTGCTGGCCCTTTTGTGCTCACATGTTCTTTCC
 TGCGTTATCCCTTGATTTCTGTGGAHAACCGTATTAACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAAACGACCCGAGCGCAGCG
 AGTCAGTGAGCGGAAAGCGGAAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGGTTAACCTGG
 CTTATCCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCGATCTGTCCGA

第 4 页(共 4 页)

图 6B (续)

GATGGCTGGACTATCTAATGGATTTTCGGTCAACGGCCACAANAACCTTGCCAAATCTTGTAGCAGCAATCTAGCTTTGTGCGATATTTCG
 TTTGTGTTTTGTTTGTAAATAAAGGTTTCGACGTCGTTCAANAATATTATCGGCTTTTGTATTTCTTTCAATCACTGTCGTTAGTGATAC
 AATTGACTCGACGTAACAACGTTAAATAAAGCTAGCTTGGACATAATTAAACATCGGGCGTGTAGCTTTATTAGGCCGATATATCGT
 CGTCTCCCAACCTTCGTCGTTAGAGTTGCTTCCGAAGACGATTTTGCATATAGCCACACGACGCTTATTAATGTGTGCGGCTAAC
 ACGTCCGGATCAAAATTTGTAGTTGAGCTTTTGGAAATATTTCTGATTTGGGGCGTTTTTTGGGGCGTTTTCAATCTAACCTGTGCCC
 CGATTTAATTCAGACAACAACGTTAGAAAGCGATGGTGCAGCGGCTGGTAAACATTTCAAGCCGCAAACTCTACTAATGGCGGCGGTTG
 GTGGAGCTGATGATAAATCTACCATCGGTGGAGCGCGGGGCTGSCGGCGGAGCGGAGGCTGGAAATGTTAGGCACCGGA
 GACGGCGTTTTAGGCTCAAAATGTCCTTTAGGCAACACAGTCCGACCTCAACTATTTGACTGTTTCCGGCCGCTTTTGGGTTTTTGGTTTT
 GACCGGCTCGAGACGAGTCCGATTTTTTCGTTTTCTAATAGCTTCCAAACAATTTGTTCTGCTCTAAAGGTGCAAGCGGTTGAG
 GTTCCGTCGGCATTTGGTGGAGCGGGGCAATTCAGACATCGATGGTGGTGGTGGAGCGGCTGGAAATGTTAGGCACCGGA
 GAAGTGGTGGCGGCTCCCGGTAATAATTTGTTCTGTTTTAGTTTTGTTCCGCCACGATTTGTGGCCACCGGCGCAGGCGCCCGC
 TGGTGCACAACGGAAGTCCGTCGCTTCGAGCAGCGCTTGGGGTGGTGGCAATTCATAATTAATAATGGAAATACAAATCGTAA
 AATCTGCTATAAGCAATGTAAATTTCCGTAATCGTTTACCGTCCGATTTTAAACAACCGCTCAATGTAAGCAATTTGTTATTTGTAAGA
 GATTTCTCAAGCTCCGCACGCGGATAACAAGCCTTTTCAATTTTACTACAGCAATTTGTTAGTGGCGAGACACTTCCGCTGTCGTCGAC
 TCGAGTTCTATAGTGTACCTAAATCGTATGTTGATGATACATAAGGTTATGTAATTAATTTAGCCGCTTAACTAACCGACAATATGT
 CCATATGGTGCACCTCTCAGTACAAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCGCACCCGCAACACCCGCTGACCGGCCCC
 TGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGATCCCGTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCCCGGAGCTGCATGTTGTCAAGGTTTTCACCCGTC
 ATCACCGAACCGCGGAGAGAAAGGCTCCGTTGATACGCCATTTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTATAGACGT
 CAGGTGGCACTTTTTCGGGAAATGTGCGGAAACCCCTAATTTGTTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAATCCGCTCATGAGA
 CAATAACCTGTATAAATGCTTCAATAAATTTGAAAAGGAAGATAGATATCAACATTTCCGTTGTCGCCCTTATTCCTTTTTT
 TGCGGCATTTGCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACCGTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG
 GTFACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCCCGAAGACGTTTTCCCAATGATGAGCACTTTTAA
 GTTCTGCTATGTGGCGGGTATTTATCCCGTATTTGACCGCGGCAAGACAACTCGGTCGCCCCATACACTAATCTCAGAAATGACTT
 GGTGAGTACTCACCAAGTCAAGAAAAGCACTTACCGGATGGCATGACAGTAAAGAAATTAAGCATGCTGCCATAACCAATGAGTG
 AFAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAAACGATCGGAGGACCGAAGGACTAACCGCTTTTGTGCAACAACATGGGGATCAATGTA
 ACTCGCTTGAICGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCACGACGAGCTGACACCCAGTCCCTGTAGCAATGGCAAC
 AACGTTGCGCAACTATACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTG
 CAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGGCTCGCGGTTATC
 ATTGCAGCACTGGGCGCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAAGCAACTATGGAATGAACGAAA
 TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCAATGGTAACTGTCAAGCCAAAGTTTACTCATATACTTTAGATTGAT
 TAAAACTTCATTTTTTAAATTTAAAAGGATCTAGTGAAAGATCCTTTTTGTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAAACGTTGAGTTTTTCG

图 6B (续)

TTCCACTGAGCGGTCAAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTTTGAGATCCTTTTTTCTGCCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC
 AAAAAACCAACCGCTACCGCGGTGGTTTGTTCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGTAACTGGCTTCAGCAGAG
 CGCAGATACCAAAATACTGTCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGCCACCACCTCAAGAACTCTGTAGCACCCCTACATACCTCGCT
 CTGC'PAATCC'TGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTCTTACC GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC GGATAA
 GGCGCAGCGGTCCGGGTGAACGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGC
 GTGAGCATTGAGAAAGCCACCGCTTCCGAAGGAGAAAGGGGACAGGTATCCGGTAAAGCGGACGGTCCGGACAGGAGAGCGC
 ACGAGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTTTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTTCGATTTTGTG
 ATGCTCGTCAGGGGGGAGCCCTATGGAAAACGCCAGCAACGGGCTTTTACGGTTCC'TGGCTTTTGTGGCTTTTGTGCTC
 ACATGTTCTTTCCTGGTTATCCCTGATTCCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGTACCGCTCGCCGACCCGA
 ACGAACCGGACCGAGTCAGTGAGCGGAGGAAAGCGCCCAATA CGAAAACCGCTCTCCCGGCGTGGCCGATTC
 TTAATGCAGGTTAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCGATCTGTCTCGA

第 4 页(共 4 页)

图 6C (续)

CCACCCACCCCCAGAAATAGAAATGACACCTACTCAGACAAATGCGATGCAATTTCCCTCATTTTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTG
 GCACCTTCCAGGGTCAAGGAAAGGACGGGGAGGGCAAAACAAGATGGCTGGCAACTAGAAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCCG
 AGCTTAGTCTAGACTAATTAATACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTCGGTGTAGTGGTTGTGCAGAGCCCTCATGCATCACGGA
 GCATGAGAAGACGTTCCCTGCGCCACCTGCTTGTCCACGGTGTAGCTTGTCTAGAGGAAAGAGCCCGTCCGAGTCCAGCA
 CGGAGGCGTGGTCTTGTAGTGTCTCCGGCTGCCAATGTCTCCCACTCCACCGGCGATGTCCGTGGGATAGAACCTTTGACC
 AGGCAGTCAAGCTGACCTGGTTCTTGGTCAAGTCAATCCCGGATGGGGCAGGGTGTACACTGTGGTCTCGGGGCTGCCCTTT
 GGCTTGGAGATGGTTTTCTCGATGGGGCTGGGAGGGCTTTGTGGAGACCTTGCACCTGTACTCTTCCATTCAGCCAGTCCCT
 GGTGCAGGACGGTGAAGACCGTGCACACGGTACGTGTGTGTACTTCCCTCCCGGGCTTTGTCTTGGCATTAATGCACCTCC
 ACGCCGTCCACGTACCAGTTGAACCTTGACCTCAGGGTCTTCCGTGGCTCACGTCCACCCACCGCATGTGACCTCAGGGGTCCGGGA
 GATCATGAGGGTGTCTTGGTTTTGGGGGAAAGAGGAAGACTGACGGTCCCGCCAGGAGTTCAGGTGCTGGGCACCGGTGGCATG
 TGTAGTTTTGTCAAGATTTGGGCTCAACTTCTTGTCCACCTTGGTGTGTCTGGGCTTGTGATTCACGTTGCAGATGTAGGTC
 TGGTGCACCAAGCTGCTGGAGGACCGGTCAACCGTGCAGGGAGTAGAGTCCCTGAGGACTGTAGGACAGCCCGGAAGGTGTG
 CACCGCTGGTCAAGGCGCTGAGTCCACGACACCGTCCACCGGTTCCGGGAAAGTAGTCTTGACCAAGCAGCCAGGGCCGCTG
 TGCCCCAGAGGTGCTCTTGGAGGAGGTGCCAGGGGAAAGACCGGATGGGCCCTTATCAAACTAGTGTCAACGTTGACTAAGAAATTT
 CATGCGGCCCGTACGATGTAAATAAAATGTAATTAACAGTATAGTATTTAATTAATAACAATGATTTGATAATAATTTCTTA
 TTTAACTATAATATATGTGTGGTTGAATTAAGGTCCTCCCGCATCTCAATGCATAATATCATAGTCCCTTGTGTAAAGTG
 ATGCGTATTTCTGAATCTTGTAAATAGCACACAGGACTCCAACCGGTTTGGCGTTTTATTTCTTGTCTCGAGGATATCATGGAG
 ATAAATAAAATGATAACCATCTCGCAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAAATAAATAAATAAATAAT
 CCGGATTAATCATACCGTCCACCATCGGGCGTGTAGCGGATCCAATGGTGGACCTGCAATGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTAGG
 CCTTGTATAACACCAAGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAATTGAAATCTGGAACCTGCCCTCTGTGTGTGCTGTGAA
 TAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTTCCAAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCAAGAGC
 AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACCGTGAACAAGCAGACTACGAGAAACAACAAGTCTACGCCCTGC
 GAAATCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAAATAGAAGCTTGTCTGTGGATGGAA
 AGGAAAAGAGTCTACAGGGAAACTTGGACCCGCTTCAATGGAAAGACAGCTTCCCATTTGTTAAACGCAACAAGAGTGTGATGATGTTTT
 TCCCTGTGTCAACATCGTCCCACTAGACCCCAACCGTGTGTACAATAATCTTGGCCCAACAGCTCTGCCGTTGCCACCCGACTAT
 GTACCTCATGACGTGATTAGGATCGTGCAGCCCTTCAATGGTGGCAGCAACAACGAGTACCCGATCAGCCCTGGCTAAGAAGGCGG
 CGGCTGCCCAATAATGAACTTCACTCTGAGTACACCAACTCGTTCGAAACAGTTTCATCGATCCGTGTCTCTGGGAGAACTTCTACA

第 2 页(共 4 页)

图 6C (续)

AGCCCAATCGTTTACAICGGTACCGACTCTGCTGAAGAGGAGGAAATTCCTCTGAAGTTTCCCTGGTGTCAAAGTAAAGGAGTTT
GCACAGACGCACCTCTGTTCACCTGGTCCGGCGTATAAACAACGATACATTTGTTATTAGTACATTTATTAAGGGCTAGATTCTGT
GCGTTGTGATTTACAGACAATTTGTTACGTAATTTAAATAATTCATFAAATTTATAATCTTTAGGGTGGTATGTTAGCGGAAA
TCAAATGATTTTCAGCGCTTTTATAATCTGAATTTAAATTAATCCTCAATAGATTGTAAATAGGTTTCGATTAGTTTCAAAC
AAGGTTGTTTTCCGAAACCGATGGCTGGACTAICTAATGGATTTTCGCTCAACGCCACAATACTTGCCAAATCTTTGTAGCAGCAA
TCTAGCTTTGTCGATATTCGTTTGTGTTTTGTTAATAAAGTTCCGACTCGACTCGAATAAATAAAGCTAGCTTGGACATAATTAACAATCGGGCGTGTAGC
CATCACTGTCGTTAGTGTAACAATTGACTCGACGTAACAACGTTAAATAAAGCTAGCTTGGACATAATTAACAATCGGGCGTGTAGC
TTTAAITAGGCCGATTAATCGTCTGTTCCCAACCTCGTCTGTTAGAAAGTTGCTTCCGAAGACGATTTTGCCATAGCCACACGACGCC
TATTAATTTGTCGGCTAACACAGTCCCGATCAAATTTGTTAGTTGAGCTTTTGTGAATTAATTTCTGATTCGGGCGTTTTTGGCGG
GGTTTCAATCAAATGTCGGATTTAAATTCAGACAAACACGTTAGAAAGCGATGTTGCAGCGGTGGTTAACATTTTCAGACGGCAA
ATCTACTAATGGCGGTTGGAGCTGATGATAAATCTACCATCGGTGGAGCGCAGCGGGCTGGCGGGAGGCGGAGGCCG
GAGGTGGTGGCGTGAITGACAGCGGCTTAGGCTCAAATGCTCTTTAGGCAACACAGTCSGCACCTCAAATAATGTAATCTGTT
TCGGGCGCGTTTTTGGTTGACCGTCTGAGACGAGTCCGATTTTTTCTGTTCTAAATAGCTTCCAAATAATGTTGTTCTGTCGTC
TAAAGGTGCAGCGGTTGAGTTCCGTCGGCATTTGGTGGAGCGGGCGGCAATTCAGACATCGATGGTGGTGGTGGTGGAGGCCG
CTGGAATGTTAGGCACGGGAGAGGTTGGCGCGGTGCGCGCGGTAAATTTGTTCTGGTTTGTGTTGGTGGTGGTGGTGGAGGCCG
GGCACCGCGCAGGCGCGCTGGCTGCACAACGGAAAGTCTGCTCGAGGCGGCTGGGGTGGTGGCAATTCAAATATATA
ATTGGAATACAATCGTAAATAATCTGCTATAAGCATTTGTAATTTCCCTATCGTTTACCGTCCCGATATTAAACAACCGCTCAAATGT
AAGCAATTTGATTTGTAAGAGATTGCTCAAGCTCCGACGCGGATAACAAGCTTTTCAATTTTACTACAGCATTTGTAGTGGCGA
GACACTTCGCTGCTCGACTCGAGTTCTATAAGTGTCACTAAATCGTATGTTATGATACATAAAGTTAATGATTAATTTGTAGCC
GCGTTCTAACGACAAATATGTCATATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCGCATAGTTAAGCCAGCCCGACACCCCGC
CAACACCGCTGACGCGCGCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCCCGGAGCTGCATG
TGTGAGAGGTTTTCAACCGTCAICACCGAAACGCGGAGAGGAAAGGSCCTCGTGATACCGCTATTTTATAGGTTAATGTCATGAT
AATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGGAAACCCCTATTTTGTATTTTCTAATAACATTCAA
ATATGATCCGCTCATGACAAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATTAATAATTAATAAGAAAGAGATAGATATTCACATTTCCGT
GTGCGCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCCGTTTTTGCCTCACCCAGAAAACGTTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGA
TCAAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAATGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAAGACGTTTTTC
CAATGATGAGCACCTTTTAAAGTTCTGCTATGTTGGCGGTTATATCCCGTATTTGACCGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATA

第 3 页(共 4 页)

图 6D
pTRABacHuLC λ HCy1 + Stuffers DNA 序列

GCAGTTCTGACCGCCTTCCTCCGTGTGGCCGAACAACGTCGAGGGGGTGGATGACCAGCGGCGTGCACCGCAGCGGCAC
AAGTATCTGTACACCGAATGATCGTCGGGCGAAGCCACGTCGGCTCCAAAGTGGCAATATGGCAAAATCGAAAAATATATACA
GTTGGGTTGTTGGCCATATCTATCGTGGCGTTGGGCATGTACGTCGGAACGTTGATTTGCATGCAAGCCGAAAATTAATCAT
TGCGATTAGTGGGATTAANAACGTTGTACATCCTCGCTTTTAATCATGCGCTCGATTAAATCGCGCAATCGAGTCAAGTGTATCA
AAGTGTGGAAATAAAGTTTCTTTTGTATTCCCGAGTCAAGCGCAGCGCGTATTFAACAAAATAGCCATCTTTGTAAGTTAGTTT
CAATTAATGCAACTTATCCCAATAATAATATTATGATCGCACGTCAGAAATAACAATGCGCCCGTTGTGCACTCAACACG
ACTATGATAGAGATCAAAATAAGCGGGAATTAATAGCTTGGACGCAACGTCACCGATCTGTGACCGCTTCCGGCACGAGC
TTTGTATTGATAAAGTTTACGAAAGCGATGACATGACCCCGTAGTGACAAACGATCACGCCCAAAAGAACTGCCGACTACAA
AATTACCGAGTATGTCGGTAAACATAATAAGCCATCCAATCGACCGTTAGTCGAATCAGGACCGCTGGTGGCGAGAAG
CCGGAAAGTATGGCGAATGCATCGTATAACCGTGTGGAGTCCGCTCATTAGAGCGTCAATGTTAGACAAGAAAGCTACATATTT
AATTGATCCCGATGATTTATTGATAAATTTGACCCCTAACTCCATACACGGTATCTA CAATGGCGGGGTTTTGGTCAAAAATTT
CCGGACTGCGAATTGTACATGCTGTAAACGGCTCCGCCACTATTATGAAATTAANAATTCCAATTTAAAAAACCAGCAAG
AGAAACATTTGTATGAAAGAAATGGGTAGAAGGAAAGAAAATGTCGTCGACATGCTGAAACAACAAGATTAATAATGCCCTCCGTTG
TATRAAAAATAATTGAAACGATTTGAAAGAAAACAATGTACCGCGCGGGTATGTACAGGAAGAGGTTTATACATAAATGTT
ACATTTGCAAAACGGTGGTTTCGTGTGCCAAGTGTGAAAACCGATGTTTAAATCAAGGCTGTGACGCAATTTCTACAAACCGACTCC
AAGTGTGGTGAAGTCAATGCATCTTTTAAATCAAAATCCCAAGATGTGTATAAACCACCAAACTGCCAAAAAATGAAAACCTGT
CGAACAGTCTGTCCGTTTGTGTTAAACGATACAAACCGCAACCAAGAACATTTGTAAATTAATAAATAAACAATATAAATGC
TAAATTTGTTTTTAAACGATACAAACCGCAACCAAGAACATTTGTAGTATTATCTATAAATGAAAACCGGTAGTTAT
AATCGCTGAGGTAATTTAAAATCAATTTCAAATGATTCACAGTTAATTTGGACAATAATAATTTATTTTCAATAAACTA
GACGCCTTGTCTGCTTCTTCTTCTGTTATTCCTTTTCTCTCAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
ATATAATGATCTATAGAGTAAAATTTTTTGTGCTATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
GCATAGTTTTTCTGTAATTTACAAACAGTGCATTTTCTGGTAGTTCTTCCGGAGTGTGCTTTAAATTAATAAATTAATAA
TCAATGAAATTTGGGATCGTCGGTTTTGTACAAATATGTTGCGGCAATAGTACGACCTTCTCTAGTTCAAATACACCAATTTT
TAGCAGCACCGGATTAACATAACTTTCCAAAATGTGTACGAAACCGTTAAACAAAACAGTTCACTCCCTTTTCTATACTAT
TGTTCTGGGAGCAGTTGTTGTTGTTAAATAAACAAGCCATTTGTAATGAGACGCCACAAAATAATAATCACAAACTGGAAAATGCT

第 1 页(共 4 页)

图 6D (续)

TTTTGGCCTTCCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAAACGGCTGGTGAAGAATAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTA
 CATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCTTTGAGAGTTTTCCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGGACTTTTAAAG
 TTCTGTATGTTGGCGGGIATATCCCGTATTGACCGCCGGCAAGACAACTCGTCCGCCATACACTATTCTCAGAAATGAC
 TTGGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGRCAGTAAAGAAATTA TGCAGTGTCCCATAAACCAT
 GAGTGATAAACACTGGGCCAACTTACTTCTGACAACTGCGGAGGACCGAAGGAGCTAAACCGCTTTTTCACAACAATGGGGG
 ATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGAACACCAGATGCCCTGT
 GCAATGGCAACAACGTTGGCAAACTATTAATGGGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGGA
 GGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
 GTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTACTACACGACGGGGAGTCAG
 GCAACTATGGATGAAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACTGTCAAGCCAAAGTTTA
 CTCATAATACTTTAGATTGATTTAAACTTCAATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGTTGAAGATCCTTTTGTGATAATCTCATGA
 CCAAAATCCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTTTGAGATCCTTTT
 TTTCTGGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAACCCACCGCTACCAAGGTTGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC
 TCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTCTTAGTGTA GCCGTAGTTAGGCCACCACT
 TCAAGA ACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAACTCCTGTFACCAGTGGCTGCTCCAGTGGCGGATAAGTCTGT
 CTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGGCAGCGGTCGGGTGAACGGGGGGTTCCGTGCAACAGCCAG
 CTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGCATTGAGAAAAGCCCAACCGCTCCCGAAGGGAGAAAGG
 CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAAGGTCGGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTCCAGGGGGAACGCCCTGGTATCTTTAT
 AGTCCGTGGGGTTTCGCCACTCTGACTTGAGCGTCCGATTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACCGC
 CAGCAAACCGGCTTTTACGGTTCCCTGGCCCTTTTGTGGCCCTTTTGTCTCAATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCGT
 TGGATAACCGTATTAACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAAACGACCGGAGCGCAGCGGAGTCAGTGAAGCGGAG
 GAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAACCGCCCTCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGETTAACCTGGCTTATCCGA
 AATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCGATCTGTCCGA