



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103667304 B

(45)授权公告日 2018.02.02

(21)申请号 201310487984.6

(22)申请日 2008.03.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103667304 A

(43)申请公布日 2014.03.26

(30)优先权数据

0706070.0 2007.03.28 GB

(62)分案原申请数据

200880017669.4 2008.03.28

(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 高瑜 郑霞

(51)Int.Cl.

C12N 15/13(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

审查员 代月函

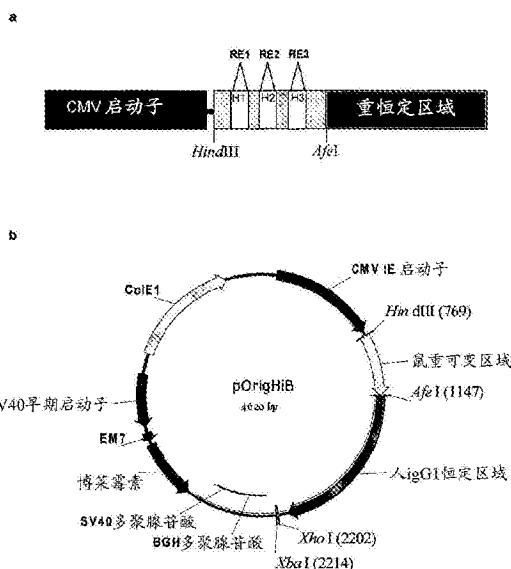
权利要求书1页 说明书45页 附图69页

(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, 所述核酸包括 (a) 启动子, (b) 编码前导序列和抗体的重组重链的序列, 和 (c) 编码抗体的轻链的序列, 其中

所述重链具有至少一种异源性T细胞表位, 所述异源性T细胞表位破坏所述重链以至于所述重链在所述核酸被表达时不能采取它的天然构象并不能与抗体轻链缔合,

至少一种异源性细胞毒性T细胞表位位于所述抗体的重链的CDRH1和/或CDRH2中,

至少一种异源性辅助T细胞表位位于所述抗体的轻链中或者位于所述抗体的重链中, 并且

所述启动子 (i) 对于其中的表达被启动的细胞不具有特异性, 或 (ii) 导致所述核酸在树突细胞中的表达。

2. 根据权利要求1中所述的核酸, 其中所述轻链在其CDR中具有至少一种异源性T细胞表位。

3. 根据权利要求2中所述的核酸, 其中所述CDR是CDRL1。

4. 根据任一项前述权利要求所述的核酸, 其中编码所述至少一种T细胞表位的序列被插入进编码所述重链或所述轻链的序列中。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的核酸, 其中编码所述至少一种T细胞表位的序列被取代进编码所述重链或所述轻链的序列中。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的核酸, 其中所述抗体是单克隆抗体。

7. 根据权利要求4所述的核酸, 其中所述抗体是单克隆抗体。

8. 根据权利要求5所述的核酸, 其中所述抗体是单克隆抗体。

9. 根据权利要求1至3和7-8中任一项所述的核酸, 其中所述重链和/或轻链具有至少一种细胞毒性T细胞表位和至少一种辅助T细胞表位。

10. 根据权利要求4所述的核酸, 其中所述重链和/或轻链具有至少一种细胞毒性T细胞表位和至少一种辅助T细胞表位。

11. 根据权利要求5所述的核酸, 其中所述重链和/或轻链具有至少一种细胞毒性T细胞表位和至少一种辅助T细胞表位。

12. 根据权利要求6所述的核酸, 其中所述重链和/或轻链具有至少一种细胞毒性T细胞表位和至少一种辅助T细胞表位。

13. 一种疫苗, 所述疫苗包括任一项前述权利要求所述的核酸以及佐剂。

14. 一种药物组合物, 所述药物组合物包括权利要求1-12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。

核酸

[0001] 本申请是申请日为2008年3月28日,申请号为200880017669.4,发明名称为“核酸”的申请的分案申请。

发明领域

[0002] 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。

[0003] 发明背景

[0004] 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)。

[0005] 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, W096/19584 (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, W096/19584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。

[0006] 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。

[0007] 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。

[0008] W000/64488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, W000/64488中所述疫苗将只在提高预先存在的T细胞应

答时有用。

[0009] W002/092126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。

[0010] 发明概述

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 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。

[0015] 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细胞表位的情性运载体而起作用,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。

[0016] 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。

[0017] 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.Immunol1995;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.Immunol1995;155:1151-1164)以及外来抗原(Shevach,Immunity2006;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 Research1999;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(Sutmuller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 Research2001;61:4766-4772,Curiel等,Nature Medicine2004;10:942-949,Wolf等,Clin.Cancer Research2003;9:606-612,Sasada等,Cancer2003;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 Medicine2004;10:942-949,Sasada等,Cancer2003;98:1089-1099,Liyanage等,J.Immunology2002;169:2756-2761,Matsuura等,Cancer2006;106:1227-1236,Yang等,Blood2006;107:3639-3646,Alvaro等,Clin.Cancer Research2005;11:1467-1473)。在患有胃癌(Sasada等,Cancer2003;98:1089-1099,Ichihara等,Clinical Cancer Research2003;9:4404-4408)和卵巢癌(Curiel等,Nature Medicine2004;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.Immunology2002;169:2756-2761,Piccirillo等,J.Immunology2001;167:1137-1140,Mempel等,Immunity206;25:129-141,Annacker等,J.Immunology2001;166:3008-3018,Woo等,J.Immunology2002;168:4272-4276)和CD4⁺(Liyanage等,J.Immunology2002;169:2756-2761,Ichihara等,Clinical Cancer Research2003;9:4404-4408,Nishikawa等,Blood2005;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(Ralainirina等,J.Leukoc.Biol.2007;81:144-153)和B细胞(Lim等,J.Immunology2005;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。

[0018] 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,Immunity2006;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.Immunology2005;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 Immunology2005;17:131-136,Jordan等,Nature Immunology2001;2(4):301-306,Picca等,Immunological Reviews2006;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,Immunity2006;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 Immunology2005;6(4):338-344)。

[0019] 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,Immunity2004;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.Immunology2004;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.Immunology2000;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。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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IgG2Fc结合结构域的人IgG1抗体,或含有IgG1Fc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。在小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。

[0023] 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。在一些实施方案中,所述核酸可与包括编码免疫球蛋白分子的轻链的至少一种序列的核酸相组合。

[0024] 在一些实施方案中,所述至少一种异源性T细胞表位可以是在重链和/或轻链的可变区域中。

[0025] 在一些实施方案中,所述至少一种T细胞表位可以是在所述免疫球蛋白的重链和/或轻链的至少一种CDR中。

[0026] 在一些实施方案中,所述CDR可以是CDRL1、CDRH1和/或CDRH2。

[0027] 在一些实施方案中,编码所述至少一种异源性T细胞表位的序列可被插入编码所述重链或轻链的序列中。

[0028] 在一些实施方案中,编码所述至少一种异源性T细胞表位的序列可被取代进编码所述重链或轻链的序列中。

[0029] 在一些实施方案中,所述核酸可编码抗体。

[0030] 在一些实施方案中,所述抗体可以是单克隆抗体。

[0031] 在一些实施方案中,所述至少一种异源性T细胞表位可以是细胞毒性T细胞表位。

[0032] 在一些实施方案中,所述至少一种异源性T细胞表位可以是辅助T细胞表位。

[0033] 在一些实施方案中,所述重链和/或轻链可具有至少一种细胞毒性T细胞表位和至少一种辅助T细胞表位。

[0034] 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。

[0035] 在一些实施方案中,所述核酸可通过以上描述的特征来修饰。

[0036] 本发明还提供:

[0037] • 一种疫苗,其包括本发明的核酸和佐剂;

[0038] • 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;

[0039] • 本发明的核酸在医学上的用途;

[0040] • 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;

[0041] • 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

[0042] • 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。

[0043] 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”。

[0044] 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。

[0045] 如上所讨论,W000/64488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。

[0046] 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)。

[0047] 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,2001J.Immunol.167,5549-5557)中导致特异性表达。

[0048] 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IgG2Fc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小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。

[0049] 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。

[0050] 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B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。

[0051] “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。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 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CDR H1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CDR L1,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:

- [0056] • CDR H1中的一种CD8表位,和CDR L1中的一种CD4表位;
- [0057] • CDR H2中的一种CD8表位,和CDR L1中的一种CD4表位;
- [0058] • CDR H1和CDR H2中的一种CD8表位,和CDR L1中的一种CD4表位;
- [0059] • CDR H1中的2种CD8表位,和CDR L1中的一种CD4表位;
- [0060] • CDR H2中的2种CD8表位,和CDR L1中的一种CD4表位;等。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 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》),Cold Spring 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。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 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。所述治疗可以是针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。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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,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。

[0076] 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。

[0077] 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。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。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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、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。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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:

[0090] 在非人动物中将T调节性细胞耗尽;

[0091] 用候选抗原免疫所述非人动物;以及

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 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。

[0095] 附图简述

[0096] 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:

[0097] 图1:描绘重链载体pOrigHIB的特征的图

[0098] 使用与人IgG1Fc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)。

[0099] 图2:描绘重链载体pOrigLIB的特征的图

[0100] 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)。

[0101] 图3:野生型免疫体嵌合重链的序列

[0102] 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。

[0103] 图4:野生型免疫体嵌合 κ 链的序列

[0104] 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。

[0105] 图5:重叠延伸PCR

[0106] 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。

[0107] 图6:免疫体重链可变区域的序列

[0108] 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Srf I替换。

[0109] 图7:免疫体 κ 链可变区域的序列

[0110] 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。

[0111] 图8:描绘双表达载体pDCOrig的特征的图

[0112] 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,其控制博来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。

[0113] 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

[0114] 嵌合重链pDCOrig IB15CH1终止的核苷酸和氨基酸序列。使用位点定向诱变在人IgG1Fc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(SVYDFFVWL)。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。

[0115] 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

[0116] 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IgG1CH1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(SVYDFFVWL)。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。

[0117] 图11:不含前导序列的DCIB15κ可变区域的核苷酸和氨基酸序列

[0118] 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。

[0119] 图12:人IgG2恒定区域的序列

[0120] 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。

[0121] 图13:人igG3恒定区域的序列

[0122] 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。

[0123] 图14:免疫体双表达载体的人同种型

[0124] A双表达载体pDCOrigIB15huigG2的图。

[0125] B双表达载体pDCOrigIB15huigG3的图。

[0126] 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。

[0127] 图15:含有G2基序的DCIB66重链的序列

[0128] 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E233L234L235被来自人IgG2的P233V234A235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)。

[0129] 被突出显示的Age I/Ahd I位点被用于将含有所述取代的部分转移至pDC0rigIB15huigG1。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。

[0130] 图16:含有G1结合基序的DCIB67重链的序列

[0131] 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P233V234A235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) E233L234L235G236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)。

[0132] 被突出显示的Age I/Ahd I位点被用于将含有所述取代的部分转移至pDC0rigIB15huigG2。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。

[0133] 图17:鼠IgG2a免疫体表达载体

[0134] (A)单链pMo0rigHIB载体,(B)含有H1中的GP100210M表位(TIMDQVPFSV)、H2中的TRP2表位(SVYDFVWL)和L1中的HepB CD4表位(TPPAYRPPNAPIL)的双表达载体DCIB53,以及(C)含有H1中的HLA-DR7限制的gp100CD4表位(GTGRAMLGHTMEVTVYH)、H2中的TRP2表位(SVYDFVWL)和H3中的HLA-DR4限制的gp100CD4表位(WNRQLYPEWTEAQRLD)的双表达载体DCIB63的图。显示了所使用的限制性位点。

[0135] 图18:描绘调节性顺应式质粒pVAXDCIB54的构建的示意图

[0136] 使用NruI将重的单链载体pVaxIB54HIB(A)直链化。使用NruI和HpaI将轻链表达盒从p0rigLIB(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。

[0137] 图19:DCIB15的序列

[0138] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0139] 图20:免疫体构建体产生低水平的完整蛋白。

[0140] 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)感染。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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] 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。

[0144] 图21:DCIB24的序列

[0145] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0146] 图22:DCIB25的序列

[0147] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0148] 图23:DCIB31的序列

[0149] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0150] 图24:DCIB32的序列

[0151] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0152] 图25:DCIB36的序列

[0153] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0154] 图26:DCIB48的序列

[0155] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0156] 图27:DCIB49的序列

[0157] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0158] 图28:DCIB52的序列

[0159] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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(SVYDFVFWL)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。

[0160] 图29:DCIB54的序列

[0161] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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gp100CD4表位(GTGRAMLGTHMEVTYH)、H2中的TRP2表位(SVYDFVFWL)和H3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。

[0162] 图30:DCIB18的序列

[0163] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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(SVYDFVFWL)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。

[0164] 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。

[0165] 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。

[0166] 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。

[0167] C,来自被免疫小鼠的脾细胞被耗尽了CD8T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。

[0168] 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⁵¹Cr释放测定中针对B16F10、B16F10IFNα和B16F10siKb黑素瘤细胞系的细胞毒性。

[0169] 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。

[0170] 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。

[0171] 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。

[0172] 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。

[0173] 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(▤)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,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。

[0175] 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⁵¹Cr释放测定中针对B16F10(■)、B16F10IFN α (▤)和B16F10siKb(□)黑素瘤细胞系的细胞毒性。

[0176] 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。

[0177] 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B16F10siKb黑素瘤系的能力。用%细胞毒性来测量应答。

[0178] 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。

[0179] G,将免疫体DNA的免疫接种(DCIB15)与gp100210M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gp100210M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。

[0180] 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。

[0181] I,将免疫体DNA的免疫接种(DCIB15)与gp100210M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gp100210M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。

[0182] 图33:DCIB21的序列

[0183] 与表达载体pDCOrig中人IgG1Fc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(FERFEIFPK)。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。

[0184] 图34:可从CDR H2位点加工多个表位。

[0185] 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C57Bl/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、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。

[0186] 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、Flu HA 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。

[0187] 图35:DCIB17的序列

[0188] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0189] 图36:DCIB26的序列

[0190] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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-2Z84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。

[0191] 图37:可从可变区域加工多个CTL表位。

[0192] 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gp100IMDQVPFSV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。

[0193] 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、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。

[0194] 图38:可从相同免疫体构建体中不同表位生成多种CTL应答。

[0195] 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)。

[0196] 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。

[0197] 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。

[0198] C, 来自被免疫小鼠的脾细胞在4小时的⁵¹Cr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。

[0199] 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。

[0200] E, 使用10 μ 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。

[0201] 图39:DCIB37的序列

[0202] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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GP100F7L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。

[0203] 图40:DCIB40的序列

[0204] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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GP100F7I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。

[0205] 图41:DCIB41的序列

[0206] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0207] 图42:DCIB42的序列

[0208] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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GP100F7Y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。

[0209] 图43:DCIB43的序列

[0210] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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GP100V5L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。

[0211] 图44:非锚定残基的修饰能提高表位的免疫原性。

[0212] 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。

[0213] 图45:DCIB35的序列

[0214] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0215] 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。

[0216] 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。

[0217] 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。

[0218] C,在第0、7和14天用含有CDR L1中HLA-DR4限制的gp100CD4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。

[0219] 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gp100CD4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。

[0220] 图47:DCIB50的序列

[0221] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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。

[0222] 图48:CD8T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。

[0223] 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CDR L1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。

[0224] 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。

[0225] 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。

[0226] 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HepB辅助肽来分析脾细胞。用斑点/百万个脾细胞来测量应答。

[0227] 图49:免疫体Fc区域有利于建立有效的免疫应答。

[0228] 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B16F10siKb阴性对照细胞系(■)来分析脾细胞。用斑点/百万个脾细胞来测量应答。

[0229] 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。

[0230] 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。

[0231] 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(DCIB15FcStop)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。

[0232] 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(■)来分析脾细胞。用斑点/百万个脾细胞来测量应答。

[0233] 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。

[0234] 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。

[0235] 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。

[0236] 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。

[0237] B,通过在腹膜内注射400 μ g抗CD25抗体(PC61)使C57Bl/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。

[0238] 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Tie2C200HFc 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 μ 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。

[0239] E和F,HHDII小鼠未被处理(e)(n=3)或被腹膜内400 μ 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 μ g Z12肽和100 μ 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 μ 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。

[0240] G,在IFA(皮下)中使用按1:1混合的100 μ 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。

[0241] 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。

[0242] 图51:DCIB71的序列

[0243] 与表达载体pDCOrig中人IgG1Fc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-2Z12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。

[0244] 图52:DCIB72的序列

[0245] 与表达载体pDCOrig中人IgG1Fc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-2Z12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。

[0246] 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。

[0247] 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。

[0248] 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。

[0249] 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CDR L1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。

[0250] 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。

[0251] 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。

[0252] 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。

[0253] 图54:DCIB53的序列

[0254] 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。

[0255] 图55:DCIB64的序列

[0256] 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gp100CD4表位(GTGRAMLGHTMEVTYH)、H2中的TRP2表位(SVYDFFVWL)和H3中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/HpaI限制性位点被突出显示。

[0257] 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。

[0258] 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。

[0259] 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。

[0260] 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。

[0261] 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。

[0262] 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。

[0263] 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。

[0264] 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的肺面积的百分比。在最后一次免疫接种之后7天经过皮下用 2×10^4 个B16F10IFN 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。

[0265] C,肿瘤注射后第46天评估的肿瘤尺寸。

[0266] D,存活率。

[0267] 图59:免疫体免疫接种显著地推迟肿瘤生长。

[0268] 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。

[0269] B,使用 2×10^4 个B16F10IFN 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。

[0270] 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。

[0271] 图60:DCIB68的序列

[0272] 与表达载体pDC0rig中人IgG1Fc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gp100CD4表位(GTGRAMLGHTMEVTVYH)、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。

[0273] 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。

[0274] 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。

[0275] 发明详述

实施例

[0276] 方法

[0277] DNA载体的生成

[0278] 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。

[0279] 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。

[0280] 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1μl的模板质粒pOrigHIB、2μl的dNTPS(2.5mM)、5μl的10×的Taq聚合酶缓冲液、1μl的正向和反向引物(25pmol)、用无菌蒸馏水配成的终体积为50μl的5个单位的Taq聚合酶(New England Biolabs)组成。反应经历了在95℃下5分钟的最初变性,接着是在95℃下30s的35个循环,在55℃(退火)下1分钟,和在72℃(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)。

[0281] 表1.CDR替换酶和表位寡核苷酸序列的列表

	<u>CDR</u>	<u>RE 位点</u>	<u>表位寡核苷酸</u>
	H1	<i>Fsp I</i>	5'NNNNNNNTGGGTTCG3' 3'NNNNNNNACCCAAGC5'
[0282]	H2	<i>Msc I</i>	5'TNNNNNNNCGATTCA3' 3'ANNNNNNNGCTAAGT5'
	H3	<i>Srf I</i>	5'GANNNNNNNTG3' 3'CTNNNNNNNAC5'
	L1	<i>Eco RV</i>	5'CTCTTGCGNNNNNNNTGGT3' 3'GAGAACGNNNNNNNACCA5'

[0283]

L2	<i>Ssp I</i>	5'CTACNNNNNNNAG3' 3'GATGNNNNNNNTC5'
L3	<i>Hpa I</i>	5'TATTACTGCNNNNNNNTTCGGTGGAGG3' 'ATAATGACGNNNNNNNAAGCCACCTCC5'

[0284] N代表表位DNA序列

[0285] 余下的字母代表需要被并入的骨架核苷酸

[0286] 1μl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TA TOP0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。

[0287] 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SC100V_H和V_L区域而将不同版本插入pOrig HIB和pOrigLIB。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)。

[0288] 表2——引物

[0289]

寡核苷酸	序列
H1	<i>FspI</i> 5'-CCT GAG AAT GTC CTG CTG CGC AGG CTC CGG GGA AG-
H2	<i>MscI</i> 5'-CAT TGG TAG TGG TGG CCA TTT CCA GAG AC-3'
H3	<i>SfiI</i> 5'-CCG TGT ATT ACT GTG CCC GGG CCA AGG AAC CAC GGT C-3'
L1	<i>EcoRV</i> 5'-GGA GCC AGC CTC GAT ATC TGC AGA AAC CAG GC-3'
L2	<i>SspI</i> 5'-CCA CAG CTC CTA ATA TTC AGT GGC AGT GGA TC-3'
L3	<i>HpaI</i> 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'

[0290]

pOrig 重链	
huigG3 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'
huigG1PVA 反向	5'-A GAC TGA CGG TCC CCC CGC GAC TGG AGG TGC TGG-3'
HuigG2ELLG 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'
migG2aC1Afe1F2	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'
MoIgG2BamHI 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'
MoigG2XhoI 正向	5'-GC AGC TCA GTG ACT GTA ACT TCG AGC ACC TGG CCC AGC-3'
MoigG2XhoI 反向	5'-GCT GGG CCA GGT GCT CGA AGT TAC AGT CAC TGA GCT GC-3'
wt κ varL1 正向	5'-C TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC CTG GTA CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA GAA TGG T-3'
wt κ 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'

[0291] 抗原表位向单链载体的CDR位点中的插入

[0292] 若干CD8CTL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。

[0293] 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。

[0294] S V Y D F F V W L

[0295] 5'-磷酸化的-T AGT GTT TAT GAT TTT TTT GTG TGG CTC CGA TTC A-3'

[0296] 3'-A TCA CAA ATA CTA AAA AAA CAC ACC GAG GCT AAG T-磷酸化的-5'

[0297] 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10μl的每种引物配制成终体积50μl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℃。

[0298] 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和在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,10μl的10×NEB缓冲液3,用无菌蒸馏水配制成终体积100μl。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。

[0299] 表3CTL和辅助表位

[0300]

蛋白质	坐标	序列	HLA 限制
TRP2	180-188	SVYDFFVWL aglglttaltgattttltgtgtggctc	A2, Kb
GP100	209-217	ITDQVPFSV accattactgaccaggtgcctttctccgtg	A2
GP100 (210M)	209-217(M)	IMDQVPFSV accattatggaccaggtgcctttctccgtg	A2
GP100 (F7L)	209-217	ITDQVPLSV accattactgaccaggtgcctttgtccgtg	A2
GP100	44-59	WNRQLYPEWTEAQRLD tggaacaggcagctgtatccagagtgacagaagcccagagactgac	DR0401
HEPB S AG	28-39	IPQSLDSWWTSL ataccgcagagctctagactcgtgtgtgacttctctc	Kd (CTL)
HepB 核蛋白	128-140	TPPAYRPPNAPIL actcctccagcttatagaccaccaaatgccctatecta	I-Ab (辅助)
MAGE3	271-279	FLWGPRLV ttcctgtgggtccaagggccctcgtt	A2
Tie2 (Z83)	124-132	FLPATLTMT ttctaccagctactttaactatgact	A2

[0301]

Tie2 (Z84)	124-132	FLPATLTMTV ttctaccagctactttaactatggtt	A2
Tie2 (Z9)	431-439	GMVEKPFNI gggatggtggaaaagccctcaacatt	A2
Tie2 (mZ9)	431-439	GMVEKPFNV gggatggtggaaaagccctcaacgtt	A2
FLU HA	111-120	FERFEIFPKE tttgaaagggttgagatattccccaaggaa	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	GELIGTLNAAKVPAD ggggagctcatcggcactctgaacgcggccaagggtgccggccgac	DR0101
磷酸丙糖异构酶(mI)	23-37	GELIGILNAAKVPAD ggggagctcatcggcactctgaacgcggccaagggtgccggccgac	DR0101
VEGFR2	773-781	VIAMFFWLL gtgaftgccatgttcttctggctactt	A2
mVEGFR2	773-781	VLAMFFWLL gtgcttgccatggttcttctggctactt	A2

[0302] 向双表达载体pDCOrig中的转移

[0303] 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。

[0304] 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莱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。

[0305] 表4.pDCOrig构建体

[0306]

	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 FLPATLTMV			HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB30	Gp100 F7L TIIDQVPLSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB31			TRP2 SVYDFFVWL		
DCIB32			TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL
DCIB33 huigG2	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB35	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD	
DCIB36					TRP2 SVYDFFVWL
DCIB37	Gp100 F7L TIIDQVPLSV			HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB40	Gp100 F7I TIIDQVPISV			HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB41	Gp100 野生型 TIIDQVPFSV			HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB42	Gp100 F7Y TIIDQVPYSV			HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB43	Gp100 V5L TIIDQLPFSV			HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB48		TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD		
DCIB49			HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL		
DCIB50	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL			Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD
DCIB52		TRP2 SVYDFFVWL	HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL		
DCIB53 MoigG2a	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB54	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD		
DCIB64 MoigG2a	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD		
DCIB65 huigG3	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB66 huigG1 + G2 基序	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB67 huigG2 + G1 基序	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB68	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH
DCIB69 MoigG2a	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH
DCIB71	Tie-2 Z12 ILNSLPLV			HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB72		Tie-2 Z12 ILNSLPLV		HepB 核蛋白 TPPAYRPPNAPIL	

[0307] pDcOrig IB15CH1终止的生成

[0308] 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)。

[0309] 前导序列从pDCOrig IB15中的去除

[0310] 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 TOP0,而且通过测序来确认克隆。缺乏前导序列的IB15V_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。

[0311] 免疫体TM双表达载体pDCOrig的人IgG2和IgG3同种型的构建

[0312] 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pOTB7huigG3的huigG3正向和反向引物(表2)(图像克隆4566267MGC45809)。相似地,人IgG2恒定区域被扩增,其使用带有pTOB7huigG2模板的igG2正向和igG2反向引物(表2)(图像克隆6281452MGC71314)。

[0313] 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pDCOrigIB15huigG2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体载体之间容易地交换可变区域。

[0314] 人IgG1Fc γ 和人IgG2受体结合结构域的突变

[0315] 为了用huigG2的P233V234A235取代CH2结构域中huigG1结合基序的氨基酸E233L234L235,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huigG1PVA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 IB15huigG1的单切割AgeI/AhdI位点插入而有效地替换野生型序列(图15)。

[0316] 构建体pDCOrig IB15huigG2的huigG2恒定结构域中的氨基酸P233V234A235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TA TOP0。在序列确认后,含有huigG1结合基序的部分使用质粒pDCOrig IB15huigG2的AgeI/AhdI位点再次替换野生型序列(图16)。

[0317] pDCOrig鼠IgG2a质粒DCIB53和DCIB63的生成

[0318] 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 huκ。

[0319] 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/L1Bsi。免疫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MoκSDM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/L1Bsi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 huκ的BamHI/XhoI位点以替换人κ链而生成鼠双表达载体pDCOrigIB GP100210m/H1TRP2/H2HepB辅助/L1moIgG2a (DCIB53,图17B和54)。

[0320] 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 huκ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wtκvarL1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/H1TRP2/H2和GP100DR4/H3的DCIB54的重可变区域转移以生成pDCOrig GP100DR7/H1TRP2/H2GP100DR4/H3moigG2a野生型κ (DCIB68,图17C和60)。

[0321] 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

[0322] 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pCR2.1TOP0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。

[0323] 对FDA法规遵从的一种pVax1 (Invitrogen)的pDCOrig骨架的改变

[0324] 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,使用临近于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。

[0325] pOrig鼠TRP2和pCDNA3GP100的生成

[0326] 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。

[0327] 夹心Elisa

[0328] 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Falcon96孔柔性板并在4 $^{\circ}$ C过夜。使用Skan Washer400(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(Sigma A7164),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。

[0329] 小鼠和免疫接种

[0330] 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(HHDII)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。

[0331] 体外的再刺激

[0332] 最后一次免疫接种之后五天,在37 $^{\circ}$ 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、20mM HEPES 缓冲液、100 单位/ml 青霉素、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ 链霉素和 10^{-5} M2-巯基乙醇的 2ml RPMI-1644 中。通过在 37°C 用 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ LPS (Sigma) 和 $7 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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。

[0333] ^{51}Cr 释放测定

[0334] 在含有或不含有 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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:

[0335] 特异性溶解 = $100 \times [(\text{实验释放} - \text{自发释放}) / (\text{最大释放} - \text{自发释放})]$

[0336] 先体外后体内的酶联免疫斑点测定

[0337] 根据制造商的指示 (Mabtech, 瑞典) 使用鼠 IFN γ 捕捉和检测试剂进行酶联免疫斑点测定。简言之, 将抗 IFN γ 抗体涂布于 96 孔 Immobilon-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 IFN γ 抗体来检测被捕捉的 IFN γ , 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 CD8 T 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。

[0338] 肿瘤研究

[0339] 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 IFN α 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。

[0340] 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。

[0341] 实施例 1-免疫体构建体产生低水平的完整抗体

[0342] 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。

[0343] 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 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (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CDR H2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)。

[0344] 该数据表明,将CD8和CD4T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。

[0345] 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。

[0346] 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

[0347] 将之前发表的来自TRP2的CTL表位氨基酸280-288(Bloom等,The Journal of Experimental Medicine1997;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。

[0348] 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)。

[0349] 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B16F10IFN 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B16F10IFN α 细胞与不表达H-2Kb分子(B16F10siKb)的B16F10系相比具有高表达的表面I类MHC。针对B16F10siKb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)。

[0350] 这些结果显示,被并入免疫体骨架CDR H2区域的TRP2(SVYDFVWL)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。

[0351] 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。

[0352] 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

[0353] 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。

[0354] 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B16F10siKb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。

[0355] 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B16F20siKb黑素瘤系的较高特异性溶解,其中所述B16F20siKb黑素瘤系已降低H-2Kb的水平。

[0356] 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)。

[0357] 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 Immunol2005;175:6169-76;Rosenberg等,Nature Medicine2004;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CD8T细胞显示优秀的抗肿瘤活性(Alexander-Miller,Immunologic research,2005;31:13-24;Hodge等,J Immunol2005;174:5994-6004;Valmori等,J Immunol2002;168:4231-40;Zeh等,J Immunol1999;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)。

[0358] 实施例4-多个表位可从CDR H2位点被加工

[0359] 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限制的流行性感胃血凝素 (FERFEIFPKE) 表位。

[0360] 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。

[0361] 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)。

[0362] 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。

[0363] 实施例5-多个CTL表位可从可变区域被加工

[0364] 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。

[0365] 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。

[0366] 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。

[0367] HHDII小鼠引起高频率的gp100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)。

[0368] 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。

[0369] 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

[0370] 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CDR L1位点中 (DCIB15; 图19)。

[0371] 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。

[0372] 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特异性应答的亲合力。对gp100表位的应答的亲合力范围是从 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B16F10HHD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)。

[0373] 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TRP2CD8表位二者的构建体免疫的小鼠与用只含有TRP2CD8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)。

[0374] 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。

[0375] 使用含有CDRH2中的TRP2表位(DCIB18)或CDRH2中的SIINFEKL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,SIINFEKL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。

[0376] 实施例7-非锚定残基修饰能增强T细胞识别

[0377] 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)。

[0378] 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)。

[0379] 表5

[0380]

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)	ITDQVPLSV	18	19

Gp100 (F7I)	ITDQVPISV	Nd	18
TRP2	SVYDFFVWL	19	21
对照		7.29	—

[0381] 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

[0382] 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WNRQLYPEWTEAQRDL (DCIB35;图45)。

[0383] 用免疫体DNA通过基因枪对Ba1b/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。

[0384] 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。

[0385] 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

[0386] 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。

[0387] 为了确定是否需要分泌的免疫体来诱导CD8和CD4T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)。

[0388] 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CD4T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)。

[0389] 该数据暗示,重链的分泌对于CD8T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。

[0390] 实施例10-不包括Fc的CTL应答的减少是由于缺乏蛋白分泌

[0391] 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SVYDFFVWL和CDR L1中的I-Ab限制的HepB CD4表位TPPAYRPPNAPIL (DCIB15) (图9)。

[0392] 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。

[0393] 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TM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)。

[0394] 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。

[0395] 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TM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)。

[0396] 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。

[0397] 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。

[0398] 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Tie2C200hFc DNA构建体对动物进行免疫(Ramage等, Int.J.Cancer2004;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PC61mAb处理后使用C200hFc如前所述对另一组小鼠进行免疫。

[0399] 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69SFC/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94SFC/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85SFC/百万个脾细胞。

[0400] 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。

[0401] 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215SFC/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137SFC/百万个细胞(图50e和f)。

[0402] 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)。

[0403] 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。

[0404]

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)

[0405] 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。²Tie-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IC₅₀nM的单位给出分数,较低分数代表较高亲和性的肽。⁵使用NetCTL1.2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。*表明高于阈值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IC₅₀nM的单位给出分数,较低分数代表较高亲和性的肽。建议的IC₅₀值是在0.01至5000nM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冒A病毒基质蛋白的已知Z18CTL表位而获得的值。

[0406] 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

[0407] 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-DR4gp100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。

[0408] 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

[0409] 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)。

[0410] 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572-580YLFFYRKSV和氨基酸988-997YLQVNSLQTV)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。

[0411] 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

[0412] 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。

[0413] 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。

[0414] 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)。

[0415] 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

[0416] 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。

[0417] 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)。

[0418] 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)。

[0419] 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 America1999;96:2982-7;Lane等,Cancer Research2004;64:1509-14;Steitz等,Cancer Immunol Immunother2006;55:246-53;Rosenberg&White,J Immunother Emphasis Tumor Immunol1996;19:81-4)。

[0420] 实施例16-免疫体免疫接种显著地延缓肿瘤生长

[0421] 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。

[0422] 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)。

[0423] 还使用攻击性较弱的B16F10IFN 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。

[0424] 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。

[0425] 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。

[0426] 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。

[0427] 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)。

[0428] 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。

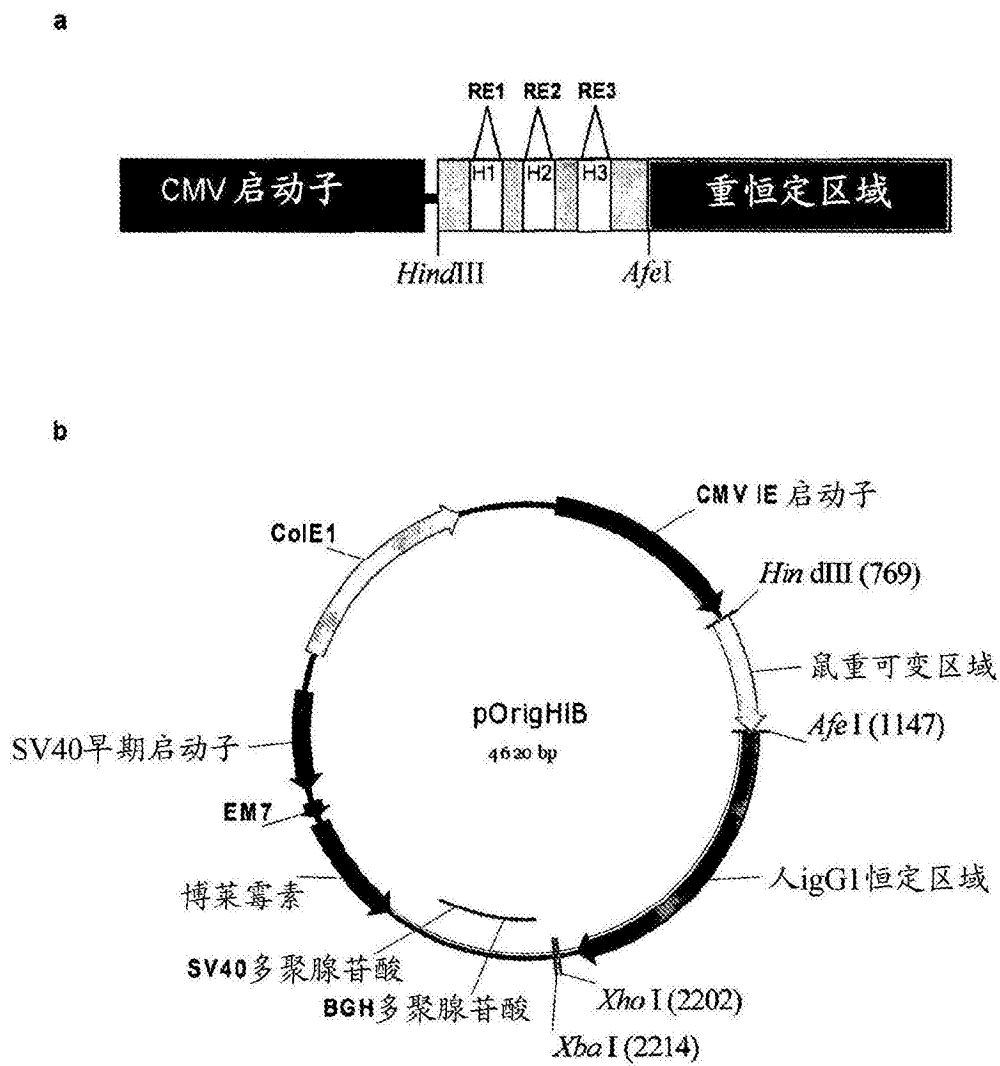


图1

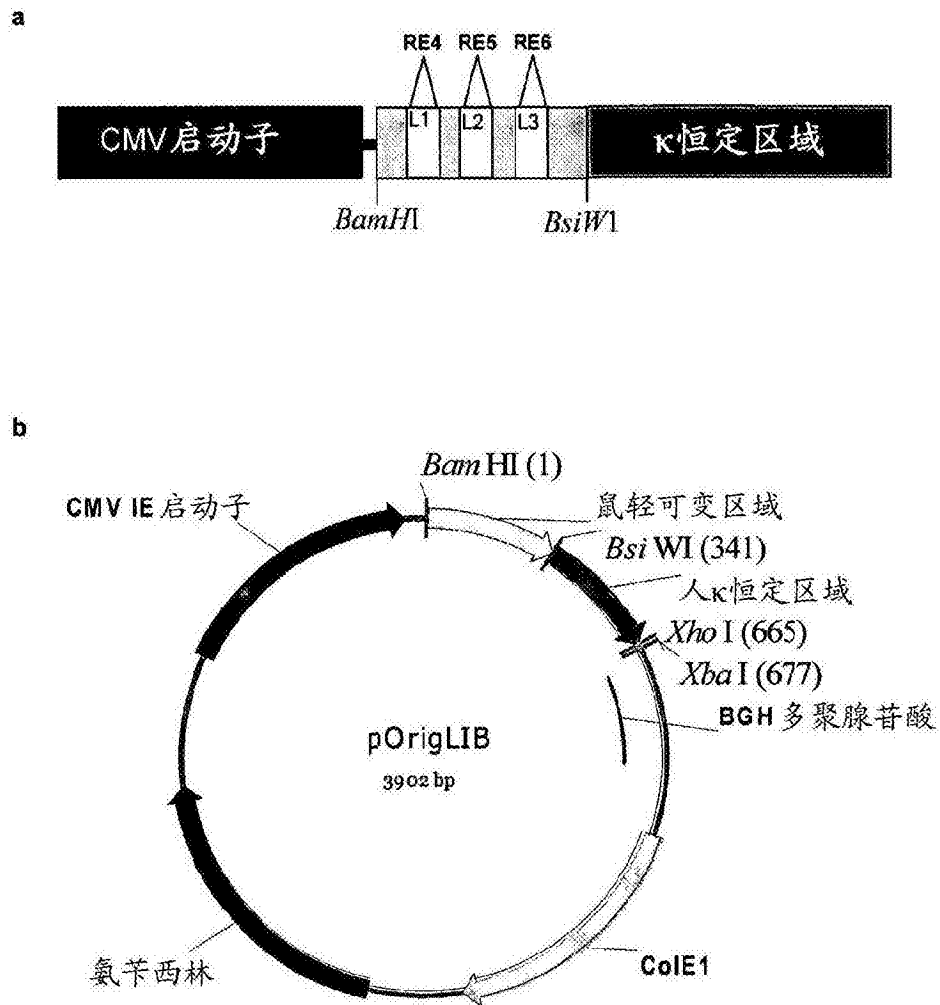


图2

图3

图4

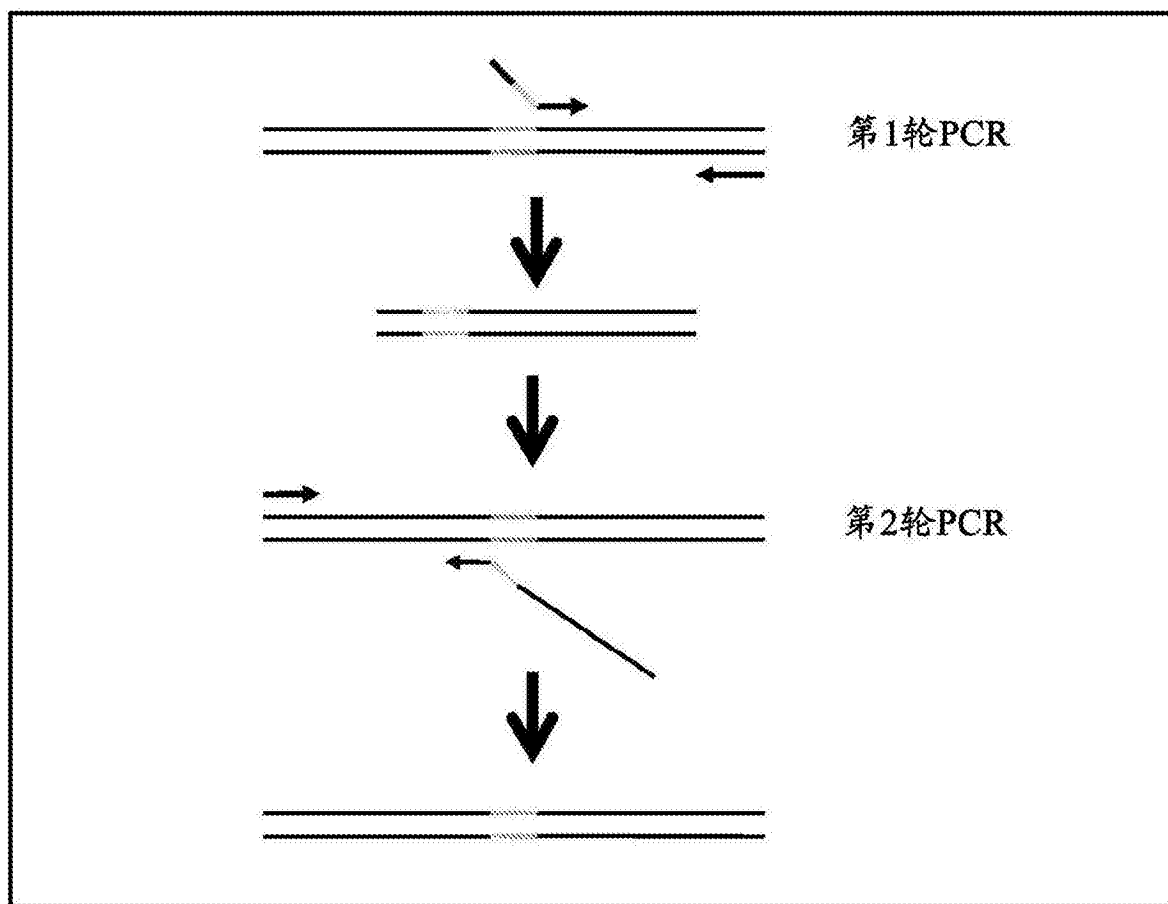


图5

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
ATGGGAIGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT
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**GGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCA
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
TACATTGGTAGTGGTGGTGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTCAACATTTCAGAGACAATAGC
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
AAGAACACCTGTATTTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGT
H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S A
CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACCACGGTCACCGTCTCC**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
ATGGGAIGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT
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
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTCAATACCTATGAC
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
ATGTCTTGGGTTCCGCCAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGT**TGGCCAT**TCAGAGAC
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
AATAGCAAGAACACCTGTATTTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACAT
Y G H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S A
TATGGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACIGGGTCAAGGTACCACGGTCACCGTCTCC**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 I
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT
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
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTCAATACCTATGAC
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
ATGTCTTGGGTTCCGCCAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTGTATAGAACCTAC
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
TATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTCAACATTTCAGAGACAATAGCAAGAACACCTGTATTTGCAATTGAACAGT
SrfI
L R A E D T A V Y Y C A G Q G T T V T V S S A
CTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGT**GCCCCGGCCA**AGGTACCACGGTCACCGTCTCC**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
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

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
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCT**TGGCGC**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**TGGCC**ATTTCAGAGACAATAGCAAGAACACCCCTGTATTTCGAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAG

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
GACACAGCCGIGTATTACTGTGCAAGACATTATGGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACC

T V T V S S A
ACGGTACCGTCTCC**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
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

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
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCT**TGGCGC**AGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCA

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
TACATTGGTAGTGGTGGTGTATAGAACCCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCCAGAGACAATAGC

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
AAGAACACCGTGTATTTCGAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGT**GCCCCGGG**CAAGGT

T I V T V S S A
ACCACGGTACCGTCTCC**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
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

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
GGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCGCTTCAATACCTATGAC

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
ATGTCITGGGTTCCGAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGG**TGGCC**ATTTCAGAGAC

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
AATAGCAAGAACACCCCTGTATTTCGAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGT**GCCCCGGG**

Q G T T V T V S S A
CAAGGTACCGGTCACCGTCTCC**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
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

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**GGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCA

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
TACATTGGIAGTGG**TGGCCA**TTTCCAGAGACAATAGCAAGAACACCCTGTATTTCGAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAG

SrfI

D T A V Y Y C A G Q G T T V T V S S A
GACACAGCCGTGTATTACTGT**GCCCGGGCCA**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
 ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGTGATGACCCAAATCTCCACTC

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
 TCCCTGCCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTC**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
 AACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT

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
 GAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGGAGCTTCGGTGGAGGCCACCAAGGTGGAAATCAAG**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
 ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGTGATGACCCAAATCTCCACTC

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
 TCCCTGCCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAACACCTAT

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
 ITAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCT**AATATT**CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTC

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
 AAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGGAGCTTCGGTGGAGGC

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
 ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGTGATGACCCAAATCTCCACTC

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
 TCCCTGCCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGAGAICTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAACACCTAT

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
 TTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGAC

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
 AGATTTCAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAG**GTTA**ACCAAGGTG

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
AIGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAATCTCCACTC
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
TCCCTGCCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCGATATCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATATTTCAGTGGCAGT
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
GGATCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACAT
V P W T F G G G T K V E I K
GTICCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG

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
AIGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAATCTCCACTC
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
TCCCTGCCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCGATATCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCC
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
GAGGATACCGGAGTTAACCAGGTGGAAATCAAGCGTACG

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
AIGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAATCTCCACTC
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
TCCCTGCCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCCAATCTTTCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTAT
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
TTAGAAATGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATATTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTC
HpaI
K I S R V E A E D T G V T K V E I K
AAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTTAACCAGGTGGAAATCAAGCGTACG

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
 ATGGGATGGAGCTGTATCAATCTCTTCTGTTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAAATCTCCACTC

 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
 ICCTGCGCTGCTACTCTGTTGGGAGCCAGCCTC**GATATCT**GCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCT**TAATATTC**AGTGGCAGT

 G S G T D F T L N I S R V E A E D T G V T K V E I K
 GGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGA**GTTAACA**AGGTGGAAATCAAG**CGTACG**

图7继续

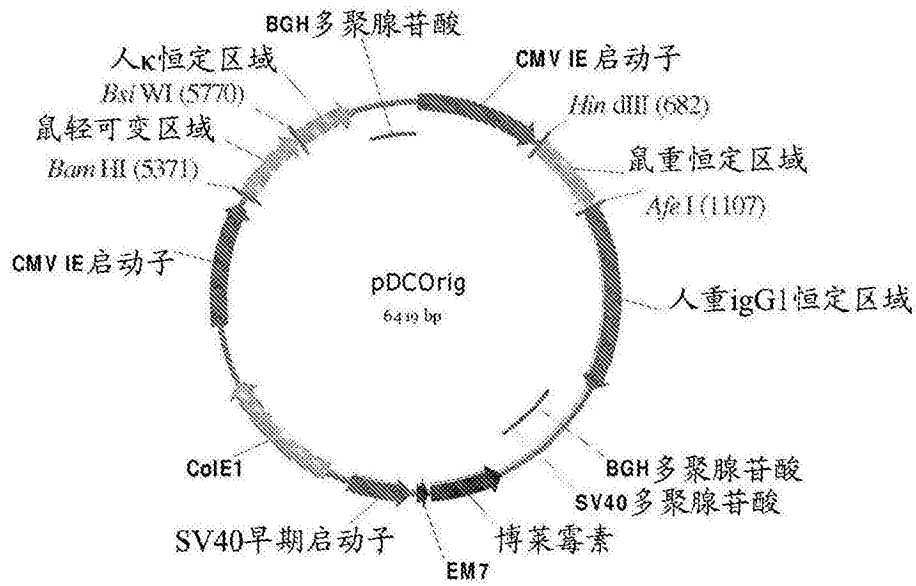


图8

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 ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGAGTCCACTCCAGGTCCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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
 GGAGGCITAAATCCAGCCIGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGCAACCATTATGGACCAGGTGCCTTCTCCGTCGGGTTCGGCAGGCTCCG
 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
 GGGAAGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTACTGTTTATGATTTTTTGTGTGGCTCGATTCCCTCTTCCAGAGAC
 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 C P S V F P L A
 GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACACGGTCCAGCGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA
 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
 CCTCTCTCCAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCGTGTCTCAAGGACTACTTCCCGAAGCCGTGACCGTGTCTGTGGAAC
 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
 TCAGGCGCCCTGACCAAGCGGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGGTGGTGACCGTGCCC
 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
 TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAGAAAGTTTGACCCCAATCT
 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 ACCATGACAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTCTGCAACCATTATGGAC
 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
 CAGGTGCCTTCTCCGTCGGGTTCGGCAGGCTCCGGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTACTGTTTATGAT
 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
 TTTTTTGTGTGGCTCGATTACCATTTCCAGAGACAAATAGCAAGAACACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACA
 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
 GCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGTCCTACTGCTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGTCAAGGTACACAGTCCACCGTCTCCAGC
 271 ----- 360

GCT
 361 --- 363

图10.DCIB15

轻链

BamHI M D V L M T Q S P L S L P V T P G E F A S I S C T P P
 GGATCCACCATGGATGTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCTGTCTACTCTCTGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGGACTCTCTCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

A Y R P P N A P I L W Y L Q E P G Q S P Q L L I Y K V S N R
 GCTTATAGACCAACCAATGCCCCATATCTATGGTATCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCTCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

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
 TTTTCTGSGGTCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGA
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

V Y Y C F Q G S H V P W T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 GTGATTTACTGCTTTCAAGSTTCACATGTTCCGTGGACGTTGGTGGAGGCCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 345

图11

AfeI
 S A S T R 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
 ACGCGTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGCGGCGCTGTCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGCCCTGGGTGCTCTGGTC
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

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

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

S N T K V D R T V E R R C C V E C P P C P A P P V A G P S V
 AGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAGATGTTGTGTGAGTGTCCACCGTGGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

F L F P P E P E D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
 TTCTCTTCCCCCAAAACCCAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACAGTGGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAGAC
 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
 CCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTT
 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 E G L P A
 CGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCCAGGACTGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC
 541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630

P I E K T I S K T E G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCGGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAG
 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
 AACCAAGTCAAGCTGACCTGCTGCTCAAGGCTTCTACCCAGCGCATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCGGAGAGAACAC
 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 E S R W Q Q G
 TACAAGACACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCCGTGGACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 811 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 900

SapI
 N V F S C S V M R E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *
 AACGCTTCTCATGCTCCGTGAIGCATGAGGCTCTGCACACCACTACACCGCAAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATATCCA
 901 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 990

CTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCGCGTCGAC
 991 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1037

图12

图13

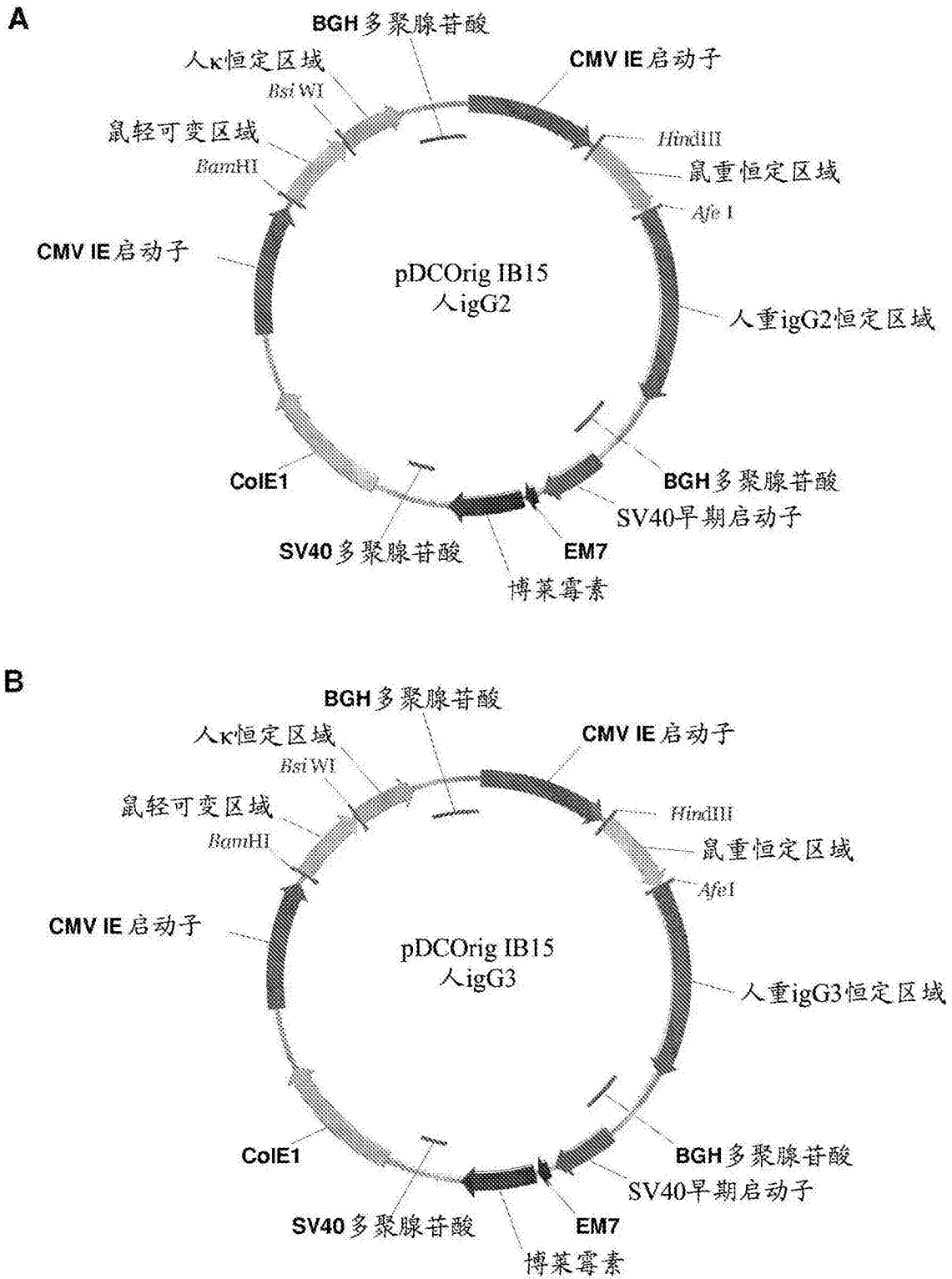


图14

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 ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTSGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90
 G G L I Q F G G S L R M S C T I I M D Q V P F S V W V R Q A P
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGTCCCTGAGAAATGTCTGACCAATTATGGACCAGGTGGCTTCTCCGTGTGGGTTCCGGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180
 G K G L E W T A Y I G S G G S V Y D F F V W L R P T I S R D
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCAIACATTGGTAGTGGTGTAGTGTTATGATTTTTTTGTGTGGTCCGATTACCATTTCCAGAGAC
 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
 AATAGCAAGAACACCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGGGAGACATTATGGTCACTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360
 V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S A S I K G P S V F P L A
 GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACACAGGTACCCGTCTCC**AGCGCT**TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTGGCA
 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 H
 CCCTCCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGCTGCGTCAAGGACTACTTCCCGCA**ACCGGT**GACGGTGTCTGTGAAC
 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
 TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
 541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630
 S S S L G T Q T Y I C N V U H K P S N T N V D K E V E P K S
 TCCAGCAGCTTGGGCAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCT
 631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720
 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
 TGTGACAAACTCACACATGCCACCGTCCCGAGCACCTCCAGTCCGCGGG**GACCGTCAGTCT**TCTCTTCCCGCCAAACCCAGGAC
 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 E F H W Y V
 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGITCAACTGGTACGTG
 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
 GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTCACCGTCTCTG
 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
 CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAGGCC
 991 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1080
 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K W Q V S L T C L V
 AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTC
 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
 AAAGGCTTCTATCCCGGACATCGCGTGGAGTGGGAGGCAATGGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGGCTGGAC
 1171 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1260
 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G H V F S C S V M H
 TCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
 1261 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1350
 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *
 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGATCTAAAGGGCGAATTGCGCCCTTAAAGGGCGAATT
 1351 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 1440

图15

[illegible]

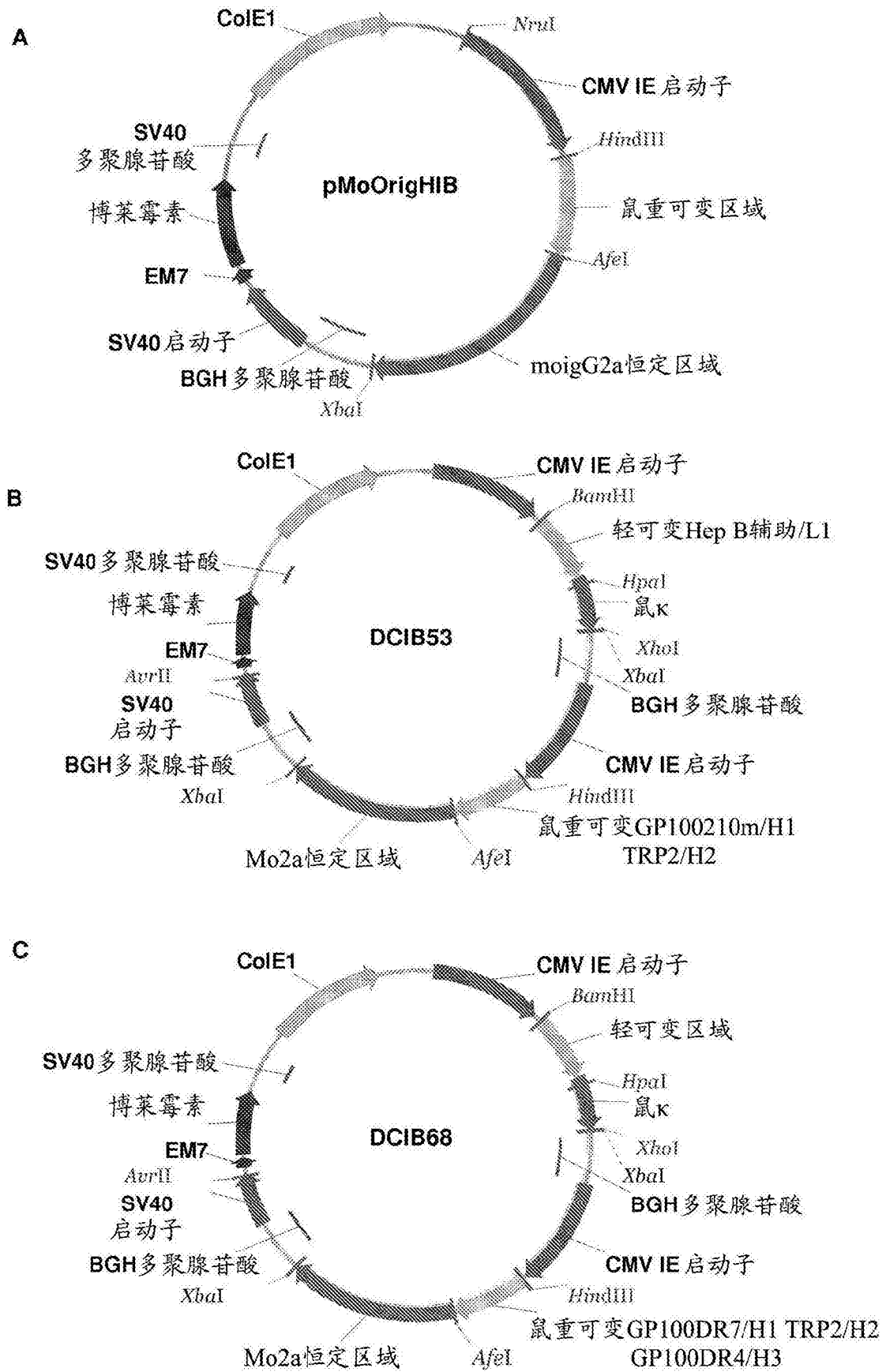


图17

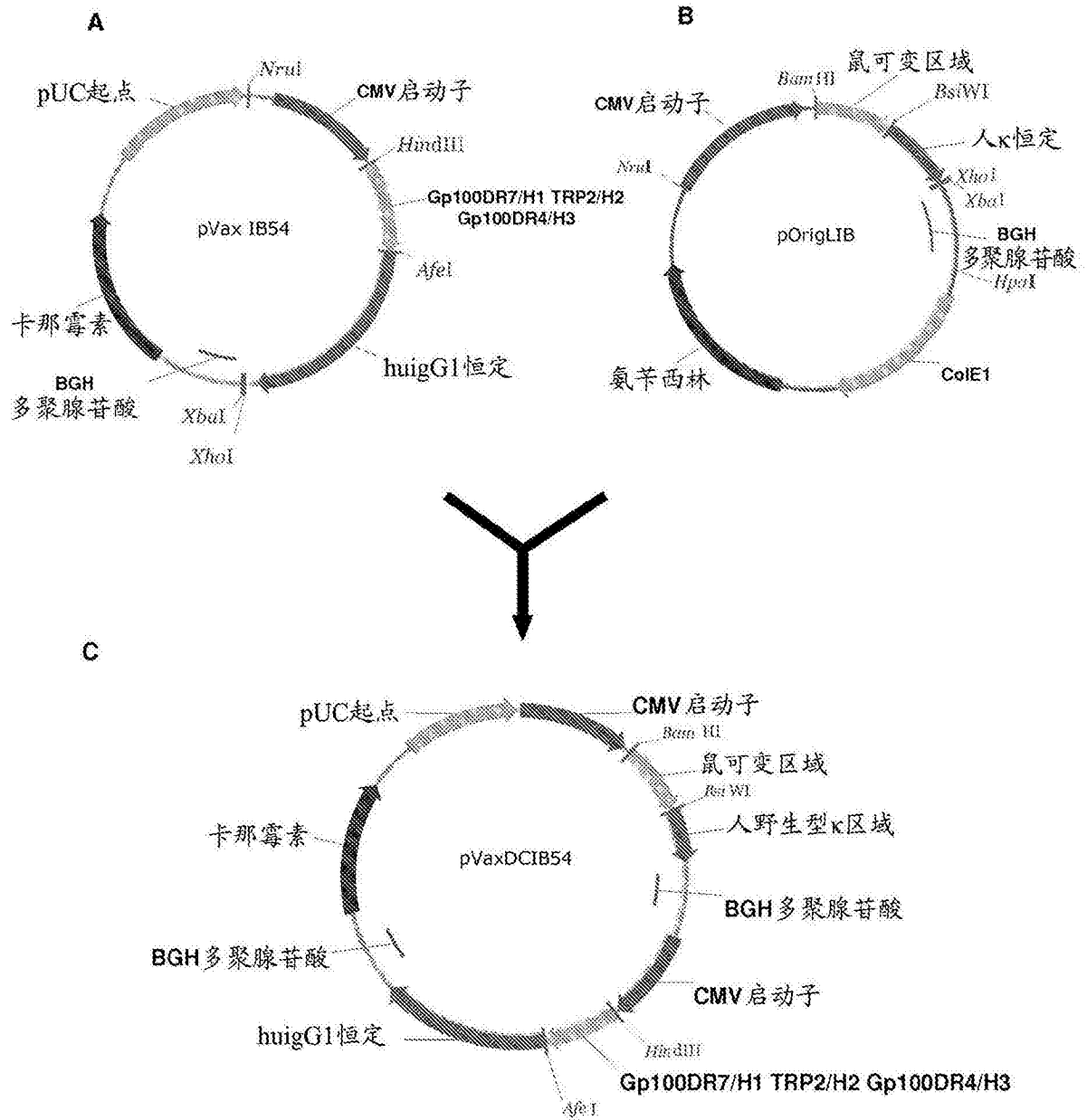


图18

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 I 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
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGGACCAITATGGACCAGGTGCCTTTCTCCGCTGGGGTTCGGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

S 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
 GGGAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTSTTTATGATTTTTTTGTGTGGCTCGATTCAACATTTCCAGAGAC
 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
 AATAGCAAGAACACCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGTCCTACTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI

V D Y A V D Y W G Q G I T V T V S S
 GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACCAAGGTACCGTCTCCAGCGCT
 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
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T P F A V R P P N A P I L W Y
 CTCTCCCTGCCTGTCTACTCTGGGGAGCCAGCCCTCGATCTCTTGGACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAAAATGCCCTATCTCTATGGTAT
 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
 CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTCCTGGGGTCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGGA
 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
 TCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

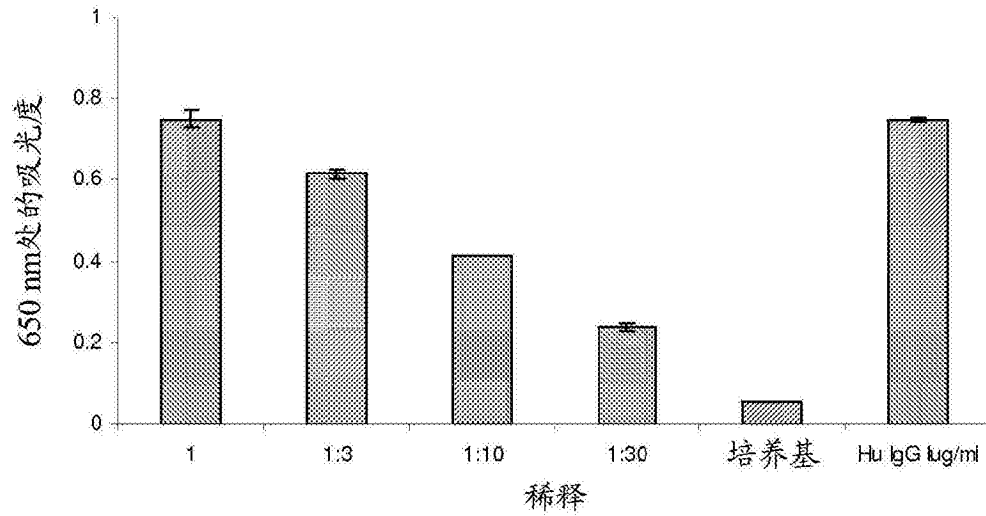
BsiWI

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

图19

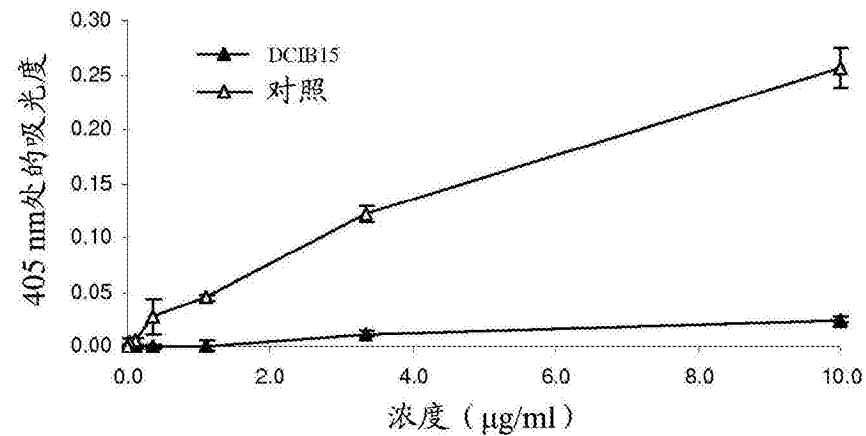
a.

上清液中gp100/H1、TRP2/H2、HepB/L1 IB蛋白的滴定



b.

纯化的DCIB15免疫体蛋白（重链）的滴定



c.

IB重链和完整抗体的表达

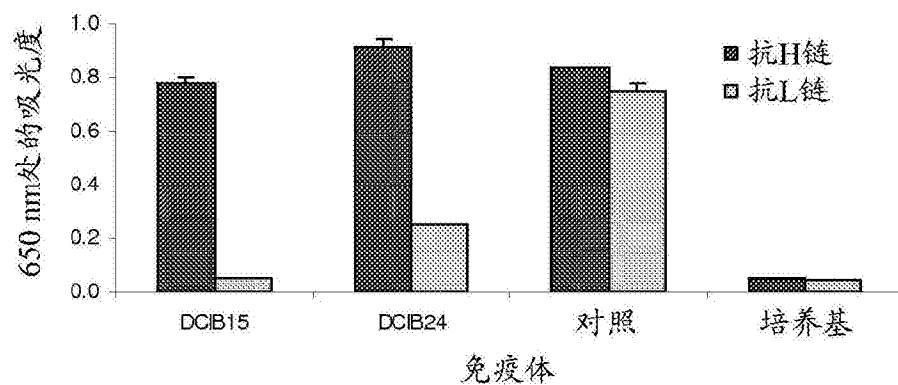
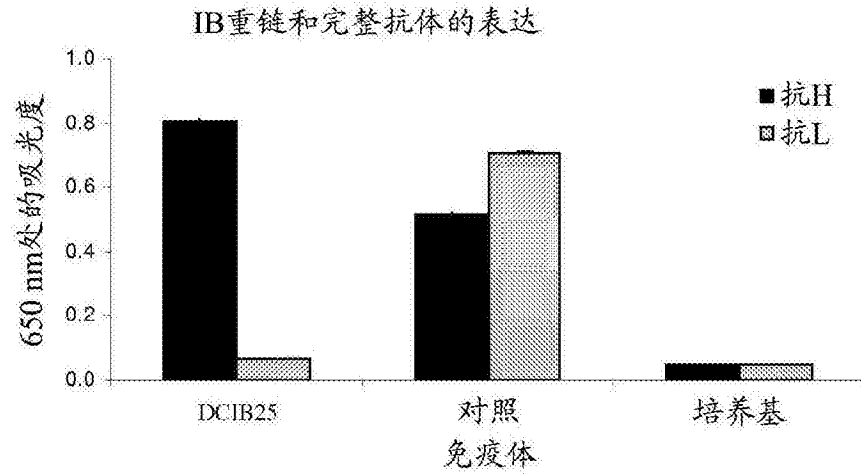


图20

d.



e.

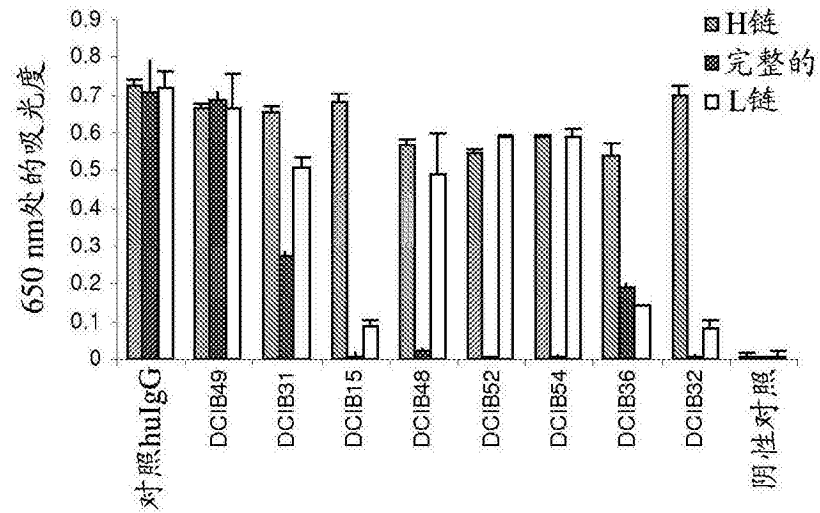


图20继续

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 S
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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
 GGAGGCTTAATCCAGGCTGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTGGC
 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 R L R F T I S
 CAGGCTCCGGSGAAGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATATAATCAACTTTGAAAACTCCGATTCCACCATTTCC
 181 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 270

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

H Y V D Y A V D Y W G Q G T I V T V S S
AfeI
 CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGATCAAGGAACCAACGGTCACCGTCTCC**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 ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGTGATGACCCAAATCCTCCA
 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
 CTCCTCCCTGGCTGTCTCTCTGGGAGCCAGCCCTCGATCTCTTGGACTCTCCAGCTTATAGACCAACAAATGCCCTATCCCTAGGTAT
 91 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V F D R F S G S G
 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTTCCTGGGGTCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGG
 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
 TCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGASTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCGGTGG
 271 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 360

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 ACSTTCGGTGGAGGCCACCAAGGTGGAATCAAG**CGTACG**
 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
 AAGCTTACCATTGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I M D Q V P E S V W V R Q A P
 GGAGGCTTAATCCAGCTCGAGGGTCCCTGAGATGTCTTGCACCATATGGACAGGTGCCTTCTCCGTGTGGGTTCGGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 160

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

N S N 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
 AATAGCAAGAACACCCCTGTATTTGCAATTGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGGTCACTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGCTCAAGGTACACAGGTACCCGTCTCCAGCGCT
 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
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGTATGACCCATCTCCA
 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
 CTCCTCCCTGCTGTCACTCTCGGGAGGCGAGGCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATATGTAATGGAAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

E W Y L Q E P G Q S P Q L L I Y N V S N E F S G V P D R F S
 GAATGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCTGATCTACAAAGTTTCCAAACGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGT
 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
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGGTACTCTCCAGCTTAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

E P E N A P I L F G G G T E V E I K **BsiWI**
 AGACCAACCAATGCCCTATCCTATCTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
 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 ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGSTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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 N V R
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGTGACGCTCTGGATTGGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCGC
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Q A P G N G L E W I A Y I G S G G D R T Y Y F D U V R G R F
 CAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTGTAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGSCCGATTG
 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
 ACCATTTTCAGAGACAATAGCAAGAACCCCTGTATTGTGAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCGA
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI

S V Y D F F V W L W G Q G T T V T V S S
 AGTGTATGATTTTTTGTGTGGCTCTGGGGCCAGGAACCAAGGTCACCGTCTCC**AGCGCT**

 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 423

轻可变

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

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

E W Y L Q K P S Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
 GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTCTGGGGTCCAGACAGATTCAGT
 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
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGTCTTCAAGGTTACAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

BsiWI

V F W T F G G G T K V E I K
 GTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAG**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
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
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
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGSGTCCCTGAGAATGTCTGTGACAGCTCTGGATTGCGTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCGC
91  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 180

Q A P G K G L E K I A Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F
CAGGCTCCGGSAAAGGGCTGGAGTSGATCCCATACATTGGTACTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTTC
181  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 270

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

S V Y D F F V W L W G Q G T T V T V S S
AGTGTATTATGATTTTTTTGTGTGGCTCTGGGGCCAGGAACACGGTCCACCGTCTCCAGCGCT
361  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 423

```

轻可变

```

BamHI  N 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
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCAATCTCCA
1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 90

L S L P V T F G E P A S I S C R S S Q S L V H S H G N T Y L
CTCTCCCTGCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTA
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
GAATGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTCTTGGGGTCCCAGACAGATTCACT
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
GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCACTCTCCAGCTTAT
271  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 360

E P P N A P I L F G G G T K V E I K BsiW1
AGACCACCAATGCCCTATCTATTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
361  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 420

```

图24

重可变

```

HindIII  N 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
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTSCAGCTGGTGGAGACTGGG
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 N S W V R
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGCTCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCCG
91 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 180

Q A F G K C L E W I A Y I G S G G D R I Y Y P D T V K G R F
CAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCCCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTC
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
ACCATTTCCAGAGACAATAGCAAGAACACCCCTGTATTGGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGA
271 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 360

H Y G H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
CATTATGGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACGGTCAACCGTCTCCAGCGCT
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
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
CTCTCCCTGCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTA
91 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 180

E W Y L Q K P G Q S F Q L L I Y K V S H R F S G V P D R F S
GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCACACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGATTTCAGT
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
GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCACTGTTTATGATTTT
271 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 360

F V W L F G G G T R V E I K BsiWI
TTTGTGTGGCTCTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
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
 AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGCTCCTGAGAATGTCCTGTGAGGCTCTGGATTGCGTTTCAATACCTATGACATGCTTGGGTTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Q A P G K G L E W I A Y I G S G G S V V D F F V W L R F T I
 CAGGCTCCGGGAAGGGGCTGAGTGGATCCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGGTTTATGATTTTGTGTGGCTCCGATTACCATI
 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 H
 TCAGAGACAATAGCAAGAACCCCTGTATTTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCCGTGGAAC
 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
 AGGCAGCTGTATCCAGAGTGGACAGAAGCCAGAGACTTGAGTGGGGCCAAGGAACCAAGGTACCCGTCTCCAGCGCT
 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
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGTGATGACCCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

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

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

G S G S C 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
 GGCAGTGCATCAGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACAT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

BsiWI

V P W T F G G G T R V E I K
 GTCCGTTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGSAATCAAGCGTACG
 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
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
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
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGAAATGCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTCCG
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
CAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTSGTAGTGGTGGTATAGAGCCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTC
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
ACCATTTCCAGAGACAATAGCAAGACACCCCTGTATTGCAATTGACAGCTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCGA
271 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 360

T P P A Y Y R P P N A P I L W G Q G T T V T V S S
ACTCCCTCCAGCTTATAGACCACCAAAATGCCCTATCCTATGGGCCCAAGGAACCAAGGTCACCGTCTCCAGCGCT
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
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCCAATCTCCA
1 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 90

L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V R S N G N T Y L
CTCTCCCTGGCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCCTCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAACACCTATTTA
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
GAATGGTACCTGCAGAAACCCAGGCCAGTCTCCACAGETCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGATTCAAT
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
GGCAGTGGATCAGSGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACAT
271 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 360

V P W T F S G G T N V E I N
GTCCCTGGACGTTCCGTTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
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 S
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCCTGTGTCAGCCCTGGATTCCGCTTTCATACCTATGACAIGTCTTGGGTTCGC
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

Q A P G N 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
 CAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTTTATGATTITTTTGTGGCTCCGATTCACCAIT
 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 E T P
 TCCAGAGACAATAGCAAGAACACCCTGTATTTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCGACTCCT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 P A Y R P P N A F I L W G Q G T T V T V S S
 CCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGGGCCAAGGAACACGGTCAACCGTCTCCAGCGCT
 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
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTCTTGATGACCCATCTCCA
 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
 CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

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

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

BsiWI
 V P W T F G G G T K V E I K
 GTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
 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 ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

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

Y H W V E 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
 TACCATTCGGTTCGGCAGGCTCCGGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTACTGTTTATGATTTTTTGTGTGG
 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
 CTCGCAITCACCATTTCAGAGACAATAGCAAGAACACCTGTATTTCGAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGCTGATTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

C A R W H 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
 TGTGCCCCGTTGGAACAGGCAGCTGTATCCAGAGTGGACAGAGGCCAGAGACTTGACTGGGGCCAGGTACACAGGCTACCCGTCTCCAGC
 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
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGTGATGACCCCAATCTCCA
 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
 CTCCTCCCTGCTGTCACTCCTGGGAGCCAGCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTA
 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
 GAATGGTACCTGCAGAACCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGATTTCAGT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G S S 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

BsiWI

V P W T F G G G T N V E I K
 GTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
 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
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAAATGTCCTGTGTCAGCCTCTGGATTGGCTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTGGC
 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
 CAGGCTCCGGGAAGGGGTGGAGTGGATCGCATACATGGTAGTGGTGGTAGTGTATGATTTTGTGTGCTCCGATTCACCAT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

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

G H Y V D Y A V D Y W G Q G T I V T V S S
 GGTACATACGTGGACTATGCTGTGGGCTACTGGGGTCAAGGAACCAAGGTCAACGTCTCC**AGCGCT**
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 428

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 ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGTGATGACCCAAATCTCCA
 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 W A P I L W Y
 CTCTCCCTGCGTGTCACTCTGTGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGGACTCTCCAGCTTATAGACCAACAAATGCCCTATCTATGGTAT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S H R F S G V P D R F S G S G
 CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGG
 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
 TCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T N V E I R
 ACGTTCCGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

BsiWI

图30

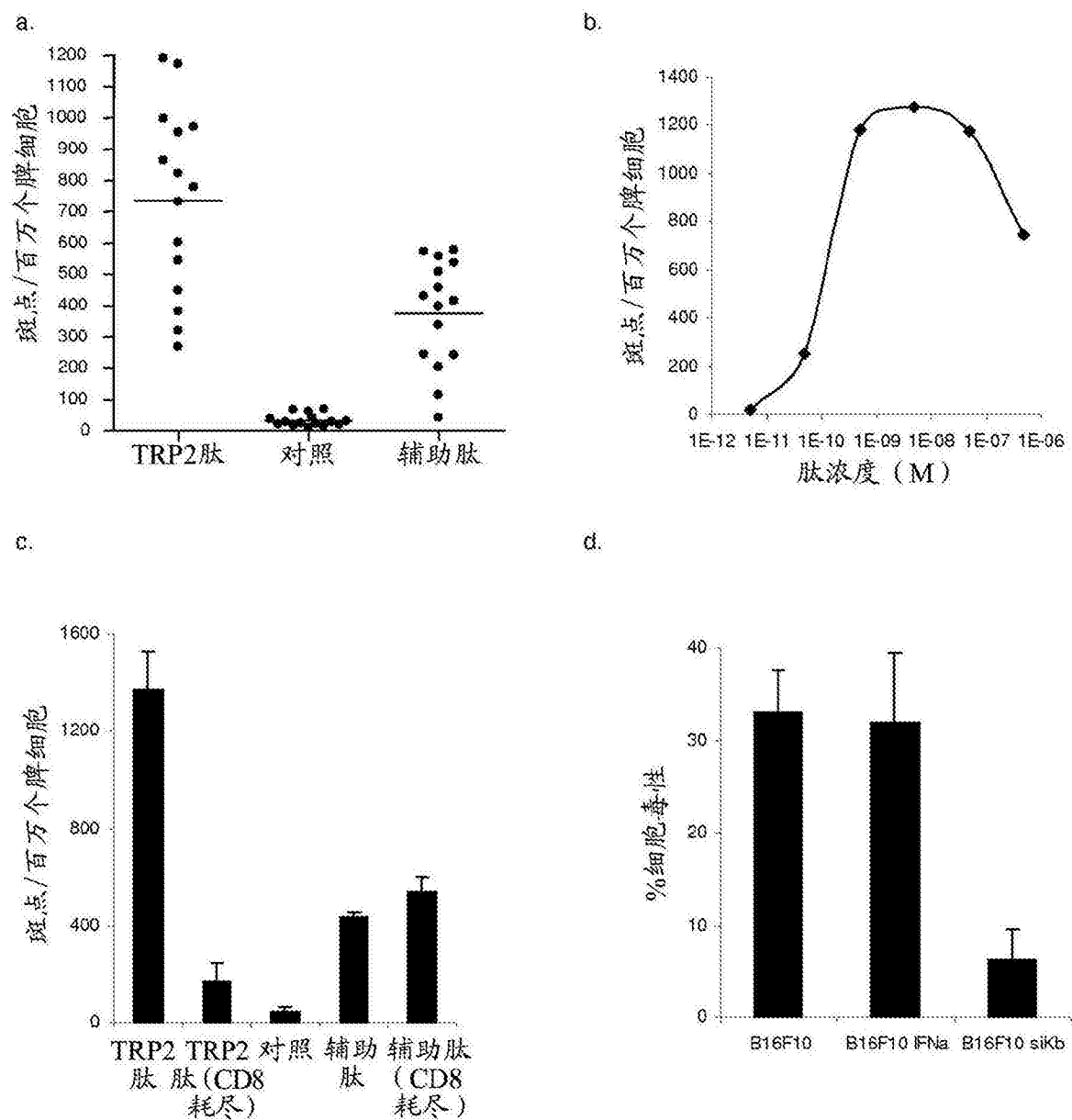
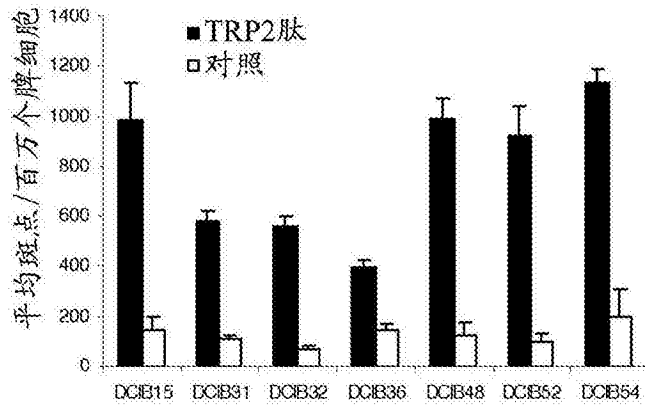
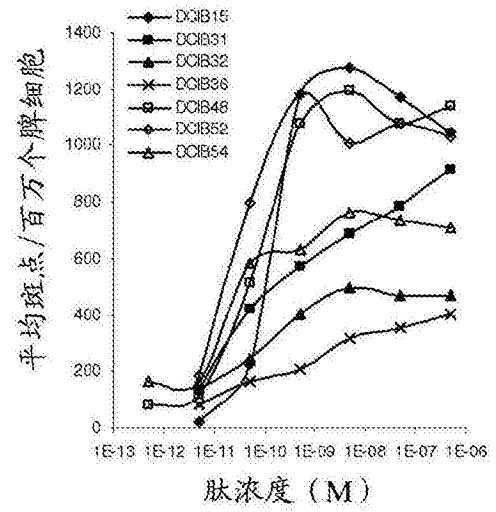


图31

e.



f.



g.

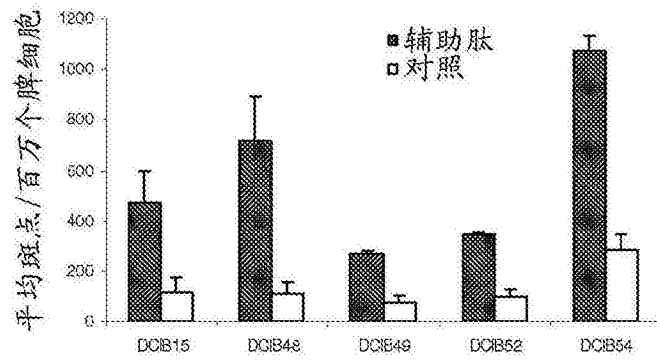
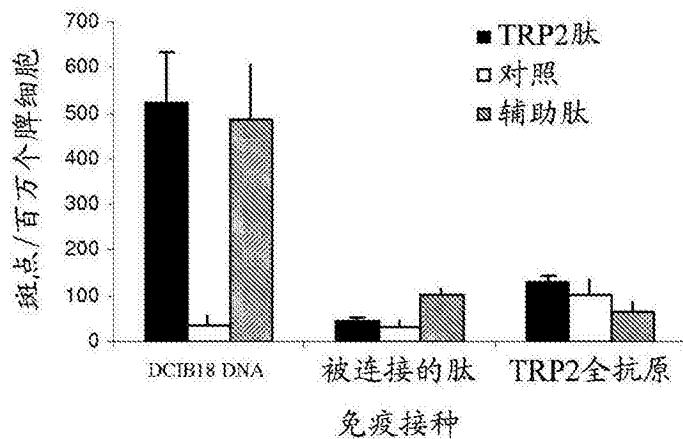
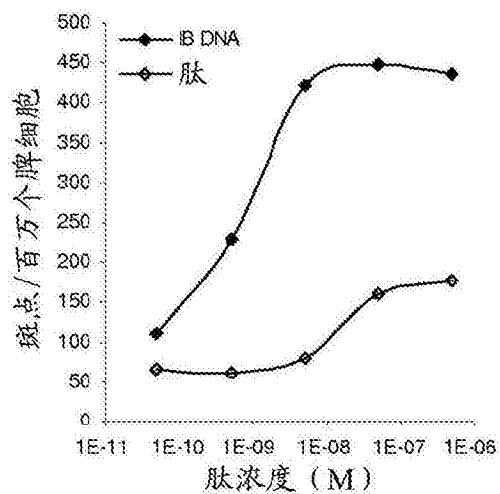


图31继续

a.



b.



c.

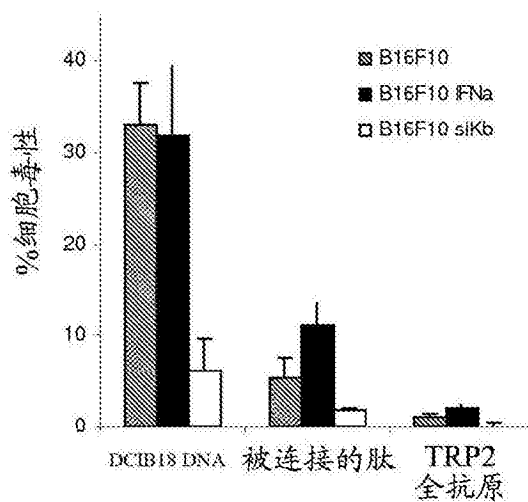
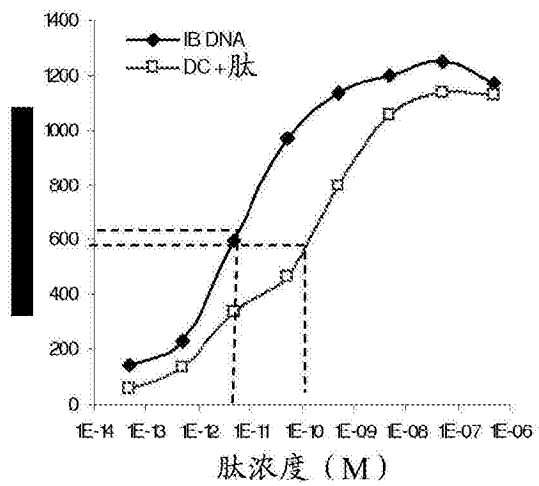
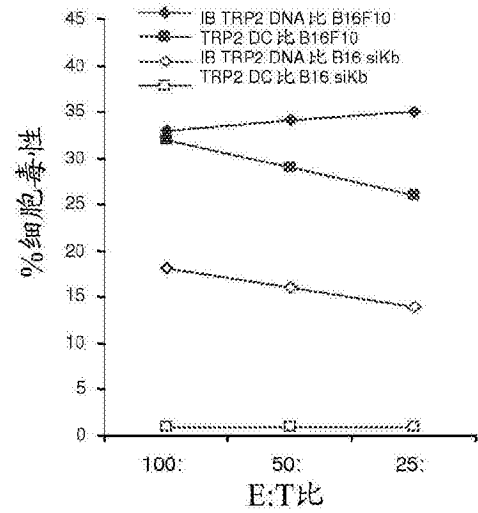


图32

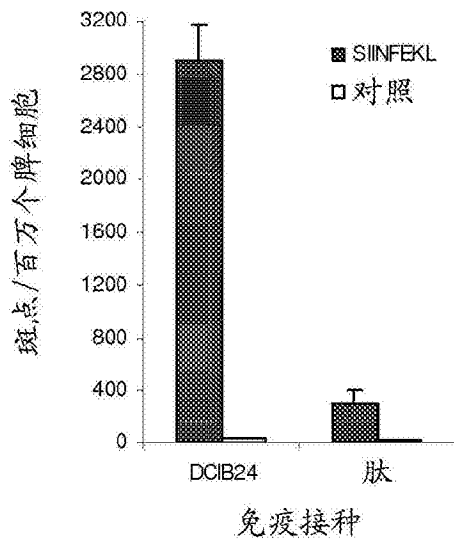
d.



e.



f.



g.

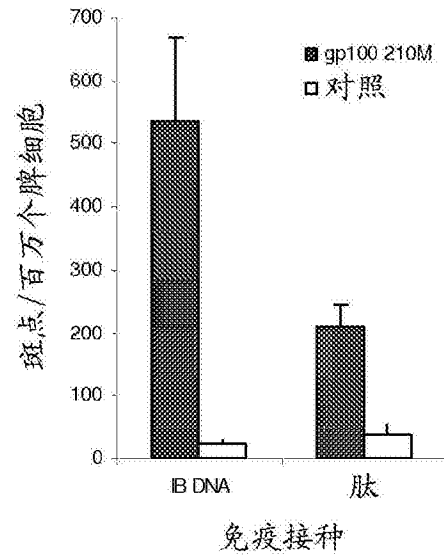
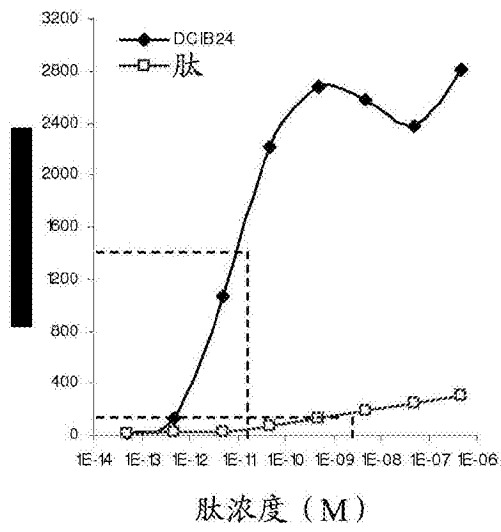


图32继续

h.



i.

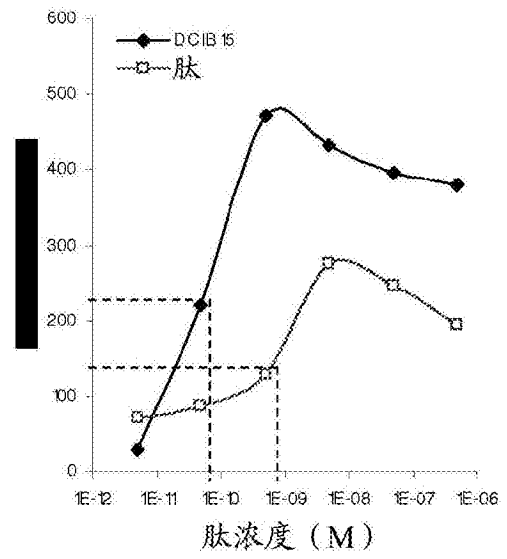


图32继续

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 I Q S P
GGATCCACCAATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACATCCGATGTGTGATGACCCAAATCTCCA
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 R
CTCTCCCTGCGCTGTACTCTGTGGGAGGCAGGCTCCATCTCTTGGTTTSAAGGGTTTGAATATTCCCAAGGAGTGGTACCTGAGAGAA
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
CCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCCAACCGATTCTCTGGGTTCCCAAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACA
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

      D E 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
GATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAGGTTTCACATGTTCCGTGGACGTTCCGT
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

      G G T K V E I K BsiWI
GGAGGCCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 390

```

图33

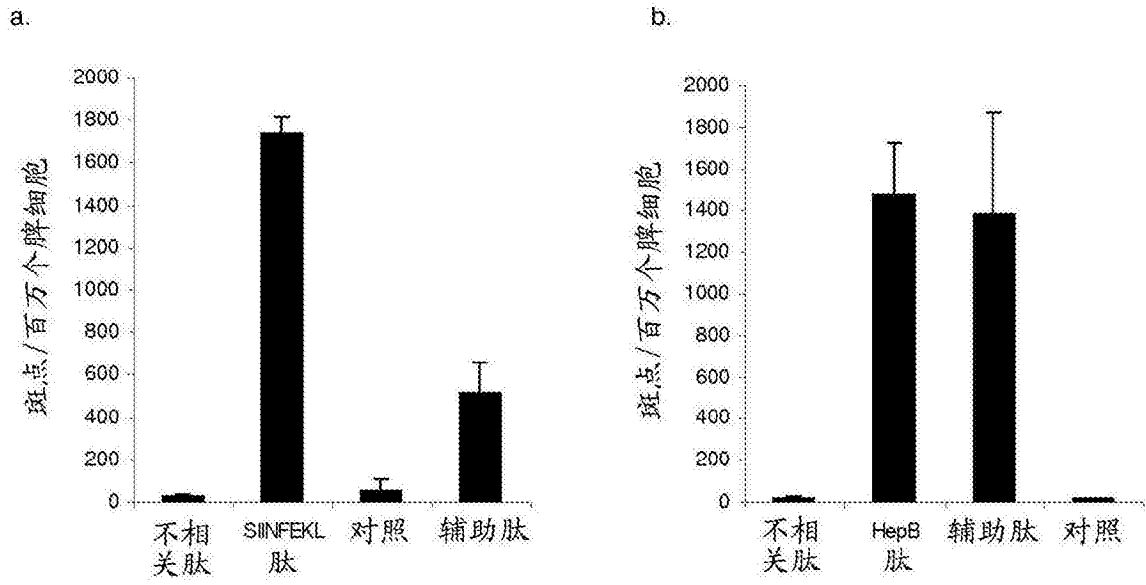


图34

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
 AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q P G G S L R M S C T I M D Q V P F E V W V R Q A P
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAAATGCTCTGCAACCATTATGGAGCCAGGTGCCTTTCTCCGTGTGGGTTCGGCAGGCTCCG
 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 E T I S
 GGGAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCCTACTATCCAGACACTGTGAAGGCGGATTCACCATTTCC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

R D N S E 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
 AGAGACAATAGCAAGAACCCCTGTATTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGCT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI

H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCACGGTCACCGTCTCCAGCGCT
 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
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGCCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T F P A Y R P P N A F I L W Y
 CTCTCCCTCCCTGTCACTCTCTGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTCCACTCCCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGTAT
 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
 CTGCAGAAACCAAGGCGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGITTCCAAACDGAATTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCACTGCGAGTGGG
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

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

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 ACGTTCGGTGGAGGCCACCAAGGTGGAAATCAGCGGTACG
 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
 AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGTCCTGAGAATGTCTGTCTTCTACCACTACTTTAACTATGGTTGGGTTCCGGCAGGCTCCGGGG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

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

D N E 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
 GACAATAGCAAGAACCCCTGTATTGCAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGTCAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI

Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 TADGTGACTATGCTGTGGACTACTGGGTCAAGGAACCAAGTCACCGTCTCCAGCGCT
 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
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T P G E P A S I S C T F P A Y R P P N A P I L W Y
 CTCTCCCTGCTGTCACTCTCTGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGGACTCTCCAGCTTATAGACCAACAAATGCCCTATCTCTATGGTAT
 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
 CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGTCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGG
 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**
 ACGTTCCGTGGAGGCCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图36

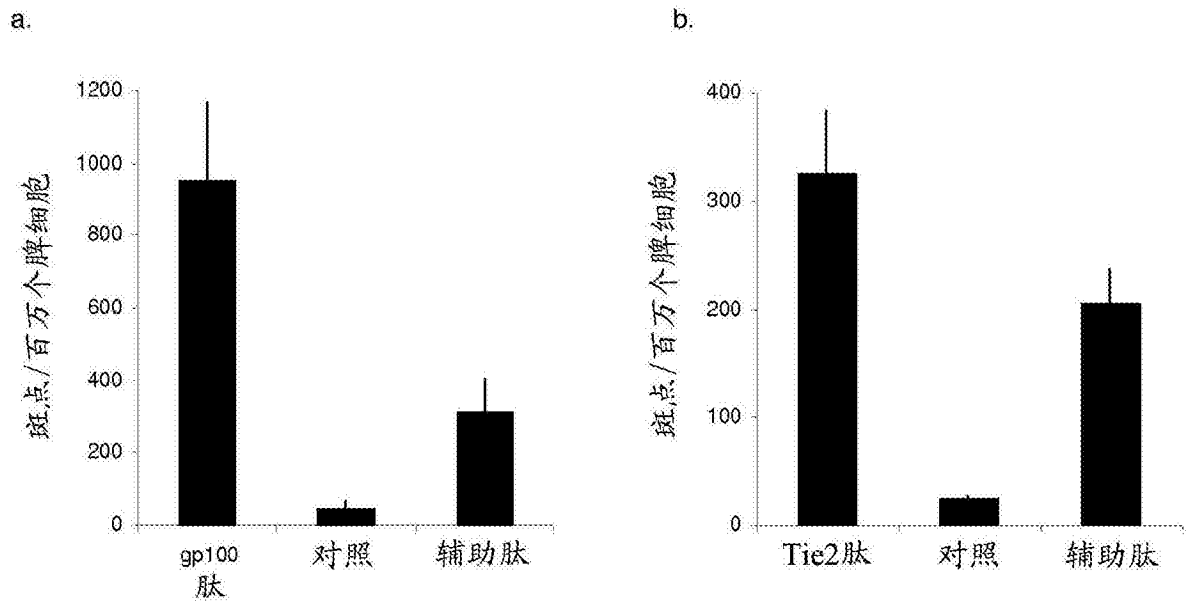


图37

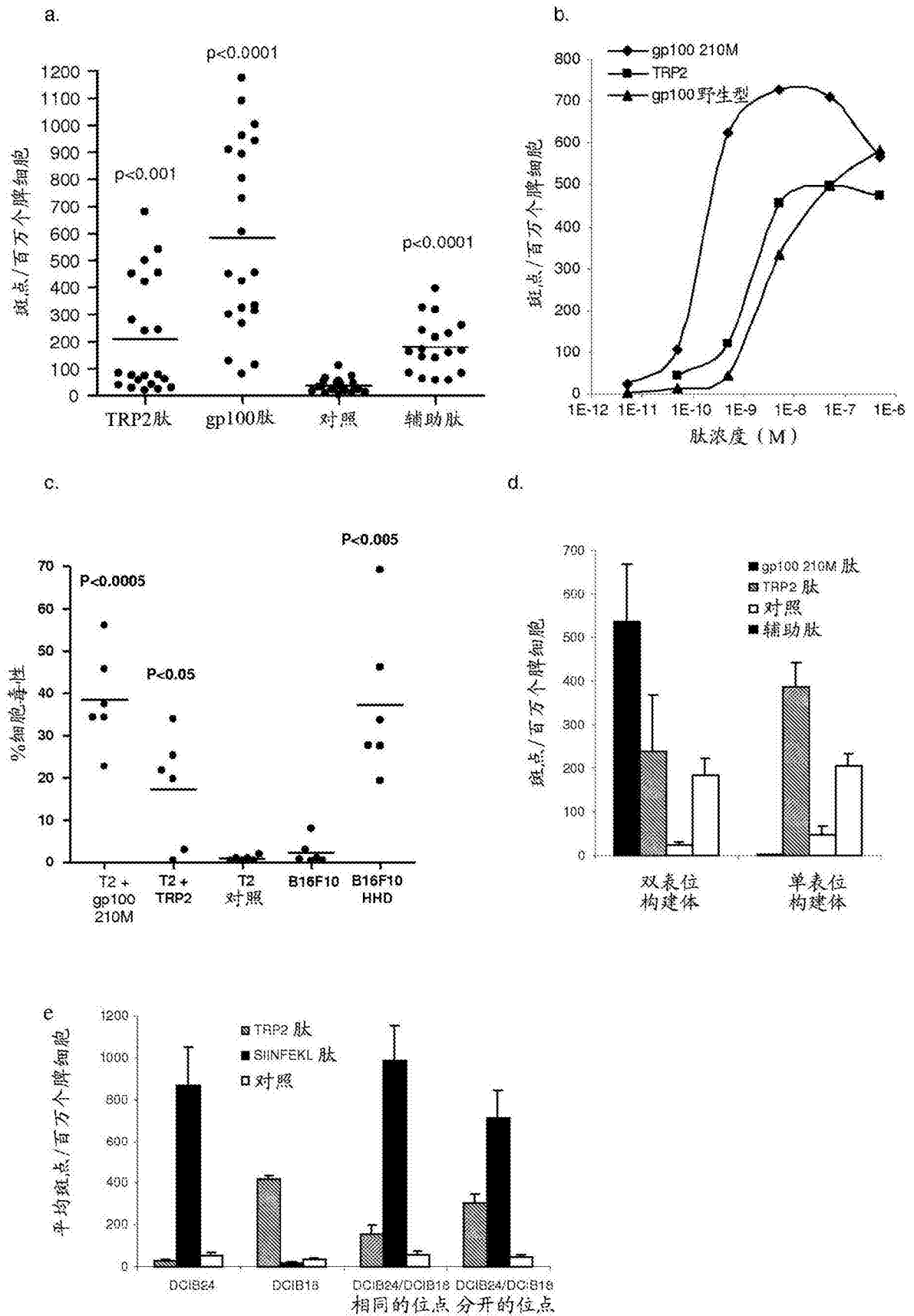


图38

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
AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
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
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTACCACTTACTGACCAAGTGCCTTTGTCCGTGTGGGTTCCGGCAGGCTCCG
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G K G L E W I A Y I G S S G D R T Y Y P D T V K G R F T I S
GGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTGAAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGGCGATTCCACCATTTCC
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
AGAGACAAATAGCAAGAACACCCCTGTATTTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGT
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
H Y V D Y A V D Y W S Q S T T V T V S S
CACTACGTGGACTATGCTGTGGCTACTGGGCTCAAGGAACCCGCTCACCGTCTCCACCGCT
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
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAAATCTCCA
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
CTCTCCCTGCTGTCACTCCCTGGGAGGCCAGCCCTCGATCTCTTGGCACTCCCTCCAGCTTATAGACCCACCAATGCCCTATCCTATGGTAT
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
CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGTCCCGACAGATTTCAGTGGCAGTGGG
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
TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K BsiWI
ACGTTCCGTTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
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
AAGCTTACCA TGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAAATGCTCTGACCATTACTGACCAGGTGCCTATCTCCGCTGTGGGTTCGGCAGGCTCCG
 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
 GGGAGGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTGATAGAACCCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGGCGATTACCAATTTC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

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

AfeI
 H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCGGTCAACCGTCTCC**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 N T Q S P
GGATCCACCA TGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

 L S L P V T F G E P A S I S C T T P P A Y R P P H A P I L W Y
 CTCTCCCTGCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGGACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTTATCTTATGGTAT
 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
 CTGCAGAAACCAAGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGTCCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGG
 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
 TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCCGTTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

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

图40

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
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACCTCCATGTGTTGATGACCCAACTCCA
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

      L S L P V T F G E F A S I S C T F F A Y R F P N A F I L W Y
CTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGCACCTCCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGIAT
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
CTGCAGAAACCAAGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCACCGATTCTCTGGGGTCCACAGACAGTTTCAGTGGCAGTGGG
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

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

      T F S G G S I K V E I K BclWI
ACGTTCCGTGGAGGCCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGTACG
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

```

93

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 ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTCTGACCATTACTGACCAGGTGCCTTACTCCGTCTGGGTTCGGCAGGCTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

G N S 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
 GGGAAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTGTAGTACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCC
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

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

AfeI
 H Y V D Y A V D Y W G Q G T I V I V S S
 CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGTCAGGAACCAAGGTCACCGTCTCCAGCGCT
 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 F
GGATCC ACCAATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGTATGACCCCAATCTCCA
 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
 CTCCTCCCTGCTGTCACTCTCTGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGGACTCTCCAGCTTATAGACCAACCAATGCCCTATCTCTATGGTAT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

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

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 R V P W
 TCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTTCAGGTTTCATATTTCCGTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I R **BsiNI**
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
 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
AAGCTTACCAIGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

G G L I Q F G G S L R M S C T F I T D Q L P F S V W V R Q A P
 GGGGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGACCATTACTGACCAGCTSCCTTCTCCGTCGCGGTTCGGCAGGCTCCG
 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
 GGGAGSGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTCCACCATTTCC
 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
 CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACACCGGTACCGTCTCCAGCGCT
 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
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGGATGACCAATCTCCA
 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
 CTCCTCCCTGCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGGACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCCTATGGTAT
 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
 CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGTCTGTGATCTACAAATTTCCAAACGATTITCTGGGGTCCAGACAGATTCASTGGCAGTGGG
 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
 TCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAGGGTTCACATGTCCGTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

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

图43

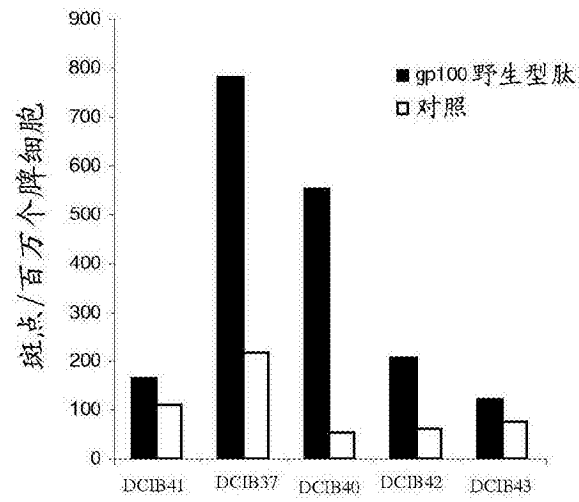


图44

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 A C C A T G G G A T G G A G C T G T A T C A T C C T C T T C T T G G T A G C A A C A G C T A C C G G A G T C C A C T C C C A G G T G C A G C T G G T G G A G A C T G G G
 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
 G G A G G C T A A T C C A G C C T G G A G G T C C C T G A G A A T G T C C T G G A C C A T T A T G G A C C A G G T G C C T T T C T C C G T G T G G T T C G G C A G G C T C C G
 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
 G G G A A G G G C T G G A G T G G A T C G C A T A C A T T G G T A G T G G T G G T A G T G T T A T G A T T T T T T G T G T G G C T C G A T T C A C C A T T T C C A G A G A C
 181 270

N S R 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
 A A T A G C A A G A C A C C C T G T A T T T G C A A T T G A A C A G T C T G A G G G C T G A G G A C A C A G C C G T A T T A C T G T G C G A G A C A T T A T G S T C A C T A C
 271 360

AfeI
 V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 G T G G A C T A T G C T G T G G A C T A C T G G G T C A A G S T A C C A C G G T C A C C G T C T C A G C G C T
 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
 G G A T C C A C C A T S G G A T G S A G C T G T A T C A T C C T C T T C T T G G T A G C A A C A G C T A C C G G A G T C C A C T C C G A T G T G T T G A T G A C C C A A Y C T C C A
 90

L S L F 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
 C T C T C C C T S C C T G T C A C T C C T G G S G A S C C A G C C T C G A T C T C T T G T G G A A C A G G C A S C T G T A C C A G A G T G G A C A G A A G C C A G A G A C T T
 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
 G A C T G S T A T C T S C A G A A A C C A G G C C A G T C T C C A C A G C T C C T G A T C T A C A A A G T T T C C A A C C G A T T T T C T G G G T C C C A G A C A G A T T C A G T
 181 270

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

V P W T F G G G T K V E I K **BsiNI**
 G T T C C G T G G A C G T T C G G T G G A G G C A C C A A G G T G G A A A I C A A G C G T A C G
 361 408

图45

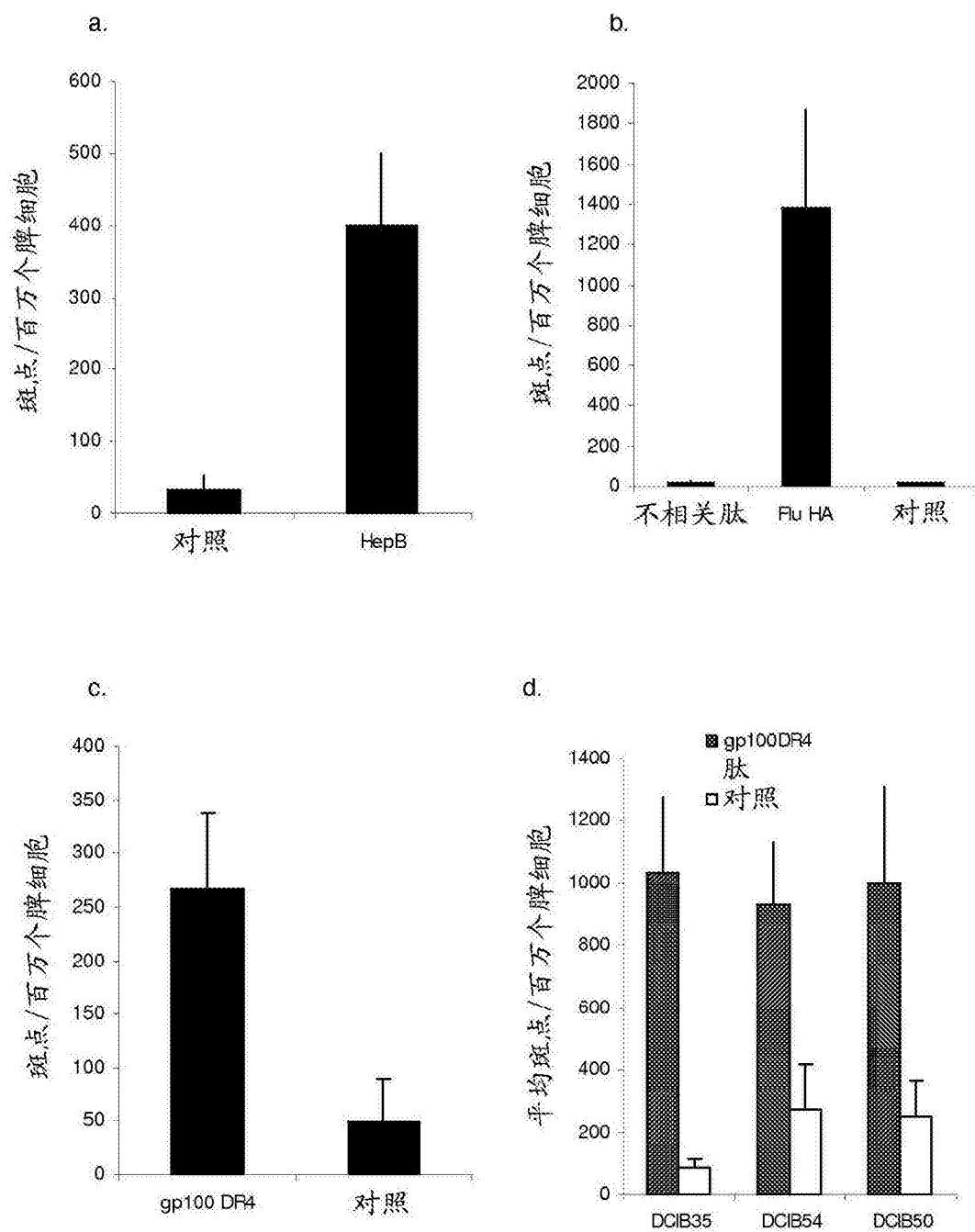


图46

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 I G
AAGCTT ACCATGGGATGGAGCTGTATCATECTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

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

S K G L E W I A Y I G S S G S V Y D F F V W L R P T I S R D
 GGGAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTAGTGTATGATTTTTTTGTGTGGCTCCGATTACCATTTCCAGAGAC
 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
 AATAGCAAGACACCCCTGTATTTCGAATTGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCGAGACATTATGCTCACTAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI

V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 GTGGACTATGCTGTGACTACTGGGGTCAAGGTACACGGTACCCGTCTCCAGCGCT
 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 H G U T Y L
 CTCCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAACACCTATTTA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y E 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 W N R Q L
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATAACGGAGTGTATTACTGCTGGAACAGGCAGCTG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

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

图47

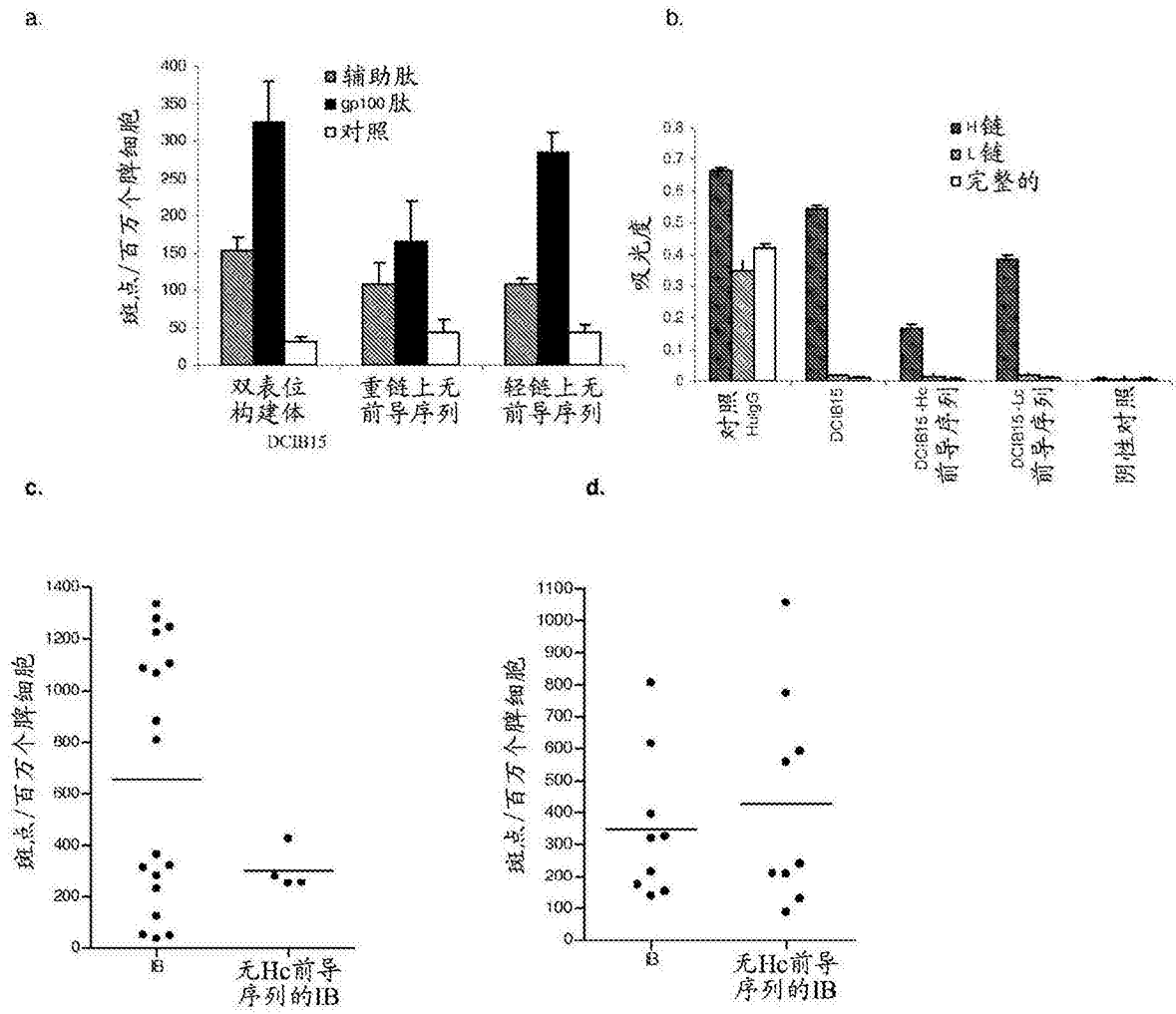
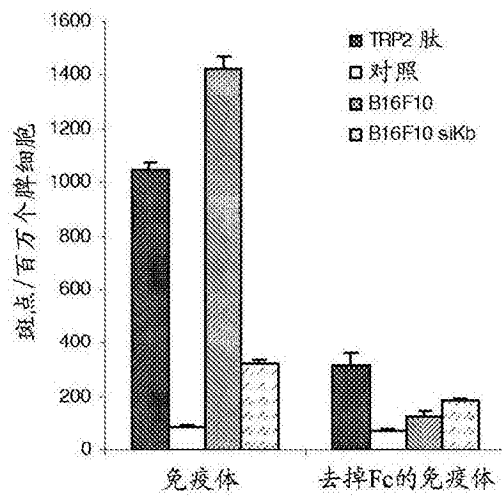
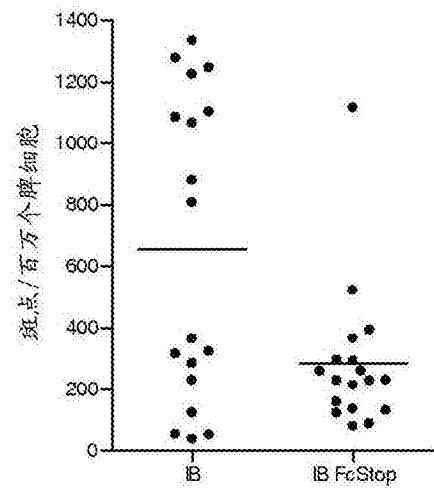


图48

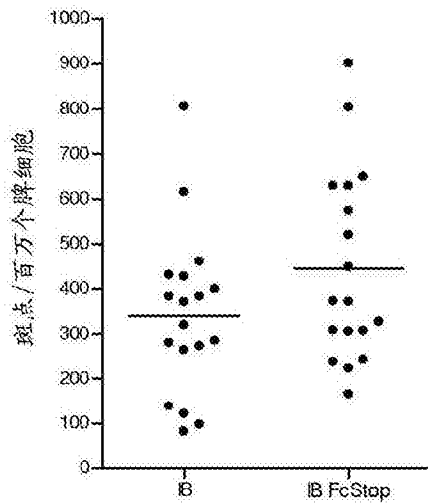
a.



b.



c.



d.

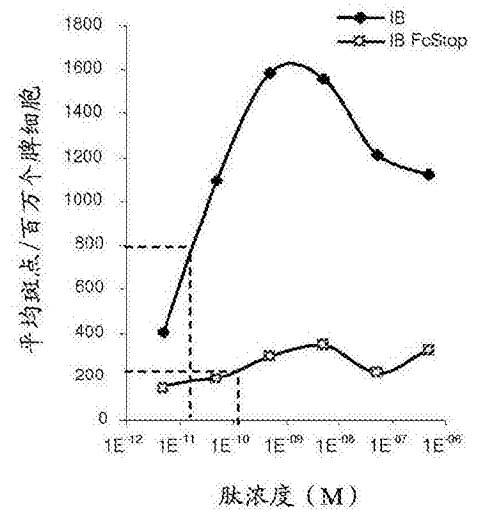


图49

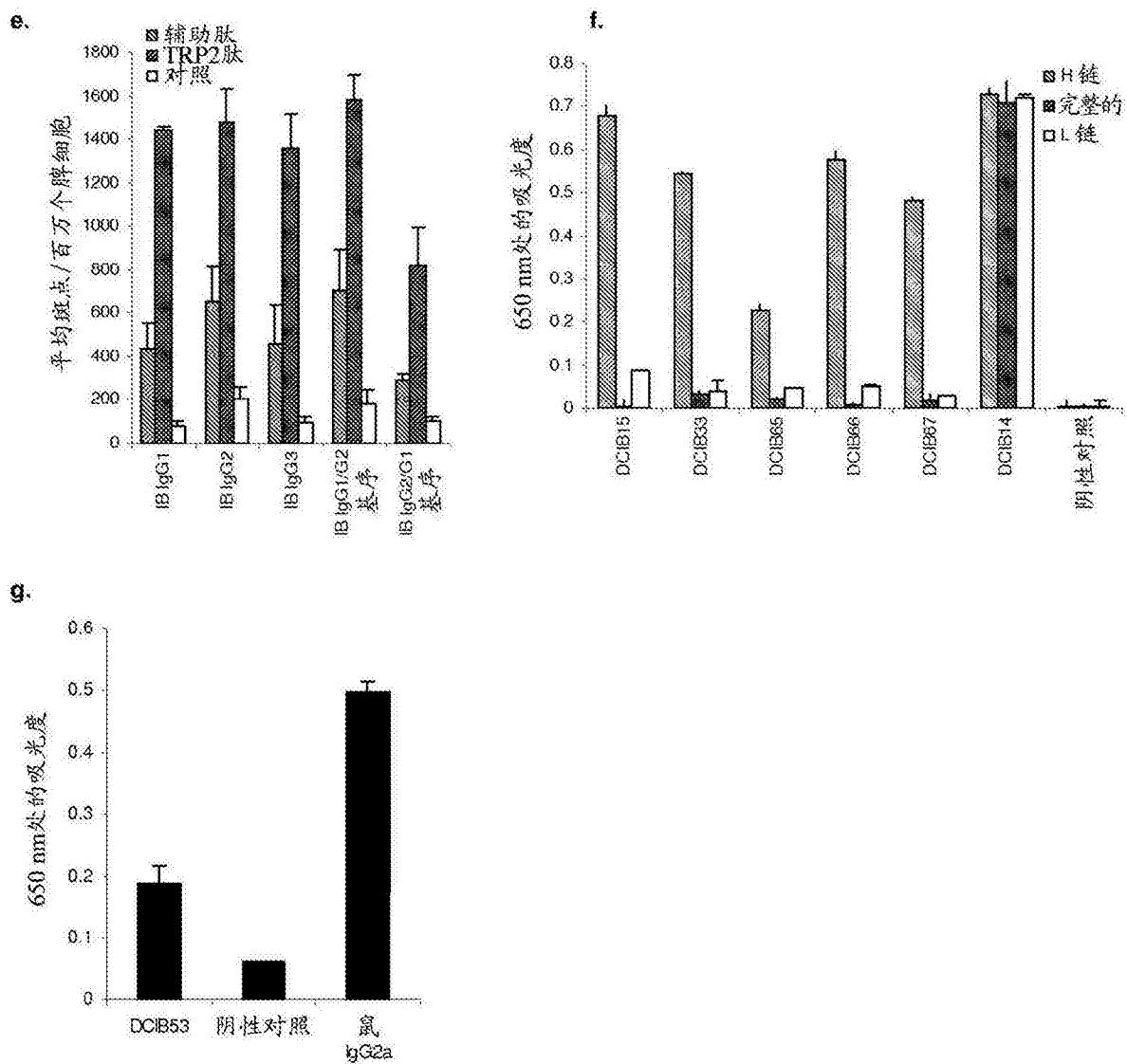


图49继续

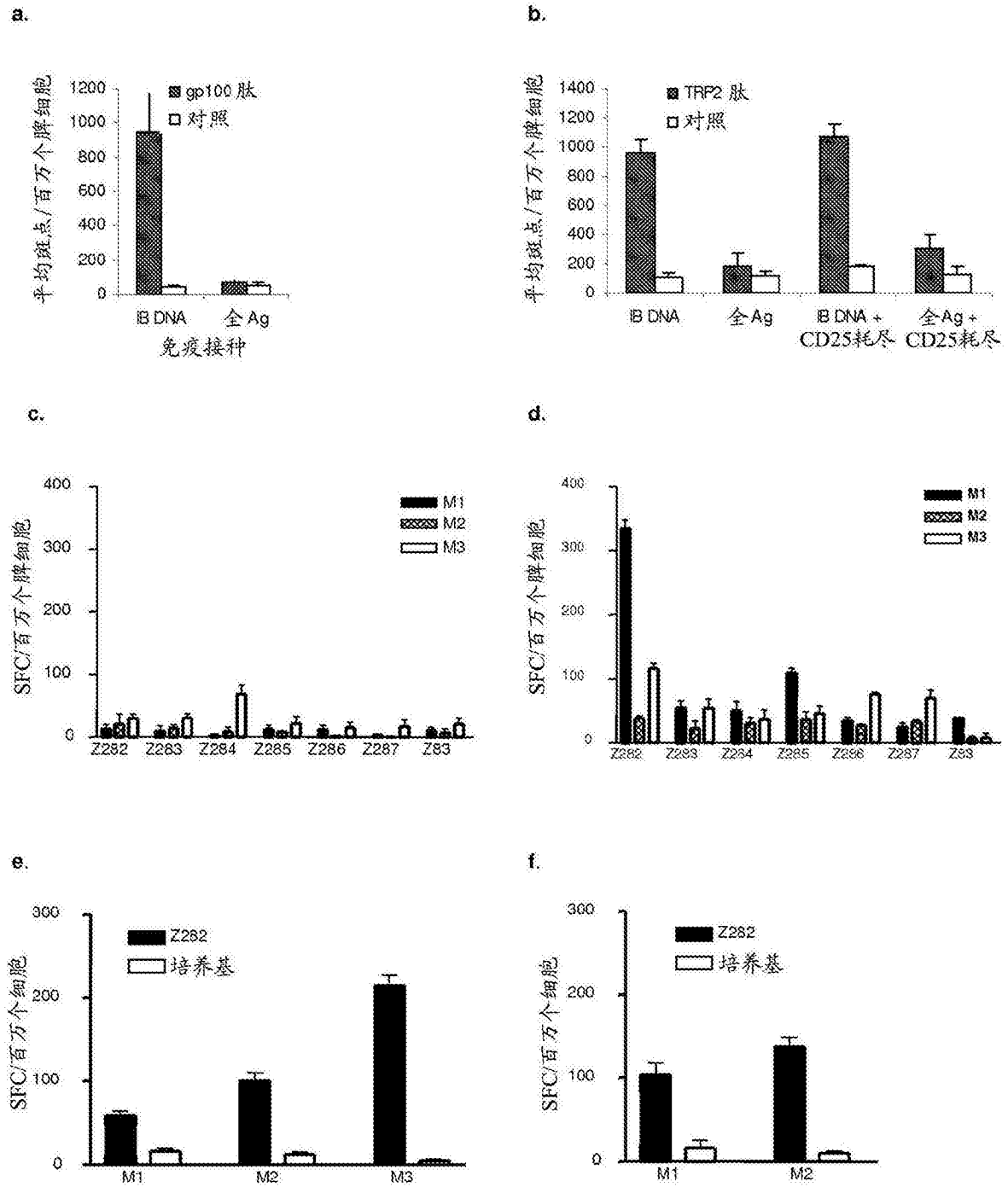


图50

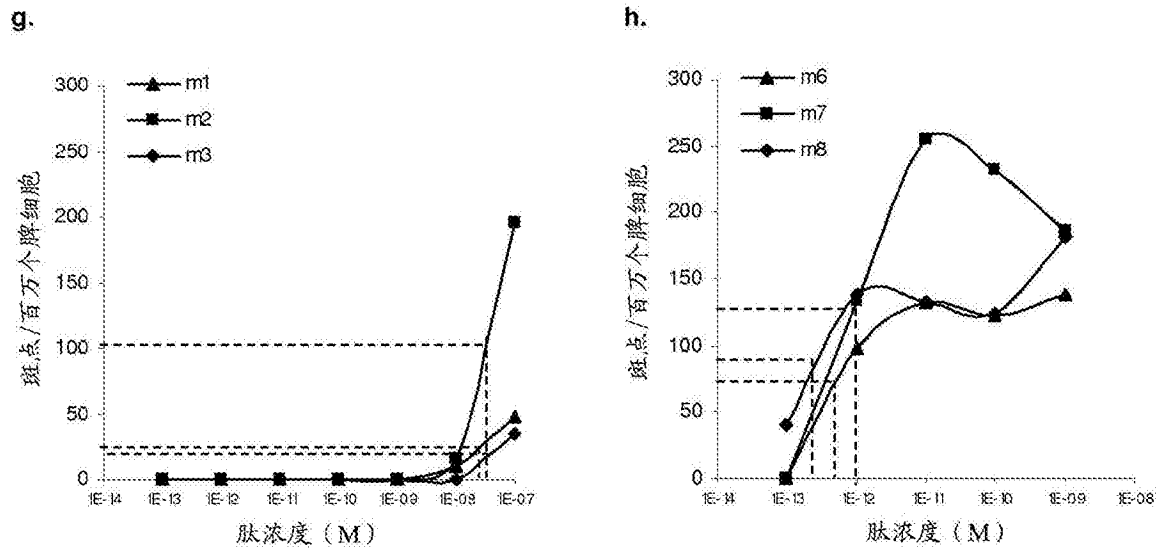


图50继续

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
 AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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 R V R Q A P G
 GGAGGCITAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGCTATCTTGATCAATTCCTACCTCTTGTAAGGTTCCGGCAGGCTCCGGGG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

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

D N S E 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
 GACAAATAGCAAGAACCCCTGTATTTGCAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACATTATGGTCAC
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
 TACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGACACCGGTACCGTCTCCAGCGCT
 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
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCAAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T F G E P A S I S C T P P A Y E P F H A P I L W Y
 CTCTCCCTGCTGTCACTCCTGGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGGACTCTCCAGCTTATAGACCAACCAATGCCCTATCCTATGGTAT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S H R F S G V F D R F S G S G
 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGG
 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
 TCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATAACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCGGTGG
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

T F G G G T K V E I K **BsiWI**
 ACGTTCCGTGGAGGSCCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
 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 ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGAAATGTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTCAATACCTATGACATGTCTTGGGTTGGC
 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
 CAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATCTTGATCAATCCCTACCTCTTGTACGATTCACCAT
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

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

G H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
AfeI
 GGTCTACGTTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCAAGGTACCGTCTCCAGCGCT
 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
GGATCC ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCCAATCTCCA
 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 H A P I L W Y
 CTCTCCCTGGCTGTCACTGCTGGGAGCCAGCCTCGATCTCTTGCCTCTCCAGCTTATAGACCACCAATGCCCTATCTCTATGGTAT
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

L Q R 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
 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTCCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTSGA
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

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

T F G G G T K V E I K
BsiNI
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAGCGTACG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 399

图52

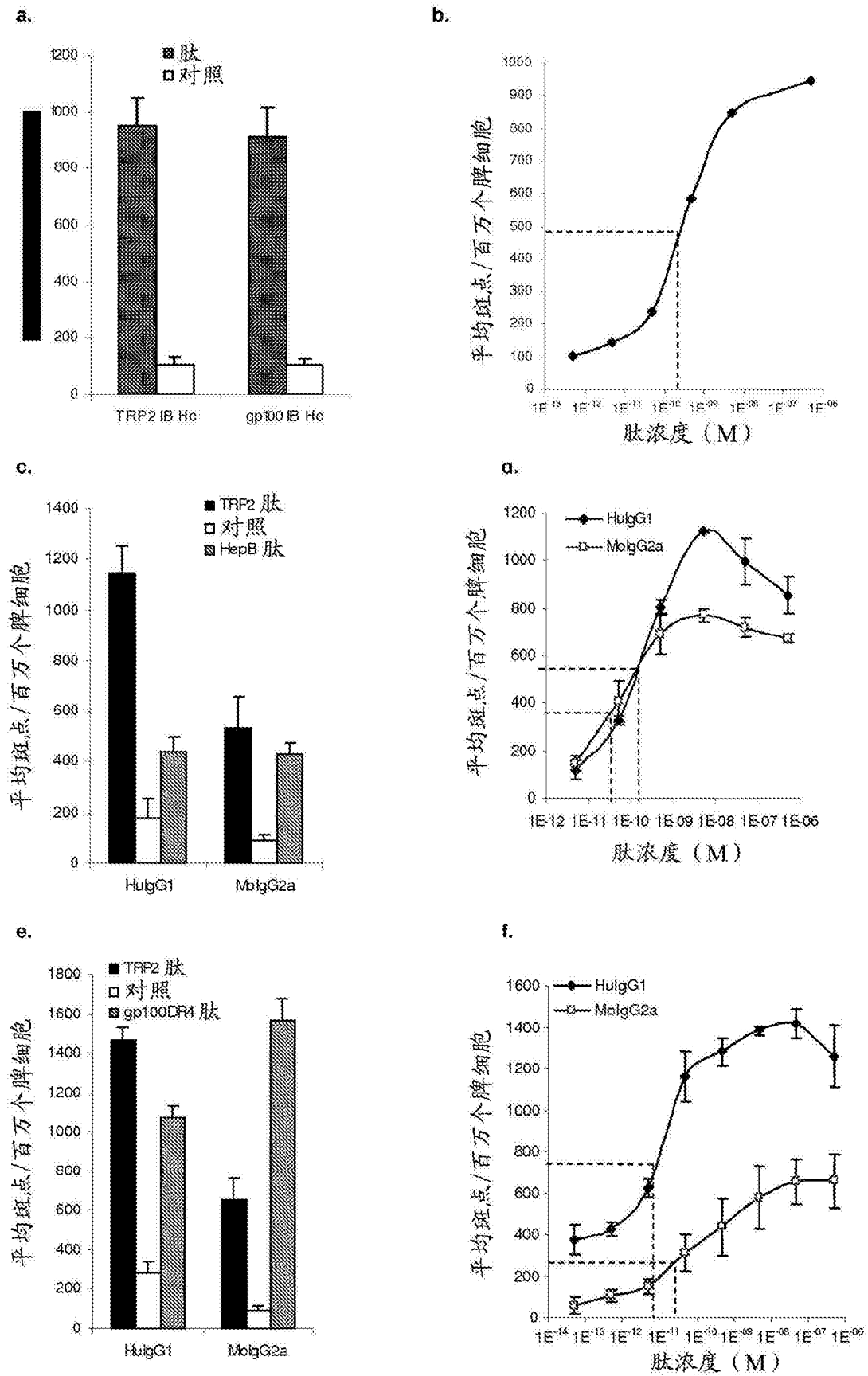


图53

[illegible]

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
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCCAATCTCCA
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

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

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

S G T D F T L E I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTTCAGGTTCAATGTTCCTGG
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
ACGTTCCGGTGGAGGCCACCAAGGTGGAATCAAGCGTCCAGATGCTGCACCAACTGTATCGATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACA
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
TCTGGAGGTGCTCAGTCTGTGCTTCTTGACACTTCTACCCCAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAA
451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540

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

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

XhoI
GAGTCTAGA
721 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 729

```

图54继续

* XbaI
TGATCTAGA
1443 1449

110

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
 GGRICCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTGATGACCCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90
 L S L P V T F G E P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L
 CTCTCCCTGCTGTACCTCTGGGGAGCCAGCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACATAGTAATGGAACACCTATTTA
 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
 GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCTCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGT
 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
 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
 GTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTGCAGATGCTGCACCAACTGT**ATCGAT**CTTCCCACCATCCAGTSAG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450
HpaI
 Q L T S G G A S V V C F L N N F Y F K D I N V K W N I D G S
 CAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCTGTCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAGATTGATGGCAGT
 451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540
 E R Q N G V L N S W T D Q D S E D S T Y S W S S T L T L T K
 GAACGACAAATGGCGTCTTGAACAGTTGACTGATCAGGACAGCAAGACAGCACCTACAGCATGACGACGACCTTCAGTTGACCAAG
 541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630
 D E Y E R H N S Y T C E A T H K I S T S P I V K S F N R N E
 GACGAGTATGACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCTACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAG
 631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720
 C * **XhoI**
 TGTAGCTCGAGTCTAGA
 721 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 736

图55继续

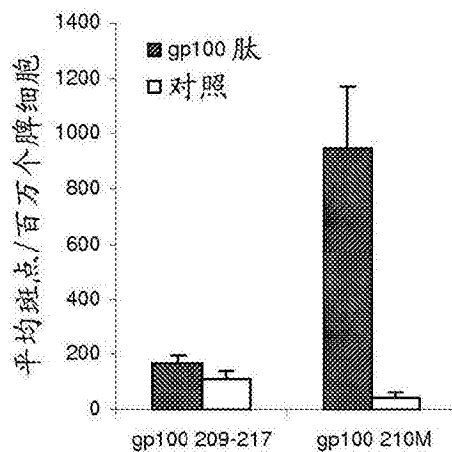


图56

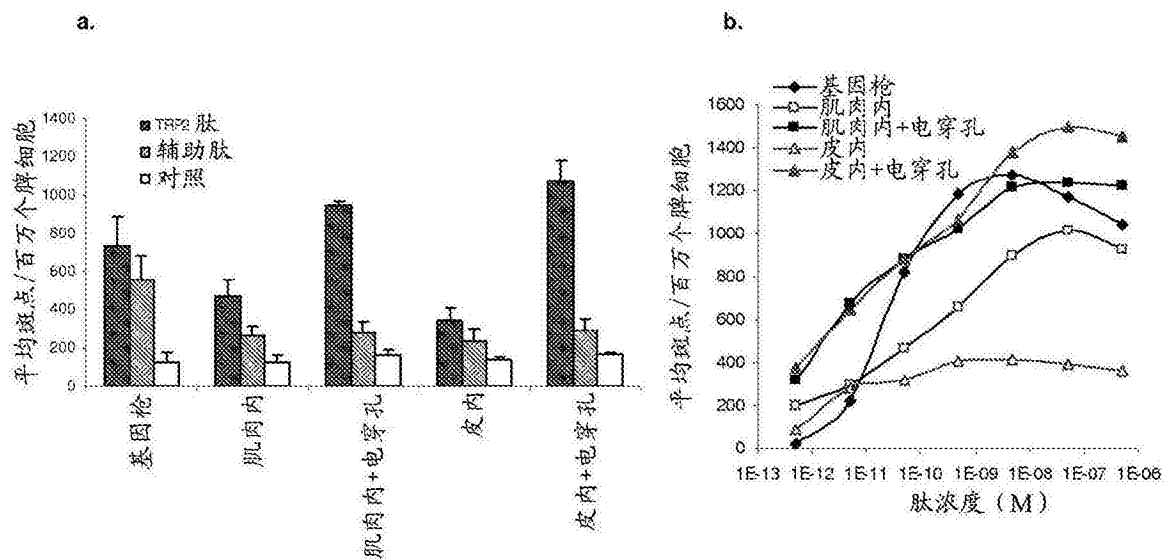
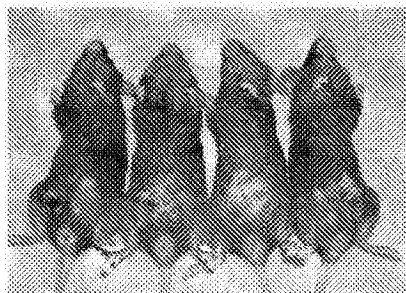


图57

a.

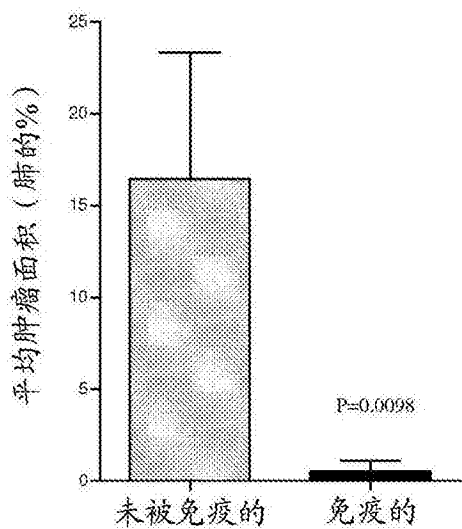


未被免疫的

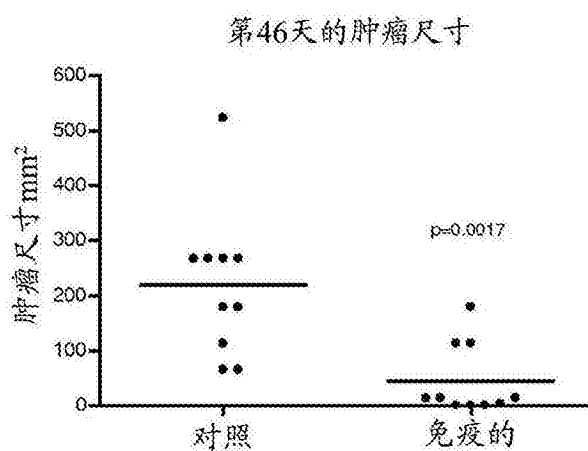


DCIB15 免疫的

b.



c.



d.

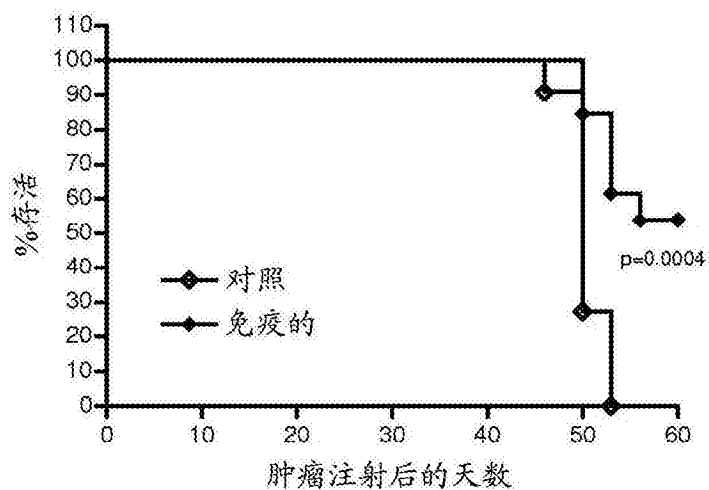


图58

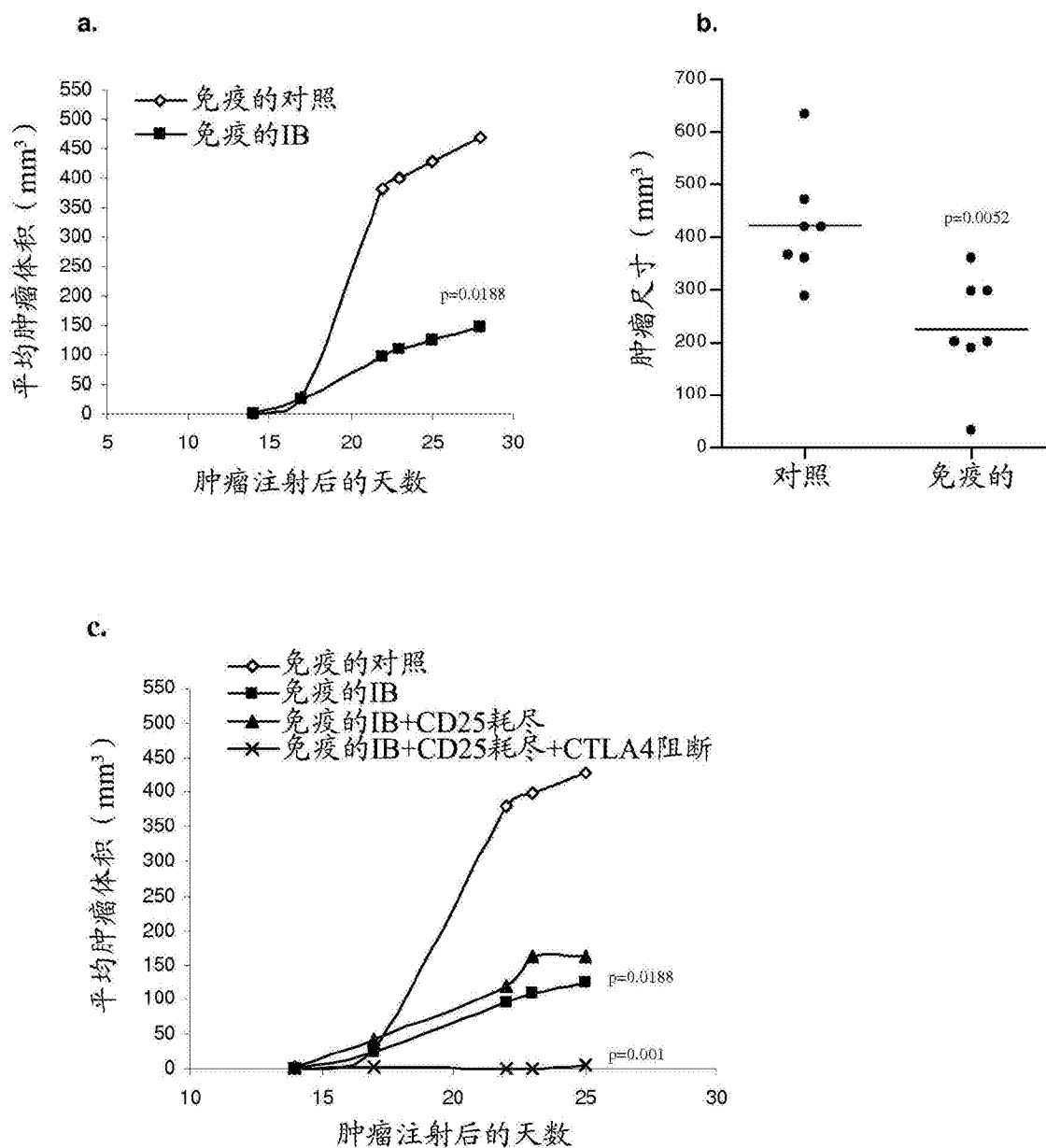


图59

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 ACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 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
 GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAAATGCTCTGGGACAGGCAGGCAATGCTGGGCACACACACCATCGAAGTAATCTG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

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

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

C A E W H 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
 TGTGCCGATGGAAACAGGCAGCTGTATCCAGAGTGGACAGAACGCCAGAGACTTGACTGGGGCCAGGTACACCGGTACACGCTCTCCAGC
 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
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTTCATGACCCCAATCTCCA
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

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

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

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

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

图60

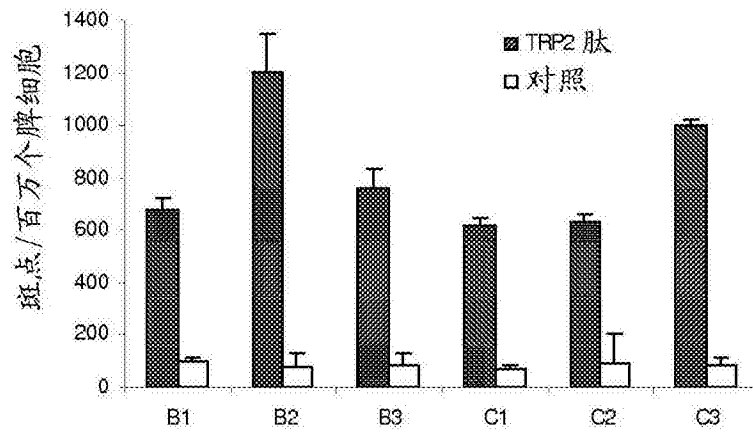


图61