

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01809333.7

[51] Int. Cl.

*A61K 39/395 (2006.01)*

*A61K 48/00 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

*A61P 37/06 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2009年4月15日

[11] 授权公告号 CN 100478029C

[22] 申请日 2001.5.14 [21] 申请号 01809333.7

[30] 优先权

[32] 2000.5.12 [33] EP [31] 00110063.5

[32] 2000.10.6 [33] US [31] 60/238,762

[86] 国际申请 PCT/US2001/015626 2001.5.14

[87] 国际公布 WO2001/087338 英 2001.11.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.11.11

[73] 专利权人 GPC 生物技术股份公司

地址 德国慕尼黑

共同专利权人 莫弗西斯股份公司

[72] 发明人 Z·纳吉 M·特萨日

E·托马森-沃尔夫

审查员 邹 凯

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 56 页 附图 52 页

[54] 发明名称

免疫调节性人 MHC II 类抗原结合性多肽

[57] 摘要

本发明涉及引起或导致免疫系统调节的人多肽。本发明还涉及编码多肽的核酸、产生多肽的方法、免疫抑制的方法、含有多肽的药物和诊断组合物和试剂盒，以及多肽的用途。

1. 一种组合物，其含有多肽，该多肽包含基于至少一种抗体对细胞表面上表达的一种抗原的结合特异性的人组合物的抗原结合域，其中用一种或多种所述多肽处理表达所述抗原的细胞，导致或引导免疫应答的抑制，其中所述免疫应答抑制的IC50是1 $\mu$ M或以下，所述基于抗体的抗原结合域与HLA-DR结合，所述基于抗体的抗原结合域包括VH和VL区的组合，其中所述组合可在MS-GPC-8、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10和MS-GPC-8-27-41的克隆之一中发现。

2. 如权利要求1所述的组合物，其特征在于，所述组合物含有选自Fv、scFv、dsFv、Fab片段的抗体片段。

3. 如权利要求1所述的组合物，其特征在于，所述组合物含有F(ab')<sub>2</sub>抗体片段或小抗体片段。

4. 如权利要求1所述的组合物，其特征在于，所述组合物含有至少一种选自IgG1、2a、2b、3、4、IgA和IgM类的抗体的完整抗体。

5. 如权利要求2所述的组合物，其特征在于，所述组合物还含有交联基团。

6. 如权利要求3所述的组合物，其特征在于，所述组合物还含有交联基团。

7. 如权利要求4所述的组合物，其特征在于，所述组合物还含有交联基团。

8. 如权利要求5所述的组合物，其特征在于，抗原结合位点与聚合物交联。

9. 一种核酸，其含有权利要求1-8任一所述的组合物的多肽的蛋白质编码序列。

10. 一种载体，其含有权利要求9所述的核酸和与其可操纵性连接的转录调节序列。

11. 一种携带权利要求9所述的核酸或权利要求10所述的载体的宿主细胞。

12. 一种产生权利要求1所述的组合物的方法，该方法包括在表达核酸的条件下培养权利要求11所述的宿主细胞。

13. 权利要求1所述的组合物用于制备免疫抑制动物的药物制剂的用途。

14. 如权利要求13所述的用途，其中所述动物是人。

15. 如权利要求14所述的用途，其特征在于，所述免疫抑制是治疗选自类风

湿性关节炎、幼年期关节炎、多发性硬化、Grave 氏病、胰岛素依赖性糖尿病、发作性睡眠病、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、移植排斥，移植物抗宿主病、Hashimoto 氏病、重症肌无力、寻常天疱疮、肾小球性肾炎、甲状腺炎、胰腺炎、胰岛炎、原发性胆汁性肝硬化、过敏性肠病和 Sjogren 综合征的疾病。

16. 如权利要求 15 所述的用途，其特征在于，所述免疫抑制是治疗选自重症肌无力、类风湿性关节炎、多发性硬化、移植排斥和移植物抗宿主病的疾病。

17. 与细胞毒性或免疫原性剂可操纵性连接的权利要求 1 所述的组合物的用途，其特征在于，该组合物用于制备免疫抑制动物的药物组合物。

18. 一种制备组合物的方法，该组合物含有一种多肽，该多肽含有人组合物的至少一种基于抗体的抗原结合域，所述结合域具有对细胞表面表达的一种抗原的结合特异性，其中用所述多价组合物处理表达所述抗原的细胞导致或引起免疫应答的抑制，其中所述免疫应答的抑制活性的 IC<sub>50</sub> 是 1 $\mu$ M 或以下，其特征在于，该方法包括步骤：

a. 克隆入至少一个免疫球蛋白表达载体，以表达权利要求 9 所述的至少一种核酸的完整抗体；

b. 将所述至少一个载体转移入宿主细胞；和

c. 从所述至少一种载体表达所述完整抗体。

19. 用权利要求 18 获得的组合物。

20. 一种药物制剂，其特征在于，含有权利要求 1 或 19 所述的组合物。

21. 权利要求 1 或 19 所述的组合物的用途，其特征在于，用于制备抑制免疫系统细胞活化的药物组合物。

22. 权利要求 1 或 19 所述的组合物的用途，其特征在于，用于制备抑制免疫系统细胞增殖的药物组合物。

23. 权利要求 1 或 19 所述的组合物的用途，其特征在于，用于制备抑制免疫系统细胞分泌 IL-2 的药物组合物。

24. 权利要求 1 或 19 所述的组合物的用途，其特征在于，用于制备抑制免疫系统细胞与其它细胞相互作用的药物组合物。

25. 权利要求 1 或 19 所述的组合物的用途，其特征在于，用于制备抑制动物中 T 细胞增殖的药物组合物。

26. 如权利要求 25 所述的用途，其特征在于，所述动物是人。

## 免疫调节性人 MHC II 类抗原结合性多肽

发明背景

涉及免疫系统的疾病明显使患者衰弱，预期在未来 10 年内会更普遍。这些疾病包括类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、I 类糖尿病、移植排斥(TR)和移植物抗宿主病(GvHD)。例如预期患类风湿性关节炎的病人数目在全球将在 2010 年从 6,600,000 增加到 7,000,000。下面显示了 1995 年患这些疾病的病人数目，2010 年预期的病人数以及相应的市场规模。

疾病	病人数(百万)		市场规模(十亿美元)	
	1995	2010(估计)	1994	2010(估计)
类风湿性关节炎	6.6	7	2.4	>3.7
多发性硬化	0.62	0.65	0.3	>1.5
I 类糖尿病	1.8	1.9	1.5	>1.5
移植物/GvHD	0.05	0.1	0.9	>1.5

目前免疫系统疾病的治疗包括消炎药，例如 NSAIDS(非-甾体消炎药)、皮质醇、细胞抑制剂(RA 用的氨甲蝶呤)和细胞因子(MS 用 $\beta$ -干扰素)。这些治疗是对症的；它们都不能使疾病完全缓解。大多数现用药物的主要问题是它们缺乏选择性：它们抑制整个免疫系统，因此所治疗的病人将对感染高度敏感。最后大多数目前使用的消炎药的副作用也有理由对这些疾病研制新的治疗剂。因此，对于治疗免疫系统疾病(例如 RA 和 MS)的基于疾病机制的选择性治疗剂有空前迫切的未满足医学需求。

TR 和 GvHD 的免疫学机制与免疫系统其它疾病的机制相似。在 TR 中，受体免疫系统攻击外源器官，而 GvHD 中引入免疫妥协的宿主的外源造血细胞攻击宿主。当前用皮质醇、硫唑嘌呤、环孢菌素(Cyclosporin) A 和 Cell Cept 预防排斥，高剂量的皮质醇、OKT3(针对泛 T-细胞标记的单克隆抗体(mAb))和 Zenapax(针对活化的 T 细胞上 IL-2R 的 mAb)用于治疗排斥。对于更耐受和更有效的免疫抑制剂，

特别是用于治疗 GvHD 的有迫切的医学需求。

每一种迄今研究的哺乳动物携带一簇基因，编码所谓的主要组织相容性复合物(MHC)。该紧密连锁的基因簇编码表面抗原，它在体液和细胞介导的免疫应答中起到了中心作用。在人体内 MHC 编码的各种产物称作人白细胞抗原或 HLA。MHC-基因组织在编码三类分子，I-III 类的区域中。

I 类 MHC 分子是 45kD 跨膜糖蛋白，与另一种糖蛋白，12kD  $\beta$ -2 微球蛋白非共价结合(Brown 等, 1993)。后者不插入细胞膜，而是编码在 MHC 外侧。人 I 类分子是三种不同的同型抗原，称为 HLA-A、-B 和 -C，在独立的基因座编码。I 类分子的组织表达是普遍存在并且是共显性的。MHC I 类分子递呈激活细胞毒性 T 细胞必需的肽抗原。

II 类 MHC 分子与两种跨膜糖蛋白，35kD $\alpha$ 链和 28kD $\beta$ 链的异二聚体非共价结合(Brown 等, 1993)。在人类中，II 类分子作为三种不同的同型出现，称为人白细胞抗原 DR(HLA-DR)、HLA-DP 和 HLA-DQ。DR 的多态性限于 $\beta$ 链，而两条链在 DP 和 DQ 同型体中都具有多态性。II 类分子共显性表达，但与 I 类相反，显示有限的组织分布：它们仅存在于免疫系统(例如树突细胞、巨噬细胞、B 淋巴细胞和活化的 T 淋巴细胞)的细胞表面。它们还在正常肾上腺的网状带的人肾上腺皮质细胞上表达，并在正常卵巢黄体的粒层-黄体素细胞中表达(Kahoury 等, 1990)。它们的主要生物学作用是结合抗原肽并将其递呈到抗原递呈细胞(APC)表面，让 CD4 辅助 T(Th)淋巴细胞识别(Babbitt 等, 1985)。MHC II 类分子还可在非免疫系统细胞表面表达。例如在器官中淋巴样细胞外的细胞可在病理性炎症反应中表达 MHC II 类分子。这些细胞可包括滑膜细胞、内皮细胞、甲状腺基质细胞和神经胶质细胞。

III 类 MHC 分子也与免疫应答有关，但编码某种程度上不同的产物。这些包括许多可溶性血清蛋白、酶和蛋白质，例如肿瘤坏死因子或类固醇 21-羟化酶。在人中，III 类分子有三种不同的同型体，称为 Ca、C2 和 Bf(Kuby, 1994, 该参考文献的页码不明)。

大量证据显示对许多疾病，特别是免疫系统疾病的易感性与主要组织相容性复合物的特定等位基因密切相关(Tiwari 等的综述, 1985)。虽然存在一些 I 类相关的疾病，已发现大多数自身免疫症状与 II 类等位基因有关。例如，II 类等位基因 DRB1\*0101、0401、0404 和 0405 在类风湿性关节炎(RA)病人中以递增的频率存在(McMichael 等, 1977; Stasny, 1978; Ohta 等, 1982; Schiff 等, 1982)，其中 DRB1\*1501 与多发性硬化(MS)有关，DQ 等位基因联合 DQA1\*0301/B1\*0302 与

胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)有关。在 RA 中共>94%的类风湿性因子阳性病人携带易感性等位基因之一(Nepom 等, 1989)。

II 类 MHC 分子是免疫抑制干预的主要目标, 原因如下: 第一, MHC-II 分子激活作为免疫调节中心的 T 辅助(Th)细胞, 负责炎症疾病中的大部分免疫病理。第二, 大多数免疫系统疾病与 II 类等位基因遗传相关。第三, MHC II 分子仅在免疫系统的细胞上表达, 而 MHC-I 分子存在于大多数体细胞上。

据信至少三种机制在与 MHC II 类分子结合的蛋白质介导的免疫抑制中起到了某些作用。第一, 由于 Th 细胞识别与 II 类分子结合的抗原肽, II 类分子特异性单克隆抗体(mAb)可空间阻碍 MHC II 类分子与 T 细胞受体间的相互作用, 从而防止 Th 细胞激活。事实上, 这在体外和体内都有显示(Baxevanis 等, 1980; Nepom 等, 1981; Rosenbaum 等, 1983)。第二, 用某些小鼠抗 MHC II 类抗体, MHC II 类分子在细胞表面表达的下调已显示与免疫抑制有关(Vidovic 等, 1995)。第三, 当某些抗-MHC II 类抗体与在细胞表面表达的抗原结合时, 激活的淋巴样细胞被杀死(Vidovic 等, 1995a)。由于仅表达特定 MHC II 类抗原的细胞可成为特异性单克隆抗体的靶, 因此仅能调节这些同种异型体介导的免疫应答, 可实现治疗选择性的提高。其它 MHC 分子介导的宿主防御免疫反应不被特异性抗原靶向, 因此保持不受调节, 非免疫妥协。

基于这些观察结果, 许多年来已设想用抗-II 类 mAb 作为候选治疗剂用于免疫抑制治疗免疫系统的疾病, 包括移植排斥。事实上, 在一系列动物疾病模型中小鼠衍生抗 II 类 mAb 的益处支持了该假想(Waldor 等, 1983; Jonker 等, 1988; Stevens 等, 1990; Smith 等, 1994)。

尽管有这些早期的支持性的数据, 迄今未描述显示所需免疫调节和其它生物性质(可能包括亲和力、增殖抑制或细胞因子分泌的减少)的人组合物的抗-mAb II 类组合物。事实上, 尽管可相对简单的获得小鼠衍生的 mAb, 但用小鼠衍生 mAb 的工作证明了获得具有所需生物性质的免疫调节性抗体的困难。例如, 在不同小鼠抗-II 类 mAb 的 T 细胞抑制能力中观察到显著和不能充分理解的差异(Naquet 等, 1983)。另外, 体内使用某些小鼠衍生的 mAb 与未预期的副作用相联系, 有时引起实验灵长类的死亡(Billing 等, 1983; Jonker 等, 1991)。

普遍接受小鼠衍生的 mAb(包括嵌合和所谓的“人源化” mAb)与人 mAb(例如 Vose 等, 2000; Kashmiri 等, 2001)相比; 伴有在病人体内增加产生不良免疫应答的危险(人抗-小鼠抗体 HAMA)。当用任何小鼠衍生的 mAb 治疗慢性病, 如类风

湿性关节炎或多发性硬化时，该危险可能增加；人免疫系统持续接触非人分子常常导致不良免疫反应。另外，已证明，要获得对所需抗原具有理想特异性或亲和性的小鼠衍生抗体非常难(Pichla 等，1997)。这些观察结果可对小鼠衍生的 mAb 的疗效和优点具有显著影响，或降低作用。小鼠衍生的 mAb 的缺点的例子包括下列：第一，小鼠衍生的 mAb 可能受到医药条件，或治疗它们适合的病况的疗程长短的限制。第二，小鼠衍生的 mAb 的剂量水平可能需要较高，以补偿较低的亲和力或疗效(低亲和力或疗效与小鼠来源无关，然而人体内的半衰期可能有关，因为小鼠 mAb 可能更容易从血液中被快速清除，这可能还需要更高的剂量)，因此，使得剂量不仅更重，而且可能免疫原性更强，可能更危险。第三，在需要高产量的合适的治疗方案和高剂量比中的限制，可会显著增加治疗的成本，意味着这些小鼠衍生的 mAb 对于开发作为商品治疗剂是不经济的。最后，即使能鉴定出显示所需特异性或亲和性的小鼠 mAb，通常这些理想特征在减少免疫原性的人源化或嵌合过程中受到有害影响(Slavin-Chiorini 等，1997)。一旦小鼠衍生的 mAb 被人源化或嵌合化，就非常难于优化其特异性或亲和性。

许多年来，本领域一直在寻找具有适用于治疗人类的药物组合物的免疫调节和其它生物性质的人抗-MHC II 类 mAb 复合物。该领域的工作人员已实践了步骤：首先鉴定一种小鼠衍生的 mAb，然后在改善该用于人类病人的非人分子的免疫耐受的帮助下修饰该 mAb 的结构(对于进一步的细节，见 Jones 等，1986；Riechmann 等，1988；Presta，1992)。通常用所谓的“人源化”过程或通过构建人-小鼠嵌合 mAb 实现该修饰。其它工作人员尝试了鉴定在人抗体多样性天然库中具有所需性质的与人抗原结合的人抗体。例如，通过探索孕妇中的胎儿耐受机制(Bonegura 等，1987)或通过筛选抗体天然多样性文库(Staubøl-Grøn 等，1996；Winter 等，1994)。然而，迄今未描述过显示所需免疫调节的生物性质、特异性、低免疫原性和亲和性的人复合物 MHC II 类 mAb。

### 发明简述

本发明一方面提供了一种组合物，包括含有人组合物的至少一种基于抗体的抗原结合域的多肽，所述结合域具有对细胞表面表达的一种抗原的结合特异性。在优选例中，用一条或多条多肽处理表达抗原的细胞(淋巴样细胞或非淋巴样细胞)导致或引起免疫应答的抑制，如其中抑制剂活性的 IC<sub>50</sub> 是 1 $\mu$ M 或以下，甚至更优选 100nM、10M 或甚至 1nM 或以下。

在某些优选例中，基于抗体的抗原结合域含有选自 Fv、scFv、dsFv 和 Fab 片段的单价抗体片段。在其它优选例中，多肽含有 F(ab)'<sub>2</sub> 抗体片段或小抗体片段。在另一个优选例中，多肽是多价组合物，含有至少一条选自 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgA 和 IgM 的完整的抗体。

根据一个优选例，多肽针对表达 MHC II 类分子的淋巴样细胞或非淋巴样细胞。后一种细胞存在于炎症和/或免疫系统疾病的病理位点。所述细胞可包括滑膜细胞、内皮细胞、甲状腺基质细胞和神经胶质细胞。

在某些实施例中，多肽与 HLA-DR 分子的 $\alpha$ -链的至少一个表位结合。根据另一个优选例，多肽与 HLA-DR 的 $\alpha$ -链的第一结构域的至少一个表位结合，例如多肽与 HLA-DR 的 $\alpha$ -链的 Glu<sup>55</sup>-Tyr<sup>79</sup> 的 $\alpha$ -螺旋内的至少一个表位结合。

在一些优选例中，多肽与 HLA-DR 分子 $\beta$ -链中的至少一种表位结合，优选与 HLA-DR 的 $\beta$ -链第一结构域的至少一个表位结合。

在某些实施例中，该多肽包括至少一个基于抗体的抗原结合域，它与人 MHC II 类抗原特异性结合的 Kd 是 1 $\mu$ M 或以下，更优选 100nM，10nM 或甚至 1nM 或以下。为了进一步说明，基于抗体的抗原结合域与人 HLA-DR 抗原特异性结合。例如，基于抗体的抗原结合结构域可包括取自 MS-GPC-1、MS-GPC-2、MS-GPC-3、MS-GPC-4、MS-GPC-5、MS-GPC-6、MS-GPC-7、MS-GPC-8、MS-GPC-10、MS-GPC-11、MS-GPC-14、MS-GPC-15、MS-GPC-16、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10 和 MS-GPC-8-27-41。

在某些实施例中，本发明提供了一种组合物，含有具有至少一个基于抗体的抗原结合域，该结合域具有与人 MHC II 类抗原，例如 HLA DR 结合特异性在 1 $\mu$ M 或以下，更优选 100nM、10nM 或甚至 1nM 或以下。可通过一种方法分离基于抗体的抗原结合域，该方法包括从重组抗体文库用与人 MHC II 类抗原结合的能力分离人组合物的 VL 和 VH 区。该方法还包括下列步骤：

a. 产生 VL 和 VH 区之一或两者的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列中至少一个的变体文库，和

b. 用与人 MHC II 类抗原以 1 $\mu$ M 或以下的 Kd 结合的能力从变体文库中分离出 VL 和 VH 区；和

c. 再用 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列(可任选的)重复步骤(a)和(b)。

在某些优选例中，该多肽的基于抗体的抗原结合域与 HLA-DR 的 $\beta$ -链结合，甚至更优选的与 HLA-DR  $\beta$ -链的第一结构域的表位结合。

本发明的一个方面提供了至少一种本发明的多肽的多价组合物，这些多肽能够导致活化细胞的细胞死亡，而不需要任何其它附加措施，并对治疗的病人具有有限的免疫原性副作用。另外，含有本发明的多肽的多价组合物能与靶抗原上的至少一个表位结合，然而几个表位结合位点可能结合在一个分子中。在一个优选例中，多肽是含有选自 Fv、scFv、dsFv 和 Fab 片段的至少两个单价抗体片段的多价组合物，还含有一个或多个交联部分。

在另一个优选例中，多肽与非活化细胞的低于 15%，优选低于 10%杀伤相比，影响至少 50%，优选至少 80%活化细胞的杀伤作用。

本发明的组合物可用于治疗各种细胞，例如淋巴样细胞和非淋巴样细胞，后者仅优选表达 MHC II 类抗原的那些细胞。

在某些优选例中，本组合物可抑制 IL-2 分泌的 IC<sub>50</sub> 在 1 $\mu$ M 或以下，甚至更优选 100nM、10nM 或甚至 1nM 或以下。

在某些优选例中，本组合物可抑制 T 细胞增殖的 IC<sub>50</sub> 在 1 $\mu$ M 或以下，甚至更优选 100nM、10nM 或甚至 1nM 或以下。

本发明的组合物含有多肽，其中基于抗体的抗原结合域与一种或多种选自 DR1-0101、DR2-15021、DR3-0301、DR4Dw4-0401、DR4Dw10-0402、DR4Dw14-0404、DR6-1302、DR6-1401、DR8-8031、DR9-9012、DRw53-B4\*0101 和 DRw52-B3\*0101 的 HLA-DR 型结合。在优选例中，本组合物的抗原结合域提供了广泛的 DR 反应性，即给定组合物的抗原结合域与至少 3 个，更优选至少 5 个或甚至 7 个不同的所述 HLA-DR 型上的表位结合。在一些实施例中，本组合物的多肽的抗原结合域与多个 HLA-DR 型结合，例如与至少人群 60%，更优选 75%，和甚至更优选 85%的表达 HLA DR 的细胞结合。

在某些实施例中，基于抗体的抗原结合域包括 VH 区与 VL 区的组合，其中组合在选自 MS-GPC-1、MS-GPC-2、MS-GPC-3、MS-GPC-4、MS-GPC-5、MS-GPC-6、MS-GPC-7、MS-GPC-8、MS-GPC-10、MS-GPC-11、MS-GPC-14、MS-GPC-15、MS-GPC-16、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10 和 MS-GPC-8-27-41 的克隆之一中发现。

在其它实施例中，基于抗体的抗原结合域包括 HuCAL VH2 和 HuCAL V $\lambda$ 1 的组合，其中 VH CDR3、VL CDR1 和 VL CDR3 在 MS-GPC-1、MS-GPC-4、MS-GPC-7、MS-GPC-8、MS-GPC-10、MS-GPC-11、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10 和 MS-GPC-8-27-41 的克隆之一中发现。

在某些优选例中，基于抗体的抗原结合域包括 HuCAL VH2 和 HuCAL V $\lambda$ 1 的组合，其中 VH CDR3 序列取自共有 CDR3 序列

$$\text{nnnnRGnFDn}$$

其中每个 n 分别代表任何氨基酸残基；和/或其中 VL CDR3 选自共有 CDR3 序列

$$\text{QSYDnnnn}$$

其中每个 n 分别代表任何氨基酸残基。优选 VH CDR3 序列是 SPRYGAFDY 和/或 VL CDR3 序列是 QSYDLIRH 或 QSYDMNVH。

在某些实施例中，基于抗体的抗原结合域与包括 HuCAL VH2 和 HuCAL V $\lambda$ 1 组合的抗体竞争与抗原的结合。优选竞争性抗体的 VH CDR3 序列取自共有 CDR3 序列

$$\text{nnnnRGnFDn}$$

其中每个 n 分别代表任何氨基酸残基；和/或

其中 VL CDR3 选自共有 CDR3 序列

$$\text{QSYDnnnn}$$

其中每个 n 分别代表任何氨基酸残基。优选 VH CDR3 序列是 SPRYGAFDY 和/或 VL CDR3 序列是 QSYDLIRH 或 QSYDMNVH。

本多肽的基于抗体的抗原结合域可包括用下列通式代表的 VL CDR1 序列：

$$\text{SGSnnNIGnNYVn}$$

其中每个 n 分别代表任何氨基酸残基。在优选例中，CDR1 序列是 SGSESNIGNNYVQ。

在本发明组合物的某些实施例中，免疫应答的抑制是由在所述细胞表面表达的所述抗原表达的下调引起或表现的。免疫应答的抑制还可以或另选由所述细胞和其它细胞之间相互作用的抑制过程引起或表现，其中所述相互作用通常导致免疫应答，或杀伤细胞。在后一种情况下，杀伤可通过用多种基于抗体的抗原结合域处理表达抗原的细胞来介导，每种基于抗体的抗原结合域是至少一种多价多肽的部分。在这种情况下，不需要细胞毒性物质或免疫学机制来导致或引起所述杀

伤。

在本多肽组合物的优选例中，杀伤影响至少 50%，优选至少 75%，更优选至少 85%的活化细胞，与非活化细胞相比低于 30%，优选低于 20%，更优选低于 10%。

本发明的组合物的鉴定还包括诱导由细胞的固有的预编程过程介导的细胞杀伤作用。其中细胞杀伤作用是这类多肽的活性，杀伤优选是非凋亡性的，依赖于非天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶的作用，如杀伤不依赖于被 zVAD-fmk 或 zDEVD-fmk 抑制的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶。

在某些优选例中，本发明的组合物包括选自 Fv、scFv、dsFv、Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 和小抗体片段的抗体片段。本组合物还可包括至少一个完整抗体，例如选自 IgG1、2a、2b、3、4、IgA 和 IgM 家族的抗体。

在某些情况下，本组合物理想的是包括一个或多个交联部分，使抗原结合位点与聚合物交联。

在优选例中，本组合物可配制在药物可接受的载体和/或稀释剂中。例如，本发明特别考虑含有量足够抑制动物，特别所述动物是人体内的免疫应答的本抗原结合组合物的药物制剂。

本发明提供了一种药物制剂，它包括量足够抑制动物，例如人体内 IL-2 分泌的本抗原结合组合物。

本发明提供了一种药物制剂，它包括量足够抑制动物，例如人体内 T 细胞增殖的本抗原结合组合物。

本方法还提供了包括抗原结合组合物的诊断组合物。

在另一个实施例中，本方法利用本发明的抗原结合组合物制备治疗动物，例如所述动物是人类的药物制剂。

本发明还提供了含有多肽的蛋白质编码序列的核酸，该多肽具有人组合物的至少一个基于抗体的抗原结合域，该结合域具有针对细胞表面表达的抗原的结合特异性。在优选例中，用核酸编码的多肽处理表达抗原的细胞导致或引起抑制免疫应答，例如，其中抑制活性的 IC<sub>50</sub> 是 1 $\mu$ M 或以下，甚至更优选 100nM、10nM 或甚至 1nM 或以下。特别考虑含有蛋白质编码序列和与其可操纵性连结的转录调节序列的载体，以及携带核酸或载体的细胞。

可用这些重组宿主细胞通过在核酸表达的条件下培养细胞，产生免疫抑制组合物。

本发明的另一个方面提供了一种抑制免疫系统的细胞活化和/或增殖的方

法。该方法通过用含有人组合物的基于抗体的至少一个抗原结合域的多肽组合物来处理细胞，该结合域与在细胞表面表达的抗原具有结合特异性。在优选例中，用核酸编码的多肽处理表达抗原的细胞导致或引起免疫应答的抑制，例如其中抑制活性的 IC<sub>50</sub> 是 1 $\mu$ M 或以下，甚至更优选 100nM、10nM 或甚至 1nM 或以下。可用类似的方法抑制 IL-2 表达和/或有免疫系统细胞参与的细胞-细胞相互作用。在某些优选例中，本方法可用于例如通过对病人施用有效量的抗原-结合的组合物免疫抑制病人。

本发明还有一个方面提供了杀伤在所述细胞表面表达抗原的细胞的方法，该方法包括步骤：用含有多种基于抗体的抗原结合域的组合物处理细胞，例如如上所述，其中基于抗体的抗原结合域是至少一种多价多肽的一部分，不需要细胞毒性物质或免疫学机制来导致或引起死亡。优选基于抗体的抗原结合域与 HLA DR 结合。

一些方法可用于治疗选自类风湿性关节炎、幼年期关节炎、多发性硬化、Grave 氏病、胰岛素依赖性糖尿病、发作性睡病、银屑病、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、移植排斥，移植物抗宿主病、Hashimoto 氏病、重症肌无力、寻常性天疱疮、肾小球性肾炎、甲状腺炎、胰腺炎、胰岛炎、原发性胆汁性肝硬化、过敏性肠病和 Sjogren 综合征等疾病。

在另一个实施例中，提供了一种鉴定可以用本发明的抗原结合组合物治疗的病人的方法，包括步骤：

- a. 从病人分离细胞；
- b. 使所述细胞与抗原结合多肽的组合物接触；和
- c. 测定所述细胞免疫抑制、IL2 分泌或增殖的程度。

例如可用例如试剂盒实施该方法，试剂盒含有：

- a. 本发明的抗原结合组合物，和
- b. 交联基团，和/或一个或多个可检测基团(可任选的包括试剂和/或溶液来影响和/或检测与抗原的结合)。

在其它实施例中，本发明提供了一种含有与细胞毒性剂可操纵性连结的本抗原结合组合物的细胞毒性组合物。

另一个实施例提供了含有与免疫原性试剂可操纵性连结的本抗原结合组合物的免疫原性组合物。

本发明的另一个方面提供了一种杀伤在细胞表面表达抗原的细胞，包括使所

述细胞与本发明的抗原结合组合物接触，该组合物与细胞毒性或免疫原性试剂可操纵性连结。对此，本发明还特别考虑用与细胞毒性或免疫原性药剂可操纵性连结的本抗原结合组合物制备治疗动物的药物组合物。

本发明的还有一个方面提供了一种进行药物商业活动的方法，包括：

(i) 分离一种或多种基于抗体的抗原结合域，这些抗原结合域与人细胞表面表达的 MHC II 类以  $1\mu\text{M}$  或以下的 Kd 结合；

(ii) 产生含有所述基于抗体的抗原结合域的组合物，该组合物具有 IC50 在 100nM 或以下的免疫抑制性；

(iii) 进行所述组合物在动物中效力和毒性的测量；

(iv) 制备描述所述组合物免疫抑制治疗用途的包装插页；和

(v) 出售所述组合物用作免疫抑制剂。

另一个一种进行生命科学商业活动的方法的实施例包括：

(i) 分离一种或多种基于抗体的抗原结合域，这些抗原结合域以  $1\mu\text{M}$  或以下的 Kd 与人细胞表面的 MHC II 类结合；

(ii) 产生含有所述基于抗体的抗原结合域的组合物，组合物是免疫抑制性的，具有 100nM 或以下的 IC50；

(iii) 对第三方授权，与第三方共同开发或出售给第三方出售所述组合物的权利。

根据本商业方法，可用一种方法分离基于抗体的抗原结合域，包括

a. 从重组抗体文库用与 HLA DR 结合的能力分离人组合物的 VL 和 VH 区，

b. 产生 VL 和 VH 区之一或两者的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列至少一个的变体文库，和

c. 从变体文库用与 HLA DR 以  $1\mu\text{M}$  或以下的 Kd 结合的能力分离 VL 和 VH 区。

根据本商业活动方法，抗原结合域可以是在选自 MS-GPC-1、MS-GPC-2、MS-GPC-3、MS-GPC-4、MS-GPC-5、MS-GPC-6、MS-GPC-7、MS-GPC-8、MS-GPC-10、MS-GPC-11、MS-GPC-14、MS-GPC-15、MS-GPC-16、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10 和 MS-GPC-8-27-41 的克隆中发现的 VH 和 VL 区的组合。

本文所用的术语“肽”指含有多个，即两个或多个通过肽键连结的氨基酸的

一条或多条链的分子。

术语“蛋白质”指肽，其中至少一部分肽具有或能够通过其在肽链内和/或在肽链之间形成二级、三级或四级结构，获得确定的立体排列。该定义包括天然存在或至少部分人工的蛋白质，以及全蛋白的片段或结构域，只要这些片段或结构域能获得如上所述的确定立体排列。

术语“多肽”互换的指肽和/或蛋白质。另外，术语“多肽”和“蛋白质”只要上下文允许，也可包括多链蛋白质复合物，例如具有重链和轻链的免疫球蛋白多肽。

在此，“含有至少一个基于抗体的抗原结合域的多肽”指免疫球蛋白(如 IgG、IgA 或 IgM 分子或抗体)或其功能性片段。术语“功能性片段”或“抗体片段”如常常所指的，指保留免疫球蛋白的抗原结合部分的免疫球蛋白的片段。本发明的功能性免疫球蛋白片段可以是 Fv(Skerra 和 Plückthun, 1988)、scFv(Bird 等, 1988; Huston 等, 1988)、二硫键连结的 Fv(Glockshuber 等, 1992; Brinkmann 等, 1993)、Fab、F(ab')<sub>2</sub> 片段或其它本领域实践者熟知的片段，其包含免疫球蛋白或功能性免疫球蛋白片段的可变结构域。

含有一条链的多肽的例子是单链 Fv 抗体片段，含有多条链的多肽的例子是 Fab 抗体片段。

本文所用的术语“抗体”，除非另外说明，广泛用于同时指抗体分子和各种抗体衍生分子。该抗体衍生分子含有至少一个可变区(重链或轻链可变区)并含有上述片段，以及独立的抗体轻链、独立的抗体重链、抗体链和其它分子之间的嵌合融合蛋白等。

为了本申请的目的，“价”指本多肽拥有的抗原结合位点数。因此，二价多肽指具有两个结合位点的多肽。术语“多价多肽”包含多肽的二价、三价、四价等形式。

免疫球蛋白分子的“抗原结合位点”指与抗原特异性结合必需的分子部分。抗原结合位点优选以 1 $\mu$ M 或以下，优选小于 100nM、10nM 或甚至在某些情况下 1nM 的 Kd 与抗原结合。与抗原特异性结合应包括与抗原的结合比与任何其它抗原的结合具有显著高的亲和力。

重(“H”)和轻(“L”)链 N-末端可变(“V”)区的氨基酸残基形成抗原结合位点。在重链和轻链的 V 区内有高度分散的三个延伸段称为“超变区”，位于更保守的被称作“框架区”或“FR”的旁侧区之间。因此术语“FR”指天然存在于免疫球

蛋白的超变区之间和附近的氨基酸序列。在一个抗体分子中，轻链的三个超变区和重链的三个超变区在立体空间相对排列，形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合抗原的立体表面互补，各重链和轻链的三个超变区称为“互补决定区”或“CDR”。

因此，“基于抗体的抗原结合域”指一种或多种多肽，其形成保留抗体的至少一些结构特征，例如至少一个 CDR 序列的抗原结合位点。在某些优选例中，基于抗体的抗原结合域包括足够视为可变区的结构，例如三个 CDR 区和分散的框架区。基于抗体的抗原结合域可由一条对应于 VH 或 VL 序列的多肽链，或由 VH 和 VL 序列的分子间或分子间联系形成。

术语“重组抗体文库”描述了展示包装，如生物学颗粒的集合，它们各具有 (a) 在颗粒表面上的至少一个抗原结合域表达的遗传信息，和 (b) 提供使颗粒能复制的遗传信息。例如，包装能显示含有抗原结合域的融合蛋白。融合蛋白的抗原结合域由显示包装代表，条件是允许抗原结合域与显示包装接触的靶表位结合。显示包装通常衍生自能够采集非常多样的抗体文库样品的系统。显示包装可以衍生自例如植物细菌细胞、细菌孢子和细菌病毒。

在本发明的一个示范性实施例中，显示包装是噬菌体颗粒，其含有含测试抗原结合域的氨基酸序列的肽融合外壳蛋白。因此，产生了编码肽融合外壳蛋白文库的可复制噬菌体载体，尤其是噬菌粒(如本文定义)的文库，用于转化合适的宿主细胞。根据与特定噬菌体颗粒结合的抗原结合位点特异性结合靶表位的能力，通过亲和筛选分离嵌合蛋白形成的噬菌体颗粒。在一个优选例中，文库的各独立噬菌体颗粒包括显示在包装表面的编码肽融合包裹蛋白的拷贝。产生本多样化肽文库的示范性噬菌体包括 M13、f1、fd、lf1、lke、Xf、Pf1、Pf3、λ、T4、T7、P2、P4、φX-174、MS2 和 f2。

术语“产生 CDR1、CDR2 和 CDR3 至少一种的变体文库”指产生变体抗原结合位点文库的方法，其中文库成员的差异是 CDR 序列，例如非 FR 序列中的一个或多个改变。这些文库可通过从所选的抗原结合位点的一个或多个 CDR 序列随机或半随机诱变产生。

本文所用的“人组合物的基于抗体的抗原结合域”优选意味着含有至少一个抗体 VH 区和抗体 VL 区的肽，其中在含有免疫球蛋白序列的蛋白质序列数据库中的同源性检索得到人起源的免疫球蛋白结构域中 VH 和 VL 区都以最高的序列相同性程度命中。这样的同源性检索可以是 BLAST 检索，例如通过登录国家生物信息

中心的序列数据库,用“blastp”例行程序进行“BasicBLAST”检索。另见 Altschul 等(1990) J Mol Biol 215:403-410。优选当施给人受体时,这样的组合物不导致不良免疫应答。在某些优选例中,人组合物的抗原结合域包括天然人免疫球蛋白的框架区,并可从激活的人 B 细胞克隆,虽然不需要天然人抗体的所有 CDR。

本文所用的术语“小抗体片段”指含有通过与所述结构域分别融合的自我结合的各结构域,而聚合的抗原结合域的多价抗体片段(Pack 等,1994),例如,含有两条 scFv 片段的二聚体,分别与自我结合的二聚结构域融合。特别优选的二聚结构域包括衍生自亮氨酸拉链(Pack 和 Plückthun,1992)或螺旋-转弯-螺旋基序(Pack 等,1993)的结构域。

本文所用的“活化的细胞”指一群感兴趣的细胞,它们不在休眠。活化可以由抗原、有丝分裂原(例如脂多糖、植物血凝素)或细胞因子(如干扰素 $\gamma$ )引起。优选所述活化在免疫应答产生过程中的休眠 T 和 B 细胞受刺激发生的。活化细胞可以是某些淋巴瘤细胞。优选活化的细胞的特征是在细胞表面表达 MHC II 类分子和一种或多种其它特征,包括细胞尺寸变大,细胞分化,DNA 复制,CD45 或 CD11 表达和产生/分泌免疫球蛋白。

本文所用的“非活化细胞”意味着一群感兴趣的细胞,大多数处于休眠和不分裂状态。所述非活化的细胞可包括从健康人血液纯化的休眠 B 细胞。这些细胞优选的特征是在细胞表面表达的 MHC II 类分子缺乏或减少,并且一种或多种其它特征,包括细胞尺寸变大,细胞分化,DNA 复制,CD45 或 CD11 表达和产生/分泌免疫球蛋白缺乏或减少。

当用于细胞系或细胞时,“淋巴样细胞”意味着该细胞系或细胞衍生自淋巴品系,包括 B 和 T 淋巴细胞品系和巨噬细胞品系。

“非淋巴样细胞和表达 MHC II 类”意味着除了淋巴样细胞以外的在病理性炎症反应中表达 MHC II 类分子的细胞。例如所述细胞包括滑膜细胞、内皮细胞、甲状腺细胞和神经胶质细胞,还可以含有基因改变的能表达 MHC II 类分子的细胞。

本文所用的术语“HLA-DR  $\alpha$ 链的第一结构域”意味着 $\alpha$ -链的 N-末端结构域。

本文所用的术语“HLA-DR  $\beta$ 链的第一结构域”意味着 $\beta$ -链的 N-末端结构域。

本文所用的术语“免疫应答的调节”涉及个体的免疫应答活性的改变或代表免疫系统部分的体外系统的改变。所述活性的改变导致或引起免疫抑制。

术语“免疫抑制”指通过辐照处理或施用抗代谢药物、抗淋巴细胞血清或特异性抗体防止或减弱免疫应答。

术语“免疫应答”指任何免疫系统或形成免疫系统部分的细胞(淋巴细胞、粒细胞、巨噬细胞等)对抗原性刺激的反应,包括但不限于抗体产生,细胞介导的免疫力和免疫耐受。

本文所用的关于免疫抑制的术语“IC<sub>50</sub>”指产生 50%最大应答或效果,例如抑制免疫应答,如可由 T 细胞活化(细胞应答)或 B-细胞活化(体液应答)体现的该组合物的浓度。

术语“凋亡”和“凋亡活性”指哺乳动物中的细胞死亡形式,其特征是伴有一种或多种形态和生物化学特征,包括核与胞质缩合,染色质聚集,原生质膜微绒毛丧失,胞质和核分解到含有核糖体、形态完整的线粒体和核物质的膜结合小泡(凋亡体)中,染色体 DNA 的降解或丧失线粒体功能。凋亡遵循非常严格的时间过程,并由天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶执行,它是非常专一的一组蛋白酶。可通过细胞存活率试验,Annexin V 染色或天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制试验确定或测定凋亡活性。可用交联抗体,例如抗 CD95 如实施例 H 中所述诱导凋亡。

术语“天然预编程过程”指一个一旦开始就沿自动的级联机制在细胞内进行的过程,它不需要从所述细胞的环境中获得任何其它辅助支持来完成该过程。

本文所用的术语“HuCAL”指 Knappik 等(2000)所述的完全合成的人组合抗体文库。

本文所用的术语“CDR3”指抗体或其片段的 VH 和 VL 区的第三互补决定区,其中 VH CDR3 覆盖位置 95-102(可能在位置 100 后的插入列为 100a-100z),VL CDR3 位置 89-96(可能在 VL $\lambda$ 中 95 位后的插入列为 95a-95c)(见 Knappik 等,2000)。

本文所用的关于免疫球蛋白分子的术语“可变区”具有本来由免疫学领域的普通技术人员对术语确定的普通意义。抗体的重链和抗体轻链都分成“可变区”和“恒定区”。可变区和重链区之间的分界点可轻易的由本领域普通技术人员根据描述抗体结构的标准文献确定,例如 Kabat 等“免疫学感兴趣的蛋白质序列:第五版”,美国健康和人类服务部,美国政府出版署(1991)。

本文所用的术语“在严格条件下杂交”要描述杂交和洗涤条件,在该条件下至少 60%彼此同源的核苷酸通常维持彼此杂交。优选条件是至少 65%,更优选至少 70%,甚至更优选 75%彼此同源的序列维持彼此杂交。这种严格条件是本领域技术人员已知的,可在 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York(1999), 6.3.1-6.3.6 中发现。优选的严格杂交条件的非限制性例子是

在约 45°C 下在 6x 氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 中杂交, 然后用 0.2x SSC、0.1%SDS 在 50–65 °C 洗涤一次或多次。

“蛋白质编码序列”或“编码”特定多肽或肽的序列是一种在体外或体内当置于合适调控序列控制下时转录(就 DNA 而言)并翻译(就 mRNA 而言)成多肽的核酸序列。编码序列的边界由 5' (氨基)端的起始密码子和 3' (羧基)端的翻译终止密码子确定。编码序列可包括但不限于来自原核或真核 mRNA 的 cDNA, 来自原核或真核 DNA 的基因组 DNA 序列, 和甚至合成的 DNA 序列。转录终止序列通常位于编码序列的 3'。

类似的, 不论从其上下文是否明显, “编码”将意味着包括编码多肽的 DNA 序列, 如该术语通常使用的, 也包括转录成抑制性反义分子的 DNA 序列。

本文所用的术语“转染”意味着在受体细胞中通过核酸介导的基因转移引入异源核酸, 例如表达载体。“瞬时转染”指外源 DNA 不整合入转染细胞的基因组的情况, 例如附加体 DNA 转录成 mRNA, 翻译成蛋白质。当核酸构建体由子代细胞继承时, 细胞被核酸构建物“稳定转染”。

“表达载体”指用于表达 DNA 的可复制 DNA 构建物, 该 DNA 表达所需蛋白质并含有转录单元, 该单元含有集合, 包括(1)具有基因表达调控作用的因子, 例如启动子、操纵子或增强子, 可操纵性连结到(2)编码所需蛋白质(例如本发明的多肽)的 DNA 序列, 其转录成 mRNA 并翻译成蛋白质, 和(3)合适的转录和翻译元件起始和终止序列。启动子和其它调控元件的选择通常根据所需的宿主细胞变化。一般在重组 DNA 技术中所用的表达载体常常是“质粒”形式, 指环状双链 DNA 环, 它们在载体形式下不与染色体结合。在本说明书中, “质粒”和“载体”可互换使用, 因为质粒是最常用的载体形式。然而, 本发明应包括其它起到相等功能, 并在下文中提到的本领域已知的表达载体形式。

在表达载体中, 控制转录或翻译的调控元件通常可衍生自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因。可另外掺入在宿主中复制的能力, 例如由复制起始点赋予的, 和促使转化子识别的选择基因。可以使用衍生自病毒, 例如反转录病毒、腺病毒等的载体。

“转录调控序列”是整篇文献中使用的术语, 指 DNA 序列, 例如起始信号、增强子和启动子等, 其诱导或控制与其可操纵连结的蛋白质编码序列的转录。应理解重组基因可以在转录调控元件的控制下, 该序列可以与控制基因天然存在形式的转录的序列(如存在)相同或不同。

当描述两个 DNA 区域之间的关系时，“可操纵性连接”简单意味着它们在功能上彼此相关。例如，如果启动子或其它转录调控序列控制编码序列的转录，它与编码序列可操纵性连接。

本文所用的术语“融合蛋白”是领域内已知的，指一种嵌合蛋白，其至少最初表达成含有衍生自两种或多种不同蛋白质的氨基酸序列的单链蛋白质，例如融合蛋白是融合基因的基因产物。

本文所用的术语“动物”指哺乳动物，优选人等哺乳动物。类似的，用本发明的方法治疗的“病人”或“个体”可以指人或非人动物。

根据本发明的方法，可以药理学可接受的组合物施用肽。一般单克隆抗体、抗体片段和肽的药理学可接受的载体是本领域一般技术人员熟知的。本文所用的术语“药理学可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、糖衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。在优选例中，施用不影响活性成分的生物活性作用和在给药浓度下对宿主没有过度毒性的载体介质。给药可以用任何合适技术进行，包括皮下和胃肠外给药，优选胃肠外。胃肠外给药包括静脉内、动脉内、肌肉内和腹膜内，其中静脉内是优选的。

适合注射用的药物形式包括无菌水溶液或分散体和用于当场制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。就所有情况而言，形式必须是无菌的，而且必须是达到能够方便用于注射。它必须在制造和储藏条件下稳定，必须保护免受微生物，例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质，含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其合适的混合物和植物油。可通过使用包衣，例如卵磷脂，通过在分散体的情况下维持所需粒径并使用表面活性剂来维持合适的流动性。可用各种抗菌剂和抗真菌剂，例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞等防止微生物的作用。在许多情况下，优选含有等渗剂，例如糖或氯化钠。延长注射组合物的吸收可通过在组合物中使用延缓吸收剂组合物，例如单硬脂酸铝和明胶实现。

通过在合适溶剂中掺入所需量的活性化合物，例如主题多肽以及各种其它如需要的上述成分过滤消毒制备无菌注射液。一般通过将各种灭菌的活性成分掺入无菌载体，其含有基础分散介质和所需的其它上述成分，制备分散体。就制备无菌注射溶液的无菌粉末而言，制备的优选方法是真空干燥和冻干技术，得到活性成分加上任何其它所需的来自先前无菌过滤的溶液的成分的粉末。

为了口腔给药，本发明的多肽可与赋形剂一起掺入，并以非吞服的漱口液和

洁牙剂形式使用。漱口液可以通过将活性成分以所需量掺入合适的溶剂，如硼酸钠溶液(Dobell 溶液)制备。活性成分还可以分散在洁牙剂中，包括：凝胶、软膏、粉末和浆液。活性成分可以以治疗有效量加到牙膏中，它可以含有水、粘合剂、摩擦剂、调味剂、发泡剂和湿润剂。

本发明的组合物可以配制成中性或盐形式。药物学上可接受的盐包括酸加成盐(由蛋白质的游离氨基形成)和无机酸，例如盐酸或磷酸形成的盐类，或有机酸，例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸形成的酸，从无机碱，例如钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物衍生的碱，和有机碱，例如异丙胺、三甲胺、组胺、普鲁卡因等衍生的有机碱也都可衍生形成不含羧基的盐类。

对于在水溶液中胃肠外给药，例如该溶液如需要必须是合适缓冲的，而液态稀释剂首先用足量盐水或葡萄糖变成等渗。这些特定水溶液尤其适合静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内给药。因此，可以使用的无菌水相介质是本领域技术人员根据本公开已知的。例如，一剂量能够溶于 1 毫升等渗 NaCl 溶液，并加到 1000ml 皮下灌注液或注射到指定的输液位点(见例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”15 版，1035-1038 页和 1570-1580)。剂量中的一些变化必须根据要治疗的个体的病况而定。负责给药的人将在任何事件中确定对于各病人的合适剂量。另外，对于人类给药，制剂必须符合无菌、致热性、FDA 局的生物学标准所要求的基本安全和纯度标准。

配制后，溶液可以按与定量制剂相同的方式施用，其用量具有同样的治疗效果。各种制剂很容易以各种剂量方式施用，例如各种注射用溶液、药物缓释胶囊等。

本文所用的术语“预防性或治疗性”处理指在医疗条件下施给宿主，例如导致免疫抑制。如果在接触该条件前施用，处理是预防性的，而如果在感染或疾病开始后给药，处理是治疗性的。

本发明的多肽含有人组合物的至少一个基于抗体的抗原结合域，该结合域对于人 MHC II 类抗原具有结合特异性，其中所述多肽与所述在细胞表面表达的抗原的结合导致或引起免疫应答调节。

本发明还涉及一种药物组合物，含有至少一种本发明的抗体结合性多肽，可任选的含有药物学上可接受的载体和/或稀释剂。本发明的多肽优选用于制备治疗动物，优选人类的药物组合物。本发明的多肽优选用于治疗或预防以 MHC II 类介导的 T 和/或 B 细胞活化为特征的病况。在另一个优选例中，所述处理是治疗或预

防一种以在炎症的病理位点表达 MHC II 类分子为特征的病况。在另一个优选例中，所述治疗是治疗或预防免疫系统的疾病。

在一个优选例中，本发明的抗原结合性组合物可用于治疗免疫系统疾病，包括类风湿性关节炎、幼年期关节炎、多发性硬化、Grave 氏病、发作性睡眠病、银屑病、系统性红斑狼疮、移植排斥，移植物抗宿主病、Hashimoto 氏病、重症肌无力、寻常性天疱疮、肾小球性肾炎、甲状腺炎、胰腺炎、胰岛炎、原发性胆汁性肝硬化、过敏性肠病和 Sjogren 综合征。

本发明还涉及一种诊断组合物，其含有至少一种本发明的多肽和/或核酸，可任选的含有其它试剂，例如缓冲剂来进行诊断。

另外，本发明涉及一种试剂盒，它含有(i)本发明的多肽，(ii)一个或多个可检测基团，和(iii)影响和/或检测(i)与抗原的结合的试剂和/或溶液。

## 附图简述

### 图 1

a. 抗-HLA-DR 抗体片段的特异性：MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-27-41、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8 和 MS-GPC-8-6 与 HLA-DR 蛋白、阴性对照蛋白(BSA、鞣丸酮-BSA、溶菌酶和人脱辅基转铁蛋白)，和空微量滴定板孔(塑料)的结合。用标准 ELISA 法评估特异性。

b. 抗-HLA-DR 抗体片段的特异性：从 HuCAL 文库分离到的 MS-GPC-1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 和 16 与 HLA-DR 蛋白、小鼠-人嵌合 HLA 蛋白和阴性对照蛋白(溶菌酶、脱氧铁运铁蛋白、BSA 和人 $\gamma$ -球蛋白)的结合。用标准 ELISA 法评估特异性。用非相关抗体片段(irr. scFv)作为对照。

### 图 2

抗-HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 和 16，以及 MS-GPC-8、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-41 和 MS-GPC-8-6-17 与各种表达 MHC II 类分子的细胞系的反应性。“+”代表用标准免疫荧光法检测的强反应性。“+/-”代表弱反应性，“-”代表检测不到抗-HLA-DR 抗体片段或 IgG 与特定细胞系的反应性。

## 图 3

肿瘤细胞在单价和交联抗-HLA-DR 抗体片段存在下用台盼蓝染色评估的存活率。在与抗-HLA-DR 抗体片段 (MS-GPC-1、6、8 和 10) 与和与抗-FLAG M2 mAb 作为交联剂培养 4 小时后评估的 GRANTA-519 细胞的存活率。

## 图 4

表 5 数据的分散绘图和拟合对数曲线, 显示本发明人抗体片段的 IgG 形式的 50nM 溶液与 200nM 小鼠抗体溶液治疗相比, 杀伤效力提高。空心圆代表用小鼠抗体 L243 和 8D1 治疗的细胞系的数据, 实心圆代表人抗体 MS-GPC-8、MS-GPC-8-27-41、MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-6-13 的数据。人(实线)和小鼠(短划线)mAb 杀伤数据的拟合对数曲线显示用 50nM 人 mAb 治疗比小鼠 mAb 总体上要好, 尽管后者最终治疗浓度是 200nM。

## 图 5

活化对非活化细胞的杀伤。用脂多糖、干扰素- $\gamma$ 和植物血凝素活化 MHH-PREB-1 细胞, 然后与 0.07-3300nM 抗 HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 的 IgG 形式一起保温 4 小时。在对照的非活化 MHH-PREB-1 细胞中未见存活率下降。

## 图 6

对照(无抗体、非细胞毒性小鼠 IgG1oF12; 淡灰色)和抗-HLA-DR 抗体片段的人 (MS-GPC-8、MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41; 暗灰色) IgG 形式针对从病人分离出的 CLL 细胞的杀伤效力。左侧, 培养 4 小时 (h4) 和 24 小时 (h24) 后 10 个病人的休眠细胞培养物针对抗体的存活率数据的条状图表示。右侧, 培养 4 小时 (h4) 和 24 小时 (h24) 后 6 个病人的活化细胞培养物针对抗体的存活率数据的条状图表示。

## 图 7

本发明某些抗-HLA-DR 抗体片段的浓度依赖性细胞存活率。竖线表示对各抗体片段获得的重复数据对数非线性回归估计的 EC50 值。a) 交联二价抗-HLA-DR 抗体 F(ab) 片段二聚物 MS-GPC-10(圆圈和实线)、MS-GPC-8(三角和短划线)和 MS-

GPC-1(十字和虚线)的杀伤曲线。b) 交联二价抗-HLA-DR 抗体(Fab)片段二聚物 MS-GPC-8-17(圆圈和实线)、小鼠 IgGs 8D1(三角和短划线)和 L243(十字和虚线)的杀伤曲线。c) 交联二价抗-HLA-DR 抗体(Fab)片段二聚物 GPC-8-6-2(三角和划线)、小鼠 IgGs 8D1(圆圈和实线)和 L243(十字和短划线)的杀伤曲线。d) 人抗-HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-8-10-57(十字和短划线)、MS-GPC-8-27-41(大叉和虚线)、小鼠 IgGs 8D1(圆圈和实线)和 L243(三角和划线)的杀伤曲线。所有浓度以二价制剂(IgG 或交联(Fab)二聚物)的 nM 给出。

### 图 8

a. Priess 细胞与抗-HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-8(用抗-FLAG M2 mAb 交联)一起培养, 显示比用抗-CD95 mAb 诱导的 Priess 细胞凋亡培养物更迅速的杀伤。Annexin V/PI 染色技术可鉴定出 Annexin V 染色阳性的和 PI 阳性染色的坏死细胞。

b. Priess 细胞与抗-HLA-DR 的抗体片段 MS-GPC-8(用抗-FLAG M2 mAb 交联)一起培养, 与用抗-CD95 mAb 诱导的 Priess 细胞凋亡培养物相比显示几乎没有凋亡机制的证据。Annexin V/PI 染色技术可鉴定出 Annexin V 阳性和 PI 阴性染色的凋亡细胞。

### 图 9

a. 用实验确定抗-HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-41 和 MS-GPC-8-6-13 的 IgG 形式抑制 T-杂交瘤细胞的 IL-2 分泌的免疫抑制性质。

b. 用实验确定抗-HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-8-27-41、MS-和 MS-GPC-8-6-19 的单价 Fab 形式抑制 T-杂交瘤细胞的 IL-2 分泌的免疫抑制性质。

IgG 形式(二价)的浓度用浓度表示, 虽然 Fab 形式(单价)的浓度用 Fab 形式浓度的一半表示, 使得能直接与 IgG 形式的浓度比较。

### 图 10

在确定 T 细胞增殖抑制的实验中抗 HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 的 IgG 形式的免疫抑制性质。

### 图 11

scFv 噬菌体的载体作图和序列显示载体 pMORPH13\_scFv

载体 pMORPH13\_scFv 是噬菌粒载体，含有编码丝状噬菌体的基因 III 蛋白 C-末端结构域和 HuCAL scFv 的融合蛋白的基因。在图 11 中，显示了含有模式 scFv 基因 (VH1A 和 V $\lambda$ 3 (Knappik 等, 2000)) 的载体。

原始 HuCAL 主宰基因 (Knappik 等 (2000): 见其中的图 3) 是用其真实 N-末端: VH1A、VH1B、VH2、VH4 和 VH6 构建的，其中 Q (=CAG) 是第一个氨基酸。VH3 和 VH5，其中 E (=GAA) 是第一个氨基酸。载体 pMORPH13-scFv 含有与 VH 链融合的短 FLAG 肽序列 (DYKD)，因此该载体中的，和所有衍生自该载体的 HuCAL VH 链在第一个位置具有 E (=GAA) (例如在 pMx7\_FS 载体中，见图 12)。

#### 图 12

scFv 表达载体 pMx7\_FS\_5D2 的载体图和序列

当 VH-CH1 与 FLAG 标记 (Hopp 等, 1988; Knappik 和 Plückthun, 1994) 和 STREP 标记 II (WSHPQFEK) (IBA GmbH, Göttingen, Germany; 见: Schmidt 和 Skerra, 1993; Schmidt 和 Skerra, 1994; Schmidt 等, 1996; Voss 和 Skerra, 1997) 融合时，表达载体 pMx7\_FS\_5D2 导致 HuCAL scFv 片段的表达 (在图 12 中，载体含有称为 “5D2” 的编码 “模拟” 抗体片段的基因)。

#### 图 13

Fab 表达载体 pMx9\_Fab\_GPC8 的载体图和序列

当 VH-CH1 与 FLAG 标记 (Hopp 等, 1988; Knappik 和 Plückthun, 1994) 和 STREP 标记 II (WSHPQFEK) (IBA GmbH, Göttingen, Germany; 见: Schmidt 和 Skerra, 1993; Schmidt 和 Skerra, 1994; Schmidt 等, 1996; Voss 和 Skerra, 1997) 的组合融合时，表达载体 pMx9\_FS\_GPC8 导致 HuCAL Fab 片段的表达 (在图 13 中，载体含有 Fab 片段 MS-GPC8)。

在 pMx9\_Fab 载体中，克隆自 scFv 片段的 HuCAL Fab 片段 (见图 11 的图片说明) 不具有与 VH 链融合的短 FLAG 肽序列 (DYKD)，该载体中的和直接衍生自该载体的 HuCAL VH 链在第一个位置都具有 Q (=CAG)。

#### 图 14

Fab 噬菌体的载体图和序列显示载体 pMORPH18\_Fab\_GPC8

载体 pMORPH18 的衍生物是噬菌粒载体，含有编码丝状噬菌体的基因 III 蛋白 C-末端结构域和 HuCAL 抗体的 VH-CH1 链之间的融合基因。另外，载体含有单独编码的 VL-CL 链。在图 14 中，显示了含有 Fab 片段 MS-GPC-8 的载体。

在 pMORPH18 载体中，克隆自 scFv 片段的 HuCAL Fab 片段(见图 11 的插图说明)不具有与 VH 链融合的短 FLAG 肽序列(DYKD)，该载体中的和直接衍生自该载体的 HuCAL VH 链在第一个位置具有 Q(=CAG)。

### 图 15

MS-GPC-1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 和 16，以及 MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 的 VH 和 VL 区的氨基酸序列。

图 15 中的序列显示原始 HuCAL 主宰基因结构中的 VH 的氨基酸 1(Knappik 等(2000)：见其中的图 3)。在 scFv 构建物中，如该申请中所述，VH 的氨基酸 1 总是 E(见图 11 的插图说明)，在本申请的 Fab 构建物中，VH 的氨基酸 1 总是 Q(见图 13 的插图说明)。

### 发明详述

下列实施例说明了本发明。

### 实施例

所有不另外指出的缓冲液、溶液或方法可以在标准教科书检索，例如 Current Protocols of Immunology(1997 和 1999)或 Sambrook 等，1989(该参考文献未出版)。除非另外说明，所有材料购自 sigma, Deisenhofen, DE 或 Merck, Darmstadt, DE 或引用的文献中给出了来源。从 LGC 参考材料, Middlesex, UK 中获得杂交瘤细胞系 LB3.1 和 L243; 抗体 8D1 的数据由 Dr. Matyas Sandor, University of Michigan, Madison, WI, USA 慷慨提供。

#### 1. 人抗原的制备

为了证明我们能鉴定人组合物的细胞毒性抗原结合域，我们首先如下制备了人抗原的纯化形式，来自 PRIESS 细胞(Gorga 等，1984; Gorga 等，1986; Gorga 等，1987; Stern 等，1992)的人 MHC II 类 DR 蛋白(DRA\*0101/DRB\*0401)。

首先，在 RPMI 和 10%胎牛血清(FCS)中用标准条件培养 PRIESS 细胞(ECACC，

Salisbury UK), 在含有 1% NP-40(BDH, Poole, UK)、25mM 碘代乙酰胺、1mM 苯甲基磺酰氟(PMSF)和 10mg/l 的各种蛋白质抑制剂(胰凝乳蛋白酶抑制剂、antipain、胃蛋白酶抑制剂 A、大豆胰蛋白酶抑制剂和亮抑肽酶)的 200 毫升磷酸缓冲盐(PBS) (pH7.5)中裂解  $10^{10}$  细胞。10,000g(30 分钟, 4°C)离心裂解物 10 分钟, 在得到的上清液中补充含有 5%脱氧胆酸钠、5mM 碘代乙酰胺和 10mg/l 的各种蛋白酶抑制剂的 40 毫升水溶液, 100,000g 离心 2 小时(4°C)。为了除去非特异性结合和内源的抗体,用 PMSF 将上清液稀释成 0.2mM, 并过夜(4°C)通过家兔血清 affigel-10 柱(5 毫升; 为了制备, 家兔血清(Charles River, Wilmington, MA, USA)与 Affigel 10(BioRad, Munich, DE)以 3:1 的体积比培养, 根据厂商指示洗涤), 然后用 0.2ml/min 的流速通过 Protein G Sepharose Fast Flow 柱(2 毫; Pharmacia)。

第二, 温和混合预处理的裂解液与 5 毫升 Protein G Sepharose Fast Flow 珠, 4°C 保温过夜, 该珠与小鼠抗-HLA-DR 抗体 LB3.1(Protein G-Sepharose FF(Pharmacia)亲和层析杂交瘤细胞系 LB3.1 的上清液)偶联, 然后转移到小柱中, 再用三种溶液充分洗涤: (1)100 毫升溶液, 含有 50mM Tris/HCl(pH8.0), 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.5%脱氧胆酸钠, 10%甘油和 0.03%叠氮化钠, 流速为 0.6ml/min。(2)25 毫升溶液, 含有 50mM Tris/HCl(pH9.0)、0.5M NaCl、0.5% NP-40、0.5%脱氧胆酸钠、10%甘油和 0.03% 叠氮化钠, 流速为 0.9ml/min; (3)25 毫升溶液, 含有 2mM Tris/HCl(pH8.0)、1%辛烷基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、10%甘油和 0.03%叠氮化钠, 流速为 0.9ml/min。

第三, 用 15 毫升含有 50mM 二乙胺/HCl(pH11.5)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、1%辛烷基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(Alexis Corp., Lausen, CH)、10%甘油、10mM 碘代乙酰胺和 0.03%叠氮化钠的溶液洗脱 MHC II 类 DR 蛋白(DRA\*0101/DRB\*0401), 流速为 0.4ml/min。立即用 100 微升 1M Tris/HCl(pH6.8)、150mM NaCl 和 1%辛烷基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷中和 800 微升组分。重复孵育裂解液和 LB3.1Protein G Sepharose Fast Flow 珠, 直到裂解液中没有 MHC 蛋白。合并 MHC II 类 DR 蛋白的纯化洗脱组分(如 SDS-PAGE 分析), 用 Vivaspin 浓缩剂浓缩到 1.0-1.3g/l(Greiner, Solingen, DE)和截留 30kDa 分子量。用相同的 Vivaspin 浓缩剂含有 1%辛烷基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷的 PBS 重新缓冲约 1 毫克 MHC II 类 DR 制剂, 使得蛋白质与 BIAcore CM5 芯片直接偶联。

## 2. HuCAL 的筛选

### 2.1. 介绍

我们根据最新产生的概念 (Knappik 等, 2000) 鉴定了某些的人抗体文库中针对人抗原 (DRA\*0101/DRB1\*0401) 的人组合物的抗原结合性抗体片段 (MS-GPC-1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 和 16)。在此得到总共 49 个不同框架的共有框架代表用于人免疫应答的 VH-和 VL-亚类。设计这些主宰基因考虑并消除了蛋白质凝聚的不良残基和建立导致基因分子组合物的独特限制性位点。在 HuCAL-scFv 中, 随机排列编码 49 个主宰基因区域的 VH-和 CL-CDR3。

## 2.2. 噬菌粒拯救, 噬菌体扩增和纯化

在大肠杆菌 TG-1 中克隆入基于噬菌粒的噬菌体显示载体 pMORPH13\_scFv (见图 11) 的 HuCAL-scFv (Knappik 等, 2000) 文库, 在含有 34 微克/毫升氯霉素和 1% 葡萄糖的 2x TY 培养基 (2xTV-CG) 中扩增。在约 0.5 OD<sub>600</sub> 37°C 进行辅助噬菌体感染 (VCSM13), 离心并重悬浮在 2 x TY/34 微克/毫升氯霉素/50 微克/毫升卡那霉素/0.1mM IPTG 中后, 细胞在 30°C 生长过夜。从上清液中 PEG-沉淀噬菌体 (Ausubel 等, 1998), 重新悬浮在 PBS/20%甘油中, 储藏在 -80°C。两轮淘洗之间的噬菌体扩增如下进行: 用洗脱噬菌体感染对数期中期的 TG1-细胞, 接种到补充了 1% 葡萄糖和 34 微克/毫升的氯霉素的 LB-琼脂糖中。30°C 过夜培养后, 刮下菌落, 调节到 0.5 OD<sub>600</sub>, 如上法加入辅助性噬菌体。

## 2.3. 手工固相淘洗

用溶于 PBS 的 MHC II 类 DRA\*0101/DRB1\*0401 (如上制备) 包裹 MaxiSorp™ 微量滴定板 (Nunc, Roskilde, DK) 的孔 (2 微克/孔)。用 5% 脱脂奶粉的 PBS 液中封闭后, 在 20°C 下经 1 小时加入 1-5x10<sup>12</sup> 如上纯化的 HuCAL-scFv 噬菌体。几次洗涤步骤后, 用 100mM 三乙胺 pH-洗脱结合的噬菌体, 随后用 1M TRIS-Cl, pH7.0 中和。如上所述在各轮之间通过噬菌体扩增进行三轮淘洗。

## 2.4. 混合的固相/全细胞淘洗

如 2.3 和 2.2 中所述, 进行三轮淘洗和噬菌体扩增, 除了在第二轮中, 10 毫升 Falcon 管中使用 1 毫升 PBS/10% FCS 的 1x10<sup>7</sup> 到 5x10<sup>7</sup> PRIESS 细胞, 以进行全细胞淘洗。20°C 与噬菌体制备物培养 1 小时后, 离心细胞悬液 (2000rpm 3 分钟) 除去非结合的噬菌体, 用 10 毫升 PBS 洗涤细胞三次, 每次后如所述进行离心。用 100mM HCl 通过 pH-洗脱法洗脱出与细胞特异性结合的噬菌体。另外, 可以直接在三乙胺处理 (100mM) 和随后中和后在悬液中加入大肠杆菌扩增结合的噬菌体。

## 2.5. HLA-DR 结合的 scFv 片段的鉴定

用 FACS 分析在 PRIESS 细胞上筛选经三轮固相淘洗 (2.3) 或混合固相/全细胞

淘洗(2.4)后获得的克隆与细胞表面 HLA-DR 的结合。为了表达,通过 XbaI/EcoRI 将 scFv 片段克隆到作为表达载体的 pMX7\_FS 中(见图 12)。在下文实施例 3.2 中显示了表达条件。

在 4°C 将  $10^6$  Priess 细胞等分转移到 96 孔微量滴定板中。经 60 分钟加入 scFv 的封闭缓冲液(PBS/5%FCS)溶液,用抗-FLAG M2 抗体(Kodak)(1:5000 稀释),然后用多克隆山羊抗小鼠 IgG 抗体-R-藻红素复合物(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, 目录号 115-116-146, F(ab')<sub>2</sub> 片段)(1:200 稀释液)检测。将细胞固定在 4%聚甲醛中,4°C 储藏。每个试验在 FACS-Calibur(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)上收集  $10^4$  个细胞。

在 500 个推定结合物中仅 15 个被鉴定为与 Priess 细胞特异性结合。如下所述进一步分析这些克隆的免疫调节能力及其杀伤能力。表 1 包含由此鉴定的克隆 MS-GPC-1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 和 16。列出的 VH 和 VL 家族以及 CDR3 指所述的基于 HuCAL 共有的抗体基因(Knappik 等, 2000); VH 和 VL CDR 的序列如表 1 所示, VH 和 VL 区的全序列如图 15 所示。

### 3. Fab 片段的产生

#### 3.1. scFv 转化为 Fab

从相应的 scFv 片段如下产生了 Fab-片段抗原结合多肽 MS-GPC-1-Fab、MS-GPC-6-Fab、MS-GPC-8-Fab 和 MS-GPC-10-Fab。将 scFv 片段的重链和轻链可变区克隆入 pMx9\_Fab(图 13), 重链可变区作为 MfeI/StyI 片段,  $\kappa$  轻链的可变区作为 EcoRV/BsiWI 片段。 $\lambda$  链首先从相应的作为模板的 pMORPH13-scFv 载体用 PCR 引物 CRT(5' 引物)和 CRT6(3' 引物)扩增出来, 其中 CRT6 引入独特的 DraIII 限制性内切酶位点。

CRT5: 5' GTGGTGGTTCGATAATC3'

CRT6: 5' AGCGTCACACTCGGTGCGGCTTTCGGCTGGCCAAGAACGGGTTA3'

用 EcoRV/DraIII 切割 PCR 产物, 克隆入 pMx9\_Fab(见图 13)。可用多克隆山羊抗人 IgG 抗体-R-藻红素复合物(Jackson ImmnoResearch, West Grove, PA, USA, 目录号 109-116-088, F(ab')<sub>2</sub> 片段)(1:200 稀释)检测 Fab 轻链。

#### 3.2. HuCAL-抗体片段在大肠杆菌中的表达和纯化

在补充有 34 微克/毫升氯霉素的 1 升 2x TY-培养基中分别在大肠杆菌细胞(JM83)中从 pMX7\_FS 或 pMx9\_Fab 表达 scFv 和 Fab 片段。用 0.5mM IPTG(scFv)或 0.1mM IPTG(Fab)诱导后, 在 22°C 培养细胞 12 小时。在弗式压碎器(Thermo

Spectronic, Rochester, NY, USA) 中在 20mM 磷酸钠、0.5M NaCl 和 10mM 咪唑 (pH7.4) 中裂解细胞沉淀。离心除去细胞碎片, 用 Streptactin 基质进行 STREP 标记纯化前, 使澄清上清液通过 0.2 微米孔, 纯化条件根据供应商 (IBA GmbH, Göttingen, Germany)。尺寸排阻层析 (SEC) 纯化如 Rheinacker 等进行 (1996)。通过 SEC 用标定的标准确定表观分子量, 在某些情况下用液相层析-质谱进行验证 (TopLab GmbH, Matinsried, Germany)。

#### 4. 抗体片段的优化

为了优化 HLA-DR 结合性抗体片段的某些生物学特征, 用 Fab 片段之一 MS-GPC-8-Fab 通过随机用所有  $\lambda$  链  $\lambda$ 1-3 库替换 HuCAL 文库的 CDR3 中的亲本 VL  $\lambda$ 1, 构建 Fab 抗体片段文库 (Knippak 等, 2000)。

通过 XbaI/EcoRI 从 pMx9\_Fab\_GPC-8 将 Fab 片段 MS-GPC-8-Fab (见 3.1) 克隆入 pMORPH18\_Fab, 噬菌体显示的 Fab 片段基于噬菌粒的载体, 来产生 pMORPH18\_Fab\_GPC-8 (见图 14)。含有独特 DraIII 限制性内切酶位点的  $\lambda$  链库 (Knappik 等, 2000) 用 NsiI 和 DraIII 切割, 被克隆入 pMORPH18\_fab\_GPC-8 (见图 14 pMORPH18\_Fab\_GPC-8 的载体图)。

如 2.3 中所述, 进行两轮针对 MHC II 类 DRA\*0101/DRB1\*0401 (如上制备) 的淘洗筛选得到 Fab 优化文库, 除了在第二轮中包裹的抗原浓度降到 12 纳克/孔。如 2.5 中所述, FACS 鉴定出优化的克隆。这些克隆中有 6 个 MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18 和 MS-GPC-8-27 进一步确定特征, 都显示如起始片段 MS-GPC-8 发现的细胞杀伤作用。表 1 列出了 MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18 和 MS-GPC-8-27 的序列特征。列出的 VH 和 VL 家族和 CDR3 指所述的 HuCAL 基于共有的抗体基因 (Knappik 等, 2000), 图 15 显示了 MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17 和 MS-GPC-8-27 的 VH 和 VL 区的全序列。

抗-HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-8-6 和 MS-GPC-8-17 的优化 Fab 形式显示对于起始 MS-GPC-8 改善的特征。例如, 优化抗体的 EC50 是 15-20 和 5-20nM (与 MS-GPC-8 的 20-40nM 比较, 其中浓度以二价交联 Fab 二聚物的浓度给出), 对于 MS-GPC-8-6 和 MS-GPC-8-17 对 MHH-Call 4 细胞的最大杀伤能力分别确定为 76% 和 78% (与 MS-GPC-8 的 65% 比较)。

为了进一步优化, 通过盒式诱变用三核苷酸定向的诱变 (Virnekäs 等, 1994) 优化衍生自 MS-GPC-8 (包括 MS-GPC-8-10 和 MS-GPC-8-27) 的一组抗-HLA-DR 抗体

片段的 VL CDR1 区域。简单说，合成了一个 VI1 CDR1 文库盒，它含有 6 个随机位点(总可变性:  $7.43 \times 10^6$ )，克隆入 VI1 框架。用 EcoRV 和 BbsI 消化 CDR1 文库，含有 CDR1 文库的片段接入 pMORPH18\_Fab 中 MS-GPC-8 衍生的 Fab 抗体的  $\lambda$  轻链中(如上所述)，用 EcoRV 和 BbsI 消化。如上所述筛选得到的文库。通过与 HLA DR 特异性结合鉴定了 10 个克隆(MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10 和 MS-GPC-8-27-41)，显示起始片段 MS-GPC-8、MS-GPC-8-10 和 MS-GPC-8-27 所发现的细胞杀伤活性。表 1 包含 MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10 和 MS-GPC-8-27-41 的序列特征。列出的 VH 和 VL 家族和 CDR3 指所述的 HuCAL 基于共有的抗体基因(Knappik 等, 2000)，图 15 显示了 MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-10-57、和 MS-GPC-8-27-41 的 VH 和 VL 区的全序列。

如实施例 10 中所述，从 10 个克隆中细胞杀伤 EC50 有显著提高，可选出 4 个 Fab 片段(MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41)。表 1 显示在 CDR1 区域优化的克隆的序列。

优化过程不仅提高了优化过程产生的抗-HLA-DR 抗体片段的生物效力，还显著改善了对 HLA DR 蛋白质的抗体片段的亲和力这一物理特征。例如，用表面等离子共振仪器(Biacore, Upsala Sweden)根据实施例 7 测量了 MS-GPC-8 及其优化子代的 Fab 形式的亲和力。MS-GPC-8 亲本 Fab 的亲和力在 VLCDR3 优化后提高了 100 倍，从 346nM 到约 60nM，VLCDR3+1 优化后进一步改进成一位数纳摩尔亲和力(范围 3-9nM)(表 2)。

## 5. IgG 的产生

### 5.1 HuCAL-免疫球蛋白表达载体的构建

如下克隆重链。除去 pcDNA3.1+(Invitrogen) (NheI/ApaI) 的多克隆位点，插入用于 HuCAL 设计的与限制性位点相容的填充片段，用于连接前导序列(NheI/EcoRI)、VH-结构域(EcoRI/BlpI)和免疫球蛋白恒定区(BlpI/ApaI)。前导序列(EMBL M83133)具有 Kozak 序列(Kozak, 1987)。人 IgG1(PIR J00228)、IgG4(EMBL K01316)和血清 IgA1(EMBL J00220)的恒定区分隔成长约 70 个碱基的重叠寡核苷酸。引入沉默突变除去与 HuCAL 设计不相容的限制性位点。用重叠延伸-PCR 剪接寡核苷酸。

如下克隆轻链。用两种不同的填充片段替换 pcDNA3.1/Zeo+(Invitrogen)的多重克隆位点。κ-填充片段提供插入κ-前导序列(NheI/EcoRV)、HuCAL-scFv Vκ-结构域(EcoRV/BsiWI)和κ-链恒定区(BsiWI/ApaI)的限制性位点。λ-填充片段中的相应限制性位点是 NheI/EcoRV(λ-前导序列)、EcoRV/HpaI(Vλ-结构域)和 HpaI/ApaI(λ链恒定区)。κ-前导序列(EMBL Z00022)和λ-前导序列(EMBL L27692)都具有 Kozak 序列。人κ-(EMBL J00241)和λ-链(EMBL M18645)中的恒定区通过上述重叠延伸-PCR 装配。

## 5.2 表达 IgG 的 CHO 细胞的产生

所有细胞维持在 37°C, 含有 5%CO<sub>2</sub> 的湿润大气下, 供应商推荐的培养基中。CHO-K1(CRL-9618)来自 ATCC, 用等摩尔的 IgG 重链和轻链表达载体混合物共转染。用 600 微克/毫升 G418 和 300 微克/毫升 Zeocin(Invitrogen)选择双抗性的转染子, 然后极限稀释。用捕获-ELISA 评估单克隆上清液的 IgG 表达。阳性克隆在补充有 10%超低 IgG-FCS 的 RPMI-1640 培养基(Life Technologies)中扩大。将上清液 pH 调节到 8.0 和无菌过滤后, 溶液进行标准蛋白质 A 柱层析(Poros 20A, PE Biosystems)。

抗-HLA-DR 抗原结合域的 IgG 形式显示对抗体片段改进的特征, 这些改进的特征包括亲和力(实施例 7)和杀伤效力(实施例 9、10 和 14)。

## 6. HLA-DR 特异性实验和表位作图

为了证明选自 HuCAL 文库的抗原结合性结构域的与人 MHC II 受体 N-末端结构域的结合位点特异性结合, 该受体在等位基因之间是大部分保守的, 迄今在细胞杀伤领域中通过受体交联是未知的, 我们对其结合特异性进行了评估, 尝试确定结合表位的特征。

Fab 抗体片段 MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-27-41、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8 和 MS-GPC-8-6 显示与 HLA-DR 蛋白质的结合特异性, 但没有与非 HLA-DR 蛋白的特异性。用下列抗原测试了选自 HuCAL 文库的 Fab 片段的反应性: HLA-DR 蛋白(DRA\*0101/DRB1\*0401: 实施例 1 中制备, 和一组无关的非-HLA-DR 蛋白质, 包括 BSA、鞣花酮-BSA、溶菌酶和人脱氧铁运铁蛋白)。用空孔(塑料的)作为阴性对照。以 1 微克/孔 PBS(Nunc-MaxiSorp™)包裹抗原 MHCII 过夜, 而对于其它抗原(BSA、鞣花酮-BSA、溶菌酶、脱氧铁运铁蛋白)用 10 微克/孔。翌日用 5%脱脂牛奶封闭 1 小时, 然后与各抗体(抗-MHCII-Fab 和无关 Fab(Mac1-8A)) 以 100 纳克/孔孵育 1

小时。抗人-IgG F(ab')<sub>2</sub>-过氧化物酶-偶联物在 PBS 中洗涤后(1:10000 在 TBS(补充了 5% w/v 脱脂奶粉/0.05% v/v Tween 20)中的稀释度)。加入底物 POD(Roche)后,最终洗涤在 PBS 中进行。用 ELISA 读数仪在 370nm 检查显色情况。

所有抗-HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-27-41、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8 和 MS-GPC-8-6 都显示对 HLA-DR 的高度特异性,如同将这些抗体片段与 HLA-DR 衍生的抗原培养时与对照比较证明可得到更高的荧光强度(图 1a)。在类似的实验中,发现 Fab 片段 MS-GPC-1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 和 16 同时与 DRA\*0101/DRB1\*0401(如上制备)和含有 DRA\*0101 和 DRB1\*0401 的 N-末端结构域与衍生自小鼠 II 类同源物 IEd(Ito 等, 1996)剩余的分子的嵌合 DR-IE 结合(图 1b)。

为了证明本发明的抗-HLA-DR 抗体片段和 IgG 的广泛 DR 反应性,测试了 MS-GPC-1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 和 16 的 scFv 形式,测试了和 MS-GPC-8、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-51 和 MS-GPC-8-6-13 的 IgG 形式的针对从 ECACC 获得的一类爱泼斯坦-巴尔病毒转化的 B 细胞系(Salisbury UK)的反应性,分别对各人群中最常见的 DR 等位基因之一具有同源性(图 2 显示了细胞系和等位基因的表)还测试了抗体片段针对一系列转染表达人 MHC II 类同型抗原的 L 细胞的反应性(除了分别表达分子 DRB3\*0101、DRB4\*0101、DP0103/0402、DP0202/0201 和 DQ0201、0602 的 DRB1:L105.1、L257.6、L25.4、L256.12 和 L21.3(Klohe 等, 1988))。

用例如 Otten 等(1997)所述的免疫荧光法证明了抗原结合片段与一类表达各种 MHC-II 类分子的细胞系的反应性。在  $2 \times 10^5$  个细胞上用抗-FLAG M2 抗体作为针对各抗-HLA-DR 抗体片段携带的 M2 标记的第二试剂和荧光素标记的山羊抗小鼠 Ig(BD Pharmingen, Torrey Pine, CA, USA)作为染色剂进行染色。将细胞在 4°C 与 200nM 抗-HLA-DR 抗体片段孵育 60 分钟,然后与厂商确定浓度的二抗和三抗一起孵育。对于 IgG 形式,省略二抗,用 FITC 标记的小鼠抗人 IgG4(Serotec, Oxford, UK)检测 IgG。在孵育步骤之间洗涤细胞。最后洗涤细胞并用 FACS Calibur(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)分析。

图 2 显示 scFv 片段 MS-GPC-1、2、5、6、7、8、10、11、14、15 和 16,以及 MS-GPC-8、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-51 和 MS-GPC-8-6-13 的 IgG 形式与所有测试的 DRB1 同型抗原反应,而 MS-GPC-3 和 4 与测试的 3 种 DRB1 同型抗原反应。该观察结果以及所有 HLA-DR 抗体片段与嵌合 DR-IE 反应的观察结果合起来,

提示所有所选的抗-HLA-DR 抗体片段识别单形 DR $\alpha$ 链的胞外第一个结构域或 DR $\beta$ 链胞外第一个结构域上的单形表位。

然后我们尝试进一步通过检测与小鼠抗体的竞争性结合定位 MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 的结合域, 其中 HLA-DR 上的结构域是已知的。已知小鼠抗体 L243 和 LB3.1 与 $\alpha$ 1 结构域结合, 1-1C4 和 8D1 与 $\beta$ 1 结构域结合, 10F12 与 $\beta$ 2 结构域结合(Vidovic 等, 1995b)。为此, 开发了一种实验, 其中首先将表达 DR 的细胞系(LG-2)与 MS-GPC-8-10-57 或 MS-GPC-8-27-41 的 IgG4 形式, MS-GPC-8-10-57 的 Fab 形式或 GPC 8 的 Fab 形式以及不相关的对照抗体一起孵育。然后加入各种小鼠抗体, 并进行检测。如果 MS-GPC-8-10-57 或 MS-GPC-8-27-41 的结合位点与小鼠抗体的结合重叠, 那么预期小鼠抗体的检测结果减少。

GPC-8-27-41 和 MS-GPC-8-10-57 的 IgG4 形式和 MS-GPC-8-10-57 的 Fab 形式的结合基本上抑制(平均荧光强度降低>90%)了 1-1C4 和 8D1 的结合, 而 L243、LB3.1 和 10F12 和对照仅稍有影响。MS-GPC-8 的 Fab 形式减少了 1-1C4 约 50%的结合(平均荧光从 244 降到 118), 终止 8D1 结合, 仅稍微影响 L243、LB3.1 和 10F12 或对照的结合。无关的对照抗体不影响结合。因此, MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 看来识别等位 HLA-DR 分子中高度保守的 $\beta$ 1 结构域表位。

在冰上进行全染色过程。预先在含有 2% FCS 和 35 微克/毫升豚鼠 IgG 的 PBS(“FACS-缓冲液”)中预封闭  $1 \times 10^7$  个人 B-淋巴母细胞系 LG-2。这些细胞分成 3 等份 A、B 和 C, 各约  $3.3 \times 10^6$  个细胞, 其中加入 A) 35 微克 MS-GPC-8-10-57 或 MS-GPC-8-27-41 IgG4, B) 35 微克 MS-GPC-8-10-57 Fab 或 MS-GPC-8 Fab, C) 35 微克不相关的 IgG4 作为阴性对照, 孵育 90 分钟。然后将 A、B、C 各分成 6 等份, 每份含有  $5.5 \times 10^5$  个细胞, 将下列各 2 微克小鼠抗体加到指管中, 孵育 30 分钟: 1.) 纯化的 mIgG; 2.) L243; 3.) LB3.1; 4.) 1-1 C4; 5.) 8D1; 6.) 10F12。然后, 在各指管中加入 4 毫升 PBS, 指管 300g 离心 8 分钟, 细胞沉淀重悬浮在 50 微升含有稀释 1-25 倍的山羊-抗-小鼠 Ig-FITC 复合物(最终浓度 20 微克/毫升)(BD Pharmingen, Torrey Pines, CA, USA)的 FACS 缓冲液中。细胞避光培育 30 分钟。然后, 用 4 毫升 PBS 洗涤细胞, 如上离心, 重新悬浮在 500 微升 PBS 中, 用于流式细胞计数分析(FACS Calibur, BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)。

用 PepSpot 技术(US 6040423; Heiskanen 等, 1999)进一步鉴定 MS-GPC 8-10-57 的结合表位。简单说, 在纤维素膜上用固相肽合成点样法(WO 00/12757)合成 73

条重叠 15-聚肽阵列。这些肽序列分别衍生自 HLA-DR4Dw14、HLA-DRA1\*0101(残基 1-81)和 HLA-DRB1\*0401(残基 2-92)的 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 结构域,有 2 个氨基酸的重叠。第二,将该阵列浸没在 0.1% Tween-20/PBS(PBS-T)中,用 5%BSA 在 PBS-T 中室温封闭 3 小时,然后用 PBS-T 洗涤 3 次。第三,制备的阵列在室温下和 50 毫升 5mg/1 GPC-8-10-57 的 IgG 形式的 1%BSA/PBS-T 溶液孵育 90 分钟。第四,结合后,用 PBS-T 洗涤膜三次,随后在室温下与偶联了辣根过氧化物酶的山羊抗人轻链抗体(在 1%BSA/PBS-T 中稀释 5000 倍)孵育 1 小时。最后,用 PBS-T 洗涤膜 3 次,用化学发光检测法在 X 光胶片上确定有无结合。对于山羊抗人轻链抗体非特异性结合的对照,用下列独立洗涤步骤剥离肽阵列,各在室温下进行 30 分钟:PBS-T(2 次),水,DMF,水,含有 8M 尿素的水溶液,1%SDS,0.5% DTT,50%乙醇,10%乙酸的水溶液(各 3 次),最后甲醇(2 次)。再次封闭膜,洗涤,与偶联有辣根过氧化物酶的山羊抗人轻链抗体一起孵育,如上所述显色。

#### 7. 抗 HLA-DR 抗体和抗体片段的亲和力

为了证明本发明抗 HLA 抗体片段的卓越结合性能,我们用标准设备,使用等离子体共振原理测量了它们与人 MHC II 形 DR 蛋白(DRA\*0101/DRB1\*0401)的亲和力。我们意外在本发明一些抗 HLA-DR 抗体片段 IgG 形式亚纳摩尔水平实现了亲和力。例如,测量 MS-GPC-8-27-41、MS-GPC-8-6-13 和 MS-GPC-8-10-57 的 IgG 形式的亲和力分别为 0.3、0.5 和 0.6nM(表 3a)。另外,我们观察到在 CDR1 和 CDR3 轻链区成熟的 Fab 片段的亲和力达到 2-8nM 范围的高亲和力(表 3b)。仅在 CDR3 轻链区成熟的 Fab 片段亲和力显示 40-100nM 范围内的亲和力(表 3c),甚至未优化的 HuCAL 抗原结合域的 Fab 片段也显示在亚微摩尔范围内的亲和力(表 3d)。我们惊奇的观察到虽然 CDR3 优化后  $K_{on}$  仅有中等程度的增加(2 倍),但  $K_{on}$  仍然在抗体优化过程中在  $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$  的数量级中大致保持恒定,而  $K_{off}$  显著下降是优化过程的特征-对于本发明中未优化的 Fab、CDR3 优化的 Fab、CDR3/CDR1 优化的 Fab 和抗 HLA-DR 抗体的 IgG 形式是亚  $100 s^{-1}$ 、亚  $10 s^{-1}$ 、亚  $1 s^{-1}$  和亚  $0.1 s^{-1}$ 。

如下测量本发明抗 HLA 抗体片段的亲和力。所有测量都用 BIAcore3000 型仪器(Biacore AB, Sweden)在 HBS 缓冲液(20mM HEPES、150mM NaCl, pH7.4)中,在 25°C,以 20 微升/分钟的流速进行。MHC II 类 DR 蛋白(在实施例 1 中制备)稀释在 100mM pH4.5 的乙酸钠中,至浓度 50-100mg/ml,与 CM5 芯片(Biacore AB)用标准 EDC-NHS 偶联化学偶联,然后如厂商指示用乙醇胺处理。MHCII 的包裹密度调节到 500-4000RU 之间。注射 5 个不同浓度的不同抗体,用 Biacore Instrument

的标准软件测量亲和力。用 10mM 甘氨酸 pH2.3 和 7.5mM NaOH 再生偶联的表面。

#### 8. 抗 HLA-DR 抗体和抗体片段的多价杀伤作用

为了证明不同效价对细胞杀伤的影响，用本发明针对 GRANTA-519 细胞的抗 HLA-DR 抗体片段单价、二价和多价的组合物进行细胞杀伤试验。来自 HuCAL 文库的抗-HLA-DR 抗体片段当与抗-FLAG M2 mAb 共同孵育，交联形成二价组合物时，与单价形式(抗体片段浓度 200nM 时 5-30%杀伤)比较，显示更高的细胞杀伤活性(抗体片段浓度 200nM 时 60-90%杀伤)(图 3)。单独或仅在抗-FLAG M2 mAb 存在下，不和抗-HLA-DR 抗体片段共同孵育细胞，不引起用细胞存活率测量的细胞毒性。如上处理细胞，但使用 50nM 抗体片段 MS-GPC-8、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 的 IgG4 形式(天然二价)，而不加入抗 FLAG M2 mAb，在孵育 4 小时后显示 76%、78%、78%和 73%的杀伤效力。

另外，我们观察到抗-HLA-DR 抗体片段的更高等级的效价可进一步显著降低细胞存活率。在含有抗-HLA-DR 抗体片段的 IgG 形式的孵育复合物中加入蛋白质 G 后，形成的多价复合物与抗 HLA-DR 抗体片段仅与二价 IgG 形式孵育后形成的二价组合物比较，进一步降低细胞存活率。

在 HLA-DR 阳性肿瘤细胞系 GRANTA-519 (DSMZ, Germany) 上测试选自 HuCAL 文库的抗 HLA-DR 抗体片段的杀伤效力。37°C 在 6%CO<sub>2</sub> 下，2x10<sup>5</sup> 个细胞与 200nM 抗 HLA-DR 抗体片段在补充有 2.5%热灭活 FBS (Biowhittaker Europe, BE)、2mM L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、1mM 丙酮酸钠和 0.1mg/ml 卡那霉素的 RPMI 1640 (PAA, Germany) 中孵育 4 小时。测试各抗 HLA-DR 抗体片段作为单价抗 HLA-DR 抗体片段或通过加入 100nM 二价交联抗-FLAG M2 mAb，作为二价组合物杀伤活化肿瘤细胞的作用。37°C 在 6%CO<sub>2</sub> 下孵育 4 小时后，用台盼蓝染色，随后对剩余存活细胞进行计数(Current Protocols in Immunology, 1997)，确定细胞存活率。

用针对与系列稀释的细菌蛋白质蛋白 G 预先孵育，制备的 MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 的 IgG 形式的多价形式的 KARPAS-422 细胞重复上述实验。蛋白 G 具有 IgG 抗体的高亲和力和两个结合位点，有效将其交联得到高结合价 4。在单独使用 IgG，而没有与蛋白质 G 的预孵育的对照中，约杀死了 55%的细胞，而用与蛋白质 G 预孵育的 IgG 的细胞杀伤在 IgG 抗体/蛋白质 G 摩尔比为约 6(基于蛋白质 G 分子量 28.5kD)时达到最大的 75%左右。更高或更低的 IgG 抗体/蛋白质 G 摩尔比达到纯 IgG 抗体的细胞杀伤效力。

#### 9. 抗-HLA-DR 抗体片段的杀伤效力。

类似实施例 8 进行抗 HLA-DR 交联抗体片段针对其它表达 HLA-DR 分子的肿瘤细胞系的杀伤效力的实验。在 4 小时孵育后, 肿瘤细胞显示细胞杀伤比 MS-GPC-8 的交联 Fab 形式大 50% 的细胞杀伤, 这些肿瘤细胞包括 MHH-CALL4、MN60、BJAB、BONNA-12, 其分别代表疾病: B 细胞急性淋巴组织性白血病、Burkitt 淋巴瘤和毛发细胞淋巴瘤。当用交联抗-FLAG M2 mAb 作为二价抗体用抗 HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-1、6 和 10 的交联 Fab 形式还显示了对于上述肿瘤细胞系类似的细胞毒性。

用实施例 8 中的方法确定针对 Priess 细胞的各交联二价抗 HLA-DR 抗体片段的最大杀伤能力。测定 MS-GPC-1、MS-GPC-6、MS-GPC-8 和 MS-GPC-10 的最大杀伤能力分别是 83%、88%、84% 和 88%。根据实施例 4 产生的抗体片段当用上述抗 FLAG M2 的 Ab 交联时, 也显示针对 GRANTA 和 Priess 细胞的杀伤作用改善(表 4)。

#### 10. 人组合物抗 HLA-DR IgG 抗体的杀伤效力

与对应的小鼠抗体(Vidovic 等, 1995b; Nagy 和 Vidovic, 1996; Vidovic 和 Toral, 1998)比较, 我们惊奇的观察到本发明的某些抗-HLA-DR 抗体片段的 IgG 形式的杀伤效力显著改善(表 5)。根据实施例 8 和 9 所述的方法, 但用 50nM, 重复测定本发明某些抗体片段的 IgG 形式(3-5 次重复实验, 其中细胞数每次实验计数两次)。当最终浓度仅用 50nM 时, MS-GPC-8、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 的抗体片段的 IgG, 对 24 个人肿瘤细胞系中的 16、22、19 和 20 个细胞系分别杀伤 50% 以上的细胞。这些细胞系以高于实施例 11 所测定的 10 个荧光单位的水平表达 HLA-DR 抗原。用两种小鼠抗-HLA-DR 抗体 L243(Vidovic 等, 1995b)和 8D1(Vidovic 和 Toral; 1988)以显著高的 mAb 最终浓度(200nM)处理细胞, 分别在 24 个表达 HLA-DR 的细胞系中仅 13 和 12 两个中的细胞存活率降低到 50% 存活细胞以下。单独挑出细胞系 MHH-PREB-1, 不算作 24 个细胞系组内, 尽管它以高于 10 个荧光单位的水平表达 HLA-DR 抗原, 但是任何上述抗体都不能诱导其细胞存活率的显著下降。在实施例 12 中进一步解释了该现象。

事实上, 即使在显著提高的浓度下, 200nM 处理的两种小鼠抗体与本发明的抗-HLA-DR 抗体片段的 IgG 形式比较, 显示显著有效的杀伤。不仅本发明人抗-HLA-DR 抗体片段的 IgG 形式与小鼠抗体比较, 显示细胞杀伤的整体提高, 而且它们显示在不同的细胞系之间杀伤效率少有变动。该实施例中杀伤人抗体的变动系数是 32%(指%杀伤=68+/-22%(SD)), 与小鼠抗体的 62%(指%杀伤=49+/-31%(SD))相比。通过将平均杀伤百分数对 log(平均 HLA DR 表达)拟合成对数回归模型, 统计学控制 HLA 表达对杀伤效力的影响, 支持该观察结果(图 4)。不仅小鼠抗体的拟

合曲线比人通常低,而且与人抗体数据(16%)的残数相比,在小鼠抗体数据(SD=28%)的残数中有更大的变动。

#### 11. 针对人抗原的抗原结合域对活化和非活化细胞的杀伤选择性

用人外周 B 细胞证明,人抗-HLA-DR mAb-介导的细胞杀伤依赖于细胞活化。从 HLA-DR 型健康捐献者取出 50 毫升肝素化的静脉血,用 Ficoll-Hypaque 梯度离心(Histopaque-1077;Sigma)如 Current Protocols in Immunology(John Wiley & Sons, Inc., 1999)中所述分离新鲜外周血单核细胞(PBMC)。用 B-细胞分离试剂盒和 MACS LS<sup>+</sup>/VS<sup>+</sup>柱(Miltenyi Biotec, Germany)根据厂商说明书从约  $5 \times 10^7$  PBMC 中获得纯化的 B 细胞(约 5%外周血白细胞)。用 FACS 分析等份的分离的 B 细胞(HLA-DR 阳性和 CD19 阳性)证实了非 B 细胞的成功除去。用市售的抗体(DB Immunocytometry Systems, San jose, CA, USA)用在 Current Protocols in Immunology(John Wiley & Sons, Inc., 1999)中所举例的标准方法进行双重染色和分析。用在补充了 10%FCS(Biowhittaker Europe, BE)、2mM L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸类、1mM 丙酮酸钠和 0.1mg/ml 卡那霉素的 RPMI 1640(PAA, Germany)中进行 1:25 稀释的商陆分裂原(PWM)(Gibco BRL, 目录号 15360-019)中,测试等份的分离的 B 细胞在 6% CO<sub>2</sub> 下孵育 3 天,细胞通过刺激活化的能力。通过 FACS 分析细胞表面上的 HLA-DR 表达证实了成功活化(Current Protocols in Immunology(John Wiley & Sons, Inc., 1999))。

通过在上述培养液,除了补充 2.5%热灭活的 FCS,以替代 10%或单独用培养液,分别孵育如上所述的活化的  $1 \times 10^6$ /毫升 B 细胞,与非活化细胞作比较,证实了 50nM 的 MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-41 的 IgG 形式或小鼠 IgG 10F12,对活化的细胞和非活化细胞的杀伤作用的选择性(Vidovic 等, 1995b)。在 6%CO<sub>2</sub> 下, 37°C 孵育 1 或 4 小时后,用二乙酸荧光素(FDA)染色活细胞和用碘化丙锭(PI)染色死细胞,随后用荧光显微镜(Leica, Germany)用标准程序(Current Protocols in Immunology, 1997)计数绿色(FDA)和红色(PI)的荧光细胞,以确定细胞存活率。

据证实 B 细胞活化过程是细胞杀伤作用必需的。在非活化细胞中,与抗 HLA-DR 抗体孵育 1 小时后,对于 MS-GPC-8-10-57(IgG)、MS-GPC-8-27-41(IgG)、10F12 和单独用培养液,培养液中的活细胞数分别为预孵育细胞密度的 81%、117%、126% 和 96%。相反,在 MS-GPC-8-10-57(IgG)、MS-GPC-8-27-41(IgG)、10F12 和单用培养液的培养基中活的活化 B 细胞数在孵育 1 小时后分别为预孵育细胞密度的 23%、42%、83%和 66%。在孵育 4 小时后,在 MS-GPC-8-10-57(IgG)、MS-GPC-8-

27-41(IgG)、10F12 和单用培养液时,发现在非活化细胞中有预孵育细胞密度的 78%、83%、95%和 97%是活的,而在活化细胞中对于 MS-GPC-8-10-57(IgG)、MS-GPC-8-27-41(IgG)、10F12 和单独用培养液,细胞密度则分别下降到了 23%、24%、53%和 67%。

#### 12. 抗-HLA 抗体片段针对细胞系 MHH PreB1 的杀伤活性

如表 5 证明的,我们观察到我们的交联抗-HLA-DR 抗体片段或 igG 不轻易在显著水平杀伤表达 HLA-DR 的特定肿瘤细胞系。我们猜想虽然已建立成稳定的细胞系,但该培养物中的细胞未充分活化。因此,我进行了实验,如下用提高的 HLA-DR 分子作为活化标记在细胞表面表达来刺激 MHH preB1 细胞系的活性。

非附着生长的 MHH preB1 细胞在含有下列添加剂的 RPMI 培养液中培养(全部来自 Gibco BRL 和 Bio Whittaker): 10%FCS、2mM L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸类、1mM 丙酮酸钠和  $1\times$  卡那霉素。以若干等份通过与脂多糖(LPS, 10 微克/ml)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ , Roche, 40ng/ml)和植物凝血素(PHA, 5 微克/ml)孵育 1 天活化,来提高 HLA-DR 分子的表达。通过流式细胞计数,用 FITC 偶联的 mAb L243(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)监测 HLA-DR 分子在细胞表面的表达。在 LPS、IFN- $\gamma$ 和 PHA 的存在下孵育 MHH preB1 1 天,导致 HLA-DR 的表面密度 2 倍增加(平均荧光漂移从 190-390)。在上述培养基(但含有降低的 FCS 浓度(2.5%))中进行细胞杀伤 4 小时。使用 MS-GPC-8-27-41 和 MS-GPC-8-10-57 的 IgG 形式的浓度系列,各等份的非活化和活化的细胞上含有最终抗体浓度为 3300、550、92、15、2.5、0.42 和 0.07nm。用显微镜以台盼蓝活细胞排除法鉴定。虽然未活化的细胞存活率在达到最大抗体浓度下也保持不受抗体影响,但在活化的 MHH preB1 细胞中,细胞存活率随着抗体浓度显著下降(图 5)。

#### 13. 人组合物的抗-HLA-DR 对体外慢性淋巴组织白血病细胞的杀伤效率

用从 10 个患有慢性淋巴组织白血病(CLL)的病人分离和纯化的 B 细胞,我们用体外试验证明了本发明的抗-HLA-DR 抗体片段的 IgG 形式显示临床相关细胞的杀伤效率。从 10 个无关的患 CLL 的病人中根据标准方法(Scandinavian J. of Immunology, 1968, 将于周 1 获得)分离和纯化 B-细胞(样品由 Prof Hallek, Ludwig Maximilian University, Munich 慷慨提供)。用 100nM 抗 HLA-DR 的各种抗体片段 MS-GPC-8、MS-GPC-8-10-57 或 MS-GPC-8-27-41 的 IgG 形式处理  $2\times 10^5$  个细胞,类似实施例 8 和 9 孵育 4 或 24 小时。建立了复制的细胞培养物,通过在用抗体处理 3 天前与在其表面表达 CD40 配体的 HeLa 细胞一起孵育活化(Buhmann 等, 1999)。

作为对照, 使用小鼠 IgG 10F12 (Vidovic 等, 1995b) 或不用抗体。如实施例 12 中所述测定各实验的细胞存活率。

惊人的是, 本发明抗-HLA-DR 抗体片段的 IgG 形式显示了高度有效和一致的杀伤作用-甚至包含了各组完全不同的病人材料。在处理仅 4 小时后, 所有三种人 IgG 使得细胞存活率与对照相比显著下降, 在 24 小时后仅有 33% 细胞仍然活着 (图 6)。我们发现, 在根据 Buhmann 等 (1999) 的方法进一步刺激体细胞时, 其杀伤作用速率可加快, 仅在与抗体培养 4 小时后, 本发明的所有人样品和抗体片段中, 仅剩余 24% 细胞存活。

#### 14. 测定抗-HLA-DR 的各种抗体片段的 EC50

我们证明细胞杀伤试验中选自 HuCAL 库的一些抗-HLA-DR 抗体片段形式, 与细胞毒性小鼠抗-HLA-DR 抗体相比, 在 50% 有效的 (EC50) 有很高的有效浓度 (表 6)。

用 HLA-DR 阳性细胞系 PRIESS 或 LG2 (ECACC, Salisbury, UK) 估计选自 HuCAL 的抗-HLA-DR 抗体片段的 EC50。将  $2 \times 10^5$  个细胞在 6% CO<sub>2</sub>, 37°C 下, 在补充了 2.5% 热灭活 FBS (Biowhittaker Europe, BE)、2mM L-谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸、1mM 丙酮酸钠和 0.1mg/ml 卡那霉素和系列稀释的二价抗-HLA-DR 抗体片段的 RPMI 1640 (PAA, Germany) 中孵育 4 小时。对于 Fab 抗体片段的稀释系列, 与相应浓度的 Fab 片段和抗 FLAG M2 抗体一起预先混合, 来产生抗-HLA-DR 抗体片段的二价组合物。所述的浓度指二价组合物的浓度, 因此可比较 IgG 和 Fab EC50 值。

在与二价抗体片段 37°C 在 6% CO<sub>2</sub> 下保温 4 小时后, 用二乙酸荧光素染色, 随后计算剩余活细胞数测定细胞存活率 (Current Protocols in Immunology, 1997)。用标准统计学软件 (R; <http://cran.r-object.org>)、非线性对数回归曲线拟合重复数据点, 对于各抗体估计 EC50。

当用抗-FLAG-M2 抗体交联时, 选自 HuCAL 文库 (实施例 4) 的 Fab 片段 MS-GPC-1、MS-GPC-8 和 MS-GPC-10 显示小于 120nM 的 EC50, 如用单价片段的浓度表达的, 对应于二价交联的 (Fab) 二聚-抗-Flag M2 偶联物的 60nM EC50 (图 7a)。当用抗-FLAG M2 抗体的交联时, 优化了 CDR3 区域内的亲和力 (实施例 4) 的抗-HLA-DR 抗体片段显示进一步改进的 EC50 小于 50nM, 或对于二价交联片段则为 25nM (图 7b), 在 CDR1 区中亲和力额外优化的那些抗体片段显示 EC50 小于 30nM (对于二价片段是 15nM)。比较而言, 同一试验内细胞毒性小鼠抗-HLA-DR 抗体 8D1 (Vidovic & Toral; 1988) 和 L243 (Vidovic 等, 1995b) 的 EC50 显示分别大于 30 和 40nM (图 7c)。

令人惊奇的是, 本发明的一些抗体片段的 IgG 形式显示与小鼠抗体相比, EC50

约增加了 1.5 个数量级(图 7d)。例如, MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 的 IgG 形式显示分别为 1.2 和 1.2nM 的 EC50。另外, 尽管未在亲和力方面优化, MS-GPC-8 的 IgG 形式显示小于 10nM 的 EC50。

如实施例 11 和 12 所示, 杀死未活化细胞(分别是正常外周 B 和 MHH PreB 细胞)的效力很小。在用 50nM MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 的 IgG 形式处理时, 分别在 4 小时后有 78%和 83%正常的外周 B 细胞存活。另外, 在仅 50nM 浓度 IgG 处理时, 几乎 100%的 MHH PreB 细胞存活。事实上, 用这些未活化的细胞, 使用合理的浓度范围(0.1-300nM)的本发明的抗-HLA DR 抗体片段的 IgG 或二价交联的 Fab 形式, 不能实现存活率水平下降到 50%以下。因此, 这些未活化细胞类型的 EC50 可以估计成至少比未优化的 Fab 形式所示的 EC50 高 5 倍(对于交联的二价片段 EC50 约 60nM), 比 VHCDR3 优化的 Fab 和 MS-GPC-8-10-57(约 1.2nM)与 MS-GPC-8-27-41(约 1.2nM)的 IgG 形式的 EC50 分别高至少 10 倍和 100 倍(对于交联的二价片段约 25nM)。

#### · 15. 细胞杀伤机制

上述实施例显示细胞死亡发生-仅需要一些多价抗-HLA-DR 抗体片段导致杀死活化的细胞。不需要进一步的细胞毒性或免疫学机制来导致细胞死亡, 因此证明细胞死亡是通过活化细胞的天然的程序化机制介导的。坏死的机制是预先程序化死亡的受到广泛理解的过程。令我们惊奇的是我们观察到一些细胞杀伤的特征提示, 当与我们的人抗-HLA-DR 抗体片段接触时, 活化细胞杀伤的机制不是本领域通常理解的“凋亡”。例如, 观察到的细胞杀伤的速率似乎比凋亡报道的明显高得多(参考文献; 我仍需要在星期一从 Zoltan 处得到)。进行了两项实验, 来证明细胞杀伤机制不是凋亡机制。

首先, 我们用膜联蛋白-V-FITC 和碘化丙锭(PI)染色技术来辨别凋亡和非凋亡细胞死亡-经历凋亡的细胞“凋亡细胞”(膜联蛋白-V 阳性/PI 阴性)可以与坏死的(“死亡的”)细胞(膜联蛋白-V 阳性/PI 阳性)和完全功能性的细胞(膜联蛋白-V 阴性/PI 阴性)区分开。用膜联蛋白 V 和 PI 试验的厂商推荐的方法, 在 6% CO<sub>2</sub>, 37 °C 下, 用或不用 200nM 抗-HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-8, 以及 100nM 交联抗-FLAG M2 mAb 在补充了 2.5%热灭活的 FCS(Biowhittaker Europe, BE)、2mM L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、1mM 丙酮酸钠和 0.1mg/ml 卡那霉素的 RPMI 1640(PAA, DE)中培养 1×10<sup>6</sup>/ml Priess 细胞。为了提供作为对照的凋亡细胞培养物, 通过在上述培养液中在 6% CO<sub>2</sub> 下, 37°C, 用 50 微克/ml 的与 10 微克/ml 蛋白质-G 交联的凋亡

诱导性抗-CD95 mAb DX2 (BD Pharmingen, Torrey Pine, Ca, USA) 诱导  $1 \times 10^6$ /ml Priess 细胞进入凋亡。在各孵育时间(1, 15 和 60 分钟, 3 和 5 小时), 收集 200 微升样品, 洗涤 2 次并用膜联蛋白-V-FITC (BD Pharmingen, Torrey Pine, Ca, USA) 和 PI, 用膜联蛋白-V 结合缓冲液根据厂商的方法染色。用 FACS Calibur (BD Immunocytometry Systems, San Jose, Ca, USA) 分析膜联蛋白-V-FITC 和 PI 对于每组细胞染色的量。

通过交联的抗-HLA-DR 抗体片段诱导的细胞死亡显示, 与抗-CD95 凋亡诱导性抗体或单独与抗-FLAG M2 mAb 孵育的细胞培养物显著不同的细胞死亡模式。抗-HLA-DR 抗体片段/抗-FLAG M2 mAb 处理过的细胞的死亡细胞(用膜联蛋白-V 阳性/PI 阳性染色测定的)的百分数, 比抗-CD95 或对照细胞增加迅速得多(图 8a)。相反, 凋亡细胞(用膜联蛋白-V 阳性/PI 阴性染色测定的)百分数对于抗-CD95 处理的细胞比交联抗-HLA-DR 的各种抗体片段或对照细胞增加快速得多(图 8b)。

其次, 我们用 zDEVD-fmk, 一种不可逆天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 抑制剂和 zVAD-fmk, 一种广谱天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂(都来自 BioRad, Munich, DE)抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶活性。凋亡的机制的特征是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶的活性, 我们假设如果天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶不是抗-HLA-DR 介导的细胞死亡必需的, 我们在这些天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂存在下应该观察不到(与不存在比较,)经历细胞死亡的细胞存活率的改变。将  $2 \times 10^5$  Priess 细胞在  $37^\circ\text{C}$ , 6%  $\text{CO}_2$  下与系列稀释的两种天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂(范围是  $180\mu\text{M}$ - $10\mu\text{M}$ ) 在补充有 2.5% 热灭活 FBS (Biowhittaker Europe, BE)、2mM L-谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸、1mM 丙酮酸钠和 0.1mg/ml 卡那霉素的 RPMI 1640 (PAA, DE) 中预培养 3 小时。通过加入 200nM 人抗-HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-8 和 100nm 交联的抗-M2 mAb 诱导 HLA-DR 介导的细胞死亡。抗-CD95 诱导的凋亡细胞培养物作为抑制剂活性的对照 (Drenou 等, 1999)。在进一步在  $37^\circ\text{C}$ , 6% $\text{CO}_2$  下孵育后, 4 和 24 小时后用台盼蓝染色随后对未染色细胞进行计数, 测定细胞存活率。如我们所料, 抗-HLA-DR 处理的细胞培养物不受天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂存在的显著影响, 而通过抗 CD-95 处理诱导的细胞死亡由于细胞培养物与天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂预培养显著下降。该观察结果支持我们的假设, 即 HLA-DR 介导的细胞死亡通过不依赖于可被 zDEVD-fmk 或 zVAD-fmk 抑制的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶蛋白酶的非凋亡机制作用。

## 16. 用 HLA-DR 特异性抗体体内治疗癌症

我们证明人组合物的抗原结合域可成功的用作癌症治疗的治疗剂。用感兴趣的 DR+人淋巴瘤或白血病细胞系接种免疫妥协的小鼠，例如 scid、裸鼠或 Rag-1 敲除的小鼠。对于测试和皮下(s. c.)或静脉内(i. v.)给药，各肿瘤建立肿瘤细胞剂量通常是  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$ /小鼠。用本发明的抗-HLA-DR 抗体片段 MS-GPC-8、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-41 的 IgG 形式或其它材料如上制备，用 1-25mg/kg 的剂量经 5 天静脉内或皮下注射处理小鼠。在持续处理后监测抗-HLA-DR 处理或对照的未处理的小鼠存活达 8 周。另外通过测量肿瘤表面积对皮下接种的小鼠的肿瘤进程进行定量测定。在实验中观察到抗-HLA-DR 处理的小鼠的存活率达 80%，显著延长，在实验终点有达 50%的小鼠存活。在皮下接种和未处理的小鼠中，肿瘤达到表面积 2-3 平方厘米，而抗-HLA-DR 处理的动物肿瘤表面积明显缩小。

## 17. 用 IL-2 分泌的减少来测量利用抗-HLA-DR 抗体片段免疫抑制

本发明的抗-HLA-DR 抗体片段在测量不死化的 T-细胞 IL-2 分泌的试验中显示充分的免疫调节性质。该抗体片段 MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 的 IgG 形式在该试验中显示非常强的免疫抑制性质，和亚纳摩尔的 IC<sub>50</sub> 值，和事实上 100%最大抑制(图 9a)。令人惊奇的是，甚至本发明的抗体片段单价组合物能强烈抑制该相同试验中的 IL-2 分泌。例如 VHCDR3 选择的和 VLCDR3/VLCDR1 优化的抗体片段的 Fab 形式显示低一位数的 nM 的 IC<sub>50</sub>，和几乎 100%最大抑制(图 9b)。本发明的其它单价抗-HLA DR 抗体片段在该试验中与对照 IgG 和 Fab 片段相比显示显著的免疫抑制性(表 7)。

通过在半-最大抗原刺激条件下，测定用 DR-转基因抗原递呈细胞(APC)刺激的杂交瘤细胞系 T-Hyb 1 的 IL-2 分泌，调查抗-HLA DR 抗体片段的免疫调节性质。用 Pharmingen(Torre Pine, CA, USA)的 OptiEIA 小鼠 IL-2 试剂盒提供的标准 ELISA 方法检测 IL-2 分泌。从未免疫的嵌合 0401-IE 转基因小鼠的脾脏中根据标准方法分离 APC(Ito 等, 1996)。在 96 孔板的含有下列添加剂(全部来自 Gibco BRL 和 PAA): 10%FCS、2mM L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、1mM 丙酮酸钠和 0.1g/l 卡那霉素的 RPMI 培养基中加入 0.2ml/孔的  $1.5 \times 10^5$  APC。加入最终体积为 100 微升上述培养液中的 200 微克/ml 最终浓度的鸡蛋卵清蛋白，细胞与该抗原在 6% CO<sub>2</sub> 下在 37°C 培育 30 分钟。在各孔中以各种浓度(通常为 0.1-200nM)加入抗-HLA DR 抗体片段，平板在 37°C/6% CO<sub>2</sub> 下孵育 1 小时，加入  $2 \times 10^5$  T-Hyb 1 细胞，在上述培养基中最终体积为 200 微升。在孵育 24 小时后，将 100 微升上清液转移到先前

用 IL-2 捕获抗体 (BD Pharmingen, Torrey Pine, Ca, USA) 包裹的 ELISA 平板 (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp 表面, Nunc, Roskilde, DK) 上, 根据厂商指示, 用 OptiEIA 小鼠 IL-2 试剂盒定量 IL-2, 并用 Victor V 读数仪 (Wallac, Finland) 阅读平板。用试剂盒提供的 IL-2 标准将分泌的 IL-2 标定为 pg/ml。

通过将胸腺瘤 BW 5147 (ATCC) 的 T-细胞受体阴性变体和来自先前用鸡蛋卵清蛋白 (Ito 等, 1996) 接种的嵌合 0401-IL 转基因小鼠的淋巴结细胞融合, 建立 T-细胞杂交瘤系 T-Hyb1。选择克隆 T-Hyb1 进行试验, 因为它应答具有高 IL-2 分泌的抗原特异性刺激。

#### 18. 用 T-细胞增殖测定的利用 HLA-DR 特异性抗体的免疫抑制过程

用测定 T-细胞增殖的第二个试验确定了抗-HLA DR 抗体片段的免疫调节性质。MS-GPC-8-10-57 和 MS-GPC-8-27-41 的 IgG 形式抑制 T 细胞增殖的 IC50 值分别是 11 和 20nM (图 10)。如下测试抗-HLA-DR 抗体片段, 对携带具有 RA-相关肽结合位点, 并缺乏小鼠 II 类分子的嵌合型小鼠-人 II 类转基因 (Muller 等, 1990; Woods 等, 1994; Current Protocols in Immunology, 卷 2, 7.21; Ito 等, 1996) 的小鼠的抗原引发的淋巴结细胞增殖的 T 细胞应答的抑制作用。在此, 免疫在体内发生, 但是抑制和读数在体外进行。先前产生了表达带有 RA 相关分子结合位点的 DRB1\*0401 的 MHC II 类分子的转基因小鼠 (Ito 等, 1996)。这些小鼠缺乏小鼠 MHC II 类, 因此所有 Th 应答都是定向通过一个人 RA-相关的 MHC II 类分子 (Ito 等, 1996)。这些转基因小鼠代表了测试人 II 类拮抗剂的模型。

用嵌合 T-细胞和从用标准方法先前接种了鸡蛋卵清蛋白 (Ito 等, 1996) 嵌合的 0401-IE 转基因小鼠 (Taconic, USA) 的淋巴结分离的嵌合型细胞和抗原递呈细胞测量的 T-细胞增殖, 测试抗-HLA-DR 抗体片段及其 IgG 形式的抑制效果。在卵清蛋白 (30 微克/孔-半最大刺激浓度) 和系列稀释的抗-HLA-DR 抗体片段或 IgG 形式存在下, 在含有 2mM L-谷氨酰胺和 0.1g/l 卡那霉素的无血清 HL-1 培养液中测试 (0.1nM-200nM), 在 96 孔组织培养板的 0.2 毫升孔中培养  $1.5 \times 10^5$  细胞 3 天。在培养的最后 16 个小时, 用  $^3\text{H}$ -甲基-胸腺嘧啶 (1 $\mu\text{Ci}$ /孔) 掺入测定抗原特异性增殖 (Falcioni 等, 1999)。收集细胞, 用闪烁计数器 (TopCount, Wallac, Finland) 测定  $^3\text{H}$  结合量。比较含有抗原的对照孔, 可以观察用抗-HLA-DR 抗体片段及其 IgG 形式处理 T-细胞的增殖。

#### 19. 选择有用的多肽用于治疗癌症

为了选择最合适的蛋白质/肽, 以进行其它一系列实验, 并评估其用于治疗

癌症的治疗组合物的适用性，收集其它数据。这些针对抗-HLA 抗原抗体片段的 IgG 形式的的数据可以包括结合亲和力，用 EC50 测定的体外杀伤效力，和跨越一套肿瘤细胞系的细胞毒性，体外估计的最大细胞杀伤百分数，和来自动物模型的体内肿瘤减少数据和小鼠存活数据。

可选择显示最高亲和力、最低杀伤的 EC50、细胞杀伤最高的最大百分数和跨越各种肿瘤细胞系最广泛，最佳肿瘤减少数据和/或最佳小鼠存活数据的抗 HLA-抗原抗体片段的 IgG 形式进入进一步的实验。这些实验可包括例如动物中的治疗方案和毒物学和对人的 I 期临床试验。

## 20. 选择有用的多肽用于治疗免疫系统疾病

为了选择最合适的蛋白/多肽进而进一步实验，和评估其用于治疗免疫系统疾病的治疗组合物的适合性，收集了其它数据。对于抗-HLA 抗原抗体片段的各种单价抗体片段或 IgG 形式的这些数据如体外用 EC50 和最大百分数细胞杀伤估计的，和移植排斥和移植物抗宿主疾病的 DR-转基因模型可包括亲和力、反应性、特异性、IC50-值，用于抑制 IL-2 分泌和 T-细胞增殖，或体外杀伤效力。

可选择显示最低 EC50，最高亲和力，最高杀伤作用，最佳特异性和/或最大抑制 T-细胞增殖或 IL-2 分泌，和在合适模型中的抑制移植排斥和/或移植物对宿主疾病的高效力的抗 HLA-抗原的抗体片段的 IgG 形式进入进一步的实验。这些实验可包括例如动物中的治疗方案和毒物学和对人的 I 期临床试验。

表 1  
HLA-DR-特异性多肽的VH和VL家族、VL CDR1和VH/VL CDR3序列

克隆	VH	CDR3 长度	VH-CDR3-序列	VL	VL-CDR1-序列	CDR3 长度	VL-CDR3-序列	家族
MS-GPC-1	H2	10	QYGHRRGGFDH	$\lambda$ 1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDFNES	H2 $\lambda$ 1
MS-GPC2	H6	19	SHNKKWRFYNLY SLYDFDF	$\kappa$ 3	RASQSVSSSYLA	8	QQESGFY	H6 $\kappa$ 3
MS-GPC3	H1B	7	LSTRMDP	$\kappa$ 3	RASQSVSSSYLA	8	QQDDNFPI	H1B $\kappa$ 3
MS-GPC4	H2	16	YVYVSVGYGVTHY DDV	$\kappa$ 3	RASQSVSSSYLA	8	QQDYSYPS	H2 $\kappa$ 3
MS-GPC5	H1A	6	HSFFDY	$\lambda$ 3		9	QSYDNVDIS	H1A $\lambda$ 3
MS-GPC-6	H3	9	GYGRYSPDL	K3	RASQSVSSSYLA	8	QQYSNLPF	H3 K 3
MS-GPC7	H2	13	SQNGFYGGNLDI	$\lambda$ 1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSRDPSNV	H2 $\lambda$ 1
MS-GPC-8	H2	10	SPRYRGAFDY	$\lambda$ 1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDMPQA	H2 $\lambda$ 1
MS-GPC-10	H2	10	QLHYRGGFDL	$\lambda$ 1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDLTMG	H2 $\lambda$ 1
MS-GPC11	H2	10	SQGYRGGGLDV	$\lambda$ 1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDYGIY	H2 $\lambda$ 1

MS-GPC14	H3	12	SSMPMYGEGFDL	λ3		10	QSYDFGVSHS	H3λ3
MS-GPC15	H3	10	FYSHVLA MDN	λ3		10	QSRDIHIHNE	H3λ3
MS-GPC16	H6	8	TQLYYFDY	κ2		8	QQYNSYPR	H6κ2
MS-GPC-8-1	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSNIGSNYVS	8	QSYDFSHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSNIGSNYVS	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-9	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSNIGSNYVS	8	QSYDIQLH	H2 λ 1
MS-GPC-8-10	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSNIGSNYVS	8	QSYDLIRH	H2 λ 1
MS-GPC-8-17	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSNIGSNYVS	8	QSYDFSVY	H2 λ 1
MS-GPC-8-18	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSNIGSNYVS	8	QSYDFSİY	H2 λ 1
MS-GPC-8-27	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSNIGSNYVS	8	QSYDMNVH	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-2	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIGSNYVH	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-19	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIGSNYVA	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-27	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSDSNIGANYVT	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-45	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSEP NIGSNYVF	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-13	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIGANYVT	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-47	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIGSNYVS	8	QSYDYDHY	H2 λ 1

MS-GPC-8-10-57	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNNYVQ	8	QSYDLIRH	H2 λ 1
MS-GPC-8-27-7	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNNYVG	8	QSYDMNVH	H2 λ 1
MS-GPC-8-27-10	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNANYVN	8	QSYDMNVH	H2 λ 1
MS-GPC-8-27-41	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNNYVQ	8	QSYDMNVH	H2 λ 1

表 2

抗体优化步骤	Fab	$k_{on} [s^{-1}M^{-1}] \times 10^5$ +/- SD	$k_{off} [s^{-1}] \times 10^{-3}$ +/- SD	$K_D [nM]$ +/- SD	L-CDR3	L-CDR1
亲本 Fab	MS-GPC-8	$0.99 \pm 0.40$	$29.0 \pm 8.40$	$346.1 \pm 140.5^{a)}$	QSYDMPQA	SGSSSNIGSNYYVS
L-CDR3-优化	-8-1	1.93	20.9	$108^e)$		
L-CDR3-优化	-8-6	$0.96 \pm 0.14$	$5.48 \pm 0.73$	$58.6 \pm 11.7^b)$		
L-CDR3-优化	-8-9	1.85	16.6	$90.1^e)$		
L-CDR3-优化	-8-10	nd	$7.0^e)$	nd		
L-CDR3-优化	-8-17	1.0	5.48	$54.7^e)$		
L-CDR3-优化	-8-18	1.06	8.3	$78.3^e)$		
L-CDR3-优化	-8-27	nd	$6.6^e)$	nd		
L-CDR3-优化	-8-6	$0.96 \pm 0.14$	$5.48 \pm 0.73$	$58.6 \pm 11.7^b)$	QSYDYDHY	SGSSSNIGSNYYVS
L-CDR3+1-优化	-8-6-2	$1.23 \pm 0.11$	$0.94 \pm 0.07$	$7.61 \pm 0.25^c)$	QSYDYDHY	SGSESNIGSNYYVH
L-CDR3+1-优化	-8-6-19	$1.10 \pm 0.08$	$0.96 \pm 0.15$	$8.74 \pm 1.33^c)$	QSYDYDHY	SGSESNIGSNYYVA
L-CDR3+1-优化	-8-6-27	$1.80 \pm 0.24$	$1.10 \pm 0.15$	$6.30 \pm 0.63^d)$	QSYDYDHY	SGSDSNIGANYYVT
L-CDR3+1-优化	-8-6-45	$1.20 \pm 0.07$	$1.03 \pm 0.04$	$8.63 \pm 0.61^c)$	QSYDYDHY	SGSEPNIIGSNYYVF
L-CDR3+1-优化	-8-6-13	$1.90 \pm 0.26$	$0.55 \pm 0.05$	$2.96 \pm 0.46^c)$	QSYDYDHY	SGSESNIGANYYVT
L-CDR3+1-优化	-8-6-47	$1.97 \pm 0.29$	$0.62 \pm 0.04$	$3.18 \pm 0.33^c)$	QSYDYDHY	SGSESNIGSNYYVS
L-CDR3+1-优化	-8-10-57	$1.65 \pm 0.21$	$0.44 \pm 0.06$	$2.67 \pm 0.25^c)$	QSYDLIRH	SGSESNIGNNYYVQ
L-CDR3+1-优化	-8-27-7	$1.74 \pm 0.21$	$0.57 \pm 0.07$	$3.30 \pm 0.34^d)$	QSYDMNVH	SGSESNIGNNYYVG
L-CDR3+1-优化	-8-27-10	$1.76 \pm 0.21$	$0.53 \pm 0.05$	$3.01 \pm 0.21^c)$	QSYDMNVH	SGSESNIGANYYVN
L-CDR3+1-优化	-8-27-41	$1.67 \pm 0.16$	$0.49 \pm 0.03$	$2.93 \pm 0.27^d)$	QSYDMNVH	SGSESNIGNNYYVQ

a) MS-GPC-8 的亲和力数据是基于 8 种不同的 Fab 制备物，在 4 种不同的芯片上测定的 (2×500, 1000, 4000RU)

b) 显示了对于 MS-GPC-8-6, 3 种不同芯片上 3 种不同制备物的平均值和标准偏差 (500, 4000, 3000RU)。

c) 将 3000RU MHCII 固定在 CM5 芯片上。在表面注射 1μM-16nM 的 7 种不同浓度。分离时间: 15 秒、用 6 微升 10mM 的甘氨酸, pH2.3, 然后用 8 微升 7.5mM NaOH 实现再生。显示 4 种制备物对于 MS-GPC-8-6-19 平均和标准偏差, 而对于其它显示 3 种不同的制备物的均值和标准偏差。

d) 在 3 种不同芯片上测定了一种蛋白制备物 (3000, 2800 和 6500RU)。

e) 成熟的 MHCII 结合物在 4000RU 密度的芯片上的亲和力测定; 一次测定。分子量在尺寸排阻层析后测定, 发现 100% 单体具有 45-48kDa 之间的正常分子量。

表 3a

从 Fab' 选择的 IgG4 单克隆抗体的亲和力。误差代表标准偏差。

结合物(IgG <sub>4</sub> )	k <sub>on</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] ×10 <sup>5</sup>	k <sub>off</sub> [s <sup>-1</sup> ] ×10 <sup>-5</sup>	K <sub>D</sub> [nM]
MS-GPC-8-27-41	1.1 ± 0.2	3,1 ± 0.4	0,31 ± 0.06
MS-GPC-8-6-13	0,7 ± 0.1	3 ± 1	0,5 ± 0.2
MS-GPC-8-10-57	0,7 ± 0.2	4 ± 1	0,6 ± 0.2

表 3b

CDR3 重链优化后通过 CDR1 轻链优化的亲和力成熟获得的结合物亲和力。误差代表标准偏差。

结合物(F <sub>ab</sub> )	k <sub>on</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] ×10 <sup>5</sup>	k <sub>off</sub> [s <sup>-1</sup> ] ×10 <sup>-3</sup>	K <sub>D</sub> [nM]
MS-GPC-8-6-2	1.2 ± 0.1	0.94 ± 0.07	7.6 ± 0.3
MS-GPC-8-6-19	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.2	9 ± 1
MS-GPC-8-6-27	1.8 ± 0.2	1.1 ± 0.2	6.3 ± 0.6
MS-GPC-8-6-45	1.20 ± 0.07	1.03 ± 0.04	8.6 ± 0.6
MS-GPC-8-6-13	1.9 ± 0.3	0.55 ± 0.05	3.0 ± 0.5
MS-GPC-8-6-47	2.0 ± 0.3	0.62 ± 0.04	3.2 ± 0.3
MS-GPC-8-10-57	1.7 ± 0.2	0.44 ± 0.06	2.7 ± 0.3
MS-GPC-8-27-7	1.7 ± 0.2	0.57 ± 0.07	3.3 ± 0.3
MS-GPC-8-27-10	1.8 ± 0.2	0.53 ± 0.05	3.0 ± 0.2
MS-GPC-8-27-41	1.7 ± 0.2	0.49 ± 0.03	2.9 ± 0.3

表 3c

GPC8 随 CDR3 轻链优化的亲和力成熟获得的结合物

结合物 (F <sub>ab</sub> )	k <sub>on</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] ×10 <sup>5</sup>	k <sub>off</sub> [s <sup>-1</sup> ] ×10 <sup>-3</sup>	K <sub>D</sub> [nM]
MS-GPC 8-18	1.06	8.3	78.3
MS-GPC 8-9	1.85	16.6	90.1
MS-GPC 8-1	1.93	20.9	108
MS-GPC 8-17	1.0	5.48	54.7
MS-GPC-8-6 <sup>a)</sup>	1.2 +/- 0.1	5.5 +/- 0.7	8 +/- 12

芯片密度 4000RU MHCII

a) 对于 MS-GPC-8, 显示了 3 种不同芯片 (500, 4000, 3000RU) 上 3 种不同制备物的均值和标准偏差。

表 3d

在 scFv 形式及其转化的 Fab 中 HuCAL 获得的结合物。

结合物	scF <sub>v</sub>			F <sub>ab</sub>		
	k <sub>on</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] ×10 <sup>5</sup>	k <sub>off</sub> [s <sup>-1</sup> ] ×10 <sup>-3</sup>	K <sub>D</sub> [nM]	k <sub>on</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] ×10 <sup>5</sup>	k <sub>off</sub> [s <sup>-1</sup> ] ×10 <sup>-3</sup>	K <sub>D</sub> [nM]
MS-GPC 1	0.413	61	1500	0.639	53	820
MS-GPC 3	0.445	530	11800			
MS-GPC 4	0.55	550	10000			
MS-GPC 6	0.435	200	4600	0.135	114	8470 (1曲线)
MS-GPC 7	0.312	254	8140	0.783	190	2410
MS-GPC 8	0.114	76	560	0.99 +/- 0.40	29.0 +/- 8.4	346 <sup>a)</sup> +/- 141
MS-GPC 10	0.187	180	9625	0.22	63	2860
MS-GPC 11	0.384	100	2500	0.361	65	1800

芯片密度 500RU MHCII

a) MS-GPC-8 的亲和力数据基于 8 种不同 Fab 制备物, 它们在 4 种不同芯片 (2 × 500, 4000, 3000RU) 上测定, 与标准偏差一起显示。

表 4

细胞与交联抗-HLA-DR 抗体片段孵育 4 小时后的杀伤效力，以及孵育 24 小时后的最大杀伤。

交联 Fab 片段	针对 GRANTA 的 杀伤效率	针对 Priess 的 最大杀伤效率
MS-GPC-1	+	+
MS-GPC-6	+	+
MS-GPC-8	+	+
MS-GPC-10	+	+
MS-GPC-8-6	++	++
MS-GPC-8-17	++	++
MS-GPC-8-6-13	+++	+++
MS-GPC-8-10-57	+++	+++
MS-GPC-8-27-41	+++	+++

表 5

人组合物的抗-HLA-DR 的 IgG 抗体与小鼠抗-HLA-DR 抗体针对一组淋巴瘤细胞系的杀伤效率的比较

细胞系		HLA-DR 表达平均-FL		mAb 杀伤 %		人 mAbs				
名称	DR 型	类型	L243	小鼠 mAbs L243	8D1	MS-GPC-8	8-27-41	8-10-57	8-6-13	
LG-2	1.1	B-淋巴瘤母细胞	458	79	85	86	87	88	82	
Priess	4.4	B-淋巴瘤母细胞	621	87	83	85	88	93	74	
ARH-77	12	B-淋巴瘤母细胞	301	88	73	84	85	88	87	
GRANTA-519	2.11	B 细胞-非霍奇金氏	1465	83	56	76	78	78	73	
KARPAS-422	2.4	B 细胞-非霍奇金氏	186	25	32	51	66	68	71	
KARPAS-299	1.2	T 细胞-非霍奇金氏	919	78	25	81	82	79	76	
DOHH-2	1.2	B 细胞淋巴瘤	444	29	23	58	59	60	53	
SR-786	1.2	T 细胞淋巴瘤	142	3	8	1	53	44	26	
MHH-CALL-4	1.2	B-ALL	348	35	41	43	63	46	43	
MN-60	10.13	B-ALL	1120	46	22	71	69	66	67	
BJAB	12.13	Burkitt 淋巴瘤	338	53	59	49	71	67	64	
RAJI	10, 17	Burkitt 淋巴瘤	617	69	64	81	84	86	83	
L-428	12	霍奇金氏淋巴瘤	244	82	81	82	91	91	92	
HDLM-2		霍奇金氏淋巴瘤	326	77	73	89	88	84	90	

HD-MY-Z	霍奇金氏淋巴瘤	79	35	39	49	69	57	72
KM-H2	霍奇金氏淋巴瘤	619	81	56	75	86	88	87
L1236	霍奇金氏淋巴瘤	41	52	62	44	63	66	66
BONNA-12	毛细淋巴白血病	2431	92	91	91	92	91	86
HC-1	毛细淋巴白血病	372	88	89	89	93	86	93
NALM-1	CML	1078	44	4	83	82	78	65
L-363	浆细胞性白血病	49	6	5	26	26	24	19
EOL-1	嗜伊红细胞	536	22	13	36	69	49	53
LP-1	多发性骨髓瘤	315	12	0	61	73	70	73
RPMI-8226	多发性骨髓瘤	19	6	0	14	29	26	19
MHH-PREB-1	B细胞-非霍奇金氏	175	3	3	2	4	8	11
MHH-CALL-2	B细胞前体白血病	+	5	5				
OPM-2	多发性骨髓瘤	3	13	0	8	1	4	5
KASUMI-1	AML	5	0	0	8	10	10	6
HL-60	AML	3	18	0	3	15	9	22
LAMA-84	CML	7	7	9	5	11	5	7

%杀伤: 用200nM小鼠或50nM人mAb37°C处理4小时后的100-%存活细胞。

表 6

本发明的一些抗-HLA-DR 抗体片段在针对淋巴瘤细胞的细胞杀伤试验中的 EC50 值。所有 EC50 指二价因子 (IgG 或交联的 Fab) 的纳摩尔浓度交联的 Fab 和 IgG 形式的值是可比较。

抗体片段	形式	测试的细胞系	二价因子的细胞杀伤的 EC50 (nM) +/- SE
MS-GPC-1	Fab	PRIESS	54 ± 14
MS-GPC-8	Fab	PRIESS	31 ± 9
MS-GPC-10	Fab	PRIESS	33 ± 5
MS-GPC-8-17	Fab	PRIESS	16 ± 4
MS-GPC-8-6-2	Fab	PRIESS	8 ± 2
MS-GPC-8-10-57	Fab	LG2	7.2
MS-GPC-8-27-41	Fab	LG2	7.2
MS-GPC-8-27-41	Fab	PRIESS	7.7
MS-GPC-8	IgG4	PRIESS	8.3
MS-GPC-8-27-41	IgG4	PRIESS	1.1 ± 0.1
MS-GPC-8-10-57	IgG4	PRIESS	1.1 ± 0.2
MS-GPC-8-27-41	IgG4	LG2	1.23 ± 0.2
MS-GPC-8-10-57	IgG4	LG2	1.0 ± 0.1
8D1	mIgG	PRIESS	33
L243	mIgG	PRIESS	47

表 7

在测定 T-Hyb1 细胞的抗原特异性刺激后 IL-2 分泌的试验中, 本发明的一些抗-HLA-DR 抗体片段的 IC50 值。IgG 形式(二价)的 IC50 表示成摩尔浓度, 而为了提供方便的比较, Fab 形式(单价)的 IC50 表示成 Fab 浓度的一半, 使得能直接与 IgG 形式比较。

抗HLA-DR 抗体片段	形式	IC50 (IgG/nM) ((Fab)/2/nM)		最大抑制 (%)
		平均	SE	
		MS-GPC-8-10-57	IgG	
MS-GPC-8-27-41	IgG	0.28	0.07	100
MS-GPC-8-6-13	IgG	0.42	0.06	100
MS-GPC-8-6-2	IgG	3.6	1.1	100
MS-GPC-8-6	IgG	6.7	2.0	100
MS-GPC-8	IgG	11.0	0.8	100
MS-GPC-8-6-2	Fab	4.7	1.9	100
MS-GPC-8-6-13	Fab	2.1	0.8	100
MS-GPC-8-6-19	Fab	5.3	0.2	100
MS-GPC-8-10-57	Fab	2.9	1.0	100
MS-GPC-8-6-27	Fab	3.0	1.2	100
MS-GPC-8-6-47	Fab	2.6	0.6	100
MS-GPC-8-27-7	Fab	5.9	2.2	100
MS-GPC-8-27-10	Fab	7.3	1.9	100
MS-GPC-8-27-41	Fab	3.6	0.7	100
MS-GPC-8-6	Fab	20		100
MS-GPC-8	Fab	110		100

## 参考文献

Ausubel, F. M. , Brent, R. , Kingston, R. E. , Moore, D. D. , Seidman, J. G. , Smith, J. A. 和 Struhl, K. (1998), Current Protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, U. S. A.

Babbitt B, Allen PM, Matsueda G, Habe E, Unanue ER (1985), Nature 317:359.

Baxevanis, C. N. , Wernet, D. , Nagy, Z. A. , Maurer, P. H. , 和 Klein, J. (1980) Immunogenetics, 11, 617.

- Billing, R. 和 Chatterjee, S. (1983) *Transplant, Proc.* 15, 649.
- Bird, R. E. 等, 单链抗原结合蛋白[勘误表发表在 *Science* 中, 1989年4月28日; 244(4903):409] *Science* 242, 423-6(1988)。
- Bonagura, V. R. , Ma, a. , McDowell, J. , Lewison, A. , King, D. W. 和 Suciufoca, N. (1987) *Cell. Immunolo* 108(2), 356。
- Brinkmann, U. , Reiter, Y. , Jung, S. , Lee, B. 和 Pastan, I. (1993) 含有二硫键稳定化的 Fv 片段的重组免疫毒素。 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7538-7542。
- Brown JH, Jardetsky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC, (1993), *Nature* 364:33。
- Buhmann R, Nolte A, Westhaus D, Emmerich B, Hallek M. (1999) *Blood* 93:1992。
- Current Protocols in Immunology*, 卷 2, 7. 21。
- Drenou B, Blancheteau V, Burgess DH, Fauchet R, Charron DJ, Mooney NA (1999) *J. Immunol.* 163:4115
- Falcioni 等 (1999) *Nat Biotechnol.* 17:562-567。
- Glockshuber, R. , Malia, M. , Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1990)。 稳定免疫球蛋白 Fv-片段的策略比较。 *Biochemistry* 29, 1362-1367。
- Gorga J. C. , Foran, J. , Burakoff, S. J. , Strominger, J. L. (1984) *Meth Emzym.* , 108, 607-613。
- Gorga, J. C. , Horejsi, V. , Johnson, D. R. , Raghupathy, R. , Strominger, J. L. , *J. Biol. Chem.* 262(1987)16087-94。
- Gorga, J. C. , Knudsen, P. J. , Foran, J. A. , Strominger, J. L. , Burakoff, S. J. , (1986), *Cell. Immunol.* 103:160-73。
- Heiskanen T, Lundkvist A, Soliymani R, Koivunen E, Vaheri A, Lankinen H (1999) *Virology*, 262(2): 321。
- Hopp, T. P. , Prickett, K. S. , Price, V. L. , Libby, R. T. , March, C. J. , Cerretti, D. P. , Urdal, D. L. & Conlon, P. J. (1988), *Bio/Technology* 6, 1204-1210。
- Huston, J. S. 等, 操纵抗体结合位点的蛋白质: 大肠杆菌中产生的抗-地高辛单链 Fv 类似物中的比活力恢复, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879-83(1988)。
- Ito K, Bain, H. -J, Molina M, Han J, Magram J, Saar E, Belunis C, Bolin DR, Arceo R, Campbell R, Falcioni F, Vidovic' D, Nagy ZA, (1996), *J. Exp.*

Med 183:2635-2644。

Jones 等(1986), Nature 321: 522-525。

Jonker, M. Schellekens, P. T. , Harpprecht, J. 和 Slingerland , W. (1991) Transplant. Proc. 23, 264。

Jonker, M. , van Lambalgen, R. , Mitchell, D. J. , Durham, S. K. 和 Steinman, L. (1988), Autoimmunity, 1, 399。

Kahoury, E. L. 和 Marshall, L. A. , (1990) Cell. Tissue Res., 262(2): 217-24。

Kashmiri, S. V. , Iwahashi, M. , Tamura, , Padlan, E. A. , Milenic, D. E. 和 Sciom, J. (2001) Crit Rev Oncol Hematol. 38:3-16。

Klohe, EP, Watts, R. , Bahl, M. , Alber, C. , Yu, W-Y, Anderson R, Silver J, Gregersen PK, Karr RK, (1988), J. Immunol. 141: 2158-2164。

Knappik, A. 和 Plückthun, A. , (1994) Biotechniques 17, 754-761。

Knappik, A. Ge, L. , Honegger, A. , Pack, P. , Fischer, M. , Wellnhofer, G. , Hoess A. , Wölle, J. , Plückthun, A. , 和 Virnekäs, B. , (2000), J. Mol. Biol. 296, 55。

Kozak, M. (1987) J. Mol. Biol. 196, 947。

Kuby, J. Immunology: 1994, 第二版。

McMichael, S. J. , Sasazuki, T. , McDevitt, H. O. , 和 Payne, R. O. , (1977), Arthritis Rheum, 20, 1037。

Muller 等(1990), J. Immunol. , 145:4006。

Nagy, Z. 和 Vidovic, D. (1996) W09617874。

Naquet, P. , Marchetto, S. 和 Pierres, M. , (1983), Immunogenetics, 18, 559。

Nepom, G. T. , Benacerraf, B. , 和 Germain, R. N. , (1981), J. Immunol. , 127, 31。

Nepom, G. T. , Byers, P. , Seyfried, C. , Healey, L. A. , Wilske, K. R. , Stage, D. , 和 Nepom, B. S. (1989), Arthritis Rheum, 32, 15。

Ohta, N. , Nishimura, Y. K. , Tanimoto, K. Horiuchi, Y. , Abe, C. , Shiokawa, Y. , Abe, T. , Katigari, M. , Yoshiki, T. 和 Sasazuki, T. , (1982), Hum. Immunol. 5, 123。

Otten 等(1997) pp 5.4.1-5.4.19, 在 Current Protocols in Immunology, Coligan 等编, Green & Wiley, New York。

Pack, P. 和 Plückthun, A. (1992) Biochemistry 31, 1579-1584。

- Pack, P. (1994) 博士论文, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Pack, P., Kujau, M., Schroeckh, V., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Riesenberger, D. 和 Plückthun, A. (1993), *Bio/Technology* 11, 1271-1277.
- Pichla, S. L., Munali, R. & Burnett, R. M. (1997) *J Struct Biol*, 119:6-16.
- Presta, (1992), *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596.
- Riechmann 等, (1988), *Nature* 332:323-329.
- Rheinnecker, M., Hardt, C., Ilag, L. L., Kufer, P., Gruber, R., Hoess, A., Lupas, A., Rottenberger, C., Plückthun, A., 和 Pack, P., (1996) *J. Immunol.* 157, 2989.
- Rosenbaum, J. T., Adelman, N. E. 和 McDevitt, H. O. (1983), *J. Exp. Med.* 154, 1694.
- Sambrook 等, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第二版.
- Schiff, B., Mizrachi, Y., Orgad, S., Yaron, M. 和 Gazit, I. (1982), *Ann. Rheum. Dis.*, 41, 403.
- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. (1993). *Prot. Engineering* 6, 109-122.
- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. (1994) *J. Chromatogr. A* 676, 337-345.
- Schmidt, T. G. M 等 (1996) *J. Mol. Biol.* 255, 753-766.
- Skerra, A. 和 Plückthun, A., (1988), *Science* 240, 1038.
- Slavin-Chiorini, D. C., Kashmiri, S. V., Milenic, D. E., Poole, D. J., Bernono, E., Schlom, J. 和 Hand P. H. (1997) *Cancer Biother Radiopharm* 12:305-316.
- Smith, R. M., Morgan, A., 和 Wraith, D. C. (1994), *Immunology*, 83, 1.
- Stasny, P. (1978), *N. Engl. J. Med.* 298, 869.
- Staubøl-Grøn, B., Wind, T. Kjær, S., Kahns, L., Hansen, N. J. V. Kristensen, P. 和 Clark B. F. C. (1996) *FEBS Lett*, 391, 71.
- Stern, A. S. 和 Podlaski, F. J. (1993) *蛋白质化学技术 IV*, Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- Stevens, H. P., Roche, N., Hovius, S. E. 和 Jonker, M. (1990), *Transplant. Proc.*, 22, 1783.
- Tiwari, J., 和 Terasaki, P. (1985), *HLA 和疾病关系* (New York:Springer Verlag).

Vidovic D, Falcioni F, Bolin DR, Nagy ZA, (1995a), Eur. J. Immunol., 25:1326.

Vidovic D, Falconi F, Siklodi B, Belunis CJ, Bolim DR, Ito K, Nagy ZA (1995b), Eur. J. Immunol. 25:3349.

Vidovic, D., Falconi, F., Siklodi, B., Belunis, CJ, Bolin, D. R., Ito, K., Nagy, Z. A. (1995b), Eur J. Immunol 25:3349

Vidovic D. & Toral, J. (1998) Cancer Letters 128:127-135.

Virnekäs, B., Ge, L., Plukthun, A., Schneider, K. C., Wellenhofer, G. & Moroney, S. E. (1994) Nucleic Acids Res 22: 5600-5607.

Vose, J. M., Colcher, D., Gobar, L., Bierman, P. J., Augustine, S., Tempero, M., Leichner, P., Lynch, J. C., Goldenberg, D. 和 Armitage, J. O. (2000) Leuk Lymphoma 38:91-101.

Voss, S. 和 Skerra, A. (1997) Protein Eng. 10, 975, 982.

Waldor, M. K., Sriram, S., McDevitt, H. O. 和 Steinman, L. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2713.

Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. 和 Hoogenboom, H. R. (1994) 用噬菌体显示技术制造抗体, Annu. Rev. Immunol. 12, 433.

Woods 等, (1994) J Exp Med 180:173-81.

	MS-GPC- 8-27-7	MS-GPC- 8-27-10	MS-GPC- 8-6-13	MS-GPC- 8-27-41	MS-GPC- 8-6-47	MS-GPC- 8-10-57	MS-GPC- 8-6-27	MS-GPC- 8	MS-GPC- 8-6
塑料	-0,004	-0,02	-0,022	-0,025	-0,001	0,005	0,007	-0,022	-0,018
BSA	-0,003	-0,019	-0,021	-0,022	0,008	0,003	0,003	-0,016	-0,019
鞣酮 -BSA	-0,005	-0,01	-0,012	-0,007	0,011	0,003	0,002	-0,009	-0,012
溶菌酶	-0,005	-0,079	-0,079	-0,073	0,013	0,014	0,006	-0,081	-0,072
人脱辅基 转铁蛋白	-0,009	-0,016	-0,018	-0,018	-0,005	-0,008	-0,004	-0,014	-0,016
MHCII (DRA*0101/ DRB1*0401)	1,549	1,493	1,467	1,525	1,4	1,256	1,297	1,058	1,306

图 1a

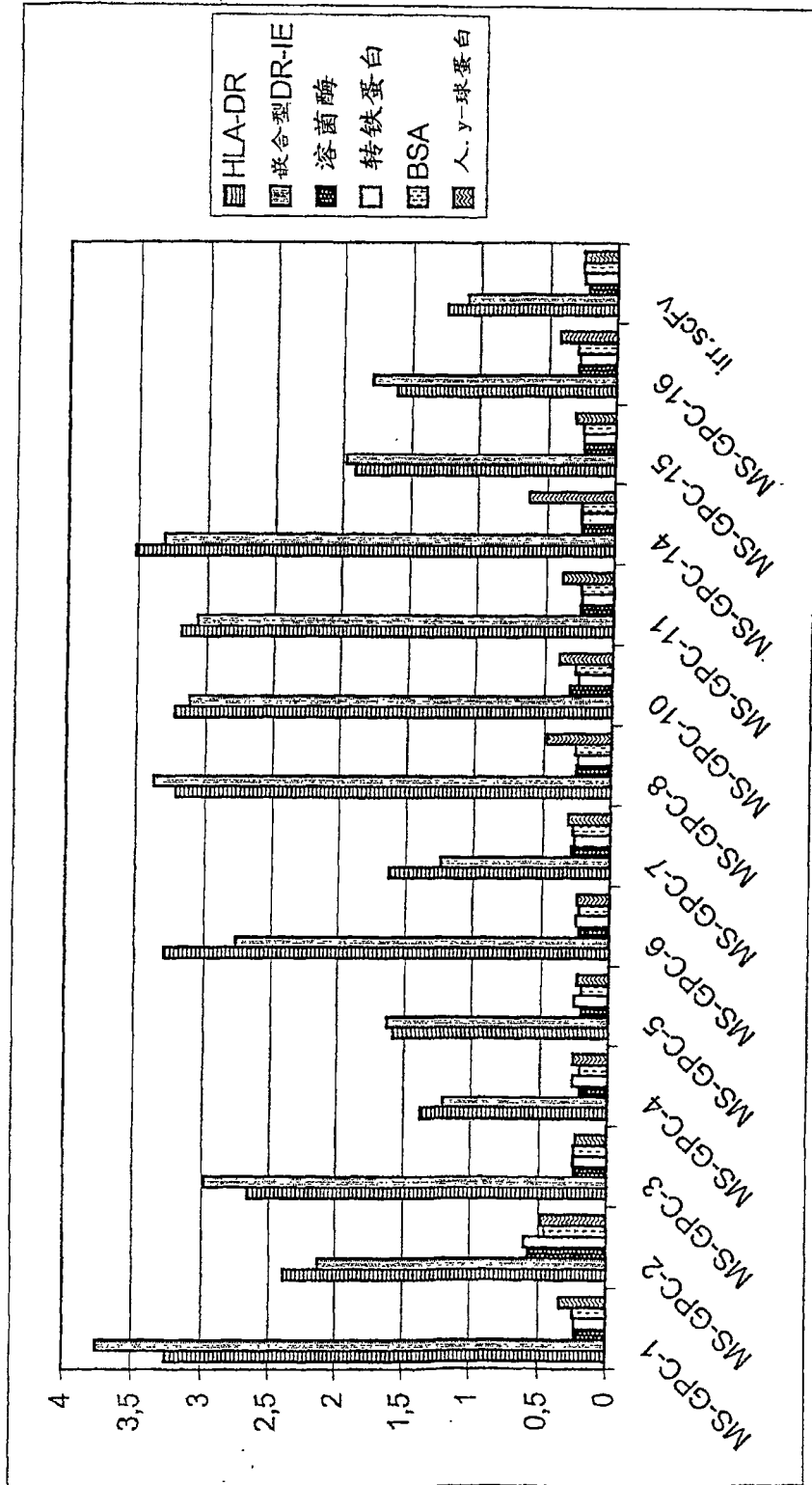


图 1b

细胞系	LC2	E4181324	VAV	Plees	TS10	BIN40	WT47	TEM	TAB089	DKB	L257.6	L105.1	L25.4	L256.12	L21.3
HLA	DR1	DR2	DR3	DR4DW4	DR4DW10	DR4DW14	DR6	DR6	DR8	DR9	DRM53	DRM52	DRM4M4.2	DRM2M2.1	DQ3/M2
DRB1*	0101	15021	0301	0401	0402	0404	1302	1401	8031	9012	B*0101	B*0101	DF0103/0402	DF0202/0201	DC3201/0302
sdFv															
MS-GFC-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/	+	-	-	-
MS-GFC-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MS-GFC-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
MS-GFC-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
MS-GFC-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS-GFC-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS-GFC-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS-GFC-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS-GFC-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/	+	-	-	-
MS-GFC-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/	+	-	-	-
MS-GFC-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/	+	-	-	-
MS-GFC-16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG															
MS-GFC-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS-GFC-8-10-57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS-GFC-8-27-41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS-GFC-8-6-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



2

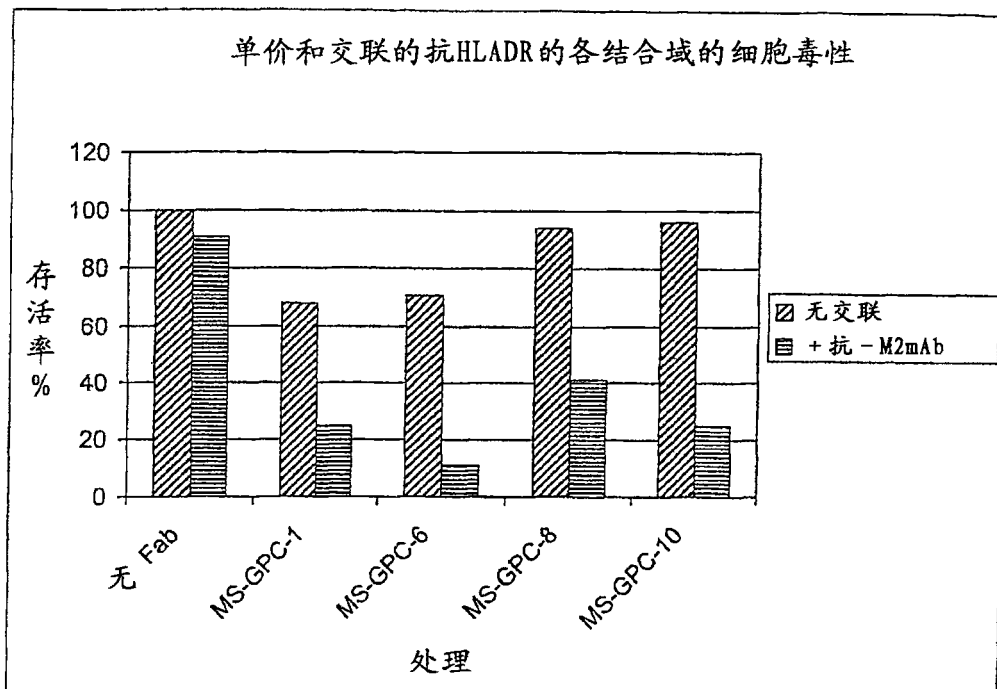


图 3

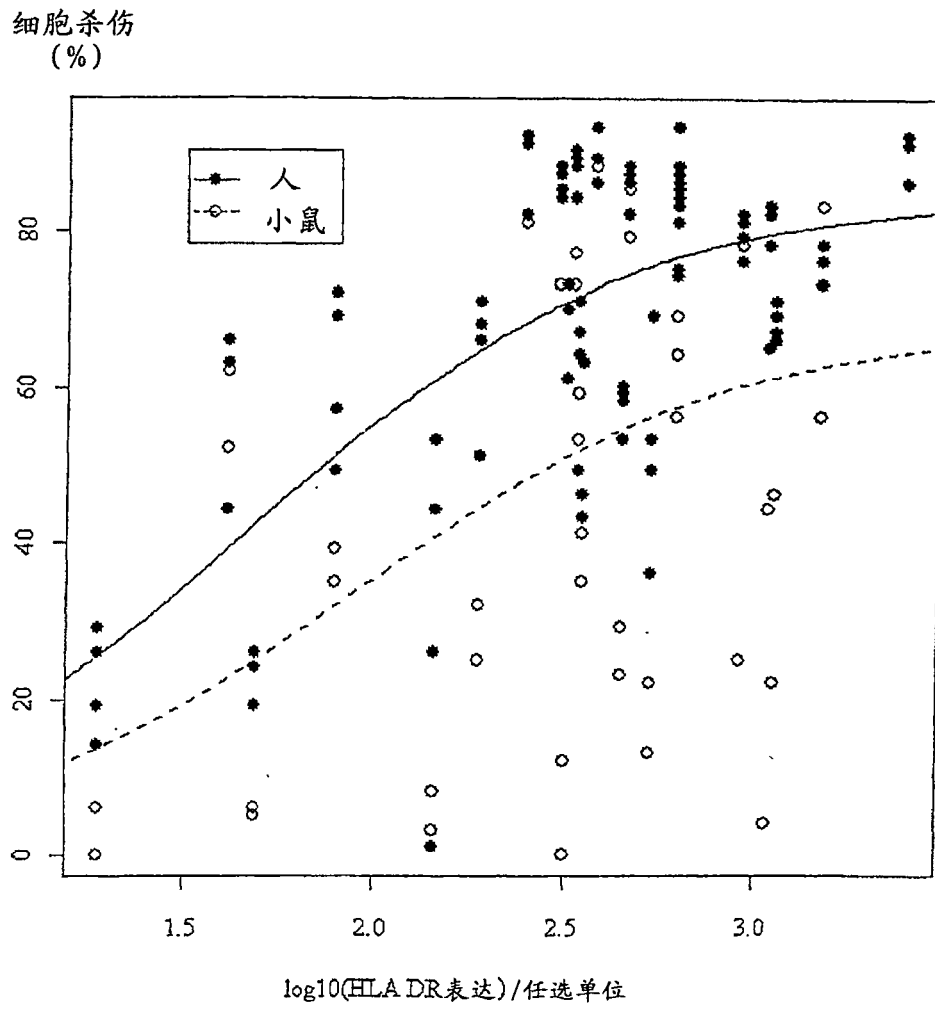


图 4

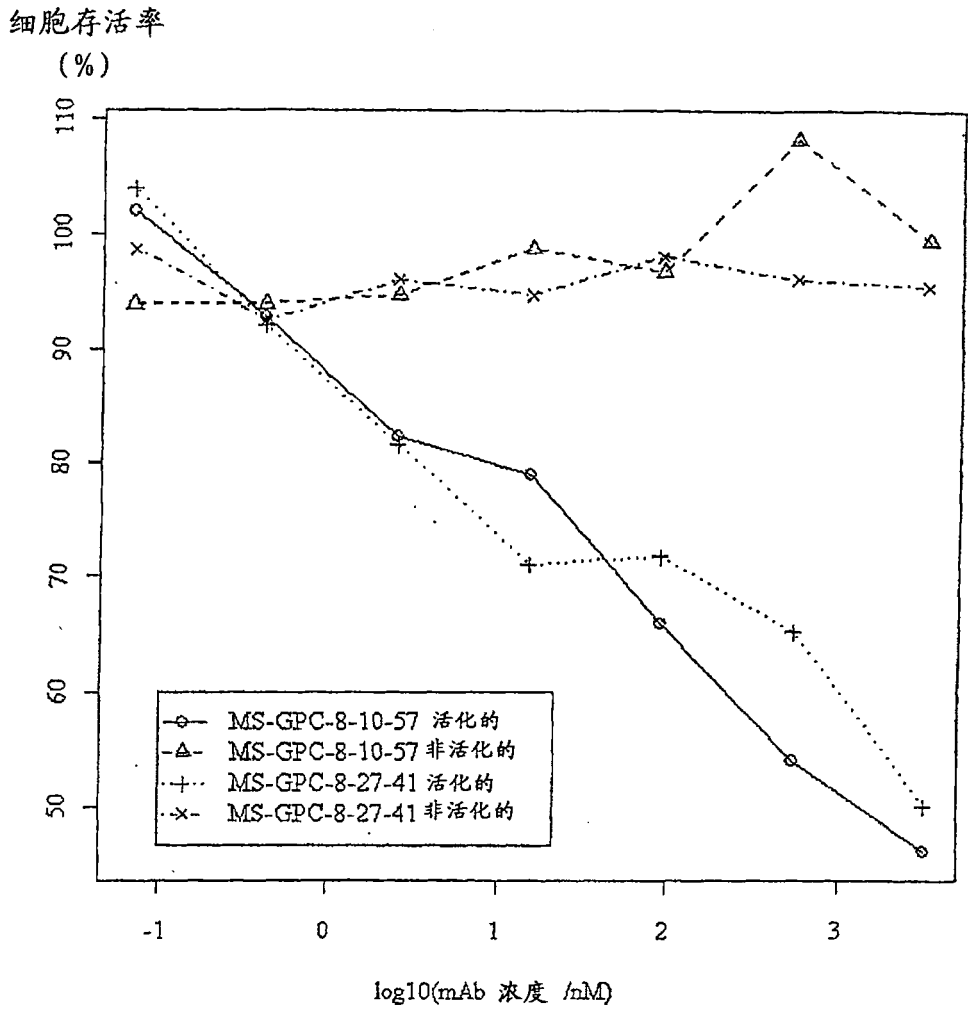
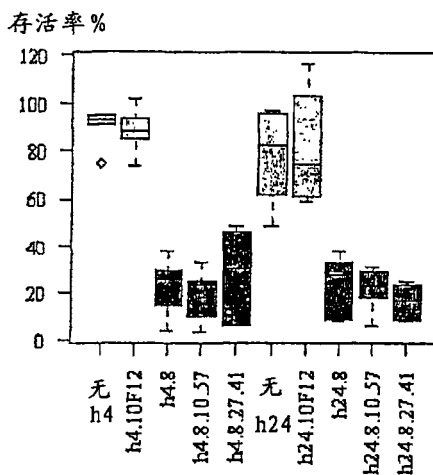
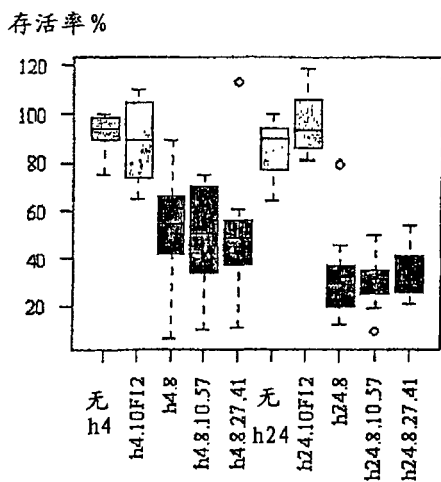


图 5



图

6

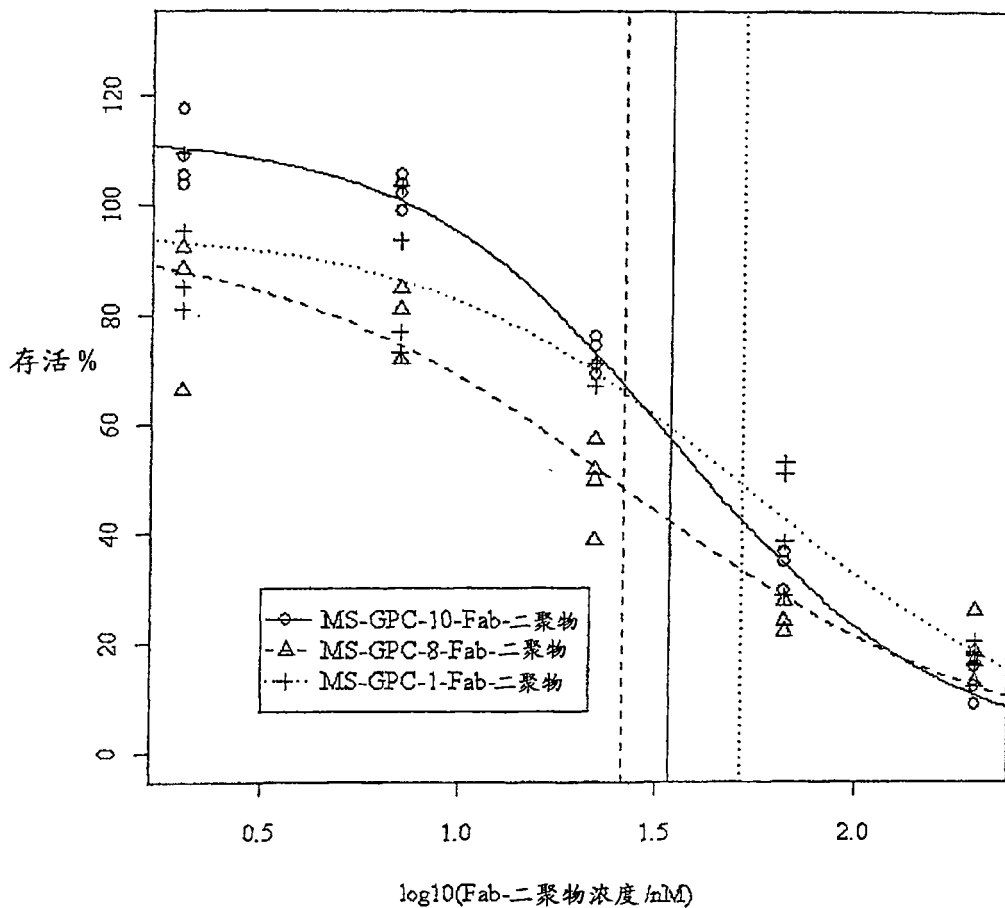


图 7a

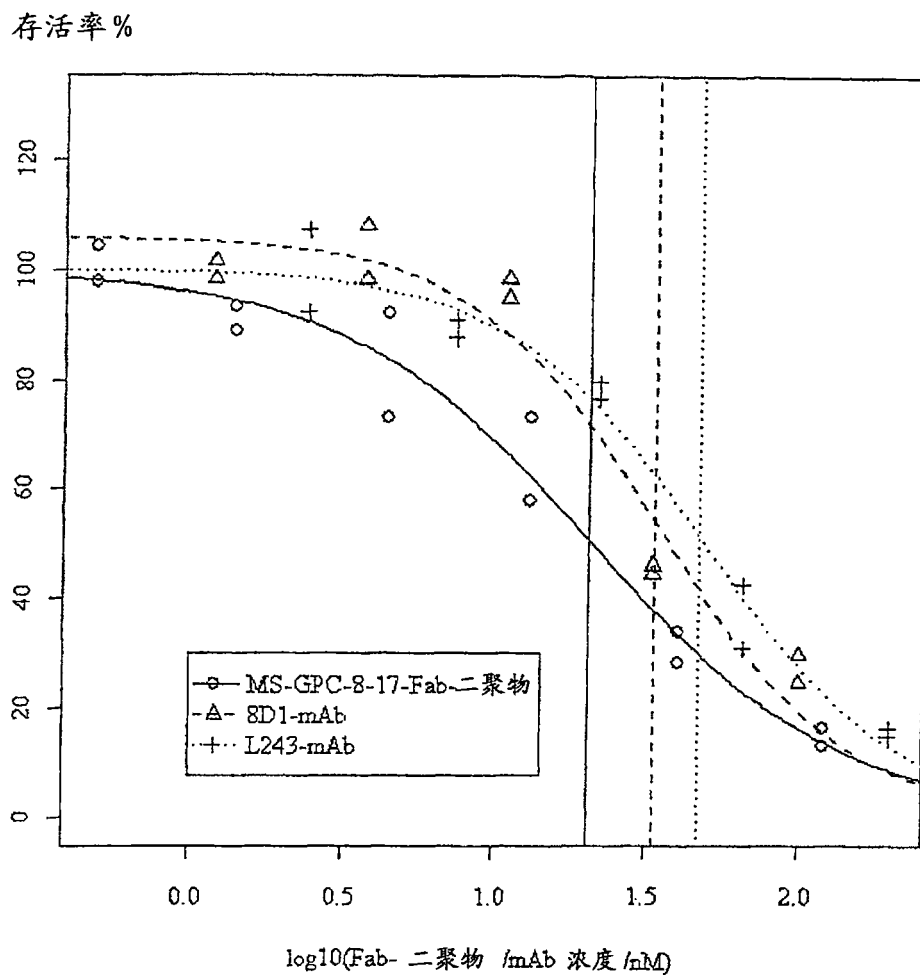


图 7b

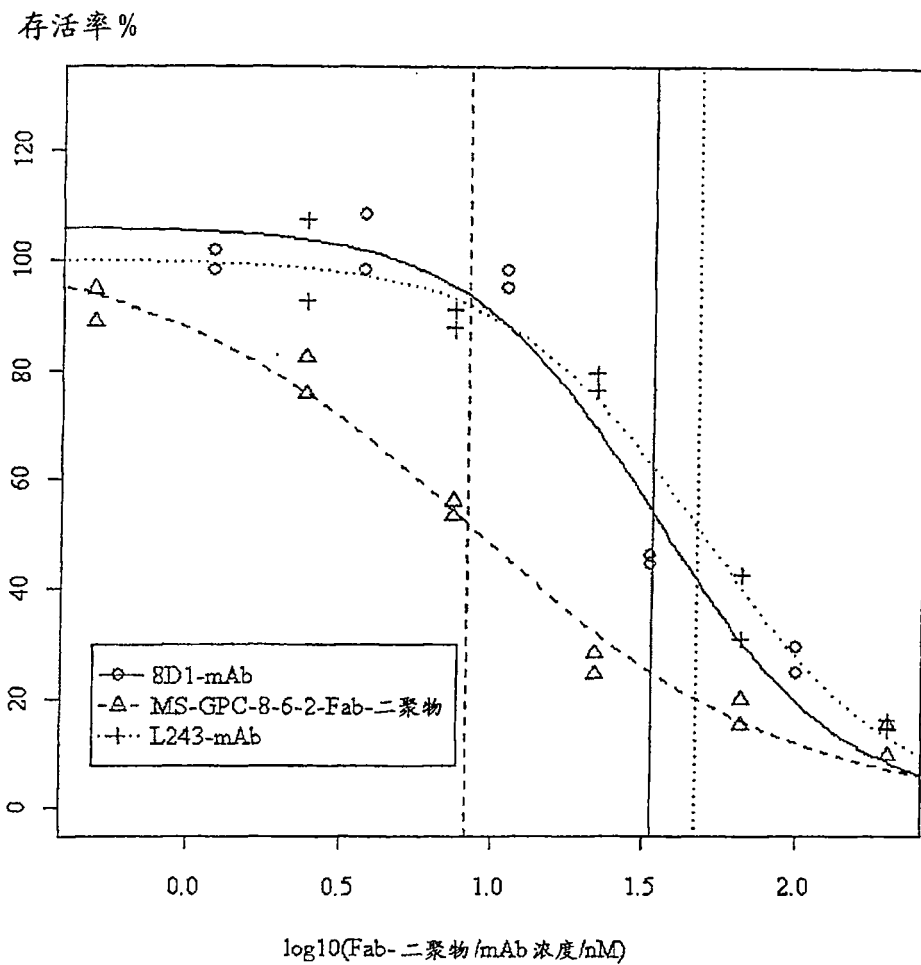


图 7c

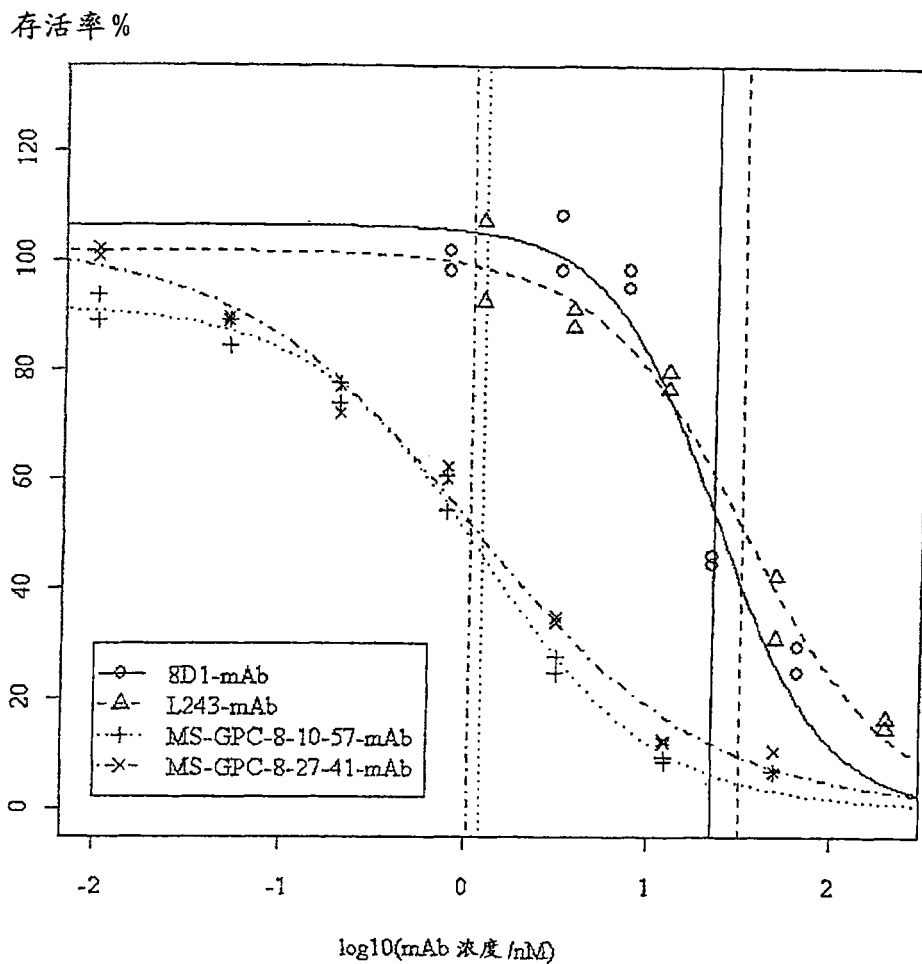


图 7d

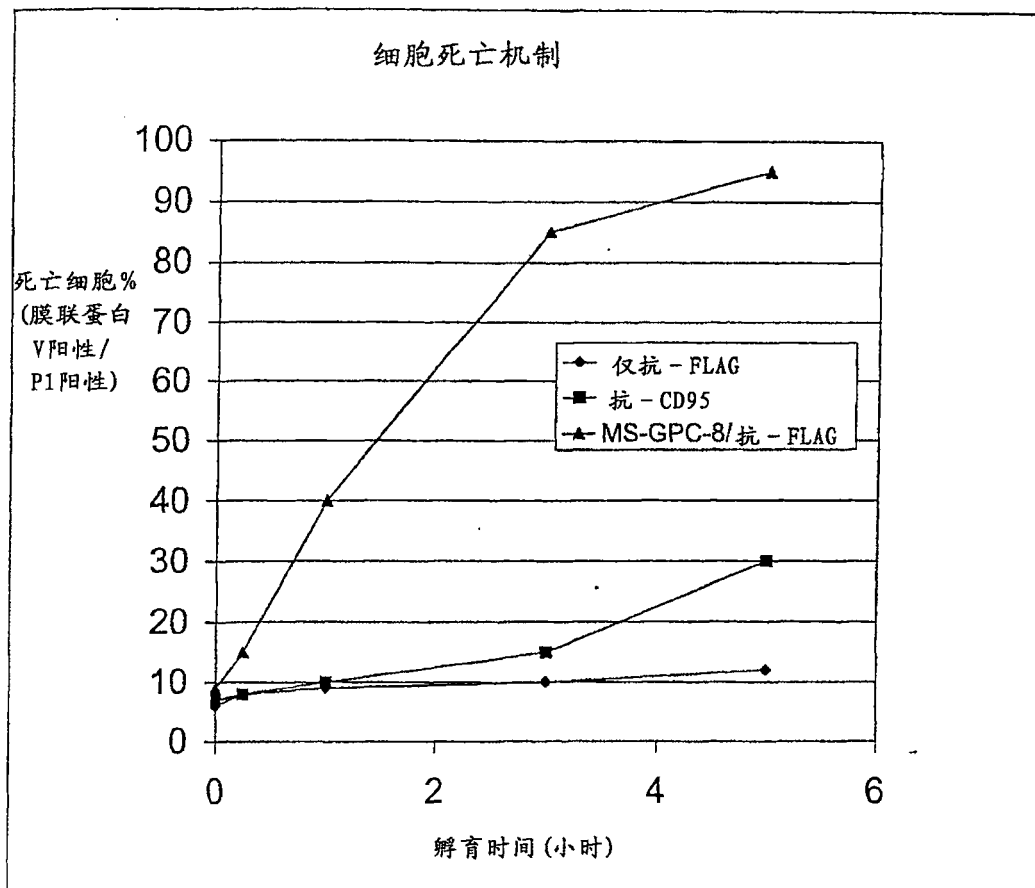


图 8a

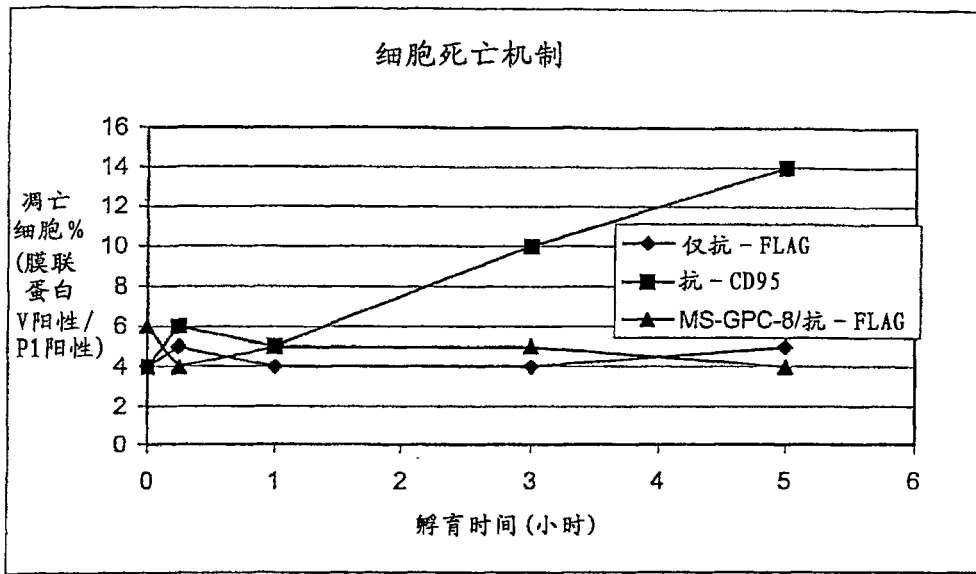


图 8b

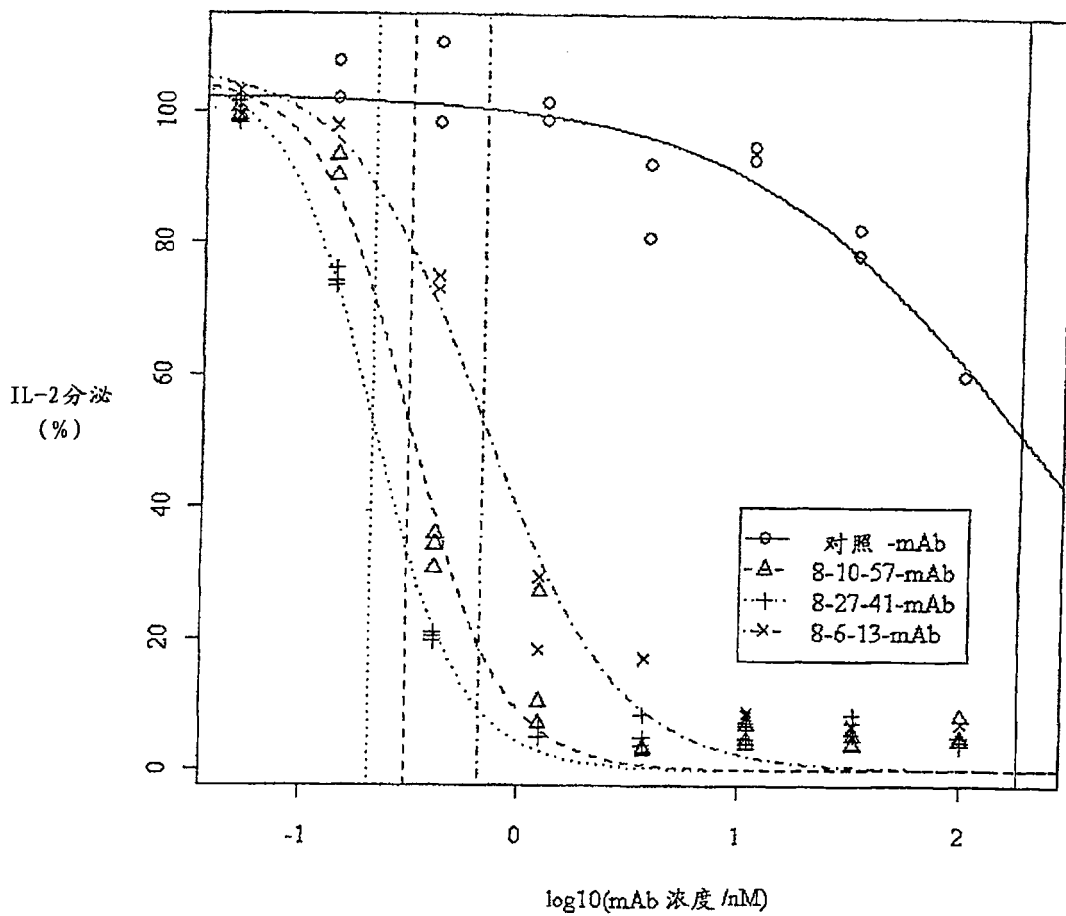


图 9a

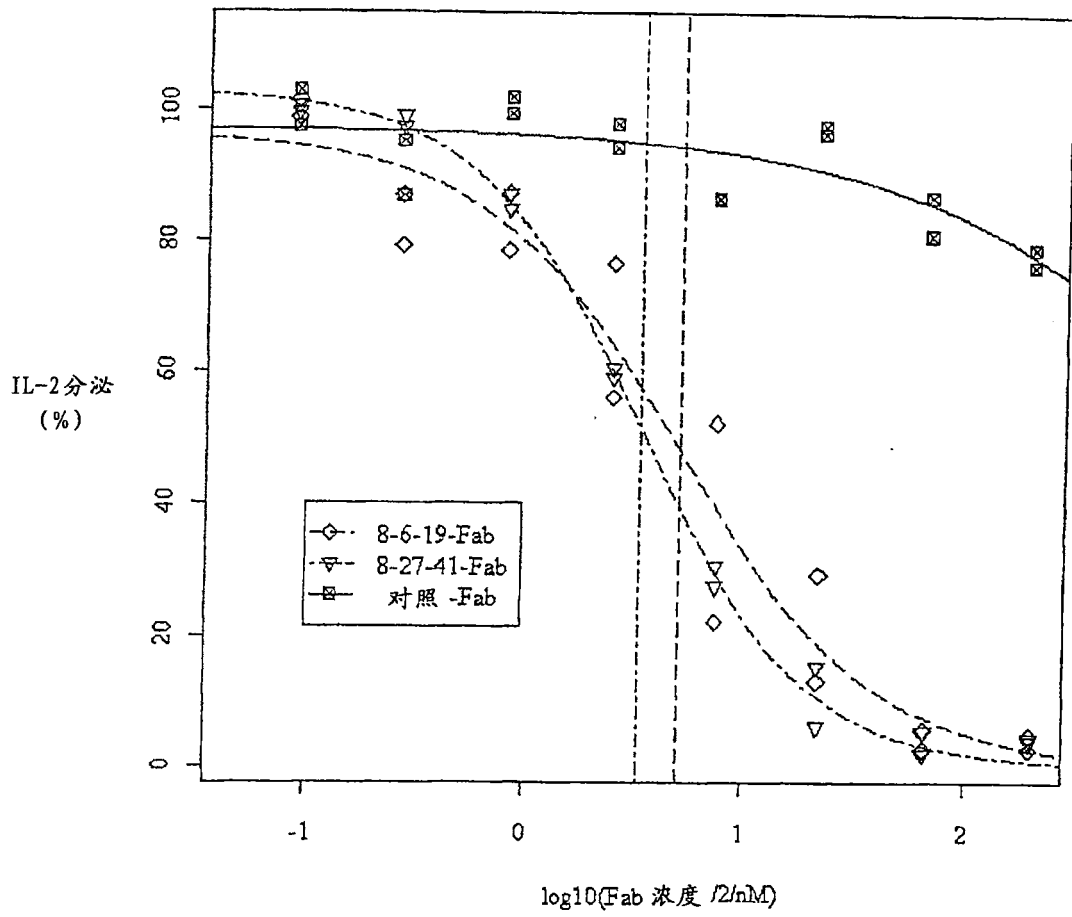


图 9b

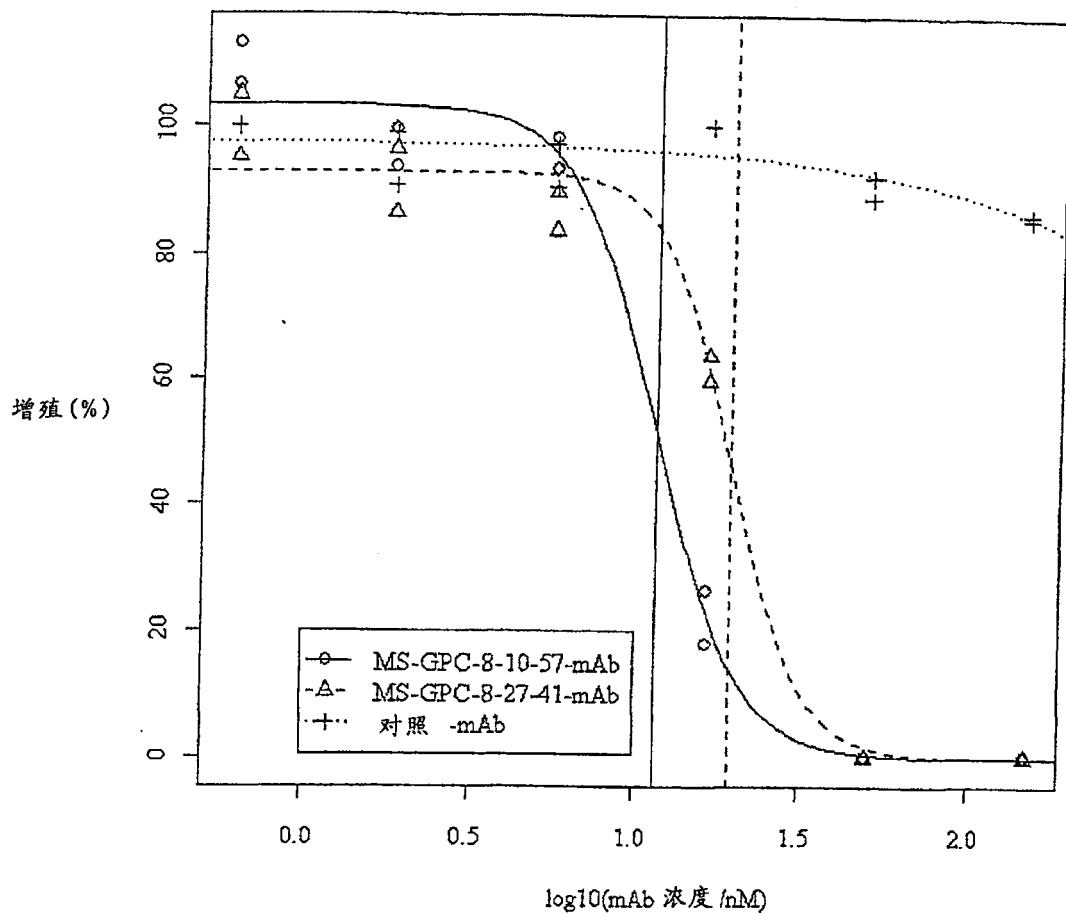


图 10

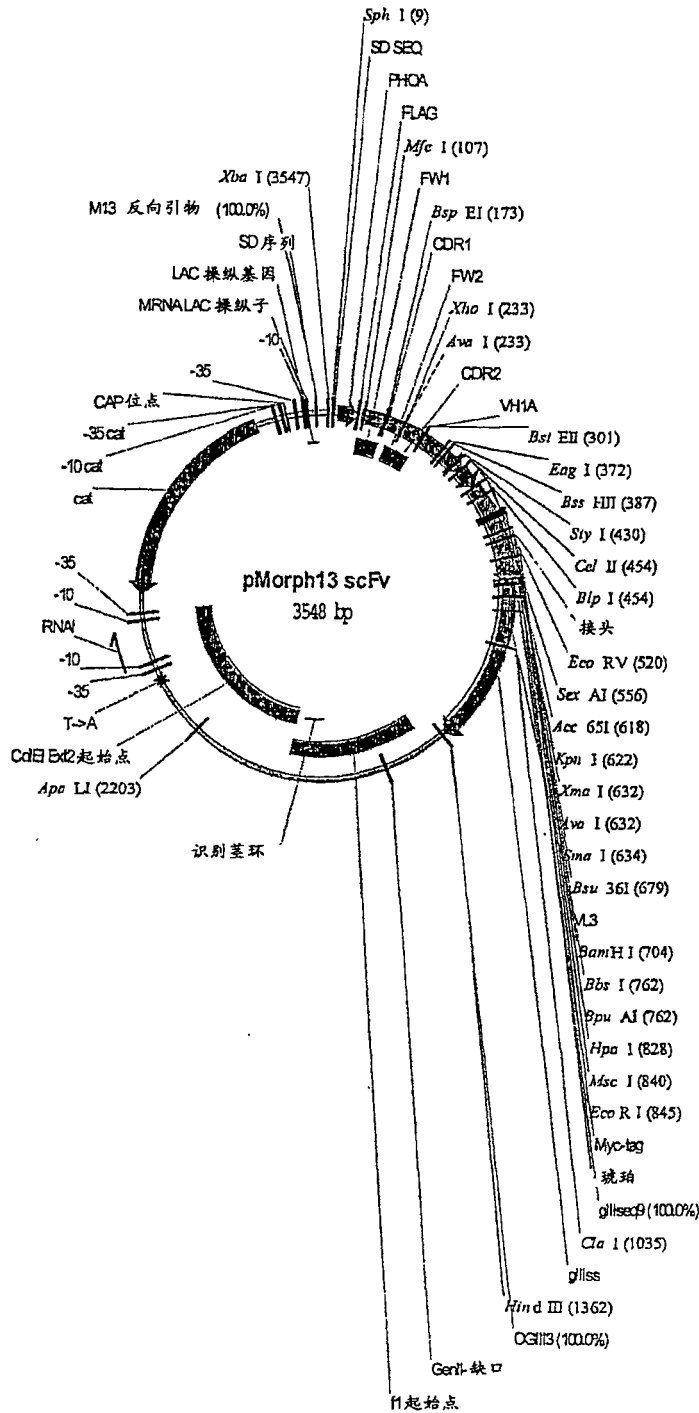


图 11

```

XbaISphI
-----
1  AGAGCATGCG TAGGAGAAA TAAATGAAA CAAAGCACTA TTGCACTGGC
   TCTCGTACGC ATCCTCTTTT ATTTTACTTT GTTTCGTGAT AACGTGACCG

51  ACTCTTACCG TTGCTCTTCA CCCCTGTTAC CAAAGCCGAC TACAAAGATG
   TGAGAAATGGC AACGAGAAGT GGGGACAATG GTTTCGGCTG ATGTTTCTAC

MfeI
-----
101 AAGTGCAATT GGTTCAGTCT GGCGCGGAAG TGAAAAAACC GGGCAGCAGC
    TTCACGTTAA CCAAGTCAGA CCGCGCCTTC ACTTTTTTGG CCCGTCGTGC

BspEI
-----
151 GTGAAAGTGA GCTGCAAAGC CTCCGGAGGC ACTTTTAGCA GCTATGCGAT
    CACTTTCACF CGACGTTTCG GAGGCCCTCC TGAAAATCGT CGATACGCTA

XhoI
-----
AvaI
-----
201 TAGCTGGGTG CGCCAAGCCC CTGGGCAGGG TCTCGAGTGG ATGGGCGGCA
    ATCGACCCAC GCGGTTGCGG GACCCGTCCC AGAGCTCACC TACCCGCCGT

BstEII
-----
251 TTATTCCGAT TTTTGGCACG GCGAACTACG CGCAGAAGTT TCAGGGCCGG
    AATAAGGCTA AAAACCGTGC CGCTTGATGC GCGTCTTCAA AGTCCCGGCC

BstEII
-----
301 GTGACCATTA CCGCGGATGA AAGCACCAGC ACCGCGTATA TGGAACTGAG
    CACTGGTAAT GGCGCCTACT TTCGTGGTGC TGGCGCATAT ACCTTGACTC

EagI
-----
BssHII
-----
351 CAGCCTGCGT AGCGAAGATA CGGCCGTGTA TTATTGCGCG CGTTATTATG
    GTCGGACGCA TCGCTTCTAT GCCGGCACAT AATAACGCGC GCAATAATAC

StyI
-----
401 ATCGTATGTA TAATATGGAT TATTGGGGCC AAGGCACCCT GGTGACGGTT
    TAGCATACAT ATTATACCTA ATAACCCCGG TTCCGTGGGA CCACTGCCAA

BlpI
-----
CelII
-----
451 AGCTCAGCGG GTGGCGGTTC TGGCGGCGGT GGGAGCGGTG GCGGTGGTTC
    TCGAGTCGCC CACCGCCAAG ACCCGCGCCA CCCTCGCCAC CGCCACCAAG

EcoRV
-----
501 TGGCGGTGGT GGTTCGGATA TCGAACTGAC CCAGCCGCCT TCAGTGAGCG

```

图 11(续)

ACCGCCACCA CCAAGGCTAT AGCTTGACTG GGTCGGCGGA AGTCACTCGC

SexAI  
-----

551 TTGCACCAGG TCAGACCGCG CGTATCTCGT GTAGCGGCGA TGCCTGGGC  
AACGTGGTCC AGTCTGGCGC GCATAGAGCA CATCGCCGCT ACGCGACCCG

XmaI  
-----

KpnI  
-----

SmaI  
-----

Acc65I  
-----

AvaI  
-----

601 GATAAATACG CGAGCTGGTA CCAGCAGAAA CCCGGGCAGG CGCCAGTTCT  
CTATTTATGC GCTCGACCAT GGTCGTCTTT GGGCCCGTCC GCGGTCAAGA

Bsu36I  
-----

651 GGTGATTTAT GATGATTCTG ACCGTCCCTC AGGCATCCCG GAACGCTTTA  
CCACTAAATA CTAATAAGAC TGGCAGGGAG TCCGTAGGGC CTTGCGAAAT

BamHI  
-----

701 GCGGATCCAA CAGCGGCAAC ACCGCGACCC TGACCATTAG CGGCACTCAG  
CGCCTAGGTT GTCGCCGTTG TGGCGCTGGG ACTGGTAATC GCCGTGAGTC

BpuAI  
-----

BbsI  
-----

751 GCGGAAGACG AAGCGGATTA TTATTGCCAG AGCTATGACG CTCATATGCG  
CGCCTTCTGC TTCGCCTAAT AATAACGGTC TCGATACTGC GAGTATACGC

HpaI  
-----

MscI  
-----

EcoRI  
-----

801 TCCTGTGTTT GCGGGCGGCA CGAAGTTAAC CGTTCCTGGC CAGGAATTGC  
AGGACACAAA CCGCCGCCGT GCTTCAATTG GCAAGAACCG GTCCTTAAGC

851 AGCAGAAGCT GATCTCTGAG GAGGATCTGA ACTAGGGTGG TGGCTCTGGT  
TCGTCTTCGA CTAGAGACTC CTCCTAGACT TGATCCCACC ACCGAGACCA

901 TCCGGTGATT TTGATTATGA AAAGATGGCA AACGCTAATA AGGGGGCTAT  
AGGCCACTAA AACTAATACT TTTCTACCGT TTGCGATTAT TCCCCGATA

gIIIseq9 100.0%

=====

951 GACCGAAAAT GCCGATGAAA ACGCGCTACA GTCTGACGCT AAAGGCAAAC  
CTGGCTTTTA CGGCTACTTT TCGCGGATGT CAGACTGCGA TTCCGTTTG

ClaI  
-----

1001 TTGATTCTGT CGCTACTGAT TACGGTGCTG CTATCGATGG TTTCATTGGT  
AACTAAGACA GCGATGACTA ATGCCACGAC GATAGCTACC AAAGTAACCA

1051 GACGTTTCCG GCCTTGCTAA TGTAATGGT GCTACTGGTG ATTTTGCTGG  
CTGCAAAGGC CGGAACGATT ACCATTACCA CGATGACCAC TAAAACGACC

```

1101 CTCTAATFCC CAAATGGCTC AAGTCGGTGA CGGTGATAAT TCACCTTTAA
    GAGATTAAGG GTTTACCGAG TTCAGCCACT GCCACTATTA AGTGGAATTT

1151 TGAATAATTT CCGTCAATAT TTACCTTCCC TCCCTCAATC GGTTGAATGT
    ACTTATTAAA GGCAGTTATA AATGGAAGGG AGGGAGTTAG CCAACTTACA

1201 CGCCCTTTTG TCTTTGGCGC TGGTAAACCA TATGAATTTT CTATTGATTG
    GCGGGAAAAC AGAAACCGCG ACCATTTGGT ATACTTAAAA GATAACTAAC

1251 TGACAAAATA AACTTATFCC GTGGTGTCTT TCGTTTTCTT TTATATGTTG
    ACTGTTTTAT TTGAATAAGG CACCACAGAA ACGCAAAGAA AATATACAAC

1301 CCACCTTTAT GSTATGATTT TCTACGTTTG CTAACATACT GCGTAATAAG
    GGTGGAAATA CATACATAAA AGATGCAAAC GATTGTATGA CGCATTATTC

                                HindIII
                                ~~~~~
1351 GAGTCTTGAT AAGCTTGACC TGTGAAGTGA AAAATGGCGC AGATTGTGCG
    CTCAGAACTA TTCGAACTGG ACACCTTCACT TTTTACCGCG TCTAACACGC
                                OGIII3 100.0%
                                =====

1401 ACATTTTTTT TGTCFGCCGT TTAATGAAAT TGTAACCGTT AATATTTTTGT
    TGTAACAAAA ACAGACGGCA AATTACTTTA ACATTTGCAA TTATAAACA

1451 TAAAATTCGC GTTAAATTTT TGTAAATCA GCTCATTTTT TAACCAATAG
    ATTTTAAGCG CAATTTAAAA ACAATTTAGT CGAGTAAAAA ATTGGTTATC

1501 GCCGAAATCG GCAAAATCCC TTATAAATCA AAAGAATAGA CCGAGATAGG
    CGGCTTTAGC CGTTTTAGGG AATATTTAGT TTTCTTATCT GGCTCTATCC

1551 GTTGAGTGTT GTTCCAGTTT GGAACAAGAG TCCACTATTA AAGAACGTGG
    CAACTCACAA CAAGGTCAAA CCTTGTCTC AGGTGATAAT TTCTTGACC

1601 ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT ATCAGGGCGA TGGCCCACTA
    TGAGGTTGCA GTTCCCGCT TTTTGGCAGA TAGTCCCGCT ACCGGGTGAT

1651 CGAGAACCAT CACCCTAATC AAGTTTTTTG GGGTCGAGGT GCCGTAAAGC
    GCTCTTGGTA GTGGGATTAG TTCAAAAAAC CCCAGCTCCA CGGCATTTCC

1701 ACTAAATCGG AACCTAAAG GGAGCCCCCG ATTTAGAGCT TGACGGGGAA
    TGATTTAGCC TTGGGATTTT CCTCGGGGGC TAAATCTCGA ACTGCCCTTT

1751 AGCCGGCGAA CGTGGCGAGA AAGGAAGGGA AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC
    TCGGCCGCTT GCACCGCTCT TTCCTTCCCT TCTTTCGCTT TCCTCGCCCG

1801 GCTAGGGCGC TGGCAAGTGT AGCGGTCACG CTGCGCGTAA CCACCACACC
    CGATCCCGCG ACCGTTTACA TCGCCAGTGC GACGCGCATT GGTGGTGTGG

1851 CGCCGCGCTT AATGCGCCGC TACAGGGCGC GTGCTAGCCA TGTGAGCAAA
    GCGGCGCGAA TTACGCGGCG ATGTCCCGCG CACGATCGGT ACACCTCGTTT

1901 AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT
    TCCGGTTCGT TTCCGGTCCT TGGCATTTTT CCGGCGCAAC GACCGCAAAA

1951 TCCATAGGCT CGCCCCCCT GACGAGCATC ACAAAAATCG ACGCTCAAGT
    AGGTATCCGA GCGGGGGGA CTGCTCGTAG TGTTTTTAGC TGCGAGTTCA

```

2001 CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC  
 GTCTCCACCG CTTTGGGCTG TCCTGATATT TCTATGGTCC GCAAAGGGGG

2051 TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTC GACCCTGCCG CTTACCGGAT  
 ACCTTCGAGG GAGCACGCGA GAGGACAAGG CTGGGACGGC GAATGGCCTA

2101 ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA  
 TGGACAGGCG GAAAGAGGGA AGCCCTTCGC ACCGCGAAAG AGTATCGAGT

2151 CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG  
 GCGACATCCA TAGAGTCAAG CCACATCCAG CAAGCGAGGT TCGACCCGAC

ApaLI  
 ~~~~~

2201 TGTGCACGAA CCCCCGTTTC AGTCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT  
 ACACGTGCTT GGGGGGCAAG TCAGGCTGGC GACGCGGAAT AGGCCATTGA

2251 ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA  
 TAGCAGAACT CAGGTTGGGC CATTCTGTGC TGAATAGCGG TGACCGTCTG

2301 GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA  
 CGGTGACCAT TGTCTAATC GTCTCGCTCC ATACATCCGC CACGATGTCT

2351 GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGA ACAGTATTTG  
 CAAGAACTTC ACCACCGGAT TGATGCCGAT GTGATCTTCT TGTCATAAAC

2401 GTATCTGCCG TCTGCTGTAG CCAGTTACCT TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC  
 CATAGACCGG AGACGACATC GGTCAATGGA AGCCTTTTTT TCAACCATCG

2451 TCTTGATCCG GCAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTGTFTTG  
 AGAACTAGGC CGTTTGTFTT GTGGCGACCA TCGCCACCAA AAAAACAAAC

2501 CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA  
 GTTCGTGCTC TAATGCGCGT CTTTTTTTCC TAGAGTTCTT CTAGGAAACT

2551 TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGG ACGAAAACCT ACGTTAAGGG  
 AGAAAAGATG CCCCAGACTG CGAGTCACCT TGCTTTTGAG TGCAATTCCT

2601 ATTTTGGTCA GATCTAGCAC CAGGCGTTTA AGGGCACCA AACTGCCTT  
 TAAAACCAGT CTAGATCGTG GTCCGCAAAT TCCCGTGGT ATTGACGGAA

2651 AAAAAAATTA CGCCCCGCC TGCCACTCAT CGCAGTACTG TTGTAATTCA  
 TTTTTTTAAT GCGGGGCGGG ACGGTGAGTA GCGTCATGAC AACATTAAGT

2701 TTAAGCATTG TGCCGACATG GAAGCCATCA CAAACGGCAT GATGAACCTG  
 AATTCGTAAG ACGGCTGTAC CTTGCGTAGT GTTTGCCGTA CTACTTGGAC

2751 AATCGCCAGC GGCATCAGCA CCTTGTGCGC TTGCGTATAA TATTTGCCCA  
 TTAGCGGTCT CCGTAGTCTG GGAACAGCGG AACGCATATT ATAAACGGGT

2801 TAGTGAAAAC GGGGGCGAAG AAGTTGTCCA TATTTGGCTAC GTTTAAATCA  
 ATCACTTTTG CCCCCGCTTC TTCAACAGGT ATAACCGATG CAAATTTAGT

2851 AAAGTGGTGA AACTCACCCA GGGATTGGCT GAGACGAAAA ACATATTCTC  
 TTTGACCACT TTGAGTGGGT CCCTAACCGA CTCTGCTTTT TGTATAAGAG

```

2901 AATAAACCCCT TTAGGGAAAT AGGCCAGGTT TTCACCGTAA CACGCCACAT
    TTATTTGGGA AATCCCTTTA TCCGGTCCAA AAGTGGCATT GTGCGGTGTA

2951 CTTGCGAATA' TATGTGTAGA AACTGCCGGA AATCGTCGTG GTATTCAC'TC
    GAACGCTTAT ATACACATCT TTGACGGCCT TTAGCAGCAC CATAAGTGAG

3001 CAGAGCGATG AAAACGTTTC AGTTTGCTCA TGGAAAACGG TGTAACAAGG
    GTCTCGCTAC TTTTGCAAAG TCAAACGAGT ACCTTTTGCC ACATTGTTCC

3051 GTGAACACTA TCCCATATCA CCAGCTCACC GTC'TTTCATT GCCATACGGA
    CACTTGTGAT AGGGTATAGT GGTGAGTGG CAGAAAGTAA CGGTATGCCT

3101 ACTCCGGGTG AGCATT'CATC AGGCGGGCAA GAATGTGAAT AAAGGCCGGA
    TGAGGCCAC TCGTAAGTAG TCCGCCCGTT CTTACACTTA TTTCCGGCCT

3151 TAAAACTTGT GCTTATTTTT CTTTACGGTC TTTAAAAAGG CCGTAATATC
    ATTTTGAACA CGAATAAAAA GAAATGCCAG AAATTTTCC GGCATTATAG

3201 CAGCTGAACG GTCTGGTTAT AGGTACATTG AGCAACTGAC TGAAATGCCT
    GTCGACTTGC CAGACCAATA TCCATGTAAC TCGTTGACTG ACTTTACGGA

3251 CAAAATGTTT TTTACGATGC CATTGGGATA TATCAACGGT GGTATATCCA
    GTTTTACAAG AAATGCTACG GTAACCCTAT ATAGTTGCCA CCATATAGGT

3301 GTGATTTTTT TCTCCATTTT AGCTTCCTTA GCTCCTGAAA ATCTCGATAA
    CACTAAAAAA AGAGGTAAAA TCGAAGGAAT CGAGGACTTT TAGAGCTATT

3351 CTCAAAAAAT ACGCCCGGTA GTGATCTTAT TTCATTATGG TGAAAGTTGG
    GAGTTTTTTA TGCGGGCCAT CACTAGAATA AAGTAATACC ACTTTCAACC

3401 AACCTCACCC GACGTCTAAT GTGAGTTAGC TCACTCATT' A GGCACCCAG
    TTGGAGTGGG CTGCAGATTA CACTCAATCG AGTGAGTAAT CCGTGGGGTC

3451 GCTTTACACT TTATGCTTCC GGCTCGTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG
    CGAAATGTGA AATACGAAGG CCGAGCATA' C AACACACCTT AACACTCGCC

          M13      反向引物      100.0%      XbaI
          =====
3501 ATAACAATTT CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GAATTTCT
    TATTGTTAAA GTGTGCCTT TGTCGATACT GGTACTAATG CTTAAAGA

```

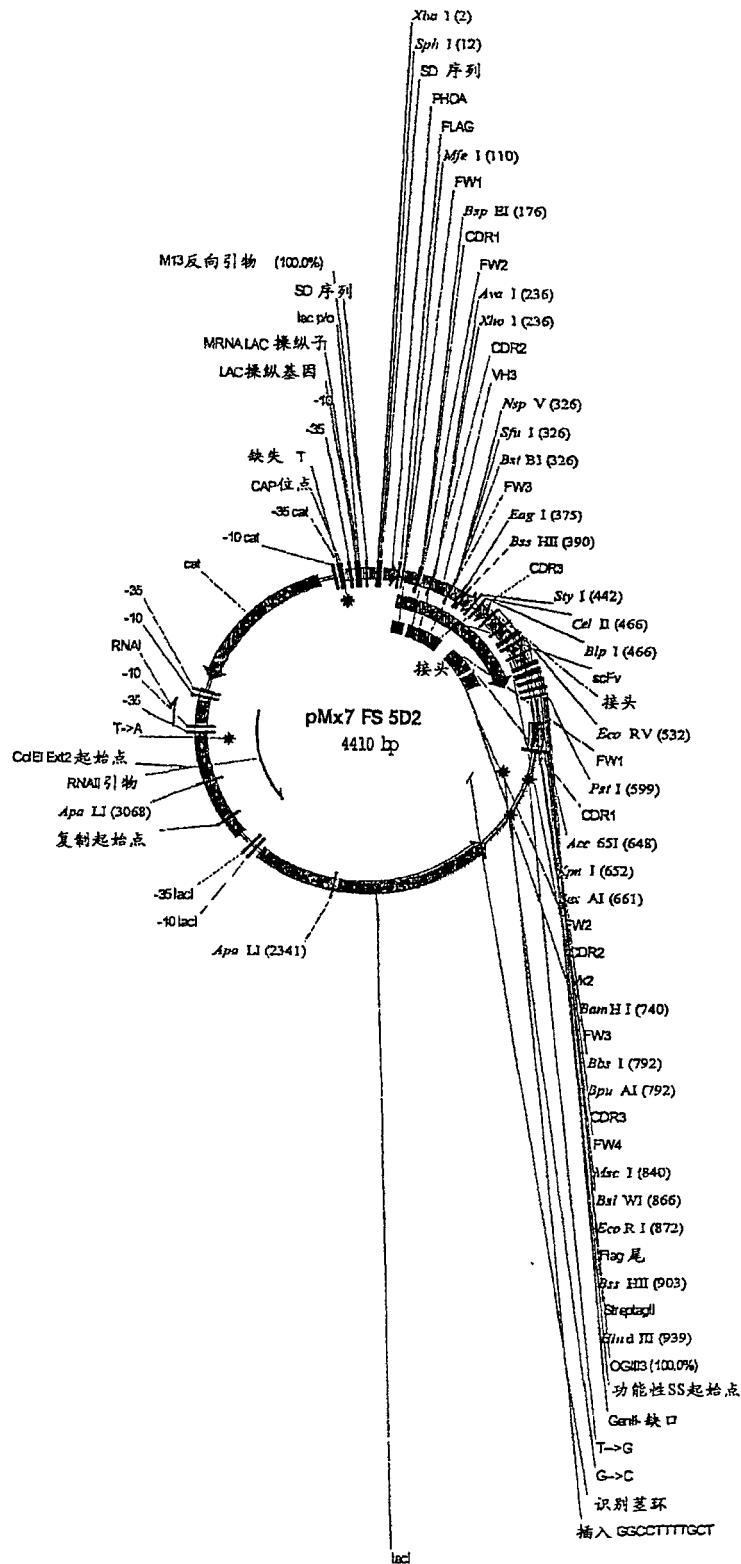


图 12

```

XbaI SphI
-----
1  TCTAGAGCAT GCGTAGGAGA AAATAAAATG AAACAAAGCA CTATTGCACT
   AGATCTCGTA CGCATCCTCT TTTATTTTAC TTTGTTTCGT GATAACGTGA

51  GGCACCTCTTA CCGTTGCTCT TCACCCCTGT TACCAAAGCC GACTACAAAG
   CCGTGAGAAT GGCAACGAGA AGTGGGGACA ATGGTTTCGG CTGATGTTTC

MfeI
-----
101 ATGAAGTGCA ATTGGTGGAA AGCGGCGGCG GCCTGGTGCA ACCGGGCGGC
    TACTTCACGT TAACCACCTT TCGCCGCCGC CGGACCACGT TGGCCCGCCG

BspEI
-----
151 AGCCTGCGTC TGAGCTGCGC GGCCTCCGGA TTTACCTTTA GCAGCTATGC
    TCGGACGCAG ACTCGACGCG CCGGAGGCCT AAATGGAAAT CGTGCATACG

XhoI
-----
AvaI
-----
201 GATGAGCTGG GTGCGCCAAG CCCCTGGGAA GGGTCTCGAG TGGGTGAGCG
    CTACTCGACC CACGCGGTTC GGGGACCCTT CCCAGAGCTC ACCCACTCGC

251 CGATTAGCGG TAGCGGCGGC AGCACCTATT ATGCGGATAG CGTGAAAGGC
    GCTAATCGCC ATCGCCGCCG TCGTGGATAA TACGCCTATC GCACCTTTCCG

BstBI
-----
SfuI
-----
NspV
-----
301 CGTTTTACCA TTTCACGTGA TAATTCGAAA AACACCCTGT ATCTGCAAAT
    GCAAAATGGT AAAGTGCAC TTAAGCTTT TTGTGGGACA TAGACGTTTA

EagI BssHII
-----
351 GAACAGCCTG CGTGCGGAAG ATACGGCCGT GTATTATTGC GCGCGTGTTA
    CTTGTTCGGAC GCACGCCTTC TATGCCGGCA CATAATAACG CGCGACAAT

StyI
-----
401 AGAAGCATT TCTCGTAAG AATTGGTTT ATTATTGGGG CCAAGGCACC
    TCTTCGTAAA AAGAGCATTC TTAACCAAAC TAATAACCC GGTTCGGTGG

```

图 12(续)

```

          BlpI
          ~~~~~
          CelII
          ~~~~~
451  CTGGTGACGG TTAGCTCAGC GGGTGGCGGT TCTGGCGGCG GTGGGAGCGG
     GACCACTGCC AATCGAGTCG CCCACCGCCA AGACCGCCGC CACCCTCGCC

          EcoRV
          ~~~~~
501  TGGCGGTGGT TCTGGCGGTG GTGGTTCCGA TATCGTGATG ACCCAGAGCC
     ACCGCCACCA AGACCGCCAC CACCAAGGCT ATAGCACTAC TGGGTCTCGG

          PstI
          ~~~~~
551  CACTGAGCCT GCCAGTGACT CCGGGCGAGC CTGCGAGCAT TAGCTGCAGA
     GTGACTCGGA CGGTCACTGA GGCCCGCTCG GACGCTCGTA ATCGACGTCT

          KpnI
          ~~~~~
          Acc65I
          ~~~~~
601  AGCAGCCAAA GCCTGCTGCA TAGCAACGGC TATAACTATC TGGATTGGTA
     TCGTCGGTTT CGGACGACGT ATCGTTGCCG ATATTGATAG ACCTAACCAT

          KpnI
          ~~~~~
          Acc65I          SexAI
          ~~~~~
651  CCTTCAAAAA CCAGGTCAA  GCCCGCAGCT ATTAATTTAT CTGGGCAGCA
     GGAAGTTTTT GTTCCAGTTT CGGCGCTCGA TAATTAAATA GACCCGTCGT

          BamHI
          ~~~~~
701  ACCGTGCCAG TGGGGTCCCG GATCGTTTTA GCGGCTCTGG ATCCGGCACC
     TGGCACGGTC ACCCCAGGGC CTAGCAAAT  CGCCGAGACC TAGGCCGTGG

          BpuAI
          ~~~~~
          BbsI
          ~~~~~
751  GATTTTACCC TGAAAATTAG CCGTGTGGAA GCTGAAGACG TGGGCGTGTA
     CTAAATGGG ACTTTTAATC GGCACACCTT CGACTTCTGC ACCCGCACAT

          MscI
          ~~~~~
801  TTATTGCCAG CAGCATTATA CCACCCGCC  GACCTTTGGC CAGGGTACGA
     AATAACGGTC GTCGTAATAT GGTGGGGCGG CTGGAAACCG GTCCCATGCT

```

```

                                BsiWI  EcoRI
                                -----
851  AAGTTGAAAT TAAACGTACG GAATTCGACT ATAAAGATGA CGATGACAAA
     TTCAACTTTA ATTTGCATGC CTTAAGCTGA TATTTCTACT GCTACTGTTT

     BssHII                               HindIII
     -----                               -----
901  GGC GCGCCCGT GGAGCCACCC GCAGTTTGAA AAATGATAAG CTTGACCTGT
     CCGCGCGGCA CCTCGGTGGG CGTCAAACCTT TTTACTATTTC GAACTGGACA
                                           OGIII3 100.0%
                                           =====

951  GAAGTGAAAA ATGGCGCAGA TTGTGCGACA TTTTTTTTTGT CTGCCGTTTA
     CTTCACTTTT TACCGCGTCT AACACGCTGT AAAAAAACA GACGGCAAAT
     OGIII3 100.0%
     =====

1001 ATTAAAGGGG GGGGGGGGCC GGCCTGGGGG GGGGTGTACA TGAAATTGTA
     TAATTTCCCC CCCCCCCCGG CCGGACCCCC CCCACATGT ACTTTAACAT

1051 AACGTTAATA TTTTGTAA AATCGCGTTA AATTTTTGTT AAATCAGCTC
     TTGCAATTAT AAAACAATTT TAAGCGCAAT TTAAAAACA TTTAGTCGAG

1101 ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAG
     TAAAAAATTG GTTATCCGGC TTTAGCCGTT TTAGGGAATA TTTAGTTTTC

1151 AATAGACCGA GATAGGGTTG AGTGTGTGTC CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA
     TTATCTGGCT CTATCCCAAC TCACAACAAG GTCAAACCTT GTTCTCAGGT

1201 CTATTAAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA
     GATAATTTCT TGCACCTGAG GTTGCAGTTT CCCGCTTTTT GGCAGATAGT

1251 GGGCGATGGC CCACTACGAG AACCATCACC CTAATCAAGT TTTTTGGGGT
     CCCGCTACCG GGTGATGCTC TTGGTAGTGG GATTAGTTCA AAAAACCCCA

1301 CGAGGTGCCG TAAAGCACTA AATCGGAACC CTAAAGGGAG CCCCCGATTT
     GCTCCACGGC ATTTCGTGAT TTAGCCTTGG GATTTCCCTC GGGGGCTAAA

1351 AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GCGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA
     TCTCGAACTG CCCCTTTCGG CCGCTTGAC CGCTCTTCC TTCCCTTCTT

1401 AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC
     TCGCTTTCTT CGCCCGCGAT CCCGCGACCG TTCACATCGC CAGTGCAGC

1451 GCGTAACCAC CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTGC
     CGCATTGGTG GTGTGGGCGG CGGAATTAC GCGGCGATGT CCCGCGCAGC

```

1501 TAGACTAGTG TTTAAACCGG ACCGGGGGGG GGCTTAAGTG GGCTGCAAAA  
 ATCTGATCAC AAATTTGGCC TGGCCCCCCC CCGAATTCAC CCGACGTTTT

1551 CAAAACGGCC TCCTGTCAGG AAGCCGCTTT TATCGGGTAG CCTCACTGCC  
 GTTTTGCCGG AGGACAGTCC TTCGGCGAAA ATAGCCCATC GGAGTGACGG

1601 CGCTTTCAG TCGGGAAACC TGTCGTGCCA GCTGCATCAG TGAATCGGCC  
 GCGAAAGGTC AGCCCTTTGG ACAGCACGGT CGACGTAGTC ACTTAGCCGG

1651 AACGCGCGGG GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGAGCCAGGG TGGTTTTTCT  
 TTGCGCGCCC CTCTCCGCCA AACGCATAAC CCTCGGTCCC ACCAAAAAGA

1701 TTTCAACAGT GAGACGGGCA ACAGCTGATT GCCCTTCACC GCCTGGCCCT  
 AAAGTGGTCA CTCTGCCCGT TGTCGACTAA CGGGAAGTGG CCGACCGGGA

1751 GAGAGAGTTG CAGCAAGCGG TCCACGCTGG TTTGCCCCAG CAGGCGAAAA  
 CTCTCTCAAC GTCGTTCCGC AGGTGCGACC AAACGGGGTC GTCCGCTTTT

1801 TCCTGTTTGA TGGTGGTCAG CGGCGGGATA TAACATGAGC TGTCTCGGT  
 AGGACAAACT ACCACCAGTC GCCGCCCTAT ATTGTACTCG ACAGGAGCCA

1851 ATCGTCGTAT CCCACTACCG AGATGTCCGC ACCAACGCGC AGCCCGGACT  
 TAGCAGCATA GGGTGATGGC TCTACAGGCG TGGTTGCGCG TCGGGCCTGA

1901 CGGTAATGGC ACGCATTGCG CCCAGCGCCA TCTGATCGTT GGCAACCAGC  
 GCCATTACCG TGCCTAACGC GGGTCGCGGT AGACTAGCAA CCGTTGGTCCG

1951 ATCGCAGTGG GAACGATGCC CTCATTACGC ATTTGCATGG TTTGTTGAAA  
 TAGCGTCACC CTTGCTACGG GAGTAAGTCG TAAACGTACC AAACAACTTT

2001 ACCGGACATG GCACTCCAGT CGCCTTCCCG TTCCGCTATC GGCTGAATTT  
 TGGCCTGTAC CGTGAGGTCA GCGGAAGGGC AAGGCGATAG CCGACTTAAA

2051 GATTGCGAGT GAGATATTTA TGCCAGCCAG CCAGACGCAG ACGCGCCGAG  
 CTAACGCTCA CTCTATAAAT ACGGTCGGTC GGTCTGCGTC TCGCGGGCTC

2101 ACAGAACTTA ATGGGCCAGC TAACAGCGCG ATTTGCTGGT GGCCCAATGC  
 TGTCTTGAAT TACCCGGTCC ATTGTCGCGC TAAACGACCA CCGGGTTACG

2151 GACCAGATGC TCCACGCCCA GTCGCGTACC GTCCTCATGG GAGAAAATAA  
 CTGGTCTACG AGGTGCGGGT CAGCGCATGG CAGGAGTACC CTCTTTTATT

2201 TACTGTTGAT GGGTGTCTGG TCAGAGACAT CAAGAAATAA CGCCGGAACA  
 ATGACAATA CCCACAGACC AGTCTCTGTA GTTCTTTTATT GCGGCCTTGT

2251 TTAGTGCAGG CAGCTTCCAC AGCAATAGCA TCCTGGTCAT CCAGCGGATA  
 AATCACGTCC GTCGAAGGTG TCGTTATCGT AGGACCAGTA GGTGCGCTAT

ApaLI

2301 GTTAATAATC AGCCCACTGA CACGTTGCGC GAGAAGATTG TGCACCGCCG  
 CAATATATAG TCGGGTGA CTGCAACGCG CTCTTCTAAC ACGTGGCGGC

2351 CTTTACAGGC TTCGACGCCG CTTGCTTCTA CCATCGACAC GACCACGCTG  
 GAAATGTCCG AAGCTGCGGC GAAGCAAGAT GGTAGCTGTG CTGGTGCAGC

2401 GCACCCAGTT GATCGGCGCG AGATTTAATC GCCGCGACAA TTGCGACGG  
 CGTGGGTCAA CTAGCCGCGC TCTAAATTAG CGGCGCTGTT AAACGCTGCC  
 2451 CGCGTGCAGG GCCAGACTGG AGGTGGCAAC GCCAATCAGC AACGACTGTT  
 GCGCACGTCC CGGTCTGACC TCCACCGTTG CGGTTAGTCG TTGCTGACAA  
 2501 TGCCCGCCAG TTGTTGTGCC ACGCGGTTAG GAATGTAATT CAGCTCCGCC  
 ACGGGCGGTC AACAAACAGG TCGGCCAATC CTTACATTAA GTCGAGGCGG  
 2551 ATCGCCGCTT CCACTTTTTT CCGCGTTTTT GCAGAAACGT GGCTGGCCTG  
 TAGCGGCGAA GGTGAAAAG GGCACAAAAG CGTCTTTGCA CCGACCGGAC  
 2601 GTTCACCACG CGGGAAACGG TCTGATAAGA GACACCGGCA TACTCTGCGA  
 CAAGTGGTGC GCCCTTTGCC AGACTATTCT CTGTGGCCGT ATGAGACGCT  
 2651 CATCGTATAA CGTTACTGGT TTCACATTCA CCACCCTGAA TTGACTCTCT  
 GTAGCATATT GCAATGACCA AAGTGTAAGT GGTGGGACTT AACTGAGAGA  
 2701 TCCGGGCGCT ATCATGCCAT ACCGCGAAAG GTTTTGCGCC ATTGATGCT  
 AGGCCGCGA TAGTACGGTA TGGCGCTTTC CAAAACGCGG TAAGCTACGA  
 2751 AGCCATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG  
 TCGGTACACT CGTTTTCCGG TCGTTTTCCG GTCCTTGGCA TTTTTCCGGC  
 2801 CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA  
 GCAACGACCG CAAAAGGTA TCCGAGGCGG GGGGACTGCT CGTAGTGTTT  
 2851 AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA  
 TTAGCTGCGA GTTCAGTCTC CACCGCTTTG GGCTGTCCTG ATATTTCTAT  
 2901 CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC  
 GTCCGCAA GGGGGACCTT CGAGGGAGCA CGCGAGAGGA CAAGGCTGGG  
 2951 TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG  
 ACGGCGAATG GCCTATGGAC AGGCGGAAAG AGGGAAGCCC TTCGCACCGC  
 3001 CTTTCTCATA GCTCAGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTG  
 GAAAGAGTAT CGAGTGGAC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAAGC

ApaLI

~~~~~

3051 CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG  
 GAGGTTGAC CCGACACACG TGCTTGGGGG GCAAGTCGGG CTGGCGACGC  
 3101 CCTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA  
 GGAATAGGCC ATTGATAGCA GAACTCAGGT TGGGCCATTG TGTGCTGAAT  
 3151 TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT  
 AGCGGTGACC GTCGTGGTG ACCATTGTCC TAATCGTCTC GCTCCATACA  
 3201 AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA  
 TCCGCCACGA TGTCTCAAGA ACTTCACCAC CGGATTGATG CCGATGTGAT  
 3251 GAAGAACAGT ATTTGGTATC TGCCTCTGCG TGTAGCCAGT TACCTTCGGA  
 CTTCTTGTC TAAACCATAG ACGCGAGACG ACATCGGTCA ATGGAAGCCT

3301 AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG  
 TTTTCTCAAC CATCGAGAAC TAGGCCGTTT GTTTGGTGGC GACCATCGCC  
 3351 TGGTTTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC  
 ACCAAAAAAA CAAACGTTTCG TCGTCTAATG CCGCTCTTTT TTTCTAGAG  
 3401 AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGGAACGAA  
 TTCTTCTAGG AAAC TAGAAA AGATGCCCCA GACTGCGAGT CACCTTGCTT  
 3451 AACTCACGTT AAGGGATTTT GGT CAGATCT AGCACCAGGC GTTTAAGGGC  
 TTGAGTGCAA TTCCCTAAAA CCAGTCTAGA TCGTGGTCCG CAAATTCCCG  
 3501 ACCAATAACT GCCTTAAAAA AATTACGCC CCGCCTGCCA CTCATCGCAG  
 TGGTTATTGA CGGAATTTTT TTAATGCGGG GCGGGACGGT GAGTAGCGTC  
 3551 TACTGTTGTA ATTCATTAAG CATTCTGCCG ACATGGAAGC CATCACAAC  
 ATGACAACAT TAAGTAATTC GTAAGACGGC TGTACCTTCG GTAGTGTTTG  
 3601 GGCATGATGA ACCTGAATCG CCAGCGGCAT CAGCACCTTG TCGCCTTGCG  
 CCGTACTACT TGGACTTAGC GGTGCGCCGTA GTCGTGGAAC AGCGGAACGC  
 3651 TATAATATTT GCCCATAGTG AAAACGGGGG CGAAGAAGTT GTCCATATTG  
 ATATTATAAA CGGGTATCAC TTTTGCCCCC GCTTCTTCAA CAGGTATAAC  
 3701 GCTACGTTTA AATCAAACT GGTGAAACTC ACCCAGGGAT TGGCTGAGAC  
 CGATGCAAAT TTAGTTTTGA CCACFTTGGAG TGGGTCCCTA ACCGACTCTG  
 3751 GAAAAACATA TTCTCAATA ACCCTTTAGG GAAATAGGCC AGGTTTTTAC  
 CTTTTTGTAT AAGAGTTATT TGGGAAATCC CTTTATCCGG TCCAAAAGTG  
 3801 CGTAACACGC CACATCTTGC GAATATATGT GTAGAAACTG CCGGAAATCG  
 GCATTGTGCG GTGTAGAACG CTTATATACA CATCTTTGAC GGCCTTTAGC  
 3851 TCGTGGTATT CACTCCAGAG CGATGAAAAC GTTTCAGTTT GCTCATGGAA  
 AGCACCATAA GTGAGGTCTC GCTACTTTTG CAAAGTCAA CGAGTACCTT  
 3901 AACGGTGTA CAAGGGTGAA CACTATCCCA TATCACCAGC TCACCGTCTT  
 TTGCCACATT GTTCCACTT GTGATAGGGT ATAGTGGTCG AGTGGCAGAA  
 3951 TCATTGCCAT ACGGAACTCC GGGTGAGCAT TCATCAGGCG GGCAAGAATG  
 AGTAACGGTA TGCCTTGAGG CCCACTCGTA AGTAGTCCGC CCGTTCTTAC  
 4001 TGAATAAAGG CCGGATAAAA CTTGTGCTTA TTTTCTTTA CGGTCTTTAA  
 ACTTATTTCC GGCCTATTTT GAACACGAAT AAAAAGAAAT GCCAGAAATT  
 4051 AAAGGCCGTA ATATCCAGCT GAACGGTCTG GTTATAGGTA CATTGAGCAA  
 TTTCCGGCAT TATAGGTCGA CTTGCCAGAC CAATATCCAT GTAACCTCGTT  
 4101 CTGACTGAAA TGCCTCAAAA TGTTCTTTAC GATGCCATTG GGATATATCA  
 GACTGACTTT ACGGAGTTTT ACAAGAAATG CTACGGTAAC CCTATATAGT  
 4151 ACGGTGGTAT ATCCAGTGAT TTTTCTCTCC ATTTTAGCTT CCTTAGCTCC  
 TGCCACCATA TAGGTCAC TA AAAAAGAGG TAAAATCGAA GGAATCGAGG  
 4201 TGAAAATCTC GATAACTCAA AAAATACGCC CGGTAGTGAT CTTATTTTCAT  
 ACTTTTAGAG CTATTGAGTT TTTTATGCGG GCCATCACTA GAATAAAGTA

4251 TATGGTGAAA GTTGGAACCT CACCCGACGT CTAATGTGAG TTAGCTCACT  
ATACCACTTT CAACCTTGGA GTGGGCTGCA GATTACACTC AATCGAGTGA

4301 CATTAGGCAC CCCAGGCTTT ACACTTTATG CTTCCGGCTC GTATGTTGTG  
GTAATCCGTG GGGTCCGAAA TGTGAAATAC GAAGGCCGAG CATAACAAC

M13 反向引物 100.0%

=====  
4351 TGGAATTGTG AGCGGATAAC AATTTACAC AGGAAACAGC TATGACCATG  
ACCTTAACAC TCGCCTATTG TTAAAGTGTG TCCTTTGTCTG ATACTGGTAC

4401 ATTACGAATT  
TAATGCTTAA

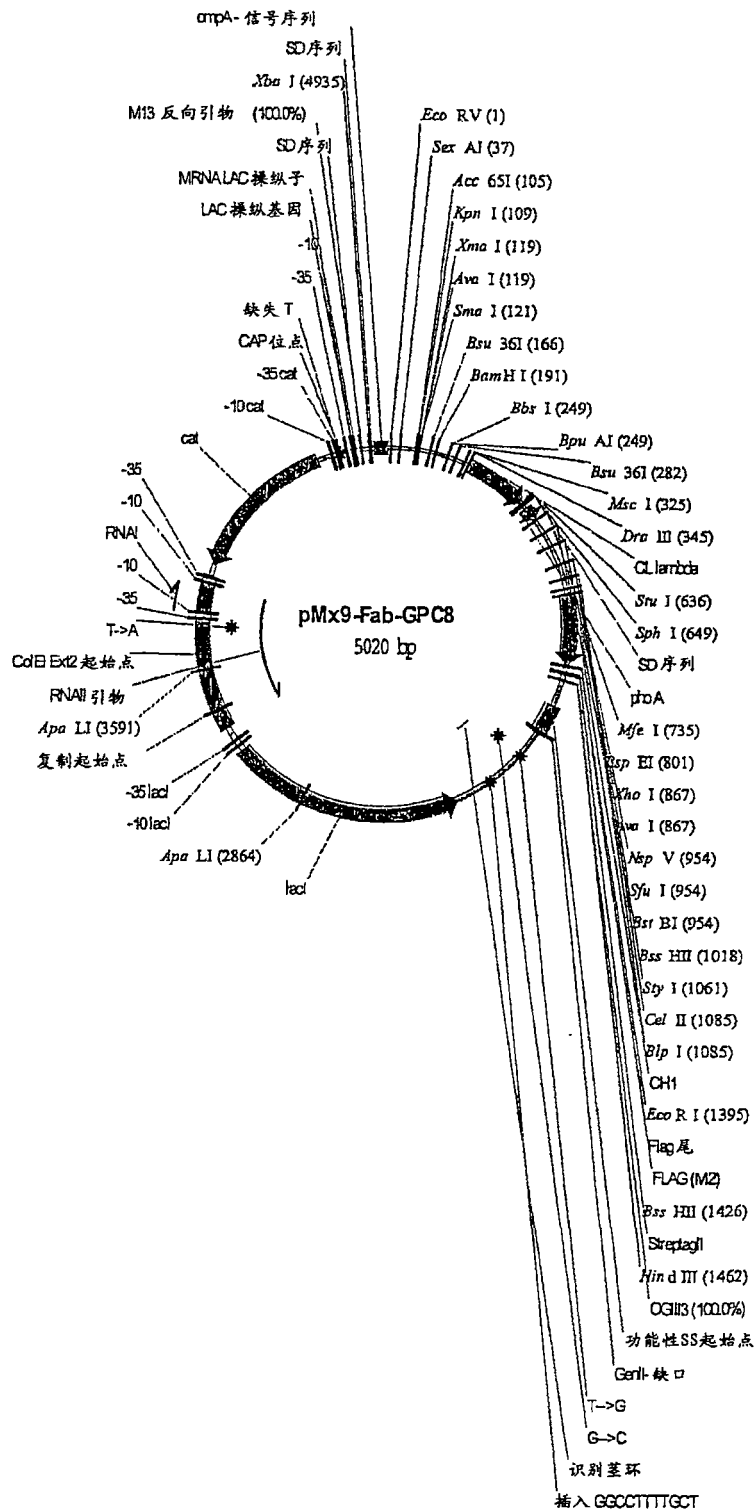


图 13

```

EcoRV                               SexAI
---                               -----
1  ATCGTGCTGA CCCAGCCGCC TTCAGTGAGT GGCGCACCAG GTCAGCGTGT
   TAGCACGACT GGGTCGGCGG AAGTCACTCA CCGCGTGGTC CAGTCGCACA

51  GACCATCTCG TGTAGCGGCA GCAGCAGCAA CATTGGCAGC AACTATGTGA
    CTGGTAGAGC ACATCGCCGT CGTCGTCGTT GTAACCGTCC TTGATACTACT

                               XmaI
                               -----
                               SmaI
                               -----
                               AvaI
                               -----
KpnI
-----
Acc65I
-----
101 GCTGGTACCA GCAGTTGCCG GGGACGGCGC CGAAACTGCT GATTTATGAT
    CGACCATGGT CGTCAACGGG CCCTGCCGCG GCTTTGACGA CTAAATACTA

                               Bsu36I
                               -----
                               BamHI
                               -----
151 AACACCAGC GTCCCTCAGG CGTGCCGGAT CGTTTTAGCG GATCCAAAAG
    TTGTTGGTCC CAGGGAGTCC GCACGGCCTA GCAAATCGC CTAGGTTTTTC

                               BpuAI
                               -----
                               BbsI
                               -----
201 CGGCACCAGC GCGAGCCTTG CGATTACGGG CCTGCAAAGC GAAGACGAAG
    GCGTGGTCCG CGCTCGGAAC GCTAATGCCG GGACGTTTCG CTTCTGCTTC

                               Bsu36I
                               -----
251 CGGATTATTA TTGCCAGAGC TATGACATGC CTCAGGCTGT GTTTGGCGGC
    GCCTAATAAT AACGGTCTCG ATACTGTACG GAGTCCGACA CAAACCGCCG

                               MscI
                               -----
                               DraIII
                               -----
301 GGCACGAAGT FTAACCGTTC TTGGCCAGCC GAAAGCCGCA CCGAGTGTGA
    CCGTGCTTCA AATTGGCAAG AACCGGTCGG CTTTCGGCGT GGCTCACACT

351 CGCTGTTTCC GCCGAGCAGC GAAGAATTGC AGGCGAACAA AGCGACCCTG
    GCGACAAAGG CGGCTCGTCC CTTCTTAACG TCCGCTTGT TCGCTGGGAC

401 GTGTGCCTGA TTAGCGACTT TTATCCGGGA GCCGTGACAG TGGCCTGGAA
    CACACGGACT AATCGCTGAA AATAGGCCCT CGGCACTGTC ACCGGACCTT

451 GGCAGATAGC AGCCCCGTCA AGGCGGGAGT GGAGACCACC ACACCCTCCA
    CCGTCTATCG TCGGGGCAGT TCCGCCCTCA CCTCTGGTGG TGTGGGAGGT

501 AACAAAGCAA CAACAAGTAC GCGGCCAGCA GCTATCTGAG CCTGACGCCT
    TTGTTTCGTT GTTGTTCATG CGCCGGTCGT CGATAGACTC GGACTGCGGA

551 GAGCAGTGGA AGTCCCACAG AAGCTACAGC TGCCAGGTCA CGCATGAGGG
    CTCGTCACCT TCAGGGTGTC TTCGATGTCC ACGGTCCAGT GCGTACTCCC

                               StuI
                               -----
                               SphI
                               -----

```

图 13(续)

```

601  GAGCACCGTG  GAAAAAACCG  TTGCGCCGAC  TGAGGCCTGA  TAAGCATGCG
      CTCGTGGCAC  CTTTTTTGGC  AACCGCGGCTG  ACTCCGGACT  ATTCGTACGC

651  TAGGAGAAAA  TAAATGAAA  CAAAGCACTA  TTGCACTGGC  ACTCTTACCG
      ATCCTCTTTT  ATTTTACTTT  GTTTCGTGAT  AACGTGACCG  TGAGAATGGC

                                     MfeI
                                     ~~~~~~
701  TTGCTCTTCA  CCCCTGTTAC  CAAAGCCCAG  GTGCAATTGA  AAGAAAGCGG
      AACGAGAAGT  GGGGACAATG  GTTTCGGGTC  CACGTTAACT  TTCTTTCGCC

                                               BspEI
                                               ~
751  CCCGGCCCTG  GTGAAACCGA  CCCAAACCCT  GACCCTGACC  TGTACCTTTT
      GGGCCGGGAC  CACTTTGGCT  GGGTTTGGGA  CTGGGACTGG  ACATGGAAAA

BspEI
~~~~~
801  CCGGATTTAG  CCTGTCCACG  TCTGGCGTTG  GCGTGGGCTG  GATTCGCCAG
      GGCCTAAATC  GGACAGGTGC  AGACCGCAAC  CGCACCCGAC  CTAAGCGGTC

                                     XhoI
                                     ~~~~~~
                                     AvaI
                                     ~~~~~~
851  CCGCCTGGGA  AAGCCCTCGA  GTGGCTGGCT  CTGATTGATT  GGGATGATGA
      GCGCGACCCT  TTCGGGAGCT  CACCGACCGA  GACTAACTAA  CCCTACTACT

901  TAAGTATTAT  AGCACCAGCC  TGAAAACGCG  TCTGACCATT  AGCAAAGATA
      ATTCATAATA  TCGTGGTCCG  ACTTTTGCGC  AGACTGGTAA  TCGTTTCTAT

      BstBI
      ~~~~~~
      SfuI
      ~~~~~~
      NspV
      ~~~~~~
951  CTTCGAAAAA  TCAGGTGGTG  CTGACTATGA  CCAACATGGA  CCCGGTGGAT
      GAAGCTTTTT  AGTCCACCAC  GACTGATACT  GGTTGTACCT  GGGCCACCIA

                                     BssHII
                                     ~~~~~~
1001  ACGGCCACCT  ATTATTGCGC  GCGTTCTCCT  CGTTATCGTG  GTGCTTTTGA
      TGCCGGTGGA  TAATAACGCG  CGCAAGAGGA  GCAATAGCAC  CACGAAACT

                                               BlnI
                                               ~~~~~~
                                               CelII
                                               ~~~~~~
      StyI
      ~~~~~~
1051  TTATTGGGGC  CAAGGCACCC  TGGTGACGGT  TAGCTCAGCG  TCGACCAAAG
      AATAACCCCG  GTTCCGTGGG  ACCACTGCCA  ATCGAGTCGC  AGCTGGTTTC

1101  GTCCAAGCGT  GTTTCGGCTG  GCTCCGAGCA  GCAAAAGCAC  CAGCGGCGGC
      CAGGTTCCGA  CAAAGGCGAC  CGAGGCTCGT  CGTTTTCCGTG  GTCGCCCGCC

1151  ACGGCTGCCC  TGGGCTGCCT  GGTAAAGAT  TATTTCCCGG  AACCAGTCAC

```

```

      TGCCGACGGG ACCCGACGGA CCAATTTCTA ATAAAGGGCC TTGGTCAGTG
1201 CGTGAGCTGG AACAGCGGGG CGCTGACCAG CGGCCTGCAT ACCTTTCGGG
      GCACTCGACC TTGTCGCCCC GCGACTGGTC GCCGCACGTA TGGAAAGGCC
1251 CCGTGCTGCA AAGCAGCGGC CTGTATAGCC TGAGCAGCGT TGTGACCGTG
      GCCACGACGT TTCGTCGCCG GACATATCGG ACTCGTCGCA ACACTGGCAC
1301 CCGAGCAGCA GCTTAGGCAC TCAGACCTAT ATTTGCAACG TGAACCATAA
      GGCTCGTCGT CGAATCCGTG AGTCTGGATA TAAACGTTGC ACTTGGTATT

                                          EcoRI
                                          -----
1351 ACCGAGCAAC ACCAAAGTGG ATAAAAAAGT GGAACCGAAA AGCGAATTCG
      TGGCTCGTTG TGTTTTACAC TATTTTTTCA CCTTGGCTTT TCGCTTAAGC

                                          BssHII
                                          -----
1401 ACTATAAAGA TGACGATGAC AAAGGCGCGC CGTGGAGCCA CCCGCACTTT
      TGATATTTCT ACTGCTACTG TTTCCGCGCG GCACCTCGGT GGGCGTCAAA

      HindIII
      -----
1451 GAAAAATGAT AAGCTTGACC TGTGAAGTGA AAAATGGCGC AGATTGTGCG
      CTTTTTACTA TTCGAACTGG ACACCTCACT TTTTACCGCG TCTAACACGC
      OGIII3 100.0%
      =====
1501 ACATTTTTTT TGTCTGCCGT TTAATTAAG GGGGGGGGGG GCCGGCCTGG
      TGTAATAAAA ACAGACGGCA AATTAATTTT CCCCCCCCCC CGGCCGGACC
1551 GGGGGGGTGT ACATGAAATT GTAAACGTTA ATATTTTGTT AAAATTCGCG
      CCCCCCACA TGTACTTTAA CATTGCAAT TATAAAACA TTTTAAGCGC
1601 TTAAATTTTT GTTAAATCAG CTCATTTTTT AACCAATAGG CCGAAATCGG
      AATTTAAAA CAATTTAGTC GAGTAAAAA TTGGTTATCC GGCTTTAGCC
1651 CAAAATCCCT TATAAATCAA AAGAATAGAC CGAGATAGGG TTGAGTGTGG
      GTTTTAGGGA ATATTTAGTT TTCTTATCTG GCTCTATCCC AACTCACAA
1701 TTCCAGTTTG GAACAAGAGT CCACTATTAA AGAACGTGGA CTCCAACGTC
      AAGGTCAAAC CTTGTTCTCA GGTGATAATT TCTTGCACCT GAGGTTGCAG
1751 AAAGGGCGAA AAACCGTCTA TCAGGGCGAT GGCCCACTAC GAGAACCATC
      TTTCCCGCTT TTTGGCAGAT AGTCCCGCTA CCGGGTGATG CTCTTGGTAG
1801 ACCCTAATCA AGTTTTTTGG GGTGAGGTG CCGTAAAGCA CTAAATCGGA
      TGGGATTAGT TCAAAAAACC CCAGCTCCAC GGCATTTTCT GATTTAGCCT
1851 ACCCTAAAGG GAGCCCCCGA TTTAGAGCTT GACGGGGAAA GCCGGCGAAC
      TGGGATTTCC CTCGGGGGCT AAATCTCGAA CTGCCCTTTT CGGCCGCTTG
1901 GTGGCGAGAA AGGAAGGGAA GAAAGCGAAA GGAGCGGGCG CTAGGGCGCT
      CACCGCTCTT TCCTTCCCTT CTTTGCCTTT CCTCGCCCCG GATCCCCGCA
1951 GGCAAGTGTA GCGGTCACGC TGCGCCTAAC CACCACACCC GCCGCGCTTA
      CCGTTCACAT CGCCAGTGCG ACGCGCATTG GTGGTGTGGG CGGCCGGAAT

```

2001 ATGCGCCGCT ACAGGGCGCG TGCTAGACTA GTGTTTAAAC CGGACCGGGG  
 TACGCGGCGA TGTCCCAGCG ACATCTGAT CACAAATTG GCCTGGCCCC

2051 GGGGGCTTAA GTGGGCTGCA AAACAAAACG GCCTCCTGTC AGGAAGCCGC  
 CCCCCGAATT CACCCGACGT TTTGTTTTGC CGGAGGACAG TCCTTCGGCG

2101 TTTTATCGGG TAGCCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA ACCTGTCGTG  
 AAAATAGCCC ATCGGAGTGA CGGGCGAAAG GTCAGCCCTT TGGACAGCAC

2151 CCAGCTGCAT CAGTGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTCGCGTA  
 GGTGACGTA GTCACCTAGC CGGTTGCGCG CCCCTCTCCG CCAAACGCAT

2201 TTGGGAGCCA GGGTGGTTTT TCTTTTCACC AGTGAGACGG GCAACAGCTG  
 AACCTCGGT CCCACCAAAA AGAAAAGTGG TCACTCTGCC CGTTGTCGAC

2251 ATTGCCCTTC ACCGCCTGGC CCTGAGAGAG TTGCAGCAAG CGGTCCACGC  
 TAACGGGAAG TGGCGGACCG GGACTCTCTC AACGTCGTTT GCCAGGTGCG

2301 TGGTTTGCCC CAGCAGGCGA AAATCCTGTT TGATGGTGGT CAGCGGCGGG  
 ACCAAACGGG GTCGTCCGCT TTTAGGACAA ACTACCACCA GTCGCGGCC

2351 ATATAACATG AGCTGTCTC GGTATCGTCG TATCCCACTA CCGAGATGTC  
 TATATTGTAC TCGACAGGAG CCATAGCAGC ATAGGGTGAT GGCTCTACAG

2401 CGCACCAACG CGCAGCCCGG ACTCGGTAAT GGCACGCATT GCGCCAGCG  
 GCGTGGTTGC GCGTCGGGCC TGAGCCATTA CCGTGCGTAA CGCGGGTCCG

2451 CCATCTGATC GTTGGCAACC AGCATCGCAG TGGGAACGAT GCCCTCATT  
 GGTAGACTAG CAACCGTTGG TCGTAGCGTC ACCCTTGCTA CGGGAGTAAG

2501 AGCATTTGCA TGGTTTGTTG AAAACCGGAC ATGGCACTCC AGTCGCCTTC  
 TCGTAAACGT ACCAAACAAC TTTTGGCCTG TACCGTGAGG TCAGCGGAAG

2551 CCGTTCGCT ATCGGCTGAA TTTGATTGCG AGTGAGATAT TTATGCCAGC  
 GGCAAGGCGA TAGCCGACTT AAATAACGC TCACTCTATA AATACGGTCCG

2601 CAGCCAGACG CAGACGCGCC GAGACAGAAC TTAATGGGCC AGCTAACAGC  
 GTCGGTCTGC GTCTGCGCGG CTCTGTCTTG AATTACCCGG TCGATTGTCCG

2651 GCGATTTGCT GGTGGCCCAA TGCACCAGA TGCTCCACGC CCAGTCGCGT  
 CGCTAAACGA CCACCGGTT ACGCTGGTCT ACGAGGTGCG GGTGAGCGCA

2701 ACCGTCCTCA TGGGAGAAAA TAATACTGTT GATGGGTGTC TGGTCAGAGA  
 TGGCAGGAGT ACCCTCTTTT ATTATGACAA CTACCCACAG ACCAGTCTCT

2751 CATCAAGAAA TAACGCCGGA ACATTAGTGC AGGCAGCTTC CACAGCAATA  
 GTAGTTCTTT ATTGCGGCCT TGTAATCAGG TCCGTGGAAG GTGTGCTTAT

2801 GCATCCTGGT CATCCAGCGG ATAGTTAATA ATCAGCCAC TGACACGTTG  
 CGTAGGACCA GTAGGTCGCC TATCAATTAT TAGTCGGGTG ACTGTGCAAC

ApaLI  
 ~~~~~

2851 CGCGAGAAGA TTGTGCACCG CCGCTTTACA GGCTTCGACG CCGCTTCGTT  
 CGCTCTTCT AACACGTGGC GGCAGAAATGT CCGAAGCTGC GGCAGGCAA

2901 CTACCATCGA CACGACCACG CTGGCACCCA GTTGATCGGC GCGAGATTTA  
 GATGGTAGCT GTGCTGGTGC GACCGTGGGT CAACTAGCCG CGCTCTAAAT  
 2951 ATCGCCGCGA CAATTTGCGA CGGCGCGTGC AGGGCCAGAC TGGAGGTGGC  
 TAGCGGCGCT GTTAAACGCT GCCGCGCACC TCCCAGTCTG ACCTCCACCG  
 3001 AACGCCAATC AGCAACGACT GTTTGCCCGC CAGTTGTTGT GCCACGCGGT  
 TTGCGGTTAG TCGTTGCTGA CAAACGGGCG GTCAACAACA CGGTGCGCCA  
 3051 TAGGAATGTA ATTCAGCTCC GCCATCGCCG CPTCCACTTT TTCCCGCGTT  
 ATCCTTACAT TAAGTCGAGG CCGTAGCCGC GAAGGTGAAA AAGGGCGCAA  
 3101 TTCGCAGAAA CGTGGCTGGC CTGGTTCACC ACGCGGGAAA CGGTCTGATA  
 AAGCGTCTTT GCACCGACCG GACCAAGTGG TCGGCCCTTT GCCAGACTAT  
 3151 AGAGACACCG GCATACTCTG CGACATCGTA TAACGTTACT GGTTCACAT  
 TCTCTGTGGC CGTATGAGAC GCTGTAGCAT ATTGCAATGA CCAAAGTGTA  
 3201 TCACCACCTT GAATTGACTC TCTTCCGGGC GCTATCATGC CATACCGCGA  
 AGTGGTGGGA CTTAACTGAG AGAAGGCCCG CGATAGTACG GTATGGCGCT  
 3251 AAGGTTTTGC GCCATTCGAT GCTAGCCATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA  
 TTCCAAAACG CGGTAAGCTA CGATCGGTAC ACTCGTTTTT CCGTCTTTTT  
 3301 GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GCGTTTTTTC CATAGGCTCC  
 CCGGTCTTTG GCATTTTTTC GGCACAACGA CCGCAAAAAG GTATCCGAGG  
 3351 GCCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA  
 CGGGGGGACT GCTCGTAGTG TTTTITAGCTG CGAGTTCAGT CTCACCCGCT  
 3401 AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT  
 TTGGGCTGTC CTGATATTTT TATGGTCCGC AAAGGGGGAC CTTCGAGGGA  
 3451 CGTGCCTCTT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCCT  
 GCACGCGAGA GGACAAGGCT GGGACGGCGA ATGGCCTATG GACAGGCGGA  
 3501 TTCTCCCTTC GGGAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCAGC CTGTAGGTAT  
 AAGAGGGAAG CCCTTCGCAC CGCGAAAGAG TATCGAGTGC GACATCCATA  
  

ApaLI  
-----

 3551 CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC  
 GAGTCAAGCC ACATCCAGCA AGCGAGGTTT GACCCGACAC ACGTGCTTGG  
 3601 CCCCCTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CCGTAACTAT CGTCTTGAGT  
 GGGGCAAGTC GGGCTGGCGA CGCGGAATAG GCCATTGATA GCAGAACTCA  
 3651 CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC  
 GGTGCGGCA TTCTGTGCTG AATAGCGGTG ACCGTGCTCG GTGACCATFG  
 3701 AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG  
 TCCTAATCGT CTCGCTCCAT ACATCCGCCA CGATGTCTCA AGAACTTCAC  
 3751 GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGAAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC  
 CACCGGATTG ATGCCGATGT GATCTTCTTG TCATAAACCA TAGACGCGAG  
 3801 TGCTGTAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC

ACGACATCGG TCAATGGAAG CCTTTTTCTC AACCATCGAG AACTAGGCCG  
 3851 AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT  
 TTTGTTTGGT GCGGACCATC GCCACCAAAA AAACAAACGT TCGTCGTCTA  
 3901 TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG  
 ATGCGCGTCT TTTTTTCCTA GAGTTCTTCT AGGAAACTAG AAAAGATGCC  
 3951 GGTCTGACGC TCAGTGG AAC GAAAACCTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCAGA  
 CCAGACTGCG AGTCACCTTG CTTTTGAGTG CAATTCCTA AAACCAGTCT  
 4001 TCTAGCACCA GCGGTTTAAG GGCACCAATA ACTGCCTTAA AAAAATTACG  
 AGATCGTGGT CCGCAAATC CCGTGGTTAT TGACGGAATT TTTTTAATGC  
 4051 CCCC GCCCTG CCACTCATCG CAGTACTGTT GTAATTCATT AAGCATTCTG  
 GGGCGGGAC GGTGAGTAGC GTCATGACAA CATTAGTAA TTCGTAAGAC  
 4101 CCGACATGGA AGCCATCACA AACGGCATGA TGAACCTGAA TCGCCAGCGG  
 GGCTGTACCT TCGGTAGTGT TTGCCGTACT ACTTGGACTT AGCGGTGCGC  
 4151 CATCAGCACC TTGTCGCCTT GCGTATAATA TTTGCCATA GTGAAAACGG  
 GTAGTCGTGG AACAGCGGAA CGCATATTAT AAACGGGTAT CACTTTTGCC  
 4201 GGGCGAAGAA GTTGTCCATA TTGGCTACGT TTAAATCAA ACTGGTGAAA  
 CCCGCTTCTT CAACAGGTAT AACCGATGCA AATTTAGTTT TGACCACCTT  
 4251 CTCACCCAGG GATTGGCTGA GACGAAAAAC ATATTCTCAA TAAACCTTTT  
 GAGTGGGTCC CTAACCGACT CTGCTTTTTG TATAAGAGTT ATTTGGGAAA  
 4301 AGGGAAATAG GCCAGSTTTT CACCGTAACA CGCCACATCT TGCGAATATA  
 TCCCTTTATC CGGTCCAAAA GTGGCATTGT GCGGTGTAGA ACGCTTATAT  
 4351 TGTGTAGAAA CTGCCGAAA TCGTCGTGGT ATTCACTCCA GAGCGATGAA  
 ACACATCTTT GACGGCCTTT AGCAGCACCA TAAGTGAGGT CTCGCTACTT  
 4401 AACGTTTCAG TTTGCTCATG GAAAACGGTG TAACAAGGGT GAACACTATC  
 TTGCAAAGTC AAACGAGTAC CTTTTGCCAC ATTGTTCCCA CTTGTGATAG  
 4451 CCATATCACC AGCTCACCGT CTTTCATTGC CATA CGGAAC TCCGGGTGAG  
 GGTATAGTGG TCGAGTGGCA GAAAGTAACG GTATGCCTTG AGGCCACTC  
 4501 CATTCAATCAG GCGGGCAAGA ATGTGAATAA AGGCCGGATA AAAC TTGTGC  
 GTAAGTAGTC CGCCCTTCT TACACTTATT TCCGGCCTAT TTTGAACACG  
 4551 TTATTTTTCT TTACGGTCTT TAAAAAGGCC GTAATATCCA GCTGAACGGT  
 AATAAAAAGA AATGCCAGAA ATTTTCCGG CATTATAGGT CGACTTGCCA  
 4601 CTGGTTATAG GTACATTGAG CAACTGACTG AAATGCCTCA AAATGTTCTT  
 GACCAATATC CATGTAAC TC GTTACTGAC TTTACGGAGT TTTACAAGAA  
 4651 TACGATGCCA TTGGGATATA TCAACGGTGG TATATCCAGT GATTTTTTTC  
 ATGCTACGGT AACCTATAT AGTTGCCACC ATATAGGTCA CTAAAAAAG  
 4701 TCCATTTTAG CTTCCTTAGC TCCTGAAAAT CTCGATAACT CAAAAATAC  
 AGGTAAAATC GAAGGAATCG AGGACTTTTA GAGCTATTGA GTTTTTTATG  
 4751 GCCCGGTAGT GATCTTATTT CATTATGGTG AAAGTTGGAA CCTCACC CGA

```

CGGGCCATCA CTAGAATAAA GTAATACCAC TTTCAACCTT GGAGTGGGCT
4801 CGTCTAATGT GAGTTAGCTC ACTCATTAGG CACCCCAGGC TTTACACTTT
GCAGATTACA CTCAATCGAG TGAGTAATCC GTGGGGTCCG AAATGTGAAA
4851 ATGCTTCCGG CTCGTATGTT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACAAATTTCA
TACGAAGGCC GAGCATACAA CACACCTTAA CACTCGCCTA TTGTTAAAGT

M13 反向引物 100.0% XbaI
=====
4901 CACAGGAAAC AGCTATGACC ATGATTACGA ATTTCTAGAT AACGAGGGCA
GTGTCCTTTG TCGATACTGG TACTAATGCT TAAAGATCTA TTGCTCCCCT
4951 AAAAATGAAA AAGACAGCTA TCGCGATTGC AGTGGCACTG GCTGGTTTCG
TTTTTACTTT TTCTGTCGAT AGCGCTAACG TCACCGTGAC CGACCAAAGC

EcoRV
~~~
5001 CTACCGTAGC GCAGGCCGAT
GATGGCATCG CGTCCGGCTA

```

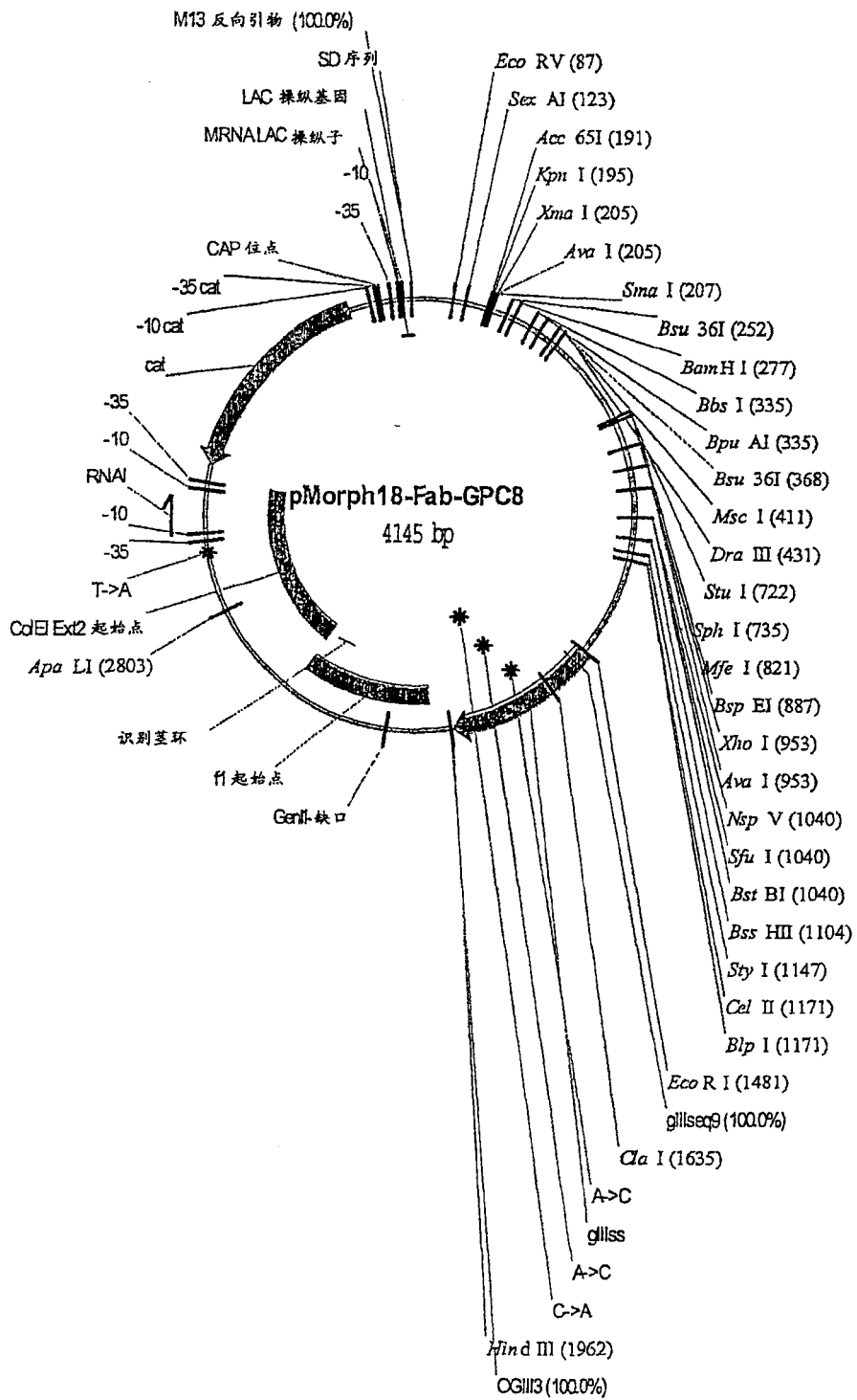


图 14

```

1 TCAGATAACG AGGGCAAAAA ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG
  AGTCTATTGC TCCCCTTTTT TACTTTTTCT GTCGATAGCG CTAACGTCAC

                                     EcoRV
                                     -----
51 GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTAGCGCAG GCCGATATCG TGCTGACCCA
  CGTGACCGAC CAAAGCGATG GCATCGCGTC CGGCTATAGC ACGACTGGGT

                                     SexAI
                                     -----
101 GCCGCCTTCA GTGAGTGGCG CACCAGGTCA GCGTGTGACC ATCTCGTGTA
  CGGCGGAAGT CACTCACCGC GTGGTCCAGT CGCACACTGG TAGAGCACAT

                                     KpnI
                                     -----
                                     Acc65I
                                     -----
151 GCGGCAGCAG CAGCAACATT GGCAGCAACT ATGTGAGCTG GTACCAGCAG
  CGCCGTCGTC GTCGTTGTAA CCGTCGTTGA TACACTCGAC CATGGTCGTC

      XmaI
      -----
      SmaI
      -----
      AvaI
      -----
                                     Bsu36I
                                     ~
201 TTGCCCCGGA CGGCGCCGAA ACTGCTGATT TATGATAACA ACCAGCGTCC
  AACGGGCCCT GCCGCGGCTT TGACGACTAA ATACTATTGT TGGTCGCAGG

      Bsu36I
      -----
                                     BamHI
                                     -----
251 CTCAGGCGTG CCGGATCGTT TTAGCGGATC CAAAAGCGGC ACCAGCGCGA
  GAGTCCGCAC GGCCTAGCAA AATCGCCTAG GTTTTCGCCG TGGTCGCGCT

                                     BpuAI
                                     -----
                                     BbsI
                                     -----
301 GCCTTGCGAT TACGGGCTTG CAAAGCGAAG ACGAAGCGGA TTATTATTGC
  CGGAACGCTA ATGCCCGGAC GTTTCGCTTC TGCTTCGCCT AATAATAACG

                                     Bsu36I
                                     -----
351 CAGAGCTATG ACATGCCTCA GGCTGTGTTT GCGGCGGCA CGAAGTTTAA
  GTCTCGATAC TGTACGGAGT CCGACACAAA CCGCCGCCGT GCTTCAAATT

      MscI
      -----
                                     DraIII
                                     -----
401 CCGTTCTTGG CCAGCCGAAA GCCGCACCGA GTGTGACGCT GTTCCGCCG
  GGCAAGAACC GGTGGGCTTT CCGCGTGGCT CACTGCGA CAAAGGCGGC

451 AGCAGCGAAG AATTGCAGGC GAACAAAGCG ACCCTGGTGT GCCTGATTAG
  TCGTCGCTTC TTAACGTCCG CTTGTTTCGC TGGGACCACA CGGACTAATC

501 CGACTTTTAT CCGGGAGCCG TGACAGTGGC CTGGAAGGCA GATAGCAGCC

```

图 14(续)

GCTGAAAATA GGCCTCGGC ACTGTCACCG GACCTTCCGT CTATCGTCGG

551 CCGTCAAGGC GGGAGTGGAG ACCACCACAC CCTCCAAACA AAGCAACAAC  
GGCAGTCCG CCCTCACCTC TGGTGGTGTG GGAGGTTTGT TTCGTTGTTG

601 AAGTACGCGG CCAGCAGCTA TCTGAGCCTG ACGCCTGAGC AGTGAAGTC  
TTCATGCGCC GGTGTCGAT AGACTCGGAC TCGGACTCG TCACCTTCAG

651 CCACAGAAGC TACAGCTGCC AGGTCACGCA TGAGGGGAGC ACCGTGGAAA  
GGTGTCTTCG ATGTCGACGG TCCAGTGCCT ACTCCCCTCG TGGCACCTTT

StuI                      SphI  
-----

701 AAACCGTTGC GCCGACTGAG GCCTGATAAG CATGCGTAGG AGAAAATAAA  
TTTGGCAACG CGGCTGACTC CGGACTATTC GTACGCATCC TCTTTTATTT

751 ATGAAACAAA GCACTATTGC ACTGGCACTC TTACCGTTGC TCTTCACCCC  
TACTTTGTTT CGTGATAACG TGACCGTGAG AATGGCAACG AGAAGTGGGG

MfeI  
-----

801 TGTTACCAA GCCCAGGTGC AATGAAAGA AAGCGGCCCG GCCCTGGTGA  
ACAATGGTTT CGGGTCCACG TTAACCTTCT TTCGCCGGGC CGGGACCACT

BspEI  
-----

851 AACCGACCCA AACCTGACC CTGACCTGTA CCTTTTCCGG ATTTAGCCTG  
TTGGCTGGGT TTGGGACTGG GACTGGACAT GGAAAAGGCC TAAATCGGAC

901 TCCACGTCTG GCGTTGGCGT GGGCTGGATT CGCCAGCCGC CTGGGAAAGC  
AGGTGCAGAC CGCAACCGCA CCCGACCTAA GCGGTCGGCG GACCCTTTCG

XhoI  
-----  
AvaI  
-----

951 CCTCGAGTGG CTGGCTCTGA TTGATTGGGA TGATGATAAG TATTATAGCA  
GGAGCTCACC GACCGAGACT AACTAACCCCT ACTACTATTC ATAATATCGT

BstBI  
-----  
SfuI  
-----  
NspV  
-----

1001 CCAGCCTGAA AACCGCTCTG ACCATTAGCA AAGATACTTC GAAAAATCAG  
GGTCGGACTT TTGCGCAGAC TGGAATCGT TTCTATGAAG CTTTTTAGTC

1051 GTGGTGCTGA CTATGACCAA CATGGACCCG GTGGATACGG CCACCTATTA  
CACCACGACT GATACTGGTT GTACCTGGGC CACCTATGCC GGTGGATAAT

BssHII                      StyI  
-----

1101 TTGCGCGCGT TCTCCTCGTT ATCGTGGTGC TTTTGATTAT TGGGGCCAAG  
AACGCGCGCA AGAGGAGCAA TAGCACCACG AAAACTAATA ACCCCGGTTC

BlnI

```

                ~~~~~
                CelII
                ~~~~~
StyI
~
1151 GCACCCTGGT GACGGTTAGC TCAGCGTCGA CCAAAGGTCC AAGCGTGTTT
    CGTGGGACCA CTGCCAATCG AGTCGCAGCT GGTTCACAGG TTCGCACAAA

1201 CCGCTGGCTC CGAGCAGCAA AAGCACCAGC GGCAGCACGG CTGCCCTGGG
    GGCAGCCGAG GCTCGTCGTT TTCGTGGTCC CCGCCGTGCC GACGGGACCC

1251 CTGCCTGGTT AAAGATTATT TCCCGGAACC AGTCACCGTG AGCTGGAACA
    GACGGACCAA TTTCTAATAA AGGGCCTTGG TCAGTGGCAC TCGACCTTGT

1301 GCGGGGCGCT GACCAGCGGC GTGCATACCT TTCCGGCCGGT GCTGCAAAGC
    CGCCCCGCGA CTGGTCCGCG CACGTATGGA AAGGCCGCCA CGACGTTTCG

1351 AGCGGCCTGT ATAGCCTGAG CAGCGTTGTG ACCGTGCCGA GCAGCAGCTT
    TCGCCGGACA TATCGGACTC GTCGCAACAC TGGCACGGCT CGTCGTCGAA

1401 AGGCACTCAG ACCTATATTT GCAACGTGAA CCATAAACCG AGCAACACCA
    TCCGTGAGTC TGGATATAAA CGTTGCACTT GGTATTTGGC TCGTTGTGGT

                EcoRI
                ~~~~~
1451 AAGTGGATAA AAAAGTGGAA CCGAAAAGCG AATTCCGGGGG AGGGAGCGGG
    TTCACCTATT TTTTCACCTT GGCTTTTTCG TTAAGCCCCC TCCCTCGCCC

1501 AGCGGTGATT TTGATTATGA AAAGATGGCA AACGCTAATA AGGGGGCTAT
    TCGCCACTAA AACTAATACT TTTCTACCGT TTGCGATTAT TCCCCGATA
                gIIIseq9 100.0%
                =====

1551 GACCGAAAAT GCCGATGAAA ACGCGCTACA GTCTGACGCT AAAGGCAAAC
    CTGGCTTTTA CGGCTACTTT TGCGCGATGT CAGACTGCGA TTTCCGTTTG

                ClaI
                ~~~~~
1601 TTGATTCTGT CGCTACTGAT TACGGTGCTG CTATCGATGG TTTCATTGGT
    AACTAAGACA GCGATGACTA ATGCCACGAC GATAGCTACC AAAGTAACCA

1651 GACGTTTCCG GCCTTGCTAA TGGTAATGGT GCTACTGGTG ATTTTGCTGG
    CTGCAAAGGC CGGAACGATT ACCATTACCA CGATGACCAC TAAAACGACC

1701 CTCTAATTCC CAAATGGCTC AAGTCGCTGA CGGTGATAAT TCACCTTTAA
    GAGATTAAGG GTTTACCGAG TTCAGCCACT GCCACTATTA AGTGGAAATT

1751 TGAATAATTT CCGTCAATAT TTACCTTCCC TCCCTCAATC GGTGAAATGT
    ACTTATTAAA GGCAGTTATA AATGGAAGGG AGGGAGTTAG CCAACTTACA

1801 CGCCCTTTTG TCTTTGGCGC TGGTAAACCA TATGAATTTT CTATTGATTG
    GCGGGAAAAC AGAAACCGCG ACCATTTGGT ATACTTAAAA GATAACTAAC

1851 TGACAAAATA AACTTATTCC GTGGTGTCTT TCGGTTTCTT TTATATGTTG
    ACTGTTTTAT TTGAATAAGG CACCACAGAA ACGCAAAGAA AATATACAAC

1901 CCACCTTTAT GTATGTATTT TCTACGTTTG CTAACATACT GCGTAATAAG
    GGTGGAAATA CATACATAAA AGATGCAAAC GATTGTATGA CGCATTATTC

```

HindIII  
-----

1951 GAGTCTTGAT AAGCTTGACC TGTGAAGTGA AAAATGGCGC AGATTGTGCG  
CTCAGAACTA TTCGAACTGG ACACTTCACT TTTTACCGCG TCTAACACGC  
OGIII3 100.0%  
=====

2001 ACATTTTTTT TGTCTGCCGT TTAATGAAAT TGTAACGTT AATATTTTGT  
TGTAACAAAA ACAGACGGCA AATTACTTTA ACATTTGCAA TTATAAAACA

2051 TAAAATTTCG GTTAAATTTT TGTTAAATCA GCTCATTTTT TAACCAATAG  
ATTTTAAGCG CAATTTAAAA ACAATTTAGT CGAGTAAAA ATTGGTTATC

2101 GCCGAAATCG GCAAAATCCC TTATAAATCA AAAGAATAGA CCGAGATAGG  
CGGCTTTAGC CGTTTTAGGG AATATTTAGT TTTCTTATCT GGCTCTATCC

2151 GTTGAGTGTT GTTCCAGTTT GGAACAAGAG TCCACTATTA AAGAACGTGG  
CAACTCACAA CAAGGTCAA CCTTGTTC CAGGTGATAAT TTCTTGACC

2201 ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT ATCAGGGCGA TGGCCCACTA  
TGAGGTTGCA GTTTCCCGCT TTTTGGCAGA TAGTCCCGCT ACCGGGTGAT

2251 CGAGAACCAT CACCCTAATC AAGTTTTTTG GGGTCGAGGT GCCGTAAAGC  
GCTCTTGTA GTGGGATTAG TTCAAAAAC CCCAGCTCCA CGGCATTTTC

2301 ACTAAATCGG AACCCTAAAG GGAGCCCCCG APTTAGAGCT TGACGGGGAA  
TGATTTAGCC TTGGGATTC CCTCGGGGGC TAAATCTCGA ACTGCCCTT

2351 AGCCGGCGAA CGTGGCGAGA AAGGAAGGGA AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC  
TCGGCCGCTT GCACCGCTCT TTCTTCCCT TCTTTCGCTT TCCTCGCCCG

2401 GCTAGGGCGC TGGCAAGTGT AGCGGTCACG CTGCGCGTAA CCACCACACC  
CGATCCCGCG ACCGTTTACA TCGCCAGTGC GACGCGCATT GGTGGTGTGG

2451 CGCCGCGCTT AATGCGCCGC TACAGGGCGC GTGCTAGCCA TGTGAGCAAA  
GCGGCGCGAA TTACGCGGCG ATGTCCCGCG CACGATCGGT AACTCGTTTT

2501 AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT  
TCCGCTCGTT TTCCGTCCT TGGCATTTTT CCGGCGCAAC GACCGCAAAA

2551 TCCATAGGCT CCGCCCCCT GACGAGCATC AAAAAATCG ACGCTCAAGT  
AGGTATCCGA GCGGGGGGA CTGCTCGTAG TGTTTTTAGC TGCGAGTTCA

2601 CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC  
GTCTCCACCG CTTTGGGCTG TCCTGATATT TCTATGGTCC GCAAAGGGGG

2651 TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTCC GACCCTGCCG CTTACCGGAT  
ACCTTCGAGG GAGCACGCGA GAGGACAAGG CTGGGACGGC GAATGGCCTA

2701 ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGTTTTC TCATAGCTCA  
TGGACAGGCG GAAAGAGGGA AGCCCTTCGC ACCGCGAAAG AGTATCGAGT

2751 CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG  
GCGACATCCA TAGAGTCAAG CCACATCCAG CAAGCGAGGT TCGACCCGAC

ApaLI  
-----

2801 TGTGCACGAA CCCCCCGTTC AGTCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT  
 ACACGTGCTT GGGGGGCAAG TCAGGCTGGC GACGCGGAAT AGGCCATTGA  
 2851 ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA  
 TAGCAGAACT CAGGTTGGGC CATTCTGTGC TGAATAGCGG TGACCGTCCG  
 2901 GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA  
 CGGTGACCAT TGTCCTAATC GTCTCGCTCC ATACATCCGC CACGATGTCT  
 2951 GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGA ACAGTATTTG  
 CAAGAACTTC ACCACCGGAT TGATGCCGAT GTGATCTTCT TGTATAAAC  
 3001 GTATCTGCGC TCTGCTGTAG CCAGTTACCT TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC  
 CATAGACCGG AGACGACATC GGTCAATGGA AGCCTTTTTC TCAACCATCG  
 3051 TCTTGATCCG GCAAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTTGTTG  
 AGAACTAGGC CGTTTGTTTG GTGGCGACCA TCGCCACCAA AAAAACAAC  
 3101 CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA  
 GTTCGTGCTC TAATGCGCGT CTTTTTTTCC TAGAGTTCTT CTAGGAAACT  
 3151 TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGA ACGAAAACTC ACGTTAAGGG  
 AGAAAAGATG CCCCAGACTG CGAGTCACCT TGCTTTTGAG TGCAATTCCC  
 3201 ATTTTGGTCA GATCTAGCAC CAGGCGTTTA AGGGCACCAA TAACTGCCTT  
 TAAAACAGT CTAGATCGTG GTCCGCAAAT TCCCGTGGTT ATTGACGGAA  
 3251 AAAAAAATTA CGCCCCGCC TGCCACTCAT CGCAGTACTG TTGTAATTCA  
 TTTTTTTAAT GCGGGGCGGG ACGGTGAGTA GCGTCATGAC AACATTAAGT  
 3301 TTAAGCATTTC TGCCGACATG GAAGCCATCA CAAACGGCAT GATGAACCTG  
 AATTCGTAAG ACGGCTGTAC CTTGCGTAGT GTTTGCCGTA CTACTTGGAC  
 3351 AATCGCCAGC GGCATCAGCA CTTGTGCGCC TTGCGTATAA TATTTGCCCA  
 TTAGCGGTCC CCGTAGTCGT GGAACAGCGG AACGCATATT ATAAACGGGT  
 3401 TAGTGAAAAC GGGGGCGAAG AAGTTGTCCA TATTGGCTAC GTTTAAATCA  
 ATCACTTTTG CCCCCGCTTC TTCAACAGGT ATAACCGATG CAAATTTAGT  
 3451 AAACCTGGTGA AAATCACCCA GGGATTGGCT GAGACGAAAA ACATATTTCTC  
 TTTGACCACT TTGAGTGGGT CCCTAACCGA CTCTGCTTTT TGTATAAGAG  
 3501 AATAAACCTT TTAGGGAAAT AGGCCAGGTT TTCACCGTAA CACGCCACAT  
 TTATTTGGGA AATCCCTTTA TCCGGTCCAA AAGTGGCATT GTGCGGTGTA  
 3551 CTTGCGAATA TATGTGTAGA AACTGCCGGA AATCGTCGTG GTATTCACCTC  
 GAACGCTTAT ATACACATCT TTGACGGCCT TTAGCAGCAC CATAAGTGAG  
 +1  
 3601 CAGAGCGATG AAAACGTTTC AGTTTGCTCA TGGAAAACGG TGTAACAAGG  
 GTCTCGCTAC TTTTGCAAAG TCAAACGAGT ACCTTTTGCC ACATTGTTC  
 3651 GTGAACACTA TCCCATATCA CCAGCTCACC GTCTTTTCAAT GCCATACGGA  
 CACTTGTGAT AGGGTATAGT GGTGAGTGG CAGAAAGTAA CCGTATGCCT  
 3701 ACTCCGGGTG AGCATTATC AGGCGGGCAA GAATGTGAAT AAAGGCCGGA  
 TGAGGCCAC TCGTAAGTAG TCCGCCGTT CTTACACTTA TTTCCGGCCT

```

3751 TAAAACTTGT GCTTATTTTT CTTTACGGTC TTTAAAAAGG CCGTAATATC
      ATTTTGAACA CGAATAAAAA GAAATGCCAG AAATTTTTCC GGCATTATAG

3801 CAGCTGAACG GTCTGGTTAT AGGTACATTG AGCAACTGAC TGAAATGCCT
      GTCGACTTGC CAGACCAATA TCCATGTAAC TCGTTGACTG ACTTTACGGA

3851 CAAAATGTTT TTTACGATGC CATTGGGATA TATCAACGGT GGTATATCCA
      GTTTTACAAG AAATGCTACG GTAACCCTAT ATAGTTGCCA CCATATAGGT

3901 GTGATTTTTT TCTCCATTTT AGCTTCCTTA GCTCCTGAAA ATCTCGATAA
      CACTAAAAAA AGAGGTAAAA TCGAAGGAAT CGAGGACTTT TAGAGCTATT

3951 CTCAAAAAAT ACGCCCGGTA GTGATCTTAT TTCATTATGG TGAAAGTTGG
      GAGTTTTTTA TGCGGGCCAT CACTAGAATA AAGTAATACC ACTTTCAACC

4001 AACCTCACCC GACGTCTAAT GTGAGTTAGC TCACTCATTA GGCACCCAG
      TTGGAGTGGG CTGCAGATTA CACTCAATCG AGTGAGTAAT CCGTGGGGTC

4051 GCTTFACTACT TTATGCTTCC GGCTCGTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG
      CGAAATGTGA AATACGAAGG CCGAGCATAC AACACACCTT AACACTCGCC

      M13 反向引物 100.0%
      =====
4101 ATAACAATTT CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GAATT
      TATTGTTAAA GTGTTCCTT TGTGATACT GGTACTAATG CTTAA

```

MS-GPC-1:

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARQYGHRGGFDHWGQGTLVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDFNE  
SVFGGGTKLTVLG

MS-GPC2:

VH

QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPGRGL  
EWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA  
VYYCARSHNKKWRFYNLYSLYDFDFWGQGTLVTVSS

VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI  
YGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQESGFPY  
TFGQGTKVEIKRT

MS-GPC3:

VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLE  
WMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAV  
YYCARLSTRMDPWGQGTLVTVSS

VL

图 15

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI  
YGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQDDNFPIT  
FGQGTKVEIKRT

MS-GPC4:

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYY  
CARYYVYSVGYGVTHYDDVWGQGTLVTVSS

VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI  
YGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQDYSYPS  
TFGQGTKVEIKRT

MS-GPC5:

VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLE  
WMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYY  
CARHSFFDYWGQGTLVTVSS

VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDALGDKYASWYQQKPGQAPVLVIY  
DDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDNVDIS  
VFGGGTKLTVLG

MS-GPC-6

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE  
WWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY  
YCARGYGRYSPDLWGQGTLVTVSS

VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI  
YGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQYSNLPF  
TFGQGTKVEIKRT

MS-GPC7:

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDTATYY  
CARSQNGFYGGNLDIWGQGTLVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSRDPSN  
VVFSGGKLTVLG

MS-GPC-8

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDTATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGTLVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDMPQ  
AVFSGGKLTVLG

MS-GPC-10

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDTATYY  
CARQLHYRGGFDLWGQGTLVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDLTM  
GVFGGGTKLTVLG

MS-GPC11:

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARsqgyrggldvWGQGTLTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDYGII  
VFGGGGTKLTVLG

MS-GPC14:

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE  
WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY  
YCARSSMPMYGEGFDLWGQGTLTVSS

VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDALGDKYASWYQQKPGQAPVLVIY  
DDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDFGVSH  
SVFGGGTKLTVLG

MS-GPC15:

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE  
WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY  
YCARFYYSHVLAMDNWGQGTLVTVSS

VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDALGDKYASWYQQKPGQAPVLVIY  
DDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSRDIHIHNE  
VFGGGTKLTVLG

MS-GPC16:

VH

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPGRGL  
EWLGRTYYRSKWyNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDA  
VYYCARTQLYYFDYWGQGTLVTVSS

VL

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQS  
PQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQY  
NSYPRTFGQGTKVEIKRT

MS-GPC-8-6

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDTATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGTLVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDYDH  
YVFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-10

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGTLTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDLIRH  
VFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-17

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGTLTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDFSV  
YVFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-27

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGTLTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDMNV  
HVFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-6-13

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGTLTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSESNIGANYVTWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDYDH  
YVFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-10-57

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGTLTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSESNIGNNYVQWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDLIRH  
VFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-27-41

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGTLTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSESNIGNNYVQWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDMNV  
HVFGGGTKLTVLG

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 免疫调节性人MHC II类抗原结合性多肽                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN100478029C</a>                                                                                                                                                                                                                                                | 公开(公告)日 | 2009-04-15 |
| 申请号            | CN01809333.7                                                                                                                                                                                                                                                                | 申请日     | 2001-05-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 莫佛塞斯公司                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 莫弗西斯股份公司                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 莫弗西斯股份公司                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| [标]发明人         | Z纳吉<br>M特萨日<br>E托马森 沃尔夫                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| 发明人            | Z·纳吉<br>M·特萨日<br>E·托马森-沃尔夫                                                                                                                                                                                                                                                  |         |            |
| IPC分类号         | A61K39/395 A61K48/00 G01N33/53 A61P37/06 G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/02 A61P29/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02       |         |            |
| CPC分类号         | C07K2317/622 C07K2317/565 C07K16/2833 C07K2317/21 A61K2039/505 C07K2317/55 A61P1/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/28 C07K2317/34 C07K2317/73 C07K2317/76 Y02A50/416 |         |            |
| 代理人(译)         | 徐迅                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| 审查员(译)         | 邹凯                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| 优先权            | 2000110063 2000-05-12 EP<br>60/238762 2000-10-06 US                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| 其他公开文献         | CN1460025A                                                                                                                                                                                                                                                                  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                                                                                                                                                                                                              |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及引起或导致免疫系统调节的人多肽。本发明还涉及编码多肽的核酸、产生多肽的方法、免疫抑制的方法、含有多肽的药物和诊断组合物和试剂盒，以及多肽的用途。

| 疾病       | 病人数(百万) |          | 市场规模(十亿美元) |          |
|----------|---------|----------|------------|----------|
|          | 1995    | 2010(估计) | 1994       | 2010(估计) |
| 类风湿性关节炎  | 6.6     | 7        | 2.4        | >3.7     |
| 多发性硬化    | 0.62    | 0.65     | 0.3        | >1.5     |
| I类糖尿病    | 1.8     | 1.9      | 1.5        | >1.5     |
| 移植术/GvHD | 0.05    | 0.1      | 0.9        | >1.5     |