



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110167584 B

(45) 授权公告日 2024.06.07

(21) 申请号 201780082386.7
 (22) 申请日 2017.11.07
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 110167584 A
 (43) 申请公布日 2019.08.23
 (30) 优先权数据
 62/418,468 2016.11.07 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2019.07.04
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2017/060301 2017.11.07
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02018/085801 EN 2018.05.11
 (73) 专利权人 威斯塔解剖学和生物学研究所
 地址 美国宾夕法尼亚州
 专利权人 宾夕法尼亚大学理事会
 (72) 发明人 大卫·B·韦纳 塞利克·夫林盖
 (74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司
 11240
 专利代理师 殷爽

(56) 对比文件
 CN 109890407 A, 2019.06.14
 CN 110234346 A, 2019.09.13
 CN 110325546 A, 2019.10.11
 US 2019284261 A1, 2019.09.19
 US 2022275065 A1, 2022.09.01
 CN 107427566 A, 2017.12.01
 CN 109789224 A, 2019.05.21
 CN 111936513 A, 2020.11.13
 IN 202017032682 A, 2020.09.18
 US 2015284448 A1, 2015.10.08
 US 2022324948 A1, 2022.10.13
 WO 2016025331 A1, 2016.02.18
 WO 9747197 A1, 1997.12.18
 WO 9200055 A1, 1992.01.09
 US 6344552 B1, 2002.02.05
 WO 1992000055 A1, 1992.01.09
 CN 111194221 A, 2020.05.22
 CN 114010802 A, 2022.02.08
 CN 104853782 A, 2015.08.19
 WO 2018085801 A1, 2018.05.11
 WO 2011143623 A1, 2011.11.17
 US 2014274925 A1, 2014.09.18
 EP 3773697 A1, 2021.02.17 (续)

审查员 杨兴艳

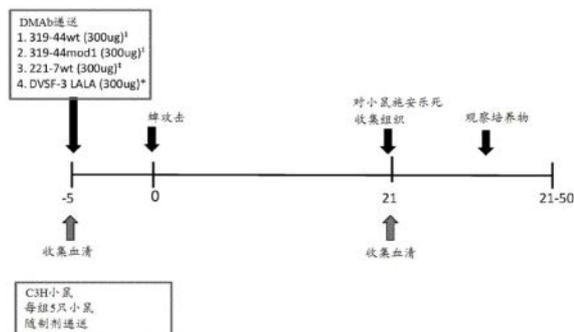
(51) Int. Cl.
 A61K 39/00 (2006.01)
 A61K 39/02 (2006.01)
 C07K 14/20 (2006.01)
 C07K 16/12 (2006.01)

权利要求书1页 说明书32页
 序列表34页 附图8页

(54) 发明名称
 用于针对莱姆病的DNA抗体构建体

(57) 摘要

本文公开了包含编码疏螺旋体抗原的抗体的重组核酸序列的组合物。本文还公开了通过向受试者施用所述组合物在所述受试者中生成合成抗体的方法。本公开还提供了使用所述组合物以及生成方法预防和/或治疗受试者的莱姆病的方法。



CN 110167584 B

[接上页]

(56) 对比文件

卢洪洲等主编.《临床感染疾病治疗学[M]》.上海交通大学出版社,2011,(第2011年8月第1版),第283页“治疗性疫苗”部分.

吴琼;周祖平.伯氏疏螺旋体的致病性及免疫防治研究进展.中国人兽共患病学报.2016,(第01期),第89-94页.

Xu,M.等.Homo sapiens isolate FAP2M21 immunoglobulin heavy chain mRNA, complete cds.Genbank Database.2021,Accession No: MW428281.1.

Xu,M.等.immunoglobulin heavy chain [Homo sapiens].Genbank Database.2021, Accession No:QSQ85782.1.

郝琴;曹伯良;侯学霞;耿震;万康林.中国莱姆病螺旋体特异性单克隆抗体的制备及初步鉴

定.中国人兽共患病学报.2008,(第05期),第74-76页.

Raymond J. Dattwyler等.The year that shaped the outcome of the OspA vaccine for human Lyme disease.《Nature Partner Journals》.2022,

S E Schutzer等.Early and specific antibody response to OspA in Lyme Disease.《The Journal of Clinical Investigation》.1994,第94卷(第1期),

谢勇恩等.莱姆病螺旋体外膜蛋白分子生物学及免疫学研究进展.《微生物学免疫学进展》.2000,第28卷(第3期),

苗广青.中国莱姆病螺旋体OspA肽段和OspC组合的多价亚单位疫苗的初步研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》.2021,

1. 一种编码合成抗体的核酸分子,其中所述核酸分子选自:
 - a) 编码抗OspA合成抗体的核苷酸序列,和
 - b) 编码抗OspA合成抗体的片段的核苷酸序列;并且其中所述核酸分子编码以下的氨基酸序列:
SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列;和/或
其中所述核酸分子是以下的核苷酸序列:
SEQ ID NO:1中列出的核苷酸序列;
或者
其中,所述核酸分子由编码一个或多个可变重链区和可变轻链区的核苷酸序列组成,
其中编码可变重链区的所述序列选自以下:
 - a) 编码SEQ ID NO:4中列出的氨基酸序列的核苷酸序列;和
 - b) SEQ ID NO:3中列出的核苷酸序列;并且其中编码可变轻链区的所述序列选自以下:
 - a) 编码SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列的核苷酸序列;和
 - b) SEQ ID NO:5中列出的核苷酸序列。
2. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中,所述核苷酸序列编码SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列。
3. 一种表达载体,包含根据权利要求1-2中任一项所述的核酸分子。
4. 一种编码合成抗体的氨基酸分子,其中所述氨基酸分子选自以下:
 - a) 抗OspA合成抗体的氨基酸序列,和
 - b) 抗OspA合成抗体的片段的氨基酸序列;其中所述氨基酸分子是:
SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列;和/或
其中所述氨基酸分子由可变重链区和可变轻链区组成;
其中所述可变重链区是:
SEQ ID NO:4中列出的氨基酸序列;并且
其中可变轻链区是:
SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列。
5. 根据权利要求4所述的氨基酸分子,其还包含裂解结构域。
6. 根据权利要求5所述的氨基酸分子,其中所述氨基酸序列包含前导序列。
7. 一种组合物,其包含根据权利要求1-3中任一项所述的核酸分子。
8. 根据权利要求7所述的组合物,其还包含药学上可接受的赋形剂。
9. 一种组合物,其包含根据权利要求4-6中任一项所述的氨基酸分子。
10. 根据权利要求9所述的组合物,其还包含药学上可接受的赋形剂。
11. 根据权利要求1-3中任一项所述的核酸分子或根据权利要求7-8中任一项所述的组合物在制备用于预防受试者的疾病的药物中的应用,其中所述疾病是莱姆病。
12. 根据权利要求4-6中任一项所述的氨基酸分子或根据权利要求9-10中任一项所述的组合物在制备用于预防受试者的疾病的药物中的应用,其中所述疾病是莱姆病。

用于针对莱姆病的DNA抗体构建体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年11月7日提交的美国临时申请号62/418,468的优先权和权益,所述美国临时申请的内容整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种组合物,其包含用于在体内生成一种或多种抗OspA合成抗体及其功能片段的重组核酸序列,并且涉及一种通过施用所述组合物预防和/或治疗受试者的细菌感染的方法。

背景技术

[0004] 莱姆病(Lyme disease)是由细菌伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)引起的,并且通过被感染的肩突硬蜱(*Ixodes scapularis*) (又称为黑足蜱(Blacklegged tick)或鹿蜱(Deer tick))的叮咬传播给人类。目前,治疗性抗体被批准用于治疗多种疾病。不幸的是,纯化抗体的制造和递送成本高昂。此外,必须每周至每月重新施用抗体疗法-这是确保有效治疗以预防或降低患者发展慢性莱姆病的风险的一个具有挑战性的考虑因素。

[0005] 因此,本领域需要预防和/或治疗伯氏疏螺旋体感染和相关莱姆病的改进的治疗剂。本发明满足这种需要。

发明内容

[0006] 在一个实施方案中,本发明涉及编码一种或多种合成抗体的核酸分子,其中所述核酸分子包含以下的至少一种:a) 编码抗OspA合成抗体的核苷酸序列和b) 编码抗OspA合成抗体的片段的核苷酸序列。

[0007] 在一个实施方案中,所述核酸分子还包含编码裂解结构域的核苷酸序列。

[0008] 在一个实施方案中,所述核酸分子编码选自以下的至少一种氨基酸序列:a) 在氨基酸序列的整个长度上与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的氨基酸序列具有至少约95%同一性的氨基酸序列;b) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列;和c) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列的片段。

[0009] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含以下的至少一种:a) 在核酸序列的整个长度上与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21或SEQ ID

NO:23的核酸序列具有至少约95%同一性的核苷酸序列; b) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:23的核苷酸序列; 和c) 选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:23的核苷酸序列的片段。

[0010] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码可变重链区和可变轻链区中的一种或多种的核苷酸序列。在一个实施方案中,编码可变重链区的所述序列选自:a) 编码SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:22的氨基酸序列的核苷酸序列;b) 编码与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列的核苷酸序列,c) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:21的核苷酸序列,和d) 与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:21的核苷酸序列具有至少95%同一性的核苷酸序列。在一个实施方案中,编码可变轻链区的所述序列选自:e) 编码SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:24的氨基酸序列的核苷酸序列;f) 编码与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列的核苷酸序列,g) SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23的核苷酸序列,和h) 与SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23的核苷酸序列具有至少95%同一性的核苷酸序列。

[0011] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0012] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码以下的一种或多种的核苷酸序列:包含SEQ ID NO:4的可变重链区,和包含SEQ ID NO:6的可变轻链区。在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码SEQ ID NO:2的核苷酸序列。

[0013] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码以下的一种或多种的核苷酸序列:包含SEQ ID NO:10的可变重链区,和包含SEQ ID NO:12的可变轻链区。在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码SEQ ID NO:8的核苷酸序列。

[0014] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码以下的一种或多种的核苷酸序列:包含SEQ ID NO:16的可变重链区,和包含SEQ ID NO:18的可变轻链区。在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码SEQ ID NO:14的核苷酸序列。

[0015] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码以下的一种或多种的核苷酸序列:包含SEQ ID NO:22的可变重链区,和包含SEQ ID NO:24的可变轻链区。在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码SEQ ID NO:20的核苷酸序列。

[0016] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码以下的一种或多种的核苷酸序列:包含SEQ ID NO:26的可变重链区,和包含SEQ ID NO:27的可变轻链区。在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码SEQ ID NO:25的核苷酸序列。

[0017] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含在核酸序列的整个长度上与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:23之一具有至少约95%同一性的核苷酸序列。

[0018] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:23的核苷酸序列。

[0019] 在一个实施方案中,所述核苷酸序列编码前导序列。

[0020] 在一个实施方案中,所述核酸分子是表达载体。

[0021] 在一个实施方案中,本发明涉及包含一种或多种合成抗体的氨基酸分子,其中所述氨基酸分子包含选自以下的至少一种:包含抗OspA合成抗体的氨基酸序列,和包含抗OspA合成抗体的片段的氨基酸序列。

[0022] 在一个实施方案中,所述氨基酸分子还包含裂解结构域。

[0023] 在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含选自以下的至少一种氨基酸序列:a)在氨基酸序列的整个长度上与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的氨基酸序列具有至少约95%同一性的氨基酸序列;b)SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列;和c)SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列的片段。

[0024] 在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含可变重链区和可变轻链区中的一种或多种。在一个实施方案中,包含可变重链区的所述序列选自:a)SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:22的氨基酸序列;和b)与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,包含可变轻链区的所述序列选自:c)SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:24的氨基酸序列;和d)与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0025] 在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0026] 在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含一种或多种选自以下的氨基酸序列:包含SEQ ID NO:4的可变重链区和包含SEQ ID NO:6的可变轻链区。在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

[0027] 在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含一种或多种选自以下的氨基酸序列:包含SEQ ID NO:10的可变重链区和包含SEQ ID NO:12的可变轻链区。在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含如SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列。

[0028] 在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含一种或多种选自以下的氨基酸序列:包含SEQ ID NO:16的可变重链区和包含SEQ ID NO:18的可变轻链区。在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含如SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列。

[0029] 在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含一种或多种选自以下的氨基酸序列:包含SEQ ID NO:22的可变重链区和包含SEQ ID NO:24的可变轻链区。在一个实施方案中,所

述氨基酸分子包含如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0030] 在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含一种或多种选自以下的氨基酸序列:包含SEQ ID NO:26的可变重链区和包含SEQ ID NO:27的可变轻链区。在一个实施方案中,所述氨基酸分子包含如SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列。

[0031] 在一个实施方案中,所述氨基酸序列包含前导序列。

[0032] 在一个实施方案中,本发明涉及一种组合物,其包含编码一种或多种合成抗体的核酸分子,其中所述核酸分子包含以下的至少一种:a) 编码抗OspA合成抗体的核苷酸序列和b) 编码抗OspA合成抗体的片段的核苷酸序列。

[0033] 在一个实施方案中,所述组合物还包含药学上可接受的赋形剂。

[0034] 在一个实施方案中,本发明涉及一种包含氨基酸分子的组合物,所述氨基酸分子包含一种或多种合成抗体,其中所述氨基酸分子包含选自以下的至少一种:包含抗OspA合成抗体的氨基酸序列,和包含抗OspA合成抗体的片段的氨基酸序列。

[0035] 在一个实施方案中,本发明涉及预防或治疗受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用编码一种或多种合成抗体的核酸分子,其中所述核酸分子包含以下的至少一种:a) 编码抗OspA合成抗体的核苷酸序列和b) 编码抗OspA合成抗体的片段的核苷酸序列。在一个实施方案中,所述方法包括向受试者施用包含所述核酸分子的组合物。

[0036] 在一个实施方案中,本发明涉及预防或治疗受试者的疾病的方法,其包括向受试者施用包含一种或多种合成抗体的氨基酸分子,其中所述氨基酸分子包含选自以下的至少一种:包含抗OspA合成抗体的氨基酸序列,和包含抗OspA合成抗体的片段的氨基酸序列。

[0037] 在一个实施方案中,所述疾病是疏螺旋体感染。在一个实施方案中,所述疾病是莱姆病。

[0038] 在一个实施方案中,所述方法还包括向受试者施用抗生素剂。

附图说明

[0039] 图1描绘了用于蜱攻击测定的方案。在蜱攻击前5天,用对照或试验DNA单克隆抗体(DMAb)免疫每组五只C3H小鼠。在免疫时或在蜱攻击后21天收集血清。

[0040] 图2描绘的实验结果证明用319-44 wt、319-44 mod1或221-7 wt DMAb免疫小鼠,在第3天的血清中具有可检测水平的抗体,并且319-44 wt DMAb提供60%针对莱姆病的保护,而319-44 mod1 DMAb提供80%的保护。

[0041] 图3描绘了来自于莱姆DMAb攻击研究的结果。用319-44 wt、319-44 mod1或221-7 wt DMAb处理的小鼠在第21天显示出强烈的抗人IgG应答。

[0042] 图4描绘的实验结果证明DMAb对伯氏疏螺旋体的杀疏螺旋体(borreliacidal)活性。所有四种DMAb(319-44 mod1、319-44 wt、221-7mod9和221-7 wt)都对伯氏疏螺旋体具有杀疏螺旋体活性。

[0043] 图5描绘的实验结果证明配制的319-44 DMAb剂量在体内产生增加的抗体水平。结果描绘了C3H/HeNcr1小鼠中人IgG的水平,n=5只/组。第7天配制的319-44mod1(300ug剂量)≈约7ug/mL。

[0044] 图6,包括图6A至图6C,描绘的实验结果证明三级优化策略导致221-7 mod 9体内表达增加。图6A描绘了用于实验的注射和测定时程。图6B描绘的实验结果证明配制的221-7

mod 9 DMAb比未配制的221-7 mod 9 DMAb产生更强的抗人IgG应答。图6C描绘的实验结果证明配制的221-7 mod 9 DMAb具有比未配制的221-7 mod 9 DMAb更高的his0spA结合水平。

[0045] 图7,包括图7A至图7B,描绘的实验结果证明注射DMAb引起在体内生成莱姆抗体。图7A描绘的实验结果证明注射319-44 DMAb,并且在较小程度上注射未配制的221-7wt DMAb,在注射后至少两天开始产生比单独的载体(pVax)更强的人IgG应答。图7B描绘的实验结果证明注射319-44 DMAb,并且在较小程度上注射未配制的221-7wt DMAb,具有比单独的pVax更高的his0spA结合水平。

[0046] 图8描绘了对用各种DMAb免疫的C3H小鼠提供的针对蜱攻击的保护百分比的图。这是图2中数据的图形表示。

具体实施方式

[0047] 本发明涉及包含编码抗体、其片段、其变体或它们的组合的重组核酸序列的组合物。所述组合物可以施用于有需要的受试者,以促进合成抗体的体内表达和形成。

[0048] 具体来说,由重组核酸序列表达的重链多肽和轻链多肽可以组装成合成抗体。重链多肽和轻链多肽可以彼此相互作用以使得组装产生合成抗体,所述合成抗体能够结合抗原,与并非如本文所述组装的抗体相比具有更大的免疫原性,并且能够引发或诱导针对抗原的免疫应答。

[0049] 此外,与响应于抗原诱导的免疫应答而产生的抗体相比,这些合成抗体在受试者中更快速地产生。合成抗体能够有效地结合并且中和一系列抗原。所述合成抗体还能够有效地防止疾病和/或促进疾病存活率。

[0050] 1. 定义

[0051] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。如有冲突,将以本文件(包括定义)为准。虽然可以在实施或测试本发明时使用与本文所述的方法和材料相似或等同的方法和材料,但是下文描述了优选的方法和材料。本文提到的所有出版物、专利申请、专利以及其他参考文献以引用的方式整体并入。本文公开的材料、方法、以及实例仅是说明性的并且不意图具有限制性。

[0052] 如本文所用的术语“包含”、“包括”、“具有”、“可”、“含有”以及其变形意图是开放式过渡短语、术语、或词语,它们不排除另外的行为或结构的可能性。除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一个/一种”和“该/所述”包括复数指代对象。本公开还考虑了“包含本文提供的实施方案或要素”、“由本文提供的实施方案或要素组成”以及“基本上由本文提供的实施方案或要素组成”的其他实施方案,无论是否明确阐述。

[0053] “抗体”可以意指类别IgG、IgM、IgA、IgD或IgE的抗体、或其片段、片段或衍生物,包括Fab、F(ab')₂、Fd和单链抗体及其衍生物。抗体可以从哺乳动物的血清样品中分离的抗体、多克隆抗体、亲和力纯化抗体或它们的混合物,它对所期望的表位或由其衍生的序列表现出足够的结合特异性。

[0054] 如本文可互换使用的“抗体片段”或“抗体的片段”指的是完整抗体的包含抗原结合位点或可变区的部分。所述部分不包括完整抗体的Fc区的恒定重链结构域(即CH₂、CH₃或CH₄,这取决于抗体同种型)。抗体片段的实例包括但不限于Fab片段、Fab'片段、Fab'-SH片

段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fv片段、双体抗体、单链Fv(scFv)分子、仅含一个轻链可变结构域的单链多肽、含有轻链可变结构域的三个CDR的单链多肽、仅含一个重链可变区的单链多肽、以及含有重链可变区的三个CDR的单链多肽。

[0055] “抗原”是指具有在宿主中产生免疫应答的能力的蛋白质。抗原可以由抗体识别和结合。抗原可以源自于体内或外部环境。

[0056] 如本文所用的“编码序列”可以意指包含编码本文所述抗体的核苷酸序列的核酸(RNA或DNA分子)。编码序列还可以包括与调控元件可操作地连接的起始信号和终止信号,所述调控元件包括能够指导在接受核酸施用的个体或哺乳动物的细胞中表达的启动子和多聚腺苷酸化信号。编码序列还可以包括编码信号肽的序列。

[0057] 如本文所用,“互补序列”或“互补”可以意指核酸,可以意指核酸分子的核苷酸或核苷酸类似物之间的沃森-克里克(Watson-Crick)(例如,A-T/U和C-G)或Hoogsteen碱基配对。

[0058] 如本文所用,“恒定电流”定义了在向组织递送电脉冲的持续时间内同一组织或限定所述组织的细胞接受或经历的电流。电脉冲是从本文所述的电穿孔装置递送的。因为本文提供的电穿孔装置具有反馈元件,优选地具有瞬时反馈,所以该电流在所述组织中在电脉冲的寿命内保持在恒定的安培数。反馈元件可以在整个脉冲的持续时间内测量组织(或细胞)的电阻,并且使电穿孔装置改变它的电能输出(例如,增加电压),以使同一组织中的电流在整个电脉冲期间(约几微秒)和脉冲间保持恒定。在一些实施方案中,反馈元件包括控制器。

[0059] 如本文所用,“电流反馈”或“反馈”可以互换使用并且可以意指所提供的电穿孔装置的主动响应,所述主动响应包括测量电极之间组织中的电流以及相应地改变由EP装置递送的能量输出,以将电流维持在恒定水平。在开始脉冲序列或电处理之前,由使用者预设该恒定水平。反馈可以通过电穿孔装置的电穿孔部件,例如控制器完成,这是因为其中的电路能够连续地监测电极之间组织中的电流,并且将该所监测的电流(或组织内的电流)与预设电流相比较,并且连续地进行能量输出调整以将所监测的电流维持在预设水平。反馈回路可以是瞬时的,因为它是模拟闭环反馈。

[0060] 如本文所用,“分散电流”可以意指从本文所述的电穿孔装置的各种针电极阵列递送的电流模式,其中所述模式使正被电穿孔的组织任何区域上电穿孔相关热应激的发生减到最低限度或优选地消除所述电穿孔相关热应激的发生。

[0061] 如本文可互换使用,“电穿孔”、“电透化”或“电动增强”(“EP”)可以指使用跨膜电场脉冲在生物膜中诱导微观路径(孔);它们的存在允许生物分子,诸如质粒、寡核苷酸、siRNA、药物、离子以及水从细胞膜的一侧传递到另一侧。

[0062] 如本文所用,“内源性抗体”可以指在接受有效剂量的抗原的施用以诱导体液免疫应答的受试者体内产生的抗体。

[0063] 如本文所用,“反馈机制”可以指由软件或硬件(或固件)执行的过程,所述过程接收所期望的组织的阻抗并且将其与预设值,优选地电流相比较(在递送能量脉冲之前、期间和/或之后),并且调整所递送的能量脉冲以达到所述预设值。反馈机制可以由模拟闭环电路执行。

[0064] “片段”可以意指可以发挥功能,即可以结合所期望的靶标并且具有与全长抗体相

同的预期作用的抗体的多肽片段。抗体的片段可以与全长具有100%同一性,除了缺少来自N末端和/或C末端的至少一个氨基酸之外,在每种情况下在位置1处具有或不具有信号肽和/或甲硫氨酸。片段可以包含特定全长抗体的长度的20%或更多、25%或更多、30%或更多、35%或更多、40%或更多、45%或更多、50%或更多、55%或更多、60%或更多、65%或更多、70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、91%或更多、92%或更多、93%或更多、94%或更多、95%或更多、96%或更多、97%或更多、98%或更多、99%或更多百分比,不包括所添加的任何异源信号肽在内。片段可以包括与抗体具有95%或更大、96%或更大、97%或更大、98%或更大或99%或更大的同一性的多肽片段,并且另外包含在计算同一性百分比时不包括在内的N末端甲硫氨酸或异源信号肽。片段还可以包含N末端甲硫氨酸和/或信号肽,诸如免疫球蛋白信号肽,例如IgE信号肽或IgG信号肽。N末端甲硫氨酸和/或信号肽可以与抗体的片段连接。

[0065] 编码抗体的核酸序列的片段可以与全长具有100%同一性,除了缺少来自5'末端和/或3'末端的至少一个核苷酸之外,在每种情况下在位置1处具有或不具有编码信号肽和/或甲硫氨酸的序列。片段可以包含特定全长编码序列的长度的20%或更多、25%或更多、30%或更多、35%或更多、40%或更多、45%或更多、50%或更多、55%或更多、60%或更多、65%或更多、70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、91%或更多、92%或更多、93%或更多、94%或更多、95%或更多、96%或更多、97%或更多、98%或更多、99%或更多百分比,不包括所添加的任何异源信号肽在内。片段可以包括编码与抗体具有95%或更大、96%或更大、97%或更大、98%或更大或99%或更大的同一性的多肽的片段,并且另外任选地包含编码在计算同一性百分比时不包括在内的N末端甲硫氨酸或异源信号肽的序列。片段还可以包含N末端甲硫氨酸和/或信号肽,诸如免疫球蛋白信号肽,例如IgE信号肽或IgG信号肽的编码序列。编码N末端甲硫氨酸和/或信号肽的编码序列可以与编码序列的片段连接。

[0066] 如本文所用,“遗传构建体”是指包含编码蛋白质,诸如抗体的核苷酸序列的DNA分子或RNA分子。编码序列包括与调控元件可操作地连接的起始信号和终止信号,所述调控元件包括能够指导在接受核酸分子施用的个体的细胞中的表达的启动子和多聚腺苷酸化信号。如本文所用的术语“可表达形式”指的是含有必要调控元件的基因构建体,所述调控元件与编码蛋白质的编码序列可操作地连接以使得当存在于个体的细胞中时,所述编码序列将被表达。

[0067] 如本文所用,“同一”或“同一性”在两个或更多个核酸或多肽序列的背景下可以意指所述序列在指定区域中具有指定百分比的相同残基。所述百分比可以通过最佳地比对这两个序列,在指定区域中比较这两个序列,确定这两个序列中存在相同残基的位置数量以产生匹配位置数,将匹配位置数除以指定区域中位置的总数,并且将结果乘以100以得到序列同一性百分比来计算。在这两个序列具有不同的长度或比对产生一个或多个交错末端并且指定的比较区域仅包括单个序列的情况下,单个序列的残基被包括在计算的分母中,但是不包括在分子中。当比较DNA和RNA时,胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)可以被认为是等同的。同一性可以手动或通过使用计算机序列算法,诸如BLAST或BLAST 2.0来进行。

[0068] 如本文所用,“阻抗”可以在论述反馈机制时使用并且可以根据欧姆定律(Ohm's law)转换成电流值,从而使得能够与预设电流相比较。

[0069] 如本文所用,“免疫应答”可以意指响应于一种或多种核酸和/或肽的引入,宿主的免疫系统,例如哺乳动物的免疫系统的活化。所述免疫应答可以呈细胞应答或体液应答或这两者的形式。

[0070] 如本文所用,“核酸”或“寡核苷酸”或“多核苷酸”可以意指共价连接在一起的至少两个核苷酸。单链的描绘还限定了互补链的序列。因此,核酸还涵盖所描绘的单链的互补链。核酸的许多变体可以用于与给定核酸相同的目的。因此,核酸还涵盖基本上相同的核酸和其互补序列。单链提供了可以在严格杂交条件下与靶序列杂交的探针。因此,核酸还涵盖了在严格杂交条件下杂交的探针。

[0071] 核酸可以是单链的或双链的,或可以含有双链序列和单链序列二者的部分。核酸可以是DNA(基因组和cDNA)、RNA、或杂合体,其中核酸可以含有脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸的组合、以及包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、肌苷、黄嘌呤次黄嘌呤、异胞嘧啶以及异鸟嘌呤的碱基的组合。核酸可以通过化学合成方法或通过重组方法获得。

[0072] 如本文所用,“可操作地连接”可以意指基因的表达处在与它在空间上连接的启动子的控制之下。启动子可以位于处在它的控制之下的基因的5'(上游)或3'(下游)。启动子和基因之间的距离可以与作为该启动子来源的基因中该启动子与它控制的基因之间的距离大致相同。如本领域已知的那样,可以调节该距离的变化而不会丧失启动子功能。

[0073] 如本文所用,“肽”、“蛋白质”或“多肽”可以意指氨基酸的连接序列并且可以是天然的、合成的、或天然和合成的修饰或组合。

[0074] 如本文所用,“启动子”可以意指能够赋予、激活或增强核酸在细胞中的表达的合成或天然来源的分子。启动子可以包含一个或多个特定的转录调控序列,以进一步增强其表达和/或改变其空间表达和/或时间表达。启动子还可以包含远端增强子或阻遏子元件,它们可以位于与转录起始位点相距多达数千个碱基对的位置处。启动子可以来源于包括病毒、细菌、真菌、植物、昆虫和动物的来源。对于其中发生表达的细胞、组织或器官,或对于发生表达的发育阶段,或响应于外部刺激,诸如生理应激、病原体、金属离子或诱导剂,启动子可以组成型地或差异性地调控基因组分的表达。启动子的代表性实例包括噬菌体T7启动子、噬菌体T3启动子、SP6启动子、lac操纵子-启动子、tac启动子、SV40晚期启动子、SV40早期启动子、RSV-LTR启动子、CMV IE启动子、SV40早期启动子或SV 40晚期启动子以及CMV IE启动子。

[0075] “信号肽”和“前导序列”在本文中可互换使用,是指可以在本文所述的蛋白质的氨基末端处连接的氨基酸序列。信号肽/前导序列通常引导蛋白质的定位。本文所用的信号肽/前导序列优选地促进蛋白质从其产生的细胞中的分泌。在从细胞中分泌时,信号肽/前导序列常常从蛋白质的其余部分(常常被称为成熟蛋白)切割。信号肽/前导序列在蛋白质的N末端处连接。

[0076] 如本文所用,“严格杂交条件”可以意指第一核酸序列(例如,探针)将与第二核酸序列(例如,靶标),诸如核酸的复杂混合物中的第二核酸序列杂交的条件。严格条件具有序列依赖性并且在不同的情况下将是不同的。严格条件可选择为在限定离子强度pH下比特定序列的热解链温度(T_m)低约5-10°C。 T_m 可以是(在限定的离子强度、pH和核酸浓度下)平衡时50%与靶标互补的探针与靶序列杂交时的温度(因为靶序列过量存在,在 T_m 下,在平衡时50%的探针被占据)。严格条件可以是如下的那些条件,其中在pH 7.0至8.3下,盐浓度低于

约1.0M钠离子,诸如约0.01M-1.0M钠离子浓度(或其他盐),并且对于短探针(例如约10个-50个核苷酸),温度为至少约30°C,对于长探针(例如大于约50个核苷酸),为至少约60°C。严格条件还可以通过添加去稳定剂,诸如甲酰胺来实现。对于选择性或特异性杂交,阳性信号可以是背景杂交的至少2倍至10倍。示例性严格杂交条件包括以下:50%的甲酰胺、5×SSC和1%的SDS,在42°C孵育;或5×SSC、1%的SDS,在65°C孵育,以及在65°C下在0.2×SSC和0.1%SDS中洗涤。

[0077] 如本文可互换使用,“受试者”和“患者”是指任何脊椎动物,包括但不限于哺乳动物(例如牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠和小鼠、非人灵长类动物(例如猴,诸如食蟹猴或恒河猴、黑猩猩等)以及人)。在一些实施方案中,受试者可以是人或非人。受试者或患者可以正接受其他形式的治疗。

[0078] 如本文所用,“基本上互补”可以意指第一序列在8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个或更多个核苷酸或氨基酸的区域内与第二序列的互补序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,或这两个序列在严格杂交条件下杂交。

[0079] 如本文所用,“基本上同一的”可以意指第一序列和第二序列在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、200个、300个、400个、500个、600个、700个、800个、900个、1000个、1100个或更多个核苷酸或氨基酸的区域内具有至少60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或对于核酸,如果第一序列与第二序列的互补序列基本上互补。

[0080] 如本文所用,“合成抗体”是指由本文所述的重组核酸序列编码并且在受试者中产生的抗体。

[0081] 如本文所用,“治疗”可以意指经由预防、抑制、阻遏、或完全消除疾病的手段来保护受试者免受疾病的影响。预防疾病涉及在疾病发作之前向受试者施用本发明的疫苗。抑制疾病涉及在诱发疾病之后,但是在它出现临床表现之前,向受试者施用本发明的疫苗。阻遏疾病涉及在疾病的临床表现之后向受试者施用本发明的疫苗。

[0082] 本文关于核酸使用的“变体”可以指(i)参考核苷酸序列的一部分或片段;(ii)参考核苷酸序列或其部分的互补序列;(iii)与参考核酸或其互补序列基本相同的核酸;或(iv)在严格条件下与参考核酸、其互补序列或与其基本相同的序列杂交的核酸。

[0083] 关于肽或多肽的“变体”在氨基酸序列上由于氨基酸的插入、缺失、或保守取代而不同,但是保留至少一种生物学活性。变体还可以意指具有这样的氨基酸序列的蛋白质:其与具有保留至少一种生物学活性的氨基酸序列的参考蛋白质基本上相同。氨基酸的保守取代,即将氨基酸用具有相似特性(例如带电荷的区域的亲水性、程度以及分布)的不同氨基酸置换,在本领域中通常被认为涉及微小变化。如本领域所理解的,通过考虑氨基酸的亲水指数可以部分地鉴定这些微小变化。Kyte等人,J.Mol.Biol.157:105-132(1982)。氨基酸的亲水指数是基于它的疏水性和电荷的考虑。在本领域中已知的是,具有相似亲水指数的氨

氨基酸可以被取代并且仍保留蛋白质功能。在一个方面,具有相差 ± 2 的亲水指数的氨基酸被取代。氨基酸的亲水性还可以用于揭示将产生保留生物学功能的蛋白质的取代。在肽的背景下氨基酸的亲水性的考虑容许计算该肽的最大局部平均亲水性,这是已经被报道与抗原性和免疫原性良好相关的有用的量度。美国专利号4,554,101以引用的方式整体并入本文。如本领域所理解的,取代具有相似亲水性值的氨基酸可产生保留生物活性,例如免疫原性的肽。可以用亲水性值在彼此 ± 2 以内的氨基酸进行取代。氨基酸的疏水指数和亲水值这两者都受该氨基酸的特定侧链的影响。与该观测结果相一致,与生物学功能相容的氨基酸取代被理解为取决于氨基酸的相对相似性,并且特别是那些氨基酸的侧链,如疏水性、亲水性、电荷、大小和其他特性所揭示。

[0084] 变体可以是在完整基因序列或其片段的全长上基本上相同的核酸序列。所述核酸序列在基因序列或其片段的全长上可以是80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的。变体可以是在氨基酸序列或其片段的全长上基本上相同的氨基酸序列。所述氨基酸序列在氨基酸序列或其片段的全长上可以是80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的。

[0085] 如本文所用,“载体”可以意指含有复制起点的核酸序列。载体可以是质粒、噬菌体、细菌人工染色体或酵母人工染色体。载体可以是DNA载体或RNA载体。载体可以是自我复制的染色体外载体或整合到宿主基因组中的载体。

[0086] 对于本文中数值范围的叙述,其间具有相同精确度的每一个中间数被明确考虑。举例来说,对于6-9的范围,除了6和9之外,还考虑了数字7和8,并且对于范围6.0-7.0,数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、以及7.0被明确考虑。

[0087] 2. 组合物

[0088] 本发明涉及一种组合物,所述组合物包含编码抗体、其片段、其变体或它们的组合的重组核酸序列。当向有需要的受试者施用,组合物可以引起合成抗体在受试者中的产生。合成抗体可以结合受试者中存在的靶分子(即,抗原)。这样的结合可以中和抗原,阻断另一种分子(例如蛋白质或核酸)对抗原的识别,并且引发或诱导对抗原的免疫应答。

[0089] 在一个实施方案中,组合物包含编码合成抗体的核苷酸序列。在一个实施方案中,组合物包含含有编码第一合成抗体的第一核苷酸序列和编码第二合成抗体的第二核苷酸序列的核酸分子。在一个实施方案中,核酸分子包含编码裂解结构域的核苷酸序列。

[0090] 在一个实施方案中,所述组合物包含一种或多种编码合成抗体的重链和轻链中的一种或多种的核酸分子。在一个实施方案中,核酸分子包含编码重链或轻链前导肽的序列。在一个实施方案中,所述组合物包含编码合成抗体重链的第一核酸分子和编码合成抗体轻链的第二核酸分子。在一个实施方案中,编码合成抗体重链的核酸序列包含编码人IgG重链信号肽、可变重链区和恒定重链区的序列。在一个实施方案中,编码合成抗体轻链的核酸序列包含编码人 κ 轻链信号肽、可变轻链区和恒定轻链区的序列。

[0091] 在一个实施方案中,所述组合物包含编码合成抗体的重链和轻链两者的单一核酸分子。在一个实施方案中,核酸分子包含编码重链和轻链前导肽两者的序列。在一个实施方案中,所述组合物包含单一核酸分子,其编码:人IgG重链信号肽、可变重链区、恒定重链区、弗林蛋白酶切割位点、‘GSG’接头、P2A肽、人 κ 轻链信号肽、可变轻链区和恒定轻链区。

[0092] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码抗OspA抗体的核苷酸序列。在一个实施方案中,抗OspA抗体是DMAb-319-44 mod1。在一个实施方案中,编码DMAb-319-44 mod1抗体的核苷酸序列包括分别编码SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的可变VH和VL区的一个或多个密码子优化的核酸序列。在一个实施方案中,编码DMAb-319-44 mod1抗体的核苷酸序列编码如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

[0093] 在一个实施方案中,抗OspA抗体是DMAb-319-44 wt。在一个实施方案中,编码DMAb-319-44 wt抗体的核苷酸序列包含分别编码SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12的可变VH和VL区的一个或多个密码子优化的核酸序列。在一个实施方案中,编码DMAb-319-44wt抗体的核苷酸序列编码如SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列。

[0094] 在一个实施方案中,抗OspA抗体是DMAb-221-7 mod9。在一个实施方案中,编码DMAb-221-7 mod9抗体的核苷酸序列包括分别编码SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:18的可变VH和VL区的一个或多个密码子优化的核酸序列。在一个实施方案中,编码DMAb-221-7mod9抗体的核苷酸序列编码如SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列。

[0095] 在一个实施方案中,抗OspA抗体是DMAb-221-7 wt。在一个实施方案中,编码DMAb-221-7 wt抗体的核苷酸序列包括分别编码SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的可变VH和VL区的一个或多个密码子优化的核酸序列。在一个实施方案中,编码DMAb-221-7抗体的核苷酸序列编码如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0096] 在一个实施方案中,编码鼠DMAb-221-7 mod9抗体的核苷酸序列包括分别编码SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的可变VH和VL区的一个或多个密码子优化的核酸序列。在一个实施方案中,编码鼠DMAb-221-7 mod9抗体的核苷酸序列编码如SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列。

[0097] 在一个实施方案中,编码抗OspA抗体的核苷酸序列包括选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:23的序列。

[0098] 本发明的组合物可以治疗、预防和/或防止与表达OspA蛋白的细菌的细菌活性相关的任何疾病、病症或病状。在某些实施方案中,所述组合物可以治疗、预防和/或防止细菌感染。在某些实施方案中,所述组合物可以治疗、预防和/或防止疏螺旋体属种感染。在某些实施方案中,所述组合物可以治疗、预防和/或防止莱姆病。

[0099] 所述合成抗体可以在接受所述组合物的施用的受试者中治疗、预防、和/或防止疾病。所述合成抗体通过结合抗原可以在接受所述组合物的施用的受试者中治疗、预防和/或防止疾病。所述合成抗体可以在接受所述组合物的施用的受试者中促进疾病存活率。所述合成抗体可以在接受所述组合物的施用的受试者中提供至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的疾病存活率。

[0100] 组合物可以在向所述受试者施用组合物的至少约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、20小时、25小时、30小时、35小时、40小时、45小时、50小时、或60小时内引起合成抗体在受试者中产生。组合物可以在向受试者施用组合物的至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、或10天内引起合成抗体在受试者中产生。组合物可以在向受试者施用组合物的约1小时至约6天、约1小时至约5天、约1小时至约4天、约1小时至约3天、约1小时至约2天、约1小时至约

1天、约1小时至约72小时、约1小时至约60小时、约1小时至约48小时、约1小时至约36小时、约1小时至约24小时、约1小时至约12小时、或约1小时至约6小时内引起合成抗体在受试者中产生。

[0101] 当向有需要的受试者施用,与在接受抗原施用以诱导体液免疫应答的受试者中内源性抗体的产生相比,组合物可以更快地引起合成抗体在受试者中产生。组合物可以在接受抗原施用以诱导体液免疫应答的受试者中产生内源性抗体之前至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天引起合成抗体的产生。

[0102] 本发明的组合物可具有有效组合物所需的特征,例如安全,以致所述组合物不会引起疾病或死亡;防止疾病;并且易于施用、副作用少、生物稳定性和每剂量成本低。

[0103] 3. 重组核酸序列

[0104] 如上文所述,组合物可以包含重组核酸序列。重组核酸序列可以编码抗体、其片段、其变体或它们的组合。抗体在下文中更详细地描述。

[0105] 重组核酸序列可以是异源核酸序列。重组核酸序列可以包括一种或多种异源核酸序列。

[0106] 重组核酸序列可以是优化的核酸序列。这种优化可以增加或改变抗体的免疫原性。优化还可以改善转录和/或翻译。优化可以包括以下一种或多种:低GC含量的前导序列用于增加转录;mRNA稳定性和密码子优化;添加kozak序列(例如,GCC ACC)以增加翻译;添加编码信号肽的免疫球蛋白(Ig)前导序列;添加内部IRES序列并尽可能消除顺式作用序列基序(即,内部TATA盒)。

[0107] 重组核酸序列构建体

[0108] 重组核酸序列可以包括一种或多种重组核酸序列构建体。重组核酸序列构建体可以包括一种或多种组分,它们更详细地描述于下文中。

[0109] 重组核酸序列构建体可以包括编码重链多肽、其片段、其变体或它们的组合的异源核酸序列。重组核酸序列构建体可以包括编码轻链多肽、其片段、其变体或它们的组合的异源核酸序列。重组核酸序列构建体还可以包括编码蛋白酶或肽酶切割位点的异源核酸序列。重组核酸序列构建体还可以包括编码内部核糖体进入位点(IRES)的异源核酸序列。IRES可以是病毒IRES或真核IRES。重组核酸序列构建体可以包括一个或多个前导序列,其中每个前导序列编码信号肽。重组核酸序列构建体可以包括一个或多个启动子、一个或多个内含子、一个或多个转录终止区、一个或多个起始密码子、一个或多个终止密码或终止密码子和/或一个或多个多聚腺苷酸化信号。重组核酸序列构建体还可以包括一个或多个接头或标签序列。标签序列可以编码血凝素(HA)标签。

[0110] (1) 重链多肽

[0111] 重组核酸序列构建体可以包括编码重链多肽、其片段、其变体或它们的组合的异源核酸。重链多肽可以包括可变重链(VH)区和/或至少一个恒定重链(CH)区。至少一个恒定重链区可以包括恒定重链区1(CH1)、恒定重链区2(CH2)以及恒定重链区3(CH3)和/或铰链区。

[0112] 在一些实施方案中,重链多肽可以包括VH区和CH1区。在其他实施方案中,重链多肽可以包括VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区。

[0113] 重链多肽可以包括互补决定区("CDR")组。CDR组可以含有VH区的三个高变区。从

重链多肽的N末端开始,这些CDR分别被表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。重链多肽的CDR1、CDR2和CDR3可以有助于抗原结合或识别。

[0114] (2) 轻链多肽

[0115] 重组核酸序列构建体可以包括编码轻链多肽、其片段、其变体或它们的组合的异源核酸序列。轻链多肽可以包括可变轻链 (VL) 区和/或恒定轻链 (CL) 区。

[0116] 轻链多肽可以包括互补决定区 (“CDR”) 组。CDR组可以含有VL区的三个高变区。从轻链多肽的N末端开始,这些CDR分别被表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。轻链多肽的CDR1、CDR2和CDR3可以有助于结合或识别抗原。

[0117] (3) 蛋白酶切割位点

[0118] 重组核酸序列构建体可以包括编码蛋白酶切割位点的异源核酸序列。蛋白酶切割位点可以由蛋白酶或肽酶识别。蛋白酶可以是内肽酶或内切蛋白酶,例如但不限于弗林蛋白酶、弹性蛋白酶、HtrA、钙蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶。蛋白酶可以是弗林蛋白酶。在其他实施方案中,蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、或切割内部肽键(即,不切割N末端肽键或C末端肽键)的任何蛋白酶。

[0119] 蛋白酶切割位点可以包括促进或增加切割效率的一个或多个氨基酸序列。一个或多个氨基酸序列可以提高或增加形成或产生离散多肽的效率。一个或多个氨基酸序列可以包括2A肽序列。

[0120] (4) 接头序列

[0121] 重组核酸序列构建体可以包括一个或多个接头序列。接头序列可以在空间上分隔或连接本文所述的一种或多种组分。在其他实施方案中,接头序列可以编码在空间上分隔或连接两个或更多个多肽的氨基酸序列。

[0122] (5) 启动子

[0123] 重组核酸序列构建体可以包括一个或多个启动子。一个或多个启动子可以是能够驱动基因表达和调控基因表达的任何启动子。这种启动子是经由DNA依赖性RNA聚合酶进行转录所需的顺式作用序列元件。用于引导基因表达的启动子的选择取决于具体的应用。启动子可以位于与重组核酸序列构建体中的转录起始点相距与它在它的天然环境中与转录起始位点相距的距离大致相同的距离处。然而,可以容许该距离的变化而不会丧失启动子功能。

[0124] 启动子可以与编码重链多肽和/或轻链多肽的异源核酸序列可操作地连接。启动子可以是被证实对于在真核细胞中表达来说有效的启动子。与编码序列可操作地连接的启动子可以是CMV启动子;来自猿猴病毒40 (SV40) 的启动子,诸如SV40早期启动子和SV40晚期启动子;小鼠乳腺瘤病毒 (MMTV) 启动子;人免疫缺陷病毒 (HIV) 启动子,诸如牛免疫缺陷病毒 (BIV) 长末端重复序列 (LTR) 启动子;莫洛尼病毒启动子;禽白血病病毒 (ALV) 启动子;巨细胞病毒 (CMV) 启动子,诸如CMV立即早期启动子;爱泼斯坦-巴尔病毒 (EBV) 启动子或劳斯肉瘤病毒 (RSV) 启动子。启动子也可以是来自人基因的启动子,诸如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸、人多角体蛋白或人金属硫蛋白。

[0125] 启动子可以是组成型启动子或诱导型启动子,所述诱导型启动子只有当宿主细胞暴露于一些特定的外部刺激时才会引发转录。在多细胞生物体的情况下,启动子也可以对

特定组织或器官或发育阶段具有特异性。启动子也可以是天然或合成的组织特异性启动子,诸如肌肉或皮肤特异性启动子。这些启动子的实例描述于美国专利申请公开号US20040175727中,该美国专利申请公开的内容整体并入本文。

[0126] 启动子可以与增强子结合。增强子可以位于编码序列的上游。增强子可以是人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸或病毒增强子,诸如来自CMV、FMDV、RSV或EBV的增强子。在美国专利第5,593,972、5,962,428和W094/016737号中描述了多核苷酸功能增强,每个专利的内容通过引用全部并入本文。

[0127] (6) 内含子

[0128] 重组核酸序列构建体可以包括一个或多个内含子。每个内含子可以包括功能性剪接供体和受体位点。内含子可以包括剪接的增强子。内含子可以包括有效剪接所需的一个或多个信号。

[0129] (7) 转录终止区

[0130] 重组核酸序列构建体可以包括一个或多个转录终止区。转录终止区可以在编码序列的下游以提供有效的终止。转录终止区可以从与上述启动子相同的基因中获得或可以从一个或多个不同的基因中获得。

[0131] (8) 起始密码子

[0132] 重组核酸序列构建体可以包括一个或多个起始密码子。起始密码子可以位于编码序列的上游。起始密码子可以与编码序列同框。起始密码子可以与有效翻译起始所需的一个或多个信号结合,例如但不限于核糖体结合位点。

[0133] (9) 终止密码子

[0134] 重组核酸序列构建体可以包括一个或多个终止子或终止密码子。终止密码子可以在编码序列的下游。终止密码子可以与编码序列同框。终止密码子可以与有效翻译终止所需的一个或多个信号结合。

[0135] (10) 多聚腺苷酸化信号

[0136] 重组核酸序列构建体可以包括一个或多个多聚腺苷酸化信号。多聚腺苷酸化信号可以包括转录物的有效多聚腺苷酸化所需的一个或多个信号。多聚腺苷酸化信号可以位于编码序列的下游。多聚腺苷酸化信号可以是SV40多聚腺苷酸化信号、LTR多聚腺苷酸化信号、牛生长激素(bGH)多聚腺苷酸化信号、人生长激素(hGH)多聚腺苷酸化信号、或人 β -球蛋白多聚腺苷酸化信号。SV40多聚腺苷酸化信号可以是来自pCEP4质粒(Invitrogen, San Diego, CA)的多聚腺苷酸化信号。

[0137] (11) 前导序列

[0138] 重组核酸序列构建体可以包括一个或多个前导序列。前导序列可以编码信号肽。信号肽可以是免疫球蛋白(Ig)信号肽,例如但不限于IgG信号肽和IgE信号肽。

[0139] 重组核酸序列构建体的排列

[0140] 如上文所述,重组核酸序列可以包括一种或多种重组核酸序列构建体,其中每种重组核酸序列构建体可以包括一种或多种组分。一种或多种组分详细描述于上文中。当被包括在重组核酸序列构建体中时,一种或多种组分可以相对于彼此以任何顺序排列。在一些实施方案中,一种或多种组分可以如下文所述在重组核酸序列构建体中排列。

[0141] (12) 排列1

[0142] 在一种排列中,第一重组核酸序列构建体可以包括编码重链多肽的异源核酸序列,并且第二重组核酸序列构建体可以包括编码轻链多肽的异源核酸序列。例如,在一个实施方案中,第一重组核酸序列编码重链多肽,其具有与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:22之一至少95%同源的氨基酸序列。在一个实施方案中,第一重组核酸序列包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21至少95%同源的核酸序列。在一个实施方案中,第二重组核酸序列编码轻链多肽,其具有与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:24之一至少95%同源的氨基酸序列。在一个实施方案中,第二重组核酸序列包含与SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:23至少95%同源的核酸序列。

[0143] 第一重组核酸序列构建体可以被放置在载体中。第二重组核酸序列构建体可以被放置在第二或单独的载体中。将重组核酸序列构建体放置到载体中更详细地描述于下文中。

[0144] 第一重组核酸序列构建体还可以包括启动子、内含子、转录终止区、起始密码子、终止密码子和/或多聚腺苷酸化信号。第一重组核酸序列构建体还可以包括前导序列,其中前导序列位于编码重链多肽的异源核酸序列的上游(或5')。因此,由前导序列编码的信号肽可以通过肽键与重链多肽连接。

[0145] 第二重组核酸序列构建体还可以包括启动子、起始密码子、终止密码子和多聚腺苷酸化信号。第二重组核酸序列构建体还可以包括前导序列,其中前导序列位于编码轻链多肽的异源核酸序列的上游(或5')。因此,由前导序列编码的信号肽可以通过肽键与轻链多肽连接。

[0146] 因此,排列1的一个实例可以包括编码包括VH和CH1的重链多肽的第一载体(并且因此包括第一重组核酸序列构建体),以及编码包括VL和CL的轻链多肽的第二载体(并且因此包括第二重组核酸序列构建体)。排列1的第二实例可以包括编码包括VH、CH1、铰链区、CH2和CH3的重链多肽的第一载体(并且因此包括第一重组核酸序列构建体),以及编码包括VL和CL的轻链多肽的第二载体(并且因此包括第二重组核酸序列构建体)。

[0147] (13) 排列2

[0148] 在第二排列中,重组核酸序列构建体可以包括编码重链多肽的异源核酸序列和编码轻链多肽的异源核酸序列。编码重链多肽的异源核酸序列可以位于编码轻链多肽的异源核酸序列的上游(或5')。或者,编码轻链多肽的异源核酸序列可以位于编码重链多肽的异源核酸序列的上游(或5')。

[0149] 重组核酸序列构建体可以被放置在载体中,如下文更详细描述的那样。

[0150] 重组核酸序列构建体可以包括编码蛋白酶切割位点的异源核酸序列和/或接头序列。如果被包括在重组核酸序列构建体中,那么编码蛋白酶切割位点的异源核酸序列可以位于编码重链多肽的异源核酸序列和编码轻链多肽的异源核酸序列之间。因此,蛋白酶切割位点允许在表达时将重链多肽和轻链多肽分离成不同的多肽。在其他实施方案中,如果接头序列被包括在重组核酸序列构建体中,则接头序列可以位于编码重链多肽的异源核酸序列和编码轻链多肽的异源核酸序列之间。

[0151] 重组核酸序列构建体还可以包括启动子、内含子、转录终止区、起始密码子、终止密码子和/或多聚腺苷酸化信号。重组核酸序列构建体可以包括一个或多个启动子。重组核

酸序列构建体可以包括两个启动子以使得一个启动子可以与编码重链多肽的异源核酸序列关联,并且第二启动子可以与编码轻链多肽的异源核酸序列关联。在另外的其他实施方案中,重组核酸序列构建体可以包括一个启动子,该启动子与编码重链多肽的异源核酸序列和编码轻链多肽的异源核酸序列关联。

[0152] 重组核酸序列构建体还可以包括两个前导序列,其中第一前导序列位于编码重链多肽的异源核酸序列的上游(或5'),并且第二前导序列位于编码轻链多肽的异源核酸序列的上游(或5')。因此,由第一前导序列编码的第一信号肽可以通过肽键与重链多肽连接,并且由第二前导序列编码的第二信号肽可以通过肽键与轻链多肽连接。

[0153] 因此,排列2的一个实例可以包括编码包括VH和CH1的重链多肽以及包括VL和CL的轻链多肽的载体(并且因此包括重组核酸序列构建体),其中接头序列位于编码重链多肽的异源核酸序列和编码轻链多肽的异源核酸序列之间。

[0154] 排列2的第二实例可以包括编码包括VH和CH1的重链多肽以及包括VL和CL的轻链多肽的载体(并且因此包括重组核酸序列构建体),其中编码蛋白酶切割位点的异源核酸序列位于编码重链多肽的异源核酸序列和编码轻链多肽的异源核酸序列之间。

[0155] 排列2的第三实例可以包括编码包括VH、CH1、铰链区、CH2和CH3的重链多肽以及包括VL和CL的轻链多肽的载体(并且因此包括重组核酸序列构建体),其中接头序列位于编码重链多肽的异源核酸序列和编码轻链多肽的异源核酸序列之间。

[0156] 排列2的第四实例可以包括编码包括VH、CH1、铰链区、CH2和CH3的重链多肽以及包括VL和CL的轻链多肽的载体(并且因此包括重组核酸序列构建体),其中编码蛋白酶切割位点的异源核酸序列位于编码重链多肽的异源核酸序列和编码轻链多肽的异源核酸序列之间。

[0157] 从重组核酸序列构建体表达

[0158] 如上文所述,在一种或多种组分中,重组核酸序列构建体可以包括编码重链多肽的异源核酸序列和/或编码轻链多肽的异源核酸序列。因此,重组核酸序列构建体可以促进重链多肽和/或轻链多肽的表达。

[0159] 当利用如上文所述的排列1时,第一重组核酸序列构建体可以促进重链多肽的表达,并且第二重组核酸序列构建体可以促进轻链多肽的表达。当利用如上文所述的排列2时,重组核酸序列构建体可以促进重链多肽和轻链多肽的表达。

[0160] 在表达时,例如但不限于在细胞、生物体或哺乳动物中,重链多肽和轻链多肽可以组装成合成抗体。具体来说,重链多肽和轻链多肽可以彼此相互作用以使得组装产生能够结合抗原的合成抗体。在其他实施方案中,重链多肽和轻链多肽可以彼此相互作用以使得组装产生与并非如本文所述组装的抗体相比具有更大的免疫原性的合成抗体。在另外的其他实施方案中,重链多肽和轻链多肽可以彼此相互作用以使得组装产生能够引发或诱导对抗原的免疫应答的合成抗体。

[0161] 载体

[0162] 上述重组核酸序列构建体可以被放置在一种或多种载体中。一种或多种载体可以含有复制起点。一种或多种载体可以是质粒、噬菌体、细菌人工染色体或酵母人工染色体。一种或多种载体可以是自我复制染色体外载体或整合到宿主基因组中的载体。

[0163] 载体包括但不限于质粒、表达载体、重组病毒、任何形式的重组“裸DNA”载体等等。

“载体”包含可以感染、转染、瞬时或永久转导细胞的核酸。应认识到,载体可以是裸核酸,或与蛋白质或脂质复合的核酸。载体任选地包含病毒或细菌核酸和/或蛋白质和/或膜(例如,细胞膜、病毒脂质包膜等)。载体包括但不限于DNA片段可以附接和复制的复制子(例如,RNA复制子、噬菌体)。因此,载体包括但不限于RNA、自主自我复制的环状或线性DNA或RNA(例如,质粒、病毒等,参见,例如美国专利第5,217,879号),并且包括表达和非表达质粒。在一些实施方案中,载体包括线性DNA、酶DNA或合成DNA。当重组微生物或细胞培养物被描述为具有“表达载体”时,这包括染色体外环状和线性DNA以及已整合进一条或多条宿主染色体的DNA二者。当载体由宿主细胞维持时,载体可以在有丝分裂期间作为自主结构由细胞稳定复制,或整合在宿主的基因组内。

[0164] 所述一种或多种载体可以是异源表达构建体,其通常是用于将特定基因引入到靶细胞中的质粒。一旦表达载体处于细胞内,由重组核酸序列构建体编码的重链多肽和/或轻链多肽就由细胞转录和翻译机制核糖体复合物产生。所述一种或多种载体可以表达大量稳定的信使RNA,因此也可以表达蛋白质。

[0165] (14) 表达载体

[0166] 一种或多种载体可以是环状质粒或线性核酸。环状质粒和线性核酸能够引导特定核苷酸序列在适当的受试者细胞中表达。包含重组核酸序列构建体的一种或多种载体可以是嵌合的,这意味着其组分中的至少一种相对于其他组分中的至少一种是异源的。

[0167] (15) 质粒

[0168] 一种或多种载体可以是质粒。质粒可用于用重组核酸序列构建体转染细胞。质粒可用于将重组核酸序列构建体引入受试者中。质粒还可以包含调控序列,所述调控序列可以非常适合于其中施用质粒的细胞中的基因表达。

[0169] 质粒还可以包含哺乳动物复制起点,以在染色体外维持质粒并且在细胞中产生质粒的多个拷贝。质粒可以是来自Invitrogen(San Diego,CA)的pVAX1、pCEP4或pREP4,它们可以包含爱泼斯坦-巴尔病毒复制起点和核抗原EBNA-1编码区,这可以在没有整合的情况下产生高拷贝游离型复制。质粒的骨架可以是pAV0242。质粒可以是复制缺陷型5型腺病毒(Ad5)质粒。

[0170] 质粒可以是pSE420(Invitrogen,San Diego,Calif.),可以用于在大肠杆菌(E.coli)中产生蛋白质。质粒也可以是pYES2(Invitrogen,San Diego,Calif.),其可以用于在酵母的酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)株中产生蛋白质。质粒也可以是MAXBAC™完整杆状病毒表达系统(Invitrogen,San Diego,Calif.),其可以用于在昆虫细胞中产生蛋白质。质粒也可以是pcDNA1或pcDNA3(Invitrogen,San Diego,Calif.),其可以用于在哺乳动物细胞,诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中产生蛋白质。

[0171] (16) RNA

[0172] 在一个实施方案中,所述核酸为RNA分子。在一个实施方案中,所述RNA分子由本文所述的DNA序列转录而来。例如,在一些实施方案中,所述RNA分子由与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:23之一至少90%同源的DNA序列编码。在另一个实施方案中,核苷酸序列包含由编码SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ

ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和 SEQ ID NO:27中的至少一个的多肽序列,或其变体或其片段的DNA序列转录的RNA序列。因此,在一个实施方案中,本发明提供了编码一种或多种DMAb的RNA分子。RNA可以是正链。因此,在一些实施方案中,RNA分子可以由细胞翻译,而不需要任何中间重复步骤,诸如逆转录。本发明所用的RNA分子可以具有5'帽(例如7-甲基鸟苷)。该帽可以增加RNA的体内翻译。本发明所用的RNA分子的5'核苷酸可以具有5'三磷酸基团。在加帽RNA中,这可以通过5'至5'桥连接至7-甲基鸟苷。RNA分子可以具有3'多聚腺苷酸尾。它还可包括其3'末端附近的多聚腺苷酸聚合酶识别序列(例如AAUAAA)。本发明使用的RNA分子可以是单链的。可用于本发明的RNA分子可包括合成RNA。在一些实施方案中,所述RNA分子是裸RNA分子。在一个实施方案中,所述RNA分子包含在载体内。

[0173] 在一个实施方案中,RNA具有5'和3'UTR。在一个实施方案中,5'UTR的长度介于0至3000个核苷酸之间。待添加到编码区的5'和3'UTR序列的长度可以因不同的方法而改变,所述方法包括但不限于设计用于PCR,与UTR的不同区域退火的引物。使用该方法,本领域的普通技术人员可以改变转录RNA转染后实现最佳翻译效率所需的5'和3'UTR长度。

[0174] 5'和3'UTR可以是目标基因的天然存在的内源5'和3'UTR。或者,可以通过将UTR序列并入正向和反向引物中或通过对模板的任何其他修饰来添加并非目标基因内源的UTR序列。使用并非目标基因内源的UTR序列可用于改变RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,已知3'UTR序列中富含AU的元件可以降低RNA的稳定性。因此,可以选择或设计3'UTR,以基于本领域熟知的UTR的性质来增加转录RNA的稳定性。

[0175] 在一个实施方案中,5'UTR可含有内源基因的Kozak序列。或者,当如上所述通过PCR添加并非目标基因内源的5'UTR时,可以通过添加5'UTR序列重新设计共有Kozak序列。Kozak序列可以提高一些RNA转录物的翻译效率,但似乎不是所有RNA都需要才能实现有效翻译。对于许多RNA而言对Kozak序列的需要是本领域已知的。在其他实施方案中,5'UTR可以源自其RNA基因组在细胞中稳定的RNA病毒。在其他实施方案中,各种核苷酸类似物可用于3'或5'UTR中以阻止核酸外切酶降解RNA。

[0176] 在一个实施方案中,RNA具有在5'末端的帽和3'聚(A)尾,其决定了细胞中的核糖体结合、翻译起始和RNA稳定性。

[0177] 在一个实施方案中,RNA是核苷修饰的RNA。核苷修饰的RNA相对于未修饰的RNA具有特别的优势,包括例如稳定性增加、先天免疫原性低或不存在及翻译增强。

[0178] (17) 环状和线性载体

[0179] 一种或多种载体可以是环状质粒,其可以通过整合到细胞基因组中来转化靶细胞或在染色体外存在(例如,具有复制起点的自主复制质粒)。载体可以是pVAX、pcDNA3.0或provax,或能够表达由重组核酸序列构建体编码的重链多肽和/或轻链多肽的任何其他表达载体。

[0180] 本文还提供了线性核酸或线性表达盒("LEC"),其能够经由电穿孔有效地向受试者递送并且表达由重组核酸序列构建体编码的重链多肽和/或轻链多肽。LEC可以是缺乏任何磷酸骨架的任何线性DNA。LEC可以不含任何抗生素抗性基因和/或磷酸骨架。LEC可以不含与所期望的基因表达无关的其他核酸序列。

[0181] LEC可以来源于能够线性化的任何质粒。质粒可能能够表达由重组核酸序列构建

体编码的重链多肽和/或轻链多肽。质粒可以是pNP (Puerto Rico/34) 或pM2 (New Caledonia/99)。质粒可以是WLV009、pVAX、pcDNA3.0或provax,或能够表达由重组核酸序列构建体编码的重链多肽和/或轻链多肽的任何其他表达载体。

[0182] LEC可以是pM2。LEC可以是pNP。pNP和pMR可以分别来源于pNP (Puerto Rico/34) 和pM2 (New Caledonia/99)。

[0183] (18) 病毒载体

[0184] 在一个实施方案中,本文提供病毒载体,它们能够将本发明的核酸递送至细胞。表达载体可以以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术是本领域中公知的,并且例如在 Sambrook等人(2001年)和在 Ausubel等人(1997),以及其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。一般来讲,合适的载体含有在至少一种生物体中发挥功能的复制起点、启动子序列、简便限制性核酸内切酶位点以及一个或多个选择性标记。(参见,例如WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利第6,326,193号。病毒载体,特别是逆转录病毒载体,已成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物(例如人)细胞的方法。其他病毒载体可以来源于慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒等等。参见例如,美国专利第5,350,674和5,585,362号。

[0185] (19) 制备载体的方法

[0186] 本文提供了一种用于制备一种或多种载体的方法,在一种或多种载体中已经放置了重组核酸序列构建体。在最终亚克隆步骤之后,可以使用本领域已知的方法,使用载体来接种大规模发酵罐中的细胞培养物。

[0187] 在其他实施方案中,在最终亚克隆步骤之后,可以将载体与一种或多种电穿孔(EP)装置一起使用。EP装置更详细地描述于下文中。

[0188] 一种或多种载体可以使用已知装置和技术组合配制或制造,但优选地,它们使用2007年5月23日提交的、许可的、共同未决的美国临时专利申请美国序列号60/939,792描述的质粒制造技术来制造。在一些实例中,本文所述的DNA质粒可以以大于或等于10mg/mL的浓度配制。除了美国序列号60/939792中所述的那些装置和方案之外,制造技术还包括或结合了本领域的普通技术人员通常已知的多种装置和方案,包括2007年7月3日公布的许可专利美国专利号7,238,522中所述的那些。上文引用的申请和专利美国序列号60/939,792和美国专利号7,238,522分别据此整体并入本文。

[0189] 4. 抗体

[0190] 如上文所述,重组核酸序列可以编码抗体、其片段、其变体或它们的组合。抗体可以与抗原结合或反应,所述抗原更详细地描述于下文中。

[0191] 抗体可以包含重链互补决定区(“CDR”)组和轻链互补决定区组,其分别插入于重链框架(“FR”)组和轻链框架组之间,这为CDR提供支撑并且限定CDR相对于彼此的空间关系。CDR组可以含有重链V区或轻链V区的三个高变区。从重链或轻链的N末端开始,这些区域分别表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。抗原结合位点因此可以包括六个CDR,包括来自重链V区和轻链V区中的每一个的CDR组。

[0192] 蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先切割IgG分子以产生几个片段,其中两个(F(ab)片段)各自包含包括完整抗原结合位点的共价异二聚体。胃蛋白酶能够切割IgG分子以提供几个

片段,包括F(ab')₂片段,其包含两个抗原结合位点。因此,抗体可以是Fab或F(ab')₂。Fab可以包括重链多肽和轻链多肽。Fab的重链多肽可以包括VH区和CH1区。Fab的轻链可以包括VL区和CL区。

[0193] 抗体可以是免疫球蛋白(Ig)。Ig可以是例如IgA、IgM、IgD、IgE和IgG。免疫球蛋白可以包括重链多肽和轻链多肽。免疫球蛋白的重链多肽可以包括VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区。免疫球蛋白的轻链多肽可以包括VL区和CL区。

[0194] 抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。抗体可以是嵌合抗体、单链抗体、亲和力成熟抗体、人抗体、人源化抗体或完全人抗体。人源化抗体可以是来自非人物种的结合所期望的抗原的抗体,所述抗原具有来自非人物种的一个或多个互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区。

[0195] 抗体可以是如下文更详细描述的双特异性抗体。抗体可以是也如下文更详细描述的双功能抗体。

[0196] 如上文所述,在向受试者施用组合物后,在受试者体内可以产生抗体。抗体在受试者体内可能具有半衰期。在一些实施方案中,抗体可以被修饰以延长或缩短其在受试者体内的半衰期。这样的修饰更详细地描述于下文中。

[0197] 抗体可以是脱岩藻糖基化的,如下文更详细描述的那样。

[0198] 在一个实施方案中,抗体结合疏螺旋体属种抗原。在一个实施方案中,抗体结合OspA。

[0199] 抗体可以被修饰以减少或防止抗原相关的疾病的抗体依赖性增强(ADE),如下文更详细描述的那样。

[0200] 双特异性抗体

[0201] 重组核酸序列可以编码双特异性抗体、其片段、其变体或它们的组合。双特异性抗体可以与两种抗原结合或反应,例如下文更详细描述抗原中的两种。双特异性抗体可以由本文所述的两种抗体的片段组成,从而允许双特异性抗体与两种预期靶分子结合或反应,所述靶分子可以包括抗原(其在下文中有更详细地描述)、配体(包括受体的配体)、受体(包括受体上的配体结合位点)、配体-受体复合物和标志物。

[0202] 本发明提供了新型双特异性抗体,其包含特异性结合第一靶标的的第一抗原结合位点和特异性结合第二靶标的的第二抗原结合位点,其具有特别有利的性质,如可生产性、稳定性、结合亲和力、生物活性、特定靶向某些T细胞、靶向效率和降低的毒性。在一些情况下,存在双特异性抗体,其中双特异性抗体以高亲和力结合第一靶标而以低亲和力结合第二靶标。在其他情况下,存在双特异性抗体,其中双特异性抗体以低亲和力结合第一靶标而以高亲和力结合第二靶标。在其他情况下,存在双特异性抗体,其中双特异性抗体以所需亲和力结合第一靶标且以所需亲和力结合第二靶标。

[0203] 在一个实施方案中,双特异性抗体是二价抗体,其包含a)特异性结合第一抗原的抗体的第一轻链和第一重链,和b)特异性结合第二抗原的抗体的第二轻链和第二重链。

[0204] 根据本发明的双特异性抗体分子可具有两个任何所需特异性的结合位点。在一些实施方案中,其中一个结合位点能够结合肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,Fab片段中包括的结合位点是对疏螺旋体属种抗原有特异性的结合位点。在一些实施方案中,单链Fv片段中包括的结合位点是对疏螺旋体属种抗原(如OspA抗原)有特异性的结合位点。

[0205] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体分子的其中一个结合位点能够结合T细胞特异性受体分子和/或天然杀伤细胞(NK细胞)特异性受体分子。T细胞特异性受体是所谓的“T细胞受体”(TCR),其允许T细胞结合由另一个称为抗原呈递细胞或APC的细胞呈递的表位/抗原并且如果存在另外的信号,则被所述表位/抗原激活并对所述表位/抗原应答。已知T细胞受体类似于天然存在的免疫球蛋白的Fab片段。它通常是单价的,涵盖 α -链和 β -链,在一些实施方案中,它涵盖 γ -链和 δ -链(同上)。因此,在一些实施方案中,TCR是TCR(α/β),并且在一些实施方案中,它是TCR(γ/δ)。T细胞受体与CD3T细胞辅助受体形成复合物。CD3是蛋白质复合物,由四条不同的链组成。在哺乳动物中,该复合物含有CD3 γ 链、CD3 δ 链和两条CD3 ϵ 链。这些链与称为T细胞受体(TCR)的分子和 ζ 链结合以在T淋巴细胞中产生激活信号。因此,在一些实施方案中,T细胞特异性受体是CD3T细胞辅助受体。在一些实施方案中,T细胞特异性受体是CD28,一种也在T细胞上表达的蛋白质。CD28可以提供T细胞活化所需的共刺激信号。CD28在T细胞增殖和存活、细胞因子产生和T辅助细胞2型发育中起重要作用。T细胞特异性受体的另一个实例是CD134,也称为Ox40。CD134/Ox40在激活后的24至72小时后表达,并且可以用于定义二级共刺激分子。T细胞受体的另一实例是能够与抗原呈递细胞(APC)上的4-1BB配体结合的4-1BB,由此产生T细胞的共刺激信号。主要存在于T细胞上的受体的另一实例是CD5,其也以低水平存在于B细胞上。改变T细胞功能的受体的另一实例是CD95,也称为Fas受体,其通过在其他细胞的表面上表达的Fas配体介导凋亡信号传导。据报道,CD95调节静息T淋巴细胞中TCR/CD3驱动的信号传导途径。

[0206] NK细胞特异性受体分子的实例是CD16(一种低亲和力Fc受体)和NKG2D。存在于T细胞和天然杀伤(NK)细胞表面上的受体分子的实例是CD2和CD2超家族的其他成员。CD2能够作为T细胞和NK细胞上的共刺激分子。

[0207] 在一些实施方案中,抗体分子的第一结合位点结合疏螺旋体属种抗原,并且第二结合位点结合T细胞特异性受体分子和/或天然杀伤(NK)细胞特异性受体分子。

[0208] 在一些实施方案中,抗体分子的第一结合位点结合疏螺旋体属种抗原,并且第二结合位点结合T细胞特异性受体分子和/或天然杀伤(NK)细胞特异性受体分子。在一些实施方案中,抗体分子的第一结合位点结合疏螺旋体属种抗原,并且第二结合位点结合CD3、T细胞受体(TCR)、CD28、CD16、NKG2D、Ox40、4-1BB、CD2、CD5和CD95中的一种。

[0209] 在一些实施方案中,抗体分子的第一结合位点结合T细胞特异性受体分子和/或天然杀伤(NK)细胞特异性受体分子,并且第二结合位点结合疏螺旋体属种抗原。在一些实施方案中,抗体的第一结合位点结合T细胞特异性受体分子和/或天然杀伤(NK)细胞特异性受体分子,并且第二结合位点结合疏螺旋体属种抗原。在一些实施方案中,抗体的第一结合位点结合CD3、T细胞受体(TCR)、CD28、CD16、NKG2D、Ox40、4-1BB、CD2、CD5和CD95中的一种,并且第二结合位点结合疏螺旋体属种抗原。在一个实施方案中,疏螺旋体属种抗原是OspA。

[0210] 双功能抗体

[0211] 重组核酸序列可以编码双功能抗体、其片段、其变体或它们的组合。双功能抗体可以与下文所述的抗原结合或反应。双功能抗体还可以被修饰以赋予抗体除识别和结合抗原之外的另外的功能。这样的修饰可以包括但不限于与因子H或其片段偶联。因子H是补体激活的可溶性调节因子并且因此可以经由补体介导的裂解(CML)来促进免疫应答。

[0212] 延长抗体半衰期

[0213] 如上文所述,抗体可以被修饰以延长或缩短抗体在受试者体内的半衰期。修饰可以延长或缩短抗体在受试者的血清中的半衰期。

[0214] 修饰可以存在于抗体的恒定区中。修饰可以是抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代,与不包含一个或多个氨基酸取代的抗体的半衰期相比,一个或多个氨基酸置换延长了抗体的半衰期。修饰可以是抗体的CH2域中的一个或多个氨基酸取代,与不包含一个或多个氨基酸取代的抗体的半衰期相比,一个或多个氨基酸取代延长了抗体的半衰期。

[0215] 在一些实施方案中,恒定区中的一个或多个氨基酸取代可以包括用酪氨酸残基置换恒定区中的甲硫氨酸残基、用苏氨酸残基置换恒定区中的丝氨酸残基、用谷氨酸残基置换恒定区中的苏氨酸残基或它们的任何组合,从而延长抗体的半衰期。

[0216] 在其他实施方案中,恒定区中的一个或多个氨基酸置换可以包括用酪氨酸残基置换CH2结构域中的甲硫氨酸残基、用苏氨酸残基置换CH2结构域中的丝氨酸残基、用谷氨酸残基置换CH2结构域中的苏氨酸残基或它们的任何组合,从而延长抗体的半衰期。

[0217] 脱岩藻糖基化

[0218] 重组核酸序列可以编码未经岩藻糖基化的抗体(即,脱岩藻糖基化抗体或非岩藻糖基化抗体)、其片段、其变体或它们的组合。岩藻糖基化包括将糖岩藻糖添加到分子中,例如,将岩藻糖与N-聚糖、O-聚糖以及糖脂连接。因此,在脱岩藻糖基化抗体中,岩藻糖不与恒定区的碳水化合物链连接。进而,与岩藻糖基化抗体相比,这种岩藻糖基化的缺乏可以提高抗体的Fc γ RIIIa结合和抗体指导的细胞毒性(ADCC)活性。因此,在一些实施方案中,与岩藻糖基化抗体相比,非岩藻糖基化抗体可以表现出增加的ADCC活性。

[0219] 抗体可以被修饰以防止或抑制抗体的岩藻糖基化。在一些实施方案中,与未修饰的抗体相比,这样的修饰的抗体可以表现出增加的ADCC活性。修饰可以在重链、轻链或它们的组合中。修饰可以是重链中的一个或多个氨基酸取代、轻链中的一个或多个氨基酸取代或它们的组合。

[0220] a. 减少的ADE反应

[0221] 抗体可以被修饰以减少或防止抗原相关的疾病的抗体依赖性增强(ADE),但是仍中和抗原。

[0222] 在一些实施方案中,抗体可以被修饰以包括减少或防止抗体与Fc γ R1a结合的一个或多个氨基酸取代。一个或多个氨基酸取代可以在抗体的恒定区中。一个或多个氨基酸取代可以包括在抗体的恒定区中用丙氨酸残基置换亮氨酸残基,即在本文也被称为LA、LA突变或LA取代。一个或多个氨基酸取代可以包括在抗体的恒定区中分别用丙氨酸残基取代两个亮氨酸残基,并且在本文也被称为LALA、LALA突变或LALA取代。LALA取代的存在可以防止或阻断抗体与Fc γ R1a结合,因此修饰的抗体不会增强或引起抗原相关的疾病的ADE,但是仍中和抗原。

[0223] 5. 抗原

[0224] 合成抗体涉及抗原或其片段或变体。抗原可以是核酸序列、氨基酸序列、多糖或其组合。核酸序列可以是DNA、RNA、cDNA、其变体、其片段或它们的组合。氨基酸序列可以是蛋白质、肽、其变体、其片段或它们的组合。多糖可以是核酸编码的多糖。

[0225] 抗原可以来自于细菌。抗原可能与细菌感染相关。在一个实施方案中,抗原可以是细菌毒力因子。

[0226] 在一个实施方案中,本发明的合成抗体靶向两种或更多种抗原。在一个实施方案中,双特异性抗体的至少一种抗原选自本文所述的抗原。在一个实施方案中,所述两种或更多种抗原选自本文所述的抗原。

[0227] 细菌抗原

[0228] 细菌抗原可以是细菌抗原或其片段或变体。细菌可来自螺旋体门(Spirochaetae phylum)。细菌可以是引起疾病的细菌。细菌可以是疏螺旋体属种细菌。细菌可以是一种或多种疏螺旋体属种细菌,包括但不限于伯氏疏螺旋体、鲁氏疏螺旋体(*Borrelia lusitaniae*)、阿氏疏螺旋体(*Borrelia afzelii*)、必氏疏螺旋体(*Borrelia bissettii*)、巴伐利亚疏螺旋体(*Borrelia bavaricensis*)、智利疏螺旋体(*Borrelia chilensis*)、伽氏疏螺旋体(*Borrelia garinii*)、法雷斯疏螺旋体(*Borrelia valaisiana*)、斯柏曼疏螺旋体(*Borrelia spielmanii*)和非兰地疏螺旋体(*Borrelia finlandensis*)。

[0229] 细菌抗原可以是疏螺旋体属种抗原,或其片段,或其变体。疏螺旋体属种抗原可来自允许疏螺旋体属种复制或存活的细菌产物。允许疏螺旋体属种复制或存活的细菌产物包括但不限于结构组分、酶和毒素。此类产品可以是脂蛋白、外表面蛋白、脊椎动物宿主内感染性或持久性所需的产物,以及涉及运动和趋化性的产物中的一种。

[0230] 在一个实施方案中,抗原是脂蛋白(例如BptA)。在一个实施方案中,抗原是外表面蛋白(例如OspA、OspB和OspC)。在一个实施方案中,抗原是脊椎动物宿主内感染性或持久性所需的产物(例如PncA、DbpA、DbpB、Bgp、P66和VlsE)。

[0231] 6. 组合物的赋形剂和其他组分

[0232] 组合物还可以包含药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂可以是功能性分子,诸如媒介物、载剂或稀释剂。药学上可接受的赋形剂可以是转染促进剂,其可以包括表面活性剂,诸如免疫刺激复合物(ISCMS);弗氏不完全佐剂(Freunds incomplete adjuvant);LPS类似物,包括单磷酸脂质A;胞壁酰肽;醌类似物;囊泡,诸如鲨烯和角鲨烯;透明质酸;脂质;脂质体;钙离子;病毒蛋白;聚阴离子;聚阳离子或纳米颗粒或者其他已知的转染促进剂。

[0233] 转染促进剂是聚阴离子;聚阳离子,包括聚L-谷氨酸(LGS);或脂质。转染促进剂是聚L-谷氨酸,聚L-谷氨酸可以以小于6mg/ml的浓度存在于组合物中。转染促进剂还可以包括表面活性剂,诸如免疫刺激复合物(ISCMS);弗氏不完全佐剂;LPS类似物,包括单磷酸脂质A;胞壁酰肽;醌类似物以及囊泡,诸如鲨烯和角鲨烯,并且还可以使用与组合物结合施用的透明质酸。组合物还可以包括转染促进剂,诸如脂质;脂质体,包括卵磷脂脂质体或本领域已知的其他脂质体,作为DNA-脂质体混合物(参见例如W09324640);钙离子、病毒蛋白、聚阴离子、聚阳离子或纳米颗粒或者其他已知的转染促进剂。转染促进剂是聚阴离子;聚阳离子,包括聚L-谷氨酸(LGS);或脂质。疫苗中转染剂的浓度小于4mg/ml、小于2mg/ml、小于1mg/ml、小于0.750mg/ml、小于0.500mg/ml、小于0.250mg/ml、小于0.100mg/ml、小于0.050mg/ml或小于0.010mg/ml。

[0234] 组合物还可以包含1994年4月1日提交的美国序列号021,579中所述的遗传促进剂,该专利以引用的方式整体并入。

[0235] 该组合物可包含DNA,其量为约1纳克至100毫克;约1微克至约10毫克;或优选约0.1微克至约10毫克;或更优选约1毫克至约2毫克。在一些优选的实施方案中,根据本发明

的组合物包含约5纳克至约1000微克的DNA。在一些优选的实施方案中,组合物可以含有约10纳克至约800微克的DNA。在一些优选的实施方案中,组合物可以含有约0.1微克至约500微克的DNA。在一些优选的实施方案中,组合物可以含有约1微克至约350微克的DNA。在一些优选的实施方案中,组合物可含有约25至约250微克,约100至约200微克,约1纳克至100毫克;约1微克到约10毫克;约0.1微克到约10毫克;约1毫克至约2毫克,约5纳克至约1000微克,约10纳克至约800微克,约0.1至约500微克,约1至约350微克,约25至约250微克,约100至约200微克的DNA。

[0236] 组合物可以根据要使用的施用方式来配制。可注射的药物组合物可以是无菌的、无热原的和无颗粒的。可以使用等渗制剂或溶液。用于等渗性的添加剂可以包括氯化钠、右旋糖、甘露糖醇、山梨糖醇和乳糖。组合物可以包含血管收缩剂。等渗溶液可以包括磷酸盐缓冲盐水。组合物还可以包含稳定剂,包括明胶和白蛋白。稳定剂可以允许制剂在室温或环境温度下在一段较长的时间内稳定,包括LGS或聚阳离子或聚阴离子。

[0237] 7. 产生合成抗体的方法

[0238] 本发明还涉及一种产生合成抗体的方法。该方法可以包括通过使用下文更详细描述递送方法向有需要的受试者施用组合物。因此,在向受试者施用组合物后,在受试者中或体内产生合成抗体。

[0239] 该方法还可以包括将组合物引入一种或多种细胞中,并且因此,在一种或多种细胞中可以形成或产生合成抗体。该方法还可以包括将组合物引入一种或多种组织中,例如但不限于皮肤和肌肉,并且因此,在一种或多种组织中形成或产生合成抗体。

[0240] 8. 鉴定或筛选抗体的方法

[0241] 本发明还涉及一种鉴定或筛选上述抗体的方法,所述抗体对上述抗原具有反应性或结合上述抗原。鉴定或筛选抗体的方法可以在本领域技术人员已知的方法中使用抗原来鉴定或筛选抗体。这些方法可以包括但不限于从文库(例如,噬菌体展示)中选择抗体以及对动物进行免疫接种,然后分离和/或纯化抗体。

[0242] 9. 组合物的递送方法

[0243] 本发明还涉及一种向有需要的受试者递送组合物的方法。递送方法可以包括向受试者施用组合物。施用可以包括但不限于在进行和不进行体内电穿孔的情况下进行DNA注射、脂质体介导的递送以及纳米颗粒促进的递送。

[0244] 接受组合物的递送的哺乳动物可以是人、灵长类动物、非人灵长类动物、奶牛、牛、绵羊、山羊、羚羊、野牛、水牛、野牛、牛科动物、鹿、刺猬、象、美洲驼、羊驼、小鼠、大鼠和鸡。

[0245] 组合物可以通过不同的途径施用,包括口服、肠胃外、舌下、透皮、经直肠、经粘膜、局部、经由吸入、经由颊面施用、胸膜内、静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、肌内、鼻内、鞘内以及关节内或它们的组合。对于兽医用途,组合物可以根据正常的兽医实践作为可适当接受的制剂施用。兽医可以容易地确定最适合于具体动物的给药方案和施途径。组合物可以通过传统注射器、无针注射装置、“微粒轰击基因枪”或其他物理方法,诸如电穿孔(“EP”)、“流体动力学方法”或超声来施用。

[0246] 电穿孔

[0247] 经由电穿孔施用组合物可以使用电穿孔装置来完成,所述电穿孔装置可以被配置成向哺乳动物的所期望的组织递送能够有效引起在细胞膜中形成可逆性孔隙能量脉冲,并

且优选的是,能量脉冲是与使用者输入的预设电流相似的恒定电流。电穿孔装置可以包括电穿孔部件和电极组件或柄部组件。电穿孔部件可以包括和结合电穿孔装置的各种元件中的一种或多种,包括:控制器、电流波形发生器、阻抗测试器、波形记录器、输入元件、状态报告元件、通信端口、存储部件、电源和电源开关。电穿孔可以使用体内电穿孔装置完成,例如CELLECTRA EP系统(Inovio Pharmaceuticals,Plymouth Meeting,PA)或Elgen电穿孔仪(Inovio Pharmaceuticals,Plymouth Meeting,PA),以促进质粒对细胞的转染。

[0248] 电穿孔部件可以充当电穿孔装置的一个元件,并且其他元件是与电穿孔部件通信的单独元件(或部件)。电穿孔部件可以充当电穿孔装置的多于一个元件,其可以与和电穿孔部件分开的电穿孔装置的另外其他元件通信。作为一个机电装置或机械装置的零件存在的电穿孔装置的元件可以不受限制,因为元件可以充当一个装置或彼此通信的单独元件。电穿孔部件可能能够在所期望的组织中递送产生恒定电流的能量脉冲,并且包括反馈机制。电极组件可以包括具有空间排列的多个电极的电极阵列,其中电极组件从电穿孔部件接收能量脉冲并且将其经由电极递送至所期望的组织。多个电极中的至少一个在递送能量脉冲期间是中性的,并且测量所期望组织中的阻抗,并且将阻抗传送给电穿孔部件。反馈机制可以接收所测量的阻抗并且可以调整由电穿孔部件递送的能量脉冲以维持恒定电流。

[0249] 多个电极可以以分散模式递送能量脉冲。多个电极可以经由按照编程序列控制电极以分散模式来递送能量脉冲,并且编程序列是由使用者输入到电穿孔部件。编程序列可以包括按顺序递送的多个脉冲,其中多个脉冲中的每一个脉冲是由至少两个有源电极递送的,其中一个中性电极测量阻抗,并且其中多个脉冲的后续脉冲由至少两个有源电极中不同的电极递送,其中一个中性电极测量阻抗。

[0250] 反馈机制可以通过硬件或软件执行。反馈机制可以通过模拟闭环电路执行。反馈每50 μ s、20 μ s、10 μ s或1 μ s发生一次,但优选地是实时反馈或瞬时的(即基本上瞬时的,如通过用于确定响应时间的可用技术确定)。中性电极可以测量所期望的组织中的阻抗并且将阻抗传送给反馈机制,并且反馈机制对阻抗作出响应并且调整能量脉冲以将恒定电流维持在与预设电流相似的值。反馈机制可以在递送能量脉冲期间连续地并且瞬时地维持恒定电流。

[0251] 可以促进本发明的组合物的递送的电穿孔装置和电穿孔方法的实例包括Draghia-Akli等人的美国专利号7,245,963、Smith等人递交的美国专利公开2005/0052630中所述的那些,这些文献的内容据此以引用的方式整体并入本文。可以用于促进组合物的递送的其他电穿孔装置和电穿孔方法包括2007年10月17日提交的共同未决的和共同拥有的美国专利申请序列号11/874072中提供的那些,该美国专利申请依照美国法典第35篇第119条(e)款要求保护2006年10月17日提交的美国临时申请序列号60/852,149和2007年10月10日提交的美国临时申请序列号60/978,982的权益,所有申请均据此整体并入。

[0252] Draghia-Akli等人的美国专利号7,245,963描述了模块化电极系统和它们用于促进将生物分子引入到身体或植物中所选择的组织的细胞中的用途。模块化电极系统可包括多个针电极;皮下注射针;电连接器,其提供从可编程恒流脉冲控制器到多个针电极的导电连接;和电源。操作人员可以抓住安装在支撑结构上的多个针电极并且将它们牢固地插入到身体或植物中所选择的组织中。然后经由皮下注射针将生物分子递送到所选择的组织中。启动可编程的恒定电流脉冲控制器并且将恒定电流电脉冲施加到多个针电极。所施加

的恒定电流电脉冲促进将生物分子引入到多个电极之间的细胞中。美国专利号7,245,963的全部内容据此以引用的方式并入。

[0253] Smith等人递交的美国专利公开2005/0052630描述了一种电穿孔装置,其可以用于有效地促进生物分子引入到身体或植物中所选择的组织的细胞中。电穿孔装置包括电动装置(“EKD装置”),其操作由软件或固件指定。EKD装置基于使用者对脉冲参数的控制和输入在阵列中的电极之间产生一系列可编程的恒定电流脉冲图形,并且允许存储和获取电流波形数据。电穿孔装置还包括可更换的电极盘,所述电极盘具有针电极的阵列、用于注射针的中心注射通道以及可移除的引导盘。美国专利公开2005/0052630的全部内容在此以引用的方式并入。

[0254] 美国专利号7,245,963和美国专利公开2005/0052630中所述的电极阵列和方法可以适用于不仅深度穿透到诸如肌肉的组织中,而且还深度穿透到其他组织或器官中。由于电极阵列的配置,因此注射针(递送所选择的生物分子)也完全插入到靶器官中,并且在由电极预先界定的区域中垂直于靶组织施用注射。美国专利号7,245,963和美国专利公开2005/005263中所述的电极优选地为20mm长和21号。

[0255] 此外,在包括电穿孔装置和其用途的一些实施方案中考虑,电穿孔装置是以下专利中所述的那些:1993年12月28日公布的美国专利5,273,525、2000年8月29日公布的美国专利6,110,161、2001年7月17日公布的美国专利6,261,281、和2005年10月25日公布的美国专利6,958,060、以及2005年9月6日公布的美国专利6,939,862。此外,本文考虑了涵盖2004年2月24日公布的美国专利6,697,669(涉及使用多种装置中的任一种递送DNA)和2008年2月5日公布的美国专利7,328,064(涉及注射DNA的方法)中提供的主题的专利。上述专利以引用的方式整体并入。

[0256] 10. 治疗方法

[0257] 本文还提供了一种在有需要的受试者中通过在受试者中产生合成抗体来治疗、防止和/或预防疾病的方法。该方法可以包括向受试者施用组合物。向受试者施用组合物可以使用上述递送方法进行。

[0258] 在某些实施方案中,本发明提供了治疗、防止和/或预防疏螺旋体属种感染的方法。在一个实施方案中,该方法治疗、防止和/或预防莱姆病。

[0259] 在受试者中产生合成抗体后,合成抗体可以与抗原结合或反应。这种结合可以中和抗原,阻断另一种分子(例如蛋白质或核酸)对抗原的识别,并且引发或诱导对抗原的免疫应答,从而治疗、防止和/或预防受试者的抗原相关的疾病。

[0260] 所述合成抗体可以在接受所述组合物的施用的受试者中治疗、预防、和/或防止疾病。所述合成抗体通过结合抗原可以在接受所述组合物的施用的受试者中治疗、预防、和/或防止疾病。所述合成抗体可以在接受所述组合物的施用的受试者中促进疾病存活率。在一个实施方案中,与未接受合成抗体施用的患病受试者的预期存活率相比,合成抗体可以使受试者的疾病存活率提高。在多个实施方案中,与在不存在组合物的情况下的预期存活率相比,合成抗体可以使已接受组合物施用的受试者的疾病存活率提高至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%。在一个实施方案中,与未接受合成抗体施用的受试者的预期保护相比,合成抗体可以增加使受试者的针对疾病的保

护。在多个实施方案中,与在不存在组合物的情况下的预期保护相比,合成抗体可以防止接受组合物施用的受试者的疾病至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%。

[0261] 11. 与抗生素组合使用

[0262] 本发明还提供了通过施用合成抗体和治疗性抗生素剂的组合来治疗、防止和/或预防有需要的受试者的疾病的方法。

[0263] 合成抗体和抗生素剂可以使用任何合适的方法施用,使得合成抗体和抗生素剂的组合都存在于受试者中。在一个实施方案中,所述方法可包括通过上文详细描述的任何方法施用包含本发明的合成抗体的第一组合物,并且在合成抗体施用后小于1天、小于2天、小于3天、小于4天、小于5天、小于6天、小于7天、小于8天、小于9天或小于10天施用包含抗生素剂的第二组合物。在一个实施方案中,所述方法可包括通过上文详细描述的任何方法施用包含本发明的合成抗体的第一组合物,并且在合成抗体施用后大于1天、大于2天、大于3天、大于4天、大于5天、大于6天、大于7天、大于8天、大于9天或大于10天施用包含抗生素剂的第二组合物。在一个实施方案中,所述方法可包括施用包含抗生素剂的第一组合物并且在抗生素剂施用后小于1天、小于2天、小于3天、小于4天、小于5天、小于6天、小于7天、小于8天、小于9天或小于10天通过上文详细描述的任何方法施用包含本发明的合成抗体的第二组合物。在一个实施方案中,所述方法可包括施用包含抗生素剂的第一组合物并且在抗生素剂施用后大于1天、大于2天、大于3天、大于4天、大于5天、大于6天、大于7天、大于8天、大于9天或大于10天通过上文详细描述的任何方法施用包含本发明的合成抗体的第二组合物。在一个实施方案中,所述方法可包括通过上文详细描述的任何方法施用包含本发明的合成抗体的第一组合物并同时施用包含抗生素剂的第二组合物。在一个实施方案中,所述方法可包括通过上文详细描述的任何方法施用包含本发明的合成抗体的第一组合物并同时施用包含抗生素剂的第二组合物。在一个实施方案中,所述方法可包括施用包含本发明的合成抗体和抗生素剂的单一组合物。

[0264] 可以与本发明的合成抗体组合使用的抗生素的非限制性实例包括氨基糖苷类(例如,庆大霉素(gentamicin)、阿米卡星(amikacin)、妥布霉素(tobramycin))、喹诺酮类(例如环丙沙星(ciprofloxacin)、左氧氟沙星(levofloxacin))、头孢菌素类(例如头孢他啶(ceftazidime)、头孢吡肟(cefepime)、头孢哌酮(cefoperazone)、头孢匹罗(cefpirome)、头孢托罗(ceftobiprole))、抗假单胞菌青霉素类:羧苄青霉素(例如,羧苄青霉素(carbenicillin)和替卡西林(ticarcillin))和脲基青霉素(例如,美洛西林(mezlocillin)、阿洛西林(azlocillin)和哌拉西林(piperacillin))、碳青霉烯类(例如,美罗培南(meropenem)、亚胺培南(imipenem)、多利培南(doripenem))、多粘菌素类(例如,多粘菌素B和粘菌素)和单胺菌素类(例如,氨曲南(aztreonam))。

[0265] 12. 合成抗体的体外和体外生成

[0266] 在一个实施方案中,合成抗体在体外或离体生成。例如,在一个实施方案中,可以在体外或离体细胞中引入和表达编码合成抗体的核酸。向细胞内引入基因并表达的方法是本领域已知的。在表达载体的情况下,可以通过本领域的任何方法容易地将载体引入宿主细胞,例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞中。例如,可以通过物理、化学或生物学手段将

表达载体转移到宿主细胞中。

[0267] 用于将多核苷酸引入宿主细胞内的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域公知的。参见例如, Sambrook等人(2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。将多核苷酸引入宿主细胞内的优选方法是磷酸钙转染。

[0268] 将目标多核苷酸引入宿主细胞内的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,特别是逆转录病毒载体,已成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物(例如人)细胞的方法。其他病毒载体可以来源于慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒等等。参见例如,美国专利第5,350,674和5,585,362号。

[0269] 用于将多核苷酸引入宿主细胞内的化学手段包括胶体分散系统,例如大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠粒和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内递送媒介物的示例性胶体系统为脂质体(例如,人造膜囊泡)。

[0270] 在利用非病毒递送系统的情况下,示例性递送媒介物为脂质体。考虑使用脂质制剂将核酸引入宿主细胞(体外、离体或体内)。另一方面,核酸可以与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可以封装在脂质体的水性内部,散布在脂质体的脂质双层内,通过与脂质体和寡核苷酸两者缔合的连接分子与脂质体连接,包埋在脂质体中,与脂质体复合,分散在含有脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质组合,作为悬浮液包含在脂质中,含有胶束或与胶束复合,或以其它方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如,它们可以呈双层结构存在,如胶束或“塌陷”结构。它们也可以简单地散布在溶液中,可能形成大小或形状不均一的聚集物。脂质是脂肪物质,其可以是天然存在的或合成脂质。例如,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪滴以及含有长链脂肪烃及其衍生物如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛的化合物类。

[0271] 本发明具有通过以下非限制性实施例说明的多个方面。

[0272] 13. 实施例

[0273] 在以下实施例中进一步说明本发明。应当了解的是,这些实施例虽然表明了本发明的优选的实施方案,但是仅通过说明方式给出。从上述论述和这些实施例,本领域技术人员可以确定本发明的基本特征,并且在不脱离其精神和范围的情况下,可以对本发明进行各种变化和修改以使它适应各种用途和条件。因此,根据上述说明,除本文所示和所述的那些之外,本发明的多种修改对本领域技术人员来说将是显而易见的。这些修改也旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0274] 实施例1

[0275] 本文提供的研究证明通过质粒DNA的肌内电穿孔生成功能性抗OspA“DNA单克隆抗体”(DMAb)。将来自抗OspA单克隆抗体的密码子优化的可变区DNA序列合成到人IgG1恒定结构域上。将编码抗体的质粒DNA递送至C3H小鼠体内。该研究支持DMAb作为现有生物疗法的替代方案。

[0276] 现在描述材料和方法

[0277] 动物及蛋白质和质粒的施用和递送。向C3H小鼠(每组5只小鼠)施用对OspA有特异性的野生型或经修饰的共有DMAb。对于这些施用,肌内注射(IM) 300 μ g质粒DNA,然后通过MID-EP系统(CELLECTRA[®]; Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA)进行EP介导增强

的递送。用于递送的脉冲参数为:3个0.5安培恒定电流,1秒间隔且长度为52毫秒的脉冲。每只动物在蜚攻击前5天接受实验或对照质粒制剂的单次施用。在蜚攻击后21天收集来自小鼠的血清用于分析(图1)。

[0278] DMAb-319-44 wt和DMAb-221-7 wt质粒DNA的构建。分别编码DMAb-319-44wt和DMAb-221-1wt的DNA质粒p319-44wt和p221-7wt编码全人IgG1mAb,其可变区分别源自抗his0spA抗体319-44和221-7。每个转基因由重链和轻链基因组成,所述重链和轻链基因由与P2A自加工序列偶联的弗林蛋白酶切割位点分开。转基因经密码子和RNA优化用于在人中表达,通过GenScript合成,并克隆到经修饰的pVax1哺乳动物表达载体(Invitrogen)中处于人巨细胞病毒立即早期启动子控制下。

[0279] DMAb-319-44 mod1和DMAb-221-7 mod9质粒DNA的构建。为了改善p319-44wt和p221-7wt DMAb表达,使用侧重于通过显著的框架区修饰而增加抗体稳定性的靶向方法进一步优化'wt' DMAb的轻链和重链可变区序列,以改善体外和体内环境下的抗体产生。首先,鉴定了高表达DMAb,其充当用于移植的接受框架。靶向HER2抗原并且证实在单剂量100 μ g DNA后在免疫缺陷小鼠中表达 $>5\mu$ g/mL人IgG的这种接受DMAb,由分别来自于高度稳定的种系家族hV_H3和hV_K1的重链和轻链组成。为了创建优化的319-44mod1,我们将三个CDR和319-44wt的另外13个重要的重链和轻链框架残基移植到高表达DMAb基因上。对于221-7 mod9,我们将三个CDR和221-7wt的另外11个重要的重链和轻链框架残基移植到高表达DMAb基因上。

[0280] 蜚攻击测定。在用携带疏螺旋体的蜚攻击前5天向小鼠施用300 μ g pDMAb-319-44 wt、pDMAb-319-44 mod1、pDMAb-221-7 wt、pDMAb-221-7 mod9或阴性对照(pDVSF-3LSLS)。在蜚攻击后21天收集血清并测定疏螺旋体的存在和IgG应答。为了分析组织中的感染,在蜚攻击后21天处死小鼠并收获细胞,然后在蜚攻击后长达50天的额外时间段进行培养并观察伯氏疏螺旋体的存在(图1)。

[0281] 现在描述实验结果

[0282] DMAb-319-44 mod1和DMAb-221-7 mod9的体内表征-通过肌内途径向小鼠施用pDMAb-319-44 wt、pDMAb-319-44 mod1、pDMAb-221-7 wt或pDMAb-221-7 mod9,然后通过EP增强递送。在蜚攻击前5天递送单次注射的DNA质粒,并在蜚攻击后21天收集血清(图1)。图2中的数据(来自pDMAb-319-44 wt、pDMAb-319-44mod1、pDMAb-221-7 wt和对照组中的个体小鼠)呈现为OD450nm,其与Ig/Fab的水平成比例。这些数据证明,单次施用pDMAb-319-44wt、pDMAb-319-44 mod1和pDMAb-221-7 wt后的Fab相对水平在DMAb施用后3天可检测。pDMAb-319-44 wt和pDMAb-319-44 mod1的水平在第3天较高并且引起受到“保护”而免受蜚攻击的小鼠数量增加。pDMAb的连续稀释发现,施用1:100至1:24,000稀释的pDMAb的小鼠在第21天显示出比施用阴性对照的小鼠显著更高的IgG水平(图3)。

[0283] 评价pDMAb-319-44 wt、pDMAb-319-44 mod1、pDMAb-221-7 wt和pDMAb-221-7 mod9的杀疏螺旋体活性。与施用对照抗体的小鼠相比,施用pDMAb-319-44 wt、pDMAb-319-44 mod1、pDMAb-221-7 wt和pDMAb-221-7 mod9的小鼠显示活的疏螺旋体百分比降低(图4)。基于其强大的杀疏螺旋体效力,选择pDMAb-319-44 wt、pDMAb-319-44 mod1和pDMAb-221-7 wt用于攻击实验。

[0284] 与施用pDMAb-319-44 wt的小鼠相比,施用pDMAb-319-44 mod1的小鼠显示出相似

或略微增加的IgG应答(图5)。在第7天,制剂将300 μ g剂量增加至大约7 μ g/mL的水平。用透明质酸酶配制的剂量(例如,添加稳定剂和/或佐剂)导致WT和mod1 DMAb的体内表达更高(图5)。

[0285] 三级优化策略引起pDMAb-221-7 mod 9的体内表达增加(图6)。到第7天,制剂将300 μ g剂量增加至>10 μ g/mL的水平

[0286] 体内研究证明,注射后2天到至少7天,莱姆抗体(抗OspA)增加且人IgG相伴增加(图7)。应该注意的是,221-7反映了无制剂的wt DMAb的注射。

[0287] 施用pDMAb-319-44 mod1抗体提供80%针对疏螺旋体感染的保护。这比pDMAb-319-44 wt抗体提供的保护作用增加(图8)。

[0288] DNA是在体内递送基因和核苷酸序列的灵活的平台。DNA编码的mAb提供针对细菌的保护,具有与蛋白质IgG mAb相当的功效。

[0289] DNA技术使mAb递送疗法能够进行常规递送,并扩大了对全球市场的可及性。DMAb可与DNA疫苗技术组合以提供即时和持久的免疫力。

[0290] 序列:

[0291] SEQ ID NO:1 DMAb 319-44 mod1 CDR的核苷酸序列:人IgG重链信号肽-VH-CH1-铰链区-CH2-CH3-定制弗林蛋白酶切割位点-‘GSG’接头和P2A肽-人 κ 轻链信号肽-VL-CL(κ)-与两个终止密码子可操作地连接

[0292] SEQ ID NO:2 DMAb 319-44 mod1 CDR的氨基酸序列:人IgG重链信号肽-VH-CH1-铰链区-CH2-CH3-定制弗林蛋白酶切割位点-‘GSG’接头和P2A肽-人 κ 轻链信号肽-VL-CL(κ)

[0293] SEQ ID NO:3DMAb 319-44 mod1重链(抗HER2 DMAb优化的CDR移植物)的核苷酸序列:人IgG重链信号肽、可变重链区、恒定重链区1、铰链区、恒定重链区2和恒定重链区3

[0294] SEQ ID NO:4 DMAb 319-44 mod1重链(抗HER2 DMAb优化的CDR移植物)的氨基酸序列:人IgG重链信号肽、可变重链区、恒定重链区1、铰链区、恒定重链区2和恒定重链区3。

[0295] SEQ ID NO:5 DMAb 319-44 mod1轻链的核苷酸序列:人 κ 轻链信号肽、可变轻链区和恒定轻链区。

[0296] SEQ ID NO:6 DMAb 319-44 mod1轻链的氨基酸序列:人 κ 轻链信号肽、可变轻链区和恒定轻链区。

[0297] SEQ ID NO:7 DMAb 319-44 wt的核苷酸序列:人IgG重链信号肽-VH-CH1-铰链区-CH2-CH3-定制弗林蛋白酶切割位点-‘GSG’接头和P2A肽-人 κ 轻链信号肽-VL-CL(κ)-与两个终止密码子可操作地连接。

[0298] SEQ ID NO:8 DMAb 319-44 wt的氨基酸序列:人IgG重链信号肽-VH-CH1-铰链区-CH2-CH3-定制弗林蛋白酶切割位点-‘GSG’接头和P2A肽-人 κ 轻链信号肽-VL-CL(κ)。

[0299] SEQ ID NO:9DMAb 319-44 wt重链的核苷酸序列:人IgG重链信号肽、可变重链区、恒定重链区1、铰链区、恒定重链区2和恒定重链区3。

[0300] SEQ ID NO:10DMAb 319-44 wt重链的氨基酸序列:人IgG重链信号肽、可变重链区、恒定重链区1、铰链区、恒定重链区2和恒定重链区3。

[0301] SEQ ID NO:11 DMAb 319-44 wt轻链的核苷酸序列:人 κ 轻链信号肽、可变轻链区和恒定轻链区。

[0302] SEQ ID NO:12 DMAb 319-44 wt轻链的氨基酸序列:人 κ 轻链信号肽、可变轻链区

和恒定轻链区。

[0303] SEQ ID NO:13DMAb 221-7 mod 9全长人IgG1单质粒的核苷酸序列:人IgG重链信号肽-VH-CH1-铰链区-CH2-CH3-定制弗林蛋白酶切割位点-‘GSG’接头和P2A肽-人 κ 轻链信号肽-VL-CL(κ)-与两个终止密码子可操作地连接。

[0304] SEQ ID NO:14 DMAb 221-7 mod 9全长人IgG1单质粒的氨基酸序列:人IgG重链信号肽-VH-CH1-铰链区-CH2-CH3-定制弗林蛋白酶切割位点-‘GSG’接头和P2A肽-人 κ 轻链信号肽-VL-CL(κ)。

[0305] SEQ ID NO:15 DMAb 221-7 mod 9重链人IgG1的核苷酸序列:人IgG重链信号肽、可变重链区、恒定重链区1、铰链区、恒定重链区2和恒定重链区3。

[0306] SEQ ID NO:16 DMAb 221-7 mod 9重链人IgG1的氨基酸序列:人IgG重链信号肽、可变重链区、恒定重链区1、铰链区、恒定重链区2和恒定重链区3。

[0307] SEQ ID NO:17 DMAb 221-7 mod 9轻链人IgG1的核苷酸序列:人 κ 轻链信号肽、可变轻链区和恒定轻链区。

[0308] SEQ ID NO:18 DMAb 221-7 mod 9轻链人IgG1的氨基酸序列:人 κ 轻链信号肽、可变轻链区和恒定轻链区。

[0309] SEQ ID NO:19 DMAb 221-7 wt的核苷酸序列:人IgG重链信号肽-VH-CH1-铰链区-CH2-CH3-定制弗林蛋白酶切割位点-‘GSG’接头和P2A肽-人 κ 轻链信号肽-VL-CL(κ)-与两个终止密码子可操作地连接。

[0310] SEQ ID NO:20DMAb 221-7 wt的氨基酸序列:人IgG重链信号肽-VH-CH1-铰链区-CH2-CH3-定制弗林蛋白酶切割位点-‘GSG’接头和P2A肽-人 κ 轻链信号肽-VL-CL(κ)。

[0311] SEQ ID NO:21 DMAb 221-7 wt重链的核苷酸序列:人IgG重链信号肽、可变重链区、恒定重链区1、铰链区、恒定重链区2和恒定重链区3。

[0312] SEQ ID NO:22 DMAb 221-7 wt重链的氨基酸序列:人IgG重链信号肽、可变重链区、恒定重链区1、铰链区、恒定重链区2和恒定重链区3。

[0313] SEQ ID NO:23DMAb 221-7 wt轻链的核苷酸序列:人 κ 轻链信号肽、可变轻链区和恒定轻链区。

[0314] SEQ ID NO:24 DMAb 221-7 wt轻链的氨基酸序列:人 κ 轻链信号肽、可变轻链区和恒定轻链区。

[0315] SEQ ID NO:25鼠DMAb 221-7 mod 9 CDR的氨基酸序列:IgG2a重链信号肽-VH-CH1-铰链区-CH2-CH3-定制弗林蛋白酶切割位点-‘GSG’接头和P2A肽- κ 轻链信号肽-VL-CL(κ)。

[0316] SEQ ID NO:26鼠DMAb 221-7 mod 9 IgG2a重链的氨基酸序列:人IgG重链信号肽、可变重链区、恒定重链区1、铰链区、恒定重链区2和恒定重链区3。

[0317] SEQ ID NO:27鼠DMAb 221-7 mod 9 IgG2a轻链的氨基酸序列: κ 轻链信号肽、可变轻链区和恒定轻链区。

[0318] 应当了解的是,上述详细说明和所附实施例仅仅是说明性的而不应当被认为对本发明的范围构成限制,本发明的范围仅由所附权利要求和它们的等同方案限定。

[0319] 对于本领域技术人员来说,对所公开的实施方案的各种改变和修改将是显而易见的。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以进行此类改变和修改,包括但不限于与本

发明的化学结构、取代基、衍生物、中间体、合成、组合物、制剂或使用有关的那些改变和修改。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 大卫·B·韦纳
- [0003] 塞利克·夫林盖
- [0004] <120> 用于针对莱姆病的DNA抗体构建体
- [0005] <130> 206108-0071-00-WO.606915
- [0006] <150> US 62/418,468
- [0007] <151> 2016-11-07
- [0008] <160> 27
- [0009] <170> PatentIn版本3.5
- [0010] <210> 1
- [0011] <211> 2193
- [0012] <212> DNA
- [0013] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0014] <220>
- [0015] <223> DMAb 319-44 mod1 CDR的核苷酸序列
- [0016] <400> 1
- [0017] atggactgga cttggagaat cctgttcctg gtcgccgccc ctactgggac tcacgccgag 60
- [0018] atgcagctgg tcgaatccgg gggaggcctg gtgcagcctg gcggaagcct gcgactgtcc 120
- [0019] tgcgctggct ctggatacat cttcgcaact tattggattg gatgggtccg ccaggcacca 180
- [0020] gggaagggac tggaatgggt gggaatcatc tacccaaacg actctgatac aagatatagt 240
- [0021] ccccggttca aaggccgctt taccatcagt gccgacaagt caattaacac agcttacctg 300
- [0022] cagatgaatt ccctgcgagc agaggacacc gccgtgtact attgcgccc gacacgctgg 360
- [0023] tatttcgatc tgtggggaca ggggaccctg gtcacagtga gctccgcctc aaccaaaggg 420
- [0024] cctagcgtgt ttcccctggc tccttctagt aagtcaacta gcggggggac cgccgctctg 480
- [0025] ggatgtctgg tgaaggatta cttccctgag ccagtcacag tgagctggaa ctccggcgct 540
- [0026] ctgaccagcg gagtccacac atttccagca gtgctgcagt caagcggact gtacagcctg 600
- [0027] tcctctgtgg tcacagtccc cagttcaagc ctggggactc agacctatat ctgcaacgtg 660
- [0028] aatcacaac cctccaatac taaggtcagc aagaaagtgg aacctaaatc ttgtgataag 720
- [0029] acacatactt gccctccctg tccagcacct gagctgctgg gagggcctag cgtgttcctg 780
- [0030] tttccacca agccaaaaga caccctgatg atcagcagaa cacctgaagt cacttgctgtg 840
- [0031] gtcgtggacg tgagccacga ggaccccga gtcgaagtta actggtacgt ggatggcgtc 900
- [0032] gaggtgcata atgctaagac caaacccgc gaggaacagt acaactccac ttatcgagtc 960
- [0033] gtgtctgtcc tgacctgct gcaccaggac tggctgaacg gaaaggagta taagtgcaa 1020
- [0034] gtgtccaaca aggccctgcc agcaccatc gagaagacaa tttctaagc taaagggcag 1080
- [0035] ccaagggaac ccaggtgta cactctgcct ccaagcagag acgagctgac aaaaaaccag 1140
- [0036] gtcagcctga cttgtctggt gaaggggttc tatccatccg atatcgagc ggagtgaggaa 1200
- [0037] tctaattgcc agcccgaaaa caattacaag accacacccc ctgtgctgga ctctgatggc 1260
- [0038] agtttctttc tgtatagcaa actgaccgtg gacaagtccc ggtggcagca gggaaacgtc 1320
- [0039] ttttctgct ctgtgatgca tgaggccctg cacaatcatt acaccagaa aagtctgtca 1380
- [0040] ctgagcccag gaaacgagg caggaagagg agatccggct ctggagcaac aaacttctcc 1440
- [0041] ctgctgaagc aggccgggga tgtggaggaa aatcctggcc caatggtcct gcagaccag 1500

[0042] gtgtttatca gtctgctgct gtggatttca ggagcctacg gggacatcca gctgacacag 1560
 [0043] tctcctcct ctctgagtgc atcacctggc gatcgagtca ccattacatg tagggccagc 1620
 [0044] cagtcctgta gttcaagcta cctggcttgg tatcagcaga agcctggaaa agcaccaaaag 1680
 [0045] ctgctgatct acggagcadc ctctagagcc actggagtgc ccagccggtt ctctgggagt 1740
 [0046] ggctcaggaa cgcacttac tctgaccatt agttcactgc agcccaggga tttcgccacc 1800
 [0047] tactattgcc agcagtatgg cagctcccct ctgacttttg gcggagggac caaagtggaa 1860
 [0048] atcaagcgaa ctgtcgcagc ccccagcgtg ttcatcttcc caccagtgga cgagcagctg 1920
 [0049] aagagcggca ccgcttccgt ggtgtgctcg ctgaacaatt tctaccctag ggaagccaaa 1980
 [0050] gtccagtgga aggtggataa cgctctgcag tcaggcaata gccaggagtc cgtgacagaa 2040
 [0051] caggactcta aagatagtac ttattcactg tctagtagac tgactctgag caaggcagac 2100
 [0052] tacgagaagc ataaagtgta tgccctgcga gtcactcacc aggggctgcg gtcaccgctc 2160
 [0053] acaaaatctt tcaacagagg ggaatgttga taa 2193
 [0054] <210> 2
 [0055] <211> 729
 [0056] <212> PRT
 [0057] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0058] <220>
 [0059] <223> DMAb 319-44 mod1 CDR的氨基酸序列
 [0060] <400> 2
 [0061] Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 [0062] 1 5 10 15
 [0063] Thr His Ala Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 [0064] 20 25 30
 [0065] Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Tyr Ile Phe
 [0066] 35 40 45
 [0067] Ala Thr Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 [0068] 50 55 60
 [0069] Glu Trp Val Gly Ile Ile Tyr Pro Asn Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
 [0070] 65 70 75 80
 [0071] Pro Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn
 [0072] 85 90 95
 [0073] Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 [0074] 100 105 110
 [0075] Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
 [0076] 115 120 125
 [0077] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 [0078] 130 135 140
 [0079] Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 [0080] 145 150 155 160
 [0081] Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 [0082] 165 170 175
 [0083] Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

[0126]	515	520	525
[0127]	Pro Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser		
[0128]	530	535	540
[0129]	Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
[0130]	545	550	555
[0131]	Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ser Arg		
[0132]	565	570	575
[0133]	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser		
[0134]	580	585	590
[0135]	Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser		
[0136]	595	600	605
[0137]	Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr		
[0138]	610	615	620
[0139]	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu		
[0140]	625	630	635
[0141]	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro		
[0142]	645	650	655
[0143]	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly		
[0144]	660	665	670
[0145]	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr		
[0146]	675	680	685
[0147]	Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His		
[0148]	690	695	700
[0149]	Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser Pro Val		
[0150]	705	710	715
[0151]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0152]	725		
[0153]	<210> 3		
[0154]	<211> 1395		
[0155]	<212> DNA		
[0156]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0157]	<220>		
[0158]	<223> DMAb 319-44 mod1重链(抗HER2 DMAb优化的CDR移植物)的核苷酸序列		
[0159]	<400> 3		
[0160]	atggactgga cttggagaat cctgttctctg gtcgccgccg ctactgggac tcacgccgag 60		
[0161]	atgcagctgg tcgaatccgg gggaggcctg gtcagcctg gcggaagcct gcgactgtcc 120		
[0162]	tgcgctggct ctggatacat cttcgcaact tattggattg gatgggtccg ccaggcacca 180		
[0163]	gggaagggac tggaatgggt gggaatcatc taccctaaacg actctgatac aagatatagt 240		
[0164]	ccccggttca aaggccgctt taccatcagt gccgacaagt caattaacac agcttacctg 300		
[0165]	cagatgaatt ccctgcgagc agaggacacc gccgtgtact attgcgccg gacacgctgg 360		
[0166]	tatttcgatac tgtggggaca ggggaccctg gtcacagtga gctccgcctc aaccaaaggg 420		
[0167]	cctagcgtgt ttcccctggc tccttctagt aagtcaacta gcggggggcac cgccgctctg 480		

[0168] ggatgtctgg tgaaggatta cttccctgag ccagtcacag tgagctggaa ctccggcgct 540
 [0169] ctgaccagcg gagtccacac atttcagca gtgctgcagt caagcggact gtacagcctg 600
 [0170] tcctctgtgg tcacagtccc cagttcaagc ctggggactc agacctatat ctgcaacgtg 660
 [0171] aatcacaac cctccaatac taaggtcgac aagaaagtgg aacctaaatc ttgtgataag 720
 [0172] acacatactt gccctccctg tccagcacct gagctgctgg gagggcctag cgtgttcctg 780
 [0173] tttccacca agccaaaaga caccctgatg atcagcagaa cacctgaagt cacttgctg 840
 [0174] gtcgtggacg tgagccacga ggaccccgaa gtcaagtta actggtacgt ggatggcgtc 900
 [0175] gagtgcata atgctaagac caaacccgc gaggaacagt acaactccac ttatcgatc 960
 [0176] gtgtctgtcc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gaaaggagta taagtcaaa 1020
 [0177] gtgtccaaca aggccctgcc agcaccatc gagaagacaa tttctaaggc taaagggcag 1080
 [0178] ccaaggaac cccaggtgta cactctgcct ccaagcagag acgagctgac aaaaaaccag 1140
 [0179] gtcagcctga cttgtctggt gaaggggttc tatccatccg atatcgactg ggagtgggaa 1200
 [0180] tctaattgcc agcccgaaaa caattacaag accacacccc ctgtgctgga ctctgatggc 1260
 [0181] agtttctttc tgtatagcaa actgaccgtg gacaagtccc ggtggcagca gggaaacgtc 1320
 [0182] ttttctgct ctgtgatgca tgaggccctg cacaatcatt acaccagaa aagtctgtca 1380
 [0183] ctgagcccag ggaaa 1395
 [0184] <210> 4
 [0185] <211> 465
 [0186] <212> PRT
 [0187] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0188] <220>
 [0189] <223> DMAb 319-44 mod1重链(抗HER2 DMAb优化的CDR移植物的氨基酸序列)
 [0190] <400> 4
 [0191] Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 [0192] 1 5 10 15
 [0193] Thr His Ala Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 [0194] 20 25 30
 [0195] Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Tyr Ile Phe
 [0196] 35 40 45
 [0197] Ala Thr Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 [0198] 50 55 60
 [0199] Glu Trp Val Gly Ile Ile Tyr Pro Asn Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
 [0200] 65 70 75 80
 [0201] Pro Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn
 [0202] 85 90 95
 [0203] Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 [0204] 100 105 110
 [0205] Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
 [0206] 115 120 125
 [0207] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 [0208] 130 135 140
 [0209] Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

[0210]	145	150	155	160
[0211]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
[0212]		165	170	175
[0213]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
[0214]		180	185	190
[0215]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
[0216]		195	200	205
[0217]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
[0218]		210	215	220
[0219]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
[0220]	225	230	235	240
[0221]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
[0222]		245	250	255
[0223]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
[0224]		260	265	270
[0225]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
[0226]		275	280	285
[0227]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
[0228]		290	295	300
[0229]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
[0230]	305	310	315	320
[0231]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
[0232]		325	330	335
[0233]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
[0234]		340	345	350
[0235]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
[0236]		355	360	365
[0237]	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
[0238]		370	375	380
[0239]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
[0240]	385	390	395	400
[0241]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
[0242]		405	410	415
[0243]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
[0244]		420	425	430
[0245]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
[0246]		435	440	445
[0247]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
[0248]		450	455	460
[0249]	Lys			
[0250]	465			
[0251]	<210> 5			

[0252] <211> 705
 [0253] <212> DNA
 [0254] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0255] <220>
 [0256] <223> DMAb 319-44 mod1轻链的核苷酸序列
 [0257] <400> 5
 [0258] atggtcctgc agaccaggt gtttatcagt ctgctgctgt ggatttcagg agcctacggg 60
 [0259] gacatccagc tgacacagtc tcctcctct ctgagtgcac cacctggcga tcgagtcacc 120
 [0260] attacatgta gggccagcca gtccgtgagt tcaagctacc tggcttgta tcagcagaag 180
 [0261] cctggaaaag caccaaagct gctgatctac ggagcatcct ctagagccac tggagtgcc 240
 [0262] agccggttct ctgggagtgg ctcaggaacc gactttactc tgaccattag ttcactgcag 300
 [0263] cccgaggatt tcgccaccta ctattgccag cagtatggca gctcccctct gacttttggc 360
 [0264] ggagggacca aagtggaaat caagcgaact gtcgcagccc ccagcgtgtt catctttcca 420
 [0265] cccagtgcag agcagctgaa gagcggcacc gcttccgtgg tgtgcctgct gaacaatttc 480
 [0266] taccctaggg aagcctaaagt ccagtggaag gtggataacg ctctgcagtc aggcaatagc 540
 [0267] caggagtccg tgacagaaca ggactctaaa gatagtactt attcactgtc tagtacactg 600
 [0268] actctgagca aggcagacta cgagaagcat aaagtgtatg cctgcgaagt cactcaccag 660
 [0269] gggctgcggt caccgctcac aaaatcttcc aacagagggg aatgt 705
 [0270] <210> 6
 [0271] <211> 235
 [0272] <212> PRT
 [0273] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0274] <220>
 [0275] <223> DMAb 319-44 mod1轻链的氨基酸序列
 [0276] <400> 6
 [0277] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 [0278] 1 5 10 15
 [0279] Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 [0280] 20 25 30
 [0281] Ala Ser Pro Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 [0282] 35 40 45
 [0283] Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 [0284] 50 55 60
 [0285] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro
 [0286] 65 70 75 80
 [0287] Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 [0288] 85 90 95
 [0289] Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 [0290] 100 105 110
 [0291] Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 [0292] 115 120 125
 [0293] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

[0294]	130	135	140	
[0295]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe			
[0296]	145	150	155	160
[0297]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
[0298]		165	170	175
[0299]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
[0300]		180	185	190
[0301]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
[0302]		195	200	205
[0303]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser			
[0304]	210	215	220	
[0305]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
[0306]	225	230	235	
[0307]	<210> 7			
[0308]	<211> 2190			
[0309]	<212> DNA			
[0310]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0311]	<220>			
[0312]	<223> DMAb 319-44 wt的核苷酸序列			
[0313]	<400> 7			
[0314]	atggattgga cctggaggat tctgtttctg gtcgccgccg ctactggaac tcacgccgag	60		
[0315]	atgcagctgg tgcagtctgg agccgaagtg aagaaacctg gcgaaagcct gaagatctcc	120		
[0316]	tgcaaaggat ctgggtacat cttcgccaca tattggattg gctgggtgcg acagatgcca	180		
[0317]	ggcaaggac tggagtggat gggaatcatc tacccaaacg actccgatac tcgctattct	240		
[0318]	cccagttttc agggccaggt gaccatcagt gccgacaagt caattaatac agcttacctg	300		
[0319]	cagtggagct ccctgaaagc ctctgacacc gctatgtact attgcgccg gacacgctgg	360		
[0320]	tatttcgatc tgtggggacg aggcacactg gtcaccgtga gcagcgcctc taaaaagggg	420		
[0321]	cctagcgtgt tccccctggc tccttcaagc aatcaacca gcggcggaac agccgctctg	480		
[0322]	ggatgtctgg tgaaggatta ctccctgag ccagtcaccg tgagctggaa ctccggaget	540		
[0323]	ctgacaagcg ggggtgcacac ttttcagca gtctgcagt cctctggact gtacagcctg	600		
[0324]	agttcagtgg tcaactgtcc cagtcctct ctggggactc agacctatat ctgcaacgtc	660		
[0325]	aatcacaagc ccagcaatac caaagtcgac aagaaagtgg aacctaagag ctgtgataaa	720		
[0326]	acacatactt gccctccctg tccagcact gagctgctgg gcggccctc cgtgttctctg	780		
[0327]	ttccacca agccaaaaga cactgatg atttcccga ctctgaagt gacctgcgtg	840		
[0328]	gtcgtggacg tgagccacga ggacccgaa gtgaagtca actggtacgt ggatggcgtc	900		
[0329]	gagtgcata atgctaagac caaaccagg gaggaacagt acaactcaac ttatagagtc	960		
[0330]	gtgagcgtcc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gaaaggagta taagtgcaa	1020		
[0331]	gtgagcaata aggtctgctc agcaccatc gagaaaaca ttagcaagc aaaagggcag	1080		
[0332]	ccacgggaac ccagtgta cactctgct ccatcccgc acgagctgac aaagaaccag	1140		
[0333]	gtgtctctga cttgtctggt caaagggtc tatccatctg atatcgccgt ggagtggaa	1200		
[0334]	agtaatgcc agcccgaaaa caattacaag accacacccc ctgtgctgga ctctgatggc	1260		
[0335]	agtttctttc tgtatagtaa gctgaccgtg gacaaatcac ggtggcagca gggaaacgtc	1320		

[0378]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
[0379]	165 170 175
[0380]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
[0381]	180 185 190
[0382]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
[0383]	195 200 205
[0384]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
[0385]	210 215 220
[0386]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
[0387]	225 230 235 240
[0388]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[0389]	245 250 255
[0390]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[0391]	260 265 270
[0392]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
[0393]	275 280 285
[0394]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[0395]	290 295 300
[0396]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[0397]	305 310 315 320
[0398]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[0399]	325 330 335
[0400]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
[0401]	340 345 350
[0402]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[0403]	355 360 365
[0404]	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[0405]	370 375 380
[0406]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[0407]	385 390 395 400
[0408]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[0409]	405 410 415
[0410]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
[0411]	420 425 430
[0412]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[0413]	435 440 445
[0414]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0415]	450 455 460
[0416]	Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser
[0417]	465 470 475 480
[0418]	Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val
[0419]	485 490 495

[0420]	Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser Gly Ala
[0421]	500 505 510
[0422]	Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
[0423]	515 520 525
[0424]	Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
[0425]	530 535 540
[0426]	Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
[0427]	545 550 555 560
[0428]	Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
[0429]	565 570 575
[0430]	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
[0431]	580 585 590
[0432]	Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
[0433]	595 600 605
[0434]	Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Val
[0435]	610 615 620
[0436]	Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
[0437]	625 630 635 640
[0438]	Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
[0439]	645 650 655
[0440]	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
[0441]	660 665 670
[0442]	Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
[0443]	675 680 685
[0444]	Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
[0445]	690 695 700
[0446]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser Pro Val Thr
[0447]	705 710 715 720
[0448]	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0449]	725
[0450]	<210> 9
[0451]	<211> 1395
[0452]	<212> DNA
[0453]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0454]	<220>
[0455]	<223> DMAb 319-44 wt重链的核苷酸序列
[0456]	<400> 9
[0457]	atggattgga cctggaggat tctgtttctg gtcgccgccg ctactggaac tcacgccgag 60
[0458]	atgcagctgg tgcagtctgg agccgaagtg aagaaacctg gcgaaagcct gaagatctcc 120
[0459]	tgcaaaggat ctgggtacat cttcgccaca tattggattg gctgggtgcg acagatgcca 180
[0460]	ggcaaggac tggagtggat gggaatcatc tacccaaacg actccgatac tcgctattct 240
[0461]	cccagttttc agggccaggt gaccatcagt gccgacaagt caattaatac agcttacctg 300

[0504]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
[0505]	130 135 140
[0506]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
[0507]	145 150 155 160
[0508]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
[0509]	165 170 175
[0510]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
[0511]	180 185 190
[0512]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
[0513]	195 200 205
[0514]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
[0515]	210 215 220
[0516]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
[0517]	225 230 235 240
[0518]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[0519]	245 250 255
[0520]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[0521]	260 265 270
[0522]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
[0523]	275 280 285
[0524]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[0525]	290 295 300
[0526]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[0527]	305 310 315 320
[0528]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[0529]	325 330 335
[0530]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
[0531]	340 345 350
[0532]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[0533]	355 360 365
[0534]	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[0535]	370 375 380
[0536]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[0537]	385 390 395 400
[0538]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[0539]	405 410 415
[0540]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
[0541]	420 425 430
[0542]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[0543]	435 440 445
[0544]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0545]	450 455 460

- [0546] Lys
 [0547] 465
 [0548] <210> 11
 [0549] <211> 702
 [0550] <212> DNA
 [0551] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0552] <220>
 [0553] <223> DMAb 319-44 wt轻链的核苷酸序列
 [0554] <400> 11
 [0555] atggtcctgc agaccaggt gtttatctcc ctgctgctgt ggatttctgg ggcttacggc 60
 [0556] gaaatcgtgc tgaccagtc ccccgggaca ctgagtctgt cacctggcga gagagctacc 120
 [0557] ctgtcttgtc gggcaagcca gtccgtgagt tcaagctacc tggcttggtg tcagcagaag 180
 [0558] cctggccagg caccaagct gctgatctac ggagcatcct ctgcgcacc tgggattccc 240
 [0559] gaccgattct ctggcagtgg atcagggacc gacttcacc tgacaattag cagactggag 300
 [0560] cccgaagact tcgccgtgta ctattgccag cagtatggca gttcacctct gacttttggg 360
 [0561] gggggcacca aggtcgaaat caaacctg gcagccccc gcgtcttcat tttccacc 420
 [0562] tccgacgagc agctgaagag cggcacagca tccgtggtgt gcctgctgaa caatttctac 480
 [0563] cctagagagg ccaagtgcca gtgaaagtg gataacgctc tgcagtcagg aaatagccag 540
 [0564] gagtccgtga cagaacagga ctctaaggat agtacttatt cactgagctc cactctgacc 600
 [0565] ctgagcaaag cagattacga gaagcataaa gtgtatgcct gcgaggtcac ccaccagggg 660
 [0566] ctgaggctc cagtcacaaa atccttcaat agaggcgaat gt 702
 [0567] <210> 12
 [0568] <211> 234
 [0569] <212> PRT
 [0570] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0571] <220>
 [0572] <223> DMAb 319-44 wt轻链的氨基酸序列
 [0573] <400> 12
 [0574] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 [0575] 1 5 10 15
 [0576] Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 [0577] 20 25 30
 [0578] Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 [0579] 35 40 45
 [0580] Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 [0581] 50 55 60
 [0582] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 [0583] 65 70 75 80
 [0584] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 [0585] 85 90 95
 [0586] Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 [0587] 100 105 110

[0588]	Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0589]	115 120 125
[0590]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[0591]	130 135 140
[0592]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[0593]	145 150 155 160
[0594]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[0595]	165 170 175
[0596]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[0597]	180 185 190
[0598]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[0599]	195 200 205
[0600]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser Pro
[0601]	210 215 220
[0602]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0603]	225 230
[0604]	<210> 13
[0605]	<211> 2205
[0606]	<212> DNA
[0607]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0608]	<220>
[0609]	<223> DMAb 221-7 mod 9全长人IgG1单质粒的核苷酸序列
[0610]	<400> 13
[0611]	atggattgga catggaggat tctgtttctg gtcgccgccc ccacaggaac ccacgccgaa 60
[0612]	gtgcagctgg tggaatcagg cggagggctg gtgcagccag gcggaagtct gcgactgtca 120
[0613]	tgcgccgtga gtgggtactc attcactagc tattggattg gatgggtgcg gcagggacca 180
[0614]	ggcaagggac tggagtgggt gggattcatc taccgccggg actccgatac acgctatagt 240
[0615]	ccttctttca aaggcaggtt cacaatctct gccgacaaaa gcatttccac tgcttatctg 300
[0616]	cagatgaact ccctgcgggc tgaggatacc gcagtgtact attgcgccag gggcattctg 360
[0617]	aggtacttcg actggtttct ggactattgg gggcagggca ccctggtcac agtgtcaagc 420
[0618]	gccttacca aaggaccaag cgtgttcca ctggctcctt cctctaagtc tactagtggc 480
[0619]	ggaaccgccg ctctgggatg tctggtgaag gattacttcc ctgagccagt cacagtgtcc 540
[0620]	tggaactctg gcgctctgac cagcggagtc cacacattc ccgcagtgtc gcagagttca 600
[0621]	ggcctgtact ccctgagctc cgtggtcaca gtcccttcta gttcactggg aactcagacc 660
[0622]	tatatctgca acgtgaatca caaaccttc aatactaagg tcgacaagaa agtggacca 720
[0623]	aaatcttggtg ataagacaca tacttgcct ccctgtccag cacctgagct gctgggccc 780
[0624]	ccaagcgtgt tctgtttcc acccaagccc aaagataccc tgatgattag caggacacca 840
[0625]	gaagtcactt gcgtggtcgt ggacgtgtcc cagcaggacc ccgaagtcaa gttcaactgg 900
[0626]	tacgtggacg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac caagagagga acagtacaac 960
[0627]	tcaacctatc gggctcgtgag cgtcctgaca gtgctgcacc aggactggct gaacggaaag 1020
[0628]	gagtataagt gcaaagtgtc taacaagccc ctgccagctc ccatcgagaa gactattagc 1080
[0629]	aaggetaaag ggcagccacg cgaaccccag gtgtacaccc tgcctccatc acgagatgag 1140

[0630] ctgacaaaa accaggtctc tctgacttgt ctgggaagg gattctatcc ctctgacatc 1200
 [0631] gcagtggagt gggaaagtaa tgggcagcct gaaaacaatt acaagaccac accccctgtg 1260
 [0632] ctggacagtg atggatcatt ctttctgtat agtaaactga ccgtggataa gtcaagatgg 1320
 [0633] cagcagggga acgtcttttc atgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacacc 1380
 [0634] cagaagtccc tgtctctgag tcctggcaaa cggggacgca agaggagatc aggaagcggg 1440
 [0635] gctacaaaact tctccctgct gaagcaggca ggggacgtgg aggaaaatcc tggcccaatg 1500
 [0636] gtctcgcaga cccagtggtt tatctccctg ctgctgtgga tttctggggc atacggcgac 1560
 [0637] atccagctga cacagtctcc cagctccctg tccgcatctg tcggcgaccg agtgaccatc 1620
 [0638] acatgtaggg ccagccaggg gatttctagt ggctcagcat ggtaccagca gaagcctggg 1680
 [0639] aaagaccaa agctgctgat ctatgacgtg tctagcctgg aatccggagt gcctagccgg 1740
 [0640] ttctccgat caggaagtgg gacagacttt actctgacca tttcaagcct gcagcctgag 1800
 [0641] gatttcgcca cttactattg ccagcagttc aatagctatc tgctgacttt tggacagggc 1860
 [0642] accaaagtgg aatcaagag gactgtcga gccctagcg tgttcatttt tccaccctcc 1920
 [0643] gatgagcagc tgaagagcgg caccgctcc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacca 1980
 [0644] cgcgaggcca aagtccagtg gaaggtggac aacgctctgc agtctggaaa tagtcaggag 2040
 [0645] tcagtactg aacaggacag caaagattcc acctattctc tgctctctac actgactctg 2100
 [0646] agcaaggcag actacagaaa gcataaagtg tatgcctgcg aagtcacca ccaggggctg 2160
 [0647] tcctcaccag tcaactaaatc tttcaatcgg ggagaatggt gataa 2205
 [0648] <210> 14
 [0649] <211> 733
 [0650] <212> PRT
 [0651] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0652] <220>
 [0653] <223> DMAb 221-7 mod 9全长人IgG1单质粒的氨基酸序列
 [0654] <400> 14
 [0655] Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 [0656] 1 5 10 15
 [0657] Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 [0658] 20 25 30
 [0659] Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Phe
 [0660] 35 40 45
 [0661] Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 [0662] 50 55 60
 [0663] Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
 [0664] 65 70 75 80
 [0665] Pro Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
 [0666] 85 90 95
 [0667] Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 [0668] 100 105 110
 [0669] Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ile Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Leu Asp
 [0670] 115 120 125
 [0671] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

[0672]	130	135	140
[0673]	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
[0674]	145	150	155 160
[0675]	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
[0676]		165	170 175
[0677]	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
[0678]		180	185 190
[0679]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
[0680]		195	200 205
[0681]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
[0682]		210	215 220
[0683]	Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
[0684]		225	230 235 240
[0685]	Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
[0686]		245	250 255
[0687]	Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
[0688]		260	265 270
[0689]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
[0690]		275	280 285
[0691]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
[0692]		290	295 300
[0693]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
[0694]		305	310 315 320
[0695]	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
[0696]		325	330 335
[0697]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
[0698]		340	345 350
[0699]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
[0700]		355	360 365
[0701]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
[0702]		370	375 380
[0703]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
[0704]		385	390 395 400
[0705]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
[0706]		405	410 415
[0707]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
[0708]		420	425 430
[0709]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
[0710]		435	440 445
[0711]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
[0712]		450	455 460
[0713]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly		

[0714]	465	470	475	480
[0715]	Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn			
[0716]		485	490	495
[0717]	Pro Gly Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu			
[0718]		500	505	510
[0719]	Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser			
[0720]		515	520	525
[0721]	Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala			
[0722]		530	535	540
[0723]	Ser Gln Gly Ile Ser Ser Gly Ser Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly			
[0724]	545	550	555	560
[0725]	Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Val Ser Ser Leu Glu Ser Gly			
[0726]		565	570	575
[0727]	Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu			
[0728]		580	585	590
[0729]	Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln			
[0730]		595	600	605
[0731]	Gln Phe Asn Ser Tyr Leu Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu			
[0732]		610	615	620
[0733]	Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser			
[0734]	625	630	635	640
[0735]	Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn			
[0736]		645	650	655
[0737]	Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala			
[0738]		660	665	670
[0739]	Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys			
[0740]		675	680	685
[0741]	Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp			
[0742]		690	695	700
[0743]	Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu			
[0744]	705	710	715	720
[0745]	Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
[0746]		725	730	
[0747]	<210> 15			
[0748]	<211> 1409			
[0749]	<212> DNA			
[0750]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0751]	<220>			
[0752]	<223> DMAb 221-7 mod 9重链人IgG1的核苷酸序列			
[0753]	<400> 15			
[0754]	atggattgga catggaggat tctgtttctg gtcgccgccc ccacaggaac ccacgccgaa 60			
[0755]	gtgcagctgg tggaatcagg cggagggtcg gtgcagccag gcggaagtet gcgactgtca 120			

[0756] tgcgccgtga gtgggtactc attcactagc tattggattg gatgggtgcg gcaggcacca 180
 [0757] ggcaagggac tggagtgggt gggattcatc taccccgggg actccgatac acgctatagt 240
 [0758] ccttctttca aaggcaggtt cacaatctct gccgacaaaa gcatttccac tgcttatctg 300
 [0759] cagatgaact ccctgcgggc tgaggatacc gcagtgtact attgcgccag gggcattctg 360
 [0760] aggtacttcg actggtttct ggactattgg gggcagggca ccctggtcac agtgtcaagc 420
 [0761] gcctctacca aaggaccaag cgtgttccca ctggctcctt cctctaagtc tactagtggc 480
 [0762] ggaaccgccg ctctgggatg tctggtgaag gattacttcc ctgagccagt cacagtgtcc 540
 [0763] tggaactctg gcgctctgac cagcggagtc cacacatttc ccgcagtgtc gcagagttca 600
 [0764] ggctgtact ccctgagctc cgtggtcaca gtcccttcta gttcactggg aactcagacc 660
 [0765] tatacttgca acgtgaatca caaaccttcc aataactaagg tcgacaagaa agtggaaacca 720
 [0766] aaatcttggt ataagacaca tactttgcct ccctgtccag cacctgagct gctgggcggc 780
 [0767] ccaagcgtgt tctgttttc acccaagccc aaagataccc tgatgattag caggacacca 840
 [0768] gaagtcactt gcgtggtcgt ggacgtgtcc cagcaggacc ccgaagtcaa gttcaactgg 900
 [0769] tacgtggacg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac caagagagga acagtacaac 960
 [0770] tcaacctatc gggctcgtgag cgtcctgaca gtgctgcacc aggactggct gaacggaaag 1020
 [0771] gagtataagt gcaaagtgtc taacaaggcc ctgccagctc ccatcgagaa gactattagc 1080
 [0772] aagctaaag ggcagccacg cgaaccccag gtgtacacc tgcctccatc acgagatgag 1140
 [0773] ctgacaaaaa accaggtctc tctgacttgt ctggtgaagg gattctatcc ctctgacatc 1200
 [0774] gcagtggagt gggaaagtaa tgggcagcct gaaaacaatt acaagaccac accccctgtg 1260
 [0775] ctggacagtg atggatcatt ctttctgtat agtaaactga ccgtggataa gtcaagatgg 1320
 [0776] cagcagggga acgtcttttc atgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacacc 1380
 [0777] cagaagtccc tgtctctgag tcttgcaa 1409
 [0778] <210> 16
 [0779] <211> 470
 [0780] <212> PRT
 [0781] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0782] <220>
 [0783] <223> DMAb 221-7 mod 9重链人IgG1的氨基酸序列
 [0784] <400> 16
 [0785] Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 [0786] 1 5 10 15
 [0787] Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 [0788] 20 25 30
 [0789] Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Phe
 [0790] 35 40 45
 [0791] Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 [0792] 50 55 60
 [0793] Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
 [0794] 65 70 75 80
 [0795] Pro Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
 [0796] 85 90 95
 [0797] Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

[0798]		100		105		110
[0799]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ile Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Leu Asp					
[0800]		115		120		125
[0801]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys					
[0802]		130		135		140
[0803]	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly					
[0804]		145		150		155 160
[0805]	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro					
[0806]		165		170		175
[0807]	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr					
[0808]		180		185		190
[0809]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val					
[0810]		195		200		205
[0811]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn					
[0812]		210		215		220
[0813]	Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro					
[0814]		225		230		235 240
[0815]	Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu					
[0816]		245		250		255
[0817]	Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp					
[0818]		260		265		270
[0819]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp					
[0820]		275		280		285
[0821]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly					
[0822]		290		295		300
[0823]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn					
[0824]		305		310		315 320
[0825]	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp					
[0826]		325		330		335
[0827]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro					
[0828]		340		345		350
[0829]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu					
[0830]		355		360		365
[0831]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn					
[0832]		370		375		380
[0833]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile					
[0834]		385		390		395 400
[0835]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr					
[0836]		405		410		415
[0837]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys					
[0838]		420		425		430
[0839]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys					

[0840]	435	440	445
[0841]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
[0842]	450	455	460
[0843]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0844]	465	470	
[0845]	<210> 17		
[0846]	<211> 702		
[0847]	<212> DNA		
[0848]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0849]	<220>		
[0850]	<223> DMAb 221-7 mod 9轻链人IgG1的核苷酸序列		
[0851]	<400> 17		
[0852]	atggtcctgc agaccaggt gtttatctcc ctgctgctgt ggatttctgg ggcatacggc	60	
[0853]	gacatccagc tgacacagtc tcccagctcc ctgtccgcat ctgtcggcga ccgagtgacc	120	
[0854]	atcacatgta gggccagcca ggggatttct agtggctcag catggtacca gcagaagcct	180	
[0855]	gggaaagcac caaagctgct gatctatgac gtgtctagcc tggaatccgg agtgcctagc	240	
[0856]	cggttctccg gatcaggaag tgggacagac tttactctga ccatttcaag cctgcagcct	300	
[0857]	gaggatttcg ccaactacta ttgccagcag ttcaatagct atctgctgac ttttgacag	360	
[0858]	ggcaccaaag tggaaatcaa gaggactgtc gcagccccta gcgtgttcat tttccacc	420	
[0859]	tccgatgagc agctgaagag cggcaccgct tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	480	
[0860]	ccacgcgagg ccaaagtcca gtggaagtg gacaacgctc tgcagtctgg aaatagtcag	540	
[0861]	gagtcagtga ctgaacagga cagcaaagat tccacctatt ctctgtcctc tacactgact	600	
[0862]	ctgagcaagg cagactacga gaagcataaa gtgtatgcct gcgaagtcac ccaccaggg	660	
[0863]	ctgtcctcac cagtcactaa atctttcaat cggggagaat gt	702	
[0864]	<210> 18		
[0865]	<211> 234		
[0866]	<212> PRT		
[0867]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0868]	<220>		
[0869]	<223> DMAb 221-7 mod 9轻链人IgG1的氨基酸序列		
[0870]	<400> 18		
[0871]	Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser		
[0872]	1	5	10 15
[0873]	Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser		
[0874]	20	25	30
[0875]	Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly		
[0876]	35	40	45
[0877]	Ile Ser Ser Gly Ser Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
[0878]	50	55	60
[0879]	Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Val Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser		
[0880]	65	70	75 80
[0881]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		

[0882]	85	90	95
[0883]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn		
[0884]	100	105	110
[0885]	Ser Tyr Leu Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
[0886]	115	120	125
[0887]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
[0888]	130	135	140
[0889]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
[0890]	145	150	155
[0891]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
[0892]	165	170	175
[0893]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
[0894]	180	185	190
[0895]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
[0896]	195	200	205
[0897]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
[0898]	210	215	220
[0899]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0900]	225	230	
[0901]	<210> 19		
[0902]	<211> 2202		
[0903]	<212> DNA		
[0904]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0905]	<220>		
[0906]	<223> DMAb 221-7 wt的核苷酸序列		
[0907]	<400> 19		
[0908]	atggattgga catggaggat tctgtttctg gtcgccgccc ccacaggaac ccacgccgaa 60		
[0909]	gtcagactgg tgcagtcagg ctccgagggtg aagaaaccag gcgaaagtct gaaaatctca 120		
[0910]	tgccaggatga gtgggtactc attcaactagc tattggattg gatgggtgcg gcagatgcca 180		
[0911]	ggcaagggac tggagcgagt gggattcatc taccgccggg actccgatac acgctatagt 240		
[0912]	ccttcatttc agggccagggt gacaatctct gccgacaaaa gcatttccac tgcttatctg 300		
[0913]	cagtggagct ccctgaaggc ttccgatacc gcaatgtact attgcgccag gggcattctg 360		
[0914]	aggtacttcg actggtttct ggactattgg gggcagggca ccctggtcac agtgtcaagc 420		
[0915]	gcctctacca aaggaccaag cgtgttccca ctggctcctt cctctaagtc tactagtggc 480		
[0916]	ggaaccgccg ctctgggatg tctggtgaag gattacttcc ctgagccagt cacagtgccc 540		
[0917]	tggaactctg gcgctctgac cagcggagtc cacacattc ccgcagtgtc gcagagttca 600		
[0918]	ggcctgtact ccctgagctc cgtggtcaca gtcccttcta gttcactggg aactcagacc 660		
[0919]	tatatctgca acgtgaatca caaaccttc aatactaagg tcgacaagaa agtggacca 720		
[0920]	aaatcttggtg ataagacaca tacttgccct ccctgtccag cacctgagct gctgggccc 780		
[0921]	ccaagcgtgt tcctgtttcc acccaagccc aaagataccc tgatgattag caggacacca 840		
[0922]	gaagtcactt gcgtggtcgt ggacgtgtcc cacgaggacc ccgaagtcaa gttcaactgg 900		
[0923]	tacgtggacg gcgtcgagggt gcataatgct aagaccaaac caagagagga acagtacaac 960		

[0966]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ile Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Leu Asp
[0967]	115 120 125
[0968]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
[0969]	130 135 140
[0970]	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
[0971]	145 150 155 160
[0972]	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
[0973]	165 170 175
[0974]	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
[0975]	180 185 190
[0976]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
[0977]	195 200 205
[0978]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
[0979]	210 215 220
[0980]	Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
[0981]	225 230 235 240
[0982]	Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[0983]	245 250 255
[0984]	Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
[0985]	260 265 270
[0986]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
[0987]	275 280 285
[0988]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
[0989]	290 295 300
[0990]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
[0991]	305 310 315 320
[0992]	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
[0993]	325 330 335
[0994]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
[0995]	340 345 350
[0996]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
[0997]	355 360 365
[0998]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
[0999]	370 375 380
[1000]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
[1001]	385 390 395 400
[1002]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
[1003]	405 410 415
[1004]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
[1005]	420 425 430
[1006]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
[1007]	435 440 445

[1008]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
[1009]	450 455 460
[1010]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly
[1011]	465 470 475 480
[1012]	Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
[1013]	485 490 495
[1014]	Pro Gly Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu
[1015]	500 505 510
[1016]	Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser
[1017]	515 520 525
[1018]	Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
[1019]	530 535 540
[1020]	Ser Gln Gly Ile Ser Ser Gly Ser Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
[1021]	545 550 555 560
[1022]	Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Val Ser Ser Leu Glu Ser Gly
[1023]	565 570 575
[1024]	Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu
[1025]	580 585 590
[1026]	Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
[1027]	595 600 605
[1028]	Gln Phe Asn Ser Tyr Leu Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
[1029]	610 615 620
[1030]	Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
[1031]	625 630 635 640
[1032]	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
[1033]	645 650 655
[1034]	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
[1035]	660 665 670
[1036]	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
[1037]	675 680 685
[1038]	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
[1039]	690 695 700
[1040]	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg
[1041]	705 710 715 720
[1042]	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1043]	725 730
[1044]	<210> 21
[1045]	<211> 1410
[1046]	<212> DNA
[1047]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1048]	<220>
[1049]	<223> DMAb 221-7 wt重链的核苷酸序列

[1050] <400> 21

[1051] atggattgga catggaggat tctgtttctg gtcgccgccc ccacaggaac ccacgccgaa 60

[1052] gtgcagctgg tgcagtcagg ctccgaggtg aagaaaccag gcgaaagtct gaaaatctca 120

[1053] tgccaggtga gtgggtactc attcactagc tattggattg gatgggtgcg gcagatgcca 180

[1054] ggcaagggac tggagcgagt gggattcadc taccgccggg actccgatac acgctatagt 240

[1055] ctttcatttc agggccaggt gacaatctct gccgacaaaa gcatttccac tgcttatctg 300

[1056] cagtggagct cctgaagge ttccgatacc gcaatgtact attgcgccag gggcattctg 360

[1057] aggtacttcg actggtttct ggactattgg gggcagggca ccctgggtcac agtgtcaage 420

[1058] gcctctacca aaggaccaag cgtgttccca ctggctcctt cctctaagtc tactagtggc 480

[1059] ggaaccgccg ctctgggatg tctggtgaag gattacttcc ctgagccagt cacagtgtcc 540

[1060] tggaactctg gcgctctgac cagcggagtc cacacattc ccgagtgct gcagagttca 600

[1061] ggctgtact cctgagctc cgtggtcaca gtcccttcta gttcactggg aactcagacc 660

[1062] tatactgca acgtgaatca caaaccttc aataactaag tcgacaagaa agtggacca 720

[1063] aaatcttggtg ataagacaca tacttgcctt ccctgtccag cacctgagct gctgggctgg 780

[1064] ccaagcgtgt tctgtttcc acccaagccc aaagataccc tgatgattag caggacacca 840

[1065] gaagtcactt gcgtggtcgt ggacgtgtcc cagcaggacc ccgaagtcaa gttcaactgg 900

[1066] tacgtggacg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac caagagagga acagtacaac 960

[1067] tcaacctatc gggctcgtgag cgtcctgaca gtgctgcacc aggactggct gaacggaaag 1020

[1068] gagtataagt gcaaagtgtc taacaaggcc ctgccagctc ccatcgagaa gactattagc 1080

[1069] aaggetaaag ggcagccacg cgaaccccag gtgtacaccc tgctccatc acgagatgag 1140

[1070] ctgacaaaaa accagctctc tctgacttgt ctggtgaagg gattctatcc ctctgacatc 1200

[1071] gcagtggagt gggaaagtaa tgggcagcct gaaaacaatt acaagaccac accccctgtg 1260

[1072] ctggacagtg atggatcatt ctttctgtat agtaaactga ccgtggataa gtcaagatgg 1320

[1073] cagcagggga acgtcttttc atgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacacc 1380

[1074] cagaagtccc tgtctctgag tcttgcaaaa 1410

[1075] <210> 22

[1076] <211> 470

[1077] <212> PRT

[1078] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1079] <220>

[1080] <223> DMAb 221-7 wt重链的氨基酸序列

[1081] <400> 22

[1082] Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

[1083] 1 5 10 15

[1084] Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Val Lys Lys

[1085] 20 25 30

[1086] Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Val Ser Gly Tyr Ser Phe

[1087] 35 40 45

[1088] Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu

[1089] 50 55 60

[1090] Glu Arg Val Gly Phe Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser

[1091] 65 70 75 80

[1092]	Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
[1093]	85 90 95
[1094]	Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
[1095]	100 105 110
[1096]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ile Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Leu Asp
[1097]	115 120 125
[1098]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
[1099]	130 135 140
[1100]	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
[1101]	145 150 155 160
[1102]	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
[1103]	165 170 175
[1104]	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
[1105]	180 185 190
[1106]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
[1107]	195 200 205
[1108]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
[1109]	210 215 220
[1110]	Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
[1111]	225 230 235 240
[1112]	Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[1113]	245 250 255
[1114]	Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
[1115]	260 265 270
[1116]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
[1117]	275 280 285
[1118]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
[1119]	290 295 300
[1120]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
[1121]	305 310 315 320
[1122]	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
[1123]	325 330 335
[1124]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
[1125]	340 345 350
[1126]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
[1127]	355 360 365
[1128]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
[1129]	370 375 380
[1130]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
[1131]	385 390 395 400
[1132]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
[1133]	405 410 415

[1134]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
[1135]	420 425 430
[1136]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
[1137]	435 440 445
[1138]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
[1139]	450 455 460
[1140]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1141]	465 470
[1142]	<210> 23
[1143]	<211> 699
[1144]	<212> DNA
[1145]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1146]	<220>
[1147]	<223> DMAb 221-7 wt轻链的核苷酸序列:
[1148]	<400> 23
[1149]	atggctctgc agaccaggt gtttatctcc ctgctgctgt ggatttctgg ggcatacggc 60
[1150]	gccatccagc tgacacagtc tcccagctcc ctgtccgcat ctgtcggcga ccgagtgacc 120
[1151]	atcacatgta gggccagcca ggggatttct agtggctcag catggtacca gcagaagcct 180
[1152]	gggaaagcac caaagctgct gatctatgac gtgtctagcc tggaatccgg agtgcctagc 240
[1153]	cggttctccg gatcaggaag tgggacagag tttactctga ccatttcaag cctgcagcct 300
[1154]	gaggatttcg ccaactacta ttgccagcag ttcaatagct atctgctgac ttttggaggg 360
[1155]	ggcaccaaag tggaaatcaa gactgtcga gccctagcg tgttcatttt tccaccctcc 420
[1156]	gatgagcagc tgaagagcgg caccgctcc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacca 480
[1157]	cgcgagcca aagtccagtg gaaggtggac aacgctctgc agtctggaaa tagtcaggag 540
[1158]	tcagtgactg aacaggacag caaagattcc acctattctc tgtcctctac actgactctg 600
[1159]	agcaaggcag actacagaaa gcataaagtg tatgcctgcg aagtcacca ccaggggctg 660
[1160]	aggtcaccag tcaactaaatc tttcaatcgg ggagaatgt 699
[1161]	<210> 24
[1162]	<211> 233
[1163]	<212> PRT
[1164]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1165]	<220>
[1166]	<223> DMAb 221-7 wt轻链的氨基酸序列
[1167]	<400> 24
[1168]	Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
[1169]	1 5 10 15
[1170]	Gly Ala Tyr Gly Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
[1171]	20 25 30
[1172]	Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
[1173]	35 40 45
[1174]	Ile Ser Ser Gly Ser Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[1175]	50 55 60

[1176]	Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Val Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
[1177]	65 70 75 80
[1178]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[1179]	85 90 95
[1180]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn
[1181]	100 105 110
[1182]	Ser Tyr Leu Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr
[1183]	115 120 125
[1184]	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
[1185]	130 135 140
[1186]	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
[1187]	145 150 155 160
[1188]	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
[1189]	165 170 175
[1190]	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
[1191]	180 185 190
[1192]	Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
[1193]	195 200 205
[1194]	Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser Pro Val
[1195]	210 215 220
[1196]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1197]	225 230
[1198]	<210> 25
[1199]	<211> 738
[1200]	<212> PRT
[1201]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1202]	<220>
[1203]	<223> 鼠DMAb 221-7 mod 9 CDR的氨基酸序列
[1204]	<400> 25
[1205]	Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
[1206]	1 5 10 15
[1207]	Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
[1208]	20 25 30
[1209]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Phe
[1210]	35 40 45
[1211]	Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[1212]	50 55 60
[1213]	Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
[1214]	65 70 75 80
[1215]	Pro Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
[1216]	85 90 95
[1217]	Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

[1218]		100		105		110
[1219]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ile Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Leu Asp					
[1220]		115		120		125
[1221]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr					
[1222]		130		135		140
[1223]	Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly					
[1224]		145		150		155
[1225]	Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro					
[1226]		165		170		175
[1227]	Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr					
[1228]		180		185		190
[1229]	Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val					
[1230]		195		200		205
[1231]	Thr Val Thr Ser Asn Thr Trp Pro Ser Gln Thr Ile Thr Cys Asn Val					
[1232]		210		215		220
[1233]	Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg					
[1234]		225		230		235
[1235]	Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro					
[1236]		245		250		255
[1237]	Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro					
[1238]		260		265		270
[1239]	Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr					
[1240]		275		280		285
[1241]	Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser					
[1242]		290		295		300
[1243]	Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His					
[1244]		305		310		315
[1245]	Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile					
[1246]		325		330		335
[1247]	Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn					
[1248]		340		345		350
[1249]	Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg					
[1250]		355		360		365
[1251]	Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu					
[1252]		370		375		380
[1253]	Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe					
[1254]		385		390		395
[1255]	Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu					
[1256]		405		410		415
[1257]	Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr					
[1258]		420		425		430
[1259]	Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly					

[1260]	435	440	445
[1261]	Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His Glu Val Leu His Asn His Leu		
[1262]	450	455	460
[1263]	Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg		
[1264]	465	470	475 480
[1265]	Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly		
[1266]		485	490 495
[1267]	Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe		
[1268]		500	505 510
[1269]	Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Leu		
[1270]		515	520 525
[1271]	Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr		
[1272]		530	535 540
[1273]	Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Gly Ser Ala Trp Tyr		
[1274]	545	550	555 560
[1275]	Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Val Ser		
[1276]		565	570 575
[1277]	Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
[1278]		580	585 590
[1279]	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala		
[1280]		595	600 605
[1281]	Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Leu Leu Thr Phe Gly Gln		
[1282]		610	615 620
[1283]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser		
[1284]	625	630	635 640
[1285]	Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val		
[1286]		645	650 655
[1287]	Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp		
[1288]		660	665 670
[1289]	Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr		
[1290]		675	680 685
[1291]	Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr		
[1292]		690	695 700
[1293]	Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala		
[1294]	705	710	715 720
[1295]	Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn		
[1296]		725	730 735
[1297]	Glu Cys		
[1298]	<210> 26		
[1299]	<211> 475		
[1300]	<212> PRT		
[1301]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		

[1302] <220>
 [1303] <223> 鼠DMAb 221-7 mod 9的氨基酸序列
 [1304] <400> 26
 [1305] Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 [1306] 1 5 10 15
 [1307] Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 [1308] 20 25 30
 [1309] Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Phe
 [1310] 35 40 45
 [1311] Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 [1312] 50 55 60
 [1313] Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
 [1314] 65 70 75 80
 [1315] Pro Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
 [1316] 85 90 95
 [1317] Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 [1318] 100 105 110
 [1319] Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ile Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Leu Asp
 [1320] 115 120 125
 [1321] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
 [1322] 130 135 140
 [1323] Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly
 [1324] 145 150 155 160
 [1325] Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
 [1326] 165 170 175
 [1327] Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
 [1328] 180 185 190
 [1329] Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val
 [1330] 195 200 205
 [1331] Thr Val Thr Ser Asn Thr Trp Pro Ser Gln Thr Ile Thr Cys Asn Val
 [1332] 210 215 220
 [1333] Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg
 [1334] 225 230 235 240
 [1335] Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro
 [1336] 245 250 255
 [1337] Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 [1338] 260 265 270
 [1339] Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr
 [1340] 275 280 285
 [1341] Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser
 [1342] 290 295 300
 [1343] Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His

[1344]	305	310	315	320
[1345]	Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile			
[1346]		325	330	335
[1347]	Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn			
[1348]		340	345	350
[1349]	Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg			
[1350]		355	360	365
[1351]	Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu			
[1352]		370	375	380
[1353]	Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe			
[1354]	385	390	395	400
[1355]	Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu			
[1356]		405	410	415
[1357]	Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr			
[1358]		420	425	430
[1359]	Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly			
[1360]		435	440	445
[1361]	Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His Glu Val Leu His Asn His Leu			
[1362]		450	455	460
[1363]	Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys			
[1364]	465	470	475	
[1365]	<210> 27			
[1366]	<211> 234			
[1367]	<212> PRT			
[1368]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1369]	<220>			
[1370]	<223> 鼠DMAb 221-7 mod 9的氨基酸序列			
[1371]	<400> 27			
[1372]	Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser			
[1373]	1	5	10	15
[1374]	Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser			
[1375]		20	25	30
[1376]	Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly			
[1377]		35	40	45
[1378]	Ile Ser Ser Gly Ser Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
[1379]		50	55	60
[1380]	Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Val Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser			
[1381]	65	70	75	80
[1382]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
[1383]		85	90	95
[1384]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn			
[1385]		100	105	110

[1386]	Ser Tyr Leu Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1387]	115 120 125
[1388]	Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
[1389]	130 135 140
[1390]	Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
[1391]	145 150 155 160
[1392]	Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
[1393]	165 170 175
[1394]	Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[1395]	180 185 190
[1396]	Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
[1397]	195 200 205
[1398]	His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
[1399]	210 215 220
[1400]	Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
[1401]	225 230

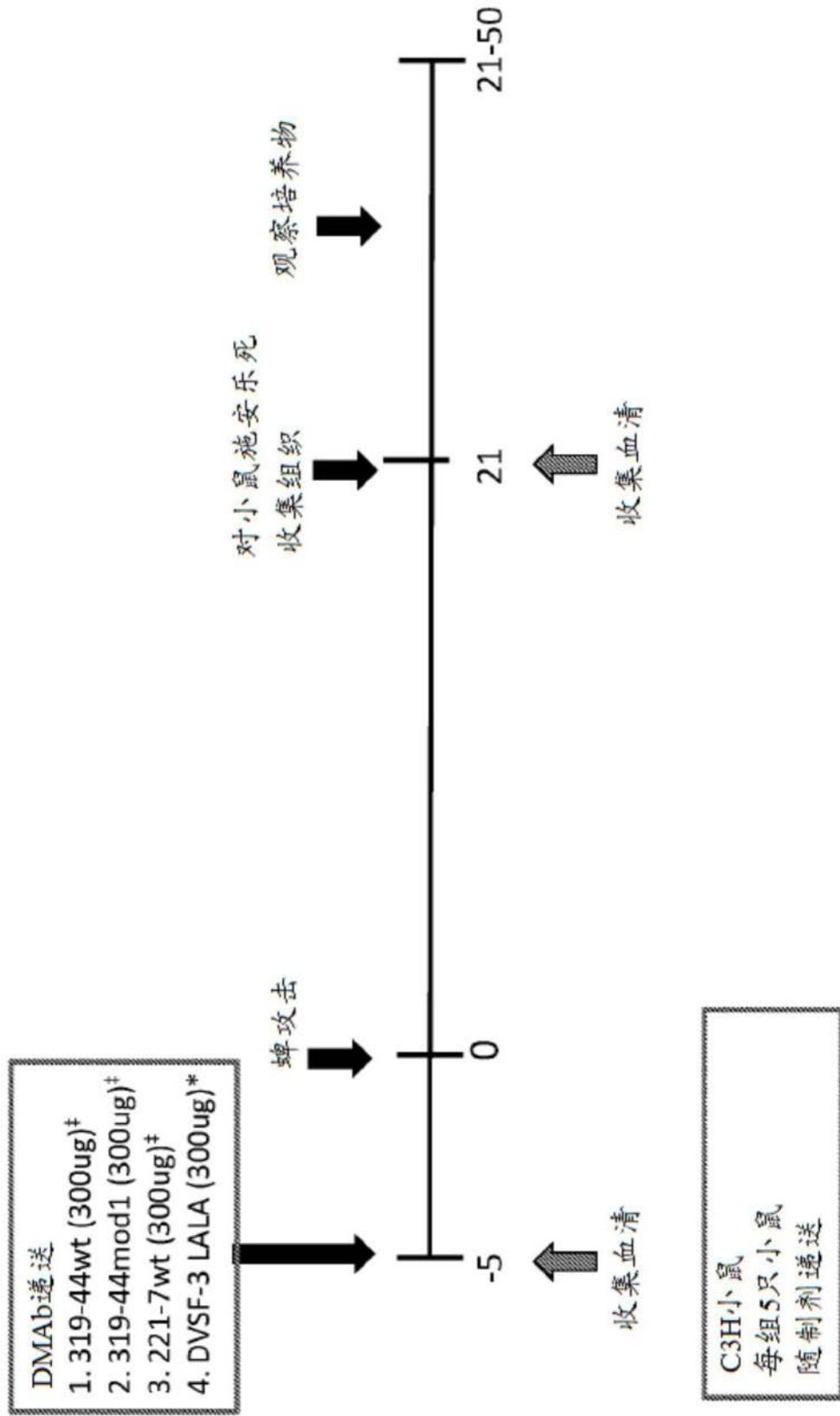


图1

	动物编号	第3天的血清抗体 (ug/ml)	第21天的血清抗体 (ug/ml)	保护作用	
				是	否
319-44 WT + 制剂	小鼠1	16.07	0.00	是	3/5
	小鼠2	4.56	0.00	是	
	小鼠3	11.20	0.00	是	
	小鼠4	7.68	0.00	否	
	小鼠5	4.83	0.00	否	
319-44 mod1 + 制剂	小鼠1	8.65	0.00	是	4/5
	小鼠2	8.94	0.00	否	
	小鼠3	9.92	0.00	是	
	小鼠4	10.94	0.00	是	
	小鼠5	7.28	0.00	是	
221-7 WT + 制剂	小鼠1	0.06	0.00	否	0/5
	小鼠2	0.50	0.00	否	
	小鼠3	0.29	0.00	否	
	小鼠4	0.18	0.00	否	
	小鼠5	0.30	0.00	否	
DVSF-3 LALA (阴性对照)	小鼠1	不适用	不适用	否	0/5
	小鼠2	不适用	不适用	否	
	小鼠3	不适用	不适用	否	
	小鼠4	不适用	不适用	否	
	小鼠5	不适用	不适用	否	

图2

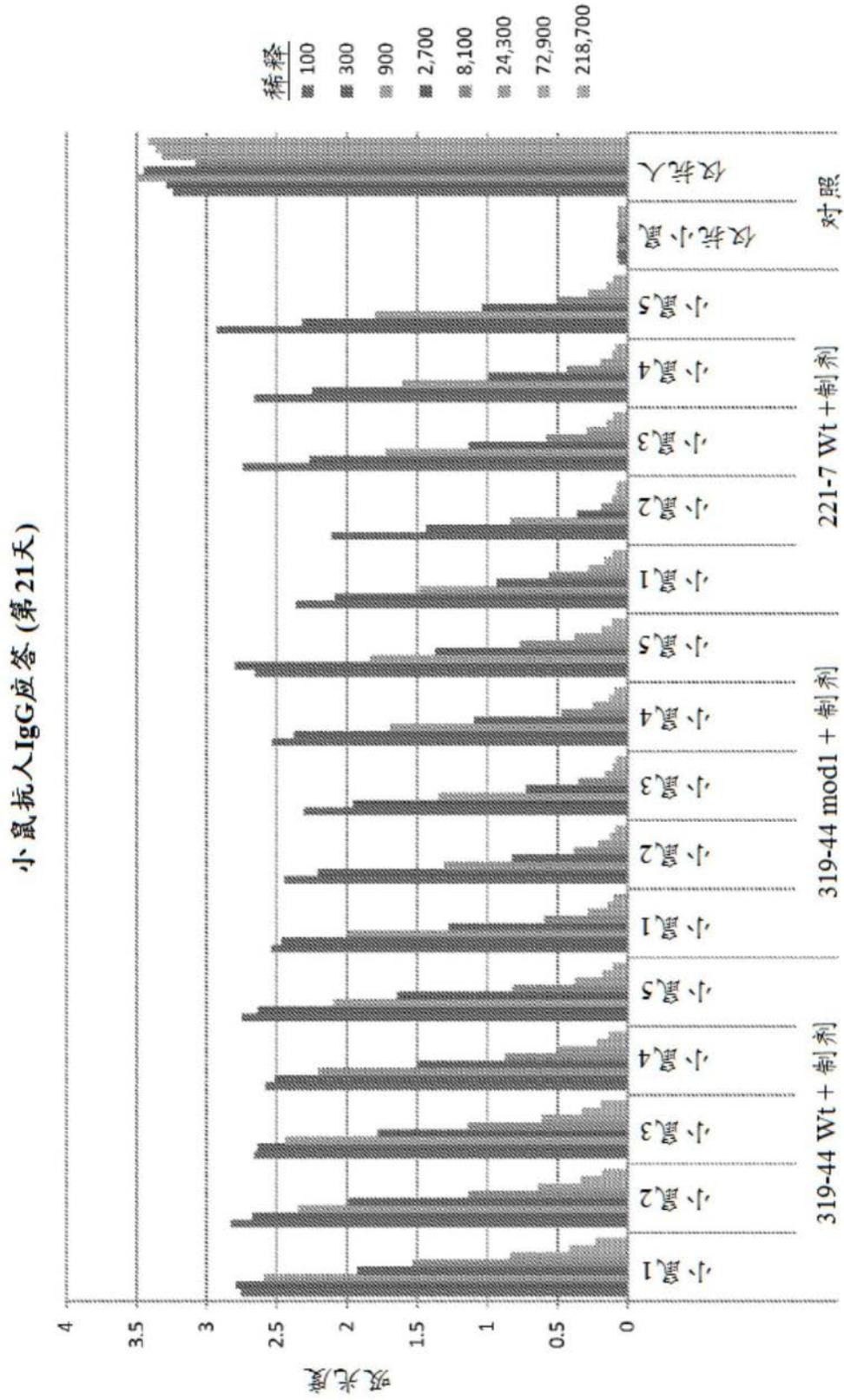


图3

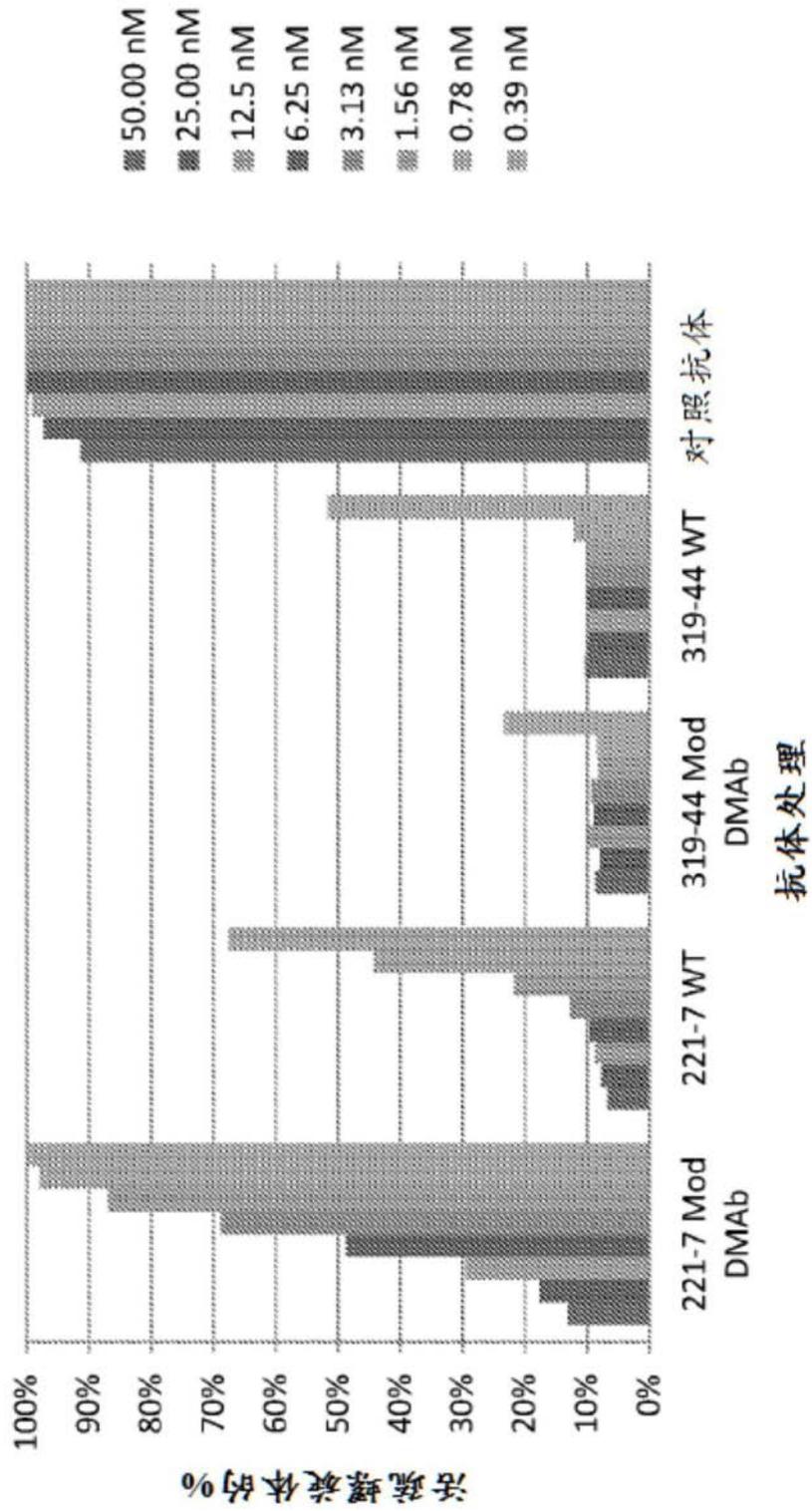


图4

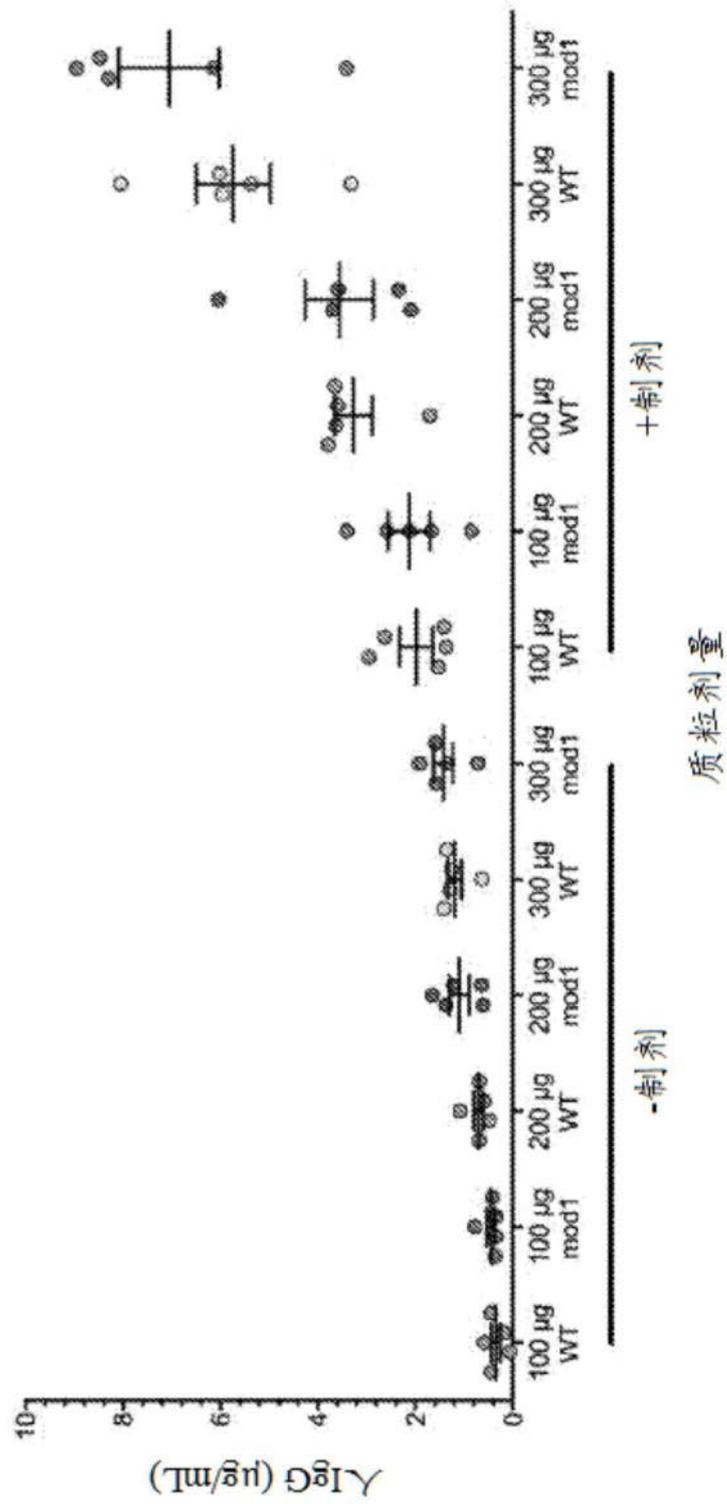


图5

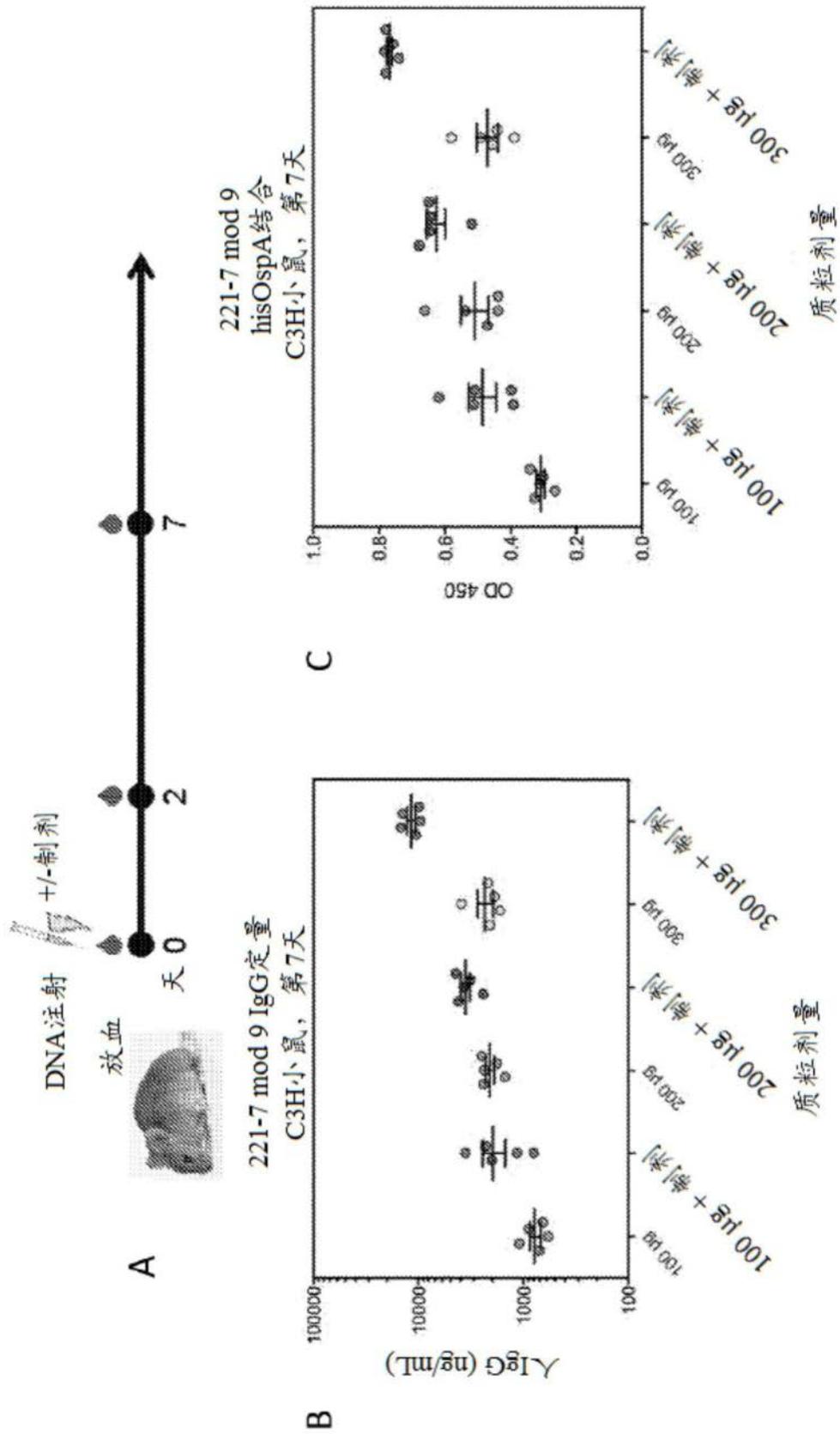


图6A-6C

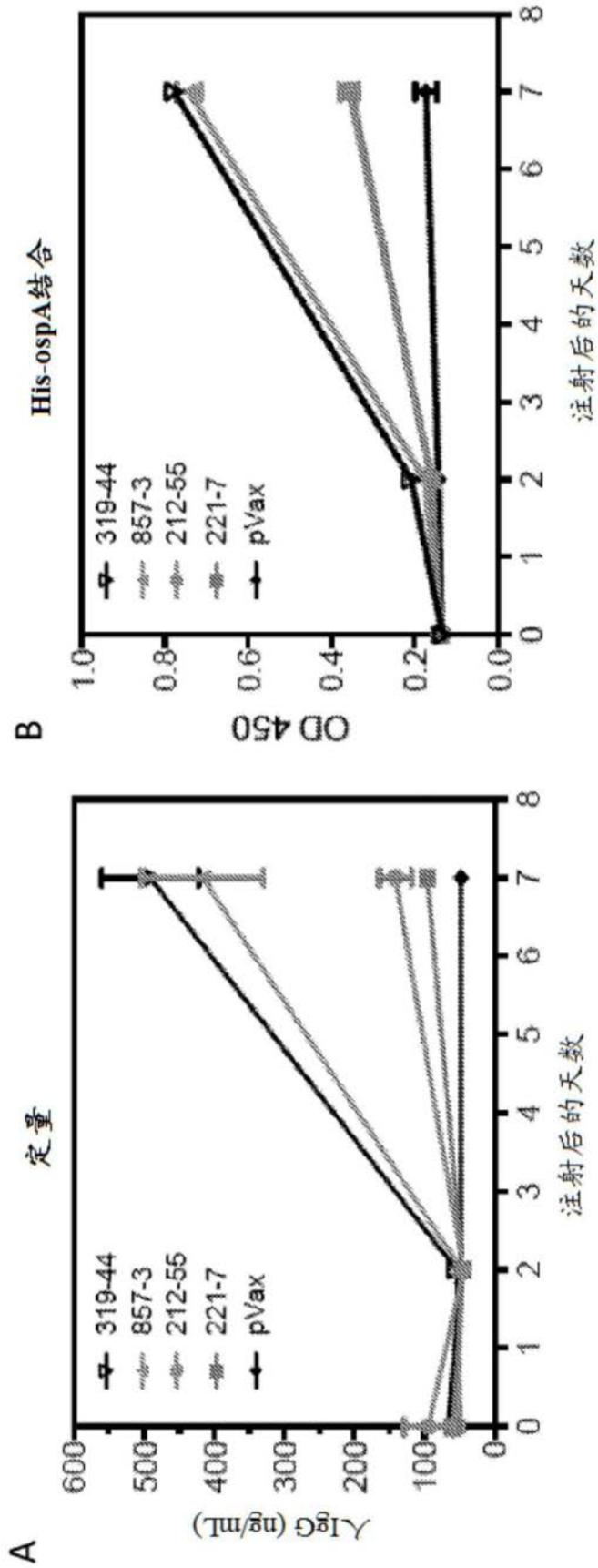


图7A-7B

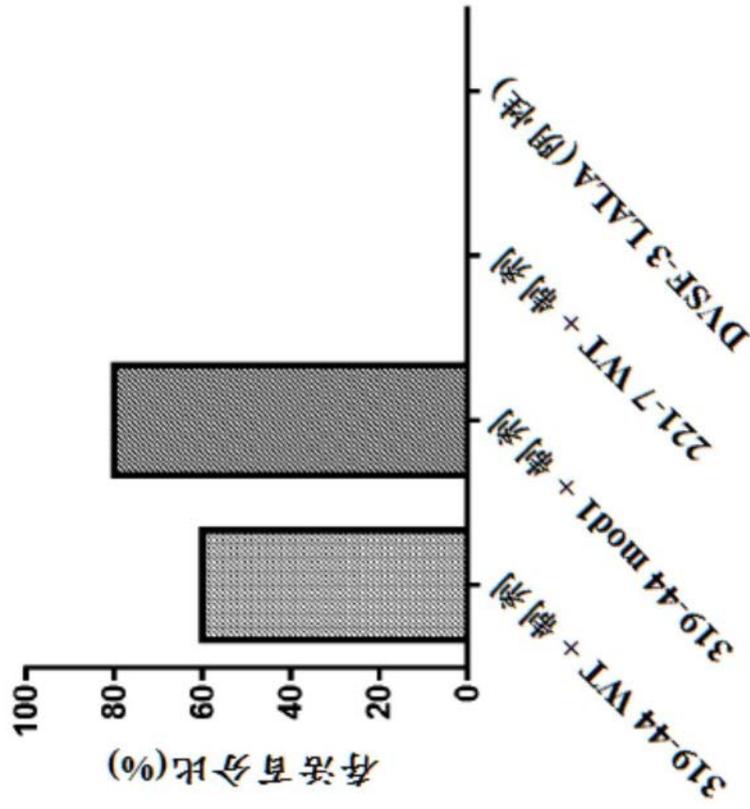


图8