

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480034907.4

[51] Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

[43] 公开日 2006年12月27日

[11] 公开号 CN 1886425A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2004.9.24

[21] 申请号 200480034907.4

[30] 优先权

[32] 2003.9.25 [33] RU [31] 2003128660

[86] 国际申请 PCT/RU2004/000373 2004.9.24

[87] 国际公布 WO2005/028510 英 2005.3.31

[85] 进入国家阶段日期 2006.5.25

[71] 申请人 弗塞沃洛德·I·基塞莱夫

地址 俄罗斯莫斯科

共同申请人 彼得·G·斯维什尼科夫

[72] 发明人 弗塞沃洛德·I·基塞莱夫

彼得·G·斯维什尼科夫

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

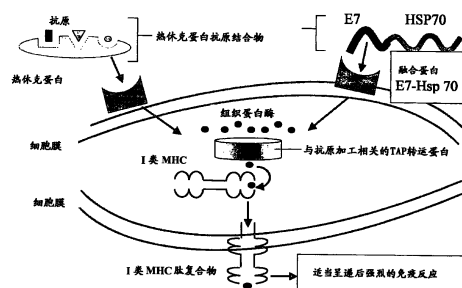
权利要求书7页 说明书42页 序列表9页
附图11页

[54] 发明名称

开发和使用对传统上低免疫原性的抗原具有特异性的单克隆抗体的方法、试剂盒和组合物

[57] 摘要

本发明涉及开发和利用特异于传统上低免疫原性的抗原的单克隆抗体。本发明提供通过化学结合感兴趣的抗原与载体分子生产单克隆抗体，从而使免疫系统对用结合抗原进行的免疫发生反应的方法。本发明还提供了结合抗原的具体组合物以及特异于这些结合抗原的单克隆抗体。本发明还提供了用于使用单克隆抗体检测疾病的试剂盒。



1. 一种生产特异于低免疫原性抗原的单克隆抗体的方法，所述方法包括：
- 5 a. 将抗原与载体分子化学结合；
b. 用结合的抗原免疫动物；
c. 从动物收集 B 细胞；
d. 用收集的 B 细胞建立杂交瘤；
e. 筛选杂交瘤对天然抗原的特异性。
- 10 2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述载体分子是 HSP70。
3. 权利要求 1 所述的方法，其中所述动物具有完整的免疫系统。
4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述动物是哺乳动物。
5. 权利要求 1 所述的方法，其中所述 B 细胞收集自腹水。
6. 权利要求 1 所述的方法，其中所述 B 细胞收集自淋巴结。
- 15 7. 权利要求 1 所述的方法，其中所述 B 细胞收集自血液。
8. 权利要求 1 所述的方法，其中所述 B 细胞收集自脾。
9. 权利要求 1 所述的方法，其中所述杂交瘤使用无限增殖小鼠细胞建立。
- 20 10. 权利要求 9 所述的方法，其中所述无限增殖小鼠细胞是小鼠骨髓瘤细胞。
11. 权利要求 1 所述的方法，其中所述杂交瘤使用无限增殖人细胞建立。
12. 权利要求 1 所述的方法，其中所述杂交瘤使用无限增殖大鼠细胞建立。
- 25 13. 权利要求 1 所述的方法，其中所述对特异性的筛选通过选自放射性免疫测定、酶联免疫吸附测定、“三明治”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质 A 测定、病毒显象测定、生物活性调节测定或免疫电泳测定的方法进行。
- 30 14. 一种包含特异于低免疫原性抗原的单克隆抗体的组合物，所述组合物通过如下步骤生产：

- a.将抗原与载体分子化学结合;
 - b.用结合抗原免疫动物;
 - c.从动物收集 B 细胞;
 - d.用收集的 B 细胞建立杂交瘤; 和
 - 5 e.筛选杂交瘤对天然抗原的特异性。
15. 权利要求 14 所述的组合物, 其中所述载体分子是 HSP70。
 16. 权利要求 14 所述的组合物, 其中所述动物具有完整的免疫系统。
 17. 权利要求 14 所述的组合物, 其中所述动物是哺乳动物。
 18. 权利要求 14 所述的组合物, 其中所述 B 细胞收集自腹水。
 - 10 19. 权利要求 14 所述的组合物, 其中所述 B 细胞收集自淋巴结。
 20. 权利要求 14 所述的组合物, 其中所述 B 细胞收集自血液。
 21. 权利要求 14 所述的组合物, 其中所述 B 细胞收集自脾。
 22. 权利要求 14 所述的组合物, 其中所述杂交瘤使用小鼠骨髓瘤细胞建立。
 - 15 23. 权利要求 14 所述的组合物, 其中所述杂交瘤使用无限增殖人细胞建立。
 24. 权利要求 14 所述的组合物, 其中所述杂交瘤使用无限增殖大鼠细胞建立。
 25. 权利要求 14 所述的组合物, 其中所述对特异性的筛选通过选自放
 - 20 射性免疫测定、酶联免疫吸附测定、“三明治”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质 A 测定、病毒显象测定、生物活性调节测定或免疫电泳测定的方法进行。
 - 25 26. 一种生产对 E7 癌蛋白具有特异性的单克隆抗体的方法, 所述方法包括:
 - a.将 E7 癌蛋白与载体分子化学结合;
 - b.用结合抗原免疫动物;
 - c.从动物收集 B 细胞;
 - d.用收集的 B 细胞建立杂交瘤; 和
 - 30 e.筛选杂交瘤对天然 E7 癌蛋白的特异性。
 27. 权利要求 26 所述的方法, 其中所述化学结合包括:

a.创建具有编码 E7 癌蛋白的核苷酸序列和编码 HSP70 的核苷酸序列的质粒；和

b.用所述质粒转染宿主细胞，其中宿主细胞将核苷酸序列转录成结合的 E7 癌蛋白。

5 28. 权利要求 27 所述的方法，其中所述编码 E7 癌蛋白的核苷酸序列是 SEQ ID NO:1。

29. 权利要求 27 所述的方法，其中所述编码 E7 癌蛋白的核苷酸序列是 SEQ ID NO:3。

10 30. 权利要求 27 所述的方法，其中所述编码 HSP70 的核苷酸序列是 SEQ ID NO:5。

31. 权利要求 27 所述的方法，其中所述宿主细胞是大肠杆菌。

32. 权利要求 26 所述的方法，其中所述载体分子是 HSP70。

33. 权利要求 26 所述的方法，其中所述动物具有完整的免疫系统。

34. 权利要求 26 所述的方法，其中所述动物是哺乳动物。

15 35. 权利要求 34 所述的方法，其中所述动物是小鼠。

36. 权利要求 26 所述的方法，其中所述 B 细胞收集自腹水。

37. 权利要求 26 所述的方法，其中所述 B 细胞收集自淋巴结。

38. 权利要求 26 所述的方法，其中所述 B 细胞收集自血液。

39. 权利要求 26 所述的方法，其中所述 B 细胞收集自脾。

20 40. 权利要求 26 所述的方法，其中所述杂交瘤使用无限增殖小鼠细胞建立。

41. 权利要求 40 所述的方法，其中所述无限增殖小鼠细胞是小鼠骨髓瘤细胞。

42. 权利要求 41 所述的小鼠骨髓瘤细胞是 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞。

25 43. 权利要求 26 所述的方法，其中所述杂交瘤使用无限增殖人细胞建立。

44. 权利要求 26 所述的方法，其中所述杂交瘤使用无限增殖大鼠细胞建立。

30 45. 权利要求 26 所述的方法，其中对特异性的筛选通过选自放射性免疫测定、酶联免疫吸附测定、“三明治”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集

测定、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质 A 测定、病毒显象测定、生物活性调节测定或免疫电泳测定的方法进行。

46. 一种包含特异于 E7 癌蛋白的单克隆抗体的组合物，所述单克隆抗体由包含下列步骤的方法产生：

- 5 a. 将 E7 癌蛋白与载体分子化学结合；
- b. 用结合抗原免疫动物；
- c. 从动物收集 B 细胞；
- d. 用收集的 B 细胞建立杂交瘤； 和
- e. 筛选杂交瘤对天然 E7 癌蛋白的特异性。
- 10 47. 权利要求 46 所述的组合物，其中所述化学结合包括：
 - a. 创建具有编码 E7 癌蛋白的核苷酸序列和编码 HSP70 的核苷酸序列的质粒； 和
 - b. 用质粒转染宿主细胞，其中宿主细胞将核苷酸序列转录成结合的 E7 癌蛋白。
- 15 48. 权利要求 47 所述的组合物，其中所述编码 E7 癌蛋白的核苷酸序列是 SEQ ID NO:1。
49. 权利要求 47 所述的组合物，其中所述编码 E7 癌蛋白的核苷酸序列是 SEQ ID NO:3。
50. 权利要求 47 所述的组合物，其中所述编码 HSP70 的核苷酸序列是
- 20 SEQ ID NO:5。
51. 权利要求 47 所述的组合物，其中所述宿主细胞是大肠杆菌。
52. 权利要求 46 所述的组合物，其中所述载体分子是 HSP70。
53. 权利要求 46 所述的组合物，其中所述动物具有完整的免疫系统。
54. 权利要求 46 所述的组合物，其中所述动物是哺乳动物。
- 25 55. 权利要求 54 所述的组合物，其中所述动物是小鼠。
56. 权利要求 46 所述的组合物，其中所述 B 细胞收集自腹水。
57. 权利要求 46 所述的组合物，其中所述 B 细胞收集自淋巴结。
58. 权利要求 46 所述的组合物，其中所述 B 细胞收集自血液。
59. 权利要求 46 所述的组合物，其中所述 B 细胞收集自脾。
- 30 60. 权利要求 46 所述的组合物，其中所述杂交瘤使用无限增殖小鼠细胞建立。

61. 权利要求 60 所述的组合物, 其中所述无限增殖小鼠细胞是小鼠骨髓瘤细胞。

62. 权利要求 61 所述的小鼠骨髓瘤细胞是 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞。

63. 权利要求 46 所述的组合物, 其中所述杂交瘤使用无限增殖人细胞
5 建立。

64. 权利要求 46 所述的组合物, 其中所述杂交瘤使用无限增殖大鼠细胞建立。

65. 权利要求 46 所述的组合物, 其中所述对特异性的筛选通过选自放射性免疫测定、酶联免疫吸附测定、“三明治”免疫测定、免疫放射测定、凝
10 胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质 A 测定、病毒显象测定、生物活性调节测定或免疫电泳测定的方法进行。

66. 一种使用对 E7 癌蛋白具有特异性的单克隆抗体检测子宫颈上皮内瘤形成的方法, 所述方法包括:

15 a. 获得宫颈上皮细胞样品; 和
b. 对样品中 E7 癌蛋白的存在进行筛选。

67. 权利要求 66 所述的方法, 其中所述筛选 E7 癌蛋白存在的方法选自放射性免疫测定、酶联免疫吸附测定、“三明治”免疫测定、免疫放射测定、凝
20 胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质 A 测定、病毒显象测定、生物活性调节测定或免疫电泳测定。

68. 权利要求 66 所述的方法, 其中所述存在的 E7 癌蛋白等于或大于 0.05ng/ml。

69. 权利要求 66 所述的方法, 其中所述单克隆抗体包含至少两种免疫
25 球蛋白同种型。

70. 权利要求 69 所述的单克隆抗体, 其中一种免疫球蛋白同种型是 IgG2a。

71. 权利要求 69 所述的单克隆抗体, 其中一种免疫球蛋白同种型是 IgG2b。

30 72. 权利要求 69 所述的单克隆抗体, 其中一种免疫球蛋白同种型与第二种免疫球蛋白同种型相比对不同的抗原决定簇具有特异性。

73. 一种测定受检者是否处于患子宫颈上皮内瘤形成危险的试剂盒, 所述试剂盒包括:

- a. 至少一种特异性地检测 E7 癌蛋白的试剂; 和
- b. 确定受检者处于患子宫颈上皮内瘤形成增加的危險中的使用说明。

5 74. 权利要求 73 所述的试剂是权利要求 46 所述的单克隆抗体。

75. 一种生产特异于朊病毒蛋白肽的单克隆抗体的方法, 所述方法包括:

- a. 将朊病毒蛋白肽与载体分子化学结合;
- b. 用结合的抗原免疫动物;
- 10 c. 从动物收集 B 细胞;
- d. 从收集的 B 细胞建立杂交瘤; 和
- e. 筛选杂交瘤对天然朊病毒蛋白的特异性。

76. 权利要求 75 所述的方法, 其中结合通过化学方法使用戊二醛进行。

77. 权利要求 75 所述的方法, 其中所述朊病毒蛋白肽是 SEQ ID NO: 6。

15 78. 权利要求 75 所述的方法, 其中所述朊病毒蛋白肽是 SEQ ID NO: 7。

79. 权利要求 75 所述的方法, 其中所述朊病毒蛋白肽是 SEQ ID NO: 9。

80. 权利要求 75 所述的方法, 其中所述载体分子是 HSP70。

81. 权利要求 75 所述的方法, 其中所述动物是小鼠。

20 82. 权利要求 75 所述的方法, 其中所述筛选使用酶联免疫吸附测定进行。

83. 一种测定受检者是否具有发生海绵状脑病的风险的试剂盒, 所述试剂盒包括:

- a. 至少一种特异性检测朊病毒蛋白的试剂, 和
- b. 确定受检者具有出现海绵状脑病的增大的风险的说明。

25 84. 一种生产对透明质酸具有特异性的单克隆抗体的方法, 所述方法包括:

- a. 将透明质酸与载体分子化学结合;
- b. 用结合的抗原免疫动物;
- c. 从动物收集 B 细胞;
- 30 d. 用收集的 B 细胞建立杂交瘤; 和
- e. 筛选杂交瘤对天然透明质酸的特异性。

85. 一种生产对基质金属蛋白酶3具有特异性的单克隆抗体的方法,所述方法包括:

- a.将基质金属蛋白酶3与载体分子化学结合;
 - b.用结合的抗原免疫动物;
 - 5 c.从动物收集B细胞;
 - d.用收集的B细胞建立杂交瘤;和
 - e.筛选杂交瘤对天然基质金属蛋白酶3的特异性。
86. 权利要求85所述的方法,其中结合用化学方法使用戊二醛进行。
87. 权利要求85所述的方法,其中所述载体分子是HSP70。
- 10 88. 权利要求85所述的方法,其中所述动物是小鼠。
89. 权利要求85所述的方法,其中所述筛选使用酶联免疫吸附测定进行。

开发和使用对传统上低免疫原性的抗原
具有特异性的单克隆抗体的方法、试剂盒和组合物

5

发明领域

本发明的方法和组合物涉及医药生化领域，概括地说涉及开发和使用对传统上低免疫原性的抗原具有特异性的单克隆抗体。

10

发明背景

免疫系统具有两种武器，即获得性或天然免疫反应。免疫系统的这两种武器共同作用与外来的入侵者斗争。能够引发获得性免疫反应的任何物质被称做抗原。外源分子可作为抗原，激发免疫反应，导致抗体的产生。但是，某些分子不激发免疫反应。过去，这一问题通过使用佐剂予以克服，如 Freund 氏完全佐剂，以激活天然的免疫反应。

15

然而，尽管使用了佐剂，仍存在许多分子，它们不激发产生抗原特异性抗体的免疫反应。具体地说，许多天然来源的抗原常常不激发充分的和分子特异性免疫反应。许多情况下，使用化学合成和重组技术生产抗原。然而，这些通过合成获得的抗原常常不具有与天然分子相同的三级结构。

20

当针对合成抗原开发出抗体时，这些抗体不能识别天然分子。

25

本发明提供了新的方法和组合物，该方法和组合物允许针对传统上不能引发足够的和特异性免疫反应的抗原产生抗原特异性抗体。这些抗体具有多种不同的用途，例如但不限于，疾病治疗（例如但不限于癌症、病毒感染等）、免疫诊断、免疫化学、免疫组织学、免疫细胞学、免疫亲和层析和基因组与蛋白质组研究。

发明综述

本发明涉及生产对低免疫原性的抗原具有特异性的单克隆抗体的方法，该方法包括化学结合抗原与载体分子，用结合抗原免疫动物，从动物体内收集 B 细胞，从收集的 B 细胞产生杂交瘤，筛选对天然抗原具有特异性的杂交瘤。在一个实施例中，载体分子是 HSP70。在另一个实施例中，

30

动物具有完整的免疫系统。在另一个实施例中，动物为哺乳动物。在另外的实施例中，B细胞单独或结合采自腹水、脾、淋巴结或血液。在其它实施例中，使用无限增殖细胞生产杂交瘤，例如但不限于小鼠骨髓瘤细胞、无限增殖人细胞或无限增殖大鼠细胞。在其它实施例中，筛选特异性的方法选自放射性免疫测定、酶联免疫吸附测定、“三明治”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质A测定、病毒显象测定、生物活性调节测定和免疫电泳测定。

本发明还涉及含有对低免疫原性抗原具有特异性的单克隆抗体的组合物，该单克隆抗体通过如下方法产生，即化学结合抗原与载体分子，用结合抗原免疫动物，从动物体内收集B细胞，从收获的B细胞产生杂交瘤，筛选对天然抗原具有特异性的杂交瘤。在一个具体的实施例中，载体分子是HSP70。在另一个实施例中，动物具有完整的免疫系统。在另一个实施例中，动物为哺乳动物。在另外的实施例中，B细胞单独或结合采自腹水、脾、淋巴结或血液。在另外的实施例中，使用无限增殖细胞生产杂交瘤，例如但不限于小鼠骨髓瘤细胞、无限增殖人细胞或无限增殖大鼠细胞。在其它实施例中，筛选特异性的方法选自放射性免疫测定、酶联免疫吸附测定、“三明治”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质A测定、病毒显象测定、生物活性调节测定和免疫电泳测定。

本发明进一步涉及生产对E7癌蛋白具有特异性的单克隆抗体的方法，该方法包括化学结合E7癌蛋白与载体分子，用结合的抗原免疫动物，从动物体内收集B细胞，从收获的B细胞产生杂交瘤，筛选对天然E7癌蛋白具有特异性的杂交瘤。在另一个实施例中，化学结合包括产生具有编码E7癌蛋白的寡核苷酸序列以及编码HSP70的寡核苷酸序列的质粒；用该质粒转染宿主细胞，其中所述宿主细胞转录寡核苷酸序列成为结合的E7癌蛋白。在另一个实施例中，编码E7癌蛋白的寡核苷酸序列是SEQ ID NO:1。在另外的实施例中，编码E7癌蛋白的寡核苷酸序列是SEQ ID NO:3。在另外的实施例中，编码HSP70的寡核苷酸序列是SEQ ID NO:5。在其它的实施例中，宿主细胞是大肠杆菌。在一个实施例中，载体分子是HSP70。在另一

个实施例中，动物具有完整的免疫系统。在另一个实施例中，动物为哺乳动物。在另外的实施例中，B细胞单独或结合采自腹水、脾、淋巴结或血液。在另外的实施例中，使用无限增殖细胞生产杂交瘤，例如但不限于小鼠骨髓瘤细胞、无限增殖人细胞或无限增殖大鼠细胞。在具体的实施例中，小鼠骨髓瘤细胞是 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞。在其它实施例中，筛选特异性的方法选自放射性免疫测定、酶联免疫吸附测定、“三明治”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质 A 测定、病毒显象测定、生物活性调节测定和免疫电泳测定。

10 本发明进一步提供含有对 E7 癌蛋白具有特异性的单克隆抗体的组合物，该组合物通过如下方法生产，即包含化学结合 E7 癌蛋白与载体分子，用结合的抗原免疫动物，从动物体内收集 B 细胞，从收集的 B 细胞产生杂交瘤，筛选对天然 E7 癌蛋白具有特异性的杂交瘤。在另一个实施例中，化学结合包括产生具有编码 E7 癌蛋白的寡核苷酸序列以及编码 HSP70 的寡核苷酸序列的质粒；用该质粒转染宿主细胞，其中所述宿主细胞转录寡核苷酸序列成为结合的 E7 癌蛋白。在另一个实施例中，编码 E7 癌蛋白的寡核苷酸序列是 SEQ ID NO:1。在另外的实施例中，编码 E7 癌蛋白的寡核苷酸序列是 SEQ ID NO:3。在另外的实施例中，编码 HSP70 的寡核苷酸序列是 SEQ ID NO:5。在其它的实施例中，宿主细胞是大肠杆菌。在一个实施例中，载体分子是 HSP70。在另一个实施例中，动物具有完整的免疫系统。在另一个实施例中，动物为哺乳动物。在另外的实施例中，B 细胞单独或结合采自腹水、脾、淋巴结或血液。在另外的实施例中，使用无限增殖细胞生产杂交瘤，例如但不限于小鼠骨髓瘤细胞、无限增殖人细胞或无限增殖大鼠细胞。在具体的实施例中，小鼠骨髓瘤细胞是 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞。在其它实施例中，筛选特异性的方法选自放射性免疫测定、酶联免疫吸附测定、“三明治”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质 A 测定、病毒显象测定、生物活性调节测定和免疫电泳测定。

25 30 本发明还提供使用对 E7 癌蛋白具有特异性的单克隆抗体检测子宫颈上皮内的瘤形成的方法，该方法包括获得子宫颈上皮细胞的样本，并筛选具

有 E7 癌蛋白存在的样本。在具体的实施例中，筛选 E7 癌蛋白存在的方法选自放射性免疫测定、酶联免疫吸附测定、“三明治”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质 A 测定、病毒显象测定、生物活性调节测定和免疫电泳测定。在另一个实施例中，E7 癌蛋白的存在等于或大于 0.05ng/ml。在另一个实施例中，单克隆抗体包括至少两个免疫球蛋白同种型。在另一个实施例中，一个免疫球蛋白同种型是 IgG2a，另一个是 IgG2b。在另一个实施例中，一个免疫球蛋白同种型比第二个免疫球蛋白同种型对于不同的抗原决定簇具有特异性。

10 本发明还提供测定受检者是否具有出现子宫颈上皮内瘤形成的风险的试剂盒，该试剂盒包含至少一种特异性检测 E7 癌蛋白的试剂，以及测定受检者具有出现子宫颈上皮内瘤形成的增大的风险的说明。在一个实施例中，该试剂是对 E7 癌蛋白具有特异性的单克隆抗体。

15 本发明还提供生产对朊病毒蛋白具有特异性的单克隆抗体的方法，该方法包括化学结合朊病毒蛋白与载体分子，用结合的抗原免疫动物，从动物体内收集 B 细胞，从收集的 B 细胞产生杂交瘤，并筛选对天然的朊病毒蛋白具有特异性的杂交瘤。在具体的实施例中，使用戊二醛进行化学结合。在其它实施例中，载体分子是 HSP70。在另一个实施例中，动物是小鼠。在另一个实施例中，使用酶联免疫吸附测定进行筛选。

20 本发明进一步提供了测定受检者是否具有出现海绵状脑病的风险的试剂盒，该试剂盒包括至少一种特异性检测朊病毒蛋白的试剂以及确定受检者具有出现海绵状脑病增大的风险的说明。

25 本发明还包括生产对透明质酸具有特异性的单克隆抗体的方法，该方法包括化学结合透明质酸与载体分子，用结合的抗原免疫动物，从动物体内收集 B 细胞，从收集的 B 细胞产生杂交瘤，并筛选对天然透明质酸具有特异性的杂交瘤。

30 本发明进一步包括生产对基质金属蛋白酶 3 具有特异性的单克隆抗体的方法，该方法包括将基质金属蛋白酶 3 与载体分子结合，用结合的抗原免疫动物，从动物体内收集 B 细胞，从收集的 B 细胞产生杂交瘤，并筛选对天然的基质金属蛋白酶 3 具有特异性的杂交瘤。在一个具体的实施例中，使用戊二醛进行化学结合。在另一个实施例中，载体分子是 HSP70。在另

一个实施例中，动物是小鼠。在另一个实施例中，使用酶联免疫吸附测定进行筛选。

附图描述

5 图 1 显示 HSP70 如何促进抗原的呈递。

图 2 显示人乳头瘤病毒 (Human Papilloma Virus) 病理的流程。CIN 指子宫颈上皮内瘤形成。HSV 是单纯疱疹病毒。HLA 指人白细胞抗原。

图 3 显示使用 PCR 扩增 E7 基因的引物序列 (SEQ ID NOS:14-17)。

10 图 4 显示用于从 HPV16 克隆 E7 癌蛋白的具有 EcoRI 和 BamHI 限制位点的寡核苷酸 (SEQ ID NO:1) 和氨基酸 (SEQ ID NO:2) 序列。

图 5 显示用于从 HPV18 克隆 E7 癌蛋白的具有 EcoRI 和 BamHI 限制位点的寡核苷酸 (SEQ ID NO:3) 和氨基酸 (SEQ ID NO:4) 序列。

图 6 显示 HPV 16 E7 或 HPV 18 E7 基因在 pBluescript SK(+)(Stratagene) 质粒的 EcoRI-BamHI 位点插入的位置上的构成 (SEQ ID NO: 18)。

15 图 7 是一张电泳凝胶图，显示了来自用 HPV 16 E7 和 HPV 18 E7 基因转染的大肠杆菌溶菌产物的分离的 E7 癌蛋白带。

图 8 显示了包含 E7 基因的 DNA 进行 PCR 扩增所用的 DNA 模板 (SEQ ID NOS:19-22)。该模板是基于包含 HPV E7 基因的质粒 DNA pHE716 和 pHE718。

20 图 9 显示质粒 PQE30-E716-DnaK 结构的示意图。

图 10 显示质粒 pQE30-DnaK 的寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:5)。

图 11 显示在最适条件下 HPV 16 E7 癌蛋白定量测定的校准曲线。

发明的详细描述

25 定义：

为了便于发明的理解，下面定义了一些术语。

如本文所使用的，术语“化学结合的”或“化学结合”是指连接抗原与载体分子。这种连接可以使用重组技术在基因水平上发生，其中可产生包含抗原和载体分子的氨基酸序列或其部分的杂合蛋白。这种杂合蛋白通过寡核
30 苷酸序列编码抗原和载体分子或其部分产生。这种连接还包括使用其它化学
反应在抗原和载体蛋白之间产生的共价键，例如但不限于戊二醛反应。

共价键还可以使用第三分子连接抗原与载体分子产生。这些交联剂能够与抗原和载体分子上的基团反应，例如但不限于伯胺、巯基、羰基、糖类或羧酸。化学结合还包括抗原和载体分子间的非共价结合。

如本文所使用的，术语“载体分子”是指与感兴趣的抗原化学结合的任何分子，这能够使免疫系统产生对天然抗原具有特异性的抗体。

如本文所使用的，术语“天然”、“自然”、“天然抗原”或“自然抗原”是指自然产生的抗原。至于本发明，“天然抗原”具有“低免疫原性”。“低免疫原性”是指天然分子不能引发强的免疫反应，所述强的免疫反应产生高亲和性的抗体。术语“抗原”、“感兴趣的抗原”或特异性分子，例如-但不限于 E7 癌蛋白、朊病毒蛋白、基质金属蛋白酶 3、透明质酸-包括保持对天然抗原专一的抗原特殊性的整个分子或其任何部分。

如本文所使用的，术语“完整的免疫系统”是指动物具有能够对外源抗原产生免疫反应的功能性免疫系统。该免疫反应包括能够产生分泌抗体的 B 细胞。

如本文所使用的，“氨基酸序列”是指天然发生的蛋白分子的氨基酸序列。“氨基酸序列”等术语，例如“多肽”或“蛋白”无意将氨基酸序列限制为与列举的蛋白分子相关的完整、天然的氨基酸序列。

如本文所使用的，术语“核酸分子编码”、“DNA 序列编码”和“DNA 编码”是指沿脱氧核糖核酸链的脱氧核苷酸的顺序或序列。这些脱氧核苷酸的顺序决定了沿多肽（蛋白质）链的氨基酸顺序。DNA 序列就这样编码氨基酸序列。

人们说 DNA 分子具有“5'端”和“3'端”，因为单核苷酸以某种方式反应形成寡核苷酸或多核苷酸，这样一个单核苷酸戊糖环的 5'磷酸在一个方向上通过磷酸二酯键与其相邻 3'氧结合。因此，寡核苷酸或多核苷酸的末端，如果其 5'磷酸没有与单核苷酸戊糖环的 3'氧连接则称做“5'端”，如果 3'氧没有与其后的单核苷酸戊糖环的 5'磷酸连接则称做“3'端”。如本文所使用的，核酸序列，即使是较大的寡核苷酸或多核苷酸的内部，也可以说具有 5'和 3'端。在线性或环状 DNA 分子中，分离的元件被称做存在于“上游”或 5'或“下游”或 3'元件。该术语反应了沿 DNA 链以 5'到 3'的形式进行转录的情况。指导连锁基因转录的启动子和增强子元件通常位于编码区的 5'端或上游。但是，即使当增强子元件位于启动子元件和编码区的 3'端时仍能发挥它们

的作用。转录终止和多腺苷酸化信号位于编码区的3'端或下游。

如本文所使用的，术语“具有核苷酸序列编码的寡核苷酸”和“具有核苷酸序列编码的多核苷酸”是指包含基因的编码区的核酸序列，或者换句话说，指编码基因产物的核酸序列。编码区可以 cDNA、基因组 DNA 或 RNA 的形式存在。当以 DNA 形式存在时，寡核苷酸或多核苷酸可以是单链（即有意义链）或双链的。如果需要准许正确地起始转录和/或正确加工初级 RNA 转录物，适当的控制元件例如增强子/启动子、剪接点、多腺苷酸化信号等可位于非常接近基因的编码区的位置。换句话说，在本发明的表达载体中使用的编码区可包含内源增强子/启动子、剪接接头、间插序列、多腺苷酸信号等，或内源和外源控制元件的组合。

如本文所使用的，术语“调节元件”是指控制核酸序列表达某些方面的遗传元件。例如，启动子是促进可操作地连接的编码区的转录起始的调节元件。其它调节元件包括剪接信号、多腺苷酸信号、终止信号等。

“扩增”是涉及模板特异性的核酸复制的一种特殊情况。它与非-特异性模板复制（即复制是依赖模板的，但不依赖特异性模板）相对照。这里模板特异性不同于复制的忠实性（即正确的多核苷酸序列的合成）和核苷酸（核糖-或脱氧核糖）特异性。模板特异性通常被描述为术语“靶”特异性。靶序列即是“靶”，意思是从其它核酸中将它们挑出而找出。扩增技术主要为这种挑选而设计。

在大多数扩增技术中通过选择酶获得模板特异性。扩增的酶是这样的一些酶，在它们被使用的条件下，仅加工异源核酸混合物中的特异性核酸序列。例如，在 Q 复制酶的情况下，MDV-1 RNA 是复制酶的特异性模板[D. L. Kacian 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 69: 3038 (1972)]。其它核酸不会由这种扩增酶复制。相似地，在 T7 RNA 聚合酶的情况下，这种扩增酶对其自身的启动子具有严格的特异性[Chamberlin 等, Nature, 228: 227(1970)]。在 T4 DNA 连接酶的情况下，当寡核苷酸或多核苷酸底物与模板在连接接合处不匹配时，该酶不会连接两种寡核苷酸或多核苷酸[D. Y. Wu 和 R. B. Wallace, Genomics, 4:560 (1989)]。最后，由于 Taq 和 Pfu 聚合酶具有高温下发挥作用的能力，所以发现它们对结合的序列显示高的特异性，并因此由引物所确定；高温产生热力学条件，有利于引物与靶序列杂交，而不与非-靶序列杂交[H. A. Erlich (编), PCR Technology, Stockton Press

(1989)]。

如本文所使用的,术语“可扩增的核酸”是指可通过任何扩增方法扩增的核酸。设想为“可扩增的核酸”通常包括“样品模板”。

如本文所使用的,术语“样品模板”是指来源于样品的核酸,该模板用于分析“靶”(下面给予定义)的存在。相反,“本底模板”是指除样品模板外的核酸,它可以存在或不存在于样品中。本底模板常常被忽视。它可能是样品遗留的结果,或者可能是因为试图从样品中纯化出来的核酸污染物的存在。例如,来自有机体的核酸而不是被检测的核酸可在试样中以本底存在。

如本文所使用的,术语“引物”是指寡核苷酸,不管是通过纯化的限制酶切消化天然发生的还是合成生产的,当将该寡核苷酸置于一定的条件下,它能起到合成起点的作用,在这种条件下与核酸链互补的引物延伸产物的合成被诱导(即,核苷酸和诱导剂例如DNA聚合酶存在,并在适当的温度和pH的条件下)。优选地,引物是单链的,因其在扩增中具有最大效率,但也可以是双链的。如果是双链的,在用于制备延伸产物前,首先将该引物进行处理,将其双链分开。优选地,该引物是寡脱氧核糖核苷酸。该引物必须足够长,以在诱导剂存在的情况下引导延伸产物的合成。引物的确切长度取决于许多因素,包括温度、引物的来源以及使用的方法。

如本文所使用的,术语“探针”是指寡核苷酸(即核苷酸序列),不管是通过纯化的限制酶切消化天然发生的还是合成、重组生产的、或是通过PCR扩增的,它能与另一个感兴趣的寡核苷酸杂交。探针可以是单链的或双链的。探针在特殊基因序列的检测、识别和分离中很有用。设想在本发明中使用的任何探针可用一些“报道分子”标记,这样可在任何检测系统中检测,包括但不限于酶(例如ELISA,以及酶基础的组织化学测定)、荧光性的、放射性的和发光系统。这并不意味着本发明限制于任何具体的检测系统或标记。

如本文所使用的,术语“靶”,当涉及聚合酶链反应使用时,是指被用于聚合酶链反应的引物结合的核酸区域。因此,找寻“靶”以从其它的核酸序列挑选出。“片段”是指靶序列中的核酸区域。

如本文所使用的,术语“聚合酶链反应”(“PCR”)是指K. B. Mullis 美国专利 4,683,195, 4,683,202 和 4,965,188 的方法,本文引用作为参考,它描述了在基因组DNA混合物中不经克隆或纯化提高靶序列片段浓度的方

法。这种扩增靶序列的方法包括在 DNA 聚合酶存在的情况下，引导大量过量的两种寡核苷酸引物进入含有所欲的靶序列的 DNA 混合物，随后是热循环的精确顺序。这两种引物与其双链靶序列中各自相应的链互补。为实现扩增，将混合物变性，然后在靶分子内部引物退火到其互补序列。退火后，
5 用聚合酶延伸引物形成一对新的互补链。变性、引物退火和聚合酶延伸的步骤可重复多次（即变性、退火和延伸组成一个“循环”；可以有多次循环）以获得所欲靶序列的高浓度的扩增片段。所欲靶序列扩增片段的长度由各个引物的相对位置决定，因此，该长度是可控制的参数。由于过程不断重复，该方法被称做“聚合酶链反应（下文中为“PCR”）。因为所欲的靶序列的
10 扩增片段在混合物中成为优势序列（就浓度来说），所以说它们经“PCR 扩增”。

使用 PCR，可以扩增基因组 DNA 中特异性靶序列的单一拷贝达到通过几种不同的方法可检测到的水平（例如，与标记探针杂交；掺入生物素化的引物，随后进行抗生物素蛋白-酶结合检测；掺和 ^{32}P -标记的脱氧核苷酸三磷酸，例如 dCTP 或 dATP，进入扩增的片段）。除基因组 DNA 外，可用
15 适当的引物分子组扩增任何寡核苷酸或多核苷酸序列。具体地说，通过 PCR 方法产生的扩增片段本身是随后进行的 PCR 扩增的有效模板。

如本文所使用的，术语“PCR 产物”、“PCR 片段”和“扩增产物”是指经两轮或更多的变性、退火和延伸的 PCR 步骤完成后获得的复合物的混合物。
20 这些术语包括这样的情况，即一个或多个靶序列的一个或多个片段已被扩增。

如本文所使用的，术语“扩增试剂”是指除引物、核酸模板和扩增酶外的扩增所需要的那些试剂（脱氧核糖核苷酸三磷酸、缓冲剂等）。典型地，扩增试剂以及其它反应成分被放置和包含于反应容器中（试管、微孔等）。

25 如本文所使用的，术语“限制性核酸内切酶”和“限制性酶”是指细菌酶，每个细菌酶在或接近特异性核苷酸序列处酶切双链 DNA。

如本文所使用的，术语“重组 DNA 分子”是指包含通过分子生物技术结合在一起 DNA 片段的 DNA 分子。

30 术语“蛋白质印迹”是指固定于例如硝化纤维或膜等载体上的蛋白质（或多肽）的分析。蛋白质在丙烯酰胺凝胶上移动以分离蛋白，随后从凝胶上转移蛋白到固体载体上，例如硝化纤维或尼龙膜。然后固定的蛋白暴露于

抗体，该抗体与感兴趣的抗原具有反应性。可通过各种方法检测到抗体的结合，包括使用放射性标记的抗体。

如本文所使用的术语“抗原决定簇”是指与具体抗体接触的抗原部分(即表位)。当使用蛋白或蛋白片段或化学成分免疫宿主动物时，抗原的许多区域可诱导抗体的产生，该抗体与蛋白质的给定区域或三维结构特异性结合；5 这些区域或结构被称做抗原决定簇。抗原决定簇可与完整抗原(即用于引起免疫反应的“免疫原”)竞争与抗体的结合。

如本文所使用的，术语“载体(vector)”是指从一个细胞向另一个细胞转移DNA片段的核酸分子。术语“载体(vehicle)”有时与“载体(vector)”10 交换使用。

如本文所使用的术语“表达载体”是指重组DNA分子，该DNA分子包含所欲的编码序列和在具体的宿主有机体中表达可操作地连接的编码序列所需的适当的核酸序列。原核生物中表达所需的核酸序列通常包括启动子、操纵子(任意的)和核糖体结合位点，以及其它序列。已知真核细胞利用15 启动子、增强子、以及终止和聚腺苷酸化信号。

如本文所使用的，术语宿主细胞是指任何真核或原核细胞(例如细菌细胞例如大肠杆菌、酵母细胞、哺乳动物细胞、鸟类细胞、两栖动物细胞、植物细胞、鱼类细胞和昆虫细胞)，不论位于体外还是体内。例如，宿主细胞可位于转基因动物中。

20 如本文所使用的术语“转染”是指将外源DNA引入真核细胞。转染可通过本领域已知的各种方法完成，包括磷酸钙-DNA共沉淀、DEAE-葡聚糖-介导的转染、Polybrene-介导的转染、电穿孔、显微注射、脂质体融合、脂转染、原生质体融合、逆转录病毒感染和生物射弹术。

25 I.某些抗原具有低免疫原性

有许多低分子量的化合物，由于它们个体小所以不能独立地引起免疫反应。在一个实施例中，半抗原可与载体蛋白(例如但不限于牛血清清蛋白、卵清蛋白或匙孔血蓝蛋白)结合，并且这种结合物被用于免疫。在这样的实施例中产生了各种问题。例如，初级免疫反应可能指向载体蛋白而不指向半抗原分子，当检验来自免疫动物的血清和杂交瘤上清时，必须考30 虑这一情况。检验应揭示抗体是对半抗原具有特异性还是对结合物整体具

有特异性。

另一个问题可包括半抗原三维结构（构象）的改变，这可在与载体结合的过程中发生。这可产生对结合物内的半抗原具有特异性、但不能识别游离的半抗原分子的抗体。在这种情况下，可尝试不同的结合变体，这样
5 半抗原不同的功能团被暴露于载体的表面。

在另一个实施例中，当感兴趣的抗原或者是保守性的低免疫原性蛋白，或者较小的抗原决定簇时，可使用免疫复合体进行免疫，所述抗原决定簇已经具有在免疫反应中所有针对它的特异性抗体的非常低的百分比。在第一种情况下，免疫复合体的抗体成分可能是早期在典型免疫后获得的不具有令人满意的亲和性的单克隆抗体。在第二种情况下，使用针对强抗原决定簇的单克隆抗体。成功使用这一方法的例子是产生针对人促红细胞生成素、 α 和 γ 干扰素和非常接近品种的免疫球蛋白的抗体（例如，但不限于针对小鼠 IgG 的大鼠单克隆抗体）。见表 1。
10

在其它实施例中，一些抗原具有非常高的保守性，不能引发任何显著的免疫反应，尽管它们具有蛋白质特性和足够的分子量（例如但不限于，血红蛋白、某些酶）。在这些具体的实施例中，抗原可与热休克蛋白结合（例如但不限于，热休克蛋白 70 kDa，还称做 HSP70）。见表 1，表示为 APP 结合物。数据显示 HSP70 通过以某种方式暴露肽片段而促进肽片段的呈递（见图 1）。蛋白质和肽与 HSP70 结合常常导致针对这些蛋白和肽的抗体生产急剧增强。然而，在其它具体的实施例中，伴随 HSP70-干扰素 γ 的结合观察到免疫反应的完全抑制。
15
20

II.使用 HSP 增加免疫原性

本发明描述的方法包括热休克蛋白作为载体的新用途，以呈递感兴趣的抗原以产生对抗原的抗原特异性抗体，该抗原通常不引发针对天然分子的适当的免疫反应。细胞进化出许多机制以帮助它们在不可预知和危险的世界中存活。一种这样的机制是热休克反应，这是由于细胞暴露于异常高温（例如但不限于，发烧）和其它应激引起的，这些应激包括缺氧、营养缺乏，氧自由基、代谢破坏、病毒感染、吞噬作用和转化作用。这种热休克反应包括产生热休克蛋白（“HSPs”）。一个这样的蛋白质家族为 HSP70 蛋白。发现 HSP70 蛋白家族成员在细胞的细胞溶胶、线粒体、以及内质网
25
30

发挥作用。当 HSP70 蛋白帮助其它蛋白折叠时，每个 HSP70 蛋白都与一小组伴随蛋白共同工作。HSP70 及其伴随蛋白有与蛋白质表面疏水性氨基酸结合的趋势，在蛋白质表面它们水解 ATP，常常伴随 ATP 水解的各个循环结合和释放其蛋白质。这些重复循环帮助例如靶蛋白重折叠。

- 5 这些热休克蛋白中某些帮助稳定和修复部分变性的细胞蛋白。这些 HSP 还充当分子伴侣蛋白。作为伴侣蛋白，HSP 帮助熔球形式的蛋白转化为蛋白的恰当折叠的最终紧密构象的蛋白，保护功能蛋白不被降解，使异常蛋白往返于降解的区域，在不同的细胞内区室间转移蛋白，辅助蛋白多聚体的装配，或帮助用主要组织相容性复合体（MHC）分子呈递抗原到抗原-呈递细胞表面。

已显示免疫系统对微生物的热休克蛋白反应强烈，这些微生物例如细菌、寄生虫和真菌。外源 HSP 的存在引发身体产生迅速而有力的免疫反应。[Murray, P., Young, R., J. Bacteriol.174 :4193-4196 (1992)]。对于许多不同的病原体 HSP70 是免疫反应的主靶，这些病原体包括细菌、真菌、蠕虫、和原生动植物寄生虫。[Young, R. A., 和 Elliot, T. J., Cell, 59: 5-8 (1989); Kaufmann, S.H., Immunol. Today, 11: 129-136, (1990); Young, D. B., 等，应激蛋白和传染病 (Stress proteins and infectious diseases), 生物学和医学中的应激蛋白 (Stress proteins in biology and medicine), 131-165, Morimoto, R.I., 等, (编辑) Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1990); Young, R. A., Ann. Rev. Immunol., 8: 401- 420(1990)]。用各种病原体 HSP 进行免疫诱导强烈的免疫反应，并针对由这些病原体引起的疾病 提供保护[Suzue, K.和 Young, R.A., J. Immunol., 156 : 873-876 (1996)]。

基于身体强烈的免疫反应使用 HSP 作为疫苗的载体开始于二十世纪九十年代早期。[Udono, H.和 Srivastava, P. K., J. Exp.Med., 178: 1391-1396, (1993); Udono, H., 等, Proc.Natl., Acad. Sci. USA, 91: 3077-3081, (1994); Suto, R.和 Srivastava, P. K., Science, 269: 1585-1588, (1995); Blachere, N. E., 等, J. Exp.Med., 186: 1315-1322, (1997); Tamura, Y. P., 等, Science, 278: 117-120, (1997); Nair, S., 等, J. Immunol., 162: 6426-6432 (1999)]。

30 抗原与 HSP70 的化学结合[Lussow, A. R., 等, Eur. J. Immunol. 21: 2297-2302 (1991); Barrios, C., 等, Eur.J. Immunol., 22: 1365-1372, (1992); 和 Perraut,

R., 等, Clin. Exp. Immunol., 93: 382-386 (1993); Suzue, K.和 Young, R. A., J. Immunol. 1, 156: 873-876, (1996); Suzue, K., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 13146-13151, (1997); Rico, A.I., 等, Infect. Immun., 66: 347-352, (1998), 本文引入作为参考]可产生有力而改制的免疫原, 该免疫原能引发 MHC-I 型限制性的、CD8+细胞毒性 T 细胞反应, 该反应足以介导对表达融合配偶体的肿瘤的排斥反应。本发明使用了这种相同的细胞机制以产生对天然非结合抗原具有特异性的抗原特异性抗体。见图 1。

现有技术描述了使用 HSP70 刺激免疫反应, 借此根据细胞和体液免疫诱导的程度评估刺激活性。然而, 在抗体生成诱导和单克隆抗体生产之间具有显著的差别。血清中抗体的存在不总是导致能够识别天然分子的高亲和性单克隆抗体的生产。在一个具体的实施例中, 在生产针对 E7 癌蛋白的单克隆抗体时, 用纯化的重组蛋白免疫小鼠后观察到抗体的生成, 然而, 当检测时, 没有一个克隆识别包含 HPV 基因组的细胞系溶解产物中的天然 E7。该免疫系统似乎识别一些不存在于天然蛋白中的重组蛋白的决定簇。换句话说, 产生的抗体与用于免疫的抗原反应, 但不与天然蛋白反应。

本发明不限于任何具体的机制, 但是, 人们相信重组蛋白的三维蛋白结构不同于天然蛋白的结构。因此, 非天然抗原决定簇应呈递给免疫系统。在解决这一问题过程中, 本发明使用了抗原呈递的天然机制(使用杂交蛋白, 它包含与热休克蛋白结合的感兴趣的蛋白或抗原)呈递天然构象的决定簇到免疫系统。在具体的实施例中, 这通过使用 HSP70 完成。

在这些具体的实施例中, 感兴趣的抗原与 HSP70 或 HSP70 的任何部分结合, 使感兴趣的抗原具有免疫原性。结合可化学完成。[Lussow, A. R., 等, Eur.J. Immunol. 21: 2297-2302(1991); Barrios, C., 等, Eur. J. Immunol., 22: 1365-1372, (1992); 和 Perraut, R., 等, Clin. Exp. Immunol., 93: 382-386 (1993); Suzue, K. 和 Young, R. A., J. Immunol. L, 156: 873-876, (1996); Suzue, K., 等, Proc.Natl. Acad. Sci USA, 94: 13146-13151, (1997); Rico, A.I., 等, Infect. Immun., 66: 347-352, (1998)]。抗原可以是任何蛋白、肽、核苷酸序列或化学成分。HSP70 可来自任何来源, 包括但不限于, 哺乳动物、爬行动物、两栖动物、鱼类、鸟类、昆虫、细菌、真菌、蠕虫、原生动物、病毒和植物。

一旦感兴趣的抗原与 HSP70 分子结合, 该结合物被引入一个外源的完

整免疫系统，该系统能够加工结合物并针对用该结合物进行的免疫产生免疫反应。任何动物可被免疫，不限于哺乳动物，但典型的实验室的例子包括大鼠、小鼠、仓鼠、沙土鼠、豚鼠、兔、狗、猴、鸡、山羊、绵羊、猪、骆驼、牛、马和猫。

5

III. 免疫

免疫的效果直接决定高亲和力的单克隆抗体是否可以产生。本领域已知各种技术，并用来提高免疫的效果，本发明描述了其中的一些技术。

A. 选择免疫的被试者

10 在具体的实施例中，有三种典型的杂交瘤系统类型：小鼠、大鼠和人。小鼠杂交瘤是最广泛使用的，人杂交瘤是最少使用的。本发明决不限制于这些例子。任何具有完整免疫系统的动物都可用做 B 细胞的来源，用于与骨髓瘤或任何其它的无限增殖细胞杂交，包括但不限于无限增殖人和无限增殖大鼠细胞，以产生杂交瘤。

15 BALB/c 小鼠系最经常用于小鼠的免疫，所有的小鼠骨髓瘤系都起源于该系小鼠。在低免疫原性抗原的情况下，另一系的小鼠可被免疫。与 BALB/c 相比这些小鼠可对某些抗原产生更强的免疫反应。通过 BALB/c 与用于免疫的小鼠系杂交获得的第一代后代，可用于产生腹水用于杂交瘤生产。

20 在其它的实施例中使用了大鼠，文献主要介绍了 LOU/C 系，但是用来自 WISTAR 系的大鼠获得了完全令人满意的效果。

B. 小鼠免疫程序

1. 短免疫程序

25 在具体的实施例中，每两周一次、共两次给予 Balb/c 小鼠的后爪垫抗原。而在另一个实施例中，抗原的量典型地为每只小鼠 5-200 μ g (但不限于这一范围)，取决于它的可获得性和免疫原性。对于有毒抗原，剂量可减少到低至 0.1 μ g。对于第一次给予抗原 (免疫循环 (round of immunization))，典型地抗原溶液的体积范围为 50-200 μ l (但只要获得免疫反应并不限于这一具体的范围) 并与佐剂，例如完全弗氏佐剂 (“CFA”) 结合。CFA 是本领域熟知的，并作为矿物油使用被杀死的分枝杆菌悬浮物。也可使用其它佐剂，例如但不限于，矿物凝胶 (例如氢氧化铝) 和表面活性物质 (例如溶血卵磷脂、复合多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔血蓝蛋白、二硝基

30

酚和潜在的人佐剂，例如 BCG ("Bacille Calmette-Guerin") 和小棒状杆菌 (Corynebacterium parvum)。抗原溶液与 CFA 的充分混合产生良好分散的乳剂，以推迟和延缓抗原进入组织。第二轮免疫如第一轮进行，但使用不完全弗氏佐剂 (IFA)，它不含有分枝杆菌。

- 5 在另一个实施例中，使用低免疫原性的抗原，它用于用不同的抗原剂量并使用各种免疫程序免疫一组动物。在一个具体的实施例中，在第二轮免疫后的第三或第四天，采集血液样品并分析它们针对特异性抗原的抗体的含量。通常选择具有最高效价的动物用于分析。然而，也有例外，例如蛋白毒素用做抗原。这些抗原类型可产生高特异性的抗体效价，但也与高
- 10 百分比的被毒素杀死的 B 淋巴细胞结合。在这些情况下，必须将不具有最高效价的动物挑选出来，和/或因为融合注意力必须集中在用于融合的细胞的成活力上。第二轮免疫后第四天，杀死动物，腿窝淋巴结细胞与骨髓瘤细胞融合。也可使用动物其它的淋巴结。

2. 长免疫程序

- 15 在另一个实施例中，当短免疫程序无效时，可尝试各种类型的长免疫程序。在这种情况下，通常以 2-4 周的间隔腹膜内或皮下免疫动物（另外，但较少，通过静脉或口服）。CFA 用于第一轮免疫，而 IFA 用于下一轮。

- 各轮免疫后的 10-14 天（从第二轮开始），如本领域熟知的检验免疫动物的血液中特异性抗体的含量。如果抗体效价达到想要的水平，通过静脉
- 20 给予抗原进行最后一轮免疫（被称做强化），不添加佐剂。在优选的实施例中，给予初始剂量的 1/10。由于强化，产生对抗原具有高亲和力的抗体的克隆被选择性地刺激。

- 然后收集分泌对天然抗原具有特异性的抗体的 B 细胞，通过本领域技术人员已知的并如本发明所描述的方法筛选活性。[Harlow 和 Lan,
- 25 Antibodies : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1988)]。这些筛选技术包括，但不限于，放射性免疫测定、ELISA（酶联免疫吸附测定）、“三明治”免疫测定、免疫放射分析、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散分析、原位免疫分析（例如使用胶体金、酶或放射表位标记）、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定（例如凝胶凝集测定、血细胞凝集
- 30 分析等）、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质 A 测定、病毒显象测定、生物活性调节测定和免疫电泳测定等。

一旦鉴别出克隆具有至少 1: 1000 的抗体效价, 使用本领域技术人员已知的并如本发明所描述的方法生产杂交瘤[Harlow 和 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1988); Kohler 和 Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975); Kozbor 等, Immunol.Tod., 4: 72 (1983); Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. 77-96(1985); PCT/US90/02545; Cote 等, Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 80: 2026-2030 (1983)]。然后这些单克隆抗体可用于疾病的治疗 (例如但不限于, 癌、病毒感染等)、免疫诊断、免疫化学、免疫组织学、免疫细胞学、免疫亲和层析以及基因组与蛋白质组研究。

10 表 1 提供了利用本发明的方法生产对传统上具有低免疫原性的蛋白具有高亲和力的单克隆抗体的具体的实施例。这些实施例仅仅是一些例子, 决不进行限制。左边第一列是感兴趣的抗原。第二列是用于免疫具有完整免疫系统的动物的免疫原。在这一列中, APP 指本发明描述的方法, 其中感兴趣的抗原与 HSP70 化学结合。还在这一列中, KLH 结合物意思是与匙孔血蓝蛋白的结合物, 而不是与 HSP70 的结合物。第三列显示免疫生产出的克隆的数量, 第四列显示能够与感兴趣的天然抗原结合的克隆的数量。第五列显示用于鉴定单克隆抗体是否对感兴趣的抗原具有特异性的定量方法。ELISA 代表酶联免疫吸附测定。WB 代表蛋白质印迹。IF 代表免疫荧光测定。IAC 代表免疫亲和层析。最后一列对为什么未结合的抗原没有引
15
20 发强烈的免疫反应提出了简单的解释。

表 1

使用辅助多肽 (APP) 技术生产的鼠科动物的单克隆抗体

靶	免疫原	生产克隆的总量	识别完整的靶的克隆的数量	方法	问题
1 基质金属蛋白酶 3 (MMP3), 人	MMP3 的重组催化区, 40212 摩尔. 质量 19,369 Da- 完整	0	0	ELISA	保守, 低免疫原性, 不适当的折叠

	MMP3 的重组催化区, 40212 摩尔·质量 19,369 Da-APP 结合	4	1	ELISA, WB	
2. 肌钙蛋白 T, 心脏特异性, 人 (TT)	对肌钙蛋白 T 有特异性的 16-mer 肽, 心脏同工型 1, KLH-结合	7	0	ELISA, WB	多重同工型, 交叉反应性
	对肌钙蛋白 T 有特异性的 16-mer 肽, 心脏同工型 1, APP-结合	3	2	ELISA, WB	
3. 促红细胞生成素, 人 (EPO)	重组, 完全大小的人促红细胞生成素-完整	0	0	ELISA	高度保守性, 低免疫原性
	重组, 完全大小的人促红细胞生成素-变性, 6M 尿素	2	1	ELISA, WB	
	重组, 完全大小的人促红细胞生成素-与 Mab 的免疫复合物	0	0	ELISA,	
	重组, 完全大小的人促红细胞生成素-APP 结合	5	3	ELISA, WB	

4.神经原特异性烯醇酶(γ -亚基), 人(NSE)	来自人脑的天然 NSE, 四聚物, 摩尔.质量 160kDa-完整	9	1	ELISA, WB, IF	保守性, 低免疫原性, 通过包被灭活
	来自人脑的天然 NSE, 四聚物, 摩尔.质量 160kDa-变性的, 6M 尿素	0	0	ELISA	
	来自人脑的天然 NSE, 四聚物, 摩尔.质量 160kDa-与 Mab 的免疫复合体	0	0	ELISA	
	来自人脑的天然 NSE, 四聚物, 摩尔.质量 160kDa-APP 结合	2	2	ELISA, WB	
5.组织血纤蛋白溶酶原活化剂, 人(TPA)	重组, 完全大小的人前 TPA, 摩尔.质量 46kDa- APP 结合	7	5	ELISA, WB, [AC 酶活抑制	避免与氨基末端片段的交叉活性, 在 1M GnHCl 中生产与前 TPA 结合的 Mab

6. 甲状旁腺激素, 人 (PTH)	N-末端 1-34 合成肽-APP 结合	5	5	ELISA	低免疫原性, 小个体, 为匹配 Mab 对需昂贵费用
7. 甲状旁腺激素, 人 (PTH)	中分子 28-48 合成肽-APP 结合	2	1	ELISA	低免疫原性, 小个体, 为匹配 Mab 对需昂贵费用
8. 甲状旁腺激素, 人 (PTH)	中分子 28-68 合成肽-APP 结合	2	1	ELISA	低免疫原性, 小个体, 为匹配 Mab 对需昂贵费用
9. 血红蛋白, 人 (Hb)	来自汇集的人红细胞的天然 Hb-完整的	0	0	ELISA	高度保守性, 低免疫原性, 需要区别糖基化/去糖基化同工型
	来自汇集的人红细胞的天然 Hb-变性的, 6M 尿素	1	1 (仅糖基化)	ELISA	
	来自汇集的人红细胞的天然 Hb-APP 结合	3	3 (两种都有)	ELISA	
10. Ghre-lin, 人	完全大小 1-28 合成肽, 辛酰基游离-APP 结合	3	3	ELISA	小个体, 低免疫原性, 保守性

11. 连接蛋白 40, 人	对人连接蛋白 40 有特异性的 16-mer 肽-KLH 结合	2	0	ELISA	低丰度
	对人连接蛋白 40 有特异性的 16-mer 肽-APP 结合	3	3	ELISA, WB, IF	
12. 干扰素 γ , 人	重组的, 实际 大小的人干扰 素 γ , 摩尔质量 16.7kD-完整的	3	2	ELISA	低免疫原 性, 需要生 产中和 Mab
	重组的, 实际 大小的人干扰 素 γ , 摩尔质量 16.7kD-APP 结 合	4	3	ELISA	
13. 流感 A 病 毒 (H5N1), 血细胞凝集素	对 H5 血细胞 凝集素 16AA 具有特异性的 试验性 16aa 和 18aa 肽型, APP 结合	5	2	ELISA, WB	低丰度, 交 叉活性
	对 H5 血细胞 凝集素 18AA 具有特异性的 试验性 16aa 和 18aa 肽型, APP 结合	2	1	ELISA, WB	

14. 来自人乳头瘤病毒 18 型的癌蛋白 E7 (E7HPV18)	重组的、实际大小 的 E7HPV18, 摩尔 质量 11995Da- 完整 E7	0	0	ELISA, WB	免疫抑制, 低免疫原 性, 寡聚 化, 不恰当 的折叠
	重组的、实际大小 的 E7HPV18, 摩尔 质量 11995Da- 变性的, 6M 尿素	0	0	ELISA, WB	
	重组的、实际大小 的 E7HPV18, 摩尔 质量 11995Da- 重组 融合蛋白 E7HPV18-APP	3	3	ELISA, WB, IF	
15. 朊病毒蛋白, 人 (PrP)	对 PrP-130-142aa 具有特异性的 13-mer 肽, APP 结合	5	3	ELISA, WB	高度保守 性, 低免疫 原性
16. 肉毒杆菌神经毒素 A (BoNT/A)	对 BoNT/A-的 H 链具有特异 性的四肽, APP 结合	进行 中		ELISA, WB	高度的毒 性, 被甲醛 灭活后具 有低免疫 原性

17. 透明质酸 (HUA)	HUA-APP 结合	3	3	ELISA	高度保守性,无免疫原性
-------------------	------------	---	---	-------	-------------

IV. 用于检测人乳头瘤病毒/子宫颈癌的单克隆抗体

在本发明的一个实施例中，使用本发明方法开发对人乳头瘤病毒 (“HPV”) E6 和 E7 癌蛋白具有特异性的单克隆抗体。这些癌蛋白特异性单克隆抗体的开发曾经非常困难，因为由于天然 E6 和 E7 癌蛋白的浓度很低，它们难以纯化，并且重组蛋白倾向于不正确地折叠和聚集。此外，E6 和 E7 癌蛋白具有免疫抑制活性。使用重组 E6 和 E7 癌蛋白作为免疫试剂生产的抗体对天然 E6 和 E7 蛋白不具有高的亲和性。因此，利用新的方法产生抗体，然后如本发明所描述的它用于多种应用。

10 A. 子宫颈癌的背景

宫颈癌在妇女中是第二种最广泛流行的癌症。基于流行病学和病毒学研究显示侵入性的子宫颈癌和 HPV 之间具有相关性(图 2)。还发现在 HPV 与外部性器官和肛门的瘤形成以及侵入性子宫颈癌之间具有相似的相关性 [Kiselev, V.I, 等, 性传播疾病中性传播病毒感染与尿殖道肿瘤疾病之间的相互关系: 疫苗、预防和控制 (Interrelationship of Sexually Transmitted Viral Infections and Oncological Illnesses of the Urogenital Tract In Sexually Transmitted Diseases: Vaccines, Prevention, and Control.) (编辑) D. I. Bernstein. Academic Press, London, Herald of Dermatology, No. 6: 20-23 (2000)]。

20 细胞学测定 (通常称做 Pap 涂片) 还组成了检验非典型的多核细胞的主要的实验室诊断技术。这一技术用于子宫颈癌的早期诊断很多年。然而, 这些方法检验到的 HPV 携带者不超过总数的 30%, 并不能预测发生更严重疾病的风险。

25 在研究 HPV 脱氧核糖核酸 (“DNA”) 的结构时, 包括研究由 DNA 编码的 9 个免疫原蛋白, 以及病毒复制、无限增殖化和其上皮细胞转化的规律, 开发出一种筛选方法。该方法的基础包括检测当病理存在时显示标准值偏差的生物化学、免疫学和遗传学常数。

解释这种类型的数据进行早期诊断、评估罹患子宫颈癌的风险、或预

测治疗的效果不总是可能的。这是因为使用的测定技术或者不具有必需的敏感性和/或特异性，测定的参数没有直接反应细胞退化的过程，或者测定没有按比例地反应细胞退化的过程。

已经描述了通过使用酶免疫测定（它包括但不限于 ELISA 等）和免疫放射分析测定[见欧洲专利(Eps)No. 386734, 375555, 406542 和 523391] 测定对患者血清中 HPV 蛋白具有特异性的抗体的效价诊断子宫颈癌的技术。然而，该方法没有达到预期的效果，因为在抗体效价和子宫颈癌之间没有发现可靠的相关性。

还存在诊断和预测子宫颈癌发展的技术，该技术基于使用聚合酶链反应(“PCR”)分类和定量测定被研究的样品中 HPV DNA 的水平[V.1. Kiselev, 等, 诊断泌尿生殖感染中使用的聚合酶链反应：内科医生手册 (The Polymerase Chain Reaction During the Diagnosis of Urogenital Infections: A Handbook for Physicians) Moscow, 2000; 世界专利 (WO) No. 00506645; 和美国专利 (U. S.) No. 5,679, 509]。

但是，因为实际上在大约 80%的情况下 HPV 感染是短期的，可以自然痊愈并除去病毒，所以使用这些技术导致了相当多的过度诊断。见图 2。然而，在绝大多数情况下 HPV DNA 的阳性结果可靠地预测了子宫颈癌的发展。

本发明提出的新的解决办法包括子宫颈癌的早期诊断和其发展风险的测定方法，该方法基于来自活组织检查细胞样品而非患者血清的 HPV E6 或 E7 癌蛋白的定量免疫测定[EP No. 1253924, A61 K 38/18, 08/02/2001]。

在一个具体的实施例中，E6 和 E7 蛋白用作 HPV 标记，并在脱蜡的 (deparaffinized) 组织样品中通过免疫荧光技术检测，使用数字计算机技术 (用于定量测定) 分析多维可见样品。当活组织检查样品中 E6 或 E7 蛋白含量超过正常控制值 54%时，得到这样的结论，即存在升高的罹患子宫颈癌的风险。人们还提出可使用其它的生化标记，例如但不限于表皮生长因子受体和胰岛素样生长因子。

在另一个实施例中，开发了一种更简单、花费更少的筛选方法，该方法由于高水平的采样和分析的普遍性，它能够容易地使自己标准化。这一筛选方法具有与前面描述的免疫荧光测定的实施例的敏感性一样的敏感性。该筛选方法可用于使用 HPV E7 癌蛋白作为标记的细胞学样品的子宫颈

癌早期诊断。使用任一诊断方法的能力取决于对 E6 或 E7 癌蛋白具有特异性的高亲力的单克隆抗体的使用。本文描述了这些抗体是如何生产的。

B. E6 和 E7 单克隆抗体的开发

针对病毒 DNA 整合进入细胞 DNA 前的上皮细胞退化过程，合成 HPV E7 蛋白有最少量的增加。在一个具体的实施例中，从人样品分离 E7 基因并克隆，然后在大肠杆菌中表达。然后用从细菌细胞中分离出来的重组 E7 蛋白免疫小鼠。然而，在绝大多数情况下，因为通过用重组蛋白免疫产生的抗体识别其它的决定簇，所以它们不与天然蛋白相互作用。为了解决这一问题，使用上文描述的方法，其中 E7 蛋白与 HSP70 结合，然后用做用于免疫的抗原。

在一个具体的实施例中，生产了两种类型的对天然来源的 E7 蛋白具有高度敏感性的单克隆抗体，它们与两种类型的“高风险”HPV 交叉反应（HPV16 和 HPV18）。这一交叉活性使 80-85%具有 HPV 伴随的瘤形成的患者得到检测。成对使用与不同的 E7 蛋白抗原决定簇反应的这两种类型的单克隆抗体，增强了特异性，并在诊断筛选中确保没有本底。

C. HPV 的筛选方法

在一个具体的实施例中，子宫颈癌的早期和临床前诊断方法包括定量免疫测定患者活组织检查细胞样品中的人乳头瘤病毒（HPV）癌蛋白。将活组织检查细胞样品溶解，使用单克隆抗体对分析细胞溶解产物上清液的 HPV E7 蛋白。在一个具体的实施例中，单克隆抗体对属于 IgG2a 和 IgG2b 亚同种型，它们识别 E7 蛋白的各种抗原决定簇。在一个具体的实施例中，IgG2a 716-321、716-325、716-332 和 716-343 抗体与至少一种 E7 抗原决定簇结合。在另一个实施例中，IgG2b 716-281 和 716-288 抗体与至少一种其它的 E7 抗原决定簇结合。在另一个实施例中，两组抗体中的一组与本领域技术人员已知的酶标结合[见 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1988)]。然后，如本领域技术人员所熟知的，这些抗体用于酶联免疫吸附测定（“ELISA”）。

在一个具体的实施例中，其中样品中 E7 蛋白的浓度等于或大于 0.05ng/ml，准确作出了早期子宫颈癌或其发生风险的诊断。在其它具体的实施例中，通过改变用于包被聚苯乙烯平板的抗体浓度、结合条件、缓冲液组成以及本领域熟知的用于 ELISA 的培养时间和温度等手段，使定量分

析进行条件最佳化。

在一个优选的实施例中，对 E7 癌蛋白的一个抗原决定簇具有特异性的抗体 716-281 用于蛋白质的初次结合，对另一个 E7 抗原决定簇具有特异性的抗体 715-332 与酶标结合。在另一个实施例中，使用的单克隆抗体对 HPV16 E7 具有特异性，但也与 HPV18 E7 交叉反应。HPV16 和 HPV18 是“高风险”HPV 的两种最流行的类型。

在另一个实施例中，当使用 ELISA 筛选方法样品对 E7 蛋白试验阳性时，进行 HPV 的分类。可通过各种方法确定 HPV 的类别，包括但不限于使用聚合酶链反应和原位 DNA 杂交。

10 V. 特异于朊病毒蛋白的单克隆抗体

在本发明另一个实施例中，使用本发明方法开发朊病毒蛋白 (“PrP”) 的单克隆抗体。人们通常认为海绵状脑病 (BSE, 疯牛病) 可能的原因是正常朊病毒蛋白的构象转变为病原同种型。由于 PrP 的病原同种型累积，随后神经原退化。这种蛋白的单克隆抗体可用做 BSE 的诊断工具。生产这种蛋白的单克隆抗体的主要困难是 PrP 高度保守的结构。用天然的和变性形式的实际大小的重组牛 PrP 多重免疫 Balb/c 小鼠，既没有引发充分的免疫反应，也没有初级阳性克隆的产生。为了生产 PrP 的单克隆抗体，进行了 PrP 分子的构象分析，并挑选了三个氨基酸序列。这三个肽序列来自牛 PrP 的 N-末端、分子中部和 C-末端部分。

20 G5: 25-36/62-69 KKRPKPGGGWNT... QPHGGGWG (20 aa) (分别为 SEQ ID NOS: 6 和 7)

G3: 109-121 QWNKPSKPKTNIK (13aa) (SEQ ID NO: 8)

G4: 226-242 ITQYQRESQAYYQRGAS (17aa) (SEQ ID NO: 9)

在具体的实施例中，这三个肽与 HSP70 化学结合，然后用于使用本发明公开的方法免疫 Balb/c 小鼠。完成免疫步骤后，收集腿窝淋巴结 (也可使用其它淋巴结、腹水、血液或脾) 用于生产特异于 PrP 的抗体的克隆。如本领域所熟知的及本文所描述的制备杂交瘤，筛选杂交瘤用于生产高亲和性单克隆抗体。使用本领域熟知的免疫测定鉴别具有高亲合性的单克隆抗体，例如但不限于 ELISA。然后，这些单克隆抗体可用于疾病的治疗、免疫诊断、免疫化学、免疫组织学、免疫细胞学、免疫亲和层析以及基因组及蛋白质组研究。

VI. 特异于透明质酸的单克隆抗体

本发明另一个实施例中，使用本发明方法生产特异于透明质酸的单克隆抗体。透明质酸是一种高分子量聚合体，由重复的葡糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖二聚单元组成，它形成在胞外基质中发现的复杂的蛋白聚糖聚集体的核心。透明质酸在人结缔组织病变中发挥重要作用，例如但不限于膝关节症状性骨关节炎。透明质酸及其降解产物的定量测定被认为是一个重要的诊断参数，它可通过使用特异于透明质酸的单克隆抗体获得。

由于聚合体的非蛋白特性及其在从细菌到哺乳动物的多种不同种属中具有同一性，生产 IgG1、IgG2a、IgG2b 同种型的高亲合性抗体非常困难。

在一个具体的实施例中，如对 PrP 所描述的，透明质酸与 HSP70 结合用于免疫和单克隆抗体的生产。见实施例 9。使用具有生物素化的透明质酸和链霉抗生物素-辣根过氧化物酶作为第二试剂用于颜色反应的 ELISA 筛选单克隆抗体。这种类型的 ELISA 是本领域熟知的 [Harlow 和 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1988)]。

结果，产生三种遗传稳定的杂交瘤细胞系，HU.D3-IgG2a, HU.D9-IgG1, HU.E3-IgG3, 每一种都分泌对透明质酸具有高度亲和性的单克隆抗体 (IgG1 和 IgG2a)。然后这些单克隆抗体可用于疾病的治疗、免疫诊断、免疫化学、免疫组织学、免疫细胞学、免疫亲和层析以及基因组及蛋白质组研究。

VII. 特异于基质金属蛋白酶 3 的单克隆抗体

本发明另一个实施例中，使用本发明的方法生产基质金属蛋白酶 3 (“MMP3”) 的单克隆抗体。基质金属蛋白酶 (MMP) 家族的蛋白涉及正常的生理过程中胞外基质的分裂，例如胚胎发育、繁殖和组织改造，还涉及疾病过程，例如关节炎及病毒转移。绝大多数 MMP 分泌为无活性的前蛋白，当用胞外蛋白酶酶切时它被激活。MMP3 是降解纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白 III、IV、IX 和 X 以及软骨蛋白多糖的酶。人们认为这种酶涉及伤口的修复、动脉粥样硬化的形成以及肿瘤的起始。有报道说 MMP3 涉及类风湿关节炎和某些形式的癌症。然后这些单克隆抗体可用于疾病的治疗、免疫诊断、免疫化学、免疫组织学、免疫细胞学、免疫亲和层析以

及基因组及蛋白质组研究。

VIII. 使用单克隆抗体分析疾病风险性的试剂盒

本发明还提供了诊断试剂盒。在一些实施例中，该试剂盒用于确定被试者是否具有患疾病或症状的风险，例如但不限于，子宫颈癌、海绵状脑病、结缔组织疾病、关节炎和转移等。试剂盒的特征和使用取决于试剂盒提供的单克隆抗体的特异性。通过各种途径生产该诊断试剂盒。在一些实施例中，试剂盒包含至少一种使用本发明的方法针对传统上低免疫原性的抗原生产的单克隆抗体。在优选的实施例中，试剂盒包含用于进行 ELISA 或其它相似的本领域熟知的免疫测定的试剂。在一些实施例中，试剂盒包括确定被试者是否具有患疾病或症状风险的说明。在优选的实施例中，说明书详细说明了患病风险是通过检测感兴趣的抗原的存在或缺失确定的，例如但不限于 E7 癌蛋白、PrP、MMP3 或透明质酸。在一些实施例中，试剂盒包括辅助试剂，例如缓冲剂、核酸稳定试剂、蛋白稳定试剂和信号产生系统（例如如 Fret 系统的荧光产生系统）。可以任何适当的方式包装试剂盒，典型地需要将各要素装入一个容器或不同的容器，还包括一张进行试验的说明书。在一些实施例中，试剂盒还优选地包括阳性对照样品。

实施例

20

实施例 1

为了证明和进一步说明某些优选的实施例和本发明的某些方面提供了下面的实施例，这些实施例不解释为限制本发明的范围。

在下文的试验性公开中，应用了如下缩写：M（摩尔的）； μM （微摩尔的）；mM（毫摩尔的）；mol（摩尔）；mmol（毫摩尔）； μmol （微摩尔）；nmol（纳摩尔）；g（克）；mg（毫克）； μg （微克）；ng（纳克）；l 或 L（升）；ml（毫升）； μl （微升）；cm（厘米）；mm（毫米）； μm （微米）；nm（纳米）； $^{\circ}\text{C}$ （摄氏度）；min.（分钟）；sec.（秒）；%（百分数）；kb（千碱基）；bp（碱基对）；PCR（聚合酶链反应）；aa（氨基酸）。

实施例 1

30

人乳头瘤病毒（HPV）的检验和分类

A. 临床材料收集

如本领域熟知的方法制备和转移临床样品。使用无菌的一次性探针刮取子宫颈上皮细胞临床样品。用 500 μ l 盐水 (0.83%的 NaCl) 洗涤探针, 以从探针上除去细胞, 将该溶液收集进入 1.5ml 加盖的微量离心管。然后储存样品直到使用, 通常在 4 $^{\circ}$ C 储存可达 5 天, 在 -10 ~ -20 $^{\circ}$ C 储存可达一个月。

5 B. DNA 纯化

DNA 提取方法是本领域熟知的, 且本发明纯化 DNA 的方法不限于这一具体的实施例。如果样品被冰冻, 则如本领域熟知的方法解冻, 然后在 10,000rpm 离心 1 分钟。在离心管底部形成沉淀, 除去上清液。将 100 μ l 的生理溶液加入离心管, 将沉淀搅匀。加入 500 μ l 溶胞溶液, 涡流旋转 10 秒钟。然后样品和离心管在 65 $^{\circ}$ C 培育。溶胞溶液中包含 6M 的硫氰酸胍(Sigma, USA), 10 mM EDTA (Sigma, USA), 1% 的 Triton X-100 (Sigma, USA), 10 mM TrisHCl, pH 7.3 (Sigma, USA), 1%2- β -巯基乙醇(BioChemical, England)。加入 20 μ l 的匀浆吸着剂 (Silica, Sigma, USA) 并在 50-100 rpm 搅动 10 分钟。样品和离心管在 10,000rpm 离心 1 分钟, 丢弃上清液。加入 15 500 μ l 洗液, 涡流旋转离心管直到沉淀与溶液混合, 再次在 10,000rpm 离心 1 分钟, 再次丢弃上清液。该洗液包含 4M 的硫氰酸胍(Sigma, USA), 10 mM EDTA (Sigma, USA)。1ml 70%的乙醇加入离心管, 充分地涡流旋转, 在 10,000rpm 离心 1 分钟, 丢弃上清液。重复乙醇洗涤步骤。然后打开离心管, 使沉淀在 55 $^{\circ}$ C 干燥 5-10 分钟。将 100 μ l 的无核酸酶水 (Promega, USA) 加入离心管并在 55 $^{\circ}$ C 培育 5 分钟。然后样品可用于聚合酶链反应。样品可在 20 4 $^{\circ}$ C 储存达 1 周或在 -20 $^{\circ}$ C 储存达 6 个月。

C. 聚合酶链反应 (“PCR”) 以分类 HPV

在 25 μ l 的溶液中进行 PCR 反应, 该溶液包含 5 μ l 的模板 DNA、67 mM Tris-HCl (pH 8.8)、16.6 mM (NH₄)₂SO₄、1.5 mM MgCl₂、100 mM dATP、25 dCTP、dTTP 和 dGTP、10 pmol 的各个引物和 1 单位的 Taq-聚合酶 (5 单位/ μ l; Promega, USA)。如本领域所熟知的, 使用热启动技术。热循环条件是: 94 $^{\circ}$ C 3 分钟, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 秒 40 轮, 65 $^{\circ}$ C 30 秒和 72 $^{\circ}$ C 30 秒。下表显示了 HPV 的类型以及扩增那些 HPV 类型的 DNA 所用的引物。

HPV 类型	引物 5'-3'	扩增子大小 (b.p.)
HPV16	E7-16-F tga cag ctc aga gga gga g (SEQ ID NO: 10)	118
	E7-16-R gca caa ccg aag cgt aga g (SEQ ID NO: 11)	
HPV18	E7-18-F gcg act cag agg aag aaa ac (SEQ ID NO: 12)	195
	E7-18-R ca aag gac agg gtg ttc aga (SEQ ID NO: 13)	

该扩增产物在 1.5%的琼脂糖凝胶上分析,并在紫外光(254nm)下摄影。

实施例 2

设计编码 HPV16 和 HPV18 型的 E7 癌蛋白的合成的重组质粒

5 将从诊断患有子宫颈发育异常 (dysplasia) 的患者的子宫颈收集的活组织检查组织样品用做 E7 基因源。测定临床样品中 HPV 的存在,并使用本发明描述的聚合酶链反应技术进行分型。HPV16 和 HPV18 型的 E7 基因通过 PCR 技术使用基因特异性引物[303-bp 片段用于 HPV 16, 324-bp 片段用于 HPV18] (SEQ ID NOS: 14-17) 进行扩增 (见图 3), 因此这些基因在
10 pBluescript SK (+) (Stratagene) 质粒中 EcoRI-BamHI 位点被克隆。克隆基因寡核苷酸序列的测定证实与 GenBank 的数据完全一致 (例如, GenBank 入藏登记号: AF 125673 用于 HPV 16 和 AY262282 用于 HPV18)。 (见图 4 和 5, SEQ ID NOS: 1 和 3)。

然后, 翻译终止序列在接近 3' 末端处被掺入基因。获得的用于 HPV 16
15 和 HPV 18 的基因产物 pHE716 和 pHE718 在图 6 中显示 (SEQ ID NO: 18)。

大肠杆菌细胞中 HPV16 和 HPV18 类型的 E7 蛋白的合成

质粒 pHE716 编码蛋白 E7-16 [Met(His)₆-GluPheE716-GlySer [111 个氨基酸残基 ("aa"), 12.5kDa, 和 4.6 的等电点(IEP)]。质粒 pHE718 编码蛋白 E7-18 [Met(His)₆-GluPheSer-E718- GlySer(117 个 aa, 13.5 kDa 和 5.4 的
20 IEP)。必须注意当电泳在十二烷基硫酸钠和聚丙烯酰胺凝胶("SDS-PAGE") 上进行时 [Laemmli, U. K., Nature, 227: 680-685 (1970)], 该蛋白具有异常的活动性 (约 21kDa), 这与参考文献资料相一致 [Jeon, J.-H., 等, 实验

和分子医药 (Experimental and Molecular Medicine), 34: 496-499, (2002)]。

大肠杆菌的 BL21 (DE3) 菌株用于结果基因的表达。如本领域已知的方法进行转染。超声处理后, 检验可溶的细胞蛋白级分中 HPV16 E7 癌蛋白和 HPV18 E7 癌蛋白; 这样, 自然条件下在 Ni-III A-琼脂糖上进行层析分析, 5 而不添加尿素 (图 7)。

更具体地, 大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 的细胞用质粒 pHE716 和 pHE718 转化。细胞在添加了氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 和葡萄糖 (0.2%) 的 Luria-Bertani (“LB”) 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培育过夜。然后细胞用含有氨苄青霉素的新鲜 LB 培养基以 1: 25 稀释并培育 2-3 小时, 直到细胞密度达到 OD₆₀₀=0.5 的光密
10 度。在 Multiscan 分析仪上以 600nm 的波长测定光密度。然后以 0.2mM 的浓度加入异丙基 β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷 (“IPTG”) 使体积达到 50ml, 再培育 3 小时。然后培养物在 5,000rpm 离心 10 分钟, 丢弃上清液。沉淀在 1ml 的 Tris-HCl 20mM、pH 8.0、0.3 M NaCl、0.1% Triton X-100 中重悬浮, 并超声处理 15 秒。然后培养物在 10,000rpm 离心 10 分钟。沉淀用 Tris-HCl
15 20mM、pH 8.0、3 M NaCl、0.1% Triton X-100 (0.5ml) 洗涤。将沉淀匀浆并在 5ml 的缓冲液 A (10mM Tris-HCl, pH 8, 6M 尿素, 0.4 M NaCl, 10mM β -巯基乙醇, 5mM 咪唑) 中重悬浮。然后样品在室温下搅动培育 1 小时。再将该样品 10,000rpm 离心 10 分钟。丢弃沉淀。用 NiSO₄ 溶液洗涤含有 IDA-琼脂糖 (1ml) 的层析柱, 然后用缓冲液 A 平衡层析柱。将上清液装载到具有
20 5ml 缓冲液 A 的层析柱上, 然后加入 10ml 的缓冲液 B (缓冲液 A 含有 10mM 咪唑)。在 0.5ml 的级分中用缓冲液 C (10 mM Tris-HCl, pH 8, 2M 尿素, 0.4 M NaCl, 10mM β -巯基乙醇, 0.3M 咪唑) 进行洗脱。一般地, HPV16 和 HPV18 的 E7 蛋白通常在级分 1-3 中洗脱。集中包含蛋白的级分, 并用包含 10 mM Tris-HCl、pH 8、150 mM NaCl 的缓冲液以 100 倍于收集级分的体
25 积透析过夜。

实施例 3

由 HPV16 (18) 型的 E7 肽和结核分枝杆菌 DnaK (HSP70) 的杂交蛋白的表达

30 使用 PCR 扩增人乳头瘤病毒 16 和 18 型的 E7 基因。含有人乳头瘤病毒 (HPV) 16 和 18 型 E7 基因的质粒 DNA pHE716 和 pHE718 用做 PCR 扩增

含有 E7 基因的片段(SEQID NOS: 19-22)的模板。见图 8。起始密码子与编码 6HIS 标签的序列存在于读码框中, 终止密码子缺失。使用克隆的 DNA 片段表达 DnaK 蛋白, 该 DNA 片段包含转染进入基于重组 pQE30 的载体的 E7 基因。

- 5 重组载体 pQE30-dnaK-Y 是事先构建的, 并用做基础质粒, (图 9) 允许表达 6HIS-DnaK 融合蛋白。pQE30-dnaK-Y 的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 5) 显示于图 10 中。为生产这一载体, 包含 E7 基因的 PCR 片段用 BamH 和 BglII 消化并克隆进入 pQE30-dnaK-Y 的 BamHI 位点。在正确方向上携带插入片段的重组体如本领域已知的方法用限制性酶切分析鉴别。重组体质粒 pQE30-E716-dnaK 和 pQE30-E718-dnaK 分别允许杂交蛋白 6HIS-E7 (16 型)-DnaK 和 6HIS-E7 (18 型)-DnaK 的表达。

这通过在各自己的培养物中用 pQE30-E716-dnaK 和 pQE30-E718-dnaK 转染 E. coli DLT1270 细胞并培养过夜完成。(DLT1270 细胞通过使用 P1 转导整合 lacI 基因进入大肠杆菌菌株 DH10B 生产。DH10B 具有如下基因型:

15 10 B (araD139 D (ara, leu) 7697 D (lac) X 74 galU galK rpsL deoR f80 lacZ DM15 end AlnupG recA1 mcrA D (mrr hsdRMS mcr BC)), 见 Grant, S., 等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 87: 4645-4649 (1990)。转染的 DLT1270 培养物在稀释了 100 倍的 Luria-Bertani ("LB")液体培养物中生长并在 37°C 振荡培养直到光密度测定其密度达到 $OD_{600}=0.5$ 。然后加入异丙基 β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷 ("IPTG") 到 0.1mM, 该培养物如上述方法再培养 2 小时。如本领域所熟知的, IPTG 诱导 LacZ 基因并用于选择由感兴趣的质粒转染的细胞。使用 SDS-PAGE 观察具有预期分子量的杂交蛋白的合成。

实施例 4

25 从大肠杆菌中分离重组 HSP70 蛋白

A. 缓冲液

预先没有制备缓冲液。在分离步骤前制备缓冲液 A 并在 1 个小时内使用。预先可制备 50 mM 的 K_2HPO_4 、pH 7 母液, 但必须在 3 天内使用。预先还可制备 10X PBS 母液。缓冲液的贮存和层析步骤在室温下进行。

- 30 缓冲液 A 包含 25 mM N- (2-羟乙基) 哌嗪-N'- (2-乙磺酸) ("HEPES"), pH7.3, 0.1 % Nonidet P-40 (w/v), 20%甘油(v/v), 1 mM 苯甲基磺酰氟

("PMSF"), 和 0.5 M NaCl。

缓冲液 B 包含 50 mM K_2HPO_4 , pH 7, 5 mM 咪唑, 0.5 M NaCl, 没有调节 pH。

缓冲液 C 包含 50 mM K_2HPO_4 , pH 7, 150 mM 咪唑, 0.5 M NaCl。

5 缓冲液 D 包含 50 mM K_2HPO_4 , pH 7, 50 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 没有调节 pH。

PBS 缓冲液包含 10 mM K_2HPO_4 , pH 7.5 和 0.145 M NaCl。

B. 螯合柱的制备

10 用去离子水洗涤 1×10 cm 柱, 从下端滤器逐出气泡, 在离开下端滤器约 1 cm 的水平留一水层。

测定螯合琼脂糖 CL-6B (Amersham Pharmacia Biotech) 制备 5 ml 的层析柱所需的量。使用移液管装载琼脂糖凝胶到层析柱上。

15 用 5 倍体积的去离子水以 3 ml/分的速率洗涤层析柱。然后用 10 倍体积的 $ZnCl_2$ 溶液(浓度为 1 mg/ml (ICN))以 3 ml/分的速率洗涤层析柱。然后用 10 倍体积的去离子水以 3 ml/分的速率洗涤层析柱。将该层析柱与 UV 检测器连接 (280 nm)。用 10 倍体积的水以 3 ml/分的速率洗涤层析柱。现在, 用于从在 500 ml 的培养基中生长的大肠杆菌细胞中分离蛋白质的层析柱制备完成。

20 D. 大肠杆菌的制备

尽快地在 4°C 下进行这一过程。首先, 通过每次在 5000 rpm 离心 15 秒用 2 倍体积的 PBS 洗涤 1 g 的大肠杆菌 (湿重) 5 次, 然后重悬浮细菌细胞。最后一次洗涤后用 5 ml 的 PBS 稀释细胞。超声处理 (20 kHz, 50-60 W) 细胞 6 次, 每次 30 秒。获得的溶液在 12,000 rpm 离心 10 分钟。丢弃沉淀, 上清液
25 上样到层析柱上。

E. 蛋白质的分离

上清液上样后, 用 10 倍柱体积的缓冲液 A 洗涤层析柱。其后用 5 倍体积的缓冲液 B 洗涤。蛋白质部分用 5 ml 的缓冲液 C 洗提并收集。

F. 透析从层析柱回收的蛋白质

30 将收集的级分置于透析袋中, 通过持续搅拌, 用 200 体积的 PBS 在 0°C 透析 30 分钟。30 分钟后, 0°C 下溶液用新鲜的 200 体积的 PBS 替换, 继

续持续的搅拌。然后，在 40℃下，级分在 5 升的 PBS 中透析过夜。如本领域已知的，使用 Bradford 或 Lowry 蛋白质定量方法测定蛋白质的浓度 [Harlow 和 Lane, Antibodies : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1988)]。在 -700℃ 冷冻溶液并冻干。

5

实施例 5

针对重组 HPV16 和 HPV18 E7 蛋白生产小鼠单克隆抗体

使用高度纯化的 HPV16 E7 和 HPV18 E7 在 Balb/c 小鼠[10 只雌性，重量为 16-18g]的后脚垫免疫小鼠 2 次，免疫间隔为 2 周。重组大肠杆菌溶菌产物的 HPV16 E7 和 HPV18 E7 的制备物使用单阶段金属螯合层析纯化。第一次免疫包含在 20μl 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中稀释的 20μg 蛋白质，并与等体积的弗氏完全佐剂混合。第二次免疫也包含在 20μl PBS 中稀释的 20μg 蛋白质，但是与等体积的弗氏不完全佐剂混合。第二次免疫后的第四天，使用聚乙二醇 (PEG) 4000 将来自腿窝淋巴结的淋巴细胞与 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞杂交(American Type Culture Collection ("ATCC") CRL 1581; ATCC CRL 8287; European Collection of Cell Cultures 85072401; DSMZ Human and Animal Cell Cultures ACC146)。在 37℃、5%的 CO₂ 的条件下，杂交瘤在次黄嘌呤-氨喋呤-胸腺嘧啶脱氧核苷("HAT")培养基中培育 2 周。使用间接 ELISA 筛选挑选出的存活的杂交瘤。使用有限稀释技术克隆阳性培养物 2 次[见 Campbell, A. M., 生化和分子生物学实验室技术中的单克隆抗体和免疫传感器技术 (Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology), 23 卷(1991)]。以 2μg/ml 的浓度吸附重组 HPV16 和 HPV18 E7 蛋白到聚苯乙烯平板上进行 ELISA, 在 37℃ 培育平板 1 小时, 然后用 PBS 洗涤平板 3 次, 将 50μl 的组织培养上清液加入平板并在 37℃ 培育 1 小时。

使用在 37℃ 下与过氧化物酶结合了 1 小时的羊抗鼠免疫球蛋白 G (IgG) [H+L]检测与固定抗原结合的单克隆抗体。含有过氧化氢的四甲联苯胺 ("TMB") 溶液用作底物。在 450nm 测定光密度。对于 HPV 16 E7 蛋白获得两组杂交瘤，它们生产 716-281 和 716-288 (IgG2b) 抗体，以及 716-321、716-325、716-332 和 16-343 (IgG2a) 抗体，这些抗体在间接 ELISA 中都与 HPV 16 和 HPV 18 E7 良好地反应 (见表 2)。

表 2、

5 在间接 ELISA 中使用固定 HPV16 和 HPV18 E7 蛋白进行单克隆抗体
滴定过程中在 450nm 处的光密度值

		MoAb 浓度, ng/ml					
		100	30	10	3	1	0
HPV16E7 包被	716-281	>2	1.777	0.947	0.398	0.154	0.017
	716-288	>2	1.515	0.705	0.301	0.091	0.007
	716-321	>2	1.382	0.462	0.160	0.047	0.013
	716-325	>2	1.131	0.375	0.117	0.030	-0.008
	716-332	>2	1.393	0.473	0.168	0.045	-0.012
	716-343	>2	1.737	0.652	0.265	0.003	0.0
HPV18E7 包被	716-281	>2	1.807	1.010	0.445	0.176	0.029
	716-288	>2	1.709	0.939	0.412	0.170	0.026
	716-321	>2	>2	1.331	0.508	0.176	0.021
	716-325	>2	>2	1.194	0.425	0.145	0.020
	716-332	>2	>2	1.350	0.526	0.190	0.025
	716-343	>2	>2	1.672	0.839	0.365	0.028

实施例 6

10 酶免疫测定性能条件的最佳化, 用于使用单克隆抗体进行 HPV16 和
HPV18 E7 蛋白的定量测定

从小鼠腹水收集 HPV16 E7 的单克隆抗体, 并在蛋白质 G-琼脂糖亲和柱上纯化(纯度大于 95%)。使用高碘酸盐技术用辣根过氧化物酶标记抗体。通过 ELISA 检查所有成对的单克隆抗体组合对于 HPV16 E7 的抗原亲和性。

15 为了进行单克隆抗体配对, 将单克隆抗体对的一个成员固定在聚苯乙烯平板上。浓度范围在 0.039-5.0ng/ml 的七个两倍稀释的 HPV 16 E7 蛋白被引入固定在托盘上的单克隆抗体。通过以四甲联苯胺 (“TMB”) 溶液作为底物,

加入与过氧化物酶结合的单克隆抗体对的第二个成员检验形成的免疫复合物。所有被检验的单克隆抗体对都具有形成三重复合物（三明治）——一种固定抗体 - E7 - 结合抗体的能力，这表明 HPV 16 E7 蛋白在溶液中的寡聚状态，即使在 10^{-12} — 10^{-9} 摩尔（M）的浓度范围内。尽管所有的单克隆抗体组合都发挥作用，相同的抗体的对或属于相同的免疫球蛋白同种型的抗体显示敏感性水平（与固定的 HPV 16 E7 浓度和校准曲线斜率有关的光密度值）低于来自不同同种型的单克隆抗体对。根据敏感性和本底的缺乏，当 716-281 单克隆抗体固定于平板并 716-332 单克隆抗体用作过氧化物酶结合物时获得最好的结果。

- 10 使用这种单克隆抗体对的测定通过改变吸附抗体的浓度、结合物稀释的量、缓冲液组成以及 ELISA 各阶段的时间和温度而最佳化。在最适条件下 HPV 16 E7 定量测定的校准曲线在图 11 中显示。716-288 单克隆抗体从具有 pH 9.6 和 $5\mu\text{g/ml}$ 浓度的 0.1 摩尔（M）碳酸盐缓冲液吸附。包含过氧化物酶的 716-332 MoAb 结合物的工作稀释物在含有 0.2% 的牛血清白蛋白（BSA）和 0.05% Tween 的磷酸盐缓冲液（PBS）中为 1/5,000。底物为四甲联苯胺（TMB）。沿 x 轴显示蛋白质浓度，单位为 ng/ml。沿 y 轴显示 45 纳米（nm）处的光密度。沿此曲线显示三次独立测定的试验误差。图中很明显，在抗原浓度范围在 0.039-5.0ng/ml 时校准曲线几乎是直线的，并以全部无本底为特征。当浓度少至 40 皮克（pg）/ml 时仍能检测到 HPV 16 E7 的存在，该量足以测定转染细胞和临床样品中 HPV 16 E7 的表达水平（见图 11）。

实施例 7

子宫颈样品中 E7 癌蛋白的测定

- 25 将刮取自子宫颈的样品置于 1ml 的盐溶液中（0.83% NaCl），冰冻并解冻三次。然后样品在 10,000rpm 微离心（Eppendorf）10 分钟。上清液在 PBS-AT（包含 0.2% BSA 和 0.1% 的 Tween 的 PBS）中以 1: 1（v/v）的比例稀释，然后将 $200\mu\text{l}$ 加入平板的加样孔中，该加样孔事先被浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 的抗 - HPV 16 E7 单克隆抗体结合，在 4 个加样孔中用两倍系列稀释液滴定。在同一平板中，纯化的重组 HPV 16 E7 蛋白从 4ng/ml 到 0.062ng/ml 进行滴定作为标准。孵育 1 小时后洗涤，将过氧化物酶标记的结合的抗 - HPV 16 E7 单克隆抗体引入，继续孵育 1 小时，发生 TMB 反应。在 Multiscan 分析仪上

以 450nm 波长测定光密度。根据标准稀释液的光密度 (OD) 值绘制标准曲线, 通过这种方法测定样品中 E7 的浓度。

进行筛选研究 (n = 100)。来自健康患者的样品 (在他们中间没有检测到 HPV, 或在他们中间检测到被“低风险”的 HPV 感染) 作为对照 (n = 10)。

- 5 来自所有健康患者的样品对 E7 是阴性的, 或在某些病例中为轻微阳性。但是在所有病例中 E7 含量小于 0.05ng/ml。

阳性样品超出 0.05ng/ml 的浓度域值。获得的数据显示于表 2 中。

表 2

子宫颈样品中 E7 癌蛋白的测定

患者编号	抗-E7 IgG	E7-16	总蛋白 OD 1/20	PCR 确认	诊断
P1	0.678 0.418	0.1ng/ml	0.084	HPV 16 和 18	CIN*III
P2	0.466 0.317	2.2ng/ml	0.151	HPV 31	CIN I-II
P3	0.232 0.127	0.8ng/ml	0.152	具有高致 癌风险的 HPV	CIN II-III
P4	0.337 0.158	3.5ng/ml	0.228		CIN III 和 怀疑宫颈 癌
P5	0.268	10ng/ml	0.041	HPV 16 和 18	CIN III 和 怀疑宫颈 癌
P6	0.422 0.202	1ng/ml	0.058	HPV 16 和 18	CIN II
P7	0.215	0.06ng/ml	0.174	HPV 16 和 18	CIN II-III
P8	0.357 0.164	0.3 ng/ml	0.089	HPV 16	CIN I-II
P9	0.412	1.6 ng/ml	0.096	HPV 18	CIN II-III

	0.197				
P10	0.335 0.130	0.9 ng/ml	0.165	HPV 16	CIN III 和 怀疑宫颈癌
P11	0.280	1.2 ng/ml	0.180	HPV 16	CIN II
P12	0.554 0.233	0.8 ng/ml	0.220	HPV 16	CIN II-III
P13	0.443	0.8 ng/ml	0.097	HPV 16	CIN I-II
P14	0.214	1.8 ng/ml	0.162	HPV 16	CIN II

*CIN - 子宫颈上皮内瘤形成

如数据所显示的，诊断筛选方法的结果与医学诊断一致。HPV 分类数据也与诊断数据一致，并因此可用于预测产生子宫颈癌的风险。

5

实施例 8

抗 PrP 的单克隆抗体的生产

如本领域熟练的技术人员已知的合成生产每种肽：G3、G4、G5[Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, 编辑 W. C. Chan 和 P. D. White, 在 The Practical Approach 系列丛中, 丛书编辑 B.D. Hames, Oxford University Press, (2000)]。将肽冻干，检验为基本上不含盐，并通过 HPLC 纯度达到 95%。每种肽取 100 μ g 用 0.1ml 100mM、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液（偶联缓冲液）重建产生“肽溶液”。用偶联缓冲液配制 HSP70 溶液(1mg/ml) 以制备“HSP70 溶液”。对于每一种肽，肽溶液(0.1ml)与 0.2ml HSP70 溶液混合，包含 200 μ g 的蛋白质，产生超过 HSP70 大约 15-20 倍摩尔的肽。立即向混合物中加入戊二醛溶液（水中含 25% 的戊二醛）达到 0.05% (v/v)，并在室温下持续振荡培养 3 小时。通过加入 0.5M 甘氨酸溶液使终浓度为 0.1M 而停止偶联反应，并在相同条件下再培养 30 分钟。然后反应混合物用 100ml PBS（10mM 磷酸钠，150mM 氯化钠，pH 7.2）在 4 $^{\circ}$ C 下透析过夜。偶联反应的效率用本领域已知的 SDS - PAGE 检验，结果显示没有剩余游离的 HSP70。将产生的结合物制成等分试样，并在 -70 $^{\circ}$ C 不添加防腐剂的条件下贮存。

用 50 μ g 的肽-HSP70 偶联溶液以 2 周一次的间隔免疫雌性 Balb/c 小鼠

(18-20g)的后脚垫。在第16天收集腿窝淋巴结，并加工成B细胞用于使用本领域已知和本文描述的常规杂交瘤技术与适当的 Balb/c 骨髓瘤细胞系融合。

5 使用 G3、G4、G5 肽通过间接 ELISA 进行初步筛选，所述肽被包被在聚苯乙烯平板上并得到以下结果：

肽 G3-杂交产生少量初级培养物，具有更少量的阳性个体，该阳性个体后来失去了活性。

肽 G4-建立来自不同组的4个克隆，三次克隆。

肽 G5-建立来自不同组的6个克隆，三次克隆。

10 生产腹水，并检验相应的肽和全长的重组 PrP。表3显示分离的克隆的名称，每个所特异的肽以及免疫球蛋白的同种型。表4显示间接 ELISA 的结果，其中用于制备偶联蛋白的肽被吸附在聚苯乙烯平板上。表5显示间接 ELISA 的结果，其中天然 PrP 蛋白被吸附在聚苯乙烯平板上。

表3

15 生产的 Mab 的免疫原和小鼠免疫球蛋白亚-同种型特异性

克隆	免疫原	同种型
4G11	G4-hsp70	IgG2b
4G29	G4-hsp70	IgG2b
4G57	G4-hsp70	IgG2b
4G69	G4-hsp70	IgG2b
5G13	G5-hsp70	IgG3
5G29	G5-hsp70	IgG1
5G38	G5-hsp70	IgG3
5G48	G5-hsp70	IgG1
5G55	G5-hsp70	IgG1
5G77	G5-hsp70	IgG1

表 4

使用肽用于包被的单克隆抗体间接 ELISA 滴定数据 (OD450nm)

包被抗原	肽 G4				肽 G5					
腹水稀释	4G 11	4G 29	4G 57	4G 69	5G 13	5G29	5G 38	5G 48	5G 55	5G 77
1/1000	1.428	1.527	1.479	*	*	*	*	*	1.604	1.643
1/3000	1.267	1.456	1.279	*	1.815	*	*	1.880	1.629	1.866
1/9000	1.016	1.412	1.094	*	1.824	*	*	1.838	1.572	*
1/27000	0.621	1.176	0.644	*	1.659	1.863	1.815	1.793	1.530	1.882
1/81000	0.284	0.877	0.273	*	1.306	1.691	1.018	1.613	1.421	1.811
1/243000	0.107	0.392	0.071	1.651	0.719	1.255	0.388	1.375	1.216	1.502
1/729000	0.035	0.118	0.010	0.755	0.247	0.725	0.114	0.752	0.873	0.961
1/2187000	0.015	0.043	0.003	0.270	0.044	0.330	0.039	0.294	0.481	0.537

表 5

5 使用 PrP 用于包被的单克隆抗体间接 ELISA 滴定数据 (OD450nm)

包被抗原	朊病毒蛋白									
腹水稀释	4G11	4G29	4G57	4G69	5G13	5G29	5G38	5G48	5G55	5G77
1/1000	0.139	0.089	0.137	0.257	0.193	0.296	0.138	0.129	1.832	0.159
1/3000	0.056	0.039	0.063	0.109	0.070	0.129	0.035	0.041	1.646	0.109
1/9000	0.036	0.031	0.044	0.070	0.030	0.093	0.014	0.018	1.726	0.088
1/27000	0.030	0.027	0.034	0.045	0.018	0.066	0.002	0.005	1.739	0.050
1/81000	0.027	0.025	0.030	0.027	0.005	0.033	0	0.004	1.742	0.032
1/243000	0.026	0.079	0.026	0.025	0	0.014	0	0.003	1.745	0.014
1/729000	0.025	0.023	0.025	0.026	0	0.009	0	0.001	1.550	0.003
1/2187000	0.031	0.024	0.024	0.024	0	0.001	0	0	1.168	0.002

上述所有单克隆抗体都对用于产生它们的免疫原具有高度的亲和性。然而在一个具体的实施例中,单克隆抗体 5G55 与重组 PrP 强烈反应。这一抗体可用于任何利用 ELISA、蛋白质印迹和免疫组织化学的应用。其它剩

余的单克隆抗体对重组 PrP 显示低至适度结合特异性。

实施例 9

针对 MMP3 的单克隆抗体的生产

- 5 如前面对于其它抗原的描述，用 MMP3 (25 μ g/小鼠) 在 BALB/c 小鼠的后脚垫免疫它们。2 周后小鼠获得第二次免疫。第二次免疫后第四天，收集淋巴结，将来自淋巴结的 B 细胞与骨髓瘤 Sp2/0-Ag14 细胞融合并置于 96-孔平板中。还收集并检验了免疫血清。

- 10 表 6 显示在 OD450nm 测定的间接 ELISA 的结果，使用 4 $^{\circ}$ C 下在聚苯乙烯平板上吸附过夜的在 PBS 中的浓度为 2pg/ml 的 MMP3。。所有其它培养如本领域已知的在具有 0.5% BSA 和 Tween 20 的 PBS 中进行。

结果显示用 MMP3 免疫的小鼠血清与非免疫小鼠的血清没有任何明显的差别。

表 6

- 15 使用 MMP3 在 OD 450nm 测定的间接 ELISA-未结合的

血清稀释度	OD ₄₅₀ 测定值
免疫血清	
1: 1000	0.52
1: 3000	0.42
1: 9000	0.36
1: 27000	0.37
非免疫血清	
1: 1000	0.53
1: 3000	0.31
1: 9000	0.25
1: 27000	0.30

还通过使用 MMP3 的间接 ELISA 和使用生物素标记的 MMP3 的直接 ELISA 检验所有的初级克隆。使用未结合的 MMP3 没有产生阳性克隆。然后使用与上述对于 PrP 相同的方法使用戊二醛将 MMP3 与 HSP70 结合。

- 20 如前所述使用结合的 MMP3(50 μ g/小鼠)免疫 Balb/c 小鼠。第二次免疫

后的第四天，收集淋巴结并如本领域已知的进行加工。分离的 B 细胞与骨髓瘤 sp 2/0 细胞融合并置于 96 孔平板中。收集并检验免疫血清。结果显示于表 7 中。表 7 显示使用 4℃ 下在聚苯乙烯平板上吸附过夜的含 2 μ g/ml MMP3 的 PBS 在 OD 450nm 测定的间接 ELISA 的结果。所有其它培养如本领域已知的在具有 0.5% 牛血清清蛋白(“BSA”)和 Tween 20 的 PBS 中进行。结果显示用结合的 MMP3-HSP70 免疫的小鼠血清与非免疫小鼠血清相比对于 MMP3 具有显著的亲和性。

表 7

使用 MMP3 在 OD 450nm 测定的间接 ELISA-结合的

血清稀释度	OD ₄₅₀ 测定值
免疫血清	
1: 1000	1.252
1: 3000	0.835
1: 9000	0.596
1: 27000	0.452
非免疫血清	
1: 1000	0.258
1: 3000	0.268
1: 9000	0.279
1: 27000	0.277

10 还通过使用 MMP3(2 μ g/ml)的间接 ELISA 和使用生物素标记的 MMP3 (500ng/ml)的直接 ELISA 检验了所有初级克隆。使用间接 ELISA 检测到 8 个阳性克隆，使用直接 ELISA 检测到 6 个阳性克隆。将所有的阳性克隆进行克隆，其中 4 个具有稳定的抗体生产并被克隆 2-3 次。表 8 鉴别了克隆和免疫球蛋白同种型。表 9 显示使用吸附在平板上的 1 μ g/ml MMP3 的间接
15 ELISA 和使用 0.5 μ g/ml MMP3-生物素的直接 ELISA 的结果。结果显示克隆对 MMP3 具有高度的亲和性。

表 8

产生针对 MMP3 的单克隆抗体的克隆和免疫球蛋白同种型

克隆名称	抗体同种型
MMP3H2	IgG3
MMP3H10	IgG3
MMP3G7	IgG2a
MMP3F11	G3

表 9

5 抗 MMP3 抗体的特征

MoAb, ng/ml	MMP3 G7, 间 接 ELISA	MMP3 G7, 直 接 ELISA	MMP3 F11, 间 接 ELISA	MMP3 F11, 直 接 ELISA	MMP3 H2, 间 接 ELISA	MMP3 H2, 直 接 ELISA	MMP3 H10, 间 接 ELISA	MMP3 H10, 直 接 ELISA
10 000	****	0.093	0.772	0.474	****	0.057	****	0.102
3 000	1.765	0.020	0.295	0.472	1.824	0.090	1.809	0.055
1 000	1.795	0.023	0.182	0.384	1.782	0.126	1.829	0.077
300	1.830	0.037	0.044	0.269	1.607	0.088	1.793	0.025
100	1.745	0.009	0.021	0.147	1.248	0.038	1.683	0.017
30	1.470	0.000	0.015	0.069	0.719	0.033	1.391	0.019
10	0.957	0.000	0.000	0.057	0.295	0.003	0.941	0.004
3	0.498	0.000	0.000	0.051	0.099	0.000	0.463	0.005

上面说明书中提到的所有出版物和专利本文引入作为参考。本发明描述的方法和系统的各种修饰和改变，这对本领域熟练的技术人员来说是明显的，不偏离本发明的范围和精神。尽管本发明连同具体优选的实施例进行描述，应当理解本发明如所要求的不应不适当地限制于这些具体的实施

10 例。事实上，描述的进行本发明的方式的各种修正对于在免疫学、医药生物化学、分子生物学或相关领域熟练的技术人员来说是显而易见的，是在如下的权利要求范围内的。

- <110> 孔斯贝格汽车公司
(Kiselev, Vsevolod I
Petr, Sveshnikov G)
- <120> 开发和使用对传统上低免疫原性的抗原具有特异性的单克隆抗体的方法、试剂盒和组合物
- <130> 免疫
- <150> RU 2003128660
<151> 2003-09-25
- <160> 22
- <170> Patentln version 3.1
- <210> 1
<211> 309
<212> DNA
<213> 人乳头瘤病毒 16 型
- <220>
<221> CDS
<222> (7)..(303)
<223>
- <400> 1
- | | |
|---|-----|
| gaattc atc atg cat gga gat aca cct aca ttg cat gaa tat atg tta | 48 |
| Ile Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu | |
| 1 5 10 | |
| gat ttg caa cca gag aca act gat ctc tac tgt tat gag caa tta aat | 96 |
| Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn | |
| 15 20 25 30 | |
| gac agc tca gag gag gag gat gaa ata gat ggt cca gct gga caa gca | 144 |
| Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala | |
| 35 40 45 | |
| gaa ccg gac aga gcc cat tac aat att gta acc ttt tgt tgc aag tgt | 192 |
| Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys | |
| 50 55 60 | |
| gac tct acg ctt cgg ttg tgc gta caa agc aca cac gta gac att cgt | 240 |
| Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg | |
| 65 70 75 | |
| act ttg gaa gac ctg tta atg ggc aca cta gga att gtg tgc ccc atc | 288 |
| Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile | |
| 80 85 90 | |
| tgt tct cag aaa cca ggatcc | 309 |
| Cys Ser Gln Lys Pro | |
| 95 | |

<212> PRT

<213> 人乳头瘤病毒 16 型

<400> 2

Ile Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu
1 5 10 15

Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser
20 25 30

Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro
35 40 45

Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser
50 55 60

Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu
65 70 75 80

Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser
85 90 95

Gln Lys Pro

<210> 3

<211> 330

<212> DNA

<213> 人乳头瘤病毒 18 型

<220>

<221> CDS

<222> (7)..(324)

<223>

<400> 3

gaattc agt atg cat gga cct aag gca aca ttg caa gac att gta ttg 48
Ser Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu
1 5 10

cat tta gag ccc caa aat gaa att ccg gtt gac ctt cta tgt cac gag 96
His Leu Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu
15 20 25 30

caa tta agc gac tca gag gaa gaa aac gat gaa ata gat gga gtt aat 144
Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn
35 40 45

cat caa cat tta cca gcc cga cga gct gaa cca caa cgt cac aca atg 192
His Gln His Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met
50 55 60

ttg tgt atg tgt tgt aag tgt gaa gcc aga att gag cta gta gta gaa 240
Leu Cys Met Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu
65 70 75

agc tca gca gac gac ctt cga gca ttc cag cag ctg ttt ctg aac acc 288
Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr
80 85 90

ctg tcc ttt gtg tgt ccg tgg tgt gca tcc cag cag ggatcc 330
 Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln
 95 100 105

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人乳头瘤病毒 18 型

<400> 4

Ser Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu
 1 5 10 15

Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu
 20 25 30

Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln
 35 40 45

His Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys
 50 55 60

Met Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser
 65 70 75 80

Ala Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser
 85 90 95

Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln
 100 105

<210> 5
 <211> 5321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重组载体 pQE30-dnaK 的核苷酸序列

<400> 5

ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcgga taacaattat aatagattca 60
 attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag aggagaaatt aactatgaga 120
 ggatgcgcatc accatcacca tcacggatcc gctcgtgctg tccgggatcga cctcgggacc 180
 accaactccg tcgtctcggg tctggaaggt ggcgacccgg tcgtcgtcgc caactccgag 240
 ggctccagga ccaccccgtc aattgtcgcg ttcgcccgca acggtgaggt gctggtcggc 300
 cagcccgccca agaaccaggc agtgaccaac gtcgatcga cctgctcgtc ggtcaagcga 360
 cacatgggca gcgactggtc catagagatt gacggcaaga aatacaccgc gccggagatc 420
 agcgcgccgca ttctgatgaa gctgaagcgc gacgccgagg cctacctcgg tgaggacatt 480
 accgacgcgg ttatcacgac gcccgccctac ttcaatgacg cccagcgtca ggccaccaag 540

gacgccggcc agatcgccgg cctcaacgtg ctgoggatcg tcaacgagcc gaccgcggcc	600
gcgctggcct acggcctcga caagggcgag aaggagcagc gaatcctggt cttcgacttg	660
ggtggtggca ctttcgacgt ttccctgctg gagatcggcg aggggtgtggt tgaggtccgt	720
gccacttcgg gtgacaacca cctcggcggc gacgactggg accagcgggt cgtcgattgg	780
ctggtggaca agttcaaggg caccagcggc atcgatctga ccaaggacaa gatggcgatg	840
cagcggctgc ggaagccgc cgagaaggca aagatcgagc tgagttcgag tcagtccacc	900
tcgatcaacc tgcctacat caccgtcgac gccgacaaga acccgttggt cttagacgag	960
cagctgacct gcgcgagtt ccaacggatc actcaggacc tgctggaccg cactcgcaag	1020
ccgttccagt cggatgatcg tgacaccggc atttcgggtg cggagatcga tcacgttggtg	1080
ctcgtgggtg gttcgaccg gatgcccgcg gtgaccgatc tggtaagga actcaccggc	1140
ggcaaggaac ccaacaaggg cgtcaacccc gatgaggttg tcgcggtggg agccgctctg	1200
caggccggcg tcctcaaggg cgaggtgaaa gacgttctgc tgottgatgt taccocgctg	1260
agcctgggta tcgagaccaa gggcggggtg atgaccaggc tcatcgagcg caacaccacg	1320
atccccacca agcggtcgga gactttcacc accgccgacg acaaccaacc gtcggtgcag	1380
atccaggtct atcaggggga gcgtgagatc gccgcgcaca acaagttgct cgggtccttc	1440
gagctgaccg gcatcccgcc ggcgcgcgcg gggatccgc agatcgaggt cactttcgac	1500
atcgacgcca acggcattgt gcacgtcacc gccaaaggaca agggcaccgg caaggagaac	1560
acgatccgaa tccaggaagg ctcgggcctg tccaaggaag acattgaccg catgatcaag	1620
gacgccgaag cgcacgccga ggaggatcg aagcgtcgcg aggaggccga tgttcgtaat	1680
caagccgaga cattggtcta ccagacggag aagttcgtca aagaacagcg tgaggccgag	1740
ggtggttcga aggtacctga agacacgctg aacaaggttg atgccgcggt ggcggaagcg	1800
aaggcggcac ttggcggatc ggatatttcg gccatcaagt cggcgatgga gaagctgggc	1860
caggagtcgc aggtctctgg gcaagcgate tacgaagcag ctcaggctgc gtcacaggcc	1920
actggegctg cccaccccgg cggcgagccg ggcggtgcc accccggctc ggctgatgac	1980
gttggtgacg cggaggtggt cgacgacggc cgggaggcca agtgacggac gggctgacct	2040
gcagccaagc ttaattagct gagcttgga tcctgttgat agatccagta atgacctcag	2100
aactccatct ggatttggtc agaacgctcg gttgccgccg ggcgtttttt attggtgaga	2160
atccaagcta gcttggcgag attttcagga gctaaggaag ctaaaatgga gaaaaaatc	2220
actggatata ccaccgttga tatatccaa tggcatcgta aagaacattt tgaggcattt	2280
cagtcagttg ctcaatgtac ctataaccag accgttcagc tggatattac ggcottttta	2340
aagaccgtaa agaaaaataa gcacaagttt tatccggcct ttattccat tcttgccgc	2400

ctgatgaatg ctcatccgga atttcgtatg gcaatgaaag acggtgagct ggtgatatgg	2460
gatagtgttc acccttgтта caccgttttc catgagcaaa ctgaaacgtt ttcatcgctc	2520
tggagtgaat accacgacga tttccggcag tttctacaca tatattcgca agatgtggcg	2580
tgttacggtg aaaacctggc ctatttcctt aaagggttta ttgagaatat gtttttcgtc	2640
tcagccaatc cctgggtgag tttcaccagt tttgatttaa acgtggccaa tatggacaac	2700
ttcttcgccc ccgttttcac catgggcaaa tattatacgc aaggcgacaa ggtgctgatg	2760
ccgctggcga ttcaggttca tcatgccgtt tgtgatggct tccatgtcgg cagaatgctt	2820
aatgaattac aacagtactg cgatgagtgg cagggcgggg cgtaattttt ttaaggcagt	2880
tattgggtgcc cttaaaccgc tggggtaatg actctctagc ttgaggcatc aaataaaacg	2940
aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt tgtttgctcg tgaacgctct	3000
cctgagtagg acaaatccgc cctctagagc tgctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa	3060
aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaage ggatgccggg	3120
agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttgcg ggtgtcgggg cgcagccatg	3180
accagtcac gtagcgatag cggagtgtat actggcttaa ctatgaggca tcagagcaga	3240
ttgtactgag agtgcacat atgcgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat	3300
accgcatcag gcgctcttcc gttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc	3360
tgccggcagc ggtatcagct cactcaaagg cggtataacg gttatccaca gaatcagggg	3420
ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg	3480
ccgcgttgct ggcgtttttc cataggetcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac	3540
gctcaagtca gaggtggcga aaccggacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg	3600
gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgct	3660
ttctcccttc ggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg	3720
tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct	3780
gcgccttacc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac	3840
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtagggcgt gctacagagt	3900
tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc	3960
tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca	4020
ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat	4080
ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac	4140
gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt	4200
aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc	4260

```

aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg      4320
cctgactecc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg      4380
ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc      4440
cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta      4500
ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg      4560
ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct      4620
ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta      4680
gctccttcgg tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatgg      4740
ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga      4800
ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt      4860
gcccggcgtc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca      4920
ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt      4980
cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc tttactttc accagcgttt      5040
ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa ggaataagg gcgacacgga      5100
aatgttgaat actcatactc ttctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt      5160
gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaata ggggttccgc      5220
gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa      5280
cctataaaaa taggcgtatc acgaggcctt ttcgtcttca c                          5321

```

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 牛

<400> 6

Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Gly Trp Asn Thr
1 5 10

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 牛

<400> 7

Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly
1 5

<210> 8
<211> 13
<212> PRT

<213> 牛

<400> 8

Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	Ile	Lys
1				5					10			

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 牛

<400> 9

Ile	Thr	Gln	Tyr	Gln	Arg	Glu	Ser	Gln	Ala	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Gly	Ala
1				5					10					15	

Ser

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> 人乳头瘤病毒 16 型

<400> 10

tgacagctca gaggaggag

19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> 人乳头瘤病毒 16 型

<400> 11

gcacaaccga agcgtagag

19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人乳头瘤病毒 18 型

<400> 12

gcgactcaga ggaagaaaac

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 人乳头瘤病毒 18 型

<400> 13

caaaggacag ggtgttcaga

20

<210> 14
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人乳头瘤病毒 18 型

 <400> 14

 tctaacgaat tcagtatgca tggacctaag g 31

<210> 15
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人乳头瘤病毒 18 型

 <400> 15

 attacaggat cccctgctggg atgcacacca 30

<210> 16
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人乳头瘤病毒 16 型

 <400> 16

 attctcgaat tcatcatgca tggagatata c 31

<210> 17
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人乳头瘤病毒 16 型

 <400> 17

 cttatcggat cctggtttct gagaacagat g 31

<210> 18
 <211> 130
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> pHE716 和 pHE718 末端序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (107)..(108)
 <223> HSP 16/HSP18 E7 基因插入位点

 <400> 18

 taatacgact cactataggg agaccacaac ggtttccctc tagaaataat tttgtttaac 60
 tttaagaagg agatatacat atgcatcacc atcaccatca cgaattcgga tccctaattag 120
 ctgaaagctt 130

<210> 19
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pHE716 的正向引物

<400> 19

gaagatctat gcatggagat acacctac 28

<210> 20
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pHE716 的反向引物

<400> 20

cgggatcctg gtttctgaga acagatgg 28

<210> 21
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pHE718 的正向引物

<400> 21

gaagatctat gcatggacct aaggcaac 28

<210> 22
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pHE718 的反向引物

<400> 22

cgggatccct gctgggatgc acaccacg 28

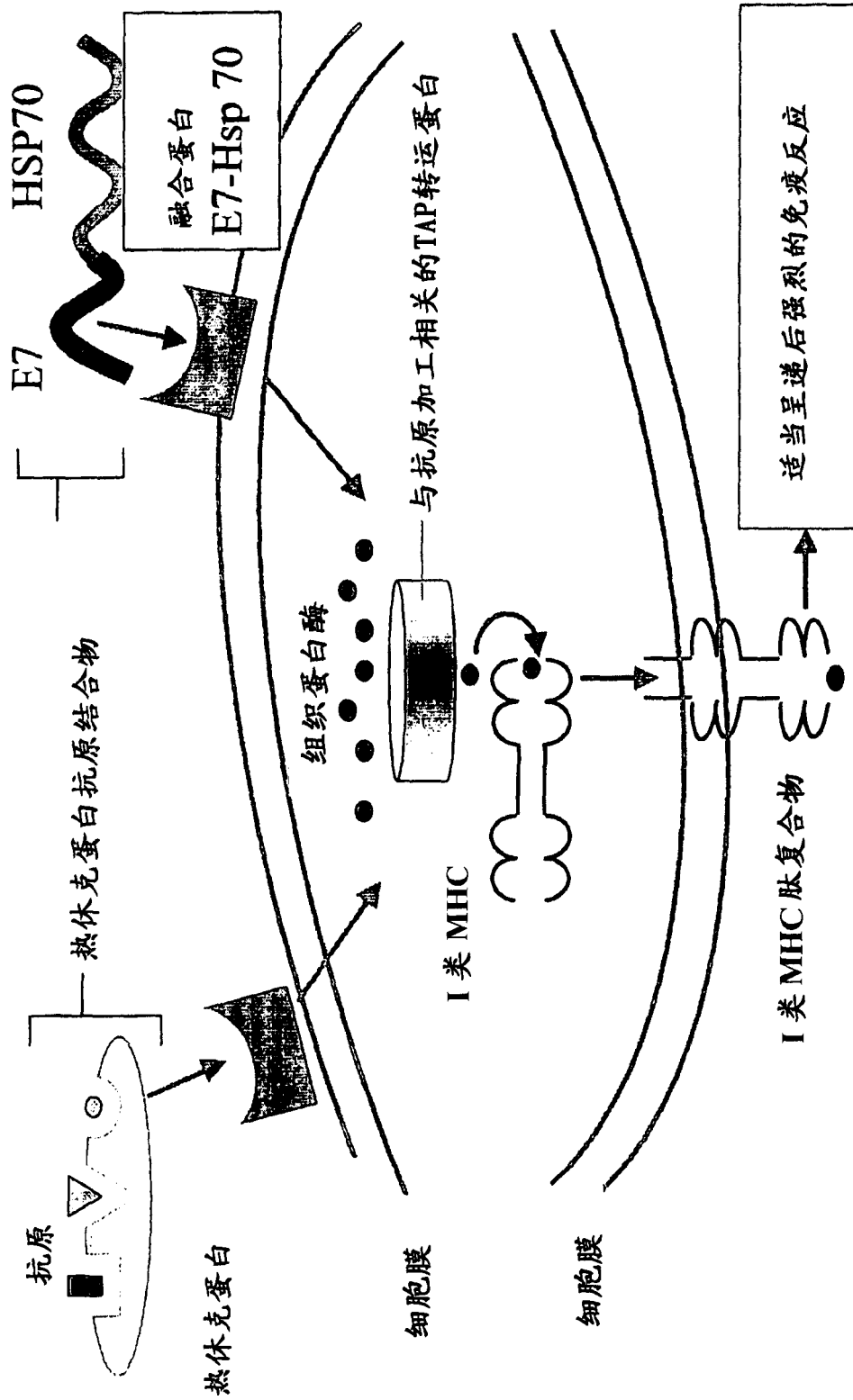


图 1

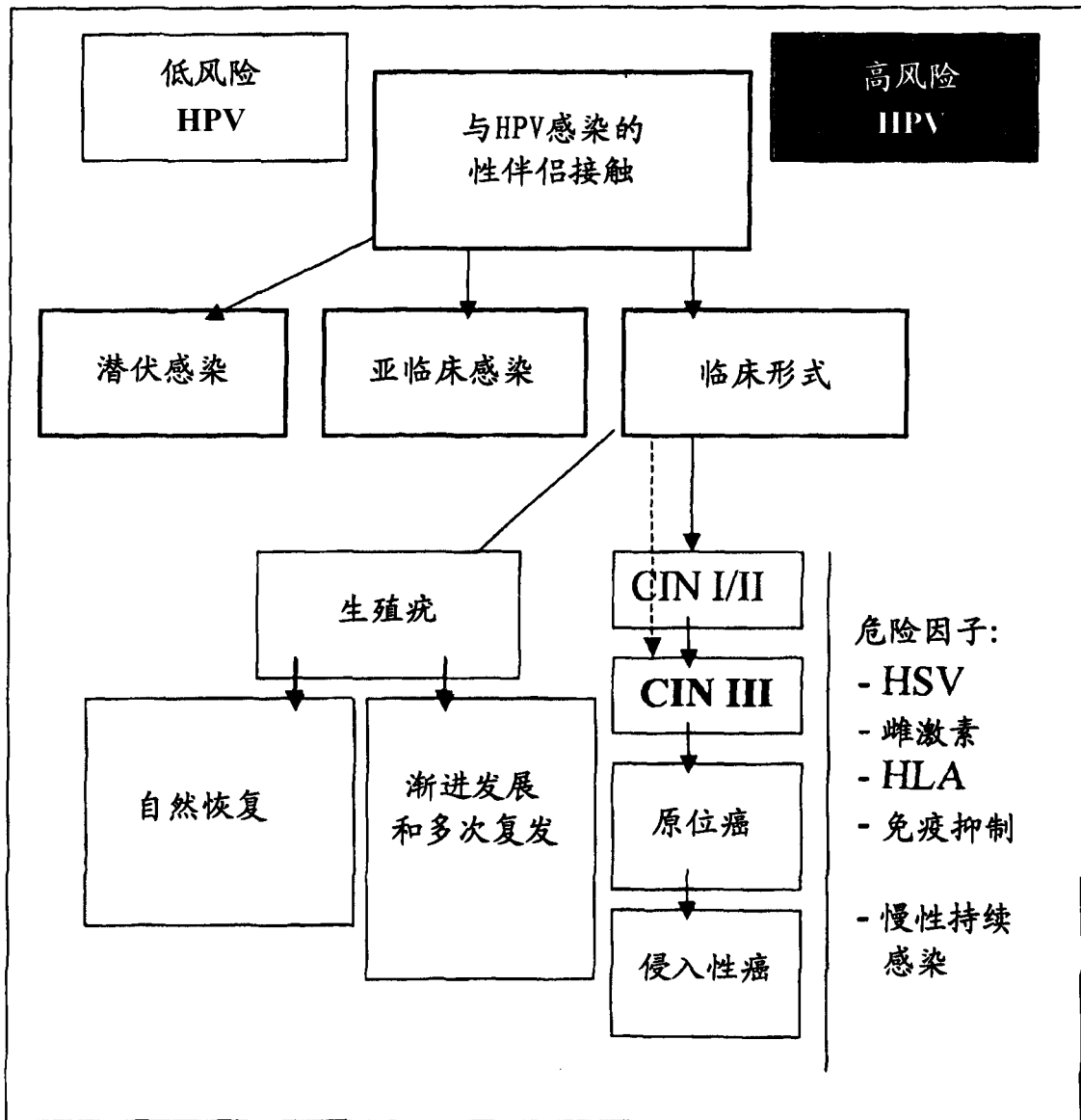


图 2

18 上 5-TCT AAC GAA TTC AGT ATG CAT GGA CCT AAG G (SEQ ID NO.: 14)
 18 下 5-ATT ACA GGA TCC CTG CTG GGA TGC ACA CCA (SEQ ID NO.: 15)
 16 上 5-ATT CTC GAA TTC ATC ATG CAT GGA GAT ACA C (SEQ ID NO.: 16)
 16 下 5-CTT ATC GGA TCC TGG TTT CTG AGA ACA GAT G (SEQ ID NO.: 17)

图 3

gaattcatcatgcatggagatacacctacattgcatgaatataatgtagatttgcaacca
 EcoRI I M H G D T P T L H E Y M L D L Q P
 gagaaactgatcttactgttatgagcaattaatgacagctcagaggaggatgaa
 E T T D L Y C Y E Q L N D S S E E D E
 atagatggtccagctggacaagcagaaccggacagagcccattacaatattgtaaccctt
 I D G P A G Q A E P D R A H Y N I V T F
 tgttgcaagtgtgactctacgcttcggttgctgctacaagaacacacgtagacattcgt
 C C K C D S T L R L C V Q S T H V D I R
 actttggaagacctgttaatgggcacactaggaattgtgtgccccatctgttctcagaaa
 T L E D L L M G T L G I V C P I C S Q K
ccaggatcc
 P BamHI

图 4

gaattcagtatgcatggacctaaggcaacattgcaagacattgtattgcatcttagagccc
 ECORI S M H G P K A T L Q D I V L H L E P
 caaatgaaattccggtgaccttctatgtcacgagcaattaagcgactcagaggaagaa
 Q N E I P V D L L C H E Q L S D S E E E
 aacgatgaaatagatggagttaatcatcaacatttaccagcccagcgactgaaccacaa
 N D E I D G V N H Q H L P A R R A E P Q
 cgtcacacaatgtgtatgtgttgtaagtgtgaagccagaattgagctagtagtagaa
 R H T M L C M C C K C E A R I E L V V E
 agtcagcagacaccttcgagcattccagcagctgttctgaacaccctgtcctttgtg
 S S A D D L R A F Q Q L F L N T L S F V
 tgtccgtggtgtgcatcccagcag**ggatcc**
 C P W C A S Q Q BamHI

图 5

T7 启动子
 TAATCGACTCATAAGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACT
 TTAAGAAGGAGATATACATATGcatcaccatcaccatcacGAATTC - E7 gene HPV16(18) - GGATCC
 rbs *Nde I* His-Tag *EcoRI* *BamHI*
TAATTAGCTGAAAGCTT
 Term *HindIII*

图 6

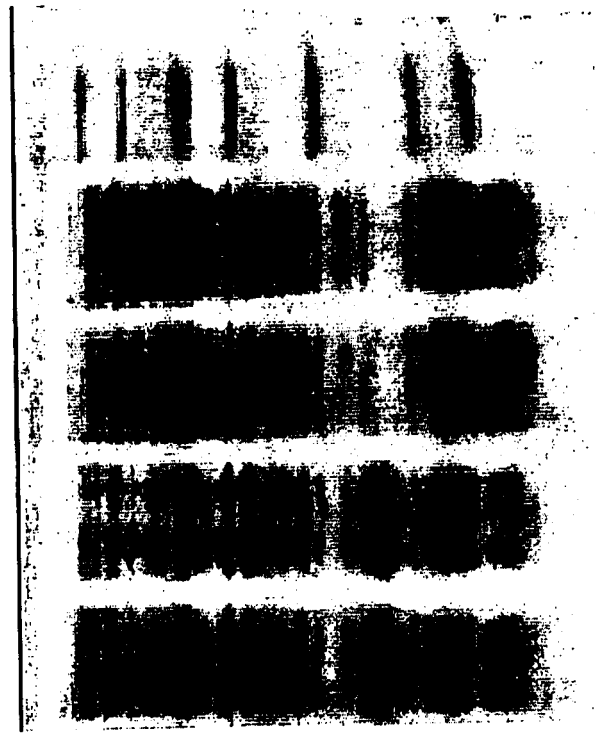
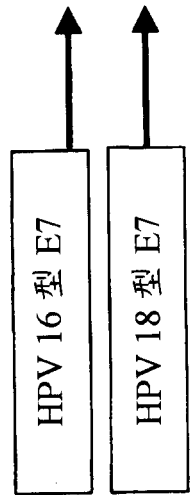


图 7



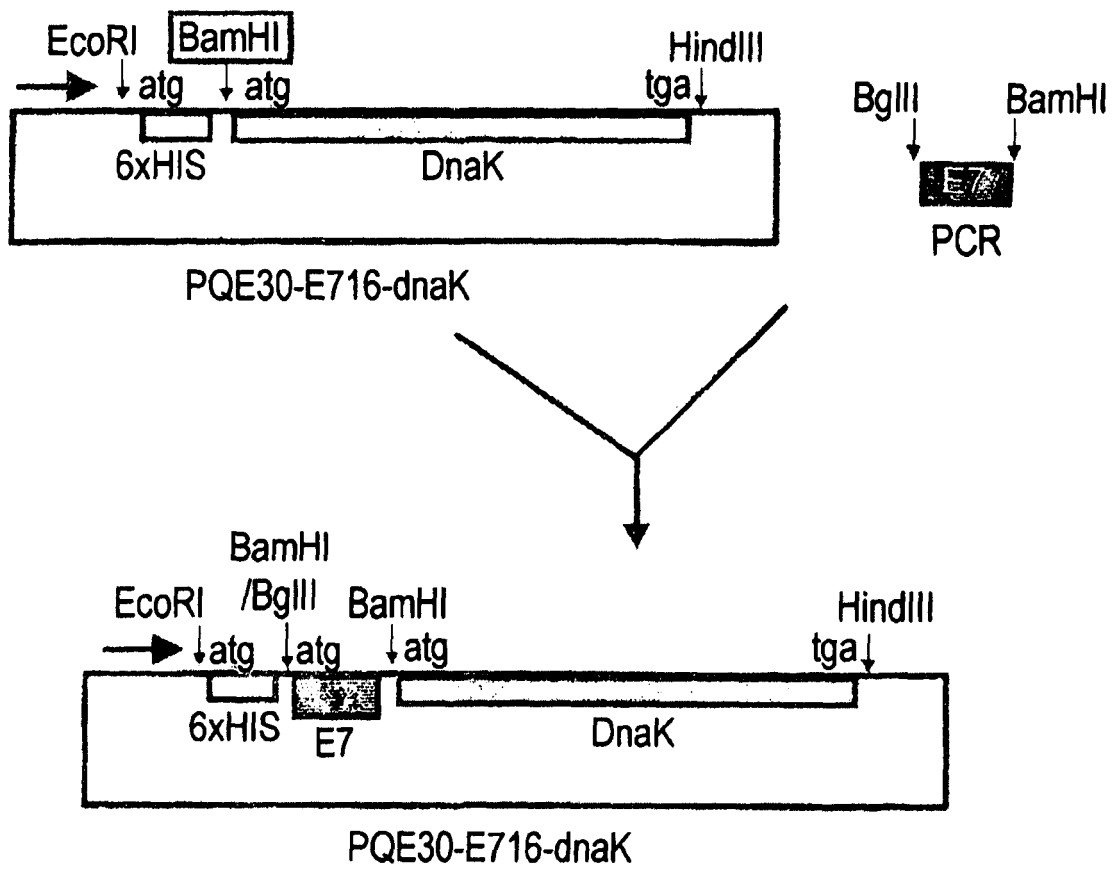


图 9

```

1   CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
61  ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAGA
121 GGATCGCATC ACCATCACCA TCACGGATCC GCTCGTGCGG TCGGGATCGA CCTCGGGACC
181 ACCAACTCCG TCGTCTCGGT TCTGGAAGGT GGCGACCCGG TCGTCTCGC CAACTCCGAG
241 GGCTCCAGGA CCACCCCGTC AATTGTGCGG TTCCGCCGCA ACGGTGAGGT GCTGGTCGGC
301 CAGCCCGCCA AGAACCAGGC AGTGACCAAC GTCGATCGCA CCGTGCGCTC GGTC AAGCGA
361 CACATGGGCA GCGACTGGTC CATAGAGATT GACGGCAAGA AATACACCCG GCCGGAGATC
421 AGCGCCCGCA TTCTGATGAA GCTGAAGCGC GACGCCGAGG CCTACCTCGG TGAGGACATT
481 ACCGACGCGG TTATCACGAC GCCCGCCTAC TTCAATGACG CCCAGCGTCA GGCCACCAAG
541 GACGCCGGCC AGATCGCCGG CCTCAACGTG CTGCGGATCG TCAACGAGCC GACCGCGGCC
601 GCGTGGCCT ACGGCCTCGA CAAGGGCGAG AAGGAGCAGC GAATCCTGGT CTTGACTTG
661 GGTGGTGCCA CTTTCGACGT TTCCCTGCTG GAGATCGGGC AGGGTGTGGT TGAGGTCCGT
721 GCCACTTCGG GTGACAACCA CCTCGGCGGC GACGACTGGG ACCAGCGGT CCGTGGATTG
781 CTGGTGGACA AGTTCAAGGG CACCAGCGGC ATCGATCTGA CCAAGGACAA GATGGCGATG
841 CAGCGGCTGC GGGAAGCCGC CGAGAAGGCA AAGATCGAGC TGAGTTCGAG TCAGTCCACC
901 TCGATCAACC TGCCCTACAT CACCGTCGAC GCCGACAAGA ACCCGTTGTT CTTAGACGAG
961 CAGCTGACCC GCGCGGAGTT CCAACGGATC ACTCAGGACC TGCTGGACCG CACTCGCAAG
1021 CCGTTCAGT CCGTGATCGC TGACACCGGC ATTTCCGGTGT CGGAGATCGA TCACGTTGTG
1081 CTCGTGGGTG GTTCGACCCG GATGCCCGCG GTGACCGATC TGGTCAAGGA ACTCACCGGC
1141 GGCAAGGAAC CCAACAAGGG CGTCAACCCC GATGAGGTTG TCGCGGTGGG AGCCGCTCTG
1201 CAGGCCGGCG TCCTCAAGGG CGAGGTGAAA GACGTTCTGC TGCTTGATGT TACCCGCTG
1261 AGCCTGGGTA TCGAGACCAA GGGCGGGGTG ATGACCAGGC TCATCGAGCG CAACACCAG
1321 ATCCCACCA AGCGGTGCGA GACTTTCACC ACCGCCGACG ACAACCAACC GTCGGTGCAG
1381 ATCCAGGTCT ATCAGGGGGA GCGTGAGATC GCCGCGCACA ACAAGTTGCT CGGGTCCCTC
1441 GAGCTGACCG GCATCCC GCCGCGCGCG GGGATTCCGC AGATCGAGGT CACTTTCGAC
1501 ATCGACGCCA ACGGCATTGT GCACGTCACC GCCAAGGACA AGGGCACCGG CAAGGAGAAC
1561 ACGATCCGAA TCCAGGAAG CTCGGGCCTG TCCAAGGAAG ACATTGACCG CATGATCAAG
1621 GACGCCGAAG CGCACGCCGA GGAGGATCGC AAGCGTCGCG AGGAGGCCGA TGTTCGTAAT
1681 CAAGCCGAGA CATTGGTCTA CCAGACGGAG AAGTTCGTCA AAGAACAGCG TGAGGCCGAG
1741 GGTGGTTCGA AGGTACCTGA AGACACGCTG AACAAAGTTG ATGCCGCGGT GCGGGAAGCG
1801 AAGGCCGCAC TTGGCGGATC GGATATTTTCG ACCATCAAGT CGGCGATGGA GAAGCTGGGC
1861 CAGGAGTCGC AGGCTCTGGG GCAAGCGATC TACGAAGCAG CTCAGGCTGC GTCACAGGCC
1921 ACTGGCGCTG CCCACCCCGG CGGCGAGCCG GCGCGTGCCC ACCCCGCTC GGCTGATGAC
1981 GTTGTGGACG CGGAGGTGGT CGACGACGGC CGGGAGGCCA AGTGACGGAC GGGTCGACCT
2041 GCAGCCAAGC TTAATTAGCT GAGCTTGGAC TCCTGTTGAT AGATCCAGTA ATGACCTCAG
2101 AACTCCATCT GGATTTGTTT AGAACGCTCG GTTGCCGCGG GCGGTTTTTT ATTGGTGAGA
2161 ATCCAAGCTA GCTTGGCGAG ATTTTCAGGA GCTAAGGAAG CTAAAATGGA GAAAAAATC
2221 ACTGGATATA CCACCGTTGA TATATCCCAA TGGCATCGTA AAGAACATTT TGAGGCATTT
2281 CAGTCAGTTG CTCAATGTAC CTATAACCAG ACCGTTTCAGC TGGATATTAC GGCCTTTTTA
2341 AAGACCGTAA AGAAAAATAA GCACAAGTTT TATCCGGCCT TTATTACAT TCTTGCCCGC
2401 CTGATGAATG CTCATCCGGA ATTTCTGATG GCAATGAAAG ACGGTGAGCT GGTGATATGG
2461 GATAGTGTTT ACCCTTGTTA CACCGTTTTT CATGAGCAA CTGAAACGTT TTCATCGCTC
2521 TGGAGTGAAT ACCACGACGA TTTCCGGCAG TTTCTACACA TATATTCGCA AGATGTGGCG
2581 TGTTACGGTG AAAACCTGGC CTATTTCCCT AAAGGGTTTA TTGAGAATAT GTTTTTCGTC
2641 TCAGCCAATC CTGGGTGAG TTTACCAGT TTTGATTTAA ACGTGGCCAA TATGGACAAC
2701 TTCTTCGCC CCGTTTTAC CATGGGCAA TATTATACGC AAGGCGACAA GGTGCTGATG
2761 CCGTGGCGA TTCAGTTCA TCATGCCGTT TGTGATGGCT TCCATGTCGG CAGAATGCTT
2821 AATGAATTAC AACAGTACTG CGATGAGTGG CAGGGCGGGG CGTAATTTTT TTAAGGCAGT
2881 TATTGGTGCC CTTAAACGCC TGGGGTAATG ACTCTCTAGC TTGAGGCATC AAATAAAACG

```

图 10

```

2941 AAAGGCTCAG TCGAAAGACT GGGCCTTTCG TTTTATCTGT TGTTTGTCGG TGAACGCTCT
3001 CCTGAGTAGG ACAAATCCGC CCTCTAGAGC TGCCTCGCGC GTTTCGGTGA TGACGGTGAA
3061 AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT GTCTGTAAGC GGATGCCGGG
3121 AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG
3181 ACCCAGTCAC GTAGCGATAG CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA
3241 TTGTACTGAG AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
3301 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTCCGG
3361 TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG
3421 ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG
3481 CCGCGTTGCT GCGTTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC
3541 GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG
3601 GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCCT
3661 TTCTCCCTTC GGGAAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCACG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG
3721 TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCCCCTTCAG CCCGACCGCT
3781 GCGCCTTATC CGGTAACATC CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC
3841 TGGCAGCAGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
3901 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC
3961 TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAAGCA
4021 CCGTGGTAGC CGGTGGTTT TTTGTTTGA AGCAGCAGAT TACGCGAGA AAAAAGGAT
4081 CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACCTAC
4141 GTTAAGGGAT TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
4201 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC
4261 AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCTGTTCA TCCATAGTTG
4321 CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG
4381 CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC
4441 CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA
4501 TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG
4561 TTGCCATTGC TACAGGCATC GTGGTGTGAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT TCATTAGCT
4621 CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA
4681 GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG
4741 TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
4801 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG AGTTGCTCTT
4861 GCCCGGCGTC AATACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA GTGCTCATCA
4921 TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT
4981 CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTGAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT
5041 CTGGGTGAGC AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA
5101 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCTTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT CAGGTTTATT
5161 GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCCGC
5221 GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA
5281 CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACAGGCCCCC TTCGTCTTCA C

```

图 10

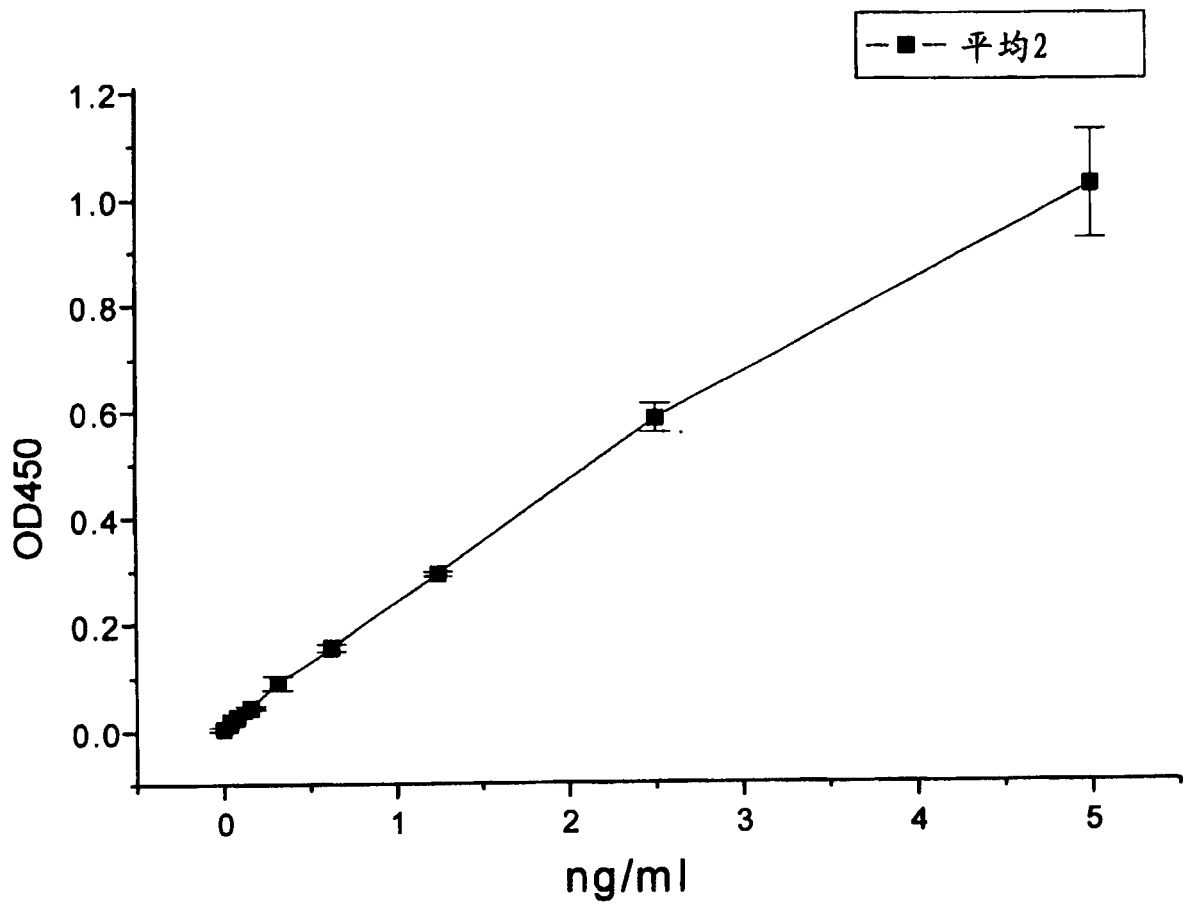


图 11

专利名称(译)	开发和使用对传统上低免疫原性的抗原具有特异性的单克隆抗体的方法、试剂盒和组合物		
公开(公告)号	CN1886425A	公开(公告)日	2006-12-27
申请号	CN200480034907.4	申请日	2004-09-24
[标]发明人	弗塞沃洛德·基塞莱夫 彼得·G·斯维什尼科夫		
发明人	弗塞沃洛德·基塞莱夫 彼得·G·斯维什尼科夫		
IPC分类号	C07K16/00 C07K16/08 C07K16/44 C07K16/40 A61K39/385 G01N33/574 G01N33/53 A61K39/00 A61K39/12 C07K16/18 C07K16/28 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/5748 C07K16/44 C07K16/40 C07K16/084 C07K16/18 C07K16/2872		
优先权	2003128660 2003-09-25 RU		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及开发和使用特异于传统上低免疫原性的抗原的单克隆抗体。本发明提供通过化学结合感兴趣的抗原与载体分子生产单克隆抗体，从而使免疫系统对用结合抗原进行的免疫发生反应的方法。本发明还提供了结合抗原的具体组合物以及特异于这些结合抗原的单克隆抗体。本发明还提供了用于使用单克隆抗体检测疾病的试剂盒。

