



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102727875 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 17

(21) 申请号 201210134834. 2

A61K 49/00(2006. 01)

(22) 申请日 2004. 07. 05

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 5/10(2006. 01)

60/490, 945 2003. 07. 30 US

(62) 分案原申请数据

200480028550. 9 2004. 07. 05

(71) 申请人 巴斯德研究院

地址 法国巴黎

(72) 发明人 克洛德·奥里欧 韦罗尼克·潘克里

龙玉春 安东尼·帕诺

弗朗索瓦·莱蒙尼尔

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 26 页

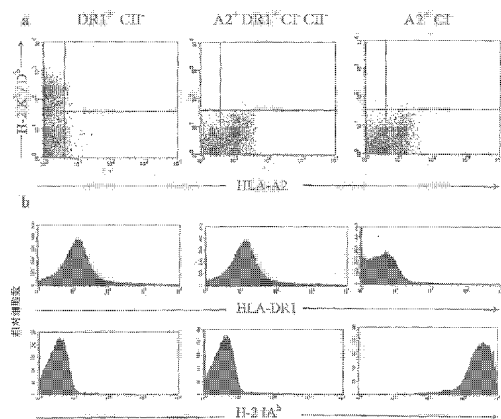
序列表 22 页 附图 7 页

(54) 发明名称

具有人类主要组织相容性复合物 (MHC) 表型的转基因小鼠、其实验性使用及用途

(57) 摘要

具有人类主要组织相容性复合物 (MHC) 表型的转基因小鼠、其实验性使用及用途, 本发明涉及转基因小鼠和分离的转基因小鼠细胞, 小鼠和小鼠细胞包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因。在实施方式中, 转基因小鼠或小鼠细胞缺乏 H2I 类和 II 类分子, 但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因。在实施方式中, 转基因小鼠或小鼠细胞包含 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型。本发明还涉及使用本发明的转基因小鼠的方法。



1. 一种同时确定候选抗原或抗原组中是否存在一种或多种抗原表位的方法,其中所述抗原表位可引起特异性体液应答、TH HLA-DR1 限制性应答和 / 或 CTRL HLA-A2 限制性应答,该方法包括:

a) 给包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺ β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠施用候选抗原或抗原组;

b) 测定小鼠体内对该抗原的特异性体液应答;

c) 测定小鼠体内对该抗原的 TH HLA-DR1 限制性应答;并

d) 测定小鼠体内对该抗原的 CTRL HLA-A2 限制性应答;

其中,如在小鼠体内观察到对抗原的特异性体液应答,可确定抗原中存在引起体液应答的抗原表位;

如在小鼠体内观察到对抗原的 TH HLA-DR1 限制性应答,可确定抗原中存在引起 TH HLA-DR1 限制性应答的抗原表位;而

如在小鼠体内观察到对抗原的 CTRL HLA-A2 限制性应答,可确定抗原中存在引起 CTRL HLA-A2 限制性应答的抗原表位。

2. 权利要求 1 的方法,进一步包括测定小鼠体内对抗原的 Th1- 特异性应答和测定小鼠体内对抗原的 Th2- 特异性应答;

其中,如在小鼠体内观察到对抗原的 Th1- 特异性应答,可确定抗原中存在引起小鼠体内 Th1- 特异性应答的抗原表位;

如在小鼠体内观察到对抗原的 Th2- 特异性应答,可确定抗原中存在引起小鼠体内 Th2- 特异性应答的抗原表位。

3. 一种确定候选抗原或抗原组中是否存在 HLA DR1- 限制性 T 辅助细胞抗原表位的方法,该方法包括:

a) 给包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺ β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠施用候选抗原或抗原组;并

b) 测定小鼠体内对抗原的 TH HLA-DR1 限制性 T 辅助细胞抗原表位应答;

其中,如在小鼠体内观察到对抗原的 TH HLA-DR1 限制性 T 辅助细胞抗原表位应答,可确定抗原中存在引起 TH HLA-DR1 限制性 T 辅助细胞抗原表位应答的抗原表位。

4. 一种确定候选抗原或候选抗原组中是否存在 HLA-A2- 限制性 T 细胞毒性 (CTL) 抗原表位的方法,该方法包括:

a) 给包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺ β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠中施用候选抗原或候选抗原组;并

b) 测定小鼠体内对抗原或抗原组的 HLA-A2- 限制性 T 细胞毒性 (CTL) 应答;

其中,如在小鼠体内观察到对抗原或抗原组的 HLA-A2- 限制性 T 细胞毒性 (CTL) 应答,

可确定在抗原或抗原组中存在引起 HLA-A2 限制性 T 细胞毒性 (CTL) 应答的抗原表位。

5. 一种比较由两种或两种以上疫苗诱导的 T- 辅助细胞应答的效力的方法, 该方法包括:

a) 给包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠施用第一种候选疫苗, 并测量小鼠体内由第一种候选疫苗诱导的 T- 辅助细胞应答;

b) 给包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠施用第二种候选疫苗, 并测量小鼠体内由第二种候选疫苗诱导的 T- 辅助细胞应答;

c) 将每种待比较的其他候选疫苗分别施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠, 并测量小鼠体内由各种待比较的其他候选疫苗诱导的 T- 辅助细胞应答; 和

d) 通过比较针对各种待比较的疫苗的 T- 辅助细胞应答来确定各种候选疫苗诱导 T- 辅助细胞应答的效力。

6. 权利要求 5 的方法, 其中 T- 辅助细胞应答为 HLA-DR1 限制性应答。

7. 一种比较由两种或两种以上疫苗诱导的 T 细胞毒性细胞应答的效力的方法, 该方法包括:

a) 给包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠施用第一种候选疫苗, 并测量小鼠体内由第一种疫苗诱导的 T 细胞毒性细胞应答;

b) 给包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠施用第二种候选疫苗, 并测量小鼠体内由第二种候选疫苗诱导的 T 细胞毒性细胞应答;

c) 将每种待比较的其他候选疫苗分别施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠, 并测量小鼠体内由每种待比较的其他候选疫苗所诱导的 T 细胞毒性细胞应答; 和

d) 通过比较针对各种待比较的疫苗的 T 细胞毒性细胞应答来确定各种候选疫苗诱导 T 细胞毒性细胞应答的效力。

8. 权利要求 7 的方法, 其中 T 细胞毒性细胞应答为 HLA-A2 限制性应答。

9. 一种同时比较由两种或两种以上疫苗引起的 T- 辅助细胞应答和 T 细胞毒性细胞应答的效力的方法, 该方法包括:

a) 给包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠施用第一种候选疫苗,并测量小鼠体内由第一种候选疫苗所诱导的 T- 辅助细胞应答和 T 细胞毒性细胞应答;

b) 给包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠施用第二种候选疫苗,并测量小鼠体内由第二种候选疫苗所诱导的 T- 辅助细胞应答和 T 细胞毒性细胞应答;

c) 将每种待比较的其他候选疫苗分别施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠,并测量小鼠体内由各种待比较的候选疫苗所诱导的 T- 辅助细胞应答和 T 细胞毒性细胞应答;并

d) 通过比较针对各种待比较的疫苗的 T- 细胞辅助细胞应答和 T 细胞毒性细胞应答,确定各种候选疫苗诱导 T- 辅助细胞应答和 T 细胞毒性细胞应答的效力。

10. 权利要求 9 的方法,其中 T- 辅助细胞应答为 HLA-DR1 限制性应答,且其中 T 细胞毒性细胞应答为 HLA-A2 限制性应答。

11. 一种同时确定在以抗原或以包含一种或多种抗原的疫苗进行免疫后,小鼠体内的体液应答、T 辅助细胞应答和 T 细胞毒性细胞应答的方法,该方法包括:

a) 将抗原或包含一种或多种抗原的疫苗施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠;

b) 测定小鼠体内对抗原或包含一种或多种抗原的疫苗的特异性体液应答;

c) 测定小鼠体内对抗原或包含一种或多种抗原的疫苗的 T- 辅助细胞应答;并

d) 测定小鼠体内对抗原或包含一种或多种抗原的疫苗的 T 细胞毒性细胞应答。

12. 权利要求 11 的方法,其中 T- 辅助细胞应答为 TH HLA-DR1 限制性应答。

13. 权利要求 12 的方法,其中 T 细胞毒性细胞应答为 CTRL HLA-A1 限制性应答。

14. 一种基于预先选定的标准对施用于人体的两种或两种以上候选疫苗组合物进行优化的方法,该方法包括:

根据权利要求 11,同时确定小鼠在使用两种或两种以上候选疫苗组合物进行免疫后的体液应答、T- 辅助细胞应答和 T 细胞毒性应答;并

通过将预先选定的标准应用于测定结果,选择最优的疫苗。

15. 权利要求 14 的方法,其中两种或两种以上候选疫苗的区别仅在于疫苗中的抗原与佐剂的比例不同。

16. 权利要求 14 的方法,其中两种或两种以上候选疫苗的区别仅在于疫苗中的佐剂类型不同。

17. 一种确定疫苗在施用于人体后是否存在引起自身免疫性疾病的风险的方法,该方法包括:

a) 给包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠或缺乏 H2 I 类和 II 类分子、但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因、并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠施用疫苗;并

b) 测定小鼠体内的自身免疫应答;

其中,如观察到小鼠体内出现自身免疫应答,表明疫苗在施用于人体后存在引起自身免疫性疾病的风险。

18. 一种分离的转基因小鼠非胚胎细胞,其包含:

a) 断裂的 H2 I 类基因;

b) 断裂的 H2 II 类基因;和

c) 功能性 HLA I 类或 II 类转基因。

19. 一种分离的转基因小鼠非胚胎细胞,其包含:

a) 断裂的 H2 I 类基因;

b) 断裂的 H2 II 类基因;

c) 功能性 HLA I 类转基因;和

c) 功能性 HLA II 类转基因。

20. 权利要求 19 的转基因小鼠非胚胎细胞,其中 HLA I 类转基因为 HLA-A2 转基因,而 HLA II 类转基因为 HLA-DR1 转基因。

21. 权利要求 20 的转基因小鼠非胚胎细胞,其中 HLA-A2 转基因包含序列表中提供的 HLA-A2 序列,而 HLA-DR1 转基因包含序列表中提供的 HLA-DR1 序列。

22. 一种分离的缺乏 H2 I 类和 II 类分子的转基因小鼠非胚胎细胞,其中所述转基因小鼠非胚胎细胞包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因。

23. 权利要求 22 的转基因小鼠非胚胎细胞,其具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型。

24. 权利要求 23 的转基因小鼠非胚胎细胞,其中 HLA-A2 转基因包含序列表中提供的 HLA-A2 序列,而 HLA-DR1 转基因包含序列表中提供的 HLA-DR1 序列。

具有人类主要组织相容性复合物 (MHC) 表型的转基因小鼠、其实验性使用及用途

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 7 月 5 日, 申请号为 200480028550.9, 发明名称为“具有人类主要组织相容性复合物 (MHC) 表型的转基因小鼠、其实验性使用及用途”的中国专利申请的分案申请。相关申请相互参考

[0002] 本申请基于 2003 年 7 月 30 日递交的美国临时申请 60/490,945 (代理人案卷号 03495.6093) 并要求其优先权, 在此通过引用将该申请的全部内容并入本申请。

[0003] 发明背景

[0004] 目前人们正在研制许多用于人类癌症免疫疗法及用于治疗传染性疾病 (如疟疾、艾滋病、丙肝病毒以及严重急性呼吸道综合症 (SARS)) 的疫苗。考虑到新兴病原体可能出现的迅速程度, 对可用于快速、可靠地评估疫苗策略和不同抗原表位的保护能力的动物模型进行改进非常重要。而且, 体内研究已经被要求用于评估不易或无法通过体外试验进行评价或测量的疫苗行为的重要变量, 如疫苗免疫原性、疫苗组成、给药途径、组织分布以及其中初级和次级淋巴器官的参与。由于其简单性和灵活性, 至少在初期疫苗研制中, 小动物 (如小鼠) 是一种很具吸引力的对麻烦并且昂贵的模型系统 (如非人类灵长类动物) 的替代物。

[0005] 在数例疫苗 (这些疫苗已在野生动物研究中证明具有保护作用) 的临床试验中观察到的中度有效性 (McMichael, A. J. & Hanke, T. *Nat Med* 9, 874-880 (2003)), 也许可以部分通过由于动物 MHC 和人类 HLA 的最佳抗原表位不同而造成的人类和动物 MHC 对免疫应答结果的不同影响进行解释 (Rotzschke, O. et al. *Nature* 348, 252-254 (1990))。因此, 除开一些缺陷, 具有人类 HLA 表达的转基因小鼠比野生小鼠更适于作为一种测试候选疫苗、评估疫苗可能诱导自身免疫性疾病的潜在风险, 以及设计更好的基于人类限制性元件的治疗方案的临床前模型。

[0006] 细胞毒 T 淋巴细胞

[0007] 细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 在消除传染性疾病和某些癌症方面具有很关键的作用 (P. Aichele, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel and M. Schulz, *J Exp Med* 171 (1990), p. 1815; L. BenMohamed, H. Gras-Masse, A. Tartar, P. Daubersies, K. Brahim, M. Bossus, A. Thomas and P. Druhile, *Eur J Immunol* 27 (1997), p. 1242; D. J. Diamond, J. York, J. Sun, C. L. Wright and S. J. Forman, *Blood* 90 (1997), p. 1751)。重组蛋白疫苗不能可靠地诱导 CTL 应答 (Habeshaw JA, Dalgleish AG, Bountiff L, Newell AL, Wilks, D, Walker LC, Manca F. 1990 Nov; 11(11): 418-25; Miller SB, Tse H, Rosenspire AJ, King SR. *Virology*. 1992 Dec; 191(2): 973-7)。在一些重要疾病的治疗中, 其它一些含有减毒病原体的免疫疫苗的在人体内的使用由于安全方面的顾虑而受到阻碍。在过去几年中, 基于抗原表位的方法已被提出作为一种研制新的预防和免疫治疗疫苗的可能性策略 (Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM. *Curr Opin Immunol*. 1996 Oct; 8(5): 651-7; Chesnut RW, Design testing of peptide based cytotoxic T-cell mediated immunotherapy to treat infectious disease, cancer, in Powell, MF, Newman, MJ (eds.) *Vaccine Design* :

The Subunit, Adjuvant Approach, Plenum Press, New-York 1995, 847)。这种方法具有一些优点,如可选择自然处理的抗原表位,使得免疫系统关注于病原体的高度保守和免疫显性表位 (R. G. van der Most, A. Sette, C. Oseroff, J. Alexander, K. Murali-Krishna, L. L. Lau, S. Southwood, J. Sidney, R. W. Chesnut, M. Matioubian and R. Ahmed, *J Immune* 157 (1996), p. 5543) 以及诱导多表位应答以阻止如在 HIV、乙肝病毒 (HBV) 和丙肝病毒 (HCV) 感染中观察到的突变逃逸。它还可以在需要 TH1 应答时,除去可能优先引起 TH2 应答的抑制性 T 细胞决定簇,相反亦然 (Pfeiffer C, Murray J, Madri J, Bottomly K. *Immunol Rev.* 1991 Oct ;123 :65-84 ;P Chaturvedi, Q Yu, S Southwood, A Sette, and B Singh *Int Immunol* 19968 :745-755)。最后,它还提供了除去抗原中的可能诱导不良自身免疫性疾病的自身免疫 T 细胞决定簇的可能。使用 CTL 抗原表位肽以获得保护性抗病毒或抗肿瘤免疫已在一些实验性模型中得到实现 (D. J. Diamond, J. York, J. Sun, C. L. Wright and S. J. Forman, *Blood* 90 1997, p. 1751 ;J. E. J. Blaney, E. Nobusawa, M. A. Brehm, R. H. Bonneau, L. M. Mylin, T. M. Fu, Y. Kawaoka and S. S. Tevethia, *J Virol* 72 (1998), p. 9567)。

[0008] 基于人类淋巴细胞应用的 CTL 抗原表位定义可能会由于导致不完全结果的环境和遗传异质性以及分离 CTL 克隆的技术困难而形成误导。目前所述的 HLA I 类或 II 类转基因小鼠已被证明是一种能够克服这些缺陷的很有价值的工具,这些带有新 CTL 和 T 辅助细胞表位的动物模型 (Hill AV. *Annu Rev Immunol.* 1998 ;16 :593-617 ;Carmon L, EI-Shami KM, Paz A., Pascolo S, Tzeheval E, Tiroso B, Koren R, Feldman M, Fridkin M, Lemonnier FA, Eisenbach L. *Int J Cancer*, 2000 Feb 1 ;85 (3) :391-7)。这些小鼠还被用于证明:i) 肽 HLA 亲和力与免疫原性间的良好关联 (Lustgarten J, Theobald M, Labadie C, LaFace D, Peterson P, Disis ML, Cheaver MA, Sherman LA. *Hum Immunol.* 1997 Feb ;52 (2) :109-18 ; Bakker AB, van der Burg SH, Huijbens RJ, DRijfhout JW, Melief CJ, Adema GJ, Figdor CG. *Int J Cancer.* 1997 Jan 27 ;70 (3) :302-9), ii) 鼠类和人类 CTL 系统在抗原处理 (产生相同抗原表位) 水平方面的显著重叠,以及, iii) 比较针对 HLA 转基因小鼠和人类中的 CTL 组成的大多数抗原的免疫动员 (Wentworth, P. A., A. Vifiello, J. Sidney, E. Keogh, P, W. Chesnut, H. Grey, A. Sette. 1996. *Eur. J. Immunol.* 26 :97 ;Alexander, J., C. Oserof, J. Sidney, P. Wentworth, E. Keogh, G. Hermanson, F. V Chisari R. T, Kubo, H. M, Grey, A, Sette, 1997. *J. Immunol.* 159 :4753)。

[0009] 迄今为止,已研制出合成肽基 CTL 抗原表位疫苗,用于多种人类疾病的免疫治疗。但是,在数例临床试验中仅观察到了中度的疗效 (21)。这可能部分是因为这些疫苗不能引起足够强的 CTL 应答。实际上,近期的报告提示需要 CD4+T 辅助细胞,以获得最大的 CTL 应答 (A. J. Zajac, K. Murali-Krishna, J. N. Blattman and R. Ahmed, *Curr Opin Immunol* 10 (1998), p. 444 ;Firat H, Garcia-Pons F, Tourdot S, Pascolo S, Scardino A, Garcia Z, Michel ML, Jack RW, Jung O, Kosmatopoulos K, Mateo L, Suhrbier A, Lemonnier FA, Langlade-Dernoyen P. *Eur J Immunol* 29, 3112, 1999)。

[0010] CTL 是针对病毒感染的保护性免疫的关键因素,但体内激活 CTL 的条件还没有被完全认识。现在, Th 细胞通常是利用合成肽激活 CTL 的基础的观点已经得到接受。对于合成 CTL 抗原表位肽,一些研究指出 T 辅助淋巴细胞刺激是引起最大的 CTL 应答所必需的 (C. Fayolle, E. Deriaud and C. Leclerc, *J Immunol* 147 (1991), p. 4069 ;C. Widmann,

P. Romero, J. L. Maryanski, G. Corradin and D. Valmori, *J Immunol Meth* 155(1992), p. 95 ;M. Shirai, C. D. Pendleton, J. Ahlers, T. Takeshita, M. Newman and J. A. Berzofsky, *J Immunol* 152(1994), p. 549 ;J. P. Sauet, H. Gras-Masse, J. G. Guillet and E. Gomard, *Int Immunol* 8(1996). p. 457)。一些该类研究表明激活 CD8⁺ 细胞需要 CD4⁺T 辅助细胞和 CD8⁺T 细胞间同时发生的相互作用依靠同样的抗原呈递细胞呈递它们的同源表位 (Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. *Nature*. 1998 Jun 4 ;393(6684) :474-8)。激活 CTL 所需的这三种细胞相互作用的关联性在病毒抗原表位和动物模型的研究中得到了确认,因为体内当 CTL 和 Th 抗原表位完全连接,而非仅仅以相互分开的混合物存在时,CTL 的诱导最为有效 (Shirai M, Pendleton CD, Ahlers J, Takeshita T, Newman M, Berzofsky JA. *J Immunol*. 1994 Jan 15 ; 152(2) :549-56 ;Oseroff C, Sette A, Wentworth P, Celis E, Maewal A, Dahlberg C, Fikes J, Kubo RT, Chesnut RW, Grey BX Alexander J. *Vaccine*. 1998 May ;16(8) :823-33)。CTL 和 Th 抗原肽有效诱导 CTL 应答的能力已在实验模型 (C. Fayolle, E. Deriaud and C. Leclerc, *J Immunol* 147(1991), p. 4069 ;C. Widmann, P. Romero, J. L. Maryanski, G. Corradin and D. Valmori, *J Immunol Meth* 155(1992), p. 95) 和人身上得到证明。而且,有效的 Th 应答不仅在最大化地引起 CTL 应答中,而且在维持 CTL 记忆方面都起着重要的作用 (E. A. Walter, P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, R. J. Finch, K-S. Watanabe, E. D. Thomas and S. R. Riddell, *N Engl J Med* 333(1995), p. 1038 ;Riddell SR, Greenberg PD, In Thomas ED, Blume KG, Forman SJ(eds) :*Hematopoietic Cell Transplantation*, 2nd edn. Malden, MA :Blackwell Science Inc., 1999)。最后,早已有文献表明 CD4⁺T “辅助”细胞对协调针对外源性抗原的分子和体液免疫应答很关键。

[0011] 最近,一种同时表达有 HLA-A*0201 I 类和 HLA-DR1 II 类分子的转基因 (Tg) 小鼠模型被建立起来 (BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, *Hum, Immunol*. 2000 Aug ;61(8) :764-79)。该作者报道说:HLA-A*0201 和 HLA-DR1 转基因在体内均有效, MHC I 类和 II 类分子都被用作限制性元件, HLA-DR1 转基因的产物 增强了 HLA-A*0201 限制性的抗原特异性 CTL 应答 (BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, *Hum, Immunol*. 2000 Aug ;61(8) : 764-79)。

[0012] 值得注意的是这些 HLA-A*0201/DR1 Tg 小鼠表达了自身的 MHC-I 类和 II 类分子。因为具有内源性小鼠 MHC I 类基因表达的 HLA I 类转基因小鼠优先并通常专门会引起 H-2 限制性 CTL 应答 (C Barra, HGournier, Z Garcia, PN Marche, E Jouvin-Marche, P Briand, P Phillip, and FA Lemonnier *J Immunol* 1993;150 :3681-3689 ;Epstein H, Hardy F., May JS, Johnson MH, Holmes N. *Eur J Immunol*. 1989 Sep ;19(9) :1575-83 ;Le AX ;EJ Bernhard, MJ Holterman, S Strub, P Parham, E Lacy, and VH Engelhard *J Immunol* 1989;142 :1366-1371 ;Vitiello A, Marchesini D, Furze J, Sherman LA, Chesnut RW., *J Exp Med*. 1991 Apr 1 ;173(4) :1007-15), 而具有内源性小鼠 MHC II 类基因表达的 HLA II 类转基因小鼠不能诱导可靠的 HLA II 类限制性抗原特异性应答 (Nishimura Y, Iwanaga T, Inamitsu T, Yanagawa Y, Yasunami M, Kimura A, Hirokawa K, Sasazuki T., *J Immunol* 1990 Jun 1 ;145(1) :353-60), 这些 HLA-A*0201/DR1 Tg 小鼠对评估对抗原的人类特异性应答的作用有限。

[0013] 然而,在 HLA I 类转基因而 H-2I 类基因敲除小鼠,或 HLA II 类转基因而 H-2II 类基因敲除小鼠中,只出现了 HLA 限制性 CTL 免疫应答 (Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau, B., J Exp Med. 1997 Jun 16 ;185(12). 2043-51 ;Madsen L, Labrecque N, Engberg J, Dierich A, Svejgaard A, Benoist C, Mathis D, Fugger L., Proc Natl Acad Sci USA-1999 Aug 31 ;96(18) :10338-43)。事实上,与仍具内源性鼠 H-2I 类分子的 HLA-A2.1 转基因小鼠相比,HLA-A2.1 转基因而 H-2 类基因敲除 (KO) 小鼠表现出了达到增强 HLA-A2.1 限制性应答的能力。(Pascolo, S. et al. J Exp Med 185, 2043-2051 (1997) ;Ureta-Vidal, A., Firat, H., Perarnau, B. & Lemonnier, F. A. J Immunol 163, 2555-2560 (1999) ;Firat, H. et al., Int Immunol 14, 925-934 (2002) ;Rohrlich, P. S. et al., Int Immunol 15, 765-772 (2003))。根据小鼠是否缺乏 H-2II 类分子,本发明人对 HLA-DR1 转基因小鼠进行了类似的观察 (A. Pajot, 数据尚未发表)。另外,在缺乏鼠 MHC 分子竞争的情况下,HLA-A2.1 转基因而 H-2 类 /-KO 小鼠或 HLA-DR1 转基因而 H-2I 类 /-KO 小鼠只发生了 HLA 限制性免疫应答 (Pascolo, S. et al. J Exp Med 185, 2043-2051 (1997)) (A. Pajot, 数据尚未发表),促进了对 HLA 限制性 CD8+ 和 CD4+T 细胞应答的监控。但是,针对病原体的保护性免疫应答通常需要 T 辅助细胞和细胞毒性 CD8+T 细胞的协调合作,因而在单独的 HLA 类或 HLA II 类转基因小鼠身上进行研究,因为不可能在同一只小鼠身上同时进行 HLA I 类和 II 类人类免疫应答的评估。

[0014] 相应地,还需要有一种方便的动物模型系统用来对包含人类 CTL 抗原表位的候选人体疫苗的免疫原性进行测试,而且,在一些情况下,还需要高效 CD4+Th (辅助 T 淋巴细胞) 抗原表位来支持抗病毒和抗肿瘤 CD8+T 细胞活性 (A. J. Zajac, K. Murali-Krishna, J. N. Blattman and R. Ahmed, Curr Opin Immunol 10 (1998), p. 444 ;Firat H, Garcia-Pons F, Tourdot S, Pascolo S, Scardino A, Garcia Z, Michel ML, Jack RW, Jung O, Kosmatopoulos K, Mateo L, Suhrbier A, Lemonnier FA, Langlade-Demoyen P, Eur J Immunol 29, 3112, 1999)。另外,还需要有一种能允许同时对 CTL 应答、TH 应答 (尤其是 TH1 或 TH2 应答) 和体液应答之间的相互协调进行评估的系统。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明人已通过提供缺乏 H-2 I 类和 II 类分子,而具有 HLA-A2.1 和 HLA-DR1 分子的转基因小鼠,满足并超过了这种需要。具体地说,本发明提供了小鼠,其包含 (1) 突变的 H-2 I 类和 II 类分子;和 (2) 表达 HLA I 类转基因分子,或表达 HLA II 类转基因分子,或同时表达 HLA I 类转基因分子和 HLA II 类转基因分子。这些小鼠为构建对于人类具有最大体内免疫原性的疫苗的研制和优化提供了一种有用的模型。具体地说,这种小鼠使得在一种动物身上对免疫适应性应答的三大因素 (抗体、辅助细胞和细胞毒淋巴细胞) 的整体分析成为可能,也使得对疫苗针对抗原攻击的保护作用的评估成为可能。

[0017] 本发明中的小鼠缺乏 H-2 I 类和 II 类分子,具有 HLA I 类转基因分子和 HLA II 类转基因分子表达,代表了一种完全人化的,可用于同时检测抗原特异性抗体、抗原特异性 HLA-DR1 限制性 T 细胞应答和抗原特异性 HLA-A2 限制性 T 细胞应答的试验小鼠。这些小鼠将有助于研究 CTL 应答、TH 应答 (尤其是 TH1 或 TH2 应答),以及,任选地,体液应答之间的相互协调是如何进行的。这些小鼠代表了一种基础和应用疫苗学研究的最佳工具。

[0018] 本发明的第一种实施方式提供了一种包含断裂的 (disrupted) H2 I 类基因、断裂

的 H2 II 类基因和功能性 I 类或 II 类转基因的转基因小鼠。

[0019] 本发明的第二种实施方式提供了一种包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因的转基因小鼠。

[0020] 在一些实施方式中, HLA I 类转基因是 HLA-A2 转基因, 而 HLA II 类转基因是 HLA-DR1 转基因。在另一些实施方式中, HLA-A2 转基因包含序列表中提供的 HLA-A2 序列, 而 HLA-DR1 转基因包含序列表中提供的 HLA-DR1 序列。

[0021] 本发明的另一实施方式中还提供了缺乏 H2 I 类和 II 类分子, 但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因的转基因小鼠。在一个实施方式中, 小鼠具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IAβ° 基因型。在一些实施方式中, HLA-A2 转基因包含序列表中提供的 HLA-A2 序列, 而 HLA-DR1 转基因包含序列表中提供的 HLA-DR1 序列。

[0022] 本发明的另一实施方式提供了一种可同时确定候选抗原或抗原组中存在一种或多种抗原表位的方法, 其中所述一种或多种抗原表位可引起特异性体液应答、TH HLA-DR1 限制性应答和 / 或 CTRL HLA-A2 限制性应答。该方法包括: 将候选抗原或抗原组施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠, 或缺乏 H2 I 类和 II 类分子, 但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因, 并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IAβ° 基因型的转基因小鼠中; 测定小鼠体内对抗原的特异性体液应答; 测定小鼠体内对抗原的 TH HLA-DR1 限制性应答; 并测定小鼠体内对抗原的 CTRL HLA-A2 限制性应答。如在小鼠体内观察到对抗原的特异性体液反应, 说明抗原内存在引起体液应答的抗原表位。如在小鼠体内观察到对抗原的 TH HLA-DR1 限制性应答, 说明抗原中存在引起 TH HLA-DR1 限制性应答的抗原表位。如小鼠体内观察到对抗原的 CTRL HLA-A2 限制性应答, 说明抗原中存在引起 CTRL HLA-A2 限制性应答的抗原表位。

[0023] 在一些实施方式中, 试验方法包括对小鼠体内的对抗原的 Th1- 特异性应答和 Th2- 特异性应答进行测定。在这种情况下, 如在小鼠体内观察到对抗原的 Th1- 特异性应答, 说明存在引起小鼠体内对抗原的 Th1- 特异性应答的抗原表位, 而在小鼠体内观察到对抗原的 Th2- 特异性应答, 说明存在引起小鼠体内对抗原的 Th2- 特异性反应的抗原表位。

[0024] 本发明还提供一种确定在候选抗原或抗原组中存在 HLA DR1- 限制性 T 辅助细胞抗原表位的方法, 该方法包括: 将候选抗原或抗原组施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠, 或缺乏 H2 I 类和 II 类分子, 但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因, 并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IAβ° 基因型的转基因小鼠; 并测定小鼠体内对抗原的 TH HLA-DR1 限制性 T 辅助细胞抗原表位应答。如在小鼠体内观察到针对抗原 TH HLA-DR1 限制性 T 辅助细胞抗原表位应答, 说明抗原中存在引起 TH HLA-DR1 限制性 T 辅助细胞抗原表位应答的抗原表位。

[0025] 另外, 本发明提供了一种包含通过以上段落中的方法确定出的 HLADR1- 限制性 T 辅助细胞抗原表位的分离的抗原。在一些实施方式中, 该分离的抗原还包括引起体液应答的抗原表位和 / 或引起 CTRL HLA-A2 限制性应答的抗原表位。在一些实施方式中, 包含 HLADR1- 限制性 T 辅助细胞抗原表位的抗原包含多肽。在另一些实施方式中, 包含 HLA DR1- 限制性 T 辅助细胞抗原表位的抗原包含多核苷酸。在另一些实施方式中, 包含 HLADR1- 限制性 T 辅助细胞抗原表位的抗原包含 DNA、RNA, 或 DNA 和 RNA。

[0026] 另外,本发明提供了一种确定候选抗原或抗原组中是否存在 HLA-A2- 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 抗原表位的方法,该方法包括:将候选抗原或抗原组施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的小鼠中;并测定小鼠体内对该抗原或抗原组的 HLA-A2- 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答。如在小鼠体内观察到针对该抗原或抗原组的 HLA-A2- 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答,说明抗原或抗原组中存在引起 HLA-A2- 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答的抗原表位。

[0027] 本发明提供了一种包含通过以上段落中方法确定的 HLA-A2- 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 抗原表位的分离的抗原。在一些实施方式中,抗原还包含引起体液应答的抗原表位和 / 或引起 TH HLA-DR1 限制性 T 辅助细胞抗原表位应答的抗原表位。在一些实施方式中,包含 HLA-A2- 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 抗原表位的抗原包含多肽。在一些实施方式中,包含 HLA-A2- 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 抗原表位的抗原包含多核苷酸。在另一些实施方式中,包含 HLA-A2- 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 抗原表位的抗原包含 DNA、RNA、或 DNA 和 RNA。

[0028] 该发明还提供了一种比较由两种或两种以上的疫苗引起的 T- 辅助细胞应答的方法。这种方法包括:将第一种候选疫苗施用于包含断裂的 H2I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠中,并测量小鼠体内由该疫苗引起的 T- 辅助细胞应答;将第二种候选疫苗施用于包含断裂的 H2I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠中,并测量小鼠体内由 第二种疫苗引起的 T- 辅助细胞应答;将每种需要比较的其他候选疫苗分别施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠中,测量小鼠体内由该种疫苗引起的 T- 辅助细胞应答;通过比较每种疫苗所引起的 T- 辅助细胞应答,确定各种疫苗引起 T- 辅助细胞应答的能力。在一些实施方式中,T- 辅助细胞应答为 HLA-DR1 限制性应答。

[0029] 另外,本发明提供了一种比较由两种或两种以上疫苗引起的细胞毒性 T 淋巴细胞应答的方法。该方法包括:将第一种候选疫苗施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠中,并测量小鼠体内由第一种疫苗引起的细胞毒性 T 淋巴细胞应答;将第二种候选疫苗施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠中,并测量小鼠体内由第二种疫苗引起

的细胞毒性 T 淋巴细胞应答 ;将每种需要比较的其他候选疫苗分别施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠中,并测量小鼠体内由该种疫苗引起的细胞毒性 T 淋巴细胞应答 ;通过比较各种疫苗所引起的 T 细胞毒性细胞应答确定各种疫苗引起细胞毒性 T 淋巴细胞应答的能力。在一些实施方式中, T 细胞毒性细胞应答为 HLA-A2 限制性应答。

[0030] 另外,本发明提供了一种可同时比较由两种或两种以上疫苗引起的 T- 辅助细胞应答和细胞毒性 T 淋巴细胞应答的方法。该方法包括 :将第一种候选疫苗施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠中,并测量小鼠体内由第一种疫苗引起的 T- 辅助细胞应答和细胞毒性 T 淋巴细胞应答 ;将第二种候选疫苗施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠中,并测量小鼠体内由第二种疫苗引起的 T- 辅助细胞应答和细胞毒性 T 淋巴细胞应答 ;将每种需要比较的其他候选疫苗分别施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠中,测量小鼠体内由该种疫苗引起的 T- 辅助细胞应答和细胞毒性 T 淋巴细胞应答 ;通过比较每种疫苗所引起的 T- 辅助细胞应答和 T 细胞毒性细胞应答确定各种候选疫苗引起 T- 辅助细胞应答和细胞毒性 T 淋巴细胞应答的能力。在一些实施方式中, T- 辅助细胞应答为 HLA-DR1 限制性应答,而 T 细胞毒性细胞应答为 HLA-A2 限制性应答。

[0031] 本发明还提供了一种可同时确定在施用一种抗原或包含一种或多种抗原的疫苗后,小鼠体内的体液应答、T- 辅助细胞应答和细胞毒性 T 淋巴细胞应答的方法。该方法包括 :将抗原或包含一种或多种抗原的疫苗施用于包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型的转基因小鼠中,测定小鼠体内对该抗原或包含一种或多种抗原的疫苗的特异性体液应答,测定小鼠体内对该抗原或包含一种或多种抗原的疫苗的 T- 辅助细胞应答,测定小鼠体内对该抗原或包含一种或多种抗原的疫苗的细胞毒性 T 淋巴细胞应答。在一些实施方式中, T- 辅助细胞应答为 TH HLA-DR1 限制性应答。在一些实施方式中, T 细胞毒性细胞应答为 CTRL HLA-A2 限制性应答。

[0032] 基于预先选择的标准,本发明还提供了一种优化两种或两种以上用于人类的候选疫苗组合的方法。该方法包括同时确定小鼠在施用两种或两种以上候选疫苗组合后的体液应答、T- 辅助细胞应答和细胞毒性 T 淋巴细胞应答。通过向包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有

HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IAβ° 基因型的转基因小鼠中施用抗原或包含一种或多种抗原的疫苗,测定小鼠体内对抗原或包含一种或多种抗原的疫苗的特异性体液应答,测定小鼠体内对抗原或包含一种或多种抗原的疫苗的 T- 辅助细胞应答,测定小鼠体内对抗原或包含一种或多种抗原的疫苗的细胞毒性 T 淋巴细胞应答,并按照预先选择的标准根据测定结果选择最优疫苗。在一些实施方式中,两种或两种以上候选疫苗的不同之处仅在于疫苗中的抗原与佐剂的比例不同。在一些实施方式中,两种或两种以上候选疫苗的不同之处仅在于疫苗中佐剂的类型不同。

[0033] 另一方面,本发明提供了一种确定疫苗在施用于人体后是否存在引起自身免疫疾病风险的方法。该方法包括:将疫苗施用于包含断裂的 H2I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA-A2 转基因和功能性 HLA-DR1 转基因的转基因小鼠,或缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因,并具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IAβ° 基因型的转基因小鼠中,并测定小鼠体内的自身免疫应答。如观察到小鼠体内出现自身免疫应答,表明疫苗在施用于人体后存在引起自身免疫疾病的风险。

[0034] 本发明还提供了一种包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因和功能性 HLA I 类或 II 类转基因的分离的转基因小鼠细胞。

[0035] 另外,本发明提供了一种包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因的分离的转基因小鼠细胞。

[0036] 在一些实施方式中,HLA I 类转基因为 HLA-A2 转基因,而 HLA II 类转基因为 HLA-DR1 转基因。在另一些实施方式中,HLA-A2 转基因包含序列表中提供的 HLA-A2 序列,而 HLA-DR1 转基因包含序列表中提供的 HLA-DR1 序列。

[0037] 另外,本发明提供了一种缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因的分离的转基因小鼠细胞。在一些实施方式中,转基因小鼠细胞具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IAβ° 基因型。在另一些实施方式中,HLA-A2 转基因包含序列表中提供的 HLA-A2 序列,而 HLA-DR1 转基因包含序列表中提供的 HLA-DR1 序列。

附图说明

[0038] 本发明将结合以下图示进行更详细的描述:

[0039] 图 1 所示为转基因分子在细胞表面表达的流式细胞检测分析。(a) 取自 HLA-DR1- 转基因 H-2 II 类 -KO(DR1+CII-, 左侧)、HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因 H-2 I 类 -/II 类 -KO(A2+DR1+CI-CII-, 中) 和 HLA-A2.1- 转基因 H-2 I 类 -/KO(A2+CI-, 右侧) 小鼠的脾细胞,使用 FITC- 标记 W6/32(抗 -HLA-ABC, 横坐标) 或生物素化的 28-8-6S(抗 -H-2Kb/D^b, 纵坐标) m. Ab 染色,后者以 PE- 标记抗 -小鼠 Ig G 显色。(b) 从同种小鼠身上取得的 B220+ 脾 B 淋巴细胞,使用 FITC- 标记 L243(抗 -HLA-DR1, 上) 和 PE- 标记 AF6-120.1(抗 H-2IAβ^b, 下) m. Ab 染色。

[0040] 图 2 显示了具有指定基因型的小鼠体内 CD8⁺ 和 CD4⁺ 脾 T 细胞数量和 BV 片段的用途(基于免疫扫描分析)。(a) 取自 HLA-DR1- 转基因 H-2II 类 -KO(DR1+CII-, 左侧)、HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因 H-2 I 类 -/II 类 -KO(A2+DR1+CI-CII-, 中) 和 HLA-A2.1- 转基因 H-2 类 -/KO(A2+CI-, 右侧) 小鼠的脾细胞,使用 PE- 标记 CT-CD4(抗 -小鼠 CD4, 纵坐

标)和 FITC- 标记 53-6.7 (抗-小鼠 CD8,横坐标)m. Ab 染色。数字与 CD4+(左上部分)或 CD8+(右下部分)T 细胞在总的脾细胞中的百分比相对应。(b 和 c)用于 BV 片段家族(1-20)的提纯脾 CD8+(b)和 CD4+(c)T 细胞进行免疫扫描 TR-PCR 分析,采用正向 BV 家族(1-20)特异的和反向 BC 引物。有效重排的 BV 片段家族的典型图像包括一系列相差 3 个核苷酸的带高斯分布的波峰。该图示说明了使用具有 HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因 H-2 I 类-/II 类-KO 代表性小鼠的结果。

[0041] 图 3 所示为 HBs- 特异性抗体、细胞溶解及增殖应答。对 HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因 H-2 I 类/II 类-KO 小鼠进行 HBs Ag- 编码质体-DNA 肌肉注射免疫,并对进行和未进行免疫的小鼠分别进行测验。(a) 体液(上),细胞溶解(中)和增殖(下)应答及对典型性 HBsAg-DNA- 免疫小鼠的特异性对照组。对含有中小 HBV 包膜蛋白的 HBsAg 分子及 preS2₁₀₉₋₁₃₄ 肽进行的抗体(IgG)滴度在 ELISA 分析中得到确定。使用相关(HBsAg₃₄₈₋₃₅₇, HLA-A2.1- 限制性◆)或对照(HBsAg₃₇₁₋₃₇₈, H-2Kb- 限制性△;和 MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉, HLA-A2.1- 限制性□)肽脉冲的 RMA-S-HHD 靶细胞对不同效应器与靶器官(E/T)比率下的细胞溶解活动进行评估。使用相关(HBsAg₁₈₀₋₁₉₅, HLA-DR1- 限制性)或对照(HBsAg₁₂₆₋₁₃₈, H-2IAb- 限制性和 HIV 1 Gag₂₆₃₋₂₇₈, HLA-DR1- 限制性)肽对增殖应答进行测定。(b) 将 6 只(1-6) HBsAg-DNA- 免疫小鼠进行的抗体(IgG,上)、细胞溶解(中)和增殖(下)应答与 6 只初次接受试验的小鼠的平均应答(0)比较进行了类似评估。在以 HBsAg₃₄₈₋₃₅₇, 免疫显性(填充条带)或 HBsAg₃₃₅₋₃₄₃, 亚显性(subdominant)(灰色条带)肽脉冲的 RMA-S-HHD 靶细胞上检测到 E/T 比率为 30/1 的细胞溶解活性。

[0042] 图 4 显示了保护分析的结果。使用编码 HBsAg 的质粒 DNA 对 HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因 H-2I 类/II 类-KO 小鼠进行(对照组不进行)两次免疫。最后一次免疫完成 15 天后,使用表达 HBsAg 或 HBx 蛋白的 10⁷PFU 的 rVV 对小鼠进行腹膜内攻击。4 天后,对这些小鼠分别进行卵巢内病毒滴度测试。给出了 rVV-HBsAg(I, n = 10) 攻击的 HBsAg-DNA- 免疫小鼠, rVV-HBsAg(N, n = 6) 攻击的初次试验的小鼠、rVV-HBx(Ix, n = 6) 攻击的 HbsAg- 免疫小鼠和 rVV-HBx(Nx, n = 6) 攻击的初次试验小鼠的结果(rVV PFU/ 卵巢,以 log₁₀ 表示)。

[0043] 图 5 显示了 pcmv S2/S 免疫后的 HLA-A2+DR1+CI-CII- 小鼠的 AC 抗-pre S2 应答。

[0044] 图 6 显示了 pcmv S2-S 免疫后的 HLA-A2+DR1+CI-CII- 小鼠对 HLA-A2 限制性抗原表位的 T CD4 增殖应答。

[0045] 图 7 显示了 pcmvS2/S 免疫后的 HLA-A2+DR1+CI-CII- 小鼠对 HLA-A2 限制性 HBS(348-357) 抗原表位的 CD8T 细胞的细胞毒性应答。序列

[0046] SEQ ID NO:1 包含以下部分:核苷酸 1-1205 包含 HLA-A2 启动子;核苷酸 1206-1265 HLA-A2 引导序列;核苷酸 1266-1565 为人 β2 微球蛋白 cDNA;核苷酸 1566-1610(Gly4Ser)₃ 接头;核苷酸 2441-4547,为含有 HLA-A2 外显子 2 和部分内含子 3 的片段;核苷酸 2441-4547,为含有部分内含子 3、外显子 4-8 和部分 H2D^b 基因 3' 非编码区域的片段。

[0047] SEQ ID NO:2 是 DRA*0101 基因的核苷酸序列。核苷酸 1-15279 是定位于 HLA-DR alpha 基因 5' 的启动子,核苷酸 15280-15425 是外显子 1,核苷酸 15344-15346 是 ATG

起始密码子,核苷酸 17838-18083 是外显子 2,核苷酸 18575-18866 是外显子 3,核苷酸 19146-19311 是外显子 4,核苷酸 20008-20340 是外显子 5。

[0048] SEQ ID NO :3 是 DRB1*010101 基因的核苷酸序列。核苷酸 7391-7552 是外显子 1,核苷酸 7453-7455 是 ATG 起始密码子,核苷酸 15809-16079 是外显子 2,核苷酸 19536-19817 是外显子 3,核苷酸 20515-20624 是外显子 4,核苷酸 21097-21121 是外显子 5,核苷酸 21750-22085 是外显子 6。

[0049] 发明详述

[0050] 除非特别说明,本发明的实践将采取细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的传统技术。这些技术在以下文献中进行了详细的解释。例如:Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. By Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U. S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson and M. Simon, eds. -in-chief, Academic Press, Inc., New York), specifically, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.) and Vol. 185, " Gene Expression Technology " (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes V (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); and Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986)。

[0051] 本发明提供了包含 (1) 突变型 H-2 I 类和 II 类分子和 (2) 表达 HLA I 类转基因分子、或 HLA II 类转基因分子、或 HLA I 类转基因分子和 HLA II 类转基因分子的小鼠。本发明中的缺乏 H-2 I 类和 II 类分子,并具有 HLA I 类和 II 类转基因分子表达的小鼠代表了一种完全人化的实验性小鼠,可用于同时检测是否存在抗原-特异性抗体、抗原-特异性 HLA-DRI 限制性 T 细胞应答及抗原-特异性 HLA-A2 限制性 T 细胞应答。这些小鼠有助于研究 CTL 应答、TH 应答 (尤其是 TH1 或 TH2 应答) 和,任选地,体液应答之间的相互协调是如何进行的。这些小鼠为基础以及应用疫苗学研究提供了最佳工具。

[0052] 本发明提供了一种包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因和功能性 HLA I 类或 II 类转基因的小鼠。在一些实施方式中,转基因小鼠包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因。这种小鼠可以说是一种完全人化的试验小鼠,因为它可被用于同时检测抗原-特异性抗体,抗原-特异性 HLA-DRI 限制性 T 细胞应答和抗原-特异性 HLA-A2 限制性 T 细胞应答是否存在。

[0053] 部分如此处提供的实施例所示,并且每个专业人士通常都能从本发明中清楚看到的是:HLA-A2.1-/HLA-DRI-转基因 H2-I/II 类-KO 小鼠具有通过 DNA 免疫产生 HBsAg-特异

性抗体、CD4⁺ 辅助细胞和 CD8⁺ 溶细胞 T 细胞应答的能力。这些在每个单独受试小鼠身上观察到的应答指向的是和人类应答一样的免疫显性表位,并且表现为免疫动物对 HBsAg 重组体疫苗病毒的特异性保护。

[0054] T 辅助细胞对于抗体应答的完全成熟 (Katz, D. H. & Benacerraf, B., *Adv Immunol* 15, 1-94 (1972)), 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 激发的针对很多表位的应答 (von Boehmer, H. & Haas, W., *J Exp Med* 150, 1134-1142 (1979); Keene, J. A. & Forman, J., *J Exp Med* 155, 768-782 (1982)), 以及 CTL 长期维护都很至关重要 (Matloubian, M., Concepcion, R. J. & Ahmed, R., *J Virol* 68, 8056-8063 (1994))。两种抗体 (Lefrancois, L., *J Virol* 51, 208-214 (1984)) 以及 CTL (Zinkernagel, R. M. & Welsh, R. M., *J Immunol* 117, 1495-1502 (1976)) 都是抵抗病毒感染的保护性免疫的关键成分。实际中,有效的 HBsAg- 特异性抗体和 CTL 应答在 HLA-A2.1/HLA-DR1- 双转基因、H-2 I 类 /II 类 -KO 小鼠身上观察到,而并没有在 HLA-A2.1- 单转基因 H-2I/II = KO 小鼠身上观察到。因此,HBsAg- 特异 CD4⁺T 辅助细胞对于产生有效的 HBsAg- 特异性 CTL 和抗体应答很重要。这些结果与在 HBsAg- 免疫小鼠 (Milich, D. R., *Semin Liver Dis* 11, 93-112 (1991)) 及 HBsAg- 接种的人上 (Celis, E., Kung, P. C. & Chang, T. W., *J Immunol* 132, 1511-1516 (1984)) 进行的研究相符,提示抗 -HBs 抗体应答的产生取决于 CD4⁺T 细胞。

[0055] 表达 HLA-A2.1 I 类和 HLA-DR1 II 类分子的转基因小鼠已经产生 (BenMohamed, L. et al. *Hum Immunol* 61, 764-779 (2000))。作者提出 HLA-A2.1 和 HLA-DR1 分子都是体内功能性限制性元件,HLA-DR1 转基因的产物能增强 HLA-A2.1 限制性抗原 - 特异性 CTL 应答。但是,发生在小鼠上的这些免疫应答,其于人类的关联性被以下事实削弱了: 这些小鼠仍然表达出它们自身的 H-2 I 类和 II 类分子,通常这些被优先并常常是专门作为对抗原的限制性元件使用 (Ureta-Vidal, A., Firat, H., Perarnau, B. & Lemonnier, F. A., *J Immunol* 163, 2555-2560 (1999); Rohrllich, P. S. et al., *Int Immunol* 15, 765-772 (2003)) (A. Pajot, 数据尚未发表)。此处描述的发明通过提供 HLA-A2.1/HLA-DR1- 转基因、H-2 I 类 /II 类 -KO 小鼠克服了该限制。

[0056] 在一些实施方式中,HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因、H-2 I 类 /II 类 -KO 小鼠在 β 2m-KO 背景下表达 HLA-A2.1 单链,其中的人类 β 2m 通过肽键与 HLA-A2.1 重链通过共价键相连。H-2IA β^b 基因失活,使得它们还缺乏在细胞表面传统表达的 H-2 IA 和 IE II 类分子,因为在 H-2b 单倍体中 H-2IEa 是假基因。此处提供的结果说明这种小鼠不具有 H-2 I 类和 II 类分子的细胞表面表达。但是,在一例报告中指出,自由 I 类重链,尤其是 H-2D^b,可能存在于 β 2m-KO 小鼠细胞表面,并可能引起同种异体反应性应答。即便如此,由于这种小鼠缺乏多肽,它们不会干扰抗原 - 特异性免疫应答 (Bix, M. & Raulet, D., *J Exp Med* 176, 829-834 (1992))。这一点在 Allen et al 的报告中得到了支持 (Allen, H., Fraser, J., Flyer, D., Calvin, S. & Flavell, R., *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 7447-7451 (1986)), 该报告确认即使细胞内不呈现 β 2m 表达,细胞表面也存在 H-2D^b 表达,但这种 D^b 抗原不会被 D^b- 异种特异性或 D^b- 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞识别。另外, D^b 抗原不能被大多数天然 D^b 的单克隆抗体识别。

[0057] 尽管如此,在 HLA-DR α 单转基因小鼠中,非传统 HLA-DR α /H-2IE β^b 杂交复合体可某种程度地在细胞表面进行表达,至少在缺乏 HLA-DR β 链时 (Lawrance, S. K. et al.,

Ce11 58,583-594(1989))。除开这些发现,即使使用会同这些杂交分子发生反应的 mAb(17-3-3S),采用血清学的方法也未在 HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因、H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠的细胞表面测出这些非传统分子 (Ozato, K., Mayer, N. & Sachs, D. H., J Immunol 124, 533-540(1980)) (图 1a 和数据未被显示)。另外,对这些小鼠的 HBsAg- 特异性和 HIV 1-Gag- 特异性 T 细胞应答的研究结果均表明 HLA-A2.1 和 HLA-DR1 分子作为限制性元件的专门用途。这说明非传统 HLA-DR α /H-2IE β^b 杂交分子不如传统 HLA-DR α /HLA-DR β 分子稳定,而且它们可能只存在于缺少 HLA-DR β 链的情况中。采用整个 (H-2IA β^b 、IA α^b 、IE β^b)H-2II 类基因区域以及 H-2D b 基因被删除的小鼠菌株进行分析,以完全排除此可能性。对取自第一种动物的脾细胞的初步分析显示出与在 HLA-DR1- 转基因 H-2II 类 -KO (I α β^{bo}) 小鼠身上所观察到的类似的 CD4+T 细胞池再生,提示这些小鼠的 HLA-DR1- 限制性 CD4+T 细胞应答与 HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因、H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠的等同。

[0058] 与亲代 HLA-A2.1- 转基因 H-2 I 类 -KO 小鼠相比,HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因, H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠的外周 CD8+T 淋巴细胞从数量和质量上都与完全多样化类似,至少在 T 细胞受体 (TCR)BV 基因片段的利用方面。与野生动物相比,部分恢复,尤其是 CD8+T 细胞池的部分恢复,一直是对具有嵌合 (原小鼠的 $\alpha 3$ 结构域)HLA-A2.1 分子表达的单 HLA- 转基因小鼠的一个观察对象。不管 $\alpha 3$ 结构域的置换,小鼠的 CD8 与 HLA-A2.2 分子之间也具有次最优的相互作用,因为 Co- 晶体分析表明人类 CD8 也与 HLA-A2.1 重链 $\alpha 2$ 结构域相互接触 (Gao, G. F. et al., Nature 387,630-634(1997))。次最优的协同作用还可能在内质网中发生,在内质网中,许多分子 (TAP, tapasine, ERp 57) 参与 MHC I 类分子的生物合成。但是,在这个阶段,文献唯一报道的这些小鼠和人类内质网分子的功能性差异 (即人类的有效转运,而不是羧基末端带有正电荷的小鼠细胞溶质肽 TAP) (Momburg, F., Neefjes, J. J. & Hammerling, G. J., Curr Opin Immunol 6,32-37(1994)) 与通过疏水的 C- 末端结合肽的 HLA-A2.1 分子无关,既然这些肽被小鼠和人类 TAP 有效地转运。尽管 CD8+T 淋巴细胞的数目在单 HLA-A2.1 转基因, H-2 类 -/KO 小鼠和 HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因 H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠中较低,然而它们在抗 HBsAg 方面起着有效的作用,并且,重要的是,后一种小鼠可产生与人类类似的抗体、辅助细胞和细胞溶解等淋巴细胞应答。

[0059] 妨碍基于 T 抗原表位的针对 T 淋巴细胞的疫苗设计的困难之一是 HLA I 类 /II 类分子多态性。HLA-A2.1 和 HLA-DR1 分子在人类个体中具有显著比例的表达 (HLA-A2.1 : 30-50%, HLA-DR1 :6-18%)。尽管已知 HLA I 类分子超家族中功能簇是基于呈递的肽³⁴ 组的显著重复,但对由各种 HLA I 类同型或等位变体引起的应答的个体分析中,确定其最佳抗原表型仍然是迫切期望的。这对于设计新的监控免疫应答的试剂,例如四聚体 fHLA-I 类或 HLA-II 类) 尤其重要。由于同样的原因,获取具有 HLA-A2.1 和其它 HLA II 类分子共同表达的小鼠菌株很有帮助,即使肽与 HLA II 类分子的连接比与 I 类分子的限制少。基于此处的结论,更多的 HLA I 类 /II 类转基因 H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠可被设计作为这些以及其它目的。

[0060] 尽管 HLA- 转基因 H-2-KO 小鼠使得进行可很好的可移置于人的抗原肽的免疫原性的详细分析和优化成为可能 (Rohrlich, P. S. et al., Int Immunol 15,765-772(2003); Loirat, D., Lemonnier, F. A. & Michel, M. L., JImmunol 165,4748-4755(2000); Scardino,

A. et al., Eur J Immunol 31,3261-3270(2001)),但这对于疫苗佐剂组成的研究的作用并不明显。这可能是由于两种物种之间在抗原激发的反应早期多种启动的效应器的不同引起的。将来,不断增加对先天免疫方面的基础知识的认识,可能有助于更加完善小鼠免疫系统的人类化。

[0061] 总之,本发明描述了一种优化的、人类化转基因小鼠模型,小鼠中的 H-2 I 类 (小鼠 $\beta 2m$) 和 II 类 (H-2 IA β^b) 基因被删除并被相应的人类基因 HHD(HLA-A*0201), HLA-DRA*0101 和 HLA-DRB1*0101 替代。HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因 H-2I 类 -/II 类 -KO 小鼠的细胞免疫完全由人类 HLA 分子所限制,完全不具备鼠 MHC 分子所限制的免疫应答。缺少鼠类 MHC 和人类 (转基因) HLA 免疫应答之间的竞争使得可以用这种小鼠来确定人类疫苗的表位,人类疫苗需要 HLA- 限制性 CD4+T 辅助细胞和 HLA- 限制性 CD8+T 溶细胞性细胞之间的合作。

[0062] “HLA”是人类 MHC 复合物,而“H-2”是小鼠 MHC 复合物。人类复合物包括三种 I 类 α -链基因,HLA-A、HLA-B 和 HLA-C,和三对 MHC II 类 α -和 β 链基因:HLA-DR、-DP 和 -DQ。在许多单倍体中,HLA-DR 簇包含一种额外的 β 链基因,其产物可与 DR α 链配对,因此这三组基因可生成四种 MHC II 类分子。在小鼠中,这三种 I 类 α -链基因为 H-2-L、H-2-D 和 H-2-K。小鼠 MHC II 类基因为 H-2-A 和 H-2-E。

[0063] 已知,作为多态性 HLA 抗原和不同 HLA 等位基因的结果,不同个体的 HLA 基因之间存在遗传差异。相应地,本发明所述的实施方式中的多态性 HLA 抗原或 HLA 等位基因可能会从一种换为另一种。HLA 多态现象和等位基因的例子可在以下地方找到:例如:<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/data.Html>、<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>、Genetic diversity of HLA:Functional and Medical Implication,Dominique Charon(Ed.),EDK Medical and Scientific International Publisher, and The HLA FactsBook, Steven G. E. Marsh, Peter Parham and Linda Barber, AP Academic Press, 2000。

[0064] “断裂的 (disrupted)”基因是一种通过同源重组或其它已知方法进行突变的基因。断裂的基因可能是基因的下效等位基因或基因的无效等位基因。专业人员将发现将要使用的等位基因的类型,并根据任何特定的环境进行选择。在本发明的许多实施方式中,优选的是无效等位基因。

[0065] “同源重组”是一种通用的对预先选中的、需要的细胞基因序列进行靶向突变,以得到转基因动物的方法 (Mansour, S. L. et al., Nature 336 :348-352(1988);Capecchi, M. R., Trends Genet. 5 :70-76(1989);Capecchi, M. R., Science 244 :1288-1292(1989);Capecchi, M. R. et al., In:Current Communications in Molecular Biology, Capecchi, M. R. (ed.), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), pp. 45-52;Frohman, M. A. et al., Cell 56 :145-147(1989))。

[0066] 现在,想要改变小鼠的任何基因都是可行的 (Capecchi, M. R., Trends Genet. 5 :70-76(1989);Frohman, M. A. et al., Cell 56 :145-147(1989))。基因打靶涉及到标准 DNA 重组技术的使用,以将所需的突变引入到选中的基因座中的克隆 DNA 序列。随后,这种突变再通过同源重组传入多能胚胎源性干细胞 (ES) 的基因组中。改变后的干细胞通过显微注射进入小鼠胚泡中并成为发育中的小鼠胚胎的一部分,最终形成嵌合体动物。在有的情况下,该嵌合体动物的生殖谱系细胞将从遗传改变的 ES 细胞分化而来,于是突变的基因型可

以通过生育来进行传递。

[0067] 基因打靶已被用于培育将 nptII 基因嵌入 $\beta 2$ -微球蛋白基因座的嵌合体和转基因小鼠 (Koller, B. H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 86 :8932-8935(1989) ; Zijistra, M. et al., Nature 342 :435-438(1989) ;Zijfstra, M. et al., Nature 344 :742-746(1989) ;DeChiaba et al., Nature 345 :78-80(1990))。类似的试验可用于培育包含被嵌入 nptII 基因破坏的 ac-abl 基因的嵌合体和转基因动物 (Schwartzberg, P. L. et al., Science 246 :799-803(1989))。这种技术被用于培育 en-2 基因被嵌入的 nptII 基因打断的嵌合体小鼠 (Joyner, A. L. et al., Nature 338 :153-155(1989))。

[0068] 采用“基因打靶”方法,必须对兴趣基因预先进行克隆,并确定内含子及外显子边界。这种方法的结果是将标志基因(如:nptII 基因)嵌入感兴趣的特定基因的转译区。这样,使用基因打靶方法就造成了对感兴趣的基因的破坏。

[0069] 使用基因打靶来改变细胞的基因显著地引起了该基因序列结构的变化。基因打靶的效果取决于一系列的可变因素,并且根据结构不同而不同。

[0070] 本发明中的嵌合体或转基因动物细胞通过向细胞(可能是前体多能细胞,如 ES 细胞,或者同等细胞)中引入一种或多种 DNA 分子制备的 (Robertson, E. J., In :Current Communications in Molecular Biology, Capecchi, M. R. (ed.), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), pp. 39-44)。“前体”只是表明多能细胞是所需要的(转染的)多能细胞的前体,是按照本发明的指导来培育的。多能(前体或转换后的)细胞可以按照已知的方法 (Evans, M. J. et al., Nature 292 :154-156(1981)) 在体内进行培育以形成嵌合体或转基因动物。

[0071] 任何 ES 细胞都可以按照本发明的指导使用。但是,优先选择 ES 细胞的原代分离株。这种初期分离细胞可直接从胚胎中获得,如 CCE 细胞株 (Robertson, E. J., In :Current Communications in Molecular Biology, Capecchi, M. R. (ed.), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), pp. 39-44), 或从 CCE 细胞株中的 ES 细胞克隆分离株中得来 (Schwartzberg, P. A. et al., Science 246 :799-803(1989), 将该文通过引用并入本文)。这种克隆分离株可根据 E. J. Robertson 的方法 (In :Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells :A Practical Approach, (E. J. Robertson, Ed.), IRL Press, Oxford, 1987) 来实现,该参考和方法均在此引用作为参考。这种克隆繁殖的目的是为了获得能够高效分化形成动物的 ES 细胞。同源选择的 ES 细胞形成转基因动物的效率是 CCE 祖细胞株的约 10 倍。对于本发明中重组方法的目的,克隆选择不具有优势。

[0072] 从胚胎中克隆获得的 ES 细胞株的一个例子是 ES 细胞株, AB1 (hpert+) 或 AB2. 1 (hpert-)。ES 细胞最好是在基质细胞(如 STO 细胞(尤其是 SNC4STO 细胞)和/或原代胚胎成纤维细胞)上进行培育。如 E. J. Robertson 所描述的那样 (In :Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells :A Practical Approach, (E. J. Robertson, Ed.), IRL Press, Oxford, 1987, pp 71-112), 在此引用作为参考。嵌合小鼠的培育和分析方法在 Bradley, A 的文献中进行了介绍 (In :Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells :A Practical Approach, (E. J. Robertson, Ed.), IRL Press, Oxford, 1987, pp 113-151), 在此引用作为参考。基质(和/或成纤维)细胞的作用是消灭异常 ES 细胞的克隆性生长。最好是在存在白细胞抑制因子("lif")的环境中培育细胞 (Gough, N. M. et al., Reprod. Fertil.

Dev. 1 :281-288(1989) ;Yamamori, Y. et al., Science 246 :1412-1416(1989), 在此引用作为参考)。既然基因编码 *lif* 已被克隆 (Gough, N. M. et al., *Reprod. Fertig. Dev.* 1 :281-288(1989)), 特别建议根据已知的方法, 用这种基因来转化基质细胞, 然后在转化后的可分泌 *lif* 入培养基的基质细胞上培育 ES 细胞。

[0073] 本处使用的“转基因”指的是部分或完全异源的核酸序列, 即, 与它所引入的转基因动物或细胞完全异质, 或与被引入的转基因动物或细胞的内源基因同源, 但将被或已被嵌入动物基因组以改变被嵌入细胞的基因组的核酸序列 (如: 被嵌入与自然基因不同的部位或其嵌入造成基因缺失)。转基因可以通过操作与一种或多种转录调节序列和任何其它能最佳表达所选核酸而所需的核酸 (如内含子) 相连。本发明的示范转基因编码含有 H-2 多肽。其它示范转基因被用于通过与 HLA 基因的基因组序列同源重组来破坏一种或多种 HLA 基因。

[0074] “功能性转基因”是产生 mRNA 转录物, 这种转录物又能在包含转基因的小鼠的至少一个细胞中生成适当处理的蛋白质的基因。专业人员将发现到各种已知转录调节元件和指导转录后处理的序列提供了很多指导宿主小鼠表达转基因的选择。在本发明的许多实施方式中, 在 H-2 基因调节元件控制下进行 HLA 转基因表达可被优先考虑。

[0075] 在一些实施方式中, HLA I 类转基因是 HLA-A2 转基因, 而 HLA II 类转基因是 HLA-DR1 转基因。HLA-A2 转基因的一个例子是一种包含序列表中提供的 HLA-A2 序列的基因。HLA-DR1 转基因的一个例子是一种包含序列表中提供的 HLA-DR1 序列的基因。

[0076] 在一个实施方式中, 本发明提供了一种缺乏 H2I 类和 II 类分子, 但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因的转基因小鼠。在一些实施方式中, 小鼠具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型。在其它实施方式中, HLA-A2 转基因包含序列表中提供的 HLA-A2 序列, 而 HLA-DR1 转基因包含序列表中提供的 HLA-DR1 序列。

[0077] 本发明还提供了分离的转基因小鼠细胞。在有的情况中的细胞包含断裂的 H2 I 类基因、断裂的 H2 II 类基因和功能性 HLA I 或 II 类转基因。在另一些情况中, 细胞包含断裂的 H2 I 类基因, 断裂的 H2 II 类基因、功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因。HLA I 类转基因可以是 HLA-A2 转基因, 而 HLA II 类转基因可以是 HLA-DR1 转基因。在一些情况中, HLA-A2 转基因包含序列表中提供的 HLA-A2 序列, 而 HLA-DR1 转基因包含序列表中提供的 HLA-DR1 序列。

[0078] 在一个实施方式中, 本发明提供了一种缺乏 H2 I 类和 II 类分子, 但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因的分离的转基因小鼠细胞。这种分离的转基因小鼠细胞包含 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型。HLA-A2 转基因可包含序列表中提供的 HLA-A2 序列, 而 HLA-DR1 转基因可包含序列表中提供的 HLA-DR1 序列。

[0079] 本发明中的分离的转基因小鼠细胞可具有本发明中的任何小鼠的基因型。但是, 本发明中的分离的小鼠细胞的基因型和本发明中小鼠的基因型不需要完全重叠。

[0080] 本发明中的分离的小鼠细胞从小鼠或小鼠胚胎中获得。在一个实施方式中, 小鼠或小鼠胚胎具有与将要获取的细胞一样的基因型。在另一个实施方式中, 小鼠或小鼠胚胎具有与将要获得的细胞不同的基因型。当细胞从小鼠或小鼠胚胎中获得后, 细胞的基因可以通过如同源重组的方法破坏。另外, 功能性转基因可通过, 如转染的方法被引入细胞的基因组中。专业人员将发现任何已知的适当的方法都可被用于修改细胞的基因组, 并由

此获得具有理想基因型的分离的小鼠细胞。

[0081] 本发明的另一个目标是缺乏 H2 I 类和 II 类分子,但包含功能性 HLA I 类转基因和功能性 HLA II 类转基因的分离的转基因小鼠细胞。在一些实施方式中,转基因小鼠细胞具有 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β 2m° IA β ° 基因型。在其它实施方式中,HLA-A2 转基因包含序列表中提供的 HLA-A2 序列,而 HLA-DR1 转基因包含序列表中提供的 HLA-DR1 序列。

[0082] T 细胞在获得性免疫的很多方面都具有重要的作用,实现了多种调节和防御功能。当有的 T 细胞遇到感染或癌性细胞,它们会将其视为外来物并发挥杀手细胞的作用,作为细胞性免疫应答的一部分,杀死宿主本身的细胞。其它 T 细胞,如 T 辅助细胞,将通过刺激 B 细胞产生抗体 或者抑制体液或细胞免疫应答的某些方面,而对外来抗原作出应答。

[0083] T 辅助细胞 (Th) 通过产生细胞因子协调多数免疫应答。尽管通常可根据携带 CD4 细胞表面标记物识别,这些细胞根据它们生成的细胞因子和它们对于免疫系统的其它细胞的影响,从功能上被分为 Th1 或 Th2 亚群。

[0084] Th1 细胞通过被称为 T 细胞抗原受体的识别系统检测入侵的病原体或癌性宿主细胞。被称为细胞免疫的 Th1- 相关免疫过程通常涉及非 -B 细胞的激活作用,并常常以生成 IFN-γ 作为特征。但是,尽管 Th1 系统基本上独立于体液性抗体的生成,Th1 细胞因子确实促进了向 IgG2a 同种型的免疫球蛋白转换。

[0085] 检测到外来抗原后,大多数成熟的 Th1 细胞将指导释放出 IL-2、IL-3、IFN-γ、TNF-β、GM-CSF、高水平的 TNF-α、MIP-1α、MIP-1β 和 RANTES。这些细胞因子将促进迟发型超敏反应和普通细胞介导免疫。例如:IL-2 是一种细胞生长因子,它可促进对初期检测出来的特定的抗原敏感的 T 细胞克隆的生成。致敏 T 细胞附在细胞上并攻击带有这种抗原的细胞或病菌。

[0086] 相反,成熟的 Th2 细胞可促进 IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、GM-CSF 和低水平 TNF-α 的分泌。另外,Th2 应答通过激活 B 细胞、刺激抗体的生成和分泌、以及引导向 IgA、IgG₁ 和 IgE 同种型的类型转换来促进体液免疫。

[0087] 此处使用的“抗原”包含:1) 至少一种 HTL 抗原表位、或 2) 至少一种 CTL 抗原表位、或 3) 至少一种 B 细胞抗原表位、或 4) 至少一种 HTL 抗原表位和至少一种 CTL 抗原表位、或 5) 至少一种 HTL 抗原表位和至少一种 B 细胞抗原表位、或 6) 至少一种 CTL 抗原表位和至少一种 B 细胞抗原表位、或 7) 至少一种 HTL 抗原表位和至少一种 CTL 抗原表位和至少一种 B 细胞抗原表位。“候选抗原”是一种处于调查阶段,确定其是否能作为抗原的分子。

[0088] “体液免疫应答”是一种抗体 - 介导的特异性免疫。

[0089] “抗原表位”是被免疫系统识别出来的抗原上的一个位点。抗体抗原表位是被抗体识别出来的抗原上的一个位点。T- 细胞抗原表位是抗原上与 MHC 分子相连的一个位点。TH 抗原表位是与 MHC II 类分子相连的位点。CTL 抗原表位是与 MHC I 类分子相连的位点。

[0090] 抗原可以包含多肽序列或多核苷酸序列(可含有 RNA、DNA、或 RNA 和 DNA)。在一个实施方式中,抗原至少包含一种编码包含一种或多种抗原多肽的多核苷酸序列。在本文中,“包含”指的是宿主细胞的转录和 / 翻译工具通过与编码至少一种抗原多肽的外源多核苷酸提供了至少一种抗原多肽。如以下专利中所描述:U. S. 专利 No. 6, 194, 389 and 6, 214, 808。

[0091] 本发明中的抗原可以是任何抗原分子。抗原分子包括:蛋白质、脂蛋白、糖蛋白(包括病毒的、细菌的、寄生的、动物)和真菌蛋白(如白蛋白、破伤风毒素、破伤风毒素、百

日咳菌、细菌外膜蛋白（包括脑膜炎球菌外膜蛋白）、RSV-F 蛋白、疟疾衍生肽、B- 乳球蛋白 B、抑酞酶、卵白蛋白、溶菌酶和肿瘤相关抗原（如癌胚抗原（CEA）、CA 15-3、CA125、CA19-9、前列腺特异性抗原（PSA）和 TAA 复合物（U. S. 专利 No. 5, 478, 556, 在此全文引用作为参考）；碳水化合物（包括天然的和合成多糖以及其它聚合物，如聚蔗糖、葡聚糖、羧甲基纤维素、琼脂糖、聚丙烯酰胺和其它丙烯酸树脂、丙交酯 - 乙交酯共聚物、聚乙烯醇、局部水解聚醋酸乙烯酯、polyvinyl pyrrolidone、B 类葡萄球菌和肺炎球菌荚膜多糖（包括 III 型）、铜绿假单胞菌胞外粘液多糖和荚膜多糖（包括 fisher type I）和流感（嗜血）杆菌多糖（包括 PRP）；半抗原和其它包含低分子量分子，如 TNP、糖、低聚糖、多糖、肽、毒素、药物、化学药品和变应原；以及从细菌、立克次（氏）体、真菌、病毒、寄生虫中衍生出来的半抗原和抗原，包括白喉、百日咳、破伤风、乙型流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、大肠杆菌、克雷白（氏）杆菌属、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、脑膜炎双球菌、脊髓灰质炎、腮腺炎、麻疹、风疹、呼吸道合胞病毒、狂犬病、伊波拉出血症、炭疽、李斯特菌属、甲 / 乙 / 丙型肝炎、I 类 / II 类人免疫缺陷症病毒、1/2 型单纯性疱疹、巨细胞病毒、EB 病毒（非洲淋巴细胞瘤病毒）、水痘带状疱疹、疟疾、结核、白色念珠菌和其它念珠菌属、卡氏肺孢子虫、支原菌、A/B 流行感冒病毒、腺病毒、A 组链球菌属、B 组链球菌属、假单胞菌 *aeruginosa*、鼻病毒属、利什曼原虫属、1/2/3 型副流感、冠形病毒、门（氏）菌、志贺（氏）杆菌、轮状病毒、弓形体属、肠道病毒，和沙眼衣原体和肺炎衣原体。

[0092] 此处的药物合剂或疫苗包含至少一种免疫组分，这种组分能溶解、悬浮或与药学上可接受的载体相结合。任何药学上可采用的载体都能被用于给药。合适的药物载体在下文中进行了描述：Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (A. Gennaro, ed., 1990) Mack Pub., Easton, Pa., 在此将其全文通过引用并入本文。载体可以是无菌液体，如水、聚乙二醇、二甲基亚砷（DMSO）、油（包括石油、动物油、植物油、花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等）。载体可以以雾状、喷雾剂、粉状、蜡状、膏状、栓剂、埋植剂、对氧水杨酸钠、软膏、片状、敷剂、膜状或化妆品制剂的形态存在。

[0093] 药物合剂或疫苗的适当组成取决于所选择的给药途径。例如：当通过单次快速静脉注射或连续输注进行静脉给药时，药物最好是水溶性的，并且最好选择盐水作为载体。对于经皮、鼻内、口腔、胃、阴道内、直肠内或其它通过粘膜给药，可选择适当的能透过屏障的渗透剂作为药物成分。对于口服给药，活性成分可与适于加入片剂、丸剂、糖衣片、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆剂、混悬液的载体结合使用。时间敏感的给药系统也可用于本发明的合剂给药。代表系统包括：聚合物基材系统，如聚（丙交酯糖苷）、copolyoxalates、聚己酸内酯、聚酯酰胺、多正酯类、聚-3-羟基丁酸和聚酞。这些及类似聚合物可根据已知的方法（如 U. S. 专利 No. 5, 075, 109 中的方法，在此全文引用作为参考）制成微包囊。适于本发明中的免疫刺激复合物的多选择给药系统包括在以下专利中提到的方法：U. S. 专利 No. 6, 194, 389, 6, 024, 983, 5, 817, 637, 6, 228, 621, 5, 804, 212, 5, 709, 879, 5, 703, 055, 5, 643, 605, 5, 643, 574, 5, 580, 563, 5, 239, 660, 5, 204, 253, 4, 748, 043, 4, 667, 014, 4, 452, 775, 3, 854, 480, 和 3, 832, 252（在此均全文应用作为参考）。

[0094] 葡萄糖水溶液和甘油溶液也可被作为液体载体使用，尤其是用于注射液和气溶胶溶液。对于通过气溶胶（使用自动喷雾罐或喷雾器）给药，专业人员可酌情加入适当的喷射剂。免疫复合物中还可以加入增溶剂、乳化剂、稳定剂；分散剂、调味剂；佐剂；载体；局麻

剂（如赛鲁卡因、利多卡因等）；抗生素或其它已知或可疑的抗病毒、抗真菌、抗寄生物或抗肿瘤复合物进行配置。

[0095] “佐剂”是一种可促进或增强对目标抗原的免疫应答的复合物。专业人员能选择适当的佐剂进行本发明中的实践。

[0096] 本发明包括通过施用本发明中的一种或多种抗原，对需要免疫刺激的病人进行治疗的方法。本处的治疗包括与任何疾病、状况、异常或症状相关的矫正、滋补、改善和预防方法。治疗还进一步包括在试验动物 或体外引起或抑制免疫应答。

[0097] 因此，治疗包括通过任何普通专业人员所熟知的方法（通常包括口服或鼻内途径、以及静脉、肌肉和皮下注射，但也包括腹膜内、体内、关节间、心室内、鞘内、表面、扁桃体、粘膜、经皮、阴道内及管饲法途径）给予免疫刺激量的本发明中的任何免疫刺激复合物。

[0098] 熟练的专业人员都知道，选择适当的给药方法对治疗的效果有帮助，对一些应用应优先选择局部给药。可采用的局部给药途径包括皮下、皮内、腹膜内、玻璃体内、吸入或灌洗、口服、鼻内给药以及向预先确定的组织、器官、关节、肿块或细胞群的定向注射。例如，粘膜应用或向粘膜淋巴节或派伊尔（氏）淋巴集结中注射可以促进体液免疫应答，引起实质性的 IgA 类转换。或者，向伤口、病灶或身体感染部位进行靶注射可以用于治疗实体瘤、局限性感染或其它需要免疫刺激的部位。

[0099] 或者，免疫系统细胞（如 T 细胞、B 细胞、NK 细胞或少突胶质细胞）可以从宿主中取出，并在体外进行处理。处理过的细胞可进一步进行培养或重新输入病人体内（或输入异源宿主中）以提供对病人或宿主的免疫刺激。例如，骨髓细胞可以被从病人身上抽出，并使用 HDR 进行处理以刺激全身或特异性免疫。高剂量辐射或类似处理可被用于毁坏病人体内剩余的免疫细胞。在重新植入后，自体刺激细胞在病人体内将恢复正常的免疫功能。或者，从癌症病人体内分离 NK 和 / 或 T 细胞可在体外暴露于一种或多种病人癌症的特异性抗原中。在被重新植入病人体内后，抗原刺激细胞将对癌症细胞产生强大的分子免疫应答。

[0100] 免疫刺激（有效）量指的是能在病人体内引起免疫应答，足以阻止、改善或治疗致病攻击、过敏症、或免疫异常的疫苗的量。免疫刺激量指的是，与将抗原施用于未预先使用疫苗治疗病人所获得的应答相比，能 提供可测定的对抗原的至少一种抗原表位的体液或分子免疫应答提高的量。因此，举例来说，免疫刺激量指的是能促进针对感兴趣的抗原表位的抗体的生成，或能激发可测定的对致病或致敏刺激的保护作用，或能促进针对感兴趣的抗原表位的 CTL 应答的含抗原药物的量。

[0101] 使用本发明中的免疫刺激量的含抗原药物进行治疗包括：引起宿主（尤其是包含至少一种免疫系统细胞或细胞株衍生物的体外组织培养宿主细胞）内免疫应答的任何直接、间接或统计学上可见或可测量的增长或其它想要的变化。宿主细胞可以从人类或动物外周血、淋巴结或类似物中衍生出来。优先选择的组织培养宿主细胞包括新提取的 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、少突胶质细胞、NK 细胞和单核细胞。每种都可以使用标准技术分离或提纯出来。可见的或可测的应答包括：B 或 T 细胞增殖或激活；抗体分泌增加；同型体转换；细胞因子释放增多，尤其是一种或多种 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , 或 RANTES 释放增多；对特异性抗原的抗体滴度或亲和力增加；与致病感染相关的发病或死亡率降低；促

进、引起、维持或延长病毒潜伏期；抑制或改善恶性和良性肿瘤的生长、转移或作用；以及提供对疾病或疾病效应的预防性保护。

[0102] 当需要抑制免疫应答时，如，在自身免疫性疾病或过敏症的治疗中，有效剂量还包括足以引起可测量或可观察的与待治疗的病况或病理有关的应答降低。

[0103] 含抗原药物的剂量及给药频率可以按经验来确定，并考虑到所治疗病人的年龄和身材，以及病情或所治疗的疾病。适当的剂量在 0.01 微克至 100 微克 / 次接种范围内，但也可略高于或低于这个量。第二次加强免疫可在间隔一周至数月后进行。

[0104] 以下实施例对本发明中的某些实施方式进行了说明。普通的专业人员将识别出在不改变本发明本质和范围的前提下进行的各种修改和变动。这些修改和变动被认为属于本发明的范围以内。这些实施例不对本发明造成限制。

[0105] 实施例

[0106] 以下实验技术和试剂被用于说明本发明中的某些非限制性实施方式。

[0107] 转基因小鼠

[0108] HLA-DR1-转基因 H-2II 类 -KO($IA\beta^{b^0}$) 小鼠由 HLA-DR1-转基因小鼠 (Altmann, D. M. et al., J Exp Med 181,867-875(1995)) 和 H-2II 类 -KO($IA\beta^{b^0}$) 小鼠 (Rohrlich, P. S. et al., Int Immunol 15,765-772(2003)) 在 Institute Pasteur of Lille 杂交得来。培育表达嵌合体单链 (HHD 分子:HLA-A2.1 的 $\alpha 1-\alpha 2$ 结构域、H-2D^b 的胞浆区的 $\alpha 3$, 依靠 15 个氨基酸的肽接头以其 N 末端与人 $\beta 2m$ C 末端相连) 的 HLA-A21-转基因小鼠。将 HLA-A2.1(HHD)-转基因 H-2 I 类 -KO 和 HLA-DR1-转基因 H2 II 类 -KO($IA\beta^{b^0}$) 小鼠进行杂交筛选直到得到 HLA-A2.1^{+/-}/HLA-DR1^{+/-} 双转基因 H-2-I 类 ($\beta 2m^0$)-/II 类 ($IA\beta^0$)-KO 小鼠, 用于此处所述的试验。使用 HLA-A2.1^{+/-} 单转基因 H-2-I ($\beta 2m^0$)-/II ($IA\beta^0$)-KO 小鼠作为保护性测定中的对照组。在 Institut Pasteur 巴黎的动物实验室中培育小鼠; 所有实验设计经过 Institut Pasteur 权威机构评估, 符合法国和欧洲关于动物福利的法规和公共卫生服务建议。

[0109] 基因分型

[0110] 使用 PCR 检测 HLA-DRB1*0101、HLA-DRA*0101 和 HLA-A*0201 转基因。在 56°C, 100mMNaCl、50mM Tris-HCl pH7.2, 100mM EDTA, 1% SDS 和 0.5mg/ml 蛋白酶 K 孵育过夜, 再加入 250 微升饱和 NaCl 溶液和异丙醇沉淀提取尾 DNA。将样品在 70% 的酒精中洗三次, 并在 150 微升 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8 中重悬起来。PCR 条件为: 1.5mMMgCl₂、1.25U 的 Taq 聚合酶、生产商 (Invitrogen, Carisbad, CA) 提供的缓冲液、1 个循环 (7min, 94°C), 40 个循环 (30sec, 94°C; 30sec, 60°C; 1min, 72°C), 1 个循环 (4min, 72°C), 使用正向引物和反向引物, 对 HHD: 5' CATTGA GAC AGA GCG GTT GGC CAC GAA GCA G 3' 和 5' GGA TGACGT GAG TAA ACC TGA ATC TTT GGA GTA CGC 3' 和对 HLA-DRB1*0101: 5' TTC TTC AAC GGG ACG GAG CGG GTG 3' 和 5' CTG CAC TGT GAA GCT ACC AAC 3', 和对 HLA-DRA*0101: 5' CTCCAA GCC CTC TCC CAG AG 3' 和 5' ATG TGC CTT ACA GAG GCC CC3'。

[0111] FACS 分析

[0112] 使用 FITC-结合 W6/32(anti-HLA-ABC, Sigma, St Louis, MO) 和生物素化抗 -28-8-6S(anti-H-2K^b/D^b, BD Biosciences, San Diego, CA) m. Ab 在去除了红细胞的、淋巴细胞 M-提纯 (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) 的脾细胞上进行流式细胞

分析研究。使用 PE- 标记的 CT-CD4 抗 - 小鼠 CD4 (CALTAG, South San Francisco, CA) 和 FITC- 标记的 53-6.7 抗 - 小鼠 CD8m. Ab (BD Biosciences) 对 CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞进行染色。MHCII 类分子表达的分析通过质谱柱阳性选择 B220+B 淋巴细胞实现 (Miltenyl Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)。用 2.4G2 m. Ab 与 Fc 受体 饱和结合, HLA-DR1 和 H-2 IA^b 的表达可以用 FITC 标记的 L243 (抗 HLA-DR) 和 PE 标记的 AF6-120.1 (抗 H-2 IA^b) (BD Biosciences) 进行分析。使用 FACS Calibur (Becton Dickinson, Bedford, MA) 对多聚甲醛固定细胞进行分析。

[0113] 免疫扫描分析

[0114] 在自动 -Macs (Miltenyi Biotec) 上阳性选择来自未经免疫处理的小鼠的 CD4+ 和 CD8+T 细胞, 使用 RNA 简易工具包 (Qiagen, Hilden, Germany) 处理 RNA, 并用于 cDNA 合成。使用 BV 片段家族特异性正向引物和两个 BC 片段共享的反向引物对 cDNA 进行 PCR- 扩增。PCR 产物为从属于内在的 BC FAM- 标记引物的延续产物。延续产物加入 6% 丙烯酰胺 /8M 尿素凝胶中电泳 (7h, 35w) 分离, 使用 373A DNA 测序仪 (PerkinElmer Applied Biosystem, Foster City, CA) 检测。使用免疫扫描软件 (Pannetier, C. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4319-4323 (1993)) 进行数据分析。

[0115] 肽

[0116] HLA-A2 结合肽 HBsAg₃₄₈₋₃₅₇GLSPTVWLSV 和 HBsAg₃₃₅₋₃₄₃WLSLLVPFV, H-2K^b 结合肽 HBsAg₃₇₁₋₃₇₈ILSPFLPL, HLA-DR1 结合肽 HBsAg₁₈₀₋₁₉₅QAGFFLLTRILTIPQS, H-2 IA^b 结合肽 HBsAg₁₂₆₋₁₃₈REGLYFPAGGSSSG 以及 preS2 肽 HBsAg₁₀₉₋₁₃₄MQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGG 是通过 Neo 系统 (Strasbourg, France) 合成的, 并溶解于浓度为 1mg/ml 的 PBS-10% DMSO 中。肽的氨基酸序列编号从 HBV ayw 亚型 preS1 域的第一个甲硫氨酸开始。

[0117] 使用编码 HBV 的 S2-S 蛋白的 DNA 进行免疫

[0118] 在人类 CMV 早期快反应基因控制下表达 preS2 和 S HBV 表面抗原的 pCMV-S2. S 质粒载体 (Michel, M. L. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 92, 5307-5311 (1995)) 编码通过质粒 Giga Kit 柱在没有内毒素的条件下提纯。如前所述, 对小鼠的再生胫骨前肌进行注射普鲁卡因麻醉 (50 微克每侧) (Davis, H. L., Michel, M. L. & Whalen, R. G., Hum Mol Genet 2, 1847-1851 (1993))。

[0119] T 细胞增殖测定

[0120] 最后免疫的 12 天后, 在加入 10% FCS、10mM HEPES, 1mM 丙酮酸钠、 5×10^{-5} M 2- 巯基乙醇、100I. U/ml 青霉素和 100 微克链霉素的 RPMI 培养基中同时培养去除了红血细胞的、聚蔗糖提纯脾细胞 ($5 \cdot 10^6$ 细胞 /25cm² 培养瓶 (Techno Plastic Products (TPP), Trasadingen, Switzerland)) 和肽 - 脉冲 (20, 微克 /ml)、 γ - 辐射 (180Gy) LPS- 胚细胞 ($5 \cdot 10^6$ 细胞 / 培养瓶)。第七天, 用于增殖分析细胞分于平底 96 孔板中, 每孔 5×10^5 细胞, 含 3% FCS 不完全 RPMI 培养基中肽冲击、放射线照射并用内毒素 (每孔 2×10^5 细胞) 处理细胞 72 小时。每孔细胞用 1Ci ³H 标记的胸腺嘧啶处理 16 小时, 然后用带滤膜的 TOMTEC 收集器 (Perkin Elmer Applied Biosystem) 收集细胞, 用 micro- β 计数器 (Perkin Elmer Applied Biosystem) 检测参入的放射性。结果以刺激指数 (SI) 形式给出, SI = 特异性肽的 cpm / 不相关肽的 cpm。

[0121] CTL 活动测量

[0122] 对进行增殖测定的同一免疫脾细胞群进行细胞毒性测定。使用与增殖测定相同的补充 RPMI 培养基同时培养应答细胞 (5.10⁶ 细胞 /25cm² 培养瓶, TPP) 和刺激性肽 - 脉冲 (20, 微克 /ml) γ - 辐射 (180Gy) LPS- 胚细胞 (5.10⁶ 细胞 / 培养瓶) 7 天。在针对 10 微克 /ml 试验或对照肽脉冲的 RMA-S HHD 靶细胞的标准 4h⁵¹Cr 测定中检测溶细胞活动。特异性溶解, 以 % 为单位, 被重复计算, 依据: [试验性 - 自发释放]/[最高自发性释放]x100, 减去使用对照肽观察到的非特异性溶解。

[0123] 体内抗体产生测量

[0124] 在 DNA 注射前后的不同时间, 使用加肝素的玻璃吸管对小鼠进行眼球后穿刺, 采集血样, 并通过特异性 ELISA 对离心法恢复的血清进行抗 HBs 和抗 -preS2 测定。使用带 HBV 小 S 蛋白 (1 微克 /ml) 或 preS2 (120-145) 合成肽 (1 微克 /ml) 的提纯重组体颗粒作为固相。在使用追加了 10% FCS 的 PBST (含有 0.1% Tween 20 的 PBS) 进行阻断后, 加入系列稀释剂。在广泛冲洗后, 使用辣根过氧化物酶 (Amersham, Little Chalfont, UK) 标记的抗小鼠 Ig (总 IgG) 对联结抗体进行检测。使用系列终点稀释法确定抗体滴度。单独检测小鼠血清, 滴度是进行至少三次测定的平均值。血清稀释在 1/100 以下被视为阴性。

[0125] 抗体滴度

[0126] 使用 ELISA (Michel, M. L. et al)., Proc Natl Acad Sci U S A 92, 5307-5311 (1995)) 在提纯的 HBV 中、小蛋白或 preS2 合成 HBs₁₀₉₋₁₃₄ 肽上对免疫小鼠血清分别进行了测定。在使用含有 0.1% Tween 20, 10% FCS 的 PBS 进行封闭并冲洗三次后, 使用辣根过氧化物酶 - 标记的抗 - 小鼠 IgG (Amersham, Little Chalfont, UK) 对连接抗体进行检测。抗体滴度 (至少三次测定的平均值) 由系列终点稀释法确定。滴度在 1/100 以下被视为阴性。

[0127] 痘苗攻击及噬菌斑测定

[0128] 在最后一次注射 12 天后, 以 10⁷PFU 表达 HBsAg (Smith, G. L., Mackett, M. & Moss, B., Nature 302, 490-495 (1983)) 或 HBx 蛋白 (Schek, N., Bartenschlager, R., Kuhn, C. & Schaller, H., Oncogene 6, 1735-1744. (1991)) (分别由 Dr B. Moss 和 Dr H. Schaller 提供) 的重组体痘苗病毒 (Western Reserve strain) 对 DNA- 注射小鼠进行腹膜内攻击。四天后, 采用 BHK 21 细胞的噬菌斑测定分析卵巢的 rVV 滴度 (Buller, R. M. & Wallace, G. D., Lab Anim Sci 35, 473-476 (1985))。

[0129] 实施例 1: 细胞表面 MHC 分子表达

[0130] 通过流式细胞术评估在脾细胞表面的 HLA-A2.1、H-2K^b/D^b、HLA-DR1 和 H-2 IA^b 分子的表达。如图 1a 所示, 在 HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因, H-2 I 类 /II 类 -KO 小鼠和 HLA-A2.1- 转基因, H-2 I 类 -KO 小鼠身上观察到相近水平的 HLA-A2.1 表达, 但未观察到 HLA-A2.1b 表达, 而且只在 HLA-DR1- 转基因、H-2 II 类 -KO 小鼠身上观察到了 H-2K^b/D^b 表达。在 B220⁺ 浓缩 B 细胞上对细胞表面的 HLA-DR1 和 H-2 IA^b 表达进行测量。如图 1b 所示, 在 HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因、H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠和 HLA-DR1- 转基因、H-2 II 类 -KO 小鼠身上观察到相近水平的 HLA-DR1 表达, 但在 HLA-A2.1- 转基因、H-2 I 类 -KO 小鼠身上未观察到该表达。但是, 细胞表面的转基因分子 (尤其是 HLA-DR1) 表达低于内源性 H-2 I 类和 II 类分子表达。

[0131] 实施例 2: CD4⁺ 和 CD8 外周淋巴细胞

[0132] 如图 2a 所示,通过免疫染色和流式细胞术分析对 CD4⁺ 和 CD8⁺ 外周脾淋巴细胞的数量进行确定。

[0133] HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因、H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠和 HLA-DR1- 转基因、H-2 II 类 -KO 小鼠身上的 CD4⁺T 淋巴细胞占了脾细胞总数的 13-14%。相反,H-2 II 类 -KO 小鼠身上的 CD4⁺ 细胞只占脾细胞总数的 2-3% (数据未显示),符合关于缺乏 MHC II 类分子小鼠的初期报告 (Cosgrove, D. et al., Cell 66, 1051-1066 (1991))。与预想的一样,转基因 HLA-A2.1 分子表达导致了 CD8⁺ 外周淋巴细胞数量的增加,在 HLA-A2.1-/HLA-DR1- 转基因、H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠和 HLA-A2.1- 转基因、H-2 I 类 -KO 小鼠中均达到了脾细胞总数的 2-3%,而在 $\beta 2$ 微球蛋白 ($\beta 2m$)-KO MHC I 类 - 缺失的小鼠身上只占了 0.6-1% (Pascolo, S. et al., J Exp Med 185, 2043-2051 (1997))。

[0134] 实施例 1 和 2 中的结果表明:

[0135] (1)HLA-A2⁺HLA-DR1⁺ $\beta 2m^{\circ}$ IA β° 小鼠的 HLA-A2 分子表达、H2-K^b 分子缺失、CD8⁺ 外周淋巴细胞数量以及 CD8⁺T 组成成分的多样性,通常与 HLA-A2⁺ $\beta 2m^{\circ}$ 小鼠相当;

[0136] (2) 在 HLA-A2⁺HLA-DR1⁺ $\beta 2m^{\circ}$ IA β° 小鼠中,HLA-DR1 分子表达、H2-IA^b 缺失、CD4⁺T 淋巴细胞的数量以及 CD4⁺ 组成成分的多样性,通常与 HLA-DR1⁺IA β° 小鼠相当;

[0137] (3)HLA-A2⁺HLA-DR1⁺ $\beta 2m^{\circ}$ IA β° 小鼠具有 HLA-A2⁺ $\beta 2m^{\circ}$ 小鼠和 HLA-DR1⁺IA β° 小鼠身上的所有优点。

[0138] 实施例 3:T 淋巴细胞受体 (TCR)BV 片段使用

[0139] 由于单 MHC I 类分子和单 MHC II 类分子的存在会减少 TCR 组成成分的数量和多样性,按先前所述 (Cochet, M. et al., Eur J Immunol 22, 2639-2647 (1992)),通过 RT-PCR 免疫扫描技术在提纯 CD4⁺ 或 CD8⁺ 脾淋巴细胞上对各 BV 家族和 CDR3 长度多样性的表达进行研究。在 CD8⁺(图 2b) 和 CD4⁺(图 2c) 淋巴细胞中,大多数 BV 家族 (15/20) 都表现出了高斯分布的显著强度高峰。在外周 T 淋巴细胞观察到的这种分布图形,每一个波峰都是 BV 片段与 3 个核苷酸长度变化的 CDR3 亚区的功能性重排的典型表现 (Cochet, M. et al., Eur J Immunol 22, 2639-2647 (1992))。

[0140] 观察到缺乏 BV 5.3 和 17 分布 (或者说其完全改变的分布趋势)是意料中的,因为这两个 BV 片段在 C57BL/6 小鼠中是假基因 (Wade, T., Bill, J., Marrack, P. C., Palmer, E. & Kappler, J. W., J Immunol 141, 2165-2167 (1988)); Chou, H. S. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 84, 1992-1996 (1987)。而 BV 5.1、5.2 和 11 片段的改变的图形是由于对应的 BV- 表达 T 淋巴细胞亚群小而引起的 (它们在 C57BL/6 小鼠中小于 5%,在 HLA-DR1- 转基因 H-2 II 类 -KO 小鼠中占约 2%) (数据未显示)。除了这些情况,HLA-A2.1/HLA-DR1- 转基因、H-2 I 类 /II 类 -KO 小鼠的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞均分别显示出 TCR BV 链使用和 CDR3 多样性,这与非 - 转基因 C57BL/6 小鼠的情况类似。

[0141] 实施例 4:功能表征

[0142] 对 Ag HBs (乙肝病毒包膜蛋白) 免疫的 HLA-A2+HLA-DR1+ $\beta 2m^{\circ}$ IA β° 小鼠进行分析。图 5 显示了特异性体液应答,即如 HBs S2 抗体的生成所示。图 6 显示了 HBS₃₄₈₋₃₅₇ 的特异性 DR1- 限制性 CD4⁺T 增殖应答。图 7 显示了 HBS₃₄₈₋₃₅₇ 或 HBS₃₃₅₋₃₄₃ 的特异性 HLA-A2- 限制性 CD8⁺ 细胞溶解 T 细胞应答。

[0143] 这些结果表明 HLA-A2+HLA-DR1+ $\beta 2m^{\circ}$ IA β° 小鼠可用于对免疫个体中的特异

性体液应答、CD4+T 辅助细胞的 Ag- 特异性 HLA-DR1- 限制性应答以及 Ag- 特异性 HLA-A2- 限制性 CD8+T 细胞的细胞溶解应答进行同时分析。

[0144] 表 1-3 中提供了从小鼠身上获得的其它信息。

[0145] 表 1. 注射了 pcmv S2-S 的 HLA-A2+DR1+H-2 CI-CII- 转基因小鼠中的对 HBV 病毒包膜 HLA-DR1 抗原表位的 T CD4+ 增殖应答

[0146]

位置	氨基酸序列	应答者/试验小鼠	刺激指数
109-134	MQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGG	(12/12)	3-4
200-214	TSLNFLGGTTVCLGQ	(6/12)	3-4
16/31	QAGFFLLTRILTIPQS	(12/12)	3-6
337/357	SLLVPFVQWFVGLSPTVWLSV	(5/12)	4-5

[0147] 表 2. 注射了 pcmv S2-S 的 HLA-A2+DR1+H-2 CI-CII- 转基因小鼠中的细胞溶解应答

[0148] 位置	氨基酸序列	应答者 / 试验小鼠	最大溶解
[0149] 348-357	GLSPTVWLS	(12/12)	20-70%
[0150] 335-343	WLSLLVPVF	(4/12)	30%

[0151] 表 3. 注射 pcmv S2-S 的 HLA-A2+DR1+H-2CI-CII 转基因小鼠中的抗 -PreS2 抗体应答

[0152] 位置	氨基酸序列	应答者 / 试验小鼠
[0153] preS2	MQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGG	(9/12)

[0154] 实施例 5 :对 HBsAg-DNA- 疫苗的免疫应答

[0155] 为评估 HLA-A2. 1-/HLA-DR1- 转基因、H-2 I 类 /II 类 -KO 小鼠的免疫能力,以及为将它们的体液、CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞应答与人类的这些应答相比较,使用 HBsAg-DNA 质体对小鼠进行免疫。这些质粒编码两种乙型肝炎病毒包膜蛋白 (preS2/S 中蛋白和 S/ 小蛋白), 所述蛋白在带有乙 肝病毒表面抗原的颗粒内自组装。目前使用的乙型肝炎病毒疫苗包含这两种蛋白。

[0156] 如图 3a 中的代表性小鼠所示, HBsAg- 特异性抗体在注射 HBsAg-DNA- 疫苗 (图 3a, 上) 后第 12 天被首次测出,而这些抗体的滴度一直增加到第 24 天 (第二次 DNA 免疫后的 12 天后,数据未显示)。这种早期的抗体应答对中 HBV 包膜蛋白所携带的 preS2-B 细胞抗原表位 (HBs109 134) 和 HBsAg 颗粒具有特异性,与 HBsAg-DNA- 免疫小鼠 (Michel, M. L. etal., Proc Natl Acad Sci U S A 92,5307-5311(1995)) 和 HBsAg 免疫人类的类似应答 (Moulija-Pelat, J. P. etal., Vaccine 12,499-502(1994)) 相符。

[0157] 检查对 HBsAg 的 CD8+CTL 应答,确定 HLA-A2. 1-/HLA-DR1- 转基因、H-2 I 类 -/II 类 -KO 类小鼠的 CD8+ 外周淋巴细胞是否从功能上受到了转基因人类 I 类分子的限制。在 HBV- 感染 HLA-A2. 1+ 人群中,免疫显性 HLA-A2. 1- 限制性 HBsAg- 特异性 CTL 应答 指 向 HBsAg₃₄₈₋₃₅₇ (Maini, M. K. etal., Gastroenterology 117,1386-1396(1999)) 和 HBsAg₃₃₅₋₃₄₃ (Nayersina, R. etal., J Immunol 150,4659-4671(1993)) 肽 (即,观察到了多抗原表位应答)。在 C57BL/6 小鼠中, H-2K^b- 限制性 HBsAg- 特异性 CTL 应答指向 HBsAg₃₇₁₋₃₇₈ 肽 (Schirmbeck, R., Wild, J. & Reimann, J., Eur J Immunol 28,4149-4161(1998))。为评

估人化小鼠是否可作出与人一样的应答,按照此处所描述的那样,使用相关的(HBsAg₃₄₈₋₃₅₇, HLA-A2.1-限制性)、或对照的(HBsAg₃₇₁₋₃₇₈, H-2K^b-限制性;MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉, HLA-A2.1-限制性)肽对脾淋巴细胞进行7天的再刺激。图3a(中)表明HBsAg-DNA-免疫引起了强HBsAg₃₄₈₋₃₅₇-特异CTL应答,但未引起对HBsAg₃₇₁₋₃₇₈或MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉肽的应答。

[0158] 为确定HLA-A2.1-/HLA-DR1-转基因、H-2 I类-/II类-KO小鼠中的外周CD4+T淋巴细胞是否会从功能上受到转基因人类II分子的限制,针对HBsAg蛋白的CD4+T淋巴细胞应答进行检查。在HBsAg-接种或HBV-感染HLA-DR1+人群中,免疫显性HLA-DR1-限制性HBsAg-特异性CD4+T淋巴细胞应答指向HBsAg₁₈₀₋₁₉₅肽(Mm, W. P. et al., Hum Immunol 46, 93-99(1996))。在C57BL/6小鼠中,H-2IA^b-限制性HBsAg-特异性CD4+T淋巴细胞应答指向HBsAg₁₂₆₋₁₃₈肽(Milich, D. R., Semin Liver Dis 11, 93-112(1991))。为将人化小鼠和人以及野生小鼠进行比较,使用相关(HBsAg₁₈₀₋₁₉₅, HLA-DR1-限制性)或对照(HBsAg₁₂₆₋₁₃₈, H-2IA^b-限制性;HIV 1Gag₂₆₃₋₂₇₈, HLA-DR1-限制性)肽对脾T淋巴细胞进行体外再激活。图3a(下)显示了针对HLA-DR1-限制性HBsAg₁₈₀₋₁₉₅肽的强增殖应答,而如预期那样,H-2IA^β-限制性肽未能有效的激发应答。同样,HIV 1 Gag₂₆₃₋₂₇₈肽未能激发应答。另外,体外使用HBsAg₁₈₀₋₁₉₅多肽增加一次免疫复活可使特异性增殖指数增加数倍(数据未显示)。

[0159] 在第一种HBsAg-DNA-免疫HLA-A2.1-/HLA-DR1-转基因H-2 I类-/II类-KO小鼠中已记录到HBsAg-特异性抗体、增殖应答及细胞溶解T细胞应答的发展和特异性,6只额外的HBsAg-DNA-免疫和6只未免疫对照组HLA-A2.1-/HLA-DR1-转基因H-2 I类-/II类-KO小鼠也被分别作了针对以上三种应答的检测。如图3b所示,这三种应答同时出现在6只受试免疫动物身上,但未出现在对照组未免疫小鼠中。有趣的是,2只免疫小鼠能引起针对HBsAg₃₄₈₋₃₅₇和HBsAg₃₃₅₋₃₄₃HLA-A2.1限制性肽的CTL应答(图3b,中)。

[0160] 实施例6:保护测定

[0161] 以上实施例记录了在HLA-A2.1-/HLA-DR1-转基因、H-2 I类/II类-KO小鼠体内诱导的HBsAg-特异性体液、CD4+和CD8+T细胞应答,并表明它们是指向与自然感染或HBsAg-接种的人体的相同的免疫显性表位。本实施例测试了这些免疫应答能否给接种动物带来保护。因为小鼠并不感染HBV,这些试验采用了HBsAg-重组体痘苗病毒(rVV-HBsAg)。两次通过肌肉注射100微克HBsAgDNA对小鼠进行免疫。免疫12天后,使用10⁷PFU的rVV-HBsAg对小鼠进行腹膜内攻击。四天后,根据公布的方法确定病毒滴度并记录为“rVV PFU/卵巢”的形式(Buller, R. M. & Wallace, G. D., Lab Anim Sci 35, 473-476(1985))。

[0162] 图4显示了试验结果。未经过HBsAg-DNA免疫的动物在攻击后显示出了rVV-HBsAg复制。相反,HBsAg-DNA免疫小鼠的病毒滴度则要低超过4个数量级。这些结果强烈表明使用HBsAg-DNA进行免疫诱导了控制rVV-HBsAg感染的保护性HBsAg-特异性免疫应答。

[0163] HBsAg-DNA免疫小鼠接受另一种HBx-重组痘苗病毒(rVV,编码乙型肝炎病毒x蛋白)的攻击的研究证实了HBsAg-DNA免疫引起的特异性保护。与未免疫的对照组相比,HBsAg-DNA-免疫小鼠中未观察到rVV-HBx复制减少。

[0164] 实施例7:HLA-DR1-限制性CD4+T淋巴细胞对于抗体和CTL应答以及抵抗病毒感染的保护很关键

[0165] 为评估HLA-DR1-限制性T辅助淋巴细胞是否有助于人化小鼠中的抗体和CTL应答,对单(HLA-A2.1)和双(HLA-A2.1/HLA-DR1)转基因H-2I类/II类-KO小鼠中的免疫应

答和病毒感染的效力进行比较。如表 4 所示,在 HLA-A2.1-/HLA-DR1- 双转基因、H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠中观察到了有力的 HBsAg₃₄₈₃₅₇- 特异性 CTL 应答,但在 HLA-A2.1 单转基因 H-2 I 类 /II 类 -KO 小鼠身上未发现。另外,在 HBsAg-DNA- 接种 HLA-A2.1- 单转基因 H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠身上检测不到抗 -HBs 抗体。作为结果,HBsAg-DNA- 免疫 HLA-A2.1- 单转基因 H-2I 类 -/II 类 -KO 小鼠未能得到抗 rVV-HBsAg 感染保护。

[0166] 表 4HBsAg-DNA 免疫小鼠的抗体、细胞溶解、增殖应答和抗 rVV-HBsAg- 攻击保护
[0167]

小鼠	特异性溶解(%)		增殖(SI) 179-194	抗体滴度	rVV-HBsAg PFU/卵巢(log10)	
	348-357	335-343				
A	1	0	0	1	0	2.5.10 ⁸
	2	0	0	1	0	2.5.10 ⁸
	3	0	0	1	0	10 ⁸
	4	0	0	1	0	2.5.10 ⁸
	5	0	0	1	0	10 ⁸
	6	0	0	1	0	1.5.10 ⁸
B	1	30	15	4.7	2000	10 ⁴
	2	14	0	3.9	3000	3.10 ³
	3	30	11	4	7500	4.10 ³
	4	5	0	2.5	6500	7.5.10 ³
	5	50	30	6.3	13000	7.5.10 ²
	6	40	18	4	16000	5.10 ²
	7	6	7	2.9	1500	2.10 ⁴
	8	5	5	3	2500	1.5.10 ⁴
	9	24	36	4.5	3000	< 10 ²
	10	23	14	5	15000	5.10 ³
C	1	0	0	1	0	10 ⁸
	2	0	0	1	0	2.10 ⁸
	3	0	0	1	0	1.5.10 ⁸
	4	0	0	1	0	10 ⁸
	5	0	0	1	0	2.5.10 ⁸
	6	0	0	1	0	10 ⁸

[0168] 使用 10⁷PFU 的 rVV-HBsAg 对未免疫的 HLA-A2.1-/HLA-DR1- 双转基因 H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠 (A1-6)、HBsAg-DNA- 免疫的 IHLA-A2.1-/HLA-DR1- 双转基因 H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠 (B1-10) 和 HBsAg-DNA- 免疫的 HLA-A2.1- 单转基因 H-2 I 类 -/II 类 -KO 小鼠 (C 1-6) 进行腹膜内攻击。四天后,使用 HBsAg₃₄₈₋₃₅₇ (免疫显性表位) 或 HBsAg₃₃₅₋₃₄₃ (亚显性表位) 对每个卵巢的噬菌斑形成单位数 (PFU/ 卵巢)、细胞溶解、增殖脾 T 细胞应答和血清抗体滴度分别进行评估,加载了 HLA-A2.1- 限制性肽的 RMA-S-HHD 靶细胞 (E/T 比为 30/1)

用于细胞溶解测定, HBsAg₁₇₉₋₁₉₄HLA-DR1- 限制性肽用于增殖测定, preS2₁₀₉₋₁₃₄ 肽用于确定抗体 (IgG) 滴度。

[0169] 本申请中所引用的参考文献的全部内容、专利和公布的专利申请在此全文引用作为参考。

[0001]

序列表

<110> 巴斯德研究院

<120> 具有人类主要组织相容性复合物(MHC)表型的转基因小鼠、其实验性使用及用途

<130> 346381-D22368

<140> PCT/IB2004/002374

<141> 2004-07-05

<150> 60/490,945

<151> 2003-07-30

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1

<211> 4547

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1205)

<223> promoter HLA-A2 gene

<220>

<221> misc feature

<222> (1206)..(1265)

<223> leader sequence HLA-A2

<220>

<221> misc_feature

<222> (1266)..(1565)

<223> human Beta2 microglobulin cDNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (1566)..(1610)

<223> GlySer linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (1611)..(2440)

<223> exon 2 and partial intron 3 from HLA-A2 gene

<220>

<221> misc_feature

<222> (2441)..(4547)

<223> intron 3 partial-exon 4-exon 8-3'non codant gene

<400> 1

gaattccttag gtttaaatac attgttttat ggattttaat acatccatct acagagccta 60

gcaggggtgtc cttggcagtt gtcttttaat acctcatgtg ggtctgccta aaaactaatt 120

ttttatgtta atcagggttta aaaaatacta agtgttcta taaaatatac acaaacactta 180

gaagtggata ctctctaaaa acaggcagtg catgagcact agtgaggggc attgtgagtg 240

cattgaacag ttgcaacttt gaggtgaata aagcctgtaa tcgcttctgg ttgcaacata 300

taggaacaca gtcgctactt tgtattgagg agatgtcctg gactcacaca gaaactcaga 360

[0002]

```

gctatggaat gatggtaaat ttaaaatact acaaccagga gtcacagata cattgtctgg 420
gaaactgcaa cttagtagct ttgtgagtc tgttgtaagg cttttggaca catttataca 480
tcaaggggct aaagtcacat tttttaccta ttagattcct gatcattcag gggttacca 540
gattctgcta cccactgtag ttaataaaca aagagcaaat tggctctctat tctgtctcat 600
gcaactcagc gcaactcttc ccgattaaaa acaaaaaaaa caacaacaaa aatctacacc 660
tccattccca gagcaagctt actctctggc accaaactcc atgggatgat ttttcttcta 720
gaagagtcca ggtggacag taaggagtgg gagtacagga gtcagttca gggacagaga 780
ttacgggata aaaagtgaag ggagagggac ggggcccatg ccgagggttt ctcccttgtt 840
tctcagacag ctcttgggcc aagactcagg gagacattga gacagagcgc ttggcacaga 900
agcagagggg tcagggcgaa gtcccagggc cccagggcgtg gctctcaggg tctcagggcc 960
cgaagggcgt gtatggattg gggagtccca gccttgggga tcccccaact ccgcagtttc 1020
ttttctccct ctcccaacct atgtagggtc cttcttctctg gatactcacg acgcggacce 1080
agttctcact cccattgggt gtccgggttc cagagaagcc aatcagtgtc gtcgcggctg 1140
cggttctaaa gtccgcagc acccaccggg actcagattc tcccagacg ccgaggatgg 1200
ccgtcatggc gcccgaacc ctctctctgc tactctcggg ggctctggcc ctgaccaga 1260
cctgggcgat ccagcgtact ccaaagattc aggtttactc acgtcatcca gcagagaatg 1320
gaaagtcaaa tttcctgaat tgetatgtgt ctgggttca tccatccgac attgaagttg 1380
acttactgaa gaatggagag agaattgaaa aagtggagca ttcagacttg tctttcagca 1440
aggactggtc tttctatctc ttgtactaca ctgaattcac cccactgaa aaagatgagt 1500
atgcctgccg tgtgaacat gtgactttgt cacagccca gatagttaag tgggatcgag 1560
acatgggagg tggcgatcc ggcggaggcg gctcgggtgg cggcggctct ggatctcact 1620
ccatgaggta tttcttcaca tccgtgtccc gcccggccg cggggagccc cgcttcatcg 1680
cagtgggcta cgtggacgac acgcagttcg tgcggttcga cagcagccc gcgagccaga 1740
ggatggagcc gcgggcgccc tggatagagc aggaggtcc ggagtattgg gacggggaga 1800
cacgaaagc gaagcccac tcacagactc accagtgga cctggggacc ctgcgcgct 1860
actacaacca gagcgaggcc ggtgagtgac cccggccgg ggcgcaggtc acgacctctc 1920
atccccacg gacgggccag gtgcgccaca gtctccgggt ccgagatccg cccgaagcc 1980
gcgggacccc gagaccctg ccccgggaga ggcccaggcg cctttaccg gtttcatttt 2040
cagtttaggc caaaaatccc cccaggttgg tccgggcccg gcggggctcg gggaccggg 2100
ctgaccgcgg ggtccgggcc aggttctcac accgtccaga ggatgtatgg ctgcgacgtg 2160
gggtcggact ggccttctc cccgggttac caccagtacg cctacgacgg caaggattac 2220
atgcacctga aagaggacct gcgctcttgg accgcggcgg acatggcagc tcagaccacc 2280
aagcacaagt gggagcggc ccatgtggcg gacgattga gagcctacct ggagggcagc 2340
tgcgtggagt ggctccgag atacctggag aacgggaagg agacgctgca gcgcacgggt 2400
accaggggccc accgggccc tccctgatcg cctgtagatc ctgtgtgaca tacctgtacc 2460
ttgtctoca gagtcaggg ctgggagtca tttctctgg ctacagactt tgtgatggt 2520
gttcaactcg actgacagtt aacgttggtc agcaagatga ccacaatggg tgagtctcag 2580
tgggtggacc cttccagtag catatgcccc taatttgat atgaactcaa acagatatta 2640
aattacttat tttccattcc ctattccatt ctgtgactat ctctctcatg ctattgaaca 2700
tcacataagg atggccatgt tcacccactg gctcatgtgg attccctctt agcttctttg 2760
tcccaaaaga aaatgtgcag tccctgtctg aggggaccag ctctgctttt ggtcactagt 2820
gcaatgacag tgtagtgtca aatagacaca tagttcactc tcatcattga tttaacagag 2880
tcttgtgtag atttcagtt gtcttgttaa ttgtggaatt tcttaaactc tccacacaga 2940
ttccccaaag gcacatgtga cccatcacc cagatctaaa ggtgaagtca cctgaggtg 3000
ctgggcccctg ggcttctacc ctgctgacat caccctgacc tggcagttga atggggagga 3060
gctgaccag gacatggagc ttgtggagac caggcctgca ggggatggaa cctccagaa 3120
gtgggcatct gtgggtgtgc ctcttgggaa ggagcagaat tacacatgcc gtgtgtacca 3180
tgaggggctg cctgagcccc tcaccctgag atgggtaag gagggtgtgg gtgcagagct 3240
ggggtcaggg aaagctggag ccctctgcag accctgagct ggtcagggat gagagctggg 3300
gtcataacc tcacctcat ttctgtacc tgtccttccc agagcctcct ccgtccactg 3360
actcttacat ggtgatcgtt gctgttctgg gtgtccttgg agctatggcc atcattggag 3420
ctgtgggtgc tttgtgatg aagagaagga gaaacacag taagaaaggg cagggctctga 3480
gtttctctc agcctcctt agaagtgtgc tctgctcatt aatggggaac acagccacac 3540
cccacattgc tactgtctct aactgggtct gctgtcagtt ctgggaattt ccagtgtcaa 3600
gatcttctct gaactctcac agcttttctt ttcacagggt gaaaaggagg ggactatgct 3660
ctggctccag gttagtgtgg ggacaggatc gtctggggga cattggagtg aagtggaga 3720
tgatgggagc tctgggaatc cataatagct cctccagaga aatcttctag ggcctgagt 3780
tgtgccatga agtgaataca ttcatgtaca tatgcatata cattgtttt gttttaccct 3840
aggctcccag agctctgaaa tgtctctccg agattgtaa ggtgacactc tagggctctga 3900
ttggggaggg gcaatgtgga catgattggg tttcagggac tcccagaatc tctgagagt 3960
gagtgggtgg ttgctggaat gttgtcttca cagtgatgg tcatgactct cattctctag 4020

```

[0003]

```

cgtgaagaca gctgcctgga ctgtactgag tgacagacga tgtgttcagg tctctcctgt 4080
gacatccaga gccctcagtt ctctttacac aacattgtct gatgttcctt gtgagcttgg 4140
gttcagtgtg aagaactgtg gagcccagcc tgccctgcac accaggaccc tatccctgca 4200
ctgccctgtg ttcccttcca tagccaacct tgctgctcca gccaaacact gggggacatc 4260
tgcatcctgt aagetccatg ctaccctgag ctgcagctcc tcaettccac actgagaata 4320
ataatttgaa tgtgggtggc tggagagatg gctcagcgtt gactgctctt ccaaaggctc 4380
tgagttcaaa tccagcaac cacatgggtg ctcaacaacca tctgtaatgg gatctaacac 4440
cctcttctgc agtgtctgaa gacagctaca gtgtacttac atataataat aaataagtct 4500
ttaaaaaata atttgaaagt gacccttgat tgtaaacaac ttgatct 4547

```

<210> 2

<211> 29133

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(15279)

<223> promoter 5' from HLA-DR alpha gene (HLA-DRA gene)

<220>

<221> gene

<222> (1)..(29133)

<223> HLA-DR alpha gene (HLA-DRA gene)

<220>

<221> misc_feature

<222> (15280)..(15425)

<223> exon 1

<220>

<221> misc_feature

<222> (15344)..(15346)

<223> ATG start

<220>

<221> misc_feature

<222> (17838)..(18083)

<223> exon 2

<220>

<221> misc_feature

<222> (18575)..(18866)

<223> exon 3

<220>

<221> misc_feature

<222> (19146)..(19311)

<223> exon 4

<220>

<221> misc_feature

<222> (20008)..(20340)

<223> exon 5

<400> 2

aaaaaattaa gtatataaag tttaaaaagt tagagtaagc taaggttaat tattgtagaa 60

aaacatTTTT cataaatTTa atgttgtctt agttacagta tttataaagt ctacagtaat 120

gtatagtaat gccttaggcc ctgcattca ctaccactc actcactgac tcatcagggc 180

aacttccagt cctgcaagct ccattcatgg taagtgtcct agaaagatct accatttaa 240

[0004]

aatctttcoat	atgggtat	caccacac	tttgtat	tagatac	aacagttag	300
attgtgttac	aattacca	agtattca	acagtcac	gctgtacag	tttgtcgc	360
aggggtaata	gggtgtac	tatagcct	atgtatag	ggctataac	tctagtttg	420
gtaaggacac	tctgtgat	tcacacaa	atgaaatc	ctaatagac	atctcttag	480
gcttgtcc	ttagctaa	gatgcatg	ttcagttt	ccccattt	agagcatag	540
cctcaatgac	tttcaatg	aaacccga	gctttcat	tctcaatc	gaagagctg	600
aggagattta	ggctgaac	aaagaaat	tcagcttag	tcattagt	tctactcc	660
acatcttcaa	catttaaca	gtgttttg	aaagacac	acaaagtg	tgaagtcac	720
aactctcaaa	tcttgtc	gcagcacc	gtcaaatg	aaaaactt	ctattttct	780
agtccactgg	aggagcct	tgtcagagg	caaacctg	ttattagct	caaacagca	840
ctcagatcag	taagtgtc	caggtgata	gtggttgt	ctacttgg	tcaattcac	900
agttcttctg	aaacttac	ctgtttgt	ttagggcc	tatcaatgg	aggtctttg	960
ttcctcaaca	ccactgg	gtgaaag	ttgcactg	tttcagaag	tgacactta	1020
gtttttgtt	ttacctct	ccgtgcat	agaagtta	caacgtgt	tgaagaaac	1080
agagtgtttg	agatgect	gttttctag	tacatcac	tggcccc	attgctgctg	1140
atctctttct	tacagcaga	aactgtag	aaattgtg	agaaaact	tctacagcag	1200
aaaacggtag	cagaaaa	gcactaaa	gcagcgt	cttgcaaac	gcaaatgcta	1260
ccaagagaaa	cagtgatg	caaacgtc	cttacatt	catggttct	ctttggaat	1320
tttattcatc	tagtctatt	tactttct	gctaaaca	gctttttaa	aatatacct	1380
taaaatttta	tcctatttt	gtagtgtt	ccagtggg	aatttgtc	actgtgacc	1440
taatgcatct	tatactgtg	tggaaaaa	aataagatt	taaattgtg	ttctgaaaa	1500
actggatata	gaaacag	atggccag	catatata	aataggcct	gctgggcacg	1560
gtggtcacg	cctgtaat	cagcactt	ggaggcca	gctgatgg	catgaggtea	1620
agagatcgag	accatcctg	ccaacatg	gaaaccc	cctctact	aaatacaat	1680
ttagctgggc	atgggtgg	gcagctgt	tcccagct	tggggagg	gaggcagg	1740
aatcacttga	gcccagg	tggaggtg	agtgagct	gatcgtgc	ctgactcca	1800
gectggcgac	agagcaag	tcctctaa	aaaaaaaa	aaaaatag	ctttgacc	1860
acagcctaca	gcagcctg	tggggaac	attccctt	cttcaata	caatccag	1920
aggtagctcg	cttaagtc	acttgcag	agtcagatt	ctgtctct	taacaatcc	1980
ggaggctaaa	taataact	tataaca	gttttaaa	ggccagg	tgattaata	2040
ctgacagttc	ccccaat	tgtgctgt	tccaactt	gaccaacc	ggaaagcta	2100
atatgcatcc	taccaatta	cataggat	tccactt	gttaccct	aagcattcc	2160
catgccaaca	gcctcca	aggtcctt	taaccact	aaagttct	acttcttgc	2220
ctgtctttga	gtctctg	aaatgca	gatgggtg	gactcctt	ttatagca	2280
ttgtgaata	ttttgtct	tttcattt	ttgatctt	tgtatttt	cattatta	2340
ctttatata	attaaa	aagaggct	cattta	atgacatt	agatctt	2400
tatcggata	tgctata	tatttagt	ttaattt	tattaa	agatttag	2460
aattactaaa	aatgctaaa	attcatca	tatatatg	agtacaaa	aggaaa	2520
aaagagagat	attagaa	ggtaata	tcagga	atattca	tatttta	2580
tggagatatt	gtctgtt	actaa	tttcccc	ttttgtg	ttttcc	2640
cacttgggg	tgaagc	acaccact	ttccag	cctttct	gaaggc	2700
acttgcgatt	agaagg	ggaaa	tgcatct	cttctg	caagtag	2760
cagctgccag	gagtgtg	ttgttt	ctgcagg	aatagtag	tctgtc	2820
cctgaccttt	ggaagca	ttttgct	ctgtcct	caaaact	gcaatgc	2880
tcactgtatt	acatctct	gggcttaa	tacctg	gtgtttt	cccctg	2940
atctgggcta	gactga	tcttgt	atgtaa	aagca	tttaaa	3000
cctgggtttt	taa	acagat	ttca	gatggg	actcca	3060
aatccagtg	aaattg	tattgt	tgaa	gagtata	tgttcac	3120
catgatcatg	tggctg	tgctgg	tgtgaa	tatctt	agtatcg	3180
gtctggaata	agatca	ttaa	gtttata	aatgg	gcttttac	3240
cattgaaa	tcaaaa	ctaagt	ccatct	tcagg	ctgtagt	3300
aaaaaa	caataa	atatcc	ttgttgg	tgca	attaca	3360
taaacattg	tttgtt	gtttg	aaaa	taat	tatgat	3420
aaatgt	ttca	ttata	acagg	atgaa	tacag	3480
tccttgt	ccttca	gtttccc	atgg	cata	tatag	3540
tatcgaa	aggaa	cactg	atgt	ag	ttat	3600
gtgtag	atgta	cactgt	aaa	act	atcac	3660
agatctct	catgcc	gccctc	agag	catt	cccc	3720
ccctac	tgcca	taattg	ttc	ta	attag	3780
tgtatata	atgga	actata	acct	actg	tgta	3840
ataatgc	tggg	attag	ccag	tgt	ggat	3900

[0005]

atatagaaag	atatttcttt	taaagaattt	gctcacatga	ttgtggaagc	ttactgagtc	3960
caaattctga	tggaagaggc	cagcagtgga	ggagactggg	acagagttgc	agtttgagcc	4020
caaaggtagt	ctgctgtgga	accaggaaga	gccaggattg	cagatggagt	ctgaggcaat	4080
ctgttgagag	gttccctctt	atgctagtca	ggcattcaac	tgattaaatg	aggggaaccc	4140
agttatggag	ggcaatgtac	tttacttaaa	atctactgac	ttaaataatg	aactctcacc	4200
ccaaaactgc	cagattatgt	gaaattccat	gtcctctact	tggtccatt	gacactcaga	4260
tggagtagat	taaacacacag	acatttactg	aaagtcctca	cttaacatca	tcaataggtt	4320
cttagaagct	gtgactttaa	gcaaaatgac	atataataaa	actaatttga	ccatagggta	4380
atlcagcgat	ccccaacatt	tttggcacca	gggactgggt	ttgtggaaga	aaattttgcc	4440
atggatgggg	gttggggact	agcggtgcca	gggagtggga	tggcacaacc	tagatccctc	4500
gcatggggcag	tccacaatac	agttcacaaa	ggtttgcact	cctgtgagaa	tccaatgctt	4560
ctgccgatct	gacagcaggc	cattagtggg	ctgtggccca	ggggttggga	acccttgggc	4620
taattgatgc	gaacaagatt	taagttccta	tggtttat	ctggtcacaa	acacatcacc	4680
aaactcctaa	ataaagactc	agaacacttc	taatattaaa	cattaaaata	aatgggaact	4740
atatatacat	ttaaggtag	tttataataa	caagtaagat	aattaattat	ccagtttttg	4800
gtgaattagt	gagtgatgg	ggtcacagtg	gtggtgggtt	acattaagga	acaaagtgtt	4860
gtaaaaatgaa	aatggtaagg	agcacctcct	ggccaccacac	agctcaaacg	caaagaagaa	4920
caaatacgtt	gaactcactg	agtacttttg	tacccattg	tttactattg	tacagtgtga	4980
tgaatatcat	gtactttaca	aatttttatt	ttagaacat	ttctattcat	tcgcttattc	5040
attttccaac	ctgcttattc	cagttcaagg	tcatggatga	ctggagccta	tcccggcagc	5100
tcaaggacaa	gagaggaacc	aacctgtgat	aggatgccat	cccatccatt	gtgggatgca	5160
gacacacaca	cacatacaca	cacacacaca	cacacacaca	aagtcactct	gctgggacaa	5220
tttagactca	ccaattaacc	taacatgcat	gtctttggga	tgtgggataa	aactcaataa	5280
cacaaagaaa	accatgcyg	acgtggggag	aacacacaaa	ctcctcatgg	ccagtggccc	5340
tggccaggaa	cctattttatt	ttctcaccaa	cattgtaaca	aaacgttgaa	caaaacaatg	5400
ctataggagg	accctctgtg	tttctcacag	tcttgagggc	tgggaagtcc	aagatcaaga	5460
tgctgacagg	ttcaattcct	ggtgaactta	gaactgaagg	ctctctggca	ggggtgcctt	5520
gtggctgca	gctgggtata	gaaactcagg	ctccccacta	ggcctccact	tacagaatcc	5580
tgactgggag	ggagagggtc	tcatcagcgc	tcccacatgg	cctctactga	caccaggaag	5640
ggagaagtgc	ctccttacac	ctggacagtg	gtgaaagtcc	cagctttcta	cttggcctcc	5700
tctgacaaca	ccttggcaaa	gtgggtgagg	agtgcctcct	tgcaacaggg	caggtggaag	5760
tccaggtctt	tcacatgggc	ttcactaaca	ccacagtgtg	gaggtggctg	attactgata	5820
ggcaggggca	aaagtcctag	gtccccagtt	ggcttctctt	gacataagcc	tgatgggtct	5880
aggtagtgtc	tcattatcgc	caggcaatgg	gataagacaa	agctcctcac	tcagtgtttg	5940
ctgactgagg	cgggatggaa	gccccgtatt	tttctgtatt	tgactggagt	agtggcgtta	6000
ctgtcagtta	tctgcctggt	aggctgctct	ttcttgttcc	cttggataga	gaaacatgct	6060
ttccttagga	tattttgtc	tgtgactact	gatgtttcct	gttttccagt	ttctccagca	6120
ctcattcctg	gatataattg	gcagaaagaa	gacctatgaa	actcaccact	ctgtcattcc	6180
ccaatcccat	ggtctgaggc	caacctgctt	ctcctctcca	tcattcaagg	gctttttatg	6240
tctgtctgta	gctgtactta	gcaggaagaa	taggaagaat	tgtacctact	tcattctgtc	6300
ttagaaccag	aaatctctca	ccatattttt	taaaatatgt	ttttgtcata	tattaaaata	6360
ttatacatct	atccttagat	ccttaaaaaa	acatataatc	tatccttaga	gttaagttaa	6420
tttggttaaca	aaaataaaac	aagactaaaa	ctattaattg	tgttaaagcc	ataaaaaata	6480
tgcaaatttt	tgcccaaaat	atgggaaatg	tgcgtgtgtg	tgtgtgtatc	tcctatgtat	6540
acacataaaa	aaagacataa	aatgaaaatt	gctgatgtat	caatacccg	ggcagggag	6600
tattctcagg	tttaactaag	tactcatatt	caagttttta	ccataggcca	cacctggctc	6660
tcagattcac	ttagaaggat	attagacagg	agtcaaagta	tgccaaagtg	ctgaatcagg	6720
tcttttctt	cagtgggaga	agttcttgaa	acagttcata	atltattcca	ggtgctagtt	6780
tcatectctg	ccccatccc	ccaagtgaca	actcaggtac	aaggagetga	atttacacct	6840
gtggaagttg	tgtccaccgt	agcttagaat	cctcatgtca	tctacgagct	agtaacctct	6900
ataacaaacc	catgggcaca	gcttccagag	tccccgtaaa	ggcatgctc	agttacaagg	6960
gtcactgcat	ttggaaatc	ccaaactatg	ggccccgctc	atltgttacg	gttcatgaaa	7020
tattcttccc	agtaaagata	caaaatgcc	accagaagcc	atltgtgcca	taagcaatgt	7080
tgtctaaaaa	tccagctgac	attcttctct	catcagggtt	ccagaaaaca	gctagaaaat	7140
tagcctaaga	ttaaatacat	catggagaag	tagaaagggt	gttataaagc	atltatccac	7200
aagattcaaa	atgaaataca	gttaattttg	tccgttttta	gacattat	caaccttcaa	7260
attatttaaa	agaagtacat	cctatatatt	gtgtgcttat	tcaaaaaagg	catggtaata	7320
cttataaaaa	gacttttaaa	atltttataa	gttttaataa	ttttataagt	aatlttataa	7380
atgaaattac	aaaccttta	agtgcactaa	ttaaatcaaa	cacactttga	gtatgcacac	7440
aagaaaaaaa	ttagttgaag	catcctgact	taagaaatcc	ttgatctttc	ataaggtgtc	7500
tgaatactca	atgtcaaaaa	cacttatgaa	gaattaaaca	ctgttgacca	caagagggaa	7560

[0006]

acctagtc	cc	agttata	acta	taaattag	aa	aatcaagg	ga	aaaatat	gtg	tcctgaga	ac	7620
ttttgaa	ata	gtcacata	tata	aacatagt	at	acaagaaa	aaa	accaacc	gct	atccctac	ccc	7680
aaggata	tgt	ttgtgg	tatg	agtggttt	ta	gtgttttg	ag	tggactg	ggt	cttggact	ccc	7740
acata	tatt	ggctaca	gag	atagagac	tt	gatttaga	aaa	atcacag	tgt	ccactttc	ta	7800
agtaag	ccct	tgaccaa	aaag	actagatt	tc	tttaaacc	ca	gttttct	cag	gtaaaat	gga	7860
aataca	acta	ttatcta	ata	aatataag	ta	agctttag	tg	tcatagt	cat	agcagtag	ta	7920
ttttca	attg	gtaaaa	agaa	actggacc	ccc	aaaaaaga	at	ttcagt	gaa	gcagtaac	ag	7980
tcttct	ggca	tatttct	cac	ctttcttt	ct	accttaa	agg	ttcaaag	ttc	ctaagtaa	tc	8040
tcagaa	acct	aaaatag	ttt	attctct	atc	ctcactat	tg	gttttta	aaa	aacatttt	gc	8100
agcatg	gacc	actgct	catg	tacagat	gct	ctccaact	ta	acaatag	ggt	tatgtccc	aa	8160
taaacc	catt	ataact	tgaa	aatatct	ttaa	gctgaaa	atg	cattta	atac	accaata	aac	8220
ccatcata	aaa	gttgaac	aat	cataag	ccaa	attataag	tc	agagacc	atc	tgtattag	ct	8280
taagtct	tg	aatggtt	tat	tttttag	atg	ccatttag	cc	acttat	attc	tcttctat	tt	8340
tattgtg	aga	actaatt	ccc	ctcttac	att	ctgtgctt	ga	cccatt	gctat	acttagt	gtg	8400
aacaag	agcc	accttct	tct	catgact	ttc	attttttt	gt	gaaaatt	tcc	ttcactca	tt	8460
cacgac	at	ggatttg	aaa	tcttac	ctac	tttaagt	actt	taaaaa	atca	tttctacc	ca	8520
tcttct	t	at	gagc	ctc	ctc	ttctcc	acac	ttcta	acttc	tcatcttc	ac	8580
actcct	gtc	ttccta	actt	cactac	agta	agtgtttt	tac	atgttt	tagaa	ctcagctc	ct	8640
ttactat	gat	tgcta	ac	gtac	cttaa	taaacc	gctc	tctag	tttt	tgtttctt	ac	8700
tctca	attat	acctttt	aga	aaaga	attaa	gagtaga	aaa	agactg	ctac	atagac	attc	8760
ttatgat	ctt	cagaaat	gag	cacagat	cat	gcttaat	gaa	aaaag	atttc	caaata	atg	8820
tgcata	gtc	cagagaaa	g	gtggc	agaaa	gtcagtgc	gt	ttgggg	gac	tattgttc	gg	8880
acatg	gccag	ttctc	agAAC	tccagt	ccct	aaattcc	ctt	ctaact	aaag	gaaaag	ccctc	8940
ttaagg	gtct	tatagaa	atc	ctgcc	acttt	cacctg	aaag	aataat	cttc	agttat	gtg	9000
cacatg	gcca	agagtaa	aaag	tctttag	tca	cttgg	aaagca	gacag	acact	gtaatg	ctaa	9060
ataatt	ggac	ataacat	gga	acttact	gag	gcctcaa	ata	tcaatt	tttac	tttggg	aaaa	9120
agagc	agcaa	ctttaa	aaagt	gattg	aaagt	aaactca	agt	tattcc	ttaa	cagagt	gatg	9180
ctta	atctaa	caaaaa	acat	gttat	atgca	cactctt	ctc	cattac	cttg	taagaaa	act	9240
ggact	agaa	acacag	ctga	aatgg	ccagt	tctgc	ctcca	tttcc	taaac	cgtgtt	ataa	9300
ttatgt	ctat	gtgacc	agta	acagac	aatg	accatg	at	atact	ttttc	atatgt	ttt	9360
tgtttt	gttt	tcaatg	ttt	tggct	tttc	tcagtat	cag	ctaag	aggcc	attaac	acag	9420
atatct	at	atggac	atgc	gagact	gtt	ttcac	ctct	ttgcag	aat	cataaa	gaaa	9480
tgatg	gggaa	aacacat	caa	agatag	agt	gataaa	gcaa	atgtg	ccaca	tatacac	cat	9540
ggaata	actat	gcagcc	atga	aaaaga	atga	gttcat	gtcc	tttgc	aggg	catgg	atgaa	9600
gtcga	aaacc	atcatt	ctca	gcaaa	ataac	acagga	acag	aaaacc	aaac	actgaa	tttt	9660
ctcact	cata	atggg	agtt	gaaca	atgag	aacacat	gga	cacag	ggcc	tgttgg	ggg	9720
gtggg	gggca	agggg	aggag	agcatt	agga	caaa	accta	gtgctt	gagg	agcttaa	aac	9780
ctagat	gacg	ggttg	atggg	agcag	aaaac	caccac	ggca	catgt	atacc	tatgta	acaa	9840
acctg	catgt	tctgc	acatg	tatccc	agaa	cttaa	agtag	aataaa	ataa	ataag	taaat	9900
aagga	atgat	gggaca	aaaca	agttt	ctgtt	attgt	ctctc	tactg	accaa	aggg	tggtca	9960
gagagt	atag	gatgaa	gcag	at	ttgtgata	tcctt	gaata	gatct	gctct	ttactat	gaa	10020
ttctat	catc	tactccc	agc	gtatg	tgga	acggg	accaa	cttact	tgcc	tggat	tttg	10080
tgaa	attg	ttctag	ggg	accaag	agt	tcctct	actt	gatat	gaagt	tgggtg	gtt	10140
aagat	gatag	gattgg	cttc	tgctt	ccatc	agaat	cttaa	agggc	aggg	atatgg	acta	10200
gttgg	tattg	gatctt	ggaa	actgt	gatgc	attggg	aatg	gtcac	actcc	cagagt	ttt	10260
ggacaca	aaag	aatgtt	tttag	tgttcc	ctac	acacc	agaca	cgggc	catga	aggaat	ctga	10320
agagc	ctacc	aaacct	tgca	caagag	aaaa	gcttt	acttg	gaacat	catc	caggct	caga	10380
gaacaca	aaat	at	ttcattc	cagta	agacg	tttctg	gtct	tttct	cttc	ctccc	ttcc	10440
ctgaac	ctac	cctagat	gag	ctatg	gcctc	aaagt	gccag	tagaac	gtaa	gaagg	aagg	10500
gaacc	acact	cattc	ctgcc	ttcaac	aat	tacac	aggg	tagaa	agaga	tttat	attaa	10560
atcaag	ttg	gacttt	caat	tattat	atag	taccaa	acaa	tcta	attgct	gaacta	agat	10620
atactt	gtgc	aattta	agg	aattg	tagaa	tagcat	atta	attaga	atca	agaaa	ataat	10680
tcatg	aa	tgctata	aat	cctac	ccaag	cgcag	ggg	tagcat	ctct	aatgaa	attc	10740
tctaa	agag	caagag	cagg	cacaat	gagt	ttttg	tttga	ttaa	agattc	catttag	tgc	10800
ttatcc	aacc	tagca	attac	at	ttgtatg	tcagat	gtt	ttta	aaaaa	taac	aaaa	10860
aaagt	acctt	aaata	aa	tagg	at	tagt	att	aca	attg	aaat	taaaa	10920
attat	atgaa	ttag	attgat	tgaa	attgat	acttt	cttaa	ttct	ctct	tcaac	acaca	10980
gacac	acaca	cacac	acaca	cacac	acaca	cacg	atgca	tacaa	acaca	tctg	aattct	11040
ataaa	atcat	tctg	acctg	atgag	attcc	atag	ttact	catg	caacag	aacata	atgt	11100
ctaa	atgaag	tttct	ggtct	ctg	ttttaca	tgga	tattg	agta	aaatca	ttcc	tattc	11160
ctgga	agaat	agcta	agaaa	ggatt	cacag	gtgagg	acat	gcgt	tttttc	agaag	atgag	11220

[0007]

aacaaagatg	agaagatgag	agcaacagaa	tgtcctatat	cctaattgctc	tgtgctgact	11280
tcggagtgcc	caatatgata	gagatggaag	gaactctgaa	aacaaattgc	cagaatttct	11340
aaggaacagg	agatggtgag	tgagtgaaac	aagccatgga	ctggctgtat	gggggcagct	11400
attagagaca	actaccctta	gacttctttg	gtgattggtc	aagctaactc	tttccttcag	11460
agtctctcaa	ttataagact	tagcttgtgc	catttagaac	agacaagaac	acagagaatt	11520
atagaacaat	ctgactacag	gttcttaagt	tatagcaatg	aaacttgtag	ttggccggca	11580
ggaaaatatt	ctgagatgtg	gattcaaagt	ttctaagtgt	gcacacgtac	acacacacac	11640
ccctacctgc	atgctgtttc	taatttacia	agactactca	agtaaagagg	ggtaatttca	11700
caccccagga	ggtctgtata	aagataactc	tggtctttaa	agcatcgggt	ttcaggtaga	11760
ggtgaagaga	gaatgaatca	aactcaaaact	gccatcctcc	cagggttaaag	atgagtcag	11820
tcattgtgga	gccctctatt	aacacaggac	atgctaggaa	ggcccattaa	cccactgccc	11880
tagcacattt	gttaacgtcc	tagtgcattt	gttgatatca	acagttcaca	gtttttattc	11940
tgatagggat	ctattccagc	agaccagctt	ctgtgacctc	tcaggatgcy	aaaaagtaac	12000
acaagaaaag	cttcttatgt	agtgaattga	gaaggaaata	cctagatcaa	tattccctca	12060
gcacctctgg	taggaagtcc	ttagtaggag	aaaaacacca	tgaagacctc	tagtgcagaa	12120
ggaaaagggg	gtagggggtg	gtggaaggga	agctaaaaga	aggggctgga	ggttctcaga	12180
attcaaacca	cacaaacaaa	tgaagtattg	aggtcccaga	cttgatctgg	gcccagtgty	12240
aaagccctaa	cttattttctc	cagaagaata	gtcctctgg	ttttagactt	ggcactgtgg	12300
ggagaaaccag	agtgatctat	ggtggatata	cacacaaaca	tagacacaca	tatttgcatt	12360
tagtaatttt	tgtaaaattt	ccatttgcct	ctctgatcct	gtctgtatct	ttgggaatag	12420
atgtaagaat	attacatctc	tcaggcttgc	tcctgcccag	gtttctgaac	gtggaatata	12480
tttctccagg	gaaactcagt	attatgagat	ttgggaggty	gaagttaggc	cacagccatc	12540
tcagggagac	gtttcacaga	catgagtttt	ggcagcagcc	ttgtgttcta	aagacattta	12600
ctcctagggg	ctctagagga	tctgcaacat	cagcagaggc	ttcctgtggy	ttcctgatct	12660
tttaaaatta	gggttctgca	gtgacttctg	ctcctccaga	ccccctaaca	gttttaaggy	12720
ctaattccct	gtaatatatt	cagttctgct	tagactgatt	acagggattc	ctatttcttg	12780
actgaattct	catggctata	gtggctcgtc	accatttgac	atcaccaaga	agtcctcatt	12840
caggtgcctt	tggaatttcc	ctcaaacaca	caggaaatta	gagtttgaaa	gaaaacggag	12900
aaccatgagc	actgtccaaa	taggaacttc	tctcctatca	cagagaaagg	gaactgaaag	12960
tcatttctca	agtctcccaa	atttagtaat	ctcacaagaa	gaaccaatca	gtgttctagg	13020
actaaacagt	gtcataagtt	gctgagcaac	aacttggatt	gaagatgcta	ttataatata	13080
tgaaatgtct	ttgaattttac	catgtttttc	tcaagcacca	tttaagaaca	aggcattatg	13140
gcagccagca	aagggcagac	atagaaaatt	atcatggtt	ttgcctctaa	aagaggagat	13200
gacaagctta	aatcatagga	tcagactctt	agcacagact	gataccatag	gctctcatct	13260
ggcccattct	cctgactctt	taccttccag	gaaaggtatt	cctgaaaaat	tgagagagag	13320
accatgctgt	aggtctcttt	ctagcgtatc	aggagttaat	gccacagtgt	gttcaagacc	13380
ctttgatgcy	atcagataat	cagtaatgta	tggaatattt	gtgttcataa	cttgtgagaa	13440
cggtctcatg	gcaggacaag	accccagcac	aacagtatgg	aaaatccacc	ctaagcagac	13500
atgtcatgac	tgatggtgaa	caatggactc	accagccagg	cacgggtggct	catgcctgta	13560
atcccagcac	tttggggaggc	agaagcaggc	agatcacgag	gtcaggagat	caaaaccatc	13620
ctggttaaca	tggtgcaacc	ccgtctctac	tgaaaatata	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaatt	13680
ggccgggcat	ggtggcgggt	gcctgtagtc	ctagctactc	gggaggctga	ggcaggagaa	13740
tggtctgaa	ccaggaggca	gagctttcag	tgagccgaga	tcgtgccact	gcactccagc	13800
ctgggcgaca	gagcaagact	tccgtctoga	aaacaaaaca	acaacaaaaa	aaacaatgga	13860
ttcaccatcc	gatgggctcc	ctcactgcca	ggtcactctt	catggaagta	tttgtattcc	13920
agtcctttct	gtggaaagaa	cttaacattc	tccttttcat	aacactgtat	cttcagaaac	13980
aagagagtct	aagtctccta	attttcagga	gtgtctatgt	tgaacatcaa	aatatattct	14040
ttagagcaga	tctttaataa	tcatatgaca	agagaaaaac	tttcataatc	ttatgacatg	14100
aggaagggaa	tattaaagcc	gttctgtggg	ttattatctc	taacgttccc	aatagaatag	14160
gctttgccag	ctgggtgctg	tggtctatgc	ctgtaatccc	agcactttga	gaggccaagg	14220
cgggcaaatc	acgaggtcag	gagctctgaga	ccagcctgac	caacatggtg	aaaccccctc	14280
tctacttaaa	atacaaaaat	tagccgggca	tggtggtggg	cgctgtaat	cccagctact	14340
caggaggctg	atgcagagga	atcgcttgaa	cccgggaggc	ggagattaca	atgagctgag	14400
atcacgccac	caactccagc	ttgggcgaca	gagcaagact	ctgtctaaaa	aaaaaaaaaaa	14460
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaat	aggctttgcc	cattatactc	tctcatattc	14520
attgacctga	atcctcaaat	gaggtgtgtc	cattagtcaa	ctccaatctc	ttgtcatata	14580
taagatggta	gagatgagaa	gaaggtagct	cctttacagc	ccactatttc	cactaactac	14640
taacctgtgt	tcaagataca	gcctttcatc	cttctccagt	gttgagagty	ttgaacctca	14700
gagtttctcc	tcttattttc	tctaaatgag	atacaatgcc	agccatccca	agctcttggc	14760
ctgagttggt	catcttgaag	tctaggactc	caagaagcat	gaaagagctt	ctttagttaa	14820
gctatgtcct	cagtactgcc	aaaattcaga	caatctccat	ggcctgacaa	tttaccttct	14880

[0008]

```

atttgggtaa tttattgtcc cttacgcaaa ctctccagct gtcatggcac agacatatga 14940
tctgtatтта gctctcactt taggtgtttc cattgattct attctcacta atgtgtttca 15000
ggatataccc tgtctagaac tcagattggg gttaaagagt ctgtccgtca ttgaccaaca 15060
gtcttaaata cttgatttgt tgtcgttgtt gtcctgtttg tttaaagaact ttacttcttt 15120
atccaatgaa cggagtatct tgtgtcctgg accctttgca agaacccttc ccctagcaac 15180
agatgcgtca tctcaaaaata tttttctgat tggccaaaga gtaattgatt tgcattttta 15240
tggtcagact ctattacacc ccacattctc tttttcttta ttcttgtctg ttctgcctca 15300
ctcccagact ctactgactc ccaacagagc gcccaagaag aaaatggcca taagtggagt 15360
ccctgtgcta ggatttttca tcatagctgt gctgatgagc gctcaggaat catgggctat 15420
caaaggtagg tgctgagggg atgaaatctg ggacgataga ctacgaagca ttggagaaaa 15480
gacctatgga catttgggag ataatgtgtg gagtgaaaga atagtgtgac aggtattatg 15540
tggctctgac agaaggtata acaaattgtg gtttgggtga gttcttccct caccacaaac 15600
tgaagtaagt caaatttggg tttagaggatc aaaactgagt tgtgtattga tgaatagcaa 15660
ggctctgcta caagccaaac tgggggtggg ggtgggggtg ggggaggaag aatattttct 15720
ggcaagcatt aacaagttat atttctgggc ttttaattatt ctttctggaa aattagtaaa 15780
attaaaaact aaaaaccaca catagttttg ctagaattaa atgaaaaaaa aagttattag 15840
ccctgttctt atctgaatac atgatacagt agttattttt tggagtgtaa atcctgtcgg 15900
tatataatga gcacataatg tgtgttgaag attactagaa gaaaaagtca tcaaaaagca 15960
acaatttacc ccaggaaaag gggaggggag gcatgctgat atgagttgcc tcatgggaca 16020
gtgatagcca ttcctgtcct tcccctctcc atggtacagc agatcttata tcatgttaac 16080
ttagtaatat ttccaagaga gtagaaaaat gagtaaggaa atggggaatc tgatattatt 16140
ctctctcatc tccagagcaa cattggtgct gttgtaaaga tgtactgtag aaaagtattc 16200
ttcaccagc atgaccccca cagaaggtgt caggtagact tgaataaagc aaagtaataa 16260
cccagctccc ataccatag tggcaattgt agatttctat tgcccaaaa gagccataca 16320
taggtatact tacctagaaa gacagaggct cttcccttgg tttgtgaaga ggcagctagg 16380
atatttgtgt gtgtttgcat agatgcaaac ggtaataaaa ttcttaggtt tatcaataca 16440
cagtcaaaaa ttaaagtctc tcatcttggc tgggcacggt ggctcacgcc tgtaatccca 16500
gcactttggg aggccgaggc aggcgatca cgaggccaag agatcgagac cgtcctgggc 16560
aacatggtga aaccccgctc ctactaaaaa tacaaaaaat tagctgggta tggtggcaca 16620
cgctgttagt cccagctact cgggaggctg aggcaggagg attgcttgag cccaggaggc 16680
ggagtttga gtgagctgag atggtgccac tgcactccag cctggcgata gagcaagact 16740
ccgtctcaaa caaccaaac aaaaacaaac aaaatatctc acctatctt tgaagactaa 16800
ggaaaaaaaa atctcccaact catcgataca ctccacagag gcagcatact ctccaagtgt 16860
agctttctct tttcatgttc attattccct tgggtgtggt tattctcaat gtcaatcata 16920
acagaacatc ttccataata acagtcccaa tttaggagc attaagataa aaggtggaat 16980
tgccaaggtc aatccagacg agaaccttct catagaggta accaccgtgt gggtttggat 17040
gctgggaagc aggggggacta tgacgctaca aggtctcagt cttaattttt ggagtatttc 17100
agtcctcagg tatattttcc atagatttgg cccctaaata aaaagaagct tctgactcta 17160
aaatgtaaac agtgcttgtt acagtcttgt tgatatatta agaaattact caccttatct 17220
catttaatct taaaaacaaa cccctgacag gatcaaaacc acagcagggc tacataatag 17280
gaaaactata cataaatagg tagaataatc tgctcaggat cactaggtaa gttgctgaat 17340
aagaattcaa gatgtttttg atcccagagt ttaaaaccca acctttcaaa cagcgtttct 17400
ttcttcttag agtacaatgt tctgagaag agatcctctg gaattctggc ctaagtgtat 17460
ttaatgcccg ggtaaagaaa gtgagagaac atttctctt aggggctgct gctggatttc 17520
taaaaagaaa ataatttctc agctagtaac atggagccaa acaacagctt cacaagactc 17580
tgggttcttt agccctcatc tecttcaatc caccctctt ataaccagtc cttcttgttt 17640
ttcccctccc agctttgttc agcagcatgc ccttcaacca gacctgtct tgtcaactcat 17700
ccctactcgc catcattctt tcattctctt tggcccaatc tctctccacc acttctgccc 17760
tacatgtatg taggttatct atttccctct cttgattccc cccaccaaac tctctttctc 17820
cacttctcgc ctttcagaag aacatgtgat catccaggcc gagtctatc tgaatcctga 17880
ccaatcaggc gagtttatgt ttgactttga tgggtatgag attttccatg tggatatggc 17940
aaagaaggag acggtctggc ggcttgaaga atttggacga tttgccagct ttgaggctca 18000
aggtgcattg gccaacatag ctgtggaaa agccaacctg gaaatcatga caaagcgtc 18060
caactatact ccgatcacca atggtacctc cctctctgct gcaactcctg acatgggaat 18120
ccatagtttg aaagttagtt cttcagctct ttgtgttaga ttattgtaac tgattttccc 18180
tccaagggcc taaccttgc attaacaagc cccaaattct catgccagag gctcgagaac 18240
tttatgggtt tgatcctatc ttgtttgtct caagtcttgt ctctgtcatc catggtctcc 18300
taciaagtca ttgccctaag ttcattgctgg gggagccaga agggaggtcc ttggatatct 18360
tatacctcaa tattggctca atttcttggg gaggggtgc tgtcagagat tgttatctga 18420
ggatgtgaca tagatttctc agggcacaat ttcaactact tttcagctt tagggtttt 18480
agatacgttt gtaccacaat tgagcatggg agggagaggg gtgagcctaa gcagtgatgg 18540

```

[0009]

ctgatttctg	tcatgtctgt	catgtgtccc	ccagtaacctc	cagaggtaac	tgtgctcacg	18600
aacagccctg	tggaactgag	agagcccaac	gtcctcatct	gtttcataga	caagttcacc	18660
ccaccagtgg	tcaatgtcac	gtggcttoga	aatggaaaac	ctgtcaccac	aggagtgtca	18720
gagacagtct	tctgcccag	ggaagaccac	ctttccgca	agttcacta	tctccccttc	18780
ctgccctcaa	ctgaggacgt	ttacgactgc	aggggtgggc	actggggctt	ggatgagcct	18840
cttctcaagc	actgggggat	ggaccaaac	tcaatctcct	ttatttcaag	gtttcctcct	18900
atgatgcttg	tgtgaaactt	gggtttctaa	ctgtttcata	atatctgcta	caattaatat	18960
aactgtcttc	tctactatc	cagcttccgc	cttttttaa	tctgtaattc	tctcaataca	19020
tcatctgttc	ttcctcttct	ttaatctatg	aataactttt	ctctttatta	agaacctac	19080
atctgattct	gagtgttact	tcttcccaca	ctcattacca	tgtactctgc	cttatttccc	19140
cccagagttt	gatgctccaa	gcctctccc	agagactaca	gagaacgtgg	tgtgtgcct	19200
gggctgact	gtgggtctgg	tgggcatcat	tattgggacc	atcttcatca	tcaagggatt	19260
gcgcaaaagc	aatgcagcag	aacgcagggg	gcctctgtaa	ggcacatgga	ggtagtag	19320
gtgtggtcag	aggaagacat	atatggagat	atctgagggg	ggaaaacagg	gtggggaaag	19380
gaaatgtaat	gcatttaaga	gacaaggtag	gaacagatgt	ggctcttgat	ttctctttgc	19440
tagaacgaat	cagacattgg	tatcatctgg	tatcccagg	cttcagggtc	tgtcatcctc	19500
ttctatagac	ggcaccttg	atcacggctc	cagctctaga	aatcatctcc	agtacctaaa	19560
accattgttt	cacattagaa	tactgagtct	agggatctag	aaaatactga	gtctagggat	19620
ctagaaaaat	aagcctcaag	atgtggcac	atcctagctt	gtatttctctg	gggcaggtca	19680
tcagtccaga	agcatttcca	gatcctggct	ccttccaggt	tagggtcaat	tcattgcatg	19740
aaatgggaat	ctcttagagg	ccaatgcctg	cttttgcttc	tttagtctca	aatgtagtat	19800
gagaaaactct	aaaaaaaggt	aaagcatggt	tgtctattat	gttcagttgg	agagttaggt	19860
atacagttag	ttcatgttgg	aaaggttaga	tgaacattga	aagaattttg	caaagtcaaa	19920
ggattaagag	agaagaggaa	ggaatctgaa	gcaaggagct	caaaaactgat	cttaaaactcc	19980
ttggtaacta	tgtgtgtctt	gctataggtg	atgggttttc	ttagagagaa	gatcactgaa	20040
gaaacttctg	ctttaatggc	tttacaagc	tggcaatatt	acaatccttg	acctcagtga	20100
aagcagtcac	cttcagcatt	ttccagcct	atagccacc	caagagtggg	tatgcctcct	20160
cgattgctcc	atactctaac	atctagctgg	cttccctgto	tattgccttt	tctgtatct	20220
attttctctc	attttctatc	attttattat	caccatgcaa	tgctctgga	ataaaacata	20280
caggtctctg	tctcagctat	ggaatgcccc	atggggcctc	tcttgtgtac	ttattgttta	20340
aggtttctctc	aaactgtgat	ttttctgaac	acaataaact	attttgaaga	tcttgggtgg	20400
aatttttggg	gtttaagcca	gttctttggg	tggcgggtgg	gggtggggag	tcggctctgg	20460
ggaatatatg	tgatcctttc	ccggtaaaat	atctgaatgt	tgaatttctc	ttataaattc	20520
tagaattcat	cagacatata	ccggttcatt	tgggcttggg	ctcattttgt	gcatctgcag	20580
gcaaccctct	tgttgtggtc	tagtctcat	caggaaaacc	taaagtgggg	ttggtttggt	20640
gggagatctc	tactgagcaa	tgatataact	ctatcttcag	tagagtgaat	ctgaaaccgc	20700
aaagtatgga	tctcagatg	catgggatgg	atgggagcag	atggggttag	agtggggcag	20760
aggaagacag	agaatccat	aaacattgca	ggatttacct	atcaacatcg	ttcattccag	20820
atttaatgag	caaagagatt	ggacactgaa	gactggcctt	accattctctg	ttagacatag	20880
tctcagatgc	ctattttatt	accgagagag	tagtctgact	gattcttgaa	accaccttat	20940
atgtgaagat	gtgtctttga	gtggaagagc	tgagtgaat	ttggggttgg	ggagaaagat	21000
atgacattaa	gatgagagga	aggaatattt	gaaacacgat	gaactgttgc	tcatttgtct	21060
ataaaactat	gacttgatat	ttatctctaa	aatagtttct	agaacctgcc	ataaaccact	21120
aagataaact	atctatgata	gtgtggtaga	ctgcaataaa	atgctgttga	aatgagttag	21180
gcttgggttt	catcttggct	gtatcattta	ctagctatgt	tttactgggt	atcttactta	21240
acttagcctc	acattactca	tgaaaatact	gggtgttaatt	tttactacat	tgaattaata	21300
tcagaattaa	aaggaaaacg	caagcaaagt	aattagatac	atgcttagtg	ataataaaat	21360
attgcaaaaa	attatacatt	ctgttgtttt	tctcaaaatt	tctatagagt	gatgataaaa	21420
atctaagaga	agctaaacaa	aacaaggata	aaccaaaagca	tcatgacctt	ctaagcctta	21480
ctaataaata	agaagtttct	cggctgggca	cgggtggctca	cgctgtaat	ccagcacttt	21540
gggaggccga	ggtggggcga	tcacaaggtc	aggaatcaa	gacctcctg	gccaacatgg	21600
tgaaccccca	tctctactaa	aaatacaaaa	attagccagg	cgtgggtgata	ggcgcctgta	21660
atcccagcta	ctctggaggt	tgaggcagga	gaatctcttg	aatccgggag	gcagaggttg	21720
cagtgagccg	agatcgcacc	actgcgctcc	tgctggcga	cagactgaga	ctccgtctca	21780
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaagtttc	tctactgttg	gttcagagaa	tcaaagcaga	21840
atcttgagac	tactgacggt	agaataggta	tgaatgtctt	tcttacctga	ctacaaactt	21900
tattataaaa	taaatagctt	aacacagaga	atacactaaa	acttagacaa	gcatggatta	21960
agaaagcaaa	aaagtaaaccc	ataactacc	atgtaagaaa	accatttttg	gccaggcgtg	22020
gtggctcacg	cctgtaatcc	cagcactttg	ggagcccgag	gcggccggat	cacgaggtca	22080
ggagatcgag	accatcctgg	ctaactgggt	gaaacccctg	ctctactaaa	aaaaaaaaaa	22140
aaaattagcc	gggtgtgggtg	gcgggtgect	gtagtcccag	ctactcgaga	agttgaggca	22200

[0010]

ggaaaatggc	gtgaacccaa	gaggcagagc	ttgcagtaag	ccgagatcgc	accaactgcac	22260
tccagcctgg	gcgacagagc	gagactccat	ctcaaaaaaa	agaaaaaaa	aaaaaaaaa	22320
aaaggaaaac	cattttaata	gactttttatt	tttagagctg	ttttaagcta	acagaaaaat	22380
tgcagaaatt	gtatacagag	ctccccacc	cccagtttct	acaatgctta	acatcctgta	22440
ttaatgtgg	acacttgta	caattgatga	accaatacta	ataattatta	ttaactaaaa	22500
ttcatagtta	tacgagggtt	cactctgtat	tacacagtta	tatgggttct	gacaaatca	22560
taatatacata	tatccacat	tacaggatta	aacaaaatag	cttcaactgat	ctaaaaatga	22620
cccaggctcc	atctactcat	ccttccttcc	tccctctgaa	ccattggcat	tctctgagct	22680
atctactagt	gttttgcctt	tttcagaatg	tcacatactt	gtaatcatac	agcatagagc	22740
tttttcagat	gagattcctt	tgcttagcca	tatgcataca	ggtttcctgc	gtatattgtc	22800
atagcttgat	agcttatttt	tctttaatgt	taaataatac	tccattgtat	aaatgtacta	22860
tggtttat	accattaat	ctattgaagg	acatcttgg	tgcttcta	ttttggcaat	22920
ttcatagtaa	gctgctataa	acatccatga	acagatgttt	gtgcagacac	aagttttcca	22980
ctttggataa	atacatagaa	gggcagttgc	tggatcatat	ggtaagagta	tgtttagctt	23040
tgtaagaaac	aactagaata	tcttccaaaa	tggtctgatac	attttgcatt	cctaccagca	23100
acgaatgaga	gtccctgttg	ttctatatcc	ttgccagcat	ttgggtattct	ggggtttggg	23160
atctcagcaa	gaaagccatt	ttaatatctt	tttattttta	aataattata	gattcagggg	23220
aaattgcaaa	gacagtatag	agacattctg	catacgcctt	caccagttt	ctccaaatgt	23280
ttatatttta	agtaattata	gcacagtagc	aaaaccaaga	aaataccttg	atacaatgtg	23340
ttatgatatg	tttaccaca	tcttagatg	ttttagatg	catgtaacca	ccaccacaat	23400
caagcacaga	gctattccat	atcacagaga	tcttcatcat	gcttcccttt	atagccaaat	23460
tccccccaca	caatcacctt	aacaacttaa	aaccactaat	ttctttgcta	ttaatctcta	23520
gaatagtgtc	attttgaaaa	tactagttaa	atggaatcat	gcagtatgtg	actgggtgtt	23580
ttcacttagc	ataataccca	tgagatccat	ccaagctgct	gcatatatca	acaatccttt	23640
tttttttatt	gctaagtagt	attccatggt	ctaaatgcag	cacagtttgc	ttaactat	23700
gocatttgaa	ggacattttg	gctgttttcta	gtttggggc	actataaata	aggtgtttt	23760
tttaccatgt	tttaaggtttt	tctatgagca	tgagttcatg	agttttcatt	tctctggtat	23820
aaatgtctgg	gatataattc	atgggcatat	ggaaatata	gttttagttt	tcaagaaact	23880
gccaaactta	gccaaagtat	atggcttata	cctgtaatcc	cagcactttg	ggaggccaag	23940
gaggaaggat	aaattgaggc	caggaatttg	aggccagccc	cagcgtctac	actttttttt	24000
ttttttgaga	cagagtctcg	ctctgttgcc	agactggagt	gccatgatgc	gatctcggct	24060
cactgcaacc	tccgcctccc	aggttcaagc	aattcttctg	cctcagcctc	tcgagttagc	24120
gagactacag	gtgcacacca	ccacgcccac	ttattttttg	tatttttagt	agagacaggg	24180
tttaccatgt	ttggcaggga	tggtcttgac	ctcatgacct	cgtgatccgc	ttgcctggtc	24240
ctcccaaagt	gctgagatta	caggcatgag	ccaccgtgcc	cggccaaatg	ttttgttttg	24300
ttttgtttt	ttgtttttt	gtcaggtgga	tgaggtggca	tgcccctata	gtcacagcta	24360
cttgggaggc	tgaggtggga	ggattgcttg	agcccaggaa	ttcagggctg	cagttagcca	24420
ctgcacttca	gectatctga	cagagcaaga	tctgtctcc	aaaaggaagg	aagggaggga	24480
agaagcaagg	aaggaaggaa	ggaaggaagg	aaggaaggaa	ggaaggagaa	aaaagaaggt	24540
agggaggagg	gaaggaagg	agggaggagg	gaaaaagaa	agaagaaagg	aagttaaaaa	24600
gaaggagggg	agggaggagg	gaagaaagga	aagatggaag	aaaggaagga	agggaggagg	24660
gagaaagaga	aagaaaaaga	aggaaggaag	aaggaagga	gggagggaag	ggaggaaggg	24720
agggagggtg	aaaggaagga	aagaaggaag	gaaggagaaa	gaaaggaag	agagaaagag	24780
aaagaaaaaa	gaaagaagaa	agaaagaaga	aagaaagaga	gagaaggaag	gaaagaaggg	24840
aaggaagga	aagaaagaaa	aagaaaaagg	aaggaaggaa	agaaggaagg	aagaaagaaa	24900
aagaaagaaa	gaaggaagga	aagaaagaaa	gaaagagaaa	gaaagaaacc	gataaaactat	24960
tctctaattg	ctttgtggga	gtatggccac	tttcatcata	ttgatttttc	ctttttttt	25020
ttttttttt	ttttttgcga	tagagtctgg	ctctgtcgcc	caggctggag	tgcaatggcg	25080
tgatttcggc	tcaactgaaac	ctctgcctcc	tggttccagg	tgattctcct	gcctcagcct	25140
ccctagtagc	tgggattaca	ggtgcacacc	atcacgcctg	gataattttt	ttgtattttt	25200
actagagatg	gggtttcacc	atgttggcca	ggttggctct	aaattcctga	cctcaggtga	25260
ttgcctgccc	ttggcctccg	gaagtgtctg	gattacagat	gtgagccacc	gcgcccagac	25320
aatattgatt	cttccttttc	catgaacatg	atattttttt	ccattttatt	gtgtcatctc	25380
tgagttcctt	gagcagtggt	ttgtagtttt	ccttgtagag	atctttctcc	tccctagtta	25440
gctgtattcc	taggtatttc	gtgtgtgtgt	ggcaatcgtg	aatgggatta	cgttcctgat	25500
ttggctctca	gcttgactgt	tgtgtgtgat	aggaatgtta	gtaatttttc	cacattaatt	25560
ttgaatgcc	agacttcgct	gaagttgtta	attagcttaa	agagcttttg	ggctgagact	25620
atggggtttt	cttgatatag	gatcatgcc	tctgcaata	ggcatagtcc	aatttcctct	25680
cttctgttt	ggatgccttt	aattcttttt	cttgctgtgt	gccctggcca	agacttccaa	25740
tactatgttg	gataggagta	gtgagagagg	gtatccttgt	cttgctgtgg	ttttcaaggg	25800
gaatgcttct	agctttttcc	catttagtat	ggtattagct	gtggggttgt	cacagaaggc	25860

[0011]

tcttattatt	ttaagttatg	ttcacttact	actcagttta	ttaagagttt	ttaaataaag	25920
ggatattgaa	ttttatcaaa	aaccattcct	gcactctattg	agctaatacat	gtggcttctg	25980
tcttttagtac	tgcttatgta	atgaatacaa	tttattgatt	tgcatatggt	gaactaacct	26040
tgcatcacca	agataaaagca	tacttgatca	ttgtagatta	gctttttaat	gtactgctgg	26100
attcagtttg	ccagtatctt	gtggaggatt	tttgcataaa	tcttcatcaa	taataatttg	26160
ctgaagtttt	cttttgtgtg	tgtgtctgcc	aggttttgtg	gctgatcctg	atgatgctgg	26220
cctcatagaa	tgagtttagag	aggatccct	cttcccaaat	tttttggact	aattataaca	26280
ggaatggtag	cagctctctt	ttgtacatca	ggcagaattc	agctgtgaat	tattctagtc	26340
ctaggggttt	tttttgtttg	gtagtctact	tattactgat	ttaatttctg	agatcattat	26400
cagctctgtc	agggattgaa	tttcttctg	gttctgtctt	gggagggtgt	acgtgtccag	26460
aaatztatca	atttcttcta	gttttccctag	tttatgtgca	tagagggtgt	tttaataatc	26520
tctgatgggt	atttgtgttt	ctgtggggtc	agtggtaata	tccccattgt	aatttctgag	26580
tgtgattatt	tgaatctctt	ctcttttctt	ctttattagt	ctaactagag	gtcttttttt	26640
tttattaatt	tttttttagg	aaaccaattc	ctggactcat	tgatcttttg	agtgttgttt	26700
ttttttctgt	ctcaatctcc	tttagttcag	ctctgatttt	ggttatttct	tgtcttctgc	26760
tagccttgat	attggtttgt	acctgggtga	ccagttcttt	tagttgtgat	gttaggttat	26820
taaattgagg	tctttctttt	tcatgtgggc	attttagtca	taaatttccc	acttaaacct	26880
gccttagctg	tgtcccagag	attctgggat	gttgtatcgt	tgttctcatc	agttttaaag	26940
aacttctcaa	tttcttccct	aatttcatta	tttacacaaa	agtcattcag	gagcaggcgg	27000
ttcaacttcc	atgtaattgt	agggttttga	atgaatttct	tagtcttaat	ttctaatttg	27060
attgcactgt	tgtctgaaag	attgtttttt	atgatttcag	ttcttgtgca	tttgcctgag	27120
agtatttgac	ttccgattat	gtgatcaatt	tttagagaca	tgccatgtgg	tgatgagaag	27180
aatgtgtata	ctgttgtttt	gggtgggata	attctataga	tgtctatcag	gtccatttga	27240
ttcagtgctg	agttcaagtc	ctgaatatct	ttgttaattt	tttgtctcga	tgatctgtct	27300
aatattatca	gtgagttggt	aacatctcca	agtattatg	tgttggagtc	taagtctctt	27360
tgaaggctcc	taagaacttg	ctttatgaat	ctgggtgttc	ctgtgttggg	tgctgatctg	27420
gtttggctgt	gttcccattc	aaatctcacc	ttgaattgta	gctcccacaa	ttctcacatg	27480
ccacggggag	cacctgggtg	gaggtaattg	aatcatgggt	gctgggtctt	cccatgctat	27540
tctcatcata	gtgaataagt	ctcatgagat	ctgatagttt	tataaagagg	agtttccctg	27600
cacaagttct	cttgtcttgt	ctgccaccat	gtgagatgtg	attttcaact	tccatcatga	27660
ttgtgaggca	tccttagcca	tgtggaactg	tcagtcaatt	aaatttctt	cttttgtaaa	27720
ttgcccagtc	tcaggtagat	ctttgtcagc	agcataacag	actaatagag	gagagtggag	27780
cactgctgaa	aagatatctg	aaaatgtgga	agtgactttg	gaactgggta	acaggcagag	27840
gtgaaacag	tttggagggc	tcagaagaag	atagggaaa	gtgggaaatt	ttggaacttc	27900
ctagagactt	gttgaatgcc	tttgcccaaa	atgctgatgg	tgatgtggac	aataatgtcc	27960
aggctaagg	agtctcagat	ggaaatgagg	aacttgttgg	gaactggagc	aaagggtgact	28020
cattatgctt	tagcaaagag	actggtggca	ttttgtccct	gtcctagaga	cttgtggaac	28080
tttgaacttg	agagagatga	tttagggtat	ctggcagaag	atatttctaa	gcagcaaagc	28140
attcaagagg	ttacttgcgt	gctgtttaaag	ccattcagtt	ttataaggga	agcagagcat	28200
aaatgttttg	aaaatttgca	gcttgacaat	gcaatagaaa	agaaaatcca	attttctgag	28260
gataaattca	agctggctgc	agaaatttca	tgggtaacga	ggagctgaat	gttaattatt	28320
aagacaatgg	ggaaaatgct	tccaaggcat	gtcagaggtg	ttttttttt	ttttccagag	28380
tctcgctctg	tcgcccaggc	tggagtgcag	tggtagatgc	tcagctcact	gcaagctctg	28440
cctgcagagt	tcattgccatt	ctcctgcctc	agccttcaa	gtagctggga	ctacaggcat	28500
ccgccaccac	acctggctaa	ttttttgtat	tttttagtaga	gacgggttt	caccatgtta	28560
gccaggatag	tctcgatctc	ctgacctcat	gatccacca	cctcggcctc	ccaaagtgtc	28620
gggattacag	gtgtgagcca	ccatgcctgg	ccatgtcaga	ggtcttgatg	gcagccctgc	28680
ccatcacagg	cctggaggcc	taggaggaaa	gaatggtttc	ttgggctggg	cccagtgtcc	28740
ccgtgctgta	tgggttcttt	ggacttgggt	ccctgtgtct	cagccgctcc	agctgtgact	28800
aaaaggggccc	aacatagagc	tcaggccacg	acttcagagg	atgcaagccc	caagccttgg	28860
cagcttccat	gtgggtgtga	gcctacgtgt	acacagaagt	caagagttga	ggtttgggaa	28920
cctccaccta	gatttcagag	gatgtatgga	aatgcttggg	tgtccaggca	gaagtttctg	28980
gcttgggag	ggcactcatg	tggaacctct	gctagggcag	tgcagaaagg	aaatgtggag	29040
tgggcaccct	cacacagagt	tctcaatggg	gcagtgccta	gtggagtttt	gaaaagagga	29100
acaccatcct	ccagactcca	gagtgatgga	tcc			29133

<210> 3

<211> 22485

<212> DNA

<213> Homo sapiens

[0012]

```

<220>
<221> gene
<222> (1)..(22485)
<223> HLA-DRB1*010101 gene

<220>
<221> misc_feature
<222> (7391)..(7552)
<223> exon 1 - HLA-DRB1*010101 gene

<220>
<221> misc_feature
<222> (7453)..(7455)
<223> ATG codon start

<220>
<221> misc_feature
<222> (15809)..(16079)
<223> exon 2 - HLA-DRB1*010101 gene

<220>
<221> misc_feature
<222> (19536)..(19817)
<223> exon 3 - HLA-DRB1*010101 gene

<220>
<221> misc_feature
<222> (20515)..(20624)
<223> exon 4 - HLA-DRB1*010101 gene

<220>
<221> misc_feature
<222> (21097)..(21121)
<223> exon 5 - HLA-DRB1*010101 gene

<220>
<221> misc_feature
<222> (21750)..(22085)
<223> exon 6 - HLA-DRB1*010101 gene

<400> 3
cttgtaaact actattgtat tctctgcttc tatgagcttg agtatttttag ttacctcata 60
taagaggaaat tctgcaatat ttgtcttctt gtaactggct tatttcactc agcataagcg 120
aaactaaaaa gcttttgcac agcaaagaaa acaataaaca gaatgaaaag ataacctgca 180
gaatggaaga aaatatttgc aaacatata tttgataagg ggttaatttc aaaaatgtat 240
aaggaactca tacaactcaa gagcaaaaaca accaaccaaa caacaagct gattaaaaaa 300
tgggcaaagg acttgaacag atatgtcttg gaaaaagatg ttatagacta aatgtttgtg 360
ttccctccta atcatatgtt aaatcctaag ccccaatatt ataggattag aaggtgggcc 420
ctttggaagg aattaggtct agagtctatc tagataaaca ctccaattaa ttgccatat 480
gggaacacaa attggttctc gatggtgtaa agttattaag gaaaaataat aacaataaat 540
ggataaacag gatcaatttc ttcttaccat ggagggagga tatgtatcct caacagaaga 600
ctgtgccatt taaaggccat attagtattc atcagagttg ataggaccct ttctgtgtaag 660
atctcagcaa tgtcatccat cgaggaactt tgggtggagc cagtctttgc accatggcac 720
tatctaggtc atggctgtaa gtctacaagt gaaaaaacca tggccaatat taatgatatt 780
gcaattagta tcagcaatac cactgaagga aacgttgaca gttaaaataa tttaggaggc 840
tgggcacagt ggctcacgcc tgtaatccca gcactttggg aggccaaagg caagagatag 900
agaccatcct agccaacatg gtgaaacccc atctccacta aaaatacaaa aattagctgg 960
gcatggtcgt gtgcacctgt agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatagcct 1020
gaaccaggga ggcagaggtt gcagttagtc aagatcacgg cactgcactc cagcctggca 1080
acagagccag actctgtctc aaaaaaaaaa aaaaagaaaa aagaaaaaaa aaagaattta 1140

```

[0013]

gtgtttaaat	cctgttctgg	agagaaaata	aaccatgcc	tatgtatfff	gcctcagtg	1200
cagaaccagt	tgcttttaga	actgattctt	gttatgcfff	tttgtttttc	atagctttag	1260
aacttgtaat	agcaataaag	attcctcact	tctggaaaaa	ctcaaaaatt	tctaataatc	1320
cttatattat	cttctgctgt	ggttattata	aagtatfff	ctctggtaa	taatataget	1380
atggcttaga	ttatftttta	ctagctggta	cfttttttct	tattctaaca	gttgactaga	1440
catctcttta	aggtcaaatc	caaaattgtg	aactatggac	actgacaggg	ttttgtttgc	1500
acccaaatca	tcttttagcat	ctctagatgg	atacttaata	gtaccaagtt	ttacaccttt	1560
atcttgctgg	tgtaaccctt	tgaatgacca	catgaccaac	acagggatgc	tagcaatagt	1620
tagtgtgggt	cttatgcttc	atftttctca	gaattgctgt	atgatactga	gagttgcttt	1680
gtttgacagg	cacacaggg	aggaagagat	gtcatgacaa	aaggattagc	taattctttt	1740
gcacacacat	aagttgattt	tatttaggta	aaatgttggt	aacataaata	agtactagta	1800
agtttacttt	ttcaagataa	taaattgtct	gcaaggatga	gctattagaa	aaataactgg	1860
taaaagattt	tattatfttt	tttaaataaa	ataagcaaca	aaccaggcac	acacttcaca	1920
ggacagattg	caaagaggtt	ggtacagctc	aacaggttca	tcaatgtctt	cactgtccac	1980
actgcagtca	ctggggagtg	ggctagtgga	gcacccaaat	gaaatftttg	aaaataacct	2040
ggcctatftt	ggactggata	gatagtggga	tacttaccac	agcacaatta	acataagagc	2100
tagaaaagata	aatcaaaaaga	aaattctttg	tacttacaat	attagtagaa	aggcctatgg	2160
gaattctagt	tgftttctct	atattgcaatg	gcaagcattc	tgttataaaa	cagctaagtt	2220
gagccaaaga	atgacatttg	gaagftaaag	aagtctctgtc	aactgaccta	gatagtftca	2280
tggtgtaatg	attggcgcta	ccaaagtftt	ttaatggagg	acattgctga	gattttactg	2340
gaaaggggtc	tatcaagtgt	gatgaatact	aataaggcct	ctaaatggca	cagttttctg	2400
ttcaggatac	atatcttcca	tgctgagaag	aaactgggtc	tgfttatcca	tttattgfta	2460
ttgtcatttt	ttcttttagat	ataaggatta	gtaatctgct	ttttactfta	aattccagat	2520
agcagtggtt	gctttctgaa	aactcctgag	aacatftttg	gactgcttgg	acaagtgaca	2580
gacattctat	gataaccagg	gcttgctgat	agccaaaaaa	gcctatfttt	ccaaaatgtg	2640
ttgcaagctt	tcagccttac	tgcaagtgag	ccccattctg	tgacaatcgg	taggactcaa	2700
gacattctgt	aatcctacca	atgtcaacct	gectgttgtt	cagcaaaagt	ctgtgcttct	2760
gattttacct	gttttagtct	gagaatgctg	gattttatft	cctgtaaaac	caagcctatg	2820
gtttcattca	tcaagaccag	agaccatgca	acttccgtac	ggaaaaacc	tttcttccag	2880
aaaccaatft	aattgccatt	tcttcaggaa	ataagctctc	gtatttgaca	cctctcacac	2940
acagcagagt	tgagaggatt	cttctcttgt	tttcagtgca	aaagttcagc	ctagagatca	3000
cctgtacgat	tgatggfttg	gtgacagttg	ctacattgft	tagcctgaac	tatgcttata	3060
ttgaaatattg	aaggaaaagtg	tgagatatat	aatftaaaga	agcatatctg	ttatagftta	3120
agtgtgtcgc	ctftaaaatt	caggtaggac	tctcactgta	tgaatgggat	taaggccctt	3180
gtaaaaaacg	cttcacacag	tttttagcct	cttgtctttc	cacctctac	catgtgagaa	3240
cacagttctg	atccccctg	taggatgcaa	ggtgccatct	tggaaagtgg	gagcatgcc	3300
tttgccagac	attgaaacctg	ctgggtgcct	aatcttggac	ttctcagcct	ccatgtatft	3360
tttataaatt	accaggtcta	ccgtatfttt	tcacagcaca	aataaactaa	gacaacatct	3420
ttgttactca	taaattgtata	aaacatacag	aatfttagttc	attgccattg	gccatftttt	3480
aaatataaat	ttgtatgatt	tatgaaatagc	gtgtcaaat	tatataaaca	aatftttgaaa	3540
atfttctctt	aactataatft	tagtacattc	ttgatgtaga	attacttatt	tttgccctctg	3600
catttatctt	gtaataataa	ggtgaacctt	agcttctctt	cctagattac	cacaccacaa	3660
ttagfttaact	agftaaattac	gatttcttat	tatcaaatga	aatgtgatat	tctctgggtt	3720
gcaattgcat	aattgtcaat	agtactgaat	tatcactgta	gtgtaggaac	acagttgtt	3780
ctcaaatcca	gggacttcta	cccaacctct	ccaagaaatc	ttcaactftt	cacattaaca	3840
gaaatatatt	tttccaaagt	aaacgagaca	ctatftttt	tctattctga	aatgatcaaa	3900
cttgcactac	ttcgtgctga	gaaattagaa	atgatgattg	agagtaataa	accggagtta	3960
ggaatgttga	ggctgttgtt	atctttaaata	agaaggagat	ttgtgcagga	gctatgggtg	4020
tccttatgta	acataaacgc	aaactgtgtc	atftccagag	gagagtaacc	atgatgatga	4080
ggggaatctt	ttgaaggaac	tagcattgct	acacagtatc	taccccaaag	tctataaaat	4140
gttgccattc	actaaaagaa	gtagtcttac	tgatfttgcac	agccatgaat	taaagggata	4200
aaaataatftt	tagftaaagg	gacataatft	tctfttagaaa	ttgaaatgta	ggtagtataa	4260
tacaacagta	gagcctgagg	ggtttggaat	cacatatata	ataccttgg	tcaatagagt	4320
tgacagaaaa	actctgcttt	aaaataatfta	atatftttatg	tgaagagtgt	tcaatccctc	4380
atftctggct	cccattatga	tctctcatt	tgftttgaggc	tatggccctt	tactattcca	4440
cttctcttgt	tttatcataa	agggagatat	aagaagactt	tgctggccgg	atgcactggc	4500
tcatgcctgt	aatcccagca	ctftgggagg	ccgagttaca	attctgagaa	ttgctacaat	4560
tctgagtaca	aagcaaaatg	ctcaaaaatt	gotgaagaaa	ttfttagtcat	ttfttattgca	4620
gcatggtgag	tatcccaccc	ctagaaacac	taaggcacac	aaggaggag	tgtgtatcac	4680
aactgtggta	gggtgtgaat	taatgcagaa	ctfttatctgt	atagttgtac	tttgaagtcc	4740
atftctgaatc	ttagatgcta	catttatata	aatataaagc	ataataagta	tctaaatgta	4800

[0014]

gaattatatg	tttaaaatta	tatgattaca	ttaactgatg	taattcatag	atthtcccta	4860
gggttctgtt	tcttgaacat	tctgtaacgt	attagtttagc	aaagtctttt	ttttttttga	4920
aactgagttc	caactctatcg	accagactgg	agtgacagtgg	catgctcccg	actcactgca	4980
acctctgcct	cctggaatca	agcaattctc	gtgcttcagc	ctcctgagta	gctgggatta	5040
caggcatgca	ccaccacacc	cagctgattt	ttgtatthtt	tctgttagta	gagacaaggt	5100
ttccacatgt	gggccaggct	ggtttcaaac	tcttgacctc	aagtggcca	cccacctcgg	5160
cctcccaaag	tgctgggatt	acaggcatga	ccaactgtgt	cctgccagca	aagtcttctt	5220
atatattccc	ttatgataaa	acaagagaag	tggaacagta	aagggccata	gcctcaatca	5280
aatgaggaaa	tcctaattggg	aaccaggaat	gagggattga	acactcttca	cataaaatat	5340
taattattht	aaaactattg	gggaaattc	agccagatat	caggcaaaat	tcacccccga	5400
tatttcacgt	agtttctttt	ctatatcc	taagtgtcgg	ccggtctgag	aaataaaggg	5460
acagagtacc	aaagagagaa	atthttaaagc	tgggtgtccc	caggagacgt	cacatgttgg	5520
caggttctgt	gatgccccac	aagccacaaa	accagcaagt	thttattagt	gattthtcaa	5580
aggggagggg	gagtgtatga	atagggtgtg	ggtcacagag	atcacatgct	tcacaaggta	5640
atagaatatc	acaaggcaaa	tggaggcagg	gcgagatcac	aggaccacag	gaccggggcg	5700
aaatthaaa	tgctaattgaa	gtttcgggca	ccattgtcat	tgataacatc	ttatcaggag	5760
acagggtttg	agcagagaca	accggtctga	tcaaaaattt	attaggcggg	aatttctca	5820
tcctaataag	cctgggagcg	ctatgggaga	ctggggttta	tttcatccct	aagettgacc	5880
acagaagacg	gccaccccc	gaagcagcca	tttcagaggc	ctaacctcag	ggaagtattc	5940
tctttctcag	ggatgttcc	tgctgagaaa	aagaattcag	cgatatttct	cccatttgc	6000
tttgaaagaa	gagaaatatg	gctctgttcc	acgtggctca	ccagtggcca	gagtthtaag	6060
ttatctctct	tgttccctga	acattgctgt	tatcctgttc	thttttcaag	gtgccagat	6120
ttcatattgt	tcaaacacac	atgctctaca	aacaatttgt	gcagthaaca	caatcatcac	6180
agggctcctg	ggtgacatac	atcctcctca	gattacaaag	atgacaggat	taagagatta	6240
aagtaaagac	gggatagga	aatcacaagg	gtattgattg	gggaagtga	gtgtccatga	6300
aatcttcaca	atthtatgtt	agagattgca	gtaaagacag	gtgtaagaaa	ttataaaagt	6360
attaatttgg	ggaactaata	aacgtccatg	aaatcttcac	aatctatggt	cttctgccat	6420
ggcttcaggc	ggtccctcca	ttcggggctc	ctgacttccc	gcaaaaaaa	cagagtgtt	6480
ctgtcaacag	ctgactttga	gtccttgatc	ggtctctcag	accctgaat	acttggattg	6540
cacagttgac	cttatccatg	gttagggta	atgcatata	aaggcaactt	cagaccctcc	6600
attgcacata	agtgccccct	gcaagccgct	tgctgtgtg	tgttctggag	ctgccataa	6660
acttggggac	agcatcagga	gatacacttg	aaaaaacct	thttactcag	atthaaatt	6720
taacaaactt	tccatttct	ttaacttact	aaagaatctc	tacctgtaa	taggtacaga	6780
thaaactcgc	tagtcaacag	ctatcattct	gtcatatcaa	cagatactcg	tggctgctgc	6840
tccttgaggc	atccacagaa	tcacagcatt	ttccagtatt	gaaagacctg	aaagatcacg	6900
gtgcottcat	thtaactgtg	agacatgaag	taattthccc	aagtctaca	cagthaagata	6960
tggtgcaata	aggaccagat	taaaagtctc	ctgatttgca	accatgttcc	ctccatctcc	7020
thttctccta	gacacactca	cacactcact	cctgcaaaaa	atthctttgt	caagtgggaa	7080
atgaatgctc	thacaaggct	caaatthgtg	aacacatcac	tgaccagcac	agagctggct	7140
aacaataggg	acacaattaa	ggtgtthttac	acgcaactgg	thcaaacctt	tcaagtacta	7200
aattthaaa	atcctthaaa	gaaggaaatt	gtthcagaaa	aggaccttca	tacagcatct	7260
ctgaccagcg	actgatgatg	ctattgtact	cagatgctga	thcgttctcc	aacactagat	7320
tacccaatcc	acgagcaagg	aaatcagtaa	ctthcttccc	ataatttgg	atgtgggtgg	7380
agaggggtca	tagttctccc	tgagtgagac	tcacctgctc	ctctggcccc	tggctctgtc	7440
ctgttctcca	gcatgggtgtg	tctgaagtthc	cctggaggct	cctgcatggc	agctctgaca	7500
gtgacactga	tgggtgtgag	ctccccactg	gctthggctg	gggacacccg	acgtaagtgc	7560
acattgtggg	tgctgaccta	ctatgggggtg	gggaaaaaag	ggagtthgtg	taacattgtg	7620
cccaggccat	gtccccttaag	aaagtgtgac	atthtcttca	gggattgccc	atctthtaca	7680
tatggatccc	aaattatthc	caccacaaat	ggaacttggc	tacttggccc	atthcatgaga	7740
ctgtgthaa	ggcctthgt	caggccatgt	thtactthaa	atctctacca	ataaaacctt	7800
tgcatacacat	gtcctcaggg	thctthtagag	atthtagaat	aaggatgcta	aaataaattc	7860
ctcatacagc	actthcccctt	atcatgthga	cttatgtcag	acgaaacaag	gthttgttht	7920
gaaaatthttg	tgggagtcaa	aggaattcaa	agggctctctc	ctagacgata	ctgtgtgtgc	7980
ctccacagga	cctgtgggtg	tggccccctc	tctcatatg	tgaggatgta	cccagtggcc	8040
tcccattgt	thcctthctt	thttthctga	actccagtgt	thataaagcc	tgtatcccctg	8100
tagcatatgt	aggtthctctg	acagaagtth	tacttagtgc	tctthctthc	thtatggggaa	8160
aaatcccctg	atctgaaact	gacatcttht	gtacttggag	tcacctaca	ggthaaagacc	8220
atthtatggg	tattcattgg	tgctctctct	tgactggctc	ctcagacctc	tgaatacttg	8280
gatactcctc	aagaactthaa	ggcactctct	gaaaaactgg	cccagattag	tgcctattat	8340
taatctthtt	taacctthct	atacttgtth	ctctgcatg	ctctaaactag	acatgacaga	8400
agagattcaa	ctaacatagg	ataaattata	tgaattctca	thtttthgta	tcaaaatag	8460

[0015]

tcaaatacca	gaaaattaat	aatgttcaaa	ctatatactc	tgtgtggggt	taccgagacg	8520
acgtggacat	tgttcacatc	taatagggct	gaaagtcaat	gaagaagtcc	tggaaactcc	8580
ttgtcttact	ggggctttgt	cctaaatttc	ataggttcac	ccatcatgcc	ctcagctttc	8640
cttaattagc	catgtctgct	tatctctacc	tccagtttct	ctctattttt	cccagctat	8700
gttgtcatca	tttccagaaa	tctctaaaac	ttgcaaagat	ccttagcact	atgagatcca	8760
ttgaaagaga	taatTTTTTT	ctTTTTTgaga	cagggcttgg	ttctgtcacc	caggetgtag	8820
tgcagtgggt	tgatctaggc	tcaactgcaac	ctctgcttcc	cacgctcaag	tgatcctccc	8880
tcctcagcct	ccagagtagc	ggagactaca	ggcaggcaaa	catgtgcagc	taatTTTcat	8940
gattttgtta	gagatgagat	tttgccatgt	tgcccaggct	gttctttaa	tcctggactc	9000
aagcaatcct	cctgccttag	cctcccaata	tgctaggatt	atagatgtga	gccattgtgc	9060
ccaggcaaaa	agagatgaac	cttaatTTTaa	aaatTTcctt	tttctttaa	cactgtttct	9120
ctatctgtga	attcttcttc	caactagaag	gaggagaaag	aagaagtttg	cctgtatttc	9180
tcaccaggag	gaggagtcta	gtgtgatata	aaaatgaaag	agtgcctggg	cttgatcccc	9240
ttcttgcttt	ccaggatccc	tgcaagtatc	agttccca	ccctggttta	ttcatgtaaa	9300
gcacacttat	ttttttcagc	agctactcct	tactggctc	cattctaagt	tcaaactatt	9360
ctatttgagt	ctatagaga	gggtcccagc	tctcatggaa	gttacacaag	agttagaggag	9420
acagacacta	acccaataag	catttaacaa	agaagaaaat	gttagagaga	catagtgcac	9480
tgaagaaaag	acatcagggt	tgtgaaaaag	agagacatgg	attcacttac	tttggttcat	9540
atgcttaggc	agctataact	gagaaagtga	cattcagctg	agacaacaaa	ataaatagac	9600
agtgcgtgaag	atctaaagga	cgaaagttcc	agggagaatg	aatggggggg	aagctctggg	9660
gtgggaaatt	atgtggaagg	acagaaagaa	ggctagaggg	actgaactat	agcaagcaag	9720
gaaatggaga	ggcagaagat	gaggtaggac	acagagagga	agtcaggagc	ctcatcata	9780
tagactctga	tggccatggg	aaaaaaattg	aaTTTattt	tatttttatt	tattttttga	9840
gacggagatt	gttctttggt	gcccaggetg	gagtgcaatg	gcgcgatctc	gactcactgc	9900
aacctctgcc	tcctgggttc	aagtgattct	cctgcctcag	cttcccaagt	agctgggatt	9960
acaggtgcct	gagaccatac	tcggcttatt	ttttgtatt	tttagtagag	acaggggtatc	10020
accatgttgg	ccaggctggg	ctcaaactcc	tgacctcaga	taatctgcct	ggcttcccaa	10080
agtgcctgaga	ttacaggcgt	gagccaccat	gcccaactcg	aattttattt	gaatagatat	10140
gagaagctac	tgtatggtta	caaggacagt	caatttatat	tcgatttttt	ttttttgaga	10200
cagagtcttg	ctctgtttgcc	caggctagat	tgcaagtgtg	caatctcagc	tcactgcaac	10260
ctctgcctcc	tgggttccag	caattctcct	gctcagcct	cccaagtagc	tgagaccaca	10320
ggtagatgcc	actacacctg	gctaattttt	tgtattttta	gtagagatgg	ggtttcaccg	10380
tgtagccag	gatggtcttg	atctcctgac	ctcgtgatcc	actcccctcg	gcctcccaaa	10440
gtgctgggat	tacaggtgtg	agccaccacg	cccggcctat	attcaattat	taaaattaat	10500
tctagctact	ctgtggggat	tggattgttg	ggtttcacaa	gtggtcagga	agactattta	10560
ggatcacagc	agggaaattct	ccagggaaaa	caggcttgtg	gcttcataga	gtgcattagt	10620
gataaagaca	gtgaaaacga	caaagtggac	agactaggca	tgtatttttg	cttagcttgt	10680
taatggatta	ctctaaaggg	ggtagaaaaa	tcaagcttat	tcctaaggat	tttgttttga	10740
caaataagtg	gtgggtggg	tttattgaga	taggaaaaac	tgtggggagga	aatgatttga	10800
agtgggtggt	tggaaataaa	agttttgttt	aaatttgaga	tgatttattg	acatttatgt	10860
ggagcaatcc	gaaggtcaat	ggcatttaag	agactcatgg	tgaggtgagg	ccagggcttc	10920
aggatattat	gttggcggca	tcagtaactg	taatgtgtta	aattccaggg	agtggaagag	10980
gatacatagg	gagatggatt	gtgtggagaa	aaaagaagag	ggtacaggcc	agcaaagggg	11040
gctgagacag	agcccaggga	tgctggagaa	aacccaagag	aacataatgg	gtgtaagtca	11100
tggaaaatag	attattttca	aggagaaggg	agaggtcaat	tgtggtgagt	accactaaga	11160
ggagggggaa	gtgagaacgt	gacagagaag	caagtgcctg	gtttgctgga	gttgatattt	11220
gcagtcaatg	gagtatccag	ggaggaaaact	ggattggacc	atttgaagag	caagtagaag	11280
tgaggacgag	gttaagggtg	actattttaa	gtagagagct	tcaggggaag	actgtgctct	11340
gggttcaggg	agcctgctgg	atctaaagga	aaagggctga	agaggctgaa	gagaaggagg	11400
aggacctgtg	aaccagagat	actgagttat	tattagcaag	gaaatactag	agggctcctg	11460
tgtgcagtgc	tgactgctca	tgcaaaaggt	cacacagaca	atatttcaca	cagccagtat	11520
ttattagtga	catagaatat	gccagttatt	actctaggtc	atgagaatag	agtgataaat	11580
aaaatgaatc	tggtcgccat	cggtatatgc	catgtaacat	tttgcagtga	ctgtgtacca	11640
ggcctatgaa	tttcagtatg	caatttcaat	aacgatcctg	ttgtatctgt	gggttttaaa	11700
aacatataca	tctctggaat	ctaaaattga	gaggatataa	gtaaaacca	gtattagaaa	11760
tttagtgctg	gaaatcagac	tgcaagtttaa	atctgagcat	atagaaagtc	cctttcttct	11820
atgtcagcag	atgccttttg	tgtgaggttt	aggtatacta	cattattaga	cataaaccag	11880
tgattctgcc	ctatgttttc	agaatgacaa	ttctttatga	aactaataga	agaacagaag	11940
acaattgcaa	aatcatgatg	aagatgctag	tggctttaga	accaaggaat	acaaaaaata	12000
atgtgagctg	cagttatagg	gattataaaa	gttaaaatgg	gaatgcattt	gagtgtttat	12060
tatgtgatca	gtgctaataa	gagtcacat	ttatTTTtac	acttaacaat	aatcctgtga	12120

[0016]

ggattaagct	attattaaat	gcatttgata	gattacaaaa	aggcttaccg	ttggtaaaaa	12180
ttgacccaag	gggaagaggt	cacattttta	ttcagatfff	ctgattctag	agtttgagag	12240
tctgtccatc	attagttagt	agtgacaata	ctgtgtctaa	attatcgaca	gaatttctga	12300
tattcatatg	tactatggtg	tttcttagag	tgtgggcaga	gattcagggc	tgctagtffc	12360
aatgtatagg	agaaactttc	attcattgtg	cattttatcat	tttaaaagtt	ctaggctggg	12420
tgcggtggct	catgcctgta	atcccagcac	tttgggaggc	caaggcgggc	agatcacgag	12480
gtcaggagat	gaagaccatc	ctggctaaca	tggtgaaacc	tcgtctctac	taaaaataca	12540
aaaaattagc	tgggcgtggg	gggtgtgacc	tgtagtccca	gctacttggg	aggctgaggc	12600
aggagaatgg	catgaacctg	ggaggcggag	cttgcagtga	gctgagatcg	tgccactgca	12660
ctccagctcc	accctgggca	aaagagcgaa	actccgtctc	aaaaaaaaaa	aaaagttcta	12720
tatgtctgtc	atggcatatg	ttgaagaaca	caaggaagta	ttaaactcact	ccttctgagg	12780
tttgtctagc	aagttgggct	aggattgcca	aataaaaatac	aggtttctag	ttaaactctga	12840
atttcagata	cacaactata	atttactgaa	aatccaaatg	taacttggca	tcctctgatt	12900
ttatttgcca	aatctgtcaa	ccctacatga	gacacatgag	catggattac	ggtgttacc	12960
atggaagcca	cagccacagt	gacagcgact	tcacacatgt	ttatftttta	actttctctc	13020
tgtaaagaaa	gtgcttagat	aatfttaggga	taaaaagata	gacattgttt	gatccaggat	13080
gcactcctct	ctgccatcgt	ttctaaaagg	caaagagaga	tttccacagg	tcttactcac	13140
agtctgactc	acagtctggg	gacctgctca	tgcfttgaaa	ctgtctgtat	gagaatgtca	13200
tttctttggg	ttctcccttt	ctgaggggac	ttgactaaa	aactgagagt	tctacctctg	13260
gccaaggctg	gaaatftgat	gcctgctagt	attgftggga	atgggagact	gaaataaatg	13320
agfttagftg	ggcattaaac	aggaataaaa	tagctgtggt	tgtgattcat	tactacaatt	13380
agftggactg	tggcagagaa	attaagaaag	aagatgatgt	gagagataaa	ttatatgatt	13440
tggtaaggca	aggaatcag	taaactctgg	ttctgaacaa	gttcattttc	tggaaagata	13500
gcactgtact	gggaccagaa	ttctacaaaa	catccgtftt	atgtaagacc	aagatftttca	13560
acaaatattt	ttcaatgcag	ttctcagctg	ctccataact	aatagtgcact	tattcaaac	13620
agatattttc	agatggttca	cacctatgtt	tcttaccag	ggacagttca	ccacctctc	13680
ccttccctcc	catcactctt	gaggaacatg	tggcaatgtt	agaataatft	ttggttctca	13740
caacaggggt	ttcttctgat	atftaatgag	cagaagccag	ggacactgct	agagaaccca	13800
caatgttcag	aatagactcc	atcaccaacc	aagatfttatc	tcgtccaaaa	tgtcaatagt	13860
gctgaggctg	gaagcattgg	ttcacactgt	gctctfttctg	aaaaatgtag	actcgtftt	13920
ttftftftft	ttfttgagat	ggggctctgc	tctgtcgcoc	agactggagt	gcagtggctc	13980
catctcagct	cactacaacc	tctgcctccc	aggttcaagc	gattctcctg	tctcagcctc	14040
cccagtagct	gggattacag	gtgcacctg	ccatgcccgg	ctaattftftt	gtatftfttag	14100
agagatgggg	ttcacccatg	ttgcccaggc	tggctctgaa	ctcctgagct	caggcaatcc	14160
accgctfttg	gtctccaaa	gtgctaggat	tcacagcatg	agccaccgcg	cccggcctag	14220
actcacatct	tttatacact	tactgcccac	ttcagttctt	tatggfttat	ttftgcttgt	14280
ttcattataa	aaaactagac	agttgcataa	attcaaccac	ttacttgttg	aatccattta	14340
gtcaatgcaa	gctcaacatt	ttcatattta	ttftftgctt	tatgcaatat	tgttcaacat	14400
ttcataaagt	tgttggctcag	cactatctct	atftaactftt	aacagfttgc	ccttctaagt	14460
cacaaatagt	gatgctgctg	caattatftt	tcactaacat	gcctcagatt	tctgtagtga	14520
ttctacattt	gataattatc	acaatgtaaa	atgcttctat	ttattcattt	cactftttacc	14580
cacaggtatta	ttfttaagtt	atftftgtca	ttctcacact	tcaaccacac	ataagacaca	14640
aaacatcaaa	aatatgtaca	tagtgttata	cataggtgta	tatttacaca	catatatgca	14700
catatgtftta	tatgtattga	aactacagaa	gcacatgtca	ccaataagag	ctctgagaca	14760
cctftgacca	cttaccctta	tcagatgaga	tttgccaaat	gagftfttgg	aacaaatftt	14820
ttfttaactga	atftctgagc	tttgtggatt	tagaaatgca	actgaaagtt	tgtggacatt	14880
tacgaggatc	atagftfttat	tctccttaaa	actcttcaat	actfttccat	tgtctfttag	14940
aaatccaaaa	tcctaacacc	actcacgagg	ctfttcaaca	cctggcttct	tgtgattftt	15000
ccaatctaac	ctfttaccct	ccttccctct	agcctctctg	ctfttagtga	ctftgttcta	15060
gtftftftgaa	gttcatcacc	aattcaagct	tttgtacatg	ggatttctca	aacctgaaat	15120
gtgcctccgg	ttftgtccaa	acagacacac	aggctccact	ctgccccctg	gctcacacct	15180
gcttaacttg	ttaagtcaca	tctgtaactg	tcactcttct	ctggcaccct	aaaggaattg	15240
agatcatcct	attatctctt	gttctagaac	tcacacactt	tgaatfttct	catctctgtc	15300
taagctcttg	tgtgtfttgg	ttftggccat	cactfttcact	gctcttaaa	ctccccagc	15360
ggagtggaga	ggtctgtftt	cccgtgtftt	gattcctaga	ggcagcgcag	gcctggcaca	15420
aggtcatcac	taaggaagtg	ttcacaggat	gaaagcgggt	cgtgctgtft	aaggaagggt	15480
taaagcctft	aaatggtaaa	gggttgagag	aaggagcaaa	gtgcctfttg	ggtggaggct	15540
ccagaggaga	ggcggcggg	gctgcgtgct	tggacggatc	ctcctccagc	tctgcttgg	15600
aggtctccag	aacagctggg	aggcagggag	gggttcccaa	aagcctfttg	atcagaggta	15660
gtftftccac	ctggtcccc	agacccccgt	ccgcctcaga	aagacagagg	atgagccct	15720
gggctgcgtg	ttgtcgggtg	tgcgggtggg	gccagatagt	gtcttcccc	gaggccgctt	15780

[0017]

ctgtaaccgg	atcgttcttg	tccccccage	acgtttcttg	gagcaggtta	aacatgagtg	15840
tcatttcttc	aacgggacgg	agcgggtgcg	gttcctggac	agatacttct	atcaccaaga	15900
ggagtacgtg	cgcttcgaca	gcgacgtggg	ggagtaccgg	gcggtgacgg	agctggggcg	15960
gcctgatgcc	gagtaactga	acagccagaa	ggacctcctg	gagcagaagc	gggccgcggt	16020
ggacacctac	tgacagacaca	actacggggt	tggtgagagc	ttcacagtgc	agcggcgagg	16080
tgagcgcggc	gccccggggg	gcctgagtcc	ctgtgagcgg	agaatctgag	tgtgtgtgtg	16140
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgagagag	agagagagag	agagagagag	16200
agagagcgcc	atctgtgagc	atctagaatc	ctctctatcc	tgagcaagga	gttctgcggg	16260
cacagggtgtg	tgtgtagagt	gtggatttgt	ccgtgtctgt	gaggctgttg	tgggagggga	16320
ggcaggaggg	ggctgcttct	tattcttggg	gacttctgtg	gggaggtgac	aagggaggtg	16380
gggtgctggg	gctggagaga	gagggcacct	tgattgtctc	gggtccttag	agatgcaagg	16440
aagggaaatg	tatggggtgt	gtgggtgggg	gaaaggttta	ggggaggaga	gctgaggggt	16500
aaggaaagtt	tgggataatg	tgaagagccc	agtttcagac	tgtcccctggc	acacaccctt	16560
catgtaatct	ctgaaataaa	agtgtgtgct	gtttgtttgt	aaaagcatta	gattaacttc	16620
taggggaatt	gagtagacct	ctgaggcacc	tctgaagctt	ctttaggtat	aaatttcttg	16680
ctagtttttt	gttttcttag	tgttataatt	ttacatagtt	gaaatgactg	tgaaactaac	16740
tttttgaatt	aaagtttgaa	aacctgttta	ctattttatt	ataatgctaa	taatttcata	16800
gttacttttt	aaatatataa	tagttgtgac	acaaattacc	tcactttctt	tgtttttttt	16860
tttcttacac	tttaagtttt	agggtaacatg	tgacacaacgt	gcaggtttgt	tacatatgta	16920
tacatgtgcc	atgtttggtg	gctgcaccca	ttaactcgtc	atttaacatt	aggtatattc	16980
cctaagtcta	tccctcccca	cccccccacc	ccacaacagg	ccccagtgtg	tgatgttccc	17040
cttcctgtgt	ccatgtgttc	tcactgttca	attcccacct	atgagtgaga	acatgcggtg	17100
ttcggttttt	tgtccttgcc	atagtttgct	gagaatgatg	gtttccagct	tcattccatgt	17160
ccctacaaaag	gacatgaact	cattcttttt	tgtggctgca	tagtattcca	tagtgtatat	17220
gtgccacatt	ttcttaatcc	agtcctatcat	tgttggacat	ttgggttggg	tccaagtctt	17280
tgtctattgtg	aatagtgcog	caataaacat	acatgtgcat	atgtctttat	agcagcatga	17340
tttataatcc	ttgggttata	taccagtaa	tgggatggct	gggtcaaatg	gtatttctag	17400
ttctagatcc	ctgaggaatc	gccacactga	cttcacaaat	ggttgaaacta	gttttagagtc	17460
ccaccaacag	ggtaaaaagtg	ttcctatttc	tccacatcct	ctccagcacc	tgttgcttcc	17520
tgacttttta	atgatcgcca	ttctaactgg	tgtgagatgg	tatctcattg	tggttttgat	17580
ttgcaattct	ctgatggcca	gtgatgatga	gcattttttc	atgtgtcttt	tggctgcata	17640
aatgtctctct	tttgagaagt	gtctgttcat	gtcctttgcc	cactttttga	tggggatttt	17700
tgtttttttc	ttgtaaaatt	gttttgattc	atgtcagatt	ctggatatta	gccctttgtc	17760
atagtgtgtg	attgcaaaaa	ttttctccca	ttctgtaggt	tgctcttcca	ctctgatggg	17820
agtttctttt	gctgtgcaga	agctctttag	tttaattaga	tcccatttgt	ccattttggc	17880
ttttgttgcc	attgcttttg	gtgttttaga	catgaagttc	ttgcccatgc	ctatgtcctg	17940
aatggatttg	cctaggtttt	cttctagggg	ttttatgggt	tcagggtctaa	catttaagtc	18000
tttaattccat	cttgaaattaa	ttttgtata	agcaaatc	gtcactttcc	ccattgatga	18060
cctttatttat	gacattcacc	aatagttgaa	aatgtatggt	tctggttaat	ttttgattta	18120
tatttttttg	atgtgtaatt	atgttgaatt	atgttgacct	atgttattggc	cagttgtaat	18180
tactgtctctg	ctctacgaat	tacctgttgt	atgttgtagg	taatggacaa	tgatctattg	18240
tctcttatct	ttagggctta	gtatttttct	cagtgacttt	gtgggtttgt	tgtactgtaa	18300
gattattaac	actttattga	tatttgattc	agtattttct	ccagtttggtg	gtatgtatat	18360
tttgaaaatt	cttttccatg	ttaagaattt	gaacattttt	atgttaataaa	atatattgca	18420
aaatgttaat	taatgattca	caactagct	caagtctacc	atgtttgtggg	attgatgtct	18480
ccaggtttct	ccttccttct	taaaaaaaaa	tgtatttatt	gagagtatgc	tagtgtcagg	18540
gatttcctta	ggcataagca	ctccaagtaa	tgagtcccag	acactgcctt	gatccaaatg	18600
tcattctgga	aagaaaaatc	attttacagt	gataagccta	ataatagtta	tacttgtttt	18660
gcctgggaga	tgcatggatc	agctaaatgt	aaatataaga	actttcaaaa	ctaaaatgac	18720
gttccttaat	ctttctctct	gcttttaggaa	tcattgctttc	ttaggaaactt	aaagatttgg	18780
agaatcattt	ctgtctgtcc	caccttccca	ggagcataac	catttctgtg	gtgttctaag	18840
gtgtgagtgc	atggcagttag	tattcctaaa	aatccatatt	cagtttcctc	atgtgcccta	18900
ctccgtccct	ttctctatcc	acattgcttt	aaatcatatt	tttctctcaa	ggtgtacaag	18960
gatgataaat	aggtgccaag	tggagaacc	aagtgtgacg	agccctctca	cagtagaatg	19020
gagtgagaag	ctttctgacc	tcataaattg	aaggctatcg	taattcattc	ttttatata	19080
tttacttgca	ttaatcctca	tataacctca	agaggtaaat	taataataat	atcctccatt	19140
attggagaga	aagttgagac	acaaaagaat	caaaaactct	tccaggatca	accagtaaaa	19200
ggcagacctt	ggatttgaac	caggcaacct	ggctcagaag	tcagttttaa	ttaccacact	19260
ctgacttttc	aaagatttgt	aaacgctttg	acaatgcatg	tcaatttcaa	gctatgaa	19320
gccaaacata	atttttcaca	atatctctca	aatctaatgg	gtccccacta	taaagattaa	19380
attccaggct	gatgacactg	tgaggccaca	tggccagctg	tgctggaggc	ctgctcaagg	19440

[0018]

```

ccagagccta ggtttacaga gaagcagaca aaaagctaaa caaggagact tactctgtct 19500
gcatgactta ttccctctac cttgttttct cctagctctat cctgaggtga ctgtgtatcc 19560
tgcaaagacc cagcccctgc agcaccacaa cctcctggtc tgctctgtga atggtttcta 19620
tccaggcagc attgaagtca ggtggttccg gaacggccag gaagagaaga ctgggggtgt 19680
gtccacaggc ctgatccaga atgggagactg gaccttcag accctgggtga tgctggaaac 19740
agttcctcgg agtgagaggg tttacacctg ccaagtggag cacccaagcc tgacgagccc 19800
tctcacagtg gaatggagtg agcagctttc tgacttcata aatctctcac ccaccaagac 19860
gogaacttta ctaatccctg agtatcaggc ttctcctatc ccacatccta ttttcatttg 19920
ctccacgttc tcatctccat cagcacaggt cactgggggg tagccctgta atactttcta 19980
gaaacacctg taccctcctg ggaagcagtc atgcctgccca ggcaggagag gctgtccctc 20040
ttttgaaact ccccatgatg tcacaagtgc gggtcacctg ctgtctgtgg gctccaggcc 20100
ctgcctctgg gtctgagact gagtttctgg tactgttgct ctgagtcggt tgttgtaac 20160
tgagaagagg gaaagtatag ggaccttctc tactgagggg gagtccaate tcagctcgcg 20220
cttttattag atctgtcact ctaggcaact acttaacctc attgggtctc aggctttctg 20280
ttcatcagat gttgaagtcc tgtcttacct caaggctgta atatttgaat gagtttgatg 20340
actgaacctt gtaactgttc agtgtgattt gaaaaccttt ctcaagaaat ggtcagttat 20400
tttagttctt gcagagcagc cttctttctc attttcaaag ctctgaaatc caagggtgca 20460
attaaagagg ttccatttgg gataaaaaatc actaaacctg gcttctctc tcaggagcac 20520
ggtctgaaac tgcacagagc aagatgctga gtggagtcgg gggcttcgtg ctgggctcgc 20580
tcttctctgg ggccggcctg ttcacttact tcaggaaatc gaaaggtgag gagcctttgg 20640
tagctggctg tctccatacg cttttctgga ggaggaacta tggctttgct gaagttgggt 20700
ctcagcatat gaatggccct ggataaagcc tctctactcc caaatgacct ccaatgttct 20760
gcaaatccag aatcatcag tgcattggtg ctatgtcaaa gcataatagc ttgtggccta 20820
cagagataac agaaagatta acaggtatag gtgctttggt tgagatcgtg gagcaatta 20880
aggaagagca actaaagcta atacaattac actggatcct gtgacagaca cttcacactt 20940
catgggtcac atggctctgtt tctgctcctc tctgctcctg ctgggtggtg ttgtgtgtc 21000
agagaactct caggtgggag atctggagct gggacattgt gttggaggac agatttctt 21060
ccatctcctt taagtgtata tcttctctt ttcttaggac actctggact tcagccaaca 21120
ggtaatacct tttcatctc tttagaagac agatttggag gccaggcgca gtggctcacg 21180
cctgtaatcc cagcactttg ggaggccgag gcgggcgaaat catgaggtca ggagttcgag 21240
accagcctga ccaactggtg gaaacccctg ctctactaaa aatacaaaaa aaaatcagtc 21300
ggcgctggtg gtgtgcgcct gtaatcccag ctactcagga ggccaaggca ggagaatcgc 21360
tggaaccacg agggcagagc ttgcagtgcg ccgagattgg gccactgcac tccagcctag 21420
gtgacagagt gagaccctat ctcaaaaaaa caaaaaaaag aaagaaagaa acagatttcc 21480
tttccctaga atgatggtag aggtaataag gcatgagaca gaagtaatag caaagacatt 21540
ggatccaaat ttctgatcag gcaatttaca ccagaactcc tcctctccac ttagaaaagg 21600
cctgtgctct gcaggagtat tgactcatgg agacttcaga acttgttttt cttcttctc 21660
cagtgtctc atctgagtc ttgaaagagg gcaaaataaa ctgttagtag agccaggtct 21720
gaaaacaaca ctttcttgcg tctctgcagg attcctgagc tgaagtgaag atgaccacat 21780
tcaaggaaga acctctgccc ccagcttgc aggatgaaac acttcccgc ttggtctca 21840
ttcttccaca agagagacct ttctccggac ctggttgcta ctggttcagc agctctgcag 21900
aaaatgtcct ccttgtgtgc tgccctcagct cgtacctttg gcctgaagtc ccagcattaa 21960
tggcagcccc tcatctcca agttttgtgc tccccttac ctaatgcttc ctgcctcca 22020
tgcatctgta ctctgctgt gccacaaaaca cattacatta ttaaatgttt ctcaaacatg 22080
gagttaaaaa tcgtctggtc atttggcccc aaggacaaa aataaaaaaga aaagaaaaag 22140
tgaagattat ttccgatag aataatggtt ttcatggata tgtcataagt atgtgagata 22200
gtgcatatgt taaatagggt gatttagaca ttttacacta caggcatata tcaaaacttc 22260
atgctgtatg acataaatgc acaattttta cttgtcaatt taaaaagtaa acctaactgt 22320
taaaaagggt atgcataaaa actgagaaca gactataaga actgaaacaa acttggcaaa 22380
catgagatga taaaccagct agcaagtcaa tcagaactct ttctcaaccc cgtctacaat 22440
attgtgtgtc tataactgta aattagtata tagtttttca ttcca 22485

```

```

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      Gly-Ser Linker

```

[0019]

<400> 4
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Primer

<400> 5
 cattgagaca gagcgcctgg cacagaagca g 31

<210> 6
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Primer

<400> 6
 ggatgacgtg agtaaacctg aatctttgga gtacgc 36

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Primer

<400> 7
 ttcttcaacg ggacggagcg ggtg 24

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Primer

<400> 8
 ctgcactgtg aagctctcac caac 24

<210> 9
 <211> 20

[0020]

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Primer

 <400> 9
 ctccaagccc tctcccagag 20

 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Primer

 <400> 10
 atgtgcctta cagaggcccc 20

 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Peptide

 <400> 11
 Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val
 1 5 10

 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Peptide

 <400> 12
 Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val
 1 5

 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Peptide

[0021]

<400> 13
 Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu
 1 5

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 14
 Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 15
 Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly
 1 5 10

<210> 16
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 16
 Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Thr Leu Gln Asp Pro Arg
 1 5 10 15

Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly
 20 25

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 17
 Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln

[0022]

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 18
Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr
1 5 10 15
Val Trp Leu Ser Val
20

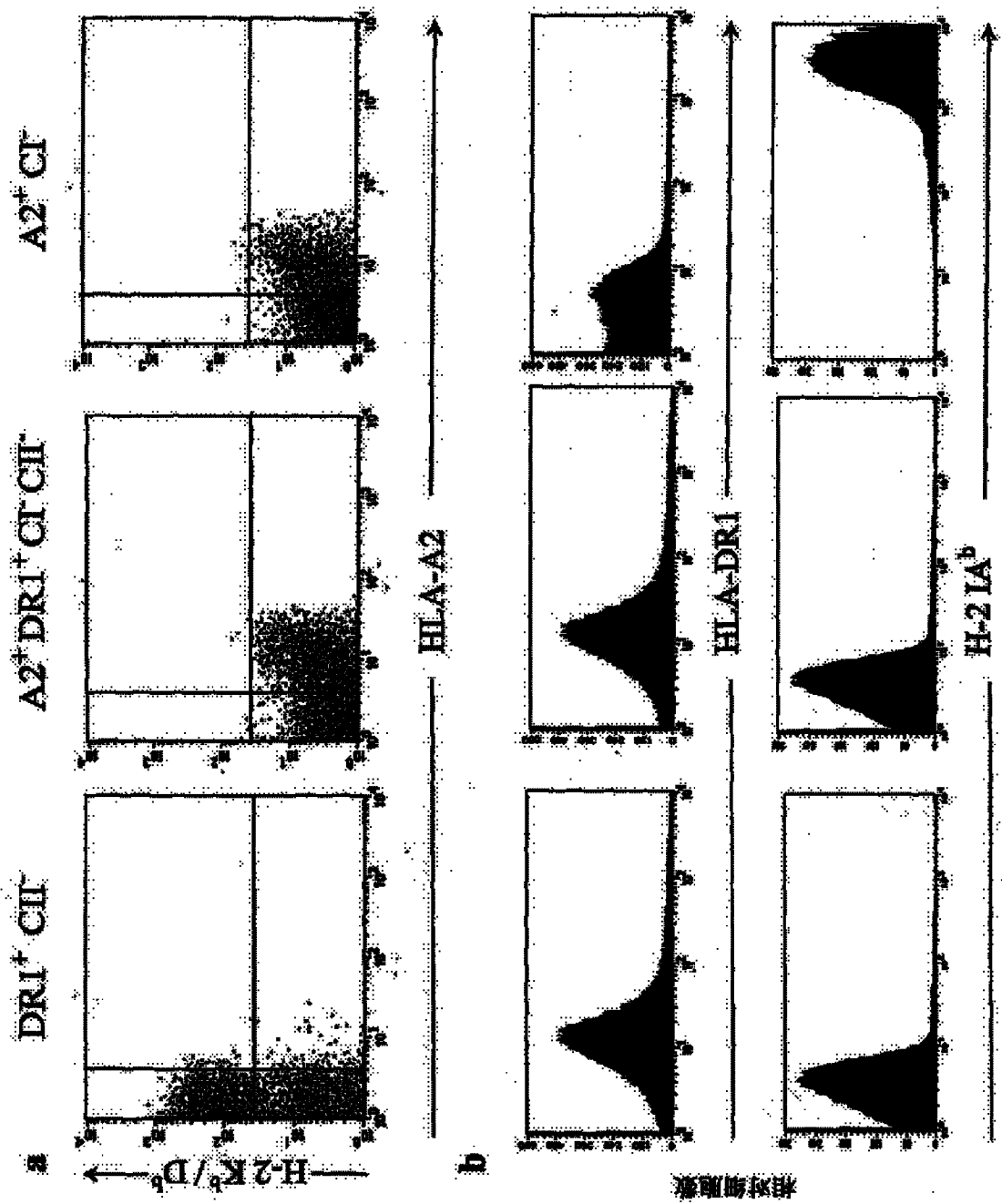


图 1

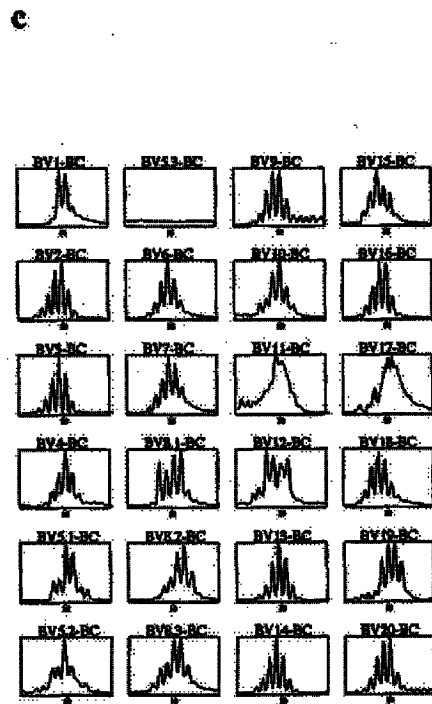
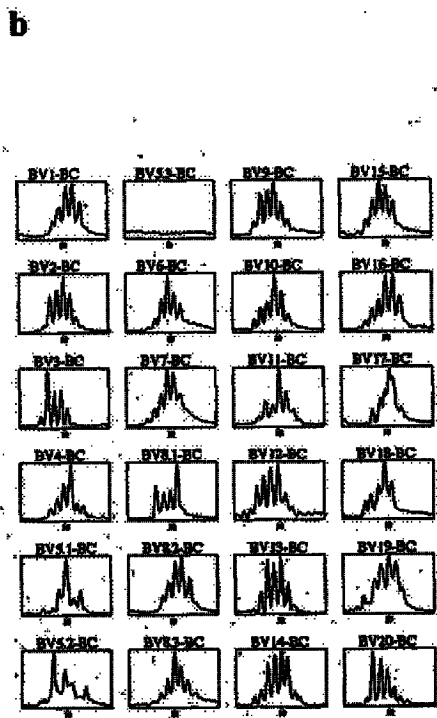
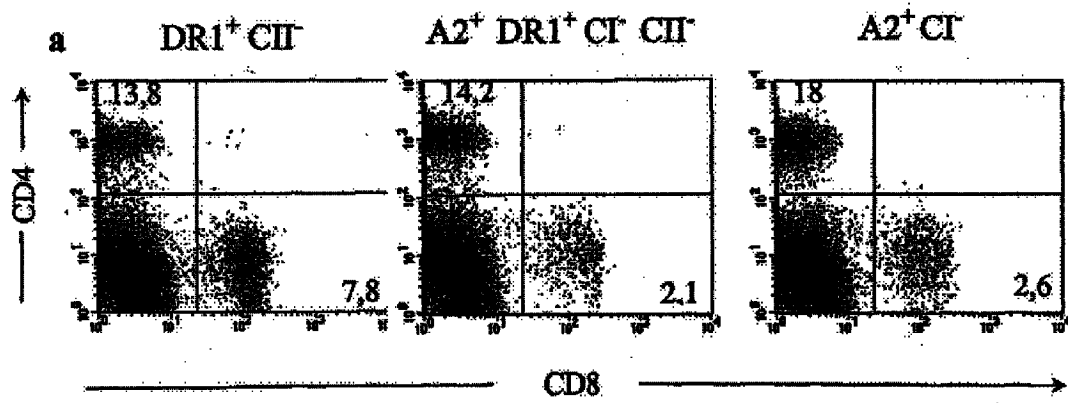


图 2

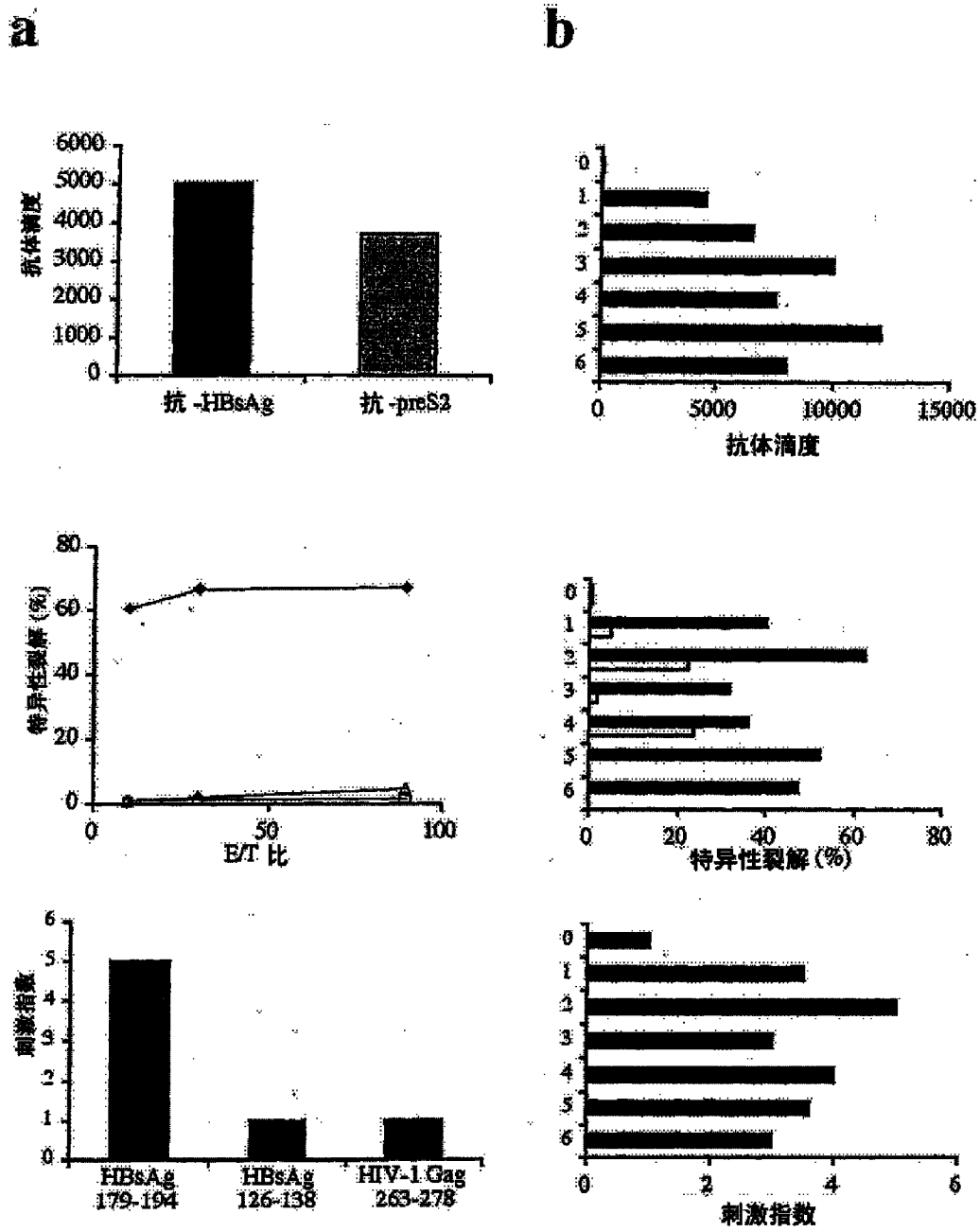


图 3

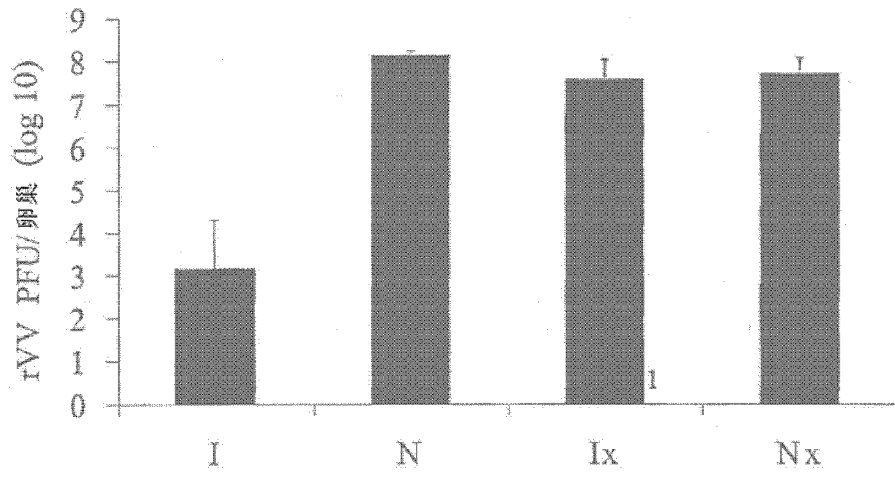


图 4

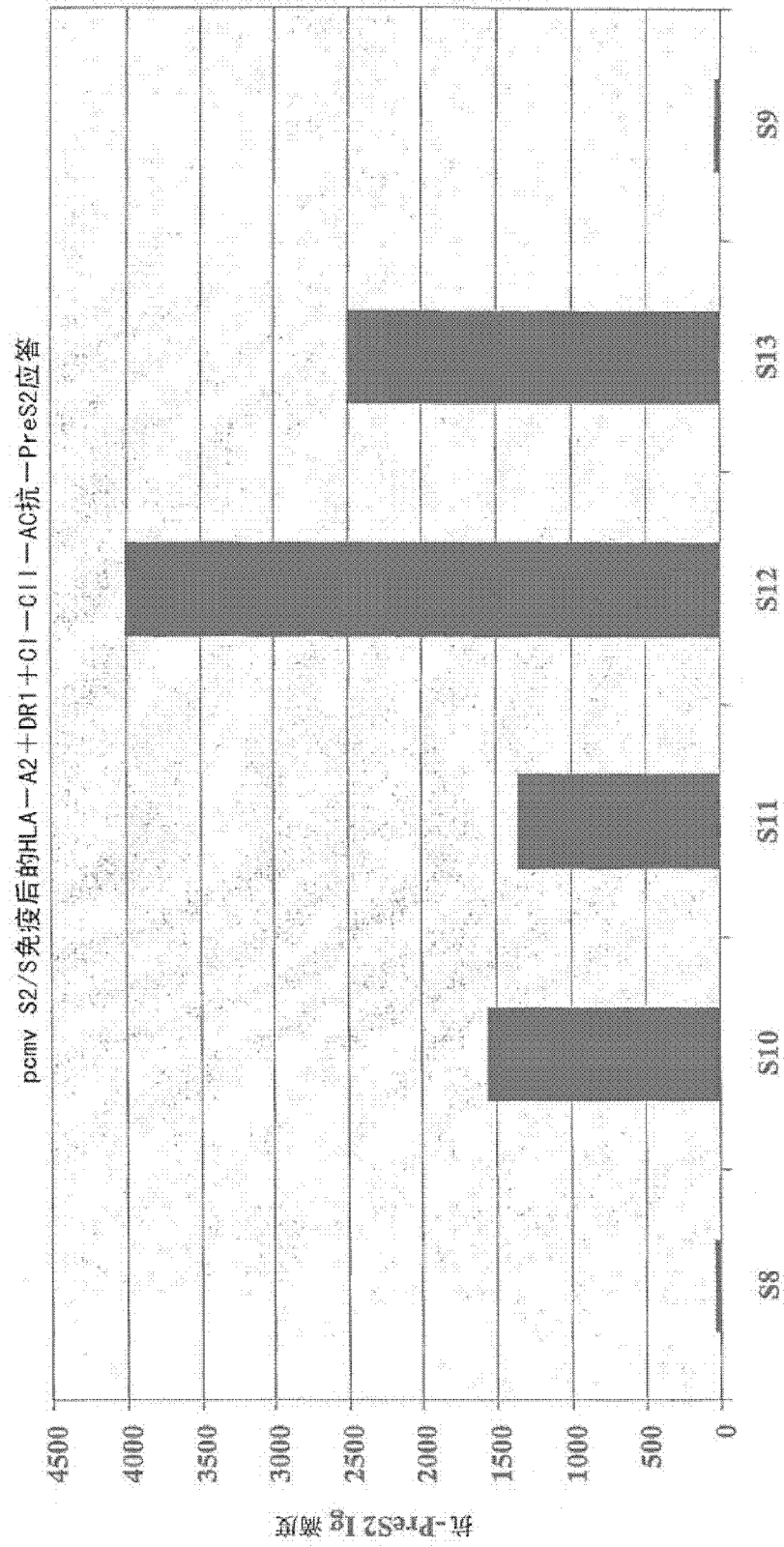


图 5

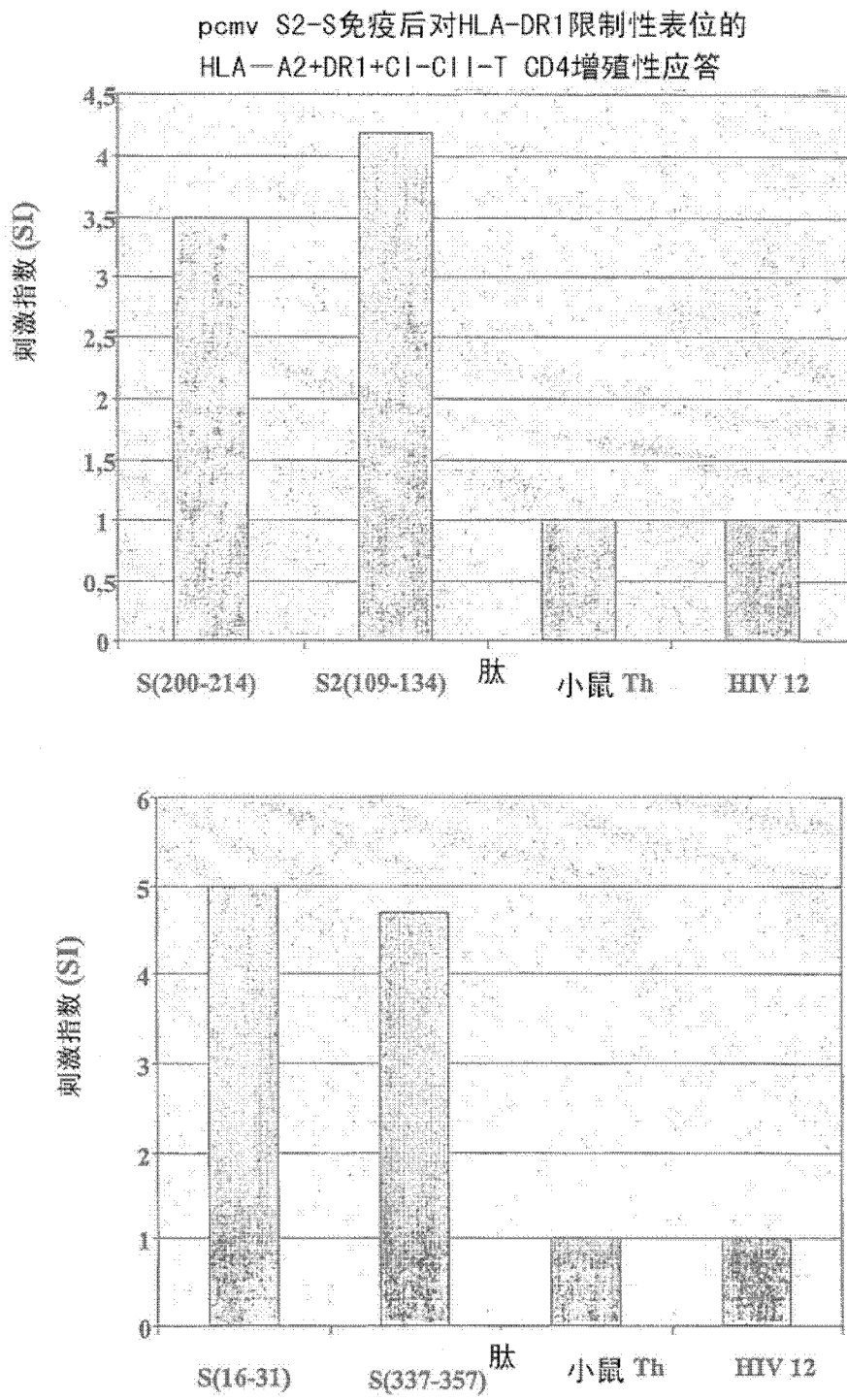


图 6

以pcmv S2-S免疫后的对HLA-A2限制性HBS (348-357) 肽的
HLA-A2+DR1+CI-01小鼠TOD8细胞毒性应答

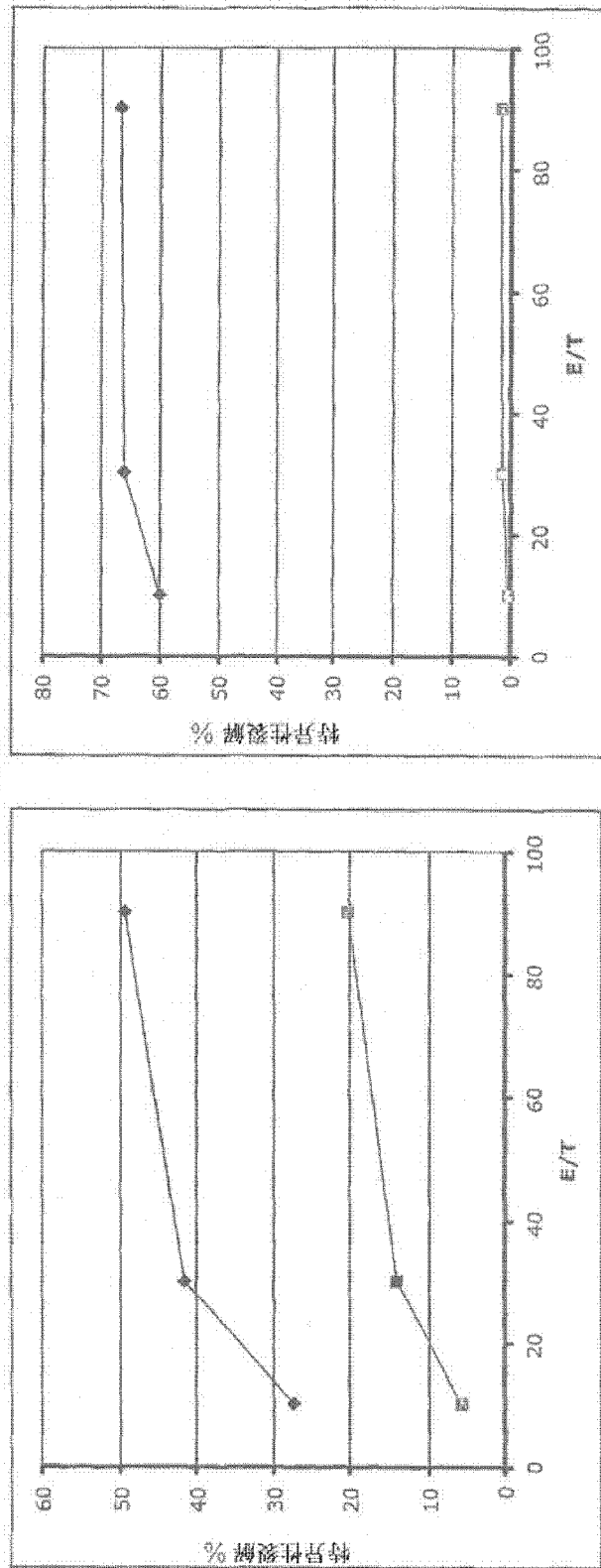


图 7

专利名称(译)	具有人类主要组织相容性复合物(MHC)表型的转基因小鼠、其实验性使用及用途		
公开(公告)号	CN102727875A	公开(公告)日	2012-10-17
申请号	CN201210134834.2	申请日	2004-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所		
申请(专利权)人(译)	巴斯德研究院		
[标]发明人	克洛德·奥里欧 韦罗尼克·潘克里 龙玉春 安东尼·帕诺 弗朗索瓦·莱蒙尼尔		
发明人	克洛德·奥里欧 韦罗尼克·潘克里 龙玉春 安东尼·帕诺 弗朗索瓦·莱蒙尼尔		
IPC分类号	A61K39/00 A61K49/00 G01N33/53 C12N5/10 A01K67/027 C07K14/74 C12N15/85		
CPC分类号	A01K2217/075 C07K14/70539 C12N15/8509 A61K49/0008 A01K2227/105 A01K2217/05 A01K67/0278 A01K67/0276 A01K2267/03 A01K67/0275 A01K2217/00 A01K2207/15 A01K2217/052 A01K2217/054		
代理人(译)	林晓红		
优先权	60/490945 2003-07-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

具有人类主要组织相容性复合物(MHC)表型的转基因小鼠、其实验性使用及用途，本发明涉及转基因小鼠和分离的转基因小鼠细胞，小鼠和小鼠细胞包含断裂的H2 I类基因、断裂的H2 II类基因、功能性HLA I类转基因和功能性HLA II类转基因。在实施方式中，转基因小鼠或小鼠细胞缺乏H2 I类和II类分子，但包含功能性HLA I类转基因和功能性HLA II类转基因。在实施方式中，转基因小鼠或小鼠细胞包含HLA-A2+HLA-DR1+β2m°IAβ°基因型。本发明还涉及使用本发明的转基因小鼠的方法。

