

[19] Patents Registry The Hong Kong Special Administrative Region 香港特別行政區 專利註冊處	[11] 1044171 B CN 1333828 B
<b>STANDARD PATENT SPECIFICATION</b> <b>標準專利說明書</b>	
[21] Application No. 申請編號 02105515.3	[51] Int.C1. <sup>8</sup> C12N C07K C12Q A61K A61P G01N A01K
[22] Date of filing 提交日期 26.07.2002	
<hr/> <p>[54] COMPOSITIONS AND METHODS FOR INCREASING BONE MINERALIZATION 增加骨礦化的組合物和方法</p> <hr/>	
[30] Priority 優先權 27.11.1998 US 60/110,283	[73] Proprietor 專利所有人 UCB Pharma S.A. Allee de la Recherche 60 Brussels, B-1070 BELGIUM
[43] Date of publication of application 申請發表日期 11.10.2002	[72] Inventor 發明人 MARY E. BRUNKOW M · E · 布倫科 DAVID J. GALAS D · J · 格拉斯 BRIAN KOVACEVICH B · 科瓦斯維克 JOHN T. MULLIGAN J · T · 默利甘 BRYAN W. PAEPER B · W · 佩珀 JEFFREY VAN NESS J · 范尼斯 DAVID G. WINKLER D · G · 溫克勒
[45] Publication of the grant of the patent 批予專利的發表日期 24.03.2016	[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址 CLT Patent & Trademark (H.K.) Ltd. Unit 09, 34/F. Office Tower, Convention Plaza No. 1 Harbour Road Wanchai HONG KONG
CN Application No. & Date 中國專利申請編號及日期 CN 99815505.5 24.11.1999	
CN Publication No. & Date 中國專利申請發表編號及日期 CN 1333828 30.01.2002	
Date of Grant in Designated Patent Office 指定專利當局批予專利日期 13.05.2015	



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1333828 B

(45) 授权公告日 2015.05.13

(21) 申请号 99815505.5

C12N 15/63(2006.01)

(22) 申请日 1999.11.24

C12N 5/10(2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/22(2006.01)

60/110,283 1998.11.27 US

C12Q 1/68(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 15/62(2006.01)

2001.07.09

A61K 38/18(2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 19/10(2006.01)

PCT/US1999/027990 1999.11.24

G01N 33/53(2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A01K 67/027(2006.01)

W000/32773 EN 2000.06.08

(56) 对比文件

WO 0032773 A, 2000.06.08, 全文.

(73) 专利权人 UCB 医药有限公司

WO 0192308 A2, 2001.12.06, 权利要求  
13-27, 序列 2.

地址 比利时布鲁塞尔

US 6495736 B1, 2002.12.17, 全文.

(72) 发明人 M·E·布伦科 D·J·格拉斯

审查员 安玉萍

B·科瓦斯维克 J·T·默利甘

B·W·佩珀 J·范尼斯

D·G·温克勒

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 黄革生

(51) Int. Cl.

C12N 15/12(2006.01)

权利要求书3页 说明书69页

C07K 14/51(2006.01)

序列表40页 附图6页

C07K 14/495(2006.01)

(54) 发明名称

增加骨矿化的组合物和方法

(57) 摘要

本发明公开了一种新的 TGF- $\beta$  结合蛋白类型或家族。还公开了用于筛选增加骨矿化的分子的试验方法和利用这些分子的方法。

1. 分离的核酸分子,其核苷酸序列是 SEQ ID NO :1 所示的核苷酸序列。
2. 分离的核酸分子,该核酸分子编码其氨基酸序列是 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的蛋白质。
3. 含有可操作地与根据权利要求 1-2 之任一项的核酸分子相连接的启动子的表达载体。
4. 根据权利要求 3 的表达载体,其中所述启动子选自 CMV I-E 启动子、SV40 早期启动子和 MuLV LTR。
5. 根据权利要求 3 的表达载体,其中所述启动子是组织特异性启动子。
6. 制备 TGF- $\beta$  结合蛋白的方法,包括在足以产生所述蛋白质的时间和条件下,培养含有根据权利要求 3 的载体的细胞。
7. 根据权利要求 6 的方法,进一步包括纯化所述蛋白质的步骤。
8. 包含根据权利要求 1-2 之任一项的核酸分子的病毒载体。
9. 根据权利要求 8 的病毒载体,其中所述载体选自单纯疱疹病毒载体、腺病毒载体、腺病毒伴随病毒载体和逆转录病毒载体。
10. 转化或转染了根据权利要求 3-5、8 和 9 之任一项的载体的宿主细胞。
11. 根据权利要求 10 的宿主细胞,其中所述细胞选自人细胞、狗细胞、猴细胞、大鼠细胞和小鼠细胞。
12. 分离的蛋白质,其由保持改变骨密度的能力的多肽构成,所述多肽的氨基酸序列选自:
  - (a) 由根据权利要求 1-2 之任一项的核酸分子所编码的氨基酸序列;和
  - (b) SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列。
13. 分离的蛋白质,其由根据权利要求 2 的分离的核酸分子所编码。
14. 与由 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列所编码的蛋白质特异结合的抗体。
15. 根据权利要求 14 的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
16. 根据权利要求 15 的抗体,其中所述抗体是抗体片段。
17. 根据权利要求 16 的抗体,其中所述抗体选自鼠抗体、人抗体和人源化抗体。
18. 根据权利要求 14 的抗体,其中所述抗体选自  $F(ab')、 $F(ab)_2$ 、Fab'、Fab 和 Fv。$
19. 产生根据权利要求 15 的抗体的杂交瘤。
20. 根据权利要求 14-18 之任一项的抗体,其能够增加骨密度或骨矿化。
21. 根据权利要求 14-18 和 20 之任一项的抗体用于制造增加骨矿化的药物的用途。
22. 根据权利要求 21 的用途,其中所述药物用于治疗骨质减少。
23. 根据权利要求 21 的用途,其中所述药物用于治疗骨折。
24. 根据权利要求 21 的用途,其中所述药物用于治疗与骨异常生长或发育有关的发育异常。
25. 融合蛋白质,其由第一多肽片段和第二多肽片段构成,其中第一多肽片段是由根据权利要求 1-2 之任一项的核酸分子所编码的蛋白质。
26. 根据权利要求 25 的融合蛋白质,其中所述第二多肽片段是适于纯化或识别的尾端。
27. 由反义序列和具有 RNA 切割酶活性的序列组成的核酶,所述反义序列特异识别编

码根据权利要求 12 之蛋白质的 RNA。

28. 根据权利要求 27 的核酶, 其中所述核酶由核糖核酸组成。
29. 根据权利要求 28 的核酶, 其中所述核糖核酸中的一或多个是 2'-0- 甲基核糖核酸。
30. 根据权利要求 27 的核酶, 其中所述核酶由脱氧核糖核酸和核糖核酸的混合物构成。
31. 根据权利要求 27 的核酶, 其中所述核酶由具有硫代磷酸酯键的核酸构成。
32. 分离的核酸分子, 其核酸序列是编码根据权利要求 27 之核酶的核酸序列。
33. 根据权利要求 32 的核酸分子, 其中该核酸是 DNA 或 cDNA。
34. 根据权利要求 32 的核酸分子, 其处于转录该核酸分子的启动子的控制之下。
35. 含有根据权利要求 27 的核酶的宿主细胞。
36. 含有根据权利要求 32-34 之任一项的核酸分子的载体。
37. 根据权利要求 36 的载体, 其中该载体是质粒、病毒、逆转录转座子或粘粒。
38. 根据权利要求 37 的载体, 其中所述病毒选自逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒。
39. 含有根据权利要求 36-38 之任一项的载体的宿主细胞。
40. 根据权利要求 39 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞被所述载体稳定转化或转染。
41. 根据权利要求 39 的宿主细胞, 其中该宿主细胞是人细胞。
42. 体外制备核酶的方法, 包括提供处于启动子转录控制之下的编码根据权利要求 27 之核酶的 DNA, 以及转录该 DNA 以产生该核酶。
43. 根据权利要求 42 的方法, 进一步包括纯化该核酶。
44. 根据权利要求 27-31 之任一项的核酶用于制备增加恒温动物骨矿化的药物的用途。
45. 根据权利要求 44 的用途, 其中所述药物用于治疗骨质减少。
46. 根据权利要求 44 的用途, 其中所述药物用于治疗骨折。
47. 根据权利要求 44 的用途, 其中所述药物用于治疗与骨异常生长或发育有关的发育异常。
48. 根据权利要求 32 的核酸分子在有利于该核酸分子转录产生核酶的条件下用于制备增加患者骨矿化的药物的用途。
49. 含有根据权利要求 27-31 之任一项的核酶和可药用载体或稀释剂的药物组合物。
50. 检测编码 TGF- $\beta$  结合蛋白的核酸分子的方法, 包括在高严紧条件下杂交根据权利要求 1-2 之任一项的分离的核酸分子, 并检测所述核酸分子和所述分离的核酸分子的杂交。
51. 根据权利要求 50 的方法, 其中所述分离的核酸分子是经标记的。
52. 根据权利要求 50 的方法, 其中所述分离的核酸分子结合在固相支持物上。
53. 检测由 SEQ ID NO :1 所编码的多肽的方法, 包括在足以允许根据权利要求 14-18 之任一项的抗体与所述多肽结合的条件和时间下, 孵育该抗体, 并检测所述结合。
54. 根据权利要求 53 的方法, 其中所述抗体结合在固相支持物上。
55. 根据权利要求 53 的方法, 其中所述抗体是经标记的。
56. 根据权利要求 55 的方法, 其中所述抗体是用选自酶、荧光蛋白和放射性同位素的标记物标记的。

57. 表达载体,含有根据权利要求 1-2 之任一项的核酸分子,其中所述核酸分子可操作地与可有效表达所述核酸分子的启动子相连接,且其中所述表达载体能够被整合到宿主细胞基因组中。

58. 根据权利要求 57 的表达载体,其中所述启动子选自 CMV I-E 启动子、SV40 早期启动子、MuLV LTR 和组织特异性启动子。

59. 确定候选分子是否能够增加骨矿质含量的体外方法,包括:

(a) 将一或多个候选分子与由根据权利要求 1-2 之任一项的核酸分子所编码的多肽和 TGF- $\beta$  蛋白质家族的选定成员混合;

(b) 确定该候选分子是否改变了该 TGF- $\beta$  家族成员的信号转导、或改变了所述多肽与该 TGF- $\beta$  家族成员的结合。

60. 确定候选分子是否能够增加骨矿质含量的体外方法,包括:确定候选分子是否抑制根据权利要求 12 的蛋白质与骨或其类似物的结合。

61. 根据权利要求 60 的方法,其中所述骨类似物是羟基磷灰石。

62. 用于检测由 SEQ ID NO :1 所编码的蛋白质的试剂盒,包含含有根据权利要求 14-18 和 20 之任一项的抗体的容器。

## 增加骨矿化的组合物和方法

### 技术领域

[0001] 一般地，本发明涉及药物学产品和方法，更具体地，本发明涉及适用于增加骨矿质含量的方法和组合物。这些组合物和方法可用以治疗多种疾病，包括例如骨质减少、骨质疏松症、骨折和其它以低骨矿质密度为特征的疾病。

### [0002] 发明背景

[0003] 在一个个体的一生中会出现两或三个明显的骨质 (bone mass) 改变期 (见 Riggs, West J. Med. 154 :63-77, 1991)。第一期在男性和女性中均会出现，并持续至达到峰值骨质。此第一期通过软骨内生长板的线性生长和由于骨膜对合 (periosteal apposition) 的速度引起的径向生长来实现。对于小梁骨 (扁骨例如椎骨和骨盆)，第二期开始于大约 30 岁，对于皮质骨 (例如肢体中的长骨) 则开始于大约 40 岁，并持续到老年。此期的特征在于缓慢的骨丢失，并且在男性和女性中均会发生。在女性中，还会出现骨丢失的第三期，其原因极可能是绝经后的雌激素缺乏。仅在此期，女性可再从皮质骨丢失 10% 的骨质，从小梁区室丢失 25% 的骨质 (见 Riggs, 同上)。

[0004] 骨矿质含量的丢失可以由多种情况引起，并可以导致严重的医学问题。例如，骨质疏松症是一种使人衰弱的疾病，其特征在于患病个体中骨骼骨质和矿质密度的明显降低，骨的结构退化包括骨微体系结构 (microarchitecture) 的降解，和相应的骨脆性以及骨折易发性的增加。人类的骨质疏松症是由临床上的骨质减少 (比年轻成年骨的骨矿质密度平均值低一个以上至 2.5 个以下标准差的骨矿质密度) 发展来的，在美国有大约 2 千 5 百万人患有骨质减少病。在美国另外有 7-8 百万名患者已被诊断患有临床骨质疏松症 (定义为比成熟的年轻成年骨的骨矿质含量平均值低 2.5 个以上标准差的骨矿质含量)。对于健康护理系统而言，骨质疏松症是花费最大的疾病之一，在美国每年花费几百亿美元。除了健康护理相关的费用外，长期的居住护理和工作日损失也增加了该疾病的经济和社会耗费。全球大约 7 千 5 百万人有患骨质疏松症的危险。

[0005] 在人类群体中骨质疏松症的频率随年龄的增加而增加，在高加索人中女性的骨质疏松症频率尤为突出 (在美国，女性骨质疏松症患者占骨质疏松症总患者的 80%)。老年人骨骼骨脆性和骨折易发性的增加由于该群体有较高的意外跌倒危险性而变得更为严重。在美国每年有超过 1.5 百万的骨质疏松相关骨折的报道。髋骨、腕和椎骨骨折是骨质疏松相关的最常见损伤。尤其是髋骨骨折对于患者而言是极为不便和费钱的，而且对于妇女髋骨骨折与高死亡率和发病率相关。

[0006] 尽管骨质疏松已被确定为由于骨质降低引起的骨折危险性提高，但现有的骨骼疾病治疗方案尚不能相当大程度地增加成年人的骨密度。所有的医师都强烈体会到需要能够增加成年人骨密度的药物，尤其是增加易于发生骨质减少和骨质疏松的腕骨、脊柱骨和髋骨的骨密度的药物。

[0007] 目前防止骨质疏松的策略可以给个体提供一些益处，但不能确保消除该疾病。这些策略包括随着高龄的开始要节制身体活动 (尤其是负重活动)，在饮食中包括充足的钙，并避免食用含酒精或烟草的产品。对于表现为临床骨质减少或骨质疏松的患者，所有目前

的治疗药物和策略均旨在通过抑制骨吸收进程来减少骨质的进一步丧失,骨吸收是组成型发生的骨重塑过程中的一个天然组成部分。

[0008] 例如,目前雌激素被用来延缓骨损失。然而,就是否对患者有长期益处和是否对75岁以上的患者有作用,有一些争议。而且,雌激素的使用被认为会增加患乳腺癌和子宫内膜癌的危险性。

[0009] 高剂量的食物钙加上或不加维生素D也被建议用于绝经后的妇女。然而,高剂量钙经常会有令人不快的胃肠道副作用,而且必须对血清和尿的钙水平进行持续监测(见Khosla和Riggs, Mayo Clin. Proc. 70 :978-982, 1995)。

[0010] 其它建议使用的治疗方法包括使用降钙素、二膦酸酯(bisphosphonate)、促蛋白合成甾类和氟化钠。然而,这些治疗方法均有可能妨碍其使用的不良副作用(例如,尽管骨密度获得适度增加,但降钙素和甾类会引起恶心并激发免疫反应,二膦酸酯和氟化钠可以抑制骨折修复)(见Khosla和Riggs,同上)。

[0011] 目前实行的治疗策略均不涉及刺激或增强新骨质生长的药物。本发明提供能用于增加骨矿化并因此可以用于治疗多种期望增加骨质的疾病的组合物和方法。而且,本发明提供了相关的其它益处。

#### [0012] 发明概述

[0013] 如上所述,本发明提供一种新的TGF- $\beta$ 结合蛋白类型或家族,用于筛选增加骨矿质含量和骨矿质密度的化合物的方法,增加骨矿质含量和骨矿质密度的化合物,和在多种疾病的治疗或预防中使用这些化合物的方法。

[0014] 在本发明的一个方面,本发明提供分离的核酸分子,其中所述核酸分子选自:(a)含有SEQ ID N0s. 1、5、7、9、11、13或15,或它们的互补序列的分离核酸分子;(b)在高严紧条件下与(a)的核酸分子特异杂交的分离核酸分子;和(c)根据(a)或(b)的编码TGF- $\beta$ 结合蛋白的分离核酸分子。在本发明的相关方面中,提供基于与上述定义序列之一的仅一部分发生的杂交(例如对于(a),可以是与选自SEQ ID NO. 1的第156-539位或第555-687位核苷酸的至少20、25、50或100个核苷酸的探针发生的杂交)的分离核酸分子。应当是很明显的,用于杂交的必需严紧性可以根据探针的大小而改变。例如,对于25个碱基的探针,高严紧条件可以包括:60mM Tris pH8.0, 2mM EDTA, 5×Denhardt氏液, 6×SSC, 0.1% (w/v) N-十二烷基肌氨酸(N-laurylsarcosin), 0.5% (w/v) NP-40(乙基苯基聚乙二醇), 45°C过夜,之后用0.2×SSC/0.1% SDS于45-50°C洗涤两次。对于低严紧条件下100个碱基的探针,适合的条件可以包括:5×SSPE, 5×Denhardt氏液, 和0.5% SDS于42-50°C过夜,之后用2×SSPE(或2×SSC)/0.1% SDS于42-50°C洗涤两次。

[0015] 在本发明的相关方面中,提供根据Wilbur-Lipman算法与SEQ ID N0s. 1、5、7、9、11、13或15有50%、60%、75%、80%、90%、95%或98%水平的同源性的分离核酸分子。例如,这样的核酸分子的代表性例子包括编码含有SEQ ID N0s. 2、6、10、12、14、或16的蛋白质的核酸分子,或根据Lipman-Pearson算法与这些序列有50%、60%、75%、80%、90%、95%或98%水平的同源性的核酸分子。

[0016] 典型地,分离的核酸分子小于100kb,而且在某些实施方案中,小于50kb、25kb、10kb、或甚至5kb。而且,在其它实施方案中,分离的核酸分子在其它无关核酸分子的“文库”(例如,亚克隆BAC,如GenBank登记号AC003098和EMB登记号AQ171546中描述的)中

是不存在的。然而,可以在相关分子的文库(例如用于改组的文库,如美国专利5,837,458;5,830,721;和5,811,238中描述的)中找到分离的核酸分子。最后,本文所描述的分离核酸分子不包括编码Dan、Cerberus、Gremlin或SCGF(美国专利5,780,263)的核酸分子。

[0017] 本发明还提供含有上述核酸分子的克隆载体,和含有可操作地与上述核酸分子之一连接的启动子(例如调节序列)的表达载体。合适启动子的代表性例子包括组织特异性启动子和基于病毒的启动子(例如CMV I-E等基于CMV的启动子、SV40早期启动子和MuLV LTR)。表达载体也可以基于或来源于病毒(例如“病毒载体”)。病毒载体的代表性例子包括单纯疱疹病毒载体、腺病毒载体、腺病毒伴随病毒载体和逆转录病毒载体。本发明还提供含有或包含任何上述载体的宿主细胞(包括例如人、猴、狗、大鼠或小鼠来源的宿主细胞)。

[0018] 在本发明的其它方面中,提供了制备TGF- $\beta$ 结合蛋白的方法,包括步骤:在足以产生TGF- $\beta$ 结合蛋白的时间和条件下培养上述含载体的宿主细胞。在进一步的实施方案中,可以对通过该方法产生的蛋白质作进一步纯化(例如通过柱层析、亲和纯化以及诸如此类的方法)。因此,根据本申请的公开可以容易地制备上述核酸分子所编码的分离蛋白质(例如SEQ ID N0s. 2、4、6、8、10、12、14或16)。

[0019] 还应该指出的是,上述蛋白质或其片段可以以融合蛋白的形式产生。例如,在一个方面,提供了包含第一多肽片段和第二多肽片段的融合蛋白,其中第一多肽片段含有上述核酸分子所编码的TGF- $\beta$ 结合蛋白或其至少10、20、30、50或100个氨基酸长的部分,第二多肽片段含有非TGF- $\beta$ 结合蛋白。在某些实施方案中,该第二多肽可以是适于纯化或识别的尾端(tag)(例如含有多个阴离子氨基酸残基的多肽—见美国专利4,851,341)、标记(例如绿色荧光蛋白或碱性磷酸酶)、或毒性分子(例如蓖麻毒素)。

[0020] 在本发明的另一方面中,提供了能够特异结合上述TGF- $\beta$ 结合蛋白类型(例如人BEER)的抗体。在多种实施方案中,该抗体可以是(例如人或鼠来源的)多克隆抗体或单克隆抗体。在进一步的实施方案中,该抗体是保留了整个抗体的结合特性的抗体片段(例如F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab或Fv片段,甚至是CDR)。本发明还提供能够产生或表达上述抗体的杂交瘤和其它细胞。

[0021] 在本发明的相关方面中,本发明提供了检测TGF- $\beta$ 结合蛋白的方法,包括步骤:在足以允许上述抗体与TGF- $\beta$ 结合蛋白结合的时间和条件下孵育所述抗体,并检测该结合。在多种实施方案中,抗体可以与固相支持物结合以利于洗涤或分离,和/或可以是标记的(例如用选自酶、荧光蛋白和放射性同位素的标记)。

[0022] 在本发明的其它方面中,本发明提供了与根据SEQ ID N0s. 1、3、5、7、9、11、13、15、17或18或它们的互补序列的核酸分子在高严紧条件下杂交的分离寡核苷酸。在进一步的实施方案中,该寡核苷酸可以在编码SEQ ID N0s. 2、4、6、8、10、12、14或16的序列中找到。在某些实施方案中,该寡核苷酸长至少15、20、30、50或100个核苷酸。在进一步的实施方案中,用另一个分子(例如酶、荧光分子或放射性同位素)标记该寡核苷酸。本发明还提供能够特异扩增编码TGF- $\beta$ 结合蛋白的上述核酸分子的全部或部分的引物。这里所用术语“特异扩增”应当理解为是指扩增上述TGF- $\beta$ 结合蛋白,而非其它TGF- $\beta$ 结合蛋白例如Dan、Cerberus、Gremlin或SCGF(美国专利5,780,263)的引物。

[0023] 在本发明的相关方面中,提供了检测编码TGF- $\beta$ 结合蛋白的核酸分子的方法,包括步骤:在高严紧条件下孵育上述寡核苷酸,并检测所述寡核苷酸的杂交。在某些实施方案

中,该寡核苷酸可以是标记的和 / 或与固相支持物结合的。

[0024] 在本发明的其它方面中,提供了能够切割编码上述 TGF- $\beta$  结合蛋白之一(例如 SEQ ID N0s. 2、6、8、10、12、14 或 16) 的 RNA 的核酶。该核酶可以由 DNA、RNA(包括 2'-0- 甲基核糖核酸)、核酸类似物(例如具有硫代磷酸酯键的核酸)或它们的混合物组成。还提供编码这些核酶的核酸分子(例如 DNA 或 cDNA),以及能够表达或产生这些核酶的载体。载体的代表性例子包括质粒、逆转录转座子、粘粒和基于病毒的载体(例如,至少部分从逆转录病毒、腺病毒、或腺伴随病毒产生的病毒载体)。本发明还提供含有这些载体的宿主细胞(例如,人、狗、大鼠或小鼠细胞)。在某些实施方案中,可以用载体稳定地转化宿主细胞。

[0025] 在本发明的更进一步的方面,提供通过合成或体外或体内转录产生核酶的方法。在更进一步的实施方案中,可以对由此产生的核酶作进一步纯化和 / 或将其制成药物组合物(例如该核酶或编码该核酶的核酸分子和药物学上可接受的载体或稀释剂一起)。同样,可以将本文描述的反义寡核苷酸和抗体或其它选定分子制成药物组合物。

[0026] 在本发明的其它方面中,提供含有可与根据 SEQ ID N0s. 1、3、5、7、9、11、13 或 15 或其互补序列的核酸分子杂交的核酸分子的反义寡核苷酸,其中所述寡核苷酸抑制本文所述的 TGF- $\beta$  结合蛋白(例如人 BEER)的表达。在多种实施方案中,该寡核苷酸长 15、20、25、30、35、40 或 50 个核苷酸。优选地,该寡核苷酸的长度小于 100、75 或 60 个核苷酸。应该易于明了的是,该寡核苷酸可以含有一或多种核酸类似物、核糖核酸或脱氧核糖核酸。而且,该寡核苷酸可以由一个或多个键(linkage)修饰,这些键包括例如共价键如硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、磷酸甲酯键、亚甲基(甲基亚胺基)键、吗啉代键(morpholino linkage)、酰胺键、聚酰胺键、短链烷基糖间键、环烷基糖间键、短链杂原子糖间键和杂环糖间键。嵌合寡核苷酸的一个代表性例子见美国专利 5,989,912。

[0027] 在本发明的再一方面,提供用于增加骨矿化的方法,包括向恒温动物导入有效量的上述核酶。在相关方面中,该方法包括步骤:在利于核酸分子转录产生该核酶的条件下,向患者导入有效量的能产生期望核酶的本文所描述核酸分子或载体。

[0028] 在本发明的其它方面,提供转基因非人动物。在一个实施方案中,提供其生殖细胞和体细胞含有编码上述 TGF- $\beta$  结合蛋白的核酸分子的转基因动物,其中所述核酸分子可操作地与可有效表达该基因的启动子相连,该基因是在胚胎阶段导入该动物或该动物祖先的,且条件是所述动物并非人类。在其它实施方案中,提供转基因敲除动物,包括其生殖细胞和体细胞中至少有一个可与编码上述 TGF- $\beta$  结合蛋白的核酸分子杂交的内源性核酸分子等位基因被破坏的动物,其中与不带有该破坏的动物相比,该破坏阻止了从所述等位基因转录信使 RNA,且条件是该动物并非人类。在多种实施方案中,该破坏是核酸缺失、替代或插入。在其它实施方案中,该转基因动物是小鼠、大鼠、绵羊、猪或狗。

[0029] 在本发明另外方面,提供用于检测 TGF- $\beta$  结合蛋白基因表达的试剂盒,其包括一个含有核酸分子的容器,其中该核酸分子选自:(a)含有 SEQID Nos :1、3、5、7、9、11、13 或 15 的核苷酸序列的核酸分子;(b)含有(a)之核苷酸序列的互补序列的核酸分子;(c)是长度为至少 15、20、30、50、75 或 100 个核苷酸的(a)或(b)的片段的核酸分子。还提供用于检测 TGF- $\beta$  结合蛋白的试剂盒,该试剂盒包含一个含有一种本文所述的 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体的容器。

[0030] 例如,在本发明的一个方面,提供用于确定所选分子是否能够增加骨矿质含量的

方法,包括步骤:(a) 将一种或多种候选分子与权利要求 1 的核酸分子编码的 TGF- $\beta$  结合蛋白,以及 TGF- $\beta$  蛋白质家族的一个选定成员(例如 BMP5 或 6)相混合,(b) 测定该候选分子是否改变了 TGF- $\beta$  家族成员的信号转导(signaling),或改变了 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员的结合。在某些实施方案中,该分子改变 TGF- $\beta$  起间充质细胞分化的正调节物作用的能力。在本发明的此方面,该候选分子可以通过例如减少(如抑制)或增加(如增强)信号转导或结合来改变信号转导或结合。

[0031] 在另一方面,提供用于确定所选分子是否能够增加骨矿质含量的方法,包括步骤:确定所选分子是否抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与骨或其类似物的结合。骨或其类似物的代表性例子包括羟基磷灰石和通过活组织检查获得的人原始骨样品。

[0032] 在以上列举的方法的某些实施方案中,该所选分子包含在分子混合物中,而且这些方法可以进一步包括步骤:分离在该测定中发挥功能的一种或多种分子。在其它实施方案中,将 TGF- $\beta$  蛋白质家族结合在固相支持物上并测量 TGF- $\beta$  结合蛋白的结合,或者将 TGF- $\beta$  结合蛋白结合在固相支持物上并测量 TGF- $\beta$  蛋白质的结合。

[0033] 利用诸如以上描述的方法,可以分析多种分子通过抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  蛋白质家族的结合增加骨矿质含量的能力。这些分子的代表性例子包括蛋白质或肽、有机分子和核酸分子。

[0034] 在本发明的其它相关方面中,提供用于增加恒温动物骨矿质含量的方法,包括步骤:给恒温动物施用治疗上有有效量的从本文所列举分析方法鉴定的分子。在另一方面,提供用于增加恒温动物骨矿质含量的方法,包括步骤:给恒温动物施用治疗上有有效量的抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  蛋白质超家族,包括骨形态发生蛋白质(BMP)结合的分子。适合分子的代表性例子包括反义分子、核酶、核酶基因和特异识别并改变 TGF- $\beta$  结合蛋白活性的抗体(例如人源化抗体)。

[0035] 在本发明的另一方面,提供用于增加恒温动物骨矿质含量的方法,包括步骤:(a)向返回骨的细胞导入指导抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  蛋白质家族和骨形态发生蛋白质(BMP)结合的分子表达的载体,和(b)给恒温动物施用该含有载体的细胞。如本文中所用的,应该理解,如果细胞在外周施用后定位在骨基质中,则细胞“返回骨”。在一个实施方案中,该方法还包括,在导入步骤之前,从骨髓分离返回骨的细胞。在再一实施方案中,返回骨的细胞选自 CD34+ 细胞和成骨细胞。

[0036] 在本发明的其它方面,提供抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  蛋白质超家族结合的(优选分离的)分子。

[0037] 在另一些实施方案中,该分子可以以组合物的形式提供,而且可以进一步含有骨吸收抑制物。这些抑制物的代表性例子包括降钙素、雌激素、二膦酸酯、具有抗吸收活性的生长因子和三苯氧胺。

[0038] 可以用于前述治疗方法中的分子的代表性例子包括例如核酶、核酶基因、反义分子和/或抗体(例如人源化抗体)。依据这些分子的选择,它们可以用来改变、拮抗或激动本文所述的 TGF- $\beta$  结合蛋白家族成员的信号转导或结合。

[0039] 在本发明的各种实施方案中,上述治疗或预防的分子和方法可以用于疾病例如骨质疏松症、骨软化、牙周病、坏血病、库欣病(Cushing's Disease)、骨折和由于肢体不动和类固醇使用引起的疾病。

[0040] 参考如下详细说明和附图,本发明的这些和其它方面将是明显的。此外,本文给出了各种更为详细地描述某些程序和组合物(例如质粒等)的文献,并因此将它们完整地以参考文献方式并入。

[0041] 附图简要说明

[0042] 图1是人Dan、人Gremlin、人Cerberus和人Beer的氨基酸序列比较示意图。箭头指示半胱氨酸骨架。

[0043] 图2总结了从对各种组织进行TGF- $\beta$ 结合蛋白基因,具体是人Beer基因表达研究获得的结果。使用半定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法,从由总RNA合成的第一链cDNA扩增该基因的一部分(在实施例2A中有更为详细的描述)。

[0044] 图3总结了使用与小鼠Beer转录本互补的cRNA探针进行小鼠胚胎切片RNA原位杂交所获得的结果(在实施例2B中有更为详细的描述)。A组为10.5dpc胚胎的横向切片。B组是12.5dpc胚胎的纵向切片,C组和D组是15.5dpc胚胎的纵向切片。

[0045] 图4说明了通过Western印迹分析显示的三种不同多克隆抗体对于它们各自抗原的特异性(在实施例4中有更详细地描述)。图4A显示了抗人Beer抗体对于人Beer抗原,而非人Dan或人Gremlin的特异反应性。图4B显示了抗人Gremlin抗体对于人Gremlin抗原,而非人Beer或人Dan的特异反应性。图4C显示了抗人Dan抗体对于人Dan抗原,而非人Beer或人Gremlin的特异反应性。

[0046] 图5说明了通过Western印迹分析显示的TGF- $\beta$ 结合蛋白Beer对BMP-5和BMP-6,而非BMP-4的选择性(在实施例5中有更详细地描述)。

[0047] 图6阐明了TGF- $\beta$ 结合蛋白Beer与BMP-5之间的离子相互作用具有15-30nM范围的解离常数。

[0048] 发明详述

[0049] 定义

[0050] 在详细陈述本发明之前,阐明某些术语的定义并列出和定义下文将用到的缩写,可能对于本发明的理解是有用的。

[0051] “分子”应理解为包括蛋白质或肽(例如抗体、重组结合伴侣(binding partner)、具有期望结合亲和性的肽)、核酸(例如DNA、RNA、嵌合核酸分子和核酸类似物PNA);和有机或无机化合物。

[0052] “TGF- $\beta$ ”应理解为包括任何已知或新的TGF- $\beta$ 超家族成员,该TGF- $\beta$ 超家族也包括骨形态发生蛋白质(BMP)。

[0053] “TGF- $\beta$ 受体”应理解为是指对于TGF- $\beta$ 超家族(包括骨形态发生蛋白质(BMP))的特定成员具有特异性的受体。

[0054] “TGF- $\beta$ 结合蛋白”应理解为是指对于TGF- $\beta$ 超家族(包括骨形态发生蛋白质(BMP))的特定成员或子集具有特异结合亲和性的蛋白质。TGF- $\beta$ 结合蛋白的具体例子包括SEQ ID NOS. 1、5、7、9、11、13和15所编码的蛋白质。

[0055] 抑制“TGF- $\beta$ 结合蛋白与TGF- $\beta$ 蛋白质家族和骨形态发生蛋白质(BMP)的结合”应理解为是指,通过除去TGF- $\beta$ 或阻止TGF- $\beta$ 与TGF- $\beta$ 结合蛋白结合,从而允许激活TGF- $\beta$ 或骨形态发生蛋白质(BMP),或允许TGF- $\beta$ 家族成员包括骨形态发生蛋白质(BMP)与其各自的受体结合的分子。该抑制可以通过例如抑制TGF- $\beta$ 结合蛋白与TGF- $\beta$ 超家族

的特定成员结合的分子来实现。

[0056] “载体”是指能够指导目的蛋白质表达的装置。载体必须包括可操作地与目的基因连接的转录启动子元件。载体可以由脱氧核糖核酸（“DNA”）、核糖核酸（“RNA”）、或两者的结合（例如 DNA-RNA 嵌合物）组成。任选地，载体可以包括聚腺苷酸化序列、一或多个限制性位点、以及一或多个选择标记例如新霉素磷酸转移酶或潮霉素磷酸转移酶。此外，依据所选宿主细胞和所用载体，还可以在本文所述的载体中并入其它遗传元件例如复制起点、其它的核酸限制性位点、增强子、赋予转录可诱导性的序列、和选择标记。

[0057] “分离的核酸分子”是非整合在生物体基因组 DNA 中的核酸分子。例如，从真核细胞的基因组 DNA 中分离的编码 TGF- $\beta$  结合蛋白的 DNA 分子即是分离的 DNA 分子。分离的核酸分子的另一个例子是非整合在生物体基因组中的化学合成核酸分子。该分离核酸分子可以是基因组 DNA、cDNA、RNA，或至少部分由核酸类似物组成。

[0058] “分离的多肽”是基本上不带有污染细胞成分例如本质上与该多肽相联的碳水化合物、脂质或其它蛋白性质杂质的多肽。在某些实施方案中，如果看起来一个特定的蛋白质制品在考马斯亮兰染色的 SDS-PAGE 凝胶上表现为单一条带，则它含有分离的多肽。当指有机分子时，“分离的”意味着采用本领域熟知方法（例如 NMR、熔点法）测定时，该化合物具有大于 90% 的纯度。

[0059] “硬化性狭窄 (Sclerostenosis)”是 Hansen(1967) 用以指一种疾病的术语 (Hansen, H. G. , Sklerosteose. In :Opitz, H. ;Schmid, F. , Handbuch der Kinderheikunde. Berlin :Springer( 出版 )61967, 第 351-355 页 ), 该疾病类似于范布肯姆全身性骨化层肥厚病, 但可能有如下不同 : 骨改变的放射性表现, 和许多案例中食指和中指的不对称皮肤并指 (趾) 现象的存在。在该疾病中下颌具有不寻常的正方形外观。

[0060] “人源化抗体”是重组蛋白质, 其中鼠单克隆抗体的互补决定区已从鼠免疫球蛋白的重和轻可变链转移至人的可变区。

[0061] 正如本文所用, “抗体片段”是指抗体的部分例如  $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$  等等。无论结构如何, 抗体片段与完整抗体所识别的相同抗原结合。例如, 抗 TGF- $\beta$  结合蛋白单克隆抗体片段与 TGF- $\beta$  结合蛋白表位结合。

[0062] 术语“抗体片段”也包括通过结合特异抗原形成复合物来象抗体一样起作用的任何合成蛋白质或遗传工程蛋白质。例如, 抗体片段包括由轻链可变区构成的分离片段、由重链和轻链可变区构成的“Fv”片段、通过肽接头连接轻链可变区和重链可变区的重组单链多肽分子（“sFv 蛋白质”）、和由模拟高变区的氨基酸残基构成的最小识别单位。

[0063] “可检测标记 (label)”是可以和抗体部分结合产生对于诊断有用的分子的分子或原子。可检测标记的例子包括螯合剂、光敏剂、放射性同位素、荧光试剂、顺磁离子、酶和其他标记物 (marker) 部分。

[0064] 如本文所用, “免疫结合物 (immunoconjugate)”是含有抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体或抗体片段, 和可检测标记的分子。免疫结合物在结合 (conjugation) 之后具有与结合之前大致上相同的, 或仅轻微降低的结合 TGF- $\beta$  结合蛋白的能力。

[0065] 缩写 :TGF- $\beta$ -“转化生长因子 -  $\beta$ ”;TGF- $\beta$  BP-“转化生长因子 -  $\beta$  结合蛋白”(一种代表性的 TGF- $\beta$  BP 称为“人 Beer”);BMP-“骨形态发生蛋白质”;PCR-“聚合酶链式反应”;RT-PCR- 在第一步使用逆转录酶 (RT) 将 RNA 首先转录成 DNA 的 PCR 方法;cDNA- 通过

将 RNA 序列拷贝成 DNA 形式所产生的任何 DNA。

[0066] 如上所述,本发明提供一种新的 TGF- $\beta$  结合蛋白类型,以及用于增加恒温动物的骨矿质含量的方法和组合物。简单地说,本发明以如下意外发现为基础:编码 TGF- $\beta$  结合蛋白家族一个新成员的基因的突变导致了稀有疾病(硬化性狭窄),该疾病的特征在于与正常个体相比患者骨矿质含量高了 1-4 倍。因此,正如以下将更为详细地讨论的,该发现导致开发了可以用于筛选抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  蛋白质家族和骨形态发生蛋白质(BMP)相结合的分子的方法,以及使用这些分子增加恒温动物(包括例如人)的骨矿质含量的方法。

[0067] 对称为硬化性狭窄的疾病的讨论

[0068] 硬化性狭窄是 Hansen(1967) 应用于一种疾病的术语(Hansen, H. G., Sklerosteose. In :Opitz, H. ;Schmid, F., Handbuch der Kinderheikunde. Berlin : Springer(出版)6 1967, 第 351-355 页),该疾病类似于范布肯姆全身性骨化层肥厚病,但骨改变的放射性表现可能不同,而且在许多案例中存在食指和中指的不对称皮肤并指(趾)现象。

[0069] 现已知道硬化性狭窄是一种以成年时期广泛播散性骨硬化损伤(disseminated sclerotic lesions of the bone)为特征的常染色体半显性疾病。该疾病是进行性的。硬化性狭窄还有一个与并指(趾)(两个或多个指(趾)融合在一起)相关的发育问题。硬化性狭窄综合征与巨型身高相关,许多患病个体达到 6 英尺高或更高。纯合子的骨矿质含量可以比正常个体高 1-6 倍,而且骨矿质密度可以比正常值(例如,从未患病同胞获得的值)高 1-4 倍。

[0070] 硬化性狭窄综合征主要在南非荷兰人血统的 Afrikaaner 人中发生。在 Afrikaaner 群体中大约 1/140 的个体是该突变基因的携带者(杂合子)。该突变表现出 100% 的外显率。关于不带有相关病理学特征(并指(趾)或头骨过度生长)的杂合子中骨矿质密度增加也有轶事报道。

[0071] 目前,似乎在硬化性狭窄中还没有垂体-下丘脑轴的异常。尤其是,似乎还没有生长激素和可的松的过度产生。此外,在患病个体中性激素水平正常。然而,骨更新标记(bone turnover markers)(成骨细胞特异性碱性磷酸酶、骨钙素、I 型原胶原 C' 前肽(PICP),以及总的碱性磷酸酶;(见 Comier, C. , Curr. Opin. in Rheu. 7 :243, 1995))指示有与该疾病相关的高成骨细胞活性(hyperosteoblastic activity),但破骨细胞活性正常至轻微降低,这是用骨吸收标记(吡啶啉、脱氧吡啶啉、N-端肽、尿羟脯氨酸、血浆酒石酸抗性酸性磷酸酶和半乳糖基羟赖氨酸(见 Comier, 同上))测量的。

[0072] 硬化性狭窄的特征在于在患病个体的一生中全身骨骼骨的持续沉积。在纯合子中骨矿质的持续沉积导致在缺乏机械刺激感受器的骨骼区域(头骨、颌、颅骨)中骨的过度生长。在患硬化性狭窄的纯合子中,头骨的过度生长导致颅压迫,并最终由于脑干所受到的过高流体静压导致死亡。在骨骼的所有其它部分,出现普通性和弥散性硬化。长骨的皮质区极大地增厚,导致骨长度的显著增加。小梁连接(trabecular connections)增厚,而这又增加了小梁骨的强度。硬化骨表现出不寻常的 X 射线不透性。

[0073] 正如实施例 1 中将更详细描述的,负责硬化性狭窄综合征的这种稀有遗传突变定位在人第 17 号染色体编码 TGF- $\beta$  结合蛋白家族一个新成员的区域(该新成员的一个代表

性例子称为“人 Beer”)。如下文将更为详细地描述的,基于该发现,骨矿化机制获得了更为全面的理解,从而允许开发测定增加骨矿化的分子的方法,以及这些分子在增加骨矿质含量和治疗或预防许多疾病中的应用。

[0074] TGF- $\beta$  超家族

[0075] 转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 超家族包含各种(在二级和三级水平上)具有共同的序列元件和结构基序的生长因子。已知该蛋白质家族在众多的细胞类型上执行着广泛的生物学反应。其中许多在胚胎发育期间模式的形成和组织的特化中发挥着重要作用;在成年个体中它们参与例如伤口愈合和骨修复及骨重塑,以及免疫系统的调节。除了三种 TGF- $\beta$  外,该超家族还包括骨形态发生蛋白质(BMP)、活化素、抑制素、生长和分化因子(GDF)以及胶质来源的神经营养因子(GDNF)。通过将特定蛋白质划入普通亚家族的一般序列特征,建立初级分类。由于较小群体的成员间更为严格的序列保守性,在亚家族中进行其它分层是可能的。在某些情况下,例如对于 BMP-5、BMP-6 和 BMP-7,这可以是此较小群体成员间的高达 75% 的氨基酸同源性。这种一致性水平使得单个代表性序列即可说明将此子群体与较大家族的其它成员分开的此子群体的关键生化元件。

[0076] TGF- $\beta$  通过诱导 I 型和 II 型受体形成异寡聚体复合物(hetero-oligomeric complexes)来实现信号转导。已经测定了 TGF- $\beta$  2 的晶体结构。TGF- $\beta$  2 的通常折叠形式含有一个由三个二硫桥形成的稳定紧凑的半胱氨酸节状结构。通过一个二硫桥稳定的二聚化是反向平行的。

[0077] TGF- $\beta$  家族成员通过结合具有内在丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性的受体来起始其细胞作用。该受体家族由两个亚家族组成,表示为 I 型和 II 型受体。TGF- $\beta$  家族的每个成员均与 I 型和 II 型受体的一个特征性组合相结合,这两种受体均是信号转导所必需的。在目前的 TGF- $\beta$  受体激活模型中,首先 TGF- $\beta$  与 II 型受体(TbR-II)结合,这以具有激活的激酶活性的寡聚形式在细胞膜中发生。之后,在缺乏 TbR-II 时不能与配体结合的 I 型受体(TbR-I)被吸收进该复合物中。然后,主要在近膜区的富含甘氨酸和丝氨酸残基的域(GS 域)中 TbR-II 使 TbR-I 磷酸化,并由此激活 TbR-I。

[0078] 迄今已鉴定了 7 种 I 型受体和 5 种 II 型受体。

[0079] 骨形态发生蛋白质(BMP) 是决定人体骨矿质

[0080] 密度的关键调节蛋白质

[0081] 骨形成理解方面的主要进展是骨形态发生蛋白质(BMP),又称生骨蛋白质(OP)的鉴定,该蛋白质调节体内软骨和骨的分化。BMP/OP 通过一连串级联事件诱导软骨内的骨分化,这些事件包括软骨的形成、软骨的过量生长和钙化、血管入侵、成骨细胞的分化、和骨的形成。如上所述,BMP/OP(BMP 2-14,和生骨蛋白 1 和 2 即 OP-1 和 OP-2)是 TGF- $\beta$  超家族的成员。BMP/OP 亚家族成员之间的惊人进化保守性提示,它们在动物的正常发育和机能中是关键的。而且,多种形式的 BMP/OP 的存在引出一个重要问题,即关于此明显冗余的生物学意义的问题。BMP/OP 除了在胎儿之后(postfetal)的软骨形成和骨生成中起作用外,还在骨骼形成(包括颅面(craniofacial)组织和牙组织的发育)以及实质器官包括肾的胚胎发育和器官形成中起着多种作用。现在我们知道,自然界依靠着剪裁的共同(但稀少)的分子机制来实现特化组织和器官的形成。BMP/OP 超家族是自然界简约性的一个很好例子,即通过使用在高度保守羧基端区域的氨基酸基序中具有微小变异的分子同种型(isoform)

来规划多种特化功能。

[0082] BMP 的拮抗作用

[0083] BMP 亚家族和活化素亚家族均受到明显的翻译后调节。存在一个复杂的细胞外控系统,籍此合成并输出一个高亲和性拮抗剂,随后该拮抗剂选择性地与 BMP 或活化素形成复合物以破坏它们的生物学活性 (W. C. Smith(1999) TIG 15(1) 3-6)。已经鉴定了许多这种天然拮抗剂,而且基于序列差异百分数,由于缺乏一级序列的保守性,它们似乎是独立进化的。目前还没有关于这类蛋白质的结构研究。这些拮抗剂的研究突出显示,其明显偏好与 BMP-2 和 BMP-4 相互作用,并中和之。而且,不同拮抗剂的抑制机制似乎不同 (S. Iemura 等 (1998) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 95, 9337-9342)。

[0084] 新的 TGF- $\beta$  结合蛋白

[0085] 1. TGF- $\beta$  结合蛋白的背景

[0086] 如上所述,本发明提供一种新的 TGF- $\beta$  结合蛋白类型,当与人 DAN、人 Gremlin 和人 Cerberus 以及 SCGF (美国专利 5,780,263) 相比时此新 TGF- $\beta$  结合蛋白类型具有几乎一致的半胱氨酸 (二硫键) 支架,但核苷酸水平上几乎没有同源性 (背景知识一般参见 Hsu, D. R. , Economides, A. N. , Wang, X. , Eimon, P. M. , Harland, R. M. ,“非洲爪蟾属背部化 (dorsalizing) 因子 Gremlin 鉴定了一个拮抗 BMP 活性的新分泌蛋白质家族”,分子细胞 (Molecular Cell) 1 :673-683, 1998)。

[0087] 该新 TGF- $\beta$  结合蛋白类型的一个代表性例子在 SEQ ID NOS. 1, 5, 9, 11, 13 和 15 中公开。还应当理解,这类结合蛋白的代表性成员包括 TGF- $\beta$  结合蛋白变体 (例如 SEQ ID NOS. 5 和 7)。本文中所使用的“TGF- $\beta$  结合蛋白变体基因”是指编码具有 SEQ ID Nos :2、10、12、14 或 16 的修饰氨基酸序列的多肽的核酸分子。该变体包括天然存在的 TGF- $\beta$  结合蛋白基因多态性或等位基因变体,以及含有这些氨基酸序列的保守氨基酸替换的合成基因。TGF- $\beta$  结合蛋白基因的其它变体形式是含有上述核苷酸序列的插入或缺失的核酸分子。TGF- $\beta$  结合蛋白变体基因可以通过确定该基因是否能与具有 SEQ ID Nos :1, 5, 7, 9, 11, 13 或 15 的核苷酸序列在严紧条件下杂交来鉴定。此外,TGF- $\beta$  结合蛋白变体基因应编码具有 半胱氨酸骨架 (backbone) 的蛋白质。

[0088] 作为一种替代方法, TGF- $\beta$  结合蛋白变体基因可以通过序列比较来鉴定。正如本文中所用的,当以获得最大对应 (correspondence) 的方式对比 (aligning) 时,如果两个氨基酸序列的氨基酸残基相同,则这两个氨基酸序列具有“100%的氨基酸序列一致性”。同样,当以获得最大对应的方式对比时,如果两个核苷酸序列的核苷酸残基相同,则这两个核苷酸序列具有“100%的核苷酸序列一致性”。序列比较可以采用标准软件程序例如 DNASTAR (Madison, Wisconsin) 生产的 LASERGENE 生物信息计算软件包中包括的那些程序来进行。其它通过确定最佳对比来比较两个核苷酸或氨基酸序列的方法是本领域技术人员所熟知的 (见例如 Peruski 和 Peruski, 因特网和新生物学 : 基因组和分子研究的工具 (The Internetand the New Biology :Tools for Genomic and Molecular Research), (ASM Press 公司, 1997) ;Wu 等 (编),“核酸及蛋白质的信息高速公路和计算机数据库”,基因生物技术方法 (Methods in GeneBiotechnology), 第 123-151 页 (CRC Press 公司, 1997) ; 和 Bishop(编) 人类基因组计算指南 (Guide to Human Genome Computing) 第 2 版 (Academic Press 公司, 1998))。

[0089] TGF- $\beta$  结合蛋白变体应与 SEQ ID Nos :2、6、10、12、14 或 16 有至少 50% 的氨基酸序列一致性, 优选高于 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 的一致性。或者, TGF- $\beta$  结合蛋白变体可以通过与 SEQ ID Nos :1、5、9、11、13 或 15 有至少 70% 的核苷酸序列一致性来鉴定。而且, 本发明还设想了与 SEQ ID NO :1 有大于 75%、80%、85%、90% 或 95% 一致性的 TGF- $\beta$  结合蛋白基因变体。无论使用何种鉴定 TGF- $\beta$  结合蛋白变体基因或 TGF- $\beta$  结合蛋白变体的具体方法, TGF- $\beta$  结合蛋白变体或由 TGF- $\beta$  结合蛋白基因变体编码的多肽均可以从功能上通过例如其结合 TGF- $\beta$  蛋白质家族选定成员和 / 或抑制该成员的信号转导的能力来表征, 或通过其特异结合抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体的能力来表征。

[0090] 本发明包括 TGF- $\beta$  结合蛋白基因的功能性片段。在本发明范畴内, TGF- $\beta$  结合蛋白基因的“功能性片段”是指编码 TGF- $\beta$  结合蛋白多肽的 (1) 具有上述功能活性, 或 (2) 特异地与抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体结合的部分的核酸分子。例如, 本文所述 TGF- $\beta$  结合蛋白基因的功能性片段包含 SEQ ID Nos :1、5、9、11、13 或 15 核苷酸序列的一部分。

[0091] 2. TGF- $\beta$  结合蛋白基因的分离

[0092] 编码结合蛋白基因的 DNA 分子可以通过使用基于例如 SEQ ID No :1 的寡核苷酸探针, 筛选人 cDNA 或基因组文库来获得。

[0093] 例如, cDNA 文库制备的第一步是采用本领域技术人员所熟知的方法分离 RNA。一般地, RNA 的分离技术必需提供用于破碎细胞的方法、抑制 RNA 酶指导的 RNA 降解的手段、以及从 DNA、蛋白质和多糖污染物中分离 RNA 的方法。例如, 总 RNA 可以通过如下步骤获得: 在液氮中冷冻组织, 用研钵和研棒磨碎此冷冻组织以裂解细胞, 用酚 / 氯仿溶液抽提该研碎组织以去除蛋白质, 并通过用氯化锂选择性沉淀从剩余的杂质中分离出 RNA( 见例如 Ausubel 等 (编), 精编分子生物学实验指南 (Short Protocols in Molecular Biology), 第三版, 第 4-1 至 4-6 页 (John Wiley & Sons 1995) [ “Ausubel (1995)” ] ; Wu 等, 基因生物技术方法, 第 33-41 页 (CRC 出版公司 1997) [ “Wu (1997)” ] )。

[0094] 或者, 总 RNA 可以通过如下步骤分离: 用异硫氰酸胍抽提研碎组织, 用有机溶剂抽提, 并使用差速离心从污染物中分离 RNA( 见例如 Ausubel (1995) 第 4-1 至 4-6 页; Wu (1997) 第 33-41 页)。

[0095] 为了构建 cDNA 文库, 必需从总 RNA 制品中分离 poly(A)<sup>+</sup>RNA。可以通过使用 oligo(dT)-纤维素层析标准技术从总 RNA 中分离 poly(A)<sup>+</sup>RNA( 见例如 Ausubel (1995) 第 4-11 至 4-12 页)。

[0096] 采用本领域技术人员熟知的技术从 poly(A)<sup>+</sup>RNA 合成双链 cDNA 分子。( 见例如 Wu (1997) 第 41-46 页)。而且, 可以使用商业上可获得的试剂盒来合成双链 cDNA 分子。例如, 这些试剂盒可以获自 Life Technologies 公司 (Gaithersburg, Maryland), CLONTECH Laboratories 公司 (Palo Alto, California), Promega 公司 (Madison, Wisconsin) 和 Stratagene Cloning Systems (La Jolla, California)。

[0097] 可以对用以获得 TGF- $\beta$  结合蛋白 cDNA 克隆的这种基本方法进行修改, 方法是构建富集 TGF- $\beta$  结合蛋白特异性 cDNA 分子的扣除 cDNA 文库。构建扣除文库的技术是本领域技术人员所熟知的( 见例如, Sargent, “差异表达基因的分离 (Isolation of Differentially Expression Genes)”, 酶学方法 (Meth. Enzymol.) 152 :423, 1987, 以及 Wu 等 (编) “扣除和完整表达 cDNA 文库的构建和筛选 (Construction and Screening of

Substracted and Complete Expression cDNA Libraries)" 基因生物技术方法 (Methods in Gene Biotechnology), 第 20-65 页 (CRC 出版公司, 1997))。

[0098] 多种克隆载体适合用于 cDNA 文库的构建。例如,可以在来源于噬菌体的载体如  $\lambda$  gt10 载体中制备 cDNA 文库 (见例如, Huynh 等, "在  $\lambda$  gt10 和  $\lambda$  gt11 中构建和筛选 cDNA 文库 (Constructing and Screening cDNA Libraries in  $\lambda$  gt10 and  $\lambda$  gt11)", DNA 克隆 : 实用方法 (DNA Cloning :A Practical Approach) 第 I 卷, Glover (编), 第 49 页 (IRL Press, 1985); Wu(1997) 第 47-52 页)。

[0099] 或者,可以将双链 cDNA 分子插入质粒载体如 pBluescript 载体 (Stratagene Cloning Systems ;La Jolla, California),  $\lambda$  GEM-4(Promega 公司 ;Madison, Wisconsin) 或其它商业可获得的载体。合适的克隆载体还可以从美国典型培养物保藏中心 (Rockville, Maryland) 获得。

[0100] 为了扩增克隆的 cDNA 分子,采用标准技术将 cDNA 文库插入原核宿主中。例如,可以将 cDNA 文库导入大肠杆菌 DH5 感受态细胞中,该细胞可以从 Life Technologies 公司 (Gaithersburg, Maryland) 获得。

[0101] 可以通过本领域熟知的方法制备人类基因组 DNA 文库 (见例如 Ausubel(1995) 第 5-1 至 5-6 页; Wu(1997) 第 307-327 页)。基因组 DNA 可以通过如下步骤分离:用去污剂 Sarkosyl 裂解组织,蛋白酶 K 消化裂解物,通过离心从裂解物中清除不溶性碎片,使用异丙醇从裂解物中沉淀核酸,并在氯化铯密度梯度上纯化重悬的 DNA。

[0102] 可以通过基因组 DNA 的随机剪切或通过用限制性内切酶部分消化基因组 DNA,获得适合用于产生基因组文库的 DNA 片段。根据常规技术,例如使用限制性酶消化提供合适的末端、使用碱性磷酸酶处理以避免 DNA 分子不合要求的连接、并用合适的连接酶进行连接,可以将基因组 DNA 片段插入载体如噬菌体或粘粒载体中。用于这些操作的技术是本领域所熟知的 (见例如 Ausubel(1995) 第 5-1 至 5-6 页; Wu(1997) 第 307-327 页)。

[0103] 编码 TGF- $\beta$  结合蛋白的核酸分子还可以使用具有基于上述人 TGF- $\beta$  结合蛋白基因之核苷酸序列的核苷酸序列的寡核苷酸引物采取聚合酶链式反应 (PCR) 来获得。用 PCR 筛选文库的一般方法参见例如, Yu 等 "使用聚合酶链式反应筛选噬菌体文库 (Use of Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries)", 分子生物学方法 (Methods in Molecular Biology) 第 15 卷 :PCR 操作指南 : 目前的方法和应用 (PCR Protocols : Current Methods and Applications), White (编) 第 211-215 页 (Humana 出版公司, 1993)。而且, 使用 PCR 分离相关基因的技术描述于例如 Preston "简并寡核苷酸引物和聚合酶链式反应在克隆基因家族成员中的应用 (Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Member)", 分子生物学方法, 第 15 卷 : PCR 操作指南 : 目前的方法和应用, White (编) 第 317-337 页 (Humana 出版公司, 1993)。

[0104] 或者,可以从商业途径例如 Research Genetics (Huntsville, AL) 和美国典型培养物保藏中心 (Rockville, Maryland) 获得人类基因组文库。

[0105] 可以采用标准方法 (见例如 Ausubel(1995) 第 6-1 至 6-11 页), 用基于 SEQ ID No :1 的一或多个多核苷酸探针筛选含有 cDNA 或基因组克隆的文库。

[0106] 按下述方法制备的抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体也可以用来从 cDNA 文库中分离编码 TGF- $\beta$  结合蛋白基因的 DNA 序列。例如,可以使用该抗体筛选  $\lambda$  gt11 表达文库,或者可以

在杂交体选择和翻译 (hybrid selection and translation) 后使用该抗体进行免疫筛选 (见例如 Ausubel (1995) 第 6-12 至 6-16 页; Margolis 等“用抗体和蛋白质探针筛选  $\lambda$  表达文库 (Screening  $\lambda$  expression libraries with antibody and protein probes)”, DNA 克隆 2 :表达系统 (DNA Cloning 2 :Expression Systems) 第 2 版, Glover 等 (编) 第 1-14 页 (牛津大学出版社 1995))。

[0107] TGF- $\beta$  结合蛋白 cDNA 或 TGF- $\beta$  结合蛋白基因组片段的序列可以采用标准方法确定。而且, 可以采用成熟技术如缺失分析 (deletion analysis) (一般参见 Ausubel (1995)), 实现对含有 TGF- $\beta$  结合蛋白启动子或调节元件的基因组片段的鉴定。

[0108] 作为替代方法, 可以通过采用相互引发 (mutually priming) 的长寡核苷酸以及本文所述的核苷酸序列, 合成 DNA 分子, 获得 TGF- $\beta$  结合蛋白基因 (见例如 Ausubel (1995) 第 8-8 至 8-9 页)。使用聚合酶链式反应的已有技术使得能够合成长至少 2 千碱基对的 DNA 分子 (Adang 等, 植物分子生物学 (Plant Molec. Biol.) 21 :1131, 1993; Bambot 等, PCR 方法和应用 (PCR Methods and Applications) 2 :266, 1993; Dillon 等, “聚合酶链式反应在快速构建合成基因中的应用 (Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes)”, 分子生物学方法, 第 15 卷 :PCR 操作指南 :目前的方法和应用, White (编) 第 263-268 页 (Humana 出版公司, 1993); Holowachuk 等, PCR 方法应用 (PCR Methods Appl.) 4 :299, 1995)。

[0109] 3. TGF- $\beta$  结合蛋白基因的制备

[0110] 可以通过采用上述程序, 利用具有基于 SEQ ID NO:1、5、9、11、13 或 15 的核苷酸序列的多核苷酸探针, 筛选各种 cDNA 或基因组文库, 来获得编码 TGF- $\beta$  结合蛋白基因变体的核酸分子。也可以通过合成构建 TGF- $\beta$  结合蛋白基因变体。例如, 可以设计一个核酸分子, 其编码与 SEQ ID Nos:2、6、8、10、12、14 或 16 的氨基酸序列相比具有保守氨基酸改变的多肽。即, 可以获得含有 SEQ ID Nos:2、6、8、10、12、14 或 16 的一或多个氨基酸替换的变体, 其中 TGF- $\beta$  结合蛋白氨基酸序列中的烷基氨基酸由烷基氨基酸替代, TGF- $\beta$  结合蛋白氨基酸序列中的芳香族氨基酸由芳香族氨基酸替代, TGF- $\beta$  结合蛋白氨基酸序列中的含硫氨基酸由含硫氨基酸替代, TGF- $\beta$  结合蛋白氨基酸序列中的含羟基氨基酸由含羟基氨基酸替代, TGF- $\beta$  结合蛋白氨基酸序列中的酸性氨基酸由酸性氨基酸替代, TGF- $\beta$  结合蛋白氨基酸序列中的碱性氨基酸由碱性氨基酸替代, 或 TGF- $\beta$  结合蛋白氨基酸序列中的二碱基 (dibasic) 单羧基氨基酸由二碱基单羧基氨基酸替代。

[0111] 在通常的氨基酸中, 例如, “保守氨基酸替代”可通过下列每组内的氨基酸之间的替代来说明:(1) 甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸, (2) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸, (3) 丝氨酸和苏氨酸, (4) 天冬氨酸和谷氨酸, (5) 谷氨酰胺和天冬酰胺, 和 (6) 赖氨酸、精氨酸和组氨酸。在进行这些替换时, 重要的是尽可能维持图 1 描画的半胱氨酸骨架。

[0112] TGF- $\beta$  结合蛋白氨基酸序列中的保守氨基酸改变可以通过用核苷酸替代 SEQ ID NO:1 中所示的核苷酸来引入。这种“保守氨基酸”变体可以通过例如寡核苷酸指导的诱变、接头分区诱变、使用聚合酶链式反应进行的诱变等等获得 (见 Ausubel (1995) 第 8-10 至 8-22 页; 以及 McPherson (编), 定向诱变 :实践方法 (Directed Mutagenesis :A Practical Approach) (IRL 出版社 1991))。这些变体的功能性能力可以采用标准方法例如本文所述试验方法来测定。或者, TGF- $\beta$  结合蛋白变体多肽可以通过其特异结合抗 TGF- $\beta$

结合蛋白抗体的能力来鉴定。

[0113] 可以进行核酸分子的常规缺失分析以获得编码 TGF- $\beta$  结合蛋白多肽的核酸分子的“功能性片段”。作为一个说明例子,可以用 Ba13 I 核酸酶消化具有 SEQ ID NO :1 核苷酸序列的 DNA 分子,获得一系列嵌套缺失。然后以正确的阅读框将这些片段插入表达载体,分离表达的多肽并检测其活性,或检测其结合抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体的能力。外切核酸酶消化的一个替代方法是使用寡核苷酸指导的诱变引入缺失或终止密码子以规定产生期望片段。或者,可以使用聚合酶链式反应合成 TGF- $\beta$  结合蛋白基因的特定片段。

[0114] 用于蛋白质功能分析的标准技术描述于例如, Treuter 等, 分子普通遗传学 (Molec. Gen. Genet.) 240 :113, 1993 ;Content 等, “人干扰素诱导的 42kDa 2-5A 合成酶的表达和初步缺失分析”, 生物干扰素系统, 关于干扰素系统的 ISIR-TNO 会议报告 (Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems), Cantell(编), 第 65-72 页 (Nijhoff 1987) ;Herschman, “EGF 受体”, 动物细胞增殖控制 (Control of Animal Cell Proliferation), 第 I 卷, Boynton 等 (编) 第 169-199 (Academic Press 1985) ;Coumaileau 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 270 :29270, 1995 ;Fukunaga 等, 生物化学杂志, 270 :25291, 1995 ;Yamaguchi 等, 生物化学药物学 (Biochem. Pharmacol.) 50 :1295, 1995 ; 和 Meisel 等, 植物分子生物学 (Plant Molec. Biol.) 30 :1, 1996。

[0115] 本发明还考虑到具有保守氨基酸改变的 TGF- $\beta$  结合蛋白基因功能片段。

[0116] 可以通过按如上所述方法确定与 SEQ ID Nos :1、5、9、1、13 或 15 以及 2、6、10、12、14 或 16 的核苷酸和氨基酸序列的一致性水平, 以结构为基础鉴定 TGF- $\beta$  结合蛋白变体基因。基于结构鉴定变体基因的一个替代方法是, 确定编码可能的 TGF- $\beta$  结合蛋白基因变体的核酸分子是否能在严紧条件下与具有 SEQ ID Nos :1、5、9、11、13 或 15, 或其长度不少于 15 或 20 个核苷酸的部分的核苷酸序列的核酸分子杂交。作为严紧杂交条件的举例说明, 在如下缓冲液中 55-60°C 孵育过夜, 具有 TGF- $\beta$  结合蛋白变体序列的核酸分子可以与具有 SEQ ID NO :1 序列的核酸分子的片段结合, 该缓冲液含有例如 5×SSPE (1×SSPE = 180mM 氯化钠, 10mM 磷酸钠, 1mM EDTA (pH7.7)), 5×Denhardt 氏液 (100×Denhardt 氏液 = 2% (w/v) 牛血清白蛋白, 2% (w/v) Ficoll, 2% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮) 和 0.5% SDS。高度严紧的杂交后洗涤典型地是在 0.5×SSC (1×SSC = 150mM 氯化钠, 15mM 柠檬酸三钠) 或 0.5×SSPE 中于 55-60°C 进行的。

[0117] 无论 TGF- $\beta$  结合蛋白基因变体的具体核苷酸序列如何, 该基因都编码能够用其功能活性或其特异结合抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体的能力来表征的多肽。更具体地, TGF- $\beta$  结合蛋白基因变体编码的多肽表现出本文所述人 TGF- $\beta$  结合蛋白基因所编码多肽的活性的至少 50%, 优选 60%、70%、80% 或 90% 以上。

[0118] 4. 在培养细胞中产生 TGF- $\beta$  结合蛋白

[0119] 为了表达 TGF- $\beta$  结合蛋白基因, 在表达载体中编码该多肽的核酸分子必需可操作地与控制转录表达的调节序列连接, 之后导入宿主细胞中。除了转录调节序列例如启动子和增强子, 表达载体还可包括翻译调节序列和适用于筛选携带该表达载体的细胞的标记基因。

[0120] 适用于在真核细胞中产生外源蛋白质的表达载体典型地含有 (1) 编码细菌复制

原点和抗生素抗性标记的原核 DNA 元件,以为表达载体在细菌宿主中的生长和筛选作准备;(2)控制转录起始的真核 DNA 元件,例如启动子;和(3)控制转录本加工的 DNA 元件,例如转录终止 / 多腺苷酸化序列。

[0121] 本发明的 TGF- $\beta$  结合蛋白优选在哺乳动物细胞中表达。哺乳动物宿主细胞的例子包括非洲绿猴肾细胞 (Vero ;ATCC CRL 1587),人胚胎肾细胞 (293-HEK ;ATCC CRL 1573),新生仓鼠肾细胞 (BHK-21 ;ATCC CRL8544);犬肾细胞 (MDCK ;ATCC CCL 34),中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1 ;ATCC CCL 61),大鼠垂体细胞 (GH1 ;ATCC CCL 82),HeLa S3 细胞 (ATCC CCL 2.2),大鼠肝癌细胞 (H-4-II-E ;ATCC CRL 1548),SV40 转化的猴肾细胞 (COS-1 ;ATCC CRL 1650) 和鼠胚胎细胞 (NIH-3T3 ;ATCC CRL 1658)。

[0122] 对于哺乳动物宿主,转录和翻译调节信号可以来自病毒,例如腺病毒、牛乳头瘤病毒、猿猴病毒等等,在这些病毒中这些调节信号与具有高水平表达的特定基因相联系。适合的转录和翻译调节序列还可以从哺乳动物基因例如肌动蛋白、胶原蛋白、肌球蛋白和金属硫蛋白基因获得。

[0123] 转录调节序列包括足以指导 RNA 合成起始的启动子区域。适合的真核启动子包括小鼠金属硫蛋白 I 基因的启动子 [Hamer 等,分子应用遗传学杂志 (J. Molec. Appl. Genet.) 1 :273,1982],疱疹病毒的 TK 启动子 [McKnight,细胞 (Cell) 31 :355,1982],SV40 早期启动子 [Benoist 等,自然 (Nature) 290 :304,1981],Rous 肉瘤病毒启动子 [Gorman 等,美国国家科学院院刊 79 :6777,1982],巨细胞病毒启动子 [Foecking 等,基因 (Gene) 45 :101,1980],和小鼠乳腺瘤病毒启动子 (一般见, Etcheverry,“工程蛋白质在哺乳动物细胞培养物中的表达 (Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture)”,蛋白质工程:原理和实践 (Protein Engineering :Principles and Practice),Cleland 等 (编) 第 163-181 页 (John Wiley & Sons 公司,1996))。

[0124] 或者,如果一种原核启动子受到真核启动子的调节,则可以使用该原核启动子,例如噬菌体 T3 RNA 聚合酶启动子来控制 TGF- $\beta$  结合蛋白基因在哺乳动物细胞中的表达 (Zhou 等,分子细胞生物学 (Mol. Cell Biol.) 10 :4529,1990;Kaufman 等,核酸研究 (Nucl. Acids Res.) 19 :4485,1991)。

[0125] TGF- $\beta$  结合蛋白基因还可以在细菌、酵母、昆虫或植物细胞中表达。可以用以在原核宿主细胞中表达 TGF- $\beta$  结合蛋白多肽的适合启动子是本领域技术人员所熟知的,包括能识别 T4、T3、Sp6 和 T7 聚合酶的启动子,λ 噬菌体的 P<sub>R</sub> 和 P<sub>L</sub> 启动子,大肠杆菌的 trp、recA、热休克、lacUV5、tac、lpp-lacSpr、phoA 和 lacZ 启动子,枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的启动子,芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 噬菌体的启动子,链霉菌属 (*Streptomyces*) 的启动子,λ 噬菌体的 int 启动子, pBR322 的 bla 启动子,以及氯霉素乙酰转移酶基因的 CAT 启动子。原核启动子的综述见 Glick, J. Ind. Microbiol. 1 :277,1987;Watson 等,基因分子生物学 (Molecular Biology of the Gene) 第 4 版 (Benjamin Cummins 1987);以及 Ausubel 等 (1995)。

[0126] 优选的原核宿主包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌 (*Bacillussubtilis*)。适合的大肠杆菌菌株包括 BL21 (DE3)、BL21 (DE3) pLysS、BL21 (DE3) pLysE、DH1、DH4I、DH5、DH5I、DH5IF'、DH5IMCR、DH10B、DH10B/p3、DH11S、C600、HB101、JM101、JM105、JM109、JM110、K38、RR1、Y1088、Y1089、CSH18、ER1451 和 ER1647 (见例如 Brown (编) Molecular Biology

Labfax(Academic 出版社 1991))。合适的枯草芽孢杆菌菌株包括 BR151、YB886、MI119、MI120 和 B170(见例如 Hardy,“芽孢杆菌克隆方法”,DNA 克隆 :实践方法 (DNA Cloning :A Practical Approach), Glover(编)(IRL 出版社 1985))。

[0127] 在原核宿主中表达蛋白质的方法是本领域技术人员所熟知的(见例如 William 等,“应用质粒载体在大肠杆菌中表达外源蛋白质以及特异性多克隆抗体的纯化”,DNA 克隆 2 :表达系统,第 2 版, Glover 等(编)第 15 页(牛津大学出版社 1995);Ward 等,“抗体的遗传操作和表达”,单克隆抗体 :原则和应用 (Monoclonal Antibodies :Principles and Applications), 第 137 页(Wiley-Liss 公司,1995); 和 Georgiou,“细菌中蛋白质的表达”,蛋白质工程 :原理和实践, Cleland 等(编)第 101 页(John Wiley & Sons 公司,1996))。

[0128] 杆状病毒系统提供了一种将克隆 TGF- $\beta$  结合蛋白基因导入昆虫细胞的有效手段。合适的表达载体以苜蓿银纹夜蛾 (Autographacalifornica) 多核型多角体病毒 (AcMNPV) 为基础, 并含有熟知的启动子例如果蝇 (Drosophila) 热休克蛋白 (hsp) 70 启动子、苜蓿银纹夜蛾多核型多角体病毒的立即早期基因启动子 (ie-1) 和迟早期 39K 启动子、杆状病毒 p10 启动子、和果蝇金属硫蛋白启动子。合适的昆虫宿主细胞包括来源于 IPLB-sf-21 的细胞系, 一种草地夜蛾 (Spodopterafrugiperda) 蛹卵巢细胞系, 例如 Sf9(ATCC CRL 1711), Sf21AE 和 Sf21(Invitrogen 公司; San Diego, CA), 以及果蝇 Schneider-2 细胞。用于在杆状病毒系统中产生重组蛋白质的确立技术参见 Bailey 等,“杆状病毒载体的操作 (Manipulation of Baculovirus Vectors)”, 分子生物学方法 (Methods in Molecular Biology) 第 7 卷 :基因转移和表达实验指南 (Gene Transfer and Expression Protocols), Murray(编)第 147-168 页(The Humana 出版公司 1991); Patel 等,“杆状病毒表达系统”, DNA 克隆 2 :表达系统, 第 2 版, Glover 等(编)第 205-244 页(牛津大学出版社 1995); Ausubel(1995) 第 16-37 至 16-57 页, Richardson(编) 杆状病毒表达实验指南 (Baculovirus ExpressionProtocols) (The Humana 出版公司 1995); 以及 Lucknow,“昆虫细胞表达技术 (Insect Cell Expression Technology)”, 蛋白质工程 :原理和实践, Cleland 等(编), 第 183-218 页(John Wiley & Sons 公司 1996)。

[0129] 用于酵母中表达的启动子包括来源于 GAL1(半乳糖)、PGK(磷酸甘油酸激酶)、ADH(醇脱氢酶)、AOX1(醇氧化酶)、HIS4(组氨醇脱氢酶)等的启动子。已经设计了许多酵母克隆载体, 而且这些载体均容易获得。这些载体包括基于 YIp 的载体如 YIp5, YRp 载体如 YRp17, YEp 载体如 YEp13, 和 YCp 载体如 YCp19。本领域技术人员将理解有许多种合适载体可以用于酵母细胞中的表达。

[0130] 还可以将表达载体导入植物原生质体、完整的植物组织、或分离的植物细胞。培养植物组织的一般方法参见例如 Miki 等,“向植物导入外源 DNA 的方法 (Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants)”, 植物分子生物学和生物技术方法 (Methods in Plant Molecualr Biologyand Biotechnology), Glick 等(编), 第 67-88 页(CRC 出版社 1993)。

[0131] 可以采用各种标准技术将表达载体导入宿主细胞, 这些技术包括磷酸钙转染、脂质体介导的转染、微粒介导的递送、电穿孔等等。优选地, 对转染细胞进行筛选和增殖, 以提供含有稳定整合在宿主细胞基因组中的表达载体的重组宿主细胞。将载体导入真核细

胞的技术和使用显性选择标记筛选这些稳定转化体的技术描述于例如 Ausubel (1995) 和 Murray (编) 基因转移和表达实验指南 (Humana 出版社 1991)。Ausubel (1995) 也提供了用于将表达载体导入细菌、酵母、昆虫和植物细胞的方法。

[0132] 表达和回收哺乳动物细胞系统产生的外源蛋白质的一般方法参见例如 Etcheverry, “工程蛋白质在哺乳动物细胞培养物中的表达”, 蛋白质工程 : 原理和实践, Cleland 等 (编), 第 163 页 (Wiley-Liss 公司, 1996)。回收细菌系统产生的蛋白质的标准技术参见例如 Grisshammer 等, “从大肠杆菌细胞中纯化过量产生的蛋白质”, DNA 克隆 2 : 表达系统, 第 2 版, Glover 等 (编), 第 59-92 页 (牛津大学出版社 1995)。用于从杆状病毒系统中分离重组蛋白质的已确立方法描述于例如 Richardson (编), 杆状病毒表达实验指南 (Baculovirus Expression Protocols) (The Humana 出版公司, 1995)。

[0133] 更为一般地, 可以通过标准技术分离 TGF- $\beta$  结合蛋白, 例如亲和层析、大小排阻层析、离子交换层析、HPLC 等等。本领域技术人员可以设计分离和纯化 TGF- $\beta$  结合蛋白的其它变化方法。例如可以使用按如下描述获得的抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体, 通过免疫亲和纯化分离大量蛋白质。

#### [0134] 5. 抗 TGF- $\beta$ 结合蛋白抗体的产生

[0135] 例如, 可以使用表达载体的产物作为抗原来获得抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体。尤其有用的抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体“特异结合” SEQ ID Nos :2、6、10、12、14 或 16 的 TGF- $\beta$  结合蛋白, 而不与其它 TGF- $\beta$  结合蛋白例如 Dan、Cerberus、SCGF 或 Gremlin 结合。本发明抗体 (包括其片段和衍生物) 可以是多克隆抗体, 或尤其是单克隆抗体。该抗体可以属于任何免疫球蛋白类型, 即可以是例如 IgG, 如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>; IgE; IgM; 或 IgA 抗体。该抗体可以是动物例如哺乳动物来源的, 可以是例如小鼠、大鼠、人或其它灵长类动物的抗体。如果需要, 该抗体可以是内化抗体 (internalising antibody)。

[0136] 可以采用本领域技术人员所熟知的方法制备抗重组 TGF- $\beta$  结合蛋白的多克隆抗体 (见例如, Green 等, “多克隆抗血清的制备”, 免疫化学实验指南 (Immunochemical Protocols) (Manson, 编), 第 1-5 页 (Humana 出版社 1992); Williams 等, “采用质粒载体在大肠杆菌中表达外源蛋白质以及特异性多克隆抗体的纯化”, DNA 克隆 2 : 表达系统, 第 2 版, Glover 等 (编), 第 15 页 (牛津大学出版社 1995))。尽管多克隆抗体典型地是在动物例如大鼠、小鼠、兔、山羊或绵羊中产生的, 但本发明的抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体也可以来源于非人灵长类动物的抗体。在狒狒中产生诊断上和治疗上有用的抗体的一般技术可以参见例如 Goldenberg 等, 国际专利申请公开文本 WO 91/11465 (1991), Losman 等, 国际癌症杂志 (Int. J. Cancer) 46 :310, 1990。

[0137] 所述抗体应至少含有一个可变区结构域。该可变区结构域可以是任意大小或氨基酸组成, 并且一般在构架序列中包含至少一个负责抗原结合的高变氨基酸序列。一般地, 术语可变 (V) 区结构域可以是免疫球蛋白重 (V<sub>H</sub>) 链和 / 或轻 (V<sub>L</sub>) 链可变结构域的任何适合配置。因此, 例如 V 区结构域可以是单体, 是能够以可接受的亲和性独立地与抗原结合的 V<sub>H</sub> 或 V<sub>L</sub> 结构域。或者, V 区结构域可以是二体, 含有 V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 或 V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub> 二聚物, 其中 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 链以非共价形式相连 (以下缩写为 F<sub>V</sub>)。然而, 如果需要, 这些链可以直接地例如通过两个可变结构域之间的二硫键, 或通过接头例如肽接头共价偶联, 以形成单链结构域 (以下缩写为 scF<sub>V</sub>)。

[0138] 可变区结构域可以是任何天然存在的可变结构域,或其工程版本。工程版本是指采用重组 DNA 工程技术构建的可变区结构域。该工程版本包括那些例如通过在或向天然抗体的氨基酸序列中插入、缺失或改变,从天然抗体可变区产生的可变区结构域。这种类型的具体例子包括那些含有至少一个 CDR 并任选含有来自一个抗体的一或多个构架氨基酸和来自第二个抗体的该可变区结构域的其余部分的工程可变区结构域。

[0139] 可变区结构域可以在 C 端氨基酸上共价连接至少一个其它抗体结构域或其片段。因此,例如当  $V_H$  域存在于可变区结构域中时,其可以与免疫球蛋白的  $C_H1$  域或其片段连接。同样, $V_L$  域可以与  $C_K$  域或其片段连接。以此方式,例如抗体可以是 Fab 片段,其中抗原结合域含有在 C 端分别共价连接了  $C_H1$  和  $C_K$  域的相关的  $V_H$  和  $V_L$  结构域。 $C_H1$  域可以再增加两个氨基酸,例如用以提供如同 Fab' 片段中的铰链区结构域,或提供其它结构域例如抗体 CH2 和 CH3 域。

[0140] 抗体片段的另一种形式是编码单个互补决定区 (CDR) 的多肽。CDR 肽 (“最小识别单位”) 可以通过构建编码目的抗体的 CDR 的基因来获得。该基因的制备方法例如使用聚合酶链式反应从产生抗体的细胞的 RNA 合成可变区 (见例如 Larrick 等,方法 : 酶学方法手册 (Methods : A Companion to Methods in Enzymology) 2 :106, 1991 ; Courtenay-Luck, “单克隆抗体的遗传操作”, 单克隆抗体 : 生产、工程化和临床应用 (Monoclonal Antibodies : Production, Engineering and Clinical Application), Ritter 等 (编), 第 166 页 (剑桥大学出版社 1995) ; 和 Ward 等, “抗体的遗传操作和表达”, 单克隆抗体 : 原理和应用, Birch 等 (编), 第 137 页 (Wiley-Liss 公司 1995))。

[0141] 用于本发明的抗体一般可以是单克隆的 (通过常规免疫和细胞融合程序制备的), 或者对于片段而言是通过采用任何合适的标准化学技术例如还原或酶裂解和 / 或消化, 例如通过胃蛋白酶处理获得的。

[0142] 更具体地, 可以利用各种技术产生单克隆抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体。啮齿类动物的针对特异抗原的单克隆抗体可以通过本领域技术人员所熟知的方法获得 (见例如 Kohler 等, 自然 256 :495, 1975 ; 和 Coligan 等 (编), 当代免疫学实验指南 (Current Protocols in Immunology), 1 : 2. 5. 1-2. 6. 7 (John Wiley & Sons 1991) [“Coligan”] ; Picksley 等, “针对大肠杆菌中所表达蛋白质的单克隆抗体的产生 (Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli.)”, DNA 克隆 2 : 表达系统, 第 2 版, Glover 等 (编) 第 93 页 (牛津大学出版社 1995))。

[0143] 简单地说, 单克隆抗体可以通过如下步骤获得 : 给小鼠注射含有 TGF- $\beta$  结合蛋白基因产物的组合物, 通过取出血清样品验证存在抗体的产生, 取出脾脏以获得 B 淋巴细胞, 融合 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞产生杂交瘤, 克隆杂交瘤, 筛选产生抗该抗原的抗体的阳性克隆, 培养产生抗该抗原抗体的克隆, 并从杂交瘤培养物中分离该抗体。

[0144] 此外, 本发明抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体也可以来源于人单克隆抗体。从经遗传改造应答抗原刺激产生特异人抗体的转基因小鼠获得人单克隆抗体。在该技术中, 人的重链和轻链座位元件被导入胚胎干细胞系来源的小鼠株中, 其中该胚胎干细胞系含有被定向破坏的内源性重链和轻链座位。该转基因小鼠可以合成特异针对人抗原的人抗体, 而且该小鼠可以用于产生分泌人抗体的杂交瘤。从转基因小鼠获得人抗体的方法描述于例如 Green 等, 自然遗传学 (Nature Genet.) 7 :13, 1994 ; Lonberg 等, 自然 368 :856, 1994 ; 和 Taylor

等,国际免疫学 (Int. Immun.) 6 :579, 1994。

[0145] 可以通过各种成熟的技术从杂交瘤培养物中分离和纯化单克隆抗体。这些分离技术包括用 A 蛋白 Sepharose 进行的亲和层析、大小排阻层析、和离子交换层析 (见例如 Coligan, 第 2.7.1-2.7.12 页和第 2.9.1-2.9.3 页; Baines 等, “免疫球蛋白 G(IgG) 的纯化”, 分子生物学方法, 第 10 卷, 第 79-104 页 (The Humana 出版公司 1992))。

[0146] 对于特定应用, 可能希望制备抗 TGF- $\beta$  结合蛋白抗体的片段。这些抗体片段可以通过例如抗体的蛋白水解来获得。可以通过常规方法将整个抗体进行胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化, 获得抗体片段。作为一个说明例子, 可以通过胃蛋白酶酶解抗体提供称为  $F(ab')_2$  的 5S 片段, 产生抗体片段。可以使用巯基还原剂进一步裂解该片段, 产生单价 3.5S  $Fab'$  片段。任选地, 可以使用封闭二硫键断裂所产生巯基的基团, 进行该裂解反应。作为替代方法, 使用胃蛋白酶酶解直接产生两个单价  $Fab$  片段和一个  $Fc$  片段。这些方法描述于例如 Goldenberg, 美国专利 4,331,647; Nisonoff 等, Arch Biochem Biophys. 89 : 230, 1960; Porter, 生物化学杂志 (Biochem. J.) 73 :119, 1959; Edelman 等, 酶学方法 (Methods in Enzymology) 1 :422 (Academic 出版社 1967); 和 Coligan 第 2.8.1-2.8.10 页和第 2.10.-2.10.4 页。

[0147] 还可以使用其它裂解抗体的方法, 例如分离重链以形成单价轻 - 重链片段, 片段的进一步裂解, 或其它酶的、化学的或遗传的技术, 只要这些片段能与完整抗体所识别的抗原结合即可。

[0148] 或者, 抗体可以是通过使用重组 DNA 技术, 包括对编码抗体可变和 / 或恒定区的 DNA 的操作和再表达, 获得的重组或工程抗体。这些 DNA 是已知的和 / 或可以容易地从 DNA 文库包括例如噬菌体抗体文库获得 (见 Chiswell, D. J 和 McCafferty, J. Tibtech. 10 80-84 (1992)), 或如果需要, 可以合成这些 DNA。可以使用标准的分子生物学和 / 或化学方法测序和操作该 DNA, 以便例如按需要引入密码子创造半胱氨酸残基、或修改、添加或缺失其它氨基酸或结构域。

[0149] 由此, 可以制备一或多个含有该 DNA 的可复制表达载体, 并用以转化合适的细胞系, 例如非产病毒性 (non-producing) 杂交瘤细胞系如小鼠 NSO 系或细菌如大肠杆菌系, 在其中进行抗体的生产。为了获得有效转录和翻译, 每个载体中的该 DNA 序列应该包括合适的调节序列, 尤其是可操作地与可变结构域序列连接的启动子和前导序列。用于通过此方式生产抗体的具体方法一般是熟知的, 并且是常规使用的。例如, 由 Maniatis 等描述的基本分子生物学程序 (分子克隆 (Molecular Biology), Cold Spring Harbor Laboratoty, 纽约, 1989); DNA 测序可以按 Sanger 等的描述 (PNAS 74, 5463, (1977)) 和 Amersham International plc 测序手册进行; 而位点定向诱变可以根据 Kramer 等 (核酸研究 12, 9441, (1984)) 的方法和 Anglian 生物技术有限公司手册来进行。此外, 还有许多出版物详细描述了适用于通过操作 DNA、构建表达载体和转化合适细胞来制备抗体的技术, 例如由 Mountain A 和 Adair, J R 在生物技术和遗传工程综述 (Biotechnology and Genetic Engineering Reviews) (Tombs, MP 编, 10, 第 1 章, 1992, Intercept, Andover, 英国) 中和国际专利说明书 WO91/09967 中所评论的。

[0150] 如果需要, 根据本发明的抗体可以具有与之相连的一或多个效应或报道分子, 而且本发明扩展到这些修饰蛋白质。效应或报道分子可以通过任何可利用的氨基酸侧链、末

端氨基酸或,如果存在的话位于抗体中的糖功能基团,与抗体相连,当然总是假设这并不会对该分子的结合性质和最终有效性产生不利影响。具体的功能基团包括例如任何游离的氨基、亚氨基、巯基、羟基、羧基或醛基。抗体与效应和 / 或报道分子的连接可以通过这些基团和效应或报道分子中的合适功能基团来实现。该连接可以是直接的或间接的,通过间隔基团或桥连基团实现。

[0151] 效应分子包括例如抗肿瘤剂、毒素(例如细菌或植物来源的酶活性毒素和其片段,如蓖麻毒素和其片段)、生物学活性蛋白质例如酶、核酸和其片段如DNA、RNA和它们的片段、天然存在的和合成的聚合物如多糖和聚烷撑聚合物(polyalkylene polymer)如聚(乙二醇)和其衍生物、放射性核素尤其是放射性碘、和螯合金属。合适的报道基团包括螯合金属、荧光化合物或可以通过NMR或ESR光谱学检测的化合物。

[0152] 具体的抗肿瘤剂包括细胞毒性和细胞抑制试剂,例如烷化剂如氮芥(nitrogen mustard)(如苯丁酸氮芥、美法仑、氮芥(mechlorethamine)、环磷酰胺或乌拉莫司汀)和其衍生物、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺、白消安、或顺铂;抗代谢物例如氨甲蝶呤、氟尿嘧啶、5-氟脱氧尿苷、阿糖胞苷、巯基嘌呤、硫代鸟嘌呤、氟乙酸或氟柠檬酸;抗生素,例如博来霉素(如博来霉素硫酸盐)、阿霉素、道诺红霉素、丝裂霉素(如丝裂霉素C)、放线菌素(如放线菌素D)、普卡霉素、加利车霉素(calichaemicin)和其衍生物、或埃斯波霉素和其衍生物;有丝分裂抑制剂例如表鬼臼毒素吡喃葡萄糖苷、长春新碱或长春碱和它们的衍生物;生物碱,例如玫瑰树碱;多元醇例如taxicin-I或taxicin-II;激素例如雄激素(如屈他雄酮或睾内脂)、孕酮(如醋酸甲地孕酮或醋酸甲羟孕酮)、雌激素(二甲基己烯雌酚二磷酸酯(dimethylstibestrol diphosphate)、聚磷酸雌二醇或雌二醇氮芥磷酸酯(estramustine phosphate))或抗雌激素(如三苯氧胺);蒽醌例如米托蒽醌;脲例如羟基脲;肼例如甲基苄肼;或咪唑例如达卡巴嗪。

[0153] 尤其有用的效果基团是加利车霉素和其衍生物(见例如南非专利说明书85/8794、88/8127和90/2839)。

[0154] 融合金属包括具有2-8(包括2和8)配位数的正二价或三价(di-or tripositive)金属融合物。该金属的具体例子包括锝(Tc)、铼(Re)、钴(Co)、铜(Cu)、金(Au)、银(Ag)、铅(Pb)、铋(Bi)、铟(In)、镓(Ga)、钇(Y)、铽(Tb)、钆(Gd)和钪(Sc)。一般地,该金属优选是放射性核素。具体的放射性核素包括<sup>99m</sup>Tc、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>58</sup>Co、<sup>60</sup>Co、<sup>67</sup>Cu、<sup>195</sup>Au、<sup>199</sup>Au、<sup>110</sup>Ag、<sup>203</sup>Pb、<sup>206</sup>Bi、<sup>207</sup>Bi、<sup>111</sup>In、<sup>67</sup>Ga、<sup>68</sup>Ga、<sup>88</sup>Y、<sup>90</sup>Y、<sup>160</sup>Tb、<sup>153</sup>Gd和<sup>47</sup>Sc。

[0155] 该融合金属可以是例如被任何适合的多齿融合剂融合的上述金属类型之一,这些融合剂例如无环或环状多胺、多醚(如冠醚和其衍生物);聚酰胺;卟啉;和碳环衍生物(carbocyclic derivatives)。

[0156] 一般地,融合剂的类型取决于所用金属。然而,在根据本发明的偶联物中一组尤其有用的是融合剂是无环多胺和环状多胺,特别是聚氨基羧酸(polyaminocarboxylic acid)例如二亚乙基三胺五乙酸和其衍生物,和大环胺(macro cyclic amine)例如环状三氮杂(aza)和四氮杂衍生物(例如国际专利说明书WO 92/22583中所描述的);以及聚酰胺,特别是去铁铵和其衍生物。

[0157] 因此,例如当希望在抗体中使用巯基作为连接点时,这可以通过与存在于效应或报道分子中的巯基反应性基团反应来实现。这些基团的例子包括α-卤羧酸或酯

( $\alpha$ -halcarboxylic acid or ester) 例如碘乙酰胺、二酰亚胺例如顺丁烯二酰亚胺、乙烯砜、或二硫化物。这些和其它合适的连接程序一般地和更为具体地描述于国际专利说明书 WO 93/06231、W092/22583、WO 90/091195 和 WO 89/01476。

[0158] 筛选增加骨密度的分子的方法

[0159] 如上所讨论的,本发明提供用于筛选和 / 或分离能够增加骨密度的化合物的方法。例如,在本发明的一个方面中,提供用于确定所选分子是否能够增加骨矿质含量的方法,包括步骤:(a) 将所选分子与 TGF- $\beta$  结合蛋白和 TGF- $\beta$  蛋白质家族的一个选定成员混合,(b) 测定该所选分子是否刺激了通过 TGF- $\beta$  蛋白质家族进行的信号转导、或抑制了 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  蛋白质家族的结合。在某些实施方案中,该分子增强 TGF- $\beta$  作为间充质细胞分化的正调节物起作用的能力。

[0160] 在本发明的其它方面,提供用于确定所选分子是否能够增加骨矿质含量的方法,包括步骤(a) 将所选分子暴露于表达 TGF- $\beta$  结合蛋白的细胞,和(b) 测定所述暴露细胞的 TGF- $\beta$  结合蛋白的表达(或活性)是否降低,并由此确定该化合物是否具有增加骨矿质含量的能力。在一个实施方案中,该细胞选自从骨活组织检查获得的自发转化或未转化正常人骨和大鼠顶骨的成骨细胞。该方法可以通过许多种试验形式来完成,包括例如对流免疫电泳(CIEP)、放射免疫测定、放射免疫沉淀、酶联免疫吸附测定(ELISA)、斑点印迹试验、抑制或竞争试验、以及三明治试验(sandwichassays)(见美国专利 4,376,110 和 4,486,530;也见抗体:实验室手册(Antibodies :A Laboratory Manual),同上)。

[0161] 在以下的实施例 5 和 6 中提供了这些试验方法的代表性实施方案。简单地说,首先将 TGF- $\beta$  超家族的家族成员或 TGF- $\beta$  结合蛋白与固相支持物结合,随后加入候选分子。然后,向该测试试验中加入标记的 TGF- $\beta$  超家族的家族成员或 TGF- $\beta$  结合蛋白,洗涤固相支持物,并测定该固体支持物上结合的或标记的 TGF- $\beta$  超家族成员或 TGF- $\beta$  结合蛋白的量。本文所描述的适用于增加骨矿质含量的分子是那些以统计学上显著的方式降低 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  超家族的一个或多个成员结合的分子。明显地,在本发明中适用的试验方法应不限于实施例 2 和 3 中所描述的实施方案。尤其是,可以改变许多参数,例如通过 TGF- $\beta$  与固相支持物的结合,或完全去除固相等方式来改变。

[0162] 在本发明的其它方面,提供用于确定所选分子是否能够增加骨矿质含量的方法,包括步骤:(a) 将所选分子暴露于表达 TGF- $\beta$  的细胞,和(b) 测定所述暴露细胞的 TGF- $\beta$  活性是否发生改变,并由此确定该化合物是否具有增加骨矿质含量的能力。与上述方法相同,可以利用多种方法来评价由于所选测试化合物导致的 TGF- $\beta$  结合蛋白表达的改变。

[0163] 例如,在本发明的一个方面,提供确定所选分子是否能够增加骨矿质含量的方法,包括步骤:(a) 将所选分子与 TGF- $\beta$  结合蛋白和 TGF- $\beta$  蛋白质家族的一个选定成员混合,(b) 测定该所选分子是否上调了 TGF- $\beta$  蛋白质家族的信号转导、或抑制了 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  蛋白质家族的结合。在某些实施方案中,该分子增强 TGF- $\beta$  作为间充质细胞(mechemchymal cell) 分化的正调节物起作用的能力。

[0164] 与上述方法相同,可以利用许多种方法来评价由于所选测试化合物引起的 TGF- $\beta$  刺激作用。以下实施例 6 中提供了一个这样的代表性方法(也见 Durham 等, Endo. 136 : 1374-1380)。

[0165] 在本发明的再其它方面,提供确定所选分子是否能增加骨矿质含量的方法,包括

步骤：测定所选分子是否抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与骨或其类似物的结合。如本文中所用的，应当理解骨或其类似物是指羟基磷灰石、或由粉状形式的骨、压碎的骨或完整的骨构成的表面。与上述方法相同，可以利用许多种方法来评价对 TGF- $\beta$  结合蛋白定位到骨基质的抑制。以下实施例 7 中提供了一个这样的代表性方法。

[0166] 应当指出的是，尽管本文列举的这些方法可以指对单一测试分子的分析，但本发明并不应由此受到限制。尤其是，所选分子可以包含在化合物的混合物中。因此，所列举的方法可以进一步包含步骤：分离抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的分子。

[0167] 候选分子

[0168] 对许多种分子都可以测试其抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的能力。代表性例子包括有机分子、蛋白质或肽、和核酸分子，以下将作更为详细的讨论。尽管从以下讨论来看，明显地本文所述候选分子可以用于本文所述的测定，但也应易于明了这些分子还可以用于各种诊断和治疗应用。

[0169] 1. 有机分子

[0170] 对于许多有机分子都可以测定其抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的能力。

[0171] 例如，在本发明的一个实施方案中，合适的有机分子选自化学制品库 (chemical library)，其中对化学制品作单独测定，或选自组合化学制品库，其中对多个化合物同时进行测定，然后展开以确定和分离具有最高活性的化合物。

[0172] 这些组合化学制品库的典型例子包括由如下文献描述的组合化学制品库：Agrafiotis 等，“自动产生具有期望性质的化学化合物的系统和方法 (System and method of automatically generating chemical compounds with desired properties)”，美国专利 5,463,564 ;Armstrong, R. W. ,“通过应用多成分组合阵列合成法合成有机化合物组合阵列 (Synthesis of combinatorial arrays of organic compounds through the use of multiple component combinatorial array syntheses)”，W095/02566 ;Baldwin, J. J. 等，“磺胺衍生物和其应用”，W0 95/24186 ;Baldwin, J. J. 等，“组合二氢苯并吡喃库 (combinatorial dihydrobenzopyran library)”，W0 95/30642 ;Brenner, S. ,“用于制备组合库的新试剂盒”，W0 95/16918 ;Cheresa, B. 等，“树脂结合的芳香族碳环化合物的文库制备”，W0 95/16712 ;Ellman, J. A. ,“在固体支持物上固相和组合合成苯 (并) 二氮 萘类化合物库”，美国专利 5,288,514 ;Felder, E. 等，“新组合化合物文库”，W0 95/16209 ;Lerner, R. 等，“编码的组合化学文库”，W0 93/20242 ;Pavia, M. R. 等，“从结构上各异的通用文库制备和筛选药物学上有用的非肽化合物的一种方法”，W0 95/04277 ;Summerton, J. E. 和 D. D. Weller,“吗啉代 - 亚基组合文库和方法”，美国专利 5,506,337 ;Holmes, C. ,“用于固相合成 thiazolidinones、matathiazanones 和它们的衍生物的方法”，W0 96/00148 ;Phillips, G. B. 和 G. P. Wei,“固相合成苯并咪唑”，Tet. Letters 37 :4887-90, 1996 ;Ruhland, B. 等，“结构各异的  $\beta$  内酰胺的固体支持组合合成”，美国化学学会杂志 (J. Amer. Chem. Soc.) 111 :253-4, 1996 ;Look, G. C. 等，“从 4- 嘧啶烷组合文库中鉴定环加氧酶 -1 的抑制物”，Bioorg and Med. Chem. Letters 6 :707-12, 1996。

[0173] 2. 蛋白质和肽

[0174] 广泛的蛋白质和肽同样可以用作 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的抑制

物候选分子。

[0175] a. 组合肽文库

[0176] 可以通过组合肽文库的筛选获得可能是 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的抑制物的肽分子。这些文库可以由本领域技术人员制备（见例如美国专利 4,528,266 和 4,359,535 以及专利合作条约公开文本 WO 92/15679、WO 92/15677、WO 90/07862、WO 90/02809）或从商业途径购买（例如 New England Biolabs Ph. D.™ 噬菌体展示肽文库试剂盒）。

[0177] b. 抗体

[0178] 考虑到本文提供的此公开，可以容易地制备抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的抗体。在本发明范围内，抗体被理解为包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗独特型抗体、抗体片段（例如 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub>、Fv 可变区、或互补决定区）。正如以上所讨论的，如果抗体以大于或等于  $10^7 M^{-1}$ ，优选大于或等于  $10^8 M^{-1}$  的 Ka 与 TGF- $\beta$  结合蛋白或特定的 TGF- $\beta$  家族成员结合，而不与或以小于或等于  $10^6 M^{-1}$  的 Ka 与其它的 TGF- $\beta$  结合蛋白结合，则该抗体被理解为是特异针对 TGF- $\beta$  结合蛋白或特定的 TGF- $\beta$  家族成员的。而且，本发明的抗体应当阻断或抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员的结合。

[0179] 本领域普通技术人员可以容易地确定单克隆抗体或结合伴侣（partner）的亲和力，以及结合的抑制（见 Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51 :660-672, 1949）。

[0180] 简单地说，本领域普通技术人员可以容易地从各种恒温动物例如马、奶牛、各种家禽、兔、小鼠或大鼠产生多克隆抗体。典型地，使用 TGF- $\beta$  结合蛋白或其 13-20 个氨基酸的独特肽（优选通过使用戊二醛形成的交联与匙孔血蓝蛋白偶联），联合佐剂例如 Freund 完全或不完全佐剂一起，通过腹膜内、肌肉内、眼内、或皮下注射免疫动物。几次加强免疫后，收集血清样品并检测其对所述蛋白质或肽的反应性。尤其优选的多克隆抗血清将在一个这些试验中给出至少高于背景三倍的信号。依据动物对蛋白质的反应性，一旦动物的效价达到平台，则通过每周给动物放血或抽血可以容易地获得更大量抗血清。

[0181] 单克隆抗体还可以容易地采用常规技术产生（见以参考文献方式并入本文的美国专利 RE 32,011、4,902,614、4,543,439 和 4,411,993；也见单克隆抗体，杂交瘤：生物学分析中的一个方面 (Monoclonal Antibodies, Hybridomas :A New Dimension in Biological Analyses), Plenum 出版社, Kennett, McKearn 和 Bechtol (编), 1980；和抗体：实验室手册 (Antibodies :A Laboratory Manual), Harlow 和 Lane (编), Cold Spring Harbor Laboratory 出版, 1988, 该文献也以参考文献方式并入本文）。

[0182] 简单地说，在一个实施方案中，按以上描述，用 TGF- $\beta$  结合蛋白或其部分免疫受试动物例如大鼠或小鼠。为了增强最终所获的免疫应答，可以将该蛋白与佐剂例如 Freund 完全或不完全佐剂混合。在最初免疫后的一至三周之间，可以再用一次加强免疫对动物进行再免疫，并使用以上描述的试验检测其对蛋白质的反应性。一旦动物对注射蛋白质的反应性达到平台，即可将其处死，并收获含有大量 B 细胞的器官例如脾和淋巴结。

[0183] 从被免疫动物获得的细胞可以通过病毒例如埃 - 巴二氏病毒 (EBV) 感染而永生化（见 Glasky 和 Reading, 杂交瘤 (Hybridoma) 8(4) :377-389, 1989）。或者，在一个优选的实施方案中，为了产生分泌单克隆抗体的“杂交瘤”，将收获的脾和 / 或淋巴结细胞悬浮物与合适的骨髓瘤细胞融合。合适的骨髓瘤系包括例如 NS-1(ATCC TIB 18) 和 P3X63-Ag

8. 653 (ATCCRL 1580)。

[0184] 在融合后,可以将细胞置于含有合适培养基例如 RPMI 1640 或 DMEM(Dulbecco 氏修改的 Eagles 培养基) (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas) 以及添加成分例如胎牛血清(即 FBS, 来自 Hyclone, Logan, Utah, 或 JRH Biosciences) 的培养板中。此外,该培养基应含有选择性地允许脾和骨髓瘤融合细胞生长的试剂例如 HAT(次黄嘌呤、氨基喋呤和胸昔) (Sigma Chemical 公司, St. Louis, Missouri)。在大约 7 天后,可以对所获的融合细胞或杂交瘤进行筛选,以确定抗 TGF- $\beta$  结合蛋白(取决于所用抗原),并阻断或抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的抗体的存在。

[0185] 有许多种试验可以用以确定抗本发明蛋白质的抗体的存在,包括例如对流免疫电泳、放射免疫测定、放射免疫沉淀、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、斑点印迹试验、Western 印迹、免疫沉淀、抑制或竞争试验、以及三明治试验(见例如美国专利 4,376,110 和 4,486,530;也见抗体:实验室手册 (Antibodies :A Laboratory Manual), Harlow 和 Lane(编), Cold Spring Harbor Laboratory 出版,1988)。几次克隆稀释和再次试验之后,可以分离产生抗目的蛋白质抗体的杂交瘤。

[0186] 也可以使用其它技术构建单克隆抗体(见 William D. Huse 等,“在  $\lambda$  噬菌体中产生具有免疫球蛋白谱的大型组合文库”,科学 (Science) 246 :1275-1281,1989 年 12 月;也见 L. Sastry 等,“在大肠杆菌中克隆免疫球蛋白的所有组成成分以产生单克隆催化抗体:重链可变区特异性 cDNA 文库的构建”,美国国家科学院院刊 86 :5728-5732,1989 年 8 月;还见 Michelle Alting-Mees 等,“单克隆表达文库:杂交瘤的一种快速替代法”,分子生物学策略 (Strategies in Molecular Biology) 3 :1-9,1990 年 1 月)。这些文献描述了可从 Stratagene (La Jolla, California) 获得的一个商业系统,该商业系统能够通过重组技术产生抗体。简单地说,从 B 细胞群体分离 mRNA,用以在  $\lambda$  ImmunoZap (H) 和  $\lambda$  ImmunoZap (L) 载体中构建重链和轻链免疫球蛋白 cDNA 表达文库。这些载体可以单独进行筛选,也可以共表达以形成 Fab 片段或抗体(见 Huse 等,同上;也见 Sastry 等,同上)。随后可以将阳性噬菌斑转变成允许从大肠杆菌高水平表达单克隆片段的非裂解性质粒。

[0187] 同样,也可以采用常规酶消化,或重组 DNA 技术以插入编码特异结合抗体的基因的可变区,构建抗体的部分或片段例如 Fab 和 Fv 片段。在一个实施方案中,使用针对可变区的核苷酸引物从产生目的单克隆抗体的杂交瘤扩增编码可变区的基因。这些引物可以由本领域普通技术人员合成,或可以从商业途径购买。Stratagene (La Jolla, California) 出售针对小鼠和人可变区的引物,包括尤其是针对  $V_{H\alpha}$ 、 $V_{H\beta}$ 、 $V_{H\gamma}$ 、 $V_{H\delta}$ 、 $C_{H1}$ 、 $V_L$  和  $C_L$  区的引物。可以使用这些引物扩增重链或轻链可变区,然后可以将其分别插入载体例如 ImmunoZAP™ H 或 ImmunoZAP™ L (Stratagene)。之后这些载体可以被导入基于大肠杆菌、酵母或哺乳动物的系统中进行表达。使用这些技术,可以产生大量含有融合的  $V_H$  和  $V_L$  域的单链蛋白质(见 Bird 等,科学 242 :423-426,1988)。此外,可以使用这些技术在不改变抗体结合特异性的情况下,将“鼠”抗体改变成“人”抗体。

[0188] 一旦获得合适的抗体,即可以通过本领域普通技术人员熟知的许多技术对其进行分离或纯化(见抗体:实验室手册,Harlow 和 Lane(编),ColdSpring Harbor Laboratory 出版社,1988)。合适的技术包括肽或蛋白质亲和柱、HPLC 或 RP-HPLC、在 A 蛋白或 G 蛋白柱上纯化、或任何这些技术的组合。

[0189] c. 突变的 TGF- $\beta$  结合蛋白

[0190] 正如本文和如下实施例（例如实施例 8 和 9）中所描述的，与天然 TGF- $\beta$  结合蛋白阻断特定 TGF- $\beta$  家族成员活性的能力竞争的 TGF- $\beta$  结合蛋白修改版本应该会导致骨密度的增加。因此，结合 TGF- $\beta$  家族成员但不抑制该 TGF- $\beta$  家族成员功能的 TGF- $\beta$  结合蛋白突变体将符合此标准。该突变版本必须有效地与 TGF- $\beta$  结合蛋白的内源性抑制功能相竞争。

[0191] d. 蛋白质的产生

[0192] 尽管本文已提供了各种基因（或其部分），但应该理解，在本发明的范围内，对一或多个这些基因的提及包括与这些基因基本相同的这些基因的衍生物（以及，如果合适的话，包括由这些基因和它们的衍生物编码的蛋白质（包括肽和多肽）。正如本文所用的，如果（a）一个核苷酸序列来源于上述基因的编码区并包括例如该序列的若干部分或以上所讨论序列的等位基因变异，或者编码抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的分子，（b）核苷酸序列能够与本发明的核苷酸序列在中、高或极高的严紧条件下杂交（见 Sambrook 等，分子克隆：实验室手册（Molecular Cloning : A Laboratory Manual），第 2 版，Cold Spring Harbor Laboratory 出版社，纽约，1989），或（c）由于遗传密码子的原因，DNA 序列与（a）或（b）中所定义的 DNA 序列是简并的，则该核苷酸序列被认为是“基本相同的”。而且，本文公开的核酸分子包括互补和非互补序列，前提是该序列在其它方面符合本文提出的标准。在本发明的范围内，高严紧性是指标准杂交条件（例如，5×SSPE, 0.5% SDS, 65°C，或相当的条件）。

[0193] 使用例如 P/C Gene 或 Intelligenetics 软件包（Intelligenetics, Mountain View, California）的疏水性绘图功能，或根据 Kyte 和 Doolittle（分子生物学杂志（J. Mol. Biol.）157 :105-132, 1982）描述的方法，本文所述核酸分子编码的蛋白质的结构可以从一级翻译产物预测。

[0194] 本发明蛋白质可以以酸式盐或碱式盐的形式，或以中性形式制备。此外，单个氨基残基可以通过氧化或还原进行修饰。而且，可以在氨基酸和核酸序列上进行各种替代、缺失或添加，其净效应是保持或进一步增强或降低突变或野生型蛋白的生物学活性。而且，例如由于遗传密码子的简并性，在编码相同氨基酸序列的核苷酸序列中，可以有相当多的变异。

[0195] 本文公开的蛋白质的其它衍生物包括该蛋白质与其它蛋白质或多肽的结合物。这可以通过例如合成其加入可能有利于蛋白质纯化或鉴别的 N- 端或 C- 端融合蛋白来实现（见美国专利 4,851,341；也见 Hopp 等，Bio/Technology 6 :1204, 1988）。或者，可以构建诸如 Flag/TGF- $\beta$  结合蛋白的融合蛋白，以有助于该蛋白质的鉴定、表达和分析。

[0196] 本发明蛋白质可以采用本文所述的多种技术构建。而且，可以通过合成含有突变序列的寡核苷酸在特定位置引入突变，而且该寡核苷酸的两侧具有限制性位点，使得其能够与该天然序列片段连接。连接之后，所获的重组序列编码具有期望的氨基酸插入、替换或缺失的衍生物。

[0197] 或者，可以使用寡核苷酸指导的位点特异性（或片段特异性）诱变程序，提供根据要求的替换、缺失或插入改变了特定密码子的改变基因。进行如上所述改变的示例性方法公开于 Walder 等（基因 42 :133, 1986）；Bauer 等（基因 37 :73, 1985）；

Craik(BioTechniques, 1985 年 1 月, 12-19); Smith 等 (遗传工程 : 原理和方法 (Genetic Engineering : Principles and Methods), Plenum 出版社, 1981); 和 Sambrook 等 (同上)。还可以通过使用与所期望缺失相邻的方便限制性内切核酸酶位点, 构建缺失或截短的蛋白质衍生物 (例如可溶性细胞外部分)。在限制性消化后, 可以补平突出端、然后重新连接该 DNA。进行如上所述改变的典型方法公开于 Sambrook 等 (分子克隆 : 实验室指南, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory 出版社, 1989)。

[0198] 在本发明核酸分子中产生的突变优选保持编码序列的阅读框。而且这些突变优选不形成能够杂交产生 mRNA 二级结构例如环或发夹结构的互补区, 这些二级结构将对 mRNA 的翻译产生不利影响。尽管可以预先决定突变位点, 但并不必预先决定突变本身的性质。例如, 为了筛选在指定位点具有最佳特性的突变, 可以在靶密码子处进行随机诱变, 然后筛选具有指明生物学活性的表达突变体。或者, 可以通过合成如下寡核苷酸在特定位置引入突变, 该寡核苷酸含有突变序列, 而且两翼具有使其能够与该天然序列的片段连接的限制性位点。连接后, 所获的重组序列编码具有期望的氨基酸插入、替换或缺失的衍生物。

[0199] 也可以采用 PCR 诱变技术、化学诱变技术 (Drinkwater 和 Klinedinst, PNAS 83 : 3402-3406, 1986)、强制核苷酸错误掺入 (forced nucleotidemisincorporation) (例如 Liao 和 Wise 基因 88 : 107-111, 1990)、或使用随机诱变处理的寡核苷酸 (Horwitz 等, 基因组 (Genome) 3 : 112-117, 1989) 来构建编码本发明蛋白质的核酸分子。

[0200] 本发明还提供通过培养含有能表达上述基因的载体的宿主细胞对上述基因进行的操作和表达。这些载体或载体结构包括合成的或 cDNA 来源的, 可操作地与合适的转录或翻译调节元件连接的, 编码目的蛋白质的核酸分子。合适的调节元件可以从各种来源获得, 包括细菌、真菌、病毒、哺乳动物、昆虫或植物基因。适合调节元件的选择取决于所选择的宿主细胞, 而且可以容易地由本领域普通技术人员完成。调节元件的例子包括 : 转录启动子和增强子或 RNA 聚合酶结合序列、转录终止子、以及核糖体结合序列, 包括翻译起始信号。

[0201] 编码上述任一种蛋白质的核酸分子可以容易地由许多种原核和真核宿主细胞表达, 这些宿主细胞包括细菌、哺乳动物、酵母或其它真菌、病毒、昆虫、或植物细胞。转化或转染这些细胞以表达外源 DNA 的方法是本领域所熟知的 (见例如 Itakura 等, 美国专利 4,704,362; Hinnen 等, 美国国家科学院院刊 75 : 1929-1933, 1978; Murray 等, 美国专利 4,801,542; Upshall 等, 美国专利 4,935,349; Hagen 等, 美国专利 4,784,950; Axel 等, 美国专利 4,399,216; Goeddel 等, 美国专利 4,766,075; 和 Sambrook 等, 分子克隆 : 实验室手册, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory 出版社, 1989; 对于植物细胞, 见 Czako 和 Marton, 植物生理学 (Plant Physiol.) 104 : 1067-1071, 1994; 和 Paszkowski 等, 生物技术 (Biotech.) 24 : 387-392, 1992)。

[0202] 适于实施本发明的细菌宿主细胞包括大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*), 鼠伤寒沙门氏杆菌 (*Salmonella typhimurium*), 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*streptomyces*) 和葡萄球菌属 (*staphylococcus*) 的各个种, 以及本领域普通技术人员熟知的许多其它细菌种。细菌宿主细胞的代表性例子包括 DH5 $\alpha$  (Stratagene, La Jolla, California)。

[0203] 细菌表达载体优选含有在宿主细胞中起作用的启动子、一或多个表型选择标记、以及细菌复制原点。典型的启动子包括  $\beta$ -内酰胺酶 (青霉素酶) 和乳糖启动子系统

(见 Chang 等, 自然 275 :615, 1978)、T7 RNA 聚合酶启动子 (Studier 等, 酶学方法 (Meth. Enzymol.) 185 :60-89, 1990)、 $\lambda$  启动子 (Elyin 等, 基因 87 :123-126, 1990)、trp 启动子 (Nichols 和 Yanofsky, 酶学方法 101 :155, 1983) 和 tac 启动子 (Russell 等, 基因 20 :231, 1982)。典型的选择标记包括各种抗生素抗性标记例如卡那霉素或氨苄青霉素抗性基因。适用于转化宿主细胞的许多质粒是本领域所熟知的, 包括尤其是 pBR322 (见 Bolivar 等, 基因 2 :95, 1977), pUC 质粒 pUC18、pUC19、pUC118、pUC119 (见 Messing, 酶学方法 101 :20-77, 1983; 和 Vieira 和 Messing, 基因 19 :259-268, 1982), 和 pNH8A、pNH16a、pNH18a, 以及 Bluescript M13 (Stratagene, La Jolla, California)。

[0204] 适用于实施本发明的酵母和真菌宿主细胞包括尤其是 *Saccharomyces pombe*、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母属 (*Pichia*) 或克鲁维酵母菌属 (*kluyveromyces*)、以及曲霉属 (*Aspergillus*) 的各个种 (McKnight 等, 美国专利 4,935,349)。对于酵母和真菌而言, 适合的表达载体包括尤其是用于酵母的 YCp50 (ATCC 37419)、和 amdS 克隆载体 pV3 (Turnbull, Bio/Technology 7 :169, 1989)、YRp7 (Struhl 等, 美国国家科学院院刊 76 :1035-1039, 1978)、YEpl3 (Broach 等, 基因 8 :121-133, 1979)、pJDB249 和 pJDB219 (Beggs, 自然 275 :104-108, 1978), 以及它们的衍生物。

[0205] 用于酵母的优选启动子包括来自酵母糖醇解基因 (Hitzeman 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 255 :12073-12080, 1980; Alber 和 Kawasaki, 分子应用遗传学杂志 (J. Mol. Appl. Genet.) 1 :419-434, 1982) 或醇脱氢酶基因 (Young 等, 用于产生化学制品的微生物遗传工程 (Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals), Hollaender 等 (编), 第 355 页, Plenum, 纽约, 1982; Ammerer, 酶学方法 (Meth. Enzymol.) 101 :192-201, 1983) 的启动子。对于真菌载体有用的选择标记的例子包括那些来源于构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 糖醇解基因的启动子, 例如 adh3 启动子 (McKnight 等, EMBO J. 4 :2093-2099, 1985)。该表达单元还可以包括转录终止子。适合的终止子的一个例子是 adh3 终止子 (McKnight 等, 同上, 1985)。

[0206] 如同细菌载体一样, 酵母载体一般也包括选择标记, 其可以是表现显性表型的许多基因中的任意一种, 条件是对于该显性表型存在一种能够筛选转化体的表型试验。优选的选择标记是那些补充宿主细胞的营养缺陷、提供抗生素抗性或使细胞能够利用特殊碳源的选择标记, 包括 leu2 (Broach 等, 同上)、ura3 (Botstein 等, 基因 8 :17, 1979) 或 his3 (Struhl 等, 同上)。另一个适合的选择标记是赋予酵母细胞氯霉素抗性的 cat 基因。

[0207] 用于转化真菌的技术在文献中有很好的说明, 见例如 Beggs (同上)、Hinnen 等 (美国国家科学院院刊 75 :1929-1933, 1978)、Yelton 等 (美国国家科学院院刊 81 :1740-1747, 1984) 和 Russell (自然 301 :167-169, 1983)。宿主细胞的基因型可以含有由表达载体上存在的选择标记弥补的遗传缺陷。对于具体宿主和选择标记的选择是本领域熟知的。

[0208] 转化酵母的方法也是本领域普通技术人员所熟知的。例如, 通过制备带有 DNA 的酵母原生质球 (见 Hinnen 等, 美国 PNAS 75 :1929, 1978) 或通过用碱式盐 (alkaline salts) 例如 LiCl 处理 (见 Itoh 等, 细菌学杂志 (J. Bacteriology) 153 :163, 1983), 可以容易地实现转化。真菌转化还可以采用聚乙二醇按 Cullen 等描述的方法 (Bio/Technology 5 :369, 1987) 进行。

[0209] 病毒载体包括那些含有指导编码上述目的蛋白质的分离核酸分子表达的启动子的病毒载体。在本发明的范围中可以使用许多种启动子，包括例如诸如 MoMLV LTR、RSV LTR、Friend MuLV LTR 的启动子、腺病毒启动子 (Ohno 等, 科学 265 :781-784, 1994)、新霉素磷酸转移酶启动子 / 增强子、细小病毒晚期启动子 (Koering 等, 人类基因治疗 (Hum. Gene Therap.) 5 :457-463, 1994)、疱疹 TK 启动子、SV40 启动子、金属硫蛋白 IIa 基因增强子 / 启动子、巨细胞病毒的立即早期启动子、和巨细胞病毒的立即晚期启动子。在本发明尤其优选的实施方案中，该启动子是组织特异性启动子 (见例如 WO 91/02805 ;EP 0, 415, 731 ; 和 WO 90/07936)。适合的组织特异性启动子的代表性例子包括神经特异性烯醇化酶启动子、血小板来源的生长因子  $\beta$  的启动子、骨形态发生蛋白质启动子、人  $\alpha$  1-chimaerin 启动子、突触蛋白 I 启动子和突触蛋白 II 启动子。除了上述启动子外，为了靶向病毒、细菌、真菌或寄生物感染的特定细胞或组织，还可以使用其它的病毒特异性启动子 (例如逆转录病毒启动子，包括以上提到的逆转录病毒启动子以及其它启动子如 HSV 启动子)，肝炎、疱疹 (例如 EBV)、和细菌、真菌或寄生物 (例如疟疾) 的特异性启动子。

[0210] 适用于实施本发明的哺乳动物细胞包括尤其是 COS、CHO、SaOS、骨肉瘤细胞、KS483、MG-63、原始成骨细胞、和人或哺乳动物的骨髓基质。用于实施本发明的哺乳动物表达载体包括能够指导克隆基因或 cDNA 转录的启动子。优选的启动子包括病毒启动子和细胞启动子。骨特异性启动子包括骨唾液酸蛋白 (sialo-protein) 和骨钙蛋白启动子。病毒启动子包括巨细胞病毒立即早期启动子 (Boshart 等, 细胞 (Cell) 41 :521-530, 1985)、巨细胞病毒立即晚期启动子、SV40 启动子 (Subramani 等, 分子细胞生物学 (Mol. Cell Biol.) 1 :854-864, 1981)、MMTV LTR、RSV LTR、金属硫蛋白 -1、腺病毒 E1a。细胞启动子包括小鼠金属硫蛋白 -1 启动子 (Palmiter 等, 美国专利 4, 579, 821)、小鼠 V<sub>K</sub> 启动子 (Bergman 等, 美国国家科学院院刊 81 :7041-7045, 1983 ;Grant 等, 核酸研究 15 :5496, 1987) 和小鼠 V<sub>H</sub> 启动子 (Loh 等, 细胞 33 :85-93, 1983)。启动子的选择至少部分地取决于所期望的表达水平或待转染的受体细胞系。

[0211] 这些表达载体还可以含有一套位于启动子下游以及编码目的肽或蛋白质的 DNA 序列上游的 RNA 拼接位点。优选的 RNA 拼接位点可以从腺病毒和 / 或免疫球蛋白基因获得。在该表达载体中还含有位于目的编码序列下游的聚腺苷酸化信号。适合的聚腺苷酸化信号包括 SV40 的早期或晚期聚腺苷酸化信号 (Kaufman 和 Sharp, 同上)、腺病毒 5 E1B 区的聚腺苷酸化信号和人生长激素基因终止子 (DeNoto 等, 核酸研究 9 :3719-3730, 1981)。该表达载体可以包括位于启动子和 RNA 拼接位点之间的非编码病毒前导序列，例如腺病毒 2 的三联前导序列。优选的载体还可以包括增强子序列例如 SV40 增强子。表达载体还可以包括编码腺病毒 VA RNAs 的序列。适合的表达载体可以从商业途径获得 (例如 Stratagene, La Jolla, California)。

[0212] 含有克隆 DNA 的载体结构可以通过例如磷酸钙介导的转染 (Wigler 等, 细胞 14 :725, 1978 ;Corsaro 和 Pearson, 体细胞遗传学 (Somatic Cell Genetics) 7 :603, 1981 ; Graham 和 Van der Eb, 病毒学 (Virology) 52 :456, 1973)、电穿孔 (Neumann 等, EMBO J. 1 :841-845, 1982) 或 DEAE- 葡聚糖介导的转染 (Ausubel 等 (编) 当代分子生物学实验指南 (Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley & Sons 公司, 纽约, 1987) 导入培养的哺乳动物细胞中。为了鉴定稳定整合了克隆 DNA 的细胞，一般将选择标记与目的基

因或 cDNA 一起导入细胞。用于哺乳动物培养细胞的优选选择标记包括赋予药物例如新霉素、潮霉素和氨甲蝶呤抗性的基因。该选择标记可以是可扩增的选择标记。优选的可扩增选择标记是 DHFR 基因和新霉素抗性基因。选择标记的综述见 Thilly (哺乳动物细胞技术 (Mammalian Cell Technology), Butterworth Publishers, Stoneham, Massachusetts, 该文献以参考文献形式并入本文)。

[0213] 在开始表达目的 DNA 序列之前,使含有适合载体的哺乳动物细胞生长一段时间,典型地是 1-2 天。然后应用药物筛选选择以稳定方式表达选择标记的细胞的生长。对于可扩增选择标记转染的细胞,可以逐步增加药物浓度以选择增加的克隆序列拷贝数,由此选择增加的表达水平。选择和筛选以期望形式或以期望水平产生目的蛋白质的表达导入序列的细胞。然后可以克隆满足这些标准的细胞,并按比例放大用于生产。

[0214] 用于转染哺乳动物细胞的操作是本领域普通技术人员所熟知的。典型的方法包括磷酸钙介导的转染、电穿孔、脂转染、逆转录病毒、腺病毒和原生质体融合介导的转染(见 Sambrook 等,同上)。裸载体结构也可以在注射至哺乳动物(或其它动物)的肌肉中后被肌细胞或其它适合的细胞摄取。

[0215] 根据本说明书,本领域已知的许多昆虫宿主细胞也可以用于本发明。例如,Atkinson 等 (Pestic. Sci. 28 :215-224, 1990) 综述了杆状病毒作为在昆虫细胞中表达外源 DNA 序列的载体的应用。

[0216] 根据本说明书,本领域已知的许多植物宿主细胞也可以用于本发明。例如 Sinkar 等 (J. Biosci. (Bangalore) 11 :47-58, 1987) 综述了毛根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 作为在植物细胞中表达基因的载体的应用。

[0217] 在本发明的相关方面,可以在其生殖细胞和体细胞含有编码目的蛋白质的基因,而且该基因可操作地与对于该基因表达有效的启动子相连的转基因动物中,表达本发明的蛋白质。或者,以类似的方式,可以制备缺乏目的基因的转基因动物(例如,“基因敲除”小鼠)。可以在各种非人类动物,包括小鼠、大鼠、兔、绵羊、狗、山羊和猪中制备这样的转基因动物(见 Hammer 等,自然 315 :680-683, 1985; Palmiter 等,科学 222 :809-814, 1983; Brinster 等,美国国家科学院院刊 82 :4438-4442, 1985; Palmiter 和 Brinster, 细胞 41 :343-345, 1985, 和美国专利 5,175,383, 5,087,571, 4,736,866, 5,387,742, 5,347,075, 5,221,778 和 5,175,384)。简单地说,通过例如微注射,将包括待表达的核酸分子以及适合定位的表达控制序列的表达载体导入受精卵的原核中。注射 DNA 的整合通过组织样品 DNA 的印迹分析来检测。优选将导入的 DNA 并入动物的生殖系中,以便其可以被传递给该动物的后代。组织特异性表达可以通过使用组织特异性启动子,或通过使用允许转基因有调节地表达的诱导型启动子例如金属硫蛋白基因启动子 (Palmiter 等, 1983, 同上) 来实现。

[0218] 可以通过尤其是培养适合的宿主和载体系统产生本发明重组翻译产物,分离蛋白质。为了分离目的蛋白质,然后可以通过各种纯化程序,处理该细胞系的上清液,或者当蛋白质不分泌到上清液中时处理蛋白质包涵体或整个细胞。例如,首先可以采用商业上可获得的蛋白质浓缩滤器例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤装置,浓缩上清液。浓缩之后,可以将浓缩物加到适合的纯化基质例如与适合支持物结合的抗蛋白质抗体上。或者,可以使用阴离子或阳离子交换树脂来纯化蛋白质。作为再一种替代方法,可以使用一或多个反相高效液相色谱层析 (RP-HPLC) 步骤来进一步纯化该蛋白质。分离本发明蛋白质的其它

方法是本领域技术人员所熟知的。

[0219] 如果根据 SDS-PAGE 分析以及之后的考马斯亮兰染色,未检测到其它(非目的)蛋白质,则在本发明的范围中该蛋白质被认为是“分离的”。在其它实施方案中,该目的蛋白质可以是分离的,以致根据 SDS-PAGE 分析以及之后的银染检测不到其它(非目的)蛋白质。

### [0220] 3. 核酸分子

[0221] 在本发明的其它方面,提供能够抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的核酸分子。例如,在一个实施方案中,提供特异抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白核酸序列表达的反义寡核苷酸分子(一般见, Hirashima 等, RNA 的分子生物学:新的前景 (Molecular Biology of RNA :NewPerspectives) (M. Inouye 和 B. S. Dudock 编, 1987, Academic 出版社, San Diego, 第 401 页);寡核苷酸:基因表达的反义抑制物 (Oligonucleotides :Antisense Inhibitors of Gene Expression) (J. S. Cohen 编, 1989, MacMillan 出版社, 伦敦);Stein 和 Cheng, 科学 261 :1004-1012, 1993; WO 95/10607; 美国专利 5, 359, 051; WO 92/06693; 和 EP-A2-612844)。简单地说,构建这些分子以使它们与转录的 TGF- $\beta$  结合蛋白 mRNA 序列的一个区域互补,并能够形成 Watson-Crick 碱基配对。所导致的双链核酸将干扰该 mRNA 的随后加工,由此阻止蛋白质的合成(见实施例 10)。

[0222] 在本发明的其它方面,提供能够抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白结合 TGF- $\beta$  家族成员的核酶。本文所用的“核酶”旨在包括含有用于特异识别的反义序列和 RNA 切割酶活性的 RNA 分子。该催化链可以以高于化学计量的浓度切割靶 RNA 中的特异位点。许多种核酶可以用于本发明范围内,包括例如锤头核酶(如描绘于 Forster 和 Symons, 细胞 48 :211-220, 1987; Haseloff 和 Gerlach, 自然 328 :596-600, 1988; Walbot 和 Bruening, 自然 334 :196, 1988; Haseloff 和 Gerlach, 自然 334 :585, 1988);发夹核酶(例如描述于 Haseloff 等, 1993 年 10 月 19 日公布的美国专利 5, 254, 678;以及 Hempel 等, 1990 年 3 月 26 日出版的欧洲专利公开文本 0 360 257);以及基于四膜虫 (Tetrahymena) 核糖体 RNA 的核酶(见 Cech 等, 美国专利 4, 987, 071)。本发明核酶典型地由 RNA 构成,但也可以由 DNA、核酸类似物(例如硫代磷酸酯)或它们的嵌合物(例如 DNA/RNA/RNA)构成。

### [0223] 4. 标记 (labels)

[0224] 上文和下文中描述的基因产物和所有的候选分子均可以用各种化合物标记,这些化合物包括例如荧光分子、毒素和放射性核素。荧光分子的典型例子包括荧光素、藻胆色素蛋白例如藻红蛋白、罗丹明、得克萨斯红和荧光素酶。毒素的典型例子包括蓖麻毒素、相思豆毒蛋白、白喉毒素、霍乱毒素、gelonin、美洲商陆抗病毒蛋白、tritin、志贺菌毒素和假单胞菌外毒素 A。放射性核素的典型例子包括 Cu-64、Ga-67、Ga-68、Zr-89、Ru-97、Tc-99m、Rh-105、Pd-109、In-111、I-123、I-125、I-131、Re-186、Re-188、Au-198、Au-199、Pb-203、At-211、Pb-212 和 Bi-212。此外,上述抗体也可以与配体结合对的一个配偶体标记或结合。代表性例子包括抗生素蛋白 - 生物素和核黄素 - 核黄素结合蛋白。

[0225] 用以上提及的代表性标记结合或标记本文所述分子的方法可以容易地由本领域普通技术人员完成(见单端孢菌毒素抗体偶联物, 美国专利 4, 744, 981; 抗体偶联物, 美国专利 5, 106, 951; 荧光物质和标记技术, 美国专利 4, 018, 884; 用于诊断和治疗的金属放射性核素标记的蛋白质, 美国专利 4, 897, 255; 和用于改良整合动力学的金属放射性核素螯合的化合物, 美国专利 4, 988, 496; 也见 Inman, 酶学方法 (Methods inEnzymology) 第 34

卷,亲和技术,酶纯化:B部分,Jakoby和Wilchek(编),Academic出版社,纽约,第30页,1974;也见Wilchek和Bayer,“生物分析应用中的抗生素蛋白-生物素复合物”,分析生物化学(Anal.Biochem.)171:1-32,1988)。

[0226] 药物组合物

[0227] 如上所述,本发明还提供各种药物组合物,其含有一个抑制TGF- $\beta$ 结合蛋白结合TGF- $\beta$ 家族成员的上述分子,以及药物学上或生理上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。一般地,此载体在使用剂量和浓度时对于受体是无毒性的。通常,这些组合物的制备需要该治疗剂与如下物质合并:缓冲液、抗氧化剂例如抗坏血酸、低分子量(少于约10个残基)多肽、蛋白质、氨基酸、糖包括葡萄糖、蔗糖或葡聚糖、螯合剂例如EDTA、谷胱甘肽、及其它稳定剂和赋形剂。中性缓冲盐或与非特异性血清白蛋白混合的盐是典型的适合稀释剂。

[0228] 此外,可以制备用于各种不同途径给药的本发明药物组合物。而且,可以将本发明药物组合物和提供该药物组合物使用说明的包装材料一起置于容器中。一般地,该说明包括一个描述该药剂浓度的明确表述,以及在某些实施方案中,还包括对重新构成该药物组合物可能是必须的赋形剂成分或稀释剂(例如水、盐或PBS)的相对量的描述。

[0229] 治疗方法

[0230] 本发明还提供增加骨矿质含量和矿质密度的方法。简单地说,有许多病症会导致骨矿质含量的降低,包括例如疾病、遗传诱因、导致骨使用缺乏(例如由于骨折)的事故、导致骨吸收或杀死骨形成细胞的治疗、以及正常老化。通过使用抑制TGF- $\beta$ 结合蛋白与TGF- $\beta$ 家族成员结合的本文所述分子,可以治疗或预防这些病症。如本文所使用的,应当理解,如果在选定位置骨矿质含量以统计学显著的方式(例如超过一倍半的标准差)获得增加,则骨矿质含量增加了。

[0231] 导致骨矿质含量降低的多种病症均可以使用本文所述分子治疗。患有这些病症的患者可以通过使用熟知技术(见例如Harrison氏内科医学原理(Harrison's Principles of Internal Medicine),McGraw-Hill公司)进行临床诊断来识别。可以治疗的疾病的代表性例子包括其中存在骨的不正常生长或发育的发育异常。这些病症的代表性例子包括软骨发育不全、锁骨颅骨发育不良、内生软骨瘤病、纤维性结构不良、戈谢病、低磷佝偻病、Marfan病、遗传性多发性外生骨疣(multiple hereditary exostoses)、多发性神经纤维瘤、成骨不全、骨硬化病、脆弱性骨硬化、硬化损害(sclerotic lesions)、骨折、牙周病、假关节和生脓性骨髓炎(pyogenic osteomyelitis)。

[0232] 其它可以治疗或预防的病症包括许多引起骨质减少(即,造成骨矿质含量或密度比青年时期的峰值骨骼矿质含量低一个以上标准差的病症)的原因。这些病症的代表性例子包括贫血状态、类固醇引起的疾病、肝素造成的疾病、骨髓疾病、坏血病、营养不良、钙缺乏症、特发性骨质疏松症、先天性骨质减少或骨质疏松症、醇中毒、慢性肝疾病、衰老、绝经后状态、月经稀发、闭经、妊娠、糖尿病、甲状腺功能亢进、库欣病、肢端肥大症、性腺功能减退症、不活动或废用(imobilization and disuse)、反射交感性营养不良综合征、短暂性区域骨质疏松和骨软化。

[0233] 在本发明的一个方面,可以通过给恒温动物施用治疗上有效量的抑制TGF- $\beta$ 结合蛋白与TGF- $\beta$ 家族成员结合的分子,来增加骨矿质含量或密度。可以治疗的恒温动物的例子包括脊椎动物和哺乳动物,包括例如马、奶牛、猪、绵羊、狗、猫、大鼠和小鼠。治疗分子

的代表性例子包括核酶、核酶基因、反义寡核苷酸和抗体（例如人源化抗体）。

[0234] 在本发明的其它方面，提供用于增加骨密度的方法，包括步骤：向返回骨的细胞导入指导抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白结合 TGF- $\beta$  家族成员的分子表达的载体，并给恒温动物施用该含有载体的细胞。简单地说，返回骨的细胞可以直接从患者的骨（例如 CD34+、成骨细胞、骨细胞等从骨髓获得的细胞）、外周血或培养物获得。

[0235] 将指导抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的分子表达的载体导入细胞中。适合载体的典型例子包括病毒载体例如疱疹病毒载体（例如美国专利 5,288,641）、腺病毒载体（例如 WO 94/26914、WO 93/9191；Kolls 等, PNAS 91(1) :215-219, 1994；Kass-Eisler 等, PNAS90(24) :11498-502, 1993；Guzman 等, 血液循环 (Circulation) 88(6) :2832-48, 1993；Guzman 等, Cir. Res. 73(6) :1202-1207, 1993；Zabner 等, 细胞 75(2) :207-216, 1993；Li 等, 人类基因治疗 4(4) :403-409, 1993；Caillaud 等, 欧洲神经科学杂志 (Eur. J. Neurosci.) 5(10) :1287-1291, 1993；Vincent 等, Nat. Genet. 5(2) :130-134, 1993；Jaffe 等, Nat. Genet. 1(5) :372-378, 1992；和 Levrero 等, 基因 101(2) :195-202, 1991）、腺伴随病毒载体 (WO 95/13365；Flotte 等, PNAS 90(22) :10613-10617, 1993)、杆状病毒载体、细小病毒载体 (Koering 等, 人类基因治疗 5 :457-463, 1994), 痘病毒载体 (Panicali 和 Paoletti, PNAS 79 :4927-4931, 1982；和 Ozaki 等, Biochem. Biophys. Res. Comm. 193(2) :653-660, 1993)、和逆转录病毒（例如 EP 0,415,731；W090/07936；WO 91/0285；WO 94/03622；WO 93/25698；WO 93/25234；美国专利 5,219,740；WO 93/11230；WO 93/10218）。同样可以构建含有混合的不同病毒或非病毒来源的不同元件（例如启动子、包膜序列 (envelope sequence) 等）的病毒载体。在各种实施方案中，病毒载体本身或含有病毒载体的病毒颗粒均可以用于以下描述的方法和组合物中。

[0236] 在本发明的其它实施方案中，可以通过各种技术施用编码抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的分子的核酸分子本身，这些技术包括例如施用与聚 L- 赖氨酸 DNA 复合物偶联的脱唾液酸血清类粘蛋白 (ASOR) (Cristano 等, PNAS 92122-92126, 1993)、与灭活腺病毒相连的 DNA (Curiel 等, 人类基因治疗 3(2) :147-154, 1992)；细胞转染剂介导的导入 (DMRIE-DOPE, Vical, California)；直接 DNA 注射 (Acsadi 等, 自然 352 :815-818, 1991)；DNA 配体 (Wu 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 246 :16985-16987, 1989)；脂转染 (Felgner 等, 美国国家科学院院刊 84 :7413-7417, 1989)；脂质体 (Pickering 等, Circ. 89(1) :13-21, 1994；和 Wang 等, PNAS 84 :7851-7855, 1987)；微粒轰击 (Williams 等, PNAS 88 :2726-2730, 1991)；和单独 (Vile 和 Hart, 癌症研究 (CancerRes.) 53 :3860-3864, 1993) 或利用 PEG- 核酸复合物直接递送编码该蛋白质的核酸分子本身。

[0237] 可以由本发明载体表达的分子的代表性例子包括核酶和反义分子，它们每一种均已在上文中作了更为详细的讨论。

[0238] 可以直接通过使用 X 射线（例如双能 X 射线吸收测量术，或“DEXA”），或通过从骨更新标志（成骨细胞特异性碱性磷酸酶、骨钙蛋白、I 型原胶 C' 原前肽 (PICP)、和总的碱性磷酸酶；见 Comier, C., Curr. Opin. in Rheu. 7 :243, 1995）或骨吸收标志（吡啶啉、脱氧吡啶啉、N- 端肽、尿羟脯氨酸、血浆酒石酸 (tartate) 抗性酸性磷酸酶和半乳糖基羟赖氨酸；见 Comier, 同上）进行的推导，确定骨矿质含量的增加。还可以从体重或利用其它方法（见 Guinness-Hey, Metab. Bone Dis. and Rel. Res. 5 :177-181, 1984）计算骨质的量。

[0239] 正如本领域技术人员所明了的,给药的量和频率当然将取决于诸如所治疗的指征的性质和严重程度、期望的反应、患者的情况等等因素。典型地,本发明组合物可以通过以上提及的各种技术来施用。

[0240] 我们提供以下实施例作为说明,而非限制。

[0241] 实施例

[0242] 实施例 1

[0243] 硬化性狭窄作图定位于人类第 17 号染色体长臂

[0244] 对人类负责硬化性狭窄 (sclerosteosis) 的缺陷的遗传作图将负责该疾病的基因定位在人第 17 号染色体的区域,该区域编码一个新的 TGF- $\beta$  结合蛋白家族成员。在硬化性狭窄中,与非患病个体相比,患者骨骼骨表现出在矿质密度方面的实质增加。头骨也表现出过度生长。硬化性狭窄患者通常是健康的,尽管他们可能在出生时表现出不同程度的并指(趾),并在颅骨中表现出不同程度的颅压迫和神经压迫。

[0245] 将收集自发生该疾病的 24 个南非 Afrikaaner 家族的 DNA 样品应用纯合性作图方法,对硬化性狭窄相关的基因缺陷进行连锁分析 (Sheffield 等,1994, 人类分子遗传学 (Human Molecular Genetics) 3 :1331-1335, “3 号染色体上巴 - 比综合征座位的鉴定以及对一种有效的纯合性作图方法的评价 (Identification of a Bardet-Biedl syndrome locus on chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping) ”)。该南非 Afrikaaner 群体在遗传上是同质的;该群体是几个世纪前定居在该地区的少数建立者的后裔,自建立之后由于地理和社会障碍该群体一直是隔离的。除了此 Afrikaaner 群落外,世界各地的硬化性狭窄是稀少的,这提示在该建立群体中存在该基因的突变,而且随着该群体的增大该基因突变在数量上也随之增加。纯合性作图的使用是基于如下假设:在来自近亲家族和隔离群体的患病个体中,与隐性突变相邻的 DNA 作图标记很可能是纯合的。

[0246] 选择一套 371 个来自常染色体的微卫星标记 (Research Genetics, 第 6 套),用以对来自硬化性狭窄患者样品的 DNA 库进行分型。用于该分析的 DNA 样品来自 24 个家族中的 29 名硬化性狭窄患者,59 名未患病家族成员,以及一组来自同一群体的无关对照个体。这些库由 4-6 名个体组成,这些个体或是患病个体、来自近亲家族的患病个体、双亲和未患病同胞,或是无关对照。在无关个体库中和在大多数有患病个体或家族成员的库中,对所述标记的分析显示,每一个标记均有几种等位基因大小。标记 D17S1299 显示是纯合性的指示:在几个患病个体库中均显示为一条带。

[0247] 用 D17S1299 区域 (17q12-q21) 中的总共 19 个标记对所有 24 个硬化性狭窄家族进行分型。每个家族的患病个体均显示出在该区域是纯合的,而且对于核心单元型 (core haplotype) 这 29 名个体中的 25 名是纯合的;他们每一个在 D17S1787 和 D17S930 之间都具有相同的等位基因。其它 4 名个体的一条染色体与该单元型相匹配,而第二条染色体与之不匹配。总之,该数据有力地说明此 3 兆碱基区域含有该硬化性狭窄突变。对此 3 兆碱基区域中的大多数外显子的序列分析,鉴定了一个定位于新 TGF- $\beta$  结合蛋白编码序列中的无义突变 (SEQ ID No. 1 第 117 位的 C > T 突变导致一个终止密码子)。该突变表现出是 Afrikaaner 后裔的硬化性狭窄患者和携带者所独有的。该基因的本质通过鉴定其内含子中的突变 (内含子的 +3 位存在 A > T 的突变) 得到进一步证实,该内含子的突变在一名

单个的患有确诊硬化性狭窄的无关患者中导致不正确的 mRNA 加工。

[0248] 实施例 2

[0249] TGF- $\beta$  结合蛋白基因表达的组织特异性

[0250] A. 通过 RT-PCR 分析人类 Beer 基因的表达

[0251] 采用商业途径可获得的试剂盒（“用于第一链 cDNA 合成的 Superscript Preamplification System”, Life Technologies, Rockville, MD), 从以下总 RNA 样品制备第一链 cDNA: 人脑、人肝、人脾、人胸腺、人胎盘、人骨骼肌、人甲状腺、人脑垂体、人成骨细胞 (NH0st, 获自 Clonetics 公司, San Diego, CA)、人骨肉瘤细胞系 (Saos-2, ATCC#HTB-85)、人骨、人骨髓、人软骨、非洲猕猴骨、酿酒酵母、和人外周血单核细胞。除了以下样品是内部制备的之外, 所有其它这些 RNA 样品均从商业途径 (Clontech, Palo Alto, CA) 购买: 人成骨细胞、人骨肉瘤细胞系、人骨、人软骨和非洲猕猴骨。这些内部 RNA 样品的制备采用了商业上可获得的试剂盒（“TRI 试剂”, Molecular Research Center 公司, Cincinnati, OH)。

[0252] 在这些样品和作为对照的人基因组样品上进行 PCR。Beer 的有义寡核苷酸引物的序列是: 5' -CCGGAGCTGGAGAACACAAG-3' (SEQ ID NO: 19)。Beer 的反义寡核苷酸引物的序列是: 5' -GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEQ ID NO: 20)。此外, 采用针对人  $\beta$ -肌动蛋白基因的引物进行 PCR, 作为对照。 $\beta$ -肌动蛋白的有义寡核苷酸引物具有序列: 5' -AGGC CAACCGCGAGAAGATGACC-3' (SEQ ID NO: 21)。 $\beta$ -肌动蛋白的反义寡核苷酸引物具有序列: 5' -GAAGTCCAGGGCGACGTAGCA-3' (SEQ ID NO: 22)。采用标准条件在 25 $\mu$ l 反应中, 以 61 摄氏度作为退火温度, 进行 PCR。用 Beer 引物进行 32 个 PCR 循环, 而用  $\beta$ -肌动蛋白的引物进行 24 个 PCR 循环。

[0253] 扩增之后, 每个反应的 12 $\mu$ l 通过琼脂糖凝胶电泳和溴化乙啶染色进行分析。见图 2A。

[0254] B. 小鼠胚胎切片的 RNA 原位杂交:

[0255] 采用厂商的操作指南, 将小鼠的全长 Beer cDNA (SEQ ID No. 11) 以反义和有义方向克隆至 pCR2.1 载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中。使用 Ambion 公司 (Austin, TX) 提供的体外转录试剂, 合成  $^{35}$ S- $\alpha$ -GTP 标记的 cRNA 有义和反义转录本。根据 Lyons 等的操作方法 (细胞生物学杂志 (J. Cell Biol.) 111:2427-2436, 1990), 进行原位杂交。

[0256] 小鼠 Beer cRNA 探针在发育中的小鼠胚胎的神经管、肢芽、血管和 正在骨化的软骨中检测到特异表达信号。图 3 的 A 部分显示了肢芽 (1) 的外胚层顶嵴 (apical ectodermal ridge) (aer)、血管 (bv) 和神经管 (nt) 中的表达。B 部分显示了第 4 脑室 (4) 中的表达。C 部分显示了下颌骨 (ma)、颈椎 (cv)、枕骨 (oc)、腭 (pa)、和血管 (bv) 中的表达。D 部分显示了肋骨 (r) 和心瓣膜 (va) 中的表达。A 部分是 10.5 dpc 胚胎的横切片。B 部分是 12.5 dpc 胚胎的纵向切片。C 和 D 部分均是 15.5 dpc 胚胎的纵向切片。

[0257] ba = 鳃弓、h = 心脏、te = 端脑 (前脑)、b = 脑、f = 额鼻块 (frontonasal mass)、g = 肠、h = 心脏、j = 颌、li = 肝、lu = 肺、ot = 听泡、ao =、sc = 脊髓、skm = 骨骼肌、ns = 鼻窦、th = 胸腺、to = 舌、f1 = 前肢、di = 隔膜

[0258] 实施例 3

[0259] 重组 Beer 蛋白的表达和纯化

[0260] A. 在 COS-1 细胞中的表达:

[0261] 采用如下 PCR 寡核苷酸引物扩增编码人全长 Beer 蛋白质的 DNA 序列 :5' 寡核苷酸引物的序列是 5'-AAGCTTGGTACCATGC AGCTCCCAC-3' (SEQ IDNO :23), 含有一个 Hind III 限制性酶位点 (粗体), 其后是从推测的氨基端起始密码子 (ATG) 之前的 6 个碱基对开始的 Beer 基因的 19 个核苷酸。3' 寡核苷酸引物的序列是 5' -AAGCTTCTACTTGTCATCGTCGTC  
CTTGTAGTCGTAGGCGTTCTCCAGCT-3' (SEQ IDNO :24), 含有一个 Hind III 限制性酶位点 (粗体), 之后是一个反向互补终止密码子 (CTA), 再之后是 FLAG 表位的反向互补序列 (下划线, Sigma-Aldrich 公司, St. Louis, MO), 而其侧翼是编码 Beer 羧基端 5 个氨基酸的核苷酸的反向互补序列。将此 PCR 产物进行 TA 克隆 (“OriginalTA 克隆试剂盒”, Invitrogen, Carlsbad, CA), 并通过 DNA 测序对单个克隆进行筛选。然后用 Hind III 消化经序列证实的克隆, 并使用商业上可获得的试剂 (“QIAquick 凝胶提取试剂盒”, Qiagen 公司, Valencia, CA) 在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行纯化。然后用 T4 DNA 连接酶将该片段与经 HindIII 消化、磷酸酶处理的 pcDNA3.1 质粒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 连接起来。转化大肠杆菌 DH10B, 并在含有 100ug/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上铺板。使用相应于 pcDNA3.1 中 T7 启动子 / 引物位置的 5' 引物, 和相应于内在 BEER 序列的反向互补序列, 且具有 5' -GCACTGGCCGGAG CACACC-3' (SEQ ID NO :25) 序列的 3' 引物, 通过基于 PCR 的筛选, 鉴定带有正确方向的期望重组体的菌落。克隆片段的序列通过 DNA 测序证实。

[0262] 采用 COS-1 细胞 (ATCC# CRL-1650) 进行转染。使用商业上可获得的试剂盒, 依据厂商提供的操作指导 (“DEAE- 葡聚糖转染试剂盒”, SigmaChemical 公司, St. Louis, MO), 用 50ug 表达质粒 pcDNA-Beer-Flag 进行转染。转染后的最终培养基是含有 0.1% 胎牛血清的 DMEM (LifeTechnologies, Rockville, MD)。培养 4 天后, 取出该培养基。通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹, 使用抗 FLAG M2 单克隆抗体 (Sigma-Aldrich 公司, St. Louis, MO), 分析重组 BEER 蛋白的表达。重组 BEER 蛋白使用抗 FLAG M2 亲和柱 (“哺乳动物瞬时表达系统”, Sigma-Aldrich 公司, St. Louis, MO) 纯化。通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹, 使用抗 FLAG M2 单克隆抗体, 分析亲和柱曲线成分。

[0263] B. 在 SF9 昆虫细胞中表达 :

[0264] 使用如下引物和标准条件, PCR 扩增人 Beer 基因序列 :有义引物 :5' -GTCGTCGGAT CCATGGGGTGGCAGGCGTTCAAGA ATGAT-3' (SEQ IDNO :26)

[0265] 反义引物 :5' -GTCGTCAGCTCTACTTGTACATCGTCCTTGTAGTCGTAGGCGTTCTCCAGCTCGGC -3' (SEQ ID NO :27)

[0266] 所获 cDNA 含有带有两处修改的 Beer 编码区。N- 端分泌信号被去除, 而且 FLAG 表位尾 (Sigma) 以符合阅读框的形式融合到插入片段的 C 末端。为了转移到杆状病毒表达载体中, 使用标准方法添加 BamHI 和 HindIII 克隆位点, 并将该基因亚克隆至 pMELBac 载体 (Invitrogen) 中。

[0267] 采用 Bac-N-Blue 转染试剂盒 (Invitrogen) 制备表达 Beer 蛋白的重组杆状病毒, 并根据厂商说明书进行纯化。

[0268] 在含有 10 % 胎牛血清的 TNM\_FH 培养基 (Invitrogen) 中维持 SF9 细胞 (Invitrogen)。对于蛋白表达, 在转瓶中以大于 10 的 MOI 感染 SF9 培养物。每天采取培养基和细胞样品, 持续 5 天, 并通过 Western 印迹使用抗 FLAG M2 单克隆抗体 (Sigma) 或抗 Beer 兔多克隆抗血清监测 Beer 的表达。

[0269] 5 天后,通过离心收获杆状病毒感染的 SF9 细胞,并采用高盐提取缓冲液 (1.5M NaCl,50mM Tris pH7.5) 从细胞沉淀中提取细胞相连的蛋白质。通过离心澄清该提取物 (20ml/300ml 培养物),对 4 升 Tris 缓冲盐 (150mM NaCl,50mM Tris pH7.5) 透析三次,并通过再次离心澄清。将该高盐组分施加于 Hitrap Heparin(Pharmacia ;5ml 柱床体积),用 HEPES 缓冲盐 (25mM HEPES 7.5,150mM NaCl) 进行大量洗涤,并使用 150mMNaCl-1200mM NaCl 的梯度洗脱结合的蛋白质。在大约 800mM NaCl 时观察到 Beer 的洗脱。向含有 Beer 的组分补加甘油和 DTT 分别达到 10% 的甘油和 1mM 的 DTT,然后在 -80℃冻存。

[0270] 实施例 4

[0271] 抗 Beer、Gremlin 和 Dan 的多克隆抗体的制备和检测

[0272] A. 抗原的制备 :

[0273] 使用标准 PCR 方法和如下寡核苷酸引物扩增人 Beer、人 Gremlin 和人 Dan 的 DNA 序列。

[0274] 人 Beer

[0275] 有义 :5' -GACTTGGATCCAGGGTGGCAGGCCTTC-3' (SEQ ID NO :28)

[0276] 反义 :5' -AGCATAAGCTTCTAGTAGGCCTCTCCAG-3' (SEQ ID NO :29)

[0277] 人 Gremlin

[0278] 有义 :5' -GACTTGGATCCGAAGGGAAAAAGAAAGGG-3' (SEQ ID NO :30)

[0279] 反义 :5' -AGCATAAGCTTTAATCCAAATCGATGGA-3' (SEQ ID NO :31)

[0280] 人 Dan

[0281] 有义 :5' -ACTACGAGCTCGGCCACCACCCATCAACAAG-3' (SEQ ID NO :32)

[0282] 反义 :5' -ACTTAGAAGCTTCAGTCCTCAGCCCCCTTCC-3' (SEQ ID NO :33)

[0283] 在每一种情况中,列出的引物均扩增除去了分泌信号序列的完整编码区。这些扩增序列包括用于亚克隆至细菌表达载体 pQE-30(Qiagen 公司, Valencia, CA) 的 BamHI/HindIII 位点 (对于 Beer 和 Gremlin) 和 SacI/HindIII 位点 (对于 Dan) 的限制性位点。pQE-30 在该克隆区域的 5' 末端含有一个编码 6×His 尾的序列。用该完整结构转化大肠杆菌菌株 M-15/pRep(Qiagen 公司),并且通过测序验证单个克隆。按厂商 (Qiagen, The QIAexpress ion) 所述在 M-15/pRep 中表达蛋白质并对其进行纯化 (6×His 亲和尾结合与 Sepharose 偶联的 Ni-NTA)。

[0284] 在 6M 脍中进行溶解,从大肠杆菌相当大量地回收 Beer 蛋白,然后透析使胍浓度降至 2-4M 以防治在贮存过程中出现沉淀。用 6M 脍溶解,回收更大量的 Gremlin 和 Dan 蛋白,经纯化后胍浓度为 0.5M。

[0285] B. 多克隆抗体的生产和检测

[0286] 采用标准操作,在兔和鸡宿主中制备分别针对这 3 种抗原的多克隆抗体 (R&R 抗体, Stanwood, WA ;家兔免疫和抗血清回收的标准操作 ;精编分子生物学实验指南 (Short Protocols in Molecular Biology) 第 2 版,1992,11. 37-11. 41。捐赠者 Helen M. Cooper 和 Yvonne Paterson ;由 Strategic Biosolutions(Ramona, CA) 制备鸡抗血清,)。

[0287] 通过 Western 印迹筛选具有活性的家兔抗血清和鸡卵的 IgY 组分。三个抗体分别通过 PAGE 分离,并转移至 0.45um 硝酸纤维素膜上 (Novex, San Diego, CA)。将该膜剪成条状,每个条含有大约 75ng 的抗原。在 3% 的印迹级阻断剂 (Blotting Grade

Block) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 中封闭这些条, 然后在 1×Tris 缓冲盐 (TBS)/0.02% TWEEN 缓冲液中洗涤 3 次。将这些条与一抗 (免疫前血液、兔抗血清或鸡卵 IgY 在封闭缓冲液中的 1 : 100-1 : 10,000 稀释液) 一起孵育 1 小时, 并伴随轻柔地滚动。经第二遍用 1×TBS/0.02% TWEEN 进行的三次洗涤之后, 与二抗 (过氧化物酶偶联的驴抗兔抗体, Amersham Life Science, Piscataway, NJ; 或过氧化物酶偶联的驴抗鸡抗体, Jackson Immuno Research, West Grove, PA) 孵育一小时。最后一轮用 1×TBS/0.02% TWEEN 进行的三次洗涤之后, 用 Lumi-Light Western 印迹底物 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, 德国) 显色这些条。

[0288] C. 抗体的交叉反应性检测 :

[0289] 按前面部分描述的操作方法, 将 Beer、Gremlin 或 Dan 的硝酸纤维素条带与它们各自的兔抗血清或鸡卵 IgY 的稀释液 (1 : 5000 和 1 : 10,000) 以及其余两种抗原产生的抗血清或鸡卵 IgY (稀释液 1 : 1000 和 1 : 5000) 一起孵育。增加非匹配抗体的水平, 以检测仅在浓度增加时才可能被观察到的这些抗体的低亲和结合。对于使用上述操作的所有三个结合事件, 显色反应的操作和持续时间是相同的。对于所有测试的抗原, 均未观察到抗原的交叉反应性。

[0290] 实施例 5

[0291] Beer 与 TGF- $\beta$  超家族蛋白质的相互作用

[0292] 采用免疫沉淀方法研究 Beer 与来自 TGF- $\beta$  超家族的不同系统发生支的蛋白质的相互作用。从商业途径获得纯化的 TGF  $\beta$ -1、TGF  $\beta$ -2、TGF  $\beta$ -3、BMP-4、BMP-5、BMP-6 和 GDNF (R & D system; Minneapolis MN)。典型的操作步骤如下。部分纯化的 Beer 在 HEPES 缓冲盐 (25mM HEPES 7.5, 150mM NaCl) 中透析。在 300ul IP 缓冲液 (150mM NaCl, 25mM Tris pH7.5, 1mM EDTA, 1.4mM  $\beta$ -巯基乙醇, 0.5% triton X-100 和 10% 甘油) 中进行免疫沉淀。在存在和不存在 500ng FLAG 表位标记的 Beer 时, 将 30ng 重组人 BMP-5 蛋白 (R & D system) 加在 15ul FLAG 亲和基质 (Sigma; St. Louis MO) 上。4°C 孵育这些蛋白质 4 小时, 然后在 IP 缓冲液 (每次洗涤 1ml) 中洗涤与亲和基质相连的蛋白质。将结合蛋白质从亲和基质上洗脱至 60ul 1×SDS PAGE 样品缓冲液中。通过 SDS PAGE 分离这些蛋白质, 并采用抗 BMP-5 抗血清 (Research Diagnostics 公司) 通过 Western 印迹检测与 Beer 相连的 BMP-5 (见图 5)。

[0293] Beer 配体结合试验 :

[0294] 在 100ul PBS/0.2% BSA 中加入 FLAG-Beer 蛋白质 (20ng), 然后吸附至预先用抗 FLAG 单克隆抗体 (Sigma, St. Louis MO) 包被、用溶于 PBS 的 10% BSA 封闭的 96 孔微滴定板的每个孔中。这在室温进行 60 分钟。去除该蛋白质溶液, 并洗涤这些孔以去除未结合蛋白质。向每个孔加入溶于 PBS/0.2% BSA 的 BMP-5, 浓度范围从 10pM 至 500nM, 然后室温孵育 2 小时。去除结合溶液, 并用 200ul 体积的 PBS/0.2% BSA 洗涤该板三次。然后使用 BMP-5 抗血清通过 ELISA (F. M. Ausubel 等 (1998) 当代分子生物学实验指南 (Current Protocols in Mol. Biol.) 第 2 卷, 11.2.1-11.2.22), 检测 BMP-5 的水平。通过从总结合中减掉非特异结合来计算特异结合, 并通过 LIGAND 程序 (Munson 和 Podbard, 分析生物化学 (Anal. Biochem), 107, 第 220-239 页, 1980) 进行分析。

[0295] 在该方法的一个变化中, 改造 Beer 并将其表达成人 Fc 融合蛋白质。同样对配体

BMP 进行改造，并表达成小鼠 Fc 融合蛋白质。将这些蛋白质一起孵育，按 Mellor 等所述的方法采用均一时间分辨荧光检测 (homogeneous time resolved fluorescence detection) (G. W. Mellor 等, J. of Biomol. Screening, 3(2) 91–99, 1998), 进行分析。

[0296] 实施例 6

[0297] 抑制 TGF- $\beta$  结合蛋白与 TGF- $\beta$  家族成员结合的筛选试验

[0298] 重复上述试验，除了两处例外。第一，BMP 浓度固定在预先确定的  $K_d$  值上。第二，加入固定浓度的候选拮抗剂集合（对于有机小分子集合为 20 $\mu$ M，而在抗体研究中为 1 $\mu$ M）。结合 TGF- $\beta$  结合蛋白的这些候选分子（拮抗剂）包括商业来源的或内部收集的有机化合物，这些有机化合物代表了各种的化学结构。这些化合物在 DMSO 中制成贮存液，并在标准试验条件下以≤ 1% 的终体积加入试验孔中。与 BMP 和 Beer 一起室温孵育 2 小时，去除该溶液并按所描述的方法定量结合的 BMP。在没有化合物或抗体时观察到的对 BMP 结合产生 40% 抑制的试剂被认为是该相互作用的拮抗剂。基于滴定研究以测定这些试剂的抑制常数和它们对 TGF- $\beta$  结合蛋白结合亲和性的影响，进一步作为潜在抑制物评价这些试剂。通过使用基于 BMP 配体作用的试验的研究（例如 BMP/BMP 受体竞争研究），还可以进行可比较的特异性对照试验，以确立该鉴定拮抗剂的选择性分布图。

[0299] 实施例 7

[0300] 对 TGF- $\beta$  结合蛋白的骨基质定位的抑制

[0301] 使用修改的 Nicolas 方法 (Nicolas, V. Calcif Tissue Int. 57 :206, 1995)，评价对骨基质（羟基磷灰石）定位的抑制。简单地说，按 Nicolas (同上) 所述方法制备  $^{125}$ I 标记的 TGF- $\beta$  结合蛋白。向配有聚丙烯滤膜 (Polyfiltroninc, Weymouth MA) 的 96 孔微滴定板的每个孔中加入羟基磷灰石。将 TGF- $\beta$  结合蛋白加入含有 0.2% 白蛋白的 PBS 缓冲液中。用该缓冲液洗涤含有基质的孔三次。使用 0.3M NaOH 洗脱吸附的 TGF- $\beta$  结合蛋白，并进行定量。

[0302] 通过 TGF- $\beta$  结合蛋白与测试分子的孵育，以及将该混合物施加到上述基质上，进行抑制物的鉴定。用含有 0.2% 白蛋白的 PBS 缓冲液洗涤该基质三次。使用 0.3M NaOH 洗脱吸附的 TGF- $\beta$  结合蛋白，并进行定量。在没有化合物或抗体的情况下观察到对 TGF- $\beta$  结合蛋白结合的 40% 抑制的试剂被认为是骨定位抑制剂。通过剂量反应研究测定这些抑制剂的抑制常数和它们对 TGF- $\beta$  结合蛋白结合亲和性的影响，进一步表征这些抑制剂。

[0303] 实施例 8

[0304] TGF- $\beta$  结合蛋白突变体的构建

[0305] A. 诱变：

[0306] pBluescript SK 中的全长 TGF- $\beta$  结合蛋白 cDNA 充当诱变模板。简单地说，使用 Vent DNA 聚合酶 (New England Biolabs, Beverly, MA) 和适合的引物（见以上提供的讨论）通过聚合酶链式反应产生该 DNA 片段。在厂商提供的缓冲液中，使用 57°C 退火温度，进行该聚合酶链式反应 23 个循环。然后将产物暴露于两个限制性酶，并在使用琼脂糖凝胶电泳分离后，将其连接回通过酶消化去除了对应序列的 pRBP4-503 中。通过 DNA 测序验证该突变体的完整性。

[0307] B. 突变 TGF- $\beta$  结合蛋白的哺乳动物细胞表达和分离

[0308] 将该突变 TGF- $\beta$  结合蛋白 cDNA 转移至实施例 3 所述的 pcDNA3.1 哺乳动物表达

载体中。在验证序列后,用所获结构转染 COS-1 细胞,并按

[0309] 实施例 3 所述纯化分泌的蛋白质。

[0310] 实施例 9

[0311] 动物模型 -I

[0312] 超量表达 Beer 基因的转基因小鼠的产生

[0313] 使用从 CITB 小鼠基因组 DNA 文库(由 Research Genetics, Huntsville, AL 获得)分离的~200 千碱基(kb)BAC 克隆 15G5, 确定小鼠 Beer 基因的全部序列以及其 5' 和 3' 侧翼区。将含有该完整基因体以及~17kb 的 5' 侧翼序列和~20kb 的 3' 侧翼序列的 41kb SalI 片段亚克隆至 SuperCosI 粘粒载体(Stratagene, La Jolla, CA) 的 BamHI 位点, 并在大肠杆菌菌株 DH10B 中增殖。然后从该粘粒结构, 采用常规手段, 凝胶纯化含有完整小鼠 Beer 基因以及分别长 17kb 和 14kb 的 5' 和 3' 侧翼序列的 35kb MluI-AviII 限制性片段(序列号 6), 用于微注射小鼠受精卵(DNX 转基因; 美国专利 4,873,191)。以 5-30% 的活产幼崽频率获得其中克隆 DNA 片段随机整合在基因组中的建立者动物(founder animal)。通过从少量小鼠组织例如尾尖提取基因组 DNA, 并进行 Southern 印迹分析, 验证该转基因的存在。DNA 的提取采用如下操作程序: 在含有 200mM NaCl, 100mM Tris pH8.5, 5mM EDTA, 0.2% SDS 和 0.5mg/ml 蛋白酶 K 的裂解缓冲液中, 55°C 过夜消化组织。第二天, 该 DNA 用酚 / 氯仿(50 : 50) 抽提一次, 用氯仿 / 异戊醇(24 : 1) 抽提一次, 然后用乙醇进行沉淀。重悬在 TE(10mM Tris pH7.5, 1mM EDTA) 中后, 每份 8-10ug DNA 样品用限制性内切酶例如 EcoRI 消化, 然后进行凝胶电泳并将其转移至带电荷的尼龙膜例如 HyBondN+(Amersham, Arlington Heights, IL) 上。然后用放射性标记的 DNA 片段杂交该所获得的滤膜, 该放射性标记 DNA 片段来源于小鼠 Beer 基因座位并且既能识别来自内源性基因座位的片段又能识别来自转基因的具有不同大小的片段。将建立者动物与非转基因小鼠进行配种, 产生足够数量的转基因和非转基因后代, 并在其中测定 Beer 基因超量表达的影响。对于这些研究, 对各种年龄的动物(例如, 1 天、3 周、6 周、4 个月) 进行多种不同的设计用来查明总的骨骼形成、骨矿质密度、骨矿质含量、破骨细胞和成骨细胞活性、软骨内骨化程度、软骨形成等的试验。转基因的转录活性可以通过如下步骤进行测定: 从不同组织中提取 RNA, 并采用 RT-PCR 进行分析, 该分析利用了转基因来源的小鼠品系(129Sv/J) 和用于 DNA 微注射的小鼠品系[(C57BL/6J × SJL/J) F2] 之间的单核苷酸多态性。

[0314] 动物模型 -II

[0315] 通过同源重组破坏小鼠的 Beer 基因

[0316] 在胚胎干(ES) 细胞中进行的同源重组可以用以失活小鼠的内源性 Beer 基因, 并随之产生带有功能缺失突变的动物。将报告基因例如大肠杆菌的 β-半乳糖苷酶基因通过基因工程插入导向载体, 使其表达可以受到内源性 Beer 基因启动子和翻译起始信号的控制。以此方式, 可以在带有定向等位基因的动物中, 测定 Beer 基因表达的空间和时间模式。

[0317] 首先通过将磷酸甘油酸激酶(PGK) 启动子驱动的可药物筛选的新霉素抗性基因(neo) 盒从 pGT-N29(New England Biolabs, Beverly, MA) 克隆至克隆载体 pSP72(Promega, Madison, WI) 中, 构建该导向载体。使用 PCR, 给该 PGKneo 盒的侧翼加上噬菌体 P1 loxP 位点, 该位点是 P1 Cre 重组酶的识别位点(Hoess 等, 美国 PNAS, 79 :3398, 1982)。这就允许之后在被打靶的 ES 细胞或 ES 细胞来源的动物中除去该 neo 抗性标记(美国专利 4,959,317)。该

PCR 引物由 loxP 的 34 个核苷酸 (ntd) 序列, 与 PGKneo 盒的 5' 和 3' 末端互补的 15–25ntd, 以及用于克隆至 pSP72 的限制性酶识别位点 (有义引物中为 BamHI, 反义引物中为 EcoRI) 组成。有义引物的序列是 :5'-AATCTGGATCCATAACTCGTATAGCATACATTACGAAGTTATCTGCAG GATTCGAGGGCCCC-3' (SEQ ID NO :34); 反义引物的序列是 :5'-AATCTGAATTCCACCGGTGTTAAT TAAATAACTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAGATCTAGAGTCAGCTCTGA-3' (SEQ ID NO :35)。

[0318] 下一步是将含有该大肠杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶基因和 SV40 聚腺苷酸化信号的 3.6kb XhoI-HindIII 片段从 pSV  $\beta$  (Clontech, Palo Alto, CA) 克隆至 pSP72-PGKneo 质粒中。通过从 BAC 克隆 15G5 扩增一个 2.4kb 的片段产生小鼠 Beer 基因座位的同源“短臂”。该片段的 3' 末端与 Beer 基因的翻译起始位点相符, 并且在此 PCR 中使用的反义引物还包括与  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的 5' 末端互补的 30ntd, 以致该基因的编码区可以按符合阅读框的形式与 Beer 起始位点融合。用于将该“短臂”引入 pSP72- $\beta$  gal-PGKneo 质粒的方法是, 在  $\beta$ -gal 基因上游的一个位点将此质粒线性化, 然后用该片段和此“短臂”PCR 产物进行共转化, 筛选该 PCR 产物通过同源重组整合在其中的质粒。用于该“短臂”扩增的有义引物包括与 pSV70 载体互补的 30ntd, 从而允许该重组事件发生。该有义引物的序列是 5'-ATTAGG TGACACTATAGAACTCGAGCAGCTGAAGCTTAACCACATGGTGGCTCACACC-3' (SEQ ID NO :36), 反义引物的序列是 :5'-AACGACGCCAGTGAATCCGTAATCATGGTCATGCTGCCAGGTGGAGGAGGGCA-3' (SEQ ID NO :37)。

[0319] 使用引入稀有限制性酶切割位点 SgrAI、FseI、AscI 和 PacI 的引物, 通过从 BAC 克隆 15G5 扩增一个 6.1kb 的片段产生 Beer 基因座位的“长臂”。具体地, 该有义引物的序列是 5'-ATTACCACCGGTGACACCCGCTTCCTGACAG-3' (SEQ ID NO :38); 该反义引物的序列是 5'-ATTACTTAATTAAACATGGCGCGCCATATGGCCGGCCCCTAATTGCGGCGCATCGTTAATT-3' (SEQ ID NO :39)。作为一个中间步骤, 将所获 PCR 产物克隆至 TA 载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中。

[0320] 该小鼠 Beer 基因导向结构还包括第二个选择标记, 单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶基因 (HSVTK), 该基因处于劳斯肉瘤病毒长末端重复元件 (RSV LTR) 的控制下。该基因的表达使得哺乳动物细胞对 9-[1,3-二羟-2-丙氧甲基] 鸟嘌呤敏感 (并且不能存活), 因此这是一个筛选去新霉素抗性的细胞的方便方法, 在新霉素抗性细胞中该结构是通过非同源重组事件发生整合的 (美国专利 5,464,764)。使用允许随后将片段克隆至“长臂”-TA 载体质粒的 FseI 和 AscI 位点中的引物, 从 pPS1337 扩增该 RSVLTR-HSVTK 盒。对于该 PCR, 有义引物的序列是 5'-ATTACGGCCGGCCGCAAAGGAATTCAAGATCTGA-3' (SEQ ID NO :40); 反义引物的序列是 5'-ATTACGGCGCCCGTCACAGGCCGCACCCAGCT-3' (SEQ ID NO :41)。

[0321] 构建该导向载体的最后一步涉及, 将含有“长臂”和 RSVLTR-HSVTK 基因的 8.8kb SgrAI-AscI 片段克隆至 pSP72-“短臂”- $\beta$  gal-PGKneo 质粒的 SgrAI 和 AscI 位点中。通过 AscI 或 PacI 消化, 线性化该导向载体, 然后通过电穿孔将其导入 ES 细胞中。

[0322] 实施例 10

[0323] 反义介导的 Beer 失活

[0324] 以重叠形式制备具有 17 个核苷酸的反义寡核苷酸, 方式是第一个寡核苷酸的 5' 末端与 Beer 转录本的翻译起始 AUG 重叠, 然后相继的寡核苷酸的 5' 末端在相对 Beer AUG 的 5' 方向上前移 5 个核苷酸 (一直到 50 个核苷酸之外)。使用了相同的碱基组成设计和制备相应的对照寡核苷酸, 但其序列被重新分布以抑制其与编码 mRNA 的任何有效杂交。通过

阳离子脂质递送 (P. L. Felgner, 美国国家科学院院刊 84 :7413, 1987), 将试剂递送至测试细胞系统中。在 100ul 减少血清培养基 (Opti-MEM 1 减少血清培养基 ;Life Technologies, Gaithersburg MD) 中加入 2ug 反义寡核苷酸, 并将其与 (6ul) 脂转染试剂 (Lipofectin reagent) (LifeTechnologies, Gaithersburg MD) 在此 100ul 减少血清培养基中混合。混合这些物质, 室温下 30 分钟使其形成复合物, 并将该混合物加到预先接种的 MC3T3E21 或 KS483 细胞中。培养这些细胞, 并回收 mRNA。使用 RT-PCR 以及 Beer 特异性引物监测 Beer 的 mRNA。此外, 将分开的实验孔收集起来, 并通过实施例 4 所述的 Western 印迹方法鉴定蛋白质的水平。收获细胞, 将其重悬在裂解缓冲液 (50mM Tris pH 7.5, 20mM NaCl, 1mM EDTA, 1% SDS) 中, 并收集可溶性蛋白质。将该物质加到 10–20% 的梯度变性 SDS PAGE 上。把分离的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上并按以上所述使用抗体试剂进行 Western 印迹。平行地, 向同样的培养物加入对照寡核苷酸, 并重复实验操作。如果使用反义寡核苷酸进行的该处理与拼凑的对照寡核苷酸相比导致 mRNA 或蛋白质水平 50% 的变化, 则 Beer mRNA 或蛋白质水平的降低被认为是有意义的。该方法使得能够选择性地失活基因以及在随后的组织培养模型中出现矿化结表型特征。

[0325] 序列

[0326] SEQ ID No. 1 :人 Beer cDNA (完整编码区加 5' 和 3' UTRs)

[0327]

AGAGCCTGTGCTACTGGAAAGGTGGCGTGCCTCCCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCCTGGCCCTGTGTCCTCGTCTGC  
 CTGCTGGTACACACAGCCTTCGGTGTAGTGGAGGGCAAGGGTGGCAGGCCTCAAGAATTGATGCCACGGAAATTCACTCCC  
 CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCACCGGAGCTGGAGAACAAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGC  
 CTCCCCACCAACCCCTTGAGACCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGAGCTGCACTTCAACCGCTACGTGACCGAT  
 GGGCCGTGCCGAGCGCCAAGCCGGTACCGAGCTGGTGTGCTCCGCCAGTGCAGGCCGCGCCCTGCTGCCAACGC  
 CATTGGCCGCGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCCAACGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC  
 AGCTGCTGTGTCCCCTGGTGGAGGGCGCGCGCGCGAGGTGCGCCTGGTGGCCTCGTGCAGTGCAGCGCCTCACC  
 CGCTTCCACACAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTGCCGCCAGAACGGGCCAGAACGGCGGGAGCCGCGGCCCC  
 CGCCCCGGAGCGCCAAGCCAACCAGGCCAGCTGGAGAACGCCACTAGAGCCCGCCGCGCCCTCCCCACCGGCGGG  
 GCCCCGGCCCTGAACCCCGCCCCACATTCTGTCCCTCTGCGCGTGGTTGATTGTTATATTCAATTGTAATTGCCTGC  
 AACCCCCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCCGGAGGGCCCTCAGCCCGCCAGCTG  
 AGGGGCTCCACGGGGCAGGGGAGGGATTGAGAGTCACAGACACTGAGCCACGCAGCCCGCCCTGGGCCCTACCT  
 TTGCTGGTCCCACTTCAGAGGAGGCAGAAATTGAAAGCATTTCACCGCCCTGGGTTTAAGGGAGCGGTGTGGAGTGG  
 GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTGACCTCGCTGCCATCAGAAAGCCTGAGCGTGC  
 CCAGAGCAGAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTCTAGTCCTGGCTTGCCACTAACTTGTGTGTAACCTTGAAAC  
 TACACAATTCTCCTCGGGACCTCAATTCCACTTTGTAATTGAGGGTGGAGGTGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT  
 TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTGAATGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGPPTGAATG  
 CAGTTGCATTGATTCAAGGACTCCAGTGCCTTCCAGAATTCAAGAGTTGATGCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAAA  
 CAAACAGAAAAAAAAAGTAAAGAGTCATTGCTGACATTTCAGGCTGACAAACTCCGGAAGAACGCTATGCT  
 CTTCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGTAGA  
 AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCCACTTCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCC  
 ACCCATAGCCATGTTAAAGTCACCTCCGAAAGAGAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGCCGAGGGAGC  
 AGCCATCACAAACTCACAGACCAGCACATCCCTTGAGACACCCTCTGCCACCACACTCAGGACACATTCTGCCT  
 AGAAAACAGCTTACTGCTTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAGAATATTGGGGAAAAACTACAAGT  
 GCTGTACATATGCTGAGAAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAAATCTTTGAAATTCAATTCCAGACAAACCTC  
 TTACTTCTGTGTAGTTAAATTGTTAAAAAGTTAAACAGAACGACATGACATATGAAAGCCTGAGGACT  
 GGTCGTTTTGGCAATTCTCCACGTGGACTTGTCCACAAGAACGAGTAGTGGTTAAAGAGTTAAGTTACAT  
 ATTATTTCTCACTTAAGTTATTGCAAAGTTCTTGAGAGAACATGAAATGTTAATATTGCTTATGAAATTAA  
 CAGTCGTTCTCCAGAGTCCAGAGAACATTGTTAATAAGAACATGAAATGACCGAAAG

[0328] SEQ ID No. 2 :人 BEER 蛋白质 (全序列)

[0329]

MQLPLALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATEIIPELGEYPEPPFELENNKTMNRAENGGRPFHHFFETKDVSEYSC  
 RELHFTRYVTDGFCRSAKPVTELVCSGQCGPARLLPNAIGRGKWWRPSGFDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVR  
 LVASCKCKRLTRFHNOSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRARSAAKQAELENAY

[0330] SEQ ID No. 3 :含有硬化性狭窄无义突变的人 Beer cDNA

[0331]

AGAGCCCTGTGCTACTGGAAAGGTGGCGTGCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCACGGCCCTGTGTCCTCGTCTGC  
 CTGCTGGTACACACAGCCTCCGTGTAGTGGAGGGCTAGGGGTGGCAGGCCTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCC  
 CGAGCTCGGAGAGTAACCCGAGCCTCACCGAGCTGGAGAACAAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGC  
 CTCCCCACCACCCCTTGAGACCAAAGACGTGTCGAGTACAGCTGCCGAGCTGCACTTCACCCGCTACGTGACCGAT  
 GGGCGTGCGCAAGCGCAAGCGGTACCCGAGCTGGTGTCTCCGGCAGTGCAGGGCCGGCGCGCTGCTGCCAACGC  
 CATCGCCGCGCAAGTGGTGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCTG  
 AGCTGCTGTGTCGGGTGGTGAGGCAGCGCGCGCGCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTCGGCCAGAACGGCCGGAGGCC  
 CGCCCGGAGCGCCAAGCCAACCAGCGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTCGGCCAGAACGGCCGGAGGCC  
 GCCCGGCGCTGAACCCGCGCCACATTCTGTCCTCTGCGCGTGGTTGATTGTTATATTCAATTGAAATGCCTGC  
 AACCCAGGGCAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCCGAAAGCCCCCTCAGCCGCCAGCTG  
 AGGGGCTCACGGGCAGGGGAGGGATTGAGAGTCACAGACACTGAGCCACGCAGCCCCGCTCTGGGCGCCTACCT  
 TTGCTGGTCCCACCTCAGAGGGCAGAATGGAAAGCATTTACCGCCCTGGGTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG  
 GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTGGATAAGATTCCCCCTGCACTCGCTGCCATCAGAACGCTGAGGCCTG  
 CCAGAGCACAAGACTGGGGCACTGTAGATGTGGTTCTAGTCCTGGCTGCCACTAACTTGCTGTGTAACCTTGAAC  
 TACACAATTCTCCTCGGGACCTCAATTCCACTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT  
 TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTGAATGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAATGAATG  
 CAGTTGCATTGATTCAAGGACTCCAGTGCCTTTGAATGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAATGAATGAAAA  
 CAAACAGAAAAAAAAAGTAAAGAGTCTATTATGGCTGACATATTACGGCTGACAAACTCCTGGAAGAAGCTATGCTG  
 CTTCCAGCCTGGCTTCCCCGGATTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTAAAGAAATAACATCATCCATTGGGTAGA  
 AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCCACTTCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCG  
 ACCCATAGCCATGTTAAAGTACCTCCAGAGAGAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGCCGAGGGAGC  
 AGCCATCACAAACTCACAGACCAGCACATCCCTTGAGACACCGCCTCTGCCACCCTCACGGACACATTCTGCCT  
 AGAAAACAGCTTCTTACTGCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTGGGGAAAAACTACAAGT  
 GCTGTACATATGCTGAGAAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAATCTTTGAAAATCATTCCAGACACCTC

[0332]

TTACTTTCTGTGTTAGTTTAAATTGTTAAAAAALALALAGTTTAAACAGAAGCACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT  
 GGTCGTTTTGGCAATTCTCCACGTGGACTTGTCCACAAGAATGAAAGTAGTGGTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT  
 ATTTATTTCTCACTTAAGTTATGCAAAAGTTTCTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAA  
 CAGTCCTGTTCTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAGACAATGAAATGACCGAAAG

[0333] SEQ ID No. 4 :从硬化性狭窄 (Scleroeteosis) 获得的截短人 Beer 蛋白质

[0334]

MQLFLALCLVCLLVHTAFRVVEG\*

[0335] SEQ ID No. 5 :编码蛋白质变体的人 Beer cDNA (V10I)

[0336]

AGAGCCTGTGCTACTGGAAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCACTGGCCCTGTGTCTCATCTGC  
 CTGCTGGTACACACAGCCTTCGGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCCTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCG  
 CGAGCTCGGAGAGTACCCCGACGCCCTCCACCGAGCTGGAGAACAAACAGACCATGAACCGGGCGAGAACGGAGGGCGGC  
 CTCCCCACCACCCCTTGAGACCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCCGAGCTGCACTTCACCCGCTACGTGACCGAT  
 GGGCGTGCAGCGCCAAGCCGGTACCGAGCTGGTGTGCTCCGGCCAGTGCAGGGCCGGCGCCTGCTGCCAACCG  
 CATCGGCCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC  
 AGCTGCTGTGTCCCCTGGTGAGGCAGCGCGCGCAAGGTGCGCTGGTGGCCTCGTGCAGTGCAGCGCCTCACCC  
 CGCTTCCACAACCAAGCTGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTGGCCGAGAACGGCCGGAGGCCGGCGCG  
 CGCCCCGGAGCGCCAAGCCAACCAAGGCCGAGCTGGAGAACGCCACTAGAGCCCGCCGCGCCCTCCCCACGGCGGG  
 GCCCGCCCTGAACCCCGCCCCACATTCTGTCCCTGCGCGTGGTTGATTGTTATTTCAATTGTAAATGCCCTGC  
 AACCCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCCGAAAGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG  
 AGGGGCTCCAGGGGCAGGGGAGGGATTGAGAGTCACAGACACTGAGCCACGCAGCCCCGCCTGGGGCCGCCTACCT  
 TTGCTGGTCCCACCTCAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTCACCGCCCTGGGTTTAAGGGAGCGGTGTGGAGTGG  
 GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTGGATAAGATTCCCCCTGCGCCCTCGCTGCCATCAGAAAGCCTGAGGGCGTGC  
 CCAGAGCACAAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTCTAGTCCTGGCTGCCACTAACTTGCTGTGTAACCTGAAC  
 TACACAATTCTCCTCGGGACCTCAATTCACTTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT  
 TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCCTTGAAATGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAATGAATG  
 CAGTTGCATTGATTCAAGTGCAGGACTTCCAGAATTCAAGAGTTGTGATGCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAAA  
 CAAACAGAAAAAAAAAGTAAAGAGTCTATTATGGCTGACATATTAACGGCTGACAAACTCCTGGAAGAAGCTATGCTG  
 CTTCCAGCCTGGCTCCCGGATGTTGGTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGTAGA  
 AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGGGAGGATAGAAATCACATCCGCCCCACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCCG  
 ACCCATAGCCATGTTAAAGTCACCTCCGAAGAGAAGTGAAGGACACTGGCCTGCAGGCCGGAGGGAGC

## [0337]

AGCCATCACAAACTCACAGACCAGCACATCCCTTGAGACACCGCCTCTGCCACCACTCACGGACACATTCTGCCT  
 AGAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTATTGGGGAAAAACTACAAGT  
 GCTGTACATATGCTGAGAACACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAAATCTTGTGAAATCATTCCAGAACACCTC  
 TTACTTCTGTGTAGTTTAAATTGTTAAAAAAAGTTTAAACAGAACGACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT  
 GGTCGTTTTGGCAATTCTCACGTGGACTTGTCCACAAGAATGAAAGTAGTGGTTTAAAGAGTTAAGTTACAT  
 ATTATTTCTCATTAAGTTATGCAAAGTTCTGTAGAGAACATGTTAATATTGCTTTATGAAATTAA  
 CAGTCGTTCTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAAATAAAGAACATGACATGACCGAAAG

## [0338] SEQ ID No. 6 :人 Beer 蛋白质变体 (V10I)

## [0339]

MQLFLALCLICLLVHTAFRVVEQGWQAFKNDATEIIRLEGEYPEPFPELENNKTMNRAENGGRPHPFETKDVESEYSC  
 RELHFTRYVTDGFCRSAKFVTELVCSGQCGFARLLFNAIGRGKWWRESGFDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVR  
 LVASCKCKRLTRFHNOSELKDFGTEAARFQKGRKPRERARSAKANQAELENAY

## [0340] SEQ ID No. 7 :编码蛋白质变体的人 Beer cDNA (P38R)

## [0341]

# 说 明 书

CN 1333828 B

45/69 页

AGAGCCTGTGCTACTGGAAAGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCACTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC  
CTGCTGGTACACACAGCCTTCGGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCCTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCG  
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACAAAGACCATGAACCGGGCGGAGAAGCGAGGGCGGC  
CTCCCCACCACCCCTTGAGACCAAAGACGTGTCGAGTACAGCTGCCGAGCTGCACTTCACCCGCTACGTGACCGAT  
GGGCGTGCGCGAGCGCCAAGCCGGTCACCGAGCTGGTGTGCTCCGGCAGTGCAGGGCCGGCGCCCTGCTGCCAACGC  
CATCGCCGCGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGAGCGCGTGC  
AGCTGCTGTGTCGGTGGTGGAGGGCGCGCGAGCTGGAGCGCAGAGTGCCTGGTGGCCTCGTGCAGTGCAAGCGCCTCAC  
CGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGGCGCTGGCCGAGAACGGCCGAGAAGGGCCGAGGCCGCG  
CGCCCGGAGCGCAAAGCCPACCAAGGCCGAGCTGGAGAACGCCTACTAGAGCCCAGCGCCCTCCCCACCGCGGG  
GCCCGGCCCTGAACCCGCGCCACATTCTGTCCTCTGCGCTGGTTGATTGTTATATTGATTGTAAATGCCCTGC  
AACCCAGGGCAGGGGCTGAGACCTCCAGGCCCTGAGGAATCCCAGGGCGCCGAGGCCCCCTCAGCCGCCAGCTG  
AGGGGTCCCACGGGGCAGGGGAGGGATTGAGAGTCACAGACACTGAGCCACGCAGCCCCGCCTCTGGGCGCCTACCT  
TTGCTGGTCCCACTTCAAGAGGGCAGAAATGGAAGCATTTCACCGCCCTGGGTTTAAGGGAGCGGTGTGGAGTGG  
GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGACACCTCGCTGCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC  
CCAGAGCACAAGACTGGGGCACTGTAGATGTGGTTCTAGTCCTGGCTCTGCCACTAATTGCTGTGTAACCTTGAAC  
TACACAATTCTCCTTCGGGACCTCAATTCACTTTGTAATTGAGGGTGGAGGTGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT  
TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTGAATGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAATGAATG

[0342]

CAGTTGCATTGATTCACTGCCAGGTCACTTCCAGATTCAAGAGTTGTGATGCTCTCTGACAGCCAAAGATGAAAAAA  
CAAACAGAAAAAAAAAGTAAAGAGTCTATTATGGCTGACATATTACGGCTGACAAACTCCTGGAAGAAGCTATGCTG  
CTTCCCAGCCTGGCTTCCCGGATTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTAAAGAAATAACATCATCCATTGGGTAGA  
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCCAACTCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCG  
ACCCATAGCCATGTTTAAAGTCACCTTCCAGAGAGAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAAGGCCCCGAGGGAGC  
AGCCATCACAAACTCACAGACCAGCACATCCCTTGAGACACCGCCTCTGCCACCACTCACGGACACATTCTGCCT  
AGAAAACAGCTTCTACTGCTCTCATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTATGGGGAAAAACTACAAGT  
GCTGTACATATGCTGAGAAACTGCAAGCATAATAGCTGCCACCCAAAATCTTTGAAAATCATTCAGACACCTC  
TTACTTCTGTGTAGTTTAAATTGTTAAAAAAAGTTTAAACAGRAGGCACATGACATATGAAAGCCTGAGGACT  
GGTCGTTTTGGCATTCAGTGGACTTGTCCACAGAATGAAAGTAGTGGTTTAAAGAGTTAAGTTACAT  
ATTATTTCTCACTTAAGTTATGCAAAAGTTCTGTAGAGAATGACAATGTTAATTGCTTATGAATTAA  
CACTGTTCTCCAGAGTCAGAGACATTGTTAATAAGACAATGAATCATGACCGAAAG

[0343] SEQ ID No. 8 :人 Beer 蛋白质变体 (p38R)

[0344]

MQLPLALCLVCLLVTAFRVVEQGWQAFKNDATEIIRELGEYPEFFPELENNKTMNRRAENGGRPHHFFETKDVSEYSC  
RELHFTRYVTDGFCRSAKFVTELVCSGQCGFARLLPNAIGRGKWWRFSGFDRCIFDRYRAQRVQLLCFGGEAPRARKVR  
LVASCKCKRLTRFHQNQSELKDEGTEZARPKGRKERFRARSAAKANQAELENAY

[0345] SEQ ID No. 9 :Vervet Beer cDNA ( 完整编码区 )

[0346]

ATGCAGCTCCCCTGGCCCTGTCTGCTGCCTGCTGGTACACGCAGCCTTCGGTGTAGTGGAGGGCCAGGGTGGCA  
 GCCCTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCCCGAGCTCGGAGAGTACCCGAGCCTCCACCGAGCTGGAGAACACA  
 AGACCATGAACCGGGCGGAGAAATGGAGGGCGGCCTCCCCACCAACCCCTTGAGACCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGC  
 CGAGAGCTGCACTTCACCCGCTACGTGACCGAtGGGCCGTGCCGCAGCGCAAGCCAGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGG  
 CCAGTGCAGGCCCGGCACGCCCTGCTGCCAACGCCATGCCGCAGCGAAGTGGTGGCGCCGAGTGGGCCGACTTCCGCT  
 GCATCCCCGACCGCTACCGCGCGAGCGTGTGCAGCTGCTGTGTCAGCTGGTGGCGCCGAGTGGGCCGACTTCCGCT  
 CTGGTGGCCTCGTCAAGTGCAGCGCTCACCGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGTCCCGAGGCCG  
 TCGGCCGCAGAAGGGCCGGAAGCCGCGGCCGCGCCGGGGGCCAAGCCAATCAGGCCAGCTGGAGAACGCCACT  
 AG

[0347] SEQ ID No. 10 :Vervet Beer 蛋白质 (全序列)

[0348]

MQLFLALCLVCLLVHAAFRVVEQGWQAFKNDATEIIIFELGEYPEFPEELENNKTMNRAENGGRFFHHFFETKDVESEYSC  
 RELHFTRYVTDGFCRSAKFVTELVCSGQCGFARLLPNAIGRKWWRFSGPDFRCI PDRYRAQRVQLLCFGGAAPRARKVR  
 LVASKCKRLTRFHQNSELKDFGPETAFQKGRKPRFRARGAKANQAELENAY

[0349] SEQ ID No. 11 :小鼠 Beer cDNA(仅有编码区)

[0350]

ATGCAGCCCTCACTAGCCCCGTGCCCTCATCTGCCACTTGTGCACGCTGCCCTCTGTGCTGTGGAGGGCCAGGGTGGCA  
 AGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTCACTCCCAAGGGCTTGGAGAGTACCCGAGCCTCCTCCTGAGAACACAGACCA  
 TGAAACCGGGCGGAGPATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCPAAAGGTGTGTCCGAGTACAGCTGCCCGAG  
 CTGCACTACACCCGCTCCTGACAGACGGCCATGCCGCAGCGCCAAAGGGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGCCAGTG  
 CGGCCCCCGCGCGCTGCTGCCAACGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAACGGACCGGATTTCGCTGCATCC  
 CGGATCGCTACCGCGCGAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCCGGGGCGCGCCGCGCTCGCGCAGGTGCGCTCTGGT  
 GCCTCGTCAAGTGCAGCGCTCACCGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGCCAGACCGCGCGGCC  
 GCAGAAGGGTCGCAAGCCGCGGCCGGCGCCGGAGCCAGGCCAACCGAGCTGGAGAACGCCACTAGAG

[0351] SEQ ID No. 12 :小鼠 Beer 蛋白质 (全序列)

[0352]

MQPSLAPCLICLLVHAAFCAVEQGWQAFRNDATEVI FGLGEYPEFPEEENNQTMNRAENGGRFFHHFYDAKDVESEYSCRE  
 LHYTRFLTDGFCRSAKFVTELVCSGQCGFARLLPNAIGRKWWRFSGPDFRCI PDRYRAQRVQLLCFGGAAPRSRKVRLV  
 ASCKCKRLTRFHQNSELKDFGPETAFQKGRKPRFRARGAKANQAELENAY

[0353] SEQ ID No. 13 :大鼠 Beer cDNA(完整编码区加上 5' UTR)

[0354]

GAGGACCGAGTGCCCTTCCTCCTCTGGCACCATGCAGCTCTCACTAGCCCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGTACATGCA  
 GCCTTCGTTGCTGTGGAGAGCCAGGGTGGCAAGCCTCAAGAATGATGCCACAGAAATCATCCGGACTCAGAGAGTA  
 CCCAGAGCCTCCTCAGGAACATAGAGAACACAGACCATGAACCGGGCGAGAACGGAGGCAGACCCCCCACCACCTT  
 ATGACACCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCCGAGCTGCACTACACCCGCTTGTGACCGACGGCCGTGCCGCAGT  
 GCCAACGCCGGTACCGAGTTGGTGTGCTCGGGCCAGTGGCCCGCGCTGCTGCCAACGCCATCGGGCGCGTGAA  
 GTGGTGGCGCCCGAACGGACCCGACTTCCGCTGCATCCGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCCG  
 CGGGCGCGCGCCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCCTCGTCAAGTGCAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAG

[0355]

**AGCCAAACCAGGCGGGACTGGAGAACGCCTACTAG**

[0356] SEQ ID No. 14 : 大鼠 Beer 蛋白质 (全序列)

[0357]

MQLSLAPCLACLLVHAFFAVAESQGWQAFKNDATEIIIPGLREYPEFFPQELENNQTMNRAENGGRFPHHFYDTKDVESEYCF  
RELHYTREVTDGFCRSAKFVTELVCSCGQCGEARLLFNAIGRVKWWRENGFDRCIEDRYR^QRVQLLCPEGGAAPRSRKRVR  
LVA.SCKCKRLTRFHNOSELKDFFGPETARFOKGKRKFPRARGAKANOAELENAY

[0358] SEQ ID No. 15 :牛 Beer cDNA(部份编码序列)

〔0359〕

AGAATGATGCCACAGAAATCATCCCCGAGCTGGCGAGTACCCCGAGCCTCTGCCAGAGCTGAACAAACAAGACCATTGAA  
CGGGCGGAGAACGGAGGGAGACCTCCCCACCACCCCTTGAGACCAAAGACGCCCTCGAGTAACGCTGCCGGGAGCTGCA  
CTTCACCCGCTACGTGACCGATGGGCCGTGUCCGAGCGCCAAGCCGGTCACCGAGCTGGTGTGCTCGGGCCAGTGCAGCC  
CGGCGCGCCTGCTGCCAACGCCATCGGCCGCGCAAGTGGTGGCGCCAAAGCGGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCCGAC  
CGCTACCGCGCGCAGGGGTGCAGCTGTTGTCTGGCGGCGCGCGCGCGCGCAAGGTGCGCCTGGTGGCCTC  
GTGCAAGTGCAGCGCCTCACTCGCTTCCACACCCAGTCCAGCTCAAGGACTTCGGGCCGAGGCCGCGGCCGAAA  
CGGGCCGGPAGCTGCGGCCGCGCCGGGACCCAAAGCCAGGCCGGCGA

[0360] SEQ ID No. 16 : 牛 Beer 蛋白质 (部分序列—缺信号序列和末尾的 6 个残基)

〔0361〕

NDATEIIPELGEYPEPLPELNNKTMNRAENGGREPHFFETKDASEYSCRELHFTRYVTDGFCRSAKPVTELVCSGQC  
ARLLPNAIGRKWWRPSGPDFRCIFDRYRAQRVQLLCPGGAAPRARKVRLVASCKCKRLTRFHQSSELKDFGPEAARFQT  
GRKLPRARAGTKASRA

[0362] SEQ ID No. 17 :用以制备小鼠 Beer 转基因的 MluI-AvIII 限制性片段

[0363]

CGCGTTTGGTAGCAGCAATATTGCGCTTCGATGAGCCTGGCGTTGAGATTGATAACCTCTGCTGCACAAAAGGCAATC

[0364]

GACCGAGCTGGACCAGCGCATTCGTACACCGTCTCCTCGAACATTATCGCAATGGAGTGTCAATTCAAGGACNGCC  
 TGATCGPAATGGTGTATCCACGCAGCGGAATCGAAACCCCTCAGCCGGTACCAATTATCTACAAACATCAGCCTTGGT  
 ATCCTCGGTGATGAGCCAGCGCAGAACAAAGGTAAACCGTCAGTCCGATAAGTTCAAAGTTAACCTGGTGTGATACCAA  
 CATTGAAACGTTGATCGAAAACCGCTGAAAAACGCTGCTGAATGTGCCGCTGGATGTACAAAGCAAATGGCAGCAG  
 ACAAGAAAAGCGATGGATGAAACTGGCTTCTATGTCCGCACGGCCATCATGATGGAATGTTCCCCGGTGGTGTATCTGG  
 CAGCAGTGCCGTCGATAGTATGCAATTGATAATTATTATCTTGCGGGTCTTCGGCGATCCGCCTTGTGTTACGGGGC  
 GGCACCTCGCGGGTTTCGCTATTATGAAAATTTCCGGTTAAGCGTTCCGTTCTCTCGTCATAACTTAATGT  
 TTTTATTTAAATAACCTCTGAAPAGAAAGGAAACGACAGSTGCTGAAPAGCAGCTTTTGGCCTCTGTCGTTCTTC  
 TCTGTTTTGTCGTTGGAATGAAACAATGAAAGTCACAAAPAGCAGAGCTTATCGATGATAAGCGGTAAACATGAGAAT  
 TCGCGGCCATAACGACTCACTATAGGGATCGACGCCACTCCCCGCGCATGAAGCGGAGGAGCTGGACTCCGCATG  
 CCCAGAGACGCCCCCAACCCCAAGTGCCTGACCTCACCTCTACCGCTGCTGGCTGGCTGGCTGGGGCTGGCGGGTCAAGGC  
 TACCACTGTTCTTAACAGGTGGCTGGCTGTCTCTGGCGCGCTCATGTGACAGCTGCCTAGTTCTGCAGTGAGGTC  
 ACCGTGGAATGTCGCTTCGTTGCCATGGCAACGGGATGAGCTTACAPCTGGGTGTGGAGCTTCTGTCCGTGTCA  
 GGAAATCCAATACCTAAAATACCTAGAAGAGGAAGTAGCTGAGCCPAGGCTTCCTGGCTCTCCAGATAAGTTG  
 ACTTAGATGGAAAAAAACAAAATGATAAGAGACCGAGCCATCTGAAAATTCTCCTAATTGACCCACTAGGAAATGTGTA  
 TATTATTGAGCTCGTATGTGTTCTTTAAAGAAAATCTTAGTCACTGTTATTAAAGAATTCTCAGCAGTGGGA  
 GAGAACCAATATTAACACCAAGATAAAAGTGGCATGATCCACATTGCAGGAAGATCCACGTTGGGTTCTGAAATG  
 AAGACCCCATTAAAGTCTTACGCTCTGTTTGCACACTAGGAAGCGATGGCGGGATGGCTGAGGGGCTGTAAGG  
 ATCTTCATGTCTTACATGTGTGTTCTGCTGCACCTAGGACCTGCTGCCTAGCCTGCAGCAGAGCCAGAGGGGTT  
 TCACATGATTAGTCTCAGACACTGGGGCAGGTTGCATGTAUTGCATCGCTTATTCCATACGGAGCACCTACTATGTG  
 TCAAACACCATATGGTGTCACTCTCAGAACGGTGGTCATCATGGTCATTTGCTGACGGTTGGATTGGTGGTAGA  
 GAGCTGAGATATGGACGCCTTCAGCATTGTCAGCTGCTGCATAGTCTTAGGGACCTCTCCAGTCCCTACCTCAACTATCCA  
 GACTCACAGGGTCAGCCTCCAGCTCAGTCAGCTGCATAGTCTTAGGGACCTCTCCAGTCCCTACCTCAACTATCCA  
 AGAACCCAGGGGCTTGGCGTCTCAGGAGCCTGCTGCTGGGGACAGGTTGAGTTATCTGCAGTAGGTTGCCT  
 AGGCATAGTGTCAAGGACTGATGGCTGCCTGGAGAACACATCCTTGCCTCTATGAAATCTGACCTTGACATGGGGC  
 GCTGCTCAGCTGGAGGATCAACTGCATACCTAAAGCCAAGCCTAAAGCTTCTCGTCCACCTGAAACTCCTGGACCAAG  
 GGGCTCCGGCACATCCTCTCAGGCCAGTGAGGGAGTCTGTGAGCTGCACTTCCAATCTCAGGGGTGAGAGGCAGA  
 GGGAGGTGGGGCAGAGCCTTGAGCTTCCCTCCATCTGGACAGCGCTCTGGCTCAGCAGCCATATGAGCACAGGC  
 ACATCCCCACCCACCCACCTTCTGCTGCAGAATTAGGCTCTGTTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
 TATCCTCTCTTAGGAGACAGGACTCTGCAAGGAGACACTGCTTTGTAAGATACTGCAGTTAAATTGGATGTTGAGG  
 GGAAAGCGAAGGGCTTTGACCTCAGTCAGGTAACCTCTAATGGGGCTACTCTAGTGCTAG  
 ACATTGCAAGAGAGCCTCAGAACACTGTAAGTACCGAGTGTGGTAGGATTGATCCTCAGGGAGCCTGACATGTGACAGTTCA  
 TTCTTCACCCAGTCACCGAACATTCACTGACCTACCCGTAACAGGCACCGTAGCAGGTAUTGAGGGACGGGACCACT  
 CAAAGAACTGACAGACCGAACGCCTTGGAAATATAACACCAAAGCATCAGGCTCTGCCAACAGAACACTCTTAAACACTCA  
 GGCCCTTTAACACTCAGGACCCCCACCCCAAGCAGTTGGCAGTGCATCCACATTTCAGAGAGGAAAAACTA  
 GGCACAGGAGCAGTATAAGTGGCTTGCTTAAGCTGTGCACTGGTAAATGGCAGGGCTGGATTGAGACCCAGACATTCCA

[0365]

# 说 明 书

CN 1333828 B

49/69 页

ACTCTAGGGTCTATTTCTTCGTTGTCGAATCTGGGTCTACTGGGTAAACTCAGGCTAGCCTCACACTCAT  
ATCCTCTCCATGGCTTACGAGTGCTAGGATTCCAGGTGTGCTACCGTGTCTGACTCCCTGTAGCTGTCTATACCA  
TCCTCACAAACATAGGAATTGTGATAGCAGCACACACCGGAAGGAGCTGGGGAAATCCCACAGAGGGCTCCGCAGGATG  
ACAGGGGAATGCCTACACAGAAGGTGGGGAGGGAGGGAGAGGGACAGCATGGCGTGGGACCACAAGTCTATTTGGGG  
TAGCTGCCGGTAACCGTATATGGCTGGGGAGGGAGAGGTCACTGAGATGAGGCAGGAAGGCCACAGCAGGCAGCGGG  
TACGGGCTCCTTATTGCCAAGAGGCTGGATCTCCTCCTTCCGGGCTGCCTGTTCTTCCACCTG  
CCTCCCATCCAGGTCTGGCTCAGGACATACCCAGCTGCAGAAACTGGCATCACCCACGTCTGAATGCTGCCAGGG  
GCAGGGCTTCATGCACGTCAACACCAGTGCTAGCTTCTACGAGGATTCTGGCATCACCTACTTGGGCATCAAGGCCAAT  
GATACGCAGGAGTTAACCTCAGTGCTTACTTTGAAAGGCCACAGRTTCAATTGACCAAGGCCTGGCCATAAAAATGG  
TAAGGAACGTACATTCCGGCACCCATGGAGCGTAAGCCCTCTGGGACCTGCTCCTCAAAGAGGCCCAACTTGAAAAA  
GGTCCAGAAAGATCCAAAATGCCACCAACTAGGGATTAAGTGTCTACATGTGAGCCGATGGGGCACTGCATAT  
AGTCTGTGCCATAGACATGACAATGGATAATAATATTCAGACAGAGAGCAGGAGTTAGGTAGCTGTGCTCCTTCCCTT  
TAATTGAGTGTGCCATTTCATGTATGTATACATGTGTCACACATGCCATAGGTTGATACTGAACACC  
GCTTCATCGTCCCCACCCACCTTATTTTGAGGCAGGGTCTCTCCCTGATCCTGGGCTCATGGTTATCTAG  
GCTGCTGGCCAGTGAGCTCTGGAGTTCTGCTTCTACCTCCCTAGCCCTGAGCACCGTAAAGACTCTGCCACATCCCCAGCCTGT  
GCTTTATGTCGGTTGGGACTGAACTTAGGTCCTAGGCTGAGCACCGTAAAGACTCTGCCACATCCCCAGCCTGT  
TTGAGCAAGTGAACCACTCCCAAATTCGCCAGTGGGCTTCTACCCCTTTATTGGCTAGGCATTGAGTGGTC  
ACCTCGCCAGAGGAATGAGTGGCCACGACTGGCTCAGGGTCAGCAGCCTAGAGATACTGGGTTAAGTCTTCCGCTC  
GCTCCCTGAGCCGAGACAGAAAAGTAGGACTGAATGAGAGCTGGCTAGGGTCAGACAGGACAGAAGGCTGAGAGGGTC  
ACAGGGCAGATGTCAGCAGAGCAGACAGGTTCTCCCTGTGGGGAGGGTGGCCACTGCAGGTGTAATTGCCCTCT  
TTGTGCTCATAGAGGCTCCTGGTACACAGCAGCTCCCTGTGGTGGACGGTGCATACTGCTGTATCAGCTC  
CTTACAGAAGTTCTATTGACTGGTAAACGGTCAACAGCTTGGCTTGGTGGACGGTGCATACTGCTGTATCAGCTC  
AAGAGCTATTCAAGAATGAAC  
GCTCAGTGACTGGCATTCTGAACATCCCTGAAGTTAGCACACATTCCCTCTGGTGTGGCTGGCTTAACACCTCTAA  
ATCTATATTTATCTTGCTGCCCTGTTACCTCTGAGAAGCCCTAGGGCACTTCCCTCGCACCTACATTGCTGGAT  
GGTTCTCTGCCAGCTTTAACTGATCCCTGCCCTGAGCCATGGGAACAGCCAATAACTGAGTTAGACATAA  
AAACGTCCTAGCCAAAATTCAGCTAAATTAGACAATAACTTACTGGTGTGGAATCCTTAAGATTCTCATGACC  
TCCTTCACATGGCAGAGTATGAAGCTTTATTACAATTGTTATTGATCAAACACTCATAAAAAGCCAGTTGTCTTC  
ACCTGCTCAAGGAAGGAACAAAATTCACTCTTAACGATCTGTGACCTTGACAACTCCATACGAATATCTTAAGAGTAC  
TAAGATTTGGTTGTGAGAGTCACATGTTACAGAATGTACAGCTTGACAGGTGCATCTGGATGCCGAAGTGCAC  
GCTGTTCCAGCCCCCTACCTCTGAGGCTGTTGGAAAGCAATGCTCTGGAAAGCAACTTAGGAGGTAGGATGCTGGAAC  
AGCAGGGTCACTTCAGCATCCCGATGACGAATCCCGTCAAAGCTGTACATTCTGTAACAGAGACTGGGAAAGCTGCAGACTTT  
AAGGCCAGGGCCCTATGGTCCCTCTTAATCCCTGTCACACCCACCCAGGCCCTCTCCAGCCGTTCTGTGCTTCTC  
ACTCTGGATAGATGGAGAACACGGCCTTGCTAGTTAAAGGAGTGAGGCTTACCCCTCTCACATGGCAGTGGTGGTCAT  
CCTCATTCAAGGGAACTCTGGGCAATTCTGCCCTTACTCCCTTTGGACTACAGGGAAATATGCTGACTTGTGTTG  
CCTTGTTGATGGGGAGACTGGATCTTGCTGGATGTTCCCTGCTAGTTTCCCCATCCTTGCAACCCATCTA

[0366]

TATCTTACCACTAGGCATAGTGGCCCTCGTTCTGGAGCCCTGCCCTCAGGCTGGTCTCGGGGACCATGTCCCCGGTTCT  
 CCCCAGCATATGGTGTTCACAGTGTCACTGCGGGTGTTGCTGAACAAAGCAGGGATTGCATCCCAGAGCTCGGGTGC  
 TTGTGGGTACACTGCTAAGATAAAATGGATACTGGCCTCTCTATCCACTTGCAAGGACTCTAGGGAACAGGAATCCATT  
 ACTTGAGAAAAGGGCTAGGAGCAGGGAGGTAGCTGGCAGCTGAAGTGCTGGCGACTAACCAATGAATACCAGAGTT  
 TGGATCTAGACACTGGCTAACCAGAACAGAACATGAGCTCTGGCTCTGTGAGAGATCCTGCCTTAACATATAAGAGAG  
 GAAAACATTGAAGAAAGACAGTAGATGCCATTGAGCCCCACATGCACATGGACAAAGTGTGCGTTGACACACATAT  
 GCACACTGTGAGACAGGCATGCACACTCGGGCTTATCACACACATAATTGAAAGAGAGAGTGAGAGAGAGAGTGAC  
 ATTAGAGTTACAGGAAAGTGTGAGTGAGCACACCCATGCACACAGACATGTGTGCCAGGGAGTAGGAAAGGAGC  
 TGGGGTTTGTATAAGAGGGAGCCATCATGTGTTCTAAGGAGGGCGTGTGAAGGAGGCCTGTGTGGCTGGACTGGAGC  
 ATGGTTGTGAGGAGCTGCCCTGTGGGAAACAGGAGGGTGGCCACCCCTGCAGAGGGTCCACTGTCCAGCGGGATCAG  
 TAAAAGCCCTGCTGAGAACCTTAGGTAATAGCCAGAGAGAGAAAGTAGGAAAGTGGGGGACTCCATCTCTGATGTAG  
 GAGGAGCTGGGAAAGTAGAGGTGCCTTGAGGTAGAAAGAGGGGTGCAGAGGAGATGCTCTTAACTGGGTAGCAGTT  
 TCTTTCAAATAATGCCTGTGAGGAGGTGTAGGTGGTGGCATTCACTCAGCAGAGGGATGATGATGCCCGGTGGA  
 TGCTGAAATGGCCGAGCATCAACCTGGCTCTGGAAGAACTCCATCTTCAGAAGGAGAGTGGAATCTGTATGCCAG  
 CGGGGTCAACAGGTGCTGGGGCCCTGGGGACTCCACTAGCACTGGGTGATGTTATCGAGTGCTTGTGTGCCAGGCAC  
 TGGCCTGGGCTTGTCTGTGTTGTTGAGACAGACTCTGCTATGTATCCGTGTCATCTGG  
 AATCTCACTGCATAGCCCAGGCTGCGAGAGAGGGAGGGCAATAGGCTTGTAAAGCAAGCCACACTTCAGAGACTAGAC  
 TCCACCCCTGCGAATGATGACAGGTCAAGAGCTGAGTCCCGAAGATTTTTCCAGCTGCCAGGTGGAGTGTTGGAGTGGC  
 AGCTAGCGGCAAGGGTAGAGGGCGAGCTCCCTGTGCAGGAGAAATGCAAGCAAGAGATGGCAAGCCAGTGAGTTAAGC  
 TCTGTGTGGGGAGCAGGTGGATGAAGAGAGAGGCTGGCTTCCGCTCTGGGGGGGGGTGAGGGTGGGATGAGGTGA  
 GAGGAGGGCAGCTCCCTGCAGTGTGATGAGATTTCCTGACAGTGACCTTGGCCTCTCCCTCCCCACTCCCTCTT  
 TCCTTCTTCCCACCATGCTTCTGTGAGAAATTCTGAGTTCCACTTCAGGTGATGCAAGACGGAAACAGA  
 AGCCGT  
 GTATGTGTGTCACTGGGAAATGGCTCATAGTCTGCAGGAAGGTGGCAGGAAGGAATAAGCTGTAGGCTGAGGAGTGTGG  
 GATGCAGGGAGAGAGGGAGAGGGATACCAAGAGAAGGAATAAGGGAGCTACAAGAGGGCATGTGTGGGGGTGTGT  
 TGT  
 GT  
 AACTGGAGTTGGAGGGAGGTGTGAGTCCCTGACATGTTGCTGGAACTGAACCCGGTCTATGCAAGAGCAGGAAGT  
 GCAGTTATCTGCTGAGCCATCTCCAGTCCTGAATCCATTCTTAAACATACAGTGGCAGAGACATGATGGGATT  
 CGTATGGATTAAATGTGGCGTCATTAAGTCCGGCACAGGCAAGCACCTGTAAAGCAGTACCCACAAACCGAACAGTGA  
 ATGTGACCATCACCCCCATGTTCTCATGTCCCCCTGTCCCCCTCATCCTCCATTCTCAAGCACCTCTGCTCTGCCT  
 TCGCTGGAGAACAGTGTGCATCTGCACACTCTTATGTCAGTGAAGTCACACAGCCTGCACCCCTCCTGGTCTGAGTATT  
 TGGGTTCTGACTCTGCTATCACACACTGTACTGCATTCTCGCTCTTTTTAAACATATTTTATTGTTGT  
 GTGTATGCACATGTGCCACATGTGTACAGATACTATGGAGGCCAGAAGAGGCCATGGCCGTCCCTGGAGCTGGAGTTACA

GGCAGCGTGTGAGCTGCCTGGTGTGGGTGCTGGGAACCAACTTGAACTAAAGCAAGCACTTTAAC TGCTGAGGCAGC  
 TCTCAGTACCCCTCTTCATTTCTCCGCCTGGGTTCCATTGTATGGACACATGTAGCTAGAATACTTGCTTATCTAATTA  
 TGTACATTGTTTGTGCTAAGAGAGAATGCTCTATAGCCTGAGCTGGCCTCACCTGCCATCCTGCCCTCAGCC  
 TCCTCCTCCTGAGTGCTAGGATGACAGGGAGTGTTAACATGGTTCATGTTTGTCAAGACTGAAGGATAACAT  
 TCATACAGAGAAGGTCTGGGTACAAAGTGTGCAGTTCACTGAATGGCACAACCGTGTCAAGAAAACAAACTCAGGGG  
 CTGGAGAGATGGCACTGACTGCTCTCCAGAGGTCCGGAGTCAATTCCCAGCAACCACATGGTGGCTCACAGCCATCTA  
 TAACGAGATCTGACGCCCTTCTGGTGTCTGAAGACAGCTACAGTGTACTCACATAAAATAAAATCTTTAAAC  
 ACACACACACACACAATTACCAACCCAGAAGCCCACTCCATGTTCCCTCCACGTCTGCTCACAGTACTCCCAGGTT  
 ACCACTGTTCAAGGTTCTAACACCTGGTTACTTGGGCTCTTCTGCTGTGGAGGCCACACATTGTGTGCTCAT  
 ACACGTTCTTCTAGTAAGTGCATATTACTCTGCTTTACATGTATTATTATTGTAGTTGTGTGCGTGTGGC  
 CCATGCATGGCACAGTGTGTGGGGATGTCAGAGTATTGTGAAACAGGGGACAGTTCTTTCTCAATCATGTGGGTTCCAG  
 AGGTTGAACTCAGGTCATCATGTGTGGCAGCAAATGCCCTAACCACTGAGACATCTCCATATTCTTTTTCCCTG  
 AGGTGGGGCTTGTCCATAGCCCAACTGGCTTGCACTTGCAGTTCAAGTGACTIONCCCTGTCTCCACCTCTTAGAGTA  
 TTGGAATTACGATGTGACTACCACACTGACTGGATCATTAATTCTTGATGGGGGGGGGGAGCGCACATGCTGCAGG  
 TGAAGGGATGACTGGACATGAGCGTGGAGGCCAGAGAACAGCTCAGTCTAATGCTCTCCAACTGAGCTATTG  
 GGTGGCCAGAGAACACTTACAGAAAGTTCTCAGTGCCTGCACTGAGCTCATTAATTCTTTAAAAAGACTTATTAGGGGGC  
 TGGAGAGATGGCTAGCCGTTAAGAGCACCGAATGCCCTCCAGAGGTCTGAGTTCAATTCCCAGCATGCCATTGCTGG  
 GCAGTAGGGGGCGCAGGTGTTAACGTGAGTAGCTGTTGCCAGTTCCGGGGTGGAGAACCTCTTGACACCCCTGCTGTC  
 CCTGGTCATTCTGGTGGTGATGGTATGCTTGTATGGAAGCCTTGTACAGTGAAGTTGGCTTCCA  
 CAGTTACCACTGCCTCCCCCTGTTCTGCAGGCCGGTGCTGTCATTGCCGAGGGCTACAGCCGCTCCCCAACGCTA  
 GTTATGCCCTACCTCATGATGCCGAGAGTGGACGTCAAGTCTGCTCTGAGTACTGTGAGGCAGAACGTGAGATCGG  
 CCCAACGATGGCTTCTGGCCAACCTCTGCCAGCTCAATGACAGACTAGCCAAAGGAGGGCAAGGTGAAACTCTAGGGTG  
 CCCACAGCCTTTTGCAAGAGGTCTGACTGGGAGGGCCCTGGCAGCCATGTTAGGAAACACAGTATACCCACTCCCTGC  
 ACCACCAAGACACGTGCCACATCTGCCCACCTGGTCCTGGGGCCACTCCACCCCTAGGGAGCACATGAAAGCCTC  
 CCTAAGAAGTTCTGCTCCTAGCCATCCTTCTGTAATTATGCTCTCCCTGAGGTGAGGTTCAAGTTATGCTCC  
 TCTGTGGCATAGATACTCATGTCAGTGAACCAAGGGTGGGAGGGCTATCAGGGTGCATGCCGGGACACGGGCACTCT  
 GACCCCTCCCCACCTGGGTTCTCTGTCAGAGGCCAGACGCCCTGCTGAGGCAGACGAATGACATTAAGTCTGAAAGCAG  
 ACCTCCCCATGTCCTGGCCTCACAGCCGACACGCCCTGCTGAGGCAGACGAATGACATTAAGTCTGAAAGCAG  
 AGTGGAGATAGATTAGTGAATAGATTCCAAAAAGAAGGAAAAAGGCTGCATTAAATTATTCTTAGAATTAA  
 AGATACTACATAGGGGCCCTGGTAAGCAAATCCATTTCAGGGCTATCTGATTCAGGGATGGCTCTGTTCTTGTTAGA  
 GCCTTGCCAGAGAGCTACGATCTATATCTGCTGCTCAGAGCCCTCCCTGAGGGATGGCTCTGTTCTTGTTAGA  
 AGAGCGATGCCCTGGCAGGGTTCCCTTTCAGAATACAGGGTGTAAAGTCCAGCCTATTACAAACAAACAA  
 CAAACAAACAAAGGACCTCCATTGGAGAATTGCAAGGATTATCCTGAATTATAGTGTGGTGAAGTTCAAGTCATCAC  
 GCCAAGTGCCTGCCATCTGGTCTATTCTAAGAATAATTAGGGAGGAGGAACCTAGCCAATTGCAAGCTCATGTC  
 GTGTGTGCACGGGTGCATATGTTGGAAGGGGTGCCTGTCCTGGGACAGAAGGAAATGAAAGGCCCTCTGCTCAC

[0368]

CCTGGCCATTACGGGAGGCTCTGCTGGTCCACGGTGTCTGCAGGATCCTGAAACTGACTCGCTGGACAGAAACGAG  
 ACTTGGGGCACCATGAGAATGGAGAGAGAGAGAGCAAGAAAAGAAAACAGCCTTAAAGAACCTTCTAAGGGGGTTTT  
 TGAACCTCGCTGGACCTTGATGTGTGCACATTGCCAGAGATTGAACATAATCCTCTGGGACTTCACGTTCTCATTAT  
 TTGTATGTCTCGGGGTACGCAGAGCGTCAGCCACCACCCAGCACCCGGCACATAGGCCTCTCATAAAAGCCCATT  
 TATGAGAACCAAGAGCTGTTGAGTACCCCGTGTATAGAGAGAGTTGTTGTCGTGGGACCCGGATCCAGCAGCCTGGT  
 TGCCCTGCCTGAGGATGTCTTACAGGAGTTGCAGAGAACCTCCTGGAGGGAAAGAAAATATCAGGGATTTTGTGA  
 ATATTCAAATTCACTGTTAACGTAAAGACTCAGCAGTGTCTAGGTTAACGTAAAGGAACTGCCTTCCAGAGCTGCT  
 GCAAGAGGCAGGAGAACGAGACCTGTCTAGGATGTCAGCCAGGGTAAGACCTCTGATCACAGCAGGAGCAGAGCTG  
 TGCAAGCTGGATGGTCATTGCCCCATTCTGTGACCCAGCAACCTGGTCACATAGGGCTGGTCATCCTTTTTTT  
 TTTTTTTTTTTTTGGCCCAAAGATGAAGTGCATTCAAAATAACACTGTAGAGTTGACAGAACTGGTTAGTGTGTTAGAGAGAGGAAA  
 GAGAGGAAAGAACAAAACAAAACACCACAAACCAAAACATCTGGCTAGCCAGGCATGATGCAATGTCTACAG  
 GCCCAGTTCATGAGAGGCAGAGACAGGAAGACCGCCGAGGTCAAGGATAGCATGGTCTACGTATCGAGACTCCAGCCA  
 GGGCTACGGTCCCAAGATCCTAGGTTGGATTGGCTTGGGTTGGAGACAGGGTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTG  
 TCCTGGAACCTCGCTCTGTAGACCAGGCTGGCTCAAACTTAGAGATCTGCCTGACTCTGCCTTGAGGGCTGGACGAAT  
 GCCACCACTGCCAACTAAGATTCCATTAAAAAAAGTTCAAGATAATTAGAGTTGCCAGCTCGTTAAAGCTAA  
 GTAGAAGCAGTCTCAGGCCCTGCTGCTGAGGCTGTTGGCTGGACCTGAAATCTGCCCAACAGTGTCCAAGTGC  
 CATGACTTGGCCATCTCCAGAGAAGGAAGTGAAAATTGTGGCTCCCCAGTCGATTGGACACAGTCTCTTGTCTA  
 GGTAACACATGGTACACATAGCATTGAACTCTCCACTCTGAGGGTGGGTTCCCTCCCCCTGCCTTCTGGGTTGGC  
 AACCCATAGGACAGCCACAGGACAGTCACTAGCACCTACTGGAAACCTCTTGTGGGAACTGAAGAAAAGAGCCTTGGG  
 AGATTCTGGCTTCCATTAGGGCTGAAAGTACAACGGTTGGCTGGCTGGCTGGACCTGAAATCTGCCCAACAGTGTCCAAGTGC  
 TTCTTCAGGTAATAACCGATGTTGAAAAGCCAACCCGGCTGCCGTGAGTAGGGGGTGGGAAATCCTG  
 GATAGTGTCTATCCATGGAAAGTGGTGGAAATAGGAATTAGGGTGTCCCTCCCCCCCCCAACCTCTCAGACCCAG  
 CCACTTTCTATGACTTAAACATCCAGGTAATAACATAAAAATGGTTCTCTCAATCTTCTAAAGTCTG  
 CCTGCTTCCAGGGTAGGTCTGTTCTTGCTGTTCTGAGAGCACAGACTAACACTTACCAAAATGAGGG  
 AACTCTGGCCACTAAAGCTTCTGGCTCCAGCACTCTTAAGTTATTAAAGAATTCTCACCTGGCTTAGCAC  
 ACCCGCCACCCCAAGTGGGTGAGGATAATGCCATGGCCAGCAGGGGGACTGTTGAGGCGGGTGCCTTCCACCTTAAG  
 TTGCTTATAGTATTAAAGATGCTAAATGTTAACTCAAGAGAAGCACTGATCTTAACTACGAGGATAAGAGATTTCTC  
 ACAGGAAATTGTCTTTCTGCAATTCTTACAGGCTTGTGCTGATCGTAGCATAGAGAGAATAGCTGGATATTAACT  
 TGTATTCCATTCTGCTGCCAGCGTTAGGTTAACTCCGTAAGGTGATTGAGTCAGTGGACCGAAGAGGCTCAGAGGGCAGG  
 GGATGGTGGGGTAGGCAGAGCACTGTCACCTGCCAGGCATGGGGGTCTGCCATCCGGAGGAAAGGAAAGTTAGC  
 CTCTAGTCTACCACCAAGTGTAAACGCACTCTAAAGTTGTAACCAAAATAATGTTACATTACAAAGACGTCTGTTTG  
 TGTTCTTGTGTTGGCTTTATGTGTGCTTATAACTGCTGTGGTGGTGTGTTAGTTGAGGTAGGA  
 TCTCAGGCTGGCCTGAACTCTGATGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTCAAGTGTAGGACT  
 AAAAGCACATGCCACACACCAGTACAGCATTCTCAACATTAAAAATAATCACCTAGGGCTGGAGAGAGGGTTCCA  
 GCTAAGAGTGCACACTGCTTGGTAGGACCTGAGTTAGTCCCAGAACCTATACTGGGTGGCTCCAGGTCCAGAGGA

[0369]

TCCAGGACCTCTGGCCTCCATGGCATCTGCTTTAGCATAACCCACATACAGMTACACACATAAATAAAATGAAC  
 CTTTAAAAACCTCTAAAACCTAACCCTGGGAGGTACGACTCTGGAAAGCTGGCATACTGTGTAAGTCCATCTCATGGTG  
 TTCTGGCTAACGTAAGACTTACAGACAGAAAAGAPCTCAGGGTGTGCTGGGGTTGGATGGAGGAAGAGGGATGAGT  
 AGGGGAGCACGGGAACTTGGGAGTGAATAATTCTTSCAGGACACTAGAGGAGGATAAAATACAGTCATTGCACCCAC  
 TACTGGACAACTCCAGGGATTATGCTGGGTGAAAAGAAGAGGCCAGGTATTGGCTGCATTGGCTGCATTGCGTAAC  
 ATTTTTTAAATTGAAAAGAAGAAGATGTAARTCAAGGTTAGATGAGTGGTTGCTGTGAGCTGAGAGCTGGGTGAGTGA  
 GACATGTGGACAACTCCATCAAGGAGCGACAGAAAAGAAGGGCTGTGGTACAGCTACCTCTAAATCTCACCTCCGGAG  
 GTGATCAAGGTTAGCCCTCAGCTAGGCTGTGGTGCATGAGACUCTGTTCAAAACTTAAATAAGAAATAATGAAAGA  
 GACATCAGGGCAGATCCTGGGCGAAGGCGGACAGGCGAGTCTGGTAAGGCGTGTAGAAGCGGATGCATGAGCA  
 CGTCCGCAGGCATCATGAGAGAGGGTAGGTAAGTAAAGGATGGATGTGAGTGTGTCGGCGTGGCGACTGCACGTCT  
 GGCTGTGGTGTGGACTGGCATCTTGGTGAGCTGGGGAAATGGTAGGGAGGATCATAAATCCCTCCGAATTAT  
 TTCAGAAACTGTCTATTACATTATCTCAAAATATTAAAGAAGPATTAAAAACAAACCTATCCAGGTGTG  
 GTGGTGTGCACCTATAGCCACGGGCRGGAAAGCTGGCAAGAGGATGGCGAGTTGAAGGTATCTGGGCTGTACA  
 GCAGACCGTCGCCCCAACCALACCAACAGCAACCCATTATGTCACACAAGAGTGTGTTATAGTGAGCGGCCTCGCT  
 GAGAGCATGGGGTGGGGTGGGGGACAGAAAATCTAAACTGCAGTCATAAGGGATCCACTGAGACCCCTGGGG  
 TTGACTGCACTTAACCTGGGAAATGATAAGGTTTGTTGAGTAAAGCATCGATTACTGACTTAACCTCAAATGA  
 AGAAAAAGAAAAAGAAAACACAAAGCCAAACCAAGGGCTGGTAGATGGCTCAGTGGTAGAGAGCACCCGACTGC  
 TCTCCGAAGGTCCAGAGTCAATCCCAGCAACCACATGGGCTCACAACCCTGTAAACGAGATATGATGCCCTCT  
 CTGGTGTCTGAAGACAGCTACAGTGTACTTACATATAATAATAATCTTAAAAAAGCCAA  
 CCGACGAAACCAAGGCCCCAACAGAGGGCAGGACAGCAGGACCCAGGAGCCATCCTGTGAAAGGCAGGGCTACC  
 CATGGGCGAGGGGTCCAGAGAGTAGGCTGGTAAGCTCAGTTCTCTGTATACCCTTTCTGTTGACACTACTTC  
 AATTACAGATAAAATAACAAATAACAAATCTAGAGCCTGGCACTCTGCTCGCTGATTTCCTGTTACGTCCAG  
 CAGGTGGCGGAAGTGTCCAAGGACAGATCGCATCATTAGGTGGCAGCATAATCTCCATCAGCAGGTGGTGCTGTGA  
 GAACCATTATGGTGTCAACAGAATCCCAGGGCCAGGAGCTGCCCTCTCCAAAGTCTGGAGCAATAGGAAAGCTTCTGGC  
 CCAGACAGGGTTAACAGTCACATTCCAGAGCAGGGAAAAGGAGACTGGAGGTACAGACAAAAGGGCAGCTCTAAC  
 AACCTCACAGCTGGTAGGAGAGATAGATCACCCCCAACATGGCACAGCTGGTTTGCTGCCCTGAAGGAAACTGA  
 CTTAGGAAGCAGGTATCAGACTCCCTTGAGGGACTTCTGCTGCCTGTAAGCTGTCAAGCAGCTGCATTGAT  
 GTGTGGGTGACAGAAGATGAAAAGGAGGACCCAGGCAGATGCCACAGATGGACCCGCACTTACAAGTCGAGGCAGGTG  
 GCAGAGCCTTGCAGAAGCTGCAAGGTGGACGACACTGATTACCCAGTTAGCATACCAAGCAGGGCTAGGCAGGACC  
 ACAGCCTCCTCCAGTCTCCAGGGCTGGGAGTCCTCCACCTCTGTCTCAGTGCAGCTCCGCCAGCCCCCTCC  
 TCCTTTGCACCTCAGGTGTGAACCTCCCTCTCCTCTCCCTGTGGCATGGCCCTCTGCTACTGCAGGCTGAGCA  
 TTGGATTCTTGCTTAGATAGACCTGAGATGGCTTCTGATTATATATATCCATCCCTGGATCTTACATCT  
 AGGACCCAGAGCTGTTGTGATACCATAGAGGCTGGGAGATGATATGGTAAGAGTGTGCTGTACAAGCATGAAGAC  
 ATGAGTTGAATCCCCAGCAACCATGTGGAAAAATAACCTCTAACCTCAGAGTTGAGGGAAAGGCAGGTGGATCTGG  
 GGGCTTACTGGCCAGCTAGCCAGCCTAACCTAAATGTCTCAGTCAGAGATCCTGTCTCAGGGATAACTGGGAGAATGA  
 CTGAGAAAGACACCTCCTCAGGTCTCCATGCACCCACACAGACACACGGGGGGGGTAATGTAATAAGCTAAGGAAATA

ATGAGGGAAATGATTTTGCTAAGAAATGAAATTCTGTGGCCGCAGAGCCTGGCCAGGAAGGAACCGCTTC  
 GCACACCAGCCTATAAGTCACCATGAGTTCCCTGGCTTAAAGAATCACATGTAATGGAGCCCAGGTCCCTCTTGCTGGTGG  
 TTGCGCTCTCCCACTGGTTTGAAAGAGAAATTCAAGAGPAGATCTCCTGGTCAGAATTGTAGGTGCTGAGCAATGTGGAGC  
 TGGGGTCAATGGGATTCCCTTAAGGCATCCTCCCAGGGCTGGGTCACTTCATACTTAGTAGGGTGCTTGACAGCAAGC  
 GTGAGACCCCTAGGTTAGAGTCCCCAGAATCTGCCCPACCCCCAAAAGGCATCCTCTGCCTCTGGGTGGGGGG  
 GAGCAAACACCTTAACTAAGACCATTAGCTGGCAGGGTAACAAATGACCTTGCTAGAGGAATTGGTCAAGCTGGAT  
 TCCGCCTCTGTAGAAGCCCCACTTGTTCCTTGTTPAGCTGGCCACAGTTGTTTGAGAATGCCTGAGGGGCCAG  
 GGAGCCAGACAATTAAAGCCAAGCTCATTGTATATCTGAPAAACCACAGCCTGACTGCCCTGCCGTGGGAGGTACTGG  
 GAGAGCTGGCTGTGTCCTGCCTACCAACGCCCUCCCCAACACACACTCCTGGGTCACTGGGAGGTGCCAGCAG  
 CAATTGGPAGTTACTGAGCTTGAGAAGTCTGGGAGGGCTGACGCTPAGCAGCACCCTCTCCACCCCCCCCCACCCC  
 ACCCCCCGTGAGGAGGGTGGAGGAAACATGGGACCAAGCCTGCTCCAGCCGTCTTATTGGCTGGCATGAGGAGAGG  
 GGGCTTAAAGGCAACCGTATCTAGGCTGGACACTGGAGCCTGTGCTACCGAGTGCCTCCTCCACCTGGCAGCATGC  
 AGCCCTCACTAGCCCCGTGCCTCATCTGCCTACTTGTSCACGCTGCCTCTGTGCTGTGGAGGGCCAGGGTGGCAAGC  
 TTCAGGAATGATGCCACAGAGGTATCCCAGGGCTTGGAGAGTACCCCGAGCCTCTCTGAGAACACCCAGACCATGAA  
 CCGGGCGGAGAATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCAAAGGTACGGGATGAGAACAGCACATTAGTGGGG  
 GGGGGGTCTGGGAGGTGACTGGGTGGTTTAGCATCTTCTCAGAGGTTGTGTGGGTGGCTAGCCTCTGCTACATCA  
 GGSCAGGGACACATTGCTTGGAGAAGAATACTAGCACAGCATTAGAACCTGGGAGGGCAGCATTGGGGGCTGGTAGAGAGC  
 ACCCAAGGCAGGGTGGAGGCTGAGGTCAAGCCAGTGGCATTAAACACGGGATGGCTTGTATGATGGTCCAGAGAAC  
 TCCTCCTAAGGATGAGGACACAGGTCAAGATCTAGCTGCTGACCAGTGGGAAGTGATATGGTAGGGCTGGATGCCAGATG  
 CCATCCATGGCTGTACTATATCCCACATGACCACCACTGAGGTAAAGAACGGCCCAAGCTTGAAGATGGAGAACCCAGA  
 GGCTCCTGAGATAAGTCACCTGGGAGTAAGAACAGAGCTGAGACTGGAAAGCTGGTTGATCCAGATGCAAGGCACCCCTAG  
 ATTGGGTTGGGTGGGAAACCTGAAGCCAGGGAGGAATCCCTTAGTCCCCCTGCCAGGGCTGCTCAATGAGCCAGA  
 GGGTTAGCATTAAAGAACAGGGTTGTAGGTGGCATGTGACATGAGGGCAGCTGAGTGAATGTCCCCTGTATGAGCA  
 CAGGTGGCACCACTTGCCTGAGCTGCACCCCTGACCCAGCTTGCCTCATTCCTGAGGACAGCAGAACACTGTGGAGGC  
 AGAGCCAGCACAGAGAGATGCCTGGGTGGGGTGGGTATCACGCACGGAACTAGCAGCAATGAAATGGGTGGGGTGG  
 CAGCTGGAGGGACACTCCAGAGAAATGACCTGCTGGTACCCATTGTGTGGAGGAGAGCTATTTCAGCTTGCAC  
 CACATGCTGTCCTCCTGTCTCCTAGCCAGTAAGGGATGTGGAGGAAAGGGCCACCCCAAGGAGCATGCAATGCAGTCA  
 CGTTTTGCAGAGGAAGTGTGCTGACCTAAGGGCACTATTCTGGAAAGCCCAAAACTAGTCCTTCCCTGGCAACAGG  
 CCTCCCCACATACCACCTCTGCAGGGGTGAGTAATTAAGCCAGGCCACAGAAGGGTGGCAAGGCCTACACCTCCCC  
 GTTGTGCCCCCCCCCCCCCGTGAAGGTGCATCCTGGCCTCTGCCCTCTGGCTTGGTACTGGATTTTTTTCTT  
 TTATGTCATATTGATCCTGACACCATGGAACCTTGGAGGTAGACAGGACCCACACATGGATTAGTTAAAGCCTCCAT  
 CCATCTAAGCTCATGGTAGGAGATAGAGCATGTCCAAGAGAGGGCAGGCATCAGACCTAGAACAGATATGGCTGGGCAT  
 CCAACCCAACTCCTCCCCGGAGAACAGACTCTAAGTCAGATCCAGCCACCCCTGAGTAACCAAGCTCAAGGTACACAGA  
 ACAAGAGAGCTGGTATACAGCAGGTGCTAACAAATGCTGTGGTAGCAGGAAAGCTATAGGTTGGTCAGAACACTCCG  
 CCCAAGTCGCGAGTGAAGAGCGAAAGGCCCTACTCGCCACGCCGCCCCACCTGGGGCTTATAACAGATCACTT  
 TCACCCCTGCGGGAGGCCAGAGAGCCCTGGCATCCTAGGTAGCCCCCCCCGGCCCCCCCCCAAGCAGCCAGCCCTGCC

[0371]

# 说 明 书

CN 1333828 B

55/69 页

TTTGGGGCAAGTCTTCTCAGCCTGGACCTGTGATTAATGAGGGGGTTGGACGCGCCCTTGGTCGCTTCAGTCT  
AATGAATTCTTATCCCTACCACCTGCCCTCTACCCCGCTCCTCCACAGCAGCTGTCTGATTTATTACCTTCATTAC  
CTCCACTCCTTCTCCATCTCTGGATACCGCCCTGTCCCAGTGGCTGGTAAAGGAGCTTAGGAAGGACCAGAGCCAG  
GTGTGGCTAGAGGCTACCGCAGGGCTGGGGATGAGGAGCTAAACTGGAAGAGTGTTGGTTAGTAGGCACAAAGCCTT  
GGTGGGATCCCTAGTACCGGAGAAGTGGAGATGGGCGTGAGAAGTTCAAGACCACCATCCTTAACACAGCCAGT  
TTGAGGCCAGCCTGGCTACATAAAACCAATCTCAAAGCTGCCAATTCTGATTCTGTGCCACGTAGTGCCCCATGTA  
ATAGTGGATGAAGTCGTTGAATCTGGGCAACCTATTTACAGATGTGGGGAAAGGCAACTTAAGTACCCGTGCCAC  
GATCACAAAGAAAGTAAGTGAACAGCTCCAGTGTTCATCCCTGGGTTCAAGGACAGGGAGAGAGAAGGCCAGGGTGG  
ATCTCACTGCTCCUCGGTGCCTCCTCTATAATCCATACAGATTGAAAGGGCAGGGCAGGTGGTGGAAAGGAGAG  
GGTGGAGGAGCAGACCAGTCTGGCCTAGGCTGCAGCCCTCACGCATCCTCTCTCCGAGATGTGTCCGAGTACAGCT  
GCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTCCTGACAGACGGCCATGCCGAGGCCAAGCCGTACCGAGTTGGTGTGCTCC  
GGCCAGTGCAGGCCCGCGCGCGCTGCTGCCAACGCCATGGGCGCGTGAGTGGTGGCGCCGAACGGACCGGATTTCCG  
CTGCATCCGGATGCTACCGCGCGAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCGGGGGCGCGCGCGCTCGCGCAAGGTGC  
GTCTGGTGGCCTCGTGCAGTGCAGCGCCTCACCCGCTTCCACAAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGCCGGAGGCC  
GCCAACCTTCCAGACCGTGTGGAGTTCCCAGCCCAGTAGAGACCGCAGGTCTCTGCCAGTGGAGAAGGCCAAGG  
GGTGGGTTCCCGCGGGCCAGGAAGGAGCTTGAGTCCCAGACTCTGCCAGGCCAGGGGGATGGGGAG  
CCCTCGCCGGACCTATAAGGACAAGGCAGTGTTCACCTTAAAGGGAGGGAGTGTGGAACGAAAGACCTGGACTGG  
TTATGGACGTACAGTAAGATCTACTCCTCCACCCAAATGTAAAGCCTGCGTGGCTAGATAGGGTTCTGACCCCTGACC  
TGGCACTGAGTGTGATGTTGGCTACGTGGTTCTCTTGGTACGGTCTCTTGTAAAAATAGGGACCGGAACCTCTG  
GAGATTCCAAGGATTGGGTACCCCGTGTAGACTGGTGAGAGAGAGGAGAACAGGGAGGGGTTAGGGAGAGATTGTGG  
TGGCAACCGCCTAGAAGAAGCTTTGGCTCCAGCCTCGCCGCTCAGAGGTTGGCTCCCCACTCCTCC  
TCATACTGCTTCAATCCATATCTGGATAGGGAGGCCAGGGTCCGAGAGATGGTGGAAAGGCCAGAAATCACACTC  
CTGGCCCCCGAAGAGCAGTGTCCGCCCAACTGCCCTGTCATATTGTAAAGGGATTTCTACACAACAGTTAAGGT  
CGTTGGAGGAAACTGGCTGCCAGTCACCTCCCACCTTGCCAGGACACCAACCTCTGCCACCCACGG  
ACACATTCTGTCTAGAAAACAGAGCGTCGTCGTGCTGTCCCTGTAGACAGCATATCTTACATTAAAAGAATAATACGGG  
GGGGGGGGCGAGGGCGCAAGTGTATACATATGCTGAGAGAGCTGTCAAGGCGCACAGCACCCACAAATTTTGT  
AAATCATTCCAGACACCTCTTACTTCTGTGTAGATTTAATGTTAAAAGGGAGGGAGAGAGCGTTGTAAAGAA  
GCACATGGAGGGGGGGTAGGGGGTTGGGCTGGTAGTTGGCAACTTCCATGTGAGACTCATCCACAAAGACTGA  
AAGCCGCGTTTTTTAAGAGTTCAGTGACATATTATTTCTCATTTAAGTTATTATGCAACATTTCCTTG  
TAGAGAAAGGCAGTGTAAATATGCTTGTGAAGCACAAGTGTGTGGTTTTGTGTTTTGTTTCCCGACCAGA  
GGCATTGTTAATAAGACAATGAATCTGAGCAGGAGGCTGTGGCTTGTCAACCACACACAATGTCTGCCACT  
GTCATCTCACTCCCTCCCTGGTACAAGACCCAAACCTGACAACACCTCCGACTGCTCTGGTAGCCCTGTGGCA  
ATACGTGTTCTTGGTAAAGTCACATTGATCTCTTGTGAAACCTGGCTCTCATCCCCAGCTGGTCATCGTCAT  
ACCCCTACCCAGCCTCCCTTAGCTGACCACCTCCACACTGTCTCCAAAAGTGCACTGTTCACCGAGCCAGTCCCT

[0372]

GGTCCAGGT CATCCCATTGCTCCTCCTTGCTCCAGACCCCTCTCCCACAAAGATGTTCATCTCCCACCCATCAAGCCCC  
 AGTGGCCCTGCGGCATCCCTGTCCTTCAGTTAGCTGAATCTACTTGCTGACACCACATGAATTCCCTCCCTGTCTTA  
 AGGTTCATGGAACCTTGCCTGCCCTGAAACCTTCCAGGACTGTCCCAGCGTCTGATGTGTCCTCTCTGTAAAGGCC  
 CACCCCACTATTGATTCCCAATTCTAGATCTTCCCTGTTCAATTCCACGGGATAGTGTCTCATCTGCCAAGTCC  
 GCTTGATATTGGGATAATGCAAAGCCAAGTACAATTGAGGACCAGTTCATCATGGGCCAAGCTTTCAAAATGTGAA  
 TTTTACACCTATAGAAGTGTAAAAGCCTCCAAAGCAGAGGCAATGCCTGGCTTCCATCAGGGCTCTGCTT  
 TATGGGCTGGTGGGAGTACATTCAAAACCCAAACACTAGGGGTGTGAAAGCAAGATGATTGGGAGTTGAGGCCAAT  
 CTTGGCTATGAGGCCCTGTCACCTCTCCCTCCCTCCAGGGTTTGTGTTGTTTGTGTTTGTGATTGAAACTG  
 CAACACTTTAAATCCAGTCAGTCATCTTGCGTGAGGGAACTCTATCCCTAAATATAAAGCTTCCATCTTGATTTGTG  
 ATGTGCACACTGGGGTTGAACTGGGCTTGTACCTGCCGGCAAGCTCTACTGCTCTAAACCCAGCCCTCACTGG  
 CTTCTGTTCAACTCCAAATGAATTCCCTAAATGAATTATCAATATCATGTTGAAAAAAATACCAATTGAGTGCTGCT  
 GGTGTCCTGTGGTCCAGATTCCAGGAAGGACTTTCAAGGAATTCCAGGCATCCTGAAGAATGTCCTAGAGCAGGAGGC  
 CATGGAGACCTTGGCCAGCCCCACAAGGCAGTGTGGTGAGGGTGAGGATGGAGGCAGGCTGCAATTGAAGCTGAGA  
 CAGGGTACTCAGGATTAAGGCTCCCAAAACAAATTCCAAGATCAGTTCTGGTACTTGCACCTGTCAGCTATGCA  
 GAGCCCAGTGGCATAGGTGAAGACACCGTTGTACTGTCATGTAATCTGTGCTTCAAGAGCCGGCAGAGACAAATAAT  
 GTTATGGTACCCCCAGGGACAGTGAATTCCAGAACAGAACACAGAACAGAGAGTGCTGCTAGAGGCTGCCGTGAAGGAGAAGGG  
 GTCCCAGACTCTAAAGCAAAGACTCCACTCACATAAGACACAGGCTGAGCAGAGCTGGCCGTGGATGCAGGGAGCCCA  
 TCCACCATCCTTAGCATGCCCTGTATTCCATCACATGCCAGGGATGAGGGCATCAGAGAGTCCAAAGTGAATGCCAA  
 ACCCAAACACACCTAGGACTTGCTTCTGGACAGACAGATGCAGGAGAGACTAGGTTGGCTGTGATCCATTACACAA  
 AAGAGGGAAAAAAACAAAAACAAACAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACCCAAAGGTCCAAATTGTA  
 GGTCAGGTTAGAGTTTATGGAAAGTTATTCACCTCCATGGGCTACAAGGCTGGGCCATCAGAAAGAACA  
 AACAAACAGGCTGATCTGGAGGGTGGTACTCTATGGCAGGGAGCACGTGTGCTTGGGTACAGCCAGACACGGGCTTG  
 TATTAATCACAGGGTTGTATTATAGGCTGAGAGTCAGCAGAACAGAGAGACAGAACAGAACACACACACACACA  
 CACACACACACACACACATGCACACACACTCACTTCTCACTCGAAGAGGCCACTTACATTCTAAGAACAAAC  
 ATTCCCTCTCATAAAGGAGACAAAGTTGCAGAACCCAAAAGAGCCACAGGGTCCCCACTCTCTTGAATGACTGGAC  
 TTGTTGCAGGGAAAGACAGAGGGCTGCAAGAGGCTTCTGGGTGACCCAGGCCACAGACACTGAATCTGGTGTGAGA  
 CCTGTATAACCCCTTCCACAGGTTCCCTGAAAGGAGCCACATTCCTGTCCTGACACTGAGGATGAGGATGAGA  
 GCACCTGGCCTCCCCATTCTGGAGTGCACTCCGGTTCCCTGAGGGCACATGAGGCTCTAGGTCTGGAAAG  
 TTCCACAAAGTATTGAAAGTGTCTTGTGTTGATTAAATTAGGCTGAGGTGTTGCTTGAATATATGCCT  
 GTGTAGCATTACAGCCTGGTGCCTGAGGAGATCAGAAGATGGCATCAGATACCCCTGAACTGGACTTGCAGACAGTTA  
 TGAGCCACTGTGTGGGTGCTAGGAACAGAACCTGGATCCTCCGGAAAGAGCAGACAGGCCAGCGCTCTAGCCACTAAGCCA  
 TCACTGAGGTTCTTCTGTGGCTAAAGAGACAGGAGACAAAGGAGAGTTCTTGTCAATAGGACCATGAATGTTCC  
 CGTAACGTGAGACTAGGGCAGGGTGAATCCCCAGTGACACCGATGCCCTGTGAGTTATTAGCAGCTCTAGCTTATT  
 CTTAATAAGTCCAGTTGGGGCAGGAGATATGTATTCCCTGTTGAAAGTGGCTGAGGTCCAGTTATCTACTTCCAAGT  
 ACTTGTGTTCTCTTGTGGAGTTGGGGAGCTCCCTGCCCTGCTGTAATGTGTCCTTCAACCTTAGACAAGATCAC  
 TTTCCCTGAGCAGTCAGGCCAGTCCAAAGCCCTCAATTAGCTTCAATAAGGAACACCCCTTTGTTGGGTGGAGGTAG

[0373]

[0374]

ATTGTGTGATT GTGTGTGACTCTGATGTCACATGCTCATCTGCCCTATGAGTTGAAAACCAAATGGCCCTGAGAGG  
 CATAACAAACCGCACTGTTGGCTGTGTGCTCACGTTTCTTAAAGCGCTGTCTGGTTGCTGCTAGCATCAGGCAGACT  
 TGCAGCAGACTACATATGCTAGCCCTGAAGTCCTCTAGGGTGCATGTCCTCAGAATTTCAGAAAGTCATCTGTGGC  
 TCCAGGACCGCCTGCACTCTCCCTGCCGAGGCTGCAGACTCTAGGCTGGGTGGAAGCAACGTTACCTCTGGAC  
 AAGTATAACGTGTTGGCTTCTTCCCTGTGGCTCCAACCTGGACATAAAATAGATGCAAGCTGTGTAATAAATATT  
 TCCTCCCGTCCACTTAGTTCTCAACAATAACTACTCTGAGAGCACTTATTAAATAGGTGGCTTAGACATAAGCTTGGCTC  
 ATTCCCCCATAGCTCTTACTCTTAACTCTTCAACCATCTGTGTCCTCCACATGGTAGTTACCTCTCCTCCAT  
 CCTGGTTGCTTCTTCCTCGAGTCGCCCTCAGTGTCTCTAGGTGATGCTTGTAAGATATTCTTCTACAAAGCTGAGAG  
 TGGTGGCACTTGGGAGTTCAAAGCCAGCCTGATCTACACAGCAAGCTCCAGGATATCCAGGGCAATGTTGGGAAACCT  
 TTCTCAAAACAAAAGGGGTTAGTTGTCAGGAGGAGACCCATGGGTTAAGAAGTCTAGACGCCATGGTATGCATA  
 CCTTTCATCCAGCACTTAGGAGGCAGAGAAAGGTGAAACTCTTGACTTTGAGGCCAGCTAGGTACATAGTGTACCC  
 TGCTTAGT  
 TATGTATAAGTATTGCCTGCACATATGTATGTATGTATGTATACCATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT  
 ACTCCCTAGAAGTCAAGACAGTTGTCAGACTCCCCAACCCCCCACCAGTGGGTGCTGAAAGCTAAACCTCTGT  
 CCTTTGTAAGCAGCAGGTGTCTATGABCCCTGAACCCTCTCCAGTCCAGATGTGCATTCTCAAAGAGGAGTCCT  
 CATATTCCCTAAACTGAACATCCTTATCAGTGAGCATCCTCGAGTCACCAAGCTACTGCACCCCTCTTAGGAAACAT  
 TCACTATTCACTCTACTTGGCTCATGAAACTTAAGTACACACACACACACACACACAGAGTCATGCACTCA  
 CAAAAGCATGCATGTACACCATTCTTATTAGACTATGCTTGCTAAAGACTTCTAGATACTTAAACATCACTTCT  
 GCCTTTGGTGGCAGGTTCCAAGATTGGTACTGGGTACTGGAAACTGAACAAGGTAGAGATCTAGAAATCACAGCAGG  
 TCAGAAGGGCCAGCCTGTACAAGAGAGAGTTCCACACCTCCAGGAACACTGAGCAGGGGCTGGACCTTGCCTCTCAG  
 CCCAAGAAACTAGTGCCTTCCTGTATGCATGCCCTCTCAGAGATTCCATAAGATCTGCCCTCTGCCATAAGATCTCCTGC  
 ATCCAGACAAGCCTAGGGGAAGTTGAGAGGCTGCTGAGCTCTCCCACAGGCCCTTCTGCTGGCAGTATTTTTA  
 TCTGGAGGAAGGAATCAGGGGGGGAGTGATCAAATACAATTATCAAGGAAAAAGTAAAAACATATATATATATATT  
 AACTGATCTAGGGAGCTGGCTCAGCAGTTAAGAGTTCTGGCTGCCCTGCTCAGATCTGCTTGTGCTTGTGCTTGT  
 CATGATGGCTTCACTGTATCTGCTTCCAGGGGATCCAACAGCCTTCTGACCTCCATAGACAAGACCTAGTCCTC  
 TGCAAGAGCACCAAATGCTTTCTGTTGATCCATCTCTAGCCTCATGCCAGATCATTAAACTACTGGACACTGT  
 CCCATTTCAGAAGATGTCACTGCCAGTCATTGCCATGAGTGGATATTCGATTCTTCTATGTTCTCACCTTGCAA  
 TTTATAAGAAAGATATCTGCAATTGTCCTGAGAGAACAAAGGGTGGAGGGCTACTGAGATGGCTTAGGGGTAAAGGT  
 GCTTGCCACAAAATCTGACAACCTTAAGTTGGCTTGGAAATCCACATGGTGGAGAGAGAGAGAGATTCCGTAAGTTGT  
 CCTCAAACCTCCACACATGTGCTGGCTTATGTGTAACCCAAATAAGTAAAGATAGTTTAAACACTACATAAGGTAG  
 GGTTTCTTCATGACCCAGGAATGATGCCCTGATAGAGCTTATGCTGAAACCCCATCTCATTGTGCCATCTGGAAAG  
 AGACAATTGCATCCCGAAACAGAATCTCATGAATGGATTAATGAGCTATTAAGAAAGTGGCTGGTTATTGCACATGC  
 TGGCGCGTAATGACCTCCACCATGATGTTATCCAGCATGAAGGTCTCACCGAGAAGTCATACAAATCTCTTAGGCTC  
 CAGAGTCGTGAGCAAAAAAGCACACCTCTAAATAATTAAACTAGCCTCAGGTAGTTAACCAACCGAAAATGAACCAAGGC  
 AGTTCTAATACAAAACCACTTCCCTCCCTGTTCAAACCAACAGTGCCTTATTATCTAAAGATAAACTCAAGCCAAGCT  
 TTTAGGTTGCCAGTATTTATGTAACAACAAGGCCGTTGACACACATCTGTAACCTCTAGTACTGGCCTCAGGGCAGA

[0375]

GACAGGTGGAGCCCTGGAGTTGAATTCCAGGTTCTGTGAGAAACTCTGTGTGAAAAGACAATATGGTGAGTGACCCGGF  
 AGGATACTGATATTGACTTCTGCCPACACACAGCCTCTGCACATCTGTAGTTGCAAGCCTTTGCACTAAGTTG  
 GCCAGAGTCAGAGTTGCAAGTGTGACTGAATGACGTGTTGCTGGTATCTACAAAGTCACCCCTCCTCTCAAG  
 CTAGCAGCACTGGCTTCGGCCAGCTGCTCATCAAGCCTCTTGAGAGTCATCACGGGGATGGGGAGCAGGGCCCTC  
 CCTAGAACACCAAGCCTGTGGTTATTCAAGGACATTATTGAGGGCCAAGATGACAGATAACTCTATCACTGGCCAA  
 CAGTCGGGTGTTGCGGTGTTAGGTTATTCTGTGTCTGAGAAAACAGTGCAACCTGGACAAAAGAAATAATGATATCA  
 TTTTCATTCAAGGCAACTAGATTCCGTGGTACAAAAGGCTCCCTGGGGPACGAGGCCGGACAGCGCGGCTCCTGAGTGG  
 CTATTCGGTCTGTCAACTTCTCATCTCTTGATTTCCTCCCTGTCTGTTCCCTCTTGCTGGGGCCAGTGGP  
 GTCTGTGACTCACAGGGAGGGTGGCAAAGCCTGGCTACGGGCTGGGGAGGGGGAGCTGTGGGGCCAG  
 TGACTTTCCCCTTCTTTTAGAAACCAAGTCTCAATTAAAGATAATGAGTCTCCTCATTCACGTGTGCTCAT  
 ATTCATAGGGACTTATCCACCCCGCCSTGTCATCTGGCTAAGTAAGAACATGTCATTTAAAGGAAACGTTTCTA  
 AAAATGTTGGCTGGACCCTGTGCGGGCACGAAACCAAGGGATGGGGCTAAAGTTACATGCTCTGTGCAAGCCCCGGTGCCT  
 TTCCCTTCGGAAAGGAGACCCGGPGGTAAAACGAAGTTGCCAACTTTGATGATGGTGTGCGCCGGTGA  
 ATGTCATCCATACCTGGGATAGGGAGGCTCTCAGGGAGTCATCTAGCCCTCCCTCAGGAAPAGATTCCACTTCCGGT  
 TTAGTTAGCTCCACCTGGTCCCTTATCCGCTGTCTGCCACTAGTCTCATCCATCCGGTTCCGCCCTCATCCACC  
 TTGCCCTTTAGTTCTAGAAACGACCCGGTAGTGGCTAGTCTGGCAGGTGGCCATTGGTCACTCCGCTACCAACTGTTACCATG  
 GCCACCAAGGTGTCATTTAAATATGAGCTCACTGAGTCCTGGGGATGGCTGGTTGGTAATATGTTGCTGCAAAATCG  
 TGAGAACTGGAGTTCAATTCCACAGCACATGGATGTATTCCAGCACCTGGPAGGCAGGGAGCAGAGATCTTAAAGCTCCT  
 GGCCAGACAGCCCAGCCTAATTAGTAATCAGTGAGAGAACCTGTCTCAAGAAACAAAGATGGAACATCAAGGTCAACCTC  
 TTGTCTCCACACACACAAATACACACATGCACATACATCCACACACAGGCAACACATGCACACACACTGAACACCCCTCA  
 CAAATACATACAAAAAAATAACATACACACATACATACACACATACACCAACATTCCCTCCTTAGTCTCCTGGCTAC  
 GCTCTGTACCCCCACTAAGGCTCAACTTCTTCTATTCTCATCTGACTCCTGTACTTGCATGCCCTTTCCAG  
 CAAGGCTTTCTTAAATCTCGTCATTCTAAACTCCCTCTAAATTCTTCCCTGCCCCCTTCTCTAGGG  
 GATAAAAGACACACACTACAAAGTCACCGTGGGACCAAGTTATTCAACCCACCCACCCCTGTTCTGTCATCCGGCCAGCT  
 AAGTAGTCCAACCTCTGGTGTGTACCCCTGGACCCCTGGCTCACCACAGCTCCTCCATGCTACCCAGCCCTGCAAAACC  
 TTCAGCCTAGCCTCTGGTCTCCAACCAGCACAGGCCAGTCTGGCTTCTATGCTCTAGAAATCTCCTCATTCTCCTA  
 TTCCCTCCTGAATCTACCACCTCTTCTCCCTCTGACCTCTAATGTTGTCACAGGATTACAAGGAAGGCCA  
 TGAATTAGCAGTTGGGTACCTCAGAGTCAGCAGGGAGCTGGATGAATTCACATTCCAGGCCTTGCTTGC  
 CGGATTCTGACAGGCAGTTCCGAAGCTGAGTCCAGGAAGCTGAATTAAAATCACACTCCAGCTGGTTCTGAGGCAGC  
 CCTACACATCAGCTGGCCCTGACTGAGCTGTCTGGTGGCAGTGGTGTGTGTGTTCTGCTTTACAAA  
 GAGCAAACTGCTCATATAGGCAGAAAGATGACTTATGCTATATAAGATAAAAGATGACTTTATGCCACTTATTAGCA  
 ATAGTTACTGTCAAAAGTAATTCTATTATACACCCCTATACATGGTATTGCTTTGTTGGAGACTCTAAAATCCAGATT  
 ATGTATTAAAAAAATCCCCAGTCCTAAAAGGTGAAGAATGGACCCAGATAGAAGGTACGGCACAAGTATGGAGT  
 CGGAGTGTGGAGTCCTGCCAATGGCTGGACAGAACGATCCAGAGAGGGTCAAGACAAATGCCCTGCCCTAAGGAAC  
 ACTGGCAGCCCTGATGAGGTACCAAGAGATTGCTAAGTGGAGGAATACAGGATCAGACCCATGGAGGGCTTAAAGCGTGA

[0376]

CTGTAGCAGCCCTCGCTGAGGGGCTCCAGGTGGCGCCAAGGTGCTGCAGTGGAGCCACATGAGAGGTGATGTCTTG  
 GAGTCACCTCGGGTACCATTTGTTAGGGAGGTGGGGATTGTGGTGTGGAGACAGGCAGCCTCAAGGATGCTTTCAACA  
 ATGGTTGATGAGTTGAACTAAAACAGGGGCCATCACACTGGCTCCCCTAGCTCTGGCTTGCCAGCTCACATCTGCC  
 CCCCCACCCCTGTCGGACCAGCTCAAGCTGTGATTCTACACATCAGGAGAGTAGCCTACTGGGCATGCC  
 ACCTCTTCTGGACCACAGGTGAGAGTGTGGCAAGCCTAGGCTCCTGTCAGGATGCAGGGCTGCCAGATAGGATGCTC  
 AGCTATCTCCTGAGCTGAACTATTTAGGAATAAGGATTATGCCCGCCGGGTTGCCAGCACCCAGCAGCCTGTGC  
 TTGCGTAAAGCAAGTGTGTTGATTTATCTAAAAAACAGAGCCGTGGACCCACCCACAGGAACAAGTATGTATGCATCTGT  
 TTCATGTATCTGAAAAGCGACACACCATTTCACATCATGGCATCTCCTAACCCCCATTCTTTTGTGTTTT  
 TTGAGACAGGGTTCTCTGTGAGTCTGGCTGTGGAACTCACTTTGAGACAGGCTGGCCTCGAACTCAGAATC  
 CTGGGATTAAAAGGTGTGTGCCACCACGCCGGCCCTAACCCCCATTCTTAATGGTGAATCCAGTGGTTGAATTTCGGGCC  
 ACACACATGTCCATTAGGGATTAGCTGTCCTGAGCTACCTGGTACAATCTTATCCCCCTGGGCTGGCCTCG  
 ATCCCTGACTCGGGCCCGATCAAGTCCAGTCCCTGGCCGATCAAGTCCAGTCCCTGGGCCGAAACAAGTCCAGTCCCT  
 AGTCGATTAGCTCATCCTGGCTCCCTGGCCTGTTACTTACACTCTCCCCCTGCTCTGGACTTGTGCTTTCTTA  
 CTCAAGTTGTCTGCCACAGTCCCTAAGCCACCTGTAAAGACAACAAAGATAACTTCCCTCAAGCACGGAAAGTCCTG  
 AGTCACCAACACCCCTGGAGGTGTGGACACATGTTCATGCGTGTGGTTGCGCTTACGTACGTGTGC

[0377] SEQ ID No. 18 :人 Beer 基因组序列（该基因有 2 个外显子，位于第 161-427 位和第 3186-5219 位）

[0378]

tagaggagaa gtctttgggg agggtttgct ctgagcacac ccctttccct ccctccgggg 60

ctgagggaaa catggacca gcccgtcccc agcctgtcct cattggctgg catgaagcag 120

agaggggctt taaaaaggcg accgtgtctc ggctggagac cagagcctgt gctactggaa 180

ggtggcgtgc ctcctctgg ctggtaaccat gcagctccca ctggccctgt gtctcgtctg 240

cctgctggta cacacagcct tccgtgtagt ggagggccag gggtggcagg cgttcaagaa 300

tgatgccacg gaaatcatcc ccgagctcg agagtacccc gagcctccac cggagctgga 360

gaacaacaag accatgaacc gggcggagaa cggagggcgg ctcctccacc acccctttga 420

gaccaaaggt atggggtgga ggagagaatt ctttagtaaaa gatcctgggg aggttttaga 480

[0379]

aacttctctt tgggaggcctt ggaagactgg ggttagaccca gtgaagattt ctggcctctg 540  
ccagcactgg tcgaggaaca gtctgcctg gaggtggggg aagaatggct cgctggtgca 600  
gccttcaaata tcaggtgcag aggcattgagg caacagacgc tggtagagc ccagggcagg 660  
gaggacgctg gggtggttag ggtatggcat cagggcatca gaacaggctc aggggctcag 720  
aaaagaaaaag gttcaaaaga atctcctcct gggaaatatacg gagccacgctc cagctgctgg 780  
taccactggg aagggAACAA ggtaagggag cctccatcc acagaacagc acctgtgggg 840  
caccggacac tctatgctgg tggtggtgt ccccaccaca cagaccaccata tcattggaaatc 900  
cccaggaggt gaacccccag ctcgaagggg aagaaacagg ttccaggcac tcagtaactt 960  
ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gtttgcattcca actgcaagat agccctgg 1020  
tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca 1080  
cccctgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccagggagct ggcacttgaa ggaatgggag 1140  
tttcggcac agtttagcc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggagggag 1200  
agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtcctca gcagccaccc cagtcacac 1260  
cttgcctcat tccagggag ggagaaggaa gaggaaccct gggttcctgg tcaggcctgc 1320  
acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcattt ggctctataa ttggcaggaa tcctgaggcc 1380  
atggggggcgt ctgaaatgac acttcagact aagagcttcc ctgtcctctg gccattatcc 1440  
aggtaggcaga gaagtccact gcccaggctc ctggacccca gcccctccccg cctcacaacc 1500  
tgttggact atgggggtgct aaaaaggggca actgcattggg aggccagccca ggaccctccg 1560  
[0380]

tcttc当地at ggaggacaag ggccgc当地ccc cccacagctc cc当地tctagg caaggta当地c 1620

tgggctccag cgactgc当地tg aagggtctga aggaacc当地aa acacaaaatg tccaccttgc 1680

tggactccca cgagaggcca cagccctga ggaagccaca tgct当地aaac aaagtcatga 1740

tctgc当地agg aagtgc当地tg cctaggggcg ctattctcg aagccgca aatgccccct 1800

tccctggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag cc当地tgc当地ag gtgaggatgc 1860

aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtggccaca tctccccctgc 1920

tgtgcttgct ct当地cagatg ggggtggggg gtggc当地tct ct当地ccctc tctggttgg 1980

tcttaagact attttc当地t ctttcttgct acattggaac tatcccatg aaacctttgg 2040

gggtggactg gtactcacac gacgaccagg tattaaaaa gctccc当地cc atctaagtcc 2100

accataggag acatggtaa ggtgtgtca gggatcagg cc当地gc当地g gagcccaatc 2160

tctgc当地tgc cagggaggat caccatgagg cgccattca gataacacag aacaagaaat 2220

gtgcc当地ca gagagccagg tcaatgttg tggcagctga acctgttagt tt当地gggtca 2280

agctc当地ggc cc当地tatggta gaaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agtccatcc 2340

ccc当地ggcagg cctccatgg atgctc当地a gcagagccctc cactcttgc当地 ggagccaaa 2400

ggtgctgggaa cccaggaa gtggagtc当地g gagatgc当地g ccagc当地ttt gggcaagttc 2460

tttctctgg ctggc当地ca gtattctcat tgataatgag ggggttggac acactgc当地t 2520

tgattc当地ttt caagtctaat gaattc当地t cctgatcacc tcccttc当地ag tccctc当地t 2580

ccacagc当地g tgc当地tgc当地t tattaccttc aattaacctc tactc当地tttcc tccatccccct 2640

[0381]

gtccacccct cccaagtggc tggaaaagga atttgggaga agccagagcc aggcagaagg 2700  
tgtgctgagt acttaccctg cccaggccag ggaccctgcg gcacaagtgt ggcttaaatac 2760  
ataagaagac cccagaagag aaatgataat aataatacat aacagccgac gctttcagct 2820  
atatgtgccca aatggtattt tctgcattgc gtgtgtaatg gattaactcg caatgcttgg 2880  
ggcggcccat tttgcagaca ggaagaagag agaggttaag gaacctgccc aagatgacac 2940  
ctgcagtgag cgatggagcc ctgggtttt aaccccagca gtcatttggc tccgagggga 3000  
cagggtgcbc aggagagctt tccaccagct ctagagcatc tgggaccttc ctgcaataga 3060  
tgttcagggg caaaagcctc tggagacagg ctggcaaaa gcagggctgg ggtggagaga 3120  
gacgggcccgg tccagggcag ggggtggccag gcggggcggcc accctcacgc ggcctctct 3180  
ccacagacgt gtccgagtac agctgccgag agctgcactt caccgcgtac gtgaccgatg 3240  
ggccgtgccc cagcgccaag ccggtcaccc agctggtggt ctccggccag tgcggcccg 3300  
cgcgctgct gcccaacgccc atcgcccgccg gcaagtggtg ggcacctagt gggcccgact 3360  
tccgctgcat ccccgaccgc taccgcgcgc agcgctgtca gctgctgtgt cccgggtggtg 3420  
aggcgccgag cgcgcccaag gtgcgcctgg tggcctcgta caagtgcaccc cgcctcaccc 3480  
gcttccacaa ccagtcggag ctcaaggact tcgggaccga ggccgctcgcc cgcagaagg 3540  
gccggaagcc gcgccccccgc gcccggagcg ccaaagccaa ccaggccgag ctggagaacg 3600  
cctactagag cccgccccccgc cccctccccca ccggcgcccg ccccgccct gaacccgcgc 3660  
35 cccacattc tgtcctctgc gcgtggttt attgtttata tttcattgtta aatgcctgca 3720  
[0382]

acccagggca gggggctgag accttccagg ccctgaggaa tccccggcgc cgccaaggcc 3780  
cccctcagcc cgccagctga ggggtcccac ggggcagggg agggattga gagtcacaga 3840  
cactgagcca cgcagccccg cctctggggc cgcttacctt tgctggtccc acttcagagg 3900  
aggcagaaat ggaagcattt tcaccgcctt ggggtttaa gggagcggtg tgggagtggg 3960  
aaagtccagg gactggtaa gaaagtttggta taagattccc cttgcacctt cgctgccccat 4020  
cagaaagcct gaggcgtgcc cagagcacaa gactggggc aactgttagat gtggtttcta 4080  
gtcctggctc tgccactaac ttgctgtgtt accttgaact acacaattct cttcgggac 4140  
ctcaatttcc actttgtaaa atgagggtgg aggtggaaat aggatctcga ggagactatt 4200  
ggcatatgtat tccaaggact ccagtgcctt ttgaatgggc agaggtgaga gagagagaga 4260  
gaaagagaga gaatgaatgc agttgcattt attcagtgcc aaggtcactt ccagaattca 4320  
gagttgttat gctctttctt gacagccaaa gataaaaac aaacagaaaa aaaaaagtaa 4380  
agagtctatt tatggctgac atatttacgg ctgcacaaact cttggaaagaa gctatgctgc 4440  
ttcccgccct ggcttccccg gatgtttggc tacctccacc cttccatctc aaagaaataa 4500  
catcatccat tgggttagaa aaggagaggg tccgagggtg gtgggaggga tagaaatcac 4560  
atccggccca acttcccaa gaggcagcatc cttcccccga cccatagcca tggggatgg 4620  
tcaccttccg aagagaagtg aaaggtcaa ggacactggc cttgcaggcc cgagggagca 4680  
gccatcacaa actcacagac cagcacatcc ctttgagac accgccttctt gcccaccact 4740  
cacggacaca tttctgccta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc 4800

[0383]

ttacactaaa agaatattat tgggggaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac 4860

tgcagagcat aatacgctgcc acccaaaaaat ctttttgaaa atcatttcca gacaacctct 4920

tactttctgt gtagtttta attgttaaaa aaaaaaaagtt ttaaacagaa gcacatgaca 4980

tatgaaagcc tgcaggactg gtcgttttt tggcaattct tccacgtggg acttgtccac 5040

aagaatgaaa gtagtggttt ttaaagagtt aagttacata tttatttct cacttaagtt 5100

atttatgcaa aagttttct ttagagaat gacaatgtta atattgctt atgaattaac 5160

agtctgttct tccagagtcc agagacattg ttaataaaga caatgaatca tgaccgaaag 5220

gatgtggtct catttgcata accacacatg acgtcatttc tgtcaaagtt gacacccttc 5280

tcttggtcac tagagctcca accttgacca caccttgac tgctctctgg tggcccttgt 5340

ggcaattatg tcttccttg aaaagtcatg tttatccctt ctttccaaa cccagaccgc 5400

atttcttcac ccagggcatg gtaataacct cagccttgta tccttttagc agcctccct 5460

ccatgctggc ttccaaaatg ctgttctcat ttagtactc ccctgctcaa aagccttcca 5520

tagctcccccc ttgcccagga tcaagtgcag tttccctatc tgacatggga ggccttctct 5580

gcttgactcc cacctccac tccaccaagc ttctactga ctccaaatgg tcatgcagat 5640

ccctgcttcc ttagttgcc atccacactt agcaccacca ataactaatc ctcttcttt 5700

aggattcaca ttacttgtca tctcttcccc taaccttcca gagatgttcc aatctcccat 5760

gatccctctc tcctctgagg ttccagcccc ttttgcctac accactactt tggttcctaa 5820

ttctgttttc catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaagtc ctgcttagta 5880

[0384]

ctggcataga caacacaaag ccaagtacaa ttcaggacca gctcacagga aacttcatct 5940  
tcttcgaagt gtggatttg a tgccctcctgg gtagaaatgt aggatcttca aaagtgggcc 6000  
agcctcctgc acttctctca aagtctcgcc tccccaaaggt gtcttaatag tgctggatgc 6060  
tagctgagtt agcatcttca gatgaagagt aaccctaaag ttactcttca gttgccctaa 6120  
ggtgggatgg tcaactggaa agctttaat taagtccagc ctaccttggg ggaacccacc 6180  
cccacaaaga aagctgaggt ccctcctgat gacttgcag tttacttacc aataacccac 6240  
ttgaattaat catcatcatc aagtcttga tagtgtgag tgggtatcag tggccggtcc 6300  
cttcctgggg ctccagcccc cgaggaggcc tcagtgagcc cctgcagaaa atccatgcat 6360  
catgagtgtc tcagggccca gaatatgaga gcaggttagga aacagagaca tcttccatcc 6420  
ctgagaggca gtgcggtcca gtgggtgggg acacgggctc tgggtcaggt ttgtgttgc 6480  
tgtttgtttg tttttagaca gagtctcgct ctattgccc ggctggagtg cagtgtcaca 6540  
atctcggctt actgcaactt ctgccttccc ggattcaagt gattctcctg cctcagcctc 6600  
cagagtagct gggattacag gtgcgtgcca ccacgcctgg ctaatttttgc tatttttgc 6660  
agagacgggg tttcaccatg ttggccaggc tagtctcgaa ctcttgacct caagtgtatct 6720  
gcctgcctcg gcctccaaa gtgcgtggat tacaggcgtg agccaccaca cccagcccc 6780  
ggttgggttt tgaatctgag gagactgaag caccaagggg ttaaatgttt tgcccacagc 6840  
catacttggg ctcagttcct tgccctaccc ctcacttgag ctgcttagaa cctgggtgggc 6900  
acatgggcaa taaccaggc acactgttt gtaccaagtg ttatggaaat ccaagatagg 6960  
[0385]

agtaattgc tctgtggagg ggatgagggga tagtggttag ggaaagcttc acaaagtggg 7020  
tggccttag agatttcca ggtggagaag ggggcttcta ggcagaaggc atagcccaag 7080  
caaagactgc aagtgcattgg ctgctcatgg gtataagaga atccaccatt cctcaacatg 7140  
taccgagtcc ttgccatgtg caaggcaaca tgggggtacc aggaattcca agcaatgtcc 7200  
aacacctaggg tctgcttct gggacctgaa gatacaggat ggatcagccc aggctgcaat 7260  
cccattacca cgagggggaa aaaaacctga aggctaaatt gtaggtcggg ttagaggta 7320  
tttatggaaa gttatattct acctacatgg ggtctataag cctggcgcca atcagaaaaag 7380  
gaacaaacaa cagacctagc tgggaggggc agcattttgt tgttaggggc ggggcacatg 7440  
ttctgggggt acagccagac tcagggcttg tattaatagt ctgagagtaa gacagacaga 7500  
ggatagaag gaaataggc cctttctctc tctctctctc tctctctctc actctctctc 7560  
tctctcacac acacacacag acacacacac acgctctgta ggggtctact tatgctccaa 7620  
gtacaaatca ggccacattt acacaaggag gtaaaggaaa agaacgttgg aggagccaca 7680  
ggaccccaaattccctgtt ttccctgaat cagggcaggac ttacgcagct gggagggtgg 7740  
agagcctgca gaagccacct gcgagtaagc caagttcaga gtcacagaca ccaaaagctg 7800  
tgtccatgtc ccacacccgc ccacaccttca cctgctcctt gacacagccc tgtgctccac 7860  
aaccggctc ccagatcatt gattatact ctggggcctg caccgtcctt cctgccacat 7920  
ccccacccca ttcttggAAC ctgcctctg tcttctccct tgtccaaggc caggcaaggc 7980  
ctcagctatt gggcagctt gaccaacagc tgaggctcct tttgtggctg gagatgcagg 8040  
[0386]

aggcagggga atattcctct tagtcaatgc gaccatgtgc ctggttgcc cagggtgtgc 8100  
tcgtttacac ctgttaggcca agcgtaatta ttaacagctc ccacttctac tctaaaaaat 8160  
gacccaatct gggcagtaaa ttatatggtg cccatgctat taagagctgc aacttgctgg 8220  
gcgtggtggc tcacacctgt aatcccagta ctttgggacg tcaaggcggg tggatcacct 8280  
gaggtcacga gttagagact ggcctggcca gcatggcaaa accccatctt tactaaaaat 8340  
acaaaaaatta gcaaggcatg gtggcatgca cctgtaatcc caggtactcg ggaggctgag 8400  
acaggagaat ggcttgaacc caggaggcag aggttgcagt gagccaagat tgtgccactg 8460  
ccctccagcc ctggcaacag agcaagactt catctcaaaa gaaaaaggat actgtcaatc 8520  
actgcaggaa gaacccaggt aatgaatgag gagaagagag gggctgagtc accatagtgg 8580  
cagcaccgac tcctgcagga aaggcgagac actgggtcat gggtactgaa gggtgccctg 8640  
aatgacgttc tgcttagag accgaacctg agccctgaaa gtgcatgcct gttcatgggt 8700  
gagagactaa attcatcatt cttggcagg tactgaatcc tttcttacgg ctgccctcca 8760  
atgccccatt tccctacaat tgtctgggt gcctaagctt ctgcccacca agagggccag 8820  
agctggcagc gagcagctgc aggtaggaga gataggtacc cataaggag gtggaaaga 8880  
gagatggaag gagaggggtg cagagcacac acctccctg cctgacaact tcctgagggc 8940  
tggtcatgcc agcagattt aaggcgaggc aggggagatg gggcgggaga ggaagtgaaa 9000  
aaggagaggg tggggatgga gaggaagaga gggtgatcat tcattcattc cattgctact 9060  
gactggatgc cagctgtgag ccaggcacca ccctagctc gggcatgtgg ttgtaatctt 9120  
[0387]

```
ggagcctcat ggagtcaca gggagtgcg gcaaggat ggataatgga cggataacaa 9180
```

```
ataaacatcc agtacaatgt ccggaatgg aaagttctcg aaagaaaaat aaagctggtg 9240
```

```
agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccaggcattt ctgaggaggt ggcatttgag 9300
```

c

9301

[0388] 从前面的描述,应该理解,尽管为了说明的目的本文描述了本发明的具体实施方案,但可以进行各种修改而不偏离本发明的精神和范畴。因此,本发明仅受附及权利要求的限制。

## 序列表

<110>Brunkow, Mary E.

Galas, David J.

Kovacevich, Brian

Mulligan, John T.

Paeper, Bryan W.

Van Ness, Jeffrey

Winkler, David G.

<120>增加骨矿化的组合物和方法

<130>240083. 508

<140>US

<141>1999-11-24

<160>41

<170>FastSEQ for Windows Version 3.0

<210>1

<211>2301

<212>DNA

<213>人 (Homo sapien)

<400>1

agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctcctctggc tggtaccatg cagctccac	60
tggccctgtg tctcgctgc ctgctggta acacagcctt ccgtgttagtg gagggccagg	120
ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccc cgagctcgga gagtaccccg	180
agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagaac ggagggcggc	240
ctccccacca ccccttttag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact	300
tcacccgcta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctggtgt	360
gctccggcca gtgcggcccg gcgcgcctgc tgcccaacgc catcgccgc ggcaagtgg	420
ggcgacctag tgggccccgac ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgc cagcgcgtgc	480
agctgctgtg tcccggttgt gaggcgccgc gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcg	540
gcaagtgc当地 ggcgc当地 accagtcgga gctcaaggac ttgggaccg	600
aggccgctcg gccgc当地 gag ggccggaagc cgccggcccg cgccggagc gccaagcca	660
accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccgc当地 accggcggc	720

gccccggccc tgaacccgcg ccccacattt ctgtcctctg cgcggtttt gattgttat	780
atttcattgt aaatgcctgc aaccaggc agggggctga gacccctcag gcccctgagga	840
atcccggcgc ccggcaaggc ccccctcagc ccgcccagctg aggggtccca cggggcaggg	900
gagggaaattt agagtcacag acactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct	960
ttgctggtcc cacttcagag gaggcagaaa tggaagcatt ttcaccgccc tggggttta	1020
agggagcggt gtgggagtgg gaaagtccag ggactggta agaaagttgg ataagattcc	1080
cccttgcacc tcgctgccc tcagaaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactgggg	1140
caactgtaga tgtggttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aaccttgaac	1200
tacacaattc tccttcggga cctcaatttc cacttgtaa aatgagggtg gaggtggaa	1260
taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg	1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagtgc	1380
caaggtcact tccagaattc agagttgtga tgctctttc tgacagccaa agatgaaaaa	1440
caaacagaaa aaaaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttagt gctgacaaac	1500
tccttggaaaga agctatgctg cttccagcc tggctcccc ggatgtttgg ctacctccac	1560
ccctccatct caaagaataa acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgaggg	1620
ggtgggaggg atagaaatca catccgcggc aacttccaa agaggcagcat ccctcccc	1680
accatagcc atgtttaaa gtcacccccc gaagagaagt gaaagggtca aggacactgg	1740
ccttgccaggc ccgaggggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc cctttgaga	1800
caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc	1860
tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttggggaaa aactacaagt	1920
gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaaa tcttttgaa	1980
aatcatttcc agacaaccc tcacttctg tgtgtttt aattgttaaa aaaaaaaaaagt	2040
tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgaaaa ttggcaattc	2100
ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat	2160
atttattttc tcacttaagt tatttatgca aaagttttc ttgttagagaa tgacaatgtt	2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gttataaaag	2280
acaatgaatc atgaccgaaa g	2301

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;213

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人

&lt;400&gt;2

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr

1 5 10 15

Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp

20 25 30

Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro

35	40	45
Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg		
50	55	60
Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys		
65	70	75
Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser		
85	90	95
Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala		
100	105	110
Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser		
115	120	125
Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val		
130	135	140
Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg		
145	150	155
Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln		
165	170	175
Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly		
180	185	190
Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu		
195	200	205
Leu Glu Asn Ala Tyr		
210		

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;2301

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人

&lt;400&gt;3

agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctcctctggc tggtaccatg cagctccac	60
tggccctgtg tctcgtctgc ctgctggta acacagccctt ccgtgttagtg gagggctagg	120
ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccc cgagctcgga gagtaccccg	180
agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagaac ggagggcggc	240
ctccccacca ccccttttag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact	300
tcacccgcta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctggtgt	360
gctccggcca gtgcggcccg gcgcgcctgc tgcccaacgc catcgccgc ggcaagtgg	420
ggcgacctag tgggcccgac ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgca cagcgcgtgc	480
agctgctgtg tcccggtggt gaggcgccgc gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcg	540

gcaagtgc aa ggcctc acc cgcttcaca accagtcgga gctcaaggac ttccggaccg	600
aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc cgccggcccg cgcccgagc gccaaagcca	660
accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccggccgc gcccctcccc accggcgggc	720
gccccggccc tgaaccccgcg ccccacattt ctgtcctctg cgcgtggttt gattgttat	780
atttcattgt aaatgcctgc aacccaggc agggggctga gaccttccag gcccgtgagga	840
atcccggcgcc cggcaaggc ccccctcagc cggccagctg aggggtccca cggggcaggg	900
gagggaattt agagtcacag acactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct	960
ttgctggtcc cacttcagag gaggcagaaa tggaaagcatt ttcaccggcc tggggttta	1020
agggagcggt gtgggagtgg gaaagtccag ggactggta agaaagttgg ataagattcc	1080
cccttgacc tcgctgccc tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactgggg	1140
caactgtaga tgtggttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aaccttgaac	1200
tacacaattt ccttcggga cctcaattt cacttgtaa aatgagggtg gaggtggaa	1260
taggatctg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg	1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagtgc	1380
caaggctact tccagaattt agagttgtga tgctctttc tgacagccaa agatgaaaaa	1440
caaacagaaa aaaaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac	1500
tcctggaaaga agctatgctg cttccagcc tggcttcccc ggatgtttgg ctacctccac	1560
ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttgggttaga aaaggagagg gtccgagggt	1620
ggtggaggg atagaaatca catccggccc aacttccaa agagcagcat ccctccccg	1680
accatagcc atgtttaaa gtcacccccc gaagagaagt gaaagggtca aggacactgg	1740
ccttcaggc ccgagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc cttttgaga	1800
caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc	1860
tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttggggaaa aactacaagt	1920
gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaaa tcttttgaa	1980
aatcatttcc agacaacctc ttacttctg ttagtttt aattgttaaa aaaaaaaagtt	2040
tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgaaaa ttggcaattc	2100
ttccacgtgg gacttgcaca caagaatgaa agtagtggtt tttaagagt taagttacat	2160
atttatttcc tcacttaagt tatxtatgca aaagttttc ttgttagagaa tgacaatgtt	2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gttataaaag	2280
acaatgaatc atgaccgaaa g	2301

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;23

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人

&lt;400&gt;4

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr

1

5

10

15

Ala Phe Arg Val Val Glu Gly

20

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;2301

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人

&lt;400&gt;5

agagcctgtg	ctactggaag	gtggcgtgcc	ctcctctggc	tggtaccatg	cagctccac	60
tggccctgtg	tctcatctgc	ctgctggta	acacagccct	ccgtgttagt	gaggggcagg	120
ggtggcaggc	gttcaagaat	gatgccacgg	aaatcatccg	cgagctcgga	gagtaccccg	180
agcctccacc	ggagctggag	aacaacaaga	ccatgaaccg	ggcggagaac	ggagggcggc	240
ctccccacca	ccccttttag	accaaagacg	tgtccgagta	cagctgccgc	gagctgcact	300
tcacccgcta	cgtgaccgat	gggccgtgcc	gcagcgccaa	gccgggtcacc	gagctgggt	360
gctccggcca	gtgcggcccg	gcmcgcctgc	tgcacaacgc	catcgccgc	ggcaagtgg	420
ggcgacctag	tgggcccac	ttccgctgca	tcccgaccg	ctaccgcg	cagcgcgtgc	480
agctgctgt	tcccggtggt	gaggcgccgc	gcgcgcgca	ggtgcgcctg	gtggcctcg	540
gcaagtgc	gcgcctcacc	cgcttccaca	accagtcgga	gctcaaggac	ttcgggaccg	600
aggccgctg	gccgcagaag	ggccggaagc	cgcggcccg	cgcccgagc	gccaaagcca	660
accaggccga	gctggagaac	gcctactaga	gcccgcgc	gcccctcccc	accggcg	720
gccccggccc	tgaaccccg	ccccacattt	ctgtcctctg	cgcgtgg	tttattttat	780
atttcattgt	aatgcctgc	aaccaggc	agggggctga	gaccttccag	gccc	840
atcccggc	ccggcaaggc	ccccctc	ccgcgc	agggtccc	cggggcaggg	900
gagggaattt	agagtcacag	acactgagcc	acgcagcccc	gcctctggg	ccgcctac	960
ttgctgg	cacttc	agag	gaggcagaaa	tggaagcatt	ttcaccgccc	1020
agggagc	gtgggagtgg	gaaagtcc	ggactgg	taaagtt	ataagattcc	1080
cccttgc	tcgctgccc	tcagaaagcc	tgaggcgt	ccagagcaca	agactgg	1140
caactgt	tagtgg	ttct	agtcctgg	ctgccc	acttgc	1200
tacacaattt	tccttcgg	cctcaattt	cacttgtt	aatgagg	gaggtgg	1260
taggatct	aggagactat	tggcatat	ttccaagg	tccagtgc	tttgaatgg	1320
cagaggt	agagagagag	agaaagagag	agaatgaat	cagtgcatt	gattcag	1380
caaggtc	acttcc	agagttgt	tgctcttc	tgacagcc	agatgaaaaa	1440
caaaca	aaaaaaagta	aagagtctat	ttatggct	catattac	gctgaca	1500
tcctgg	agaagct	tttcc	ttcc	ggatgtt	ctac	1560
ccctccat	caaagaata	acatcat	ttgggg	ttag	cc	1620
ggtgg	atagaaatca	catcc	aaacttcc	agagcag	gtccgagg	1680
acccatag	cc	atgttt	gtcac	cc	cc	1740
ccttgc	aggc	aaa	ttcc	aa	gg	1800
ccgagg	gagc	g	gag	g	g	

caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc 1860  
 tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttggggaaa aactacaagt 1920  
 gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaaa tcttttgaa 1980  
 aatcattcc agacaaccctc ttacttctg tgttagtttt aattgttaaa aaaaaaaaaagt 2040  
 tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgaaaa ttggcaattc 2100  
 ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat 2160  
 atttatttc tcacttaagt tattnatgca aaagttttc ttgttagagaa tgacaatgtt 2220  
 aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gttaataaag 2280  
 acaatgaatc atgaccgaaa g 2301

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt;213

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人

&lt;400&gt;6

Met	Gln	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Cys	Leu	Ile	Cys	Leu	Leu	Val	His	Thr
1									10					15	
Ala	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Gly	Gln	Gly	Trp	Gln	Ala	Phe	Lys	Asn	Asp
									25					30	
Ala	Thr	Glu	Ile	Ile	Arg	Glu	Leu	Gly	Glu	Tyr	Pro	Glu	Pro	Pro	Pro
									40					45	
Glu	Leu	Glu	Asn	Asn	Lys	Thr	Met	Asn	Arg	Ala	Glu	Asn	Gly	Gly	Arg
							50				55		60		
Pro	Pro	His	His	Pro	Phe	Glu	Thr	Lys	Asp	Val	Ser	Glu	Tyr	Ser	Cys
							65			75				80	
Arg	Glu	Leu	His	Phe	Thr	Arg	Tyr	Val	Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Arg	Ser
							85			90				95	
Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Glu	Leu	Val	Cys	Ser	Gly	Gln	Cys	Gly	Pro	Ala
							100			105				110	
Arg	Leu	Leu	Pro	Asn	Ala	Ile	Gly	Arg	Gly	Lys	Trp	Trp	Arg	Pro	Ser
							115			120				125	
Gly	Pro	Asp	Phe	Arg	Cys	Ile	Pro	Asp	Arg	Tyr	Arg	Ala	Gln	Arg	Val
							130			135				140	
Gln	Leu	Leu	Cys	Pro	Gly	Gly	Glu	Ala	Pro	Arg	Ala	Arg	Lys	Val	Arg
							145			150				155	
Leu	Val	Ala	Ser	Cys	Lys	Cys	Lys	Arg	Leu	Thr	Arg	Phe	His	Asn	Gln
							165			170				175	
Ser	Glu	Leu	Lys	Asp	Phe	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Arg	Pro	Gln	Lys	Gly

180	185	190
Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu		
195	200	205
Leu Glu Asn Ala Tyr		
210		

&lt;210&gt;7

&lt;211&gt;2301

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人

&lt;400&gt;7

agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctcctctggc tggtaccatg cagctccac	60
tggccctgtg tctcgctgc ctgctggta acacagcctt ccgtgttagtg gagggccagg	120
ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccg cgagctcgga gagtacccc	180
agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagaac ggagggcggc	240
ctccccacca ccccttttag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact	300
tcacccgcta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctgggt	360
gctccggcca gtgcggcccg gcgcgcctgc tgcccaacgc catcgccgc ggcaagtgg	420
ggcgacctag tgggcccgac ttccgctgca tcccgaccg ctaccgcgca cagcgcgtgc	480
agctgctgtg tcccggttgt gaggcgccgc gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcgt	540
gcaagtgc当地 ggcgc当地 cgc当地 caca accagtcgga gctcaaggac ttccggaccg	600
aggccgctcg gccgc当地 agggccgcaag ggccggaagc cgccggcccg cgccggagc gccaaagcca	660
accaggccga gctggagaac gcctactaga gccc当地 cccctccccc accggcgggc	720
gccccggccc tgaaccgc当地 ccccacattt ctgtcctctg cgctggttt gattgttat	780
atttcattgt aaatgcctgc aaccaggc当地 agggggctga gaccttccag gccctgagga	840
atcccgccg cccgc当地 cccctcagc cgc当地 agcttccca cggggcaggc	900
gagggaattt agagtc当地 acactgagcc acgc当地 ccccttgggg ccgc当地 tacct	960
ttgc当地 cacttc当地 gagc当地 gggc当地 tggc当地 agggc当地 ccccttgggg	1020
agggagc当地 gtgggagttt gaaatccag ggactggta agaaatgggata agatgttcc	1080
cccttgc当地 tc当地 gccc当地 tc当地 agaaatggcc tgaggc当地 cc当地 gagc当地 agactgggg	1140
caactgtaga tggc当地 ttcttctt agtccctggct ctgccc当地 cttgc当地 gtgt	1200
tacacaattt tc当地 ttccggc当地 cctcaattt当地 cactt当地 gatggggtt gaggtggaa	1260
taggatctcg aggagactat tggc当地 attgc当地 ttccaggc当地 tccaggc当地 tttgaatggg	1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgc当地 gattc当地 agtgc	1380
caaggctact tccaggc当地 agatgttgc当地 tgctctt当地 tgacaggccaa agatgaaaaaa	1440
caaacagaaaa aaaaaaaaaaaa aagatgttat ttatggctga catatttacg gctgacaaaac	1500
tcctggaaaga agctatgctg cttccc当地 agcc tggcttccccc ggatgtttgg ctacctccac	1560
ccctccatct caaaggaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggt	1620

ggtgtggaggg atagaaatca catccgc(cc) aacttccaa agagcagcat ccctccccgg  
 acccatagcc atgttttaaa gtcacccccc gaagagaagt gaaagggttca aggacactgg  
 ccttcagggc ccgaggggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc cctttgaga  
 cacccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc  
 tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt  
 gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaaa tcttttgaa  
 aatcattcc agacaaccc tcactttctg tgttagtttt aattgttaaa aaaaaaaaaagt  
 tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgaaaa ttggcaattc  
 ttccacgtgg gacttgc(cc) caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat  
 atttatttcc tcacttaagt tatttatgca aaagttttc ttgttagagaa tgacaatgaa  
 aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gttaataaag  
 acaatgaatc atgaccgaaa g  
 2301

&lt;210&gt;8

&lt;211&gt;213

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人

&lt;400&gt;8

Met	Gln	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Cys	Leu	Val	Cys	Leu	Leu	Val	His	Thr
1														15	
Ala	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Gly	Gln	Gly	Trp	Gln	Ala	Phe	Lys	Asn	Asp
														30	
Ala	Thr	Glu	Ile	Ile	Arg	Glu	Leu	Gly	Glu	Tyr	Pro	Glu	Pro	Pro	Pro
														45	
Glu	Leu	Glu	Asn	Asn	Lys	Thr	Met	Asn	Arg	Ala	Glu	Asn	Gly	Gly	Arg
														60	
Pro	Pro	His	His	Pro	Phe	Glu	Thr	Lys	Asp	Val	Ser	Glu	Tyr	Ser	Cys
														80	
Arg	Glu	Leu	His	Phe	Thr	Arg	Tyr	Val	Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Arg	Ser
														95	
Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Glu	Leu	Val	Cys	Ser	Gly	Gln	Cys	Gly	Pro	Ala
														110	
Arg	Leu	Leu	Pro	Asn	Ala	Ile	Gly	Arg	Gly	Lys	Trp	Trp	Arg	Pro	Ser
														125	
Gly	Pro	Asp	Phe	Arg	Cys	Ile	Pro	Asp	Arg	Tyr	Arg	Ala	Gln	Arg	Val
														140	
Gln	Leu	Leu	Cys	Pro	Gly	Gly	Glu	Ala	Pro	Arg	Ala	Arg	Lys	Val	Arg
														160	
Leu	Val	Ala	Ser	Cys	Lys	Cys	Lys	Arg	Leu	Thr	Arg	Phe	His	Asn	Gln

165	170	175
Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly		
180	185	190
Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu		
195	200	205
Leu Glu Asn Ala Tyr		
210		
<210>9		
<211>642		
<212>DNA		
<213>Cercopithecus pygerythrus		

<400>9						
atgcagctcc	cactggccct	gtgtcttgtc	tgcctgctgg	tacacgcagc	ttccgtgtta	60
gtggagggcc	aggggtgtggca	ggccttcaag	aatgatgcca	cgaaatcat	ccccgagctc	120
ggagagtacc	ccgagcctcc	accggagctg	gagaacaaca	agaccatgaa	ccgggcggag	180
aatggagggc	ggcctcccca	ccacccttt	gagaccaaag	acgtgtccga	gtacagctgc	240
cgagagctgc	acttcacccg	ctacgtgacc	gatggccgt	gccgcagcgc	caagccagtc	300
accgagttgg	tgtgtccgg	ccagtgcggc	ccggcacgccc	tgctgccaa	cgccatcgcc	360
cgcggcaagt	ggtggcgccc	gagtggccccc	gacttccgct	gcatccccga	ccgctaccgc	420
gcgcagcgtg	tgcagctgct	gtgtcccggt	ggtgccgcgc	cgcgcgcgc	caaggtgcgc	480
ctgggtggct	cgtcaagtg	caagcgcctc	acccgcttcc	acaaccagtc	ggagctcaag	540
gacttcggtc	ccgaggccgc	tcggccgcag	aagggccgga	agccgcggcc	ccgcgccccgg	600
ggggccaaag	ccaatcaggc	cgagctggag	aacgcctact	ag		642

<210>10		
<211>213		
<212>PRT		
<213>Cercopithecus pygerythrus		

<400>10			
Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Ala			
1	5	10	15
Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp			
20	25	30	
Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro			
35	40	45	
Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg			
50	55	60	

Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys  
 65 70 75 80  
 Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser  
 85 90 95  
 Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala  
 100 105 110  
 Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser  
 115 120 125  
 Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val  
 130 135 140  
 Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg  
 145 150 155 160  
 Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln  
 165 170 175  
 Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly  
 180 185 190  
 Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu  
 195 200 205  
 Leu Glu Asn Ala Tyr  
 210

&lt;210&gt;11

&lt;211&gt;638

&lt;212&gt;DNA

<213> 台湾鼷鼠 (*Mus musulus*)

&lt;400&gt;11

atgcagccct cactagcccc	gtgcctcatc tgcctacttg	tgcacgctgc cttctgtgct	60
gtggagggcc aggggtggca	agccttcagg aatgatgcca	cagaggtcat cccagggtt	120
ggagagtacc ccgagcctcc	tcctgagaac aaccagacca	tgaaccgggc ggagaatgga	180
ggcagacctc cccaccatcc	ctatgacgcc aaaggtgtgt	ccgagtagcacag ctgccgcgag	240
ctgcactaca cccgcttcct	gacagacggc ccatgccgca	gcccgaagcc ggtcaccggag	300
ttggtgtgct ccggccagtg	cggcccgcg cggtctgctgc	ccaacgccat cggcgcgctg	360
aagtggtgcc gcccgaacgg	accggatttc cgctgcatcc	cggatcgcta cggcgcgccag	420
cgggtgcagc tgctgtgccc	cggggcgcg ggcgcgcgt	cgcgcaaggt gcgtctggtg	480
gcctcgtgca agtgcaagcg	cctcacccgc ttccacaacc	agtccggagct caaggacttc	540
gggccggaga ccgcgcggcc	gcagaagggt cgcaagccgc	ggcccgccgc cggggagcc	600
aaagccaaacc aggcggagct	ggagaacgcc tactagag		638

&lt;210&gt;12

&lt;211&gt;211

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 台湾鼷鼠

&lt;400&gt;12

Met Gln Pro Ser Leu Ala Pro Cys Leu Ile Cys Leu Leu Val His Ala

1 5 10 15

Ala Phe Cys Ala Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Arg Asn Asp

20 25 30

Ala Thr Glu Val Ile Pro Gly Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro

35 40 45

Glu Asn Asn Gln Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro

50 55 60

His His Pro Tyr Asp Ala Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys Arg Glu

65 70 75 80

Leu His Tyr Thr Arg Phe Leu Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser Ala Lys

85 90 95

Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala Arg Leu

100 105 110

Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Val Lys Trp Trp Arg Pro Asn Gly Pro

115 120 125

Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu

130 135 140

Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg Leu Val

145 150 155 160

Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu

165 170 175

Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys

180 185 190

Pro Arg Pro Gly Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu

195 200 205

Asn Ala Tyr

210

&lt;210&gt;13

&lt;211&gt;674

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt; 褐鼠 (Rattus norvegicus)

&lt;400&gt;13

gaggaccgag	tgccttcct	ccttctggca	ccatgcagct	ctcactagcc	ccttgccttg	60
cctgcctgct	tgtacatgca	gccttcgttg	ctgtggagag	ccaggggtgg	caagccttca	120
agaatgatgc	cacagaaatc	atcccggac	tcagagagta	cccagagcct	cctcaggaac	180
tagagaacaa	ccagaccatg	aaccgggccg	agaacggagg	cagacccccc	caccatcctt	240
atgacaccaa	agacgtgtcc	gagtacagct	gccgcgagct	gcactacacc	cgcttcgtga	300
ccgacggccc	gtgcccgcagt	gccaagccgg	tcaccgagtt	ggtgtgctcg	ggccagtgcg	360
gccccgcg	gctgctgccc	aacgcacatcg	ggcgcgtgaa	gtggtgtgcgc	ccgaacggac	420
ccgacttccg	ctgcacatccc	gatcgctacc	gcgcgacg	ggtgcagctg	ctgtgccccg	480
gcggcgcggc	gccgcgcctcg	cgcaagggtgc	gtctggtggc	ctcgtgcaag	tgcaagcgcc	540
tcacccgctt	ccacaaccag	tcggagctca	aggacttcgg	acctgagacc	gcccggccgc	600
agaagggtcg	caagccgcgg	ccccgcgccc	ggggagccaa	agccaaccag	gcggagctgg	660
agaacgccta	ctag					674

&lt;210&gt;14

&lt;211&gt;213

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 褐鼠

&lt;400&gt;14

Met	Gln	Leu	Ser	Leu	Ala	Pro	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu	Leu	Val	His	Ala
1						5				10				15	

Ala	Phe	Val	Ala	Val	Glu	Ser	Gln	Gly	Trp	Gln	Ala	Phe	Lys	Asn	Asp
											20		25		30

Ala	Thr	Glu	Ile	Ile	Pro	Gly	Leu	Arg	Glu	Tyr	Pro	Glu	pro	Pro	Gln
											35		40		45

Glu	Leu	Glu	Asn	Asn	Gln	Thr	Met	Asn	Arg	Ala	Glu	Asn	Gly	Gly	Arg
						50		55			60				

Pro	Pro	His	His	Pro	Tyr	Asp	Thr	Lys	Asp	Val	Ser	Glu	Tyr	Ser	Cys
										65	70	75		80	

Arg	Glu	Leu	His	Tyr	Thr	Arg	Phe	Val	Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Arg	Ser
						85		90			95				

Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Glu	Leu	Val	Cys	Ser	Gly	Gln	Cys	Gly	Pro	Ala
									100		105		110		

Arg	Leu	Leu	Pro	Asn	Ala	Ile	Gly	Arg	Val	Lys	Trp	Trp	Arg	Pro	Asn
									115		120		125		

Gly	Pro	Asp	Phe	Arg	Cys	Ile	Pro	Asp	Arg	Tyr	Arg	Ala	Gln	Arg	Val
									130		135		140		

Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg  
 145 150 155 160  
 Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg phe His Asn Gln  
 165 170 175  
 Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly  
 180 185 190  
 Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu  
 195 200 205  
 Leu Glu Asn Ala Tyr  
 210

&lt;210&gt;15

&lt;211&gt;532

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Bos torus

&lt;400&gt;15

agaatgatgc cacagaaaatc atccccgagc tggcgagta ccccgagcct ctgccagagc	60
tgaacaacaa gaccatgaac cggcgaggaga acggagggag acctccccac caccctttg	120
agaccaaaga cgccctccgag tacagctgcc gggagctgca cttcacccgc tacgtgaccg	180
atggccgtg ccgcagcgcc aagccgtca ccgagctggt gtgctcgcc cagtgcggcc	240
cggcgccct gctgccaac gccatcgcc gcggcaagtg gtggcgccca agcggcccg	300
acttccgctg catccccgac cgctaccgag cgcagcggt gcagctgttgc tgcctggcg	360
gcgcggcgcc gcgcgcgcgc aaggtgcgc aaggtgcgc tggtggcctc gtgcaagtgc aagcgcctca	420
ctcgcttcca caaccagtcc gagctcaagg acttcggcc cgaggccgcg cggccgcaaa	480
cggccggaa gctgcggccc cgcccccggg gcaccaaagc cagccggcc ga	532

&lt;210&gt;16

&lt;211&gt;176

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Bos torus

&lt;400&gt;16

Asn Asp Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro	
1 5 10 15	
Leu Pro Glu Leu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly	
20 25 30	
Arg Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Ala Ser Glu Tyr Ser	
35 40 45	
Cys Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg	

50	55	60
Ser Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro		
65	70	75
Ala Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro		
85	90	95
Ser Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg		
100	105	110
Val Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val		
115	120	125
Arg Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn		
130	135	140
Gln Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Ala Ala Arg Pro Gln Thr		
145	150	155
Gly Arg Lys Leu Arg Pro Arg Ala Arg Gly Thr Lys Ala Ser Arg Ala		
165	170	175

&lt;210&gt;17

&lt;211&gt;35828

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;台湾鼷鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;其它特征

&lt;222&gt;(1)...(35828)

&lt;223&gt;n = A, T, C or G

&lt;400&gt;17

cgcgttttgg tgagcagcaa tattgcgctt ccatgaggcct tggcggttag attgataacct	60
ctgctgcaca aaaggcaatc gaccgagctg gaccagcgca ttcgtgacac cgtctcccttc	120
gaacttattc gcaatggagt gtcattcatc aaggacngcc tcatcgcaaa tggtgctatc	180
cacgcagcgg caatcgaaaa ccctcagccg gtgaccaata tctacaacat cagccttggt	240
atcctgcgtg atgagccagc gcagaacaag gtaaccgtca gtgccgataa gttcaaagtt	300
aaacctggtg ttgataccaa cattgaaaacg ttgatcgaaa acgcgctgaa aaacgctgct	360
aatgtgcgg cgctggatgt cacaaagcaa atggcagcag acaagaaagc gatggatgaa	420
ctggcttcct atgtccgcac ggccatcatg atggaatgtt tccccggtag ttttatctgg	480
cagcagtgcc gtcgatagta tgcaattgtt aattattatc atttgcgggt ctttccggc	540
gatccgcctt gtagcccccc ggcgacactcg cgggtttcg ctatttatga aaattttccg	600
gtttaaggcg ttccgttct tcttcgtcat aacttaatgt ttttattaa aataccctct	660
gaaaagaaaag gaaacgacag gtgctgaaag cgagctttt ggcctctgtc gttcccttc	720

tctgttttg tccgtggaat gaacaatgga agtcaacaaa aagcagagct tatcgatgat	780
aagcggtaaa acatgagaat tcgcggccgc ataatacgac tcactatagg gatcgacgcc	840
tactccccgc gcatgaagcg gaggagctgg actccgcatg cccagagacg cccccaacc	900
cccaaagtgc ctgacacctag cctctaccag ctctggctg ggcttggcg gggtaaaggc	960
taccacgttc tcttaaacagg tggctggct gtcttggc cgcgctcat gtgacagctg	1020
cctagttctg cagtgaggc accgtggaat gtctgccttc gttgccatgg caacggatg	1080
acgttacaat ctgggtgtgg agctttcct gtccgtgtca ggaaatccaa ataccctaaa	1140
ataccctaga agaggaagta gctgagccaa ggcttcctg gcttctccag ataaagttt	1200
acttagatgg aaaaaaaca aatgataaag acccgagcca tctgaaaatt cctcctaatt	1260
gcaccactag gaaatgtgta tattattgag ctcgtatgtg ttcttatttt aaaaagaaaa	1320
cttttagtcat gttattaata agaatttctc akgagtggg gagaaccaat attaacacca	1380
agataaaaagt tggcatgatc cacattgcag gaagatccac gttgggttt catgaatgt	1440
aagacccat ttattaaagt cctaagctct gttttgcac actaggaagc gatggccggg	1500
atggctgagg ggctgttaagg atcttcaat gtcttacatg tgtttcct gtcctgcacc	1560
taggacctgc tgccctagcct gcagcagagc cagaggggtt tcacatgatt agtctcagac	1620
acttggggc aggttgcatt tactgcattg cttatttcca tacggacac ctactatgt	1680
tcaaacacca tatggtgttc actcttcaga acggtggtgg tcatcatggt gcatttgctg	1740
acggttggat tggtggtaga gagctgagat atatggacgc actcttcagc attctgtcaa	1800
cgtggctgtg cattcttgct cctgagcaag tggctaaaca gactcacagg gtcagcctcc	1860
agctcagtcg ctgcatagtc ttaggaaacc tctcccagtc ctccctaccc caactatcca	1920
agaagccagg gggcttggcg gtctcaggag cctgcttgc gggggacagg ttgttgagtt	1980
tttatctgcag tagggtgcct aggcatatg tcaggactga tggctgcctt ggagaacaca	2040
tcctttgccc tctatgcaaa tctgaccttg acatggggc gctgctcagc tggaggatc	2100
aactgcatac ctaaagccaa gcctaaagct tcttcgtcca cctgaaactc ctggaccaag	2160
gggcttccgg cacatcctct caggccatgt agggagtctg tgtgagctgc actttcaat	2220
ctcagggcgt gagaggcaga gggaggtggg ggcagagcct tgcagcttt tcctccatc	2280
tggacagcgc tctggctcag cagccatat gacacaggc acatccccac cccacccca	2340
cctttcctgt cctgcagaat ttaggctctg ttcacgggg ggggggggg gggcagtc	2400
tatcctctct tagtagaca ggactctgca ggagacactg ctgtgttacta tactgcatt	2460
taaatttggg tgggtgagg ggaaagcgaa gggcctttt gaccattcag tcaaggtacc	2520
ttcttaactcc catcgattt ggggctact ctgtgttagt acattgcaga gagcctcaga	2580
actgttagtta ccagtgtggt aggattgtatc cttcaggag cctgacatgt gacagttcca	2640
ttcttcaccc agtcaccgaa catttattca gtacctaccc cgtaacaggc accgtacgag	2700
gtactgaggg acggaccact caaagaactg acagaccgaa gccttggaa ataaacacca	2760
aagcatcagg ctctgccaac agaacactct ttaacactca ggcctttaa cactcaggac	2820
ccccacccccc accccaagca gttggcactg ctatccacat tttacagaga ggaaaaacta	2880
ggcacaggac gatataagtgc gcttgcctaa gcttgcgtgc atggtaaatg gcagggtgg	2940
attgagaccc agacattcca actcttaggtt ctatTTCTG ttttctcgt tggtcgaatc	3000
tgggtcttac tgggtaaact caggctagcc tcacactcat atccttctcc catggcttac	3060

gagtgcgttattccagggttgtgtgcaccaatgtctgactccctgttagttgtctatacca	3120
tcctcacaacataggaatttgatagcagcacacacaccggaggagctggaaatccc	3180
acagagggtccgcaggatgacaggcgaatgcctacacagaaggtgggaaaggaaagcag	3240
aggaaacacgtatggcgtggaccacaagtctattggggaaagctgccgtaaccgtata	3300
tggctgggtgagggagaggtcatgagatgaggcaggaa gagccacagcaggcagcggg	3360
tacgggctccatttgccttattgccaaggcgtcgatccctcttccgggctgc	3420
ctgttcattttccaccactgcctccatccaggctgtggctcaggacatcacccagctg	3480
cagaaactggcgtcgtgaatgctgccaggagcaggcttcattgcacgtcaacccatgg	3540
aacaccatgtctagttcta cgaggattctggcatcacacttggcatcaaggccat	3600
gatacgcaggagttcaacctcagtgcattactttggaaagggccacagatttattgacc	3660
gctgctggcccataaaaaatggtaaggAACGTacattccggaccatggcgtaaggccct	3720
ctgggacactgcttcatttgccttattggggccacttggaaagaaagatccaaa	3780
atatgccaccacttagggat taagtgccttacatgtgagccgtggggcactgcata	3840
agtctgtgccatagacatgacaatggataataattca gacagagagcaggagttagg	3900
tagctgtcttcatttgcatttgcattttttattcatgttatgtgtata	3960
catgtgtgtcacacatgccatagttgtactgaacaccgtctcaatcgttccccacc	4020
ccacatttttttggaggca gggctcttcctgatcctggctcattggtttatctag	4080
gctgctggccactgagctctggatctgc ttttctctacctccctagccctggactgc	4140
agggcatgtgctggccaggctttatgtcgcttggggatctgaactttagccctag	4200
gcctgagcacctgaaagactctgacatccacccagctgttttgcattcattgatggc	4260
ccagaattcccccagggttttgcattacccttttattggctaggcattcattgatggc	4320
acctcgccaggaaatgatggccactggctcagggtcagcgcctagatggatgttttt	4380
gttaagtcttcctgctgcgtccgcacaca gaaagttaggactaatgtatgttttttt	4440
gctggctagtggcagacagacatggc tgagagggtc acagggcagaatgtcagcaga	4500
gcagacaggttctccctgttgggggactggccactgcagggttaatggcttcttgc	4560
ttgtgccttagaggcttcctggatcacactgacttccctgttgcgttgcgttgc	4620
gagaactcccatttgcatttgcatttttttttttttttttttttttttttttttttttttt	4680
tttggcttgggacgggtgcatactgcttatcagctcaatgttttttttttttttttttt	4740
ac	4800
gctcagtgcatt	4860
cctggcttaacccatcttt	4920
gcccctagggttt	4980
taaatctgttt	5040
ccctctgccttt	5100
aaacgtctcttt	5160
ccttaagatt	5220
tttattgtcaactaactcaaaaaagccatgttttttttttttttttttttttttttttt	5280
aaattcatccatt	5340
taagatt	5400

aatgctctgg aagcaacttt aggaggtagg atgcttggAAC agcgggtcac ttcagcatcc	5460
cgtacgaa tcccgtcaaa gctgtacatt ctgtAACAGA ctgggaaAGC tgcagacttt	5520
aaggccaggg cccttatggtc cctcttaatc cctgtcacac ccaacccgag cccttctcct	5580
ccagccgttc tgtgcttctc actctggata gatggagaAC acggcTTGC tagttaaagg	5640
agttagggctt cacccttctc acatggcagt ggTTGGTcat cctcattcag ggaactctgg	5700
ggcattCTGC ctTTacttCC tcttttggA ctacaggGA tatATGCTGA ctTgtttGA	5760
ccttgttat ggggagactg gatcttggt ctggAAATGTT tcctgtAGT tttccccat	5820
ccttgccaa accctatcta tatcttacca cttaggcatag tggccCTCGT tctggagcCT	5880
gccttcaggc tgTTCTCGG ggaccatgtc cctggTTCT ccccagcata tggTgttCAC	5940
agtgttcaCT gcgggtggTT gctGAACAAA gcggggATTG catcccAGAG ctccggTgCC	6000
ttgtgggtac actgctaAGA taaaATGGAT actggcCTCT ctctgaccAC ttgcagAGCT	6060
ctggTgcCTT gtgggtacAC tgctAAAGATA aaatggatac tggcCTCTCT ctatccACTT	6120
gcaggactCT agggAACAGG aatccattAC tgagAAAACC agggctAGG agcaggAGGG	6180
tagctggca gctGAAGTGC ttggcacta accaatGAAT accAGAGTT ggATCTCTAG	6240
aatactCTTA aaatctggGT gggcAGAGTG gcctgcCTGT aatcccAGAA ctggggAGGC	6300
ggagacAGGG aatcatcAGA gcaaACTGGC taaccAGAAT agcaAAACAC tgAGCTCTGG	6360
gctctgtAG agatcCTGCC ttaACATATA agagAGAGAA taaaACATTG aagaAGACAG	6420
tagatGCCAA tttaAGCCC ccACATGCAC atggACAAGT gtgcgtttGA acACACATAT	6480
gcactcatgt gaaccaggCA tgcACACTCG ggCTTATCAC ACACATAATT tgAAAGAGAG	6540
agttagAGAG gagAGTGCAC attAGAGTT ACAGGAAAGT gtgAGTgAGC acACCCATGC	6600
acACAGACAT gtgtGCCAGG gagTAGGAAA ggAGCCTGGG tttgttATA agAGGGAGCC	6660
atcatgttt tctaAGGAGG gcgtgtGAAG gagGCgttGT gtggcTGGG actggAGCAT	6720
ggttGtaACT gagcatgCTC CCTGTTGGAA acAGGAGGGT ggCCACCCtG cAGGGTCC	6780
cactgtCCAG cgGGatCAGT aaaAGCCCT gctgAGAAct ttaggtAATA gCcAGAGAGA	6840
gaaAGGTAGG aaAGTGGGG gACTCCATC tctgtatgtAG gaggtatCTGG gcaAGTgAGAG	6900
gtgcgtttGA ggtAGAAAGA ggggtgcAGA ggAGATgCTC ttaattCTGG gtcAGCAGTT	6960
tctttccAAA taatgcCTGT gagGAAGGTGT aggtggTggC cattcactCA ctcAGCAGAG	7020
ggatGATGAT gcccGGTggA tgctggAAAT ggCCAGCAT caACCCtGGC tctggAAAGAA	7080
ctccatCTT cagaAGGAGA gtggatCTGT gtatggCCAG cgGGGTcaca ggtgcTTGG	7140
gcccCTGGG gACTCCTAGC actgggtGAT gtttATCGAG tgctCTTGT tgCCAGGcAC	7200
tggcCTGGG cttgtttCT gtctCTGTt tttcgTTt tttgAGACAG actCTTGTa	7260
tgtatCCGTG tcaatCTTG AATCTCACTG catAGCCAG gctgCGGAGA gagGGGAGGG	7320
caatAGGCt tGtaAGCAAG ccACACTCA gagACTAGAC tccACCCtGC gaATGATGAC	7380
aggTCAGAGC tgAGTTCCGG aAGATTTTT ttccAGCTGC cAGGTGGAGT gtggAGTggC	7440
agCTAGCGC aAGGGTAGAG ggcgAGCTCC ctgtcAGGA gaaATGCAAG caAGAGATGG	7500
caAGCCAGTG agttaAGCAT tctgtgtGGG gagcAGGTGG atGAAGAGAG aggCTGGGT	7560
ttcgcCTCTG ggggggggt gagGGGTGG gatGAGGTGA gagGAGGGCA gctccCTGCA	7620
gtgtGATGAG atTTTCTGT acAGTgACCT ttggcCTCTC cctccccAc ttccCTTCTT	7680
tcctttCTTC ccaccATTGC ttccCTTGTc cttgAGAAAT tctgAGTTc cactTCATG	7740

gtgatgcaga cgaaaacaga agccgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt	7800
gtgtgtgt ttgtgttat gtgtgtgt gtgtttgt gtatgtgt cagtggaaat	7860
ggctcatagt ctgcaggaag gtggcagga agaataagc tgtaggctga ggcagtgtgg	7920
gatcaggga gagaggagag gagggatacc agagaaggaa attaaggag ctacaagagg	7980
gcattgtgg ggtgtgtgt tigtgtgtt gtttatattt gtattggaaa tacattttt	8040
taaaaaatac ttatccattt atttattttt atgtcacgt gtgtgtgcct gcatgagttc	8100
atgtgtgcca cgtgtgtcg ggaacccttg gaggccacaa gggggcatct gatcccctgg	8160
aactggagtt ggaggagggtt gtgagtcctt tgacatgtt gctggact gaaccccggt	8220
cctatgcaag agcaggaagt gcagttatct gctgagccat ctctccagtc ctgaaatcca	8280
ttctcttaaa atacacgtgg cagagacatg atgggattt cgtatggatt taatgtggcg	8340
gtcattaagt tccggcacag gcaagcacct gtaaaagccat caccacaacc gcaacagtga	8400
atgtgaccat cacccccatg ttcttcatgt cccctgtccc ctccatcctc cattctcaag	8460
cacctcttgc tctgcctctg tcgctggaga acagtgtgca tctgcacact cttatgtcag	8520
tgaagtaca cagcctgcac cccttcctgg tctgagtatt tgggtctga ctctgctatc	8580
acacactact gtactgcatt ctctcgctct cttttttaa acatattttt atttgggtt	8640
gtgtatgcac atgtgccaca tgtgtacaga tactatggag gccagaagag gccatggccg	8700
tccctggagc tggagttaca ggcagcgtgt gagctgcctg gtgtgggtgc tgggaaccaa	8760
acttgaatct aaagcaagca cttttaactg ctgaggcagc tctcagtacc cttcttcatt	8820
tctccgcctg ggttccattt tatggacaca tgttagctaga atatcttget tatctaatta	8880
tgtacattgt tttgtgctaa gagagagtaa tgctctatag cctgagctgg cctcaaccctt	8940
gccatcctcc tgcctcagcc tcctccctt gagtgcctt atgacaggcg agtggtaact	9000
tacatggttt catgtttgt tcaagactga aggataacat tcatcagag aaggtctgg	9060
tcacaaagtg tgcagttcac tgaatggcac aaccgtat caagaaacaa aactcagggg	9120
ctggagagat ggcactgact gctttccag aggtccggag ttcaattccc agcaaccaca	9180
tggggctca cagccatcta taacgagatc tgacgcctc ttctgggtgt tctgaagaca	9240
gctacagtgt actcacataa aataaataaa tctttaaaac acacacacac acacaattac	9300
cacccagaa agcccactcc atgttccctc ccacgtctc gcctacagta ctcccagggtt	9360
accactgttc aggcttctaa caacctgggt tacttggcc tctttctgc tctgtggagc	9420
cacacatttgc tgcctcat acacgttctt tcttagtaat tgcattttc tctgcgtttt	9480
tacatgtatt tatattttgt agttgtgtt gcgtgtggc ccatgcattt cacagtgtgt	9540
ggggatgtca gagtattgtt aacaggggac agtttttc ttcaatcatg tgggttccag	9600
agggttgaact caggtcatca tgtgtggcag caaatgcctt taccactga gacatctcca	9660
tattctttt tttccctgtt aggtggggc ttgttccata gcccaaactg gctttgcact	9720
tgcagttcaa agtgaactccc tgtccacc tcttagagta ttggaaattac gatgtgtact	9780
accacacccgt actggatcat taatttttgc atggggcgg ggaagcgcac atgctgcagg	9840
tgaagggatg actggactgg acatgagcgt ggaagccaga gaacagcttc agtctaattgc	9900
tctcccaact gagctatttc ggttgccag agaacaactt acagaaagtt ctcagtgcca	9960
tgtggattcg gggttggagt tcaactcatc agcttgacat tggctcctct acccacttgag	10020
ccttctact actctctacc tagatcatta attttttt aaaaagactt attaggggc	10080

tggagagatg gctcagccgt taagagcacc gaatgccctt ccagaggccc tgagttcaat	10140
tcccagcatg ccattgctgg gcagtagggg gcgcagggtgt tcaacgttag tagctgtgc	10200
cagtttccg cggtgagaa cctctgaca ccctgctgtc cctggcattt ctgggtgggt	10260
gcatgggtat atgcttggtt tatggaagac tttgactttt acagtgaagt tgggcttcca	10320
cagttaccac gtctccctg tttctgcag gccgggtgt tgcatttcgc cgcgagggt	10380
acagccgctc cccaacgcta gttatgcctt acctcatgtat gcggcagaag atggacgtca	10440
agtctgctct gactactgtt aggcagaatc gtgagatcgg cccaaacgtat ggcttcctgg	10500
cccaactctg ccagctaat gacagactag ccaaggaggaa caaggtaaaa ctcttaggggt	10560
ccccacgcctt ctggcaga ggtctactg ggaggccctt ggccatgtt ttttaggaaac	10620
acagtataacc cactccctgc accaccagac acgtgcccac atctgtccca ctctggcctt	10680
cggggccac tccaccctt gggagcacat gaagaagctc cctaagaagt tctgctcctt	10740
agccatcattt tcctgttaatt tatgtctctc cctgaggtt ggttcagggtt tatgtccctg	10800
tctgtggcat agatacatct cagtgaccat ggggtggagg gctatcagggtt tgcatggccc	10860
gggacacggg cactttcat gaccctccc ccacctgggt tcttcctgtt tggtccagaa	10920
ccacgacccctt ggtaaaggaa ctatgaaac acaggccctt acctcccat gtctgttcc	10980
ggtcctcaca gcccacacg ccctgcttagt gcagacgaat gacattaatg tctgaagcag	11040
agtggagata gattagttagttagattttca aaaagaagga aaaaaaaaggc tgcattttaa	11100
aattatttcc tttagaattaa agataactaca tagggccctt tggttaagca aatccatttt	11160
tcccagggc tatcttgattt ctttggaaatg tttaaagtgtt gccttgccag agagcttacg	11220
atctatatct gctgcttcag agcctccctt gaggatggctt ctgttcctt gcttggtaga	11280
agagcgatgc ctggcagg gtttccccctt ttcagaataa caggggttaa agtccaggctt	11340
attacaaca aacaaacaaa caaacaaca aaggacccctt atttggagaa ttgcaaggat	11400
tttatctga attatagtgtt tggtgagttt aagtcatcac gccaatgtt tgccatctgtt	11460
gttgctattt taagaataat taggaggagg aacctagcca attgcagctc atgtccgtgg	11520
gtgtgtgcac ggggtcatat gttggaaagggtt gtgcctgtcc cttggggac agaaggaaaa	11580
tggaaaggccc ctctgctcac cctggcattt tacgggaggc tctgctgggtt ccacgggttc	11640
tgtgcaggat cctgaaactg actcgcttgcg cagaaacgag acttggcggc accatgagaa	11700
tggagagaga gagagcaaag aaagaaacag cttttaaaag aacttctaa ggggtttttt	11760
tgaacctcgc tggaccttgtt atgtgtgcac atttgcaga gattgaacat aatcctcttg	11820
ggacttcacg ttctcattttt ttgtatgtt ccggggtcac gcagagccgtt cagccaccac	11880
cccaagcaccc ggcacatagg cgtctcataa aagccctt tatgagaacc agagctttt	11940
gagtagcccg tgtatagaga gagttttgtt cgtggggcac ccggatccca gcagcctgg	12000
tgcctgcctt taggatgttt tacaggagttt tgcagagaaa ctttccttgg agggaaagaa	12060
atatcaggaa tttttgttta atattcaaa ttcagtttta agtgaagac tcagcagtgtt	12120
tcatggtaa ggtaaaggaaat atgccttttc cagagctgtt gcaagaggca ggagaaggcag	12180
acctgtctta ggtgtcactt cccaggtaa agacctgttca tcacaggcagg agcagagctgtt	12240
tgcagcctgg atggcatttcc tcccttattt tttgtgttccca cagcaaccctt ggtcacatag	12300
ggctggcat cttttttttt tttttttttt gcccagaatg aagtgaccat	12360
agccaagttt tttttttttt tttttttttt gcccagaatg aagtgaccat	12420

catttcaaaa taacactgta gagttgacag aactggcca tggatgttgc gagaggaaaa	12480
gagagggaaag aacaaaacaa aacaaaacac cacaaaccaa aaacatctgg gctagccagg	12540
catgattgca atgtctacag gcccagttca tgagaggcag agacaggaag accgccgaaa	12600
ggtcaaggat agcatggtct acgtatcgag actccagcca gggctacggt cccaagatcc	12660
tagtttgg attttggc ttgggtttt agacagggtt tctctgtta gcccctggctg	12720
tcctggaact cgctctgttag accaggctgg cctcaaactt agagatctgc ctgactctgc	12780
ctttgagggc tgggacgaat gccaccactg cccaaactaag attccattaa aaaaaaaaaa	12840
agttcaagat aattaagagt tgccagctcg ttaaagctaa gtagaagcag tctcaggcct	12900
gctgcttag gctgttcttg gcttgacact gaaatctgcc cccaaacagtg tccaagtgc	12960
catgactttg agccatctcc agagaaggaa gtgaaaattt tggctccccca gtcgattggg	13020
acacagtc tctttgtcta ggtAACACAT ggtgacacat agcattgaac tctccactct	13080
gagggtgggt ttccctcccc ctgcctctt tgggttggc accccatagg acagccacag	13140
gacagtca gacacact ggaaacctct ttgtggaaac atgaagaaag agcctttggg	13200
agattcctgg cttccattt gggctgaaag tacaacggtt cttgggttgc tttgcctcg	13260
gtttataaaa ctagctacta ttcttcaggtaaaaatccga tgggtggaa aagccaaaccc	13320
cgtggctgcc cgtgagtagg ggggtgggtt gggaaatcctg gatagtgttc tatccatgg	13380
aagtggtgga ataggaatta agggtgttcc ccccccccccc aacctttcc tcagaccag	13440
ccactttcta tgacttataaa acatccaggtaaaaattaca aacataaaaa tggttctct	13500
tctcaatctt ctaaagtctg cctgcctttt ccagggtagt gtcttttct ttgctgttct	13560
attgtcttga gagcacagac taacacttac caaatgaggg aactcttgc ccataactaag	13620
gctcttctgg gctccagcac tcttaagtta tttaagaat tctacttgc ccttttagcac	13680
acccgcacc cccaaagtggg tgtggataat gccatggcca gcagggggca ctgttgaggc	13740
gggtgcctt ccacctaag ttgcttatag tatttaagat gctaaatgtt ttaatcaaga	13800
gaagcactga tcttataata cgaggataag agatttctc acaggaaatt gtcttttca	13860
taattctttt acaggctttg tcctgatcgt agcatagaga gaatagctgg atatttaact	13920
tgtattccat tttcctctgc cagcgtttagg ttaactccgt aaaaagtgtat tcagtggacc	13980
gaagaggctc agagggcagg ggtatgggg gtgaggcaga gcactgtcac ctgccaggca	14040
tgggagggtcc tgccatccgg gagaaaagg aaagtttagc ctctagtctt ccaccagtgt	14100
taacgcactc taaagttgtta accaaaataa atgtcttaca ttacaaagac gtctgttttgc	14160
tgtttcctt tgggttttg ggcttttat gtgtgttta taactgtgt ggtgggtctg	14220
ttgttagtt tgaggttagga tctcaggctg gccttgaact tctgatcgcc tgccctgcc	14280
cctgccccctg cccctgtccc tgcctccaag tgcttaggact aaaagcacaat gccaccacac	14340
cagtacagca ttttctaac attaaaaat aatcacctag gggctggaga gagggttcca	14400
gctaagagtg cacactgctc ttgggttagga cctgagtttgc gttcccagaa cctataactgg	14460
gtggctccag gtccagagga tccaggaccc tggcctcca tggcatctg ctcttagcac	14520
ataccacat acagatacac acataaaaat aaaatgaagc cttaaaaac ctcctaaaac	14580
ctagccctt ggggtacgac tctggaaagc tggcatactg tgtaagtcca tctcatgg	14640
ttctggctaa cgtaagactt acagagacag aaaagaactc agggtgtgt ggggttggg	14700
atggaggaag agggatgagt aggggagca cggggactt gggcagtgaa aattcttgc	14760

aggacactag aggaggataa ataccagtca ttgcacccac tactggacaa ctccagggaa	14820
ttatgctggg taaaaagaga aggccccagg tattggctgc attggctgca tttgcgtaac	14880
attttttaa attgaaaaga aaaagatgta aatcaagggtt agatgagtgg ttgctgtgag	14940
ctgagagctg gggtagtga gacatgtgga caactccatc aaaaagcgac agaaagaacg	15000
ggctgtggc acagctacct ctaatctcca cctccggag gtgatcaagg ttagccctca	15060
gctagcctgt ggtgcatgag accctgttc aaaaactta ataaagaaat aatgaaaaaa	15120
gacatcaggg cagatcctt gggccaaagg cggacaggcg agtctcggtg taaggtcg	15180
tagaagcga tgcattgagca cgtgccgcag gcatcatgag agagccctag gtaagtaagg	15240
atggatgtga gtgtgtcgcc gtcggcgac tgcacgtcct ggctgtggc ctggactggc	15300
atctttggc agctgtggag gggaaatggg tagggagatc ataaaatccc tccgaattat	15360
ttcaagaact gtctattaca attatctcaa aatattaaaa aaaaagaaga attaaaaaaac	15420
aaaaaaaccta tccaggtgtg gtgggtgtca cctatagcca cggcacttg gaaagctgga	15480
gcaagaggat ggcgagttt aaggtatctg gggctgtaca gcaagaccgt cgtccccaaa	15540
ccaaacccaa cagcaaacc attatgtcac acaagagtgt ttatagttag cgccctcgct	15600
gagagcatgg ggtgggggtg ggggtgggg acagaaatat ctaaactgca gtcaataggg	15660
atccactgag accctgggc ttgactgcag cttAACCTG ggaaatgata agggtttgt	15720
gtttagtaaa agcatcgatt actgacttaa cctcaaataa agaaaaagaa aaaaagaaaa	15780
caacaaagc caaaccagg ggctgtgtg atggctcagt gggtaagagc acccgactgc	15840
tcttccgaag gtccagagtt caaatccag caaccacatg gtggctcaca accatctgt	15900
acgagatatg atgcccttt ctgggtgtc tgaagacagc tacagtgtac ttacatataa	15960
taaataaaatc ttaaaaaaaaaaaa aaaaagccaa ccgagcaac caggccccca	16020
aacagaaggc aggcacgacg gcaggcacca cgagccatcc tgtggaaagg cagggctacc	16080
catggccga ggagggtcca gagagatagg ctggtaagct cagttctct gtataccctt	16140
tttcttggc acactacttc aattacagat aaaataacaa ataaacaaaa tcttagagcct	16200
ggccactctc tgctcgctt attttcctg ttacgtccag caggtggcgg aagtgttcca	16260
aggacagatc gcatcattaa ggtggccagc ataatctccc atcagcaggt ggtgctgtga	16320
gaaccattat ggtgctcaca gaatccggg cccaggagct gccctctccc aagtctggag	16380
caataggaaa gcttctggc ccagacaggg ttaacagtcc acattccaga gcagggaaa	16440
aggagactgg aggtcacaga caaaaggcc agcttctaact aacttcacag ctctggtagg	16500
agagatagat caccccaac aatggccaca gctggtttg tctggccga aggaaactga	16560
cttaggaagc aggttatcaga gtcccttcc tgagggact tctgtctgcc ttgtaaagct	16620
gtcagagcag ctgcattgtat gtgtgggtga cagaagatga aaaggaggac ccaggcagat	16680
cggccacagat ggaccggcca cttacaagtc gaggcaggtg gcagagcctt gcagaagctc	16740
tgcaggtgga cgacactgtat tcattacca gttacatc acacgcggc taggcggacc	16800
acagcctcct tcccagtctt cctccaggc tggggagttcc tccaaccttc tgtctcagt	16860
cagctccgc cagccctcc tcctttgca cctcagggtt gaaccctccc tcctctcctt	16920
ctccctgtgg catggccctc ctgctactgc aggctgagca ttggatttct ttgtgcttag	16980
atagacctga gatggctttc tgatttat atatatatcc atcccttggaa tcttacatct	17040
aggaccaga gctgtttgtg ataccataag aggctggga gatgatatgg taagagtgt	17100

tgctgtacaa gcatgaagac atgagttcga atccccagca accatgtgga aaaataacct	17160
tctaacctca gagttgaggg gaaggcagg tggattctgg gggcttactg gccagctagc	17220
cagcctaacc taaatgtctc agtcagagat cctgtcttag ggaataactt gggagaatga	17280
ctgagaaaga cacccctca ggtctccat gcacccacac agacacacgg ggggggggta	17340
atgtataag ctaagaaata atgaggaaa tgatTTTt ctaagaaatg aaattctgt	17400
ttggcccaa gaagcctggc caggaaagga actgccttg gcacaccagc ctataagtca	17460
ccatgagttc cctggctaag aatcacatgt aatggagccc aggtccctt tgcctggtgg	17520
ttgcctctcc cactggttt gaagagaaat tcaagagaga ttccttggt cagaattgtt	17580
ggtgctgagc aatgtggagc tgggtcaat gggattcctt taaaggcatc cttccaggg	17640
ctgggtcata cttcaatagt agggtgctt cacagcaagc gtgagaccct aggttagagt	17700
ccccagaatc tggcccaac cccccaaaaa ggcacccctc tgcctctgg tgggtgggg	17760
gagcaaacac cttaactaa gaccattagc tggcaggggt aacaaatgac cttggctaga	17820
ggaatttggt caagctggat tccgcctt tcttgcactt ctttgtttaag	17880
ctggcccaca gttgtttt agaatgcctg agggcccccag ggagccagac aattaaaagc	17940
caagctcatt ttgatatctg aaaaccacag cctgactgcc ctgcctgtgg gaggtactgg	18000
gagagctggc tggccctg ctcaccaac gcccccccc ccaacacaca ctcctcggtt	18060
cacctggag gtgcacccagc caatttggaa gtttactgag cttgagaagt cttggaggg	18120
ctgacgctaa gcacacccct tctccacccc cccccacccc accccgtga ggaggagggt	18180
gaggaaacat gggaccagcc ctgctccagc ccgtccttat tggctggcat gaggcagagg	18240
ggcattaaa aaggcaaccg tatctaggct ggacactgga gcctgtgcta ccgagtgc	18300
tcctccaccc ggcagcatgc agccctact agccccgtgc ctcatctgcc tacttgtca	18360
cgctgcctt tggctgtgg agggccagg gtggcaagcc ttccaggaatg atgccacaga	18420
gtcatccca gggcttggag agtacccga gcctcctctt gagaacaacc agaccatgaa	18480
ccggcggag aatggaggca gaccccca ccatccctat gacccaaag gtacggatg	18540
aagaaggcaca ttatggggg ggggggtctt gggaggtgac tgggtgggtt ttagcattt	18600
cttcagaggt ttgtgtgggt ggctagcctc tgctacatca gggcaggac acattgcct	18660
ggaagaatac tagcacagca tttagaacctg gagggcagca ttgggggct ggttagagagc	18720
acccaaggca gggtgaggc tgaggtcagc cgaagctggc attaacacgg gcatggc	18780
gtatgttgtt ccagagaatc tcctcctaag gatgaggaca caggtcagat ctatgtctg	18840
accagtgggg aagtgtatgt gtgaggctgg atgcccagatg ccatccatgg ctgtactata	18900
tcccacatga ccaccacatg aggtaaagaa ggccccagct tgaagatgga gaaaccgaga	18960
ggctcctgag ataaagtacac ctgggagtaa gaagagctga gactggaagc tggttgtac	19020
cagatgcaag gcaacccctt attgggtttt ggtggaaacc tgaagccagg aggaatccct	19080
ttatgtcccc ctggccagg gtctgctcaa tgagcccaga gggtagcat taaaagaaca	19140
gggtttgtag gtggcatgtg acatgagggg cagctgagtg aaatgtcccc tgtatgagca	19200
caggtggcac cactggccct gagctgcac cctgacccca gcttgcctc attcctgagg	19260
acagcagaaa ctgtggaggc agagccagca cagagagatg cctgggtgg gggtgggggt	19320
atcacgcacg gaacttagcag caatgaatgg ggtgggtgg cagctggagg gacactccag	19380
agaaaatgacc ttgctggta ccatttgcgtt gggaggagag ctcatttcc agctgcccac	19440

cacatgctgt ccctcctgtc tcctagccag taagggatgt ggaggaaagg gccacccaa	19500
aggagcatgc aatgcagtca cgttttgca gaggaagtgc ttgacctaag ggcactattc	19560
ttggaaagcc ccaaaaactag tccttcctg ggcaaacagg cctccccac ataccaccc	19620
tgcaggggtg agtaaattaa gccagccaca gaagggtgca aaggcctaca cctccccct	19680
gttgtgcccc cccccccccc gtgaaggtgc atcctggcct ctgcccctt ggcttggt	19740
ctgggatttt tttttcctt ttatgtcata ttgatcctga caccatggaa cttttggagg	19800
tagacaggac ccacacatgg attagttaaa agcctccat ccatctaagc tcatggtagg	19860
agatagagca tgtccaagag aggagggcag gcatcagacc tagaagatat ggctggcat	19920
ccaaccaat ctccctcccc ggagaacaga ctctaagtc gatccagcca cccttgagta	19980
accagctcaa ggtacacaga acaagagagt ctggtataca gcaggtgcta aacaaatgct	20040
tgtggtagca aaagctatacg tttttggc agaactccga cccaagtcgc gagtgaagag	20100
cgaaaggccc tctactcgcc accgccccgc ccccacctgg ggtcctataa cagatcactt	20160
tcacccttgc gggagccaga gagccctggc atcctaggta gcccccccg cccccccccc	20220
gcaaggcagcc cagccctgcc tttgggcaa gttctttct cagcctggac ctgtgataat	20280
gagggggtt gacgcgccgc ctgggtcgc tttcaagtct aatgaattct tatccctacc	20340
acctgcctt ctaccccgct cctccacagc agctgtcctg atttattacc ttcaattaac	20400
ctccactcct ttctccatct cctggatac cgccctgtc ccagtggctg gtaaaggagc	20460
tttaggaagga ccagagccag gtgtggctag aggctaccag gcagggctgg ggtatgaggag	20520
ctaaactgga agagtgtttt gtttagtaggc acaaagcctt gggtgggatc cctagtaccg	20580
gagaagtgga gatggcgct gagaagttca agaccatcca tccttaacta cacagccagt	20640
ttgagggccag cctggctac ataaaaaccc aatctcaaaa gctccaatt ctgattctgt	20700
gccacgtgt gcccgtatc atagtggatg aagtgcgtga atcctgggc aacctatccc	20760
acagatgtgg gaaaaagcaa cttaagtac cctgcccaca gatcacaaag aaagtaagt	20820
acagagctcc agtgtttcat ccctgggttc caaggacagg gagagagaag ccaggggtgg	20880
atctcactgc tccccgggtc ctccttcata taatccatac agattcgaaa ggcgcaggca	20940
ggtttggaaa aagagagaag ggtggaaagga gcagaccagt ctggcctagg ctgcagcccc	21000
tcacgcattcc ctctctccgc agatgtgtcc gagtacagct gccgcgagct gcactacacc	21060
cgcttcctga cagacggccc atgccgcagc gccaagccgg tcaccgagtt ggtgtgtcc	21120
ggccagtgcg gccccgcgcg gctgcgtccc aacgcctcg ggccgcgtaa gtggcggcgc	21180
ccgaacggac cgatttccg ctgcattcccg gatgcgtacc ggcgcagcg ggtgcagctg	21240
ctgtgccccg gggcgccgg cccgcgtcg cgcaagggtgc gtctgggtgc ctcgtgcaag	21300
tgcaagcgcc tcacccgctt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg gccggagacc	21360
gcccggccgc agaagggtcg caagccgcgg cccggccccc ggggagccaa agccaaccag	21420
gcggagctgg agaacgccta ctagagcgag cccgcgccta tgcaagccccc ggcgcgtcc	21480
attcgtttc agtgtaaagc ctgcagccca ggccagggtt gccaacttt ccagaccgtg	21540
tggagttccc agcccgatag agaccgcagg tccttctgcc cgctgcggg gatggggagg	21600
gggtgggtt cccgcggcc aggagaggaa gcttgagttcc cagactctgc ctggccccc	21660
gtggatggg ggtctttcta ccctcgccgg acctatacag gacaaggcag tgtttccacc	21720
ttaaaggaa gggagtgtgg aacgaaagac ctggactgg ttatggacgt acagtaagat	21780

ctactccttc cacccaaatg taaaggctgc gtgggctaga tagggttct gaccctgacc	21840
tggccactga gtgtgatgtt gggctacgtg gttctttt ggtacggct tctttgtaaa	21900
atagggaccg gaactctgct gagattccaa ggattgggt accccgtgta gactggtag	21960
agagaggaga acaggggagg gtttagggga gagattgtgg tggcaaccg cctagaagaa	22020
gctgttgtt ggctcccagc ctgcgcgcct cagaggttg gcttccccca ctccttcctc	22080
tcaaatactgc cttcaaatacc atatctggga taggaaaggc cagggtccga gagatggtag	22140
aaggccaga aatcacactc ctggccccc gaagagcagt gtccgcddd caactgcctt	22200
gtcatattgt aaaggattt tctacacaac agtttaaggt cggtggagga aactggctt	22260
gccagtcacc tccatcctt gtcccttgc aggacaccac ctccgcctg ccacccacgg	22320
acacatttct gtctagaaac agagcgtcg cgtgcgtcc tctgagacag catatcttac	22380
attaaaaaga ataatacggg gggggggggc ggagggcgc agtttatac atatgttag	22440
aagctgtcag gcgcacacgc accaccaca atcttttgtt aaatcatttc cagacaccc	22500
ttacttctg tgttagattt aattgttaaa agggaggag agagacggt tgtaacagaa	22560
gcacatggag ggggggttag gggggttggg gctggtgagt ttggcgaact ttccatgtga	22620
gactcatcca caaagactga aagccgcgtt ttttttttta agagttcagt gacatatttta	22680
ttttctcatt taagttattt atgccaacat tttttctt tagagaaagg cagtgttaat	22740
atcgcttgtt gaagcacaag tgtgtgttgt tttttttttc ttgtttttc cccgaccaga	22800
ggcattgtta ataaagacaa tgaatctcgac gcaggaggct gtggcttgc tttgtcaacc	22860
acacacaatg tctgcactt gtcatctcac tcccttcct tggcacaag acccaaacct	22920
tgacaacacc tccgactgct ctctggtagc cttgtggca atacgtttt ccttgaaaa	22980
gtcacattca tccttcctt tgcaaaccctg gctctcattt cccagctggg tcatcgcat	23040
accctcaccc cagcctccct ttagctgacc actctccaca ctgtttcca aaagtgcacg	23100
tttcaccgag ccagttccctt ggtccaggc atcccttgc tcctccttgc tccagaccct	23160
tctccacaa agatgttcat ctcccactcc atcaagcccc agtggccctg cggctatccc	23220
tgtctttca gttagctgaa tctacttgc gacaccat gaattccttcc ccctgttta	23280
agttcatgg aactcttgcc tgccctgaa cttccagga ctgtccaggc gtctgatgt	23340
tcctctctt tgtaaagccc cacccacta tttgattccc aattctagat ctcccttgc	23400
tcattccttc acggatagt gtctcatctg gccaaagtctt gcttgatatt gggataaatg	23460
caaagccaag tacaattttag gaccagttca tcattggggcc aagcttttcaaaaatgtgaa	23520
ttttacacct atagaagtgt aaaaggcttc caaagcagag gcaatgcctg gctttctt	23580
caacatcagg gtcctgctt tatgggtctg gtgggttagt acattcataa acccaacact	23640
aggggtgtga aagcaagatg attggaggtt cgaggccaat ctggctatg aggcctgtc	23700
tcaacacttc ctccctccct ccagggtttt gttttttttt gtttttttga tttgaaactg	23760
caacacttta aatccagtca agtgcattt tgcgtgaggg gaactctatc cctaataataa	23820
gcttccatct tgattgtgt atgtgcacac tgggggttga acctggccct ttgtacctgc	23880
cggcaagct ctctactgct ctaaaccctt ccctcactgg ctttctttt caactccaa	23940
tgaattcccc taaatgaattt atcaatatac tgcgtttttt gtttttttga tttgaaactg	24000
ggtgtccctg tggttccaga ttccaggaag gacttttcag ggaatccagg catcctgaag	24060
aatgtcttag agcaggaggc catggagacc ttggccagcc ccacaaggca gtgtggtag	24120

gagggtgagg atggaggcag gcttgcatt gaagctgaga cagggtactc aggattaaaa	24180
agcttcccccaaaacaatttcaagatcagt tcctggact tgcacctgtt cagctatgca	24240
gagcccagtggcataggt aagacaccgg ttgtactgtc atgtactaac tgtgcttcag	24300
agccggcaga gacaaataat gttatggta ccccaggga cagtgattcc agaaggaaca	24360
cagaagagag tgctgctaga ggctgcctga aggagaaggg gtcccagact ctctaagcaa	24420
agactccact cacataaaga cacaggctga gcagagctgg ccgtggatgc agggagccca	24480
tccaccatcc tttagcatgc cttgttatttccatcacatg ccagggatga ggggcatcag	24540
agagtccaag ttagccccaa acccaaacac acctaggact tgcttctgg gacagacaga	24600
tgcaggagag actaggttg gctgtatcc cattaccaca aagagggaaa aaacaaaaaa	24660
caaacaaca aacaaaaaaa aacaaaacaa aacaaaaaaa aacccaaggt ccaaattgtt	24720
ggtcaggtt gagtttattt atggaaagtt atattctacc tccatgggt ctacaaggct	24780
ggcgcccatc agaaagaaca aacaacaggc tgatctggga ggggtggcac tctatggcag	24840
ggagcacgtg tgcttgggt acagccagac acggggctt tattatcac agggcttgc	24900
ttaataggct gagagtcaag cagacagaga gacagaagga aacacacaca cacacacaca	24960
cacacacaca cacacacaca catgcacaca ccactcatttctactcgaa gagcccctac	25020
ttacattcta agaacaacc attcctcctc ataaaggaga caaagttgc gaaacccaaa	25080
agagccacag ggtccccact ctcttgaaa tgacttggac ttgttgcagg gaagacagag	25140
gggtctgcag aggcttcctg ggtgacccag agccacagac actgaaatct ggtgctgaga	25200
cctgtataaa ccctttcca caggtccct gaaaggagcc cacattcccc aaccctgtct	25260
cctgaccact gaggatgaga gcacttggc cttcccttatttcttgagtc accctgggtt	25320
ccccatctga gggcacatga ggtctcaggcttggaaag ttccacaagt attgaaagt	25380
ttcttggttt gtttgtattt taatttagt gtatgagtgc ttgttgcata atatatgcct	25440
gtgttagcatt tacaaggctg gtgcctgagg agatcagaag atggcatcag ataccctgg	25500
actggacttg cagacagtta tgagccactg tgtgggtgct aggaacagaa cctggatcct	25560
ccggaagagc agacagccag cgctcttagc cactaagcca tcactgaggt tcttctgtg	25620
gctaaagaga caggagacaa aggagagttt cttttagtca ataggaccat gaatgttcc	25680
cgtaacgtga gactaggca gggatccc ccagtgcac cgtggccct gtgtagttat	25740
tagcagctct agtcttattt cttataaagt cccagttgg ggcaggagat atgtattccc	25800
tgcttgaag tggctgaggt ccagttatct acttccaaatcttgc ttgttgcatttcttgc	25860
ttggggaaagc tccctgcctg cctgtaaatg tgtccatttct tcaaccttag acaagatcac	25920
tttccctgag cagtcaggcc agtccaaagc cttcaattt agcttcata aggaacaccc	25980
cttttgggttgg gtggaggtag cacttgcctt gaatcccagc attaagaagg cagagacagt	26040
cggatctctg tgagttcaca gccagcctgg tctacggagt gagttccaaag acagccagcc	26100
ctacacagag aaaccctgtc tcgaaaaaaa caaaaacaaa agaaataaag aaaaagaaaa	26160
caaaaacgaa caaacagaaa aacaagccag agtgtttgtc cccgtatattt attaatata	26220
tttttgcctt tttgccattt tagactaaaaa gactcgggaa agcaggctc tctctgttcc	26280
tcatccggac acacccagaa ccagatgtat ggaagatggc taatgtctg cagttgcaca	26340
tctggggctg ggtggattgg ttagatggca tggctgggt gtggtaacga tgactgcagg	26400
agcaaggagt atgtggtgca tagcaaacga ggaagttgc acagaacaac actgtgtgt	26460

ctgatgtgca ggtatggca catgcaagca gaagccaagg gacagccta gggtagtgtt	26520
tccacagacc cctccccct tttAACATGG gcataCTCTCA ttggcCTGGA gcttgccaac	26580
tgggctggc tggctAGCTT gtaggtcccA gggatctgca tatctctGCC tccctagtgc	26640
tgggattaca gtcataATATG agcacacCTG GCTTTTTat gtgggttctg ggcttgaac	26700
ccagatCTGA gtGCTTGCAA ggcaatcggt tgaatgactg cttcatCTCC ccagaccTG	26760
ggattctact ttCTATTAAA gtatttctat taaatcaatg agcccTGcc cctgcactca	26820
gcagttCTTA ggcCTGCTGA gagTCAGTG gggagtGAGA gcaagcCTG agacCCATC	26880
agcgaAGCAG aggACAAAGA aatgAAAact tgggattcGA ggctCGGat atggagatac	26940
agaaaAGGTC aggGAAGGAA atGAACCAGA tgaatAGAGG cAGGAAGGGT aggGCCCTG	27000
atacatggaa CCTGGTGTAC atgttatCTG catgggTTT gcattGCAAT ggctCTTCAG	27060
caggttCACC acactGGGAA acagaAGCCa AAAAGAAGAG taggtGGTGT tggagtCAGA	27120
tactgtcagt catgcCTGAA gaaatGGAAG caattaACGA tgcGCCGCAA ttaggatatt	27180
agctccCTGA agaaAGGCAA gaagCTGGC tgtGGCact gaaggagCT ttGAATGATG	27240
tcacattCTC tgtatGCCTA gcaggcAGT attggagACT gagactTGAC ttgtgtGTCC	27300
atATGATTCC tcCTTTCTC acagtCATCT ggggcTCCTG agctCGTCC ttgtCCAAGA	27360
acctggagCT ggCAGTGGC agCTGAGTG atAGATGTCT gcaAGAAAGA tctgAAAAGA	27420
gggagGAAGA tgaaggACCC agaggACCAC cgacCTCTGC tgcCTGACAA agCTGcAGGA	27480
ccagtCTCTC ctacAGATGG gagACAGAGG CGAGAGATGA atggTCAGGG gaggAGTCAG	27540
agaaaAGGAGA gggTgaggCA gagACAAAG gagggAAACA cttgtGCTCT acagCTACTG	27600
actgagTACC agCTGCGTGG cagACAGCCa atGCCAAGGC tcggCTGATC atggCACCTC	27660
gtgggactCC tagCCCAGTG ctggcAGAGG ggagtGCTGA atggTCATG gtttggatAT	27720
gatCTGAATG tggTCAGGC ctAGTTCT tccAGTTGCT gggataAAAGC accCTGACCA	27780
aagCTACTTT ttgtttGTT tggTTTGTt tggTTTGTt tggTTTGTg aggCAGGGTT	27840
tctCTGTATC accCTAGCTG tccTGAACt cactCTGTAG accaggCTGG CCTCGAACtC	27900
agaaaATCCCC ctgcCTCTGC ctcctaAGTG ctggAAATTAA aggCCTGCGC caccACTGCC	27960
ggcccAAAGC tacttaAGAAG gagAGAGAGG AATGTATAAG tattataATT ccaggttATA	28020
gttcattGCT gtAgAAATTGG agtCTTCATA ttccAGGTAA tctcccACAG acatGCCACA	28080
aaacaACCTG ttctACGAAA tctCTCATGG actCCCTTC CCAGTAATTc taaaACTGTGT	28140
caaATCTACA agaaATAGTG acagtCACAG tctctaACGT tttggcATG agtCTGAAGT	28200
ctcattGCTA agtACTGGGA agatGAAAAC tttacCTAGT gtcAGCATTG ggAGCAGAGC	28260
ctttgggatt tgAGATGGC tttgcAGAG ctcctaATGG ctacatGGAG agagggggCC	28320
tgggAGAGAC ccataCACCT tttgCTGCCT tatgtCACCT gacCTGCTCC ttggGAAGCT	28380
ctagcaAGAA ggcCTTCCCT ggatCACCCA ccacCTTGCA CCTCCAGAAC tcAGAGCCAA	28440
attaaACTTT ctgttACTG tcgtCAAAGC acagtCGGTc tgggttGTAT cactGTCAAT	28500
gggAAACAGA ctgcCTGGA tggataACTT gtacATTGCA taatGTCTAG aaatgAAAAG	28560
tcctATAGAG aaaaAGAAAAA ttAGCTGGCA cacAGATAGA ggCCCTGGAG gaggCTGGCT	28620
ttgtccTCCC cgaggAGGTG gcgAGTAAGG tGtaaatGTT catggatGTA aatggGCCA	28680
tatATGAGGG tctgggtaa caAGAAGGCC tGtGAATATA aagcactgaa ggtatgtcta	28740
gtctggagaa ggtcactaca gagAGTTCTC caactcAGTG cccatacaca cacacacaca	28800

cacacacaca cacacacaca cacacacaca ccacaaagaa aaaaaggaag aaaaatctga	28860
gagcaagtac agtacttaaa attgtgtat tgtgtgtgt actctgtat cacatgcta	28920
tcttgcccta ttagttgaaa accaatggc ccctgagagg cataacaacc acactgttg	28980
ctgtgtgctc acgttttct taaagcgtct gtctggttt ctgcttagcat caggcagact	29040
tgcagcagac tacatatgct cagccctgaa gtcctctag ggtgcatttc tcttcagaat	29100
ttcagaaagt catctgtggc tccaggaccg cctgcactct ccctctgccg cgaggctgca	29160
gactcttaggc tgggtggaa gcaacgctta cctctggac aagtataaca tggtggctt	29220
tcttcctc tgggtgtcca acctggacat aaaatagatg caagctgtgt aataaatatt	29280
tcctccgtc cacttagttc tcaacaataa ctactctgag agcacttatt aataggtggc	29340
tttagacataa gctttggctc attccccac tagctttac ttcttaact ctttcaaacc	29400
attctgtgtc ttccacatgg ttagttacct ctcctccat cctggttcgc ttctccccc	29460
gagtcgcct cagtgtctc aggtgatgt tgtaagatat tcttctaca aagctgagag	29520
tgggtgcact ctgggagttc aaagccagcc tgatctacac agcaagctcc aggatatcca	29580
gggcaatgtt gggaaaacct ttctcaaaca aaaagagggg ttcatgtgtc aggaggagac	29640
ccatgggtta agaagtctag acgagccatg gtgtatgcata ccttcatcc aagcacttag	29700
gaggcaaaaga aaggtgaaac tctttactt tgaggccagc tagttacat agtatacc	29760
tgcttagtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgttaatt taaaagtcta	29820
aaaatgcatt ctttaaaaaa tatgtataag tatttgcctg cacatatgta tgtatgtatg	29880
tataccatgt gtgtgtctgg tgctgaagga ctaggcatac actccctaga actagagtc	29940
tagacagtt tgacactccc caaccccca ccatgtgggt gcttgaagct aaactcctgt	30000
cctttgtaaa gcagcagggtg tctatgaacc ctgaaccatc tctccagtct ccagatgtgc	30060
attctcaaag aggagtctt catattccc taaactgaac atccttatca gtgagcatcc	30120
tcgagtcacc aaagctactg caaacctct taggaaacat tcactattca cttctacttg	30180
gctcatgaaa cttaaagtaca cacacacaaa cacacacaca cacacagagt catgcactca	30240
caaaagcatg catgtacacc attcttatta gactatgctt tgctaaaaga cttccttaga	30300
tactttaaaa catcaactct gcctttggc gggcagggtc caagattggc actggcgatc	30360
tggaaactga acaaggtaga gatctagaaa tcacagcagg tcagaaggc cagcctgtac	30420
aagagagagt tccacacaccc ccaggaacac tgagcaggg gctggaccc tgcctctcag	30480
cccaagaaac tagtgcgtt cctgtatgca tgcctctcag agattccata agatctgcct	30540
tctgccataa gatctcctgc atccagacaa gcctaggaa agttgagagg ctgcctgagt	30600
ctctccaca gcccccttct tgcctggcag tatttttta tctggaggag aggaatcagg	30660
gtggaaatga tcaaatacaa ttatcaagga aaaagtaaaaa aacatatata tatatatatt	30720
aactgatcta gggagctggc tcagcagtta agagttctgg ctgccttgc ttcatgttt	30780
gctttgattc ccagcaccca catgatggct ttcaactgta tctctgttc cagggatcc	30840
aacagcctct tctgacccctc atagacaaga cctagtcctc tgcaagagca ccaaattgtc	30900
ttatctgttg atccatctct ctagcctcat gccagatcat taaaactac tggacactgt	30960
cccattttac gaagatgtca ctgcccagtc atttgccatg agtggatatt tcgattctt	31020
ctatgttctc acccttgcaa ttataagaa agatatctgc atttgtctcc tgagagaaca	31080
aagggtggag ggctactgag atggctctag ggtaaaggt gcttgcaca aaatctgaca	31140

acttaagttt ggtcttgaa tccacatgg ttagagagag aagagattcc cgtaagttgt	31200
cctcaaactt cccacacatg tgctgtggct tatgtgtaac cccaataagt aaagatagtt	31260
ttaaacacta cataaggtag gtttctca tgaccccaag gaatgatgcc cctgatagag	31320
cttatgtga aaccccatct ccattgtgcc atctggaaag agacaattgc atcccgaaa	31380
cagaatcttc atgaatggat taatgagcta ttaagaaagt ggctggta ttgcacatgc	31440
tggcggcgta atgacctcca ccatgatgtt atccagcatg aaggtcctca ccagaagtca	31500
tacaaatctt ctaggcttc cagagtcgtg agcaaaaaaa gcacacctct aaataaatta	31560
actagcctca ggttagttaac caccggaaat gaaccaaggc agttctaata caaaaccact	31620
tccctccct gtc当地acca cagtcccta ttatctaaaa gataaacttc aagccaagct	31680
tttaggttgc cagtattttat gtaacaacaa ggcccgttga cacacatctg taactcctag	31740
tactggcct cagggcaga gacaggtgga gccctggagt ttgaattcca ggttctgtga	31800
gaaaactctgt ctgaaaagac aatatggta gtgacccggg aggatatctg atattgactt	31860
ctggccaaca cacagccatc tctgcacatc tgttagttca agcctttgc actaagtttgc	31920
gccagagtca gagtttgc当地 gtgttgc当地 actgaatgca cgtttgctg gtgatctaca	31980
aagtccccct ccttctcaag ctagcagcac tggctcggc cagctgctca ttcaagcctc	32040
tttgcagagt catcacgggg atgggggagc agggccccctc cctagaacac caagcctgtg	32100
gttgttatt caggacatta ttgagggcca agatgacaga taactctatc acttggccaa	32160
cagtcgggtt ttgcgggtt aggttatttgc tttgtctgca gaaaacagtg caacctggac	32220
aaaagaaata aatgatataca ttttcatttca aggcaacttag attccgttgt acaaaaggct	32280
ccctgggaa cgaggccggg acagcgcggc tcctgagtcg ctattccgt ctgtcaactt	32340
ctctaatttc ttgatttc当地 ccctctgtct gttc当地tcc tcttgctggg gcccagtgaa	32400
gtctgtgtac tcacagggag gaggggtggca aagcccttgtt cctctacggg ctggggaaag	32460
gggggaagct gtc当地ccag tgacttttcc ccccttctt ttttctt当地 aaccagtctc	32520
aatttaagat aatgagtctc ctcattcacg tgtgctact attcataggg acttatccac	32580
ccccgcctg tcaatctggc taagtaagac aagtcaaatt taaaaggaa cgttttctaa	32640
aaaatgtggc tggaccgtgt gccggcacga aaccaggat ggccgtctaa gttacatgct	32700
ctctgccagc cccggc当地tcc tttc当地tcc gaaaggagac ccggaggtaa aacgaagttg	32760
ccaacttttgc atgatgggtgt gc当地gggtg actctttaaa atgtcatcca tacctggat	32820
agggaaggct cttcaggagat tcatctagcc ctccctt当地 gaaaagattc cacttccgtt	32880
ttagtagct tccacctgg tccctt当地ccg ctgtctctg ccactagtcc tcatccatcc	32940
ggtttccgccc ctc当地ccacc ttgccc当地tta agttccctaga aagcagcacc gtatgtt当地gg	33000
caggtggggcc attggctact ccgctaccac ttgttaccatg gccaccaagg tgtcattaa	33060
atatgagctc actgagtcct gc当地ggatggc ttgggtt当地ta atatgcttgc tgcaaaatcg	33120
tgagaactgg agttcaatttcc cagcacatg gatgtatttgc cagcacctgg aaggcaggaa	33180
gcagagatct taaagctcct gccagacag cccagctaa ttagtaatca gtgagagacc	33240
ctgtctcaag aaacaagatg gaacatcaaa ggtcaacctc ttgtctccac acacacaaat	33300
acacacatgc acatacatcc acacacaggc aaacacatgc acacacctga acaccctcca	33360
caaatacata cataaaaaaaa taaatacata cacacataca tacatacacc aacattccct	33420
ctc当地tagtc tc当地ggctac gctctgtca cccccc当地taa ggctcaact tcttctt当地ttt	33480

cttcatcttg actcctctgt actttgcatt cctttccag caaaggctt tcttaaatc	33540
tccgtcattc ataaaactccc tctaaatttc ttcccctgcc ctttcttgc tctcttaggaa	33600
gataaagaca cacactacaa agtcaccgtg ggaccagttt attcacccac ccaccctgc	33660
ttctgttcat cggccagct aagtagtcca acctctctgg tgctgtaccc tggaccctgg	33720
cttcaccaca gtcctccat gtcaccaggc ctcgaaacc ttcaagcctag cctctgggtc	33780
tccaaccaggc acaggcccag tctggcttct atgtcctaga aatcccttc attctctcca	33840
tttcctcctt gaatctacca cttctttctt cccttctcctt gacctctaatt gtcttggta	33900
aacgattaca aggaagccaa tgaaattagc agtttgggtt acctcagagt cagcaggggaa	33960
gctggatga attcacattt ccaggccttt gcttgcctt ccggattctg acaggcagtt	34020
ccgaagctga gtccaggaag ctgaatttaa aatcacactc cagctgggtt ctgaggcagc	34080
cctaccacat cagctggccc tgactgagct gtgtctgggtt ggcagtggtt ctgggtgtc	34140
tgggtgtc ggtgggtgtt gtgggtgtt gggtgggtt ggtgtgtt tgggtgtgt	34200
ttttctgctt ttacaaaact ttcttaattt ttatacaag gacaaatctg cctcatatag	34260
gcagaaagat gacttatgcc tatataagat ataaagatga cttaatgccca cttattagca	34320
atagttaatc tcaaaagttt ttcttattt acaccctt acatggatt gcttttgtt	34380
gagactctaa aatccagatt atgtatttaa aaaaaaaatc cccagtcctt aaaaggtgaa	34440
gaatggaccc agatagaagg tcacggcaca agtatggagt cggagtggtt agtcctgcc	34500
atggctgga cagaagcattc cagagagggtt ccaagacaaa tgcctcgctt cctaaggaac	34560
actggcagcc ctgatgaggtt accagagatt gctaagtggaa ggaatacagg atcagaccca	34620
tggagggct taaagcgtt ctgttagcagc cctccgctt gggctccag gtggcgc	34680
aaggtgctgc agtgggagcc acatgagagg tgatgtctt ggtcaccc ggttaccatt	34740
gttttagggatgtt gttgggtt gttgggtt gacaggcagc ctcaaggatg ctttcaaca	34800
atggttatgtt agttggactt aaaaacagggg ccatcacact ggctccata gctctggct	34860
tgccttc cacatctgccc cccacccccctt tgtctggcac cagctcaagc tctgtgattc	34920
tacacatcca aaagaggaag agtagcttac tggcatgcc acctttctt gaccatcagg	34980
ttagagtggtt gcaagccctt ggctcctgtt caggatgcag ggctgccaga taggatgtc	35040
agctatctcc ttagctggaa ctattttagg aataaggatt atgcccgc ggggttggcc	35100
agcaccctt cagcctgtt ttgcgtaaaa gcaagtgcgtt ttgatttac taaaaacaga	35160
gccgtggacc caccacagg acaagtatgtt atgcattttt ttcatgttac tggatgtt	35220
cacaaccatttttccatca tggcatctt ctaacccca ttctttttt ttttgggg	35280
ttgagacagg gttctctgtt gtagtcctgg ctgtctggaa actcaactt tagaccaggc	35340
tggcctcgaa ctcagaaatc ctgggattaa aggtgtgtc caccacgccc ggccttaacc	35400
cccttccatca atgggtatcc agtgggtt gtttcggcc acacacatgtt ccattaggaa	35460
ttagctgtt tcttctgagc tacctggatc aatctttatc ccctggggcc tggctcctt	35520
atccctgact cggcccgat caagtcaggat tcctggccc gatcaagtcc agttcctgg	35580
cccgaaacaaatc tccagtcctt agtcgttac gtcatttcgtt gtccttgcctt ctgttcttac	35640
ttacactctt ccccttgctt tggactt gctttcttta ctcaagttgtt ctgcccacagt	35700
ccctaagccaa cctctgttac acaactaaga taataacttcc ctcaagcactt gaaagtccgt	35760
agtcaccaca ccctctggat gttgtgtt gatgttcat gcgtgtgtt ggccttacgt	35820

acgtgtgc	35828
<210>18	
<211>9301	
<212>DNA	
<213>人	
<400>18	
tagaggagaa gtctttgggg agggttgct ctgagcacac cccttcctt ccctccgggg	60
ctgagggaaa catgggacca gccctcccc accctgtcct cattggctgg catgaagcag	120
agagggcct taaaaaggcg accgtgtctc ggctggagac cagagcctgt gctactggaa	180
ggtggcgtgc cctcctctgg ctggtaccat gcagctcca ctggccctgt gtctcgctg	240
cctgctggta cacacagcct tccgtgtagt ggagggccag ggtggcagg cgttcaagaa	300
tgtatgccacg gaaatcatcc ccgagctcg agagtacccc gagcctccac cggagctgga	360
gaacaacaag accatgaacc gggcgagaa cggagggcgg cctccacc accccttga	420
gaccaaaggt atggggtgga ggagagaatt cttagtaaaa gatcctgggg aggtttaga	480
aacttctt tggaggcctt ggaagactgg gtagaccca gtgaagattt ctggcctctg	540
ccagcactgg tcgaggaaca gtcttcctg gaggtgggg aagaatggct cgctggcga	600
gccttcaaatt tcaggtgcag aggcatgagg caacagacgc tggtgagagc ccagggcagg	660
gaggacgctg ggtgggtgag ggtatggcat cagggcatca gaacaggctc aggggctcag	720
aaaagaaaag gtttcaaaga atcttcctt ggaatatacg gagccacgtc cagctgtgg	780
taccactggg aagggAACAA ggtaagggag cctccatcc acagaacagc acctgtgggg	840
caccggacac tctatgctgg tggtggctgt cccaccaca cagaccaca tcatggaatc	900
cccaggaggt gaaccccccag ctcgaagggg aagaaacagg ttccaggcac tcagtaactt	960
ggttagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gtttgcattca actgcaagat agccctgg	1020
tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca	1080
cccctgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccagggagct ggcacttgaa ggaatgggag	1140
tttcggcac agtttagcc ccLgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggagggag	1200
agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tcttcctca gcagccaccc cagtccaaac	1260
cttgcctcat tccagggag ggagaaggaa gaggaaccct gggttcctgg tcaggcctgc	1320
acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcattt ggtctataa ttggcaggaa tcctgaggcc	1380
atggggcgt ctgaaatgac acttcagact aagagcttcc ctgttccttg gccattatcc	1440
aggtggcaga gaagtccact gcccaggctc ctggacccca gccctccccg cctcacaacc	1500
tgttggact atggggtgct aaaaaggca actgcattgg aggccagcca ggaccctccg	1560
tcttcaaaat ggaggacaag ggcgcctccc cccacagctc cccttcagg caaggtcagc	1620
tggcctccag cgactgcctg aagggtgtta aggaacccaa acacaaaatg tccacccatc	1680
tggactccca cgagaggcca cagccctga ggaagccaca tgctcaaaac aaagtcatga	1740
tctgcagagg aagtgcctgg cctagggcgc ctatttcgaa aaagccgcaa aatgccccct	1800
tccctggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag ccctgcagag gtgaggatgc	1860

aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtggccaca tctccctgc	1920
tgtgcttgct cttcagagtg ggggtgggg gtggccttct ctgtcccttc tctggttgg	1980
tcttaagact attttcatt ctttcttgc acattggaac tatccccatg aaaccttgg	2040
gggtggactg gtactcacac gacgaccagg tattaaaaa gctcccaccc atctaagtcc	2100
accataggag acatggtcaa ggtgtgtca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc	2160
tctgcctgcc cagggagtagt caccatgagg cgcccatattca gataacacag aacaagaaat	2220
gtgcccagca gagagccagg tcaatgtttg tggcagctga acctgttagt tttgggtcag	2280
agctcaggc ccctatggta ggaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agctccatcc	2340
cccagcccag cctcccatgg atgctgaac gcagagccctc cactcttgc ggagccaaaa	2400
ggtgctggga ccccagggaa gtggagtccg gagatgcagc ccagccttt gggcaagttc	2460
ttttctctgg ctgggcctca gtattctcat tgataatgag ggggttggac acactgcctt	2520
tgattccctt caagtctaat gaattctgt cctgatcacc tccccttcag tccctcgct	2580
ccacagcagc tgccctgatt tattaccttca aattaacctc tactccttcc tccatccc	2640
gtccacccct cccaagtggc tggaaaagga atttgggaga agccagagcc aggcaagg	2700
tgtgctgagt acttaccctg cccaggccag ggaccctcg gcacaagtgt ggcttaaattc	2760
ataagaagac cccagaagag aaatgataat aataatacat aacagccgac gcttcagct	2820
atatgtgcca aatggtattt tctgcattgc gtgtgtatg gattaactcg caatgcttgg	2880
ggcggcccat tttgcagaca ggaagaagag agaggtaag gaacttgcgg aagatgacac	2940
ctgcagttag cgtggagcc ctgggtttt aacccagca gtcatttggc tccgagggga	3000
cagggtgcgc aggagagctt tccaccagct ctagagcatc tggacacctc ctgcaataga	3060
tgttcagggg caaaagcctc tggagacagg cttggcaaaa gcagggctgg ggtggagaga	3120
gacggcccg tccaggcag gggtggccag gcgggccc accctcacgc ggcctctt	3180
ccacagacgt gtccgagtagc agctgcccg agctgcactt caccgcgtac gtgaccgatg	3240
ggccgtgccg cagcgccaa cgggtcaccg agctggtgtc ctccggccag tgcggcccg	3300
cgccctgct gcccaacgcg atcggcccg gcaagtgggt ggcacctagt gggcccgact	3360
tccgctgcat ccccgaccgc taccgcgcgc agcgcgtgca gctgctgtgt cccggtgg	3420
aggcgcccg cgcgccgcaag gtgcgcctgg tggcctcgta caagtgcag cgcctcaccc	3480
gcttccacaa ccagtcggag ctcaaggact tcgggaccga ggccgctcg ccgcagaagg	3540
gccggaagcc gcggcccccgc gcccggagcg ccaaagccaa ccaggccgag ctggagaacg	3600
cctactagag cccgcccccg cccctccccca cggcggggcg ccccgccct gaaccgcgc	3660
cccacatttc tgtcctctgc gcgtggttt attgttata tttcattgtta aatgcctgca	3720
accaggcga gggggctgag accttccagg ccctgaggaa tcccgccgc cggcaaggcc	3780
cccctcagcc cgccagctga ggggtccac gggcagggg agggattga gagtcacaga	3840
cactgagcca cgcagccccg cctctgggc cgcctaccc ttgctggccc acttcagagg	3900
aggcagaaat ggaagcattt tcaccgcctt ggggtttaa gggagcggtg tggagtg	3960
aaagtccagg gactggtaa gaaagtggta taagattccc cttgcaccc cgctccat	4020
cagaaagcct gagggcgtgcc cagaggcaca gactggggc aactgttagat gtggttcta	4080
gtcctggctc tgccactaac ttgctgtta accttgaact acacaattct cttcgcc	4140
ctcaatttcc actttgtaaa atgagggtgg aggtggaaat aggatctcgaa ggagactatt	4200

ggcatatgat tccaaggact ccagtgcctt ttgaatggc agaggtgaga gagagagaga	4260
gaaagagaga gaatgaatgc agttgcattt attcagtgcc aaggtcaattt ccagaattca	4320
gagttgtat gctcttttctt gacagccaaa gatgaaaaac aaacagaaaa aaaaaagtaa	4380
agagtctatt tatggctgac atatttacgg ctgacaaact cctggaagaa gctatgctgc	4440
ttcccagcct ggctcccccg gatgtttggc tacctccacc cctccatctc aaagaataaa	4500
catcatccat tgggttagaa aaggagaggg tccgagggtg gtgggaggga tagaaatcac	4560
atccgccccca acttccaaa gagcagcatc cctcccccga cccatagcca tgttttaag	4620
tcacccctcg aagagaagtg aaaggttcaa ggcacactggc cttgcaggcc cgagggagca	4680
gccatcacaa actcacagac cagcacatcc ctttgagac accgccttct gcccaccact	4740
cacggacaca tttctgccta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc	4800
ttacactaaa agaatattat tggggaaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac	4860
tgcagagcat aatagctgcc accaaaaat cttttgaaa atcatttcca gacaacctct	4920
tactttctgt gtagtttta attgttaaaa aaaaaaagtt ttaaacagaa gcacatgaca	4980
tatgaaagcc tgcaggactg gtcgttttt tggcaattct tccacgtggg acttgtccac	5040
aagaatgaaa gtagtggttt ttaaagagtt aagttacata tttatttct cacttaagtt	5100
atttatgcaa aagttttct ttagagaaat gacaatgtt atattgctt atgaattaac	5160
agtctgttct tccagagtcc agagacattt ttaataaaga caatgaatca tgaccgaaag	5220
gatgtggct cattttgtca accacacatg acgtcatttc tgtcaaagtt gacacccttc	5280
tcttggtcac tagagctcca accttggaca caccttgac tgctctctgg tggcccttgc	5340
ggcaattatg tcttcctttt gaaagtcatg tttatccctt ccttccaaa cccagaccgc	5400
atttcttcac ccagggcatg gtaataaccc cagccttgc tccttttagc agcctccct	5460
ccatgctggc ttccaaaatg ctgttctcat ttagtactc ccctgctcaa aagccttcca	5520
tagctcccc ttgcccagga tcaagtgcag tttccctatc tgacatggg ggccttct	5580
gcttgactcc cacctccac tccaccaagc ttcctactga ctccaaatgg tcatgcagat	5640
ccctgcttcc ttagtttgc atccacactt agcaccggca ataactaattt ctctttttt	5700
aggattcaca ttacttgtca tctttcccc taaccttcca gagatgttcc aatctccat	5760
gatcccttcc tcctctgagg ttccagcccc tttgtctac accactactt tggccctaa	5820
ttctgttttcc catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaagtc ctgcttagta	5880
ctggcataga caacacaaag ccaagtacaa ttcaggacca gtcacagga aacttcatct	5940
tcttcgaatgt gtagtttgc tgcctctgg gtagaaatgt aggatcttca aaagtggcc	6000
agcctccctgc acttctctca aagtctgccttcc tcccaaggt gtcttaatag tgctggatgc	6060
tagctgagtt agcatcttca gatgaagagt aaccctaaat ttacttca gttgcccataa	6120
ggtggatgg tcaactggaa agctttaaat taagtccagc ctaccttggg ggaaccacc	6180
cccacaaaga aagctgaggt ccctcctgat gacttgcag tttaactacc aataaccac	6240
ttgaattaat catcatcatc aagtcttgc taggtgttag tgggtatcag tggccggc	6300
cttcctgggg ctccagcccc cgaggaggcc tcagtgcagcc cctgcagaaa atccatgc	6360
catgagtgtc tcagggccca gaatatgaga gcaggttagga aacagagaca tcttccatcc	6420
ctgagaggca gtgcggccttca gtgggtgggg acacgggctc tgggtcaggt ttgtgtt	6480
tgttttttgc ttgttgc gacttgcctt ctattgcctt ggctggagtg cagtgtcaca	6540

atctcggtt actgcaactt ctgccttccc ggattcaagt gatttcctg cctcagccctc	6600
cagagtagct gggattacag gtgcgtgcca ccacgcctgg ctaattttt tatttttgat	6660
agagacgggg tttcaccatg ttggccaggc tagtctcgaa ctcttgacct caagtgatct	6720
gcctgcctcg gcctcccaa gtgctggat tacaggcgtg agccaccaca cccagcccc	6780
ggttgggttt tgaatctgag gagactgaag caccaagggg ttaaatgttt tgcccacagc	6840
catacttggg ctcagttcct tgccctaccc ctcacttgag ctgcttagaa cctggtggc	6900
acatggcaa taaccaggc acactgttt gtaccaagtg ttatggaaat ccaagatagg	6960
agtaatttgc tctgtggagg ggatgaggga tagtggtag ggaaagcttc acaaagtggg	7020
tgttgcttag agatttcca ggtggagaag ggggctcta ggcagaaggc atagccaaag	7080
caaagactgc aagtgcattg ctgctcatgg gtagaagaga atccaccatt cctcaacatg	7140
taccgagtcc ttgccatgtg caaggcaaca tgggggtacc aggaattcca agcaatgtcc	7200
aaaccttaggg tctgcttct gggacctgaa gatacaggat ggatcagccc aggctgcaat	7260
cccattacca cgagggggaa aaaaacctga aggctaaatt gtaggtcggg ttagaggtta	7320
tttatggaaa gttatattct acctacatgg ggtctataag cctggcgcca atcagaaaaag	7380
gaacaaacaa cagacctagc tgggggggc agcattttgt tgtagggggc gggcacatg	7440
ttctgggggt acagccagac tcagggctt gattaatagt ctgagagtaa gacagacaga	7500
gggatagaag gaaataggc ctttcttc tctctcttc tctctcttc actctcttc	7560
tctctcacac acacacacag acacacacac acgctctgta ggggtctact tatgctccaa	7620
gtacaaatca ggccacattt acacaaggag gtaaaggaaa agaacgttg aggagccaca	7680
ggacccaaa attccctgtt ttcctgaat caggcaggac ttacgcagct gggagggtgg	7740
agagcctgca gaagccaccc gcgagtaagc caagttcaga gtcacagaca cccaaagctg	7800
gtgccatgtc ccacacccgc ccacccca cctgctcctt gacacagccc tgtgctccac	7860
aacccggctc ccagatcatt gattatagct ctggggcctg caccgtcctt cctgccacat	7920
ccccacccca ttcttgaaac ctgccctctg tcttctccct tgtccaaggg caggcaaggg	7980
ctcagctatt gggcagctt gaccaacagc tgaggctct ttttgtggctg gagatgcagg	8040
aggcagggga atattcctct tagtcaatgc gaccatgtgc ctggttgcc cagggtggc	8100
tcgtttacac ctgttaggcca agcgttaatta ttaacagctc ccacttctac tctaaaaat	8160
gacccaatct gggcagtaaa ttatatggtg cccatgctat taagagctgc aacttgctgg	8220
gcgtgggtgc tcacacctgt aatccagta ctggggacg tcaaggcggg tggatcacct	8280
gaggtcacga gttagagact ggcctggcca gcatggcaa accccatct tactaaaaat	8340
acaaaaatta gcaaggcatg gtggcatgca cctgtaatcc caggtactcg ggaggctgag	8400
acaggagaat ggcttgaacc caggaggcag aggttcagtg gagccaagat tgtgccactg	8460
ccctccagcc ctggcaacag agcaagactt catctaaaa gaaaaaggat actgtcaatc	8520
actgcagggaa gaacccaggt aatgaatgag gagaagagag gggctgagtc accatagtgg	8580
cagcaccgac tcctgcagga aaggcagac actgggtcat gggtactgaa gggtgccctg	8640
aatgacgttc tgcttagag accgaacctg agccctgaaa gtgcacgcct gttcatggg	8700
gagagactaa attcatcatt cttggcagg tactgaatcc tttcttacgg ctgccctcca	8760
atgccaatt tccctacaat tgtctgggt gcctaagctt ctgcccacca agagggccag	8820
agctggcagc gagcagctgc aggtaggaga gataggtacc cataagggag gtggaaaga	8880

gagatggaag gagagggtg cagagcacac acctccctg cctgacaact tcctgaggc	8940
tggtcatgcc agcagattt aaggcggaggc aggggagatg gggcggaga ggaagtgaaa	9000
aaggagaggg tggggatgga gaggaagaga gggtgatcat tcattcattc cattgctact	9060
gactggatgc cagctgtgag ccaggcacca ccctagctc gggcatgtgg ttgtaatctt	9120
ggagcctcat ggagtcaca gggagtgctg gcaaggagat ggataatgga cggataacaa	9180
ataaacattt agtacaatgt ccggaatgg aaagttctcg aaagaaaaat aaagctggc	9240
agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccaggcattt ctgaggaggt ggcattttag	9300
c	9301

<210>19

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>19

ccggagctgg agaacaacaa g

21

<210>20

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>20

gcactggccg gagcacacc

19

<210>21

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>21

aggccaaccg cgagaagatg acc	23
<210>22	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>PCR 引物	
<400>22	
gaagtccagg gcgacgtgc a	21
<210>23	
<211>25	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>PCR 引物	
<400>23	
aagcttggta ccatgcagctccac	25
<210>24	
<211>50	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>PCR 引物	
<400>24	
aagcttctac ttgtcatcg tgcgtttgtt gtcgtaggcg ttctccagct	50
<210>25	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223>PCR 引物

<400>25

gcactggccg gagcacacc

19

<210>26

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>26

gtcgtcgat ccatgggtg gcaggcgttc aagaatgat

39

<210>27

<211>57

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>27

gtcgtcaagc ttctacttgt catcgtcctt gtagtcgtag gcgttctcca gctcggc

57

<210>28

<211>29

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>28

gacttggatc ccaggggtgg caggcgttc

29

<210>29

<211>29

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>29

agcataagct tcttagtaggc gttctccag

29

<210>30

<211>29

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>30

gacttggatc cgaaggaaaa aagaaagg

29

<210>31

<211>29

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>31

agcataagct tttaatccaa atcgatgga

29

<210>32

<211>33

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>32

actacgagct cggccccacc acccatcaac aag

33

<210>33

<211>34

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>33

acttagaagg tttcagtcct cagccccctc ttcc

34

<210>34

<211>66

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>34

aatctggatc cataacttcg tatagcatac attatacgaa gttatctgca ggattcgagg

60

gccccc

66

<210>35

<211>82

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>35

aatctgaatt ccaccgggtgt taattaaata acttcgtata atgtatgcta tacgaagttt

60

tagatctaga gtcagcttctt ga

82

<210>36

<211>62

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>36

atttaggtga cactatagaa ctgcggcggc tgaagcttaa ccacatggtg gtcacaacc 60  
at 62

<210>37

<211>54

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>37

aacgacggcc agtgaatccg taatcatggc catgctgccg ggtggaggag ggca 54

<210>38

<211>31

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>38

attaccaccg gtgacaccccg cttcctgaca g 31

<210>39

<211>61

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>39

attacttaat taaacatggc gcgccatatg gccggccct aattgcggcg catcgtaat 60  
t 61

<210>40

<211>34

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>40

attacggccg gccgcaaagg aattcaagat ctga 34

<210>41

<211>34

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>41

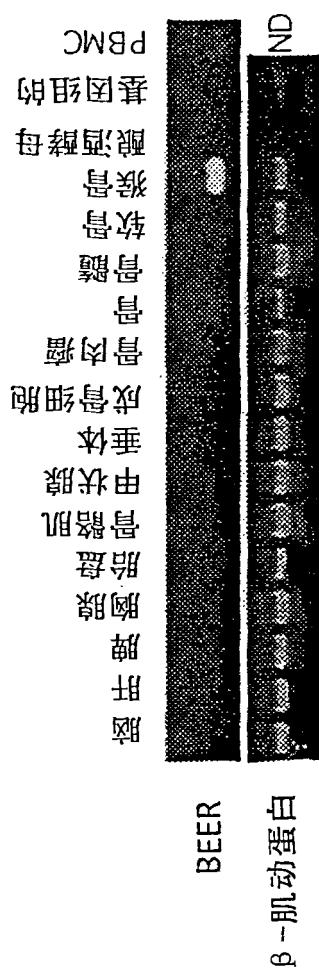
attacggcgc gcccctcaca ggccgcaccc agct 34

共有半胱氨酸骨架

		50				
Agremlin.pro	-----					
Acerberus.pro	MHLLLLFQLLV LLPLGKTTTRH	QDGRQNQSSL SPVLLPRNQR ELPTGNHEEA				
Adan.pro	-----					
Abeer.pro	-----					
	51	100				
Agremlin.pro	-----	M SRTAYTVGAL LLLLGTLLPA AEGKKKGSGQ				
Acerberus.pro	EEEKPDLFVAV PHLVAT.SPA GEGQRQREK M LSRRGFRFWKK PEREMHPSRD					
Adan.pro	-----					
Abeer.pro	-----	MQLPLA LCLVCLLVHT				
	101	150				
Agremlin.pro	AI.PPPDKAQ HNDSEQTQSP QQPGSRNRGR GQGRGTAMPQ EEVLESSQEA					
Acerberus.pro	SDSEPFPPGT QSLIQPID.G MKMEKSPLRE EAKKFVHHFM FRKTPASQGV					
Adan.pro	-----	MLRVLVGAFL PAMLLAAPPP				
Abeer.pro	AFRVVEGQGW QAFKNDATEI IPELGEYPEP PPELENNKTM NRAENGRPP					
	151	↓	↓	↓	↓	200
Agremlin.pro	LHVTERKYLK RDWCKTQPLK QTIHEEGCNS RTIINRF.CY GQCNSFYIPR					
Acerberus.pro	ILPIKSHEVH WETCRTVPFS QTITHEGCEK VVQQNNL.CF GKCGSVHFP.					
Adan.pro	INKLALFPDK SAWCEAKNIT QIVGHSGCEA KSIQNRA.CL GQCFSYSVPN					
Abeer.pro	HHPFETKDVS EYSCRELHFT RYVTDGPCRS AKPVTELVCS GQCGPARLLP					
	201	↓	↓	↓	250	
Agremlin.pro	HIRKEEGSFQ SCSF...CKP KKFTTMMVTL NCPELQPPTK K.KRVTRVKQ					
Acerberus.pro	..GAAQHSHT SCSH...CLP AKFTTMHLPL NCTELSSVIK V...VMLVEE					
Adan.pro	TFPQSTESLSV HCDS...CMP AQSMWEIVTL ECPGHEEVPR VDKLVEKILH					
Abeer.pro	NAIGRGKWR PSGPDFRCIP DRYRAQRVQL LCPGGEAPRA RKVRLVAS..					
	↓↓	↓	↓	↓	300	
Agremlin.pro	CRC.ISIDLD -----					
Acerberus.pro	CQCKVKTEHE DGHLILHAGSQ DSFIPGVSA-----					
Adan.pro	CSCQACGKEP SHEGLSVYVQ GEDGPGSQPG THPHPHPHPH PGGQTPEPED					
Abeer.pro	CKCKRLTRFH NQSELKDFGT EAARPQKGRK PRPRARSAKA NQAELENAY-					
	301	314				
Agremlin.pro	-----					
Acerberus.pro	-----					
Adan.pro	PPGAPHTEEE GAED					
Abeer.pro	-----					

冬 1

## 通过 RT-PCR 研究人 Beer 基因表达



2

小鼠胚胎切片的 RNA 原位杂交

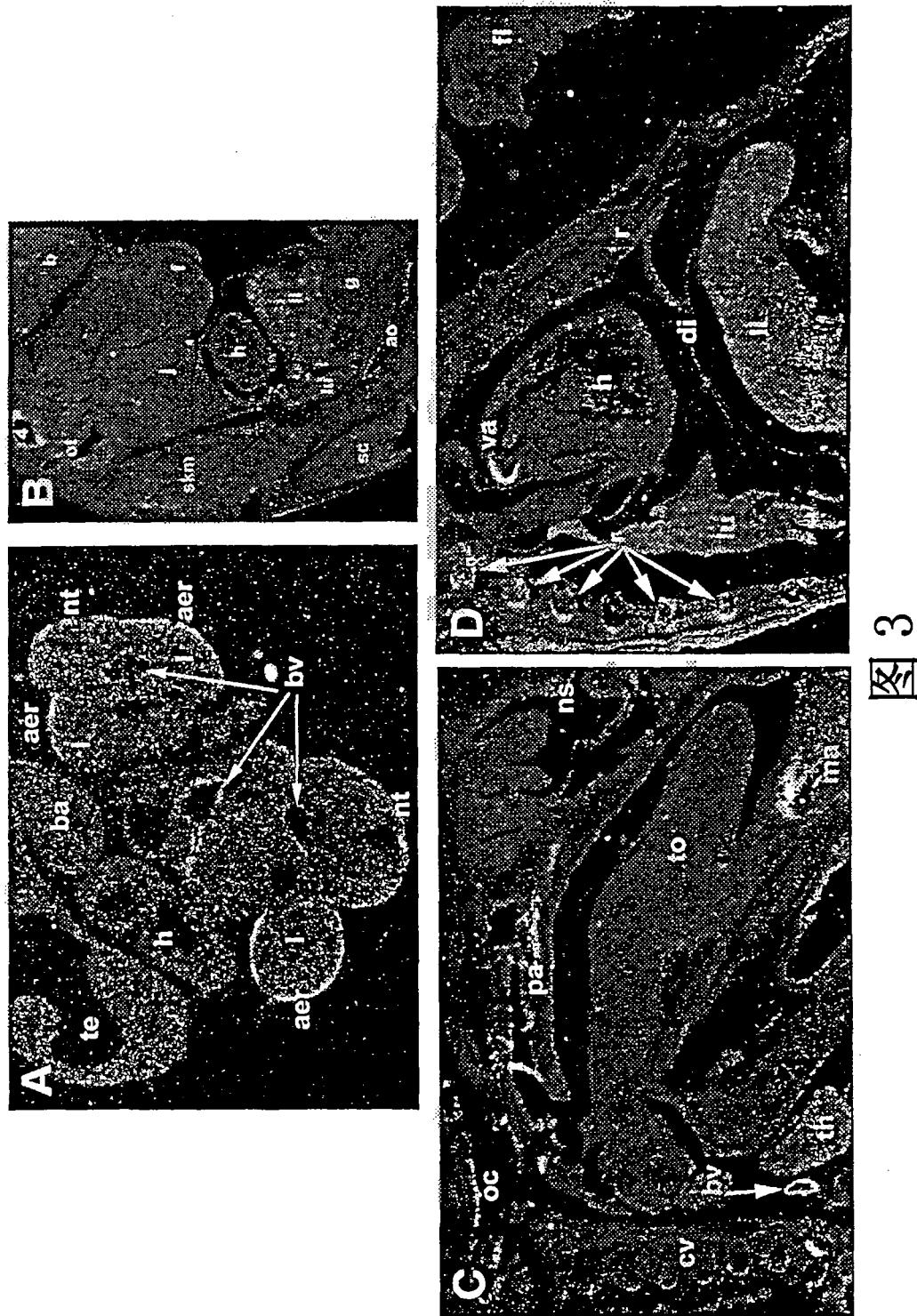
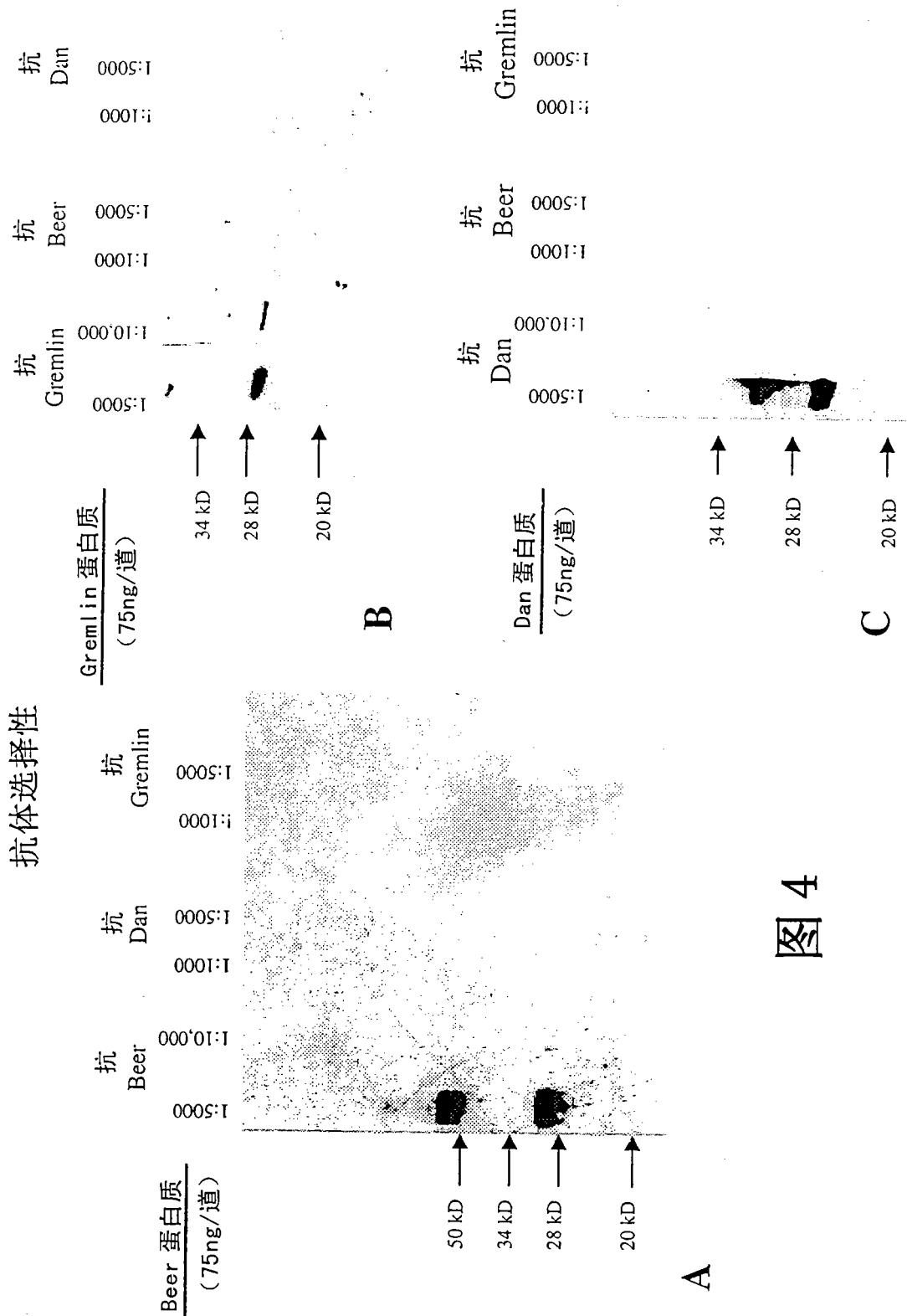
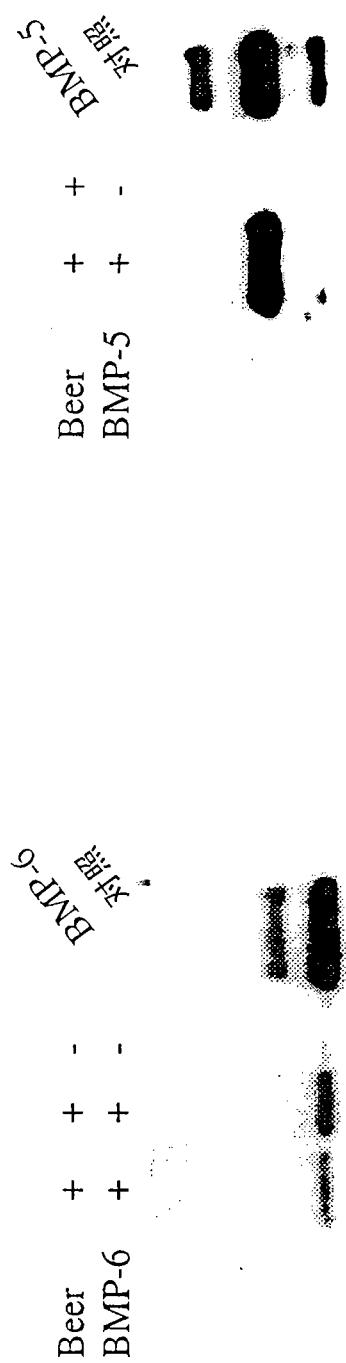


图 3

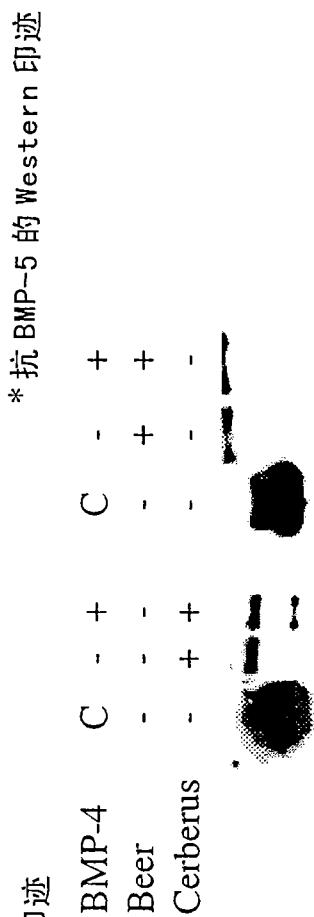


对 Beer 与 BMP 家族成员结合的评价

抗-FLAG 免疫沉淀



\* 抗 BMP-6 的 Western 印迹



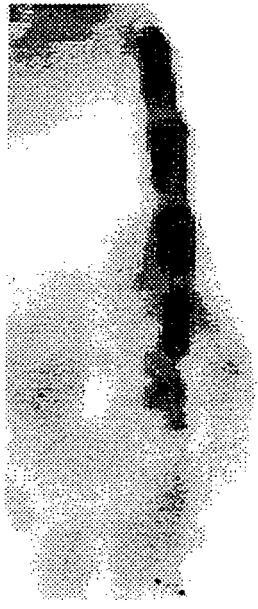
\* 抗 BMP-5 的 Western 印迹

\* 抗 BMP-4 的 Western 印迹

图 5

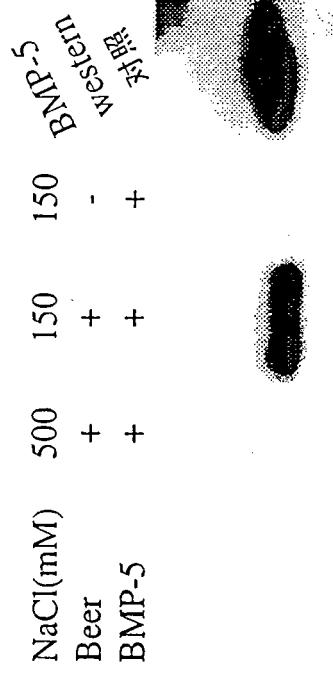
### BMP-5/Beer 解离常数的特性分析

.75 1.5 7.5 15 30 60 120 nM BMP-5



\*抗 FLAG 免疫沉淀\*抗-BMP-5 western 印迹

### BMP-5/Beer 结合的离子破坏



\*抗 FLAG 免疫沉淀  
\*抗 BMP-5 western

图 6