

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/12
C12N 15/70 C12N 1/21
C07K 14/725 A61K 38/17
G01N 33/53

[21] 申请号 95192081.2

[43]公开日 1997年7月30日

[11] 公开号 CN 1155903A

[22]申请日 95.1.12

[30]优先权

[32]94.1.13 [33]US[31]08/181,492

[86]国际申请 PCT/US95/00408 95.1.12

[87]国际公布 WO95/19435 英 95.7.20

[85]进入国家阶段日期 96.9.12

[71]申请人 T细胞科学公司

地址 美国马萨诸塞州

[72]发明人 萨瓦斯·C·梅克里德斯

帕特里克·C·库恩格

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

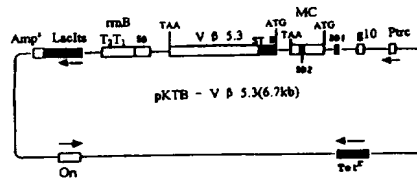
代理人 巫肖南

权利要求书 3 页 说明书 58 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 T细胞抗原受体V区域蛋白及其制备方法

[57]摘要

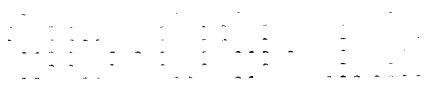
本发明涉及全长T细胞抗原受体V区域蛋白的生产。本发明提供了表达该蛋白的方法，以及增加该蛋白产量的表达载体。本发明还提供了Vβ5.3区域蛋白。本发明的蛋白在诊断和治疗免疫相关失调症方面有实用价值。



权 利 要 求 书

- 1、一种生产重组全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的方法，包括：
 - (a)用含编码全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的区域和可诱导性细菌启动子的重组表达载体转化感受态细菌宿主细胞；
 - (b)诱导 a 步骤中被转化细菌宿主细胞中的可诱导细菌启动子；和
 - (c)回收重组全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白。
- 2、权利要求 1 的方法，其中，该可诱导性细菌启动子选自化学调节启动子和热调节启动子。
- 10 3、权利要求 2 的方法，其中该表达载体还含有选自 lacI 基因或 lacI^q 基因的调节基因序列。
 - 4、权利要求 2 的方法，其中该表达载体包括 lacI_{ts} 基因。
 - 5、权利要求 4 的方法，其中 lacI_{ts} 基因取向与 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白编码区相同。
- 15 6、权利要求 1 的方法，其中该细菌启动子选自 lac 启动子、tac 启动子和 trc 启动子。
 - 7、权利要求 6 的方法，其中该重组表达载体还含有前导序列。
 - 8、权利要求 7 的方法，其中该前导序列选自来自大肠杆菌的热稳定性肠毒素 STII 前导和来自胡萝卜欧文氏杆菌的 pelB 前导。
- 20 9、权利要求 8 的方法，其中该重组表达载体还含有衍生自大肠杆菌的 STII 前导序列的前导序列，该感受态细菌宿主细胞是不带有 lacI 或 lacI^q 基因的细胞。
 - 10、权利要求 9 的方法，其中该细菌宿主菌株是一蛋白酶缺陷菌株。
 - 11、根据权利要求 10 的方法，其中该蛋白酶缺陷菌株选自 SG22094、
 - 25 SG21163 和 SG21173。
 - 12、根据权利要求 1 的方法，其中，该表达载体还含有 g10 和微型顺反子序列(SEQ ID NO.28)调节元件。
 - 13、权利要求 1 的方法，其中该重组表达载体还含有：
 - a)一个 trc 启动子，作为可诱导细菌启动子；
 - b)一个核糖体结合位点；
- 30

- c)一个转录终止子;
d)一个 lacI_{ts} 调节基因序列;
e)一个 pBR322 复制起始点; 和
f)一个四环素抗性基因。
- 5 14、权利要求 13 的方法, 其中该重组表达载体选自 pKTBi - V β 5.3 和 pKBi - V β 5.3。
- 15、权利要求 13 的方法, 其中该重组表达载体还含有前导序列。
- 16、权利要求 15 的方法, 其中该重组表达载体选自 pK - V β 5.3、pKT - V β 5.3、pKTB - V β 5.3 和 pKB - V β 5.3。
- 10 17、一种表达载体, 含一个在 lacI_{ts} 基因控制下可诱导细菌启动子, 其中所述 lacI_{ts} 基因控制编码全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的区域的表达。
- 18、权利要求 17 的表达载体, 其中该可诱导细菌启动子选自 lac 启动子、tac 启动子和 trc 启动子。
- 19、权利要求 17 的表达载体, 其中该可诱导细菌启动子是 trc 启动子。
- 15 20、权利要求 19 的表达载体, 它还包括前导序列。
- 21、一种表达载体, 它从 5'至 3'方向包括:
- a)一个 trc 启动子;
b)一个核糖体结合位点;
c)一个编码全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的区域;
- 20 d)一个转录终止子;
e)一个 lacI_{ts} 调节基因序列;
f)一个 pBR322 复制起始点; 和
g)一个四环素抗性基因。
- 22、用权处要求 17 的表达载体转化的细菌细胞。
- 25 23、权利要求 17 的表达载体, 其中所述载体选自 pK - STII - V β 5.3, pKT - V β 5.3, pKTB - V β 5.3, pKTBi - V β 5.3 和 pKBi - V β 5.3。
- 24、由权利要求 13 的方法生产的全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白。
- 25、含有全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的药物组合物。
- 26、权利要求 25 的药物组合物, 其中该 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白是
- 30 V β 5.3 蛋白, 其分子式为氨基酸序列 SEQ ID NO. 27 的 1 - 92 氨基酸。
- 27、治疗免疫相关失调症的方法, 包括给需要此种治疗的受治者施用含



全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的药物组合物。

28、根据权利要求 27 的方法，其中免疫相关失调症是多发性硬化症。

29、权利要求 28 的方法，其中全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白是 V β 5.3，其分子式是氨基酸序列 SEQ ID NO 27 的第 1 - 92 氨基酸。

5 30、基本纯化的 T 细胞抗原受体 V β 5.3 蛋白，其分子式是氨基酸序列 SEQ ID NO.27 的第 1 - 92 氨基酸。

31、基本纯化的 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白在制造治疗免疫相关疾病之药物中的应用。

10 32、每升细胞培养物至少产生 300 毫克全长重组 T 细胞抗原受体 V β 蛋白的转化细菌细胞。

33、诊断免疫相关失调症的方法，包括使用重组全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白检测来自患者的生物学样本中与免疫失调症相关的特定 T 细胞亚群，或识别特定 V 区域蛋白的自身抗体的存在。

15

说明书

T 细胞抗原受体 V 区域蛋白及其制备方法

5

本发明总的来说属于免疫学及医学领域，涉及全长度重组 T 细胞受体 (TCR)V 区域蛋白，涉及以工业规模量生产重组 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的表达载体，以及应用全长度重组 T 细胞受体 V 区域蛋白诊断和治疗免疫系统疾病和失调的方法。

10

1. T 细胞抗原受体

对外来抗原的免疫反应，分为体液免疫(由 B 细胞介导)和细胞免疫(由 T 细胞介导)。B 细胞用于识别抗原的受体分子是识别球形蛋白质构象表位的免疫球蛋白。T 细胞上的抗原受体与免疫球蛋白相关，但结合与自身主要组织相容性复合物(MHC)分子相缔合的经处理抗原分子(Dembic 等人，1986，

15

Immunol. Today, 7:308).

20

TCR 基因，如免疫球蛋白基因一样，由 T 细胞个体发育期间重排的编码区(或基因片段)组成(Chien 等人，1984, Nature, 312:31 - 35; Hedrick 等人，1984, Nature, 308:149 - 153; Yanagi 等人，1984, Nature, 308:145 - 149)。自从克隆过编码 β - 链的第一个 cDNA 以来，人 T 细胞受体 β 链基因座位得到广泛研究(Yanagi, Y.等人，1984, Nature 308:145 - 149; Hedrick 等人，1984, Nature, 308:149 - 152; Siu 等人，1984, Cell, 37:393 - 401)。该基因座位是含编码 β 链已知区域或结构域之区域的基因复合物，所述区域指：可变区(V)、多样性区(D)和连接区(J)。这些编码区同一个编码恒定区(C)的区域一起，参与体细胞重排(Chien 等人，1984, Nature, 309:322 - 326)。原位进行研究证实，TCR β 的座位位于 7 号染色体的 7 q35(Isobe 等人，1985, Science, 228:580)。目前估计，该复合物全长跨度超过 600 kb，并含有 70 - 80 个可变区片段(Cancannon 等人，1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6598 - 6602; Tillinghast 等人，1986, Science, 233:879 - 883; Kimura 等人，1987, Eur. J. Immunol., 17:375 - 383; Lai 等人，1988, Nature, 331:543 - 546)。这些 V 区域基因片段前后与两个串联组织的区域相邻，所述组织区每个均包括一

30

个 D 和一个 C 基因片段, 接着是一簇 6 或 7 个 J 区域基因片段(Tunnacliffe 等人, 1985, Nucleic Acids Res., 13:6651 - 6661; Toyonaga 等人, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:8624 - 8628)。随着 V、D、J 编码区(基因片段)的成功 DNA 重排, 翻译的 β 链多肽与 TCR α 链配对, 并可在 T 细胞表面表达 (由 Kronenberg 等人综述, 见 1986, Ann. Rev. Immunol., 4:529 - 591)。

TCR α 和 δ 基因在人 14 号染色体上座位相邻。TCR δ 编码区完全位于 α 基因座位中(Satyanarayana 等人, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8166 - 8170; Chien 等人, 1987, Nature, 330:722 - 727; Elliot 等人, 1988, Nature, 331:627 - 631)。据估计至少存在 45 - 50 个 V α 编码区(Becker 等人, 1985, Nature, 317:430 - 434), 而仅仅只有约 10 个 V δ 编码区(Chien 等人, 1987, 前述文献)。外周血中, 以二个 V δ 编码区表达为主, 即 V δ 1 和 V δ 2。

γ TCR 基因首先在小鼠中(Saito 等人, 1984, Nature, 309:757 - 762; Kranz 等人, 1985, Nature, 313:762 - 755; Hayday 等人, 1985, Cell, 40:259 - 269), 然后在人中(Lefranc 等人, 1985, Nature, 316:464 - 466; Murre 等人, 1985, Nature, 316: 549 - 552)鉴定出来。人 γ TCR 基因座位由 5 - 10 个 V 编码区, 5 个 J 编码区和 2 个 C 编码区组成(Dialynas 等人, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:2619)。

TCR 多样性及由此相应的 T 细胞特异性有几种来源(Barth 等人, 1985, Nature, 316:517 - 523; Fink 等人, 1986, Nature, 321:219 - 225): 种系基因片段多样性(Chien 等人, 1984, Nature, 309:322 - 326; Malissen 等人, 1984, Cell, 37:1101 - 1110; Gascoigne 等人, 1984, Nature, 310:387 - 391; Kavalier 等人, 1984, Nature, 310:421 - 423; Siu 等人, 1984, Nature, 311:344 - 349; Patten 等人, 1984, Nature, 312:40 - 46); 不同 V、D 和 J 编码区组装的组合多样性(Siu 等人, 1984, Cell, 37:393 - 401; Goverman 等人, 1985, Cell, 40:859 - 867)和连接的灵活性; N - 区域多样性, 以及或者使用多种 D 区域, 或者使用 D β 片段三种翻译阅读框架任何一种。看来 TCR 多样性并不由在免疫球蛋白中观测到的体细胞超突变机理引起(Barth 等人, 前述文献)。根据这些机理产生的 TCR, 氨基末端区(N - 末端区)结构域(即由 V、D 和 J 编码区组合构建的)不同, 但其它均相似, 包括其羧基末端区(C - 末端区)结构域(它构成 TCR 恒定区)在内。从上述可知, 能产生极大的 TCR 分子库。

对人 TCR β 链可变编码区的结构和多样性研究, 使人们将这些编码区分类成不同的 V 区域亚族(Tillinghast 等人, 1986, *Science*, 233:879 - 883; Concannon 等人, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:6598 - 6602; Borst 等人, 1987, *J. Immunol.*, 139:1952 - 1959)。每个 V 区域亚族其特征在于有一个共有序列, 并含其 DNA 序列表现出约 75 % 以上相似性的相似编码区域。例如, 采用人为的但简单的数字命名其 V β 基因片断, 将 16 种小鼠 V β 序列归类入 14 种不同的亚族(见 Barth 等人, 1985 “The Murine T Cell Receptor Employs a Limited Repertoire of Expressed V β Gene Segments” *Nature*, 316:517 - 523)。根据这一命名法, 同一亚族的成员其第一个数字相同而第二个不同, 因而 V β 8.1、V β 8.2 和 V β 8.3 都属于 V β 8 亚族。对人编码区也建议采用相似体系。就人来说, 约 60 个功能性 V β 编码区分入至少 24 个族(Toyonaga 和 Mak, 1988, *Ann. Rev. Immunol.*, 5:585; Wilson 等人, 1988 *Immunol. Rev.*, 101:149; 及 Robinson, M.A., 1991, *J. Immunol.*, 146:4392)。

2. 自身免疫中的 T 细胞

免疫系统中, T 细胞对于效应机制的分化和调节起关键作用(Paul 等人, 1987, *Science*, 195:1293 - 1300)。通过 T 细胞进行的抗原和主要组织相容性分子的共识别必须是特异性的, 且必须精确调节, 因为不适当的调节将引起自身免疫。有几个实验室研究过看来是不适当免疫调节引起的疾病, 例如自身免疫病, 和某些形式的免疫缺损, 并且其发病机理都与 T 细胞有关。

几种有害的免疫反应, 以特定 TCR 组成的克隆或寡克隆增殖为特征, 如引起 T 细胞白血病或淋巴瘤的恶性肿瘤疾病(例如参见 Jack 等人, 1990, *Am. J. Pathol.*, 136:17; Nitta 等人, 1990, *Science*, 249:672; 和 Yoshino 等人, 1991, *Int. J. Cancer*, 47:654)。T 细胞白血病式淋巴瘤中, TCR 起独特的肿瘤标志作用, 因为它稳定地重排并存在于细胞表面。特定 TCR 组成也与器官移植受体相联系, 该受体的 T 淋巴细胞的 TCR 与供体例如骨髓移植供体的 MHC 抗原反应。

几个研究组已报道过某些自身免疫情况下的选择性 TCR V 区域表达。例如, Grunwald 等人注意到, 若与患类肉瘤病人的外周血淋巴细胞比较, 支气管肺泡灌洗中 CD4⁺ T 细胞的 V α 2.3 基因产物优先表达(Grunwald, J. 等人, 1992, *Eur. J. Immunol.*, 22:129)。川崎病中, 注意到起病时便有 V β 2 和 V β 8 T 细胞优先增殖(Abe, J. 等人, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

89:4066).

有关这方面也对类风湿性关节炎(RA)进行过广泛研究。有些研究者注意到某些 T 细胞亚类优先增殖, 例如 DerSimonian 等人, 1993, *J.Exp. Med.*, 177:1623(CD8 + 外周血 T 淋巴细胞中携带 V α 12.1 的 T 细胞优先增殖);
5 Stamenkovic 等人, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1179(IL - 2 中生长的透过滑膜的 T 细胞, 通过 Southern 转膜杂交印迹分析为寡克隆); Paliard 等人, 1991, *Science*, 253:325(假设超抗原激活的 V β 14 T 细胞, 包括自身反应 T 细胞克隆增殖, 并迁移到 RA 患者的滑液中); Howell 等人, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10921(特别关注来自 RA 病人滑液的 IL - 2R + 细胞
10 中 V β 3、14、17 T 细胞 V 区基因的使用); Vematsu 等人, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8534(一个 RA 个体的滑液 T 细胞中寡克隆 T 细胞 V 区基因的使用); 国际专利申请 WO 90/06758(V β 3, 9, 10 与 RA 关系)。

也广泛研究过肠炎。有些研究组注意到增殖的 T 细胞群体, 或特定 TCR V 区基因的优先利用, 例如, Posnett 等人, 1990, *J.Clin. Invest.*, 85:1770;
15 Spencer 等人, 1991, *J.Clin. Pathol.*, 44:915; Trejdosiewicz 等人, 1991, *Clin. Exp. Immunol.*, 84:440; Van Kerckhove 等人, 1992, *J. Exp. Med.*, 175:57。还有其他人报道通过分枝杆菌属麻疯菌(*Mycobacterium leprae*)中, TCR V 基因的优先利用(Van Shooten 等人, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 11244;
Wang 等人, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:188)。

20 多发性硬化病(MS), 是以中枢神经系统单核细胞浸润和脱髓鞘为特征的自身免疫疾病。虽然 MS 的病理是未知的, 但遗传和环境因素与发病过程有关。遗传诱因的主要因素包括该病与特定第 II 类主要组织相容性复合物(MHC)单倍型相关(Terasaid 等人, 1976, *Science*, 193:1245 - 1247; Ho 等人, 1982, *Immunogenetics*, 15:509 - 517; Spielman 等人, 1982, *Epidemiol. Rev.*, 4:45 -
25 65; Francis 等人, 1986, *Lancet*, 1:211; Elian 等人, 1987, *Disease Markers*, 5:89 - 99; Vrban 等人, 1988, *Cell*, 54:577 - 592; Vandenbark 等人, 1989, *Nature*, 341:541 - 544; Howell 等人, 1989, *Science*, 246:668 - 670)。

业已证明, 从患 MS 病人的脑髓液中分离出的 T 细胞利用了有限的一组 TCR V 区域基因。MS 患者体内激活的髓鞘质碱性蛋白(MBP)特异性 T 细胞
30 表明, MBP - 反应性 T 细胞与该病致病机理有关(Wucherpfennig, K.W. 等人, 1990, *Science*, 248:1016 - 1019)。使用 TCR V β 引物进行聚合酶链反应

(PCR)扩增 cDNA 表明, MBP 反应性 T 细胞系只使用有限数量 V β 编码区 (Wucherpfennig, K.W.等人, 1990, 前述文献,) V β 17 和较少 V β 12 常常被用于识别人类自身抗原 MBP 的免疫决定区; Oksenberg, J.R.等人, 1993, Nature, 362:68 - 70(在有某些 HLA 表现型的患者脑中检测出重排 V β 5.2 和 /或 V β 5.3 基因); Kotzin, B.L., 1991, Proc.) Natl. Acad. Sci. USA, 88:9161 - 9165(患 MS 病人的 MBP 特异性克隆中可见偏向使用 β 链可变区 5.2/5.3, 及较少 V β 6.1)。某些研究结果也暗示 MS 脑损伤中有限的 TCR V α 基因表达 (Oksenberg, J.R.等人, 1990, Nature, 345:344 - 346)。

3. T 细胞介导治疗法

10 过去, 选择性地改变个体的 T 细胞群体方面的努力集中于用完整活 T 淋巴细胞或减毒 T 淋巴细胞免疫接种(见 Cohen, I. R., 1986, Immunol. Rev., 94:5 - 21 所作综述), 或以选择 TCR V 区域特异性肽部分为基础的肽疫苗接种。这些方法基于现流行的观点, 即潜在致病 T 细胞优先利用有限的一组 V 编码区。由 Cohen 开创的该方法利用活的、或减毒 T 细胞作疫苗, 特别用于治疗
15 或预防经验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)。但该方法有局限性, 因为它依赖于疾病特异的 T 细胞克隆的分离: 必需利用病人自身增殖的细胞来治疗各病人, 就是说, 需要“量身订制”, 或者说个体化治疗(见 Zhang 等人, 1993, Science, 261:1451)。

还有其它人提出过基于 TCR V 区参与的 TCR 肽的治疗应用, 如 Offner, H., 1991, Science, 251:430(用基于 TCR V β 8 氨基酸序列的肽治疗, 缓解
20 Lewis 大鼠病情, 并加速其康复); 还有 Hashim, G.A.等人, 1992, J.Immunol., 149:2803 - 2809; Offner, H.等人, 1992, J.Immunol., 148:1706 - 1711; Offner, H., 等人, 1991, J. Immunol., 146:4165 - 417; Sun, D., 1992, Cell, Immunol.,141:200 - 210 等文均有报道。这些肽一般是短肽, 长度在 8 - 25
25 个氨基酸之间, 很少超过 30 个氨基酸。例如与 EAE 相关的 TCR 链上存在的 21 个氨基酸肽用于预防 Lewis 大鼠 EAE 病(Vandenback, A.A.等人, 1989, Nature, 341:541 - 544; Vandenbark, A.A., 国际专利公开 WO 91/01133; Janeway, C.A., 1989, Nature,341:482 - 483)。另有人报道过相应于 β 链 VDJ 区域或 J α 区的只有 8 或 11 个氨基酸的更短肽, 证明其用作疫苗, 在大鼠模型中可有效预防或缓解 EAE 病情(Howell, M.D.等人, 1989, Science, 246:668
30 - 671; Howell, M.D.等人, 国际专利公开 WO 92/12996)。

衍生自 TCR 蛋白的肽普遍用作治疗自身免疫病的候选药物，是因为其容易合成，还因为以前尚无能按有用量，并具有明显生物活性之标准生产更长 TCR V 区域蛋白的方法可依。更重要的问题是，其所用合成小肽的主要缺点是要求对这个能有效调节免疫反应的特殊序列作出预测。必须预测要使用的肽的抗原性或免疫原特性，比如它们在 V 区域的超变区或互补决定区(CDR)的存在。此外，衍生自特定 TCR 的所设计肽之大小需经过计算，使之保持适当表位结构，以便抑制 T 细胞活性，或激活释放针对携带特定 TCR(该肽与之相应)的 T 细胞亚群体之抗体。设计此种肽需很多时间和经验，在考虑用于治疗人的很多情况下，出于人道或道德原因，必需的实验无法进行。

另外，为获得由调节性 T 细胞引起的特异性抗原反应，该肽必须与个体的 MHC 分子结合。这些存在于靶细胞上的 MHC 抗原具多态区，其中特定等位基因存在于特定个体之中。绝大部分情况下，个体有二个单倍型，即存在来自同一基因座的特定 MHC 抗原的二个不同等位基因。并不是所有肽均有与 MHC 抗原结合的能力，也不是所有 MHC 抗原可结合某一单个肽，因为就每个单倍型而言有多种 MHC 抗原。因此此种 T 细胞介导的肽类治疗法的适用性需要针对每个个体的单倍型进行测定，即要求对患者个体订制不同的肽。

4. 可溶性 T 细胞抗原受体的生产

借助重组技术生产大量可溶性 TCR 蛋白因为几个原因而未能如愿。生产可溶性 T 细胞抗原受体要克服的主要障碍是在不存在穿膜区域条件下的分泌作用(Traunecker, A. 等人, 1989, Immunol. Today, 10:29 - 32)。某一研究者已证明鼠 TCR(包括 V、D、J 区, 接着是平截型 C β 区)的全长单体 β 链的分泌。该方法利用了免疫球蛋白轻链羧基末端与 TCR β 链中 Cys 241 周围序列之间的同源性。该所得构建体利用编码来自 MPC - 11 的 k - 链前导肽序列和重排的 VDJ 外显子的嵌合基因。该所得构建体在哺乳动物细胞中表达, 且在该细胞上清液中可检测出。但该方法并未提出在不存在额外蛋白序列的条件下获得全长 V 区域蛋白的手段, 因为该分泌作用取决于平截 C β 外显子的存在(Gasgoigne, N., 1990, J. Biol. Chem., 265(16):9296 - 9301)。

另一研究组借助磷脂酰肌醇聚糖连接锚定的重组 TCR 异二聚体的表达, 试图实现 TCR β 链的可溶性形式以生化有意义量进行表达。该方法产生少量(每次收获 0.5 mg)全长 TCR 链, 且需用磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C 从转

染的细胞表面裂解下来(Lin, A. Y.等人, 1990, Science, 249:677 - 679)。

还有一些人通过将鼠 TCR 的可变区和恒定区与免疫球蛋白 κ 轻链恒定区组合, 而生产出嵌合分子。这些研究者已能获得少量分泌的异二聚体 $\alpha\beta$ TCR 的可溶性形式(Gregoire, C.等人, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8077 - 8081)。Gregoire 等人给出了由 KB5 - C2 的 $C\alpha$ 和 $V\alpha$ 基因连接 S105 单克隆抗体 κ 轻链的 C 区组成的鼠嵌合体。也给出了 $V\beta C\beta C\kappa$ 嵌合体。二者均被转染进不表达天然免疫球蛋白重链或轻链的哺乳动物 B 细胞骨髓瘤中(也见 Weber, S.等人, 1992, Nature, 356:793 - 795)。

Novotny 等人, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8646 - 8650 介绍了一种生产具抗原结合特性的可溶性 TCR 的方法。将合成寡聚接头克隆进 $V\beta$ 区 C 末端和 $V\alpha$ 区 N 末端, 得到单链 $V\beta V\alpha$ 。该所获表达载体编码框架中 pelB 前导序列之后紧接 $V\beta$ 、接头和 $V\alpha$ 片段。该构建体表达是在 lac Z 启动子控制之下, 因此是 IPTG 可诱导的。

目前, 有研究组已获得了与羧基末端多组氨酸“尾”融合的 T 细胞受体 V 区的少量分泌。该质粒含 PelB 前导序列, 并在可化学诱导启动子的控制之下(Ward, E.S., 1991, Scand. J. Immunol., 34:215 - 220)。但此项研究并未描述如何在不存在融合部分的情况下获得 T 细胞抗原受体 V 区蛋白, 或者怎样获得工业用量的受体 V 区域。

因此, 非常需要针对自身免疫反应具特异性能, 其选择具可预测性, 且能方便和重复制备的药剂和药物组合物。

本发明首次提供了成功地生产治疗特定的 T 细胞介导疾病(涉及 T 细胞亚群)的通用药剂的方法, 从而解决了上述问题。具体地说, 本发明提供了可以进行自然加工的有效量的全长 TCR V 区域蛋白。体内加工后提供多种活性片段, 并由每一个体的抗原呈现细胞呈现, 从而不再需要进行“量体裁衣”式的治疗药物。本发明也提供了在细菌中生产 TCR V 区域蛋白的一类重组表达载体。本发明重组 TCR V 区域蛋白, 在治疗、预防或抑制与免疫相关之失调症方面有用。在另一实施方案中, TCR 分子可以与药用相宜载体混合, 作为治疗组合物使用。在又一实施方案中, 所述 TCR V 区域蛋白可用于产生抗 - TCR 抗体。此外, 该 TCR V 区域蛋白可用于诊断表征特定免疫相关失调症。根据其自身抗体结合的能力, 本发明 TCR V 区域蛋白可用作诊断探针。本发明优点之一是, 该 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白能在不存在融合蛋白

或亲和尾(affinity tail)的条件下表达。本发明另一优点是, 该 TCR V 区域蛋白能以工业规模之量生产, 以便制备成对 T 细胞介导的自身免疫疾病有疗效之组合物。

5 本发明还提供了生产纯全长 TCR V 区域分子的表达载体。本发明表达载体包括编码 T 细胞抗原受体 V 区域的基本元件。本发明的 TCR 编码区是编码全长 TCR V 区域蛋白的任何核酸分子。在一优选实施例方案中, 该 TCR 编码区包括 V β 5.3 区域的结构性编码序列。

10 本文所述表达载体, 提供了可诱导表达 TCR V 区域蛋白的工具。在优选实施方案中, T 细胞抗原受体 V 区域编码序列处于可诱导细菌启动子的转录控制之下。根据本发明, 该可诱导细菌启动子受化学或热调节。最优选该可诱导细菌启动子受热诱导。

15 在一实施例方案中, 本发明的表达载体包括编码能与启动子结合的蛋白的调节基因, 并由此抑制从可诱导启动子的转录作用。在一优选实施方案中, 启动子来自 *E.coli lac* 操纵子, 而调节基因含有 *E.coli lac I* 阻遏基因的功能性突变。该突变体 *lac I* 基因(*lacIts*)编码一个温度敏感性阻遏蛋白, 利用该 *lacIts* 基因产生启动子热诱导作用。在一优选方案中, 可诱导细菌启动子是 *trc* 启动子, 而热诱导作用由 *lacIts* 调节基因提供。

20 在一实施方案中, 调节基因位于一个共转化载体上。另一实施方案中, 该调节基因位于细菌宿主细胞染色体中。在一优选实施方案中调节基因位于重组表达载体中。另一优选实施方案中, 突变体 *lacI* 基因的转录方向与所表达之 T 细胞抗原受体结构基因取向相同。

25 本发明的重组表达载体包括前导肽或信号肽的编码序列亦为一有利方案。该前导序列, 与欲表达的 TCR V 区编码区在同一读框内及 5'端融合, 指导有 N - 末端前导肽的 TCR V 区域蛋白的合成, 而该 N - 末端前导肽随后指导重组蛋白穿过宿主细胞膜的分泌作用。本发明的其它实施方案不利用前导序列, 而所需 V 区域产物可从细胞中分离, 例如通过脲提取法分离。

30 在一优选实施方案中, 本发明重组表达载体从 5'到 3'的方向依次包括: 一个 *trc* 启动子, 一个核糖体结合位点、一任选的前导序列、一个全长 T 细胞抗原受体 V 区域编码区、一个终止密码子、一个或多个转录终止子, 一个其转录方向与 T 细胞抗原受体 V 区编码区相同的 *lacIts* 调节基因、一个细菌的复制起始点, 和一个四环素抗性基因。

本发明也提供了以明显超过已有方法高水平生产 TCR V 区域蛋白的方法。

5 本发明提供治疗患免疫相关失调症病人的组合物和方法。该治疗包括给
需此种治疗的患者施用根据本发明的组合物，其量及给药时间适宜于调节所
述免疫失调症状。本发明的优点之一是，本发明组合物可治疗免疫相关失调
症，而无需筛选特定肽片段，且无需针对特定待治疗个体调配特定组合物。

10 本发明也涉及全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白在治疗自身免疫疾病和失
调方面的应用。在一特定实施方案中，本发明涉及全长 V β 5.3 蛋白的治疗
应用。在另一实施方案中，本发明提供全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白，在
生产治疗自身免疫疾病或失调药物中的应用。因此在一个实施方案中，本发
明能将全长 V β 5.3 蛋白用于生产治疗 MS 之类与免疫相关的疾病和失调症
的药物。

有关附图的简要说明：

15 图 1：本发明全长 V β 5.3 蛋白的全核苷酸序列[SEQ ID No.25 和 SEQ ID
NO.26]和氨基酸序列[SEQ ID NO.27]。

20 图 2：pKTB - V β 5.3 质粒图谱。该质粒含 Ptrc(trc 启动子)、g10(来
自噬菌体 T7 的 g10 前导基因片段)、SD1(核糖体结合位点 1)、MC(编码核糖
体结合位点 2[SD2]AAG GAG[见微型顺反子核苷酸全序列 SEQ ID NO.28]和
肽 Met Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu[SEQ ID NO.29]的微型顺反子)、STII(STII
前导序列)、V β 5.3(V β 5.3 编码区)、T1T2(rnB 操纵子的转录终止子)、
编码温度敏感性 lac 抑制基因的 lacI_{ts}、Ori(复制起始点)、和 Tet^r(四环素抗
性基因)。

本发明描述了重组表达载体和大量生产 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的有效
方法及其应用，包括诊断、治疗、预防或抑制免疫相关疾病及失调症。

25 已开发出一系列高水平生产全长 TCR V 区域蛋白的载体。此外，还提
供了使用本发明表达载体以工业规模生产全长重组 TCR V 区域蛋白的方
法。本发明的方法和载体是独特的，因为它们提供的生产全长 T 细胞抗原受
体 V 区域蛋白不存在额外蛋白序列或融合对应体。正如前面有关本发明背景
部份详细叙述过的，从前，T 细胞抗原受体 V 区域只能作为更大蛋白的部
30 分，以极低水平生产。这些额外蛋白在体内使用时可以引起不期望的免疫原
性，常被管理当局划入不能允许的杂质之列。以前提纯的 V 区域蛋白还包括

TCR 的其它区域, 如与 V 区域融合的 C 区。有些人曾构建过提供作为嵌合蛋白的 TCR V 区域(例如 V 区域与免疫球蛋白分子部分融合)的表达系统。

本发明的表达载体和方法, 还提高了 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的表达水平。生产有商业应用价值(例如科研、诊断和治疗)的蛋白, 其主要考虑便
5 是要以工业规模生产该蛋白。因此本发明提供了 TCR V 区域蛋白之更高水平生产法。本发明使得 V 区域蛋白大量生产(例如每升细菌培养物产 1 - 500 mg 或更多)成为可能。优选该蛋白生产水平至少可达 100 mg/l。在最优选实施方案中, 本发明生产水平是每升细菌细胞培养物至少获 300 mg V β 蛋白。

本发明方法和表达载体生产的 TCR V 区域蛋白无额外的蛋白序列。因此
10 此本发明省去了现有方法中获得纯净 TCR V 区域蛋白所需要的其它几个步骤。在一个实施方案中, 本发明还提供了通过热诱导提高 V 区域蛋白表达的方法, 由此避免需清除化学诱导剂(例如 IPTG)的步骤。

因为根据本发明的 TCR V 区域蛋白不存在额外蛋白, 因此本发明提供了
15 生产相对纯净产物的简单方法。本发明省去了附加加工步骤, 例如向体系内引入酶或化学试剂, 以便获得无任何融合的非 TCR 肽片段或亲和尾的蛋白。此种操作不仅往往会降低 V 区域产物的回收量, 也引入了必需消除的成份, 即需附加提纯步骤。

1. T 细胞抗原受体 V 区域

本发明的 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白是任何全长 T 细胞抗原受体 V 区
20 域。全长 TCR V 区域蛋白是由 T 细胞抗原受体 V 区域的一个编码区编码的。该 TCR V 区域编码区是编码全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的核苷酸序列。本发明范围中, V 区域包括 T 细胞抗原受体的可变区。从最为广泛的角度来说, 本发明技术可以用来获得包括 V 区域, 还包括 D 和/或 J 区域全部或部分区域的 TCR 蛋白之大量表达。

25 生产的 TCR V 区域蛋白不存在额外蛋白序列, 例如恒定区、穿膜区或胞质区之类的其它 TCR 区。并且本发明的 TCR V 区域蛋白也不存在非 TCR 的融合对应体, 例如亲和尾。此外, 本发明 TCR V 区域蛋白, 也不作为包括其它蛋白分子如免疫球蛋白在内的更大嵌合蛋白的一部分来生产。

30 已意识到, 编码 T 细胞受体 V 区域的互补决定区(CDR)之一的 DNA 序列实际可以跨越 V 编码区和 D 编码区之间的已知的连接区(如在 V β 5.3 的 CDR3 情况下), 这样本文所用之术语“全长” V 区域编码区, 既可包括此种

横跨 V - D 连接区的 CDR 的全部编码序列, 或此种 CDR 只位于已知 V 区域的部分序列, 或者可以根本不包括此种 CDR 的编码序列。而且, 本发明全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白可以是任何 T 细胞抗原受体 V 区域, 并不只限于 V β 区(即 TCR β - 链 V 区域)。因此 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白可以是 α 亚基、 β 亚基、 δ 亚基、或 γ 亚基的可变区。

在一优选实施方案中, 本发明之 TCR V 区域蛋白是可得到全长编码序列的任何 T 细胞抗原受体 V 区域。获得本发明全长编码序列的方法是已知技术。人 V 区结构域 DNA 序列可按已知方法从多种人细胞(优选外周血 T 淋巴细胞)中分离获得。

10 本发明之 DNA 序列可用不同方法制备。优选该 T 细胞抗原受体 V 区域 DNA 序列通过用编码完整 TCR 的 DNA 序列作模板进行聚合酶链反应(PCR)而制备。例如, 采用抗 - CD3 抗体刺激, 从人外周血淋巴细胞制备 cDNA, 再通过扩增可制备人 V β 区域, 此系遵循 Chov 等人, 1989, 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8941 - 8945 一文所述方法进行的。

15 本发明一个方面, 是从含该全长序列的任何克隆获得全长 T 细胞抗原受体 V 区域的编码区。例如, Concannon 等人, 1986, 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6598 - 6602 一文中所述含全长编码区的几个 TCR V 区域序列和 cDNA 克隆。

本发明优选的 TCR V 区域蛋白是那些与免疫相关疾病或失调有关者, 具体例如 V β 8.1(川崎病, 见 Abe 等人, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4066)、V β 6.1(麻疯病, 见 Wang 等人, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:188)、V β 5.1(Lyme 病, 见 Lahesma 等人, 1993, J. Immunol., 150:4125)、V β 5.2、或 V β 5.3 或 V β 6.1(多发性硬化症, 见 Kotzin 等人, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9161)、V β 2.1 或 V β 3.1(类风湿性关节炎, 见 Uematsu 等人, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8534; 也见 Hfler, D.A. 等人, 1988, J. Exp. Med., (67:1313; Mantgazza R. 等人, 1990, Autoimmunity, 3:431)。

30 由自身免疫疾病中 T 细胞表达的, 或由对特定自身抗原应答的 T 细胞克隆表达的 TCR, 可以使用 TCR 特异性抗体(例如对 TCR 可变区片段特异性的多克隆、单克隆或嵌合抗体)配合抗体标记法, 包括荧光显微术、流式细胞计数、免疫细胞化学、或其它已知技术来加以鉴定。许多针对 TCR α 和/或

β 链 V 区的此类抗体已在文献中介绍过(例如见国际专利公开 WO 90/06758)。

此外, 该 T 细胞克隆的 DNA 或 mRNA 可以使用已知杂交方法直接检测, 也可经 PCR 扩增(Synha 等人, 1988, Science, 239:1026; Saiki 等人, 1986, Nature, 324:163)后, 使其与各种 TCR 基因族的核酸探针特异性杂交来进行探
5 测。然后该 TCR 序列或其部分可以直接从扩增的重排 DNA 或 mRNA 获得。

特定 TCR 的表达也可以通过检测编码至少部分 TCR 的核酸序列来鉴定, 例如, 可在克隆 TCR V 基因之后, 或者可以通过测定至少部分 TCR 蛋白的氨基酸序列来鉴定。显然, 上述任何方法, 或本领域专业人员熟知的其
10 它方法, 结果均能鉴定在某 T 细胞 克隆或 T 细胞系上表达的 TCR。

用于将 TCR 基因表达与疾病相关联的分子研究法的例子包括:

(1)产生和分析从一个或多个患病受试者获取的, 与疾病相关 T 细胞所得到的 cDNA 库, 确定是否存在频繁使用的或者“显性”的 TCR 基因;

(2)对疾病样本进行 Southern 分析, 确定是否存在特异性遗传多态性(例如 RFLP)或寡克隆 TCR 重排;
15

(3)采用 cDNA 合成、PCR 扩增、印迹(Slot blot)杂交法等对疾病样本进行分析;

(4)针对未预先培养之 T 细胞进行 TCR 探针的核酸原位杂交。

优选的 TCR V 区域蛋白包括 V β 8.1, V β 5.2 或 V β 5.3。编码 V β 5.3 的双链 cDNA 和 V β 5.3 的氨基酸序列示于图 1(见 SEQ ID NO. 25, 26 和
20 27)。

采用本领域专业人员熟知的方法, 可将 T 细胞抗原受体 V 区域克隆导入本发明的表达载体上。例如, V 区域被从 cDNA 克隆用 PCR 合成并在 5'端加上起始 ATG。可以合成任何适当的限制性酶切位点, 用于整合进起始密码子并重建 V 区域的编码区。在优选实施方案中, 限制性位点是 NcoI 位点。在
25 V 区域编码序列的 3'端设计一个终止密码子和适当限制性位点, 以便其可亚克隆进载体中。

应当认识到本发明的方法可用于制备从人以外的动物衍生的全长 TCR V 区域。

30 2. 表达载体

本发明范围内的重组表达载体是含有编码待表达 TCR V 区域的核酸形

式的外源 DNA 的质粒。将本发明之重组表达载体导入细菌宿主细胞，例如，通过转化，再分离和克隆表达所需 V 区域蛋白的转化子。

5 本发明涉及含编码全长 TCR V 区域蛋白的 DNA 序列的表达载体。优选该 TCR V 区域蛋白是本文详述的那些 T 细胞抗原受体蛋白。本发明范围的表达载体是含有在调节元件的转录和翻译控制下表达的 TCR V 区域基因的质粒。所述调节元件例如是启动子、核糖体结合位点以及转录终止子。此外还含细菌中稳定复制的复制起始点。它还优选包括编码抗生素抗性的基因，以便于含有质粒的转化细胞的筛选。当该表达载体导入适当宿主时，该所克隆序列便得到表达。

10 本发明所用表达载体通常是质粒形式。质粒是不整合入染色体的环形双链 DNA 序列。本发明表达载体也可以包括其它 DNA 序列，例如使表达产物定位或使其稳定的前导序列或信号序列，和/或使基因表达得到调整的调节序列，例如使该表达对温度变动或生长培养基组成变化能有所反应。

15 含一个或多个控制序列的表达载体，以可操纵方式连接到编码 TCR V 区域的 DNA 序列上。本发明范围内，所谓“以可操纵方式连接”表示，对基因表达有调节功能，或能编码某功能蛋白结构域的一种核酸序列，以其 5' 或 3' 末端共价连接到编码某蛋白的第二个核酸序列上，以便其调节功能对第二核酸序列施加影响，或者所述编码功能性的结构域在同一框架中与由第二个核酸编码的蛋白融合。所述对基因表达的调节功能，一般包括转录起始，
20 转录终止、和对 mRNA 转录物处理。在基因表达中施加此种调节功能的核酸序列包括转录启动子、转录终止子、和 mRNA 处理信号。可以“按可操纵方式”连接到另一蛋白的功能性结构域包括例如可使蛋白透过细胞膜运输的前导肽或信号肽。

25 在一个实施方案中，启动子可以是任何可诱导启动子。在一优选方案中，所述启动子是可由存在或不存在某些培养基成分调节的启动子。本领域专业人员熟知受某些培养基成分的存在或不存在控制的几种细菌启动子，它们可以同本发明的表达载体相连使用。优选强细菌启动子，例如 lac 启动子、tac 启动子、和 trc 启动子。因此，在一个实施方案中，本发明的一个载体中 TCR V 区域编码序列的一个启动子是受异丙基 - β - D - 硫代半乳糖吡喃糖
30 苷(IPTG)(lac、tac、和 trc 启动子的安慰化学诱导物分子)的存在与否来调节。优选情况下，IPTG 诱导启动子是 lac 启动子或 tac 启动子。在更为优选的实

5 实施方案中, IPTG 诱导启动子是 trc 启动子(Brosius 等人, 1985, J.Biol. Chem., 260:3539 - 3541), 它相似于 lac UV5 启动子的 - 10 区域与色氨酸操纵子的 - 35 区域融合衍生的 tac 启动子(de Boer 等人, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 80:21 - 25; Amann 等人, 1983, Gene, 25:167 - 178)。除启动子中有单个碱基对改变外, trc 启动子与 tac 启动子相同(Brosius 等人, 1985, 前述文献)。

10 另一实施方案中将本发明表达载体加以改进, 使之能通过温度改变来分泌表达本发明全长 TCR V 区域蛋白。根据该方案, 在不存在化学诱导剂条件下, 该表达载体可表达 TCR V 区域蛋白, 即排除对 IPTG 和含 LacI 及 lacI^q 基因的细菌宿主菌株这样的因素之需要。本发明表达载体的优选方案包括能使蛋白表达受热诱导的调节基因。该调节基因序列最优选 lacIts 基因、该基因编码温度敏感 lac 阻遏物。

15 另一优选实施方案中, lacIts 基因靠近转录终止子, 并在其下游, 其转录方向与 V 区域编码序列相同。

此外, 本发明表达质粒优选含一个或多个筛选遗传标记。优选该筛选遗传标记赋予抗生素抗性, 例如氨苄青霉素、卡那霉素或四环素抗性。最优选该选择性标志是四环素抗性基因。

20 另外, 该载体包括一个细菌复制起始点。优选方案中, 复制起始点来自 pBR322。该表达载体还含有核糖体结合位点和 *E.coli* 的 rmb 核糖体 RNA 操纵子的转录终止子(Brosius 等人, 1981, Plasmid, 6:112 - 118)。

25 优选实施方案中, 本发明表达载体从 5'到 3'方向含有如下基本元件: 一段含启动子和操纵基因的 DNA 序列、含能使宿主细胞中所需基因的 mRNA 结合到核糖体上的核糖体结合位点的 DNA 序列、 ATG 起始密码子或者一旦将所需基因插入载体中即能转换成 ATG 起始密码子的 DNA 序列、一个可插入所需基因并使之与 ATG 起始密码子处于同一阅读框架中的限制性位点, 或一个含为插入适当基因或待表达编码区的几个限制性位点的多克隆位点, 编码欲表达的 T 细胞抗原 V 区域的核酸序列, 和用于有效终止转录的转录终止子。该载体也含来自细菌质粒的能在宿主细胞中自主复制的复制起始点的 DNA 序列, 以及含与载体存在于宿主时表现出的可筛选或可识别表型特性相关的基因之 DNA 序列。该表达载体还可任选包括以可操纵方式连接的信号编码序列或前导编码序列。即在同一阅读框架中, 融合于编码 TCR V 区域的

30

核酸序列的 5'末端, 以便该前导序列 - TCR V 区域序列的翻译得到前导肽 - TCR V 区域融合蛋白。其中, 在该融合蛋白氨基末端的前导肽指导 TCR V 区域蛋白穿过宿主细胞膜的分泌作用。某些优选方案中, 该表达载体含一个通过温度改变使该分泌蛋白表达的调节基因。

5 在一更为优选之方案中, 从 5'到 3'方向, 该表达载体含下述基本元件:
由 lac UV5 启动子的 - 10 区融合色氨酸操纵子的 - 35 区组成的 trc 启动子(de Boer 等人, 前述文献; Amann 等人, 1983, 前述文献)、一个强核糖体结合位点、欲表达的 TCR V 区域编码区、来自 rrn B 核糖体 RNA 操纵子的二个转录终止子、编码温度敏感性 lac 阻遏物的 lacI_{ts} 基因、pBR322 的复制起点、
10 和一个四环素抗性基因。该选方案之典型一例, 表达载体 pKBi - V β 5.3, 根据布达佩斯条约保藏于 American Type Culture Collection(ATCC)保藏号 69739(1995 年 1 月 6 日)。

本发明表达载体可以含以可操纵方式连接于 TCR V 区域编码区 5'末端编码信号肽的前导序列。一旦表达, 氨基末端信号肽将指导 TCR V 区域蛋白
15 穿过宿主细胞膜分泌, 进入周质腔或培养基。本领域专业人员熟知, 有许多前导序列可以与本发明表达载体连用。一种适宜的前导序列是来自胡萝卜欧文氏杆菌 (*E.carotovora*) 的 pelB 信号序列 (Lei 等人, 1987, J. Bacteriology, 169:4379 - 4383)。另一适宜前导序列是大肠杆菌 (*E.coli*) 热稳定性肠毒素 II(STII)的信号序列 (Morioka - Fujimoto 等人, 1991, J. Biol. Chem.,
20 266:1728 - 1732)。

在一个实施方案中, 表达体系含 STII 前导序列, 而 V 区域编码区经 PCR 合成, 3' 末端含适当限制位点, 且 5'末端含组建的 MluI 位点, 以使其能方便地与结合入 STII 前导肽 3'末端的 MluI 位点连接。在另一更优选方案中, 表达载体从 5'到 3'方向含: 由 lac UV5 启动子 - 10 区与色氨酸操纵子 - 35
25 区融合的 trc 启动子、一个强核糖体结合位点、STII 前导、欲表达的 T 细胞抗原受体 V 区域编码区、来自 rrnB 操纵子的转录终止子、编码温度敏感性 lac 阻遏物的 lacI_{ts} 基因、pBR322 复制起始点, 和一个四环素抗性基因。在一最优方案中, 表达载体是 pKB - V β 5.3。

本发明的表达载体可以使用本领域标准技术构建(见 Maniatis 等人,
30 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1982))。

本发明另外还涉及含表达载体的宿主细胞，而所述表达载体含编码全长 TCR V 区域的 DNA 序列。此外，优选宿主细胞含有带一个或多个调控 DNA 序列的表达载体，而所述调控 DNA 序列能指导编码全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白之 DNA 序列的复制和/或表达。适宜的宿主细胞包括原核宿主细胞，5 优选的原核宿主细胞是细菌宿主细胞，最优选是 *E.coli*(大肠杆菌)细胞。从本申请的说明，本领域专业人员可以明白，具体使用的表达载体将影响挑选用来生产全长 TCR V 区域蛋白之宿主株的选用。例如，对本发明范围内针对化学诱导的表达载体来说，具体采用带有 *lacI* 或 *lacI^q* 基因(它调节 *trc* 启动子)的细菌宿主菌株。而本发明范围内，对于含有 *lacIts* 基因(它提供温度敏感性阻遏物)之类的调节基因的表达载体来说，则优选不宿有野生型 *lacI* 或 *lacI^q* 10 基因的细菌宿主菌株。特别优选的宿主细胞是 LJ24。

某些方案中，本发明表达载体不含前导序列，某些优选方案中细菌宿主菌株是 *E.coli* BL21，或更优选蛋白酶缺陷 *E.coli* 菌株，例如 SG21163, SG22094, 或 SG21173。

15 采用现有技术各种方法，可将本发明表达载体导入宿主细胞中，所用方法由宿主细胞之类型而定。例如，氯化钙处理或电穿孔一般用于原核细胞(参见 Maniatis 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, cold spring Harbor, NY(1982))。

一旦表达载体被导入适当宿主细胞，可将该宿主细胞在能使大量 TCR V 20 区域得到表达的条件下培养。

采用任何适当手段可以鉴定该含表达载体的宿主细胞(其中所述表达载体含编码 TCR V 区域蛋白的 DNA 序列)。例如下面实施例，使用免疫测定法免疫测定 V 区域蛋白的产生。另外，本发明含表达载体的宿主细胞，可以通过检测 TCR V 区域 DNA 转录水平来鉴定，而所述转录水平测定则由测定 25 宿主细胞中 TCR - V 区域特异性 mRNA 转录物而得出(例如采用 Northern 印迹分析)。而在另一方法中，含本发明表达载体的宿主细胞，可通过用与该载体的 TCR V 区域编码序列互补的探针进行 DNA - DNA 杂交来鉴定。

本发明 DNA 序列，表达载体或 DNA 分子，可以用已知技术中的各种方法测定。例如由 Sanger 等人，在 1977，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463 30 - 5467 中所述双脱氧链终止技术进行测定。

遵循本文提供的实施例，并利用上述一种或多种检测方法，本领域专业

人员不用作过多实验, 很容易选择出能提供最佳 TCR V 区域表达的表达载体和宿主细胞之组合。通过一特定宿主菌株与本发明的一特定表达载体相组合, 能够获得相当高的全长 T 细胞受体蛋白的表达水平。优选该全长 TCR V 区域蛋白的表达水平是每升培养物至少 300 mg。这样的表达水平, 比如可用
5 E.Coli SG21173 作细菌宿主菌株, pKBi - V β 5.3 作为表达载体(见下面实施例)的优选方案来达到。本发明的此种宿主和表达载体之组合, 可以生产大量全长 T 细胞受体蛋白, 而成本却低于已有方法。

表达之后, 可以按标准方法来提纯本发明蛋白, 包括硫酸铵沉淀法、亲和色谱法、柱色谱法、凝胶电泳法等等(参见 Scopes, R., Protein Purification,
10 Springer - Verlag, NY(1982))。

在一优选实施方案中, T 细胞抗原受体 V 区域是可溶性的, 这就是说, 该 T 细胞抗原受体 V 区域在水相系统中可溶解。“可溶性”蛋白一般其特征在于, 室温下经高离心力离心(100,000 xg)不能使之从水相缓冲液中沉淀出来。溶解性对于简化 TCR V 区域蛋白从生产细胞中提纯来说特别重要。蛋白
15 化学中一般使用的水相缓冲液含有维持特定 pH 值(一般在生理学范围 pH5 - 9)的缓冲化合物, 其提供特定离子强度(一般约 10 mM - 约 500 mM), 并且通常包括一种蛋白酶抑制剂和温和去垢剂。标准缓冲液的例子是磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液或任何大量用于蛋白分离的缓冲液(见 Methods in Enzymology; Mahler and Cordes Biological Chemistry(2d Ed.), Harper and Row, New York
20 (1966))。

3. T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的应用

本发明首次提供了有效地、经济地生产诊断、治疗和研究使用量的 TCR V 区域蛋白之手段, 该蛋白是非融合蛋白, 或不与额外序列(例如亲和尾)连接。

25 A. 研究应用和诊断应用

本发明 TCR V 区域蛋白对于 T 细胞抗原受体(TCR)的结构和功能研究很有用。除了作为 TCR 特异形式的底物或结合结构域外, 这些蛋白可以作为研究构象的工具, 例如, 研究 T 细胞受体各部分的天然构象。

该 T 细胞 V 区域蛋白也可用作诊断探针。在一特定方案中, 本发明的
30 TCR V 区域蛋白可以用来测定一生物样本中某一特定 TCR V 区域亚族的存在或其量。一个此种检测在 Rittershaus, C.W. 的国际专利公开 WO 92/08981

中有介绍，该专利题为“Therapeutic and Diagnostic Methods Using Total Leukocyte Surface Antigens”。因此，本发明提供通过检测与疾病相关的特定 T 细胞亚类来诊断免疫相关疾病，例如多发性硬化症(MS)的方法。

5 另一方案中，本发明可用于生产抗体制备中所需的大量 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白。该抗体可采用本领域很多已知技术之任何一种来制备。为生产单克隆抗体(MAb)，可使用借助培养物中连续细胞系来提供抗体分子生产的任何方法。这些方法包括(但不限于)最先由 Kohler 和 Milstein(1995, Nature, 256:495 - 497)介绍的杂交瘤技术；更近的人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor 等人, 1983, Immunology Today, 4:72); EBV 技术(Cole 等人, Monoclonal
10 Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp 77 - 96(1985)); 和损伤 (trauma) 技术。对于抗体生产方法的综述见: Hartlaw, E.等人, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)。

15 根据其存在于生物样本中的自身抗体反应之能力，本发明 TCR V 区域蛋白可以作为诊断探针使用。

本发明也考虑到可以由适当检测器，例如闪烁计数器和 Geiger 计数器，或放射显影膜来检测的 TCR V 区域蛋白的标记衍生物。此类衍生物例如包括体外和体内诊断用的 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{112}In 、 ^{99}M 、Tc 等等。

B. 治疗应用

20 如上所述，本发明在治疗免疫相关疾病方面很有用。此外，所谓“免疫相关疾病”指免疫系统参与了该病病理之疾病，或者，若对免疫系统加以适当刺激，便可预防的一类疾病。相关疾病包括(但不限于)自身免疫疾病、肿瘤、感染性疾病、过敏症、移植病、移植物对宿主病、和退化性神经系统疾病等。自身免疫疾病包括(但不限于)关节炎(例如类风湿性关节炎)、I 型糖尿病、青少年糖尿病、多发性硬化症、自身免疫甲状腺炎(淋巴瘤性甲状腺炎)、
25 重症肌无力、全身性红斑狼疮(SLE)、 Sjogren 综合征、突眼性甲状腺肿、Addison 病、Goodpasture 综合征、硬皮病、皮肤肌炎、粘液水肿、多肌炎、恶性贫血、包括 Crohn 病和自身免疫性萎缩性胃炎在内的肠胃炎症，以及自身免疫溶血性贫血。肿瘤病包括(但不限于)、白血病、淋巴瘤、非-何杰金氏淋巴瘤和何杰金氏淋巴瘤和何杰金氏淋巴瘤之类的淋巴增生性疾病，以及
30 乳腺癌、结肠癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、黑色素瘤、肾癌之类的癌症。感染

性疾病包括(但不限于)由 HIV、HSV、EBV、CMB、流感、A、B、C 肝炎等病毒引起的病毒性感染; 由酵母属念珠菌等引起的真菌感染; 寄生虫感染, 例如由血吸虫、丝虫、线虫、旋毛虫或原虫(如引起昏睡病的锥虫等)、引起疟疾的疟原虫、或引起利什曼病的利什曼虫等引起的感染; 由分支杆菌、
5 棒状杆菌或葡萄球菌等引起的细菌感染。过敏症包括(但不限于)I 型过敏症例如与过敏原接触引起的过敏症; II 型过敏症例如存在于 Goodpasture 综合征、和重症肌无力等中的过敏症。

本发明 TCR V 区域蛋白的治疗应用, 其前提在于特定免疫相关疾病与特定 T 细胞抗原受体 V 区域的优先表达, 或编码一 TCR V 区域蛋白特定序
10 列的扩大使用相关。虽然本发明不局限于任何特定科学理论, 但该 TCR V 区域有用, 部份原因为其可用于调节个体内的免疫应答。具体说来, 若特定 V 区域的异常高表达与特定免疫相关失调相关, 那么可以通过中和载荷该特定 V 区域蛋白的 T 细胞来治疗个体。而引入 TCR V 区域蛋白, 则通过刺激与载
15 荷靶 V 区之 T 细胞特异性相互作用的调节性 T 细胞, 来对免疫抑制功能施加影响。也很有可能是, TCR V 区域蛋白可以激发与 T 细胞上靶 V 区能特异性相互作用的抗体应答, 由此调节该免疫反应。

本发明全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白在治疗免疫相关疾病方面具有独特优点。以前, 涉及特异性 T 细胞的免疫相关疾病的治疗可选择性方法包括:
20 (a)不经治疗可能自愈; (b)用相应于 T 细胞原受体 V 区域不同片段的肽治疗; (c)非特异性治疗, 例如类固醇或非类固醇抗炎症药剂治疗。然而这些方法无一能提供本发明的特别优点。本发明的治疗方法具有超过现有技术治疗免疫相关疾病的突出优点, 本发明方法的目标仅仅是表达特定 TCR V 区域的特定 T 细胞亚群, 适用范围很广的患者, 因为本发明已消除了需根据特定个体的 MHC 单倍型选择特定肽的要求。本发明的方法更为靠近只调整与疾病相关
25 的 T 细胞, 而不影响被治疗者的其它 T 细胞这一目的。因此本发明在更广泛的群体内取得了较大特异性治疗之成就。

在一优选实施方案中, 全长 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白可用于向下调节或消除显示带有相同 V 区域的 TCR 之 T 细胞亚群。T 细胞抗原受体 V 区域蛋白可以通过调节载负靶 V 区域之 T 细胞的活性或对载负靶 V 区的反应活跃
30 的 T 细胞群诱导出非反应性作用, 而治疗病症。在这种情况下, 该 T 细胞抗原受体作为治疗组合物用于受治疗者。

使用任何已知不同技术的可鉴定与给定疾病相关的特异性T细胞抗原受体V区域蛋白。由 Oksenberg, J.R.等人, 1989, 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:988 - 992 一文中介绍过用于已知患有重症肌无力或多发性硬化症的患者的遗传学方法。

5 本发明所谓“治疗”一词, 意指对于疾病的“预防”、“抑制”或“治疗”诸情况。“预防”涉及诱发疾病之前施用保护性组合物。这样, 例如在实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)的动物模型中, 在注射诱发疾病的致脑炎病原以前, 适当给其施用保护性组合物, 结果可成功地“预防”该病。

“抑制”指诱发事件出现之后, 而临床病症出现之前, 施以该组合物。
10 再次以 EAF 为例, 在注射致脑炎病原之后, 而神经学症状出现之前恰到好处地给以保护性组合物, 结果可使该病受到“抑制”。

“治疗”指病症出现之后施以保护性组合物。以 EAE 为例, 注射致脑炎病原并出现临床症状之后, 恰当地施用保护性组合物, 结果使该病得以“治疗”。

15 为测定本发明 TCR V 区域蛋白的预防, 抑制, 或治疗效果, 可测量某些临床后果, 尤其是测定体外淋巴细胞增殖反应的变化。测定该特定 V 区域蛋白的治疗效力为本领域已知技术。

为确定该蛋白在对抗疾病的保护作用或治疗疾病中有效性, 可以采取动物模型系统。Knight 等人, 1978, 在 J.Exp. Med., 147:1653 和 Reinersten 等人, 1978, 299:515 二文中公开过对易感小鼠进行的全身性红斑狼疮(SLE)治疗。采用来自另一物种的可溶性 AChR 蛋白, 对 SJL/J 雌性小鼠诱导重症肌无力(MG)后的治疗, 如 Lindstrom 等人, 1988, 在 Adv. Immunol., 42:233 - 284 一文中所介绍。通过注射II型胶原蛋白使易感性小鼠诱导关节炎, 如 Stuart 等人, 1984, 在 Ann. Rev. Immunol., 42:233 - 284 一文中所述。注射分支杆菌热休克蛋白使易感大鼠诱导付关节炎(adjutant arthritis), 如 Van Eden 等人, 1988, 在 Nature, 331: 171 - 173 一文中所述。施用甲状腺球蛋白使小鼠诱导甲状腺炎, 如 Maron 等人, 1980, 152:1115 - 1120 一文中所述。胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)可自然出现, 或可由某些系的小鼠(如 Kanasawa 等人, 1984 所述)诱导。小鼠和大鼠的 EAE 可以用作人类 MS 症的模型。该模型中,
25 脱髓鞘症由施用髓鞘质碱性蛋白(MBP)而诱导, 如 Paterson, P.Y.的 Textbook of Immunopathology(Mischer 等编, Grune 和 Stratton, New York, pp. 179 -
30

213(1986)一书、McFarlin, D.E.等人, 1973, *Science*, 179:478 - 480、和 Satoh, J.等人, 1987, *J.Immunol.*, 138:179 - 184 诸文所述。

当然, 同样的蛋白可能在人体中并不有效, 因为该蛋白可能并不相应于与该病相关的人 TCR 的适当位点, 但应明确, 为治疗属于其它物种(包括人)

5 的受治者, 可能要求将特定动物模型中所述蛋白序列加以修改。

4.含 T 细胞抗原受体 V 区域的药用组合物

本发明的蛋白和组合物或其功能性衍生物非常适宜于制备药用组合物。本发明药用组合物, 可以施用于能感受本发明组合物有益效果的任何动物。所述动物之首要者是人, 当然本发明并不限于人。

10 本发明药用组合物可采用能达到其所求目的之任何手段施药。例如可经非肠道给药, 如皮下、静脉内、真皮内、肌肉、腹膜、透皮给药, 或者经口腔含化给药。此外, 同时还可口服给药。该蛋白和药用组合物可以经非肠道丸剂注射, 或在一定时间内慢慢灌注的方式给药。

15 所用剂量取决于受治者年龄、性别、健康状况、和体重、以及可能存在的其它同时进行的治理的方法, 还应考虑治疗频率和所希望之效果。本发明组合物的给药剂量范围要大到足以产生所需效果, 例如, 通过延迟型过敏反应(DTH)或抗体产生测定看出, 引起了对该蛋白的免疫反应, 并且该免疫相关疾病明显得到预防、抑制或治疗。但该剂量也不应大到引起各种副作用的程度, 例如不希望的交叉反应, 普遍的免疫抑制、过敏性反应等等。

20 用于人类的优选剂量范围是约 0.001 - 1 mg/kg 体重。

除了含本身具药物活性的本发明蛋白外, 该药物组合物还可含适宜的药用可接受载体, 包括将该活性化合物加工制成药用制剂的赋形剂和助剂。优选该组合物包括明矾之类的佐剂, 或本领域已知其它佐剂(例如参见 Warren 等人, 1986, *Ann. Rev. Immunol.*, 4:369 - 388; Chedid, L., 1986, *Feder. Proc.*, 45:2531 - 2560)。

25 为提高扩散效果或生物活性, 可使用本领域已知方法和化合物将该蛋白掺入脂质体中。

可以口服的片剂和胶囊形式、可以直肠给药的制剂(例如栓剂)、和注射或口服用的溶液形式制剂, 均可以约 0.001 - 约 99 %, 优选约 0.01 - 约 95
30 % 活性化合物(一种或多种)的量与赋形剂相组合。

具体说来, 适宜的赋形剂是糖之类的填料, 例如乳糖或蔗糖、甘露糖或

山梨糖醇纤维素制剂，和/或磷酸钙之类的填料，例如磷酸三钙或磷酸氢钙，以及淀粉浆之类的粘合剂，例如玉米淀粉、小麦淀粉、水稻淀粉、土豆淀粉、明胶、黄耆胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、和/或聚乙烯基吡咯烷酮。

5 其它可以口服的药物制剂包括明胶制扣封胶囊，以及软胶囊、明胶和甘油或山梨醇之类增塑剂制密封胶囊。扣封胶囊可含颗粒形活性化合物，使其与乳糖等填料、淀粉等粘合剂、和/或滑石粉或硬脂酸镁等润滑剂混合，还可任选地含有稳定剂。软胶囊中，优选该活性化合物溶于(或悬浮于)适当液体，例如脂肪油或液体石蜡中。此外还可加入稳定剂。

10 可用于直肠的药物制剂，包括例如栓剂，它由一种或多种活性化合物与栓剂基质结合组成。适宜的栓剂基质是例如天然或合成甘油三酯或链烷烃。此外也可使用由活性化合物与基质结合组成的明胶直肠胶囊。可用的基质包括例如液体甘油三酯、聚乙二醇、或链烷烃。

15 适于非肠道给药的制剂包括在水溶性形式，例如水溶性盐中该蛋白的水溶液。此外，该蛋白悬浮液也可以适当油注射悬浮液给药。适宜的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油，如芝麻油、或合成脂肪酸酯，例如油酸乙酯或甘油三酯。含能提高悬浮液粘度之物质的水注射悬浮液包括，例如，羧甲基纤维素钠、山梨醇、和/或葡聚糖，这些悬浮还可任选地含有稳定剂。

20 为注射给药，使用常规的药用相宜非肠道载体配制该蛋白。这些载体是非毒性及治疗性的，在 Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin E.W.编，Mack Publishing Co. Easton, PA(1990))一书中描述了许多配方。赋形剂的非限制性例子是水、盐水、Ringer 氏溶液、右旋糖溶液，及 Hank 氏平衡盐溶液。根据本发明的制剂可以含少量添加剂，例如能维持等渗性，生理 pH 值和稳定性的物质。

25 本发明蛋白优选配制成基本上不含聚集物和其它蛋白物质的纯净形式，优选浓度为约 1.0 ng/ml - 100 mg/ml。

用于预防、抑制、或治疗免疫相关疾病的本发明蛋白有效剂量是约 1 ng - 100 mg/kg 体重范围，优选剂量范围是约 10 ng - 10 mg/kg 体重，更优选范围是约 100 ng - 1 mg/kg 体重。

30 提高该蛋白效力的方法在现有技术中是已知的。这些技术适用于本发明的蛋白质。

下面实施例仅为了说明，并不限制其范围。

实施例

下述一般技术用于下面所有实施例中。

1. 一般材料和方法

5 A. 细菌、质粒、和一般方法

E. coli GM2929(甲基化酶阴性)和 *E. coli* LJ24(lac 缺失)(Rasmussen 等人, 1991, J.Bacteriology, 173:6390 - 6397)由 Dr. Martin Marinus 赠与(University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA)。 *E. coli* JM109(Yanisch - Perron 等人, 1985, Gene, 33:103 - 119)购自 Promega Corporation, Madison, WI (USA)。 BL21 (*lon*⁻, *ompT*⁻)(Wood, W.B., 1996, J. Mol. Biol., 16:118 - 133; Studier 和 Moffatt, 1986, J. Mol.Biol., 189:113 - 130)购自 Novagen, Madison, WI(USA)。 SG22094(*lon*⁻, *clp*⁻)、 SG21163(*lon*⁻, *htpr*⁻)和 SG21173(*lon*⁻, *htpr*⁻, *clp*⁻)由 Dr. Susan Gottesman(National Institute of Health, Bethesda, MD (USA))赠与。这些 Gottesman 菌株有 *lacI* 基因缺失。用于转染的感受态细菌按 Morrison(1979, Meth. Enzymology, 68:326 - 331)提供的方法制备, 或从 Gibco BRL, Gaithersburg, MD(USA)购买(DH 5 α)。

pKK233 - 2(Amann 和 Brosius, 1985, Gene, 40:183 - 190)购自 Pharmacia, Piscataway, NJ(USA)。 pBR322(Bolivar 等人, 1977, Gene, 2:95 - 113)从 New England Biolabs, Beverly, MA(USA)获得。 pBluescript II KS + (Alting - Mees 等人, 1992, Meth. Enzymology, 216:483 - 495)从 Stratagene, La Jolla, CA(USA)获得。含 *arg U*(*dnaY*)基因的 pDC952(Lindsey 等人, 1989, J.Bacteriology, 171:6197 - 6205)由 Dr. James R. Walker (University of Texas, Austin, TX)赠与。 pSE420(Brosius, 1992, Meth. Enzymology, 216:469 - 483)和 pKK480 - 3(Brosius, 1992, 前述文献)由 Dr. Jurgen Brosius(Mount Sinai School of Medicine, New York, NY)赠与。 pUCts(Bukrinsky 等人, 1988, Gene, 70:415 - 417)通过 Jurgen Brosius 从 Michail I. Bukrinsky 处获得。

用标准方法构建质粒(Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1989))。DNA 限制酶和修饰酶除非专门说明外均购自 New England Biolabs, 并均按厂商说明书使用。除非另外指明, 合成寡核苷酸均购自 Operon Technologies, Inc., Alameda, CA(USA)。

将等摩尔浓度互补寡核苷酸，在 10 mM Tris pH 8.0, 0.5 mM MgCl₂ 中混合，并于 100 °C 放置 5 分钟，然后慢慢冷却至 25 °C，使其退火杂交在一起。使用 GeneAmp 试剂盒(The Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT(USA))，在 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 仪中进行聚合酶链反应(PCR)(Saiki 等人，1988, Science, 239:487 - 491)。DNA 测序使用 Sequenase kit (US Biochemical, Cleveland, OH(USA))，采用双脱氧核苷酸链终止法(Sanger 等人，1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463 - 5467)进行。所有化学试剂均选取最高纯度者。

B. 细胞培养物的生长和诱导

10 为进行化学诱导培养，将冷冻甘油贮存菌种用来接种含 6 μ g/ml 四环素的 5 - 25 ml 2 XYT 培养基[每升水中含 16 g Bacto - Tryptone (Difco 0123)、10 g Bacto - Yeast Extract (Difco 0127)、10 g NaCl, pH 7.2 - 7.4]，并使其在 37 °C，280 rpm 条件下生长过夜。一般，再用 1/100 体积该过夜培养物接种含 25 ml 2 XYT 培养基加 6 μ g/ml 四环素的二个 125 ml 烧瓶的每一个。培养物在 37 °C，280 rpm 条件下生长直到 A₅₈₀ 为 0.5 - 1.0 吸收单位为止，然后 15 后用 1 mM 异丙基 β - D - 硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导，并使其继续生长 2 小时。

为进行热诱导，将培养物在 30 °C，280 rpm 条件下生长直至 A₅₈₀ 为 0.5 - 1.0 吸收单位为止。然后将一份培养物保持在 30 °C 而其余的转移至 42 °C 20 水浴进行诱导，并使其再生长 2 小时。或者，一培养物于 30 °C 生长直到 A₅₈₀ 为 0.3 - 0.6 吸收单位为止，然后再将其分为二等份，一份维持于 30 °C，而另一份于 42 °C 生长进行诱导。

为检测诱导结果，将相当于 A₅₈₀ = 1.0 吸收单位的 1 ml 细胞的两份样品移出(例如假设 A₅₈₀ = 3.0，则应取出 333 μ l 培养物)。将该样品在 Eppendorf 25 微量离心机上，14000 xg 条件下离心 1 分钟，弃去上清液，并将沉淀之细胞于 - 20 °C 贮存。

C. 稳定性研究

将细菌连续三次划线培养成单克隆，并将来自第三个平板的一个单克隆用来接种含 6 μ g/ml 四环素的 200 ml 2 XYT 培养基。该培养物生长至 A₅₈₀ = 0.5 - 1.0 吸收单位，取出 60 ml 与 40 ml 甘油混合，取 1 ml 等分样分装于 30 100 个小瓶中，于 - 80 °C 贮存。将剩余培养物分成两等分；一份进行非诱导

培养，另一份加入 IPTG 诱导培养或改变温度诱导培养。二者再生长 2 小时。诱导以前及诱导两小时之后，各取相当于 $A_{580} = 1.0$ 吸收单位的 1 ml 培养物之样品，检测 A_{580} 吸收，pH 值，并通过 EIA、丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹分析检测蛋白产生。

- 5 以冷冻库中取三只小瓶进行细菌生长和蛋白产生平行试验。各瓶(1 ml)均用于接种 200 ml 2 XYT 培养基加 $6 \mu\text{g/ml}$ 四环素，并培养至 $A_{580} = 0.5 - 1.0$ 吸收单位。然后将各培养物均分成二等分，一分进行非诱导培养，另一份进行化学或热诱导。将相当于 $A_{580} = 1.0$ 时 1 ml 培养物之样品，分别在诱导前和诱导 2 小时之后从两份培养物中取出，并按前述方法检测。
- 10 为进行稳定性研究，诱导之前，从三份平行培养物之一取出 1 ml 等分样，用 2 XYT 培养基按 1/1000 比例稀释，并取 $20 \mu\text{l}$ 或 $200 \mu\text{l}$ 接种于 200 ml 加四环素的 2 XYT 培养基中，使其生长至 $A_{580} = 0.5 - 1.0$ 吸收单位。然后将培养物分成二等分，其中一份诱导，二者均再生长 2 小时。诱导前及诱导二小时之后分别取出相当于 $A_{580} = 1.0$ 时 1 ml 培养物量之样品，并进行上述检测。
- 15

D. 细胞分级分离

- 在 7000 xg 条件下，将细胞离心处理 7 分钟使之沉淀，并将上清液(培养基)以 14000 xg 条件，在电泳之前再离心 5 分钟。该细胞沉淀物再悬浮于原始培养物 1/5 体积的 20 % (w/v) 蔗糖、 $0.3 \text{ M Tris} - \text{HCl pH } 8.0$ ， 1 mM EDTA
- 20 中，于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温 15 分钟，并于 6000 xg 离心处理 7 分钟。弃去上清液，将沉淀再悬浮于 1/5 原始体积冷水中，于 $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 10 分钟，通过渗透休克法 (Nossal 和 Heppel, 1966, J. Biol. Chem., 241:3055 - 3062) 将位于周质腔中之蛋白释放出来。接着在 9000 xg 条件下离心处理 10 分钟后，保留上清液(周质级份)，该细胞沉淀再悬浮于 $1 \times \text{TST}(25 \text{ mM Tris} - \text{HCl pH } 8.0$ 、 200 mM NaCl 、 1 mM EDTA 、 $10 \text{ ml/l Tween } 20$)，超声处理，于 12000 xg 离心 15 分钟、并保留上清液(可溶性细胞溶质级份)。
- 25

E. 聚丙烯酰胺凝胶电泳

- 通过剧烈振荡或采用超声处理，在 $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 下，每次 5 秒，功率输出 0.4，共三次，将冷冻 *E. coli* 细胞沉淀再悬浮于 $70 \mu\text{l}$ 水中(Sonic Dismembrator, Model 301, ARTEK Systems Corp.)。将该破裂细胞与 $70 \mu\text{l} 2\times$ 上样缓冲液($125 \text{ mM Tris} - \text{HCl}$ 、 $\text{pH } 6.8$ 、 4% SDS、 20% 甘油、 10% β -巯基乙醇、
- 30

0.002 % 溴酚兰)混合(Laemmli, 1970, Nature, 227:680 - 685)。将样品于 100 °C 保温 5 分钟, 14000 xg 条件下离心 30 秒, 然后将 10 - 15 μ l 等分样加入事先制好的 16 % 或 10 - 20 % 丙烯酰胺 Tricine 凝胶(acrylamide Tricine gels)上(Novex, San Diego, CA(USA)), 置于同一厂商提供的缓冲液中电泳。电泳条件是每两块胶 125 V 恒定电压, 或 45 mA 恒定电流, 时间是 2 小时, 直到溴酚兰染料泳出凝胶为止。标准物是每泳道使用 1 μ l 的预染色低分子量蛋白标准物(#SE 130024, Integrated Separation Systems, Natick, MA(USA))。将凝胶在 10 % 乙酸、25 % 甲醇、0.025 % 考马斯亮蓝 R 中染色过液。

F. Western 印迹分析

10 经 SDS - PAGE 分离, 使用 Semi - Dry electroblotter(Integrated Separation Systems)、通过电转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上(Immobilon - P, Millipore, Bedford, MA(USA)), 将蛋白进行免疫检测(Towbin 等人, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350 - 4354)。蛋白转移条件是每 cm^2 膜 10 mA 进行 1 - 3 小时。然后将该膜在封闭缓冲液(1 \times PBS, 2 % 奶粉、0.1 % Tween - 20)中过夜封闭处理。

15 将该膜洗三次、每次以 1 \times PBS、0.1 % Tween - 20 洗 5 分钟, 接着再每次用 1 \times PBS 洗 5 分钟共三次, 然后将其浸入辣根过氧化物酶(HRP) - 酶联的抗 - V β 5.3 单克隆抗体(13A2 - HRP, 0.25 mg/ml)以 1:3000 之比在 1 \times PBS、0.1 % Tween - 20 中的稀释液中。接着轻柔晃动 2 小时, 如上所述洗涤该膜, 并以强化化学发光检测法使该蛋白显现(Amersham, Arlington Heights, IL(USA)), 按厂商说明书进行。膜曝光时间为 5 秒至 1 分钟。

G. 酶免疫测定法

25 将冷冻细胞沉淀以剧烈振荡处理使之再悬浮于 20 μ l 8 M 脲、50 mM Tris - HCl, pH 8.5 中(Marston 和 Hartley, 1990, Meth. Enzymology, 182:264 - 276), 并按如下所述进行酶免疫测定, 对 V β 5.3 定量分析:

30 将 Nunc - Immuno Maxisorp 板(VWR #62409 - 002)用每 ml PBS 中含 4 μ g 4C2 IgG, 按每孔 100 μ l 之量包被处理, 并于 4 °C 贮存过夜。弃去包被液, 按 200 μ l/孔加入封闭缓冲液(PBS, 0.05 % Tween - 20 中 1 % 酪蛋白水解物)。室温下, 150 rpm 条件下, 将这些板温育 2 小时, 然后用洗涤缓冲液(PBS, 0.05 % Tween - 20)洗三次。将封闭缓冲液中的样品(稀释 1/2000 至 1/32000)和 V β 5.3 标准物以 100 μ l/孔量加入并于 150 rpm 条件下室温中保

温 90 分钟。将该板用洗涤缓冲液洗三次，将 HRP 酶联抗 V β 5.3 单抗(13A2 - HRP)以 1/500 稀释于加入 5 % 胎牛血清的封闭缓冲液中，以 100 μ l/孔(0.5 μ g/ml)量加入各孔。然后于 150 rpm 条件下将该板再于室温保温 90 分钟，洗涤四次，并加入 100 μ l/孔邻苯二胺(OPD)底物。30 分钟后，加入 50 μ l/2N H₂SO₄/孔使反应终止。测定 490 nm 波长处的吸收率，减去 650 nm 处本底吸收率。空白孔不含样品。

2. 质粒构建

实施例 1

pK2D 的构建

10 表达本发明 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白的出发点是含有能对表达 T 细胞抗原受体 V 区域蛋白适当调节之元件的质粒的构建。这些元件包括启动子，二个转录终止子、及细菌中稳定复制的复制起始点。因为调节方面的考虑关系到该蛋白(该蛋白的一个特征是适合体内作治疗用)的制备，选用编码抗四环素的基因以便于质粒载负细胞的选择。最后，出发表达载体要有一多
15 克隆位点，其设计应有利于本发明的优选编码区克隆进表达载体中。下面实施例描述了本发明的独特出发质粒。

构建优选表达载体的出发点是 pKK233 - 2(4.6 kb)，下面将要介绍。如下述，将 NcoI 限制位点转变成 SpeI 位点：用 NcoI 消化 pKK233 - 2，所得
20 5'突出末端通过以绿豆(mung bean)核酸酶于 25 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟而除去。用苯酚 - 氯仿抽提该质粒两次，在有 2 M 乙酸铵存在下用乙醇沉淀，并重悬于水中。用细菌碱性磷酸酶(Gibco BRL)去磷酸化之后，将该载体与合成的 SpeI 接头(#1085, New England Biolabs)连接，将该连接物转化入 DH 5 α 感受态细胞产生 pKK233 - 2A 载体。

接着，按下面步骤将四环素基因复原：用 EcoRI 和 SalI 消化 pKK233 -
25 2A(4.6 kb)，产生两个片段，分别为 279 bp 和 4321 bp。用琼脂糖凝胶电泳将两片段分开，并使用 GeneClean Kit (BIO 101, La Jolla, CA(USA))从琼脂糖中纯化该大片段，用 EcoRI 和 SalI 从 pBR322 上切下含四环素基因氨基末端编码区的 651 bp 片段。并连接到来自 pKK233 - 2A 的 4321 bp 片段上。所得质粒 pK2B(4.97 kb)为 *E. coli* DH5 α 细胞提供四环素抗性，并被进一步修饰
30 使其缺失 β - 内酰胺酶 (β - lactamase)基因的的一部分，并将 HindIII 位点转变成 SacII 位点，详述如下：

使用 pK2B 作模板, 将跨越 SpeI 独特位点到转录终止子 3'端的 DNA 片段进行 PCR 合成。按 5'→ 3'的方向, 含 SpeI、PstI 和 SacII 限制酶识别序列(下划线者)的 5'“有义”引物表示如下:

5' - TATAATGACTAGTCGCTGCAGCCAACCGCGGCTG - 3' [SEQ ID NO 1]

5

含一个 ScaI 位点(下划线者)的 3'“反义”引物表示如下:

5' - GTCCTAGAGTACTGAGCGGATAC - 3' [SEQ ID NO 2]

将 1 ng pK2B DNA 模板, 与含 10 mM Tris - HCl pH 8.3, 50 mM KCl、
10 1.5 mM MgCl₂、100 μg/ml 明胶、脱氧核苷酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)
各 200 μM、两种引物各 1 μM、和 2.5 单位 AmpliTaq DNA 聚合酶的各反
应物混合在一起。最终反应体积是 100 μl, 用 100 μl 矿物油覆盖。该 DNA
95 °C 变性 2 分钟。按 95 °C 变性 1 分钟、60 °C 退火 1 分钟、及 72 °C 引物延
伸 1 分钟的模式循环 30 次完成扩增反应。以 1 % 琼脂糖凝胶于 40 mM Tris
15 - HCl pH 7.8, 5 mM 乙酸钠、1 mM EDTA 中电泳分析该扩增 DNA。

以 SpeI 和 ScaI 消化所得 485 bp PCR 合成片段, 然后连接到用 SpeI 和
ScaI 消化 pK2B 后所得 4129 bp 片段上, 得到称之为 pK2C 的质粒。

质粒 pK2C(4.6 kb)被进一步修饰使含一多克隆位点。首先用 SpeI 和 SacII
消化 pK2C, 并连接到含 15 个限制位点的双链合成寡核苷酸上。使等摩尔浓
20 度的两个互补的合成寡核苷酸(长度分别为 91 和 97 bp)退火形成多克隆位点
(MCS), 所述两寡核苷酸序列如下:

5' - GGCTCGAGCCTAGGCTGCAGCCCGGGCGCGCGCGGCCCGCAGGCC
TTTAATTAAGAGCTCCGGACCGCACAAATGTGGGCGCGCCCTTAAGA - 3'
[SEQ ID NO 3]

25

5' - CTAGTCTTAAGGGCGCGCCACATTGTGCGGTCCGGAGCTCTTAA
TTAAAGGCCTGCGGCCGCGCGCCCCGGGCTGCAGCCTAGGCTCGAG
CCGC - 3' [SEQ ID NO 4]

该 MCS 编码下述限制酶位点: SpeI、AflII、AscI、DraIII、RsrII、
30 SacI、PacI、StnI、NotI、BssHIII、XmaI、PstI、AvrII、XhoI 和 SacII。
将该连接混合物转化入甲基化酶阴性 *E. coli* GM2929。所得质粒 pK2D(4.67 kb)

被局部测序，以确保该体外合成区域的完整性。

结果：

出发质粒是含有下述元件的 pKK233 - 2：trc 启动子(Brosius 等人, 1985, 前述文献), 该启动子相似于 lac UV5 启动子 - 10 区与色氨酸启动子 - 35 区融合(de Boer 等人, 1983, 前述文献; Aman 等人, 1983 前述文献) 5 衍生的 tac 启动子, 还含有一个核糖体结合位点, 接着是三个单限制酶(NcoI、PstI 和 HindIII)克隆位点、然后是 *E.coli* rrnB 核糖体 RNA 操纵子的转录终止子(Brosius 等人, 1981, Plasmid, 6:112 - 118), 此外该 pKK233 - 2 还含有 10 氯苄青霉素抗性的 β - 内酰胺酶(β -lactamase)基因、pBR322 复制起始点, 以及来自四环素抗性基因的无功能性羧基末端小片段。

对该 pKK233 - 2 进行修饰, 以破坏 NcoI 位点, 恢复四环素抗性基因, 除去 β - 内酰胺酶编码区的一个片段(上此使该基因失活), 并插入一个由 15 个限制位点组成的多克隆位点, 产生 pK2D。

实施例 2

15 将质粒 pK2D 进一步修饰, 加入来自胡萝卜欧文氏杆菌(*Erwinia carotovora*)的 pelB 信号序列(Lei 等人, 1987, J.Bacteriology, 169:4379 - 4383), 或者 *E.coli* 的热稳定肠毒素 II(STII)信号序列(Morioka - Fujimoto 等人, 1991, J. Biol. Chem., 266:1728 - 1732)。

pK - pelB 的构建

20 操作质粒 pK2D(4.67 kb)使之包括进一个核糖体结合位点(Shine 和 Dalgarno, 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:1342 - 1346; Shine 和 Dalgarno, 1995, Nature, 254:34 - 38; Steitz 和 Jakes, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:4734 - 4738)和来自胡萝卜欧文氏杆菌的 pelB 信号序列(Lei 等人, 1987, 前述文献), 建立质粒 pK - pelB(4.74 kb), 详述如下:

25 用位于 MCS 的 SpeI 和 SacI 消化 pK2D, 并将该载体与二个互补的合成寡核苷酸(分别长 103 bp 和 95 bp, 见示于下面的序列)连接。将一个沉默突变(较小字母表示)引入 pelB 序列中, 以产生 NcoI 限制位点(下面划线表示), 以便于随后的 V β 5.3 基因序列的亚克隆。

30

5' - CTAGTAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACC
TATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCA
GCcATGGCCGAGCT - 3' [SEQ ID NO 5]

5' - CGGCCATgGCTGGTTGGGCAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCT
5 GCCGTAGGCAATAGGTATTTCAATTATGACTGTCTCCTTGAAATAGA
ATTTA - 3' [SEQ ID NO 6]

pK - STII 的构建

操作质粒 pK2D，使之含有一个核糖体结合位点和 E.coli 热稳定肠毒素 (STII)信号序列(Morioka - Fujimoto 等人，1991，前述文献)，详述如下：

10 用位于 MCS 的 SpeI 和 DraIII 消化 pK2D，将该载体与二个互补的合成寡核苷酸连接，该两寡核苷酸分别长 105 bp 和 98 bp，如下面所示的序列。将两个沉默突变(较小字母)引入 STII 序列以产生 MluI 和 DraIII 限制位点(下面划线表示)，以便于随后 V β 5.3 的亚克隆。

15 5' - CTAGTAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAAAAGAA
TATAGCATTCTACTAGCTTCAATGTTTCGTCTTCTCTATTGCAACTA
ACGCgTACGCaCATT - 3' [SEQ ID NO 7]

5' - GtGCGTAcGCGTTAGTTGCAATAGAGAAGACGAACATTGAAGCT
AGTAGGAATGCTATATTCTTTTTTCATTATGACTGTCTCCTTGAAATA
20 GAATTTA - 3' [SEQ ID NO 8]

实施例 3

25 将含来自实施例 2(前述)信号序列的质粒进一步加以修饰，使之包括二个调节元件。

pKT - pelB 的构建

质粒 pK - pelB 被进一步修饰，使其在 pelB 前导序列的上游含二个调节元件，构建 pKT - pelB(4.8 kb)。该两元件是来自噬菌体 T7 基因 10 (g10)的翻译增强子、和一个编码 8 个氨基酸残基的微型顺反子 ATG TAT CGA TTA
30 AAT AAG GAG GAA TAA(GEQ ID NO.28)。采用 SpeI 和 SacI 消化 pK2D，接着将该载体连接到编码 g 10 序列、核糖结合位点、微型顺反子和 pelB 前

导序列(按 5' - 3'的方向)的合成寡核苷酸上来完成两个调节元件的插入。该寡核苷酸是以两组长为 71 - 89 聚体的互补链合成的, 它们可通过 9bp 的互补突出区相连接。该两个寡核苷酸互补对称称之为 A 对(Pair A)(寡 J5A + J6A, 分别 89bp 和 76 bp 长)和 B 对(Pair B)(寡 J5B + J6B, 分别 71 bp 和 76 bp 长), 其序列如下:

J5A

5' - CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAACCTTTATTATTAATAAAATTAA
AGAGGTATATATTAATGTATCGATTAATAAGGAGGAATAAATA - 3' [SEQ ID NO 9]

J6A

5' - CTCCTTATTTAATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTTTA
ATAATAAAGTTAATCGATGCCCAATTCCGGA - 3' [SEQ ID NO 10]

J5B

5' - ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTC
GCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGCT - 3' [SEQ ID NO 11]

J6B

5' - CGGCCATGGCTGGTTGGGCAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTG
CCGTAGGCAATAGGTATTTTCATTATTTATTC - 3' [SEQ ID NO 12]

pKT - STII 的构建

将质粒 pK - STII 进一步修饰, 使之包含与 pKT - pelB 中相同的两个调节元件, 由此建立 pKT - STII(4.8 kb)。用 SepI 和 DraIII 消化 pK2D, 将该载体连接到编码 g 10 序列、核糖体结合位点、一个微型顺反子和 STII 前导序列(按 5' - 3'的方向)的合成寡核苷酸上。该寡核苷酸是以两组长 73 - 89 聚体的互补链合成的, 它们可通过 9bp 的互补突出区相连接。该两互补寡核苷酸对被称为 A 对(Pair A)(寡 J5A + J6A, 分别 89 bp 和 76 bp 长), 和 B 对(Pair B)(寡 J5C + J6C, 分别 73 bp 和 79 bp 长), 其序列如下:

J5A

5' - CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAACCTTTATTATTA AAAAATTAA
AGAGGTATATATTAATGTATCGATTAATAAGGAGGAATAAATA - 3' [SEQ ID NO 9]

J6A

5' - CTCCTTATTTAATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTTA
ATAATAAAGTTAATCGATGCCCAATTCCGGA - 3' [SEQ ID NO 10]

J5C

5' - ATGAAAAAGAATATAGCATTCTACTAGCTTCAATGTTTCGTCTT
CTCTATTGCAACTAACGCGTACGCACATT - 3' [SEQ ID NO 13]

J6C

5' - GTGCGTACGCGTTAGTTGCAATAGAGAAGACGAACATTGAAGC
TAGTAGGAATGCTATATTCTTTTTTCATTATTTATTC - 3' [SEQ ID NO 14]

实施例 4

pK - pelB - V β 5.3 的构建:

有关 T 细胞抗原受体 V β 5.3 蛋白的表达的下一步是将 V β 5.3 序列加入含上述实施例 2 信号序列的质粒中。

15 该 V β 5.3 的全部核苷酸序列产生如下: V β 5.3 克隆 12A1 的 DNA 序列最初由 Leiden 等人报道过(1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:4456 - 4460), 然后再部份地加以修正(Leiden 等人, 1986, Molec. Cell Biol., 6:3207 - 3214)。该克隆 12A1 缺失编码 N - 末端四个氨基酸残基的核苷酸; 此外, 所推测的克隆 12A1 N 末端氨基酸残基是不正确的。V β 5.3(HPB - ALL)
20 的 N 末端氨基酸序列由 Jones 等人报道过(1985, Science, 227:311 - 314), 但未指明 N 末端第一氨基酸残基。经过后来测定, 该残基是甘氨酸(Jebb Leiden, 尚未发表过)。使用上述序列资料, 采用重组 DNA 技术重建完整 V β 5.3。所得质粒(pBB - V β 5.3)是下面实施例的 V β 5.3 序列来源。有关编码 V β 5.3 的全长核苷酸序列和预测的氨基酸序列, Plaza 等人有更新的报道
25 (1991, J. Immunol., 147:4360 - 4365)(也见本文图 1; SEQ ID NO. 25、26 和 27)。

使用 pBB - V β 5.3(6.2 kb)作为模板以 PCR 法合成 V β 5.3。5' “有义”引物含有一个 NcoI 限制酶位点(下划线表示):

5' - TAATTAGCCATGGCCGCGTAACCCAATCTCCG - 3' [SEQ ID NO 15]

30

3' “反义”引物与载体中 PstI 位点下游的一段区域互补:

5' - CCAGTGCCAAGCTTGCATGCC - 3' [SEQ ID NO 16]

使用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段, 将所得 V β 5.3 片段切成平齐末端, 并连接到 pBluescriptII KS + 的去磷酸化的 EcoRV 位点, 产生质粒 pBL - pelB - V β 5.3。用 NcoI 和 PstI 消化切割该 V β 5.3 插入段, 以琼脂糖纯化, 并连接到 pK - pelB 的 NcoI 和 PstI 位点, 产生质粒 pK - pelB - V β 5.3(5 kb)。pK - STII - V β 5.3 的构建

使用 pBB - V β 5.3(6.2 kb)作模板经 PCR 法合成 V β 5.3。5' “有义”引物含一个 MluI 限制酶位点(下划线表示):

10 5' - GAAATTAACGCGTACGCAGGCGTAACCCAATCTC - 3' [SEQ ID NO 17]

3' “反义”引物与载体中 PstI 位点下游一段区域互补:

5' - CCAGTGCCAAGCTTGCATGCC - 3' [SEQ ID NO 18]

15 使用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段, 将所得 V β 5.3 片段切成平齐末端, 并连接到 pBluescript II KS + 的去磷酸化 EcoRV 位点, 产生质粒 pBL - STII - V β 5.3。用 MluI 和 PstI 消化切割该 V β 5.3 插入段, 用琼脂糖凝胶纯化, 并连接到 pK - STII 的 MluI 和 PstI 位点上, 产生质粒 pK - STII - V β 5.3(5 kb)。

20 结果

与 PelB 或 STII 前导序列融合的 V β 5.3 在 *E. coli* JM109 中表达(表 1)。诱导作用进行 2 小时, 并采用 EIA 测定 V β 5.3 产量。

表 1

V β 5.3 的表达和定位

25

	pK - pelB - V β 5.3		pK - STII - V β 5.3	
定位	0 mM IPTG	1 mM IPTG	0 mM IPTG	1 mM IPTG
上清液	0 μ g/ml	1.3 μ g/ml	0.5 μ g/ml	2.2 μ g/ml
周质	0.9	4.6	没有检测	5.5
30 胞液	9.9	范围以外[1:40]	2.0	范围以外[1:40]

虽然大部分表达蛋白位于胞内，但两前导序列都是有功能的。

实施例 5

本例详述含前导序列和二一个调节元件(g 10 和微型顺反子)以及 V β 5.3 序列的质粒。

5 pKT - pelB - V β 5.3 的构建

用 NcoI 和 PstI 从 pK - pelB - V β 5.3 切割下 V β 5.3 插入段，并连接到 pKT - pelB 的 NcoI 和 PstI 位点上，而构建质粒 pKT - pelB - V β 5.3。

pKT - STII - V β 5.3 的构建

用相似方法，使用 MluI 和 PstI，从 pK - STII - V β 5.3 上切割下 V β 5.3 插入段，并连接到 pKT - STII 的 MluI 和 PstI 位点上，从而构建 pKT - STII - V β 5.3。

所有随后的质粒构建体均利用 STII 信号序列。因此，假如未指明该信号序列，应理解为利用了该 STII 序列。

结果

15 pKT - V β 5.3

将质粒 pK - STII - V β 5.3(实施例 4)加以修饰，使其在 STII 前导序列的上游包括二个调节元件而建立 pKT - V β 5.3。所述元件是来自噬菌体 T7 基因 10(g 10)的翻译增强子、和编码 8 个氨基酸残基的微型顺反子。业已证明该两元件可提高几个基因的翻译效率(Schoner 等人，1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:5403 - 5407; Schoner 等人，1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:8506 - 8510; Olins 等人，1988, Gene, 73:227 - 235; Olins 和 Rangwala, 1989, J. Biol. Chem., 264:16973 - 16976)。

在 IPTG 诱导条件下，于 *E.coli* JM 109 中，pKT - V β 5.3 与 pK - STII - V β 5.3(实施例 4)相比，可提高 8 倍以上蛋白产量。由于目前缺乏高纯 V β 5.3 标准样品，因此此处所记录之 EIA 值只是近似的。表明 pKT - V β 5.3 在 *E.coli* JM 109 中是稳定的。

实施例 6

pKTB - V β 5.3 的构建

进一步修饰 pKT - V β 5.3(实施例 5)，使之无需 IPTG 诱导可进行分泌表达。编码温度敏感 lac 阻遏蛋白(Bukrinsky 等人，1988, Gene, 70:415 - 417)的 lacI_{ts} 基因的存在，使其能够从 30 °C - 42 °C 提高温度，而控制从 trc 启动

子的基因表达。这就避免使用 IPTG 或使用带有 lacI 或 lacI^q 基因的细菌菌株的必要。

通过 EcoRI 消化, 从 PUCts 切下 lacIts 基因。用 Klenow 将由载体序列侧接的含完整 lacIts 编码区及其相联调节元件 1.7 kb 片段切成平齐末端, 并连接到位于 pKT - V β 5.3 rrnB 操纵子下游的脱磷酸 ScaI 位点, 产生质粒 pKTB - V β 5.3(6.8 kb)。该 lacIts 基因的取向由限制性酶切图确定。

结果

该 lacIts 基因被以任意方向插入 pKT - V β 5.3 中 rrnB 转录终止子的下游, 建立质粒 pKTB - V β 5.3(图 2)。该质粒在 *E. coli* LJ24(lacI 缺失)中表达, 用丙烯酰胺凝胶上考马斯兰染色法(Laemmli, 1970 前述文献), 和用 Western 印迹法(Towbin 等人, 1979, 上述文献)分析该蛋白。lacIts 基因的一种取向(转录方向朝 Amp^r 区)明显地比其相反取向获得更高 V β 5.3 产量。

将从全部细胞沉淀提取物中获得的推定 V β 5.3 带电转移到 Immobilon - P 膜上, 并用考马斯兰染色。将该带切下, 并进行氨基末端氨基酸测序(Matsudaira, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:10035 - 10038), 总共产生 10 个氨基酸残基。该结果加工后的 V β 5.3 的 N - 末端 10 个氨基酸残基序列完全相符, 即未测到前导序列。

该质粒也在三个不同的细菌菌株中通过热诱导表达, 所述三菌株均含逐渐提高的内源 lac 阻遏物水平, 即 LJ24 < DH5 α < JM109。采用 EIA 法, 从诱导培养物上清液中检测 V β 5.3 表达(表 2)

表 2

不同细菌菌株中的 pKTB - V β 5.3 表达

诱导细胞 2 小时, 测量培养上清液中的 V β 5.3 产量(μ g/ml)

25 质粒	调节元件	<i>E.coli</i> 宿主	诱导作用	未诱导 (产率)	诱导 (产率)
pKTB-V β 5.3	lacIts	JM 109(lacI ^q)	42 °C	未测	0.5
pKTB-V β 5.3	lacIts	DH 5 α (lacI)	42 °C	未测	5.0
pKTB-V β 5.3	lacIts	LJ 24(Δ lacI)	42 °C	未测	5.2
30 pKT-V β 5.3	lacI ^q	JM 109	2 mM IPTG	0	0.9
pKT	lacI ^q	JM 109	42 °C	未测	0

该数据与 Western 印迹观察和所预料结果相符，即最高表达水平是在 LJ24(Δ lacI)中达到的，而最低表达是在 JM 109(lacI^q)中获得的。在培养上清液中测得的 V β 5.3 量相当低，这与 *E.coli* 一般不分泌蛋白进入培养基这一事实相符。正如表 1 所示，表达的大部分 V β 5.3 局限于周质中。

5 lacIts 基因的 DNA 序列

将温度诱导 lacIts 基因的完全编码序列加上包括启动子的上游 80 个核苷酸测序，并同已发表的 IPTG 可诱导 lacI 基因序列(Farabaugh, 1978, Nature, 274:765 - 769)加以比较。该启动子区域与 lacI 基因该区域相同，而与 lacI^q 基因该区域不同(Calos M.P., 1978, Nature, 274:762 - 765)。lacIts 基因序列显示一个编码 360 个氨基酸的 1080 个核苷酸的开放阅读框架，且与 lacI 基因 #559 核苷酸(从起始密码子的第一核苷酸数起)不同(从 G 变为 A)，这样使得氨基酸残基#187 从甘氨酸(GGC)变成丝氨酸(AGC)。此种只有一个氨基酸残基的变化，便给予了 lac 阻遏蛋白的热敏感性。

此外，lacI 基因的已发表序列(Farabaugh, 1978, 前述文献)，以及在 Genebank(基因座位 ECOLAC)中出现的序列，在#857 位置有一错误：#857 核苷酸应是 T 而不是 C，这样使得残基#286 编码亮氨酸(TTA)，而不是丝氨酸(TCA)。该 C - T 转变，如前面由限制性酶切图(Brosius, 1992, Meth. Enzymol., 216:469 - 483)表明的，在 lacI 基因的 3'端引入了一个 HpaI 位点。应当注意到，前述 Farabaugh(1978)文献中，同一密码子(TCA)被错误地报道为编码亮氨酸，而非编码丝氨酸。

实施例 7

pKTB 的构建

用 Sall 和 PstI 消化质粒 pKTB - V β 5.3(6.7 kb)，使用 GeneClean Kit(BIO 101)从琼脂糖凝胶中纯化 5.42 kb 片段。用 Sall 和 PstI 消化质粒 pKT - STII(4.8 kb)，以相似方法纯化 1.15 kb 片段，并连接到 5.42 kb 片段上，产生质粒 pKTB(6.56 kb)。

实施例 8

pKB - V β 5.3 的构建

该质粒相同于减去二个调节元件的 pKTB - V β 5.3，即减去了 g 10 翻译增强子和微型顺反子。用 Sall 和 PstI 消化质粒 pKTB(6.56 kb)，使用 GeneClean Kit (BIO 101)从琼脂糖纯化大片段(5.4 kb)。用 Sall 和 PstI 消化质粒

pK - V β 5.3，用相似方法纯化 1.3 kb 片段，并连接到 5.4 kb 片段上，得到质粒 pKB - V β 5.3(6.7 kb)。

结果

pKB - V β 5.3

- 5 正如上面所讨论的，加上两个调节元件，即 g 10 基因片段和微型顺反子，看来可提高 IPTG 诱导条件下的 V β 5.3 产量。我们打算除去 pKTB - V β 5.3 载体中的该两元件，并于热诱导条件下再检测 V β 5.3 的产量。通过丙烯酰胺电泳和 Western 印迹分析表明，pKTB - V β 5.3 和 pKB - V β 5.3 比较，除去该两元件对 V β 5.3 的产量无影响。全细胞脲提取物 EIA 测定表
- 10 明，当在 E.coli LJ24 中表达时，pKB - V β 5.3 比 pKTB - V β 5.3 产生更多的蛋白。

表 3

不同细菌菌株中的 V β 5.3 表达

15	质粒	LJ24	SG22094	SG21163	SG21173
	pKTB-V β 5.3	90	80	20	30
	+前导+g 10/MC				
	pKB-V β 5.3	110	50	40	20
	+前导 - g 10/MC				
20	pKTBi-V β 5.3	6	100	100	100
	- 前导+g 10/MC				
	pKTBi-V β 5.3	10	170	130	390
	- 前导 - g 10/MC				

诱导时间: 42 °C 2 小时

25 培养物体积: 25 ml

前导: STII

g 10: T7 基因 10

MC: 微型顺反子

样品: 全细胞脲提取物

- 30 V β 5.3 产量(mg/l)、按 EIA 测量，根据单位/ml 近似推算。1 mg V β 5.3 近似等于 1×10^7 单位。

质粒 pKB - V β 5.3 被证明对于发酵来说是稳定的。

实施例 9

pKB 的构建

用 SalI 和 PstI 消化质粒 pKTB(6.56 kb), 使用 GeneClean Kit(BIO 101)从琼脂糖中纯化片段(5.4 kb)。用 SalI 和 PstI 消化质粒 pK - STII(4.75 kb), 以相似方法纯化 1.1 kb 片段, 并连接到 5.4 kb 片段上, 产生质粒 pKB(6.5 kb)。

实施例 10

pKTBi 的构建

该质粒与减去 STII 信号序列的 pKTB 相同。用 SpeI 和 XmaI 消化 pKTB(6.56 kb), 并连接于编码 g 10 翻译增强子、一个核糖体结合位点、和一个含第二核糖体结合位点的微型顺反子双链合成寡核苷酸上。NcoI、DraIII、RsrII 和 XmaI 的限制位点被设计在 3'端。该两互补寡核苷酸序列如下:

15 5' - CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAAC TTTATTATTA AAAAATTA
AAGAGGTATATATTAATGTATCGATTAATAAGGAGGAATAAACC
ATGGCACATTGTGCGGTCCGC - 3' [SEQ ID NO 19]

20 5' - CCGGGCGGACCGCACAATGTGCCATGGTTTATTCCTCCTTATTTA
ATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTAATAATAAAGTTA
ATCGATGCCCAATCCGGA - 3' [SEQ ID NO 20]

实施例 11

pKBi 的构建

25 该质粒与减去 STII 信号序列的 pKB 相同。用 SpeI 和 DraIII 消化 pKTB(6.56 kb), 并连接于一个含一个核糖体结合位点, 和含在 3'端设计的 NcoI 和 Dra III 位点的双链合成寡核苷酸上。该两互补寡核苷酸序列如下:

30 5' - CTAGTAAATTATATTTAAAGGAGGAATAAACCATGGCACATT - 3' [SEQ ID NO 21]

5' - GTGCCATGGTTTATTCCTCCTTTAAATATAATTTA - 3' [SEQ ID NO 22]

实施例 12

pKTBi - V β 5.3 的构建

该质粒与减去 STII 信号序列的 pKTB - V β 5.3 相同。用 XmaI 和 NcoI
5 消化 pKTBi(6.4 kb), 并连接到使用 pKTB - V β 5.3 作模板经 PCR 合成的 V
 β 5.3 上。含 NcoI 限制酶位点(下划线表示)的 5'有义引物是:

5' - TATAGTCCATGGGCGTAACC - 3' [SEQ ID NO 23]

含 XmaI 位点(下划线表示)的 3'反义引物是:

10

5' - AACTTCCCCGGGTTATCATTAGCTGC - 3' [SEQ ID NO 24]

结果

pKTBi - V β 5.3

作上述工作的同时, 从表达质粒中除去 STII 前导序列。因为大部分表达
15 的 V β 5.3 局限于胞内(见下述), 可预料这些构建体的放大可能产生一个加
上或去掉前导序列的 V β 5.3 分子的异源群体, 该前导肽将使加工后的 V β
5.3 随后的提纯复杂化。因此将 STII 除去, 建立用于胞内表达的 pKTBi - V
 β 5.3。预期该表达的 V β 5.3 含 N - 末端蛋氨酸, 尽管正如对 pKBi - V
 β 5.3(下面)的观察所知, 该蛋氨酸可以由内源蛋氨酸氨基肽酶除去[Ben -
20 Bassat 等人, 1978, J.Bacteriology, 169:751 - 757; Baneyx 和 Georgiou,
“ Expression of Proteolytically Sensitive Polypeptides in E. Coli” in Stability of
Protein Pharmaceuticals, PartA: Chemical and Physical Pathways of Protein
Degradation(Tim J. Ahrn and Mark C.Manning, eds.), Plenum Press, New York,
pp. 69 - 108(1992)].

25 pKTBi - V β 5.3 已构建完毕, 但它在 E.coli LJ24 中不能表达出显著量
的蛋白质(见前述表 3)。经对完整 V β 5.3 插入段测序, 序列完全正确。诱导
后分离的质粒 DNA 由限制性消化分析看出并无变化。对于含 pKTBi - V β
5.3 的 LJ24 菌株明显地不能表达出有意义水平的蛋白这一问题, 一个可能的
解释是由于不存在前导肽, 不能稳定胞内 V β 5.3 蛋白, 导至其很快降解的
30 缘故。

因此, 将该 pKTBi - V β 5.3 转化入蛋白酶缺陷之菌株 SG22094(lon⁻,

clp⁻)和 BL21(lon⁻, ompT⁻), 该两菌株给出的产量 SG22904 > BL21。还检测了不同的诱导温度对产量的影响, 发现两菌株均于 42 °C 最佳。此外, 在 2 - 5 小时之间, 产量无明显增加。

5 pKTBi - V β 5.3 也在另外两个蛋白酶缺陷的菌株 SG21163(lon⁻, htp^r⁻)和 SG21173(lon⁻, htp^r⁻, clp⁻)中表达。该结果归纳入表 3 中(前面)。

应当注意到菌株 LJ24, SG22094, SG21163 和 SG21174 不产生内源 lac 阻遏物, 因为所有这些菌株中 lacI 基因均缺失。因此, 野生型 lac 阻遏物不干扰 trc 启动子的热诱导作用。前面实施例表明无信号肽的 V β 5.3 构建体可以很容易地在缺乏蛋白酶的宿主中表达, 其结果产生大量 V β 5.3 蛋白。

10

实施例 13

pKBi - V β 5.3 构建

15 该质粒与减去 g 10 元件和微型顺反子(SEQ ID NO. 28)的 pKTBi - V β 5.3 相同。用 NcoI 和 SalI 消化 pKBi(6.43 kb), 并将 970 bp 片段从琼脂糖中纯化。用 NcoI 和 SalI 消化 pKTBi - V β 5.3(6.75 kb), 用相似方法纯化 5.68 kb 片段, 并将其连接到上述 970 bp 片段上, 产生质粒 pKBi - V β 5.3(6.64 kb)。
结果

pKBi - V β 5.3

20 该减去二个调节元件的无前导 V β 5.3 构建体成功地在蛋白酶缺陷菌株中表达, 我们的研究结果相似于 pKTBi - V β 5.3 的研究结果。该 pKBi - V β 5.3 在另外两个蛋白酶缺陷的菌株中表达: SG21163(lon⁻, htp^r⁻)和 SG21173(lon⁻, htp^r⁻, clp⁻)。该结果归纳入表 3 中。所有的菌株试验中 pKBi - V β 5.3 始终比 pKTBi - V β 5.3 产生更多蛋白(表 3)。该表达蛋白的 N - 末端测序表明, 其开始的 17 个氨基酸残基与预期的 V β 5.3 序列相符, 末端蛋氨酸残基不存在。该质粒也是稳定的。

25 本文中对特定实施方案的叙述并不意味着对本发明范围加以限制。事实上, 除了本文中这些详述内容外, 本发明的各种修改, 参照上述介绍和附图, 对于本领域专业人员来说属显而易见。此种修改势必落入所附权利要求范围之内。本文所涉及的各种公开发表的文献, 均以其全文列入本文作为参考。

30

序列表

(1)一般资料:

(i)申请人: T Cell Science, Inc.

5 (ii)发明题目: T 细胞抗原受体 V 区域蛋白及其制备方法

(iii)序列数量: 29

(iv)通信地址:

(A)收件人: T Cell Sciences, Inc.

(B)街道: 115 Fourth Avenue

10 (C)城市: Needham

(D)州: Massachusetts

(E)国家: USA

(F)邮编: 02194 - 2725

(v)计算机可读形式:

15 (A)介质类型: Diskette, 3.50 英寸, 1.44 Mb 贮存

(B)计算机: IBM PC 相容

(C)操作系统: MS - DOS

(D)软件: Wordperfect 6.0

(vi)现有申请资料:

20 (A)申请号:

(B)申请日期:

(C)分类号:

(vii)优先申请资料:

(A)申请号: 08/181,492

25 (B)申请日期: 1994 年 1 月 13 日

(viii)代理人资料

(A)姓名: Yankwich, Leon R

(B)登记号: 30,237

(C)案号: TCS - 203 - PCT(94, 664 - A)

30 (ix)通讯资料:

(A)电话: 617 - 345 - 9100

(2)SEQ ID NO: 1 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 34 个碱基对

(B)类型: 核酸

5 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

10 (iv)反义:

(ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:1

15

TATAATGACT AGTCGCTGCA GCCAACCGCG GCTG

34

(2)SEQ ID NO: 2 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 23 个碱基对

20 (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

25 (iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

30 (xi)序列描述: SEQ ID NO:2

(2)SEQ ID NO: 3 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 91 个碱基对

5 (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

10 (iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

15 (xi)序列描述: SEQ ID NO:3

GGCTCGAGCC TAGGCTGCAG CCCGGGGCGC GCGCGGCCGC AGGCCTTTAA

TTAAGAGCTC CGGACCGCAC AATGTGGGCG CGCCCTTAAG A

91

20 (2)SEQ ID NO: 4 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 97 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

25 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

30 (ix)特征:

(A)名字:



(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:4

	CTAGTCTTAA GGGCGCGCCC ACATTGTGCG GTCCGGAGCT CTTAATTAAA	50
5	GGCCTGCGGC CGCGCGCGCC CCGGGCTGCA GCCTAGGCTC GAGCCGC	97

(2)SEQ ID NO: 5 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 103 个碱基对

10

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

15

(iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

20

(xi)序列描述: SEQ ID NO:5

	CTAGTAAATT CTATTTCAAG GAGACAGTCA TAATGAAATA CCTATTGCCT	50
	ACGGCAGCCG CTGGATTGTT ATTACTCGCT GCCCAACCAG CCATGGCCGA	100
	GCT 103	

25

(2)SEQ ID NO: 6 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 95 个碱基对

(B)类型: 核酸

30

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸
(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

5 (ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:6

10 CGGCCATGGC TGGTTGGGCA GCGAGTAATA ACAATCCAGC GGCTGCCGTA 50
GGCAATAGGT ATTTCAATTAT GACTGTCTCC TTGAAATAGA ATTTA 95

(2)SEQ ID NO: 7 的资料

(i)序列特征:

15 (A)长度: 105 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

20 (A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

(A)名字:

25 (B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:7

CTAGTAAATT CTATTTCAAG GAGACAGTCA TAATGAAAAA GAATATAGCA 50
TTCCTACTAG CTTCAATGTT CGTCTTCTCT ATTGCAACTA ACGCGTACGC 100
ACATT 105

30

(2)SEQ ID NO: 8 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 98 个碱基对

(B)类型: 核酸

5 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

10 (iv)反义:

(ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:8

15

GTGCGTACGC GTTAGTTGCA ATAGAGAAGA CGAACATTGA AGCTAGTAGG
AATGCTATAT TCTTTTTTCAT TATGACTGTC TCCTTGAAT AGAATTTA

50

98

(2)SEQ ID NO: 9 的资料

20 (i)序列特征:

(A)长度: 89 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

25 (ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

30 (A)名字:

(B)位置:



(xi)序列描述: SEQ ID NO:9

CTAGTCCGGA ATTGGGCATC GATTAAC TTT ATTATTAAAA ATTAAAGAGG
TATATATTAA TGTATCGATT AAATAAGGAG GAATAAATA

50

89

5

(2)SEQ ID NO: 10 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 76 个碱基对

10

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

15

(iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

20

(xi)序列描述: SEQ ID NO:10

CTCCTTATTT AATCGATACA TTAATATATA CCTCTTTAAT TTTTAATAAT
AAAGTTAATC GATGCCCAAT TCCGGA

50

76

25 (2)SEQ ID NO: 11 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 71 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

30

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸



(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

5 (A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:11

ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC 50
CCAACCAGCC ATGGCCGAGC T 71

10

(2)SEQ ID NO: 12 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 76 个碱基对

15 (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

20 (iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

25 (xi)序列描述: SEQ ID NO:12

CGGCCATGGC TGGTTGGGCA GCGAGTAATA ACAATCCAGC GGCTGCCGTA 50
GGCAATAGGT ATTCATTAT TTATTC 76

30 (2)SEQ ID NO: 13 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 73 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

5 (ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

10 (A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:13

ATGAAAAAGA ATATAGCATT CCTACTAGCT TCAATGTTTCG TCTTCTCTAT

50

15

TGCAACTAAC GCGTACGCAC ATT

73

(2)SEQ ID NO: 14 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 79 个碱基对

20 (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

25 (iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

30 (xi)序列描述: SEQ ID NO:14

GTGCGTACGC GTTAGTTGCA ATAGAGAAGA CGAACATTGA AGCTAGTAGG
AATGCTATAT TCTTTTTCAT TATTTATTC

50

79

(2)SEQ ID NO: 15 的资料

- 5 (i)序列特征:
(A)长度: 33 个碱基对
(B)类型: 核酸
(C)链型: 单链
(D)拓扑结构: 线性
- 10 (ii)分子类型: 其它核酸
(A)描述: 合成寡核苷酸
(iii)假定:
(iv)反义:
(ix)特征:
- 15 (A)名字:
(B)位置:
(xi)序列描述: SEQ ID NO:15

TAATTAGCCA TGGCCGGCGT AACCCAATCT CCG

33

20 (2)SEQ ID NO: 16 的资料

- (i)序列特征:
(A)长度: 21 个碱基对
(B)类型: 核酸
(C)链型: 单链
(D)拓扑结构: 线性
- 25 (ii)分子类型: 其它核酸
(A)描述: 合成寡核苷酸
(iii)假定:
(iv)反义:
- 30 (ix)特征:
(A)名字:



(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:16

CCAGTGCCAA GCTTGCATGC C

21

5 (2)SEQ ID NO: 17 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 34 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

10 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

15 (ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:17

GAAATTAACG CGTACGCAGG CGTAACCCAA TCTC

34

20

(2)SEQ ID NO: 18 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 21 个碱基对

(B)类型: 核酸

25 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

30 (iv)反义:

(ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:18

CCAGTGCCAA GCTTGCATGC C

21

5

(2)SEQ ID NO: 19 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 110 个碱基对

10

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

15

(iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

20

(xi)序列描述: SEQ ID NO:19

CTAGTCCGGA ATTGGGCATC GATTAAC TTT ATTATTAAAA ATTAAAGAGG

50

TATATATTAA TGTATCGATT AAATAAGGAG GAATAAACCA TGGCACATTG

100

TGCGGTCCGC 110

25

(2)SEQ ID NO: 20 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 110 个碱基对

(B)类型: 核酸

30

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性



(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

5 (ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:20

10	CCGGGCGGAC CGCACAATGT GCCATGGTTT ATTCCTCCTT ATTTAATCGA	50
	TACATTAATA TATACCTCTT TAATTTTAA TAATAAAGTT AATCGATGCC	100
	CAATTCGGGA 110	

(2)SEQ ID NO: 21 的资料

15 (i)序列特征:

(A)长度: 42 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

20 (ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

25 (A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:21

CTAGTAAATT ATATTTAAAG GAGGAATAAA CCATGGCACA TT	42
--	----

30 (2)SEQ ID NO: 22 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 35 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

5 (ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

10 (A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:22

GTGCCATGGT TTATTCCTCC TTAAATATA ATTTA

35

15 (2)SEQ ID NO: 23 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 20 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

20 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

25 (ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:23

TATAGTCCAT GGGCGTAACC

20

30

(2)SEQ ID NO: 24 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

5 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: 合成寡核苷酸

(iii)假定:

(iv)反义:

10 (ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:24

AACTTCCCGG GTTATCATTA GCTGC

25

15

(2)SEQ ID NO: 25 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 276 个碱基对

(B)类型: 核酸

20 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(iii)假定:

(iv)反义:

25 (ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:25

30

5

GGC GTA ACC CAA TCT CCG ACT CAC CTG ATC AAA ACG AGA	39
GGA CAG CAC GTG ACT CTG AGA TGC TCT CCT ATC TCT GGG	78
CAC AAG AGT GTG TCC TGG TAC CAA CAG GTC CTG GGT CAG	117
GGG CCC CAG TTT ATC TTT CAG TAT TAT GAG AAA GAA GAG	156
AGA GGA AGA GGA AAC TTC CCT GAT CGA TTC TCA GCT CGC	195
CAG TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG AAT GTG AAC GCC	234
TTG TTG CTG GGG GAC TCG GCC CTG TAT CTC TGT GCC AGC	273
AGC	276

(2)SEQ ID NO: 26 的资料

- 10 (i)序列特征:
- (A)长度: 276 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑结构: 线性
- 15 (ii)分子类型: cDNA
- (iii)假定:
- (iv)反义:
- (ix)特征:
- (A)名字:
 - (B)位置:
- 20 (xi)序列描述: SEQ ID NO:26

25

CCG CAT TGG GTT AGA GGC TGA GTG GAC TAG TTT TGC TCT	39
CCT GTC GTG CAC TGA GAC TCT ACG AGA GGA TAG AGA CCC	78
GTG TTC TCA CAC AGG ACC ATG GTT GTC CAG GAC CCA GTC	117
CCC GGG GTC AAA TAG AAA GTC ATA ATA CTC TTT CTT CTC	156
TCT CCT TCT CCT TTG AAG GGA CTA GCT AAG AGT CGA GCG	195
GTC AAG GGA TTG ATA TCG AGA CTC GAC TTA CAC TTG CGG	234
AAC AAC GAC CCC CTG AGC CGG GAC ATA GAG ACA CGG TCG	273
TCG	276

30

(2)SEQ ID NO: 27 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 92 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

5 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

10 (A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:27

15

Gly	Val	Thr	Gln	Ser	Pro	Thr	His	Leu	Ile	Lys	Thr	Arg	Gly	Gln
1				5					10					15
His	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Ser	Pro	Ile	Ser	Gly	His	Lys	Ser	Val
				20					25					30
Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Val	Leu	Gly	Gln	Gly	Pro	Gln	Phe	Ile	Phe
				35					40					45
Gln	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Glu	Glu	Arg	Gly	Arg	Gly	Asn	Phe	Pro	Asp
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Ala	Arg	Gln	Phe	Pro	Asn	Tyr	Ser	Ser	Glu	Leu	Asn
				65					70					75
Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Leu	Cys	Ala
				80					85					90
Ser	Ser													
														92

20

(2)SEQ ID NO: 28 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 27 个碱基对

(B)类型: 核酸

25 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(iii)假定:

(iv)反义:

30 (ix)特征:

(A)名字:

(B)位置:
(xi)序列描述: SEQ ID NO:28

ATG TAT CGA TTA AAT AAG GAG GAA TAA

27

5 (2)SEQ ID NO: 29 的资料

(i)序列特征:

(A)长度: 8 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

10 (ii)分子类型: 肽

(A)描述:

(iii)假定:

(iv)反义:

(ix)特征:

15 (A)名字:

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:29

Met Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu
1 5 8

20

说明书附图

1 GGC GTA ACC CAA TCT CCG ACT CAC CTG ATC AAA ACG AGA GGA CAG
CCG CAT TGG GTT AGA GGC TGA CTG GAC TAG TTT TGC TCT CCT GTC
1 Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys Thr Arg Gly Gln

46 CAC GTG ACT CTG AGA TGC TCT CCT ATC TCT GGG CAC AAG AGT GTG
GTG CAC TGA GAC TCT ACG AGA GGA TAG AGA CCC GTG TTC TCA CAC
16 His Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Ile Ser Gly His Lys Ser Val

91 TCC TGG TAC CAA CAG GTC CTG GGT CAG GGG CCC CAG TTT ATC TTT
AGG ACC ATG GTT GTC CAG GAC CCA GTC CCC GGG GTC AAA TAG AAA
31 Ser Trp Tyr Gln Gln Val Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile Phe

136 CAG TAT TAT GAG AAA GAA GAG AGA GGA AGA GGA AAC TTC CCT GAT
GTC ATA ATA CTC TTT CTT CTC TCT CCT TCT CCT TTG AAG GGA CTA
46 Gln Tyr Tyr Glu Lys Glu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Phe Pro Asp

181 CGA TTC TCA GCT CGC CAG TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG AAT
GCT AAG AGT CGA GCG GTC AAG GGA TTG ATA TCG AGA CTC GAC TTA
61 Arg Phe Ser Ala Arg Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn

226 GTG AAC GCC TTG TTG CTG GGG GAC TCG GCC CTG TAT CTC TGT GCC
CAC TTG CGG AAC AAC GAC CCC CTG AGC CGG GAC ATA GAG ACA CGG
76 Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala

271 AGC AGC [SEQ ID NO. 25]
TCG TCG [SEQ ID NO. 26]
91 Ser Ser [SEQ ID NO. 27]

图 1

图 2

