

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/19

C07K 14/52 C12N 5/10

A61K 38/19



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96193078.0

[45] 授权公告日 2004 年 8 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1161468C

[22] 申请日 1996.2.13 [21] 申请号 96193078.0

[30] 优先权

[32] 1995.2.15 [33] US [31] 08/388,779

[32] 1996.2.9 [33] US [31] 08/591,070

[86] 国际申请 PCT/US1996/002492 1996.2.13

[87] 国际公布 WO1996/025498 英 1996.8.22

[85] 进入国家阶段日期 1997.10.5

[71] 专利权人 安姆根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 S·G·艾利奥特

审查员 丁 海

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 70 页 附图 14 页

[54] 发明名称 MPL 配体类似物

[57] 摘要

本发明公开了几种 MPL 配体类似物,与氨基酸数目相同的天然 mpl 配体的序列相比,这些类似物有一个或多个改变的糖基化位点。本发明也涉及编码这些 mpl 配体类似物的 DNA 序列、用于类似物表达的重组质粒和宿主细胞和包括这些类似物的治疗用组合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种 mpl 配体类似物, 其中

(a) 所述 mpl 配体类似物具有特异性刺激或者增加巨核细胞或血小板的
5 生物活性,

(b) 所述 mpl 配体类似物是外源 DNA 在 CHO 或 COS 细胞中表达的产物, 并且

(c) 所述 mpl 配体具有至少一个增加的 N-型糖基化位点, 它选自图 1
中氨基酸序列 1-174 或 1-199 的以下配体:

10

[Asn²⁵] mpl 配体;

[Asn³⁰, Thr³²] mpl 配体;

[Asn⁸², Ala⁸³] mpl 配体;

[Asn¹²⁰, Thr¹²²] mpl 配体;

15

[Asn⁵³, Thr⁵⁵] mpl 配体;

[Asn⁵⁸, Thr⁶⁰] mpl 配体;

[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²²] mpl 配体;

[Asn⁵⁴, Ser⁵⁶] mpl 配体;

[Asn⁵², Thr⁵⁴] mpl 配体;

20

[Asn⁸¹, Thr⁸³] mpl 配体;

[Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴] mpl 配体;

[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²², Asn⁵⁵⁽ⁱ⁾, Thr⁵⁷] mpl 配体;

[Asn³⁰, Thr³², Asn^{55'(i)}, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴] mpl 配体;

[Asn⁵⁵, Thr⁵⁷] mpl 配体;

25

[Asn⁵⁶] mpl 配体;

[Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴, Thr¹⁶⁶] mpl 配体; 和

[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²², Asn⁵⁵, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴, Thr¹⁶⁶] mpl 配
体。

2. 权利要求 1 的类似物, 它是

30

[Asn²⁵] mpl 配体 1-174;

[Asn³⁰, Thr³²] mpl 配体 1-174;

- [Asn⁸², Ala⁸³] mpl 配体 1 - 174;
[Asn¹²⁰, Thr¹²²] mpl 配体 1 - 174;
[Asn⁵³, Thr⁵⁵] mpl 配体 1 - 174;
[Asn⁵⁸, Thr⁶⁰] mpl 配体 1 - 174;
5 [Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²²] mpl 配体 1 - 174;
[Asn⁵⁴, Ser⁵⁶] mpl 配体 1 - 174;
[Asn⁵², Thr⁵⁴] mpl 配体 1 - 174;
[Asn⁸¹, Thr⁸³] mpl 配体 1 - 174;
[Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴] mpl 配体 1 - 174;
10 [Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²², Asn⁵⁵⁽ⁱ⁾, Thr⁵⁷] mpl 配体 1 - 174;
[Asn³⁰, Thr³², Asn^{55'(i)}, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴] mpl 配体 1 - 174;
[Asn³⁰, Thr³², Asn^{55'(i)}, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴] mpl 配体 1 - 199;
[Asn⁵⁵, Thr⁵⁷] mpl 配体 1 - 174;
[Asn⁵⁶] mpl 配体 1 - 174;
15 [Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴, Thr¹⁶⁶] mpl 配体 1 - 174;
[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²², Asn⁵⁵, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴, Thr¹⁶⁶] mpl 配体
1 - 174; 或
[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²², Asn⁵⁵, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴, Thr¹⁶⁶] mpl 配体
1 - 199。
20 3. 一种编码权利要求 1 的 mpl 配体类似物的 DNA 序列。
4. 一种以权利要求 3 的 DNA 序列转染的 CHO 或 COS 细胞, 其转染的方式为使宿主细胞可以表达 mpl 配体类似物。
5. 一种包括有效治疗剂量的权利要求 1 - 的 mpl 配体类似物以及可药用的稀释剂、佐剂或载体的药物组合物。
25 6. 一种编码权利要求 2 的 mpl 配体类似物的 DNA 序列。
7. 一种以权利要求 6 的 DNA 序列转染的 CHO 或 COS 细胞, 其转染的方式为使宿主细胞可以表达 mpl 配体类似物。
8. 一种包括有效治疗剂量的权利要求 2 的 mpl 配体类似物以及可药用的稀释剂、佐剂或载体的药物组合物。

MPL 配体类似物

发明领域

- 5 本发明涉及具有至少一个改变的 O - 或 N - 型糖基化位点的 mpl 配体类似物。本发明也涉及编码这些 mpl 配体类似物的 DNA 序列和表达类似物的重组质粒和宿主细胞。

发明背景

- 10 MGDF ; 或巨核细胞生长发育因子为一种新近克隆的细胞因子, 它似乎是循环血小板水平的主要调节物。可参见如下文献: Bartley, T. D. 等, 《细胞》(Cell) 77 卷 1117 - 1124 页 (1994); Lok, S. 等, 《自然》(Nature) 369 卷 565 - 568 页 (1994); de Sauvage, F. J. 等, 《自然》(Nature) 369 卷 533 - 538 页 (1994); Miyazake, H. 等, 15 《实验血液学》22 卷 838 页 (1994); Kuter, D. J. 等 PNAS USA, 91 卷 11104 - 11108 页 (1994)。Bartleg, T. D. 等在《细胞》77 卷 1117 - 1124 页 (1994) 中也将 MGDF 称为血小板生成素 (TPO)、mpl 配体和巨核细胞生成素。本文中 “mpl 配体” 通常是指激活 mpl 受体的所有多肽, 包括 TPO 和 MGDF。mpl 受体是一种细胞表面蛋白, 激活后 20 引起巨核细胞和血小板的生成和/或发育。参见 WO 92/07074。

- “mpl 配体类似物” 为与天然序列有区别的多肽, 这种区别影响糖基化位点的数量、位置和类型。这些多肽为本发明的一个方面。成熟的天然人 mpl 配体蛋白总共有 332 个氨基酸。该蛋白质的序列 (与一长度为 21 个氨基酸的先导序列相连接) 及相应的 cDNA 示于图 1 (序列号: 25 1 和 2)。

- 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞和大肠杆菌细胞产生的重组 mpl 配体具有生物活性, 在猫、鼠和猴体内能够特异性刺激或增加巨核细胞和/或血小板。例如可参见 Hunt. P. 等, 《血液》(Blood) 84 卷 10 期 390A 页 (1994)。切断的人 mpl 配体分子 (与人 cDNA 编码的 332 氨基酸蛋白 30 相比) 有至少 151 个氨基酸 (从图 1 中的 22 位氨基酸开始), 它们在体内仍然保持生物活性。图 2 (序列号: 3 和 4) 列出了一个切断的 mpl

配体分子的实例，该分子的成熟形式有 174 个氨基酸，具有生物活性。

图 2 显示这个 174 个氨基酸的蛋白质与一个 21 个氨基酸的 N 端先导序列连接。该分子在下面实施例中用来创制某些 mpl 配体类似物。其它类似物是以图 1 中 1 - 199、1 - 191 和 1 - 183 的氨基酸为基础。也有可能从成熟人 mpl 配体蛋白质 N 末端除去头 6 个氨基酸而仍保持生物活性。因而，生物活性似乎取决于图 1 中成熟人 mpl 配体氨基酸序列中的第 7 位到第 151 位氨基酸（包括第 7、第 151 位氨基酸）。

通常，真核细胞产生的很多细胞表面蛋白和分泌蛋白均带有一个或多个寡糖基因。这种修饰称为糖基化，能够显著地影响蛋白质的物理特性，对蛋白质的稳定性、分泌和亚细胞定位也很重要。正确的糖基化对生物活性是必需的。实际上，真核生物的某些基因在细菌（如大肠杆菌）中表达时，由于细菌缺乏对蛋白质进行糖基化处理的细胞过程，产生的蛋白质未进行糖基化，因而活性很低或没有活性。

糖基化发生在多肽骨架的特定位置或位点，通常有两类：O - 型寡糖连接到丝氨酸（Ser）或苏氨酸（Thr）残基上，而 N - 型寡糖（链）连接到天冬酰胺（Asn）残基上。这些氨基酸残基为 Asn-X-Ser/Thr 序列的一部分，其中 X 可为除脯氨酸之外的任何氨基酸，优选除脯氨酸之外的 19 种天然氨基酸中的一种。每一类型中 N - 型和 O - 型寡糖和糖残基的结构是不同的，上述两类中常见的一类糖为 N - 乙酰神经氨酸（下面称为唾液酸）。唾液酸常为 N - 型和 O - 型寡糖的末端残基，并且由于它带负电荷，可能会使糖蛋白呈酸性。

本文中，糖基化“位点”是指结构上能够与糖残基相连接的氨基酸残基，而这些位点实际上可能与糖残基相连也可能不与糖残基相连。如上所述，O - 型位点是 Ser 或 Thr 残基，而 N - 型位点是 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr，这里 X 为除 Pro 外的任何氨基酸（优选除 Pro 之外的 19 种天然氨基酸中的一种）。一个位点是否被糖链所糖基化取决于表达该分子的宿主细胞、相邻位点的氨基酸和其它因素。

本文所说的连接于一个 mpl 配体类似物的“链”的数量是指连接于特定宿主细胞表达的一个 mpl 配体上的碳水化合物（即糖基）链的平均数。应注意到，天然和对应的重组 mpl 配体的糖基化位点通常是一样的，而链的数量可能不同，这取决于用于重组表达的特定宿主细胞是否将糖

链连接于这个位点（与天然来源的配体相比）。本文中，对重组和天然 mpl 配体类似物进行比较时，都比较相同数目的氨基酸，而不论天然来源是否实际产生了具有该长度的 mpl 配体分子。因而，“天然”是指特定种类（如人）中使用的序列，而不是指在这种天然来源中实际表达的分子的长度。

天然存在的 mpl 配体是一糖基化的分子。天然 mpl 配体的糖基化类型与 mpl 配体中的两个关键区域有关。成熟人 mpl 配体的前 151 个左右的氨基酸序列，与该分子的活性部位相对应，它与一种能够刺激红细胞生成的细胞因子促红细胞生成素（EPO）表现出相当的同源性，被称为人 mpl 配体的“EPO - 样”区域。成熟蛋白的其余氨基酸组成一个所谓“N - 型碳水化合物”区域，因为它们包括了至少大多数天然 N - 型糖基化位点。在人 mpl 配体中有六个 N - 型糖基化位点，都在 N - 型糖基化区域内。两个区域都有 O - 型糖基化位点。整个分子中约有 12 - 14 个 O - 型糖基化链。在 CHO 细胞中重组表达人 mpl 配体 DNA 的实验数据表明在 EPO - 样区域中至少有两个 O - 型位点糖基化，这两个位点为第 1 位（Ser）和第 37 位（Thr）。

象 mpl 配体这样的糖蛋白可用等电聚焦（IEF）等技术分成不同的带电形式。例如有几个研究小组已报道了粗制和部分纯化的促红细胞生成素制品的 IEF 研究结果。（Lukowsky 等，《生物化学杂志》（J. Biochem.）50 卷 909 页（1972）；Shelton 等，《医学生物化学》（Biochem. Med.）12 卷 45 页（1975）；Fuhr 等，《生物化学与生物物理学研究通讯》（Biochem. Biophys. Res. Comm.）98 卷 930 页（1981））。

尽管有关 mpl 配体分子的糖基化有上述了解，但仍有必要得到糖基化方式不同的 mpl 配体分子，这种分子保持或提高了生物活性。

因而，本发明的目的之一是提供新的糖基化的 mpl 配体分子，即 mpl 配体类似物。本发明的另一个目的是提供含这些分子的药用组合物和用本发明的 mpl 配体类似物治疗可用 mpl 配体治疗的疾病的方法。

发明概述

在一个实施方案中，本发明涉及包括一种氨基酸序列的 mpl 配体类似物，与相应的天然序列的 mpl 配体相比，该序列包括至少一个增加的、

至少一个缺失的、和/或同时有至少一个增加的和至少一个缺失的糖基化位点。增加或缺失糖基化位点可导致以下结果；同相应天然序列的 mpl 配体，尤其是人 mpl 配体相比，类似物的碳水化合物链的数目增加或减少，唾液酸含量升高或降低。例如，一种类似物可能包括在相同的或不同的位置缺失一个或多个 N - 或 O - 型位点，或者增加一个或多个 N - 或 O - 型位点。

上述实施方案中，本发明另一方面涉及包括一些氨基酸序列的 mpl 配体类似物，这些序列中一个或多个 N - 或 O - 型糖基化位点被一个或多个非天然存在的位点所取代。因而，一个 N - 型位点可能会被另一个不同的 N - 型位点所取代；一个 N - 型位点可能会为一个 O - 型位点所取代；一个 O - 型位点可能会被另一个不同的 O - 型位点所取代；一个 O - 型位点可能会为一个 N - 型位点所取代。

任何上述改变的组合也包括在本发明之中。

本发明还包括编码这些 mpl 配体类似物的 DNA 序列和表达类似物的重组质粒和宿主细胞。

上述各种情况下，糖基化位点的改变导致所得 mpl 配体类似物中糖链数目、含量、位置或类型（N - 对 O - ）的改变，并且保持了 mpl 配体的生物活性，即类似物仍能激活 mpl 受体。mpl 受体的激活意味着巨核细胞生成增加，因而导致体内血小板的增加。

附图简述

图 1 示出天然人 mpl 配体的 DNA 和氨基酸序列，包括信号肽（- 21 位到 - 1 位氨基酸）和成熟氨基酸序列（1 - 332）。

图 2 示出与 21 个氨基酸的信号肽相连接的、对应于成熟人 mpl 配体 1 - 174 位氨基酸的 mpl 配体的 DNA 和氨基酸序列。在编码区的侧翼序列的 5' 末端和 3' 末端分别引入 XbaI 和 SalI 克隆位点。

图 3 示出大肠杆菌和 CHO 表达的 mpl 配体的 Western 印迹结果。MK 代表 Met - Lys，为了在大肠杆菌中表达，它被加到 mpl 配体的 N - 末端，用组织蛋白酶 C 等二肽酶可切除。MK 被去除的分子称为 desMK。图中指出了糖苷酶神经氨酸酶和 O - 聚糖酶处理的情况。

图 4 示出在正常小鼠体内大肠杆菌和 CHO 表达的 mpl 配体活性（用

血小板计数表示)。所得数据表明糖基化 mpl 配体 (CHO 材料) 的活性较未糖基化的 (大肠杆菌) 高。这可能是由于糖基化配体的半衰期较长。例如, CHO 332 表示 CHO 细胞表达的人 mpl 配体 1 - 332 位氨基酸(图 1)。

5 图 5 示出表达重组人 mpl 配体和类似物 4、6、7、9、10 和 11 的 COS 细胞上清液 Western 印迹分析结果。类似物的构建在例 4 中述及。类似物 4、7、10 至少含有一个额外的碳水化合物链, 因为它们在凝胶中运动较慢。类似物编号与表 1 (如 11 对应于类似物 N11) 中的类似物编号相对应。表 1 中的对照为 N1。

10 图 6 示出表达重组人 mpl 配体和类似物 4、5、13、14 和 15 的 COS 细胞上清的 Western 印迹分析结果。类似物的构建在例 4 中述及。类似物 4、13、14 和 15 至少含有一个额外的碳水化合物链, 因为它们在凝胶中运动较慢。

图 7 示出表达人 mpl 配体和所示的 mpl 配体类似物的 COS 细胞上清用 N - 聚糖酶处理后的 Western 印迹分析结果。结果表明类似物有不同的糖基化方式。

图 8 示出以 mpl 配体类似物对人巨核细胞生长进行活体分析的结果。A 组和 D 组分别为阳性和阴性对照。A 组孔接受了 37.5 pg 野生型 (即天然序列) mpl 配体 1 - 174 的 COS - 1 条件培养基, 表现出了大量的巨核细胞生长。D 组接受了 1.5 μ l COS - 1 模拟条件培养基, 未见生长。B 组和 C 组分别为 mpl 配体 1 - 174 类似物 7 和 10。B 组接受了 9.0 pg mpl 配体 COS - 1 条件培养基, 而 C 组接受了 27pg, 二者均表现出良好的巨核细胞生长。

25 图 9 示出 CHO mpl 配体 1 - 174 以及类似物 N4 和 N15 (见表 1) 的 Western 印迹分析结果。在凝胶中运动较慢证实类似物 N4 (4B) 含有一个额外的寡糖, 而类似物 N15 (15 - 8) 含有两个额外的寡糖。

图 10 示出 CHO 细胞产生的 mpl 配体类似物用和不用 N - 聚糖酶处理后的 Western 印迹结果。用 N - 聚糖酶处理后, 在凝胶中运动较慢证实存在有 N - 型寡糖。

30 图 11 示出用不同类型不同剂量的 mpl 配体处理小鼠, 其血小板计数的结果。所得数据证实增加 N - 和/或 O - 型碳水化合物的数量可使体内活性增加。

图 12 示出 COS 产生的 mpl 配体 1 - 174 以及类似物 N10、N15、N33、N39、N31、N35 和 N40 的 Western 印迹分析结果。图中也指出了增加的 N - 型糖基化位点的数量。图形显示增加 N - 型位点的数量也使得 N - 型碳水化合物的数量增加, 从而降低了 mpl 配体的运动性。

- 5 图 13 示出 COS 产生的 mpl 配体 1 - 174 和类似物 N15、N29、N30 和 N38 的 Western 印迹分析结果, 图中也指出了 N - 型糖链的数量。

发明详述

- 10 本发明提供了与具有相应序列的天然 mpl 配体相比糖基化位点不同的 mpl 配体。优选所得分子含有额外的糖基化位点, 这些位点在以哺乳动物细胞 (如 COS、CHO 和人细胞) 表达时为糖链所占据。

- 在第一实施方案中, 本发明涉及包括一种氨基酸序列的 mpl 配体类似物, 与相应的天然序列的 mpl 配体相比, 该序列至少增加一个、至少缺失一个和/或至少既增加一个又缺失一个糖基化位点。与相应的天然序
15 列的 mpl 配体, 尤其是与人 mpl 配体相比, 增加或缺失糖基化位点导致碳水化合物链的数目增加或减少, 唾液酸含量的升高或降低。同时有一个位点缺失和另一个位点增加不会导致位点数量的改变, 但位点的位置和/或类型发生了改变。本发明也包括这种同时改变的类似物。

- 上述实施方案中, 本发明另一方面涉及包括一些氨基酸序列的 mpl
20 配体类似物, 其序列中一个或多个 N - 或 O - 型糖基化位点被一个或多个非天然存在的位点所取代。因而, 一个 N - 型位点可能会被另一个不同的 N - 型位点所取代; 一个 N - 型位点可能会被一个 O - 型位点所取代; 一个 O - 型位点可能会被另一个不同的 O - 型位点所取代; 和/或一个 O - 型位点可能会被一个 N - 型位点所取代。基本上在同一位置的一个
25 位点取代另一个位点可能会增加该位点的糖基化效率, 或引起其它效应。例如, 本文的证据表明苏氨酸残基取代丝氨酸残基可能会增加 O - 型位点的糖基化效率。

- 本文中, mpl 配体包括天然 mpl 配体、天然 mpl 配体的截短物以及某些非天然的多肽, 这些多肽具有和天然 mpl 配体完全一样的氨基酸序
30 列和糖基化, 这具有特异性刺激巨核细胞和/或血小板的生长、发育和/或生成的生物活性。优选基于至少图 1 中的 7 - 151 位氨基酸到 1 - 332

位氨基酸的 mpl 配体类似物。

在一个优选实施方案中，mpl 配体为转染到真核宿主细胞的外源基因的表达产物；即在优选实施方案中 mpl 配体为“重组 mpl 配体”，优选的真核细胞为哺乳动物细胞，更优选 CHO 细胞。按照本文和本文引用的出版物所介绍的有关 mpl 配体的克隆和表达的方法，有利于产生重组 mpl 配体。

根据图 1，其他一些优选的 mpl 配体分子具有以下氨基酸序列：

	mpl 配体 1 - 332	图 1 的氨基酸 1 - 332
	mpl 配体 1 - 199	图 1 的氨基酸 1 - 199
10	mpl 配体 1 - 191	图 1 的氨基酸 1 - 191
	mpl 配体 1 - 183	图 1 的氨基酸 1 - 183
	mpl 配体 1 - 174	图 1 的氨基酸 1 - 174
	mpl 配体 1 - 163	图 1 的氨基酸 1 - 163
	mpl 配体 1 - 153	图 1 的氨基酸 1 - 153
15	mpl 配体 1 - 152	图 1 的氨基酸 1 - 152
	mpl 配体 1 - 151	图 1 的氨基酸 1 - 151
	mpl 配体 7 - 332	图 1 的氨基酸 7 - 332
	mpl 配体 7 - 199	图 1 的氨基酸 7 - 199
	mpl 配体 7 - 191	图 1 的氨基酸 7 - 191
20	mpl 配体 7 - 183	图 1 的氨基酸 7 - 183
	mpl 配体 7 - 174	图 1 的氨基酸 7 - 174
	mpl 配体 7 - 163	图 1 的氨基酸 7 - 163
	mpl 配体 7 - 153	图 1 的氨基酸 7 - 153
	mpl 配体 7 - 152	图 1 的氨基酸 7 - 152
25	mpl 配体 7 - 151	图 1 的氨基酸 7 - 151

例如，应当注意到，与较短的序列相比，mpl 配体 1 - 183、1 - 191、7 - 183 和 7 - 191 在其 C 末端包含有一个或两个额外的天然存在的糖基化位点。在上述所有的例子中，N 端可进一步包含甲硫氨酸-赖氨酸。

本文所说的体外特异活性是测定相对的体外特异活性，而非测定绝对体外特异活性。对本申请来说，特异活性仅用来比较用同一种检测法

在同一条件下所测定的 mpl 配体类似物的相对活性，这些条件包括同样的内标，对用来计算特异活性的数据进行同样的分析。

本文“mpl 配体类似物”这个词是指 mpl 配体的氨基酸序列中有一或多处改变，而使碳水化合物连接位点的类型（N - 或 O - 型，这会影
5 响连接的碳水化合物的含量）、数量或位置改变。在一个优选实施方案中，糖基化位点的改变引起连接到 mpl 配体分子上的糖链数量的改变。在一更优实施方案中，糖基化位点的改变增加了至少一个（通常 1 - 6 个，优选 1 - 5 个，更优选 2 - 4 个）糖链，最优选通过 N - 键加上该链。在另一更优实施方案中，根据生物活性检测的结果，同天然序列的
10 mpl 配体（如人 mpl 配体）相比，mpl 配体类似物保留了至少相同的体内生物活性，可能具有基本上更高的体内活性。这些检测包括测定巨核细胞或血小板的生成。

制备这些 mpl 配体类似物，优选采用定点诱变的方法使其氨基酸残基增加、缺失或替换，从而使糖基化位点增加、缺失或改变。“改变”
15 是指一个位点缺失，同时在此缺失位点的同一位置或不同位置增加了另一位点。然而，正如本领域的技术人员所了解的那样，其他方法也可以产生编码同样氨基酸序列的基因，本文也包括了这些方法。所得类似物同天然人/重组 mpl 配体相比，连接的碳水化合物链更少或更多（优选更多）。

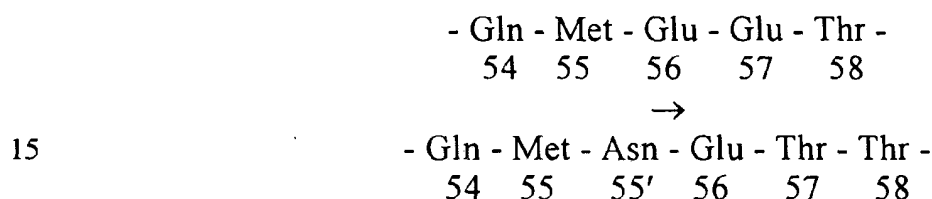
20 本发明的一个重要目的是使 mpl 配体增加一个或多个碳水化合物（即糖）链。比相应天然存在的氨基酸序列（如 1 - 332 或 1 - 174 等）含更多碳水化合物链的 mpl 配体类似物加入不破坏其二级或三级结构的糖基化位点，从而基本上不降低其生物活性。本文中，“天然存在”的 mpl 配体指与相关配体氨基酸数目相同的氨基酸序列，即使特定长度的
25 mpl 配体种类在天然物种中实际上并不表达。极为有利的是，mpl 配体类似物有多达 6 个额外的 N - 糖基化或 O - 糖基化位点，这使得其可加上 1 到 6 个额外的 N - 型或 O - 型碳水化合物链（或同时具有两种链）。

例如，30 位的脯氨酸为天冬酰胺取代，32 位的缬氨酸为苏氨酸取代就产生了天冬酰胺 - 谷氨酸 - 苏氨酸序列，它可作为 N - 糖基化的新
30 位点（参见后页表 1 中的类似物 N4）。

有两个或两个以上 N - 型链的类似物也可通过联合突变进行构建；

例如，表 1 所述的类似物 N4 和 N10 可进行联合以产生有两个额外的可加入碳水化合物位点的类似物（即表 1 中的类似物 N15）。以同样方式可构建有三个或三个以上加入链的类似物。如本领域的技术人员所了解的那样，本发明包括有不同糖基化位点（根据位点的数目、类型、位置区分）的多种其他 mpl 配体类似物。本发明的 mpl 配体类似物在各种条件下均更优选基于含人氨基酸序列的 mpl 配体（见图 1 和图 2）；然而，本文也包括基于其它种类（如狗、猪、猴子、小鼠或大鼠）的 mpl 配体序列。

插入氨基酸以产生糖基化位点也在考虑之列。例如下面显示了 57 位
10 的 Glu 被 Thr 所取代, 同时 Asn 插入 55 位的 Met 和 56 位之间:



这增加了一个新的糖基化位点（氨基酸 55'、56 和 57）。参见以下的类似物 N23。

20 本发明的类似物也包括在 mpl 配体的羧基端伸出一个或多个氨基酸的类似物，羧基末端的突出物提供了至少一个额外的碳水化合物位点。mpl 配体的羧基末端根据所用的 mpl 配体的特定形式（如 1 - 332 位氨基酸的 mpl 配体或 1 - 163 位氨基酸的 mpl 配体）而有所变化。在羧基末端加入含一个或多个 N - 或 O - 型糖基化位点的氨基酸能使 mpl 配体
25 的羧基末端加入一个额外的碳水化合物位点。

表 1 和表 6 列出了一些代表性的 mpl 配体类似物, 它们含有可加入 N - 型糖链的额外位点, 这些类似物的人 mpl 配体多肽链基于人氨基酸序列, 在多肽链的不同位置上有 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 序列以产生 N - 型位点。表 4 和表 7 列出了加入至少一个额外的 N - 型糖链的类似物, 这可由这些糖蛋白在 SDS 凝胶中的迁移所证实 (参见例 6 和图 3、5、6、7、9、10、12 和 13)。注意这些表中也包括一些截短物(即 N1、N16、N17 和 N31), 它们不是本文所定义的“类似物”。它们列在表中是为了显示怎样制备不同的截短物。

本发明也包括编码本文公开的 mpl 配体的 DNA 序列, 优选编码的类似物含有加入 N - 型链的额外位点。实施例 4 和 14 公开了用来向 mpl 配体 DNA 序列中引入变化以产生、删除和/或改变碳水化合物连接位点的方法。

5 这些 mpl 配体类似物可以是外源 DNA 序列的表达产物, 外源 DNA 即通过重组 DNA 技术产生的序列, 它们可以是化学合成的产物, 或者也可以通过联合的方法产生。外源 DNA 序列包括编码 mpl 配体类似物的 cDNA、基因组 DNA 或化学合成的 DNA。本发明也提供了用来表达这些类似物的重组 DNA 质粒和真核宿主细胞。表达载体包括能够在真核宿
10 主细胞中表达克隆 DNA 序列的任何载体, 尤其是用来在 COS 和 CHO 细胞中进行表达的载体。这些载体的实例包括 pDSR α 和 pDSR α 2 质粒, 参见《分子细胞生物学》(Mol. Cell. Biol.) 8 卷 466 - 472 页 (1988); WO 91/13160 (1991) 和 WO 90/14363 (1990)。表达 mpl 配体类似物的 COS 和 CHO 宿主细胞的培养采用本领域的技术人员已知的标准方
15 法进行。

改变连接于 mpl 配体的碳水化合物链的数目、类型、位置或含量可能会产生一些有利的特性, 如溶解度增加、对蛋白酶的抗性增加、免疫原性下降、血清中半衰期延长和生物活性增加或改变。

对表达 mpl 配体类似物 N2 - N15 (N1 为人 mpl 配体 1 - 174, 参
20 见图 2) 的 COS 细胞的条件培养基进行了分析, 以确定其体外生物活性, 结果示于表 4。

对表达 mpl 配体类似物/截短物 N15 - N40 的 COS 细胞的条件培养基进行了分析, 以确定其体外生物活性, 结果示于表 7。

各种形式的体内生物活性结果列出于图 11 中 (见实施例 13)。

25 本发明的另一实施方案涉及哺乳动物 (如中国仓鼠卵巢, CHO) 宿主细胞, 此细胞优先合成 mpl 配体或每一分子有更多唾液酸的 mpl 配体类似物, 例如, 它们的唾液酸含量超过了真核细胞天然产生或重组产生的 mpl 配体 1 - 332、1 - 199、1 - 191、1 - 183、1 - 174、1 - 163、1 - 153、1 - 152 或 1 - 151。在 CHO 细胞中表达的类似物
30 N4 和 N15 和全长及不同长度的类似物的体外活性见表 5。

mpl 配体分子的唾液酸含量可能会影响其体内生物活性。例如, 四

触角形（四个分支）N - 型寡糖通常提供四个可能的唾液酸的连接位点，而二触角形和三触角形寡糖（它们可在天冬氨酸连接的位点取代四触角形寡糖）通常最多只有两个或三个唾液酸连接。O - 型寡糖通常提供两个唾液酸的连接位点。因而，如果N - 型寡糖是四触角形的话，以

5 N - 型碳水化合物取代O - 型碳水化合物的mpl配体分子可以在每条链提供两个额外的唾液酸。对哺乳动物细胞培养物进行筛选，以找出通常向重组mpl配体加入四触角形链的细胞，从而使唾液酸连接位点的数目达到最大值。

二氢叶酸还原酶缺陷的中国仓鼠卵巢（CHO）细胞是常用来生产重

10 组糖蛋白、包括重组mpl配体的宿主细胞。

本发明还包括含有有效治疗剂量的根据本发明的mpl配体类似物的组合物，该组合物中还包括mpl配体疗法中有用的、合适的稀释剂、佐剂和/或载体。本文中，“有效治疗剂量”指在给定条件和用药方案下起到治疗效果的剂量。

15 该组合物可以肠道外方式全身性给药。组合物可以选择静脉或皮下方式给药。全身性给药时，本发明的治疗用组合物可以是无热原的、肠道外可接受的水溶液形式。制备这种可药用的蛋白质溶液，同时考虑pH、等渗性、稳定性和其它方面，这是在本领域的技术之内的。特定途径的选择取决于待治疗的疾病。使用mpl配体或mpl配体类似物时，优

20 选将其作为一种制剂的一部分，该制剂含有合适的载体（如人血清白蛋白）、合适的稀释剂（如缓冲液溶液）和/或合适的佐剂。需要的剂量是足够提高病人血小板水平的量，并根据待治疗疾病的严重程度、用药方法及其它条件而有所改变。

以本发明的方法和组合物所治疗的疾病通常是已表现巨核细胞血小板缺乏或预期将会出现巨核细胞/血小板缺乏（如由于计划进行外科手术）的疾病。这些疾病通常是由于体内缺乏（暂时或永久）活性mpl配体。血小板缺乏的通用术语是血小板减少症，因而本发明的方法和组合物通常可用来治疗血小板减少症。

血小板减少症（血小板缺乏）可由多种原因引起，包括化疗、骨髓

30 移植和多种药物治疗、放疗、外科手术、意外失血以及其它特殊疾病。与血小板减少症有关并根据本发明进行治疗的代表性的特殊疾病包括：

传统方法监测。

本发明的类似物也可以进行其它修饰，如增加活性、稳定性、半衰期等。例如聚乙二醇化（PEG 化）（多个或一个）可以通过蛋白质上的氨基或碳水化合物基团加入到 mpl 配体类似物上。脂肪酸或其它多聚物也可连接到蛋白质或碳水化合物基团上。

更具体地讲，不符包括以下实施方案：

1) 一种 mpl 配体类似物，其中

(a) 所述 mpl 配体类似物具有特异性刺激或者增加巨核细胞或血小板的生物活性，

(b) 所述 mpl 配体类似物是外源 DNA 在 CHO 或 COS 细胞中表达的产物，并且

(c) 所述 mpl 配体具有至少一个增加的 N-型糖基化位点，它选自图 1 中氨基酸序列 1-174 或 1-199 的以下配体：

[Asn²⁵] mpl 配体；

[Asn³⁰, Thr³²] mpl 配体；

[Asn⁸², Ala⁸³] mpl 配体；

[Asn¹²⁰, Thr¹²²] mpl 配体；

[Asn⁵³, Thr⁵⁵] mpl 配体；

[Asn⁵⁸, Thr⁶⁰] mpl 配体；

[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²²] mpl 配体；

[Asn⁵⁴, Ser⁵⁶] mpl 配体；

[Asn⁵², Thr⁵⁴] mpl 配体；

[Asn⁸¹, Thr⁸³] mpl 配体；

[Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴] mpl 配体；

[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²², Asn⁵⁵⁽ⁱ⁾, Thr⁵⁷] mpl 配体；

[Asn³⁰, Thr³², Asn⁵⁵⁽ⁱ⁾, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴] mpl 配体；

[Asn⁵⁵, Thr⁵⁷] mpl 配体；

[Asn⁵⁶] mpl 配体；

[Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴, Thr¹⁶⁶] mpl 配体； 和

[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²², Asn⁵⁵, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴, Thr¹⁶⁶] mpl 配

体。

2) 上述 1) 的类似物, 它是

[Asn²⁵] mpl 配体 1 - 174;

[Asn³⁰, Thr³²] mpl 配体 1 - 174;

[Asn⁸², Ala⁸³] mpl 配体 1 - 174;

[Asn¹²⁰, Thr¹²²] mpl 配体 1 - 174;

[Asn⁵³, Thr⁵⁵] mpl 配体 1 - 174;

[Asn⁵⁸, Thr⁶⁰] mpl 配体 1 - 174;

[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²²] mpl 配体 1 - 174;

[Asn⁵⁴, Ser⁵⁶] mpl 配体 1 - 174;

[Asn⁵², Thr⁵⁴] mpl 配体 1 - 174;

[Asn⁸¹, Thr⁸³] mpl 配体 1 - 174;

[Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴] mpl 配体 1 - 174;

[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²², Asn⁵⁵⁽ⁱ⁾, Thr⁵⁷] mpl 配体 1 - 174;

[Asn³⁰, Thr³², Asn^{55'(i)}, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴] mpl 配体 1 - 174;

[Asn³⁰, Thr³², Asn^{55'(i)}, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴] mpl 配体 1 - 199;

[Asn⁵⁵, Thr⁵⁷] mpl 配体 1 - 174;

[Asn⁵⁶] mpl 配体 1 - 174;

[Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴, Thr¹⁶⁶] mpl 配体 1 - 174;

[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²², Asn⁵⁵, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴, Thr¹⁶⁶] mpl 配体

1 - 174; 或

[Asn³⁰, Thr³², Asn¹²⁰, Thr¹²², Asn⁵⁵, Thr⁵⁷, Thr¹⁶³, Asn¹⁶⁴, Thr¹⁶⁶] mpl 配体

1 - 199。

3) 一种编码上述 2) 的 mpl 配体类似物的 DNA 序列。

4) 一种以上述 3) 的 DNA 序列转染的 CHO 或 COS 细胞, 其转染的方式为使宿主细胞可以表达 mpl 配体类似物。

5) 一种包括有效治疗剂量的上述 1) 的 mpl 配体类似物以及可药用的稀释剂、佐剂或载体的药物组合物。

6) 一种编码上述 2) 的 mpl 配体类似物的 DNA 序列。

7) 一种以上述 6) 的 DNA 序列转染的 CHO 或 COS 细胞, 其转染的方式为使宿主细胞可以表达 mpl 配体类似物。

8) 一种包括有效治疗剂量的上述 2) 的 mpl 配体类似物以及可药用

的稀释剂、佐剂或载体的药物组合物。

以下提供的实施例是为了充分说明本发明，而不应被理解为限制本发明的范围。实施例中用于活性检测的 mpl 配体标准品为在大肠杆菌中表达后重新折叠成活性构象并经纯化的重组 mpl 配体标准品。因而，只测定了相对特异活性。

实施例 1

Mpl 配体 1 - 174 的构建

编码图 2 中的氨基酸 1 - 174 (起始序列为 S - P - A - P - P - A...) 的人 mpl 配体基因通过聚合酶链反应 (PCR) 由人胎肝 cDNA 文库产生 (Bartley 等, 《细胞》(Cell) 77 卷 1117 - 1124 页 (1994))。5' PCR 引物编码人 mpl 配体的氨基末端、XbaI 位点和优化的 Kozak 序列。3' 引物包括终止密码子和 SalI 限制位点。扩增的 DNA 片段用 XbaI 和 SalI 消化, 然后连接到 XbaI 和 SalI 切下的 pDSR α 2 上。所得质粒 pDSR α 2 mpl 配体 1 - 174 在哺乳动物细胞中进行表达。所得基因序列 (包括信号肽) 示于图 2 中。

含 mpl 配体 1 - 174 的质粒 DNA 用 XbaI 和 SalI 限制酶消化, 所得 DNA 片段进行琼脂糖凝胶电泳, 605 个核苷酸的 mpl 配体 1 - 174 DNA 片段用 GeneClean™ 试剂盒按照生产商 (BIO 101, Inc.) 提供的方法从凝胶中分离出来。WO 90/14363 中所述的质粒 pDSR α 2 也用 XbaI 和 SalI 限制酶消化, 回收载体片段。连接两个片段得到 pDSR α 2 (mpl 配体 1 - 174)。

实施例 2

Mpl 配体 1 - 174 在 CHO 细胞中的表达和纯化

用 pDSR α 2 - mpl 配体 1 - 174 转染二氢叶酸还原酶缺陷 (DHFR⁻) 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。转染前一天, 将 1×10^6 个 CHO DHFR⁻

传统方法监测。

本发明的类似物也可以进行其它修饰，如增加活性、稳定性、半衰期等。例如聚乙二醇化（PEG化）（多个或一个）可以通过蛋白质上的氨基或碳水化合物基团加入到 mpl 配体类似物上。脂肪酸或其它多聚物也可连接到蛋白质或碳水化合物基团上。

以下提供的实施例是为了充分说明本发明，而不应被理解为限制本发明的范围。实施例中用于活性检测的 mpl 配体标准品为在大肠杆菌中表达后重新折叠成活性构象并经纯化的重组 mpl 配体标准品。因而，只测定了相对特异活性。

实施例 1

Mpl 配体 1 - 174 的构建

编码图 2 中的氨基酸 1 - 174（起始序列为 S - P - A - P - P - A ...）的人 mpl 配体基因通过聚合酶链反应（PCR）由人胎肝 cDNA 文库产生（Bartley 等,《细胞》（Cell）77 卷 1117 - 1124 页（1994））。5' PCR 引物编码人 mpl 配体的氨基末端、XbaI 位点和优化的 Kozak 序列。3'引物包括终止密码子和 SalI 限制位点。扩增的 DNA 片段用 XbaI 和 SalI 消化，然后连接到 XbaI 和 SalI 切下的 pDSR α 2 上。所得质粒 pDSR α 2 mpl 配体 1 - 174 在哺乳动物细胞中进行表达。所得基因序列（包括信号肽）示于图 2 中。

含 mpl 配体 1 - 174 的质粒 DNA 用 XbaI 和 SalI 限制酶消化，所得 DNA 片段进行琼脂糖凝胶电泳，605 个核苷酸的 mpl 配体 1 - 174 DNA 片段用 GeneClean™试剂盒按照生产商（BIO 101, Inc.）提供的方法从凝胶中分离出来。WO 90/14363 中所述的质粒 pDSR α 2 也用 XbaI 和 SalI 限制酶消化，回收载体片段。连接两个片段得到 pDSR α 2（mpl 配体 1 - 174）。

实施例 2

Mpl 配体 1 - 174 在 CHO 细胞中的表达和纯化

用 pDSR α 2 - mpl 配体 1 - 174 转染二氢叶酸还原酶缺陷（DHFR⁻）的中国仓鼠卵巢（CHO）细胞。转染前一天，将 1×10^6 个 CHO DHFR⁻

细胞接种于 100 毫米组织培养皿中，在 CHO D⁻ 培养基（DMEM，10% 胎牛血清，1% 青霉素/链霉素/谷氨酰胺，1% 非必需氨基酸（Gibco）和 1% HT 添加物（Gibco））中生长。进行四次转染。每次转染时，质粒 DNA（50 微克）均以 PvuI 和缓冲液 H（Boehringer Mannheim）消化成线状。每次使用哺乳动物细胞转染试剂盒（Speciality Media）时，使 DNA 沉淀并逐滴加入平板中。在组织培养箱中培养 24 小时后，以新鲜 CHO D⁻ 培养基置换其中的培养基。24 小时后，细胞移至 96 孔组织培养板中，每孔含有 100 微升 CHO 选择培养基（D - MEM，5% 透析过的胎牛血清，1% 青霉素/链霉素/谷氨酰胺，1% 非必需氨基酸（Gibco）），筛选转化子。每周更换培养基，直至出现克隆。两周后，采用下述的 32D 细胞繁殖检测法（见例 9）筛选 mpl 配体的表达。表达超过 1×10^5 单位/毫升的克隆进行扩增并低温冻存。一个克隆进行扩增以用于转瓶生产，产生了将近 8 升条件培养基。

含有 mpl 配体 1 - 174 cDNA 的质粒 pDSR α 2 按上述方法转染至 DHFR 缺陷的 CHO 细胞中。两升种有表达 mpl 配体 1 - 174 的 CHO 细胞的转瓶无血清 CHO 细胞条件培养基（50% D - MEM，50% HAMS - F12，1% 青霉素/链霉素/谷氨酰胺，1% 非必需氨基酸（Gibco）），用 2 升的 Amicon 2000 型搅拌室和截留 10000 道尔顿的膜（YM10，Amicon）浓缩 15 倍。然后将 45 毫升浓缩的条件培养基以 0.4ml/min 流速用 Pharmacia FPLC 直接上样于 4ml hu-MPL-X 亲和层析柱上。此亲和层析柱的构建按生产商推荐的方法进行：每毫升 Pharmacia CNBr 活化的 Sepharose 树脂偶联 1.5 - 2.5 毫克 Mpl - X（mpl 受体的可溶性胞外结构域）。上样后，用 10ml 磷酸盐缓冲液（PBS；10mM NaPO₄ pH 6.8/150mM NaCl）洗柱，然后用 24ml 10mM Tris，pH 8.0/1M NaCl 洗柱。Mpl 配体（1 - 174）用 40ml 20mM CAPS（3 - [环己胺] - 1 丙磺酸）pH 10.5/1M NaCl/5mM CHAPS（3 - [(3 - 胆酰胺丙基)二甲氨] - 1 - 丙磺酸）洗脱下来，以每份 6ml 进行收集。第 2 份在 14% SDS 凝胶中产生单一的带型。将其浓缩并对 0.9% NaCl 盐溶液透析，它在体内及体外均有生物活性。CHO 细胞表达的其它 mpl 配体以类似方式进行纯化。

实施例 3

重组人 Mpl 配体的体内生物活性

对以不同类型的 mpl 配体治疗的小鼠进行了血小板计数。产生了 CHO 来源的 mpl 配体 1 - 332、1 - 174、1 - 163 和 1 - 153，并用
5 Mpl 受体亲和层析进行纯化。也产生了大肠杆菌来源的 Met - Lys - mpl 配体 1 - 332、Met - Lys - mpl 配体 1 - 174、Met - Lys - mpl 配体 1 - 163 和 Met - Lys - mpl 配体 1 - 153，用常规层析进行纯化。

图 4 示出用不同类型的 CHO 细胞来源的（实线）或大肠杆菌来源的（虚线）重组人 mpl 配体治疗的小鼠的血小板计数结果。正常雌性 Balb/C
10 小鼠连续 5 天经皮下注射所示浓度的 mpl 配体。最后一次注射后 24 小时，在尾静脉侧面切一个小口，采集血样。以 Sysmex 电子血细胞分析仪（Baxter Diagnostics, Inc. Irvine, CA）对血细胞进行分析。所示数据为 4 只动物测定值的平均值、平均值的 + / - 标准差。其它血细胞参数（如白细胞总数或红细胞数）未受这些治疗的影响（数据未列出）。

结果显示 CHO 细胞表达的 mpl 配体的体内活性较大肠杆菌产生的同
15 种 mpl 配体的活性高。如实施例 6 中所述，CHO 细胞表达的各种 mpl 配体均含有 N 和/或 O - 型碳水化合物，而大肠杆菌表达的 mpl 配体没有。这表明碳水化合物提高 mpl 配体的体内活性。碳水化合物使体内活性提高可能由于增加了循环半衰期、稳定性或使二者同时增加。

20

实施例 4

Mpl 配体类似物 N2 - N15 的构建

在 mpl 配体上产生额外的糖基化位点的方法如下。

合成以下寡核苷酸引物用来进行体外诱变以制备类似物 N2 - N14
25 （这些类似物的结构见表 1）：

N2 -	CCCATGTCAATCACAGCAGACT	SEQ ID NO.: 5
N3 -	CTTCACAGCAACCTGAGCCAGT	SEQ ID NO.: 6
N4 -	CAGTGCAACGAGACCCACCCTTTG	SEQ ID NO.: 7
N5 -	GCCTACAAATGTCACGCTGCCTGCT	SEQ ID NO.: 8
N6 -	CCCCTTGTAACATCATCCCTC	SEQ ID NO.: 9
N7 -	CAACTGAACGCCACTTGTCTCTCA	SEQ ID NO.: 10
N8 -	ACTTGTCTCAACTCCACCCTGGGGGA	SEQ ID NO.: 11

N9 - CTCCTGGGGAACCTTTCTGGA	SEQ ID NO.: 12
N10 - GACCACAAATCACACCGATCCCAAT	SEQ ID NO.: 13
N11 - ACCCTTTGTCTACAAATGTCACGCTGCCTGCT	SEQ ID NO.: 14
N12 - TCTCTCAAACCTCACGGGGGAGCTT	SEQ ID NO.: 15
N13 - TGGAAAAATCAGACGGAGGAGAC	SEQ ID NO.: 16
N14 - TGGAGGAGAACAAGACACAGGACAT	SEQ ID NO.: 17

为构建 m13mp18 mpl 配体 1 - 174, 图 2 中的基因引入 XbaI 和 SalI 限制酶消化的 m13mp18 DNA。单链 DNA 由 m13mp18 (mpl 配体 1 - 174) 感染的大肠杆菌 RZ1032 菌株的上清回收。方法见 Kunkel 等, 《酶学方法》(Methods in Enzymol.) 154 卷 367 页 (1987) 和 Messing, 《酶学方法》(Methods in Enzymol.) 101 卷 20 页 (1983)。进行体外诱变时, 将近 0.5 μ g 单链 DNA 和 0.125 皮摩尔上述任一合成引物与 6 μ l 缓冲液 (250mM Tris pH 7.8, 50mM MgCl₂, 50mM 二硫苏糖醇和 1% 牛血清白蛋白 (BSA - Pharmacia)) 混合。引物预先用 ATP 和 T4 多核苷酸激酶激活。引物与模板退火时, 反应体积用水调整为 10 μ l, 混合物加热至 65 $^{\circ}$ C 保持 5 分钟, 随后冷却至室温。进行延伸反应时, 加入 dTTP、dATP、dGTP 和 dCTP 各 2.5 μ l 和 1ml ATP (浓度均为 10 μ M), 随后加入 1 μ l (1 个单位) 大肠杆菌 DNA 聚合酶 (Klenow 片段) 和 1 μ l (1 个单位) T4 DNA 连接酶。混合物于 14 $^{\circ}$ C 过夜, 按所述方法 (Messing, 同上) 转化大肠杆菌 JM 109 (Yanisch - Perron 等, 《基因》(Gene) 33 卷 103 页 (1985))。

以示差杂交鉴别突变克隆。营养琼脂上的蚀斑转移到 Gene Screen 滤膜 (New England Nuclear)。将滤膜置于 1800 型紫外交联仪中采用自动交联方式 (Stratagene) 通过照射使 DNA 交联于滤膜上。然后将滤膜置于含 1% SDS 的 6 $\times$ SSC (0.9M NaCl/0.09M 柠檬酸钠) 中于 60 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。杂交时, 上述的寡核苷酸引物 (8 皮摩尔) 以 T4 多核苷酸激酶和 γ -³²P 标记的 ATP 进行末端标记, 与滤膜一起在含 0.5% SDS 和 125 μ g/ml 鲑精 DNA 的 6 $\times$ SSC 中温育过夜。根据估计的寡核苷酸熔点来选择杂交温度。通常杂交温度比熔点低 10 $^{\circ}$ C 左右。第二天, 在杂交温度下用 6 $\times$ SSC/1% SDS 洗膜 2 次, 随后再在杂交温度下用 6 $\times$

SSC 洗两次, 然后放射自显影。若有必要, 滤膜在较高温度下以 $6 \times$ SSC 清洗, 直至几乎或完全测不出含野生型 mpl 配体 cDNA 序列的菌斑的杂交信号。鉴别出在这些条件下有阳性杂交信号的克隆, 将其重新转染 JM 109 以分离出纯化的克隆。双脱氧链终止序列分析表明发生了突变。

- 5 带有所需变化的双链 m13 mpl 配体 1 - 174 DNA 用 QIAGEN 试剂盒 (Chatsworth CA.) 按生产商提供的方法从 JM 109 转染的细胞中回收。DNA 以 XbaI 和 SalI 消化, 分离出 605bp 的 mpl 配体 DNA 片段。pDSR α 2 以 XbaI 和 SalI 消化。分离出载体片段并连接到上述 mpl 配体片段上。通过限制酶切分析鉴定重组质粒。所得质粒(称为 mpl 配体 1 - 174 - NX, 10 其中 NX 为类似物的序号)含有编码 mpl 配体类似物的 DNA, 该类似物在所示位置上有改变的氨基酸残基。所得质粒然后再进行测序, 以证实存在所需突变。

- 构建了在 30 位和 120 位有两个额外的 N - 型糖基化位点的类似物 N15。带有 Asn30 和 Thr32 突变的 PDSR α 2 mpl 配体 174 - N4 以 XbaI 15 和 PstI 限制酶消化, 分离出大约 385 个核苷酸的 DNA 片段。含有 Asn120 和 Thr122 突变的 PDSR α 2 mpl 配体 1 - 174 - N10 用 PstI 和 SalI 限制酶消化, 分离出约 220 个核苷酸的 DNA 片段。pDSR α 2 以 XbaI 和 SalI 消化。分离出载体片段并将其连接到上述 mpl 配体片段上。这样就产生了带有 Asn30、Thr32、Asn120 和 Thr122 置换的 PDSR α 2 mpl 配体 174 20 - N15。

这些普通方法用来构建示于表 1 中的 mpl 配体类似物。图中示出了每一类似物中的 DNA 序列改变; 否则用来诱变的寡核苷酸引物序列有与人 mpl 配体互补的序列。

表 1

类似物/ 种类序号	氨基酸置换	序列改变
N1	(1-174): Pro ¹⁷⁵ →Gly ³³² 缺失	CCA→TGA(终止密码子)
N2	Leu ²² →Asn ²²	CCT→AAT
N3	Arg ²⁵ →Asn ²⁵	AGA→AAC
N4	Pro ³⁰ , Val ³² →Asn ³⁰ , Thr ³²	CCA, GTT →AAC, ACC
N5	Pro ³⁸ , Leu ⁴⁰ →Asn ³⁸ , Thr ⁴⁰	CCT, CTG →AAT, ACG
N6	Leu ⁸⁶ →Asn ⁸⁶	CTC→AAC
N7	Gly ⁸² , Pro ⁸³ →Asn ⁸² , Ala ⁸³	GGA, CCC→AAC, GCC
N8	Ser ⁸⁷ , Leu ⁸⁹ →Asn ⁸⁷ , Thr ⁸⁹	TCA, CTC→AAC, ACC
N9	Gln ⁹² →Asn ⁹²	CAG→AAC
N10	Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² →Asn ¹²⁰ , Thr ¹²²	GCT, AAG→AAT, ACC
N11	Pro ³⁶ , Pro ³⁸ , Leu ⁴⁰ → Ser ³⁶ , Asn ³⁸ , Thr ⁴⁰	CCT, CCT, CTG→ TCT, AAT, ACG
N12	Ser ⁸⁸ Leu ⁹⁰ →Asn ⁸⁸ , Thr ⁹⁰	TCC, CTG→AAC, ACG
N13	Thr ⁵³ , Met ⁵⁵ →Asn ⁵³ , Thr ⁵⁵	ACC, ATG→AAT, ACG
N14	Thr ⁵⁸ , Ala ⁶⁰ →Asn ⁵⁸ , Thr ⁶⁰	ACC, GCA→AAC, ACA
N15	Pro ³⁰ , Val ³² , Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² → Asn ³⁰ , Thr ³² , Asn ¹²⁰ , Thr ¹²²	CCA, GTT, GCT, AAG→ AAC, ACC, AAT, ACC

注意：此处类似物 N2 - N15 指类似物 2 - 15。并且，此处所称的[Asn²²] mpl 配体指被研究的特定 mpl 配体的 22 位氨基酸被置换为天冬酰胺，优选的 mpl 配体至少含有图 1 中 7 - 151 位氨基酸的人源序列（包括上述优选的人 mpl 配体序列）。因而，以天冬酰胺残基置换 mpl 配体 1 - 174（人源序列）的 22 位亮氨酸残基产生的 mpl 配体类似物可以用[Asn²²] mpl 配体 1 - 174 表示。

将 mpl 配体 DNA 插入到 pDSR α 2 构建的质粒称为 pDSR α 2 1 - 174 - NX，此处 NX 是类似物的序号。表达载体 pDSR α 2 在 WO 90/14363（1990）中已大体述及。用 XbaI 和 SalI 消化 pDSR α 2 可得到 pDSR α 2 mpl 配体 1 - 174 - NX 质粒。分离出载体片段并将其连接到含所需序列的大约 605bp 的片段上。

实施例 5

Mpl 配体和 Mpl 配体 N1 - N15 在 COS 细胞中的表达

人 mpl 配体和表 1 所述的 mpl 配体类似物的 cDNA 克隆通过电穿孔法转到 COS - 1 细胞（ATCC No. CRL - 1650）。从半汇合的培养皿中收集 COS - 1 细胞，用培养基（含有 10 % 胎牛血清和 1 % L - 谷氨酰胺/青霉素/链霉素（Irvine Scientific）的 Dulbecco 改良必需培养基）清洗后，重新悬浮，使其浓度为 6×10^6 细胞/ml。0.5ml 细胞转移到 0.2cm 电穿孔池（Bio - Rad）中，与 50 μ g 编码 mpl 配体类似物的质粒 DNA 进行电穿孔，所用系统为 BTX 电穿孔系统电子细胞操作器 600（BTX Electroporation System Electroporation Manipulator 600），工作条件为 130 伏的低电压和 650 μ F。电穿孔处理过的细胞以 10ml 培养基涂布于 100mm 组织培养皿中。涂布后 12 到 24 小时以 10ml 新鲜培养基替换原来的培养基。电穿孔后 3 到 5 天收集条件培养基。

实施例 6

Mpl 配体和 Mpl 配体 N1 - N15 的鉴定

A. 鉴定碳水化合物的加入

含有大约 30 - 60ng mpl 配体或 mpl 配体类似物的 COS 细胞上清在室温下以免抗 mpl 配体多克隆抗体进行免疫沉淀过夜，该 COS 细胞如例

5 中所述用 mpl 配体类似物 cDNA 转染。在某些情况下表达水平较低，
则用于免疫沉淀的最大体积为大约 8 - 9ml。抗体为抗大肠杆菌中表达的
纯化 mpl 配体 1 - 163 的抗体。将 30 μ l 含 0.1 % 叠氮化钠的磷酸盐缓冲液
(PBS) 中的 1:1 蛋白质 A - Sepharose 加入免疫沉淀物中，在室
5 温下温育 1 小时。样品离心后以 PBS 洗涤，重新悬浮于 SDS 样品缓冲液
中 (0.125M Tris - HCl pH 6.8 / 4 % SDS / 20 % 甘油 / 10 % β - 巯基
乙醇 / 0.001 % 溴酚蓝) 中。样品进行 12 % SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳
分析，转移到硝酸纤维素膜上，再用小鼠单克隆抗体进行 Western 分析
(可参见以下文献: Burnette 等, 《生物化学分析》(Anal. Biochem. 112
10 卷 195 - 203 页 (1981) ; Elliott 等, 《基因》(Gene) 79 卷 167 -
180 页 (1989)) 所用抗体为合成的 mpl 配体肽 (如相应于图 1 中的氨
基酸残基 47 - 62) 作抗原而产生的。含 mpl 配体的带能用 ECL 试剂盒
(Amersham) 显色。

图 5 显示类似物 N4、N7 和 N10 DNA 转染的 COS 细胞上清中的
15 蛋白较人源序列的 mpl 配体 174 (N1) 大。图 6 显示 N13、N14 和 N4
DNA 转染的 COS 细胞上清中的蛋白也比人源序列的 mpl 配体大。这种
增大表明存在有一个额外的 N - 型碳水化合物链。N15 含两个额外的 N
- 型糖基化位点。图 6 表明该类似物中含有比只有 1 处额外的 N - 型糖
基化更大的材料。蛋白质的大小根据它们在 SDS - PAGE 上相对已知分
20 子量的蛋白质标准物的运动性进行估计。由图 6 计算出来的较大的带的
估计大小列于表 2。这一结果表明 N15 含有 2 个额外的 N - 型糖链。其
它选定的类似物的 Western 印迹分析也示于图 6。

表 2
N - 型碳水化合物的估算

Mpl 配体类似物 (1 - 174)	分子量 (Da)	分子量变化 (Da) (较天然序列增加)	可能的 N - 型 链的数量 (@4 KDa/位点)
N1 天然	23500	0	0
N 4	28700	5200	1
N 7	27200	3700	1
N 10	27200	3700	1
N 13	26700	3200	1
N 14	28700	5200	1
N 15	33500	10000	2

为了证实 mpl 配体类似物增大是由于 N - 型碳水化合物的加入而进行了试验。按上述方法免疫沉淀含 mpl 配体的 COS 细胞条件培养基并用 PBS 清洗。然后每一管加入 10 μ l 0.5 % SDS，每一样品煮沸 3 分钟。然后加入下列成分：10.8 μ l 0.5M NaPO₄ pH 8.6, 5ml 7.5 % 辛基酚聚氧乙烯醚和 3 μ l 250 单位/毫升的 N - 聚糖酶 (Genzyme)。N - 聚糖酶处理除去 N - 型碳水化合物。样品 37 $^{\circ}$ C 下保温 6 小时。加入 SDS - PAGE 样品缓冲液终止反应，按上述方法用抗 mpl 配体的单克隆抗体和抗小鼠 ECL Western 检测试剂盒 (Amersham) 进行 SDS - PAGE Western 分析 (12 % 丙烯酰胺)。采用这种方法对人 mpl 配体和 mpl 配体类似物进行的 N - 型链分析示于图 7。N4、N7 和 N10 用 N - 聚糖酶处理后在 Western 印迹上的运动性下降至与 N1 相同。正如所预料的那样，N1 用 N - 聚糖酶处理之后对运动性没有影响，因为 N1 没有 N - 型糖基化位点。这些结果表明所见的增大是由于 N - 型碳水化合物的加入。

B. mpl 配体上 O - 型碳水化合物的分析

为了分析 O - 型碳水化合物对人 mpl 配体的作用，从上述的 CHO 细胞条件培养基中纯化出几种蛋白质。每一种蛋白质均以 O - 聚糖酶 (糖肽 α - N - 乙酰半乳糖胺酶，Oxford GlycoSystems) 进行 + / - 处理。

O - 聚糖酶除去糖蛋白中的 O - 型碳水化合物。用大肠杆菌表达的每种蛋白形式作为未糖基化的对照。为分析 O - 型碳水化合物对分子量差别的作用,有必要首先除去所有 N - 型碳水化合物。由于全长形式的 mpl 配体 1 - 332 含有 N - 型碳水化合物, CHO 细胞表达的全长样品同上述 5 COS 细胞表达的 mpl 配体类似物一样进行 N - 聚糖酶 (肽 - N4 - (N - 乙酰 - β - 葡萄糖氨基) 天冬酰胺酰胺酶) 处理, 只是此处 N - 聚糖酶处理是保温过夜。

对全长 (1 - 332) mpl 配体进行 O - 聚糖酶处理前, 样品 pH 用 1/15 体积的 100mM 乙酸 (pH 2.2) 调整至 pH 6.0 - pH 7.0 之间。1 微克蛋白质在 SDS 中煮沸 3 分钟变性, 然后与 1U/ml 神经氨酸苷酶 (唾液 10 酸酶, 来自 *Arthrobacter Urefaciens*, Boehringer Mannheim)、1mM 乙酸钙 (pH 6.8) 和 20mM 磷酸钠 (pH 6.8) 溶液 37 °C 保温 60 分钟。

随后进行 O - 聚糖酶处理: 加入 5mU 酶使终体积为 100 μ l, 37 °C 保温过夜。蛋白质 (0.2 μ g/道) 采用 SDS - PAGE (15 % 丙烯酰胺) 进 15 行分离。然后转移到 0.2 μ m 硝酸纤维素膜上, 与抗 mpl 配体的多克隆抗体温育过夜, 用抗兔 ECL Western 检测试剂盒 (Amersham) 使 mpl 配体蛋白显色。

图 3 示出 4 种不同形式的人源 mpl 配体的 Western 印迹结果。1 - 3 道为全长 mpl 配体 1 - 332, 4 - 6 道为 mpl 配体 1 - 174, 7 - 9 道 20 为 mpl 配体 1 - 163, 10 - 12 道为 mpl 配体 1 - 153。神经氨酸苷酶和 O - 糖苷酶处理后的配体示于 2、5、8 和 11 道中, 其分子量降至与 3、6、9 和 12 道中未糖基化的配体相同。每一例中运动性均增加到与大肠杆菌中表达的未糖基化形式相同。这些结果表明 1、4、7 和 10 道中较大的带是由于 O - 型碳水化合物引起的。每条带的分子量是与已知 25 分子量的蛋白质的运动性比较而估计的。

从表 3 中列出的不同蛋白质的估计分子量可见, 运动性的明显改变可归因于多个 O - 型碳水化合物, mpl 配体 1 - 332 含多达 14 个 O - 型碳水化合物链 (估计 950 道尔顿/链), mpl 配体 1 - 174 含 9 个链, mpl 配体 1 - 163 含 4 个链, mpl 配体 1 - 153 含 2 个链。2 道中的样品 30 为全长 mpl 配体 1 - 332。该蛋白显然被降解, 这可能是由于同糖苷酶在 37 °C 保温的时间延长所致。因而, 3 道中大肠杆菌表达的未糖基化的

形式用来计算加入到 CHO 细胞表达的 mpl 配体 1 - 332 中的 O - 型碳水化合物的大致分子量。

这些结果与测试的 CHO 表达的所有 mpl 配体形式均存在碳水化合物是一致的。通过单糖成分的直接分析证实 CHO 细胞表达的 mpl 配体 1 - 332、1 - 174 和 1 - 163 中存在 O - 型碳水化合物。唾液酸、GalNAc 和 Gal 通过酸水解从糖蛋白中释放出来。单糖采用高压阴离子交换层析和脉冲电流检测。每种形式的 mpl 配体均测得了这三种糖。这一结果表明存在着含 O - 型碳水化合物的唾液酸。这一结果与图 4 中的体内结果是一致的，图 4 中 CHO 细胞表达的 mpl 配体形式比大肠杆菌中表达的相应形式的体内活性要高。因此存在碳水化合物能提高 mpl 配体的体内活性。

表 3
O - 型碳水化合物计算

Mpl 配体形式	O-聚糖酶处理 (+ / -)	分子量 (Da)	分子量变化	可能的 O-型链的数目 (@950 Da/链)
1-332	-	54200	13600	14
"	大肠杆菌变体	40600		
1-174	-	24600	8600	9
"	+	16000		
1-163	-	18400	3900	4
"	+	14500		
1-153	-	15200	2300	2
"	+	12900		

15 实施例 7
Mpl 配体的 ELISA 检测

多克隆抗体的产生：在长达三个月的时间里用大肠杆菌产生的重组人 mpl 配体 1 - 163 使新西兰白兔超免疫。收集表现出高抗体效价的六只兔子的抗血清，特异的抗 mpl 配体的抗体进行亲和纯化。

20 亲和纯化：重组人 mpl 配体 1 - 163 根据厂商说明共价联结到 Actigel - ALD (Sterogene Bioseparations, Inc.) 上。一份兔抗血清样品加入

到 mpl 配体亲和凝胶上，混合物置于搅拌器上 4 - 8 °C 缓慢搅动过夜。未结合的血清蛋白用 PBS 从胶床中洗脱下来，特异性结合的抗 mpl 配体的抗体用免疫纯化温和抗原/抗体洗脱缓冲液（ImmunoPure Gentle Ag/Ab Elution Buffer, Pierce Chemical Co.）洗脱下来。回收的抗体用 PBS 透析，更换几次透析液后，抗体溶液用 Amicon 搅拌室超滤单元（Amicon Stirred Cell Ultrafiltration Unit）浓缩，所得抗体浓缩液为随后用于孔包被和酶结合物制备的特异性抗 mpl 配体的抗体。

ELISA 试剂：Immulon 4 Removawell Strips（Dynatech Laboratories, Inc.）以亲和纯化的兔抗 mpl 配体的抗体包被。亲和纯化的抗体以 0.1M 碳酸氢钠（新鲜配制的，pH 约为 8.2）稀释至浓度为 2.5 µg/ml。每孔中加入 100 µl 抗体，酶联板在密闭的湿盒中于室温下温育 24 小时。然后每孔中加入 200 µl 含 1 % 胎牛血清、5 % 蔗糖的 TEN 液（TEN 液：50mM Tris 7.4 / 10mM EDTA / 150mM NaCl）的封闭液，酶联板再置于密闭的湿盒中室温下温育 24 小时。弃去孔中的包被液和封闭液。再包被/封闭步骤包括：每孔中加入 300 µl 溶于 PBS 的超封闭（SuperBlock）封闭缓冲液（Pierce Chemical Co.）。室温下保持大约 5 分钟，弃去该溶液，室温下风干 24 小时。包被好的酶联板放置于密闭的塑料袋中于 4 - 8 °C 保存，以供 mpl 配体 ELISA 之用。

由收集的兔抗血清中亲和纯化的抗 mpl 配体的抗体共价联结于辣根过氧化物酶（HRPO）上用作信号产生抗体。亲和纯化的抗体用亚胺硫杂戊烷盐酸（iminothiolane HCl Fluka Chemical Corp.）处理。另外，HRPO 用 6 - 马来酰亚胺己酸 - N - 琥珀酰亚胺酯（Fluka Chemical Corp.）处理。将这两种活化的蛋白质混合以使它们共价结合。然后将反应混合物用 FPLC Superose 6（Pharmacia）柱层析，以分离出所需分子量（即大约 200 kD）的抗体：HRPO 结合物。合并含所需结合物的部分，用 Centricon 30（Amicon Division, W. R. Grace & Co.）浓缩，以 50 % 的甘油溶液保存于 - 20 °C。该抗 mpl 配体抗体：HRPO 浓缩物以含 2 % 胎牛血清的 PBS 稀释以供 ELISA 之用。用于 ELISA 的结合物的最终浓度为 250 - 500 ng/ml。

用大肠杆菌产生的重组人 mpl 配体 1 - 163 作标准物。该 mpl 配体以含 2 % 胎牛血清（Sigma Chemical Co.）、0.05 % 乙汞硫代水杨酸

钠的 TEN 缓冲液稀释后保存。制备的标准物含 mpl 配体分别为 1.0、0.5、0.25、0.125 和 0.062 ng/ml。

检测：板孔中加入 100 μ l mpl 配体标准物或样品，然后置于密闭的湿盒中于室温下温育 18 - 24 小时。弃去孔中内含物和残液，用洗液（含 5 0.05 % 吐温 20 的 TEN 缓冲液）洗一次。每孔中加入抗 mpl 配体的抗体：HRPO 结合物溶液（100 μ l），然后置于密闭的湿盒中于室温下温育 2 小时。弃去各孔中内含物，用含 0.05 % 吐温 20 的 TEN 缓冲液洗 4 次。

进行显色反应时，加入 100 μ l TMB/过氧化物底物溶液（Kirkegaard & Perry 溶液 A 和 B 1:1 混合），室温下温育 20 分钟。加入 100 μ l 终止液（0.5N 硫酸）终止反应。在微量板检测仪上读取 450nm 的吸收值。样品中 mpl 配体的浓度根据曲线拟合程序产生的标准曲线来计算。

实施例 8

mpl 配体 1 - 174 类似物在短期液体培养

15 巨核细胞检测法中的生物活性

按上述方法制备 mpl 配体 1 - 174 类似物，并检测它们刺激液体培养的巨核细胞生长的能力。分离自人白细胞提取单元（Nichol 等，《干细胞》（Stem Cells）12 卷 494 - 505 页（1994））的 CD34 选择细胞以 2×10^5 /ml 接种于培养基（IMDM/1 % 普鲁卡因青霉素谷氨酰胺/1 20 % 非必需氨基酸 / 1 % MEM 丙酮酸钠/ 1 % MEM 维生素/ 10 % 去离子 BSA / 10 % 正常人 AB 血浆/ 10 μ M α - thiacylglycerol / 20 μ g/ml L - 天冬酰胺）上。此外每孔中加入 1.5 μ l 含有 mpl 配体（1 - 174）或 mpl 配体 1 - 174 类似物的 COS - 1 条件培养基。在 Terasaki 式微量组织培养板（Vanguard International）上的终体积为 15 μ l。细胞在含 5 % CO₂ 25 的湿盒中于 37 °C 温育 8 天，用 1 % 戊二醛直接固定于培养孔上，然后与含有抗 GPIb、抗 GPIIb（Biodesign）和抗 GPIb（Dako, Carpinteria, CA）的单克隆抗体合剂一起温育。以链霉抗生物素蛋白 - β - 半乳糖苷酶检测系统（HistoMark, Kirkegaard and Perry）使免疫反应显色。巨核细胞在图 8 中以暗色（实际图片中为蓝色）表示。

30 图 8 中 A 部分和 D 部分分别为阳性和阴性对照。A 组孔接受了 37.5pg 野生型 mpl 配体 1 - 174 COS - 1 条件培养基，可见有明显的巨

核细胞生长。D组孔接受了1.5 μ l COS-1模拟条件培养基,未见生长。图8中B部分和C部分分别为mpl配体1-174类似物N7和N10。B组孔接受了9.0pg mpl配体COS-1条件培养基,而C组孔接受了27pg,两者均显示出良好的巨核细胞生长。

- 5 该试验表明,所试的mpl配体类似物能够在体外刺激人巨核细胞的生长。

实施例9

Mpl配体1-174类似物在体外细胞增殖检测法中的生物活性

- 10 按以上介绍的方法制备mpl配体1-174类似物,并检测它们刺激32D-mpl细胞增殖的能力。为构建32D-mpl细胞,全长人mpl受体序列(Vigon, I., 等, PNAS 89卷5640-5644(1992))亚克隆至含莫洛尼氏小鼠肉瘤病毒转录启动子的表达载体上。6 μ l该构建体和6 μ l双嗜性逆转录病毒包装的构建体(Landau, N. R., Littman, D. R.,
15 《病毒学杂志》(Journal of Virology) 66卷5110-5113页(1992))用CaPO₄哺乳动物转染试剂盒(Stratagene)转染到3 $\times$ 10⁶293细胞中。2天及4天后再次转染这些细胞。最后一次转染次日,293细胞与IL-3依赖的鼠细胞系(32D,克隆23; Greenberger等, PNAS 80卷2931-2936页(1983))共孵。24小时后,32D细胞在BSA
20 梯度(Path-o-cyte; Miles Inc.)上回收并成带。细胞在1ng/ml鼠源IL-3中扩大培养,然后在20%APK9血清(Bartley等,《细胞》(Cell) 77卷1117-1124页(1994))中选择生长。用多克隆兔抗肽(MPL)血清进行FACS,根据细胞表面表达的受体对细胞分类。这些细胞因子依赖的鼠32D-mpl细胞对mpl配体有反应。32D-MPL
25 细胞在含10%胎克隆II血清(Hyclone Laboratories)和1.0ng/ml muIL3的MEM培养基生长至细胞密度为1 $\times$ 10⁶细胞/ml。细胞通过离心(大约500 $\times$ G)收集,用缺少muIL3的生长培养基洗两次,重新悬浮为1 $\times$ 10⁵细胞/ml。

- 30 用mpl配体1-163制得包含12个点的mpl配体标准曲线,范围为5000-1pg/ml。100 μ l每一稀释度的标准mpl配体或检测样品加至含100 μ l重新悬浮细胞的96孔微量组织培养板(10000细胞/孔)的合适孔

中, 在 37 °C、10 % CO₂ 的加湿培养箱中温育。48 小时后, 每孔加入 40µl MTS 试剂 (水相非放射性细胞增殖试剂盒, Promega), 14 - 18 小时后在细胞板读数仪上读取 490nm 的光密度。每一样品的体外活性根据样品的剂量反应曲线计算。一个单位定义为产生 50 % 最大刺激所需的每一样品 mpl 配体的量。以单位/ml 表示的生物活性除以 mpl 配体 ELISA 确定的以 ng/ml 表示的 mpl 配体的浓度计算出特异活性。

在 COS 细胞中转染和表达的 mpl 配体类似物的特异生物活性示于表 4。氨基酸的置换对碳水化合物加入的影响也进行了总结。纯化人序列 mpl 配体的体外活性按上述检测法测定为 200 - 300 单位/ng。由表 4 也可清楚地看出, 含有额外 N - 型碳水化合物的 mpl 配体类似物 (如 N4 和 N10) 同天然序列 mpl 配体一样表达良好, 即使它们含有额外的碳水化合物链 (如实施例 6 中 A 部分中所测定的)。这两种类似物也保持了全部体外生物活性。因而, 含 N - 型碳水化合物的 mpl 配体类似物可在哺乳动物细胞中正常表达, 并且它们具有正常或升高的体外生物活性。

15

表 4

Mpl 配体形式 (氨基酸长度)	序列	N-型链的数目 (a)	Elisa (ng/ml) (b)	体外活性 (单位/ml) (c)	特异活性 (单位/ng) (d)
模拟的	NONE	0	<0.08	<10	<125
N1 (174)	天然的	NA	25	5375	215
N1 (174)	天然的	0	31.4	8800	280
N1 (174)	天然的	0	31.75	NA	NA
N2 (174)	N22	0	NA	NA	NA
N3 (174)	N25	NA	1.85	636	344
N4 (174)	N30T32	1	38	8830	232
N4 (174)	N30T32	1	24	NA	NA
N5 (174)	N38T40	0	1.2	<10	<8
N6 (174)	N86	0	0.44	<10	<22
N7 (174)	N82A83	0 to 1	6	2660	443
N7 (174)	N82A83	0 to 1	4.7	3080	655
N9 (174)	N92	0	10.5	1970	188
N10 (174)	N120T122	1	20.4	5943	291
N10 (174)	N120T122	1	33.7	9690	288
N11 (174)	S36N38T40	NA	<0.625	<10	<16
N11 (174)	S36N38T40	0	1.3	<10	<8
N13 (174)	N53T55	0 to 1	67	18000	269
N14 (174)	N58T60	0 to 1	17.9	4850	271
N15 (174)	N30T32N120T122	0 to 2	26	6420	247

注意

- (a) 额外的 N - 型链的数目按实施例 6 中所述根据类似物多肽在 SDS 凝胶中的运动性估计。
- (b) CHO 细胞上清中 mpl 配体类似物的量按本实施例所介绍的 ELISA 5 检测法确定。
- (c) 体外活性根据对依赖 mpl 配体生长的 32D 细胞的胸腺嘧啶摄入的刺激来计算。
- (d) 根据增殖试验测得的 mpl 配体类似物的体外活性与根据 mpl 配体 ELISA 测得的 mpl 配体类似物的量的比率。
- 10 N. A. 未得到

实施例 10

- Mpl 配体 1 - 174、N4 和 N15 在 CHO 细胞中的表达和纯化
- 含 mpl 配体 1 - 174、N4 和 N15 cDNA 的 pDSR α 2 转染 DHFR - 15 缺陷的 CHO 细胞, 所用方法为实施例 2 中所述的方法作以下改进。
- 每一类似物进行一次转染。转染后三周, 采用 mpl 配体 ELISA 筛选 mpl 配体表达。各种形式的三个表达克隆低温冻存。每一类似物的最高表达的克隆以转瓶生产扩大培养。N4 产生了 7.4 升条件培养基 (50 % D - MEM、50 % HAMS - F12、1 % 青霉素/链霉素/谷氨酰胺、1% 20 非必需氨基酸 (Gibco)), N15 产生了 4.6 升条件培养基。
- 来自转瓶接种有表达 mpl 配体 1 - 174 (2.9L) N4 (7.4L)、N15 (4.4L) 的 CHO 细胞的无血清条件培养基采用 S1Y10 (截留 10000 道尔顿分子量) Amicon 螺旋超滤柱分别浓缩 12、19 和 12 倍。150 毫升浓缩的条件培养基以 0.3ml/min 流速直接加样于 3.3ml hu - Mpl - X (受体) 亲和柱上。此亲和柱是按生产商推荐的方法每毫升 Pharmacia CNBr 活化的 Sepharose 树脂偶联 1.0 - 1.5 毫克 Mpl - X (可溶性的 Mpl 受体 25 细胞外结构域) 而构建的。上样后, 以 30ml 磷酸盐缓冲液 (PBS; 10mM NaPO₄ pH 6.8/150mM NaCl) 洗柱, 再以 60ml 10mM Tris, pH 8.0/1M NaCl/1mM CHAPS 洗柱。Mpl 配体 1 - 174 用 30ml 20mM 30 CAPS (3 - [环己胺] - 1 丙磺酸) pH 10.5/1M NaCl/1mM CHAPS (3 - [3 - 胆酰胺丙基) 二甲胺] - 1 - 丙磺酸) 洗脱出来。

各洗脱组分加入 0.6ml 1M Tris pH 7.0 进行中和。SDS - PAGE 分析表明 10mM Tris, pH 8.0 / 1M NaCl 1mM CHAPS 洗脱时 1 - 174 mpl 配体有明显的“伤流”。洗脱组分以 SDS - PAGE 进行分析。收集含有 mpl 配体 1 - 174 的组分。此亲和纯化进行如下调整后重复一次：0.5ml/min 上样和洗脱, 除去 10mM Tris, pH 8.0 / 1M NaCl / 1mM CHAPS 的洗脱。

含单一 mpl 配体带的所有组分用 YM 10 (截留 10000 道尔顿分子量) 膜在 centricon 装置上的 50ml 搅拌室中进行浓缩。该 0.5ml 浓缩液直接加样于 PBS 平衡的 Pharmacia Superdex 200 HR 10/30 凝胶过滤柱上, 流速为 0.25ml/min, 每一组分收集 0.25ml。合并所有含单一 mpl 配体带 (根据 SDS - PAGE 分析) 的洗脱组分。

CHO 细胞表达的其它形式 (N4 和 N15) 的 mpl 配体以类似方式 (合并两次亲和纯化, 在 Superdex 200 凝胶过滤柱上分离) 纯化。

15 实施例 11

CHO 细胞表达的 N4 和 N15 中碳水化合物加入的测定

为确定 CHO 细胞中表达的 mpl 配体形式是否含有 N - 型碳水化合物, 如例 6 中所述方法用 SDS - PAGE Western 印迹对条件培养基进行分析, 所用方法进行以下改进。

20 使用来自转瓶的 CHO D⁻ 条件培养基。样品加样至 Centricon - 10 离心浓缩器中 (Amicon, Beverly, MA), 在 Beckman J2 - HS 离心机上使用固定角转头 (JA 20.1) 以 6000 RPM 离心 1 小时。含大约 100ng mpl 配体类似物的浓缩样品与同体积的 SDS 样品缓冲液 (如实施例 6 中所述) 加样至 SDS PAGE 凝胶上。大肠杆菌表达的、不含碳水化合物的 mpl 配体 MK 1 - 174 也同时加样。图 9 示出运动性的差异, 它与预期的碳水化合物数量一致。运动最快的种类为 Met-Lys (1 - 174) 大肠杆菌 mpl 配体, 其后依次为 mpl 配体 1 - 174 (CHO)、N4 (CHO) 和 N15 (CHO)。参见图 9。相对于未糖基化的 mpl 配体的分子增大最可能的解释是 mpl 配体 1 - 174 (CHO) 上有额外的 O - 型碳水化合物, N4 (CHO) 上有额外的 O - 型碳水化合物和一个额外的 N - 型寡糖, N15 (CHO) 上有额外的 O - 型碳水化合物和两个额外的 N - 型寡糖。

为了证实分子量的增加确实是由于 N - 型碳水化合物链的加入, 样品按实施例 6 中所述用 N - 聚糖酶处理以除去所有的 N - 型碳水化合物。每一样品中含有由条件培养基中纯化的大约 100ng mpl 配体类似物。

N - 聚糖酶处理后 N4 (CHO) 和 N15 (CHO) 的运动性降至与
5 mpl 配体 1 - 174 (CHO) 相同。以 N - 聚糖酶处理 mpl 配体 MK 1 - 174 (大肠杆菌) 或 mpl 配体 1 - 174 (CHO) 不影响运动性, 因为根据预计这两种形式都不含任何 N - 型碳水化合物。比较 N - 聚糖酶处理与否的情况表明 N4 的大小差别相当于一个 N - 型碳水化合物链的大小, 而 N15 的大小差别相当于两个碳水化合物链的大小。因而, 当这两种
10 种 mpl 配体形式在 CHO 细胞中表达时, 它们的 N - 型糖基化位点增加会导致 N - 型碳水化合物增加。参见图 10。

实施例 12

CHO 细胞中生产的 Mpl 配体类似物的体外生物活性

15 CHO 细胞或大肠杆菌细胞表达和纯化的纯 mpl 配体和类似物用因子依赖性细胞系 32D - Mpl 和例 9 所述检测法分析其体外生物活性, 其活性根据以 CHO 细胞产生的 mpl 配体 1 - 332 为标准物获得的曲线来计算。几种形式的 mpl 配体的特异体外生物活性示于表 5。从表中可明显看出 CHO 细胞中表达的、含有额外的碳水化合物的 mpl 配体类似物具有
20 体外生物活性。

表 5

MPL 配体的体外活性

25	MPL 配体形式	N - 型链的数目	体外活性
			U/mg × 10E6
	MK 174 (E. coli)	0	13
	1 - 163 (CHO)	0	86
	1 - 174 (CHO)	0	85
	N 4 (CHO)	1	60
30	N 15 (CHO)	2	92
	1 - 332 (CHO)	6	41

实施例 13

Mpl 配体类似物的体内生物活性

检测以几种形式 mpl 配体处理的小鼠的血小板数, 结果示于图 11。

CHO 来源的 mpl 配体 1 - 332、1 - 174、N4 和 N15 以 mpl 受体亲和
5 层析进行纯化。大肠杆菌来源的 Met-Lys-mpl 配体 1 - 174 以常规层析
进行纯化。所示浓度的每种形式给于正常雌性 Balb/c 小鼠皮下注射, 每
日一次, 连用 5 天。最后一次注射后 24 小时, 由尾静脉侧面切一小口收
集血样。用 Sysmex 血细胞电子分析仪 (Baxter Diagnostics, Inc.
Irvine, CA) 进行血细胞分析。数据以 4 只动物测定结果的平均值和平
10 均值的 $\pm$ 标准差表示。其它血细胞参数, 如白细胞数或红细胞数不受
这些处理的影响 (数据未引出)。

所有形式的 mpl 配体均刺激血小板数增加。然而, 不同形式的活性
有所不同。相对体内活性为 mpl 配体 MK 1 - 174 (大肠杆菌) < mpl 配
体 1 - 174 (CHO) < N4 (CHO) < mpl 配体 1 - 332 (CHO) < N15
15 (CHO)。这些结果表明加入非天然存在的 N-型碳水化合物导致体内
活性增加, 而且增加碳水化合物的量使体内活性成比例增加。

实施例 14

通过重叠 PCR 构建 Mpl 配体类似物和截短物 N16 - N40

20 类似物 N16 到 N40 (这些类似物结构见表 6) 通过重叠 PCR (聚合
酶链反应) 构建, 所用方法根据 Cheng 等, PNAS 91 卷 5695 页 (1994)
介绍的方法加以改进。一般在每一构建物中引入 1 到 2 个突变。

合成以下寡核苷酸引物用于制备类似物 N16 - N40:

5' F	CCCTCTAGACCACCATGGAAGTGAATTGCTCCTC	SEQ ID NO.: 18
25 3' R (1-174)	CCCGTCGACTCAGAGCTCGTTCAGTGTG	SEQ ID NO.: 19
N16 - 3' R	CCCGTCGACTCACTCCAACAATCCAGAAG	SEQ ID NO.: 20
N17 - 3' R	CCCGTCGACTTATCTGGCTGAGGCAGTGA	SEQ ID NO.: 21
N18 - F	CACGTCCTTAACAGCAGCCTGAGCCAGTG	SEQ ID NO.: 22
N18 - R	CACTGGCTCAGGCTGCTGTTAAGGACGTG	SEQ ID NO.: 23
N19 - F	CCCTTTGCCTAACGGTTCCTGCTGCCTGCTGT	SEQ ID NO.: 24
N19 - R	ACAGCAGGCAGCAGGGAACCGTTAGGCAAAGGG	SEQ ID NO.: 25

N20 - F	TGCCTACACCTAACCTGTCGCCTGCTGTGGA	SEQ ID NO.: 26
N20 - R	TCCACAGCAGGCGACAGGTTAGGTGTAGGCA	SEQ ID NO.: 27
N21 - F	GGAAAACCAATATGTCGGAGACCAAGGCACA	SEQ ID NO.: 28
N21 - R	TGTGCCTTGGTCTCCGACATATTGGTTTTC	SEQ ID NO.: 29
N22 - F	TGGGAGAATGGAACACCACGATGGAGGAGACC	SEQ ID NO.: 30
N22 - R	GGTCTCCTCCATCGTGGTGTTCATTCTCCCA	SEQ ID NO.: 31
N23 - F	AAAACCCAGATGAACGAGACGACCAAGGCACA	SEQ ID NO.: 32
N23 - R	TGTGCCTTGGTCTCGTTCATCTGGGTTTT	SEQ ID NO.: 33
N24 - F	CCCAGATGGAGAACACCTCGGCACAGGACAT	SEQ ID NO.: 34
N24 - R	ATGTCCTGTGCCGAGGTGTTCTCCATCTGGG	SEQ ID NO.: 35
N25 - F	CACGGGGACAAAACGGAACCACTTGCCTCTCA	SEQ ID NO.: 36
N25 - R	TGAGAGGCAAGTGGTTCCGTTTTGTCCCCGTG	SEQ ID NO.: 37
N26 - F	CAGGGCAGGAACACATCTCACAAGGATCCCA	SEQ ID NO.: 38
N26 - R	TGGGATCCTTGTGAGATGTGTTCTGCCCCTG	SEQ ID NO.: 39
N27 - F	GGGCAGGACCAACGCTAGCAAGGATCCCAAT	SEQ ID NO.: 40
N27 - R	ATTGGGATCCTTGCTAGCGTTGGTCTGCCC	SEQ ID NO.: 41
N29 - F pair1	CAGTGCAACGAGTCCCACCCTTGG	SEQ ID NO.: 42
N29 - R pair1	CAAAGGGTGGGACTCGTTGCACTG	SEQ ID NO.: 43
N29 - F pair2	GACCACAAATCACTCCGATCCCAA	SEQ ID NO.: 44
N29 - R pair2	TTGGGATCGGAGTGATTGTGGTC	SEQ ID NO.: 45
N30 - F	GTCCCCACCAACACCTCTCTAGTCCTC	SEQ ID NO.: 46
N30 - R	GAGGACTAGAGAGGTGTTGGTGGGGAC	SEQ ID NO.: 47
N31 - 3' R	CCCGTCGACTCACTTCAGAAGCCCAGAGCCAGT	SEQ ID NO.: 48
N36(1) - F	GAAAACCCAGAACGAGACCACCAAGGCACAG	SEQ ID NO.: 49
N36(1) - R	CTGTGCCTTGGTGGTCTCGTTCTGGGTTTTTC	SEQ ID NO.: 50
N36(2) - F	CACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAG	SEQ ID NO.: 51
N36(2) - R	CTCCCAGAATGTCCTGTGCCTTGGTG	SEQ ID NO.: 52
N37 - F	GAAAACCCAGATGAACGAGACCAAGGCACAG	SEQ ID NO.: 53
N37 - R	CTGTGCCTTGGTCTCGTTCATCTGGGTTTTTC	SEQ ID NO.: 54
N38 - F	GTCCCCACCAACACCACTCTAGTCCTC	SEQ ID NO.: 55
N38 - R	GAGGACTAGAGTGGTGTGGTGGGGAC	SEQ ID NO.: 56

F = 正向

R = 反向

构建体引入一个新的糖基化位点分两步连续进行。第一步用 4 个不同的寡核苷酸进行两个反应。这些寡核苷酸包括一个 5'正向引物、一个反向诱变引物、一个正向诱变引物（通常与反向诱变引物互补）和一个反向 3'引物。反向 3'引物含有终止密码子和 Sall 限制酶切位点的序列。

- 5 终止密码子在 175、184、192 和 200 位引入。因此，可获得长度为 1 - 174、1 - 183（N16）、1 - 191（N17）和 1 - 199（N31）的形式。PCR1 使用模板 DNA（含有 mpl 配体 1 - 174 序列或全长 mpl 配体 1 - 332 序列的 pDSR α 2）、5'正向引物和反向诱变引物。PCR2 使用模板 DNA、3'反向引物和正向诱变引物。然后进行两个 PCR 反应，
10 扩增的 DNA 片段通过琼脂糖凝胶电泳分离。含有合适大小的 DNA 片段的琼脂糖小块由凝胶中切下。

来自 PCR1 和 PCR2 的 DNA 片段合并在一起，用 5'正向引物和 3'反向引物进行第 3 个 PCR 反应。因而，扩增出含有插入所需突变的 mpl 配体的全长 DNA 片段。

- 15 扩增的片段再通过琼脂糖凝胶电泳分离，合适大小的 DNA 片段用 GeneClean™试剂盒纯化，所用方法由生产商提供（Bio 101, Inc.）。纯化的 DNA 以 XbaI 和 Sall 消化，然后再以 GeneClean™试剂盒纯化。该片段连接到 XbaI 和 Sall 切下的 pDSR α 2 上。连接的 DNA 在载体 tRNA 存在下以含 0.3M NaOAc（pH 5.2）的 2 倍体积乙醇沉淀并转化大肠杆菌。
20 采用限制酶切分析和琼脂糖凝胶电泳对克隆进行检测，以鉴别出含有合适大小的 DNA 插入片段的克隆。然后制备纯化的质粒 DNA，对 mpl 配体插入片段进行测序，以证实存在所需的突变并确信没有引入额外的氨基酸变化。

- 在有些情况下，同时存在两个或多个突变，可参见 N29、N33、
25 N34、N35、N39 和 N40。这可以通过向已含有一个改变的 DNA 引入一个新的置换而完成。例如，N33 是通过向 N15 引入 N23 的改变而获得的。在这种情况下，用 N23 诱变引物和 N15 模板 DNA 重复上述过程即可。

- 另一种方案可向模板 DNA 中同时引入两个改变。模板 DNA 可含有
30 天然序列或编码已含有改变的 mpl 配体的序列。在此情况下，步骤 1 包括 3 个 PCR 反应和 6 个寡核苷酸。这些寡核苷酸包括一个 5'正向引物、

2 对正向和反向诱变引物和一个反向 3'引物。每对引物彼此互补并且含有预设的引入一个新的糖基化位点的序列。

PCR1 包括模板 DNA、5'正向引物和第 1 对中的反向诱变引物。
PCR2 包括模板 DNA、第 1 对中的正向诱变引物和第 2 对中的反向诱变
5 引物。其中第 2 对引物位于第 1 对引物的 3'位。PCR3 包括模板 DNA、第 2 对中的正向诱变引物和反向 3'引物。

每一 PCR 反应的 DNA 片段按前述方法用琼脂糖凝胶电泳分离并切出胶块。然后将 3 个 DNA 片段合并在一起,再用 5'正向和 3'反向引物进行 PCR 扩增。

10 按前述方法纯化编码完整目的基因并含有两个新的糖基化位点的序列的 DNA 片段, XbaI 和 SalI 进行酶切,并将其连接到 XbaI 和 SalI 切开的 pDSR α 2 上。

用已含有突变的模板进行 PCR 反应也可合并多个突变。例如,向 N15 模板 DNA 中引入 N36 和 N38 的变化获得 N39。这可通过使用不同
15 于 N36 (N36 (1)) 引物的一套引物 (N36 (2)) 而完成。参见前面列出的引物。两套引物都引入相同的突变。

也可产生较长的 mpl 配体形式。因而,可以类似于 N39 的方式产生 N40, 不同之处在于 PCR3 的 3'反向引物 (步骤 1) 和步骤 2 中的 PCR 引物为用来产生 N31 的引物。这一引物在 200 位引入了一个终止密码子,
20 其下游为一个 SalI 限制位点。除此之外,用于 PCR3 的模板 DNA 含有编码全长 mpl 配体 (1 - 332) 的序列。

典型 PCR 反应混合物包括: 正向和反向引物 (5pm/ μ l) 各 4 μ l、1 μ l 模板 (50ng)、10 μ l 5 $\times$ LP 缓冲液 (100mM N - 三 (羟甲基) 甲基甘氨酸) pH 8.7 / 25 % 甘油 / 425mM KOAc)、10 μ l dNTP 贮存
25 液 (dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 1mM)、0.8 μ l rtTh 聚合酶 (Perkin Elmer; 2.5U/ μ l) 和 2 μ l Vent 聚合酶 (NEB; 0.01 U/ μ l, 以 1 $\times$ LP 缓冲液 1 : 100 新鲜稀释的溶液)。加水使终体积为 50 μ l。各成分按所列顺序加入,第 1 循环温度升至 60 $^{\circ}$ C 以上时,加入 1 μ l 50mM MgOAc 启动 PCR。反应条件为: 前 2 个循环: 94 $^{\circ}$ C, 10 秒/45 $^{\circ}$ C, 1
30 分钟/68 $^{\circ}$ C, 5 分钟;再进行 25 个循环: 94 $^{\circ}$ C, 10 秒/55 $^{\circ}$ C, 1 分钟/68 $^{\circ}$ C, 5 分钟。

这些通用程序用来构建表 6 中所列的 mpl 配体类似物和截短物 N16 到 N40。各种形式的 DNA 序列变化也已列出。

表 6

有 N - 型碳水化合物链加入位点的 MPL 配体类似物

5

类似物/ 种类序号	氨基酸置换	序列变化
N16	(1-183); Thr ¹⁸⁴ →Gly ³³² 缺失	ACA→TGA (stop codon)
N17	(1-191); Thr ¹⁹² →Gly ³³² 缺失	ACT→TAA (stop codon)
N18	His ²³ , Arg ²⁵ →Asn ²³ , Ser ²⁵	CAC, AGA→AAC, AGC
N19	Thr ³⁷ , Pro ³⁸ , Val ³⁹ → Asn ³⁷ , Gly ³⁸ , Ser ³⁹	ACA, CCT, GTC →AAC, GGT, TCC
N20	Val ³⁹ , Leu ⁴¹ →Asn ³⁹ , Ser ⁴¹	GTC, CTG→AAC, TCG
N21	Gln ⁵⁴ , Glu ⁵⁶ →Asn ⁵⁴ , Ser ⁵⁶	CAG, GAG→AAT, TCG
N22	Lys ⁵² , Gln ⁵⁴ →Asn ⁵² , Thr ⁵⁴	AAA, CAG→AAC, ACG
N23	Glu ⁵⁷ →Asn ^{55'(i)} , Thr ⁵⁷	GAG→AAC(i), ACG
N24	Glu ⁵⁷ , Lys ⁵⁹ →Asn ⁵⁷ , Ser ⁵⁹	GAG, AAG→AAC, TCG
N25	Leu ⁸¹ , Pro ⁸³ →Asn ⁸¹ , Thr ⁸³	CTG, CCC→AAC, ACC
N26	Thr ¹¹⁸ , Ala ¹²⁰ →Asn ¹¹⁸ , Ser ¹²⁰	ACC, GCT→AAC, TCT
N27	Thr ¹¹⁹ , His ¹²¹ →Asn ¹¹⁹ , Ser ¹²¹	ACA, CAC→AAC, AGC
N29	Pro ³⁰ , Val ³² , Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² → Asn ³⁰ , Ser ³² , Asn ¹²⁰ , Ser ¹²²	CCA, GTT, GCT, AAG→ AAC, TCC, AAT, TCC
N30	Ser ¹⁶³ , Arg ¹⁶⁴ →Thr ¹⁶³ , Asn ¹⁶⁴	AGC, AGA→ACC, AAC

	N31	(1-199); Trp ²⁰⁰ →Gly ³³² 缺失	TGG→TGA (stop codon)
5	N33	Pro ³⁰ , Val ³² , Glu ⁵⁷ , Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² → Asn ³⁰ , Thr ³² , Asn ^{55'(i)} , Thr ⁵⁷ Asn ¹²⁰ , Thr ¹²²	CCA, GTT, GAG, GCT, AAG → AAC, TCC, AAC(i), ACG, AAT, TCC
10	N34	Pro ³⁰ , Val ³² , Glu ⁵⁷ , Ser ¹⁶³ , Arg ¹⁶⁴ → Asn ³⁰ , Thr ³² , Asn ^{55'(i)} , Thr ⁵⁷ , Thr ¹⁶³ , Asn ¹⁶⁴	CCA, GTT, GAG, AGC, AGA → AAC, TCC, AAC(i), ACG, ACC, AAC
	N35	N4+N23+N30+N31 (1-199)	- -
	N36	Met ⁵⁵ , Glu ⁵⁷ →Asn ⁵⁵ , Thr ⁵⁷	ATG, GAG→AAC, ACC
15	N37	Glu ⁵⁶ →Asn ⁵⁶	GAG→AAC
	N38	Ser ¹⁶³ , Arg ¹⁶⁴ , Ser ¹⁶⁶ →Thr ¹⁶³ , Asn ¹⁶⁴ , Thr ¹⁶⁶	AGC, AGA, TCT →ACC, AAC, ACT
20	N39	N4+N10+N36+N38 (1-174)	- -
	N40	N4+N10+N36+N38+N31 (1-199)	- -

上表中“(i)”表示插入的氨基酸。例如, Glu⁵⁷→Asn^{55'(i)}, Thr⁵⁷ (表6中的类似物23)表示57位的Glu被Thr取代,并且,除此之外,还有一个Asn插入55位Met和56位之间。Asn编号为55'以使后面的氨基酸保留它们原来的编号。

包括前面实施例中所有变化的实例以“+”连接特定的类似物序号来表示。见类似物N35、N39和N40。这些类似物的氨基酸链长度在括号中标出。因而,类似物N35包含了类似物N4、N24、N30和N31中产生的所有变化。N31中标出的改变表示类似物N35长为199个氨基酸。表6中所有类似物长度均为174个氨基酸,只有已标明不同长度的是例外(或当有氨基酸插入时总长度会增加所插入的氨基酸数)。

实施例 15

Mpl 配体类似物和截短物 N16 到 N40 的鉴定

A. mpl 配体类似物的表达水平和体外生物活性的测定

- 5 N16 到 N40 采用电穿孔法（实施例 5）或 CaPO_4 法（哺乳动物细胞转染试剂盒；特制培养基）转染 COS 细胞。3 - 4 天后收集无细胞条件培养基，分装成小份，在 -70°C 保存。按实施例 7 所述采用 ELISA 检测法测定表达水平。按改进的实施例 9 的检测法检测上清的生物活性。但对例 9 中方法进行一点改进。以纯化的 CHO 细胞表达的 mpl 配体 1 - 332 为标准物制备的标准曲线计算活性。
- 10 所得结果列于表 7。由表 7 可见，大多数 mpl 配体类似物有表达和分泌。某些类似物似乎分泌有所增加。对这些样品的生物检测表明大多数样品的特异活性与未修饰的形式相当。某些类似物含有多个 N - 型碳水化合物链（见下文）。这表明碳水化合物的加入会导致类似物的分泌增加，而体外活性正常。

表 7

	Mpl 配体形式 (氨基酸长度)	序列	N-型链的 数目	Elisa (ng/ml)	体外活性 (单位/ml)	特异活性 (单位/ng)
			(a)	(b)	(c)	(d)
5	N1 (174)	天然的	0	28	3991	143
	N15 (174)	N30T32N120T122	0-2	45	7003	156
	N16 (183)	1-183	0	85	9276	NA
	N17 (191)	1-191	NA	<0.3	11	NA
	N18 (174)	N23S25	0	2	5	2.5
	N19 (174)	N37G38S39	NA	<0.3	NA	NA
10	N20 (174)	N39S41	NA	<0.3	<10	NA
	N21 (174)	N54S56	0-1	30	4380	146
	N22 (174)	N52T54	0-1	2	856	428
	N23 (174)	N55'(i)T57	1	11	1059	96
	N24 (174)	N57S59	0	5.3	458	86
	N25 (174)	N81T83	NA	0.22	123	559
	N26 (174)	N118S120	NA	0.9	96	106
	N27 (174)	N119S121	0	4.5	338	75
15	N29 (174)	N30S32N120S122	0-2	15	1627	108
	N30 (174)	T163N164	0-1	128	15592	122
	N31 (199)	1-199	至少 1	156	19000	122
	N33 (174)	4+10+23	3	78	10057	129
	N34 (174)	4+23+30	至少 2	112	13536	120
	N35 (199)	34 +31	4 或 4 以上	172	13112	76
	N36 (174)	N55T57	0-1	48	5808	121
	N37 (174)	N56	1	32	4504	141
	N38 (174)	T163N164T166	0-1	25	3904	156
20	N39 (174)	N4+N10+N36+N38	3 到 4	127	17661	139
	N40 (199)	N4+N10+N36+N38+N31	至少 5	134	19735	147

注意

(a) 加入的 N - 型链的数目根据类似物多肽在 SDS 凝胶中的运动性来估计。

(b) COS 细胞上清中的 mpl 配体类似物的量通过 EIA 测定。

(c) 通过测定依赖 mpl 配体生长的 32D - MPL 细胞的增殖来确定体外活性。

(d) 增殖检测法测得的 mpl 配体类似物的体外活性与 mpl 配体 ELISA 测得的 mpl 配体类似物的量的比率。

i - 插入

NA: 未得到

B. 碳水化合物加入的测定。

使用实施例 6 中所述方法对表 6 中列出的类似物进行检测以确定其中是否有 N - 型碳水化合物加入。

也用改进的方法对某些类似物 (N21、 N22、 N30、 N33 和 N36) 进行检测。这是必要的, 因为用来进行 Western 印迹的单克隆抗体是用包括氨基酸残基 47 到 62 的一种肽而产生的, 表 6 中所列的某些类似物 (如 N21) 含有某些置换, 因而影响它们与此抗体的免疫反应活性。因此, 为分析这些类似物, 用大肠杆菌细胞表达的 mpl 配体 1 - 163 产生的小鼠单克隆抗体免疫沉淀上清。

一般用 15 μ g 抗体免疫沉淀 50ng mpl 配体类似物。按实施例 6 所述方法对免疫沉淀物进行 Western 印迹, 但免疫沉淀带的显色是以免抗 mpl 配体多克隆抗体 (通常为 1 μ g/ml; 用大肠杆菌细胞表达的 mpl 配体 1 - 163 产生) 和抗兔 ECL 试剂盒 (Amersham) 与印迹物一起温育。各种试验的结果见表 7。一些类似物的大小增加, 表明存在 N - 型碳水化合物 (N21、 N22、 N23、 N29、 N30、 N31、 N33、 N34、 N35、 N36、 N38、 N39 和 N40)。这些类似物中有一些有不止 1 个 N - 型链, 如 N29、 N33、 N34、 N35、 N39 和 N40。这些类似物以正常或更高的水平分泌, 它们的体外生物活性与 mpl 配体 1 - 174 相当。这表明多功能 N - 型糖基化位点可以被引入 mpl 配体而对其表达或生物活性没有不利影响。

为证实 mpl 配体上可加入多个寡糖链, COS 细胞中表达的各种类似物按实施例 6 中所述方法进行 Western 印迹分析。图 12 表明随着加入的 N - 型糖基化位点的增加, 类似物的运动性下降。图中有 4 个新位点的类似物为 N39 和 N40。N - 型位点最多的类似物运动最慢。这一结果在 1 - 174 和 1 - 199 形式的 mpl 配体中均可见到。这表明至少 4 个类似物可以合并在一起, 产生有多个 N - 型碳水化合物链的新类似物。

实施例 16

含 Asn - X - Ser 的糖基化位点与含

Asn - X - Thr 的糖基化位点的比较

N - 型糖基化位点包括 Asn - X - Thr 或 Asn - X - Ser, 其中 X 可为除 Pro 之外的 20 种天然氨基酸中的任何一种。我们想确定第三位是优选

Ser 还是 Thr。因此, 对两套均含有 mpl 配体糖基化类似物、sequon 的第 3 位分别为 Ser 或 Thr 的类似物进行了测定以确定是否影响 N - 型糖基化位点的占有百分率。N15 含有 2 个 Asn - X - Thr 位点, 而 N29 在同一位置含有 2 个 Asn - X - Ser。同样, N30 含有一个 Asn - X - Ser, 而
5 N38 在同一位置含有 Asn - X - Thr。

为了比较这两套类似物, 让它们在 COS 细胞中进行表达, 分泌的 mpl 配体进行 Western 分析, 方法同实施例 6 中所述。图 13 列出了这些结果。与 N29 相比, N15 中糖基化 mpl 配体的比例显著增加。相反, 对 N30 和 N38 进行比较时, 糖基化和未糖基化的 mpl 配体的比例相差甚小。
10 这些结果表明 Asn - X - Ser 和 Asn - X - Thr 均可引入 mpl 配体并且它们均可作为 N - 型碳水化合物加入位点。除此之外, 某些情况下优选 Asn - X - Thr sequon (即它可以更有效地进行糖基化)。

尽管本发明以优选实施方案的方式进行了叙述, 但并不受公开的实施方案的限制, 相反, 本发明意在包括所附权利要求的精神和范围之内
15 的各种改进和等效的方案, 本发明的范围根据最广义的解释来确定, 以使其覆盖所有改进和等效的方案。

序列表

(1) 一般信息:

- (i) 申请人: Elliott, Steven G.
- (ii) 发明名称: MPL 配体类似物
- 5 (iii) 序列数: 56
- (iv) 通信地址:
- (A) 联系人: AMGEN INC
- (B) 街道: 1840 Dehavilland Drive
- (C) 城市: Thousand Oaks
- 10 (D) 州: CA
- (E) 国家: USA
- (F) 邮政编码: 91320 - 1789
- (v) 计算机可读形式:
- (A) 介质类型: 软盘
- 15 (B) 计算机: IBM PC 兼容
- (C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS
- (D) 软件: PatentIn Release #1.0, 版本 #1.30
- (vi) 本申请数据:
- (A) 申请号:
- 20 (B) 申请日:
- (C) 分类号:

(2) SEQ ID NO: 1 信息

(i) 序列特征

- (A) 长度: 1342 碱基对
- 25 (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: cDNA

(ix) 特征:

- 30 (A) 名称/键: CDS
- (B) 位置: 36 .. 1094

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 信号肽

(B) 位置: 1..98

(ix) 特征:

5

(A) 名称/键: 成熟肽

(B) 位置: 99..1094

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 1:

CAGGGAGCCA CGCCAGCCAA GACACCCCGG CCAGA ATG GAG CTG ACT GAA TTG	53
Met Glu Leu Thr Glu Leu	
-21 -20	
CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA AGG CTA ACG CTG TCC AGC	101
Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser	
15 -10 -5 1	
CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT	149
Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg	
5 10 15	
GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC	197
Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His	
20 25 30	
CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA	245
Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly	
35 40 45	
GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA	293
Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly	
50 55 60 65	
GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG	341
Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu	
70 75 80	
GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC	389
Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val	
85 90 95	
CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT	437
Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro	
100 105 110	
CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG	485
Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu	
115 120 125	
AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG CTT GTA	533
Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val	
130 135 140 145	
GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA GCT GTC	581
Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val	
150 155 160	

CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC CTC ACA CTG AAC GAG CTC CCA AAC AGG Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro Asn Arg 165 170 175	629
ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC TTC ACT GCC TCA GCC AGA ACT ACT Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr Thr 180 185 190	677
GGC TCT GGG CTT CTG AAG TGG CAG CAG GGA TTC AGA GCC AAG ATT CCT Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys Ile Pro 195 200 205	725
GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTG GAC CAA ATC CCC GGA TAC Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly Tyr 210 215 220 225	773
CTG AAC AGG ATA CAC GAA CTC TTG AAT GGA ACT CGT GGA CTC TTT CCT Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe Pro 230 235 240	821
GGA CCC TCA CGC AGG ACC CTA GGA GCC CCG GAC ATT TCC TCA GGA ACA Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly Thr 2 250 255	869
TCA GAC ACA GGC TCC CTG CCA CCC AAC CTC CAG CCT GGA TAT TCT CCT Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser Pro 260 265 270	917
TCC CCA ACC CAT CCT CCT ACT GGA CAG TAT ACG CTC TTC CCT CTT CCA Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu Pro 275 280 285	965
CCC ACC TTG CCC ACC CCT GTG GTC CAG CTC CAC CCC CTG CTT CCT GAC Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro Asp 290 295 300 305	1013
CCT TCT GCT CCA ACG CCC ACC CCT ACC AGC CCT CTT CTA AAC ACA TCC Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr Ser 310 315 320	1061
TAC ACC CAC TCC CAG AAT CTG TCT CAG GAA GGG TAAGGTTCTC AGACACTGCC Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly 325 330	1114
GACATCAGCA TTGTCTCGTG TACAGCTCCC TTCCCTGCAG GGCGCCCCTG GGAGACAACT	1174
GGACAAGATT TCCTACTTTC TCCTGAAACC CAAAGCCCTG GTAAAAGGGA TACACAGGAC	1234
TGAAAAGGGA ATCATTTTTTC ACTGTACATT ATAAACCTTC AGAAGCTATT TTTTAAAGCT	1294
ATCAGCAATA CTCATCAGAG CAGCTAGCTC TTTGGTCTAT TTTCTGCA	1342

(2) SEQ ID NO: 2 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 353 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 2:

```

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala
-21 -20                               -15                -10

Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val
 5                               1                   5                10

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser
                15                               20                25

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala
                30                               35                40

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys
 45                               50                55

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
 60                               65                70                75

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly
                80                               85                90

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu
                95                               100               105

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp
 110                               115               120

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val
 125                               130               135

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala
 140                               145               150               155

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu
                160                               165               170

Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr
                175                               180               185

Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly
 190                               195               200

```

Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu
 205 210 215
 Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly
 220 225 230 235
 Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro
 240 245 250
 5 Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu
 255 260 265
 Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr
 270 275 280
 Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu
 285 290 295
 10 His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser
 300 305 310 315
 Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu
 320 325 330
 Gly

15 (2) SEQ ID NO: 3 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 600 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

20 (D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: cDNA

(ix) 特征:

(A) 名称/键: CDS

(B) 位置: 12..596

25 (ix) 特征:

(A) 名称/键: 信号肽

(B) 位置: 12..74

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 成熟肽

30 (B) 位置: 75..96

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 3:

TCTAGACCAC C ATG GAG CTG ACT GAA TTG CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Val Val Met Leu Leu -21 -20 -15 -10	50
CTA ACT GCA AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp 5 1 5	98
CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAC GTC CTT CAC AGC Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser 10 15 20	146
AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu 25 30 35 40	194
CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu 45 50 55	242
GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu 60 65 70	290
GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser 75 80 85	338
CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu 90 95 100	386
CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala 105 110 115 120	434
CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg 125 130 135	482
GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val 140 145 150	530
AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA GCT GTC CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val 155 160 165	578
CTC ACA CTG AAC GAG CTC TAGG Leu Thr Leu Asn Glu Leu 170	600

(2) SEQ ID NO: 4 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 195 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5 (D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 4:

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala
-21 -20 -15 -10

Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val
5 1 5 10

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser
15 20 25

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala
30 35 40

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys
45 50 55

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
60 65 70 75

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly
80 85 90

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu
95 100 105

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp
110 115 120

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val
125 130 135

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala
140 145 150 155

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu
160 165 170

Asn Glu Leu

(2) SEQ ID NO: 5 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 22 碱基对

(B) 类型: 核酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 5:

10 CCCATGTCAA TCACAGCAGA CT

22

(2) SEQ ID NO: 6 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 22 碱基对

15 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

20 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 6:

CTTCACAGCA ACCTGAGCCA GT

22

(2) SEQ ID NO: 7 信息

(i) 序列特征

25 (A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

30 (A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 7:

CAGTGCAACG AGACCCACCC TTTG

24

- (2) SEQ ID NO: 8 信息
- (i) 序列特征
- 5 (A) 长度: 25 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑形状: 线状
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- 10 (A) 表述: /desc = “核酸”
- (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 8:

GCCTACAAAT GTCACGCTGC CTGCT

25

- (2) SEQ ID NO: 9 信息
- 15 (i) 序列特征
- (A) 长度: 21 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑形状: 线状
- 20 (ii) 分子类型: 其它核酸
- (A) 表述: /desc = “核酸”
- (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 9:

CCCACCTTGTA ACTCATCCCT C

21

- 25 (2) SEQ ID NO: 10 信息
- (i) 序列特征
- (A) 长度: 24 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- 30 (D) 拓扑形状: 线状
- (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 10:

CAACTGAACG CCACTTGTCT CTCA

24

5 (2) SEQ ID NO: 11 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 26 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 11:

ACTTGTCTCA ACTCCACCCT GGGGGA

25

15

(2) SEQ ID NO: 12 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 21 碱基对

(B) 类型: 核酸

20 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 12:

25

CTCCTGGGGA ACCTTTCTGG A

21

(2) SEQ ID NO: 13 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 25 碱基对

30 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 13:

5 GACCACAAAT CACACCGATC CCAAT

25

(2) SEQ ID NO: 14 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 32 碱基对

10 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

15 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 14:

ACCCCTTTGTC TACAAATGTC ACGCTGCCTG CT

32

(2) SEQ ID NO: 15 信息

(i) 序列特征

20 (A) 长度: 25 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

25 (A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 15:

TCTCTCAAAC CTCACGGGGG AGCTT

25

(2) SEQ ID NO: 16 信息

30 (i) 序列特征

(A) 长度: 23 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

5 (A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 16:

TGGAAAAATC AGACGGAGGA GAC

23

(2) SEQ ID NO: 17 信息

10 (i) 序列特征

(A) 长度: 25 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

15 (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 17:

TGGAGGAGAA CAAGACACAG GACAT

25

20 (2) SEQ ID NO: 18 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 38 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

25 (D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 18:

CCCTCTAGAC CACCATGGAA CTGACTGAAT TGCTCCTC

38

30

(2) SEQ ID NO: 19 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 28 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

5 (D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

10 (B) 位置: 互补 (1 .. 28)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 19:

GTGTGACTTG CTCGAGACTC AGCTGCTC

28

(2) SEQ ID NO: 20 信息

15 (i) 序列特征

(A) 长度: 29 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

20 (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1 .. 29)

25 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 20:

GAAGACCTAA CAACCTCACT CAGCTGCCC

29

(2) SEQ ID NO: 21 信息

(i) 序列特征

30 (A) 长度: 29 碱基对

(B) 类型: 核酸

- (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑形状: 线状
 (ii) 分子类型: 其它核酸
 (A) 表述: /desc = “核酸”
- 5 (ix) 特征:
 (A) 名称/键: -
 (B) 位置: 互补 (1..29)
 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 21:
- AGTGACGGAG TCGGTCTATT CAGCTGCCC** 29
- 10 (2) SEQ ID NO: 22 信息
 (i) 序列特征
 (A) 长度: 29 碱基对
 (B) 类型: 核酸
 15 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑形状: 线状
 (ii) 分子类型: 其它核酸
 (A) 表述: /desc = “核酸”
 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 22:
- 20 **CACGTCCTTA ACAGCAGCCT GAGCCAGTG** 29
- (2) SEQ ID NO: 23 信息
 (i) 序列特征
 (A) 长度: 29 碱基对
 25 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑形状: 线状
 (ii) 分子类型: 其它核酸
 (A) 表述: /desc = “核酸”
- 30 (ix) 特征:
 (A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1 .. 29)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 23:

GTGCAGGAAT TGTCGTCGGA CTCGGTCAC

29

5 (2) SEQ ID NO: 24 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 33 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 24:

CCCTTTGCCT AACGGTCCCC TGCTGCCTGC TGT

33

15

(2) SEQ ID NO: 25 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 33 碱基对

(B) 类型: 核酸

20 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

25 (A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1 .. 33)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 25:

GGGAAATCGA TTGCCAAGGG ACGACGGACG ACA

33

30 (2) SEQ ID NO: 26 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

5 (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 26:

TGCCTACACC TAACCTGTCG CCTGCTGTGG A

31

10 (2) SEQ ID NO: 27 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

15 (D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

20 (B) 位置: 互补 (1..31)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 27:

ACGGATGTGG ATTGGACAGC GGACGACACC T

31

(2) SEQ ID NO: 28 信息

25 (i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

30 (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 28:

GGAAAACCAA TATGTCGGAG ACCAAGGCAC A

31

(2) SEQ ID NO: 29 信息

5 (i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

10 (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1..31)

15 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 29:

CCTTTTGGTT ATACAGCCTC TGGTTCCGTG T

31

(2) SEQ ID NO: 30 信息

20 (i) 序列特征

(A) 长度: 32 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

25 (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 30:

TGGGAGAATG GAACACCACG ATGGAGGAGA CC

32

30 (2) SEQ ID NO: 31 信息

(i) 序列特征

- (A) 长度: 32 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑形状: 线状
- 5 (ii) 分子类型: 其它核酸
 - (A) 表述: /desc = “核酸”
- (ix) 特征:
 - (A) 名称/键: -
 - (B) 位置: 互补 (1..32)
- 10 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 31:

ACCCTCTTAC CTTGTGGTGC TACCTCCTCT GG

32

- (2) SEQ ID NO: 32 信息
 - (i) 序列特征
 - 15 (A) 长度: 32 碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑形状: 线状
 - (ii) 分子类型: 其它核酸
 - 20 (A) 表述: /desc = “核酸”
 - (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 32:

AAAACCCAGA TGAACGAGAC GACCAAGGCA CA

32

- 4 (2) SEQ ID NO: 33 信息
 - 25 (i) 序列特征
 - (A) 长度: 32 碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑形状: 线状
 - (ii) 分子类型: 其它核酸
 - 30 (A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1..32)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 33:

5 TTTTGGGTCT ACTTGCTCTG CTGGTTCCGT GT 32

(2) SEQ ID NO: 34 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基对

10 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

15 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 34:

CCCAGATGGA GAACACCTCG GCACAGGACA T 31

(2) SEQ ID NO: 35 信息

(i) 序列特征

20 (A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

25 (A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1..31)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 35:

30 GGGTCTACCT CTTGTGGAGC CGTGTCTGT A 31

(2) SEQ ID NO: 36 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 32 碱基对

(B) 类型: 核酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 36:

10 CACGGGGACA AAACGGAACC ACTTGCCTCT CA

32

(2) SEQ ID NO: 37 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 32 碱基对

15 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

20 (ix) 特征:

(A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1..32)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 37:

25 GTGCCCCTGT TTTGCCTTGG TGAACGGAGA GT

32

(2) SEQ ID NO: 38 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

30 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 38:

CAGGGCAGGA ACACATCTCA CAAGGATCCC A

31

5

(2) SEQ ID NO: 39 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

10

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

15

(A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1..31)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 39:

GTCCCGTCCT TGTGTAGAGT GTTCCTAGGG T

31

20 (2) SEQ ID NO: 40 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

25

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 40:

GGGCAGGACC AACGCTAGCA AGGATCCCAA T

31

30

(2) SEQ ID NO: 41 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

5 (D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

10 (B) 位置: 互补 (1..31)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 41:

CCCGTCCTGG TTGCGATCGT TCCTAGGGTT A

31

(2) SEQ ID NO: 42 信息

15 (i) 序列特征

(A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

20 (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 42:

CAGTGCAACG AGTCCCACCC TTGG

24

25 (2) SEQ ID NO: 43 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

30 (D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1..24)

5 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 43:

GTCACGTTGC TCAGGGTGGG AAAC

24

(2) SEQ ID NO: 44 信息

(i) 序列特征

10 (A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

15 (A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 44:

GACCACAAAT CACTCCGATC CCAA

24

(2) SEQ ID NO: 45 信息

20 (i) 序列特征

(A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

25 (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1..24)

30 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 45:

CTGGTGTTTA GTGAGGCTAG GGTT

24

(2) SEQ ID NO: 46 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 27 碱基对

(B) 类型: 核酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 46:

10 GTCCCCACCA ACACCTCTCT AGTCCTC

27

(2) SEQ ID NO: 47 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 27 碱基对

15 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

20 (ix) 特征:

(A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1..27)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 47:

25 CAGGGGTGGT TGTGGAGAGA TCAGGAG

27

(2) SEQ ID NO: 48 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 33 碱基对

(B) 类型: 核酸

30 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

5 (B) 位置: 互补 (1..33)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 48:

TGACCGAGAC CCGAAGACTT CACTCAGCTG CCC

33

(2) SEQ ID NO: 49 信息

10 (i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

15 (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 49:

GAAAACCCAG AACGAGACCTA CCAAGGCACA G

31

20 (2) SEQ ID NO: 50 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

25 (D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

30 (B) 位置: 互补 (1..31)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 50:

CTTTTGGGTC TTGCTCTGGT GGTTCCTGT C

31

(2) SEQ ID NO: 51 信息

(i) 序列特征

5 (A) 长度: 26 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

10 (A) 表述: /desc = “核酸”

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 51:

CACCAAGGCA CAGGACATTC TGGGAG

26

(2) SEQ ID NO: 52 信息

15 (i) 序列特征

(A) 长度: 26 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

20 (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1..26)

25 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 52:

GTGGTTCCGT GTCCTGTAAG ACCCTC

26

(2) SEQ ID NO: 53 信息

(i) 序列特征

30 (A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

5 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 53:

GAAAACCCAG ATGAACGAGA CCAAGGCACA G

31

(2) SEQ ID NO: 54 信息

(i) 序列特征

10 (A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

15 (A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1..31)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 54:

20 CTTTGGGTC TACTTGCTCT GGTTCCTGT C

31

(2) SEQ ID NO: 55 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 27 碱基对

25 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

30 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 55:

GTCCCCACCA ACACCACTCT AGTCCTC

27

(2) SEQ ID NO: 56 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 27 碱基对

(B) 类型: 核酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑形状: 线状

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 表述: /desc = “核酸”

(ix) 特征:

10 (A) 名称/键: -

(B) 位置: 互补 (1..27)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 56:

CAGGGGTGGT TGTGGTGAGA TCAGGAG

27

1 -21	CAGGGAGCCACGCCAGCCAAGACACCCCGCCAGAAATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTC MetGluLeuThrGluLeuLeuLeu	53 -14
70 -13	GTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCGCTTGT ValValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCys	119 7
120 8	GACCTCCGAGTCCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCCATGTCCCTTCACAGCAGACTGAGC AspLeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSer	179 27
180 28	CAGTGCCCCAGAGGTTACCCCTTTGCCCTACACCTGTCCCTGCTGCCCTGTGGACTTTAGC GlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSer	239 47
240 48	TTGGGAGAAATGGAAACCCAGATGGAGAGACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAGCAGTG LeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaVal	299 67
300 68	ACCCTTCTGCTGGAGGAGTGATGGCAGCACGGGACAACTGGGACCCACTTGCCTCTCA ThrLeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSer	359 87
360 88	TCCCTCCTGGGGCAGCTTTCTGGACAGGTCCGTCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTC SerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeu	419 107

图.1A

420	CTTGAAACCCAGCTTCCTCACAGGGCAGGACCACAGCTCACAAAGGATCCCAATGCCATCC	479
108	LeuGlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIle	127
480	TTCCCTGAGCTTCCAACACACCTGCTCCGAGGAAAGGTGCGTTTCCTGATGCTGTAGGAGGG	539
128	PheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysValArgPheLeuMetLeuValGlyGly	147
540	TCCACCCCTCTGCGTCAGGCGGGCCCCACCCACACAGCTGTCCCCAGCAGAACTCTCTA	599
148	SerThrLeuCysValArgArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeu	167
600	GTCCTCACACTGAACGAGCTCCCAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCACT	659
168	ValLeuThrLeuAsnGluLeuProAsnArgThrSerGlyLeuGluThrAsnPheThr	187
660	GCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGGATTCAGAGCCAAG	719
188	AlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLys	207
720	ATTCCTGGTCTGTGAACCAACCTCCAGGTCCCCTGGACCAAAATCCCCGGATACCTGAAC	779
208	IleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsn	227
780	AGGATACACGAACTCTTGAATGGAACTCGTGGACTCTTTCCTGGACCCCTCACGCAGGACC	839
228	ArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThrArgGlyLeuPheProGlyProSerArgArgThr	247

图.1B

840	CTAGGAGCCCCGGACATTTCCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCAAACCTC	899
248	LeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeu	267
900	CAGCCTGGATAATTCTCCTTCCCCAACCCATCCTCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCT	959
268	GlnProGlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPhePro	287
960	CTTCCACCCACCTTGCCCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCTGCTTCCTGACCCCTTCT	1019
288	LeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeuProAspProSer	307
1020	GCTCCAAACGCCCTTACCAGCCCTCTTCTTAAACACATCCTACACCCACTCCCAGAAAT	1079
308	AlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsn	327
1080	CTGTCTCAGGAAGGTAAGGTTCTCAGACACTGCCGACATCAGCATTTGTCTCGTGACAG	1139
329	LeuSerGlnGlyEnd	
1140	CTCCCTTCCCTGCAGGGCGCCCTGGGAGACAACTGGACAAAGATTTCCCTACTTTCTCCTG	1199
1200	AAACCCAAAGCCCTGGTAAAGGGATACACAGGACTGAAAAGGGAATCATTTTTCACCTGT	1259
1260	ACATTATAAACCTTCAGAAAGCTATTTTTTTAAAGCTATCAGCAATACTCATCAGAGCAGCT	1319
1320	AGCTCTTTGGTCTATTTTCTGCA	1342

图.1C

10 30 50
TCTAGACCACCATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAA
M E L T E L L L V V M L L L T A R

70 90 110
GGCTAACGCTGTCCAGCCCGGCTCCTGCTGTGACCTCCGAGTCCTCAGTAAACTGC
L T L S S P A P P A C D L R V L S K L L

130 150 170
TTCGTGACTCCCACGTCCTTCACAGCAGACTGAGCCAGTGCCCGAGAGGTTACCCCTTGC
R D S H V L H S R L S Q C P E V H P L P

190 210 230
CTACACCTGTCCCTGCTGCCCTGCTGGACTTTAGCTTGGGAGAATGGAAAACCCAGATGG
T P V L L P A V D F S L G E W K T Q M E

250 270 290
AGGAGACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAGCAGTGACCCCTTCTGCTGGAGGGAGTGATGG
E T K A Q D I L G A V T' L L L E G V M A

图.2A

310	330	350
CAGCAGGGGACAACTGGGACCCACTTGCCTCTCATCCCTCCTGGGGCAGCTTCTTGAC		
A R G Q L G P T C L S S L L G Q L S G Q		
370	390	410
AGTCCGTCTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTCCTTGAACCCAGCTTCCTCCACAGG		
V R L L L G A L Q S L L G T Q L P P Q G		
430	450	470
GCAGGACCACAGCTCACAAGGATCCCAATGCCATCTTCCTGAGCTTCCAACACCTGCTCC		
R T T A H K D P N A I F L S F Q H L L R		
490	510	530
GAGGAAAGGTGCGTTTCCTGATGCTTGAGAGGGTCCACCCCTCTGCGTCAGGCGGGCCC		
G K V R F L M L V G G S T L C V R R A P		
550	570	590
CACCCACCACAGCTGTCCCCCAGCAGAACCTCTCTAGTCCTCACACTGAACGAGCTCTAGG		
P T T A V P S R T S L V L T L N E L *		

TCGAC

图.2B

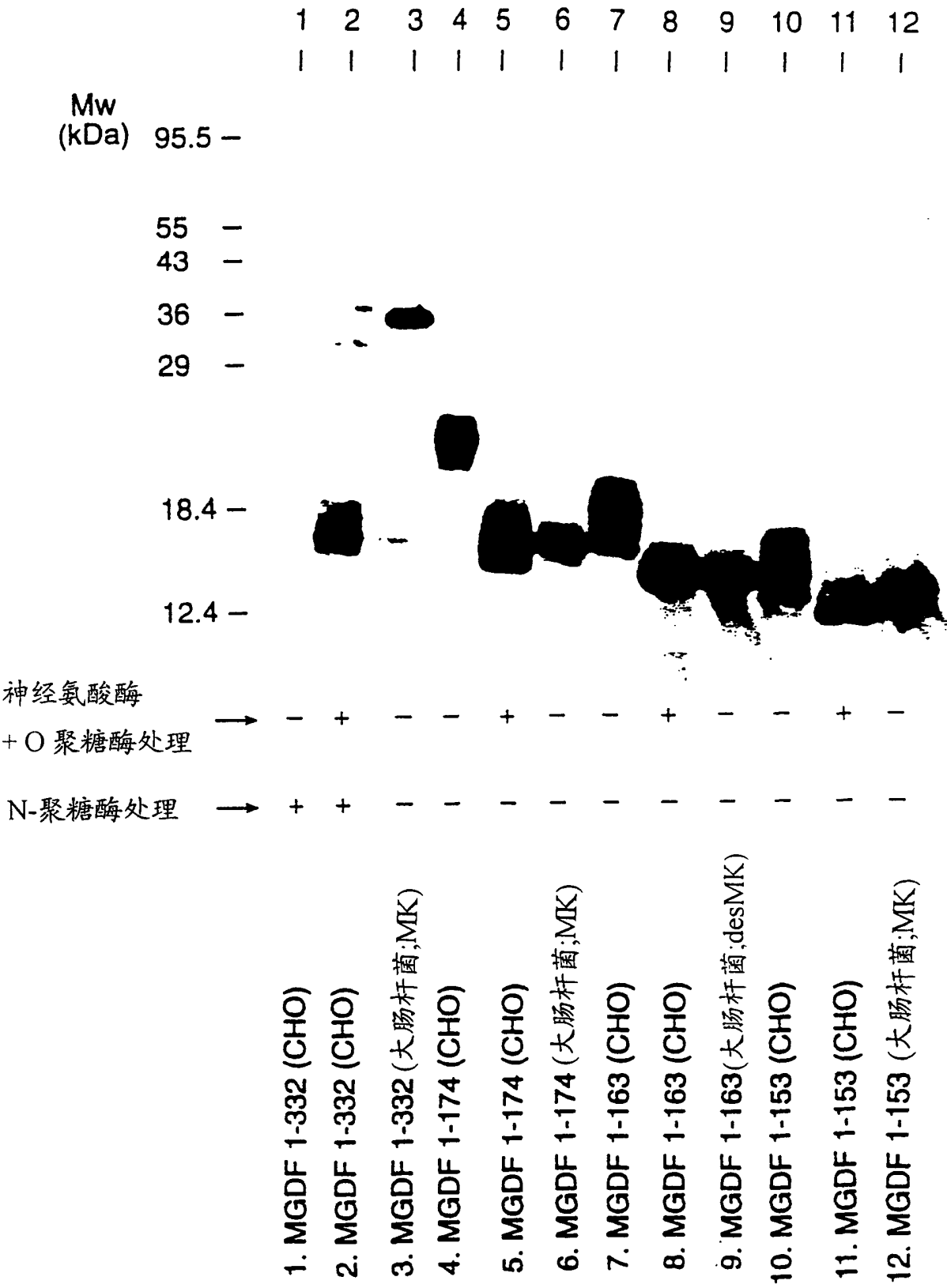
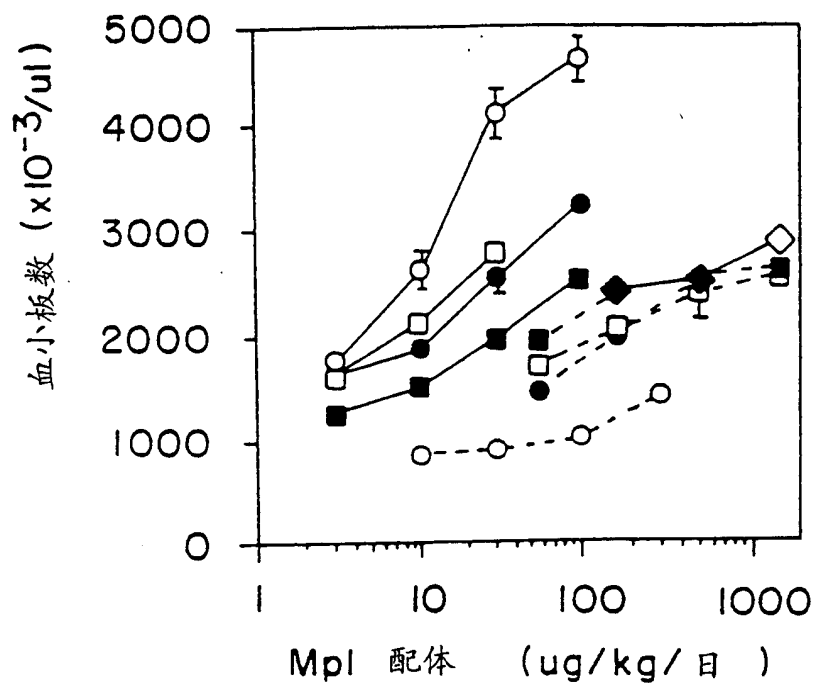


图 3

图 . 4



—○— CHO 332

—●— CHO 174

—□— CHO 163

—■— CHO 153

--○-- (coli) MK 332

--●-- (coli) MK 174

--□-- (coli) MK 163

--■-- (coli) MK 153

—◇— (coli) desMK 163

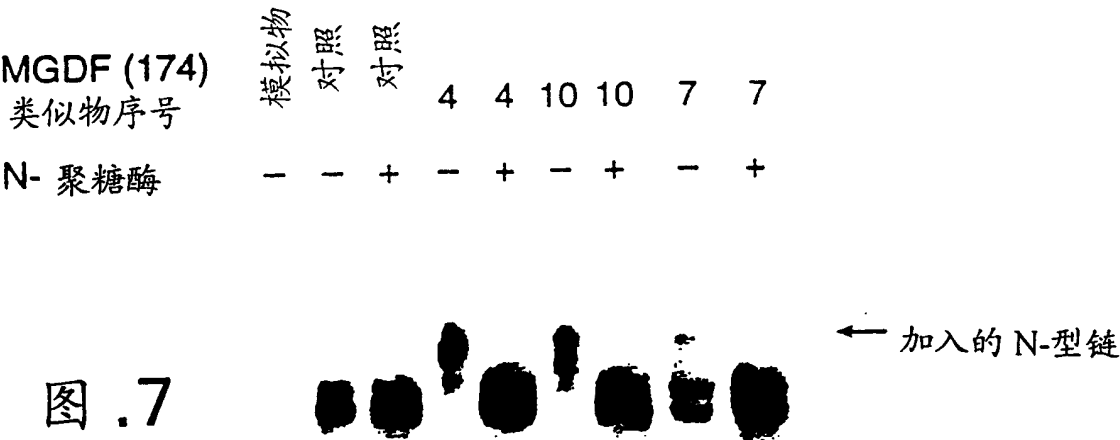
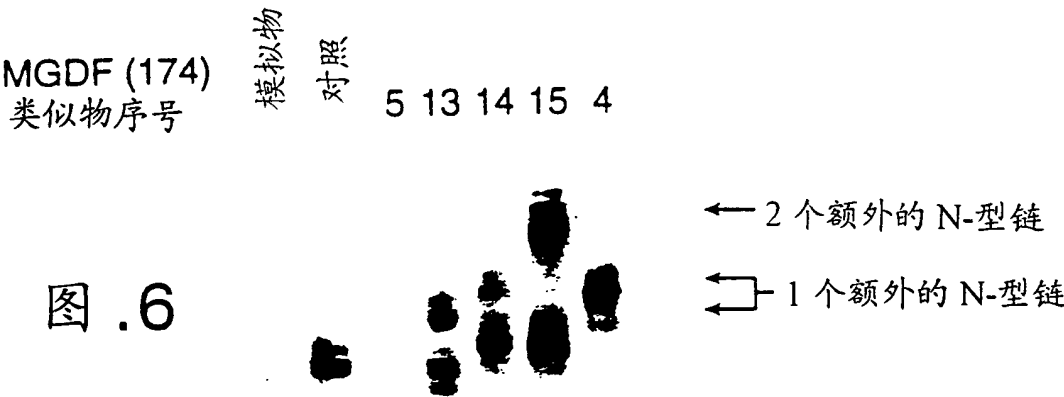
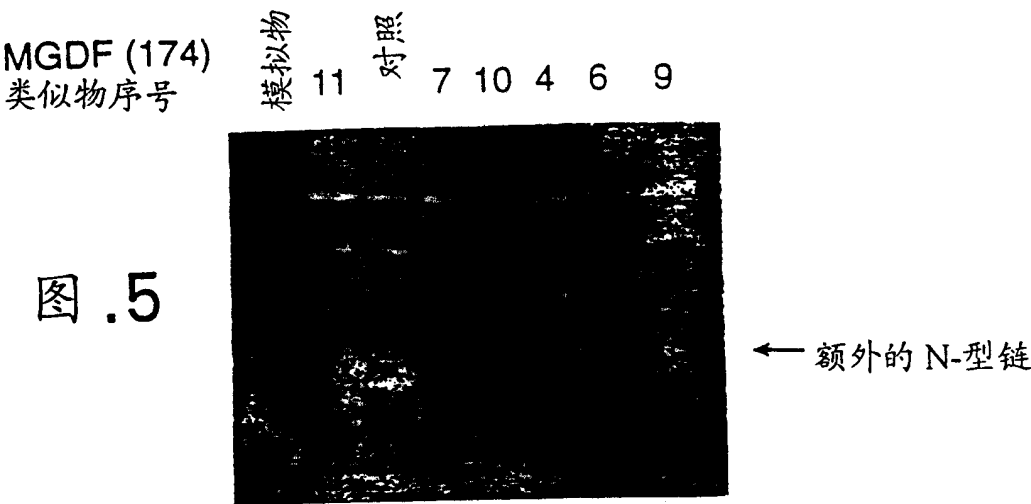
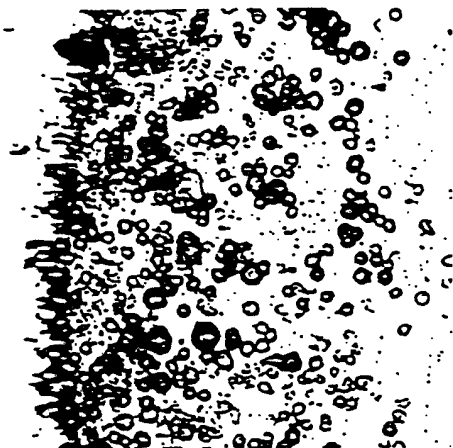
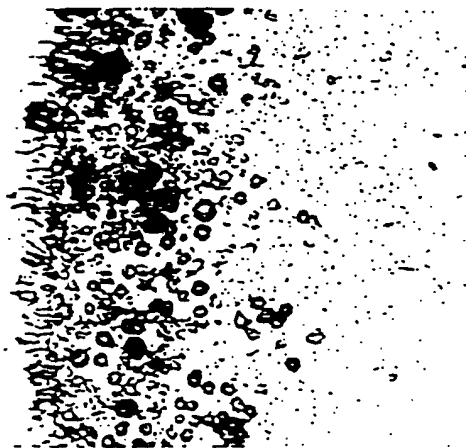


图 .8A

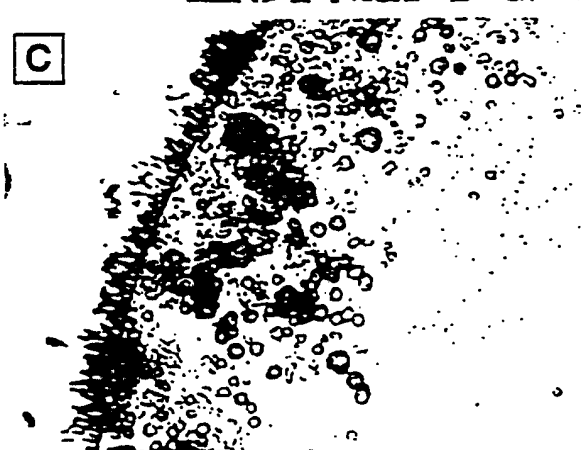
A



B



C



D

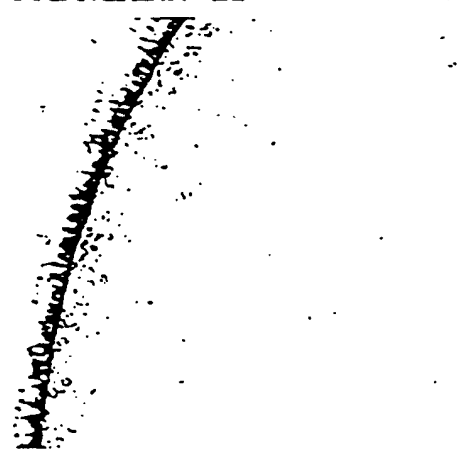


图 .8C

图 .8D

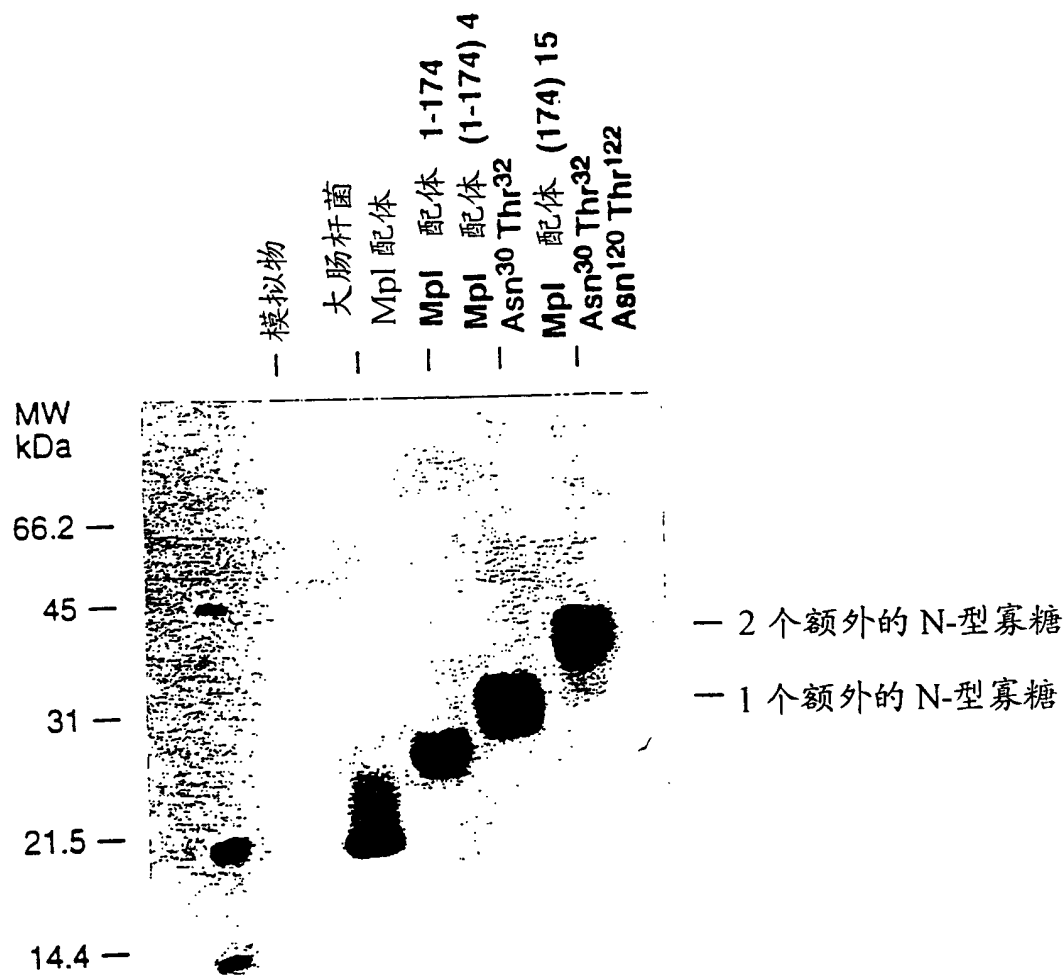


图.9

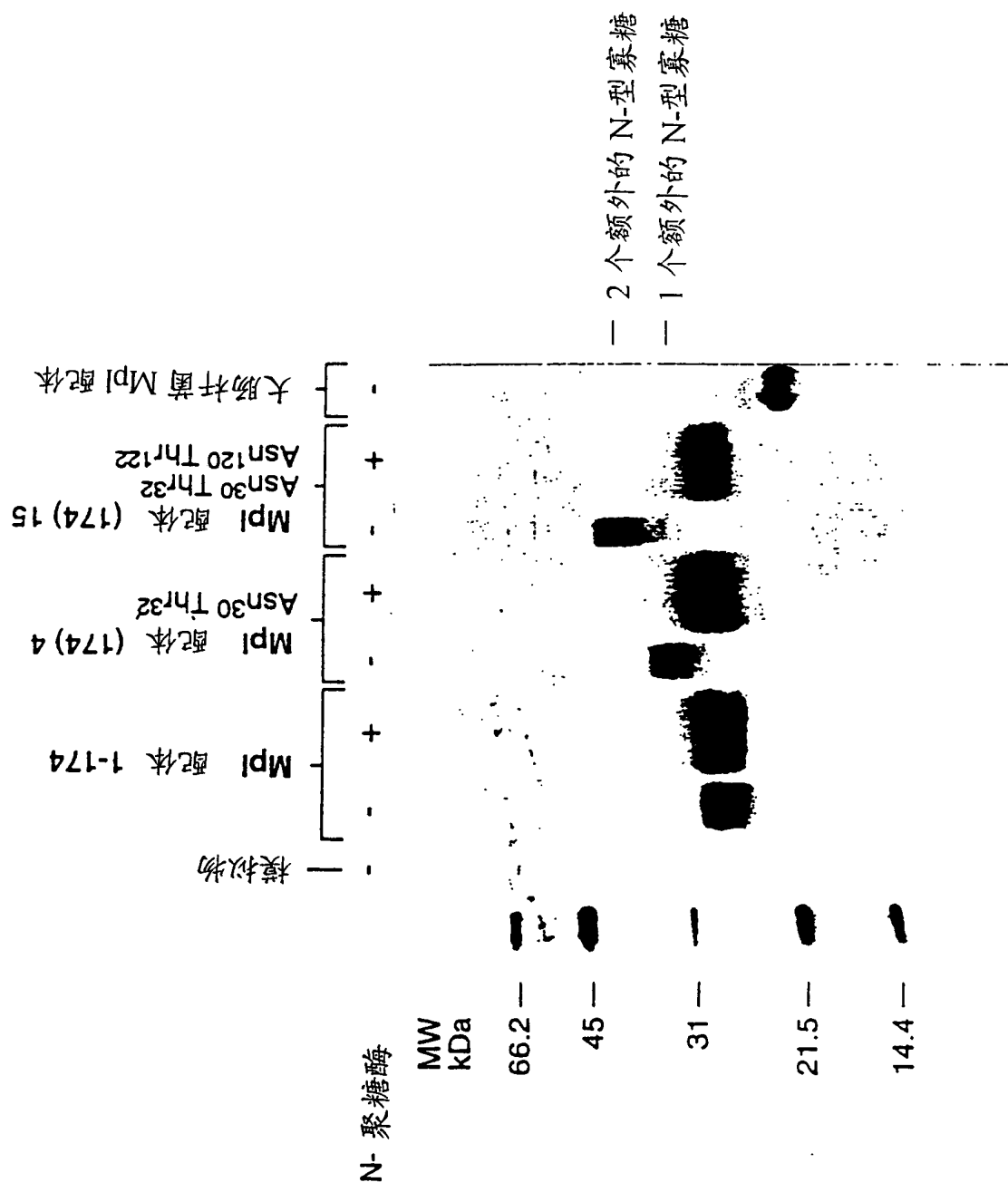
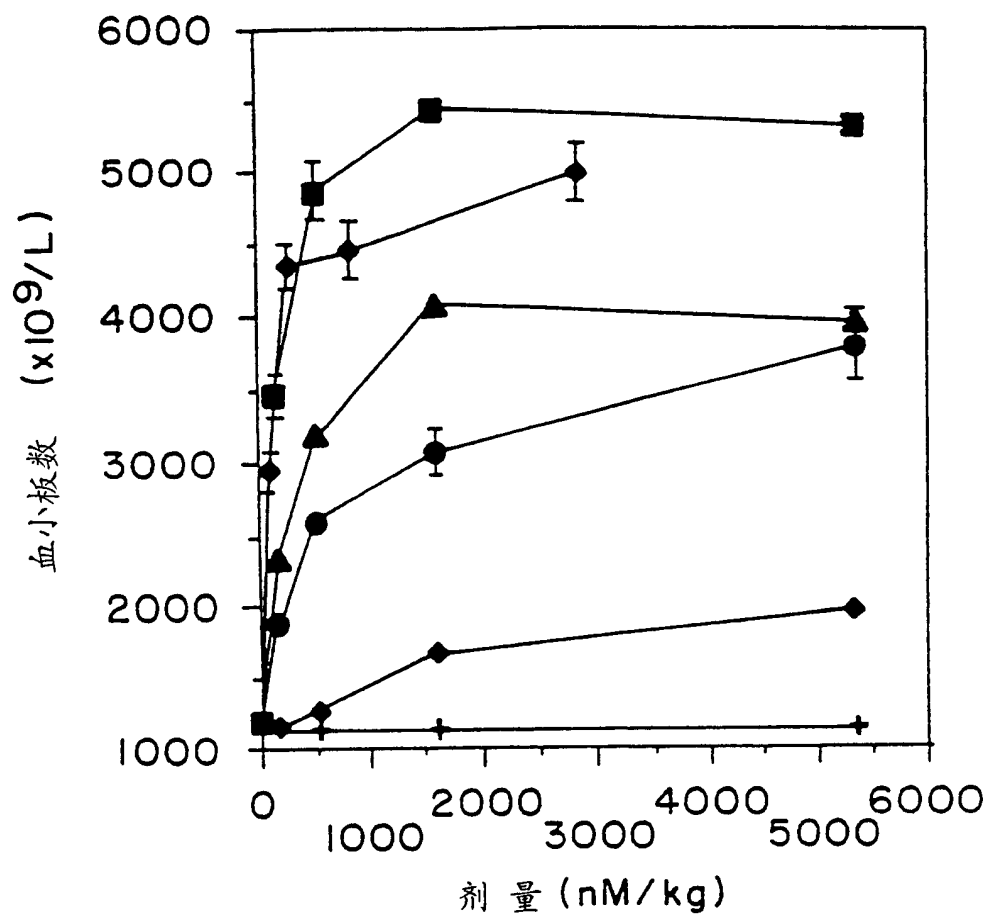


图.10

图.11



- 5. CHO-174-15
- ◆— 2. CHO-1-332
- ▲— 4. CHO-174-4
- 3. CHO 1-174
- ◆— 6. 大肠杆菌Mk 1-174
- +— 1. 载体

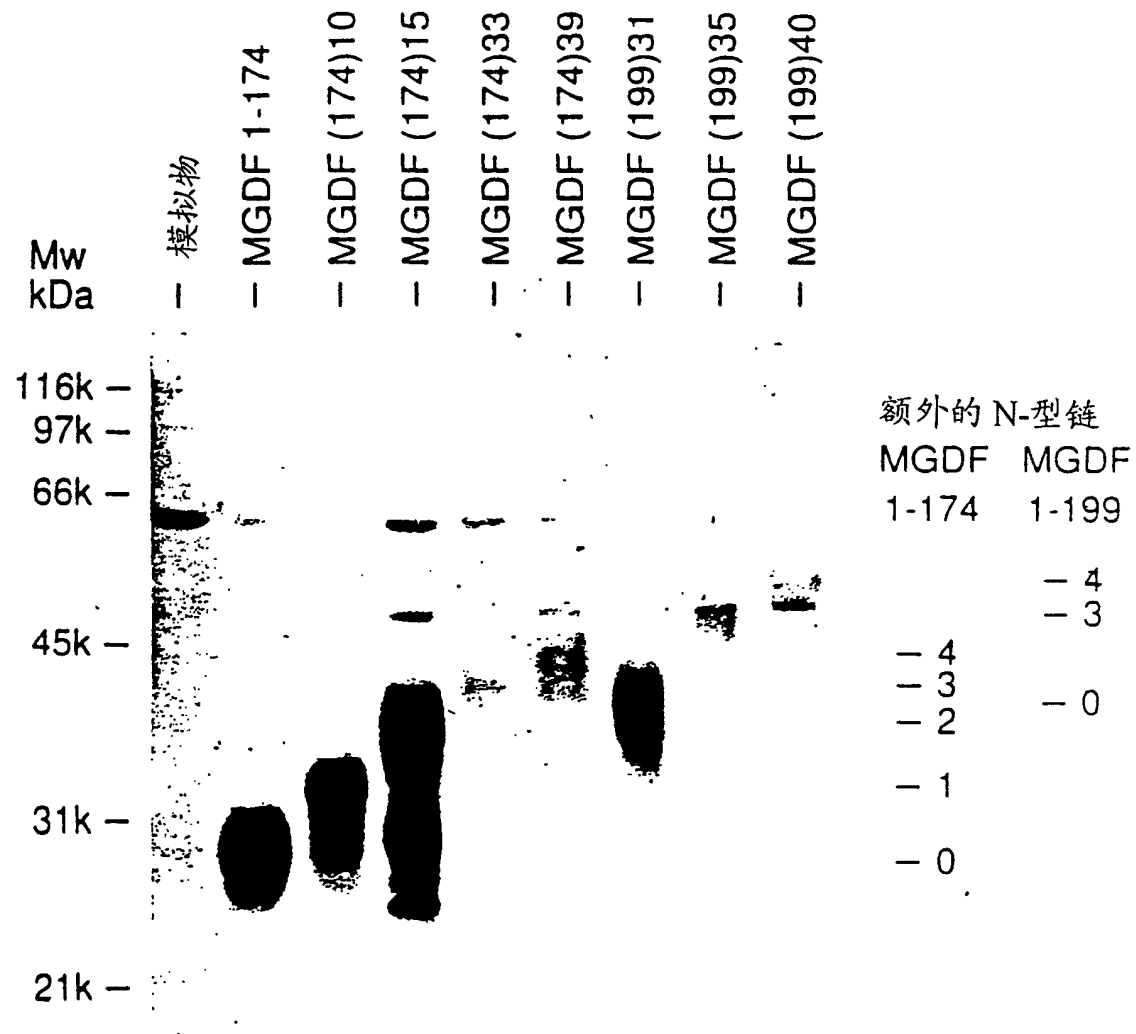


图.12

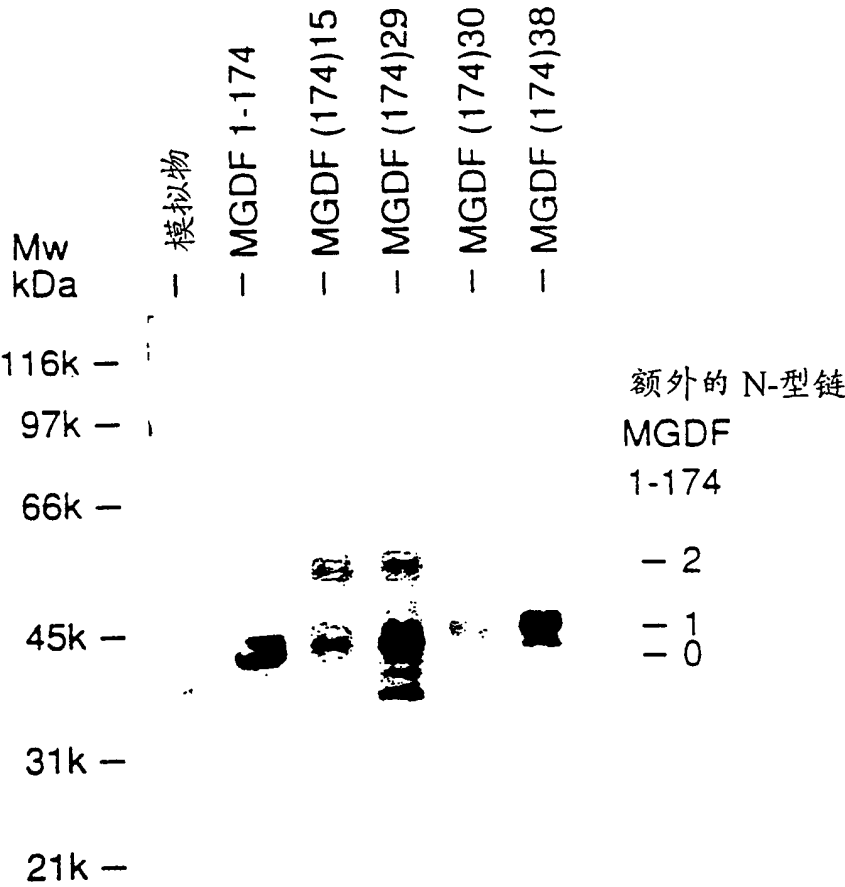


图 .13