



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 92114889.5

[51] Int.Cl⁵

C12P 21/00

[43] 公开日 1993 年 11 月 17 日

[22] 申请日 92.11.14

[30] 优先权

[32] 91.11.14 [33] US [31] 792,492

[71] 申请人 里珍纳龙药品有限公司

地址 美国纽约州

共同申请人 安姆根有限公司

[72] 发明人 S·P·施奎因托 N·叶 D·吉斯

G·D·扬科普洛斯

S·-F·S·胡

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 汪 洋

C12P 19/30 C12N 15/18

C12N 15/63

说明书页数: 34

附图页数: 28

[54] 发明名称 用杂合前原区域表达神经营养性因子

[57] 摘要

本发明涉及含有神经营养性因子的前原蛋白或前原肽,以及用上述前体和它们的核酸序列生产有一种或多种促神经营养性激素生物活性的蛋白或肽。本发明提供的嵌合前原分子含有与促神经营养性激素序列或其生物活性部分或其衍生物融合的杂合前原区域。根据本发明可以使用的成熟促神经营养性激素序列是包括但不限于 NGF、BDNF、NT-3 和 NT-4 的同源分子的 NGF / BDNF 家庭成员。相似地,可以从包括但不限于 NGF、BDNF、NT-3 和 NT-4 的 NGF / BDNF 家族的那些促神经营养性激素分子中得到前原区域。

<02>

权 利 要 求 书

1、一种嵌合前原蛋白或前原肽，含有（a）第一种促神经营养性激素的前原区；和（b）基本上等于第二种促神经营养性激素成熟形式的氨基酸序列，其中，第一和第二种促神经营养性激素是不同的。

2、一种嵌合前原蛋白或前原肽，含有（a）第一种促神经营养性激素的前原区；和（b）基本上等于第二种促神经营养性激素的部分成熟形式的生物活性氨基酸序列，其中，第一和第二种促神经营养性激素是不同的。

3、根据权利要求1的嵌合前原蛋白，其中第一和第二种促神经营养性激素选自神经生长因子，脑衍生的神经营养性因子，和促神经营养性激素-3。

4、根据权利要求2的嵌合前原蛋白，其中第一和第二种促神经营养性激素选自神经生长因子，脑衍生的神经营养性因子，和促神经营养性激素-3。

5、根据权利要求1的嵌合前原蛋白或前原肽，其中，前原区是神经生长因子的长前原区。

6、根据权利要求2的嵌合前原蛋白或前原肽，其中，前原区是神经生长因子的长前原区。

7、根据权利要求1的嵌合前原蛋白或前原肽，其中，前原区是神经生长因子的短前原区。

8、根据权利要求2的嵌合前原蛋白或前原肽，其中，前原区是神经生长因子的短前原区。

9、根据权利要求1的嵌合前原蛋白或前原肽，其中，第一种

促神经营养性激素是促神经营养性激素-3。

10、根据权利要求2的嵌合前原蛋白或前原肽，其中，第一种促神经营养性激素是促神经营养性激素-3。

11、根据权利要求1的嵌合前原蛋白或前原肽，其中，第一种促神经营养性激素是脑衍生的神经营养性因子。

12、根据权利要求2的嵌合前原蛋白或前原肽，其中，第一种促神经营养性激素是脑衍生的神经营养性因子。

13、根据权利要求5或6的嵌合前原蛋白或前原肽，其中，第二种促神经营养性激素是脑衍生的神经营养性因子。

14、根据权利要求7或8的嵌合前原蛋白或前原肽，其中，第二种促神经营养性激素是脑衍生的神经营养性因子。

15、根据权利要求9或10的嵌合前原蛋白或前原肽，其中，第二种促神经营养性激素是脑衍生的神经营养性因子。

16、一种核酸分子，含有编码权利要求1嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

17、一种核酸分子，含有编码权利要求2嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

18、一种核酸分子，含有编码权利要求3嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

19、一种核酸分子，含有编码权利要求4嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

20、一种核酸分子，含有编码权利要求5嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

21、一种核酸分子，含有编码权利要求6嵌合前原蛋白或前原

肽的核苷酸序列。

2 2、一种核酸分子，含有编码权利要求 7 嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

2 3、一种核酸分子，含有编码权利要求 8 嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

2 4、一种核酸分子，含有编码权利要求 9 嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

2 5、一种核酸分子，含有编码权利要求 1 0 嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

2 6、一种核酸分子，含有编码权利要求 1 1 嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

2 7、一种核酸分子，含有编码权利要求 1 2 嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

2 8、一种核酸分子，含有编码权利要求 1 3 嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

2 9、一种核酸分子，含有编码权利要求 1 4 嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

3 0、一种核酸分子，含有编码权利要求 1 5 嵌合前原蛋白或前原肽的核苷酸序列。

3 1、根据权利要求 1 6 或 1 7 的核酸分子，它是一个载体。

3 2、根据权利要求 1 8 或 1 9 的核酸分子，它是一个载体。

3 3、一种含权利要求 3 1 的载体的重组细胞。

3 4、一种含权利要求 3 2 的载体的重组细胞。

3 5、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达

并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素成熟形式的条件下，使含权利要求 1 的核酸分子的重组细胞生长。

3 6、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素部分成熟形式的条件下，使含权利要求 2 的核酸分子的重组细胞生长。

3 7、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素成熟形式的条件下，使含权利要求 3 的核酸分子的重组细胞生长。

3 8、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素部分成熟形式的条件下，使含权利要求 4 的核酸分子的重组细胞生长。

3 9、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素成熟形式的条件下，使含权利要求 5 的核酸分子的重组细胞生长。

4 0、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素部分成熟形式的条件下，使含权利要求 6 的核酸分子的重组细胞生长。

4 1、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素成熟形式的条件下，使含权利要求 6 的核酸分子的重组细胞生长。

4 2、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素部分成熟形式的条件下，使含权利要求 8 的核酸分子的重组细胞生长。

4 3、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达

并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素成熟形式的条件下，使含权利要求 9 的核酸分子的重组细胞生长。

4 4、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素部分成熟形式的条件下，使含权利要求 1 0 的核酸分子的重组细胞生长。

4 5、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素成熟形式的条件下，使含权利要求 1 1 的核酸分子的重组细胞生长。

4 6、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素部分成熟形式的条件下，使含权利要求 1 2 的核酸分子的重组细胞生长。

4 7、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素成熟形式的条件下，使含权利要求 1 3 的核酸分子的重组细胞生长。

4 8、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素成熟形式的条件下，使含权利要求 1 4 的核酸分子的重组细胞生长。

4 9、一种生产促神经营养性激素的方法，包括在允许细胞表达并加工嵌合前原蛋白或肽以生产第二种促神经营养性激素成熟形式的条件下，使含权利要求 1 5 的核酸分子的重组细胞生长。

5 0、根据权利要求 3 5 或 3 6 的方法，其中生产的第二种促神经营养性激素的成熟形式或其部分能够表现出神经营养性活性。

用杂合前原区域表达神经营养性因子

本发明涉及在真核宿主细胞中构建并表达作为生物活性神经营养性因子的新的嵌合前原蛋白或前原肽。实质上，本发明是基于发现嵌合前原蛋白或前原肽经有效的翻译后加工后，导致有生物活性的第二种神经营养性因子蛋白的表达水平提高，所述的嵌合前原蛋白或前原肽含有与第二种，不同神经营养性因子的成熟蛋白或其部分融合的第一种神经营养因子的前原区。

神经系统的发育和维持依赖于已知称之为神经营养性因子的蛋白。神经营养性因子是一种细胞激活素，一种作为信使并与其他细胞相联系持续地协调和调节生物学功能。神经营养性因子促进神经系统组分的存活和/或分化。普遍的神经细胞死亡伴随着中枢和外周神经系统的正常发育，并在调节可突出到指定靶区域的神经元的数量中起明显的作用 (Berg, D.K., 1982, Neuronal Development 297-331)。对发育期间外周靶组的部分切除和移植研究已经表明，为了限制在它们的突出区域产生的存活因子（神经营养性因子）的数量，在神经元之间的竞争引起神经细胞的死亡。目前鉴定的重要的神经营养性因子包括神经生长因子 (NGF; Levi-Montalcini and Angeletti, 1968, Phys. Rev. 48:534); 促神经营养性激素-3 (NT-3; Hohn et al., 1990, Nature 344:339; Maisonpierre et al., 1990, science 247:1446), 脑衍生的神经营养性因子 (BDNF; Barde et al., 1982, EMBO J., 1:549), 促神经营养性激素-4 (NT-4; Hallbook et al.,

1991, *Neuron* 6:845-858), 和纤毛神经营养性因子 (CNTF; Lin et al., 1979, *Science*. 246:1023)。

在体内, 通常合成作为“前原”前体蛋白质的促神经营养性激素。“前原”区域是指前体的 NH_2 -末端, 在蛋白质的成熟的, 生物活性形式的生物合成中, 经蛋白水解作用除去上述末端。“前”区域是指在穿过细胞膜的过程中, 通过蛋白水解作用过程, 除去正常的信号序列以便产生一种蛋白原; 然后通过蛋白水解作用除去“原”区域以产生成熟形式的蛋白质 (参见如 Darnell et al., 1990, *Molecular Cell Biology* 2d ed., Scientific American Books pp. 650-657)。

2.1.1 神经生长因子

神经生长因子 (NGF) 是迄今为止这些神经营养性分子中特征描述最完全的, 并且在体外和体内试验已经表明, 在小鸡和大鼠的早期发育中, 神经生长因子对于交感和神经脊衍生的感受器神经元的存活是必需的 (Levi-Montalcini and Angeletti, 1963, *Develop. Biol.* 7:653-659; Levi-Montalcini et al., 1968, *Physiol. Rev.* 48:524-569)。直到最近, 对 NGF 的几乎全部的研究都集中在它在外周神经系统中的作用, 但现在发现, 在中枢神经系统中, NGF 也影响特定神经元群体的发育和维持 (Thoenen et al., 1987, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 109:145-178; Whitemore and Seiger, 1987, *Brain Res. Rev.* 12:439-464)。

在小鼠下颌腺中富含 NGF 蛋白质从而允许通过相应的传统的蛋白质化学方法 (Angeletti and Bradshaw 1971, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68:2417-2420) 确定初级氨基酸序列。使用基于由小鼠 NGF 蛋白质序列能够设计适当的寡核苷酸探针为基础的传统分子生物学术技

术, 已经从许多种, 包括鼠 (Scott et al., 1983, Nature 302:538-540), 人 (Wilrich et al., 1983, Nature 303:821-825), 牛和小鸡 (Meier et al., 1986 EMBO J. 5:1489-1493) 和大鼠 (Whitte - more et al., 1988, J. Neurosci. Res. 20:402-410) 中克隆了 NGF 基因。

小鼠 NGF 基因有约 4.5 kb, 含数个小 5' 外显子, 通过不同的拼接而产生四种不同的 mRNA (Serby et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3057-3064)。两种主要的转录产生“长”和“短”NGF 前肽原 (Edwards, et al., 1986, Nature 319:784-787; Serby, et al., 1987, Mol Cell. Biol. 7:3057-3064)。“短”前体在 NH₂ 一末端含一个位于原区域侧的传统的信号序列 (前区域)。“长”前体在其 NH₂ 一末端含一个附加的“原区域” (参见如, Suter et al., 1991, EMBO. J. 10:2395-2400, 图 1)。到此为止, 还未阐明“长”和“短”NGF 前原前体之间的功能差异。然而, 在大多数组织中。含有更丰富的较短的 mRNA 转录体 (Edwards et al., 1986, J. Biol. Chem. 263:6810-6815)。

小鼠 NGF 的生物活性形式是一个含一个二聚体的 7s 复合体, 该二聚体是 NGF 的 α -亚单位和 γ -亚单位与经过完全加工的 β -NGF 成熟形式结合, 所述的 NGF 的 α -亚单位和 γ 亚单位是丝氨酸蛋白酶的激肽释放酶家族的两个成员 (Varon et al., Biochemistry 7:1296-1303; Mason et al., 1983, Nature. 303:300-307)。NGF 前体的翻译, 加工分泌而形成 NGF 的生物活性形式已了解得很清楚。关于已报告的编码小鼠 NGF 的 cDNA 序列长度 (Scott, et al., 1983, Nature 302:538-540), Darling 等人 (1983, Cold Spring

Harbor symp. Quan. Biol. 48:427-433) 利用一个体外无细胞翻译系统鉴定在 NGF 7S 复合体的生物合成中关键的中间体。经蛋白水解处理除去前原 NFG 前体的信号序列,以便产生一个约 3.1 K D 的 NGF 原。NGF 原中间体的原区域含一对已知作为内蛋白水解加工位点的精氨酸残基。在这两个残基的任一位点上的蛋白水解加工产生一个附加的大 (2.1 K D) 和小 (1.8.5 K D) 的中间体。可以从上述中间体中的任一个经蛋白水解作用得到成熟的 NGF。在某些生物合成 NGF 成熟形式的情况下,蛋白水解释放一个 COOH-末端二肽 (arg-gly)。

已经表明,在体内 γ -亚单位蛋白水解裂解 NGF 原前体形成成熟的 NGF (Edward, et al., 1988, J. Biol. Chem. 263:6810-6815)。试图在体外模仿上述过程,但未成功,体外模仿导致不可信的 NGF 原前体的加工,这可能由于体外翻译产物的不正常折叠造成的。Silen 和 Agard (1989, Nature 341:462-464) 证明原区域可有助于 α -溶解蛋白酶前体的适当折叠。因此,NGF 前体的原区域也可能在内蛋白水解加工前需要适当的折叠,以形成成熟的形式,并连接到有生物活性的 7S NGF 复合体中。Suter 等人 (1991, EMBO J. 10: 2395-2400) 的描述支持上述假设,他们确定了在 NGF 原区域中,两个部分保守区域的功能。已证明区域 I 对于 NGF 在 COS 细胞中的表达是必需的。另外,发现定位在 NGF 原区域中,邻近成熟编码区的区域 II 参与蛋白水解加工。

最近已经证明:在体内 NGF 原的内蛋白水解加工由人类的 fur 基因产物控制,该产物是与膜相连的内蛋白酶,与编码一酵母内蛋白酶 (Bresnahan, et al., 1990, J. Cell Biol 111: 2851-2859) 的

KEXZ 基因有结构同源性。

因此，活性形式的小鼠 NGF 的生物合成起始阶段包括 NGF 基因的转录和转录产物可能的可变拼接，以便产生能够翻译长或短的 NGF 前原前体的 mRNA。长或短的前原 NGF 前体随后进行一系列的内蛋白水解加工过程，该加工过程可能是前原区域的结构特征，使前体进行适当折叠而诱导，从而形成 NGF 的成熟形式。

2.1.2 来源于脑的神经营养性因子

用猪脑为原料，Barde 等人 (1982, EMBO. J. 1: 549-553) 报告了一种因子，现称作来源于脑的神经营养性因子 (BDNF)，它表现出可促进 E10/E11 小鸡胚的脊根神经节神经元的存活。在强碱性蛋白 (等电点, pI 10.1) 中存在神经营养活性，该碱性蛋白在十二烷基磺酸钠 (SDS) 凝胶电泳中显示有一个 12.3 KD 的带。应注意到 BDNF 的强碱性和分子大小与 NGF 单体很相似。

在互补的未决美国专利申请系列号 07/400,591, 申请日 1989, 8.30 中第一次描述了完成克隆 BDNF 基因，该文献引入本文作文参考 (也可参见 PCT 国际公开 No. W091/03568, 公开日 1991, 3.21)。已对各种品种包括人、猪、大鼠和小鼠的完整的 cDNA 和/或基因组 BDNF 基因进行克隆，并测定了这些基因的序列。在 COS 细胞中完成了重组 BDNF 的表达。

BDNF 神经元特异性与 NGF 的区别的第一个证明是：在体外证明纯化的 BDNF 维持小鸡胚 E6, E9 或 E12 的 40-50 % 的与神经基板衍生的结状神经节无关的感觉神经元的存活 (Lindsay et al., 1985, J. Cell. Sci. Supp. 3:115-129)。通过其自身或与 BDNF 偶联，NGF 对这些神经元都没有明显的影响。在后来的外植体培养研究中

表明 BDNF 似乎维持来自其他神经基板衍生的感觉神经节，包括岩状神经节，膝状神经节和腹侧三叉神经节的存活和轴突生长 (Davies et al., 1986, J. Neurosci 6: 1897-1904)，没有任何一个神经节对 NGF 敏感，除影响来自外周神经节的培养的神经元外，发现 BDNF 刺激来自脊神经脊突的培养细胞的存活和神经原的分化 (Kalcheim and Gendreau, 1988, Develop, Brain Res. 41: 79-86)。

两项对 BDNF 的最新研究 (Kalcheim, et al., 1987, EMBO J. 6: 2871-2873; Hofer and Barde, 1988, Nature 311: 261-262) 已经指出在鸟类 P N S 发育中 BDNF 的生理作用。除了对神经脊和神经基板源的外周感受器神经原的影响外，已经发现 BDNF 维持正在发育的 C N S 神经元的存活，Johnson 等人 (1986, J. Neurosci 6: 3031-3938) 提供的资料说明 BDNF 可维持来自 E17 大鼠胚的视黄醛神经节培养细胞的存活。

除影响培养中正在发育的神经原的存活外，已经表明，BDNF 也影响培养的成熟的外周和中枢神经系统神经元。

分析成熟 BDNF 的预测的一级结构表明：与 N G F 有惊人的相似；仅具有 3 个引入 N G F 序列中的缺口得到最佳匹配，对于各种 N G F (从蛇到人) 和 BDNF 共有 5 1 个等同物。重要的是，这些等同物包括 6 个半胱氨酸残基。

2.1.3. 促神经营养性激素 - 3

发现了叫做促神经营养性激素 - 3 的促神经营养性激素家族的另一成员，并克隆了来自小鼠、大鼠和人中的 NT-3 基因 (参见美国专利申请系列 No. 07/490,004, 申请日: 1990.3.7, 该文献引入本文作为参考; 也参见 P C T 国际公开 No. WO91/03569, 公开日: 1991,

3,21)。发现估算的 P I 为约 9.5，有 119 个氨基酸组成的成熟小鼠 NT-3 蛋白质的一般结构与确认的 NGF 和 BDNF 的相似；一个假设的含 18 个氨基酸的信号序列（分别与 BDNF 和 NGF 有 5 和 9 个氨基酸等同物）后面跟随有含 121 个氨基酸的原序列（相当于小鼠 NGF 的 103 个氨基酸的原序列和小鼠 BDNF 的含 112 个氨基酸的原序列）。对成熟的小鼠 NGF、BDNF 和 NT-3 进行比较表明：它们有 54 个氨基酸相同。已知在 NGF 和 BDNF 中参与形成二硫键（Leibrock et al., 1989, Nature 341: 149-152; Angeletti, 1973, Biochem. 12: 100-115)的全部 6 个半胱氨酸残基在保守的残基中间。同样，成熟的大鼠 NT-3 表现出与大鼠 NGF 有 57% 的同源性，与大鼠 BDNF 有 58% 的同源性；全部 3 种蛋白质都享有 120 个残基中的 57 个（48%）。此外，发现大鼠 NGF 和 BDNF 的 6 个半胱氨酸残基在大鼠 NT-3 中是绝对保守的，并且这三种蛋白质之间的最大同源区域表现出群集在这些半胱氨酸残基周围。

除在同一种内 NT-3、NGF 和 BDNF 之间具有同源性外，在大鼠和人 NT-3 之间，编码成熟多肽（119 个氨基酸）的区域中观察到高度保守的核酸序列。推测的成熟大鼠和人的氨基酸序列（以及小鼠的 NT-3）表现出绝对相同使人联想起高度保守的 BDNF。在大鼠、小鼠、人和猪之间的成熟多肽的氨基酸序列中表现出完全相同。相反，成熟人的 NGF 和啮齿类（大鼠和小鼠）的 NGF 的氨基酸序列有约 10% 的区别。

研究 NT-3 的神经营养性活性表明 NT-3 能促进培养中的游离的背根神经节神经元的存活和轴突生长。进一步观察 NT-3 发现，NT-3 促进来自结状神经节和交感神经节外植体的轴突生长，而

BDNF 促进从结状神经节而不是交感神经节突出生长，并且 NGF 促进交感神经节而不是结状神经节外植体的突出生长。因此，NT-3 比 BDNF 或 NGF 有更宽的作用特异性。

2.1.4. 促神经营养性激素 - 4

最近已经克隆并分离了 NGF 家族的一个新成员促神经营养性激素 - 4 (Hallbook et al., 1991, Neuron 6: 845-858)。已获得了相当于爪蟾属 (Xenopus) 和蝾螈的 NT-4 基因的 PCR 片段，并随后分离了基因组爪蟾属的克隆。该克隆的核苷酸序列分析表明有一个 236 个氨基酸蛋白质的开放阅读框架，具有数个与 NGF, BDNF 和 NT-3 相似的结构特征。这些特征包括一个推测的氨基酸末端信号序列和一个靠近蛋白水解断裂位点的潜在的 N-糖基化作用位点。如 NGF, BDNF, 和 NT-3 一样，在一个外显子中编码了全部爪蟾属前 - 原 - NT-4 蛋白质。

2.2. 生产促神经营养性激素

已经试图利用各种表达型载体和宿主生产重组促神经营养性激素。

所有使用动物细胞表达系统 (哺乳动物肾细胞) 的研究中，Liebrock 等人 [Nature 341: 149 (1989)] 报道了有生物活性的猪 BDNF 的表达，且 Rosenthal 等人 [Neuron 4:767 (1990)]，Maisonpierre 等人 [Science 247: 1446 (1990)] 和 Hohn 等人 [Nature 344: 399 (1990)] 分别报道了有生物活性的各个种的 NT-3 的表达。另外，Chan 等人 [EP 公开 No. 370171, 公开日 1990.5] 报道了通过杆状病毒表达系统，用昆虫细胞表达有生物活性的成熟的人 BDNF。

就促神经营养性激素的微生物生产而论，Iwai 等人 [Chem.

Pharm. Bull. 34: 4727 (1986)] 报道了编码人 NGF 和其融合体的合成“基因”在大肠杆菌中的表达。产物唯一特征在于分子量，在用还原剂处理后，没有任何信息表明有生物活性存在。

Dicou 等人 [J. Neuroscience Res. 22: 13 (1989)] 报告了在大肠杆菌中分别表达大鼠和 hNGF 融合体。Dicou 等人 (1989, J. Neurosci. Res. 22: 13-19) 把完整的小鼠前原一神经生长因子 DNA 序列与大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因的羧基末端融合，并且把相当于人神经生长因子基因 11 到 106 密码子的基因组 DNA 片段 β -半乳糖苷酶氨基末端的第五密码子融合。两种细菌载体与表达大量的嵌合蛋白质相关。虽然细菌细胞溶解后，大多数嵌合小鼠前原一神经生长因子表现出是不溶的，但大多数人的嵌合 β -神经生长因子似乎存在于上清液中。还未报告神经营养性活性。

最后，Hu 等人 [Gene 70: 57 (1988); and Abstract 343.16 of the 20th Ann. Meeting of the Soc for Neuroscience (1990)] 报告了在大肠杆菌中表达小鼠 NGF。

本发明涉及新的含有生物活性神经营养性因子的嵌合前原蛋白质或前原肽，以及使用上述前体和它们的核酸序列生产有一种或多种促神经营养性激素生物活性的蛋白质或肽。由本发明提供的嵌合前原分子包含一个与成熟促神经营养性激素序列或其生物活性部分或其衍生物融合的杂合前原区域。根据本发明可使用的成熟促神经营养性激素序列是指包括但不限于 NGF, BDNF, NT-3 和 NT-4 的 NGF/BDNF 家族的同源分子。相似地，可以从包括但不限于 NGF, BDNF, NT-3 和 NT-4 的 NGF/BDNF 家族的那些促神经营养性激素分子中得到前原区域。本质上，本发明是基于发现：含有与脑衍生的神经营养性因子的成熟部

分融合的神经生长因子的前原区域的嵌合前原蛋白或前原肽（前原 NGF/BDNF）比同源前源脑衍生的神经营养性因子（前源 BDNF）可更有效地经真核宿主细胞加工。

本发明进一步基于发现：能表达嵌合前原 NGF/BDNF 的经稳定的转染和扩增的真核宿主细胞仅把 BDNF 的成熟形式分泌到培养基中。根据本发明，可以用 NGF 的“长”或“短”的前原区域构建嵌合的神经营养性基因。

本发明也以发现含有与脑衍生的神经营养性因子的成熟编码区融合的 NT-3 的前原区域的嵌合前原蛋白质或前原肽（前原 NT-3/BDNF）比同源前原脑衍生的神经营养性因子（前原 BDNF）可更有效地加工为基础。本发明进一步以发现表达嵌合 NT-3/BDNF 经稳定转染和扩增的真核宿主细胞仅把 BDNF 的成熟形式分泌到培养基中为基础。

本发明提供编码嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽的核酸，以及通过使用上述核酸表达这些嵌合神经营养性蛋白和肽的方法。

图 1：重组 BDNF，NGF，和嵌合前体形式的聚丙烯酰胺凝胶电泳。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳辨别用各种构建体稳定转染的代谢标记的 CHO-DG44 细胞的细胞上清液，并通过放射自显影方法观察。第 1 泳道：野生型对照 CHO-DG44 细胞，使用下列构建体：含人 NGF 基因的表达型载体 pCDM8（第 2 泳道）；短前原 BDNF 构建体（第 3 泳道）；长前原 NGF/BDNF 嵌合物构件体（第 4 泳道）；泳道 5：分子量标记物。

图 2：重组 BDNF 的生物活性。用胚（E 8）小鸡脊根神经节检测来自转染的 CHO 细胞系的粗上清液记录轴突突出物。密封的实心菱形：DGC-N/B-2.5-#23 细胞系（含长前原 NGF/BDNF 嵌合构建体）。

带点的方块：DGZ1000-B-3-2.5 细胞系（含短前原 BDNF 构建体）。

图 3：人 BDNF CDNA 序列（SEQ ID NO:1）和推导出的氨基酸序列（SEQ ID NO:2），和来自猪（SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4），大鼠（SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6）及鸡（SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8）的 DNA 序列比较。该图来自 PCT 国际公开 NO. WO 91/03568，公开日 1991.3.21。

图 4：人 NGF 的核苷酸（SEQ ID NO:9）和推导出的氨基酸（SEQ ID NO:10）序列。 -187 至 -1 表明长前原区。序列资料来自 EP 公开 121,338，公开日 1984.10.10，由 Gray 和 Ullrich 提供。

图 5：大鼠（SEQ ID NO:11）和人（SEQ ID NO:13）NT-3 基因的校对的 DNA 序列。由“PREPRO——”表明预测的翻译起始位点，用“MATURE——”表明预测的成熟 NT-3 的起始位点。成熟大鼠（SEQ ID NO:12）和人（SEQ ID NO:14）NT-3 蛋白质有相同的氨基酸序列，而它们的前原区域在下面划线的 11 位不同。该图所示来自 PCT 国际公开 NO. WO91/03569，公开日 1991,3,21。

图 6：在 NT-3/BDNF 嵌合构建体中使用的 DNA 片段 3（SEQ ID NO:15 和 16），它们相当于 NT-3 前原区的 35 个氨基酸（SEQ ID NO:17）。

图 7：Western 印迹分析来自 CHO 细胞的限制性培养基，CHO 细胞表达原始的前原 BDNF（第 2 - 11 泳道）或嵌合前原 NT-3/BDNF（第 12 - 19 泳道）第 1 泳道是用 450ng 纯化的成熟人 BDNF 载样。第 20 泳道是用来自 BRL 的预染色的低分子量标记物载样。第 8 泳道和第 16 泳道代表来自每个转染体的非生产克隆。

本发明涉及新的含生物活性神经营养性因子的嵌合前原蛋白质或

前原肽，以及使用上述前体和它们的核酸序列生产有一种或多种促神经营养性激素生物活性的蛋白质或肽。本发明提供的嵌合前原分子含有与成熟促神经营养性激素序列或其生物活性部分或其衍生物融合的一种杂合前原区域。根据本发明可使用的成熟促神经营养性激素序列是包括但不限于NGF，BDNF，NT-3和NT-4的NGF/BDNF家族的同源分子。相似地，可以从包括但不限于NGF，BDNF，NT-3和NT-4的NGF/BDNF家族的那些促神经营养性激素分子中得到前原区域。本质上，本发明基于发现嵌合前原蛋白质或前原肽可比同源前原脑衍生的神经营养性因子（前原BDNF）能更有效地经真核宿主细胞加工，所述的嵌合前原蛋白质或前原肽含有神经生长因子的前原区域和源于脑的神经营养性因子的成熟分部分（前原NGF/BDNF）或者NT-3的前原区域和成熟部分的脑衍神经营养性因子（前原NT-3/BDNF）。本发明进一步以发现表达嵌合前原NGF/BDNF或NT-3/BDNF的经稳定转染和扩增的真核宿主细胞仅向培养基中分泌BDNF的成熟形式。同源前原BDNF的翻译后加工是高度无效的。相反，可有效地加工同一神经营养基因家族的成员之一NGF。暂留转染后，仅把NGF的成熟生物活性形式分泌到宿主细胞培养基中。为了生产成熟的生物活性BDNF，通过稳定宿主细胞系的繁殖解决BDNF加工问题。通过表达嵌合构建体，本发明提供了一种新的解决加工问题的方法，在一个特殊的实施方案中，嵌合构建体含有融合在成熟BDNF框架中的NGF的长前原区域，并且在另一特殊的实施方案中，它含有融合在成熟BDNF框架中的NT-3的前原区域。

本发明提供编码嵌合神经营养性前原蛋白质或前原肽的核酸，以及通过使用上述核酸表达这些嵌合神经营养性蛋白质和肽的方法。

根据本发明的编码嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽的核酸的表达比使用编码同源神经营养性前原蛋白或前原肽的表达具有更显著的优点。生产嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽提供提高了表达水平的生物活性神经营养性因子。提高的表达水平另外应提供了比污染的表达的神经营养性因子的未加工形式更好的生物活性神经营养性纯化模式，上述污染的表达神经营养性因子的未加工形式在粗上清液中是不明显的。

5.1 本发明的表达产物

根据本发明可获得的生物活性蛋白质是天然的神经营养性因子，它们是促神经营养性激素基因家族的成员或生物活性蛋白质或其衍生物。本文所用的术语“生物活性”是指能够显示出成熟促神经营养性激素的一种或多种生物活性。上述促神经营养性激素包括但不限于成熟的 BDNF, NT-3, NGF 和 NT-4 以及用确定促神经营养性激素基因家族成员所用的方法鉴别类似于上述的其它成员（如，使用分子探针，由 PCR 生产，相当于家族内同源区域；参见 PCT 公开 WO 91/03569）。

可获得用本发明可表达的编码各种促神经营养性激素蛋白质的 DNA 序列。参见 Ullrich 等人的（Nature 303:821 (1983)；E.P. 公开 121,388，公开日 1984.10.10）关于 hNGF 编码序列和如 Meier 等人（EMBO J. 5:1489 (1986)）和 Schwarz 等人（J. Neurochem. 52:1203 (1989)）关于来自其它各种的 NGF cDNA；ATCC 质粒菌株 phBDNF-C-1（保藏号：4068）是关于一个 hBDNF cDNA 克隆和如，Leibrock 等人，在下文，关于一个猪 BDNF cDNA；和 ATCC 质粒菌株 pC8-hN3(P1)（保藏号 40765）关于一个人的 NT-3 cDNA 克隆和 Maisonpierre 等人（Science 247:1446 (1990)）和 Hohn 等人

(Nature 344:339 (1990)) 的关于来自其他各种的 NT-3 编码序列。已经报告了人 (Rosenthal et al., Neuron 4:767 (1990)) 和大鼠 (Maisonpierre et, ol., 见下文) 的 NT-3 基因克隆。进一步说, 在 PCT 公开 WO 91/03568, 公开日 1991.3.21, 和互补的待审美国申请系列 No. 570657, 申请日 1990.8.20 中公开了 BDNF 的核苷酸和氨基酸序列; 在 PCT 公开 WO 91/03569 公开日 1991.3.21 和互补的待审申请系列 No. 570,189, 申请 1990.8.20 中公开了 NT-3 的核苷酸和氨基酸序列。另外, 本文分别在图 3, 4 和 5 中展示了 BDNF (SEQ ID NO: 1-8), NGF (SEQ ID NO: 9-10) 和 NT-3 (SEQ ID NO: 11-14) 的核苷酸和氨基酸序列。

另外, 可用上文所述的方法, 用 BDNF/NGF/NT-3/NT-4 家族任意两个成员共有的同源区域鉴别来自任何有机体的促神经营养性激素基因。例如, 但不限于, 通过 BDNF/NGF/NT-3/NT-4 合成的简并寡核苷酸鉴别并克隆一种新的促神经营养性激素, 所述的简并寡核苷酸相应于任意两个促神经营养性激素之间高度保守的蛋白质序列片段。然后, 在用 CDNA 模板的多聚酶链反应 (PCR) 中用这些寡核苷酸作引物, 所述的 CDNA 模板是从推测能表达所需促神经营养性激素的细胞中制备的。然后可以用 PCR 产物作为探针克隆完整的 CDNA 和/或基因组基因, 可通过标准方法确定它们的序列。通过选择那些除含有与其他已知的促神经营养激素同源的序列外, 还含有与其他已知的促神经营养激素不同源的序列 (例如, 至少含六个相邻核苷酸, 其中至少有两个核苷酸不同) 的细胞而鉴别新的促神经营养性激素。同样, 相应于一个种内促神经营养激素序列的寡核苷酸可用于 PCR 中生产用于克隆来自其它种的促神经营养性激素基因的探针。

NGF 和 BDNF 是约 120 个氨基酸的碱性蛋白质它们共有约 50% 的氨基酸序列相同，包括 6 个绝对保守的半胱氨酸残基，在活性 NGF 中，已发现这 6 个半胱氨酸残基形成 3 个二硫键 (Bradshaw, A., 1978, *Ann. Rev. Biochem* 4]: 191-216; Leibrock et al., 1989 *Nature* 341: 149-52)。比较来自进化趋异种的 NGF 序列发现，在这些半胱氨酸残基侧面的氨基酸含有该分子的大部分高度保守区域 (Meier et al., 1986, *EMBO J.* 5: 1489-93; Selby et al., 1987, *J. Neurosci. Res.* 18: 293-8)。惊人的是，这些也是 BDNF 和 NGF 之间最相似的区域 (Leibrock et al., 1989, *Nature* 341:149-152)。

在本发明的一个优选情况中，通过表达有关本发明的嵌合前原分子，生产一种成熟的人促神经营养性激素。在一个特殊的实施方案中，由一个核酸编码嵌合前原分子，该核酸含融合在成熟 BDNF 编码序列框架中的 NGF 的长前原区域。在另一实施方案中，由一核酸编码嵌合前原分子，该核酸含有融合在成熟 BDNF 编码区框架中的 NT-3 前原区域。仍在另一实施方案中，NGF 的长前原区融合在 NT-3 编码区的框架中。

如上文讨论的，没有资料证明 NGF 前体的“长”和“短”前原区域间有明显的生物学区别。在本发明的另一特殊情况中，在构建嵌合神经营养性基因中，可利用“长”或“短”前原区域。当构建本发明的含 NGF 前原区的嵌合融合体时，本领域专业人员可利用“短”NGF 前原区或“长”NGF 前原区。

根据本发明可以表达为嵌合前原前体的成熟的促神经营养激素分子实质上也包括有生物活性的等序列，片段或衍生物。

例如，可以通过提供功能分子的取代，添加，或缺失改变促神经

营养激素核酸序列。由于核苷酸编码序列的简并，在本发明实施时，也可使用本质上编码同样的促神经营养激素氨基酸序列的其它DNA序列。这些包括但不限于含有全部或部分由不同密码子取代改变的促神经营养激素基因，所述的不同密码子编码序列内功能相同的氨基酸残基，因此产生没有痕迹的改变。同样，本发明的促神经营养激素蛋白或其片段或其衍生物包括但不限于那些含有其部分一级氨基酸序列改变的序列，在改变的序列中，功能相等的氨基酸残基取代序列内的残基，这种取代使序列不产生任何变化。如，用作为功能等同物的相似极性的另一氨基酸取代序列中的一个或多个氨基酸残基不产生任何改变。可从氨基酸所属的该类的其它成员中选择序列内氨基酸的取代物。例如，非极性（疏水的）氨基酸包括丙氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，色氨酸和蛋氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸，丝氨酸，苏氨酸，半胱氨酸，酪氨酸，天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷（碱性的）氨基酸包括精氨酸，赖氨酸和组氨酸。带负电荷（酸性的）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸也包括在本发明范围内的是通过翻译期间或翻译后修饰，如，通过糖基化作用，蛋白水解裂解，连接到一抗体分子上或其它细胞配体上，乙酰化作用，磷酸化作用，还原作用，裂解，等获得的促神经营养激素蛋白或其片段或其衍生物。

另外，可以在体外或体内突变给定的促神经营养激素序列，以便产生和/或破坏翻译，起始，和/或终止序列，或者在编码区产生变异和/或形成新的限制性内切酶位点或破坏以前存在的限制性位点有利于在体外进一步修饰。可以使用本领域专业人员已知的任何诱变技术，包括但不限于，体外位点特异性诱变（Hutchinson, et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551），使用T A B[®]接头（Pharmacia），

等。

本发明也涉及编码嵌合前原促神经营养激素分子的核酸的表达，并回收成熟的促神经营养激素产物。

5.2 构建嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽

可以使用标准的重组DNA技术，如通过限制酶消化并连接编码所需前原和成熟区域的核酸序列构建编码嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽的核酸。或者，可以使用化学合成法，如固相氨基磷酸酯技术构建核酸序列。在本发明优选的实施方案中，可以用多聚酶链反应（PCR；Saiki et al., 1985, Science 230: 1350-1354）通过重叠延伸（Horton et al., 1989, Gene 77: 61-68）完成核酸序列的拼接，并因此产生本发明的编码嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽的核酸（参见，如，在下文第5部分）。

在一优选的情况中，通过使用两个分别用不同模板的不同PCR反应生产本发明的核酸。为了举例说明，如果需要一个X-Y嵌合体，首先，用一个模板，如，X，使用与X完全同源的探针，以及一个既与X有同源区域又与Y有同源区的探针完成PCR反应。然后分离PCR反应产物，并在用Y作为模板的第二个PCR反应中，把它用作探针，以及用第二个完全与Y同源的探针。

进一步期望能在引物中渗入有用的限制性内切酶裂解位点。

另外，可通过利用3个寡核苷酸引物的一步PCR生产嵌合神经营养性因子。例如，通过生产的3个寡核苷酸引物，把编码至少部分所需前原区域（X）的核酸与编码一成熟神经营养性蛋白或肽（Y）的核酸序列连接，所述的三个引物中，一个相当于X序列的一部分（X引物），另一个相当于Y序列的一部分（Y引物），第三个含有

X 和 Y 序列的一部分 (X Y 引物)。在一步 P C R 中, 结合这三个寡核苷酸, 并 X 和 Y 引物的量大于 X Y 引物, 如, 以 X:XY:Y 为约 100:1:100 的比率。[在 P C R 中所用的模板可以是编码所需前原区域和成熟神经营养性蛋白或肽的核酸的混和物] 通过桥接核苷酸 (如, X Y 引物) 确定拼接位点的位置。

可以使用本领域常规使用的条件, 如使用标准 P C R 反应溶液和方法的在 94 °C 1 分钟, 在约 43 °C 2 分钟, 在约 72 °C 3 分钟进行 35 次循环。然后用凝胶电泳纯化所得的 P C R 片段, 并用适当的限制性内切酶消化所得的 P C R 片段, 并把它连接到适当的克隆载体中。

构建本发明嵌合体的其它方法对于本领域专业人员来说是显而易见的。

可以用本领域已知的方法克隆 D N A 反应产物。可以使用本领域已知的任何数量的载体宿主系统。可能的载体包括, 但不限于粘性质粒, 质粒或修饰过的病毒, 但载体系统必须与所用的宿主细胞相匹配。上述载体包括, 但不限于, 噬菌体如入噬菌体衍生物, 或质粒如 pBR322, pUC, 或 Bluescript® (stratagene) 质粒衍生物。经转化、转染、感染、电穿孔、等可以把重组分子引入宿主细胞。

5.3 表达编码嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽的核酸

可以把编码嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽的核苷酸序列连接到适当的表达载体中, 所述载体即含有对于转录克隆的嵌合 D N A 序列所必需的元素载体。利用一个促神经营养激素基因和 / 或与嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽相应的其两侧的区域也可以提供必需的转录和翻译信号。可以用各种真核宿主—载体系统表达克隆的嵌合 D N A 序列和所得的 m R N A 转录体、这些包括但不限于用病毒 (如疫

苗病毒，腺病毒等）感染的，用其它载体转染的，含本发明染色体整合的核酸的哺乳动物细胞系统，但所用的宿主系统必须有适当的，把前原嵌合体加工成成熟促神经营养激素的细胞机制。改变载体的表达元素的强度和特异性。依据所用的宿主-载体系统，可以使用大量适当的转录和翻译元素中任何一个元素。

可以用以前所述的有关把DNA片段插入到载体中的任意方法构建含有编码嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽序列的表达型载体，该载体包括在嵌合DNA序列上游含有适当的转录/翻译控制信号。这些方法可包括体外重组DNA和合成技术以及体内重组（基因重组）。可以通过第二个核酸序列调节编码嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽的核酸序列的表达，以便在用重组DNA分子转化的宿主中表达嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽。例如可以用本领域已知的在哺乳动物细胞中有活性的启动子/增强子元素控制表达。可以用于控制嵌合神经营养性因子表达的启动子包括，但不限于细胞肥大病毒（CMV）启动子，SV40早期启动子区域（Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290: 304-310），在劳氏肉瘤病毒的3'长末端重复所含的启动子（Yamamoto, et al., 1980, Cell 22: 787-797），疱疹胸苷激酶启动子（Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:144-1445），金属硫蛋白基因的调节序列（Brinster et al., 1982, Nature 296: 39-42）；以及表现组织特异性并已在转基因动物中使用的下列动物转录控制区域，在胰腺泡细胞中有活性的胰肽酶E1基因控制区域（Swift et al., 1984, Cell. 38: 639-646, Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; Mac Donald, 1987, Hepatology 7: 425-515）；在胰β细胞中有活性

的胰岛素基因控制区域 (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); 在淋巴样细胞中有活性的免疫球蛋白基因控制区域 (Grosschedl et al., 1984, Cell 38: 647-658; Adames et al., 1985, Nature 318: 533-538; Alexander et al., 1987 Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); 在睾丸、乳房淋巴样和肥大细胞中有活性的小鼠乳汁肿瘤病毒控制区域 (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), 在肝中有活性的清蛋白基因控制区域 (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel 1: 268-276), 在肝中有活性的 α -胎儿球蛋白基因控制区域 (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648; Hammer, et al., 1987, Science 235: 53-58); 在肝中有活性的 α 1 - 抗胰蛋白酶基因控制区域 (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161-171), 在髓样细胞中有活性的 β -球蛋白基因控制区域 (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340, Kollias et al., 1986, Cell 46: 89-94); 在脑的少突神经胶质细胞中有活性的髓磷脂碱蛋白基因控制区域 (Readhead et al., 1987, Cell 48: 703-712); 在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链 - 2 基因控制区域 (Sani, 1985, Nature 314: 283-286); 在下丘脑中有活性的促性腺释放激素基因控制区域 (Mason et al., 1986, Science 234: 1372-1378)。

可以使用的表达型载体的特殊实施例是 CDM8. (Seed, 1987, Nature 329: 840-842; Seed and Aruffo, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-3369; Aruffo & Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8573-8577); 另一个实施例是 pCMX (参见共有未决申请系列 No. 678,408, 申请日 1991,3,28)。

可以通过 3 种一般方法鉴别含有嵌合神经营养性前原蛋白或前原

肽基因的表达型载体：(a) DNA-DNA 杂交，(b) 存在或不存在“标记物”基因功能，和(c) 表达插入序列。在第一种方法中，通过使用探针的 DNA-DNA 杂交，检测插入到表达型载体中外源基因的存在，所述的探针含有与至少部分插入的嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽基因同源的序列。在第二种方法中，可以在某种“标记”基因功能（如，胸苷激酶活性，转化表型，等）存在或不存在的基础上鉴别并选择重组载体/宿主系统，所述的某种“标记”基因功能是由载体中外源基因的插入的。例如，如果把嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽的编码序列插入到载体的标记基因序列中，那么通过没有标记基因功能，可以鉴别含嵌合插入序列的重组体。在第三种方法中，可以通过检测由重组体表达的外源基因产生鉴别重组表达型载体。例如，上述检测可以以如上文 5.4 部分中描述的生物检测系统中，神经营养性因子基因产物的物理或功能特性为基础。

一旦鉴别和分离了一个特定的重组 DNA 分子，就可以用本领域已知的几种方法进行繁殖。一旦建立了适宜的宿主系统和生长条件，就可以大量地繁殖并制备重组表达型载体。

在某些诱导子存在的情况下，可以增加某种启动子的表达；因此，可以控制经过遗传工程加工的嵌合神经营养性前原蛋白或前原肽的表达。此外，对于蛋白质的翻译和翻译后加工及修饰（如，糖基化，裂解），不同的宿主细胞有特有的和特殊的机制。为了确保必要的加工（如，由裂解除去前原区）和任何所需的修饰，应选择适当的细胞系或宿主系统。因此，哺乳动物宿主细胞如猴，人或牛是优选的。

在本发明的特殊实施方案中，根据上文列出的方法，可以在 CHO 细胞系统中表达编码嵌合促神经营养激素的 DNA。一旦鉴别了表达

嵌合促神经营养激素的重组体，就应分析成熟的基因产物。通过以产物的物理或功能特性为基础的分析，可以完成上述分析。参见上文 5.4 部分。

一旦鉴别了成熟的神经营养性因子蛋白或肽，就可以通过包括层析（如，离子交换、亲和性和大小柱层析），离心，不同的溶解性的标准方法，或纯化蛋白质的任何其它标准方法分离并纯化上述的神经营养性因子蛋白或肽。

5.4 神经营养性因子检测方法

根据本发明生产的促神经营养激素蛋白或肽能够表现出一种或多种包括但不限于神经营养活性，通过抗体与促神经营养激素结合，与同源受体结合等等的生物活性。应把本文所用的术语“神经营养性活性”解释成一种涉及对神经系统细胞的生物效应，所述的神经系统细胞包括，但不限于神经元，星形胶质细胞，胶质细胞，少突神经胶质细胞，小胶质细胞和施旺细胞。对于没有直接或间接地受到嵌合神经营养性因子作用的神经系统细胞，生物效应是可在神经系统细胞的结构和/或生理学方面改变的。生物效应的例子是延长存活，轴突突起，维持和发展分化功能（如表达一种酶，如胆碱乙酰转移酶，或酪氨酸羟化酶）或，相反地，细胞死亡或衰老，或去分化。

可以使用任何已知的检测上述活性的检测方法以及将来可发展的系统确定神经营养性活性的存在。检测系统可以包括体外测试系统，如使用组织外植体的组织培养生物检测系统，从组织制备的细胞，或不死的细胞系，如从脑，脊髓、或外周神经系统得到的，以及体内测试系统，其中可以给动物服用神经营养性因子；可以使用上述动物，通过完成化学的，组织学或行为测试，确定在上述动物中的神经营养

性效应。另外，在非人的转基因动物中，可以掺入作为转基因的神经营养性因子，并可以检测在所述动物中的生物学效应。

例如，但不限于，可以用下列已知的生物检测系统测量神经营养性活性：

(i) 在 Barde et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 1199-1203 中描述的脊根神经节检测系统，该文献全部引入本文作为参考；

(ii) 由 Lindsay et al., 1985, Dev. Biol. 112: 319-328, 描述的结状神经节检测系统，该文献全部引入本文作为参考；

(iii) 在 Barde et al., 1982, EMBO J. 1: 549-553 中描述的交感神经节检测系统，该文献全部引入本文作为参考；

(iv) 脊髓神经元。简单地，从检测动物中无菌移出脊髓，然后分离尾部到延髓部分，并除去感觉神经节和脑脊膜。然后，可再把索分成腹部和中背部片段，分别进行培养，把组织切成小碎片，并经研磨通过 Pasteur 吸管在 50% DMEM (Gibco) 和 50% 的 Ham's 营养混和物 F12 (Gibco) 中离解，50% 的 Ham's 营养混和物用 33mM 葡萄糖，2mM 谷氨酰胺，15mM NaHCO₃，10mM HEPES，25 μ g/ml 胰岛素 100 μ g/ml 转铁蛋白，60 μ M 丁二胺，20nM 黄体酮，30nM 亚硒酸钠，0.5 μ g/ml 青霉素 G，0.5 μ g/ml 链霉素，和 2.5 μ g/ml 小牛血清白蛋白补充。然后可重复研究两次，并收集上清液，用 40 μ m 的 Tetko 过滤器过滤。然后将离解的腹部细胞以每 35mm 培养皿 0.5 百万个细胞的密度铺在用多聚-D-赖氨酸覆盖的 (10 μ g/ml) 培养皿中。可以每 35mm 培养皿 1.5 百万个细胞的密度，把离解的中背部细胞铺在用多聚-D-赖氨酸 (10 μ g/ml)，多聚-L-鸟氨酸

(10 μ g/ml) 或多聚-L-鸟氨酸加昆布氨酸 (laminin) (5 μ g/ml) 覆盖的培养皿中。

(v) 基部前脑胆碱能神经元检测方法 (参见 PCT 公开 WO 91/03568, 公开日 1991.3.21);

(vi) 腹部中脑 dopaminergic 神经元检测系统 (参见 PCT 公开 WO 91/03568, 公开日 1991.3.21); 和

(vii) PC12 细胞检测系统

6. 实施例: 构建并表达前原-NGF/成熟-BDNF 嵌合体

6.1. 用多聚酶链反应构建嵌合核酸分子

用多聚酶链反应克隆 (PCR, Saiki et al., 1985, Science 230: 1350-1354) 构建前原 NGF/成熟 BDNF 嵌合体, 该嵌合体由与成熟人 BDNF 序列融合的小鼠 NGF 的长前原形式组成。

为了完成上述内容, 合成两个 PCR 引物。5' 引物 (5'-CTC-GTC-GAC-AGC-CGG-CAC-TCT-GAC-CCT-GCG-CGC-CGA-3') [SEQ ID NO: 17] 编码 BDNF 的前 7 个氨基酸, 并包括两个唯一的通过使用修饰密码子产生的限制位点, Nae I, 和 BssH2。3' PCR 引物是一个 3' pCDM8 寡核苷酸, 该寡核苷酸相当于来自在 pC8hB 中 BDNF 序列 3' 末端的多聚连接子序列的下游区域 [5'-CAA-AGA-TCC-TCT-AGA-GTC-G-(C)-3'] [SEQ ID NO: 18]。多聚连接子含一个 Not I 限制位点。在同 pC8hB (hBDNF 在 PCDM8 中) DNA 作模板的 PCR 中, 使用这两个引物。用 5 微克 pC8hB 与各 500ng 的引物进行 5 个 PCR 循环。同时用 NaeI 和 NotI 消化 PCR 产物, 并用凝胶电泳分离 365bp 的消化产物。通过用 Eco47 和 NotI 消化 pC81mN (在 pCDM8 中的长小鼠 NGF) 完成载体的制备, 并通过凝胶电泳分离 4.6kb 的载体片段。

把 365bp 的片段连接到 pC81mN 的 Eco 47/Not 1 位点。这种连接导致小鼠 NGF 前原区与成熟 BDNF 编码区在框架中直接融合。通过用 BssH2 消化, 通过估计在亚克隆中 Eco47 位点的损失, 并最后经 DNA 定序诊断检测构建体。

6.2. 表达嵌合分子

用 CHO-DG44 细胞生产稳定的细胞系以生产有生物活性的 BDNF。CHO-DG44 细胞 (从在 Columbia University 的 Dr. L. chasin 得到) 缺两拷贝的二氢叶酸还原酶基因 (Urlaub and chasin 1980, Proc. Natl. Acad Sci USA. 77: 4216-4220)。已经预先描述了表达 BDNF 的稳定转染的 CHO-DG44 细胞系 (P C T 国际公开 No. WO 91/03568, 公开日 1991, 3, 21)。通过用 pC8hB DNA 转染而生产这些细胞系, pC8hB DNA 编码包括克隆到表达型载体 pCDM8 中的前原区的人 BDNF 基因。采用磷酸钙共沉淀方法将 $20\mu\text{g}$ NGF/BDNF 嵌合体 (pC81mN/B) 与 $0.2\mu\text{g}$ 质粒 p410 共转染 CHO-DG44 细胞 (1×10^6 细胞/100mm 平皿), 所述的质粒 p410 编码一个减弱的二氢叶酸还原酶基因 (dhfr.)。转染 48 小时后, 细胞在选择培养基 (没有次黄嘌呤和胸苷的, 含 10% 可透析的胎牛血清及各 1% 青霉素和链霉素的 Ham's F12; -HT 培养基) 上传代培养。用氨甲喋呤 (MTX) 处理 -HT- 抗性克隆收集物, 以便用于扩增。在 $2.5\mu\text{M}$ MTX 中处理用 $0.05\mu\text{M}$ MTX 获得的克隆收集物, 进行进一步扩增, 将首先在 $0.5\mu\text{M}$ MTX 中然后在 $2.5\mu\text{M}$ MTX (因此扩增两循环) 中选择的克隆分离 (DGC-N/B-2.5-#23), 如通过生物活性和代谢标记估计的一样, 证明该克隆是 BDNF 的最高效生产者。通过记录鸡胚 (E8) 脊根神经节 (DRG) 的轴突生长, 评估生物活性 (Maisopierre et al.,

1990, Science 247:1446-1451)。

7. 实施例：比较在同源前原 BDNF 和前原 NGF/BDNF 嵌合体之间的加工效率

通过实验直接比较在 CHO 细胞中前原 BDNF 与前原 NGF/BDNF 的加工和表达。

7.1. 代谢标记

代谢标记比较用 pC8hB 或 pC81mN/B 转染并用 $2.5 \mu\text{M}$ 氮甲嘌呤扩增的 CHO-DG44 细胞系 (图 1)。为完成该标记实验, 把从短前原 BDNF 构建体 (细胞系 = DGZ1000-B-3-2.5) 或长小鼠前原 NGF/BDNF 嵌合构建体 (细胞系 = DGC-N/B-2.5#23) 表达 BDNF 的 CHO-DG44 细胞, 在标记前等密度 (在 6 - 孔平皿中 2×10^5 细胞/孔) 培养 24 小时。然后在无血清的条件下, 用 ^{35}S - 半胱氨酸和 ^{35}S - 甲硫氨酸将细胞标记 4 小时。用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (15% 凝胶) 电泳分析 $30 \mu\text{l}$ 标记细胞上清液样品, 并把标记的蛋白质转移到尼龙膜上, 并通过放射自显影肉眼观察。如在图 1 中观察到的, 用在表达型载体 pCDN8 中的人 NGF 基因稳定转染的 CHO-DG44 细胞表达 NGF 的成熟形式, 该 NGF 的成熟形式迁移成约 12,300 分子量 (图 2, 第二泳道)。在第一泳道中所示的是用野生型 CHO-DG44 细胞作对照。在稳定转染的细胞系 DGZ1000-B-3-2.5 (用与细胞系 DGC-N/B-2.5#23 相似的 HTX 选择和扩增方法获得) (图 1, 第三泳道中, 检测未加工的 BDNF 原 (31 KD), 已加工的 BDNF 原前体的原部分 (16 KD) 以及短前原 BDNF 蛋白的成熟形式 (14 KD)。仅在用长 NGF/BDNF 原嵌合构建体稳定转染的 DGC-N/B-2.5-#23 中检测到经蛋白水解加工的 BDNF 的成熟形式 (14 KD) (图 1, 第

四泳道)。在限制培养基中,从该细胞系未检测到没有加工的 NGF/BDNF 原。我们估计成熟 BDNF 的标记密度,细胞系 DGC-N/B-2.5-#23 比用短 BDNF 原构建体构建的细胞系 DGZ-1000-B-3-2.5 每个细胞多产生约 5 倍的成熟 BDNF 蛋白。

7.2. 生物活性

比较上述两个 CHO 细胞系中产生的 BDNF 的活性。用鸡胚 (E8) 脊根神经节检测粗上清液并记录轴突的生长。与代谢标记实验一致,细胞系 DGC-N/B-2.5#23 比细胞系 DGZ1000-B-3-2.5 多产生约 5 倍的成熟 BDNF。例如,当需要 $50\ \mu\text{l}$ 的 DGZ1000- β -3-2.5 上清液以便达到最大 DRG 生物活性时,用 $10\ \mu\text{l}$ 的 DGC-N/B-2.5-#23 细胞上清液就可得到最大轴突生长效果 (图 2.)

7.3. 比较用长和短 NGF 前原区的 NGF 的表达

用前原 NGF 转染 COS 细胞,该前原 NGF 含长 (“l_mNGF”) 或短 (“s_mNGF”) NGF 前原区和成熟 NGF 编码区。转染 48 小时后,收集培养上清液,并将 DRG 外植块与纯化的 NGF 和假转染的 COS 细胞上清液一起检测。在表 1 中,列出了用各构建体的三种不同浓度得到的结果表明,用前原区的长或短形式表达的 NGF 有显著的生物活性。

表 1
各种 C O S 上清液对 D R G 外植体的影响

样 品	稀 释 度	D R G
(一)对照 N G F	10ng/ml	0, 0, 0, 0, 0, 5 5+, 5+, 5+, 5+, 5+
假 转 染	10 μ l	0, 1, 1, 1, 1
	50 μ l	0.5, 1, 1, 1, 1.5
	100 μ l	0.5, 0.5, 1, 1, 1
	250 μ l	2, 2.5, 2.5, 2.5, 2.5
s m N G F	10 μ l	2, 3, 3, 3, 3.5
	50 μ l	5, 5, 5, 5, 5
	100 μ l	5+, 5+, 5+, 5+, 5+
	250 μ l	5+, 5+, 5+, 5+, 5+
l m N G F	10 μ l	2, 2, 2, 2, 2
	50 μ l	4, 4, 4, 4, 4
	100 μ l	5, 5, 5, 5, 5
	250 μ l	5, 5, 5, 5, 5

7.4. 结论

我们从上述研究中得出结论，NGF的长原部分比BDNF的短原部分更适于在CHO细胞中加工BDNF。因此，嵌合NGF原/成熟BDNF基因构建体的优点是，它可以允许在哺乳动物细胞中以每个细胞为基础，高水平表达BDNF。另外，由于在粗上清液中污染的BDNF的未加工形式不明显，所以能提供更好的纯化方法。

另外，使用NGF的长或短前原区导致有生物活性的NGF的表达。这表明，可以在嵌合神经营养性基因构建体中，使用NGF的长或短前原区。

8. 实施例：构建并表达前原-NT-3/BDNF嵌合体

8.1 构建嵌合核酸分子

从用相应限制酶消化的pC8hB中，得到含有前原和成熟人BDNF整个编码区的HindIII-xhoI DNA片段。通过把包括完整前原区的人BDNF编码序列克隆到表达型载体pCDM8（上文讨论的）中，而得到质粒pC8hB。把该片段连接到pDSR α 2（参见公开的欧洲专利申请90305433.6；EPO公开No. 0398753A2，该文献全部引入本文作为参考）中。预先消化质粒pDSR α 2，以便得到用于与人BDNF片段连接的克隆位点5'-HindIII和3'-SalI。所得的质粒叫做pDSR α 2（BDNF）。

为了得到含前原NT-3序列和成熟BDNF序列的嵌合质粒，按如下步骤制备三个DNA片段，然后把制备的DNA片段以特定的方向连接。用限制酶消化，从上述的表达型质粒pDSR α 2（BDNF）中缺失一个约400bp的含全部前原人BDNF序列的5'-HindIII/3'NarI片段。从这些消化产物中回收的DNA片段包含全部表达型载体

pDSR α 2 和成熟的人 BDNF 序列, 并以 5' -HindIII 和 3' -NarI 位点 (标记的 DNA 片段 No.1) 为末端。从用相应的限制酶消化的质粒 pC8hN3 中得到一个约 300 个碱基对的, 含人 NT-3 前原区的 5' -HindIII / 3' -SacII DNA 片段。消化结果, SacII 位点下游缺失相当于前原 NT-3 区域的 35 个氨基酸残基的编码序列。通过把包括完整前原区的人 NT-3 编码序列克隆到表达型载体 pCDM8 中, 得到质粒 pC8hN3。把 300 个碱基对的 5' -HindIII / 3' -SacII 片段标记成 DNA 片段 No.2。最后, 为了再产生上述丢失的 35 个氨基酸残基, 制备 DNA 片段 No.3, 它是一个合成的寡核苷酸连接子 (图 6 和 SEQ ID NO:15-17)。该连接子还包含 5' -SacII 和 3' -NarI 限制位点的一半位点, 以便促使上文公开的 DNA 片段 Nos 1 和 2 的连接。这种连接导致产生表达型载体 pDSR α 2 (NT-3/BDNF), 其中, 通过寡核苷酸连接子 (片段 No.3, 图 6 和 SEQ ID NO:15) 把 NT-3 的前原区 (片段 No.2) 与成熟 BDNF (片段 No.1) 连接。

8.2 在 COS 细胞中表达并鉴定 NT-3/BDNF 嵌合体

用 CHO-D(-) 细胞 (ATCC 保藏号 CCL61) 制备用于生产有生物活性 BDNF 的稳定的细胞系。CHO-D(-) 细胞是编码二氢叶酸还原酶基因缺陷型的, 并在 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (D - MEM) 中维持, Dulbecco 改良的 Eagle 培养基是用 MEM 非必需氨基酸, 各 1% 的青霉素和链霉素, 10% 胎牛血清, 次黄嘌呤和胸苷补充, 用 2.5 μ g NT-3/BDNF 嵌合构建体 [pDSR α 2 (NT-3/BDNF)], 通过磷酸钙共沉淀方法转染 CHO-D(-) 细胞, 上述的 NT-3/BDNF 嵌合构建体预先用限制酶 PvuI 消化而线性化。上述载体 (pDSR α 2) 编码小鼠二氢叶酸还原酶小基因 (dhfr), 该基因表达后能够使转染的 CHO-D(-)

细胞克服 dhfr 基因缺陷并在没有核苷酸次黄嘌呤和胸苷的情况下生长。通过载体 pDSR α 2 不能成功地转染的亲本 CHO-D(-) 细胞不能在选择培养基中存活，除用经透析的胎牛血清代替胎牛血清，并省略了次黄嘌呤和胸苷外，所述的选择培养基与上述的维持培养基的组分相同。用胰酶消化细胞，并在转染后，以 1×10^5 细胞/100 mm 平皿的密度，将细胞在选择培养基中培养 48 小时。两星期后，用圆筒状克隆筛选机挑出单个菌落。然后把每个克隆扩散到 100 mm 平皿上。当培养物达到会合时，吸出原来的含血清培养基并用 3 ml 无血清培养基代替加入。收集限制性培养基 (CM) 并把各 50 μ l 的培养物放在 15% SDS - 聚丙烯酰胺凝胶上，进行凝胶电泳。用对天然 BDNF 特异的兔抗血清进行 Western 凝胶印迹。如在图 7 中所示，表达来自 pDSR α 2 (BDNF) 的原始 BDNF 的所有克隆除分泌已加工的 BDNF 外还分泌多形式的未加工 BDNF。未加工形式与加工形式的比率是 2:1。相反，表达来自 pDSR α 2 (BDNF) 的嵌合 NT-3/BDNF 的所有克隆仅分泌完全加工过的，BDNF 的成熟形式，这种 BDNF 带有不能检测到的部分加工过的前体。

来自嵌合 NT-3/BDNF 克隆的 1 升无血清限制性培养基经传代纯化，所述的传代经 S-Sepharose 柱，接着通过 Sephacryl S-200 大小的筛析柱。SDS - PAGE 分析和氨基酸序列测定表明，获得了一个分子量为 14 KD (预测的成熟人 BDNF) 的同源蛋白质，该同源蛋白质有唯一与成熟人 BDNF 的 N - 末端序列一致的 N - 末端序列。此外，经鸡脊根神经节检测 (上文对 NGF/BDNF 嵌合体描述的) 表明是纯化的 BDNF，并有完全的生物活性。

8.3 NT-3/BDNF 嵌合体在 COS 细胞中的表达及其生物活性

用 COS-7 细胞 (ATCC 保藏号 CRL1051) 作为暂留表达系统, 检测有生物活性的 BDNF 的生产。按常规方法将 COS-7 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素和链霉素抗生素的 D-MEM 中保持。用分别为 20 μ g 的 pDSR α 2, pDSR α 2(BDNF) 和 pDSR α 2(NT-3/BDNF) 单独在 1600 伏, 经 0.4 微秒, 通过电穿孔转染 COS-7 细胞 (5×10^6 细胞/ml)。以 2×10^6 细胞/60 mm 平皿的密度将转染的 COS-7 细胞进行平皿培养。收集转染后 24 和 72 小时之间积累的限制性培养基。通过记录鸡胚 (E8) 脊根神经节 (与 NGF/BDNF 嵌合体) 的轴突生长, 估计生物活性。如在表 2 中所示, 嵌合 pDSR α 2 (NT-3/BDNF) 的克隆分离物 CI 1 和 CI 20 比来自 pDSR α 2 (BDNF) 的表达的成熟 BDNF 的活性高约 5 倍, 后者含不变的 DBNF 前原区。

表 2

检测用质粒 DNA 转染的 COS 细胞的限制性培养基的鸡 DRG 外植体

DNA 来 源	测试的培养 基体积 (μ l)	记录生长的轴突
pDSR α 2	10	0, 0, 0, 0, 0
	50	0, 0, 0, 0.5, 0.5
pDSR α 2(BDNF)	10	0, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5
	50	1, 1, 1, 1.5, 1.5
pDSR α (NT-3/BDNF), CI-2	10	1, 1, 1.5, 1.5, 1.5
	50	2.5, 2.5, 2.5, 2, 2
pDSR α (NT-3/BDNF), CI-20	10	1, 1, 2, 2, 2
	50	2.5, 2.5, 2.5, 2.5, 2.5

8.4 结论

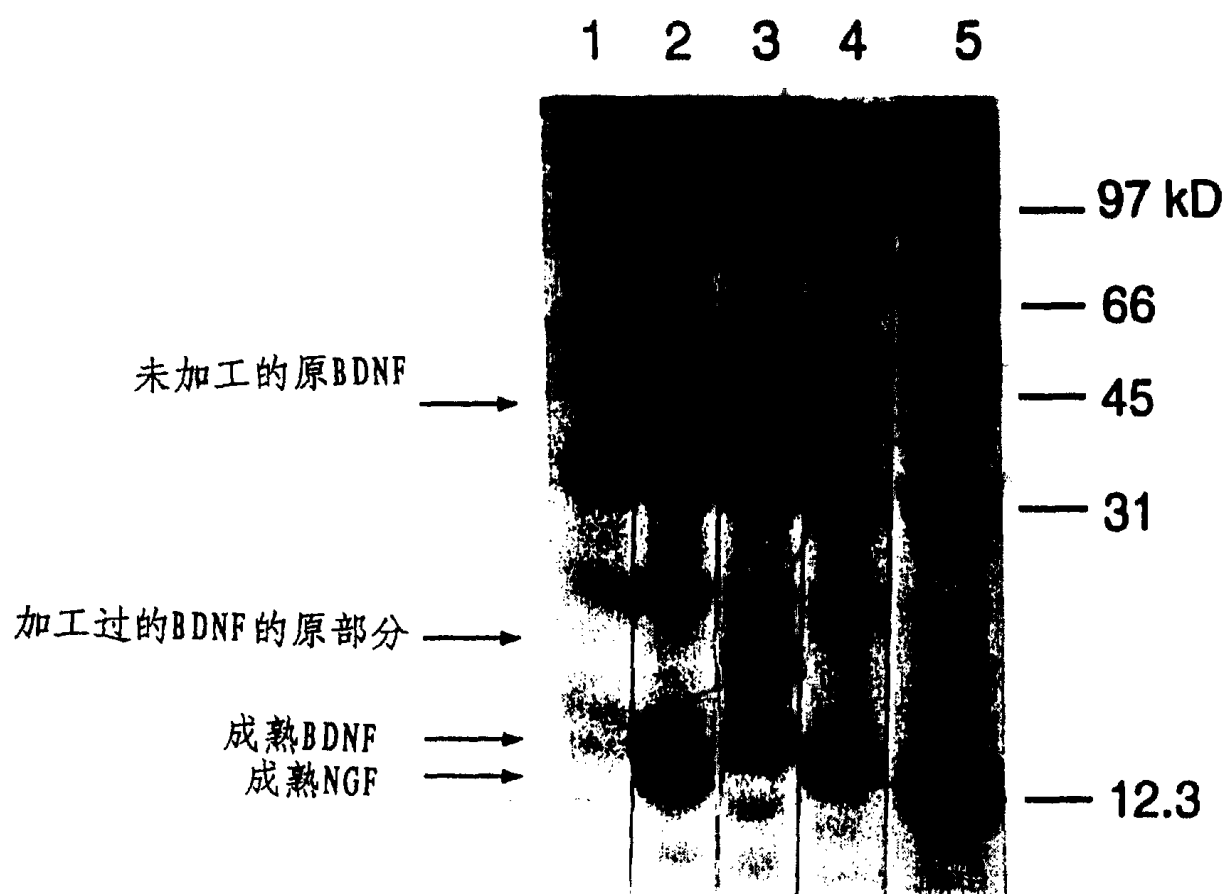
这些研究表明, 用 NT-3 前原区取代 BDNF 前原区有利于前原区的蛋白水解加工, 并且显著地提高了成熟 BDNF 的净产量。此外, 通过宿主细胞在成熟的经加工过的 BDNF 的 N-末端没有任何改变就可以精确地识别在前原 NT-3 和成熟 BDNF DNA 序列之间重建的裂解位

点。与嵌合 NGF/BDNF 基因构建体一样，嵌合 NT-3/BDNF 基因构建体以哺乳动物的每个细胞为基础，产生高水平的加工过的 BDNF，并且通过减少污染的未加工形式，可以更好地进行纯化。

本发明不限于本文所述特殊实施方案。的确，从上面的描述和附图中，除本文中描述的外，本发明的其它各种修饰物对于本领域专业人员来说是显而易见的。上述的修饰也包括在本发明权利要求范围内。

本文引述的各种公开和专利申请，其公开的内容全部引入本文作为参考。

图 1



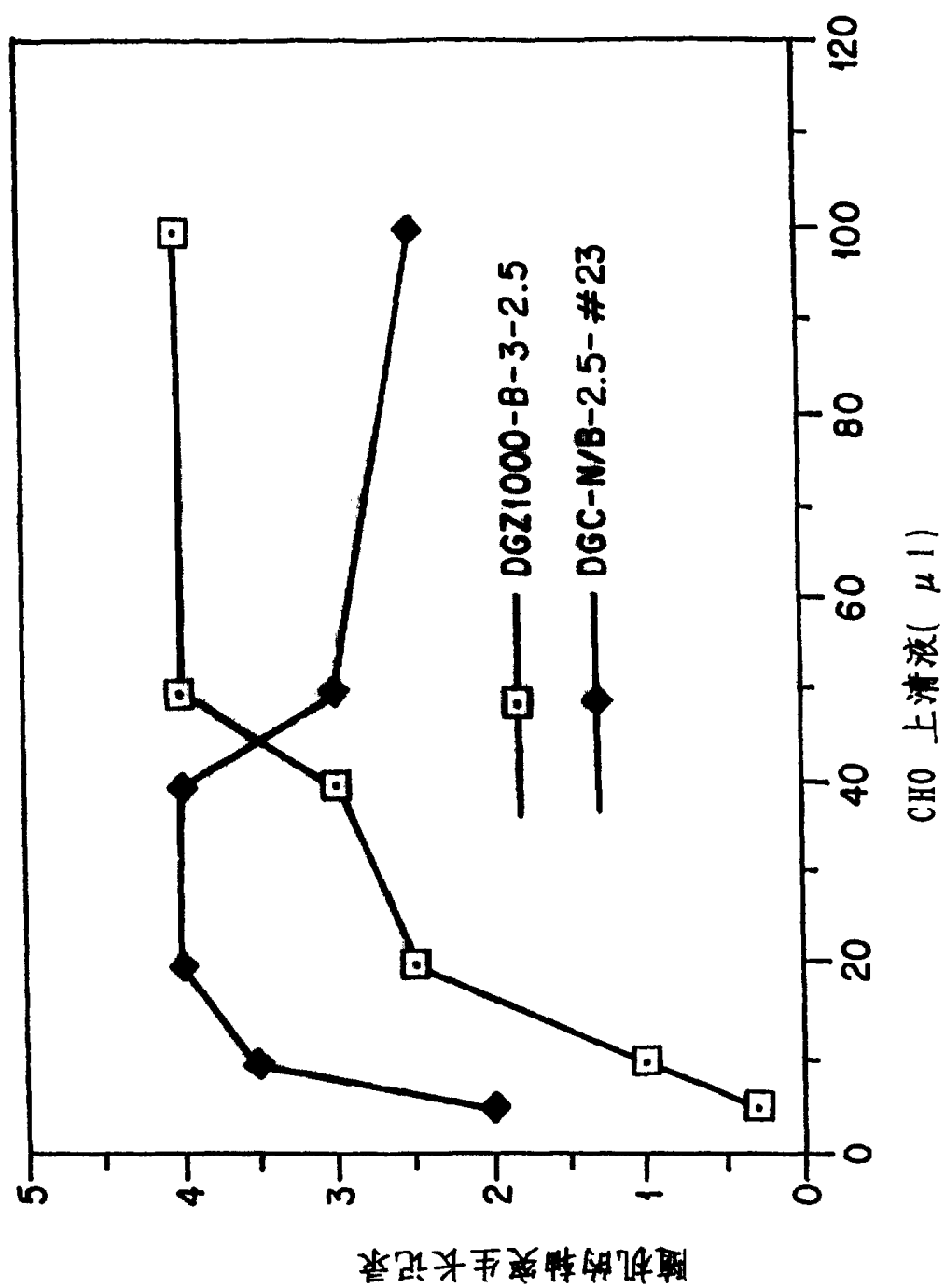


图 2

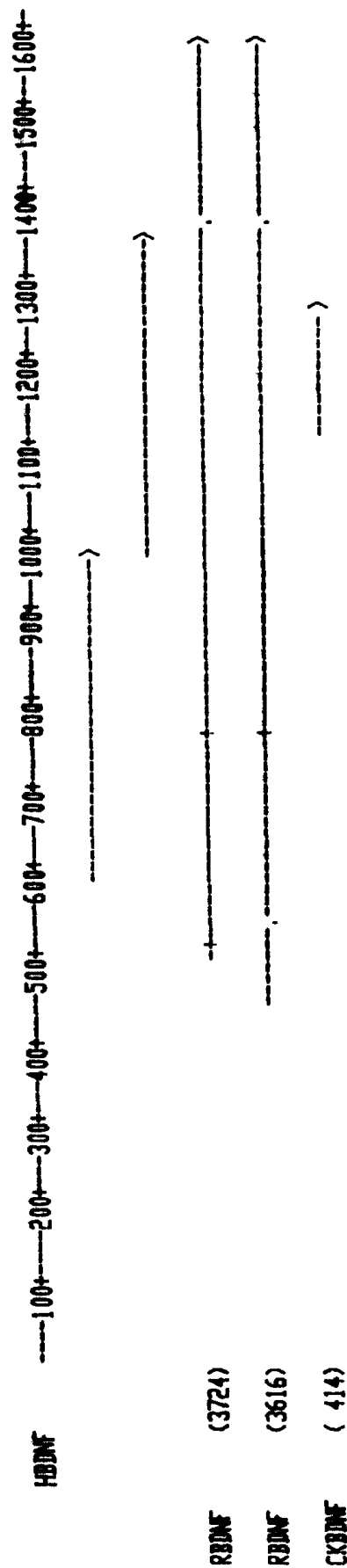


图 3

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	
AAGCTTGATATCGAATTCCGGAAATTCGGTCCCACTGCTGTTTATTGTGCTATTCTAGCTAGACATCAGATAGCAAGGCCCATCAGACCCCTCAGGCCACTGCTGTTCTGTACACATTCTCGCAACTATAGCTTAGGCTTAAGGCAAGGGGTTGACGACAAAATAACACGATAAGTACGATCTGTAGTGTATCGATCTTCCGGGTAGCTGGGGAGTCCGGTGACGACAAAGCAGCTGTGTAAAG												
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250
CTGCAAGGACCATGTTGCTAACTTGAAAAAATTACTATTAAATTACACTTGCAGTTGTTGCTTAGTAACATTATGATTTTGTGTTCTGTGACAGCATGAGCAGAGATCATTAAAAATTAACTTACGACGTTTCCCTGGTACACGATTGAACTTTTAAATGATTAATTAAATGTGAACGTCAACACGAAATCATTTGTAATACTAAACACAAAGCAGCACTGTGTAATCTGTCTCTAGTAAATTTTAAATTTGAAT												
260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380
CAAAGCTGCTAAAGTGGGAAGAGGAGAACTTGAAAGCCACAAATTTTGGCACTTGGTAGAGCCATCTAATCTCAGGTTATATGCTAGATCTTGGGGCAACACTGECATGCTCTGTTTATATTAAAGTTTCGACGATTTCACCCCTTCTCTTGAACTTCGGTGTAAACGTTGAACGAATCTTGGTAGATTAGAGTCCAAATATACGATCTAGAACCCCGTTTGTGACGTACAGAGACCAATATATAATTT												

390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510
CCACATACAGCACACTACTGACACTGATTTGTGCTGGTGCAGCTGGAGTTTATCACCACACATAAAAAACCTTGACCCCTGACGAATGGCTTGGAAATTACAATCAGATGGGGCCACATGGCATCCCGGGGTATGTCGTGATGACTGCTGACTAAACACAGACACCGTCGACCTCAAAATAGTGGTCTCTGTATTTTGTGGAACCTGGGAGCTCTTACGGACCTTAATGTTAGTCTACCCCGGTGTAAGGTAAGGGCC												

C

4
39

...CA..GGG...G.G..AAAATA.T.GA.T.TG..G.....-G.A.T.T.....-D

...A..T....>

图 3 A

HBDF

520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630			
TGAAGAAGCCCTAACCAGTTTCTGCTTGTGTTTCTGCTTCTCCCTACAGTCCACCAGGTGAGAGAGTG	ATG	ACC	ATC	CTT	TTC	CTT	ACT	ATG	GTT	ATT	TCA	TAC	TTT	GGT
ACTTCTTTGCGGATTGGTCAAAAGACAGACAGACAGACAGACAGAGGGATGTCAGGTGGTGCACCTCTTCTCAC	TAC	TGG	TAG	GAA	AAG	GAA	TGA	TAC	CAA	TAA	AGT	ATG	AAA	CCA

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly

PRE-PRO FORM OF BDNF

17 CCTTG...C...AG...-C...G...A...G...-C...GA...G...GG...-AG...A...T...A...C...
 99 A...GCAGCT...T...G...-T...A...-T...-GACAAG...AG...GA...-AAA...A...

图 3 B

640 650 660 670 680 690 700 710 720
 TGC ATG AAG GCT GCC CCC ATG AAA GAA GCA AAC ATC CGA GGA CAA GGT GGC TTG GGC TAC CCA GGT GTG GGG ACC CAT GGG ACT CTG GAG AGC GTG
 ACG TAC TTC CGA CGG GGG TAC TTT CTT CGT TTG TAG GCT CCT GTT CCA CCG AAC CGG ATG GGT CCA CAC GCC TGG GTA CCC TGA GAC CTC TCG CAC
 Cys Met Lys Ala Ala Pro Met Lys Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Leu Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val

129 G G... AC C AA
 209 C G... C A...

730 740 750 760 770 780 790 800 810 820
 AAT GGG CCC AAG GCA GGT TCA AGA GGC TTG ACA TCA TTG GCT GAC ACT TTC GAA CAC GTG ATA GAA GAG CTG TTG GAT GAG GAC CAG AAA GTT CCG
 TTA CCC GGG TTC CGT CCA AGT TCT CCG AAC TGT AGT AAC CGA CTG TGA AAG CTT GTG CAC TAT CTT CTC GAC AAC CTA CTC CTG GTC TTT CAA GCC
 Asn Gly Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg

CGACGA

225 G T C... ..G ..C C... .. T ..G C C C G

ATCGTCGTCATCGTC

305 C... ..G ..GG T C C G C C C

图 3 C

HBONFI																															
830	840	850	860	870	880	890	900	910																							
CCC	AAT	GAA	GAA	AAC	AAT	AAG	GAC	GCA	GAC	TTG	TAC	ACG	TCC	AGG	GTG	ATG	CTC	AGT	AGT	CNA	GTG	CCT	TTG	GAG	CCT	CCT	CTT	CTC	TTT	CTG	CTG
GGG	TTA	CTT	CTT	CTT	TTG	TTA	TTC	CTG	CGT	CTG	AAC	ATG	TGC	AGG	TCC	CAC	TAC	GAG	TCA	TCA	GTT	CAC	GGA	AAC	CTC	GGA	GAA	GAG	AAA	GAC	GAC
Pro	Asn	Glu	Glu	Asn	Asn	Lys	Asp	Ala	Asp	Leu	Tyr	Thr	Ser	Arg	Val	Met	Leu	Ser	Ser	Gln	Val	Pro	Leu	Glu	Pro	Pro	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

327	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
416	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

3 D

423G... ..T... ..T... ..C... ..C... ..T... ..C... ..
512G... ..C... ..C... ..C... ..C... ..C... ..C... ..C... ..

[illegible]

519C .ATC .TG .G .AG
608CGG .TGCAC .G ...

[illegible]

807 ... C. ... ————
 89616 ... C. ... ————
 A

[illegible]

THE

AAAAAATAATTTTATGAACACGCAAGTATAAATGAAGTTTATACAGTACAGTGGTCTACAACTATTTATTTGGAGATGTCCATCAGCAAGCGAAGAGAGTCATTTGGSCACAACTTAAAGAAGTCGCAATT

922G.....A.....A.....I.....

TTTAA
TTT

1012 AA.....

[illegible]

INDEX

ACATTCCTTGATTAATGTTGTGGTTTGTTECGTTGCCAAGAACTGAAACGGAAATTCCTGACG
TGTAAAGCAACTATTACAAACCAAAACAAACGCAACGGTCTTGACTTTTGCCCTTAAGGACGCTC

1050C.....T.....AA..

1140C.....

三

AGCGCATCGA GTGACTTTGG AGCTGGCCTT ATATTGGAT CTCCCGGCA GCTTTTGG

AACTCCTAGT GAAC ATG CTG TGC CTC AAG CCA GTG AAA TTA GGC TCC CTG

Met Leu Cys Leu Lys Pro Val Lys Leu Gly Ser Leu

-187

-180

GAG GTG GGA CAC GGG CAG CAT GGT GGA GTT TTG GCC AGT GGT CGT GCA
Glu Val Gly His Gly Gln His Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg Ala

-170

-160

GTC CAA GGG GCT GGA TGG CAT GCT GGA CCC AAG CTC AGC TCA GCG TCC
Val Gln Gly Ala Gly Trp His Ala Gly Pro Lys Leu Ser Ser Ala Ser

-150

GGA CCC AAT AAC AGT TTT ACC AAG GGA GCA GCT TTC TAT CCT GGC CAC
Gly Pro Asn Asn Ser Phe Thr Lys Gly Ala Ala Phe Tyr Pro Gly His

-140

-130

ACT GAG GTG CAT AGC GTA ATG TCC ATG TTG TTC TAC ACT CTG ATC ACA
Thr Glu Val His Ser Val Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr

-120

GCT TTT CTG ATC GGC ATA CAG GCG GAA CCA CAC TCA GAG AGC AAT GTC
Ala Phe Leu Ile Gly Ile Gln Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val

-110

-100

CCT GCA GGA CAC ACC ATC CCC CAA GTC CAC TGG ACT AAA CTT CAG CAT
Pro Ala Gly His Thr Ile Pro Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His

-90

-80

TCC CTT GAC ACT GCC CTT CGC AGA GCC CGC AGC GCC CCG GCA GCG GCG
Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala

-70

ATA GCT GCA CGC GTG GCG GGG CAG ACC CGC AAC ATT ACT GTG GAC CCC
Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro

-60

-50

AGG CTG TTT AAA AAG CGG CGA CTC CGT TCA CCC CGT GTG CTG TTT AGC
Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser

-40

ACC CAG CCT CCC CGT GAA GCT GCA GAC ACT CAG GAT CTG GAC TTC GAG
 Thr Gln Pro Pro Arg Glu Ala Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu

-30

-20

GTC GGT GGT GCT GCC CCC TTC AAC AGG ACT CAC AGG AGC AAG CGG TCA
 Val Gly Gly Ala Ala Pro Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser

-10

1

TCA TCC CAT CCC ATC TTC CAC AGG GGC GAA TTC TCG GTG TGT GAC AGT
 Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser

10

GTC AGC GTG TGG GTT GGG GAT AAG ACC ACC GCC ACA GAC ATC AAG GGC
 Val Ser Val Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly

20

30

AAG GAG GTG ATG GTG TTG GGA GAG GTG AAC ATT AAC AAC AGT GTA TTC
 Lys Glu Val Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Ser Val Phe

40

AAA CAG TAC TTT TTT GAG ACC AAG TGC CGG GAC CCA AAT CCC GTT GAC
 Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp

50

60

图 4B

AGC GGG TGC CGG GGC ATT GAC TCA AAG CAC TGG AAC TCA TAT TGT ACC
Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr

70

80

ACG ACT CAC ACC TTT GTC AAG GCG CTG ACC GTG GAT GGC AAG CAG GCT
Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala

90

GCC TGG CGG TTT ATC CGG ATA GAT ACG GCC TGT GTG TGT GTG CTC AGC
Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser

100

110

AGG AAG GCT GTG AGA AGA GCC TGACCTGCCG ACACGCTCCC TCCCCCTGCC
Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala

120

CCTTCTACAC TCTCCTGGGC CCCTCCCTAC CTC AACCTGT AAATTATTTT AAATTATAAG

GACTGCATGG TAATTTATAG TTTATACAGT TTAAAGAAT CATATTAT TAAATTTTG

GAAGCATCCT GTGTCTGA

4 C

9	1142	r/NT-3	R
33	1057	h/NT-3	H

10 * 20 * 30 * 40 * 50 * R

GA TTCCATAA TGA CCC AGA CTC TTC CAG TCA GAT ATT AAC ACT TGT GTT
CT AAGGTATT ACT GGG TCT GAG AAG GTC AGT CTA TAA TTG TGA ACA CAA
End Pro Arg Leu Phe Gln Ser Asp Ile Asn Thr Cys Val>

40 * 50 * 60 * 70 * 80 * H

TGCCAGAA TAA CAC AGA CTC AGC TGC CAG AGC CTG CTC TTA ACA CCT GTG
ACGGTCTT ATT GTG TCT GAG TCG ACG GTC TCG GAC GAG AAT TGT GGA CAC
End His Arg Leu Ser Cys Gln Ser Leu Leu Thr Pro Val>

60 * 70 * 80 * 90 * 100 * R

TCC TTC TTT CAG ATC TTA CAG GTG AAC AAG GTG ATG TCC ATC TTG TTT
AGG AAG AAA GTC TAG AAT GTC CAC TTG TTC CAC TAC AGG TAG AAC AAA
Ser Phe Phe Gln Ile Leu Gln Val Asn Lys Val

Met Ser Ile Leu Phe>
PREPRO _>>

90 * 100 * 110 * 120 * 130 * H

TTT CCT TTT CAG ATC TTA CAG GTG AAC AAG GTG ATG TCC ATC TTG TTT
AAA GGA AAA GTC TAG AAT GTC CAC TTG TTC CAC TAC AGG TAG AAC AAA
Phe Pro Phe Gln Ile Leu Gln Val Asn Lys Val

Met Ser Ile Leu Phe>
PREPRO _>>

110	120	130	140	150	
*	*	*	*	*	
TAT GTG ATA TTT CTT GCT TAT CTC CGT GGC ATC CAA GGC AAC AAC ATG					R
ATA CAC TAT AAA GAA CGA ATA GAG GCA CCG TAG GTT CCG TTG TTG TAC					
Tyr Val Ile Phe Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Ile Gln Gly Asn Asn Met>					
140	150	160	170		
*	*	*	*		
TAT GTG ATA TTT CTC GCT TAT CTC CGT GGC ATC CAA GGT AAC AAC ATG					H
ATA CAC TAT AAA GAG CGA ATA GAG GCA CCG TAG GTT CCA TTG TTG TAC					
Tyr Val Ile Phe Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Ile Gln Gly Asn Asn Met>					
160	170	180	190	200	
*	*	*	*	*	
GAT CAA AGG AGT TTG CCA GAA GAC TCT CTC AAT TCC CTC ATT ATC AAG					R
CTA GTT TCC TCA AAC GGT CTT CTG AGA GAG TTA AGG GAG TAA TAG TTC					
Asp Gln Arg Ser Leu Pro Glu Asp Ser Leu Asn Ser Leu Ile Ile Lys>					
180	190	200	210	220	
*	*	*	*	*	
GAT CAA AGG AGT TTG CCA GAA GAC TCG CTC AAT TCC CTC ATT ATT AAG					H
CTA GTT TCC TCA AAC GGT CTT CTG AGC GAG TTA AGG GAG TAA TAA TTC					
Asp Gln Arg Ser Leu Pro Glu Asp Ser Leu Asn Ser Leu Ile Ile Lys>					

210	220	230	240	
* TTG ATC CAG GCG GAT ATC TTG AAA AAC AAG CTC TCC AAG CAG ATG GTA AAC TAG GTC CGC CTA TAG AAC TTT TTG TTC GAG AGG TTC GTC TAC CAT	* Leu Ile Gln Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Leu Ser Lys Gln Met Val>	* 230	* 240	* 250
* CTG ATC CAG GCA GAT ATT TTG AAA AAC AAG CTC TCC AAG CAG ATG GTG GAC TAG GTC CGT CTA TAA AAC TTT TTG TTC GAG AGG TTC GTC TAC CAC	* Leu Ile Gln Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Leu Ser Lys Gln Met Val>	* 260	* 270	* 280
* 250 GAT GTT AAG GAA AAT TAC CAG AGC ACC CTG CCC AAA GCA GAG GCA CCC CTA CAA TTC CTT TTA ATG GTC TCG TGG GAC GGG TTT CGT CTC CGT GGG	* Asp Val Lys Glu Asn Tyr Gln Ser Thr Leu Pro Lys Ala Glu Ala Pro>	* 290	* 300	* 310
* 280 GAC GTT AAG GAA AAT TAC CAG AGC ACC CTG CCC AAA GCT GAG GCT CCC CTG CAA TTC CTT TTA ATG GTC TCG TGG GAC GGG TTT CGA CTC CGA GGG	* Asp Val Lys Glu Asn Tyr Gln Ser Thr Leu Pro Lys Ala Glu Ala Pro>	* 320	* 330	* 340

300 * 310 * 320 * 330 * 340 *
 AGA GAA CCA CAG CAG GGA GAG GCC ACC AGG TCA GAA TTC CAG CCG ATG R
 TCT GTT GGT CTC GTC CCT CTC CGG TGG TCC AGT CTT AAG GTC GGC TAC

Arg Glu Pro Glu Gln Gly Gly Ala Thr Arg Ser Gly Phe Gln Pro Met

330 * 340 * 350 * 360 * 370 *
 CGA GAG CCG GAG CAG GGA GGG CCC CGC AAG TCA GCA TTC CAG CCA GTG H
 GCT CTC GGC CTC GTC CCT CCC GGG GCG TTC AGT CGT AAG GTC GGT CAC

Arg Glu Pro Glu Gln Gly Gly Pro Arg Lys Ser Ala Phe Gln Pro Val>

350 * 360 * 370 * 380 * 390 *
 ATT GCA ACA GAC ACA GAA CTA CTA CGG CAA CAG AGA CGC TAC AAT TCA R
 TAA CGT TGT CTG TGT CTT GAT GAT GAT GGC GTT GTC TCT GCG ATG TTA AGT

Ile Ala Thr Asp Thr Glu Leu Leu Arg Gln Arg Gln Arg Tyr Asn Ser>

380 * 390 * 400 * 410 *
 ATT GCA ATG GAC ACC GAA CTG CTG CGA CAA CAG AGA CGC TAC AAC TCA H
 TAA CGT TAC CTG TGG CTT GAC GAC GCT GTT GTC TCT GCG ATG TTG AGT

Ile Ala Met Asp Thr Glu Leu Leu Arg Gln Arg Gln Arg Tyr Asn Ser>

图 5 C

400 * 410 * 420 * 430 * 440 *
 CCC CGG GTC CTG AGT GAC AGC ACC CCT TTG GAG CCC CCT CCC TTA R
 GGG GCC CAG GAC GAC TCA CTG TCG TGG GGA AAC CTC GGG GGA GGG AAT

Pro Arg Val Leu Leu Ser Asp Ser Thr Pro Leu Glu Pro Pro Pro Leu>

420 * 430 * 440 * 450 * 460 *
 CCG CGG GTC CTG AGC GAC ACG ACC CCC TTG GAG CCC CCG CCC TTG H
 GGC GCC CAG GAC GAC TCG CTG TGC TGG GGG AAC CTC GGG GGC GGG AAC

Pro Arg Val Leu Leu Ser Asp Thr Thr Pro Leu Glu Pro Pro Pro Leu>

450 * 460 * 470 * 480 *
 TAT CTA ATG GAA GAT TAT GTG GGC AAC CCG GTG GTA ACC AAT AGA ACA R
 ATA GAT TAC CTT CTA ATA CAC CCG TTG GGC CAC CAT TGG TTA TCT TGT

Tyr Leu Met Glu Asp Tyr Val Gly Asn Pro Val Val Thr Asn Arg Thr>

470 * 480 * 490 * 500 * 510 *
 TAT CTC ATG GAG GAT TAC GTG GGC AGC CCC GTG GTG GCG AAC AGA ACA H
 ATA GAG TAC CTC CTA ATG CAC CCG TCG GGG CAC CAC CGC TTG TCT TGT

Tyr Leu Met Glu Asp Tyr Val Gly Ser Pro Val Val Ala Asn Arg Thr>

 5 D

490 * 500 510 520 530
TCA CCA CGG AGG AAA CGC TAT GCA GAG CAT AAG AGT CAC CGA GGA GAG R
AGT GGT GCC TCC TTT GCG ATA CGT CTC GTA TTC TCA GTG GCT CCT CTC

Ser Pro Arg Arg Lys Arg

Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu>
— >>
—

520 530 540 550
TCA --- CGG CGG AAA CGG TAC GCG GAG CAT AAG AGT CAC CGA GGG GAG H
AGT --- GCC GCC TTT GCG ATG CCG CTC GTA TTC TCA GTG GCT CCC CTC

Ser — Arg Arg Lys Arg

Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu>
— >>
—

540 * 550 560 570 580
TAC TCA GTG TGT GAC AGT GAG AGC CTG TGG GTG ACC GAC AAG TCC TCA R
ATG AGT CAC ACA CTG TCA CTC TCG GAC ACC CAC TGG CTG TTC AGG AGT

Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser>

560 * 570 580 590 600
TAC TCG GTA TGT GAC AGT GAG AGT CTG TGG GTG ACC GAC AAG TCA TCG H
ATG AGC CAT ACA CTG TCA CTC TCA GAC ACC CAC TGG CTG TTC AGT AGC

Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser>

5 E

590 * 600 * 610 * 620 * 630 *
 GCC ATT GAC ATT CGG GGA CAC CAG GTT ACA GTG TTG GGA GAG ATC AAA R
 CGG TAA CTG TAA GCC CCT GTG GTC CAA TGT CAC AAC CCT CTC TAG TTT

Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys>

610 * 620 * 630 * 640 * 650 *
 GCC ATC GAC ATT CGG GGA CAC CAG GTC ACG GTG CTG GGG GAG ATC AAA H
 CGG TAG CTG TAA GCC CCT GTG GTC CAG TGC CAC GAC CEC CTC TAG TTT

Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys>

640 * 650 * 660 * 670 * 680 *
 ACC GGC AAC TCT CCT GTG AAA CAA TAT TTT TAT GAA ACG AGG TGT AAA R
 TGG CCG TTG AGA GGA CAC TTT GTT ATA AAA ATA CTT TGC TCC ACA TTT

Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys>

660 * 670 * 680 * 690 * 700 *
 ACG GGC AAC TCT CCC GTC AAA CAA TAT TTT TAT GAA ACG CGA TGT AAG H
 TGC CCG TTG AGA GGG CAG TTT GTT ATA AAA ATA CTT TGC GCT ACA TTC

Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys>
 50

690	700	710	720	
* GAA GCC AGG CCA GTC AAA AAC GGT TGC AGG GGG ATT GAT GAC AAA CAC CTT CGG TCC GGT CAG TTT TTG CCA ACG TCC CCC TAA CTA CTG TTT GTG	* Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys His>	* 730	* 740	* 750
* GAA GCC AGG CCG GTC AAA AAC GGT TGC AGG GGT ATT GAT GAT AAA CAC CTT CGG TCC GGC CAG TTT TTG CCA ACG TCC CCA TAA CTA CTA TTT GTG	* H			
Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys His>				

730	740	750	760	770	
* TGG AAC TCT CAG TGC AAA ACG TCG CAA ACC TAC GTC CCA GCA CTG ACT ACC TTG AGA GTC ACG TTT TGC AGC GTT TGG ATG CAG GCT CGT GAC TGA	* R	* 770	* 780	* 790	
Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr>					
* TGG AAC TCT CAG TGC AAA ACA TCC CAA ACC TAC GTC CGA GCA CTG ACT ACC TTG AGA GTC ACG TTT TGT TGT AGG GTT TGG ATG CAG GCT CGT CAC TGA	* H				
Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr>					

5 G

```

780 *      790 *      800 *      810 *      820 *
TCA GAA AAC AAC AAA CTC GTA GGC TGG CGC TGG ATA CGA ATA GAC ACT   R
AGT CTT TTG TTG TTT GAG CAT CCG ACC GCG ACC TAT GCT TAT CTG TGA

Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr>

800 *      810 *      820 *      830 *      840 *
TCA GAG AAC AAT AAA CTC GTG GGC TGG CGG TGG ATA CGG ATA GAC ACG   H
AGT CTC TTG TTA TTT GAG CAC CCG ACC GCC ACC TAT GCC TAT CTG TGC

Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr>
100

830 *      840 *      850 *      860 *
TCC TGT GTG TGT GCC TTG TCA AGA AAA ATC GGA AGA ACA TGA   R
AGG ACA CAC ACA CGG AAC AGT TCT TTT TAG CCT TCT TGT ACT

Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr End>

850 *      860 *      870 *      880 *
TCC TGT GTG TCT GCC TTG TCG AGA AAA ATC GGA AGA ACA TGA   H
AGG ACA CAC ACA CGG AAC AGC TCT TTT TAG CCT TCT TGT ACT

Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr End>
119

```

图 5 H

870	*	880	*	890	*	900	*	910	*	920	*	R
ATTGGCATCT GTCCCCACAT ATAAATTATT ACTTTAAATT ATATGATATG CAT												
TAACCGTAGA CAGGGGTGTA TATTTAATAA TGAATTTTAA TATACTATAC GTA												
890	*	900	*	910	*	920	*	930	*	940	*	H
ATTGGCATCT CTCCCCATAT ATAAATTATT ACTTTAAATT ATATGATATG CAT												
TAACCGTAGA GAGGGGTATA TATTTAATAA TGAATTTTAA TATACTATAC GTA												
930	*	940	*	950	*	960	*	970	*	980	*	R
GTAGCATATA AATGTTTATA TTGTTTTTAT ATATTATAAG TTGACCTTTA TTTATTAAAC												
CATCGTATAT TTACAAATAT AACAAAATA TATAATATTC AACTGGAAAT AAATAATTGG												
950	*	960	*	970	*	980	*	990	*	1000	*	H
GTAGCATATA AATGTTTATA TTGTTTTTAT ATAT-ATAAG TTGACCTTTA TTTATTAAAC												
CATCGTATAT TTACAAATAT AACAAAATA TATA-TATTC AACTGGAAAT AAATAATTGG												

图 5 I

990	*	1000	*	1010	*	1020	*	1030	*	1040	*	
TTCAGCAACC		CTTACAGTAT		ATAAGCTTTT		TTTTCTCAAT		AAAATTGCTG		TGCTTGCCCTT		R
AAGTCGTTGG		GAATGTCATA		TATTCGAAAA		AAAAGAGTTA		TTTTAAGCAC		ACGAACGGA		
1010	*	1020	*	1030	*	1040	*	1050	*			
TTCAGCAACC		CT-ACAGTAT		ATAAGCTTAT		CGATACCGTC		GACCTCGAGG		GGGGGCC/		H
AAGTCGTTGG		GA-TGTCATA		TATTCGAATA		GCTATGECAG		CTGAGCTCC		CCCCCG/		
1050	*	1060	*	1070	*	1080	*	1090	*	1100	*	
CGCTCAGGCC		TCTCCCATCT		GTTAACCTTG		TTTTGTGATT		GGGCTCTCGG		GAACCTTCTG		R
GCGAGTCCGG		AGAGGGTAGA		CAATTGGAAC		AAACACTAA		CCGAGAGGCC		CTTGGGAAGAC		
1110	*	1120	*	1130	*	1140	*					
TAAACCTGT		GTACACCAGT		ATTGGCATT		CAGTATTGTC		AA/				R
ATTTTGGACA		CATGTGGTCA		TAAACCGTAA		GTCATAACAG		TT/				

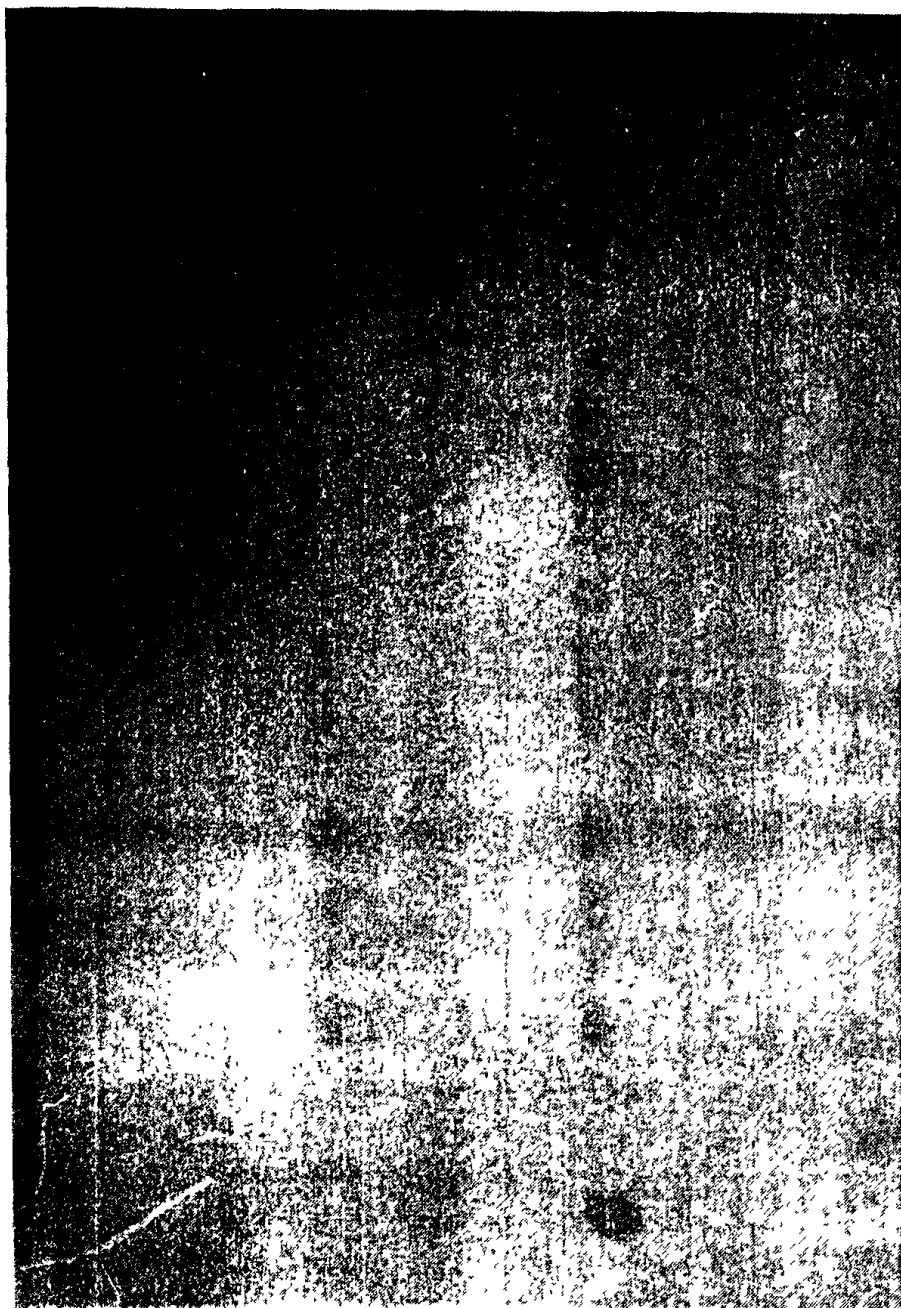
5'GG GTC CTG CTG AGC GAC ACC ACC CCC TTG **GAG** CCC CCG
 3' CG CC CAG GAC GAC TCG CTG TGC TGG GGG **AAC CTC** GGG GGC

 CCC TTG TAT CTC ATG GAG CAT TAC GTG GGC **AGC CCG**
 GGG AAC ATA GAG TAC CTC CTA ATG CAC CCG TCG GGG

 GTG GTG GCG AAC AGA ACA TCA CGG CGG **AAA 3'**
 CAC CAC CGC TTG TCT TGT AGT GCC GCC TTT **GCS'**

■ 6

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



7