



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101875692 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 03

(21) 申请号 201010209043. 2

A01K 67/027(2006. 01)

(22) 申请日 2005. 12. 28

C12R 1/91(2006. 01)

(30) 优先权数据

60/640, 333 2004. 12. 30 US

(62) 分案原申请数据

200580048811. 8 2005. 12. 28

(71) 申请人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡

(72) 发明人 黄智宏 米兰达·G·S·亚普

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 罗天乐

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

C12N 15/12(2006. 01)

C12N 15/113(2010. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C12P 21/00(2006. 01)

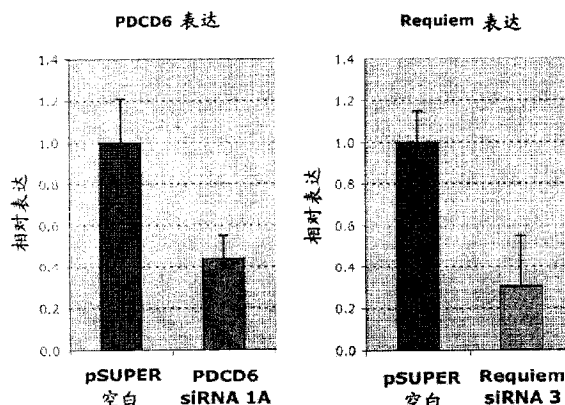
权利要求书 2 页 说明书 48 页 序列表 27 页
附图 26 页

(54) 发明名称

中国仓鼠凋亡相关基因

(57) 摘要

本发明涉及中国仓鼠凋亡相关基因,更具体地本发明提供能够介导细胞凋亡的分离的中国仓鼠基因和多肽。所披露的多肽为 FAIM、FADD、PDCD6 和 Requiem。还披露了调节所述多肽表达以增强细胞生存力、重组蛋白质产量和蛋白质糖基化的方法。



1. 一种分离的多肽,其包含与 SEQ ID NO :4 所示的序列具有至少 99% 序列同一性的序列,所述多肽能够介导中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞凋亡。
2. 权利要求 1 所述的分离的多肽,其包含 SEQ ID NO :4 所示的序列。
3. 一种分离的多核苷酸,其包含编码权利要求 1 或 2 所述多肽的序列。
4. 一种分离的多核苷酸,其包含与 SEQ ID NO :8 所示的序列具有 90% 或更高序列同一性的序列;或与其互补的、能够在严格条件下与其杂交的、或由于遗传密码而与其具有简并性的序列,所述多核苷酸序列编码能够介导中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞凋亡的多肽。
5. 一种表达序列,包含与调控序列可操作连接的根据权利要求 3 或 4 的多核苷酸或其部分,所述调控序列能够指导所述多核苷酸的表达,其中所述表达序列优选是表达载体。
6. 一种构建体,其能够在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中减量调节或抑制与 SEQ ID NO :4 所示的序列具有至少 99% 序列同一性的序列的表达。
7. 根据权利要求 6 所述的构建体,其中所述构建体包括反义构建体、抑制载体构建体、包含与 SEQ ID NO :4 所示的序列具有至少 99% 序列同一性的序列的无功能变体的构建体、双链 (ds) RNA 构建体、小干扰 RNA (siRNA) 构建体,或显性阴性突变体构建体。
8. 权利要求 6 或 7 所述的构建体,其中所述构建体包含具有序列 5' -GATCCGCGGATCC TTGAACCTGATTTCAAGAGAATCAGGTTTCAGGATCCGCTTTTTTGAAAAAGCTT-3'、SEQ ID NO :15、或 SEQ ID NO :16 的小干扰 RNA (siRNA) 插入。
9. 根据权利要求 6 到 8 任一项所述的构建体,其中所述构建体包含具有 SEQ ID NO :40 所示序列的质粒。
10. 一种细胞,其包含根据权利要求 5 所述的表达序列,或根据权利要求 6 到 9 任一项所述的构建体。
11. 根据权利要求 10 所述的细胞,其中所述表达序列或构建体被转染或稳定整合入该细胞。
12. 一种经修饰的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或该经修饰细胞的后代,其中较之未经如此修饰的细胞,所述经修饰细胞减量调节具有 SEQ ID NO :4 所示的序列或与其有至少 99% 的序列同一性的序列的多肽的表达,或者具有 SEQ ID NO :8 所示的序列或与其有至少 99% 的序列同一性的序列的多核苷酸的表达。
13. 一种细胞系,其包含权利要求 10、11 或 12 所述的细胞,或其后代。
14. 一种细胞培养物,其包含权利要求 10、11 或 12 所述的细胞,或其后代,或权利要求 13 所述的细胞系。
15. 一种转基因非人动物,其包含权利要求 10、11 或 12 所述的细胞,或其后代。
16. 一种产生重组蛋白的方法,所述方法包括提供根据权利要求 10 到 12 所述的细胞,所述细胞包含能够表达所述重组蛋白的表达载体,并且导致所述重组蛋白在所述细胞中自所述表达载体表达。
17. 一种方法,包括在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中减量调节具有 SEQ ID NO :4 所示的序列或与其有至少 99% 的序列同一性的序列的多肽、或具有 SEQ ID NO :8 所示的序列或与其有至少 99% 的序列同一性的序列的多核苷酸的表达。
18. 根据权利要求 17 所述的方法,其包括将权利要求 6 到 9 中任一项所述的载体暴露于所述细胞,将所述构建体转染入所述细胞内或将所述构建体稳定整合入所述细胞。

19. 根据权利要求 6 到 9 任一所述的构建体、权利要求 10 到 12 任一所述的细胞、权利要求 13 所述的细胞系、权利要求 14 所述的细胞培养物、或者权利要求 15 所述的转基因非人动物用于产生蛋白质的用途,所述蛋白质优选是异源蛋白,更优选来自外源导入的序列,最优选是重组蛋白,优选是干扰素 γ 。

20. 根据权利要求 10 到 12 任一项所述的细胞、权利要求 13 所述的细胞系、权利要求 14 所述的细胞培养物、权利要求 15 所述的转基因非人动物、或权利要求 16 到 18 任一项所述的方法,其中较之所述多肽的表达未被如此调节的细胞:(i) 所述细胞的细胞生存力提高或增强,优选其中所述细胞的凋亡减少;(ii) 所述细胞的蛋白质产量,优选重组表达的蛋白质产量提高或增强;和/或(iii) 所述细胞所表达的蛋白质的糖基化,优选唾液酸化作用提高或增强。

中国仓鼠凋亡相关基因

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 12 月 28 日、申请号为 200580048811.8(国际申请号为 PCT/SG2005/000433)、发明名称为“中国仓鼠凋亡相关基因”的发明申请的分案申请。

[0002] 领域

[0003] 本发明涉及生物技术和分子生物学领域。本发明特别涉及来自中国仓鼠 (Chinese hamster) (*Cricetulus griseus*) 的新的基因,所述基因涉及凋亡过程的介导。

[0004] 背景

[0005] 随着人类基因组计划的完成,每天都发现更多具有治疗潜力的蛋白质。许多这些新的生物治疗剂常常需要开发高产的生产过程来满足全球的需求。用于复杂的治疗性生物产品生产的最常用的细胞系之一是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞,其最初来源于中国仓鼠。

[0006] 然而,中国仓鼠的基因组很少被表征,特别是,缺少对该有机体中控制生理学上重要的过程的基因的了解。

[0007] 美国专利号 6,562,797 描述了称为 FADD 的纯化的哺乳动物蛋白质,其具有结合 Fas 受体的细胞质区域或结构域的能力。这个文件还描述了调节 FAS 相关的凋亡的方法。然而,所公开的唯一序列是人类来源的。

[0008] 美国专利号 6,683,168 和美国专利申请公开号 US 2004/0121389 描述了许多形式的 FAIM 序列的序列:短的、长的、超长的和肺癌相关的。所述序列是人类和小鼠序列。

[0009] 美国专利号 6,544,523 列出了编码 Fas 配体的 DNA 的序列。美国专利号 6,451,759 描述了这种配体的非可裂解形式。

[0010] 概述

[0011] 我们首次描述了中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*) FAIM、FADD、PDCD6 和 Requiem 的序列。

[0012] 根据本发明的第 1 方面,我们提供了包含选自以下的序列的分离的多肽,所述分离的多肽能够介导细胞的凋亡:(a) 与 SEQ ID NO:1 所示序列具有至少 97% 的序列同一性的 cg FAIM 序列;(b) 与 SEQ ID NO:2 所示序列具有至少 69% 序列同一性的 cgFADD 序列;(c) 与 SEQ ID NO:3 所示序列具有至少 89% 序列同一性的 cgPDCD6 序列;(d) 与 SEQ ID NO:4 所示序列具有至少 90% 序列同一性的 cgRequiem 序列;(e) 以上 (a) 到 (d) 的任一项的至少 15 个连续残基的片段的序列。

[0013] 根据本发明的第 2 方面,提供了包含能够介导细胞凋亡的中国仓鼠序列的分离的多肽,所述序列选自 SEQ ID NO:1 所示的 cgFAIM 序列;SEQ ID NO:2 所示的 cgFADD 序列;SEQ ID NO:3 所示的 cgPDCD6 序列;和 SEQ ID NO:4 所示的 cgRequiem 序列。

[0014] 根据本发明的第 1 方面,我们提供了包含能够介导细胞的凋亡的中国仓鼠序列的分离的多肽,所述序列选自 SEQ ID NO:1 所示的 cgFAIM 序列;SEQ ID NO:2 所示的 cgFADD 序列;SEQ ID NO:3 所示的 cgPDCD6 序列;和 SEQ ID NO:4 所示的 cgRequiem 序列。

[0015] 根据本发明的第 2 方面,提供了包含选自以下的序列的分离的多肽:(a) 与 SEQ ID NO:1 所示序列具有至少 97% 序列同一性的 cg FAIM 序列;(b) 与 SEQ ID NO:2 所示序列具有至少 69% 序列同一性的 cgFADD 序列;(c) 与 SEQ ID NO:3 所示序列具有至少 89% 序列同

一性的 cgPDCD6 序列 ;(d) 与 SEQ ID NO :4 所示序列具有至少 90% 序列同一性的 cgRequiem 序列 ;(e) 以上 (a) 到 (d) 的任一项的至少 15 个连续残基的片段的序列。

[0016] 根据本发明的第 3 方面,我们提供了包含序列的分离的多核苷酸,所述序列编码所列出的多肽,其中所述序列优选的选自 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :8 组成的组。

[0017] 作为本发明的第 4 方面,提供了包含选自以下的序列的分离的多核苷酸,或与其互补的序列,其能够在严谨条件下与其杂交,或作为遗传密码结果的其简并序列:(a) 与 SEQ ID NO :5 所示序列具有 90% 或更高序列同一性的 cg FAIM 序列 ;(b) 与 SEQ ID NO :6 所示序列具有 90% 或更高序列同一性的 cgFADD 序列 ;(c) 与 SEQ ID NO :7 所示序列具有 93% 或更高序列同一性的 cgPDCD6 序列 ;(d) 与 SEQ ID NO :8 所示序列具有 89% 或更高序列同一性的 cgRequiem 序列 ;(e) 以上 (a) 到 (d) 的任一项的至少 15 个连续残基的片段的序列。

[0018] 根据本发明的第 5 方面,我们提供了表达序列,其包含与调控序列可操作连接的如上列出的多核苷酸或其部分,所述调控序列能够指导所述多核苷酸的表达。

[0019] 优选的,这种表达序列是表达载体。

[0020] 在第 6 方面,本发明提供了包含根据如上列出的多核苷酸的载体,当暴露于细胞时,所述载体能够调节细胞的 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 或 cgRequiem 的表达。

[0021] 优选的,所述载体包含中国仓鼠 FAIM 序列或其部分,所述载体能够导致细胞中 cgFAIM,优选 pcDNA3.1(+)FAIM(SEQ ID NO :37) 的增量调节。

[0022] 优选的,所述载体包含中国仓鼠 FADD 序列或其部分,所述载体能够导致细胞中 cgFADD,优选 pcDNA3.1(+)FADD DN(SEQ ID NO :38) 的减量调节。

[0023] 优选的,所述载体包含中国仓鼠 PDCD6 序列或其部分,所述载体能够导致细胞中 cgPDCD6,优选 pSUPER.neo.PDCD6siRNA(SEQ ID NO :39) 的减量调节。

[0024] 优选的,所述载体包含中国仓鼠 Requiem 序列或其部分,并能够导致细胞 cgRequiem,优选 pSUPER.neo.Requiem siRNA(SEQ ID NO :40) 的减量调节。

[0025] 在本发明的第 7 方面,提供了包含所描述的表达序列或所描述的载体的细胞,其中所述表达序列优选已被转化到所述细胞中。

[0026] 根据本发明的第 8 方面,我们提供了包含如所列的多肽、如所列的多核苷酸、如所列的表达序列、如所列的载体或如所列的细胞,连同药学上可接受的运载体(carrier)或稀释剂的药物组合物。

[0027] 根据本发明的第 9 方面,我们提供了生产多肽的方法,包括:(a) 提供包含如所列的多核苷酸序列和调控序列的表达序列,其中所述调控序列能够指导所述多肽从所述多核苷酸序列的表达,(b) 容许在所述调控序列的控制下从所述表达序列表达所述多肽,以及(c) 任选的纯化所述多肽。

[0028] 优选的,所述表达序列包含转染到细胞,优选的中国仓鼠细胞中的表达载体,以容许所述多肽被所述细胞表达。

[0029] 根据本发明的第 10 方面,提供了一种方法,包括在细胞,优选的中国仓鼠细胞中调节,优选增量调节具有 SEQ ID NO :1 所示序列的 cgFAIM 多肽或具有 SEQ ID NO :5 所示序列的 cgFAIM 多核苷酸的表达。

[0030] 作为本发明的第 11 方面,我们提供了一种方法,包括在细胞中,优选的中国仓鼠细胞中,调节,优选的减量调节具有 SEQ ID NO:2 所示序列的 cgFADD 多肽、具有 SEQ ID NO:3 所示序列的 cgPDCD6 多肽或具有 SEQ ID NO:4 所示序列的 cgRequiem 多肽,或者具有 SEQ ID NO:6 所示序列的 cgFAIM 多核苷酸、具有 SEQ ID NO:7 所示序列的 cgPDCD6 多核苷酸或具有 SEQ ID NO:8 所示序列的 cgRequiem 多核苷酸的表达。

[0031] 优选的,所述方法包括使如所列的载体暴露于细胞,优选的用所述载体转染所述细胞。

[0032] 根据本发明的第 12 方面,我们提供了一种细胞,优选的中国仓鼠细胞,其已被修饰,优选的被遗传工程化,以与没有被如此修饰的细胞相比,增量调节具有 SEQ ID NO:1 所示序列的多肽或具有 SEQ ID NO:5 所示序列的多核苷酸的表达。

[0033] 根据本发明的第 13 方面,我们提供了一种细胞,优选的中国仓鼠细胞,其已被修饰,优选的被遗传工程化,以与没有被如此修饰的细胞相比,减量调节具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示序列的多肽或具有 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:8 所示序列的多核苷酸的表达。

[0034] 根据本发明的第 14 方面,提供了一种细胞系,其包含所描述的细胞,或其后代,优选的中国仓鼠细胞系。

[0035] 根据本发明的第 15 方面,我们提供了一种细胞培养物,其包含所描述的细胞,或其后代,或所描述的细胞系。

[0036] 根据本发明的第 16 方面,我们提供了包含所描述的细胞,或其后代的转基因非人类动物,优选的中国仓鼠。

[0037] 优选的,与其中所述多肽的表达不被如此调节的细胞相比,(i) 细胞的细胞生存力被提高或增强,优选其中细胞的凋亡被降低;(ii) 细胞的蛋白质产量,优选的重组表达的蛋白质的产量被提高或增强;和/或(iii) 细胞表达的蛋白的糖基化、优选的唾液酸化作用被提高或增强。

[0038] 根据本发明的第 17 方面,我们提供了如所列方法、如所列细胞、如所列细胞系、如所列细胞培养物、或如所列转基因非人动物的用途,用于蛋白质、优选的异源蛋白质、更优选的从外源导入的序列,最优选的重组蛋白质的生产。

[0039] 根据本发明的第 18 方面,我们提供了生产重组蛋白质的方法,所述方法包括提供如所列的细胞,用能够表达所述重组蛋白质的表达载体转染所述细胞,并引起所述细胞中的重组蛋白表达。

[0040] 根据本发明的第 19 方面,我们提供了包含具有 SEQ ID NO:9 的 cgFADD 显性阴性序列的多肽,或能够编码这种多肽的多核苷酸,优选的 SEQ ID NO:10,或其片段、同源物、变体或衍生物。

[0041] 作为本发明的第 20 方面,我们提供了多肽,优选的重组蛋白质,更优选的干扰素 γ ,可通过根据本发明的第 17 或第 18 方面的方法产生,与可从不被如此修饰的细胞产生的多肽相比,所述多肽具有提高的唾液酸化作用。

[0042] 优选的,所述唾液酸化作用大于 2.9mol 唾液酸/mol 产生的多肽,优选的约 3.5mol 唾液酸/mol 产生的多肽。

[0043] 本发明的进一步特别的和优选的方面在附随的独立和从属权利要求中列出。从属

权利要求的特征可以酌情与独立权利要求的特征组合,并且与未在权利要求中明确列出的特征组合。

[0044] 除非另有陈述,本发明的实践将采用化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术,所有这些都处在本领域普通技术人员的能力范围内。这些技术已经在文献中说明了。参见,例如, J.Sambrook, E.F.Fritsch, and T.Maniatis,1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J.M. Polak and James O' D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; D.M. J. Lilley and J.E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press; *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO. I* by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); *Antibodies: A Laboratory Manual* by Ed Harlow (Editor), David Lane (Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-314-2), 1955, Lars-Inge Larsson "Immunocytochemistry: Theory and Practice", CRC Press inc., Boca Raton, Florida, 1988, ISBN 0-8493-6078-1, John D. Pound (ed); "Immunochemical Protocols, vol 80", in the series: "Methods in Molecular Biology", Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998, ISBN 0-89603-493-3, *Handbook of Drug Screening*, edited by Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, New York, NY, Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); *Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench*, Edited Jane Roskams and Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3; 和 *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy* (17th Edition, Beers, M. H., and Berkow, R, Eds, ISBN: 0911910107, John Wiley & Sons)。这些普通的教科书的每一个通过参考在此引入。

[0045] 本发明还涉及:

[0046] 1. 一种分离的多肽,其包含选自以下的序列,并能够介导细胞凋亡:

[0047] (a) 与 SEQ ID NO:1 所示的序列具有至少 97% 序列同一性的 cgFAIM 序列;

[0048] (b) 与 SEQ ID NO:2 所示的序列具有至少 69% 序列同一性的 cgFADD 序列;

[0049] (c) 与 SEQ ID NO:3 所示的序列具有至少 89% 序列同一性的 cgPDCD6 序列;

[0050] (d) 与 SEQ ID NO:4 所示的序列具有至少 90% 序列同一性的 cgRequiem 序列;

[0051] (e) 是上述 (a) 到 (d) 中任一个的至少 15 个连续残基的片段的序列。

[0052] 2. 一种分离的多肽,包含能介导细胞的凋亡的中国仓鼠序列,所述序列选自 SEQ ID NO:1 所示的 cgFAIM 序列; SEQ ID NO:2 所示的 cgFADD 序列; SEQ ID NO:3 所示的 cgPDCD6 序列; 和 SEQ ID NO:4 所示的 cgRequiem 序列。

[0053] 3. 一种分离的多核苷酸,其包含编码根据项 1 或 2 的多肽的序列,其中所述序列优

选自下组:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8。

[0054] 4. 一种分离的多核苷酸,其包含选自以下的序列,或包含与选自以下的序列互补的序列,所述互补序列能够在严谨条件下与选自以下的序列杂交,或者包含作为遗传密码的结果是选自以下的序列的简并物的序列:

[0055] (a) 与 SEQ ID NO:5 所示的序列具有 90%或更高序列同一性的 cgFAIM 序列;

[0056] (b) 与 SEQ ID NO:6 所示的序列具有 90%或更高序列同一性的 cgFADD 序列;

[0057] (c) 与 SEQ ID NO:7 所示的序列具有 93%或更高序列同一性的 cgPDCD6 序列;

[0058] (d) 与 SEQ ID NO:8 所示的序列具有 89%或更高序列同一性的 cgRequiem 序列;

[0059] (e) 是上述 (a) 到 (d) 中任一个的至少 15 个连续残基的片段的序列。

[0060] 5. 一种表达序列,包含与调控序列可操作连接的根据项 3 或 4 的多核苷酸或其部分,所述调控序列能够指导所述多核苷酸的表达。

[0061] 6. 根据项 5 的表达序列,其是表达载体。

[0062] 7. 一种载体,其包含根据项 3 或 4 的多核苷酸,当暴露于细胞时所述载体能够调节所述细胞的 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 或 cgPequiem 的表达。

[0063] 8. 根据项 7 的载体,其包含中国仓鼠 FAIM 序列或其部分,所述载体能够引起细胞中 cgFAIM 的增量调节,优选的是 pcDNA3.1(+)FAIM(SEQ

[0064] ID NO:37)。

[0065] 9. 根据项 7 的载体,其包含中国仓鼠 FADD 序列或其部分,所述载体能够引起细胞中 cgFADD 的减量调节,优选的是 pcDNA3.1(+)FADD DN(SEQ ID NO:38)。

[0066] 10. 根据项 7 的载体,其包含中国仓鼠 PDCD6 序列或其部分,所述载体能够引起细胞中 cgPDCD6 的减量调节,优选的是 pSUPER.neo.PDCD6

[0067] siRNA(SEQ ID NO:39)。

[0068] 11. 根据项 7 的载体,其包含中国仓鼠 Requiem 序列或其部分,并且能够引起细胞中 cgRequiem 的减量调节,优选的是 pSUPER.neo.RequiemsiRNA(SEQ ID NO:40)。

[0069] 12. 一种细胞,其包含根据项 5 或 6 的表达序列或根据项 7 到 11 中任一项的载体,其中优选将所述表达序列转化到所述细胞中。

[0070] 13. 一种药物组合物,包含根据项 1 或 2 的多肽、根据项 3 或 4 的多核苷酸、根据项 5 或 6 的表达序列、根据项 7 到 11 中任一项的载体或根据项 12 的细胞,连同药学上可接受的运载体或稀释剂。

[0071] 14. 一种生产多肽的方法,其包括:

[0072] (a) 提供包含根据项 3 或 4 的多核苷酸序列和调控序列的表达序列,其中所述调控序列能够指导从所述多核苷酸序列表达所述多肽,

[0073] (b) 使所述多肽在所述调控序列的控制下从所述表达序列表达,和

[0074] (c) 任选地纯化所述多肽。

[0075] 15. 根据项 14 的方法,其中所述表达序列包含转染到细胞中的表达载体以能够通过所述细胞表达所述多肽,所述细胞优选的是中国仓鼠细胞。

[0076] 16. 一种方法,包括在细胞中调节,优选增量调节具有 SEQ ID NO:1 所示序列的 cgFAIM 多肽或具有 SEQ ID NO:5 所示序列的 cgFAIM 多核苷酸的表达,所述细胞优选中国仓鼠细胞。

- [0077] 17. 一种方法,包括在细胞中调节,优选减量调节具有 SEQ ID NO:2 所示序列的 cgFADD 多肽、具有 SEQ ID NO:3 所示序列的 cgPDCD6 多肽或具有 SEQ ID NO:4 所示序列的 cgRequiem 多肽,或者具有 SEQ ID NO:6 所示序列的 cgFAIM 多核苷酸、具有 SEQ ID NO:7 所示序列的 cgPDCD6 多核苷酸或具有 SEQ ID NO:8 所示序列的 cgRequiem 多核苷酸的表达,所述细胞优选的是中国仓鼠细胞。
- [0079] 18. 根据项 16 或 17 的方法,其包括使根据项 7 到 11 的任一项的载体暴露于细胞,优选所述载体转染所述细胞。
- [0080] 19. 一种细胞,优选中国仓鼠细胞,其已经被修饰,优选被遗传工程化以与未被如此修饰的细胞相比增量调节具有 SEQ ID NO:1 所示序列的多肽或者具有 SEQ ID NO:5 所示序列的多核苷酸的表达。
- [0081] 20. 一种细胞,优选中国仓鼠细胞,其已经被修饰,优选被遗传工程化,以与未被如此修饰的细胞相比减量调节具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示序列的多肽或者具有 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:8 所示序列的多核苷酸的表达。
- [0082] 21. 一种细胞系,包含根据项 19 或 20 的细胞,或其后代,优选为中国仓鼠细胞系。
- [0083] 22. 一种细胞培养物,包含根据项 19 或 20 的细胞,或其后代,或根据项 21 的细胞系。
- [0084] 23. 一种转基因的非人动物,包含根据项 19 或 20 的细胞,或其后代,优选为中国仓鼠。
- [0085] 24. 根据项 15 到 18 的任一项的方法,根据项 12、19 或 20 的细胞,根据项 21 的细胞系,根据项 22 的细胞培养物或根据项 21 的转基因非人动物,其中,与不如此调节所述多肽表达的细胞相比:
- [0086] (i) 细胞的细胞生存力提高或增强,优选其中细胞凋亡减少;
- [0087] (ii) 细胞的蛋白质产量,优选重组表达的蛋白质的产量提高或增强;和/或
- [0088] (iii) 细胞对表达的蛋白质的糖基化作用、优选唾液酸化作用提高或增强。
- [0089] 25. 根据项 15 到 18 的任一项的方法,根据项 19 或 20 的细胞,根据项 21 的细胞系,根据项 22 的细胞培养物或根据项 21 的转基因非人动物用于生产蛋白质的用途,所述蛋白质优选异源蛋白质,更优选来自外源引入的序列,最优选重组蛋白质,优选干扰素- γ 。
- [0090] 26. 生产重组蛋白质,优选干扰素- γ 的方法,所述方法包括提供根据项 19 或 20 的细胞,用能表达所述重组蛋白质的表达载体转染所述细胞,并使所述重组蛋白质在所述细胞中表达。
- [0091] 27. 包含具有 SEQ ID NO:9 的 cgFADD 显性阴性序列的多肽、或能够编码这种多肽的多核苷酸,优选 SEQ ID NO:10,或其片段、同源物、变体或衍生物。
- [0092] 28. 可通过项 25 或 26 的方法生产的多肽,优选重组蛋白质,更优选干扰素- γ ,其中与可由未经如此修饰的细胞产生的多肽相比,所述多肽具有提高的唾液酸化作用。
- [0093] 29. 根据项 28 的多肽,其中所述唾液酸化作用大于 2.9mol 唾液酸/mol 产生的多肽,优选约 3.5mol 唾液酸/mol 产生的多肽。
- [0094] 附图的简要说明
- [0095] 仅通过举例的方式,参考在附图中举例说明的其优选的实施方式,将进一步描述本发明,其中:

[0096] 附图 1 是显示在用相关的构建体转染的细胞中 FADD 显性阴性 (Dominant Negative) 和 FAIM 的过量表达、以及 Requiem 和 PDCD6 表达的抑制的图表。

[0097] 附图 2A、2B、2C 和 2D 是显示过量表达 FAIM 的 CHO IFN- γ 细胞的生长动力学的图表。附图 2A 显示了相对于时间的活细胞密度 (细胞 /ml)，附图 2B 显示了相对于时间的总细胞密度，附图 2C 显示了相对于时间的生存力，附图 2D 显示了相对于时间的凋亡细胞。由于凋亡细胞的显著减少 (附图 2D)，与对照细胞相比，FAIM 过量表达显著降低了细胞培养物生存力的丧失 (附图 2C)。

[0098] 附图 3A、3B、3C 和 3D 是显示过量表达 FADD 显性阴性的 CHO IFN- γ 细胞的生长动力学的图表。附图 3A 显示了相对于时间的活细胞密度 (细胞 /ml)，附图 3B 显示了相对于时间的总细胞密度，附图 3C 显示了相对于时间的生存力，附图 3D 显示了相对于时间的凋亡细胞。由于凋亡细胞显著减少 (附图 3D)，与对照细胞相比，过量表达 FADD 显性阴性显著降低了细胞培养物生存力的丧失 (附图 3C)。

[0099] 附图 4A、4B、4C 和 4D 是显示具有 PDCD6 抑制的 CHO IFN- γ 细胞的生长动力学的图表。附图 4A 显示了相对于时间的活细胞密度 (细胞 /ml)，附图 4B 显示了相对于时间的总细胞密度，附图 4C 显示了相对于时间的生存力，附图 4D 显示了相对于时间的凋亡细胞。由于凋亡细胞的显著减少 (附图 4D)，与对照细胞相比，当 PDCD6 被抑制时，显著降低了细胞培养物生存力的丧失 (附图 4C)。

[0100] 附图 5A、5B、5C 和 5D 是显示具有 Requiem 抑制的 CHO IFN- γ 细胞的生长动力学的图表。附图 5A 显示了相对于时间的活细胞密度 (细胞 /ml)，附图 5B 显示了相对于时间的总细胞密度，附图 5C 显示了相对于时间的生存力，附图 5D 显示了相对于时间的凋亡细胞。由于凋亡细胞的显著减少 (附图 5D)，与对照细胞相比，当 Requiem 被抑制时，显著降低了细胞培养物生存力的丧失 (附图 5C)。

[0101] 附图 6A、6B、6C、6D 和 6E 是显示 CHO 细胞培养物中胱天蛋白酶 2、3、8 和 9 的活性的图表。附图 6A 显示了用对照转染的细胞中胱天蛋白酶活性，附图 6B 显示了在过量表达 FAIM 的细胞中的胱天蛋白酶活性，附图 6C 显示了在过量表达 FADD 显性阴性的细胞中的胱天蛋白酶活性，附图 6D 显示了具有 PDCD6 抑制的细胞中胱天蛋白酶活性，附图 6E 显示了具有 Requiem 抑制的细胞中胱天蛋白酶活性。靶向 FAIM、FADD 显性阴性、PDCD6 或 REQUIEM 的基因能够抑制和 / 或延迟培养物中的胱天蛋白酶活性。

[0102] 附图 7A、7B、7C 和 7D 是显示了转染的 CHO IFN- γ 细胞的干扰素- γ 产量的图表。附图 7A 显示了在过量表达 FAIM 的细胞中的干扰素- γ 活性，附图 7B 显示了在过量表达 FADD 显性阴性的细胞中的干扰素- γ 活性，附图 7C 显示了在具有 PDCD6 抑制的细胞中的干扰素- γ 活性，附图 7D 显示了在具有 REQUIEM 抑制的细胞中的干扰素- γ 活性。通过基因靶向方法可实现干扰素 γ 产量显著改善高达 300%。

[0103] 附图 8A 显示了具有 Requiem 或 PDCD6 抑制或者 FADD DN 或 FAIM* 过量表达的稳定 CHO IFN- γ 克隆在补料分批培养中的活细胞密度。(呈现的数据是两个一式两份实验的平均值)。

[0104] 附图 8B 显示了具有 Requiem 或 PDCD6 抑制或者 FADD DN 或 FAIM* 过量表达的稳定 CHO IFN- γ 克隆在补料分批培养中的活细胞密度。

[0105] 附图 9A 显示了具有 Requiem 或 PDCD6 抑制或者 FADD DN* 或 FAIM* 过量表达的稳定

定 CHO IFN- γ 克隆在补料分批培养中的干扰素 γ 产量。(呈现的数据是两个一式两份实验的平均值)

[0106] 附图 9B 显示了具有 Requiem 或 PDCD6 抑制或者 FADD DN* 或 FAIM* 过量表达的稳定 CHO IFN- γ 克隆在补料分批培养中的干扰素 γ 产量。

[0107] 附图 10 显示了在补料分批培养的指数中期、稳定期和死亡期期间具有 Requiem 或 PDCD6 抑制或者 FADD DN* 或 FAIM* 过量表达的稳定 CHO

[0108] IFN- γ 克隆的重组 IFN- γ 的唾液酸化作用。

[0109] 序列表

[0110] SEQ ID NO :1 是中国仓鼠 FAIM 的氨基酸序列的序列。SEQ IDNO :2 是中国仓鼠 FADD 的氨基酸序列。SEQ ID NO :3 是中国仓鼠 PDCD6 的氨基酸序列。SEQ ID NO :4 是中国仓鼠 Requiem 的氨基酸序列。

[0111] SEQ ID NO :5 是中国仓鼠 FAIM 的核酸序列。SEQ ID NO :6 是中国仓鼠 FADD 的核酸序列。SEQ ID NO :7 是中国仓鼠 PDCD6 的核酸序列。SEQ ID NO :8 是中国仓鼠 Requiem 的核酸序列。

[0112] SEQ ID NO :9 是中国仓鼠 FADD 显性阴性的氨基酸序列。SEQ IDNO :10 是中国仓鼠 FADD 显性阴性的核酸序列。SEQ ID NO :11 是中国仓鼠 FADD 显性阴性 5'-PCR 引物的序列。SEQ ID NO :12 是中国仓鼠 FADD 显性阴性 3'-PCR 引物的序列。SEQ ID NO :13 是中国仓鼠 PDCD6 抑制载体插入物 5' 的序列。SEQ ID NO :14 是中国仓鼠 PDCD6 抑制载体插入物 3' 的序列。SEQ ID NO :15 是中国仓鼠 Requiem 抑制载体插入物 5' 的序列。SEQ ID NO :16 是中国仓鼠 Requiem 抑制载体插入物 3' 的序列。

[0113] SEQ ID NO :17 是中国仓鼠 FAIM 5' PCR 引物的序列。SEQ ID NO :18 是中国仓鼠 FAIM 3'PCR 引物的序列。SEQ ID NO :19 是中国仓鼠 FADD 5'PCR 引物的序列。SEQ ID NO :20 是中国仓鼠 FADD 3'PCR 引物的序列。SEQ ID NO :21 是中国仓鼠 PDCD65'PCR 引物的序列。SEQ

[0114] ID NO :22 是中国仓鼠 PDCD63' PCR 引物的序列。SEQ ID NO :23 是中国仓鼠 PDCD63' -RACE 引物的序列。SEQ ID NO :24 是中国仓鼠 Requiem 5' PCR 引物的序列。SEQ ID NO :25 是中国仓鼠 Requiem 3' PCR 引物的序列。SEQ ID NO :26 是中国仓鼠 Requiem 3' -RACE 引物的序列。

[0115] SEQ ID NO :27 是中国仓鼠 FAIM 定量实时 PCR 引物 5' 的序列。SEQ ID NO :28 是中国仓鼠 FAIM 定量实时 PCR 引物 3' 的序列。SEQ ID

[0116] NO :29 是中国仓鼠 FADD 定量实时 PCR 引物 5' 的序列。SEQ ID NO :30 是中国仓鼠 FADD 定量实时 PCR 引物 3' 的序列。SEQ ID NO :31 是中国仓鼠 PDCD6 定量实时 PCR 引物 5' 的序列。SEQ ID NO :32 是中国仓鼠 PDCD6 定量实时 PCR 引物 3' 的序列。SEQ ID NO :33 是中国仓鼠 Requiem 定量实时 PCR 引物 5' 的序列。SEQ ID NO :34 是中国仓鼠 Requiem 定量实时 PCR 引物 3' 的序列。SEQ ID NO :35 是 β -肌动蛋白定量实时 PCR 引物 5' 的序列。

[0117] SEQ ID NO :36 是 β -肌动蛋白定量实时 PCR 引物 3' 的序列。SEQ ID

[0118] NO :37 是质粒 pcDNA3.1(+)FAIM 的核酸序列。SEQ ID NO :38 是质粒 pcDNA3.1(+) FADD DN 的核酸序列。SEQ ID NO :39 是质粒 pSUPER.neo.PDCD6siRNA 的核酸序列。SEQ ID NO :40 是质粒 pSUPER.neo.Requiem siRNA 的核酸序列。

[0119] 在此描述的方法和组合物可以适当地采用序列表中所示序列的任何一个或多个。

[0120] 详细说明

[0121] 中国仓鼠序列

[0122] 本公开一般地提供了来自中国仓鼠, *Cricetulus griseus* 的某些核酸、多肽以及其片段、同源物、变体和衍生物, 其能够调节细胞中的凋亡。

[0123] 特别地, 我们提供了如序列表中列出的中国仓鼠 FADD、FAIM、PDCD6 和 Requiem 多肽和核酸序列。此外, 我们提供了这种基因、片段、同源物的用途。

[0124] 特别优选的用途包括, 修饰细胞, 特别是中国仓鼠卵巢细胞, 用于增强的性质, 例如提高的生存力、提高的表达蛋白质 (特别是重组蛋白质) 的能力, 和这些蛋白质的提高的糖基化, 优选的唾液酸化作用。这样修饰的细胞和这些的衍生物 (例如, 菌落、克隆、细胞系等等) 以下进一步详细描述, 可以用于生产重组蛋白质的凋亡抗性细胞。CGFAIM、CGFADD、CGPDCD6 和 CGREQUIEM 多肽

[0125] 要理解的是, 在此公开的多肽序列不局限于序列表中列出的特定序列、或其片段, 或从 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 蛋白质获得的序列, 还包括获得自任何来源的同源序列, 例如, 相关的细胞同源物, 来自其他物种的同源物或其变体或衍生物, 只要它们视情况具有 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的至少一种生物学活性。

[0126] 本公开进一步包括在序列表中列出的氨基酸序列的变体、同源物或衍生物, 以及由在此公开的核苷酸序列编码的氨基酸序列的变体、同源物或衍生物。视情况, 这些序列通常被称为 “cgFADD 序列”、“cgFAIM 序列”、“cgPDCD6 序列” 或 “cgRequiem 序列”。

[0127] 生物学活性

[0128] 在高度优选的实施方式中, 所述序列视情况包含 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的至少一种生物学活性。

[0129] 优选的, 对于 cgFAIM 来说, 生物学活性包括凋亡抑制活性, 优选的通过胱天蛋白酶活性的减量调节来分析。因此, 在这个文件中描述的 cgFADD 序列优选的能够抑制凋亡, 具体地能够在细胞的环境中减量调节胱天蛋白酶活性。

[0130] 在高度优选的实施方式中, 当使用这种方法来分析时, 与没有用相关的 cgFAIM 序列如此转染的细胞相比, cgFAIM 序列当转染入细胞时能够抑制凋亡至少 10%、优选的 20%、更优选的 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多。

[0131] 对于 cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 来说, 所述生物学活性优选的包括凋亡刺激活性, 优选的通过胱天蛋白酶活性的增量调节来分析。因此, 在这个文件中描述的 cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 序列优选的能够增量刺激凋亡, 具体地能够在细胞的环境中增量调节胱天蛋白酶活性。

[0132] 在高度优选的实施方式中, 当使用这种方法来分析时, 与没有用相关的 cgFADD、cgPDCD6 或 cgRequiem 序列如此转染的细胞相比, cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 序列当转染入细胞时能够刺激凋亡至少 10%、优选的 20%、更优选的 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多。

[0133] 在高度优选的实施方式中, 通过分析胱天蛋白酶活性来分析 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 序列对凋亡的活化或抑制。因此, 如上列出的凋亡刺激或抑制百分比在高度优选的实施方式中被解读为胱天蛋白酶活性的刺激或抑制百分比。

[0134] 因此,凋亡活性监视方法,例如使用比色或荧光测定法的胱天蛋白酶活性测量分析可以用于确定 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的生物化学活性。这种方法可以在用合适的表达构建体转染(例如通过本领域已知的手段,或使用实施例中陈述的方案)的细胞中进行,来确定凋亡是否被影响,和 / 或胱天蛋白酶活性是否被增量或减量调节。

[0135] 胱天蛋白酶是介导凋亡的半胱氨酸蛋白酶的大家族(Nicholson&Thornberry 1997;Thornberry&Littlewood 1998)。胱天蛋白酶-8 是在受体介导的凋亡途径中最上游起作用的起始胱天蛋白酶。细胞表面受体活化后,胱天蛋白酶-8 直接或间接地启动下游效应物胱天蛋白酶例如胱天蛋白酶-3 的蛋白水解活性(Srinivasula et al 1996 和 Cohen 1997)。胱天蛋白酶-9(其为另一种上游胱天蛋白酶)经由细胞色素 C 向胞质溶胶的线粒体释放被活化。释放的细胞色素 C 与凋亡蛋白酶活化因子(apoptotic protease activating factor)APAF-1 结合,形成活化胱天蛋白酶-9 原(procaspase-9)的复合物(Zou et al 1999 和 Hu et al 1999)。活性的胱天蛋白酶-9 启动蛋白酶级联,该蛋白酶级联也激活胱天蛋白酶-3 和其他下游胱天蛋白酶级联。

[0136] 在优选的实施方式中,被分析来确定凋亡活性的增量或减量调节的胱天蛋白酶活性包括胱天蛋白酶-8 或胱天蛋白酶-9。

[0137] 分析胱天蛋白酶-8 和胱天蛋白酶-9 活性的方法是本领域已知的,在例如 Nicholson DW and Thornberry NA(1997)Caspases:killer proteases.Trends Biochem Sci. 272:2952-2956 和 Thornberry NA and Littlewood Y(1998)Caspases:Enemies within.Science 281:1312-1316 中具体地描述了。先有技术中列出的任何方案可以被用于分析胱天蛋白酶活性。

[0138] 然而,在优选的实施方式中,以下列出的“胱天蛋白酶分析方案”被采用来分析胱天蛋白酶-8 和 / 或胱天蛋白酶-9 活性。

[0139] 胱天蛋白酶分析方案

[0140] 可以通过利用特异于固定在反应孔中的不同胱天蛋白酶的荧光底物来分析胱天蛋白酶活性。将含有活性胱天蛋白酶的细胞溶胞产物添加到孔中将裂解底物,并释放可以使用标准荧光平板读数器检测的荧光产物。

[0141] 具体地, BD ApoAlert™ 胱天蛋白酶分析平板(目录号 K2033-1, BDBiosciences Clontech, Palo Alto, California, USA) 使用了由被它们的各自活化的胱天蛋白酶识别的短肽组成的不同胱天蛋白酶底物。肽被共价连接到荧光染料 7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)。结合肽的 AMC 在 UV 范围($\lambda_{\max} = 380\text{nm}$)发射,而未结合的 AMC 在绿色范围中发射($\lambda_{\max} = 460\text{nm}$)。这使得将 460nm 处荧光强度的增加与测试样品中相应的胱天蛋白酶的活性增加加以关联成为可能。为了分析胱天蛋白酶-8 活性,使用的底物是 VDVAD-AMC,而对于胱天蛋白酶-9 分析,使用 LEHD-AMC 作为它的底物。

[0142] 为了使用 BD ApoAlert™ 胱天蛋白酶分析平板分析胱天蛋白酶活性,通过离心使来自样品的细胞沉淀,然后重悬浮在 $1\times$ 细胞裂解缓冲液(BDBiosciences Clontech)中,并在冰上孵育 10 分钟。然后通过 4°C 离心 5 分钟除去细胞碎屑。然后将 $50\mu\text{L} 2\times$ 反应缓冲液 / DTT 混合物添加到将要使用的 96 孔平板的每个孔。平板在 37°C 预孵育 5 分钟。然后将 $50\mu\text{L}$ 的合适的细胞溶胞产物添加到孔中并在 37°C 孵育 2 小时。然后使用荧光平板读数

器来测量释放的 AMC 的数量（在 380nm 激发，在 460nm 发射）。

[0143] 胱天蛋白酶活性被定义为：减去参考样品 460nm 处的绝对发射之后，样品 460nm 处的绝对发射。参考样品是在零参考时间收集的样品。

[0144] 用 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 表达载体转染的细胞的胱天蛋白酶活性可以与用空载体转染的（或未转染）的细胞相比较来确定凋亡视情况被刺激或抑制的百分比。

[0145] [“胱天蛋白酶分析方案”结束]

[0146] 在高度优选的实施方式中，当使用这种方法来分析时，与没有用相关的 cgFAIM 序列如此转染的细胞相比，cgFAIM 序列当转染入细胞时能够抑制胱天蛋白酶 -8、或胱天蛋白酶 -9、或两者的表达至少 10%、优选的 20%、更优选的 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多。

[0147] 在高度优选的实施方式中，当使用这种方法来分析时，与没有用相关的 cgFADD、cgPDCD6 或 cgRequiem 序列如此转染的细胞相比，cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 序列当转染入细胞时能够刺激胱天蛋白酶 -8、或胱天蛋白酶 -9、或两者的表达至少 10%、优选的 20%、更优选的 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多。

[0148] 也可以使用检测凋亡相关事件，例如膜改变、DNA 片段化和凋亡的其他生物化学标志的其他分析，来代替或补充所描述的分析。

[0149] 同源物

[0150] 公开的多肽包括从任何来源获得的同源序列，例如，相关的病毒 / 细菌蛋白质，细胞同源物和合成肽，以及其变体或衍生物。因此，多肽还包括来自其他物种包括动物例如哺乳动物（例如，小鼠、大鼠或兔子）特别是啮齿动物的、编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的同源物的那些。

[0151] 在本文件的上下文中，同源序列或同源物包括视情况与 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem，例如在此的序列表中所示的，在至少 30、优选的 40、50、60、70、80、90 或 100 个氨基酸上，在氨基酸水平上具有至少 60、65、70、75、80、85、86、87、88、89 或 90% 的同一性，优选的至少 91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 同一性的氨基酸序列。在这个文件的上下文中，同源序列包括与 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列，优选的在至少 15、25、35、50 或 100，优选的 200、300、400 或 500 个氨基酸上在氨基酸水平上具有至少 15、20、25、30、40、50、60、65、70、75、80、85、86、87、88、89 或 90% 的同一性，优选的至少 91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 同一性的氨基酸序列。例如，序列可以与 cgFADD（优选的包含 SEQ ID NO :1 所示的序列）、cgFAIM（优选的包含 SEQ ID NO :2 所示的序列）、cgPDCD6（优选的包含 SEQ ID NO :3 所示的序列）或 cgRequiem（优选的包含 SEQ ID NO :4 所示的序列）具有所称的序列同一性。

[0152] 尽管也可以根据相似性来考虑同源性（即，具有相似化学性质 / 功能的氨基酸残基），在本文件的上下文中，优选的根据序列同一性来表述同源性。在高度优选的实施方式中，序列同一性相对于相关序列的长度的全部来确定，即，例如在相关基因的完整长度或全长序列上。

[0153] 可以通过目测、或更常见地，借助易获得的序列比较程序来进行同源性比较。这些商业上可获得的计算机程序能计算两个或多个序列之间的同源性%。

[0154] 可以在连续的序列上计算同源性%，即，一个序列与另一个序列比对，一个序列中的每个氨基酸直接与另一个序列中相应氨基酸比较，一次一个残基。这称为“无缺口”比对。一般，这种无缺口比对只在相对短的残基数上进行（例如低于 50 个连续的氨基酸）。

[0155] 尽管这是非常简单且一致的方法，但是它没有考虑到，例如，在除此之外相同的序列对中，一个插入或缺失将导致随后的氨基酸残基被逐出序列比对，因此当进行整体排列时，将很可能导致%同源性的大幅度下降。因此，多数序列比较方法被设计成考虑到可能的插入和缺失而不会对整体同源性积分不适当地扣分，从而产生最佳的序列对比。这通过在序列对比中插入“缺口”来试图最大化局部的同源性而实现。

[0156] 但是，这些更复杂的方法对序列比对中出现的每个缺口指定了“缺口罚分”，这样，对于相同数量的相同氨基酸，带有尽可能少的缺口的序列比对——反映两个比较序列之间的更高相关性——将比有较多缺口的序列获得更高的积分。一般用“远交缺口计分 (Affine gap costs)”来给缺口的存在扣 (charge) 较多的计分，给缺口中每个随后的残基扣较少罚分。这是最普遍使用的缺口积分系统。高缺口罚分当然将产生具有较少缺口的最优化的序列对比。多数序列比对程序允许修改缺口罚分。但是当使用这种软件作序列比较时，优选使用缺省值。例如，当使用 GCG Wisconsin Bestfit 包时，氨基酸序列的缺省缺口罚分是缺口为 -12，每个延伸为 -4。

[0157] 因此最大%同源性的计算首先需要产生考虑到缺口罚分的最佳序列对比。用于进行这种比对的合适的计算机程序是 GCG Wisconsin Bestfit 软件包 (Devereux 等, 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387)。可以进行序列比较的其他软件例子包括，但不局限于 BLAST 软件包（参见 Ausubel 等, 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, 第四版, 第 18 章），FASTA (Atschul 等, 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) 和 GENWORKS 比较工具系列。BLAST 和 FASTA 都可得到，用于脱机和联机检索（参见 Ausubel 等, 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, 第 7-58 到 7-60 页）。然而优选的是使用 GCGBestfit 程序。

[0158] 尽管最终同源性%可以根据同一性而测量，比对过程自身一般不以全或无成对比较为基础。相反，通常使用按比例绘制的 (scaled) 相似性评分矩阵将得分分配到每个以化学相似性或进化距离为基础而进行的成对比较。这种常用矩阵的一个例子是 BLOSUM62 矩阵，即 BLAST 程序系列的缺省矩阵。GCG Wisconsin 程序一般用公共默认值或如果已提供，则使用自定义符号比较表（更详细内容见用户手册）。优选将公共默认值用于 GCG 软件包，或在使用其它软件的情况下，使用缺省矩阵，如 BLOSUM62。

[0159] 一旦软件产生最优比对，就有可能计算%同源性，优选%序列同一性。软件一般作为序列比较的一部分进行此计算并产生以数字表示的结果。

[0160] 在优选的实施方式中，根据用于比较的相关序列的完整长度来考虑序列相似性、同一性、同源性或互补性。

[0161] 变体和衍生物

[0162] 相对于在此描述的氨基酸序列的术语“变体”或“衍生物”包括从所述序列或对所述序列的任何替换、改变、修饰、置换、缺失或添加一个（或多个）氨基酸。优选的，产生的氨基酸序列基本上保持了与未修饰的序列相同的活性，优选的具有至少与序列表中所示 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 多肽相同的活性。因此，优选保持序列的关键特征——即它们能够调节一种或多种凋亡过程。

[0163] 具有实施例中所示氨基酸序列的多肽,或其片段或同源物可以被修饰以用于在此描述的方法和组合物。一般地,进行维持序列的生物学活性的修饰。可以进行氨基酸替换,例如从 1、2 或 3 个到 10、20 或 30 个替换,只要修饰的序列保持了未修饰序列的生物学活性。氨基酸替换可以包括使用非天然发生的类似物,例如,用来提高治疗性施用的多肽的血浆半衰期。

[0164] cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 的天然变体很可能包含保守性氨基酸替换。保守性替换可以例如根据以下的表格定义。第二栏中同一块中的氨基酸,优选第三栏中同一行的氨基酸可以相互替代:

[0165]

脂肪族的	非极性	G A P
		I L V
	极性-不带电的	C S T M
		N Q
	极性-带电的	D E
		K R
芳香族的		H F W Y

[0166] 片段

[0167] 在此公开并且作为标记物有用的多肽还包括上述全长多肽的片段和其变体,包括在序列表中列出的序列的片段。

[0168] 多肽还包括 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 多肽的任一个的全长序列的片段。优选的片段包含至少一个表位。鉴定表位的方法是本领域公知的。片段一般将包含至少 6 个氨基酸,更优选的至少 10、20、30、50 或 100 个氨基酸。

[0169] 包括的是片段,其包含,优选的由 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 氨基酸序列的 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145 或 150 个或更多残基组成。

[0170] cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 蛋白质的多肽片段和其等位和物种变体可以含有一个或多个(例如,5、10、15 或 20 个)替换、缺失或插入,包括保守的替换。当替换、缺失和 / 或插入发生时,例如在不同的物种中,优选序列表中描绘的氨基酸残基的少于 50%、40% 或 20% 被改变。

[0171] cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem,和它们的片段、同源物、变体和衍生物可以通过重组方法来产生。然而,它们也可以使用技术人员公知的技术例如固相合成通过合成方法产生。蛋白质也可以作为融合蛋白生产,例如,来帮助提取和纯化。融合蛋白配偶体的实例包括谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、6×His、GAL4(DNA 结合和 / 或转录活化结构域)和 β-半乳糖苷酶。在融合蛋白配偶体和目标蛋白质序列之间包括蛋白水解裂解位点来容许

除去融合蛋白序列也是方便的。优选的融合蛋白将不会阻碍目标蛋白质序列的功能。还可以通过纯化来自动物细胞的细胞提取物获得蛋白质。

[0172] 在此公开的 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 多肽,变体、同源物、片段和衍生物可以是基本上分离的形式。要理解的是这种多肽可以与不干扰该蛋白质的预定目的的运载体或稀释剂混合,而仍认为是基本上分离的。cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 变体、同源物、片段或衍生物也可以是基本上纯化的形式,在这种情况下一般它将包含在制品中的蛋白质,其中在制品中超过 90%,例如 95%、98%或 99%的蛋白质是蛋白质。

[0173] 在此公开的 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 多肽、变体、同源物、片段和衍生物可以用具有显示作用的标记来标记。具有显示作用的标记可以是容许多肽等被检测的任何适合的标记。适合的标记包括放射性同位素,例如 ^{125}I ,酶,抗体,多核苷酸和接头例如生物素。标记的多肽可以在诊断过程例如免疫分析中使用来确定样品中多肽的数量。多肽或标记的多肽也可以用于血清学或细胞介导的免疫分析,用于使用标准方案检测动物和人类对所述多肽的免疫反应性。

[0174] 在此公开的 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 多肽、变体、同源物、片段和衍生物,任选的被标记的,也可以固定到固相上,例如免疫分析孔或蘸取棍 (dipstick) 的表面。这种标记的和 / 或固定的多肽可以在适合的容器中与适合的试剂、对照物、说明书等等一起被包装在试剂盒中。这种多肽和试剂盒可以用于通过免疫分析来检测针对所述多肽或它们的等位或物种变体的抗体的方法。

[0175] 免疫分析方法是本领域公知的,一般包括:(a) 提供包含可由针对所述蛋白质的抗体结合的表位的多肽;(b) 在容许抗体-抗原复合物形成的条件下孵育生物样品与所述多肽;和(c) 确定是否形成包含所述多肽的抗体-抗原复合物。

[0176] 在此公开的 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 多肽、变体、同源物、片段和衍生物可以用于体外或体内细胞培养系统来研究它们的相应基因和其同源物在细胞功能中的作用,包括它们在疾病中的功能。举例来说,截短的或修饰的多肽可以导入细胞来破坏在细胞中存在的正常功能。多肽可以通过多肽从重组表达载体的原位表达来导入细胞中(见下文)。所述表达载体任选的带有可诱导的启动子来控制所述多肽的表达。

[0177] 使用合适的宿主细胞,例如昆虫细胞或哺乳动物细胞,预计提供了这种翻译后修饰(例如,肉豆蔻酰化、糖基化、截断、lipidation 以及酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸磷酸化),这可能是赋予重组表达产物最佳生物学活性所需的。表达在此公开的 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 多肽、变体、同源物、片段和衍生物的这种细胞培养物系统可以在分析系统中使用来鉴定在所述细胞中干扰或增强所述多肽的功能的候选物质。CGFAIM、CGFADD、CGPDCD6 和 CGREQUIEM 核酸

[0178] 我们一般地提供了许多 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 核酸,连同其片段、同源物、变体和衍生物。这些核酸序列优选的编码在此公开的多肽序列,特别是序列表中的多肽序列。

[0179] 优选的,所述多核苷酸包含 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 核酸,优选的分别选自 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ

[0180] ID NO :7 和 SEQ ID NO :8 组成的组。

[0181] 特别地,我们提供了编码在此公开的任何中国仓鼠多肽的核酸或多核苷酸。因此,术语““cgFADD 序列”、“cgFAIM 序列”、“cgPDCD6 序列”和

[0182] “cgRequiem 序列”应被相应地解释。然而,优选的,这些核酸或多核苷酸包含 SEQ ID NO :5-16 和 SEQ ID NO :37、38、39 和 40 所列的任一序列、或编码任一相应多肽的序列,和这种核酸的片段、同源物、变体或衍生物。因而以上术语优选的应看作是指这些序列。

[0183] 如在本文件中使用,术语“多核苷酸”、“核苷酸”和核酸意欲互相是同义的。“多核苷酸”一般是指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核酸,其可以是未修饰的 RNA 或 DNA 或修饰的 RNA 或 DNA。“多核苷酸”非限制性地包括单链和双链 DNA,单链和双链区域的混合物的 DNA,单链和双链的 RNA,和单链和双链区域的混合物的 RNA,包含可以是单链的或更一般地是双链的 DNA 和 RNA 的杂合体分子,或单链和双链区域的混合物。此外,“多核苷酸”指包含 RNA 或 DNA 或 RNA 与 DNA 两者的三链区域。术语多核苷酸还包括含有一个或多个修饰的碱基的 DNA 或 RNA,以及主干为了稳定性或其他理由加以修饰的 DNA 或 RNA。“修饰的”碱基包括,例如,三苯甲基化的碱基,和不常见的碱基,例如次黄苷。已经对 DNA 和 RNA 进行了各种修饰,因而“多核苷酸”涵盖如一般在自然中存在的多核苷酸的化学、酶学地或代谢修饰的形式,以及病毒和细胞特有的 DNA 和 RNA 的化学形式。“多核苷酸”还涵盖相对短的多核苷酸,常常称为寡核苷酸。

[0184] 技术人员要理解的是,由于遗传密码简并性的结果,许多不同的多核苷酸和核酸可以编码相同的多肽。此外,要理解的是,技术人员可以使用常规技术,产生不影响由在此描述的多核苷酸编码的多肽序列的核苷酸替换,来反映所述多肽将要被表达的任何特定宿主有机体的密码子利用率。

[0185] 变体、衍生物和同源物

[0186] 在此描述的多核苷酸可以包括 DNA 或 RNA。它们可以是单链的或双链的。它们也可以是其中包括合成的或修饰的核苷酸的多核苷酸。对寡核苷酸的许多不同类型的修饰是本领域已知的。这些包括甲基磷酸酯和硫代磷酸酯主干,在分子的 3' 和 / 或 5' 末端添加吡啶或聚赖氨酸链。对于本文件的目的而言,要理解的是在此描述的多核苷酸可以通过本领域可用的任何方法来修饰。可以进行这种修饰来提供多核苷酸的体内活性或寿命期。

[0187] 当多核苷酸是双链时,双链体的两条链独立地或组合地包括在此描述的方法和组合物中。当多核苷酸是单链时,要理解的是也包括该多核苷酸的互补序列。

[0188] 相对于核苷酸序列,术语“变体”、“同源物”或“衍生物”包括从所述序列或对所述序列的任何替换、改变、修饰、置换、缺失或添加一个(或多个)核苷酸。优选的,产生的序列能够编码具有凋亡介导物活性的多肽。

[0189] 如上所述,对于序列同一性,“同源物”优选的与序列表中所示相关序列具有至少 5% 同一性、至少 10% 同一性、至少 15% 同一性、至少 20% 同一性、至少 25% 同一性、至少 30% 同一性、至少 35% 同一性、至少 40% 同一性、至少 45% 同一性、至少 50% 同一性、至少 55% 同一性、至少 60% 同一性、至少 65% 同一性、至少 70% 同一性、至少 75% 同一性、至少 80% 同一性、至少 85% 同一性、至少 90% 同一性或至少 95% 同一性。

[0190] 更优选的,存在至少 95% 同一性,更优选的至少 96% 同一性、更优选的至少 97% 同一性、更优选的至少 98% 同一性、更优选的至少 99% 同一性。核苷酸同源性比较可以如上所述进行。优选的序列比较程序是如上所述的 GCG Wisconsin Bestfit 程序。默认的计

分矩阵对每个相同的核苷酸有 10 的匹配值,对每个错配为 -9。默认的缺口生成罚分是 -50,默认的缺口延伸罚分每个核苷酸是 -3。

[0191] 在优选的实施方式中, cgFAIM 多核苷酸具有与 SEQ ID NO :5 所示序列至少 90% 或更高的序列同一性。优选的, cgFAIM 多核苷酸具有与 SEQ ID NO :5 所示序列至少 91% 或更高、优选的 92% 或更高、93% 或更高、94% 或更高、95% 或更高、96% 或更高、97% 或更高、98% 或更高、99% 或更高或 99.5% 或更高的序列同一性。

[0192] 类似地,在优选的实施方式中, cgFADD 序列具有与 SEQ ID NO :6 所示序列的至少 90% 的序列同一性。优选的, cgFADD 多核苷酸具有与 SEQ ID NO :6 所示序列至少 91% 或更高、优选的 92% 或更高、93% 或更高、94% 或更高、96% 或更高、96% 或更高、97% 或更高、98% 或更高、99% 或更高或 99.5% 或更高的序列同一性。

[0193] 在优选的实施方式中, cgPDCD6 序列具有与 SEQ ID NO :7 所示序列至少 93% 或更高的序列同一性。优选的, cgPDCD6 多核苷酸具有与 SEQ ID NO :7 所示序列 94% 或更高、95% 或更高、96% 或更高、97% 或更高、98% 或更高、99% 或更高或 99.5% 或更高的序列同一性。

[0194] 在优选的实施方式中, cgRequiem 多核苷酸具有与 SEQ ID NO :8 所示序列的至少 90% 或更高的序列同一性。优选的, cgRequiem 多核苷酸具有与 SEQ ID NO :8 所示序列 90% 或更高、优选的 91% 或更高、92% 或更高、93% 或更高、94% 或更高、95% 或更高、96% 或更高、97% 或更高、98% 或更高、99% 或更高或 99.5% 或更高的序列同一性。

[0195] 杂交

[0196] 我们进一步描述了能与在此呈现的任何序列选择性杂交的 cgFAIM, cgFADD, cgPDCD6 and cgRequiem 核苷酸序列,或其任何变体、片段或衍生物,或上述任何的互补物。核苷酸序列优选的是长度至少 15 个核苷酸,更优选的长度至少 20、30、40 或 50 个核苷酸。

[0197] 在此使用的术语“杂交”应当包括“核酸的链通过碱基配对与互补链连接的过程”,以及如在聚合酶链式反应技术中进行的扩增的过程。

[0198] 能够与在此呈现的核苷酸序列或它们的互补物选择性杂交的多核苷酸,一般地在至少 20 个、优选的至少 25 或 30 个,例如至少 40、60 或 100 或更多个连续核苷酸的区域上与在此呈现的相应核苷酸序列至少 70%、优选的至少 80 或 90%,更优选的至少 95% 或 98% 同源。

[0199] 术语“选择性杂交”是指用作探针的多核苷酸在目标多核苷酸被发现以显著高于背景的水平与探针杂交的一定条件下使用。背景杂交可以由于其他多核苷酸存在而发生,例如,在被筛选的 cDNA 或基因组 DNA 文库中。在这种情况下,背景指由探针和文库的非特异性 DNA 成员之间的相互作用产生的信号水平,其强度低于用目标 DNA 观察到的特异性相互作用 10 倍、优选的低于 100 倍。可以通过例如,用 32p 对探针进行放射性标记,来测量相互作用的强度。

[0200] 杂交条件基于核酸结合复合物的熔融温度 (T_m),如 Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego CA) 中所教导的,并如以下说明被赋予定义的“严谨度”。

[0201] 最大严谨度一般在约 $T_m - 5^\circ\text{C}$ (低于探针的 $T_m - 5^\circ\text{C}$) 发生;高严谨度在低于 $T_m - 5^\circ\text{C}$ 到 10°C ;中度严谨度在低于 T_m 约 10°C 到 20°C ;低严谨度在低于 T_m 约 20°C 到 25°C 。本领域技术人员将理解的是,最大严谨度杂交可以用于鉴定或检测相同的多核苷酸序列,而中

度（或低度）严谨度杂交可以用于鉴定或检测相似的或相关的多核苷酸序列。

[0202] 在优选的方面，我们公开了能够与 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 核酸、或其片段、同源物、变体或衍生物在严谨条件（例如，65℃ 和 $0.1 \times \text{SSC}$ { $1 \times \text{SSC} = 0.15\text{MNaCl}, 0.015\text{M}$ 柠檬酸钠 pH 7.0}）下杂交的核苷酸序列。

[0203] 当多核苷酸是双链时，双链体的两条链独立地或组合地被本公开涵盖。当多核苷酸是单链时，要理解的是该多核苷酸的互补序列也被公开和涵盖。

[0204] 可以以多种方式获得与在此公开的序列不是 100% 同源、但落入本公开之内的多核苷酸。在此描述的序列的其他变体可以例如通过探查从一系列个体，例如来自不同群体的个体制成的 DNA 文库来获得。此外，可以获得在其他病毒 / 细菌，或细胞同源物，特别是在哺乳动物细胞（例如，大鼠、小鼠、牛和灵长类细胞）中发现的细胞同源物，而且这种同源物和其片段一般将能够选择性地与此处的序列表中所示序列杂交。这种序列可以通过如下方法来获得：探查从其他动物物种制成的 cDNA 库或来自其他动物物种的基因组 DNA 库，在中度至高度严谨的条件下用包含 SEQ ID NO :1 到 40 的全部或部分的探针来探查这些文库。相似的考虑适用于获得 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 的物种同源物和等位变体。

[0205] 在此描述的多核苷酸可以用于产生引物，例如 PCR 引物，用于选择性的扩增反应的引物；产生探针，例如使用放射性或非放射性标记通过传统方法用具有显示作用的标记标记的探针，或者所述多核苷酸可以被克隆到载体中。这些引物、探针和其他片段长度将是至少 15、优选的至少 20、例如至少 25、30 或 40 个核苷酸，并且也被在此使用的术语多核苷酸涵盖。优选的片段长度低于 500、200、100、50 或 20 个核苷酸。

[0206] 多核苷酸例如 DNA 多核苷酸和探针可以重组地、合成地或通过本领域技术人员可获得的任何方法来产生。它们也可以通过标准技术克隆。

[0207] 一般地，引物将通过合成方式来生产，包括一次一个核苷酸地分步式生产期望的核酸序列。使用自动化技术实现这个的技术是本领域中容易获得的。

[0208] 更长的多核苷酸一般将使用重组方式产生，例如，使用 PCR（聚合酶链式反应）克隆技术。这将包括制备侧翼于希望被克隆的序列区域的引物对（例如，约 15 到 30 个核苷酸），使引物与从动物或人类细胞获得的 mRNA 或 cDNA 接触，在引起希望的区域扩增的条件下进行聚合酶链式反应，分离扩增的片段（例如，通过在琼脂糖凝胶上纯化反应混合物）并回收扩增的 DNA。引物可以被设计以含有适合的限制性内切酶识别位点，使得扩增的 DNA 可以被克隆入适合的克隆载体。CG 序列的用途

[0209] 如实施例所示，我们确定了这四个基因涉及细胞中凋亡的介导。

[0210] 我们还显示了对这些基因的靶向通过调节它们的活性引起了凋亡的降低，并由此改善了细胞生存力。因而基因和多肽和其产物在许多领域，例如在细胞培养中具有实用性。

[0211] 因此，美国专利号 6,586,206 描述了凋亡抑制物在使用培养的宿主细胞生产重组蛋白质中的用途，具有改善期望的蛋白质产量的效果。相应地，因而中国仓鼠 FAIM、FADD、PDCD6 和 Requiem 序列的公开允许在细胞培养中靶向这些基因来增强细胞生存力并促进重组蛋白质生产的产量增强。具体地，我们在此描述的 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 修饰的细胞、优选的中国仓鼠细胞、更优选的中国仓鼠卵巢细胞，可以适当地被采用用于以改善的产量生产重组蛋白质。CGFAIM、CGFADD、CGPDCD6 和 CGREQUIEM 修饰的细胞

[0212] 根据在此描述的方法和组合物，在细胞中调节 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和

cgRequiem 的任何一种或多种改善了群体的细胞生存力,优选的中国仓鼠群体。特别地,我们在实施例中显示了降低 cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的表达,以及提高 cgFAIM 的表达,导致细胞生存力改善。

[0213] 然而,要理解的是,除了调节多肽表达,或作为调节多肽表达的替代,可以采用调节任何这些基因的方法,包括调节物实体例如激动剂和拮抗剂的使用。

[0214] 为了方便起见,将调节这些基因的任何一個或多个的表达的细胞称为“修饰的细胞”,虽然要理解的是,这些细胞可能本身不是被物理修饰的,但可以是被修饰的细胞的后代。具体地我们提供了其中 cgFAIM 表达被增量调节的细胞,以及其中 cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem,或其任意组合的表达被减量调节的细胞。因而,要理解的是,cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 的一个、两个、三个或全部四个的表达可以在修饰的细胞中被调节。修饰可以是短暂的,或可以是永久或长期的,取决于修饰的方式。

[0215] 修饰的细胞可以包括哺乳动物细胞,优选的中国仓鼠细胞,最优选的 CHO 细胞。它们可以包括啮齿动物细胞,优选的小鼠或大鼠细胞。优选的,这种修饰的细胞包括中国仓鼠细胞,最优选的 CHO 细胞。然而,它们可以包括灵长类细胞,例如猴细胞或人细胞。

[0216] 相关的细胞可以通过本领域已知的任何手段靶向相关的基因来修饰。

[0217] 一种可能的方法是表达针对 cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的反义构建体,来抑制基因功能并防止相关多肽的表达。另一种方法是使用 cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 多肽的无功能的变体,其与内源的基因产物竞争细胞死亡机制的细胞成分,产生对功能的抑制。做为选择,可以向细胞施用通过如上述分析鉴定为与 cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 多肽结合的化合物,来阻止多肽的功能。例如,这可以通过重组 DNA 技术,或通过直接施用化合物来进行。针对 cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的适合的抗体也可以用作试剂。

[0218] 做为选择,双链的 RNA(dsRNA) 是在广泛的有机体中干扰基因表达的强大的方法,其近来已经显示在哺乳动物中是成功的 (Wianny and Zernicka-Goetz,2000, Nat Cell Biol 2000,2,70-75)。相应于 cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 多核苷酸的序列的双链 RNA 可以被导入或在细胞或细胞系中表达来增强细胞生存力。

[0219] 特别地,我们描述了当期望表达降低时通过使用小干扰 RNA(single interfering RNA) (siRNA) 以及使用显性阴性突变体的修饰。我们进一步描述了使用载体,其允许用于提高相关基因的表达的相关序列的过量表达。修饰可以是短暂的,或可以是永久的。因而,我们提供了细胞系,其包含在 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 中具有基因组的和可遗传的修饰的细胞。建立这种细胞系的详细方案在实施例中列出。

[0220] 修饰的细胞可以做单细胞、细胞组、克隆、克隆系、菌落、细胞系或组织来提供。我们进一步提供了转基因动物,其细胞包含 cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的减量调节的表达,或 cgFADD 的增量调节的表达,或这两者。

[0221] 优选的,显性突变体包括 cgFADD 显性突变,cgFADD 显性突变包含 SEQ ID NO :9 中列出的序列。做为选择,或此外,所述序列可以包含:

[0222] FDI VCDNVGRDWKRLARQLKVSEAKIDGIEERYPRSLSEQVREALRVWKIAEREKATVAGLVKALRACR LNLVADLVE

[0223] 显性突变体可以由 SEQ ID NO :10 中所列的序列编码,或作为选择,

[0224] TTTGACATTGTATGCGACAATGTGGGGAGAGATTGGAAGAGACTGGCCCCGCCAGCTGAAAGTGTCTGAGGCCAAAATTGATGGGATTGAGGAGAGGTACCCCCGAAGCCTGAGTGAGCAGGTAAGGGAGGCTCTGAGAGTCTGGAA GATTGCCGAGAGGGAGAAAAGCCACGGTGGCTGGACTGGTAAAGGCACCTTCGGGCCTGCCGGCTGAACCTGGTGGCTG ACCTGGTGGAA

[0225] 提高的细胞生存力

[0226] 当与同源的未修饰细胞、或野生型细胞、或衍生它们的亲本细胞相比时，修饰的细胞具有几个有益的性质。它们可能具有改善的细胞生存力的性质。因此，对于世代的时间或数量而言，它们可以在培养中存活更久。

[0227] 优选的，通过测定已经被修饰，即通过靶向 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 修饰的细胞群体的存活细胞密度，来度量细胞生存力。优选的，与没有被修饰的细胞（例如，对照群体）相比，修饰的细胞维持了更高的细胞生存力。细胞生存力优选的以相关的细胞群体中存活细胞的百分比来测量。

[0228] 在优选的实施方式中，细胞生存力通过“台盼蓝生存力排阻分析”来测定。这种分析一般用于在细胞培养领域中的细胞生存力测定。在实施例 1 中列出了详细的方案，简言之：细胞悬液与磷酸盐缓冲溶液中的 0.4% 台盼蓝混合，并使用血球计计数。活细胞呈现圆形并且可折射，没有任何蓝色染料着色，而死细胞吸收染料并呈现蓝色。然后将生存力表示为相对于被计数的总细胞数的活细胞百分比。

[0229] 活细胞被定义为其膜完整性仍然能够在台盼蓝排阻生存力分析中阻止台盼蓝吸收的细胞。

[0230] 优选的，修饰的细胞与对照群体相比具有至少 5%、优选的 10% 或更多、更优选的 15%、更优选的 15%、20%、30%、40%、50% 或更多存活细胞。做为选择，或此外，修饰的细胞与未被修饰的细胞相比细胞生存力维持了更长时间。例如，修饰的细胞与对照细胞相比能够维持一定百分比的细胞生存力（例如，95%）更长时间。

[0231] 优选的，修饰的细胞与对照细胞相比细胞生存力延长至少 1 小时，更优选的至少 6 小时，最优选的至少 12 小时或更久，例如，至少 24 小时，至少 36 小时或至少 48 小时。在高度优选的实施方式中，与对照细胞相比，在生存力开始降至低于 95% 之前，修饰的细胞生存力延长至少 24 小时。

[0232] 与未修改对照细胞相比，修饰的细胞优选能有更高的存活培养物密度。优选的，与对照细胞相比，修饰的细胞能有高 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200% 或更高的活细胞密度。例如，修饰的细胞可以达到高达 9.6×10^6 个细胞 /ml 的密度。

[0233] 修饰的细胞优选的显示凋亡标记物表达的延迟发作，优选的是胱天蛋白酶 2、胱天蛋白酶 3 或胱天蛋白酶 8。就单个细胞更长时间的存活或显示了凋亡的细胞数目而言，修饰的细胞也具有显示降低的凋亡的性质。优选的，它们具有对凋亡有抗性的性质（参见下文）。

[0234] 提高的蛋白质产量

[0235] 方便地，如实施例 21 中所证明的，与未修改的对照细胞相比，修饰的细胞能有提高的蛋白质产量，优选的，提高的重组表达的蛋白质产量。优选的，修饰的细胞与对照细胞相比能有高 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200% 或更高

的产量。更优选的,修饰的细胞与对照细胞相比能有高 $2.5\times$ 、 $3\times$ 、 $5\times$ 、 $10\times$ 或更高的产量。优选的,重组表达的蛋白质包含干扰素 γ 。因而我们提供了在所描述的修饰的细胞中表达重组蛋白质、优选的生物治疗分子的方法。

[0236] 优选的,所述修饰的细胞在分批培养、补料分批培养或两者中显示了它们的性质中的任何一种或多种。

[0237] 提高的糖基化

[0238] 与对照的未修饰细胞相比,所述修饰的细胞优选的还能提高表达的蛋白质的糖基化。实施例显示了修饰的细胞能够在延长的细胞培养时间上维持蛋白质糖基化,不管细胞培养物生存力的损失是否发生。在高度优选的实施方式中,糖基化包括唾液酸化作用。

[0239] 修饰的细胞系的这种特征在生物治疗剂的制备中特别有益,因为较低程度的唾液酸化作用会降低基于蛋白质的药物的体内半衰期 (Varki,1993, *Biotechnol Bioeng* 43: 423-428;Gramer et al.,1995, *Glycobiology* 3:97-130)。

[0240] 在优选的实施方式中,在细胞培养物的一个或多个生长阶段、优选在指数生长期的至少部分中(优选的至少在指数中期中),但更优选的还在发生最大存活细胞密度之时,更优选的还在亲本或未修改细胞中将出现细胞死亡之时,维持表达的蛋白质的糖基化。在这种情况下,糖基化的水平优选的被维持在一个水平,而亲本或未修改的细胞中该水平将会降低。在优选的实施方式中,糖基化被维持在至少 2.7 、优选的至少 $2.9\text{mole 糖/mole 表达的蛋白质的水平}$ 。

[0241] 在优选的实施方式中,与亲本或未修饰的细胞相比,在生长期中相同的时间点,修饰细胞对表达的蛋白质的糖基化提高。在这种优选的实施方式中,糖基化可以达到至少 2.9 、优选的至少 3 、 3.1 、 3.2 、 3.3 、 3.4 或 $3.5\text{mole 糖/mole 表达的蛋白质的水平}$ 。

[0242] 我们进一步提供了具有提高的糖基化、优选的唾液酸化作用的重组蛋白质,所述重组蛋白质使用所描述的修饰的细胞制备。与可从不被如此修饰的细胞产生的多肽相比,这种多肽具有提高的唾液酸化作用。优选的,所述糖基化或唾液酸化作用大于 $2.9\text{mol 唾液酸/mol 产生的多肽}$,优选的约 $3.5\text{mol 唾液酸/mol 产生的多肽}$ 。在高度优选的实施方式中,表达的蛋白质包含干扰素 γ 。

[0243] 我们进一步提供了通过调节细胞的 cgFAIM、gFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 表达、修饰细胞来展示上述任何一种或多种性质的方法。凋亡

[0244] 根据本发明, cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 修饰的细胞的细胞生存力的提高源于修饰的细胞群体中凋亡的降低。这种修饰的细胞可以显示降低的凋亡,或对凋亡有抗性。与对照细胞相比,所述修饰的细胞优选的能够维持更高的存活细胞密度,优选的持续更久的时间。优选的,与未修饰的对照群体相比,在修饰的群体中存活细胞数目更高,例如高 10% 、 20% 、 30% 、 40% 、 50% 、 100% 、 200% 、 500% 或更多。

[0245] 优选的,与对照细胞相比,修饰的细胞显示生存力延长至少 6 小时、至少 12 小时、优选的至少 18 小时,最优选的至少 24 小时。在高度优选的实施方式中,与对照细胞相比,胱天蛋白酶 2 和 / 或胱天蛋白酶 3 和 / 或胱天蛋白酶 8 表达被延迟这么长时间。

[0246] 因而,优选的,与对照群体相比,修饰细胞的群体中的凋亡降低至少 10% 、优选的 25% 或更多、更优选的 40% 、 50% 、 75% 、 95% 或更多。在优选的实施方式中,修饰细胞的群体中凋亡细胞的百分比降低这么些数量。在高度优选的实施方式中,修饰的细胞对凋亡有

抗性,即,显示了很少的凋亡或没有显著的凋亡。

[0247] 分析凋亡的方法是本领域已知的,在下文和实施例中详细描述了。在实施例 14:凋亡分析中列出了分析凋亡的优选的方法。

[0248] 可选择的凋亡的分析包括定量或测量相关细胞中胱天蛋白酶 2、胱天蛋白酶 3 和胱天蛋白酶 8 的任何一种或多种的水平。因此,优选的,与没有被如此修饰的细胞或群体相比,在修饰的细胞或群体中这些胱天蛋白酶的任何一种或多种的水平被降低 10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%或更多。优选的,与未被修饰的对照细胞相比,修饰的细胞展现胱天蛋白酶 2、胱天蛋白酶 3 和胱天蛋白酶 8 的任何一种或多种的表达延迟优选的至少 1 小时、更优选的至少 6 小时、最优选的至少 12 小时或更多,例如,至少 24 小时、至少 36 小时、至少 48 小时、至少 72 小时、至少 144 小时、至少 288 小时或更久的一段时间。胱天蛋白酶水平可以通过本领域已知的任何方法来分析,包括 RT-PCR、RNase 保护、SDS-PAGE、免疫分析,等等。

[0249] 细胞死亡可以通过两种不同的机制,坏死或凋亡的任一种来发生。此外,某些化合物和细胞据说对于细胞是细胞毒的,即引起细胞死亡的。

[0250] “细胞毒性”是指化合物(例如,食物、化妆品或药物)或介导细胞(细胞毒性 T 细胞)的细胞杀伤性质。与坏死和凋亡相反,术语细胞毒性不必要指特定的细胞死亡机制。举例来说,细胞介导的细胞毒性(也就是由细胞毒 T 淋巴细胞 [CTL] 或天然杀伤 [NK] 细胞介导的细胞死亡)组合了坏死和凋亡的某些方面。

[0251] “坏死”(也称为“意外的”细胞死亡)是指当细胞暴露于严重的物理或化学损害时发生的病理过程。当细胞暴露于可能引起对质膜的损害的生理条件的极端改变(例如,低温、氧不足)时,发生坏死。在生理条件下,对质膜的直接损害由如补体和裂解病毒的试剂引起。坏死开始于细胞维持稳态的能力的受损,引起水和细胞外离子的流入。细胞内的细胞器,最值得注意的是线粒体,以及完整的细胞肿胀并破裂(细胞裂解)。由于质膜的最终崩溃,细胞质内容物包括溶酶体酶被释放到细胞外液中。因此,在体内,坏死性细胞死亡常常与引起强烈的炎症性反应的广泛组织损伤相关。

[0252] “凋亡”(“正常”或“程序化”细胞死亡)是指一种生理过程,通过这种过程在发育和其他正常的生物学过程期间不需要的或无用的细胞被清除。凋亡是在正常的生理条件下发生的细胞死亡的模式,细胞在其自己的死亡中是主动参与者(“细胞自杀”)。这最经常地在标准的细胞更新和组织稳态、胚胎发生、免疫耐受性的诱导和维持、神经系统的发育和内分泌依赖性组织萎缩期间被发现。经历凋亡的细胞显示了特征性形态学和生物化学特征。这些特征包括染色质聚集、核和细胞质的浓缩、细胞质和核分配到含有核糖体的膜结合囊泡(凋亡体)中、线粒体和核材料的形态上的完整。在体内,这些凋亡体被巨噬细胞或者邻近的上皮细胞快速地识别和吞噬。由于在体内除去凋亡细胞的这种有效的机制,不引发炎症性的反应。在体外,凋亡体以及剩余的细胞碎片最终肿胀并最后裂解。体外细胞死亡的这种终末期被称为“二次坏死”。

[0253] 表 1 概括了坏死和凋亡之间各种可观察的差异。优选的,修饰的细胞展现出这些特征的一种或多种的降低。任何这些差异,单独或组合地,可以被分析以确定细胞死亡是否通过凋亡或通过坏死发生。

[0254]

	坏死	凋亡
形态特征	膜完整性的丧失 从细胞质和线粒体的肿胀开始 以完全细胞裂解结束 没有囊泡形成,完全裂解 细胞器的崩解(肿胀)	膜起泡,但没有完整性的丧失 染色质在核膜处聚集 以细胞质的缩小和核的浓缩开始 以细胞片段化成较小的体而结束 膜结合囊泡(凋亡体)的形成 由于涉及 bcl-2 家族的蛋白质的孔洞形成,线粒体变成渗漏的。
生物化学特征	离子稳态的调节的丧失 没有能量需求(被动的过程,也在 4℃ 发生) DNA 的随机消化(琼脂糖凝胶电泳后 DNA 模糊)	涉及活化和酶促步骤的紧密调节的过程 能量(ATP)依赖性(主动过程,不在 4℃ 发生) DNA 的非随机单和寡核小体长度的片段化(琼脂糖凝胶电泳后阶梯图式) 裂解前 DNA 片段化,线粒体释放
	裂解后的 DNA 段裂(=死亡的晚期事件)	各种因子(细胞色素 C, AIF)到细胞质中 胱天蛋白酶级联的活化 膜不对称性的改变(即,磷脂酰丝氨酸从细胞质到膜的细胞外侧的易位)
生理意义	影响连续细胞的群体 由非生理性干扰引起(补体攻击、裂解性病毒、低温、氧不足、缺血、代谢毒物) 巨噬细胞的吞噬作用 显著的炎症性的反应	影响单个的细胞 由生理学刺激诱导(生长因子的缺乏,激素环境的改变) 邻近的细胞或巨噬细胞的吞噬作用 没有炎症性反应

[0255]

[0256] 表 1 :坏死和凋亡的区别特征和意义

[0257] 参考以下文件,它们详细地描述了凋亡,以及用于凋亡的测量细胞死亡的各种分析:Schwartzman, R. A. and Cidlowski, J. A. (1993). Endocrine Rev. 14, 133 ;Vermes,

I. and Haanan, C. (1994). *Adv. Clin. Chem.* 31, 177 ; Berke, G. (1991). *Immunol. Today* 12, 396 ; **Krähenbühl**, O. and Tschopp, J. (1991). *Immunol. Today* 12, 399 ; Van Furth, R. and Van Zwet, T. L. (1988). *J. Immunol ; Methods* 108, 45. Cohen, J. J. (1993) Apoptosis. *Immunol. Today* 14, 126 ; Savill, J. S. et al. (1989). *J. Clin. Invest.* 83, 865 ; Wyllie, A. H. (1980). *Nature* 284, 555 ; Leist, M. et al. (1994) *Biochemica* No. 3, 18-20 ; Fraser, A. and Evan, G. (1996) *Cell* 85, 781-784 ; Duke, R. C. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6361 ; Duke, R. C. & Cohen, J. J. (1986). *Lymphokine Res.* 5, 289 ; Trauth, B. C. et al. (1994) *Eur. J. Cell. Biol.* 63, 32, Suppl 40 ; Matzinger, P. (1991). *J. Immunol ; Methods* 145, 185 ; Kaeck, M. R. (1993) ; *Anal. Biochem.* 208, 393 ; Prigent, P. et al. (1993). *J. Immunol ; Methods* 160, 139 ; Huang, P. & Plunkett, W. (1992) ; *Anal. Biochem.* 207, 163 Bortner, C. D. et al. (1995) *Trends Cell Biol.* 5, 21 ; Gold, R. et al. (1994) ; *Lab. Invest.* 71, 219.

[0258] 凋亡和细胞介导的细胞毒性的特征是在膜崩解之前基因组 DNA 裂解成分立的碎片。因而,可以通过测量 DNA 片段化,例如,通过观察 DNA 阶梯的存在,来分析凋亡。例如,作为来自细胞群体的“阶梯”(180bp 的重复作为梯子的“横档”),或通过经由例如 ELISA 来定量组蛋白复合的 DNA 片段,可以分析 DNA 片段。这种分析依靠一步夹心免疫分析来检测核小体。步骤包括通过离心使细胞团化,弃去上清液(其含有在孵育期间从膜漏出的、来自坏死的细胞的 DNA)。在裂解缓冲液中重悬浮并孵育细胞。裂解之后,通过离心使完整的核团化。将上清液的等分量转移到链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定板的反应孔,上清液中的核小体与两种单克隆抗体结合:抗-组蛋白(生物素标记)的单克隆抗体和抗-DNA(过氧化物酶共轭)的单克隆抗体。抗体-核小体复合物通过链霉抗生物素蛋白与微量滴定板结合。洗涤固定化的抗体-组蛋白复合物三次来除去非免疫反应性的细胞成分,样品与过氧化物酶底物(**ABTS[®]**)孵育。然后用分光光度法测定有颜色的产物的数量(因而,测定固定化的抗体-组蛋白复合物的数量)。

[0259] 几种蛋白酶涉及凋亡的早期阶段。因而,除分析凋亡所诱导的蛋白酶例如胰天蛋白酶,例如胰天蛋白酶 3 的活性之外,或者不检测它们的活性,也可以通过检测它们的存在分析凋亡。可以按不同的方法,例如,通过例如细胞溶胞产物的体外酶分析,通过捕获胰天蛋白酶并测量适合的底物的蛋白水解裂解,可以分析胰天蛋白酶活化。此外,通过检测体内胰天蛋白酶底物例如 PARP(聚-ADP-核糖-聚合酶)的裂解,可以分析胰天蛋白酶。PARP 的裂解的碎片可以用适合的抗体例如抗 PARP 抗体来检测。蛋白酶分析和 DNA 片段化分析特别适合于分析细胞群体中的凋亡。

[0260] 研究单个细胞中凋亡的方法也是可用的,例如,ISNT 和 TUNEL 酶促标记分析。如上所述,广泛的 DNA 降解是在凋亡的早期阶段常常发生的特征性事件。DNA 的裂解在高分子量 DNA 中产生双链的、低分子量的 DNA 片段(单和寡核小体)以及的单链断裂(“切口”)。在 TUNEL 中,这种 DNA 链断裂通过用适合的修饰的核苷酸(例如, X-dUTP、X=生物素、DIG 或荧光素)来酶促标记游离的 3' -OH 末端来检测。适合的标记酶包括 ISNT(“原位切口翻译”)中的 DNA 聚合酶(缺口翻译)和 TUNEL(“TdT-mediated X-dUTP nick end labeling”; Huang, P. & Plunkett, W., 1992, *Anal. Biochem.* 207, 163 ; Bortner, C. D. et al., 1995, *Trends Cell Biol.* 5, 21) 中的末端脱氧核苷酸转移酶(末端标记)。

[0261] 通过测量膜改变也可以分析凋亡,包括:末端唾液酸残基从细胞表面糖蛋白的侧

链丧失,暴露新的糖残基;出现可以充当巨噬细胞分泌的粘附分子例如血小板反应蛋白的受体的表面糖蛋白;细胞膜磷脂不对称性的丧失,膜表面疏水性和电荷的改变。特别地,人类抗凝素膜联蛋白 V 是 35-36 千道尔顿、 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白,其具有对磷脂酰丝氨酸(PS)的高亲合力。在正常的存活细胞中,PS 位于细胞膜的胞质面。然而,在凋亡的细胞中,PS 从质膜的内侧面易位到外侧面,从而将 PS 暴露于外部的细胞环境。膜联蛋白 V 因而可以用于检测不对称地暴露在凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸(Homburg, C. H. E. et al. 1995, Blood 85, 532; Verhoven, B. et al., 1995, J. Exp. Med. 182, 1597)。此外, DNA 染料例如 DAPI、溴化乙锭和碘化丙锭等等,可以用于差异染色以辨别存活的和非存活的细胞。也可以使用 DNA 含量的分布型;因而,通透的凋亡细胞泄漏出低分子量 DNA,可以通过例如流式细胞计来检测“亚-G1 峰”或“A0”细胞(与 G1 细胞相比具有更低的 DNA 染色的细胞)的检测。也以这种方式检测凋亡的特征性形态变化。

[0262] 通过使用抗体检测凋亡相关蛋白例如 ced-3, ced-4, ced-9(Ellis, H. M. and Horvitz, H. R., 1986, Cell 44, 817-829; Yuan, J. Y. and Horvitz, H. R., 1990, Dev. Biol. 138, 33-41; Hentgartner, M. O., Ellis, R. E. and Horvitz, H. R., 1992, Nature 356, 494-499.)、Fas(CD95/Apo-1; Enari et al., 1996, Nature 380, 723-726)、Bcl-2(Baffy, G. et al., 1993, J. Biol. Chem. 268, 6511-6519; Miyashita, T. and Reed, J. C., 1993, Blood 81, 151-157; Oltvai, Z. N., Millman, C. L. and Korsmeyer, S. J., 1993, Cell 74, 609-619)、p53(Yonish-Rouach, E. et al., 1991, Nature 352, 345-347) 等等也可以用于分析凋亡。

[0263] 核苷酸载体

[0264] 多核苷酸可以掺入到重组可复制载体中。载体可以用于在相容的宿主细胞中复制所述核酸。因而在进一步的实施方式中,我们提供了通过将多核苷酸导入可复制的载体、将所述载体导入相容的宿主细胞,并在引起所述载体复制的条件下使所述宿主细胞生长来制备多核苷酸的方法。所述载体可以从宿主细胞中回收。适合的宿主细胞包括细菌例如大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞系和其他真核细胞系,例如昆虫 Sf9 细胞。

[0265] 优选的,载体中的多核苷酸与控制序列可操作地连接,所述控制序列能够使宿主细胞表达编码序列,即,所述载体是表达载体。术语“可操作地连接”是指所描述的组件处在允许它们按照它们预期的方式起作用的相互关系中。“可操作地连接”到编码序列的调节序列以在与所述控制序列相容的条件下实现所述编码序列表达的方式连接。

[0266] 所述控制序列可以被修饰,例如通过添加进一步的转录调节元件,来使得由所述控制序列指导的转录的水平对于转录调节物更有反应性。

[0267] 载体可以被转化或转染到如下所述适合的宿主细胞中来提供蛋白质的表达。这个过程可以包括在使编码蛋白质的编码序列的载体得以表达的条件下、培养用如上所述的表达载体转化的宿主细胞,并且任选的回收所述表达的蛋白质。

[0268] 所述载体可以是,例如,质粒或病毒载体,其具有复制起点,任选的用于所述多核苷酸的表达的启动子,和任选的所述启动子的调节物。载体可以含有一种或多种选择性标记基因,例如对于细菌质粒来说为氨苄青霉素抗性基因,对于哺乳动物载体来说为新霉素抗性基因。载体可以用来,例如,转染或转化宿主细胞。

[0269] 与编码蛋白质的序列可操作连接的控制序列包括启动子/增强子和其他表达调节信号。可以选择这些控制序列来与表达载体被设计来在其中表达的宿主细胞相容。术语

“启动子”是本领域公知的,涵盖从最小的启动子到包括上游元件和增强子的启动子的在大小和复杂度上不同的核酸区域。

[0270] 启动子一般从在哺乳动物细胞中有功能的启动子中选择,虽然也可以使用原核启动子和在其他真核细胞中有功能的启动子。启动子一般来源于病毒或真核基因的启动子序列。例如,它可以是来自其中将要发生表达的细胞的基因组。对于真核启动子,它们可以是以遍在的方式起作用的启动子(例如, α -肌动蛋白、 β 肌动蛋白、微管蛋白启动子),或作为选择,以组织特异性方式起作用的启动子(例如,丙酮酸激酶的基因的启动子)。它们也可以是响应特定的刺激的启动子,例如,结合甾类激素受体的启动子。也可以使用病毒启动子,例如莫洛尼鼠白血病病毒长末端重复序列(MMLV LTR)启动子、劳氏肉瘤病毒(RSV)LTR启动子或人巨细胞病毒(CMV)IE启动子。

[0271] 同样有益的是启动子是可诱导的,从而异源基因的表达水平可以在细胞的生命期间被调节。“可诱导的”是指使用启动子获得的表达水平可以被调节。

[0272] 此外,任何这些启动子可以通过添加进一步的调节序列,例如增强子序列而被修饰。也可以使用包含来自如上所述两个或多个不同启动子的序列元件的嵌合启动子。

[0273] CGFAIM、CGFADD、CGPDCD6 和 CGREQUIEM 多肽的表达

[0274] 为了表达生物学活性的 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 多肽,将中国仓鼠 FAIM、FADD、PDCD6 或 Requiem 多核苷酸序列与调控序列相连以使调控序列指导所述多核苷酸的表达。然后使得在所述调控序列的控制下进行多肽的表达。任选的,这样产生的多肽可以被纯化。

[0275] 优选的,调控序列是不与 FAIM、FADD、PDCD6 或 Requiem 多核苷酸序列天然相连的调控序列。

[0276] 因此我们描述了生产多肽的方法,包括提供细胞,优选的中国仓鼠细胞,其中中国仓鼠 FAIM、FADD、PDCD6 或 Requiem 多核苷酸序列已经与调控序列相连以使得调控序列指导所述多核苷酸的表达,并在使所述多肽得以表达的条件下培养所述细胞,以及任选的纯化所述多肽。

[0277] 我们进一步描述了生产多肽的方法,包括:(a) 提供表达序列,其是通过使中国仓鼠 FAIM、FADD、PDCD6 或 Requiem 多核苷酸序列与调控序列相连使得调控序列指导所述多核苷酸的表达而产生的;(b) 使得所述多肽在所述调控序列的控制下从所述表达序列表达,和 (c) 任选的纯化所述多肽。

[0278] 特别地,编码相应的核酸或其同源物、变体或衍生物的核苷酸序列可以插入到合适的表达载体中,即,含有对于插入的编码序列的转录和翻译所必需的元件的载体。

[0279] 我们还提供了通过任何上述方法产生的多肽。

[0280] 使 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 多肽得以表达的方法在下文列出。要理解的是,这些方法可能适用于在此描述的方法和组合物的实施方式,在这些实施方式中期望对多肽进行增量调节,例如 cgFADD 的增量调节以实现增强的细胞生存力。

[0281] 提供表达的多肽的一种方法是通过表达载体的方式,即,含有可调控的启动子,任选的具有其他调控序列例如增强子的载体(例如,质粒),所述调控序列与已经克隆到表达载体中编码目的多肽的序列可操作连接。

[0282] 可以用本领域技术人员公知的方法构建含有编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和

cgRequiem 的序列和合适的转录和翻译控制元件的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、合成技术和体内遗传重组。在 Sambrook, J. et al. (1989; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, ch. 4, 8, and 16-17, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.) 和 Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; Current Protocols in Molecular Biology, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.) 中描述了这样的技术。

[0283] 可以利用各种表达载体 / 宿主系统来包含和表达编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列。这些包括,但不限于,微生物,例如用重组噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌;用酵母表达载体转化的酵母;用病毒表达载体感染的昆虫细胞系统(例如,杆状病毒);用病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒(CaMV)或烟草花叶病毒(TMV))或用细菌表达载体(例如,Ti 或 pBR322 质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。可以采用任何适合的宿主细胞。

[0284] “控制元件”或“调控序列”是载体的非翻译区域(即,增强子、启动子和 5' 和 3' 非翻译区),其与宿主细胞蛋白质相互作用来进行转录和翻译。这些元件可以在它们的强度和特异性上有所不同。取决于使用的载体系统和宿主,可以使用任何数量的适合的转录和翻译元件,包括组成型和可诱导的启动子。例如,当在细菌系统中克隆时,可以使用可诱导的启动子,例如 BLUESCRIPT 噬菌粒的杂合体 lacZ 启动子(Stratagene, La Jolla, Calif.),或 PSPORT1 质粒(GIBCO/BRL)等等。可以在昆虫细胞中使用杆状病毒多角体蛋白启动子。来自植物细胞基因组(例如,热休克、RUBISCO 和贮藏蛋白基因)的启动子或增强子或来自植物病毒的启动子或增强子(例如,病毒启动子或前导序列)可以克隆到载体中。

[0285] 在哺乳动物细胞系统中,来自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子是优选的。如果必需产生含有编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列的多个拷贝的细胞系,可以使用带有合适的选择性标记的基于 SV40 或 EBV 的载体。

[0286] 在细菌系统中,取决于 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的预定用途,可以选择许多表达载体。例如,当需要大量的 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 用于抗体诱导时,可以使用指导易于纯化的融合蛋白的高水平表达的载体。这种载体包括,但不限于,多功能的大肠杆菌克隆和表达载体,例如 BLUESCRIPT(Stratagene),其中编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列可以与氨基末端 Met 和随后的 β -半乳糖苷酶的 7 个残基按读码框连接到载体中,具有从而产生杂合体蛋白, pIN 载体(Van Heeke, G. and S. M. Schuster(1989) J. Biol. Chem. 264 :5503-5509),等等。pGEX 载体(Promega, Madison, Wis.)也可以用于将外源多肽表达为与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的融合蛋白。一般地,这种融合蛋白是可溶的,通过吸附到谷胱甘肽琼脂糖珠上继之在游离谷胱甘肽存在下洗脱,可以容易地从裂解的细胞纯化。在这种系统中制备的蛋白质可以被设计以包括肝素、凝血酶或因子 XA 蛋白酶裂解位点,从而克隆的目标多肽可以随意从 GST 部分释放。

[0287] 在酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中,可以使用含有组成型或可诱导启动子,例如 α 因子、醇氧化酶和 PGH 的许多载体。对于综述,参见 Ausubel(同上)和 Grant et al. (1987; Methods Enzymol. 153 :516-544)。

[0288] 在使用植物表达载体的情况下,编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列的表达可以被许多启动子的任一种驱动。例如,病毒启动子,例如 CaMV 的 35S 和 19S 启动子可以单独使用或与来自 TMV 的 Ω 前导序列组合使用。(Takamatsu, N. (1987)

EMBO J. 6 :307-311.) 做为选择,可以使用植物启动子例如 RUBISCO 的小亚基或热激启动子。(Coruzzi, G. et al. (1984)EMBO J. 3 :1671-1680 ;Broglie, R. et al. (1984)Science 224 :838-843 ;和 Winter, J. et al. (1991)Results Probl. Cell Differ. 17 :85-105.) 通过直接 DNA 转化或病原体介导的转染,这些构建体可以被导入植物细胞。在许多一般可获得的综述中描述了这些技术。(参见,例如 Hobbs, S. or Murry, L. E. in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, N. Y. ;pp. 191-196.)。

[0289] 也可以使用昆虫系统来表达 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem。例如,在一个这样的系统中,苜蓿丫纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核多角体病病毒 (nuclear polyhedrosis virus) (AcNPV) 被用作在草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞或银纹夜蛾 (*Trichoplusia*) 幼虫中表达外源基因的载体。编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列可以被克隆到病毒的非必需区域,例如核多角体蛋白基因,并置于核多角体蛋白启动子的控制下。cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的成功插入将使得核多角体蛋白基因失活,并产生缺乏外壳蛋白的重组病毒。然后所述重组病毒可以用于感染,例如草地夜蛾细胞或银纹夜蛾幼虫,在其中 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 可以被表达。(Engelhard, E. K. et al. (1994)Proc. Nat. Acad. Sci. 91 :3224-3227.)

[0290] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用许多基于病毒的表达系统。在腺病毒用作表达载体的情况下,编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列可以连接到由晚期启动子和三联 (tripartite) 前导序列组成的腺病毒转录 / 翻译控制复合物中。在病毒基因组非必需 E1 或 E3 区域中的插入,可以用来获得能在受感染宿主细胞中表达 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的存活病毒 (Logan, J. and T. Shenk (1984)Proc. Natl. Acad. Sci. 81 :3655-3659.)。此外,转录增强子,例如劳氏肉瘤病毒 (RSV) 增强子,可以用来提高在哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0291] 因而,例如,在人胚肾 293 (HEK293) 细胞或贴壁 dhfr CHO 细胞中表达 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 蛋白质。为了最大化受体表达,一般在插入到 pCDN 或 pCDNA3 载体中之前从受体 cDNA 中除去所有的 5' 和 3' 非翻译区域 (UTR)。通过 lipofectin 用单个受体 cDNA 转染细胞,并在 400mg/ml G418 存在下选择。在 3 周的选择之后,挑选单个克隆并扩展用于进一步的分析。只用载体转染的 HEK293 或 CHO 细胞充当阴性对照。为了分离稳定地表达单个受体的细胞系,一般选择约 24 个克隆并通过 Northern 印迹分析来分析。一般在被分析的 G418 抗性克隆的约 50% 中可检测到受体 mRNA。

[0292] 也可以采用人的人工染色体 (HAC) 来递送比可在质粒中包含和表达的 DNA 更大的 DNA 片段。构建约 6kb 到 10Mb 的 HAC,并经由常规的递送方法 (脂质体、聚阳离子氨基聚合物或囊泡) 来递送用于治疗目的。

[0293] 也可以使用特异性起始信号来实现编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列的更有效的翻译。这些信号包括 ATG 起始密码子和邻近的序列。在编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列和它的起始密码子和上游序列被插入合适的表达载体的情况下,不需要其他的转录或翻译控制信号。然而,在仅插入编码序列或其片段的情况下,应当提供外源的翻译控制信号,包括 ATG 起始密码子。此外,起始密码子应该处在正确的阅读框中以确保完整插入物的翻译。外源的翻译元件和起始密码子可以是各种来源的,天然的和合成的。通过包含适合于所使用的特定细胞系统的增强子,例如在

文献中描述的那些,可以增强表达的效力。(Scharf, D. et al. (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20 :125-162.)

[0294] 此外,可以选择宿主细胞菌株调节插入的序列的表达,或以期望的方式加工表达的蛋白质的能力。多肽的这种修饰包括但不限于,乙酰化、羧化作用、糖基化、磷酸化、脂质化和酰化作用。也可以使用裂解蛋白质的“前原”形式的翻译后加工来促进正确的插入、折叠和/或功能。具有翻译后活性的特异性细胞系统和特征性机制的不同的宿主细胞(例如, CHO、HeLa、MDCK、HEK293 和 WI38) 可以从美国典型培养物保藏所(ATCC, Bethesda, Md.) 获得,并可以选择来确保外源蛋白的正确修饰和加工。

[0295] 对于重组蛋白质的长期、高产量生产,优选稳定的表达。例如,能稳定表达 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 的细胞系可以使用在同一个或分开的载体上含有病毒复制起点和/或内源表达元件和选择性标记基因的表达载体来转化。在导入外源载体之后,可以使细胞在富集培养基中生长约 1-2 天,然后转移到选择培养基。选择性标记的目的是赋予对选择的抗性,它的存在使得成功表达导入的序列的细胞得以生长和回收。稳定地转化的细胞的抗性克隆可以使用适合于该细胞类型的组织培养技术来增殖。

[0296] 可以使用许多选择系统来回收转化的细胞系。这些包括但不限于,单纯性疱疹病毒胸苷激酶基因(Wigler, M. et al. (1977) *Cell* 11 :223-32) 和腺嘌呤磷酸核糖转移酶基因(Lowy, I. et al. (1980) *Cell* 22 :817-23),其可以分别应用于 tk⁻ 或 apr⁻ 细胞。同样,可以使用抗代谢物、抗生素或除草剂抗性作为选择的基础。例如, dhff 赋予对氨甲蝶呤的抗性(Wigler, M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77 :3567-70); npt 赋予对氨基糖苷类新霉素和 G-418 的抗性(Colbere-Garapin, F. et al (1981) *J. Mol. Biol.* 150 :1-14); 以及 als 或 pat 分别赋予对氯磺隆(chlorsulfuron) 和 phosphinotricin 转乙酰酶的抗性(Murry, 同上)。已经描述了其他的可选择基因,例如, trpB, 其使得细胞利用吡啶而不是色氨酸,或 hisD, 其容许细胞利用 histinol 而不是组氨酸。(Hartman, S. C. and R. C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 :8047-51.) 近来,可见标记的使用变得流行,这种标记物如花色素苷, β -葡萄糖醛酸酶和它的底物,和荧光素酶和它的底物萤光素。可以使用这些标记来不仅是鉴定转化体,还定量可归因于特定载体系统的短暂的或稳定的蛋白质表达的数量。(Rhodes, C. A. et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55 :121-131.)

[0297] 虽然标记基因表达的存在/缺乏表明目标基因也存在,可能需要确认基因的存在和表达。例如,如果编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 的序列被插入到标记基因序列内,可以通过标记基因功能的缺乏来鉴定含有编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 的序列的转化细胞。做为选择,标记基因可以在单个启动子的控制下与编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 的序列串联。响应于诱导或选择的标记基因表达通常表明串联的基因也表达。

[0298] 做为选择,含有编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 的核酸序列并且表达 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 的宿主细胞可以通过本领域技术人员已知的各种步骤来鉴定。这些步骤包括但不限于, DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交和蛋白质生物分析或免疫分析技术,其包括基于膜、溶液或芯片的技术,用于核酸或蛋白质序列的检测和/或定量。

[0299] 编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 的多核苷酸序列的存在可以通过

使用编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的多核苷酸的片段的探针或片段的 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交或扩增来检测。基于核酸扩增的分析包括使用基于编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列的寡核苷酸或寡聚物来检测含有编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的 DNA 或 RNA 的转化体。

[0300] 使用特异于蛋白质的多克隆或单克隆抗体、用于检测和测量 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的表达的各种方案是本领域已知的。这些技术的实例包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫分析 (RIA) 和荧光活化的细胞分选 (FACS)。优选双位点、基于单克隆的免疫分析, 该分析利用与 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 上两个互不干扰的表位反应的单克隆抗体, 但也可以采用竞争性结合分析。本领域例如在 Hampton, R. et al. (1990 ;Serological Methods, a Laboratory Manual, Section IV, APS Press, St Paul, Minn.) 中和 Maddox, D. E. et al. (1983 ;J. Exp. Med. 158 :1211-1216) 中很好地描述了这些和其他的分析。

[0301] 各种标记和偶联技术是本领域技术人员已知的, 可以用于各种核酸和氨基酸分析中。产生标记的杂交物或 PCR 探针用于检测与编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的多核苷酸相关的序列的方法包括寡核苷酸标记 (oligolabeling)、切口翻译、末端标记或使用标记的核苷酸的 PCR 扩增。做为选择, 编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列或其任何片段, 可以被克隆到载体中用于 mRNA 探针的产生。这些载体是本领域已知的, 是商业上可获得的, 可以用于通过添加合适的 RNA 聚合酶例如 T7、T3 或 SP6 和标记的核苷酸来体外合成 RNA 探针。这些步骤可以使用各种商业上可获得的试剂盒来进行, 例如由 Pharmacia&Upjohn (Kalamazoo, Mich.)、Promega (Madison, Wis.) 和 U. S. Biochemical Corp. (Cleveland, Ohio) 提供的那些。可以用来易化检测的适合的报告物分子或标记包括放射性核素、酶、荧光剂、化学发光剂或显色剂, 以及底物、辅助因子、抑制物、磁性粒子, 等等。

[0302] 用编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的核苷酸序列转化的宿主细胞可以在适合于从细胞培养物表达和回收蛋白质的条件下培养。取决于使用的序列和 / 或载体, 通过转化细胞产生的蛋白质可以位于细胞膜中、是分泌的或被包含于细胞内。本领域技术人员将理解的是, 含有编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的多核苷酸的表达载体可以被设计以含有信号序列, 其指导 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 穿过原核或真核细胞膜的分泌。其他构建体可以用来将编码 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的序列连接到编码多肽结构域的核苷酸序列, 所述多肽结构域将便于可溶蛋白质的纯化。这种促进纯化的结构域包括但不限于, 金属螯合肽例如组氨酸-色氨酸模块, 其容许在固定化的金属上纯化; 蛋白 A 结构域, 其容许在固定化的免疫球蛋白上纯化; 和在 FLAGS 延伸 / 亲和纯化系统中使用的结构域 (Immunex Corp., Seattle, Wash.)。在纯化结构域和 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 编码序列之间包括可裂解接头序列, 例如特异于因子 XA 或肠激酶 (Invitrogen, San Diego, Calif.) 的序列, 可以用来便于纯化。一种这样的表达载体提供了融合蛋白的表达, 所述融合蛋白含有 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 和在硫氧还蛋白或肠激酶裂解位点之前的编码 6 个组氨酸残基的核酸。组氨酸残基便于在固定化的金属离子亲和层析上纯化 (IMAC; described in Porath, J. et al. (1992) Prot. Exp. Purif. 3 :263-281), 而肠激酶裂解位点提供了从融合蛋

白纯化 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的手段。在 Kroll, D. J. et al. (1993 ; DNA Cell Biol. 12 :441-453) 中提供含有融合蛋白的载体的论述。

[0303] cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的片段, 以及全长多肽, 不仅可以 通过重组生产来产生, 还可以通过使用固相技术的直接的肽合成为产生。(Merrifield J. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85 :2149-2154.) 可以利用手工技术或通过自动装置进行蛋白质 合成。例如, 使用 Applied Biosystems 431A 肽合成仪 (Perkin Elmer) 可以实现自动化的 合成。cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的各种片段可以分开合成, 然后组合来 产生全长分子。

[0304] 其他表达方法也是已知的, 例如, 可以采用称为“基因活化”的方法来调节 cgFAIM、 cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 的活性或表达。这种方法在 US 专利号 5, 641, 670 中详细描述 了, 通过引用合并在此。大体上, 基因活化方法是基于这样的认识, 细胞中目的内源基因的 调节或活性可以通过在细胞基因组中预定位点通过同源重组插入适合的 DNA 构建体来 改变, 所述合适的 DNA 构建体包括 : (a) 目标序列 ; (b) 调控序列 ; (c) 外显子和 (d) 不配对 的剪接 - 供体位点, 其中所述目标序列指导元件 (a)-(d) 的整合, 从而元件 (b)-(d) 可操作 地连接到内源基因。所述 DNA 构建体做为选择可以包含 : (a) 目标序列, (b) 调控序列, (c) 外显子, (d) 剪接 - 供体位点, (e) 内含子和 (f) 剪接 - 受体位点, 其中所述目标序列指导元 件 (a)-(f) 的整合, 从而元件 (b)-(f) 可操作地连接到内源基因的第一外显子。

[0305] 参考其中将要插入 DNA 的位点来选择使用的目标序列。在两种方案中, 使用靶向 事件来产生新的转录单位, 其是由所述靶向 DNA 构建体导入的序列和内源细胞基因的融合 产物。例如, 新的转录单位的形成容许通过向宿主细胞的基因组中导入所描述的 DNA 构建 体来使转录沉默基因 (在转染前在细胞中不表达的基因) 被活化。如所获得的在细胞中被 表达的内源基因例如 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 或 cgRequiem 的表达可以被改变, 即它被提 高、降低, 包括被消除, 或者可以通过使用基因活化方法改变调控或诱导模式。

[0306] 抗体

[0307] 可被用来调节这些蛋白质的活性的 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的特异性拮抗剂可以包括针对一种或多种所述蛋白质的抗体。特别地, 能够结合 cgFADD、 cgPDCD6 和 cgRequiem 的抗体, 优选的能够抑制其任何生物学活性的抗体, 适合用于减量调 节相关蛋白质的表达, 以增强细胞生存力。

[0308] 因此我们特别地提供了抗 -cgFADD、抗 -cgFAIM、抗 -cgPDCD6 和抗 -cgRequiem 抗 体, 以及产生它们的方法。

[0309] 如在此使用的, 抗体是指完整的抗体或能够结合选择的目标的抗体片段, 包括 Fv、 ScFv、Fab' 和 F(ab')₂, 单克隆和多克隆的抗体, 工程化的抗体, 包括嵌合的、CDR 移植的 和人源化的抗体, 和使用噬菌体展示或可选择的技术产生的人工选择的抗体。小的片段, 例如 Fv 和 ScFv, 由于它们尺寸很小和随之的优越的组织分布, 具有用于诊断和治疗应用的有 益性质。

[0310] 在此描述的抗 -cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 抗体可以用于例如在细胞 的环境中相关蛋白质的检测。因而, 它们可以是包含效应物蛋白例如标记的改变的抗体。特 别优选的是能够为抗体的体内或体外分布成像的标记。这些标记可以是放射性标记或不透 射线的标记, 例如金属微粒, 其在胚或细胞团块内是可以容易地看见的。此外, 它们可以是

荧光标记或在组织样品上可见的其他标记。

[0311] 重组 DNA 技术可以用于改进在此描述的抗体。因而,可以构建嵌合抗体来降低其在诊断或治疗应用中的免疫原性。此外,通过 CDR 移植 [参见欧洲专利申请 0239400 (Winter)] 和任选的,骨架修饰 [EP 0239400] 来人源化抗体,可以使免疫原性最小化。

[0312] 抗 -cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 cgRequiem 抗体可以从动物血清获得,或对单克隆抗体或其片段来说,可以在细胞培养物中产生。DNA 重组技术可以用来根据规定程序在细菌或优选哺乳动物细胞培养物中产生抗体。所选择的细胞培养物系统优选地分泌抗体产物。

[0313] 因而,我们公开了用于抗体的生产的过程,包括培养宿主,例如大肠杆菌或哺乳动物细胞,其已经用包含表达盒的杂合载体转化,所述表达盒包含与编码信号肽的第一 DNA 序列可操作连接的启动子,所述第一 DNA 序列按适当的读码框与编码所述抗体蛋白质的第二 DNA 序列连接,以及分离所述蛋白质。

[0314] 在适合的培养基中进行杂交瘤细胞或哺乳动物宿主细胞的体外扩增,所述培养基是惯用的标准培养基,例如 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 或 RPMI 1640 培养基,任选的补充有哺乳动物血清,例如胎牛血清,或痕量元素和生长维持添加剂,例如饲养细胞如正常的小鼠腹腔渗出物细胞、脾细胞、骨髓巨噬细胞、2-氨基乙醇、胰岛素、转铁蛋白、低密度脂蛋白、油酸,等等。本身是细菌细胞或酵母细胞的宿主细胞增殖同样地在本领域已知的适合培养基中进行,例如对于细菌,在 LB 培养基、NZCYM 培养基、NZYM 培养基、NZM 培养基、Terrific Broth、SOB 培养基、SOC 培养基、2x YT 培养基或 M9 基本培养基中进行,对于酵母在 YPD 培养基、YEPA 培养基、基本培养基或 Complete Minimal Dropout 培养基中进行。

[0315] 体外生产提供了相对纯的抗体制备物,并且容许规模扩大来得到大量的期望抗体。细菌细胞、酵母或哺乳动物细胞培养的技术是本领域已知的,包括均匀悬浮培养,例如在气升式反应器中或在连续搅拌反应器中,或者固定化的或捕集的 (entrapped) 细胞培养,例如空心纤维、微囊中,在琼脂糖微珠或陶瓷筒 (cartridge) 上。

[0316] 也可以通过体内扩增哺乳动物细胞来获得大量的期望抗体。为此,将产生期望的抗体的杂交瘤细胞注射到组织相容的哺乳动物中来引起生产抗体的肿瘤生长。任选的,在注射之前,动物用烃、特别是矿物油例如姥鲛烷 (四甲基-十五烷) 预处理 (prime)。在一到三周后,将抗体从这些哺乳动物的体液中分离。例如,向任选的用异十八烷预处理的 BALB/c 小鼠腹膜内注射杂交瘤细胞或转染的细胞,一到两周后,从动物采集腹水;其中所述杂交瘤细胞通过融合适合的骨髓瘤细胞和来自 Balb/c 小鼠的生产抗体的脾细胞获得,所述转染的细胞来自产生期望抗体的杂交瘤细胞系 Sp2/0。

[0317] 在例如 Kohler and Milstein, (1975) Nature 256:495-497; US 4,376,110; Harlow and Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor 中讨论了上述的和其他的技术,通过参考在此引用。制备重组抗体分子的技术在上述参考文献中描述了,并且也在例如 EP 0623679; EP 0368684 和 EP 0436597 中描述了,通过参考将它们在此引用。

[0318] 例如,通过免疫印迹、通过酶免疫分析,例如夹心分析或斑点分析,或放射免疫分析,来筛选细胞培养物上清液中期望的抗体。

[0319] 为了分离抗体,可以浓缩培养物上清液或腹水中的免疫球蛋白,例如,通过用硫酸铵沉淀、相对吸湿性材料例如聚乙二醇透析、通过选择性膜过滤,等等。如果必要和/或希望,通过常规的层析方法来纯化抗体,例如凝胶过滤、离子交换层析、在 DEAE-纤维素上层析和/或(免疫)亲和层析,例如使用 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 或其片段或使用蛋白-A 的亲和层析。

[0320] 还提供了分泌单克隆抗体的杂交瘤。优选的杂交瘤细胞是遗传上稳定的,分泌具有期望的特异性的单克隆抗体,并可以通过解冻和重克隆从深度冷冻的培养物中激活。

[0321] 还包括制备分泌针对 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 的单克隆抗体的杂交瘤细胞系的方法,其特征在于,用一种或多种 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 多肽、或其抗原性片段免疫适合的哺乳动物,例如 BALB/c 小鼠;将被免疫动物的生产抗体的细胞与适合的骨髓瘤细胞系的细胞融合,克隆融合中所获得的杂交细胞,选择分泌期望的抗体的细胞克隆。例如,用 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞系 PAI 或骨髓瘤细胞系 Sp2/0-Ag14 的细胞融合,筛选获得的杂交细胞的期望抗体的分泌,克隆阳性的杂交瘤细胞。

[0322] 优选的是制备杂交瘤细胞系的方法,其特征在于,在几个月内,例如在两个月和四个月之间,通过皮下和/或腹膜内注射 10^6 和 10^7 和 10^8 之间个表达 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 的细胞和适合的佐剂数次,例如四到六次,在最后一次注射后两到四天从被免疫小鼠采集脾细胞,并在存在融合起始物、优选的聚乙二醇的情况下与骨髓瘤细胞系 PAI 的细胞融合。优选的,骨髓瘤细胞在含有约 30% 到约 50%、分子量约 4000 的聚乙二醇的溶液中与三到二十倍过量的来自被免疫小鼠的脾细胞融合。融合之后,细胞如上所述以一定的间隔在补充有选择培养基,例如 HAT 培养基的适合的培养基中扩展,以防止正常的骨髓瘤细胞生长超过期望的杂交瘤细胞。

[0323] 还公开了包含插入物的重组 DNA,所述插入物编码针对如上所述 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 的抗体的重链可变区和/或轻链可变区。根据定义,这种 DNA 包括编码单链的 DNA、由所述编码 DNA 和其互补 DNA 组成双链的 DNA,或这些互补(单链的)DNA 本身。

[0324] 此外,编码针对 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 的抗体的重链可变区和/或轻链可变区的 DNA 可以是酶学或化学合成的 DNA,其具有编码重链可变区和/或轻链可变区的真正(authentic)DNA 序列或其突变体。真正 DNA 的突变体是编码上述抗体的重链可变区和/或轻链可变区的 DNA,所述抗体中一个或多个氨基酸被缺失或用一种或多种其他氨基酸替换。优选的,所述一个或多个修饰在抗体的重链可变区和/或轻链可变区的 CDR 之外。这种突变 DNA 还意指沉默突变,其中一个或多个核苷酸被具有编码相同的一个或多个氨基酸的新密码子的其他核苷酸替换。这种突变序列也是简并序列。简并序列在遗传密码的意义上是简并的,其中无限数量的核苷酸被其他核苷酸替换而不引起最初编码的氨基酸序列的改变。由于它们不同的限制性位点和/或为特定的宿主、特别是大肠杆菌所偏爱的特定密码子频率,这种简并序列可用于获得重链鼠可变区和/或轻链鼠可变区的最佳的表达。

[0325] 术语突变体意图包括通过根据本领域已知方法对真正 DNA 体外诱变获得的 DNA 突变体。

[0326] 对于完整的四聚免疫球蛋白分子的组装和嵌合抗体的表达,将编码重链和轻链可变区的重组 DNA 插入物与编码重链和轻链恒定区的相应 DNA 融合,然后例如在掺入杂合载体之后,转移到合适的宿主细胞内。

[0327] 还公开的是重组 DNA,其包含插入物,所述插入物编码与人类恒定区,例如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 或 $\gamma 4$,优选的 $\gamma 1$ 或 $\gamma 4$ 融合的、针对 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的抗体的重链鼠可变区。同样地还公开了重组 DNA,其包含编码与人类恒定区 κ 或 λ ,优选的 κ 融合的、针对 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 的抗体的轻链鼠可变区的插入物。

[0328] 在另一个实施方式中,我们公开了编码重组多肽的重组 DNA,其中重链可变区和轻链可变区通过间隔区基团的方式连接,任选的包含便于抗体在宿主细胞中加工的信号序列和 / 或编码便于抗体纯化的肽的 DNA 和 / 或裂解位点和 / 或肽间隔区和 / 或效应物分子。

[0329] 编码效应物分子的 DNA 意图是编码在诊断或治疗应用中有用的效应物分子的 DNA。因而,特别指明是毒素或酶,特别是能催化前体药物的活化的酶的效应物分子。编码这种效应物分子的 DNA 具有编码天然发生的酶或毒素的 DNA 的序列,或其突变体,并且可以通过本领域公知的方法制备。制剂和施用

[0330] 肽和多肽,例如 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 肽和多肽,核酸和多核苷酸和激动剂和拮抗剂肽或小分子,可以与适合的药物运载体一同配制。这种制剂包含治疗有效量多肽或化合物,和药学上可接受的运载体或赋形剂。这种运载体包括但不限于,盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇和其组合。制剂应当适合于施用方式,并且是本领域技术人员能力范围内的。我们进一步描述了药物包装和试剂盒,其包含装有上述的组合物的一种或多种成分的一个或多个容器。

[0331] 所述多肽和其他化合物可以单独使用,或与其他化合物例如治疗化合物一同使用。

[0332] 药物组合物的全身性施用的优选的形式包括注射,一般为静脉内注射。可以使用其他注射途径,例如皮下的、肌肉内的或腹膜内的。全身性施用的可选择的方法包括经粘膜和经表皮施用,使用渗透剂例如胆汁盐或羧链孢酸或其他洗涤剂。此外,如果适当地配制在肠的或胶囊的制剂中,口服施用也是可能的。这些化合物的施用也可以是局部的和 / 或局部化的,以药膏、膏剂、凝胶剂等等的形式。

[0333] 所需的剂量范围取决于肽的选择、给药途径、制剂的性质、受试者病症的性质和主治医师的判断。然而,适合的剂量在 $0.1-100 \mu\text{g/kg}$ 受试者的范围内。然而,考虑到可用化合物的种类和各种给药途径的不同效率,预料所需剂量存在很大变化。例如,预计口服施用比静脉内注射需要更高的剂量。这些剂量水平的变化可以使用本领域充分了解的经验性规则来调整以优化。

[0334] 用于治疗的肽也可以在以如上所述的常称为“基因治疗”的治疗模式中在受试者中内源地产生。因而,例如,受试者的细胞可以用多核苷酸,例如 DNA 或 RNA,加以工程化,来先体外后体内 (*ex vivo*) 编码多肽,并且例如,通过使用逆转录病毒质粒载体。然后将细胞导入受试者中。药物组合物

[0335] 我们还提供了药物组合物,包括施用治疗有效量的多肽、多核苷酸、肽、载体或抗体 (例如 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 多肽,等等) 和任选的药学上可接受

的运载体、稀释剂或赋形剂（包括其组合）。

[0336] 所述药物组合物可以在人和兽医学中用于人类或动物使用，一般将包括任何一种或多种药学上可接受的稀释剂、运载体或赋形剂。用于治疗用途的可接受的运载体或稀释剂是药物领域公知的，在例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985) 中描述了。药物运载体、赋形剂或稀释剂的选择也可以根据预定的施用途径和标准的药物实践来选择。药物组合物可以包含作为运载体、赋形剂或稀释剂的，或除运载体、赋形剂或稀释剂之外的任何适合的一种或多种粘合剂、一种或多种润滑剂、一种或多种悬浮剂、一种或多种包被剂、一种或多种增溶剂。

[0337] 可以在药物组合物中提供防腐剂、稳定剂、染料和甚至调味剂。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。还可以使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0338] 取决于不同的递送系统存在着不同的组合物 / 制剂需求。举例来说，在此描述的药物组合物可以被配制成使用微型泵或通过粘膜途径递送，例如，作为用于吸入或可摄取溶液的鼻喷雾或气雾剂，或胃肠外地递送，其中组合物以可注射的形式配制，用于通过例如静脉内的、肌肉内的或皮下的途径来递送。做为选择，可以对制剂进行设计来通过两种途径递送。

[0339] 当试剂要通过胃肠粘膜来经粘膜递送时，在通过胃肠道转运期间它应当能保持稳定；例如，它应当对蛋白水解降解有抗性、在酸性 pH 下稳定并且对胆汁的去污剂作用有抗性。

[0340] 在合适时，可以通过吸入施用、以栓剂或阴道栓的形式施用、以洗液、溶液、乳膏剂、软膏剂或扑粉形式的局部施用、通过使用皮肤贴片施用、以含有赋形剂例如淀粉或乳糖的片剂形式口服施用、单独的或与赋形剂混合在胶囊或囊泡 (ovule) 中、或以含有增味剂或着色剂的酏剂、溶液或悬浮液的形式、或它们可以胃肠外注射，例如静脉内、肌肉内或皮下注射。对于肠胃外施用，组合物可以最好以无菌水溶液的形式使用，其可以含有其他物质，例如足够的盐或单糖来使溶液与血液等渗。对于颊或舌下的施用，组合物可以以可按照常规的方式配制的片剂或锭剂的形式施用。疫苗

[0341] 另一个实施方式涉及在哺乳动物中诱导免疫反应的方法，其包括用 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 多肽或其片段接种所述哺乳动物，其足以产生抗体和 / 或 T 细胞免疫反应来保护所述动物免于 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 相关的疾病。

[0342] 又一个实施方式涉及在哺乳动物中诱导免疫反应的方法，其包括经由指导 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 多核苷酸的体内表达的载体来递送 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 多肽，以诱导这种免疫反应来产生抗体以保护所述动物免于疾病。

[0343] 进一步的实施方式涉及免疫的 / 疫苗制剂（组合物），当被导入哺乳动物宿主时，其在该哺乳动物中诱导针对 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 多肽的免疫学反应，其中所述组合物包含 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 多肽或 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 基因。疫苗制剂可以进一步包含适合的运载体。

[0344] 由于 cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和 / 或 cgRequiem 多肽可以在胃中被降解，优选的是胃肠外施用（包括皮下的、肌肉内的、静脉内的、皮内的注射等等）。适合于肠胃外施用

的制剂包括含水和无水的无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使得制剂与接受者的血液等渗的溶质;以及含水和无水的无菌悬浮液,其可以包括悬浮剂或增稠剂。制剂可以存在于单位剂量或多剂量容器中,例如,密封的安瓿瓶和小瓶,并可以保存在冻干的条件下,仅需要在使用前即时添加无菌的液体运载体。疫苗制剂还可以包括用于增强制剂的免疫原性的佐剂系统,例如水包油系统或本领域已知的其他系统。剂量将取决于疫苗的比活性,可以通过常规实验容易地确定。

[0345] 疫苗可以从在此描述的一种或多种多肽或肽来制备。

[0346] 制备含有免疫原性的一种或多种多肽或肽作为一种或多种活性成分的疫苗是本领域技术人员已知的。一般地,这种疫苗被制备为作为液体溶液或悬浮液的注射剂;也可以制备适合于在注射之前溶解于或悬浮于液体的固体形式。制品也可以是乳化的,或是封装入脂质体中的蛋白质。活性免疫原性成分常常与药学上可接受的并且与活性成分相容的赋形剂混合。适合的赋形剂是,例如,水、盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等等,和其组合。

[0347] 此外,如果希望,疫苗可以含有微量的辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、pH 值缓冲剂和/或增强疫苗的有效性的佐剂。可能有效的佐剂的实例包括但不限于:氢氧化铝、N-乙酰-胞壁酰基-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰-正-胞壁酰基-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(CGP 11637,称为nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-羟基磷酰氧)-乙胺(CGP 19835A,称为MTP-PE)、和RIBI,其含有在2%角鲨烯/Tween 80乳剂中的从细菌提取的三种成分:单磷酰基脂质A、海藻糖二霉菌酸酯和细胞壁骨架(MPL+TDM+CWS)。

[0348] 佐剂和其他试剂的进一步的实例包括氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝钾(明矾)、硫酸铍、硅土、高岭土、碳、油包水乳剂、水包油乳剂、胞壁酰二肽、细菌内毒素、脂质X、短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*) (粉刺丙酸菌(*Propionobacterium acnes*))、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、多核糖核苷酸、海藻酸钠、羊毛脂、溶血卵磷脂、维生素A、皂角苷、脂质体、左旋咪唑、DEAE-葡聚糖、嵌段共聚物或其他合成的佐剂。这些佐剂可以从各种来源商业上获得例如,Merck Adjuvant 65(Merck and Company, Inc., Rahway, N. J.),或弗氏不完全佐剂和完全佐剂(Difco Laboratories, Detroit, Michigan)。

[0349] 一般地,使用佐剂例如Amphigen(水包油)、Alhydrogel(氢氧化铝)或Amphigen和Alhydrogel的混合物。仅仅氢氧化铝被批准用于人类。

[0350] 免疫原和佐剂的比例可以在宽的范围上变化,只要两者都以有效量存在。例如,氢氧化铝可以以疫苗混合物的约0.5%的数量存在(Al_2O_3 基础)。方便地,配制疫苗来含有范围从0.2到200 $\mu g/ml$ 、优选的5到50 $\mu g/ml$ 、最优选的15 $\mu g/ml$ 的免疫原终浓度。

[0351] 在制剂之后,疫苗可以被掺入无菌容器,其然后被密封并保存在低温,例如4°C,或它可以被冻干。冻干法允许以稳定的形式长期保存。

[0352] 疫苗通过注射,例如皮下地或肌内地,常规胃肠外施用。适合于其他施用方式的另外的制剂包括栓剂,和在某些情况下,口服制剂。对于栓剂,传统的粘合剂和运载体可以包括,例如,聚亚烷基二醇或甘油三酯;这些栓剂可以由含有范围为0.5%到10%、优选的1%到2%的活性成分的混合物形成。口服制剂可以包括通常采用的赋形剂,例如药物级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等等。这些组合物采取溶液、悬浮液、片剂、药丸、胶囊、缓释制剂或粉末的形式,并含有10%到95%、优选25%到70%的活性成分。

当疫苗组合物是冻干的时,可以例如作为悬浮液在施用之前重构冻干的材料。重构优选的在缓冲液中进行。

[0353] 用于给患者口服施用的胶囊、片剂和丸剂可以具有肠溶包衣,其包含,例如, Eudragit “S”、Eudragit “L”、醋酸纤维素、苯二甲酸醋酸纤维素或羟基丙基甲基纤维素。

[0354] 在此描述的多肽可以以中性或盐形式被配制为疫苗。药学上可接受的盐包括酸加成盐(由肽的游离氨基形成),其由无机酸例如盐酸或磷酸,或这样的有机酸例如乙酸、草酸、酒石酸和马来酸形成。与游离羧基形成的盐也可以来自无机碱,例如,钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物,和这样的有机碱如异丙胺、三甲胺、2-乙胺乙醇、组氨酸和普鲁卡因。

[0355] 施用

[0356] 一般地,医师将决定最适合于个体受试者的实际剂量,它将随特定患者的年龄、体重和反应变化。以下的剂量是平均情况的示范。当然,也可以有单独的例子,其中更高的或更低的剂量范围是有益的。

[0357] 在此公开的药物和疫苗组合物可以通过直接注射施用。组合物可以配制用于胃肠外、粘膜、肌肉内、静脉内、皮下、眼内或经表皮施用。一般地,每种蛋白质可以以 0.01 到 30mg/kg 体重、优选的 0.1 到 10mg/kg、最优选的 0.1 到 1mg/kg 体重的剂量施用。

[0358] 术语“施用”包括通过病毒或非病毒技术的递送。病毒递送机制包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体和杆状病毒载体。非病毒的递送机制包括脂质介导的转染、脂质体、免疫脂质体、lipofectin、阳离子表面的两亲化合物(cationic facial amphiphile)(CFA)和其组合。这种给药机制的途径包括但不限于粘膜的、鼻的、口服、胃肠外的、胃肠的、局部的或舌下的途径。

[0359] 术语“施用的”包括但不限于通过粘膜途径的递送,例如,作为用于吸入的鼻部喷雾或气雾剂,或作为可摄取的溶液;胃肠外的途径,其中递送通过可注射的形式,例如,静脉内的、肌肉内的或皮下的途径。

[0360] 术语“共施用”是指每种例如多肽和其他的实体如佐剂的能实现免疫系统的必要的调节的施用部位和时间。因此,虽然多肽和佐剂可以从时间上在同一时刻并在相同部位施用,在与佐剂不同的时间和不同的部位使用多肽也可能是有益的。多肽和佐剂甚至可以在相同的运载工具中递送,多肽和抗原可以是偶联的和/或不偶联的和/或遗传上偶联的和/或不偶联的。

[0361] cgFAIM、cgFADD、cgPDCD6 和/或 cgRequiem 多肽、多核苷酸、肽、核苷酸、抗体等等和任选的佐剂,可以作为单剂或多剂独立地施用或共同施用给宿主受试者。

[0362] 在此描述的疫苗组合物和药物组合物可以通过许多不同的途径,例如注射(包括胃肠外的、皮下的和肌肉注射)、鼻内的、粘膜的、口服的、阴道内的、尿道的或眼睛的施用。

[0363] 在此描述的疫苗和药物组合物可以常规地胃肠外施用,通过注射,例如皮下或肌肉内注射。适合于其他施用方式的另外的制剂包括栓剂,和在某些情况下,口服制剂。对于栓剂,传统的粘合剂和运载体可以包括,例如,聚亚烷基二醇或甘油三酯;这样的栓剂可以由含有范围为 0.5%到 10%、可以是 1%到 2%的活性成分的混合物形成。口服制剂可以包括通常采用的赋形剂,例如药物级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等等。这些组合物采取溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉末的形式,并含有 10%到 95%、优选 25%到 70%的活性成分。当疫苗组合物是冻干的时,可以例如,作为悬浮液在

施用之前重构冻干的材料。重构优选的在缓冲液中进行。

实施例

[0364] 实施例 1. 细胞系与细胞培养物

[0365] CHO IFN- γ 是适应于在悬浮液中生长的中国仓鼠卵巢细胞系。它最初来源于二氢叶酸还原酶阴性 (DHFR⁻)、Dukx 细胞 (Urlaub&Chasin 1980)。CHO IFN- γ 已用 DHFR 和人类干扰素- γ 的基因共转染 (Scahill et al.1983)。

[0366] CHO IFN- γ 被维持在补充有 4mM 谷氨酰胺、20mM 葡萄糖和 0.25 μ M 氨甲蝶呤 (Sigma, St. Louis, MO) 的无葡萄糖 / 谷氨酰胺的 HyQ CHO MPS 培养基 (Hyclone, Logan, UT) 中。

[0367] 实施例 2. 总 RNA 提取与第一链 cDNA 合成

[0368] 使用 Trizol (Invitrogen) 从 CHO K1 细胞提取总 RNA。所有逆转录试剂来自 Promega。在含有 1 $\times$ 逆转录缓冲液、10mM 每种 dNTP 和 25 单位的重组 RNAsin[®] 核糖核酸酶抑制物的反应混合物中, 使用莫洛尼鼠白血病病毒 (Moloney Murine Leukaemia Virus) 逆转录酶以 42 $^{\circ}$ C、1 小时合成全长 cDNA。

[0369] 实施例 3. 基因特异性 PCR

[0370] 从 CHO K1 总 RNA 制备的 cDNA 用作基因特异性 PCR 的模板。所有 PCR 试剂来自 Promega。

[0371] 实施例 4. 中国仓鼠 FAIM 的基因特异性克隆

[0372] 使用 5' PCR 引物 5'-GCCGCGAGAGCTGCTGACTACGTCGTGG-3' 和 3' PCR 引物 5'-GTT ACTGTG-GTGAGATATGAATGGGTTTGG-3' 扩增 FAIM 的编码区。PCR 反应混合物含有 1 μ L cDNA 模板, 1 $\times$ 反应缓冲液, 200 μ M 每种 dNTP、2.0mM MgCl₂、1 μ M 每种引物和 Taq DNA 聚合酶混合物 (总共 5U)。PCR 条件是: 94 $^{\circ}$ C 5 分钟, 随后进行 31 个 94 $^{\circ}$ C 1 分钟、58 $^{\circ}$ C 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 2 分钟的循环, 最终在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。然后将 PCR 产物亚克隆到 pCR[®]-TOPO[®] (Invitrogen, Grand Island, NY) 中用于测序。

[0373] 中国仓鼠 FAIM (cgFAIM)

[0374] cgFAIM 的序列在 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:5 中列出。中国仓鼠序列编码 179 个氨基酸的蛋白质。

[0375] 也称为 CD95 或 APO-1 的 Fas 是来自在受体介导的凋亡途径中起重要作用的肿瘤坏死因子 (TNF) 受体家族的受体。TNF 受体家族的细胞外区域具有 2-6 个富含半胱氨酸的亚结构域的重复。Fas 活化通过胱天蛋白酶 8 的寡聚反应启动细胞内信号转导级联。胱天蛋白酶 8 已经显示是负责效应物胱天蛋白酶的级联样活化的起始胱天蛋白酶之一 (Srinivasula et al. 1996)。Fas 还显示促使线粒体细胞色素 C 释放, 其引起胱天蛋白酶 9 和其他效应物胱天蛋白酶的活化 (Li et al. 1997)。

[0376] 已经发现 Fas 凋亡抑制分子 (Fas apoptosis inhibitory molecule) (FAIM) 是可以赋予对 Fas 诱导的凋亡的抗性的可诱导蛋白质 (Schneider et al. 1999; Rothstein et al. 2000)。已经显示 FAIM 在 B 细胞中的表达与 sIg 信号一起能够阻断 Fas 杀伤, 并且这是通过阻断 Fas 信号转导途径中胱天蛋白酶 3 活化之前的步骤来完成的 (Schneider et al. 1999)。已经显示了 FAIM 存在两种可选择的剪接形式, 其中 FAIM-S 广泛地表达, 而

FAIM-L 是脑组织特异性的 (Zhong et al, 2001)。FAIM 序列看来在不同物种中也是高度保守的, 表明了重要的系统发育作用。

[0377] 实施例 5. 中国仓鼠 FADD 的基因特异性克隆

[0378] 使用 5' PCR 引物 5'-CCATGGACCCATTCCTGGTGC-3' 和 3' PCR 引物 5'-TTCTTCCACCAGGTCAGC-CACC-3' 扩增 FADD 的部分编码区。PCR 反应混合物含有 1 μ L cDNA 模板, 1 $\times$ 反应缓冲液, 200 μ M 每种 dNTP、1.5 mM MgCl₂、1 μ M 每种引物和 Taq DNA 聚合酶混合物 (总共 5U)。

[0379] PCR 条件是: 94 $^{\circ}$ C 5 分钟, 随后进行 31 个 94 $^{\circ}$ C 1 分钟、55 $^{\circ}$ C 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 2 分钟的循环, 最终在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。然后将 PCR 产物亚克隆到 pCR[®]-TOPO[®] (Invitrogen, Grand Island, NY) 中用于测序。

[0380] 中国仓鼠 FADD (cgFADD)

[0381] cgFADD 的序列在 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:6 中列出。

[0382] FADD 是 CD95 (Fas/APO-1) 和肿瘤坏死因子 (TNF) 受体诱导的凋亡的共同介导者 (Chinnaiyan et al 1996)。含有死亡和死亡效应物结构域的 FADD 是 Fas 参加后胱天蛋白酶 8 活化的重要介导者 (Chinnaiyan et al. 1995)。我们描述了通过使用人工工程化的 FADD 分子——仅含有 FADD 的凋亡受体结合死亡结构域、而不含死亡效应物结构域的 FADD DN, 而对 cgFADD 表达所进行的调节。效应物结构域通过募集胱天蛋白酶到诱导死亡的信号转导复合物来引起更下游的凋亡级联的活化。在此描述的方法允许过量表达工程化形式的 FADD——即显性失活, 以及这种工程化的分子通过与天然 FADD 竞争、并因而中断凋亡级联在防止胱天蛋白酶募集中的用途。

[0383] 实施例 6. 中国仓鼠 PDCD 6 的基因特异性克隆

[0384] 使用 5' PCR 引物 5'-GCCCATGGCTGCCTACTCCTA-3' 和 3' PCR 引物 5'-AATCCAGCCATCCTGAT-CCGT-3' 扩增 PDCD6 的部分编码区。PCR 反应混合物含有 1 μ L cDNA 模板, 1 $\times$ 反应缓冲液, 200 μ M 每种 dNTP、1.5 mM MgCl₂、1 μ M 每种引物和 Taq DNA 聚合酶混合物 (总共 5U)。

[0385] PCR 条件是: 94 $^{\circ}$ C 5 分钟, 随后进行 31 个 94 $^{\circ}$ C 1 分钟、52 $^{\circ}$ C 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 2 分钟的循环, 最终在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。然后将 PCR 产物亚克隆到 pCR[®]-TOPO[®] (Invitrogen, Grand Island, NY) 中用于测序。纯化获得的 PCR 产物并克隆到 pCR 2.1-Topo 载体中并测序。3' -RACE 引物是 5' -CAGCGGGTTGATAAAGACAGGAGTGGAGTG-3'。

[0386] 通过在含有溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶中电泳来分离 3' -RACE PCR 产物, 切除相关的条带并使用 Qiagen 试剂盒提取凝胶, 之后克隆到 pCR[®]-TOPO[®] (Invitrogen, Grand Island, NY) 中用于测序。

[0387] 中国仓鼠 PDCD6 (cg PDCD6)

[0388] cgPDCD6 的序列在 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:7 中列出。中国仓鼠序列编码 191 个氨基酸的蛋白质。

[0389] PDCD6 也称为凋亡连锁基因 2 (apoptosis-linked gene 2) (ALG-2), 其编码属于 panta-EF-hand 蛋白质家族的钙结合蛋白质。有迹象表明它参与受体、Fas 和糖皮质激素诱导的凋亡 (Vito et al. 1996; Krebs & Klemenz, 2000 and Jung et al., 2001)。有趣的是, Jang

et al. 2002 证明了 ALG-2 缺乏不引起 TCR、FAS 或地塞米松信号转导诱导的凋亡的阻断。

[0390] 实施例 7. 中国仓鼠 Requem 的基因特异性克隆

[0391] 使用 5' PCR 引物 5'-ATG-GCGGCTGTGGTGGAGAAT-3' 和 3' PCR 引物 5'-GGAGTTCTGGTTCTGGTAG-ATGG-3' 扩增 Requem 的部分编码区。PCR 反应混合物含有 1 μ L cDNA 模板, 1 $\times$ 反应缓冲液, 200 μ M 每种 dNTP、2.0mM $MgCl_2$ 、1 μ M 每种引物和 Taq DNA 聚合酶混合物 (总共 5U)。

[0392] PCR 条件是: 94 $^{\circ}$ C 5 分钟, 随后进行 60 个 94 $^{\circ}$ C 1 分钟、44 $^{\circ}$ C 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 2 分钟的循环, 最终在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。然后将 PCR 产物亚克隆到 pCR[®]-TOPO[®] (Invitrogen, Grand Island, NY) 中用于测序。纯化获得的 PCR 产物并克隆到 pCR 2.1-Topo 载体中并测序。3' -RACE 引物是 5' -GCCTCAGTTACCACTATGCCCATTCCCACC-3'。

[0393] 通过在含有溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶中电泳来分离 3' -RACE PCR 产物, 切除相关的条带并使用 Qiagen 试剂盒提取凝胶, 之后克隆到 pCR[®]-TOPO[®] (Invitrogen, Grand Island, NY) 中用于测序。

[0394] 中国仓鼠 Requem (cgRequem)

[0395] cgRequem 的序列在 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:8 中列出。中国仓鼠序列编码 391 个氨基酸的蛋白质。

[0396] Requem 也称为 ubi-d4, 是髓样细胞中胱天蛋白酶的活化所必需的锌指基因 (Gabig et al. 1994)。已提示 Requem 很可能编码存活因子 (survival factor) 撤退后凋亡应答所需的转录因子 (Gabig et al. 1994)。此外, Gabiget al. (1998) 后来在鼠髓样细胞和人类 K562 白血病细胞的细胞质和核亚细胞部分中检测到了该蛋白质, 从而表明该蛋白质可能具有不同于转录因子的功能。

[0397] 实施例 8. 中国仓鼠 FAIM 表达载体构建

[0398] 概括地说, 被克隆到 pCR[®]-TOPO[®] (Invitrogen, Grand Island, NY) 中的、来自 FAIM 基因特异性 PCR 的已证实的 PCR 产物被亚克隆到 pcDNA3.1(+) (Invitrogen) 中并再次测序。然后使用 Maxi Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 纯化最终的质粒 pcDNA3.1(+)FAIM, 对其浓度进行定量, 用于向 CHO IFN- γ 中转染。

[0399] 详细地, 通过使用 5'-PCR 引物 5'-GAATTCGCCACCATGACAGATCTTGTAGC-3' 和 3'-PCR 引物 5'-GAATTCGTGAACACATTTAATTACCA-3' 来创建具有人工 kozak 序列和接头区域的 cgFAIM。下划线的序列由 EcoRI 限制性位点组成, 而斜体的序列由人工 kozak 组成, 以便于 FAIM 的“读码框内”表达。cgFAIM 的掺入区域是粗体的。

[0400] PCR 反应混合物含有 1 μ L pCR2.1-TOPO cgFAIM 模板, 1 $\times$ 反应缓冲液, 200 μ M 每种 dNTP、2.0mM $MgCl_2$ 、1 μ M 每种引物和 Taq DNA 聚合酶混合物 (总共 5U)。PCR 条件是: 94 $^{\circ}$ C 5 分钟, 随后进行 60 个 94 $^{\circ}$ C 1 分钟、44 $^{\circ}$ C 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 2 分钟的循环, 最终在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

[0401] 然后在 37 $^{\circ}$ C 用 EcoRI 限制性内切酶消化证实的 PCR 产物大约 4 小时来产生具有用于进一步连接的粘性末端的 cgFAIM 插入物。空白 pcDNA3.1(+) 载体 (Invitrogen) 则在 37 $^{\circ}$ C 用 EcoRI 限制性内切酶消化大约 4 小时。然后通过添加 12 μ L 的插入物到 3 μ L 载体、2 μ L 无 Dnase 的水、2 μ L 10 $\times$ T4DNA 连接酶缓冲液 (Invitrogen) 和 1 μ L T4DNA 连接酶 (3U/

μ L) (Invitrogen) 中, 将 EcoRI 消化的 cgFAIM 插入物连接到 EcoRI 消化的 pcDNA3.1(+) 中。然后在室温下孵育此连接混合物大约 16 小时。

[0402] 然后将 10 μ L 连接混合物转化到感受态 DH5 α 细菌细胞中用于质粒增殖。通过在具有用于选择的氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上培养, 选择阳性转化体。然后对各个 DH5 α 克隆进行质粒提取, 用于测序来证实插入到 pcDNA3.1(+) 表达载体中的 cgFAIM 序列。然后使用 Maxi Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 纯化来自证实的克隆的质粒 pcDNA3.1(+) cgFAIM, 测定它的浓度用于向 CHO IFN-γ 中转染。

[0403] 实施例 9. 中国仓鼠 FADD 显性阴性表达载体构建

[0404] 通过使用 5' -PCR 引物 5' -GATATCGGATCCGCCACC-ATGGCCTTTGACATTGTATGCGACAATGTGGGG-3' 和 3' -PCR 引物 5' -CCCGGG-CTCGAGTGCCTCCC-TTCCACCAGGTCAG-3' 来创建具有 kozak 序列的 FADD 显性阴性 (FADD dominant negative) (FADD DN) 片段。下划线的序列分别由 BamHI 和 XhoI 限制性位点组成, 而斜体序列由人工 kozak 和起始密码子组成, 以便于 cgFADD 显性阴性的“读码框内”表达。掺入的 cgFADD 的编码区域是粗体的。

[0405] PCR 反应混合物含有 1 μ L cDNA 模板, 1× 反应缓冲液, 200 μ M 每种 dNTP、1.5 mM MgCl₂、1 μ M 每种引物和 Taq DNA 聚合酶混合物 (总共 5U)。亚克隆到 pCR[®]-TOPO[®] 中的部分 FADD 序列被用作模板。PCR 条件是: 94℃ 5 分钟, 随后进行 31 个 94℃ 1 分钟、50℃ 1 分钟和 72℃ 2 分钟的循环, 最终在 72℃ 延伸 10 分钟。

[0406] 然后在 37℃ 用 BamHI 和 XhoI 限制性内切酶消化证实的 PCR 产物大约 4 小时来产生具有用于进一步连接的粘性末端的 cgFADD DN 插入物。空白 pcDNA3.1(+) 载体 (Invitrogen) 则在 37℃ 用 BamHI 和 XhoI 限制性内切酶消化大约 4 小时。然后通过添加 12 μ L 的插入物到 3 μ L 载体、2 μ L 无 Dnase 的水、2 μ L 10×T4DNA 连接酶缓冲液 (Invitrogen) 和 1 μ L T4DNA 连接酶 (3U/μ L) (Invitrogen) 中, 将 BamHI/XhoI 消化的 cgFADD DN 插入物连接到 BamHI/XhoI 消化的 pcDNA3.1(+) 中。然后在室温下孵育此连接混合物大约 16 小时。

[0407] 然后将 10 μ L 连接混合物转化到感受态 DH5 α 细菌细胞中用于质粒增殖。通过在具有用于选择的氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上培养, 选择阳性转化体。然后对各个 DH5 α 克隆进行质粒提取, 用于测序来证实插入到 pcDNA3.1(+) 表达载体中的 cgFADD DN 序列。然后使用 Maxi Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 纯化来自证实的克隆的质粒 pcDNA3.1(+) FADD 显性阴性, 测定它的浓度用于向 CHO IFN-γ 中转染。

[0408] 实施例 10. 中国仓鼠 PDCD6 抑制载体构建

[0409] 根据获得的 cgPDCD6 序列设计寡聚插入物。使用 BLAST 将寡聚插入物设计与基因组数据库比较来消除与其他基因的任何显著的同源性。5' 寡聚插入物 5' -GATCCCGTGAGCTTCAGCAAGCATTATTCAAGAGATAATGCTTGCTGAAGC-TCATTTTTTGGAAA-3' 与合成的 3' 寡聚插入物 5' -AGCTTTTCCAAAAAATGAGCTTCAGCAAGCATTATCTCTTGAATAATGCTTGCTGAAGCTCACG-3' 退火, 然后连接到 HindIII/BglIII 消化的 pSUPER.neo 载体 (OligoEngine, Seattle, WA) 中。

[0410] 将 4 μ L 退火的寡聚插入物添加到 3 μ L HindIII/BglIII 消化的 pSUPER.neo、13 μ L 无 Dnase 的水、2 μ L 10×T4DNA 连接酶缓冲液 (Invitrogen) 和 1 μ L T4 DNA 连接酶 (3U/μ L) (Invitrogen) 中。然后在室温下孵育此连接混合物大约 16 小时。

[0411] 然后将 10 μ L 连接混合物转化到感受态 DH5 α 细菌细胞中用于质粒增殖。通过在

具有用于选择的氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上培养,选择阳性转化体。然后对各个 DH5 α 克隆进行质粒提取,用于测序来证实插入到 pSUPE R. neo 表达载体中的 cgPDCD6 siRNA 序列。然后使用 Maxi Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 纯化来自证实的克隆的质粒 pSUPE R. neo cgPDCD6siRNA,测定它的浓度用于向 CHO IFN- γ 中转染。

[0412] 实施例 11. 中国仓鼠 Requiem 抑制载体构建

[0413] 根据获得的 cgRequiem 序列设计寡聚插入物。5' 寡聚插入物 5' -GATCCCGCGGAT CCTTGAACCTGATTTCAAGAGAATCAGGTTCAAGGATCCGC-TTTTTTGAAA-3' 与 3' 寡聚插入物 5' -AG CTTTCCAAAAAGCGGATCCTTGAACCTGATTCTCTTGAAATCAGGTTCAAGGATCCGCGG-3' 退火,然后连接到 HindIII 和 BglIII 消化的 pSUPE R. neo 载体 (OligoEngine, Seattle, WA) 中。

[0414] 将 4 μ L 退火的寡聚插入物添加到 3 μ L HindIII/BglIII 消化的 pSUPE R. neo、13 μ L 无 Dnase 的水、2 μ L 10 $\times$ T4DNA 连接酶缓冲液 (Invitrogen) 和 1 μ L T4DNA 连接酶 (3U/ μ L) (Invitrogen) 中。然后在室温下孵育此连接混合物大约 16 小时。

[0415] 然后将 10 μ L 连接混合物转化到感受态 DH5 α 细菌细胞中用于质粒增殖。通过在具有用于选择的氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上培养,选择阳性转化体。然后对各个 DH5 α 克隆进行质粒提取,用于测序来证实插入到 pSUPE R. neo 表达载体中的 cgRequiem siRNA 序列。然后使用 Maxi Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 纯化来自证实的克隆的质粒 pSUPE R. neo cgRequiem siRNA,测定它的浓度用于向 CHO IFN- γ 中转染。

[0416] 实施例 12. 转染与选择

[0417] 使用 Lipofectamine 试剂 (Invitrogen) 进行转染。以每孔 50 万个细胞在 6 孔平板中使细胞生长过夜,次日每孔用大约 1 μ g 线性化的质粒转染。根据厂家的说明书以 Lipofectamine (μ L) 与 DNA (μ g) 的比例为 3 : 1 制备 Lipofectamine-DNA 复合物。

[0418] 为了产生稳定的细胞,使细胞生长 24 小时,之后将培养基转换为含有 1000 μ g/mL 遗传霉素的选择培养基。将细胞维持在选择培养基中 4 周,其中未转染的细胞在选择培养基中于一周内死亡。

[0419] 实施例 12A. 稳定整合的单细胞克隆

[0420] 通过将细胞连续稀释到 96 孔平板中使得在每个孔中仅有一个细胞,获得稳定整合的单细胞克隆。在光学显微镜下检查加样孔,标出仅含单个细胞的那些孔。然后将单个克隆扩展入 24 孔板中,随后是 6 孔板,之后进入摇瓶培养。

[0421] 实施例 12B. 分批培养和补料分批培养

[0422] 在 5.0L 生物反应器 (B. Braun, Melsungen, Germany) 中以 2.5×10^5 细胞/mL 的接种密度来接种 4.0L 初始工作体积的培养基。使用补充有 20mM 葡萄糖和 4mM 谷氨酰胺的无葡萄糖/谷氨酰胺的 HyQ CHO MPS 培养基 (Hyclone, Logan, UT) 进行分批培养,而补料分批培养补充有 4mM 葡萄糖和 0.5mM 谷氨酰胺。溶解的氧气浓度维持在 50% 空气饱和度,通过间歇性将 CO₂ 添加到气体混合物中和 / 或使用 7.5% (w/v) NaHCO₃ 溶液 (Sigma),将培养物 pH 维持在 7.15。

[0423] 使用改良的在线动态补料策略进行补料分批操作 (Lee et al., 2003)。每 1.5 小时使用自动化的无菌在线进样环管进行相关的受控营养物水平的浓度在线监视。用于补料分批培养的基础进料培养基 (basal feed media) 用定制的含 1 $\times$ 盐 (Hyclone) 的 10 $\times$ 无钙、无葡萄糖和无谷氨酰胺的 DMEM/F12 制备,补充有 10g/L 大豆蛋白质水解产物、Hysoy (Quest

International, Hoffman Estate, IL)、10mL/L 化学限定的脂质 (chemically defined lipids) (Gibco BRL, Grand Island, NY)、1mg/L d-生物素 (Sigma)、2mM L-天冬氨酸、2mM L-天冬酰胺、4mM L-半胱氨酸、1mM L-谷氨酸、1mM L-甲硫氨酸和 5mM L-丝氨酸 (Sigma)。

[0424] 基础进料培养基进一步补充有 100mM 谷氨酰胺 (Sigma) 和 500mM 葡萄糖 (Sigma)。每 1.5 小时,进行残余谷氨酰胺浓度的自动化在线测量。如果残余谷氨酰胺浓度低于设定点控制浓度,用进料培养基进行进料注射,来提高培养物谷氨酰胺浓度到 0.3mM。

[0425] 实施例 13. 使用实时 PCR 的基因表达定量

[0426] 从稳定的细胞收集大约 1000 万个细胞,使用 Trizol™ 试剂 (Invitrogen) 提取总 RNA。然后使用 GeneQuant™ Pro RNA/DNA Calculator (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 定量 RNA 样品。使用 260nm 比 280nm 的吸光度比值来评定 RNA 质量,比例 1.8 和以上被认为是足够纯的 RNA 样品。

[0427] 使用定量实时 PCR 来确定转染实验之后的目标基因相对过量表达或抑制。为了产生转录物拷贝的标准曲线,连续稀释含有 FAIM、FADD、PDCD6 或 Requiem 的定量的 pCR®-TOPO® (Invitrogen) 质粒,并用于定量实时 PCR。

[0428] 使用 5' 引物 5'-TGGAGCTGCGAAAACCAAAG-3' 和 3' 引物 5'-AAACTCGCTGCTGTCTCCAT-3' 进行 FAIM 转录物的定量实时 PCR。使用 5' 引物 5'-GATATCGGATCCGCCACCATGG-3' 和 3' 引物 5'-TGCCTCCCTTCCACCAG-GTCAG-3' 进行 FADD 显性阴性转录物的定量实时 PCR。使用 5' 引物 5'-CAGCGGGTTGATAAAGACAGG-3' 和 3' 引物 5'-GCCAGCCTTG-TTTTCTCGG-3' 进行 PDCD6 转录物的定量实时 PCR。使用 5' 引物 5'-TGGAGTAGCCAGAGCAATTG-3' 和 3' 引物 5'-TCGACGCTTTTACGCCAG-3' 进行 Requiem 转录产物的定量实时 PCR。

[0429] 然后针对 β -肌动蛋白转录物的表达将每个样品标准化。使用 5' 引物 5'-AGCTGAGAGGGAAATTGTGCG-3' 和 3' 引物 5'-GCAACGG-AACCGCTCATT-3' 进行 β -肌动蛋白转录物的定量实时 PCR。最后,转染的细胞中标准化的定量基因表达除以空载体转染的细胞中标准化的定量基因表达来得出标准化的相对基因表达。

[0430] 实施例 14. 凋亡分析

[0431] 使用溴化乙锭 / 吖啶橙分析将收集的样品中的细胞分类为凋亡的或非凋亡的群体。在 PBS 溶液 (Sigma) 中制备 100 μ g/mL 的溴化乙锭 (Sigma) 和吖啶橙 (Sigma) 的贮存液。

[0432] 从样品中取样约 1×10^6 个细胞,在 100 μ L 的 1 : 1 溴化乙锭 : 吖啶橙贮存液中重悬浮,在室温下孵育 5 分钟。然后将样品加载到玻璃载玻片上,在荧光显微镜下检查大约 400 个细胞。

[0433] 然后具有核凝缩的凋亡形态学的细胞被相应地分类。除了形态学分析之外,根据厂家的方案使用 BD ApoAlert™ Caspase Assay Plates (BDBiosciences Clontech, CA) 测量胱天蛋白酶 2、3、8 和 9 的活性。胱天蛋白酶的活化被认为是凋亡的生物化学标志。

[0434] 实施例 15. IFN- γ 定量

[0435] 使用酶联免疫吸附 (ELISA) 分析 (HyCult Biotechnology, Uden, Netherlands) 来分析连续稀释的上清液样品的 IFN- γ 浓度。在高生存力 (> 95%) 期间和在低生存力 (70-80%) 期间具有最高 IFN- γ 浓度的样品被送去进行免疫亲和纯化和进一步的 N-糖基

化表征。

[0436] 实施例 16. 实时 PCR 用于基因表达检测

[0437] 为了确定目标基因在细胞中的表达,进行定量实时 PCR。实时 PCR 被认为是检测转录物水平的敏感方法。

[0438] 基因表达分析显示用 pcDNA3.1(+)Faim 转染的细胞过量表达 FAIM 比用 pcDNA3.1(+) 空白转染细胞多三倍(附图 1)。用 pcDNA3.1(+)FADD 显性阴性转染的细胞过量表达 FADD 显性阴性高达 4 倍(附图 1)。附图 1 中数据还显示可以有效地使用 siRNA 抑制基因表达。用 pSUPERPDCD6siRNA 转染引起 PDCD6 表达被抑制大约 60%,而 pSUPER RequiemsRNA 能够抑制 Requiem 表达高达 70%(附图 1)。

[0439] 实施例 17. 靶向中国仓鼠 FAIM 基因赋予的凋亡抗性

[0440] 用 FAIM 表达载体(实施例 8)和作为对照的空白载体来转染细胞,分析对凋亡的抗性。

[0441] 与仅用空白载体转染的细胞相比,过量表达 FAIM 的细胞能够将高存活细胞密度维持更长时间(附图 2A)。FAIM 过量表达的细胞还显示了生存力在开始降至低于 95%之前,被显著延长至少 24 小时(附图 2B)。凋亡细胞的百分比也显著低于没有 FAIM 过量表达的对照细胞(附图 2D)。与对照细胞相比,胱天蛋白酶 2 和 3 活性的提高也延迟了大约 24 小时(附图 6B)。这显示了 FAIM 过量表达可以在抑制细胞培养过程中的凋亡中非常有效。

[0442] 实施例 18. 靶向中国仓鼠 FADD 基因赋予的凋亡抗性

[0443] 用 FADD 表达载体(实施例 9)和作为对照的空白载体来转染细胞,并分析对凋亡的抗性。

[0444] 与仅用空白载体转染的细胞相比,过量表达 FADD 显性阴性的细胞能够将高存活细胞密度维持更长时间(附图 3A)。FADD 显性阴性过量表达的细胞还显示在生存力开始降至低于 95%之前生存力显著延长约 24 小时(附图 3B)。凋亡细胞的百分比也显著低于没有 FADD 过量表达的对照细胞(附图 3D)。胱天蛋白酶 2、3 和 8 的活性的提高也显著地延迟(附图 6C)。数据显示培养物中的胱天蛋白酶 2 和 8 活性仅在 144 小时后提高,而胱天蛋白酶 3 活性的提高被显著地抑制。这显示了靶向 FADD 信号转导有效抑制细胞培养过程中的凋亡。

[0445] 实施例 19. 靶向中国仓鼠 PDCD6 基因赋予的凋亡抗性

[0446] 用 PDCD6 表达载体(实施例 10)和作为对照的空白载体来转染细胞,并分析对凋亡的抗性。

[0447] 与仅用空白 siRNA 载体转染的细胞相比,具有 PDCD6 抑制的细胞能够将高存活细胞密度维持更长时间(附图 4A)。具有 PDCD6 抑制的细胞还显示生存力丧失率显著下降(附图 4B)。凋亡细胞的百分比也显著低于没有 PDCD6 抑制的对照细胞(附图 4D)。胱天蛋白酶 2、3、8 和 9 活性的提高也显著地延迟(附图 6D)。数据显示培养物中胱天蛋白酶 2、3 和 8 活性仅在 144 小时后提高,而胱天蛋白酶 9 活性总是低于参考点。这显示靶向 PDCD6 信号转导可以有效抑制细胞培养过程中的凋亡。

[0448] 实施例 20. 靶向中国仓鼠 Requiem 基因赋予的凋亡抗性

[0449] 用 Requiem 表达载体(实施例 11)和作为对照的空白载体来转染细胞,并分析对凋亡的抗性。

[0450] 与仅用空白 siRNA 载体转染的细胞相比,具有 Requiem 抑制的细胞能够将更高的存活细胞密度维持更长时间(附图 5A)。具有 Requiem 抑制的细胞还显示了生存力丧失率显著下降(附图 5B)。凋亡细胞的百分比也显著低于没有 Requiem 抑制的对照细胞(附图 5D)。胱天蛋白酶 2、3 和 9 的活性的提高也显著地延迟(附图 6E)。数据显示了胱天蛋白酶活性显著地低于对照的活性。这显示靶向 Requiem 信号转导可以有效抑制细胞培养过程中的凋亡。

[0451] 实施例 21. 重组蛋白质产量的改善

[0452] 附图 7 显示了基因靶向就最终产物产量而言改善了细胞培养过程。

[0453] 与对照细胞中所见的典型的 2.3mg/L 产量相比,FAIM 过量表达的细胞使得干扰素 γ 产量高达 3.3mg/L(附图 7A)。

[0454] 靶向 FADD 信号转导甚至使得干扰素 γ 产量达 5.0mg/L,呈现出超过 200% 的提高(附图 7B)。

[0455] PDCD6 和 Requiem 的抑制分别使得干扰素 γ 产量改善到 4.2 和 5.8mg/L。

[0456] 工程化的细胞对凋亡诱导的耐性(robustness)提高,伴随最终重组蛋白质产量的有效提高,表明 FADD、FAIM、PDCD6 和 Requiem 的基因靶向是用于改善细胞培养系统中生物治疗剂产量的有效的新策略。

[0457] 实施例 22. 在补料分批培养中除生存力增强之外存活培养物密度的提高

[0458] 进行实验来确定在不同的分批和补料分批应激/营养物环境下工程化的凋亡抗性细胞系进行补料分批培养的能力。

[0459] 附图 8A 显示了具有 Requiem 或 PDCD6 抑制的稳定整合的 CHO IFN- γ 细胞系的存活细胞密度。PDCD6 和 Requiem 抑制使得在补料分批培养期间活细胞密度的显著提高。

[0460] 与在没有任何凋亡靶向的细胞中一般所见到的 5×10^6 个细胞/mL 相比,可以达到高达 9×10^6 个细胞/mL 的存活细胞密度。

[0461] 用显示 FADD DN 或 FAIM 过量表达的稳定整合的 CHO IFN- γ 细胞系重复实验,观察到相似的结果。

[0462] 这证明了,通过 Requiem 或 PDCD6 抑制或者 FAIM 和 FADD DN 过量表达所进行的凋亡抗性工程化不仅使得培养物生存力延长,而且由于它们针对抑制细胞生长的一种或多种因子的耐性,赋予了生长至高得多的存活细胞密度的能力。

[0463] 实施例 23. 在补料分批培养中提高的重组蛋白质产量

[0464] 附图 9A 显示了基因靶向使得干扰素 γ 生产和产量进一步显著改善。

[0465] 与在标准补料分批培养中所见的一般 20 μ g/mL 相比,具有稳定抑制的 Requiem 或 PDCD6 的细胞分别得到高达 49 和 41 μ g/mL 的干扰素 γ 产量。这代表重组蛋白质产量的改善大于 200%。

[0466] 用过量表达 FAIM 的细胞重复该实验,看到了相似的结果。

[0467] 实施例 24. 在修饰的 CHO 细胞系中重组人类 IFN- γ 的唾液酸化作用提高 - 唾液酸含量分析

[0468] 如上所述从亲本 CHO 细胞系产生表达 IFN- γ 的修饰的 CHO 细胞系。

[0469] 从指数生长中期收集的样品中和在当高生存力(> 95%)期间和在低生存力(70-80%)期间检测到最高 IFN- γ 浓度时收集的样品中纯化重组 IFN- γ 。

[0470] 然后使用如 Wong et al. (2005a), Biotechnol Bioeng 89 :164-177 中描述的改良的硫代巴比妥酸分析来测定 IFN- γ 的唾液酸含量。

[0471] 实施例 25. 在修饰的 CHO 细胞系中重组人类 IFN- γ 的增强的唾液酸化作用 -- 结果

[0472] 附图 10 显示了对修饰的 CHO IFN- γ 细胞系和亲本 CHO IFN- γ 细胞系而言, 在补料分批培养期间三个时间点, 即指数中期 ($> 95\%$ 生存力)、稳定期 ($> 95\%$ 生存力) 和死亡期 (70-80% 生存力), 收获的重组人类 IFN- γ 的唾液酸化作用。

[0473] 对于后者, 随着培养物从指数中期 (2.9mol SA/mol IFN- γ) 进展到稳定期 (2.3mol SA/mol IFN- γ) 再到死亡期 (2.1mol SA/mol IFN- γ), 重组人类 IFN- γ 的唾液酸含量降低。

[0474] 相比之下, 对于四个修饰的 CHO IFN- γ 细胞系而言, 在三个时间点收获的 IFN- γ 的唾液酸含量被维持, 甚至显示了唾液酸化作用的提高, 范围为 2.7-3.5mol SA/mol IFN- γ 。

[0475] 这些结果显示了凋亡抗性 CHO 细胞的另一种潜在益处是在延长的培养时间中维持 / 增强蛋白质糖基化质量, 尽管存在培养物生存力损失 (70-80%)。对于用来制造生物治疗剂的细胞系来说这是明显的益处, 因为较低的唾液酸化作用程度可以降低基于蛋白质的药物的体内半衰期 (Varki, 1993, Biotechnol Bioeng 43 :423-428 ;Gramer et al., 1995, Glycobiology 3 :97-130)。

[0476] 参考文献

[0477] Altschul SF, Thomas LM, Alejandro AS, Jinghui Z, Zheng Z, Webb M, and David JL (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402.

[0478] Chestkov, A. V., Baka, I. D., Kost, M. V., Georgiev, G. P., Buchman, V. L. (1996) The d4 gene family in the human genome. Genomics 36 :174-177

[0479] Chinnaiyan AM, O' Rourke K, Tewari M and Dixit VM. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell, May 81(4) :505-12

[0480] Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O' Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, and Dixit VM. (1996) FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/AP0-1) and TNF receptor-induced apoptosis. The Journal of Biological Chemistry. 271(9) :4961-4965

[0481] Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J. 326 :1-16

[0482] Fussenegger M., Fassnacht D., Schwartz R., Zanghi J. A., Graf M., Bailey J. E. and Portner R. (2000) Regulated over-expression of the survival factor bcl-2 in CHO cells increases viable cell density in batch culture and decrease DNA release in extended fixed-bed cultivation. Cytotechnology 32 :45-61

[0483] Gabig TG, Mantel PL, Rosli R and Crean CD. (1994) Requiem: a novel zinc finger gene essential for apoptosis in myeloid cells. J. Biol. Chem. 269(47) :

29515-9

[0484] Gabig, T. G. , Crean, C. D. , Klenk, A. , Long, H. , Copeland, N. G. , Gilbert, D. J. , Jenkins, N. A. , Quincey, D. , Parente, F. , Lespinasse, F. , Carle, G. F. , Gaudray, P. , etal. (1998) Expression and chromosomal localization of the Requiem gene. *Mammalian Genome* 9 :660-665

[0485] Goswami J. , Sinskey A. J. , Steller H. , Stephanopoulos and Wang DIC. (1999) Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 62 : 632-640

[0486] Gramer MJ, Goochee CF. 1994. Glycosidase activities of the 293 and NS0 cell lines and of an antibody-producing hybridoma cell line. *Biotechnol Bioeng* 43 : 423-428

[0487] Hu Y, Benedict MA, Ding L and Nunez G (1999) Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in APAF-1 mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 18 :3586-3595

[0488] Jang, I. K. , Hu, R. , Lacana, E. , D' Adamio, L. , Gu, H. (2002) Apoptosis-linked gene 2-deficient mice exhibit normal T-cell development and function. *Molec. Cell. Biol.* 22 :4094-4100

[0489] Jung, Y. S. , Kim, K. S. , Kim, K. D. , Lim, J. S. , Kim, J. W. and Kim, E. (2001) Apoptosis-linked gene 2 binds to the death domain of Fas and dissociates from Fas during Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288(2) :420-426

[0490] Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26 : 239-257

[0491] Krebs, J. and Klemenz, R. (2000) The ALG-2/AIP-complex, a modulator at the interface between cell proliferation and cell death? A hypothesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1498(2-3) :153-161

[0492] Laken HA and Leonard MW. (2001) Understanding and modulation apoptosis in industrial cell culture. *Cur. Opin. in Biotechnol.* 12 :1/5-1/9

[0493] Lee YY, Yap MGS, Hu WS and Wong KTY. 2003. Low-glutamine fed-batch cultures of 293-HEK serum-free suspension cells for adenovirus production. *Biotechnol. Prog.* 19 :501-509

[0494] Li P, Nijhawan D. , Budihardjo I. , Srinivasula S. M. , Ahmad M. , Alnemri E. S. and Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91 :479-489

[0495] Mastrangelo A. J. , Hardwich J. M. , Zou S. and Betenbaugh M. J. (2000) Over-expression of bcl-2 family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults. *Biotechnol Bioeng.* 67 :555-564

[0496] Nicholson DW and Thornberry NA (1997) Caspases: killer proteases.

TrendsBiochem Sci. 272 :2952-2956

[0497] Rothstein TL, Zhong X, Schram BR, Negm RS, Donohoe TJ, Cabral DS, Foote LC, Schneider TJ. (2000) Receptor-specific regulation of B-cell susceptibility to Fas-mediated apoptosis and a novel Fas apoptosis inhibitory molecule. *Immunol Rev.* 176 :116-33.

[0498] Scahill, SJ, Devos R, Der Heyden VJ and Fiers W. 1983. Expression and characterization of the product of a human immune interferon cDNA gene in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80 :4654-4658

[0499] Schneider TJ, Fischer GM, Donohoe TJ, Colarusso TP and Thomas L. Rothstein (1999) A Novel Gene Coding for a Fas Apoptosis Inhibitory Molecule (FAIM) Isolated from Inducibly Fas-resistant B Lymphocytes *J. Exp. Med.*, Volume 189, Number 6, March 15, 1999 949-956

[0500] Srinivasula S. M., Ahmand M., Hemandes-Alnemri T., Litwack G. and Alnemri E. S. (1996) Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: The Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 :14486-14491

[0501] Tey B. T., Singh R. P., Piredda L., Piacentini M. and Al-Rubeai M. (2000) Influence of Bcl-2 on cell death during the cultivation of a Chinese hamster ovary cell line expressing a chimeric antibody. *Biotechnol Bioeng.* 68 :31-43

[0502] Thornberry NA and Littlewood Y (1998) Caspases: Enemies within. *Science* 281 :1312-1316

[0503] Urlaub & Chasin. 1980. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 :4216-4220

[0504] Varki A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology* 3 :97-130

[0505] Vito P, Lacana E and D' Adamio L. (1996) Interfering with apoptosis: Ca²⁺-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science.* 271 (5248) : 521-5

[0506] Wong CFD, Wong TKK, Goh LT, Heng CK, Yap GSM. 2005a. Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 89 :164-177

[0507] Zhong X, Schneider TJ, Cabral DS, Donohoe TJ, Rothstein TL. (2001) An alternatively spliced long form of Fas apoptosis inhibitory molecule (FAIM) with tissue-specific expression in the brain. *Mol Immunol.* 2001 Jan ;38(1) :65-72

[0508] Zou H, Li Y, Liu X and Wang X (1999) An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274 : 11549-11556

[0509] 本文件中引用的每个申请和专利,以及在上述申请和专利中引用或参考的每个文

件,包括每个申请和专利(“申请引用的文件”)进行(prosecution)期间,和在每个申请和专利以及在任何申请引用的文件中引用或提及的任何产品的厂家说明书或目录,通过引用合并在此。此外,在这个文本中引用的所有文件,在这个文本中引用的文件中引用或参考的所有文件,在这个文本中引用或提及的任何产品的任何厂家说明书或目录,在此通过引用合并在此。

[0510] 本发明的描述的方法和系统的各种修改和变体对于本领域的技术人员是显而易见的,而不背离本发明的范围和精神。虽然已经结合具体的优选实施方式描述了本发明,应当理解的是要求权利的发明不应过度局限于这种特定的实施方式。实际上,对于分子生物学或相关领域的技术人员明显的、用于进行本发明的描述的模式的各种修改,预计在本发明的范围之内。

序列表

<110> 新加坡科技研究局 (Agency for Science, Technology and Research)

<120> 中国仓鼠凋亡相关基因

<130>P021527W0

<140>PCT/SG2005/000433

<141>200512-28

<150>US 60/640, 333

<151>2004-12-30

<160>44

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>179

<212>PRT

<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400>1

```
Met Thr Asp Leu Val Ala Val Trp Asp Val Ala Leu Ser Asp Gly Val
1           5           10           15
His Lys Ile Glu Phe Glu His Gly Thr Thr Ser Gly Lys Arg Val Val
20           25           30
Tyr Val Asp Gly Lys Glu Glu Ile Arg Lys Glu Trp Met Phe Lys Leu
35           40           45
Val Gly Lys Glu Thr Phe Cys Val Gly Ala Ala Lys Thr Lys Ala Thr
50           55           60
Ile Asn Ile Asp Ala Val Ser Gly Phe Ala Tyr Glu Tyr Thr Leu Glu
65           70           75           80
Ile Asp Gly Lys Ser Leu Lys Lys Tyr Met Glu Asn Arg Ser Lys Thr
85           90           95
Thr Asn Thr Trp Val Leu His Leu Asp Gly Gln Asp Leu Arg Val Val
100          105          110
Leu Glu Lys Asp Thr Met Asp Val Trp Cys Asn Gly Gln Lys Met Glu
```

115	120	125
Thr Ala Gly Glu Phe Val Asp Asp Gly Thr Glu Thr His Phe Ser Val		
130	135	140
Gly Asn His Asp Cys Tyr Ile Lys Ala Val Ser Ser Gly Lys Arg Arg		
145	150	155
Glu Gly Ile Ile His Thr Leu Ile Val Asp Asn Arg Glu Ile Pro Glu		
165	170	175
Leu Pro Gln		

<210>2

<211>180

<212>PRT

<213> 中国仓鼠 (Cricetulus griseus)

<400>2

Met Asp Pro Phe Leu Val Leu Leu His Ser Val Ser Gly Asn Leu Ser		
1	5	10
Ser Ser Asp Leu Leu Glu Leu Lys Phe Leu Cys Arg Glu Arg Val Ser		
20	25	30
Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp Leu PheSer Val		
35	40	45
Leu Leu Glu Gln Asn Asp Leu Glu Arg Thr Arg Thr Gly Leu Leu Arg		
50	55	60
Glu Leu Leu Ala Ser Leu Arg Arg His Asp Leu Leu Gln Arg Leu Asp		
65	70	75
Asp Phe Glu Ala Gly ThrAla Ala Ser Ala Ala Pro Gly Glu Ala Asp		
85	90	95
Leu Arg Val Ala Phe Asp Ile Val Cys Asp Asn Val Gly Arg Asp Trp		
100	105	110
Lys Arg Leu Ala Arg Gln Leu Lys Val Ser Glu Ala Lys Ile Asp Gly		
115	120	125
Ile Glu Glu Arg Tyr Pro Arg Ser Leu Ser Glu Gln ValArg GluAla		
130	135	140
Leu Arg Val Trp Lys Ile Ala Glu Arg Glu Lys Ala Thr Val Ala Gly		
145	150	155
Leu Val Lys Ala Leu Arg Ala Cys Arg Leu Asn Leu Val Ala Asp Leu		
165	170	175
Val Glu Gly Arg		

180

<210>3

<211>191

<212>PRT

<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400>3

Met Ala Ala Tyr Ser Tyr Arg Pro Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Pro
1 5 10 15
Ser Ala Gly Ala Ala Leu Pro Asp Gln Ser Phe Leu Trp Asn Val Phe
 20 25 30
Gln Arg Val Asp Lys Asp Arg Ser Gly Val Ile Ser Asp Asn Glu Leu
 35 40 45
Gln Gln Ala Leu Ser Asn Gly Thr Trp Thr Pro Phe Asn Pro Val Thr
 50 55 60
Val Arg Ser Ile Ile Ser Met Phe Asp Arg Glu Asn Lys Ala Gly Val
65 70 75 80
Asn Phe Ser Glu Phe Thr Gly Val Trp Lys Tyr Ile Thr Asp Trp Gln
 85 90 95
Asn Val Phe Arg Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Ser Gly Met Ile Asp Lys
 100 105 110
Asn Glu Leu Lys Gln Ala Leu Ser Gly Phe Gly Tyr Arg Leu Ser Asp
 115 120 125
Gln Phe His Asp Ile Leu Ile Arg Lys Phe Asp Arg Gln Gly Arg Gly
 130 135 140
Gln Ile Ala Phe Asp Asp Phe Ile Gln Gly Cys Ile Val Leu Gln Arg
145 150 155 160
Leu Thr Asp Ile Phe Arg Arg Tyr Asp Thr Asp Gln Asp Gly Trp Ile
 165 170 175
Gln Val Ser Tyr Glu Gln Tyr Leu Ser Met Val Phe Ser Ile Val
 180 185 190

<210>4

<211>391

<212>PRT

<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400>4

```

MetAla Ala Val Val Glu Asn Val Val Lys Leu Leu Gly Glu Gln Tyr
1           5           10           15
Tyr Lys Asp Ala Met Glu Gln Cys His Asn Tyr Asn Ala Arg Leu Cys
20           25           30
Ala Glu Arg Ser Val Arg Leu Pro Phe Leu Asp Ser Gln Thr Gly Val
35           40           45
Ala Gln Ser Asn Cys Tyr Ile Trp Met Glu Lys Arg His Arg Gly Pro
50           55           60
Gly Leu Ala Ser Gly Gln Leu Tyr Ser Tyr Pro Ala Arg Arg Trp Arg
65           70           75           80
Lys Lys Arg Arg Ala His Pro Pro Glu Asp Pro Arg Leu Ser Phe Pro
85           90           95
Ser Ile Lys Pro Asp Thr Asp Gln Thr Leu Lys Lys Glu Gly Leu Ile
100          105          110
Ser Gln Asp Gly Ser Ser Leu Glu Ala Leu Leu Arg Thr Asp Pro Leu
115          120          125
Glu Lys Arg Gly Ala Pro Asp Pro Arg Val Asp Asp Asp Ser Leu Gly
130          135          140
Glu Phe Pro Val Thr Asn Ser Arg Ala Arg Lys Arg Ile Leu Glu Pro
145          150          155          160
Asp Asp Phe Leu Asp Asp Leu Asp Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Asp Thr
165          170          175
Pro Lys Arg Arg Gly Lys Gly Lys Ser Lys Ser Lys Gly Val Ser Ser
180          185          190
Ala Arg Lys Lys Leu Asp Ala Ser Ile Leu Glu Asp Arg Asp Lys Pro
195          200          205
Tyr Ala Cys Asp Ile Cys Gly Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Pro Cys Leu
210          215          220
Ser Tyr His Tyr Ala Tyr Ser His Leu Ala Glu Glu Glu Gly Glu Asp
225          230          235          240
Lys Glu Asp Ser Gln Pro Pro Thr Pro Val Ser Gln Arg Ser Glu Glu
245          250          255
Gln Lys Ser Lys Lys Gly Pro Asp Gly Leu Ala Leu Pro Asn Asn Tyr
260          265          270
Cys Asp Phe Cys Leu Gly Asp Ser Lys Ile Asn Lys Lys Thr Gly Gln
275          280          285
Pro Glu Glu Leu Val Ser Cys Ser Asp Cys Gly Arg Ser Gly His Pro

```

290	295	300	
Ser Cys Leu Gln Phe Thr Pro Val Met Met Ala Ala Val Lys Thr Tyr			
305	310	315	320
Arg Trp Gln Cys Ile Glu Cys Lys Cys Cys Asn Leu Cys Gly Thr Ser			
	325	330	335
Glu Asn Asp Asp Gln Leu Leu Phe Cys Asp Asp Cys Asp Arg Gly Tyr			
	340	345	350
His Met Tyr Cys Leu Thr Ser Ser Met Ser Glu Pro Pro Glu Gly Ser			
	355	360	365
Trp Ser Cys His Leu Cys Leu Asp Leu Leu Lys Glu Lys Ala Ser Ile			
	370	375	380
Tyr Gln Asn Gln Ser Ser Ser			
385	390		

<210>5

<211>881

<212>DNA

<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400>5

```

gccgcgagag ctgctgacta cgtcgtggga tcaggagccg gtggcggagc gccgggcagc 60
cctctttata acctggaaaa aatgacagat cttgtagctg tttgggacgt tgcattaagt 120
gatggagtcc acaagattga atttgagcat gggaccacat caggcaaacg agttgtgtac 180
gtggatggga aggaagagat aagaaaagaa tggatgttca aattggtggg caaagaaacc 240
ttctgtgttg gagctgcgaa aaccaaagcc accataaata tagatgctgt cagtggtttt 300
gcttatgagt ataccctgga aatcgatggg aaaagcctca agaagtacat ggagaacaga 360
tcaaagacca ccaacacctg ggtactgcac ttggatggcc aggacttaag agttgttttg 420
gaaaaagata ctatggatgt atggtgcaat ggtcaaaaaa tggagacagc aggcgagttt 480
gtagatgatg gaactgaaac acacttcagt gttgggaacc atgactgtta cataaaagct 540
gtcagcagcg ggaagagaag agaagggatt atccacacac tcattgtgga taacagggag 600
atcccagagc tccctcagtg actgctgggt agtgggttct gagctgaaga ggagacatca 660
ggactttcta atggctgttg taattaaatg tgttcactgt gtacatattg gtagatttag 720
tctgcaatgt ttttatTTTT tgttactgga aactgtaata ttccaatggt caagaaaaat 780
gtggaatcat aaaaatttat ttttaacta ctgtaaagtg tttctaattc aaataggaaa 840
taaaatatgg accaaacca ttcatatctc accacagtaa c 881

```

<210>6

<211>542

<212>DNA

<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400>6

```

ccatggaccc attcctggtg ctgctgcact cgggtgtctgg caacttgtcg agcagcgate 60
tgctggagct aaagtccctg tgccgtgagc gcgtgagcaa acgaaagctg gagcgtgtgc 120
agagtggcct ggacctgttc tcagtgtcgc tggagcagaa cgatctggag cgcacacgca 180
ccgggctgct gcgtgagctg ctggcctcgc tgcgcagaca cgatctcctg caacgcctgg 240
acgactttga agcgggggacg gcggcctcgg ccgcaccggg ggaggcagat ctgcgggtgg 300
cctttgacat tgtatgcgac aatgtgggga gagattggaa gagactggcc cgccagctga 360
aagtgtctga ggccaaaatt gatgggattg aggagaggta cccccgaagc ctgagtgagc 420
aggtaaggga ggctctgaga gtctggaaga ttgccgagag ggagaaagcc acggtggctg 480
gactggtaaa ggcacttcgg gcctgccggc tgaacctggt ggctgacctg gtggaaggga 540
gg 542

```

<210>7

<211>1068

<212>DNA

<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400>7

```

gcccattggct gcctactcct accgcccagg cccggggcgcc ggccccggcc cttctgctgg 60
agctgcgctg ccagaccaga gcttcctgtg gaacgtcttc cagcgggttg ataaagacag 120
gagtggagtg atttcagaca atgagcttca gcaagcatta tccaatggta cttggactcc 180
gtttaatcca gtgactgtta ggtcaatcat ttctatgttt gaccgagaaa acaaggctgg 240
cgtgaacttc agtgaattta caggcgtgtg gaagtacatc acagactggc agaattgtctt 300
ccgaacctat gaccgggaca actctgggat gattgacaag aacgagctca agcaagcact 360
ctcaggtttt ggctaccggc tctctgacca gtccatgac atcctcatcc gcaaatttga 420
cagacaagga cgagggcaga tcgcatctga tgacttcac cagggctgca tcgtcttgca 480
gaggttgaca gacatattca gacgtatga cacggatcag gacggctgga ttcagggtgc 540
ttatgagcag tatctctcca tggctcttcag catcgtataa ccaggccctg tgaacagcaa 600
gcacagcatg caaaaaagac tgaaaatgcc aaatcccttc cctgtgatga aacagggcac 660
aagtacagtt agatgctgtt ctccctgtag gctgtataat taatacttgg ggacctggct 720
gtacatatgt gaataagctg gttagtgtt ctgtagtggc accctagcta cactgttata 780
atacaaacat tgggtttgct gactaattgt gccacgaggg gaaaccgaat attggttcag 840
gattctgctc tcaaactatc atgttctttt ctagctgtct ctaattctgt agttgaaaat 900
acttttatta gccaatagga ttttaaaata atatggaact tgcacagaag gcttttcatg 960
tgccttactt ttttaaaaaa gagtttatgt attcattgga atatgtaaca taagcaataa 1020
agtaatgate cagcccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1068

```

<210>8

<211>2482

<212>DNA

<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400>8

```

ggtatcaacg cagcctcccg gcgggagggga gaggagcagg gaagatggcg gctgtggtgg 60
agaatgtagt gaagctcctt ggggaacagt actacaaaga tgccatggaa cagtgccaca 120
attacaatgc ccgcctctgt gctgagcgta gcgtgcgtct gcctttcttg gactcacaga 180
ctggagtagc ccagagcaat tgttatatct ggatggaaaa gcgacaccgg ggaccaggat 240
tggcctctgg acagttgtac tctaccctg cccggcgctg gcgtaaaaag cgtcgagctc 300
accacctga ggatcccagg ctttccttcc catctattaa accagacaca gaccagaccc 360
tgaagaaaga ggggcttata tctcaggatg gcagcagttt agaggctcta ctgcgtactg 420
accctctgga gaaacgaggt gctccagatc cccgtgttga tgatgacagc ctgggcgagt 480
ttcctgtcac caacagtcga gcacggaagc ggatccttga acctgatgac ttcctagatg 540
atcttgatga tgaagactat gaagaagata ctccaaaacg tcggggaaag gggaaatcca 600
agagtaaggg tgtgagcagt gcccggaaga aactggatgc ttccatcctg gaggaccgtg 660
ataagcccta tgcctgtgac atttgtggaa aacgctacaa gaatcgacct tgcctcagtt 720
accactatgc ctattcccac ctggctgagg aggagggaga ggacaaagaa gactctcaac 780
cacctactcc tgtttccag aggtctgagg agcagaaatc caagaaagga cctgatggat 840
tagccctgcc caacaactac tgtgacttct gcctgggaga ctcaaaaatc aacaagaaga 900
cagggcgacc tgaggagcta gtgtcctgtt ctgactgtgg ccgctcaggg caccctcct 960
gcctgcagtt caccctcctg atgatggcgg ctgtgaagac ctaccgctgg cagtgcacgc 1020
agtgaagtg ctgcaacctc tgcggcactt cggagaatga cgaccagctg ctcttctgtg 1080
atgactgtga ccgtggctac cacatgtact gtctcacctc atccatgtcg gagcctcctg 1140
aaggaagtgg gagctgccac ctgtgtctgg atctgtgaa ggagaaagcg tccatctacc 1200
agaaccagag ctctcctga tgtgccaccc ggctccccac acacctaaagg ctgttgcctc 1260
cctctacctt ggttttcata cccctcttct tcttcttctt tcaactctgg agttctgccc 1320
aactgccttt ggcaacagca cagggaaggt ggcaactctt gactgcctct ggtcccaagc 1380
cctcagggag taaggagcag catgctgccc caggctgac tggtggccca gcttctctct 1440
gtctctcaag aagtgcattc actctgcttg ccttgggccc aagtccctgg taatcacagg 1500
gttcaaatgg gttcctctaa gaagtatgag agcagctcac ttgtctcaag cctggcctac 1560
ccctcctccc cctctggtgt ccagagtttt accccagggg tgagccaggc ctaacctttg 1620
cttgagacac ctggagtgat cagactgagg tggcacttgc taggaccctt tctaccct 1680
tgttctgctt cactttgcct ctgccaaagc agtcctgtgt cttctgtcat gctacatggg 1740
gtcctgtgct tgcactgtga tgctctcagg cacctcctgg ctctgtcctg ttctgcccag 1800
tcccacaaag agacaagcag cttcacctgc ccttcccgctg cttggctggc gcgtcacag 1860
gtggctctct gcaatccaaa catttcccat cctcagactt ttgagtcttc tgctccttc 1920
cttgttccct ttggttttgt gggggagagg gacaatgtca gggggccctg ccagaagctt 1980

```

```

ggggaccaca agaagttgga taatgtgcct gttttttaac tcgataaaaa tgcctacctc 2040
caaaatcccc ttttctttct tcttggacct gggcattcag cctcctgccc ttaactgaat 2100
caggagcctc tgcctcctac tgtgtatcct ggctcccagg agagaggatg gtcccccttc 2160
cttgcacact agctagcage tggtaaagtc ttctttccct gattttttgtt tcttgcttag 2220
tggcactgac attaatgtagg aggggacagt ccatgccaga acactctgga atggccttcc 2280
tccttggctg tgggcaggcc ctgacttggt ttctgcaaag ttgaggcccc tcctcctatc 2340
cttagttcct gtatccaaaa cattagtaag aataaacatt ttacacaga aaaaaaaaaa 2400
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2460
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2482

```

<210>9

<211>82

<212>PRT

<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400>9

```

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

```

<210>10

<211>253

<212>DNA

<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400>10

```

gccacatgg cctttgacat tgtatgcgac aatgtgggga gagattggaa gagactggcc 60
cgccagctga aagtgtctga ggccaaaatt gatgggattg aggagaggta cccccgaagc 120
ctgagtgage aggttaaggga ggctctgaga gtctggaaga ttgccgagag ggagaaaagcc 180
acggtggctg gactggtaaa ggcacttcgg gcctgccggc tgaacctagt ggctgacctg 240

```

gtggaaggga ggc	253
<210>11	
<211>51	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400>11	
gatatcggat cgcaccat ggcctttgac attgtatgcg acaatgtggg g	51
<210>12	
<211>34	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400>12	
ccgggctcg agtgcctccc ttccaccagg tcag	34
<210>13	
<211>65	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 抑制载体插入物	
<400>13	
gatcccgatga gcttcagcaa gcattattca agagataatg cttgctgaag ctcatttttt	60
ggaaa	65
<210>14	
<211>64	
<212>DNA	
<213> 人工的	

<220>

<223> 抑制载体插入物

<400>14

agctttttcca aaaaatgagc ttcagcaagc attatctctt gaataatgct tgctgaagct 60

cacg

64

<210>15

<211>64

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 抑制载体插入物

<400>15

gatcccgcg atccttgaac ctgatttcaa gagaatcagg ttcaaggatc cgcttttttg 60

gaaa

64

<210>16

<211>64

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 抑制载体插入物

<400>16

agctttttcca aaaaagcgga tccttgaacc tgattctctt gaaatcaggt tcaaggatcc 60

gcgg

64

<210>17

<211>28

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>17

gccgcgagag ctgctgacta cgtcgtgg 28

<210>18

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>18

gttactgtgg tgagatatga atgggtttgg 30

<210>19

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>19

ccatggaccc attcctggtg c 21

<210>20

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>20

tt ctccacc aggtcagcca cc 22

<210>21

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>21

gcccatggct gcctactcct a

21

<210>22

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>22

aatccagcca tcctgatccg t

21

<210>23

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>23

cagcgggttg ataaagacag gaggaggagtg

30

<210>24

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>24

atggcggctg tggaggagaa t

21

<210>25

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>25

ggagtttctgg ttctggtaga tgg

23

<210>26

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>26

gcctcagtta ccactatgcc cattccccacc

30

<210>27

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>27

tggagctgcg aaaaccaaag

20

<210>28

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>28

aaactcgcct gctgtctcca t

21

<210>29

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>29

gatatcggat ccgccaccat gg

22

<210>30

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>30

tgcctccctt ccaccaggtc ag

22

<210>31

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>31	
cagcgggttg ataaagacag g	21
<210>32	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400>32	
gccagccttg ttttctcgg	19
<210>33	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400>33	
tggagtagcc cagagcaatt g	21
<210>34	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400>34	
tcgacgtttt ttacgccag	19
<210>35	
<211>21	
<212>DNA	

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>35

agctgagagg gaaattgtgc g

21

<210>36

<211>18

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>36

gcaacggaac cgctcatt

18

<210>37

<211>6056

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒

<400>37

gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggtttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcac agcccatata 300
tggagtcccg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtagcccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catgggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660

actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	720
aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgta	acaactccgc	cccattgacg	caaattgggcg	780
gtaggcgtgt	acggtgggag	gtctatataa	gcagagctct	ctggctaact	agagaaccca	840
ctgcttactg	gcttategaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	gctggctagc	900
gtttaaactt	aagcttggta	ccgagctcgg	atccactagt	ccagtgtggg	ggaattcgcc	960
accatgacag	atcttgtagc	tgtttgggac	gttgcattaa	gtgatggagt	ccacaagatt	1020
gaatttgagc	atgggaccac	atcaggcaaa	cgagttgtgt	acgtggatgg	gaaggaagag	1080
ataagaaaag	aatggatgtt	caaattgggtg	ggcaaagaaa	ccttctgtgt	tggagctgcg	1140
aaaaccaaag	ccaccataaa	tatagatgct	gtcagtggtt	ttgcttatga	gtataccctg	1200
gaaatcgatg	ggaaaagcct	caagaagtac	atggagaaca	gatcaaagac	caccaacacc	1260
tgggtactgc	acttggatgg	ccaggactta	agagttgttt	tggaaaaaga	tactatggat	1320
gtatggtgca	atggtcaaaa	aatggagaca	gcaggcgagt	ttgtagatga	tggaaactgaa	1380
acacacttca	gtgttgggaa	ccatgactgt	tacataaaaag	ctgtcagcag	cggaagaga	1440
agagaaggga	ttatccacac	actcattgtg	gataacaggg	agatcccaga	gctccctcag	1500
tgactgctgg	ttagtgggtt	ctgagctgaa	gaggagacat	caggactttc	taatggctgt	1560
ggtaattaaa	tgtgttcacg	aattctgcag	atatccagca	cagtggcggc	cgctcgagtc	1620
tagagggcc	gtttaaaccc	gctgatcagc	ctcgactgtg	ccttctagtt	gccagccatc	1680
tgttgtttgc	ccctcccccg	tgccttcctt	gaccctggaa	ggtgccactc	ccactgtcct	1740
ttcctaataa	aatgaggaaa	ttgcatcgca	ttgtctgagt	aggtgtcatt	ctattctggg	1800
gggtgggggtg	gggcaggaca	gcaaggggga	ggattgggaa	gacaatagca	ggcatgctgg	1860
ggatgcggtg	ggctctatgg	cttctgaggc	ggaaagaacc	agctggggct	ctagggggta	1920
tccccacgcg	ccctgtagcg	gcgcattaag	cgcggcgggt	gtggtgggta	cgcgcagcgt	1980
gaccgctaca	cttgccagcg	ccctagcgcc	cgctcccttc	gctttcttcc	cttcctttct	2040
cgccacgttc	gccggctttc	cccgtcaagc	tctaaatcgg	gggctccctt	tagggttccg	2100
atttagtgct	ttacggcacc	tcgaccccaa	aaaacttgat	tagggtgatg	gttcacgtag	2160
tgggccatcg	ccctgataga	cggtttttcg	ccctttgacg	ttggagtcca	cgttctttaa	2220
tagtggactc	ttgtttcaaa	ctggaacaac	actcaaccct	atctcggtct	attcttttga	2280
tttataaggg	attttgccga	tttcggccta	ttggttaaaa	aatgagctga	tttaacaaaa	2340
atttaacgcg	aattaattct	gtggaatgtg	tgtcagttag	ggtgtggaaa	gtccccaggc	2400
tccccagcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	caggtgtgga	2460
aagtccccag	gctccccagc	aggcagaagt	atgcaaagca	tgcattctcaa	ttagtcagca	2520
accatagtec	cgccccctaac	tcgccccatc	ccgccccctaa	ctccgcccag	ttccgcccct	2580
tctccgcccc	atggctgact	aatttttttt	atttatgcag	aggccgaggc	cgctctgccc	2640
tctgagctat	tccagaagta	gtgaggaggc	ttttttggag	gcctaggctt	ttgcaaaaaag	2700
ctccggggag	cttgtatata	catttttcgga	tctgatcaag	agacaggatg	aggatcgttt	2760
cgcatgattg	aacaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttgggt	ggagaggcta	2820
ttcggtctatg	actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	atgccgccgt	gttccggctg	2880
tcagcgcagg	ggcgccccgt	tctttttgtc	aagaccgacc	tgtccggtgc	cctgaatgaa	2940
ctgcaggacg	aggcagcgcg	gctatcgtgg	ctggccacga	cgggcgttcc	ttgcgcagct	3000

gtgctcgacg	ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	tattgggcga	agtgccgggg	3060
caggatctcc	tgtcatctca	ccttgctcct	gccgagaaag	tatccatcat	ggctgatgca	3120
atgcggcggc	tgcatacgct	tgatccggct	acctgcccac	tcgaccacca	agcgaacat	3180
cgcacgcgac	gagcacgtac	tcggatggaa	gccggctctt	tcgatcagga	tgatctggac	3240
gaagagcatc	aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgcca	ggctcaaggc	gcgcatgccc	3300
gacggcgagg	atctcgtcgt	gacccatggc	gatgcctgct	tgccgaatat	catggtggaa	3360
aatggccgct	tttctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	gtgtggcgga	ccgctatcag	3420
gacatagcgt	tggctaccgc	tgatattgct	gaagagcttg	gcggcgaatg	ggctgaccgc	3480
ttcctcgtgc	tttacgggat	cgcgcctccc	gattcgcagc	gcacgccttt	ctatcgcctt	3540
cttgacgagt	tcttctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	gaccgaccaa	gcgacgcccc	3600
acctgccatc	acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaagggtt	ggcttcggaa	3660
tcgttttccg	ggacgcgggc	tggatgatcc	tccagcgcgg	ggatctcatg	ctggagttct	3720
tcgcccaccc	caacttggtt	attgcagctt	ataatgggtt	caaataaagc	aatagcatca	3780
caaatttcac	aaataaagca	tttttttcac	tgcatcttag	ttgtgggttg	tccaaactca	3840
tcaatgtatc	ttatcatgtc	tgtataccgt	cgacctctag	ctagagcttg	gcgtaatcat	3900
ggctcatagct	gtttcctgtg	tgaaattggt	atccgcctac	aattccacac	aacatacgag	3960
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggt	cctaattgag	gagctaactc	acattaattg	4020
cgttgcgctc	actgcccgtc	ttccagtcgg	gaaacctgtc	gtgccagctg	cattaatgaa	4080
tcggccaacg	cgcggggaga	ggcggtttgc	gtattgggcg	ctcttccgct	tcctcgtcca	4140
ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggg	atcagctcac	tcaaaggcgg	4200
taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaaggcc	4260
agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	4320
cccctgacga	gcatacaaaa	aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	4380
tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	4440
tgccgcttac	cggataacct	tcgccttttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	4500
gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggctcgttc	ctccaagctg	ggctgtgtgc	4560
acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	4620
acccggtta	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	4680
cgaggtatgt	aggcggtgct	acagagttct	tgaagtgggt	gcctaactac	ggctacacta	4740
gaagaacagt	atttggtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	4800
gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	tttttttggt	tgcaagcagc	4860
agattacgcg	cagaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	gatcttttct	acggggctct	4920
acgctcagtg	gaacgaaaac	tcacgttaag	ggattttggt	catgagatta	tcaaaaagga	4980
tcttcaccta	gatcctttta	aattaaaaat	gaagttttaa	atcaatctaa	agtatatatg	5040
agtaaacttg	gtctgacagt	taccaatgct	taatcagtga	ggcacctatc	tcagcgatct	5100
gtctattttc	ttcatccata	gttgccctgac	tccccgtcgt	gtagataact	acgatacggg	5160
agggcttacc	atctggcccc	agtcttgcaa	tgataccgcg	agaccacgcg	tcaccggctc	5220
cagattttatc	agcaataaac	cagccagccg	gaaggggcca	gcgcagaagt	gttcctgcaa	5280
ctttatccgc	ctccatccag	tctattaatt	gttgccggga	agctagagta	agtagttcgc	5340

cagttaatag	tttgcgcaac	gttggttgcca	ttgctacagg	catcgtgggtg	tcacgctcgt	5400
cgtttggtat	ggcttcattc	agctccgggt	cccaacgata	aaggcgagtt	acatgatccc	5460
ccatgttggtg	caaaaaagcg	gttagctcct	tcggtcctcc	gatcgttggtc	agaagtaagt	5520
tggccgcagt	gttatcactc	atgggttatgg	cagcactgca	taattctctt	actgtcatgc	5580
catccgtaag	atgcttttct	gtgactgggtg	agtactcaac	caagtcattc	tgagaatagt	5640
gtatgcggcg	accgagttgc	tcttgcccgg	cgtcaatacg	ggataatacc	gcgccacata	5700
gcagaacttt	aaaagtgtc	atcattggaa	aacgttcttc	ggggcgaaaa	ctctcaagga	5760
tcttaccgct	gttgagatcc	agttcgatgt	aaccactcgt	tgcacccaac	tgatcttcag	5820
catcttttac	tttcaccagc	gtttctgggt	gagcaaaaac	aggaaggcaa	aatgccgcaa	5880
aaaaggaat	aaggcgacac	cggaaatgtt	gaatactcat	actcttcctt	tttcaatatt	5940
attgaagcat	ttatcagggt	tattgtctca	tgagcggata	catatttgaa	tgtatttaga	6000
aaaataaaca	aataggggtt	ccgcgcacat	tccccgaaa	agtgccacct	gacgtc	6056

<210>38

<211>5632

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒

<400>38

gacggatcgg	gagatctccc	gateccctat	ggtgcactct	cagtacaatc	tgctctgatg	60
ccgcatagtt	aagccagtat	ctgctccctg	cttggtgtgt	ggaggctcgt	gagtagtgcg	120
cgagcaaaat	ttaagctaca	acaaggcaag	gcttgaccga	caattgcatg	aagaatctgc	180
ttagggttag	gcgttttgcg	ctgcttcgcg	atgtacgggc	cagatatacg	cgttgacatt	240
gattattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	ttacggggtc	attagttcat	agcccatata	300
tggagtcccg	cgttacataa	cttacggtaa	atggcccggc	tggctgaccg	cccaacgacc	360
cccgccatt	gacgtcaata	atgacgtatg	tccccatagt	aacgccaata	gggactttcc	420
attgacgtca	atgggtggag	tatttacggt	aaactgccc	cttggcagta	catcaagtgt	480
atcatatgcc	aagtacgccc	cctattgacg	tcaatgacgg	taaatggccc	gcctggcatt	540
atgcccgata	catgacctta	tgggactttc	ctacttggca	gtacatctac	gtattagtca	600
tcgctattac	catggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	660
actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	720
aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgta	acaactccgc	cccattgacg	caaatgggcg	780
gtaggcgtgt	acggtgggag	gtctatataa	gcagagctct	ctggctaact	agagaacca	840
ctgcttactg	gcttategaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	gctggctagc	900
gtttaaactt	aagcttggta	ccgagctcgg	atccgccacc	atggcctttg	acattgtatg	960
cgacaatgtg	gggagagatt	ggaagagact	ggcccggccag	ctgaaagtgt	ctgaggccaa	1020

aattgatggg attgaggaga ggtacccccg aagcctgagt gagcaggtaa gggaggctct	1080
gagagtctgg aagattgccg agaggagaa agccacggtg gctggactgg taaaggcact	1140
tcgggcctgc cggtgaacc tagtggctga cctggtggaa gggaggcact cgagtctaga	1200
gggcccgttt aaaccgcgtg atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt	1260
gtttgcccct ccccggtgcc ttccttgacc ctggaagggt ccactccac tgcctttcc	1320
taataaaatg aggaaattgc atcgcatgtt ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt	1380
ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat	1440
gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagct ggggctctag ggggtatccc	1500
cacgcgcct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc	1560
gctacacttg ccagcgcct agcgcgcgt cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc	1620
acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt	1680
agtgtcttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatgggtc acgtagtggg	1740
ccatcgccct gatagacggt ttttcgcct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt	1800
ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctatc ttttgattta	1860
taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt	1920
aacgcgaatt aattctgtgg aatgtgtgtc agttagggtg tggaaagtcc ccaggctccc	1980
cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt	2040
ccccaggctc ccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca	2100
tagtcccgc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc	2160
cgccccatgg ctgactaatt tttttatatt atgcagaggc cgaggccgcc tctgcctctg	2220
agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc aaaaagctcc	2280
cgggagcttg tatatccatt ttcggatctg atcaagagac aggatgagga tcgtttcgca	2340
tgattgaaca agatggattg cacgcagggt ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg	2400
gctatgactg ggcacaacag acaatcggt gctctgatgc cgccgtgttc cggtgtcag	2460
cgcaggggcg cccggttctt ttgtcaaga ccgacctgtc cgggtgccctg aatgaactgc	2520
aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc	2580
tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg	2640
atctcctgtc atctcacctt gctcctgcc agaaaagtatc catcatggct gatgcaatgc	2700
ggcggtgca tacgcttgat ccggtacct gccattcga ccaccaagcg aaacatcgca	2760
tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat ctggacgaag	2820
agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc atgcccagc	2880
gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg	2940
gccgcttttc tggattcacc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc taccaggaca	3000
tagcgttggc tacccgtgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttc	3060
tcgtgcttta cggatcgcg gctcccgatt cgcagcgcac cgccttctat cgccttcttg	3120
acgagttctt ctgagcggga ctctgggggt cgaaatgacc gaccaagcga cgcccaacct	3180
gccatcacga gatttcgatt ccaccgcgc cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt	3240
tttccgggac gccggctgga tgatcctcca gcgcggggat ctcatgctgg agttcttcgc	3300
ccacccaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa	3360

tttcacaaat aaagcatttt ttctactgca ttctagtgtt ggtttgtcca aactcatcaa	3420
tgtatcttat catgtctgta taccgtcgac ctctagctag agcttggcgt aatcatggtc	3480
atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg	3540
aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt	3600
gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg	3660
ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga	3720
ctcgtcgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat	3780
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca	3840
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc	3900
tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcgaag tcagagggtg cgaaaccgga caggactata	3960
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtcgcg tctcctgttc cgaccctgcc	4020
gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttccgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc	4080
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga	4140
acccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	4200
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag	4260
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct acactagaag	4320
aacagtattt ggtatctgcg ctctgttgaa gccagttacc ttccgaaaaa gagttagtag	4380
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgtgg tagcggtttt ttgttttgca agcagcagat	4440
tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc tttctacgg ggtctgacgc	4500
tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat ttgggtcatg agattatcaa aaaggatctt	4560
cacctagatc cttttaaat aaanaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta	4620
aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct	4680
atttcgttca tccatagtig cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg	4740
cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat acccgagac ccacgctcac cggtccaga	4800
tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggc ctgcaacttt	4860
atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt	4920
taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtgggtgtcac gctcgtcgtt	4980
tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccat	5040
gttgtgcaaa aaagcgggta gctccttcgg tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc	5100
cgcagtgtta tcaactatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc	5160
cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat	5220
gcggcgaccg agttgtcttt gcccggcgtc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag	5280
aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt	5340
accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc	5400
ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa	5460
gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcttttttc aatattattg	5520
aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata ttggaatgta tttagaaaaa	5580
taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tc	5632

<210>39

<211>4758

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒

<400>39

ctaaattgta agcgttaata ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc	60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga	120
gatagggttg agtggtgttc cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc	180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc	240
ctaatacaagt tttttggggg cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag	300
ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa	360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac	420
cacaccgccc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgctc cattcgccat tcaggctgcg	480
caactgtttg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg	540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg	600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaaat tggagctcca	660
ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg atccccggg ctgcatcccc gatccttate	720
gctatcgatt cacacaaaaa accaacacac agatgtaatg aaaataaaga tattttattg	780
cggccatcgt gatggcaggt tgggcgtcgc ttggtcggtc atttcgaacc ccagagtccc	840
gctcagaaga actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg	900
ataccgtaaa gcacgaggaa gcggtcagcc cattcgccgc caagctcttc agcaatatca	960
cgggtagcca acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc acagtcgatg	1020
aatccagaaa agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc gccatgggtc	1080
acgacgagat cctcgccgtc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaaacag ttcggctggc	1140
gcgagccctt gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga	1200
gtacgtgctc gctcgatgcg atgtttcgct tgggtggtcga atgggcaggt agccggatca	1260
agcgtatgca gccgccgcat tgcacagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg	1320
tgagatgaca ggagatcctg ccccggcact tcgcccata gcagccagtc cttcccgt	1380
tcagtgacaa cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc	1440
cgcgtgcctt cgtcctgcag ttatttcagg gcaccggaca ggtcgggtctt gacaaaaaga	1500
accgggcgcc cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt	1560
tgtgcccagt catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat	1620
ccatcttggt caatcatggg ggctctagcc ttaagtcca gactgttgtg tcagaagaat	1680
caagctgate tgagtccggg aagctagctt gggctgcagg tcgaaaggcc cggagatgag	1740
gaagaggaga acagcgcggc agacgtgcgc ttttgaagcg tgcagaatgc cgggcctccg	1800

gaggaccttc	gggcgcccgc	cccgcacctg	agcccgcccc	tgagcccgcc	cccggaccca	1860
ccccttccca	gcctctgagc	ccagaaagcg	aaggagcaaa	gctgctattg	gccgctgccc	1920
caaaggccta	cccgtttcca	ttgctcagcg	gtgctgtcca	tctgcacgag	actagtgaga	1980
cgtgctactt	ccatttgtca	cgctctgcac	gacgcgagct	gcggggcggg	ggggaacttc	2040
ctgactaggg	gaggagtaga	aggtggcgcg	aaggggccac	caaagaacgg	agccggttgg	2100
cgcctaccgg	ccggtggatg	tggaatgtgt	gcgaggccag	aggccacttg	tgtagcgcca	2160
agtgcccgagc	ggggctgcta	aagcgcatgc	tccagactgc	cttgggaaaa	gcgcctccc	2220
taccggtag	aattcgaacg	ctgacgtcat	caaccgcgtc	caaggaatcg	cgggcccagt	2280
gtcactaggc	gggaacaccc	agcgcgcggtg	cgccttgcca	ggaagatggc	tgtgagggac	2340
aggggagtg	cgcctgcaa	tatttgcattg	tcgctatgtg	ttctgggaaa	tcaccataaa	2400
cgtgaaatgt	ctttggattt	gggaatctta	taagtctctg	atgagaccac	agatcccgtg	2460
agcttcagca	agcattatc	aagagataat	gcttgcgtga	gctcattttt	tggaaaagct	2520
tatcgatacc	gtcgacctcg	aggggggggc	cggtagccag	cttttgttcc	ctttagttag	2580
ggttaattgc	gcgcttgccg	taatcatggt	catagctgtt	tcctgtgtga	aattgttatt	2640
cgtcacaat	tccacacaac	atacgagccg	gaagcataaa	gtgtaaagcc	tggggtgcct	2700
aatgagtgag	ctaactcaca	ttaattgcgt	tgcgctcact	gcccgccttc	cagtcgggaa	2760
acctgtcgtg	ccagctgcat	taatgaatcg	gccaacgcgc	ggggagaggc	ggtttgcgta	2820
ttgggcgctc	tccgccttcc	tcgctcactg	actcgctgcg	ctcggtcgtt	cggctgcggc	2880
gagcgggtatc	agctcactca	aaggcggtaa	tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	2940
caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	3000
tgctggcggtt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	3060
gtcagagggtg	gcgaaacccg	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	cctggaagct	3120
ccctcgtgcg	ctctcctgtt	ccgacctgc	cgtttaccgg	atacctgtcc	gcctttctcc	3180
cttcgggaag	cgtggcgctt	tctcatagct	cacgctgtag	gtatctcagt	tcggtgtagg	3240
tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	aacccccctg	tcagcccgac	cgtgcgcct	3300
tatccggtaa	ctatcgtctt	gagtcacaac	cggtaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	3360
cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	ggtagttagg	cggtagctaca	gagttcttga	3420
agtggtaggc	taactacggc	tacactagaa	ggacagtatt	tggtatctgc	gctctgctga	3480
agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	cggcaaaaca	accaccgctg	3540
gtagcgggtg	tttttttgtt	tgcaagcagc	agattacgcg	cagaaaaaaa	ggatctcaag	3600
aagatccttt	gatcttttct	acggggctctg	acgctcagtg	gaacgaaaac	tcacgttaag	3660
ggatttttgt	catgagatta	tcaaaaagga	tcttcacctt	gatcctttta	aattaaaaat	3720
gaagttttta	atcaatctaa	agtatatatg	agtaaacttg	gtctgacagt	taccaatgct	3780
taatcagtga	ggcacctatc	tcagcgatct	gtctatttctg	ttcatccata	gttgccctgac	3840
tccccgtcgt	gtagataact	acgatacggg	agggcttacc	atctggcccc	agtgtgcaa	3900
tgataccgcg	agaccacgc	tcaccggctc	cagatttatt	agcaataaac	cagccagccg	3960
gaagggccga	gcgcagaagt	ggctctgcaa	ctttatccgc	ctccatccag	tctattaatt	4020
gttgccggga	agctagagta	agtagttcgc	cagttaatag	tttgcgcaac	gttggttcca	4080
ttgctacagg	catcgtgggtg	tcacgctcgt	cgtttgggtat	ggcttcattc	agctccggtt	4140

```

cccaacgatac aaggcgagtt acatgateccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct 4200
tcggctcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atgggttatgg 4260
cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg 4320
agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg 4380
cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa 4440
aacgtttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt 4500
aaccactcg tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt 4560
gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aagggcgaca cggaaatgtt 4620
gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca 4680
tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat 4740
ttccccgaaa agtgccac 4758

```

<210>40

<211>4756

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒

```

ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgcgtta aatttttggt aaatcagctc 60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
gatagggttg agtgtgttc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
ctaatcaagt tttttgggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc cttaaaggag 300
ccccgatatt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaaacgt gcgagaaagg aagggaagaa 360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac 420
cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgctc cattcgccat tcaggtgcg 480
caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg 600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tggagctcca 660
ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg atccccggg ctgcatcccc gatccttate 720
gctatcgatt cacacaaaaa accaacacac agatgtaatg aaaataaaga tattttattg 780
cggccatcgt gatggcaggt tgggcgtcgc ttggtcggtc atttcgaacc ccagagtcce 840
gctcagaaga actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg 900
ataccgtaaa gcacaggaa gcggtcagcc cattcgccgc caagctcttc agcaatatca 960
cgggtagcca acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc acagtcgatg 1020
aatccagaaa agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc gccatgggtc 1080
acgacgagat cctcgccgtc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaaacag ttcggtggc 1140
gcgagccctt gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga 1200

```

gtacgtgctc gctcgatgcg atgttttcgct tgggtggtcga atgggcaggt agccggatca	1260
agcgtatgca gccgcgcgat tgcacagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg	1320
tgagatgaca ggagatcctg ccccggcact tcgcccata gcagccagtc ccttcccgt	1380
tcagtgacaa cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccgc tcgtggccag ccacgatagc	1440
cgcgctgcct cgtcctgcag ttcatcaggg gcaccggaca ggctcggctctt gacaaaaaga	1500
accgggcgcc cctgcgctga cagccggaac acggcgccat cagagcagcc gattgtctgt	1560
tgtgcccagt catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat	1620
ccatcttggt caatcatggt ggctctagcc ttaagttcga gactgttggt tcagaagaat	1680
caagctgata tgagtcgggt aagctagctt gggctgcagg tcgaaaggcc cggagatgag	1740
gaagaggaga acagcgcggc agacgtgcgc ttttgaagcg tgcagaatgc cgggcctccg	1800
gaggaccttc gggcgccccgc cccgcccctg agcccgcccc tgagcccgcc cccggaccca	1860
ccccttccca gcctctgagc ccagaaagcg aaggagcaaa gctgctattg gccgctgccc	1920
caaaggccta cccgcttcca ttgctcagcg gtgctgtcca tctgcacgag actagtgaga	1980
cgtgctactt ccatttgtca cgctctgcac gacgcgagct gcggggcggg ggggaacttc	2040
ctgactaggg gaggagtaga aggtggcgcg aaggggccac caaagaacgg agccggttgg	2100
cgcctaccgg ccggtggatg tggaaatgtgt gcgaggccag aggccacttg ttagcgcca	2160
agtgccagc ggggctgcta aagcgcatgc tccagactgc cttgggaaaa gcgcctcccc	2220
taccggtag aattcgaacg ctgacgtcat caaccgcctc caaggaatcg cgggcccagt	2280
gtcactaggg gggaacaccc agcgcgcgctg cgccctggca ggaagatggc tgtgaggac	2340
aggggagttg cgccctgcaa tatttgcattg tcgctatgtg ttctgggaaa tcaccataaa	2400
cgtgaaatgt ctttggattt gggaatctta taagtctgt atgagaccac agatcccgcg	2460
gaccttgaa cctgatttca agagaatcag gttcaggatc cgcttttttg gaaaagctta	2520
tcgataccgt cgacctcgag ggggggcccc gtaccagct tttgttccct ttagtgaggg	2580
ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg	2640
ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa	2700
tgagttagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac	2760
ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt	2820
gggcgctctt ccgcttccct gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg gctgcggcga	2880
gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca	2940
ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg	3000
ctggcgTTTT tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgtcaagt	3060
cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc	3120
ctcgtgcgt ctcctgttcc gacctgccg ctaccggat acctgtccgc ctttctccct	3180
tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc	3240
gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta	3300
tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca	3360
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag	3420
tggtagccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag	3480
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaacaac caccgtggt	3540

```

agcgggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa 3600
gacccctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg 3660
attttgggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga 3720
agtttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta 3780
atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgcctgactc 3840
cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg 3900
ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga 3960
agggccgagc gcagaagtgg tcttgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt 4020
tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt 4080
gctacaggca tcgttggtgtc acgctcgctg tttgggtatg cttcattcag ctccggttcc 4140
caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc 4200
ggtcctccga tcgttggtcag aagtaagtgg gccgcagtgt tatcactcat gggttatggca 4260
gcaactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag 4320
tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg 4380
tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgctcat cattggaaaa 4440
cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa 4500
cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga 4560
gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga 4620
atactcatac tcttcttttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg 4680
agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt 4740
ccccgaaaag tgccac 4756

```

<210>41

<211>78

<212>PRT

<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400>41

```

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

```

<210>42

<211>234

<212>DNA

<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400>42

```
tttgacattg tatgcgacaa tgtggggaga gattggaaga gactggcccg ccagctgaaa 60
gtgtctgagg ccaaaattga tgggattgag gagaggtacc cccgaagcct gagtgagcag 120
gtaagggagg ctctgagagt ctggaagatt gccgagaggg agaaagccac ggtggctgga 180
ctggtaaagg cacttcgggc ctgccgctg aacctggtgg ctgacctggt ggaa 234
```

<210>43

<211>29

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>43

```
gaattcgcca ccatgacaga tcttgtagc 29
```

<210>44

<211>26

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400>44

```
gaattcgtga acacatttaa ttacca 26
```

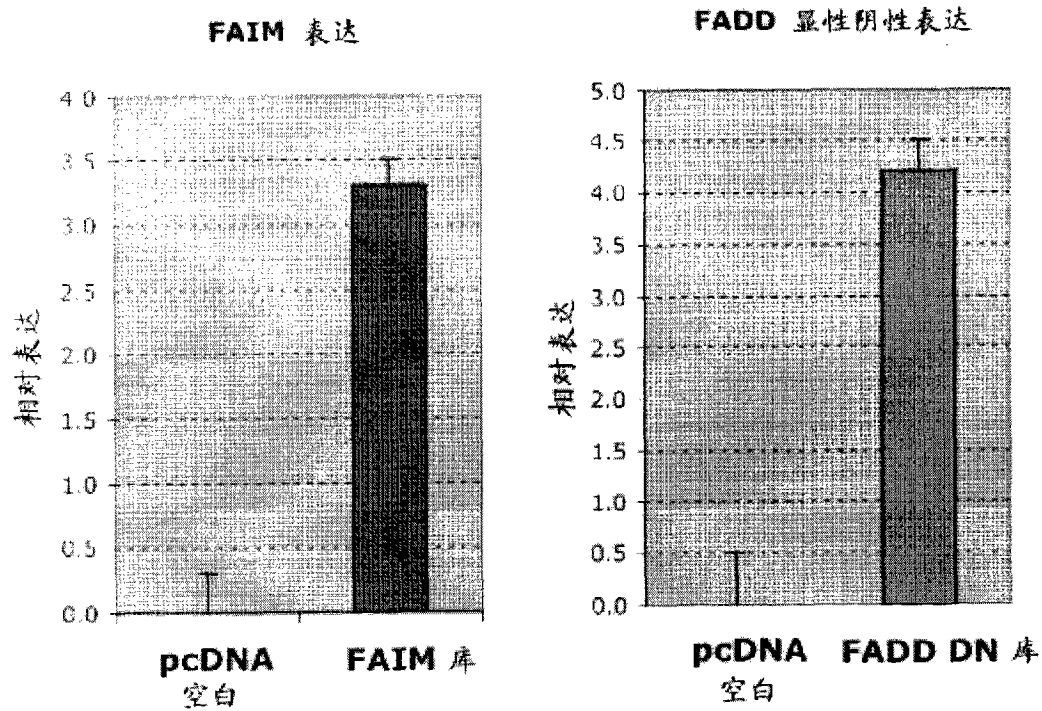


图 1

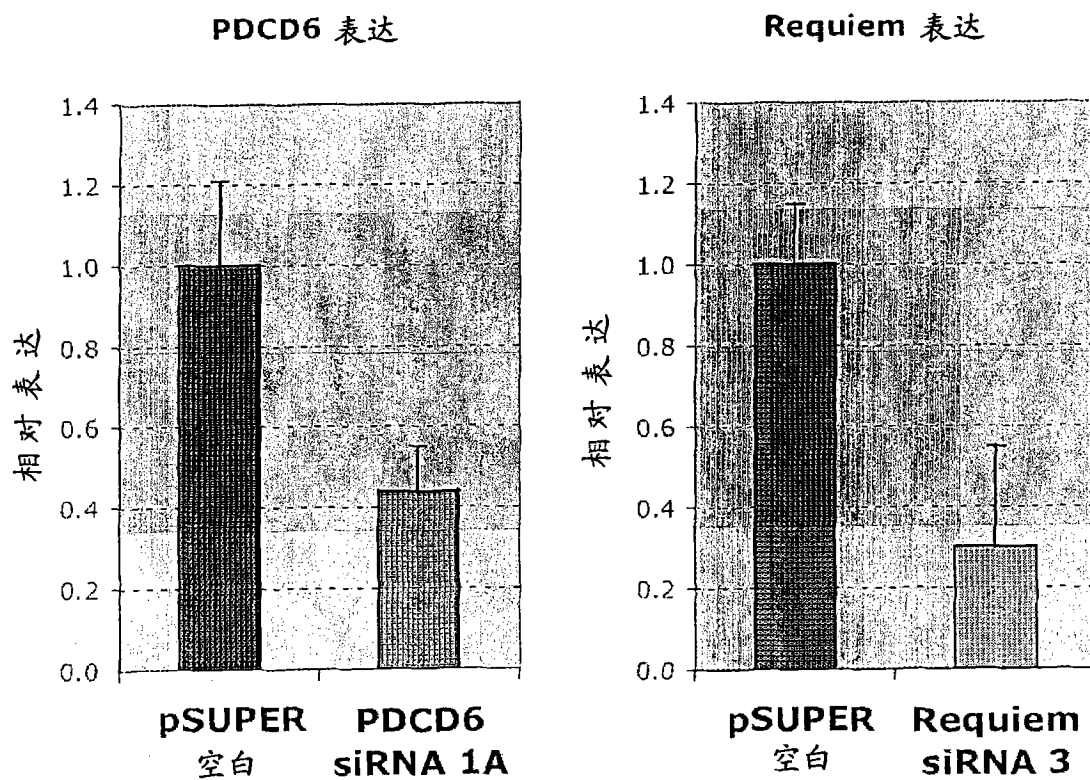


图 1(续)

存活细胞的密度

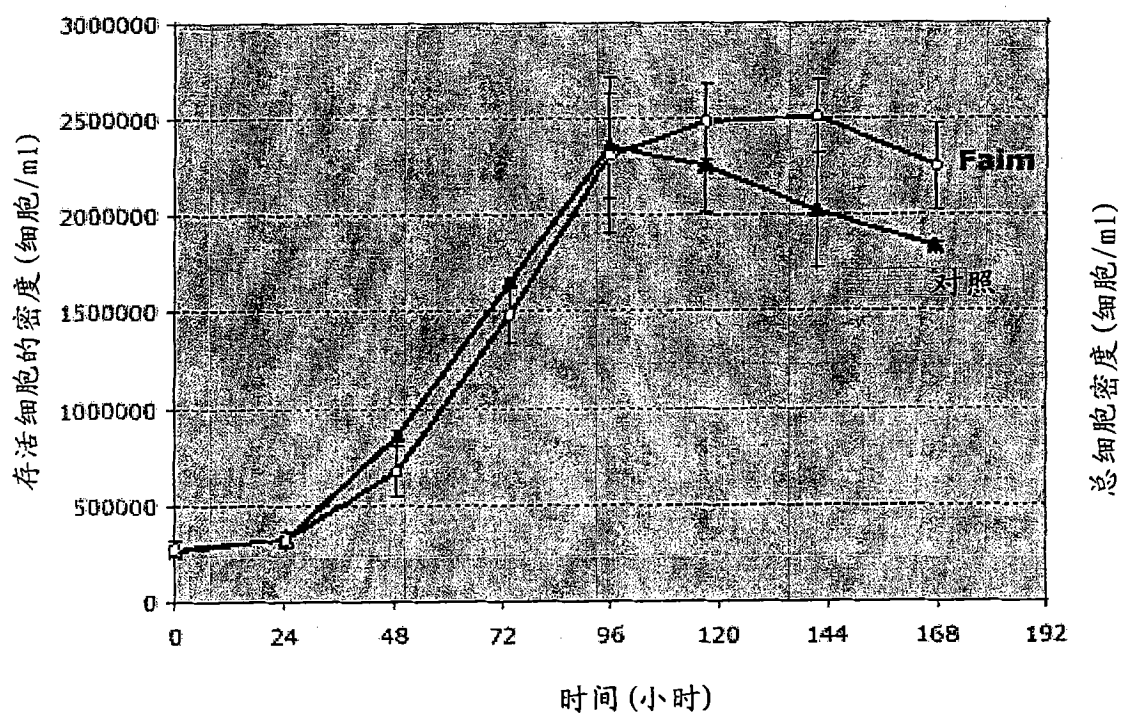


图 2A

总细胞密度

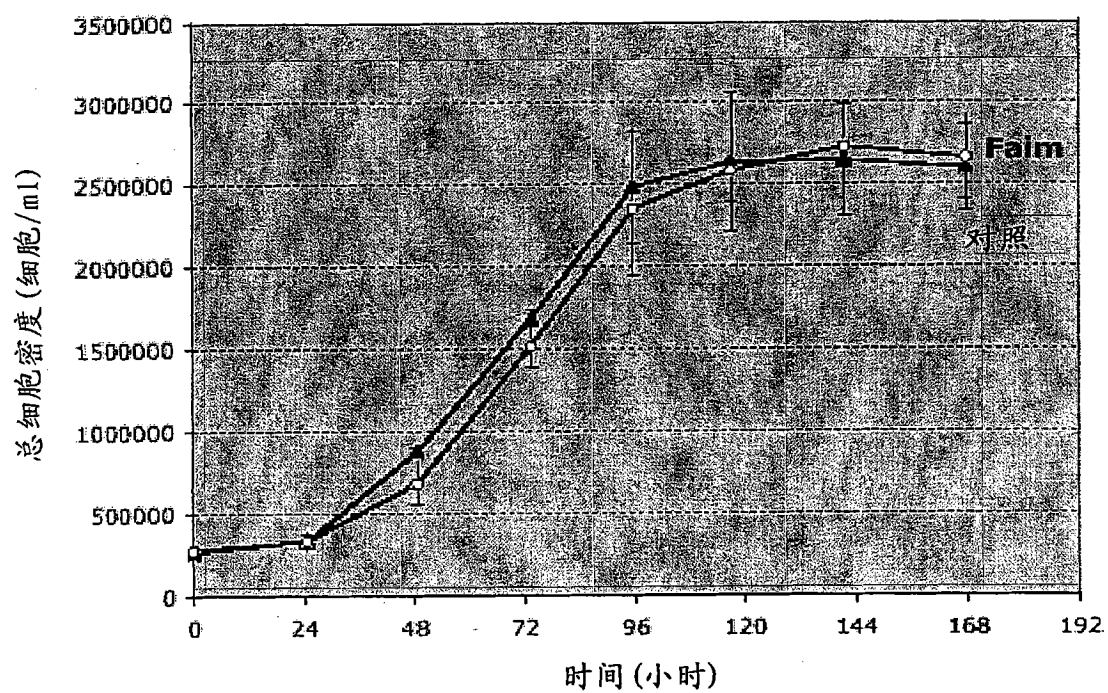


图 2B

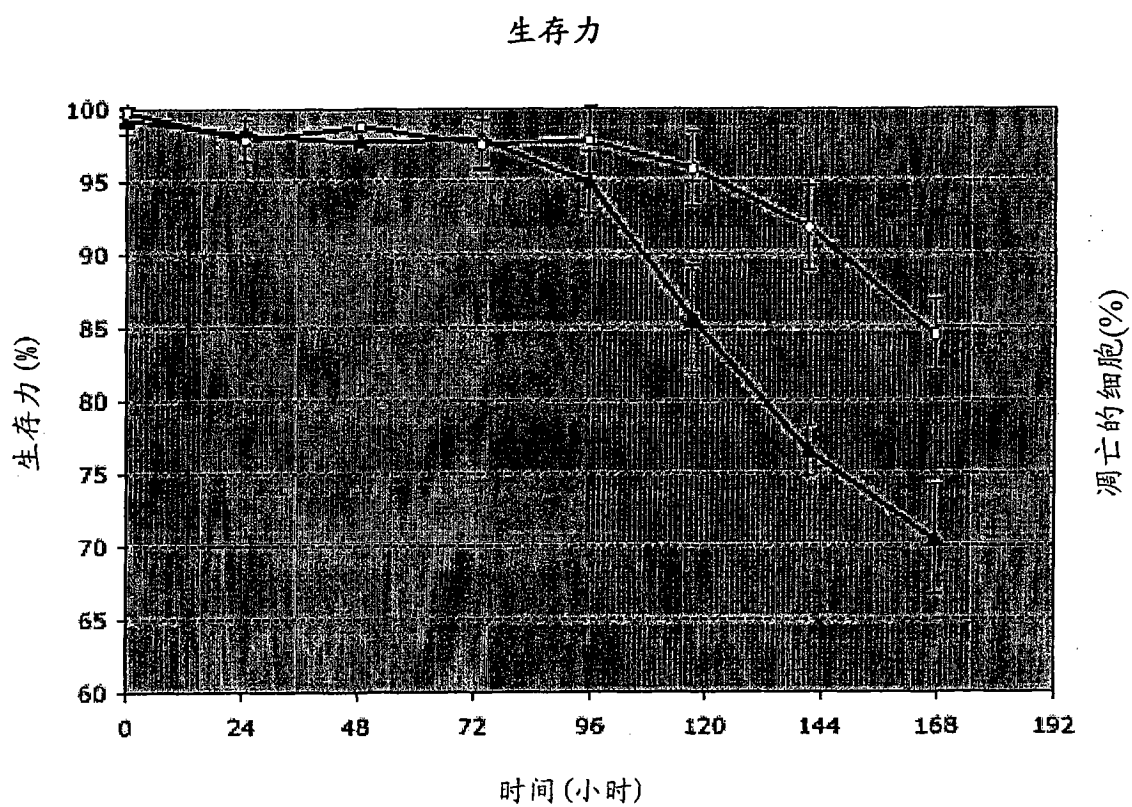


图 2C

凋亡的细胞

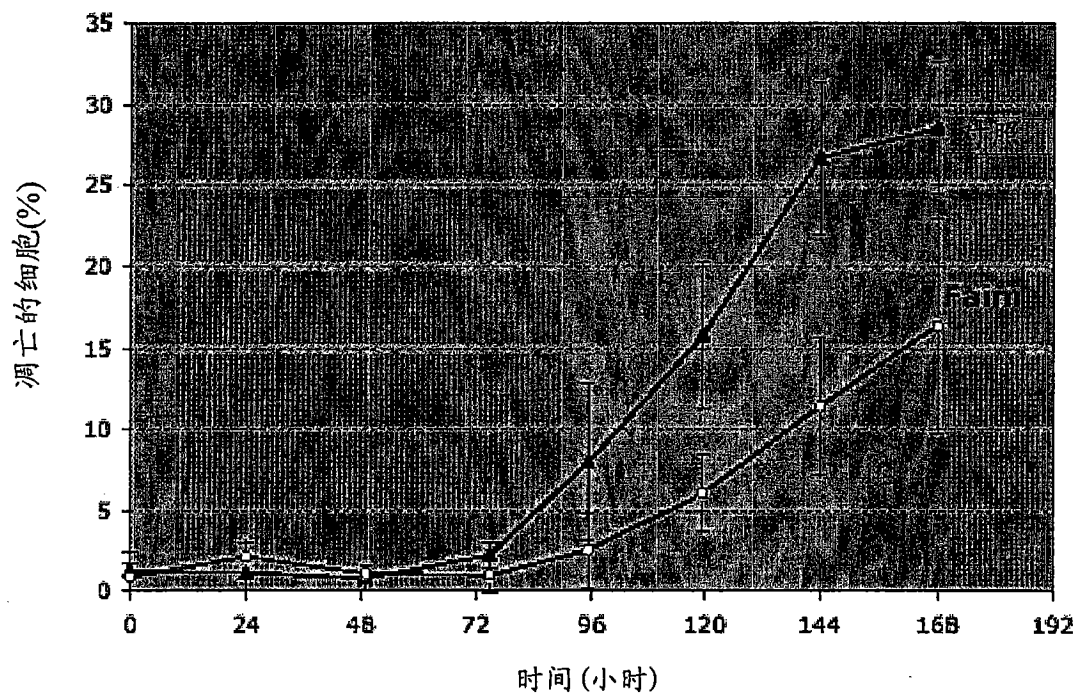


图 2D

存活细胞的密度

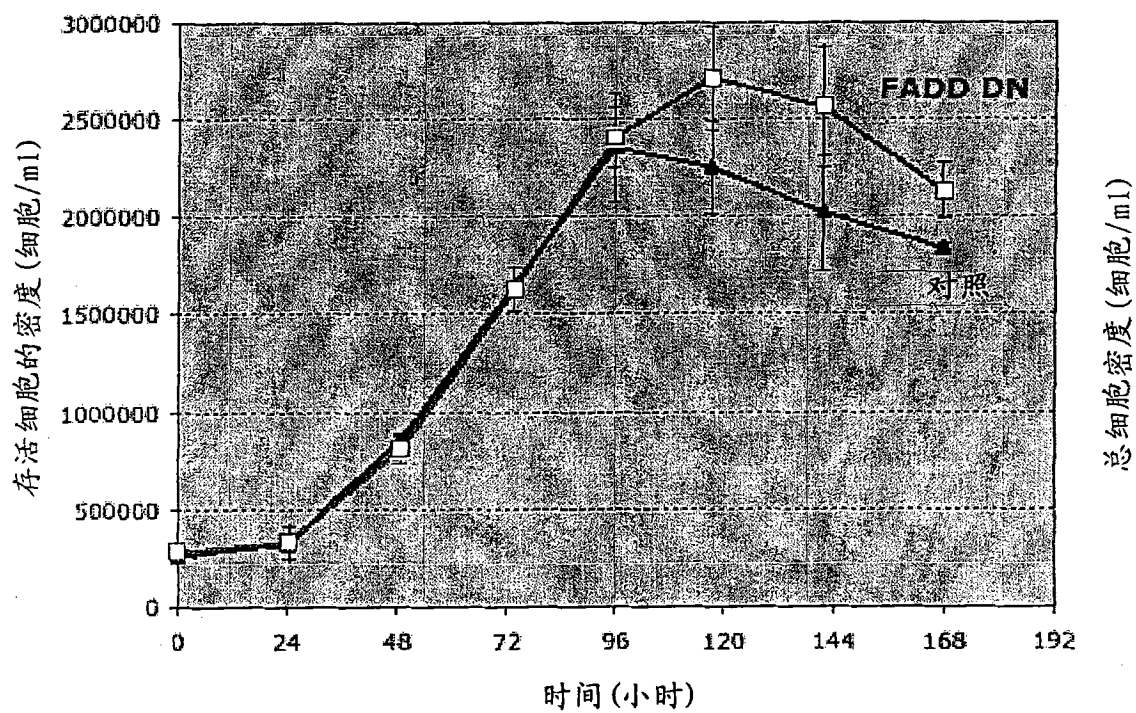


图 3A

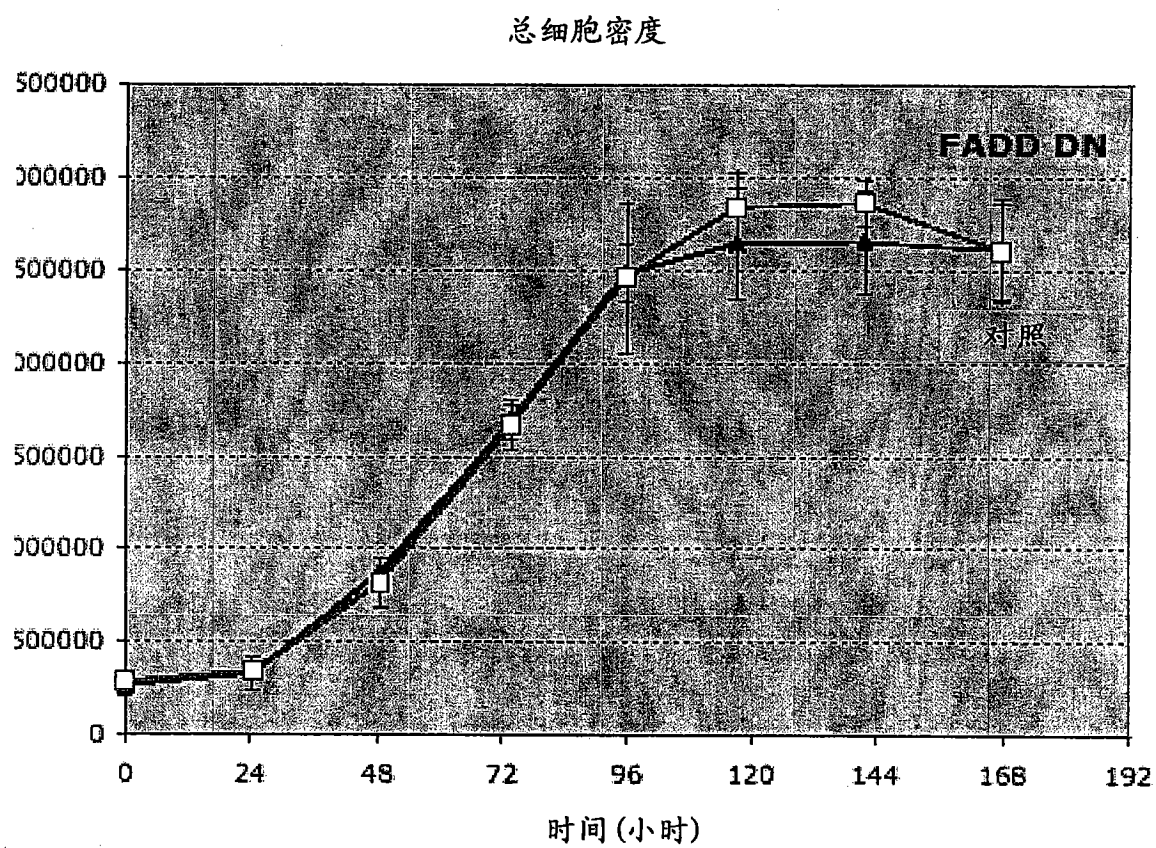


图 3B

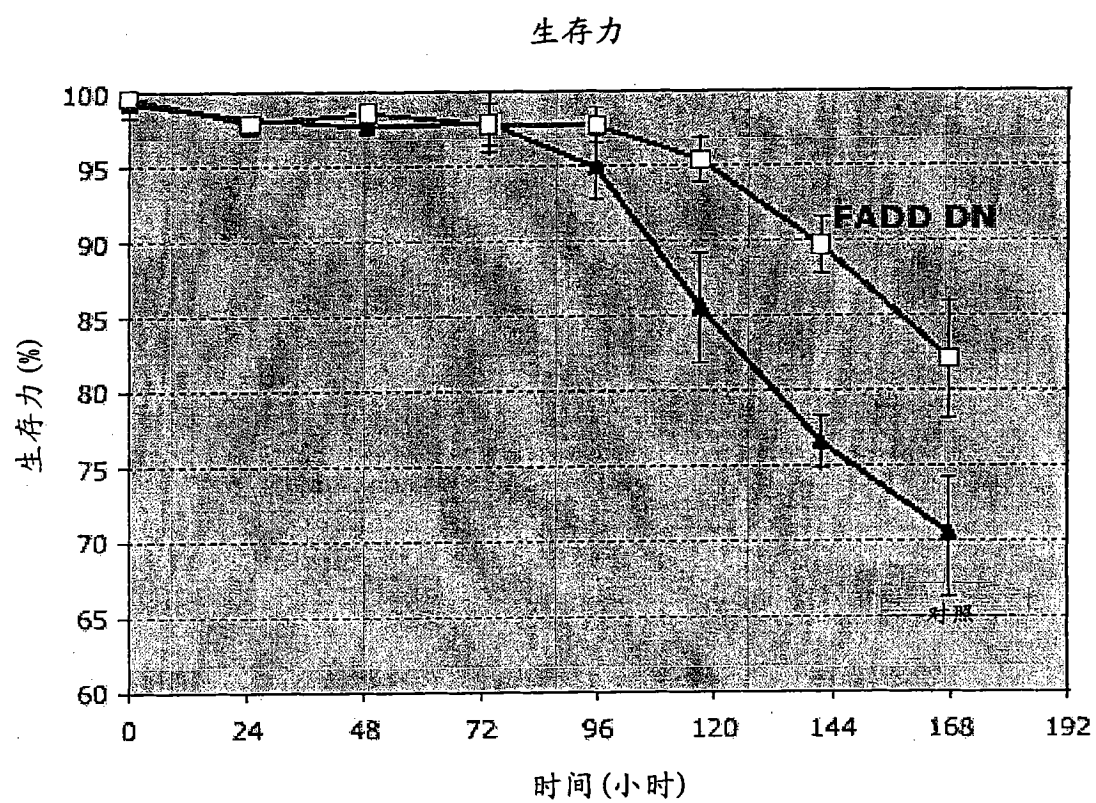


图 3C

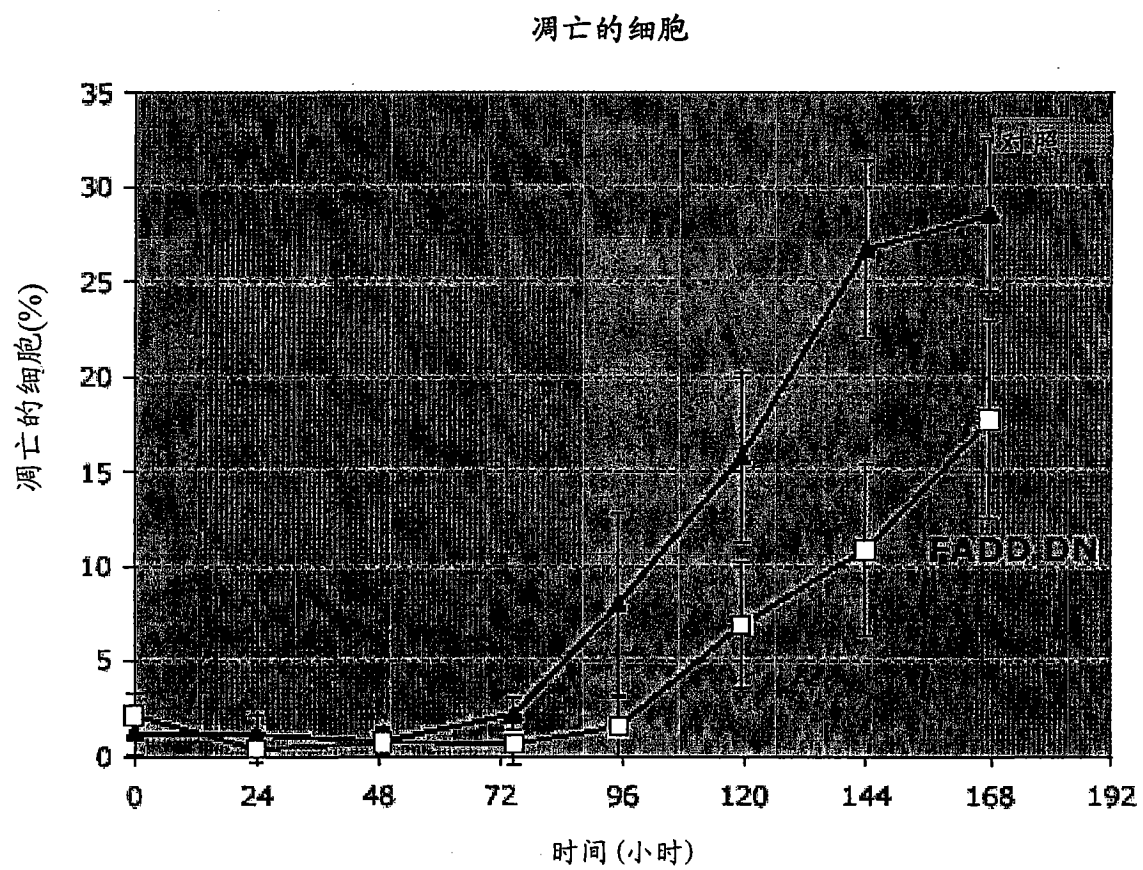


图 3D

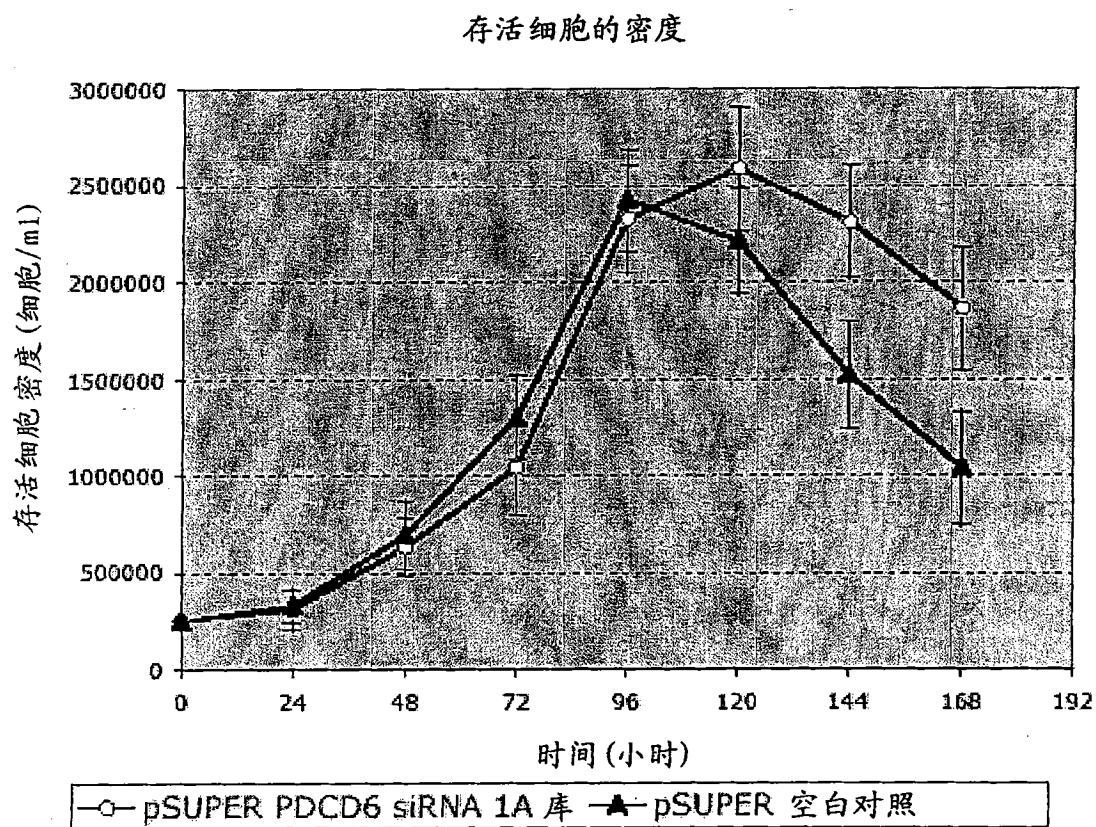


图 4A

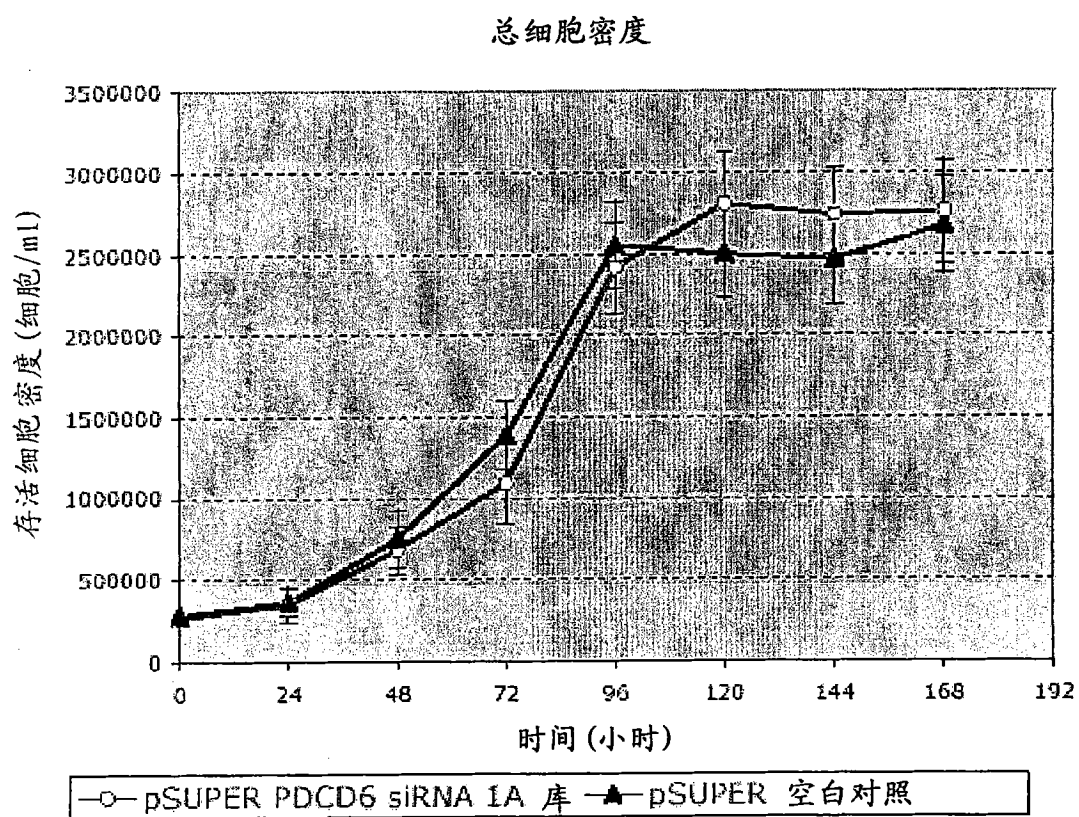


图 4B

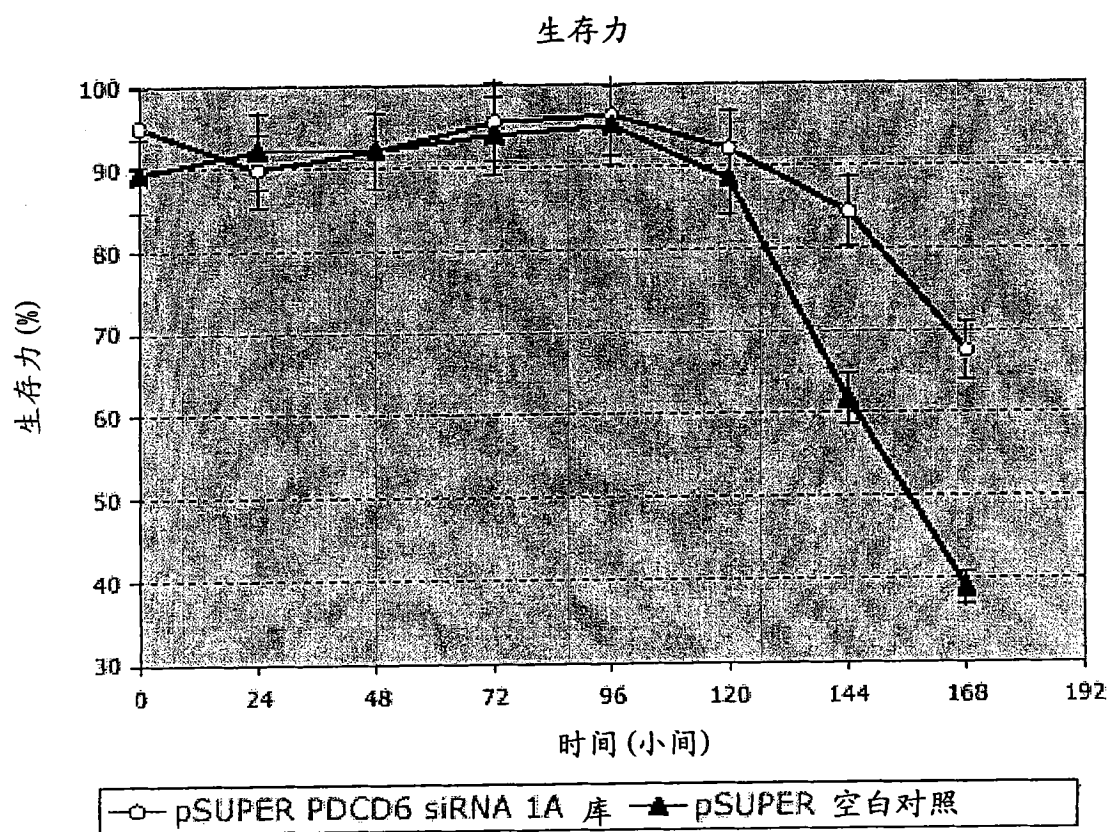


图 4C

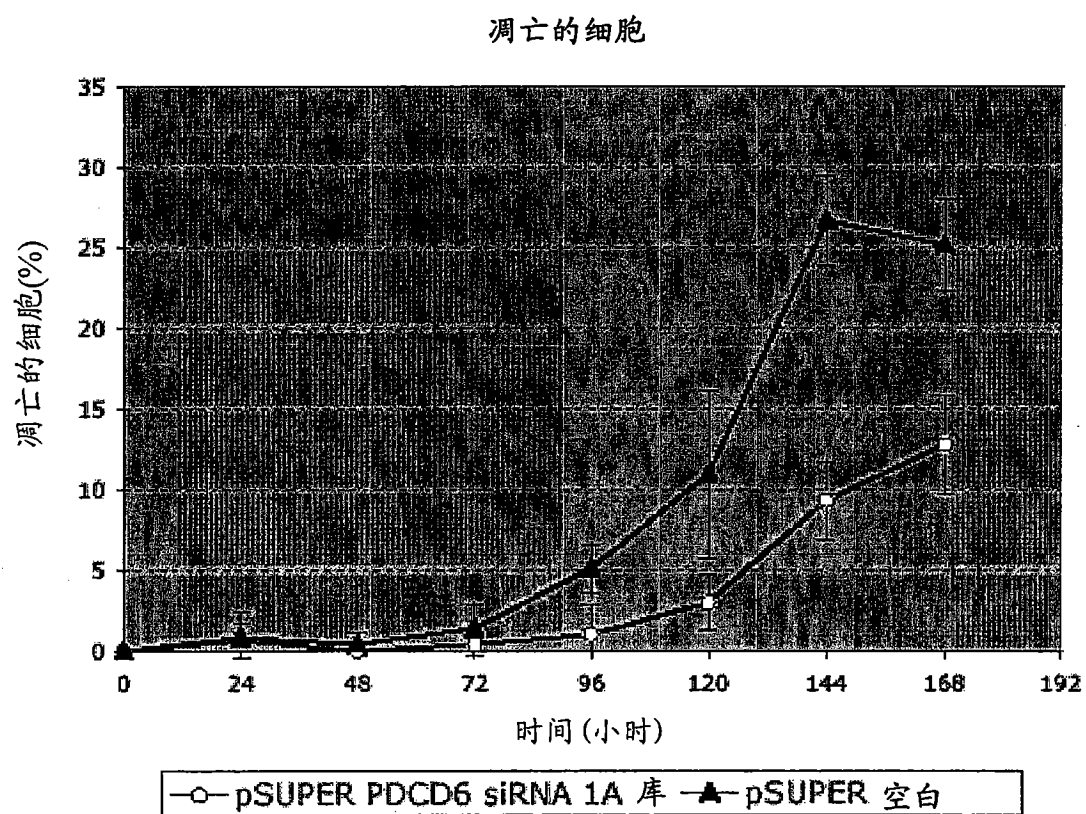


图 4D

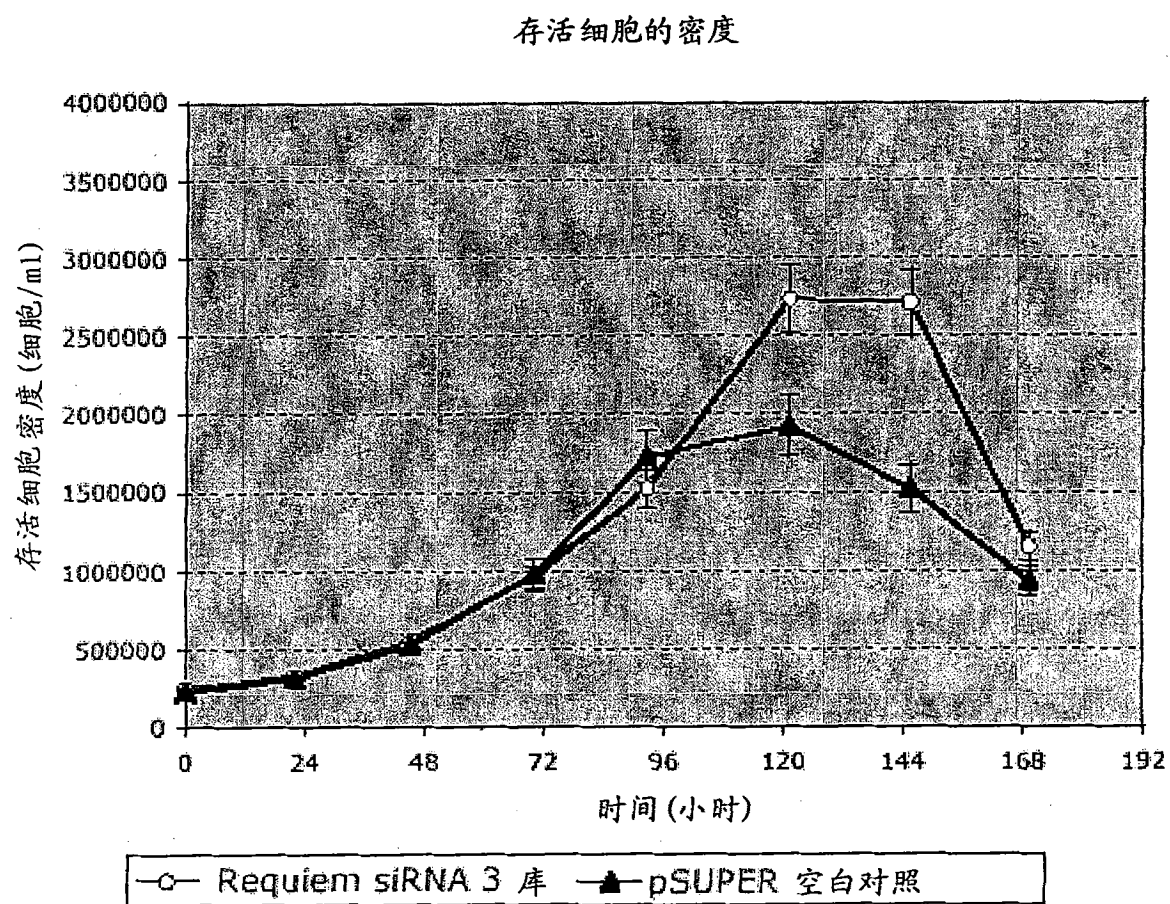


图 5A

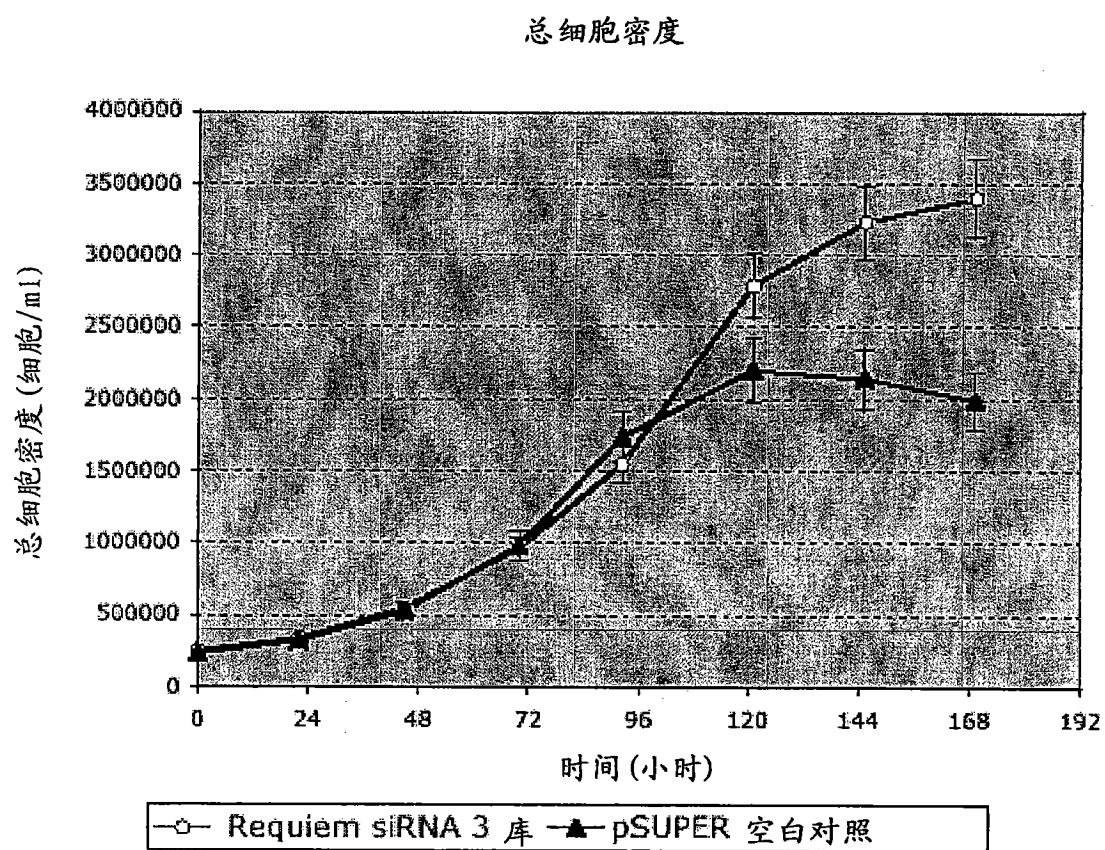


图 5B

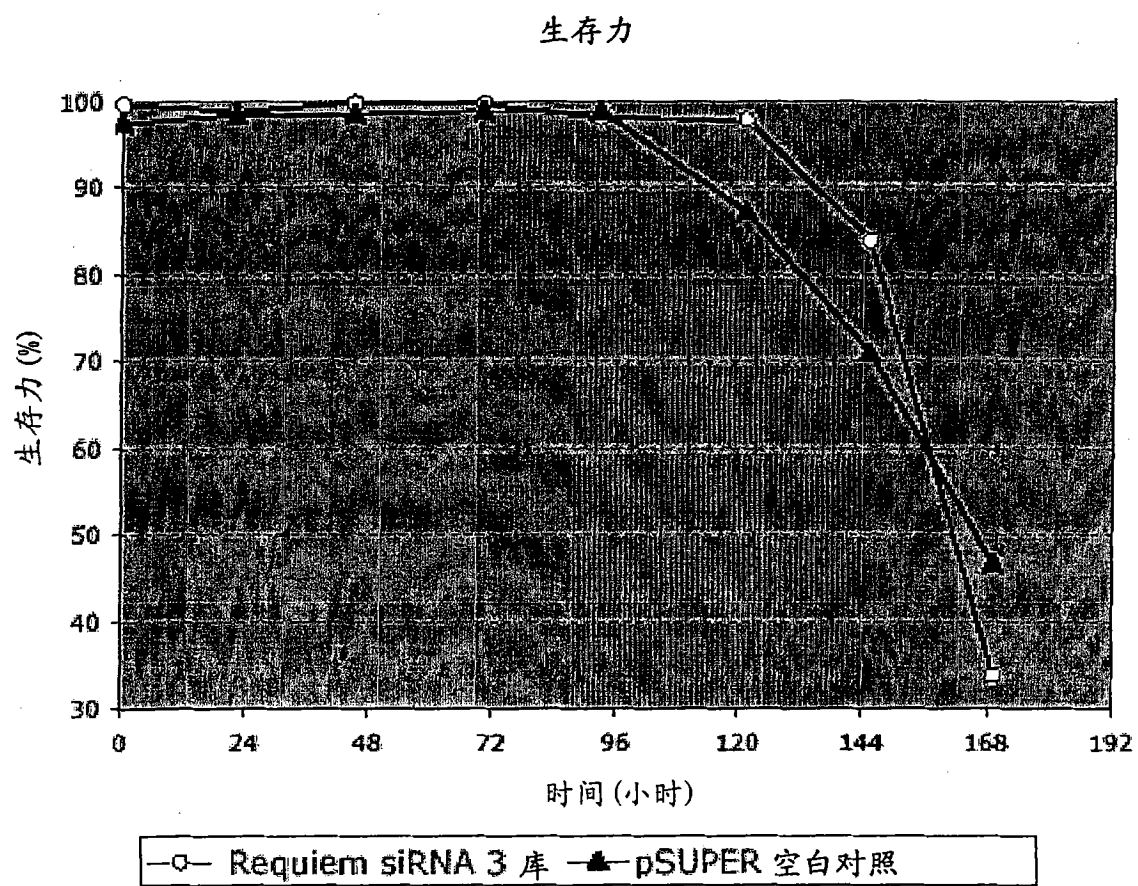


图 5C

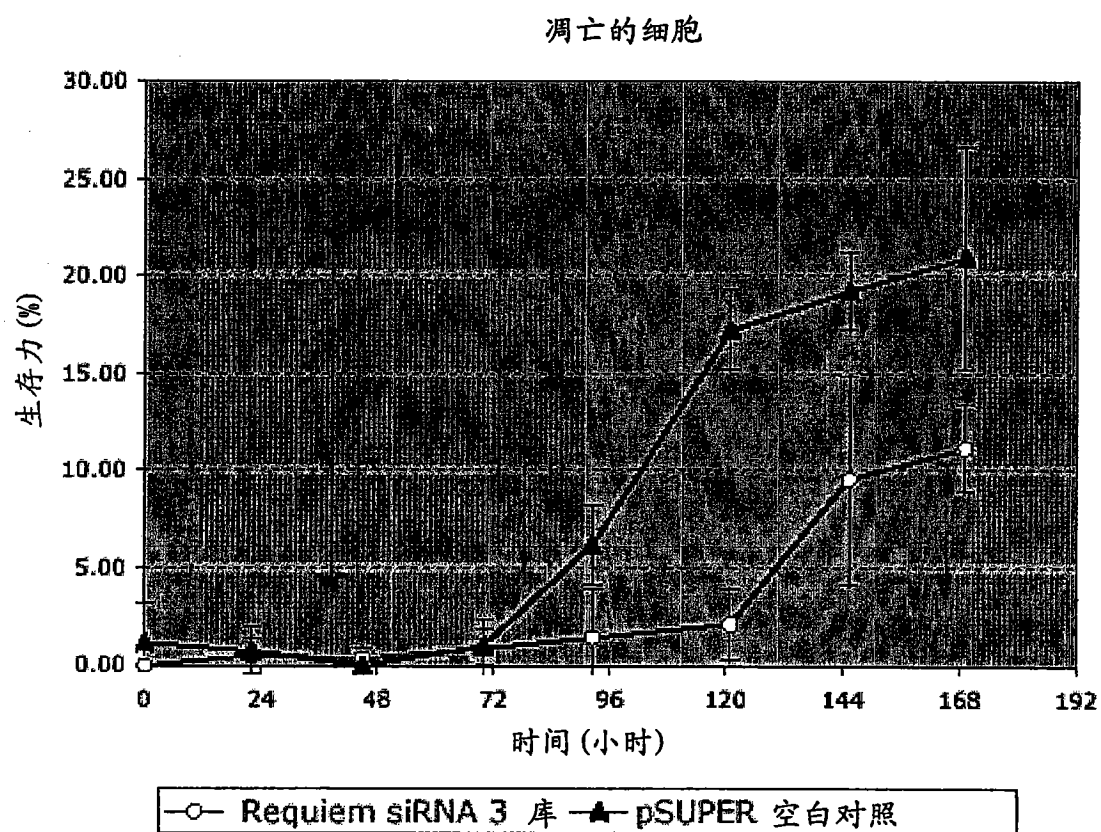


图 5D

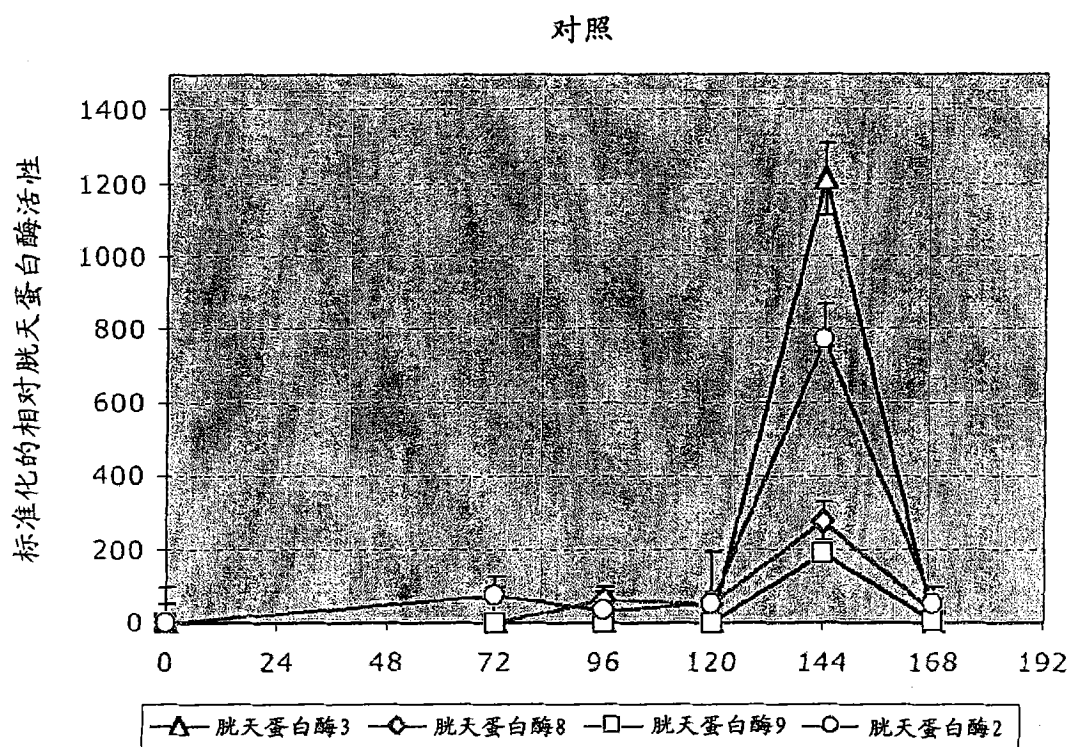


图 6A

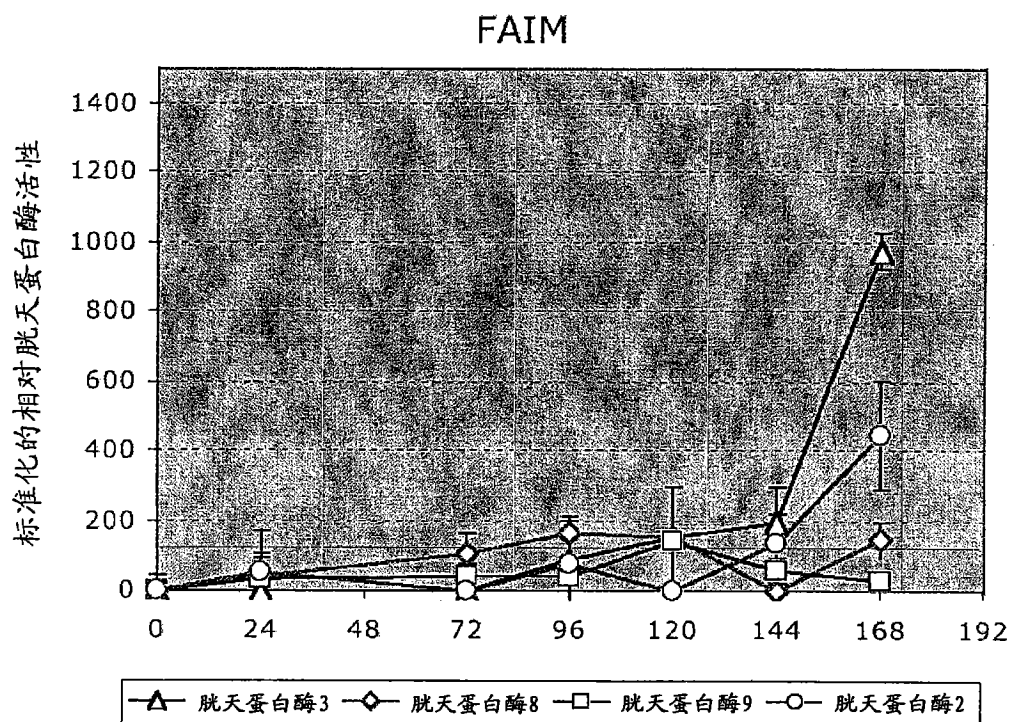


图 6B

FADD显性阴性

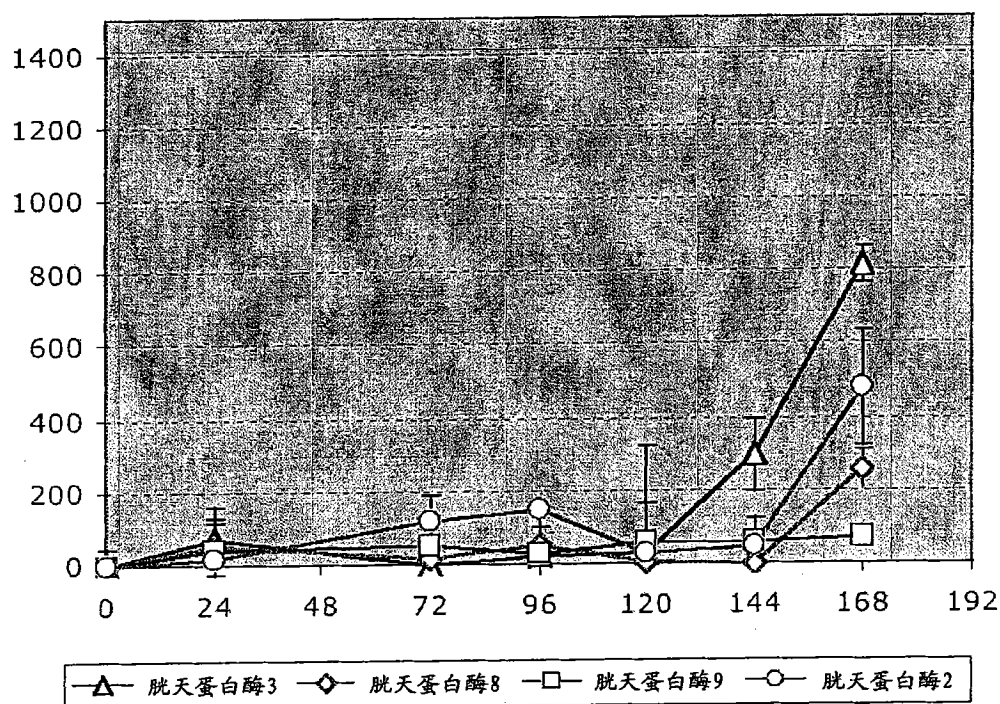


图 6C

PDCD6的抑制

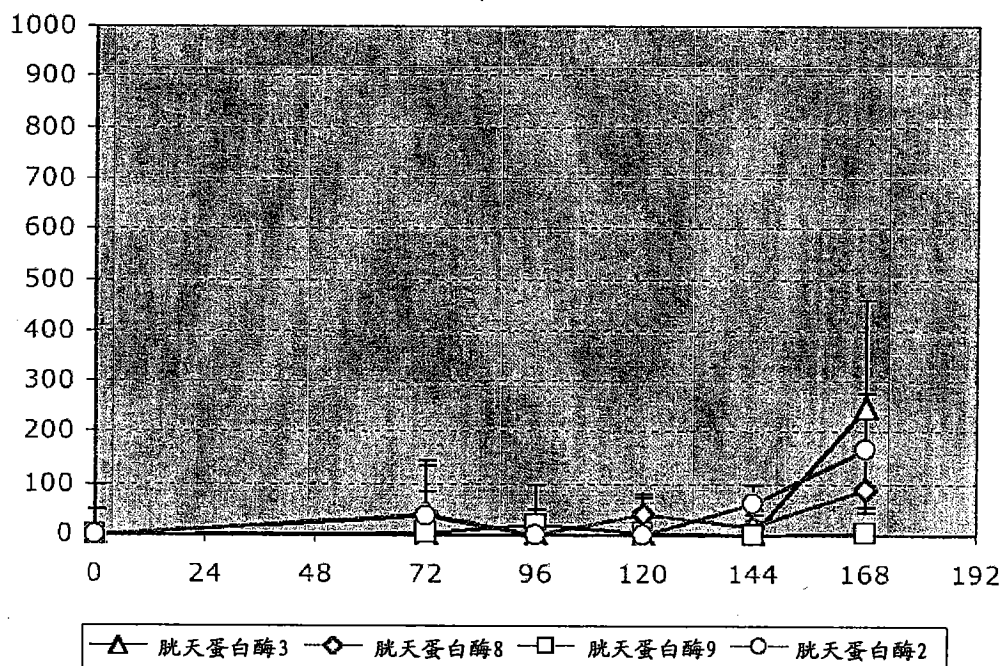


图 6D

REQUIEM的抑制

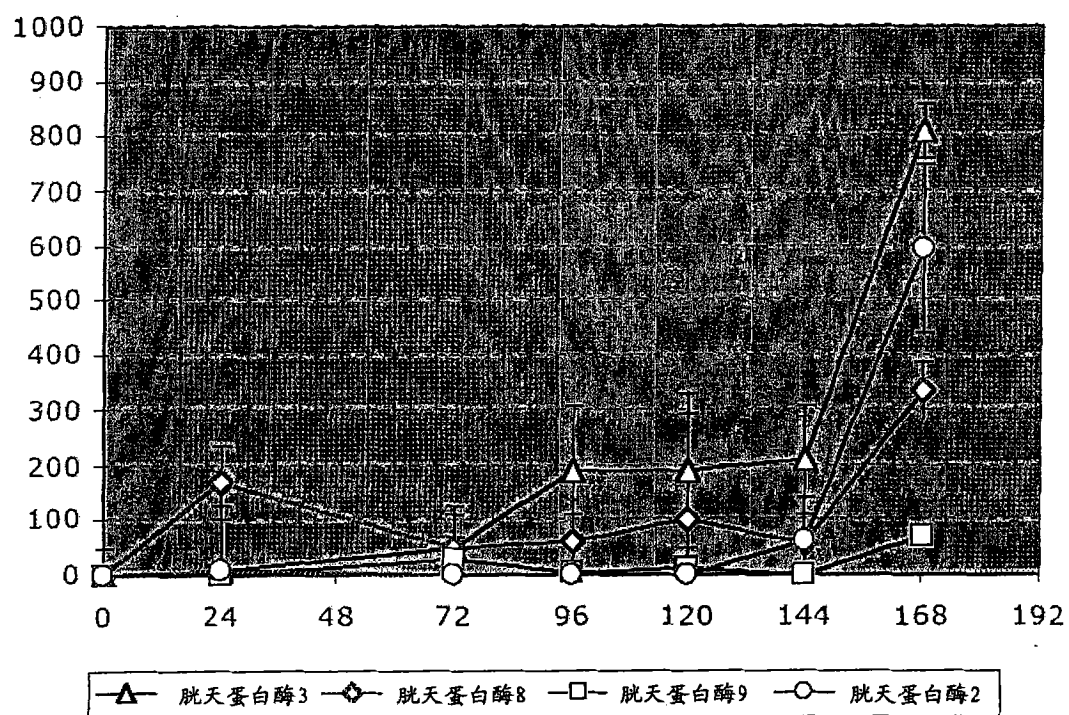


图 6E

FAIM

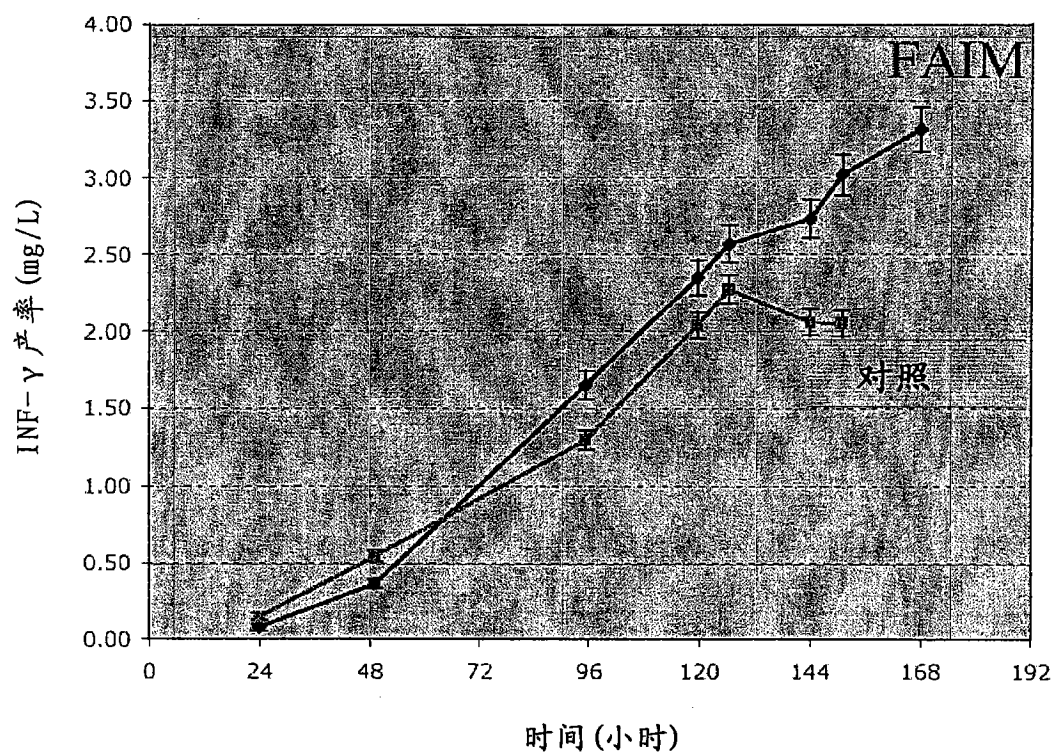


图 7A

FADD DN

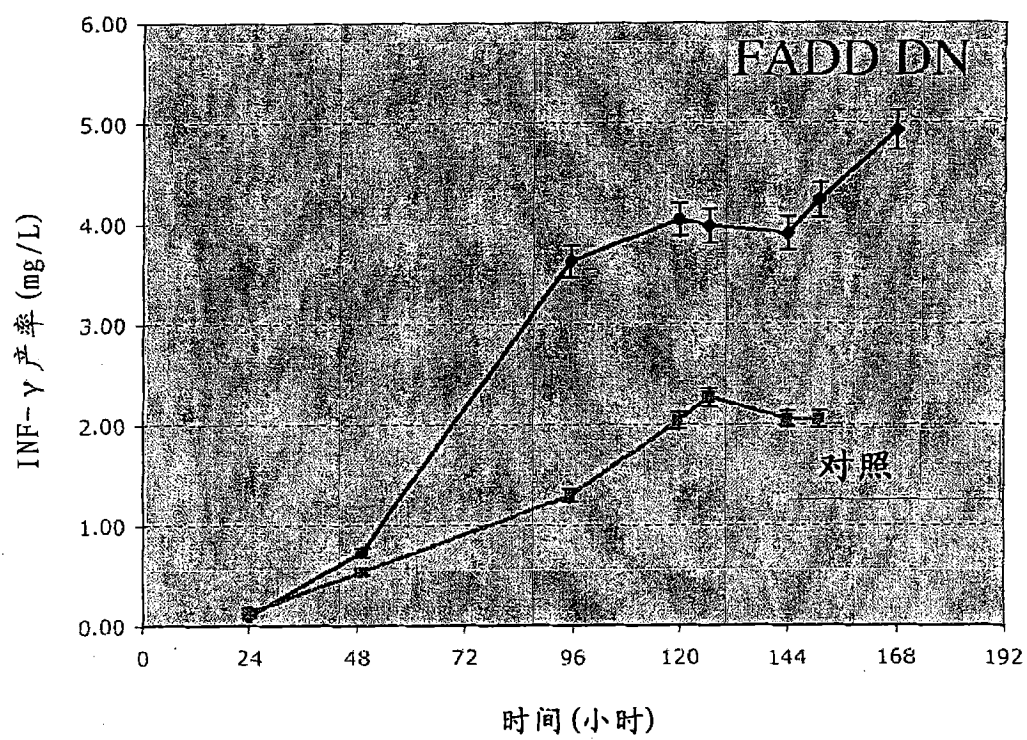


图 7B

PDCD6的抑制

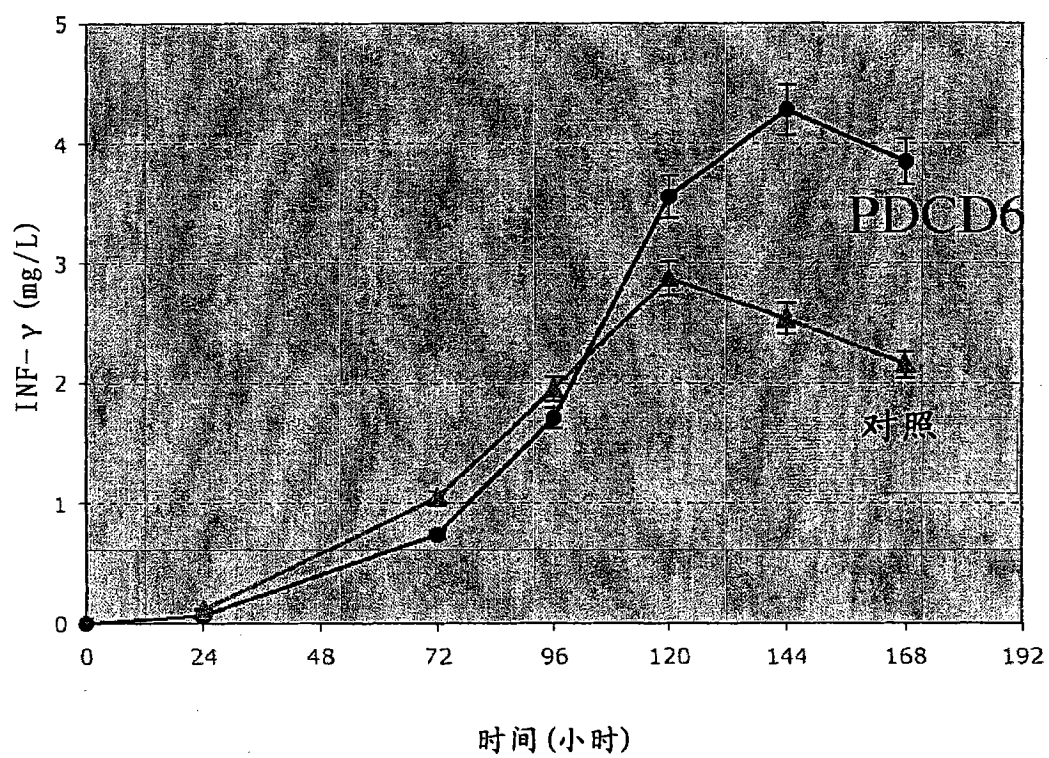


图 7C

REQUIEM的抑制

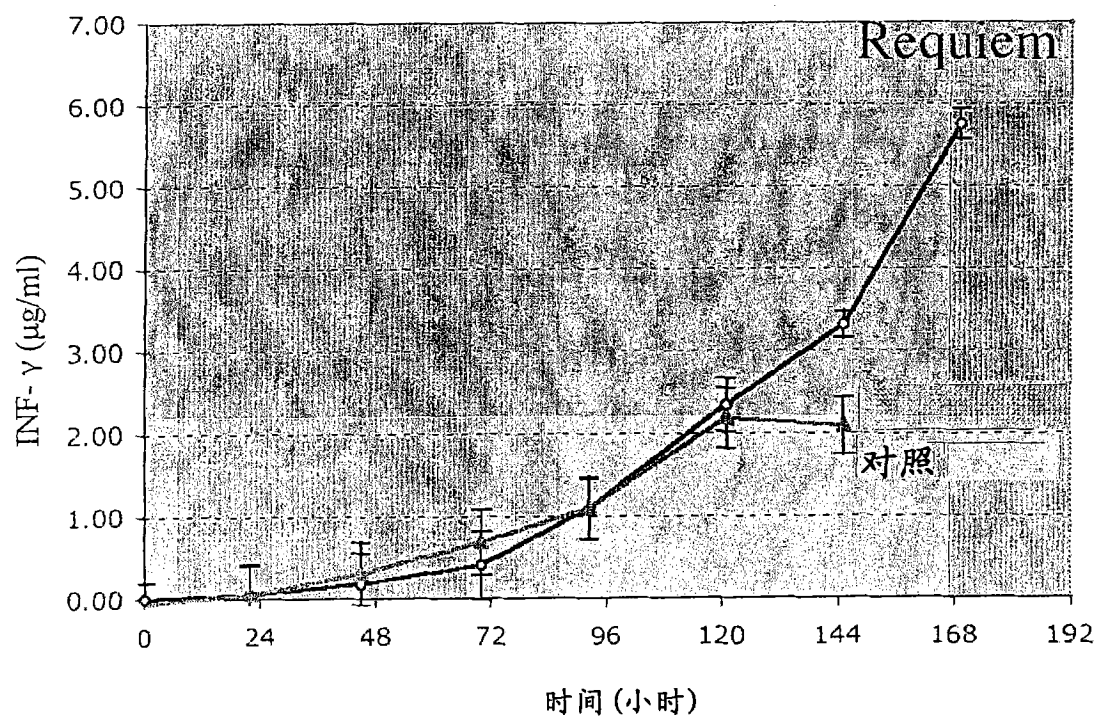


图 7D

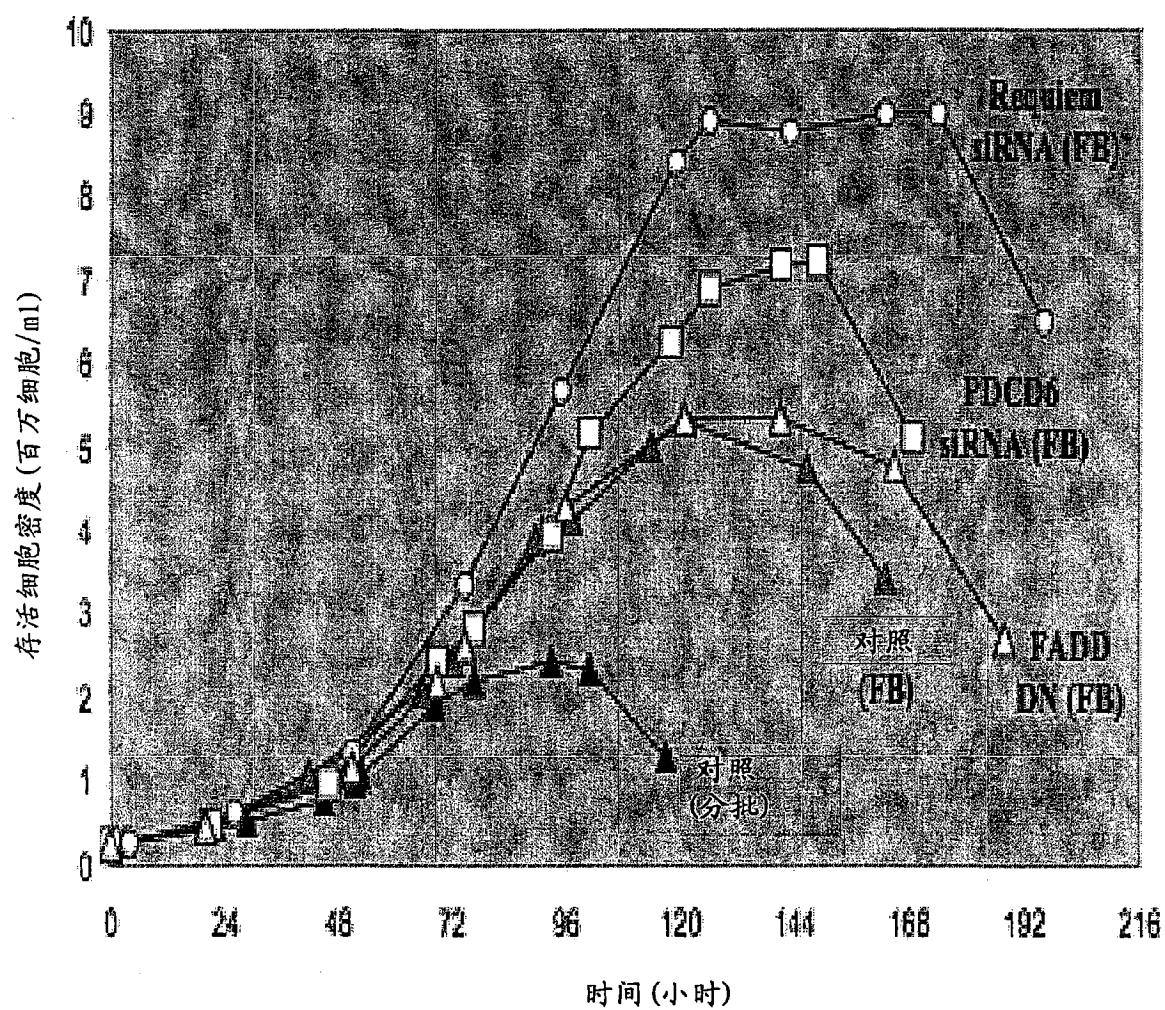


图 8A

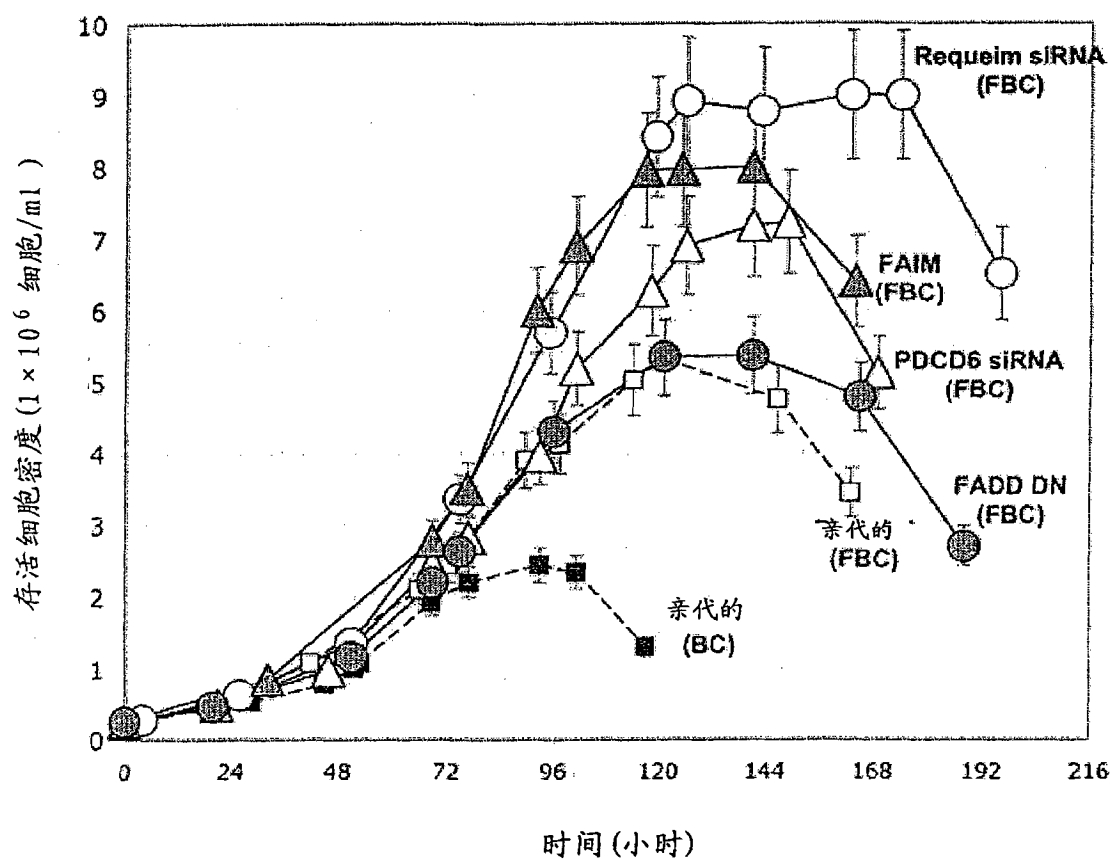


图 8B

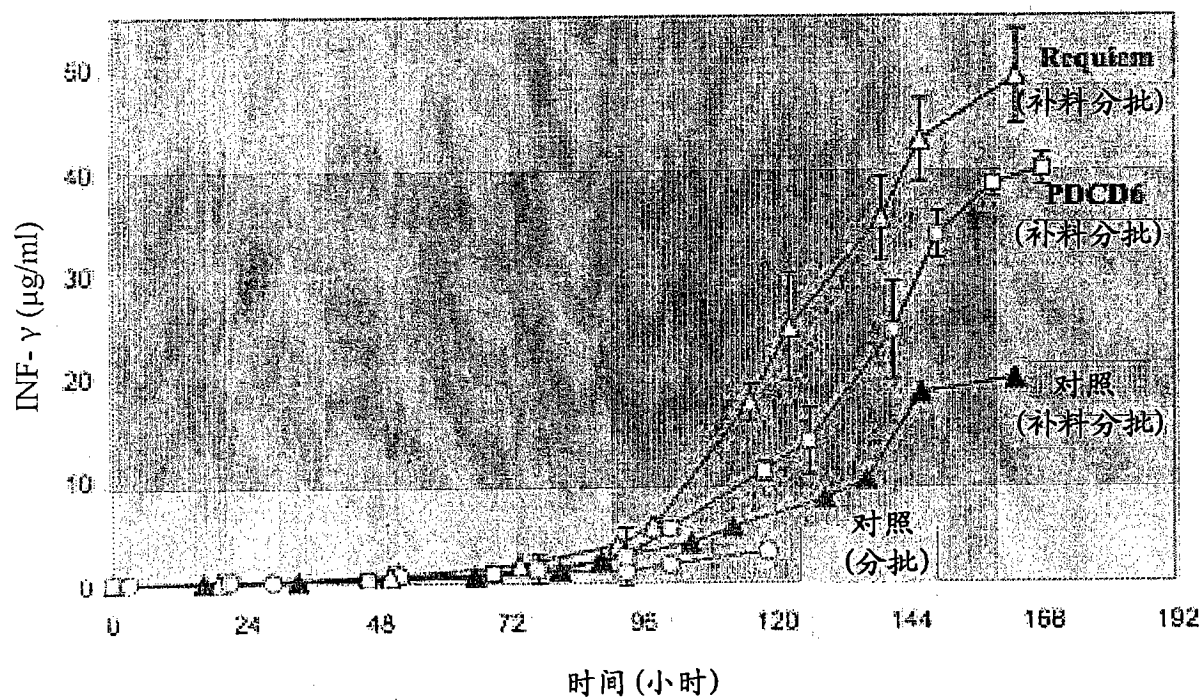


图 9A

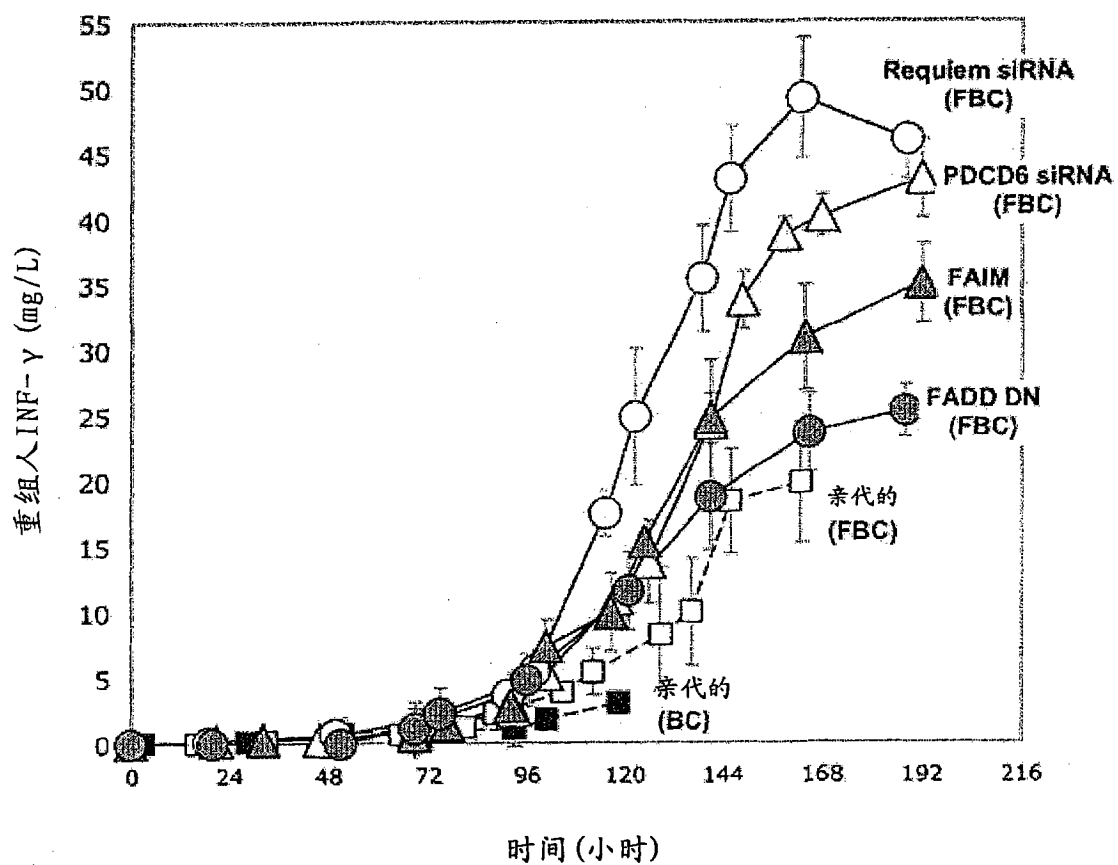


图 9B

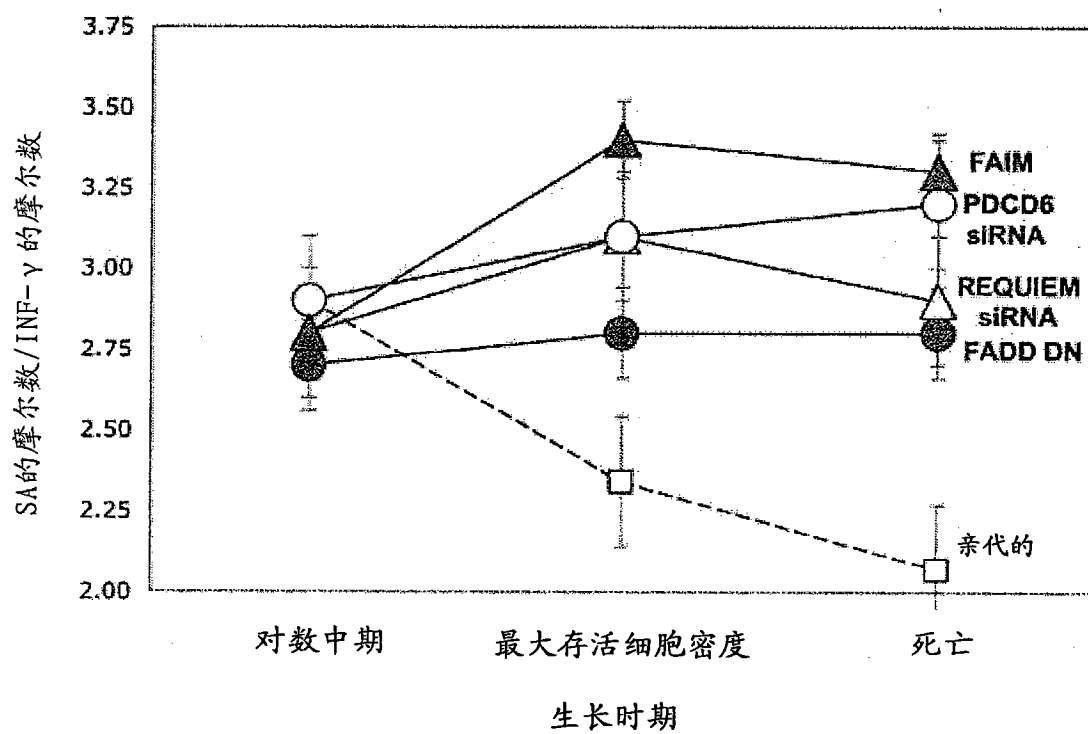


图 10