

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380104658.7

[51] Int. Cl.

C07K 14/52 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 1 月 11 日

[11] 公开号 CN 1720263A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 5/28 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

[22] 申请日 2003.10.29

[21] 申请号 200380104658.7

[30] 优先权

[32] 2002.10.29 [33] DK [31] PA200201634

[32] 2002.10.29 [33] US [31] 60/421,807

[86] 国际申请 PCT/DK2003/000735 2003.10.29

[87] 国际公布 WO2004/039841 英 2004.5.13

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.31

[71] 申请人 伯瑞恩药物公司

地址 丹麦奥胡斯

[72] 发明人 T·L·霍尔帝特 M·H·安德森

H·K·奥托

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 刘晓东

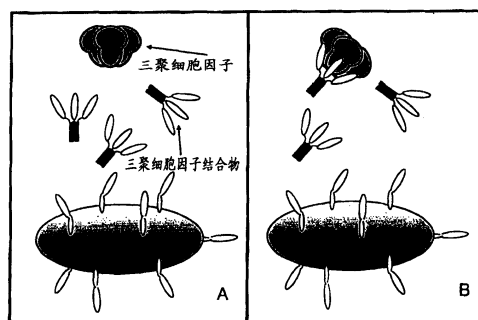
权利要求书 4 页 说明书 45 页 序列表 37 页
附图 4 页

[54] 发明名称

三聚细胞因子的三聚结合蛋白

[57] 摘要

本发明提供了能结合三聚细胞因子的三聚结合单元。更具体地,提供了含有三聚化结构域和 3 个单体的三聚多肽,所述单体含有能结合三聚细胞因子的结合元件。优选地,该三聚结合单元以这样的方式结合,使得在结合以后,能基本上封闭三聚细胞因子的全部受体结合位点,从而抑制三聚细胞因子的潜在生物活性。一方面,本发明涉及能结合肿瘤坏死因子配体超家族的三聚细胞因子例如 TNF、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL 和 BAFF 的三聚结合物。



1. 含有 3 个单体的三聚多肽, 其中每个所述的单体含有能结合三聚细胞因子的特异性结合元件, 且每个所述的单体含有三聚化结构域。

2. 根据权利要求 1 的三聚多肽, 其中所述的三聚细胞因子是肿瘤坏死因子配体超家族的成员。

3. 根据权利要求 2 的三聚多肽, 其中所述的肿瘤坏死因子配体超家族的成员选自由下述组成的组: LTA; TNF; LTB; TNFSF4; TNFSF5; TNFSF6; TNFSF7; TNFSF8; TNFSF9; TNFSF10; TNFSF11; TNFSF12; TNFSF13; TNFSF13B; TNFSF14; TNFSF15; 和 TNFSF18。

4. 根据权利要求 2 的三聚多肽, 其中所述的特异性结合元件是源自肿瘤坏死因子受体超家族成员的多肽。

5. 根据权利要求 2 的三聚多肽, 其中所述的肿瘤坏死因子受体超家族成员选自由下述组成的组: TNFRSF1A, TNFRSF1B, LTBR, TNFRSF4, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFRSF6B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFRSF12, TNFRSF12L, TNFRSF13B, TNFRSF13C, TNFRSF14, TNFRSF Fn14, NGFR, TNFRSF17, TNFRSF18, TNFRSF19, TNFRSF19L, TNFRSF21, TNFRSF22 和 TNFRSF23。

6. 根据权利要求 1 的三聚多肽, 其中所述的特异性结合元件源自 TNFRSF1A (p55 TNF 受体)。

7. 根据权利要求 1 的三聚多肽, 其中所述的特异性结合元件源自 TNFRSF1B (p75 TNF 受体)。

8. 根据权利要求 7 的三聚多肽, 其中所述的特异性结合元件是含有选自下述的氨基酸序列的多肽: TNFRSF1B 1-235 (SEQ ID NO: 76), TNFRSF1B 1-185 (SEQ ID NO: 77), TNFRSF1B 1-163 (SEQ ID NO: 78) 和 TNFRSF1B 1-142 (SEQ ID NO: 79)。

9. 根据权利要求 7 的三聚多肽, 其中所述的特异性结合元件是含有由选自下述的 DNA 序列编码的氨基酸序列的多肽: TNFRSF1B D1D2 (SEQ ID

NO: 13), TNFRSF1B D1D2, 1/6 (SEQ ID NO: 15), TNFRSF1B D1D2 1/4 (SEQ ID NO: 17), TNFRSF1B D1D2, 1/3 (SEQ ID NO: 19), TNFRSF1B D1D2, 1/2 (SEQ ID NO: 21), TNFRSF1B D1D4 (SEQ ID NO: 23), TNFRSF1B D2 (SEQ ID NO: 25), TNFRSF1B D2, 1/6 (SEQ ID NO: 26), TNFRSF1B D2, 1/4 (SEQ ID NO: 27), TNFRSF1B D2, 1/3 (SEQ ID NO: 28), TNFRSF1B D2, 1/2 (SEQ ID NO: 29) 和 TNFRSF1B D2D4 (SEQ ID NO: 30)。

10. 根据权利要求 1 的三聚多肽, 其中所述的特异性结合元件是抗体或抗体片段。

11. 根据权利要求 10 的三聚多肽, 其中所述的抗体或抗体片段能在至少一个区域内结合人 TNF (SEQ ID NO: 80), 该区域选自由下述的氨基酸残基组成的区域: 氨基酸残基 1-18, 1-20, 1-26, 1-30, 12-22, 22-31, 22-40, 36-45, 49-97, 49-98, 56-79, 58-65, 69-97, 70-87, 76-90, 96-105, 105-128, 108-128, 110-127, 115-125, 117-128, 132-157, 135-155, 136-153, 138-149, 141-153 和 146-157。

12. 根据权利要求 11 的三聚多肽, 其中所述的抗体或抗体片段选自 MAb 1 (ECACC 89080301), MAb 21 (ECACC 90012432), MAb 25 (ECACC 89121401), MAb 32 (ECACC 89080302), MAb 37 (ECACC 89080303), MAb 42 (ECACC 89080304), MAb 47 (ECACC 89121402), MAb 53 (ECACC 90012433) 和 MAb 54 (ECACC 89083103) 或其片段。

13. 根据权利要求 10 的三聚多肽, 其中所述的抗体是 D2E7 或其片段。

14. 根据权利要求 9 的三聚多肽, 其中所述的抗体是 CDP 870 或其片段。

15. 根据权利要求 1 的三聚多肽, 其中所述的特异性结合元件是具有 C 型凝集素样结构域 (CTLD) 支架结构的蛋白质。

16. 根据权利要求 15 的三聚多肽, 其中所述的具有 C 型凝集素样结构域的特异性结合元件是选自: TN3-2-B (SEQ ID NO: 103), TN3-2-C (SEQ ID NO: 104) 和 TN3-2-D (SEQ ID NO: 105)。

17. 根据权利要求 1 的三聚多肽, 其中所述的三聚化结构域是源自

tetranectin.

18. 根据权利要求 17 的三聚多肽, 其中所述的源自 tetranectin 的三聚化结构域含有与 SEQ ID NO: 81 的序列具有至少 68% 氨基酸序列相同性的序列。

19. 根据权利要求 18 的三聚多肽, 其中所述的氨基酸序列相同性至少为 75%, 例如至少 87%, 包括至少 92%。

20. 根据权利要求 17 的三聚多肽, 其中所述的源自 tetranectin 的三聚化结构域含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 81。

21. 根据权利要求 17 的三聚多肽, 其选自: TN-2-B (SEQ ID NO: 106), TN-2-C (SEQ ID NO: 108), TN-2-D (SEQ ID NO: 107) 和 AD1D4-GSS-I10 (SEQ ID NO: 109)。

22. 根据权利要求 1 的三聚多肽, 其中还含有位于所述特异性结合元件和三聚化结构域之间的接头。

23. 一种药物组合物, 其含有根据权利要求 1-22 中任一项的三聚多肽。

24. 治疗患有由三聚细胞因子、例如肿瘤坏死因子介导的病理的对象的方法, 包括给所述的对象施用有效量的根据权利要求 1-22 中任一项的三聚多肽或根据权利要求 23 的组合物。

25. 根据权利要求 24 的方法, 其中所述的肿瘤坏死因子介导的病理选自: 类风湿性关节炎、银屑病和克罗恩氏病。

26. 制备含有 3 个单体的三聚多肽的方法, 每个所述单体含有能结合三聚多肽细胞因子的特异性结合元件, 且每个所述单体含有三聚化结构域, 所述的方法包括下述步骤: (i) 在能表达所述三聚多肽的条件下, 培养用编码所述三聚多肽的载体转化的宿主; 和 (ii) 分离所述的三聚多肽。

27. 根据权利要求 26 的方法, 其中所述的特异性结合元件含有选自下述的氨基酸序列: TNFRSF1B 1-235 (SEQ ID NO: 76), TNFRSF1B 1-185 (SEQ ID NO: 77), TNFRSF1B 1-163 (SEQ ID NO: 78) 和 TNFRSF1B 1-142 (SEQ ID NO: 79)。

28. 根据权利要求 26 的方法, 其中所述的特异性结合元件是多肽, 其含有由选自下述的 DNA 序列编码的氨基酸序列: TNFRSF1B D1D2 (SEQ ID NO: 13), TNFRSF1B D1D2, 1/6 (SEQ ID NO: 15), TNFRSF1B D1D2 1/4 (SEQ ID NO: 17), TNFRSF1B D1D2, 1/3 (SEQ ID NO: 19), TNFRSF1B D1D2, 1/2 (SEQ ID NO: 21), TNFRSF1B D1D4 (SEQ ID NO: 23), TNFRSF1B D2 (SEQ ID NO: 25), TNFRSF1B D2, 1/6 (SEQ ID NO: 26), TNFRSF1B D2, 1/4 (SEQ ID NO: 27), TNFRSF1B D2, 1/3 (SEQ ID NO: 28), TNFRSF1B D2, 1/2 (SEQ ID NO: 29) 和 TNFRSF1B D2D4 (SEQ ID NO: 30)。

29. 根据权利要求 1-22 中任一项的三聚多肽的应用。

30. 根据权利要求 1-22 中任一项的三聚多肽在制备药物组合物中的应用。

31. 检测样品中的三聚细胞因子的实验方法, 其包括: (i) 使所述样品与根据权利要求 1 的三聚多肽接触, 和 (ii) 检测所述三聚多肽与所述三聚细胞因子的结合。

三聚细胞因子的三聚结合蛋白

技术领域

本发明提供了能结合三聚细胞因子的三聚结合蛋白。更具体地提供了能以某种方式结合的三聚结合物 (trimeric binder), 从而在结合以后, 能基本上封闭所述三聚细胞因子的全部受体结合位点, 进而抑制三聚细胞因子的潜在生物活性。一方面, 本发明涉及能结合肿瘤坏死因子配体超家族的细胞因子、包括肿瘤坏死因子 (TNF) 的三聚结合物。

背景技术

细胞因子是高等真核生物分泌的小多肽, 其负责细胞间的信号转导, 且影响其它细胞的生长、分裂和功能。它们是有用的、多效的多肽, 其例如通过相应的受体, 发挥局部的或系统的细胞间调节因子的作用, 因此在许多生物过程中起关键作用, 例如免疫、炎症和造血作用 (骨髓中的血细胞的形成和发育)。细胞因子由多种细胞类型生产, 包括成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞/单核细胞、和淋巴细胞。迄今为止, 已经鉴别出了大量的细胞因子, 包括干扰素、肿瘤坏死因子、白介素和淋巴因子。它们与经典的激素不同, 因为它们由许多组织或细胞类型生产, 而不是由专门的腺体生产。

细胞因子-受体相互作用的调控是治疗性地干涉多种疾病和病理的有用机理。可以与细胞因子相互作用的可溶性的结合蛋白能潜在地把细胞因子与受体隔开, 由此降低或阻止特定受体途径的激活。

某些细胞因子以多亚基复合物形式出现, 其含有多拷贝的相同亚基。肿瘤坏死因子配体超家族 (TNFLSF) 中的巨噬细胞移行抑制因子 (MIF) 和蛋白, 例如肿瘤坏死因子 (TNF; TNFLSF 成员 2) 和淋巴毒素 α (LT- α ; TNFLSF 成员 1), 以 3 个相同亚基形成的同型三聚体的形式出现。已知许多这样的三聚细胞因子会参与信号转导并起调节因子的作用, 还参与许

多不同类型的疾病和医学适应症。

已知 TNF 配体超家族的三聚细胞因子能在不同水平控制和调节免疫和炎症反应。还已知 TNF 配体超家族成员与几种疾病有关,例如急性的或慢性的炎性疾病。现在, TNF 配体超家族具有至少 17 种公认的配体,包括 LTA (淋巴毒素 α ; TNFLSF 成员 1), TNF (肿瘤坏死因子; TNFLSF 成员 2), LTB (淋巴毒素 β ; TNFLSF 成员 3), OX-40L TNFLS 成员 4); CD40L (TNFLS 成员 5); FasL (TNFLS 成员 6); CD27L (TNFLS 成员 7); CD30L (TNFLS 成员 8); 4-1BB-L (TNFLS 成员 9); TRAIL (TNFLS 成员 10); RANKL (TNFLS 成员 11); TWEAK (TNFLS 成员 12); APRIL (TNFLS 成员 13); BAFF (TNFLS 成员 13B); LIGHT (TNFLS 成员 14); VEGI (TNFLS 成员 15); 和 GITRL (TNFLS 成员 18)。

有证据表明, TNF 配体超家族的三聚细胞因子的信号单元和它们的对应受体是 3 个受体和 3 个配体装配成六聚体复合物的形式,其中一个细胞因子三聚体结合 3 个受体分子 (Bodmer 等 2002, *TRENDS in Biochemical Sciences* 27(1), pp. 19-26)。在成为该六聚体复合物的一部分之前,受体以单体形式存在。图 1 解释了该一般机理。

TNF (TNFLSF 成员 2) 是免疫和炎症反应的主要介导体之一,例如已知它在类风湿性关节炎的发病机理中起重要作用,该病是常见的自身免疫炎症疾病,它影响着约 0.5-1% 的人口。另外,还已知 TNF 参与广泛的疾病状态的发病机理,包括内毒素休克、脑型疟和移植物抗宿主反应。TNF 由许多细胞类型生产,主要由活化的巨噬细胞生产。可溶形式的 TNF 由 3 个相同的 17 kD 蛋白亚基组成,而膜结合形式则由 3 个相同的 26 kD 亚基组成。TNF 以前还称作 "TNF- α " 和 "恶液质素"。

最近发现 TWEAK (TNFLSF 成员 12) 是血管生成 (血管的形成和生长) 的直接的和强烈的诱导物,因为发现皮摩尔浓度的 TWEAK 就能促进正常内皮细胞的增殖,且 TWEAK 能在体内大鼠角膜模型中诱导血管生成 (Lynch 等, 1999, *The Journal of Biological Chemistry*, 274(13) pp. 8455-8459)。更具体地,血管生成对于实体瘤的生长、维持和它们的转移是必须的,还已知它参与其它的病理学疾病,例如糖尿病性视网膜病、

银屑病、接触性皮炎和再狭窄。

US20020037852A1 中指出三聚细胞因子 BAFF (TNFLS 成员 13B) 由 T 细胞和树突细胞表达, 以进行 B 细胞的共刺激, 因此它可能在 B 细胞功能的控制中起重要作用。其中暗示 BAFF 和它的受体可能具有抗癌和免疫调节用途、以及治疗免疫抑制病例如 HIV 的应用。

APRIL (TNFLS 成员 13) 是能结合受体 TNFRSF13B 和 TNFRSF17 的三聚细胞因子。近来已经证实, 向各种肿瘤细胞添加重组的 APRIL 会刺激它们的增殖, 因而 APRIL 可能参与调节肿瘤细胞生长 (Hahne M., 等, 1998; J. Exp. Med. 188: 1185-1190)。还已经提出, APRIL 可能参与单核细胞/巨噬细胞介导的免疫过程。

而且, 据称 TNF 超家族内的细胞因子会参与遗传性疾病, 例如超 IgM 综合症、I 型自身免疫淋巴增殖综合症、TNF-R1-相关的周期热综合症、少汗性外胚层发育不良和家族扩张性骨质溶解症。

已经进行了许多尝试来发现和开发合适的三聚细胞因子的拮抗剂和结合物, 其能结合特定的三聚细胞因子, 并由此阻止该三聚细胞因子结合到例如细胞膜结合型受体上, 从而抑制该特定受体途径的激活。

一个实例是针对三聚细胞因子 TNF (TNFLSF 成员 2) 的拮抗剂。现在, 市场上可以得到 2 种类型的 TNF 拮抗剂, 即英夫利昔单抗 (Remicade) 和 Eternarcept (Enbrel), 美国 and 欧洲的市场主管部门都批准了其用于治疗类风湿性关节炎。还已经证实, 这 2 种产品对于治疗银屑病和克罗恩氏病也是有效的。英夫利昔单抗是一种嵌合抗体, 其含有鼠可变区和人 IgG1 和 κ 恒定区, 通过结合可溶的和跨膜形式的 TNF 来中和 TNF 的生物活性, 并抑制 TNF 与其受体的结合。英夫利昔单抗的结构类似于自然产生的抗体。Eternarcept 是一种融合蛋白, 由 p75 TNF 受体的胞外域和人 IgG1 的铰链和 Fc 域组成。

WO 00/42073 中给出了三聚细胞因子的拮抗剂的另一个实例, 其中公开了针对三聚细胞因子 TWEAK (TNFLS 成员 12) 的单克隆抗体。其中提到, 该抗体可以阻止移植物抗宿主病的发展。

但是, 使用现在已知的三聚细胞因子的结合物和抑制剂产物会遇到

的一个常见的技术问题是，在形成三聚细胞因子和结合物或抑制剂产物的 1:1 复合物后，不能有效地封闭三聚细胞因子的所有 3 个受体结合位点，因为 3 个受体结合位点中的至少 1 个或 2 个还是开放的。开放的细胞因子受体结合位点可能会与对应的细胞表面细胞因子受体结合，由于该受体在细胞表面的高局部浓度，由此开始进一步募集细胞因子受体，并介导受体信号传递。

通过 TNF 结合物 Eternacept 可以清楚地解释该问题。Eternacept 是二价分子，能与 TNF 三聚体形成 1:1 复合物。当 Eternacept 结合 TNF 时，Eternacept 分子仅能占据 3 个可能的受体结合位点中的 2 个，剩下的第 3 个受体结合位点仍是开放的。这暗示着开放的 TNF 受体结合位点可能会与细胞表面 TNF 受体结合，由于该受体在细胞表面上的高局部浓度，从而开始进一步募集 TNF 受体，并介导信号传递。图 2 解释了该问题。

TNF 结合物英夫利昔单抗也存在相同的问题。每个英夫利昔单抗分子仅能结合给定的 TNF 分子的 1 个受体结合位点（亚基），因而剩下 2 个开放的受体结合位点。这些开放的受体结合位点可能随后与对应的游离受体结合，导致 TNF 受体的进一步募集和受体信号传递。

现在，本发明的发明人已经发现，通过提供一种融合蛋白（原聚体）可以克服上面的技术问题，该融合蛋白被构建成三聚细胞因子的结合单元（结合物）与三聚化结构域的融合体。本发明的融合蛋白作为三聚蛋白，能与三聚细胞因子形成 1:1 复合物，优选地同时有效地结合三聚细胞因子的所有 3 个受体结合位点，由此没有受体结合位点是开放的，因此能抑制细胞因子向细胞表面的积聚。本发明由此提供了一种融合蛋白，其具有下述优点：与目前已知的三聚细胞因子拮抗剂相比，能更有效地抑制和中和三聚细胞因子的生物活性。根据本发明的融合蛋白的另一个优点是，当用作药物时，与目前已知的三聚细胞因子的结合物相比，使用更少量的融合蛋白即可达到治疗效果。

发明内容

因此, 本发明一方面涉及含有 3 个单体的三聚多肽, 每个所述的单体含有能结合三聚细胞因子的特异性结合构件, 且每个所述的单体含有三聚化结构域。

另一方面, 提供了含有根据本发明的三聚多肽的药物组合物。

另一方面, 本发明涉及通过给具有三聚细胞因子(例如肿瘤坏死因子)介导的病理学的对象施用有效量的根据本发明的三聚多肽来治疗该对象的方法。

最后, 提供了制备根据本发明的三聚多肽的方法、和检测样品中的三聚多肽细胞因子的实验方法。

发明详述

一方面, 本发明提供了能结合三聚细胞因子的三聚结合物, 优选地其结合方式能够使得在结合后, 能基本上封闭和/或中和三聚细胞因子的所有受体结合位点, 从而抑制或中和三聚细胞因子的潜在生物活性。因此, 提供了包含 3 个单体的三聚多肽, 其中每个单体含有能结合三聚细胞因子的特异性结合构件, 且其中每个单体都含有三聚化结构域。

在本文中, 术语"三聚细胞因子"是指小蛋白和其片段, 其由细胞生产和分泌, 能在具有针对该细胞因子的受体的细胞中引起特异性反应, 例如影响细胞的生长、分裂和/或功能。术语"三聚的"在本文中指本发明的细胞因子以含有 3 个亚基、优选 3 个相同亚基(同型三聚体)的多亚基复合物形式存在。

这种三聚细胞因子的典型实例包括巨噬细胞移行抑制因子(MIF)和肿瘤坏死因子配体超家族(TNFSF)中的细胞因子。现在, 如上所述, TNF 配体超家族具有至少 17 种公认的配体, 它们共享有称作"TNF 同源域"(TNF homology domain, THD)的保守的三聚 C-末端域, 其负责受体结合。该三聚化结构域的序列相同性在 TNF 家族成员之间约为 20-30%。THD 是长为 150 个氨基酸的序列, 其含有芳族和疏水残基的保守框架, 如 Bodmer 等 2002, *TRENDS in Biochemical Sciences* 27(1), 第 19-26 页的图 2 所示。因此, 在本文中, "肿瘤坏死因子配体超家族的成员"是指含有该

TNF 同源域 THD 的三聚蛋白。目前已知的 TNF 配体超家族中的三聚细胞因子如下面的表 1 所示, 还列出了别名和相应的 Genbank ID (GenBank, National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)。本文所使用的 TNF 配体超家族的命名法遵循官方 TNF 超家族 (TNFSF) 命名法, 可以参见 <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/tnftop.html>。

表 1: TNF 配体超家族

配体标识	Genbank ID	别名
LTA	X01393	TNFSF1, TNFB, LT
TNF	X02910	TNFSF2, TNF- α , DIF
LTB	L11016	TNFSF3, TNFC, p33
TNFSF4	D90224	OX-40L, gp34, TXGP1
TNFSF5	X67878	CD40LG, IMD3, HIGM1, CD40L, hCD40L, TRAP, CD154, gp39
TNFSF6	U11821	FasL, APT1LG1
TNFSF7	L08096	CD70, CD27L, CD27LG
TNFSF8	L09753	CD30LG
TNFSF9	U03398	4-1BB-L
TNFSF10	U37518	TRAIL, Apo-2L, TL2
TNFSF11	AF013171	TRANCE, RANKL, OPGL, ODF
TNFSF12	AF030099	TWEAK, DR3LG, APO3L
TNFSF13	NM_003808	APRIL
TNFSF13B	AF136293	BAFF, THANK, BLYS, TALL-1, TALL1, TNFSF20
TNFSF14	AF036581	LIGHT, LTg, HVEM-L
TNFRSF F α 14	-	成纤维细胞生长因子可诱导的立即早期反应蛋白 14, FGF-可诱导的 14, Tweak-受体, TweakR
TNFSF15	AF039390	TL1, VEGI
TNFSF18	AF125303	AITRL TL6 hGITRL

因此, 在本发明的一个有用的实施方案中, 根据本发明的三聚多肽能结合选自下列的肿瘤坏死因子配体超家族成员的三聚细胞因子: LTA; TNF; LTB; TNFSF4; TNFSF5; TNFSF6; TNFSF7; TNFSF8; TNFSF9; TNFSF10; TNFSF11; TNFSF12; TNFSF13; TNFSF13B; TNFSF14; TNFRSF F α 14;

TNFSF15; 和 TNFSF18。

如本文所使用的，术语"特异性结合构件"是指彼此具有结合特异性的一对分子中的成员。特异性结合对中的成员可以是自然产生的，或全部地或部分地合成生产的。分子对中的一个成员在其表面上有区域或者有腔，能特异性地结合分子对中的另一成员的特定空间和极性结构，因此与其呈互补性。因而，该对中的成员具有彼此特异性地结合的性质。特异性结合对类型的实例是抗原-抗体、生物素-链霉抗生物素蛋白、激素-激素受体、配体-配体受体、酶-底物。特异性结合对的其它实例包括：碳水化合物和凝集素，互补的核苷酸序列(包括在 DNA 杂交实验中用于检测目标核酸序列的探针和捕获核酸序列)，互补的肽序列，包括通过重组方法形成的那些，效应物和受体分子，酶辅因子和酶，酶抑制剂和酶等。而且，特异性结合对可以包括作为原始特异性结合构件的类似物或片段的成员。

在有用的实施方案中，能结合三聚细胞因子的特异性结合构件为本发明的三聚多肽提供了对三聚细胞因子的结合亲和力(Kd)，由表面等离子体共振测得该结合亲和力优选地为 1×10^{-8} M 或更低。在其它有用的实施方案中，Kd 值低于 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, 1×10^{-13} M, 1×10^{-14} M, 或甚至低于 1×10^{-15} M。在其它有用的实施方案中，由表面等离子体共振测得根据本发明的三聚多肽的 K-off 速度小于 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ，例如小于 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、包括小于 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 和甚至小于 $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 。如本文所使用的，术语"K-off"是指特异性结合构件从特异性结合构件/三聚细胞因子复合物中解离出来的解离速度常数。如本文所使用的，术语"表面等离子体共振"是指一种光学现象，通过检测生物传感器基质内的蛋白浓度的变化，例如使用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden) 检测，可以分析实时的生物特异性的相互作用。关于进一步的描述，见实施例 10。

如上所述，根据本发明的三聚细胞因子结合物优选地能至少部分地或完全地封闭、抑制或中和三聚细胞因子的生物活性。如本文所使用的，表述"中和"是指抑制或降低体内或体外测得的三聚细胞因子的生物活

性。

在有用的实施方案中，特异性结合构件是源自肿瘤坏死因子受体超家族成员的多肽。现在，已经知晓肿瘤坏死因子超家族中的至少 29 种受体，列在下面的表 2 中，同时列出了它们的别名以及相应的 Genbank ID (GenBank, National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)。本文所使用的 TNF 受体超家族成员的命名遵循官方 TNF 超家族 (TNFSF) 命名法，可以参见 <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/tnftop.html>。

表 2: TNF 受体超家族

受体标识	Genbank ID	别名
TNFRSF1A	M75866	p55-R, CD120a, TNF-R-I p55, TNF-R, TNFR1, TNFAR, TNF-R55, p55TNFR, TNFR60
TNFRSF1B	M32315	CD120b, p75, TNF-R, TNF-R-II, TNFR80, TNFR2, TNF-R75, TNFBR, p75TNFR
LTBR	L04270	TNFRSF3, TNFR2-RP, CD18, TNFR-RP, TNFCR, TNF-R-III
TNFRSF4	X75962	OX40, ACT35, TXGP1L
TNFRSF5	X60592	p50, Bp50, CD40
TNFRSF6	M67454	FAS, CD95, APO-1, APT1
TNFRSF6B	AF104419	DcR3, M68, TR6, HGNC: 15888, NHL, DKFZP434C013, KIAA1088, bK3184A7.3, C20orf41
TNFRSF7	M63928	Tp55, S152, CD27
TNFRSF8	M83554	Ki-1, DIS166E, CD30
TNFRSF9	L12964	4-1BB, CD137, ILA
TNFRSF10A	U90875	DR4, Apo2, TRAILR-1
TNFRSF10B	AF012628	DR5, KILLER, TRICK2A, TRAIL-R2, TRICKB
TNFRSF10C	AF012536	DcR1, TRAILR3, LIT, TRID
TNFRSF10D	AF029761	DcR2, TRUNDD, TRAILR4

受体标识	Genbank ID	别名
TNFRSF11A	AF018253	RANK
TNFRSF11B	U94332	OPG, OCIF, TR1
TNFRSF12	U72763	DR3, TRAMP, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3
TNFRSF12L	-	DR3L
TNFRSF13B	AF023614	TACI
TNFRSF13C	AF373846	BAFFR
TNFRSF14	U70321	HVEM, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA
NGFR	M14764	TNFRSF16, p75NTR
TNFRSF17	Z29574	BCMA, TNFRSF13
TNFRSF18	AF125304	AITR, GITR
TNFRSF19	AB040434	TAJ- α , TROY, TAJ, TRADE
TNFRSF19L	AF319553	FLJ14993, RELT
TNFRSF21	AF068868	DR6
TNFRSF22	-	SOBa, Tnfrh2, 2810028K06Rik
TNFRSF23	-	mSOB, Tnfrh1

因而，在有用的实施方案中，源自肿瘤坏死因子超家族中的受体的特异性结合构件选自受体 TNFRSF1A, TNFRSF1B, LTBR, TNFRSF4, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFRSF6B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFRSF12, TNFRSF12L, TNFRSF13B, TNFRSF13C, TNFRSF14, NGFR, TNFRSF17, TNFRSF18, TNFRSF19, TNFRSF19L, TNFRSF21, TNFRSF22 和 TNFRSF23。但是，预期可以鉴别出该蛋白家族的其它有用受体，并由此可以鉴别出其它的功能特异性结合构件。

在有用的实施方案中，特异性结合元件源自 TNF 受体 TNFRSF1A (TNFrI, p55 受体) 和/或 TNFRSF1B (TNFrII, p75 TNF 受体)。更具体地，已经证实了 TNFRSF1B 受体和其亚基能有效地特异性地结合和中和

TNF。作为实例，TNF 结合蛋白 Eterncept 是由 TNFRSF1B 受体的胞外域（即 TNFRSF1B 受体的亚基）组成的融合蛋白。因此，在具体的实施方案中，根据本发明的三聚多肽包括特异性结合元件，其是 TNFRSF1B 受体 (TNFrII) 的亚基或片段，例如 US 5,712,155 公开的 TNFRSF1B 受体片段。因此，在有用的实施方案中，所述特异性结合元件是含有选自下述的氨基酸序列的多肽：TNFRSF1B 1-235 (SEQ ID NO: 76)，TNFRSF1B 1-185 (SEQ ID NO: 77)，TNFRSF1B 1-163 (SEQ ID NO: 78) 和 TNFRSF1B 1-142 (SEQ ID NO: 79)。

在其它有用的实施方案中，如下面的实施例所公开的，所述特异性结合元件可以是 TNFRSF1B 受体 (TNFrII) 的一个或多个片段、和这种片段的组合，例如含有选自下述的 DNA 序列编码的氨基酸序列的多肽：TNFRSF1B D1D2 (SEQ ID NO: 13)，TNFRSF1B D1D2, 1/6 (SEQ ID NO: 15)，TNFRSF1B D1D2 1/4 (SEQ ID NO: 17)，TNFrII D1D2, 1/3 (SEQ ID NO: 19)，TNFRSF1B D1D2, 1/2 (SEQ ID NO: 21)，TNFRSF1B D1D4 (SEQ ID NO: 23)，TNFRSF1B D2 (SEQ ID NO: 25)，TNFRSF1B D2, 1/6 (SEQ ID NO: 26)，TNFRSF1B D2, 1/4 (SEQ ID NO: 27)，TNFRSF1B D2, 1/3 (SEQ ID NO: 28)，TNFRSF1B D2, 1/2 (SEQ ID NO: 29) 和 TNFRSF1B D2D4 (SEQ ID NO: 30)。

根据本发明，能结合三聚细胞因子的特异性结合元件还可以是抗体或抗体片段。在本文中，术语“抗体”用于描述天然的、或者部分地或全部地合成的免疫球蛋白。由于可以以多种方式修饰抗体，术语“抗体”应当理解为包括了具有所需三聚细胞因子特异性的结合域的任何特异性结合元件或物质。因此，该术语涵盖了抗体片段、抗体的衍生物、功能等同物和同系物，包括含有免疫球蛋白结合域的任何多肽，无论是天然的，还是全部地或部分地合成的。因此，也包括含有免疫球蛋白结合域与另一多肽相融合的嵌合分子、或等同物。该术语还包括具有结合域的任何多肽或蛋白，所述结合域是抗体结合域或与其同源，例如抗体模拟物。它们可以源自天然来源，或者它们是部分地或全部地合成的。抗体的实例是免疫球蛋白同种型和它们的同种型亚类；含有抗原结合域的片段，例如 Fab, scFv, Fv, dAb, Fd；和二体 (diabodies)。

US 6,451,983 B2 描述了人肿瘤坏死因子的抗体,其能 i. a. 中和 TNF 的生物学活性。更具体地,US 6,451,983 B2 提供了能结合某些特定拓扑学区域内的成熟人 TNF (SEQ ID NO: 80) 的抗体或其片段。因此,在本发明的有用的实施方案中,该特异性结合元件是能在选自下列氨基酸残基组成的区域内的至少一个区域结合成熟的人 TNF (SEQ ID NO: 80) 的抗体或其片段: 氨基酸残基 1-18, 1-20, 1-26, 1-30, 12-22, 22-31, 22-40, 36-45, 49-97, 49-98, 56-79, 58-65, 69-97, 70-87, 76-90, 96-105, 105-128, 108-128, 110-127, 115-125, 117-128, 132-157, 135-155, 136-153, 138-149, 141-153 或 146-157。

US 6,451,983 B2 还提供了可以用于本发明的特异性单克隆抗体。因此,能结合人 TNF 的特异性结合元件可以是选自下述的抗体或抗体片段: MAb 1 (ECACC 89080301), MAb 21 (ECACC 90012432), MAb 25 (ECACC 89121401), MAb 32 (ECACC 89080302), MAb 37 (ECACC 89080303), MAb 42 (ECACC 89080304), MAb 47 (ECACC 89121402), MAb 53 (ECACC 90012433) 和 MAb 54 (ECACC 89083103), 其中 ECACC 是指欧洲动物细胞培养物中心 (European Collection of Animal Cell Cultures)。

有用的抗体的其它实例包括 US 6,090,382 中公开的人化抗体 D2E7 和 WO/00194585 中公开的人化抗体片段 CDP 870。

在具体的实施方案中,本发明的特异性结合元件可以含有抗体类似物或人工抗体,例如 WO/0248189 中公开的具有 C-型凝集素样结构域 (C-type lectin-like domains, CTLD) 的支架结构的蛋白。正如将从下面的实施例中明白的,基于能结合 TNF 的 CTLD 抗体类似物的有用 tetranectin 可以选自 TN3-2-B (SEQ ID NO: 103)、TN3-2-C (SEQ ID NO: 104) 和 TN3-2-D (SEQ ID NO: 105)。

本发明的一个重要的方面是,除了特异性结合元件外,三聚多肽的单体还含有三聚化结构域。在本文中,术语"三聚化结构域"是能与其它类似的或相同的三聚化结构域相互作用的肽、蛋白或蛋白的部分。这种相互作用是能生成三聚蛋白或多肽的类型。这样的相互作用可以由三聚化结构域的组分之间的共价键造成,以及由氢键力、疏水力、范德华

力和盐桥造成。

三聚化结构域的一个实例公开在 WO 95/31540 中，其中公开了含有胶凝素 (collectin) 颈区的多肽。构成胶凝素颈区的氨基酸序列可以附着到选择的任何多肽上。然后可以在合适的条件下，用含有胶凝素颈区氨基酸序列的 3 个多肽制备三聚体。

在目前优选的实施方案中，三聚化结构域源自 tetranectin，更具体地包含 tetranectin 三聚化结构单元 (此后称作 TTSE)，其在 WO 98/56906 中详细公开。TTSE 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 81 所示。TTSE 的三聚化作用由卷曲螺旋结构造成，该结构与 2 个其它的 TTSE 的卷曲螺旋结构相互作用，形成 3 个 α 螺旋卷曲螺旋三聚体，其即使在相对较高的温度下也是特别稳定的。术语 TTSE 也意在包括天然产生的 tetranectin 蛋白家族成员的 TTSE 的变体、已经对其氨基酸序列进行了修饰而未在任何实质程度上负面影响 TTSE 形成 α 螺旋卷曲螺旋三聚体的能力的变体。因此，根据本发明的三聚多肽可以包含作为三聚化结构域的 TTSE，其含有与 SEQ ID NO: 81 的序列具有至少 68%、例如至少 75%、包括至少 87%、例如至少 92% 的氨基酸序列相同性的序列。与此相一致，TTSE (SEQ ID NO: 81) 的半胱氨酸残基 No. 50 可以有利地诱变成丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸或任何其它的氨基酸残基，以防止形成不希望的链间二硫键，后者会导致不希望的多聚化作用。

在另一个实施方案中，可以如下修饰 TTSE 三聚化结构域 (SEQ ID NO: 81)：(i) 插入多组氨酸序列和/或血液凝固因子 X_a 的切割位点，(ii) 用 Ser 替换 Cys 50，和 (iii) 包含 C-末端 KGS 序列。

下面的实施例中提供了根据本发明的不同三聚多肽的几个实例，其中已经应用了上面的 TTSE 三聚化结构域。它们包括基于 CTLD 的 TNF 结合单元 TN-2-B (SEQ ID NO: 106)、TN-2-C (SEQ ID NO: 108) 和 TN-2-D (SEQ ID NO: 107)、和三聚体化的人 TNFR II 片段 AD1D4-GSS-I10 (SEQ ID NO: 109)。

根据本发明，所述特异性结合元件可以连接到三聚化结构域的 N-或 C-末端氨基酸残基。但是也预见到，在某些实施方案中，可以将特异性

结合元件有利地连接到单体的三聚化结构域 N-末端和 C-末端，由此提供含有 6 个能结合三聚细胞因子的特异性结合元件的三聚多肽。

可以明白，有弹性的分子连接物可以任选地置于特异性结合元件和三聚化结构域之间，并共价地连接它们。在某些实施方案中，连接物是约 1-20 个氨基酸残基的多肽序列。连接物可以小于 10 个氨基酸，最优选地，为 5, 4, 3, 2, 或 1 个。在某些情况下，9、8、7 或 6 个氨基酸是合适的。在有用的实施方案中，连接物基本上是无免疫原性的，不易于蛋白水解切割，且不含有已知能与其它残基相互作用的氨基酸残基(例如半胱氨酸残基)。

通过在能表达三聚多肽的条件下、培养用编码三聚多肽的载体转化的宿主，可以在任何合适的标准蛋白表达系统中表达本发明的三聚多肽。优选地，表达系统是这样的系统，其中所需蛋白可以容易地分离和进行体外再折叠。作为一般规律，原核表达系统是优选的，因为可以得到高产量的蛋白，并且有有效的纯化和再折叠方法可供利用。因而，本领域的技术人员无需过多实验、凭借自身的能力和判断即可选择合适的或中意的表达系统。类似地，一旦选定了本发明的三聚多肽的一级氨基酸序列，结合所选宿主中的密码子偏好、宿主中的分泌信号序列的必要性、信号序列中的蛋白酶切割位点的导入等因素，本领域的普通技术人员即可容易地设计合适的能编码目标蛋白的重组 DNA 构建体。这些重组 DNA 构建体可以框架内地插入适用于选定宿主的许多表达载体中的任意一个中。合适的或中意的表达载体的选择也是在本领域技术人员的能力和判断力之内。优选地，表达载体包含能驱动重组构建体的表达的强启动子。最后，使用本领域熟知的合适的标准方法，可以分离出三聚多肽，并任选地进行其它的操作，例如冻干。

通过本领域熟知的任何合适的方法，可以用根据本发明的三聚多肽制备药物组合物。该组合物可以含有与三聚多肽在一起的一种或多种可接受的载体、和任选的其它治疗成分。该载体必须是在与其它成分相容且对其受体无毒害的意义上为可接受的。通常，制备药物组合物的方法包括将活性成分和载体相结合的步骤。

本发明的治疗应用包括通过给需要治疗的动物施用治疗有效量的根据本发明的三聚多肽来治疗该动物的疾病或障碍。如上所述，已知三聚细胞因子、特别是 TNF 配体超家族的三聚细胞因子，是能充当胞间信号转导分子的多效多肽，其能控制和调节免疫和炎症反应。因而应当指出，本发明的三聚多肽可以用于治疗三聚细胞因子介导的广范围的障碍和疾病，包括炎症疾病、自身免疫病、免疫障碍、感染、恶性肿瘤和神经变性病。在一个有用的实施方案中，疾病是肿瘤坏死因子介导的病理学，例如类风湿性关节炎、银屑病和克罗恩氏病。

通过任何合适的技术，包括肠胃外地，可以将本发明的三聚多肽直接施用给动物，也可以局部地或全身地施用。具体的给药途径依赖于，例如，动物的病史。肠胃外给药的实例包括皮下、肌肉内、静脉内、动脉内和腹膜内给药。

本文中可由三聚融合蛋白潜在地治疗的动物包括哺乳动物，例如人。

最后，本发明提供了检测样品中的三聚多肽细胞因子的实验方法，其包括：(i) 使样品与根据本发明的三聚多肽接触，和 (ii) 检测三聚多肽向三聚细胞因子的结合。

现在，通过下面的非限制性实施例和附图来进一步描述本发明。

附图说明

图 1 显示了肿瘤坏死因子超家族内的三聚细胞因子与相应的细胞结合型单体受体的结合，其启动 2 个细胞因子受体的进一步募集，导致六聚细胞因子-受体信号单元的形成。

图 2 显示了二价结合物与肿瘤坏死因子超家族 (TNFSF) 内的三聚细胞因子的结合，该二价结合物与三聚细胞因子形成 1:1 复合物。当所述二价结合物结合三聚 TNFSF 细胞因子时，二价结合物分子仅仅占据 3 个可能的受体结合位点中的 2 个，第 3 个受体结合位点仍是开放的。这暗示着，开放的细胞因子受体结合位点可以结合细胞表面三聚细胞因子受体，并且，由于该受体在细胞表面的高局部浓度，从而开始进一步募集三聚受体，并介导信号传递。

图 3 显示了三聚细胞因子的结合物，其能与三聚细胞因子形成 1:1 复合物，并同时有效地结合三聚细胞因子的所有 3 个受体结合位点，由此没有受体结合位点仍是开放的。细胞因子向细胞表面的积聚受到阻断，也就不会发生信号转导。

图 4 显示了 10 倍稀释的三聚体化受体片段 D1D4GSSI10 Trip 在鼠成纤维细胞细胞系 L929 实验中在固定的两种不同 TNF α 浓度 (1.0ng/ml 和 0.1ng/ml) 下对 TNF α 介导的细胞毒性的抑制。

实施例

实施例 1

用于生产三聚细胞因子结合物的 trip 大肠杆菌表达质粒和噬菌粒的设计和构建

噬菌粒

使用标准方法，通过将用寡核苷酸引物 C-sfikpn-TRI (SEQ ID NO: 1) 和 N-sfikpn-TRI (SEQ ID NO: 2) 由表达质粒 pTtripb 扩增的经 Sfi I 和 Not I 限制性消化的 DNA 片段 sktripB 连接到 Amersham Pharmacia Biotech (编号 27-9401-01) 提供的经 Sfi I 和 Not I 预切割的载体 pCANTAB 5E 中，构建了噬菌粒 psktripB。sktripB 插入片段的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

使用标准方法，通过将用寡核苷酸引物 C-sfikpn-TRI (SEQ ID NO: 1) 和 N-sfikpn-I10TRI (SEQ ID NO: 4) 从表达质粒 pTtripb 扩增的、经 Sfi I 和 Not I 限制性消化的 DNA 片段 skI10tripB 连接到 Amersham Pharmacia Biotech (编号 27-9401-01) 提供的经 Sfi I 和 Not I 预切割的载体 pCANTAB 5E 中，构建了噬菌粒 pskI10tripB。skI10tripB 插入片段的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。

表达质粒

使用标准方法，通过将用寡核苷酸引物 C-bamkpn-TRI (SEQ ID NO: 6) 和 N-bamkpn-TRI (SEQ ID NO: 7) 从表达质粒 pTtripb 扩增的、经 BamH I 和 Hind I 性消化限制的 DNA 片段 bktripB 连接到经 BamH I 和 Hind I 限

制性消化的表达质粒 pT7H6 中,构建了表达质粒 pT7H6-bktripB。bktripB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示。

使用标准方法,通过将用寡核苷酸引物 C-bamkpn-TRI (SEQ ID NO: 6)和 N-bamkpn-I10TRI (SEQ ID NO: 9)从表达质粒 pTtripb 扩增的、经 BamH I 和 Hind I 限制性消化的 DNA 片段 bkI10tripB 连接到经 BamH I 和 Hind I 限制性消化的表达质粒 pT7H6 中,构建了表达质粒 pT7H6-bkI10tripB。bkItripB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

实施例 2

使用 TNFRII 片段的三聚 TNF 结合物的设计和构建

TNF 受体 TNFRSF1B (TNFRII) 的片段和亚基用于构建基于源自 tetranectin 的三聚化结构域 TripB 的三聚 TNF 结合物。如下进行设计和克隆:

将 TNFRSF1B 片段克隆进噬菌粒载体

使用标准方法,通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D1-rev (SEQ ID NO: 11)和 D2kpn-fo (SEQ ID NO: 12))、Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1D2 连接到 Sfi I 和 Kpn I 切割载体 psktripB 中,构建了噬菌粒载体 pD1D2tripB。得到的 D1D2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

使用标准方法,通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1)的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D1-rev (SEQ ID NO: 11) D1/6kpn-fo (SEQ ID NO: 14))、经 Sfi I 和 Kpn I 切割的 DNA 片段 D1D1/6 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 psktripB 中,构建了噬菌粒载体 pD1D2,1/6tripB。得到的 D1D2,1/6 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示。

使用标准方法,通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D1-rev (SEQ ID NO: 11)和 D1/4kpn-fo (SEQ ID

NO: 16))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性切割的 DNA 片段 D1D1/4 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 psktripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD1D2, 1/4tripB。得到的 D1D2, 1/4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D1-rev (SEQ ID NO: 11)和 D1/3kpn-fo (SEQ ID NO: 18))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1D1/3 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 psktripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD1D2, 1/3tripB。得到的 D1D2, 1/3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1)的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D1-rev (SEQ ID NO: 11)和 D1/2kpn-fo (SEQ ID NO: 20))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性切割的 DNA 片段 D1D1/2 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 psktripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD1D2, 1/2tripB。得到的 D1D2, 1/2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D1-rev (SEQ ID NO: 11)和 D4kpn-fo (SEQ ID NO: 22))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性切割的 DNA 片段 D1D4 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 psktripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD1D4tripB。得到的 D1D4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D1-rev (SEQ ID NO: 11)和 D2kpn-fo (SEQ ID NO: 12))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1D2 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD1D2I10tripB。得到的 D1D2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA

扩增的(用寡核苷酸引物 D1-rev (SEQ ID NO: 11)和 D1/6kpn-fo (SEQ ID NO: 14))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1D1/6 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD1D2, 1/6I10tripB。得到的 D1D2, 1/6 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D1-rev (SEQ ID NO: 11)和 D1/4kpn-fo (SEQ ID NO: 16))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1D1/4 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD1D2, 1/4I10tripB。得到的 D1D2, 1/4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D1-rev: (SEQ ID NO: 11)和 D1/3kpn-fo (SEQ ID NO: 18))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1D1/3 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD1D2, 1/3I10tripB。得到的 D1D2, 1/4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 D1-rev (SEQ ID NO: 11)和 D1/2kpn-fo (SEQ ID NO: 20))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1D1/2 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD1D2, 1/2I10tripB。得到的 D1D2, 1/2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D1-rev (SEQ ID NO: 11)和 D4kpn-fo (SEQ ID NO:

22))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1D4 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD1D4I10tripB。得到的 D1D4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24) 和 D2kpn-fo (SEQ ID NO: 12))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D2 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 psktripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD2tripB。得到的 D2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24) 和 D1/6kpn-fo (SEQ ID NO: 14))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1/6 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 psktripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD2, 1/6tripB。得到的 D2, 1/6 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24) 和 D1/4kpn-fo (SEQ ID NO: 16))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1/4 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 psktripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD2, 1/4tripB。得到的 D2, 1/4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24) 和 D1/3kpn-fo (SEQ ID NO: 18))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1/3 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 psktripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD2, 1/3tripB。得到的 D2, 1/3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA

扩增的(用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24)和 D1/2kpn-fo (SEQ ID NO: 20))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1/2 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 psktripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD21/2tripB。得到的 D2, 1/2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24)和 D4kpn-fo (SEQ ID NO: 22))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D2D4 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 psktripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD2D4tripB。得到的 D2D4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24)和 D2kpn-fo (SEQ ID NO: 12))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D2 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD2I10tripB。得到的 D2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24)和 D1/6kpn-fo (SEQ ID NO: 14))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1/6 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD2, 1/6I10tripB。得到的 D2, 1/6 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24)和 D1/4kpn-fo (SEQ ID NO: 16))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1/4 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD2, 1/4I10tripB。得到的 D2, 1/4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech

Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24)和 D1/3kpn-fo (SEQ ID NO: 18))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1/3 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD2,1/3I10tripB。得到的 D2,1/3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24)和 D1/2kpn-fo (SEQ ID NO: 20))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D1/2 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD2,1/2I10tripB。得到的 D2,1/2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 D2-rev (SEQ ID NO: 24)和 D4kpn-fo (SEQ ID NO: 22))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 D2D4 连接到经 Sfi I 和 Kpn I 切割的载体 pskI10tripB 中, 构建了噬菌粒载体 pD2D4I10tripB。得到的 D2D4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示。

将 TNFRSF1B (TNFRII) 受体片段克隆至表达载体中

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31)和 D2kpn-fo (SEQ ID NO: 12))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D2 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中, 构建了表达载体 pT7H6FXD1D2tripB。得到的 FXD1D2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 32 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31)和 D1/6kpn-fo (SEQ ID NO: 14))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/6 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中, 构建了表达载体

pT7H6FXD1D2,1/6tripB。得到的 FXD1D2,1/6 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31) 和 D1/4kpn-fo (SEQ ID NO: 16))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/4 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD1D2,1/4tripB。得到的 FXD1D2,1/4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31) 和 D1/3kpn-fo (SEQ ID NO: 18))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/3 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bktripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD1D2,1/3tripB。得到的 FXD1D2,1/3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31) 和 D1/2kpn-fo (SEQ ID NO: 20))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/2 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bktripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD1D2,1/2tripB。得到的 FXD1D2,1/2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31) 和 D4kpn-fo (SEQ ID NO: 22))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D4 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bkI10tripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD1D4tripB。得到的 FXD1D4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38) 和 D2kpn-fo (SEQ ID NO: 12))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD2 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD2tripB。得到的 FXD2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38) bamD2-rev (SEQ ID NO: 38) 和 D1/6kpn-fo (SEQ ID NO: 14))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1/6 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD2,1/6tripB。得到的 FXD2,1/6 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 40 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38) 和 D1/4kpn-fo (SEQ ID NO: 16))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/4 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD2,1/4tripB。得到的 FXD2,1/4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38) 和 D1/3kpn-fo (SEQ ID NO: 18))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/3 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bktripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD2,1/3tripB。得到的 FXD2,1/3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA

扩增的(用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38)和 D1/2kpn-fo (SEQ ID NO: 20))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1/2 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bktripB 中, 构建了表达载体 pT7H6FXD2,1/2tripB。得到的 FXD2,1/2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38)和 D4kpn-fo (SEQ ID NO: 22))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD2D4 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bktripB 中, 构建了表达载体 pT7H6FXD2D4tripB。得到的 FXD2D4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31)和 D2kpn-fo (SEQ ID NO: 12))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D2 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bkI10tripB 中, 构建了表达载体 pT7H6FXD1D2I10tripB。得到的 FXD1D2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 32 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31)和 D1/6kpn-fo (SEQ ID NO: 14)), 经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/6 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bkI10tripB 中, 构建了表达载体 pT7H6FXD1D2,1/6I10tripB。得到的 FXD1D2,1/6 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31)和 D1/4kpn-fo (SEQ ID NO: 16))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/4 连接

到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bkI10tripB 中, 构建了表达载体 pT7H6FXD1D2.1/4I10tripB。得到的 FXD1D2,1/4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31)和 D1/3kpn-fo (SEQ ID NO: 18))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/3 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bkI10tripB 中, 构建了表达载体 pT7H6FXD1D2,1/3I10tripB。得到的 FXD1D2,1/3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31)和 D1/2kpn-fo (SEQ ID NO: 20))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/2 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bkI10tripB 中, 构建了表达载体 pT7H6FXD1D2,1/2I10tripB。得到的 FXD1D2,1/2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamD1-rev (SEQ ID NO: 31)和 D4kpn-fo (SEQ ID NO: 22))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D4 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bkI10tripB 中, 构建了表达载体 pT7H6FXD1D4I10tripB。得到的 FXD1D4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38)和 D2kpn-fo (SEQ ID NO: 12))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD2 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bkI10tripB 中, 构建了表达载体

pT7H6FXD2I10tripB。得到的 FXD2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38) 和 D1/6kpn-fo (SEQ ID NO: 14))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1/6 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bkI10tripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD2, 1/6I10tripB。得到的 FXD2, 1/6 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 40 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38) 和 D1/4kpn-fo (SEQ ID NO: 16))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/4 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bkI10tripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD2, 1/4I10tripB。得到的 FXD2, 1/4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38) 和 D1/3kpn-fo (SEQ ID NO: 18))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1D1/3 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bkI10tripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD2, 1/3I10tripB。得到的 FXD2, 1/3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38) 和 D1/2kpn-fo (SEQ ID NO: 20))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD1/2 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bkI10tripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD2, 1/2I10tripB。得到的 FXD2, 1/2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamD2-rev (SEQ ID NO: 38)和 D4kpn-fo (SEQ ID NO: 22))、经 Sfi I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXD2D4 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bkI10tripB 中，构建了表达载体 pT7H6FXD2D4I10tripB。得到的 FXD2D4 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 pBamHI-A5 (SEQ ID NO: 82)和 pKpnI-I162 (SEQ ID NO: 83))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 AD1D4-I162 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7-bktripB 中，构建了表达载体 pT7AD1D4-I162-tripB。得到的 AD1D4-I162-tripB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 84 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 pBamHI-A5 (SEQ ID NO: 82)和 pKpnI-GSS (SEQ ID NO: 85))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 AD1D4-GSS 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7-bktripB 中，构建了表达载体 pT7AD1D4-GSS-tripB。得到的 AD1D4-GSS-tripB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 86 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 pBamHI-A5 (SEQ ID NO: 82)和 pKpnI-D235 (SEQ ID NO: 87))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 AD1D4-D235 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7-bktripB 中，构建了表达载体 pT7AD1D4-D235-tripB。得到的 AD1D4-D235-tripB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 88 所示。

使用标准方法，通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech

Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 pBamHI-A5 (SEQ ID NO: 82)和 pKpnI-I162 (SEQ ID NO: 83))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 AD1D4-I162 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7-bkI10tripB 中, 构建了表达载体 pT7AD1D4-I162-I10-tripB。得到的 AD1D4-I162-I10-tripB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 89 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 pBamHI-A5 (SEQ ID NO: 83)和 pKpnI-GSS (SEQ ID NO: 85))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 AD1D4-GSS 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7-bkI10tripB 中, 构建了表达载体 pT7AD1D4-GSS-I10-tripB。得到的 AD1D4-GSS-I10-tripB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 90 所示。

使用标准方法, 通过将人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 pBamHI-A5 (SEQ ID NO: 83)和 pKpnI-D235 (SEQ ID NO: 87))、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 AD1D4-D235 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7-bkI10tripB 中, 构建了表达载体 pT7AD1D4-D235-I10-tripB。得到的 AD1D4-D235-I10-tripB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 91 所示。

使用标准方法, 通过将 cDNA (用寡核苷酸引物 pKpnI-V17 (SEQ ID NO: 92)和 pBAD6H (SEQ ID NO: 93))扩增的、经 Kpn I 和 Hind III 限制性消化的 DNA 片段 V17-TripB 连接到经 Kpn I 和 Hind III 切割的载体 pT7AD1D4-GSS-tripB 中, 构建了表达载体 pT7AD1D4-GSS-V17-tripB。得到的 AD1D4-GSS-V17-tripB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 94 所示。

使用标准方法, 通过将 cDNA (用寡核苷酸引物 pKpnI-V17 (SEQ ID NO: 92)和 pBAD6H (SEQ ID NO: 93))扩增的经 Kpn I 和 Hind III 限制性消化的 DNA 片段 V17-TripB 连接到经 Kpn I 和 Hind III 切割的载体 pT7AD1D4-D235-tripB 中, 构建了表达载体 pT7AD1D4-D235-V17-tripB。

得到的 AD1D4-D235-V17-tripB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 95 所示。

实施例 3

三聚体化的 TNFRII 片段 AD1D4-GSS-I10-TripB 的生产、再折叠和纯化

T7 RNA 聚合酶依赖性的表达质粒 pT7D1D4GSSI10 (能表达 TNFRII 衍生物 AD1D4-GSS-I10-TripB) 的构建如上面的实施例 2 所述。

如 Studier 和 Moffat, J. Mol. Biol., 189: 113-130, 1986 所述, 以中等规模 (6 x 1 升) 培养和表达大肠杆菌 BL21 细胞中的质粒 pT7AD1D4-GSS-I10, 生产了三聚体化的人 TNFRII 片段 AD1D4-GSS-I10 (SEQ ID NO: 109)。简言之, 在 37℃ 的指数生长培养物 (OD600 值为 0.8) 以感染复数约为 5 用噬菌体 λ -CE6 感染。在离心收集细胞之前, 培养物在 37℃ 再生长 3 小时。通过渗透压休克和超声处理裂解细胞, 将总细胞蛋白萃取到苯酚 (用 Tris-HCl 调节到 pH 8) 中。通过加入 2.5 倍体积的乙醇和离心, 从苯酚相中沉淀出蛋白。将蛋白沉淀溶解到含有 6 M 氯化胍、50 mM Tris-HCl pH 8 和 50 mM dithioerythriol 的缓冲液中。在 Sephadex G-25 (Amersham Biosciences) 上用 8 M 胍、0.5 M NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8 和 5 mM 2-巯基乙醇进行凝胶过滤后, 将粗蛋白制品应用到 Ni^{2+} 活化的 NTA-琼脂糖 (Qiagen, Germany) 柱上进行融合蛋白的纯化 (Hochuli 等, 1988), 在固定化到柱上时, 如 WO 94/18227 所述进行循环折叠过程。

在加入还原剂和/或使用之前, 将为液相色谱制备的所有缓冲液在真空下脱气。

在将粗蛋白提取物上样到 Ni^{2+} NTA-琼脂糖柱上后, 通过用 1 柱体积的上样缓冲液、随后用 6 M 氯化胍 (Guanidinium chloride)、50 mM Tris-HCl 和 5 mM 2-巯基乙醇洗涤, 直到柱洗出液在 280 nm 的光密度 (OD) 是稳定的, 从大肠杆菌和 λ 噬菌体蛋白主要部分中纯化出了融合蛋白 AD1D4-GSS-I10。

使用如表 1 所述的梯度方式, 用 0.5 M NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8

和 2 mM/0.2 mM 还原型/氧化型谷胱甘肽作为缓冲液 A，用 8 M 脲、0.5 M NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8 和 3 mM 还原型谷胱甘肽作为缓冲液 B，在 Ni^{2+} NTA-琼脂糖柱上重折叠融合蛋白。

循环折叠过程完成后，使用含有 8 M 脲、0.5 M NaCl、50 mM Tris-HCl 和 10 mM EDTA pH 8 的缓冲液，从 Ni^{2+} NTA-琼脂糖柱上洗脱下 AD1D4-GSS-I10 融合蛋白。

通过在 S-和 Q-Sepharose (Amersham Biosciences) 上的离子交换色谱，从二聚体和更高级的多聚体纯化出单体的 AD1D4-GSS-I10 融合蛋白：将洗脱缓冲液洗脱的融合蛋白(约 80%的融合蛋白物)在 Sephadex G-25 上凝胶过滤到含有 8 M 脲、10 mM Tris-HCl pH 8.0 和 25 mM NaCl 的缓冲液中，并应用到 S-Sepharose 离子交换柱上。将“穿过的”级分中的不结合蛋白直接上样到 Q-Sepharose 柱上。用从 8 M 脲、25 mM NaCl、10 mM Tris-HCl pH 8 至 8 M 脲、300 mM NaCl、10 mM Tris-HCl pH 8 的线性梯度，经 10 个柱体积，从 Q-Sepharose 柱洗脱出单体的 AD1D4-GSS-I10 融合蛋白。单体的 AD1D4-GSS-I10 融合蛋白在梯度的最开始处洗脱，而二聚体和更高级的多聚体较后洗脱。通过凝胶过滤到含有 10 mM HEPES pH 7.4 和 125 mM NaCl 的缓冲液中，将含有单体融合蛋白的级分复性和三聚体化。

表 3: 缓冲液梯度控制方案

步骤	时间(分钟)	流速(ml/分钟)	泵 A (%)	泵 B (%)
1	0.0	2.00	100.0	0.0
2	45.0	2.00	100.0	0.0
3	46.0	2.00	0.0	100.0
4	52.0	2.00	0.0	100.0
5	60.0	2.00	100.0	0.0
6	105.0	2.00	100.0	0.0
7	106.0	2.00	4.0	96.0
8	113.0	2.00	4.0	96.0
9	120.0	2.00	100.0	0.0
10	165.0	2.00	100.0	0.0
11	166.0	2.00	6.0	94.0

步骤	时间(分钟)	流速(ml/分钟)	泵 A (%)	泵 B (%)
12	172.0	2.00	6.0	94.0
13	180.0	2.00	100.0	0.0
14	225.0	2.00	100.0	0.0
15	226.0	2.00	8.0	92.0
16	232.0	2.00	8.0	92.0
17	240.0	2.00	100.0	0.0
18	285.0	2.00	100.0	0.0
19	286.0	2.00	10.0	90.0
20	292.0	2.00	10.0	90.0
21	300.0	2.00	100.0	0.0
22	345.0	2.00	100.0	0.0
23	346.0	2.00	12.0	88.0
24	352.0	2.00	12.0	88.0
25	360.0	2.00	100.0	0.0
26	405.0	2.00	100.0	0.0
27	406.0	2.00	14.0	86.0
28	412.0	2.00	14.0	86.0
29	420.0	2.00	100.0	0.0
30	465.0	2.00	100.0	0.0
31	466.0	2.00	16.0	84.0
32	472.0	2.00	16.0	84.0
33	480.0	2.00	100.0	0.0
34	525.0	2.00	100.0	0.0
35	526.0	2.00	18.0	82.0
36	532.0	2.00	18.0	82.0
37	540.0	2.00	100.0	0.0
38	585.0	2.00	100.0	0.0
39	586.0	2.00	20.0	80.0
40	592.0	2.00	20.0	80.0
41	600.0	2.00	100.0	0.0
42	645.0	2.00	100.0	0.0
43	646.0	2.00	22.0	78.0
44	652.0	2.00	22.0	78.0
45	660.0	2.00	100.0	0.0
46	705.0	2.00	100.0	0.0
47	706.0	2.00	24.0	76.0
48	713.0	2.00	24.0	76.0

步骤	时间(分钟)	流速(ml/分钟)	泵 A (%)	泵 B (%)
49	720.0	2.00	100.0	0.0
50	765.0	2.00	100.0	0.0
51	766.0	2.00	25.0	75.0
52	772.0	2.00	25.0	75.0
53	780.0	2.00	100.0	0.0
54	825.0	2.00	100.0	0.0
55	826.0	2.00	25.0	75.0
56	832.0	2.00	25.0	75.0
57	840.0	2.00	100.0	0.0
58	885.0	2.00	100.0	0.0
59	886.0	2.00	25.0	75.0
60	892.0	2.00	25.0	75.0
61	900.0	2.00	100.0	0.0
62	945.0	2.00	100.0	0.0
63	946.0	2.00	25.0	75.0
64	952.0	2.00	25.0	75.0
65	960.0	2.00	100.0	0.0
66	1005.0	2.00	100.0	0.0
67	1006.0	2.00	30.0	70.0
68	1012.0	2.00	30.0	70.0
69	1020.0	2.00	100.0	0.0
70	1065.0	2.00	100.0	0.0
71	1066.0	2.00	30.0	70.0
72	1072.0	2.00	30.0	70.0
73	1080.0	2.00	100.0	0.0
74	1125.0	2.00	100.0	0.0
75	1126.0	2.00	35.0	65.0
76	1132.0	2.00	35.0	65.0
77	1140.0	2.00	100.0	0.0
78	1185.0	2.00	100.0	0.0
79	1186.0	2.00	40.0	60.0
80	1192.0	2.00	40.0	60.0
81	1200.0	2.00	100.0	0.0
82	1245.0	2.00	100.0	0.0
83	1246.0	2.00	50.0	50.0
84	1252.0	2.00	50.0	50.0
85	1260.0	2.00	100.0	0.0

步骤	时间(分钟)	流速(ml/分钟)	泵 A (%)	泵 B (%)
86	1305.0	2.00	100.0	0.0
87	1306.0	2.00	60.0	40.0
88	1312.0	2.00	60.0	40.0
89	1319.0	2.00	100.0	0.0
90	1364.0	2.00	100.0	0.0
91	1365.0	2.00	60.0	40.0
92	1371.0	2.00	60.0	40.0
93	1378.0	2.00	100.0	0.0
94	1423.0	2.00	100.0	0.0

实施例 4

三聚体化的 TNFRII 片段 AD1D4-GSS-I10 的生物活性

在 L929 细胞实验中检测 TNF α 介导的细胞毒性的抑制, 检测三聚体化的 TNFRII 片段 AD1D4-GSS-I10 (如实施例 3 所述生产的) 的生物活性。

使用鼠成纤维细胞细胞系 L929 (ECACC no.: 85011425) 来检测 TNF α 介导的细胞毒性。将细胞维持在添加了 10% FBS 和抗生素(100 U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素)的 RPMI 1640 液体培养基(Biowhittaker, UK) 中。将细胞以 3×10^5 细胞/ml 涂布到含有 75 μ l/孔的 RPMI 1640 完全培养基的 96-孔平底微滴定平板(NUNC, Roskilde, Denmark) 中, 并在 37°C、在 5% CO₂ 中培养过夜。在补充了 2 μ g/ml 放线菌素 D (Sigma) 的完全 RPMI 1640 培养基中, 将重组人 TNF α (rhTNF α , RD Systems, UK) (1 ng/ml 和 0.1 ng/ml) 与各种浓度(10-倍稀释液)的三聚体化受体片段(AD1D4-GSS-I10)在 37°C、在 5% CO₂ 中孵育 1 小时。此后, 将 75 μ l/孔的 TNF- α /三聚体化受体片段混合物添加到细胞培养物中, 在 37°C、在 5% CO₂ 中孵育过夜。一式三份地测试了每种浓度的 TNF- α /受体片段混合物。使用 MTT (3-[4, 5-二甲基-噻唑-2-基]-2, 5-二-苯基-四唑鎓溴化物) 作为 CellTiter 96 非放射性细胞增殖测试试剂盒(Promega)的一部分, 检测了细胞增殖。为了制备足以用于一个 96 孔平板(含有在 150 μ l 体积中培养的细胞)的试剂, 将 3.0 ml MTS 溶液加入到 150 μ l PMS 中。加入 30 μ l/孔的组合的 MTS/PMS 溶液, 在使用 ELISA 平板读数器在 492 nm

记录吸光度之前, 将平板在 37°C、在 5% CO₂ 中孵育 1-4 小时。在每个实验中, 还包括 TNF α 和细胞的对照组、单独的细胞和缓冲液对照组。

实验结果总结在图 4 中。在存在最高浓度的 AD1D4-GSS-I10 的情况下 TNF α 的细胞毒性作用受到显著抑制, 因而证实了该化合物的生物学活性。

实施例 5

使用 D2E7 抗体片段设计、构建和生产三聚 TNF 结合物

选择了人化抗体 D2E7 的单链抗体可变区片段(scFv)作为结合物用于构建能结合 TNF 的三聚多肽基于 US 6, 090, 382 公开的序列, 通过扩增 D2E7 的 VH 和 VL 域, 可以构建三聚结合物。

含有位于 N-末端 scFv 和 C-末端三聚化结构域之间的 Gly, Thr 接头的三聚 D2E7 scFv 的设计和构建

以 2 个步骤构建表达载体 pT7H6FXD2E7tripB。第一步是构建 pT7H6FX (D2E7VH) tripB。通过将从含有 D2E7 序列的 DNA 扩增的(用寡核苷酸引物 FXVH (SEQ ID NO: 45)和 VHBamKpn (SEQ ID NO: 46))、经 Bgl II 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FX(D7E2VH)连接到经 BamH I Kpn I 切割的 pT7H6bktripB 载体中, 构建出该载体。第二步是, 通过将从含有 D2E7 序列的 DNA 扩增的(用寡核苷酸引物 G4SVL (SEQ ID NO: 47)和 VLkpn (SEQ ID NO: 48))、经 BamH I Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 G4SVL 连接到经 BamH I Kpn I 切割的 pT7H6FX(D2E7VH)tripB 载体中, 构建出 pT7H6FXD2E7tripB。得到的 FXD2E7 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 49 所示。

含有位于 N-末端 scFv 和 C-末端三聚化结构域之间的 Gly, Gly, Gly, Gly, Ser, Gly, Thr 接头的三聚 D2E7 scFv 的设计和构建

以 2 个步骤构建表达载体 pT7H6FXD2E7G4StripB。第一步是, 通过将从含有 D2E7 序列的 DNA 扩增的((用寡核苷酸引物 FXVH (SEQ ID NO: 45)和 VHBamKpn (SEQ ID NO: 46))、经 Bgl II 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FX(D7E2VH)连接到经 BamH I Kpn I 切割的 pT7H6bktripB 载体中, 构建出 pT7H6FX(D2E7VH)tripB。第二步是, 通过将从含有 D2E7 序列的

DNA 扩增的(用寡核苷酸引物 G4SVL (SEQ ID NO: 47)和 VLG4Skpn (SEQ ID NO: 50))、经 BamH I Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 G4SVL 连接到经 BamH I Kpn I 切割的 pT7H6FX(D2E7VH)tripB 载体中, 构建出 pT7H6FXD2E7tripB。得到的 FXD2E7G4S 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示。

含有位于 N-末端三聚化结构域和 C-末端 scFv 之间的 Gly, Ser 接头的三聚 D2E7 scFv 的设计和构建

使用标准方法, 通过将从 pT7H6FXD2E7G4StripB 扩增的(用寡核苷酸引物 bc1VH (SEQ ID NO: 52)和 VLhind (SEQ ID: 53))、经 Bcl I 和 Hind III 限制性消化的 DNA 片段连接到经 BamH I 和 Hind III 切割的载体 pT76HFXtripa (Lorentsen, RH. 等, Biochem J.; 347: 83-87, 2000)中, 构建出表达载体 pT76HFXTripAGSD2E7。得到的 GSD2E7 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示。

含有位于 N-末端三聚化结构域和 C-末端 scFv 之间的 Gly, Ser, Gly, Gly, Gly, Ser 接头的三聚 D2E7 scFv 的设计和构建

使用标准方法, 通过将从 pT7H6FXD2E7G4StripB 扩增的(用寡核苷酸引物 bc1G4SVH (SEQ ID NO: 55)和 VLhind (SEQ ID: 53))、经 Bcl I 和 Hind III 限制性消化的 DNA 片段连接到经 BamH I 和 Hind III 切割的载体 pT76HFXtripa (Lorentsen, RH. 等, Biochem J.; 347: 83-87, 2000)中, 构建出表达载体 pT76HFXTripAG4SD2E7。得到的 G4SD2E7 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示。

为了制备上面的融合蛋白 H6FXD2E7tripB, H6FXD2E7G4StripB, H6FXTripAD2D7TripA 和 H6FxFripAG4SD2E7, 如 Studier 等(1990)所述, 使 质 粒 pT7H6FXD2E7tripB, pT7H6FXD2E7G4StripB, pT7H6FXTripAD2D7TripA 和 pT7H6FxFripAG4SD2E7 在大肠杆菌 BL21 细胞中小规模地生长(1 升; 2xTY 培养基, 5 mM MgSO₄和 100 μ g 氨苄青霉素)。在 37℃指数生长的培养物(OD₆₀₀ 值为 0.8)以感染复数约为 5 用噬菌体 λ CE6 进行感染。使培养物在 37℃再生长 3 小时, 通过离心收集细胞。将细胞重新悬浮在 50 ml 0.5 M NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8 和 1 mM EDTA

pH 8 中。向每份中加入苯酚(50 ml, 调节至 pH 8), 超声处理混合物, 以提取总蛋白。进行离心澄清(25 分钟, 10.000 g)后, 通过加入 2.5 体积的乙醇和离心, 使粗蛋白级分从苯酚相中沉淀出来。将蛋白沉淀溶解到含有 6 M 氯化胍、50 mM Tris-HCl pH 8 和 0.1 M dithioerythriol 的缓冲液(15-25 ml)中。在 Sephadex G-25 (Pharmacia, Sweden) 上凝胶过滤到 8 M 脲、1M NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8 和 10 mM 2-巯基乙醇中后, 将粗蛋白制品应用到 Ni 活化的 NTA-琼脂糖柱(75 ml 柱体积)上进行纯化(Hochuli 等, 1988)。然后使洗涤缓冲液(6 M 脲-HCl, 50 mM Tris-HCl pH 8 和 10 mM 2-巯基乙醇)流经柱, 直到得到稳定的基线值。

然后对每个柱应用 pH 梯度(1000 ml, 8 M 脲和 10 mM 2-巯基乙醇中的梯度, 通过线性(每体积)混合含有 50 mM 磷酸二氢钠(pH 5 缓冲液)和 50 mM 磷酸氢二钠(pH 8 缓冲液)的溶液得到), 洗脱基本纯的融合蛋白。

为了通过 Thøgersen 等(WO 94/18227)的方法进行体外重折叠, 将 20 mg 每种纯化的融合蛋白在重折叠"缓冲液 B"(如下所述)中与足以产生约 75 ml 填充床体积柱的 Ni^{2+} 活化 NTA-琼脂糖基质悬浮液的等份试样混合成悬浮液。然后对每种融合蛋白如 WO 94/18227 中关于纤溶酶原 kringle 4 所述进行反复的重折叠过程, 但是使用含有 0.5 M NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM 谷胱甘肽和 0.2 mM 氧化型谷胱甘肽的缓冲液作为"缓冲液 A", 使用含有 8 M 脲、1 M NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8 和 2 mM 谷胱甘肽的缓冲液作为"缓冲液 B", 在 10℃ 进行含有融合蛋白的 scFv 的重折叠。

完成重折叠过程后, 用 300 ml 含有 0.5 M NaCl 和 50 mM Tris-HCl pH 8 的缓冲液洗涤每个柱, 以洗去谷胱甘肽。然后用 20 mM EDTA, 0.5 M NaCl 和 50 mM Tris-HCl pH 8 将每种蛋白的重折叠部分从 NTA-琼脂糖中洗脱到洗脱缓冲液中。向每种蛋白样品中加入固态脲达到约 8 M 的终浓度、并通过稀释或透析将 NaCl 浓度降低到 5 mM 以下以后, 再通过离子交换色谱(S-Sepharose, Pharmacia, 1,6 (i.d.)), 经 90 厘米柱, 在含有 8 M 脲、5 mM Tris-HCl (来自 1 M 贮液、pH 8)和 25 mM 醋酸钠(来

自 1 M 贮液、pH 5) 的缓冲液中, 以 2 ml/min 洗脱, 对每种正确折叠的融合蛋白产物进行最终的纯化。在水性缓冲液 (例如磷酸盐缓冲的盐水) 中透析后, 回收每种纯的和正确地重折叠的融合蛋白, 其产率为 2-6 mg/升生长培养物。

实施例 6

使用 TNFRSF13B 受体片段设计和构建三聚的 APRIL 结合物

使用 APRIL 受体 TNFRSF13B, 并基于源自 tetranectin 的三聚化结构域 TripB, 构建针对三聚细胞因子 APRIL 的三聚结合物。具有不同接头的这样的结合物的设计和克隆如下所述:

TNFRSF13B6 的克隆

以 2 个步骤构建表达载体 pT7H6FXTNFRS13B6tripB。第一步是, 使用标准方法, 通过将从人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 bglIIIFXΔTNFRSF13B (SEQ ID NO: 57) 和 ΔTNFRSF13Bkpn: (SEQ ID NO: 58))、经 Bgl II 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXΔTNFRSF13B 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 pT7H6-bktripB 中, 构建 pT7H6FXΔTNFSF13B。第二步是, 使用标准方法, 通过将从人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸引物 kpnΔTNFSF13B (SEQ ID NO: 59) 和 ΔTNFSF13B6kpn (SEQ ID NO: 60))、经 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 ΔTNFRSF13B6 连接到经 Kpn I 切割的 pT7H6FXΔTNFSF13B 载体中, 构建出最终的表达载体 pT7H6FXTNFRSF13B6tripB。得到的 FXTNFRSF13B6 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 61 所示。

TNFRSF13B10 的克隆

以 2 个步骤构建表达载体 pT7H6FXTNFRS13B10tripB。第一步是, 使用标准方法, 通过将从人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的 (用寡核苷酸

引物 bglIiFXΔTNFRSF13B (SEQ ID NO: 57) 和 ΔTNFRSF13Bkpn (SEQ ID NO: 58))、经 Bgl II 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXΔTNFRSF13B 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中, 构建出 pT7H6FXΔTNFRSF13B。第二步是, 使用标准方法, 通过将从人骨髓和人白细胞(Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 kpnΔTNFSF13B (SEQ ID NO: 59) 和 ΔTNFSF13B10kpn (SEQ ID NO: 62))、经 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 ΔTNFSF13B10 连接到经 Kpn I 切割的 pT7H6FXΔTNFRSF13B 载体中, 构建出最终的表达载体 pT7H6FXTNFRSF13B10tripB。得到的 FXTNFRSF13B10 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 63 所示。

TNFRSF13B20 的克隆

以 2 个步骤构建表达载体 pT7H6FXTNFRS13B20tripB。第一步是, 使用标准方法, 通过将从人骨髓和人白细胞(Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bglIiFXΔTNFRSF13B (SEQ ID NO: 57) 和 ΔTNFRSF13Bkpn (SEQ ID NO: 58))、经 Bgl II 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXΔTNFSF13B 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中, 构建出 pT7H6FXΔTNFRSF13B。第二步是, 使用标准方法, 通过将从人骨髓和人白细胞(Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 kpnΔTNFRSF13B (SEQ ID NO: 59) 和 ΔTNFRSF13B20kpn (SEQ ID NO: 64))、经 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 ΔTNFSF13B20 连接到经 Kpn I 切割的 pT7H6FXΔTNFRSF13B 载体中, 构建出最终的表达载体 pT7H6FXTNFRSF13B20tripB。得到的 FXTNFRSF13B20 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 65 所示。

TNFRSF13B30 的克隆

以 2 个步骤构建表达载体 pT7H6FXTNFRS13B30tripB。第一步是, 使用标准方法, 通过将从人骨髓和人白细胞(Clontech Laboratories, Inc

目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bglIIIFXΔTNFRSF13B (SEQ ID NO: 57)和 ΔTNFRSF13Bkpn (SEQ ID NO: 58))、经 Bgl II 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXΔTNFRSF13B 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中, 构建出 pT7H6FXΔTNFRSF13B。第二步是, 使用标准方法, 通过将从人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 kpnΔTNFRSF13B (SEQ ID NO: 59)和 ΔTNFRSF13B30kpn (SEQ ID NO: 66))、经 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 ΔTNFRSF13B30 连接到经 Kpn I 切割的 pT7H6FXΔTNFRSF13B 载体中, 构建出最终的表达载体 pT7H6FXTNFRSF13B30tripB。得到的 FXTNFRSF13B30 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 67 所示。

TNFRSF13B61 的克隆

以 2 个步骤构建表达载体 pT7H6FXTNFRS13B61tripB。第一步是, 使用标准方法, 通过将从人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bglIIIFXΔTNFRSF13B (SEQ ID NO: 57)和 ΔTNFRSF13Bkpn (SEQ ID NO: 58))、经 Bgl II 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXΔTNFRSF13B 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中, 构建出 pT7H6FXΔTNFRSF13B。第二步是, 使用标准方法, 通过将从人骨髓和人白细胞 (Clontech Laboratories, Inc 目录号 7181-1 和 7182-1) 的混合物分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 kpnΔTNFRSF13B (SEQ ID NO: 59)和 ΔTNFRSF13B61kpn (SEQ ID NO: 68))、经 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 ΔTNFRSF13B61 连接到经 Kpn I 切割的 pT7H6FXΔTNFRSF13B 载体中, 构建出最终的表达载体 pT7H6FXTNFRSF13B61tripB。得到的 FXTNFRSF13B61 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 69 所示。

实施例 7

使用 TNFRSF Fn14 受体片段设计和构建三聚 TWEAK 结合物

使用 TWEAK 受体 TNFRSF Fn14, 并基于源自 tetranectin 的三聚化结构域 TripB 构建针对三聚细胞因子 TWEAK 的三聚结合物。该结合物的设计和克隆如下所述:

使用标准方法, 通过将从小心脏(Clontech Laboratories, Inc 目录号 7121-1) 分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bamFn-rev (SEQ ID NO: 70)和 FNkpn-fo (SEQ ID NO: 71)、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FxFn14 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中, 构建出表达载体 pT7H6FxFn14tripB。得到的 FxFn14 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 72 所示。

实施例 8

使用 TNFRSF13C 受体片段设计和构建三聚 BAFF 结合物

使用 BAFF 受体 TNFRSF13B, 并基于源自 tetranectin 的三聚化结构域 TripB 构建针对相应三聚细胞因子 BAFF 的三聚结合物。该结合物的设计和克隆如下所述:

三聚 TNFRSF13C 片段的克隆

使用标准方法, 通过将从小淋巴结(Clontech Laboratories, Inc 目录号 7164-1) 分离出的 cDNA 扩增的(用寡核苷酸引物 bam13C-rev (SEQ ID NO: 73)和 13Ckpn-fo (SEQ ID NO: 74)、经 BamH I 和 Kpn I 限制性消化的 DNA 片段 FXTNFRSF13C 连接到经 BamH I 和 Kpn I 切割的载体 PT7H6-bktripB 中, 构建了表达载体 pT7H6FXTNFSF13CtripB。得到的 FXTNFRSF13C 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 75 所示。

实施例 9

TNF 的三聚体化 CTLD 结合物的分离和构建

使用如以前在 WO/0248189 中公开的 Tetranectin (SEQ ID NO: 96) C-型凝集素-样结构域(CTLD)的支架结构来分离和构建三聚细胞因子 TNF (TNF α) 的三聚结合单元。结合单元的设计和克隆如下所述:

文库构建和初步筛选

使用噬菌体展示来分离 TNF CTLD 结合物。使用的噬菌体展示文库是基于 tetranectin 的单价 CTLD 形式 (SEQ ID NO: 97)。

组合文库 PhtCTL D-1b003 (WO/0248189, 实施例 5) 和与 PhtCTL D-1b003 的基本相同地制成的文库变体, 该文库变体在装配反应中包括针对环 1 的两个额外随机化的寡核苷酸: 在 tetranectin (SEQ ID NO: 98) 的氨基酸残基位点 116-122 随机化的 TN-lib3-tprev 和 TN-lib2-tprev (SEQ ID NO: 99) 和针对环 4 的两个额外寡核苷酸: 在位点 146-149 随机化的 TN-lib3-tpfo (SEQ ID NO: 100) 和 TN-lib2-tpfo (SEQ ID NO: 101)。使用约 1×10^{12} 个噬菌体作为输入, 进行了 2 轮筛选, 在第一轮淘选中使用 10 $\mu\text{g/ml}$ 生物素化的-TNF, 在第二轮淘选使用 1 $\mu\text{g/ml}$ 。

如下进行筛选: 在 1 ml PBS (PBS, 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4 , 8 g NaCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$, 用水补加至 1 L, 并用 NaOH 调节至 pH 7.4) 中洗涤 20 μl 链霉抗生物素蛋白包被的顺磁珠 (Dyna1) 2 次, 在室温下、在 3% 脱脂奶粉中封闭 1 小时。将在 3% 脱脂奶粉/PBS 中的 250 μl 预封闭噬菌体与 250 μl 可溶的生物素化 TNF 混合, 使之在 37°C 孵育 30 分钟。在 PBS, 0.1% Tween 20 中洗涤 1 次、在 PBS 中洗涤 2 次链霉抗生物素蛋白珠后, 将它们加入反应物中, 以捕获结合了抗原的噬菌体。用 PBS、0.1% Tween 20 和 PBS 进一步洗涤珠子, 用 200 μl 50 mM dithiothreitol, 将结合了抗原的噬菌体从珠子上洗脱 30 分钟。用洗脱的噬菌体重新感染指数生长的大肠杆菌 TG1 细胞, 然后涂布平板, 并在含有 2% 葡萄糖和 0.1 mg/ml 氨苄青霉素的 2xTY 琼脂平板上滴定。

基本上按照 WO/0248189 所述, 通过在 ELISA 中分析与 TNF α 的结合而从选择的群体中筛选出单个克隆, 只是在 ELISA 中用于覆盖的抗原是 5 $\mu\text{g/ml}$ TNF。

在第 2 轮筛选中分离出了称作 TN3-2 的特异性 TNF α 结合物 (表 4)。

次级文库构建和亲合力驱动的筛选

研究了向 TN3-2 引入新的序列变化是否能提高 TN3-2 的 TNF 亲合力。为了构建 TN3-2 突变体文库, 使用 TN3-2 克隆作为模板, 使用寡核苷酸

TN-lib2-tpfo (SEQ ID NO:101)和 TN-lib3-tpfo (SEQ ID NO:100) 在环 4 中进行新的随机化(Lib. TN3-2 loop4 r)。基本上按照 WO/0248189 所述进行文库构建。

在含有递减浓度的生物素化 TNF (100 ng/ml 至 0.1 ng/ml)的 3 轮亲合力驱动筛选中使用了 TN3-2loop4r 文库。如上所述进行选择。如上所述筛选阳性克隆。

结论

亲本克隆 TN3-2 的序列与 tetranectin 在环 1(Tetranectin 氨基酸号 116-122)和环 4(Tetranectin 氨基酸号 146-149)中有所不同。对 TN3-2loop4r 文库进行 3 轮亲合力驱动筛选后，通过 ELISA 分析鉴别出阳性克隆，显示出 48 个克隆中的 45 个能结合 TNF α 。选出的一种鉴定的 TNF α 结合克隆的环 1 和环 4 序列以及它们对应的 SEQ ID NO 如表 4 所示(TN3-2-B, TN3-2-C, TN3-2-D)。

表 4: 亲本克隆 TN3-2 的环 1 和环 4 中的氨基酸序列和从文库 TN3-2loop4r 分离出的 3 个亲合力成熟化克隆

克隆	SEQ ID	环 1 序列	环 4 序列	其它突变 ^a
Tetranectin	SEQ ID NO: 96	DMAAEGT	GCKT	
TN3-2	SEQ ID NO: 102	KVRSRYF	PRHT	V124 至 M
TN3-2-B	SEQ ID NO: 103	KVRSRYF	PTNN	V124 至 M, D165 至 G
TN3-2-C	SEQ ID NO: 104	KVRSRYF	PTNR	
TN3-2-D	SEQ ID NO: 105	KVRSRYF	PNNR	V124 至 I, D165 至 G

^a tetranectin 的环 4 序列之外的突变

实施例 10

TNF 的三聚体化 CTLD 结合物的亲合力检测

将按照实施例 7 所述分离出的编码单体 CTLD TNF α 结合物的 DNA 插入片段亚克隆进大肠杆菌 pBAD 表达载体(Invitrogen Corp., USA)中。使重组单体 TNF α 结合物在大肠杆菌中表达，并根据生产商的说明书从周质中纯化。在 BiaCore 上进行分析之前，将纯化的单体在 10 mM Tris

pH 8.0、150 mM NaCl、2 mM CaCl₂中透析。

为了表达 TNF α 结合物的三聚形式，使用限制性内切核酸酶 Bgl II 和 Mun I 切割编码 TNF α 结合物的合适 DNA 插入片段(来自实施例 7)，并将含有环 1 和 4 的 DNA 片段亚克隆进经 Bgl II Mun I 限制性消化的大肠杆菌 pT7H6FX-htlec DNA (如 WO 02/48189 中的实施例 1 和图 5 所述)中。

在大肠杆菌中表达了重组的三聚 TNF α 结合物，基本上按照 WO 94/18227 的实施例 9 所述纯化未折叠的融合蛋白衍生物。

简而言之，通过将融合蛋白上样到处于 8 M 脲、50 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl、5 mM 2-巯基乙醇中的带 Ni²⁺的次氨基三醋酸(NTA)柱上，进行 TNF α 结合物的重折叠。上样以后，对柱进行循环重折叠过程。使用的重折叠缓冲液是：复性缓冲液 A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM 还原型谷胱甘肽和 0.2 mM 氧化型谷胱甘肽)和变性缓冲液 B (8 M 脲, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 3 mM 还原型谷胱甘肽)。使用 50 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl、10 mM EDTA，将重折叠的融合蛋白从柱上洗脱下来，使用牛凝血因子 Xa (Protein Engineering Technology, Aarhus, Denmark)，以 1:100 (w/w)、在 4℃ 切割融合蛋白过夜。通过在 Sephadex G25 上进行凝胶过滤，将切割后的蛋白换入 8 M 脲、25 mM 醋酸钠缓冲液 (pH 5)、50 mM NaCl、1 mM Tris-HCl 缓冲液中，并上样到 10 ml SP-Sepharose 柱 (Amersham Biosciences)上，用 50 mM 至 500 M NaCl 经 20 个柱体积进行梯度洗脱。通过非还原性 SDS/PAGE 分析进行判断，收集含有切割的单体蛋白的级分并合并，通过在 PD10 柱 (Amersham Biosciences)上的凝胶过滤将缓冲液换成 10 mM Tris pH 8.0、150 mM NaCl、2 mM CaCl₂。

在 BIAcore 3000 装置 (BiaCore, Sweden)上进行了表面等离子体共振 (SPR) 结合分析。将要固定化的 TNF α 捕获抗体 (AHC3712, Biosource International)溶解到 10 mM 醋酸钠 pH 5.0 中，并使用胺耦连试剂盒 (BiaCore, Sweden)固定到 CM5 BiaCore 传感器芯片上。

以 5 μ l/min 的流速进行结合分析。在将蛋白样品上样之前，将芯片

在 10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 50 μ M EDTA 和 0.005% 表面活性剂 P20 中平衡。将 TNF α 以 10 μ g/mL 的浓度溶解到 10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ 中, 并注射 10 μ L。使用 KINJECT 选项, 注射单体或三聚形式的 TNF α 结合物的等份试样 (20 μ l) 进行 5 分钟的解离, 然后用 10mM 甘氨酸 pH 2.5 再生芯片。在从 1 至 200 nM 的 6 个不同蛋白浓度下测试 TNF α 结合物的结合。使用 BIA 评价程序 3.2 版 (BiaCore) 评价结合数据。

表 5 显示了来自 BiaCore 数据的动力学值。从单体结合物至相应的三聚结合物 (TN-2-B, TN-2-C 和 TN-2-D) 有亲合力的增加倍数, 显示了将 TNF α 结合物 TN3-2-B, TN3-2-C, TN3-2-D 三聚体化的亲合力作用。

表 5

克隆	SEQ ID	$k_{on} M^{-1}s^{-1} *$	$k_{off} s^{-1}$	K_D^{obs}	增加倍数
TN-2-B (三聚的)	SEQ ID NO: 106	3.02×10^6	7.36×10^{-4}	0.24 nM	304
TN3-2-B (单体的)	SEQ ID NO: 103	1.4×10^7	0.923	73 nM	n. a.
TN-2-D (三聚的)	SEQ ID NO: 107	5.06×10^5	2.07×10^{-3}	4.1 nM	12
TN3-2-D (单体的)	SEQ ID NO: 105	3.64×10^5	0.0185	50 nM	n. a.
TN-2-C (三聚的)	SEQ ID NO: 108	8.84×10^5	3.53×10^{-3}	4 nM	37
TN3-2-C (单体的)	SEQ ID NO: 104	1.34×10^5	0.022	150 nM	n. a.

通过将 TNF α 结合物三聚体化, 亲合力 (K_D) 有了显著增长。例如, 单体的 TN3-2-B 具有非常差的 k_{off} 值。与此相反, 同一 CTLD 结合物的三聚形式 (TN-2-B) 的 k_{off} 值提高了超过 1000 倍。总体上可以看出, 三聚体化能将解离速度提高数倍。而且, 实施例 7 的低亲合力亲本克隆 TN3-2 仅能以其三聚形式在 BiaCore 上检测到, 因为其单体的亲合力低于检测限度。

参考文献

Studier 和 Moffat (1986), Journal of Molecular Biology 189: 113-130.

Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. 和 St ü ber, D. (1988), Bio/Technology 6:1321-1325.

Lorentsen, RH. 等 (2000) Biochemical Journal 347:83-87.

<110> Borean Pharma A/S
 <120> 三聚细胞因子的三聚结合蛋白
 <130> 3005
 <160> 109
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 1
 ctgccatgcg gccgccttca gggagaccgt ctg 33
 <210> 2
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 2
 gtgaccaggc ccagccggcc atgtaagtag ctaaggtagc gagccaccaa cccagaag 58
 <210> 3
 <211> 197
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 3
 ggcccagccg gccatgtaag tagctaaggt accgagccac caacccagaa gcccagaag 60
 attgtaaatg ccaagaaaga tggtgtgaac acaaagatgt ttgaggagct caagagccgt 120
 ctggacaccc tggcccagga ggtggccctg ctgaaggagc agcaggccct gcagacggtc 180
 tccctgaagg cggccgc 197
 <210> 4
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 4
 gtgaccaggc ccagccggcc atgtaagtag ctaaggtagc attgtaaatg ccaagaaaga 60
 tg 62
 <210> 5
 <211> 170
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 5
 ggcccagccg gccatgtaag tagctaaggt accattgtaa atgccaagaa agatgttgtg 60
 aacacaaaga tgtttgagga gctcaagagc cgtctggaca ccctggccca ggaggtggcc 120
 ctgctgaagg agcagcaggc cctgcagacg gtctccctga aggcggccgc 170

<210>	6		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	6		
	ctgccataag cttacttcag ggagaccgtc tg		32
<210>	7		
<211>	51		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	7		
	gtgaccagga tccatgtaag tagctaaggt accgagccac caaccagaa g		51
<210>	8		
<211>	191		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	8		
	ggatccatgt aagtagctaa ctgcaggtga gccaccaacc cagaagccca agaagattgt		60
	aaatgccaaag aaagatgttg tgaacacaaa gatgtttgag gagctcaaga gccgtctgga		120
	caccctggcc caggaggtgg ccctgctgaa ggagcagcag gccctgcaga cggctctccct		180
	gaagtaagct t		191
<210>	9		
<211>	55		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	9		
	gtgaccagga tccatgtaag tagctaaggt accattgtaa atgccaagaa agatg		55
<210>	10		
<211>	162		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	10		
	ggatccatgt aagtagctaa ggtaccattg taaatgccaa gaaagatgtt gtgaacacaa		60
	agatgtttga ggagctcaag agccgtctgg acaccctggc ccaggaggtg gccctgctga		120
	aggagcagca ggcctgcag acggtctccc tgaagtaagc tt		162
<210>	11		
<211>	44		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	11		
	gtgaccaggc ccagccggcc atggccggga gcacatgccg gctc		44
<210>	12		

<211>	34		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	12		
	cgtgctgggt accggtgcag atgcggttct gttc		34
<210>	13		
<211>	274		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	13		
	ggcccgccg gccatggccg ggagcacatg ccggctcaga gaatactatg accagacagc		60
	tcagatgtgc tgcagcaagt gctcgccggg ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac		120
	ctcggacacc gtgtgtgact cctgtgagga cagcacatac acccagctct ggaactgggt		180
	tcccgagtgc ttgagctgtg gctcccgctg tagctctgac caggtggaaa ctcaagcctg		240
	cactcgggaa cagaaccgca tctgcaccgg tacc		274
<210>	14		
<211>	39		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	14		
	cgtgctgggt accgggccta gcggtgcaga tgcggttct		39
<210>	15		
<211>	283		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	15		
	ggcccgccg gccatggccg ggagcacatg ccggctcaga gaatactatg accagacagc		60
	tcagatgtgc tgcagcaagt gctcgccggg ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac		120
	ctcggacacc gtgtgtgact cctgtgagga cagcacatac acccagctct ggaactgggt		180
	tcccgagtgc ttgagctgtg gctcccgctg tagctctgac caggtggaaa ctcaagcctg		240
	cactcgggaa cagaaccgca tctgcaccgc taggcccggt acc		283
<210>	16		
<211>	31		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	16		
	cgtgctgggt acccgcgag taccagccgg g		31
<210>	17		
<211>	298		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	17		
	ggcccgccg gccatggccg ggagcacatg ccggctcaga gaatactatg accagacagc		60

```

tcagatgtgc tgcagcaagt gctcgccggg ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac 120
ctcggacacc gtgtgtgact cctgtgagga cagcacatac acccagctct ggaactgggt 180
tcccagagtgc ttgagctgtg gctcccgtg tagctctgac caggtggaaa ctcaagcctg 240
cactcgggaa cagaaccgca tctgcacctg caggcccggc tggtagctgc cgggtacc 298

```

```

<210> 18
<211> 29
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 18
cgtgctgggt accctcctgc ttgctcagc 29

```

```

<210> 19
<211> 316
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 19
ggcccagccg gccatggccg ggagcacatg ccggctcaga gaatactatg accagacagc 60
tcagatgtgc tgcagcaagt gctcgccggg ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac 120
ctcggacacc gtgtgtgact cctgtgagga cagcacatac acccagctct ggaactgggt 180
tcccagagtgc ttgagctgtg gctcccgtg tagctctgac caggtggaaa ctcaagcctg 240
cactcgggaa cagaaccgca tctgcacctg caggcccggc tggtagctgc cgctgagcaa 300
gcaggagggg ggtacc 316

```

```

<210> 20
<211> 44
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 20
cgtgctgggt acctgcagcc agccgagccc cctcctgctt gctc 44

```

```

<210> 21
<211> 331
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 21
ggcccagccg gccatggccg ggagcacatg ccggctcaga gaatactatg accagacagc 60
tcagatgtgc tgcagcaagt gctcgccggg ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac 120
ctcggacacc gtgtgtgact cctgtgagga cagcacatac acccagctct ggaactgggt 180
tcccagagtgc ttgagctgtg gctcccgtg tagctctgac caggtggaaa ctcaagcctg 240
cactcgggaa cagaaccgca tctgcacctg caggcccggc tggtagctgc cgctgagcaa 300
gcaggagggg gctcggctgg ctgcaggtac c 331

```

```

<210> 22

```

<211>	31		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	22		
cgtgctgggt	accggacgtg	gacgtgcaga	c 31
<210>	23		
<211>	529		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	23		
ggcccagccg	gccatggccg	ggagcacatg	cgggctcaga gaatactatg accagacagc 60
tcagatgtgc	tgcagcaagt	gctcgccggg	ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac 120
ctcggacacc	gtgtgtgact	cctgtgagga	cagcacatac acccagctct ggaactgggt 180
tcccgagtgc	ttgagctgtg	gctcccgtg	tagctctgac caggtggaaa ctcaagcctg 240
cactcgggaa	cagaaccgca	tctgcacctg	caggcccggc tggtagtgcg cgctgagcaa 300
gcaggagggg	tgccggctgt	gcgcgccgt	gcgcaagtgc cgcccgggct tcggcgtggc 360
cagaccagga	actgaaacat	cagacgtggt	gtgcaagccc tgtgccccgg ggacgttctc 420
caacacgact	tcatccacgg	atatttgag	gccccaccag atctgtaacg tgggtggccat 480
ccctgggaat	gcaagcaggg	atgcagtctg	cacgtccacg tccggtacc 529
<210>	24		
<211>	44		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	24		
gtgaccaggc	ccagccggcc	atggccgact	cctgtgagga cagc 44
<210>	25		
<211>	157		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	25		
ggcccagccg	gccatggccg	actcctgtga	ggacagcaca tacaccagc tctggaactg 60
ggttcccag	tgtttgagct	gtggctcccg	ctgtagctct gaccaggtgg aaactcaagc 120
ctgcactcgg	gaacagaacc	gcattctgac	cggtacc 157
<210>	26		
<211>	166		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	26		
ggcccagccg	gccatggccg	actcctgtga	ggacagcaca tacaccagc tctggaactg 60
ggttcccag	tgtttgagct	gtggctcccg	ctgtagctct gaccaggtgg aaactcaagc 120
ctgcactcgg	gaacagaacc	gcattctgac	cgctaggccc ggtacc 166

<210> 27
 <211> 182
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 27
 ggcccagccg gccatggcct gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact 60
 gggttcccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccagggtg gaaactcaag 120
 cctgcactcg ggaacagaac cgcactctgca cctgcaggcc cggctgggtac tgcgcgggta 180
 cc 182

<210> 28
 <211> 199
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 28
 ggcccagccg gccatggccg actcctgtga ggacagcaca tacaccagc tctggaactg 60
 ggttcccagag tgcttgagct gtggctcccg ctgtagctct gaccagggtg aaactcaagc 120
 ctgcactcgg gaacagaacc gcatctgcac ctgcaggccc ggctgggtact gcgcgctgag 180
 caagcaggag gggggtacc 199

<210> 29
 <211> 214
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 29
 ggcccagccg gccatggccg actcctgtga ggacagcaca tacaccagc tctggaactg 60
 ggttcccagag tgcttgagct gtggctcccg ctgtagctct gaccagggtg aaactcaagc 120
 ctgcactcgg gaacagaacc gcatctgcac ctgcaggccc ggctgggtact gcgcgctgag 180
 caagcaggag ggggctcggc tggctgcagg tacc 214

<210> 30
 <211> 412
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 30
 ggcccagccg gccatggccg actcctgtga ggacagcaca tacaccagc tctggaactg 60
 ggttcccagag tgcttgagct gtggctcccg ctgtagctct gaccagggtg aaactcaagc 120
 ctgcactcgg gaacagaacc gcatctgcac ctgcaggccc ggctgggtact gcgcgctgag 180
 caagcaggag gggtgccggc tgtgcgcgcc gctgcgcaag tgccgcccg gcttcggcgt 240
 ggccagacca ggaactgaaa catcagacgt ggtgtgcaag ccctgtgccc cggggacgtt 300
 ctccaacacg acttcatcca cggatatttg caggccccac cagatctgta acgtgggtggc 360
 catccctggg aatgcaagca gggatgcagt ctgcacgtcc acgtccggta cc 412

<210> 31
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 31
 gccagggatc catcgagggt agggggagca catgccggct c 41

<210> 32
 <211> 278
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 32
 gccagggatc catcgagggt agggggagca catgccggct cagagaatac tatgaccaga 60
 cagctcagat gtgctgcagc aagtgtctgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca 120
 agacctcgga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact 180
 gggttccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccaggtg gaaactcaag 240
 cctgcactcg ggaacagaac cgcactctgca ccggtacc 278

<210> 33
 <211> 287
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 33
 gccagggatc catcgagggt agggggagca catgccggct cagagaatac tatgaccaga 60
 cagctcagat gtgctgcagc aagtgtctgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca 120
 agacctcgga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact 180
 gggttccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccaggtg gaaactcaag 240
 cctgcactcg ggaacagaac cgcactctgca ccgctaggcc cgggtacc 287

<210> 34
 <211> 302
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 34
 gccagggatc catcgagggt agggggagca catgccggct cagagaatac tatgaccaga 60
 cagctcagat gtgctgcagc aagtgtctgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca 120
 agacctcgga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact 180
 gggttccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccaggtg gaaactcaag 240
 cctgcactcg ggaacagaac cgcactctgca cctgcaggcc cggctggtac tgcgcgggta 300
 cc 302

<210> 35
 <211> 320
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 35
gccagggatc catcgaggggt aggggggagca catgccggct cagagaatac tatgaccaga 60
cagctcagat gtgctgcagc aagtgtctgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca 120
agacctcgga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact 180
gggttcccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccaggtg gaaactcaag 240
cctgcactcg ggaacagAAC cgcatctgca cctgcaggcc cggctggtac tgcgcgctga 300
gcaagcagga ggggggtacc 320

<210> 36
<211> 335
<212> DNA
<213> 人

<400> 36
gccagggatc catcgaggggt aggggggagca catgccggct cagagaatac tatgaccaga 60
cagctcagat gtgctgcagc aagtgtctgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca 120
agacctcgga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact 180
gggttcccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccaggtg gaaactcaag 240
cctgcactcg ggaacagAAC cgcatctgca cctgcaggcc cggctggtac tgcgcgctga 300
gcaagcagga gggggctcgg ctggctgcag gtacc 335

<210> 37
<211> 533
<212> DNA
<213> 人

<400> 37
gccagggatc catcgaggggt aggggggagca catgccggct cagagaatac tatgaccaga 60
cagctcagat gtgctgcagc aagtgtctgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca 120
agacctcgga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact 180
gggttcccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccaggtg gaaactcaag 240
cctgcactcg ggaacagAAC cgcatctgca cctgcaggcc cggctggtac tgcgcgctga 300
gcaagcagga ggggtgccgg ctgtgcgcgc cgctgcgcaa gtgccgcccg ggcttcggcg 360
tggccagacc aggaactgaa acatcagacg tgggtgtgcaa gccctgtgcc ccggggacgt 420
tctccaacac gacttcatcc acggatattt gcaggcccca ccagatctgt aacgtggtgg 480
ccatccctgg gaatgcaagc agggatgcag tctgcacgtc cacgtccggt acc 533

<210> 38
<211> 44
<212> DNA
<213> 人

<400> 38
gccagggatc catcgaggggt aggggagcact cctgtgagga cagc 44

<210>	39		
<211>	159		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	39		
ggatccatcg	agggtagggg	cgactcctgt	gaggacagca catacaccca gctctggaac 60
tgggttcccc	agtgcttgag	ctgtggctcc	cgctgtagct ctgaccaggt ggaaactcaa 120
gcctgcactc	gggaacagaa	ccgcatctgc	accggtacc 159
<210>	40		
<211>	168		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	40		
ggatccatcg	agggtagggg	cgactcctgt	gaggacagca catacaccca gctctggaac 60
tgggttcccc	agtgcttgag	ctgtggctcc	cgctgtagct ctgaccaggt ggaaactcaa 120
gcctgcactc	gggaacagaa	ccgcatctgc	accgctaggg ccggtacc 168
<210>	41		
<211>	183		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	41		
ggatccatcg	agggtagggg	cgactcctgt	gaggacagca catacaccca gctctggaac 60
tgggttcccc	agtgcttgag	ctgtggctcc	cgctgtagct ctgaccaggt ggaaactcaa 120
gcctgcactc	gggaacagaa	ccgcatctgc	acctgcaggc ccggctggta ctgcgcgggt 180
acc			183
<210>	42		
<211>	201		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	42		
ggatccatcg	agggtagggg	cgactcctgt	gaggacagca catacaccca gctctggaac 60
tgggttcccc	agtgcttgag	ctgtggctcc	cgctgtagct ctgaccaggt ggaaactcaa 120
gcctgcactc	gggaacagaa	ccgcatctgc	acctgcaggc ccggctggta ctgcgcgctg 180
agcaagcagg	aggggggtac	c	201
<210>	43		
<211>	216		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	43		
ggatccatcg	agggtagggg	cgactcctgt	gaggacagca catacaccca gctctggaac 60
tgggttcccc	agtgcttgag	ctgtggctcc	cgctgtagct ctgaccaggt ggaaactcaa 120
gcctgcactc	gggaacagaa	ccgcatctgc	acctgcaggc ccggctggta ctgcgcgctg 180

agcaagcagg aggggggctcg gctggctgca ggtacc	216
<210> 44	
<211> 414	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 44	
ggatccatcg agggtagggg cgactcctgt gaggacagca catacaccca gctctggaac	60
tgggttcccc agtgcttgag ctgtggctcc cgctgtagct ctgaccaggt ggaaactcaa	120
gcctgcactc gggaacagaa ccgcatctgc acctgcaggc ccggctggta ctgcgcgctg	180
agcaagcagg aggggtgccg gctgtgcgcg ccgctgcgca agtgccgccc gggcttcggc	240
gtggccagac caggaactga aacatcagac gtggtgtgca agccctgtgc cccggggacg	300
ttctccaaca cgacttcate cacggatatt tgcaggcccc accagatctg taacgtggtg	360
gccatccctg ggaatgcaag cagggatgca gtctgcacgt ccacgtccgg tacc	414
<210> 45	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 45	
gccagagatc tatcgagggt agggaggtgc agctggtgga g	41
<210> 46	
<211> 59	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 46	
ctggtcggta ccggatccgc cgccaccact cgagacggtg accagagtac cttggcccc	59
<210> 47	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 47	
gcaggcggat ccgggggagg aggtagtggc ggtggtggat cagacatcca gatgaccag	60
tc	62
<210> 48	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 48	
ccgagcggta cctttgattt ccaccttggt ccc	33
<210> 49	
<211> 754	
<212> DNA	
<213> 人	

<400> 49

```

agatctatcg agggtaggga ggtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtacagccc      60
ggcagggtccc tgagactctc ctgtgcggcc tctggattca cctttgatga ttatgccatg      120
cactgggtcc ggcaagctcc agggaagggc ctggaatggg tctcagctat cacttggaat      180
agtggtcaca tagactatgc ggactctgtg gagggccgat tcaccatctc cagagacaac      240
gccaagaact ccctgtatct gcaaatgaac agtctgagag ctgaggatac ggccgtatat      300
tactgtgcga aagtctcgta ccttagcacc gcgtcctccc ttgactattg gggccaaggt      360
accctgggtca ccgtctcgag tggtaggggc gggatccggg ggaggaggta gtggcgggtg      420
tggatcagac atccagatga ccagtcctcc atcctccctg tctgcatctg taggggacag      480
agtcaccatc acttgtcggg caagtcaggg catcagaaat tacttagcct ggtatcagca      540
aaaaccaggg aaagccccta agctcctgat ctatgctgca tccactttgc aatcaggggt      600
cccatctcgg ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc actctacca tcagcagcct      660
acagcctgaa gatgttgcaa cttattactg tcaaaggat aaccgtgcac cgtatacttt      720
tggccagggg accaagggtg aatcaaagg tacc                                     754

```

<210> 50

<211> 48

<212> DNA

<213> 人

<400> 50

```

ccgagcggta ccagatccac cgcccccttt gatttccacc ttggtccc      48

```

<210> 51

<211> 769

<212> DNA

<213> 人

<400> 51

```

agatctatcg agggtaggga ggtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtacagccc      60
ggcagggtccc tgagactctc ctgtgcggcc tctggattca cctttgatga ttatgccatg      120
cactgggtcc ggcaagctcc agggaagggc ctggaatggg tctcagctat cacttggaat      180
agtggtcaca tagactatgc ggactctgtg gagggccgat tcaccatctc cagagacaac      240
gccaagaact ccctgtatct gcaaatgaac agtctgagag ctgaggatac ggccgtatat      300
tactgtgcga aagtctcgta ccttagcacc gcgtcctccc ttgactattg gggccaaggt      360
accctgggtca ccgtctcgag tggtaggggc gggatccggg ggaggaggta gtggcgggtg      420
tggatcagac atccagatga ccagtcctcc atcctccctg tctgcatctg taggggacag      480
agtcaccatc acttgtcggg caagtcaggg catcagaaat tacttagcct ggtatcagca      540
aaaaccaggg aaagccccta agctcctgat ctatgctgca tccactttgc aatcaggggt      600
cccatctcgg ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc actctacca tcagcagcct      660
acagcctgaa gatgttgcaa cttattactg tcaaaggat aaccgtgcac cgtatacttt      720

```

tggccagggg accaaggtgg aaatcaaagg gggcggtgga tctggtacc 769

<210> 52
<211> 29
<212> DNA
<213> 人

<400> 52
gccagtgatc agaggtgcag ctggtggag 29

<210> 53
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<400> 53
cctcgaagct tatttgattt ccaccttggt ccc 33

<210> 54
<211> 743
<212> DNA
<213> 人

<400> 54
tgatcagagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcccgg cagggtccctg 60
agactctcct gtgcggcctc tggattcacc tttgatgatt atgccatgca ctgggtccgg 120
caagctccag ggaagggcct ggaatgggtc tcagctatca cttggaatag tggtcacata 180
gactatgctg actctgtgga gggcggattc accatctcca gagacaacgc caagaactcc 240
ctgtatctgc aaatgaacag tctgagagct gaggatacgg ccgtatatta ctgtgcgaaa 300
gtctcgtacc ttagcaccgc gtccctccctt gactattggg gccaaggtac cctgggtcacc 360
gtctcgagtg gtggcggcgg gatccggggg aggaggtagt ggcggtggtg gatcagacat 420
ccagatgacc cagtctccat cctccctgtc tgcattctgta ggggacagag tcaccatcac 480
ttgtcgggca agtcagggca tcagaaatta cttagcctgg tatcagcaaa aaccagggaa 540
agcccctaag ctctgatct atgctgcatc cactttgcaa tcaggggtcc catctcggtt 600
cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc agcagcctac agcctgaaga 660
tgttgcaact tattactgtc aaaggtataa ccgtgcaccg tatacttttg gccaggggac 720
caaggtggaa atcaaataag ctt 743

<210> 55
<211> 44
<212> DNA
<213> 人

<400> 55
gccagtgatc aggaggtggc gggctctgagg tgcagctggt ggag 44

<210> 56
<211> 758
<212> DNA

<213> 人

<400> 56

```

tgatcaggag gtggcggtc tgaggtgcag ctggtggagt ctgggggagg cttggtacag      60
cccggcaggt ccctgagact ctctgtgcg gcctctggat tcaccttga tgattatgcc      120
atgcaactggg tccggcaagc tccagggaag ggctctggaat ggtctcagc tatcacttgg      180
aatagtggtc acatagacta tgcggactct gtggagggcc gattcaccat ctccagagac      240
aacgccaaga actccctgta tctgcaaata aacagtctga gagctgagga tacggccgta      300
tattactgtg cgaaagtctc gtaccttagc accgcgtcct cccttgacta ttggggccaa      360
ggtaccctgg tcaccgtctc gagtgggtggc ggcgggatcc gggggaggag gtagtggcgg      420
tggtggatca gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga      480
cagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctggtatca      540
gcaaaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg      600
ggtcccatct cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag      660
cctacagcct gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac      720
ttttggccag gggaccaagg tggaaatcaa ataagctt                                758

```

<210> 57

<211> 38

<212> DNA

<213> 人

<400> 57

```

gccagagatc tatcgagggg aggatgagtg gcctgggc                                38

```

<210> 58

<211> 18

<212> DNA

<213> 人

<400> 58

```

catgcaggta cccagcag                                18

```

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> 人

<400> 59

```

ctgctgggta cctgcatg                                18

```

<210> 60

<211> 32

<212> DNA

<213> 人

<400> 60

```

cggcacggta ccgctcctga gcttgttctc ac                                32

```

<210> 61

<211> 354
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 61
 agatctatcg agggtaggat gagtggcctg ggccggagca ggcgaggtgg ccggagccgt 60
 gtggaccagg aggagcgctt tccacagggc ctgtggacgg gggtaggctat gagatcctgc 120
 cccgaagagc agtactggga tcctctgctg ggtacctgca tgcctgcaa aaccatttgc 180
 aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag 240
 caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga 300
 cagcacccta agcaatgtgc atacttctgt gagaacaagc tcaggagcgg tacc 354

<210> 62
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 62
 cggcacggta ccaaggttca ctgggctcct g 31

<210> 63
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 63
 agatctatcg agggtaggat gagtggcctg ggccggagca ggcgaggtgg ccggagccgt 60
 gtggaccagg aggagcgctt tccacagggc ctgtggacgg gggtaggctat gagatcctgc 120
 cccgaagagc agtactggga tcctctgctg ggtacctgca tgcctgcaa aaccatttgc 180
 aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag 240
 caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga 300
 cagcacccta agcaatgtgc atacttctgt gagaacaagc tcaggagccc agtgaacctt 360
 ggtacc 366

<210> 64
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 64
 cggcacggta cctccactcc gctgtctcct g 31

<210> 65
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 65
 agatctatcg agggtaggat gagtggcctg ggccggagca ggcgaggtgg ccggagccgt 60
 gtggaccagg aggagcgctt tccacagggc ctgtggacgg gggtaggctat gagatcctgc 120

```

cccgaagagc agtactggga tcctctgctg ggtacctgca tgtcctgcaa aaccatttgc 180
aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag 240
caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga 300
cagcacccta agcaatgtgc atacttctgt gagaacaagc tcaggagccc agtgaacctt 360
ccaccagagc tcaggagaca gcggagtggg ggtacc 396

```

```

<210> 66
<211> 36
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 66
cggcacggta ccagggtca acagacttaa caaaag 36

```

```

<210> 67
<211> 426
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 67
agatctatcg agggtaggat gagtggcctg ggccggagca ggcgaggtgg ccggagccgt 60
gtggaccagg aggagcgctt tccacagggc ctgtggacgg gggtaggctat gagatcctgc 120
cccgaagagc agtactggga tcctctgctg ggtacctgca tgtcctgcaa aaccatttgc 180
aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag 240
caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga 300
cagcacccta agcaatgtgc atacttctgt gagaacaagc tcaggagccc agtgaacctt 360
ccaccagagc tcaggagaca gcggagtggg gaagttgaaa acaattcaga caactcggga 420
ggtacc 426

```

```

<210> 68
<211> 31
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 68
cggcacggta ccgctgtaga ccagggccac c 31

```

```

<210> 69
<211> 519
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 69
agatctatcg agggtaggat gagtggcctg ggccggagca ggcgaggtgg ccggagccgt 60
gtggaccagg aggagcgctt tccacagggc ctgtggacgg gggtaggctat gagatcctgc 120
cccgaagagc agtactggga tcctctgctg ggtacctgca tgtcctgcaa aaccatttgc 180
aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag 240
caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga 300

```

cagcacccta agcaatgtgc atacttctgt gagaacaagc tcaggagccc agtgaacctt	360
ccaccagagc tcaggagaca gcggagtgga gaagttgaaa acaattcaga caactcgga	420
aggtaccaag gattggagca cagaggctca gaagcaagtc cagctctccc ggggctgaag	480
ctgagtgcag atcaggtggc cctggtctac agcgggtacc	519
<210> 70	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 70	
ggccagggat ccatcgaggg taggggggag caagcgccag g	41
<210> 71	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 71	
cgggtgcggta ccggggccaaa gcagccggaa g	31
<210> 72	
<211> 186	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 72	
ggatccatcg agggtagggg ggagcaagcg ccaggcacccg cccctgtctc ccgcggcagc	60
tcttgagagcg cggacctgga caagtgcatt gactgcgcgt cttgcagggc gcgaccgcac	120
agcgacttct gcctgggctg cgctgcagca cctcctgcc ccttccggct gctttggccc	180
ggtacc	186
<210> 73	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 73	
ggccagggat ccatcgaggg taggatgagg cgaggggccc g	41
<210> 74	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 74	
cgggtgcggta ccgagcagcc cgggcagg	28
<210> 75	
<211> 258	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 75	

```

ggatccatcg agggtaggat gaggcgaggg ccccgagacc tgcggggcag ggacgcgcca      60
gccccacgc cctgcgtccc ggccgagtgc ttcgacctgc tgggccgcca ctgcgtggcc      120
tgcgggctcc tgcgcacgcc gcggccgaaa ccggccgggg ccagcagccc tgcgcccagg      180
acggcgctgc agccgcagga gtcggtgggc gcgggggccc gcgaggcggc gctgccctg      240
cccggtctgc tcgtacc                                     258

```

```

<210> 76
<211> 235
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 76

```

```

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1          5          10          15

```

```

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
          20          25          30

```

```

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
          35          40          45

```

```

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
          50          55          60

```

```

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
          65          70          75          80

```

```

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
          85          90          95

```

```

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
          100          105          110

```

```

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
          115          120          125

```

```

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
          130          135          140

```

```

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
          145          150          155          160

```

```

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
          165          170          175

```

```

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
          180          185          190

```

```

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr

```

195	200	205
Pro Glu Pro Ser Thr Ala 210	Pro Ser Thr Ser Phe 215	Leu Leu Pro Met Gly 220
Pro Ser Pro Pro Ala 225	Glu Gly Ser Thr Gly 230	Asp 235
<210> 77		
<211> 185		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 77		
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser 1 5 10 15		
Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys 20 25 30		
Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr 35 40 45		
Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu 50 55 60		
Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser 65 70 75 80		
Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys 85 90 95		
Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys 100 105 110		
Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala 115 120 125		
Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro 130 135 140		
Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His 145 150 155 160		
Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala 165 170 175		
Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg 180 185		
<210> 78		

<211> 163
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 78

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
 20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
 35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
 50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
 65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
 85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
 100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
 115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
 130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
 145 150 155 160

Gln Ile Cys

<210> 79
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 79

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
 20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
 35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys
130 135 140

<210> 80
<211> 157
<212> PRT
<213> 人

<400> 80

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
1 5 10 15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
20 25 30

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95

Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
100 105 110

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
115 120 125

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 81
<211> 51
<212> PRT
<213> 人

<400> 81

Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Leu Val Asn Ala Lys Lys Asp
1 5 10 15

Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
20 25 30

Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
35 40 45

Val Cys Leu
50

<210> 82
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 82
gcgcacggat ccatggccca ggtggcattt acaccctac

39

<210> 83
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 83
caccacggta ccgatctggt ggggcctgca aat

33

<210> 84
<211> 738
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AD1D4-I162-tripB

<400> 84
atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc 60
cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctgcgccggc 120
caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 180

```

agcacataca cccagctctg gaactggggt cccgagtgtg tgagctgtgg ctcccgtgt 240
agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 300
aggcccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgtg 360
cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 420
tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg 480
ccccaccaga tcggtaccga gccaccaacc cagaagccca agaagattgt aaatgccaag 540
aaagatgttg tgaacacaaa gatgtttgag gagctcaaga gccgtctgga caccctggcc 600
caggaggttg ccctgctgaa ggagcagcag gccctgcaga cggctctccct gaagggtcta 660
gaacaaaaac tcattctcaga agaggatctg aatagcgccg tcgaccatca tcattcatcat 720
cattgaaagc tgaattcc 738

```

<210> 85
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸引物

```

<400> 85
caccacggta ccggaggaac cggaggacgt ggacgtgcag actgcatcca t 51

```

<210> 86
 <211> 810
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AD1D4-GSS-tripB

```

<400> 86
atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgcc cggagcccgg gagcacatgc 60
cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctgcgccggc 120
caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 180
agcacataca cccagctctg gaactggggt cccgagtgtg tgagctgtgg ctcccgtgt 240
agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 300
aggcccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgtg 360
cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 420
tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg 480
ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc 540
acgtccacgt cctccggttc ctccggtacc gagccacca occagaagcc caagaagatt 600
gtaaatgcca agaaagatgt tgtgaacaca aagatgtttg aggagctcaa gagccgtctg 660
gacaccctgg ccaggaggt ggccctgctg aaggagcagc aggcctgca gacggtctcc 720

```

ctgaagggtc tagaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgaccat 780
catcatcatc atcattgaaa gctgaattcc 810

<210> 87
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 87
agatttggtc ccgtcgccag tgctcccttc agctggggg 39

<210> 88
<211> 957
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AD1D4-D235-tripB

<400> 88
atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc 60
cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctcgccgggc 120
caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 180
agcacatata ccagctctg gaactgggtt cccgagtgtc tgagctgtgg ctcccgtgt 240
agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 300
aggcccggct ggtactgccc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg 360
cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 420
tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgagg 480
ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc 540
acgtccacgt cccccaccg gagtatggcc ccaggggcag tacacttacc ccagccagtg 600
tccacacgat cccaacacac gcagccaact ccagaacca gcactgctcc aagcacctcc 660
ttcctgctcc caatggggccc cagcccccca gctgaaggga gcactggcga cggtagccgag 720
ccaccaaccc agaagcccaa gaagattgta aatgccaaga aagatgttgt gaacacaaag 780
atgtttgagg agctcaagag ccgtctggac accctggccc aggaggtggc cctgctgaag 840
gagcagcagg ccctgcagac ggtctccctg aagggtctag aacaaaaact catctcagaa 900
gaggatctga atagcgccgt cgaccatcat catcatcatc attgaaagct gaattcc 957

<210> 89
<211> 711
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AD1D4-I162-I10-TripB

<400> 89
 atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc 60
 cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaag ctcgccgggc 120
 caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 180
 agcacatata cccagctctg gaactgggtt cccgagtgtc tgagctgtgg ctcccgtgt 240
 agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 300
 agggccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgtg 360
 cgcaagtgcc gcccggtt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 420
 tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg 480
 ccccaccaga tcggtaccat tgtaaatgcc aagaaagatg ttgtgaacac aaagatgttt 540
 gaggagctca agagccgtct ggacaccctg gcccaggagg tggccctgct gaaggagcag 600
 caggccctgc agacggctct cctgaagggt ctagaacaaa aactcatctc agaagaggat 660
 ctgaatagcg ccgtcgacca tcatcatcat catcattgaa agctgaattc c 711

<210> 90
 <211> 711
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AD1D4-GSS-I10-tripB

<400> 90
 atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc 60
 cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaag ctcgccgggc 120
 caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 180
 agcacatata cccagctctg gaactgggtt cccgagtgtc tgagctgtgg ctcccgtgt 240
 agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 300
 agggccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgtg 360
 cgcaagtgcc gcccggtt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 420
 tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg 480
 ccccaccaga tcggtaccat tgtaaatgcc aagaaagatg ttgtgaacac aaagatgttt 540
 gaggagctca agagccgtct ggacaccctg gcccaggagg tggccctgct gaaggagcag 600
 caggccctgc agacggctct cctgaagggt ctagaacaaa aactcatctc agaagaggat 660
 ctgaatagcg ccgtcgacca tcatcatcat catcattgaa agctgaattc c 711

<210> 91
 <211> 930
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AD1D4-D235-I10-tripB

<400> 91
 atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc 60
 cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaagc ctgcgccggc 120
 caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 180
 agcacatata ccagctctg gaactgggtt cccgagtgct tgagctgtgg ctcccgctgt 240
 agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 300
 agggccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgcgctg 360
 cgcaagtgcc gcccggtt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 420
 tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgagg 480
 cccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc 540
 acgtccacgt cccccaccg gagtatggcc ccaggggcag tacacttacc ccagccagtg 600
 tccacacgat cccaacacac gcagccaact ccagaaccca gactgctcc aagcacctcc 660
 ttctgctcc caatgggccc cagccccca gctgaaggga gactggcga cgggtaccatt 720
 gtaaattgca agaaagatgt tgtgaacaca aagatgtttg aggagctcaa gagccgtctg 780
 gacacctgg cccaggaggt ggcctgctg aaggagcagc aggcctgca gacggctctcc 840
 ctgaagggtc tagaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgaccat 900
 catcatcatc atcattgaaa gctgaattcc 930

<210> 92
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> pKpnI-V17

<400> 92
 gacggtaccg ttgtgaacac aaagatgttt g 31

<210> 93
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> pBAD6H

<400> 93
 ggctcggaat tcaatgatga tgatgatgat ggctcg 35

<210> 94
 <211> 762
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AD1D4-GSS-V17-tripB

<400> 94

```

atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc      60
cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaata ctgccggggc      120
caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac      180
agcacatata ccagctcttg gaactgggtt cccgagtgtc tgagctgtgg ctcccgctgt      240
agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc      300
aggcccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg      360
cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg      420
tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgagg      480
ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc      540
acgtccacgt cctccggttc ctccggtacc gttgtgaaca caaagatgtt tgaggagctc      600
aagagccgtc tggacaccct ggcccaggag gtggccctgc tgaaggagca gcaggccctg      660
cagacggtct ccctgaaggg tctagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatagc      720
gccgtcgacc atcatcatca tcatcattga aagctgaatt cc                        762

```

<210> 95

<211> 909

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AD1D4-D235-V17-tripB

<400> 95

```

atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc      60
cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaata ctgccggggc      120
caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac      180
agcacatata ccagctcttg gaactgggtt cccgagtgtc tgagctgtgg ctcccgctgt      240
agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc      300
aggcccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg      360
cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg      420
tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgagg      480
ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc      540
acgtccacgt cccccaccg gagtatggcc ccaggggcag tacacttacc ccagccagtg      600
tccacacgat cccaacacac gcagccaact ccagaaccca gactgctcc aagcacctcc      660
ttctgtctcc caatgggccc cagcccccca gctgaaggga gactggcga cggtagcgtt      720
gtgaacacaa agatgtttga ggagctcaag agcgtctgga acacctggc ccaggagggtg      780
gccctgtga aggagcagca ggccctgcag acggtctccc tgaagggtct agaacaaaaa      840
ctcatctcag aagaggatct gaatagcgcc gtcgaccatc atcatcatca tcattgaaag      900

```

ctgaattcc

909

<210> 96
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 96

Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp
 1 5 10 15

Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
 20 25 30

Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
 35 40 45

Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys Phe Leu Ala Phe
 50 55 60

Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp Cys Ile Ser Arg
 65 70 75 80

Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu Asn Asp Ala Leu
 85 90 95

Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala Glu Ile Trp Leu
 100 105 110

Gly Leu Asn Asp Met Ala Ala Glu Gly Thr Trp Val Asp Met Thr Gly
 115 120 125

Ala Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile Thr Ala Gln Pro
 130 135 140

Asp Gly Gly Lys Thr Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser Gly Ala Ala Asn
 145 150 155 160

Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu Pro Tyr Ile Cys
 165 170 175

Gln Phe Gly Ile Val
 180

<210> 97
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 97

Ala Leu Gln Thr Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys
 1 5 10 15

```

Phe Leu Ala Phe Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp
      20              25              30

Cys Ile Ser Arg Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu
      35              40              45

Asn Asp Ala Leu Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala
      50              55              60

Glu Ile Trp Leu Gly Leu Asn Asp Met Ala Ala Glu Gly Thr Trp Val
      65              70              75              80

Asp Met Thr Gly Ala Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile
      85              90              95

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

Gly Ala Ala Asn Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu
      115             120             125

Pro Tyr Ile Cys Gln Phe Gly Ile Val
      130             135

```

```

<210> 98
<211> 102
<212> DNA
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> TN-lib3-tprev

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> 随机化

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(26)
<223> 随机化

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(29)
<223> 随机化

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(32)
<223> 随机化

```

```

<220>

```

<221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> 随机化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 随机化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(41)
 <223> 随机化

<400> 98
 gagatctggc tgggcctcaa cnsnnsnns nnsnnsnns nstgggtgga catgaccgt 60
 acccgcatcg cctacaagaa ctgggagact gagatcaccg cg 102

<210> 99
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> TN-lib2-tprev

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> 随机化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> 随机化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> 随机化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 随机化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> 随机化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> 随机化

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(33)
<223> 随机化

<400> 99
gctgggcctc aacgacnnsn nsnsgagnn snnstgggtg gacatgaccg gtaccgcat      60
cgcctacaag aactgggaga ctgagatcac cgcg                                     94

<210> 100
<211> 108
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TN-lib3-tpfo

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(64)
<223> 随机化

<220>
<221> misc_feature
<222> (66)..(67)
<223> 随机化

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(70)
<223> 随机化

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)..(73)
<223> 随机化

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)..(76)
<223> 随机化

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(79)
<223> 随机化

<400> 100
cgcggcagcg cttgtcgaac cacttgccgt tggccgcgcc tgacaggacc ggcagttct      60
csnnsnnsnn snnnsnnsna tcgggttgcg cggtgatctc agtctccc                    108

<210> 101
<211> 102
<212> DNA
<213> 人工序列

```

<220>
<223> TN-lib2-tpfo

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(64)
<223> 随机化

<220>
<221> misc_feature
<222> (66)..(67)
<223> 随机化

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(70)
<223> 随机化

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)..(73)
<223> 随机化

<400> 101
cgcggcagcg cttgtcgaac cacttgccgt tggccgcgcc tgacaggacc ggcgagttct 60
csnnsnnsnn snnatcgggt tgcgcggtga tctcagttct cc 102

<210> 102
<211> 137
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TN3-2

<400> 102

Ala Leu Gln Thr Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys
1 5 10 15

Phe Leu Ala Phe Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp
20 25 30

Cys Ile Ser Arg Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu
35 40 45

Asn Asp Ala Leu Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala
50 55 60

Glu Ile Trp Leu Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Met
65 70 75 80

Asp Met Thr Gly Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile
85 90 95

Thr Ala Gln Pro Asp Pro Arg His Thr Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser
100 105 110

Gly Ala Ala Asn Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu
115 120 125

Pro Tyr Ile Cys Gln Phe Gly Ile Val
130 135

<210> 103
<211> 137
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TN3-2-B

<400> 103

Ala Leu Gln Thr Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys
1 5 10 15

Phe Leu Ala Phe Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp
20 25 30

Cys Ile Ser Arg Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu
35 40 45

Asn Asp Ala Leu Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala
50 55 60

Glu Ile Trp Leu Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Met
65 70 75 80

Asp Met Thr Gly Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile
85 90 95

Thr Ala Gln Pro Asp Pro Thr Asn Asn Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser
100 105 110

Gly Ala Ala Asn Gly Lys Trp Phe Gly Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu
115 120 125

Pro Tyr Ile Cys Gln Phe Gly Ile Val
130 135

<210> 104
<211> 137
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TN3-2-C

<400> 104

Ala Leu Gln Thr Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys
1 5 10 15

Phe Leu Ala Phe Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp
20 25 30

Cys Ile Ser Arg Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu
35 40 45

Asn Asp Ala Leu Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala
50 55 60

Glu Ile Trp Leu Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Val
65 70 75 80

Asp Met Thr Gly Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile
85 90 95

Thr Ala Gln Pro Asp Pro Thr Asn Arg Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser
100 105 110

Gly Ala Ala Asn Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu
115 120 125

Pro Tyr Ile Cys Gln Phe Gly Ile Val
130 135

<210> 105

<211> 137

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TN3-2-D

<400> 105

Ala Leu Gln Thr Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys
1 5 10 15

Phe Leu Ala Phe Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp
20 25 30

Cys Ile Ser Arg Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu
35 40 45

Asn Asp Ala Leu Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala
50 55 60

Glu Ile Trp Leu Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Ile
65 70 75 80

Asp Met Thr Gly Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile
85 90 95

Thr Ala Gln Pro Asp Pro Asn Asn Arg Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser
100 105 110

Gly Ala Ala Asn Gly Lys Trp Phe Gly Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu
115 120 125

Pro Tyr Ile Cys Gln Phe Gly Ile Val
130 135

<210> 106
<211> 181
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TN-2-B

<400> 106

Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp
1 5 10 15

Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
20 25 30

Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
35 40 45

Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys Phe Leu Ala Phe
50 55 60

Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp Cys Ile Ser Arg
65 70 75 80

Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu Asn Asp Ala Leu
85 90 95

Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala Glu Ile Trp Leu
100 105 110

Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Met Asp Met Thr Gly
115 120 125

Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile Thr Ala Gln Pro
130 135 140

Asp Pro Thr Asn Asn Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser Gly Ala Ala Asn
145 150 155 160

Gly Lys Trp Phe Gly Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu Pro Tyr Ile Cys

	165	170	175
Gln Phe Gly Ile Val			
	180		
<210>	107		
<211>	181		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	TN-2-D		
<400>	107		
Glu Pro Pro Thr	Gln Lys Pro Lys Lys	Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp	
1	5	10	15
Val Val Asn Thr	Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr		
	20	25	30
Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr			
	35	40	45
Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys Phe Leu Ala Phe			
	50	55	60
Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp Cys Ile Ser Arg			
65	70	75	80
Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu Asn Asp Ala Leu			
	85	90	95
Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala Glu Ile Trp Leu			
	100	105	110
Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Ile Asp Met Thr Gly			
	115	120	125
Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile Thr Ala Gln Pro			
	130	135	140
Asp Pro Asn Asn Arg Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser Gly Ala Ala Asn			
145	150	155	160
Gly Lys Trp Phe Gly Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu Pro Tyr Ile Cys			
	165	170	175
Gln Phe Gly Ile Val			
	180		
<210>	108		
<211>	181		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TN-2-C

<400> 108

Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp
 1 5 10 15

Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
 20 25 30

Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
 35 40 45

Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys Phe Leu Ala Phe
 50 55 60

Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp Cys Ile Ser Arg
 65 70 75 80

Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu Asn Asp Ala Leu
 85 90 95

Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala Glu Ile Trp Leu
 100 105 110

Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Val Asp Met Thr Gly
 115 120 125

Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile Thr Ala Gln Pro
 130 135 140

Asp Pro Thr Asn Arg Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser Gly Ala Ala Asn
 145 150 155 160

Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu Pro Tyr Ile Cys
 165 170 175

Gln Phe Gly Ile Val
 180

<210> 109

<211> 256

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AD1D4-GSS-I10

<400> 109

Met Gly Ser Met Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro

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

图1

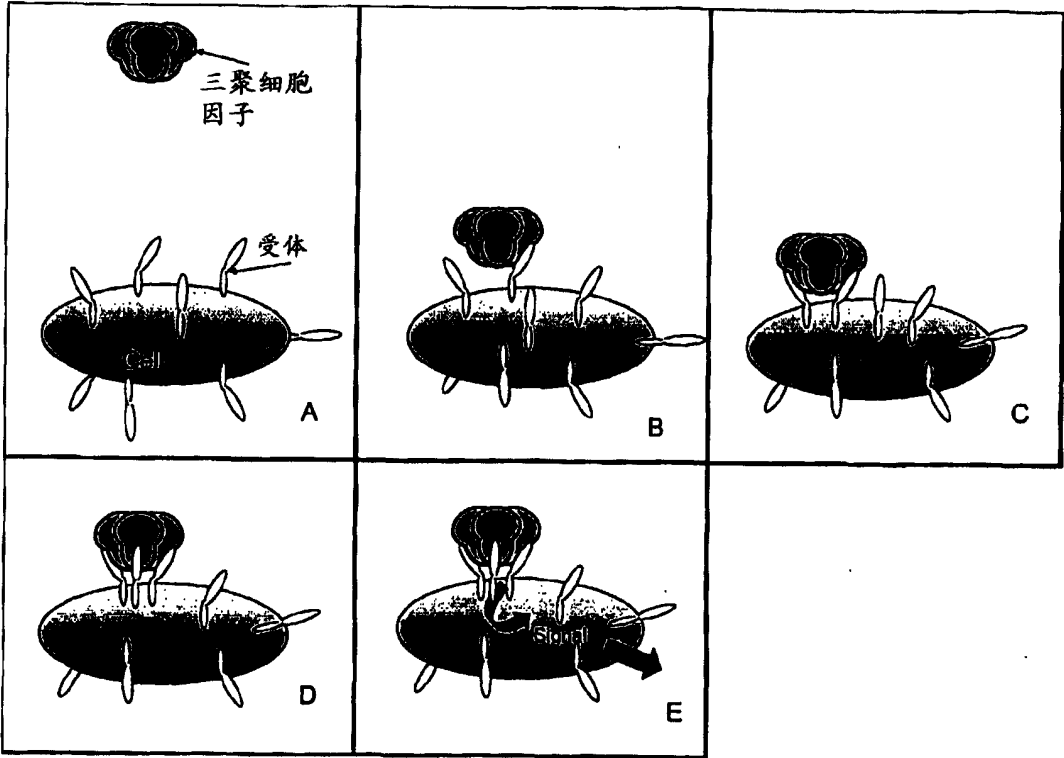


图2

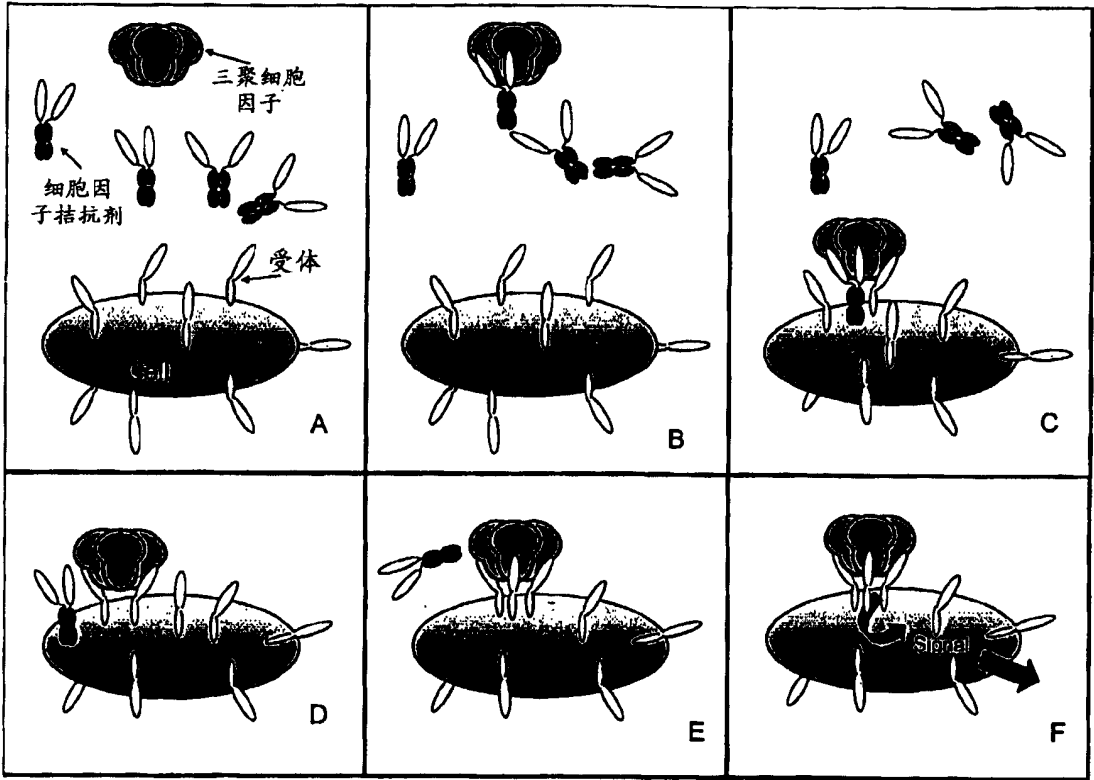


图 3

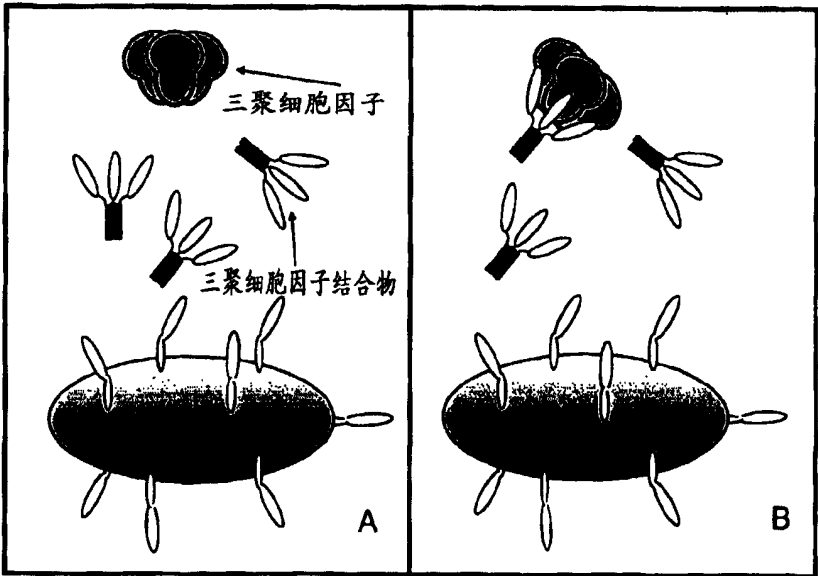


图 4

