

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99813723.5

[51] Int. Cl.

C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 31 日

[11] 授权公告号 CN 100345970C

[22] 申请日 1999.9.22 [21] 申请号 99813723.5

[30] 优先权

[32] 1998. 9. 25 [33] US [31] 60/101858

[32] 1999. 5. 19 [33] US [31] 09/313942

[86] 国际申请 PCT/US1999/022045 1999. 9. 22

[87] 国际公布 WO2000/018932 英 2000. 4. 6

[85] 进入国家阶段日期 2001. 5. 25

[73] 专利权人 里珍纳龙药品有限公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 N·斯塔尔 G·D·彦科普洛斯

[56] 参考文献

WO9319777A1 1993. 10. 14

WO9731946A1 1997. 9. 4

WO96/11213A1 1996. 4. 18

EP0835939A2 1998. 4. 15

审查员 曾繁辉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 50 页 附图 63 页

[54] 发明名称

以受体为基础的拮抗剂和制备方法及其用途

[57] 摘要

本发明提供了一种能够结合细胞因子而形成非功能性复合物的融合多肽。 本发明还提供了一种编码该融合多肽的核酸序列和该融合多肽的制备方法和用途。

1. 一种编码融合多肽的分离的核酸分子, 所述融合多肽包含以下融合多肽成分:

(a) 白细胞介素-1 (IL-1) 受体的特异性决定成分的胞外结构域的 IL-1 结合部分;

(b) 所述 IL-1 受体的信号转导成分的胞外结构域的 IL-1 结合部分;
和

(c) 一种多聚化成分;

所述多聚化成分 (c) 与包含在另一所述融合多肽中的多聚化成分 (c) 进行多聚化, 从而形成所述融合多肽的多聚体;

所述多聚体结合并且捕获 IL-1, 从而作为 IL-1 的拮抗剂。

2. 权利要求 1 的分离的核酸分子, 其中所述融合多肽的成分 (a) 包含 I 型 IL-1R 的胞外结构域的 IL-1 结合部分, 并且成分 (b) 包含 IL-1R AcP 的胞外结构域的 IL-1 结合部分。

3. 权利要求 1 的分离的核酸分子, 其中所述融合多肽的成分 (a) 包含 II 型 IL-1R 的胞外结构域的 IL-1 结合部分, 并且成分 (b) 包含 IL-1R AcP 的胞外结构域的 IL-1 结合部分。

4. 前述任意一项权利要求的分离的核酸分子, 其中所述多聚体为二聚体。

5. 前述任意一项权利要求的分离的核酸分子, 其中多聚化成分包含一种免疫球蛋白衍生的结构域。

6. 权利要求 5 的分离的核酸分子, 其中免疫球蛋白衍生的结构域选自 IgG 的 Fc 结构域、IgG 的重链和 IgG 的轻链。

7. 前述任意一项权利要求的分离的核酸分子, 其中编码成分 (a) 的核苷酸序列在编码成分 (b) 的核苷酸序列的上游。

8. 权利要求 1-6 的任意一项的核酸分子, 其中编码成分 (a) 的核苷酸序列在编码成分 (b) 的核苷酸序列的下游。

9. 一种多聚体, 包含两种或更多由前述任意一项权利要求的核酸分子编码的融合多肽, 所述多聚体结合并且捕获 IL-1, 并且作为 IL-1 的拮抗剂。

10. 权利要求 9 的多聚体, 所述多聚体为二聚体, 包含两个所述融合多肽。

11. 包含权利要求 1-8 的任意一项的核酸分子的载体。
12. 包含权利要求 1-8 的任意一项的核酸分子的表达载体，其中核酸分子与一种表达控制序列可操作性连接。
13. 包含权利要求 12 的表达载体的宿主细胞。
14. 权利要求 13 的细胞，其是细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。
15. 权利要求 13 的细胞，其是大肠杆菌、COS 细胞、CHO 细胞、293 细胞、BHK 细胞或 NS0 细胞。
16. 一种生产融合多肽的方法，该方法包括在允许生产所述融合多肽的条件下培养权利要求 13、14 或 15 的细胞，以及回收所生产的融合多肽。
17. 权利要求 16 的方法，进一步包括允许所述融合多肽形成权利要求 9 所定义的融合多肽的多聚体。
18. 权利要求 17 的方法，其中所述多聚体是权利要求 10 所定义的二聚体。
19. 一种包含权利要求 9 的多聚体或权利要求 10 的二聚体的药物组合物，其中所述多聚体或二聚体处于药学上可接受的液体、固体或半固体载体中，与载体或靶向分子相连和/或被掺入到脂质体、微胶囊或控制释放制剂中。

以受体为基础的拮抗剂和制备方法及用途

本申请要求 1999 年 5 月 19 日提交的美国申请号 09/313,942 的优先权、要求 1998 年 9 月 25 日提交的美国临时申请号 60/101,858 的优先权。贯穿于本申请中的各种公开文献作为参考。将这些文献所公开的全部技术内容引入本文作为本申请的参考。

发明背景

尽管发现了不同的生物活性,但是睫状神经营养因子(CNTF)、白血病抑制因子(LIF)、致癌蛋白 M(OSM)和白细胞介素-6(IL-6)包括在所定义的细胞因子族中(本文指的是细胞因子的“CNTF族”)。这些细胞因子被分在一组的原因是因其不同的结构相似性[Bazan,《神经元杂志》(J. Neuron) 7: 197-208 (1991); Rose 和 Bruce,《美国国家科学院学报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 88: 8641-8645 (1991)]并且可能更重要的是因为它们共有“ β ”信号转导受体成分[Baumann 等《生化杂志》(J. Bio. Chem.) 265: 19853-19862 (1993); Davis 等《科学》(Science) 260: 1805-1808 (1993); Gearing 等《科学》(Science) 255: 1434-1437 (1992); Ip 等《细胞》(Cell) 69: 1121-1132 (1992); Stahl 等《生化杂志》(J. Bio. Chem.) 268: 7628-7631 (1993); Stahl 和 Yancopoulos《细胞》(Cell) 74: 587-590 (1993)]。通过该族细胞因子激活受体是由这些 β 成分的同二聚化或异二聚化所导致的[Davis 等《科学》(Science) 260: 1805-1808 (1993); Murakami 等《科学》(Science) 260: 1808-1810 (1993); Stahl 和 Yancopoulos《细胞》(Cell) 74: 587-590 (1993)]。IL-6 受体的激活需要 gp130 的同二聚化[Murakami 等《科学》(Science) 260: 1808-1810 (1993); Hibi 等《细胞》(Cell) 63: 1149-1157 (1990)],所述的 gp130 是一种开始鉴定为 IL-6 信号转导物的蛋白质[Hibi 等《细胞》(Cell) 63: 1149-1157 (1990)]。CNTF、LIF 和 OSM 受体的激活是由 gp130 与第二种与 gp130 相关的称作 LIFR β 的蛋白质之间的异二聚化所导致的[Davis 等《科学》(Science) 260: 1805-1808 (1993)],所述的 LIFR β 开始因其结合 LIF 的能力而被鉴定[Gearing 等《欧洲分子生物

学协会杂志》(EMBO J.) 10: 2839-2848 (1991)]。

除 β 成分外, 这些细胞因子中的某些还需要确定特异性的“ α ”成分, 它们比 β 成分更局限于其组织分布且由此可确定特定细胞因子的细胞靶物[Stahl 和 Yancopoulos 《细胞》(Cell) 74: 587-590 (1993)]。因此, LIF 和 OSM 是广泛起作用的因子, 它们仅需要在响应细胞上存在 gp130 和 LIFR β , 而 CNTF 需要 CNTFR α [Stahl 和 Yancopoulos 《细胞》(Cell) 74: 587-590 (1993)]且 IL-6 需要 IL-6R α [Kishimoto 《科学》(Science) 258: 593-597 (1992)]。CNTFR α (Davis 等 《科学》(Science) 259: 1736-1739 (1993)) 和 IL-6R α [Hibi 等 《细胞》(Cell) 63: 1149-1157; Murakami 等 《科学》(Science) 260: 1808-1810 (1990) ; Taga 等 《细胞》(Cell) 58: 573-581 (1989)]可以起可溶性蛋白质的作用, 这与它们不与胞内信号传输分子发生相互作用而用于帮助其配体与合适的信号转导 β 亚单位发生相互作用的观点相一致[Stahl 和 Yancopoulos 《细胞》(Cell) 74: 587-590 (1993)]。

来自其它细胞因子系统的附加证据也支持了二聚化提供了一种通常的机理的观点, 所有细胞因子受体通过该机理启动信号转导。在这方面, 生长激素(GH)可能用作最佳的实例。晶体学研究已经显示各 GH 分子含有两种不同的受体结合位点, 它们均由受体中相同结合结构域来识别, 使得单一 GH 分子连接两种受体分子[de Vos 等 《科学》(Science) 255: 306-312 (1992)]。二聚化依次发生, 首先在 GH 上的位点 1 与一种受体分子结合, 随后位点 2 与第二种受体分子结合[Fuh 等 《科学》(Science) 256: 1677-1680 (1992)]。当红细胞生成素(EPO)受体主要被引入半胱氨酸残基并产生二硫键连接的同二聚体的单一氨基酸改变所激活时, 使用红细胞生成素(EPO)受体进行的研究也与受体激活中二聚化的重要性一致[Watowich 等 《美国国家科学院学报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89: 2140-2144 (1991)]。

除 β 亚单位的同或异二聚化作为受体激活的关键步骤外, 第二种重要特征在于由 CNTF 族细胞因子形成最终受体复合物通过一种机理而发生, 由此配体以一种有序方式依次结合受体成分[Davis 等 《科学》(Science) 260: 1805-1818 (1993) ; Stahl 和 Yancopoulos

《细胞》(Cell) 74: 587-590 (1993)]。因此, 在最终使 LIFR β 恢复成启动信号转导的 β 成分的异二聚体前, CNTF 首先结合 CNTFR α , 从而形成一种复合物, 该复合物结合 gp130 以形成因仅具有单一 β 成分而不适宜信号传输的中间体(此处称作 $\alpha\beta 1$ 中间体)。尽管尚未直接分离含有与 IL-6R α 和 gp130 单一分子结合的 IL-6 的类似中间体, 但是我们已经根据与其相对较远的相关性(CNTF)类似以及最终活性 IL-6 受体复合物恢复两种 gp130 单体这一事实推定它确实存在。总而言之, 这些发现对一类细胞因子受体复合物的结构提出了建议(附图 1), 其中各细胞因子最高可以含有 3 个受体结合位点: 一个是结合可选择的 α 特异性决定成分的位点(α 位点); 一个是结合第一种 β 信号转导成分的位点($\beta 1$ 位点); 且一个是结合第二种 β 信号转导成分的位点($\beta 2$ 位点)[Stahl 和 Yancopoulos《细胞》(Cell) 74: 587-590 (1993)]。以顺序方式使用这 3 个位点, 在复合物形成过程的最后步骤即导致 β 成分异二聚化的过程中, 关键在于启动信号转导[Davis 等《科学》(Science) 260: 1805-1818 (1993)]。有关受体激活的具体方式和用于 CNTF 的非功能性 $\beta 1$ 中间体存在的知识已经导致了这样一种发现、即 CNTF 在某些情况中是一种 IL-6 的高亲和性拮抗剂并提供了设计以配体或受体为基础的如下具体所述细胞因子 CNTF 族的拮抗剂的基础策略。

一旦细胞因子的结合诱导受体复合物形成, 则 β 成分的二聚化激活使各种底物磷酸化的胞内酪氨酸激酶活性[Ip 等《细胞》(Cell) 69: 121-1132 (1992)]。这种酪氨酸激酶的激活看起来是下游事件的关键, 这是因为阻断酪氨酸磷酸化的抑制剂也可防止诸如基因诱导这样的随后发生的事件[Ip 等《细胞》(Cell) 69: 121-1132 (1992); Nakajima 和 Wall, 《细胞分子生物学》(Mol. Cell. Biol.) 11: 1409-1418 (1991)]。近来, 我们已经证实新近发现的包括 Jak1、Jak2 和 Tyk2 (称作 Jak/Tyk 激酶) [Firmbach-Kraft 等《癌基因》(Oncogene) 5: 1329-1336 (1990); Wilks 等《细胞分子生物学》(Mol. Cell. Biol.) 11: 2057-2065 (1991)]并涉及与其它细胞因子信号转导[Argetsinger 等《细胞》(Cell) 74: 237-244 (1993); Silvennoinen 等《美国国家科学院学报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 90: 8429-8433 (1993); Velazquez 等《细胞》(Cell) 70:

313-322 (1992); Witthuhn 等《细胞》(Cell) 74: 227-236 (1993)] 的非受体酪氨酸激酶族在没有配体存在的情况下预先与 β 亚单位 gp130 和 LIFR β 的胞质结构域连接并在添加配体时使酪氨酸磷酸化和被激活[Stahl 等《科学》(Science) 263: 92-95 (1994)]。因此, 这些激酶作为细胞外部配体结合结果出现在细胞内部激活胞内信号转导的最接近的步骤中。下面描述检测系统, 它用于筛选以该系统为基础的特异性激动剂或拮抗剂活性的小分子收集物。

CNTF 族细胞因子在提供拮抗剂和激动剂的潜在治疗应用的各种生理过程中起重要作用。

发明概括

本发明的一个目的是用于治疗与细胞因子相关的疾病或紊乱的细胞因子拮抗剂的生产方法。

本发明的另一个目的是所公开的细胞因子拮抗剂在治疗与细胞因子相关的疾病或紊乱中的用途。例如, 可以将本文所述的 IL-6 拮抗剂用于治疗骨质疏松、包括多发性骨髓瘤在内的癌症的初期和二期结果或恶病质。

本发明的另一个目的是开发用于鉴定细胞因子受体的新型激动剂和拮抗剂的筛选系统。

本发明的另一个目的是开发用于鉴定起 CNTF 族细胞因子激动剂或拮抗剂作用的小分子的筛选系统。

本发明的另一个目的是开发用于鉴定 CNTF 族细胞因子的新型激动剂和拮抗剂的筛选系统。

本发明的另一个目的是开发用于鉴定 CNTF 族细胞因子的新型激动剂和拮抗剂的筛选系统。

附图简述

附图 1: 一类细胞因子受体模型中受体成分的顺序结合。该模型显示细胞因子最高含有 3 种受体结合位点且通过结合第一种可选择的 α 成分、随后结合 β 1 且然后是 β 2 而与其受体成分发生相互作用。许多细胞因子受体的 β 成分通过膜近侧区(阴影部分)与 Jak/Tyk 族的胞质蛋白质酪氨酸激酶发生相互作用。仅在 β 成分的二聚化时启动信号转导, 正如 β 成分和 Jak/Tyk 激酶的酪氨酸磷酸化(P)的图解表示的。

附图 2: CNTF 在表达 IL6R α 、gp130、CNTFR α 而不是 LIFR β 的 PC12 细胞系 (称作 PC12D) 中抑制 IL-6 响应。在有或没有所述 CNTF 存在的情况下培养不含血清的 PC12D 细胞 + IL-6 (50ng/mL)。某些平板还含有所指示的可溶性 IL6R α (1mg/mL) 或可溶性 CNTFR α (1mg/mL)。用抗-gp130 对细胞裂解物进行免疫沉淀并用抗磷酸酪氨酸进行免疫印迹。酪氨酸磷酸化的特征在于 IL-6 诱导的 IL-6 受体系统激活, 它在共同添加 CNTF 时被阻断。

附图 3: 碘化 CNTF 结合在 PC12D 细胞上的斯卡查德分析。在有或没有用以测定特异性结合情况的过量非放射性竞争剂存在的情况下用不同浓度的碘化 CNTF 培养 PC12D 细胞。该附图表示了特异性结合的一定量碘化 CNTF 的斯卡查德图并给出了符合带有 9pM 和 3.4nM 解离常数的两种结合位点的数据。

附图 4: 人 gp130-Fc-His6 氨基酸序列。1-169 位氨基酸来自人 gp130 (Hibi 等《细胞》(Cell) 63: 1149-1157 (1990))。注意 2 位氨基酸已经由 Leu 改变成了 Val 以便顺应编码 DNA 序列中的 Kozak 序列。用斜体字表示 gp130-Fc-His6 的信号肽 (1-22 位氨基酸)。用粗体型字表示 Ser-Gly 的桥连 (620、621 位氨基酸)。662-853 位氨基酸来自人 IgG1 的 Fc 结构域 (Lewis 等《免疫学杂志》(J. Immunol.) 151: 2829-2838 (1993))。(+) 表示位于形成连接两个 Fc 结构域的链间二硫键的 Fc 之前的 IgG 铰合部的两个半胱氨酸 (632 和 635 位氨基酸)。用粗体/斜体型字表示六组氨酸标记 (854-859 位氨基酸)。(·) 表示终止 (STOP) 密码子的位置。

附图 5: 人 IL-6R α -Fc 的氨基酸序列。关键: 1-358 位氨基酸来自人 IL-6R α (Yamasaki 等《科学》(Science) 241: 825-828 (1988))。注意 2 位氨基酸已经由 Leu 改变成了 Val 以便顺应编码 DNA 序列中的 Kozak 序列。用斜体字表示 IL-6R α -Fc 的信号肽 (1-19 位氨基酸)。用粗体型字表示 Ala-Gly 的桥连 (359、360 位氨基酸)。361-592 位氨基酸来自人 IgG1 的 Fc 结构域 (Lewis 等《免疫学杂志》(J. Immunol.) 151: 2829-2838 (1993))。(+) 表示位于形成连接两个 Fc 结构域的链间二硫键的 Fc 之前的 IgG 铰合部的两个半胱氨酸 (371 和 374 位氨基酸)。(·) 表示终止 (STOP) 密码子的位置。

附图 6: CNTF/IL-6/IL-11 受体系统。图解描绘了有序形成的六聚化信号转导受体复合物。细胞因子与 $R\alpha$ 成分结合而形成一种专性细胞因子· $R\alpha$ 复合物 (K_d 约为 5nM)。这种低亲和性复合物接下来与第一种信号转导成分(标记的 $\beta 1$)结合而形成一种高亲和性细胞因子· $R\alpha$ · $\beta 1$ 复合物 (K_d 约为 10pM)。就 IL-6 $R\alpha$ 而言, 这种成分是 gp130。这种三聚化高亲和性复合物随后与另一种这类复合物结合。这种复合物的形成产生信号转导, 此时它分别涉及两种信号转导成分即标记的 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 的二聚化(选自(Ward 等《生物化学杂志》(J. Bio. Chem.) 269: 23286-23289 (1994); Stahl 和 Yancopoulos《神经生物学杂志》(J. Neurobiology) 25: 1454-1466 (1994); Stahl 和 Yancopoulos《细胞》(Cell) 74: 587-590 (1993)))。

附图 7: 以异二聚化受体为基础的用于 IL-6 的配体捕获物的设计。异二聚化配体捕获物 (trap) 由两个链间二硫键连接的蛋白质 gp130-Fc 和 IL-6 $R\alpha$ -Fc 组成。证实 gp130-Fc·IL-6 $R\alpha$ -Fc 复合物(上组)可模拟高亲和性细胞因子· $R\alpha$ · $\beta 1$ 复合物(下组)。配体捕获物通过隔离 IL-6 且由此不用来与 IL-6-响应细胞上的天然受体发生相互作用而起拮抗剂的作用。

附图 8: 异二聚化免疫球蛋白重链/轻链受体融合体。图解描绘了重链/轻链受体融合分子的一个实例。gp130 的胞外结构域与 $C\gamma$ 融合, 而 IL-6 $R\alpha$ 的胞外结构域与 κ 链 (κ) 的恒定区融合。还描绘了链间二硫键 (S-S)。

附图 9: gp130- $C\gamma 1$ 的氨基酸序列。关键: 1-619 位氨基酸来自人 gp130 (Hibi 等《细胞》(Cell) 63: 1149-1157 (1990))。用粗体型字表示 Ser-Gly 的桥连。662-651 位氨基酸来自人 IgG1 的恒定区 (Lewis 等《免疫学杂志》(J. Immunol.) 151: 2829-2838 (1993))。(*) 表示终止 (STOP) 密码子的位置。

附图 10: gp130 $\Delta 3$ fibro 的氨基酸序列。关键: 1-330 位氨基酸来自人 gp130 (Hibi 等《细胞》(Cell) 63: 1149-1157 (1990))。其它符号如附图 9 中所述。

附图 11: J-CH1 的氨基酸序列。关键: 用粗体型字表示 Ser-Gly 的桥连, 用斜体字表示 J-肽, 给 CH1 结构域加下划线。

附图 12: $C\gamma 4$ 的氨基酸序列。关键: 用粗体型字表示 Ser-Gly

的桥连, 2-239 位氨基酸包括 $C\gamma 4$ 序列。

附图 13: κ 结构域的氨基酸序列。关键: 用粗体型字表示 Ser-Gly 的桥连, 2-108 位氨基酸包括 κ 结构域。涉及含有 $C\gamma$ 的 CH1 结构域的 κ 结构域二硫键的是 C-末端半胱氨酸 (108 位氨基酸)。

附图 14: λ -结构域的氨基酸序列。关键: 用粗体型字表示 Ser-Gly 的桥连, 2-106 位氨基酸包括 λ 结构域 (Cheung 等《病毒学杂志》(J. Virol.) 66: 6714-6720 (1992))。涉及含有 $C\gamma$ 的 CH1 结构域的 λ 结构域二硫键的是 C-末端半胱氨酸 (106 位氨基酸)。

附图 15: 可溶性 IL-6R α 结构域的氨基酸序列。关键: 1-358 位氨基酸包括可溶性 IL-6R α 结构域 (Yamasaki 等《科学》(Science) 241: 825-828 (1988))。用粗体型字表示 Ala-Gly 的桥连。

附图 16: 可溶性 IL-6R α 313 结构域的氨基酸序列。关键: 1-313 位氨基酸包括截短的 IL-6R α 结构域 (IL-6R α 313)。用粗体型字表示 Thr-Gly 的桥连。

附图 17: gp130- $C\gamma 1$ · IL-6R α - κ 的纯化。在非还原条件下进行 4% - 12% 梯度凝胶 SDS-PAGE。通过用银染色可以观察到蛋白质。泳道 1: 在蛋白质 A 琼脂糖 (Pharmacia) 上纯化的约 100ng 的物质。泳道 2: 标准物分子大小 (Amersham)。泳道 3: 此处所示的是在 IL-6 亲和色谱步骤中进一步纯化后蛋白质 A 纯化的物质。表示了 gp130- $C\gamma$ 二聚体 [(gp130- $C\gamma 1$)₂]、与一种 IL-6R α - κ [(gp130- $C\gamma 1$)₂ · (IL-6R α - κ)₁] 结合的 gp130- $C\gamma 1$ 二聚体和与两种 IL-6R α - κ [(gp130- $C\gamma 1$)₂ · (IL-6R α - κ)₂] 结合的 gp130- $C\gamma 1$ 二聚体的位置以及用千道尔顿表示的标准物分子大小的大小 (200、100 和 46)。

附图 18: 缓慢与配体捕获物 IL-6 解离。将来自以重链/轻链受体为基础的配体捕获物 (gp130- $C\gamma 1$ · IL-6R α - κ) 的解离比例与用中和单克隆抗体 B-E8 (BE8 MAbs) 获得的解离比例进行比较。

附图 19: IL-6 可以诱导配体捕获物的多聚化。(A) 图解描绘两种不同的配体捕获物并根据其结合蛋白质 A 的能力列举。gp130-Fc · IL-6R α -Fc (GF6F) 通过其 Fc-结构域结合蛋白质 A, 而 gp130-CH1 · IL-6R α - κ (G16 κ) 不结合蛋白质 A。(B) 用蛋白质 A-琼脂糖从如所标记的 GF6F $\pm$ IL-6、G16 κ $\pm$ IL-6 或 GF6F+G16 κ $\pm$ IL-6 的混合物中沉淀的蛋白质的抗卡巴蛋白质印迹。

附图 20: IL-6 依赖性 XG-1 细胞增殖的抑制。为进行增殖试验而通过使细胞缺乏 IL-6 5 小时来制备 XG-1 细胞[Zhang 等《血液》(Blood) 83: 3654-3663 (1994)]。将试验设定在 96-孔组织培养皿内的 RPMI + 10% 胎牛血清 + 青霉素/链霉素 + 0.050nM 2-巯基乙醇 + 谷氨酰胺中进行。每孔使用 0.1ml 的该培养基。在试验的开始阶段以 250,000/ml 的密度悬浮细胞。在添加 IL-6±配体捕获物或抗体 72 小时后,如上所述进行 MTT 试验(Panayotatos 等《生物化学》(Biochemistry) 33: 5813-5818 (1994))。列举了使用的不同配体捕获物。

附图 21A - 21D: 命名为 424 的融合多肽的核苷酸序列编码和推定氨基酸序列,它能够结合细胞因子 IL-4 而形成非功能性复合物。

附图 22A - 22D: 命名为 603 的融合多肽的核苷酸序列编码和推定氨基酸序列,它能够结合细胞因子 IL-4 而形成非功能性复合物。

附图 23A - 23D: 命名为 622 的融合多肽的核苷酸序列编码和推定氨基酸序列,它能够结合细胞因子 IL-4 而形成非功能性复合物。

附图 24A - 24F: 命名为 412 的融合多肽的核苷酸序列编码和推定氨基酸序列,它能够结合细胞因子 IL-6 而形成非功能性复合物。

附图 25A - 25F: 命名为 616 的融合多肽的核苷酸序列编码和推定氨基酸序列,它能够结合细胞因子 IL-6 而形成非功能性复合物。

附图 26A - 26E: 命名为 569 的融合多肽的核苷酸序列编码和推定氨基酸序列,它能够结合细胞因子 IL-1 而形成非功能性复合物。

附图 27: 表示在 TF1 细胞生物测定试验中属于一种 IL-2R γ -scb-IL4R α -Fc Δ C1 融合多肽的命名为 4SC375 的 IL-4 捕获物作为 IL-4 拮抗剂优于单独的 IL4R α Fc Δ C1 几个数量级。

附图 28: 表示在 TF1 细胞生物测定试验中命名为 4SC375 的 IL-4 捕获物显示出与命名为 4SC424 (附图 21A - 21D 中所述) 的 IL-4 捕获物相同的拮抗剂活性,其中 4SC424 是一种具有同等含量的 IL-2R γ 成分与 IL-4R α 成分的 IL-2R γ -IL4R α -Fc Δ C1 融合多肽。

附图 29: 表示附图 24A - 24F 中所述的 IL6 捕获物 (6SC412IL6R-scb-gpx-Fc Δ C1) 在 XG1 生物测定试验中是一种优于中和单克隆抗体对人 IL-6-BE8 的 IL-6 拮抗剂。

附图 30: 表示捕获物 1SC569 (附图 26A - 26E 中所述) 能够拮

抗 IL-1 的作用并在用 IL-1 治疗时阻断 IL-6 从 MRC 5 细胞中产生。

附图 31A - 31G: 列举了 IL-4R α 1. IL-13R α 1. Fc 单链捕获物构建体的核苷酸和编码的氨基酸序列。

附图 32A - 32G: 列举了 IL-13R α 1. IL-4R α 1. Fc 单链捕获物构建体的核苷酸和编码的氨基酸序列。

附图 33: 由 IL-4R α 1. IL-13R α 1. Fc 和 IL-13R α 1. IL-4R α 1. Fc 阻断 IL-13。以 10nM 的浓度添加 IL-4R α 1. IL-13R α 1. Fc 或 IL-13R α 1. IL-4R α 1. Fc 捕获物阻断 IL-13 诱导的生长达 ~ 2nM。在 ~ 4 - 5nM 的 IL-13 浓度下, TF1 细胞的生长被抑制了 50%。

附图 34: 由 IL-4R α 1. IL-13R α 1. Fc 和 IL-13R α 1. IL-4R α 1. Fc 阻断 IL-4。以 10nM 的浓度添加 IL-4R α 1. IL-13R α 1. Fc 或 IL-13R α 1. IL-4R α 1. Fc 阻断 IL-4 诱导的生长达 ~ 1nM。在 ~ 3 - 4nM 的 IL-4 浓度下, TF1 细胞的生长被抑制了 50%。

附图 35: 人 IL-1 捕获物阻断了外源给予的 huIL-1 的体内作用。在 0 时给 BALB/c 小鼠皮下注射 huIL-1 (0.3 μ g/kg)。在注射 huIL-1 前 24 小时, 用载体或 150 倍摩尔以上的 huIL-1 捕获物预处理动物。在处死动物前 2 小时 (26 小时), 用第 2 次注射 huIL-1 (0.3 μ g/kg, 皮下) 攻击小鼠。在不同的时间点处采集血样并检测血清中的 IL-1 水平 (表示为平均值 $\pm$ /-SEM; n=5/组)。

附图 36A 和附图 36B: 人 IL-4 捕获物拮抗猴体内的人 IL-4 的作用。附图 36A: 用所指示的 3 个部分处理猕猴。每日皮下注射两次人 IL-4 (25 μ g/kg)、持续 4 天; 并从给予人 IL-4 前 1 天开始静脉内给予人 IL-4 捕获物 (8mg/ml) 和载体 5 天。每日采集血浆并检测 MCP-1 水平。将结果表示为平均值 $\pm$ /-SEM; n=4。 (ANOVA p<0.0007; Tukey-Kramer: 部分 2 与部分 1 比较, p 0.05; 部分 2 与部分 3 比较, p 0.05; 部分 1 与部分 3 比较, 没有显著性差异。) 附图 36B: 用所指示的 3 个部分处理猕猴。每日皮下注射两次人 IL-4 (25 μ g/kg)、持续 4 天; 并从给予人 IL-4 前 1 天开始静脉内给予人 IL-4 捕获物 (8mg/ml) 和载体 5 天。每日采集全血用于 CD16 的流式细胞仪分析。将结果表示为平均值 $\pm$ /-SEM; n=4。 (ANOVA p<0.042; Tukey-Kramer: 部分 2 与部分 1 比较, p<0.05; 部分 2 与部分 3 和部分 1 比较, 没有显著性差异。)

附图 37: 小鼠 IL-4 捕获物部分防止小鼠体内 IL-4 介导的 IgE 增加。将用抗小鼠 IgD 注射 (100 μ l/小鼠, 皮下) 的 BALB/C 小鼠随机分成 3 组, 各组接受(第 3-5 天时)载体、鼠 IL-4 捕获物(1mg/kg, 皮下)或小鼠 IL-4 的单克隆抗体(1mg/kg, 皮下)。在不同的时间点处采集血清并检测 IgE 水平。将结果表示为平均值 $\pm$ SEM (n=5/组)。(ANOVA $p = 0.0002$; Tukey-Kramer: 载体与 IL-4 捕获物比较, $p < 0.01$; 载体与 IL-4 抗体比较, $p < 0.001$; IL-4 捕获物与 IL-4 抗体比较, 没有显著性差异)。

发明详述

本发明提供了一种编码能够结合细胞因子而形成非功能性复合物的融合多肽的分离的核酸分子, 它包括:

a) 一种编码第一种融合多肽成分的核苷酸序列, 所述的第一种融合多肽成分包括细胞因子受体特异性决定成分的胞外结构域的细胞因子结合部分的氨基酸序列;

b) 一种编码第二种融合多肽成分的核苷酸序列, 所述的第二种融合多肽成分包括细胞因子受体的信号转导成分胞外结构域的细胞因子结合部分的氨基酸序列;

c) 一种编码第三种融合多肽成分的核苷酸序列, 所述的第三种融合多肽成分包括多聚化成分的氨基酸序列。

所谓“细胞因子结合部分”指的是结合所述细胞因子所必需的胞外结构域的最小部分。本领域技术人员可以接受的观点是细胞因子受体的确定特征是存在的两种含有规范半胱氨酸的纤连蛋白样结构域且存在的 WSXWX 盒状室(Bazan, J. F., 1990, PNAS 87: 6934-6938)。还可以将编码细胞因子受体结合成分和细胞因子受体信号转导成分的胞外结构域的序列用于生成本发明的融合多肽。类似地, 可以使用编码细胞因子受体成分较长部分的较长序列。然而, 期望小于胞外结构域的片段起结合细胞因子的作用, 且由此本发明期望包括结合细胞因子所必需的胞外结构域最小部分作为细胞因子结合部分的融合多肽。

本发明包括细胞因子受体的“特异性决定成分”和细胞因子受体的“信号转导成分”。无论用于命名细胞因子特定成分或亚单位的命名法如何, 本领域技术人员均可以识别用于决定细胞因子的细胞靶物

的受体成分或亚单位且由此得知构成“特异性决定成分”的成分。

类似地，无论所用的命名法如何，本领域技术人员均可以得知构成“信号转导成分”的受体成分或亚单位。本文所用的“信号转导成分”是一种不属于特异性决定成分且在没有特异性成分存在的情况下不结合细胞因子或与之结合较弱的天然受体的成分。在该天然受体中，“信号转导成分”可以参与信号传输。

例如，尽管某些细胞因子受体含有命名为 α 和 β 的成分，但是 IL-4 受体含有称作 IL-2R γ 的信号转导成分。然而，无论何名称与该成分相关，本领域技术人员均可以得知 IL-4 受体的何种成分是信号转导成分。因此，为了实施本发明和产生对 IL-4 的高亲和性捕获物，本领域技术人员生产了一种分离的核酸分子，它包括：编码第一种融合多肽成分的核苷酸序列，所述的第一种融合多肽成分包括 IL-4 受体特异性决定成分（IL-4R α ）的胞外结构域的细胞因子结合部分的氨基酸序列；编码第二种融合多肽成分的核苷酸序列，所述的第二种融合多肽成分包括 IL-4 受体的信号转导成分（IL-2R γ ）胞外结构域的细胞因子结合部分的氨基酸序列；和编码第三种融合多肽成分的核苷酸序列，所述的第三种融合多肽成分包括多聚化成分（例如一种 IgG 的 Fc 结构域）的氨基酸序列，从而生成一种 IL-4 的高亲和性捕获物。

将可以用于制备本发明细胞因子拮抗剂的受体成分的某些另外的实例列在表 1 中。表 1 中列举了用于描述那些起某些细胞因子受体特异性决定成分作用的成分和那些起某些细胞因子受体信号转导成分作用的成分的科学文献中所用的某些可变命名，它们仅作为实例而不以任何方式起限定作用。

表 1		信号转导成分	
细胞因子	特异性决定成分	IL-1R AcP (参考文献 8, 11)	
白细胞介素-1 (IL-1)	I 型 IL-1R (参考文献 8) I 型 IL-1R (参考文献 8) IL-1RI (参考文献 11) IL-1RII (参考文献 11)		
白细胞介素-2 (IL-2)	α -亚单位 (参考文献 2) α -链 (参考文献 3) IL-2R α (参考文献 1)	β -链 (参考文献 3) β -亚单位 (参考文献 2) γ -链 (参考文献 3) IL-2R β (参考文献 1, 10) IL-2R γ (参考文献 1, 10)	
白细胞介素-3 (IL-3)	IL-3R α (参考文献 1) α -亚单位 (参考文献 2) α -受体成分 (参考文献 5)	β_c (参考文献 1) β -亚单位 (参考文献 2) β -链 (参考文献 3) β -受体成分 (参考文献 5)	
白细胞介素-4 (IL-4)	IL-4R (参考文献 1)	γ -链 (参考文献 3) IL-2R γ (参考文献 1)	
白细胞介素-5 (IL-5)	IL-5 α (参考文献 1) α -亚单位 (参考文献 2) α -受体成分 (参考文献 5)	β_c (参考文献 1) β -亚单位 (参考文献 2) β -链 (参考文献 3) β -受体成分 (参考文献 5)	

表 1 (接 续)

细胞因子	特异性决定成分	信号转导成分
粒细胞巨噬细胞集落刺激因子	α -受体成分 (参考文献 5) α -亚单位 (参考文献 2) GMR α - (参考文献 2)	β -受体成分 (参考文献 5) β -亚单位 (参考文献 2) β -链 (参考文献 3) β_c (参考文献 1) GMR β (参考文献 1, 2)
白血病抑制因子	LIFBP (参考文献 1) α -受体成分 (参考文献 5)	Gp130 (参考文献 1, 3) β -受体成分 (参考文献 5)
白细胞介素 - 11 (IL - 11)	α -链 (参考文献 4) NR1 (参考文献 4)	Gp130 (参考文献 4)
白细胞介素 - 15 (IL - 15)	IL - 15R α (参考文献 10)	IL - 2R β (参考文献 10) IL - 2R γ (参考文献 10)
干扰素 - γ (IFN γ)	IFN - γ R (参考文献 7) IFN - γ R1 (参考文献 7)	AF - 1 (参考文献 7) IFN - γ R2 (参考文献 7)
TGF β	II 型 (参考文献 6, 9)	I 型 (参考文献 6, 9)

表 1 中仅引用了大量参考文献中的几篇并将它们列举如下:

1. Sato 和 Miyajima 《细胞生物学最新观点》 (Current Opinion in Cell Biology) 6: 174-179 (1994) - 参见 176 页第 9 - 16 行;

2. Miyajima 等 《免疫学年鉴回顾》 (Annual Review of Immunology) 10: 295-331 (1992) - 参见 295 页第 4 行至 296 页第 1 行; 305 页最后一段;

3. Kondo 等 《科学》 (Science) 262: 1874-1877 (1993) - 参见 1874 页第 1 和 2 列;

4. Hilton 等 《欧洲分子生物学协会杂志》 (EMBO Journal) 13: 4765-4775 (1994) - 参见 4766 页第 1 列、第 20、24 行;

5. Stahl 和 Yancopoulos 《细胞》 (Cell) 74: 587-590 (1993) - 参见 587 页第 2 列第 15 至 22 行;

6. Bassing 等 《生物化学杂志》 (Journal of Biological Chemistry) 269: 14861-14864 (1994) - 参见 14861 页第 2 列第 1 至 9 和 21 至 28 行;

7. Kotenko 等 《生物科学杂志》 (Journal of Biological Science) 270: 20915-20921 (1995) - 参见 20915 页摘要的第 1 至 5 行;

8. Greenfeder 等 《生物化学杂志》 (Journal of Biological Chemistry) 270: 13757-13765 (1995) - 参见 13757 页第 1 列第 6 行至第 2 列第 3 行和第 2 列第 10 - 12 行; 第 13764 页第 2 列倒数第 3 行和 13765 页第 1 列第 1 至 7 行;

9. Lebrun 和 Vale 《细胞分子生物学》 (Molecular Cell Biology) 17: 1682-1691 (1997) - 参见 1682 页摘要的第 2 至 6 行;

10. Kennedy 和 Park 《临床免疫学杂志》 (Journal of Clinical Immunology) 16: 134-143 (1996) - 参见 134 页摘要的第 1 至 7 行; 136 页第 2 列第 1 至 5 行;

11. Wesche 等 《生物化学杂志》 (Journal of Biological Chemistry) 272: 7727-7731 (1997) - 参见 7731 页第 20 至 26 行.

Kotenko 等近来鉴定了据报导可用作活性 IL-10 受体复合物和启动 IL-10 诱导的信号转导事件所必需的辅助链的 IL-10R2 (IL-10R β)

链 (S. V. Kotenko 等《欧洲分子生物学协会杂志》(EMBO Journal) 1997 第 16 卷: 5894-5903)。另外的细胞因子及其受体描述在由 Chares A. Janeway, Jr. 和 Paul Travers 著、Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc. copyright 1996 出版的《免疫生物学、健康与疾病的免疫系统》(Immunobiology, The Immune System In Health and Disease) 第 2 版第 A:9 页附录 II 中。

在制备编码本发明融合多肽的核酸序列的过程中, 用由宿主载体系统表达时产生融合多肽单体种类的单链核苷酸编码所述融合多肽的第一种、第二种和第三种成分。由此表达的单体因多聚化成分(第三种融合多肽成分)之间的相互作用而多聚化。以这种方式生产融合多肽避免了如果第一种和第二种成分作为独立的分子产生且然后多聚化而对由此产生的异二聚化混合物纯化的需求。例如, 1995 年 11 月 28 日授权的美国专利号 5, 470, 952 描述了起 CNTF 或 IL-6 拮抗剂作用的异二聚化蛋白质的生产方法。从用合适的 α 和 β 成分共转染的细胞系统纯化异二聚体。然后使用诸如从制备型非变性聚丙烯酰胺凝胶中的被动洗脱法这样的方法或通过使用高效阳离子交换层析法从同二聚体中分离异二聚体。使用本发明的方法可以避免对该纯化步骤的需求。

此外, 1996 年 4 月 18 日公开的 PCT 国际申请 WO 96/11213 中命名了二聚化 IL-4 抑制剂, 该申请的申请人已经制备了两种 IL-4 受体被聚合间隔物所结合的同二聚体并已经制备了 IL-4 受体被聚合间隔物连接成 IL-2 受体 γ 链的异二聚体。所述的聚合间隔物是聚乙二醇(PEG)。分别表达两种受体成分 IL-4R 和 IL-2R γ 并纯化它们。然后通过使用双官能 PEG 试剂将所述成分彼此连接而生产聚乙二醇化(pegylated)的同二聚体和异二聚体。本发明的有利因素是它可避免对这类耗时而昂贵的纯化和聚乙二醇化(pegylated)步骤的需求。

在本发明的一个实施方案中, 编码第一种成分的核苷酸序列是编码第二种成分的核苷酸序列的上游。在本发明的另一个实施方案中, 编码第一种成分的核苷酸序列是编码第二种成分的核苷酸序列的下游。可以准备实施本发明另外的实施方案, 其中依次重排第一种、第二种和第三种融合多肽成分。例如, 如果将编码第一种成分的核苷酸序列命名为 1、将编码第二种成分的核苷酸序列命名为 2 并将编码第

三种成分的核苷酸序列命名为 3, 那么作为从 5'-3'读码的本发明分离的核酸中的成分顺序可以是下列 6 种组合中的任意一种: 1, 2, 3; 1, 3, 2; 2, 1, 3; 2, 3, 1; 3, 1, 2 或 3, 2, 1。

在本发明的另一个实施方案中, 由所述融合多肽结合的细胞因子可以是血细胞生成素族细胞因子, 它们选自白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-4、白细胞介素-5、白细胞介素-6、白细胞介素-7、白细胞介素-9、白细胞介素-11、白细胞介素-13、白细胞介素-15、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、制癌蛋白 M、白血病抑制因子和心脏营养蛋白-1 (cardiotrophin-1) 组成的组。

在本发明另外的实施方案中, 由所述融合多肽结合的细胞因子可以是干扰素族细胞因子, 它们选自 IFN- γ 、IFN- α 和 IFN- β 组成的组。

在本发明另外的实施方案中, 由所述融合多肽结合的细胞因子可以是免疫球蛋白超家族的细胞因子, 它们选自 B7.1 (CD80) 和 B7.2 (B70) 组成的组。

在本发明另外的实施方案中, 由所述融合多肽结合的细胞因子可以是 TNF 族细胞因子, 它们选自 TNF- α 、TNF- β 、LT- β 、CD40 配体、Fas 配体、CD27 配体、CD30 配体和 4-1 BBL 组成的组。

在本发明另外的实施方案中, 由所述融合多肽结合的细胞因子可以是选自白细胞介素-1、白细胞介素-10、白细胞介素-12、白细胞介素-14、白细胞介素-18 和 MIF 组成的组的细胞因子。

因为在 TGF- β /BMP 族细胞因子中的特异性确定和信号转导通过类似机理发生 (参见 D. Kingsley, 《基因与发育》(Genes & Development) 1994, 8: 133-146; J. Wrana, 《无机电解质代谢》(Miner Electrolyte Metab) 24: 120-130 (1998); R. Deryneck 和 X. Feng《生物化学和生物物理学志》(Biochimica et Biophysica Acta) 1333 (1997) F105-F150; 和 J. Massague 和 F. Weis-Garcia: “丝氨酸/苏氨酸激酶受体: 转化 β 族生长因子信号的介体” - 《癌症调查》(Cancer Surveys) 1996 第 27 卷“细胞信号传输”, 皇家癌症研究基金会 (Imperial Cancer Research Fund)), 所以可以将本发明用于生产属于 TGF- β /BMP 族的细胞因子的高亲和性拮抗剂。

因此, 在本发明另外的实施方案中, 由融合多肽结合的细胞因子可以是 TGF- β /BMP 族的细胞因子, 它们选自 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF-

β 3、BMP-2、BMP-3a、BMP-3b、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8a、BMP-8b、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-15、BMP-16、与子宫内膜出血相关的因子(EBAF)、生长分化因子-1(GDF-1)、GDF-2、GDF-3、GDF-5、GDF-6、GDF-7、GDF-8、GDF-9、GDF-12、GDF-14、米勒抑制物质(mullerian inhibiting substance)(MIS)、活化素-1、活化素-2、活化素-3、活化素-4和活化素-5组成的组。

在本发明的可选择的实施方案中,特异性决定成分、信号转导成分或两者均可以被单链Fv取代。单链Fv(scFv)是一种仅具有通过一段合成肽序列与轻链V区连接的重链V区的截短的Fab。参见,例如转让给Cambridge Antibody Technology Limited的美国专利号5,565,332、5,733,743、5,837,242、5,858,657和5,871,907,将它们引入本文作为参考。因此,本发明期望:例如,一种编码能够结合细胞因子而形成非功能性复合物的融合多肽的分离的核酸分子,它包括:一种编码第一种融合多肽成分的核苷酸序列,所述的第一种融合多肽成分包括细胞因子受体特异性决定成分的胞外结构域的细胞因子结合部分的氨基酸序列;一种编码第二种融合多肽成分的核苷酸序列,所述的第二种融合多肽成分包括scFv的氨基酸序列,所述的scFv能够在与细胞因子受体的特异性决定成分胞外结构域细胞因子结合部分结合的位点不同的位点上结合细胞因子;和一种编码第三种融合多肽成分的核苷酸序列,所述的第三种融合多肽成分包括多聚化成分的氨基酸序列。另一方面,所述的特异性决定成分可以被scFv取代,所述的scFv在细胞因子上结合到与信号转导成分结合的位点不同的位点。因此,本发明关注一种编码能够结合细胞因子而形成非功能性复合物的融合多肽的分离的核酸分子,它包括:一种编码第一种含有scFv氨基酸序列的融合多肽成分的核苷酸序列,所述的scFv在细胞因子上结合与细胞因子受体信号转导成分的胞外结构域细胞因子结合的位点不同的位点;一种编码第二种融合多肽成分的核苷酸序列,所述的第二种融合多肽成分包括细胞因子受体的信号转导成分胞外结构域的细胞因子结合部分的氨基酸序列;和一种编码第三种融合多肽成分的核苷酸序列,所述的第三种融合多肽成分包括多聚化成分的氨基酸序列。

在另一个实施方案中,本发明关注一种编码能够结合细胞因子而

形成非功能性复合物的融合多肽的分离的核酸分子，它包括：一种编码第一种含有第一种 scFv 氨基酸序列的融合多肽成分的核苷酸序列，所述的第一种 scFv 与细胞因子上的位点结合；一种编码第二种含有第二种 scFv 氨基酸序列的融合多肽成分的核苷酸序列，所述的第二种 scFv 在细胞因子上结合与第一种 scFv 结合的位点不同的位点；和一种编码第三种融合多肽成分的核苷酸序列，所述的第三种融合多肽成分包括多聚化成分的氨基酸序列。

在所有上述含有 scFv's 的实施方案中，本发明还关注编码第一种成分的核苷酸序列是编码第二种成分的核苷酸序列的上游的实施方案；编码第一种成分的核苷酸序列是编码第二种成分的核苷酸序列的下游的实施方案；和本发明另外的依次重排第一种、第二种和第三种融合多肽的实施方案。例如，如果将编码第一种成分的核苷酸序列命名为 1、将编码第二种成分的核苷酸序列命名为 2 并将编码第三种成分的核苷酸序列命名为 3，那么作为从 5'-3'读码的本发明分离的核酸中的成分顺序可以是下列 6 种组合中的任意一种：1, 2, 3；1, 3, 2；2, 1, 3；2, 3, 1；3, 1, 2 或 3, 2, 1。

在本发明优选的实施方案中，所述的多聚化成分包括免疫球蛋白衍生的结构域。更具体地说，免疫球蛋白衍生的结构域可以选自 IgG 的 Fc 结构域、IgG 的重链和 IgG 的轻链组成的组。在另一个实施方案中，所述的多聚化成分可以是 Fc 结构域，可以从其中除去前 5 个氨基酸（包括半胱氨酸）以便产生称作 Fc ($\Delta C1$) 的多聚化成分。另一方面，所述的多聚化成分可以是 Fc 结构域，其中前 5 个氨基酸内的半胱氨酸已经被另一种诸如（例如）丝氨酸或丙氨酸这样的氨基酸所取代。

本发明还提供了由本发明分离的核酸分子编码的融合多肽。因第三种多聚化成分的功能而优选该融合多肽是多聚化形式。在优选的实施方案中，多聚体是二聚体。合适的多聚化成分是编码免疫球蛋白重链铰合区的序列（Takahashi 等，1982，《细胞》（Cell）29：671-679）、免疫球蛋白基因序列及其部分。在本发明的一个优选的实施方案中，将免疫球蛋白基因序列、特别是一种编码 Fc 结构域的基因序列用于编码第三种多聚化成分。

本发明还关注一种包括本文所述本发明核酸分子的载体。

本发明还提供了一种包括本文所述本发明核酸分子的表达载体,其中所述的核酸分子可操作地与一种表达控制序列连接。本发明还提供了一种用于生产融合多肽的宿主-载体系统,它包括已经引入适于表达所述融合多肽的宿主细胞的本发明表达载体。所述的合适的宿主细胞可以是一种诸如大肠杆菌这样的细菌细胞、诸如巴斯德毕赤氏酵母这样的酵母细胞、诸如草地贪夜蛾这样的昆虫细胞或诸如COS、CHO、293、BHK或NS0细胞这样的哺乳动物细胞。

本发明还提供了生产本发明融合多肽的方法,该方法在允许生产所述融合多肽并回收如此生产的融合多肽的条件下通过使本文所述的宿主-载体系统的细胞生长来进行。

本发明提供了以由诸如CNTF族细胞因子这样的细胞因子共有的受体成分为基础的新型拮抗剂。

本文所述的本发明关注任意细胞因子拮抗剂的生产方法,它应用一种 α 特异性决定成分,在与细胞因子混合时与第一种 β 信号转导成分结合而形成非功能性中间体,然后与第二种 β 信号转导成分结合,从而导致 β -受体二聚化和随后的信号转导。根据本发明,使受体的可溶性 α 特异性决定成分($sR\alpha$)与细胞因子受体($\beta 1$)的第一种 β 信号转导成分的胞外结构域($\beta 1$)结合成异二聚体($sR\alpha: \beta 1$),它们通过结合细胞因子而形成一种非功能性复合物而起拮抗剂的作用。

正如实施例1中所述,CNTF和IL-6共有 $\beta 1$ 受体成分gp130.CNTF与CNTFR α 和gp130形成中间体这一事实可以在缺乏LIFR β 的细胞中得到证实(实施例1),其中CNTF与CNTFR α 的复合物结合gp130并通过IL-6和IL-6R α 防止gp130的同二聚化,由此阻断信号转导。这些研究为开发本文所述的IL-6拮抗剂提供了基础,正如它们表明:在配体存在的情况下,如果可以形成由配体、其 α 受体成分及其 $\beta 1$ 受体成分组成的非功能性中间体复合物,那么它将有效地阻断配体的作用。其它细胞因子可以使用诸如LIFR β 这样的其它 $\beta 1$ 受体成分,它们也可用于生产本发明的拮抗剂。

因此,例如在本发明的一个实施方案中,IL-6或CNTF的有效拮抗剂由其受体的 α 特异性决定成分(分别是 $sIL-6R\alpha$ 和 $sCNTFR\alpha$)胞外结构域与gp130的胞外结构域的异二聚体组成。下文分别称作 $sIL-6R\alpha: \beta 1$ 或 $sCNTFR\alpha: \beta 1$ 的所得的异二聚体分别起IL-6或CNTF

高亲和性捕获物的作用,由此使细胞因子难以与天然膜结合形式的其受体形成信号转导复合物。

尽管已经证实来自受体胞外部分的可溶性配体结合结构域作为其配体的捕获物起一定的作用且由此起拮抗剂的作用[Bargetzi 等《癌症研究》(Cancer Res.) 53: 4010-4013 (1993); 等《美国国家科学院学报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89: 8616-8620 (1992); Mohler 等《免疫学杂志》(J. Immunol.) 151: 1548-1561 (1993); Narazaki 等《血液》(Blood) 82: 1120-1126 (1993)], 但是 IL-6 和 CNTF 受体的异常方面在于 α 受体成分构成了配体结合结构域, 它们以可溶性形式与其配体一同有效地起受体激动剂的作用[Davis 等《科学》(Science) 259: 1736-1739 (1993); Taga 等《细胞》(Cell) 58: 573-581 (1989)]. 按照本发明制备的 sR α : β 1 异二聚体为其配体提供了有效的捕获物, 从而结合皮摩尔范围的具有亲和性的这些配体(以对 CNTF 与 PC12D 细胞的结合研究为基础)而不会产生功能性中间体。可以将本文所述的技术应用于开发任意细胞因子的细胞因子捕获物, 它使用提供特异性的 α -成分, 以及一种 β 成分, 该 β 成分在与 α -特异性成分结合时, 对细胞因子具有的亲和性高于各单独成分。因此, 本发明的拮抗剂包括下列物质的拮抗剂: 白细胞介素 1-5[IL-1, Greenfeder 等《生化杂志》(J. Bio. Chem.) 270: 13757-13765 (1995); Gou 等《生化杂志》(J. Bio. Chem.) 270: 27562-27568 (1995)]; IL-2[Taniguchi 等欧洲专利号 0386289-A 和 0386394-A (1990); Takeshita 等《科学》(Science) 257: 379-382 (1992)]; IL-3[Kitamura 等《细胞》(Cell) 66: 1165-1174 (1991)]; IL-4[Idzerda 等《实验药物杂志》(J. Exp. Med.) 171: 861-873 (1990)]; IL-5[Taverneir 等《细胞》(Cell) 66: 1175-1184 (1991)]; IL-11[Cherel 等直接提交给 EMBL/GenBank/DBJ 数据库; 登记号 Z38102]; 白细胞介素 15[IL-15; Hemar 等《细胞生物学杂志》(J. Cell. Biol.) 1295: 55-64 (1995); Taniguchi 等欧洲专利号 0386289-A 和 0386394-A (1990); Takeshita 等《科学》(Science) 257: 379-382 (1992)]; 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子[GM-CSF; Hayashida 等《美国国家科学院学报》(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 97: 9655-9659 (1990)]

]; LIF; γ 干扰素[IFN γ ; Aguet 等《细胞》(Cell)55: 273-280(1988); Soh 等《细胞》(Cell)76: 793-802(1994)]和 β 转化生长因子[TGF β ; Inagaki 等《美国国家科学院学报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)90: 5359-5363(1993)]。

使用本领域技术人员所公知的方法可以制备 α 和 β 受体胞外结构域。已经克隆、测序并表达了 CNTFR α 受体[Davis 等《科学》(Science)253: 59-63(1993)], 将该文献的全部内容引入本文作为参考]。Gearing 等在《欧洲分子生物学协会杂志》(EMBO J.)10: 2839-2848(1991)、Hibi 等在《细胞》(Cell)63: 1149-1157(1990)中和1993年5月27公开的 PCT 申请 W0 93/10151 中描述了 LIFR β 和 gp130 的克隆方法, 将这些文献的全部内容引入本文作为参考。

通过原核或真核表达系统中克隆并表达可以制备用于实施本发明的受体分子。使用许多方法可以表达和纯化重组受体基因。可以将编码所述因子的基因亚克隆入诸如例如不以任何方式起限定作用的 pCP110 这样的细菌表达载体中。

通过任意技术可以纯化重组因子, 使得随后形成稳定的具有生物活性的蛋白质。例如(且不以任何方式起限定作用), 可以从细胞中回收作为可溶性蛋白质或作为包含体的所述因子, 用 8M 盐酸胍和透析可以从细胞中定量提取它们。为了进一步纯化所述因子, 可以使用常规的离子交换层析、疏水作用层析、反相层析或凝胶过滤。

可以使用公知的融合区改造 sR α : β 1 异二聚化受体, 1993 年 5 月 27 公开的描述 β 受体异二聚体的生产方法的标题为“致癌蛋白 M 和白血病抑制因子的受体”的 PCT 申请 W0 93/10151 中描述了这些公知的融合区; 或可以通过以化学方式交联胞外结构域来制备 sR α : β 1 异二聚化受体。所用的结构域可以由 α 和 β 成分的完整胞外结构域组成或它们可以由维持与其配体形成复合物和 sR α : β 1 复合物中其它成分的能力的突变体或其片段组成, 例如, 正如下面实施例 4 中所述, 已经使用缺乏三种纤连蛋白样结构域的 gp130 制备了 IL-6 拮抗剂。

在本发明的一个实施方案中, 使用亮氨酸拉链改造胞外结构域。已经使用 1: 1 的化学计量法证实了人转录因子 c-jun 和 c-fos 的亮氨酸拉链结构域可形成稳定的异二聚体[Busch 和 Sassone-Corsi《遗传学趋势》(Trends Genetics)6: 36-40(1990); Gentz 等《科

学》(Science) 243: 1695-1699 (1989)]。尽管还证实了可形成 jun-jun 同二聚体,但是它们的稳定性低于 jun-fos 异二聚体约 1000 倍。尚未检测到 Fos-fos 同二聚体。

使用遗传工程嵌合基因在上述受体成分的可溶性或胞外结构域的 C-末端上对 c-jun 和 c-fos 的亮氨酸拉链结构域进行框内融合。这些融合体可以是直接的或它们可以使用诸如人 IgG 铰合区这样的柔性接头或由诸如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或丙氨酸这样的氨基酸组成的各种长度和组合形式的多肽接头。另外, 可以用 His-His-His-His-His-His (His6)、[SEQ. ID NO.1]标记嵌合蛋白以便通过金属螯合物层析和/或通过可利用的抗体表位进行快速纯化, 从而进行蛋白质印迹上的检测、免疫沉淀或生物测定试验中的活性缺失/阻断。

在另一个实施方案中, 正如下面实施例 3 中所述, 使用类似的方法、且使用人 IgG1 的 Fc-结构域制备 sR α : β 1 异二聚体[Aruffo 等《细胞》(Cell) 67: 35-44 (1991)]。与后者相反, 当将携带 Fc-结构域的嵌合分子表达为二硫键连接的同二聚体时, 异二聚体的形成必须通过化学方式实现。因此, 在有利于破坏链间二硫键但不影响链内二硫键的条件下可以减少同二聚体。然后按照等摩尔量混合单体与不同的胞外部分并将其氧化成同二聚体和异二聚体的混合物。通过层析技术分离该混合物中的成分。另一方面, 通过遗传工程和表达由受体成分的可溶性或胞外部分组成的分子、随后是 hIgG 的 Fc-结构域、随后是上述 c-jun 或 c-fos 亮氨酸拉链可以使形成的这类异二聚体产生偏差[Kostelny 等《免疫学杂志》(J. Immunol.) 148: 1547-1553 (1992)]。由于这些亮氨酸拉链主要形成异二聚体, 所以如果需要可以将它们用于形成异二聚体。就使用亮氨酸拉链描述的嵌合蛋白而言, 还可以用金属螯合物或表位标记它们。可以将这种标记的结构域用于通过金属-螯合物层析和/或通过抗体快速纯化, 从而进行蛋白质印迹上的检测、免疫沉淀或生物测定试验中的活性缺失/阻断。

在另一个实施方案中, 可以使用形成二聚体的其它免疫球蛋白衍生的结构域来制备异二聚体。例如, 这类结构域包括 IgG 重链 (C γ 1 和 C γ 4) 以及人免疫球蛋白 κ 和 λ 轻链的恒定区。C γ 与轻链的异二聚化发生在 C γ 的 CH1 结构域与轻链 (C λ) 恒定区之间并且通过经单一二硫桥共价连接两个结构域得到稳定。因此, 正如实施例 4 中所述, 使用

这些免疫球蛋白结构域可以制备构建体。另一方面，所述的免疫球蛋白结构域包括可以来源于启动二聚化的 T 细胞受体成分的结构域。在本发明的另一个实施方案中，通过使用柔性接头环表达为嵌合分子来制备 sR α : β 1 异二聚体。将编码嵌合蛋白的 DNA 构建体设计成它可表达以串联方式通过柔性环彼此融合的两种可溶性或胞外结构域。这种环可以是完全人工的（例如由丝氨酸或苏氨酸在某一间隔处打断聚甘氨酸重复序列）或“借”自天然出现的蛋白质（例如 hIgG 的铰合区）。可以对分子进行改造，其中对融合的可溶性或胞外结构域的顺序进行转换（例如 sIL6R α /环/sgp130 或 sgp130/环/ sIL6R α ）和/或其中所述环的长度和组成是可变的，从而对具有所需特征的分子进行选择。

另一方面，按照本发明制备的异二聚体可以纯化自与合适的 α 和 β 成分共转染的细胞系。使用本领域技术人员可得到的方法可以从同二聚体中分离异二聚体。例如，通过从制备型、非变性聚丙烯酰胺凝胶中的被动洗脱法可以回收有限量的异二聚体。另一方面，使用高效阳离子结合层析法可以纯化异二聚体。已经使用单 S 阳离子交换柱获得了极佳的纯化结果。

除通过结合游离的 CNTF 或 IL-6 而起拮抗剂作用的 sR α : β 1 异二聚体外，本发明还关注具有新特性的 IL-6 的改造的突变译本的用途，所述的新特性是能够结合 IL-6R α 和单一 gp130 分子、而不能使第二种 gp130 完成 β 成分的同二聚化且由此对任意 IL-6 响应细胞起有效 IL-6 拮抗剂的作用。我们用于 IL-6 和 CNTF 受体复合物结构的模型表明这些细胞因子具有不同的结合 α 、 β 1 和 β 2 受体成分的位点 [Stahl 和 Yancopoulos 《细胞》 (Cell) 74: 587-590 (1993)]。包括这些位点中的每一个的关键氨基酸残基的突变产生具有所需拮抗剂特性的新型分子。 β 1 位点的脱离会产生一种仍然结合 α 受体而非 β 1 成分且由此包括具有纳摩尔亲和力的拮抗剂的分子。包括 IL-6 的 β 2 位点 (IL-6 β 2⁻) 的关键氨基酸残基的突变产生一种可结合 IL-6R α 和第一种 gp130 单体而不能连接 (engage) 第二种 gp130 且由此功能失活的分子。类似地，CNTF β 2 位点的突变产生一种可结合 CNTFR α 和 gp130 而不能连接 LIFR β 的分子 (CNTF β 2⁻)，由此通过形成非功能性 β 1 中间体而拮抗 CNTF 的作用。以上述 CNTF 形成具有高亲和性的 β 1

中间体的结合结果为基础, CNTF β 2⁻和 IL-6 β 2⁻可构成具有 10pM 范围亲和力的拮抗剂。

将不同的方法用于生成并鉴定具有所需特性的 IL-6 或 CNTF 的突变。可以使用通过编码 IL-6 或 CNTF 的 DNA 的标准方法进行的随机诱变, 随后分析收集的产物以便鉴定具有下面所概括的所需新特性的突变细胞因子。已经广泛使用遗传工程进行诱变来阐明重组蛋白质功能结构域的结构组成。在文献中已经描述了进行缺失或取代诱变的几种不同手段。最成功的手段看起来是丙氨酸扫描诱变[Cunningham 和 Wells (1989) 《科学》(Science) 244: 1081-1085]和同系物扫描诱变[Cunningham 等 (1989) 《科学》(Science) 243: 1330-1336]。

可以将使用这类方法进行的 IL-6 或 CNTF 核酸序列的定向诱变用于生成 CNTF β 2⁻和 IL-6 β 2⁻候选物。有系统地进行适于定向诱变的区的选择或这种选择根据研究来决定, 由此将对各因子的各组单克隆抗体用于设计细胞因子区, 它在结合单一 α 受体成分或上述 $\alpha\beta$ 1 异二聚化可溶性受体后可能暴露。类似地, 对单一或与 α 受体成分或上述 $\alpha\beta$ 1 异二聚化可溶性受体结合的复合物形式的细胞因子进行化学修饰或有限蛋白水解、随后分析保护和暴露区可以揭示出潜在的 β 2 结合位点。

鉴定具有所需特性的 CNTF 或 IL-6 突变体的检测试验涉及高亲和力阻断对适当响应的细胞系的 IL-6 或 CNTF 的作用[Davis 等《科学》(Science) 259: 1736-1739 (1993); Murakami 等《美国国家科学院学报》(Natl. Acad. Sci. USA) 88: 11349-11353 (1991)]。这类检测试验包括由 CNTF 或 IL-6 引起的细胞增殖、存活力或 DNA 合成或细胞系的构建, 其中因子的结合诱导诸如 CAT 或 β -半乳糖苷酶这样的报导基因产生[Savino 等《美国国家科学院学报》(Natl. Acad. Sci. USA) 90: 4067-4071 (1993)]。

另一方面, 可以使用以受体为基础的检测试验评价不同突变体的特性。一种这类检测试验由下列步骤组成: 对突变体使用表位标记的[Davis 等《科学》(Science) 253: 59-63 (1991)] sR α : β 1 试剂筛选其结合上述 sR α : β 1 受体异二聚体的能力。此外, 一种检测试验可以通过评价表位标记的可溶性 β 2 试剂是否可以在有 β 1 异二聚体存在的情况下结合细胞因子来探测 β 2 位点的存在或不存在。例如, CNTF

仅在存在 CNTFR α 和 gp130 的情况下结合 LIFR β (β 2 成分) [Davis 等《科学》(Science) 260: 1805-1808 (1993); Stahl 等《生化杂志》(J. Biol. Chem.) 268: 7628-7631 (1993)]。因此, 可溶性 LIFR β 试剂仅可以在存在可溶性 sR α : β 1 二聚体 sCNTFR α : β 1 存在的情况下结合 CNTF。对于 IL-6 来说, sR α : β 1 试剂可以是 IL-6R α : β 1 且用于 β 2 的探针可以是表位标记的 sgp130。因此, 可以将 CNTF 的 β 2⁻ 突变体鉴定为结合 sR α : β 1 试剂的那些突变体, 从而证明细胞因子的 α 和 β 1 位点是完整的, 不过不能结合 β 2 试剂。

此外, 本发明提供了检测或测定潜在 β 2⁻ 突变体活性的方法, 该方法通过测定 β -受体成分或选自 Jak1、Jak2 和 Tyk2 或任意其它信号转导成分 (诸如 CLIPs) 组成的组的信号转导成分的磷酸化情况进行, 经测定它们对 CNTF 族细胞因子的响应是磷酸化。

表达本文所述的信号转导成分的细胞可以如此自然进行或被遗传改造以便如此进行。例如, 可以使用本领域中任何公知的方法, 通过转导、转染、微注射、电穿孔经转基因动物等将如 Velazquez 等在《细胞》(Cell) 第 70 卷 313-322 (1992) 中获得的 Jak1 和编码 Tyk-2 核酸序列引入细胞。

根据本发明, 使细胞与潜在拮抗剂接触并将 β -成分或信号转导成分的酪氨酸磷酸化情况与没有潜在拮抗剂存在情况下的相同成分的酪氨酸磷酸化情况进行比较。在本发明的另一个实施方案中, 将上述细胞与潜在拮抗剂接触所导致的酪氨酸磷酸化与接触亲代 CNTF 族的相同细胞的酪氨酸磷酸化进行比较。在这类检测试验中, 细胞表达必须胞外受体 (α -成分) 或可以使细胞在有可溶性受体成分存在的情况下与测试活性剂接触。因此, 例如, 在为鉴定 CNTF 激动剂或拮抗剂所设计的检测系统中, 细胞可以表达 α -成分 CNTFR α 、 β -成分 gp130 和 LIFR β 以及诸如 Jak1 这样的信号转导成分。使细胞与测试活性剂接触并将 β -成分或信号转导成分的酪氨酸磷酸化与在有 CNTF 存在情况下产生的磷酸化形式进行比较。另一方面, 将接触测试活性剂所导致的酪氨酸磷酸化与没有测试活性剂存在情况下发生的磷酸化进行比较。另一方面, 例如, 用于 IL-6 的一种检测系统可以包括使表达 β -成分 gp130 和诸如 Jak1、Jak2 或 Tyk2 这样的信号转导蛋白质的细胞接触与可溶性 IL-6 受体共同施用的测试活性剂。

在本发明的另一个实施方案中,将上述手段用于开发筛选小分子拮抗剂的方法,所述的小分子拮抗剂在配体结合、受体复合物形成和随后的信号转导过程中的不同步骤时起作用。通过评价对如上所述的可溶性受体与配体之间复合物形成的干扰情况来筛选可能干扰配体-受体相互作用的分子。另一方面,对小分子或天然产物的文库筛选 IL-6 或 CNTF 诱导报道基因响应的以细胞为基础的检测试验以便鉴定潜在的拮抗剂。在对其它因子(诸如类似于激活受体酪氨酸激酶的 GM-CSF 或神经营养蛋白-3)产生反应的以细胞为基础的检测试验中重新筛选那些显示出拮抗剂活性的分子以便评价其对 CNTF/IL-6/OSM/LIF 族因子的特异性。将这类以细胞为基础的筛选方法用于鉴定在信号转导过程中抑制任意大量靶物的拮抗剂。

在一种这样的检测系统中,拮抗剂的特异性靶物是 Jak/Tyk 族激酶与受体 β 亚单位之间的相互作用[Firmbach-Kraft 《癌基因》(Oncogene) 5: 1329-1336 (1990); Wilks 等《细胞分子生物学》(Mol. Cell. Biol.) 11: 2057-2065 (1991)]。如上所述, LIFR β 和 gp130 预先与 Jak/Tyk 族胞质蛋白酪氨酸激酶结合,这些激酶随配体诱导的 β 成分二聚化而被激活(参见 Stahl 等《科学》(Science) 263: 92-95 (1993))。因此,可以进入细胞质并破坏 β 成分与 Jak/Tyk 激酶之间相互作用的小分子能够阻断所有随之发生的胞内信号传输。使用评价小分子阻断纯化 β 成分相关结合结构域与 Jak/Tyk 激酶之间相互作用的能力的体外实验方案可以筛选这类活性。另一方面,一种方法使用双杂交相互作用系统易于筛选这样的分子,它们可以抑制结合 Jak/Tyk 激酶的 β 成分的以酵母为基础进行的检测。[Chien 等《美国国家科学院学报》(Proc. Natl. Acad. Sci.) 88: 9578-9582 (1991)]。在这类系统中,两种蛋白质(在本实施例中是 β 成分和 Jak/Tyk 激酶或其相关结构域)之间的相互作用诱导诸如 β -半乳糖苷酶这样的合适的标记产生。对选择的小分子测试其破坏所需相互作用而不抑制两种对照蛋白质之间相互作用的能力。这种筛选方法的优点在于需要测试化合物在抑制 β 成分与 Jak/Tyk 激酶之间相互作用之前进入细胞。

本文所述的 CNTF 拮抗剂结合细胞因子 CNTF 和 IL-6 或与之竞争。因此,它们可用于治疗由 CNTF 或 IL-6 介导的疾病或紊乱。例如,

IL-6 拮抗剂的治疗应用包括如下情况:

1) 在可以因绝经后妇女或经过卵巢切除术的雌激素水平下降而恶化的骨质疏松症中, 看起来 IL-6 是破骨细胞发生的关键介体, 从而导致骨的吸收[Horowitz《科学》(Science)260: 626-627(1993); Jilka 等《科学》(Science) 257: 88-91(1992)]。重要的是, 看起来 IL-6 仅在雌激素缺失的情况下起主要作用且显然与正常骨的维持的关系最小。与它一致的实验证据表明阻断抗体对 IL-6 的功能可以减少破骨细胞的数量[Jilka 等《科学》(Science) 257: 88-91(1992)]。尽管也使用雌激素替代疗法, 但是看起来存在包括子宫内膜和乳腺癌的危害增加在内的副作用。因此, 本文所述的 IL-6 拮抗剂更特别可以将破骨细胞发生降低至正常水平。

2) 看起来 IL-6 通过以自分泌或旁分泌方式起作用来促进肿瘤形成而直接与多发性骨髓瘤相关[van Oers 等《血液学年鉴》(Ann. Hematol.) 66: 219-223(1993)]。此外, IL-6 水平升高产生不需要的继发性反应诸如骨吸收、血钙过多和恶病质; 在有限的研究中, 对 IL-6 或 IL-6R α 的功能阻断抗体具有一定成效[Klein 等《血液》(Blood) 78: 1198-1204(1991) ; Suzuki 等《欧洲免疫学杂志》(Eur. J. Immunol.) 22: 1289-1993(1992)]。因此, 本文所述的 IL-6 拮抗剂有利于继发性反应和抑制肿瘤生长。

3) IL-6 可以是导致与 AIDS 和癌症相关的恶病质的肿瘤坏死因子(TNF)的介体[Strassmann 等《临床研究杂志》(J. Clin. Invest.) 89: 1681-1684(1992)], 可能通过降低脂肪组织中脂蛋白脂酶活性来达到该目的[Greenberg 等《癌症研究》(Cancer Research) 52: 4113-4116(1992)]。因此, 本文所述的拮抗剂可以用于在这类患者中缓解或减少恶病质。

可以使用本领域技术人员公知的方法来确定用于治疗这些或其它 CNTF 族相关疾病或紊乱的有效剂量[参见, 例如 Fingl 等《治疗学的药理基础》(The Pharmacological Basis of Therapeutics), Goodman 和 Gilman 编辑, Macmillan Publishing Co., New York, pp. 1-46(1975)]。本发明应用的药物组合物包括药理上可接受的液体、固体或半固体载体中的与载体或靶分子(targeting)(例如抗体、激素、生长因子等)连接的上述拮抗剂和/或在体内给药前混入

脂质体、微囊和控释制剂（包括表达细胞的拮抗剂）。例如，所述的药物组合物可以在诸如无菌水、盐水、磷酸盐缓冲液或右旋糖溶液这样的水溶液包括一种或多种拮抗剂。另一方面，在可以根据这类治疗需要植入患者体内的固体（例如蜡）或半固体（例如胶质）制剂中可以包括所述的活性剂。给药途径可以是本领域中公知的任意给药方式，包括但不限于静脉内给药、鞘内给药、皮下给药、经注入所涉及的组织给药、动脉内给药、口服给药或通过植入装置给药。

给药可以导致本发明活性剂分布在身体中或发布在局限区域。例如，在涉及神经系统远区的某些条件下，可能需要静脉内或鞘内给予活性剂。在某些情况中，可以将含有活性剂的移植物放入损害区域或放在接近损害的区域。合适的移植物包括但不限于以可吸收明胶海绵、蜡或以微粒为基础的移植物。

实施例

实施例 1: CNTF 与 IL-6 竞争结合 GP130

材料和方法

材料 从 DNAX 获得对 IL-6 有响应的 PC12 细胞的克隆（PC12D）。如 [Kasiakowski 等《神经化学杂志》（J. Neurochem.）57: 1003-10012（1991）]所述制备大鼠 CNTF。IL-6 和 sIL-6R α 商购自 R&D System。通过所述的方法（Stahl 等《生化杂志》（J. Biol. Chem.）268: 7628-7631（1993））使家兔体内对来源于接近 gp130 C-末端区的肽（序列：CGTEGQVERFETVGM[SEQ. ID. NO. 2]）的抗血清升高。抗磷酸酪氨酸单克隆 4G10 商购自 UBI 且用于 ECL 的试剂商购自 Amersham。

信号转导检测试验 使平板（10cm）中的 PC12D 在不含血清的培养基（RPMI1640 + 谷氨酰胺）内饥饿 1 小时，然后在 37℃ 和有或没有规定浓度下的添加的大鼠 CNTF 存在的情况下用 IL-6（50ng/mL）+sIL-6R α （1mg/mL）对其培养 5 分钟。接着使样品进行所述的抗-gp130 免疫沉淀、SDS-PAGE 和抗磷酸酪氨酸免疫印迹（Stahl 等《生化杂志》（J. Biol. Chem.）268: 7628-7631（1993））。

结果

使用表达 IL-6R α 、gp130 和 CNTFR α 而非 LIFR β 的 PC12 细胞系（称作 PC12D）测定 CNTF 阻断 IL-6 响应的能力。正如作预计的，这

些细胞对 IL-6 有响应而对 LIFR β 没有响应(附图 2),这是因为 LIFR β 是一种 CNTF 信号转导所需要的成分[Davis 等《科学》(Science) 260: 59-63(1993)]. 根据对其它细胞系的结果[Ip 等《细胞》(Cell) 69: 1121-1132(1992)], PC12D 细胞使 gp130 (以及各种其它称作 CLIPs 的蛋白质)酪氨酸磷酸化作为对 2nM IL-6 的响应(附图 2)。添加重组可溶性 IL-6R α (sIL-6R α) 提高了 gp130 酪氨酸磷酸化的水平,正如在某些其它系统中所报导的[Taga 等《细胞》(Cell) 58: 573-581(1989)]. 然而,与 IL-6 同时添加 2nM CNTF 可严重减少 gp130 的酪氨酸磷酸化。尽管在有 CNTF、IL-6 和 sIL-6R α 在的情况下保留了轻度的 gp130 酪氨酸磷酸化响应,但是如果 CNTF 的浓度有四倍于 8nM 的增加,那么这种情况被消除。因此,在含有 CNTFR α 而非 LIFR β 的 IL-6 响应细胞中, CNTF 是一种相当有效的 IL-6 作用的拮抗剂。

实施例 2: CNTF 与 CNTFR α : β 的结合

材料和方法

CNTF 结合的斯卡查德分析 如[Stahl 等《生化杂志》(JBC) 268: 7628-7631(1993)]所述制备和纯化 ^{125}I -CNTF。使用浓度范围在 20pM - 10nM 的 ^{125}I -CNTF 在 PC12 细胞中进行饱和结合研究。直接在单层细胞上进行结合。从孔中除去培养基并用由磷酸缓冲盐水 (PBS; pH 7.4)、0.1mM 杆菌肽、1mM PMSF、1mg/ml 亮异蛋白酶肽和 1mg/ml BSA 组成的测试缓冲液将细胞洗涤一次。将细胞在室温下的 ^{125}I -CNTF 中培养 2 小时,随后用测试缓冲液快速洗涤 2 次。将细胞用含有 1% SDS 的 PBS 裂解并用 Packard γ 计数器在 90-95% 的效率下计数。通过存在的 100 倍以上的未标记 CNTF 来确定非特异性结合的情况。特异性结合的范围在 70% - 95%。

结果

根据对 PC12D 细胞上碘化 CNTF 结合情况进行斯卡查德分析来估计 CNTF 与 CNTFR α : β 1 结合的平衡常数(附图 3)。该数据与具有解离常数为 9pM 和 3.4nM 的 2 个位点配合一致。低亲和性位点相当于 CNTF 与具有接近 3nM 的 K_d 的 CNTFR α 的相互作用[Panayptatos 等《生化杂志》(J. Biol. Chem.) 268: 19000-19003(1993)]。我们将高亲和性复合物解释为含有 CNTF、CNTFR α 和 gp130 的中间体。确实

含有 CNTFR α 、gp130 和 LIFR β 且由此作为对 CNTF 的响应产生强有力的酪氨酸磷酸化的尤文氏肉瘤细胞系 (EW-1) 显示出与具有 1nM 和 10 的解离常数极为类似的 2 个位点配合。因此, 如果 CNTF 结合另外含有 LIFR β 的复合物, 那么显然 CNTF 通过同样高的亲和性与仅含有 CNTFR α 和 gp130 的复合物结合, 由此证明产生本文所述的 sR α : β 拮抗剂的可能性。

实施例 3: 细胞因子配体捕获物的生产方法

病毒原种的生产

在 27℃ 下的 Gibco SF900II 培养基中使获自草地贪夜蛾的 SF21 昆虫细胞生长至密度为 1×10^6 个细胞/ml。将用于 GP130-Fc-His6(附图 4) 或 IL6R α -Fc(附图 5) 的各病毒原种加入到生物反应器中至低复数为 0.01-0.1PFU/细胞以便启动感染。使该感染过程持续 5-7 天, 从而使病毒复制达到最大值而基本上不发生细胞裂解。以无菌方式将细胞混悬液等分入无菌离心瓶并通过离心除去细胞。将不含细胞的上清液收集在无菌瓶中并在 4℃ 下储存至进一步应用为止。

通过如 O'Reilly、Miller 和 Luckow 所述的噬菌斑测定试验测定病毒滴度。在接种有 2×10^6 个细胞的 60mm 组织-培养皿中实施该方法。将顺序稀释的病毒原种加入到粘附细胞中并通过振荡培养该混合物以便使病毒吸附各个细胞。加入琼脂覆盖物并在 27℃ 下将平板培养 5-7 天。用中性红染色存活细胞显示有环状噬菌斑产生, 对它们进行计数而得到病毒滴度。

用于蛋白质生产的细胞共感染

使未感染的 SF21 细胞在装有 40L SF900II 培养基的 ABEC 生物反应器中生长。将温度控制在 27℃ 并通过控制惰性气流中氧的流速将溶解的氧的浓度维持在 50% 饱和度的水平。当达到 2×10^6 个细胞/mL 密度时, 使用一种带有具有 Milipore Prostak 0.65 微米膜的切向流过滤装置的低剪切蒸汽灭菌泵将细胞在生物反应器内浓缩至 20L 体积。浓缩后, 将新鲜无菌生长培养基缓慢加入到所述的生物反应器中, 同时过滤系统经渗滤持续除去剩余的生长培养基。在已经进行 2 个体积的交换 (40L) 后, 将另外 20L 新鲜培养基加入到所述的生物反应器中以便使细胞重新悬浮至 40L 的原始体积。通过使用血细胞计数器对存活细胞进行计数再测定一次细胞密度。

以细胞密度、病毒滴度和所需的感染复数 (MOI) 为基础计算各病毒原种的所需用量。5:1、5:2、10:2 和 10:4 的 IL-6R α -Fc 与 GP130-Fc-His6 的病毒原种之比均导致产生显著量的异二聚体。理想的病毒原种之比高度取决于来自两种同二聚体中每一种的异二聚体纯化的简化。IL6R α -Fc 同二聚体通过固定化金属亲和层析相对易于除去下游。选择病毒感染比例以便将形成的更难以清除下游的 GP130-Fc-His6 同二聚体减少到最低限度。如果改进了用于清除所得同二聚体的纯化方法时,那么为感染选择的 GP130-Fc-His6 病毒原种的相对量随连续的批量而增加。

以无菌方式将病毒原种在单一容器内混合、然后转染入生物反应器。这导致 SF21 细胞的同步感染。使感染过程进行 3-4 天,从而有充足的时间产生最大量的异二聚体蛋白质。

回收和蛋白质 A 的层析纯化

在生物反应器过程的感染阶段结束时,使用 10ft² Milipore Prostack 滤膜 (0.65 微米) 孔大小在所述的生物反应器中浓缩细胞。在清洁的加工容器内收集通过滤膜的不含细胞的透过物。在过滤操作结束时,用 10N NaOH 将含有蛋白质产物的透过物流的 pH 调节至 8.0。通过将提取物压过 0.8 微米的深度滤膜 (Sartorius)、随后通过 0.2 微米滤膜而除去所得的沉淀。加入足量的 0.5M EDTA 储备液而得到 5mM 的终浓度。将过滤的蛋白质溶液上含有 100-200mL Pharmacia Protein A Sepharose 4 Fast Flow 的用 PBS 平衡的 10cm 直径柱。蛋白质 A 对 3 种重组蛋白质产物中的每一种的 Fc-Fc 结构域具有极高的亲和性,从而使它们结合,而其它不含细胞的提取物中的蛋白质流过该柱。在上样后,用另含有 350mM NaCl 的 PBS 将该柱洗涤至基线。在低 pH 下用 0.5M 乙酸或用降低 pH 梯度的 0.1M 柠檬酸和 0.2M 磷酸二钠缓冲液洗脱 IgG-Fc 标记的蛋白质。将 Tris 碱或磷酸二钠加入到所洗脱的蛋白质中以便避免与过长时间的与低 pH 条件的接触。

将收集的蛋白质渗滤入 PBS 或 HEPES 缓冲液并用 1mM 碘乙酰胺衍生 (derivitized) 以便保护接近各 Fc 结构域铰合区的游离半胱氨酸上暴露的巯基。这可防止二硫化物介导的蛋白质聚集。将具有标称 30 千道尔顿截断值的 6ft² 微孔螺旋纹 (spiral wound) 超滤膜用于进行缓冲液交换。使用渗滤缓冲液作为空白、通过在 280nm 处的

UV 吸收度来测定总蛋白质。使用 6% 的 Tris-甘氨酸凝胶 (Novex)、通过 SDS PAGE 凝胶电泳来测定异二聚体和两种同二聚体蛋白质的相对量。将凝胶进行考马斯染色、然后转入脱色溶液过夜。将 Shimadzu 光密度扫描仪用于测定 SDS PAGE 凝胶上各蛋白质带的相对密度。将峰面积比用于计算柱收集级分中异二聚体和各同二聚体的级分。

固定化金属亲和层析纯化

GP130-Fc-His6 融合蛋白 C-末端上的 6 个组氨酸残基为从两种同二聚体中分离异二聚体 IL-6 拮抗剂提供了极佳的分子柄 (handle)。GP130-Fc-His6 部分的各 C-末端组氨酸上的咪唑基具有与包括铜、镍、锌、钴、铁和钙在内的几种二价金属的强结合常数。由于 IL6R α -Fc 同二聚体不具有 C-末端组氨酸残基, 所以显然具有最低的亲和性。IL6R α -Fc-GP130-Fc-His6 异二聚体具有单一固定组的 6 个组氨酸, 使得它对金属具有更强的亲和性, 同时 GP130-Fc-His6 同二聚体具有 2 组 6 个组氨酸, 它们均使得三种 IgG 标记的蛋白质与金属亲和柱具有最高的亲和性。在洗脱缓冲液中使用增加量的咪唑选择性洗脱三种蛋白质由此可按如下顺序洗脱蛋白质:

1. IL6R α -Fc 同二聚体
2. IL6R α -Fc-GP130-Fc-His 异二聚体
3. GP130-Fc-His 同二聚体

用硫酸镍溶液饱和和含有 100mL Pharmacia Chelating Sepharose Fast Flow 的 26mm 直径柱, 直到在柱洗脱液中观察到明显的绿色为止。然后将该柱用几个柱体积的去离子水洗涤、接着用 50mM HEPES、40mM 咪唑 (pH 8.0) 平衡。咪唑与固定化镍结合产生绿色至蓝色的改变。将咪唑加入到上样的蛋白质中至终浓度为 40mM。将咪唑加入到上样的蛋白质中可减少与 IL6R α -Fc 同二聚体的结合、增加剩余两个种类可利用的表面积。上样后, 将该柱用几个柱体积的 50mM HEPES、80mM 咪唑 (pH 8.0) 洗涤至重新建立稳态基线为止。用几个柱体积范围内的 50mM HEPES、150mM 咪唑 (pH 8.0) 选择性洗脱异二聚体。如上部分中所述收集蛋白质级分并将其渗滤入 PBS。

实施例 4: 构建配体捕获物的另一种方法

如上所述, 通过 CNTF 且类似地是通过 IL-6 和 IL-11 激活受体, 其结合事件遵循一固定的顺序 (附图 6)。细胞因子开始结合其具有

低亲和性的同源 $R\alpha$ ($K_d=3-10\text{nM}$)；这是一种所需的步骤 - 不表达所述同源 $R\alpha$ 的细胞对同源细胞因子没有响应。细胞因子· $R\alpha$ 复合物结合第一种信号转导成分 gp130 而形成高亲和性复合物 (10pM 等级的 CNTF·CNTFR α ·gp130 复合物的 K_d)。因为产生信号传输的信号转导成分二聚化, 这种复合物不会转导信号 (Stahl 和 Yancopoulos 《神经生物学杂志》 (J. Neurobiology) 25: 1454-1446 (1994); Stahl 等《科学》 (Science) 267: 1349-1353 (1995); Davis 等《科学》 (Science) 260: 1805-1808 (1993); Stahl 等《科学》 (Science) 263: 92-95 (1994); Murakami 等《科学》 (Science) 260: 1808-1810 (1993))。至少就 IL-6 的情况而言, 细胞因子· $R\alpha$ 信号转导物异二聚化复合物随后结合另一种类似的复合物而形成六聚化复合物 (附图 6) (Ward 等《生化杂志》 (J. Biol. Chem.) 269: 23286-23289 (1994))。所得信号转导物的二聚化 - 就 IL-6 而言是 gp130 (Murakami 等《科学》 (Science) 260: 1808-1810 (1993)) 且就 CNTF 而言是 IL-11、gp130 和 LIFR (Davis 等《科学》 (Science) 260: 1805-1808 (1993)) - 引起信号转导。

开始制备的异二聚化分子包括与 gp130 胞外结构域连接的可溶性 $R\alpha$ 成分。证实这些分子可模拟高亲和性细胞因子· $R\alpha$ ·gp130 复合物并起其同源细胞因子高亲和性拮抗剂的作用 (附图 7)。为了制备这些分子, 将 gp130 的胞外结构域分别与 IL-6 和 CNTF、IL-6 $R\alpha$ 和 CNTFR α 的 α -受体成分的胞外结构域配对。为了使 $R\alpha$ 与 gp130 胞外结构域连接, 使可溶性 $R\alpha$ -成分和 gp130 与人 IgG1 的 Fc 部分融合而分别产生 $R\alpha$ -Fc 和 gp130-Fc。选择 Fc 结构域主要但并非唯一的原因是, 它自然形成二硫键连接的二聚体。将包括 $R\alpha$ -Fc·gp130-Fc 的异二聚化分子表达、纯化并证实起其同源配体高效拮抗剂的作用。此外, 发现这些分子对其同源细胞因子具有高度特异性, 因为这是确定细胞因子被结合和捕获的 α -受体成分的选择 (在没有合适的 $R\alpha$ 存在的情况下不存在可测定的细胞因子与 gp130 结合)。

此处我们描述了该项技术的延伸, 它使得通过设计可以具有另外的有利特征诸如稳定性、Fc-受体-介导的清除或降低的效应器功能 (诸如补体结合) 的不同异二聚化可溶性受体配体捕获物的改造成为可能。此外, 应证实所述的技术适合于改造哺乳动物或其它合适的蛋

白质表达系统中的任意异二聚化蛋白质，包括但不限于应用受体、配体和诸如酶或催化抗体这样的催化成分的异二聚化分子。

材料和方法

用于 IL-6 的以异多聚化免疫球蛋白重链/轻链可溶性受体为基础的配体捕获物的遗传工程

使用人 gp130、人 IL-6 α -受体 (IL-6R α)、带有或不带有连接区 (J) 的人 IgG1 (C γ 1) (Lewis 等《免疫学杂志》(Journal of Immunology) 151: 2829-2838 (1993)) 或 IgG4 (C γ 4) 的重链 (C γ) 恒定区以及还带有或不带有不同 j-肽 (j) 的人免疫球蛋白 (Ig) 的轻链 κ 和 λ 恒定区 (Cheung 等《病毒学杂志》(Journal of Virology) 66: 6714-6720 (1992)) 来改造本文所述的 IL-6 捕获物。这种设计利用了 C γ 结构域与 κ 或 λ 轻链异二聚化的天然能力。C γ 与轻链的异二聚化发生在 C γ 的 CH1 结构域与轻链 (C λ) 恒定区之间且通过经单二硫桥共价连接 2 个结构域而得到稳定。我们推定：与人 IgG1 的 Fc 结构域类似，可以将 C γ 与 C λ 的结合用于产生二硫键连接的异二聚化蛋白质，它们由一个链上的 gp130 胞外结构域与另一个链上的 IL-6R α 胞外结构域组成。与这类蛋白质的以 Fc 为基础的配对物类似，据推测这类蛋白质是 IL-6 的高亲和性配体捕获物且结果是抑制 IL-6 与 IL-6 响应细胞上的天然受体的相互作用，由此起 IL-6 拮抗剂的作用。此外，与抗体极为类似的是，应用全长 C γ 区的构建体可以形成 C γ 链的同二聚体，从而产生由两个“轻链”和两个“重链”组成的抗体样分子 (附图 8)。这种设计的潜在优点在于它可以更为接近地模拟 IL-6 · IL-6R α · gp130 复合物且可以显示出对配体的亲和性高于可比拟的单异二聚体。将另外的设计与使用仅含 CH1 结构域的截短译本的 C γ 结合起来。这些方法与受体- κ 融合蛋白一起形成异二聚化分子且由此类似于抗体的 Fab 片段。

可以在质粒载体中改造所有的可溶性受体-Ig 嵌合基因，所述的质粒载体包括但不限于适合于哺乳动物表达的载体 (COS 猴肾细胞、中国仓鼠卵巢细胞 [CHO] 和 ras-转化的成纤维细胞 [MG-ras]) 且在用于有效翻译的各嵌合基因开始处包括 Kozak 序列 (CGC CGC CAC CAT GGT G)。使用标准遗传工程方法来进行改造。通过 DNA 测序、哺乳动物表达、随后使用合适抗体进行蛋白质印迹、测定配体结合和解离

的生物物理检测试验并通过生长抑制试验（如下所述的 XG-1）来检验各构建体。由于用于改造这些嵌合蛋白的结构域位于合适限制位点的侧翼，所以能够使用这些结构域改造其它嵌合蛋白，包括应用诸如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、GM-CSF、LIF、IL-11、IL-15、IFN γ 、TGF β 及其它这样的因子的受体胞外结构域的嵌合体。将用于制备 IL-6 捕获物的各成分的氨基酸配位体列在下面（注意：将带有起始的甲硫氨酸的起始码编为#1；使用 20 个氨基酸的单字母码列出长序列）：

（a）应用人 gp130 的构建体：

（i）通过使 gp130 的胞外结构域（1-619 位氨基酸）与 Ser-Gly 桥、随后是包括 C γ 1 和终止密码子的 330 个氨基酸框内融合来改造 gp130-C γ 1（附图 9）。

（ii）除将 J-肽（氨基酸序列：GQGTLVTVSS）插入 Ser-Gly 桥与 C γ 1 序列之间外，按照与 gp130-C γ 1 相同的方式改造 gp130-C γ 1（参见附图 9）。

（iii）通过框内融合不带有其三个纤连蛋白样结构域的 gp130 的胞外结构域来改造 gp130 Δ 3fibro-C γ 1（附图 10）。嵌合蛋白的剩余部分与 gp130-C γ 1 相同。

（iv）除仅使用 C γ 1 的 CH1 部分取代 C γ 1 区外，按照与对 gp130-C γ 1 所述相同的方式改造 gp130-J-CH1（附图 11）。这种构建体的 C-末端结构域包括含有导致 IgG 的重链与轻链异二聚化的半胱氨酸残基的铰合部分。含有两个涉及 C γ 1 同二聚化的铰合部分已经与 CH2 和 CH3 结构域一起缺失。

（v）除使用 C γ 4 取代 C γ 1 外，按照与对 gp130-C γ 1 所述相同的方式改造 gp130-C γ 4（附图 12）。此外，通过在 C γ 4 结构域的铰合区引入两个碱基的沉默突变来改造 RsrII DNA 限制位点。RsrII 位点要求进行其它所需的遗传工程操作，诸如构建与 gp130-C γ 4 相同的 CH1。

（vi）除使用人 Ig 的 κ 轻链取代 C γ 1 外，按照与对 gp130-C γ 1 所述相同的方式改造 gp130- κ （附图 13）。

（vii）除将 J-肽（氨基酸序列：TFGQG TKVEIK）插入 Ser-Gly 桥与 κ -区之间外，按照与对 gp130-J- κ 所述相同的方式改造 gp130-

J- κ (附图 13)。

(viii) 除使用人 Ig 的 λ 轻链的恒定区 (Cheung 等《病毒学杂志》(Journal of Virology) 66: 6714-6720 (1992)) 取代 C γ 1 外, 按照与对 gp130-C γ 1 所述相同的方式改造 gp130- λ (附图 14)。

(b) 应用人 IL-6R α 的构建体:

(i) 通过使包括 IL-6R α 胞外结构域 (附图 15) 的 IL-6R α (Yamasaki 等《科学》(Science) 241: 825-828 (1988)) 的 1-358 位氨基酸与 Ala-Gly 桥、随后是包括 C γ 1 和终止密码子的 330 个氨基酸框内融合来改造 IL6R α -C γ 1。

(ii) 除使用用于 gp130- κ 的 κ -结构域 (附图 13) 取代 C γ 1 外, 如对 IL6R α -C γ 1 所述改造 IL6R α - κ 。

(iii) 除将对 gp130-j- κ 所述的 j-肽放置在 Ala-Gly 桥与 κ -结构域之间外, 如对 IL6R α - κ 所述改造 IL6R α -j- κ 。

(iv) 使用由 1-313 位氨基酸组成的截短型 IL-6R α 改造三种另外的构建体 IL6R α 313-C γ 1、IL6R α 313- κ 和 IL6R α 313-j- κ (附图 16)。通过使 IL6R α 313 与 Thr-Gly 桥、随后是上述 C γ 1、 κ 和 j- κ -结构域框内融合来制备这些构建体中的每一种。改造这些构建体以便补充 gp130 Δ 3fibro-衍生的构建体。

配体捕获物的表达和纯化

为了生产共价连接的可溶性 gp130 与可溶性 IL-6R α 的异二聚体, 将 gp130-Ig 嵌合蛋白与以互补对形式的合适 IL-6R α -Ig 嵌合蛋白共同表达。通过以稳定或短暂的方式将相应的表达载体共转入转染入合适的哺乳动物细胞系来实现共表达。通过几种不同的方法从条件培养基中纯化所得的二硫键连接的异二聚体, 所述的方法包括但不限于固定化蛋白质 A 或蛋白质 G 上的亲和色谱法、以配体为基础的亲和色谱法、离子交换法和凝胶过滤法。

用于纯化重链/轻链受体融合蛋白的方法类型的一个实例如下: 通过共转染分别编码 gp130-C γ 1 和 IL-6R α - κ 的两种不同载体而在 COS 细胞中表达 gp130-C γ 1 · IL-6R α - κ 。在共转染 2 天后收集不含血清的条件培养基 (400ml) 并通过 1ml 蛋白质 A 琼脂糖 (Pharmacia) 上的亲和色谱法来纯化含有 C γ 1 的蛋白质。通过 1ml NHS-活化琼脂糖 (Pharmacia) 上的第二次亲和色谱步骤进一步纯化该步骤中产生

的用重组人 IL-6 衍生的物质以便从 gp130-C γ 1 和 IL-6R α - κ 复合物中除去 gp130-C γ 1 二聚体（该 gp130-C γ 1 二聚体不结合 IL-6）。正如由 SDS-PAGE、随后是银染色所证实的，通过该方法产生的蛋白质的纯度超过 90%（附图 17）。已经成功地使用类似方案对其它重链/轻链受体异二聚体进行了纯化。

结果

免疫球蛋白重链/轻链受体融合体拮抗剂的生物活性

在各种不同的检测试验中对纯化的配体捕获物测试其结合 IL-6 的能力。例如，与 IL-6 自抗-IL-6 单克隆中和抗体 B-E8 的解离率一起平行测定与配体捕获物结合的 IL-6 的解离率[Brochier 等《国际免疫药理学杂志》(Int. J. Immunopharmacology) 17: 41-48 (1995) 及其中的参考文献]。该类型实验的一个实例如附图 18 中所示。在该实验中用 500pM 的 gp130-C γ 1 · IL-6R α - κ 或 mAb B-E8 将 20pM 125 I-IL-6 (1000 μ Ci/mmol; Amersham) 预培养 20 小时。此时加入 1000 倍以上 (20nM) 的“冷”IL-6。定期取出反应的等分试样、用蛋白质 G-琼脂糖沉淀配体捕获物或 B-E8 并测定剩余结合的 125 I-IL-6 的 cpm 数量。在 3 天后，显然人 125 I-IL-6 从配体捕获物中的解离率极低，大约起始计数的 75% 仍然与配体捕获物结合。相反，3 天后低于 5% 的计数仍然与抗体结合。这一结果证明配体从这些配体捕获物中的解离率极低。

在不同组实验中测试在有配体存在的情况下配体捕获物多聚化的能力。该实验的一个实例如附图 19 中所示。通过测试不经自身结合蛋白质 A 的 gp130-CH1 · IL-6R α - κ 是否可以在有 gp130-Fc · IL-6R α -Fc 存在的情况下以 IL-6 依赖性方式被蛋白质 A-琼脂糖沉淀来测定 IL-6 诱导的 gp130-Fc · IL-6R α -Fc 与 gp130-CH1 · IL-6R α - κ 的结合（附图 9）。通过使用不检测 gp130-Fc · IL-6R α -Fc 的抗卡巴特异性 HRP 接合物的蛋白质印迹来测定由蛋白质 A-琼脂糖沉淀的 gp130-CH1 · IL-6R α - κ 。仅在 gp130-Fc · IL-6R α -Fc 和 IL-6 都存在时，gp130-CH1 · IL-6R α - κ 可以被蛋白质 A-琼脂糖沉淀。这一结果最终表明 IL-6 可以诱导配体捕获物多聚化且进一步表明配体捕获物可以模拟六聚化细胞因子 · R α · 信号转导物复合物（附图 1）。配体诱导的多聚化可以在体内清除细胞因子 · 配体捕获物方面起显著作用。

可以在测定配体依赖性细胞增殖的检测试验中进一步测试不同配体捕获物的生物活性。有几种 IL-6 细胞增殖试验且它们应用诸如 B9、CESS 或 XG-1 这样的细胞系。使用 XG-1 细胞系的该类型试验的一个实例如下所述：XG-1 是一种来源于人多发性骨髓瘤的细胞系（Zhang 等《血液》（Blood）83：3654-3663（1994））。XG-1 依赖于外源提供的存活和增殖用人 IL-6。XG-1 系的 IL-6 的 EC50 约为 50pmoles/ml。通过在 XG-1 培养物中用 50pg/ml IL-6 培养增加量的纯化配体捕获物来测试几种不同 IL-6 捕获物阻断 XG-1 细胞的 IL-6-依赖性增殖的能力。已经使用与上述那些方法类似的方法表达和纯化了所测试的配体捕获物。发现所有所测试的配体捕获物均可以以剂量依赖性方式抑制 IL-6-依赖性增殖（附图 20）。所测试的 5 种不同捕获物中 gp130-CH1 · IL-6R α - κ 最具活性且主要显示出与抗体 B-E8 相同的对 IL-6 的中和活性。低至 10 倍摩尔过量的 gp130-CH1 · IL-6R α - κ 或 B-E8 完全阻断了 IL-6 的活性（A570 - 650 = 0.3AU 的读数相当于没有 XG-1 细胞增殖）。100 倍摩尔过量的所有测试配体捕获物完全阻断了 IL-6 的活性。这种观测到的抑制是高度选择性的，因为，甚至以相对于 IL-6 1000 倍摩尔过量使用时，阻断 CNTF 活性的 gp130-Fc · CNTFR α -Fc 配体捕获物和 gp130-Fc 同二聚体均没有表现出任何对 IL-6 的阻断活性（数据未列出）。该数据证明以异二聚化免疫球蛋白重链/轻链受体为基础的配体捕获物作为其同源配体的高亲和性拮抗剂起作用。

实施例 5: 融合多肽成分的克隆

使用组织 cDNAs (CLONTECH)、通过标准 PCR 技术获得人细胞因子受体的胞外结构域；将其克隆入表达载体 pMT21 (Genetics Institute, Inc.)；并使用 ABI 373A DNA 测序仪和 Taq 双脱氧终止子循环测序试剂盒 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)、通过标准技术测序序列。对于 IL-4R α 来说，克隆来自基因库序列的 241 - 868 位核苷酸（相当于 24 - 231 位氨基酸）。对于 IL-2R γ 来说，克隆来自基因库序列 D11086 的 15 - 776 位核苷酸（相当于 1 - 233 位氨基酸）。对于 IL-6R α 来说，克隆来自基因库序列 X52425 的 52 - 1044 位核苷酸（相当于 1 - 331 位氨基酸）。对于 gp130 来说，克隆来自基因库序列 M57230 的 322 - 2112 位核苷酸（相当于 30 - 619

位氨基酸)。对于 IL-1RAcP 来说, 克隆来自基因库序列 AB006357 的 1-1074 位核苷酸(相当于 1-358 位氨基酸)。对于 IL-1RI 来说, 克隆来自基因库序列 X16896 的 55-999 位核苷酸(相当于 19-333 位氨基酸)核苷酸。

实施例 6: 融合多肽(细胞因子捕获物)的生产

通过标准克隆和 PCR 技术由各个克隆的 DNAs(上文所述)来构建编码细胞因子捕获物的核苷酸序列。在每种情况中, 框内构建所述序列以便使编码第一种融合多肽成分的序列与编码第二种融合多肽成分的序列、随后是作为多聚化成分的 Fc 结构域(人 IgG1 的铰合部、CH2 和 CH3 区)融合。在某些情况中, 将另外的核苷酸框内插入编码第一种和第二种融合多肽成分的序列之间以便在两种成分之间添加接头(参见附图 21A-附图 21D-捕获物 424; 附图 24A-附图 24F-捕获物 412; 和附图 26A-附图 26E-捕获物 569)。

对于 IL-4 捕获物 424(附图 21A-附图 21D)、603(附图 22A-附图 22D)和 622(附图 23A-附图 23D)来说, IL-2R γ 成分与 5'连接、后面是 IL4R α 成分且然后是 Fc 成分。对于 IL-6 捕获物 412(附图 24A-附图 24F)和 616(附图 25A-附图 25F)来说, IL-6R α 成分与 5'连接、后面是 gp130 成分且然后是 Fc 结构域。对于 IL-1 捕获物 569(附图 26A-附图 26E)来说, IL-1RAcP 成分是 5', 后面连接有 IL-1RI 成分且然后是 Fc 结构域。将最终的构建体克隆入哺乳动物表达载体 pCDNA3.1(STRATAGENE)。

在 569 序列(附图 26A-附图 26E)中, 1-1074 位核苷酸编码 IL1RAcP 成分; 1075-1098 位核苷酸编码接头区; 1099-2043 位核苷酸编码 IL1RI 成分且 2044-2730 位核苷酸编码 Fc 结构域。

在 412 序列(附图 24A-附图 24F)中, 1-993 位核苷酸编码 IL6R α 成分; 994-1023 位核苷酸编码接头区; 1024-2814 位核苷酸编码 gp130 成分且 2815-3504 位核苷酸编码 Fc 结构域。

在 616 序列(附图 25A-附图 25E)中, 1-993 位核苷酸编码 IL6R α 成分; 994-2784 位核苷酸编码 gp130 成分且 2785-3474 位核苷酸编码 Fc 结构域。

在 424(附图 21A-附图 21D)和 622(附图 23A-附图 23D)序列中, 1-762 位核苷酸编码 IL2R γ 成分; 763-771 位核苷酸编码

接头区；772-1395 位核苷酸编码 IL4R α 成分且 1396-2082 位核苷酸编码 Fc 结构域。

最后，在 603 序列（附图 22A-附图 22D）中，1-762 位核苷酸编码 IL2R γ 成分；763-1386 位核苷酸编码 IL4R α 成分且 1387-2073 位核苷酸编码 Fc 结构域。

通过本领域技术人员众所周知的标准技术将 DNA 构建体短暂转染入 COS 细胞或稳定转染入 CHO 细胞。通过标准技术、使用蛋白质 A 亲和层析和大小排阻层析来收集和纯化上清液。（参见，例如 Harlow 和 Lane “抗体-实验室手册”（Antibodies-A Laboratory Manual），Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）。

实施例 7：使用 TF-1（ATCC）细胞的 IL-4 生物测定试验方案所需的试剂和设备

MTT 染料溶液

MTT(3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]) (Sigma 目录号 M2128)。

工作浓度：将 5mg 的无水 MTT 溶于不含 Ca^{+2} 、 Mg^{+2} 的 200ml PBS 中。

无菌过滤并在 -20℃ 下等分储存。

增溶溶液

将 100g SDS、950ml dH₂O、50ml 二甲基甲酰胺和 850 μ l 浓 HCl 混合成 1000ml。

用 0.45 μ m 滤膜装置进行无菌过滤。

在室温下储存。

TF-1 细胞生长培养基：

RPMI1640、10% FBS、Pen/Strep、2mM L-谷氨酰胺。

其它：

0.4% 锥虫蓝染料；稀释用无菌试管；96 孔无菌细胞培养平板（Falcon#3072）；血细胞计数器；离心管；ELISA 平板读出器；15、25、50 和 100 μ l 体积的多道移液管；无菌试剂储蓄器、无菌移液管管头；手套。

试验方案

A. 试验平板的制备

1. 用不同浓度的 IL-4 和 10nM IL-4 拮抗剂制备含有 50 μ l 生长

培养基/孔的 96 孔无菌组织培养平板。可以通过制备 4 倍最高检测浓度的 IL-4 工作稀释液来进行该步骤。在独立的试管中，制备 2 倍顺序稀释的 IL-4。将 25 μ l 各稀释液加入到平板的一横行中（即 A 行得到最高浓度，G 行得到最低浓度）。将 25 μ l 不含 IL-4 的生长培养基加入到 H 行中。通过制备 4 倍于终浓度的储备液来制备测试用拮抗剂。将 25 μ l 加入到一式三份一组的含有 IL-4 的孔中（纵行 1、2、3，A-H）。确定在 H 行中包括拮抗剂。

2. 作为阳性对照，保持一组孔中不含拮抗剂。这些孔中仅含有 IL-4 和培养基。

3. 在制备用于试验的细胞前将平板在 37℃ 下和 5% CO₂ 加湿培养箱内培养 1-2 小时。

B. 细胞的制备

4. 通过在不合生长因子的试验培养基中离心将细胞洗涤两次。

5. 测定细胞数量和锥虫蓝存活率并在试验培养基中将细胞悬浮至终浓度为 8×10^5 /ml。

6. 将 50 μ l 细胞混悬液（40,000 个细胞）分散入平板的所有孔中。总体积目前应为 100 μ l/孔。

7. 在 37℃ 下的 5% CO₂ 加湿培养箱中将平板培养 68 小时。

C. 显色

8. 在培养 68 小时后，向各孔中加入 15 μ l 的 MTT 染料溶液。

9. 将平板在 37℃ 下的 5% CO₂ 加湿培养箱内培养 4 小时。

10. 4 小时后，向各孔中加入 100 μ l 的增溶溶液。使平板在密封容器内稳定过夜以便完全增溶甲臆晶体。

11. 在 570/650nm 处记录吸收度。

结果

附图 27 表明：在 TF1 细胞生物测定试验中，属于 IL-2R γ -scb-IL4R α -Fc Δ C1 融合多肽的命名为 4SC375 的 IL-4 捕获物作为 IL-4 拮抗剂优于单独的 IL4R α Fc Δ C1 几个数量级。

附图 28 表明在 TF1 细胞生物测定试验中的拮抗剂活性与命名为 4SC424 的 IL-4 捕获物相同，所述的 4SC424 是一种含有等量 IL-2R γ 成分与 IL-4R α 成分的 IL-2R γ -IL4R α -Fc Δ C1 融合多肽。

实施例 8: 属于 XG-1 细胞的 IL-6 生物测定试验方案

所需的试剂和设备

MTT 染料溶液

MTT(3-[4, 5-二甲基噻唑-2-基]) (Sigma 目录号 M2128)。

工作浓度：将 5mg 的无水 MTT 溶于不含 Ca^{+2} 、 Mg^{+2} 的 200ml PBS 中。

无菌过滤并在 -20°C 下等分储存。

增溶溶液

将 100g SDS、950ml dH_2O 、50ml 二甲基甲酰胺和 850 μl 浓 HCl 混合成 1000ml。

用 0.45 μm 滤膜装置进行无菌过滤。

在室温下储存。

试验培养基：

RPMI1640、10% FBS、Pen/Strep、2mM L-谷氨酰胺、50 μM 巯基乙醇。

其它：

0.4% 锥虫蓝染料；稀释用无菌试管；96 孔无菌细胞培养平板 (Falcon#3072)；血细胞计数器；离心管；ELISA 平板读出器；15、25、50 和 100 μl 体积的多道移液管；无菌试剂储蓄器、无菌移液管管头；手套。

试验方案

A. 试验平板的制备

1. 用不同浓度的 IL-6 和 10nM IL-6 拮抗剂制备含有 50 μl 生长培养基/孔的 96 孔无菌组织培养平板。可以通过制备 4 倍最高检测浓度的 IL-6 工作稀释液来进行该步骤。在独立的试管中，制备 2 倍顺序稀释的 IL-6。将 25 μl 各稀释液加入到平板的一横行中（即 A 行得到最高浓度，G 行得到最低浓度）。将 25 μl 不含 IL-6 的生长培养基加入到 H 行中。通过制备 4 倍于终浓度的储备液来制备测试用拮抗剂。将 25 μl 加入到一式三份一组的含有 IL-6 的孔中（纵行 1、2、3，A-H）。确定在 H 行中包括拮抗剂。典型的 IL-6 滴定以 200ng/ml 开始至 3.1ng/ml 结束。

2. 作为阳性对照，保持一组孔中不含拮抗剂。这些孔中仅含有 IL-6 和培养基但不含拮抗剂。

3. 在制备用于试验的细胞前将平板在 37℃ 下和 5% CO₂ 加湿培养箱内培养 1-2 小时。

B. 细胞的制备

4. 通过在不含生长因子的试验培养基中离心将细胞洗涤两次(以 1000RPM 进行 5 分钟)。

5. 测定细胞数量和锥虫蓝存活率并在试验培养基中将细胞悬浮至终浓度为 8×10^5 /ml。

6. 将 50μl 细胞混悬液(40000 个细胞)分散入平板的所有孔中。总体积目前应为 100μl/孔。

7. 在 37℃ 下的 5% CO₂ 加湿培养箱中将平板培养 68 小时。

C. 显色

8. 在 68 小时后, 向各孔中加入 15μl 的染料溶液。

9. 将平板在 37℃ 下的 5% CO₂ 加湿培养箱内培养 4 小时。

10. 4 小时后, 向各孔中加入 100μl 的增溶溶液。使平板在密封容器内稳定过夜以便完全增溶甲腈晶体。

11. 在 570/650nm 处记录吸收度。

结果

附图 29 表明: 在 XG1 生物测定试验中, 附图 24A-附图 24F 中所述的 IL6 捕获物(6SC412IL6R-scb-gpx-FcΔC1)是一种优于对人 IL-6-BE8 的中和单克隆抗体的拮抗剂。

实施例 9: 用于 IL1 捕获物的 MRC5 生物测定试验

MRC5 人肺成纤维细胞通过分泌 IL-6 而对 IL-1 起反应且由此将它们用于检测 IL-1 捕获物阻断 IL-6 的 IL-1-依赖性产生的能力。对照属于与 Fc 结构域融合的 IL-1 I 型受体胞外结构域的 IL-1-RI.Fc 测试 IL1 捕获物 1SC569(附图 26A-附图 26E)。

以 1×10^5 个细胞/ml 将 MRC5 细胞悬浮于培养基中并将 0.1ml 的细胞平板固定(10,000 个细胞/孔)入 96 孔组织培养平板的孔中。在 37℃ 下和加湿 5% CO₂ 培养箱中将平板培养 24 小时。

在 96 孔组织培养皿中将不同剂量下的 IL-1 捕获物和重组人 IL-1 进行预培养并在 37℃ 下培养 2 小时。然后将 0.1ml 的该混合物加入到含有 MRC5 细胞的 96 孔平板中, 使得 IL-1 捕获物的终浓度为 10nM 且 IL-1 的终浓度范围在 2.4pM-5nM。对照孔中只含有捕获物

或不含任何物质。

接着在 37℃ 下和加湿 5% CO₂ 培养箱中将平板培养 24 小时。收集上清液并使用 R&D Systems Quantikine 免疫试验试剂盒、按照制造商的说明检测 IL-6 的水平。

结果

附图 30 表明：捕获物 569（附图 26A - 26E）能够拮抗 IL-1 的作用并在用 IL-1 处理时阻断 IL-6 从 MRC5 细胞中产生。在 10nM 浓度下，捕获物 569 能够阻断 IL-6 产生至 IL-1 浓度为 3nM。相反，IL-1-RI.Fc 是一种极差的 IL-1 的拮抗剂。它仅能够阻断 IL-1 的作用至约 10-20pM。因此，捕获物 569 在阻断 IL-1 方面优于 IL-1-RI.Fc 约 100 倍。

实施例 10: IL-13/IL-4 单链捕获物的构建

1. 为了生成命名为 IL-4R α . IL-13R α 1.Fc 的 IL-13/IL-4 双捕获物，将人 IL-4R α 胞外结构域（相当于附图 31A - 附图 31G 的 #1-693 位核苷酸）和人 IL-13R α 1 胞外结构域（相当于附图 31A - 附图 31G 的 #700-1665 位核苷酸）通过标准 PCR 技术扩增并连入含有人 Fc 序列（相当于附图 31A - 附图 31G 的 #1671-2355 位核苷酸）的表达载体 pMT21 中，由此生成由 N - C 末端 IL-4R α 、IL-13R α 1 以及人 IgG1 的铰合部、CH2 和 CH3 区组成的融合蛋白。此外，在 IL-4R α 与 IL-13R α 1 之间框内构建带有氨基酸序列 SerGly 的 2 个氨基酸接头（相当于附图 31A - 附图 31G 的 #694-699 位核苷酸）并在 IL-13R α 1 与 Fc 部分之间框内构建带有氨基酸序列 ThrGly 的 2 个氨基酸接头（相当于附图 31A - 附图 31G 的 #1666-1671 位核苷酸）。通过标准技术对所有序列进行序列鉴定。然后使用标准分子生物学技术将 IL-4R α . IL-13R α 1.Fc 编码序列亚克隆入表达载体 pCDNA3.1（Stratagene）。

2. 为了生成命名为 IL-13R α 1. IL-4R α . Fc 的 IL-13/IL-4 双捕获物，将 IL-13R α 1 胞外结构域（相当于附图 32A - 附图 32G 的 #1-1029 位核苷酸）和人 IL-4R α 胞外结构域（相当于附图 32A - 附图 32G 的 #1060-1692 位核苷酸）通过步骤 PCR 技术扩增并连入含有人 Fc 序列（相当于附图 32A - 附图 32G 的 #1699-2382 位核苷酸）的表达载体 pJEF14 中以便生成由 N 至 C 的 IL-13R α 1、IL-4R α 以及人 IgG1 的铰合部、CH2 和 CH3 区组成的融合蛋白。此外，在 IL-13R α 1 与 IL-4R α

之间框内构建带有氨基酸序列 GlyAlaProSerGlyGlyGlyGlyArgPro 的 10 个氨基酸接头（相当于附图 32A - 附图 32G 的#1030-1059 位核苷酸）并在 IL-4R α 与 Fc 部分之间框内构建带有氨基酸序列 SerGly 的 2 个氨基酸接头（相当于附图 32A - 附图 32G 的#1693-1698 位核苷酸）。通过标准技术对所有序列进行序列鉴定。然后使用标准分子生物学技术将 IL-13R α 1. IL-4R α 1. Fc 的编码序列亚克隆入表达载体 pCDNA3.1（Stratagene）。

实施例 11: IL-4R α . IL-13R α 1. Fc 和 IL-13R α 1. IL-4R α 1. Fc 的表达

在 LB + 氨苄西林内使 DH10B 细胞中大规模 (IL) 培养的 pCAE801（编码 IL-4R α . IL-13R α 1. Fc 的 DNA 载体构建体）和 pCAE802（编码 IL-13R α 1. IL-4R α 1. Fc 的 DNA 质粒构建体）生长过夜并使用 Qiagen Endofree Mega 试剂盒、按照制造商的方案提取质粒 DNA。用 UV 分光光度计和荧光计测定纯化质粒 DNA 的浓度。还可以通过用 BbsI、XmnI 和 NcoI 限制酶消化等分试样来检验质粒 DNA。所有限制酶消化相当于 1% 琼脂糖凝胶中预定大小的片段。

以 4×10^6 个细胞/平板的密度给 40 个 15cm 培养平板接种 CHO-K1/E1A 细胞。平板固定培养基是 Gibco Ham's F-12 w/10% Hyclone 胎牛血清 (FBS) + 青霉素/链霉素并给该培养基补充谷氨酰胺。第二天使用溶于 12ml 体积的 Gibco Oprimem 和 Gibco Lipofectamine、按照制造商的方案给各平板转染 6 μ g 的 pCAE801 或 pCAE802。在向细胞中添加转染混合物 4 小时后加入 12ml/平板的 Optimem w/10% FBS。在 37 $^{\circ}$ C 下和 5% CO₂ 培养箱中将平板培养过夜。第二天从各平板中除去培养基并加入 25ml 表达培养基 (Gibco CHO-S-SFM II w/谷氨酰胺 + 1mM 丁酸钠)。在 37 $^{\circ}$ C 下将该平板培养 3 天。

培养 3 天后, 将培养基从各平板中除去并用吊桶式转头以 400rpm 离心至沉淀出细胞。将上清液离心入 1L 无菌瓶中并如下所述纯化表达的蛋白质。

实施例 12: 从培养基中纯化 IL-4R α . IL-13R α 1. Fc 和 IL-13R α 1. IL-4R α 1. Fc

1. IL-4R α . IL-13R α 1. Fc 的纯化

在 CHO 细胞中短暂表达 IL-4R α . IL-13R α 1. Fc 并如上所述从平板转染物中收集上清液。分别使用山羊抗-hIgG (γ 链特异性; Sigma

1-3382) 和山羊抗-hIgG (Fc 特异性) -FITC 接合物 (Sigma F9512) 捕获和报道抗体、通过夹心式 ELISA 测定表达的分泌蛋白质。产量在 5.8-9.2mg (平均 7.5mg) /升条件培养基的范围。将 Complete™ 蛋白酶抑制剂片 (Roche Diagnostics Corp.) 溶入培养基 (1片/L)。在 4℃ 下, 在上用 pH 7.4 的 Dulbecco's PBS 缓冲液 (Life Technologies) 预平衡的 5mL Hi Trap® 蛋白质 A 亲和柱 (Amersham Pharmacia Biotech) 前将条件培养基进行无菌过滤 (0.22μm 孔大小)。流速为 ~1-2mL/分钟。用 PBS 充分洗涤该柱以便从该柱中除去非特异性结合的蛋白质。使用 20mM 柠檬酸钠、150mM NaCl (pH 3.5) 洗脱 IL-4Rα. IL-13Rα1. Fc。通过用 1M Tris-OH 滴定而立即中和该洗脱液。收集含有蛋白质的级分并立即将其透析入 4℃ 下、pH 7.4 的 PBS 缓冲液。从蛋白质 A 纯化步骤中回收 6.8mg (73%)。在环境温度下, 使用用 PBS、5% v/v 甘油 (pH 7.4) 预平衡的 superose 6 柱 (25mL 床体积; Amersham Pharmacia Biotech)、通过大小排阻层析进一步纯化 IL-4Rα. IL-13Rα1. Fc。流速为 0.5mL/分钟。根据考马斯染色的非还原和还原的 SDS-PAGE (Novex NuPAGE 4-12% Bis-Tris 凝胶) 估计蛋白质级分。适当收集级分以便减少聚集的蛋白质的量。总产率为 51% (4.4mg), 通过 SDS-PAGE 评定的纯度为 97%。通过非还原和还原的 SDS-PAGE (4-12% Bis-Tris)、分析型大小排阻层析 (Tosohaas TSKG4000SWXL)、N-末端测序和使用山羊抗-hIgG-HRP 接合物 (Promega W403B) 以及小鼠单克隆抗-hIL-4R (R&D MAB230)、随后是作为二次抗体的抗-mIgG-HRP 接合物 (Promega W402B) 进行的免疫印迹分析纯化的 IL-4Rα. IL-13Rα1. Fc。

2. IL-13Rα1. IL-4Rα. Fc 的纯化

在 CHO 细胞中短暂表达人 IL-13Rα1. IL-4Rα. Fc 并如上所述从平板转染物中收集上清液。分别使用山羊抗-hIgG (γ链特异性; Sigma 1-3382) 和山羊抗-hIgG (Fc 特异性) -FITC 接合物 (Sigma F9512) 捕获和报道抗体、通过夹心式 ELISA 测定表达的分泌蛋白质。产量为 8.8/升条件培养基。将 Complete™ 蛋白酶抑制剂片 (Roche Diagnostics Corp.) 溶入培养基 (1片/L)。在 4℃ 下, 在上用 pH 7.4 的 Dulbecco's PBS 缓冲液 (Life Technologies) 预平衡的 5mL Hi Trap® 蛋白质 A 亲和柱 (Amersham Pharmacia Biotech) 前将条

件培养基进行无菌过滤（0.22 μ m 孔大小）。流速为~1-2mL/分钟。用 PBS 充分洗涤该柱以便从该柱中除去非特异性结合的蛋白质。使用 20mM 柠檬酸钠、150mM NaCl（pH 3.5）洗脱 IL-13R α 1. IL-4R α . Fc。通过用 1M Tris-OH 滴定而立即中和该洗脱液。收集含有蛋白质的级分并立即将其透析入 4℃下、pH 7.4 的 PBS 缓冲液。从蛋白质 A 纯化步骤中回收 3.8mg（43%）。在环境温度下，使用用 PBS、5% v/v 甘油（pH 7.4）预平衡的 superose 6 柱（25mL 床体积；Amersham Pharmacia Biotech）、通过大小排阻层析进一步纯化 IL-13R α 1. IL-4R α . Fc。流速为 0.5mL/分钟。根据考马斯染色的非还原和还原的 SDS-PAGE（Novex NuPAGE 4-12% Bis-Tris 凝胶）估计蛋白质级分。适当收集级分以便减少聚集的蛋白质的量。总产率为 17%（1.5mg），通过 SDS-PAGE 评定的纯度为 95%。通过非还原和还原的 SDS-PAGE（4-12% Bis-Tris）、分析型大小排阻层析（Tosohaas TSKG4000SWXL）、N-末端测序和使用山羊抗-hIgG-HRP 接合物（Promega W403B）以及小鼠单克隆抗-hIL-4R（R&D MAB230）、随后是作为二次抗体的抗-mIgG-HRP 接合物（Promega W402B）进行的免疫印迹分析纯化的 IL-13R α 1. IL-4R α . Fc。

实施例 13: 通过 IL-4R α . IL-13R α 1. Fc 和 IL-13R α 1. IL-4R α . Fc 阻断 IL-4 和 IL-13

材料和方法

TF1 生物测定试验 将 TF1 细胞维持在生长培养基（10ng/ml GM-CSF、RPMI1640、10% FBS、L-谷氨酰胺、青霉素、链霉素）中。为了进行生物测定试验，将细胞用试验培养基（如上所述但不含 GM-CSF）洗涤 2 次且然后以 2×10^5 个细胞固定在 50 μ l 试验培养基中。以 40nM 的浓度将纯化的 IL-4R α . IL-13R α 1. Fc 和 IL-13R α 1. IL-4R α . Fc 稀释入试验培养基。将 25 μ l 各捕获物加入到细胞中。在试验培养基中将 IL-13 或 IL-4 稀释成 40nM 且然后制备溶于试验培养基中的 2 倍稀释液系列。接着将 25 μ l IL-13 或 IL-4 加入到含有细胞和捕获物的孔中。接下来在 37℃下和 5% CO₂ 中将细胞培养~70 小时。通过 MTS 检测试验、按照制造商的方案（Promega, Inc.）测定 TF1 细胞增殖程度。

结果

如上所述在 TF1 生物测定试验中测定 IL-4R α . IL-13R α 1. Fc 和 IL-13R α 1. IL-4R α . Fc 捕获物阻断人 IL-13 和人 IL-4 活性的能力。IL-13 刺激 TF1 细胞增殖，其半数最大生长浓度是 0.2nM。添加 10nM 浓度的 IL-4R α . IL-13R α 1. Fc 或 IL-13R α 1. IL-4R α . Fc 捕获物可阻断最高可达 2nM 的 IL-13-诱导的生长（附图 33）。在 ~4-5nM IL-13 浓度下，TF1 细胞的生长被抑制了 50%。TF1 细胞对半数最大生长为 ~0.02nM 的刺激其增殖的 IL-4 更为敏感。添加 10nM 浓度的 IL-4R α . IL-13R α 1. Fc 或 IL-13R α 1. IL-4R α . Fc 可阻断最高可达 ~1nM 的 IL-13-诱导的生长（附图 34）。在 ~3-4nM IL-4 浓度下，TF1 细胞的生长被抑制了 50%。这些结果证明 IL-4R α . IL-13R α 1. Fc 和 IL-13R α 1. IL-4R α . Fc 均可以阻断 IL-4 和 IL-13 刺激细胞响应的能力。

实施例 14: 体内通过 IL-1 捕获物阻断注射的 IL-1

IL-1 是一种促炎细胞因子。已经证实系统性给予 IL-1 可在动物体内引起急性反应，包括短暂高血糖、血胰岛素过少、发热、厌食和白细胞介素-6（IL-6）血清水平升高（Reimers, 1998）。由于小鼠对鼠和人 IL-1 有反应，所以可以使用人 IL-1 且可以评价人特异性 IL-1 拮抗剂的体内结合作用。将这种急性小鼠模型用于测定人 IL-1 捕获物拮抗外源给予的人 IL-1 的体内作用的能力。这产生了人 IL-1 捕获物的体内功效的快速迹象且可以将它用作辅助分子筛选的检测试验。

实验设计

给小鼠皮下注射人 IL-1（0.3 μ g/kg）。在注射人 IL-1 前 24 小时用载体或 150 倍摩尔以上的人 IL-1 捕获物（0.54mg/kg）预治疗动物。在处死动物前 2 小时（26 小时），给小鼠第二次注射人 IL-1（0.3 μ g/kg）。在不同的时间点处采集血样并检测血清的 IL-6 水平。

结果

外源给予人 IL-1 导致血清 IL-6 水平显著升高。在 150 倍摩尔以上时，人 IL-1 捕获物完全阻断了 IL-6 的增加（附图 35）。此外，人 IL-1 捕获物的作用至少又持续了 24 小时，甚至再次给予 IL-1 时也可防止 IL-6 增加（附图 35）。这类持续长久的功效提示每日注射 IL-6 捕获物对慢性应用并不是必需的。

实施例 15: 在猕猴中评价 IL-4 捕获物阻断对人 IL-4 的生理反应的

能力

系统性给予人 IL-4 在猕猴体内引起全身反应 (Gundel 等, 1996)。因此, 通过确定这些反应可以证明 IL-4 捕获物阻断人 IL-4 的有效性。

实验设计:

本实验由 3 部分组成: 人 IL-4 + 载体 (部分 1); 人 IL-4 + 人 IL-4 捕获物 (部分 2); 和人 IL-4 + 载体 (部分 3)。从给予人 IL-4 前第 1 天开始, 每日两次皮下注射人 IL-4 (25 μ g/kg)、持续 4 天; 且每日静脉内给予人 IL-4 捕获物 (8mg/kg) 和载体、持续 5 天。每日采集全血用于对 CD16 的流式细胞分析并获得血浆用于检测细胞因子单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)。CD16 和 MCP-1 是 IL-4 介导的人和猴体内的炎症的标记。

结果

在有人 IL-4 存在的情况下, MCP-1 增加了 2.5 倍且被 IL-4 捕获物明显阻断 (附图 36A)。类似地, IL-4 捕获物减弱外周血液中 CD16 阳性淋巴细胞百分比的减少 (附图 36B)。在剩余期限后, 给猴重新注射 IL-4 并重新证实动物对人 IL-4 的反应性 (附图 36A 和 36B), 从而提示 IL-4 捕获物特异性介导对 MCP-1 和 CD16 反应的抑制作用。

实施例 16: IL-4 捕获物对 IL-4-诱导的 IgE 分泌的作用

已经证实注射抗小鼠 IgD 抗体可刺激正常小鼠体内 IL-4-介导的 IgE 增加。已经将该模型广泛用于评价 IL-4 拮抗剂诸如可溶性 IL-4 受体和抗-IL-4 单克隆抗体 (Sato 等, 1993)。我们决定使用该模型评价 IL-4 捕获物阻断 IL-4-介导的 IgE 增加的能力。

实验设计

将注射了抗-小鼠 IgD (100 μ l/小鼠, 皮下) 的 BALB/C 小鼠随机分成 3 组。各组接受 (第 3-5 天时) 载体、鼠 IL-4 捕获物 (1mg/kg, 皮下) 或对小鼠 IL-4 的单克隆抗体 (1mg/kg, 皮下)。在不同时间点处采集血清并检测 IgE 水平。

结果

用鼠 IL-4 捕获物或小鼠 IL-4 抗体治疗均可显著拮抗这种小鼠模型中 IL-4-介导的 IgG 升高 (附图 37)。这提示鼠 IL-4 捕获物结合鼠 IL-4 并拮抗由体内内源性 IL-4

引起的生理反应。

本发明在范围上并不限于本文所述的特定实施方案。实际上，除所述的那些实施方案外，本领域技术人员显然可以根据上述描述和附图对本发明进行各种修改。这类修改也属于所附权利要求的范围。

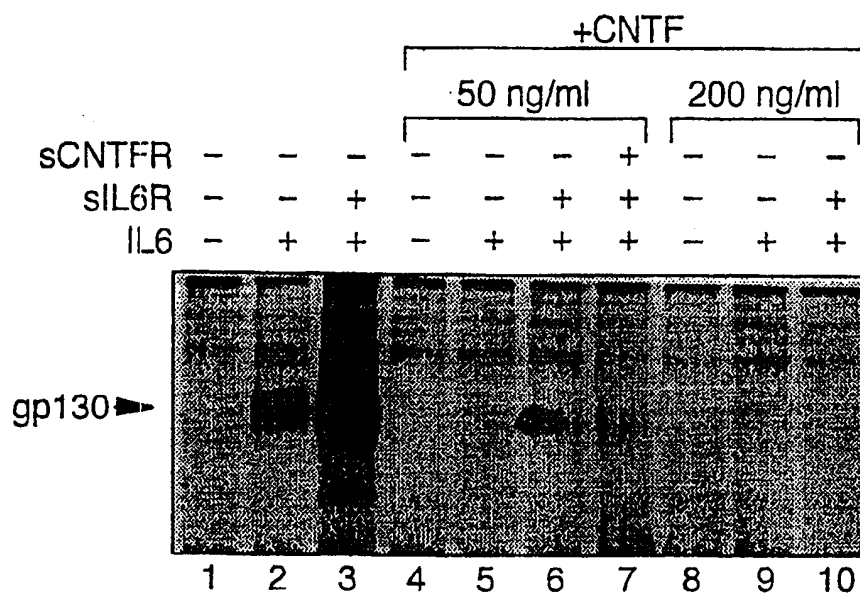


图 2

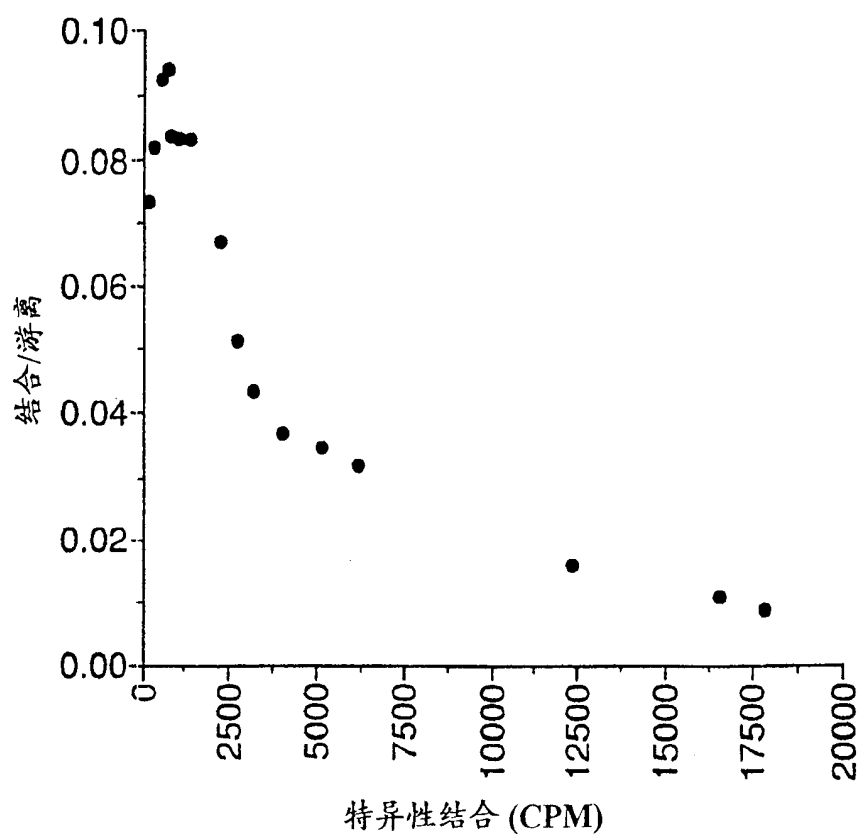


图 3

人gp130-Fc-His6的氨基酸序列

序列范围: 1-861

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
MVTLQTWVQALFIFLT	TES	TGELLDPCGYISPES	PVVQL	HSNFTAVCVLKEK	CMDYFHV
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
NANYIVWKTNHFTIPKE	QYT	IINRTASSVTFTDIAS	LN	NIQ	LTCNILTFGQLEQN
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
ISGLPPEKPKNLSCIV	NEGK	KMRCEWDGGRETHLE	TNFTL	KSEWATHKFA	DCAKRDTFT
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
SCTVDYSTVYFVNIEV	WVEA	ENALGKVTS	DHINFDPVYKV	KPNPPHNLSVIN	SEELSSIL
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
KLTWTNPSIKSVIILKY	NIQ	YRTKDASTWSQIPPE	D	TAST	RSSFTVQDLKPFTE
310	320	330	340	350	360
*	*	*	*	*	*
CMKEDGKGYWSDWSEE	ASGI	TYEDRPSKAPSF	WYKIDPSH	TQGYRTVQ	LVWKTLPPEAN
370	380	390	400	410	420
*	*	*	*	*	*
GKILDYEVTLTRWKSHL	QNY	TVNATKLTVNLTND	RYLATL	TVRNLVGKS	DAAVLTIPACD
430	440	450	460	470	480
*	*	*	*	*	*
FQATHPVMDLKAFPKDN	MLW	VEWTTTPRESVK	KYILEWCVL	SDKAPCITDW	QQEDGTVHRT
490	500	510	520	530	540
*	*	*	*	*	*
YLRGNLAESKCYLITV	TPVY	ADGPGSPESIKAYL	KQAPPS	KGPTVVRTKKVG	KNEAVLEWD
550	560	570	580	590	600
*	*	*	*	*	*
QLPVDVQNGFIRNYTIF	YRT	IIGNETAVNV	DSSHTEY	TL	SLTSDTLYMVR
610	620	630	640	650	660
*	*	*	*	*	*
KDGPEFTFTTPKFAQGE	IES	<u>GEPKSCDKTHTC</u>	<u>PRCPAP</u>	<u>EL</u>	<u>LGGPSVLEFP</u>
670	680	690	700	710	720
*	*	*	*	*	*
RTPEVTCVVVDVSHED	PEVK	<u>FNWYVDGVEV</u>	<u>HNAKTKPRE</u>	<u>E</u>	<u>OYNSTYRVVSV</u>
730	740	750	760	770	780
*	*	*	*	*	*

图 4

NGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGOPREPOVYTLPPS RDELTKNOVSLTCLVKGEYP
 790 800 810 820 830 840
 * * * * * *
SDIAVEWESNGOPENNYKTT PPVLDSGSEFLYSKLTVDK SRWOOGNVFSCSVMHREALHN
 850 860
 * *
HYTOKSLSLSPGKHHHHHH•

图 4(续)

人 IL-6R α -Fc 的氨基酸序列

序列范围: 1 - 594

10 20 30 40 50 60
 * * * * * *
MVAVGCALLAALLAAPGAAL APRRCPAQEVARGVLTSLPG DSVTLTCPGVEPEDNATVHW
 70 80 90 100 110 120
 * * * * * *
VLRKPAAGSHPSRWAGMGRR LLRSVQLHDSGNYSCYRAG RPAGTVHLLVDVPPEEPQLS
 130 140 150 160 170 180
 * * * * * *
CFRKSPLSNVVCEWGPRSTP SLTTKAVLLVRKFQNSPAED FQEPQYQSQESQKFCQLAV
 190 200 210 220 230 240
 * * * * * *
PEGDSSFYIVSMCVASSVGS KFSKTQTFQCGILQPDPPA NITVTAVARNPRWLSVTWQD
 250 260 270 280 290 300
 * * * * * *
PHSWNSSFYRLRFELRYRAE RSKTFTTWMVKDLQHHCVIH DAWSGLRHVVLRAQEFGQ
 310 320 330 340 350 360
 * * * * * *
GEWSEWSPEAMGTPWTESRS PPAENEVSTPMQALTNNKDD DNILFRDSANATSLPVQDAG
 370 380 390 400 410 420
 * † † * * * * *
EPKSCDKTHTCPFPAPPELL GGPSVLEFPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 430 440 450 460 470 480
 * * * * * *
MTYVDGVEVHNAKTKPREEO YNSTYRVVSVLTVLHODWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 490 500 510 520 530 540
 * * * * * *
ISKAKGOPREPOVYTLPPSR DELTKNOVSLTCLVKGEYPS DIAVEWESNGOPENNYKTFP
 550 560 570 580 590
 * * * * *
PVLDSGSEFLYSKLTVDKS RWOOGNVFSCSVMHREALHNH YTOKSLSLSPGK•

图 5

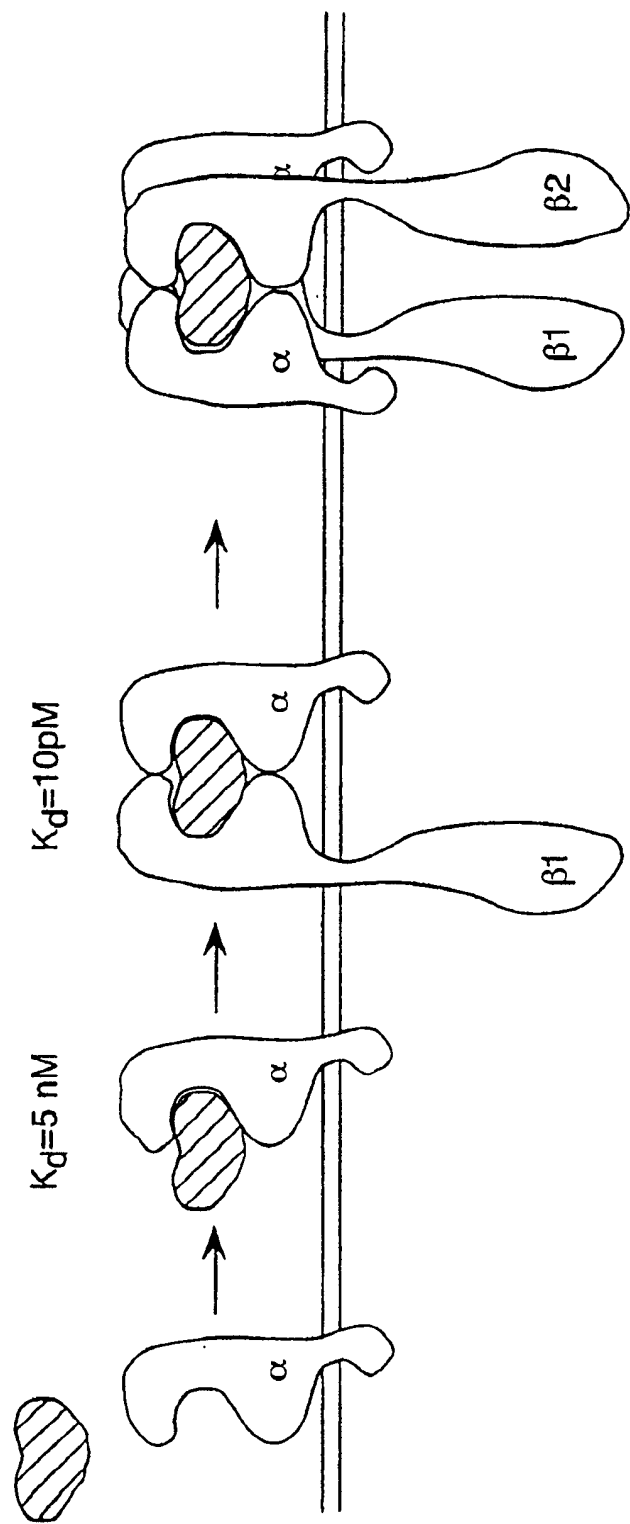


图 6

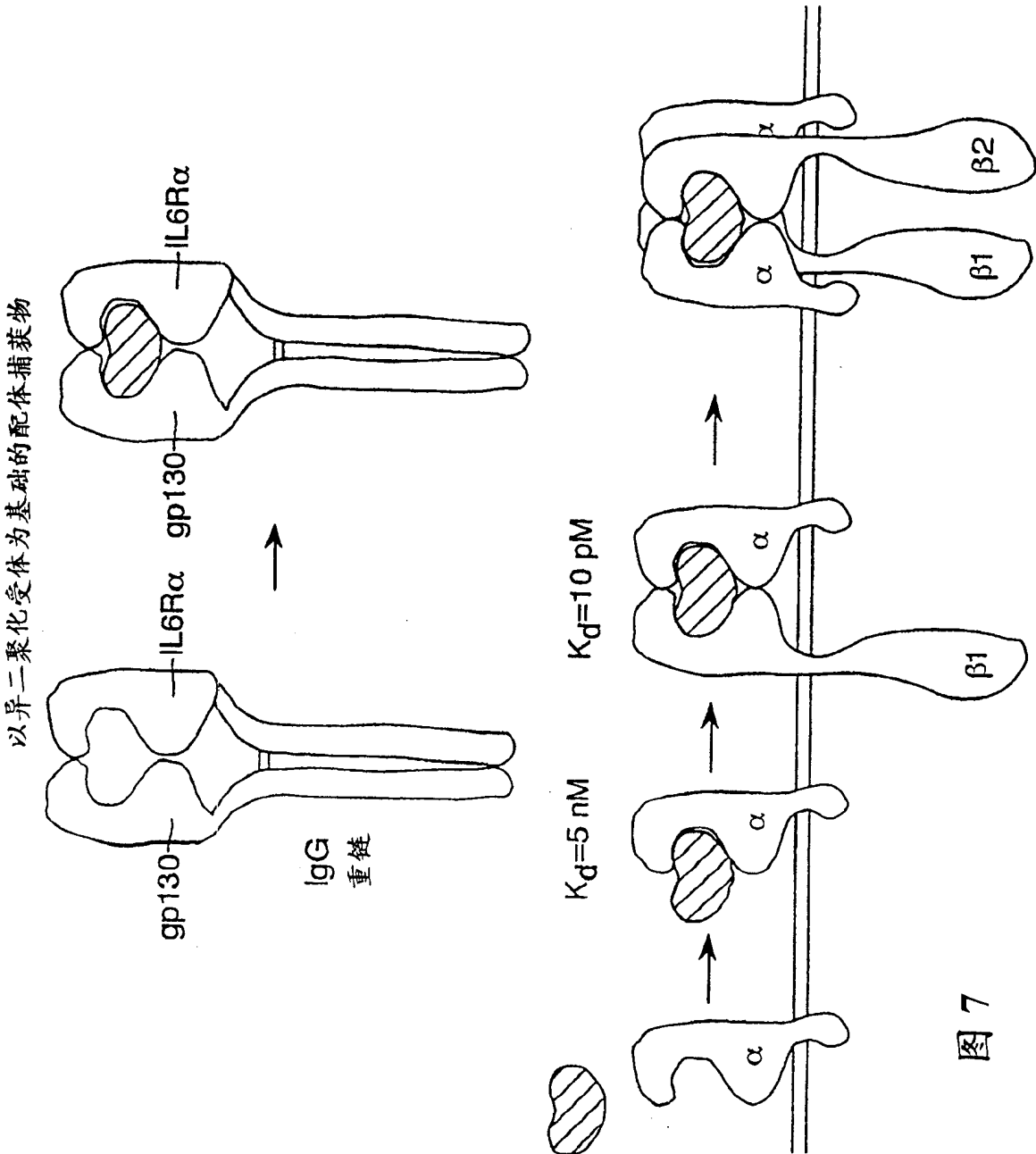


图 7

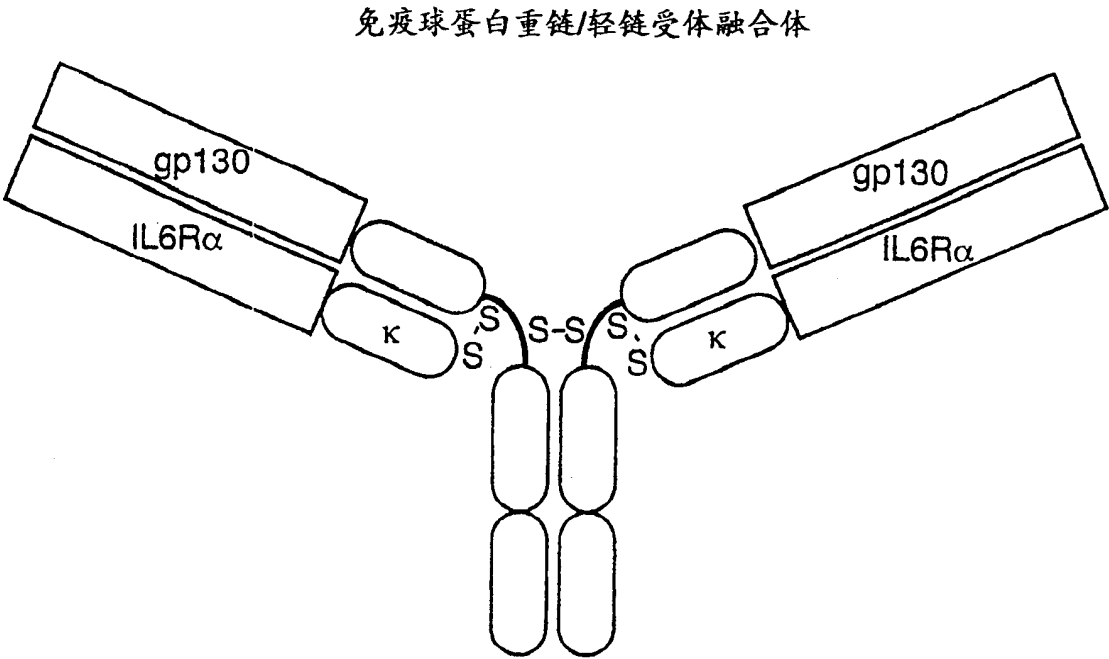


图 8

gp130-Cy1 的氨基酸序列

序列范围: 1-952

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
MVTLQTVVQALFIFLTES	TGELLDPCGYISPESPVVQL	HSNFTAVCVLKEKCMDYFHV			
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
NANYIVWKTNHFTIPKEQYT	IINRTASSVTFTDIASLNIQ	LTCNILTFGQLEQNVYGITI			
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
ISGLPPEKPKNLSCIVNEGK	KMRCEWDGGRETHLETNFTL	KSEWATHKFADCKAKRDTPT			
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
SCTVDYSTVYFVNIEVWVEA	ENALGKVTSDHINFDPVYKV	KPNPPHNLSVINSEELSSIL			
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
KLTWTNPSIKSVHILKYNIQ	YRTKDASTWSQIPPEDTAST	RSSFTVQDLKPFTEYVFRIR			
310	320	330	340	350	360
*	*	*	*	*	*
CMKEDGKGYWSDWSEEASGI	TYEDRPSKAPSFYKIDPSH	TQGYRTVQLVWKTLPPEAN			
370	380	390	400	410	420
*	*	*	*	*	*
GKILDYEVTLTRWKSHLQNY	TVNATKLTVNLTNDRYLATL	TVRNLVGKSDDAVALTIPACD			
430	440	450	460	470	480
*	*	*	*	*	*
FQATHPVMDLKAFPKDNMLW	VEWTTTPRESVKYILEWCVL	SDKAPCITDWQQEDGTVHRT			
490	500	510	520	530	540
*	*	*	*	*	*
YLRGNLAESKCYLITVTPVY	ADGPGSPESIKAYLKQAPPS	KGPTVRTKKVGKNEAVLEWD			
550	560	570	580	590	600
*	*	*	*	*	*
QLPVDVQNGFIRNYTIFYRT	IIGNETAVNVDSSTHEYTLS	SLTSDTLYMVRMAAYTDEGG			
610	620	630	640	650	660
*	*	*	*	*	*
KDGPEFTFTTPKFAQGEIES	GASTKGPSVEPLARSSKSTS	GGTAALGCLVKDYFEPVTV			
670	680	690	700	710	720
*	*	*	*	*	*
SWNSGALTSGVHTFPAVLOS	SGLYSLSSVVTVPSSSLGTO	TYICNVNHKPSNTKVDKKVE			
730	740	750	760	770	780
*	*	*	*	*	*
PKSCDKTHTCPPEPAPELLG	GPSVLEFPKPKDTLMISRT	PEVTCVVVDVSHEDPEVKEN			

图 9

790	800	810	820	830	840
*	*	*	*	*	*
<u>WYVDGVEVHNAKTKPREEOY NSTYRVVSVLTVLHODWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTI</u>					
850	860	870	880	890	900
*	*	*	*	*	*
<u>SKAKGPREPOVYTLPPSRD ELTKNOVSLTCLVKGEYPSD IAVEWESNGOPENNYKTTTP</u>					
910	920	930	940	950	
*	*	*	*	*	
<u>VLDSGSGFFLYSKLTVDKSR WOOGNVFSCSVMHEALHNHY TOKSLSLSPGK*</u>					

图 9(续)

gp130Δ3fibro 的氨基酸序列

序列范围: 1 - 332

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
MVTLQTWVQALFIFLTES TGELLDPCGYISPESPVVQL HSNFTAVCVLKEKCMDYFHV					
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
NANYIVWKTNHFTIPKEQYT IINRTASSVTFTDIASLNIQ LTCNILTFGQLEQNVYGITI					
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
ISGLPPEKPKNLSCIVNEGK KMRCEWDGGRETHLETNFTL KSEWATHKFADCKAKRDTPT					
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
SCTVDYSTVYFVNIEVWVEA ENALGKVTSDHINFDPVYKV KPNPPHNLSVINSEELSSIL					
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
KLTWTNPSIKSVIILKYNIQ YRTKDASTWSQIPPEDTAST RSSFTVQDLKPFTEYVFRIR					
310	320	330			
*	*	*			
CMKEDGKGYWSDWSEEASGI TYEDRPSKAPSG					

图 10

J-CH1 的氨基酸序列

序列范围: 1 - 121

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
SGGQGT LVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VS WNSGALTS					
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
GVHTFPAV LOSSGLYSLSSV VTFPSSSLGTOTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHT *					

图 11

Cγ4 的氨基酸序列

序列范围: 1 - 330

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
SGASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ					
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
SSGLYSLSSV VTFPSSSLGT KTYTCNV DHKPSNTKVDKRV ESKYGP PCPSCPAPEFLGGP					
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNS					
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEM					
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ					
310	320	330			
*	*	*			
EGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGK*					

图 12

K- 结构域的氨基酸序列

序列范围: 1 - 108

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
SGTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQ					
70	80	90	100		
*	*	*	*		
DSKDSTYSLSSTLTLSKADY EHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC*					

图 13

 λ - 结构域的氨基酸序列

序列范围: 1 - 107

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
SGPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSK					
70	80	90	100		
*	*	*	*		
QSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS*					

图 14

可溶性IL-6R α 结构域的氨基酸序列

序列范围: 1-360

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
MVAVGCALLAALLAAPGAAL	APRRCPAQEVARGVLTSLPG	DSVTLTCPGVEPEDNATVHW			
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
VLRKPAAGSHPSRWAGMGRR	LLRSVQLHDSGNYSYRAG	RPAGTVHLLVDVPPEEPQLS			
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
CFRKSPLSNVVCWGPSTP	SLTTKAVLLVRKFQNSPAED	FQEPQYSQESQKFSCQLAV			
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
PEGDSSFYIVSMCVASSVGS	KFSKTQTFQGCILQPDPPA	NITVTAVARNPRWLSVTWQD			
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
PHSWNSSFYRLRFELRYRAE	RSKTFTTWMVKDLQHHCVIH	DAWSGLRHVVQLRAQEFGQ			
310	320	330	340	350	360
*	*	*	*	*	*
GEWSEWSPEAMGTPWTESRS	PPAENEVSTPMQALTTNKDD	DNILFRDSANATSLPVQDAQ			

图 15

可溶性IL-6R α 313 结构域的氨基酸序列

序列范围: 1-315

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
MVAVGCALLAALLAAPGAAL	APRRCPAQEVARGVLTSLPG	DSVTLTCPGVEPEDNATVHW			
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
VLRKPAAGSHPSRWAGMGRR	LLRSVQLHDSGNYSYRAG	RPAGTVHLLVDVPPEEPQLS			
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
CFRKSPLSNVVCWGPSTP	SLTTKAVLLVRKFQNSPAED	FQEPQYSQESQKFSCQLAV			
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
PEGDSSFYIVSMCVASSVGS	KFSKTQTFQGCILQPDPPA	NITVTAVARNPRWLSVTWQD			
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
PHSWNSSFYRLRFELRYRAE	RSKTFTTWMVKDLQHHCVIH	DAWSGLRHVVQLRAQEFGQ			
310					
*					
GEWSEWSPEAMGTG					

图 16

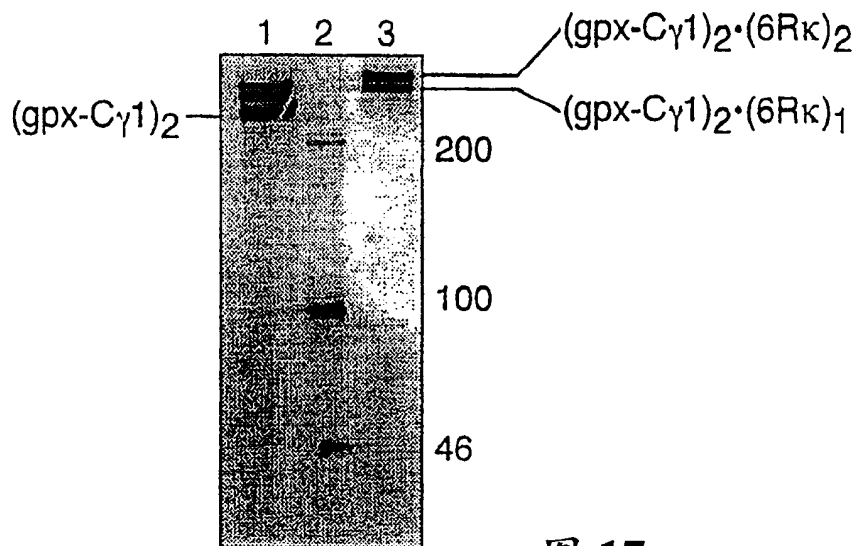


图 17

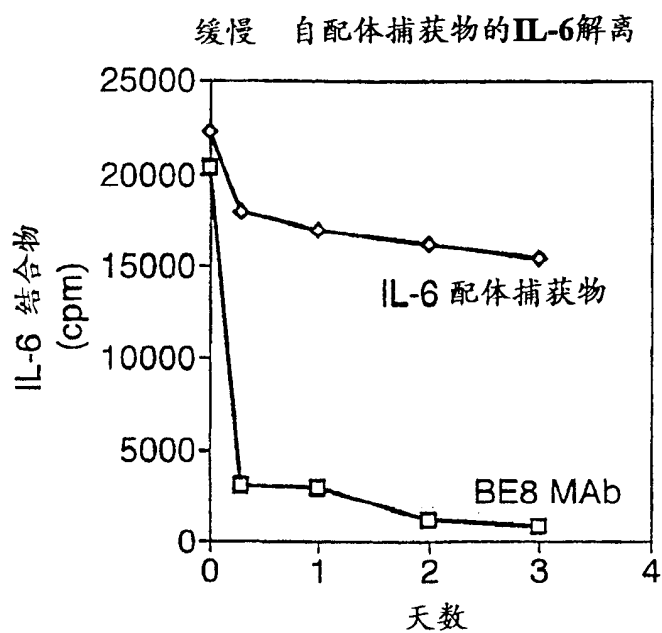


图 18

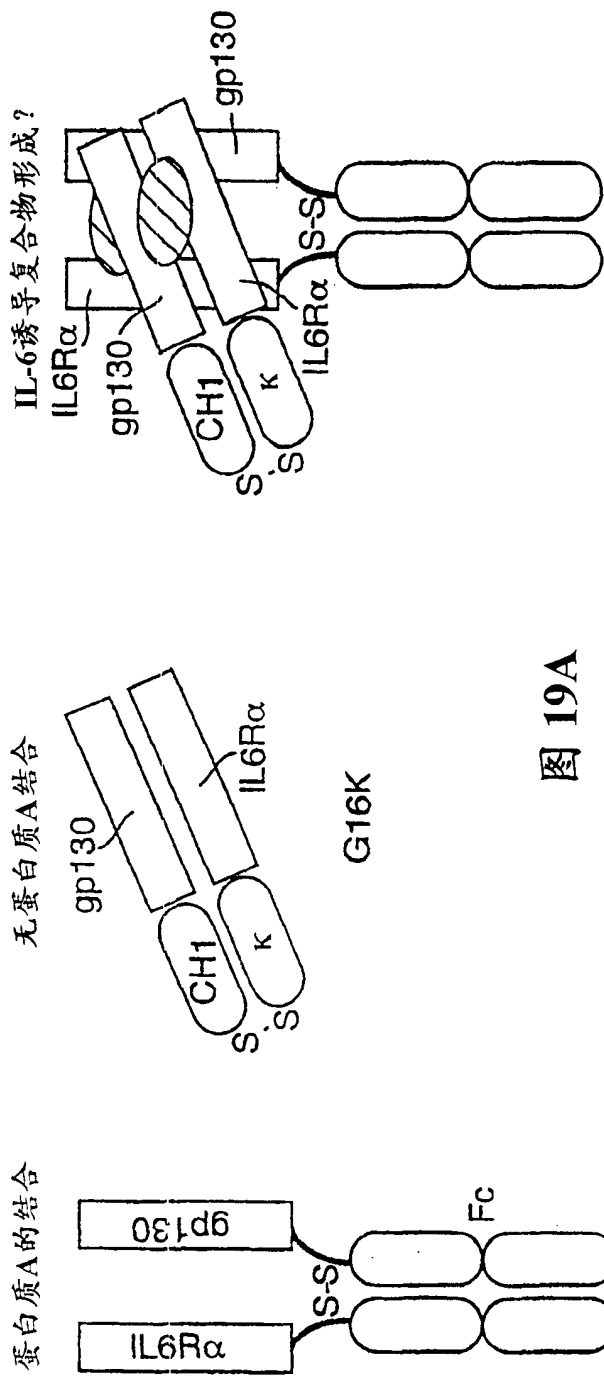


图 19A

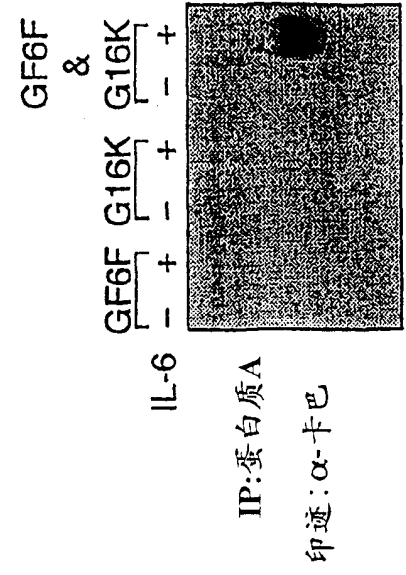


图 19B

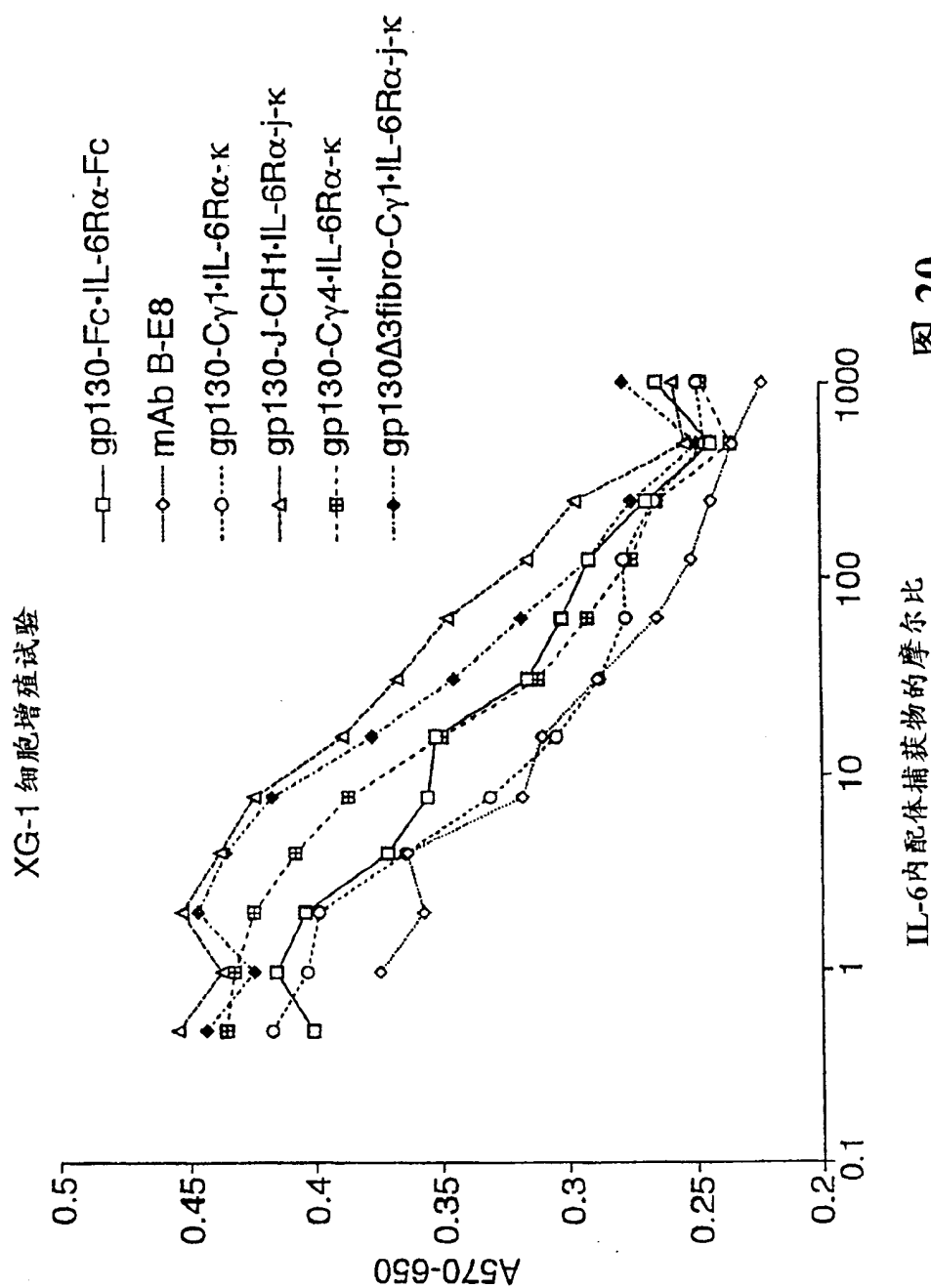


图 20

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *
ATG GTG AAG CCA TCA TTA CCA TTC ACA TCC CTC TTA TTC CTG CAG CTG
Met Val Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu>

50      60      70      80      90
      *      *      *      *      *
CCC CTG CTG GGA GTG GGG CTG AAC ACG ACA ATT CTG ACG CCC AAT GGG
Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly>

100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *
AAT GAA GAC ACC ACA GCT GAT TTC TTC CTG ACC ACT ATG CCC ACT GAC
Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp>

150     160     170     180     190
      *      *      *      *      *
TCC CTC AGT GTT TCC ACT CTG CCC CTC CCA GAG GTT CAG TGT TTT GTG
Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val>

200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *
TTC AAT GTC GAG TAC ATG AAT TGC ACT TGG AAC AGC AGC TCT GAG CCC
Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro>

250     260     270     280
      *      *      *      *      *
CAG CCT ACC AAC CTC ACT CTG CAT TAT TGG TAC AAG AAC TCG GAT AAT
Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn>

290     300     310     320     330
      *      *      *      *      *
GAT AAA GTC CAG AAG TGC AGC CAC TAT CTA TTC TCT GAA GAA ATC ACT
Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr>

340     350     360     370     380
      *      *      *      *      *
TCT GGC TGT CAG TTG CAA AAA AAG GAG ATC CAC CTC TAC CAA ACA TTT
Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe>

390     400     410     420     430
      *      *      *      *      *
GTT GTT CAG CTC CAG GAC CCA CGG GAA CCC AGG AGA CAG GCC ACA CAG
Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln>

440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *
ATG CTA AAA CTG CAG AAT CTG GTG ATC CCC TGG GCT CCA GAG AAC CTA
Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu>

490     500     510     520
      *      *      *      *      *
ACA CTT CAC AAA CTG AGT GAA TCC CAG CTA GAA CTG AAC TGG AAC AAC
Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn>

530     540     550     560     570
      *      *      *      *      *
AGA TTC TTG AAC CAC TGT TTG GAG CAC TTG GTG CAG TAC CGG ACT GAC
Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp>

```

图 21A

```

      580      590      600      610      620
      *      *      *      *      *
TGG GAC CAC AGC TGG ACT GAA CAA TCA GTG GAT TAT AGA CAT AAG TTC
Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe>

      630      640      650      660      670
      *      *      *      *      *
TCC TTG CCT AGT GTG GAT GGG CAG AAA CGC TAC ACG TTT CGT GTT CGG
Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg>

      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *
AGC CGC TTT AAC CCA CTC TGT GGA AGT GCT CAG CAT TGG AGT GAA TGG
Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp>

      730      740      750      760
      *      *      *      *      *
AGC CAC CCA ATC CAC TGG GGG AGC AAT ACT TCA AAA GAG AAC GCG TCG
Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Ala Ser>

770      780      790      800      810
      *      *      *      *      *
TCT GGG AAC ATG AAG GTC CTG CAG GAG CCC ACC TGC GTC TCC GAC TAC
Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr>

      820      830      840      850      860
      *      *      *      *      *
ATG AGC ATC TCT ACT TGC GAG TGG AAG ATG AAT GGT CCC ACC AAT TGC
Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys>

      870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *
AGC ACC GAG CTC CGC CTG TTG TAC CAG CTG GTT TTT CTG CTC TCC GAA
Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu Leu Ser Glu>

      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *
GCC CAC ACG TGT ATC CCT GAG AAC AAC GGA GGC GCG GGG TGC GTG TGC
Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly Cys Val Cys>

      970      980      990      1000
      *      *      *      *      *
CAC CTG CTC ATG GAT GAC GTG GTC AGT GCG GAT AAC TAT ACA CTG GAC
His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Asp>

1010      1020      1030      1040      1050
      *      *      *      *      *
CTG TGG GCT GGG CAG CAG CTG CTG TGG AAG GGC TCC TTC AAG CCC AGC
Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe Lys Pro Ser>

      1060      1070      1080      1090      1100
      *      *      *      *      *
GAG CAT GTG AAA CCC AGG GCC CCA GGA AAC CTG ACA GTT CAC ACC AAT
Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val His Thr Asn>

      1110      1120      1130      1140      1150
      *      *      *      *      *
GTC TCC GAC ACT CTG CTG CTG ACC TGG AGC AAC CCG TAT CCC CCT GAC
Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr Pro Pro Asp>

      1160      1170      1180      1190      1200
      *      *      *      *      *

```

图 21B

```

AAT TAC CTG TAT AAT CAT CTC ACC TAT GCA GTC AAC ATT TGG AGT GAA
Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser Glu>

      1210      1220      1230      1240
      *      *      *      *      *
AAC GAC CCG GCA GAT TTC AGA ATC TAT AAC GTG ACC TAC CTA GAA CCC
Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu Glu Pro>

1250      1260      1270      1280      1290
*      *      *      *      *
TCC CTC CGC ATC GCA GCC AGC ACC CTG AAG TCT GGG ATT TCC TAC AGG
Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile Ser Tyr Arg>

      1300      1310      1320      1330      1340
      *      *      *      *      *
GCA CGG GTG AGG GCC TGG GCT CAG TGC TAT AAC ACC ACC TGG AGT GAG
Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr Asn Thr Thr Trp Ser Glu>

      1350      1360      1370      1380      1390
      *      *      *      *      *
TGG AGC CCC AGC ACC AAG TGG CAC AAC TCC TAC AGG GAG CCC TTC GAG
Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr Arg Glu Pro Phe Glu>

      1400      1410      1420      1430      1440
      *      *      *      *      *
CAG TCC GGA GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA
Gln Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu>

      1450      1460      1470      1480
      *      *      *      *      *
CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp>

1490      1500      1510      1520      1530
*      *      *      *      *
ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp>

      1540      1550      1560      1570      1580
      *      *      *      *      *
GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly>

      1590      1600      1610      1620      1630
      *      *      *      *      *
GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn>

      1640      1650      1660      1670      1680
      *      *      *      *      *
AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp>

      1690      1700      1710      1720
      *      *      *      *      *
CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro>

1730      1740      1750      1760      1770
*      *      *      *      *
GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu>

```

图 21C

```

1780      1790      1800      1810      1820
*      *      *      *      *
CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn>

1830      1840      1850      1860      1870
*      *      *      *      *
CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile>

1880      1890      1900      1910      1920
*      *      *      *      *
GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr>

1930      1940      1950      1960
*      *      *      *
ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys>

1970      1980      1990      2000      2010
*      *      *      *      *
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys>

2020      2030      2040      2050      2060
*      *      *      *      *
TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu>

2070      2080
*      *      *      *      *
TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

```

图 21D

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *      *      *      *      *
ATG GTG AAG CCA TCA TTA CCA TTC ACA TCC CTC TTA TTC CTG CAG CTG
Met Val Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu>

50      60      70      80      90
      *      *      *      *      *      *      *      *
CCC CTG CTG GGA GTG GGG CTG AAC ACG ACA ATT CTG ACG CCC AAT GGG
Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly>

100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAT GAA GAC ACC ACA GCT GAT TTC TTC CTG ACC ACT ATG CCC ACT GAC
Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp>

150     160     170     180     190
      *      *      *      *      *      *      *      *
TCC CTC AGT GTT TCC ACT CTG CCC CTC CCA GAG GTT CAG TGT TTT GTG
Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val>

200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *      *      *
TTC AAT GTC GAG TAC ATG AAT TGC ACT TGG AAC AGC AGC TCT GAG CCC
Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro>

250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *      *
CAG CCT ACC AAC CTC ACT CTG CAT TAT TGG TAC AAG AAC TCG GAT AAT
Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn>

290     300     310     320     330
      *      *      *      *      *      *      *      *
GAT AAA GTC CAG AAG TGC AGC CAC TAT CTA TTC TCT GAA GAA ATC ACT
Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr>

340     350     360     370     380
      *      *      *      *      *      *      *      *
TCT GGC TGT CAG TTG CAA AAA AAG GAG ATC CAC CTC TAC CAA ACA TTT
Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe>

390     400     410     420     430
      *      *      *      *      *      *      *      *
GTT GTT CAG CTC CAG GAC CCA CGG GAA CCC AGG AGA CAG GCC ACA CAG
Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln>

440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *      *      *
ATG CTA AAA CTG CAG AAT CTG GTG ATC CCC TGG GCT CCA GAG AAC CTA
Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu>

490     500     510     520
      *      *      *      *      *      *      *      *
ACA CTT CAC AAA CTG AGT GAA TCC CAG CTA GAA CTG AAC TGG AAC AAC
Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn>

530     540     550     560     570
      *      *      *      *      *      *      *      *
AGA TTC TTG AAC CAC TGT TTG GAG CAC TTG GTG CAG TAC CGG ACT GAC
Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp>

```

图 22A

```

      580      590      600      610      620
      *      *      *      *      *
TGG GAC CAC AGC TGG ACT GAA CAA TCA GTG GAT TAT AGA CAT AAG TTC
Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe>

      630      640      650      660      670
      *      *      *      *      *
TCC TTG CCT AGT GTG GAT GGG CAG AAA CGC TAC ACG TTT CGT GTT CGG
Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg>

      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *
AGC CGC TTT AAC CCA CTC TGT GGA AGT GCT CAG CAT TGG AGT GAA TGG
Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp>

      730      740      750      760
      *      *      *      *      *
AGC CAC CCA ATC CAC TGG GGG AGC AAT ACT TCA AAA GAG AAC GGG AAC
Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Gly Asn>

770      780      790      800      810
      *      *      *      *      *
ATG AAG GTC CTG CAG GAG CCC ACC TGC GTC TCC GAC TAC ATG AGC ATC
Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile>

      820      830      840      850      860
      *      *      *      *      *
TCT ACT TGC GAG TGG AAG ATG AAT GGT CCC ACC AAT TGC AGC ACC GAG
Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu>

      870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *
CTC CGC CTG TTG TAC CAG CTG GTT TTT CTG CTC TCC GAA GCC CAC ACG
Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr>

      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *
TGT ATC CCT GAG AAC AAC GGA GGC GCG GGG TGC GTG TGC CAC CTG CTC
Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu>

      970      980      990      1000
      *      *      *      *
ATG GAT GAC GTG GTC AGT GCG GAT AAC TAT ACA CTG GAC CTG TGG GCT
Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala>

1010      1020      1030      1040      1050
      *      *      *      *      *
GGG CAG CAG CTG CTG TGG AAG GGC TCC TTC AAG CCC AGC GAG CAT GTG
Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val>

      1060      1070      1080      1090      1100
      *      *      *      *      *
AAA CCC AGG GCC CCA GGA AAC CTG ACA GTT CAC ACC AAT GTC TCC GAC
Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp>

      1110      1120      1130      1140      1150
      *      *      *      *      *
ACT CTG CTG CTG ACC TGG AGC AAC CCG TAT CCC CCT GAC AAT TAC CTG
Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu>

      1160      1170      1180      1190      1200
      *      *      *      *      *

```

图 22B

```

TAT AAT CAT CTC ACC TAT GCA GTC AAC ATT TGG AGT GAA AAC GAC CCG
Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro>

      1210      1220      1230      1240
      *      *      *      *      *      *      *
GCA GAT TTC AGA ATC TAT AAC GTG ACC TAC CTA GAA CCC TCC CTC CGC
Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg>

1250      1260      1270      1280      1290
*      *      *      *      *      *      *      *
ATC GCA GCC AGC ACC CTG AAG TCT GGG ATT TCC TAC AGG GCA CGG GTG
Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val>

      1300      1310      1320      1330      1340
      *      *      *      *      *      *      *
AGG GCC TGG GCT CAG AGC TAT AAC ACC ACC TGG AGT GAG TGG AGC CCC
Arg Ala Trp Ala Gln Ser Tyr Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro>

      1350      1360      1370      1380      1390
      *      *      *      *      *      *      *
AGC ACC AAG TGG CAC AAC TCC TAC AGG GAG CCC TTC GAG CAG TCC GGA
Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln Ser Gly>

      1400      1410      1420      1430      1440
      *      *      *      *      *      *      *
GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly>

      1450      1460      1470      1480
      *      *      *      *      *      *      *
GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met>

1490      1500      1510      1520      1530
*      *      *      *      *      *      *
ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His>

      1540      1550      1560      1570      1580
      *      *      *      *      *      *      *
GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val>

      1590      1600      1610      1620      1630
      *      *      *      *      *      *      *
CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr>

      1640      1650      1660      1670      1680
      *      *      *      *      *      *      *
CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly>

      1690      1700      1710      1720
      *      *      *      *      *      *      *
AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile>

1730      1740      1750      1760      1770
*      *      *      *      *      *      *
GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val>

```

图 22C

```

1780      1790      1800      1810      1820
*      *      *      *      *
TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser>

1830      1840      1850      1860      1870
*      *      *      *      *
CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu>

1880      1890      1900      1910      1920
*      *      *      *      *
TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro>

1930      1940      1950      1960
*      *      *      *
GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val>

1970      1980      1990      2000      2010
*      *      *      *      *
GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met>

2020      2030      2040      2050      2060
*      *      *      *      *
CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser>

2070
*      *      *
CCG GGT AAA TGA
Pro Gly Lys ***>

```

图 22D

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *
ATG GTG AAG CCA TCA TTA CCA TTC ACA TCC CTC TTA TTC CTG CAG CTG
Met Val Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu>

50      60      70      80      90
      *      *      *      *      *
CCC CTG CTG GGA GTG GGG CTG AAC ACG ACA ATT CTG ACG CCC AAT GGG
Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly>

100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *
AAT GAA GAC ACC ACA GCT GAT TTC TTC CTG ACC ACT ATG CCC ACT GAC
Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp>

150     160     170     180     190
      *      *      *      *      *
TCC CTC AGT GTT TCC ACT CTG CCC CTC CCA GAG GTT CAG TGT TTT GTG
Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val>

200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *
TTC AAT GTC GAG TAC ATG AAT TGC ACT TGG AAC AGC AGC TCT GAG CCC
Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro>

250     260     270     280
      *      *      *      *      *
CAG CCT ACC AAC CTC ACT CTG CAT TAT TGG TAC AAG AAC TCG GAT AAT
Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn>

290     300     310     320     330
      *      *      *      *      *
GAT AAA GTC CAG AAG TGC AGC CAC TAT CTA TTC TCT GAA GAA ATC ACT
Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr>

340     350     360     370     380
      *      *      *      *      *
TCT GGC TGT CAG TTG CAA AAA AAG GAG ATC CAC CTC TAC CAA ACA TTT
Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe>

390     400     410     420     430
      *      *      *      *      *
GTT GTT CAG CTC CAG GAC CCA CGG GAA CCC AGG AGA CAG GCC ACA CAG
Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln>

440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *
ATG CTA AAA CTG CAG AAT CTG GTG ATC CCC TGG GCT CCA GAG AAC CTA
Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu>

490     500     510     520
      *      *      *      *
ACA CTT CAC AAA CTG AGT GAA TCC CAG CTA GAA CTG AAC TGG AAC AAC
Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn>

530     540     550     560     570
      *      *      *      *      *
AGA TTC TTG AAC CAC TGT TTG GAG CAC TTG GTG CAG TAC CGG ACT GAC
Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp>

```

图 23A

```

      580          590          600          610          620
      *          *          *          *          *
TGG GAC CAC AGC TGG ACT GAA CAA TCA GTG GAT TAT AGA CAT AAG TTC
Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe>

      630          640          650          660          670
      *          *          *          *          *
TCC TTG CCT AGT GTG GAT GGG CAG AAA CGC TAC ACG TTT CGT GTT CCG
Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg>

      680          690          700          710          720
      *          *          *          *          *
AGC CGC TTT AAC CCA CTC TGT GGA AGT GCT CAG CAT TGG AGT GAA TGG
Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp>

      730          740          750          760
      *          *          *          *          *
AGC CAC CCA ATC CAC TGG GGG AGC AAT ACT TCA AAA GAG AAC GCG TCG
Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Ala Ser>

770          780          790          800          810
      *          *          *          *          *
TCT GGG AAC ATG AAG GTC CTG CAG GAG CCC ACC TGC GTC TCC GAC TAC
Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr>

      820          830          840          850          860
      *          *          *          *          *
ATG AGC ATC TCT ACT TGC GAG TGG AAG ATG AAT GGT CCC ACC AAT TGC
Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys>

      870          880          890          900          910
      *          *          *          *          *
AGC ACC GAG CTC CGC CTG TTG TAC CAG CTG GTT TTT CTG CTC TCC GAA
Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu Leu Ser Glu>

      920          930          940          950          960
      *          *          *          *          *
GCC CAC ACG TGT ATC CCT GAG AAC AAC GGA GGC GCG GGG TGC GTG TGC
Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly Cys Val Cys>

      970          980          990          1000
      *          *          *          *          *
CAC CTG CTC ATG GAT GAC GTG GTC AGT GCG GAT AAC TAT ACA CTG GAC
His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Asp>

1010          1020          1030          1040          1050
      *          *          *          *          *
CTG TGG GCT GGG CAG CAG CTG CTG TGG AAG GGC TCC TTC AAG CCC AGC
Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe Lys Pro Ser>

      1060          1070          1080          1090          1100
      *          *          *          *          *
GAG CAT GTG AAA CCC AGG GCC CCA GGA AAC CTG ACA GTT CAC ACC AAT
Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val His Thr Asn>

      1110          1120          1130          1140          1150
      *          *          *          *          *
GTC TCC GAC ACT CTG CTG CTG ACC TGG AGC AAC CCG TAT CCC CCT GAC
Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr Pro Pro Asp>

      1160          1170          1180          1190          1200
      *          *          *          *          *

```

图 23B

```

AAT TAC CTG TAT AAT CAT CTC ACC TAT GCA GTC AAC ATT TGG AGT GAA
Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser Glu>

      1210      1220      1230      1240
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAC GAC CCG GCA GAT TTC AGA ATC TAT AAC GTG ACC TAC CTA GAA CCC
Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu Glu Pro>

1250      1260      1270      1280      1290
      *      *      *      *      *      *      *      *
TCC CTC CGC ATC GCA GCC AGC ACC CTG AAG TCT GGG ATT TCC TAC AGG
Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile Ser Tyr Arg>

      1300      1310      1320      1330      1340
      *      *      *      *      *      *      *      *
GCA CGG GTG AGG GCC TGG GCT CAG AGC TAT AAC ACC ACC TGG AGT GAG
Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Ser Tyr Asn Thr Thr Trp Ser Glu>

      1350      1360      1370      1380      1390
      *      *      *      *      *      *      *      *
TGG AGC CCC AGC ACC AAG TGG CAC AAC TCC TAC AGG GAG CCC TTC GAG
Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr Arg Glu Pro Phe Glu>

      1400      1410      1420      1430      1440
      *      *      *      *      *      *      *      *
CAG TCC GGA GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA
Gln Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu>

      1450      1460      1470      1480
      *      *      *      *      *      *      *      *
CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp>

1490      1500      1510      1520      1530
      *      *      *      *      *      *      *      *
ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp>

      1540      1550      1560      1570      1580
      *      *      *      *      *      *      *      *
GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly>

      1590      1600      1610      1620      1630
      *      *      *      *      *      *      *      *
GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn>

      1640      1650      1660      1670      1680
      *      *      *      *      *      *      *      *
AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp>

      1690      1700      1710      1720
      *      *      *      *      *      *      *      *
CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro>

1730      1740      1750      1760      1770
      *      *      *      *      *      *      *      *
GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu>

```

图 23C

```

1780      1790      1800      1810      1820
*      *      *      *      *
CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn>

1830      1840      1850      1860      1870
*      *      *      *      *
CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile>

1880      1890      1900      1910      1920
*      *      *      *      *
GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr>

1930      1940      1950      1960
*      *      *      *
ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys>

1970      1980      1990      2000      2010
*      *      *      *      *
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys>

2020      2030      2040      2050      2060
*      *      *      *      *
TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu>

2070      2080
*      *      *      *
TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

```

图 23D

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *
ATG GTG GCC GTC GGC TGC GCG CTG CTG GCT GCC CTG CTG GCC GCG CCG
Met Val Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro>

50      60      70      80      90
      *      *      *      *      *
GGA GCG GCG CTG GCC CCA AGG CGC TGC CCT GCG CAG GAG GTG GCA AGA
Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg>

100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *
GGC GTG CTG ACC AGT CTG CCA GGA GAC AGC GTG ACT CTG ACC TGC CCG
Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro>

150     160     170     180     190
      *      *      *      *      *
GGG GTA GAG CCG GAA GAC AAT GCC ACT GTT CAC TGG GTG CTC AGG AAG
Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys>

200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *
CCG GCT GCA GGC TCC CAC CCC AGC AGA TGG GCT GGC ATG GGA AGG AGG
Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg>

250     260     270     280
      *      *      *      *
CTG CTG CTG AGG TCG GTG CAG CTC CAC GAC TCT GGA AAC TAT TCA TGC
Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys>

290     300     310     320     330
      *      *      *      *      *
TAC CGG GCC GGC CGC CCA GCT GGG ACT GTG CAC TTG CTG GTG GAT GTT
Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val>

340     350     360     370     380
      *      *      *      *      *
CCC CCC GAG GAG CCC CAG CTC TCC TGC TTC CCG AAG AGC CCC CTC AGC
Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser>

390     400     410     420     430
      *      *      *      *      *
AAT GTT GTT TGT GAG TGG GGT CCT CGG AGC ACC CCA TCC CTG ACG ACA
Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr>

440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *
AAG GCT GTG CTC TTG GTG AGG AAG TTT CAG AAC AGT CCG GCC GAA GAC
Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp>

490     500     510     520
      *      *      *      *
TTC CAG GAG CCG TGC CAG TAT TCC CAG GAG TCC CAG AAG TTC TCC TGC
Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys>

530     540     550     560     570
      *      *      *      *      *
CAG TTA GCA GTC CCG GAG GGA GAC AGC TCT TTC TAC ATA GTG TCC ATG
Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met>

```

图 24A

```

      580      590      600      610      620
      *      *      *      *      *
TGC GTC GCC AGT AGT GTC GGG AGC AAG TTC AGC AAA ACT CAA ACC TTT
Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe>

      630      640      650      660      670
      *      *      *      *      *
CAG GGT TGT GGA ATC TTG CAG CCT GAT CCG CCT GCC AAC ATC ACA GTC
Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val>

      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *
ACT GCC GTG GCC AGA AAC CCC CGC TGG CTC AGT GTC ACC TGG CAA GAC
Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp>

      730      740      750      760
      *      *      *      *
CCC CAC TCC TGG AAC TCA TCT TTC TAC AGA CTA CGG TTT GAG CTC AGA
Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg>

770      780      790      800      810
*      *      *      *      *
TAT CGG GCT GAA CGG TCA AAG ACA TTC ACA ACA TGG ATG GTC AAG GAC
Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp>

      820      830      840      850      860
      *      *      *      *      *
CTC CAG CAT CAC TGT GTC ATC CAC GAC GCC TGG AGC GGC CTG AGG CAC
Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His>

      870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *
GTG GTG CAG CTT CGT GCC CAG GAG GAG TTC GGG CAA GGC GAG TGG AGC
Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser>

      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *
GAG TGG AGC CCG GAG GCC ATG GGC ACG CCT TGG ACA GAA TCC AGG AGT
Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser>

      970      980      990      1000
      *      *      *      *
CCT CCA GCT GAG AAC GAG GTG TCC ACC CCC ATG ACC GGT GGC GCG CCT
Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Thr Gly Gly Ala Pro>

1010      1020      1030      1040      1050
*      *      *      *      *
TCA GGT GCT CAG CTG GAA CTT CTA GAC CCA TGT GGT TAT ATC AGT CCT
Ser Gly Ala Gln Leu Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser Pro>

      1060      1070      1080      1090      1100
      *      *      *      *      *
GAA TCT CCA GTT GTA CAA CTT CAT TCT AAT TTC ACT GCA GTT TGT GTG
Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys Val>

      1110      1120      1130      1140      1150
      *      *      *      *      *
CTA AAG GAA AAA TGT ATG GAT TAT TTT CAT GTA AAT GCT AAT TAC ATT
Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr Ile>

      1160      1170      1180      1190      1200
      *      *      *      *      *

```

图 24B

```

GTC TGG AAA ACA AAC CAT TTT ACT ATT CCT AAG GAG CAA TAT ACT ATC
Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr Ile>

      1210      1220      1230      1240
      *      *      *      *      *      *
ATA AAC AGA ACA GCA TCC AGT GTC ACC TTT ACA GAT ATA GCT TCA TTA
Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser Leu>

1250      1260      1270      1280      1290
      *      *      *      *      *      *
AAT ATT CAG CTC ACT TGC AAC ATT CTT ACA TTC GGA CAG CTT GAA CAG
Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln>

      1300      1310      1320      1330      1340
      *      *      *      *      *      *
AAT GTT TAT GGA ATC ACA ATA ATT TCA GGC TTG CCT CCA GAA AAA CCT
Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys Pro>

      1350      1360      1370      1380      1390
      *      *      *      *      *      *
AAA AAT TTG AGT TGC ATT GTG AAC GAG GGG AAG AAA ATG AGG TGT GAG
Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys Glu>

      1400      1410      1420      1430      1440
      *      *      *      *      *      *
TGG GAT GGT GGA AGG GAA ACA CAC TTG GAG ACA AAC TTC ACT TTA AAA
Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu Lys>

      1450      1460      1470      1480
      *      *      *      *      *      *
TCT GAA TGG GCA ACA CAC AAG TTT GCT GAT TGC AAA GCA AAA CGT GAC
Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg Asp>

1490      1500      1510      1520      1530
      *      *      *      *      *      *
ACC CCC ACC TCA TGC ACT GTT GAT TAT TCT ACT GTG TAT TTT GTC AAC
Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val Asn>

      1540      1550      1560      1570      1580
      *      *      *      *      *      *
ATT GAA GTC TGG GTA GAA GCA GAG AAT GCC CTT GGG AAG GTT ACA TCA
Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr Ser>

      1590      1600      1610      1620      1630
      *      *      *      *      *      *
GAT CAT ATC AAT TTT GAT CCT GTA TAT AAA GTG AAG CCC AAT CCG CCA
Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro Pro>

      1640      1650      1660      1670      1680
      *      *      *      *      *      *
CAT AAT TTA TCA GTG ATC AAC TCA GAG GAA CTG TCT AGT ATC TTA AAA
His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu Lys>

      1690      1700      1710      1720
      *      *      *      *      *      *
TTG ACA TGG ACC AAC CCA AGT ATT AAG AGT GTT ATA ATA CTA AAA TAT
Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys Tyr>

1730      1740      1750      1760      1770
      *      *      *      *      *      *
AAC ATT CAA TAT AGG ACC AAA GAT GCC TCA ACT TGG AGC CAG ATT CCT
Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile Pro>

```

图 24C

```

1780      1790      1800      1810      1820
*      *      *      *      *
CCT GAA GAC ACA GCA TCC ACC CGA TCT TCA TTC ACT GTC CAA GAC CTT
Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp Leu>

1830      1840      1850      1860      1870
*      *      *      *      *
AAA CCT TTT ACA GAA TAT GTG TTT AGG ATT CGC TGT ATG AAG GAA GAT
Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu Asp>

1880      1890      1900      1910      1920
*      *      *      *      *
GGT AAG GGA TAC TGG AGT GAC TGG AGT GAA GAA GCA AGT GGG ATC ACC
Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile Thr>

1930      1940      1950      1960
*      *      *      *
TAT GAA GAT AGA CCA TCT AAA GCA CCA AGT TTC TGG TAT AAA ATA GAT
Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile Asp>

1970      1980      1990      2000      2010
*      *      *      *      *
CCA TCC CAT ACT CAA GGC TAC AGA ACT GTA CAA CTC GTG TGG AAG ACA
Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys Thr>

2020      2030      2040      2050      2060
*      *      *      *      *
TTG CCT CCT TTT GAA GCC AAT GGA AAA ATC TTG GAT TAT GAA GTG ACT
Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val Thr>

2070      2080      2090      2100      2110
*      *      *      *      *
CTC ACA AGA TGG AAA TCA CAT TTA CAA AAT TAC ACA GTT AAT GCC ACA
Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala Thr>

2120      2130      2140      2150      2160
*      *      *      *      *
AAA CTG ACA GTA AAT CTC ACA AAT GAT CGC TAT CTA GCA ACC CTA ACA
Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu Thr>

2170      2180      2190      2200
*      *      *      *
GTA AGA AAT CTT GTT GGC AAA TCA GAT GCA GCT GTT TTA ACT ATC CCT
Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile Pro>

2210      2220      2230      2240      2250
*      *      *      *      *
GCC TGT GAC TTT CAA GCT ACT CAC CCT GTA ATG GAT CTT AAA GCA TTC
Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala Phe>

2260      2270      2280      2290      2300
*      *      *      *      *
CCC AAA GAT AAC ATG CTT TGG GTG GAA TGG ACT ACT CCA AGG GAA TCT
Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu Ser>

2310      2320      2330      2340      2350
*      *      *      *      *
GTA AAG AAA TAT ATA CTT GAG TGG TGT GTG TTA TCA GAT AAA GCA CCC
Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala Pro>

2360      2370      2380      2390      2400

```

图 24D

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
TGT ATC ACA GAC TGG CAA CAA GAA GAT GGT ACC GTG CAT CGC ACC TAT
Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr Tyr>

      2410      2420      2430      2440
      *      *      *      *      *      *      *      *
TTA AGA GGG AAC TTA GCA GAG AGC AAA TGC TAT TTG ATA ACA GTT ACT
Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val Thr>

2450      2460      2470      2480      2490
      *      *      *      *      *      *      *      *
CCA GTA TAT GCT GAT GGA CCA GGA AGC CCT GAA TCC ATA AAG GCA TAC
Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala Tyr>

      2500      2510      2520      2530      2540
      *      *      *      *      *      *      *      *
CTT AAA CAA GCT CCA CCT TCC AAA GGA CCT ACT GTT CGG ACA AAA AAA
Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys Lys>

      2550      2560      2570      2580      2590
      *      *      *      *      *      *      *      *
GTA GGG AAA AAC GAA GCT GTC TTA GAG TGG GAC CAA CTT CCT GTT GAT
Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val Asp>

      2600      2610      2620      2630      2640
      *      *      *      *      *      *      *      *
GTT CAG AAT GGA TTT ATC AGA AAT TAT ACT ATA TTT TAT AGA ACC ATC
Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr Ile>

      2650      2660      2670      2680
      *      *      *      *      *      *      *
ATT GGA AAT GAA ACT GCT GTG AAT GTG GAT TCT TCC CAC ACA GAA TAT
Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu Tyr>

2690      2700      2710      2720      2730
      *      *      *      *      *      *      *      *
ACA TTG TCC TCT TTG ACT AGT GAC ACA TTG TAC ATG GTA CGA ATG GCA
Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met Ala>

      2740      2750      2760      2770      2780
      *      *      *      *      *      *      *      *
GCA TAC ACA GAT GAA GGT GGG AAG GAT GGT CCA GAA TTC ACT TTT ACT
Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe Thr>

      2790      2800      2810      2820      2830
      *      *      *      *      *      *      *      *
ACC CCA AAG TTT GCT CAA GGA GAA ATT GAA TCC GGG GGC GAC AAA ACT
Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ser Gly Gly Asp Lys Thr>

      2840      2850      2860      2870      2880
      *      *      *      *      *      *      *      *
CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser>

      2890      2900      2910      2920
      *      *      *      *      *      *      *
GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg>

2930      2940      2950      2960      2970
      *      *      *      *      *      *      *      *
ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT

```

图 24E

```

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro>
2980      2990      3000      3010      3020
*        *        *        *        *
GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala>
3030      3040      3050      3060      3070
*        *        *        *        *
AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val>
3080      3090      3100      3110      3120
*        *        *        *        *
AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr>
3130      3140      3150      3160
*        *        *        *
AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr>
3170      3180      3190      3200      3210
*        *        *        *        *
ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu>
3220      3230      3240      3250      3260
*        *        *        *        *
CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys>
3270      3280      3290      3300      3310
*        *        *        *        *
CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser>
3320      3330      3340      3350      3360
*        *        *        *        *
AAT CGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp>
3370      3380      3390      3400
*        *        *        *
TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser>
3410      3420      3430      3440      3450
*        *        *        *        *
AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala>
3460      3470      3480      3490      3500
*        *        *        *        *
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys>
*
TGA
***>

```

图 24F

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *
ATG GTG GCC GTC GGC TGC GCG CTG CTG GCT GCC CTG CTG GCC GCG CCG
Met Val Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro>

50      60      70      80      90
*      *      *      *      *
GGA GCG GCG CTG GCC CCA AGG CGC TGC CCT GCG CAG GAG GTG GCA AGA
Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg>

100     110     120     130     140
*      *      *      *      *
GGC GTG CTG ACC AGT CTG CCA GGA GAC AGC GTG ACT CTG ACC TGC CCG
Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro>

150     160     170     180     190
*      *      *      *      *
GGG GTA GAG CCG GAA GAC AAT GCC ACT GTT CAC TGG GTG CTC AGG AAG
Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys>

200     210     220     230     240
*      *      *      *      *
CCG GCT GCA GGC TCC CAC CCC AGC AGA TGG GCT GGC ATG GGA AGG AGG
Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg>

250     260     270     280
*      *      *      *      *
CTG CTG CTG AGG TCG GTG CAG CTC CAC GAC TCT GGA AAC TAT TCA TGC
Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys>

290     300     310     320     330
*      *      *      *      *
TAC CGG GCC GGC CGC CCA GCT GGG ACT GTG CAC TTG CTG GTG GAT GTT
Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val>

340     350     360     370     380
*      *      *      *      *
CCC CCC GAG GAG CCC CAG CTC TCC TGC TTC CGG AAG AGC CCC CTC AGC
Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser>

390     400     410     420     430
*      *      *      *      *
AAT GTT GTT TGT GAG TGG GGT CCT CGG AGC ACC CCA TCC CTG ACG ACA
Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr>

440     450     460     470     480
*      *      *      *      *
AAG GCT GTG CTC TTG GTG AGG AAG TTT CAG AAC AGT CCG GCC GAA GAC
Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp>

490     500     510     520
*      *      *      *      *
TTC CAG GAG CCG TGC CAG TAT TCC CAG GAG TCC CAG AAG TTC TCC TGC
Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys>

530     540     550     560     570
*      *      *      *      *
CAG TTA GCA GTC CCG GAG GGA GAC AGC TCT TTC TAC ATA GTG TCC ATG
Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met>

```

图 25A

```

      580      590      600      610      620
      *      *      *      *      *
TGC GTC GCC AGT AGT GTC GGG AGC AAG TTC AGC AAA ACT CAA ACC TTT
Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe>

      630      640      650      660      670
      *      *      *      *      *
CAG GGT TGT GGA ATC TTG CAG CCT GAT CCG CCT GCC AAC ATC ACA GTC
Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val>

      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *
ACT GCC GTG GCC AGA AAC CCC CGC TGG CTC AGT GTC ACC TGG CAA GAC
Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp>

      730      740      750      760
      *      *      *      *      *
CCC CAC TCC TGG AAC TCA TCT TTC TAC AGA CTA CGG TTT GAG CTC AGA
Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg>

770      780      790      800      810
      *      *      *      *      *
TAT CGG GCT GAA CGG TCA AAG ACA TTC ACA ACA TGG ATG GTC AAG GAC
Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp>

      820      830      840      850      860
      *      *      *      *      *
CTC CAG CAT CAC TGT GTC ATC CAC GAC GCC TGG AGC GGC CTG AGG CAC
Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His>

      870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *
GTG GTG CAG CTT CGT GCC CAG GAG GAG TTC GGG CAA GGC GAG TGG AGC
Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser>

      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *
GAG TGG AGC CCG GAG GCC ATG GGC ACG CCT TGG ACA GAA TCG CGA TCG
Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser>

      970      980      990      1000
      *      *      *      *      *
CCT CCA GCT GAG AAC GAG GTG TCC ACC CCC ATG GAA CTT CTA GAC CCA
Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Glu Leu Leu Asp Pro>

1010      1020      1030      1040      1050
      *      *      *      *      *
TGT GGT TAT ATC AGT CCT GAA TCT CCA GTT GTA CAA CTT CAT TCT AAT
Cys Gly Tyr Ile Ser Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn>

      1060      1070      1080      1090      1100
      *      *      *      *      *
TTC ACT GCA GTT TGT GTG CTA AAG GAA AAA TGT ATG GAT TAT TTT CAT
Phe Thr Ala Val Cys Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His>

      1110      1120      1130      1140      1150
      *      *      *      *      *
GTA AAT GCT AAT TAC ATT GTC TGG AAA ACA AAC CAT TTT ACT ATT CCT
Val Asn Ala Asn Tyr Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro>

      1160      1170      1180      1190      1200
      *      *      *      *      *

```

图 25B

```

AAG GAG CAA TAT ACT ATC ATA AAC AGA ACA GCA TCC AGT GTC ACC TTT
Lys Glu Gln Tyr Thr Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe>

      1210      1220      1230      1240
      *      *      *      *      *
ACA GAT ATA GCT TCA TTA AAT ATT CAG CTC ACT TGC AAC ATT CTT ACA
Thr Asp Ile Ala Ser Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr>

1250      1260      1270      1280      1290
*      *      *      *      *
TTC GGA CAG CTT GAA CAG AAT GTT TAT GGA ATC ACA ATA ATT TCA GGC
Phe Gly Gln Leu Glu Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly>

      1300      1310      1320      1330      1340
      *      *      *      *      *
TTG CCT CCA GAA AAA CCT AAA AAT TTG AGT TGC ATT GTG AAC GAG GGG
Leu Pro Pro Glu Lys Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly>

      1350      1360      1370      1380      1390
      *      *      *      *      *
AAG AAA ATG AGG TGT GAG TGG GAT GGT GGA AGG GAA ACA CAC TTG GAG
Lys Lys Met Arg Cys Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu>

      1400      1410      1420      1430      1440
      *      *      *      *      *
ACA AAC TTC ACT TTA AAA TCT GAA TGG GCA ACA CAC AAG TTT GCT GAT
Thr Asn Phe Thr Leu Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp>

      1450      1460      1470      1480
      *      *      *      *      *
TGC AAA GCA AAA CGT GAC ACC CCC ACC TCA TGC ACT GTT GAT TAT TCT
Cys Lys Ala Lys Arg Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser>

1490      1500      1510      1520      1530
*      *      *      *      *
ACT GTG TAT TTT GTC AAC ATT GAA GTC TGG GTA GAA GCA GAG AAT GCC
Thr Val Tyr Phe Val Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala>

      1540      1550      1560      1570      1580
      *      *      *      *      *
CTT GGG AAG GTT ACA TCA GAT CAT ATC AAT TTT GAT CCT GTA TAT AAA
Leu Gly Lys Val Thr Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys>

      1590      1600      1610      1620      1630
      *      *      *      *      *
GTG AAG CCC AAT CCG CCA CAT AAT TTA TCA GTG ATC AAC TCA GAG GAA
Val Lys Pro Asn Pro Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu>

      1640      1650      1660      1670      1680
      *      *      *      *      *
CTG TCT AGT ATC TTA AAA TTG ACA TGG ACC AAC CCA AGT ATT AAG AGT
Leu Ser Ser Ile Leu Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser>

      1690      1700      1710      1720
      *      *      *      *      *
GTT ATA ATA CTA AAA TAT AAC ATT CAA TAT AGG ACC AAA GAT GCC TCA
Val Ile Ile Leu Lys Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser>

1730      1740      1750      1760      1770
*      *      *      *      *
ACT TGG AGC CAG ATT CCT CCT GAA GAC ACA GCA TCC ACC CGA TCT TCA
Thr Trp Ser Gln Ile Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser>

```

图 25C

```

1780      1790      1800      1810      1820
*      *      *      *      *
TTC ACT GTC CAA GAC CTT AAA CCT TTT ACA GAA TAT GTG TTT AGG ATT
Phe Thr Val Gln Asp Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile>

      1830      1840      1850      1860      1870
*      *      *      *      *
CGC TGT ATG AAG GAA GAT GGT AAG GGA TAC TGG AGT GAC TGG AGT GAA
Arg Cys Met Lys Glu Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu>

      1880      1890      1900      1910      1920
*      *      *      *      *
GAA GCA AGT GGG ATC ACC TAT GAA GAT AGA CCA TCT AAA GCA CCA AGT
Glu Ala Ser Gly Ile Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser>

      1930      1940      1950      1960
*      *      *      *      *
TTC TGG TAT AAA ATA GAT CCA TCC CAT ACT CAA GGC TAC AGA ACT GTA
Phe Trp Tyr Lys Ile Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val>

1970      1980      1990      2000      2010
*      *      *      *      *
CAA CTC GTG TGG AAG ACA TTG CCT CCT TTT GAA GCC AAT GGA AAA ATC
Gln Leu Val Trp Lys Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile>

      2020      2030      2040      2050      2060
*      *      *      *      *
TTG GAT TAT GAA GTG ACT CTC ACA AGA TGG AAA TCA CAT TTA CAA AAT
Leu Asp Tyr Glu Val Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn>

      2070      2080      2090      2100      2110
*      *      *      *      *
TAC ACA GTT AAT GCC ACA AAA CTG ACA GTA AAT CTC ACA AAT GAT CGC
Tyr Thr Val Asn Ala Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg>

      2120      2130      2140      2150      2160
*      *      *      *      *
TAT CTA GCA ACC CTA ACA GTA AGA AAT CTT GTT GGC AAA TCA GAT GCA
Tyr Leu Ala Thr Leu Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala>

      2170      2180      2190      2200
*      *      *      *      *
GCT GTT TTA ACT ATC CCT GCC TGT GAC TTT CAA GCT ACT CAC CCT GTA
Ala Val Leu Thr Ile Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val>

2210      2220      2230      2240      2250
*      *      *      *      *
ATG GAT CTT AAA GCA TTC CCC AAA GAT AAC ATG CTT TGG GTG GAA TGG
Met Asp Leu Lys Ala Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp>

      2260      2270      2280      2290      2300
*      *      *      *      *
ACT ACT CCA AGG GAA TCT GTA AAG AAA TAT ATA CTT GAG TGG TGT GTG
Thr Thr Pro Arg Glu Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val>

      2310      2320      2330      2340      2350
*      *      *      *      *
TTA TCA GAT AAA GCA CCC TGT ATC ACA GAC TGG CAA CAA GAA GAT GGT
Leu Ser Asp Lys Ala Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly>

      2360      2370      2380      2390      2400

```

图 25D

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
ACC GTG CAT CGC ACC TAT TTA AGA GGG AAC TTA GCA GAG AGC AAA TGC
Thr Val His Arg Thr Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys>

      2410      2420      2430      2440
      *      *      *      *      *      *      *      *
TAT TTG ATA ACA GTT ACT CCA GTA TAT GCT GAT GGA CCA GGA AGC CCT
Tyr Leu Ile Thr Val Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro>

2450      2460      2470      2480      2490
      *      *      *      *      *      *      *      *
GAA TCC ATA AAG GCA TAC CTT AAA CAA GCT CCA CCT TCC AAA GGA CCT
Glu Ser Ile Lys Ala Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro>

      2500      2510      2520      2530      2540
      *      *      *      *      *      *      *      *
ACT GTT CGG ACA AAA AAA GTA GGG AAA AAC GAA GCT GTC TTA GAG TGG
Thr Val Arg Thr Lys Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp>

      2550      2560      2570      2580      2590
      *      *      *      *      *      *      *      *
GAC CAA CTT CCT GTT GAT GTT CAG AAT GGA TTT ATC AGA AAT TAT ACT
Asp Gln Leu Pro Val Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr>

      2600      2610      2620      2630      2640
      *      *      *      *      *      *      *      *
ATA TTT TAT AGA ACC ATC ATT GGA AAT GAA ACT GCT GTG AAT GTG GAT
Ile Phe Tyr Arg Thr Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp>

      2650      2660      2670      2680
      *      *      *      *      *      *      *      *
TCT TCC CAC ACA GAA TAT ACA TTG TCC TCT TTG ACT AGT GAC ACA TTG
Ser Ser His Thr Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu>

2690      2700      2710      2720      2730
      *      *      *      *      *      *      *      *
TAC ATG GTA CGA ATG GCA GCA TAC ACA GAT GAA GGT GGG AAG GAT GGT
Tyr Met Val Arg Met Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly>

      2740      2750      2760      2770      2780
      *      *      *      *      *      *      *      *
CCA GAA TTC ACT TTT ACT ACC CCA AAG TTT GCT CAA GGA GAA ATT GAA
Pro Glu Phe Thr Phe Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu>

      2790      2800      2810      2820      2830
      *      *      *      *      *      *      *      *
TCC GGG GGC GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA
Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu>

      2840      2850      2860      2870      2880
      *      *      *      *      *      *      *      *
CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp>

      2890      2900      2910      2920
      *      *      *      *      *      *      *      *
ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp>

2930      2940      2950      2960      2970
      *      *      *      *      *      *      *      *
GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC

```

图 25E

```

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly>
2980      2990      3000      3010      3020
*      *      *      *      *
GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn>
3030      3040      3050      3060      3070
*      *      *      *      *
AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp>
3080      3090      3100      3110      3120
*      *      *      *      *
CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro>
3130      3140      3150      3160
*      *      *      *      *
GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu>
3170      3180      3190      3200      3210
*      *      *      *      *
CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn>
3220      3230      3240      3250      3260
*      *      *      *      *
CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile>
3270      3280      3290      3300      3310
*      *      *      *      *
GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr>
3320      3330      3340      3350      3360
*      *      *      *      *
ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys>
3370      3380      3390      3400
*      *      *      *      *
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys>
3410      3420      3430      3440      3450
*      *      *      *      *
TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu>
3460      3470
*      *      *      *
TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

```

图 25F

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *
ATG GTG CTT CTG TGG TGT GTA GTG AGT CTC TAC TTT TAT GGA ATC CTG
Met Val Leu Leu Trp Cys Val Val Ser Leu Tyr Phe Tyr Gly Ile Leu>

50      60      70      80      90
      *      *      *      *      *
CAA AGT GAT GCC TCA GAA CGC TGC GAT GAC TGG GGA CTA GAC ACC ATG
Gln Ser Asp Ala Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met>

100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *
AGG CAA ATC CAA GTG TTT GAA GAT GAG CCA GCT CGC ATC AAG TGC CCA
Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro>

150      160      170      180      190
      *      *      *      *      *
CTC TTT GAA CAC TTC TTG AAA TTC AAC TAC AGC ACA GCC CAT TCA GCT
Leu Phe Glu His Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala>

200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *
GGC CTT ACT CTG ATC TGG TAT TGG ACT AGG CAG GAC CGG GAC CTT GAG
Gly Leu Thr Leu Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu>

250      260      270      280
      *      *      *      *
GAG CCA ATT AAC TTC CGC CTC CCC GAG AAC CGC ATT AGT AAG GAG AAA
Glu Pro Ile Asn Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys>

290      300      310      320      330
      *      *      *      *      *
GAT GTG CTG TGG TTC CGG CCC ACT CTC CTC AAT GAC ACT GGC AAC TAT
Asp Val Leu Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr>

340      350      360      370      380
      *      *      *      *      *
ACC TGC ATG TTA AGG AAC ACT ACA TAT TGC AGC AAA GTT GCA TTT CCC
Thr Cys Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro>

390      400      410      420      430
      *      *      *      *      *
TTG GAA GTT GTT CAA AAA GAC AGC TGT TTC AAT TCC CCC ATG AAA CTC
Leu Glu Val Val Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu>

440      450      460      470      480
      *      *      *      *      *
CCA GTG CAT AAA CTG TAT ATA GAA TAT GGC ATT CAG AGG ATC ACT TGT
Pro Val His Lys Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys>

490      500      510      520
      *      *      *      *
CCA AAT GTA GAT GGA TAT TTT CCT TCC AGT GTC AAA CCG ACT ATC ACT
Pro Asn Val Asp Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr>

530      540      550      560      570
      *      *      *      *      *
TGG TAT ATG GGC TGT TAT AAA ATA CAG AAT TTT AAT AAT GTA ATA CCC
Trp Tyr Met Gly Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro>

```

图 26A

```

      580      590      600      610      620
      *      *      *      *      *
GAA GGT ATG AAC TTG AGT TTC CTC ATT GCC TTA ATT TCA AAT AAT GGA
Glu Gly Met Asn Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly>

      630      640      650      660      670
      *      *      *      *      *
AAT TAC ACA TGT GTT GTT ACA TAT CCA GAA AAT GGA CGT ACG TTT CAT
Asn Tyr Thr Cys Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His>

      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *
CTC ACC AGG ACT CTG ACT GTA AAG GTA GTA GGC TCT CCA AAA AAT GCA
Leu Thr Arg Thr Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala>

      730      740      750      760
      *      *      *      *      *
GTG CCC CCT GTG ATC CAT TCA CCT AAT GAT CAT GTG GTC TAT GAG AAA
Val Pro Pro Val Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys>

770      780      790      800      810
*      *      *      *      *
GAA CCA GGA GAG GAG CTA CTC ATT CCC TGT ACG GTC TAT TTT AGT TTT
Glu Pro Gly Glu Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe>

      820      830      840      850      860
      *      *      *      *      *
CTG ATG GAT TCT CGC AAT GAG GTT TGG TGG ACC ATT GAT GGA AAA AAA
Leu Met Asp Ser Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys>

      870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *
CCT GAT GAC ATC ACT ATT GAT GTC ACC ATT AAC GAA AGT ATA AGT CAT
Pro Asp Asp Ile Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His>

      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *
AGT AGA ACA GAA GAT GAA ACA AGA ACT CAG ATT TTG AGC ATC AAG AAA
Ser Arg Thr Glu Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys>

      970      980      990      1000
      *      *      *      *      *
GTT ACC TCT GAG GAT CTC AAG CGC AGC TAT GTC TGT CAT GCT AGA AGT
Val Thr Ser Glu Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala Arg Ser>

1010      1020      1030      1040      1050
*      *      *      *      *
GCC AAA GGC GAA GTT GCC AAA GCA GCC AAG GTG AAG CAG AAA GTG CCA
Ala Lys Gly Glu Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Pro>

      1060      1070      1080      1090      1100
      *      *      *      *      *
GCT CCA AGA TAC ACA GTG TCC GGT GGC GCG CCT ATG CTG AGC GAG GCT
Ala Pro Arg Tyr Thr Val Ser Gly Gly Ala Pro Met Leu Ser Glu Ala>

      1110      1120      1130      1140      1150
      *      *      *      *      *
GAT AAA TGC AAG GAA CGT GAA GAA AAA ATA ATT TTA GTG TCA TCT GCA
Asp Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser Ala>

      1160      1170      1180      1190      1200
      *      *      *      *      *

```

图 26B

```

AAT GAA ATT GAT GTT CGT CCC TGT CCT CTT AAC CCA AAT GAA CAC AAA
Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu His Lys>

      1210      1220      1230      1240
      *      *      *      *      *      *      *      *
GGC ACT ATA ACT TGG TAT AAG GAT GAC AGC AAG ACA CCT GTA TCT ACA
Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Val Ser Thr>

1250      1260      1270      1280      1290
      *      *      *      *      *      *      *      *
GAA CAA GCC TCC AGG ATT CAT CAA CAC AAA GAG AAA CTT TGG TTT GTT
Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp Phe Val>

      1300      1310      1320      1330      1340
      *      *      *      *      *      *      *      *
CCT GCT AAG GTG GAG GAT TCA GGA CAT TAC TAT TGC GTG GTA AGA AAT
Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg Asn>

      1350      1360      1370      1380      1390
      *      *      *      *      *      *      *      *
TCA TCT TAC TGC CTC AGA ATT AAA ATA AGT GCA AAA TTT GTG GAG AAT
Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe Val Glu Asn>

      1400      1410      1420      1430      1440
      *      *      *      *      *      *      *      *
GAG CCT AAC TTA TGT TAT AAT GCA CAA GCC ATA TTT AAG CAG AAA CTA
Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln Lys Leu>

      1450      1460      1470      1480
      *      *      *      *      *      *      *      *
CCC GTT GCA GGA GAC GGA GGA CTT GTG TGC CCT TAT ATG GAG TTT TTT
Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe Phe>

1490      1500      1510      1520      1530
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAA AAT GAA AAT AAT GAG TTA CCT AAA TTA CAG TGG TAT AAG GAT TGC
Lys Asn Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr Lys Asp Cys>

      1540      1550      1560      1570      1580
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAA CCT CTA CTT CTT GAC AAT ATA CAC TTT AGT GGA GTC AAA GAT AGG
Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp Arg>

      1590      1600      1610      1620      1630
      *      *      *      *      *      *      *      *
CTC ATC GTG ATG AAT GTG GCT GAA AAG CAT AGA GGG AAC TAT ACT TGT
Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr Cys>

      1640      1650      1660      1670      1680
      *      *      *      *      *      *      *      *
CAT GCA TCC TAC ACA TAC TTG GGC AAG CAA TAT CCT ATT ACC CGG GTA
His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg Val>

      1690      1700      1710      1720
      *      *      *      *      *      *      *      *
ATA GAA TTT ATT ACT CTA GAG GAA AAC AAA CCC ACA AGG CCT GTG ATT
Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val Ile>

1730      1740      1750      1760      1770
      *      *      *      *      *      *      *      *
GTG AGC CCA GCT AAT GAG ACA ATG GAA GTA GAC TTG GGA TCC CAG ATA
Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln Ile>

```

图 26C

```

1780      1790      1800      1810      1820
*      *      *      *      *
CAA TTG ATC TGT AAT GTC ACC GGC CAG TTG AGT GAC ATT GCT TAC TGG
Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile Ala Tyr Trp>

      1830      1840      1850      1860      1870
*      *      *      *      *
AAG TGG AAT GGG TCA GTA ATT GAT GAA GAT GAC CCA GTG CTA GGG GAA
Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly Glu>

      1880      1890      1900      1910      1920
*      *      *      *      *
GAC TAT TAC AGT GTG GAA AAT CCT GCA AAC AAA AGA AGG AGT ACC CTC
Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser Thr Leu>

      1930      1940      1950      1960
*      *      *      *      *
ATC ACA GTG CTT AAT ATA TCG GAA ATT GAG AGT AGA TTT TAT AAA CAT
Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe Tyr Lys His>

1970      1980      1990      2000      2010
*      *      *      *      *
CCA TTT ACC TGT TTT GCC AAG AAT ACA CAT GGT ATA GAT GCA GCA TAT
Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp Ala Ala Tyr>

      2020      2030      2040      2050      2060
*      *      *      *      *
ATC CAG TTA ATA TAT CCA GTC ACT AAT TCC GGA GAC AAA ACT CAC ACA
Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Ser Gly Asp Lys Thr His Thr>

      2070      2080      2090      2100      2110
*      *      *      *      *
TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe>

      2120      2130      2140      2150      2160
*      *      *      *      *
CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro>

      2170      2180      2190      2200
*      *      *      *      *
GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val>

2210      2220      2230      2240      2250
*      *      *      *      *
AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr>

      2260      2270      2280      2290      2300
*      *      *      *      *
AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val>

      2310      2320      2330      2340      2350
*      *      *      *      *
CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys>

      2360      2370      2380      2390      2400

```

图 26D

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser>

      2410      2420      2430      2440
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro>

2450      2460      2470      2480      2490
      *      *      *      *      *      *      *      *
TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val>

      2500      2510      2520      2530      2540
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly>

      2550      2560      2570      2580      2590
      *      *      *      *      *      *      *      *
CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp>

      2600      2610      2620      2630      2640
      *      *      *      *      *      *      *      *
GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp>

      2650      2660      2670      2680
      *      *      *      *      *      *      *      *
CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His>

2690      2700      2710      2720      2730
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

```

图 26E

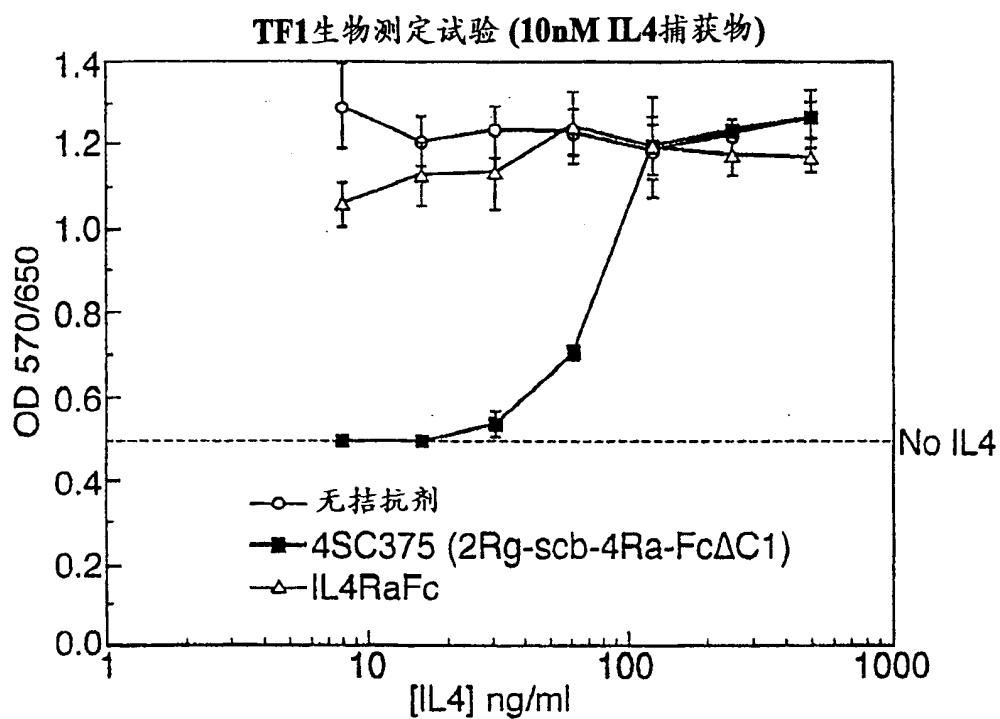


图 27

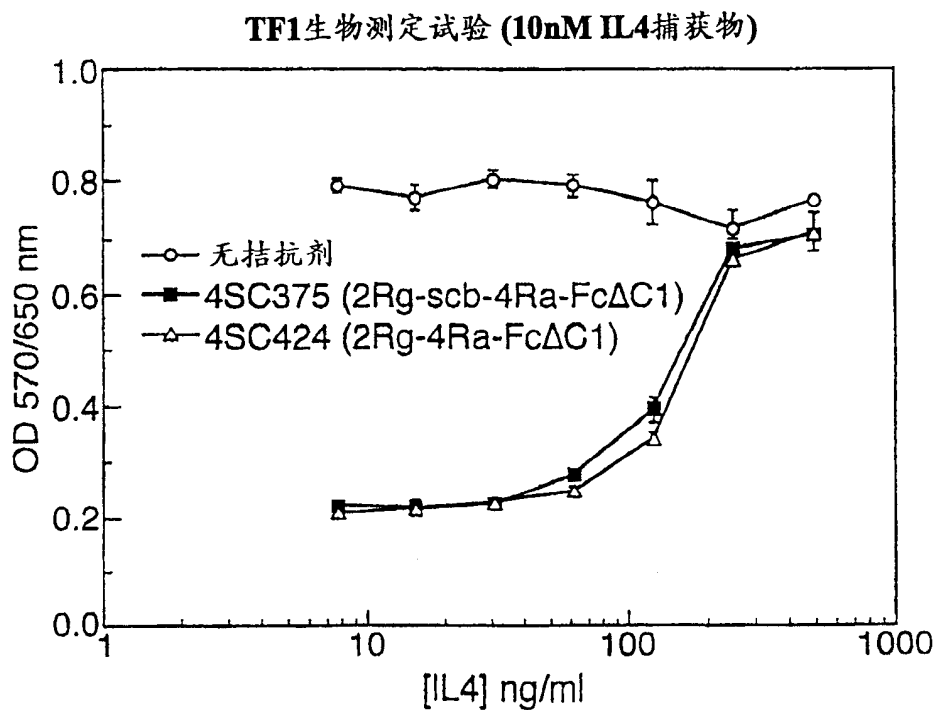


图 28

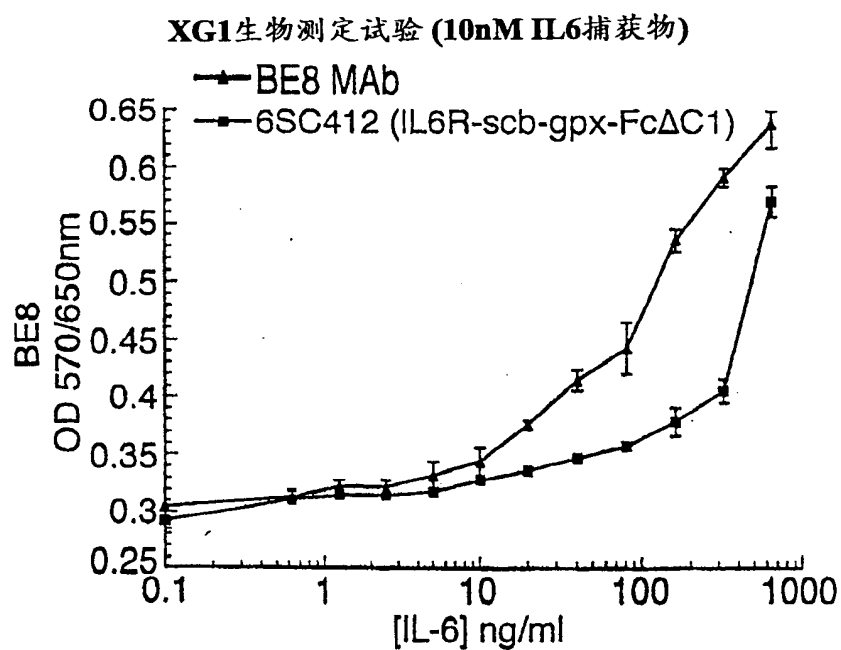


图 29

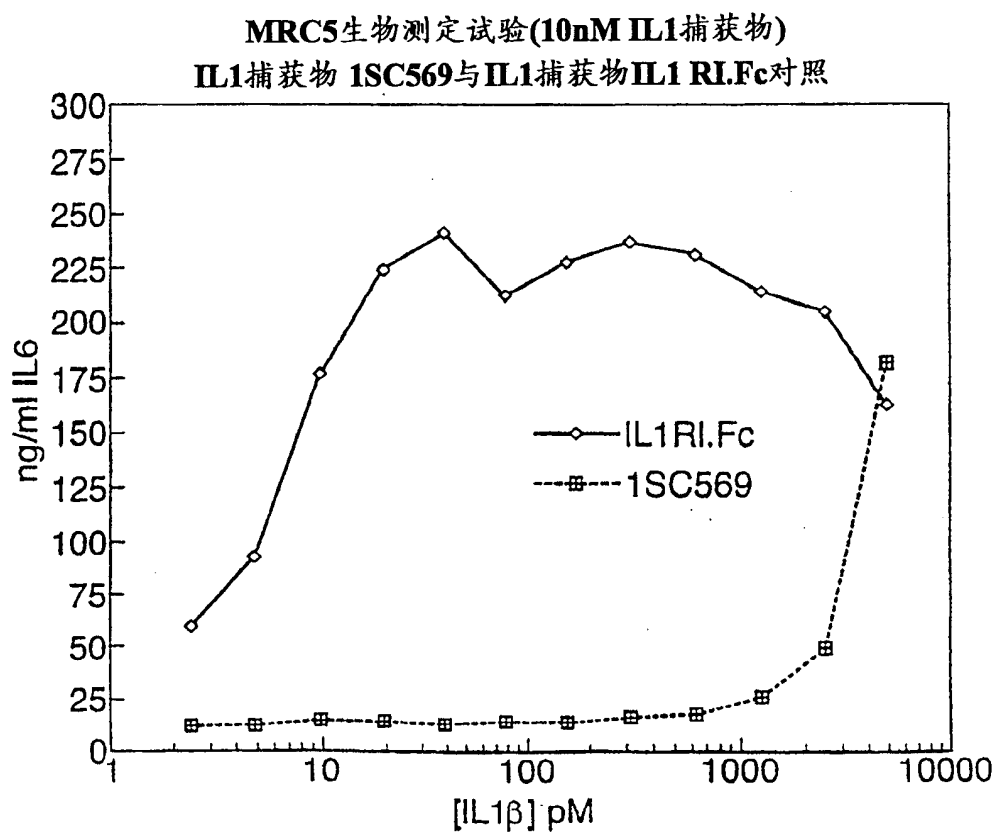


图 30

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *      *
ATG GTG TGG CTT TGC TCT GGG CTC CTG TTC CCT GTG AGC TGC CTG GTC
TAC CAC ACC GAA ACG AGA CCC GAG GAC AAG GGA CAC TCG ACG GAC CAG
Met Val Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val>

50      60      70      80      90
      *      *      *      *      *
CTG CTG CAG GTG GCA AGC TCT GGG AAC ATG AAG GTC TTG CAG GAG CCC
GAC GAC GTC CAC CGT TCG AGA CCC TTG TAC TTC CAG AAC GTC CTC GGG
Leu Leu Gln Val Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro>

100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *
ACC TGC GTC TCC GAC TAC ATG AGC ATC TCT ACT TGC GAG TGG AAG ATG
TGG ACG CAG AGG CTG ATG TAC TCG TAG AGA TGA ACG CTC ACC TTC TAC
Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met>

150     160     170     180     190
      *      *      *      *      *
AAT GGT CCC ACC AAT TGC AGC ACC GAG CTC CGC CTG TTG TAC CAG CTG
TTA CCA GGG TGG TTA ACG TCG TGG CTC GAG GCG GAC AAC ATG GTC GAC
Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu>

200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *
GTT TTT CTG CTC TCC GAA GCC CAC ACG TGT ATC CCT GAG AAC AAC GGA
CAA AAA GAC GAG AGG CTT CGG GTG TGC ACA TAG GGA CTC TTG TTG CCT
Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly>

250     260     270     280
      *      *      *      *      *
GGC GCG GGG TGC GTG TGC CAC CTG CTC ATG GAT GAC GTG GTC AGT GCG
CCG CGC CCC ACG CAC ACG GTG GAC GAG TAC CTA CTG CAC CAG TCA CGC
Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala>

290     300     310     320     330
      *      *      *      *      *
GAT AAC TAT ACA CTG GAC CTG TGG GCT GGG CAG CAG CTG CTG TGG AAG
CTA TTG ATA TGT GAC CTG GAC ACC CGA CCC GTC GTC GAC GAC ACC TTC
Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys>

340     350     360     370     380
      *      *      *      *      *
GGC TCC TTC AAG CCC AGC GAG CAT GTG AAA CCC AGG GCC CCA GGA AAC
CCG AGG AAG TTC GGG TCG CTC GTA CAC TTT GGG TCC CGG GGT CCT TTG
Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn>

```

图 31A

```

      390          400          410          420          430
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
CTG ACA GTT CAC ACC AAT GTC TCC GAC ACT CTG CTG CTG ACC TGG AGC
GAC TGT CAA GTG TGG TTA CAG AGG CTG TGA GAC GAC GAC TGG ACC TCG
Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser>

      440          450          460          470          480
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
AAC CCG TAT CCC CCT GAC AAT TAC CTG TAT AAT CAT CTC ACC TAT GCA
TTG GGC ATA GGG GGA CTG TTA ATG GAC ATA TTA GTA GAG TGG ATA CGT
Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala>

      490          500          510          520
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GTC AAC ATT TGG AGT GAA AAC GAC CCG GCA GAT TTC AGA ATC TAT AAC
CAG TTG TAA ACC TCA CTT TTG CTG GGC CGT CTA AAG TCT TAG ATA TTG
Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn>

530          540          550          560          570
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GTG ACC TAC CTA GAA CCC TCC CTC CGC ATC GCA GCC AGC ACC CTG AAG
CAC TGG ATG GAT CTT GGG AGG GAG GCG TAG CGT CGG TCG TGG GAC TTC
Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys>

      580          590          600          610          620
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
TCT GGG ATT TCC TAC AGG GCA CGG GTG AGG GCC TGG GCT CAG AGC TAT
AGA CCC TAA AGG ATG TCC CGT GCC CAC TCC CGG ACC CGA GTC TCG ATA
Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Ser Tyr>

      630          640          650          660          670
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
AAC ACC ACC TGG AGT GAG TGG AGC CCC AGC ACC AAG TGG CAC AAC TCC
TTG TGG TGG ACC TCA CTC ACC TCG GGG TCG TGG TTC ACC GTG TTG AGG
Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser>

      680          690          700          710          720
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
TAC AGG GAG CCC TTC GAG CAG TCC GGT GGG GGC GGG GGC GCC GCG CCT
ATG TCC CTC GGG AAG CTC GTC AGG CCA CCC CCG CCC CCG CGG CGC GGA
Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro>

      730          740          750          760
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
ACG GAA ACT CAG CCA CCT GTG ACA AAT TTG AGT GTC TCT GTT GAA AAC
TGC CTT TGA GTC GGT GGA CAC TGT TTA AAC TCA CAG AGA CAA CTT TTG
Thr Glu Thr Gln Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn>

```

图 31B

```

770          780          790          800          810
*          *          *          *          *
CTC TGC ACA GTA ATA TGG ACA TGG AAT CCA CCC GAG GGA GCC AGC TCA
GAG ACG TGT CAT TAT ACC TGT ACC TTA GGT GGG CTC CCT CGG TCG AGT
Leu Cys Thr Val Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser>

      820          830          840          850          860
      *          *          *          *          *
AAT TGT AGT CTA TGG TAT TTT AGT CAT TTT GGC GAC AAA CAA GAT AAG
TTA ACA TCA GAT ACC ATA AAA TCA GTA AAA CCG CTG TTT GTT CTA TTC
Asn Cys Ser Leu Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys>

      870          880          890          900          910
*          *          *          *          *
AAA ATA GCT CCG GAA ACT CGT CGT TCA ATA GAA GTA CCC CTG AAT GAG
TTT TAT CGA GGC CTT TGA GCA GCA AGT TAT CTT CAT GGG GAC TTA CTC
Lys Ile Ala Pro Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu>

      920          930          940          950          960
*          *          *          *          *
AGG ATT TGT CTG CAA GTG GGG TCC CAG TGT AGC ACC AAT GAG AGT GAG
TCC TAA ACA GAC GTT CAC CCC AGG GTC ACA TCG TGG TTA CTC TCA CTC
Arg Ile Cys Leu Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu>

      970          980          990          1000
*          *          *          *          *
AAG CCT AGC ATT TTG GTT GAA AAA TGC ATC TCA CCC CCA GAA GGT GAT
TTC GGA TCG TAA AAC CAA CTT TTT ACG TAG AGT GGG GGT CTT CCA CTA
Lys Pro Ser Ile Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp>

1010          1020          1030          1040          1050
*          *          *          *          *
CCT GAG TCT GCT GTG ACT GAG CTT CAA TGC ATT TGG CAC AAC CTG AGC
GGA CTC AGA CGA CAC TGA CTC GAA GTT ACG TAA ACC GTG TTG GAC TCG
Pro Glu Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser>

      1060          1070          1080          1090          1100
*          *          *          *          *
TAC ATG AAG TGT TCT TGG CTC CCT GGA AGG AAT ACC AGT CCC GAC ACT
ATG TAC TTC ACA AGA ACC GAG GGA CCT TCC TTA TGG TCA GGG CTG TGA
Tyr Met Lys Cys Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr>

      1110          1120          1130          1140          1150
*          *          *          *          *
AAC TAT ACT CTC TAC TAT TGG CAC AGA AGC CTG GAA AAA ATT CAT CAA
TTG ATA TGA GAG ATG ATA ACC GTG TCT TCG GAC CTT TTT TAA GTA GTT
Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln>

```

图 31C

```

      1160      1170      1180      1190      1200
      *        *        *        *        *
TGT GAA AAC ATC TTT AGA GAA GGC CAA TAC TTT GGT TGT TCC TTT GAT
ACA CTT TTG TAG AAA TCT CTT CCG GTT ATG AAA CCA ACA AGG AAA CTA
Cys Glu Asn Ile Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp>

      1210      1220      1230      1240
      *        *        *        *        *
CTG ACC AAA GTG AAG GAT TCC AGT TTT GAA CAA CAC AGT GTC CAA ATA
GAC TGG TTT CAC TTC CTA AGG TCA AAA CTT GTT GTG TCA CAG GTT TAT
Leu Thr Lys Val Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile>

1250      1260      1270      1280      1290
      *        *        *        *        *
ATG GTC AAG GAT AAT GCA GGA AAA ATT AAA CCA TCC TTC AAT ATA GTG
TAC CAG TTC CTA TTA CGT CCT TTT TAA TTT GGT AGG AAG TTA TAT CAC
Met Val Lys Asp Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val>

      1300      1310      1320      1330      1340
      *        *        *        *        *
CCT TTA ACT TCC CGT GTG AAA CCT GAT CCT CCA CAT ATT AAA AAC CTC
GGA AAT TGA AGG GCA CAC TTT GGA CTA GGA GGT GTA TAA TTT TTG GAG
Pro Leu Thr Ser Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu>

      1350      1360      1370      1380      1390
      *        *        *        *        *
TCC TTC CAC AAT GAT GAC CTA TAT GTG CAA TGG GAG AAT CCA CAG AAT
AGG AAG GTG TTA CTA CTG GAT ATA CAC GTT ACC CTC TTA GGT GTC TTA
Ser Phe His Asn Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn>

      1400      1410      1420      1430      1440
      *        *        *        *        *
TTT ATT AGC AGA TGC CTA TTT TAT GAA GTA GAA GTC AAT AAC AGC CAA
AAA TAA TCG TCT ACG GAT AAA ATA CTT CAT CTT CAG TTA TTG TCG GTT
Phe Ile Ser Arg Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln>

      1450      1460      1470      1480
      *        *        *        *        *
ACT GAG ACA CAT AAT GTT TTC TAC GTC CAA GAG GCT AAA TGT GAG AAT
TGA CTC TGT GTA TTA CAA AAG ATG CAG GTT CTC CGA TTT ACA CTC TTA
Thr Glu Thr His Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn>

1490      1500      1510      1520      1530
      *        *        *        *        *
CCA GAA TTT GAG AGA AAT GTG GAG AAT ACA TCT TGT TTC ATG GTC CCT
GGT CTT AAA CTC TCT TTA CAC CTC TTA TGT AGA ACA AAG TAC CAG GGA
Pro Glu Phe Glu Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro>

```

图 31D

```

1540      1550      1560      1570      1580
*      *      *      *      *
GGT GTT CTT CCT GAT ACT TTG AAC ACA GTC AGA ATA AGA GTC AAA ACA
CCA CAA GAA GGA CTA TGA AAC TTG TGT CAG TCT TAT TCT CAG TTT TGT
Gly Val Leu Pro Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr>

1590      1600      1610      1620      1630
*      *      *      *      *
AAT AAG TTA TGC TAT GAG GAT GAC AAA CTC TGG AGT AAT TGG AGC CAA
TTA TTC AAT ACG ATA CTC CTA CTG TTT GAG ACC TCA TTA ACC TCG GTT
Asn Lys Leu Cys Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln>

1640      1650      1660      1670      1680
*      *      *      *      *
GAA ATG AGT ATA GGT AAG AAG CGC AAT TCC ACA ACC GGA GAC AAA ACT
CTT TAC TCA TAT CCA TTC TTC GCG TTA AGG TGT TGG CCT CTG TTT TGA
Glu Met Ser Ile Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Thr Gly Asp Lys Thr>

1690      1700      1710      1720
*      *      *      *      *
CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA
GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser>

1730      1740      1750      1760      1770
*      *      *      *      *
GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG
CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg>

1780      1790      1800      1810      1820
*      *      *      *      *
ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT
TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro>

1830      1840      1850      1860      1870
*      *      *      *      *
GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC
CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala>

1880      1890      1900      1910      1920
*      *      *      *      *
AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC
TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val>

```

图 31E

			1930				1940				1950				1960			
	*		*		*		*		*		*		*		*		*	
	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC		
	TCG	CAG	GAG	TGG	CAG	GAC	GTG	GTC	CTG	ACC	GAC	TTA	CCG	TTC	CTC	ATG		
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr>		
1970				1980				1990				2000				2010		
*		*		*		*		*		*		*		*		*		*
AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GCC	CTC	CCA	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC			
TTC	ACG	TTC	CAG	AGG	TTG	TTT	CGG	GAG	GGT	CGG	GGG	TAG	CTC	TTT	TGG			
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr>			
	2020			2030				2040				2050				2060		
	*		*		*		*		*		*		*		*		*	
ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	CCA	CAG	GTG	TAC	ACC	CTG			
TAG	AGG	TTT	CGG	TTT	CCC	GTC	GGG	GCT	CTT	GGT	GTC	CAC	ATG	TGG	GAC			
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu>			
	2070			2080				2090				2100				2110		
*	*		*	*		*		*		*		*		*		*		*
CCC	CCA	TCC	CGG	GAG	GAG	ATG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC			
GGG	GGT	AGG	GCC	CTC	CTC	TAC	TGG	TTC	TTG	GTC	CAG	TCG	GAC	TGG	ACG			
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys>			
	2120			2130				2140				2150				2160		
	*		*		*		*		*		*		*		*		*	
CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC			
GAC	CAG	TTT	CCG	AAG	ATA	GGG	TCG	CTG	TAG	CGG	CAC	CTC	ACC	CTC	TCG			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser>			
	2170			2180				2190				2200						
	*		*	*		*		*		*		*		*		*		*
AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC			
TTA	CCC	GTC	GGC	CTC	TTG	TTG	ATG	TTC	TGG	TGC	GGA	GGG	CAC	GAC	CTG			
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp>			
2210				2220				2230				2240				2250		
*		*		*		*		*		*		*		*		*		*
TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAT	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC			
AGG	CTG	CCG	AGG	AAG	AAG	GAG	ATA	TCG	TTC	GAG	TGG	CAC	CTG	TTC	TCG			
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser>			
	2260			2270				2280				2290				2300		
	*		*	*		*		*		*		*		*		*		*
AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT			
TCC	ACC	GTC	GTC	CCC	TTG	CAG	AAG	AGT	ACG	AGG	CAC	TAC	GTA	CTC	CGA			
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala>			

图 31F

```
      2310      2320      2330      2340      2350
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA
GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys>

*
TGA
ACT
***>
```

图 31G

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *      *      *      *      *
ATG GTG TGG CCG GCG CGG CTC TGC GGG CTG TGG GCG CTG CTG CTC TGC
TAC CAC ACC GGC CGC GCC GAG ACG CCC GAC ACC CGC GAC GAC GAG ACG
Met Val Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys>

50      60      70      80      90
*      *      *      *      *      *      *      *
GCC GGC GGC GGG GGC GGG GGC GGG GGC GCC GCG CCT ACG GAA ACT CAG
CGG CCG CCG CCC CCG CCC CCG CCC CCG CGG CGC GGA TGC CTT TGA GTC
Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln>

100     110     120     130     140
*      *      *      *      *      *      *      *
CCA CCT GTG ACA AAT TTG AGT GTC TCT GTT GAA AAC CTC TGC ACA GTA
GGT GGA CAC TGT TTA AAC TCA CAG AGA CAA CTT TTG GAG ACG TGT CAT
Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val>

150     160     170     180     190
*      *      *      *      *      *      *      *
ATA TGG ACA TGG AAT CCA CCC GAG GGA GCC AGC TCA AAT TGT AGT CTA
TAT ACC TGT ACC TTA GGT GGG CTC CCT CGG TCG AGT TTA ACA TCA GAT
Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu>

200     210     220     230     240
*      *      *      *      *      *      *      *
TGG TAT TTT AGT CAT TTT GGC GAC AAA CAA GAT AAG AAA ATA GCT CCG
ACC ATA AAA TCA GTA AAA CCG CTG TTT GTT CTA TTC TTT TAT CGA GGC
Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro>

250     260     270     280
*      *      *      *      *      *      *      *
GAA ACT CGT CGT TCA ATA GAA GTA CCC CTG AAT GAG AGG ATT TGT CTG
CTT TGA GCA GCA AGT TAT CTT CAT GGG GAC TTA CTC TCC TAA ACA GAC
Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu>

290     300     310     320     330
*      *      *      *      *      *      *      *
CAA GTG GGG TCC CAG TGT AGC ACC AAT GAG AGT GAG AAG CCT AGC ATT
GTT CAC CCC AGG GTC ACA TCG TGG TTA CTC TCA CTC TTC GGA TCG TAA
Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile>

340     350     360     370     380
*      *      *      *      *      *      *      *
TTG GTT GAA AAA TGC ATC TCA CCC CCA GAA GGT GAT CCT GAG TCT GCT
AAC CAA CTT TTT ACG TAG AGT GGG GGT CTT CCA CTA GGA CTC AGA CGA
Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala>

```

图 32A

```

      390          400          410          420          430
      *          *          *          *          *
GTG ACT GAG CTT CAA TGC ATT TGG CAC AAC CTG AGC TAC ATG AAG TGT
CAC TGA CTC GAA GTT ACG TAA ACC GTG TTG GAC TCG ATG TAC TTC ACA
Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys>

      440          450          460          470          480
      *          *          *          *          *
TCT TGG CTC CCT GGA AGG AAT ACC AGT CCC GAC ACT AAC TAT ACT CTC
AGA ACC GAG GGA CCT TCC TTA TGG TCA GGG CTG TGA TTG ATA TGA GAG
Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu>

      490          500          510          520
      *          *          *          *          *
TAC TAT TGG CAC AGA AGC CTG GAA AAA ATT CAT CAA TGT GAA AAC ATC
ATG ATA ACC GTG TCT TCG GAC CTT TTT TAA GTA GTT ACA CTT TTG TAG
Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile>

530          540          550          560          570
      *          *          *          *          *
TTT AGA GAA GGC CAA TAC TTT GGT TGT TCC TTT GAT CTG ACC AAA GTG
AAA TCT CTT CCG GTT ATG AAA CCA ACA AGG AAA CTA GAC TGG TTT CAC
Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val>

      580          590          600          610          620
      *          *          *          *          *
AAG GAT TCC AGT TTT GAA CAA CAC AGT GTC CAA ATA ATG GTC AAG GAT
TTC CTA AGG TCA AAA CTT GTT GTG TCA CAG GTT TAT TAC CAG TTC CTA
Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp>

      630          640          650          660          670
      *          *          *          *          *
AAT GCA GGA AAA ATT AAA CCA TCC TTC AAT ATA GTG CCT TTA ACT TCC
TTA CGT CCT TTT TAA TTT GGT AGG AAG TTA TAT CAC GGA AAT TGA AGG
Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser>

      680          690          700          710          720
      *          *          *          *          *
CGT GTG AAA CCT GAT CCT CCA CAT ATT AAA AAC CTC TCC TTC CAC AAT
GCA CAC TTT GGA CTA GGA GGT GTA TAA TTT TTG GAG AGG AAG GTG TTA
Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn>

      730          740          750          760
      *          *          *          *          *
GAT GAC CTA TAT GTG CAA TGG GAG AAT CCA CAG AAT TTT ATT AGC AGA
CTA CTG GAT ATA CAC GTT ACC CTC TTA GGT GTC TTA AAA TAA TCG TCT
Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg>

```

图 32B

```

770          780          790          800          810
*           *           *           *           *
TGC CTA TTT TAT GAA GTA GAA GTC AAT AAC AGC CAA ACT GAG ACA CAT
ACG GAT AAA ATA CTT CAT CTT CAG TTA TTG TCG GTT TGA CTC TGT GTA
Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His>

      820          830          840          850          860
      *           *           *           *           *
AAT GTT TTC TAC GTC CAA GAG GCT AAA TGT GAG AAT CCA GAA TTT GAG
TTA CAA AAG ATG CAG GTT CTC CGA TTT ACA CTC TTA GGT CTT AAA CTC
Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu>

      870          880          890          900          910
*           *           *           *           *
AGA AAT GTG GAG AAT ACA TCT TGT TTC ATG GTC CCT GGT GTT CTT CCT
TCT TTA CAC CTC TTA TGT AGA ACA AAG TAC CAG GGA CCA CAA GAA GGA
Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro>

      920          930          940          950          960
*           *           *           *           *
GAT ACT TTG AAC ACA GTC AGA ATA AGA GTC AAA ACA AAT AAG TTA TGC
CTA TGA AAC TTG TGT CAG TCT TAT TCT CAG TTT TGT TTA TTC AAT ACG
Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys>

      970          980          990          1000
*           *           *           *           *
TAT GAG GAT GAC AAA CTC TGG AGT AAT TGG AGC CAA GAA ATG AGT ATA
ATA CTC CTA CTG TTT GAG ACC TCA TTA ACC TCG GTT CTT TAC TCA TAT
Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile>

1010          1020          1030          1040          1050
*           *           *           *           *
GGT AAG AAG CGC AAT TCC ACA GGC GCG CCT AGT GGT GGA GGT GGC CGG
CCA TTC TTC GCG TTA AGG TGT CCG CGC GGA TCA CCA CCT CCA CCG GCC
Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Gly Ala Pro Ser Gly Gly Gly Gly Arg>

      1060          1070          1080          1090          1100
*           *           *           *           *
CCC GCA AGC TCT GGG AAC ATG AAG GTC TTG CAG GAG CCC ACC TGC GTC
GGG CGT TCG AGA CCC TTG TAC TTC CAG AAC GTC CTC GGG TGG ACG CAG
Pro Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val>

      1110          1120          1130          1140          1150
*           *           *           *           *
TCC GAC TAC ATG AGC ATC TCT ACT TGC GAG TGG AAG ATG AAT GGT CCC
AGG CTG ATG TAC TCG TAG AGA TGA ACG CTC ACC TTC TAC TTA CCA GGG
Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro>

```

图 32C

```

      1160      1170      1180      1190      1200
      *        *        *        *        *
ACC AAT TGC AGC ACC GAG CTC CGC CTG TTG TAC CAG CTG GTT TTT CTG
TGG TTA ACG TCG TGG CTC GAG GCG GAC AAC ATG GTC GAC CAA AAA GAC
Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu>

      1210      1220      1230      1240
      *        *        *        *        *
CTC TCC GAA GCC CAC ACG TGT ATC CCT GAG AAC AAC GGA GGC GCG GGG
GAG AGG CTT CGG GTG TGC ACA TAG GGA CTC TTG TTG CCT CCG CGC CCC
Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly>

1250      1260      1270      1280      1290
      *        *        *        *        *
TGC GTG TGC CAC CTG CTC ATG GAT GAC GTG GTC AGT GCG GAT AAC TAT
ACG CAC ACG GTG GAC GAG TAC CTA CTG CAC CAG TCA CGC CTA TTG ATA
Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr>

      1300      1310      1320      1330      1340
      *        *        *        *        *
ACA CTG GAC CTG TGG GCT GGG CAG CAG CTG CTG TGG AAG GGC TCC TTC
TGT GAC CTG GAC ACC CGA CCC GTC GTC GAC GAC ACC TTC CCG AGG AAG
Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe>

      1350      1360      1370      1380      1390
      *        *        *        *        *
AAG CCC AGC GAG CAT GTG AAA CCC AGG GCC CCA GGA AAC CTG ACA GTT
TTC GGG TCG CTC GTA CAC TTT GGG TCC CGG GGT CCT TTG GAC TGT CAA
Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val>

      1400      1410      1420      1430      1440
      *        *        *        *        *
CAC ACC AAT GTC TCC GAC ACT CTG CTG CTG ACC TGG AGC AAC CCG TAT
GTG TGG TTA CAG AGG CTG TGA GAC GAC GAC TGG ACC TCG TTG GGC ATA
His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr>

      1450      1460      1470      1480
      *        *        *        *        *
CCC CCT GAC AAT TAC CTG TAT AAT CAT CTC ACC TAT GCA GTC AAC ATT
GGG GGA CTG TTA ATG GAC ATA TTA GTA GAG TGG ATA CGT CAG TTG TAA
Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile>

1490      1500      1510      1520      1530
      *        *        *        *        *
TGG AGT GAA AAC GAC CCG GCA GAT TTC AGA ATC TAT AAC GTG ACC TAC
ACC TCA CTT TTG CTG GGC CGT CTA AAG TCT TAG ATA TTG CAC TGG ATG
Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr>

```

图 32D

```

1540      1550      1560      1570      1580
  *      *      *      *      *
CTA GAA CCC TCC CTC CGC ATC GCA GCC AGC ACC CTG AAG TCT GGG ATT
GAT CTT GGG AGG GAG GCG TAG CGT CGG TCG TGG GAC TTC AGA CCC TAA
Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile>

1590      1600      1610      1620      1630
  *      *      *      *      *
TCC TAC AGG GCA CGG GTG AGG GCC TGG GCT CAG TGC TAT AAC ACC ACC
AGG ATG TCC CGT GCC CAC TCC CGG ACC CGA GTC ACG ATA TTG TGG TGG
Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr Asn Thr Thr>

1640      1650      1660      1670      1680
  *      *      *      *      *
TGG AGT GAG TGG AGC CCC AGC ACC AAG TGG CAC AAC TCC TAC AGG GAG
ACC TCA CTC ACC TCG GGG TCG TGG TTC ACC GTG TTG AGG ATG TCC CTC
Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr Arg Glu>

1690      1700      1710      1720
  *      *      *      *
CCC TTC GAG CAG TCC GGA GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA
GGG AAG CTC GTC AGG CCT CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT
Pro Phe Glu Gln Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro>

1730      1740      1750      1760      1770
  *      *      *      *      *
GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA
CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys>

1780      1790      1800      1810      1820
  *      *      *      *      *
CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG
GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val>

1830      1840      1850      1860      1870
  *      *      *      *      *
GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC
CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr>

1880      1890      1900      1910      1920
  *      *      *      *      *
GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG
CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu>

```

图 32E


```

      2310      2320      2330      2340      2350
      *      *      *      *      *      *      *      *
TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG
AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln>

      2360      2370      2380
      *      *      *      *      *      *
AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

```

图 32G

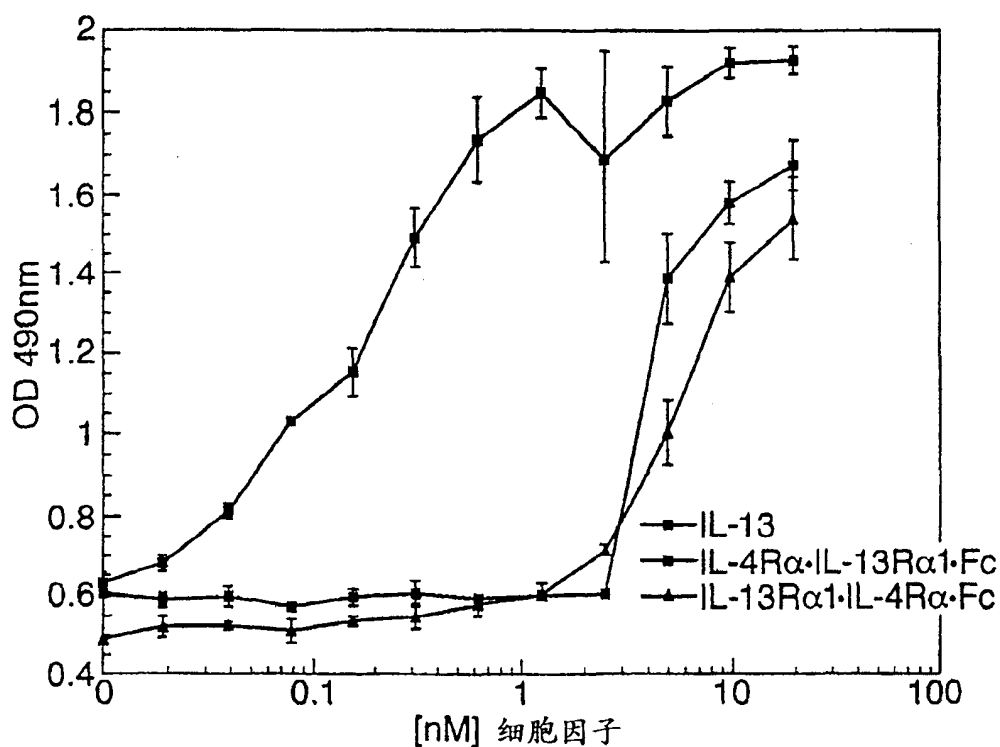


图 33

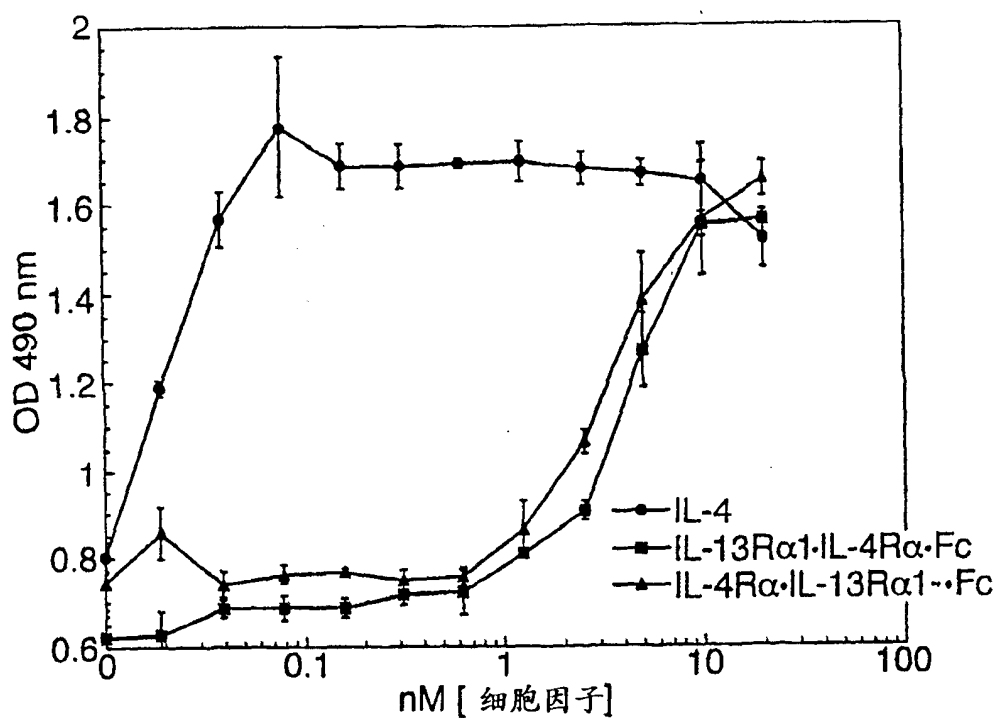


图 34

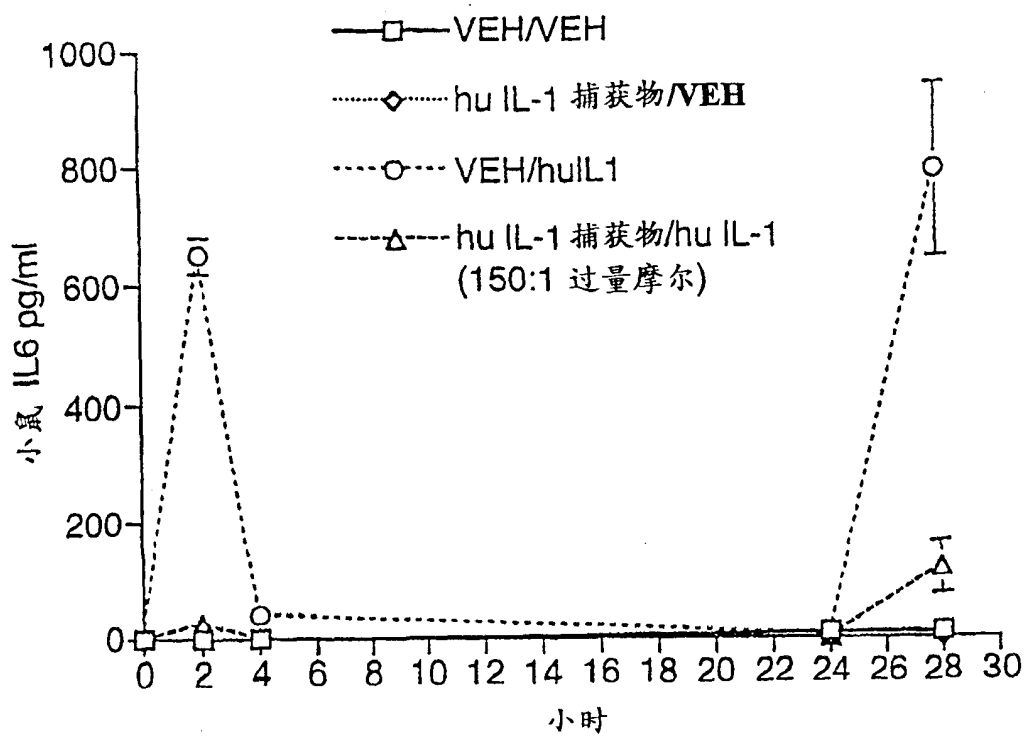


图 35

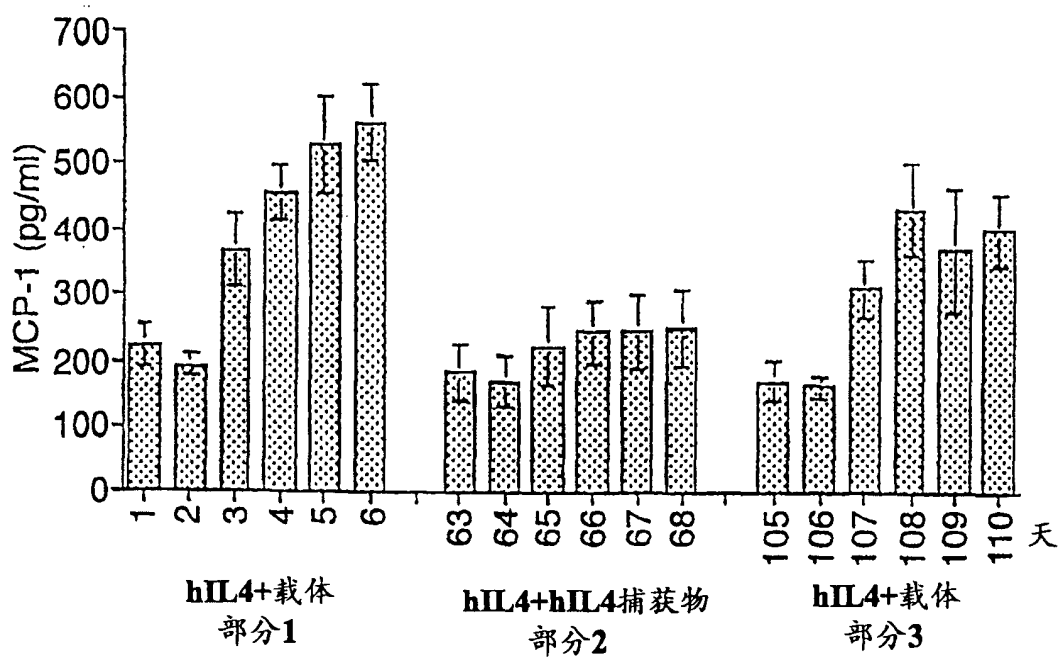


图 36A

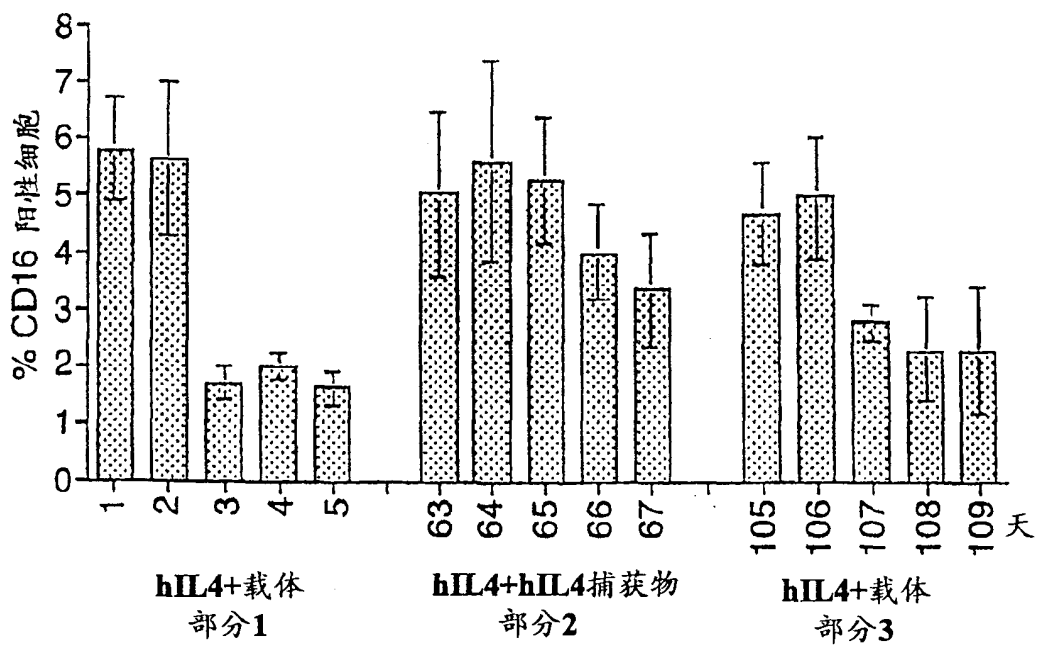


图 36B

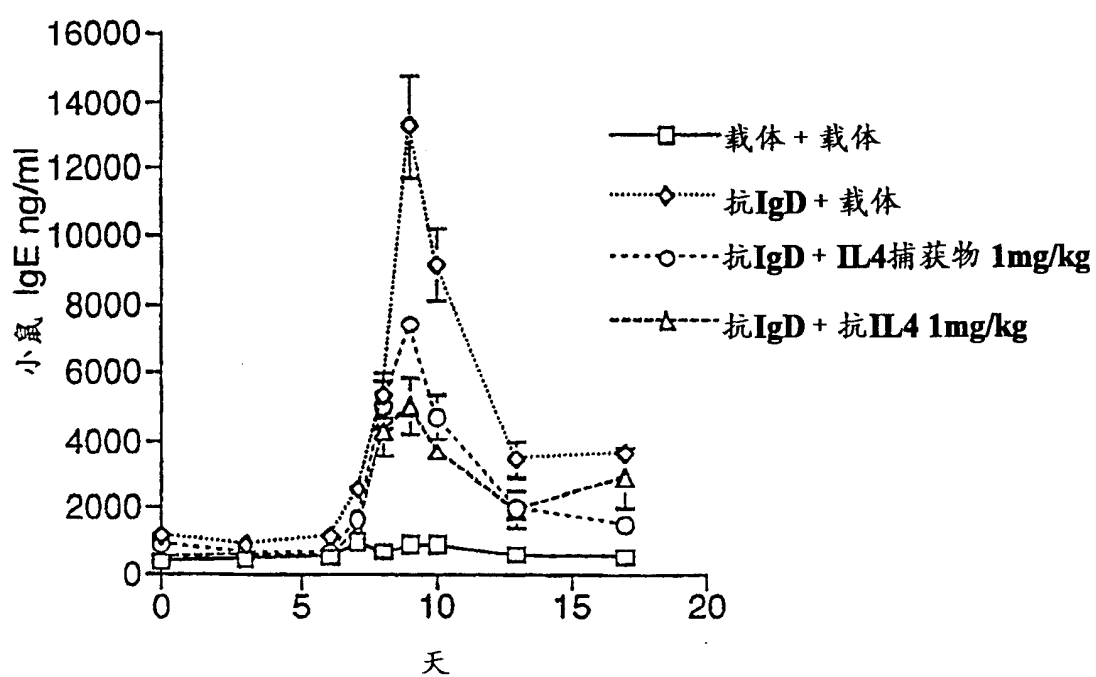


图 37