



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102875683 B

(45) 授权公告日 2014.06.11

(21) 申请号 201110193210.3

(22) 申请日 2011.07.11

(73) 专利权人 旭华(上海)生物研发中心有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区碧波路 518 号 315 室

(72) 发明人 金宜慧 刘瑞贤 周若芸 严孝强
王宇鹏 李强 孙乃超

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 祝莲君 雷芳

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1187120 A, 1998.07.08, 说明书正文第 1-5 段.

CN 1521192 A, 2004.08.18, 权利要求 1-16.

US 2006/0094083 A1, 2006.05.04, 全文.

审查员 易方方

权利要求书2页 说明书15页

序列表9页 附图5页

(54) 发明名称

长效重组人生长激素的 Fc 融合蛋白

(57) 摘要

本发明公开了一种长效重组人生长激素的 Fc 融合蛋白。本发明的人生长激素的 Fc 融合蛋白 (hGH-L-vFc 融合蛋白) 含有人生长激素、约 2-20 个氨基酸的柔性肽接头、和人 IgG Fc 变体。本发明的 Fc 变体无裂解性,且显示极小的不良 Fc-介导的副作用,还公开了一种高表达水平制备或产生这类融合蛋白的方法。本发明的 hGH-L-vFc 融合蛋白表现出血清半衰期延长,且生物活性增加,从而改善药物动力学和药效,在治疗时间内所需的注射次数较少。

1. 一种重组 hGH-L-vFc 融合蛋白,其特征在于,所述的融合蛋白从 N 端到 C 端依次含有人 GH、肽接头和人 IgG Fc 变体,

并且所述的人 IgG Fc 变体选自下组:

(i) 含有 Pro331Ser 突变的人 IgG2 绞链区、CH2 和 CH3 区域;

(ii) 含有 Ser228Pro 和 Leu235Ala 突变的人 IgG4 绞链区、CH2 和 CH3 区域;

(iii) 含有 Leu234Val、Leu235Ala 和 Pro331Ser 突变的人 IgG1 绞链区、CH2 和 CH3 区域;

并且所述的肽接头含有 2-20 个氨基酸,所述肽接头存在于人 GH 和人 IgG Fc 变体之间;且所述的肽接头含有两个或更多选自甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸的氨基酸。

2. 如权利要求 1 所述的重组 hGH-L-vFc 融合蛋白,其特征在于,所述的肽接头的序列如 SEQ ID NO.:18 中第 192 到 207 位所示。

3. 如权利要求 1 所述的重组 hGH-L-vFc 融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.:18、20 或 22 所示。

4. 如权利要求 1 所述的重组 hGH-L-vFc 融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白的氨基酸序列是如 SEQ ID NO.:18 中第 27-456 位、SEQ ID NO.:20 中第 27-462 位或 SEQ ID NO.:22 中第 27-460 位所示的氨基酸序列。

5. 如权利要求 1 所述的重组 hGH-L-vFc 融合蛋白,其特征在于,所述的 hGH-L-vFc 融合蛋白在摩尔基础上,具有与 rhGH 类似或更高的体外生物活性、更长的半衰期。

6. 一种编码权利要求 1 所述的重组 hGH-L-vFc 融合蛋白的 DNA 分子。

7. 一种 CHO 衍生细胞株,其特征在于,所述细胞在其生长培养基中在每 24 小时内,产生超过 $10 \mu\text{g}/$ 百万个细胞的如权利要求 1-5 任一所述的重组 hGH-L-vFc 融合蛋白。

8. 如权利要求 7 所述的 CHO 衍生细胞株,其特征在于,在生长培养基中,每 24 小时内,产生超过 $30 \mu\text{g}/$ 百万个细胞的如权利要求 1-5 任一所述的重组 hGH-L-vFc 融合蛋白。

9. 如权利要求 7 所述的 CHO 衍生的细胞株,其特征在于,它含有编码 hGH-L-vFc 融合蛋白的 DNA 序列,并且所述的 DNA 序列如 SEQ ID NO.:17、19 或 21 所示。

10. 一种制备权利要求 1 所述重组融合蛋白的方法,其特征在于,包括步骤:

(a) 在生长培养基中,在所述重组融合蛋白在每 24 小时期间内表达超过 $10 \mu\text{g}/10^6$ 个细胞的条件下,培养权利要求 7 所述的细胞株;和

(b) 纯化步骤 (a) 表达的所述重组融合蛋白,其中所述重组融合蛋白在摩尔基础上,具有与 rhGH 类似的或更高的体外生物活性,更长的半衰期。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述的肽接头的序列如 SEQ ID NO.:18 中第 192 到 207 位所示。

12. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.:18、20 或 22 所示。

13. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述的融合蛋白的氨基酸序列是如 SEQ ID NO.:18 中第 27-456 位、SEQ ID NO.:20 中第 27-462 位或 SEQ ID NO.:22 中第 27-460 位所示的氨基酸序列。

14. 一种提高含有人 GH、柔性肽接头和人 IgG Fc 变体的重组融合蛋白的表达量的方法,其特征在于,所述的方法包括:

- (a) 将编码融合蛋白的 DNA 引入 CHO 细胞,生成 CHO 衍生的细胞系;
- (b) 培养这种 CHO 衍生的细胞系,从而表达融合蛋白;和
- (c) 纯化步骤 (b) 表达的融合蛋白,

其中重组融合蛋白是 hGH-L-vFc 融合蛋白,并且融合蛋白从 N 端到 C 端依次含有人 GH、肽接头和人 IgG Fc 变体,其特征为表现出极高的体外生物活性,即在摩尔基础上,具有与人 GH 类似或更高的体外生物活性和更长的半衰期;其中在人 GH 和 IgG Fc 变体间存在含有约 2-20 个氨基酸的柔性肽接头;和柔性肽接头含有 2 个或多个氨基酸选自甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸的氨基酸;和其中人 IgG Fc 变体含有选自以下的人 IgG 的绞链区、CH2 和 CH3 区域:Pro331Ser 突变的人 IgG2;Ser228Pro 和 Leu235Ala 突变的人 IgG4;和 Leu234Val、Leu235Ala 和 Pro331Ser 突变的人 IgG1。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其特征在于,所述的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18、20 或 22 所示。

16. 如权利要求 14 所述的方法,其特征在于,所述的编码融合蛋白的 DNA 如 SEQ ID NO:17、19 或 21 所示。

长效重组人生长激素的 Fc 融合蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学和医学领域。更具体地,本发明涉及一种长效重组人生长激素的 Fc 融合蛋白及其制法和用途。

背景技术

[0002] 人生长激素 (hGH) 是由脑下垂体产生和释放,全长 191 个氨基酸、分子量为 22kDa 的肽类激素。它参与了大部分人的正常生长和发育的调控,是刺激身体生长的主要激素,并呈现出多种生物效应,包括线性增长、体质形成、泌乳、巨噬细胞活化以及类似胰岛素作用等。此外,生长激素还可以刺激骨骼、软骨和肌肉的代谢。

[0003] 生长激素与其特异生长激素受体 (hGHR) 在靶点细胞表面相互结合,介导出生化串联反应,从而激活生物效应。生长激素与受体分子的结合通常遵循一种序贯机制;先通过生长激素内的结合位点 1 与第一个受体分子结合,其后再通过生长激素的结合位点 2 与第二个受体分子结合。这种由一个生长激素分子与两个生长激素受体分子的结合是激化生物活性、调节生长和发育所必需的步骤。具体地,结合位点 2 包含了生长激素分子 N 端的 8 个氨基酸和其他几个来自属于螺旋线 1 和螺旋线 3 内的氨基酸。结合位点 1 则包括生长激素分子在螺旋线 1 之内的氨基酸以及 C-端附近的氨基酸。结合位点 1 的 8 个氨基酸占了结合总能量的 85%。换言之,这 8 个氨基酸在与受体结合的过程中扮演了决定性的角色。若将这 8 个氨基酸残基的位置以其它氨基酸取代,将会迅速改变其与生长激素受体结合的能力(例如见, Wells et al. Recent Prog. Horm. Res., 48 :253-75, 1993)。这 8 种氨基酸位于螺旋线 1 和螺旋线 2 之间段 (K41, L45, P61, R64) 和螺旋线 4 内的羧基 C 端半段 (K172, T175, F176, R178), 而其后段 4 个氨基酸残基正好位于全长 191 个氨基酸的生长激素的 C-终端附近。因此生长激素 C 端附近的氨基酸在与受体结合的过程中举足轻重。

[0004] 换言之,生长激素 C 端的氨基酸与其功能密切相关,故目前对 GH 进行基因工程改造时通常避开 C 端,也不采用人 GH 的 C 末端与其他蛋白进行融合的方式。

[0005] 儿童和成人在生长激素缺乏情况下,补充重组人生长激素 (rhGH) 是理想的治疗方式。但其缺点是重组人生长激素在人体内药效甚短,其静脉注射的血清清除半衰期约 20 分钟。若以皮下注射重组人生长激素,其高峰血药浓度通常要几个小时后才能达到,而其消除半衰期则为 3 至 8 小时。因此,重组人生长激素的治疗需要每周注射 3 次,或每天一次,以保持适当的血清生长激素水平。对于那些需要长期接受生长激素治疗的病人,往往由于不能按时注射,造成治疗效果降低。长效、高活性的重组人生长激素因而成为此药剂改善的目标。

[0006] 在 1999 年到 2004 年间,基因技术 (Genentech) 公司和阿尔凯默斯 (Alkermes) 股份有限公司开发出 Nutropin Depot 在市场销售,该产品是一种持续释放形式的生长激素,具长效特性,接受治疗的病人其注射次数可减至每 2 或 4 周一次,而不需每天注射。不过由于生产成本过高,该产品在 2004 年被撤出市场。

[0007] 在此期间,数种治疗性蛋白药物藉着与某些聚合物如聚乙二醇 (PEG) 进行结构上

的修改来延长其半衰期和改善体内效价而创建了这些蛋白质药物的第二代产品。蛋白药物与聚乙二醇共价性的结合通常可增加蛋白质的有效期限,并降低其在人体内的清除率。重组人生长激素亦不例外。一些有关聚乙二醇生长激素的文献显示,数种不同形式的聚乙二醇生长激素确实具有比重组人生长激素较长的半衰期,但往往在蛋白质的聚乙二醇化过程中造成了生物活性的损失。

[0008] IgG 类的免疫球蛋白是人类血液中最丰富的蛋白质。它们的半衰期可高达 21 天。已有报导将 IgG 的 Fc 区域与其它蛋白质(如各种细胞因子和可溶性受体)结合而形成融合蛋白(参见,例如 Capon 等人, *Nature*, 337 :525-531, 1989 ;Chamow 等人, *Trends Biotechnol.*, 14 :52-60, 1996 ;美国专利 No. 5, 116, 964 和 5, 541, 087)。典型的融合蛋白是一重二聚体蛋白质,系通过 IgG Fc 绞链区中的半胱氨酸残基与蛋白连接,而形成类似 IgG、但缺少 CH1 区域和轻链的分子。由于结构上的同源,Fc 融合蛋白表现出的体外药物动力学特性与同种型的人 IgG 相当类似。因此制造含有与人 IgG 蛋白质的 Fc 区域相连的 hGH 融合蛋白,将有助于延长 hGH 的循环半衰期和 / 或增加它的生物活性。

[0009] 此外,由于生长激素分子 C 端氨基酸在生物活性的高度重要性,因此在构建 hGH-Fc 融合蛋白(hGH-Fc) 时必须预先考虑到如何克服连接 Fc 半体时所带来的后果。若直接将庞大的 IgG Fc 半体联结在 C 端,会为 C 端造成空间位阻效应,而大大地影响了生长激素结合位点对受体的可亲度。首先,融合蛋白与第一个生长激素受体的结合将因 Fc 半体带来的位阻现象受损,其接下去与细胞表面上的第二受体的后续结合可能因为此位阻效应而更进一步减弱。因此,根据上述生长激素 C- 终端氨基酸的重要性(K172, T175, F176, R178),hGH-Fc 融合蛋白对受体的亲和力将受到破坏,导致其生物活性降低甚至丧失。因此目前的技术都是避免将 Fc 半体直接联结在 C- 终端,以免其活性遭受破坏。大多数重组蛋白都将 Fc 半体联结到生长激素分子的 N- 终端。但此替换方式亦有其缺陷,由于生长激素分子与其受体的结合位点分布于两终端,不论是将 Fc 接到 N 端或 C 端,融合蛋白的生物活性都可能会因 Fc 所带来的位阻效应而遭破坏。

[0010] 由于 hGH-L-vFc 融合蛋白的构建有其本质上的困难,迄今为止尚没有既具有半衰期显著延长的令人满意的 GH 衍生物。因此,本领域迫切需要开发长效、高活性、可以以合理的成本生产的 hGH 衍生物。

发明内容

[0011] 本发明的目的就是提供一种具有高度生物活性的 hGH-L-vFc 融合蛋白及其制备方法和用途。

[0012] 在本发明的第一方面,提供了一种重组 hGH-L-vFc 融合蛋白,所述的融合蛋白从 N 端到 C 端依次含有人 GH、肽接头和人 IgG Fc 变体,

[0013] 并且所述的人 IgG Fc 变体选自下组:

[0014] (i) 含有 Pro331Ser 突变的人 IgG2 绞链区、CH2 和 CH3 区域;

[0015] (ii) 含有 Ser228Pro 和 Leu235Ala 突变的人 IgG4 绞链区、CH2 和 CH3 区域;

[0016] (iii) 含有 Leu234Val、Leu235Ala 和 Pro331Ser 突变的人 IgG1 绞链区、CH2 和 CH3 区域。

[0017] 在另一优选例中,所述的肽接头含有 2-20 个氨基酸,所述肽接头存在于人 GH 和人

IgG Fc 变体之间 ;且所述的肽接头含有两个或更多选自甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸的氨基酸。

[0018] 在另一优选例中,所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO :18、20 或 22 所示。

[0019] 在另一优选例中,所述融合蛋白的氨基酸序列是去除了 -26 到 -1 位氨基酸残基的 hGH 前导肽之后的 SEQ ID NO :18、20 或 22 所示的氨基酸序列。

[0020] 在另一优选例中,所述的 hGH-L-vFc 融合蛋白在摩尔基础上,具有与 rhGH 类似或更高的体外生物活性、更长的半衰期。

[0021] 在本发明的第二方面,提供了一种编码本发明第一方面所述重组 hGH-L-vFc 融合蛋白的 DNA 分子。

[0022] 在本发明的第三方面,提供了一种 CHO 衍生细胞株,所述细胞在其生长培养基中在每 24 小时内,产生超过 10 μ g/ 百万个细胞的如本发明第一方面所述的重组 hGH-L-vFc 融合蛋白。

[0023] 在另一优选例中,所述的 CHO 衍生细胞株在生长培养基中,每 24 小时内,产生超过 30 μ g/ 百万个细胞的本发明第一方面所述的重组 hGH-L-vFc 融合蛋白。

[0024] 在另一优选例中,所述的 CHO 衍生的细胞株含有编码 hGH-L-vFc 融合蛋白的 DNA 序列,并且所述的 DNA 序列具有 SEQ ID NO :17、19 或 21 所示的核苷酸序列。

[0025] 在本发明的第四方面,提供了一种制备本发明第一方面所述重组融合蛋白的方法,包括步骤:

[0026] (a) 在融合蛋白在其生长培养基中每 24 小时期间内,表达超过 10 μ g/ 10^6 (百万) 个细胞的条件下,培养本发明的第三方面所述的细胞株 ;和

[0027] (b) 纯化步骤 (a) 表达的蛋白质,其中重组融合蛋白在摩尔基础上,具有与 rhGH 类似的或更高的体外生物活性,更长的半衰期。

[0028] 在另一优选例中,所述的重组融合蛋白在人 GH 和人 IgG Fc 变体之间有 2-20 个氨基酸的柔性肽 ;且所述柔性肽接头含有两个或更多选自甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸的氨基酸。

[0029] 在另一优选例中,所述的融合蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO :18、20 或 22 所示。

[0030] 在另一优选例中,所述的融合蛋白的氨基酸序列是去除了 -26 到 -1 位氨基酸残基的 hGH 前导肽之后的 SEQ ID NO :18、20 或 22 所示的氨基酸序列。

[0031] 在本发明的第五方面,提供了一种提高含有人 GH、柔性肽接头和人 IgG Fc 变体的重组融合蛋白的表达量的方法,所述的方法包括:

[0032] (a) 将编码融合蛋白的 DNA 引入 CHO 细胞,生成 CHO 衍生的细胞系 ;

[0033] (b) 培养这种 CHO 衍生的细胞系,从而表达融合蛋白 ;和

[0034] (c) 纯化步骤 (b) 表达的融合蛋白,

[0035] 其中重组融合蛋白是 hGH-L-vFc 融合蛋白,其特征为表现出极高的体外生物活性,即在摩尔基础上,具有与人 GH 类似或更高的体外生物活性和更长的半衰期 ;其中在人 GH 和 IgG Fc 变体间存在含有约 2-20 个氨基酸的柔性肽接头 ;和柔性肽接头含有 2 个或多个氨基酸选自甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸的氨基酸 ;和其中人 IgG Fc 变体含有选自以下的人 IgG 的绞链区、CH2 和 CH3 区域 :Pro331Ser 突变的人 IgG2 ;Ser228Pro 和 Leu235Ala 突变的人 IgG4 ;和 Leu234Val、Leu235Ala 和 Pro331Ser 突变的人 IgG1。

[0036] 在另一优选例中,所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18、20 或 22 所示。

[0037] 在另一优选例中,所述编码融合蛋白的 DNA 具有 SEQ ID NO:17、19 或 21 所示的核苷酸序列。

[0038] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0039] 图 1 显示了人 IgG1、IgG2、IgG4 和它们变体的绞链区和 CH2 区域的氨基酸序列的比对。比较三个部分:氨基酸区域 228、234-237 和 330-331。这些变体的氨基酸突变以粗斜体显示。氨基酸残基编号是根据 EU 编号体系标定。

[0040] 图 2 显示了在 pGFP 表达载体内 HindIII-EcoRI 片段的 hGH-L-vFc_{v2} 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列。氨基酸残基 -26 到 -1 是 hGH 的前导肽。成熟蛋白含有 hGH(氨基酸残基 1 到 191)、肽接头(氨基酸残基 192 到 207)和 Fc 变体(氨基酸残基 208 到 430)。在 Fc 区域中,粗体的核苷酸和相应的氨基酸变体用下划线标出。

[0041] 图 3 显示了在 pGFP 表达载体内 HindIII-EcoRI 片段的 hGH-L-vFc_{v4} 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列。氨基酸残基 -26 到 -1 是 hGH 的前导肽。成熟蛋白含有 hGH(氨基酸残基 1 到 191)、肽接头(氨基酸残基 192 到 207)和 Fc 变体(氨基酸残基 208 到 436)。在 Fc 区域中,粗体的核苷酸和相应的氨基酸变体用下划线标出。

[0042] 图 4 显示了在 pGFP 表达载体内 HindIII-EcoRI 片段的 hGH-L-vFc_{v1} 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列。氨基酸残基 -26 到 -1 是 hGH 的前导肽。成熟蛋白含有 hGH(氨基酸残基 1 到 191)、肽接头(氨基酸残基 192 到 207)和 Fc 变体(氨基酸残基 208 到 434)。在 Fc 区域中,粗体的核苷酸和相应的氨基酸变体用下划线标出。

[0043] 图 5 显示旋转培养瓶内细胞株的生长及其分泌 hGH-LvFc_{v2} 融合蛋白的浓度趋势曲线图。

[0044] 图 6 显示了 hGH-L-vFc_{v2} 纯化蛋白刺激 Nb2 细胞增殖的能力。

具体实施方式

[0045] 本发明人经过长期而深入的研究,首次设计了一种独到的绞链区肽接头来降低空间位阻效应,可以制得 hGH 的 C 端与 Fc 连接的融合蛋白,中间有柔软的肽接头。令人意外的是,此融合蛋白不仅不会导致 GH 的功能丧失,反而能够维持、甚至提高生长激素-Fc 融合蛋白的生物活性。在此基础上完成了本发明。

[0046] 具体地,本发明 hGH-L-vFc 融合蛋白从 N 端到 C 端依次含有人 GH、肽接头和人 IgG Fc 变体。较佳地,其中人 Ig Fc 变体含有选自以下的变体绞链区、CH2 和 CH3 区域:(A) 含有 Leu234Val、Leu235Ala 和 Pro331Ser 突变的人 IgG1;(B) 含有 Pro331Ser 突变的人 IgG2;和(C) 含有 Ser228Pro 和 Leu235Ala 突变的人 IgG4。较佳地,使用约 2-20 个氨基酸长度的、含有以下 2 种或多种氨基酸构成的柔性肽接头:甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸。IgG Fc 变体是非裂解性的,且与天然 IgG Fc 相比含有氨基酸突变。此类 hGH-L-vFc 融合蛋白在摩尔基础上,具有与 rhGH 类似或更高的体外生物活性。且 hGH-L-vFc_{v2} 的体内血清清除半衰

期比 rhGH 有显著增长。

[0047] 本发明的另一实施例为人 Ig Fc 变体含有绞链区、CH2 和 CH3 区域。其 CH2 区域在 228、234、235 和 331 位（由 EU 编号体系确定的位置）含有氨基酸突变，从而降低 Fc 的效应子功能。

[0048] 在本发明的另一实施例中，公开了一种从哺乳动物细胞系如 CHO 衍生的细胞系制备或生产这种重组融合蛋白的方法。培养转染的细胞系，使得重组融合蛋白在其生长培养基中在 24 小时期间以超过 10 （较佳地为 30 ） $\mu\text{g}/10^6$ （百万）个细胞的水平下表达。这些 hGH-L-vFc 融合蛋白显示出高度的体外生物活性和更长的体内血清半衰期而无不良副作用，从而改善了药物动力学和药效，进而降低了实现类似药效所需的剂量和注射次数。

[0049] 此外，本发明人还发现，在 hGH 和人 IgG Fc 变体间添加的肽接头以两种方式提高 hGH-L-Fc 的体外生物活性：(1) 使 Fc 区域远离 hGH 上的 hGHR 结合位点，和 (2) 使一个 hGH 远离另一个 hGH 结构域，从而使两个 hGH 区域能分别与靶细胞上的 hGHR 反应。且人的 IgG Fc 变体在 CH2 区域在 228、234、235、331 位点含有氨基酸突变，从而降低 Fc 的效应子功能。

[0050] Fc 元件

[0051] Fc 元件来自免疫球蛋白的 Fc 区域，Fc 在消灭病原体的免疫防御中具有重要作用。IgG 的效应子功能由 Fc 介导而通过两种主要机制：(1) 与细胞表面 Fc 受体 (Fc γ Rs) 的结合，导致通过抗体 - 依赖性细胞毒性 (ADCC) 途径，由杀伤细胞通过吞噬作用或裂解作用而吞噬病原体；(2) 与第一补体成分 C1 的 C1q 部分的结合，引发依赖于补体的细胞毒性 (CDC) 途径，从而溶解病原体。在四种人 IgG 同种型中，IgG1 和 IgG3 能有效地结合 Fc γ R。IgG4 与 Fc γ R 的结合亲和力比 IgG1 或 IgG3 的低一个数量级，而 IgG2 与 Fc γ R 的结合低得难以测定。人 IgG1 和 IgG3 还能有效地结合 C1q，并激活补体串联反应。人 IgG2 对补体的固定作用很弱，而 IgG4 似乎在激活补体串联反应的能力方面相当缺乏。对应用于人的治疗而言，当 hGH-Fc 融合蛋白结合于靶点细胞表面上的 hGHR 时，融合蛋白的 Fc 区域必须不能有不良效应子功能，因而不会溶解或除去这些靶点细胞。因此，hGH-Fc 的 Fc 区域必须是非溶解性的，对结合于 Fc γ Rs 和 C1q 从而触发效应子功能方面，Fc 区域必须是无活性的。显然，没有一种天然的 IgG 同种型适合产生 hGH-Fc 融合蛋白。为了得到非溶解性的 Fc，必须使天然 Fc 区域中的一些氨基酸突变，以降低其效应子功能。

[0052] 透过人和鼠的 IgG 同种型的氨基酸序列的比较显示，Fc 片段在 CH2 区域 N 末端附近的序列在 IgG Fc 与 Fc γ Rs 的结合中具有重要作用。其在 234 位到 237 位基序的重要性已在基因工程建构的抗体中证明（参见，例如 Duncan 等人，Nature, 332 :563-564, 1988）。本发明所提氨基酸残基编号是根据 Kabat 等人所述的 EU 编号体系标定（《SEQUENCES of PROTEINS of IMMUNOLOGICAL INTEREST》，第 5 版，United States Department of Health and Human Services, 1991）。在四种人 IgG 同种型中，IgG1 和 IgG3 与 Fc γ Rs 的结合力最高，且两者具有相同的 Leu234-Leu-Gly-Gly237 序列（图 1）。IgG4 与 Fc γ Rs 结合的亲和力甚低，观其序列显示有个氨基酸受到替换，即在 234 位点上 Leu 换成 Phe。在不与 Fc γ Rs 结合的 IgG2 中，则发生两个位点替换和一个位点被删除，从而形成 Val234-Ala-Gly237 序列（图 1）。为了减少 Fc 与 Fc γ R 的结合和 ADCC 活性，IgG4 中的 Leu235 可用 Ala 取代（参见，例如 Hutchins 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92 :11980-11984, 1995）。IgG1 抗体内的 Glu233-Leu-Leu235 序列曾被用 IgG2 中的 Pro233-Val-Ala235 相关序列来替换。这种

改变使 IgG1 变体在小鼠中失去了透过 Fc γ R- 介导除去靶点细胞的能力。

[0053] 有关抗体对 Fc γ R 与 Clq 结合至关重要的第二部位座落于人 IgG 的 CH2 区域靠近羧基端的附近（参见，例如 Duncan 等人，Nature, 332 :738-740, 1988）。在四种人 IgG 同种型中，这部分中仅有一个位点显示取代：IgG4 中的 Ser330 和 Ser331 替换了 IgG1、IgG2 和 IgG3 中的 Ala330 和 Pro331（图 1）。Ser330 的存在不影响 Fc γ R 与 Clq 的结合。用 Ser 替代 Pro331 则使 IgG1 失去了与 Clq 的结合亲和力，而用 Pro 替代 Ser331 部分保留了 IgG4 的补体固定活性（参见，例如 Tao 等人，J. Exp. Med., 178 :661-667, 1993 ;Xu 等人，J. Biol. Chem., 269 :3469-3474, 1994）。

[0054] 融合蛋白及其生产方法

[0055] 本发明提供了一类新型有效的 hGH-L-Fc 融合蛋白，融合蛋白中的 Fc 元件为变体 (vFc)，以用于构建高效的 hGH-L-vFc 融合蛋白。人 IgG2 不结合 Fc γ R，但显示出微弱的补体活性。具有 Pro331Ser 突变的 Fc γ_2 变体应比天然 Fc γ_2 的变体活性更低，而且仍旧不结合于 Fc γ R。IgG4Fc 在激活变体串联反应有缺陷，且它与 Fc γ R 的结合亲和力比活性最高的同种型 (IgG1) 低约一个数量级（十倍）。与天然 Fc γ_4 相比，具有 Leu235Ala 突变的 Fc γ_4 变体应表现出极微的效应子功能。具有 Leu234Val、Leu235Ala 和 Pro331Ser 突变的 Fc γ_1 也表现出比天然 Fc γ_1 低得多的效应子功能。这些 Fc 变体都比天然存在的人 IgG Fc 更适于制备 hGH 融合蛋白。在非溶解 Fc 的制备中也可引入其它替换，而不危及循环半衰期或导致不良的构象变化。

[0056] 本发明融合蛋白通常由生物合成的方法制备。根据本发明所述的核苷酸序列，本技术领域人员可方便地用各种已知方法制得本发明的编码核酸。这些方法例如但不限于：PCR，DNA 人工合成等，具体的方法可参见 J. 萨姆布鲁克，《分子克隆实验指南》。作为本发明的一种实施方式，可通过分段合成核苷酸序列再进行重叠延伸 PCR 的方法来构建本发明的编码核酸序列。

[0057] 本发明还提供了一种表达载体，包含编码本发明的融合蛋白的序列以及与之操作性相连的表达调控序列。所述的“操作性相连”或“可操作地连于”指这样一种状况，即线性 DNA 序列的某些部分能够调节或控制同一线性 DNA 序列其它部分的活性。例如，如果启动子控制序列的转录，那么它就是可操作地连于编码序列。

[0058] 表达载体可采用市售的例如但不限于：pcDNA3、pIRES、pDR，pUC18 等可用于真核细胞系统表达的载体。本领域技术人员可以根据宿主细胞来选择合适的表达载体。

[0059] 根据已知空载表达载体的酶切图谱，本领域技术人员可按照常规方法通过限制性酶剪切与拼接，将本发明的融合蛋白的编码序列插入合适的限制性位点，制得本发明的重组表达载体。

[0060] 本发明还提供了表达本发明融合蛋白的宿主细胞，其中含有本发明的融合蛋白的编码序列。所述的宿主细胞优选的是真核细胞，例如但不限于 CHO，COS 细胞，293 细胞，RSF 细胞等。作为本发明的优选方式，所述的细胞是 CHO 细胞，其可良好地表达本发明的融合蛋白，可获得结合活性良好，稳定性良好的融合蛋白。

[0061] 本发明还提供一种用重组 DNA 制备本发明融合蛋白的方法，其步骤包括：

[0062] 1) 提供编码融合蛋白的核酸序列（如 SEQ ID NO :17 序列）；

[0063] 2) 将 1) 的核酸序列插入到合适的表达载体，获得重组表达载体；

[0064] 3) 将 2) 的重组表达载体导入合适的宿主细胞；

[0065] 4) 在适合表达的条件下培养转化宿主细胞；

[0066] 5) 收集上清液，并纯化融合蛋白产物。

[0067] 将所述编码序列导入宿主细胞可采用本领域的多种已知技术，例如但不限于：磷酸钙沉淀，原生质体融合，脂质体转染，电穿孔，微注射，反转录法，噬菌体转导法，碱金属离子法。

[0068] 有关宿主细胞的培养和表达可参见 Olander RM Dev Biol Stand 1996 ;86 :338。可通过离心去除悬浮液中的细胞和残渣，收集清液。可通过琼脂糖凝胶电泳技术进行鉴定。

[0069] 可将上述制备获得的融合蛋白纯化为基本均一的性质，例如在 SDS-PAGE 电泳上呈单一条带。例如，当重组蛋白为分泌表达时，可以采用商品化的超滤膜来分离所述蛋白，例如 Millipore、Pellicon 等公司产品，首先将表达上清浓缩。浓缩液可采用凝胶层析的方法进一步加以纯化，或采用离子交换层析的方法纯化。例如阴离子交换层析 (DEAE 等) 或阳离子交换层析。凝胶基质可为琼脂糖、葡聚糖、聚酰胺等常用于蛋白纯化的基质。Q⁻ 或 SP⁻ 基团是较为理想的离子交换基团。最后，还可用羟基磷灰石吸附层析，金属螯合层析，疏水相互作用层析和反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 等方法对上述纯化产物进一步精制纯化。上述所有纯化步骤可利用不同的组合，最终使蛋白纯度达到基本均一。

[0070] 可利用含有所述融合蛋白的特异性抗体、受体或配体的亲和层析柱对表达的融合蛋白进行纯化。根据所使用的亲和柱的特性，可利用常规的方法，如高盐缓冲液、改变 pH 等方法洗脱结合在亲和柱上的融合性多肽。可选择地，所述的融合蛋白的氨基端或羧基端还可含有一个或多个多肽片段，作为蛋白标签。任何合适的标签都可以用于本发明。例如，所述的标签可以是 FLAG, HA, HA1, c-Myc, 6-His 或 8-His 等。这些标签可用于对融合蛋白进行纯化。

[0071] 药物组合物

[0072] 本发明还提供了一种药物组合物，它含有有效量（如 0.000001-90wt%；较佳的 0.1-50wt%；更佳的，5-40wt%）的本发明的融合蛋白，以及药学上可接受的载体。通常，可将有效量的本发明融合蛋白配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中 pH 通常约为 5-8，较佳地，pH 约为 6-8。术语“有效量”或“有效剂量”是指可对人和 / 或动物产生功能或活性的且可被人 / 或动物所接受的量。“药学上可接受的”的成分是适用于人和 / 或哺乳动物而无过度不良反应（如毒性、刺激和变态反应）的，即具有合理的效益 / 风险比的物质。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体，包括各种赋形剂和稀释剂。

[0073] 药学上可接受的载体包括（但并不限于）：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。通常药物制剂应与给药方式相匹配，本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。所述的药物组合物宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量。本发明的药物制剂还可制成缓释制剂。

[0074] 本发明所述的融合蛋白的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定（例如通过临床试验）。所述的因素包括但不限于：所述的融合蛋白的药代动力学参数例如生物利

用率、代谢、半衰期等；患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。通常，当本发明的融合蛋白每天以约 0.00001mg-50mg/kg 动物体重（较佳的 0.0001mg-10mg/kg 动物体重）的剂量给予，能得到令人满意的效果。例如，由治疗状况的迫切要求，可每天给予若干次分开的剂量，或将剂量按比例地减少。

[0075] 本发明融合蛋白的优点如下：

[0076] 1. 延长 GH 的循环半衰期和 / 或增加生物活性。

[0077] 2. 血清中药物浓度波动的减少，安全性提高，耐受性的改善。

[0078] 3. 含有非溶解 Fc 变体的 hGH-L-vFc 融合蛋白能显著地有助于治疗因内源性生长激素分泌不足的成长缺失，以及特纳综合症引起的体型矮小，慢性肾功能衰竭，Prader-Willi 综合症，特发性体型矮小等病症。

[0079] 4. 降低注射频率，使患者有更好的生活品质。

[0080] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

[0081] 实施例 1 构建编码 hGH-L-vFc_{v2} 融合蛋白编码的基因

[0082] 1. 制备含人 - 生长激素的基因序列质粒

[0083] hGH-L-vFc_{v2} 融合蛋白编码序列是由数个 DNA 片段组合而成的。含有人 GH 的前导肽和成熟蛋白编码的基因的制备，系根据 NCBI 参考序号 NM_000515.3 所载人 - 生长激素的基因序列用人工合成方法制备。合成方法是先沿着 hGH 基因的双链 DNA 序列从 5' 终端向 3' 终端行进，制备四个上下链交替、长度约为 180 个碱基的寡核苷酸片段。每个片段的终端分别与下一个互补链片段的终端含有约 20 个碱基的互补重叠序列。其后再将此四个寡核苷酸片段，用聚合酶链式反应技术 (PCR) 组合成长度约为 650 碱基的核苷酸片段。为了便于克隆，所合成基因的两端将含有限制性酶内切位点。表 1 列出了用于克隆 hGH-L-vFc 融合蛋白的寡核苷酸序列。

[0084] 表 1

[0085]

[0086]

SEQ ID NO	引物序列
1	5'-cccaagcttggcgggagatggctacaggctcccggga-3'
2	5'-cggatcccgaagccacagctgcctcca-3'
3	5'-gtcgagtcccaccgtgccca-3'
4	5'-ggaattctcatttaccggagacagggga-3'
5	5'-tggttttctcgatggaggctggaggcct-3'
6	5'-aggcctcccagcctccatcgagaaaacca-3'
7	5'-cggatccgggtggcgggttccggaggagggaagcggggaggatcagtcgagtgcccaccgtgccca-3'

8	5'-gagtcacaataatgggtcccca-3'
9	5'-ggaattctcattaccagagacagga-3'
10	5'-cctgagttcgsgggggacca-3'
11	5'-gagtcacaataatgggtccccaatgcccaccatgcccagcacctgagttcgsgggggacca-3'
12	5'-cggatccgggtggcgggtccgggtggaggcgaagcggcgggtggaggatcagagtcacaataatgggtcccca-3'
13	5'-gacaaaactcacacatgcccc-3'
14	5'-acctgaagtcgsgggggaccgt-3'
15	5'-gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccaccatgaaagtcgsgggggaccgt-3'
16	5'-cggatccgggtggcgggtccgggtggaggcgaagcggcgggtggaggatcagacaaaactcacacatgcccc-3'

[0087] 在 PCR 组合反应时用作 5' 寡核苷酸引物的序列引入了 HindIII 的酶切位点 (SEQ ID NO :1) ;3' 引物则引入了 BamHI 位点 (SEQ ID NO :2)。将得到的长度约为 650bp 的 hGH DNA 片段以 HindIII 和 BamHI 内切酶切除末端,以琼脂糖凝胶电泳纯化后,插入到接受载体的 HindIII 和 BamHI 位点,即克隆得到含人-生长激素的基因序列的质粒,命名为 pHGH。其所含 hGH 基因的序列可由 DNA 测序验证。

[0088] 2 制备含 L-vFc_{v2} 序列的质粒

[0089] 人 IgG2 重链的绞链区域含有包括 4 个半胱氨酸的 12 个氨基酸残基 (GluArgLysCysCysValGluCysProProCysPro)。在这 4 个半胱氨酸残基中,第 3 和第 4 个参与两个重链间二硫键的形成;而消除第 1 个和第 2 个半胱氨酸残基可防止非特异性的二硫键粘接。在本发明中 Fc_{v2} 的绞链区域可以将其切短为 7 个氨基酸残基 (ValGluCysProProCysPro)。IgG2 的 Fc 区域可用从人白细胞制备的 RNA 和合适的 5' (SEQ ID NO :3) 和 3' (SEQ ID NO :4) 引物,通过逆转录和 PCR 制得含人 Fc_{v2} 编码序列的基因。紧接着用此含有 IgG2 的绞链、CH2 和 CH3 区域完整序列的 Fc_{v2} DNA 片段作为模板,将 Fc_{v2} 中 331 位点的 Ser 替换成 Pro,产生 Fc_{v2}Pro331Ser (vFc_{v2}) 变体。此替换突变的引入,是先用天然 Fc_{v2} 作为模板、含突变序列的寡核苷酸 (表 1) 作引物产生两个具部分重叠的 DNA 片段,然后用重叠 PCR 中将它们组装起来:SEQ ID NO :3 作为 5' 引物并用 SEQ ID NO :5 作为 3' 引物生成 5' 片段;用 SEQ ID NO :6 作为 5' 引物并用 SEQ ID NO :4 作为 3' 引物生成 3' 片段;最后用 SEQ ID NO :7 作为 5' 引物和 SEQ ID NO :4 作为 3' 引物,将这两个片段在覆盖 Pro331Ser 突变的区域连接起来。SEQ ID NO :7 引物含有 16 个氨基酸肽接头的编码序列并包括 BamHI 限制性内切酶位点,而 SEQ ID NO :4 则含有 EcoRI 限制性内切酶位点。将此制得长度约为 700bp 的 DNA 片段以 BamHI 和 EcoRI 内切酶切除末端,以琼脂糖凝胶电泳纯化后,插入接受载体 (如 pUC19) 的 BamHI 和 EcoRI 位点,即可克隆得到含 L-vFc_{v2} 序列的质粒, pL-vFc_{v2}。其所含 L-vFc_{v2} 基因的序列可用 DNA 测序验证。

[0090] 3 制备 hGH-L-vFc_{v2} 融合基因

[0091] hGH-L-vFc_{v2} 融合基因的制备方法如下:用 HindIII 和 BamHI 从 pHGH 质粒上切下 hGH 片段,然后用琼脂糖凝胶电泳纯化。另一方面将 pL-vFc_{v2} 质粒用 HindIII 和 BamHI 切开并用琼脂糖凝胶电泳纯化。其后将纯化的 hGH 片段插入 pL-vFc_{v2} 质粒肽接头的 5' 末端,得到 pHGH-L-vFc_{v2} 质粒。该融合基因含有完整的 hGH、Gly-Ser 肽接头和 Fc_{v2} 变体基因。

[0092] 在 hGH 和 Fc 部分间存在的肽接头,增加了 hGH 区域的柔性,因而提高了其生物活性 (参见,例如美国专利 No. 6, 797, 493 和 6, 900, 292)。对本发明而言,优选的肽接头是长度含有约 20 个或较少的氨基酸;而使用的氨基酸可含有 2 种或更多选自以下的氨基酸:甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸。常见的肽接头范例之一是含有 Gly-Ser 肽构建板块的肽接头,如 GlyGlyGlyGlySer。

[0093] 4. 构建 hGH-L-vFc 融合蛋白表达载体

[0094] 为表达 hGH-L-vFc 融合蛋白,需将 hGH-L-vFc 融合蛋白的完整基因编码插入哺乳动物表达载体如 pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。方法是将 pHGH-L-vFc_{v2} 质粒从 HindIII 和 EcoRI 位点切下 hGH-L-vFc 片段,然后用琼脂糖凝胶电泳纯化。另一方面将表达载体用 HindIII 和 EcoRI 切开并用琼脂糖凝胶电泳纯化。其后将纯化的 hGH-L-vFc 片段插入切后的表达载体,得到最终的表达载体质粒 (称为 pGFP2)。此 pGFP2 含有在哺乳动物细胞中高水平表达所需的巨细胞病毒早期基因启动子及增强子。该质粒还含有可选择性标记基因,从而可赋予被转染的细菌中氨苄青霉素抗性,而在被转染的哺乳动物细胞中赋予 G418 抗性。另外,当宿主细胞,如仓鼠卵巢细胞 (Chinese Hamster Ovary, CHO),的二氢叶酸还原酶 (Dihydrofolate reductase, DHFR) 基因表达有缺陷时,pGFP2 表达载体含有 DHFR 基因,从而能在氨甲蝶呤 (Methotrexate, MTX) 存在下共同扩增被转染细胞内的 hGH-L-vF₂

融合基因和 DHFR 基因（参见，例如美国专利 No. 4, 399, 216），从而提高 hGH-L-vF_{v2} 融合蛋白的表达水平。

[0095] 图 2 显示了 pGFP 表达载体内 hGH-L-vFc_{v2} 融合基因 (SEQ ID NO :17) 和推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO :18)，它含有前导肽 (-26 到 -1 位氨基酸)、hGH 的序列 (氨基酸残基 1 到 191)、16 个氨基酸的肽接头 (GlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer) (氨基酸残基 192 到 207) 和 Fc_{v2}Pro331Ser 变体的序列 (下划线标出)。

[0096] 实施例 2 构建编码 hGH-L-vFc_{v4} 融合蛋白编码的基因

[0097] 由于绞链区域中重链间二硫键的解离，一部分的人 IgG4 会解离而形成被认为是半抗体的分子。这种情况在其它三种人 IgG 同种型分子中通常不会发生。文献显示，在 IgG1 和 IgG2 中的 228 位点为 Pro，而在 IgG4 该位点为 Ser228。将 IgG4 的 Ser228 残基用 Pro 作单氨基酸取代，可使 IgG4 保持完整的抗体分子 (参见 Angal 等, Molec. Immunol., 30 : 105-108, 1993 ; Owens 等, Immunotechnology, 3 : 107-116, 1997 ; 美国专利 No. 6, 204, 007)。另外，将 Fc_{v4} 进行 Leu235Ala 突变，可使此 Fc_{v4} 变体降低与 Fc γ R 的结合力。此种突变，加上前述 Ser228Pro 突变，将会使得融合蛋白在纯化时更能获得均匀、完整的制备物。

[0098] 构建含 hGH-L-vFc_{v4} 融合蛋白编码基因的方法如下：

[0099] 用从人白细胞制备的 RNA 和合适的 5' 引物 (SEQ ID NO :8) 和 3' 引物 (SEQ ID NO :9)，通过逆转录和 PCR 得到含人 IgG4 的 Fc 区域 (Fc_{v4}) 编码的基因片段。接下来将得到的含有 IgG4 的绞链、CH 和 CH3 区域完整序列的 Fc_{v4} 的 DNA 片段作为模板，进行 Ser228Pro 和 Leu235Ala 突变程序以产生 Fc_{v4} 变体 (vFc_{v4})，在这过程中 Ser228 和 Leu235 将分别被 Pro 和 Ala 替代。在此突变过程，首先用 3' 引物 (SEQ ID NO :9) 和含有 Leu235Ala 突变的 5' 引物 (SEQ ID NO :10) 以 PCR 扩增 CH2 和 CH3 区域。其次用 SEQ ID NO :12 作为 5' 引物和 SEQ ID NO :9 作为 3' 引物，在 PCR 中将这种扩增的片段与合成的长度为 60 个碱基且含 Ser228Pro 和 Leu235Ala 突变的寡核苷酸 (SEQ ID NO :11) 连接起来。SEQ ID NO :12 引物含有 16 氨基酸 Gly-Ser 肽接头 (包括 BamHI 位点) 的编码序列。PCR 连接后得到的 DNA 片段长度约为 700bp，并含 BamHI 和 EcoRI 内切酶位点。将此 DNA 片段以 BamHI 和 EcoRI 内切酶切除并用琼脂糖凝胶电泳纯化后，插入同样以 BamHI 和 EcoRI 内切酶切开的接受载体，可克隆到含 L-vFc_{v4} 的质粒，pL-vFc_{v4}。该质粒中 L-vFc_{v4} 基因的序列可用 DNA 测序验证。

[0100] 其次，在制备 hGH-L-vFc_{v4} 融合基因时，用 HindIII 和 BamHI 从 pHGH 质粒上切下 hGH 片段，然后用琼脂糖凝胶电泳纯化。另一方面将 pL-vFc_{v4} 质粒用 HindIII 和 BamHI 切开并用琼脂糖凝胶电泳纯化。其后将纯化的 hGH 片段插入 pL-vFc_{v4} 质粒肽接头的 5' 末端，得到 pHGH-L-vFc_{v4} 质粒。该融合基因含有完整的 hGH、16 个氨基酸的 Gly-Ser 肽接头和 Fc_{v4} 变体基因。最后将 pHGH-L-vFc_{v4} 质粒从 HindIII 和 EcoRI 位点切下 hGH-L-vFc 片段，然后用琼脂糖凝胶电泳纯化。另一方面将表达载体用 HindIII 和 EcoRI 切开并用琼脂糖凝胶电泳纯化。其后将纯化的 hGH-L-vFc 片段插入切后的表达载体，得到最终的表达体质粒，命名为 pGFP4。

[0101] 图 3 显示了 pGFP 表达载体内 hGH-L-vFc_{v4} 融合基因 (SEQ ID NO :19) 和推导的融合蛋白序列 (SEQ ID NO :20)，它含有前导肽 (氨基酸残基 -26 到 -1)、hGH 序列 (氨基酸残基 1 到 191)、16 个氨基酸的肽接头 (GlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer) (氨基酸残基 192 到 207) 和具有 Ser228Pro 和 Leu235Ala 突变的 Fc_{v4} 变体的融合基因

(下划线标出)。

[0102] 实施例 3 构建编码 hGH-L-vFc_{v1} 融合蛋白编码的基因

[0103] 人 IgG1 重链的绞链区域含有包括 3 个半胱氨酸的 15 个氨基酸残基 (GluProLysSerCysAspLysThrHisThrCysProProCysPro)。在这 3 个半胱氨酸残基中,第 2 和第 3 个参与两个重链间二硫键的形成。第 1 个半胱氨酸残基参与与 IgG 轻链的二硫键结合。由于 Fc 融合蛋白分子中没有轻链,该半胱氨酸残基可能与其它半胱氨酸残基配对,而导致非特异性二硫键结合。要防止这种非特异性二硫键结合,可以将 Fc_{v1} 的绞链区域切短,以消除第 1 个半胱氨酸残基 (AspLysThrHisThrCysProProCysPro)。用从人白细胞制备的 RNA 和合适的 5' 引物 (SEQ ID NO:13) 和 3' 引物 (SEQ ID NO:4),通过逆转录和 PCR 得到含 Fc_{v1} 区域编码的基因。将得到的含有 Fc_{v1} 截短的绞链区域和 CH2 及 CH3 完整序列的 DNA 片段用作模板,来进行 Leu234Val、Leu235Ala 和 Pro331Ser 三重位点突变以产生 Fc_{v1} 变体 (vFc_{v1})。

[0104] 引导这些突变的方法如下:先制备两个含有上述位点突变的 DNA 片段,然后用天然 Fc_{v1} 作为模板在重叠 PCR 中将它们组装起来。第一个片段,5' 片段,系用 SEQ ID NO:14 作为 5' 引物并用 SEQ ID NO:5 作为 3' 引物制成。此 5' 引物含有 Leu234Val、Leu235Ala 突变,3' 引物含有 Pro331Ser 突变。第二个片段,3' 片段,可用 SEQ ID NO:6 作为 5' 引物并用 SEQ ID NO:4 作为 3' 引物制成。其次,用 SEQ ID NO:14 作为 5' 引物和 SEQ ID NO:4 作为 3' 引物,将 5' 和 3' 片段在覆盖 Pro331Ser 突变的区域连接起来。最后,用 SEQ ID NO:16 作为 5' 引物、SEQ ID NO:4 作为 3' 引物,通过 PCR 将此扩增的长度约 650bp 的片段和合成的 55 碱基的寡核苷酸 (SEQ ID NO:15) (含有 Leu234Val 和 Leu235Ala) 连接起来。SEQ ID NO:16 引物含有 16 个氨基酸 Gly-Ser 肽接头 (包括 BamHI 位点) 的编码序列。将得到的长度约为 700bp 的 DNA 片段经 BamHI 和 EcoRI 切开并用琼脂糖凝胶电泳纯化后,插入接受载体的 BamHI 和 EcoRI 位点,可克隆到 pL-vFc_{v1} 质粒。该基因的序列可用 DNA 测序验证。

[0105] 要制备 hGH-L-vFc_{v1} 融合基因,可先用 HindIII 和 BamHI 从 pHGH 质粒上切下 hGH 片段、纯化后,再插入 pL-vFc_{v1} 质粒肽接头的 5' 末端 (同样用 HindIII 和 BamHI 切开并纯化),得到 pHGH-L-vFc_{v1} 质粒。此融合基因含有 hGH,16 个氨基酸 Gly-Ser 肽接头和 Fc_{v1} 变体基因。此 hGH-L-vFc_{v1} 融合基因片段经 HindIII 和 EcoRI 切开并用琼脂糖凝胶电泳纯化后,可插入哺乳动物表达载体的 HindIII 和 EcoRI 位点。所得到的最终表达的载体质粒命名为 pGFP1。

[0106] 图 4 显示了 pGFP 表达载体内 hGH-L-vFc_{v1} 融合基因序列 (SEQ ID NO:21) 和推导的融合蛋白序列 (SEQ ID NO:22),它含有前导肽 (氨基酸残基 -26 到 -1)、hGH 序列 (氨基酸残基 1 到 191)、16 个氨基酸肽接头 (GlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer) (氨基酸残基 192 到 207) 和具有 Ser234Val、Leu235Ala 和 Pro331Ser 突变的 Fc_{v1} 变体的融合基因 (下划线标出)。

[0107] 实施例 4 融合蛋白于转染细胞株中的表达

[0108] 为实现融合蛋白的表达,可将重组 pGFP1、pGFP2 或 pGFP4 表达载体质粒转染入哺乳动物宿主细胞株,以表达 hGH-L-vFc 融合蛋白。为了获得稳定、高水平的表达,优选的宿主细胞株是具 DHFR 酶缺陷的 CHO 细胞 (参见,例如美国专利 No. 4,818,679)。优选的转染方法是电穿孔。其它方法,包括磷酸钙共沉淀、脂转染和原生质融合也可以使用。转染时先在

比色皿内放置 $2-5 \times 10^7$ 个细胞, 随后加入 $10 \mu\text{g}$ 用 BspCI 线性化的质粒 DNA, 均匀混合, 然后放置于电穿孔仪器中 (Gene Pulser Electroporator, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 将电压设置在 250V 电容设置在 $960 \mu\text{F}$ 行使电穿孔。在转染 2 天后, 将培养基改成含 0.8mg/ml G418 的生长培养基。转染约 2 周后, 对 G418 药物具有抗性的转染子可长成肉眼可见的细胞群落 (克隆)。此时可用抗人 IgG Fc 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 筛选分泌融合蛋白的转染子。此外, 通过 ELISA 也可用抗 hGH 试验进行对表达的融合蛋白作定量分析。在选定融合蛋白较高表达的转染子后, 通过在 96 孔板上极限稀释, 亚克隆这些产生高水平 Fc 融合蛋白的细胞群落。

[0109] 为了使选定并经过亚克隆的转染子细胞克隆达到融合蛋白较高水平的表达, 适宜的方法是与 DHFR 基因共扩增的程序来增加融合蛋白的基因数量。通常, 基因数量增加, 融合蛋白的表达量会随之增高。在含有递增浓度 MTX 的生长培养基中, DHFR 酶的活性受 MTX 药物抑制而不能正常合成核苷, 细胞的正常生长因而受到影响。细胞为克服此 MTX 药物的抑制必需扩增 DHFR 酶的基因数以产生更多的酶让细胞维持正常生长。转染的融合蛋白基因与 DHFR 基因相邻, 因此在 DHFR 基因扩增的过程会与 DHFR 基因共同扩增。经过递增浓度 MTX 的逐步筛选, 选出能在高达 $1 \mu\text{g/ml}$ MTX 培养基中生长的转染子, 再次通过极限稀释法进行亚克隆。通过测定分泌率, 对亚克隆的细胞株进行进一步的分析, 最后选出几个分泌率水平超过约 10 (较佳地约 30) $\mu\text{g}/10^6$ (百万) 个细胞 /24 小时的细胞株。将这些选出的细胞株使用无血清生长培养基培养, 让其逐渐适应于悬浮培养。这些细胞在生长过程中会分泌融合蛋白于培养基中, 可用之纯化融合蛋白。

[0110] 其中之一细胞株, 定号 9-10-39, 可以 $20 \mu\text{g}/10^6$ (百万) 个细胞 /24 小时的速率分泌 hGH-LvFc_{v2}。培养液内 hGH-LvFc_{v2} 融合蛋白的浓度用 ELISA 定量分析测定, 以纯化之 hGH-LvFc_{v2} 融合蛋白作标准溶液。将细胞株 9-10-39 在 100 毫升的旋转培养瓶逐步适应成悬浮细胞培养。

[0111] 图 5 显示在 100 毫升的旋转培养瓶内, 此细胞株的生长曲线及其分泌 hGH-LvFc_{v2} 融合蛋白的浓度。十二天后, 培养液内之融合蛋白之浓度可累积至约 1 克 / 升 (g/L)。

[0112] 实施例 5 融合蛋白的纯化和定性

[0113] 用 1N NaOH 将含有 hGH-L-vFc 融合蛋白的条件培养基滴定到 pH 7 到 8, 然后用 $0.45 \mu\text{m}$ 的硝酸纤维素过滤器过滤。将滤液加样到磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 平衡的 Prosep A 柱上。待融合蛋白结合于 Prosep A 后, 弃去流穿组分。用 PBS 洗涤该柱, 直到 280nm 处的 OD 值低于 0.01。然后用 0.1M pH3.75 的柠檬酸缓冲液洗脱结合的融合蛋白。用 0.4 体积的 1M K₂HPO₄ 中和, 合并含有纯化蛋白的组分, 并用 PBS 透析。然后溶液用 $0.22 \mu\text{m}$ 的硝酸纤维素过滤器过滤, 并存储在 4°C。在非还原条件下, 由 SDS-PAGE 测得纯化的 hGH-L-vFc 蛋白质的分子量范围为 90 到 100kDa。在还原条件下, 纯化的蛋白迁移至约 50kDa。用 BSA 作为标准, 通过 BCA 蛋白质分析定量该融合蛋白。

[0114] 实施例 6 体外生物活性分析

[0115] 体外生物活性可以用转染子或纯化蛋白质刺激大鼠淋巴瘤细胞 Nb2 细胞的增殖能力方法测定。虽然 Nb2 细胞的增殖是受到生长激素对细胞上的泌乳受体刺激而起反应, 但 Nb2 细胞增殖活性的测试可以用来评价生长激素的生物活性 (参见, 例如内田等人, J. Mol. Endocrinol., 23 :347-353, 1999)。

[0116] 测验开始约 48 小时之前,先将细胞转移到预检测培养基中 (RPMI 1640 培养基,含有 1% 马血清和 $50 \mu\text{mol}$ 的 β -巯基乙醇以减缓细胞增殖速度。保温培育后,收集细胞并以每毫升 4×10^5 个细胞的浓度悬浮在培养基。将每份 $50 \mu\text{l}$ 细胞样品加到 96 孔组织培育板的各孔中。用 $50 \mu\text{l}$ 含有 0.01-100nM 各种浓度 hGH-L-vFc 融合蛋白或 rhGH 对照的分析培养基培养这些细胞。在 37°C 、5% CO_2 湿润培养箱中培养该平板 48 小时,然后在各孔中添加 $20 \mu\text{l}$ 噻唑兰 (用 PBS 配制成 2.5mg/ml)。五小时后,在每孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 含有 10% SDS 的裂解液,封口膜密封后置 37°C 恒温箱中过夜,以溶解细胞和所形成的甲瓩。然后在 570nm 对该平板进行光密度读数,其中参考光束设为 630nm。将 OD 读数相对于 hGH-L-vFc 融合蛋白的浓度作图。由所得剂量反应曲线可测定 hGH-L-vFc 的生物活性。

[0117] 图 6 显示了 hGH-L-vFc_{v2} 纯化蛋白刺激 Nb2 细胞增殖的能力。由此图读出 S 形曲线的转折点,即可算出最大有效浓度的半数值 (half maximal effective concentration, EC_{50}) 为 1.2nM。按摩尔计,重组融合蛋白表现出的体外生物活性与 rhGH 类似。

[0118] 实施例 7 药物组合物制备

[0119] hGH-L-vFc 融合蛋白 $50 \mu\text{g}$

[0120] 生理盐水 1ml

[0121] 调节 pH 至 6.7-7.2

[0122] 得到含 hGH-L-vFc 融合蛋白的药物组合物。

[0123] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001]

序列表

- <110> 旭华(上海)生物研发中心有限公司
- <120> 长效重组人生长激素的Fc融合蛋白
- <130> P2011-0076
- <160> 22
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 37
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(37)
- <223> 引物
- <400> 1
- cccaagcttg gcgcggagat ggctacaggc tcccgga 37
- <210> 2
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(27)
- <223> 引物
- <400> 2
- cggatccgaa gccacagctg ccctcca 27
- <210> 3
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(21)
- <223> 引物
- <400> 3
- gtcgagtgcc caccgtgecc a 21
- <210> 4
- <211> 28
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(28)
- <223> 引物
- <400> 4
- ggaattctca ttaccggga gacaggga 28

[0002]

<210>	5	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(29)	
<223>	引物	
<400>	5	
	tggttttctc gatggagcct gggaggcct	29
<210>	6	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(29)	
<223>	引物	
<400>	6	
	aggcctccca gcctccatcg agaaaacca	29
<210>	7	
<211>	70	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(70)	
<223>	引物	
<400>	7	
	cggatccggg ggcggttccg gtggaggcgg aagcggcggg ggaggatcag tcgagtgcc	60
	accgtgccca	70
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(21)	
<223>	引物	
<400>	8	
	gagtcacaat atggtcccc a	21
<210>	9	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(1)..(28)	
<223>	引物	

[0003]

<400> 9 ggaattetca tttaccaga gacagga	28
<210> 10 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> misc_feature <222> (1)..(21) <223> 引物	
<400> 10 cctgagttcg cggggggacc a	21
<210> 11 <211> 60 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> misc_feature <222> (1)..(60) <223> 引物	
<400> 11 gagtccaaat atggtecccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcgc ggggggacca	60
<210> 12 <211> 70 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> misc feature <222> (1)..(70) <223> 引物	
<400> 12 cggatccggg ggcgggtccg gtggaggcgg aagcggcggg ggaggatcag agtccaaata	60
tggtcccca	70
<210> 13 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> misc_feature <222> (1)..(21) <223> 引物	
<400> 13 gacaaaactc acacatgcc a	21
<210> 14 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> misc_feature	

[0004]

<222> (1)..(23)	
<400> 14	
acctgaagtc gcggggggac cgt	23
<210> 15	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(55)	
<223> 引物	
<400> 15	
gacaaaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaag tcgcgggggg accgt	55
<210> 16	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(70)	
<223> 引物	
<400> 16	
cggatccggt ggcggttccg gtggaggcgg aagcggcggg ggaggatcag acaaaactca	60
cacatgccca	70
<210> 17	
<211> 1392	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(1392)	
<223> hGH-L-vFc Y 2的核苷酸序列	
<400> 17	
aagcttctag ctgcaatggc tacaggctcc cggacgtccc tgctcctggc ttttggcctg	60
ctctgectgc cctggcttca agagggcagt gccttcccaa ccattcccctt atccaggctt	120
tttgacaacg ctatgctccg cgcccatcgt ctgcaccage tggcctttga cacctaccag	180
gagtttgaag aagcctatal cccaaaggaa cagaagtatl callcctgca gaacccccag	240
acctccctct gtttctcaga gtctattccg acacctcca acagggagga aacacaacag	300
aaatccaacc tagagetget ccgatctcc ctgctgetca tccagtctgt gctggagccc	360
gtgcagtccc tcaggagtgt ctctgccaac agcctgggtg acggcgcctc tgacagcaac	420
gtctatgacc tcctaaagga cctagaggaa ggcatccaaa cgtgatggg gaggctgaa	480
gatggcagcc cccggactgg gcagatcttc aagcagacct acagcaagtt cgacacaaac	540
tcacacaacg atgacgcact actcaagaac tacgggctgc tctactgctt caggaaggac	600
atggacaagg tcgagacatt cctgcgcata gtgcagtgcc gctctgtgga gggcagctgt	660
ggcttgggat ccggtggggg ttccggtgga ggcggaagcg gcggtggagg atcagtcgag	720
tgcccaccgt gccacgacc acctgtggca ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa	780
ccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg	840
agccacgaag accccagagt ccagtccaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	900
gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcagct tccgtgtggt cagcgtctc	960
accgttctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa	1020
ggcctcccag cctccatcga gaaaaccate tccaaaacca aaggcgagcc ccgagaacca	1080
caggtgtaca ccttcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc	1140
tgcttggtca aaggttctta ccccagcagc atcgcctgtg agtgggagag caatgggcag	1200

[0005]

```

cgggagaaca actacaagac cacacctecc atgctggact ccgacggctc ctctctctc 1260
tacagcaagc tcacctgga caagacagg tggcagcagg ggaacgtett ctcatgctcc 1320
gtgatgcatg aggcctctgca caacctact acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt 1380
aatgagaat tc 1392

```

<210> 18
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(456)
 <223> hGH-L-vFc γ 2的氨基酸序列

 <400> 18

```

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1          5          10          15
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
20        25        30
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
35        40        45
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
50        55        60
Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
65        70        75        80
Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
85        90        95
Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
100       105       110
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
115       120       125
Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130       135       140
Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145       150       155       160
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
165       170       175
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
180       185       190
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
195       200       205
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
210       215       220
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
225       230       235       240
Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245       250       255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260       265       270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
275       280       285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290       295       300
Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
305       310       315       320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
325       330       335
Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
340       345       350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
355       360       365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

```

[0006]

```

          370              375              380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385              390              395              400
Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
          405              410              415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
          420              425              430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
          435              440              445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          450              455

```

- <210> 19
- <211> 1410
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(1410)
- <223> hGH L vFc γ 4的核苷酸序列

```

<400> 19
aagcttctag ctgcaatggc tacaggctcc cggacgtccc tgctcctggc ttttgccctg      60
ctctgcctgc cctggcttca agagggcagt gccttcccaa ccatccctt atccaggctt      120
tttgacaacg ctatgctccg cgcccatcgt ctgcaccagc tggcctttga cacctaccag      180
gagtttgaag aagcctatat cccaaaggaa cagaagtatt cattcctgca gaaccccag      240
acctccctct gtttctcaga gtctattccg acacctcca acagggagga aacacaacag      300
aaatccaace tagagctgct cgcgatctcc ctgctgctca tccagtcgtg gctggagccc      360
gtgcagttec tcaggagtgt cttcgccaac agcctggtgt acggcgctc tgacagcaac      420
gtctatgacc tctaaagga cctagaggaa ggcattccaa cgctgatggg gaggctggaa      480
gatggcagcc cccggactgg gcagatcttc aagcagacct acagcaagt cgacacaaac      540
tcacacaacg atgacgcact actcaagaac tacgggctgc tctactgctt caggaaggac      600
atggacaagg tcgagacatt cctgcgcatc gtgcagtgcc gctctgtgga gggcagctgt      660
ggcttcggat ccggtggcgg ttccgggtgga ggcggaagcg gcggtggagg atcagagtcc      720
aaatatggtc ccccatgccc accatgccc gacactgagt tcgctggggg accatcagtc      780
ttctgttcc ccccaaac caaggacct ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaag      840
tgcgtggtgg tggactgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat      900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgctggagg agcagttcaa cagcacgtac      960
cgtgtggtca gcgtctcac cgtcctgeac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag     1020
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa     1080
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag     1140
aaccaggtca gcctgacctg cctggtaaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcctgggag     1200
tgaggagaca atgggcagcc ggagacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc     1260
gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg     1320
aatgtcttct catgctcctg gatgatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc     1380
ctctccctgt ctctgggtaa atgagaattc     1410

```

- <210> 20
- <211> 462
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(462)
- <223> hGH-L-vFc γ 4的氨基酸序列

```

<400> 20
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1              5              10              15
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
          20              25              30

```

[0007]

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 35 40 45
 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 50 55 60
 Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
 65 70 75 80
 Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
 100 105 110
 Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
 115 120 125
 Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
 130 135 140
 Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
 145 150 155 160
 Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
 165 170 175
 His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
 180 185 190
 Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
 195 200 205
 Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 290 295 300
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 305 310 315 320
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 325 330 335
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 355 360 365
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 370 375 380
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 405 410 415
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450 455 460

<210> 21
 <211> 1404
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1404)
 <223> hGII-L-vFc Y 1的核苷酸序列

[0008]

```

<400> 21
aagcttctag ctgcaatggc tacaggtccc cggacgtccc tgctcctgge ttttgccctg      60
ctctgacctc cctggttcca agagggcagt gccttcccaa ccattccett atccaggctt      120
tttgacaacg ctatgctccg cgcctatcgt ctgcaccagc tggcctttga cacctaccag      180
gagtttgaag aagcctatat cccaaaggaa cagaagtatt cattcctgca gaacccccag      240
acctccclcl gtlclclaga glclalclcg acacclccca acagggagga aacacaacag      300
aatccaacc tagagctgct cgcacatccc ctgctgctca tccagtcgtg gctggagccc      360
gtgcagttcc acaggagtgt cttcgccaac agcctggtgt acggcgcctc tgacagcaac      420
gtctatgacc tcctaaagga cctagaggaa ggcattcaaa cgctgatggg gaggctggaa      480
gatggcagcc cccggactgg gcagatcttc aagcagacct acagcaagtt cgacacaaac      540
tcacacaacg atgacgcact actcaagaac tacgggctgc tctactgctt caggaaggac      600
atggacaagg tcgagacatt cctgcgcata gtgcagtgcc gctctgtgga gggcagctgt      660
ggcttcggat ccggtggcgg ttccgggtgga ggcggaagcg gcggtggagg atcagacaaa      720
actcaacact gccaccctg cccagcacct gaagtcgegg ggggaccctc agtcttctc      780
ttcccaccaa aacccaagga caccctcatg atctccgga cacctgaggt cacatgcgtg      840
gtggtggcag tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg      900
gaggtgcata atgccaagac aaagccggcg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg      960
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtgatgac gcaaggagta caagtgaag      1020
gtctcaaca aagcctccc agcctccatc gagaaaacca tctcaaagc caaaggcag      1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatccggg atgagctgac caagaaccag      1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatgcctg ggagtgggag      1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc      1260
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaaccgc      1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacctctccc      1380
ctgtctccgg gtaaatgaga attc                                          1404
    
```

```

<210> 22
<211> 460
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(460)
<223> hGH-L-vFc γ 1的氨基酸序列
    
```

```

<400> 22
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1          5          10          15
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
20        25        30
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
35        40        45
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
50        55        60
Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
65        70        75        80
Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
85        90        95
Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
100       105       110
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
115       120       125
Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130       135       140
Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145       150       155       160
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
165       170       175
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
180       185       190
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
    
```

[0009]

		195						200						205			
Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
		210					215					220					
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro		
225						230				235					240		
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe		
						245				250				255			
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val		
			260					265					270				
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe		
			275					280					285				
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro		
290						295					300						
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr		
305					310					315					320		
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val		
				325					330					335			
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala		
			340					345					350				
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg		
			355					360					365				
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly		
370						375					380						
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro		
385					390					395					400		
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser		
				405					410					415			
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln		
			420					425					430				
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His		
		435					440					445					
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
450						455						460					

人 IgG 同种型	氨基酸位置				
	228.....234	235	236	237.....330	331
G1	Pro.....Leu	Leu	Gly	Gly.....Ala	Pro
G2	Pro.....Val	Ala	Gly.....Ala	Pro
G4	Ser.....Phe	Leu	Gly	Gly.....Ser	Ser
G1 变体	Pro..... <i>Val</i>	<i>Ala</i>	Gly	Gly.....Ala	<i>Ser</i>
G2 变体	Pro.....Val	Ala	Gly.....Ala	<i>Ser</i>
G4 变体	<i>Pro</i>Phe	<i>Ala</i>	Gly	Gly.....Ser	Ser

图 1

```

aag ctt cta gct gca atg gct aca ggc tcc cgg acg tcc ctg ctc ctg gct ttt ggc ctg 60
HindIII      M A T G S R T S L L L A F G L
-26
ctc tgc ctg ccc tgg ctt caa gag ggc agt gcc ttc cca acc att ccc tta tcc agg ctt 120
L C L P W L Q E G S A F P T I P L S R L
-10
ttt gac aac gct atg ctc cgc gcc cat cgt ctg cac cag ctg gcc ttt gac acc tac cag 180
F D N A M L R A H R L H Q L A F D T Y Q
10
gag ttt gaa gaa gcc tat atc cca aag gaa cag aag tat tca ttc ctg cag aac ccc cag 240
E F E E A Y I P K E Q K Y S F L Q N P Q
30
acc tcc ctc tgt ttc tca gag tct att ccg aca ccc tcc aac agg gag gaa aca caa cag 300
T S L C F S E S I P T A P S N R E E T Q Q
50
aaa tcc aac cta gag ctg ctc cgc atc tcc ctg ctg ctc atc cag tgc tgg ctg gag ccc 360
K S N L E L L R I S L L I Q S W L E P
70
gtg cag ttc ctc agg agt gtc ttc gcc aac agc ctg gtg tac ggc gcc tct gac agc aac 420
V Q F L R S V F A N S L V Y G A S D S N
90
gtc tat gac ctc cta aag gac cta gag gaa ggc atc caa acg ctg atg ggg agg ctg gaa 480
V Y D L L A K D L E E G I C A T L M G R L E
110
gat ggc agc ccc cgg act ggg cag atc ttc aag cag acc tac agc aag ttc gac aca aac 540
D G S P R T G G Q I F K Q T Y S K F D T N
130
tca cac aac gat gac gca cta ctc aag aac tac ggg ctg ctc tac tgc ttc agg aag gac 600
S H N D D A L L K N Y G L L Y C F R K D
150
atg gac aag gtc gag aca ttc ctg cgc atc gtg cag tgc cgc tct gtg gag ggc agc tgt 660
M D K V E T F L R I V Q C R S V E G S C
170
ggc ttc gga tcc ggt ggc ggt tcc ggt gga ggc gga agc ggc ggt gga gga tca gtc gag 720
G F G S G G G S G G G G G S G G G S V E
190
tgc cca ccg tgc cca gca cca cct gtg gca gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa 780
C P P C P A C P P V A G P S V F L F P P K
210
ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg 840
P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V
230
agc cac gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat 900
S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N
250
gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt gtg gtc agc gtc ctc 960
A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L
270
acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa 1020
T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K
290
ggc ctc cca gcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca 1080
G L P A S I E K T I S K T K G Q P R E P
310
cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc 1140
Q V Y T L P P S R E M T K N Q V S L T
330
tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag 1200
C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q
350
ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc 1260
P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L
370
tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc 1320
Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F T S C S
390
gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt 1380
V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
410
aaa tga gaa ttc 1392
K EcoRI
430

```

图 2

aag ctt cta gct gca atg gct aca ggc tcc cgg acg tcc ctg ctc ctg gct ttt ggc ctg HindIII M -26	60
ctc tgc ctg ccc tgg ctt caa gag ggc agt gcc ttc cca acc att ccc tta tcc agg ctt L C L P W L Q E G S A F P T I P L S R L -10	120
ttt gac aac gct atg ctc cgc gcc cat cgt ctg cac cag ctg gcc ttt gac acc tac cag F D N A M L R A H R L H Q L A F D T Y Q 10	180
gag ttt gaa gaa gcc tat atc cca aag gaa cag aag tat tca ttc ctg cag aac ccc cag E F E E A Y I P K E Q K Y S F L Q N P Q 30	240
acc tcc ctc tgt ttc tca gag tct att ccg aca ccc tcc aac agg gag gaa aca caa cag T S L C F S E S I P T P S N R E E T Q Q 50	300
aaa tcc aac cta gag ctg ctc cgc atc tcc ctg ctg ctc atc cag tgc tgg ctg gag ccc K S N L E L L R I S L L L I Q S W L E P 70	360
gtg cag ttc ctc agg agt gtc ttc gcc aac agc ctg gtg tac ggc gcc tct gac agc aac V Q F L R S V F A N S L V Y G A S D S N 90	420
gtc tat gac ctc cta aag gac cta gag gaa ggc atc caa acg ctg atg ggg agg ctg gaa V Y D L L K D L E E G I Q T L M G R L E 110	480
gat ggc agc ccc cgg act ggg cag atc ttc aag cag acc tac agc aag ttc gac aca aac D G S P R T G Q I F K Q T Y S K F D T N 130	540
tca cac aac gat gac gca cta ctc aag aac tac ggg ctg ctc tac tgc ttc agg aag gac S H N D D A L L K N Y G L L Y C F R K D 150	600
atg gac aag gtc gag aca ttc ctg cgc atc gtg cag tgc cgc tct gtg gag ggc agc tgt M D K V E T F L R I V Q C R S V E G S C 170	660
ggc ttc gga tcc ggt ggc ggt tcc ggt gga ggc gga agc ggc ggt gga gga tca gagtcc G F G S G G G S G G G G G S G G G G S E S 190	720
aaa tat ggt ccc cca tgc <u>cca</u> cca tgc cca gca cct gag ttc <u>gag</u> ggg gga cca tca gtc K Y G P P C <u>P</u> P C P A P E F <u>A</u> G G P S V 210	780
ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T 230	840
tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D 250	900
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc acg tac G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y 270	960
cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K 290	1020
tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K 310	1080
ggg cag ccc cga gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K 330	1140
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E 350	1200
tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S 370	1260
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G 390	1320
aat gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S 410	1380
ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tga gaa ttc L S L S L G K EcoRI 430	1410

图 3

aag ctt cta gct gca atg gct aca ggc tcc cgg acg tcc ctg ctc ctg gct ttt ggc ctg HindIII M -26	60
ctc tgc ctg ccc tgg ctt caa gag ggc agt gcc ttc cca acc att ccc tta tcc agg ctt L C L P W L Q E G S A F P T I P L S R L -10	120
ttt gac aac gct atg ctc cgc gcc cat cgt ctg cac cag ctg gcc ttt gac acc tac cag F D N A M L R A H R L H Q L A F D T Y Q 10	180
gag ttt gaa gaa gcc tat atc cca aag gaa cag aag tat tca ttc ctg cag aac ccc cag E F E E A Y I P K E Q K Y S F L Q N P Q 30	240
acc tcc ctc tgt ttc tca gag tct att ccg aca ccc tcc aac agg gag gaa aca caa cag T S L C F S E S I P T P S N R E E T Q Q 50	300
aaa tcc aac cta gag ctg ctc cgc atc tcc ctg ctg ctc atc cag tgc tgg ctg gag ccc K S N L E L L R I S L L L I Q S W L E P 70	360
gtg cag ttc ctc agg agt gtc ttc gcc aac agc ctg gtg tac ggc gcc tct gac agc aac V Q F L R S V F A N S L V Y G A S D S N 90	420
gtc tat gac ctc cta aag gac cta gag gaa ggc atc caa acg ctg atg ggg agg ctg gaa V Y D L L K D L E E G I Q T L M G R L E 110	480
gat ggc agc ccc cgg act ggg cag atc ttc aag cag acc tac agc aag ttc gac aca aac D G S P R T G Q I F K Q T Y S K F D T N 130	540
tca cac aac gat gac gca cta ctc aag aac tac ggg ctg ctc tac tgc ttc agg aag gac S H N D D A L L K N Y G L L Y C F R K D 150	600
atg gac aag gtc gag aca ttc ctg cgc atc gtg cag tgc cgc tct gtg gag ggc agc tgt M D K V E T F L R I V Q C R S V E G S C 170	660
ggc ttc gga tcc ggt ggc ggt tcc ggt gga ggc gga agc ggc ggt gga gga tca gac aaa G F G S G G G S G G G G S G G G G S D K 190	720
act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gtc ggc ggg gga ccg tca gtc ttc ctc T H T C P P C P A P E V A G G G G P S V F L 210	780
ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg aca cct gag gtc aca tgc gtg F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V 230	840
gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V 250	900
gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V 270	960
gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K 290	1020
gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q 310	1080
ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q 330	1140
gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E 350	1200
agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G 370	1260
tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V 390	1320
ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 410	1380
ctg tct ccg ggt aaa tga gaa ttc L S P G K tga gaa ttc EcoRI 430	1404

图 4

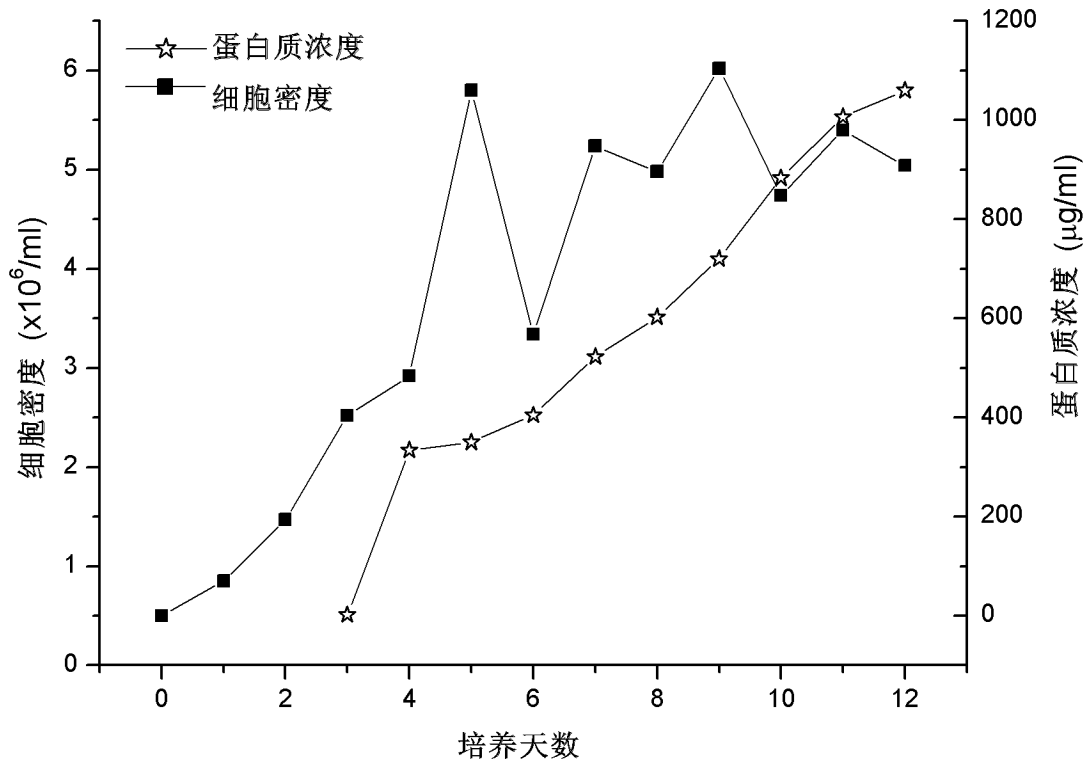


图 5

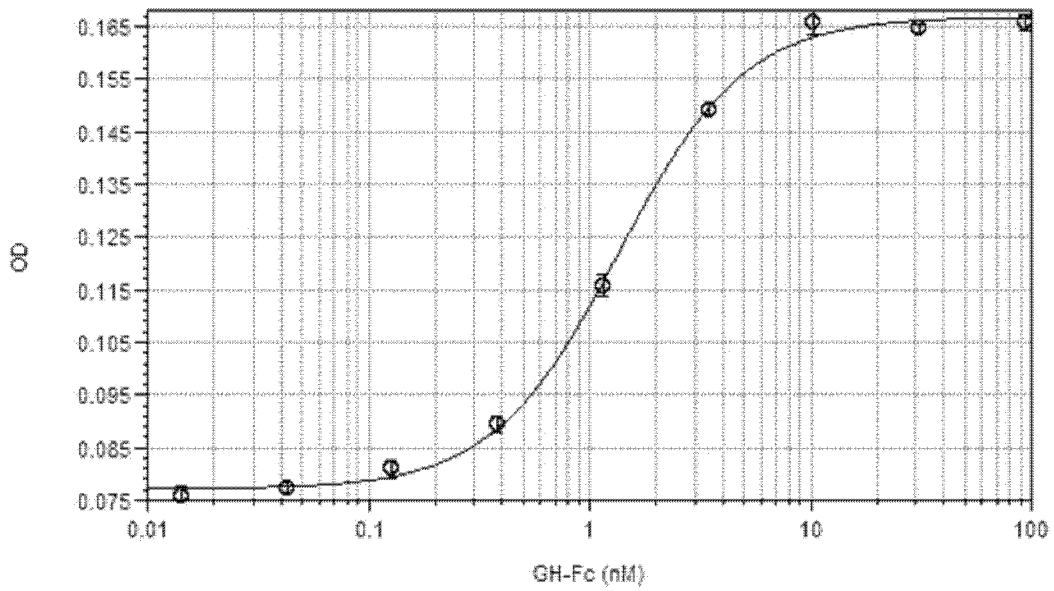


图 6