

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/46 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02804341.3

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1293098C

[22] 申请日 2002.7.26 [21] 申请号 02804341.3

[30] 优先权

[32] 2001. 7. 26 [33] KR [31] 2001 - 45028

[86] 国际申请 PCT/KR2002/001427 2002.7.26

[87] 国际公布 WO2003/010202 英 2003.2.6

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.30

[73] 专利权人 梅德克斯金株式会社

地址 韩国首尔

[72] 发明人 郑用勳 韩志雄 李惠子 崔恩英

金真美

[56] 参考文献

US5073627A 1991.12.17 C07K13/00

US5861151A 1999.6.19 C07K19/00

EP0464533A 1991.6.22 C07K15/06

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利

商标事务所

代理人 李华英

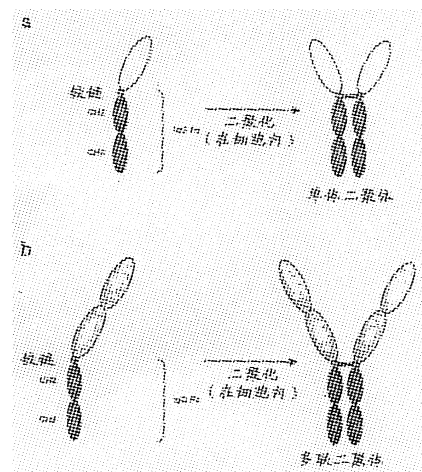
权利要求书 4 页 说明书 159 页 附图 23 页

[54] 发明名称

多联免疫粘附

[57] 摘要

本发明公开了包含两个可溶性结构域的多联蛋白，其中生物活性蛋白的一个可溶性结构域的 C 末端与生物活性蛋白的相同可溶性结构域或不同可溶性结构域的 N 末端相连。另外，本发明还公开了二聚蛋白，其通过在两个单体蛋白的铰链区形成分子间二硫键而形成，所述单体蛋白是通过将参与免疫应答的蛋白的两个相同可溶性胞外结构域的多联体与免疫球蛋白 Fc 片段相连而形成，还公开了二聚蛋白的糖基化蛋白，编码该单体蛋白的 DNA 构建体，含有该 DNA 构建体的重组表达质粒，由该重组表达质粒所转化的或转染的宿主细胞，以及通过培养该宿主细胞制备该二聚蛋白的方法。另外，本发明还公开了包含该二聚蛋白或其糖基化形式的药物或诊断组合物。



1. 包含两个单体蛋白的多联融合二聚蛋白，该单体蛋白是通过将参与免疫应答的蛋白的两个相同可溶性胞外结构域的多联体与免疫球蛋白分子 Fc 片段的铰链区相连而形成的，其中所述单体蛋白通过在铰链区的分子间二硫键而连接到一起，并且该二聚蛋白具有改进的稳定性和治疗效果。

2. 权利要求 1 的多联融合二聚蛋白，其中所述免疫球蛋白分子是 IgG。

3. 权利要求 1 的多联融合二聚蛋白，其中所述参与免疫应答的蛋白选自：细胞因子，细胞因子受体，粘附分子，肿瘤坏死因子受体，受体酪氨酸激酶，趋化因子受体，以及含有可溶性胞外结构域的其他细胞表面蛋白。

4. 权利要求 3 的多联融合二聚蛋白，其中所述蛋白选自：IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-17, TNF, TGF, IFN, GM-CSF, G-CSF, EPO, TPO, M-CSF, GHR, IL-13R, IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, TNFR, TGFR, IFNR, 干扰素- α R, - β R, 和 - γ R, GM-CSFR, G-CSFR, EPOR, cMpl, gp130, Fas(Apo 1), CCR1, CXCR1-4, TrkA, TrkB, TrkC, Htk, REK7, Rse/Tyro-3, 肝细胞生长因子 R, 血小板衍生生长因子 R, Flt-1, CD2, CD4, CD5, CD6, CD22, CD27, CD28, CD30, CD31, CD40, CD44, CD100, CD137, CD150, LAG-3, B7, B61, β -neurexin, CTLA-4, ICOS, ICAM-1, 补体 R-2(CD21), IgER, 溶酶体膜 gp-1, α 2-微球蛋白受体相关蛋白, 和钠释放肽 R。

5. 权利要求 1 的多联融合二聚蛋白，其中所述单体蛋白具有 SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列。

6. 编码单体蛋白的 DNA 构建体，该单体蛋白是通过将参与免疫应答的蛋白的两个相同可溶性胞外结构域的多联体与免疫球蛋白分

子 Fc 片段铰链区相连而形成的。

7. 权利要求 6 的 DNA 构建体,其中所述免疫球蛋白分子是 IgG。

8. 权利要求 6 的 DNA 构建体,其中所述参与免疫应答的蛋白选自: 细胞因子, 细胞因子受体, 粘附分子, 肿瘤坏死因子受体, 受体酪氨酸激酶, 趋化因子受体, 以及含有可溶性胞外结构域的其他细胞表面蛋白。

9. 权利要求 8 的 DNA 构建体,其中所述蛋白选自: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-17, TNF, TGF, IFN, GM-CSF, G-CSF, EPO, TPO, M-CSF, GHR, IL-13R, IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, TNFR, TGFR, IFNR, 干扰素- α R, - β R, 和- γ R, GM-CSFR, G-CSFR, EPOR, cMpl, gp130, Fas(Apo 1), CCR1, CXCR1-4, TrkA, TrkB, TrkC, Htk, REK7, Rse/Tyro-3, 肝细胞生长因子 R, 血小板衍生生长因子 R, Flt-1, CD2, CD4, CD5, CD6, CD22, CD27, CD28, CD30, CD31, CD40, CD44, CD100, CD137, CD150, LAG-3, B7, B61, β -neurexin, CTLA-4, ICOS, ICAM-1, 补体 R-2(CD21), IgER, 溶酶体膜 gp-1, α 2-微球蛋白受体相关蛋白, 和钠释放肽 R。

10. 权利要求 6 的 DNA 构建体,其中所述 DNA 构建体含有 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 19 的核苷酸序列。

11. 包含权利要求 6 的 DNA 构建体的重组表达质粒, 所述构建体与其可操作连接。

12. 权利要求 11 的重组表达质粒, 其中所述重组表达质粒是 pTR11-Top10'质粒 (保藏号: KCCM-10288), pTR22-Top10'质粒(保藏号: KCCM-10291), pCD22Ig 质粒 (保藏号: KCCM-10402), 或 pCT44Ig 质粒 (保藏号: KCCM-10400)。

13. 由权利要求 11 的重组表达质粒转化或转染的宿主细胞。

14. 权利要求 13 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

15. 权利要求 13 或 14 的宿主细胞, 其中所述重组表达质粒是 pTR11-Top10'质粒(保藏号: KCCM-10288), pTR22-Top10'质粒(保藏号: KCCM-10291), pCD22Ig 质粒(保藏号: KCCM-10402), 或 pCT44Ig 质粒(保藏号: KCCM-10400)。

16. 权利要求 15 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是 TR11Ig-CHO 细胞系(保藏号: KCLRF-BP-00046)或 TR22Ig-CHO 细胞系(保藏号: KCLRF-BP-00047)。

17. 制备多联融合二聚蛋白的方法, 在所述蛋白中两个单体蛋白的铰链区之间形成二硫键, 该方法包括以下步骤:

在适于表达 DNA 构建体的条件下, 培养权利要求 13 的经转化或转染的宿主细胞, 所述 DNA 构建体编码多联融合单体蛋白, 所述单体蛋白中, 参与免疫应答的蛋白的两个相同可溶性胞外结构域的多联体与免疫球蛋白分子 Fc 片段的铰链区相连; 以及

从培养基中分离并纯化由产生的单体蛋白二聚化作用而形成的二聚蛋白。

18. 权利要求 17 的方法, 其中所述编码多联融合单体蛋白的 DNA 构建体的制备如下: 通过将编码免疫球蛋白分子 Fc 片段的 DNA 片段与编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的 DNA 相连, 形成编码简单融合单体蛋白的 DNA 构建体; 再将制备的 DNA 构建体和与编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的 DNA 片段相同的第二个 DNA 片段相连。

19. 权利要求 18 的方法, 其中编码多联融合单体蛋白的 DNA 构建体含有糖基化基序序列。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述糖基化基序序列被插入两个可溶性胞外结构域相连接处的区域。

21. 权利要求 18 的方法, 其中所述多联融合单体蛋白含有前导序列。

22. 权利要求 21 的方法, 其中所述多联融合单体蛋白是 CTLA-4, 所述前导序列具有 MACLGFQRHKAQKNLAARTWPCTLLFFIP

VFCKA 的氨基酸序列。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述前导序列具有去除了 ACLGFQRHKAQKNLAA 的 MRTWPCTLLFFIPVFCKA 氨基酸序列。

24. 权利要求 17-23 任一项的方法，其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

25. 包含两个单体蛋白的多联融合二聚蛋白，该单体蛋白是将参与免疫应答的蛋白的两个相同可溶性胞外结构域的多联体与免疫球蛋白分子 Fc 片段的铰链区相连而形成的，其中所述单体蛋白是通过在铰链区形成分子间二硫键而连接到一起，并糖基化，该二聚蛋白具有改进的稳定性和治疗效果。

26. 权利要求 25 的多联融合二聚蛋白，其中所述单体蛋白具有 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列。

27. 编码单体蛋白的 DNA 构建体，该单体蛋白是将参与免疫应答的蛋白的两个相同可溶性胞外结构域的多联体与免疫球蛋白 Fc 片段的铰链区相连接而形成，并含有糖基化基序肽。

28. 权利要求 27 的 DNA 构建体，其中所述 DNA 构建体含有 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列。

29. 可操作连接至权利要求 27 的 DNA 构建体的重组表达质粒。

30. 权利要求 29 的重组表达质粒，其中所述重组表达质粒是 pTR11Ig-MG 质粒（保藏号：KCCM-10404），pTR22Ig-MG 质粒（保藏号：KCCM-10407），pCD22Ig-MG 质粒（保藏号：KCCM-10401），或 pCT44Ig-MG 质粒（KCCM-10399）。

31. 由权利要求 29 的重组表达质粒转化或转染的宿主细胞。

32. 权利要求 31 的宿主细胞，其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

33. 包含权利要求 1 的二聚蛋白的药物或诊断组合物。

34. 包含权利要求 25 的糖基化二聚蛋白的药物或诊断组合物。

多联免疫粘附

技术领域

本发明涉及多联蛋白 (concatameric proteins), 更具体地涉及生物活性蛋白结构域的多联结构, 其中生物活性蛋白的胞外可溶性结构域 C 末端与生物活性蛋白的相同或其它胞外可溶性结构域 N 末端相融合, 以及两个多联体通过与免疫球蛋白 Fc 片段铰链区相偶联而形成二聚体, 以及多联蛋白的糖基化形式。

背景技术

细胞因子的活性与针对各种抗原刺激的炎症和/或免疫应答的病理严重程度相关。目前, 许多能够识别细胞因子的抗原特异性抗体和可溶性受体都被用于抑制细胞因子的功能, 以达到治疗目的 (WO 93/016184, WO 96/02576, WO 96/023067, WO 1997/03682, 和 US 5,434,131, 5,656,272, 5,977,318, 6,210,661, 6,225,117)。抗体和可溶性受体是通过干扰细胞因子和细胞表面上细胞因子受体之间的相互作用而抑制细胞因子的信号转导。

Capon 等人公开了将可溶性受体用作细胞因子的功能抑制剂, 该可溶性受体与人免疫球蛋白的重链相融合 (Nature 337:5254, 1989), 此后, 公开许多专利, 这些发明均涉及可溶性受体与免疫球蛋白的融合蛋白 (US 专利 5,521,288, 5,844,095, 6,046,310, 6,090,914, 6,100,383, 6,225,448)。

通常, 可溶性受体和免疫球蛋白的融合蛋白具有下述优点 (Capon 等, Nature 337:5254, 1989)

1. 通过二聚化形成二价而增加对配体的总体亲合力
2. 延长蛋白的血液半衰期, 也就是提高了分子稳定性
3. 通过免疫球蛋白重链 Fc 片段激活效应细胞
4. 可利用亲和柱如利用蛋白 A 简便地纯化

多数受体胞外结构域和免疫球蛋白重链的融合蛋白由不含 CH1 结构域的重链组成，这样二聚体就不会与轻链结合。对于参与免疫应答的蛋白和受体的功能，更加期望利用该结构。例如，WO94/06476 和 US 5,447,851 中公开的 TNFR(WO92/16221, WO95/34326)-免疫球蛋白融合蛋白已被用于抑制 TNF-介导的炎症。众所周知，TNFR-免疫球蛋白融合蛋白比原始的单体分子具有更高的亲合性（Lesslauer 等，*Eur. J. Immunol.* 21:2883, 1991；Ashkenazi 等，*Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:10535, 1991；Peppe 等，*J. Exp. Med.* 174:1483, 1991；Mohler 等，*J. Immunol.* 151:1548, 1993）。

为增强对 TNF 介导的反应的抑制，可通过 TNFR, CD2 和 CTLA-4 的可溶性胞外结构域的多聚化来提高效力。例如，当将分别与免疫球蛋白重链（重链融合蛋白）及轻链（轻链融合蛋白）相结合的 TNFR 胞外结构域的融合蛋白在相同细胞内共表达时，通过重链与重链和轻链相连，我们可以得到四聚体形式的融合蛋白。如 Scallon 等所示，该四聚体显示出比单体或二聚体形式强得多的效力（*Cytokine* 7:759, 1995）。

但是，该方法用于商业应用还存在许多困难，例如：在相同细胞系内同时表达两种不同的融合蛋白，多聚体形式的产量极低；难以纯化高分子量的多聚体形式。因此，目前所用的免疫球蛋白融合蛋白仅为重链融合形式。

所以，非常渴望发展产量高、纯化效力高的生产多聚蛋白治疗剂的方法。

发明内容

本发明人利用 DNA 重组技术，通过将生物活性蛋白可溶性结构域的 C 末端与相同或其它生物活性蛋白的可溶性结构域 N 末端相融合，从而制得了多联蛋白。另外，本发明人通过将其与免疫球蛋白 Fc 片段的铰链区相连而使该多联体成为二聚体，并使用 DNA 诱变技术而加入更多糖基化。本发明人还发现多联蛋白二聚体及其糖基化形式比常规的单体融合蛋白显示出更高的效力和稳定性。

因此，本发明一方面提供多联蛋白，其中生物活性蛋白可溶性结构域的C末端与相同或其它生物活性蛋白可溶性结构域的N末端相融合。

另一方面，本发明还提供二聚体蛋白，其由两个单体蛋白通过铰链区的二硫键连接而成，所述单体蛋白的多联部分与免疫球蛋白Fc片段的铰链区相融合。

本发明还提供编码单体融合蛋白的DNA构建体，所述单体融合蛋白的多联结构域与免疫球蛋白Fc片段的铰链区相融合。

本发明还提供含有编码单体融合蛋白的DNA构建体的DNA质粒，所述单体融合蛋白的多联部分与免疫球蛋白Fc片段的铰链区相融合。

本发明还提供由重组DNA质粒所转染或转化的宿主细胞，所述质粒包括编码单体融合蛋白的DNA构建体，所述单体融合蛋白的多联部分与免疫球蛋白Fc片段的铰链区融合。

本发明还提供一种方法用于培养宿主细胞，该宿主细胞用重组DNA质粒转染或转化，所述质粒包括编码单体融合蛋白的DNA构建体，所述单体融合蛋白的多联部分与免疫球蛋白Fc片段的铰链区相融合，所述培养在适于表达DNA构建体的条件下进行，所述构建体编码与免疫球蛋白Fc片段的铰链区偶联的多联融合蛋白，并生产二聚多联体，所述二聚多联体是通过如上所述的两个单体多联体在铰链区的二硫键相连而形成，包括从细胞培养物中纯化上述蛋白的过程。

本发明还提供在适于表达DNA构建体的最佳条件下，所述DNA构建体编码单体融合蛋白，该单体融合蛋白的免疫功能的多联部分与免疫球蛋白Fc片段的铰链区相融合，培养宿主细胞的方法，该宿主细胞用重组DNA质粒转染或转化，所述质粒包含编码单体融合蛋白的DNA构建体，所述单体融合蛋白的免疫调节功能的多联部分与免疫球蛋白Fc片段的铰链区相融合，并且其中插入了糖基化基序，还提供生产糖基化二聚体的方法，该二聚体是通过如上所述的两个单体蛋白的铰链区的二硫键相连而成，包括从细胞培养物中纯化上述糖基化蛋白

的过程。

本发明另一方面还提供用于将糖基化基序插入编码单体融合蛋白的 DNA 构建体中的 DNA 引物，所述单体融合蛋白的多联部分与免疫球蛋白 Fc 片段的铰链区相融合。

本发明还提供糖基化二聚体，该二聚体是通过两个单体蛋白在铰链区的二硫键相连而成，所述单体蛋白中参与免疫应答的多联部分与免疫球蛋白 Fc 片段的铰链区相融合。

本发明还提供含有药学有效量的二聚体以及药学可接受载体的药物组合物，所述二聚体通过两个单体融合蛋白在铰链区的二硫键而形成，所述单体蛋白中参与免疫应答的多联部分与免疫球蛋白 Fc 片段的铰链区相融合。

本发明还提供含有药学有效量的糖基化二聚体以及药学可接受载体的药物组合物，所述糖基化二聚体通过两个单体蛋白在铰链区的二硫键而形成，所述单体蛋白中参与免疫应答的多联部分与免疫球蛋白 Fc 片段的铰链区相融合。

附图说明

通过以下具体的描述并结合附图，可更加清楚地理解本发明上述目的和其它目的，特征和其它优点，附图为：

图 1 显示利用聚合酶链式反应（PCR）制备 DNA 构建体的方法示意图，该构建体编码常规简单融合单体蛋白；

图 2 显示利用 PCR 制备 DNA 构建体的方法示意图，该构建体编码本发明的多联融合单体蛋白；

图 3a 显示 $[\text{TNFR}/\text{Fc}]_2$ ， $[\text{CD2}/\text{Fc}]_2$ 或 $[\text{CTLA4}/\text{Fc}]_2$ 融合蛋白的结构，这些都是在细胞中利用 TNFR/Fc，CD2/Fc 或 CTLA4/Fc 融合蛋白的同二聚反应而形成的简单融合二聚蛋白，作为常规简单融合单体蛋白的实例。

图 3b 显示 $[\text{TNFR-TNFR}/\text{Fc}]_2$ ， $[\text{CD2-CD2}/\text{Fc}]_2$ 或 $[\text{CTLA4-CTLA4}/\text{Fc}]_2$ 融合蛋白的结构，这些都是在细胞中利用 TNFR-TNFR/Fc，CD2-CD2/Fc 或 CTLA4-CTLA4/Fc 融合蛋白的同二

聚反应而形成的多联融合二聚蛋白，作为本发明多联融合二聚蛋白的实施方案。

图 4a 显示[TNFR1-TNFR1/Fc]₂ 的结构，作为本发明多联融合二聚蛋白的实施方案。

图 4b 显示[TNFR2-TNFR2/Fc]₂ 的结构，作为本发明多联融合二聚蛋白的另一个实施方案。

图 4c 显示[CD2-CD2/Fc]₂ 的结构，作为本发明多联融合二聚蛋白的另一个实施方案。

图 4d 显示[CTLA4-CTLA4/Fc]₂ 的结构，作为本发明多联融合二聚蛋白的另一个实施方案。

图 5 显示重组表达质粒 pTR11Ig-Top10' 的构建过程图，该质粒表达本发明的 TNFR1-TNFR1/Fc 多联融合单体蛋白。

图 6 显示重组表达质粒 pCD22Ig 的构建过程图，该质粒表达本发明的 CD2-CD2/Fc 多联融合单体蛋白。

图 7 是重组表达质粒 pTR11Ig-Top10' 的图谱，该质粒表达本发明的 TNFR1-TNFR1/Fc 多联融合单体蛋白。

图 8 是重组表达质粒 pTR22Ig-Top10' 的图谱，该质粒表达本发明的 TNFR1-TNFR1/Fc 多联融合单体蛋白。

图 9 是重组表达质粒 pCD22Ig 的图谱，该质粒表达本发明的 CD2-CD2/Fc 多联融合单体蛋白。

图 10 是重组表达质粒 pCT44Ig 的图谱，该质粒表达本发明的 CTLA4-CTLA4 /Fc 多联融合单体蛋白。

图 11 是重组表达质粒 pTR11Ig-MG 的图谱，该质粒表达本发明 mgTNFR1-TNFR1/Fc 多联融合单体蛋白，该蛋白含有四个糖基化基序肽。

图 12 是重组表达质粒 pTR22Ig-MG 的图谱，该质粒表达本发明 mgTNFR2-TNFR2/Fc 多联融合单体蛋白，该蛋白含有 2 个糖基化基序肽。

图 13 是重组表达质粒 pCD22Ig-MG 的图谱，该质粒表达本发明

的 mgCD2-CD2/Fc 多联融合单体蛋白,该蛋白含有 2 个糖基化基序肽。

图 14 是重组表达质粒 pCT44Ig-MG 的图谱,该质粒表达本发明的 mgCTLA4-CTLA4 /Fc 多联融合单体蛋白,该蛋白含有 3 个糖基化基序肽。

图 15 显示在还原或非还原条件下,纯化的多联融合二聚蛋白 [TNFR1-TNFR1/Fc]₂ 和 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂ 的 SDS-PAGE 结果;

图 16 显示常规的简单融合二聚蛋白 [TNFR1/Fc]₂ (●) 和 [TNFR2/Fc]₂ (○) 以及本发明的多联融合二聚蛋白 [TNFR1-TNFR1/Fc]₂ (▼) 和 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂ (▽) 对 TNF-α 的细胞毒性的抑制效果。

图 17 显示常规的简单融合二聚蛋白 [TNFR1/Fc]₂ (●) 和 [TNFR2/Fc]₂ (○) 以及本发明的多联融合二聚蛋白 [TNFR1-TNFR1/Fc]₂ (▼) 和 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂ (▽) 对 TNF-β 的细胞毒性的抑制效果。

图 18 显示常规的简单融合二聚蛋白 [CD2/Fc]₂ (●), 已知的免疫抑制剂环孢菌素 A (▼) 和本发明的多联融合二聚蛋白 [CD2-CD2/Fc]₂ (○) 对活性 T 淋巴细胞增殖的抑制效果。

图 19 显示常规的简单融合二聚蛋白 [CTLA4/Fc]₂ (●), 已知的免疫抑制剂环孢菌素 A (▼) 和本发明的多联融合二聚蛋白 [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ (○) 对活性 T 淋巴细胞增殖的抑制效果。

图 20 显示常规的简单融合二聚蛋白 [TNFR1/Fc]₂ (●), 本发明的多联融合二聚蛋白 [TNFR1-TNFR1/Fc]₂ (○) 和糖基化多联融合二聚蛋白 [mgTNFR1-TNFR1/Fc]₂ (▽) 的血液半衰期。

图 21 显示常规的简单融合二聚蛋白 [CD2/Fc]₂ (●), 本发明的多联融合二聚蛋白 [CD2-CD2/Fc]₂ (○) 和糖基化多联融合二聚蛋白 [mgCD2-CD2/Fc]₂ (▽) 的血液半衰期。

图 22 显示常规的简单融合二聚蛋白 [CTLA4/Fc]₂ (●), 本发明的多联融合二聚蛋白 [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ (○) 和糖基化多联融合二聚蛋白 [mgCTLA4-CTLA4/Fc]₂ (▽) 的血液半衰期。

图 23 显示作为对照的 PBS (●), 常规的简单融合二聚蛋白 [TNFR1/Fc]₂ (■) 和 [TNFR2/Fc]₂ (▲), 以及本发明的多联融合二聚蛋白 [TNFR1-TNFR1/Fc]₂ (×) 和 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂ (△) 在 DBA/1 小鼠中对诱导产生胶原诱导的关节炎 (CIA) 的抑制效果。

本发明的最佳实施方式

本发明总地涉及多联蛋白, 更具体地涉及免疫粘附分子。典型地, 免疫粘附分子通过免疫球蛋白 (Ig) 的 Fc 片段与受体或粘附分子的配体结合区相融合而形成, 这样就获得了一个类似于抗体的结构。本领域已知的典型粘附分子具有抗体的结构, 其中可变区被受体的配体结合区所替代, 而保留 Fc 片段。文献中已经提出了许多免疫粘附分子。但是, 本发明的免疫粘附分子与常规的免疫粘附分子结构不同, 而现有技术也没有预测或描述本发明免疫粘附分子的制备。

术语定义

为全面地理解本发明免疫粘附分子的特征性结构, 下文给出了本发明所用术语的确切定义。一般来说, 本发明中没有额外定义的所有技术和科学术语按本领域中通常的含义理解。尽管具有本发明通常的含义, 但是仍如下定义以下各术语, 以便能够更加清楚地理解其含义, 明确地限定本发明的范围。

本文所用的术语“免疫球蛋白”指 B 细胞内产生的蛋白分子, 作为抗原受体能够特异性地识别大量的抗原。该分子具有 Y 形结构, 由两条相同的轻链 (L 链) 和两条相同的重链 (H 链) 构成, 这四条链之间通过一些二硫键结合在一起, 包括 H 链之间在铰链区的二硫键桥。L 和 H 链含有可变区和恒定区。L 链的可变区与 H 链的可变区相连, 这样就产生了两个相同的抗原结合区。根据 H 链恒定区的特征, 可将免疫球蛋白分为五种同种型: A(IgA), D(IgD), E(IgE), G(IgG) 和 M(IgM)。每种亚型都具有独特的结构和生物学特性。例如, 与其它同种型相比, IgG 的 Fc 结构略微有所不同。另外, IgG 和 IgA 还具有一些亚型。例如, 人 IgG 同种型具有四种亚型, IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4, 其分别具有 γ_1 , γ_2 , γ_3 和 γ_4 H 链。免疫球蛋白分子的生物学功能,

如补体活化, Fc受体介导的吞噬作用以及抗原依赖性细胞毒性, 都是通过H链的Fc区中的结构决定簇(互补性决定区)介导的。这种H链的Fc区被用于构建本发明的二聚蛋白, 并可衍生自上述免疫球蛋白的所有同种型和亚型。

本文所用的术语“免疫球蛋白分子的Fc片段”指没有抗原结合活性且容易结晶的片段, 其含有铰链区和CH₂及CH₃区, 以及负责使抗体结合到效应物质和细胞上的部分。所以, 本发明提及的Fc片段可与一些文献中描述的不同, 但包括铰链区。这种关于Fc片段的描述为本发明的描述提供便利, 参照本发明说明书及附图, 本领域技术人员可以充分理解这种描述。

本文所用的术语“生物活性蛋白”指通常具有生理或药学活性的蛋白, 肽或多肽, 在形成了多联体或免疫粘附分子之后仍保留其部分天然活性。本文所用的术语“生物活性”含义不限于生理或药学活性。例如, 一些多联体, 如含有酶的多联体可以在有机溶剂内催化反应。类似地, 一些含有伴刀豆球蛋白A或免疫球蛋白分子的高分子量融合分子可用作实验室诊断试剂。

所述蛋白, 肽或多肽的非限定性实例包括: 血红蛋白, 血清蛋白(如血液因子包括因子VII, VIII和因子IX), 免疫球蛋白, 细胞因子(如白细胞介素), α -、 β -和 γ -干扰素, 集落刺激剂(如G-CSF和GM-CSF), 血小板衍生长因子(PDGF), 和磷脂酶激活蛋白(PLAPs)。其它典型的生物或治疗蛋白包括: 胰岛素, 植物蛋白(如凝集素和蓖麻毒蛋白), 肿瘤坏死因子(TNF)以及其相关的等位基因, 生长因子(如组织生长因子和内皮生长因子如TGF α 或TGF β), 激素(如促卵泡激素, 甲状腺刺激激素, 抗利尿激素, 色素沉着或分散激素和甲状旁腺激素, 促黄体生成素释放激素及其衍生物, 降钙素, 降钙素基因相关多肽(CGRP), 合成脑啡肽, 生长调节素, 促红细胞生成素, 下丘脑释放因子, 催乳素, 慢性促性腺激素, 组织纤溶酶原激活剂, 生长激素释放肽(GHRP), 胸腺体液因子(THF)。免疫球蛋白包括IgG, IgE, IgM, IgA, IgD及其片段。一些蛋白, 如白细胞

介素,干扰素或集落刺激因子可使用 DNA 重组技术以非糖基化形式产生。这种非糖基化的蛋白可用作本发明的生物活性材料。

另外,本发明所用生物活性材料包括任何在体内具有生物活性的多肽。生物活性材料的实例包括:肽或多肽,抗体的片段,单链结合蛋白(参见 US Patent No. 4,946,778),结合分子包括抗体或其片段,多克隆抗体,单克隆抗体,和催化抗体的融合多肽。生物活性材料的其它例子包括过敏原蛋白,如豚草,抗原 E,蜜蜂毒液,或螨类过敏原。

另外,本发明所用生物活性材料包括酶。例举的酶可包括:糖类特异性酶,蛋白酶,氧化还原酶,转移酶,水解酶,裂合酶,异构酶和连接酶。具体地说,非限制性地例举酶可包括:天冬酰胺酶,精氨酸酶,精氨酸脱氨酶,腺苷脱氨酶,过氧化物歧化酶,内毒素酶,过氧化氢酶,胰凝乳蛋白酶,脂酶,尿酸酶,腺苷脱磷酸酶(adenosine dephosphatase),酪氨酸酶,和胆红素氧化酶。糖类特异性酶的实例包括葡糖氧化酶,glucodase,半乳糖苷酶,葡糖脑苷脂酶,和葡糖醛酸酶。

本文所用的术语“参与免疫应答的蛋白”指所有在细胞或体液免疫应答期间介导细胞间信号转导从而激活或抑制免疫应答的蛋白。免疫是保护“自身”不受“非自身”如细菌或病毒侵害的过程。免疫应答大致可分为细胞和体液免疫应答,T和B淋巴细胞在其中起到最为重要的作用。T细胞,主要介导细胞免疫应答,直接攻击并杀死感染病毒的细胞或肿瘤细胞,或者通过分泌细胞因子来帮助其它免疫细胞,所述细胞因子发挥功能诱导或激活免疫应答或炎症反应。B细胞产生针对进入体内的非自身的外来物质(抗原)例如细菌或病毒的抗体,这种免疫应答被称为细胞免疫应答。细胞间的信号转导在细胞和体液免疫应答中都是必需的基本过程,在信号转导过程中,信号分子,也就是配体,与细胞表面受体之间发生相互作用,所述细胞表面受体可以将特异性信号转导入细胞内。

本发明的参与免疫应答的蛋白的代表性实例包括:细胞因子,细

胞因子受体, 粘附分子, 肿瘤坏死因子受体 (TNFR), 酶, 受体酪氨酸激酶, 趋化因子受体, 其它细胞表面蛋白和可溶性配体. 非限制性地例举细胞因子可包括: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-17, TNF, TGF, IFN, GM-CSF, G-CSF, EPO, TPO 和 M-CSF. 细胞因子受体的实例包括, 但不限于: 生长激素受体 (GHRs), IL-13R, IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, TNFR, TGFR, IFNR(如 IFN- γ R α 链和 IFN- γ R β 链), 干扰素- α R, - β R, 和- γ R, GM-CSFR, G-CSFR, EPOR, cMpl, gp130 和 Fas(Apo 1). 非限制性例举的酶可包括: 流行性感 C 血凝素酯酶和尿激酶. 例举趋化因子受体可包括 CCR1 和 CXCR1-4. 受体酪氨酸激酶的实例包括, 但不限于: TrkA, TrkB, TrkC, Htk, REK7, Rse/Tyro-3, 肝细胞生长因子 R, 血小板衍生生长因子 R, 和 Flt-1. 其它细胞表面蛋白的实例包括 CD2, CD4, CD5, CD6, CD22, CD27, CD28, CD30, CD31, CD40, CD44, CD100, CD137, CD150, LAG-3, B7, B61, β -neurexin, CTLA-4, ICOS, ICAM-1, 补体 R-2(CD21), IgER, 溶酶体膜 gp-1, α 2-微球蛋白受体相关蛋白, 和钠释放肽 R. 可溶性配体的非限定性实例包括: IL-10, heregulin, 和角质形成细胞生长因子.

本发明参与免疫应答的蛋白的配体及其应用是本领域技术人员公知的, 将其总结如下表 1-7.

表 1
参与免疫应答的蛋白：粘附分子

粘附分子	配体	用途
CD4	HIV gp120	抑制体内 HIV 感染; 鉴定参与配体结合的 CD4 结构域
L-选择蛋白	GlyCAM-1, CD34	预防中性白细胞介导的肺损伤; 通过组织化学染色确定组织中配体的位置; 分离及克隆配体并测定其属性
E-选择蛋白	唾液酸 Lewis ^x	预防中性白细胞介导的肺损伤; 测定配体结合中的热力学属性
P-选择蛋白	唾液酸 Lewis ^x	预防中性白细胞介导的肺损伤; 研究与细胞表面结合中单个氨基酸残基的功能
ICAM-1	CD11a/CD18	疟疾中红细胞的吞噬作用; 抑制鼻病毒的感染; 在糖尿病中抗炎
ICAM-2	CD11a/CD18	研究 T 细胞受体所介导的 T 细胞活化
ICAM-3	CD11a/CD18	鉴定与配体结合的受体结构域
VCAM-1	VLA-4	研究 VLA-4 在 T 淋巴细胞向皮肤炎症部位迁移中所起的作用
LFA-3	CD2	研究 CD2 在对 T 细胞的共刺激中的作用
L1 糖蛋白	成纤维细胞生长因子受体	修复后刺激神经再生; 与 FGF 功能比较

表 2
参与免疫应答的蛋白：酶

酶	配体	用途
流行性感 C 凝血素酯酶	9-O-乙酰化唾液酸	在配体的组织特异性表达研究 中使用的失活酶
尿激酶	尿激酶受体	开发的失活酶以通过干扰尿激酶活化而抑制癌转移

表 3
参与免疫应答的蛋白：细胞因子受体

细胞因子受体	配体	用途
IFN- γ R α 链	IFN- γ	抑制 IFN 介导的自身免疫
IFN- γ R β 链	IFN- γ	研究配体-受体复合体中亚基的结构
IL1R	IL-1	抑制 IL-1 介导的自身免疫
IL4R	IL-4	鉴定参与配体结合的受体结构域
促红细胞生成素 R	促红细胞生成素	抗配体抗体的表位的图谱设计
cMpl	血小板生成素	分离及克隆配体
gp130	IL-6-IL6R 复合体	研究配体-受体复合体中亚基的结构

表 4
参与免疫应答的蛋白：肿瘤坏死因子受体

TNF 受体	配体	用途
TNFR-1	TNF, 淋巴毒素- α	治疗脓毒性休克, 类风湿性关节炎及其它炎症疾病; 鉴定参与配体结合的结构域
TNFR-2	TNF, 淋巴毒素- α	抑制富集 TNF 的 HIV 复制; 预防小鼠中胶原诱导的关节炎
淋巴毒素- β R	淋巴毒素- β	研究细胞表面淋巴毒素- β 亚基的结构
Fas/Apo-1/CD95	Fas/Apo-1/CD95 配体	治疗过度的细胞凋亡及相关疾病(如 AIDS); 抵抗淋巴细胞的凋亡及外周免疫耐受性; 在 T 细胞介导的细胞毒性中 Fas 配体的作用; 分离及克隆配体
CD27	CD27 配体	分离及克隆配体
CD30	CD30 配体	分离及克隆配体
CD40	gp39	分离及克隆配体
4-1BB	4-1BB 配体	通过组织化学染色鉴定含配体的组织; 分离及克隆配体; 研究潜在配体的结构决定子
OX40	gp34	分离及克隆配体

表 5
参与免疫应答的蛋白：受体酪氨酸激酶

受体酪氨酸激酶	配体	用途
TrkA, B, C	Neutropin	测定 Neutropin 结合的属性
Htk	Htk 配体	分离及克隆配体
REK7	AL-1	分离及克隆配体
Rse/Tyro-3	蛋白 S, Gas6	鉴定配体和测定其属性
肝细胞生长因子 R	肝细胞生长因子	鉴定参与配体结合的受体结构域
血小板衍生生长因子 R	血小板衍生生长因子	鉴定参与配体结合的受体结构域
Flt-1	血管内皮生长因子 (VEGF)	测定受体结合配体的属性
Flk-1/KDR	VEGF	评价受体对 VEGF 和胎盘生长因子的选择性

表 6
参与免疫应答的蛋白：其它细胞表面蛋白

其它细胞表面蛋白	配体	用途
B7	CD28	研究 B 细胞引起的 T 细胞刺激
B61	Eck	在炎症中 Eck 的作用
β -neurexin	β -neurexin 配体	测定来自 β -neurexin 的信号序列的属性
CD2	LFA-3, CD48	鉴定配体
CD5	CD5 配体	研究 B 细胞引起的 T 细胞刺激
CD6	ALCAM	研究克隆配体的结合活性
CD22	CD45, 其它唾液酸糖蛋白	鉴定配体; 研究 T-B-细胞相互作用中 CD22 的作用; 测定唾液酸-寡糖配体中结合决定子的属性
CD28	B7, B7-2	研究 B 细胞引起的 T 细胞刺激
CD31	CD31	鉴定与同型结合相关的 CD31 结构域
CD44	透明质酸盐	通过组织化学染色筛选含配体的组织; 测定配体的结构决定子的属性
补体 R-2(CD21)	C3 片段	抑制抗体对免疫抑制剂以及癌症治疗剂的反应性
CTLA-4	B7	鉴定 CTLA-4 作为 B7 的第二受体
IgE R	IgE	抑制肥大细胞结合 IgE 作为过敏性疾病的治疗
溶酶体膜 gp-1	LAMP-1 配体	设计抗配体抗体的表位图谱
α 2-微球蛋白受体-结合蛋白	gp330	通过组织化学染色测定组织中配体的位置
钠释放肽 R	钠释放肽	设计抗配体抗体的表位图谱; 制备用于结构研究的重组受体

表 7
参与免疫应答的蛋白：可溶性配体

可溶性配体	配体	用途
IL-2	IL-2R	延长 IL-2 在循环系统中的半衰期
IL-10	IL-10R	治疗脓毒性休克及移植排斥；延长 IL-10 在循环系统中的半衰期
Heregulin	Her4/p180 ^{erbB4}	研究 Her4 的信号转导
角质形成细胞生长因子	角质形成细胞生长因子 R	通过组织化学染色确定受体的位置

本文所用的术语“可溶性胞外结构域”指穿透含磷脂的细胞膜的膜内在蛋白中暴露于细胞外区域的部分，其中膜内在蛋白含有一个或多个跨膜区，该跨膜区主要由疏水氨基酸构成。这种胞外结构域主要含有亲水氨基酸，其通常位于蛋白折叠结构的表面，因而可溶于含水环境中。大多数细胞表面受体蛋白的胞外结构域作用为结合特异性配体，而胞内结构域则在信号转导中起重要作用。

本文所用的术语“多联体连接的”指生物活性蛋白的两个可溶性结构域相连从而形成长多肽的状态。

本文所用的术语“多联蛋白”指多联体连接的蛋白。例如，参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的 N 末端与该参与免疫应答的蛋白的相同可溶性胞外结构域 C 末端相连，其中前者可溶性胞外结构域的 C 末端与免疫球蛋白分子 Fc 片段的铰链区相连。这样，参与免疫应答的蛋白的两个相同的可溶性胞外结构域就形成了一个长的多肽。

本文所用的术语“简单融合单体蛋白”指具有单体结构的融合蛋白，该单体结构由参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域与免疫球蛋白分子 Fc 片段铰链区相连而形成的简单多肽构成，在本发明中为便于描述，可将简单融合单体蛋白命名为“蛋白名称/Fc”。例如，由参与免疫应答的蛋白 TNFR1 可溶性胞外结构域与免疫球蛋白分子 Fc 片

段相连而形成的简单融合单体蛋白可命名为“TNFR1/Fc”。如果需要的话，Fc片段的来源也可在命名中指出。例如，如果Fc片段来源于IgG1，单体蛋白就称为TNFR1/IgG1Fc。

本文所用的术语“简单融合二聚蛋白”指具有二聚结构的融合蛋白，其中两个简单融合单体蛋白通过在铰链区形成分子间二硫键而连接到一起。在本发明中为便于描述，将这种简单融合二聚蛋白命名为“[蛋白名称/Fc]₂”。例如，将TNFR1蛋白的可溶性胞外结构域与免疫球蛋白分子Fc片段相连而形成简单融合单体蛋白，当我们将两个这样的简单融合单体蛋白通过在铰链区形成分子间二硫键而融合到一起时，这样获得的融合蛋白具有二聚结构，将其称之为[TNFR1/Fc]₂。另外，如果需要的话，还可在名称中指出Fc片段的来源。例如，如果Fc片段来自IgG1，该二聚蛋白就可称为[TNFR1/IgG1Fc]₂。

本文所用的术语“多联融合单体蛋白”指具有单体结构的融合蛋白，该单体结构由单一多肽构成，该单一多肽中参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的N末端与该参与免疫应答的蛋白的相同可溶性胞外结构域的C末端相连，其中前者可溶性胞外结构域的C末端与免疫球蛋白分子Fc片段的铰链区相连。在本发明中，为便于描述，可将这种多联融合单体蛋白称为“蛋白名称-蛋白名称/Fc”。例如，参与免疫应答的蛋白TNFR1蛋白的可溶性胞外结构域与免疫球蛋白分子Fc片段相连形成了简单融合单体蛋白，将该简单融合单体蛋白的TNFR1可溶性胞外结构域与TNFR1的相同可溶性胞外结构域相连，获得的多联融合单体蛋白就称为TNFR1-TNFR1/Fc。如果需要，可以在命名中指出Fc片段的来源。例如，如果Fc片段是来自IgG1，那么该单体蛋白可称为TNFR1-TNFR1/IgG1Fc。

本文所用的术语“多联融合二聚蛋白”指具有二聚体结构的融合蛋白，其中两个多联融合单体蛋白通过在铰链区形成分子间二硫键而融合在一起。为便于本发明的描述，多联融合二聚蛋白可命名为“[蛋白名称-蛋白名称/Fc]₂”。例如，通过连接简单融合单体蛋白的TNFR1可溶性胞外结构域与参与免疫应答的蛋白TNFR1的相同可溶性胞外

结构域而形成多联融合单体蛋白，将两个这样的多联融合单体蛋白通过在铰链区形成分子间二硫键融合到一起，得到的具有二聚体结构的融合蛋白就命名为[TNFR1-TNFR1/Fc]₂，其中简单融合单体蛋白是通过连接 TNFR1 可溶性胞外结构域与免疫球蛋白分子的 Fc 片段而形成的。如果需要的话，可以在命名中指出 Fc 片段的来源。例如，如果 Fc 片段是来自 IgG1，那么该融合蛋白可称为 [TNFR1-TNFR1/IgG1Fc]₂。

本文所用的术语“载体”指作为一种载体能够稳定地将外源基因携带运送至宿主细胞内的 DNA 分子。为进行应用，载体应能够复制，具有将其自身导入宿主细胞的系统，并具有可选择标记。外源基因可包括例如编码多联融合单体蛋白的 DNA 构建体。

本发明所用的术语“重组表达质粒”指携带有待在宿主细胞内表达的外源基因的环状 DNA 分子，所述外源基因与其可操作连接。当导入宿主细胞内时，重组表达质粒能够不依赖宿主染色体 DNA 而进行复制，以高拷贝数复制其本身，并产生异源 DNA。正如本领域公知的：为增加转染基因在宿主细胞中的表达水平，该基因应该与转录及翻译调节序列可操作连接，所述调节序列在被选作表达体系的宿主细胞中有功能。优选地，该表达调节序列和外源基因可由单一表达载体携带，该载体含有细菌-可选择标记和复制起点。如果使用真核细胞作为表达体系，该表达载体应该进一步含有在该真核宿主细胞中有用的表达标记。

本文所用的术语“可操作连接”指载体中元件的排列，其中每个元件都能够行使其先天的功能。所以，与编码序列可操作连接的调控序列能够影响编码序列的表达。作用于诱导编码序列表达的调控序列不必与编码序列相邻。例如，当启动子序列和编码序列之间存在间插序列时，启动子序列可仍与编码序列“可操作连接”。

本发明所用的宿主细胞可以是原核或真核细胞。另外，通常可使用能够高效导入外源 DNA 以及能够高水平表达导入基因的宿主细胞。可用于本发明的宿主细胞包括原核和真核细胞，如大肠杆菌 (E. coli)，

假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.), 芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.), 链霉菌属 (*Streptomyces* sp.), 真菌或酵母, 昆虫细胞如草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9), 动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 或小鼠细胞, 非洲绿猴细胞如 COS1, COS7, 人胚肾细胞, BSC1, BSC40 或 BMT10, 以及组织培养的人类细胞. 当克隆编码本发明融合蛋白的 DNA 构建体时, 优选动物细胞作为宿主细胞. 当使用 COS 细胞时, 由于 SV40 大 T 抗原在 COS 细胞中表达, 携带有 SV40 复制起点的质粒可作为多拷贝游离体存在, 从而能够高表达外源基因. 导入宿主细胞的 DNA 序列对于宿主细胞可以是同源或异源, 或者是含有同源或异源 DNA 序列的杂交 DNA 序列.

为表达编码本发明多联融合蛋白的 DNA 序列, 可使用作为表达体系的宿主细胞和载体的多种组合. 可用于转化真核宿主细胞的表达载体含有表达调节序列, 该调节序列可来自: 例如 SV40, 牛乳头瘤病毒, 腺病毒, 腺伴随病毒, 巨细胞病毒和逆转录病毒. 可用于细菌宿主细胞的表达载体包括来自大肠杆菌的细菌质粒, 例如 pBluescript, pGEX2T, pUC, pCR1, pBR322, pMB9 及其衍生物, 可用于广泛宿主细胞的质粒, 如 RP4, 噬菌体 DNA, 例如多种 λ 噬菌体衍生物, 包括 λ gt10, λ gt 11 和 NM989, 以及其它 DNA 噬菌体, 例如丝状单链 DNA 噬菌体如 M13. 可用于酵母细胞的表达载体包括 2 μ 质粒及其衍生物. 可用于昆虫细胞的表达载体包括 pVL 941.

本文所用的术语“转化”指将 DNA 导入合适的宿主细胞, 从而使该 DNA 可作为染色体外元件, 或者通过染色体整合而复制.

本文所用的术语“转染”指合适的宿主细胞对表达载体的摄入, 无论实际上是否表达任何编码序列.

本文所用的术语“信号序列”指介导将表达蛋白转运到细胞膜外的氨基酸序列, 还称为“前导序列”. 细胞表面蛋白或分泌蛋白, 被转运到细胞膜外, 其 N 末端序列通常被细胞膜中的信号肽酶切除. 这样的 N 末端序列就称为信号序列或信号肽, 或前导序列或前导肽. 分泌 (或转运的) 蛋白或所有存在于细胞膜外的蛋白或所有存在于细胞外

环境的蛋白都具有特定的信号序列。这些信号序列之间没有特异同源性，并且根据其来源不同，相同的蛋白具有不同的信号序列。二级结构或非极性和带电残基的分布对于信号序列的正确功能而言，比其初级结构更加重要。尽管没有特异同源性，但是信号序列还是具有如下的几个共同特征。信号序列在其N端含有N结构域，这是一个亲水性区域，包含一个或多个带正电的残基，N结构域后为H结构域，H结构域是一个稍长的疏水性区域。在大肠杆菌中，信号序列含有约18-30个氨基酸。其N结构域含有许多阳离子氨基酸，如Lys或Arg，这样就具有净正电荷。在H结构域中发现了许多疏水性氨基酸如Ala或Leu，而极性或带电荷的氨基酸如Pro, Lys, Arg, Asn或Glu在H结构域很少见。大量氨基酸如Ala和Leu残基形成了 α 螺旋结构，以促进膜穿透。C结构域位于H结构域和蛋白实际分泌部分之间。这个C结构域的疏水性较小，含有能够被信号肽酶如LebB或LspA识别的序列。没有关于信号肽酶切割的精确位点的报道，但是已知信号肽酶通常在C结构域中在Ala-X-Ala序列之后进行切割。含有上述信号序列的蛋白前体（preproteins）通过与几种蛋白相互作用而到达细胞膜，并通过切割信号肽的特定区域而折叠为其成熟形式。这样的信号序列对于在细胞表面或胞外环境中表达目的蛋白的策略十分重要。外源蛋白和融合蛋白应该被稳定高效地运送到胞外环境。典型地，具有优异分泌能力的细胞表面蛋白可用于在细胞表面表达外源蛋白或融合蛋白，其通常具有分泌信号序列，能够提供优秀的分泌效率。

制备本发明的多联融合二聚蛋白

本发明的多联融合二聚蛋白通常如下制备：(a)使用编码免疫球蛋白分子Fc片段的基因和编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的基因，制备编码简单融合单体蛋白的DNA构建体；(b)通过聚合酶链式反应，分别向制备的编码简单融合单体蛋白的DNA构建体以及与所述编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的基因相同的基因中插入限制性内切酶的识别序列；(c)利用识别该识别序列的限制性内切酶切割编码简单融合单体蛋白的DNA构建体以及编码参与免

疫应答的蛋白可溶性胞外结构域的基因中限制性内切酶的识别序列；
(d) 使用连接酶连接被切割的 DNA 片段，以产生编码多联融合单体蛋白的 DNA 构建体（参见图 2）；(e) 将制备的编码多联融合单体蛋白的 DNA 构建体与载体可操作连接以产生重组表达质粒；(f) 用该重组质粒转化或转染宿主细胞；以及 (g) 在适于编码多联融合单体蛋白的 DNA 构建体表达的条件下，培养该转化体或转染子，并分离纯化所感兴趣的多联融合二聚蛋白。

可利用含有特定限制性内切酶识别序列以及编码前导序列的序列的引物，和含有编码可溶性胞外结构域 3'端以及免疫球蛋白分子 Fc 片段特定区域 5'端部分区域的反义序列的引物，通过 PCR 制备编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的 DNA 片段。

可利用具有编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域 3'端部分区域的序列以及编码免疫球蛋白分子 Fc 片段特定区域 5'端的序列的引物以及具有编码特定限制性内切酶识别序列及免疫球蛋白分子 Fc 片段特定区域 3'段的反义序列的另一引物，通过 PCR 制备编码免疫球蛋白分子 Fc 片段特定区域的 DNA 片段。

将如上所述的编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的 DNA 片段、以及编码免疫球蛋白分子 Fc 片段特定区域的 DNA 片段混合在试管中。变性后，将 DNA 重退火。然后使用 DNA 聚合酶在各杂交 DNA 的 3'端聚合，形成完整的双链 DNA 片段。利用获得的双链 DNA 片段，并使用具有编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的序列的引物，以及编码免疫球蛋白分子 Fc 片段特定区域 3'端的引物，进行另一个聚合酶链式反应 (PCR)，以此扩增免疫球蛋白融合基因，该基因含有相应于编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的 DNA 片段的序列以及相应于编码免疫球蛋白分子 Fc 片段特定区域的 DNA 片段的序列。

通过 PCR 将限制性内切酶识别序列导入扩增的免疫球蛋白融合基因和具有编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的序列的 DNA 片段中。然后用限制性内切酶切割识别序列，切割的区域用连接

酶相连接，这样就产生了多联免疫球蛋白融合基因。

免疫球蛋白融合基因还可进一步含有信号序列，以促进其编码的蛋白向细胞外分泌。例如，CTLA-4 分子含有独特的前导序列，该序列在其 N 端具有高度亲水性的丰余序列，并且其异常地长，且具有高度水溶性 (Harper, K 等, *J. Immunol.* 147:1037-1044; 及 Brunet, J. F. *Nature* 328:267-270, 1987)。通常，大多数细胞表面蛋白或分泌蛋白具有前导序列，该序列在其 N 末端含有 20-24 个高疏水性的氨基酸。但是，本发明所用的 CTLA-4 分子含有总共 37 个残基：其 N 端 16 个亲水氨基酸，和通常在其跨膜区的 21 个高疏水性的氨基酸。在制备 CTLA4Ig 融合蛋白的常规方法中，CTLA-4 分子的前导序列被制瘤素 M 的前导序列 (Linsley, P.S.等, *J.Exp. Med.* 174: 561-569, 1991) 或 IL-6 的前导序列 (Yamada, A 等, *Microbiol. Immunol.* 40:513-518, 1996) 所替代。本发明人证明了包含具有“MRTWPCTLLFFIPVFCKA”序列的前导序列的 CTLA-4 分子是优选的，而不是由“ACLGFRHKAQKNLAA”这 16 个氨基酸构成的氨基酸序列，并可容易地实现将表达的蛋白分泌到细胞外环境，如国际专利公开号为 WO98/31820 中所公开的。

通过将免疫球蛋白融合基因插入载体来制备重组表达质粒，然后将其导入宿主细胞以产生转化体或转染子。可通过培养该转化或转染细胞并分离纯化多联融合蛋白而获得所感兴趣的多联融合二聚蛋白。

可用于制备本发明多联融合二聚蛋白的宿主细胞优先选自：骨髓细胞系，CHO 细胞，猴 COS 细胞，人胚肾 293 细胞，以及杆状病毒感染昆虫细胞。在这种表达体系中产生的目的多肽作为包含体被分泌到培养基中。然后可使用蛋白 A 或蛋白 G 柱，通过亲和层析纯化多联融合二聚蛋白。实际上，有效的哺乳动物表达体系及这种纯化系统非常适用于表达二聚形式的参与免疫应答的蛋白以及分离这种蛋白。

制备本发明的糖基化多联融合二聚蛋白

通过糖基化作用修饰以真核细胞作为宿主细胞所产生的分泌蛋白。已知糖基化作用可影响蛋白的体内稳定性、功能以及物理属性。

所以,本发明优选的方面包括利用重组 DNA 技术以及上述动物细胞系作为宿主细胞,向参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域上连接额外的糖链,来促进目的多联融合二聚蛋白的产生。

已知两种糖基化作用模式。一种是 O-连接的糖基化作用,其中寡糖连接到丝氨酸或苏氨酸残基上,另一种是 N-连接的糖基化作用,其中寡糖连接到天冬酰胺残基上。N-连接的糖基化作用发生在特定氨基酸序列中,特别是 Asn-X-Ser/Thr,其中 X 是除脯氨酸之外的任何氨基酸。N-连接的寡糖结构不同于 O-连接的寡糖结构,并且在 N-连接类型中发现的糖基化残基也不同于 O-连接类型。例如,在 O-连接的寡糖中,N-乙酰半乳糖胺总是连接到丝氨酸或苏氨酸上,而在所有 N-连接的寡糖中,N-乙酰葡萄糖胺与天冬酰胺相连。O-连接的寡糖通常只含有 1-4 个糖残基。相比之下,N-连接的寡糖含有 5 个或更多糖残基,本质上包括 N-乙酰葡萄糖胺和甘露糖。

在本发明中,为实现额外的 O-连接或 N-连接的糖基化作用,编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的 DNA 序列中一个或多个核苷酸被改变,得到的 DNA 在合适的动物宿主细胞中表达,以使用宿主系统来诱导糖基化作用。另一方面,本发明的糖基化多联融合二聚蛋白可如下制备:改变编码参与免疫应答的蛋白的可溶性胞外结构域的 DNA 序列,通过加入 Asn-X-Ser/Thr 序列来诱导或增加 N-连接的糖基化作用。

可根据本领域的常规方法来改变 DNA 序列,以引入糖基化作用。本发明优选的一方面在于:为保护多联融合蛋白特别是两个可溶性胞外结构域免受细胞间蛋白酶的攻击,以此延长其在血清中的半衰期,可使用 PCR 制备编码多糖基化多联融合单体蛋白的 DNA 构建体,该 DNA 构建体将多糖基化位点导入两个可溶性胞外结构域之间的相连区域。在本发明一特定方面中,按如下操作可将糖基化基序肽序列导入多联融合蛋白内。使用编码可溶性胞外结构域的前导序列和 EcoRI 限制酶切位点的引物以及反义引物进行 PCR 制备 DNA 片段,所述反义引物中编码第一个可溶性胞外结构域 3'端部分区域以及第二个可溶

性胞外结构域 5'端部分区域的核苷酸序列的一部分被糖基化基序序列所替代。另一 DNA 片段可利用引物和反义引物通过 PCR 制备，所述引物中，编码第一个可溶性胞外结构域 3'端部分区域以及第二个可溶性胞外结构域 5'端部分区域的核苷酸序列的一部分被糖基化基序序列所替代，所述反义引物编码 IgG1 Fc 部分的 3'端以及 XbaI 限制酶切位点。然后，使用这两种 DNA 片段在试管中进行第二次 PCR。

在本发明实施方案中，可用于本发明的可溶性胞外结构域包括 TNFR1, TNFR2, CD2 和 CTLA-4 的可溶性胞外结构域。参照附图，序列表和实施例将更具体地描述它们的应用。

肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 已知为激素恶液质素，肿瘤坏死因子- β (TNF- β) 也已知为淋巴毒素，这两种因子都是多功能细胞因子，诱导炎症、细胞免疫应答、败血症、细胞毒性、恶液质、类风湿性关节炎、炎症相关疾病 (Tartaglia, L. A.等, Immunol. Today 13:151, 1992), 和抗病毒反应 (Butler, P., Peptide Growth Factor II, 1990, Springer-Verlag, Berlin, 39-70 页)。TNF- α 和 TNF- β 的这些作用，包括细胞毒性，都源自其与三聚体形式的 TNF 受体的结合 (Eck, M.J 等, J.Biol.Chem. 267:2119, 1992)。作为 TNF 受体，55kDa 的 I 型 (TNFR1 或 p55) 以及约 75kDa 的 II 型 (TNFR2 或 p75) 是已知的 (Smith, C.A.等, Science 248: 1019, 1990; Loetscher H 等, Cell 61: 351, 1990; 和 Schall 等, Cell 61: 361, 1990)。这两种受体对 TNF- α 和 TNF- β 的亲合性类似 (Schall 等, Cell 61: 361, 1990)。通过抑制 TNF- α 和 TNF- β 结合其在细胞表面上的受体(已知这可有效减轻 TNF 依赖性炎症)，这两种可溶性受体的免疫球蛋白融合蛋白对 TNF- α 和 TNF- β 的作用有抑制效果。

在调节免疫应答的细胞表面抗原中，共刺激分子 CD2 和 CTLA-4, 诱导二级刺激以充分激活 T 细胞，当其为可溶性形式时，也可根据与 TNF 受体相同的方法，将其用于治疗各种免疫学疾病。免疫应答是通过抗原呈递细胞 (APC) 的细胞表面抗原分子与 T 淋巴细胞的特异性受体 (也就是说，T 淋巴细胞与 APC 的白细胞功能抗原分子) 结合而

完成的，当在抗原呈递期间不产生共刺激信号作为二级信号时，T 淋巴细胞通过细胞凋亡或抑制克隆活化而被去除。CD2 是 T 淋巴细胞上的白细胞功能抗原，与 APC 上的 LFA-3 结合，并参与白细胞的粘附和共刺激，以及通过与 CD28 的共刺激而促进 T 细胞活化。CTLA-4 在 T 淋巴细胞活化后表达，其表达水平在静止期增加。CTLA-4 对 APC 的 B7 分子的亲合性比 CD28 高 20 倍以上，并在结合 B7 后，转导信号抑制 T 淋巴细胞活化。

本发明一特定方面提供多联融合单体蛋白 TNFR1-TNFR1/Fc，如 SEQ ID NO: 6 所示；还提供多联融合单体蛋白 TNFR2-TNFR2/Fc，如 SEQ ID NO: 8 所示；还提供多联融合单体蛋白 CD2-CD2/Fc，如 SEQ ID NO: 18 所示；以及多联融合单体蛋白 CTLA4-CTLA4/Fc，如 SEQ ID NO: 20 所示。

本发明另一特定方面提供：编码多联融合单体蛋白 TNFR1-TNFR1/Fc 的 DNA 构建体 (TNFR1-TNFR1-IgG)，如 SEQ ID NO: 5 所示；编码多联融合单体蛋白 TNFR2-TNFR2/Fc 的 DNA 构建体 (TNFR2-TNFR2-IgG)，如 SEQ ID NO: 7 所示；编码多联融合单体蛋白 CD2-CD2/Fc 的 DNA 构建体 (CD2-CD2-IgG)，如 SEQ ID NO: 17 所示；编码多联融合单体蛋白 CTLA4-CTLA4/Fc 的 DNA 构建体 (CTLA4-CTLA4-IgG)，如 SEQ ID NO: 19 所示。

本发明还提供：重组表达质粒 pTR11Ig-Top10'，其与编码多联融合单体蛋白 TNFR1-TNFR1/Fc 的 DNA 构建体可操作连接，如 SEQ ID NO: 5 所示；重组表达质粒 pTR22Ig-Top10'，其与编码多联融合单体蛋白 TNFR2-TNFR2/Fc 的 DNA 构建体可操作连接，如 SEQ ID NO: 7 所示；重组表达质粒 pCD22Ig，其与编码多联融合单体蛋白 CD2-CD2/Fc 的 DNA 构建体可操作连接，如 SEQ ID NO: 17 所示；以及重组表达质粒 pCT44Ig，其与编码多联融合单体蛋白 CTLA4-CTLA4/Fc 的 DNA 构建体可操作连接，如 SEQ ID NO: 19 所示。所述重组表达质粒保藏在 Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM)，保藏号分别为 KCCM-10288，

KCCM-10291, KCCM-10402, 和 KCCM-10400. 根据布达佩斯条约 (Budapest treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure) 的条款, 将维持 KCCM 保藏。

本发明还提供: 用重组表达质粒 pTR11Ig-Top10' 转化或转染的哺乳动物宿主细胞 (如 TR11Ig-CHO), 所述质粒与编码多联融合单体蛋白 TNFR1-TNFR1/Fc 的 DNA 构建体可操作连接, 如 SEQ ID NO: 5 所示; 用重组表达质粒 pTR22Ig-Top10' 转化或转染的哺乳动物宿主细胞 (如 TR22Ig-CHO), 所述质粒与编码多联融合单体蛋白 TNFR2-TNFR2/Fc 的 DNA 构建体可操作连接, 如 SEQ ID NO: 7 所示; 用重组表达质粒 pCD22Ig 转化或转染的哺乳动物宿主细胞, 所述质粒与编码多联融合单体蛋白 CD2-CD2/Fc 的 DNA 构建体可操作连接, 如 SEQ ID NO: 17 所示; 以及用重组表达质粒 pCT44Ig 转化或转染的哺乳动物宿主细胞, 所述质粒与编码多联融合单体蛋白 CTLA4-CTLA4/Fc 的 DNA 构建体可操作连接, 如 SEQ ID NO: 19 所示。用重组表达质粒 pTR11Ig-Top10' 转染的中国仓鼠卵巢细胞系 TR11Ig-CHO 以及用重组表达质粒 pTR22Ig-Top10' 转染的中国仓鼠卵巢细胞系 TR22Ig-CHO 被保藏在 KCCM, 其保藏号分别为 KCLRF-BP-00046 和 KCLRF-BP-00047. 根据布达佩斯条约 (Budapest treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure) 的条款, 将维持 KCCM 保藏。

本发明还提供: 含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgTNFR1-TNFR1/Fc, 如 SEQ ID NO: 10 所示; 含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgTNFR2-TNFR2/Fc, 如 SEQ ID NO: 12 所示; 含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgCD2-CD2/Fc, 如 SEQ ID NO: 22 所示; 含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgCTLA4-CTLA4/Fc, 如 SEQ ID NO: 24 所示。

本发明还提供: 编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白

mgTNFR1-TNFR1/Fc 的 DNA 构建体, 如 SEQ ID NO: 9 所示; 编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgTNFR2-TNFR2/Fc 的 DNA 构建体, 如 SEQ ID NO: 11 所示; 编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgCD2-CD2/Fc 的 DNA 构建体, 如 SEQ ID NO: 21 所示; 编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgCTLA4-CTLA4/Fc 的 DNA 构建体, 如 SEQ ID NO: 23 所示。为产生糖基化基序肽, 设计引物对 (正向和反向引物): 这些引物与相应于多联融合蛋白 TNFR/Fc, CD2/Fc 和 CTLA4/Fc 可溶性胞外结构域之间连接区的核苷酸序列互补, 并含有编码天冬酰胺 (N) 的密码子 (ATT 和 AAC) 或者编码丝氨酸 (S) 和苏氨酸 (T) 的密码子 (分别为 TCC; 和 ACC, ACG 和 ACA), 多联融合蛋白基因中的任何密码子均可被其替代。当设计引物时, 可根据允许核苷酸序列发生最小替代的条件和每条引物的解链温度 (T_w), 从多个氨基酸序列中选择其中一个。

本发明还提供: 重组表达质粒 pTR11Ig-MG, 该质粒与编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgTNFR1-TNFR1/Fc 的 DNA 构建体可操作连接, 如 SEQ ID NO: 9 所示; 重组表达质粒 pTR22Ig-MG, 该质粒与编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgTNFR2-TNFR2/Fc 的 DNA 构建体可操作连接, 如 SEQ ID NO: 11 所示; 重组表达质粒 pCD22Ig-MG, 该质粒与编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgCD2-CD2/Fc 的 DNA 构建体可操作连接, 如 SEQ ID NO: 21 所示; 以及重组表达质粒 pCT44Ig-MG, 该质粒与编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgCTLA4-CTLA4/Fc 的 DNA 构建体可操作连接, 如 SEQ ID NO: 23 所示。所述重组表达质粒保藏在 Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM), 保藏号分别为 KCCM-10404, KCCM-10407, KCCM-10401, 和 KCCM-10399。根据布达佩斯条约 (Budapest treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure) 的条款, 将维持 KCCM 保藏。

本发明还提供由重组表达质粒 pTR11Ig-MG 转化或转染的哺乳动

物宿主细胞，该质粒与编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgTNFR1-TNFR1/Fc 的 DNA 构建体可操作连接，如 SEQ ID NO: 9 所示；由重组表达质粒 pTR22Ig-MG 转化或转染的哺乳动物宿主细胞，该质粒与编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgTNFR2-TNFR2/Fc 的 DNA 构建体可操作连接，如 SEQ ID NO: 11 所示；由重组表达质粒 pCD22Ig-MG 转化或转染的哺乳动物宿主细胞，该质粒与编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgCD2-CD2/Fc 的 DNA 构建体可操作连接，如 SEQ ID NO: 21 所示；以及由重组表达质粒 pCT44Ig-MG 转化或转染的哺乳动物宿主细胞，该质粒与编码含有糖基化基序肽的多联融合单体蛋白 mgCTLA4-CTLA4/Fc 的 DNA 构建体可操作连接，如 SEQ ID NO: 23 所示。

本发明的多联融合二聚蛋白可在培养本发明的转化体或转染子后从培养基中分离。所述多联融合二聚蛋白可参与免疫应答，如上表 1 所示，这样就可根据蛋白种类将其用作治疗剂，诊断试剂以及实验室工具，其应用是本领域技术人员公知的。特别地，当用作治疗剂时，可按本领域通常的治疗有效量应用所述多联融合二聚蛋白，可以理解：可以视多种不同的因素来改变该量，所述因素包括所用化合物的活性，患者的年龄，体重，健康状况，性别和饮食，给药时间、给药途径、药物的组合，以及所预防或治疗的特定疾病的致病状态。另外，当作为治疗剂使用时，应该理解：本发明多联融合二聚蛋白可按本领域技术人员公知的施用参与免疫应答的蛋白的常规方法和途径应用。

参照以下实施例并结合附图，将更详细地解释本发明。但是，以下实施例仅为说明本发明，本发明并不仅限于这些实施例。为便于描述本发明，根据下述实施例所制备的 DNA 构建体、重组表达质粒和转化细胞系的信息，以及所用引物和保藏号都总结在下面的表 8 和表 9 中。

表 8
DNA 构建体的信息和保藏号

DNA 构建体名称	SEQ ID No.		保藏基因		保藏细胞系	
	DNA	蛋白质	命名	保藏号	命名	保藏号
TNFR1-IgG	1	2				
TNFR2-IgG	3	4				
TNFR1-TNFR1-IgG	5	6	pTR11Ig-Top10'	KCCM 10288	TR11Ig-CHO	KCLRF-BP-00046
TNFR2-TNFR2-IgG	7	8	pTR22Ig-Top10'	KCCM 10291	TR22Ig-CHO	KCLRF-BP-00047
mg TNFR1-TNFR1-IgG	9	10	pTR11Ig-MG	KCCM 10404		
mg TNFR2-TNFR2-IgG	11	12	pTR22Ig-MG	KCCM 10407		
CD2-IgG	13	14				
CTLA4-IgG	15	16				
CD2-CD2-IgG	17	18	pCD22Ig	KCCM 10402		
CTLA4-CTLA4-IgG	19	20	pCT44Ig	KCCM 10400		
mgCD2-CD2-IgG	21	22	pCD22Ig-MG	KCCM 10401		
mgCTLA4-CTLA4-IgG	23	24	pCT44Ig-MG	KCCM 10399		

表 9
引物信息

引物名称	SEQ ID NO.	说明
Oligo TNFR-EDF-EcoRI	25	含有 TNFR1 胞外结构域 5'端及 EcoRI 位点
Oligo TNFR-EDR-IgGh	26	含有 TNFR1 胞外结构域 3'端及 IgG 铰链区的反向引物
Oligo IgG1-T1F	27	含有 IgG 铰链区 5'端及 TNFR1 3'端
Oligo IgG1-R-XbaI	28	含有 IgG 铰链区 3'端及 XbaI 位点的反向引物
Oligo TNFR2-EDF-EcoRI	29	含 TNFR2 胞外结构域 5'端及 EcoRI 位点
Oligo TNFR2-EDR-IgGh	30	含有 TNFR2 胞外结构域 3'端及 IgG 铰链区的反向引物
Oligo IgG1-T2F	31	含有 IgG 铰链区 5'端及 TNFR2 3'端
Oligo TNFR1-CF-BamHI	32	含有 TNFR1 胞外结构域 5'端及 BamHI 位点。用于制备多联体
Oligo TNFR1-NR-BamHI	33	含有 TNFR1 胞外结构域 3'端及 BamHI 位点的反向引物, 用于制备多联体
Oligo TNFR2-CF-BamHI	34	含有 TNFR2 胞外结构域 5'端及 BamHI 位点。用于制备多联体
Oligo TNFR2-NR-BamHI	35	含有 TNFR2 胞外结构域 3'端及 BamHI 位点的反向引物, 用于制备多联体
Oligo mgTNFR1-TNFR1-IgG-F	36	用于诱变的引物, 含有能够将糖基化位点插入 TNFR1-TNFR1 连接区的序列, 以及相应于 TNFR1 3'端和 5'端的序列; 用于制备 MG(多糖基化)形式
Oligo mgTNFR1-TNFR1-IgG-R	37	用于诱变的反向引物, 含有能够将糖基化位点插入 TNFR1-TNFR1 连接区的序列, 以及相应于 TNFR1 3'端和 5'端的序列; 用于制备 MG 形式
Oligo mgTNFR2-TNFR2-IgG-F	38	用于诱变的引物, 含有能够将糖基化位点插入 TNFR2-TNFR2 连接区的序列, 以及相应于 TNFR2 3'端和 5'端的序列; 用于制备 MG 形式
Oligo mgTNFR2-TNFR2-IgG-R	39	用于诱变的反向引物, 含有能够将糖基化位点插入 TNFR2-TNFR2 连接区的序列, 以及相应于 TNFR2 3'端和 5'端的序列; 用于制备 MG 形式
Oligo CD2F-EcoRI	40	含有 CD2 胞外结构域 5'端及 EcoRI 位点
Oligo CD2R-RstI	41	含有 CD2 胞外结构域 3'端及 PstI 位点
Oligo IgG-F-PstI	42	含有 IgG 铰链区 5'端及 PstI 位点
Oligo CTLA4F-EcoRI	43	含有 CTLA-4 胞外结构域 5'端及 EcoRI 位点
Oligo CTLA4R-PstI	44	含有 CTLA-4 胞外结构域 3'端及 PstI 位点
Oligo CD2-NT-F	45	含有 CD2 胞外结构域 5'端; 用于制备多联体
Oligo CD2-CT-R	46	含有 CD2 胞外结构域 3'端的反向引物, 用于制备多联体
Oligo CTLA4-NT-F	47	含有 CTLA-4 胞外结构域 5'端; 用于制备多联体
Oligo CTLA4-CT-R	48	含有 CTLA-4 胞外结构域 3'端的反向引物, 用于制备多联体
Oligo mgCD2-CD2-IgG-F	49	用于制备 MG(多糖基化)形式的 CD2-CD2-IgG
Oligo mgCD2-CD2-IgG-R	50	用于制备 MG(多糖基化)形式的 CD2-CD2-IgG 的反向引物
Oligo mgCTLA4-CTLA4-IgG-F	51	用于制备 MG(多糖基化)形式的 CTLA4-CTLA4-IgG
Oligo mgCTLA4-CTLA4-IgG-R	52	用于制备 MG(多糖基化)形式的 CTLA4-CTLA4-IgG 的反向引物

实施例 1

人 TNFR

A. 制备编码简单融合单体蛋白 TNFR1/Fc 的 DNA 构建体(图 1 和图 5)

a. 编码 TNFR1 可溶性胞外结构域的 DNA 片段

按现有技术所述聚合酶链式反应 (PCR) 方法 (Holten 等, *Biotechniques* 8:528, 1990), 构建编码 I 型人 TNF 受体 (TNFR1, p55) 可溶性胞外结构域和人免疫球蛋白 G1 Fc 片段的融合基因。

使用引物 (SEQ ID NO: 25 的核苷酸序列) 和反义引物 (SEQ ID NO: 26 的核苷酸序列), 通过 PCR 构建编码 TNFR1 可溶性胞外结构域的 DNA 片段, 所述引物具有 EcoRI 限制酶切位点以及编码前导序列 (SEQ ID NO: 2 的 1-20 位的氨基酸序列) 的序列, 所述反义引物具有编码所述 TNFR1 可溶性胞外结构域 (TNFR1-ED) 3' 端部分区域以及免疫球蛋白 G1 (IgG1) 铰链区 5' 端的序列。该反应所用模板 cDNA 用从健康成人单核细胞 (T 淋巴细胞) 提取的 mRNA 进行逆转录 PCR(RT-PCR) 来构建。

健康成人血液抽取后, 用 RPMI-1640 (Gibco BRL, USA) 稀释至 1:1, 使用 Ficoll-hypaque (Amersham, USA) 进行密度梯度离心, 获得在顶部形成的 T 淋巴细胞层。为得到 5×10^5 细胞/ml 的细胞浓度, 用 RPMI-1640 洗涤细胞 3 次, 加入含 10% 胎牛血清 (FBS, Gibco BRL, USA) 的 RPMI-1640 培养基, 然后加入白细胞凝集素 (Pharmacia, USA), 使其浓度为 3.5ug/ml, 再在 37°C, 5%CO₂ 培养箱内培养 2 天。

使用 Tri-Reagent(MRC, USA) mRNA 纯化试剂盒纯化 mRNA。首先, 用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.2) 洗涤 2×10^7 的人 T 淋巴细胞 3 次, 然后与 1ml Tri-Reagent 混合几次, 使 RNA 溶解。向该试管中加入 0.2ml 氯仿并彻底混合后, 将该试管在室温下 (RT) 孵育 15 分钟, 然后在 4°C, 15000rpm 离心 15 分钟。将溶液的上部转到 1.5ml 试管中, 加入 0.5ml 异丙醇, 然后在 4°C, 15000rpm 离心 15 分钟。弃去上清后,

用 1ml 经 75%乙醇-25%DEPC (Sigma, USA)处理过的三蒸水重悬沉淀, 然后在 4°C, 15000rpm 离心 15 分钟. 彻底去除上清并在空气中干燥去除乙醇残余后, 用 50 μ l 经 DEPC 处理的三蒸水重悬 RNA.

将 2 μ g 纯化的 mRNA 与 1 μ l 的 oligo dT(dT30, Promega, USA)引物在 1.5ml 试管中混合为 10 μ M, 在 70°C 加热 2min, 冰上冷却 2min, 合成初级 cDNA. 然后, 向该混合物中加入 200U M-MLV 逆转录酶 (Promeg, USA), 10 μ l 5x 反应缓冲液 (250mM Tris-HCl, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 和 50mM DTT), 1 μ l dNTP (各 10mM, Takara, Japan)和经 DEPC 处理的三蒸水, 使总体积为 50 μ l, 然后在 42°C 反应 1 小时.

b. 编码免疫球蛋白 Fc 片段的 DNA 片段

使用引物 (SEQ ID NO: 27 的核苷酸序列) 和反义引物 (SEQ ID NO: 28 的核苷酸序列), 通过 PCR 构建编码免疫球蛋白 G1 Fc 片段的 DNA 片段, 所述引物具有编码所述 TNFR 可溶性胞外结构域 3'端部分区域以及免疫球蛋白 G1 (IgG1) 铰链区 5'端的序列, 所述反义引物具有 XbaI 限制酶切位点以及编码 Ig G1 Fc 3'端的序列. 该反应所用模板 cDNA 用从恢复期的未明原因发热患者的外周血液细胞 (B 淋巴细胞) 抽提的 mRNA 进行 RT-PCR 来构建.

c. 编码简单融合单体蛋白 TNFR1/Fc 的 DNA 构建体

将如上制备的编码 TNFR1 可溶性胞外结构域的 DNA 片段和编码免疫球蛋白 Fc 片段的 DNA 片段混合在同一试管内, 诱导共同序列(该序列包括 TNFR1 可溶性胞外结构域 3'端和 IgG1 铰链区 5'端)间的互补结合. 将该混合物作为模板, 使用具有编码 TNFR1 5'端序列的引物 (SEQ ID NO: 25 所示序列) 和具有编码 IgG1 Fc 3'端序列的另一条引物 (SEQ ID NO: 28 所示序列), 进行 PCR, 扩增包括编码 TNFR1 可溶性胞外结构域的 DNA 片段及编码 IgG1 Fc 片段的 DNA 片段的 DNA 构建体. 构建的基因包括前导序列, 以促进蛋白在表达后分泌.

d. 克隆编码简单融合单体蛋白 TNFR1/Fc 的 DNA 构建体

将上述的编码简单融合单体蛋白 TNFR1/Fc 的 DNA 构建体用

EcoRI 和 XbaI 限制酶切，并将其插入到市售的克隆载体 pBluescript KS II (+) (Stratagene, USA) 的 EcoRI/XbaI 位点进行克隆。通过 DNA 测序测定总编码区的序列 (SEQ ID NO: 1)。这样制备的融合蛋白为简单融合单体蛋白，命名为 TNFR1/Fc，图 1 所示的椭圆形代表融合基因初级表达产物的结构。推定的该简单融合单体蛋白 TNFR1/Fc 的氨基酸序列对应于 SEQ ID NO: 2。

B. 制备编码简单融合单体蛋白 TNFR2/Fc 的 DNA 构建体 (图 1 和图 5)

a. 编码 TNFR2 可溶性胞外结构域的 DNA 片段

按构建 TNFR1/Fc 的相同方法，构建编码 II 型人 TNF 受体 (TNFR2, p75) 可溶性胞外结构域和人免疫球蛋白 G1 Fc 片段的融合基因。

使用引物 (SEQ ID NO: 29 的核苷酸序列) 和反义引物 (SEQ ID NO: 30 的核苷酸序列)，通过 PCR 构建编码 TNFR2 可溶性胞外结构域的 DNA 片段，所述引物具有 EcoRI 限制酶切位点以及编码前导序列的序列，所述反义引物具有编码 TNFR2 可溶性胞外结构域 (TNFR2-ED) 3'端部分区域以及免疫球蛋白 G1 (IgG1) 铰链区 5'端的序列。该反应所用模板 cDNA 用从健康成人单核细胞 (T 淋巴细胞) 抽提的 mRNA 进行 RT-PCR 来构建。

b. 编码简单融合单体蛋白 TNFR2/Fc 的 DNA 构建体

将如上所述制备的编码 TNFR2 可溶性胞外结构域的 DNA 片段和编码免疫球蛋白 G1 Fc 片段的 DNA 片段混合在同一试管内后，诱导共同序列 (该序列包括 TNFR2 可溶性胞外结构域 3'端和 IgG1 铰链区 5'端) 间的互补结合。将该混合物作为模板，使用具有编码 TNFR2 5'端的序列的引物 (SEQ ID NO: 29 所示核苷酸序列) 和具有编码 IgG1 Fc 3'端的序列的另一条引物 (SEQ ID NO: 28 所示核苷酸序列)，进行 PCR，扩增包括编码 TNFR2 可溶性胞外结构域的 DNA 片段及编码 IgG1 Fc 片段的 DNA 片段的 DNA 构建体。构建的基因包括前导序列，以促进蛋白在表达后分泌。

c. 克隆编码简单融合单体蛋白 TNFR2/Fc 的 DNA 构建体

将上述的编码简单融合单体蛋白 TNFR2/Fc 的 DNA 构建体用 EcoRI 和 XbaI 限制酶切, 并将其插入到市售的克隆载体 pBluescript KS II (+) (Stratagene, USA) 的 EcoRI/XbaI 位点进行克隆. 通过 DNA 测序测定总编码区的序列 (SEQ ID NO: 3). 这样制备的融合蛋白为简单融合单体蛋白, 命名为 TNFR2/Fc, 图 1 所示的椭圆形代表融合基因初级表达产物的结构. 推定的该简单融合单体蛋白 TNFR2/Fc 的氨基酸序列对应于 SEQ ID NO: 4.

C. 制备编码多联融合单体蛋白 TNFR1-TNFR1/Fc 的 DNA 构建体(图 2 和图 5)

为制备含有多联形式的 TNFR1 可溶性胞外结构域的融合基因, 即编码 TNFR1-TNFR1/Fc 多联融合单体蛋白的构建体, 利用 PCR, 将 BamHI 限制酶切位点分别插入到 TNFR1 可溶性胞外结构域序列以及如上构建的编码简单融合单体蛋白 TNFR1/Fc 的 DNA 构建体中, 然后用连接酶连接 BamHI 限制酶切产生的每条片段区域. 将如上制备的编码简单融合单体蛋白 TNFR1/Fc 的 DNA 构建体, 用作本次反应的模板.

分别利用相应于 SEQ ID NO:25 核苷酸序列的引物和相应于 SEQ ID NO:33 核苷酸序列的另一条引物, 通过 PCR 扩增 3'端带有 BamHI 限制酶切位点的 TNFR1 可溶性胞外结构域的片段; 利用相应于 SEQ ID NO:28 核苷酸序列的引物和相应于 SEQ ID NO:32 核苷酸序列的另一条引物, 通过 PCR 扩增 5'端带有 BamHI 限制酶切位点的 TNFR1/Fc 简单融合单体蛋白的另一片段. 加入 1 μ l 初级 cDNA, 2U Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene, USA), 10 μ l 10X 反应缓冲液[200mM Tris-HCl, pH8.75, 100mM (NH₄)₂SO₄, 100mM KCl, 20mM MgCl₂], 1% TritonTM X-100, 1mg/ml BSA, 3 μ l 引物 1(10 μ M), 3 μ l 引物 2(10 μ M), 2 μ l dNTP (每种 10mM), 补加三蒸水使总体积为 100 μ l, 进行 PCR 反应. 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C 1min; 58 $^{\circ}$ C 1.5min; 72 $^{\circ}$ C 1min, 31 个循环; 并 72 $^{\circ}$ C 15min, 使 PCR 产物延伸完全末端补齐.

在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳后, 用 Qiaex II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen, USA) 纯化 PCR 产物。该纯化的 PCR 产物用 BamHI 限制酶切, 并用苯酚-氯仿抽提方法抽提。然后, 用连接酶连接 BamHI 限制酶切产生的两种 DNA 片段。

D. 制备编码 TNFR2-TNFR2/Fc 多联融合单体蛋白的 DNA 构建体(图 2 和图 5)

当利用 PCR, 将 BamHI 限制酶切位点分别插入到 TNFR2 可溶性胞外结构域序列及上述制备的编码简单融合单体蛋白 TNFR2/Fc 的 DNA 构建体中后, 用连接酶连接 BamHI 限制酶切产生的每条片段区域, 得到编码多联融合单体蛋白 TNFR2-TNFR2/Fc 的 DNA 构建体。

利用相应于 SEQ ID NO: 34 核苷酸序列的引物和相应于 SEQ ID NO: 35 核苷酸序列的引物, 扩增 3'端带有 BamHI 限制酶切位点的 TNFR2 可溶性胞外结构域的片段。如同 TNFR1 一样进行 PCR, 只是将如上制备的、编码 SEQ ID NO: 3 的简单融合单体蛋白的 DNA 构建体作为模板。PCR 产物用如 TNFR1 相同的方法纯化。

E. 编码带有糖基化基序的多联融合单体蛋白 TNFR1-TNFR1/Fc 的 DNA 构建体

使用反义引物 (SEQ ID NO: 37 的核苷酸序列) 和另一引物 (SEQ ID NO: 25 的核苷酸序列), 通过 PCR 制备 DNA 片段, 所述反义引物具有编码第一个 TNFR1 可溶性胞外结构域 3'端部分区域 (SEQ ID NO: 5 的 565-591 位核苷酸序列) 的序列, 但除外 TNFR1 可溶性胞外结构域连接区的疏水性多肽区域的序列 (SEQ ID NO: 6 的 197-216 位氨基酸序列), 还具有编码第二个 TNFR1 可溶性胞外结构域 5'端部分区域 (SEQ ID NO: 5 的 649-681 位核苷酸序列) 的序列, 所述另一引物具有编码 EcoRI 限制酶切位点以及前导序列的序列。

另外, 通过制备上述引物 (SEQ ID NO: 36 和 37 的核苷酸序列), 插入编码糖基化位点的总共四条氨基酸序列 (SEQ ID NO: 10 的 189-191, 192-194, 198-200 和 204-206 位氨基酸序列), 相应于 SEQ ID NO: 5 的 565-567 位核苷酸 (CTG, Leu), 574-576 (ACG, Thr), 652-654

(CTA, Leu) 和 670-672 (AGA, Arg) 被核苷酸 AAC(Asn, N) 替代; SEQ ID NO: 5 的 571-573 位 (TGC, Cys) 和 580-582 (TTG, Leu) 位核苷酸被核苷酸 ACC(Thr, T) 替代; 658-660 位核苷酸 (GAC, Asp) 被 TCC(Ser, S) 替代。

在该反应中, 编码多联形式的 TNFR1-TNFR1/Fc 的基因 (SEQ ID NO: 5 的核苷酸) 被用作模板。在一级 PCR 过程中, 反义引物只有一半被诱导与用作模板的、编码多联形式 TNFR1-TNFR1/Fc 的基因结合, 并且, 随着链式反应进行, 未与模板结合的部分在聚合酶的作用下, 被诱导形成完整的双链 DNA, 这样就能够产生编码第二个可溶性胞外结构域的部分区域的 5'端序列与编码 TNFR1 可溶性胞外结构域包括前导序列的 3'端序列之间相连状态的 DNA 片段。所以, 编码第二个可溶性胞外结构域的 5'端序列部分区域就能够结合下述的第二个 DNA 片段。

第二个 DNA 片段是使用引物 (SEQ ID NO: 36 的核苷酸序列) 和反义引物 (SEQ ID NO: 28 的核苷酸序列), 通过 PCR 制备, 所述引物具有编码第一个 TNFR1 可溶性胞外结构域 3'端部分区域 (SEQ ID NO: 5 的 565-591 位核苷酸序列) 以及第二个 TNFR1 可溶性胞外结构域 5'端部分区域 (SEQ ID NO: 5 的 649-681 位核苷酸序列) 的序列, 所述反义引物具有编码 XbaI 限制酶切位点以及 IgG1 Fc 3'端的序列。该反应也如上进行, 即, 反义引物仅有一半被诱导与模板结合, 于是象上述一样 DNA 片段就具有了编码 TNFR1 胞外结构域的 5'端包括第一个可溶性胞外结构域 3'端部分区域的序列。

接下来, 将上述 PCR 制备的两种 DNA 片段混合在同一试管内, 使共同序列之间结合, 并利用引物 (SEQ ID NO: 25 和 28 的核苷酸序列) 通过 PCR 进行融合, 所述引物编码每个多联基因的 5'和 3'端, 产物命名为 mgTNFR1-TNFR1-IgG。

F. 编码带有糖基化基序的多联融合单体蛋白 TNFR2-TNFR2/Fc 的 DNA 构建体

使用反义引物 (SEQ ID NO: 39 的核苷酸序列) 和另一引物 (SEQ

ID NO: 29 的核苷酸序列), 通过 PCR 制备 DNA 片段, 所述反义引物具有编码第一个 TNFR2 可溶性胞外结构域 3'端部分区域(SEQ ID NO: 7 的 586-606 位核苷酸序列)的序列, 但除外 TNFR2 可溶性胞外结构域连接区的疏水性多肽区域的序列(SEQ ID NO: 8 的 203-263 位氨基酸序列), 还具有编码第二个 TNFR2 可溶性胞外结构域 5'端部分区域(SEQ ID NO: 7 的 790-807 位核苷酸序列)的序列, 所述另一引物具有编码 EcoRI 限制酶切位点以及前导序列的序列。

另外, 通过制备上述引物(SEQ ID NO: 38 和 39 的核苷酸序列), 插入编码糖基化位点的总共两条氨基酸序列(SEQ ID NO: 12 的 199-201 和 206-208 位氨基酸序列), 相应于 SEQ ID NO: 7 的 595-597 位核苷酸(GTC, Val)和 799-801 位核苷酸(GGG, Gly)被核苷酸 AAC(Asn, N)替代。

在该反应中, 编码多联形式的 TNFR2-TNFR2/Fc 的基因(SEQ ID NO: 7 的核苷酸)被用作模板。在一级 PCR 过程中, 反义引物只有一半被诱导与用作模板的、编码多联形式 TNFR2-TNFR2/Fc 的基因结合, 并且, 随着链式反应进行, 未与模板结合的部分在聚合酶的作用下, 被诱导形成完整的双链 DNA, 这样就能够产生编码第二个可溶性胞外结构域部分区域的 5'端序列与编码 TNFR2 可溶性胞外结构域包括前导序列的 3'端序列之间相连状态的 DNA 片段。所以, 编码第二个可溶性胞外结构域的 5'端序列的部分区域就能够结合下述的第二个 DNA 片段。

第二个 DNA 片段是使用引物(SEQ ID NO: 38 的核苷酸序列)和反义引物(SEQ ID NO: 28 的核苷酸序列)通过 PCR 制备的, 所述引物具有编码第一个 TNFR2 可溶性胞外结构域 3'端部分区域(SEQ ID NO: 7 的 586-606 位核苷酸序列)以及第二个 TNFR2 可溶性胞外结构域 5'端部分区域(SEQ ID NO: 7 的 790-807 位核苷酸序列)的序列, 所述反义引物具有编码 XbaI 限制酶切位点以及 IgG1 Fc 3'端的序列。该反应如上进行, 即, 反义引物仅有一半被诱导与模板结合, 于是象上述一样的 DNA 片段就具有了编码 TNFR2 胞外结构域的 5'端, 包括

第一个可溶性胞外结构域3'端部分区域的序列。

接下来，将上述 PCR 制备的两种 DNA 片段混合在同一试管内，使共同序列之间结合，并利用引物（SEQ ID NO: 29 和 28 的核苷酸序列）通过 PCR 进行融合，所述引物编码每个多联基因的 5'和 3'端，产物命名为 mgTNFR2-TNFR2-IgG。

G. 克隆编码多联融合单体蛋白 TNFR-TNFR/Fc 及其糖基化形式的 DNA 构建体

将如上所述的编码多联融合单体蛋白 TNFR-TNFR/Fc 及其糖基化形式的 DNA 构建体插入到 pBluescript KS II (+) (Stratagen, USA) 的 EcoRI/XbaI 位点而进行克隆。这样获得的融合蛋白中，多联融合单体蛋白被命名为 TNFR1-TNFR1/Fc 和 TNFR2-TNFR2/Fc，其糖基化形式被命名为 mgTNFR1-TNFR1/Fc 和 mgTNFR2-TNFR2/Fc。推定的氨基酸序列分别相应于 SEQ ID NO: 6, 8, 10 和 12。

将 10 μ g 用作载体的 pBluescript KS II (+) (Stratagen, USA) 与 15U EcoRI, 15U XbaI, 5 μ l 10X 反应缓冲液 (100mM Tris-HCl, pH7.5, 100mM MgCl₂, 10mM DTT, 500nM NaCl), 5 μ l 0.1% 的 BSA (Takara, Japan) 混合，加入三蒸水补足体积到 50 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时，对 DNA 进行限制酶切。在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳后，用 Qiaex II 凝胶抽提试剂盒 (Qiagen, USA) 纯化 PCR 产物。

将 100ng 经过了 EcoRI 和 XbaI 限制酶切的 pBluescript KS II (+) (Stratagen, USA) 与 20ng 经过所述限制酶切的 PCR 产物, 0.5U T4 DNA 连接酶 (Amersham, USA), 1 μ l 10X 反应缓冲液 (300mM Tris-HCl, pH7.8, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 10mM ATP) 混合，加入三蒸水补足体积到 10 μ l，在 16 $^{\circ}$ C 水浴孵育混合物 16 小时。用氯化铷 (RbCl, Sigma, USA) 方法将 E.coli Top10 (Novex, USA) 制备成感受态细胞，并进行转化，然后涂布在含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素 (Sigma, USA) 的固体 LB 培养基上，并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 16 小时。将形成的菌落接种到 4ml 含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 16 小时。根据 Sambrook 等人 (Molecular cloning, Cold Spring

Harbor Laboratory 出版, p1.25-1.31, p1.63-1.69, p7.26-7.29, 1989) 的碱裂解法, 从 1.5ml 上述孵育培养液纯化质粒, 用 EcoRI 和 XbaI 限制酶切证实克隆的存在。

如下所述, 用双脱氧链终止 DNA 测序法 (Sanger 等, Proc.Natl.Acad.Sci., 74: 5483, 1977) 鉴定总编码区的序列。使用上述碱裂解法纯化的质粒和 Sequenase™ ver 2.0(Amersham, USA), 根据手册进行 DNA 测序反应。当上述的反应混合物被加样到 6%的聚丙烯酰胺凝胶上后, 以 1800-2000V 的恒定电压, 在 50°C 电泳 2 小时, 凝胶变干后, 通过曝光于 X-射线底片 (Kodak, USA) 鉴定 DNA 序列。

实施例 2 和 3

CD2 和 CTLA4

通过 PCR, 使用引物[CD2 (SEQ ID NO: 40 的核苷酸序列)和 CTLA4 (SEQ ID NO: 43 的核苷酸序列)]和反义引物[CD2 (SEQ ID NO: 41 的核苷酸序列)和 CTLA4 (SEQ ID NO: 44 的核苷酸序列)], 构建编码 CD2 和 CTLA4 可溶性胞外结构域的 DNA 片段, 其中所述引物具有 EcoRI 限制酶切位点及编码前导序列[CD2 (SEQ ID NO: 14 的 1-24 位氨基酸序列)和 CTLA4 (SEQ ID NO: 16 的 1-21 位氨基酸序列)]的编码序列[CD2 (SEQ ID NO: 13 的核苷酸序列)和 CTLA4 (SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列)], 所述反义引物具有 PstI 限制酶切位点和编码上述蛋白可溶性胞外结构域 3'端的序列[CD2 (SEQ ID NO: 13 的核苷酸序列)和 CTLA4 (SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列)]. 该反应的模板 cDNA 用从健康成人单核细胞 (T 淋巴细胞) 抽提的 mRNA 通过逆转录 PCR(RT-PCR) 制备。

同样, 使用带有 PstI 限制酶切位点以及 IgG1 恒定区 5'端编码序列的引物 (SEQ ID NO: 42 的核苷酸序列), 和带有 XbaI 限制酶切位点以及 IgG1 Fc 3'端编码序列的反义引物 (SEQ ID NO: 28 的核苷酸序列), 通过 PCR 来构建编码免疫球蛋白 G1 Fc 片段的 DNA 构建体。该反应所用模板 cDNA 用从恢复期的未明原因发热患者的外周血液细胞 (B 淋巴细胞) 抽提的 mRNA 进行 RT-PCR 来制备。

接下来,用 PstI 对如上述制备的编码 CD2 和 CTLA4 可溶性胞外结构域的 DNA 片段以及编码免疫球蛋白 G1 Fc 片段的 DNA 片段进行限制酶切,然后使用 T4 DNA 连接酶进行连接,构建简单二聚形式的 CD2/Fc 和 CTLA4/Fc 基因.构建的基因含有前导序列以促进蛋白在表达后分泌.

上述的 DNA 构建体用限制性内切酶 EcoRI 和 XbaI 进行限制酶切,并插入到市售克隆载体 pBluescript KS II (+) (Stratagene, USA) 的 EcoRI/XbaI 位点,进行克隆.进行 DNA 测序来鉴定整个编码区的序列(SEQ ID NO: 13 和 15).这些所产生的融合蛋白被命名为 CD2/Fc 和 CTLA4/Fc,其推定的氨基酸序列相应于 SEQ ID NO: 14 和 16.

加入 1 μ l 初级 cDNA, 2U Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene, USA), 10 μ l 10X 反应缓冲液[200mM Tris-HCl, pH8.75, 100mM (NH₄)₂SO₄, 100mM KCl, 20mM MgCl₂], 1% TritonTM X-100, 1mg/ml BSA, 3 μ l 引物 1 (10 μ M), 3 μ l 引物 2 (10 μ M), 2 μ l dNTP (每种 10mM), 补加三蒸水使总体积为 100 μ l, 进行 PCR 反应.反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C 1min; 58 $^{\circ}$ C 1.5min; 72 $^{\circ}$ C 1min, 31 个循环; 并 72 $^{\circ}$ C 15min, 使 PCR 产物延伸完全末端补齐.

多联形式的 CD2-CD2/Fc 和 CTLA4-CTLA4/Fc 融合基因如下构建.

为制备含有多联形式的 CD2 和 CTLA4 可溶性胞外结构域的融合基因,利用连接酶进行平头末端连接,使用 PstI 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶,将 CD2 和 CTLA4 可溶性胞外结构域序列插入到带有平头末端的简单二聚体形式融合基因的胞外结构域和免疫球蛋白之间的连接区.具体而言,通过 PCR,使用引物[CD2 (SEQ ID NO: 13 的核苷酸序列)和 CTLA4 (SEQ ID NO: 48 的核苷酸序列)]和反义引物 [CD2 (SEQ ID NO: 46)和 CTLA4 (SEQ ID NO: 48)],构建 DNA 构建体,其中所述引物具有编码可溶性胞外结构域前导序列末端[CD2 (SEQ ID NO: 14 的 25 位氨基酸序列)和 CTLA4 (SEQ ID NO: 16 的 22 位氨基酸序列)]的编码序列[CD2 (SEQ ID NO: 13 的核苷酸序列)和

CTLA4 (SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列)], 所述反义引物具有编码上述可溶性胞外结构域 3'端的序列[CD2 (SEQ ID NO: 13 的核苷酸序列)和 CTLA4 (SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列)]. 将上述的简单融合单体基因 [CD2/Fc(SEQ ID NO:13 的核苷酸序列)和 CTLA4/Fc(SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列)]用作该反应的模板。

此外, CD2/Fc 和 CTLA4/Fc, 以简单单体形式被插入到 pBluescript KS II (+)中, 使用限制性内切酶 PstI 将其制备成具有 3'突出端。用 T4 DNA 聚合酶处理, 使 3'突出端的切头端部分缺失, 以形成平头末端。为制备可溶性胞外结构域多联体形式的融合基因, 将上述 PCR 制备的 CD2 和 CTLA4 可溶性胞外结构域插入处理成平头末端的简单单体基因的切头中, 进行克隆。这些所产生的融合蛋白被命名为 CD2-CD2/Fc 和 CTLA4-CTLA4/Fc, 为多联融合单体蛋白的形式, 其推定的氨基酸序列分别相应于 SEQ ID NO: 18 和 20。

多糖基化形式的多联融合基因如下构建。

使用引物 (该引物包括 EcoRI 限制酶切位点和带前导序列的可溶性胞外结构域), 以及反义引物 (该反义引物具有编码多联形式融合基因第一个可溶性胞外结构域 3'端部分和带有糖基化基序替代核苷酸的第二个可溶性胞外结构域 5'端部分的序列), 通过 PCR 制备得到 DNA 片段; 再使用引物 (该引物具有编码多联形式融合基因第一个可溶性胞外结构域 3'端部分和带有糖基化基序替代核苷酸的第二个可溶性胞外结构域 5'端部分区域的序列), 以及反义引物 (该反义引物具有编码免疫球蛋白 G1 Fc 片段 3'端的序列和 XbaI 限制酶切位点), 通过 PCR 制备得到另一 DNA 片段, 将上述得到的两种 DNA 片段混合在同一试管内, 通过二级 PCR 插入糖基化基序。

至于多联融合基因 CD2/Fc 和 CTLA4/Fc, 是根据上述 TNFR/Fc 相同的方法, 使用修饰的引物, 通过 PCR 插入糖基化基序, 但是其与 TNFR/Fc 的差别在于与 CD2 和 CTLA4 可溶性胞外结构域结合的氨基酸序列保持不变。

在 CD2/Fc 和 CTLA4/Fc 多联融合蛋白的多糖基化过程中, CD2/Fc

是使用制备的引物,通过插入总共2个糖基化基序肽区域(SEQ ID NO: 22的200-202和206-208位氨基酸序列)而完成,所述制备的引物中SEQ ID NO: 17的598-600(CCT, Pro)和616-618(GAG, Glu)位核苷酸被AAT(Asn, N)替代,而CTLA4/Fc是使用制备的引物(SEQ ID NO: 51和52),通过插入总共3个糖基化基序肽区域(SEQ ID NO: 24的136-138, 142-144, 和147-149位氨基酸序列)而完成,所述制备的引物中SEQ ID NO: 19的403-405(GTA, Val)和424-426(CCA, Pro)位核苷酸被AAT(Asn, N)替代;409-411(GAT, Asp)和445-447(GTG, Val)位核苷酸被ACA(Thr, T)和ACG(Thr, T)替代.这样产生的融合蛋白被命名为mgCD2-CD2/Fc和mgCTLA4-CTLA4/Fc,为多联融合单体蛋白,其推定的氨基酸序列分别相应于SEQ ID NO: 22和24.

实施例4

TNFR/Fc简单/多联融合二聚蛋白的表达和纯化

为在CHO-K1细胞(ATCC CCL-61, 卵巢, 中国仓鼠, 灰仓鼠(Cricetulus griseus))中表达融合蛋白,从转化的E.coli中纯化含有TNFR/Fc融合基因的pBluescript KS II (+)质粒DNA,将利用EcoRI和XbaI限制酶切作用产生的TNFR/Fc片段插入动物细胞表达载体pCRTM3 (Invitrogen, USA)质粒的EcoRI/XbaI位点中,构建动物细胞表达载体.将其命名为质粒pTR11-Top 10'和质粒pTR22-Top 10',并于2001年7月10日保藏在Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM),保藏号分别为KCCM 10288和KCCM 10291.

将含有上述TNFR/Fc融合基因的质粒pTR11-Top 10'或质粒pTR22-Top 10' DNA与LipofectaminTM试剂(Gibco BRL, USA)混合,进行转染.1-3 X 10⁵细胞/孔的CHO-K1细胞被接种在6孔组织培养板(Nunc, USA)上,在10% FBS-DMEM培养基中培养至50-80%,然后将DNA-脂质体复合体和2-25 μ l LipofectaminTM试剂(Gibco BRL, USA)加入细胞培养板中不含血清的DMEM培养基内,所述复合体与1-2 μ g含有上述TNFR/Fc融合基因的质粒pTR11-Top 10'或质粒pTR22-Top 10' DNA反应了15-45min.培养5小时后,加入带有20%

血清的 DMEM 培养基, 继续培养细胞 18-24 小时。初次转染后, 将细胞在含 1.5mg/ml Geneticin (G418, Gibco BRL, USA) 的 10% FBS-DMEM 培养基中培养 3 周, 筛选形成的菌落, 用于扩增培养。使用过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG (KPL, USA), 利用 ELISA 分析融合蛋白的表达。

ELISA 如下进行。首先, 用 0.1M 碳酸氢钠将 1mg/ml 过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG(KPL, USA) 稀释到 1: 2000, 然后向 96 孔柔性板 (Falcon, USA) 中等份加入 100 μ l 该稀释液, 并用塑料膜密封, 然后在 4 $^{\circ}$ C 孵育超过 16 小时, 使其包被到板的表面。然后, 用洗涤缓冲液(0.1% Tween-20 在 1X PBS 中)和稀释缓冲液(48.5ml 1X PBS, 1.5ml FBS, 50ul Tween-20)洗涤 3 次, 再将其等分为 180l。向第一个孔中滴入 20 μ l 培养上清液后, 使用微量移液管将其连续稀释, 将 0.01 μ g/ μ l 的人免疫球蛋白 G (Sigma, USA) 作为阳性对照, 未转染 CHO K-1 细胞的培养基作为阴性对照, 将其同样稀释。稀释后, 用铝箔包裹 96 孔 ELISA 板 (Falcon, USA), 并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 小时, 用洗涤缓冲液洗涤三次。用稀释缓冲液以 1: 5000 稀释结合过氧化物酶的山羊抗人 IgG(KPL, USA), 等分 100 μ l, 用铝箔包裹, 在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。反应后, 将板洗涤三次, 使用 TMB 微孔过氧化物酶底物体系 (KPL, USA) 显色, 使用微板读板器(Bio-Rad, Model 550, Japan)测定 655nm 波长下的吸光度, 以检验是否存在表达。

上述制备的转染子被命名为 TR11Ig-CHO 和 TR22Ig-CHO, 并于 2001 年 7 月 7 日保藏在 Korea Cell Line Research Foundation (KCLRF), 保藏号分别为 KCLRF-BP-00046 和 KCLRF-BP-00047。为纯化上述转染子所产生的蛋白, 使这些转染子适应一种不含血清的培养基 CHO-S-SFM II (Gibco BRL, USA), 具体过程如下。将 3×10^5 细胞接种到 6 孔板上, 在 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 下培养超过 16 小时, 使其粘附, 在显微镜下检查, 约有 30-50% 的板面积被细胞覆盖, 然后将细胞培养在培养基中, 培养基由 10% FBS DMEM 和 CHO-S-SFM II 构成, 比例为 8: 2。当以该比例培养连续传代 3 次后, 以 6: 4 的比例培养 3

次；以 4: 6 培养 3 次；3: 7 培养 3 次，以 2: 8 培养 3 次；1: 9 培养 3 次；最终在 100% 的 CHO-S-SFM II 培养基中培养。通过 ELISA 检测表达水平。

当在 CHO-S-SFM II 中大规模培养这些转染细胞时，200X g 离心含各种融合蛋白的上清液 12 分钟，以去除细胞碎屑，通过使用 HiTrap 蛋白 A 柱 (Amersham, USA) 的方法，如下所述纯化蛋白。将 20mM 磷酸钠 (pH7.0, Sigma, USA) 以 1ml/min 的速度过柱 2min，将 10ml 上清以相同的速度过柱，使融合蛋白与蛋白 A 结合。将 20mM 磷酸钠 (pH7.0) 以相同的速度过柱 2min，进行洗涤，然后将 0.1M 柠檬酸 (pH3.0, Sigma, USA) 以相同的速度过柱 3min，将 500 μ l 提取物连续分部收集到 1.5ml 试管中。使用 1M Tris (pH11.0, USB, USA) 将其调节至 pH7.0，按上述的 ELISA 检验试管中是否存在融合蛋白。用 Centricon 30 (Amicon, USA)，以 2000Xg 在 4 $^{\circ}$ C 离心 30min，使纯化蛋白浓缩。

实施例 5

纯化的 TNFR1-TNFR1/Fc 和 TNFR2-TNFR2/Fc 的 SDS-PAGE(图 15)

利用 SDS-PAGE 方法，在加入还原剂 (其破坏二硫键) DTT 而形成的还原条件以及不含 DTT 的非还原条件下，将利用蛋白 A 柱纯化的蛋白进行电泳。表 10 中显示了 SDS-PAGE 上分子量的估算结果。可以证实 TNFR/Fc 蛋白是以二聚体的形式存在于细胞中。从 TNFR1-TNFR1-Ig 的氨基酸序列推导出的分子量为约 70kDa，而在 SDS-PAGE 中估计为约 102kDa。可将这种差异视为糖蛋白电泳所产生的普通现象，该特征似乎是糖基化位点降低了电泳迁移率而致。

表 10. SDS-PAGE 中 TNFR-TNFR/Fc 的分子量

蛋白	分子量 (kDa)	
	还原条件	非还原条件
TNFR1-TNFR1/Fc	102	200
TNFR2-TNFR2/Fc	115	220

实施例 6

简单/多联融合二聚 TNFR/Fc 融合蛋白对 TNF α 和 TNF β 细胞毒性的中和作用实验

L929 细胞[ATCC, *Mus musculus* (小鼠), NCTC 克隆 929 (来自 L 株; L-929; L 细胞)用于测试 TNFR/Fc 融合蛋白对 TNF α 和 TNF β 诱导的细胞毒性的抑制作用. 该分析是基于 TNFR 具有抑制 TNF 诱导的细胞毒性的活性 (Scallon 等, *Cytokine* 7:759, 1995).

将 L929 以 3×10^4 细胞/孔的量接种在 96 孔板内, 并在 CO₂ 培养箱内 37°C 孵育 24 小时. 然后加入放线菌素 D (Sigma, USA) 使其浓度为 3 μ g/ml, 将细胞与 TNF α 和 TNF β 以及连续 10 次稀释的 TNFR 试样共同孵育 16-18 小时, 其中 TNF α 和 TNF β 的浓度为表达 100% 细胞毒性 (0.5-2ng/ml). 然后, 用染色试剂结晶紫 (Wako Pure Chemical Industries, Japan) 染色 96 孔板内的细胞, 使用分光光度计 (Bio-Rad, Model-550, Japan), 利用在 595nm 波长下的吸光度来估算细胞活性.

表 11 显示了每种 TNFR/Fc 融合蛋白的 IC₅₀, 多联融合蛋白 (TNFR1-TNFR1/Ig 和 TNFR2-TNFR2/Ig) 显示出对两种 TNF 诱导的细胞毒性的抑制作用比简单二聚融合蛋白 (TNFR1/Ig 和 TNFR2/Ig) 的抑制作用强. 同样, 比较现有的简单融合二聚体和本发明多联形式 TNFR/Fc 融合蛋白二聚体对 TNF α (图 16) 和 TNF β (图 17) 细胞毒性的抑制作用, 更清楚地显示出本发明多联形式 TNFR/Fc 融合蛋白二聚体显著地抑制 TNF α 和 TNF β 的细胞毒性.

表 11. 对细胞毒性抑制作用的 IC₅₀

融合蛋白		IC50(ug/ml)	
		TNF α 处理	TNF β 处理
简单二聚体	[TNFR1/Fc] ₂	63	129
	[TNFR2/Fc] ₂	189	469
多联二聚体	[TNFR1-TNFR1/Fc] ₂	9	20
	[TNFR2-TNFR2/Fc] ₂	15	15

实施例 7

简单/多联融合二聚体 CD2/Fc 融合蛋白和 CTLA4/Fc 融合蛋白对活性免疫细胞增殖的抑制作用实验

WT100B1S, 一种 B 淋巴细胞系, 是通过用 Epstein-Barr 病毒转染不明原因发热患者 B 淋巴细胞而制备得到, 将该细胞接种在补充 10%FBS 的 RPMI 1640 中, 用作 T 淋巴细胞的抗原呈递细胞. 2000rpm 离心 2min 使其沉淀后, 将该细胞重悬在补充 10%FBS 的 RPMI 1640 中, 使浓度达到 5.0×10^5 细胞/ml, 然后接受 3000rd γ -射线照射.

使用 Ficoll-hypaque(Amersham, USA)从健康成人血液中分离 T 淋巴细胞, 然后培养在补充 10%FBS 的 RPMI 1640 中, 使其浓度达到 2.0×10^6 细胞/ml.

为进行初次混合淋巴细胞反应 (MLR), 将各 15ml 的 WT100B1S 和 T 淋巴细胞混合到 150mm 细胞培养皿中, 培养 3 天, 然后加入 15ml 补充 10%FBS 的 RPMI 1640 继续培养 3 天. 经过了总共 6 天的培养后, 使用上述的 Ficoll-hypaque(Amersham, USA)纯化活 T 淋巴细胞, 用含有 45% FBS, 45% RPMI 1640 和 10% DMSO 的培养基, 将纯化的 T 淋巴细胞冷冻后保藏在液氮中.

初次 MLR 反应的 T 淋巴细胞被解冻以进行二次 MLR, 用 RPMI 1640 培养基洗涤细胞 2 次, 并用补充 10%FBS 的 RPMI 1640 将其制备成细胞浓度为 3.0×10^5 细胞/ml 的悬液.

用上述方法重新培养用作为抗原呈递细胞的 WT100B1S, 然后接受 3000rd γ -射线的照射, 用补充 10% FBS 的 RPMI 1640 制备成 7.5×10^4 细胞/ml 的悬液. 向 96 孔平底细胞培养板中加入 100 μ l 制备的 WT100B1S, 并与 CD2/Fc 和 CTLA4/Fc 融合蛋白混合, 所述蛋白终浓度为 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 和 10^{-4} μ g/ml, 加入 100 μ l 上述初次 MLR 反应的 T 淋巴细胞. 在 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱内孵育 2 天后, 加入 100 μ l 补充 10% FBS 的 RPMI 1640 并继续孵育 2 天. 在总共 6 天孵育的最后 6 个小时内, 加入 1.2 μ Ci/ml ^3H -胸苷 (Amersham, USA) 与细胞共同孵育.

培养结束后, 将 96 孔板在 4°C, 110Xg 离心 10min, 沉淀 T 淋巴细胞, 去除上清, 并用 200 μ l 1XPBS 洗涤沉淀. 在相同的条件下离心, 去除 PBS, 然后加入 200 μ l 冰冷的三氯乙酸 (TCA, Merck, USA), 混合 2min, 然后在 4°C 下反应 5min 以去除 3 H-胸苷残余.

上述相同条件下离心后, 去除上清, 加入 200 μ l 冰冷的 70%乙醇, 在 4°C 孵育 5min, 使 T 淋巴细胞固定. 离心后去除上清, 用上述相同的 10% TCA 处理方法彻底去除 3 H-胸苷 (Amersham, USA) 残余.

与 100 μ l 2% SDS (pH8.0)和 0.5N NaOH 在 37°C 反应 30min, 进行细胞溶解, 在 25°C, 110Xg 离心 10min, 沉淀 T 淋巴细胞, 然后将 50 μ l 上清转移到 96 孔样品板 (Wallac, USA). 向上清中加入 1.5 体积的 OptiPhase SuperMix (Wallac, USA), 并混合 5min, 使用 1450 MicroBeta TriLux 微量板液体闪烁发光计数器 (Wallac, USA), 测定 3 H 的 cpm 值, 检验是否存在 T 淋巴细胞增殖.

实施例 8

小鼠中糖基化多联融合二聚蛋白对延长血浆半衰期的作用实验

将 5 μ g 纯化的融合蛋白腹腔内注射到小鼠体内 (ICR, Samtako, Korea), 并以最大周期 120 小时 (5 天) 的定时间隔抽取血液, 通过 ELISA 测定蛋白的浓度, 测定糖基化多联融合二聚蛋白 [mgTNFR1-TNFR1/Fc] $_2$, [mgTNFR2-TNFR2/Fc] $_2$, [mgCD2-CD2/Fc] $_2$, 和 [mgCTLA4-CTLA4/Fc] $_2$ 的血浆半衰期. 如图 20, 图 21 和图 22 所示, 可以看出糖基化多联融合二聚蛋白的血浆半衰期高于相应的天然形式简单融合二聚蛋白, 从而可预期持续的作用会提高其效力.

实施例 9

简单/多联 TNFR/Fc 融合蛋白二聚体对 DBA/1 小鼠中胶原诱导的关节炎的作用实验

给每只 DBA/1 小鼠尾部注射 100 μ g 以 2mg/ml 浓度溶解在 0.05M 醋酸中的 II 型胶原和 Arthrogen-CIA 佐剂 (Chondrex, USA), 使其形成胶原诱导的关节炎 (CIA). 使用不完全弗氏佐剂 (Difco, USA)

在3周后进行加强。

用 100 μ g II 型胶原免疫 DBA/1 小鼠后 3-4 周形成关节炎。发病后 3-5 天观察到小鼠红肿脚爪，炎性关节炎持续超过 3-4 周。尽管最终炎症有所缓解，损伤的关节永久保持僵硬。在表 12 的基础上，每周测定 2-3 次关节炎的程度，表 12 显示关节炎严重程度的主观指数（每次实验测定平均 5 只小鼠）。为测定简单和多联融合二聚 TNFR/Fc 对 CIA 的作用，将 TNFR/Fc 或 PBS 腹腔内注射到小鼠体内。每次实验中，将 TNFR/Fc 以每 2 天 10 μ g 的量在 19-45 天注射 5 只小鼠（图 23 中的箭头）。向 5 只小鼠注射 PBS 作为对照。如图 7 所示，可看出，对小鼠注射现有的简单二聚形式 TNFR/Fc 融合蛋白的效果比作为对照的 PBS 注射的小鼠关节炎指数降低约 26-38%，而注射了多联形式二聚体 [TNFR1-TNFR1/Fc]₂ 和 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂ 的小鼠则降低了 42-55%。所以，可以看出多联融合二聚 TNFR/Fc 融合蛋白相比于现有的简单融合二聚 TNFR/Fc 融合蛋白，显著地降低小鼠关节炎。

表 12. 关节炎严重程度评分

严重程度评分	疾病状况
0	无红斑和肿胀
1	仅限于踝和跗骨部的红斑以及轻度肿胀
2	红斑以及轻度肿胀从踝扩展到跗骨处
3	红斑以及轻度肿胀从踝扩展到跗骨关节
4	红斑以及严重肿胀扩展到踝，腿和趾

以上的结果显示多联形式的二聚 TNFR/Fc 融合蛋白对降低 CIA 的发展速度比现有的简单融合蛋白更加有效，所以，在应用于治疗关节炎方面，多联形式的蛋白组合物会比现有的蛋白组合物更加有效。

本发明的多联蛋白，多联融合二聚蛋白及其糖基化蛋白能够提高效率，并具有高稳定性，能够高产量地生产。

工业实用性

序 列 表

- <110> MeDexGen Inc.
 CHUNG, Yong Hoon
 HAN, Ji Woong
 LEE, Hye Ja
 CHOI, Eun Yong
 KIM, Jin Mi
 YIM, Soo Bin
- <120> 通过多联体化制备 Ig-融合蛋白的方法, 由该方法制备的 TNFR/Fc、
 CD2/Fc、CTLA4/Fc 融合蛋白, 编码所述蛋白的 DNA, 包括所述
 DNA 的载体, 和由载体 TOR 转化的细胞
- <160> 52
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
 <211> 1335
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo sapiens)
- <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1332)
 <223> TNFR1-IgG
- <220>
 <221> C_region
 <222> (634)..(1335)
 <223> 铰链,CH₂,CH₃ 区
- <220>
 <221> misc_signal
 <222> (160)..(168)
 <223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (433)..(441)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (451)..(459)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(15)
<223> PCR 引物 SEQ ID:25 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (616)..(652)
<223> PCR 引物 SEQ ID:26 (反义) 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (616)..(651)
<223> PCR 引物 SEQ ID:27 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1312)..(1335)
<223> PCR 引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(60)
<223> 信号肽

```

<400> 1
atg ggc ctc tcc acc gtg cct gac ctg ctg ctg ccg ctg gtg ctc ctg      48
Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

gag ctg ttg gtg gga ata tac ccc tca ggg gtt att gga ctg gtc cct      96
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30

cac cta ggg gac agg gag aag aga gat agt gtg tgt ccc caa gga aaa      144
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
35 40 45

tat atc cac cct caa aat aat tog att tgc tgt acc aag tgc cac aaa      192
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60

gga acc tac ttg tac aat gac tgt cca ggc ccg ggg cag gat acg gac      240
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80

tgc agg gag tgt gag agc ggc tcc ttc acc gct tca gaa aac cac ctc      288
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
85 90 95

aga cac tgc ctc agc tgc tcc aaa tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg      336
Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

gag atc tct tct tgc aca gtg gac cgg gac acc gtg tgt ggc tgc agg      384
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

aag aac cag tac ogg cat tat tgg agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc      432
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130 135 140

aat tgc agc ctc tgc ctc aat ggg acc gtg cac ctc tcc tgc cag gag      480

```

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu			
145	150	155	160
aaa cag aac acc gtg tgc acc tgc cat gca ggt ttc ttt cta aga gaa	528		
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu			
165	170	175	
aac gag tgt gtc tcc tgt agt aac tgt aag aaa agc ctg gag tgc acg	576		
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr			
180	185	190	
aag ttg tgc cta ccc cag att gag aat gtt aag ggc act gag gac tca	624		
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser			
195	200	205	
ggc acc aca gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca	672		
Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro			
210	215	220	
ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc	720		
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
225	230	235	240
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc	768		
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
245	250	255	
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc	816		
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe			
260	265	270	
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg	864		
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
275	280	285	
egg gag gag cag tac aac agc acg tac egg gtg gtc agc gtc ctc acc	912		
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
290	295	300	
gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc	960		

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	
305	310 315 320
tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc	1008
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	
	325 330 335
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg	1056
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	
	340 345 350
gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc	1104
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	
	355 360 365
ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg	1152
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	
	370 375 380
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc	1200
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	
	385 390 395 400
tcc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag	1248
Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	
	405 410 415
ggg aac gtc ttc toa tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac	1296
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	
	420 425 430
tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa	1335
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	435 440

<210> 2

<211> 444

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
 85 90 95

Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205

Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 3

<211> 1473

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1470)

<223> TNFR2-IgG

<220>

<221> C_region

<222> (772)..(1473)

<223> 铰链,CH₂,CH₃区

<220>

<221> misc_signal

<222> (511)..(519)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> misc_signal

<222> (577)..(585)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(15)

<223> PCR引物 SEQ ID:29 结合位点

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (754)..(790)
 <223> PCR引物 SEQ ID:30 (反义) 结合位点

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (754)..(790)
 <223> PCR引物 SEQ ID:31 结合位点

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1451)..(1473)
 <223> PCR引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(66)
 <223> 信号肽

<400> 3
 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc 48
 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15
 tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac 96
 Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30
 gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag 144
 Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45
 aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg ccg ggc caa cat gca aaa 192

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys	
50 . 55 60	
gtc ttc tgt acc aag acc tcg gac acc gtg tgt gac tcc tgt gag gac	240
Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp	
65 70 75 80	
agc aca tac acc cag ctc tgg aac tgg gtt ccc gag tgc ttg agc tgt	288
Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys	
85 90 95	
ggc tcc cgc tgt agc tot gac cag gtg gaa act caa gcc tgc act cgg	336
Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg	
100 105 110	
gaa cag aac cgc atc tgc acc tgc agg ccc gcc tgg tac tgc gcg ctg	384
Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu	
115 120 125	
agc aag cag gag ggg tgc cgg ctg tgc gcg ccg ctg cgc aag tgc cgc	432
Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg	
130 135 140	
ccg gcc ttc gcc gtg gcc aga cca gga act gaa aca tca gac gtg gtg	480
Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val	
145 150 155 160	
tgc aag ccc tgt gcc ccg ggg acg ttc tcc aac acg act tca tcc acg	528
Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr	
165 170 175	
gat att tgc agg ccc cac cag atc tgt aac gtg gtg gcc atc cct ggg	576
Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly	
180 185 190	
aat gca agc atg gat gca gtc tgc acg tcc acg tcc ccc acc cgg agt	624
Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser	
195 200 205	
atg gcc cca ggg gca gta cac tta ccc cag coa gtg tcc aca cga tcc	672

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser	
210	215 220
caa cac acg cag cca act cca gaa ccc agc act gct cca agc acc tcc	720
Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser	
225	230 235 240
ttc ctg ctc cca atg ggc ccc agc ccc cca gct gaa ggg agc act ggc	768
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly	
	245 250 255
gac gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc	816
Asp Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
	260 265 270
cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca	864
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
	275 280 285
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc	912
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
	290 295 300
gtg gtg .gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg	960
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
305	310 315 320
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag	1008
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
	325 330 335
gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg	1056
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
	340 345 350
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac	1104
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
	355 360 365
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg	1152

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 370 375 380
 cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag 1200
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 385 390 395 400
 ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aac ggc ttc tat 1248
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 405 410 415
 ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac 1296
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 420 425 430
 aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc tcc ttc 1344
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Ser Phe
 435 440 445
 ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac 1392
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 450 455 460
 gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cao aac cac tac acg 1440
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 465 470 475 480
 cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1473
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 4
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4
 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

<220>
<221> misc_signal
<222> (451)..(459)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (631)..(639)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (712)..(720)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (985)..(993)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (1003)..(1011)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(15)
<223> PCR 引物 SEQ ID : 25 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (592)..(628)

<223> **PCR引物 SEQ ID :33 (反义) 结合位点**

<220>

<221> primer_bind

<222> (622)..(655)

<223> **PCR引物 SEQ ID :32 结合位点**

<220>

<221> primer_bind

<222> (1168)..(1204)

<223> **PCR引物 SEQ ID:26 (反义) 结合位点**

<220>

<221> primer_bind

<222> (1168)..(1204)

<223> **PCR引物 SEQ ID:27 结合位点**

<220>

<221> primer_bind

<222> (1864)..(1887)

<223> **PCR引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点**

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(60)

<223> **信号肽**

<400> 5

atg ggc ctc tcc acc gtg cct gac ctg ctg ctg ccg ctg gtg ctc ctg 48

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu

1 5 10 15

gag ctg ttg gtg gga ata tac ccc tca ggg gtt att gga ctg gtc cct 96

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro

20	25	30	
cac cta ggg gac agg gag aag aga gat agt gtg tgt ccc caa gga aaa			144
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys			
35	40	45	
tat atc cac cct caa aat aat tcg att tgc tgt acc aag tgc cac aaa			192
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys			
50	55	60	
gga acc tac ttg tac aat gac tgt cca ggc cgg ggg cag gat acg gac			240
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp			
65	70	75	80
tgc agg gag tgt gag agc ggc toc ttc acc gct tca gaa aac cac etc			288
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu			
85	90	95	
aga cac tgc etc agc tgc tcc aaa tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg			336
Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val			
100	105	110	
gag atc tot tot tgc aca gtg gac cgg gac acc gtg tgt ggc tgc agg			384
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg			
115	120	125	
aag aac cag tac cgg cat tat tgg agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc			432
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe			
130	135	140	
aat tgc agc etc tgc etc aat ggg acc gtg cac etc tcc tgc cag gag			480
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu			
145	150	155	160
aaa cag aac acc gtg tgc acc tgc cat gca ggt ttc ttt cta aga gaa			528
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu			
165	170	175	
aac gag tgt gtc tcc tgt agt aac tgt aag aaa agc ctg gag tgc acg			576
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr			

180	185	190	
aag ttg tgc cta ccc cag att gag aat gtt aag ggc act gag gac gga			624
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Gly			
195	200	205	
tcc ggg aac att tca ctg gtc cct cac cta ggg gac agg gag aag aga			672
Ser Gly Asn Ile Ser Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg			
210	215	220	
gat agt gtg tgt ccc caa gga aaa tat atc cac cct caa aat aat tcg			720
Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser			
225	230	235	240
att tgc tgt acc aag tgc cac aaa gga acc tac ttg tac aat gac tgt			768
Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys			
245	250	255	
cca ggc cgg ggg cag gat acg gac tgc agg gag tgt gag agc ggc tcc			816
Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser			
260	265	270	
ttc acc gct tca gaa aac cac ctc aga cac tgc ctc agc tgc tcc aaa			864
Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys			
275	280	285	
tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg gag atc tct tct tgc aca gtg gac			912
Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp			
290	295	300	
cgg gac acc gtg tgt ggc tgc agg aag aac cag tac cgg cat tat tgg			960
Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp			
305	310	315	320
agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc aat tgc agc ctc tgc ctc aat ggg			1008
Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly			
325	330	335	
acc gtg cac ctc tcc tgc cag gag aaa cag aac acc gtg tgc acc tgc			1056
Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys			

340	345	350	
cat gca ggt ttc ttt cta aga gaa aac gag tgt gtc tcc tgt agt aac			1104
His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn			
355	360	365	
tgt aag aaa agc ctg gag tgc acg aag ttg tgc cta ccc cag att gag			1152
Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu			
370	375	380	
aat gtt aag ggc act gag gac tca ggc acc aca gca gag ccc aaa tct			1200
Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser			
385	390	395	400
tgt gac aaa act cac aca tgc cca cag tgc cca gca cct gaa ctc ctg			1248
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu			
405	410	415	
ggg gga cag tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc			1296
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
420	425	430	
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc			1344
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
435	440	445	
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag			1392
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
450	455	460	
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg			1440
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
465	470	475	480
tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat			1488
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
485	490	495	
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc			1536
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			

500	505	510	
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa oca cag			1584
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
515	520	525	
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc			1632
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val			
530	535	540	
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg			1680
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
545	550	555	560
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct			1728
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
565	570	575	
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc tcc ttc ctc tac agc aag ctc acc			1776
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
580	585	590	
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg			1824
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
595	600	605	
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg			1872
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
610	615	620	
tct ccg ggt aaa	tga		1887
Ser Pro Gly Lys			
625			

<210> 6

<211> 628

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
 85 90 95

Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Gly
 195 200 205

Ser Gly Asn Ile Ser Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg
 210 215 220

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 225 230 235 240

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
 245 250 255

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 260 265 270

Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 275 280 285

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 290 295 300

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 305 310 315 320

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 325 330 335

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
 340 345 350

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
 355 360 365

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
 370 375 380

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser
 385 390 395 400

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 405 410 415

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

420	425	430
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
435	440	445
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
450	455	460
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
465	470	475
480		
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
485	490	495
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
500	505	510
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
515	520	525
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
530	535	540
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
545	550	555
560		
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
565	570	575
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
580	585	590
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
595	600	605
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
610	615	620
Ser Pro Gly Lys		
625		

<210> 7
<211> 2163
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2160)
<223> TNFR2-TNFR2-IgG

<220>
<221> C_region
<222> (1462)..(2163)
<223> 铰链,CH₂,CH₃ 区

<220>
<221> misc_signal
<222> (511)..(519)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (577)..(585)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (769)..(777)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (1201)..(1209)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> misc_signal

<222> (1267)..(1275)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(15)

<223> PCR引物 SEQ ID:29 结合位点

<220>

<221> primer_bind

<222> (761)..(795)

<223> PCR引物 SEQ ID:35 (反义) 结合位点

<220>

<221> primer_bind

<222> (741)..(768)

<223> PCR引物 SEQ ID:34 结合位点

<220>

<221> primer_bind

<222> (1444)..(1480)

<223> PCR引物 SEQ ID:30 (反义) 结合位点

<220>

<221> primer_bind

<222> (1444)..(1480)

<223> PCR引物 SEQ ID:31 结合位点

<220>

<221> primer_bind
 <222> (2141)..(2163)
 <223> PCR引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(66)
 <223> 信号肽

<400> 7

atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gog ctg gcc gtc gga ctg gag etc	48
Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu	
1 5 10 15	
tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac	96
Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr	
20 25 30	
gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag	144
Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln	
35 40 45	
aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg ccg ggc caa cat gca aaa	192
Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys	
50 55 60	
gtc ttc tgt acc aag acc tcg gac acc gtg tgt gac tcc tgt gag gac	240
Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp	
65 70 75 80	
agc aca tac acc cag ctc tgg aac tgg gtt ccc gag tgc ttg agc tgt	288
Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys	
85 90 95	
ggc tcc cgc tgt agc tct gac cag gtg gaa act caa gcc tgc act cgg	336
Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg	
100 105 110	

gaa cag aac cgc atc tgc acc tgc agg ccc ggc tgg tac tgc gcg ctg	384
Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu	
115 120 125	
agc aag cag gag ggg tgc cgg ctg tgc gcg cgg ctg cgc aag tgc cgc	432
Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg	
130 135 140	
ccg ggc tto ggc gtg gcc aga cca gga act gaa aca tca gac gtg gtg	480
Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val	
145 150 155 160	
tgc aag ccc tgt gcc ccg ggg acg ttc tcc aac acg act tca tcc acg	528
Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr	
165 170 175	
gat att tgc agg ccc cac cag atc tgt aac gtg gtg gcc atc cct ggg	576
Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly	
180 185 190	
aat gca agc atg gat gca gtc tgc acg tcc acg tcc ccc acc cgg agt	624
Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser	
195 200 205	
atg gcc cca ggg gca gta cac tta ccc cag cca gtg tcc aca cga tcc	672
Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser	
210 215 220	
caa cac acg cag cca act cca gaa ccc agc act gct cca agc acc tcc	720
Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser	
225 230 235 240	
ttc ctg ctc cca atg ggc ccc agc ccc cca got gaa ggg agc gga tcc	768
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Gly Ser	
245 250 255	
aac gca act aca ccc tac gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc	816
Asn Ala Thr Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu	
260 265 270	

aga gaa tac tat gac cag aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser 275 280 285	864
ccg ggc caa cat gca aaa gtc ttc tgt acc aag acc tcg gac acc gtg Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val 290 295 300	912
tgt gac tcc tgt gag gac agc aca tac acc cag ctc tgg aac tgg gtt Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val 305 310 315 320	960
ccc gag tgc ttg agc tgt ggc tcc cgc tgt agc tct gac cag gtg gaa Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu 325 330 335	1008
act caa gcc tgc act cgg gaa cag aac cgc atc tgc acc tgc agg ccc Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro 340 345 350	1056
ggc tgg tac tgc gcg ctg agc aag cag gag ggg tgc cgg ctg tgc gcg Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala 355 360 365	1104
ccg ctg cgc aag tgc cgc ccg ggc ttc ggc gtg gcc aga cca gga act Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr 370 375 380	1152
gaa aca tca gac gtg gtg tgc aag ccc tgt gcc ccg ggg acg ttc tcc Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser 385 390 395 400	1200
aac acg act tca tcc acg gat att tgc agg ccc cac cag atc tgt aac Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn 405 410 415	1248
gtg gtg gcc atc cct ggg aat gca agc atg gat gca gtc tgc acg tcc Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser 420 425 430	1296

acg tcc ccc acc cgg agt atg gcc cca ggg gca gta cac tta ccc cag Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln 435 440 445	1344
cca gtg tcc aca cga tcc caa cac acg cag cca act cca gaa ccc agc Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser 450 455 460	1392
act get cca agc acc tcc ttc ctg ctc cca atg ggc ccc agc ccc cca Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro 465 470 475 480	1440
gct gaa ggg agc act ggc gac gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr 485 490 495	1488
cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cot gaa ctc ctg ggg gga ccg tca His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser 500 505 510	1536
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 515 520 525	1584
acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro 530 535 540	1632
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 545 550 555 560	1680
aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val 565 570 575	1728
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 580 585 590	1776

aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc	1824
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
595 600 605	
atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc oga gaa cca cag gtg tac acc ctg	1872
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
610 615 620	
ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc	1920
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
625 630 635 640	
ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc	1968
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
645 650 655	
aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac	2016
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
660 665 670	
tcc gac ggc tcc tcc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc	2064
Ser Asp Gly Ser Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
675 680 685	
agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct	2112
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
690 695 700	
ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa	2160
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
705 710 715 720	
tga	2163
<210> 8	
<211> 720	
<212> PRT	
<213> 智人	

<400> 8

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Gly Ser
 245 250 255

Asn Ala Thr Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu
 260 265 270

Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser
 275 280 285

Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val
 290 295 300

Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val
 305 310 315 320

Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu
 325 330 335

Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro
 340 345 350

Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala
 355 360 365

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr
 370 375 380

Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser
 385 390 395 400

Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn
 405 410 415

Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser


```

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
          645                650                655

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
          660                665                670

Ser Asp Gly Ser Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
          675                680                685

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
          690                695                700

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705                710                715                720

```

<210> 9

<211> 1827

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1824)

<223> mgTNFR1-TNFR1-IgG

<220>

<221> C_region

<222> (1126)..(1827)

<223> 铰链,CH₂,CH₃ 区

<220>

<221> misc_signal

<222> (160)..(168)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (433)..(441)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (451)..(459)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (565)..(573)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (574)..(582)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (592)..(600)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (610)..(618)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (925)..(933)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (943)..(951)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(15)
<223> PCR 引物 SEQ ID:25 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (545)..(606)
<223> PCR 引物 SEQ ID:37 (反义) 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (559)..(621)
<223> PCR 引物 SEQ ID:36 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1108)..(1144)
<223> PCR 引物 SEQ ID:26 (反义) 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1108)..(1144)
<223> PCR 引物 SEQ ID:27 结合位点

<220>
<221> primer_bind

<222> (1804)..(1827)

<223> PCR 引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(60)

<223> 信号肽

<400> 9

atg ggc ctc tcc acc gtg cct gac ctg ctg ctg ccg ctg gtg ctc ctg 48
Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

gag ctg ttg gtg gga ata tac ccc tca ggg gtt att gga ctg gtc cct. 96
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30

cac cta ggg gac agg gag aag aga gat agt gtg tgt ccc caa gga aaa 144
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
35 40 45

tat atc cac oct caa aat aat tcg att tgc tgt acc aag tgc cac aaa 192
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60

gga acc tac ttg tac aat gac tgt cca ggc ccg ggg cag gat acg gac 240
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80

tgc agg gag tgt gag agc ggc tcc ttc acc gct tca gaa aac cac ctc 288
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
85 90 95

aga cac tgc ctc agc tgc tcc aaa tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg 336
Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

gag atc tct tct tgc aca gtg gac cgg gac acc gtg tgt ggc tgc agg 384

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg	
115	120
aag aac cag tac cgg cat tat tgg agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc	432
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe	
130	135
aat tgc agc ctc tgc ctc aat ggg acc gtg cac ctc tcc tgc cag gag	480
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu	
145	150
aaa cag aac acc gtg tgc acc tgc cat gca ggt ttc ttt cta aga gaa	528
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu	
165	170
aac gag tgt gtc tcc tgt agt aac tgt aag aaa agc aac gag acc aac	576
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Asn Glu Thr Asn	
180	185
aag acc tgc cta cac aac ggg tcc agg gag aag aac gat agt gtg tgt	624
Lys Thr Cys Leu His Asn Gly Ser Arg Glu Lys Asn Asp Ser Val Cys	
195	200
occ caa gga aaa tat atc cac cct caa aat aat tog att tgc tgt acc	672
Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr	
210	215
aag tgc cac aaa gga acc tac ttg tac aat gac tgt oca ggc ccg ggg	720
Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly	
225	230
cag gat acg gac tgc agg gag tgt gag agc ggc tcc ttc acc gct tca	768
Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser	
245	250
gaa aac cac ctc aga cac tgc ctc agc tgc tcc aaa tgc cga aag gaa	816
Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu	
260	265
atg ggt cag gtg gag atc tct tct tgc aca gtg gac cgg gac acc gtg	864

Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val	
275	280 285
tgt ggc tgc agg aag aac cag tac cgg cat tat tgg agt gaa aac ctt	912
Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu	
290	295 300
ttc cag tgc ttc aat tgc agc ctc tgc ctc aat ggg acc gtg cac ctc	960
Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu	
305	310 315 320
tcc tgc cag gag aaa cag aac acc gtg tgc acc tgc cat gca ggt ttc	1008
Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe	
	325 330 335
ttt cta aga gaa aac gag tgt gtc tcc tgt agt aac tgt aag aaa agc	1056
Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser	
	340 345 350
ctg gag tgc acg aag ttg tgc cta ccc cag att gag aat gtt aag ggc	1104
Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly	
	355 360 365
act gag gac tca ggc acc aca gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act	1152
Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	
	370 375 380
cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca	1200
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser	
	385 390 395 400
gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg	1248
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
	405 410 415
acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct	1296
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	
	420 425 430
gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc	1344

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
435	440 445
aag aca aag cag cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc	1392
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
450	455 460
agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac	1440
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
465	470 475 480
aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc	1488
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
	485 490 495
atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg	1536
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
	500 505 510
ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc	1584
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
	515 520 525
ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc	1632
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
530	535 540
aat ggg cag cag gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac	1680
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
545	550 555 560
tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc	1728
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
	565 570 575
agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct	1776
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
	580 585 590
ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa	1824

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 595 600 605

tga

1827

<210> 10

<211> 608

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
 85 90 95

Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu

145	150	155	160
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu	165	170	175
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Asn Glu Thr Asn	180	185	190
Lys Thr Cys Leu His Asn Gly Ser Arg Glu Lys Asn Asp Ser Val Cys	195	200	205
Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr	210	215	220
Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly	225	230	235
Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser	245	250	255
Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu	260	265	270
Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val	275	280	285
Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu	290	295	300
Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu	305	310	315
Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe	325	330	335
Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser	340	345	350
Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly	355	360	365

Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 370 375 380

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 385 390 395 400

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 405 410 415

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 420 425 430

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 435 440 445

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 450 455 460

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 465 470 475 480

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 485 490 495

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 500 505 510

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 515 520 525

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 530 535 540

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 545 550 555 560

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 565 570 575

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 580 585 590

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 595 600 605

<210> 11

<211> 1980

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1977)

<223> mgTNFR2-TNFR2-IgG

<220>

<221> C_region

<222> (1279)..(1980)

<223> 铰链,CH₂,CH₃ 区

<220>

<221> misc_signal

<222> (511)..(519)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> misc_signal

<222> (577)..(585)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> misc_signal

<222> (595)..(603)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (616)..(624)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (1018)..(1026)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (1084)..(1092)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(15)
<223> PCR 引物 SEQ ID:29 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (586)..(627)
<223> PCR 引物 SEQ ID:39 (反义) 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (586)..(630)
<223> PCR 引物 SEQ ID:38 结合位点

<221> primer_bind
 <222> (1261)..(1296)
 <223> PCR引物 SEQ ID:30 (反义) 结合位点

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1261)..(1296)
 <223> PCR引物 SEQ ID:31 结合位点

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1957)..(1980)
 <223> PCR引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(66)
 <223> 信号肽

<400> 11
 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc 48
 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15
 tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac 96
 Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30
 gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag 144
 Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45
 aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg ccg ggc caa cat gca aaa 192
 Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60


```

gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg      1680
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
545                550                555                560

tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc      1728
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
                565                570                575

ctg acc tgc ctg gtc aaa gcc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag      1776
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
                580                585                590

tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc      1824
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                595                600                605

gtg ctg gac tcc gac gcc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg      1872
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
        610                615                620

gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg      1920
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
625                630                635                640

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct      1968
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
                645                650                655

ccg ggt aaa          tga          1980
Pro Gly Lys

<210> 12
<211> 659
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12
Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu

```

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 435 440 445

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 450 455 460

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 465 470 475 480

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 485 490 495

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 500 505 510

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 515 520 525

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 530 535 540

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 545 550 555 560

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 565 570 575

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 580 585 590

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 595 600 605

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 610 615 620

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 625 630 635 640

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

	645	650	655
Pro Gly Lys			
<210>	13		
<211>	1314		
<212>	DNA		
<213>	智人		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(1)..(1311)		
<223>	CD2-IgG		
<220>			
<221>	C_region		
<222>	(613)..(1314)		
<223>	铰链,CH ₂ ,CH ₃ 区		
<220>			
<221>	misc_signal		
<222>	(265)..(273)		
<223>	N-连接的糖基化位点		
<220>			
<221>	misc_signal		
<222>	(421)..(429)		
<223>	N-连接的糖基化位点		
<220>			
<221>	misc_signal		
<222>	(448)..(456)		
<223>	N-连接的糖基化位点		

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(27)
 <223> PCR引物 SEQ ID:40 结合位点

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (589)..(618)
 <223> PCR引物 SEQ ID:41 (反义) 结合位点

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (611)..(633)
 <223> PCR引物 SEQ ID:42 结合位点

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1292)..(1314)
 <223> PCR引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(72)
 <223> 信号肽

<400> 13
 atg agc ttt cca tgt aaa ttt gta gcc agc ttc ctt ctg att ttc aat 48
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15
 gtt tct tcc aaa ggt gca gtc tcc aaa gag att acg aat gcc ttg gaa 96
 Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
 20 25 30

acc tgg ggt gcc ttg ggt cag gac atc aac ttg gac att oct agt ttt Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe 35 40 45	144
caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa tgg gaa aaa act tca gac Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp 50 55 60	192
aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag aaa gag act ttc aag gaa Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu 65 70 75 80	240
aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga act ctg aaa att aag cat Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His 85 90 95	288
ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag gta tca ata tat gat aca Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr 100 105 110	336
aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt gat ttg aag att caa gag Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu 115 120 125	384
agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act tgt atc aac aca acc ctg Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu 130 135 140	432
acc tgt gag gta atg aat gga act gac ccc gaa tta aac ctg tat caa Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln 145 150 155 160	480
gat ggg aaa cat cta aaa ctt tct cag agg gtc atc aca cac aag tgg Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp 165 170 175	528
acc acc agc ctg agt gca aaa ttc aag tgc aca gca ggg aac aaa gtc Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val 180 185 190	576

agc aag gaa tcc agt gtc gag cct gtc agc tgt cct gca gag ccc aaa	624
Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Ala Glu Pro Lys	
195 200 205	
tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc	672
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	
210 215 220	
ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc	720
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	
225 230 235 240	
ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg	768
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
245 250 255	
agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg	816
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	
260 265 270	
gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc	864
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	
275 280 285	
acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg	912
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	
290 295 300	
aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc	960
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala	
305 310 315 320	
ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca	1008
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	
325 330 335	
cag gtg tac acc ctg ccc cca toc cgg gat gag ctg acc aag aac cag	1056
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln	
340 345 350	

gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc 1104
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 355 360 365

gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg 1152
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 370 375 380

cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc 1200
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 385 390 395 400

acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc 1248
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 405 410 415

gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc 1296
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 420 425 430

ctg tct ccg ggt aaa tga 1314
 Leu Ser Pro Gly Lys
 435

<210> 14
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 14
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15
 Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
 20 25 30
 Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe
 35 40 45

Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp
 50 55 60

Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu
 65 70 75 80

Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His
 85 90 95

Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr
 100 105 110

Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu
 115 120 125

Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu
 130 135 140

Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln
 145 150 155 160

Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp
 165 170 175

Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val
 180 185 190

Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Ala Glu Pro Lys
 195 200 205

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 210 215 220

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 225 230 235 240

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 245 250 255

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

260	265	270
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
275	280	285
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
290	295	300
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
305	310	315 320
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
325	330	335
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
340	345	350
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
355	360	365
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
370	375	380
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
385	390	395 400
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
405	410	415
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
420	425	430
Leu Ser Pro Gly Lys		
435		

<210> 15
 <211> 1134
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1131)
<223> CTLA4-IgG

<220>
<221> C_region
<222> (433)..(1134)
<223> 铰链,CH₂,CH₃ 区

<220>
<221> misc_signal
<222> (289)..(297)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (385)..(393)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(15)
<223> **PCR 引物 SEQ ID:43 结合位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (409)..(438)
<223> **PCR 引物 SEQ ID:44 (反义) 结合位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (430)..(453)

<223> PCR 引物 SEQ ID:42 结合位点

<220>

<221> primer_bind

<222> (1111)..(1134)

<223> PCR 引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(63)

<223> 信号肽

<400> 15

atg agg acc tgg ccc tgc act ctc ctg ttt ttt ott ctc ttc atc cct 48
 Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 1 5 10 15

gtc ttc tgc aaa gca atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc 96
 Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 20 25 30

agc agc cga ggc atc ggc agc ttt gtg tgt gag tat gca tct cca ggc 144
 Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 35 40 45

aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ott cgg cag gct gac agc cag 192
 Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 50 55 60

gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc 240
 Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
 65 70 75 80

ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat caa gtg 288
 Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
 85 90 95

aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc tac atc Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile 100 105 110	336
tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly 115 120 125	384
aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa ccg tgc cca gat tot Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser 130 135 140	432
gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro 145 150 155 160	480
gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 165 170 175	528
ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 180 185 190	576
gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr 195 200 205	624
gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 210 215 220	672
cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His 225 230 235 240	720
cag gac tgg ctg aat gcc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 245 250 255	768

gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag 816
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 260 265 270

ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg 864
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 275 280 285

acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc 912
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300

agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac 960
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320

tac aag acc acg cot ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc 1008
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335

tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc 1056
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 340 345 350

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag 1104
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 355 360 365

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1134
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 16

<211> 377

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro

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

<223> CD2-CD2-IgG

<220>

<221> C_region

<222> (1153)..(1854)

<223> 铰链,CH₂,CH₃ 区

<220>

<221> misc_signal

<222> (265)..(273)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> misc_signal

<222> (421)..(429)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> misc_signal

<222> (448)..(456)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> misc_signal

<222> (805)..(813)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> misc_signal

<222> (961)..(969)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> misc_signal
<222> (988)..(996)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(27)
<223> PCR引物 SEQ ID:40 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (598)..(612)
<223> PCR引物 SEQ ID:46 (反义) 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (612)..(630)
<223> PCR引物 SEQ ID:45 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1128)..(1158)
<223> PCR引物 SEQ ID:41 (反义) 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1151)..(1173)
<223> PCR引物 SEQ ID:42 结合位点.

<220>
<221> primer_bind
<222> (1832)..(1854)
<223> PCR引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点

```

<220>
<221>   sig_peptide
<222>   (1)..(72)
<223>   信号肽

<400>   17
atg agc ttt cca tgt aaa ttt gta ggc agc ttc ctt ctg att ttc aat           48
Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
   1             5             10             15

gtt tct tcc aaa ggt gca gtc tcc aaa gag att acg aat gcc ttg gaa           96
Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
             20             25             30

acc tgg ggt gcc ttg ggt cag gac atc aac ttg gac att cct agt ttt           144
Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe
             35             40             45

caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa tgg gaa aaa act tca gac           192
Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp
             50             55             60

aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag aaa gag act ttc aag gaa           240
Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu
             65             70             75             80

aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga act ctg aaa att aag cat           288
Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His
             85             90             95

ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag gta tca ata tat gat aca           336
Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr
             100             105             110

aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt gat ttg aag att caa gag           384
Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu
             115             120             125

```

agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act tgt atc aac aca acc ctg	432
Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu	
130 135 140	
acc tgt gag gta atg aat gga act gac ccc gaa tta aac ctg tat caa	480
Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln	
145 150 155 160	
gat ggg aaa cat cta aaa ctt tct cag agg gtc atc aca cac aag tgg	528
Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp	
165 170 175	
acc acc agc ctg agt gca aaa ttc aag tgc aca gca ggg aac aaa gtc	576
Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val	
180 185 190	
agc aag gaa tcc agt gtc gag cct gtc agc tgt cct aaa gag att acg	624
Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Lys Glu Ile Thr	
195 200 205	
aat gcc ttg gaa acc tgg ggt gcc ttg ggt cag gac atc aac ttg gac	672
Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp	
210 215 220	
att cct agt ttt caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa tgg gaa	720
Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu	
225 230 235 240	
aaa act tca gac aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag aaa gag	768
Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu	
245 250 255	
act ttc aag gaa aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga act ctg	816
Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu	
260 265 270	
aaa att aag cat ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag gta tca	864
Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser	
275 280 285	

ata tat gat aca aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt gat ttg Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu 290 295 300	912
aag att caa gag agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act tgt atc Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile 305 310 315 320	960
aac aca acc ctg acc tgt gag gta atg aat gga act gac occ gaa tta Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu 325 330 335	1008
aac ctg tat caa gat ggg aaa cat cta aaa ctt tct cag agg gtc atc Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile 340 345 350	1056
aca cac aag tgg acc acc agc ctg agt gca aaa ttc aag tgc aca gca Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala 355 360 365	1104
ggg aac aaa gtc agc aag gaa tcc agt gtc gag cct gtc agc tgt cct Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro 370 375 380	1152
gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro 385 390 395 400	1200
gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 405 410 415	1248
ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 420 425 430	1296
gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr 435 440 445	1344

gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag	1392
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	
450 455 460	
cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc tgt cac	1440
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His	
465 470 475 480	
cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa	1488
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
485 490 495	
gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag	1536
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	
500 505 510	
ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg	1584
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu	
515 520 525	
acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc	1632
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	
530 535 540	
agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac	1680
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	
545 550 555 560	
tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc	1728
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	
565 570 575	
tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc	1776
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	
580 585 590	
ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag	1824
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln	
595 600 605	

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1854
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615

<210> 18
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15

Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
 20 25 30

Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe
 35 40 45

Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp
 50 55 60

Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu
 65 70 75 80

Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His
 85 90 95

Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr
 100 105 110

Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu
 115 120 125

Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu
 130 135 140

Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln
 145 150 155 160

Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp
 165 170 175

Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val
 180 185 190

Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Lys Glu Ile Thr
 195 200 205

Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp
 210 215 220

Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu
 225 230 235 240

Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu
 245 250 255

Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu
 260 265 270

Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser
 275 280 285

Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu
 290 295 300

Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile
 305 310 315 320

Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu
 325 330 335

Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile
 340 345 350

Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala
 355 360 365

Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro
 370 375 380

Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 385 390 395 400

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 405 410 415

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 420 425 430

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 435 440 445

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 450 455 460

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His
 465 470 475 480

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 485 490 495

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 500 505 510

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 515 520 525

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 530 535 540

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 545 550 555 560

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 565 570 575

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

```

          580              585              590
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
          595              600              605

```

```

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
  610              615

```

<210> 19

<211> 1509

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1506)

<223> CTLA4-CTLA4-IgG

<220>

<221> C_region

<222> (808)..(1509)

<223> 铰链,CH₂,CH₃ 区

<220>

<221> misc_signal

<222> (289)..(297)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> misc_signal

<222> (385)..(393)

<223> N-连接的糖基化位点

<220>

<221> misc_signal

<222> (664)..(672)
<223> **N-连接的糖基化位点**

<220>
<221> misc_signal
<222> (760)..(768)
<223> **N-连接的糖基化位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(15)
<223> **PCR 引物 SEQ ID:43 结合位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (418)..(431)
<223> **PCR 引物 SEQ ID:48 (反义) 结合位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (432)..(453)
<223> **PCR 引物 SEQ ID:47 结合位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (784)..(813)
<223> **PCR 引物 SEQ ID:44 (反义) 结合位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (805)..(826)
<223> **PCR 引物 SEQ ID:42 结合位点**

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (1486)..(1509)
<223> PCR引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(63)
<223> 信号肽

<400> 19
atg agg acc tgg ccc tgc act ctc ctg ttt ttt ctt ctc ttc atc cct 48
Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
1 5 10 15

gtc ttc tgc aaa gca atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc 96
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
20 25 30

agc agc cga ggc atc gcc ago ttt gtg tgt gag tat gca tot cca ggc 144
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
35 40 45

aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg cag gct gac agc cag 192
Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
50 55 60

gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc 240
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
65 70 75 80

ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat caa gtg 288
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
85 90 95

aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc tac atc 336
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
100 105 110

```

tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly 115 120 125	384
aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa ccg tgc cca gat tcg Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser 130 135 140	432
gat aac atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc agc agc cga Asp Asn Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg 145 150 155 160	480
ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag tat gca tot cca ggc aaa gcc act Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr 165 170 175	528
gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg cag gct gac agc cag gtg act gaa Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu 180 185 190	576
gtc tgt gcg gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc ttc cta gat Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp 195 200 205	624
gat toc atc tgc acg gcc acc toc agt gga aat caa gtg aac ctc act Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr 210 215 220	672
atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc tac atc tgc aag gtg Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val 225 230 235 240	720
gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc aac gga acc Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr 245 250 255	768
cag att tat gta att gat cca gaa ccg tgc cca gat tct gca gag ccc Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Ala Glu Pro 260 265 270	816

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca cgg tgc cca gca cct gaa	864
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu	
275 280 285	
ctc ctg ggg gga cgg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac	912
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp	
290 295 300	
acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac	960
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	
305 310 315 320	
gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc	1008
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	
325 330 335	
gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag cgg cgg gag gag cag tac aac	1056
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	
340 345 350	
agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc tgt cac cag gac tgg	1104
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His Gln Asp Trp	
355 360 365	
ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca	1152
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro	
370 375 380	
gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa	1200
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu	
385 390 395 400	
cca cag gtg tac acc ctg ccc oca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac	1248
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn	
405 410 415	
cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc	1296
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	
420 425 430	

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag cag gag aac aac tac aag acc 1344
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 435 440 445

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag 1392
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 450 455 460

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc 1440
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 465 470 475 480

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc 1488
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 485 490 495

tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1509
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 20

<211> 502

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 1 5 10 15

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 20 25 30

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 50 55 60

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
 65 70 75 80

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
 85 90 95

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
 100 105 110

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
 115 120 125

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
 130 135 140

Asp Asn Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
 145 150 155 160

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
 165 170 175

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
 180 185 190

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
 195 200 205

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
 210 215 220

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
 225 230 235 240

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
 245 250 255

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Ala Glu Pro
 260 265 270

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

275	280	285
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp 290	295	300
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp 305	310	315 320
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly 325	330	335
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn 340	345	350
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His Gln Asp Trp 355	360	365
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro 370	375	380
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu 385	390	395 400
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn 405	410	415
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 420	425	430
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 435	440	445
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 450	455	460
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 465	470	475 480
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 485	490	495

Ser Leu Ser Ser Pro Gly Lys
500

<210> 21
<211> 1854
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1851)
<223> mgCD2-CD2-IgG

<220>
<221> C_region
<222> (1153)..(1854)
<223> 铰链,CH₂,CH₃ 区

<220>
<221> misc_signal
<222> (265)..(273)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (421)..(429)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (448)..(456)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (598)..(606)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (616)..(624)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (805)..(813)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (961)..(969)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (988)..(996)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(27)
<223> PCR引物 SEQ ID:40 结合位点

<220>
<221> primer_bind
<222> (588)..(630)
<223> PCR引物 SEQ ID:50 (反义) 结合位点

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (588)..(630)
 <223> **PCR 引物 SEQ ID:49 结合位点**

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1128)..(1158)
 <223> **PCR 引物 SEQ ID:41 (反义) 结合位点**

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1151)..(1173)
 <223> **PCR 引物 SEQ ID:42 结合位点**

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1832)..(1854)
 <223> **PCR 引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点**

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(72)
 <223> **信号肽**

<400> 21
 atg agc ttt cca tgt aaa ttt gta gcc agc ttc ctt ctg att ttc aat 48
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15
 gtt tct tcc aaa ggt gca gtc tcc aaa gag att acg aat gcc ttg gaa 96
 Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
 20 25 30

acc tgg ggt gcc ttg ggt cag gac atc aac ttg gac att cct agt ttt	144
Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe	
35 40 45	
caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa tgg gaa aaa act tca gac	192
Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp	
50 55 60	
aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag aaa gag act ttc aag gaa	240
Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu	
65 70 75 80	
aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga act ctg aaa att aag cat	288
Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His	
85 90 95	
ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag gta tca ata tat gat aca	336
Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr	
100 105 110	
aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt gat ttg aag att caa gag	384
Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu	
115 120 125	
agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act tgt atc aac aca acc ctg	432
Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu	
130 135 140	
acc tgt gag gta atg aat gga act gac ccc gaa tta aac ctg tat caa	480
Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln	
145 150 155 160	
gat ggg aaa cat cta aaa ctt tct cag agg gtc atc aca cac aag tgg	528
Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp	
165 170 175	
acc acc agc ctg agt gca aaa ttc aag tgc aca gca ggg aac aaa gtc	576
Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val	
180 185 190	

agc aag gaa tcc agt gtc gag aat gtc agc tgt cct aaa aat att acg Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Asn Val Ser Cys Pro Lys Asn Ile Thr 195 200 205	624
aat gcc ttg gaa acc tgg ggt gcc ttg ggt cag gac atc aac ttg gac Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp 210 215 220	672
att cct agt ttt caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa tgg gaa Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu 225 230 235 240	720
aaa act tca gac aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag aaa gag Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu 245 250 255	768
act ttc aag gaa aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga act ctg Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu 260, 265 270	816
aaa att aag cat ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag gta tca Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser 275 280 285	864
ata tat gat aca aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt gat ttg Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu 290 295 300	912
aag att caa gag agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act tgt atc Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile 305 310 315 320	960
aac aca acc ctg acc tgt gag gta atg aat gga act gac ccc gaa tta Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu 325 330 335	1008
aac ctg tat caa gat ggg aaa cat cta aaa ctt tct cag agg gtc atc Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile 340 345 350	1056

aca cac aag tgg acc acc agc ctg agt gca aaa ttc aag tgc aca gca Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala 355 360 365	1104
ggg aac aaa gtc agc aag gaa tcc agt gtc gag cct gtc agc tgt cct Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro 370 375 380	1152
gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro 385 390 395 400	1200
gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 405 410 415	1248
ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 420 425 430	1296
gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr 435 440 445	1344
gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 450 455 460	1392
cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc tgt cac Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His 465 470 475 480	1440
cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 485 490 495	1488
gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln 500 505 510	1536

ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc oca tcc cgg gat gag ctg 1584
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 515 520 525

acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc 1632
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 530 535 540

agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac 1680
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 545 550 555 560

tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc 1728
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 565 570 575

tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc 1776
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 580 585 590

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag 1824
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 595 600 605

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1854
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615

<210> 22
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 22
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15
 Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu

	20	25	30
Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe	35	40	45
Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp	50	55	60
Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu	65	70	75
Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His	85	90	95
Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr	100	105	110
Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu	115	120	125
Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu	130	135	140
Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln	145	150	155
Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp	165	170	175
Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val	180	185	190
Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Asn Val Ser Cys Pro Lys Asn Ile Thr	195	200	205
Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp	210	215	220
Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu	225	230	235
			240

Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu
245 250 255

Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu
260 265 270

Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser
275 280 285

Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu
290 295 300

Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile
305 310 315 320

Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu
325 330 335

Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile
340 345 350

Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala
355 360 365

Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro
370 375 380

Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
385 390 395 400

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
405 410 415

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
420 425 430

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
435 440 445

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 450 455 460
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His
 465 470 475 480
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 485 490 495
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 500 505 510
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 515 520 525
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 530 535 540
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 545 550 555 560
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 565 570 575
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 580 585 590
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 595 600 605
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615

<210> 23
 <211> 1509
 <212> DNA
 <213> 智人
 <220>

<221> CDS
<222> (1)..(1506)
<223> mgCTLA4-CTLA4-IgG

<220>
<221> C_region
<222> (808)..(1509)
<223> 铰链,CH₂,CH₃ 区

<220>
<221> misc_signal
<222> (289)..(297)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (385)..(393)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (403)..(411)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (424)..(432)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (439)..(447)
<223> N-连接的糖基化位点

<220>
<221> misc_signal
<222> (664)..(672)
<223> **N-连接的糖基化位点**

<220>
<221> misc_signal
<222> (760)..(768)
<223> **N-连接的糖基化位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(15)
<223> **PCR 引物 SEQ ID:43 结合位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (394)..(456)
<223> **PCR 引物 SEQ ID:52 (反义) 结合位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (397)..(460)
<223> **PCR 引物 SEQ ID:51 结合位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (784)..(813)
<223> **PCR 引物 SEQ ID:44 (反义) 结合位点**

<220>
<221> primer_bind
<222> (805)..(826)

<223> PCR引物 SEQ ID:42 结合位点

<220>

<221> primer_bind

<222> (1486)..(1509)

<223> PCR引物 SEQ ID:28 (反义) 结合位点

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(63)

<223> 信号肽

<400> 23

atg agg acc tgg ccc tgc act ctc ctg ttt ttt ctt ctc ttc atc cct 48
 Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 1 5 10 15

gtc ttc tgc aaa gca atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc 96
 Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 20 25 30

agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag tat gca tct cca ggc 144
 Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 35 40 45

aaa gcc act gag gtc ogg gtg aca gtg ctt egg cag gct gac agc cag 192
 Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 50 55 60

gtg act gaa gtc tgt gog gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc 240
 Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
 65 70 75 80

ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat caa gtg 288
 Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
 85 90 95

aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc tac atc Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile 100 105 110	336
tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly 115 120 125	384
aac gga acc cag att tat gta aat gat aca gaa ccg tgc aat gat tog Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Asn Asp Thr Glu Pro Cys Asn Asp Ser 130 135 140	432
gat aac aat cac acg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc agc agc cga Asp Asn Asn His Thr Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg 145 150 155 160	480
ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag tat gca tct cca ggc aaa gcc act Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr 165 170 175	528
gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg cag gct gac agc cag gtg act gaa Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu 180 185 190	576
gtc tgt gog gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc ttc cta gat Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp 195 200 205	624
gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat caa gtg aac ctc act Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr 210 215 220	672
atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc tac atc tgc aag gtg Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val 225 230 235 240	720
gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc aac gga acc Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr 245 250 255	768

cag att tat gta att gat cca gaa cgg tgc cca gat tct gca gag ccc	816
Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Ala Glu Pro	
260 265 270	
aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca cgg tgc cca gca cct gaa	864
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu	
275 280 285	
ctc ctg ggg gga cgg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac	912
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp	
290 295 300	
acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac	960
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	
305 310 315 320	
gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc	1008
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	
325 330 335	
gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag cgg cgg gag gag cag tac aac	1056
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	
340 345 350	
agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc tgt cac cag gac tgg	1104
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His Gln Asp Trp	
355 360 365	
ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca	1152
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro	
370 375 380	
gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa	1200
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu	
385 390 395 400	
cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac	1248
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn	
405 410 415	

```

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc      1296
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
      420                425                430

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc      1344
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
      435                440                445

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag      1392
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
      450                455                460

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc      1440
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
      465                470                475                480

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc      1488
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
      485                490                495

tcc ctg tct ccg ggt aaa      tga      1509
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      500

```

<210> 24
<211> 502
<212> FRT
<213> 智人

```

<400> 24
Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
  1                5                10                15

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
      20                25                30

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
      35                40                45

```

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 50 55 60

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
 65 70 75 80

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
 85 90 95

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
 100 105 110

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
 115 120 125

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Asn Asp Thr Glu Pro Cys Asn Asp Ser
 130 135 140

Asp Asn Asn His Thr Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
 145 150 155 160

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
 165 170 175

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
 180 185 190

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
 195 200 205

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
 210 215 220

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
 225 230 235 240

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
 245 250 255

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Ala Glu Pro

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 485 490 495

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物, 寡核苷酸 TNFR1-EDF-EcoRI

<400> 25

ccggaattcc ggtctggcat ggcctctcc acc

33

<210> 26

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物, 寡核苷酸 TNFR1-EDR-IgGh

<400> 26

cacaagattt ggcctctgct gtggtgctg agtcttc

37

<210> 27

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> **PCR 引物, 寡核苷酸** IgG1-T1F

<400> 27

gaggactcag gcaccacagc agagcccaaa tttgtg

37

<210> 28

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> **PCR 引物, 寡核苷酸** IgG1-R-XbaI

<400> 28

gctctagagc tcatttaccg ggagacaggg agag

34

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> **PCR 引物, 寡核苷酸** TNFR2-EDF-EcoRI

<400> 29

ccggaattcc gggcaacctat ggcgccgctc gcc

33

<210> 30

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> **PCR 引物, 寡核苷酸** TNFR2-EDR-IgGh

<400> 30
cacaagattt gggctctgag tcgccagtgc tcccttc 37

<210> 31
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物, 寡核苷酸 IgG-T2F

<400> 31
gaagggagca ctggcgacgc agagcccaaa tcttgtg 37

<210> 32
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物, 寡核苷酸 TNFR1-CF-BamHI

<400> 32
cgcggatccg ggaacatttc actggtccct cacctag 37

<210> 33
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物, 寡核苷酸 TNFR1-NR-BamHI

<400> 33
cgcggatccg tctcagtg ccttaacatt ctcaatctg 39

<210> 34
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物, 寡核苷酸 TNFR2-CF-BamHI

<400> 34
cgcggatcca acgcaactac accctacgcc ccggag 36

<210> 35
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物, 寡核苷酸 TNFR2-NR-BamHI

<400> 35
cgcggatccg ctcccttcag ctggggggct g 31

<210> 36
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物, 寡核苷酸 mgTNFR1-TNFR1-IgG-F

<400> 36
 aaaagcaacg agaccaacaa gacotgccta cacaacgggt ccagggagaa gaacgatagt 60

 gtg 63

 <210> 37
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> PCR引物, 寡核苷酸 mgTNFR1-TNFR1-IgG-R

 <400> 37
 ctccctggac ccgttgta ggcaggtctt gttggtctcg ttgctttct tacagttact 60

 ac 62

 <210> 38
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> PCR引物, 寡核苷酸 mgTNFR2-TNFR2-IgG-F

 <400> 38
 atggatgcaa actgcacgtc ccggagccc aacagcacaat gccgg 45

 <210> 39
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>

<223> **PCR 引物, 寡核苷酸** mgTNFR2-TNFR2-IgG-R

<400> 39

gcatgtgctg ttgggtccg gggacgtgca gtttgcaccc at

42

<210> 40

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> **PCR 引物, 寡核苷酸** CD2F-EcoRI

<400> 40

ccggaattca tgagctttcc atgtaaattt gtagcc

36

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> **PCR 引物, 寡核苷酸** CD2R-PstI

<400> 41

ctctgcagga cagctgacag gctcgacact

30

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> **PCR 引物, 寡核苷酸** IgG-F-PstI

<400> 42
atctgcagag cccaatctt gtgac 25

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物, 寡核苷酸 CTLA4F-EcoRI

<400> 43
ccggaattca tgaggacctg gccc 24

<210> 44
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物, 寡核苷酸 CTLA4R-PstI

<400> 44
ctctgcagaa tctgggcacg gttcaggatc 30

<210> 45
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物, 寡核苷酸 CD2-NT-F

<400> 45
taaagagatt acgaatgcc 19

<210> 46
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物, 寡核苷酸 CD2-CT-R

<400> 46
tgcaggacag ctgacagg 18

<210> 47
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物, 寡核苷酸 CTLA4-NT-F

<400> 47
ggataatcat gcacgtggcc cag 23

<210> 48
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物, 寡核苷酸 CTLA4-CT-R

<400> 48
 tgcagaatct gggcacgg 18

<210> 49
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物, 寡核苷酸 mgCD2-CD2-IgG-F

<400> 49
 cagtgtcgag aatgtcagct gtctaaasa tattacgaat gcc 43

<210> 50
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物, 寡核苷酸 mgCD2-CD2-IgG-R

<400> 50
 ggcattogta atatttttag gacagctgac attctcgaca ctg 43

<210> 51
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物, 寡核苷酸 mgCTLA4-CTLA4-IgG-F

<400> 51

atttatgtaa acgatacaga accgtgcaat gattcggata acaaccacac agcccagcct 60

gctg 64

<210> 52

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物, 寡核苷酸 mgCTLA4-CTLA4-IgG-R

<400> 52

aggctgggct gtgtggttgt taccogaatc attgcaoggt tctgtatcgt ttacataaat 60

ctg 63

图1

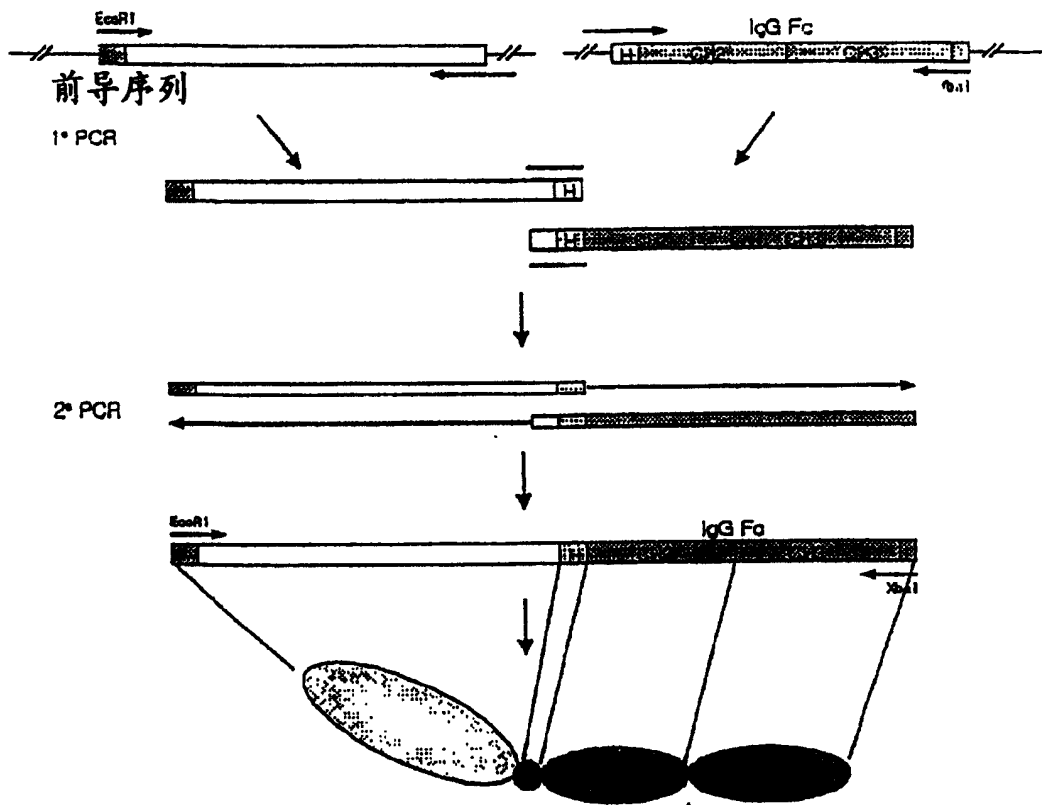


图2

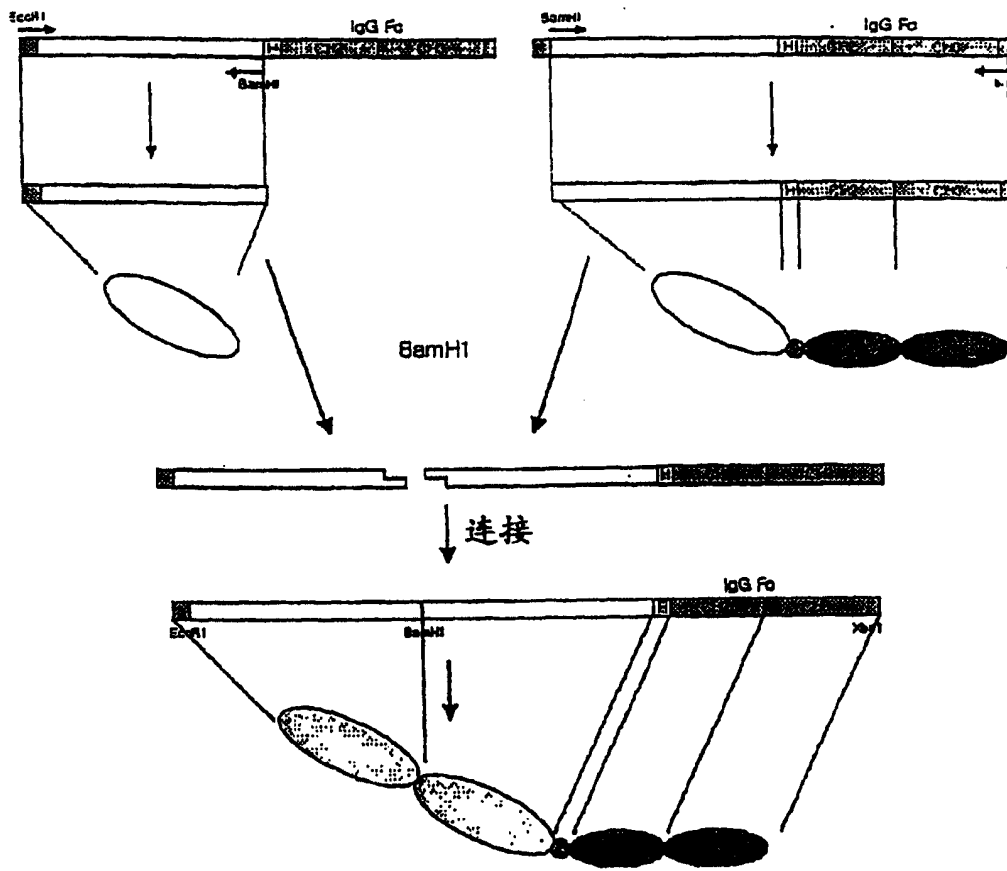


图3

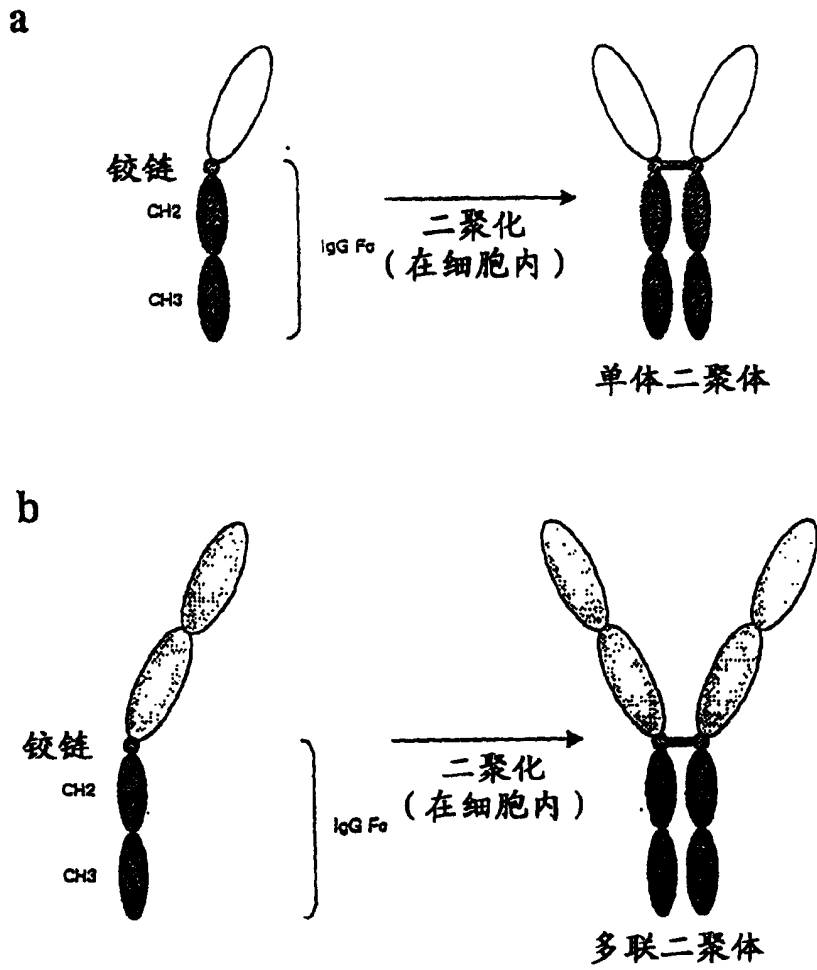


图4

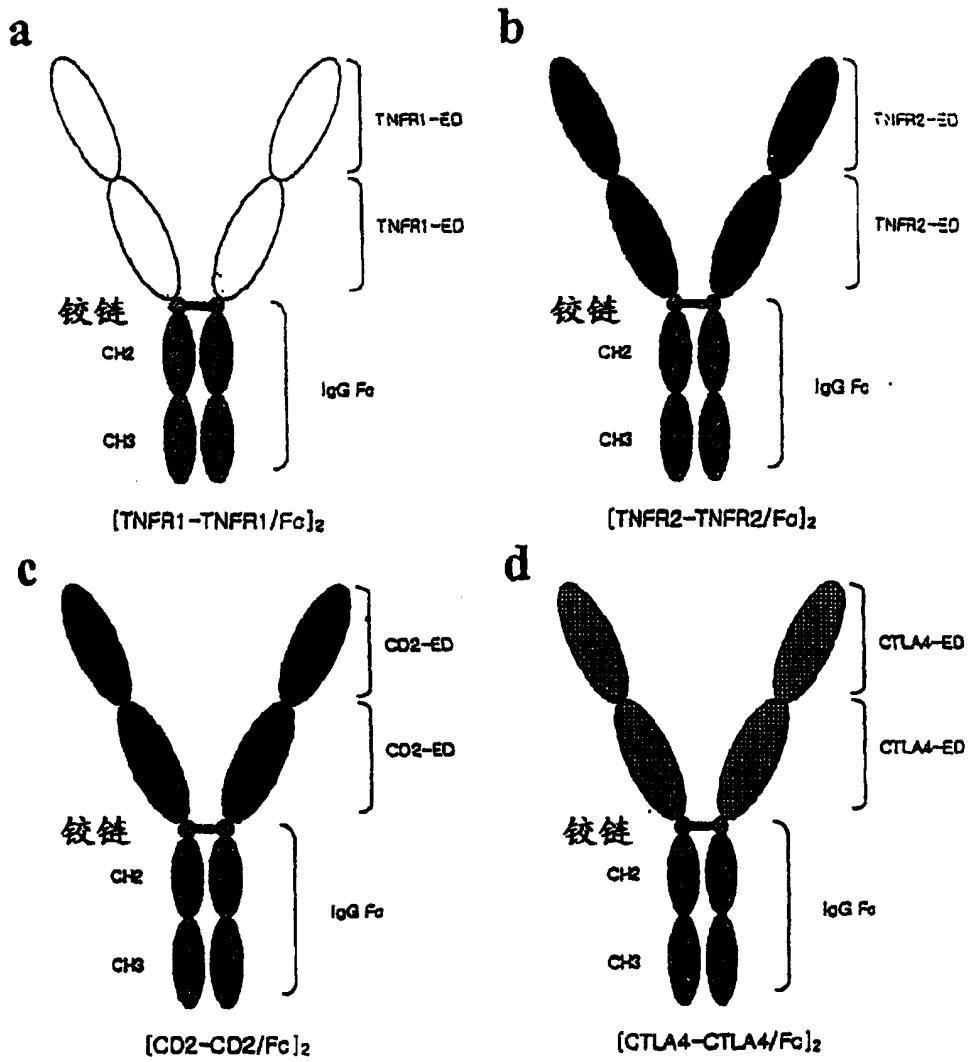


图5

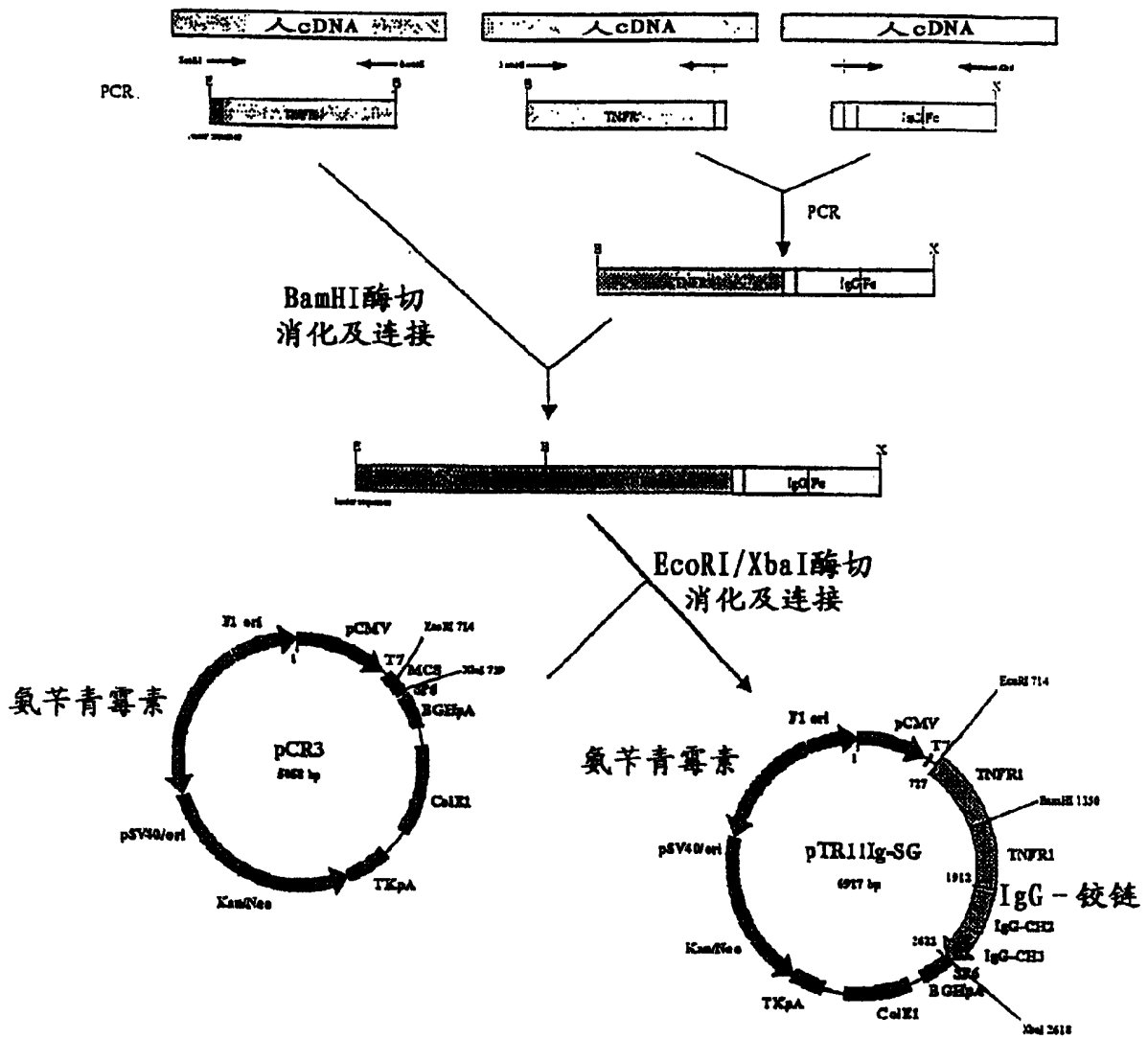


图7

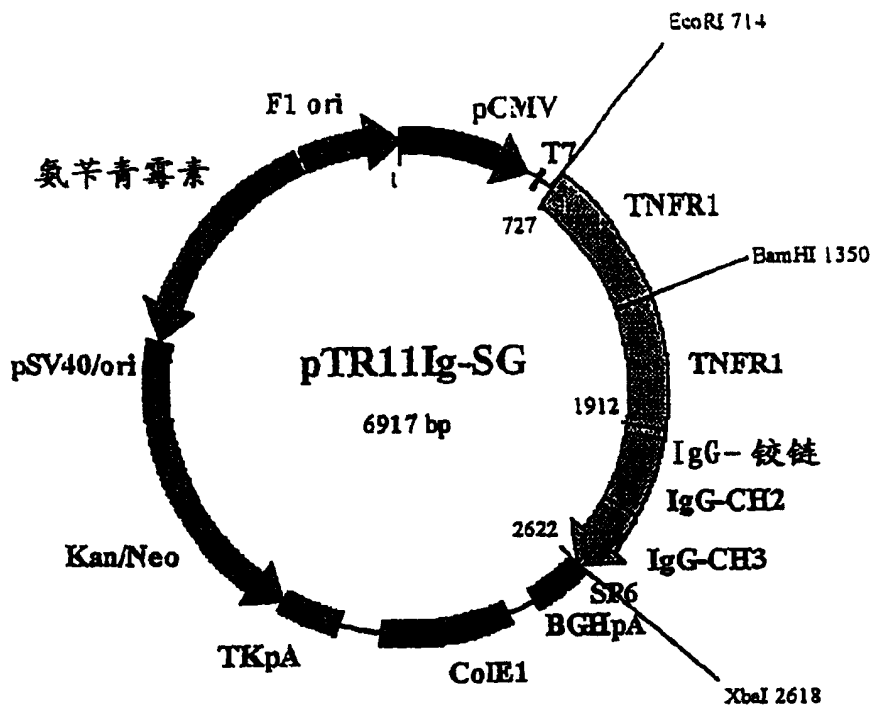


图 8

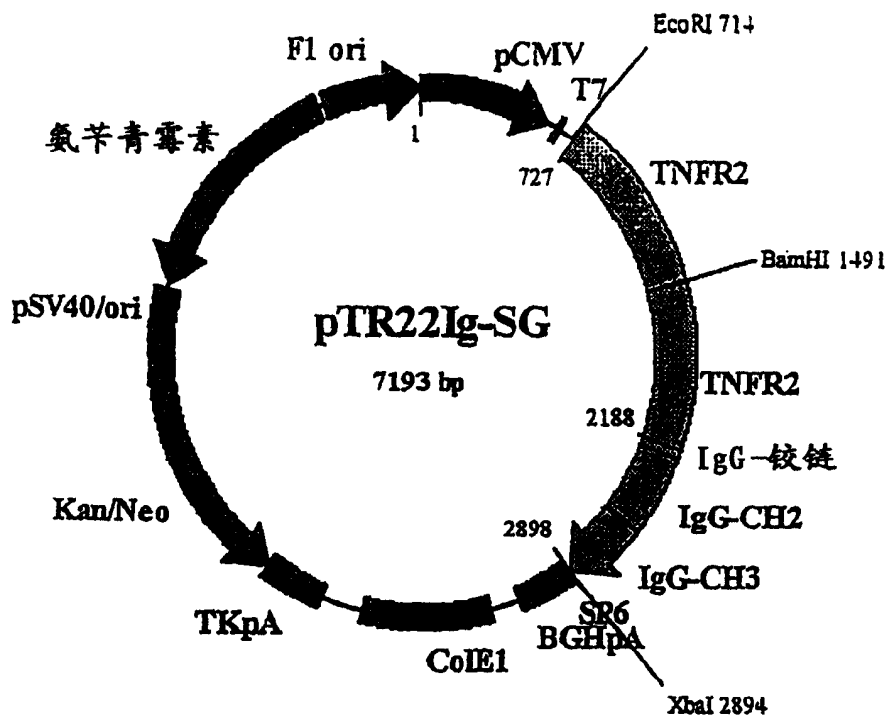


图9

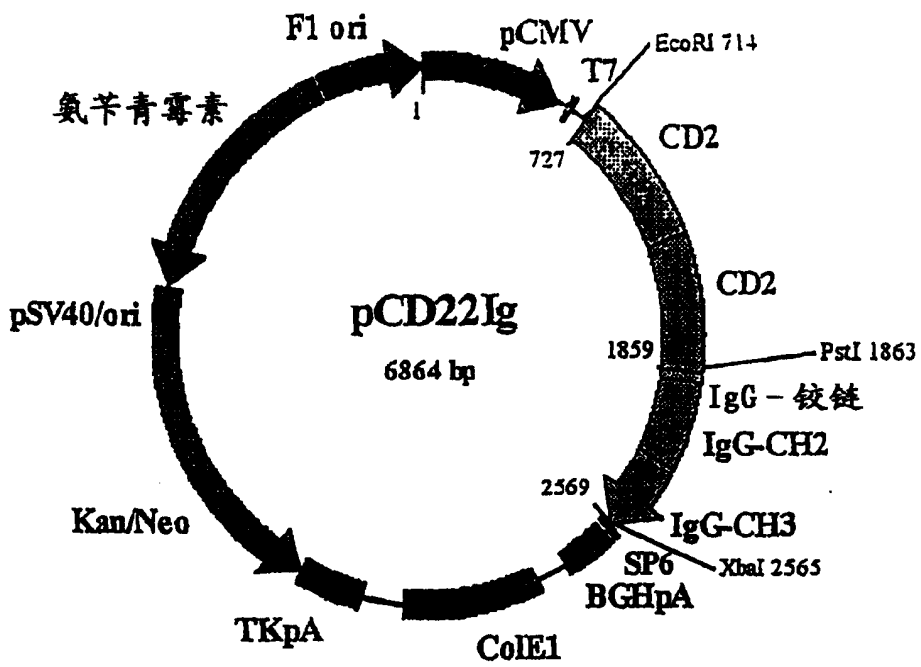


图10

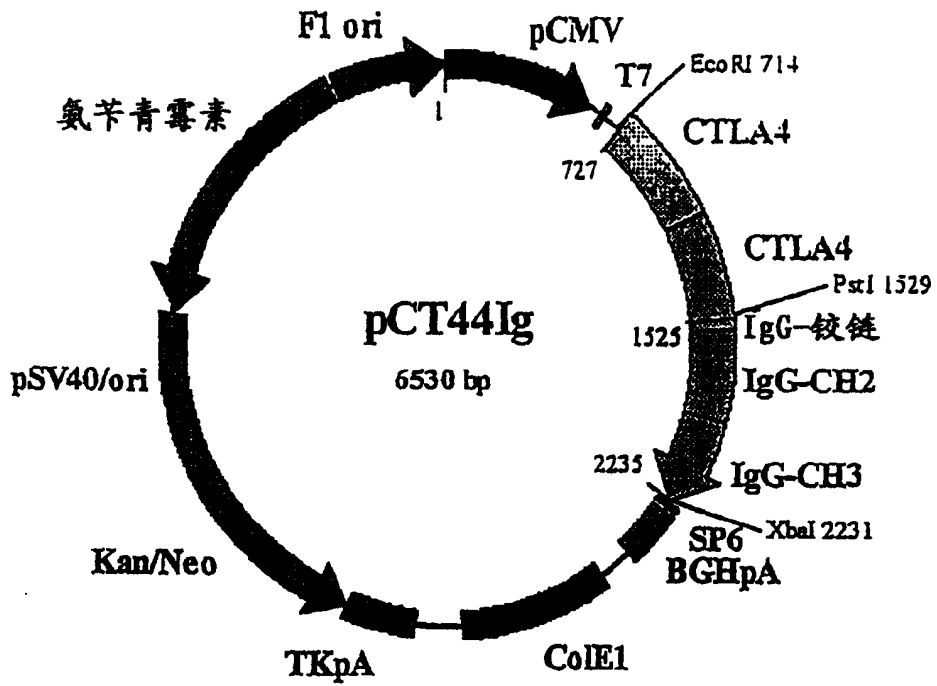


图 11

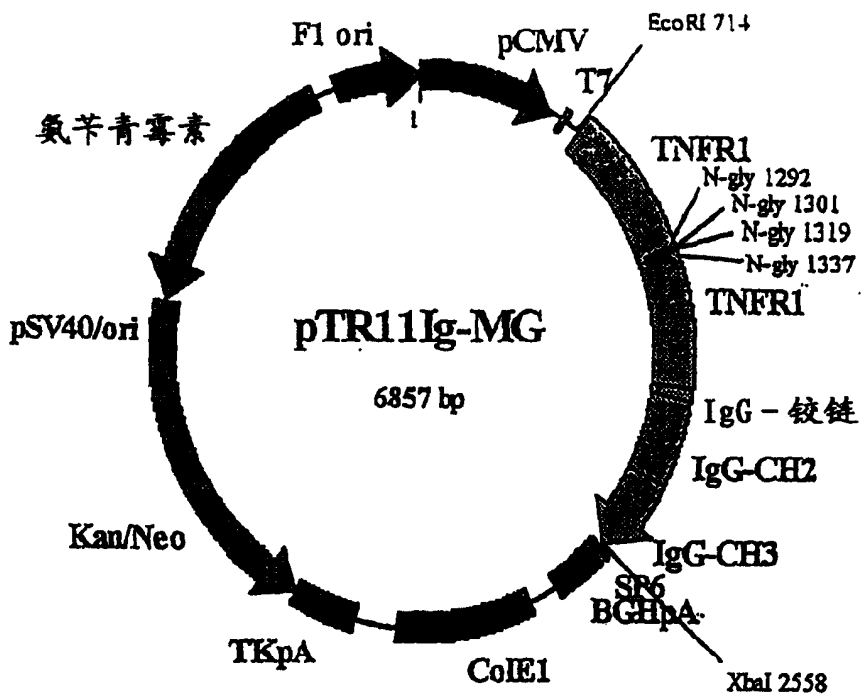


图 12

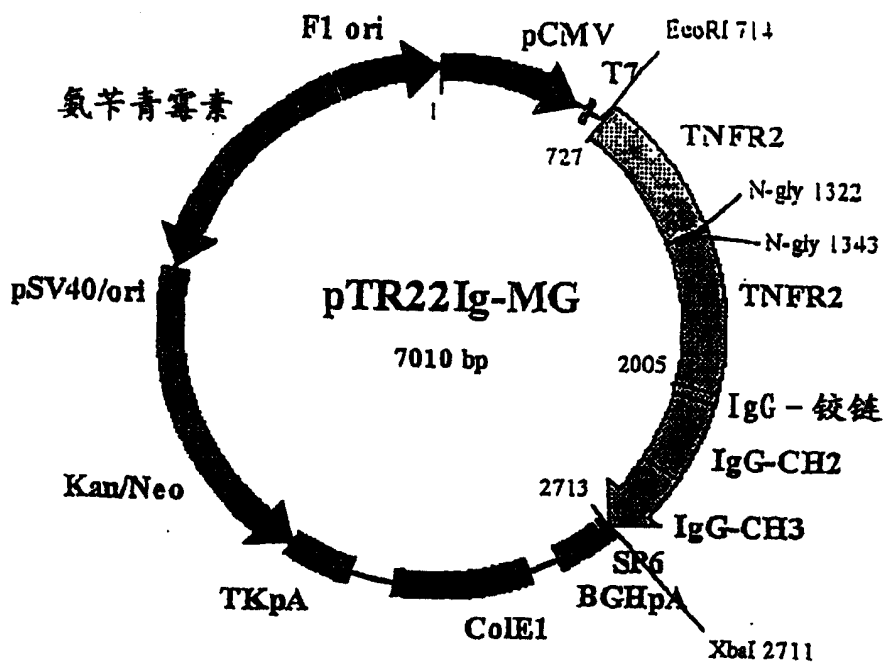


图 13

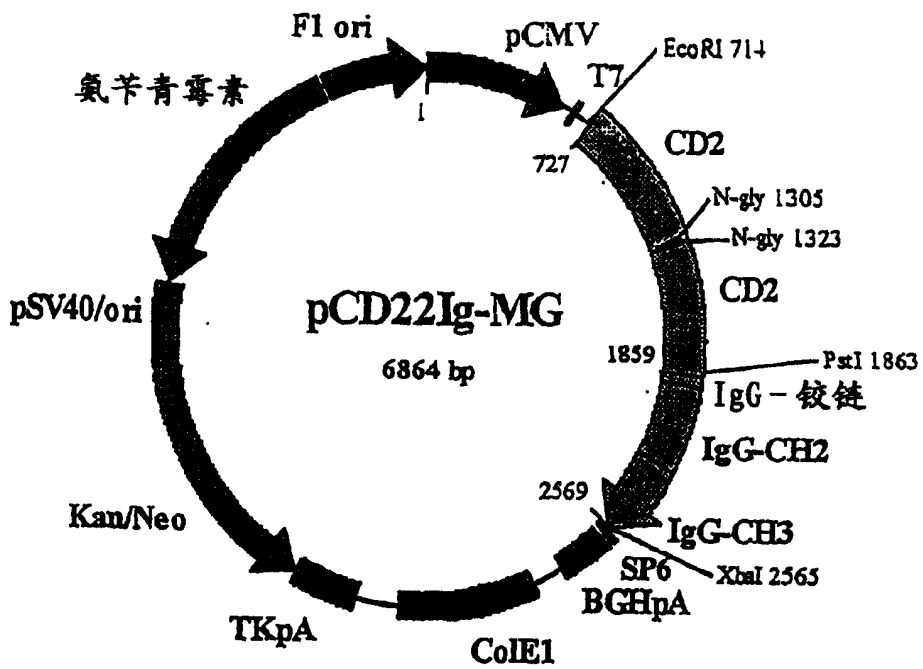


图 14

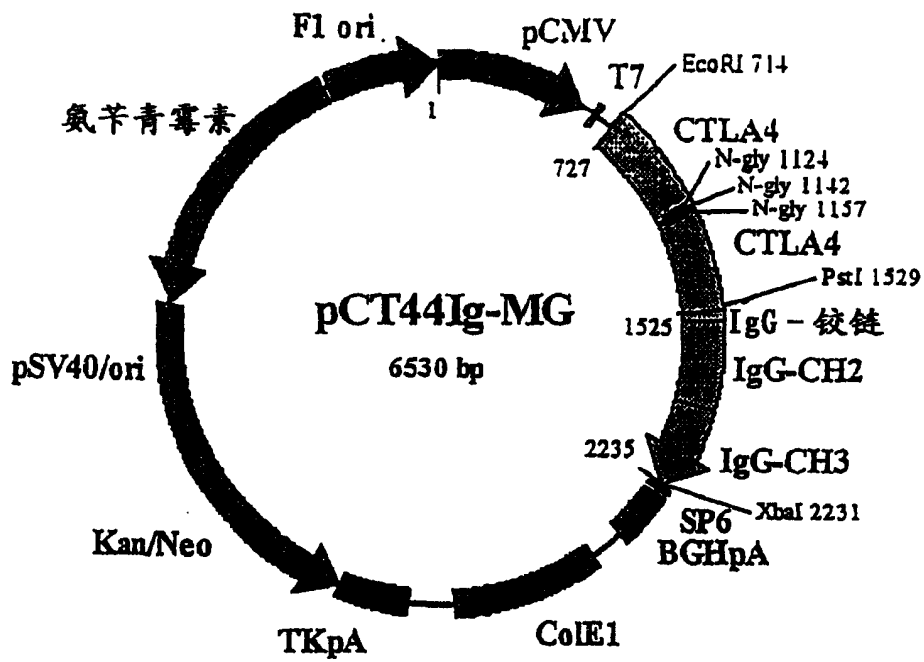


图15

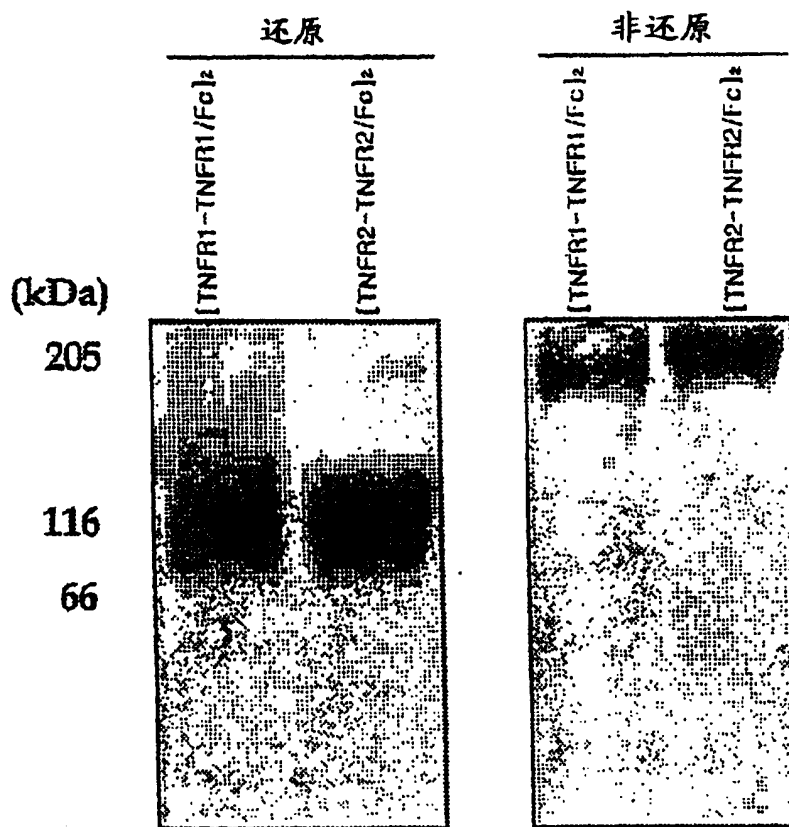


图16

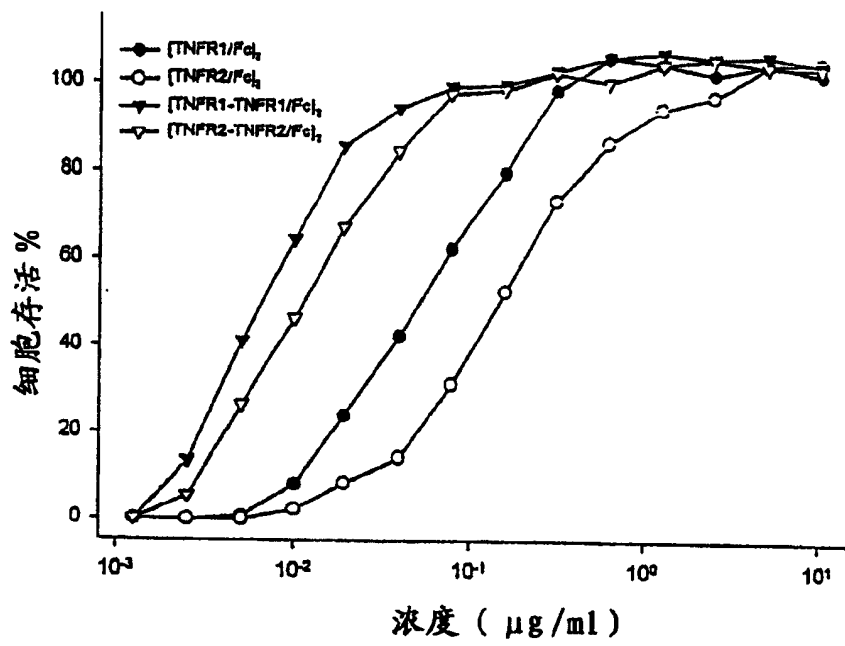


图17

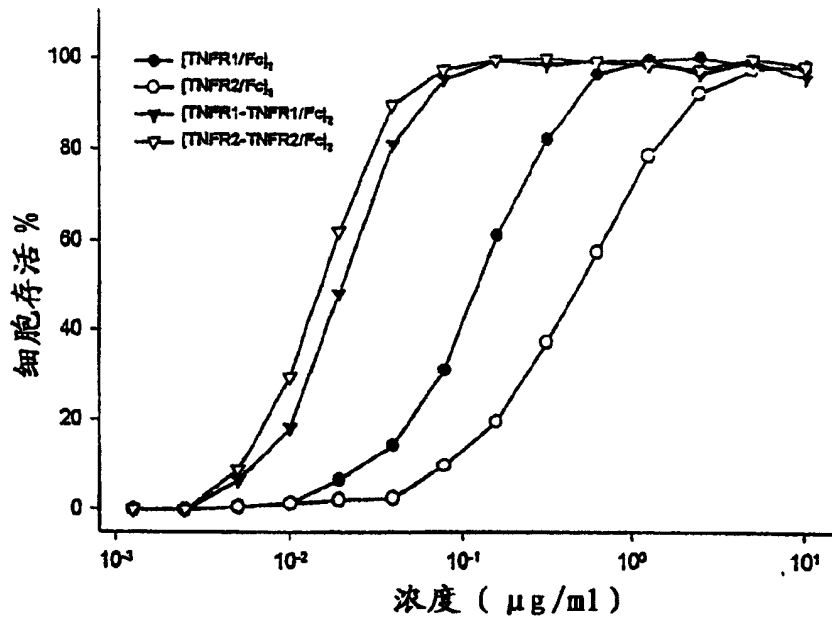


图 18

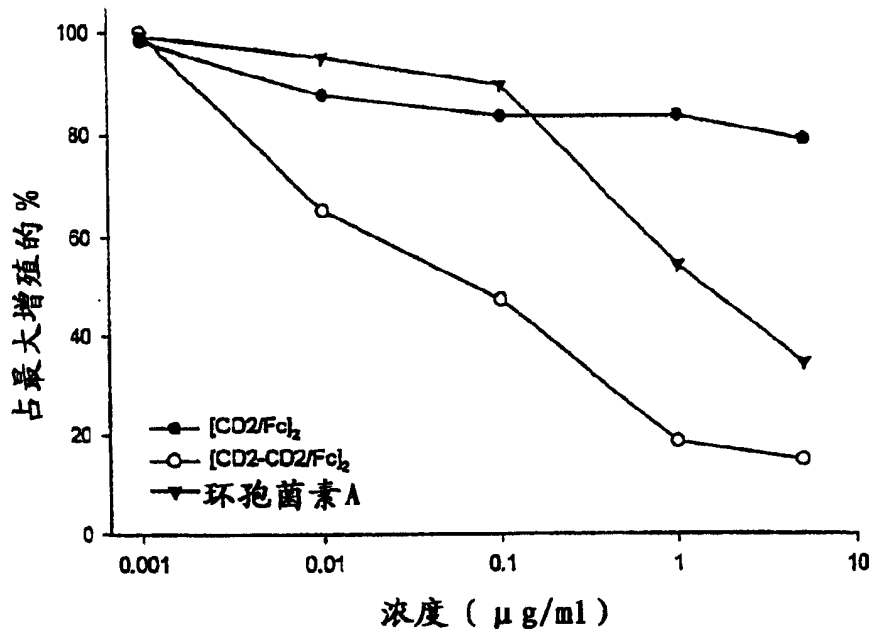


图19

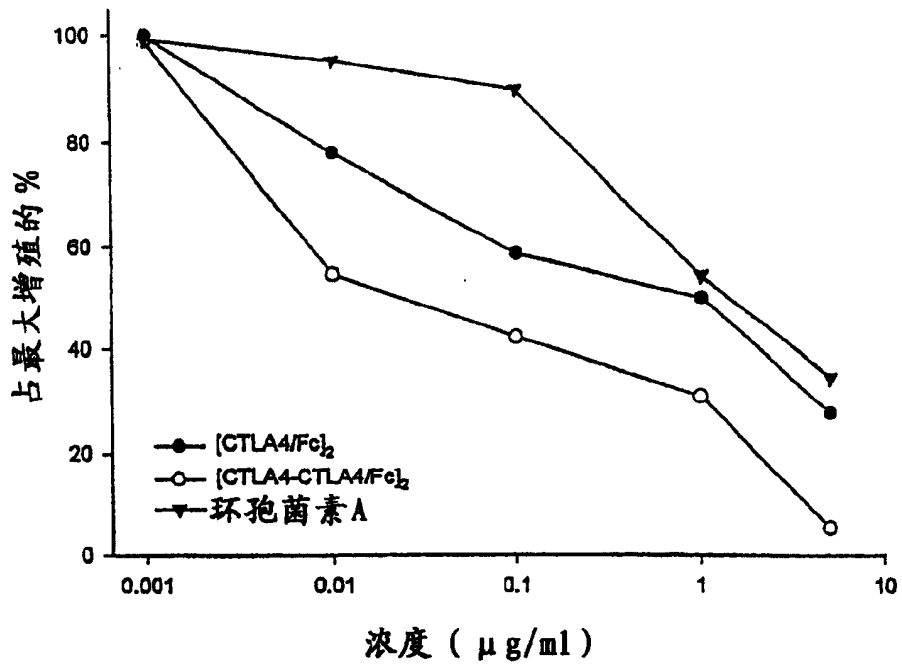


图 20

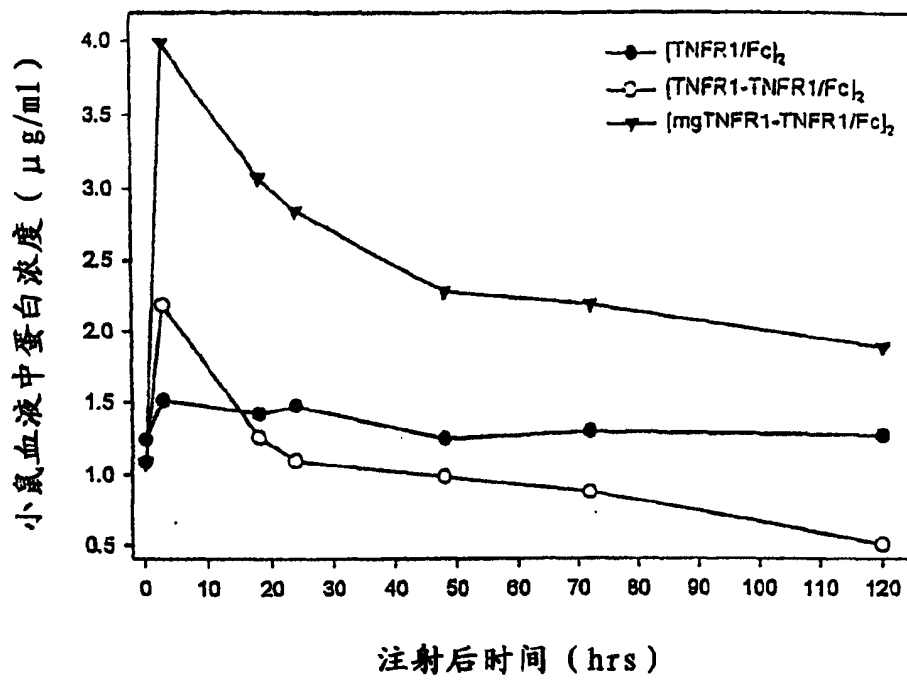


图21

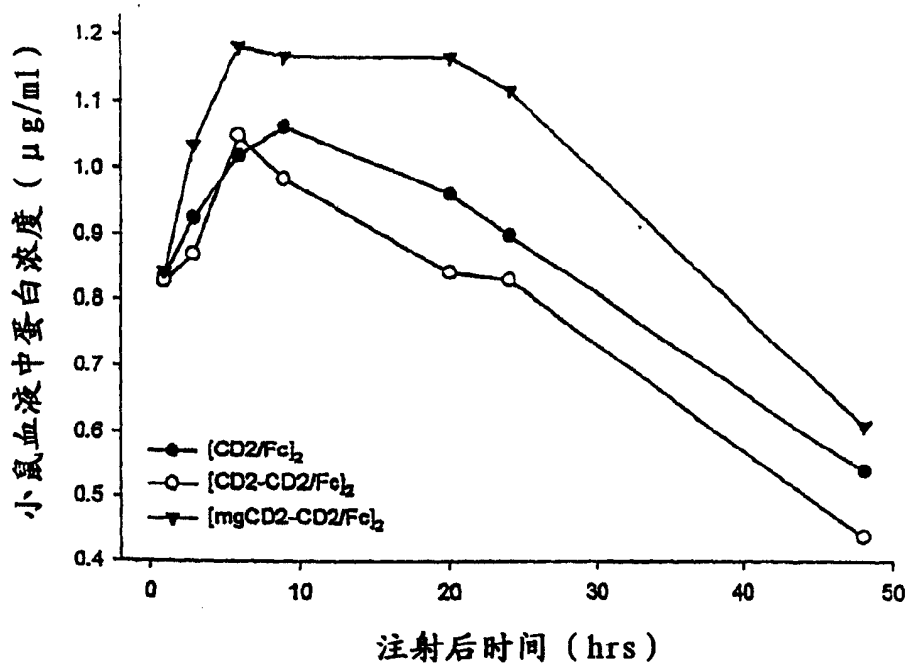


图 22

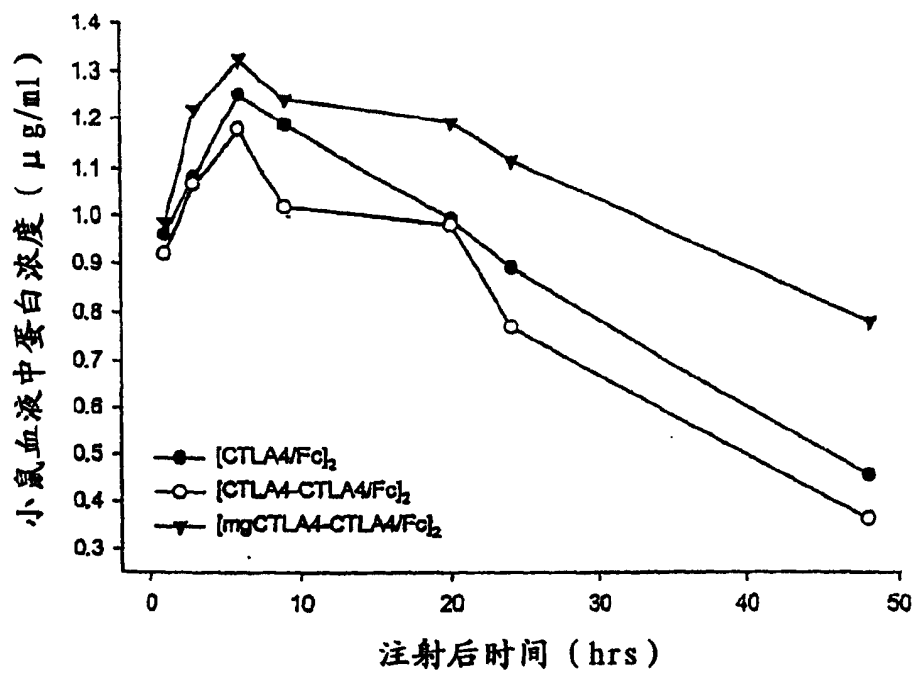


图 23

