

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2002年3月14日(14.03.02)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 02/20802 A1

- (51) 国际分类号⁷: C12N 15/57, C07K 14/745
- (21) 国际申请号: PCT/CN00/00260
- (22) 国际申请日: 2000年9月4日(04.09.00)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 湖南瑞雅生物技术有限公司(HUNAN ROYAL BIOTECH)
[CH/CH]; 中国湖南省长沙市湘雅路 88 号, Hunan 410078 (CN).
- (72) 发明人;及
- (75) 发明人/申请人(仅对美国): 夏家辉(XIA, Jiahui)
[CN/CN]; 中国湖南省长沙市湘雅路 88 号, Hunan 410078 (CN).
- (74) 代理人: 湖南省专利事务所(HUNAN PATENT AGENCY); 中国湖南省长沙市八一路135号, Hunan 410001 (CN).
- (81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW
- (84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A CELL LINE EXPRESSING MUTANT HUMAN TISSUE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR, CONSTRUCTING STRATEGY AND METHOD OF EXPRESSED PROTEIN PREPARATION

(54) 发明名称: 表达突变型人组织型纤溶酶原激活素的细胞株、构建方法及表达蛋白的制备方法

(57) Abstract: The invention relates to a cell line expressing mutant protein -human tissue-type- plasminogen activator, and the method for constructing it, and to the method for producing the mutant protein. The cell line of present invention has been deposited as Accession NO: CCTCC C200006. The method of constructing the cell line as follows: utilizing the DNA sequence of related gene having no important physiological function of short-arm of humanic chromosome on D, G group or the DNA sequence having homology with above DNA sequence as leading sequence having homology with above DNA sequence as leading sequence of aim gene; and constructing TNK-TPA transformant having specific gene vector; introducing TNK-TPA gene into nucleoli tissue target region D, G chromosome group of host cellHT1080 by the trasformant, obtaining cell line; and using the cell line to preparing TNK-TPA protein.

(57) 摘要

本发明涉及一种能表达突变型人组织型纤溶酶原激活素的的细胞株及其构建方法, 并涉及突变型人组织型纤溶酶原激活素的制备方法。本发明提供的细胞株具有保藏号 CCTCC C200006, 其构建方法是用人类 D、G 组染色体短臂上无重要生理功能相关基因的 DNA 序列或与该 DNA 序列具有同源性的 DNA 序列作为目的基因的引导序列, 并由此构建具有特异性的基因载体-TNK-TPA 重组体; 利用该重组体将 TNK-TPA 目的基因导入宿主细胞 HT1080 的 D、G 组染色体核仁组织区靶位, 获得细胞株, 并将该细胞株用于制备 TNK-TPA 蛋白质。



WO 02/20802 A1

表达突变型人组织型纤溶酶原激活素的细胞株、构建方法 及表达蛋白的制备方法

技术领域

5 本发明涉及一种人体细胞株，具体地是指能表达突变型人组织型纤溶酶原激活素（TNK-TPA）的人体细胞株。本发明还涉及该细胞株的构建方法，及其在制备基因药物人组织型纤溶酶原激活素生产方法中的应用。

10 背景技术

人组织型纤溶酶原激活素能通过激活纤溶酶原而局部溶解血管内血栓，使阻塞的血管再通。目前，国际上能够利用基因工程技术对人体 t-PA 基因进行大规模重组开发，并成功开发出 rt-PA 药物的仅为美国 Genetech 公司一家。该公司开发出的第一代产品——rt-PA 已成为欧美
15 国家治疗血栓性疾病的首选药物。但是，它还存在一定的缺点。一是其价格高昂，国际市场价格 1375 美元/支；二是药物功能仍然存在一定的缺陷，主要有如下三点：1)、rt-PA 的半衰期太短，只有 3-5 分钟；2)、rt-PA 对血块中纤维蛋白的特异性结合效力不高；3)、rt-PA 的活性和效力仍有待进一步提高。由于半衰期短，使得给药剂量很大，而且由于特异性和
20 活性不够高，一方面，使仍有 10-20% 的病人的血栓不能被 rt-PA 完全溶解，另一方面会引起全身性纤溶状态，影响正常凝血机制，从而导致出血，尤其是颅内和消化道出血，这些严重的并发症。鉴于上述原因，国

外应用 rt-PA 的同时就已经开始进行第二代 rt-PA 的研究, 即对 t-PA 基因进行修饰, 消除或减弱上述缺陷。TNK-TPA 是研究得最多的一种突变体, 如 Keyt BA, Paoni NF, Refino CJ 等人在美国科学院院刊 (1994 年 4 月) 公开了“一种快速作用并且更有效的人组织型纤溶酶原激活素”, 其中公开了 TNK-TPA 的 DNA 序列(A Faster-acting And More Potent Form of Tissue Plasminogen Activator. <Proc Natl Acad Sci USA> 1994 Apr 26; 91(9):3670-4)。它是在 tPA 基因上进行三个位点的定点突变后构建的, 2 个位于 Kringle1 功能域, T103N 和 Q117N; 1 个位于 Protease 功能域, KhRR296-299AAAA。T103N 增加了一个糖基化位点, 增加 TNK-tPA 与纤维蛋白结合的特异性并降低了它在体内的清除速率; Q117N 破坏了 K1 区与甘露寡糖的结合, 也就破坏了肝 KUPFFER 细胞的识别位点, 延长半衰期; KHRR296-299AAAA 破坏了丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 (PAI-1) 的作用位点, 使半衰期延长。目前, 对于 TNK-TPA 的开发, 国内外普遍都是采用普通真核基因表达载体, 以 CHO 细胞作为宿主细胞, TNK-TPA 随机整合到宿主细胞基因组这一表达体系。如吴本传等人在《生物化学与生物物理进展》(1997, 24 (1): 71-75) 提出的“重组组织型纤溶酶原激活剂的纯化和鉴定”一文中公开了上述表达体系和表达蛋白的制备方法。

20 发明内容:

本发明人发现 2 个携带额外双随体小染色体 (BM) 而表型正常的家系, 该小染色体分别在 2 个家系的 2 代人和 3 代人之间稳定遗传, 且对

人体无任何危害。全世界至今已报导这类家系 17 个，但没有人提出利用该小染色体为原件组装人源性基因载体的构想。本申请人提出分离该小染色体原件，组装人源基因载体的方案。在研究中申请人用 FISH 技术查明，该小染色体来源于人的 D、G 组染色体短臂即 13、14、15、21、
5 22 号染色体短臂，由于 D、G 组染色体短臂为核仁组织区，富含核糖体 DNA(rDNA)，该区域不但在人群中存在着长度不同的各种多态（即含 rDNA 的量有多有少），而且在细胞分裂间期该区域基因转录十分活跃，因此，本申请人推测如果能从 BM 克隆出具有特异性的 DNA 片段，
10 并以其作为目的基因的引导序列，将目的基因定点导入人体 D、G 组染色体短臂核仁组织区，应该有较强的、稳定的和无害的表达。后续的实施例对此作出了有力的证明。

本发明人首先利用显微切割的方法，构建了小染色体特异性的 pUC19 文库并从中筛选得到单拷贝片段，该片段经荧光原位杂交（FISH）证实来源于小染色体和 D、G 组染色体短臂，进一步以此单拷贝片段为探针筛选人 PAC 基因组 DNA 文库，获得了约 120kb 的小染色体
15 特异性 DNA 片段（BMSF），并经 FISH 证实来源于小染色体和 D、G 组染色体短臂（图 1）。测序分析 BMSF 的序列特性，未发现与重要生理功能相关的基因，因此证明，以此为靶位点是安全的。本申请人进一步利用上述得到的约 120Kb 或从中选择更小的具有特异性的片段作为目的基因的引导序列，构建基因载体。
20

因此本申请人认为基因引导序列选自人类 D、G 组染色体短臂上无重要生理功能相关基因的 DNA 序列或与该 DNA 序列具有同源性的 DNA

序列作为目的基因的引导序列，并由此构建的基因载体具有特异性，能将目的基因定点导入到人体细胞中 D、G 组染色体短臂上，得到满足本发明目的的细胞株。

在获得目的基因引导序列的基础上，按现有技术可构建各种形式的载体，将目的基因 TNK-TPA 装入所构建的载体便得到载体-TNK-TPA 重组体。构建载体和将目的基因装入载体的方法是常规的方法。利用上述得到的载体-TNK-TPA 重组体，按常规方法即可将目的基因 TNK-TPA 导入宿主细胞。

本发明实施例中具体给出了从人 D、G 组染色体短臂上克隆得到的具有特异性的约 120kb DNA 序列，并从中选择更小的具有特异性的 3.8 kb DNA 片段作为目的基因引导序列，并构建载体的过程，得到列表 1 表示的载体。进一步将目的基因装入该载体，得到载体-TNK-TPA 重组体，其中目的基因 TNK-TPA 的插入位点为 5910 位。

本发明按上述方法将 TNK-TPA 目的基因导入到 HT1080 细胞中 D、G 组染色体上，得到的一种新细胞株。该细胞株已于 18. 8 月 2000 (18.08.00) 向中国典型培养物保藏中心提出保藏(中国.武汉武汉大学校内, 邮政编码:430072), 其保藏号是: CCTCC C200006。该保藏物的名称是: 人纤维肉瘤细胞系, 为人的转基因细胞。保藏人对保藏物指定的名称为 JH-2。该保藏培养物为纯培养物, 培养条件是: 含 10%小牛血清的 DMEM (高糖), PH: 7.0-7.4, 37 摄氏度。

上述得到的细胞株, 可直接替代现有技术中的 CHO 转化体, 用于制备 TNK-TPA。

用本发明提供的细胞株表达得到的表达产物纯化后，经 Western 杂交和氨基酸测序证实是目的蛋白。

本发明由于利用人源基因载体 TNK-TPA cDNA 定点导入人 HT1080 细胞株中 D、G 组染色体上，得到一种新的细胞株，并提供了一种应用
5 该细胞株制备 TNK-TPA 的方法，与现有技术相比，其表达量有显著的提高，并且保持稳定的表达水平，将显著地降低 TNK-TPA 的生产成本。

图 1 是 120kb PAC 克隆 DNA 的 FISH 定位图；

图 2 是本发明提供的一种基因载体的结构图（基因载体序列全长：
10 11162bp）；其中 pGEM -7（8267—11162）：载体复制元件及原核筛选系统；TK（1—2840）：真核细胞负筛选基因，该基因使用 TK 启动子和 TK polyA 信号；Neo（4342—5910）：真核细胞正筛选基因，该基因使用 sv40 启动子和 sv40 polyA 信号；GLS（2841—4341，5911—8267）：目的基因引导序列；Cloning site（5910）：目的基因插入位点；

15 图 3 是外源性 TNK-TPA 目的基因在阳性细胞克隆中的 FISH 定位，证明利用该载体已将 TNK-TPA 定点导入 D、G 组染色体短臂；

图 4 是 TNK-TPA 纯化产物 Western 结果，1~4 为 TNK-TPA 纯化产物，“-”示阴性对照；

20 实施例 1

本发明中使用的基因引导序列的制备：

1. 基因引导序列 PAC 克隆的获得

1 .1 显微切割、PCR、微克隆构建 BM 特异性 pUC19 文库 (Deng H-X, Yoshiura K, Dirks RW, et al. Hum Genet 1992, 89:13.)

1.2 BM 特异性单拷贝 DNA 的获得及鉴定

(1)菌落点阵膜的制备：在两张尼龙膜上划好 14×14 个方格，标记为 A、
5 B，分别置于 2 个有固体 LB 的平皿中，从文库皿中随机挑取白色克
隆分别点到两张膜坐标相同的方格内，共挑 14×12 个，第 13 行点 100ng
单拷贝 DNA 做阳性对照，第 14 行点 100ng gDNA 做为阴性对照，两
个皿分别置 37°C 培养 10~12 小时，其中 B 膜置 4°C 保存，将 A 膜从
皿中取出，分别在用以下溶液浸湿的滤纸上处理，10%SDS，5 分钟，
10 0.5N NaOH/1.5M NaCl，3 分钟，1.5M NaCl/0.5M Tris \cdot HCl，3 分钟，
 $2 \times \text{SSC}/0.2\text{M}$ Tris \cdot HCl，10 分钟， 80°C 真空干燥 2 小时， 37°C 保存
待用。

(2)gDNA 探针的制备

取 50~75ng gDNA 加无菌水至 11ml， 100°C 煮沸变性 10 分钟，以下列体
15 系做随机引物标记反应：

2mM dNTP(dATP ⁻)	3 μ l
primer mixture	2 μ l
Klenow 酶	1 μ l
α - ³² P-dATP	3 μ l

20 点离混匀， 37°C 浮浴 30 分钟。加 8 μ l stopmixture，过 G-50 柱纯化探针，
取 1/10 测液闪值。

(3)杂交：菌落点阵膜置于 $2 \times \text{SSC}$ 中浸泡 10 分钟，轻轻拭去膜表面的菌

落碎片, 65°C, 5ml 杂交液预杂交, 30 分钟以上。根据液闪值, 按 1.2×10^6 cpm/ml 杂交液的量取探针液于 100°C 煮沸变性 10 分钟, 加入 5ml 新鲜杂交液, 与菌落点阵膜 65°C 杂交 12 小时以上。按以下条件洗膜:
2×SSC/0.1% SDS, 室温 10 分钟, 2×SSC/0.1% SDS, 65°C 10 分钟,
0.1×SSC/0.1% SDS, 65°C 10 分钟, -70°C 放射自显影, 杂交信号无或
弱的初步认为是单拷贝。

(4) 测序, Southern 杂交鉴定: 在 B 膜上相应位置挑取无杂交信号的克隆, 小量扩增, 抽提质粒 DNA 测序, 与 GenBank 数据库比较, 无相似性的为单拷贝。最后 EcoRI 酶切分离插入子 DNA, 并以随机引物法, 用 α -³²P-dATP 标记并与 EcoRI 消化的 gDNA 转移尼龙膜杂交, 方法同上, 1 条或 2 条杂交带的为单拷贝。

1.3 BM 及 D、G 组染色体短臂特异性 PAC 克隆的获得及鉴定

(1) 筛选人 PAC gDNA 文库获得阳性克隆编号

利用 α -³²P-dATP 随机引物法标记 260bp 的单拷贝探针 P8-7→G-50 柱 (中等粒度) 纯化→4°C 待用→PAC 膜 7 张用 2×SSC 浸泡 10 分钟→55°C 预杂交 3 小时→探针 100°C 变性 10 分钟→以 4.6×10^5 cpm/ml 的量加入 50ml 购买的杂交液中, 与 PAC 膜于 65°C 杂交 1 小时→洗膜: 2×SSC, 室温 10 分钟一次, 2×SSC/0.1% SDS 65°C 10 分钟洗 2 次→上 X 光片, -70°C 放射自显影 12 小时→冲洗 X 光片→按说明书方法读取阳性克隆编号。

(2) 从 5 个不同的板上随机挑选阳性克隆编号, 购买 PAC 克隆。

1.4 PAC DNA 与中期相细胞 FISH 杂交, 证实来源于 D、G 组染色体短

臂，如图 1 所示。

上述实验方法参见《分子克隆实验指南》J.萨姆布鲁克等,第 2 版,1989 冷泉港实验室出版。(J. Sambrook et al. Molecular Cloning . Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989)

5 2. 基因引导序列 DNA 的获得

主要材料: β -agarose(Bio-Labs) NotI Agarose

①Not I 酶切 PAC169 质粒;

②通过 PFGE 分离约 120Kb 大小的插入子 DNA;

脉冲电泳条件: 电极缓冲液: $0.5 \times$ TBE、High strength Analytical Grade

10 Agarose: (Bio-Rad, Low Melting point Agarose LMP) 1%、Switch Time:

2 秒 \rightarrow 15 秒 电泳时间: 18 小时, 电压: 6V/cm, 角度: 120° 温度:

14 $^\circ$ C

③电泳结束后, 用 EB 染色 ($0.2\mu\text{g/ml}$) 30 分钟, 根据 Marker 指示, 用 无菌小刀片切下约 120kb 的条带。

15 ④切下的胶块用 β -agarase 处理, 乙醇沉淀。

实施例 2

本发明中使用的基因载体的制备:

1. 基因载体的构建及目的基因的导入

20 1.1 载体的构建

1.1.1 用 NsiI 和 StuI (平端酶) 酶切 PAC DNA, 普通琼脂糖凝胶回收

3.8kbDNA 片段, 电洗脱纯化;

1.1.2 用 HindIII 酶切 pGEM-TK 载体 DNA, Klenow 酶补平, 产生一平头末端;

1.1.3 pGEM-TK/HindIII 补平产物进一步用 NsiI 酶切;

1.1.4 3.8kb/NsiI+StuI 纯化产物与 pGEM-TK/HK+NsiI 酶切产物于 16°C 连接 17 小时;

1.1.5 连接产物转化 JM109 感受态细菌, 氨苄皿 37°C 培养 18 小时;

1.1.6 随机挑取单克隆, 用 NsiI 及 NheI 双酶切鉴定阳性克隆。

1.1.7 用 XbaI 和 NheI 双酶切 pCDN-GPR 质粒获得 Neo/XbaI+NheI

1.1.8 将 Neo/XbaI+NheI 与 pGEM-TK-3.8kb/NheI 连接, 构建成 pNS2 基因载体。

2.1 TNK-TPA 的导入

2.1.1 将 TNK-TPA (CDS) 克隆至 pcDNA 3.1(-);

2.1.2 设计引物 TPCF 和 TPCR 扩增 TNK-TPA 基因及表达元件 (CMV 启动子和 BGH poly A 信号), 使其两端装上 AvrII 酶切位点; 引物序列为:

15 TpcF: ATgCATCCTAggggAggTCgCTgAgTAgTg

AvrII

TpcR: TgCATgCCTAggTACCCCCTAgAgCCCAG

AvrII

2.1.3 用 AvrII 酶切 TNK-TPA/FIX 基因及表达元件 (CMV 启动子和 BGH poly A 信号) 并与 NheI 酶切的 pNS2 载体连接。

上述实验方法详见《分子克隆实验指南》J. 萨姆布鲁克等, 第 2 版, 1989 冷泉港实验室出版 (J. Sambrook et al. Molecular Cloning .

Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989)

2. 基因载体 DNA 的抽提

2.1 材料:

2.1.1 QIAGEN Plasmid Maxi Kit

5 2.1.2 培养基: 液体 LB

Trypton 5g

Yeast extract 2.5g

NaCl 2.5g

ddH₂O 定量至 500ml

10 高压蒸汽灭菌

2.1.3 氨苄青霉素 (Amp): 100mg/ml (1000×)

2.2 方法:

1) 挑取阳性单克隆至 3ml LB(Amp+) 37°C, 250rpm 培养 1 小时;

2) 取 100μl 上述初级培养物置 100ml LB (Amp+) 中, 37°C, 250rpm

15 培养 16 小时;

3) 于 4°C, 6000g 离心 15 分钟收获细菌;

4) 10ml Buffer P1 重悬菌体;

5) 加入 10ml Buffer P2, 轻柔地倒转 6 次混匀, 室温 5 分钟;

6) 加入 10ml 冰上预冷 Buffer P3, 轻柔倒转 6 次混匀, 冰上 20 分钟;

20 7) 4°C, 20000g 离心 30 分钟;

8) 迅速将上清转移至另一 40ml 高速离心管, 4°C, 20000xg 再次离心 15 分钟;

- 9) 10ml Buffer QBT 平衡 QIGEN tip 500
- 10) 将上清转移至 QIGAE tip 500 过柱
- 11) 用 30ml Buffer QC 洗柱 2 次;
- 12) 15ml Buffer QF 洗脱, 收集洗脱液;
- 5 13) 洗脱液加 (0.7 倍体积) 10.7ml 异丙醇, 混匀;
- 14) 15000g, 4°C, 离心 30 分钟;
- 15) 去上清, DNA 沉淀加入 5ml 70%乙醇洗涤, 15000g, 4°C 离心 10 分钟;
- 16) 去 70%乙醇, 空气中干燥 10 分钟适量 TE 溶解 DNA 沉淀。

10

实施例 3

利用实施例 2 得到载体-TNK-TPA 重组体, 在宿主细胞 HT1080 中导入目的基因, 筛选后得到所需的细胞株, 并在体外表达, 证实其定点导入和高效表达。

15 1. 材料:

1.1 细胞: HT1080

培养基: 高糖 DMEM+10% FBS (HT1080) EMEM+10%FBS

1.2 电穿孔仪: Bio-Rad 公司

2.方法:

- 20 1) 细胞于 75cm² 培养瓶内传代后长至 70%~80%满底
- 2) 收获细胞, 用 HeBs 缓冲液洗 2 次, 计数细胞
- 3) 15000rpm, 4°C 离心 10 分钟

- 4) 适量 HeBS 重悬, 使细胞浓度为 $10^6 \sim 10^7/\text{ml}$
- 5) 取 0.4ml 电击杯, 每杯加细胞悬液 0.8ml, 载体 DNA $10\mu\text{g}$ 左右
- 6) 用电穿孔仪进行电击, 电击条件设定为电压 260V, 电容 $550\mu\text{F}$, 电击时间一般为 11~13 毫秒。
- 5 7) 电击细胞转入 75cm^2 培养瓶中, 加 14ml 含双抗的培养基, 37°C , 5% CO_2 中培养, 24~48 小时。
- 8) 培养基内加入终浓度 $300\mu\text{l}$ 的 G418 进行筛选, 2~3 天换液一次, 换液时重新加 G418, 同时用正常细胞做对照
- 9) 约 7~10 天后正常细胞全部死亡, 计数转染细胞内存活克隆数, 改用
10 维持量 G418 $150\mu\text{g}/\text{ml}$
- 10) 转染细胞继续用终浓度为 $500\text{ng}/\text{ml}$ 的 GCV 进行筛选
- 11) 7~10 天大部分克隆死亡, 剩余存活细胞改用维持量 GCV $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 或不加经过筛的细胞长至 70~80% 满底后, 测定转移基因的表达活性。

3. 结果

15 利用该载体将 TNK-TPA 基因用电穿孔的方法分别导入 HT1080 细胞, 经正、负筛选得到阳性细胞株, FISH 证实为定点插入(图 3)。TNK-TPA 活性测定结果详见表 1。

HT1080 细胞阴性对照 TNK-TPA 活性为 $0\text{U}/10^6$ 细胞/24 小时, 导入后 TNK-TPA 活性为 $408\text{U}/10^6$ 细胞/24 小时, 转化后 95 天表达量为 407, 20 表达十分稳定, 见表 1。表达产物均已通过 Western 杂交和氨基酸测序证实(图 4)。

表 1 TNK-TPA 转化的阳性细胞 TNK-TPA 活性测定($\mu\text{g}/10^6$ 细胞)

/24 小时)

	转化后	T1	转化后	T15
	33 天	408	54 天	188
	37 天	396	58 天	204
5	60 天	411	95 天	114
	68 天	430		
	74 天	430		
	88 天	441		
	90 天	440.9		
10	95 天	407		

(T1、T15 为两个 TNK-TPA 阳性细胞株)

4、TNK-TPA 蛋白质的制备工艺:

- 1) TNK-TPA/HT1080 细胞株 DMEM 培养至 80%满底, 换无血清培养基, 24 小时后收集上清液, 其中含有表达 TNK-TPA;
- 15 2) 将得到的上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤;
- 3) 用 10KD 超滤膜将过滤后的上清液超滤浓缩 7 倍;
- 4) 过 PROSEP-LYSINE II chromatography media 柱;
- 5) 0.05 MPB, PH 7.0 , 5 倍柱体积洗去非特异性吸附蛋白;
- 6) 0.2M Argine/0.05M PB, PH 7.5 条件下洗脱结合在柱上的 TNK-TPA;
- 20 7) 3KD 超滤去盐, 冻干制成粉剂。

权利要求

1、一种表达人突变型组织型纤溶酶原激活素的的细胞株，其保藏号为 CCTCC C200006。

5 2、构建权利要求 1 所述的表达突变型人组织型纤溶酶原激活素的细胞株的方法，其特征在于

(1) 以人类 D、G 组染色体短臂上无重要生理功能相关基因的 DNA 序列或与该 DNA 序列具有同源性的 DNA 序列作为目的基因的引导序列，用常规方法构建的具有特异性的基因载体，

10 (2) 按常规方法将目的基因 TNK-TPA 装入上述的载体，得到载体-TNK-TPA 重组体；

(3) 用上述载体-TNK-TPA 重组体，将 TNK-TPA 目的基因导入宿主细胞 HT1080 的 D、G 组染色体核仁组织区靶位，经筛选获得细胞株。

15 3、根据权利要求 2 所述的构建表达突变型人组织型纤溶酶原激活素的细胞株的方法，其特征在于所用的载体具有序列表 1 表示的 DNA 序列。

4、制备突变型人组织型纤溶酶原激活素的方法，其特征在于利用权利要求 1 中所述的细胞株作为工程细胞株表达制备 TNK-TPA。

20



图 1

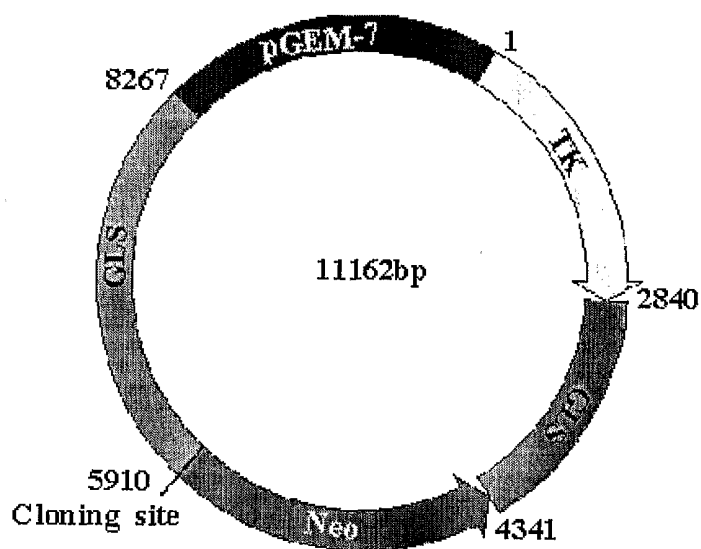


图 2



图 3

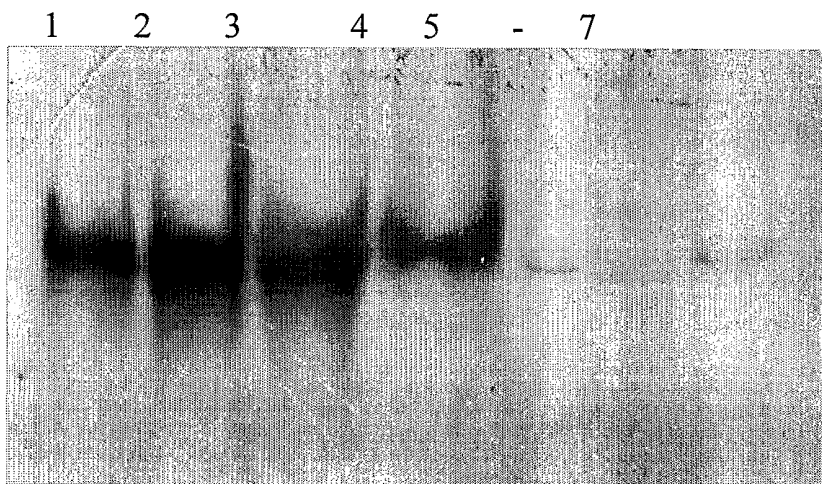


图 4

序列表

<110> 湖南瑞雅生物技术有限公司

<120> 表达突变型人组织型纤溶酶原激活素的细胞株、构建方法及
5 表达蛋白的制备方法

<160> 1

<211> 11162bp

<212> DNA

<213> 目的基因载体

10 <400>

1 GGGCGAATTG GGCCCGACGT CGCATGCTCC TCTAGACTCG AGGAATTCTA
51 CCGGGTAGGG GAGGCGCTTT TCCCAAGGCA GTCTGGAGCA TGCGCTTAAG
101 CAGCCCCGCT GGGCACTTGG CGCTACACAA GTGGCCTCTG GCCTCGCACA
151 CATTCCACAT CCACCGGTAG GCGCCAACCG GCTCCGTTCT TTGGTGGCCC
15 201 CTTTCGCGCA CCTTCTACTC CTCCCCTAGT CAGGAAGTTC CCCCCGCCC
251 CGCAGCTCGC GTCGTGCAGG ACGTGACAAA TGGAAAGTAGC ACGTCTCACT
301 AGTCTCGTGC AGATGGACAG CACCGCTGAG CAATGGAAGC GGGTAGGCCT
351 TTGGGGCAGC GGCCAATAGC AGCTTTGCTC CTTTCGCTTTC TGGGCTCAGA
401 GGCTGGGAAG GGGTGGGTCC GGGGGCGGGC TCAGGGGCGG GCTCAGGGGC
20 451 GGGGCGGGCG CCCGAAGTTC CTCCGAGGC CCGGCATTCT GACGCTTCAA
501 AAGCGCACGT CTGCCGCGCT GTTCTCCTCT TCCTCATCTC CGGCCTTTTCG
551 ACCTGCAGCG ACCCGCTTAA CAGCGTCAAC AGCGTGCCGC AGATCTTGGT
601 GCGTGAAAC TCCCGCACCT CTTCCGCAAG CGCCTTGTAG AAGCGCGTAT
651 GGCTTCGTAC CCCTGCCATC AACACGCGTC TCGTTCGAC CAGGCTGCGC
25 701 GTTCTCGCGG CCATAGCAAC CGACGTACGG CGTTGCGCCC TCGCCGGCAG
751 CAAGAAGCCA CGGAAGTCCG CCTGGAGCAG AAAATGCCCA CGTACTGCG
801 GGTTTATATA GACGGTCCTC ACGGGATGGG GAAAACCACC ACCACGCAAC
851 TGCTGGTGGC CCTGGGTTCG CGCGACGATA TCGTCTACGT ACCCGAGCCC
901 GATGACTTAC TGGCAGGTGC TGGGGGCTTC CGAGACAATC GCGAACATCT
30 951 ACACCACACA ACACCGCCTC GACCAGGGTG AGATATCGGC CGGGGACGCG
1001 GCGGTGGTAA TGACAAGCGC CCAGATAACA ATGGGCATGC CTTATGCCGT
1051 GACCGACGCC GTTCTGGCTC CTCATATCGG GGGGGAGGCT GGGAGCTCAC
1101 ATGCCCCGCC CCCGGCCCTC ACCCTCATCT TCGACCGCCA TCCCATCGCC
1151 GCCCTCCTGT GCTACCCGGC CGCGCGATAC CTTATGGGCA GCATGACCCC

1201 CCAGGCCGTG CTGGCGTTCG TGGCCCTCAT CCCGCCGACC TTGCCCGGCA
 1251 CAAACATCGT GTTGGGGGCC CTTCCGGAGG ACAGACACAT CGACCCGCTG
 1301 GCCAAACGCC AGCGCCCCGG CGAGCGGCTT GACCTGGCTA TGCTGGCCGC
 1351 GATTCGCCGC GTTTACGGGC TGCTTGCCAA TACGGTGCGG TATCTGCAGG
 5 1401 GCGGCGGGTC GTGGCGGGAG GATTGGGGAC AGCTTTCGGG GACGGCCGTG
 1451 CCCGCCCCAG GGTGCCGAGC CCCAGAGCAA CGCGGGCCCA CGACCCCAT
 1501 TCGGGGACAC GTTATTTACC CTGTTTCGGG CCCCCGAGTT GCTGGCCCCC
 1551 AACGGCGACC TGTACAACGT GTTTGCCTGG GCCTTGACG TCTTGCCAA
 1601 ACGCCTCCGT CCCATGCACG TCTTTATCCT GGATTACGAC CAATCGCCCC
 10 1651 CCGGCTGCCG GGACGCCCTG CTGCAACTTA CCTCCGGGAT GGTCCAGACC
 1701 CACGTCACCA CCCCCGGCTC CATAACGACG ATCTGCGACC TGGCGCGCAC
 1751 GTTTGCCCGG GAGATGGGGG AGGCTAACTG AAACACGGAA GGAGACAATA
 1801 CCGGAAGGAA CCCGCGCTAT GACGGCAATA AAAAGACAGA ATAAAACGCA
 1851 CGGGTGTTGG GTCGTTTGT CATAAACGCG GGGTTCGGTC CCAGGGCTGG
 15 1901 CACTCTGTCG ATACCCACC GAGACCCCAT TGGGGCCAAT ACGCCCGCGT
 1951 TTCTTCCTTT TCCCCACCCC ACCCCCAAG TTCGGGTGAA GGCCAGGGC
 2001 TCGCAGCCAA CGTCGGGGCG GCAAGCCCTG CCATAGCCAC GGGCCCCGTG
 2051 GGTTAGGGAC GGGGTCCCC ATGGGGAATG GTTTATGGTT CGTGGGGGTT
 2101 ATTATTTTGG GCGTTGCGTG GGGTCAGGTC CACGACTGGA CTGAGCAGAC
 20 2151 AGACCCATGG TTTTGGATG GCCTGGGCAT GGACCGCATG TACTGGCGCG
 2201 ACACGAACAC CGGGCGTCTG TGGCTGCCAA ACACCCCCGA CCCCCAAAA
 2251 CCACCGCGCG GATTTCTGGC GCCGCCGGAC GAACTAAACC TGACTACGGC
 2301 ATCTCTGCC CTTCTTCGCT GGTACGAGGA GCGCTTTTGT TTTGTATTGG
 2351 TCACCACGGC CGAGTTTCCG CGGGACCCCG GCCAGGACCT GCAGAAATTG
 25 2401 ATGATCTATT AAACAATAAA GATGTCCACT AAAATGGAAG TTTTCTCTGT
 2451 CATACTTTGT TAAGAAGGTT GAGAACAGAG TACCTACATT TTGAATGGAA
 2501 GGATTGGAGC TACGGGGTG GGGGTGGGGT GGGATTAGAT AAATGCCTGC
 2551 TCTTTACTGA AGGCTCTTTA CTATTGCTTT ATGATAATGT TTCATAGTTG
 2601 GATATCATAA TTAAACAAG CAAAACCAA TTAAGGGCCA GCTCATTCTT
 30 2651 CCCACTCATG ATCTATAGAT CTATAGATCT CTCGTGGGAT CATTGTTTTT
 2701 CTCTTGATT CCACTTTGTG GTTCTAAGTA CTGTGGTTTC CAAATGTGTC
 2751 AGTTTCATAG CCTGAAGAAC GAGATCAGCA GCCTCTGTTC CACATACACT
 2801 TCATTCTCAG TATTGTTTTG CCAAGTTCTA ATTCCATCAG AAGCTCCTTA
 2851 ATTTTATAACC ACTGACTTAT TTTGAAGGCT GCTATAAGAA ACAGCCCTAT
 35 2901 GAAACTGGTA TTTTCTACT GCAAGGTGGC TACTTTAAGA CAATTTTTCA
 2951 TTGCATTCTA TCAAGGGATG TCTTATTATT ATATCATTAT ATCAAGTGAT
 3001 GTTATAAATA GTAAGAATCA GATTAAGGGC TCATATGTCC TTCTTTGTAT
 3051 TGA CTGTTGA AAAGGTATGG GGCCAAATTT GTAGTTTGTC TGGAATTACA
 3101 TATTTTTGGG GGTCTCTATT ATCTTCATAC TTATCCTATC TAAATTTTCC
 40 3151 ATTGCCAAAT TTCCTTACTT ATTTTAGTGT TTATCCTATT GCTCATGTAT
 3201 TTTTATGTCT CCATAAGTCT ATTTTGAAA AAGGCAGAGT ACTCATAATT
 3251 TTAGTATATC TTTTAGCTTT ATGTTGCCAT AAACCTTTCA TTATATACAT
 3301 GATCAACAAC AGCAAATTAT CTCACCTCAG TATTTAGTTT ATTATTTTAC
 3351 AAAGTATTT ATGATTGCTA ACATGTAAC GAAGGTATAC ACTATTAGAA

3401 CACAGTTTTC AGTAGAAAGT AGCACTGCCA TTGAGTAAAA AAATGTTCTA
 3451 ACATTAGAGC AACATTCTTA TACAAGTTTG CATGTTGTTT ACTGAGGTCT
 3501 AAAGCATGAC TACACAAAAG GCTGAATAAA ATTCAGATTC TTACATACAC
 3551 ATAAAATTGT TTTATTGAGA TGACAAAAGTA TATTTATTAT GCCACCCAGA
 5 3601 ATATAATCCA CTCTGATAAC TGCCAGTGTA TGCACTTGCT GAAGTAACTC
 3651 AGTACATAAA TGGTAGCCAC AACAGTTGCT GTGCATGAAA GTTCTTCTCT
 3701 TCCAGATTGA AGAGTGTACA ATCTAAAAGCA TTTTAAAACT TTAAATCCCT
 3751 TATTAGCTTA AATATAATTT AAAATTTTAG TTTGCCGTAC CTATAATTTG
 3801 TCTGTACACT AGGTTACTAA GGGTGATATG ATTACATATG TGGATACAAA
 10 3851 ATAATTTTAA TGGAAAATGA AATTAGGGTA CTCAACAAAG ATAAAGGGTA
 3901 ATGATCATGT AACTAACCG TATTTGAGAT TAGTTTAAAG CTGGGGTAGC
 3951 TATACTTATG TTTCACAGAC CTTGAGAAGA TAGGGAAAAA AAGCTTTTAT
 4001 CAACATTGCT AAGGAACAGG TAAAAGCTAA CATTAGGTAA CTAAGAGGTG
 4051 ACATAAAAAA GACTGAATAA AATATCATGG AGGTTTCATA ATAAGATTGG
 15 4101 AAATTCCATA GACTAGGAGA GAAAAGATCC CAAAATATAC ATGCTCATTG
 4151 GGAAAACAGC TAGTAAGAAC AAGGAGAGAT CTCTATTTAA TGATACAATA
 4201 GTAGAGTTAT AATTTCTGT ATATTGTAAG TTTCAAGCAT TTAAACATTT
 4251 TCATTGAATT ATAAAATATT ATTTGTAAAA GAAAGAAAAA CAGCACAAC
 4301 GCAGATTACA GATGACTAAG ATAGATGAAT CATGAAAAGG TGCTAGATTG
 20 4351 TGAGCGGATA ACAATTTTAC ACAGGAAACA GCTATGACCA TGATTACGCC
 4401 AAGCTCTCGA CGGGATCGCG GCCGCGATCC AGACATGATA AGATACATTG
 4451 ATGAGTTTGG ACAAACCACA ACTAGAATGC AGTGAAAAAA ATGCTTTATT
 4501 TGTGAAATTT GTGATGCTAT TGCTTTATTT GTAACCATTA TAAGCTGCAA
 4551 TAAACAAGTT GGGGTGGGCG AAGAACTCCA GCATGAGATC CCCGCGCTGG
 25 4601 AGGATCATCC AGCCGGCGTC CCGGAAAACG ATTCCGAAGC CCAACCTTTC
 4651 ATAGAAGGCG GCGGTGGAAT CGAAATCTCG TGATGGCAGG TTGGGCGTCC
 4701 CTTGGTCGGT CATTTCGAAC CCCAGAGTCC CGCTCAGAAG AACTCGTCAA
 4751 GAAGGCGATA GAAGGCGATG CGCTGCGAAT CGGGAGCGGC GATACCGTAA
 4801 AGCACGAGGA AGCGGTCAGC CCATTCGCCG CCAAGCTCTT CAGCAATATC
 30 4851 ACGGGTAGCC AACACTATGT CCTGATAGCG GTCCGCCACA CCCAGCCGGC
 4901 CACAGTCGAT GAATCCAGAA AAGCGGCCAT TTTCCACCAT GATATTCGGC
 4951 AAGCAGGCAT CGCCATGGGT CACGACGAGA TCCTCGCCGT CGGGCATGCT
 5001 CGCCTTGAGC CTGGCGAACA GTTCGGCTGG CGCGAGCCCC TGATGCTCTT
 5051 CGTCCAGATC ATCCTGATCG ACAAGACCGG CTTCCATCCG AGTACGTGCT
 35 5101 CGCTCGATGC GATGTTTCGC TTGGTGGTCG AATGGGCAGG TAGCCGGATC
 5151 AAGCGTATGC AGCCGCCGCA TTGCATCAGC CATGATGGAT ACTTTCTCGG
 5201 CAGGAGCAAG GTGAGATGAC AGGAGATCCT GCCCCGGCAC TTCGCCAAT
 5251 AGCAGCCAGT CCCTTCCCGC TTCAGTGACA ACGTCGAGCA CAGCTGCGCA
 5301 AGGAACGCCC GTCGTGGCCA GCCACGATAG CCGCGCTGCC TCGTCTTGCA
 40 5351 GTTCATTAG GGCACCGGAC AGGTCCGGTCT TGACAAAAAG AACCAGGGCGC
 5401 CCCTGCGCTG ACAGCCGGAA CACGGCGGCA TCAGAGCAGC CGATTGTCTG
 5451 TTGTGCCAG TCATAGCCGA ATAGCCTCTC CACCCAAGCG GCCGAGAAC
 5501 CTGCGTGCAA TCCATCTTGT TCAACCATGG TGGATCGATC CAAGCTCCCA
 5551 ACACAACATAT GTCAGAAGCA AATGTGAGGA GCAACTGATC CTACCTCACC

5601 TTATATGCTC TGCCCTGGCT CCTGCCCTCT CTATCCTGTG TGAGCAGATT
 5651 GGCCCTTACC AAGGTGTGGC TCTACGGAAT CAGGCTTCGG TGATGACAAG
 5701 CATATTTCTC CCTAGAATGC TGTGCCACTC ACTGGCTTAG GAGTCTCAGC
 5751 TCTGGGTACT CCCTCTGAAT AATGTTTGTC CTTATCTGTG CAGAGAACAC
 5801 TGTCTCTAAA GCATCCTTTT TGGCAACGCA TTTGCTCAAT CAACTACTGA
 5851 ATTGGTGTTA AAATTAATTT TCCTTTTTTTT CTCATTATGC AAATAAGAAA
 5901 TTGAGAAGCA AAGCTAGCAG AGATTTCTAT CACACCTATC AGGGATACAC
 5951 AATTTCCAAG AATTCAGAA GTGTTTGGTG TTCCTATTAA CATAAATCCG
 6001 GAAATAACAC CTGAGTGAAC TGTCTTCTAA TTCTTCAACT GGATGGCTTT
 6051 TTAGTGTAAG AGATGTTGAA TACTGATTGA CTTTTTAATA ATTTTATAGT
 6101 ATATGTCAGA AATATTGCAC AGTCCCTATT TACATCATTG TACAGTGGTT
 6151 TTTAAAATGT TTTAAGAATA AAAAATCATG AACTTTTATT TGATTTTTCT
 6201 GAGGAAATAA CTTTTTGGAT TTAATTTCAA TGAAACCGTT GATAACATTT
 6251 CCCTCCCAA CAATCTCTGG CAACGATCCC TCAGATTTTA ATGATTATGT
 6301 ATTATTACCT TTTAATACAA GTAGAATAAC ACTCAGGGAA TTTACAACAT
 6351 TTGTTATTTT CAGTAAATAC ATTGGTTGAA GTTTTAAAAGT CTATCCGTAG
 6401 TAAACTTACA TCTTTCAGGA GCTTGGTCAA TGTGTTCTGG ACAAAGCAGG
 6451 AAGATGTGAC TGAAATCCTG AAAGGAGCCG GCTCCTGCAG CACAAGGATA
 6501 ATGATACATC TGGGTACATT TCTCTTCAACA GCATTTGATA GTGGCTCCAA
 6551 AGTGCTTACA AAATGCACAT TGCTGAAAGG GGTAAGGAG AGAAATCTCT
 6601 TTATAAAACC TTGAAAAGGA ATATTTAAAT ATAAGCTGGG AAGGTATAAA
 6651 AACTCTCTG TAACATCACA AGTAAACAAA TTGAACCTGC AAAATATTAA
 6701 ACAAAGGATT CATTAAAAAT AATAAAATCT ACATTACTCA ATTTAGTGCT
 6751 TTGTGTGCTA CCAACTCATC CTTCCATTCA AATTAGAAAG TTAGAATTTG
 6801 ATTCCTTATA TTTTCAAAAA TAAATTGTGA AGCATTTTAG AAACAAAACC
 6851 TAAAATTTTT TTTTAAAAGC AAATAGTAAT ATGGTAAAG GGGCAGGTTT
 6901 CTATATTGAG GATTATTATA AAGTTTTTAA ATCCTACCAA AACTAGTAAT
 6951 AGGAACATAT ATTATTTATG AGACATATTA CTATTTTTTA CCCTGCCTAA
 7001 AAATAAATAC AAATAAATTC ATCAATTATA AGTAAACAGG GACACAAATG
 7051 GTTAAAGACT CACACACAAA AAAAACAATA CTACATACTT CAATGTAGCA
 7101 ATCAACTTCA AATTTCTTAA CAAAAGATGG AAATGTTGGG GAAAAAATTA
 7151 GTCATCTGGT ATCTTTCCCA TTTCAACCTG CCTCCATTAT CTTGCAAGTG
 7201 GTAAAATGCA CAGAAAATAAG CCTCAAACAA GAGGGGCAGT CTAGGGCAAG
 7251 TGAACACATA AGTCGGAAGA AATTATGTAA AATGTTGCAT TTACTTATTC
 7301 AGTTTTCCCT TAGAATGATT CACAAACTCT TCCTCATTCT CCCAAGTCCA
 7351 TTTTGAGTAT CATTTTCTTT GAAGAGAGTC TGATGGGCCC TGACTATAC
 7401 AGTATGAAAT CTCTCTGTGG GAAATGACTA TCTAACATAA ATTTTTGTTT
 7451 ACACCGTTAC ATGGTACCTA CTTGCTTATG CCATTACATG ATCAGTTTAC
 7501 CTTTTTCTCA ACCTAATCCA AGATCCTTCA ATTGAGGCAC TATACTATCT
 7551 TTGTATCCAA AGCACCACAAA ATGCTGCTTC AAACAGGCCC TAATAGATAG
 7601 GTGTTCCCTAT ACATATACCA AAAAGACTTA ACTTTTGGTG ATCTTGTTTG
 7651 TGAGTGTGGC TCATAAACAG CTTAGTTGAG ATAAGTGGAG CCTCATGTAG
 7701 CAGAGACAGT TGGACCCTGC TAACATTACT GTGGATATCT TCACATGTTA
 7751 CTACATTGAC TTTATATTCT GCTAATTAAC CAGGGACTAC AGTAGTAAAA

7801 ATTATAATTG TTTTCAATGT TTTATGTGTA AATCTGTATC TCACATACTA
 7851 TCAAACCTCTT CCTCACTGTC ATCAGTCTAC TGCATTGAAT CCAACATAAC
 7901 AAAGCTAAAT GACTCCTGAG GGCTGAATCA GAAAGAAGAA AAGAAAGAGA
 7951 TACAAAACCTT TAGTCGGCCC GGTGGCTCAC ACCTGTAATC CCAGCACTTT
 5 8001 GGAAGGCCAA GGCGGGCGGA TCACGAGGTC AGGAGATCGA GACCATCCTG
 8051 GCTGATACAG TGAAACTCCA TCTCTACTGA AAATACAAAA AATTAGCTGG
 8101 ACGTGGTGGT GGGCACCTGT AGTCCCAGCT ACTCAGGAGG CTGAAGCAGG
 8151 AGAAGCTTCT AAATAACTCA TAAACACTAA TTAAGTGTGT GACACTTTAA
 8201 TTTTATACAA TATTTATAAG TATACAGAAT AACATTTTCTG TGCTATTTTG
 10 8251 GCACTCAAGG GTATTAATGC ATAGCTTGAG TATTCTATAG TGTCACCTAA
 8301 ATAGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGCTGT TTCCTGTGTG AAATTGTTAT
 8351 CCGCTCACAA TTCCACACAA CATAACGAGCC GGAAGCATAA AGTGTAAGC
 8401 CTGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC
 8451 TGCCCGCTTT CCAGTCGGGA AACCTGTCGT GCCAGCTGCA TTAATGAATC
 15 8501 GGCCAACGCG CGGGGAGAGG CGGTTTGCCT ATTGGGCGCT CTCCCGCTTC
 8551 CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT
 8601 CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC
 8651 GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA
 8701 AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCGATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC
 20 8751 ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GCGGAAACCC GACAGGACTA
 8801 TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT
 8851 TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA
 8901 GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
 8951 GTCGTTGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA
 25 9001 CCGCTGCGCC TTATCCGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC
 9051 ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG
 9101 AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACCTACGG
 9151 CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA
 9201 CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT
 30 9251 GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA
 9301 AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT
 9351 GGAACGAAAA CTCACGTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG
 9401 ATCTTACCT AGATCCTTTT AAATTAATAA TGAAGTTTTA AATCAATCTA
 9451 AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG
 35 9501 AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTT GTTCATCCAT AGTTGCCTGA
 9551 CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC
 9601 CAGTGTGCA ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT
 9651 CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA
 9701 ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT
 40 9751 AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGGC ATTGCTACAG
 9801 GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT
 9851 TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAGC
 9901 GGTTAGCTCC TTCGGTCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGAG
 9951 TGTTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCATG

10001 CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA CCAAGTCATT
 10051 CTGAGAATAC CGCGCCCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCG GCGTCAATAC
 10101 GGGATAATAG TGTATGACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTGGA
 10151 AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC
 5 10201 CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA
 10251 CTTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA
 10301 AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCCT
 10351 TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT
 10401 ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA
 10 10451 TTTCCCGGAA AAGTGCCACC TGTATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC
 10501 GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGACGC GCCCTGTAGC GGCGCATTAA
 10551 GCGCGGCGGG TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC
 10601 GCCCTAGCGC CCGCTCCTTT CGCTTTCTTC CCTTCCTTTC TCGCCACGTT
 10651 CGCCGGCTTT CCCCCTCAAG CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC
 15 10701 GATTTAGAGC TTTACGGCAC CTCGACCGCA AAAAATTGA TTTGGGTGAT
 10751 GGTTACGTA GTGGGCCATC GCCCTGATAG ACGGTTTTTC GCCCTTTGAC
 10801 GTTGGAGTCC ACGTTCCTTA ATAGTGGACT CTGTTCCAA ACTGGAACAA
 10851 CACTCAACCC TATCTCGTC TATCTTTTG ATTTATAAGG GATTTTGCCG
 10901 ATTTCGGCCT ATTGGTAAA AAATGAGCTG ATTTAACAAA TATTTAACGC
 20 10951 GAATTTTAAAC AAAATATTA CGTTTACAAT TTCCATTTCG CATTGAGGCT
 11001 GCGCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGGTGCG GGCTCTTCG CTATTACGCC
 11051 AGCTGGCGAA AGGGGGATGT GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAACGCCA
 11101 GGGTTTTCCC AGTCACGACG TTGTA AACG ACGGCCAGTG AATTGTAATA
 11151 CGACTCACTA TA

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN00/00260

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12N15/57, C07K14/745

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C12N15/57, C07K14/745

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, EPOQUE(WPI), NCBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	US, A, 5223408 (Genetech, Inc.) 29 June 1993, See the whole document	1-13,15-18
A	US, A, 5795737 (General Hospital Corporation) 18 August 1998, See the whole document	1-13,15-18
A	EP, A, 269382(SMITHKLINE BECKMAN CORP.) 01June1988, See the whole document	1-13,15-18

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
 See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 February 2001(02.02.2001)

Date of mailing of the international search report

22 FEB 2001 (02.02.01)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

PAN,aiqun

Telephone No. 86-10-62093906



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN00/00260

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
US-A-5223408	29-06-1993	none	
US-A-5795737	18-08-1998	EP-A-0851868	08-07-1998
EP-A-269382	01-01-1988	PT-A-86162	15-12-1988

A. 主题的分类

IPC⁷ C12N15/57, C07K14/745

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ C12N15/57, C07K14/745

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

EPOQUE(WPI), CNPAT,NCBI

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	US, A, 5223408 (基因技术有限公司) 29.6 月 1993, 参见全文	1-13,15-18
A	US, A, 5795737 (综合医院集团) 18. 8 月 1998, 参见全文	1-13,15-18
A	EP, A, 269382(史克贝克曼公司) 01. 6 月 1988, 参见全文	1-13,15-18

其余文件在 C 栏的续页中列出。

见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

- “A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件
- “E” 在先文件,但是在国际申请日的同一日或之后公布的
- “L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)
- “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件
- “P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

- “T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件,它与申请不相抵触,但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理
- “X” 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时,要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性
- “Y” 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起,这种结合对本领域技术人员是显而易见的,要求保护的发明不能认为具有创造性
- “&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

02 Feburary 2001(01.02.2001)

国际检索报告邮寄日期

22. 2月 2000 (22. 02. 01)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)
传真号: 86-10-62019451

授权官员

潘爱群
电话号码: 86-10-62093906



国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN00/00260

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
US-A-5223408	29-06-1993	无	
US-A-5795737	18-08-1998	EP-A-0851868	08-07-1998
EP-A-269382	01-01-1988	PT-A-86162	15-12-1988