



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101628111 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 06

(21) 申请号 200910146212. X

(22) 申请日 2002. 05. 20

(30) 优先权数据

60/293, 343 2001. 05. 24 US

(62) 分案原申请数据

02812698. X 2002. 05. 20

(73) 专利权人 津莫吉尼蒂克斯公司

地址 美国华盛顿

(72) 发明人 M·W·里克森 J·A·格罗斯

(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 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

C07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/62(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 00/40716 A2, 2000. 07. 13, 全文.

G-U Von Bulow and R J Bram. NF-AT

activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. 《Science》. 1997, 第 278 卷 138-141.

审查员 李影

权利要求书1页 说明书97页 附图7页

(54) 发明名称

TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质

(57) 摘要

干预肿瘤坏死因子受体与其配体结合的分子, 例如, 可溶性的受体, 已经被证实在基础研究和作为治疗方法均有用。本发明提供了经过改进的可溶性的跨膜激活剂和钙调节剂和亲环蛋白配体相互作用剂 (TACI) 受体。

1. 一种融合蛋白质,其由 SEQ ID NO :54 所示的氨基酸序列的分泌形式组成,其中已从 SEQ ID NO :54 所示的氨基酸序列中除去了 SEQ ID NO :25 所示的优化的 tPA (otPA) 前导序列。
2. 编码权利要求 1 所述的融合蛋白质的核酸分子。
3. 权利要求 2 所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含 SEQ ID NO :53 所示的核苷酸序列,其中已除去了编码 SEQ ID NO :25 所示的优化的 tPA (otPA) 前导序列的核酸序列。

## TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质

[0001] 本申请是申请日为2002年5月20日、申请号为02812698.X、发明名称为“TACI-免疫球蛋白融合蛋白质”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明总的来说涉及包含肿瘤坏死因子受体部分和免疫球蛋白部分的改良的融合蛋白质。具体地说,本发明涉及改良 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质。

[0003] 发明背景

[0004] 细胞因子是介导包括调节很多细胞类型的生长和各种生物效应的可溶的小蛋白质, (参见:例如 Arai 等人, *Annu. Rev. Biochem.* 59 :783(1990) ;Mosmann, *Curr. Opin. Immunol.* 3 :311(1991) ;Paul 和 Seder, *Cell* 76 :241(1994))。构成细胞因子组的蛋白质包括白细胞介素、干扰素、集落刺激因子、肿瘤坏死因子、以及其他调节分子。例如:人的白细胞介素-17 是刺激白细胞介素-6、胞内粘附分子 1、白细胞介素-8、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的表达和前列腺素 E2 表达的细胞因子,并且在 CD34+ 造血前体细胞转变成嗜中性粒细胞的优先成熟中起作用 (Yao 等人, *J. Immunol.* 155 :5483(1995) ;Fossiez 等人, *J. Exp. Med.* 183 :2593(1996))。

[0005] 结合细胞因子的受体一般由一种或多种整合膜蛋白质组成,该整合膜蛋白质以高亲和性与细胞因子结合并且将该结合事件通过特定的受体亚基的胞质部分转导到细胞。根据其细胞外的配体结合区的相似性,细胞因子的受体被分为若干类。例如:根据其特征性的 200 个残基的胞外区,负责结合和 / 或转导干扰素效应的受体链是 II 型细胞因子受体家族的成员。

[0006] 在免疫应答的时候发生的细胞相互作用由若干细胞表面受体家族的成员 (包括肿瘤坏死因子受体 (FNFR) 家族) 调节。TNFR 家族由一些整合膜糖蛋白受体构成,在与它们各自配体的连接中,许多受体调节不同造血细胞谱系之间的相互作用 (参见:例如 Cosman, *Stem Cells* 12 :440(1994) ;Wajant 等人, *Cytokine Growth Factor Rev.* 10 :15(1999) ;Yeh 等人, *Immunol. Rev.* 169 :283(1999) ;Idriss 和 Naismith, *Microsc. Res. Tech.* 50 :184(2000))。

[0007] 一种这样的受体是 TACI,跨膜激活剂和 CAML- 相互作用剂 (vonBülow 和 Bram, *Science* 228 :138(1997) ;Bram 和 von Bülow, 美国专利 5,969,102(1999))。TACI 是一种膜结合受体,它具有包含二个富含半胱氨酸的假性重复片断 (cysteine-rich pseudo-repeats) 的胞外区、一个跨膜区和与 CAML (钙调节剂和亲环蛋白配体) 相互作用的胞质区、CAML 是位于胞内囊泡的整合膜蛋白质,当其在 Jurkat 细胞内过度表达时,是一种 NF-AT 激活的协同诱导物。TACI 与 B 细胞和 T 细胞的一种亚型相关。在此提供编码 TACI 的核苷酸序列和其相应的氨基酸序列,分别为 SEQ ID NO :1 和 2。

[0008] TACI 受体与肿瘤坏死因子 (TNF) 配体家族的两个成员相结合。一个配体被不同地称为 ZTNF4、“BAFF”、“neutrokin- $\alpha$ ”、“BLyS”、“TALL-1”、以及“THANK” (Yu 等人, 国际公开文本 W098/18921(1998), Moore 等人, *Science* 285 :269(1999) ;Mukhopadhyay 等

人 J. Biol. Chem. 274 :15978(1999) ;Schneider 等人 J. Exp. Med. 189 :1747(1999) ;Shu 等人, J. Leukoc. Biol. 65 :680(1999)。提供 ZTNF4 氨基酸序列为 SEQ ID NO :3。另一个配体被不同地称为“ ZTNF2”、“APRIL”和“TNRF 死亡配体 -1”(Hahne 等人, J. Exp. Med. 188 :1185(1998) ;Kelly 等人, Cancer Res. 60 :1021(2000))。提供 ZTNF2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO :4。两个配体都亦与 B 细胞成熟受体 (BCMA) 结合 (Gross 等人, Nature404 :995(2000))。提供 BCMA 的核苷酸序列和氨基酸序列分别为 SEQ IDNO :26 和 SEQ ID NO :27。

[0009] 经证实的肿瘤坏死因子受体的体内活性表明了该受体的可溶形式的临床潜力。TACI 受体的可溶形式已经被以免疫球蛋白融合蛋白质的形式被制造出来。最初的版本导致低水平表达的异质蛋白质。在 TACI 氨基末端、在 Fc 羧基末端以及 TACI 柄部可观察到异质性。因此对药用的 TACI 受体组合物存在着需要。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了改良的 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质, 它适合作为治疗用的化合物。

[0012] 附图简述

[0013] 图 1 显示了人 TACI 的氨基酸序列。富含半胱氨酸的假性重复段的位置用阴影指出, 跨膜结构域被框住, 同时柄的区域用虚线指出。

[0014] 图 2 是免疫球蛋白的 IgG1 亚群的示意图。C<sub>L</sub>:轻链恒定区 ;C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub>:重链恒定区 ;V<sub>L</sub>:轻链可变区 ;V<sub>H</sub>:重链可变区 ;CHO:碳水化合物 ;N:氨基末端 ;C:羧基末端。

[0015] 图 3A、3B、3C 和 3D 为野生型人  $\gamma$ 1 恒定区 Fc 的氨基酸序列与变体 Fc-488、Fc4、Fc5、Fc6、Fc7 和 Fc8 的比较。人的  $\gamma$ 1 恒定区的 C<sub>H1</sub> 结构域不是 Fc 的一部分, 因此没有显示。指出了铰链区、C<sub>H2</sub> 和 C<sub>H3</sub> 结构域的位置。指出了一般与轻链恒定区 (LC) 和重链恒定区 (HC) 结合的二硫键有关的 Cys 残基。符号“.”表示在该位置与野生型相同, 而“\*\*\*”表示羧基末端的位置, 并且说明了 Fc6 与其它 Fc 版本相比在羧基末端的差异。用 EU 索引位置指出氨基酸的位置。

[0016] 图 4 显示 <sup>125</sup>I-ZTNF4 与多种 TACI-Fc 构建体的特异性结合。TACI-Fc 融合蛋白质具有缺少 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的前 29 个氨基酸残基的 TACI 部分。融合蛋白质之一具有带完整柄结构区的 TACI 部分, 而 TACI-Fc 融合蛋白质之中的三个具有在柄结构区有多种缺失 (TACI (d1-29, d107-154)-Fc5 ;TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 ;TACI (d1-29, d120-154)-Fc5) 的 TACI 部分。实施例 4 叙述了实验的详细情况。

[0017] 发明详述

[0018] 1. 总述

[0019] 如下所述, 本发明提供了跨膜激活剂、钙调节剂和亲环蛋白配体相互作用剂 (TACI)- 免疫球蛋白融合蛋白质, 以及应用 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质的方法。例如, 本发明提供了抑制肿瘤细胞增殖的方法, 包含给予肿瘤细胞含有 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质的组合物。上述组合物可以给予体外培养的细胞。或者, 该组合物可以是一种药物组合物, 它包含药学可接受的载体和 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质, 该药物组合物可以给予患肿瘤受治疗者。受治疗者可以是哺乳动物的受治疗者。该药物组合物的施用可以抑制, 例如, 哺乳动物受治疗者的 B 淋巴细胞的增殖。

[0020] 本发明还提供了在哺乳动物中抑制 ZTNF4 活性的方法, 它包含给哺乳动物施用含

有 TACI- 免疫球蛋白的组合物。ZTNF4 活性可与多种不同的疾病和病症相关联。例如,含有 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质的药物组合物可用于治疗自身免疫病,如系统性红斑狼疮、重症肌无力、多发性硬化、胰岛素依赖性糖尿病、克罗恩氏病、类风湿关节炎、多关节型 (polyarticular-course) 青少年类风湿关节炎以及银屑病性关节炎。或者,含有 TACI- 免疫球蛋白的药物组合物可用于治疗病症,例如哮喘、支气管炎、肺气肿以及终末阶段的肾衰。含有 TACI- 免疫球蛋白的药物组合物亦可用于治疗肾脏疾病,例如肾小球肾炎、脉管炎、肾炎、淀粉样变以及肾盂肾炎,或者用于病症,例如肿瘤、慢性白细胞性白血病、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、移植后淋巴组织增生病以及轻链丙球蛋白病。在某种情况下,ZTNF4 活性可以与 T 细胞相关联。含有 TACI- 免疫球蛋白的药物组合物亦可用于治疗与免疫抑制、移植排斥、移植对抗宿主的疾病以及炎症相关的疾病或病症。例如:含有 TACI- 免疫球蛋白的药物组合物可用于减轻炎症和治疗病症,例如关节痛、肿胀、贫血及败血症性休克。

[0021] 本发明还提供了在哺乳动物受治疗者中降低循环血液的 ZTNF4 水平的方法,它包括将含有药学可接受的载体和 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质的药物组合物给予哺乳动物受治疗者,其中药物组合物的给药降低哺乳动物受治疗者循环血液中 ZTNF4 的水平。作为说明,与药物组合物用药前血液的 ZTNF4 水平相比,上述药物组合物的给药能够降低循环血液的 ZTNF4 水平至少 10%、至少 20%、至少 10 到 60%、至少 20 到 50%、或至少 30 到 40%。本领域中的技术人员可以测定循环中的 ZTNF4 水平。在实施例 4 和实施例 5 中叙述了说明性的方法。

[0022] 如下所述,说明性的 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质包含:

[0023] (a) TACI 受体部分,它由具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 30 到 154 的氨基酸序列的多肽片段组成,其中 TACI 受体部分包含至少 (i) SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 34 到 66 和 (ii) SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 71 到 104 的序列之一,同时其中 TACI 受体部分至少与 ZTNF2 或 ZTNF4 之一结合,以及

[0024] (b) 包含免疫球蛋白恒定区的免疫球蛋白部分。适合的 TACI 受体部分包括:含有 SEQ ID NO:2 氨基酸残基 34 到 66 和 SEQ ID NO:2 氨基酸残基 71 到 104 的多肽;含有 SEQ ID NO:2 氨基酸残基 34 到 104 的多肽;含有 SEQ ID NO:2 氨基酸残基 30 到 110 的氨基酸序列的多肽;以及具有由 SEQ ID NO:2 氨基酸残基 30 到 110 组成的氨基酸序列的多肽。

[0025] TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质的免疫球蛋白部分可以包含重链恒定区,如人的重链恒定区。IgG1 重链恒定区是适合的重链恒定区的例子之一。说明性的 IgG1 重链恒定区是含有 C<sub>H2</sub> 和 C<sub>H3</sub> 区的 IgG1 Fc 片段。IgG1 Fc 片段可以是野生型 IgG1 Fc 片段或经突变的 IgG1 Fc 片段,例如含有 SEQ ID NO:33 氨基酸序列的 Fc 片段。一种典型的 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质是具有包含氨基酸序列 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的蛋白质。

[0026] 本文所述的 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质可以是聚合物,如二聚体。

[0027] 本发明还提供了编码 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质的核酸分子。用 SEQ ID NO:53 提供了说明性的编码 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质的核苷酸序列。

[0028] 本发明还包括由具有 SEQ ID NO:2 氨基酸残基 30 到 154 的氨基酸序列的多肽片段组成的 TACI 可溶性受体,其中 TACI 可溶性受体包含至少 (i) SEQ ID NO:2 氨基酸残基 34 到 66 和 (ii) SEQ ID NO:2 氨基酸残基 71 到 104 的序列之一,同时其中 TACI 可溶性受体至

少与 ZTNF2 或 ZTNF4 之一结合。本文所述的附加 TACI 可溶受体是对于 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质适合的 TACI 受体部分。此外, TACI 可溶性受体可用于所述的对于 TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质方法中。

[0029] 参阅下面的详细叙述和附图将会对本发明的这些方面和其它方面了解更清楚。此外还有, 下面确定了各种参考资料。

## [0030] 2. 定义

[0031] 在接着进行的叙述中, 大量使用了许多术语。提供下面定义以便于理解本发明。

[0032] 本文所用的“核酸”或“核酸分子”是指多核苷酸, 例如脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA)、寡核苷酸、用聚合酶链式反应 (PCR) 产生的片段、以及用任何连接反应、剪切反应、核酸内切酶作用和核酸外切酶作用产生的片段。核酸分子可以由天然存在的核苷酸 (如 DNA 和 RNA)、或者天然存在核苷酸的类似物 (如天然存在核苷酸的  $\alpha$ -对映体形式)、或者前二者的结合物的单体组成。修饰的核苷酸在糖的部分和 / 或嘧啶或嘌呤碱基部分可以有变更。糖的修饰包括, 例如: 用卤素、烷基、氨基和叠氮基替换一个或更多羟基, 或者糖类可作为醚类或酯类被官能化。此外, 整个糖的部分可以用立体的和电子的相似结构 (如重氮糖和碳环糖的类似物) 替换。在碱基部分中修饰的实例包括烷基化的嘌呤和嘧啶、酰基化的嘌呤或嘧啶、或者其它熟知的杂环取代物。核酸的单体可以由磷酸二酯键或该键的类似键连接。磷酸二酯连接的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、磷酸苯胺硫代酯、磷酸苯胺酯、磷酸酰胺酯等等。术语“核酸分子”亦包括所谓的“肽核酸”, 它含有附着在聚酰胺主链上的天然存在的或经修饰的核酸碱基。核酸可以是单链也可以是双链。

[0033] 术语“核酸分子的互补体”是指与所提到的核苷酸序列相比, 有互补的核苷酸序列和相反方向的核酸分子。例如: 序列 5' ATGCACGGG3' (SEQ ID NO:57) 与 5' CCCGTGCAT 3' (SEQ ID NO:58) 是互补的。

[0034] 术语“重叠群”表示核酸分子具有与另一核酸分子相同的或互补的一段邻接的序列。邻接序列被认为是核酸分子以其全部或以部分“重叠”某给定的核酸分子的某一段。

[0035] 术语“简并核苷酸序列”表示与编码多肽的参照核酸分子相比, 包含一个或多个简并密码子的核苷酸序列。简并密码子含有不同的核苷酸三联体, 但编码相同的氨基酸残基 (例如: GAU 和 GAC 三联体各自编码 Asp)。

[0036] 术语“结构基因”是指一种核酸分子, 它被转录到信使 RNA (mRNA) 中, 然后 mRNA 被翻译为氨基酸的序列, 后者是特异的多肽的特征。

[0037] “分离的核酸分子”是没有整合到生物体的基因组 DNA 中的核酸分子。例如: 已经从细胞基因组 DNA 中分离出的编码生长因子的 DNA 分子是分离的 DNA 分子。分离的核酸分子的另一个例子是不整合到生物基因组中的化学合成的核酸分子。已经从特定物种分离出的核酸分子比该物种染色体的完整 DNA 分子小。

[0038] “核酸分子构建体”是一种单链或者双链的核酸分子, 它已经通过人的干预修饰过, 它含有以自然界不存在的排列方式结合和排列的核酸片段。

[0039] “线状 DNA”表示含有游离的 5' 和 3' 端的非环状 DNA 分子。线状 DNA 可以用酶切或物理断裂的方法, 从如质粒之类的闭环 DNA 分子来制备。

[0040] “互补 DNA (cDNA)”是用逆转录酶从 mRNA 模板产生的单链 DNA 分子。一般, 使用与部

分 mRNA 互补的引物以开始逆转录。本领域技术人员也使用术语“cDNA”来指由上述单链 DNA 分子和其互补 DNA 链组成的双链 DNA 分子。术语“cDNA”也指从 RNA 模板合成的 cDNA 分子的克隆。

[0041] “启动子”是控制结构基因转录的核苷酸序列。一般,启动子位于结构基因转录起始位点附近的 5' 非编码区。在转录启动中起作用的启动子内的序列元件经常以共有核苷酸序列为特征。这些启动子元件包括 RNA 聚合酶结合部位、TATA 序列、CAAT 序列、分化特异性元件 (DSEs ;McGehee 等人, Mol. Endocrinol. 7 :551(1993))、环状 AMP 效应元件 (CREs)、血清效应元件 (SREs ;Treisman, Seminars in Cancer Biol. 1 :47(1990))、糖皮质激素效应元件 (GRES)、以及其它转录因子的结合部位,如 CRE/ATF(O' Reilly 等人, J. Biol. Chem. 267 :19938(1992))、AP2(Ye 等人, J. Biol. Chem. 269 :25728(1994))、SP1、cAMP 效应元件结合蛋白质 (CREB ;Loeken, Gene Expr. 3 :253(1993)) 和八聚体因子(通常参阅 :Watson 等人编著, Molecular Biology of the Gene, 第四版(The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), 和 Lemaigre 与 Rousseau, Biochem. J. 303 :1(1994))。如果启动子是可诱导的启动子,那么转录速率响应于诱导剂而提高。如果启动子是组成型启动子,用诱导剂不能调节转录速率。阻抑型启动子亦被熟知。

[0042] “核心启动子”含有启动子功能的基本核苷酸序列,包括 TATA 框和转录的起点。根据本定义,在没有可提高活性或赋予组织特异性活性的特异性序列的情况下,核心启动子可以具有或不具有可检测出的活性。

[0043] “调节元件”是调节核心启动子活性的核苷酸序列。例如 :调节元件可以含有与细胞因子结合的核苷酸序列,该细胞因子使转录能够排他或择优地在特殊的细胞、组织或细胞器中进行。该调节元件的类型一般与以“细胞特异性”、“组织特异性”或“细胞器特异性”的方式表达的基因相关联。

[0044] “增强子”是调节元件的一种类型,它可以提高转录效率,而与增强子相对转录起始位点的距离或方向无关。

[0045] “异源 DNA”是指一种 DNA 分子或 DNA 分子的种群,它在给定的宿主细胞内不天然存在。对于特定的宿主细胞异源的 DNA 分子,只要是宿主 DNA 与非宿主 DNA(即外源 DNA)联合,就可以含有由的宿主细胞物种(即内源 DNA)衍生的 DNA。例如 :含有编码多肽的非宿主 DNA 片段、与包含转录启动子的宿主 DNA 片段可操作地连接的 DNA 分子被认为是异源 DNA 分子。相反,异源 DNA 分子可以包含与外源启动子可操作连接的内源基因。作为另一个实例,如果将该 DNA 分子引入到缺少野生型基因的突变细胞中,包含从野生型细胞中得到的基因的 DNA 分子被认为是异源 DNA。

[0046] “多肽”是由天然产生或合成的肽键连接的氨基酸残基的聚合物。少于大约 10 个氨基酸残基的多肽通常被称为“肽”。

[0047] “蛋白质”是包括一个或多个多肽链的大分子。蛋白质也可以包含非肽的成分,如碳水化合物基团。可以在生产蛋白质的细胞中将碳水化合物和其它非肽取代基团加入到蛋白质中,并且该基团将因细胞的类型不同而不同。本文给蛋白质下定义是依据它们的氨基酸主链结构 ;对象碳水化合物基团之类的取代基一般不作规定,但其仍然可以存在。

[0048] 用非宿主 DNA 分子编码的肽或多肽是“异源”肽或多肽。

[0049] “整合的遗传因子”是通过人工的操作将该因子引入到细胞之后已经掺入到宿主

细胞的染色体中的 DNA 片段。在本发明中,整合遗传因子通常大多数是从用电穿孔或其它技术而引入到细胞中的线性质粒得到的。整合遗传因子被从原始宿主细胞传递到其后代。

[0050] “克隆载体”是一种在宿主细胞中具有自我复制能力的核酸分子,例如质粒、粘粒或噬菌体。克隆载体一般含有一个或少量允许在不丧失载体基本生物功能的情况下可以以特定方式插入核酸分子的限制性核酸内切酶识别位点,以及编码适合供克隆载体转化细胞的鉴定和选择之用的标记基因的核苷酸序列。标记基因一般包括提供四环素抗性或氨苄青霉素抗性的基因。

[0051] “表达载体”是一种编码在宿主细胞中表达的基因的核酸分子。一般,表达载体包含转录启动子、基因和转录终止子。基因表达通常在启动子的控制下发生,而该基因被称为“可操作地连接到”启动子上。相似地,如果调节元件调节核心启动子的活性,调节元件和核心启动子是可操作地连接的。

[0052] “重组宿主”是一种含有异源核酸分子,如克隆载体或表达载体,的细胞。在本文中,重组宿主的例子是从表达载体生产 TACI-Fc 融合蛋白质的细胞。

[0053] “整合的转化体”是重组宿主细胞,在其中异源 DNA 被整合进入到细胞的基因组 DNA 中。

[0054] “融合蛋白质”是由包含至少两个基因的核苷酸序列的核酸分子表达的杂合蛋白质。例如:TACI-免疫球蛋白融合蛋白质包含 TACI 受体部分和免疫球蛋白部分。如本文所使用的,“TACI 受体部分”是结合至少 ZTNF2 或 ZTNF4 中的一个的 TACI 受体的胞外结构域的一部分。短语“免疫球蛋白部分”是指包含免疫球蛋白恒定区的多肽。例如:免疫球蛋白部分可以包含重链恒定区。术语“TACI-Fc”融合蛋白质是指免疫球蛋白部分包含重链恒定区 C<sub>H2</sub> 和 C<sub>H3</sub> 的 TACI-免疫球蛋白融合蛋白质。

[0055] 术语“受体”表示一种与被称为“配体”的生物活性分子结合的与细胞相关的蛋白质。这种相互作用介导配体对细胞的效应。在 TACI 受体结合的背景下,词组“特异性结合”是指配体与受体竞争性结合的能力。例如:ZTNF4 与 TACI 受体特异性结合,这可以通过观测可检测的标记过的 ZTNF4 和未标记的 ZTNF4 之间对 TACI 受体的竞争来证明。

[0056] 受体可以是膜结合的、胞质的、细胞核的;单体的(例如:甲状腺素激活的受体、 $\beta$ -肾上腺素受体)或聚合物的(例如:PDGF 受体、生长激素受体、IL-3 受体、GM-CSF 受体、G-CSF 受体、红细胞生成素受体和 IL-6 受体)。膜结合受体的特征在于它包含胞外的配体结合域和一般与信号转导有关的胞内效应器域的多个结构域的结构。在某些膜结合受体中,胞外的配体结合域和胞内效应器域位于分离的肽链上,它们构成了具有完整功能的受体。

[0057] 通常,配体与受体结合导致受体中的构象变化,该变化导致细胞中效应器域和其它分子之间的相互作用,它依次地引起细胞新陈代谢中的变化。与受体-配体相互作用经常相关的代谢事件包括基因转录、磷酸化作用、去磷酸化作用、环化 AMP 产生的增加、细胞钙质的转移、细胞膜脂质的动员、细胞粘着、肌醇脂质的水解和磷脂的水解。

[0058] 术语“分泌信号序列”表示编码在合成较大的多肽的细胞中作为较大多肽的组分引导该多肽通过其分泌途径的肽(分泌肽)的 DNA 序列。在通过分泌途径转运时,较大的多肽通常被切割以除去分泌肽。

[0059] “分离的多肽”是基本上不含有污染的细胞组分,如在自然界中与多肽相连的碳水化合物、脂质或其它蛋白质杂质的多肽。一般,分离的多肽制剂含有高纯度的多肽,即纯度

至少约 80%、纯度至少约 90%、纯度至少约 95%、纯度高于 95%、或纯度高于 99%。显示特定的蛋白质制剂含有分离的多肽的一种方法是在蛋白质制剂的十二烷基硫酸钠 (SDS)- 聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶的考马斯亮蓝染色之后显出单个条带。但是, 术语“分离的”不排除相同的多肽以其他的物理形式存在, 例如二聚体或者糖基化的或衍生的形式。

[0060] 本文所使用的术语“氨基端”和“羧基端”是用来表示在多肽内的位置。在上下文允许的地方, 使用这些术语来提及多肽的特定的序列或一部分以表示其邻近或相对的位置。例如: 某一序列在多肽内的参照序列的羧基端是指位于参照序列的羧基末端的近端, 但是不一定在整个多肽的羧基末端。

[0061] 术语“表达”是指基因产物的生物合成。例如, 就结构基因而论, 表达包括将结构基因转录到 mRNA 中和将 mRNA 翻译为一个或多个多肽。

[0062] 本文所使用的术语“拼接变体”表示从基因转录而来的 RNA 的可变形式。拼接变体通过在转录的 RNA 分子内, 或在比较少见的情况下, 在分别转录的 RNA 分子之间, 使用可变拼接位点而自然产生, 并且可以导致从相同基因转录产生若干 mRNA 的结果。拼接变体可以编码具有不同的氨基酸序列的多肽。本文中亦使用术语拼接变体来表示由从基因转录的 mRNA 的拼接变体编码的多肽。

[0063] 本文所使用的, 术语“免疫调节剂”包括细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、共刺激分子、造血因子以及这些分子的合成的类似物。

[0064] 术语“补体 / 抗补体对”表示在适当的条件下形成非共价连接的稳定配对的不同部分。例如: 生物素和抗生物素蛋白 (或链霉抗生物素蛋白) 是补体 / 抗补体对的典型。其它典型的补体 / 抗补体对包括受体 / 配体对、抗体 / 抗原 (或半抗原或表位) 对、正义 / 反义多核苷酸对等等。由于希望补体 / 抗补体对接着还能解离, 补体 / 抗补体对最好结合亲和力和小于  $10^9 M^{-1}$ 。

[0065] “抗体片段”是抗体的一部分, 如  $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、Fab'、Fab 等等。与结构无关, 抗体片段与被完整抗体识别的相同抗原结合。

[0066] 术语“抗体片段”还包括与特异性抗原结合的合成或基因工程改造的多肽, 例如: 由轻链可变区组成的多肽、由重链和轻链可变区组成的“Fv”片段、其中用肽连接体 (“scFv 蛋白质”) 连接轻链和重链可变区的重组单链多肽分子以及由与高变区极为相似的氨基酸残基组成的最小识别单位。

[0067] “嵌合抗体”是含有从啮齿类动物抗体得到的可变区和互补决定区的重组蛋白质, 而该抗体分子的其他部分是从人的抗体中得到的。

[0068] “人源化的抗体”是已经将单克隆抗体的鼠互补决定区从鼠免疫球蛋白的重链和轻链可变区转移到人的可变区的重组蛋白质。

[0069] 如本文所使用的, “治疗剂”是一种分子或原子, 它与抗体部分缀合以生产可用于治疗缀合物。治疗剂的例子包括药物、毒素、免疫调节剂、螯合物 (chelators)、硼化合物、光活性剂或染料以及放射性同位素。

[0070] “可检测标记”是一种分子或原子, 其与抗体部分缀合以生产可用于诊断的分子, 可检测标记的例子包括螯合物、光活性剂、放射性同位素、荧光剂、顺磁离子或其它标记部分。

[0071] 本文所使用的术语“亲和标记物”表示可以附在另一多肽上的多肽片段, 用以纯

化或检测第二多肽,或者为第二多肽提供底物的附着位点。原则上,任何可以得到其抗体或其他有特异性结合的试剂的肽或蛋白都可以作为亲和标记物来使用。亲和标记物包括多组氨酸序列段、蛋白 A(Nilsson 等人, EMBO J. 4 :1075(1985); Nilsson 等人, Methods Enzymol. 198 :3(1991))、谷胱甘肽 S- 转移酶 (Smith 和 Johnson, Gene 67 :31(1988))、Glu-Glu 亲和标记物 (Grussenmeyer 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :7952(1985))、P 物质、FLAG 肽 (Hopp 等人, Biotechnology 6 :1204(1988))、链霉抗生物素蛋白结合肽、或其它抗原表位或结合结构域。通常参阅 :Ford 等人, Protein Expression and Purification 2 :95(1991)。编码亲和标记物的 DNA 分子可以从商业供应商 (例如 :Pharmacia Biotech、Piscataway, NJ) 处获得。

[0072] “裸抗体”是一种完整的抗体,与抗体片段不同,它不与治疗剂缀合。裸抗体包括多克隆和单克隆抗体两种,以及某些重组抗体,如嵌合和人源化的抗体。

[0073] 如本文所用到的,术语“抗体组分”包括完整的抗体和抗体片段两种。

[0074] “免疫缀合物”是指抗体组分与治疗剂或可检测标记的缀合物。

[0075] “靶多肽”或“靶肽”是包含至少一个表位的氨基酸序列,它在靶细胞,例如肿瘤细胞或载有传染性因子的抗原的细胞上表达。T 细胞识别由主要组织相容性复合分子递呈的针对靶多肽或靶肽的肽表位,并且一般溶解靶细胞或在靶细胞的位置招募其它免疫细胞,从而杀伤靶细胞。

[0076] “抗原肽”是被 T 细胞识别的一种肽,它与主要组织相容性复合分子结合以形成 MHC- 肽复合物,从而,在对 T 细胞递呈时诱导细胞毒性淋巴细胞的应答。因此,抗原肽可以与适当的主要组织相容性复合分子结合,并且诱导结合或表达该抗原的靶细胞的毒性 T 细胞的应答,例如针对靶细胞的细胞溶解作用或特异性细胞因子的释放。抗原肽可以在递呈抗原的细胞或靶细胞上,与 I 类或 II 类主要组织相容性复合分子结合。

[0077] 在真核生物中, RNA 聚合酶 II 催化结构基因的转录以生产 mRNA。核酸分子可以被设计成含有 RNA 聚合酶 II 的模板,其中 RNA 的转录物具有与特异 mRNA 互补的序列。该 RNA 转录物被称为“反义 RNA”,同时编码反义 RNA 的核酸分子被称为“反义基因”。反义 RNA 分子可以与 mRNA 分子结合,导致 mRNA 翻译的抑制。

[0078] 由于标准分析方法的不精确,聚合物的分子量和长度被理解为近似值。以“大约”X 或“大概”X 来表达该值时,所述的数值 X 应被理解为精确到  $\pm 10\%$ 。

[0079] 3. 编码 TACI- 免疫球蛋白蛋白质的核酸分子的生产

[0080] 图 1 提供了预测的人的 TACI 氨基酸序列 (von Bülow 和 Bram, Science 278 :138(1997))。TACI 多肽含有下述预期元件:(a) 作为肿瘤坏死因子配体结合结构域特征的二个富含半胱氨酸的假重复结构,(b) 存在于配体结合结构域和跨膜结构域之间的 62 个氨基酸的“柄区”,(c) 20 个氨基酸的跨膜结构域,和 (d) 127 个氨基酸的胞内结构域。氨基酸序列不含有预期的疏水的氨基端信号序列。

[0081] 为了制造用作为天然配体:天然受体相互作用的抑制剂的人的 TACI 可溶形式,产生了 TACI 胞外结构域- 人的免疫球蛋白 Fc 融合蛋白质。可以得到的人的 TACI 序列被用作设计融合蛋白质分子的起点 (von Bülow 和 Bram, Science 278 :138(1997))。该初始构建体,设计为“TACI-Fc4”,包括下面所述的 TACI 多肽的氨基酸残基 1 到 154 以及修饰过的人的 Fc 段。当不包括任何预期的跨膜结构域的潜在部分时,为了包括尽可能多的 TACI 柄



[0095] IgG 构成主要类型,它是从血浆中发现的第二丰富的蛋白质的状态存在的。在人类中,IgG 由被称为 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的四种亚型组成。如图 2 所示,每种免疫球蛋白的重链都具有由恒定区蛋白质结构域 ( $C_{H1}$ 、铰链区部、 $C_{H2}$  和  $C_{H3}$ ) 组成的恒定区,它对于给定的亚型是不变的。IgG 类型的重链恒定区用希腊符号  $\gamma$  来标记。例如,IgG1 亚型免疫球蛋白含有  $\gamma 1$  重链恒定区。

[0096] Fc 片段,或 Fc 结构域,由用二硫键连接的重链铰链区、 $C_{H2}$  和  $C_{H3}$  结构域组成。在免疫球蛋白融合蛋白质中,IgG1 亚型的 Fc 结构域经常被用作免疫球蛋白部分,因为 IgG1 具有任何血清蛋白质中最长的血清半衰期。较长的血清半衰期可以成为对于动物研究和潜在的人类治疗应用的所希望的蛋白质特性。此外,IgG1 亚型具有最强的实现抗体介导的效应子功能的能力。在免疫球蛋白融合蛋白质中或许最有用的基本的效应子的功能是 IgG1 抗体介导抗体依赖的细胞毒作用的能力。在另一方面,对于主要作为拮抗物的融合蛋白质这可能是不希望的功能。在 IgG1 亚型中,若干对于抗体恒定区介导的活性重要的特异性氨基酸残基已经被确定。因此包含或排除这些特异性的氨基酸就允许包含或排除特异性的免疫球蛋白恒定区介导的活性。

[0097] 由于制造 Fc 融合蛋白质,六个版本的修饰的人的 IgG1 Fc 被产生出来。为了便于克隆含有人的  $\gamma 1$  Fc 区的融合蛋白质而设计了 Fc-488,并且它是用野生型人的免疫球蛋白  $\gamma 1$  恒定区作为模板来构建的。考虑到由于不成对的半胱氨酸残基所导致的潜在的有害作用,决定用丝氨酸残基替换正常情况下用二硫键与免疫球蛋白轻链恒定区结合半胱氨酸 (SEQ ID NO :6 的氨基酸残基 24)。为了将来 DNA 操作的简便,额外的变化被引入到编码 EU 索引位置 218 (SEQ ID NO :6 的氨基酸残基 22) 的密码子中,以引入 Bgl II 限制酶的识别位点。将这些变化引入到在 PCR 引物上编码的 PCR 产物中。根据 Bgl II 位点的位置和为了使 Fc 铰链区完整,将 EU 索引位置 216 和 217 (SEQ ID NO :6 的氨基酸残基 20 和 21) 的密码子掺入到融合蛋白质的相应序列中。

[0098] Fc4、Fc5 和 Fc6 包含了通过降低 Fc  $\gamma$  RI 的结合和补体 C1q 的结合而降低由 Fc 介导的效应子功能的突变。Fc4 包含与被引入到 Fc-488 中的相同氨基酸替代。将额外的氨基酸替代引入,以降低潜在的 Fc 介导的效应子的功能。具体而言,三个氨基酸替代被引入以降低 Fc  $\gamma$  RI 结合。它们是在 EU 索引位置 234、235 和 237 (SEQ ID NO :6 的氨基酸残基 38、39 和 41) 的替代物。在这些位置的替代已经显示降低对 Fc  $\gamma$  RI 的结合 (Duncan 等人, Nature 332 :563 (1988))。这些氨基酸替代也可以降低 Fc  $\gamma$  RIIa 的结合,以及 Fc  $\gamma$  RIII 的结合 (Sondermann 等人, Nature 406 :267 (2000) ;Wines 等人, J. Immunol. 164 :5313 (2000))。

[0099] 若干研究小组已经描述了在补体 C1q 结合和接着发生的补体的固定中 EU 索引位置 330 和 331 (SEQ ID NO :6 的氨基酸残基 134 和 135) 的相关性 (Canfield 和 Morrison, J. Exp. Med. 173 :1483 (1991) ;Tao 等人, J. Exp. Med. 178 :661 (1993))。将在该位置的氨基酸替代引入到 Fc4 中以减少补体的固定。除终止密码子之外,Fc4 的  $C_{H3}$  结构域和在相应的野生型多肽中的完全一样,将克隆的 DNA 在大肠杆菌的  $dam^+$  菌株中培育时,TGA 被变为 TAA 以消除潜在的  $dam$  甲基化位点。

[0100] 在 Fc5 中,将在 EU 索引位置 218 的精氨酸残基突变回赖氨酸,因为含有该特殊 Fc 的融合蛋白质不使用 Bgl II 克隆方案。Fc5 序列的其他部分与上述的 Fc4 相符。

[0101] 除羧基端赖氨酸密码子已经被除去之外,Fc6 和 Fc5 完全一样。成熟免疫球蛋白

的 C 末端赖氨酸经常在从 B 细胞分泌之前在翻译后从成熟免疫球蛋白被除去,或在血清循环时被除去。因此, C 末端的赖氨酸残基一般在循环的抗体上不会被找到。如在上面所述的 Fc4 和 Fc5 一样,在 Fc6 序列中的终止密码子被改为 TAA。

[0102] 除位于 C<sub>H2</sub> 结构域的在 EU 索引位置 297 上的氨基酸替代之外, Fc7 和野生型  $\gamma$  1Fc 完全一样。EU 索引位置 Asn-297 (SEQ ID NO :6 的氨基酸残基 101) 是 N-连接的碳水化合物的附着的位点。由于在碳水化合物结构中潜在的批与批之间的变化, N-连接的碳水化合物在重组表达的蛋白质中引入了潜在的变异性的来源。在消除这种潜在的变异性的努力中, 将 Asn-297 突变为谷氨酰胺残基以防止 N-连接的碳水化合物在该残基位置上的附着。在残基 297 上的碳水化合物也参与 Fc 与 Fc  $\gamma$  RIII 的结合 (Sondermann 等人, Nature 406 : 267 (2000))。因此, 通常碳水化合物的去除会减少重组的含 Fc7 融合蛋白质与 Fc  $\gamma$  Rs 的结合。如上所述, Fc7 序列的终止密码子突变为 TAA。

[0103] 除将在 EU 索引位置 220 (SEQ ID NO :6 的氨基酸残基 24) 半胱氨酸残基用丝氨酸残基替代之外, Fc8 和在 SEQ ID NO :6 中所示的野生型免疫球蛋白  $\gamma$  1 区完全一样。该突变去除了通常与免疫球蛋白轻链恒定区以二硫键结合的半胱氨酸残基。

[0104] 表 1 叙述了实例 TACI-Fc 构建体。

[0105] 表 1

[0106] 实例 TACI-Fc 融合蛋白质构建体

[0107]

TACI 序列 <sup>a</sup>	Fc 版本
TACI <sup>b</sup>	Fc4
TACI <sup>b</sup>	Fc5
TACI <sup>b</sup>	Fc $\gamma$ 1
TACI (d107-154)	Fc5
TACI (R119Q)	Fc4
TACI (1-104)-BCMA (42-54) <sup>c</sup>	Fc5
TACI (d143-150)	Fc5
TACI (R142G, d143-150)	Fc5
TACI (R119G, Q121P, R122Q, S123A)	Fc5
TACI (R119G, R122Q)	Fc5
TACI (d1-28, V29M)	Fc6

TACI (d1-29)	Fc6
TACI (d1-29)	Fc5
TACI (d1-29, d107-154)	Fc5
TACI (d1-29, d111-154)	Fc5
TACI (d1-29, d120-154)	Fc5

[0108] a 在括号内提供了参考 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的、关于氨基酸序列的位置、突变和缺失信息。

[0109] b 包括 SEQ ID NO :2 氨基酸残基 1 到 154。

[0110] c 该构建体包括 SEQ ID NO :2 (TACI) 氨基酸残基 1 到 104 和 SEQ ID NO :27 (BCMA) 氨基酸 42 到 54。

[0111] 用重组的中国仓鼠卵巢细胞生产 TACI-Fc 蛋白质,采用免疫印记分析和氨基酸序列分析分离并分析。意想不到的是,从 N 末端缺失前 29 个氨基酸的 TACI 多肽导致在中国仓鼠卵巢细胞的 TACI-Fc 融合蛋白质生产中增长 10 倍。该缺失也减少了全长柄区的切割。此外,在 TACI 柄区内的切割,通过截短柄区或者通过在另一个氨基酸序列(例如:BCMA 柄区的氨基酸序列)内替换 TACI 的柄区而得到抑制。

[0112] 如实施例 4 所述,TACI-Fc 构建体的功能分析表明,融合蛋白质 TACI (d1-29)-Fc5、TACI (d1-29, d107-154)-Fc5、TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 和 TACI (d1-29, d120-154)-Fc5 对于 ZTNF4 具有相似结合亲和力。但是,构建体 TACI (d1-29)-Fc5、TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 和 TACI (d1-29, d120-154)-Fc5 与构建体 TACI (d1-29, d107-154)-Fc5 相比,每摩尔 TACI-Fc 对 ZTNF4 表现出更高的结合性。根据目的应用(即:治疗、诊断或研究),可以使用高能或者低能的 TACI-Fc 融合蛋白质。此外,高能和低能 TACI-Fc 融合蛋白质的组合使 ZTNF2 或 ZTNF4 的滴定成为可能。

[0113] 本发明预期包含由 SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 30 到 106、SEQ ID NO :2 的 30 到 110、SEQ ID NO :2 的 30 到 119 或者 SEQ ID NO :2 的 30 到 154 组成的 TACI 受体部分的 TACI-免疫球蛋白融合蛋白质。本发明也包括包含由 SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 31 到 106、SEQ ID NO :2 的 31 到 110、SEQ ID NO :2 的 31 到 119 或者 SEQ ID NO :2 的 31 到 154 组成的 TACI 受体部分的 TACI-免疫球蛋白融合蛋白质。

[0114] 更一般地说,本发明包括 TACI-免疫球蛋白融合蛋白质,其中 TACI 受体部分由 SEQ ID NO :2 氨基酸残基 30 到 154 的片段组成,并且其中 TACI 受体部分至少与 ZTNF2 或 ZTNF4 之一结合。上述片段包含富含半胱氨酸的假性重复区,以及任选地至少能够包括以下之一:存在于富含半胱氨酸的假性重复区的氨基端的位置上的 N 末端片段,和存在于富含半胱氨酸的假性重复区的羧基端位置上的柄片段。适合的富含半胱氨酸的假性重复区包括多肽:(a) 至少包含 SEQ ID NO :2 氨基酸残基 34 到 66 和 SEQ ID NO :2 氨基酸残基 71 到 104 之一,(b) 包含 SEQ ID NO :2 氨基酸残基 34 到 66 和 SEQ ID NO :2 氨基酸残基 71 到 104 二者,或者 (c) 包含 SEQ ID NO :2 氨基酸残基 34 到 104。

[0115] 适合的 N 末端片段包括 SEQ ID NO :2 的下述部分:氨基酸残基 33、氨基酸残基 32

到 33、氨基酸残基 31 到 33 以及氨基酸残基 30 到 33。适合的柄片段包括 SEQ ID NO :2 氨基酸残基 105 到 154 的一个或多个氨基酸。例如,柄片段可以由 SEQ ID NO :2 的下述部分组成:氨基酸残基 105、氨基酸残基 105 到 106、氨基酸残基 105 到 107、氨基酸残基 105 到 108、氨基酸残基 105 到 109、氨基酸残基 105 到 110、氨基酸残基 105 到 111、氨基酸残基 105 到 112、氨基酸残基 105 到 113、氨基酸残基 105 到 114、氨基酸残基 105 到 115、氨基酸残基 105 到 116、氨基酸残基 105 到 117、氨基酸残基 105 到 118、氨基酸残基 105 到 119、氨基酸残基 105 到 120、氨基酸残基 105 到 121、氨基酸残基 105 到 122、氨基酸残基 105 到 123、氨基酸残基 105 到 124、氨基酸残基 105 到 125、氨基酸残基 105 到 126、氨基酸残基 105 到 127、氨基酸残基 105 到 128、氨基酸残基 105 到 129、氨基酸残基 105 到 130、氨基酸残基 105 到 131、氨基酸残基 105 到 132、氨基酸残基 105 到 133、氨基酸残基 105 到 134、氨基酸残基 105 到 135、氨基酸残基 105 到 136、氨基酸残基 105 到 137、氨基酸残基 105 到 138、氨基酸残基 105 到 139、氨基酸残基 105 到 140、氨基酸残基 105 到 141、氨基酸残基 105 到 142、氨基酸残基 105 到 143、氨基酸残基 105 到 144、氨基酸残基 105 到 145、氨基酸残基 105 到 146、氨基酸残基 105 到 147、氨基酸残基 105 到 148、氨基酸残基 105 到 149、氨基酸残基 105 到 150、氨基酸残基 105 到 151、氨基酸残基 105 到 152、氨基酸残基 105 到 153 和氨基酸残基 105 到 154。

[0116] 额外的适合的柄片段包括 BCMA 柄区的一个或多个氨基酸(即:SEQID NO :27 的氨基酸残基 42 到 54)。例如:柄片段可以由 SEQ ID NO :27 的下述部分组成:氨基酸残基 42、氨基酸残基 42 到 43、氨基酸残基 42 到 44、氨基酸残基 42 到 45、氨基酸残基 42 到 46、氨基酸残基 42 到 47、氨基酸残基 42 到 48、氨基酸残基 42 到 49、氨基酸残基 42 到 50、氨基酸残基 42 到 51、氨基酸残基 42 到 52、氨基酸残基 42 到 53 和氨基酸残基 42 到 54。

[0117] 更一般地说,柄片段可以由二到 50 个氨基酸残基组成。

[0118] 本文中所述的融合蛋白质的免疫球蛋白部分包含至少一个免疫球蛋白恒定区。优选地是,免疫球蛋白部分代表人免疫球蛋白的片段。人免疫球蛋白序列可以是野生型的氨基酸序列,或者是具有至少上面讨论过的氨基酸突变之一的经修饰野生型氨基酸序列。

[0119] 人免疫球蛋白氨基酸序列也可以具有一个或多个已知同种异型决定簇的特征性的突变而与野生型不同。表 2 显示人的 IgG  $\gamma$  1 恒定区的同种异型决定簇(Putman, The Plasma Proteins, Vol. V, 第 49 到 140 页(Academic Press, Inc. 1987))。EU 索引位置 214、356、358 和 431 定义了已知的 IgG  $\gamma$  1 同种异型体。位置 214 在 IgG  $\gamma$  1 恒定区的 C<sub>H1</sub> 结构域中,因此,不存在于 Fc 序列内。SEQ ID NO :6 的野生型 Fc 序列包括 G1m(1) 和 G1m(2-) 同种异型体。但是,可以将 TACI-Fc 蛋白质的 Fc 部分修饰以反映这些同种异型体的任何组合。

[0120] 表 2

[0121] 人免疫球蛋白  $\gamma$  1 恒定区同种异型决定簇

同种异形体	氨基酸残基	氨基酸位置	
		EU 指数	SEQ ID NO:6
Glm(1)	Asp, Leu	356, 358	160, 162
Glm(1-)	Glu, Met	356, 358	160, 162
Glm(2)	Gly	431	235
Glm(2-)	Ala	431	235
Glm(3)	Arg	214	---
Glm(3-)	Lys	214	---

[0123] 本文公开的 TACI-Fc 蛋白质的实例包含人 IgG1 恒定区。但是,适合的免疫球蛋白部分也包括包含至少一个恒定区的多肽,如来自下述任何免疫球蛋白的重链恒定区: IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE 和 IgM。较更有利地,与野生型 IgG1 或野生型 IgG3 相比,从野生型 IgG2 或野生型 IgG4 衍生的免疫球蛋白部分提供降低了的效应子功能。如上所述本发明还预期包含 TACI 受体部分以及为白蛋白或  $\beta_2$  巨球蛋白的融合蛋白质。

[0124] 另一类与 ZTNF2 或 ZTNF4 结合的受体融合蛋白质是 BCMA-免疫球蛋白融合蛋白质。已经用 BCMA-Fc4 融合蛋白质进行了研究,其中 BCMA 部分由 SEQ ID NO:27 的氨基酸残基 1 到 48 组成。意想不到的,用鼠进行的药物动力学研究揭示,BCMA-Fc4 融合蛋白质具有大约 101 小时的半衰期,然而,TACI-Fc 蛋白质有 25 小时的半衰期。因此,BCMA-免疫球蛋白融合蛋白质的药物应用在一定的临床背景下可能更优选。此外,TACI-免疫球蛋白和 BCMA-免疫球蛋白融合蛋白质的组合对于一定的治疗情况可能有利。该组合治疗可以通过 TACI-免疫球蛋白和 BCMA-免疫球蛋白融合蛋白质的给药,或通过 TACI-免疫球蛋白和 BCMA-免疫球蛋白融合蛋白质的异源二聚体的给药来实现。

[0125] 另一类的结合 ZTNF4 的受体融合蛋白质是包含被称为“Ztnfr12”的受体胞外结构域的免疫球蛋白融合蛋白质。Ztnfr12 氨基酸和核苷酸序列分别以 SEQ ID NO:59 和 SEQ ID NO:60 被提供。适合的 Ztnfr12 受体部分包括包含 SEQ ID NO:60 氨基酸残基 1 到 69 或者 SEQ ID NO:60 氨基酸残基 19 到 35 的多肽。

[0126] 本发明的融合蛋白质可以有单链多肽、二聚体、三聚体、或二聚体或三聚体的复合物的形式。二聚体可以是同源二聚体或异源二聚体,同时三聚体可以是同源三聚体或异源三聚体。异源二聚体的实例包括 TACI-免疫球蛋白多肽和 BCMA-免疫球蛋白多肽、TACI-免疫球蛋白多肽和 Ztnfr12-免疫球蛋白多肽、以及 BCMA-免疫球蛋白多肽和 Ztnfr12-免疫球蛋白多肽。异源三聚体的实例包括 TACI-免疫球蛋白多肽和两个 BCMA-免疫球蛋白多肽、TACI-免疫球蛋白多肽和两个 Ztnfr12-免疫球蛋白多肽、BCMA-免疫球蛋白多肽和两个 Ztnfr12-免疫球蛋白多肽、两个 TACI-免疫球蛋白多肽和 BCMA-免疫球蛋白多肽、两个 TACI-免疫球蛋白多肽和 Ztnfr12-免疫球蛋白多肽、两个 BCMA-免疫球蛋白多肽和 Ztnfr12-免疫球蛋白多肽、以及 TACI-免疫球蛋白多肽、BCMA-免疫球蛋白多肽和 Ztnfr12-免疫球蛋白多肽的三聚体。

[0127] 在上述融合蛋白质中,TACI 受体部分可以至少包含 SEQ ID NO:2 的下述氨基酸序列之一:氨基酸残基 30 到 154、氨基酸残基 34 到 66、氨基酸残基 71 到 104、氨基酸残基 47

到 62 以及氨基酸残基 86 到 100。BCMA 受体部分可以至少包含 SEQ ID NO :27 的下述氨基酸序列之一 ;氨基酸残基 1 到 48、氨基酸残基 8 到 41、以及氨基酸残基 21 到 37。Ztnfr12 受体部分可以至少包含 SEQ ID NO :60 的下述氨基酸序列之一 ;氨基酸残基 1 到 69、以及氨基酸残基 19 到 35。

[0128] 融合蛋白质可以使用在实施例中所描述的用来构建实例 TACI-Fc 分子的 PCR 方法来生产。但是,本领域的技术人员可以应用其他标准的方法。例如,编码 TACI、BCMA、Ztnfr12 或免疫球蛋白多肽的核酸分子可以通过使用根据本文中公开的序列而得到的多核苷酸探针筛选人 cDNA 或基因组文库来获得。这些技术是标准的和非常完备地建立的(参阅:例如, Ausubel 等人 (eds.), Short Protocols in Molecular Biology, 第 3 版, 第 4-1 到 4-6 页 (John Wiley 和 Sons 1995) (“Ausubel(1995)”) ;Wu 等人, Methods in Gene Biotechnology, 第 33-41 页 (CRC Press, Inc. 1997) (“Wu(1997)”) ;Ausubel(1995) 见第 5-1 到 5-6 页 ;Wu(1997) 见第 307-327 页))。

[0129] 另外,用于构建免疫球蛋白融合蛋白质的分子可以通过用突变引发的长寡核苷酸和本文所述的核苷酸序列合成核酸分子来获得。(参阅:例如, Ausubel(1995) 见第 8-8 到 8-9 页)。应用聚合酶链反应的成熟工艺提供了可合成长度至少二千碱基 DNA 分子的能力 (Adang 等人, Plant Molec. Biol. 21 :1131(1993), Bambot 等人, PCR Methods and Applications 2 :266(1993), Dillon 等人, “Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes,” in Methods in Molecular Biology, Vol. 15 :PCR Protocols :Current Methods and Applications, White (ed.), 第 263-268 页, (Humana Press, Inc. 1993), 和 Holowachuk 等人, PCR Methods Appl. 4 :299(1995))。

[0130] 本发明的核酸分子也可以用“基因机”以诸如亚磷酰胺方法之类的方案合成。如果需要化学合成双链 DNA, 例如对于基因或基因片段合成之类的应用, 那么分别合成各互补链。短基因 (60 到 80 个碱基对) 的生产在技术上是简单的, 它可以用在合成互补链之后对其退火来完成。但是, 对于较长的基因 (大于 300 碱基对) 的生产, 可能需要特殊的策略, 因为, 在化学 DNA 合成时每个周期的偶联效率很少为 100%。为了克服该问题, 用长度 20 到 100 个核苷酸的单链片段以模块的形式装配成合成的基因 (双链的)。关于多核苷酸合成的综述, 参阅, 例如, Glick 和 Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press 1994), Itakura 等人, Annu. Rev. Biochem. 53 :323(1984), 和 Climie 等人, Proc. Nat’ l Acad. Sci. USA 87 :633(1990)。

#### [0131] 4. TACI- 免疫球蛋白多肽的生产

[0132] 本发明的多肽可以通过按照传统的技术在重组的宿主细胞中生产。对于表达编码 TACI- 免疫球蛋白的序列, 编码多肽的核酸分子必须与在表达载体中控制转录表达的调节序列切实可操作地连接, 之后引入到宿主细胞中。除转录的调节序列 (如启动子和增强子) 之外, 表达载体可以包括翻译调节序列和适于筛选带有表达载体的细胞的标记基因。

[0133] 适合在真核细胞中生产外源蛋白的表达载体一般含有 (1) 编码细菌复制起始点的和在细菌宿主中为表达载体的生长和选择提供的抗生素抗性标记的原核 DNA 元件 ;(2) 控制转录起始的真核 DNA 元件, 如启动子 ;和 (3) 控制转录物加工的 DNA 元件, 如转录终止 / 聚腺苷酸化序列。

[0134] 表达载体也可以包括编码指导异源多肽进入到宿主细胞的分泌途径的分泌序列

的核苷酸序列。例如,表达载体可以包含编码 TAC1 免疫球蛋白的核苷酸序列和由从任何分泌型基因中得到的分泌序列。如上面讨论的,一种适合的信号序列是 tPA 信号序列。典型的信号序列由 SEQ ID NO:25 提供。另一个适合的信号序列是鼠 26-10V<sub>H</sub> 信号序列。例如 Near 等人, *Mol. Immunol.* 27:901(1990) 叙述了鼠 26-10 抗体。说明性的鼠 26-10V<sub>H</sub> 信号序列的氨基酸和核苷酸序列分别由 SEQ ID NO:61 和 SEQ ID NO:65 提供。SEQ ID NO:62 公开了包含鼠 26-10V<sub>H</sub> 信号序列的 TAC1-Fc5 融合蛋白质的氨基酸序列。

[0135] 本发明的 TAC1-免疫球蛋白蛋白质可以在哺乳动物细胞中表达。适合的哺乳动物宿主细胞的实施例包括非洲绿猴肾细胞 (Vero; ATCC CRL 1587)、人胚肾细胞 (293-HEK; ATCC CRL 1573)、幼仓鼠肾细胞 (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314)、犬肾细胞 (MDCK; ATCC CCL 34)、中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin 等人, *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555, 1986))、大鼠垂体细胞 (GH1; ATCC CCL82)、海拉 S3 细胞 (ATCC CCL2. 2)、大鼠肝癌细胞 (H-4-II-E; ATCC CRL 1548)、SV40 转化的猴肾细胞 (COS-1; ATCC CRL 1650) 和鼠胚胎细胞 (NIH-3T3; ATCC CRL 1658)。

[0136] 对于哺乳动物宿主,转录和翻译调节信号可以从病毒来源得到,例如腺病毒、牛乳头瘤病毒、猿猴病毒,等等,其中调节信号与高水平表达的特定基因相关。适合的转录和翻译调节序列也可以从哺乳动物的基因获得,如肌动蛋白、胶原蛋白、肌球蛋白和金属硫蛋白基因。

[0137] 转录调节序列包括一个足够指导 RNA 合成起始的启动子区。适合的真核启动子包括小鼠金属硫蛋白 I 基因的启动子 (Hamer 等人, *J. Molec. Appl. Genet.* 1:273(1982))、疱疹病毒 TK 启动子 (McKnight, *Cell* 31:355(1982))、SV40 早期启动子 (Benoist 等人, *Nature* 290:304(1981))、劳斯 (Rous) 肉瘤病毒启动子 (Gorman 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 79:6777(1982))、巨细胞病毒启动子 (Foecking 等人, *Gene* 45:101(1980))、以及小鼠乳癌病毒启动子 (一般参阅:Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," 载于 *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland 等人 (eds.), 第 163-181 页 (John Wiley and Sons, Inc. 1996))。一种实用的启动子和增强子的组合由骨髓增殖肉瘤病毒启动子和人巨细胞病毒增强子提供。

[0138] 另一方面,如果,用真核启动子调节原核启动子,则原核启动子,如噬菌体 T3 RNA 聚合酶启动子,可以用于控制哺乳动物细胞内 TAC1-免疫球蛋白蛋白质的生产 (Zhou 等人, *Mol. Cell. Biol.* 10:4529(1990), 以及 Kaufman 等人, *Nucl. Acids Res.* 19:4485(1991))。

[0139] 可以用包括磷酸钙转染、脂质体介导的转染、微粒介导的传递、电穿孔等等在内的多种标准技术,将表达载体引入到宿主细胞内。可以将转染过的细胞进行选择并且繁殖,以提供含有在宿主细胞基因组中稳定整合的表达载体的重组宿主细胞。用于将载体引入到真核细胞的技术和采用显性选择标记以选择上述稳定转化体的技术已有叙述,例如, Ausubel (1995) 和 Murray (ed.), *Gene Transfer and Expression Protocols* (Humana Press 1991)。

[0140] 例如,一种适合的选择标记是提供抗生素新霉素抗药性的基因。这种情况下,在新霉素类药物,如 G-418 或其同类存在的情况下进行选择。选择系统也可以用于提高目的基因的表达水平,即被称为“扩增”的过程。扩增是在低水平的选择剂存在的情况下以培养转染子 (transfectant) 来进行的,接下来,增加选择剂的量以选择高水平生产的所引入的基

因的产品的细胞。适合的可扩增可选择标记是提供氨甲蝶呤抗性的二氢叶酸还原酶。也可以使用其他药物的抗性基因（例如：潮霉素抗性、多药抗性、嘌呤霉素乙酰转移酶）。或者，将像绿荧光蛋白质之类的改变表型的标记或者像 CD4、CD8、I 类 MHC、胎盘碱性磷酸酶之类的细胞表面蛋白质，可以通过用例如 FACS 分类术或磁性小珠分离技术之类的方法，从未转染的细胞中分离转染的细胞。

[0141] TACI- 免疫球蛋白多肽也可以用病毒传递系统通过培养哺乳动物细胞来生产。用于此目的的代表性的病毒包括腺病毒、疱疹病毒、痘病毒和腺伴随病毒 (AVV)。腺病毒，一种双链 DNA 病毒，是目前研究最多的用于异源核酸传递的基因转导载体（关于综述，参阅 Becker 等人, *Meth. Cell Biol.* 43:161(1994)，以及 Douglas 和 Curiel, *Science & Medicine* 4:44(1997)）。腺病毒系统的优点包括，能够容纳相对较大的 DNA 的插入、以高滴度生长的能力、转染较大范围的哺乳动物细胞类型的能力、以及允许使用大量可以得到的含有不同启动子的载体的灵活性。

[0142] 通过删除部分腺病毒基因组，可以接纳较大的异源 DNA 的插入（大于 7kb）。可以用直接连接反应或通过共转染的质粒一起同源重组将该插入物整合到病毒 DNA 中。一种选择是从病毒载体中删除必须的 E1 基因，这将导致除非由宿主细胞提供 E1 基因，否则不能复制。例如，腺病毒载体传染的人 293 细胞 (ATCC Nos. CRL-1573, 45504, 45505) 可以作为贴壁细胞或以相对高的细胞密度在悬浮培养基中生长，以生产显著量的蛋白质（参阅 Garnier 等人, *Cytotechnol.* 15:145(1994)）。

[0143] 本领域的技术人员可以设计适合的表达载体来用哺乳动物细胞生产本文所述的融合蛋白质。实施例 4 叙述了一种表达载体的特性。作为另一个实例，表达载体可以包含双顺反子表达盒，其包括人巨细胞病毒增强子的一部分、骨髓增殖肉瘤病毒的启动子、编码融合蛋白质的核苷酸序列、脊髓灰质炎病毒内部核糖体进入位点、编码鼠二氢叶酸还原酶的核苷酸序列、再加上 SV40 聚腺苷酸添加序列。SEQ ID NO:69 的核苷酸序列显示了一种巨细胞病毒增强子 / 骨髓增殖肉瘤病毒 LTR 启动子构建体，其中巨细胞病毒增强子从核苷酸 1 延伸到 407。缺少负控制区的骨髓增殖肉瘤病毒 LTR 启动子从 SEQ ID NO:69 的核苷酸 408 延伸到核苷酸 884。没有负控制区的骨髓增殖肉瘤病毒 LTR 启动子的核苷酸序列在 SEQ ID NO:70 中提供。

[0144] 实施例 1 叙述了一种表达载体，它包含指导重组蛋白质的转基因表达的巨细胞病毒启动子、免疫球蛋白内含子和组织纤溶酶原激活蛋白的信号序列。一种合适的免疫球蛋白内含子是鼠 26-10V<sub>H</sub> 内含子。SEQ ID NO:66 提供了鼠 26-10V<sub>H</sub> 内含子的示例核苷酸序列。表达载体也可以包括位于编码 TACI- 免疫球蛋白蛋白质的核苷酸序列上游的 5' 未翻译区 (UTR)。适合的 5' -UTR 可以从鼠 26-10V<sub>H</sub> 基因中得到。SEQ ID NO:63 公开了有用的天然鼠 26-10V<sub>H</sub> 的 5' -UTR 核苷酸序列，而 SEQ ID NO:64 显示鼠 26-10V<sub>H</sub> 5' -UTR 核苷酸序列时，它已经在 3' 末端被得到最优化。

[0145] 作为实例，SEQ ID NO:67 提供了包括下述元件的核苷酸序列：天然鼠 26-10V<sub>H</sub> 5' -UTR (核苷酸 1 到 51)、鼠 26-10V<sub>H</sub> 信号序列 (核苷酸 52 到 97 和 182 到 192)、鼠 26-10V<sub>H</sub> 内含子 (核苷酸 98 到 181)、编码 TACI 部分的核苷酸序列 (核苷酸 193 到 435)、以及编码 Fc5 部分的核苷酸序列 (核苷酸 436 到 1131)。由于用最优化的鼠 26-10V<sub>H</sub> 5' -UTR (核苷酸 1 到 51) 对天然序列的替换，核苷酸序列 SEQ ID NO:68 与 SEQ ID NO:67 不同。

[0146] TACI- 免疫球蛋白蛋白质也可以在其它较高等的真核细胞,例如鸟类的、真菌的、昆虫、酵母或植物细胞中表达。杆状病毒系统提供了一种向昆虫细胞中引入克隆的基因的有效方法。适合的表达载体以苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 多核型多角体病毒 (AcMNPV) 为基础,并且含有熟知的启动子,例如,果蝇热休克蛋白 (hsp)70 启动子、苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒立即早期基因启动子 (ie-1) 和晚早期 39K 启动子、杆状病毒 p10 启动子、和果蝇金属硫蛋白启动子。制备重组杆状病毒的第二种方法使用 Luckow 所述的基于转座子的系统 (Luckow 等人, *J. Virol.* 67 :4566(1993))。使用转移载体的该系统,以 BAC-to-BAC 试剂盒 (Life Technologies, Rockville, MD) 销售。该系统使用一种转移载体 PFASTBAC (Life Technologies), 它含有 Tn7 转座子, 以将编码 TACI- 免疫球蛋白多肽的 DNA 转移到大肠杆菌 (*E. Coli*) 中作为被称为“杆粒 (bacmid)”的较大质粒而维持的杆状病毒的基因组中。参阅, Hill-Perkins 和 Possee, *J. Gen. Virol.* 71 :971(1990), Bonning 等人, *Gen. Virol.* 75 :1551(1994), 以及 Chazenbalk 和 Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270 :1543(1995)。此外,转移载体可以在表达的 TACI- 免疫球蛋白多肽的 C- 或 N- 末端包括与编码表位标签的 DNA 以符合读框的方式融合,该表位例如 Glu-Glu 表位标签 (Grussenmeyer 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 82 :7952(1985))。采用本领域已知的技术,将含有编码 TACI- 免疫球蛋白蛋白质核苷酸序列的转移载体转化到大肠杆菌中,并且筛选含有标志重组杆状病毒的间断的 lacZ 基因的杆粒。然后将含有重组杆状病毒基因组的杆粒 DNA 用普通技术分离。

[0147] 实例 PFASTBAC 载体可以在相当大的程度上修饰。例如,可以将多角体蛋白启动子去除,用杆状病毒的碱性蛋白质启动子 (也被称为 Pcor, p6.9 或 MP 启动子) 替换,它在杆状病毒感染的早期表达,并且已经显示出比表达分泌型蛋白质有利 (参阅,例如, Hill-Perkins 和 Possee, *J. Gen. Virol.* 71 :971(1990), Bonning 等人, *J. Gen. Virol.* 75 :1551(1994), 以及 Chazenbalk 和 Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270 :1543(1995))。在上述转移载体的构建体中,可以使用短的或长的碱性蛋白质启动子。此外,转移载体可以用从昆虫蛋白质中得到的分泌信号序列来构建。例如,来自蛻皮甾类葡糖基转移酶 (EGT)、蜜蜂蜂毒肽 (Invitrogen Corporation ;Carlsbad, CA) 或杆状病毒 gp67 (PharMingen ;San Diego, CA) 的分泌信号序列可以在上述构建体中使用。

[0148] 将重组病毒或杆粒用于转染宿主细胞。适合的昆虫宿主细胞包括从 IPLB-Sf-21 得到的细胞系,草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 蛹卵巢细胞系,如 Sf9 (ATCC CRL 1711)、Sf21AE 和 Sf21 (Invitrogen Corporation ;San Diego, CA)、以及果蝇 (*Drosophila*) 施奈德-2 (Schneider-2) 细胞、和从粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 中得到的 HIGH FIVE0 细胞系 (Invitrogen) (美国专利 No. 5, 300, 435)。可以将市场上能够得到的无血清培养基用于细胞的生长和维持。对于 Sf9 细胞,适合的培养基是 Sf900 II™ (Life Technologies) 或 ESF921™ (Expression Systems); 而对于粉纹夜蛾细胞,是 Ex-cell10405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) 或 Express Five0™ (Life Technologies)。在使用重组病毒时,细胞一般从大概  $2-5 \times 10^5$  细胞的接种密度生长到  $1-2 \times 10^6$  细胞的密度,这时,以 0.1 到 10 的感染复数加入重组病毒的母株,更一般地,感染复数接近 3。

[0149] 在杆状病毒系统中生产重组蛋白质的成熟工艺由 Bailey 等人提供,可参阅: Bailey 等人,“Manipulation of Baculovirus Vectors,” 载于 *Methods in Molecular Biology*, 卷 7: Gene Transfer and Expression Protocols, Murray (编辑) 第 147-168

页 (The Humana Press, Inc. 1991), Patel 等人, "The baculovirus expression system," 载于 DNA Cloning 2: Expression system, 第 2 版, Glover 等人 (编辑), 第 205-244 页 (Oxford University Press 1995), Ausubel (1995) 第 16-37 到 16-57 页, Richardson (编辑), Baculovirus Expression Protocols, (The Humana Press, Inc. 1995), 以及 Lucknow, "Insect Cell Expression Technology," 载于 Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland 等人 (编辑), 第 183-218 页 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)。

[0150] 真菌细胞, 包括酵母细胞, 也可以用于表达本文所述的基因。在这方面有特殊意义的酵母种类包括啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 和 *Pichia methanolica*。对于酵母的表达适合的启动子包括从 GAL1 (半乳糖)、PGK (磷酸甘油酸激酶)、ADH (醇脱氢酶)、AOX1 (醇氧化酶)、HIS4 (组氨酸脱氢酶) 中得到的启动子。许多酵母克隆载体已经被设计出来并且很容易得到。载体可以被设计成生成使用在酵母中进行同源重组所需要的元件的构建体 (参阅, 例如, Raymond 等人, *BioTechniques* 26:134 (1999))。例如, 这样的表达载体可以包括对于在啤酒糖酵母中进行选择和复制所需要的 URA3 和 CEN-ARS (自主复制序列) 序列。其它适合的载体包括基于 YIp- 载体, 如 YIp5, YRp 载体, 如 YRp17, YEp 载体, 如 YEp13 以及 YCp 载体, 如 YCp19。用外源 DNA 转化啤酒糖酵母细胞和用这些细胞生产重组多肽的方法已经被公开, 例如, Kawasaki, 美国专利 No. 4, 599, 311; Kawasaki 等人, 美国专利 No. 4, 931, 373; Brake, 美国专利 No. 4, 870, 008; Welch 等人, 美国专利 No. 5, 037, 743; 以及 Murray 等人, 美国专利 No. 4, 845, 075。通过由可选择的标记决定的表型、普通的药物抗性或在缺少特定营养 (例如: 亮氨酸) 的情况下生长的能力来筛选转化的细胞。适合在啤酒糖酵母中使用的载体系统是由 Kawasaki 等人 (美国专利 No. 4, 931, 373) 公开的 POT1 载体系统, 它允许通过转化的细胞能够在含葡萄糖的培养基中生长来筛选转化的细胞。其他的适合用于酵母中的启动子和终止子, 包括从糖醇解酶基因 (参阅, 如 Kawasaki, 美国专利 No. 4, 599, 311; Kingsman 等人, 美国专利 No. 4, 615, 974 和 Bitter, 美国专利 No. 4, 977, 092) 和醇脱氢酶基因 (亦参阅美国专利 No. 4, 990, 446、5, 063, 154、5, 139, 936 和 4, 661, 454) 中得到的那些。

[0151] 本领域已知用于其它酵母的转化系统, 酵母包括多形汉逊氏酵母 (*Hansenula polymorpha*)、非洲粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、产乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*Kluyveromyces fragilis*)、玉蜀黍黑粉菌 (*Ustilago maydis*)、巴斯德毕赤氏酵母、*Pichia methanolica*、季也蒙氏毕赤氏酵母 (*Pichiaguilliermondii*) 和麦芽糖假丝酵母 (*Candida maltosa*)。参阅, 例如, Gleeson 等人, *J. Gen. Microbiol.* 132:3459 (1986) 和 Cregg, 美国专利 No. 4, 882, 279。根据 McKnight 等人在美国专利 No. 4, 935, 349 所述的方法, 可以使用曲霉属 (*Aspergillus*) 细胞。Sumino 等人在美国专利 No. 5, 162, 228 公开了转化 *Acremonium chrysogenum* 的方法。Lambowitz 在美国专利 No. 4, 486, 533 公开了转化链孢霉属 (*Neurospora*) 的方法。

[0152] 例如, 在重组蛋白质的生产中作为宿主而使用 *Pichia methanolica* 已经被 Raymond 公开, 对此可参阅美国专利 No. 5, 716, 808, Raymond, 美国专利 No. 5, 736, 383, Raymond 等人, *Yeast* 14:11-13 (1998), 以及国际专利申请 Nos. WO 97/17450、WO97/17451、WO 98/02536 和 WO 98/02565。转化 *P. methanolica* 所用的 DNA 分子通常将以双链、环状质粒制备, 在转化前最好将其线性化。对于用 *P. methanolica* 生产多肽, 质粒中的启动子和终

止子可以是 *P. methanolica* 基因的,如 *P. methanolica* 醇利用基因 (AUG1 或 AUG2)。其它有用的启动子包括二羟丙酮合酶 (DHAS)、甲酸脱氢酶 (FMD) 和过氧化氢酶 (CAT) 基因的那些。为方便 DNA 整合入宿主染色体,最好使质粒的整个表达片段在两端都被宿主 DNA 序列所包围。在 *Pichia methanolica* 中使用的可选择适合的标记是 *P. methanolica* ADE2 基因,它编码 5-氨基咪唑核苷酸羧化酶 (AIRC ;EC 4. 1. 1. 21),并且允许 *ade2* 宿主细胞在缺少腺嘌呤的情况下生长。对于希望最少量地使用甲醇的大量工业生产,宿主细胞可以在缺失两个甲醇利用基因 (AUG1 或 AUG2) 的情况下被应用。对于分泌型蛋白质的生产,宿主细胞可以在液泡蛋白酶基因 (PEP4 和 PRB1) 上有缺陷。应用电穿孔,以便于将含有编码目的多肽的 DNA 的质粒引入到 *P. methanolica* 细胞。可以用指数式衰减的脉冲电场通过电穿孔转化 *P. methanolica* 细胞,其场强为 2.5 到 4.5kV/cm,优选为大约 3.75kV/cm,同时时间常数 ( $t$ ) 为 1 到 40 毫秒,最优选为大约 20 毫秒。

[0153] 也可以将表达载体引入到植物原生质体、完整的植物组织或分离的植物细胞中。将表达载体引入到植物组织中的方法包括直接转染或植物组织与根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 共同培养、微粒介导的传递、DNA 注射、电穿孔等等。参阅,例如,Horsch 等人, *Science* 227 :1229(1985), Klein 等人, *Biotechnology* 10 :268(1992), 以及 Miki 等人,“Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants”载于 *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick 等人 (编辑),第 67-88 页 (CRC Press, 1993)。

[0154] 另一方面, TACI- 免疫球蛋白蛋白质可以在原核宿主细胞中生产。可以用于在原核宿主中生产 TACI- 免疫球蛋白多肽的合适的启动子为本领域中的技术人员所熟知,包括能够识别 T4、T3、Sp6 和 T7 聚合酶的启动子、噬菌体  $\lambda$  的  $P_R$  和  $P_L$  启动子、大肠杆菌的 *trp*、*recA*、热休克、*lacUV5*、*tac*、*lpp-lacSpr*、*phoA* 和 *lacZ* 启动子、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的启动子、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 噬菌体的启动子、链霉菌属 (*streptomyces*) 启动子、噬菌体  $\lambda$  的 *int* 启动子、pBR322 的 *bla* 启动子和氯霉素乙酰转移酶基因的 CAT 启动子。对于原生启动子已有综述,可参阅 Glick, *J. Ind. Microbiol.* 1 :277(1987), Watson 等人, *Molecular Biology of the Gene*, 第 4 版 (Benjamin Cummins 1987), 以及 Ausubel 等人 (1995)。

[0155] 适合的原核宿主包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌。适合的大肠杆菌菌株包括 BL21 (DE3)、BL21 (DE3) pLysS、BL21 (DE3) pLysE、DH1、DH4I、DH5、DH5I、DH5IF'、DH5IMCR、DH10B、DH10B/p3、DH11S、C600、HB101、JM101、JM105、JM109、JM110、K38、RR1、Y1088、Y1089、CSH18、ER1451 和 ER1647 (参阅,例如, Brown (编辑), *Molecular Biology Labfax* (Academic Press 1991))。适合的枯草芽孢杆菌菌株包括 BR151、YB886、MI119、MI120 和 B170 (参阅,例如, Hardy, “*Bacillus Cloning Methods*,” 载于 *DNA Cloning : A Practical Approach*, Glover (编辑) (IRL Press 1985))。

[0156] 在细菌,如大肠杆菌中表达 TACI- 免疫球蛋白蛋白质时,多肽可以被保留在胞质中,一般作为不可溶的颗粒,或者可以被细菌分泌序列引导进入壁膜间隙。在前一种情况下,细胞被裂解,并且颗粒回收并用例如异硫氢酸胍或脲变性。然后,变性的多肽可以通过稀释的变性剂被重新折叠和二聚化,例如用脲溶液和还原的及被氧化的谷胱甘肽组合溶液透析,接着用缓冲的盐溶液透析。在后一种情况下,通过破裂细胞 (例如:超声处理或渗透震扰) 的方法,可以将多肽以溶解的并且具有功能的形式从壁膜间隙回收,以释放壁膜间

隙的内容物并回收蛋白质,从而排除了变性和重新折叠的必要。

[0157] 用原核宿主表达蛋白质的方法为本领域的技术人员熟知(参阅,例如,Williams 等人,“Expression of foreign proteins in E.coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies,”载于 DNA Cloning 2: Expression Systems, 第 2 版, Glover 等人(编辑)第 15 页(Oxford University Press 1995), Ward 等人,“Genetic Manipulation and Expression of Antibodies,”载于 Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, 第 137 页(Wiley-Liss, Inc. 1995) 以及 Georgiou, “Expression of Proteins in Bacteria,”载于 Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland 等人(编辑), 第 101 页(John Wiley & Sons, Inc. 1996))。

[0158] 人们已经提供了将表达载体引入到细菌、酵母、昆虫和植物细胞的标准方法,例如, Ausubel (1995)。

[0159] 人们已经提供了用哺乳动物细胞系统生产表达和回收外源蛋白质的一般方法,例如: Etcheverry, “Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture,”载于 Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland 等人(编辑), 第 163 页(Wiley-Liss, Inc. 1996)。人们已经提供了回收用细菌系统生产的蛋白质的标准工艺,例如: Grisshammer 等人, “Purification of over-produced proteins from E. coli cells,”载于 DNA Cloning 2: Expression Systems, 第 2 版, Glover 等人(编辑)第 59-92 页(Oxford University Press 1995)。对于分离从杆状病毒系统分离重组蛋白质的成熟方法的叙述可参阅 Richardson(编辑), Baculovirus Expression Protocols(The Humana Press, Inc. 1995)。

[0160] 或者,本发明的多肽可以通过下述方法合成,例如:完全固相合成、部分固相的方法、片段缩合或传统溶液合成。这些合成方法为本领域的技术人员熟知(参阅,例如: Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149(1963), Stewart 等人, “Solid Phase Peptide Synthesis”(第 2 版), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer 和 Rapp, Chem. Pept. Prot. 3: 3(1986), Atherton 等人, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach(IRL Press 1989), Fields 和 Colowick, “Solid-Phase Peptide Synthesis,” Methods in Enzymology Volume 289(Academic Press 1997), 以及 Lloyd-Williams 等人, Chemical Approaches to the Synthesis of Peptide and Proteins(CRC Press, Inc. 1997))。在全部化学合成策略中的变异,如“天然化学连接反应”和“表达蛋白质连接反应”也是标准的(参阅,例如: Dawson 等人, Science 266:776(1994), Hackeng 等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94:7845(1997), Dawson, Methods Enzymol. 287:34(1997), Muir 等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:6705(1998), 以及 Severinov 和 Muir, J. Biol. Chem. 273:16205(1998))。

[0161] 5. TACI-免疫球蛋白融合蛋白质的鉴定

[0162] 可以用多种方法评定融合蛋白质结合 ZTNF4 或 ZTNF2 的能力,从而检测 TACI-免疫球蛋白融合蛋白质的功能。作为实例,实施例 4 提供了测定 ZTNF4 结合亲和力和结合能力的方法。

[0163] 或者,如 Gross 等人在国际专利申请 No. WO 00/40716 中所述的, TACI-免疫球蛋白融合蛋白质可以用抑制由可溶 ZTNF4 对人 B 细胞的激活的能力而表征。简单地说,根据

制造商的说明书,使用 CD19 磁珠和 VarioMacs 磁性分离系统 (Miltenyi Biotec Auburn, CA),将人 B 细胞从外周血单核细胞中分离。将 B 细胞与可溶的 ZTNF4(25ng/ml) 和重组的人 IL-4(10ng/ml Pharmingen) 混合,将该细胞以每个孔  $1 \times 10^5$  细胞数铺到圆底 96 孔板上。

[0164] 可以将可溶的 TACI- 免疫球蛋白蛋白质从大约  $5 \mu\text{g/ml}$  稀释到大约  $6\text{ng/ml}$ , 然后与 B 细胞一起孵育五天,在第四天对每孔用  $1 \mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ - 胸苷脉冲过夜。作为对照,在没有 ZTNF4 的情况下,也将 TACI- 免疫球蛋白蛋白质与 B 细胞和 IL-4 一起孵育。用 Packard 平板收获器将平板收获,并用 Packard 读数器计数。

[0165] 这种通用方法被用于测定三种 TACI-Fc 融合蛋白质。虽然,所有融合蛋白质都抑制 B 细胞增殖,但是构建体 TACI(d1-29, d111-154)-Fc5 和 TACI(d1-29, d120-154)-Fc5 比 TACI(d1-29, d107-154)-Fc5 更有效。

[0166] 已有成熟的动物模型可以用来体内测试在一定疾病状态下 TACI- 免疫球蛋白蛋白质的效率。例如,可以用 TACI- 免疫球蛋白蛋白质在一些自身免疫疾病的动物模型中进行测试,例如,作为 SLE(系统性红斑狼疮)的模型的 MRL-lpr/lpr 或 NZB x NZW F1 鼠同类品系。上述动物模型为本领域已知(参阅,例如, Cohen 和 Miller(编辑), Autoimmune Disease Models :A Guidebook(Academic Press, Inc. 1994))。

[0167] 新西兰黑鼠 (NZB) 和 新西兰白鼠 (NZW) 之间杂交的后代发育成为十分类似人类的 SLE 的自发形式的 SLE。后代鼠,称为 NZBW,在一个月龄时开始产生针对 T 细胞的 IgM 自身抗体,至五到七个月龄抗 DNA 自身抗体是占优势的免疫球蛋白。多克隆 B 细胞的过度活化导致自身抗体的超量产生。该自身抗体,尤其是那些针对单链 DNA 的抗体的积累,与肾小球肾炎的发生相关,它在临床上的表现为蛋白尿、氮质血症以及因肾衰竭而死亡。

[0168] 肾衰竭是导致受自发 SLE 影响的小鼠死亡的最主要原因,在 NZBW 品系中,该过程是慢性的和消除性的。该病在雌鼠中比在雄鼠中更急且重,平均存活时间与雄鼠的 406 天相比仅为 245 天。虽然在 7 到 9 个月龄时许多雌鼠将出现症状(蛋白尿),但是一些雌鼠发生症状时可以更年轻或更老。在 NZBW 鼠中观察到的致命的免疫性肾炎与在人的 SLE 中观察到的肾小球肾炎相类似,使得该自发型鼠模型对于潜在的 SLE 治疗测试非常具有吸引力 (Putterman 和 Naparstek,“Murine Models of Spontaneous Systemic Lupus Erythematosus,”载于 Autoimmune Disease Models :A Guidebook,第 217-234 页 (Academic Press, Inc., 1994); Mohan 等人, J. Immunol. 154 :1470 (1995); 以及 Daikh 等人, J. Immunol. 159 :3104 (1997))。

[0169] 如 Gross 等人在国际专利申请 No. WO 00/40716 中所述,当 NZBW 鼠中 B 细胞自身抗体的产生被认为是平均处于高水平时,可以将 TACI- 免疫球蛋白蛋白质向 NZBW 鼠给药,以监测其在 5 周时间内对 B 细胞的抑制效果。简单地说,可以将 100 只 8 周大的雌性 (NZB x NZW) F<sub>1</sub> 鼠分成六组,每组 15 只。治疗前,一个月一次监测鼠的尿蛋白,抽血作全血细胞计数和血清库。血清可以用来对自身抗体的存在进行筛查。因为蛋白尿是肾小球肾炎的标志征象,所以在研究过程中一直以一定的间隔用试纸监测尿蛋白水平。在鼠大约为 5 个月龄时可以开始治疗。在 5 周内一周三次,对鼠进行腹膜内注射仅有载体(磷酸缓冲盐水)或人 TACI- 免疫球蛋白(对照蛋白质)或 TACI- 免疫球蛋白蛋白质(例如:每次给药 20 到  $100 \mu\text{g}$  测试蛋白质)。

[0170] 在治疗期间采血两次,并且在治疗以后将至少采集两次。在治疗开始后每两周测

定蛋白尿的尿试纸检测值和体重。在安乐死的时候,采集血、尿的试纸检测值和体重。将脾和胸腺分割以用于荧光活化的细胞的分类分析和组织学研究。也将颌下唾液腺、肠系膜淋巴结链、带胆囊的肝叶、盲肠和大肠、胃、小肠、胰腺、右肾、肾上腺、舌与气管和食管一起、心脏以及肺采集用于组织学研究。

[0171] 实验变态反应性脑脊髓炎的鼠模型,已经用来作为研究免疫介导的疾病的机理和潜在治疗干预方法二者的工具。该模型类似人的多发性硬化,并且作为神经蛋白,如髓鞘碱性蛋白或蛋白脂质蛋白,对 T 细胞激活的结果而产生脱髓鞘作用。用抗原接种诱导 CD4<sup>+</sup>、II 型 MHC<sup>-</sup> 限制的 T 细胞 (Th1)。在对于实验变态反应性脑脊髓炎的方案中的改变可以产生该模型的急性、慢性复发性或者被动转移的变体 (Weinberg 等人, *J. Immunol.* 162 : 1818(1999) ;Mijaba 等人, *Cell. Immunol.* 186 :94(1999) ; 以及 Glabinski, *Meth. Enzym.* 288 :182(1997))。

[0172] Gross 等人在国际专利申请 No. WO 00/40716 中叙述了一种方法,用以评价在与实验变态反应性脑脊髓炎相关的症状的改善中 TACI- 免疫球蛋白蛋白质的效果。简单地说,给 25 只雌性 PLxS/JL F1 小鼠 (12 周龄) 皮下注射配有完全弗氏佐剂的抗原 (髓鞘蛋白脂质蛋白, PLP, 残基 139-151) 125  $\mu$ g/ 鼠。将该鼠分为五组,每组五只鼠。在 0 和 2 天给与百日咳毒素的腹膜内注射。给这些组 1x、10x 或 100x 剂量的 TACI- 免疫球蛋白蛋白质,一组将仅接受载体,而另一组将不进行治疗。预防性治疗在 0 天开始,干预性治疗在 7 天或临床征象出现时开始进行。在大约 10 到 14 天疾病征象,体重下降和麻痹出现,并持续大约一周。每天通过称体重和给予与它们症状程度相应的临床评分来评价动物。实验变态反应性脑脊髓炎的临床征象在接种的 10 到 14 天内出现,并且持续大约一周。在研究的最后,用过量的气体对全部动物进行安乐死,之后尸检。采集脑和脊柱用于组织学研究或冷冻脑和脊柱用于 mRNA 分析。对体重和临床评分的数据以个体和分组绘出曲线。

[0173] 在胶原蛋白诱导的关节炎模型中,小鼠患有慢性炎症性关节炎,它非常类似人的类风湿性关节炎。因为胶原蛋白诱导的关节炎与类风湿性关节炎共有相似的免疫学和病理学特性,这使得它对于筛选潜在的人抗炎化合物是理想的模型。在应用胶原蛋白诱导的关节炎模型中的另一个优点是,其病理机理已知。在 II 型胶原上的 T 和 B 细胞表位已经确定,同时,多种与免疫介导的关节炎的免疫学 (迟发型过敏反应和抗胶原蛋白抗体) 和炎症 (细胞因子、趋化因子和基质降解酶) 相关的参数已经确定,并且可以应用于评定模型中测试化合物的效果 (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3 :407(1999) ;Williams 等人, *Immunol.* 89 : 9784(1992) ;Myers 等人, *Life Sci.* 61 :1861(1997) ; 以及 Wang 等人, *Immunol.* 92 : 8955(1995))。

[0174] Gross 等人在国际专利申请 No. WO 00/40716 中叙述了一种方法,用以评价在与胶原蛋白诱导的关节炎相关症状的改善中 TACI- 免疫球蛋白蛋白质的效果。简单地说,将 8 周大雄性 DBA/1J 鼠 (Jackson Labs) 分组为 5 只 / 组,每隔三周地进行两次 50 到 100  $\mu$ l 的 1mg/ml 的胶原蛋白 (小鸡或牛来源) 皮下注射。一组对照组不进行胶原蛋白注射。第一次注射配有完全弗氏佐剂,而第二次注射配有不完全弗氏佐剂。在第二次注射时或在第二次注射之前、或者在动物出现了二或更高的临床评分并持续至少 24 小时之后,将 TACI- 免疫球蛋白蛋白质预防性地给药。在第二次胶原蛋白注射之后,通常在 2 到 3 周内,动物开始出现关节炎的症状。例如,TACI-Fc、对照蛋白质、人 IgFc、或磷酸缓冲盐水 (载体) 可以在第

二次注射前 7 天（第 7 天）开始用于预防性的给药。蛋白质可以 100  $\mu$ g 给药，以 200  $\mu$ l 一周三次给药，并且连续 4 周。

[0175] 在胶原蛋白诱导的关节炎模型中，用游标卡尺对每一个爪测量爪的厚度，并且对每一个爪给予临床评分，以评价疾病的程度。例如，临床评分为“0”表示正常鼠，评分为“1”表示 1 或多个趾有红肿，评分为“2”表示轻度爪部炎症，评分为“3”表示中度爪部炎症，评分为“4”表示严重爪部炎症。在患病一段时间的时间后，通常为 7 天之后，对动物施行安乐死。采集爪，进行组织学研究或 mRNA 分析。采集血清，进行免疫球蛋白和细胞因子测定。

[0176] 重症肌无力是另一种自身免疫疾病，其鼠模型也可以得到。重症肌无力是涉及产生针对烟碱乙酰胆碱受体的自身抗体的神经肌肉传导疾病失调。该疾病是获得性的或遗传性的，有着包括活动后异常乏力和疲劳的临床特征。

[0177] 重症肌无力的鼠模型已经被建立。(Christadoss 等人, “Establishment of a Mouse Model of Myasthenia gravis Which Mimics Human Myasthenia gravis Pathogenesis for Immune Intervention,” 载于 *Immunobiology of Proteins and Peptides VIII*, Atassi 和 Bixler (编辑), 第 195-199 页 (1995))。实验性自身免疫性重症肌无力是抗体介导的疾病，其特征在于针对乙酰胆碱受体的抗体的存在。该抗体破坏受体导致有缺陷的神经肌肉电脉冲，引起肌肉乏力。在实验性自身免疫性重症肌无力模型中，用烟碱乙酰胆碱受体免疫鼠。在第二次免疫后数周重症肌无力的临床征象变得明显。评价实验性自身免疫性重症肌无力有若干方法，包括用放射免疫试验测定乙酰胆碱受体抗体的血清水平 (Christadoss 和 Dauphinee, *J. Immunol.* 136 :2437 (1986) ; Lindstrom 等人, *Methods Enzymol.* 74 :432 (1981))、测定肌肉乙酰胆碱受体或肌电描记术 (Coligan 等人 (编辑), *Protocols in Immunology. Vol. 3*, 第 15.8.1 页 (John Wiley & Sons, 1997))。

[0178] TACI- 免疫球蛋白在实验性自身免疫性重症肌无力方面的效果可以通过对临床上正在进展重症肌无力期间的 B6 鼠中应用融合蛋白质来测定。例如，给 100 只 B6 鼠在 0 天和 30 天用配以完全弗氏佐剂的乙酰胆碱受体 20  $\mu$ g 进行免疫。用乙酰胆碱受体强化之后，大约 40 到 60% 的小鼠发生从中度 (2 级) 到重度 (3 级) 临床重症肌无力。将患有 2 级和 3 级临床疾病的鼠分为三组 (有着相等的乏力级别)，之后称重 (乏力的鼠体重也减轻，因为它们采食食物和水时有困难) 和采血以获得血清 (为得到治疗前抗乙酰胆碱受体抗体和同种型水平)。给 A 组 1.P 注射磷酸缓冲盐水，对 B 组腹膜内注射人 IgG-Fc 作为对照蛋白 (100  $\mu$ g)，给 C 组用 100  $\mu$ g TACI-Fc 注射，一周三次持续四周。对鼠进行一周两次的在临床肌肉乏力方面的筛选，并且在治疗开始后 15 天和 30 天称重并采血以获得血清。在第 15 天采集全血，采用标记 B220 和 CD5 通过荧光活化细胞分选仪分析以测定 T/B 细胞之比。在治疗开始后 30 到 45 天将存活的鼠杀死，将其尸体冷冻，用于以后的肌肉乙酰胆碱受体提取，以测定肌肉乙酰胆碱受体的损失情况，这是重症肌无力的基本病理 (参阅，例如，Coligan 等人。(编辑), *Protocols in Immunology. Vol. 3*, 第 15.8.1 页 (John Wiley & Sons, 1997))。

[0179] 针对鼠肌肉乙酰胆碱受体的血清抗体可以通过确立的放射免疫试验法测定，同时抗乙酰胆碱受体的抗体同种型 (IgM、IgG1、IgG2b 和 IgG2c) 用 ELISA 检测。上述方法是已知的。测定 TACI- 免疫球蛋白对正在进展的临床重症肌无力、抗乙酰胆碱受体抗体和同种型水平、以及肌肉乙酰胆碱受体损失方面的效果。

[0180] 可以将大约 100 只鼠在 0 天和 30 天用配以完全弗氏佐剂的乙酰胆碱受体 20  $\mu$ g 进行免疫。将患有临床重症肌无力的鼠分为四组。A 组用 100  $\mu$ g 对照 Fc 进行腹膜内注射, B 组用 20  $\mu$ g 对照 Fc 进行注射, C 组用 100  $\mu$ g TACI-Fc 注射, 以及 D 组用 20  $\mu$ g TACI-Fc 注射, 一周三次持续四周。在治疗开始之前和治疗开始之后 15 天和 30 天, 给鼠称重和采血以获得血清。如上面叙述的, 测试血清中的抗乙酰胆碱受体抗体和同种型。也可以检测肌肉乙酰胆碱受体损失。

[0181] TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质的其它适合的测定, 可以由本领域的技术人员确定。

[0182] 6. TACI- 免疫球蛋白缀合物的生产

[0183] 本发明包括化学修饰的 TACI- 免疫球蛋白组合物, 其中的 TACI- 免疫球蛋白多肽与聚合物相连接。一般该聚合物是水溶性的, 因此在水性环境中, 如生理环境中, TACI- 免疫球蛋白缀合物不沉淀。适合的聚合物的实例是已经修饰过的具有单个反应基团的聚合物, 例如用于酰化作用的活性酯、或用于烷化的醛。这样, 聚合反应的程度可以被控制。活性醛的实例是聚乙二醇丙醛、或单-( $C_1$ - $C_{10}$ ) 烷氧基、或其芳氧基衍生物(参阅, 例如, Harris 等人, 美国专利 No. 5, 252, 714)。聚合物可以是支链或非支链。此外, 聚合物的混合物可以用于生产 TACI- 免疫球蛋白的缀合物。

[0184] 用于治疗 TACI- 免疫球蛋白的缀合物可以含有制药上可接受的水溶性聚合物部分。适合的水溶性聚合物包括聚乙二醇 (PEG)、单甲氧基-PEG、单-( $C_1$ - $C_{10}$ ) 烷氧基-PEG、芳氧基-PEG、多-(N- 乙烯基吡咯烷酮) PEG、tresyl 单甲氧基 PEG、PEG 丙醛、二琥珀酰碳酸酯 PEG、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷 / 环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、右旋糖、纤维素、或其它以碳水化合物为基础的聚合物。适合的 PEG 具有的分子量可以从大约 600 到 60,000, 包括, 例如: 5,000、12,000、20,000 和 25,000。TACI- 免疫球蛋白的缀合物也可以含有上述水溶性聚合物的混合物。

[0185] 一个 TACI- 免疫球蛋白的缀合物的实例含有 TACI- 免疫球蛋白部分和附在 TACI- 免疫球蛋白 N- 末端的聚烷基氧化物部分。PEG 是一种适合的聚烷基氧化物。作为实例, 可以用 PEG, 即被称为“PEG 化 (PEGylation)”的过程来修饰 TACI- 免疫球蛋白。TACI- 免疫球蛋白的 PEG 化可以采用本领域已知的任何一种 PEG 化反应进行(参阅, 例如, 欧洲专利 EP 0 154 316, Delgado 等人, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9:249(1992), Duncan 和 Spreafico, *Clin. Pharmacokinet*, 27:290(1994), 以及 Francis 等人, *Int J Hematol* 68:1(1998))。例如, PEG 化可以用活性聚乙二醇分子通过酰化反应或烷基化反应进行。在另一种供选择的方法中, TACI- 免疫球蛋白的缀合物用缩合活性的 PEG 来形成, 其中 PEG 的末端羟基或氨基基团已经被活化的连接体所替换(参阅, 例如, Karasiewicz 等人, 美国专利 No. 5, 382, 657)。

[0186] 通过酰化来 PEG 化, 一般需要将 PEG 的活化酯的衍生物与 TACI- 免疫球蛋白多肽反应。一个活化 PEG 酯的实例是以 N- 羟基琥珀酰亚胺酯化的 PEG。如本文所使用的, 术语“酰化反应”包括下列在 TACI- 免疫球蛋白和水溶性聚合物之间的连接类型: 酰胺、氨基甲酸酯、聚氨酯等等。通过酰化来制备 PEG 化的 TACI- 免疫球蛋白的方法一般包含步骤 (a) 在一个或多个 PEG 基团附着在 TACI- 免疫球蛋白上的条件下将 TACI- 免疫球蛋白多肽与 PEG(如: PEG 醛衍生物的活性酯) 反应, 以及 (b) 获得反应产物。通常, 对于酰化反应的最佳反应条件将根据已知的参数和期望的结果来确定。例如, PEG : TACI- 免疫球蛋白的比

越大,多 PEG 化的 TACI- 免疫球蛋白产物的百分比越大。

[0187] 通过酰化得到的 PEG 化的产物一般是多 PEG 化的 TACI- 免疫球蛋白产物,其中赖氨酸  $\epsilon$ -氨基基团借助于酰基连接基团被 PEG 化。连接键的实例是酰氨。一般,所得到的 TACI- 免疫球蛋白将至少 95% 被单、二或三 PEG 化,虽然根据反应条件可以生成具有 PEG 化程度较高的某些种类。采用标准提纯方法,例如透析、超滤、离子交换层析、亲和层析等等,可以将 PEG 化的种类从未缀合的 TACI- 免疫球蛋白多肽中分离。

[0188] 通过烷基化进行 PEG 化一般包括,在还原剂的存在下,将 PEG 末端醛衍生物与 TACI- 免疫球蛋白反应。借助于  $-\text{CH}_2\text{-NH}$  基团,PEG 基团可以附着在多肽上。

[0189] 借助于还原性烷基化作用来生产单 PEG 化的产物的衍化可以利用不同类型的伯氨基的不同活性来衍化。一般,在允许利用赖氨酸残基  $\epsilon$ -氨基基团和蛋白质 N 末端残基  $\alpha$ -氨基基团之间 pKa 差异的 pH 值下进行反应。通过上述选择性的衍化,含有像醛这样的活性基团的水溶性聚合物与蛋白质的附着是可控制的。与聚合物的缀合主要发生在蛋白质的 N- 末端,而没有对其他活性基团如赖氨酸侧链氨基基团的显著修饰。本发明提供了 TACI- 免疫球蛋白单聚合物缀合物的基本均一的制备物。

[0190] 以还原性烷基化作用生产单聚合物 TACI- 免疫球蛋白缀合分子的基本均一的集合可以包含步骤 (a) 在还原性烷基化作用的条件下以选择性修饰 TACI- 免疫球蛋白氨基末端的  $\alpha$ -氨基基团的适合的 pH 值,使 TACI- 免疫球蛋白多肽与活性 PEG 反应,和 (b) 获得反应产物。用于还原性烷基化作用的还原剂在水溶液中应该是稳定的,并且具有仅还原在还原性烷基化作用的起始过程中形成的希夫碱的能力。例证的还原剂包括硼氢化钠、氰基硼氢化钠、硼烷二甲胺、硼烷三甲胺和硼烷吡啶。

[0191] 对于 TACI- 免疫球蛋白单聚合物缀合物的基本均一的集合,还原性烷基化反应条件是使得水溶性聚合物部分与 TACI- 免疫球蛋白 N- 末端选择性地附着的条件。该反应条件通常根据赖氨酸氨基基团和在 N- 末端的  $\alpha$ -氨基基团之间 pKa 差异而提供。pH 值也影响所用得聚合物与蛋白质的比。一般说来,如果 pH 值较低,将希望聚合物对于蛋白质是更大量地过量,因为 N- 末端  $\alpha$ -基团的活性越低,越需要较多的聚合物来实现最佳条件。如果 pH 值较高,聚合物 : TACI- 免疫球蛋白比则不需要这么大,因为较多的活性基团可用而。一般,将 pH 值落在 3 到 9 或者 3 到 6 之间。

[0192] 另一个要考虑的因素是水溶性聚合物的分子量。通常,聚合物的分子量越高,可以附着在蛋白质上的聚合物分子的数量越少。对于 PEG 化反应,一般的分子量是大约 2kDa 到大约 100kDa、大约 5kDa 到大约 50kDa 或者大约 12kDa 到大约 25kDa。通常水溶性聚合物对 TACI- 免疫球蛋白的摩尔比将在 1 : 1 到 100 : 1。一般,水溶性聚合物对 TACI- 免疫球蛋白的摩尔比,对于多 PEG 化反应在 1 : 1 到 20 : 1,而对于单 PEG 化反应则在 1 : 1 到 5 : 1。

[0193] 生产包含多肽和水溶性聚合物部分的缀合物的通用方法在本领域是已知的。(可参阅,例如, Karasiewicz 等人,美国专利 No. 5, 382, 657, Greenwald 等人,美国专利 No. 5, 738, 846, Nieforth 等人, Clin. Pharmacol. Ther. 59 :636 (1996), Monkarsh 等人, Anal. Biochem. 247 :434 (1997))。

[0194] 本发明设想的组合物包含本文所述的肽或多肽。上述组合物可以进一步包含载体。该载体可以是传统的有机或无机载体。载体的实例包括水、缓冲溶液、乙醇、丙二醇、聚

乙二醇、芝麻油、玉米油等等。7. TACI- 免疫球蛋白多肽的分离

[0195] 就大分子污染而论,尤其就其它蛋白质和核酸以及不含传染性的和致热性的物质而论,本发明的多肽可以被提纯到至少大约 80% 纯度、至少大约 90% 纯度、至少大约 95% 纯度、或者大于 95% 纯度。本发明的多肽亦可以被提纯到药品纯的状态,即纯度大于 99.9%。在某些制剂中,纯化的多肽基本上不含有其它多肽,尤其其它动物来源的多肽。

[0196] 分级法和 / 或传统的纯化方法可以用于获得合成的 TACI- 免疫球蛋白多肽和从重组宿主细胞纯化的重组 TACI- 免疫球蛋白多肽的制剂。一般说来,硫酸铵沉淀和酸或离液剂提取可以用于样品的分级。典型的纯化步骤可以包括羟磷灰石、大小排阻、FPLC 和反相高效液相色谱。适合的层析介质包括衍生的右旋糖、琼脂糖、纤维素、聚丙烯酰胺、专门的硅等等。PEI、DEAE、QAE 和 Q 的衍生物是适合的。典型的层析介质包括用苯基、丁基或辛基基团衍生的,如苯基 -Sepharose FF (Pharmacia)、Toyopearl 丁基 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA)、辛基 -Sepharose (Pharmacia) 等等;或者聚丙烯酸树脂,如 Amberchrom CG 71 (Toso Haas) 等等。适合的固体支持物包括玻璃珠、硅基树脂、纤维素树脂、琼脂糖珠、交联的琼脂糖珠、聚苯乙烯珠、交联的聚丙烯酰胺树脂以及在其使用条件下不溶的类似物。该支持物可以用允许蛋白质以氨基基团、羧基基团、巯基基团、羟基基团和 / 或糖类部分附着的活性基团修饰。

[0197] 偶联化学的实例包括溴化氰激活、N- 羟基琥珀酰胺激活、环氧化物激活、巯基激活、酰肼激活、以及对于碳化二亚胺偶联化学的羧基和氨基衍生物。在本领域中,这些及其它固体介质是熟知并被广泛采用的,同时可以从商品供应商那里得到。多肽分离和纯化的特殊方法的选择是常规设计的问题,并且部分地由所选的支持物的特性来决定。可参阅,例如, Affinity Chromatography: Principles & Methods (Pharmacia LKB Biotechnology 1988), 和 Doonan, Protein Purification Protocols (The Humana Press 1996)。

[0198] 在 TACI- 免疫球蛋白的分离和纯化中附加的变化可以被本领域的技术人员设计出来。例如,抗 -TACI 或抗 -Fc 抗体可以通过免疫亲和纯化用于分离大量的蛋白质。

[0199] 本发明的多肽也可以通过特殊性质的利用来分离。例如,固定化的金属离子吸附层析可以用于纯化富含组氨酸的蛋白质,包括那些包含多组氨酸标记物的。简单地说,凝胶首先被用二价金属离子充满以形成螯合物 (Sulkowski, Trends in Biochem. 3:1 (1985))。富含组氨酸的蛋白质,将根据所用金属离子以不同亲和性,被吸附到该基质,之后,用竞争性洗脱、降低 pH 值、或者强螯合剂的使用,来将其洗脱。其他纯化方法包括,通过凝集素亲和层析、蛋白质 A 层析、以及离子交换层析进行糖基化蛋白质的纯化 (M. Deutscher, (编辑), Meth. Enzymol. 182:529 (1990))。

[0200] 如上所述, TACI- 免疫球蛋白多肽或者其片段也可以通过化学合成来制备。TACI- 免疫球蛋白多肽可以是单体或聚合物;糖基化的或非糖基化的;PEG 化的或非 PEG 化的;并且可以包括或不包括起始的甲硫氨酸氨基酸残基。TACI- 免疫球蛋白融合蛋白质可以是非糖基化的、糖基化的、或者仅在 TACI 部分或仅在免疫球蛋白部分糖基化的。免疫球蛋白部分可以从人抗体、嵌合抗体、或人源化的抗体获得。

[0201] 8. TACI- 免疫球蛋白多肽的治疗应用

[0202] 通过结合 ZTNF4 或 ZTNF2, TACI- 免疫球蛋白蛋白质可以用于调节免疫系统,这样,阻止这些配体与内源 TACI 或 BCMA 受体的结合。因此,本发明包括, TACI- 免疫球蛋白蛋白

质在缺少足够数量的 TAC1 或 BCMA 的受体或产生过量的 ZTNF4 或 ZTNF2 的受治疗者中的应用。这些分子可以对那些需要治疗的任何受治疗者给药,并且本发明设想了兽医的和人的治疗应用两个方面。实例的受治疗者包括哺乳动物的受治疗者,例如,农畜、家畜和人的患者。

[0203] TAC1-免疫球蛋白多肽可以应用于治疗以下疾病:自身免疫疾病、B 细胞癌、免疫调节、IBD 和任何抗体介导的病状(例如:ITCP、重症肌无力等等)、肾脏疾病、间接 T 细胞免疫应答、移植排斥、以及移植物对抗宿主的病。本发明的多肽可以在免疫应答期间以特异性调节 B 细胞应答为目标。另外,本发明的多肽可以用于调节 B 细胞发育、其它细胞的发育、抗体产生和细胞因子产生。本发明的多肽也可以通过中和 ZTNF4 的增殖效应来调节 T 和 B 细胞的通讯。

[0204] 本发明的 TAC1-免疫球蛋白多肽可以用于中和 ZTNF4 的效应,以治疗下述疾病,对于它们 ZTNF4 多肽增加是相关联的:前 B 细胞或 B 细胞白血病,例如:浆细胞白血病、慢性或急性淋巴细胞白血病;骨髓瘤,例如:多发性骨髓瘤、浆细胞骨髓瘤、内皮性骨髓瘤和巨细胞骨髓瘤;以及淋巴瘤,例如:非霍奇金淋巴瘤。

[0205] ZTNF4 是在 CD8<sup>+</sup> 细胞、单核细胞、树突细胞、活化的单核细胞中表达的,其表明,在某种自身免疫疾病中,细胞毒性 T 细胞可以通过 ZTNF4 的过度产生刺激 B 细胞产生。选择性阻断 B 淋巴细胞活动的免疫抑制蛋白质将被用于治疗疾病。自身抗体的产生为若干自身免疫疾病所共有,并且促进组织破坏和疾病加重。自身抗体也可以导致免疫复合物沉积并发病的发生,和导致许多系统性红斑狼疮的症状,包括:肾衰竭、神经痛症状和死亡。调节不依赖细胞应答的抗体的产生在许多疾病状态下也将是有益的。B 细胞也已经显示出,在类风湿关节炎中的关节炎性的免疫球蛋白的分泌作用中起作用。因此,抑制 ZTNF4 抗体的产生,将有益于自身免疫疾病的治疗,例如重症肌无力、类风湿关节炎、多关节型青少年类风湿关节炎、银屑病性关节炎。像 TAC1-免疫球蛋白蛋白质这样的选择性地阻断或中和 B 淋巴细胞的活动的免疫抑制剂治疗将应用于上述目的。

[0206] 本发明提供用 TAC1-免疫球蛋白蛋白质选择性阻断或中和与晚期肾病相关的 B 淋巴细胞活动的方法,其中所述肾病可以与或者不与自身免疫疾病相关。上述方法也将应用于治疗免疫性肾病。上述方法将应用于治疗肾小球肾炎,后者与例如膜性肾病、IgA 肾病或贝惹病、IgM 肾病、古德帕斯彻病、感染后肾小球肾炎、肾小球系增生性疾病、慢性淋巴细胞白血病、微小病变型肾病综合症的疾病相关。上述方法也用作治疗与例如狼疮、多动脉炎、Henoch-Schonlein 病、硬皮病、HIV 相关疾病、淀粉样变或溶血性尿毒症的疾病相关的继发性肾小球肾炎或血管炎的治疗应用。本发明的方法也用于作为治疗与慢性肾盂肾炎、止痛药滥用、肾钙质沉着相关的间质性肾炎或肾盂肾炎、或由其它因素引起的肾病、肾结石、或者慢性或急性间质性肾炎的治疗应用的组成部分。

[0207] 本发明的方法还包括 TAC1-免疫球蛋白蛋白质在治疗高血压或大血管病中的应用,包括肾动脉狭窄或阻塞和胆固醇栓塞或肾栓塞。

[0208] 本发明还提供了治疗以下疾病的方法,如肾或泌尿系统肿瘤、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、轻链神经病或淀粉样变。

[0209] 本发明还提供了用 TAC1-免疫球蛋白蛋白质阻断或抑制活化的 B 细胞以治疗哮喘和慢性呼吸道疾病,如支气管炎和肺气肿的方法。本文所述的 TAC1-免疫球蛋白蛋白质也

可以用于治疗斯那格伦综合症。

[0210] 还提供了用 TACI- 免疫球蛋白蛋白质抑制或中和效应子 T 细胞应答的方法,以用于免疫抑制,尤其是在对于移植物对抗宿主疾病和移植排斥的治疗中应用。此外,对于象胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM) 和克罗恩氏病这样的自身免疫性疾病的治疗,TACI- 免疫球蛋白蛋白质在治疗方案中有益。对于治疗慢性炎症疾病,尤其对于减轻关节痛、肿胀、贫血和其它相关症状以及治疗败血症性休克,本发明的方法将具有额外的治疗价值。

[0211] 成熟的动物模型可用于体内测试在某种疾病状态下,本发明的 TACI- 免疫球蛋白蛋白质的效果。特别是,TACI- 免疫球蛋白蛋白质可以用许多的自身免疫性疾病的动物模型进行体内测试,例如 MRL-lpr/lpr 或 NZB x NZW F1 鼠同类品系,其作为 SLE (系统性红斑狼疮) 的模型。这些动物模型在本领域是已知的。

[0212] 新西兰黑鼠 (NZB) 和 新西兰白鼠 (NZW) 之间杂交的后代发育为非常类似人类 SLE 的 SLE 的自发形式。后代鼠,称为 NZBW,在一个月龄开始产生针对 T 细胞的 IgM 自身抗体,并且至 5 到 7 个月龄时,Ig 抗 DNA 自身抗体是占优势的免疫球蛋白。多克隆的 B 细胞过度激活导致自身抗体的过度产生。该自身抗体、尤其针对单链 DNA 的抗体的沉积,与肾小球肾炎的发展相关,它临床上表现为蛋白尿、氮血症以及因肾衰竭而死亡。肾衰竭是导致受自发 SLE 影响的鼠死亡的最主要原因,在 NZBW 品系中,该过程是慢性的和消除性的。该病在雌鼠中比在雄鼠更急且严重,平均存活时间与雄鼠的 406 天相比仅为 245 天。虽然在 7 到 9 个月龄时许多雌鼠将出现症状 (蛋白尿) 时,但是一些雌鼠发生症状时可以更年轻或更老。在 NZBW 鼠中观察到的致命免疫性肾炎与在人的 SLE 中观察到的肾小球肾炎相类似,使得该自发型鼠模型对于潜在的 SLE 治疗测试有用。

[0213] 实验变态反应性脑脊髓炎 (EAE) 的鼠模型,已经用来作为研究免疫介导的疾病的机理和潜在治疗干预方法二者的工具。该模型类似人的多发性硬化,并且作为神经蛋白,如髓鞘碱性蛋白 (MBP) 或蛋白脂质蛋白 (PLP),对 T 细胞激活的结果而产生脱髓鞘作用。用抗原接种导致 CD4+、II 型 MHC- 限制的 T 细胞 (Th1) 的诱导。在对于 EAE 的方案中的改变可以产生该模型的急性、慢性复发性或者被动转移的变体。

[0214] 在胶原蛋白诱导的关节炎 (CIA) 模型中,鼠患有慢性炎症性关节炎,它非常类似人的类风湿性关节炎 (RA)。因为 CIA 与 RA 共有相似的免疫学和病理学特性,这使得它对于筛选潜在的人抗炎化合物是理想的模型。应用 CIA 模型的另一个优点是,其病理机理已知。在 II 型胶原上的 T 和 B 细胞表位已经确定,同时,多种与免疫介导的关节炎相关的免疫学 (迟发型过敏反应和抗胶原蛋白抗体) 和炎症 (细胞因子、趋化因子和基质降解酶) 参数已经确定,并且可以应用于评定模型中测试化合物的效果。

[0215] 重症肌无力 (MG) 是可以得到其鼠模型的另一种自身免疫疾病。MG 是涉及产生针对烟碱乙酰胆碱受体 (AChR) 的自身抗体的神经肌肉传导疾病。MG 是获得性的或遗传性的,有着包括活动后异常乏力和疲劳的临床特征。MG 的鼠模型已经被确立。实验性自身免疫性重症肌无力 (EAMG) 是抗体介导的疾病,其特征在于针对 AChR 的抗体的存在。该抗体破坏受体,导致有缺陷的神经肌肉电脉冲,引起肌肉乏力。在 EAMG 模型中,用烟碱乙酰胆碱受体给鼠免疫。在第二次免疫后数周,MG 的临床征象变得明显。评价 EAMG 有若干方法,包括用放射免疫试验测定 AChR 抗体的血清水平、测定肌肉 AChR 或肌电描记术。

[0216] 通常,TACI- 免疫球蛋白蛋白质的给药剂量将依据像受治疗者的年龄、体重、身高、

性别、总体健康条件和既往的医疗历史这样的因素而不同。一般,理想的是提供在大约 1pg/kg 到 10mg/kg(药量/受治疗者体重)范围内的一定剂量的 TACI-免疫球蛋白蛋白质剂量给受治疗者,虽然依据情况也可以以较低或较高的剂量给药。

[0217] 对受治疗者进行 TACI-免疫球蛋白蛋白质给药可以是静脉内的、动脉内的、腹膜内的、肌肉内的、皮下的、胸膜内的、鞘内的、通过一个局部导管灌注、或病损内部直接注射。在以注射的方式给药治疗性的蛋白质时,可以以连续注入或者以单或多次的剂量给药。

[0218] 给药的其他途径包括口服的、粘膜、肺的和透皮的。口服给药适合于聚脂微球体 (microsphere)、玉米醇溶蛋白微球体、类蛋白质微球体、多氰基丙烯酸酯微球体以及基于脂质的系统(可参阅,例如,DiBase 和 Morrel,“Oral Delivery of Microencapsulated Proteins,”载于 Protein Delivery:Physical Systems, Sanders 和 Hendren(编辑),第 255-288 页(Plenum Press 1997))。通过像胰岛素给药的模式,说明了鼻内给药的可行性(可参阅,例如,Hinchcliffe 和 Illum, Adv. Drug Deliv. Rev. 35:199(1999))。包含 TACI-免疫球蛋白的干燥的或液体的颗粒,可以借助于干粉分散剂、液体气雾发生器、或喷雾器来制备和吸入。(例如:Pettit 和 Gombotz, TIBTECH 16:343(1998); Patton 等人, Adv. Drug. Deliv. Rev. 35:235(1999))。该方法由 AERX 糖尿病管理系统举例说明,它是一种将气雾状胰岛素送入肺中的手持电动吸入器。研究表明,借助于低频超声波,48,000kDa 大的蛋白质已经被以治疗浓度透皮递送,这证明了透皮给药的可行性(Mitragotri 等人, Science 269:850(1995))。通过电穿孔的透皮给药提供了另一种 TACI-免疫球蛋白蛋白质给药的方法(Potts 等人, Pharm. Biotechnol. 10:213(1997))。

[0219] 包含 TACI-免疫球蛋白蛋白质的药物组合物可以根据已知的制备药用的组合物的方法来配制,由此,治疗用的蛋白质与制药上可接受的载体以混合物的形式来组合。一种组分,如果它的给药可以被受治疗的患者所耐受,即被称为是“制药上可接受的载体”。无菌的磷酸缓冲盐溶液是制药上可接受的载体的一个实例。其它适合的载体为本技术领域中所众所周知。可参阅,例如,Gennaro(编辑),Remington's Pharmaceutical Sciences,第 19 版(Mack Publishing Company 1995)。

[0220] 为了治疗的目的,将 TACI-免疫球蛋白蛋白质以治疗有效量向患者给药。如果给药量在生理上有显著性,则 TACI-免疫球蛋白蛋白质和制药上可接受的载体被认为是以“治疗有效量”给药。如果其存在引起了在受治疗的患者生理方面可检测的变化,则该药物在生理上显著。例如,如果其存在减轻了炎症反应,则用于治疗炎症的药物是生理上显著的。作为另一个实例,如果该药剂的给药引起肿瘤数量上的减少、减少的转移、实体瘤尺寸减小、或肿瘤坏死增加,则用于抑制肿瘤细胞生长的药物是生理上显著的。此外,如果该药物的给药引起循环中抗双链 DNA 抗体的减少、或至少下述症状之一的减轻:发热、关节痛、红斑性皮肤损害、或系统性红斑狼疮的其它特征,则用于治疗系统性红斑狼疮的药物是生理上显著的。将 TACI-免疫球蛋白蛋白质以治疗有效量给药的通常的标志的一个实例是,在给受治疗的患者给药之后,ZTNF4(BLyS)的循环水平减少。

[0221] 包含 TACI-免疫球蛋白蛋白质的药物组合物可以以液体形式、气雾剂或固体形式提供。液体形式是以可注射的溶液和口服悬浮液为实例的。典型的固体形式包括胶囊、片剂以及可控制释放的形式。后一种形式是以微型渗透泵和植入物为实例的(Bremer 等人, Pharm. Biotechnol. 10:239(1997); Ranade,“Implants in Drug Delivery,”载于

Drug Delivery Systems, Ranade 和 Hollinger(编辑),第 95-123 页 (CRC Press 1995); Bremer 等人,“Protein Delivery with Infusion Pumps,” 载于 Protein Delivery: Physical Systems, Sanders 和 Hendren(编辑),第 239-254 页 (Plenum Press 1997); Yewey 等人,“Delivery of Protein from a Controlled Release Injectable Implant,” 载于 Protein Delivery: Physical Systems, Sanders 和 Hendren(编辑),第 93-117 页 (Plenum Press 1997)。

[0222] 脂质体提供了一种以静脉内、腹膜内、鞘内、肌内、皮下、或借助于口服给药、吸入、鼻内给药等方式,向受治疗的患者递送治疗用的多肽的方法。脂质体是细微的膜泡,它由一个或多个包围含水区室的脂双层组成(通常可参阅, Bakker-Woudenberg 等人, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12(Suppl. 1):S61(1993), Kim, Drugs 46:618(1993), 以及 Ranade,“Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers,” 载于 Drug Delivery Systems, Ranade 和 Hollinger(编辑),第 3-24 页 (CRC Press 1995))。脂质体在成分上类似于细胞膜,因此,脂质体可以被安全地给药,同时是可生物降解的。根据制备方法,脂质体可以是单层或多层的,脂质体的直径尺寸变化可以从  $0.02\ \mu\text{m}$  到大于  $10\ \mu\text{m}$ 。多种药剂可以用脂质体封装:疏水药剂部分用双分子层,而亲水部分在内部含水的区域内(可参阅,例如, Machy 等人, Liposomes In Cell Biology And Pharmacology (John Libbey 1987), 和 Ostro 等人, American J. Hosp. Pharm. 46:1576(1989))。此外,通过脂质体尺寸、分子层数、脂质组分、以及脂质体电荷和表面特征的变化,有可能控制封装的药物的治疗有效性。

[0223] 脂质体实际上可以被任何类型的细胞吸收,然后缓慢地释放所封装的药物。或者,被吸收的脂质体可以被吞噬细胞吞噬。胞吞继之以脂质体脂质的被内容酶体降解和封装药剂的释放 (Scherphof 等人, Ann. N. Y. Acad. Sci. 446:368(1985))。静脉内给药后,小的脂质体 ( $0.1$  到  $1.0\ \mu\text{m}$ ) 一般被主要位于肝和脾的网状内皮系统的细胞吸收,而大于  $3.0\ \mu\text{m}$  的脂质体在肺部沉积。这种小的脂质体被网状内皮系统细胞的优先吸收已经被用于向巨噬细胞和肝部肿瘤递送化疗药剂。

[0224] 网状内皮系统可以通过若干方法被避开,包括:以大剂量的脂质体颗粒使之饱和、或者用药理学的方法选择性失活巨噬细胞 (Claassen 等人, Biochim. Biophys. Acta 802:428(1984))。另外,将糖脂或聚乙二醇衍生的磷脂加入脂质体膜已经显示出导致了显著地减少的网状内皮系统的吸收 (Allen 等人, Biochim. Biophys. Acta 1068:133(1991); Allen 等人, Biochim. Biophys. Acta 1150:9(1993))。

[0225] 脂质体也可以通过改变磷脂组成或者在脂质体中插入受体或配体来被制备出来,以靶向特定细胞或器官。例如:用高含量的非离子型表面活性剂制备的脂质体已经用于靶向肝 (Hayakawa 等人, 日本专利 04-244,018; Kato 等人, Biol. Pharm. Bull. 16:960(1993))。该剂型是通过在甲醇中混合大豆磷脂酰胆碱、 $\alpha$ -维生素 E 和乙氧基化氢化的蓖麻油 (HCO-60),在真空下浓缩混合物,之后用水重组而制备。二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 与大豆衍生的 sterylglucoside 混合物 (SG) 和胆固醇 (Ch) 的脂质体剂型也已经表明靶向肝 (Shimizu 等人, Biol. Pharm. Bull. 20:881(1997))。

[0226] 或者,可以将多种靶向配体结合到脂质体表面,例如:抗体、抗体片段、碳水化合物、维生素和转运蛋白质。例如,可以将脂质体用分枝型半乳糖脂质衍生物来修饰,以靶向

脱唾液酸糖蛋白（半乳糖）受体,该受体专门在肝细胞表面表达 (Kato 和 Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14 :287(1997) ;Murahashi 等人, Biol. Pharm. Bull. 20 :259(1997))。同样, Wu 等人在 Hepatology 27 :772(1998) 上已经表明,用脱唾液酸胎球蛋白标记的脂质体导致缩短了的脂质体血浆半衰期和较大地增强了的肝细胞对脱唾液酸胎球蛋白标记的脂质体的吸收。另一方面,含分支型半乳糖脂衍生物的脂质体的肝部积累可被预注射的脱唾液酸胎球蛋白抑制 (Murahashi 等人, Biol. Pharm. Bull. 20 :259(1997))。多顺乌头酸化的人血清白蛋白脂质体提供了另一种使脂质体靶向肝的方法 (Kamps 等人, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 94 :11681(1997))。此外, Geho 等人在美国专利 No. 4, 603, 044 叙述了定向于肝细胞的脂质体小泡递送系统,它具有对与肝的特异性代谢细胞相关的肝胆受体的特异性。

[0227] 在组织靶向的更普通的方法中,靶细胞被用对靶细胞表达的配体特异的生物素化的抗体预先标记 (Harasym 等人, Adv. Drug Deliv. Rev. 32 :99(1998))。在血浆消除游离抗体后,施用缀合链霉抗生素的脂质体。在另一种方法中,靶向抗体被直接附着在脂质体上 (Harasym 等人, Adv. Drug Deliv. Rev. 32 :99(1998))。

[0228] 可以采用标准的蛋白质微量封装技术,将 TACI- 免疫球蛋白蛋白质封装在脂质体内 (可参阅,例如, Anderson 等人, Infect. Immun. 31 :1099(1981), Anderson 等人, Cancer Res. 50 :1853(1990), 和 Cohen 等人, Biochim. Biophys. Acta 1063 :95(1991), Alving 等人 "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," 载于 Liposome Technology, 第2版, Vol. III, Gregoriadis (编辑), 第317页 (CRC Press 1993), Wassef 等人, Meth. Enzymol. 149 :124(1987))。如上所述,治疗用的脂质体可以含有多种组分。例如,脂质体可以包含聚(乙二醇)的脂质衍生物 (Allen 等人, Biochim. Biophys. Acta 1150 :9(1993))。

[0229] 可降解的聚合物微球体已经被设计成可保持治疗性蛋白质的高的系统水平。微球体用降解的聚合物制备,例如,(丙交酯乙交酯)共聚物 (PLG)、聚酞类、聚(原酯)、不可生物降解的乙基乙烯基乙酸酯聚合物,其中蛋白质被包在聚合物中 (Gombotz 和 Pettit, Bioconjugate Chem. 6 :332(1995) ;Ranade, "Role of Polymer in Drug Delivery," 载于 Drug Delivery Systems, Ranade 和 Hollinger (编辑), 第51-93页 (CRC Press 1995) ;Roskos 和 Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," 载于 Protein Delivery :Physical Systems, Sanders 和 Hendren (编辑), 第45-92页 (Plenum Press 1997) ;Bartus 等人, Sciences 281 :1161(1998) ;Putney 和 Burke, Nature Biotechnology 16 :153(1998) ;Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2 :548(1998))。包有聚乙二醇 (PEG) 的毫微球体也可以为治疗用蛋白质静脉给药提供载体 (可参阅,例如, Gref 等人, Pharm. Biotechnol. 10 :167(1997))。

[0230] 如上面所讨论的,本发明也设想了化学修饰的 TACI- 免疫球蛋白蛋白质,其中多肽与聚合物连接。

[0231] 其它给药形式可以由本领域的技术人员设计,如,例如, Ansel 和 Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第5版 (Lea & Febiger 1990)、Gennaro (编辑), Remington's Pharmaceutical Sciences, 第19版 (Mack Publishing Company 1995)、以及 Ranade 和 Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press

1996) 所示。

[0232] 作为实例,药物组合物可以包括容器的试剂盒来供应,该容器包含 TACI- 免疫球蛋白蛋白质。治疗用多肽可以一次或多次剂量的可注射溶液形式,或者以在注射前重配制的无菌粉末的形式来提供。或者,上述试剂盒可以包括用于将治疗性多肽给药的干粉分散剂、液体气雾发生器或喷雾器。上述试剂盒可以进一步包含关于药物组合物的适应证和用法的书面的信息。此外,上述信息可以包括一个声明,即 TACI- 免疫球蛋白蛋白质组合物在已知对 TACI 部分或者对免疫球蛋白部分过敏的患者中禁忌。

[0233] 9. TACI 免疫球蛋白核苷酸序列的治疗应用

[0234] 本发明包括编码 TACI 免疫球蛋白融合蛋白质的核酸分子的应用,以给需要上述治疗的受治疗者提供该融合蛋白质。如上面所讨论的,为了兽医治疗应用或人的治疗应用,可以将该核酸分子给有病症或疾病的受治疗者用药。正如在前面一个实例所讨论的,编码 TACI 免疫球蛋白融合蛋白质的核酸分子可以应用于系统性红斑狼疮的长期治疗。

[0235] 有许多给受治疗者引入 TACI 免疫球蛋白基因的方法,包括:表达 TACI 免疫球蛋白的重组宿主细胞的应用、编码 TACI 免疫球蛋白的裸核酸的递送、阳离子脂质载体与编码 TACI 免疫球蛋白的核酸分子一起的应用、以及表达 TACI 免疫球蛋白的病毒的应用,例如重组逆转录病毒、重组腺伴随病毒、重组腺病毒、重组单纯疱疹病毒(可参阅,例如, Mulligan, *Science* 260 :926(1993), Rosenberg 等人, *Science* 242 :1575(1988), LaSalle 等人, *Science* 259 :988(1993), Wolff 等人, *Science* 247 :1465(1990), Breakfield 和 Deluca, *The New Biologist* 3 :203(1991))。在离体的方法中,例如,从受治疗者分离细胞,用表达 TACI 免疫球蛋白基因的载体转染,之后植入到受者中。

[0236] 为了实现 TACI 免疫球蛋白基因的表达,表达载体被构建出来,其中编码 TACI 免疫球蛋白基因的核苷酸序列被与核心启动子可操作地连接,并且可选择与调节元件连接,以控制基因转录。以上叙述了表达载体的一般要求。

[0237] 或者, TACI 免疫球蛋白基因可以用重组病毒载体来递送,包括例如:腺病毒载体(例如, Kass-Eisler 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90 :11498(1993), Kolls 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91 :215(1994), Li 等人, *Hum. Gene Ther.* 4 :403(1993), Vincent 等人, *Nat. Genet.* 5 :130(1993), 以及 Zabner 等人, *Cell* 75 :207(1993))、腺伴随病毒载体(Flotte 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90 :10613(1993))、 $\alpha$  病毒,如 Semliki Forest 病毒和 Sindbis 病毒(Hertz 和 Huang, *J. Vir.* 66 :857(1992), Raju 和 Huang, *J. Vir.* 65 :2501(1991), 以及 Xiong 等人, *Science* 243 :1188(1989))、疱疹病毒载体(例如:美国专利 Nos. 4, 769, 331、4, 859, 587、5, 288, 641 和 5, 328, 688)、细小病毒载体(Koering 等人, *Hum. Gene Therap.* 5 :457(1994))、痘病毒载体(Ozaki 等人, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193 :653(1993), Panicali 和 Paoletti, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 79 :4927(1982))、痘病毒,如金丝雀痘病毒或牛痘病毒(Fisher-Hoch 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86 :317(1989), 和 Flexner 等人, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 569 :86(1989))、以及逆转录病毒(例如: Baba 等人, *J. Neurosurg* 79 :729(1993), Ram 等人, *Cancer Res.* 53 :83(1993), Takamiya 等人, *J. Neurosci. Res.* 33 :493(1992), Vile 和 Hart, *Cancer Res.* 53 :962(1993), Vile 和 Hart, *Cancer Res.* 53 :3860(1993), 以及 Anderson 等人, 美国专利 No. 5, 399, 346)。在不同的实施方案里,含有病毒载体的病毒载体本身,或者病毒颗粒,可以在如下面叙述的方法和

组合物中应用。

[0238] 作为一个系统的说明,腺病毒,即一种双链 DNA 病毒,用于异源核酸分子的递送是被详细表征的基因转移载体。(对于综述可参阅 Becker 等人, *Meth. Cell Biol.* 43 : 161(1994); Douglas 和 Curiel, *Science & Medicine* 4 :44(1997))。腺病毒系统提供若干优点,包括:(i) 接纳相对较大 DNA 的插入片段的能力,(ii) 生长至高滴度的能力,(iii) 感染较大范围的哺乳动物细胞类型的能力,以及 (iv) 与许多不同的启动子一起使用的能力,包括:普遍存在的、组织特异性的、和可调节的启动子。另外,可以将腺病毒通过静脉内注射给药,因为该病毒在血流中稳定。

[0239] 使用部分腺病毒基因组已缺失的腺病毒载体,插入片断是通过直接连接反应或用共转染质粒同源重组的方法被合并到病毒 DNA 中的。在典型的系统中,必须的 E1 基因被从病毒载体中缺失,并且除非宿主细胞提供 E1 基因,否则病毒不能复制。当从静脉内向未治疗的动物给药时,腺病毒主要靶向肝。虽然已缺失 E1 基因的腺病毒递送系统在宿主细胞中不能复制,但是宿主的组织将表达和加工被编码的异源基因。如果相应的基因包括分泌信号序列,宿主细胞也将分泌异源蛋白质。分泌的蛋白质将从表达异源基因的组织(例如:高度血管化的肝)进入循环。

[0240] 此外,含有各种病毒基因缺失的腺病毒载体可以用于减少或消除针对载体的免疫应答。上述腺病毒的 E1 已缺失,另外,包括 E2A 或 E4 的缺失(Lusky 等人, *J. Virol.* 72 : 2022(1998); Raper 等人, *Human Gene Therapy* 9 :671(1998))。E2b 的缺失减少免疫应答也已经有报道(Amalfitano 等人, *J. Virol.* 72 :926(1998))。通过删除整个腺病毒的基因组,可以接受很大的异源 DNA 的插入物。全部病毒基因已被缺失的被称为“gutless”腺病毒的后代,对于大的异源 DNA 插入物的插入尤其有利(对于综述,可参阅 Yeh. 和 Perricaudet, *FASEB J.* 11 :615(1997))。

[0241] 能够表达治疗基因的重组病毒的高滴度的母株可以采用标准方法从受感染哺乳动物细胞获得。例如:重组单纯疱疹病毒可以用 Vero 细胞制备,如以下文献所述:Brandt 等人, *J. Gen. Virol.* 72 :2043(1991), Herold 等人, *J. Gen. Virol.* 75 :1211(1994), Visalli 和 Brandt, *Virology* 185 :419(1991), Grau 等人, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30 : 2474(1989), Brandt 等人, *J. Virol. Meth.* 36 :209(1992), 以及 Brown 和 MacLean(编辑), *HSV Virus Protocols*(Humana Press1997)。

[0242] 或者,可以将包含 TACI 免疫球蛋白基因的表达载体,用脂质体通过体内脂质转染法引入到受治疗者细胞中。合成阳离子脂质可以应用于制备脂质体用于在体内转染的编码标记的基因(Felgner 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 84 :7413(1987); Mackey 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 85 :8027(1988))。在体内将外源基因引入到特定器官的脂质转染法的应用具有某些实用的优点。脂质体可以用于导向对特定细胞类型的转染,它对于有细胞异质性的组织尤其有利,例如:胰、肝、肾和脑。脂质可以与为了定向目的的其他分子化学偶联。靶肽(例如:激素或神经递质)、蛋白质,如抗体,或非肽分子,可以与脂质体化学偶联。

[0243] 电穿孔是另一种可选择的给药模式。例如:Aihara 和 Miyazaki, *Nature Biotechnology* 16 :867(1998),已经说明了在体内为使基因转移到肌肉的电穿孔的应用。

[0244] 通常,包含具有 TACI 免疫球蛋白核苷酸序列(如重组病毒)的治疗载体的组合

物的剂量,将依据受治疗者的年龄、体重、身高、性别、总体的健康状况和既往的医疗历史这样的因素而不同。适合的治疗载体给药途径包括静脉内注射、动脉内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、肿瘤内注射以及注射到含肿瘤的腔隙内。作为实例, Horton 等人, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 96 :1553 (1999), 说明了在鼠模型中, 编码  $\alpha$ -干扰素的质粒 DNA 的肌肉内注射对于原发性和转移性肿瘤产生有效的抗肿瘤效应。

[0245] 包含本发明的病毒载体、非病毒载体、或者病毒载体和非病毒载体之组合的组合物, 可以根据已知的制备药用的组合物的方法配制, 由此, 载体或病毒与制药上可接受的载体以混合物的形式组合。如上所述, 一种组分, 如磷酸缓冲盐水, 如果它的给药可以被受治疗的患者所耐受, 即被称为是“制药上可接受的载体”。其它适合的载体为本技术领域众所周知。(可参阅, 例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 19 版 (Mack Publishing Company 1995), 和 Gilman's the Pharmaceutical Basis of Therapeutics 第 7 版 (Mac Millan Publishing Company 1998))。

[0246] 为了治疗的目的, 将治疗用的基因表达载体或者包含上述载体和制药上可接受的载体的重组病毒, 以治疗有效量向患者给药。如果给药量在生理上显著的, 则表达载体 (或病毒) 和制药上可接受的载体的组合物被认为是以“治疗有效量”给药的。如果它的存在引起了在受治疗的患者生理方面可检测的变化, 则药物在生理上显著。例如, 如果它的存在减轻了炎症反应, 则用于治疗炎症的药剂是生理上显著。作为另一个实例, 如果该药剂的给药引起在肿瘤数量上减少、减少转移、实体瘤尺寸减小、或肿瘤坏死增加, 则用于抑制肿瘤细胞生长的药物在生理上显著。

[0247] 当用治疗用的基因表达载体或者重组病毒治疗的对象是人时, 那么, 该治疗优选为体细胞基因治疗。也就是说, 用治疗性基因表达载体或者重组病毒治疗人时, 优选不必需将核酸分子引入到可成为人生殖细胞系的一部分并被传递到相继的世代的细胞中 (例如: 人生殖细胞系的基因治疗)。

[0248] 10. 转基因小鼠的生产

[0249] 转基因鼠可以被遗传改造为在所有组织或者在组织特异的或组织优选的调节元件控制下过度表达编码 TACI 免疫球蛋白融合蛋白质的核酸序列。该 TACI 免疫球蛋白融合蛋白质的过度产生者可以用来表征由过度表达引起的表型, 并且转基因动物可以作为由过量的 TACI 受体蛋白质引起的人类疾病的模型之用。过度表达 TACI 免疫球蛋白融合蛋白质的转基因鼠也为在大动物的奶或血中生产 TACI 免疫球蛋白融合蛋白质提供了模型生物反应器。生产转基因鼠的方法对于本领域的技术人员是众所周知的 (可参阅, 例如, Jacob, “Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice,” 载于 Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice, Jacob (编辑), 第 111-124 页 (Academic Press, Ltd. 1994), Monastersky 和 Robl (编辑), Strategies in Transgenic Animal Science (ASM Press 1995), 以及 Abbud 和 Nilson, “Recombinant Protein Expression in Transgenic Mice,” 载于 Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression, Fernandez 和 Hoeffler (编辑), 第 367-397 页 (Academic Press, Ltd. 1999))。

[0250] 例如, 生产表达编码 TACI 免疫球蛋白融合蛋白质的核酸序列的转基因鼠的方法, 可以从成熟的可育雄鼠 (种鼠) (B6C3f1, 2 到 8 月龄 (Taconic Farms, Germantown, NY))、

切除输精管的雄鼠（不育鼠）(B6D2f1,2 到 8 月 (Taconic Farms))、性成熟前的可育雌鼠（供体）(B6C3f1,4 到 5 周 (Taconic Farms)) 和成熟的可育雌鼠（受体）(B6D2f1,2 到 4 月 (Taconic Farms)) 开始。将供体驯化一周,然后注射 Pregnant Mare 血清促性腺激素 (SigmaChemical Company ;St.Louis, MO) I.P. 大约 8 IU/ 鼠,46-47 小时后,注射人绒毛膜促性腺激素 (hCG(Sigma)) I.P. 8 IU/ 鼠,以引起超量排卵。在激素注射之后让供体与种鼠交配。排卵通常在 hCG 注射 13 小时内发生。交配是通过交配以后的早晨阴道塞的存在来得到确认的。

[0251] 受精卵在解剖镜下被采集。将输卵管采集起来,并且将卵放置在含有透明质酸酶 (Sigma) 的尿液分析的载玻片中。将卵在透明质酸酶中洗涤一次,再在已经用 5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub> 和 90% N<sub>2</sub> 在 37°C 孵化过的 Whitten's W640 培养基中洗涤两次 (详述见,例如 :Menino 和 O' Claray, Biol. Reprod. 77 :159 (1986),以及 Dienhart 和 Downs, Zygote 4 :129 (1996))。之后将卵储存在 37°C /5% CO<sub>2</sub> 的孵化器中直到显微注射。

[0252] 将十到二十微克含有编码 TAC1 免疫球蛋白融合蛋白质序列的质粒 DNA 线性化、凝胶纯化、并且在 10mM Tris-HCl (pH 值 7.4)、0.25mM EDTA (pH 值 8.0) 中重悬浮,以每微升 5 到 10 毫微克的最终浓度进行显微注射。例如,编码 TAC1 免疫球蛋白融合蛋白质的序列可以编码具有 SEQ ID NO :2 氨基酸残基 1 到 29 和 111 到 154 的缺失和 Fc 免疫球蛋白部分的 TAC1 多肽。

[0253] 将质粒 DNA 显微注射到装在一滴用温的 CO<sub>2</sub> 平衡的矿物油覆盖的 W640 培养基中的收获的卵中。将 DNA 吸入到注射针中 (从 0.75mm ID、1mm OD 硼硅酸盐毛细玻璃管拉成的),注射到单个卵中。用注射针将每一个卵穿透,进入到一个或两个单倍体原核中。

[0254] 皮升 (picoliter) 的 DNA 被注射到原核中,不与核仁接触便将注射针抽回。重复该程序直到全部卵被注射为止。将成功地显微注射的卵转移到有预先排气的 W640 培养基的器官组织培养盘中,以在 37°C /5% CO<sub>2</sub> 的孵化器中过夜储存。

[0255] 第二天,将二细胞胚胎转移到假妊娠受体中。在与切除输精管的不能繁殖的鼠交配之后,通过阴道塞的存在对受体进行鉴定。将受体麻醉,在背部左侧剃毛,并且被转移到解剖显微镜下。在皮肤上切一个小切口,穿过位于膝和脾中间的以胸廓、鞍部、和后腿为界的腹部区域中央的肌肉壁。使生殖器官暴露在小手术单之上。将脂肪垫在手术单上伸出,并将小型弹簧镊 (Roboz, Rockville) 固定于脂肪垫上,悬挂于鼠的背部上,防止器官滑动回去。

[0256] 用含矿物油及随后的交替的 W640 和气泡的细移液管,将 12 到 17 个健康的由前几天注射得到的二细胞胚胎转移到受体中。定位肿胀的壶腹,并且在壶腹和囊之间固定输卵管,用 28g 针在接近囊处在输卵管上做一个切口,确认没有弄破壶腹或囊。

[0257] 将移液管转移到输卵管的切口中,将胚胎吹入,允许第一个气泡排出移液管。将脂肪垫缓慢推进腹膜,并让生殖器官滑入。用线缝合腹膜壁,并用伤口夹闭合皮肤。让鼠在 37°C 滑动加热器上恢复最少 4 小时。

[0258] 让受体成对地返回笼中,并且允许其 19-21 天的妊娠。生育后,断奶前产后的 19-21 天是允许的。区分刚断奶小鼠的性别,然后放入分性别的笼中,用清洁剪刀剪去尾部 0.5cm 活体解剖 (用于基因型分析)。

[0259] 用例如 QIAGEN DNEASY 试剂盒按照制造商的说明书,从尾部剪下的小块来制备基

基因组 DNA。通过 PCR 分析基因组 DNA, 该 PCR 是采用为扩增编码 TAC1 免疫球蛋白融合蛋白质的核酸序列或扩增被引入相同质粒的可选择的标记基因而设计的引物。在确认动物是转基因的之后, 通过将转基因雌鼠与野生型雄鼠, 或者转基因雄鼠与一只或两只野生型雌鼠放在一起, 让它们与近亲繁殖的品系杂交。当幼鼠出生并断奶时, 其性别被分开, 并且为了基因型分析将其尾部剪去。

[0260] 为了在活的动物中进行转基因表达的检查, 进行了部分肝切除。在紧接着剑突下的上腹部进行外科手术准备。采用无菌操作, 在胸骨以下做一个 1.5 到 2cm 的小切口, 使肝的左外叶露出。用 4-0 丝线, 围绕下部的肝叶打一个结, 将其固定在体腔外。当可吸收的 Dexon (American Cyanamid ;Wayne, N. J.) 的第二个环被放在第一个结的近端时, 用无创钳夹住该结。从 Dexon 结的远端切割, 大约 100mg 切除的肝组织被置于无菌培养皿中。将切除的肝的切片转移到 14ml 聚丙烯圆底试管中并且立即在液氮中冷冻, 然后, 在干冰上储存。用缝线和伤口夹将手术部位闭合, 手术后, 将动物笼置于 37°C 加热垫上 24 小时。手术后每天对动物进行检查, 手术后 7 到 10 天将伤口夹去除。为每只转基因鼠用 RNA 溶液杂交试验或者聚合酶链反应检测 TAC1 免疫球蛋白融合蛋白质 mRNA 的表达水平。

[0261] 采用上述的常规方法, 在奶中表达显著水平的 TAC1 免疫球蛋白融合蛋白质的转基因鼠已被生产出来。在这种独特的情况下, 编码 TAC1 免疫球蛋白融合蛋白质的序列编码了带有 SEQ ID NO :2 氨基酸残基 1 到 29 和 111 到 154 缺失和 Fc 免疫球蛋白部分的 TAC1 多肽。

[0262] 像通常叙述的一样, 通过参考下述以实施例的方式提供的实施例将使本发明更容易被理解, 但是这不能作为对本发明的限制。

[0263] 实施例 1

[0264] 编码 TAC1-Fc 蛋白质的核酸分子的构建

[0265] 如 Gross 等人, Nature 404 :995 (2000) 所述的, 编码人的 TAC1 的核酸分子在 ZTNF4 的受体克隆的表达时获得。采用标准技术, 通过重叠 PDR, 产生出包含在 TAC1-Fc 表达构建体中的编码序列 (参阅, 例如 :Horton 等人, Gene 77 :61 (1989))。人的 TAC1 cDNA 和 Fc cDNA 被作为 PCR 扩增的起动模板来使用。PCR 引物被设计出以生产想要的编码序列的 5' 和 3' 端, 并且引入限制酶识别位点以便于该编码序列插入到表达载体中。将 TAC1-Fc 编码序列插入到包括鼠功能性的二氢叶酸还原酶基因的表达载体中。一种表达载体也包含引导重组蛋白质转基因的表达的巨细胞病毒启动子、免疫球蛋白内含子、组织纤溶酶原激活蛋白的信号序列、内部核糖体进入序列、用于表面选择转染的细胞的被缺失了的 CD8 顺反子、以及用于在酵母细胞中生长质粒的酵母表达元件。

[0266] 用于生产 TAC1-Fc 融合蛋白质的一种方法是通过用于构建 TAC1-Fc4 的方法来说明的。其它的 TAC1-Fc 融合蛋白质是通过将编码 TAC1-Fc 融合蛋白质的核苷酸序列插入到哺乳动物表达载体中, 然后将该表达载体引入到哺乳动物细胞中来生产。

[0267] A. Ig  $\gamma$  1 Fc4 片段的构建

[0268] 为制备 TAC1-Fc4 融合蛋白质, 将人的 IgG1 的 Fc 区 (铰链区和 C<sub>H2</sub> 和 C<sub>H3</sub> 结构域) 修饰, 以去除 Ig  $\gamma$  1 受体 (Fc  $\gamma$  RI) 和补体 (C1q) 结合功能。人的 IgG1 Fc 的该修饰版本被指定为 "Fc4"。

[0269] 使用寡引物 5' ATCAGCGGAA TTCAGATCTT CAGACAAAAC TCACACATGCCAC 3' (SEQ ID

NO:7) 和 5' GGCAGTCTCT AGATCATTTA CCCGGAG ACAGGG AG 3' (SEQ ID NO:8) 采用 PCR, 将 Fc 区从人的胎儿肝的文库 (Clontech) 中分离。用 PCR 引起 Fc 区内的突变, 以降低 Fc  $\gamma$  RI 的结合。将 Fc  $\gamma$  RI 结合位点 (Leu-Leu-Gly-Gly; SEQ ID NO:6 的氨基酸残基 38 到 40, 它相当于 EU 索引位置 234 到 237) 突变为 Ala-Glu-Gly-Ala, 以降低 Fc  $\gamma$  RI 的结合 (参阅, 例如: Duncan 等人, Nature 332:563(1988); Baum 等人, EMBO J. 13:3992(1994))。寡核苷酸引物 5' CCGTGCCAG CACCTGAAGC CGAGGGGCA CCGTCAGTCT TCCTCTCCC C 3' (SEQ ID NO:9) 和 5' GGATTCTAGA TTATTTACCC GGAGACAGGG A3' (SEQ ID NO:10) 被应用以引起该突变。向 50  $\mu$  l 的最终体积中加入 IgFc 模板 570 ng、10x Pfu 反应缓冲液 (Stratagene) 5  $\mu$  l、1.25mM dNTPs 8  $\mu$  l、蒸馏水 31  $\mu$  l、20mM 寡核苷酸引物 2  $\mu$  l。将相等体积的矿物油加入, 将反应加热到 94°C 持续 1 分钟。将 Pfu 聚合酶 (2.5 单位, Stratagene) 加入继而进行 25 个循环的在 94°C 持续 30 秒钟, 55°C 持续 30 秒钟, 72°C 持续 1 分钟, 接着在 72°C 延伸反应 7 分钟。用电泳将反应产物分离, 将与预测尺寸相对应的大约 676 个碱基对的条带检出。从凝胶上将该条带切断, 并且使用 QIAGEN QIAquick™ Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen) 根据制造商的说明书进行回收。

[0270] PCR 也被用于引起 Ala 到 Ser (SEQ ID NO:6 的氨基酸残基 134, 它相当于 EU 索引位置 330) 和 Pro 到 Ser (SEQ ID NO:6 的氨基酸残基 135, 它相当于 EU 索引位置 331) 的突变, 以降低补体 C1q 的结合或补体的固定 (Duncan 和 Winter, Nature 332:788(1988))。作为模板使用 Fc  $\gamma$  RI 结合位点突变的 IgFc 序列进行两次第一轮的反应。向 50  $\mu$  l 的最终体积中加入 Fc  $\gamma$  RI 结合位点突变的 IgFc 模板 1  $\mu$  l、10x Pfu 反应缓冲液 (Stratagene) 5  $\mu$  l、1.25mM dNTPs 8  $\mu$  l、蒸馏水 31  $\mu$  l、2  $\mu$  l 的 20mM 5' GGTGGCGGCT CCCAGATGGG TCCTGTCCGAG CCCA GATCT TCA GACAAAA CTCAC 3' (SEQ ID NO:11), 即在 SEQ ID NO:5 的核苷酸 36 开始的 5' 引物、以及 2  $\mu$  l 的 20mM 5' TGGGAGGGCTTTGTTGGA 3' (SEQ ID NO:12), 即在 SEQ ID NO:5 的核苷酸 405 互补体开始的 3' 引物。第二反应含有各 2  $\mu$  l 的 20mM 的贮液寡核苷酸引物 5' TCCAACAAAG CCCTCCCATC CTCCATCGAG AAAACCATCTCC 3' (SEQ ID NO:13), 即在 SEQ ID NO:5 的核苷酸 388 开始的 5' 引物和 5' GGATGG ATCC ATGAAGCACC TGT GGTCTT CCTCCTGCTG GTGGCGGCTCCCAGATG 3' (SEQ ID NO:14), 即 3' 引物的原料, 以引起 Ala 到 Ser 的突变, XbaI 限制性位点和终止密码子。将相等体积的矿物油加入, 将反应加热到 94°C 持续 1 分钟。将 Pfu 聚合酶 (2.5 单位, Stratagene) 加入继而进行 25 个循环的在 94°C 持续 30 秒钟, 55°C 持续 30 秒钟, 72°C 持续 2 分钟, 接着在 72°C 延伸反应 7 分钟。用电泳将反应产物分离, 并将分别与预测尺寸相对应的大约 370 个和大约 395 个碱基对的条带检测出来。从凝胶中将该条带切出, 并且使用 QIAGEN QIAquick™ Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen) 根据制造商的说明书进行提取。

[0271] 为连接上述片段, 并且加入 5' BamHI 限制性位点和来自人免疫球蛋白 JBL 2' C<sub>L</sub> 重链可变区的信号序列, 进行第二轮反应, (Cogne 等人, Eur. J. Immunol. 18:1485(1988))。向 50  $\mu$  l 的最终体积中加入 30  $\mu$  l 蒸馏水、8  $\mu$  l 1.25mM dNTPs、5  $\mu$  l 10x Pfu 反应缓冲液 (Stratagene) 以及两种第一次的两个 PCR 反应的产物各 1  $\mu$  l。将相等体积的矿物油加入, 将反应加热到 94°C 持续 1 分钟。将 Pfu 聚合酶 (2.5 单位, 层聚基因) 加入继而进行 5 个循环的在 94°C 持续 30 秒钟, 55°C 持续 30 秒钟, 72°C 持续 2 分钟。再次升温到 94°C, 并且将各 2  $\mu$  l 的 20mM 贮液的寡核苷酸引物 5' GGATGGATCC ATGAAGCACCTGTGGTTCTT CCTCCTGCTG

GTGGCGG CTC CCAGATG 3' (SEQ ID NO:14),即在 SEQ ID NO:5 的核苷酸 1 开始的 5' 引物和 5' GGATTCTAGATTATTTACCC GGAGACAGGGA 3' (SEQ ID NO:10) 加入,继而进行 25 个循环的在 94°C 持续 30 秒钟,55°C 持续 30 秒钟,72°C 持续 2 分钟,最后在 72°C 延伸反应 7 分钟。采用凝胶电泳将反应部分显影。将与预测尺寸相对应的 789 个碱基对的条带检测出。

#### [0272] B. TACI-Fc4 表达载体的构建

[0273] 借助于在酵母中的同源重组,构建包含 TACI-Fc4 融合蛋白质编码区的表达质粒。采用 PCR 分离 TACI 的 cDNA 片段,它包括 SEQ ID NO:1 从核苷酸 14 到核苷酸 475 的多核苷酸序列。在 TACI 片段的生产中使用的两种引物是:(1) 含有 5' 载体侧翼序列的 40 个碱基对和与 TACI 片段氨基末端相对应的 17 个碱基对的引物 (5' C TCAGCCAGG AAATCCATGC CGAGTTGAGA CGCTTCCGTA GAATGAGTGG CCTGGGCCG 3';SEQ ID NO:15);(2) 与侧翼 Fc4 序列相对应的 3' 端的 40 个碱基对和与 TACI 片段羧基末端相对应的 17 个碱基对 (5' GCATGTGTGA GTTTTGTCTGAAGATCTGGG CTCCTTCAGC CCCGGGAG 3';SEQ ID NO:16)。向 100  $\mu$ l 的最终体积中加入 TACI 模板 10ng、10x Taq 聚合酶反应缓冲物 (PerkinElmer) 10  $\mu$ l、2.5nM dNTPs 8  $\mu$ l、蒸馏水 78  $\mu$ l、20mM 寡核苷酸引物贮液各 2  $\mu$ l 和 Taq 聚合酶 (2.5 单位, Life Technology)。将相等体积的矿物油加入,将反应加热到 94°C 持续 2 分钟,继而进行 25 个循环的在 94°C 持续 30 秒钟,65°C 持续 30 秒钟,65°C 持续 30 秒钟,72°C 持续 1 分钟,接着在 72°C 延伸反应 5 分钟。

[0274] 用相似的方法将包含 cDNA 编码 Fc4 片段的片段构建。在 Fc4 片段生产中使用的两种引物是 (上游和下游),含有 5' TACI 侧翼序列的 40 个碱基对和与 Fc4 片段氨基末端相对应的 17 个碱基对的寡核苷酸引物 (5' GCA CAG AGGC TCAGAAGCAA GTCCAGCTCT CCCGGGGCTGAAGGAGCCCA GATCTTCAGA3';SEQ ID NO:17);和含有与侧翼载体序列相对应的 3' 端的 40 个碱基对和与 Fc4 片段羧基末端相对应的 17 个碱基对的寡核苷酸引物 (5' GGGGTGGGTA CAACCCAGAG GCTGTTTTAATCTAGATTAT TTACCCGGAG ACAGGG 3';SEQ ID NO:18)。向 100  $\mu$ l 的最终体积中如上所述的 Fc4 模板 10ng、10x Taq 聚合酶反应缓冲液 (Perkin Elmer) 10  $\mu$ l、2.5nM dNTPs 8  $\mu$ l、蒸馏水 78  $\mu$ l、20mM 寡核苷酸贮液各 2  $\mu$ l 和 Taq 聚合酶 (2.5 单位, LifeTechnology)。将相等体积的矿物油加入,将反应加热到 94°C 持续 2 分钟,继而进行 25 个循环的在 94°C 持续 30 秒钟,65°C 持续 30 秒钟,72°C 持续 1 分钟,接着在 72°C 延伸反应 5 分钟。

[0275] 为了分析,10 微升的如上所述的各 100  $\mu$ l 的 PCR 反应物与 1xTBE 缓冲液一起在 0.8% LMP 琼脂糖凝胶上 (Seaplaque GTG) 跑电泳。将剩余的 90  $\mu$ l 各种 PCR 反应物用添加的 1M 氯化钠 5  $\mu$ l 和无水乙醇沉淀。用 SmaI 切割质粒 pZMP6,使之在多连接位点直线化。质粒 pZMP6 来自于质粒 pCZR199 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, ATCC#98668),是哺乳动物表达载体,它含有具有巨细胞病毒立即早期启动子的表达盒、来自鼠免疫球蛋白重链基因座的可变区的一致 (consensus) 内含子、用于编码序列插入的多个限制位点、终止密码子和人的生长激素的终止子。质粒还具有大肠杆菌的复制原点、带 SV40 启动子的哺乳动物可选择标记表达单位、增强子和复制的原点、二氢叶酸还原酶基因和 SV40 终止子。载体 pZMP6 通过用巨细胞病毒立即早期启动子替换金属硫蛋白启动子,和在开放的阅读框架的 5' 端的 Kozac 序列,从 pCZR199 构建。

[0276] 将 100 微升感受态的酵母细胞 (啤酒糖酵母) 与 10  $\mu$ l 含有大约 1  $\mu$ g TACI 胞外

结构域和 Fc4 PCR 片段、以及 100ng SmaI 消化过的 pZMP6 载体混合,然后转移到 0.2cm 电穿孔杯。在 0.75kV (5kV/cm),  $\infty$  ohms, 25  $\mu$  F 下给酵母 /DNA 混合物电脉冲。向每个杯加入 600  $\mu$  l 1.2M 山梨糖醇,将酵母以两个 300  $\mu$  l 等分试样在 URA-D 平板铺板,之后在 30°C 温育。

[0277] 大约 48 小时后,将来自单个平板的 Ura+ 酵母转化物用 1ml 水重新悬浮,简单地离心使酵母细胞沉淀。用 1ml 溶胞缓冲液 (2% TritonX-100、1% SDS、100mM 氯化钠、10mM Tris、pH 值 8.0、1mM EDTA) 将细胞沉淀重新悬浮。将 500 微升溶胞混合物加到含有 300  $\mu$  l 酸洗过的玻璃珠和 200  $\mu$  l 酚氯仿的 Eppendorf 试管,以 1 分钟的时间间隔旋转两到三次,接着在 Eppendorf 离心机中以最大速度旋转 5 分钟。将 300 微升的水相物转移到新的试管,并用 600  $\mu$  l 乙醇沉淀 DNA,接着在 4°C 离心分离 10 分钟。用 100  $\mu$  l 水中将 DNA 沉淀重新悬浮。

[0278] 电感受态的 (electrocompetent) 大肠杆菌细胞 (DH10B、GibcoBRL) 转化是用 0.5 到 2ml 准备的酵母 DNA 和 40  $\mu$  l DH10B 细胞进行的。以 2.0kV、25mF 和 400ohms 向细胞给予电脉冲。电穿孔后,将 1ml SOC (2% 细菌用胰蛋白胨 (Difco, Detroit, MI)、0.5% 酵母提取物 (Difco)、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM MgSO<sub>4</sub>、20mM 葡萄糖) 以 250  $\mu$  l 等分试样在四个 LB AMP 平板 (LB 培养液 (Lennox)、1.8% 细菌用琼脂 (Difco)、100mg/L 氨苄青霉素) 上铺板。

[0279] 通过限制性酶切消化鉴定包含 TAC1-Fc4 的正确的表达构建体的个体的克隆,以确定插入物的存在,同时证实多种 DNA 序列已经正确地相互连接。阳性的克隆插入物要经过序列分析。采用 Qiagen Maxi 试剂盒 (Qiagen) 根据生产商的说明书将大量的质粒 DNA 分离。

[0280] C. Fc5、Fc6 和 Fc7 的构建

[0281] 在 Fc5 中,将在 EU 索引位置 218 的 Arg 残基被变回 Lys 残基。野生型人的 Ig  $\gamma$  1 在该位置含有赖氨酸。简单地说,使用寡核苷酸引物 5' GAGCCC AAATCTT CAGAC AAAA CTCACACA TGCCCA 3' (SEQ ID NO :19) 和 5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTA CCCGGAG ACA 3' (SEQ ID NO :20) 将编码 Fc5 的核酸分子生产出来。PCR 扩增的条件如下所述。向 50  $\mu$  l 的最终体积中加入 Fc4 模板 236ng、10Pfu 反应缓冲液 (Stratagene) 5  $\mu$  l、2.5mM dNTPs 4  $\mu$  l、20  $\mu$  m 的每种寡核苷酸 1  $\mu$  l、Pfu 聚合酶 (2.5 单位, Stratagene) 1  $\mu$  l。扩增温度分布由以下组成:在 94 °C 持续 2 分钟,5 个循环的在 94°C 持续 15 秒钟,42°C 持续 20 秒钟,72 °C 持续 45 秒钟,20 个循环的在 94°C 持续 15 秒钟,72°C 持续 1 分钟 20 秒钟,接着在 72°C 延伸反应 7 分钟。用琼脂糖凝胶电泳将反应产物分离,将与预测尺寸相对应的大约 718 个碱基对的条带检出。从凝胶中将该条带切下,并且使用 QIAGEN QIAquick Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen) 根据制造商的说明书进行回收。

[0282] 除羧基末端的赖氨酸密码子已经被除去之外,Fc6 与 Fc5 相同。如在 Fc4 和 Fc5 中所述的,Fc6 序列中的终止密码子变为 TAA。Fc6 用寡核苷酸引物 5' GAG CCC AAAT CTTCA GACAA AACTCACACA TGCCCA 3' (SEQ ID NO :19) 和 5' GGCGCG CCTC TAGATTAACCCGGAGACA GG GAGAGGC3' (SEQ ID NO :21) 编码 Fc5 的模板 DNA 产生的。

[0283] 除在位于 C<sub>H</sub>2 结构域的 EU 索引位置 Asn297 的氨基酸取代物之外,Fc7 与野生型  $\gamma$  1 Fc 相同。将 Asn297 突变为 Gln 残基,以防止在该残基位置的 N 连接的碳水化合物的附着。

如上所述,在 Fc7 序列中的终止密码子被变为 TAA。Fc7 是通过重叠 PCR 产生,用野生型人 IgG  $\gamma$  1Fc cDNA 作为模板和寡核苷酸引物 5' GAGCCC AAATCTTGCACAAAACCTCACA 3' (SEQ ID NO :22) 和 5' GTACGTGCTTTGGTACTGCTCCTCCCGCGGCTT 3' (SEQ ID NO :23) 以产生 Fc7 的 5' 半、以及寡核苷酸引物 5' CAGTACCAAAGCACGTACCGTGTGGTCA 3' (SEQ ID NO :24) 和 5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3' (SEQ ID NO :20) 以产生 Fc7 的 3' 半。将两种 PCR 产物组合,并且用寡核苷酸引物 5' GAGCCCAAATCTTGCACAAAACCTCACA 3' (SEQ ID NO :22) 和 5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3' (SEQ ID NO :20) 扩增。

[0284] 将全部所得 PCR 产物凝胶纯化,克隆,并且用 DNA 序列分析确认。

[0285] D. 氨基端被截短的 TACI-Fc 融合蛋白质的构建

[0286] 四种氨基端被截短 TACI-Fc 的版本被产生出来。四种全都具有与 SEQ ID NO :2 氨基酸残基 30 号融合的修饰过的人组织纤溶酶原激活蛋白的信号序列 (SEQ ID NO :25)。但是,这四种蛋白质在 Fc5 与 SEQ ID NO :2 的 TACI 氨基酸序列融合的位点上不同。表 3 列出了四种融合蛋白质的结构。

[0287] 表 3

[0288] TACI 融合蛋白质

[0289]

TACI-Fc 的名称	TACI 氨基酸残基
TACI(d1-29)-Fc5	SEQ ID NO :2 的 30 到 154
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	SEQ ID NO :2 的 30 到 106
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	SEQ ID NO :2 的 30 到 110
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	SEQ ID NO :2 的 30 到 119

[0290] 蛋白质编码表达盒采用标准技术通过重叠 PCR 产生 (可参阅,例如:Horton 等人, Gene 77 :61 (1989))。将编码 TACI 的核酸分子和编码 Fc5 的核酸分子用作 PCR 的模板。寡核苷酸引物在表 4 和表 5 中被列出。

[0291] 表 4

[0292] 用于生产 TACI 融合蛋白质的寡核苷酸引物

[0293]

TACI-Fc 的名称	寡核苷酸名称			
	5' TACI	3' TACI	5' Fc5	3' Fc5
TACI(d1-29)-Fc5	ZC24,903	ZC24,955	ZC24,952	ZC24,946
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	ZC24,903	ZC24,951	ZC24,949	ZC24,946
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	ZC24,903	ZC28,978	ZC28,979	ZC24,946
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	ZC24,903	ZC28,981	ZC28,980	ZC24,946

[0294] 表 5

[0295] 寡核苷酸序列

## [0296]

引物	核苷酸序列	SEQ ID No.
ZC24,903	5' TATTAGCCGGCCACCATGGATGCAATGA 3'	40
ZC24,955	5' TGAAGATTGGGCTCCTTGAGACCTGGGA 3'	41
ZC24,952	5' TCCCAGGTCTCAAGGAGCCCAAATCTTCA 3'	42
ZC24,946	5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3'	20
ZC24,951	5' TGAAGATTGGGCTCGTTCTCACAGAAGTA 3'	43
ZC24,949	5' ATACTTCTGTGAGAACGAGCCCAAATCTTCA 3'	44
ZC28,978	5' TTTGGGCTCGCTCCTGAGCTTGTTCACACA 3'	45
ZC28,979	5' CTCAGGAGCGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	46
ZC28,981	5' TTTGGGCTCCCTGAGCTCTGGTGGAA 3'	47
ZC28,980	5' GAGCTCAGGGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	48

[0297] 第一轮 PCR 扩增由两种反应来组成得到四种氨基末端被截短的各版本。对于每一个版本,在一种反应中用 5' 和 3' TACI 寡核苷酸,而在另一种反应中用 5' 和 3' Fc5 寡核苷酸,分别进行两种反应。第一轮的 PCR 扩增的条件如下所述。向 25  $\mu$  l 的最终体积中加入 DNA 模板大约 200ng、10x Pfu 反应缓冲液 (Stratagene) 2.5  $\mu$  l、2.5mM dNTPs 2  $\mu$  l、20  $\mu$  M 的 5' 寡核苷酸和 3' 寡核苷酸各 0.5  $\mu$  l、Pfu 聚合酶 (2.5 单位, Stratagene) 0.5  $\mu$  l。扩增温度分布由以下组成:在 94 $^{\circ}$ C 持续 3 分钟,35 个循环的在 94 $^{\circ}$ C 持续 15 秒钟,50 $^{\circ}$ C 持续 15 秒钟,72 $^{\circ}$ C 持续 2 分钟,接着在 72 $^{\circ}$ C 延伸反应 2 分钟。用琼脂糖凝胶电泳将反应产物分离,将与预测尺寸相对应的条带从凝胶中切下,并且使用 QIAGEN QIAquick Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen) 根据制造商的说明书进行回收。

[0298] 第二轮的 PCR 扩增反应,或重叠 PCR 扩增反应,是采用从第一轮 PCR 凝胶纯化的片段作为模板而进行的。第二轮的 PCR 扩增反应的条件如下所述。向 25  $\mu$  l 的最终体积中加入 TACI 片段和 Fc 片段的 DNA 模板每种大约 10ng、10x Pfu 反应缓冲液 (Stratagene) 2.5  $\mu$  l、2.5mM dNTPs 2  $\mu$  l、20  $\mu$  M ZC24,903 (SEQ ID NO :40) 和 ZC24,946 (SEQ ID NO :20) 各 0.5  $\mu$  l 以及 Pfu 聚合酶 (2.5 单位, Stratagene) 0.5  $\mu$  l。扩增温度分布由以下组成:在 94 $^{\circ}$ C 持续 1 分钟,35 个循环的在 94 $^{\circ}$ C 持续 15 秒钟,55 $^{\circ}$ C 持续 15 秒钟,72 $^{\circ}$ C 持续 2 分钟,接着在 72 $^{\circ}$ C 延伸反应 2 分钟。用琼脂糖凝胶电泳将反应产物分离,将与预测尺寸相对应的条带从凝胶中切下,并且使用 QIAGEN QIAquick Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen) 根据制造商的说明书进行回收。

[0299] 对于四种版本的氨基末端被截短的 TACI-Fc 的 PCR 产物,将每种都分别使用 Invitrogen's ZEROBLUNT TOPO PCR Cloning 试剂盒,按照制造商推荐的方法克隆。表 6 确定了这些 TACI-Fc 构建体的核苷酸和氨基酸序列。

[0300] 表 6

[0301] TACI-Fc 变异体的序列

TACI-Fc 的名称	SEQ ID Nos.	
	核苷酸	氨基酸
TACI(d1-29)-Fc5	49	50
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	51	52
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	53	54
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	55	56

[0303] 在核苷酸序列得到验证后,将包含氨基末端被截短的 TACI-Fc 融合物的四种版本中的各种的质粒用 FseI 和 AscI 酶切消化,以释出编码氨基酸的片段。将 FseI-AscI 片段连接到含有 CMV 启动子和 SV40 多 A 片段的哺乳动物表达载体中。将表达载体引入到如下所述的中国仓鼠卵巢细胞中。

[0304] 实施例 2

[0305] 用中国仓鼠卵巢细胞生产 TACI-Fc 蛋白质

[0306] 借助于电转染,将 TACI-Fc 表达构建体用来转染在无动物蛋白的培养基中生长的适应悬浮的中国仓鼠卵巢 (CHO) DG44 细胞 (Urlaub 等人, Som. Cell. Molec. Genet 12: 555 (1986))。由于在两个二氢叶酸还原酶染色体位置的缺失,CHO DG44 细胞缺少功能性二氢叶酸还原酶基因。在氨甲蝶呤浓度增加的情况下,细胞的生长导致表达构建体上二氢叶酸还原酶基因和连接的编码重组蛋白质的基因的扩增。

[0307] 将 CHO DG44 细胞在 PFCHO 培养基 (JRH Biosciences, Lenexa, KS)、4mM L-谷氨酰胺 (JRH Biosciences)、和 1x hypothanxine-胸苷补液 (Life Technologies) 中传代,然后在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 的条件下将该细胞在置于旋转式摇动平台上以 120 RPM 旋转的 Corning 摇动烧瓶中温育。将该细胞用线性化的表达质粒分别转染。为确保无菌,将 Eppendorf 试管中的质粒 DNA 200 μg 与剪切的鲑鱼精子 (salmonsperm) 载体 DNA (5' → 3' Inc. Boulder, CO, 10mg/ml) 20 μl、3M NaOAc (pH 值 5.2) 22 μl、以及 100% 乙醇 (Gold Shield Chemical Co., Hayward, CA) 484 μl 混合,在冰上进行 25 分钟的单次乙醇沉淀。温育后,将试管置于在 4°C 冷室中的无菌台 (microfuge) 中以 14,000 RPM 离心,去上层清液,然后将沉淀用 70% 乙醇 0.5ml 洗涤两次,之后让其风干。

[0308] 当通过在 25ml 锥形离心试管中以 900 RPM 持续 5 分钟离心总共 10<sup>6</sup> 细胞 (16.5ml),将 DNA 沉淀进行干燥时,CHO DG44 细胞被制备出。将 CHO DG44 细胞重新悬浮于总量 300 μl 的 PFCHO 生长培养基中,之后放入带有 0.4cm 电极缺口的基因脉冲杯 (Gene-PulserCuvette) (Bio-Rad) 中。大约干燥 50 分钟后,将 DNA 在 500 μl PFCHO 生长培养基中重新悬浮,加入杯中的细胞中以使总量不超过 800 μl,并且让其置于室温中持续 5 分钟以减少气泡形成。将杯置于 0.296kV (千伏) 和 0.950HC (高电容) 的 BioRad Gene

Pulser II 设备中,并立即电穿孔。

[0309] 在将细胞放置于在 CoStar T-75 烧瓶中的总量 20ml 的 PFCHO 培养基中之前,将细胞在室温温育 5 分钟。将烧瓶置于在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 的条件下 48 小时,然后,在利用锥虫蓝不相容性通过血细胞计数器对细胞计数,并放入不含 hypoxanthine- 胸苷补充液而含有 200mM 氨甲蝶呤 (Cal Biochem) 的 PFCHO 选择培养基中。

[0310] 氨甲蝶呤选择过程的回收时,采用蛋白质印迹分析,检测含有分泌的 TACI-Fc 蛋白质的条件培养基。

[0311] 实施例 3

[0312] TACI-Fc 蛋白质的结构分析

[0313] 在某些情况下, TACI-Fc 融合蛋白质在分析之前被部分纯化。将中国仓鼠卵巢细胞培养的条件培养基通过 0.22 μm 的滤器进行无菌过滤,并且将其 TACI-Fc 蛋白捕获在蛋白质 A 柱上。结合蛋白质 A 的物质被洗脱,并通过 S-200 大小排阻柱而进行最终的纯化。

[0314] 细胞的条件培养基和纯化的蛋白质两者上均进行蛋白质印迹分析,以评定 TACI-Fc 蛋白质的结构稳定性。简单的说,将蛋白质或上层清液的样品转移到硝化纤维素膜上,并用缀合过氧化物酶的羊抗鼠 IgG2a (Boehringer Mannheim), 或缀合过氧化物酶的羊抗人 IgG Fc 特异性抗血清 (Pierce) 检测 TACI-Fc 蛋白质。

[0315] 氨基末端的氨基酸序列分析在来自 Perkin Elmer Applied Biosystems Division (Foster City, CA) 的 Model 476A 和 494 蛋白质测序系统上进行。数据分析用 Applied Biosystems Model 610A 蛋白质测序的数据分析系统, 2.1a 版进行。所用的绝大多数的设备和试剂来自 Applied Biosystems, Inc。

[0316] 实施例 4

[0317] TACI-Fc 蛋白质的功能分析

[0318] 采用两种方法检测四种 TACI-Fc 蛋白质与 ZTNF4 的结合特性。一种方法测定 TACI-Fc 构建体与 TACI 覆盖的平板竞争 <sup>125</sup>I- 标记的 ZTNF4 的能力。在第二种方法中,增加浓度的 <sup>125</sup>I- 标记的 ZTNF4 与每种 TACI-Fc 构建体一起被温育,并测定与沉淀的 ZTNF4-TACI-Fc 复合物相关的放射活性。TACI-Fc 融合蛋白质具有缺少 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的前 29 个氨基酸残基的 TACI 部分。一种融合蛋白质具有带完整柄区的 TACI 部分 (TACI (d1-29)-Fc5), 而其它三种融合蛋白质具有在柄区有多种缺失的 TACI 部分 (TACI (d1-29, d107-154)-Fc5 ; TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 ; TACI (d1-29, d120-154)-Fc5)。

[0319] A. 竞争性结合测定

[0320] 根据标准方法,用 Iodobeads (Pierce) 放射碘化 ZTNF4。简单地说,采用用单个 Iodobeads, 将 50 μg ZTNF4 用 4mCi 的 <sup>125</sup>I 碘化。用 0.25% 的牛血清白蛋白溶液猝灭反应,使用 PD-10 柱 (Pierce) 通过凝胶过滤去除游离 <sup>125</sup>I。在脱盐步骤之前和之后用三氯乙酸沉淀检测 <sup>125</sup>I-ZTNF4 制备物的特异性放射活性。

[0321] 将被称为“TACI-N”的 TACI 受体的 N-末端片段加到 96 孔平板 (0.1 μg/ml, 共 100 μl), 在 4°C 下温育过夜。洗涤平板,用 Superblock (Pierce) 封闭,然后再洗涤。将 TACI-Fc 构建体,以 0 到 11.5ng/ml 范围内的不同浓度,与固定浓度的 <sup>125</sup>I-ZTNF4 (20ng/ml) 混合,然后在用 TACI-N 覆盖的平板上在 37°C 温育 2 小时。对照物在溶液中含有 TACI-N, 或

者不含有 TACI-Fc。温育后,洗涤平板并且记数。每种测试三次进行。

[0322] 结果显示, TACI-Fc 构建体在浓度大约 100ng/ml 或更高的情况下完全抑制  $^{125}\text{I}$ -ZTNF4 的结合。TACI-Fc 蛋白质、TACI(d1-29)-Fc5、TACI(d1-29, d111-154)-Fc5 和 TACI(d1-29, d120-154)-Fc5 与 TACI-Fc 构建体, TACI(d1-29, d107-154)-Fc5 相比, 是更有效的抑制剂。单独的 Fc 片段不抑制结合。对三种实验的每种构建体计算  $\text{IC}_{50}$  值。各种构建体的平均值是 :TACI(d1-29)-Fc5 :2.07nM ;TACI(d1-29, d107-154)-Fc5 :4.95nM ; TACI(d1-29, d111-154)-Fc5 :2.31nM ;和 TACI(d1-29, d120-154)-Fc5 :2.21nM。

#### [0323] B. 溶液结合测定

[0324] 以 0.05nM 浓度, 将每种 TACI-Fc 构建体以 0.25ml/ 试管的总体积在室温下与 0.4pM 到 1.5nM 的  $^{125}\text{I}$ -ZTNF4 一起温育 30 分钟。向每个试管加入 Pansorbin(Staph) 悬浮液, 15 分钟后, 将样品离心处理, 洗涤两次, 将沉淀记数。通过将 130nM 未标记的 ZTNF4 加入  $^{125}\text{I}$ -ZTNF4/TACI-Fc 的混合物中, 测定非特异性的结合。通过从在每种  $^{125}\text{I}$ -ZTNF4 浓度下结合的总 cpm 减去在未标记 ZTNF4 存在下结合的 cpm 来计算特异性结合。每种测试重复三次进行。结合常数采用 GraphPadPrism 软件 (MacIntosh v. 3.0) 计算。

[0325] 图 4 说明了  $^{125}\text{I}$ -ZTNF4 与多种 TACI-Fc 构建体的特异性结合。与每种构建体的结合都显示接近饱和, 并且构建体 TACI(d1-29)-Fc5、TACI(d1-29, d111-154)-Fc5、TACI(d1-29, d120-154)-Fc5 与 TACI(d1-29, d107-154)-Fc5 的结合相比较则更高。将  $B_{\text{max}}$  和  $K_d$  值计算出来, 其结果总结在表 7 中。

[0326] 表 7

[0327]  $^{125}\text{I}$ -ZTNF4 与 TACI-Fc 构建体的结合

[0328]

TACI-Fc 构建体	$K_d$ (nM)	$B_{\text{max}}$ (nM)
TACI(d1-29)-Fc5	0.134	0.023
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	0.121	0.010
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	0.115	0.018
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	0.092	0.021

[0329] 实施例 5

[0330] 循环 ZTNF4 的测定

[0331] 采用电化学发光试验, 测定有着疾病情况的 (例如 :SLE、类风湿性关节炎) 个体相对于正常个体的 ZTNF4 水平。再用 ORIGIN 缓冲液 (Igen, Gaithersburg, MD) 中制备的 10ng/ml、1ng/ml、0.1ng/ml、0.01ng/ml 和 0ng/ml 的人的可溶的 ZTNF4, 绘出标准曲线。将血清样品在 ORIGIN 缓冲液中稀释。将标准和样品与在 ORIGIN Assay 缓冲液 (IGEN) 稀释到  $1\mu\text{g/ml}$  的生物素化的兔抗人 ZTNF4-NF BV 抗体和用 ORIGIN Assay 缓冲液 (IGEN) 稀释到  $1\mu\text{g/ml}$  的 ruthenylated 兔抗人 ZTNF4-NF BV 多克隆抗体一起, 在室温下温育 2 小时。温育后, 将样品旋动并且将 0.4mg/ml 链酶抗生物素 Dynabeads (Dynal, Oslo, 挪威) 以  $50\mu\text{l}$ /管加入到每个标准和样品中, 在室温下温育 30 分钟。然后将样品旋动, 并且根据生产商的

说明书用 Origin Analyzer (Igen) 分析仪分析样品。Origin 实验是以电化学发光为基础的并且以 ECL 显示读数。在一项研究中,从两种都已经进展为肾小球肾炎和自身免疫疾病晚期的 NZBWF1/J 和 MRL/Mpj-Fas<sup>lpr</sup> 小鼠得到的血清样品中检测到 ZTNF4 水平的增加。

[0332] ORIGIN ASSAY 也被用于检测相对于正常个体循环水平的 SLE 患者血液中的 ZTNF4 的水平。用 ORIGIN 缓冲液 (Igen) 中制备的 10ng/ml、1ng/ml、0.1ng/ml、0.01ng/ml 和 0ng/ml 的人的可溶的 ZTNF4, 绘出标准曲线。所有患者样品以 25  $\mu$  l 的最终体积重复三次进行。将标准和样品与用 ORIGIN Assay 缓冲液 (IGEN) 稀释到 1  $\mu$  g/ml 的捕捉抗体、生物素化的兔抗人 ZTNF4-NF BV 多克隆抗体和用 ORIGIN Assay 缓冲液 (IGEN) 稀释到 1  $\mu$  g/ml 的检测抗体、ruthenylated 兔抗人 ZTNF4-NF BV 多克隆抗体一起,在室温下温育 2 小时。温育后,将样品旋动并且将 0.4mg/ml 链酶抗生物素 Dynabeads (Dyna1) 以 50  $\mu$  l/管加入到每个标准和样品中,在室温下温育 30 分钟。然后将样品旋动,并且根据生产商的说明书用 Origin 1.5 Analyzer (Igen) 分析仪分析样品。

[0333] 该实验包括 28 个正常对照样品和 20 个来自诊断为 SLE 的患者的样品。与正常对照血清供者相比较,从诊为 SLE 的患者的血清中观察到 ZTNF4 水平的提高。与任意人群参考血清样品相比较, ZTNF4 水平被计算出在患者或对照样品中 ZTNF4 水平成倍提高。28 个对照样品的平均值高于人群参考样品 1.36 倍,而 20 个 SLE 患者的样品的平均值则是 4.92 倍。20 个 SLE 患者中的 7 个具有高于对照样品的平均值 2 倍的 ZTNF4 水平,而仅有一个对照个体高于对照样品的平均值 2 倍以上。

[0334] 序列表

[0335] <110>ZymoGenetics, Inc.

[0336] <120>TACI- 免疫球蛋白融合蛋白

[0337] <130>01-20PC

[0338] <150>60/293, 343

[0339] <151>2001-05-24

[0340] <160>70

[0341] <170>FastSEQ for Windows Version 3.0

[0342] <210>1

[0343] <211>1377

[0344] <212>DNA

[0345] <213>人

[0346] <220>

[0347] <221>CDS

[0348] <222>(14) ... (892)

[0349] <400>1

[0350] agcatcctga gta atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg 49

[0351] Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg

[0352] 1 5 10

[0353] agc cgt gtg gac cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg acg ggg 97

[0354] Ser Arg Val Asp Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly

[0355]	15	20	25	
[0356]	gtg gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg			145
[0357]	Val Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu			
[0358]	30	35	40	
[0359]	ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc aac cat cag agc cag cgc			193
[0360]	Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg			
[0361]	45	50	55	60
[0362]	acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc			241
[0363]	Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly			
[0364]	65	70	75	
[0365]	aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc			289
[0366]	Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile			
[0367]	80	85	90	
[0368]	tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc			337
[0369]	Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu			
[0370]	95	100	105	
[0371]	agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga			385
[0372]	Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly			
[0373]	110	115	120	
[0374]	gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag			433
[0375]	Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu			
[0376]	125	130	135	140
[0377]	cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt			481
[0378]	His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser			
[0379]	145	150	155	
[0380]	gca gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt			529
[0381]	Ala Asp Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys			
[0382]	160	165	170	
[0383]	gcc gtc ctc tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag			577
[0384]	Ala Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys			
[0385]	175	180	185	
[0386]	agg ggg gat ccc tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt			625
[0387]	Arg Gly Asp Pro Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser			
[0388]	190	195	200	
[0389]	ccg gcc aag tct tcc cag gat cac gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg			673
[0390]	Pro Ala Lys Ser Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val			
[0391]	205	210	215	220
[0392]	agc aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct gag			721
[0393]	Ser Thr Ser Pro Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu			

[0394]	225	230	235	
[0395]	tgc agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac			769
[0396]	Cys Arg Ala Pro Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp			
[0397]	240	245	250	
[0398]	ccc act tgt gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg			817
[0399]	Pro Thr Cys Ala Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu			
[0400]	255	260	265	
[0401]	cag cct tgc cca cac atc cca gac agt ggc ctt ggc att gtg tgt gtg			865
[0402]	Gln Pro Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val			
[0403]	270	275	280	
[0404]	cct gcc cag gag ggg ggc cca ggt gca taaatggggg tcaggaggg			912
[0405]	Pro Ala Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala			
[0406]	285	290		
[0407]	aaaggaggag ggagagagat ggagaggagg ggagagagaa agagaggtgg ggagagggga			972
[0408]	gagagatatg aggagagaga gacagaggag gcagaaaggg agagaaacag aggagacaga			1032
[0409]	gaggagagaga gagacagagg gagagagaga cagaggggaa gagaggcaga gagggaaaga			1092
[0410]	ggcagagaag gaaagagaca ggcagagaag gagagaggca gagagggaga gaggcagaga			1152
[0411]	gggagagagg cagagagaca gagagggaga gaggacaga gagagataga gcaggaggtc			1212
[0412]	ggggcactct gactcccagt tcccagtgca gctgtaggtc gtcacacct aaccacacgt			1272
[0413]	gcaataaagt cctcgtgcct gctgctcaca gccccgaga gccctcctc ctggagaata			1332
[0414]	aaacctttgg cagctgcct tctcaaaaa aaaaaaaaa aaaaa			1377
[0415]	<210>2			
[0416]	<211>293			
[0417]	<212>PRT			
[0418]	<213>人			
[0419]	<400>2			
[0420]	Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp			
[0421]	1	5	10	15
[0422]	Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg			
[0423]	20	25	30	
[0424]	Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met			
[0425]	35	40	45	
[0426]	Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala			
[0427]	50	55	60	
[0428]	Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp			
[0429]	65	70	75	80
[0430]	His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His			
[0431]	85	90	95	
[0432]	Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val			

[0433]	100	105	110
[0434]	Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn		
[0435]	115	120	125
[0436]	Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser		
[0437]	130	135	140
[0438]	Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val		
[0439]	145	150	155
[0440]	Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys		
[0441]	165	170	175
[0442]	Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro		
[0443]	180	185	190
[0444]	Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser		
[0445]	195	200	205
[0446]	Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro		
[0447]	210	215	220
[0448]	Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro		
[0449]	225	230	235
[0450]	Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala		
[0451]	245	250	255
[0452]	Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro		
[0453]	260	265	270
[0454]	His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu		
[0455]	275	280	285
[0456]	Gly Gly Pro Gly Ala		
[0457]	290		
[0458]	<210>3		
[0459]	<211>285		
[0460]	<212>PRT		
[0461]	<213>人		
[0462]	<400>3		
[0463]	Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu		
[0464]	1	5	10
[0465]	Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro		
[0466]	20	25	30
[0467]	Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu		
[0468]	35	40	45
[0469]	Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val		
[0470]	50	55	60
[0471]	Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg		

[0472]	65	70	75	80
[0473]	Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly			
[0474]		85	90	95
[0475]	Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu			
[0476]		100	105	110
[0477]	Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn			
[0478]		115	120	125
[0479]	Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln			
[0480]		130	135	140
[0481]	Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys			
[0482]		145	150	155
[0483]	Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser			
[0484]		165	170	175
[0485]	Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr			
[0486]		180	185	190
[0487]	Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met			
[0488]		195	200	205
[0489]	Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu			
[0490]		210	215	220
[0491]	Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu			
[0492]		225	230	235
[0493]	Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly			
[0494]		245	250	255
[0495]	Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu			
[0496]		260	265	270
[0497]	Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu			
[0498]		275	280	285
[0499]	<210>4			
[0500]	<211>250			
[0501]	<212>PRT			
[0502]	<213>人			
[0503]	<400>4			
[0504]	Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly			
[0505]		1	5	10
[0506]	Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp			
[0507]		20	25	30
[0508]	Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu			
[0509]		35	40	45
[0510]	Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg			

[0511]	50	55	60	
[0512]	Leu Gln Gly Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp			
[0513]	65	70	75	80
[0514]	Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn			
[0515]		85	90	95
[0516]	Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys			
[0517]		100	105	110
[0518]	Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys			
[0519]		115	120	125
[0520]	Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg			
[0521]		130	135	140
[0522]	Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala			
[0523]	145	150	155	160
[0524]	Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe			
[0525]		165	170	175
[0526]	Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr			
[0527]		180	185	190
[0528]	Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr			
[0529]		195	200	205
[0530]	Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile			
[0531]		210	215	220
[0532]	Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro			
[0533]	225	230	235	240
[0534]	His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu			
[0535]		245	250	
[0536]	<210>5			
[0537]	<211>762			
[0538]	<212>DNA			
[0539]	<213>人			
[0540]	<220>			
[0541]	<221>CDS			
[0542]	<222>(7) ... (759)			
[0543]	<400>5			
[0544]	ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc			48
[0545]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro			
[0546]		1	5	10
[0547]	aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc			96
[0548]	Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys			
[0549]		15	20	25
				30

[0550]	cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc	144
[0551]	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu	
[0552]	35 40 45	
[0553]	ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag	192
[0554]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu	
[0555]	50 55 60	
[0556]	gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag	240
[0557]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys	
[0558]	65 70 75	
[0559]	ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag	288
[0560]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys	
[0561]	80 85 90	
[0562]	ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc	336
[0563]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu	
[0564]	95 100 105 110	
[0565]	acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag	384
[0566]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	
[0567]	115 120 125	
[0568]	gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa	432
[0569]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	
[0570]	130 135 140	
[0571]	gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc	480
[0572]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser	
[0573]	145 150 155	
[0574]	cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa	528
[0575]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	
[0576]	160 165 170	
[0577]	ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag	576
[0578]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln	
[0579]	175 180 185 190	
[0580]	ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc	624
[0581]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly	
[0582]	195 200 205	
[0583]	tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag	672
[0584]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln	
[0585]	210 215 220	
[0586]	cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac	720
[0587]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn	
[0588]	225 230 235	

[0589] cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 762  
 [0590] His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 [0591] 240 245 250  
 [0592] <210>6  
 [0593] <211>251  
 [0594] <212>PRT  
 [0595] <213>人  
 [0596] <400>6  
 [0597] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 [0598] 1 5 10 15  
 [0599] Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 [0600] 20 25 30  
 [0601] Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 [0602] 35 40 45  
 [0603] Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 [0604] 50 55 60  
 [0605] Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 [0606] 65 70 75 80  
 [0607] Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 [0608] 85 90 95  
 [0609] Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 [0610] 100 105 110  
 [0611] Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 [0612] 115 120 125  
 [0613] Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 [0614] 130 135 140  
 [0615] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 [0616] 145 150 155 160  
 [0617] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 [0618] 165 170 175  
 [0619] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 [0620] 180 185 190  
 [0621] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 [0622] 195 200 205  
 [0623] Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 [0624] 210 215 220  
 [0625] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 [0626] 225 230 235 240  
 [0627] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0628]		245	250
[0629]	<210>7		
[0630]	<211>44		
[0631]	<212>DNA		
[0632]	<213> 人工序列		
[0633]	<220>		
[0634]	<223>PCR 引物		
[0635]	<400>7		
[0636]	atcagcggaa ttcagatctt cagacaaaac tcacacatgc ccac		44
[0637]	<210>8		
[0638]	<211>35		
[0639]	<212>DNA		
[0640]	<213> 人工序列		
[0641]	<220>		
[0642]	<223>PCR 引物		
[0643]	<400>8		
[0644]	ggcagtctct agatcattta cccggagaca gggag		35
[0645]	<210>9		
[0646]	<211>51		
[0647]	<212>DNA		
[0648]	<213> 人工序列		
[0649]	<220>		
[0650]	<223>PCR 引物		
[0651]	<400>9		
[0652]	ccgtgcccag cacctgaagc cgagggggca ccgtcagtct tcctcttccc c		51
[0653]	<210>10		
[0654]	<211>31		
[0655]	<212>DNA		
[0656]	<213> 人工序列		
[0657]	<220>		
[0658]	<223>PCR 引物		
[0659]	<400>10		
[0660]	ggattctaga ttatttacc c ggagacaggg a		31
[0661]	<210>11		
[0662]	<211>55		
[0663]	<212>DNA		
[0664]	<213> 人工序列		
[0665]	<220>		
[0666]	<223>PCR 引物		

- [0667] <400>11
- [0668] ggtggcgct cccagatggg tectgtccga gcccagatct tcagacaaaa ctcac 55
- [0669] <210>12
- [0670] <211>18
- [0671] <212>DNA
- [0672] <213> 人工序列
- [0673] <220>
- [0674] <223>PCR 引物
- [0675] <400>12
- [0676] tgggagggct ttgttgga 18
- [0677] <210>13
- [0678] <211>42
- [0679] <212>DNA
- [0680] <213> 人工序列
- [0681] <220>
- [0682] <223>PCR 引物
- [0683] <400>13
- [0684] tccaacaaag ccctccate ctccatcgag aaaaccatct cc 42
- [0685] <210>14
- [0686] <211>57
- [0687] <212>DNA
- [0688] <213> 人工序列
- [0689] <220>
- [0690] <223>PCR 引物
- [0691] <400>14
- [0692] ggatggatcc atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggctc ccagatg 57
- [0693] <210>15
- [0694] <211>59
- [0695] <212>DNA
- [0696] <213> 人工序列
- [0697] <220>
- [0698] <223>PCR 引物
- [0699] <400>15
- [0700] ctcagccagg aatccatgc cgagttgaga cgcttccgta gaatgagtgg cctgggccg 59
- [0701] <210>16
- [0702] <211>48
- [0703] <212>DNA
- [0704] <213> 人工序列
- [0705] <220>

- [0706] <223>PCR 引物  
[0707] <400>16  
[0708] gcatgtgtga gttttgtctg aagatctggg etccttcagc cccgggag 48  
[0709] <210>17  
[0710] <211>60  
[0711] <212>DNA  
[0712] <213>人工序列  
[0713] <220>  
[0714] <223>PCR 引物  
[0715] <400>17  
[0716] gcacagagge tcagaagcaa gtccagctct cccggggctg aaggagccca gatcttcaga 60  
[0717] <210>18  
[0718] <211>56  
[0719] <212>DNA  
[0720] <213>人工序列  
[0721] <220>  
[0722] <223>PCR 引物  
[0723] <400>18  
[0724] ggggtgggta caacccaga gctgttttaa tctagattat ttaccggag acaggg 56  
[0725] <210>19  
[0726] <211>36  
[0727] <212>DNA  
[0728] <213>人工序列  
[0729] <220>  
[0730] <223>PCR 引物  
[0731] <400>19  
[0732] gagcccaaat cttcagacaa aactcacaca tgccca 36  
[0733] <210>20  
[0734] <211>36  
[0735] <212>DNA  
[0736] <213>人工序列  
[0737] <220>  
[0738] <223>PCR 引物  
[0739] <400>20  
[0740] taattggegc gcctctagat tatttaccg gagaca 36  
[0741] <210>21  
[0742] <211>37  
[0743] <212>DNA  
[0744] <213>人工序列

- [0745] <220>
- [0746] <223>PCR 引物
- [0747] <400>21
- [0748] ggcgcgcctc tagattaacc cggagacagg gagaggc 37
- [0749] <210>22
- [0750] <211>28
- [0751] <212>DNA
- [0752] <213>人工序列
- [0753] <220>
- [0754] <223>PCR 引物
- [0755] <400>22
- [0756] gagcccaaat cttgcgacaa aactcaca 28
- [0757] <210>23
- [0758] <211>33
- [0759] <212>DNA
- [0760] <213>人工序列
- [0761] <220>
- [0762] <223>PCR 引物
- [0763] <400>23
- [0764] gtacgtgctt tggtactgct cctcccgcgg ctt 33
- [0765] <210>24
- [0766] <211>28
- [0767] <212>DNA
- [0768] <213>人工序列
- [0769] <220>
- [0770] <223>PCR 引物
- [0771] <400>24
- [0772] cagtaccaa gcacgtaccg tgtggtca 28
- [0773] <210>25
- [0774] <211>35
- [0775] <212>PRT
- [0776] <213>人工序列
- [0777] <220>
- [0778] <223>优化的 tPA 前导序列
- [0779] <400>25
- [0780] Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
- [0781] 1 5 10 15
- [0782] Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
- [0783] 20 25 30

[0784] Phe Arg Arg  
 [0785] 35  
 [0786] <210>26  
 [0787] <211>995  
 [0788] <212>DNA  
 [0789] <213>人  
 [0790] <220>  
 [0791] <221>CDS  
 [0792] <222>(219)···(770)  
 [0793] <400>26  
 [0794] aagactcaaa cttagaaact tgaattagat gtggattca aatccttacg tgccgcgaag 60  
 [0795] acacagacag cccccgtaag aaccacgaa gcaggcgaag ttcattgttc tcaacattct 120  
 [0796] agctgctctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttccaggc 180  
 [0797] tgttctttct gtagctcct tgttttcttt ttgtgatc atg ttg cag atg gct ggg 236  
 [0798] Met Leu Gln Met Ala Gly  
 [0799] 1 5  
 [0800] cag tgc tcc caa aat gaa tat ttt gac agt ttg ttg cat gct tgc ata 284  
 [0801] Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile  
 [0802] 10 15 20  
 [0803] cct tgt caa ctt cga tgt tct tct aat act cct cct cta aca tgt cag 332  
 [0804] Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln  
 [0805] 25 30 35  
 [0806] cgt tat tgt aat gca agt gtg acc aat tca gtg aaa gga acg aat gcg 380  
 [0807] Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val Lys Gly Thr Asn Ala  
 [0808] 40 45 50  
 [0809] att ctc tgg acc tgt ttg gga ctg agc tta ata att tct ttg gca gtt 428  
 [0810] Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val  
 [0811] 55 60 65 70  
 [0812] ttc gtg cta atg ttt ttg cta agg aag ata agc tct gaa cca tta aag 476  
 [0813] Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile Ser Ser Glu Pro Leu Lys  
 [0814] 75 80 85  
 [0815] gac gag ttt aaa aac aca gga tca ggt ctc ctg ggc atg gct aac att 524  
 [0816] Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu Leu Gly Met Ala Asn Ile  
 [0817] 90 95 100  
 [0818] gac ctg gaa aag agc agg act ggt gat gaa att att ctt ccg aga ggc 572  
 [0819] Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu Ile Ile Leu Pro Arg Gly  
 [0820] 105 110 115  
 [0821] ctc gag tac acg gtg gaa gaa tgc acc tgt gaa gac tgc atc aag agc 620  
 [0822] Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys Glu Asp Cys Ile Lys Ser

[0823]	120	125	130	
[0824]	aaa ccg aag gtc gac tct gac cat tgc ttt cca ctc cca gct atg gag			668
[0825]	Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe Pro Leu Pro Ala Met Glu			
[0826]	135	140	145	150
[0827]	gaa ggc gca acc att ctt gtc acc acg aaa acg aat gac tat tgc aag			716
[0828]	Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys Thr Asn Asp Tyr Cys Lys			
[0829]		155	160	165
[0830]	agc ctg cca gct gct ttg agt gct acg gag ata gag aaa tca att tct			764
[0831]	Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu Ile Glu Lys Ser Ile Ser			
[0832]		170	175	180
[0833]	gct agg taattaacca tttcgactcg agcagtgcca ctttaaaaat cttttgtcag			820
[0834]	Ala Arg			
[0835]	aatagatgat gtgtcagatc tcttttaggat gactgtatattt ttcagttgcc gatacagctt			880
[0836]	tttgtcctct aactgtggaa actctttatg ttagatatat ttctctaggt tactgtttggg			940
[0837]	agcttaatgg tagaaacttc cttggtttca tgattaaagt cttttttttt cctga			995
[0838]	<210>27			
[0839]	<211>184			
[0840]	<212>PRT			
[0841]	<213>人			
[0842]	<400>27			
[0843]	Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser			
[0844]	1	5	10	15
[0845]	Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr			
[0846]		20	25	30
[0847]	Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser			
[0848]		35	40	45
[0849]	Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu			
[0850]		50	55	60
[0851]	Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile			
[0852]	65	70	75	80
[0853]	Ser Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu			
[0854]		85	90	95
[0855]	Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu			
[0856]		100	105	110
[0857]	Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys			
[0858]		115	120	125
[0859]	Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe			
[0860]		130	135	140
[0861]	Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys			

[0862]	145	150	155	160	
[0863]	Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu				
[0864]		165	170	175	
[0865]	Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg				
[0866]		180			
[0867]	<210>28				
[0868]	<211>762				
[0869]	<212>DNA				
[0870]	<213>人工序列				
[0871]	<220>				
[0872]	<223>修饰的免疫球蛋白部分				
[0873]	<221>CDS				
[0874]	<222>(7)···(759)				
[0875]	<400>28				
[0876]	ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc				48
[0877]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro				
[0878]	1 5 10				
[0879]	aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc				96
[0880]	Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys				
[0881]	15 20 25 30				
[0882]	cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc				144
[0883]	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu				
[0884]	35 40 45				
[0885]	ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag				192
[0886]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu				
[0887]	50 55 60				
[0888]	gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag				240
[0889]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys				
[0890]	65 70 75				
[0891]	ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag				288
[0892]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys				
[0893]	80 85 90				
[0894]	ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc				336
[0895]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu				
[0896]	95 100 105 110				
[0897]	acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag				384
[0898]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys				
[0899]	115 120 125				
[0900]	gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa				432

[0901]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	
[0902]	130	135 140
[0903]	gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc	480
[0904]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser	
[0905]	145	150 155
[0906]	cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa	528
[0907]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	
[0908]	160	165 170
[0909]	ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag	576
[0910]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln	
[0911]	175	180 185 190
[0912]	ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc	624
[0913]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly	
[0914]	195	200 205
[0915]	tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag	672
[0916]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln	
[0917]	210	215 220
[0918]	cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac	720
[0919]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn	
[0920]	225	230 235
[0921]	cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	762
[0922]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
[0923]	240	245 250
[0924]	<210>29	
[0925]	<211>251	
[0926]	<212>PRT	
[0927]	<213>人工序列	
[0928]	<400>29	
[0929]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
[0930]	1	5 10 15
[0931]	Val Leu Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro	
[0932]	20	25 30
[0933]	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	
[0934]	35	40 45
[0935]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr	
[0936]	50	55 60
[0937]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn	
[0938]	65	70 75 80
[0939]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	

[0940]		85		90		95											
[0941]	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
[0942]			100						105					110			
[0943]	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
[0944]			115						120					125			
[0945]	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
[0946]			130						135					140			
[0947]	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	
[0948]			145						150					155		160	
[0949]	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
[0950]					165						170				175		
[0951]	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	
[0952]					180									185		190	
[0953]	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
[0954]					195									200		205	
[0955]	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	
[0956]					210									215		220	
[0957]	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	
[0958]					225									230		235	
[0959]	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
[0960]						245										250	
[0961]	<210>30																
[0962]	<211>762																
[0963]	<212>DNA																
[0964]	<213>人工序列																
[0965]	<220>																
[0966]	<223>修饰的免疫球蛋白部分																
[0967]	<221>CDS																
[0968]	<222>(7)···(759)																
[0969]	<400>30																
[0970]	ggatcc	atg	aag	cac	ctg	tgg	ttc	ttc	ctc	ctg	ctg	gtg	gcg	gct	ccc	48	
[0971]		Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro		
[0972]		1				5						10					
[0973]	aga	tgg	gtc	ctg	tcc	gag	ccc	aga	tct	tca	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	96
[0974]	Arg	Trp	Val	Leu	Ser	Glu	Pro	Arg	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	
[0975]		15				20					25				30		
[0976]	cca	ccg	tgc	cea	gca	cct	gaa	gcc	gag	ggg	gca	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	144
[0977]	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
[0978]						35								40		45	

[0979]	ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag	192
[0980]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu	
[0981]	50 55 60	
[0982]	gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag	240
[0983]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys	
[0984]	65 70 75	
[0985]	ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag	288
[0986]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys	
[0987]	80 85 90	
[0988]	ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc	336
[0989]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu	
[0990]	95 100 105 110	
[0991]	acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag	384
[0992]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	
[0993]	115 120 125	
[0994]	gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaaacc atc tcc aaa	432
[0995]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	
[0996]	130 135 140	
[0997]	gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc	480
[0998]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser	
[0999]	145 150 155	
[1000]	cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa	528
[1001]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	
[1002]	160 165 170	
[1003]	ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag	576
[1004]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln	
[1005]	175 180 185 190	
[1006]	ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc	624
[1007]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly	
[1008]	195 200 205	
[1009]	tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag	672
[1010]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln	
[1011]	210 215 220	
[1012]	cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac	720
[1013]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn	
[1014]	225 230 235	
[1015]	cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	762
[1016]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
[1017]	240 245 250	

[1018] <210>31  
 [1019] <211>251  
 [1020] <212>PRT  
 [1021] <213>人工序列  
 [1022] <400>31  
 [1023] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 [1024] 1 5 10 15  
 [1025] Val Leu Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 [1026] 20 25 30  
 [1027] Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 [1028] 35 40 45  
 [1029] Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 [1030] 50 55 60  
 [1031] Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 [1032] 65 70 75 80  
 [1033] Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 [1034] 85 90 95  
 [1035] Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 [1036] 100 105 110  
 [1037] Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 [1038] 115 120 125  
 [1039] Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 [1040] 130 135 140  
 [1041] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 [1042] 145 150 155 160  
 [1043] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 [1044] 165 170 175  
 [1045] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 [1046] 180 185 190  
 [1047] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 [1048] 195 200 205  
 [1049] Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 [1050] 210 215 220  
 [1051] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 [1052] 225 230 235 240  
 [1053] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 [1054] 245 250  
 [1055] <210>32  
 [1056] <211>762

[1057]	<212>DNA			
[1058]	<213> 人工序列			
[1059]	<220>			
[1060]	<223> 修饰的免疫球蛋白部分			
[1061]	<221>CDS			
[1062]	<222>(7) ... (759)			
[1063]	<400>32			
[1064]	ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc	48		
[1065]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro			
[1066]	1 5 10			
[1067]	aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tet tca gac aaa act cac aca tgc	96		
[1068]	Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys			
[1069]	15 20 25 30			
[1070]	cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc	144		
[1071]	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu			
[1072]	35 40 45			
[1073]	ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag	192		
[1074]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
[1075]	50 55 60			
[1076]	gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag	240		
[1077]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys			
[1078]	65 70 75			
[1079]	ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag	288		
[1080]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
[1081]	80 85 90			
[1082]	ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc	336		
[1083]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
[1084]	95 100 105 110			
[1085]	acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag	384		
[1086]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
[1087]	115 120 125			
[1088]	gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa	432		
[1089]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
[1090]	130 135 140			
[1091]	gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc	480		
[1092]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
[1093]	145 150 155			
[1094]	cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa	528		
[1095]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			

[1096]	160	165	170	
[1097]	ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag			576
[1098]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
[1099]	175	180	185	190
[1100]	ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc			624
[1101]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
[1102]		195	200	205
[1103]	tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag			672
[1104]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
[1105]		210	215	220
[1106]	cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac			720
[1107]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
[1108]		225	230	235
[1109]	cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga			762
[1110]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[1111]	240	245	250	
[1112]	<210>33			
[1113]	<211>251			
[1114]	<212>PRT			
[1115]	<213>人工序列			
[1116]	<400>33			
[1117]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp			
[1118]	1	5	10	15
[1119]	Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro			
[1120]		20	25	30
[1121]	Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
[1122]		35	40	45
[1123]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
[1124]	50	55	60	
[1125]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn			
[1126]	65	70	75	80
[1127]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
[1128]		85	90	95
[1129]	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
[1130]		100	105	110
[1131]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			
[1132]		115	120	125
[1133]	Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
[1134]	130	135	140	

[1135]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp	
[1136]	145	150 155 160
[1137]	Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	
[1138]		165 170 175
[1139]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu	
[1140]		180 185 190
[1141]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe	
[1142]		195 200 205
[1143]	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly	
[1144]		210 215 220
[1145]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr	
[1146]		225 230 235 240
[1147]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
[1148]		245 250
[1149]	<210>34	
[1150]	<211>759	
[1151]	<212>DNA	
[1152]	<213>人工序列	
[1153]	<220>	
[1154]	<223>修饰的免疫球蛋白部分	
[1155]	<221>CDS	
[1156]	<222>(7)···(756)	
[1157]	<400>34	
[1158]	ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc	48
[1159]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro	
[1160]	1 5 10	
[1161]	aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc	96
[1162]	Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys	
[1163]	15 20 25 30	
[1164]	cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc	144
[1165]	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu	
[1166]		35 40 45
[1167]	ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag	192
[1168]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu	
[1169]		50 55 60
[1170]	gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag	240
[1171]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys	
[1172]		65 70 75
[1173]	ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag	288

[1174]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
[1175]	80	90		
[1176]	ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc	336		
[1177]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
[1178]	95	100	105	110
[1179]	acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag	384		
[1180]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
[1181]	115	120	125	
[1182]	gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa	432		
[1183]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
[1184]	130	135	140	
[1185]	gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc	480		
[1186]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
[1187]	145	150	155	
[1188]	cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa	528		
[1189]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
[1190]	160	165	170	
[1191]	ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag	576		
[1192]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
[1193]	175	180	185	190
[1194]	ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc	624		
[1195]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
[1196]	195	200	205	
[1197]	tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag	672		
[1198]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
[1199]	210	215	220	
[1200]	cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac	720		
[1201]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
[1202]	225	230	235	
[1203]	cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga	759		
[1204]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
[1205]	240	245	250	
[1206]	<210>35			
[1207]	<211>250			
[1208]	<212>PRT			
[1209]	<213>人工序列			
[1210]	<400>35			
[1211]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp			
[1212]	1	5	10	15

[1213] Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 [1214]                   20                   25                   30  
 [1215] Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 [1216]                   35                   40                   45  
 [1217] Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 [1218]           50                   55                   60  
 [1219] Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 [1220] 65                   70                   75                   80  
 [1221] Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 [1222]                   85                   90                   95  
 [1223] Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 [1224]                   100                   105                   110  
 [1225] Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 [1226]           115                   120                   125  
 [1227] Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 [1228]           130                   135                   140  
 [1229] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 [1230] 145                   150                   155                   160  
 [1231] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 [1232]                   165                   170                   175  
 [1233] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 [1234]                   180                   185                   190  
 [1235] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 [1236]           195                   200                   205  
 [1237] Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 [1238]           210                   215                   220  
 [1239] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 [1240] 225                   230                   235                   240  
 [1241] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 [1242]                   245                   250  
 [1243] <210>36  
 [1244] <211>762  
 [1245] <212>DNA  
 [1246] <213>人工序列  
 [1247] <220>  
 [1248] <223>修饰的免疫球蛋白部分  
 [1249] <221>CDS  
 [1250] <222>(7)···(759)  
 [1251] <400>36

[1252] ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc 48  
 [1253] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro  
 [1254] 1 5 10  
 [1255] aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tet tgc gac aaa act cac aca tgc 96  
 [1256] Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 [1257] 15 20 25 30  
 [1258] cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc 144  
 [1259] Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 [1260] 35 40 45  
 [1261] ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag 192  
 [1262] Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 [1263] 50 55 60  
 [1264] gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag 240  
 [1265] Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 [1266] 65 70 75  
 [1267] ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag 288  
 [1268] Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 [1269] 80 85 90  
 [1270] ccg cgg gag gag cag tac caa agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc 336  
 [1271] Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 [1272] 95 100 105 110  
 [1273] acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag 384  
 [1274] Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 [1275] 115 120 125  
 [1276] gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa 432  
 [1277] Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 [1278] 130 135 140  
 [1279] gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc 480  
 [1280] Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 [1281] 145 150 155  
 [1282] cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa 528  
 [1283] Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 [1284] 160 165 170  
 [1285] ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag 576  
 [1286] Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 [1287] 175 180 185 190  
 [1288] ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc 624  
 [1289] Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 [1290] 195 200 205

[1291] tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag 672  
 [1292] Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 [1293] 210 215 220  
 [1294] cag ggg aac gtc ttc tea tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac 720  
 [1295] Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 [1296] 225 230 235  
 [1297] cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 762  
 [1298] His Thr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 [1299] 240 245 250  
 [1300] <210>37  
 [1301] <211>251  
 [1302] <212>PRT  
 [1303] <213>人工序列  
 [1304] <400>37  
 [1305] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 [1306] 1 5 10 15  
 [1307] Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 [1308] 20 25 30  
 [1309] Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 [1310] 35 40 45  
 [1311] Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 [1312] 50 55 60  
 [1313] Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 [1314] 65 70 75 80  
 [1315] Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 [1316] 85 90 95  
 [1317] Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 [1318] 100 105 110  
 [1319] Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 [1320] 115 120 125  
 [1321] Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 [1322] 130 135 140  
 [1323] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 [1324] 145 150 155 160  
 [1325] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 [1326] 165 170 175  
 [1327] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 [1328] 180 185 190  
 [1329] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

[1330]	195	200	205	
[1331]	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
[1332]	210	215	220	
[1333]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
[1334]	225	230	235	240
[1335]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[1336]	245	250		
[1337]	<210>38			
[1338]	<211>762			
[1339]	<212>DNA			
[1340]	<213>人工序列			
[1341]	<220>			
[1342]	<223>修饰的免疫球蛋白部分			
[1343]	<221>CDS			
[1344]	<222>(7)···(759)			
[1345]	<400>38			
[1346]	ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc	48		
[1347]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro			
[1348]	1	5	10	
[1349]	aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc	96		
[1350]	Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys			
[1351]	15	20	25	30
[1352]	cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc	144		
[1353]	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
[1354]	35	40	45	
[1355]	ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag	192		
[1356]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
[1357]	50	55	60	
[1358]	gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag	240		
[1359]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys			
[1360]	65	70	75	
[1361]	ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag	288		
[1362]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
[1363]	80	85	90	
[1364]	ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc	336		
[1365]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
[1366]	95	100	105	110
[1367]	acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag	384		
[1368]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			

[1369]		115	120	125	
[1370]	gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa				432
[1371]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys				
[1372]		130	135	140	
[1373]	gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc				480
[1374]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser				
[1375]		145	150	155	
[1376]	cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa				528
[1377]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys				
[1378]		160	165	170	
[1379]	ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag				576
[1380]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln				
[1381]	175	180	185	190	
[1382]	ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc				624
[1383]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly				
[1384]		195	200	205	
[1385]	tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag				672
[1386]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln				
[1387]		210	215	220	
[1388]	cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac				720
[1389]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn				
[1390]		225	230	235	
[1391]	cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga				762
[1392]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys				
[1393]		240	245	250	
[1394]	<210>39				
[1395]	<211>251				
[1396]	<212>PRT				
[1397]	<213>人工序列				
[1398]	<400>39				
[1399]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp				
[1400]	1	5	10	15	
[1401]	Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro				
[1402]		20	25	30	
[1403]	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro				
[1404]		35	40	45	
[1405]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr				
[1406]		50	55	60	
[1407]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn				

[1408]	65	70	75	80
[1409]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
[1410]		85	90	95
[1411]	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
[1412]		100	105	110
[1413]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			
[1414]		115	120	125
[1415]	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
[1416]		130	135	140
[1417]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp			
[1418]	145	150	155	160
[1419]	Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
[1420]		165	170	175
[1421]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
[1422]		180	185	190
[1423]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
[1424]		195	200	205
[1425]	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
[1426]		210	215	220
[1427]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
[1428]	225	230	235	240
[1429]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[1430]		245	250	
[1431]	<210>40			
[1432]	<211>29			
[1433]	<212>DNA			
[1434]	<213>人工序列			
[1435]	<220>			
[1436]	<223>PCR引物			
[1437]	<400>40			
[1438]	tattaggccg gccaccatgg atgcaatga	29		
[1439]	<210>41			
[1440]	<211>29			
[1441]	<212>DNA			
[1442]	<213>人工序列			
[1443]	<220>			
[1444]	<223>PCR引物			
[1445]	<400>41			
[1446]	tgaagatttg ggctccttga gacctggga	29		

- [1447] <210>42  
[1448] <211>29  
[1449] <212>DNA  
[1450] <213> 人工序列  
[1451] <220>  
[1452] <223>PCR 引物  
[1453] <400>42  
[1454] tcccaggtct caaggagccc aaatcttca 29  
[1455] <210>43  
[1456] <211>30  
[1457] <212>DNA  
[1458] <213> 人工序列  
[1459] <220>  
[1460] <223>PCR 引物  
[1461] <400>43  
[1462] tgaagatttg ggctcgttct cacagaagta 30  
[1463] <210>44  
[1464] <211>31  
[1465] <212>DNA  
[1466] <213> 人工序列  
[1467] <220>  
[1468] <223>PCR 引物  
[1469] <400>44  
[1470] atacttctgt gagaacgagc ccaaattcttc a 31  
[1471] <210>45  
[1472] <211>30  
[1473] <212>DNA  
[1474] <213> 人工序列  
[1475] <220>  
[1476] <223>PCR 引物  
[1477] <400>45  
[1478] tttgggctcg ctctgagct tgttctcaca 30  
[1479] <210>46  
[1480] <211>28  
[1481] <212>DNA  
[1482] <213> 人工序列  
[1483] <220>  
[1484] <223>PCR 引物  
[1485] <400>46

[1486]	ctcaggagcg agcccaaate ttcagaca	28
[1487]	<210>47	
[1488]	<211>26	
[1489]	<212>DNA	
[1490]	<213> 人工序列	
[1491]	<220>	
[1492]	<223>PCR 引物	
[1493]	<400>47	
[1494]	tttgggctcc ctgagctctg gtggaa	26
[1495]	<210>48	
[1496]	<211>28	
[1497]	<212>DNA	
[1498]	<213> 人工序列	
[1499]	<220>	
[1500]	<223>PCR 引物	
[1501]	<400>48	
[1502]	gagctcaggg agcccaaate ttcagaca	28
[1503]	<210>49	
[1504]	<211>1214	
[1505]	<212>DNA	
[1506]	<213> 人工序列	
[1507]	<220>	
[1508]	<223> 融合蛋白	
[1509]	<221>CDS	
[1510]	<222>(17)··· (1192)	
[1511]	<400>49	
[1512]	tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg	52
[1513]	Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu	
[1514]	1 5 10	
[1515]	ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc	100
[1516]	Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala	
[1517]	15 20 25	
[1518]	gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag	148
[1519]	Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln	
[1520]	30 35 40	
[1521]	tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc	196
[1522]	Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys	
[1523]	45 50 55 60	
[1524]	aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc	244

[1525]	Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala phe Cys Arg Ser Leu Ser	
[1526]	65 70 75	
[1527]	tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc	292
[1528]	Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys	
[1529]	80 85 90	
[1530]	atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac	340
[1531]	Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr	
[1532]	95 100 105	
[1533]	ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc	388
[1534]	Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu	
[1535]	110 115 120	
[1536]	agg aga cag cgg agt gga gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga	436
[1537]	Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly	
[1538]	125 130 135 140	
[1539]	agg tac caa gga ttg gag cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc	484
[1540]	Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu	
[1541]	145 150 155	
[1542]	cca ggt ctc aag gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca	532
[1543]	Pro Gly Leu Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro	
[1544]	160 165 170	
[1545]	ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc	580
[1546]	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe	
[1547]	175 180 185	
[1548]	ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc	628
[1549]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	
[1550]	190 195 200	
[1551]	aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc	676
[1552]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	
[1553]	205 210 215 220	
[1554]	aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg	724
[1555]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	
[1556]	225 230 235	
[1557]	cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc	772
[1558]	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	
[1559]	240 245 250	
[1560]	gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc	820
[1561]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	
[1562]	255 260 265	
[1563]	tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc	868

[1564]	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala			
[1565]	270	280		
[1566]	aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg	916		
[1567]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu pro Pro Ser Arg			
[1568]	285	290	295	300
[1569]	gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc	964		
[1570]	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly			
[1571]	305	310	315	
[1572]	ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg	1012		
[1573]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
[1574]	320	325	330	
[1575]	gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc	1060		
[1576]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
[1577]	335	340	345	
[1578]	ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag	1108		
[1579]	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln			
[1580]	350	355	360	
[1581]	ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac	1156		
[1582]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His			
[1583]	365	370	375	380
[1584]	tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctagag	1202		
[1585]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[1586]	385	390		
[1587]	gcgcgccaat ta	1214		
[1588]	<210>50			
[1589]	<211>392			
[1590]	<212>PRT			
[1591]	<213> 人工序列			
[1592]	<220>			
[1593]	<223> 融合蛋白			
[1594]	<400>50			
[1595]	Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly			
[1596]	1	5	10	15
[1597]	Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg			
[1598]	20	25	30	
[1599]	Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro			
[1600]	35	40	45	
[1601]	Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser			
[1602]	50	55	60	

[1603]	Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
[1604]	65 70 75 80
[1605]	Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
[1606]	85 90 95
[1607]	Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
[1608]	100 105 110
[1609]	Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg
[1610]	115 120 125
[1611]	Ser Gly Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly
[1612]	130 135 140
[1613]	Leu Glu His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys
[1614]	145 150 155 160
[1615]	Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[1616]	165 170 175
[1617]	Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
[1618]	180 185 190
[1619]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
[1620]	195 200 205
[1621]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
[1622]	210 215 220
[1623]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
[1624]	225 230 235 240
[1625]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
[1626]	245 250 255
[1627]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
[1628]	260 265 270
[1629]	Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
[1630]	275 280 285
[1631]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
[1632]	290 295 300
[1633]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
[1634]	305 310 315 320
[1635]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
[1636]	325 330 335
[1637]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
[1638]	340 345 350
[1639]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
[1640]	355 360 365
[1641]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

[1642]	370	375	380	
[1643]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[1644]	385	390		
[1645]	<210>51			
[1646]	<211>1070			
[1647]	<212>DNA			
[1648]	<213>人工序列			
[1649]	<220>			
[1650]	<223>融合蛋白			
[1651]	<221>CDS			
[1652]	<222>(17)···(1048)			
[1653]	<400>51			
[1654]	tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg			52
[1655]	Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu			
[1656]	1 5 10			
[1657]	ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc			100
[1658]	Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala			
[1659]	15 20 25			
[1660]	gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag			148
[1661]	Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln			
[1662]	30 35 40			
[1663]	tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc			196
[1664]	Tyr Trp Asp pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys			
[1665]	45 50 55 60			
[1666]	aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc			244
[1667]	Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser			
[1668]	65 70 75			
[1669]	tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc			292
[1670]	Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys			
[1671]	80 85 90			
[1672]	atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac			340
[1673]	Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr			
[1674]	95 100 105			
[1675]	ttc tgt gag aac gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca			388
[1676]	Phe Cys Glu Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro			
[1677]	110 115 120			
[1678]	ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc			436
[1679]	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe			
[1680]	125 130 135 140			

[1681]	ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc	484
[1682]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	
[1683]	145 150 155	
[1684]	aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc	532
[1685]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	
[1686]	160 165 170	
[1687]	aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg	580
[1688]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	
[1689]	175 180 185	
[1690]	cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc	628
[1691]	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	
[1692]	190 195 200	
[1693]	gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc	676
[1694]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	
[1695]	205 210 215 220	
[1696]	tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc	724
[1697]	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	
[1698]	225 230 235	
[1699]	aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg	772
[1700]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	
[1701]	240 245 250	
[1702]	gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc	820
[1703]	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	
[1704]	255 260 265	
[1705]	ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg	868
[1706]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	
[1707]	270 275 280	
[1708]	gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc	916
[1709]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	
[1710]	285 290 295 300	
[1711]	ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag	964
[1712]	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	
[1713]	305 310 315	
[1714]	ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac	1012
[1715]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	
[1716]	320 325 330	
[1717]	tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctagag	1058
[1718]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
[1719]	335 340	



[1759]		245		250		255		
[1760]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser							
[1761]		260		265		270		
[1762]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr							
[1763]		275		280		285		
[1764]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr							
[1765]		290		295		300		
[1766]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe							
[1767]	305		310		315		320	
[1768]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys							
[1769]		325		330		335		
[1770]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys							
[1771]		340						
[1772]	<210>53							
[1773]	<211>1082							
[1774]	<212>DNA							
[1775]	<213>人工序列							
[1776]	<220>							
[1777]	<223>融合蛋白							
[1778]	<221>CDS							
[1779]	<222>(17)···(1060)							
[1780]	<400>53							
[1781]	tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg						52	
[1782]		Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu						
[1783]		1		5		10		
[1784]	ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc						100	
[1785]	Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala							
[1786]		15		20		25		
[1787]	gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag						148	
[1788]	Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln							
[1789]		30		35		40		
[1790]	tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc						196	
[1791]	Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys							
[1792]		45		50		55		60
[1793]	aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc						244	
[1794]	Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser							
[1795]		65		70		75		
[1796]	tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc						292	
[1797]	Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys							

[1798]	80	85	90	
[1799]	atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac			340
[1800]	Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr			
[1801]	95	100	105	
[1802]	ttc tgt gag aac aag ctc agg agc gag ccc aaa tct tca gac aaa act			388
[1803]	Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr			
[1804]	110	115	120	
[1805]	cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca			436
[1806]	His Thr Cys pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser			
[1807]	125	130	135	140
[1808]	gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg			484
[1809]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
[1810]	145	150	155	
[1811]	acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct			532
[1812]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
[1813]	160	165	170	
[1814]	gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc			580
[1815]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
[1816]	175	180	185	
[1817]	aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc			628
[1818]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
[1819]	190	195	200	
[1820]	agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac			676
[1821]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
[1822]	205	210	215	220
[1823]	aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc			724
[1824]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr			
[1825]	225	230	235	
[1826]	atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg			772
[1827]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
[1828]	240	245	250	
[1829]	ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc			820
[1830]	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
[1831]	255	260	265	
[1832]	ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc			868
[1833]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
[1834]	270	275	280	
[1835]	aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac			916
[1836]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			

[1837]	285	290	295	300	
[1838]	tcc gac ggc tcc ttc ttc etc tac agc aag etc acc gtg gac aag agc				964
[1839]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser				
[1840]		305	310	315	
[1841]	agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct				1012
[1842]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala				
[1843]		320	325	330	
[1844]	ctg cac aac cac tac acg cag aag agc etc tcc ctg tct ccg ggt aaa				1060
[1845]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys				
[1846]		335	340	345	
[1847]	taatctagag ggcgcgccaat ta				1082
[1848]	<210>54				
[1849]	<211>348				
[1850]	<212>PRT				
[1851]	<213>人工序列				
[1852]	<220>				
[1853]	<223>融合蛋白				
[1854]	<400>54				
[1855]	Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly				
[1856]	1	5	10	15	
[1857]	Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg				
[1858]		20	25	30	
[1859]	Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro				
[1860]		35	40	45	
[1861]	Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser				
[1862]		50	55	60	
[1863]	Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu				
[1864]	65	70	75	80	
[1865]	Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala				
[1866]		85	90	95	
[1867]	Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn				
[1868]		100	105	110	
[1869]	Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro				
[1870]		115	120	125	
[1871]	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe				
[1872]		130	135	140	
[1873]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val				
[1874]	145	150	155	160	
[1875]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe				

[1876]		165		170		175		
[1877]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro							
[1878]		180		185		190		
[1879]	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr							
[1880]		195		200		205		
[1881]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val							
[1882]		210		215		220		
[1883]	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala							
[1884]	225		230		235		240	
[1885]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg							
[1886]		245		250		255		
[1887]	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly							
[1888]		260		265		270		
[1889]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro							
[1890]		275		280		285		
[1891]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser							
[1892]		290		295		300		
[1893]	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln							
[1894]	305		310		315		320	
[1895]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His							
[1896]		325		330		335		
[1897]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys							
[1898]		340		345				
[1899]	<210>55							
[1900]	<211>1109							
[1901]	<212>DNA							
[1902]	<213>人工序列							
[1903]	<220>							
[1904]	<223>融合蛋白							
[1905]	<221>CDS							
[1906]	<222>(17)···(1090)							
[1907]	<400>55							
[1908]	tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg						52	
[1909]		Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu						
[1910]		1		5		10		
[1911]	ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc						100	
[1912]	Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala							
[1913]		15		20		25		
[1914]	gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag						148	

[1915]	Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln	
[1916]	30	35 40
[1917]	tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc	196
[1918]	Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys	
[1919]	45	50 55 60
[1920]	aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc	244
[1921]	Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser	
[1922]	65	70 75
[1923]	tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc	292
[1924]	Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys	
[1925]	80	85 90
[1926]	atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac	340
[1927]	Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr	
[1928]	95	100 105
[1929]	ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc	388
[1930]	Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu	
[1931]	110	115 120
[1932]	agg gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca	436
[1933]	Arg Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	
[1934]	125	130 135 140
[1935]	gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa	484
[1936]	Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	
[1937]	145	150 155
[1938]	ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg	532
[1939]	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	
[1940]	160	165 170
[1941]	gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac	580
[1942]	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr	
[1943]	175	180 185
[1944]	gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag	628
[1945]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	
[1946]	190	195 200
[1947]	cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac	676
[1948]	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	
[1949]	205	210 215 220
[1950]	cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa	724
[1951]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
[1952]	225	230 235
[1953]	gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag	772

[1954]	Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	
[1955]	240	245 250
[1956]	ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg	820
[1957]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu	
[1958]	255	260 265
[1959]	acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc	868
[1960]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	
[1961]	270	275 280
[1962]	agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac	916
[1963]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	
[1964]	285	290 295 300
[1965]	tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc	964
[1966]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	
[1967]	305	310 315
[1968]	tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc	1012
[1969]	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	
[1970]	320	325 330
[1971]	ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag	1060
[1972]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln	
[1973]	335	340 345
[1974]	aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa tctagaggcg cgccaatta	1109
[1975]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *	
[1976]	350	355
[1977]	<210>56	
[1978]	<211>357	
[1979]	<212>PRT	
[1980]	<213>人工序列	
[1981]	<220>	
[1982]	<223>融合蛋白	
[1983]	<400>56	
[1984]	Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly	
[1985]	1	5 10 15
[1986]	Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg	
[1987]	20	25 30
[1988]	Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro	
[1989]	35	40 45
[1990]	Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser	
[1991]	50	55 60
[1992]	Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu	

[1993]	65	70	75	80
[1994]	Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala			
[1995]		85	90	95
[1996]	Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn			
[1997]		100	105	110
[1998]	Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Glu Pro Lys			
[1999]		115	120	125
[2000]	Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala			
[2001]		130	135	140
[2002]	Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
[2003]	145	150	155	160
[2004]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
[2005]		165	170	175
[2006]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
[2007]		180	185	190
[2008]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser			
[2009]		195	200	205
[2010]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu			
[2011]		210	215	220
[2012]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser			
[2013]	225	230	235	240
[2014]	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
[2015]		245	250	255
[2016]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln			
[2017]		260	265	270
[2018]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
[2019]		275	280	285
[2020]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr			
[2021]		290	295	300
[2022]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu			
[2023]	305	310	315	320
[2024]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			
[2025]		325	330	335
[2026]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
[2027]		340	345	350
[2028]	Leu Ser Pro Gly Lys			
[2029]		355		
[2030]	<210>57			
[2031]	<211>9			

[2032] <212>DNA  
 [2033] <213> 人工序列  
 [2034] <220>  
 [2035] <223> 说明性核苷酸  
 [2036] <400>57  
 [2037] atgcacggg 9  
 [2038] <210>58  
 [2039] <211>9  
 [2040] <212>DNA  
 [2041] <213> 人工序列  
 [2042] <220>  
 [2043] <223> 说明性核苷酸  
 [2044] <400>58  
 [2045] cccgtgcat 9  
 [2046] <210>59  
 [2047] <211>586  
 [2048] <212>DNA  
 [2049] <213> 人  
 [2050] <220>  
 [2051] <221>CDS  
 [2052] <222> (27) ... (578)  
 [2053] <400>59  
 [2054] gcagcttggtg cggcggcgctc ggcacc atg agg cga ggg ccc cgg agc ctg cgg 53  
 [2055] Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg  
 [2056] 1 5  
 [2057] ggc agg gac gcg cca gcc ccc acg ccc tgc gtc ccg gcc gag tgc ttc 101  
 [2058] Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe  
 [2059] 10 15 20 25  
 [2060] gac ctg ctg gtc cgc cac tgc gtg gcc tgc ggg ctc ctg cgc acg ccg 149  
 [2061] Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro  
 [2062] 30 35 40  
 [2063] cgg ccg aaa ccg gcc ggg gcc agc agc cct gcg ccc agg acg gcg ctg 197  
 [2064] Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu  
 [2065] 45 50 55  
 [2066] cag ccg cag gag tcg gtg ggc gcg ggg gcc ggc gag gcg gcg ctg ccc 245  
 [2067] Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro  
 [2068] 60 65 70  
 [2069] ctg ccc ggg ctg ctc ttt ggc gcc ccc gcg ctg ctg ggc ctg gca ctg 293  
 [2070] Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu

[2071]	75	80	85	
[2072]	gtc ctg gcg ctg gtc ctg gtg ggt ctg gtg agc tgg agg cgg cga cag			341
[2073]	Val Leu Ala Leu Val Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln			
[2074]	90	95	100	105
[2075]	cgg cgg ctt cgc ggc gcg tcc tcc gca gag gcc ccc gac gga gac aag			389
[2076]	Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys			
[2077]		110	115	120
[2078]	gac gcc cca gag ccc ctg gac aag gtc atc att ctg tct ccg gga atc			437
[2079]	Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile			
[2080]		125	130	135
[2081]	tct gat gcc aca gct cct gcc tgg cct cct cct ggg gaa gac cca gga			485
[2082]	Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly			
[2083]		140	145	150
[2084]	acc acc cca cct ggc cac agt gtc cct gtg cca gcc aca gag ctg ggc			533
[2085]	Thr Thr Pro Pro Gly His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly			
[2086]		155	160	165
[2087]	tcc act gaa ctg gtg acc acc aag acg gcc ggc cct gag caa caa			578
[2088]	Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln			
[2089]	170	175	180	
[2090]	tagcaggg	586		
[2091]	<21 0>60			
[2092]	<211>184			
[2093]	<212>PRT			
[2094]	<213>人			
[2095]	<400>60			
[2096]	Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro			
[2097]	1	5	10	15
[2098]	Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys			
[2099]		20	25	30
[2100]	Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala			
[2101]		35	40	45
[2102]	Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly			
[2103]		50	55	60
[2104]	Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly			
[2105]	65	70	75	80
[2106]	Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu Val			
[2107]		85	90	95
[2108]	Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser			
[2109]		100	105	110

[2110] Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp  
 [2111] 115 120 125  
 [2112] Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala  
 [2113] 130 135 140  
 [2114] Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser  
 [2115] 145 150 155 160  
 [2116] Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr  
 [2117] 165 170 175  
 [2118] Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln  
 [2119] 180  
 [2120] <210>61  
 [2121] <211>19  
 [2122] <212>PRT  
 [2123] <213>人工序列  
 [2124] <220>  
 [2125] <223>26-10VH 信号序列  
 [2126] <400>61  
 [2127] Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 [2128] 1 5 10 15  
 [2129] Val Leu Ser  
 [2130] <210>62  
 [2131] <211>332  
 [2132] <212>PRT  
 [2133] <213>人工序列  
 [2134] <220>  
 [2135] <223>融合蛋白  
 [2136] <400>62  
 [2137] Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 [2138] 1 5 10 15  
 [2139] Val Leu Ser Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro  
 [2140] 20 25 30  
 [2141] Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser  
 [2142] 35 40 45  
 [2143] Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu  
 [2144] 50 55 60  
 [2145] Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala  
 [2146] 65 70 75 80  
 [2147] Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn  
 [2148] 85 90 95

[2149] Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
 [2150] 100 105 110  
 [2151] Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 [2152] 115 120 125  
 [2153] Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 [2154] 130 135 140  
 [2155] Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 [2156] 145 150 155 160  
 [2157] Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 [2158] 165 170 175  
 [2159] Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 [2160] 180 185 190  
 [2161] Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 [2162] 195 200 205  
 [2163] Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 [2164] 210 215 220  
 [2165] Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 [2166] 225 230 235 240  
 [2167] Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 [2168] 245 250 255  
 [2169] Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 [2170] 260 265 270  
 [2171] Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 [2172] 275 280 285  
 [2173] Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 [2174] 290 295 300  
 [2175] Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 [2176] 305 310 315 320  
 [2177] Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 [2178] 325 330  
 [2179] <210>63  
 [2180] <211>51  
 [2181] <212>DNA  
 [2182] <213>人工序列  
 [2183] <220>  
 [2184] <223>26-10 VH 5' UTR  
 [2185] <400>63  
 [2186] aacatatgtc caatgtctc tccacagaca ctgaacacac tgactccaac g 51  
 [2187] <210>64



[2227]	atctgaagaa aagaaatggc ttgggatgtc acagataatcc actctgtctt tctcttcaca	180
[2228]	ggtgtcctct ctgctatgag atcctgcccc gaagagcagt actgggatecc tctgctgggt	240
[2229]	acctgcatgt cctgcaaac catttgcaac catcagagcc agcgcacctg tgcagccttc	300
[2230]	tgcaggtcac tcagctgccg caaggagcaa ggcaagtct atgaccatct cctgagggac	360
[2231]	tgcatcagct gtgcctccat ctgtggacag caccctaagc aatgtgcata cttctgtgag	420
[2232]	aacaagctca ggagcgagcc caaatctca gacaaaactc acacatgccc accgtgccc	480
[2233]	gcacctgaag ccgagggggc accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	540
[2234]	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac	600
[2235]	cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgataatgc caagacaaag	660
[2236]	ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	720
[2237]	caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccatcc	780
[2238]	tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	840
[2239]	ctgccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa	900
[2240]	ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	960
[2241]	tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctca cagcaagctc	1020
[2242]	accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag	1080
[2243]	gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa ataaa	1135
[2244]	<210>68	
[2245]	<211>1135	
[2246]	<212>DNA	
[2247]	<213>人工序列	
[2248]	<220>	
[2249]	<223>融合蛋白	
[2250]	<400>68	
[2251]	aacatattgc caatgtctc tccacagaca ctgaacacac tgactgccac catgggatgg	60
[2252]	agctggatct ttctctttct tctgtcagga actgcaggta aggggctccc cagttccaaa	120
[2253]	atctgaagaa aagaaatggc ttgggatgtc acagataatcc actctgtctt tctcttcaca	180
[2254]	ggtgtcctct ctgctatgag atcctgcccc gaagagcagt actgggatecc tctgctgggt	240
[2255]	acctgcatgt cctgcaaac catttgcaac catcagagcc agcgcacctg tgcagccttc	300
[2256]	tgcaggtcac tcagctgccg caaggagcaa ggcaagtct atgaccatct cctgagggac	360
[2257]	tgcatcagct gtgcctccat ctgtggacag caccctaagc aatgtgcata cttctgtgag	420
[2258]	aacaagctca ggagcgagcc caaatctca gacaaaactc acacatgccc accgtgccc	480
[2259]	gcacctgaag ccgagggggc accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	540
[2260]	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac	600
[2261]	cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgataatgc caagacaaag	660
[2262]	ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	720
[2263]	caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccatcc	780
[2264]	tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	840
[2265]	ctgccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa	900

[2266]	ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	960
[2267]	tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcteta cagcaagctc	1020
[2268]	accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag	1080
[2269]	gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa ataaa	1135
[2270]	<210>69	
[2271]	<211>884	
[2272]	<212>DNA	
[2273]	<213> 人工序列	
[2274]	<220>	
[2275]	<223>CMV 增强子 /MPSV LTR 启动子构建物	
[2276]	<400>69	
[2277]	cgcgttacat aacttacggt aaatggccc cctggctgac cgccaacga ccccccca	60
[2278]	ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccatgacgt	120
[2279]	caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg	180
[2280]	ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgcccag	240
[2281]	tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt	300
[2282]	accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg	360
[2283]	ggatttcaa gtctccacce cattgacgtc aatgggagtt tgttttgaat gaaagacccc	420
[2284]	acctgtaggt ttggcaagct agcttaagta acgccatttg caaggcatgg aaaaatacat	480
[2285]	aactgagaat agagaagttc agatcaaggt caggaacaga gaaacaggag aatatgggcc	540
[2286]	aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccgcctcag ggccaagaac agttggaaca	600
[2287]	ggagaatatg ggccaacag gatatctgtg gtaagcagtt cctgccccgc tcagggccaa	660
[2288]	gaacagatgg tcccagatc ggtcccgcctc tagcagttt ctagagaacc atcagatggt	720
[2289]	tccagggtgc cccaaggacc tgaatgacc ctgtgcctta ttgactaa ccaatcagtt	780
[2290]	cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc tcccagact caataaaaga gccacaacc	840
[2291]	cctcactcgg cgcgccagtc ctccgataga ctgcgtcgcc cggg	884
[2292]	<210>70	
[2293]	<211>455	
[2294]	<212>DNA	
[2295]	<213> 人工序列	
[2296]	<220>	
[2297]	<223>MPSV LTR 不具有负调控区的 MPSV LTR 启动子	
[2298]	<400>70	
[2299]	aatgaaagac cccacctgta ggtttgcaa gctagaaggt taggaacaga gagacagcag	60
[2300]	aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccgcctca gggccaagaa	120
[2301]	cagatggtcc ccagatgcgg tcccgcctc agcagtttct agagaacct cagatgtttc	180
[2302]	cagggtgccc caaggacctg aaaatgacct tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc	240
[2303]	gcttctcgtc tctgttcgcg cgcttctgct ccccagctc aataaaagag cccacaacc	300
[2304]	ctcactcggc gcgccagtc tccgatagac tgcgtcgccc gggtagccgt gttctcaata	360

---

[2305]	aacctcttg cagttgcatc cgactcgtgg tctcgtgtt ccttgggagg gtctctctg	420
[2306]	agtgattgac taccegtcag cgggggtctt tcagt	455

10 20 30 40 50  
MSG LGRSRRG GRSRVDQ EER FPQGLWTGVA MRS [REDACTED]

60 70 80 90 100  
[REDACTED] RSL [REDACTED]

-----  
110 120 130 140 150  
[REDACTED] ENKLRS PVNLPP ELRR QRSGEVENNS DNSGRYQGLE HRGSEASPAL

-----  
160 170 180 190 200  
PGLKLSADQV ALVYST [REDACTED] LGLC LCAVLCCFLV AVACFLK KRG DPSCQPRSR

210 220 230 240 250  
PRQSPAKSSQ DHAMEAGSPV STSPEPVETC SFCFPECRAP TOESAVTPGT

260 270 280 290  
PDPTCAGRWG CHTRTTVLQP CPHIPDSGLG IVCVPAQEGG PGA

图 1

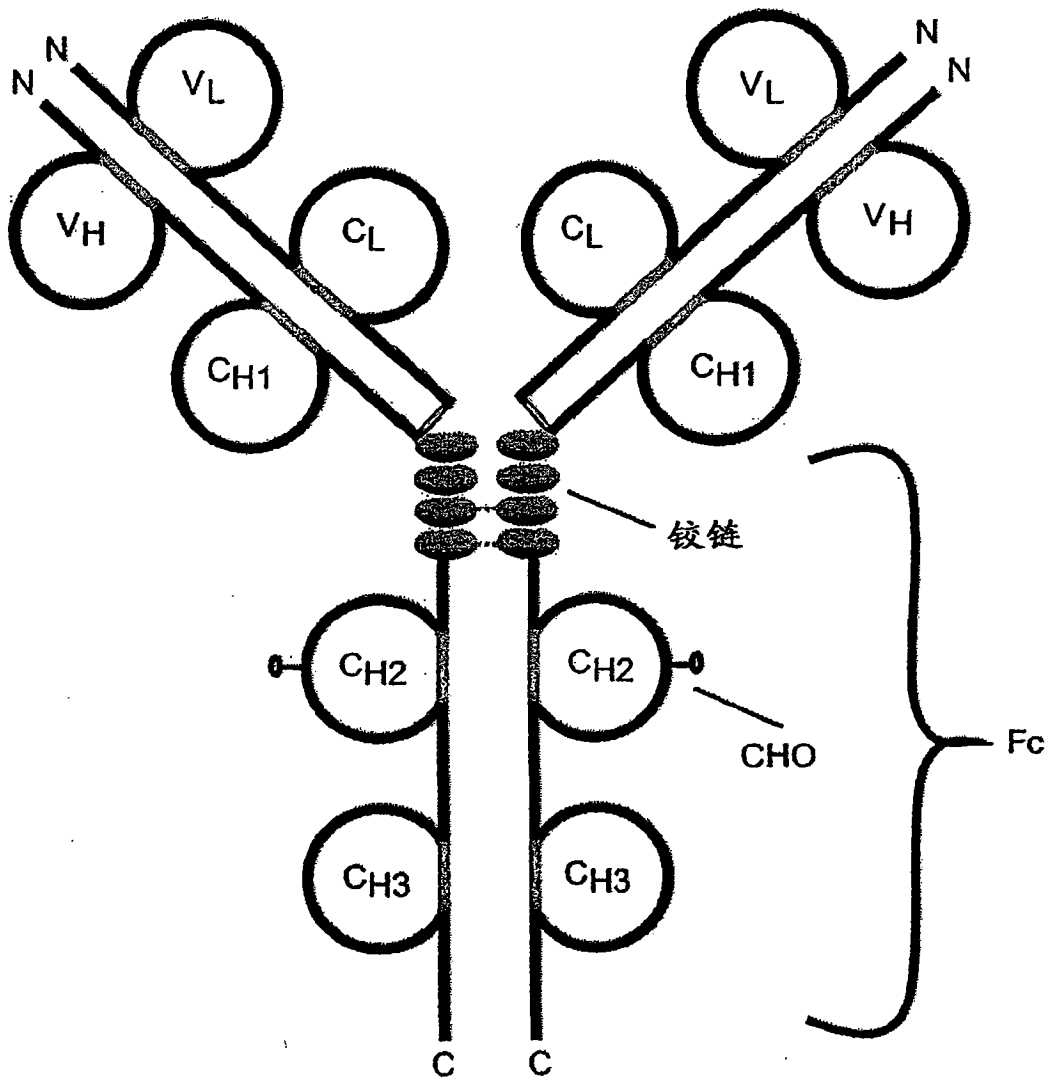


图 2

	LC										HC			HC	
	218				222						230				
wt	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
Fc-488	.	.	Arg	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	Arg	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

<- 铰链 ->

	234				235		237				245				
wt	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

CH2 ->

	260														
wt	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

	275														
wt	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

图 3A



	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
wt															
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

<- CH2 | CH3 ->

	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
wt															
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
wt															
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
wt															
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

图 3C



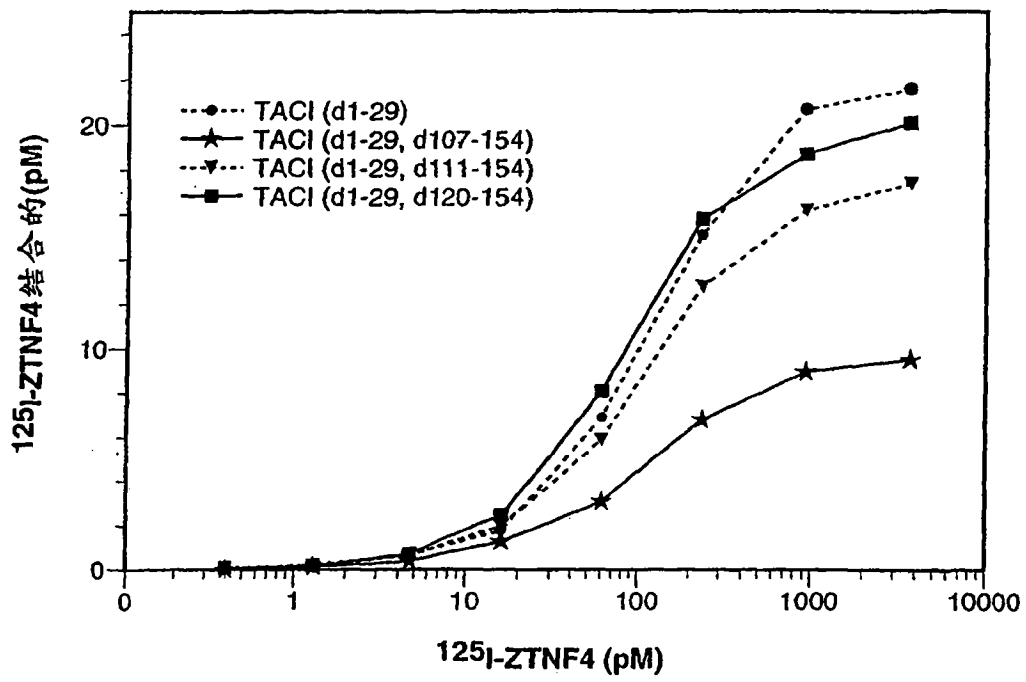


图 4