

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580011056.6

[51] Int. Cl.

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 4 月 4 日

[11] 公开号 CN 1942481A

[22] 申请日 2005.4.13

[21] 申请号 200580011056.6

[30] 优先权

[32] 2004.4.14 [33] EP [31] 04008881.7

[86] 国际申请 PCT/EP2005/003888 2005.4.13

[87] 国际公布 WO2005/100395 英 2005.10.27

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.12

[71] 申请人 豪夫迈-罗氏公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 A·埃尔曼 I·德勒埃 T·莫尔  
S·扎恩

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司  
代理人 程 伟

权利要求书 3 页 说明书 22 页 序列表 13 页  
附图 9 页

[54] 发明名称

用于制备 IL-15/Fc 融合蛋白的表达系统及其用途

[57] 摘要

本发明涉及含有一个或多个核酸的表达系统，其包括至少一个编码白细胞介素 15/Fc (IL-15/Fc) 融合蛋白的核酸，至少一个启动子，至少一个编码 CD5 引导子的核酸，如果需要，至少一个编码选择标记基因的核酸；本发明涉及包括所述表达系统的组分的核酸，并且涉及含有该表达系统或该核酸的宿主细胞。而且，本发明涉及使用该表达系统制备 IL-15/Fc 融合蛋白的方法，并涉及该表达系统、该核酸、该宿主细胞或用于在宿主细胞表达 CD5 引导子的用途。

1. 含有一个或多个核酸的表达系统，其包括：
  - a) 至少一个编码 IL- 15/Fc 融合蛋白的核酸，
  - b) 至少一个启动子，
  - c) 至少一个编码 CD5 引导子的核酸，该启动子和该编码 CD5 引导子的核酸被功能性的连接到编码该 IL- 15/Fc 融合蛋白的核酸。
2. 根据权利要求 1 所述的表达系统，其中该启动子是 CMV 启动子。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的表达系统，其中该启动子是转录调控单位的一部分，该转录调控单位还包括内含子，特别是内含子 A。
4. 根据权利要求 1 至 3 任何一项所述的表达系统，其中该融合蛋白的 Fc 部分是免疫球蛋白 G 的 Fc 片段。
5. 根据权利要求 1 至 4 任何一项所述的表达系统，另外还包括
  - d) 至少一个编码选择标记基因的核酸。
6. 根据权利要求 1 至 5 任何一项所述的表达系统，另外还包括至少一个多聚腺苷酸信号的核酸。
7. 根据权利要求 1 至 6 任何一项所述的表达系统，另外还包括核糖体、氨基酸和/或 tRNAs。
8. 根据权利要求 1 至 7 任何一项所述的表达系统，其中仅包括一个核酸。
9. 根据权利要求 1 至 8 任何一项所述的表达系统，其含有具有 SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 或 SEQ ID No. 3 的序列的核酸或编码 SEQ

ID No. 4 或 SEQ ID No. 5 的多肽的核酸。

10. 一种核酸，其包括权利要求 1 至 4 所述的组分 a) 到 c) 以及可选择的包括权利要求 5 的组分 d)。

11. 一种核酸，其包括 SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 或 SEQ ID No. 3 的序列，或者编码 SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 5 的多肽的核酸。

12. 一种宿主细胞，其含有根据权利要求 1 至 9 任何一项所述的表达系统或者根据权利要求 10 或 11 所述的核酸。

13. 根据权利要求 12 所述的宿主细胞，其是哺乳动物细胞。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的宿主细胞，其是 CHO 细胞系或其衍生物，特别是 CHO-K1 细胞系的细胞。

15. 一种制备 IL- 15/Fc 融合蛋白的方法，其包括

- a. 提供根据权利要求 12 至 14 任何一项所述的宿主细胞，
- b. 培养该宿主细胞，
- c. 选择，如果需要并
- d. 分离表达的 IL- 15/Fc 融合蛋白。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中该宿主细胞是哺乳动物细胞，优选 CHO 细胞系或其衍生物的细胞，特别优选 CHO-K1 细胞系的细胞。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的方法，其中制备的 IL- 15/Fc 融合蛋白的量至少为 10 pg/(细胞 x 天)，优选的量为至少 15 pg/(细胞 x 天)。

18. 根据权利要求 1 至 9 任何一项所述的表达系统、根据权利要求 10 或 11 所述的核酸、或根据权利要求 12 至 14 任何一项所述的宿

---

主细胞在制备 IL- 15-Fc 融合蛋白中的用途。

19. CD5 引导子在 CHO 细胞及其衍生物,特别是在 CHO-K1 细胞中表达蛋白的用途。

20. 根据权利要求 19 所述的用途,其中该蛋白的表达受 CMV 启动子的调控,特别是与内含子 A 联合的 CMV 启动子的调控。

## 用于制备 IL-15/Fc 融合蛋白的表达系统及其用途

本发明涉及包括至少一个编码白细胞介素-15/Fc (IL-15/Fc)融合蛋白的核酸的表达系统以及在其帮助下制备 IL-15/Fc 融合蛋白。而且，本发明涉及使用该表达系统制备 IL-15/Fc 融合蛋白的方法，而且还涉及该表达系统，该核酸，该宿主细胞或用于在宿主细胞中表达蛋白的 CD5 引导序列的用途。

在哺乳动物中的免疫事件基于作为类似于免疫网络的复杂的细胞和非细胞相互作用的多样性。在这个复杂的网络中的许多机制的功能仅仅在最近才被阐明。在 1994 年描述的包括白细胞介素-15 因子的细胞因子(Grabstein 等, 1994, Science 264: 965-968)作为可溶解的信使在免疫网络中发挥重要作用。白细胞介素-15 (IL-15) 作为免疫调节剂、生长因子、趋化因子和生存因子在免疫系统的细胞的增殖、分化、活化和生存中起作用，该免疫系统例如，T 细胞、单核细胞/巨噬细胞、NK 细胞和其它的诸如角化细胞和其它的 IL-15 敏感细胞。除了作为免疫调节剂的功能，IL-15 还在肌肉和脂肪组织的代谢的调控中发挥作用。

典型的，IL-15 通过异源三聚体白细胞介素-15 受体 (IL-15R) 结合到其效应器细胞。IL-15R 由特异结合 IL-15 的  $\alpha$  亚单位，也被 IL-2 识别的  $\beta$  亚单位和被白细胞介素家族的另外成员如 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 和 IL-15 识别的  $\gamma$  亚单位组成。

IL-15 在复杂的自体免疫疾病和慢性炎症疾病，例如风湿性关节炎、牛皮癣、多发性硬化症、Crohn's 疾病、溃疡性结肠炎、小肠结肠炎、肺结节病或系统性红斑狼疮以及在移植器官、组织和细胞的免疫排斥中发挥作用。IL-15 还在淋巴性白血病中发挥作用。

白细胞介素-15 根据激活原则被治疗性地用于癌症患者和免疫缺陷性疾患中扩展淋巴细胞群，或者根据拮抗原则，通过使用阻断 IL-15 功能的试剂而在具有免疫系统病理性激活的疾病中应用。这些试剂可以是可溶的 IL-15-受体多肽，抗 IL-15 或 IL-15 受体的抗体或它们可以

是含有 IL-15 部分的融合蛋白，例如含有 IL-15 成份和免疫球蛋白成份的融合蛋白（在 Fehninger 和 Caligiuri, 2001, Blood 97(1): 14-32 中综述）。本文证明该白介素-免疫球蛋白有用。

可以在原核表达系统中制备白介素和免疫球蛋白的重组融合蛋白。这些表达系统的主要的不利之处是缺乏原核生产的蛋白的糖基化，这可能损害了该表达产品的功能和稳定性，并且因此限制了该表达产品的医学可用性。相反，白介素和免疫球蛋白的重组融合蛋白在替代的通常确保正确糖基化的诸如哺乳动物细胞的表达系统中具有相对低的表达效率的缺点(Zheng 等, 1999, J. Immunol. 163: 4041-4048)。因此，还需要提供适合真核细胞的表达系统，其能够制备大量具有足够纯度的重组 IL-15/Fc 融合蛋白。

因此，本发明的目的是提供这种类型的改良的表达系统。

通过提供用于制备 IL-15/Fc 融合蛋白的表达系统而实现本发明的目的，该表达系统包括一个或多个核酸，该核酸包括：

- a) 至少一个编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸，
- b) 至少一个启动子
- c) 至少一个编码 CD5 引导序列的核酸，

该启动子和编码 CD5 引导序列的核酸被功能性的连接到编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸上。

在根据本发明的表达系统的协助下，通过重组 DNA 技术的方法，例如在真核细胞中可以较大规模的制备 IL-15/Fc 融合蛋白。因此，本发明使得可以为商业目的制备 IL-15/Fc 融合蛋白。

重组 DNA 技术通常指例如向载体传送遗传信息的技术。这些载体使得该遗传信息能够被例如通过导入宿主而进一步处理，使得该遗传信息能够在新环境中扩增和表达。该遗传信息通常以核酸的形式存在，例如以基因组 DNA 或 cDNA 的形式存在，其包括一个或多个编码形式的所需基因产物的信息。可以作为载体的实例是质粒，在质粒中，核酸，例如 cDNA 为了扩增而可以被整合到在转录调控元件例如启动子、增强子、或沉默子的控制下的合适位置，从而在宿主细胞中表达。质粒进一步可以包括既影响所需表达产物的合成又影响后者在宿主细胞中的稳定和定位的要素，或者元件使得使用的质粒和表达产品可被选

择的要素。

根据本发明，术语表达系统指一个或多个核酸——当与对转录必须的诸如核糖体、氨基酸和/或 tRNAs 等其它要素适当结合时，——该表达系统可能导致 IL-15/Fc 融合蛋白在适合的条件下，诸如在适合的宿主细胞中表达。

根据一个优选的实施方案，该表达系统由所述的一个或多个核酸组成。

为了在宿主细胞中使表达成为可能，表达系统的核酸还可以是一个或多个载体的部分，该载体可以通过本领域技术人员熟知的重组 DNA 技术的方法制备 (Sambrook 等. (eds.), 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Press, New York)。本领域技术人员已知本发明可以使用多种载体。用于在真核细胞中表达的合适的载体例如，酵母载体 pYES (在啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中表达; Invitrogen) 和 pICZ (在毕赤酵母 (*P. pastoris*) 中表达; Invitrogen)。杆状病毒载体，例如 pBacPAK9 (在昆虫细胞中表达; Clontech)，以及还有大量的可以用于在哺乳动物细胞中异源表达的载体，例如 Rc/CMV, Rc/RSV, pcDNA 和其它 SV40 衍生的载体，其中除被表达的核酸序列之外，还可以插入适合的转录调控要素。

除了在选择的主宿中调节质粒复制的复制原点之外，合适的载体优选通常含有选择标记基因和识别限制性内切酶的位点，其使得核酸片段能被插入。通过合适的限制性内切酶识别位点可以将编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸插入载体。

适合用于根据本发明表达系统的病毒载体系统包括，例如反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒载体和疱疹病毒或乳头状瘤病毒载体。

编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸优选 DNA 或 RNA，特别优选基因组 DNA，cDNA 或其组合。

IL-15/Fc 融合蛋白的核酸编码 IL-15/Fc 融合蛋白。根据本发明的 IL-15/Fc 融合蛋白是含有两个融合部分，即 IL-15 组分和 Fc 组分的融合蛋白。除了功能蛋白之外还含有免疫球蛋白的融合部分的重组蛋白例如描述于 Capon 等 (US 5,428,130) 中。

给出了优选的由 N 端突变或未突变的 IL-15 部分和 C 端 Fc 部分组

成的融合蛋白。该蛋白例如公开于 WO 97/41232 和 Kim 等 (1998, J. Immunol. 160:5742-5748)中。

融合蛋白的 IL-15 部分选择性的调节与 IL-15 受体 (IL-15R) 的结合, 该受体例如在活化的 T 细胞上表达。因此该 IL-15 部分可以是天然形成的 IL-15 及其突变。

在一个更优选的实施方案中, IL-15 组分是野生型的 IL-15。在这里, 该 IL-15 可以是例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、牛、山羊、绵羊、马、猪、狗、猫或猴的任何种中的 IL-15, 优选人的 IL-15。其还包括不同的剪切变体和天然发生的变体。更优选这里给出哺乳动物的核酸, 特别是人或鼠科的核酸形式。

IL-15 突变包括 IL-15 组分, 相比较于天然发生的 IL-15, 含有突变, 例如一个或多个删除、插入或取代或其组合。然而, 使用的 IL-15 变体必须能够使 IL-15/Fc 融合蛋白结合 IL-15R。例如这可以在使用标记的 IL-15 和具有 IL-15 受体的膜或细胞的放射性配体结合实验中检测 (Carson WE 等, 1994, J Exp Med., 180(4): 1395-1403)。

在一个优选实施方案中, 该突变可以具有类似 IL-15 的作用 (具有激动剂作用的组分) 和其活性, 相比较于 IL-15, 可以具有相同、降低或甚至增加的水平。可以用于含有具有激动剂作用的 IL-15 组分的 IL-15/Fc 融合蛋白的检测系统是通过所述的 IL-15 组分激活鼠科的 CTLL-2 细胞的增殖。

根据本发明, 如果 IL-15 组分具有至少 10%、优选至少 25%、更优选至少 50%, 更优选 100%, 甚至更优选 150% 以及最优选至少 200% 的活性, 则该组分具有激动剂作用。

具有激动剂作用的 IL-15 组分的活性指由 IL-15 组分引起的刺激反应与通过野生型的 IL-15 (野生型 IL-15 相应于 100% 活性) 的刺激的百分比。在测试中既可以单独使用 IL-15 组分, 也可以使用融合蛋白。

对于具有激动剂作用的 IL-15 组分, 优选使用保守的氨基酸取代, 其残基被具有相似特性的另一个残基取代。典型的取代是在脂肪族氨基酸的组中的取代、在具有脂肪族羟基侧链的氨基酸的组中的取代、在具有酸性基团的氨基酸的组中的取代、在具有酰胺衍生物的氨基酸组中的取代、在具有碱性基团的氨基酸的组中的取代或在具有芳基基

团的氨基酸的组中的取代。典型的保守和半保守取代如下所述：

| 氨基酸 | 保守取代          | 半保守取代                     |
|-----|---------------|---------------------------|
| A   | G; S; T       | N; V; C                   |
| C   | A; V; L       | M; I; F; G                |
| D   | E; N; Q       | A; S; T; K; R; H          |
| E   | D; Q; N       | A; S; T; K; R; H          |
| F   | W; Y; L; M; H | I; V; A                   |
| G   | A             | S; N; T; D; E; N; Q       |
| H   | Y; F; K; R    | L; M; A                   |
| I   | V; L; M; A    | F; Y; W; G                |
| K   | R; H          | D; E; N; Q; S; T; A       |
| L   | M; I; V; A    | F; Y; W; H; C             |
| M   | L; I; V; A    | F; Y; W; C                |
| N   | Q             | D; E; S; T; A; G; K; R    |
| P   | V; I          | L; A; M; W; Y; S; T; C; F |
| Q   | N             | D; E; A; S; T; L; M; K; R |
| R   | K; H          | N; Q; S; T; D; E; A       |
| S   | A; T; G; N    | D; E; R; K                |
| T   | A; S; G; N; V | D; E; R; K; I             |
| V   | A; L; I       | M; T; C N                 |
| W   | F; Y; H       | L; M; I; V; C             |
| Y   | F; W; H       | L; M; I; V; C             |

在本发明的另一个实施方案中，使用具有拮抗剂作用的 IL-15 的组分。这种类型的组分抑制 IL-15 的作用或抑制 IL-15 与 IL-15R 结合，这种抑制可能是完全的或仅仅是部分的。用于具有拮抗剂作用的 IL-15 组分的 IL-15/Fc 融合蛋白的检测系统是描述于 WO 97/41232 (BAF-BO3 细胞增殖方法)中的检测系统。根据本发明，如果 IL-15 组分抑制至少 10%、优选至少 25%、更优选至少 50%，最优选至少 95% 的 IL-15 介导的作用或 IL-15 与 IL-15R 的结合，则该 IL-15 组分具有拮抗剂作用。在测试中即可单独使用 IL-15 组分又可使用融合蛋白。

对于具有拮抗剂作用的 IL-15 组分，优选非保守的氨基酸取代，其

残基被具有不同特性的氨基酸取代。进一步优选在与 IL-15R 相互作用的或用于信号传导的分子区域发生的取代。

在一个优选的实施方案中,使用的具有拮抗剂作用的 IL-15 组分是在 WO 97/41232 中描述的突变或是在第 56 位置的氨基酸具有突变的 IL-15 组分(天冬氨酸, AAA21551)。最优选的突变是在白细胞介素-15 的第 149 和/或 156 氨基酸位置的点突变,特别是用天冬氨酸替代谷氨酸(参见 WO 97/41232)。在一个实施方案中,还可能结合描述的突变。

在一个实施方案中,融合蛋白的突变的 IL-15 部分与野生型的 IL-15,优选人野生型的 IL-15(例如,国家生物技术信息中心的数据,接受号 AAA21551)或其它天然发生的变体(例如,国家生物技术信息中心的数据接受号为 CAA63914 和 CAA71044 的变体)具有至少 65%,优选至少 70%,更优选至少 85%,仍然优选至少 95%和最优选至少 99%的同一性。

IL-15/Fc 融合蛋白的第二个功能单位是 Fc 组分。该 Fc 部分指免疫球蛋白恒定的片段(c=恒定),其通过木瓜蛋白酶剪切而制得并且其氨基酸序列是高度保守的。该 Fc 片段是通常不结合抗原的抗体片段。根据本发明的 Fc 部分指优选上述定义的除了铰链区还包括恒定结构域 CH2 和 CH3 的免疫球蛋白片段。

该 Fc 组分源自任何抗体的 Fc 部分,例如 IgA, IgD, IgG, IgE 或 IgM,优选 IgM 或 IgG,更优选 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4 亚类的 Fc 部分。

在本发明的一个特定实施方案中,融合蛋白的 Fc 部分是免疫球蛋白 G(IgG)的 Fc 片段,其缺乏 IgG 可变区的轻链和重链。可以使用的 IgGs 的实例是 IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 和 IgG4。优选人或鼠的 IgG1。

本发明可以使用抗体的整个 Fc 部分,或仅仅是其一部分。然而, Fc 部分的所述部分优选以这样的方式设计:即 IL-15/Fc 融合蛋白比没有免疫球蛋白组分的 IL-15 组分在血液循环中具有更长的半衰期。这可以通过将融合蛋白和 IL-15 组分给药,例如用注射的方法用于一个或多个实验动物的血流中,并比较血液循环中的半衰期而检测。通过半衰期增加至少 10%,更优选至少 20%,仍然优选至少 50%和最优选至少 100%来显示更长的半衰期。

该 Fc 部分还可以是具有至少一个突变的 Fc 部分。该突变的 Fc 可以采用上述的对于 IL-15 部分的突变方法。

一个实施方案中，融合蛋白的突变的 Fc 部分与鼠或人野生型免疫球蛋白，优选人 IgG1-Fc 或自然发生的变体相比具有至少 65%，优选至少 70%，更优选至少 85%，仍然更优选至少 95% 并最优选至少 99% 的同一性。

在本发明一个优选的实施方案中，融合蛋白的 Fc 部分是天然的形式或具有保守氨基酸取代并含有完整 FcR- 和/或互补结合位点的形式。融合蛋白的 Fc 部分可以调节补体系统的活性并结合表达 Fc 受体的细胞，因此导致被融合蛋白的 IL-15 部分识别的细胞的消除。在调节补体激活和 Fc 受体结合的氨基酸位置的突变的引入，特别是非保守氨基酸的替代，使得关闭这些功能成为可能。这些突变的实例是那些 Fc 受体 (FcR) 结合位点或补体结合位点的突变 (在天然人 IgG1 的氨基酸 214, 356, 358 和/或 435 位点或在天然鼠 IgG2A 的 Leu 235, Glu 318, Lys 320 和/或 Lys 322 位点)。在这些位置的氨基酸取代通常导致 Fc 部分的渐退的 (lytic) 和补体-激活功能的缺失 (WO 97/41232)。

进一步优选的实施方案中，人 Fc 部分的铰链区的位置 4，更优选人 IgG1 (人 IgG1 的 167 位置) 的半胱氨酸被例如丙氨酸取代，以防止分子内的桥联并因此产生的表达的 IL-15/Fc 融合蛋白的聚积。

在另一个优选的实施方案中，Fc 部分是人免疫球蛋白 IgG1 的 Fc 部分或鼠免疫球蛋白 IgG2A 的 Fc 部分，其除了铰链区，还包括重链区 CH2 和 CH3。

在该 IL-15/Fc 融合蛋白中，IL-15 组分通过直接或通过连接体而融合到免疫球蛋白组分中。该连接体优选由不超过 25 个氨基酸，更优选不超过 15 个氨基酸，仍然更优选不超过 10 个氨基酸和最优选不超过 1、2、3、4 或 5 个氨基酸组成。

在另一个优选的实施方案中，编码白细胞介素的人核酸或者结合到同样的编码 Fc 的人核酸或者结合到其它诸如小鼠或大鼠的种的编码 Fc 的核酸上。例如，编码 IL-15 的人核酸可以结合到同样的编码 IgG1 的人核酸上、编码 IgG2A 的鼠核酸上或编码 IgG2B 的大鼠核酸上。进一步的可能的核酸的结合对于本领域技术人员来讲是可以理解的。

对于 IL-15/Fc 融合蛋白的最优选的核酸是 SEQ ID No. 1 序列的第 979 到 2014 位置, SEQ ID No. 2 的第 1985 到 3020 位置的序列, 或 SEQ ID No. 3 或者编码 SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No.5 的多肽序列的核酸。最优选包括编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸的载体是 SEQ ID No. 1 或 SEQ ID No. 2 的载体。

然而, 术语“编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸”还包括与 SEQ ID No.3 所示的核苷酸序列或编码 SEQ ID No.4 或 5 的多肽的核苷酸序列具有至少大约 60%, 优选大约 75%, 特别优选大约 90% 并更特别优选大约 95% 同一性的核酸, 相应的 IL-15/Fc 融合蛋白结合 IL-15R, 并相比较于没有免疫球蛋白组分的相应的 IL-15/Fc 融合蛋白 (用于检测系统, 参见上文) 具有在血液中增加的半衰期。

术语“包含编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸的载体”还包括与 SEQ ID No.1 或 SEQ ID No. 2 所示的核苷酸序列具有至少大约 60%, 优选大约 75%, 特别优选大约 90% 并更特别优选大约 95% 同一性的核酸, 相应的 IL-15/Fc 融合蛋白结合 IL-15R, 并相比较于没有免疫球蛋白组分的相应的 IL-15/Fc 融合蛋白 (用于检测系统, 参见上文) 具有在血液中增加的半衰期。

该表达系统进一步包括启动子。该启动子及其功能是本领域技术人员已知的。该启动子例如可以衍生自病毒、细菌或真核生物。该启动子可以控制要表达的基因组成型转录或可以被诱导的, 并因此使得基因表达被特异性调控成为可能。该启动子还可以是细胞或组织特异的, 即限制在特定细胞类型中表达该基因产物。具有这些特性的启动子对于本领域技术人员而言是已知的。特别适合在宿主细胞中控制表达的启动子, 例如, 在酵母中表达的 ADH2 启动子, 或在昆虫细胞中表达的多角体蛋白启动子。在哺乳动物细胞中调节基因产物强表达的启动子是, 例如, 病毒基因的病毒启动子, 例如 RSV (劳氏肉瘤病毒) 启动子、SV40 (猿猴病毒 40) 启动子和 CMVi/e (巨细胞病毒立即早期多肽) 启动子。根据本发明, 优选 CMV 启动子。还包括 CMV 启动子的突变, 该突变序列与天然发生的 CMV 启动子相比具有优选 95%、更优选 99% 的同源性(Kouzarides 等, 1983, Mol Biol. Med. 1(1): 47-58) 和/或该突变相比较于野生型启动子, 具有优选从 90—110%, 更优选

从 95-105% 的活性。

另外, 该转录调控区可以, 特别是当使用 CMV 启动子时, 含有一个或多个内含子, 优选内含子 A(Chapman 等, 1991, *Nucleic Acids Res.* 19(14): 3979-3986)。此实施方案具有可能达到特别高量的 IL-15/Fc 融合蛋白的优点, 例如通过向转录因子提呈合适的结合位点。还包括内含子 A 中的突变, 该突变序列与天然发生的内含子, 特别是内含子 A 相比具有优选 80%, 更优选 90% 并更优选 95% 的同源性(Chapman 等, 1991, *Nucleic Acids Res.* 19(14): 3979-3986), 和/或相比较于野生型的内含子, 特别是内含子 A 具有优选从 90-110%, 更优选 95-105% 的活性。

根据本发明的表达系统的另一个要素是编码 CD5 引导子的核酸, 即 CD5 淋巴细胞抗原的分泌信号序列(Jones 等, 1986, *Nature* 323 (6086): 346-349)。该分泌信号序列调节表达产物分泌到宿主细胞的培养基中。将编码 CD5 引导子的核酸与编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸在表达系统中排列, 以便该引导子能够调节该融合蛋白的分泌。转录和翻译之后, 优选 CD5 引导子位于融合蛋白的表达产物的羧基端, 但是也可以同等优选位于融合蛋白的氨基端。

令人惊讶的是, CD5 引导子显示出在 CHO 细胞中调节表达产物分泌到细胞培养基中, 比可比较的信号序列(参见实施例 2, 图 8)高 200-300 倍。而且还包括在 CD5 引导子中的突变, 该突变序列与天然发生的 CD5 引导子相比具有优选 80%, 更优选 90% 并更优选 95% 的同源性(Jones 等, 1986, *Nature* 323 (6086): 346- 349), 和/或相比较于野生型的 CD5 引导子具有优选从 80-120%, 更优选 90-110% 的并更优选从 95-105% 的活性。

在表达系统中, 启动子和编码 CD5 引导子的核酸被功能性地连接到编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸上。功能性连接指就编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸而言, 启动子和编码 CD5 引导子的核酸以这样的方式排列, 以便它们可以实施它们的功能。启动子的功能是调节融合蛋白的表达。如果两者都位于一个核酸上, 该启动子通常在融合蛋白的 5' 端, 或在 3' 端。引导子的功能是调节融合蛋白的分泌。如果编码引导子的核酸和编码融合蛋白的核酸位于一个核酸, 该引导子通常位于融合蛋白的侧面。“功能性连接” 优选指启动子和 CD5 引导子以与融合蛋白

有关的方式排列，以便该启动子调控融合蛋白的表达并且该 CD5 引导子引起该融合蛋白的分泌。

在一个优选的实施方案中，表达系统另外含有至少用于选择标记基因的核酸，其例如能够使转染有表达系统的宿主细胞从非转染的细胞中选择出来。标记基因的实例是与抗生素联合使用的抗性调节基因。所述基因例如插入到表达载体并与适用于适当转染宿主细胞的抗生素一起使用。用于选择真核宿主细胞的已知抗生素的实例是氨苄青霉素、卡那霉素、zeocin 和本发明的一个优选实施方案中的新霉素，所有这些使得宿主细胞能够通过表达相应的抗性调节基因而被筛选。本领域技术人员已知其它标记基因，例如选择基因 tk 或 DHFR 与相应的诸如 HAT 或氨蝶呤和甲氨蝶呤的选择试剂一同应用。其它合适的选择标记基因，例如维多利亚水母(A. Victoria)及其变体来源的绿色荧光蛋白基因，允许转染有表达载体的宿主细胞通过光学选择而不需要使用选择试剂处理。

优选使用编码色氨酸合成酶的基因作为选择地标记基因，相应的表达质粒被导入色氨酸合成酶缺陷的宿主细胞以用于选择和表达。

在进一步优选的实施方案中，表达系统还包括至少一个多腺苷酸化信号的核酸，通常，其除了终止转录，还影响 RNA 转录本的稳定性。其实例是来自 SV40、 $\beta$  珠蛋白基因的多腺苷酸化序列，或在优选的实施方案中来自牛生长激素基因 BGH (EP 173552)。多腺苷酸化信号的核酸以这样的方式作为表达系统的一部分，其能够改良融合蛋白的表达或其稳定性。通常将其连接到编码融合蛋白的核酸，以便该转录产物包括编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸和多腺苷酸化信号。

在另一个实施方案中，例如在无细胞系统中，为了转录和/或翻译，该表达系统含有除了上述组分之外的表达所需要的组分。这种类型的可能组分的实例是转录因子、酶（例如肽基转移酶、aminoacyl-tRNA 合成酶和 RNA 聚合酶）以及其它细胞蛋白（例如 eIF4E, eIF1 and eIF2），还进一步有辅助底物(ATP, GTP 和镁离子)，优选 tRNAs, 氨基酸和/或核糖体。

在本发明一个优选的实施方案中，表达系统仅仅包括一个含有 a) 到 c) 的组分的核酸，如果合适还有 d)，其中所有的均如上所定义。

在本发明一个高度优选的实施方案中，表达系统包括序列 SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 和 SEQ ID No. 3 中任何的核酸，或者编码 SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 5 的多肽的核酸。然而，还包括其序列与 SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 和 SEQ ID No. 3 序列之一的核酸或者与编码 SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 5 的多肽的核酸之间具有至少大约 60%，优选大约 75%，特别优选大约 90%并更特别优选 95%同一性的核酸，相应的 IL-15/Fc 融合蛋白结合 IL-15R，且相比较于相应的没有免疫球蛋白组分（用于检测系统，参见上文）的 IL-15/Fc 融合蛋白，其在血液中具有增加的半衰期。

在更优选的实施方案中，该表达系统包括核酸，在该核酸中从 5' 到 3' 排列下列组分：CMV 启动子，如果合适其后为内含子 A，CD5 引导子，IL-15/Fc 融合蛋白，特别是具有在 IL-15 的 149 和/或 156 的氨基酸位置上存在天冬氨酸取代谷氨酰胺的点突变的 IL-15，（参见 WO 97/41232），和在铰链区的位置 4 的半胱氨酸被丙氨酸取代的人 IgG1 的 Fc 部分组成，如果合适还有多聚腺苷酸信号和如果合适，至少有一个标记基因。该标记基因，特别的还可以被安排在第二个核酸上。因此，这样的核酸（有或没有标记基因）也是根据本发明的核酸的优选实施方案。

本发明进一步涉及一个核酸，其包括 IL-15/Fc 融合蛋白、启动子、CD5 引导子、如果合适还包括选择性标记基因，以及如果合适还包括多聚腺苷酸信号，所有的组分如上所述。在一个优选的实施方案中，该核酸含有 SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 或 SEQ ID No. 3，或者编码 SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 5 的多肽的核酸。然而，还包括其序列与 SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 和 SEQ ID No. 3 序列之一的核酸或者与编码 SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 5 的多肽的核酸之间具有至少大约 60%，优选大约 75%，特别优选大约 90%并更特别优选 95%同一性的核酸，相应的 IL-15/Fc 融合蛋白结合 IL-15R，相比较于相应的没有免疫球蛋白组分（用于检测系统，参见上文）的 IL-15/Fc 融合蛋白，其在血液中具有增加的半衰期。

本发明进一步涉及包括根据本发明的表达系统或根据本发明的核酸的宿主细胞。

可以使用的宿主细胞可以是真核细胞，例如酵母细胞（例如啤酒酵母（*S. cerevisiae*）和毕赤酵母（*P. pastori*））、昆虫细胞（例如 Sf9）或哺乳动物细胞。这种类型的哺乳动物细胞的实例是人胚胎肾细胞系 HEK-293，从中国仓鼠卵巢细胞制备的 CHO 细胞系，及其衍生物例如，CHO-K1 和 CHO-DHFR，细胞系 BHK, NIH 3T3, HeLa, COS-I, COS-7 和 NS.1。宿主细胞优选哺乳动物细胞，更优选 CHO 细胞及其衍生物，更优选 CHO-K1 细胞系。

在优选的实施方案中，宿主细胞是那些被表达系统的核酸稳定转染的细胞。在稳定转染的细胞的情况下，表达系统整合到靶细胞的基因组中并且以稳定的方式维持在基因组中。不同于瞬时转染，这里转染的基因不仅不降解，而且随着细胞的分裂而加倍并遗传到子代细胞中。后者因而保留了在很长的时间里制备所需蛋白的能力。

制备转染细胞特别是稳定转染细胞的方法是本领域技术人员已知的。例如可以通过电穿孔的方法转染宿主细胞，其中由于暂时施加电场而使细胞膜产生通透，从而允许核酸被吸收入细胞中，或者通过病毒载体转染或感染的方法。除了重组蛋白的瞬时表达，使用的表达系统还可以允许转染的宿主细胞的克隆选择，以便选择具有合适表达效率的克隆细胞系。

在一个优选的实施方案中，宿主细胞是真核哺乳动物细胞，其含有至少一个根据 SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 或 SEQ ID No. 3 的核酸，或者编码 SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 5 的多肽的核酸。还包括其序列与上述序列具有至少大约 60%，优选大约 75%，特别优选大约 90%，并更特别优选 95%同一性的核酸，相应的 IL-15/Fc 融合蛋白结合 IL-15R，其相比较于相应的没有免疫球蛋白组分（用于检测系统，参见上文）的 IL-15/Fc 融合蛋白在血液中具有增加的半衰期。

在一个特定的优选实施方案中，根据本发明的一个宿主细胞是 CHO-K1 细胞系（中国仓鼠卵巢细胞的亚克隆），其稳定转染了至少一个根据 SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 和/或 SEQ ID No. 3 的核酸，或者编码 SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 5 的多肽的核酸。还包括其序列与上述序列具有至少大约 60%，优选大约 75%，特别优选大约 90%并更特别优选大约 95%同一性的核酸，相应的 IL-15/Fc 融合蛋白结合 IL-15R，

其相比较于相应的没有免疫球蛋白组分（用于检测系统，参见上文）的 IL-15/Fc 融合蛋白在血液中具有增加的半衰期。

本发明进一步涉及制备如上定义的 IL-15/Fc 融合蛋白的方法，包括：

- a. 提供如上描述的宿主细胞，
- b. 培养该宿主细胞，
- c. 选择，如果合适并
- d. 分离表达的 IL-15/Fc 融合蛋白。

可以使用的宿主细胞的实例如上所述。该细胞优选哺乳动物细胞，更优选 CHO 细胞及其衍生物，最优选 CHO-K1 细胞系。可以采用标准的方法用编码 IL-15/Fc 融合蛋白的核酸转染合适的宿主细胞(Sambrook 等人, 1989, *supra*)。

转染的宿主细胞可以是粘附细胞或悬浮培养。使用的宿主细胞优选存在于悬浮培养基中的细胞，避免在从粘附细胞向悬浮细胞的适应过程中的表达效率的降低。

可以使用标准的方法在发酵条件下，在适合的营养培养基中培养原代细胞和细胞系(Freshney, 1993, *Animal Cell Culture: A practical approach*, John Wiley & Sons, Inc.)，该条件适合所使用的宿主细胞在每个情况下对于盐浓度、PH、维生素、微量元素、选择试剂、温度、通气等的要求，并且其使得所需要的表达产物以最佳条件表达。有利的是，所使用的是不含血清或外源蛋白的营养培养基，其能确保表达产物相对高的纯度。

选择，特定的克隆选择，指一种方法，其中具有所需要特性的宿主细胞通过一步一步的筛选（thinning-out）而增殖。优选的克隆选择的方法选择那些确保表达产物的足够表达水平和/或高糖基化的方式和高唾液酸化的状态的宿主细胞克隆。糖基化方式和唾液酸化状态影响表达产物的半衰期、生物分布、免疫原性和纯化及其他行为。合适的测定糖基化方式和唾液酸状态的方法是本领域技术人员已知的，其包括使用 IEF（等电点聚焦）的结合酶剪切和 HPAEC-PAD（具有脉冲安培计的高效阴离子交换层析）。

本发明的方法还包括从宿主细胞中分离异源表达的 IL-15/Fc 融合

蛋白的方法，或在一个优选的实施方案中，从宿主细胞的培养基中分离异源表达的 IL-15/Fc 融合蛋白的方法。可以根据本领域技术人员熟知的方法分离，如果合适，纯化重组蛋白，其包括，例如细胞裂解、差速离心、沉淀、凝胶过滤、亲和层析、离子交换层析和 HPLC 反相层析等。用于纯化重组蛋白的合适方法的一个例子是亲和层析，其中不溶的基质由于化学处理而与配体结合。有用的配体可以是具有能够结合该基质的活性化学基团的任何分子。通常选择配体以便能够以可逆的方式与需要纯化的多肽结合。在适合该分子与配体结合的条件下，将在宿主细胞预纯化的培养基中的需要被纯化的分子施加到基质上，通过随后的洗涤步骤，将未结合的分子从培养基中去除。通过加入溶解多肽与配体结合的溶液而可以洗脱需要纯化的多肽。另一个合适的方法是阴离子交换层析，其中通过过量的正电荷或负电荷而将需要纯化的多肽结合到基质上。在根据本发明方法的一个优选实施方案中，首先通过从宿主细胞中除去细胞培养基而纯化表达产物，然后通过离心和/或过滤步骤来除去细胞碎片。在优选实施方案中，通过蛋白-A 亲和层析和阴离子交换层析的组合而从宿主细胞的预纯化培养基中纯化重组的 IL-15/Fc 融合蛋白，如果需要，然后进行凝胶过滤。通过这种方法获得的表达产物可以随后通过本领域技术人员已知的方法鉴定关于含量、同一性和纯度的特性，所述方法例如，BCA，光密度检测，SDS PAGE, Western Blot, ELISA, 氨基酸分析，氨基末端测序，指纹法(MALDI)，分子量测定 (HPLC-ESI)等。

从组合物中纯化 IL-15/Fc 的特别优选的方法包括：

- a) 将该组合物施加到亲和层析柱上，并从柱上洗脱第一次的 IL-15/Fc 洗脱液；
- b) 将步骤 a) 的洗脱液施加到阴离子交换层析柱上并从柱上洗脱第二次 IL-15/Fc 洗脱液；
- c) 将步骤 b) 的洗脱液施加到凝胶过滤柱上并从柱上洗脱第三次 IL-15/Fc 洗脱液。

在优选的实施方案中，根据本发明的方法使得制备的 IL-15/Fc 融合蛋白的量至少 10pg/（细胞 X 天），更优选至少 15pg/（细胞 X 天）。

在更优选的实施方案中，纯化后的蛋白的纯度至少 90%，更优选

至少 95% 并且最优选至少 99%。

本发明进一步涉及上述的表达系统、核酸或宿主细胞在制备 IL-15/Fc 融合蛋白中的用途，该用途通过如上描述的方法实施。

本发明还进一步涉及如上所描述的 CD5 引导子在 CHO 细胞及其衍生物，特别是 CHO-K1 细胞中表达蛋白的用途。令人惊讶的是，当使用 CD5 引导子时，该蛋白的表达或其释放到细胞培养上清中的蛋白相比较于没有引导子的表达高 200-300 倍。另外，在这些细胞中，CD5 引导子显示出显著优越于其它引导子（参见实施例 2，图 8）。该蛋白可以是任何蛋白。在优选实施方案中，该蛋白的表达被 CMV 启动子特别是与内含子 A 联合调节。

通过下面的实施例和附图解释本发明，而非对其进行限定。

#### 附图说明

图 1 pcDNA3.1hCD5.6Ala7 表达构建体的图谱的描述。

图 2-3 pcDNA3.1hCD5.6Ala7 表达构建体的序列的描述(SEQ ID No. 1)。

图 4 pMG10Ala7 表达构建体的图谱描述。

图 5-6 pMG10Ala7 表达构建体的序列描述(SEQ ID No. 2)。

图 7A 突变的具有 CD5 引导子的人 IL-15/Fc 的核酸序列的描述(SEQ ID No. 3)。

图 7B 突变的具有 CD5 引导子的人 IL-15/Fc 的氨基酸序列的描述(SEQ ID No. 4)。

图 7C 突变的具有 CD5 引导子的人 IL-15/Fc 的氨基酸序列的描述(SEQ ID No. 5)。

图 8 用含有在每个事例中显示的引导子序列的 pcDNA3.1hCD5.6Ala7 质粒转染 CHO-K1 细胞之后，细胞培养基上清中 IL-15/Fc 含量的描述。

图 9 用不同表达构建体转染 CHO-K1 细胞之后，细胞培养基上清中 IL-15/Fc 含量的描述。每个条代表在每种情况下两个独立实验的两次检测的平均值+SEM。

pcDNA3.1 相应于 pcDNA3.1hCD5.6Ala7 载体。

pVS8-Ala7 相应于具有 IL-15/Fc 构建体的 pSwitch 质粒 (Valentis)。

pMG-Ala7 相应于具有 IL-15/Fc 构建体的 pMG 质粒 (Invivogen)。

pCINeo-Ala7 相应于具有 IL-15/Fc 构建体的 pCI-Neo 质粒 (Promega)。

## 实施例

### 实施例 1: 在 CHO-K1 细胞中生产 IL-15/Fc

为了生产用于生产 IL-15/Fc 的 CHO-K1 细胞系,应该形成 IL-15/Fc 的表达构建体,并根据其分泌特性、其含有的片段的同一性/整合性和适合的抗性基因对其最优化。

#### a) 开始材料

人 IL-15/Fc 表达构建体(突变的 IL-15/人 Fc)由美国波士顿哈佛医学院以色列之家 Deaconness 医学中心的免疫系(the Department of Immunology of the "Beth Israel Deaconness Medical Center" (Harvard Medical School, Boston, USA))提供。

从 MWG-Biotech (Ebersberg, Germany)获得寡核苷酸。从基因文库获得相关信号肽的序列。

限制性内切酶(BgIII, XbaI, BamHI, SmaI, BstXI, ApaI), Lipfectamin2000, 其它分子生物学试剂(T4-DNA 连接酶, T4-多核苷酸激酶)和质粒 pSecTagA, pcDNA3.1 从 Invitrogen (Karlsruhe, Germany) 或 Amersham-Pharmacia (NheI, Protein A Sepharose Uppsala, Sweden) 获得。

感受态 E. coli XL10-GoId 细胞从 Stratagene (La Jolla, USA)获得。BCA 试剂盒(Pierce)购自 KMF Laborchemie (Sankt Augustin, Germany)。

质粒-DNA 纯化试剂盒(Endofree-Maxi Kit, Endofree-Giga Kit)来自 Qiagen (Hilden, Germany)。

抗体从 BD-Pharmingen (鼠-抗-hIL-15; 目录号 554712; Heidelberg, Germany) 和 Dianova (山羊-抗-小鼠-POD; 目录号 15-036-003; 山羊-抗-人-POD; 目录号 109-036-088; Hamburg, Germany)获得。

## b) 方法/结果

起始质粒在 pSecTagA 载体骨架上含有包括融合到人 IgG1 的 Fc 部分(铰链区和 CH2, CH3 区)的突变的人 IL-15 的融合蛋白的 cDNA。除了在此申请中引用的 Fc 部分是鼠 Igγ2a 外, 该质粒的结构相应于 Kim 等描述的(J. Immunol, 160: 5742-5748; 1998)。

已经存在于 pSecTagA 载体中的 Igk 引导子用于通过 IL-15/Fc 部分的读码框(in-frame)克隆分泌该融合蛋白。为了此目的, 从天然的 IL-15 序列中除去内在的信号序列。然而由于克隆, 10 个额外的氨基酸被插入到 Igk 引导子序列的 3'端和 IL-15 编码序列的 5' 端之间, 在蛋白加工之后, 其仍留在分泌蛋白中。为了除去这些非特异的氨基酸并为了改善该蛋白的分泌特性, 对其它分泌的或细胞表面的蛋白的多种引导子序列进行检测: 鼠 Igk (Coloma et al, J. Immun. Methods 152: 89-104; 1992;接受号 X91670), 人 CD5 (Jones et al, Nature 323: 346-349; 1986;接受号 X04391), CD4 (Hodge et al, Hum. Immunol. 30: 99-104; 1991; 接受号 M35160), MCP-1 (Yoshimura et al, J. FEBS Lett. 244: 487-493; 1989; 接受号 M24545) 和 IL-2 (Taniguchi et al, Nature 302: 305-310; 1983; 接受号 K02056) (接受号基于国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information))。在除去 Igk 引导子和额外的氨基酸后, 通过克隆双链寡核苷酸而用提及的信号肽序列替代引导子。通过测序对其同一性进行检测。随后, 通过使用 Lipfectamin2000 瞬时转染 HEK-293 细胞而对获得的构建体进行检测。在根据 Moll 和 Vestweber 的方法 (Methods in Molecular Biology, 96: 77-84, 1999)进行蛋白-A-Sepharose 纯化之后, 通过 BCA 方法检测用多种构建体转染的细胞的细胞培养基上清的蛋白含量。通过 SDS 凝胶的银染和对 Fc 或 IL-15 部分的蛋白印迹检测的方法对蛋白的同一性进行检测, 以便确保融合蛋白的两个组分都存在。在描述的实验中, CD5 引导子获得了最好的结果, 因此被选作该载体的进一步优化。

进一步检测是否用含有外显子/内含子结构的基因组 DNA 取代 Fc 部分的 cDNA 也能够有助于改良蛋白表达。不得被核剪切器除去的内含子的存在可以改良 RNA 从细胞核的输出和 RNA 的稳定性。因此, 通过引入剪切供体和剪切受体的位点而将基因组 Fc 部分连接到

IL-15cDNA 序列。获得的质粒同样也被多种引导序列修饰并用上述方法检测。然而，通过蛋白印迹分析的蛋白质揭示存在多种不需要的剪切变体，从而决定继续使用 Fc 部分的 cDNA。

结果，获得的质粒包括人 CD5 引导子和 cDNA- Fc 部分。

突变的 IL-15/Fc 表达构建体的测序揭示 Fc 部分含有 3 个已经存在于原始构建体中的突变。这些突变中的两个涉及在高度保守位置的氨基酸。第三个突变是在铰链区的位置 4 的 Cys-Ala 突变，其是为了防止分子内和分子间半胱氨酸桥而故意插入的。

为了除去两个不需要的突变并保留该 Cys-Ala 突变，通过 RT-PCR 对 Fc 的 cDNA 进行亚克隆。使用的 RNA 来源是用编码 VCAM-1-Fc 融合蛋白的构建体转染的 CHO-K1 细胞系。扩增的 Fc-cDNA 片段被克隆入 CD5-mutIL-15 质粒，然后通过 BamHI/XbaI 限制性内切酶除去 Fc 部分。

在独特的限制性内切图谱的基础上以及通过随后的测序对获得的质粒再进行分析，并将其称为 CD5-6Ala7。由于作为 DNA-嵌入试剂的 zeocin 的使用能够产生突变，将 IL- 15/Fc 的表达盒从原始的 pSecTagA 骨架上除去并克隆到含有在 SV40 启动子控制下的新霉素抗性基因的 pcDNA3.1 中。对获得的质粒的两条链进行测序，显示与 IL- 15/Fc 表达盒完全对应。

通过瞬时转染 CHO-K1 细胞和对细胞培养基上清进行蛋白印迹分析再次检测构建体的蛋白表达。作为阳性对照，在平行实验中使用 CD5-6Ala7 质粒进行转染。

最后，以每孔  $5 \times 10^5$  个细胞的密度将细胞一式三份的接种于 6 孔组织培养盘中。使用分别稀释在 250  $\mu$ l Optimem1 培养基中的 2  $\mu$ g 质粒和 4  $\mu$ l Lipofectamin2000 进行转染。在室温孵育 30 分钟后混合两个溶液，将混合液滴加到组织培养盘的培养基中。

转染 2 天后，除去培养基并通过针对人 IL-15 部分的蛋白印迹方法分析其 IL-15/Fc 含量：20  $\mu$ l 细胞培养上清与 5  $\mu$ l 的 5 x Laemmli 缓冲液混合，并在 85°C 孵育 5 min。然后将样品在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳。然后使用半干印迹盒对凝胶进行印迹分析。使用在 PBS 中含有 5%奶粉和 0.1% Tween20 的封闭液对印记进行处理。然后使用在封

闭液中以 1:1000 稀释度稀释的单克隆小鼠-抗-人-IL-15 抗体孵育 4 小时。三次洗涤步骤之后(10 min PBS, 0.1% Tween20), 将印记用二级抗体, 山羊-抗-小鼠过氧化物酶 (稀释度 1 :5000), 在室温另外孵育 2 小时。然后再对印迹洗涤 3 次, 然后使用 Lumilight 溶液滴加到印迹表面, 然后用 X 射线胶片暴露于该印迹。

在用 CD5- 6Ala7 转染之后获得的在信号范围之内的特异蛋白印迹信号显示所有的三个平行转染的细胞培养物上清中含有 IL-15/Fc 蛋白。因此表明 pcDNA3.1hCD5.6Ala7 质粒 (图 1—3) 可用于在 CHO-K1 细胞中表达蛋白。

### c) 结论

制备了 IL- 15/Fc 质粒, pcDNA3.1hCD5.6Ala7, 其含有包括在 CMV 启动子控制下的 CD5 引导子和融合到人 IgG1- Fc 的 cDNA 的突变的人 IL-15 的表达盒。为了选择稳定的真核细胞克隆, 引入新霉素抗性基因。对该质粒进行测序, 显示 100%的对应于相关的编码区, 仅在载体骨架上有与之无关的轻微的偏差 (个碱基对的重复 3)。通过瞬时转染 CHO-K1 细胞对该构建体的功能进行验证。

## 实施例 2

使用含有编码所需要产物的 DNA 的质粒转染真核细胞系 (如 CHO-K1 细胞) 是标准的生产治疗蛋白的方法。然而, 这种方法中产生的稳定细胞克隆的低的生产水平是众所周知的问题。因此有多种策略来提高已经存在的细胞系的产量。除了增加细胞中质粒拷贝的数目的尝试 (例如, 通过甲氨蝶呤/DHFR 系统), 还可以进一步修饰表达构建体自身。除了强启动子 (如 CMV 启动子), 引入内含子可能导致更好的 RNA 稳定性和更好的从细胞核的 RNA 输出, 其输出通过细胞的剪切装置完成。然而, 对于哪一个内含子/转基因的组合是合适的, 必须进行检测。为了这个目的, 多种内含子与人 IL- 15/Fc 组合以便发现通过 CHO-K1 细胞增加 IL- 15/Fc 产量的组合。

### a) 材料

用作起始质粒的质粒是 pcDNA3.1hCD5.6Ala7 质粒。在图 1 对其

进行了示意性描述。其序列公开为 SEQ ID No. 1。

检测系统使用 CHO-K1 细胞(DSM, Braunschweig, Germany, 接受号: ACC 110) 或者 HEK-293 细胞(Qbiogene, Grünberg, Germany, AE80503, QBI-293A)。也使用 E. coli 细胞(XL10-Gold, Strategene, La Jolla, USA)。在标准的培养条件下培养细胞(5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 潮湿空气)。CHO-K1 细胞以 1: 20 的比例一周传代 2 次, 而 HEK-293 细胞以 1: 6 的比例传代。CHO-K1 细胞使用的培养基是 DMEM-F 12+ 10% FKS+1% PEN/Strep, 而 HEK-293 细胞使用的培养基是 DMEM+Glutamax+10% FKS+1% PEN/Strep。使用 Optimem1 培养基进行转染。所有的培养基购自 Invitrogen, Karlsruhe, Germany (目录号 31331-028; 32430-027; 51985-018)。使用的质粒是 pCl- Neo (Promega), 其含有 CMV 启动子和嵌合内含子, 人  $\beta$  球蛋白基因的 5' 剪切供体位点和可变区的 IgG 重链的 3' 剪切受体位点。pMG (Invivogen) 是含有包括来自 CMV 的内含子 A 的延长的 CMV 启动子。pSwitch (Valentis) 是合成内含子, IVS8。而且, 使用下述酶和限制性内切酶: ApaI, EcoRV, XbaI, NruI, PacI, SmaI, XhoI, T4-DNA 连接酶, T4-DNA 聚合酶, 来自牛小肠的碱性磷酸酶。这些和其它的分子生物学的试剂(Lipofectamin2000) 购自 Invitrogen。NheI 购自 Amersham-Pharmacia (Uppsala, Sweden), 而质粒纯化试剂盒购自 Qiagen, Hilden, Germany。扩展的高保真 PCR 系统 (目录号 1 732 641) 购自 Roche, Mannheim, Germany。

## b) 方法

i) pcDNA3.1hCD5.6Ala7 质粒的 IL- 15/Fc 插入通过 NheI/ApaI 消化而分离。质粒首先通过 ApaI 限制酶消化而线性化, 而且通过 T4-聚合酶处理而使 5' 突出端平端化。然后通过随后的 NheI 消化而分离 IL-15/Fc 插入片段。将该片段与用 NheI 和 SmaI 消化的 pCl Neo 连接。

ii) 除去 pcDNA3.1hCD5.6Ala7 的 CMV 启动子并用源自 pMG 的延伸的含有内含子 A 的 CMV 启动子取代: 该 pMG 质粒用 PacI 切割并通过 T4-聚合酶处理而使突出端平端化。第二次 XbaI 处理之后, 获得 1.7 kb 的片段, 其含有 CMV 启动子 + 内含子 A, 通过琼脂糖凝胶电泳纯化该片段。通过 NheI 和随后的 NruI 的限制性内切将 CMV 启动

子从 pcDNA3.hCD5.6Ala7 中除去。将获得的片段在 4°C 与 pMG-启动子-内含子过夜连接。

iii) 通过 PCR 方法扩增 IVS8 内含子, 并克隆到 pcDNA3.1hCD5.6Ala7 中的 CMV 启动子的 3'端和 IL-15 插入片段之间。通过 NheI 限制内切酶消化而将质粒线性化, 然后用来自牛小肠的碱性磷酸酶处理。通过 PCR 扩增内含子, 使用含有 XbaI 限制内切酶剪切位点的引物, 并使用扩展的高保真 PCR 系统在下述条件下扩增: 使用的反应混合物含有 2  $\mu$ l dNTPs (Qiagen, Taq core kit, 2 mmol/每个), 25 pmol 引物, 5  $\mu$ l 10 x 缓冲液, 0.75  $\mu$ l 高保真 Taq 聚合酶, 1  $\mu$ l (大约 15 ng) pSwitch-XhoI/EcoRV 片段, 并用水补足终体积为 50  $\mu$ l。PCR 程序如下 (25 个循环): 95°C 5 min, 94°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 72°C 5 min。使用 XbaI 剪切 PCR 产物, 从 0.8%-琼脂糖凝胶上洗脱, 并与线性化的质粒连接。将获得的质粒转化到 E. coli XL10 Gold 中, 并用小量分析法分析获得的质粒。显示合适的限制内切酶图谱的每个质粒的一个克隆被用于随后的没有内毒素的质粒制备。

在瞬时转染 HEK-293 或 CHO-K1 细胞后分析 IL- 15/Fc 的表达。转染前一天, 以每孔  $5 \times 10^5$  个细胞的密度将细胞一式两份的接种于 6 孔组织培养盘中。根据 Felgner 等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417; 1987)的方法进行转染, 使用分别稀释在 250  $\mu$ l Optimem1 培养基中的 2  $\mu$ g 质粒和 4  $\mu$ l Lipofectamin2000 进行转染。混合两个溶液, 在室温孵育 30 分钟后, 将混合液滴加到细胞培养盘的细胞培养基中。转染 2 天后, 除去培养基并通过针对 IL- 15/Fc 的 Fc 部分的 ELISA 方法分析其 IL-15/Fc 含量。

### c) 结果

转染有不同表达构建体的 HEK-293 细胞的 IL- 15/Fc 的分泌几乎不受其它载体组分的影响。相反, 由 CHO-K1 细胞表达的 IL- 15/Fc 在将内含子插入 IL- 15/Fc 构建体之后, 以 200-300 的系数增加。原始构建体 pcDNA3.1hCD5.6Ala7 获得的分泌蛋白水平很难被检测到 (低于 10 ng/ml), 当用 pMG10Ala7 转染细胞后, 插入的内含子则导致 IL- 15/Fc 的水平大约为 300 ng/ml (图 4 -6; SEQ ID No. 2)。显示 IL- 15/Fc 在

CHO-K1 细胞中的表达水平的 ELISA 数据在图 4 中描述。由于在转染 pMG 构建体之后的表达水平是最高的，选用后者制备稳定的 CHO-K1 表达细胞系。

最后，第一次对质粒进行单链测序。构建体中的两条链均在含有 IL- 15/Fc 盒、新插入的 CMV 启动子和内含子片段的区域被测序。含有 IL- 15/Fc 盒的质粒在 CMV 启动子的调控下。源自 CMV（质粒 MG）的内含子 A 位于启动子和翻译起始之间。质粒含有位于 IL- 15/Fc 片段下游的 BGHpolyA 位点；新霉素抗性基因由 SV40 启动子调控并且含有 SV40 polyA 位点。质粒含有用于在 *E. coli* 中选择和增殖的氨苄青霉素抗性基因。

#### d) 讨论和结论

为了增加稳定的 CHO-K1 -IL- 15/Fc 转基因的蛋白产量，通过在启动子和 IL- 15/Fc 盒之间插入内含子来修饰质粒。重组的内含子-转基因-宿主细胞大大影响了蛋白表达，并且因此不可能预测内含子对在两种分析的细胞类型中增加 IL- 15/Fc 表达最有效。

然而，通过插入内含子很难影响 HEK-293 细胞，大量增加的 IL- 15/Fc 分泌在 CHO-K1 细胞中检测到。相比较于原始的 IL- 15/Fc 表达载体，使用含有 CMV 启动子和来源于 pMG 的内含子 A 的质粒的 CHO-K1 细胞中的 IL- 15/Fc 蛋白的表达增加了多于一个数量级。该质粒可以用于制备生产 IL- 15/Fc 的细胞系，该细胞系可以用于制备用于临床前和临床研究中的 IL- 15/Fc，或用于工业生产的 IL- 15/Fc。

## 序列表

&lt;110&gt; 豪夫迈—罗氏公司

&lt;120&gt; 用于制备 IL-15/Fc 融合蛋白的表达系统及其用途

&lt;130&gt; C62387PC

&lt;150&gt; 04008881.7

&lt;151&gt; 2004-04-14

&lt;160&gt; 5

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 6458

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 质粒 pcDNA3.1hCD5.6Ala7

&lt;400&gt; 1

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg   | 60  |
| ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg  | 120 |
| cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc  | 180 |
| ttagggttag gcgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt | 240 |
| gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtccat agcccatata  | 300 |
| tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggtcgaccg cccaacgacc  | 360 |
| cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc   | 420 |
| attgacgtca atgggtggag tatttaacgt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt   | 480 |
| atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt   | 540 |
| atgccagta catgacotta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca    | 600 |
| tcgtattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg   | 660 |
| actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc   | 720 |
| aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactcgc ccattgacg caaatgggcg    | 780 |
| gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca   | 840 |

---

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc    | 900  |
| caccatgccc atgggggtctc tgcaaccgct ggccaccttg tacctgctgg ggatgctggt  | 960  |
| cgcttcctgc ctcgaaact ggggtgaatgt aataagtgat ttgaaaaaa ttgaagatct    | 1020 |
| tattcaatct atgcatattg atgctacttt atatacgga agtgatgttc accccagttg    | 1080 |
| caaagtaaca gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtccgg   | 1140 |
| agatgcaagt attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaaca acagtttgtc   | 1200 |
| ttctaattgg aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaaa   | 1260 |
| tattaaagaa tttttggaca gttttgtaca tattgtcgac atgttcatca acacttcgga   | 1320 |
| tcccaaactc gctgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg    | 1380 |
| gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac    | 1440 |
| ccctgaggtc acgtgctggtg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa | 1500 |
| ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta   | 1560 |
| caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg   | 1620 |
| caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat     | 1680 |
| ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga   | 1740 |
| tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga   | 1800 |
| catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc   | 1860 |
| cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag   | 1920 |
| gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta   | 1980 |
| cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgatct agagggcccg tttaaaccog   | 2040 |
| ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctccccctg   | 2100 |
| gccttctctg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat   | 2160 |
| tgcatcgcat tgtctgagta ggtgtcatte tattctgggg ggtgggggtgg ggcaggacag  | 2220 |
| caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggc   | 2280 |
| ttctgaggcg gaaagaacca gctggggctc taggggggtat cccacgcgc cctgtagcgg   | 2340 |
| cgcattaagc gcggcggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc   | 2400 |
| cctagcgcgc gctcctttcg ctttcttccc ttctttctc gccacgttcg ccggttttcc    | 2460 |
| ccgtcaagct ctaaactcgg ggctcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct    | 2520 |
| cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatg ttacgtagt gggccatcgc cctgatagac    | 2580 |
| ggtttttctc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac   | 2640 |

---

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| tggaacaaca  | ctcaacccta  | tctcgggtcta | ttcttttgat  | ttataaggga  | ttttgccgat  | 2700 |
| ttcggcctat  | tggttaaaaa  | atgagctgat  | ttaacaaaaa  | tttaacgcga  | attaattctg  | 2760 |
| tggaatgtgt  | gtcagttagg  | gtgtggaaag  | tccccaggct  | ccccagcagg  | cagaagtatg  | 2820 |
| caaagcatgc  | atctcaatta  | gtcagcaacc  | aggtgtggaa  | agtccccagg  | ctccccagca  | 2880 |
| ggcagaagta  | tgcaaagcat  | gcattctcaat | tagtcagcaa  | ccatagtccc  | gcccctaact  | 2940 |
| ccgccccatcc | cgccccctaac | tccgcccagt  | tccgcccatt  | ctccgccccca | tggctgacta  | 3000 |
| atTTTTTTTta | tttatgcaga  | ggccgaggcc  | gcctctgcct  | ctgagctatt  | ccagaagtag  | 3060 |
| tgaggaggct  | tttttgagg   | cctaggcttt  | tgcaaaaagc  | tcccgggagc  | ttgtatatcc  | 3120 |
| attttcggat  | ctgatcaaga  | gacaggatga  | ggatcgtttc  | gcatgattga  | acaagatgga  | 3180 |
| ttgcacgcag  | gttctccggc  | cgcttgggtg  | gagaggctat  | tccgctatga  | ctgggcacaa  | 3240 |
| cagacaatcg  | gctgctctga  | tgccgccgtg  | ttccggctgt  | cagcgcaggg  | gcgcccggtt  | 3300 |
| ctttttgtca  | agaccgacct  | gtccgggtgcc | ctgaatgaac  | tgaggacga   | ggcagcgcgg  | 3360 |
| ctatcgtggc  | tggccacgac  | ggcgcttcc   | tgccgagctg  | tgctcgacgt  | tgctcactgaa | 3420 |
| gcgggaaggg  | actggctgct  | attgggcgaa  | gtgccggggc  | aggatctcct  | gtcatctcac  | 3480 |
| cttgcctctg  | ccgagaaagt  | atccatcatg  | gctgatgcaa  | tgccggcggt  | gcatacgctt  | 3540 |
| gatccggcta  | cctgcccatt  | cgaccaccaa  | gcgaaacatc  | gcatcgagcg  | agcacgtact  | 3600 |
| cggatggaag  | ccggtcttgt  | cgatcaggat  | gatctggacg  | aagagcatca  | ggggctcgcg  | 3660 |
| ccagccgaac  | tgttcgccag  | gctcaaggcg  | cgcattgccg  | acggcgagga  | tctcgtcgtg  | 3720 |
| acccatggcg  | atgcctgctt  | gccgaatata  | atggtggaaa  | atggccgctt  | ttctggattc  | 3780 |
| atcgactgtg  | gccggctggg  | tgtggcggac  | cgctatcagg  | acatagcggt  | ggctaccggt  | 3840 |
| gatattgctg  | aagagcttgg  | cggcgaatgg  | gctgaccgct  | tcctcgtgct  | ttacggtatc  | 3900 |
| gccgctccc   | attcgcagcg  | catcgcttcc  | tatcgcttcc  | ttgacgagtt  | cttctgagcg  | 3960 |
| ggactctggg  | gttcgaaatg  | accgaccaag  | cgacgccccaa | cctgccatca  | cgagatttcc  | 4020 |
| attccaccgc  | cgccttctat  | gaaagggttg  | gcttcggaat  | cgttttccgg  | gacgcgggt   | 4080 |
| ggatgatcct  | ccagcgcggg  | gatctcatgc  | tggagttctt  | cgcccacccc  | aacttgttta  | 4140 |
| ttgcagctta  | taatggttac  | aaataaagca  | atagcatcac  | aaatttcaca  | aataaagcat  | 4200 |
| ttttttcact  | gcattctagt  | tgtggtttgt  | ccaaactcat  | caatgtatct  | tatcatgtct  | 4260 |
| gtataccgtc  | gacctctagc  | tagagcttgg  | cgtaatcatg  | gtcatagctg  | tttctgtgt   | 4320 |
| gaaattgtta  | tccgctcaca  | attccacaca  | acatacgagc  | cggaagcata  | aagtgtaaag  | 4380 |
| cctgggggtgc | ctaattgagt  | agctaactca  | cattaattgc  | gttgcgctca  | ctgcccgcctt | 4440 |
| tccagtcggg  | aaacctgtcg  | tgccagctgc  | attaatgaat  | cggccaacgc  | gcggggagag  | 4500 |

---

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| gcggtttgcg tattggggcg tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg   | 4560 |
| ttcggtgctg gcgagcggtg tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat   | 4620 |
| caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta   | 4680 |
| aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa   | 4740 |
| atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc   | 4800 |
| cccctggaag ctccctcgctg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt  | 4860 |
| ccgcctttct cccttcggga agcgtggcg tttctcatag ctacgctgt aggtatctca     | 4920 |
| gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg    | 4980 |
| accgctgcgc cttatccggt aactatcgctc ttgagtccaa cccggtgaaga cagcacttat | 5040 |
| cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta   | 5100 |
| cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct   | 5160 |
| gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac   | 5220 |
| aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa   | 5280 |
| aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa   | 5340 |
| actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt  | 5400 |
| taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tgggtctgaca  | 5460 |
| gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcaccca   | 5520 |
| tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc   | 5580 |
| ccagtgcctg aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa    | 5640 |
| accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggctcctg aactttatcc gctccatcc    | 5700 |
| agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca   | 5760 |
| acgttgttgc cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat    | 5820 |
| tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag    | 5880 |
| cggttagctc cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac   | 5940 |
| tcattggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt  | 6000 |
| ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgogg cgaccgagtt   | 6060 |
| gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgogccaca tagcagaact ttaaaagtgc   | 6120 |
| tcattcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat  | 6180 |
| ccagttcgat gtaaccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca    | 6240 |
| gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga   | 6300 |

---

```

cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 6360
gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 6420
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtc 6458

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 7464

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 质粒 pMG10A1a7

&lt;400&gt; 2

```

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgtttttgcg ctgcttcgta agctgcaata aacaatcatt attttcattg 240
gatctgtgtg ttggtttttt gtgtgggctt gggggagggg gagggcagaa tgactccaag 300
agctacagga aggcaggtca gagacccac tggacaaaca gtggctggac tctgcaccat 360
aacacacaat caacagggga gtgagctgga tcgagctaga gtccgttaca taacttaagg 420
taaattggccc gcctggctga ccgcccaacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt 480
atgttcccat agtaacgcca atagggaactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac 540
ggtaaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtac cccctatttg 600
acgtcaatga cggtaaattg cccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttatgggact 660
ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatogetat taccatgggtg atgcggtttt 720
ggcagtacat caatgggagt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc 780
ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc 840
gtaacaactc cgtcccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata 900
taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga tcgcctggag acgcatcca cgtgttttg 960
acctccatag aagacaccgg gaccgatcca gcctccgcgg ccgggaacgg tgcattggaa 1020
cgcggtattc ccgtgccaag agtgacgtaa gtaccgccta tagagtctat agggccacc 1080
ccttggttcc ttatgcatgc tatactgttt ttggcttggg gtctatacac cccgcttcc 1140
tcatgttata ggtgatggta tagcttagcc tatagggtgtg ggttattgac cattattgac 1200

```

---

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cactccccta ttggtgacga tactttccat tactaatcca taacatggct ctttgccaca  | 1260 |
| actctcttta ttggctatat gccaatcac tgctcttcag agactgacac ggactctgta   | 1320 |
| tttttacagg atgggggtctc atttattatt tacaaattca catatacaac accaccgtcc | 1380 |
| ccagtgtccc cagtttttat taaacataac gtgggatctc cacgcgaatc tcgggtacgt  | 1440 |
| gttccggaca tgggctcttc tccggtagcg gcggagcttc tacatccgag cctgtctccc  | 1500 |
| atgcctccag cgactcatgg tcgctcggca gctccttgct cctaacagtg gaggccagac  | 1560 |
| ttaggcacag cacgatgcc accaccacca gtgtgccgca caaggccgtg gcggtagggt   | 1620 |
| atgtgtctga aaatgagctc ggggagcggg cttgcaccgc tgacgcattt ggaagactta  | 1680 |
| aggcagcggc agaagaagat gcaggcagct gagttgttgt gttctgataa gagtcagagg  | 1740 |
| taactcccgt tgcgggtctg ttaacggtgg agggcagtg agtctgagca gtactcgttg   | 1800 |
| ctgccgcgcg cgccaccaga cataatagct gacagactaa cagactgttc ctttccatgg  | 1860 |
| gtcttttctg cagtcacccg ggggatcctt cgaacgtagc tctagccacc atgcccatgg  | 1920 |
| ggtctctgca accgctggcc accttgtagc tgctggggat gctggtcgct tcctgcctcg  | 1980 |
| gaaactgggt gaatgtaata agtgatttga aaaaaattga agatcttatt caatctatgc  | 2040 |
| atattgatgc tactttatat acggaaagtg atgttcaccc cagttgcaaa gtaacagcaa  | 2100 |
| tgaagtgctt tctcttgagg ttacaagtta tttcacttga gtccggagat gcaagtattc  | 2160 |
| atgatacagt agaaaatctg atcatcctag caaacaacag tttgtcttct aatgggaatg  | 2220 |
| taacagaatc tggatgcaaa gaatgtgagg aactggagga aaaaaatatt aaagaatttt  | 2280 |
| tggacagttt tgtacatatt gtcgacatgt tcatcaacac ttcggatccc aaatctgctg  | 2340 |
| acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtot   | 2400 |
| tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacgt  | 2460 |
| gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg  | 2520 |
| gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc  | 2580 |
| gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt  | 2640 |
| gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag  | 2700 |
| ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga   | 2760 |
| accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt | 2820 |
| gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg  | 2880 |
| acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga  | 2940 |
| acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc  | 3000 |

---

|             |            |             |            |            |            |      |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| tctccctgtc  | tccgggtaaa | tgatctagag  | ggcccgttta | aaccgcgtga | tcagcctcga | 3060 |
| ctgtgccttc  | tagttgccag | ccatctgttg  | tttgcccctc | ccccgtgcct | tccttgaccc | 3120 |
| tggaaaggtgc | cactcccact | gtcctttcct  | aataaaatga | ggaaattgca | tcgcattgtc | 3180 |
| tgagtaggtg  | tcattctatt | ctgggggggtg | gggtggggca | ggacagcaag | ggggaggatt | 3240 |
| gggaagacaa  | tagcaggcat | gctggggatg  | cggtgggctc | tatggcttct | gaggcgaaaa | 3300 |
| gaaccagctg  | gggctctagg | gggtatcccc  | acgcgccttg | tagcggcgca | ttaagcgcg  | 3360 |
| cgggtgtggt  | ggttacgcgc | agcgtgaccg  | ctacacttgc | cagcgcccta | gcgcccgtc  | 3420 |
| ctttcgcttt  | cttcccttcc | tttctcgcca  | cgttcgcgg  | ctttccccgt | caagctctaa | 3480 |
| atcgggggct  | ccctttagg  | ttccgattta  | gtgctttacg | gcacctcgac | cccaaaaaac | 3540 |
| ttgattagg   | tgatggttca | cgtagtgggc  | catcgccctg | atagacggtt | tttcgcctt  | 3600 |
| tgacgttga   | gtccacgttc | tttaatatgt  | gactcttggt | ccaaactgga | acaacactca | 3660 |
| accctatctc  | ggtctattct | tttgatttat  | aagggtttt  | gccgatttcg | gcctattggt | 3720 |
| taaaaaatga  | gctgatttaa | caaaaattta  | acgcgaatta | attctgtgga | atgtgtgtca | 3780 |
| gtaggggtg   | ggaaagtccc | caggctcccc  | agcaggcaga | agtatgcaaa | gcatgcatct | 3840 |
| caattagtca  | gcaaccagg  | gtggaaagtc  | cccaggctcc | ccagcaggca | gaagtatgca | 3900 |
| aagcatgcat  | ctcaattagt | cagcaaccat  | agtcccgcgc | ctaactccgc | ccatcccgc  | 3960 |
| cctaactccg  | cccagttccg | cccattctcc  | gccccatggc | tgactaattt | tttttattta | 4020 |
| tgacagaggcc | gaggccgcct | ctgcctctga  | gctattccag | aagtagtgag | gaggcttttt | 4080 |
| tggaggccta  | ggcttttgca | aaaagctccc  | gggagcttgt | atatccattt | tcggatctga | 4140 |
| tcaagagaca  | ggatgaggat | cgtttcgcat  | gattgaacaa | gatggattgc | acgcaggttc | 4200 |
| tccggccgct  | tgggtggaga | ggctattcgg  | ctatgactgg | gcacaacaga | caatcggctg | 4260 |
| ctctgatgcc  | gccgtgttcc | ggctgtcagc  | gcaggggcgc | ccggttcttt | ttgtcaagac | 4320 |
| cgacctgtcc  | ggtgccctga | atgaactgca  | ggacgaggca | gcgcggctat | cgtggctggc | 4380 |
| cacgacgggc  | gttccttgcg | cagctgtgct  | cgacgttgtc | actgaagcgg | gaagggactg | 4440 |
| gctgctattg  | ggcgaagtgc | cggggcagga  | tctcctgtca | tctcaccttg | ctcctgccga | 4500 |
| gaaagtatcc  | atcatggctg | atgcaatgcg  | gcggctgcat | acgcttgatc | cggctacctg | 4560 |
| cccattcgac  | caccaagcga | aacatcgcat  | cgagcgagca | cgtactcgga | tggaagccgg | 4620 |
| tcttgtcgat  | caggatgatc | tggacgaaga  | gcatcagggg | ctcgcgccag | ccgaactgtt | 4680 |
| cgccaggctc  | aaggcgcgca | tgcccgaacg  | cgaggatctc | gtcgtgaccc | atggcgatgc | 4740 |
| ctgcttgccg  | aatatcatgg | tggaaaatgg  | ccgcttttct | ggattcatcg | actgtggccg | 4800 |
| gctgggtgtg  | gcggaccgct | atcaggacat  | agcgttggct | acccgtgata | ttgctgaaga | 4860 |

---

|                                                                      |      |
|----------------------------------------------------------------------|------|
| gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc    | 4920 |
| gcagcgcata gcctttctatc gcctttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctgggggttc | 4980 |
| gaaatgaccg accaagcgcac gcccaacctg ccatcacgag atttcgattc caccgccgcc   | 5040 |
| ttctatgaaa gggttgggctt cggaatcggtt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag  | 5100 |
| cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccccaact tgtttattgc agcttataat    | 5160 |
| ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat    | 5220 |
| tctagttgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttata atgtctgtat accgtcgacc    | 5280 |
| tctagctaga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg    | 5340 |
| ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa   | 5400 |
| tgagtgaagt aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac    | 5460 |
| ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt    | 5520 |
| gggcgctctt ccgcttcttc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga    | 5580 |
| gcggtatcag ctactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca    | 5640 |
| ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg    | 5700 |
| ctggcgtttt tccataggct ccgccccctt gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt    | 5760 |
| cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctcc   | 5820 |
| ctcgtgcgct ctctgtttcc gacctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct     | 5880 |
| tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc    | 5940 |
| gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctt agcccgaccg ctgcgcctta     | 6000 |
| tccggtaact atcgtcttga gtccaaccgc gtaagacacg acttatcgcc actggcagca    | 6060 |
| gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag    | 6120 |
| tggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag    | 6180 |
| ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt    | 6240 |
| agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa    | 6300 |
| gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg    | 6360 |
| attttggta tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa ttaaaaatga      | 6420 |
| agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta    | 6480 |
| atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgcoctgactc   | 6540 |
| cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg    | 6600 |
| ataccgcgag acccagctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga     | 6660 |

```

agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt 6720
tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt 6780
gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgteg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc 6840
caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc 6900
ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat gggttatggca 6960
gcactgcata attctcttac tgtcatgcc a tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag 7020
tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg 7080
tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaacttta aagtgtcat cattggaaaa 7140
cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa 7200
cccactcgtg caccgaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga 7260
gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga 7320
atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg 7380
agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt 7440
ccccgaaaag tgccacctga cgtc 7464

```

<210> 3

<211> 1113

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有 CD5 引导子的突变的 IL-15/Fc DNA

<400> 3

```

atgcccattgg ggtctctgca accgctggcc accttgtagc tgctggggat gctggctcgt 60
tcctgcctcg gaaactgggt gaatgtaata agtgatttga aaaaaattga agatcttatt 120
caatctatgc atattgatgc tactttatat acggaaagtg atgttcaccc cagttgcaaa 180
gtaacagcaa tgaagtgcct tctcttgag ttacaagtta ttctacttga gtccggagat 240
gcaagtattc atgatacagt agaaaatctg atcatcctag caaacaacag tttgtcttc 300
aatgggaatg taacagaatc tggatgcaaa gaatgtgagg aactggagga aaaaaatatt 360
aaagaatttt tggacagttt tgtacatatt gtcgacatgt tcatcaacac ttcggatccc 420
aaatctgctg acaaaaactca cacatgcca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 480
ccgtcagttc tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 540

```

```

gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      600
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      660
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag      720
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc      780
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag      840
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      900
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgta      960
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     1020
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     1080
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga                                     1113

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 370

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 具有 CD5 引导子的人 CRB-15 的氨基酸序列

&lt;400&gt; 4

```

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1           5           10           15

```

```

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp
20           25           30

```

```

Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr
35           40           45

```

```

Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met
50           55           60

```

```

Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp
65           70           75           80

```

```

Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn
85           90           95

```

---

Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys  
 100 105 110

Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Asp Ser Phe Val  
 115 120 125

His Ile Val Asp Met Phe Ile Asn Thr Ser Asp Pro Lys Ser Ala Asp  
 130 135 140

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 165 170 175

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 180 185 190

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 195 200 205

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 210 215 220

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 225 230 235 240

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 245 250 255

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 260 265 270

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 275 280 285

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 290 295 300

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 305 310 315 320

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 325 330 335

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

---

340                                      345                                      350  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
                  355                                      360                                      365  
  
 Gly Lys  
          370  
  
 <210> 5  
 <211> 371  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 具有 CD15 引导子的鼠 IL-15/Fc 的氨基酸序列 (人突变的 IL-15,  
       鼠 IgG2A)  
 <400> 5  
  
 Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly  
 1                                      5                                      10                                      15  
  
 Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp  
                  20                                      25                                      30  
  
 Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr  
                  35                                      40                                      45  
  
 Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met  
                  50                                      55                                      60  
  
 Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp  
 65                                      70                                      75                                      80  
  
 Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn  
                  85                                      90                                      95  
  
 Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys  
                  100                                      105                                      110  
  
 Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Asp Ser Phe Val  
                  115                                      120                                      125  
  
 His Ile Val Asp Met Phe Ile Asn Thr Ser Asp Pro Arg Gly Pro Thr

| 130                                                                                | 135 | 140 |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly<br>145 150 155 160 |     |     |
| Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met<br>165 170 175     |     |     |
| Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu<br>180 185 190     |     |     |
| Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val<br>195 200 205     |     |     |
| His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu<br>210 215 220     |     |     |
| Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly<br>225 230 235 240 |     |     |
| Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile<br>245 250 255     |     |     |
| Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val<br>260 265 270     |     |     |
| Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr<br>275 280 285     |     |     |
| Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu<br>290 295 300     |     |     |
| Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro<br>305 310 315 320 |     |     |
| Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val<br>325 330 335     |     |     |
| Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val<br>340 345 350     |     |     |
| His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr<br>355 360 365     |     |     |
| Pro Gly Lys<br>370                                                                 |     |     |

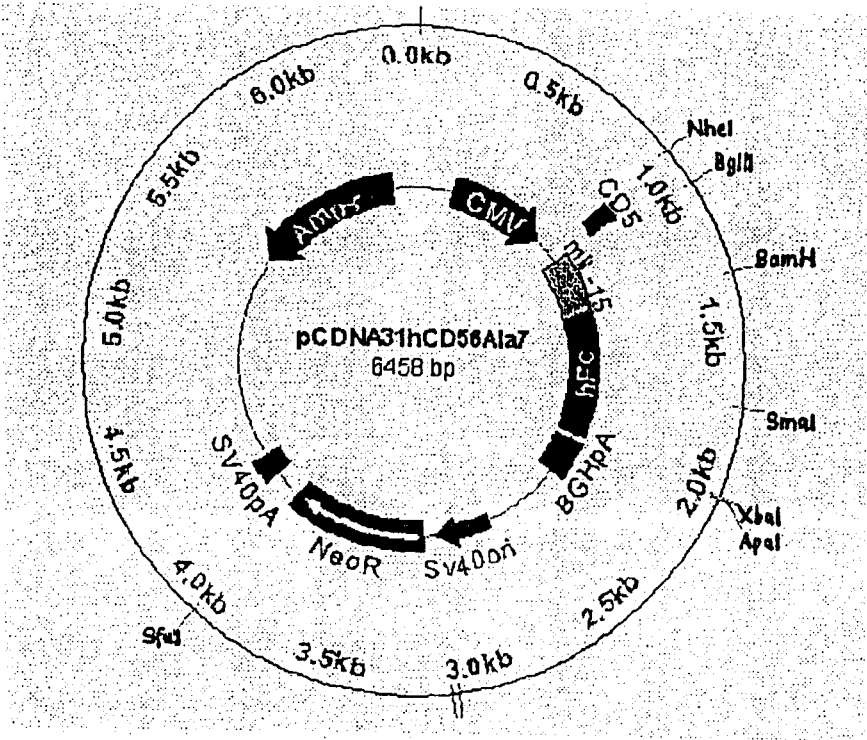


图 1

|            |             |             |            |             |            |      |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| gacggatcgg | gagatctccc  | gatccccat   | gggtgactct | cagtacaatc  | tgctctgatg | 60   |
| ccgcatagtt | aagccagtat  | ctgtccctg   | cttgtgtgtt | ggaggtcgct  | gagtagtgcg | 120  |
| cgagcaaat  | ttaagctaca  | acaaggcaag  | gcttgaccga | caattgcatg  | aagaatctgc | 180  |
| ttagggttag | gcgtttttgcg | ctgtcttcgcg | atgtacgggc | cagatatacg  | cgttgacatt | 240  |
| gattattgac | tagttattaa  | tagtaataca  | ttacgggggc | attagttcat  | agcccatata | 300  |
| tggaagtccg | cgttacataa  | cttacggtaa  | atggcccgcc | tggtgaccg   | cccaacgacc | 360  |
| cccgcccat  | gacgtcaata  | atgacgtatg  | ttcccatagt | aacgccaata  | gggactttcc | 420  |
| attgacgtca | atgggtggag  | tatttacggt  | aaactgcccc | cttggcagta  | catcaagtgt | 480  |
| atcatatgcc | aagtacgccc  | cctattgacg  | tcaatgacgg | taaatggccc  | gcctggcatt | 540  |
| atgcccagta | catgacctta  | tggtactttc  | ctacttgga  | gtacatctac  | gtattagtca | 600  |
| tcgctattac | catggtgatg  | cggttttggc  | agtacatcaa | tggtcggtga  | tagcggtttg | 660  |
| actcacgggg | atttccaagt  | ctccacccca  | ttgacgtcaa | tggtgagttt  | ttttggcacc | 720  |
| aaaatcaacg | ggactttcca  | aatgtcgta   | acaactccgc | cccatgacg   | caaattggcg | 780  |
| gtagccgtgt | acggtgggag  | gtctatataa  | gcagagctct | ctggctaact  | agagaacca  | 840  |
| ctgcttactg | gcttatcgaa  | attaatacga  | ctcactatag | ggagacccaa  | gctggctagc | 900  |
| caccatgccc | atggggtctc  | tgcaaccgct  | ggccaccttg | tacctgctgg  | ggatgctggt | 960  |
| cgcttctcgc | ctcggaact   | gggtgaatgt  | aataagtgt  | ttgaaaaaaa  | ttgaagatct | 1020 |
| tattcaatgt | atgcataatt  | atgctacttt  | atatacggaa | agtgtgttcc  | accccgattg | 1080 |
| caaagtaaca | gcaatgaagt  | gctttctctt  | ggagttacaa | gttatttcac  | ttgagtcggg | 1140 |
| agatgcaagt | attcatgata  | cagtagaaaa  | tctgatcatc | ctagcaaaaa  | acagtttgtc | 1200 |
| ttctaattgg | aatgtaacag  | aatctggatg  | caaagaatgt | gaggaaactg  | aggaaaaaaa | 1260 |
| tattaaagaa | tttttggaca  | gttttgcac   | tattgtcgac | atgttcatca  | acacttcgga | 1320 |
| tcccaaatct | gctgacaaaa  | ctcacacatg  | cccaccgtgc | ccagcacctg  | aactcctggg | 1380 |
| gggaccgtca | gtcttctctt  | tccccccaaa  | acccaaggac | accctcatga  | tctcccgga  | 1440 |
| ccctgaggtg | acgtgcgtgg  | tggtggacgt  | gagccacgaa | gaccctgagg  | tcaagttcaa | 1500 |
| ctggtacgtg | gacggcggtg  | aggtgcataa  | tgccaagaca | aagccgcggg  | aggagcagta | 1560 |
| caacagcacg | taccgtgtgg  | tcagcgtcct  | caccgtcctg | caccaggact  | ggctgaatgg | 1620 |
| caaggagtac | aagtgcaagg  | tctccaacaa  | agccctccca | gcccccatcg  | agaaaacat  | 1680 |
| ctccaaagcc | aaagggcagc  | cccgagaacc  | acaggtgtac | accctgcccc  | catcccgga  | 1740 |
| tgagctgacc | aagaaccagg  | tcagcctgac  | ctgcctggtc | aaaggcttct  | atcccagcga | 1800 |
| catcgccgtg | gagtgaggga  | gcaatgggca  | gccggagaac | aactacaaga  | ccacgcctcc | 1860 |
| cgtgctggac | tccgacggct  | ccttcttctt  | ctacagcaag | ctcaccgtgg  | acaagagcag | 1920 |
| gtggcagcag | gggaacgtct  | tctcatgctc  | cgtagtgcac | gaggctctgc  | acaaccacta | 1980 |
| cacgcagaag | agcctctccc  | tgtctccggg  | ttaatgatct | agagggcccc  | tttaaacccg | 2040 |
| ctgatcagcc | tcgactgtgc  | cttctagtgt  | ccagccatct | gttgtttgcc  | cctccccctg | 2100 |
| gccttctctt | acctggaag   | gtgccactcc  | cactgtcctt | tcctaataaaa | atgaggaaat | 2160 |
| tgcatcgcat | tgtctgagta  | gggtgcattc  | tattctgggg | gggtgggtgg  | ggcaggacag | 2220 |
| caagggggag | gattgggaag  | acaatagcag  | gcatgctggg | gatgcgggtg  | gctctatggc | 2280 |
| ttctgaggcg | gaaagaacca  | gctggggctc  | taggggggat | ccccacgcgc  | cctgtagcgg | 2340 |
| cgcattaaag | gcggcggggtg | tggtgggtac  | gcgcagcgtg | accgctacac  | ttgccagcgc | 2400 |
| cctagcgccc | gctcctttcg  | cttcttctcc  | ttcctttctc | gccacgttcc  | ccggttttcc | 2460 |
| ccgtcaagct | ctaaatcggg  | ggctcccttt  | agggttccga | tttagtgctt  | tacggcacct | 2520 |
| cgaccccaaa | aaacttgatt  | aggggtgatg  | ttcacgtagt | gggccatcgc  | cctgatagac | 2580 |
| gggttttctc | cctttgacgt  | tggtggtcac  | gttctttaat | agtggactct  | tgttccaaac | 2640 |
| tggaacaaca | ctcaacccta  | tctcgggtcta | ttcttttgat | ttataaggga  | ttttgccgat | 2700 |
| ttcggtctat | tggttaaaaa  | atgagctgat  | tttaacaaaa | tttaacgcga  | attaattctg | 2760 |
| tggaatgtgt | gtcagtttag  | gtgtggaag   | tccccaggct | ccccagcagg  | cagaagtatg | 2820 |
| caaagcatgc | atctcaatta  | gtcagcaacc  | aggtgtggaa | agtccccagg  | ctccccagca | 2880 |
| ggcagaagta | tgcaaacgat  | gcattctaat  | tagtcagcaa | ccatagtccc  | gcccctaact | 2940 |
| ccgcccatac | cgcccctaac  | tccgcccagt  | tccgcccatt | ctccgcccc   | tggtgacta  | 3000 |
| atttttttta | tttatgcaga  | ggccgaggcc  | gcctctgcct | ctgagctatt  | ccagaagtat | 3060 |
| tgaggaggct | tttttggagg  | cctaggcttt  | tgcaaaaagc | tcccgggagc  | ttgtatatcc | 3120 |
| attttcggat | ctgatcaaga  | gacaggatga  | ggatcgtttc | gcatgattga  | acaagatgga | 3180 |
| ttgcaacgag | gttctccggc  | cgcttgggtg  | gagaggctat | tcggctatga  | ctgggcacaa | 3240 |
| cagacaatcg | gctgctctga  | tgccgcctgt  | ttccgctgtg | cagcgcaggg  | gcgcccgggt | 3300 |
| ctttttgtca | agaccgacct  | gtccggtgcc  | ctgaatgaac | tgaggagcga  | ggcagcgcgg | 3360 |
| ctatcgtggc | tgccacgac   | ggcggttctc  | tgccgagctg | tgctcgacgt  | tgctactgaa | 3420 |
| gcgggaagg  | actggctgct  | attgggcgaa  | gtgcccgggc | aggatctcct  | gtcatctcac | 3480 |
| cttgctcctg | ccgagaaagt  | atccatcatg  | gctgatgcaa | tgccgaggct  | gcatacgctt | 3540 |
| gatccggcta | cctgccatt   | cgaccaccaa  | gcgaacatc  | gcatcgagcg  | agcacgtact | 3600 |
| cggatggaag | ccggtcttgt  | cgatcaggat  | gatctggacg | aagagcatca  | ggggctcgcg | 3660 |
| ccagccgaac | tggtcgccag  | gctcaaggcg  | cgcgtgcccg | acggcgaggga | tctcgtcgtg | 3720 |
| acccatggcg | atgcctgctt  | gccgaatatc  | atgggtgaaa | atggccgctt  | ttctggattc | 3780 |

图 2

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atcgactgtg  | gccggctggg  | tgtggcggac  | cgctatcagg  | acatagcggt  | ggctacccgt  | 3840 |
| gatatgtctg  | aagagcttgg  | cggcgaatgg  | gctgaccgct  | tcctcgtgct  | ttacggtatc  | 3900 |
| gccgctcccc  | attcgagcgc  | catcgccctc  | tatcgccctc  | ttgacgagtt  | cttctgagcg  | 3960 |
| ggactctggg  | gttcgaaatg  | accgaccaag  | cgacgcccaa  | cctgccatca  | cgagatttgc  | 4020 |
| attccaccgc  | cgccttctat  | gaaagggttg  | gcttcggaat  | cgttttccgg  | gacgcccgtt  | 4080 |
| ggatgatcct  | ccagcgccgg  | gatctcatgc  | tggagttctt  | cgcccccccc  | aacttgttta  | 4140 |
| ttgcagctta  | taatggttac  | aaataaagca  | atagcatcac  | aaatttcaca  | aataaagcat  | 4200 |
| ttttttcact  | gcattctagt  | tgtggtttgt  | ccaaactcat  | caatgtatct  | tatcatgtct  | 4260 |
| gtataccgct  | gacctctagc  | tagagcttgg  | cgtaatcatg  | gtcatagctg  | tttccctgtg  | 4320 |
| gaaattgtta  | tccgctcaca  | attccacaca  | acatacgagc  | cggaagcata  | aagtgtaaag  | 4380 |
| cctgggggtgc | ctaagtgtg   | agctaactca  | cattaattgc  | gttgcgctca  | ctgcccgttt  | 4440 |
| tccagtcggg  | aaacctgtcg  | tgccagctgc  | attaatgaat  | cggccaaacgc | gcggggagag  | 4500 |
| gcgggttgcg  | tattgggcgc  | tcttccgctt  | cctcgcctcac | tgactcgtcg  | cgctcggtcg  | 4560 |
| ttcggtcgcg  | gcgagcggta  | tcagctcact  | caaaagcggt  | aatacggtta  | tccacagaat  | 4620 |
| caggggataa  | cgagggaaa   | aacatgtgag  | caaaaggcca  | gcaaaaggcc  | aggaaccgta  | 4680 |
| aaaaggccgc  | gttgctggcg  | ttttccata   | ggctccgccc  | ccctgacgag  | catcacaata  | 4740 |
| atcgacgctc  | aagtgcagag  | tggcgaaaac  | cgacaggact  | ataaagatac  | caggcgcttc  | 4800 |
| cccctggaag  | ctccctcgtg  | cgctctctct  | ttccgaccct  | gccgcttacc  | ggataacctg  | 4860 |
| ccgcctttct  | cccttcggga  | agcgtggcgc  | tttctcatag  | ctcacgctgt  | aggtatctca  | 4920 |
| gttcggtgta  | ggtcgttcgc  | tccaagctgg  | gctgtgtgca  | cgaaaccccc  | gttcagcccc  | 4980 |
| accgctgcgc  | cttatccggg  | aactatcgct  | ttgagtccaa  | cccggttaaga | cacgacttat  | 5040 |
| cgccactggc  | agcagccact  | ggtaacagga  | ttagcagagc  | gaggtatgta  | ggcgggtgta  | 5100 |
| cagagttcct  | gaagtgggtg  | cctaactacg  | gctacactag  | aagaacagta  | tttggtatct  | 5160 |
| gcgctctgct  | gaagccagtt  | accttcggaa  | aaagagttgg  | tagctcttga  | tccggcacaac | 5220 |
| aaaccaccgc  | tggtagcggg  | ggtttttttg  | tttgcaagca  | gcagattacg  | cgcagaaaaa  | 5280 |
| aaggatctca  | agaagatcct  | ttgatctttt  | ctacgggggc  | tgacgctcag  | tggaaacgaa  | 5340 |
| actcacgtta  | agggattttg  | gtcatgagat  | tatcaaaaag  | gatcttcacc  | tagatccttt  | 5400 |
| taaaattaaa  | atgaagtttt  | aaatcaatct  | aaagtatata  | tgagtaaaat  | tggctctgaca | 5460 |
| gttaccatag  | cttaatcagt  | gaggcaccta  | tctcagcgat  | ctgtctattt  | cgttcatcca  | 5520 |
| tagttgcctg  | actccccgtc  | gtgtagataa  | ctacgatacg  | ggaggggctta | ccatctggcc  | 5580 |
| ccagtgcctg  | aatgataccg  | cgagaccacc  | gctcaccggc  | tccagattta  | tcagcaataa  | 5640 |
| accagccagc  | cggaaggggc  | gagcgcagaa  | gtggtcctgc  | aactttatcc  | gcctccatcc  | 5700 |
| agtctattaa  | ttgttgccgg  | gaagctagag  | taagtgttgc  | gccagttaat  | agtttgcgca  | 5760 |
| acgttgttgc  | cattgtctca  | ggcatcgtgg  | tgtcacgctc  | gtcgttttgt  | atggcttcat  | 5820 |
| tcagctccgg  | ttcccaacga  | tcaaggcgag  | ttacatgac   | ccccatgttg  | tgcacaaaaa  | 5880 |
| cggttagctc  | cttcgggtcct | ccgatcgttg  | tcagaagtaa  | gttgcccgca  | gtgttatcac  | 5940 |
| tcattggttat | ggcagcactg  | cataattctc  | ttactgtcat  | gccatccgta  | agatgctttt  | 6000 |
| ctgtgactgg  | tgagtactca  | accaagtcac  | tctgagaata  | gtgtatgcgg  | cgaccgagtt  | 6060 |
| gctcttgccc  | ggcgtcaata  | cggtgataata | ccgcgccaca  | tagcagaact  | ttaaaagtgc  | 6120 |
| tcattcattg  | aaaacgttct  | tcggggcgaa  | aactctcaag  | gatcttaccg  | ctgttgagat  | 6180 |
| ccagttcgat  | gtaacccact  | cgtgcaccca  | actgatcttc  | agcatctttt  | actttcacca  | 6240 |
| gcgtttctgg  | gtgagcaaaa  | acaggaaagg  | aaaatgccgc  | aaaaaaggga  | ataaggcgca  | 6300 |
| cacggaaaatg | ttgaatactc  | atactcttcc  | tttttcaata  | ttattgaagc  | atttatcagg  | 6360 |
| gttattgtct  | catgagcgga  | tacatatattg | aatgtattta  | gaaaaataaa  | caaatagggg  | 6420 |
| ttccgcgcac  | atttccccga  | aaagtgcac   | ctgacgtc    |             |             | 6458 |

图 3

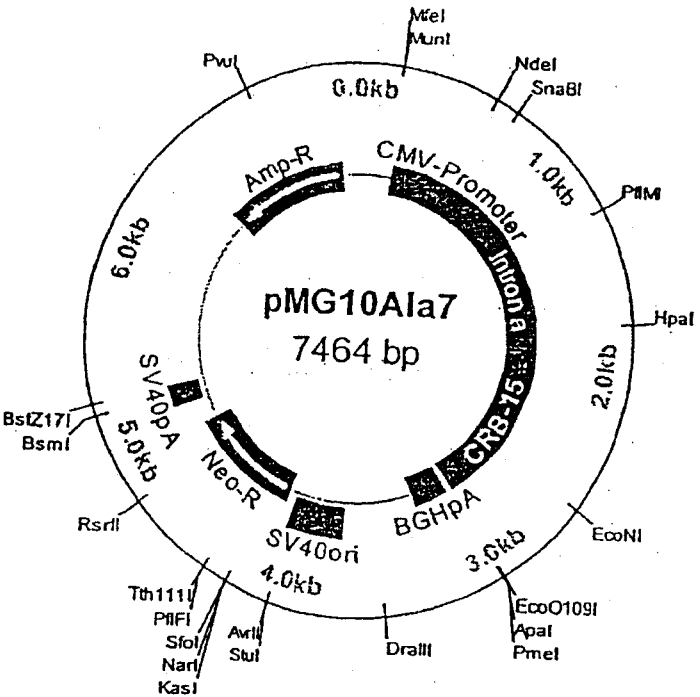


图 4

|             |             |             |            |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| gacggatcgg  | gagatctccc  | gatcccctat  | ggtgcactct | cagtacaatc | tgctctgatg  | 60   |
| ccgcatagtt  | aagccagtat  | ctgctccctg  | cttgtgtgtt | ggaggctcgt | gagtagtgcg  | 120  |
| cgagcaaaat  | taaagctaca  | acaaggcaag  | gcttgaccga | caattgcatg | aagaatctgc  | 180  |
| ttagggttag  | gcgtttttgcg | ctgcttcgta  | agctgcaata | aacaatcatt | attttcattg  | 240  |
| gatctgtgtg  | ttggtttttt  | gtgtgggctt  | gggggagggg | gaggccagaa | tgactccaag  | 300  |
| agctacagga  | aggcaggtca  | gagacccac   | tggaacaaca | gtggctggac | tctgcaccat  | 360  |
| aacacacaat  | caacagggga  | gtgagctgga  | tcgagctaga | gtccgttaca | taacttacgg  | 420  |
| taaatggccc  | gcctggctga  | ccgcccacg   | acccccgccc | attgacgtca | ataatgacgt  | 480  |
| atgttcccat  | agtaacgcca  | atagggactt  | tccattgacg | tcaatgggtg | gagtatttac  | 540  |
| ggtaaaactgc | ccacttgcca  | gtacatcaag  | tgtatcatat | gccaagtacg | ccccctattg  | 600  |
| acgtcaatga  | cggtaaatgg  | ccgcctggc   | attatgccc  | gtacatgacc | ttatgggact  | 660  |
| ttcctacttg  | gcagtacatc  | tacgtattag  | tcacgtctat | taccatgggt | atgcggtttt  | 720  |
| ggcagtagat  | caatgggctg  | ggatagcgg   | ttgactcacg | gggatttcca | agctccacc   | 780  |
| ccattgacgt  | caatgggagt  | ttgttttggc  | acaaaaatca | acgggacttt | ccaaaatgtc  | 840  |
| gtaacaactc  | cgccccattg  | acgcaaatgg  | gcggtagggc | tgtacgggtg | gaggtctata  | 900  |
| taagcagagc  | tcgttttagt  | aaccgtcaga  | tcgcctggag | acgccatcca | cgctgttttg  | 960  |
| acctccatag  | aagacaccgg  | gaccgatcca  | gcctccgcgg | ccgggaacgg | tgcatgggaa  | 1020 |
| cgcgatttcc  | ccgtgccaa   | agtgaagtaa  | gtaccgccta | tagagtctat | aggcccaccc  | 1080 |
| ccttggtctt  | ttatgcatgc  | tatactgttt  | ttggcttggg | gtctatacac | ccccgcttcc  | 1140 |
| tcattgtata  | gggtatggt   | tagcttagcc  | tataggtgtg | ggttattgac | cattattgac  | 1200 |
| cactccccta  | ttggtgacga  | tactttccat  | tactaatcca | taacatggct | ctttgccaca  | 1260 |
| actctcttta  | ttggctatat  | gccaatacac  | tgtccttcag | agactgacac | ggactctgta  | 1320 |
| tttttacagg  | atggggcttc  | atttattatt  | tacaaatcca | catatacaac | accaccgtcc  | 1380 |
| ccagtgcctg  | cagtttttat  | taaacataac  | gtgggatctc | cacgcgaatc | tcgggtacgt  | 1440 |
| gttcgggaca  | tgggctcttc  | tcgggtagcg  | gcggagcttc | tacatccgag | ccctgctccc  | 1500 |
| atgcctccag  | cgactcatgg  | tcgctcggca  | gctccttgc  | cctaacagtg | gaggccagac  | 1560 |
| ttaggcacag  | cacgatgccc  | accaccacca  | gtgtgccgca | caaggccgtg | gcggtaggg   | 1620 |
| atgtgtctga  | aaatgagctc  | ggggagcggg  | cttgaccgcg | tgacgcattt | ggaagactta  | 1680 |
| aggcagcggc  | agaagaagat  | gcaggcagct  | gagttgttgt | gttctgataa | gagtcagagg  | 1740 |
| taactcccgt  | tgcggtgctg  | ttaacgggtg  | agggcagtg  | agtctgagca | gtactcgttg  | 1800 |
| ctgccgcgcg  | cgccaccaga  | cataatagct  | gacagactaa | cagactgttc | ctttccatgg  | 1860 |
| gtcttttctg  | cagtcacccg  | ggggatcctt  | cgaacgtagc | tctagccacc | atgcccatgg  | 1920 |
| ggtctctgca  | accgttgccc  | accttgtacc  | tgctggggat | gctgggtcgt | tcctgcctcg  | 1980 |
| gaaactgggt  | gaatgtaata  | agtgatattga | aaaaaattga | agatcttatt | caatctatgc  | 2040 |
| atattgatgc  | tactttatat  | acggaaagtg  | atgttcaccc | cagtttgcaa | gtaacagcaa  | 2100 |
| tgaagtgtct  | tctcttggag  | ttacaagtta  | tttcaattga | gtccggagat | gcaagtattc  | 2160 |
| atgatacagt  | agaaaaatctg | atcatcctag  | caaacaacag | tttgtcttct | aatgggaaatg | 2220 |
| taacagaatc  | tggatgcaaa  | gaatgtgagg  | aactggagga | aaaaaatatt | aaagaatttt  | 2280 |
| tggacagttt  | tgtacatatt  | gtcgacatgt  | tcatacaac  | ttcggtatcc | aaatctgctg  | 2340 |
| acaaaaactca | cacatgcccc  | ccgtgcccag  | cacctgaact | cctgggggga | ccgtcagttc  | 2400 |
| tcctcttccc  | cccaaaaccc  | aaggacaccc  | tcatgatctc | ccggaccctt | gaggtcacgt  | 2460 |
| gcgtgggtgt  | ggacgtgagc  | cacgaagacc  | ctgaggtcaa | gttcaactgg | tacgtggacg  | 2520 |
| gcgtggaggt  | gcataatgcc  | aagacaaagc  | cgcgggagga | gcagtacaac | agcacgtacc  | 2580 |
| gtgtgggtcag | cgctctcacc  | gtcctgcacc  | aggactggct | gaatggcaag | gagtagaagt  | 2640 |
| gcaaggtctc  | caacaaagcc  | ctcccagccc  | ccatcgagaa | aacctctccc | aaagccaaag  | 2700 |
| ggcagccccg  | agaaccacag  | gtgtacaccc  | tgccccatc  | ccgggatgag | ctgaccaaga  | 2760 |
| accaggtcag  | cctgacctgc  | ctgggtcaaag | gcttctatcc | cagcgacatc | gccgtggagt  | 2820 |
| gggagagcaa  | tgggcagccg  | gagaacaact  | acaagaccac | gcctcccgtg | ctggactccg  | 2880 |
| acgggtcctt  | cttctcttac  | agcaagctca  | ccgtggacaa | gagcaggtgg | cagcagggga  | 2940 |
| acgtcttctc  | atgctccgtg  | atgcatgagg  | ctctgcacaa | ccactacacg | cagaagagcc  | 3000 |
| tctccctgtc  | tcgggttaaa  | tgatctagag  | ggcccgttta | aaccgctga  | tcagcctcga  | 3060 |
| ctgtgccttc  | tagttgccag  | ccatctgttg  | tttgccctc  | ccccgtgctt | tccttgaccc  | 3120 |
| tgaaaggtgc  | cactcccaact | gtcctttcct  | aataaaatga | ggaaattgca | tcgcattgtc  | 3180 |
| tgaagttagt  | tcattctatt  | ctgggggggtg | gggtggggca | ggacagcaag | ggggaggatt  | 3240 |
| gggaaagacaa | tagcaggcat  | gctggggatg  | cggtgggctc | tatggcttct | gaggcggaaa  | 3300 |
| gaaccagctg  | gggctctagg  | gggtatcccc  | acgcgcctg  | tagcggcgca | ttaagcgcgg  | 3360 |
| cggtgtgtgg  | gggttacgcg  | agcgtgaccc  | ctacacttgc | cagcgcctta | gcgcccgtc   | 3420 |
| ctttcgcttt  | cttcccttcc  | tttctcgcca  | cgttcgccgg | ctttccccgt | caagctctaa  | 3480 |
| atcgggggct  | cccttttaggg | ttccgattta  | gtgctttacg | gcacctcgac | cccaaaaaac  | 3540 |
| ttgatttagg  | tgatggttca  | cgtagtggg   | catcgccctg | atagacgggt | tttcgcccct  | 3600 |
| tgacgttggg  | gtccacgttc  | tttaaatgtg  | gactcttgtt | ccaaactgga | acaacactca  | 3660 |
| accctatctc  | ggtctattct  | tttgatttat  | aagggtttt  | gccgatttcg | gcctattggt  | 3720 |
| taaaaaatga  | gctgatttaa  | caaaaattta  | acgcgaatta | attctgtgga | atgtgtgtca  | 3780 |

图 5

|             |              |             |            |             |             |      |
|-------------|--------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| gttaggggtg  | ggaaagtc     | ccaggtcccc  | agcaggcaga | agtatgcaa   | gcatgcatct  | 3840 |
| caattagtca  | gcaaccaggt   | gtggaaagtc  | cccagggtcc | ccagcaggca  | gaagtatgca  | 3900 |
| aagcatgcat  | ctcaattagt   | cagcaaccat  | agtcccgc   | ctaactccgc  | ccatcccgc   | 3960 |
| cctaactccg  | cccagttccg   | cccatttctc  | gccccatggc | tgactaattt  | tttttattta  | 4020 |
| tgcagaggcc  | gaggccgect   | ctgcctctga  | gctattccag | aagtagtgag  | gaggcttttt  | 4080 |
| tggaggccta  | ggcttttgca   | aaaagctccc  | gggagcttgt | atatccattt  | tcggatctga  | 4140 |
| tcaagagaca  | ggatgaggat   | cgtttcgcat  | gattgaacaa | gatggattgc  | acgcaggttc  | 4200 |
| tccggccgct  | tggttgaggaga | ggctattcgg  | ctatgactgg | gcacaacaga  | caatcggctg  | 4260 |
| ctctgatgcc  | gccgtgttcc   | ggctgtcagc  | gcaggggcgc | ccggttcttt  | ttgtcaagac  | 4320 |
| cgacctgtcc  | ggtgccttga   | atgaactgca  | ggacgaggca | gcgcggctat  | cggtgctggc  | 4380 |
| cacgacgggc  | gttccttgcg   | cagctgtgct  | cgacgttgct | actgaagcgg  | gaagggaactg | 4440 |
| gctgctattg  | ggcgaagtgc   | cggggcagga  | tctcctgtca | tctcaccttg  | ctcctgccga  | 4500 |
| gaaagtatcc  | atcatggctg   | atgcaatgcg  | cgggctgcat | acgcttgatc  | cggctacctg  | 4560 |
| cccattcgac  | caccaagcga   | aacatcgcat  | cgagcgagca | cgactactga  | tggaagccgg  | 4620 |
| tcttgctgat  | caggatgac    | tggacgaaga  | gcatcagggg | ctcgcgccag  | ccgaactgtt  | 4680 |
| cgccaggctc  | aaggcgcgca   | tgcccgcagc  | cgaggatctc | gtcgtgaccc  | atggcgtatc  | 4740 |
| ctgcttgccc  | aatacatg     | tggaatag    | ccgcttttct | ggattcatcg  | actgtggccg  | 4800 |
| gctgggtgtg  | gcggaccgct   | atcaggacat  | agcgttggtc | acccgtgata  | ttgtgaaaga  | 4860 |
| gcttgccggc  | gaatgggctg   | accgcttctc  | cgctgtttac | ggtatcgccg  | ctcccgaattc | 4920 |
| gcagcgcac   | gccttctatc   | gccttcttga  | cgagttcttc | tgagcgggac  | tctgggggttc | 4980 |
| gaaatgaccg  | accaagcgac   | gccccaccctg | ccatcacgag | atttcgattc  | caccgcgcgc  | 5040 |
| ttctatgaaa  | ggttgggctt   | cggaaatcgtt | ttccgggacg | ccggctggat  | gatcctccag  | 5100 |
| cgcggggatc  | tcatgctgga   | gttcttcgcc  | caccccaact | tgtttattgc  | agcttataat  | 5160 |
| ggttacaaat  | aaagcaatag   | catcacaaat  | ttcacaaata | aagcattttt  | ttcactgcat  | 5220 |
| tctagtgtg   | gtttgtccaa   | actcatcaat  | gtatcttctc | atgtctgtat  | accgtcgacc  | 5280 |
| tctagctaga  | gcttggcgta   | atcatggtca  | tagctgtttc | ctgtgtgaaa  | ttgttatccg  | 5340 |
| ctcacaattc  | cacacaacat   | acgagccgga  | agcataaagt | gtaaagcctg  | gggtgcctaa  | 5400 |
| tgagtgaagt  | aactcacatt   | aattgcgttg  | cgctcactgc | ccgctttcca  | gtcgggaaac  | 5460 |
| ctgtcgtgcc  | agctgcatta   | atgaatcggc  | caacgcgcgc | ggagaggcgc  | tttgcgtatt  | 5520 |
| gggcgcctct  | ccgcttctct   | gctcactgac  | tcgctgcgct | cggtcgttcg  | gctgcggcga  | 5580 |
| gcgggtatcag | ctcactcaaa   | ggcggttaata | cggttatcca | cagaatcagg  | ggataacgca  | 5640 |
| ggaagaaaca  | tgtgagcaaa   | aggccagcaa  | aaggccagga | accgtaaaaa  | ggccgcgttg  | 5700 |
| ctggcggttt  | tccataggct   | ccgccccctc  | gacgagcatc | acaaaaatcg  | acgctcaagt  | 5760 |
| cagaggtggc  | gaaacccgac   | aggactataa  | agataaccag | cgtttccccc  | tggaagctcc  | 5820 |
| ctcgtgcgct  | ctcctgttcc   | gaccctgccc  | cttaccggat | acctgtccgc  | ctttctccct  | 5880 |
| tcgggaagcg  | tggcgctttc   | tcatagctca  | cgctgtaggt | atctcagttc  | ggtgtaggtc  | 5940 |
| gttcgctcca  | agctgggctg   | tgtgcacgaa  | ccccccgctc | agcccgaccg  | ctgcgcctta  | 6000 |
| tccggttaact | atcgtcttga   | gtccaaaccg  | gtaagacacg | acttatcgcc  | actggcagca  | 6060 |
| gccactggta  | acaggattag   | cagagcgagg  | tatgtaggcg | gtgctacaga  | gttcttgaag  | 6120 |
| tgggtggcta  | actacggcta   | cactagaaga  | acagtatttg | gtatctgcgc  | tctgctgaag  | 6180 |
| ccagttacct  | tcggaaaaag   | agttggtagc  | tcttgatccg | gcaaaacaaac | caccgctggt  | 6240 |
| agcgggtggt  | tttttgtttg   | caagcagcag  | attacgcgca | gaaaaaaagg  | atctcaagaa  | 6300 |
| gatcctttga  | tcttttctac   | gggtgtctgac | gctcagtgga | acgaaaaactc | acgttaaggg  | 6360 |
| attttgggtca | tgagattatc   | aaaaaggatc  | ttcacctaga | tccttttaaa  | ttaaaaatga  | 6420 |
| agttttaaat  | caatctaaag   | tatatatgag  | taaaacttgg | ctgacagtta  | ccaatgctta  | 6480 |
| atcagtgagg  | cacctatctc   | agcgatctgt  | ctatttctgt | catccatagt  | tgcttgactc  | 6540 |
| cccgtcgtgt  | agataactac   | gatacgggag  | ggcttaccat | ctggccccag  | tgctgcaatg  | 6600 |
| ataccgcgag  | acccacgctc   | accggctcca  | gatttatcag | caataaacca  | gccagccgga  | 6660 |
| agggccgagc  | gcagaagtgg   | tcttgcaact  | ttatccgcct | ccatccagtc  | tattaattgt  | 6720 |
| tgcggggaag  | ctagagtaag   | tagttcgcca  | gttaatagtt | tgcgcaacgt  | tggtgccatt  | 6780 |
| gctacaggca  | tcgtgggtgc   | acgctcgtcg  | tttggtatgg | cttcattcag  | ctccggttcc  | 6840 |
| caacgatcaa  | ggcgagttac   | atgatccccc  | atgttggtga | aaaaagcgg   | tagctccttc  | 6900 |
| ggtcctccga  | tcgttgctcag  | aagtaagttg  | gccgcagtgt | tatcactcat  | ggttatggca  | 6960 |
| gcactgcata  | attctcttac   | tgtcatgcca  | tccgtaagat | gcttttctgt  | gactggtgag  | 7020 |
| tactcaacca  | agtcattctg   | agaatagtgt  | atgcggcgac | cgagtgtgct  | ttgcccgccg  | 7080 |
| tcaatacggg  | ataataaccg   | gccacatagc  | agaactttaa | aagtgtctcat | cattggaaaa  | 7140 |
| cgttcttcgg  | ggcgaaaact   | ctcaaggatc  | ttaccgctgt | tgagatccag  | ttcgatgtaa  | 7200 |
| cccactcgtg  | cacccaactg   | atcttcagca  | tcttttactt | tcaccagcgt  | ttctgggtga  | 7260 |
| gcaaaaaacag | gaaggcaaaa   | tgccgcaaaa  | aagggaataa | ggcgacacgc  | gaaatgttga  | 7320 |
| atactcatal  | tcttctttt    | tcaatatatt  | tgaagcattt | atcagggtta  | ttgtctcatg  | 7380 |
| agcggataca  | tatttgaatg   | tatttagaaa  | aataaaca   | taggggttcc  | gcgcacattt  | 7440 |
| ccccgaaaag  | tgccacctga   | cgtc        |            |             |             | 7464 |

图 6

## A

```

atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtagc tgctggggat gctgggtcgt      60
tcctgcctcg gaaactgggt gaatgtaata agtgatttga aaaaaattga agatcttatt      120
caatctatgc atattgatgc tactttatat acggaagtgt atgttcaccc cagttgcaaa      180
gtaacagcaa tgaagtgcct tctcttgag ttacaagtta tttcacttga gtccggagat      240
gcaagtatcc atgatacagt agaaaatctg atcatcctag caaacaacag tttgtcttct      300
aatgggaatg taacagaatc tggatgcaaa gaatgtgagg aactggagga aaaaaatatt      360
aaagaatfff tggacagttt tgtacatatt gtcgacatgt tcatcaacac ttcggatccc      420
aaatctgctg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga      480
ccgtcagttc tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc      540
gaggtcacgt gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      600
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      660
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag      720
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc      780
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag      840
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      900
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg      960
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg      1020
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg      1080
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga                                     1113

```

## B

```

MPMGSLLQPLA TLYLLGMLVA SCLGNWVNV I SDLKKIEDLI QSMHIDATLY TESDVHPSCK      60
VTAMKCFLE LQVISLESGD ASIHDIVENL I IILANNSLSS NGNVTESGCK ECEELEEKNI      120
KEFLDSFVHI VDMFINTSDP KSADKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP      180
EVTVCVVVDV HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK      240
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI      300
AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSQSV MHEALHNHYT      360
QKSLSLSPGK

```

## C

```

MPMGSLLQPLA TLYLLGMLVA SCLGNWVNV I SDLKKIEDLI QSMHIDATLY TESDVHPSCK      60
VTAMKCFLE LQVISLESGD ASIHDIVENL I IILANNSLSS NGNVTESGCK ECEELEEKNI      120
KEFLDSFVHI VDMFINTSDP RGPTIKPCPP CKCPAPNLLG GPSVFIFPPK IKDVLMSLS      180
PIVTCVVVDV SEDDPDVQIS WFNVNVEVHT AQTQTHREDY NSTLRVVSAL PIHQDWMWG      240
KEFKCKVNNK DLPAPIERTI SKPKGSVRAP QVYVLPPEE EMTKKQVTLT CMVTFMPED      300
IYVEWTNNGK TELNYKNTEP VLDSGGSYFM YSKLRVEKKN WVERNSYSCS VVHEGLHNNH      360
TTKSFSRTPG K

```

图 7

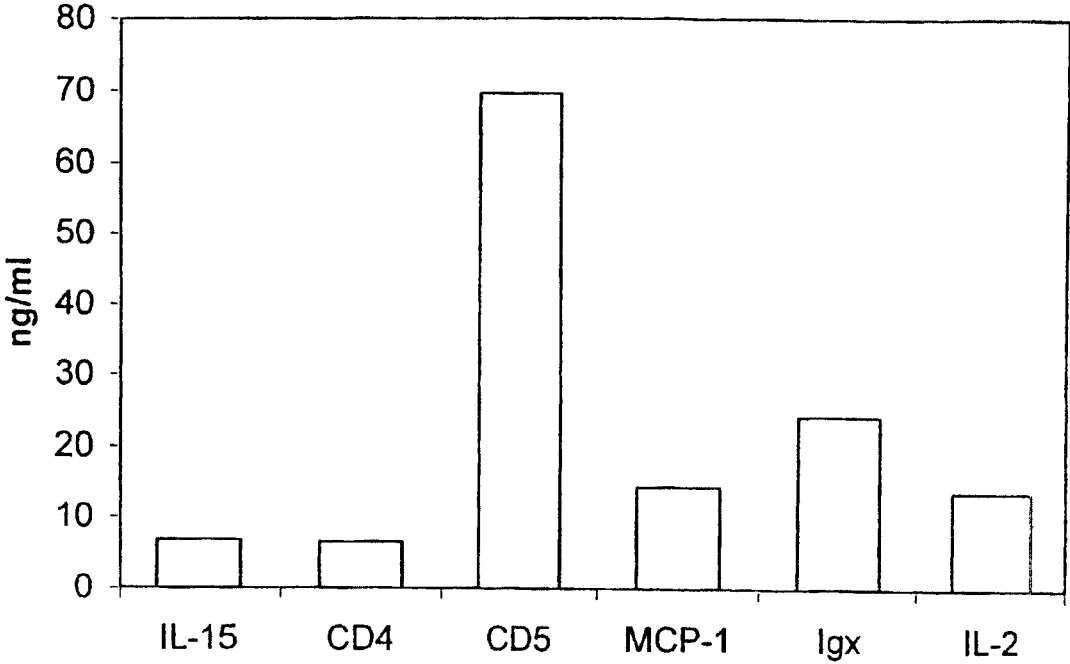


图 8

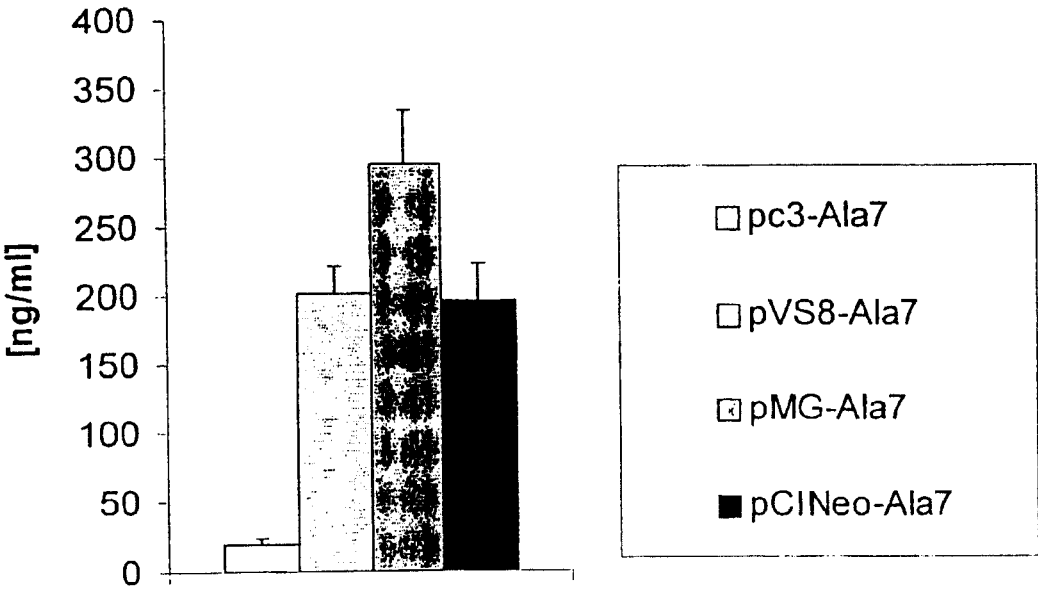


图 9