



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101965363 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 02

(21) 申请号 200780041028. 8

C07K 1/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 10. 31

(30) 优先权数据

60/856, 864 2006. 11. 02 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 05. 04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/023298 2007. 10. 31

(87) PCT申请的公布数据

W02008/140477 EN 2008. 11. 20

(71) 申请人 丹尼尔·J·卡鹏

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 丹尼尔·J·卡鹏

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限

公司 31224

代理人 刘粉宝

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

C12P 21/04 (2006. 01)

权利要求书 13 页 说明书 98 页 附图 86 页

(54) 发明名称

具有活动部分的杂合免疫球蛋白

(57) 摘要

提供了包含活动部分的杂合免疫球蛋白及相关组合物和使用方法与制备方法。此外,提供了相似基因装置及相关组合物和使用方法与制备方法。

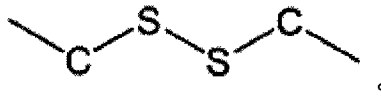
1. 一化合物,包含第一段连续氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位;和

第二段连续氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列与所述第一段连续氨基酸的序列相同且包含相同靶点结合部位;其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自在其预定末端具有半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基,该半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基通过结构如下的键连接:

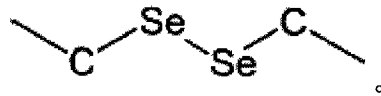


其中各 X 相同并表示硫 (S) 或硒 (Se),各 C 表示该半胱氨酸或硒代半胱氨酸残基之一的 β 碳原子。

2. 如权利要求 1 所述的化合物,其中所述键具有以下结构:



3. 如权利要求 1 所述的化合物,其中所述键具有以下结构:



4. 如权利要求 1 所述的化合物,其中所述第一段和第二段连续氨基酸各自预定末端的残基为半胱氨酸残基。

5. 如权利要求 1 所述的化合物,其中所述第一段和第二段连续氨基酸各自预定末端的残基为硒代半胱氨酸残基。

6. 如权利要求 1 所述的化合物,其中所述第一段连续氨基酸或第二段连续氨基酸包含至少 20 个氨基酸。

7. 如权利要求 1 所述的化合物,其中所述第一段连续氨基酸或第二段连续氨基酸包含至少 100 个氨基酸。

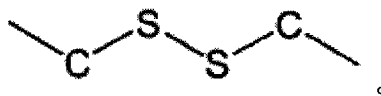
8. 一化合物,包含第一段连续氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位;和

第二段连续氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列不同于所述第一段连续氨基酸序列并包含不同部分的结合部位;其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自在其预定末端具有半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基,该半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基通过结构如下的键连接:

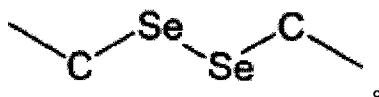


其中各 X 可相同或不同并表示硫 (S) 或硒 (Se),各 C 表示该半胱氨酸或硒代半胱氨酸残基之一的 β 碳原子。

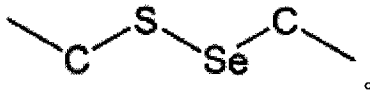
9. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述键具有以下结构:



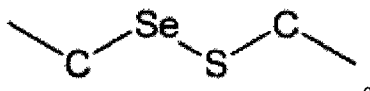
10. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述键具有以下结构:



11. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述键具有以下结构:



12. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述键具有以下结构:



13. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自预定末端的残基都是半胱氨酸残基。

14. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自预定末端的残基都是硒代半胱氨酸残基。

15. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述第一段或第二段连续氨基酸之一在预定末端的残基是半胱氨酸残基且在另一预定末端的残基为硒代半胱氨酸残基。

16. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述第一段连续氨基酸或第二段连续氨基酸包含至少 20 个氨基酸。

17. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述第一段连续氨基酸或第二段连续氨基酸包含至少 100 个氨基酸。

18. 一多聚体,包含通过至少一个键连接在一起的两个或多个相同的、如权利要求 1 或 8 中任一项所述的化合物。

19. 如权利要求 18 所述的多聚体,其中所述多聚体为二聚体。

20. 如权利要求 18 所述的多聚体,其中所述多聚体为三聚体。

21. 如权利要求 18 所述的多聚体,其中所述多聚体为四聚体。

22. 如权利要求 1 或 8 中任一项所述的化合物,其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸两者的预定末端是其 N- 末端。

23. 如权利要求 1 或 8 中任一项所述的化合物,其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸两者的预定末端是其 C- 末端。

24. 如权利要求 1 或 8 中任一项所述的化合物,其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸之一的预定末端是 C- 末端,另一预定末端是 N- 末端。

25. 如权利要求 1 或 8 中任一项所述的化合物,其中所述第一段氨基酸包含 L- 氨基酸。

26. 如权利要求 1 或 8 中任一项所述的化合物,其中所述第一段氨基酸包含 D- 氨基酸。

27. 如权利要求 1 或 8 中任一项所述的化合物,其中所述第一段氨基酸包含 L- 氨基酸和 D- 氨基酸。

28. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述第二段氨基酸包含 L- 氨基酸。

29. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述第二段氨基酸包含 D- 氨基酸。

30. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述第二段氨基酸包含 L- 氨基酸和 D- 氨基酸。

31. 如权利要求 1 或 8 所述的化合物,其中所述第一段氨基酸包含至少 50 个连续氨基酸。

32. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述第二段氨基酸包含至少 50 个连续氨基酸。

33. 如权利要求 1 或 8 所述的化合物,其中所述第一段氨基酸包含不止一类的氨基酸。
34. 如权利要求 1 或 8 所述的化合物,其中所述第二段氨基酸包含不止一类的氨基酸。
35. 如权利要求 18 所述的多聚体,其中所述一个或多个键包括二硫键。
36. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述第二段连续氨基酸的序列对应免疫球蛋白恒定区的序列。
37. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述免疫球蛋白为人免疫球蛋白。
38. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述免疫球蛋白的恒定区为 IgG、IgA、IgE、IgD 或 IgM 免疫球蛋白的恒定区。
39. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述免疫球蛋白的恒定区为 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 免疫球蛋白的恒定区。
40. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述免疫球蛋白的恒定区是 IgG 免疫球蛋白的恒定区并包含铰链区域、CH6 区域和 CH3 区域。
41. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述不同部分是免疫效应物或免疫调节剂。
42. 如权利要求 1 或 8 所述的化合物,其中所述靶点是蛋白质。
43. 如权利要求 1 或 8 所述的化合物,其中所述靶点是 EGF 受体、HER2、VEGF 受体、CD20 抗原、Cd11a、IgE 免疫球蛋白、糖蛋白 IIa 受体、糖蛋白 IIIa 受体、TNF α 或 TNF 受体、gp120。
44. 如权利要求 1 所述的化合物,其中所述第一段和第二段连续氨基酸各自包含 TNFRSF1a、TNFRSF1b、VEGFR1、VEGFR6、VEGFR3、人 Erb1、人 Erb2、人 Erb6、人 Erb3 或人 Erb4 中任一个的氨基酸序列。
45. 如权利要求 8 所述的化合物,其中所述第一段或第二段连续氨基酸包含 TNFRSF1a、TNFRSF1b、VEGFR1、VEGFR6、VEGFR3、人 Erb1、人 Erb2、人 Erb6、人 Erb3 或人 Erb4 中任一个的氨基酸序列。
46. 一组合物,包含结合靶点的有效量的权利要求 1 的化合物和载体。
47. 一组合物,包含结合靶点的有效量的权利要求 8 的化合物和载体。
48. 一组合物,包含结合靶点的有效量的权利要求 18 的多聚体和载体。
49. 如权利要求 48 所述的组合物,其中所述多聚体也以结合所述不同部分的有效量存在。
50. 如权利要求 46、47、48 或 49 所述的组合物,所述载体为药学上可接受的载体。
51. 一种影响靶点活性的方法,包括使所述靶点和权利要求 46、47、48 或 49 的组合物接触,在一定条件下使得所述化合物结合到所述靶点并影响所述靶点的活性。
52. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述组合物结合到所述靶点提高了所述靶点的活性。
53. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述组合物结合到所述靶点降低了所述靶点的活性。
54. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述靶点为 EGF 受体、HER2 蛋白、VEGF 受体、CD20 抗原、Cd11a 和 IgE 免疫球蛋白、糖蛋白 II a 受体、糖蛋白 IIIa 受体、TNF α 或 TNF 受体。
55. 一复合物,包含权利要求 1、8 或 18 中任一项的化合物的组合物和第三段连续氨基酸,其中所述第三段连续氨基酸通过一个或多个键结合到所述第一段或第二段连续氨基酸之一。

56. 如权利要求 55 所述的复合物,其中所述一个或多个键包括范德华力。
57. 如权利要求 55 所述的复合物,其中所述一个或多个键包括氢键。
58. 如权利要求 55 所述的复合物,其中所述一个或多个键包括共价键。
59. 如权利要求 55 所述的复合物,其中所述一个或多个键包括二硫键。
60. 如权利要求 18 所述的多聚体,其中所述至少一个键是二硫键。
61. 如权利要求 18 所述的多聚体,其中所述二硫键位于两个非末端氨基酸残基之间。
62. 如权利要求 18 所述的多聚体,其中所述二硫键位于两个氨基酸残基之间,其中所述两个氨基酸残基中至少一个是非末端氨基酸残基。
63. 制备权利要求 1 的化合物的方法,包括:
- (a) 用重组体核酸转染细胞,所述重组体核酸包含 (i) 第一部分,所述第一部分的序列为 N- 末端信号序列,与以下 (ii) 相邻,(ii) 第二部分,所述第二部分的序列编码一段连续氨基酸,与以下 (iii) 相邻,(iii) 第三部分,所述第三部分的序列编码 C- 末端包含内蛋白的结合域,在允许合成包含与所述 C- 末端含内蛋白的结合域相邻的所述段连续氨基酸的嵌合多肽的条件下;
- (b) 分离步骤 (a) 中产生的嵌合多肽;
- (c) 处理所述嵌合多肽以导致所述 C- 末端含内蛋白的结合域从所述段连续氨基酸发生硫介导的断裂并用 C- 末端硫酯代替它;
- (d) 处理步骤 (c) 的产物以让半胱氨酸残基附着到所述产物上,以形成具有 C- 末端半胱氨酸的产物;和
- (e) 在允许形成所述化合物的条件下、在步骤 (e) 的另一产物存在下氧化步骤 (e) 的产物。
64. 如权利要求 63 所述的方法,其中所述重组体核酸具有 SEQ ID Nos. 1-8 中任一个列出的序列。
65. 如权利要求 63 所述的方法,其中所述 C- 末端含内蛋白的结合域为内蛋白-壳多糖结合域。
66. 如权利要求 63 所述的方法,其中所述 C- 末端含内蛋白的结合域为 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域。
67. 如权利要求 63 所述的方法,其中在步骤 b) 中通过亲和层析来分离所述嵌合多肽。
68. 如权利要求 63 所述的方法,其中在步骤 b) 中通过将所述产物暴露于由壳多糖衍生的树脂来分离所述嵌合多肽。
69. 如权利要求 63 所述的方法,其中所述氧化条件允许在各产物的 C- 末端半胱氨酸之间形成二硫键。
70. 一化合物,包含一独立折叠的蛋白质域,所述蛋白质域通过非肽键融合到第二独立折叠的蛋白质域。
71. 一化合物,包含第一多肽链,所述第一多肽链包含末端半胱氨酸残基,在其 S- 末端融合到包含末端半胱氨酸残基的第二多肽链的 S- 末端。
72. 包含第一多肽链的一化合物,所述第一多肽链包含末端硒代半胱氨酸残基,在其 Se- 末端融合到包含末端半胱氨酸残基的第二多肽链的 S- 末端。
73. 包含第一多肽链的一化合物,所述第一多肽链包含末端硒代半胱氨酸残基,在其

Se- 末端融合到包含末端硒代半胱氨酸残基的第二多肽链的 Se- 末端。

74. 一多聚体, 包含通过至少一个键连接在一起的两个或多个相同的、权利要求 70-73 中任一项的化合物。

75. 制备包含 N- 末端半胱氨酸的一段连续氨基酸的方法, 包括:

(a) 用重组体核酸转染细胞, 所述重组体核酸包含 (i) 第一部分, 所述第一部分的序列编码 N- 末端信号序列, 与以下 (ii) 相邻, (ii) 第二部分, 所述第二部分的序列编码包含 N- 末端半胱氨酸残基的一段连续氨基酸, 在允许 (i) 合成包含通过肽键在其 C- 末端连接到所述段连续氨基酸的 N- 末端半胱氨酸的所述 N- 末端信号序列的嵌合多肽和 (ii) 所述 N- 末端信号序列在所述细胞内从所述嵌合多肽断裂下来以产生包含 N- 末端半胱氨酸的一段连续氨基酸的条件下;

(b) 回收步骤 (a) 中产生的所述段连续氨基酸。

76. 如权利要求 75 所述的方法, 其中所述段连续氨基酸包含免疫球蛋白 Fc 多肽。

77. 如权利要求 76 所述的方法, 其中所述免疫球蛋白 Fc 多肽为人免疫球蛋白 Fc 多肽。

78. 如权利要求 77 所述的方法, 其中所述 N- 末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc 多肽的 cys-5 残基。

79. 如权利要求 75 所述的方法, 其中所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。

80. 如权利要求 75 所述的方法, 其中用质粒 pSA 进行所述转染。

81. 如权利要求 75 所述的方法, 其中所述 N- 末端信号序列选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质。

82. 如权利要求 75 所述的方法, 其中所述信号肽为音猬、干扰素 α 2 或胆固醇酯转移酶。

83. 如权利要求 75 所述的方法, 其中通过亲和层析回收所述段连续氨基酸。

84. 如权利要求 75 所述的方法, 其中通过细胞信号肽酶进行细胞内的嵌合多肽断裂。

85. 制备包含 N- 末端半胱氨酸或硒代半胱氨酸的一段连续氨基酸的方法, 包括:

(a) 用重组体核酸转染细胞, 所述重组体核酸包含 (i) 第一部分, 所述第一部分的序列编码 N- 末端信号序列, 与以下 (ii) 相邻的, (ii) 第二部分, 所述第二部分的序列编码包含 N- 末端半胱氨酸残基的一段连续氨基酸, 在允许 (i) 合成包含通过肽键在其 C- 末端连接到 Fc 多肽的 N- 末端半胱氨酸的所述 N- 末端信号序列的嵌合多肽和 (ii) 所述 N- 末端信号序列在所述细胞内从所述嵌合多肽断裂下来以产生包含 N- 末端半胱氨酸的一段连续氨基酸的条件下;

(b) 用包含氨基酸序列 cys-asn-lys-thr-his-thr 的肽或包含氨基酸序列 sec-asn-lys-thr-his-thr 的肽的 C- 末端结合步骤 (a) 中产生的所述段连续氨基酸的 N- 末端从而制备包含 N- 末端半胱氨酸或硒代半胱氨酸的所述段连续氨基酸; 和

(c) 回收步骤 (b) 中产生的所述段连续氨基酸。

86. 如权利要求 85 所述的方法, 其中所述段连续氨基酸包含免疫球蛋白 Fc 多肽。

87. 如权利要求 85 所述的方法, 其中所述免疫球蛋白 Fc 多肽为人免疫球蛋白 Fc 多肽。

88. 如权利要求 87 所述的方法, 其中所述 N- 末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc 多肽的 cys-5 残基。

89. 如权利要求 85 所述的方法,其中所述 N-末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc 多肽的 cys-11 残基。

90. 如权利要求 85 所述的方法,其中步骤 (b) 中的肽包含氨基酸序列 cys-asp-lys-thr-his-thr 且制备的所述段连续氨基酸包含 N-末端半胱氨酸。

91. 如权利要求 85 所述的方法,其中步骤 (b) 中肽包含氨基酸序列 sec-asp-lys-thr-his-thr 且制备的所述段连续氨基酸包含 N-末端硒代半胱氨酸。

92. 如权利要求 85 所述的方法,其中在连接之前用 N-末端 Msc 保护基来保护步骤 (b) 中的肽。

93. 如权利要求 85 所述的方法,其中所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。

94. 如权利要求 85 所述的方法,其中用质粒 pSA 来进行所述转染。

95. 如权利要求 85 所述的方法,其中所述 N-末端信号序列选自具有 N-末端半胱氨酸的蛋白质。

96. 如权利要求 85 所述的方法,其中所述信号肽为音猬、干扰素 $\alpha 2$ 或胆固醇酯转移酶。

97. 如权利要求 85 所述的方法,其中通过亲和层析回收所述段连续氨基酸。

98. 如权利要求 85 所述的方法,其中通过细胞信号肽酶进行细胞内嵌合多肽断裂。

99. 制备包含 C-末端半胱氨酸或 C-末端硒代半胱氨酸的一段连续氨基酸的方法,包括:

(a) 用重组体核酸转染细胞,所述重组体核酸包含 (i) 第一部分,所述第一部分的序列编码 N-末端信号序列,与以下 (ii) 相邻,(ii) 第二部分,所述第二部分的序列编码一段连续氨基酸,与以下 (iii) 相邻,(iii) 第三部分,所述第三部分的序列编码 C-末端含内蛋白的连接域,在允许 (i) 合成包含所述 N-末端信号序列的嵌合多肽,所述 N-末端信号序列与所述段连续氨基酸相邻,所述段连续氨基酸与所述 C-末端含内蛋白的结合域相邻,和 (ii) 所述 N-末端信号序列从所述嵌合多肽断裂下来以产生具有 N-末端赖氨酸残基并包含与所述 C-末端含内蛋白的结合域相邻的所述段连续氨基酸的第二嵌合多肽的条件下;

(b) 分离步骤 (a) 中产生的第二嵌合多肽;

(c) 处理所述第二嵌合多肽以导致 C-末端含内蛋白的结合域从所述段连续氨基酸发生硫介导的断裂,以形成 C-末端硫酯;

(d) 用半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基在其 C-末端连接步骤 (c) 的产物,以形成具有 C-末端半胱氨酸或 C-末端硒代半胱氨酸的产物;和

(e) 回收步骤 (d) 的产物。

100. 如权利要求 99 所述的方法,其中所述段相邻的连续氨基酸包含 IgG 免疫球蛋白 Fc 多肽和 IgG M1 外显子。

101. 如权利要求 100 所述的方法,其中所述 IgG 免疫球蛋白为人 IgG 免疫球蛋白。

102. 如权利要求 99 所述的方法,其中所述段相邻的连续氨基酸包含 CD4 细胞外区域。

103. 如权利要求 99 所述的方法,其中所述 N-末端信号序列选自具有 N-末端赖氨酸的蛋白质。

104. 如权利要求 99 所述的方法,其中所述 N-末端信号序列为 CD2T-细胞表面糖蛋白

或 CD4T- 细胞表面糖蛋白。

105. 如权利要求 99 所述的方法,其中所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。

106. 如权利要求 99 所述的方法,其中用质粒 pSA 来进行所述转染。

107. 如权利要求 99 所述的方法,其中所述 C- 末端含内蛋白的结合域为内蛋白 - 壳多糖结合域。

108. 如权利要求 99 所述的方法,其中所述 C- 末端含内蛋白的结合域为 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域。

109. 如权利要求 99 所述的方法,其中所述 C- 末端含内蛋白的结合域为自我剪接的含内蛋白的结合域。

110. 如权利要求 99 所述的方法,其中在步骤 b) 中通过将产物暴露于由壳多糖衍生的树脂来分离所述嵌合多肽。

111. 如权利要求 99 所述的方法,其中通过细胞信号肽酶来进行细胞内第二嵌合多肽的断裂。

112. 如权利要求 99 所述的方法,其中用半胱氨酸残基连接步骤 (c) 的产物。

113. 如权利要求 99 所述的方法,其中用硒代半胱氨酸残基连接步骤 (c) 的产物。

114. 制备包含 N- 末端半胱氨酸和 C- 末端半胱氨酸或硒代半胱氨酸的一段连续氨基酸的方法,包括:

(a) 用重组体核酸转染细胞,所述重组体核酸包含 (i) 第一部分,所述第一部分的序列编码 N- 末端信号序列,与以下 (ii) 相邻,(ii) 第二部分,所述第二部分的序列编码一段连续氨基酸,与以下 (iii) 相邻,(iii) 第三部分,所述第三部分的序列编码 C- 末端含内蛋白的结合域,在允许 (i) 合成包含 N- 末端信号序列的嵌合多肽,所述 N- 末端信号序列与所述段连续氨基酸相邻,所述段连续氨基酸与所述 C- 末端含内蛋白的结合域相邻,和 (ii) 所述 N- 末端信号序列从所述嵌合多肽断裂下来以产生具有 N- 末端半胱氨酸残基并包含与 C- 末端含内蛋白的结合域相邻的所述段连续氨基酸的第二嵌合多肽的条件下;

(b) 分离步骤 (a) 中产生的第二嵌合多肽;

(c) 处理所述第二嵌合多肽以导致 C- 末端含内蛋白的结合域从所述段连续氨基酸发生硫介导的断裂,以形成 C- 末端硫酯;

(d) 用半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基在其 C- 末端连接步骤 (c) 的产物,以形成具有 C- 末端半胱氨酸或 C- 末端硒代半胱氨酸的产物;和

(e) 回收步骤 (d) 的产物。

115. 如权利要求 114 所述的方法,其中所述段相邻的连续氨基酸包含 IgG 免疫球蛋白 Fc 多肽和 IgGM1 外显子。

116. 如权利要求 115 所述的方法,其中所述 IgG 免疫球蛋白为人 IgG 免疫球蛋白。

117. 如权利要求 114 所述的方法,其中所述 N- 末端信号序列选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质。

118. 如权利要求 114 所述的方法,其中所述 N- 末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc 多肽的 cys-5 残基。

119. 如权利要求 114 所述的方法,其中所述 N- 末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc

多肽的 cys-11 残基。

120. 如权利要求 114 所述的方法,其中所述 N-末端信号为音猬、干扰素 $\alpha 2$ 或胆固醇酯转移酶。

121. 如权利要求 114 所述的方法,其中所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。

122. 如权利要求 114 所述的方法,其中用质粒 pSA 来进行所述转染。

123. 如权利要求 114 所述的方法,其中所述 C-末端含内蛋白的结合域为内蛋白-壳多糖结合域。

124. 如权利要求 114 所述的方法,其中所述 C-末端含内蛋白的结合域为 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域。

125. 如权利要求 114 所述的方法,其中所述 C-末端含内蛋白的结合域为自我剪接的含内蛋白的结合域。

126. 如权利要求 114 所述的方法,其中在步骤 b) 中通过将产物暴露于由壳多糖衍生的树脂来分离所述第二嵌合多肽。

127. 如权利要求 114 所述的方法,其中在步骤 e) 中通过亲和层析分离所述产物。

128. 如权利要求 114 所述的方法,其中通过细胞信号肽酶来进行细胞内嵌合多肽的断裂。

129. 如权利要求 114 所述的方法,其中用半胱氨酸残基连接步骤 (c) 的产物。

130. 如权利要求 114 所述的方法,其中用硒代半胱氨酸残基连接步骤 (c) 的产物。

131. 制备包含 N-末端半胱氨酸或硒代半胱氨酸和 C-末端半胱氨酸或硒代半胱氨酸的一段连续氨基酸的方法,包括:

(a) 用重组体核酸转染细胞,所述重组体核酸包含 (i) 第一部分,所述第一部分的序列编码 N-末端信号序列,与以下 (ii) 相邻,(ii) 第二部分,所述第二部分的序列编码一段连续氨基酸,与以下 (iii) 相邻,(iii) 第三部分,所述第三部分的序列编码 C-末端含内蛋白的结合域,在允许 (i) 合成包含所述 N-末端信号序列的嵌合多肽,所述 N-末端信号序列与所述段连续氨基酸相邻,所述段连续氨基酸与所述 C-末端含内蛋白的结合域相邻,和 (ii) 所述 N-末端信号序列从所述嵌合多肽断裂下来以产生具有 N-末端半胱氨酸残基并包含与 C-末端含内蛋白的结合域相邻的所述段连续氨基酸的第二嵌合多肽;

(b) 分离步骤 (a) 中产生的第二嵌合多肽;

(c) (i) 用包含氨基酸序列 cys-asp-lys-thr-his-thr 的肽或包含氨基酸序列 sec-asp-lys-thr-his-thr 的肽的 C-末端连接步骤 (a) 中产生的所述段连续氨基酸的 N-末端,以产生包含 N-末端半胱氨酸或 N-末端硒代半胱氨酸的所述段连续氨基酸;

(ii) 处理所得嵌合多肽以导致所述 C-末端含内蛋白的结合域从所述段连续氨基酸断裂下来并用 C-末端硫酯代替它;

(iii) 用半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基在其 C-末端连接步骤 (c) 的产物以形成具有 C-末端半胱氨酸或 C-末端硒代半胱氨酸的产物;和

(d) 回收步骤 (c) (iii) 的产物。

132. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述相邻的连续氨基酸包含 IgG 免疫球蛋白 Fc 多肽和 IgG M1 外显子。

133. 如权利要求 132 所述的方法,其中所述 IgG 免疫球蛋白为人 IgG 免疫球蛋白。
134. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述 N- 末端信号序列选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质。
135. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述 N- 末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc 多肽的 cys-11 残基。
136. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述 N- 末端信号序列选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质。
137. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述 N- 末端信号为音猬、干扰素 $\alpha 2$ 或胆固醇酯转移酶。
138. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。
139. 如权利要求 131 所述的方法,其中用质粒 pSA 来进行所述转染。
140. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述 C- 末端含内蛋白的结合域为内蛋白 - 壳多糖结合域。
141. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述 C- 末端含内蛋白的结合域为 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域。
142. 如权利要求 131 所述的方法,其中在步骤 (b) 中通过将产物暴露于由壳多糖衍生的树脂来分离所述嵌合多肽。
143. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述免疫球蛋白 Fc 多肽为人免疫球蛋白 Fc 多肽。
144. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述 Fc 多肽的 N- 末端半胱氨酸残基为 cys-11 残基。
145. 如权利要求 131 所述的方法,其中步骤 (c) (i) 的肽包含氨基酸序列 cys-asp-lys-thr-his-thr 且制备的所述段连续氨基酸包含 N- 末端半胱氨酸。
146. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述步骤 (c) (i) 中的肽包含氨基酸序列 sec-asp-lys-thr-his-thr 且制备的所述段连续氨基酸包含 N- 末端硒代半胱氨酸。
147. 如权利要求 131 所述的方法,其中在连接之前用 N- 末端 Msc 保护基保护步骤 (c) 中的肽。
148. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。
149. 如权利要求 131 所述的方法,其中用质粒 pSA 来进行所述转染。
150. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述 N- 末端信号序列选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质。
151. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述信号肽为音猬、干扰素 $\alpha 2$ 或胆固醇酯转移酶。
152. 如权利要求 131 所述的方法,其中通过亲和层析回收所述段连续氨基酸。
153. 如权利要求 131 所述的方法,其中步骤 (c) 以步骤 (c) (i) ;步骤 (c) (ii) ;步骤 (c) (iii) 的顺序进行。
154. 如权利要求 131 所述的方法,其中步骤 (c) 以步骤 (c) (ii) ;步骤 (c) (iii) ;步骤

(c) (i) 的顺序进行。

155. 制备一化合物的方法,包括在还原条件下使一段连续氨基酸与第二段连续氨基酸接触以制备所述化合物,所述一段连续氨基酸的各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位,所述第二段连续氨基酸的氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸的序列与所述第一段连续氨基酸的序列相同并包含相同靶点结合部位,其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自在其预定末端具有半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基。

156. 制备一化合物的方法,包括在还原条件下使一段连续氨基酸与第二段连续氨基酸接触以制备所述化合物,所述一段连续氨基酸的各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位,所述第二段连续氨基酸的氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸的序列不同于所述第一段连续氨基酸的序列并包含相同靶点结合部位,其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自在其预定末端具有半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基。

157. 如权利要求 155 或 156 所述的方法,其中所述还原条件不使所述段连续氨基酸变性。

158. 如权利要求 155 或 156 所述的方法,其中所述还原条件包括将所述段连续氨基酸暴露于包含 Tris-HCL 和巯基乙醇的缓冲液。

159. 如权利要求 158 所述的方法,其中所述缓冲液的 pH 为 7.6-8.4。

160. 如权利要求 158 所述的方法,其中所述缓冲液的 pH 为 8。

161. 如权利要求 158 所述的方法,其中所述方法还包括将所述产物交换到氧化缓冲液中。

162. 如权利要求 155 或 156 所述的方法,其中所述段连续氨基酸包含 CD4 细胞外区域。

163. 如权利要求 155 或 156 所述的方法,其中所述段连续氨基酸包含免疫球蛋白 Fc 多肽的序列。

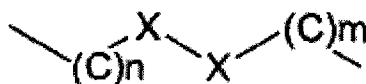
164. 如权利要求 163 所述的方法,其中所述免疫球蛋白为人免疫球蛋白。

165. 一化合物,包含:

第一段连续氨基酸,所述第一段连续氨基酸的氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位,和

第二段连续氨基酸,所述第二段连续氨基酸的氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列与所述第一段连续氨基酸序列相同并包含相同靶点结合部位,

其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自独立在其预定末端具有包含硫 (S) 或硒 (Se)、具有直链脂族侧链的天然氨基酸或非天然氨基酸,其中该硫 (S) 或硒 (Se) 通过结构如下的键连接在一起:



其中各 X 为硫 (S) 或硒 (Se),各 (C) 表示该天然或非天然氨基酸之一的直链脂族侧链的碳原子,其中 n 和 m 独立为 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

166. 如权利要求 165 所述的化合物,其中所述天然氨基酸为同型半胱氨酸或同型硒代半胱氨酸。

167. 如权利要求 165 所述的化合物,其中所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型半胱氨酸。

168. 如权利要求 165 所述的化合物,其中所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型硒代半胱氨酸。

169. 如权利要求 165 所述的化合物,其中所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型半胱氨酸。

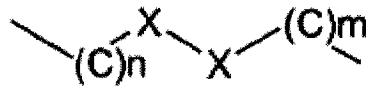
170. 权利要求 168 或 169 的化合物,其中所述预定末端为 C- 末端。

171. 一化合物,包含:

第一段连续氨基酸,所述第一段连续氨基酸的各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位;和

第二段连续氨基酸,所述第二段连续氨基酸的氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列不同于所述第一段连续氨基酸序列并包含不同部分的结合部位,

其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自独立在其预定末端具有包含硫 (S) 或硒 (Se)、具有直链脂族侧链的天然氨基酸或非天然氨基酸,其中该硫 (S) 或硒 (Se) 通过结构如下的键连接在一起:



其中各 X 可相同或不同,表示为硫 (S) 或硒 (Se),各 (C) 表示该天然或非天然氨基酸之一的直链脂族侧链的碳原子,其中 n 和 m 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

172. 如权利要求 171 所述的化合物,其中所述天然氨基酸为同型半胱氨酸或同型硒代半胱氨酸。

173. 如权利要求 171 所述的化合物,其中所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型半胱氨酸。

174. 如权利要求 171 所述的化合物,其中所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型硒代半胱氨酸。

175. 如权利要求 171 所述的化合物,其中所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型半胱氨酸。

176. 如权利要求 174 或 175 所述的化合物,其中所述预定末端为 C- 末端。

177. 制备蛋白质的方法,所述蛋白质包含与内蛋白相邻的第一多肽,所述内蛋白与包含结合域的第二多肽相邻,所述方法包括用核酸转染动物细胞,所述核酸包含 (i) 第一部分,所述第一部分编码与以下 (ii) 相邻的多肽,(ii) 第二部分,所述第二部分编码所述内蛋白,与第三部分相邻,所述第三部分编码所述结合域,在一定的条件下使得所述动物细胞表达并分泌所述蛋白质。

178. 如权利要求 177 所述的方法,其中所述动物细胞来源于哺乳动物。

179. 如权利要求 177 所述的方法,其中所述结合域为壳多糖结合域。

180. 一组合物,包含通过末端二硫键附着到固体表面的多肽。

181. 如权利要求 180 所述的方法,其中所述固体表面为芯片或珠子。

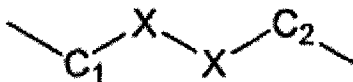
182. 一化合物,包含:

第一段连续氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且所述第一段连续氨基酸包含具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基;和

第二段连续氨基酸,包含至少 100 个氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸,其

中所述第二段连续氨基酸的至少 90 个连续氨基酸具有与人免疫球蛋白部分恒定区多肽的部分相同的序列,其中所述第二段连续氨基酸在其预定末端包含具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基,

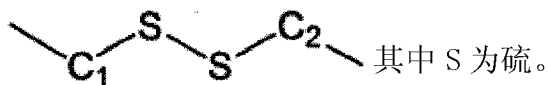
其中所述第一段连续氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基和所述第二段连续氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基通过结构如下的键连接在一起:



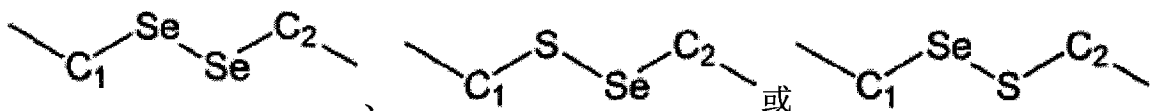
其中各 X 独立表示硫属元素,其中 C₁ 表示所述第一段连续氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基的侧链碳原子,C₂ 表示所述第二段连续氨基酸的侧链碳原子。

183. 如权利要求 182 所述的化合物,其中 C₁ 和 C₂ 中的至少其一为氨基酸的 β 碳原子。

184. 如权利要求 182 所述的化合物,其中所述键具有如下结构:



185. 如权利要求 182 所述的化合物,其中所述键具有如下结构:



其中 S

为硫, Se 为硒。

186. 如权利要求 182 所述的化合物,其中所述第二段氨基酸预定末端的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为半胱氨酸。

187. 如权利要求 182 所述的化合物,其中所述第二段氨基酸预定末端的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为硒代半胱氨酸、同型半胱氨酸或同型硒代半胱氨酸。

188. 如权利要求 182 所述的化合物,其中所述第一段氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为半胱氨酸。

189. 如权利要求 182 所述的化合物,其中所述第一段氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为硒代半胱氨酸、同型半胱氨酸或同型硒代半胱氨酸。

190. 如权利要求 182 所述的化合物,其中所述第一段连续氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为末端残基。

191. 如权利要求 182 所述的化合物,其中所述第一段连续氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为倒数第二个、倒数第三个或倒数第四个末端残基。

192. 如权利要求 182 所述的化合物,其中所述第二段连续氨基酸的序列与人免疫球蛋白恒定区相同。

193. 如权利要求 192 所述的化合物,其中所述第二段连续氨基酸是人免疫球蛋白恒定区的部分。

194. 如权利要求 182 所述的化合物,其中所述第一段连续氨基酸的序列与人免疫球蛋白恒定区相同。

195. 如权利要求 182 所述的化合物,其中所述人免疫球蛋白恒定区多肽为人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4。

196. 如权利要求 195 所述的化合物,其中其中至少一个具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基的侧链包括 C1-C10 亚烷基。

197. 一组合物,包含两种权利要求 182 的化合物,所述化合物通过各化合物的第二段连续氨基酸之间的至少一个二硫键结合在一起。

198. 由连续氨基酸组成的多肽,所述连续氨基酸具有以下序列:SEQ ID NO:35-46 之一所列序列;SEQ ID NO:53-67 之一所列序列,或 SEQ ID NO:74-82 之一所列序列,SEQ ID NO:89-97 之一所列序列。

199. 一组合物,包含权利要求 198 的多肽和载体。

200. 如权利要求 199 所述的组合物,其中所述载体为磷酸盐缓冲生理盐水。

201. 一组合物,包含两种权利要求 198 的多肽,所述多肽通过所述两个多肽之间的至少一个二硫键结合在一起。

202. 由连续氨基酸组成的多肽,所述连续氨基酸的序列与以下序列的部分相同:SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:81 或 SEQ ID NO:96 中所列,其中所述多肽的至少一个末端残基具有含硫属官能团的侧链。

203. 如权利要求 202 所述的多肽,其中所述具有含硫属官能团的侧链的末端残基为半胱氨酸或其类似物。

具有活动部分的杂合免疫球蛋白

[0001] 本申请中引用了各种出版物。这些出版物的全部公开内容通过引用结合到本申请中,以充分地描述在本申请中描述和要求保护的本发明时本领域技术人员所知的现有技术。

[0002] 发明背景

[0003] 所有机械和设备都有活动部分。活动部分的作用是通过转变能源进行工作,以完成有用任务。活动部件覆盖一个尺寸和形状谱。谱图的一端是进行机械任务的机械中明显的可见世界。图谱的另一端是进行电子工作的设备采用的电荷载体的不可见世界。

[0004] 这个图谱如此广阔,以至于某些区域仅刚开始技术应用。其中有具有几纳米至几百纳米的活动部分的设备。这些尺寸范围由于与化学物质的基本单元-分子的尺寸相当而引起了科学家和工程师的极大兴趣。纳米机械具有利用分子独特性能如分子间结合或催化的前景。

[0005] 制备具有各种可想象尺寸和形状的分子的能力是构造纳米机械中的一个关键活动。这样,广泛地期待将其用于医药、电子、光学和许多其它领域。许多商业活动集中于合成非常大量的不同化学分子。然而,分子构型(结合不同)仅是一种产生多样性的实践方法。分子构象(键旋转不同)提供了产生许多连续尺寸和形状的另一重要途径。

[0006] 分子构象在产生具有活动部分的分子的策略中具有某些独特优势。原子和化学键具有精确线性和角度尺寸的同时,构象变化可提供分子尺寸和形状的无限变化。共价和非共价化学键都提供旋转自由度。绕着连接分子不同部分(区域)的一系列键中的每个键的二面旋转能提供纳米机械的必要动态因素。

[0007] 总的来说,通过单键(即单一电子对)相互连接的任意两个原子可相对彼此和连接到各自的其它原子完全 360 度旋转。一系列连续单键就象一系列相互连接的球接头。尽管局限于旋转运动,一系列连续单键,就象一系列连续球接头,可再现其它类相互连接的互动部分(如一系列连续铰链)的运动。

[0008] 产生有用纳米机械的一个挑战方面是寻求活动部分和相互连接数的平衡。一定水平上,提高任意机械中的部分或连接数是不利的。因此汽车发动机采用了最佳数目的活塞、阀门、凸轮轴、滑轮等。

[0009] 化学领域中的相似挑战通过两个相关、但非常不同类的分子即有机和生物高分子得以说明。聚乙烯和蛋白质提供了很好的对比。聚乙烯是通过连续单键 $(-C-)_n$ 相互连接的连续乙烯段 $(CH_2)_n$, 而蛋白质是通过连续肽键 $(=N-C-C=)_n$ 相互连接的连续氨基酸段 $(NHCHRCO)_n$ 。无支链聚乙烯是单键的重复链,而蛋白质是一个双键接两个单键的重复链。这两类链之间的最重要区别是聚乙烯可采用几乎任意构象,因此没有确定的尺寸或形状(仅有统计平均尺寸或形状),而蛋白质非常刚性,因此具有非常确定(且不变)的尺寸和形状。

[0010] 与机械设备的一个简单但有道理的对比将用聚乙烯代表活动部分与连接之比高的机械,用蛋白质代表活动部分与连接之比低的机械。没有一种分子非常适合于类机械任务,除非能利用各自能形成的更高级结构的优势。例如,聚乙烯在利用了其形成分子间纤维的能力时有用。有趣的是,聚乙烯展示这种三级结构的能力取决于其本身柔顺性。尽管一

些蛋白质可形成具有商业价值的纤维（如丝、毛和胶原），大多数蛋白质是球形的，不形成具有商业价值的纤维。

[0011] 球形蛋白质，就几乎所有实际目的而言，是具有很少（如果存在）活动部分的机械，就象必须与其它客体如使用它的人和其楔入对象结合才能发挥其杠杆作用的撬棍。虽然，许多情况下，具有以允许相对、协调运动的方式连接在一起的不同区域（如结合域）的类蛋白质分子非常有意义。一个例子是能协同结合具有两个或多个相同结合部位的疾病靶点的类蛋白质分子。这将充分利用球形蛋白质结合域的独特性能，即它们对靶点，特别是与疾病有关的其它蛋白质的巨大特异性。

[0012] 可定量地估计能协同结合疾病靶点的类蛋白质分子的潜在商业价值。开始设想是现在使用的大多数治疗法，不管小分子或生物药剂，通常非协同地结合其靶点，亲和常数为纳摩尔数量级（ 10^{-9}M ）。显著地，协同治疗法能设想地结合相同靶点，亲和常数为纳摩尔 \times 纳摩尔（ $10^{-9}\text{M} \times 10^{-9}\text{M}$ ）[即埃摩尔 10^{-18}M]。

[0013] 因为通常需要治疗法大摩尔过量于其靶点（约 1 百万倍），因此联合治疗将等于小 10^{-6} 剂量下的非联合治疗。就许多现有生物药剂（如抗体和免疫粘附素）而言，这个差别达到 1 毫克 / 单剂量，而不是 1 克 / 单剂量。患者花费超过 \$1,000 / 克，这个因素对新药发现和发展及现有生物药剂具有重大意义。

[0014] 与抗体和免疫粘附素相关的一个相反事实是：尽管它们是具有两个相同结合域的对称蛋白质，它们通常不对称地结合到对称靶点上。两个结合域之间的非柔性连接不提供允许协同结合的类机械运动。针对工程抗体和免疫粘附素的许多努力都由于难以达到结合位置和靶点位置之间的互补对称所需的精确几何尺寸而失败。与用于制备常规机械的材料如木头、金属、塑料、陶瓷等不同，分子不能简单地被切割、锻造、浇铸、机床加工或连接成精确尺寸和形状。

[0015] 尽管因此不容易通过任意单一固定尺寸和形状获得协同结合，结合域之间的构象柔性确实提供潜在解决方法。一种“以不变应万变”的策略是以具有对称移动的结合域的类蛋白分子会还能对称结合（即协同性）的主张为基础的。结合域被热力学地驱动到与两个靶点位置的同时结合最适合的构象，因为其代表能量最有利的构象最低点。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明一个实施方案提供了一化合物，包含第一段连续氨基酸，各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位；和第二段连续氨基酸，各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列与所述第一段连续氨基酸的序列相同且包含相同靶点结合部位；其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自在其预先确定的末端具有半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基，该半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基通过结构如下的键连接：

[0018]

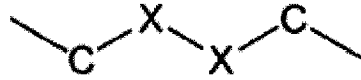


[0019] 其中各 X 相同并表示硫 (S) 或硒 (Se)，各 C 表示该半胱氨酸或硒代半胱氨酸残基之一的 β 碳原子。

[0020] 本发明一个实施方案还提供了一化合物，包含第一段连续氨基酸，所述氨基酸各

自通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位；和第二段连续氨基酸，各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列与所述第一段氨基酸的序列不同且包含不同部分的结合部位；其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自在其预先确定的末端具有半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基，该残基通过结构如下的键连接：

[0021]



[0022] 其中各 X 可相同或不同，表示硫 (S) 或硒 (Se)，各 C 表示半胱氨酸或硒代半胱氨酸残基之一的 β 碳原子。

[0023] 本文中描述的基因设备包含在预定终端通过非肽键连接的两个或多段连续氨基酸。这种基因设备既对称又相对一个或多个重要靶点对称地结合（即协同的）。本文中的基因设备是类蛋白分子，可通过许多相关术语描述，包括对称粘附素、免疫对称粘附素、半对称粘附素和双对称粘附素 [意味着来自 Gk. *symmetros* 中的“having a common measure, even, proportionate (具有通常尺度、均匀、均衡)”和 L. *adhaerentem*, *prp. of adhaerere* 中的“stick to (粘到)”的“均衡地粘到”]。

[0024] 本文中公开的是一化合物，包含通过一个或多个非肽键相互连接的两个或多个独立折叠的蛋白质域，键绕着所述域可进行二面旋转。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1：具有一个 X-末端的所述段连续氨基酸，描绘了 N-、C-、S- 和 Se- 末端的位置。N- 末端和 C- 末端氨基酸残基，画成了纽曼式投影，分别显示在投影平面的上方和下方：(i) 一段连续氨基酸（广义结构），具有：具有自由 α -氨基 (NH_2) 的 N- 末端氨基酸残基（侧链 = R_1 ）和具有自由 α -羧基 (COOH) 的 C- 末端氨基酸残基（侧链 = R_n ）。(ii) 具有 N- 末端 S- 末端的一段连续氨基酸，具有：具有自由 α -氨基 (NH_2) 和 β -巯基 (SH) 的 N- 末端半胱氨酸和具有自由 α -羧基 (COOH) 的 C- 末端氨基酸残基。(iii) 具有 C- 末端 S- 末端的一段连续氨基酸，具有：具有自由 α -氨基 (NH_2) 的 N- 末端氨基酸残基和具有自由 α -羧基 (COOH) 和 β -巯基 (SH) 的 C- 末端半胱氨酸。(iv) 具有 N- 末端 Se- 末端的一段连续氨基酸，具有：具有自由 α -氨基 (NH_2) 和 β -硒氢基 (SeH) 的 N- 末端硒代半胱氨酸和具有自由 α -羧基 (COOH) 的 C- 末端氨基酸残基。(v) 具有 C- 末端 Se- 末端的一段连续氨基酸，具有：具有自由 α -氨基 (NH_2) 的 N- 末端氨基酸残基和具有自由 α -羧基 (COOH) 和 β -硒氢基 (SeH) 的 C- 末端硒代半胱氨酸。

[0027] 图 2：具有两个 X-末端的所述段连续氨基酸，描绘了 N-、C-、S- 和 Se- 末端，N- 末端和 C- 末端氨基酸残基，画成了纽曼式投影，分别显示在投影平面的上方和下方。(i) 具有两个 X-末端的一段连续氨基酸（广义结构），具有：具有自由 α -氨基 (NH_2) 的 N- 末端氨基酸残基（侧链 = X_1 ）和具有自由 α -羧基 (COOH) 的 C- 末端氨基酸残基（侧链 = X_n ）。(ii) 具有 N- 末端 S- 末端和 C- 末端 S- 末端的一段连续氨基酸，具有：具有自由 α -氨基 (NH_2) 和 β -巯基 (SH) 的 N- 末端半胱氨酸和具有自由 α -羧基 (COOH) 和 β -巯基 (SH) 的 C- 末端半胱氨酸。(iii) 具有 N- 末端 S- 末端和 C- 末端 Se- 末端的一段连续氨基酸，具有：具有自由 α -氨基 (NH_2) 和 β -巯基 (SH) 的 N- 末端半胱氨酸和具有自由 α -羧基 (COOH) 和 β -硒氢基 (SeH) 的 C- 末端硒代半胱氨酸。(iv) 具有 N- 末端 Se- 末端和 C- 末

端 S- 末端的一段连续氨基酸,具有:具有自由 α -氨基 (NH_2) 和 β -硒氢基 (SeH) 的 N- 末端硒代半胱氨酸和具有自由 α -羧基 (COOH) 和 β -巯基 (SH) 的 C- 末端半胱氨酸。(v) 具有 N- 末端 Se- 末端和 C- 末端 Se- 末端的一段连续氨基酸,具有:具有自由 α -氨基 (NH_2) 和 β -硒氢基 (SeH) 的 N- 末端硒代半胱氨酸和具有自由 α -羧基 (COOH) 和 β -硒氢基 (SeH) 的 C- 末端硒代半胱氨酸。

[0028] 图 3:由在 C- 末端通过肽键连接到第二段连续氨基酸的 N- 末端的第一段连续氨基酸组成的嵌合多肽的一般结构。嵌合多肽,象自然中发现的蛋白质一样,是连续的多段连续氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸。象其它蛋白质一样,嵌合多肽由于肽键通过本身提供不超过两个能沿着多肽链二面旋转的连续单键而构象柔顺性有限。此图中的氨基酸残基按照如下编号:所述第一段连续氨基酸具有长度 = n 的残基,编号 = $1, 2, 3, \dots, (n-2), (n-1), n$ 。所述第二段连续氨基酸具有长度 = p 的残基,编号 = $1', 2', 3', \dots, (p-2), (p-1), p$ 。嵌合多肽具有长度 = $(n+p)$ 的残基,编号 = $1, 2, 3, \dots, (n-2), (n-1), n, (n+1), (n+2), (n+3), \dots, (n+p-2), (n+p-1), (n+p)$ 。主要和次要互变异构形式和共振结构分别显示在左边、中间和右边。

[0029] 图 4A:由在 C- 末端 -X- 末端通过 -X-X- 键连接到第二段连续氨基酸的 N- 末端 -X- 末端的第一段连续氨基酸组成的、具有头-尾构型的“对称粘附素”的一般结构。所述 -X-X- 键不是肽键。这里设想的键的非限定性示例包括任意组合,其中各 X 为 S 或 Se 原子。头-尾对称粘附素的整体极性为 N- 至 C- 末端。对称粘附素,象蛋白质一样,是多段连续氨基酸,各氨基酸连接到前一氨基酸,但不同于蛋白质的是通过用一个或多个 -X-X- 代替肽键。对称粘附素的构象柔顺性比多肽大,因为各 -X-X- 键提供了 7 个能二面旋转的相邻单键。氨基酸残基按照如下编号:所述第一段连续氨基酸具有长度 = n 的残基,编号 = $1, 2, 3, \dots, (n-2), (n-1), n$ 。所述第二段连续氨基酸具有长度 = p 的残基,编号 = $1', 2', 3', \dots, (p-2), (p-1), p$ 。所述头-尾对称粘附素具有长度 = $(n+p)$ 的残基,编号 = $1, 2, 3, \dots, (n-2), (n-1), n, (n+1), (n+2), (n+3), \dots, (n+p-2), (n+p-1), (n+p)$ 。主要和次要互变异构形式和共振结构分别显示在左边、中间和右边。

[0030] 图 4B:图 4A(左)的对称粘附素与由在倒数第二个 C- 末端残基通过 -X-X- 键结合到第二段连续氨基酸的倒数第二个 N- 末端残基的 X- 末端的第一段连续氨基酸组成的对称粘附素(右)对比。显示了各自的共振结构。

[0031] 图 4C:图 4A(左)的对称粘附素与由在倒数第三个 C- 末端残基通过 -X-X- 键结合到第二段连续氨基酸的倒数第三个 N- 末端残基的 X- 末端的第一段连续氨基酸组成的对称粘附素(右)对比。显示了各自的共振结构。

[0032] 图 4D:图 4A(左)的对称粘附素与由在倒数第四个 C- 末端残基通过 -X-X- 键结合到第二段连续氨基酸的倒数第四个 N- 末端残基的 X- 末端的第一段连续氨基酸组成的对称粘附素(右)对比。显示了各自的共振结构。

[0033] 图 5:由在 N- 末端 -X- 末端通过 -X-X- 键连接到第二段连续氨基酸的 N- 末端 -X- 末端的第一段连续氨基酸组成的、具有头-头构型的“对称粘附素”的一般结构。头-头对称粘附素的整体极性在 -X-X- 键位置变化,从 C- 至 N- 末端变到 N- 至 C- 末端。氨基酸残基按照如下编号:所述第一段连续氨基酸具有长度 = n 的残基,编号 = $1, 2, 3, \dots, (n-2), (n-1), n$ 。所述第二段连续氨基酸具有长度 = p 的残基,编号 = $1', 2', 3', \dots,$

(p-2)、(p-1)、p。所述头-头对称粘附素具有长度 = (n+p) 的残基, 编号 = 1、2、3、..., (n-2)、(n-1)、n、(n+1)、(n+2)、(n+3)、..., (n+p-2)、(n+p-1)、(n+p)。主要和次要互变异构形式和共振结构分别显示在左边、中间和右边。

[0034] 图 6: 由在 C- 末端 -X- 末端通过 -X-X- 键连接到第二段连续氨基酸的 C- 末端 -X- 末端的第一段连续氨基酸组成的、具有尾-尾构型的“对称粘附素”的一般结构。尾-尾对称粘附素的整体极性在 -X-X- 键位置变化, 从 N- 至 C- 末端变到 C- 至 N- 末端。氨基酸残基按照如下编号: 所述第一段连续氨基酸具有长度 = n 的残基, 编号 = 1、2、3、..., (n-2)、(n-1)、n。所述第二段连续氨基酸具有长度 = p 的残基, 编号 = 1'、2'、3'、..., (p-2)、(p-1)、p。所述尾-尾对称粘附素具有长度 = (n+p) 的残基, 编号 = 1、2、3、..., (n-2)、(n-1)、n、(反向)、p、(p-1)、(p-2)、..., 3'、2'、1'。主要和次要互变异构形式和共振结构分别显示在左边、中间和右边。

[0035] 图 7: 显示了全反式构象的头-尾半对称粘附素的示意图。将 C- 末端 -X- 末端与 N- 末端 -X- 末端连接在一起的七个连续单键都是反式的 (N-C-C-X-X-C-C-C)。这个构象中两个结合域相互指向外面; 绕着所述七个连续单键中的任一个 180 度旋转将使两个结合域指向彼此。不考虑构象, 具有头-尾构象的半对称粘附素是非对称分子 (对比图 7 和 8); 然而, 两个或多个头-尾半对称粘附素可一起形成对称分子。

[0036] 图 8: 显示了 X- 顺式 -X 构象的头-尾半对称粘附素的示意图。将 C- 末端 -X- 末端与 N- 末端 -X- 末端连接起来的七个连续单键中除了一个以外的其余所有都是反式的 (N-C-C-X- 顺式 -X-C-C-C)。在这个构象中两个结合域指向彼此; 绕着所述七个连续单键中的任一个 180 度旋转将使两个结合域相互指向外面。不考虑构象, 具有头-尾的半对称粘附素是非对称分子 (对比图 7 和 8); 然而, 两个或多个头-尾半对称粘附素可一起形成对称分子。

[0037] 图 9: 显示了全反式构象的头-头半对称粘附素的示意图。将第一个 N- 末端 X- 末端和第二个 N- 末端 -X- 末端连接在一起的七个连续单键都是反式的 (C-C-C-X-X-C-C-C)。这个构象中两个结合域相互指向外面; 绕着所述七个连续单键中的任一个 180 度旋转将使两个结合域指向彼此。具有头-头构型半对称粘附素仅在两个其可能构象中是对称分子: 全反式和 X- 顺式 -X (对比图 9 和 10); 然而, 两个或多个头-头半对称粘附素亚单位可形成具有无限个对称构象的分子。

[0038] 图 10: 显示 X- 顺式 -X 构象的头-头半对称粘附素的示意图。将第一个 N- 末端 -X- 末端和第二个 N- 末端 -X- 末端连接起来的七个连续单键中除了一个以外的其余所有都是反式的 (C-C-C-X- 顺式 -X-C-C-C)。在这个构象中两个结合域指向彼此; 绕着所述七个连续单键中的任一个再 180 度旋转将使两个结合域相互指向外面。具有头-头构型半对称粘附素仅在两个其可能构象中是对称分子: 全反式和 X- 顺式 -X (对比图 9 和 10); 然而, 两个或多个头-头半对称粘附素亚单位可形成具有无限个对称构象的分子。

[0039] 图 11: 显示全反式构象的尾-尾半对称粘附素的示意图。将第一个 C- 末端 -X- 末端和第二个 C- 末端 -X- 末端连接起来的七个连续单键都是反式的 (N-C-C-X-X-C-C-N)。这个构象中两个结合域相互指向外面; 绕着所述七个连续单键中的任一个 180 度旋转将使两个结合域指向彼此。具有尾-尾构型半对称粘附素仅在两个其可能构象中是对称分子: 全反式和 X- 顺式 -X (对比图 11 和 12); 然而, 两个或多个尾-尾半对称粘附素亚单位可形成

具有无限个对称构象的分子。

[0040] 图 12:显示 X-顺式 -X 构象的尾-尾半对称粘附素的示意图。将第一个 C-末端 -X-末端和第二个 C-末端 -X-末端连接起来的七个连续单键中除了一个以外的其余所有都是反式的 (N-C-C-X-顺式 -X-C-C-N)。在这个构象中两个结合域指向彼此;绕着所述七个连续单键中的任一个再 180 度旋转将使两个结合域相互指向外面。具有尾-尾构型半对称粘附素仅在两个其可能构象中是对称分子:全反式和 X-顺式 -X(对比图 9 和 10);然而,两个或多个尾-尾半对称粘附素亚单位可形成具有无限个对称构象的分子。

[0041] 图 13:由两个免疫球蛋白 Fab 结合域组成的尾-尾半对称粘附素的示意图。这里显示了全反式构象。将第一个 C-末端 X-末端和第二个 C-末端 -X-末端连接起来的七个连续单键都是反式的 (N-C-C-X-X-C-C-N)。在这个构象中两个 Fab 结合域指向外面;绕着所述七个连续单键中的任一个 180 度旋转将使所述 Fab 结合域指向彼此(对比图 13 和 14)。重链区通过 X-X 键结合在一起;轻链区通过内二硫键连接到重链区。缩写:VL,轻链可变区;CL,轻链恒定区;VH,重链可变区;CH1,重链恒定区 1。

[0042] 图 14:由两个免疫球蛋白 Fab 结合域组成的尾-尾半对称粘附素的示意图。这里显示了 X-顺式 -X 构象。将第一个 C-末端 -X-末端和第二个 C-末端 -X-末端连接起来的七个连续单键中除了一个以外的其余所有都是反式的 (N-C-C-X-顺式 -X-C-C-N)。在这个构象中两个 Fab 结合域指向彼此;绕着所述七个连续单键中的任一个再 180 度旋转将使所述 Fab 结合域相互指向外面(对比图 13 和 14)。重链区通过 X-X 键结合在一起;轻链区通过内二硫键连接到重链区。缩写:VL,轻链可变区;CL,轻链恒定区;VH,重链可变区;CH1,重链恒定区 1。

[0043] 图 15:免疫粘附素分子的示意图(Capon 等,(1989)Nature 337,525-530)。免疫粘附素为形成二硫键连接的二聚物的嵌合多肽。各嵌合多肽由在 C-末端通过肽键连接到免疫球蛋白 Fc 域的 N-末端的结合域组成。尽管免疫粘附素是结构对称的,但它们通常不会协同结合到二聚体或多聚体靶点分子。缩写:CH2,重链恒定区 2;CH3,重链恒定区 3。

[0044] 图 16:免疫球蛋白(抗体)分子的示意图。免疫球蛋白为由两个重链和两个轻链组成的异源四聚体。尽管免疫球蛋白是结构对称的,但它们通常不会协同结合到二聚体或多聚体靶点分子。缩写:VL,轻链可变区;CL,轻链恒定区;VH,重链可变区;CH1,重链恒定区 1;CH2,重链恒定区 2;CH3,重链恒定区 3。

[0045] 图 17:显示全反式构象的头-尾免疫对称粘附素的示意图。头-尾免疫对称粘附素是形成二硫键连接的二聚体的头-尾半对称粘附素。各半对称粘附素由免疫球蛋白 Fab 结合域组成,所述 Fab 结合域具有通过 -X-X- 结合到具有 N-末端 -X-末端的免疫球蛋白 Fc 亚单位的 C-末端 -X-末端。所述二聚体包含两个功能性 Fab 结合域和一个功能性 Fc 结合域。将各 Fab 域结合到 Fc 亚单位的七个连续单键都是反式的 (N-C-C-X-X-C-C-C)。绕着连续单键的第一 (N-C)、第三 (C-X)、第五 (X-C) 或第七 (C-C) 对的 180 度对称旋转将在第一总体方向移动所述两个 Fab 域(对比图 17 和 18)。绕着连续单键的第二 (C-C)、第四 (X-X) 或第六 (C-C) 单键对的 180 度对称旋转将在第二总体方向移动所述两个 Fab 域(对比图 17 和 19)。

[0046] 图 18:显示 X-顺式 -C 构象的头-尾免疫对称粘附素的示意图。X-顺式 -C 构象从全反式构象通过七个连续单键的第五对的对称旋转获得 (N-C-C-X-X-顺式 -C-C-C)

(对比图 17 和 18)。这里显示的类似于 X- 顺式 -C 构象的其它构象从全反式构象接着连续单键的第一 (N- 顺式 -C-C-X-X-C-C-C)、第三 (N-C-C- 顺式 -X-X-C-C-C) 或第七对 (N-C-C-X-X-C-C- 顺式 -C) 的对称旋转获得。

[0047] 图 19 :显示 X- 顺式 -X 构象的头 - 尾免疫对称粘附素的示意图。X- 顺式 -X 构象从全反式构象通过七个连续单键的第四对的对称旋转获得 (N-C-C-X- 顺式 -X-C-C-C) (对比图 17 和 19)。这里显示的类似于 X- 顺式 -X 构象的其它构象从全反式构象接着连续单键的第二 (N-C- 顺式 -C-X-X-C-C-C) 或第六对 (N-C-C-X-X-C- 顺式 -C-C) 的对称旋转获得。

[0048] 图 20 :显示全反式构象的尾 - 尾免疫对称粘附素的示意图。尾 - 尾免疫对称粘附素是形成二硫键连接的二聚体的尾 - 尾半对称粘附素。各半对称粘附素由免疫球蛋白 Fab 结合域组成, 所述 Fab 结合域具有通过 X-X 键连接到具有 C- 末端 -X- 末端的免疫球蛋白 Fc 亚单位的 C- 末端 -X- 末端。所述二聚体包含两个功能性 Fab 结合域和一个功能性 Fc 结合域。将各 Fab 域结合到 Fc 亚单位的七个连续单键都是反式的 (N-C-C-X-X-C-C-N)。绕着连续单键的第一 (N-C)、第三 (C-X)、第五 (X-C) 或第七 (C-C) 对的 180 度对称旋转将在第一总体方向移动所述两个 Fab 域 (对比图 20 和 21)。绕着第二 (C-C)、第四 (X-X) 或第六 (C-C) 单键对的 180 度对称旋转将在第二总体方向移动所述两个 Fab 域 (对比图 20 和 22)。

[0049] 图 21 :显示 X- 顺式 -C 构象的尾 - 尾免疫对称粘附素的示意图。X- 顺式 -C 构象从全反式构象通过七个连续单键的第五对的对称旋转获得 (N-C-C-X-X- 顺式 -C-C-N) (对比图 20 和 21)。这里显示的类似于 X- 顺式 -C 构象的其它构象从全反式构象接着连续单键的第一 (N- 顺式 -C-C-X-X-C-C-N)、第三 (N-C-C- 顺式 -X-X-C-C-N) 或第七对 (N-C-C-X-X-C-C- 顺式 -N) 的对称旋转获得。

[0050] 图 22 :显示 X- 顺式 -X 构象的尾 - 尾免疫对称粘附素的示意图。X- 顺式 -X 构象从全反式构象通过连续单键的第四对的对称旋转获得 (N-C-C-X- 顺式 -X-C-C-N) (对比图 20 和 22)。这里现实的类似于 X- 顺式 -X 构象的其它构象从全反式构象接着连续单键的第二 (N-C- 顺式 -C-X-X-C-C-N) 或第六对 (N-C-C-X-X-C- 顺式 -C-N) 的对称旋转获得。

[0051] 图 23 :显示全反式构象的、具有四个 Fab 结合域的双对称粘附素的示意图。该分子为各自由三个段连续氨基酸组成的两个半对称粘附素的二聚体。这里显示的双对称粘附素是形成二硫键连接的二聚体的头 - 尾、尾 - 尾半对称粘附素。各半对称粘附素由两个免疫球蛋白 Fab 域组成, 所述 Fab 域具有通过 -X-X- 键结合到免疫球蛋白 Fc 亚单位的 C- 末端 -X- 末端; 第一 Fab 域连接到 Fc N- 末端 -X- 末端, 第二 Fab 域连接到 Fc C- 末端 -X- 末端。所述二聚体具有四个功能性结合域和一个功能性 Fc 结合域。将所有四个 Fab 域连接到 Fc 亚单位的七个连续单键都是反式的 (N-C-C-X-X-C-C-C/N)。绕着连续单键的第一 (N-C)、第三 (C-X)、第五 (X-C) 或第七 (C-C/N) 对的 180 度对称旋转将在第一总体方向移动所述四个 Fab 域 (对比图 23 和 24)。绕着第二 (C-C)、第四 (X-X) 或第六 (C-C) 单键对的 180 度对称旋转将在第二总体方向移动所述四个 Fab 域 (对比图 23 和 25)。

[0052] 图 24 :由四个 Fab 结合域和一个 Fc 域组成的双免疫对称粘附素的 X- 顺式 -C 构象的示意图。该分子是各自由三个段连续氨基酸组成的两个半对称粘附素的二聚体。

[0053] 图 25 :由四个 Fab 结合域和一个 Fc 域组成的双免疫对称粘附素的 X- 顺式 -X 构象示意图。该分子是各自由三个段连续氨基酸组成的两个半对称粘附素的二聚体。

[0054] 图 26 :由两个 Fab 结合域、一个 Fc 域和两个非 Fab 结合域组成的双免疫对称粘附

素的全反式构象示意图。该分子是各自由三个段连续氨基酸组成的两个半对称粘附素的二聚体。这里显示的双对称粘附素是形成二硫键连接的二聚体的头-尾、尾-尾半对称粘附素。各半对称粘附素由具有通过 -X-X- 键结合到免疫球蛋白 Fc 亚单位的 N-末端 -X-末端的 C-末端 -X-末端的一个免疫球蛋白和具有通过 -X-X- 键结合到免疫球蛋白 Fc 亚单位的 C-末端 -X-末端的 C-末端 -X-末端的一个非免疫球蛋白结合域组成。所述二聚体具有两个功能性 Fab 结合域、两个功能性非免疫球蛋白结合域和一个功能性 Fc 结合域。将所有四个结合域连接到 Fc 亚单位的七个连续单键都是反式的 (N-C-C-X-X-C-C-C/N)。绕着连续单键的第一 (N-C)、第三 (C-X)、第五 (X-C) 或第七 (C-C/N) 对的 180 度对称旋转将在第一总体方向移动所述四个结合域 (对比图 26 和 27)。绕着第二 (C-C)、第四 (X-X) 或第六 (C-C) 单键对的 180 度对称旋转将在第二总体方向移动所述四个结合域 (对比图 26 和 28)。

[0055] 图 27:由两个 Fab 结合域、一个 Fc 域和两个非 Fab 结合域组成的双免疫对称粘附素的 X-顺式 -C 构象示意图。该分子是各自由三个段连续氨基酸组成的两个半对称粘附素的二聚体。

[0056] 图 28:由两个 Fab 结合域、一个 Fc 域和两个非 Fab 结合域组成的双免疫对称粘附素的 X-顺式 -X 构象示意图。该分子是各自由三个段连续氨基酸组成的两个半对称粘附素的二聚体。

[0057] 图 29:结合到第一对称靶点的免疫球蛋白的示意图。该相互作用是对称和协同的。两个靶点都被两个免疫球蛋白结合。

[0058] 图 30:结合到第一对称靶点的对称粘附素的示意图。该相互作用是对称和协同的。两个靶点都被第一构象 (全反式) 的两个对称粘附素结合。

[0059] 图 31:结合到第二对称靶点的免疫球蛋白的示意图。该相互作用既不是对称的也不是协同的。仅一个靶点被各免疫球蛋白结合。

[0060] 图 32:结合到第二对称靶点的对称粘附素的示意图。该相互作用是对称和协同的。两个靶点都被第二构象 (X-顺式 -C) 的两个对称粘附素结合。

[0061] 图 33:结合到第三对称靶点的免疫球蛋白的示意图。该相互作用既不是对称的也不是协同的。仅一个靶点被各免疫球蛋白结合。

[0062] 图 34:结合到第三对称靶点的对称粘附素的示意图。该相互作用是对称和协同的。两个靶点都被第三构象 (X-顺式 -X) 的两个对称粘附素结合。

[0063] 图 35A:具有 N-末端 -S-末端的人 IgG1Fc 对称粘附素前体亚单位的各种多肽合成中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了三种不同 Fc 前期 (pre-Fc) 多肽,任选包括人音猬 (sonic hedgehog) (SHH)、人干扰素 α 2 (IFN) 或人胆固醇酯转移酶 (CETP) 信号序列 (分别为残基 -23 至 -1、-23 至 -1 或 -17 至 -1) 和在铰链外显子 CDKTHTCPPCP 编码的第五个氨基酸开始的人 IGHG1Fc 区域 (残基 1 至 228) (Ellison 等, (1982) Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079)。所述三种不同 Fc 前期多肽分别具有长度为 251、251 和 245 的残基。(ii) 部分显示了具有 N-末端 -S-末端的成熟 Fc 区域 (长度 = 228)。N-末端半胱氨酸残基突出 (underlined)。(IGHG1, UniProtKB/Swiss-Prot entry P01857, Iggamma-1 chain C region, Homo sapiens)。

[0064] 图 35B:具有 N-末端 -S-末端的人 IgG2Fc 对称粘附素前体亚单位的各种多肽合成中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了三种不同 Fc 前期多肽,任选包括人音猬 (SHH)、人

干扰素 α 2(IFN) 或人胆固醇酯转移酶 (CETP) 信号序列 (分别为残基 -23 至 -1、-23 至 -1 或 -17 至 -1) 和在铰链外显子 CCVECPPCP 编码的第四个氨基酸开始的人 IGHG2Fc 区域 (残基 1 至 225) (Ellison et al. (1982)Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079)。所述三种不同 Fc 前期多肽分别具有长度为 248、248 和 242 的残基。(ii) 部分显示了具有 N- 末端 -S- 末端的成熟 Fc 区域 (长度 = 225)。所述 N- 末端半胱氨酸残基突出。(IGHG2, UniProtKB/Swiss-Prot entry P01859, Ig gamma-2 chain C region, Homo sapiens)。

[0065] 图 35C :具有 N- 末端 -S- 末端的人 IgG3 Fc 对称粘附素前体亚单位的各种多肽合成中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了三种不同 Fc 前期多肽, 任选包括人音猬 (SHH)、人干扰素 α 2(IFN) 或人胆固醇酯转移酶 (CETP) 信号序列 (分别为残基 -23 至 -1、-23 至 -1 或 -17 至 -1) 和在第一铰链外显子 CPRCP 编码的第十三个氨基酸开始的人 IGHG3Fc 区域 (残基 1 至 267) (Strausberg et al. (2002)Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 16899-1690)。所述三种不同 Fc 前期多肽分别具有长度为 290、290 和 284 残基。(ii) 部分显示了具有 N- 末端 -S- 末端的成熟 Fc 区域 (长度 = 267)。所述 N- 末端半胱氨酸残基突出。(IGHG3, UniProtKB/Swiss-Prot entry Q8N4Y9, Ig gamma-3 chain C region, Homo sapiens)。

[0066] 图 35D :具有 N- 末端 -S- 末端的人 IgG4Fc 对称粘附素前体亚单位的各种多肽合成中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了三种不同 Fc 前期多肽, 任选包括人音猬 (SHH)、人干扰素 α 2(IFN) 或人胆固醇酯转移酶 (CETP) 信号序列 (分别为残基 -23 至 -1、-23 至 -1 或 -17 至 -1) 和在第一铰链外显子 CPSCP 编码的第八个氨基酸开始的人 IGHG4Fc 区域 (残基 1 至 222) (Strausberg 等, (2002)Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 16899-1690)。所述三种不同 Fc 前期多肽分别具有长度为 245、245 和 239 的残基。(ii) 部分显示了具有 N- 末端 -S- 末端的成熟 Fc 区域 (长度 = 222)。所述 N- 末端半胱氨酸残基突出。(IGHG4, UniProtKB/Swiss-Prot entry Q8TC63, Ig gamma-4 chain C region, Homo sapiens)。

[0067] 图 36A :具有 N- 末端 -X- 末端的人 Fc 对称粘附素前体亚单位的各种多肽合成中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了三种不同 Fc 前期多肽, 任选包括人音猬 (SHH)、人干扰素 α 2(IFN) 或人胆固醇酯转移酶 (CETP) 信号序列 (分别为残基 -23 至 -1、-23 至 -1 或 -17 至 -1) 和在第一铰链外显子 CPPCP 编码的第十一个氨基酸开始的人 IGHG1Fc 区域 (残基 1 至 222) (Ellison 等, (1982)Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079)。所述三种不同 Fc 前期多肽分别具有长度为 245、245 和 239 的残基。(ii) 部分显示了具有 N- 末端 -S- 末端的成熟 Fc 区域 (长度 = 222)。所述 N- 末端半胱氨酸残基突出。(iii) 部分显示了通过化学自然连接延长以具有 N- 末端 -X- 末端的成熟 Fc 区域 (长度 = 226)。所述 N- 末端 X 氨基酸 (如半胱氨酸、硒代半胱氨酸) 突出, 接着是铰链外显子 XDKTHTCPPCP 编码的第六个氨基酸。(IGHG1, UniProtKB/Swiss-Prot entry P01857, Iggamma-1 chain C region, Homo sapiens)。

[0068] 图 36B :具有 N- 末端 -X- 末端的人 Fc 对称粘附素前体亚单位的各种多肽合成中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了三种不同 Fc 前期多肽, 任选包括人音猬 (SHH)、人干扰素 α 2(IFN) 或人胆固醇酯转移酶 (CETP) 信号序列 (分别为残基 -23 至 -1、-23 至 -1 或 -17 至 -1) 和在第一铰链外显子 CP 编码的第十四个氨基酸开始的人 IGHG1Fc 区域 (残基 1 至 219) (Ellison et al. (1982)Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079)。所述三种不同 Fc 前期多肽分别具有长度为 242、242 和 236 的残基。(ii) 部分显示了具有 N- 末端 -S- 末端的成熟 Fc 区域 (长度 = 219)。所述 N- 末端半胱氨酸残基突出。(iii) 部分显示了通过化学自然连接

延长以具有 N-末端 -X-末端的成熟 Fc 区域 (长度 = 222)。所述 N-末端 X 氨基酸 (如半胱氨酸、硒代半胱氨酸) 突出,接着是铰链外显子 XPPCP 编码的第十二个氨基酸。(IGHG1, UniProtKB/Swiss-Prot entry P01857, Ig gamma-1 chain C region, Homo sapiens)。

[0069] 图 37A:在具有 C-末端 -X-末端的人 Fc 对称粘附素前体亚单位的内蛋白(intein)基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了两种不同 Fc 前期内蛋白多肽,任选包括人 CD2 或 CD4 信号序列(分别为残基 -24 至 -I₁ 或 -25 至 -1)、在铰链外显子(KTHTCPPCP)编码的第七个氨基酸开始的人 IGHG1Fc 区域(残基 1 至 224)、人 IGHG3M1 区域(残基 225 至 241)和 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域(残基 242 至 441)。所述两种不同 Fc 前期内蛋白嵌合多肽分别具有长度为 465 和 466 的残基。(ii) 部分显示了成熟 Fc 内蛋白嵌合多肽(长度 = 441),包括人 Fc/M1 区域和 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域。所述内蛋白自剪切部位突出。(iii) 部分显示了硫酯封端的人 Fc/M1 区域(长度 = 242)。C-末端硫代甘氨酸残基(Z)突出。(iv) 部分显示了具有 C-末端 -X-末端的人 Fc/M1 区域(长度 = 243)。C-末端 X 氨基酸残基(如半胱氨酸、硒代半胱氨酸)突出。(IGHG1, UniProtKB/Swiss-Prot entry P01857, Ig gamma-1chain C region, Homo sapiens;IGHG3, NCBI/GenBank accession BAA11363, membrane-bound-type Ig gamma-chain, Homosapiens)。

[0070] 图 37B:具有 C-末端 -S-末端的人 Fc 对称粘附素前体亚单位的各种多肽合成中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了两种不同 Fc 前期多肽,任选包括人 CD2 或 CD4 信号序列(分别为残基 -24 至 -1 或 -25 至 -1)、在铰链外显子(KTHTCPPCP)编码的第七个氨基酸开始的人 IGHG1 Fc 区域(残基 1 至 224)和一部分人 IGHG3 M1 区域(残基 225 至 232)。所述两种不同 Fc 前期多肽分别具有长度为 256 和 257 的残基。(ii) 部分显示了具有 N-末端 -S-末端的成熟 Fc 区域(长度 = 232)。所述 N-末端半胱氨酸残基突出。(IGHG1, UniProtKB/Swiss-Prot entry P01857, Ig gamma-1chain C region, Homo sapiens)。

[0071] 图 38A-38B:在具有 N-末端 -S-末端和 C-末端 -X-末端的人 Fc 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(A) (i) 部分显示了三种不同 Fc 前期内蛋白多肽,任选包括人音猬(SHH)、人干扰素 α 2(IFN) 或人胆固醇酯转移酶(CETP)信号序列(分别为残基 -23 至 -1、-23 至 -1 或 -17 至 -1)、在铰链外显子(CDKTHTCPPCP)编码的第五个氨基酸开始的人 IGHG1 Fc 区域(残基 1 至 226)、人 IGHG3 M1 区域(残基 227 至 243)和 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域(残基 244 至 443)。所述三种不同 Fc 前期内蛋白嵌合多肽分别具有长度为 466、466 和 460 的残基。(ii) 部分显示了成熟 Fc 内蛋白嵌合多肽(长度 = 443),包括人 Fc/M1 区域和 N-末端 -S-末端的 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域。所述 N-末端半胱氨酸残基和内蛋白自剪切部位突出。(B) (iii) 部分显示了硫酯封端的人 Fc/M1 区域(长度 = 244)。所述 N-末端半胱氨酸残基和 C-末端硫代甘氨酸残基(Z)突出。(iv) 部分显示了具有 N-末端 -S-末端和 C-末端 -X-末端的 Fc/M1 区域(长度 = 245)。所述 N-末端半胱氨酸残基和 C-末端 X 氨基酸残基(如半胱氨酸、硒代半胱氨酸)突出。(IGHG1, UniProtKB/Swiss-Prot entry P01857, Ig gamma-1chain C region, Homosapiens;IGHG3, NCBI/GenBank accession BAA 11363, membrane-bound-type Ig gamma-chain, Homo sapiens)。

[0072] 图 39A-39B:在具有 N-末端 -X-末端和 C-末端 -X-末端的人 Fc 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(A) (i) 部分显示了三种不同 Fc

前期内蛋白多肽,任选包括人音猬 (SHH)、人干扰素 α 2(IFN) 或人胆固醇酯转移酶 (CETP) 信号序列 (分别为残基 -23 至 -1、-23 至 -1 或 -17 至 -1)、在铰链外显子 (CPPCP) 编码的第十一个氨基酸开始的人 IGHG1 Fc 区域 (残基 s1 至 220)、人 IGHG3 M1 区域 (残基 221 至 237) 和 MthRIR1 内蛋白-壳多糖结合域 (残基 238 至 437)。所述三种不同 Fc 前期内蛋白嵌合多肽分别具有长度为 460、460 和 454 的残基。(ii) 部分显示了成熟 Fc 内蛋白嵌合多肽 (长度 = 437),包括人 Fc/M1 区域和具有 N-末端-S-末端的 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域。所述 N-末端半胱氨酸残基和内蛋白自剪切部位突出。(B) (iii) 部分显示了通过化学自然连接延长以具有 N-末端-X-末端的成熟 Fc 内蛋白嵌合多肽 (长度 = 443)。所述 N-末端 X 氨基酸 (如半胱氨酸、硒代半胱氨酸) 突出。(iv) 部分显示了硫酯封端的人 Fc/M1 区域 (长度 = 244)。所述 N-末端 X 氨基酸残基和 C-末端硫代甘氨酸残基 (Z) 突出。(v) 部分显示了具有 N-末端-X-末端和 C-末端-X-末端的 Fc/M1 区域 (长度 = 245)。所述 N-末端 X 氨基酸残基和 C-末端 X 氨基酸残基突出。(IGHG1, UniProtKB/Swiss-Prot entry P01857, Ig gamma-1 chain C region, Homo sapiens; IGHG3, NCBI/GenBank accession BAA11363, membrane-bound-type Ig gamma-chain, Homo sapiens)。

[0073] 图 40A-40B:在具有 C-末端-X-末端的人 CD4 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(A) (i) 部分显示了 CD4 前期内蛋白多肽 (长度 = 596),包括人 CD4 信号序列 (残基 -25 至 -1) 和细胞外区域 (残基 1 至 371) 和 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域 (残基 372 至 571)。(ii) 部分显示了成熟 CD4 内蛋白嵌合多肽 (长度 = 571),包括人 CD4 细胞外区域和 MthRIR1 内蛋白-壳多糖结合域。内蛋白自剪切部位的位置突出。(B) (iii) 部分显示了硫酯封端的人 CD4 细胞外区域 (长度 = 372)。所述 C-末端硫代甘氨酸残基 (Z) 突出。(iv) 部分显示了具有 C-末端-X-末端的人 CD4 细胞外区域 (长度 = 373)。所述 C-末端 X 氨基酸残基 (如半胱氨酸、硒代半胱氨酸) 突出。(CD4, UniProtKB/Swiss-Prot entry P01730, T-cell surface glycoprotein CD4)。

[0074] 图 41A-41B:在具有 C-末端-X-末端的 Di62-VH 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(A) (i) 部分显示了 Di62 前期 VH-内蛋白多肽 (长度 = 444),包括小鼠 Di62-VH 信号序列 (残基 -19 至 -1) 和可变区 (残基 1 至 117)、人 CH1 恒定区 (残基 118 至 225) 和 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域 (残基 226 至 425)。(ii) 部分显示了成熟 Di62-VH 内蛋白嵌合多肽 (长度 = 425),包括小鼠 Di62-VH 可变区、人 CH1 恒定区和 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域。内蛋白自剪切部位的位置突出。(B) (iii) 部分显示了硫酯封端的小鼠 Di62-VH 可变区 / 人 CH1 恒定区 (长度 = 226)。所述 C-末端硫代甘氨酸残基 (Z) 突出。(iv) 部分显示了小鼠 Di62-VH 可变区 / 具有 C-末端-X-末端的人 CH1 恒定区 (长度 = 227)。所述 C-末端 X 氨基酸残基 (如半胱氨酸、硒代半胱氨酸) 突出。(Di62-VH, NCBI/GenBank accession CAA05416, IgG heavy chain, antigen binding of human TNF alpha subunits, Mus musculus)。

[0075] 图 42:Di62-Vk 对称粘附素前体亚单位的各种多肽合成中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了 Di62-Vk 前期多肽 (长度 = 234),包括小鼠 Di62-Vk 信号序列 (残基 -20 至 -1) 和可变区 (残基 1 至 107) 和人 Ck 恒定区 (残基 108 至 214)。(ii) 部分显示了成熟 Di62-Vk 嵌合多肽 (长度 = 214),包括小鼠 Di62-Vk 可变区和人 Ck 恒定区。(Di62-Vk, NCBI/GenBank accession CAA05417, IgG light chain, antigen binding of human TNF alpha subunit,

Mus musculus)。

[0076] 图 43 :在具有 C-末端 -X-末端的人 TNRI A 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了 TNRI A 内蛋白前期多肽 (长度 = 411), 包括人 TNRI A 信号序列 (残基 -21 至 -1) 和细胞外区域 (残基 1 至 190) 和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域 (残基 191 至 390)。(ii) 部分显示了成熟 TNRI A 内蛋白嵌合多肽 (长度 = 390), 包括人 TNRI A 细胞外区域和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域。内蛋白自剪切部位的位置突出。(iii) 部分显示了硫酯封端的人 TNRI A 细胞外区域 (长度 = 191)。C-末端硫代甘氨酸残基 (Z) 突出。(iv) 部分显示了具有 C-末端 -X-末端的人 TNRI A 细胞外区域 (长度 = 192)。所述 C-末端 X 氨基酸残基 (如半胱氨酸、硒代半胱氨酸) 突出。(TNRI A, UniProtKB/Swiss-Prot entry P19438, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A)。

[0077] 图 44A :在具有 C-末端 -X-末端的人 TNRI B 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了 TNRI B 内蛋白前期多肽 (长度 = 457), 包括人 TNRI B 信号序列 (残基 -22 至 -1) 和细胞外区域 (残基 1 至 235) 和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域 (残基 236 至 435)。(ii) 部分显示了成熟 TNRI B 内蛋白嵌合多肽 (长度 = 435), 包括人 TNRI B 细胞外区域和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域。内蛋白自剪切部位的位置突出。(iii) 部分显示了硫酯封端的人 TNRI B 细胞外区域 (长度 = 236)。C-末端硫代甘氨酸残基 (Z) 突出。(iv) 部分显示了具有 C-末端 -X-末端的人 TNRI B 细胞外区域 (长度 = 237)。所述 C-末端 X 氨基酸残基 (如半胱氨酸、硒代半胱氨酸) 突出。(TNRI B, UniProtKB/Swiss-Prot entry 20333, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B)。

[0078] 图 44B :TNRI B 免疫粘附素前体亚单位的各种多肽合成中间体的氨基酸序列。(i) 部分显示了 TNRI B- 免疫粘附素前期多肽 (长度 = 489), 包括 TNRI B 信号序列 (残基 -22 至 -1) 和细胞外区域 (残基 1 至 235) 和人重链恒定区 (残基 236 至 467)。(ii) 部分显示了成熟 TNRI B- 免疫粘附素 (长度 = 467)。

[0079] 图 45A-45C :在具有 C-末端 -X-末端的人 VGFR1 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(A) (i) 部分显示了 VGFR1 内蛋白前期多肽 (长度 = 958), 包括人 VGFR1 信号序列 (残基 -26 至 -1) 和细胞外区域 (残基 1 至 732) 和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域 (残基 733 至 932)。(B) (ii) 部分显示了成熟 VGFR1 内蛋白嵌合多肽 (长度 = 932), 包括人 VGFR1 细胞外区域和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域。内蛋白自剪切部位的位置突出。(C) (iii) 部分显示了硫酯封端的人 VGFR1 细胞外区域 (长度 = 733)。所述 C-末端硫代甘氨酸残基 (Z) 突出。(iv) 部分显示了具有 C-末端 -X-末端的人 VGFR1 细胞外区域 (长度 = 734)。所述 C-末端 X 氨基酸残基 (如半胱氨酸、硒代半胱氨酸) 突出。(VGFR1, UniProtKB/Swiss-Prot entry P17948, Vascular endothelial growth factor receptor 1)。

[0080] 图 46A-46C :在具有 C-末端 -X-末端的人 VGFR2 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(A) (i) 部分显示了 VGFR2 内蛋白前期多肽 (长度 = 964), 包括人 VGFR2 信号序列 (残基 -19 至 -1) 和细胞外区域 (残基 1 至 745) 和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域 (残基 746 至 945)。(B) (ii) 部分显示了成熟 VGFR2 内蛋白嵌

合多肽（长度 = 945），包括人 VGFR2 细胞外区域和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域。内蛋白自剪切部位的位置突出。(C) (iii) 部分显示了硫酯封端的人 VGFR2 细胞外区域（长度 = 746）。所述 C- 末端硫代甘氨酸残基 (Z) 突出。(iv) 部分显示了具有 C- 末端 -X- 末端的人 VGFR2 细胞外区域（长度 = 747）。所述 C- 末端 X 氨基酸残基（如半胱氨酸、硒代半胱氨酸）突出。(VGFR2, UniProtKB/Swiss-Prot entry P35968, Vascular endothelial growth factor receptor 2)。

[0081] 图 47A-47C : 在具有 C- 末端 -X- 末端的人 VGFR3 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(A) (i) 部分显示了 VGFR3 内蛋白前期多肽（长度 = 975），包括人 VGFR3 信号序列（残基 -24 至 -1）和细胞外区域（残基 1 至 751）和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域（残基 752 至 951）(B) (ii) 部分显示了成熟 VGFR3- 内蛋白嵌合多肽（长度 = 951）包括人 VGFR3 细胞外区域和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域。内蛋白自剪切部位的位置突出。(C) (iii) 部分显示了硫酯封端的人 VGFR3 细胞外区域（长度 = 752）。所述 C- 末端硫代甘氨酸残基 (Z) 突出。(iv) 部分显示了具有 C- 末端 -X- 末端的人 VGFR3 细胞外区域（长度 = 753）。所述 C- 末端 X 氨基酸残基（如半胱氨酸、硒代半胱氨酸）突出。(VGFR3, UniProtKB/Swiss-Prot entry P35916, Vascular endothelial growth factor receptor 3)。

[0082] 图 48A-48B : 在具有 C- 末端 -X- 末端的人 ERBB1 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(A) (i) 部分显示了 ERBB1 内蛋白前期多肽（长度 = 845），包括人 ERBB1 信号序列（残基 -24 至 -1）和细胞外区域（残基 1 至 621）和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域（残基 622 至 821）。(ii) 部分显示了成熟 ERBB1- 内蛋白嵌合多肽（长度 = 821），包括人 ERBB1 细胞外区域和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域。内蛋白自剪切部位的位置突出。(B) (iii) 部分显示了硫酯封端的人 ERBB1 细胞外区域（长度 = 622）。所述 C- 末端硫代甘氨酸残基 (Z) 突出。(iv) 部分显示了具有 C- 末端 -X- 末端的人 ERBB1 细胞外区域（长度 = 623）。所述 C- 末端 X 氨基酸残基（如半胱氨酸、硒代半胱氨酸）突出。(ERBB1, UniProtKB/Swiss-Prot entry P00533, Epidermal growth factor receptor)。

[0083] 图 49A-49B : 在具有 C- 末端 -X- 末端的人 ERBB2 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(A) (i) 部分显示了 ERBB2 内蛋白前期多肽（长度 = 852），包括人 ERBB2 信号序列（残基 -22 至 -1）和细胞外区域（残基 1 至 630）和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域（残基 631 至 830）。(ii) 部分显示了成熟 ERBB2 内蛋白嵌合多肽（长度 = 830），包括人 ERBB2 细胞外区域和 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域。内蛋白自剪切部位的位置突出。(B) (iii) 部分显示了硫酯封端的人 ERBB2 细胞外区域（长度 = 631）。所述 C- 末端硫代甘氨酸残基 (Z) 突出。(iv) 部分显示了具有 C- 末端 -X- 末端的人 ERBB2 细胞外区域（长度 = 632）。所述 C- 末端 X 氨基酸残基（如半胱氨酸、硒代半胱氨酸）突出。(ERBB2, UniProtKB/Swiss-Prot entry P04626, Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)。

[0084] 图 50A-50B : 在具有 C- 末端 -X- 末端的人 ERBB3 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成的各种多肽中间体的氨基酸序列。(A) (i) 部分显示了 ERBB3- 内蛋白多肽（长度 = 843），包括人 ERBB3 信号序列（残基 -19 至 -1）和细胞外区域（残基 1 至 624）和 Mth RIR1

内蛋白-壳多糖结合域(残基 625 至 824)。(ii) 部分显示了成熟 ERBB3-内蛋白嵌合多肽(长度=824),包括人 ERBB3 细胞外区域和 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域。内蛋白自剪切部位的位置突出。(B) (iii) 部分显示了硫酯封端的人 ERBB3 细胞外区域(长度=625)。所述 C-末端硫代甘氨酸残基(Z) 突出。(iv) 部分显示了具有 C-末端-X-末端的人 ERBB3 细胞外区域(长度=626)。所述 C-末端 X 氨基酸残基(如半胱氨酸、硒代半胱氨酸) 突出。(ERBB3, UniProtKB/Swiss-Prot entry P21860, Receptortyrosine-protein kinase erbB-3)。

[0085] 图 51A-51B:在具有 C-末端-X-末端的人 ERBB4 对称粘附素前体亚单位的内蛋白基合成中的各种多肽中间体的氨基酸序列。(A) (i) 部分显示了 ERBB4 前期内蛋白多肽(长度=851),包括人 ERBB4 信号序列(残基 -25 至 -1) 和细胞外区域(残基 1 至 626) 和 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域(残基 627 至 826)。(ii) 部分显示了成熟 ERBB4-内蛋白嵌合多肽(长度=826),包括人 ERBB4 细胞外区域和 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域。内蛋白自剪切部位的位置突出。(B) (iii) 部分显示了硫酯封端的人 ERBB4 细胞外区域(长度=627)。所述 C-末端硫代甘氨酸残基(Z) 突出。(iv) 部分显示了具有 C-末端-X-末端的人 ERBB4 细胞外区域(长度=628)。所述 C-末端 X 氨基酸残基(如半胱氨酸、硒代半胱氨酸) 突出。(ERBB4, UniProtKB/Swiss-Prot entry Q15303, Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4)。

[0086] 图 52:具有 N-末端-S-末端的人 IgG1 Fc 对称粘附素亚单位在 293 肾细胞中的表达。道(lane)1-6 和道 7-12 分别显示了图 35A(ii) 和图 36A(ii) 的 IgG1 Fc 多肽。细胞培养上清:道 1、3、5、7、9 和 11;细胞溶解产物:道 2、4、6、8、10 和 12。所用信号序列:SHH(道 1、2、7 和 8);IFNA(道 3、4、9、10);CETP(道 5、6、11 和 12)。

[0087] 图 53:人 IgG1 Fc 对称粘附素亚单位在 293 肾细胞中的表达。道 1-2、3-4 和 5-6 分别显示了图 35A(ii)、图 36A(ii) 和图 37B(ii) 的 IgG1 Fc 多肽。细胞培养上清:(道 1-6)。所用信号序列:SHH(道 1-6)。

[0088] 图 54:在 293 肾细胞表达的人 IgG1 Fc 对称粘附素亚单位的蛋白质 A 纯化。道 2 和 8 分别显示了图 36A 和图 35A 的 IgG1 Fc 多肽。道 1-7:图 36A IgG1 Fc 多肽的琼脂糖凝胶(sepharose) 柱馏分-蛋白质 A。

[0089] 图 55:图 54 中显示的已纯化人 IgG1 Fc 对称粘附素亚单位-蛋白质 A 的硫醇基-琼脂糖凝胶结合。道 1-3 和道 4-6 分别显示了图 35A 和图 36A 的人 IgG1 Fc 多肽。道 1 和 4:原料;道 2 和 5:硫醇基-琼脂糖凝胶流过馏分;道 3 和 6:硫醇基-琼脂糖凝胶结合馏分。

[0090] 图 56:人 CD4-内蛋白融合蛋白质在人 293 肾细胞中的表达。道 1-4 显示了图 40A(ii) 的 CD4-内蛋白融合多肽。细胞培养上清:道 1 和 3;细胞溶解产物:道 2 和 4。

[0091] 图 57:人 TNR1B 融合蛋白质在人 293 肾细胞中的表达。道(lane) 和 5 显示了图 44A(ii) 的 TNR1B-内蛋白融合蛋白质。道 1 和 3 显示了图 44B(ii) 的 TNR1B-免疫粘附素融合蛋白质。道 3 和 6 显示了模拟转染细胞的蛋白质。细胞培养上清:道 1-3;细胞溶解产物:道 4-7。道 7:对照 TNR1B-免疫粘附素(R&D 体系)。

[0092] 图 58:具有 C-末端-S-末端的 TNR1B 对称粘附素亚单位。道 1-2 显示了通过壳多糖亲和层析和用 MESNA 分裂/洗脱纯化的图 44A(iii) 的 TNR1B 多肽。道 3 显示了图

44A(iii) 的 TNRI B 多肽和荧光标记肽 (New England Biolabs) 之间的自然连接产物。(i) 板:直接荧光;(ii) 板:带抗 TNRI B 抗体的蛋白质印迹 (R&D Systems);(iii) 板:SYPRO Ruby 染色 (Sigma-Aldrich)。

[0093] 图 59:具有 C-末端-S-末端的 TNRI B 对称粘附素亚单位。道 5 显示了通过壳多糖亲和层析和用半胱氨酸分裂/洗脱的图 44A(iv) 的 TNRI B 多肽。道 1-4 显示了 TNRI B-免疫粘附素。

[0094] 图 60:TNRI B 对称粘附素。道 1-4 显示了氧化前(道 1 和 4)和在 10mM CuSO₄ 存在下氧化后的图 44A(iv) 的 TNRI B 对称粘附素。道 3 和 6 显示了 TNRI B-免疫粘附素对照物。道 1-3:还原条件;道 4-6:非还原条件。TNRI B 对称粘附素单体 (42kd) 和二聚体 (84kd) 分别在道 2 和 5 中显而易见。

[0095] 图 61A-61C:在 Biacore T-I00 上对各种 TNRI B 多肽进行的 TNF- α 饱和结合分析。(A) 采用标准 Biacore 胺化学将图 44A(iv) 的 TNRI B 对称粘附素共价偶合到 Biacore CM-5 芯片上。(B) 采用标准 Biacore 胺化学将 TNRI B 免疫粘附素 (R&D Systems) 共价偶合到 Biacore CM-5 芯片。(C) 采用标准 Biacore 硫醇化学将图 44A(iv) 的 TNRI B 对称粘附素共价偶合到 Biacore CM-5 芯片。偶合后,采用 TNF- α (R&D Systems) 在指示浓度下进行饱和结合分析。

[0096] 图 62A-62C:图 61A-61C 中所示的 TNF- α 饱和结合分析的 Scatchard 分析。(A) 采用胺化学共价偶合的图 44A(iv) 的 TNRI B 对称粘附素; $K_d = K_d = 4.697 \times 10^{-9} M$ 。(B) 采用胺化学共价结合的 TNRI B-免疫粘附素 (R&D Systems); $K_d = 4.089 \times 10^{-9} M$ 。(C) 采用硫醇化学共价结合的图 44A(iv) 的 TNRI B 对称粘附素; $K_d = 0.8476 \times 10^{-9} M$ 。

[0097] 发明详述

[0098] 本发明提供一化合物,包含第一段连续氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位;和第二段连续氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列与所述第一段连续氨基酸的序列相同且包含相同靶点结合部位;其中所述第一氨基酸段和第二氨基酸段各自在其预定末端具有半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基,该半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基通过结构如下的键连接:

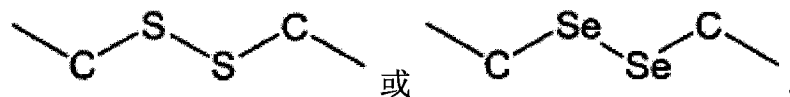
[0099]



[0100] 其中各 X 相同并表示硫 (S) 或硒 (Se),各 C 表示该半胱氨酸或硒代半胱氨酸残基之一的 β 碳原子。

[0101] 一个实施方案中,所述键具有以下结构:

[0102]



[0103] 一个实施方案中,所述第一和第二段连续氨基酸各自预定末端的残基为半胱氨酸残基。一个实施方案中,所述第一和第二段连续氨基酸各自预定末端的残基为硒代半胱氨酸残基。

[0104] 本发明还提供一化合物,包含第一段连续氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一

氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位；和第二段连续氨基酸，各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列不同于所述第一连续氨基酸序列并包含不同部分的结合部位；其中所述第一氨基酸段和第二氨基酸段各自在其预定末端具有半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基，该半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基通过结构如下的键连接：

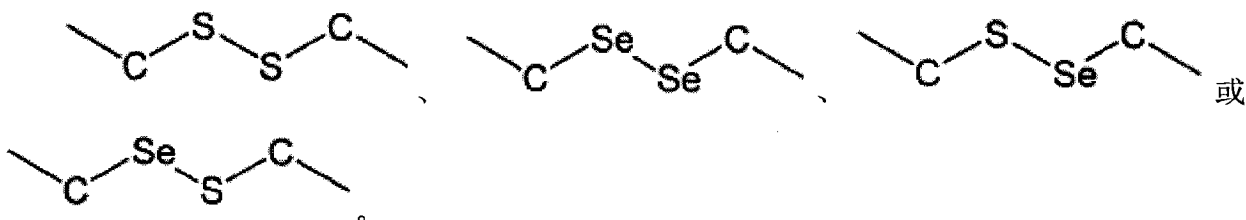
[0105]



[0106] 其中各 X 可相同或不同并表示硫 (S) 或硒 (Se)，各 C 表示该半胱氨酸或硒代半胱氨酸残基之一的 β 碳原子。

[0107] 一个实施方案中，所述键具有以下结构：

[0108]



[0109] 一个实施方案中，所述第一氨基酸段和第二氨基酸段各自预定末端的残基都是半胱氨酸残基。一个实施方案中，所述第一氨基酸段和第二氨基酸段各自预定末端的残基都是硒代半胱氨酸残基。一个实施方案中所述第一或第二段连续氨基酸之一在预定末端的残基是半胱氨酸残基且在另一预定末端的残基为硒代半胱氨酸残基。

[0110] 本发明提供一多聚体，包含通过至少一个键连接在一起的两个或多个相同本发明化合物。一个实施方案中，所述多聚体为二聚体。一个实施方案中，所述多聚体为三聚体。一个实施方案中，所述多聚体为四聚体。所述多聚体的一个实施方案中，所述一个或多个键包括二硫键。

[0111] 所述化合物的一个实施方案中，所述第一氨基酸段和第二氨基酸段两者的预定末端是其 N- 末端。一个实施方案中，所述第一氨基酸段和第二氨基酸段两者的预定末端是其 C- 末端。一个实施方案中，所述第一氨基酸段和第二氨基酸段之一的预定末端是 C- 末端，另一预定末端是 N- 末端。

[0112] 所述化合物的一个实施方案中，所述第一氨基酸段包含 L- 氨基酸。一个实施方案，所述第一氨基酸段包含 D- 氨基酸。一个实施方案中，所述第一氨基酸段包含 L- 氨基酸和 D- 氨基酸。

[0113] 一个实施方案中，所述第二氨基酸段包含 L- 氨基酸。一个实施方案中，所述第二氨基酸段包含 D- 氨基酸。一个实施方案中，所述第二氨基酸段包含 L- 氨基酸和 D- 氨基酸。

[0114] 一个实施方案中，所述第一氨基酸段包含至少 50 个连续氨基酸。一个实施方案中，所述第二氨基酸段包含至少 50 个连续氨基酸。一个实施方案中，所述第一和 / 或第二氨基酸段的长度为 1-100、100-200 或 200-300 个氨基酸。一个实施方案中，所述第一或第二氨基酸段包含至少 20、25、30、35、40 或 45 个连续氨基酸。

[0115] 一个实施方案中，所述第一氨基酸段包含不止一类的氨基酸。一个实施方案中，所述第二氨基酸段包含不止一类的氨基酸。

[0116] 本发明化合物的一个实施方案中，所述第一和 / 或第二氨基酸段的序列对应免疫

球蛋白的恒定区的序列。一个实施方案中,所述免疫球蛋白为人免疫球蛋白。一个实施方案中,所述免疫球蛋白的恒定区为 IgG、IgA、IgE、IgD 或 IgM 免疫球蛋白的恒定区。一个实施方案中,所述免疫球蛋白的恒定区为 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 免疫球蛋白的恒定区。一个实施方案中,所述免疫球蛋白的恒定区,其为 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 免疫球蛋白的恒定区,具有本文中列出的一个序列。一个实施方案中,所述免疫球蛋白的恒定区是 IgG 免疫球蛋白的恒定区并包含铰链区域、CH6 区域和 CH3 区域。一个实施方案中,所述不同部分是免疫效应物或免疫调节剂。

[0117] 一个实施方案中,所述靶点是蛋白质。一个实施方案中,所述靶点是 EGF 受体、HER2、VEGF 受体、CD20 抗原、Cd11a、IgE 免疫球蛋白、糖蛋白 IIa 受体、糖蛋白 IIIa 受体、TNF α 或 TNF 受体、gp120。一个实施方案中,所述第一和第二段连续氨基酸各自包含 TNFRSF1a、TNFRSF1b、VEGFR1、VEGFR6、VEGFR3、人 Erb1、人 Erb2、人 Erb6、人 Erb3 或人 Erb4 中任一个的氨基酸序列。一个实施方案中,所述第一或第二段连续氨基酸包含 TNFRSF1a、TNFRSF1b、VEGFR1、VEGFR6、VEGFR3、人 Erb1、人 Erb2、人 Erb6、人 Erb3 或人 Erb4 中任一个的氨基酸序列。

[0118] 本发明提供一组合物,包含结合靶点和载体的有效量的任一本发明化合物。一个实施方案中,所述化合物为有效量,以结合靶点和载体。一个实施方案中,所述化合物为多聚体且为结合靶点和载体的有效量。一个实施方案中,所述多聚体也以结合所述不同部分的有效量存在。一个实施方案中,所述载体为药学上可接受的载体。一个实施方案中,所述载体为磷酸盐缓冲生理盐水。这种组合物可为经过冻干的。

[0119] 本发明提供一种影响靶点活性的方法,包括使所述靶点和一种或多种本发明化合物的组合物接触,在一定条件下使得所述化合物结合到所述靶点并影响所述靶点的活性。一个实施方案中,所述组合物结合到所述靶点提高了所述靶点的活性。一个实施方案中,所述组合物结合到所述靶点降低了所述靶点的活性。一个实施方案中,所述靶点为 EGF 受体、HER2 蛋白质、VEGF 受体、CD20 抗原、Cd11a 和 IgE 免疫球蛋白、糖蛋白 IIa 受体、糖蛋白 IIIa 受体、gp40、gp120、TNF α 或 TNF 受体。

[0120] 本发明提供一复合物,包含任一本发明化合物的组合物和第三段连续氨基酸,其中所述第三段连续氨基酸通过一个或多个键结合到所述第一或第二段连续氨基酸之一。一个实施方案中,所述一个或多个键包括范德华 (van der Waals) 力。一个实施方案中,所述一个或多个键包括氢键。一个实施方案中,所述一个或多个键包括共价键。一个实施方案中,所述一个或多个键包括二硫键。一个实施方案,所述至少一个键是二硫键。一个实施方案中,所述二硫键位于两个非末端氨基酸残基之间。一个实施方案中,所述二硫键位于两个氨基酸残基之间,其中所述两个氨基酸残基中至少一个是非末端氨基酸残基。

[0121] 本发明提供制备一种本发明化合物的方法,包括:

[0122] (a) 用重组体核酸转染细胞,所述重组体核酸包含 (i) 第一部分,所述第一部分的序列为 N-末端信号序列,与以下 (ii) 相邻,(ii) 第二部分,所述第二部分的序列编码一段连续氨基酸,与以下 (iii) 相邻,(iii) 第三部分,所述第三部分的序列编码 C-末端含内蛋白的结合域,在允许合成包含与所述 C-末端含内蛋白的结合域相邻的所述段连续氨基酸的嵌合多肽的条件下;

[0123] (b) 分离步骤 (a) 中产生的嵌合多肽;

[0124] (c) 处理所述嵌合多肽以导致所述 C- 末端含内蛋白的结合域从所述段连续氨基酸发生硫介导的剪切并用 C- 末端硫酯代替它；

[0125] (d) 处理步骤 (c) 的产物以让半胱氨酸残基附着到所述产物上, 以形成具有 C- 末端半胱氨酸的产物; 和

[0126] (e) 在允许形成所述化合物的条件下、在步骤 (e) 的另一产物存在下氧化步骤 (e) 的产物。

[0127] 一个实施方案中, 所述重组核酸具有 SEQ ID NO. 1-8 中任一个列出的序列。一个实施方案中, 所述含 C- 末端内蛋白的结合域为内蛋白 - 壳多糖结合域。一个实施方案中, 所述含 C- 末端内蛋白的结合域为 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域。一个实施方案中, 在步骤 b) 中通过亲和层析来分离所述嵌合多肽。一个实施方案中, 在步骤 b) 中通过将所述产物暴露于由壳多糖衍生的树脂来分离所述嵌合多肽。一个实施方案中, 所述氧化条件允许在各产物的 C- 末端半胱氨酸之间形成二硫键。

[0128] 本发明提供一化合物, 包含一独立折叠的蛋白质域, 所述蛋白质域通过非肽键融合到第二独立折叠的蛋白质域。本发明提供包含第一多肽链的一化合物, 所述第一多肽链包含末端半胱氨酸残基, 在其 S- 末端融合到包含末端半胱氨酸残基的第二多肽链的 S- 末端。本发明提供包含第一多肽链的一化合物, 所述第一多肽链包含末端硒代半胱氨酸残基, 在其 Se- 末端融合到包含末端半胱氨酸残基的第二多肽链的 S- 末端。本发明提供包含第一多肽链的一化合物, 所述第一多肽链包含末端硒代半胱氨酸残基, 在其 Se- 末端融合到包含末端硒代半胱氨酸残基的第二多肽链的 Se- 末端。本发明提供一多聚体, 包含通过至少一个键连接在一起的两个或多个相同的、权利要求 66-69 中任一方法的化合物。

[0129] 本发明提供制备包含 N- 末端半胱氨酸的一段连续氨基酸的方法, 包括:

[0130] (a) 用重组体核酸转染细胞, 所述重组体核酸包含 (i) 第一部分, 所述第一部分的序列编码 N- 末端信号序列, 与以下 (ii) 相邻, (ii) 第二部分, 所述第二部分的序列编码包含 N- 末端半胱氨酸残基的一段连续氨基酸, 在允许 (i) 合成包含通过肽键在其 C- 末端连接到所述段连续氨基酸的 N- 末端半胱氨酸的所述 N- 末端信号序列的嵌合多肽和 (ii) 所述 N- 末端信号序列在所述细胞内从所述嵌合多肽剪切下来以产生包含 N- 末端半胱氨酸的所述段连续氨基酸的条件下;

[0131] (b) 回收步骤 (a) 中产生的所述段连续氨基酸。

[0132] 本文中公开的一个方法实施方案中, 在步骤 (b) 分离所述段连续氨基酸。

[0133] 一个实施方案中, 所述段连续氨基酸包含免疫球蛋白 Fc 多肽。一个实施方案中, 所述免疫球蛋白 Fc 多肽为人免疫球蛋白 Fc 多肽。一个实施方案中, 所述 N- 末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc 多肽的 cys-5 残基。一个实施方案中, 所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。一个实施方案中, 用质粒 pSA 进行所述转染。一个实施方案中, N- 末端信号序列选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质。一个实施方案中, 所述信号肽为音猬、干扰素 $\alpha 2$ 或胆固醇酯转移酶。一个实施方案中, 通过亲和层析回收所述段连续氨基酸。一个实施方案中, 通过细胞信号肽酶进行细胞内的嵌合多肽剪切。

[0134] 本发明提供制备包含 N- 末端半胱氨酸或硒代半胱氨酸的一段连续氨基酸的方法, 包括:

[0135] (a) 用重组体核酸转染细胞, 所述重组体核酸包含 (i) 第一部分, 所述第一部分的

序列编码 N- 末端信号序列, 与以下 (ii) 相邻的, (ii) 第二部分, 所述第二部分的序列编码包含 N- 末端半胱氨酸残基的一段连续氨基酸, 在允许 (i) 合成包含通过肽键在其 C- 末端连接到 Fc 多肽的 N- 末端半胱氨酸的所述 N- 末端信号序列的嵌合多肽和 (ii) 所述 N- 末端信号序列在所述细胞内从所述嵌合多肽剪切下来以产生包含 N- 末端半胱氨酸的一段连续氨基酸的条件下;

[0136] (b) 用包含氨基酸序列 *cys-asp-lys-thr-his-thr* 的肽或包含氨基酸序列 *sec-asp-lys-thr-his-thr* 的肽的 C- 末端连接步骤 (a) 中产生的所述段连续氨基酸的 N- 末端从而制备包含 N- 末端半胱氨酸或硒代半胱氨酸的所述段连续氨基酸; 和

[0137] (c) 回收步骤 (b) 中产生的所述段连续氨基酸。

[0138] 一个实施方案中, 所述段连续氨基酸包含免疫球蛋白 Fc 多肽。一个实施方案中, 所述免疫球蛋白 Fc 多肽为人免疫球蛋白 Fc 多肽。一个实施方案中, 所述 N- 末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc 多肽的 *cys-5* 残基。一个实施方案中, 所述 N- 末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc 多肽的 *cys-11* 残基。一个实施方案中, 步骤 (b) 中的肽包含氨基酸序列 *cys-asp-lys-thr-his-thr* 且制备的连续氨基酸段包含 N- 末端半胱氨酸。一个实施方案中, 步骤 (b) 中肽包含氨基酸序列 *sec-asp-lys-thr-his-thr* 且制备的连续氨基酸段包含 N- 末端硒代半胱氨酸。一个实施方案中, 在连接之前用 N- 末端 Msc 保护基来保护步骤 (b) 中肽。一个实施方案中, 所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。一个实施方案中, 用质粒 pSA 来进行所述转染。一个实施方案中, 所述 N- 末端信号序列选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质。一个实施方案中, 所述信号肽为音猬、干扰素 $\alpha 2$ 或胆固醇酯转移酶。一个实施方案中, 通过亲和层析回收所述段连续氨基酸。一个实施方案中, 通过细胞信号肽酶进行细胞内嵌合多肽剪切。实施方案中, 采用具有 N- 末端半胱氨酸或硒代半胱氨酸的其它短肽序列代替上述那些。

[0139] 本发明提供制备包含 C- 末端半胱氨酸或 C- 末端硒代半胱氨酸的一段连续氨基酸的方法, 包括:

[0140] (a) 用重组体核酸转染细胞, 所述重组体核酸包含 (i) 第一部分, 所述第一部分的序列编码 N- 末端信号序列, 与以下 (ii) 相邻, (ii) 第二部分, 所述第二部分的序列编码一段连续氨基酸, 与以下 (iii) 相邻, (iii) 第三部分, 所述第三部分的序列编码 C- 末端含内蛋白的结合域, 在允许 (i) 合成包含所述 N- 末端信号序列的嵌合多肽, 所述 N- 末端信号序列与所述段连续氨基酸相邻, 所述段连续氨基酸与所述 C- 末端含内蛋白的结合域相邻, 和 (ii) 所述 N- 末端信号序列从所述嵌合多肽剪切下来以产生具有 N- 末端赖氨酸残基并包含与所述 C- 末端含内蛋白的结合域相邻的所述段连续氨基酸的第二嵌合多肽的条件下;

[0141] (b) 分离步骤 (a) 中产生的第二嵌合多肽;

[0142] (c) 处理所述第二嵌合多肽以导致 C- 末端含内蛋白的结合域从所述段连续氨基酸发生硫介导的剪切, 以形成 C- 末端硫酯;

[0143] (d) 用半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基在其 C- 末端连接步骤 (c) 的产物, 以形成具有 C- 末端半胱氨酸或 C- 末端硒代半胱氨酸的产物; 和

[0144] (e) 回收步骤 (d) 的产物。

[0145] 一个实施方案中, 所述段相邻的连续氨基酸包含 IgG 免疫球蛋白 Fc 多肽和 IgG M1 外显子。一个实施方案中, 所述 IgG 免疫球蛋白为人 IgG 免疫球蛋白。一个实施方案中, 所

述相邻的连续氨基酸包含 CD4 细胞外区域。一个实施方案中,所述 N-末端信号序列选自具有 N-末端赖氨酸的蛋白质。一个实施方案中,所述 N-末端信号序列为 CD2 T-细胞表面糖蛋白或 CD4 T-细胞表面糖蛋白。一个实施方案中,所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。一个实施方案中,用质粒 pSA 来进行所述转染。一个实施方案中,所述 C-末端含内蛋白的结合域为内蛋白-壳多糖结合域。一个实施方案中,所述 C-末端含内蛋白的结合域为 MthRIR1 内蛋白-壳多糖结合域。一个实施方案中,所述 C-末端含内蛋白的结合域为自我剪接的含内蛋白的结合域。一个实施方案中,在步骤 b) 中通过将产物暴露于由壳多糖衍生的树脂来分离所述嵌合多肽。一个实施方案中,通过细胞信号肽酶来进行所述细胞内第二嵌合多肽的剪切。一个实施方案中,用半胱氨酸残基结合步骤 (c) 的产物。一个实施方案中,用硒代半胱氨酸残基结合步骤 (c) 的产物。

[0146] 本发明提供制备包含 N-末端半胱氨酸和 C-末端半胱氨酸或硒代半胱氨酸的一段连续氨基酸的方法,包括:

[0147] (a) 用重组体核酸转染细胞,所述重组体核酸包含 (i) 第一部分,所述第一部分的序列编码 N-末端信号序列,与以下 (ii) 相邻,(ii) 第二部分,所述第二部分的序列编码一段连续氨基酸,与以下 (iii) 相邻,(iii) 第三部分,所述第三部分的序列编码 C-末端含内蛋白的结合域,在允许 (i) 合成包含 N-末端信号序列的嵌合多肽,所述 N-末端信号序列与所述段连续氨基酸相邻,所述段连续氨基酸与所述 C-末端含内蛋白的结合域相邻,和 (ii) 所述 N-末端信号序列从所述嵌合多肽剪切下来以产生具有 N-末端半胱氨酸残基并包含与 C-末端含内蛋白的结合域相邻的所述段连续氨基酸的第二嵌合多肽的条件下;

[0148] (b) 分离步骤 (a) 中产生的第二嵌合多肽;

[0149] (c) 处理所述第二嵌合多肽以导致 C-末端含内蛋白的结合域从所述段连续氨基酸发生硫介导的剪切,以形成 C-末端硫酯;

[0150] (d) 用半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基在其 C-末端连接步骤 (c) 的产物,以形成具有 C-末端半胱氨酸或 C-末端硒代半胱氨酸的产物;和

[0151] (e) 回收步骤 (d) 的产物。

[0152] 一个实施方案中,所述段相邻的连续氨基酸包含 IgG 免疫球蛋白 Fc 多肽和 IgG M1 外显子。一个实施方案中,所述 IgG 免疫球蛋白为人 IgG 免疫球蛋白。一个实施方案中,所述 N-末端信号序列选自具有 N-末端半胱氨酸的蛋白质。一个实施方案中,所述 N-末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc 多肽的 cys-5 残基。一个实施方案中,所述 N-末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc 多肽的 cys-11 残基。一个实施方案中,所述 N-末端信号为音猬、干扰素 $\alpha 2$ 或胆固醇酯转移酶。一个实施方案中,所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。一个实施方案中,用质粒 pSA 来进行所述转染。一个实施方案中,所述 C-末端含内蛋白的结合域为内蛋白-壳多糖结合域。一个实施方案中,所述 C-末端含内蛋白的结合域为 Mth RIR1 内蛋白-壳多糖结合域。一个实施方案中,所述 C-末端含内蛋白的结合域为自我剪接的含内蛋白的结合域。一个实施方案中,在步骤 b) 中通过将产物暴露于由壳多糖衍生的树脂来分离所述第二嵌合多肽。一个实施方案中,在步骤 e) 中通过亲和层析分离所述产物。一个实施方案中,通过细胞信号肽酶来进行细胞内嵌合多肽的剪切。一个实施方案中,用半胱氨酸残基连接步骤 (c) 的产物。一个实施方案中,用硒代半胱氨酸残基连接步骤 (c) 的产物。

[0153] 本发明提供制备包含 N- 末端半胱氨酸或硒代半胱氨酸和 C- 末端半胱氨酸或硒代半胱氨酸的一段连续氨基酸的方法, 包括:

[0154] (a) 用重组体核酸转染细胞, 所述重组体核酸包含 (i) 第一部分, 所述第一部分的序列编码 N- 末端信号序列, 与以下 (ii) 相邻, (ii) 第二部分, 所述第二部分的序列编码一段连续氨基酸, 与以下 (iii) 相邻, (iii) 第三部分, 所述第三部分的序列编码 C- 末端含内蛋白的结合域, 在允许 (i) 合成包含所述 N- 末端信号序列的嵌合多肽, 所述 N- 末端信号序列与所述段连续氨基酸相邻, 所述段连续氨基酸与所述 C- 末端含内蛋白的结合域相邻, 和 (ii) 所述 N- 末端信号序列从所述嵌合多肽剪切下来以产生具有 N- 末端半胱氨酸残基并包含与 C- 末端含内蛋白的结合域相邻的所述段连续氨基酸的第二嵌合多肽;

[0155] (b) 分离步骤 (a) 中产生的第二嵌合多肽;

[0156] (c) (i) 用包含氨基酸序列 *cys-asp-lys-thr-his-thr* 的肽或包含氨基酸序列 *sec-asp-lys-thr-his-thr* 的肽的 C- 末端连接步骤 (a) 中产生的所述段连续氨基酸的 N- 末端, 以产生包含 N- 末端半胱氨酸或 N- 末端硒代半胱氨酸的所述段连续氨基酸;

[0157] (ii) 处理所得嵌合多肽以导致所述 C- 末端含内蛋白的结合域从所述段连续氨基酸剪切下来并用 C- 末端硫酯代替它;

[0158] (iii) 用半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基在其 C- 末端连接步骤 (c) 的产物以形成具有 C- 末端半胱氨酸或 C- 末端硒代半胱氨酸的产物; 和

[0159] (d) 回收步骤 (c) (iii) 的产物。

[0160] 一个实施方案中, 所述相邻的连续氨基酸包含 IgG 免疫球蛋白 Fc 多肽和 IgGM1 外显子。一个实施方案中, 所述 IgG 免疫球蛋白为人 IgG 免疫球蛋白。一个实施方案中, 所述 N- 末端信号序列选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质。一个实施方案中, 所述 N- 末端半胱氨酸残基为人免疫球蛋白 Fc 多肽的 *cys-11* 残基。一个实施方案中, N- 末端信号序列选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质。一个实施方案中, 所述 N- 末端信号为音猬、干扰素 $\alpha 2$ 或胆固醇酯转移酶。一个实施方案中, 所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。一个实施方案中, 用质粒 pSA 来进行所述转染。一个实施方案中, 所述含 C- 末端内蛋白的结合域为内蛋白 - 壳多糖结合域。一个实施方案中, 所述含 C- 末端内蛋白的结合域为 Mth RIR1 内蛋白 - 壳多糖结合域。一个实施方案中, 在步骤 (b) 中通过将产物暴露于由壳多糖衍生的树脂来分离所述嵌合多肽。

[0161] 一个实施方案中, 所述免疫球蛋白 Fc 多肽为人免疫球蛋白 Fc 多肽。一个实施方案中, 所述 Fc 多肽的 N- 末端半胱氨酸残基为 *cys-11* 残基。一个实施方案中, 所述步骤 (c) (i) 的肽包含氨基酸序列 *cys-asp-lys-thr-his-thr* 和所述段连续氨基酸。一个实施方案中, 所述步骤 (c) (i) 中的肽包含氨基酸序列 *sec-asp-lys-thr-his-thr* 且制备的所述段连续氨基酸包含 N- 末端硒代半胱氨酸。一个实施方案中, 在连接之前用 N- 末端 Msc 保护基保护步骤 (c) 中的肽。一个实施方案中, 所述细胞为 293 人胚细胞或 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞。一个实施方案中, 用质粒 pSA 来进行所述转染。一个实施方案中, 所述 N- 末端信号序列选自 N- 末端半胱氨酸的蛋白质。一个实施方案中, 所述信号肽为音猬、干扰素 $\alpha 2$ 或胆固醇酯转移酶。一个实施方案中, 通过亲和层析回收所述段连续氨基酸。

[0162] 一个实施方案中, 本方明方法的步骤 (c) 以步骤 (c) (i); 步骤 (c) (ii); 步骤 (c) (iii) 的顺序进行。一个实施方案中, 本方明方法的步骤 (c) 以步骤 (c) (ii); 步骤 (c)

(iii) ;步骤 (c) (i) 的顺序进行。

[0163] 本发明提供制备一化合物的方法,包括在还原条件下使一段连续氨基酸与第二段连续氨基酸接触以制备所述化合物,所述一段连续氨基酸的各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位,所述第二段连续氨基酸的氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸的序列与所述第一段连续氨基酸的序列相同并包含相同靶点结合部位,其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自在其预定末端具有半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基。

[0164] 本发明提供制备一化合物的方法,包括在还原条件下使一段连续氨基酸与第二段连续氨基酸接触以制备所述化合物,所述一段连续氨基酸的各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位,所述第二段连续氨基酸的氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸的序列不同于所述第一段连续氨基酸的序列并包含相同靶点结合部位,其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自在其预定末端具有半胱氨酸残基或硒代半胱氨酸残基。

[0165] 本发明方法的一个实施方案中,所述还原条件不使所述段连续氨基酸变性。一个实施方案中,所述还原条件包括将所述连续氨基酸暴露于包含 Tris-HCL 和巯基乙醇的缓冲液。一个实施方案中,所述缓冲液的 pH 为 7.6-8.4。一个实施方案中,所述缓冲液的 pH 为 8。一个实施方案中,所述方法还包括将所述产物交换到氧化缓冲液中。一个实施方案中,所述段连续氨基酸包含 CD4 细胞外区域。一个实施方案中,所述段连续氨基酸包含免疫球蛋白 Fc 多肽的序列。一个实施方案中,所述免疫球蛋白为人免疫球蛋白。

[0166] 实施方案中,本发明方法的转染细胞在适合多肽表达的条件下生长。

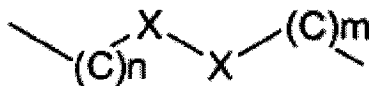
[0167] 一个实施方案中,提供了一化合物,包含:

[0168] 第一段连续氨基酸,所述第一段连续氨基酸的氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位,和

[0169] 第二段连续氨基酸,所述第二段连续氨基酸的氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列与所述第一段连续氨基酸序列相同并包含相同靶点结合部位,

[0170] 其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自独立在其预定末端具有包含硫 (S) 或硒 (Se)、具有直链脂族侧链酸的天然氨基酸或非天然氨基酸,其中该硫 (S) 或硒 (Se) 通过结构如下的键连接在一起:

[0171]



[0172] 其中各 X 为硫 (S) 或硒 (Se),各 (C) 表示该天然或非天然氨基酸之一的直链脂族侧链的碳原子,其中 n 和 m 独立为 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

[0173] 一个实施方案中,所述天然氨基酸为同型半胱氨酸或同型硒代半胱氨酸。一个实施方案中,所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型半胱氨酸。一个实施方案中,所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型硒代半胱氨酸。一个实施方案中,所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型半胱氨酸。一个实施方案中,所述预定末端为 C- 末端。

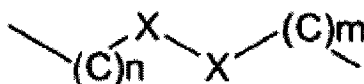
[0174] 提供一化合物,包含:

[0175] 第一段连续氨基酸,所述第一段连续氨基酸的各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列包含靶点结合部位;和

[0176] 第二段连续氨基酸,所述第二段连续氨基酸的氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且氨基酸序列不同于所述第一段连续氨基酸序列并包含不同部分的结合部位,

[0177] 其中所述第一段氨基酸和第二段氨基酸各自独立在其预定末端具有包含硫 (S) 或硒 (Se)、具有直链脂族侧链的天然氨基酸或非天然氨基酸,其中该硫 (S) 或硒 (Se) 通过结构如下的键连接在一起:

[0178]



[0179] 其中各 X 可相同或不同,表示为硫 (S) 或硒 (Se),各 (C) 表示该天然或非天然氨基酸之一的直链脂族侧链的碳原子,其中 n 和 m 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

[0180] 一个实施方案中,所述天然氨基酸为同型半胱氨酸或同型硒代半胱氨酸。一个实施方案中,所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型半胱氨酸。一个实施方案中,所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型硒代半胱氨酸。一个实施方案中,所述第一段和第二段氨基酸在其预定末端具有同型半胱氨酸。一个实施方案中,所述预定末端为 C- 末端。

[0181] 提供了制备蛋白质的方法,所述蛋白质包含与内蛋白相邻的第一多肽,所述内蛋白与包含结合域的第二多肽相邻,所述方法包括用核酸转染动物细胞,所述核酸包含 (i) 第一部分,所述第一部分编码与以下 (ii) 相邻的多肽,(ii) 第二部分,所述第二部分编码所述内蛋白,与第三部分相邻,所述第三部分编码所述结合域,在一定的条件下使得所述动物细胞表达并分泌所述蛋白质。一个实施方案中,所述动物细胞来源于哺乳动物。一个实施方案中,所述结合域为壳多糖结合域。

[0182] 提供一化合物,包含通过末端二硫键附着到固体表面的多肽。一个实施方案中,所述固体表面为芯片或珠子。

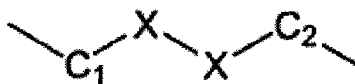
[0183] 提供一化合物,包含:

[0184] 第一段连续氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸且所述第一段连续氨基酸包含具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基;和

[0185] 第二段连续氨基酸,包含至少 100 个氨基酸,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸,其中所述第二段连续氨基酸的至少 90 个连续氨基酸具有与人免疫球蛋白部分恒定区多肽的部分相同的序列,其中所述第二段连续氨基酸在其预定末端包含具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基,

[0186] 其中所述第一段连续氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基和所述第二段连续氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基通过结构如下的键连接在一起:

[0187]



[0188] 其中各 X 独立表示硫属元素,其中 C₁ 表示所述第一段连续氨基酸的具有含硫属官

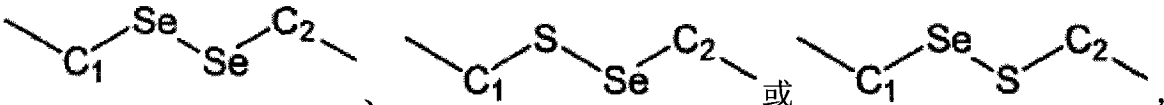
能团的侧链的氨基酸残基的侧链碳, C₂ 表示所述第二段连续氨基酸的侧链碳。

[0189] 实施方案中, 至少其中所述第二段连续氨基酸的至少 91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100 个连续氨基酸的序列与人免疫球蛋白恒定区多肽的部分相同。

[0190] 所述化合物的一个实施方案中, C₁ 和 C₂ 中的至少其一为氨基酸的 β 碳原子。所述化合物的一个实施方案中, 所述键具有如下结构:

[0191]  其中 S 为硫。所述化合物的一个实施方案中, 所述键具有如下结构:

有如下结构:

[0192]  其中 S 为硫, Se 为硒。

S 为硫, Se 为硒。

[0193] 所述化合物的一个实施方案中, 所述第二段氨基酸预定末端的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为半胱氨酸。所述化合物的一个实施方案中, 所述第二段氨基酸预定末端的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为硒代半胱氨酸、同型半胱氨酸或同型硒代半胱氨酸。所述化合物的一个实施方案中, 所述第一段氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为半胱氨酸。所述化合物的一个实施方案中, 所述第一段氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为硒代半胱氨酸、同型半胱氨酸或同型硒代半胱氨酸。所述化合物的一个实施方案中, 所述第一段连续氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为末端残基。

[0194] 一个实施方案中, 所述第一段连续氨基酸的具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基为倒数第二个、倒数第三个或倒数第四个末端残基。

[0195] 一个实施方案中, 所述第二段连续氨基酸的序列与人免疫球蛋白恒定区相同。一个实施方案中, 所述第二段连续氨基酸是人免疫球蛋白恒定区的部分。一个实施方案中, 所述第一段连续氨基酸的序列与人免疫球蛋白恒定区相同。

[0196] 一个实施方案中, 所述人免疫球蛋白恒定区多肽为人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4。提供一化合物, 其中至少一个具有含硫属官能团的侧链的氨基酸残基的侧链包括 C1-C10 亚烷基。

[0197] 提供一组合物, 包含两种本发明化合物, 所述化合物通过各化合物的第二段连续氨基酸之间的至少一个二硫键结合在一起。

[0198] 提供一包含多肽的组合物, 包含具有以下序列的连续氨基酸: SEQ ID NO:35-46 之一所列序列; SEQ ID NO:53-67 之一所列序列, 或 SEQ ID NO:74-82 之一所列序列, SEQ ID NO:89-97 之一所列序列, 其中多肽不由天然免疫球蛋白多肽, 包括其酶切片断组成。

[0199] 提供一包含多肽的组合物, 所述多肽由具有以下序列的连续氨基酸组成: SEQ ID NO:35-46 之一所列序列; SEQ ID NO:53-67 之一所列序列, 或 SEQ ID NO:74-82 之一所列序列, SEQ ID NO:89-97 之一所列序列。

[0200] 提供一包含本发明多肽和载体的组合物。所述化合物的一个实施方案中, 所述载体为磷酸盐缓冲生理盐水。

[0201] 提供一组合物,包含通过非肽键连接的两种独立选定的本发明多肽。一个实施方案中,所述键为二硫属键。一个实施方案中,所述键为二硫键。

[0202] 提供一组合物,包含通过所述两个多肽之间的至少一个二硫键结合在一起的两种本发明多肽。

[0203] 提供一组合物,包含由序列与以下序列的部分相同的连续氨基酸组成的多肽:SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:81 或 SEQ ID NO:96 中所列,其中所述多肽的至少一个末端残基具有含硫属官能团的侧链。

[0204] 所述化合物的一个实施方案中,所述具有含硫属官能团的侧链的末端残基为半胱氨酸或其类似物。

[0205] 以上所列的各种 N-末端信号序列、质粒、表达 vectors、重组体核酸、多段连续氨基酸、内蛋白结合域、细胞类型、回收/分离方法等是非限定性示例,更多的示例列于以下实施例中。

[0206] 术语定义

[0207] 所述段连续氨基酸:排列成链的多个氨基酸,除了链中的第一氨基酸不连接到前一氨基酸外,各氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸。所述链的氨基酸可为天然的或非天然的,或可包含其混合物。除非另外指出,所述氨基酸可为基因编码的、天然的或非基因编码的、或非天然的,和其任一选择。

[0208] 一个实施方案中,一段连续氨基酸具有生物活性,包括但不限于靶点结合活性或免疫效应物活性,在所述多段连续氨基酸通过 -X-X- 键(如 -S-S-、-S-Se-、-Se-Se- 或 -Se-S- 键)结合到另一段连续氨基酸时保留所述生物活性。“连续氨基酸片段”是“一段氨基酸”的另一种描述。

[0209] N-末端氨基酸残基:具有自由 α -氨基 (NH_2) 官能团或 α -氨基 (NH_2) 官能团衍生物的两个或多个连续氨基酸的段的末端残基。

[0210] N-末端:N-末端氨基酸残基的自由 α -氨基 (NH_2) (或其衍生物)。

[0211] C-末端氨基酸残基:具有自由 α -羧基 (COOH) 官能团或 α -羧基 (COOH) 官能团衍生物的一段两个或多个连续氨基酸的末端残基。

[0212] C-末端:C-末端氨基酸残基的自由 α -羧基 (COOH) (或其衍生物)。

[0213] S-末端半胱氨酸残基:半胱氨酸,所述半胱氨酸是一段连续氨基酸的 N-和/或 C-末端残基且具有自由 β -巯基 (SH) 官能团或 β -巯基 (SH) 官能团衍生物。

[0214] S-末端:S-末端半胱氨酸残基的自由 β -巯基 (SH) (或其衍生物)。

[0215] Se-末端硒代半胱氨酸残基:硒代半胱氨酸,所述硒代半胱氨酸是一段连续氨基酸的 N-和/或 C-末端残基且具有自由 β -硒氢基 (SeH) 官能团或 β -硒氢基 (SeH) 官能团衍生物。

[0216] Se-末端:Se-末端硒代半胱氨酸残基的自由 β -硒氢基 (SeH) (或其衍生物)。

[0217] X-末端氨基酸残基:半胱氨酸(或半胱氨酸衍生物)或同型半胱氨酸(或同型半胱氨酸衍生物)、硒代半胱氨酸(或硒代半胱氨酸衍生物)或同型硒代半胱氨酸(或同型硒代半胱氨酸衍生物),其为一段连续氨基酸的 N-和/或 C-末端残基并分别具有自由 β -巯基 (SH) 或 β -硒氢基 (SeH) 官能团,或其含硫或含硒的衍生物。

[0218] X-末端:分别是 S-末端半胱氨酸/半胱氨酸衍生物残基或 Se-末端硒代半胱氨酸

酸 / 硒代半胱氨酸衍生物残基的自由 β -巯基 (SH) 或 β -硒氢基 (SeH)。此外, X- 末端可为 S- 末端同型半胱氨酸残基或 Se- 末端同型硒代半胱氨酸残基的自由 β -巯基 (SH) 或 β -硒氢基 (SeH)。

[0219] 靶点: 结合到一段连续氨基酸的分散选择或其三级结构的一部分的实体, 包括但不限于受体、载体蛋白质、激素、细胞粘附蛋白、组织特异性粘附因子、生长因子和酶。靶点的具体实例包括人 EGF 受体、HER2 蛋白质、VEGF 受体、人 CD20 抗原、人 Cd11a、人 IgE 免疫球蛋白、人糖蛋白 IIa 受体、人糖蛋白 IIIa 受体、人 TNF α 和 TNF 受体。

[0220] 除非另有说明, 或与上下文相反, “键” 理解为包括共价键、偶极 - 偶极相互作用如氢键、分子键作用力如范德华力。

[0221] “信号序列” 是指引多肽的翻译后输送的短 (3-60 个氨基酸长) 肽链。

[0222] 本文中实施方案中所用的“氨基酸”是指基因编码氨基酸即异亮氨酸、丙氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、精氨酸、丝氨酸、组氨酸、酪氨酸、硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸并还包括同型半胱氨酸和同型硒代半胱氨酸的 L 或 D 异构体。

[0223] 氨基酸的其它实例包括牛磺酸、氨基丁酸、多巴胺、羊毛硫氨酸、2-氨基异丁酸、脱氢丙氨酸、鸟氨酸和瓜氨酸的 L 或 D 异构体, 及其非天然同系物和合成改性形式, 包括具有被多达两个碳原子缩短或增长的亚烷基的氨基酸、包含任选取代的芳基的氨基酸和包含卤代基团包括卤代烷基和芳基的氨基酸及 β 或 γ 氨基酸和环状类似物。

[0224] 由于可电离氨基和羧基的存在, 这些实施方案中的氨基酸可为酸性或碱性盐, 可为中性形式。各氨基酸残基还可经过氧化或还原改性。其它假定改性包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化和赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化。

[0225] 共价衍生物可通过将特定官能团连接到氨基酸侧链或在 N- 或 C- 末端连接来制备。

[0226] 本文中所用的“硫属元素”仅限于硫、硒、碲和钋, 即本文中所用的“硫属元素”不包括氧和钷。

[0227] 本文中所用的“含硫属元素官能团的侧链”是含末端活性非氧、非钷的硫属元素的氨基酸残基侧链。作为非限定性实例, 具有含硫属元素官能团的侧链的氨基酸将为半胱氨酸、硒代半胱氨酸、同型半胱氨酸等, 但不包括例如甲硫氨酸, 其包含硫属原子 (S) 但不是末端活性硫属原子。

[0228] 包含具有 R 基取代的氨基酸的化合物属于本发明范围内。理解的是: 本领域普通技术人员可选择本发明化合物上的取代基和取代模式以从容易获得的原料制备化学稳定的化合物。

[0229] 本文中所用的“天然氨基酸”是指基因编码氨基酸即异亮氨酸、丙氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、精氨酸、丝氨酸、组氨酸、酪氨酸、硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸和同型半胱氨酸和同型硒代半胱氨酸的 L 或 D 异构体。

[0230] 本文中所用的“非天然氨基酸”是指异亮氨酸、丙氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、甘氨酸、缬氨

酸、脯氨酸、精氨酸、丝氨酸、组氨酸、酪氨酸、硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、同型半胱氨酸、同型硒代半胱氨酸、牛磺酸、氨基丁酸、多巴胺、羊毛硫氨酸、2-氨基异丁酸、脱氢丙氨酸、鸟氨酸或瓜氨酸的化学改性 L 或 D 异构体,包括在 α 碳和 S 或 Se 之间具有 C_3-C_{10} 脂族侧链的半胱氨酸和硒代半胱氨酸衍生物。在一个实施方案中,所述脂族侧链为亚烷基。另一实施方案中,所述脂族侧链为亚链烯基或亚炔基。

[0231] 除了本文中描述的连续氨基酸序列段,预期可通过将合适核苷酸变化引入编码 DNA 和 / 或通过合成所需连续氨基酸序列制备其变体。本领域技术人员会理解:当表达是选定的合成方法(而不是例如化学合成),如改变糖基化部位的数目或位置或改变膜锚定特征时,氨基酸变化可改变本文中所述段连续氨基酸的翻译后加工。

[0232] 本文中描述的序列变化可通过,例如采用例如美国专利 5,364,934 中列出的任一保守和不保守突变技术和指南进行。变化可为取代、删除或插入一个或多个将重要连续氨基酸序列编码的密码子,从而与自然序列相比,在所述氨基酸序列中产生变化。任选所述变化是通过至少一个氨基酸被一个或多个所述区域中的任意其它氨基酸取代。确定哪一氨基酸残基可插入、取代或删除而没有负面影响所需活性的指南通过将所述序列与同源已知蛋白质分子对比并使高同源性区域中的氨基酸序列变化数目最小来发现。氨基酸取代可是一个氨基酸被具有类似结构和 / 或化学性能的另一氨基酸取代的结果,如用丝氨酸代替亮氨酸,即保守氨基酸取代。插入或删除可任选在约 1-5 氨基酸范围内。允许的变化可通过系统地插入、删除或取代序列中的氨基酸并测试所得变体通过全长度或成熟自然序列展示的活性。理解的是:所有末端变化都在本文中公开的发明内容内进行。

[0233] 结合配偶体的氨基酸序列变体可根据各种预期靶点制备,包括提高结合配偶体对其配体的亲和力、促进结合配偶体的稳定性、纯化和制备、改变其血浆半衰期、提高疗效和减轻结合配偶体治疗使用中副作用的严重性或几率。

[0234] 本文中推断了这些序列的氨基酸序列变体,包括插入、取代或删除的变体。这种变体通常可通过将靶点结合单体编码的 DNA 中的核甘糖的定点突变制备,通过这样获得将变体编码的 DNA 并接着在重组细胞培养中表达所述 DNA。具有多达约 100-150 个氨基酸残基的片断也可方便地通过体外合成来制备。这种氨基酸序列变体是预定变体且在自然中找不到。所述变体具有相同量(尽管不是必需的)的非变体形式的定性生物活性(包括靶点结合)。尽管引入氨基酸序列变化的部位是预定的,突变本身不必是预定的。例如,为了使给定部位的突变的性能最优化,在靶点密码子处进行随机或饱和突变(其中插入全部 20 个可能残基)并筛选表达的变体以获得所需活性的最佳组合。本领域中普通技术人员可进行这种筛选。

[0235] 氨基酸插入通常在数量级为约 1-10 个氨基酸残基上;取代通常引入单个残基;删除将在约 1-30 个残基范围内。删除或插入优选在相邻对中进行,即删除 2 个残基或插入 2 个残基。通过以下讨论非常显然的是:将取代、删除、插入或其任一组合引入或组合以达到最终结构。

[0236] 本发明一方面涉及包含一段连续氨基酸的化合物,所述段连续氨基酸与本申请说明书、图、SEQ ID NO. 或序列中公开的氨基酸序列具有至少约 80% 序列一致性,优选至少约 81% 序列一致性,更优选至少约 82% 序列一致性,还更优选至少约 83% 序列一致性,还更优选至少约 84% 序列一致性,还更优选至少约 85% 序列一致性,还更优选至少约 86% 序

列一致性,还更优选至少约 87%序列一致性,还更优选至少约 88%序列一致性,还更优选至少约 89%序列一致性,还更优选至少约 90%序列一致性,还更优选至少约 91%序列一致性,还更优选至少约 92%序列一致性,还更优选至少约 93%序列一致性,还更优选至少约 94%序列一致性,还更优选至少约 95%序列一致性,更优选至少约 96%序列一致性,还更优选至少约 97%序列一致性,还更优选至少约 98%序列一致性和还更优选至少约 99%序列一致性。

[0237] 所述 % 氨基酸序列一致性值容易采用例如 WU-BLAST-2 计算机程序获得 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266 :460-480 (1996))。

[0238] 本文中提供天然序列片段。这种片段可在 N- 末端或 C- 末端截断,或可缺少内部残基,例如与全长度天然蛋白质相比时。而且,理解的是:任何末端变体在本文中公开发明内容内进行。某些片段缺少对感兴趣序列的所需生物活性而言不必需的氨基酸残基。

[0239] 可采用任一常规技术。所需肽片段或连续氨基酸段片段可化学合成。另一方法包括通过酶消化法产生片段,例如通过用已知酶处理蛋白质来在特定氨基酸残基定义的部位剪切蛋白质,或通过合适限制酶消化所述 DNA 并分离所需片段。还有另一合适技术包括通过聚合酶链反应 (PCR) 分离并放大将所需多肽 / 序列片段编码的 DNA 片段。PCR 中在 5' 和 3' 引物处采用定义 DNA 片段的所需末端的寡聚核苷酸。

[0240] 具体实施方案中,感兴趣的保守取代显示于表 1 的“优选取代”标题下。如果这种取代导致生物活性变化,那么引入更多实质性变化,在表 1 中称为示例性取代,或下面参考氨基酸类别进一步描述的,并筛选产物。

[0241] 表 1

[0242]

最初的	示例性的	优选的
Ala (A)	val ;leu ;ile	val
Arg (R)	lys ;gin ;asn	lys
Asn (N)	gln ;his ;lys ;arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro ;ala	ala

His(H)	asn ;gln ;lys ;arg	arg
Ile(I)	leu ;val ;met ;ala ;phe ;norleucine(正亮氨酸)	leu
Leu(L)	norleucine(正亮氨酸) ;ile ;val ;met ;ala ;phe	ile
Lys(K)	arg ;gln ;asn	arg
Met(M)	leu ;phe ;ile	leu
Phe(F)	leu ;val ;ile ;ala ;tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr ;phe	tyr
Tyr(Y)	trp ;phe ;thr ;ser	phe
Val(V)	ile ;leu ;met ;phe ;ala ;norleucine(正亮氨酸)	leu

[0243] 序列的功能或免疫逻辑一致性的实质性改性通过选择在保持以下的效果上明显不同的取代物实现：(a) 取代区域内多肽主链结构例如折叠或螺旋构象，(b) 靶点部位处分子的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积。根据通常侧链性能将天然残基分成以下组：

[0244] (1) 疏水的：norleucine(正亮氨酸)、met、ala、val、leu、ile；

[0245] (2) 中性亲水的：cys、ser、thr；

[0246] (3) 酸性的：asp、glu；

[0247] (4) 碱性的：asn、gln、his、lys、arg；

[0248] (5) 影响链取向的残基：gly、pro；

[0249] (6) 芳族的：trp、tyr、phe。

[0250] 非保守性取代会必需将这些类之一的成员换成另一类。这种取代的残基也可引入保守取代部位，或更优选引入剩下的（非保留）部位。

[0251] 变化可采用本领域中已知的方法进行，如寡核苷酸介导的（定点）突变、丙氨酸扫描和 PCR 突变。可在克隆 DNA 上进行定点突变 (Carter et al., Nucl. Acids Res., 13: 4331(1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10: 6487(1987))、盒式突变 (Wells et al., Gene, 34: 315(1985))、限制性选择突变 (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415(1986)) 或其它已知技术以制备变异 DNA。

[0252] 还可采用扫描氨基酸分析来鉴定相邻序列的一个或多个氨基酸。优选扫描中，氨

氨酸是较小的中性氨基酸。这种氨基酸包括丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸。丙氨酸通常是这组中的优选扫描氨基酸,因为它排除了 β -碳原子外的侧链并不大可能改变变体的主链构象 (Cunningham and Wells, *Science*, 244 :1081-1085 (1989))。丙氨酸也通常是优选的,因为它是最常见的氨基酸。此外经常在埋藏和暴露位置发现它 (Creighton, *The Proteins*, (W. H. Freeman & Co., N. Y.) ; Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150 :1 (1976))。如果丙氨酸取代不产生足够量的变体,可采用电子等排氨基酸。

[0253] 共价改性:连续氨基酸段可进行共价改性。一种共价改性包括使靶点氨基酸残基与有机衍生剂反应,所述有机衍生剂能与不在 $-x-x-$ 键中的选定侧链或 N- 或 C- 末端残基反应。用双官能剂衍生对于例如交联到用于有趣抗体的反序列的纯化方法中水不溶性支撑基体或表面是有用的,反之亦然。通常使用的交联剂包括例如 1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯,例如与 4-叠氮水杨酸的酯、同源双官能酰亚胺酯,包括二琥珀酰亚胺基酯如 3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)、双官能马来酰亚胺如双-N-马来酰亚胺基-1,8-辛烷和 1-3-((p-叠氮基苯基)二硫代)丙酰亚胺甲酯等试剂。

[0254] 其它改性包括谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基分别脱酰胺成对应的谷氨酰和天冬氨酰残基、脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酰或苏氨酰残基的羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化 (T. E. Creighton, *proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))、N-末端胺的乙酰化和任一 C-末端羧基的酰胺化。

[0255] 另一类共价改性包括改变氨基酸连续段或多肽的自然糖基化模式。为了本文中的目的,“改变自然糖基化模式”是指删除氨基酸序列中发现的一个或多个碳水化合物部分(通过移走下面的糖基化部位或通过化学和/或酶方法删除糖基化),和/或增加天然序列中不存在的一个或多个糖基化部位。此外,该短语包括天然蛋白质的糖基化的定性变化,包括存在的各种碳水化合物部分的本质和性能变化。

[0256] 增加氨基酸序列的糖基化部位可通过改变氨基酸序列实现。这种改变可通过例如加入或用一或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代到天然序列(0个连接的糖基化部位)来进行。氨基酸序列可任选通过如下方式改变:DNA水平的变化,特别是通过使将在预选基点处的氨基酸序列编码的DNA突变从而产生将翻译成所需氨基酸的密码子。

[0257] 增加氨基酸序列上碳水化合物部分数目的另一方法是将糖苷化学或酶偶联到多肽上。这种方法已在本领域例如 1987年9月11日公开的 WO 87/05330 和 Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981) 中描述。

[0258] 氨基酸序列上存在的碳水化合物部分的除去可通过化学或酶作用地实现,或通过作为糖基化靶点的编码氨基酸残基的密码子的突变取代实现。化学去糖基化技术在本领域中已知并已在例如 Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259 :52 (1987) 和 Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118 :131 (1981) 中描述。多肽上碳水化合物部分的酶切可通过采用 Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138 :350 (1987) 描述的多种内切糖苷酶和外切糖苷酶实现。

[0259] 另一类共价改性包括将氨基酸序列以美国专利 4,640,835 ; 4,496,689 ; 4,301,144 ; 4,670,417 ; 4,791,192 or 4,179,337 中列出的方式连接到多种非蛋白质聚合物之一,如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯上,或提供表位的标签多肽上,抗标签

抗体可选择性地结合到所述表位上。各种标签多肽及其各抗体在本领域中是众所周知的。示例包括聚组氨酸或聚组氨酸-甘氨酸标签;流感 HA 标签多肽及其抗体 12CA5(Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165(1988));c-myc 标签及其 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体(Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616(1985));和单纯疱疹 Herpes Simplex) 病毒性糖蛋白 D(gD) 标签及其抗体(Paborsky et al., *protein Engineering*, 3(6):547-553(1990))。其它标签多肽包括 Flag-肽(Hopp et al., *BioTechnology*, 6:1204-1210(1988));KT3 表位肽(Martin et al., *Science*, 255:192-194(1992)); α -微管蛋白表位肽(Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166(1991));和 T7 基因 10 蛋白质肽标签(Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397(1990))。

[0260] 盐

[0261] 本文中公开的化合物的盐属于本发明范围。本文中所用的“盐”是本发明化合物已通过制备化合物的酸性或碱性盐改性的盐。

[0262] 药剂

[0263] 所述盐可为药学上可接受的。药学上可接受的盐的实例包括但不限于:碱性残基如胺的无机或有机酸盐;酸性残基如羧酸的碱性或有机盐。所述盐可采用有机或无机酸制备。这种酸性盐为氯化物、溴化物、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐、磺酸盐、甲酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、柠檬酸盐、苯甲酸盐、水杨酸盐、抗坏血酸盐等。羧酸盐为碱土金属盐、钠盐、钾盐或锂盐。

[0264] 这里公开的化合物的药学上可接受的盐可以常规方式制备,例如用化学当量的药学上可接受的酸或碱处理对应游离碱或酸的溶液或悬浮液。可采用常规浓缩或结晶技术分离所述盐。合适酸的示例为乙酸、乳酸、琥珀酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、葡萄糖酸、抗坏血酸、苯甲酸、肉桂酸、富马酸、硫酸、磷酸、盐酸、氢溴酸、氢碘酸、氨基磺酸、磺酸如甲磺酸、苯磺酸、对甲基苯磺酸和相关酸。示例碱为钠、钾和钙。

[0265] 术语“药学上可接收的载体”理解为包括赋形剂、载体或稀释剂。所用的具体载体、稀释剂或赋形剂将取决于应用活性成分的方式和目的。

[0266] 本发明化合物可以单剂量或多剂量单独或与一种或多种药学上可接受的载体结合给药。合适药物载体包括惰性固体稀释剂或填料、无菌水溶液和各种有机溶剂。本文中公开的药物组合物可以多种剂型给药,如注射液、片剂、粉剂、锭剂、糖浆剂等。如果需要,这些药物组合物可包含其它成分,如调味剂、结合剂、赋形剂等。此外,硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石等润滑剂可用于制片。相似类型的固体组合物也可用作软、硬填充明胶胶囊中的填料。其优选材料包括乳糖和高分子量聚乙二醇。当需要水悬浮液或酞剂进行口服给药时,其中的必需活性成分可与各种甜味剂或调味剂、着色物质或染料,如果需要,乳化剂或悬浮剂及稀释剂如水、乙醇、丙二醇、甘油及其组合物结合。

[0267] 就肠胃外给药而言,可采用包含在无菌水溶液的本发明化合物或其药学上可接受的盐的溶液。如果需要,这种水溶液适当地缓冲,液体稀释剂首先提供足够生理盐水和葡萄糖。这些特定水溶液特别适于静脉内给药、肌肉内给药、皮下给药和腹腔内给药。采用的无菌水介质都容易通过本领域中技术人员已知的标准技术获得。

[0268] 最终药物组合物可加工成单位剂型(如小瓶内的粉剂或冻干体、小瓶内的溶液、

片剂、胶囊剂或袋剂),然后包装发售。加工步骤将根据具体单位剂型变化。例如片剂通常在压力下压成所需形状,胶囊剂或袋剂采用简单的填充工序。本领域中的技术人员都非常清楚用于制备各种单位剂型的步骤。

[0269] 本发明组合物可为多种形式。这些包括,例如液体、半固体和固体剂型,如液体溶液(如可注射和输注溶液)、分散液或悬浮液、片剂、丸剂、粉剂、脂质体和栓剂。优选形式取决于预期给药方式和疗程。一些组合物为可注射或输注溶液。给药方式为肠胃外(例如静脉内、肌肉、皮下、腹腔内和肌肉内)。一个实施方案中,所述化合物通过静脉内输注或注射给药。另一实施方案中,所述化合物通过肌肉内或皮下注射给药。

[0270] 本文中考虑的治疗组合物在制备和储存条件下通常必须是无菌而稳定的。所述组合物可配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或适合于高药物浓度的其它有序结构。无菌注射液可通过如下制备:将在合适溶剂的所需量化合物与所需一种成分或成分组合物结合,然后过滤灭菌。通常,分散液通过将活性化合物结合到包含碱性分散介质和选自以上列举的那些的所需其它成分的无菌载体来制备。采用无菌粉制备无菌注射液的情况下,优选制备方法是从已灭菌过滤的溶液中制备活性成分和任何其它所需成分的真空干燥和冷冻干燥。溶液的合适流动性可通过如下方式保持:例如采用卵磷脂等涂层,分散液的情况下保持所需粒径,和采用表面活性剂。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包含延缓吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶来进行。

[0271] 某些实施方案中,活性化合物可与防止所述化合物快速释放的载体一起制备,如控制释放剂,包括植入物、经皮贴剂和微胶囊输送体系。可采用生物可降解、生物相容聚合物,如乙烯-醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这种药剂的许多方法已授予专利或为本领域中技术人员通常所知。参见如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。某些实施方案中,本发明化合物可口服给药,例如与惰性稀释剂或可吸收食用载体。还可将所述化合物(如果需要,和其它成分一起)封入硬或软壳明胶胶囊中,压成片剂,或直接结合到受治疗者的饮食中。就口服治疗给药而言,所述化合物可与赋形剂结合并以可吸收片剂、含片、口含片、胶囊、酏剂、悬浮剂、糖浆剂、糯米纸囊剂等使用。通过不同肠胃外给药的方式将本发明给药中,所述化合物可用防止其失活的材料涂层或一起给药。

[0272] 辅助性活性化合物也可结合到所述组合物中,例如化疗剂、抗肿瘤剂。此外,本发明化合物可与一种或多种其它治疗剂一起配制和/或一起给药。这些试剂包括但不限于:结合其它靶点的抗体(例如,结合一种或多种生长因子或细胞因子、它们细胞表面受体的抗体)、结合蛋白、抗肿瘤剂、化疗剂、抗肿瘤剂、反义寡核苷酸、生长因子。一个实施方案中,本文中公开的化合物的药物组合物可包含一种或多种治疗剂。

[0273] 就治疗用而言,本文中公开的组合物可以各种方式给药,包括可溶形式,通过团注法、持续输注、从植入物缓释、口服给药、局部注射(例如心脏内、肌肉内)、系统注射或药学领域中众所周知的其它合适技术。其它给药方法包括但不限于口服、皮下、经皮、肌肉内和肠胃外给药方法。通常,合适组合物会包含已纯化化合物和生理上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。这种载体在所用剂量和浓度下对赋形剂是无毒的。这种组合物的制备可包括将化合物与缓冲剂、抗氧剂、碳水化合物包括葡萄糖、蔗糖或葡聚糖、螯合剂如 EDTA、谷胱甘肽和其它稳定剂和赋形剂结合。与同种血清蛋白混合的中性缓冲盐水或盐水是示例性的合适

稀释剂。可采用合适赋形剂溶液（例如蔗糖）作为稀释剂将产物配制成冷冻干产物。

[0274] 其它衍生物包含共价结合到非蛋白聚合物的本发明化合物 / 组合物。结合到所述聚合物通常以一定的方式进行从而不干扰所述化合物的优选生物活性，例如化合物对靶点的结合活性。非蛋白聚合物通常为亲水合成聚合物，即不是在自然中发现的聚合物。然而，存在自然中并通过重组或体外方法制备的聚合物是可用的，正如从自然中分离的聚合物。亲水聚乙烯聚合物属于本发明范围，例如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。特别有用的是聚烯醚如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙烯酯或甲氧基聚乙二醇；聚氧化烯如聚氧乙烯、聚氧丙烯、聚氧乙炔和聚氧丙炔的嵌段共聚物 (Pluronics)；聚甲基丙烯酸酯；卡波姆 (carbomer)；包含如下糖单体的支链或无支链多糖：D- 甘露糖、D- 和 L- 半乳糖、岩藻糖、果糖、D- 木糖、L- 树胶醛糖、D- 葡萄糖醛酸、唾液酸、D- 半乳糖醛酸、D- 甘露糖醛酸（例如褐藻酸或海藻酸）、D- 葡萄糖胺、D- 半乳糖胺、D- 葡萄糖和神经氨酸包括同多糖和杂多糖如乳糖、支链淀粉、淀粉、羟乙基淀粉、淀粉糖、硫酸葡聚糖、葡聚糖、糖原或酸性粘多糖的多糖亚单位，例如透明质酸；糖醇的聚合物如聚山梨醇和聚甘露醇；及肝素或 heparon。

[0275] 本发明药物组合物可包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明化合物。“治疗有效量”是指在一定剂量和必需时间周期下对获得所需治疗结果有效的量。化合物的治疗有效量可根据个人病情、年龄、性别和重量等因素而变化。治疗有效量还是治疗有利影响超过化合物的所有毒性或不利影响的量。“预防有效量”是指在一定剂量和必需时间周期下对获得所需预防结果有效的量。通常，由于预防剂量是在发病之前或发病的较早阶段用于受治疗者，预防有效量会少于治疗有效量。

[0276] 药物组合物实例

[0277] 这种组合物和剂量的非限定实例如下所列：

[0278] 包含一化合物的组合物，所述化合物包含具有贝伐单抗 (bevacizumab, 例如 Avastin) 序列的一段连续氨基酸，所述组合物包含海藻糖、磷酸钠（单碱性、一水合物）、磷酸钠（二碱性、无水的）、聚山梨醇酯 20 和注射用水 (Water for Injection, USP)。所述组合物还可经过冻干，可向其中加入以进行重组。一个实施方案中，所述组合物的 pH 为 6.2 或约 6.2。一个实施方案中，所述化合物可与静脉内 5- 氟尿嘧啶等化疗药物组合给药，以治疗结肠或直肠的皮肤转移癌的患者。一个实施方案中，所述化合物作为 IV 输注液的给药剂量为 0.1-10mg/kg，一次 /14 天。另一实施方案中，剂量为 5mg/kg，一次 /14 天。一个实施方案中，剂量为 1.0-2.0mg/kg，一次 /14 天。一个实施方案中，剂量为 0.01-1.5mg/kg，一次 /14 天。一个实施方案，剂量为 0.001-10mg/kg，一次 /1-21 天。

[0279] 包含一化合物的组合物，所述化合物包括一段连续氨基酸，所述段连续氨基酸包含具有曲妥珠单抗 (trastuzumab, 例如 Herceptin) 序列的连续氨基酸，所述组合物可包含海藻糖、L- 组氨酸 HCl、L- 组氨酸和聚山梨醇酯 20、USP。这可用抑菌注射用水 (Bacteriostatic Water for Injection, BWFI)、USP 或其等同物重组，包含 1.1% 苯甲醇作为防腐剂或其等同物。一个实施方案中，所述组合物的 pH 为约 6.0。所述组合物还可经过冻干，可向其中加入水以进行重组。一个实施方案中，化合物可给药给有转移性乳腺癌的受治疗者，所述受治疗者的肿瘤过度表达 HER2 蛋白质。一个实施方案中，受治疗者接受了或正在接受化学治疗。另一实施方案中，所述化合物与紫杉醇组合给药给有转移性乳腺癌的受治疗者，所述受治疗者的肿瘤过度表达 HER2 蛋白质且未接受转移性疾病的化学治

疗。一个实施方案中,所述化合物以连续 45-120 分钟输注 IV 输注的方式给药的最初剂量为 0.1-10mg/kg。另一实施方案中,所述化合物以 90 分钟输注给药的剂量为 4mg/kg。一个实施方案中,以 30 分钟输注给药给受治疗者的周维持剂量为 2mg/kg。一个实施方案中,所述化合物以 90 分钟输注给药的剂量为 0.5-1.5mg/kg。一个实施方案中,以 30 分钟输注给药给受治疗者的周维持剂量为 0.5-1.0mg/kg。一个实施方案中,所述化合物以 90 分钟输注给药的剂量为 0.04-0.5mg/kg。一个实施方案中,所述化合物以 90 分钟输注给药的剂量为 0.001-10mg/kg。

[0280] 包含一化合物的组合物,所述化合物包括一段连续氨基酸,所述段连续氨基酸包含具有利妥昔单抗 (rituximab, 例如 Rituxin) 序列的连续氨基酸,所述组合物可包含氯化钠、柠檬酸钠二水合物、聚山梨醇酯 80 和注射用水 (Water for Injection, USP) 或其等同物。一个实施方案中,将组合物的 pH 调节到 6.5。所述组合物还可经过冻干,可向其中加入水以进行重组。一个实施方案中,将化合物给药给受治疗者来治疗复发性或难治性、低级或小囊、CD20- 阳性、B- 细胞非霍奇金淋巴瘤。一个实施方案中,所述化合物的给药剂量为 250-500mg/m²,每周一次 IV 输注 4 或 8 剂。另一实施方案中,所述化合物以 375mg/m²,每周一次 IV 输注给药 4 或 8 剂。一个实施方案中,所述化合物的给药剂量为 150-250mg/m²,每周一次 IV 输注 4 或 8 剂。一个实施方案中,所述化合物的给药剂量为 1.5-5mg/m²,每周一次 IV 输注 4 或 8 剂。一个实施方案中,所述化合物的给药剂量为 1.0-500mg/m²,每周一次 IV 输注 4 或 8 剂。

[0281] 包含一化合物的组合物,所述化合物包括一段连续氨基酸,所述段连续氨基酸包含具有依法利珠单抗 (efalizumab, 例如 Raptiva) 序列的连续氨基酸,所述组合物可包含苷糖、L- 组氨酸盐酸盐一水合物、L- 组氨酸和聚山梨醇酯 20。可采用无菌非 USP 水或无菌注射用水 (Sterile Water for Injection, USP) 或其等同物将这种组合物稀释到合适剂型。所述组合物还可经过冻干,可向其中加入水以进行重组。一个实施方案中,将化合物给药给受治疗者来治疗慢性中、重度斑块状银屑病。这种受治疗者可用于系统治疗或光线疗法。一个实施方案中,将所述化合物以 0.1-1.1mg/kg 的单一皮下 (SC) 预先剂量,然后以 0.8-1.5mg/kg 的每周 SC 剂量 (最大单一计量不超过总量 250mg) 给药。另一实施方案中,将所述化合物以 0.7mg/kg 的单一 SC 预先剂量,然后以 1mg/kg 的每周 SC 剂量 (最大单一计量不超过总量 200mg) 给药。一个实施方案中,将所述化合物以 0.001-1.0mg/kg 的单一皮下 (SC) 预先剂量,然后以 0.008-0.015mg/kg 的每周 SC 剂量给药。

[0282] 包含一化合物的组合物,所述化合物包括一段连续氨基酸,所述段连续氨基酸包含具有奥马佐单抗 (例如 Xolair) 序列的连续氨基酸,所述组合物可包含苷糖、L- 组氨酸盐酸盐一水合物、L- 组氨酸和聚山梨醇酯 20。所述组合物可经过冻干。一个实施方案中,可采用无菌注射用水 (Sterile Water for Injection, USP) 或其等同物将这种组合物稀释到合适剂型。一个实施方案中,将化合物给药给受治疗者来治疗中、重度持续哮喘。另一实施方案中,将所述化合物给药给皮肤测试为阳性或对常年高空过敏症有体外活性且吸入性激素不足够控制其症状的受治疗者,以减少哮喘恶化几率。一个实施方案中,将所述化合物以每 2 或 4 周 100-400mg 的剂量皮下给药。另一实施方案中,将所述化合物以每 2 或 4 周 150-375mg 的剂量 SC 给药。一个实施方案中,将所述化合物以每 2 或 4 周 25-150mg 的剂量皮下给药。一个实施方案中,将所述化合物以每 2 或 4 周 1-4mg 的剂量皮下给药。

[0283] 包含一化合物的组合物,所述化合物包括一段连续氨基酸段,所述段连续氨基酸包含具有依那西普(etanercept,例如Enbrel)序列的连续氨基酸,所述组合物可包含甘露醇、昔糖和氨基丁三醇。一个实施方案中,所述组合物可为冻干体。一个实施方案中,所述组合物可用例如无菌注射用水(Sterile Bacteriostatic Water for Injection, BWFI), USP(含0.9%苯甲醇)重组。一个实施方案中,将所述化合物给药给受治疗者以减轻患有中、重度活动期类风湿性关节炎的受治疗者的症状、诱导主要临床响应、抑制结构性损伤的进展并提高生理机能。所述化合物可与甲氨喋呤(MTX)一起开始或者单独使用。一个实施方案中,将所述化合物给药给受治疗者以减轻对一种或多种DMARD响应不够的受治疗者的中、重度活动期特发性幼年类风湿性关节炎症状。一个实施方案中,将所述化合物给药给受治疗者以减轻有银屑病关节炎的受治疗者的症状、抑制活动性关节炎的结构性损伤进展并提高生理机能。一个实施方案中,将所述化合物给药给治疗者以减轻有活动期强直性脊柱炎的受治疗者的症状。一个实施方案中,将所述化合物给药给受治疗者以治疗慢性中、重度斑块型银屑病。一个实施方案,其中所述受治疗者有类风湿性关节炎、银屑病关节炎或强直性脊柱炎,将所述化合物以25-75mg/周、一次或多次皮下(SC)注射给药。另一实施方案中,将所述化合物以50mg/周、单次SC注射给药。一个实施方案中,其中受治疗者有斑块型银屑病,将所述化合物以25-75mg,每周两次或4天一次,连续3个月给药,接着减少到25-75mg/周的维持剂量。另一实施方案,将所述化合物以50mg,每周两次或4天一次,连续3个月给药,接着减少到50mg/周的维持剂量。一个实施方案中,剂量比本文中所列剂量少2x-100x。一个实施方案中,其中受治疗者有活动期特发性JRA,可将所述化合物以0.2-1.2mg/kg/周的剂量给药(可达最大量75mg/周)。另一实施方案中,将所述化合物以0.8mg/kg/周的剂量给药(可达最大量50mg/周)。一些实施方案中,剂量比以上所列剂量少2x-100x。

[0284] 包含一化合物的组合物,所述化合物包括一段连续氨基酸段,所述段连续氨基酸包含具有英夫利西单抗(infliximab,例如Remicade)序列的连续氨基酸,所述组合物可包含昔糖、聚山梨醇80、磷酸二氢钠一水合物和磷酸氢二钠二水合物。一个实施方案中不存在防腐剂。一个实施方案中,所述组合物为冻干体。一个实施方案中,所述组合物用例如注射用水(BWFI), USP重组。一个实施方案中,所述组合物的pH为7.2或约7.2。一个实施方案中,将所述化合物给药给有类风湿性关节炎的受治疗者,以2-4mg/kg的剂量静脉内输注,接着第一次输注后的2和6周和之后的每8周再类似剂量给药。另一实施方案中,将所述化合物以3mg/kg的剂量静脉内输注,接着第一次输注后的2和6周和之后的每8周再类似剂量给药。一个实施方案中,将剂量调节到10mg/kg或以每4周的频率治疗。一个实施方案中,所述化合物与甲氨喋呤组合给药。一个实施方案中,将所述化合物给药给有克罗恩(Crohn)病或瘘管性克罗恩病的受治疗者,在0、2和6周以2-7mg/kg的诱导方案剂量,然后之后以每8周4-6mg/kg的维持方案来治疗中、重度克罗恩病或瘘管性克罗恩病。另一实施方案中,将所述化合物在0、2和6周以5mg/kg的诱导方案剂量,然后之后以每8周5mg/kg的维持方案给药,来治疗中、重度活动期克罗恩病或瘘管性克罗恩病。一个实施方案中,将剂量调节到10mg/kg。一个实施方案中,将所述化合物给药给有强直性脊柱炎的受治疗者,以2-7mg/kg的剂量静脉内输注,然后在第一次输注后的2和6周,接着之后每6周再以类似剂量给药。另一实施方案中,将所述化合物以5mg/kg的剂量静脉内输注,然后在第一次输注后的2和6周,接着之后每6周再以类似剂量给药。一个实施方案中,将所述化合物

给药给有银屑病关节炎的受治疗者,以 2-7mg/kg 的剂量静脉内输注,然后在第一次输注后的 2 和 6 周,接着之后每 8 周再以类似剂量给药。另一实施方案中,将所述化合物以 5mg/kg 的剂量静脉内输注,然后在第一次输注后的 2 和 6 周,接着之后每 8 周再以类似剂量给药。一个实施方案中,将所述化合物与氨甲喋呤一起给药。一个实施方案中,将所述化合物给药给有溃疡性结肠炎的受治疗者,在 0、2 和 6 周以 2-7mg/kg 的诱导方案剂量,然后以每 8 周 2-7mg/kg 的维持方案来治疗中、重度活性溃疡性结肠炎。另一实施方案中,将所述化合物给药给有溃疡性结肠炎的受治疗者,在 0、2 和 6 周以 5mg/kg 的诱导方案剂量,然后以每 8 周 5mg/kg 的维持方案。一些实施方案中,剂量为以上用于治疗各种疾病所列的剂量少 2x-100x。

[0285] 包含一化合物的组合物,所述化合物包括一段连续氨基酸,所述段连续氨基酸包含具有西妥昔单抗 (cetuximab, 例如 Erbitux) 序列的连续氨基酸,所述组合物可包含无防腐剂组合物,包含氯化钠、磷酸氢二钠七水合物、磷酸二氢钠一水合物。一个实施方案中,所述组合物为冻干体。一个实施方案中,所述组合物用例如注射用水 (Water for Injection, USP) 重组。一个实施方案中,所述组合物的 pH 为约 7.0-约 7.4。一个实施方案中,将所述化合物给药给受治疗者来治疗表皮生长因子受体 (EGFR) 表达的转移性大肠癌。一个实施方案中,将所述化合物与伊立替康 (irinotecan) 组合用于治疗对伊立替康为主的化学治疗不反应的患者。一个实施方案中,将所述化合物以 300-500mg/m² 的剂量作为初剂量 (第一次输注) 120 分钟 IV 输注 (最大输注速率为 5mL/min) 给药。另一实施方案中,将所述化合物以 400mg/m² 的剂量作为初剂量 (第一次输注) 120 分钟 IV 输注 (最大输注速率为 5mL/min) 给药。

[0286] 一个实施方案中,周维持剂量 (所有其它输注) 为在 60 分钟内输注 200-300mg/m² (最大输注速率为 5mL/min)。另一实施方案中,周维持剂量 (所有其它输注) 为在 60 分钟内输注 250mg/m² (最大输注速率为 5mL/min)。一些实施方案中,剂量比以上所列剂量少 2x-100x。

[0287] 包含一化合物的组合物,所述化合物包括一段连续氨基酸,所述段连续氨基酸包含具有阿昔单抗 (例如 Reopro) 序列的连续氨基酸,所述组合物可包含无防腐剂的组合物,包含磷酸钠和聚山梨醇酯 80。一个实施方案中,所述组合物为冻干体。一个实施方案中,将组合物在例如注射用水 (Water for Injection, USP) 中稀释或与之重组。一个实施方案中,所述组合物的 pH 为 7.2 或约 7.2。一个实施方案中,将所述组合物用作经皮冠状动脉介入治疗 (PCI) 的辅助物。这种用途中,可在 PCI 开始前 10-60 分钟时将所述组合物以 0.15 to 0.35mg/kg 进行静脉团注给药。另一实施方案,剂量为 0.2mg/kg。一个实施方案中,团注后,接着以 0.1-0.15g/kg/min 连续静脉输注 12 小时。另一实施方案,剂量为 0.125g/kg/min,进行 12 小时。一个实施方案中,将所述组合物用作患有不稳定型心绞痛的受治疗者的经皮冠状动脉介入治疗 (PCI) 的辅助物。这种用途的一个实施方案中,可在 PCI 开始前将所述组合物以 0.1-0.4mg/kg 进行静脉团注给药,然后以 5-15g/min 连续静脉输注 24 小时,在 PCI 后停 1 小时。另一实施方案中,在 PCI 开始前将所述组合物以 0.25mg/kg 进行静脉团注给药,然后以 10g/min 连续静脉输注 24 小时,在 PCI 后停 1 小时。一些实施方案中,剂量比以上所列剂量小 2x-100x。

[0288] 本文中所述组合物的各实施方案中,所述组合当为冻干体时,可与例如无菌水

溶液、无菌水、无菌注射用水 (Sterile Water for Injections, USP)、无菌注射用生理水 (Sterile Bacteriostatic Water for Injections, USP) 及本领域中技术人员已知的其等同物重组。

[0289] 理解的是:任何本发明化合物给药中,所述化合物可以单独、在载体中、作为药物组合物的部分或在任何合适载体中的形式给药。

[0290] 剂量

[0291] 理解的是:本文中描述剂量范围的地方,如每周 1-10mg/kg,本文中公开的发明还考虑了上限和下限之间的各整数剂量及其十分之一。因此,作为给出的实例,本发明考虑了 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4mg/kg 等至 10mg/kg。

[0292] 在实施方案中,本发明化合物可作为单剂量给药或作为多剂量给药。

[0293] 总地来说,按照以上所述方法治疗疾病或病症的日剂量将通常为约 0.01- 约 10.0mg/kg 待治疗者体重。

[0294] 普通医师考虑体重、年龄和待治疗者的状况、患病程度和选定的具体给药路径等后可根据上述剂量进行改变。

[0295] 还预计所公开的化合物将与护理后果协同作用影响所需有效剂量。

[0296] 试剂盒

[0297] 本发明另一方面提供包括本文中公开的化合物和包含这些化合物的药物组合物的试剂盒。除了所述化合物或药物组合物外,试剂盒可包含诊断或治疗试剂。试剂盒还可包括用于诊断或治疗方法的说明书。诊断实施方案中,所述试剂盒包括化合物或其药物组合物和诊断试剂。治疗实施方案中,所述试剂盒包括抗体或其药物组合物和一种或多种治疗试剂,如其它抗肿瘤剂、或化学治疗试剂。

[0298] 受治疗者

[0299] 一些实施方案中,受治疗者是人。一个实施方案中,受治疗者为 18 岁或更大。另一实施方案中,受治疗者不到 18 岁。

[0300] 本文中公开的各种元素的所有组合都属于本发明范围。

[0301] 参考下面的试验详述将更好地理解本发明,但本领域中技术人员将理解的是:详述的具体实施例仅用于说明本发明,其在之后的权利要求书得到更详尽描述。

[0302] 对称粘附素

[0303] 本发明说明描述了基因装置 (遗传装置, genetic device), 所述基因装置为包含以新型方式连接的功能性连续氨基酸段。到目前为止, 已对蛋白质进行基因工程来依靠它们采用新型固定结构或构象产生新功能。与这种现有基因工程蛋白质相比, 本文中公开的基因装置包含两个或多个不同蛋白质区域, 所述蛋白质区域通过新型共价化学键以允许所述区域之间发生相对运动的方式连接。蛋白质区域之间的相对运动组成所述基因装置的活动部分和它们从而能进行的有用工作。该工作的输入能量由所述蛋白质区域本身固有的旋转动能及所述蛋白质区域与溶剂分子之间的机械相互作用能等提供。

[0304] 本公开描述了“对称粘附素”, 一具体类基因装置。对称粘附素包含两个或多个化学结合的粘附素 (独立折叠的多肽结合域或连续氨基酸段)。这些化学结合的粘附素能互相对运动, 形成亲和性大大提高的两个或多个对称取向的结合域, 可用于结合二聚配体、三聚配体、四聚配体等。对称粘附素-Fc 杂合蛋白质是特别有用的基因装置实施方案。

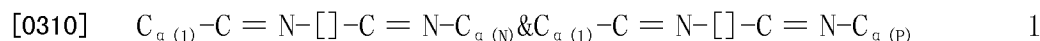
[0305] 对称性在治疗蛋白质功效中的重要性是由于以下事实：大多数蛋白质疾病靶点本身展示了如此高序对称结构。例如，如果疾病靶点由两个蛋白质组成，则称之为二聚体，如果其由三个蛋白质组成，则称之为三聚体，等等。如果蛋白质仅以每次一个的基准治疗结合到蛋白质疾病靶点上，那么结合强度通常为纳摩尔数量级。在这种通常结合水平上，这是现在治疗蛋白质的典型水平，必须用相对蛋白质疾病靶点巨大、浪费的过量治疗蛋白质（一百万比一的基准）充满身体。

[0306] 采用简单的一组规则设计对称粘附素，通过使蛋白质更对称使得它们成为更有用的治疗物。就设计来以每次两个的基准结合蛋白质疾病靶点的对称粘附素而言，结合强度将为纳摩尔数量级。协同结合允许这样超常的结合水平。在这样超常的结合水平，仅需要给药相对蛋白质疾病靶点少许多的治疗蛋白质（一比一基准）。

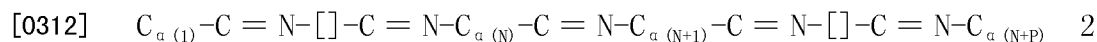
[0307] 肽键结合化学

[0308] 所有蛋白质都由一个或多个多肽链、连续氨基酸段组成，所述氨基酸通过肽键连接到前一氨基酸。由于单键（-C-N-）和双键（-C=N-）之间的共振，所述共振发生在酰胺中，所述肽键具有很大的双键特征度（-C=N-C_α-C=N-）。从而，蛋白质中的肽键几乎在一个平面上。尽管邻接的 N-C_α 和 C_α-C 键旋转相对自由，肽键的刚性将折叠多肽链的自由度降低到象单一静态物。

[0309] 考虑具有 1 中显示的肽结合的第一段 N 连续氨基酸和第二段 P 连续氨基酸，AA₁-[]-AA_n 和 AA₁-[]-AA_p：

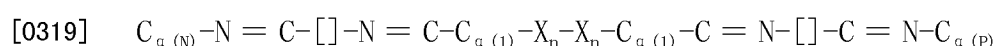
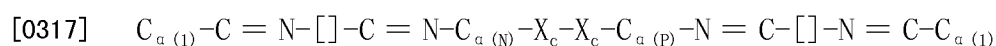
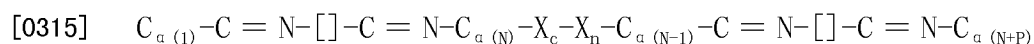


[0311] 通过新肽键将所述第一段连续氨基酸在其 N- 末端连接到所述第二段连续氨基酸的 C- 末端将形成具有 2 中所示肽结合的嵌合多肽，AA₁-[]-AA_n-AA_{n+1}-[]-AA_{n+p}：

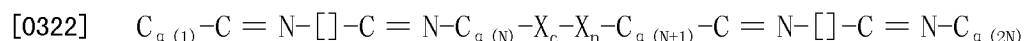


[0313] 所述嵌合多肽，象任一其前体，为单一段连续氨基酸，各氨基酸也通过肽键连接到前一氨基酸。折叠嵌合多肽链将因此也通常表现为单一静态物。

[0314] 本发明提供新型类蛋白质分子，本文中称为基因装置，所述分子象机械装置，是具有两个或多个以允许相对运动的方式连接的活动部分的动态物。基因装置中的各部分或区域是连续氨基酸段，各相互连接通过连接各连续氨基酸段的预定末端的非肽键形成。优选，基因装置中的区域为结合域。三种不同类型的基因装置通过 3、4 和 5 中所示的相互连接布局识别：



[0321] 具有在不同末端 (6) 连接的两个相同结合域的基因装置具有不对称构型，



[0323] 具有在相同末端 (7 和 8) 连接的两个相同结合域的基因装置具有点对称构型，

[0324] 具有在相同末端 (7 和 8) 连接的两个相同结合域的基因装置具有点对称构型，

[0325] $C_{\alpha(1)}-C = N-[]-C = N-C_{\alpha(N)}-X_c-X_c-C_{\alpha(N)}-N = C-[]-N = C-C_{\alpha(1)}$

[0326]

7

[0327] $C_{\alpha(N)}-N = C-[]-N = C-C_{\alpha(1)}-X_n-X_n-C_{\alpha(1)}-C = N-[]-C = N-C_{\alpha(N)}$

[0328]

8

[0329] 7 和 8 中显示的基因装置在本文中称为半对称粘附素。尽管半对称粘附素具有点对称结构,它们不能使其两个结合域独立旋转,因此它们通常不能对称结合到对称靶点的超过一个结合部位上。

[0330] 本发明还提供能对称结合到对称靶点的两个或多个结合部位的一类蛋白质分子(即协同地)。能对称地结合对称靶点基因装置在本文中称为对称粘附素。象人体用两只手而不是一只手抓住超大但对称的物体(如重力球)一样,对称粘附素结合对称靶点的能力通常比蛋白质大许多。

[0331] 对称粘附素亚型

[0332] 表 2-11 列出了不同对称粘附素的各种非限定实施方案。例如表 2,描述了 CD4-对称粘附素,在第一行显示了 CD4 半对称粘附素的构型,即具有 C-末端 X-末端的 CD4 区域,例如一段连续氨基酸,其为具有 C-末端半胱氨酸或 selenosysteine 残基的 CD4 区域,通过非肽键(例如半胱氨酸-半胱氨酸二硫键或硒代半胱氨酸-硒代半胱氨酸二硒键)连接结合到第二段连续氨基酸,所述第二段连续氨基酸为具有 C-末端半胱氨酸或 selenosysteine 残基的 CD4 区域,通过非肽键-通常所述的 [CD4-Xc-Xc-CD4] 结合。所述 CD4 半对称粘附素和 Fc 半对称粘附素形成免疫-对称粘附素的二聚体列于表 2 第二行中,例如描述为 [CD4-Xc-Sn-Fc]₂。各表中,Xc 表示 C-末端 X-末端;Xn 表示 N-末端 X-末端,S 表示 N-末端半胱氨酸残基。

[0333] 表 2

[0334] CD4 对称粘附素

[0335]

连续氨基酸段	种类	对称粘附素构型
CD4-X _c	半	[CD4-X _c -X _c -CD4]
CD4-X _c +S _n -Fc	免疫	[CD4-X _c -S _n -Fc] ₂
CD4-X _c +X _n -Fc	免疫	[CD4-X _c -X _n -Fc] ₂
CD4-X _c +Fc-X _c	免疫	[Fc-X _c -X _c -CD4] ₂
CD4-X _c +S _n -Fc-X _c	双	[CD4-X _c -S _n -Fc-X _c -X _c -CD4] ₂
CD4-X _c +X _n -Fc-X _c	双	[CD4-X _c -X _n -Fc-X _c -X _c -CD4] ₂

[0336] 表 3

[0337] TNR 半对称粘附素

[0338]

连续氨基酸段	#	对称粘附素构型
$\text{TNR}_1\text{-X}_c$	1	$[\text{TNR}_1\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-TNR}_1]$
$\text{TNR}_2\text{-X}_c$	1	$[\text{TNR}_2\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-TNR}_2]$
$\text{TNR}_{\text{Fab}}\text{-X}_c$	1	$[\text{TNR}_{\text{Fab}}\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-TNR}_{\text{Fab}}]$
$\text{TNR}_1\text{-X}_c\text{+TNR}_2\text{-X}_c$	3	$[(\text{TNR}_{1/2})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(TNR}_{1/2})]$
$\text{TNR}_1\text{-X}_c\text{+TNR}_{\text{Fab}}\text{-X}_c$	3	$[(\text{TNR}_{1/\text{Fab}})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(TNR}_{1/\text{Fab}})]$
$\text{TNR}_2\text{-X}_c\text{+TNR}_{\text{Fab}}\text{-X}_c$	3	$[(\text{TNR}_{2/\text{Fab}})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(TNR}_{2/\text{Fab}})]$
$\text{TNR}_1\text{TNR}_1\text{-X}_c\text{+TNR}_2\text{-X}_c\text{+TNR}_{\text{Fab}}\text{-X}_c$	6	$[(\text{TNR}_{1/2/\text{Fab}})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(TNR}_{1/2/\text{Fab}})]$

[0339]

[0340] 表 4

[0341] TNR 免疫对称粘附素

[0342]

连续氨基酸段	#	对称粘附素构型
$\text{TNR}_1\text{-X}_c\text{+S}_n\text{-Fc}$	1	$[\text{TNR}_1\text{-X}_c\text{-S}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{TNR}_1\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	1	$[\text{TNR}_1\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{TNR}_1\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	1	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-TNR}_1]_2$
$\text{TNR}_2\text{-X}_c\text{+S}_n\text{-Fc}$	1	$[\text{TNR}_2\text{-X}_c\text{-S}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{TNR}_2\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	1	$[\text{TNR}_2\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{TNR}_2\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	1	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-TNR}_2]_2$
$\text{TNR}_{\text{Fab}}\text{-X}_c\text{+S}_n\text{-Fc}$	1	$[\text{TNR}_{\text{Fab}}\text{-X}_c\text{-S}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{TNR}_{\text{Fab}}\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	1	$[\text{TNR}_{\text{Fab}}\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{TNR}_{\text{Fab}}\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	1	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-TNR}_{\text{Fab}}]_2$

$TNR_1-X_c+TNR_2-X_c+S_n-Fc$	3	$[(TNR_{1/2})-X_c-S_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_2-X_c+^*n-Fc$	3	$[(TNR_{1/2})-X_c-X_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_2-X_c+Fc-X_c$	3	$[Fc-X_c-X_c-(TNR_1Z_2)]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_{Fab}-X_c+S_n-Fc$	3	$[(TNR_{1/Fab})-X_c-S_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_{Fab}-X_c+X_n-Fc$	3	$[(TNR_{1/Fab})-X_c-X_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_{Fab}-X_c+Fc-X_c$	3	$[Fc-X_c-X_c-(TNR_{1/Fab})]_2$
$TNR_2-X_c+TNR_{Fab}-X_c+S_n-Fc$	3	$[(TNR_{2/Fab})-X_c-S_n-Fc]_2$
$TNR_2-X_c+TNR_{Fab}-X_c+X_n-Fc$	3	$[(TNR_{2/Fab})-X_c-X_n-Fc]_2$
$TNR_2-X_c+TNR_{Fab}-X_c+Fc-X_c$	3	$[Fc-X_c-X_c-(TNR_2ZF_{313})]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_2-X_c+TNR_{Fab}-X_c+S_n-Fc$	6	$[(TNR_{1/2/Fab})-X_c-S_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_2-X_c+TNR_{Fab}-X_c+X_n-Fc$	6	$[(TNR_{1/2/Fab})-X_c-X_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_2-X_c+TNR_{Fab}-X_c+Fc-X_c$	6	$[Fc-X_c-X_c-(TNR_{1/2/Fab})]_2$

[0343]

[0344] 表 5TNR 双对称粘附素

[0345]

连续氨基酸段	#	对称粘附素构型
$TNR_1-X_c+S_n-Fc-X_c$	1	$[TNR_1-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-TNR_1]_2$
$TNR_1-X_c+X_n-Fc-X_c$	1	$[TNR_1-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-TNR_1]_2$
$TNR_2-X_c+S_n-Fc-X_c$	1	$[TNR_2-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-TNR_2]_2$
$TNR_2-X_c+X_n-Fc-X_c$	1	$[TNR_2-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-TNR_2]_2$
$TNR_{Fab}-X_c+S_n-Fc-X_c$	1	$[TNR_{Fab}-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-TNR_{Fab}]_2$
$TNR_{Fab}-X_c+X_n-Fc-X_c$	1	$[TNR_{Fab}-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-TNR_{Fab}]_2$

$TNR_1-X_c+TNR_2-X_c+S_n-Fc-X$	12	$[(TNR_{1/2})-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-(TNR_{1/2})]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_2-X_c+X_n-Fc-X_c$	12	$[(TNR_{1/2})-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-(TNR_{1/2})]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_{Fab}-X_c+S_n-Fc-X$	12	$[(TNR_{1/Fab})-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-(TNR_{1/Fab})]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_{Fab}-X_c+X_n-Fc-X$	12	$[(TNR_{1/Fab})-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-(TNR_{1/Fab})]_2$
$TNR_2-X_c+TNR_{Fab}-X_c+S_n-Fc-X$	12	$[(TNR_{2/Fab})-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-(TNR_{2/Fab})]_2$
$TNR_2-X_c+TNR_{Fab}-X_c+X_n-Fc-X_c$	12	$[(TNR_{2/Fab})-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-(TNR_{2/Fab})]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_2-X_c+TNR_{Fab}-X_c+S_n-Fc-X_c$	63	$[(TNR_{1/2}/Fab)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-(TNR_{1/2}/Fab)]_2$
$TNR_1-X_c+TNR_2-X_c+TNR_{Fab}-X_c+S_n-Fc-X_c$	63	$[(TNR_{1/2}/Fab)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-(TNR_{1/2}/Fab)]_2$

[0346] 表 6VGFR 半对称粘附素

[0347]

连续氨基酸段	#	对称粘附素构型
$VGFR_1-X_c$	1	$[VGFR_1-X_c-X_c-VGFR_1]$
$VGFR_2-X_c$	1	$[VGFR_2-X_c-X_c-VGFR_2]$
$VGFR_3-X_c$	1	$[VGFR_3-X_c-X_c-VGFR_3]$
$VGFR_1-X_c+VGFR_2-X_c$	3	$[(VGFR_{1/3})-X_c-X_c-(VGFR_{1/2})]$
$VGFR_1-X_c+VGFR_3-X_c$	3	$[(VGFR_{1/3})-X_c-X_c-(VGFR_{1/3})]$
$VGFR_2-X_c+VGFR_3-X_c$	3	$[(VGFR_{2/3})-X_c-X_c-(VGFR_{2/3})]$
$VGFR_1-X_c+VGFR_2-X_c+VGFR_3-X_c$	6	$[(VGFR_{1/2/3})-X_c-X_c-(VGFR_{1/2/3})]$

[0348]

[0349] 表 7VGFR 免疫对称粘附素

[0350]

连续氨基酸段	#	对称粘附素构型

$VGFR_1-X_c+S_n-Fc$	1	$[VGFR_1-X_c-S_n-Fc]_2$
$VGFR_1-X_c+X_n-Fc$	1	$[VGFR_1-X_c-X_n-Fc]_2$
$VGFR_1-X_c+Fc-X_c$	1	$[Fc-X_c-X_c-VGFR_1]_2$
$VGFR_2-X_c+S_n-Fc$	1	$[VGFR_2-X_c-S_n-Fc]_2$
$VGFR_2-X_c+X_n-Fc$	1	$[VGFR_2-X_c-X_n-Fc]_2$
$VGFR_2-X_c+Fc-X_c$	1	$[Fc-X_c-X_c-VGFR_2]_2$
$VGFR_3-X_c+S_n-Fc$	1	$[VGFR_3-X_c-S_n-Fc]_2$
$VGFR_3-X_c+X_n-Fc$	1	$[VGFR_3-X_c-X_n-Fc]_2$
$VGFR_3-X_c+Fc-X_c$	1	$[Fc-X_c-X_c-VGFR_3]_2$
$VGFR_1-X_c+VGFR_2-X_c+S_n-Fc$	3	$[(VGFR_{1/2})-X_c-S_n-Fc]_2$
$VGFR_1-X_c+VGFR_2-X_c+X_n-Fc$	3	$[(VGFR_{1/2})-X_c-X_n-Fc]_2$
$VGFR_1-X_c+VGFR_2-X_c+Fc-X_c$	3	$[Fc-X_c-X_c-(VGFR_{1/3})]_2$
$VGFR_1-X_c+VGFR_3-X_c+S_n-Fc$	3	$[(VGFR_{1/3})-X_c-S_n-Fc]_2$
$VGFR_1-X_c+VGFR_3-X_c+X_n-Fc$	3	$[(VGFR_{1/3})-X_c-X_n-Fc]_2$
$VGFR_1-X_c+VGFR_3-X_c+Fc-X_c$	3	$[Fc-X_c-X_c-(VGFR_{1/2/3})]_2$
$VGFR_2-X_c+VGFR_3-X_c+S_n-Fc$	3	$[(VGFR_{2/3})-X_c-S_n-Fc]_2$
$VGFR_2-X_c+VGFR_3-X_c+X_n-Fc$	3	$[(VGFR_{2/3})-X_c-X_n-Fc]_2$
$VGFR_2-X_c+VGFR_3-X_c+Fc-X_c$	3	$[Fc-X_c-X_c-(VGFR_{2/3})]_2$
$VGFR_1-X_c+VGFR_2-X_c+VGFR_3-X_c+S_n-Fc$	6	$[(VGFR_{1/2/3})-X_c-S_n-Fc]_2$
$VGFR_1-X_c+VGFR_2-X_c+VGFR_3-X_c+X_n-Fc$	6	$[(VGFR_{1/2/3})-X_c-X_n-Fc]_2$
$VGFR_1-X_c+VGFR_2-X_c+VGFR_3-X_c+Fc-X_c$	6	$[Fc-X_c-X_c-(VGFR_{1/2/3})]_2$

[0351]

[0352] 表 8VGFR 双对称粘附素

[0353]

连续氨基酸段	#	对称粘附素构型
$\text{VGFR}_1\text{-X}_c\text{+S}_n\text{-Fc-X}_c$	1	$[\text{VGFR}_1\text{-X}_c\text{-S}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-VGFR}_1]_2$
$\text{VGFR}_1\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	1	$[\text{VGFR}_1\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-VGFR}_1]_2$
$\text{VGFR}_2\text{-X}_c\text{+S}_n\text{-Fc-X}_c$	1	$[\text{VGFR}_2\text{-X}_c\text{-S}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-VGFR}_2]_2$
$\text{VGFR}_2\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	1	$[\text{VGFR}_2\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-VGFR}_2]_2$
$\text{VGFR}_3\text{-X}_c\text{+S}_n\text{-Fc-X}_c$	1	$[\text{VGFR}_3\text{-X}_c\text{-S}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-VGFR}_3]_2$
$\text{VGFR}_3\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	1	$[\text{VGFR}_3\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-VGFR}_3]_2$
$\text{VGFR}_1\text{-X}_c\text{+VGFR}_2\text{-X}_c\text{+S}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{VGFR}_{1/2})\text{-X}_c\text{-S}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(VGFR}_{1/2})]_2$
$\text{VGFR}_1\text{-X}_c\text{+VGFR}_2\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{VGFR}_{1/2})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(VGFR}_{1/2})]_2$
$\text{VGFR}_1\text{-X}_c\text{+VGFR}_3\text{-X}_c\text{+S}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{VGFR}_{1/3})\text{-X}_c\text{-S}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(VGFR}_{1/3})]_2$
$\text{VGFR}_1\text{-X}_c\text{+VGFR}_3\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{VGFR}_{1/3})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(VGFR}_{1/3})]_2$
$\text{VGFR}_2\text{-X}_c\text{+VGFR}_3\text{-X}_c\text{+S}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{VGFR}_{2/3})\text{-X}_c\text{-S}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(VGFR}_{2/3})]_2$
$\text{VGFR}_2\text{-X}_c\text{+VGFR}_3\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{VGFR}_{2/3})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(VGFR}_{2/3})]_2$
$\text{VGFR}_1\text{X}_c\text{+VGFR}_2\text{-X}_c\text{+VGFR}_3\text{-X}_c\text{+S}_n\text{-Fc-X}_c$	63	$[(\text{VGFR}_{1/2/3})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(VGFR}_{1/2/3})]_2$
$\text{VGFR}_1\text{X}_c\text{+VGFR}_2\text{-X}_c\text{+VGFR}_3\text{-X}_c\text{+S}_n\text{-Fc-X}_c$	63	$[(\text{VGFR}_{1/2/3})\text{-X}_c\text{X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(VGFR}_{1/2/3})]_2$

[0354] 表 9ErbB 半对称粘附素

[0355]

连续氨基酸段	#	对称粘附素构型
ErbB_1X_c	1	$[\text{ErbB}_1\text{X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_1]$

$\text{ErbB}_2\text{-X}_c$	1	$[\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_2]$
$\text{ErbB}_3\text{-X}_c$	1	$[\text{ErbB}_3\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_3]$
$\text{ErbB}_4\text{-X}_c$	1	$[\text{ErbB}_4\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_4]$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_2\text{-X}_c$	3	$[(\text{ErbB}_{1/2})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/2})]$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c$	3	$[(\text{ErbB}_{1/3})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/3})]$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c$	3	$[(\text{ErbB}_{1/4})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/4})]$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c$	3	$[(\text{ErbB}_{2/3})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{2/3})]$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c$	3	$[(\text{ErbB}_{2/4})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{2/4})]$
$\text{ErbB}_3\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c$	3	$[(\text{ErbB}_{3/4})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{3/4})]$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c$	6	$[(\text{ErbB}_{1/2/3})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/2/3})]$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c$	6	$[(\text{ErbB}_{1/2/4})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/2/4})]$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c$	6	$[(\text{ErbB}_{1/3/4})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/3/4})]$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c$	6	$[(\text{ErbB}_{2/3/4})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{2/3/4})]$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c$	10	$[(\text{ErbB}_{1/2/3/4})\text{-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/2/3/4})]$

[0356]

[0357] 表 10ErbB 免疫对称粘附素

[0358]

连续氨基酸段	#	对称粘附素构型
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	1	$[\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	1	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_1]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	1	$[\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	1	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_2]_2$

$\text{ErbB}_3\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	1	$[\text{ErbB}_3\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_3\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	1	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_3]_2$
$\text{ErbB}_4\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	1	$[\text{ErbB}_4\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_4\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	1	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_4]_2$
$\text{EiTbB}_2\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	3	$[(\text{ErbB}_{1/2})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+EiTbB}_2\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	3	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/2})]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	3	$[(\text{ErbB}_{1/3})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	3	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/3})]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	3	$[(\text{ErbB}_{1/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	3	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/4})]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	3	$[(\text{ErbB}_{2/3})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+Fc-X}_1$	3	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{2/3})]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	3	$[(\text{ErbB}_{2/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	3	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{2/4})]_2$
$\text{ErbB}_3\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	3	$[(\text{ErbB}_{3/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_3\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+Fc-X}$	3	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{3/4})]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	6	$[(\text{ErbB}_{1/2/3})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	6	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/2/3})]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	6	$[-(\text{ErbB}_{1/2/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+Fc-X}_c$	6	$[\text{Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/2/4})]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc}$	6	$[(\text{ErbB}_{1/3/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc}]_2$

$\text{ErbB}_1\text{-Xc}+\text{ErbB}_3\text{-Xc}+\text{ErbB}_4\text{-Xc}+\text{Fc-Xc}$	6	$[\text{Fc-Xc-Xc}-(\text{ErbB}_{1/3/4})]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-Xc}+\text{ErbB}_3\text{-Xc}+\text{ErbB}_4\text{-Xc}+\text{X}_n\text{-Fc}$	6	$[(\text{ErbB}_{2/3/4})\text{-Xc-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-Xc}+\text{ErbB}_3\text{-Xc}+\text{ErbB}_4\text{-Xc}+\text{Fc-Xc}$	6	$[\text{Fc-Xc-Xc}-(\text{ErbB}_{2/3/4})]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-Xc}+\text{ErbB}_2\text{-Xc}+\text{ErbB}_3\text{-Xc}+\text{ErbB}_4\text{-Xc}+\text{X}_n\text{-Fc}$	10	$[(\text{ErbB}_{1/2/3/4})\text{-Xc-X}_n\text{-Fc}]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-Xc}+\text{ErbB}_2\text{-Xc}+\text{ErbB}_3\text{-Xc}+\text{ErbB}_4\text{-Xc}+\text{Fc-Xc}$	10	$[\text{Fc-Xc-Xc}-(\text{ErbB}_{1/2/3/4})]_2$

[0359]

[0360] 表 11ErbB 双对称粘附素

[0361]

连续氨基酸段	#	对称粘附素构型
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	1	$[\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_1]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	1	$[\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_2]_2$
$\text{ErbB}_3\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	1	$[\text{ErbB}_3\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_3]_2$
$\text{ErbB}_4\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	1	$[\text{ErbB}_4\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-ErbB}_4]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_2\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{ErbB}_{1/2})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/2})]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{ErbB}_{1/3})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/3})]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{ErbB}_{1/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/4})]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{ErbB}_{2/3})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{2/3})]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{ErbB}_{2/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{2/4})]_2$
$\text{ErbB}_3\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	12	$[(\text{ErbB}_{3/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{3/4})]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_3\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	63	$[(\text{ErbB}_{1/2/3})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/2/3})]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c\text{+ErbB}_2\text{-X}_c\text{+ErbB}_4\text{-X}_c\text{+X}_n\text{-Fc-X}_c$	63	$[(\text{ErbB}_{1/2/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-X}_c\text{-(ErbB}_{1/2/4})]_2$

$\text{ErbB}_1\text{-X}_c + \text{ErbB}_3\text{-X}_0 + \text{ErbB}_4\text{-X}_0 + \text{X}_n\text{-Fc-X}_c$	<p>63</p>	$\left[(\text{ErbB}_{1/3/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-Xc-(ErbB}_{1/3/4}) \right]_2$
$\text{ErbB}_2\text{-X}_c + \text{ErbB}_3\text{-X}_c + \text{ErbB}_4\text{-X}_c + \text{X}_n\text{-Fc-X}_c$	<p>63</p>	$\left[(\text{ErbB}_{2/3/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-Xc-(ErbB}_{2/3/4}) \right]_2$
$\text{ErbB}_1\text{-X}_c + \text{ErbB}_2\text{-X}_c + \text{ErbB}_3\text{-X}_c + \text{ErbB}_4\text{-X}_c + \text{X}_n\text{-Fc-X}_c$		$\left[(\text{ErbB}_{1/2/3/4})\text{-X}_c\text{-X}_n\text{-Fc-X}_c\text{-Xc-(ErbB}_{1/2/3/4}) \right]_2$

[0362]

[0363] 多段连续氨基酸

[0364] 本文中所称的多段连续氨基酸的实例包括但不限于包含结合域连续氨基酸，如分泌性或跨膜蛋白质、细胞内结合域和抗体（整体或其部分）及其改性变体。以下是一

些非限定性示例：

[0365] 1) 免疫球蛋白

[0366] 免疫球蛋白是通过链内二硫键连接在一起的多肽链的分子，其中至少一个结合的氨基酸不是末端残基，通常具有两个轻链和两个重链。各链中，一个区域 (V) 具有根据所述分子的抗体特异性可变的氨基酸序列。另一区域 (C) 具有同类分子常见的相当恒定序列。所述区域从氨基末端在序列中编号。

[0367] 免疫球蛋白基因超家族由具有类免疫球蛋白区域的分子组成。该家族成员包括 I 类和 II 类主要组织相容性抗原、免疫球蛋白、T- 细胞受体 α 、 β 、 γ 和 δ 链、CD1、CD2、CD4、CD8、CD28、CD3 的 γ 、 δ 和 ϵ 链、OX-2、Thy-1、细胞间或神经细胞粘附分子 (I-CAM 或 N-CAM)、与淋巴细胞功能相关的抗原 -3 (LFA-3)、神经细胞质的蛋白质 (NCP-3)、多聚 Ig 受体、髓鞘相关糖蛋白 (MAG)、高亲和力 IgE 受体、外周髓鞘 (Po) 的主要糖蛋白、血小板衍生长因子受体、集落刺激因子 -1 受体、巨噬细胞 Fc 受体、Fc γ 受体和癌胚抗原。

[0368] 已知可用一个免疫球蛋白的可变区 (包括高变区) 代替另一个免疫球蛋白的可变区和用一种免疫球蛋白的可变区 (包括高变区) 代替另一种免疫球蛋白的可变区。参见例如 EP0173494 ;EP 0125023 ;Munro, Nature 312 (13Dec. 1984) ;Neuberger et al., Nature 312 : (13 Dec. 1984) ;Sharon et al., Nature 309 (May 24, 1984) ;Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6851-6855 (1984) ;Morrison et al. Science 229 : 1202-1207 (1985) ;和 Boulianne et al., Nature 312 :643-646 (Dec. 13, 1984)。Morrison et al., Science 229 :1202-1207 (1985) 教导了从一种具有稠合到免疫球蛋白恒定区的可变区的免疫球蛋白嵌合体制备另一种的方法。

[0369] 也还知道可能用免疫球蛋白基因超家庭的两个成员 --CD4 和 T 细胞受体的免疫球蛋白可变区代替免疫球蛋白中的可变区 ;参见例如 Capon et al., Nature 337 :525-531, 1989, Traunecker et al., Nature 339 :68-70, 1989, Gascoigne et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 84 :2936-2940, 1987 和已公开欧洲申请 EP0 0325224A2。美国专利 5, 116, 964 (Capon et al., May 26, 1992), 通过引用结合于本文中, 描述了通常称为免疫粘附素的杂合免疫球蛋白, 其结合了例如配体结合伴侣的粘附性和靶向性与免疫球蛋白效应物功能。美国专利 5, 336, 603 (Capon et al., August 9, 1994), 通过引用结合于本文中, 描述了包含了融合蛋白质的异功能免疫粘附素 (immunoadhesion), 其中包含人 CD4 抗原可变 (V) 区的多肽在其 C- 末端稠合到包含免疫球蛋白链恒定区的多肽的 N- 末端, 所述免疫球蛋白链恒定区二硫键合到与之成对的、具有能结合预定抗原的抗体结合部位的免疫球蛋白重链 - 轻链对。

[0370] 免疫球蛋白的“组成部分”包括包含完整抗体的一部分优选所述完整抗体的抗原结合或可变区的抗体片段。抗体片段的实例包括 Fab、Fab¹、F(ab')₂ 和 Fv 片段 ;双链抗体 (diabody) ;线式抗体 (Zapata et al., Protein Eng. 8 (10) :1057-1062 (1995)) ;单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0371] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两种相同抗原结合片段, 称为“Fab”片段, 各自具有单一抗原结合部位和残留“Fc”片段, 命名反映了容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生 F(ab')₂ 片段, 所述片段具有两个抗原结合部位且仍能使抗原交联。

[0372] “Fv”是最小的抗体片段, 所述片段包含完整的抗原识别和结合部位。该区域由牢固、非共价结合的一个重链和一个轻链可变区的二聚体组成。是在这种构型中各可变区的

三个 CDR 相互作用来定义 V_H - V_L 二聚体表面上的抗原结合部位。总地来说,所述六个 CDR 赋予所述抗体抗原结合特异性。然而,即使单个可变区(或包含特别针对抗原的仅三个 CDR 的 Fv 的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力比整个结合部位低。

[0373] 所述 Fab 片段还包含轻链的恒定区和重链的第一恒定区(CH1)。Fab 片段通过在包含来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸的重链 CH1 区域的羧基末端加入了几个残基而不同于 Fab' 片段。Fab' -SH 是本文中 Fab¹ 的名称,其中恒定区的半胱氨酸残基具有自由巯基。F(ab')₂ 抗体片段最初作为 Fab' 片段对产生,所述 Fab' 片段对之间具有铰链半胱氨酸。其它抗体片段的化学偶合也是已知的。

[0374] 来源于任意脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”,根据它们恒定域的氨基酸序列,可被分成两个显然不同的类型的其中之一,这两个不同类型也称 kappa 和 lambda。

[0375] 免疫球蛋白根据它们重链恒定域的氨基酸序列,可被分成不同的类型。免疫球蛋白共有五种主要类型:IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, 并且其中一些还可进一步分成亚类(同种型),例如, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 和 IgA2。

[0376] “单链抗体”或“sFv”抗体片段包括抗体的所述 V_H 和 V_L 域,其中这些域为单个多肽链。优选地,该 Fv 多肽进一步包括在所述 V_H 和 V_L 域之间的一多肽连接子,该连接子可使所述 sFv 形成用于抗原结合的期望结构。关于 sFv 的综述,参见单克隆抗体药理学的 Pluckthun, 113 卷, Rosenburg 和 Moore eds., Springer-Verlag, 纽约, 269-315 页 (1994)。

[0377] 因此,将免疫球蛋白不同的组分与其它生物活性分子连接,可产生保留各个组分功能性的杂合分子。

[0378] 在一实施例中,本发明提供包括一个或多个免疫球蛋白组分的新的杂合分子。

[0379] 2) 细胞外蛋白质

[0380] 在其它情况下,细胞外蛋白质在多细胞生物体的形成、分化和维持中扮演着重要的角色。在 2004 年 4 月公布的美国专利(专利号为 No. 6, 723, 535, Ashkenazi 等)中描述的对感兴趣的不同的细胞内蛋白质进行的讨论,在这里也一并作为参考。

[0381] 多数单个细胞的命运,例如增殖、迁移、分化或与其它细胞反应,是典型地由接受的来自其它细胞和/或直接环境的信息所控制。该信息通常由分泌性多肽(例如促有丝分裂因子、存活因子、细胞毒性因子、分化因子、神经肽和激素)传递,这些分泌性多肽依次被不同的细胞受体或膜结合蛋白接受和翻译。这些分泌性多肽或信号分子通常通过细胞的分泌途径到达它们的细胞外环境的作用位点。

[0382] 分泌性蛋白质具有多种工业用途,包括如药物制剂、诊断学、生物传感器和生物反应器。目前大部分有效的蛋白质类药物,例如血栓溶解剂、干扰素、白介素、促红细胞生成素、集落刺激因子以及其它各种细胞活素,是分泌性蛋白质。它们的受体即膜蛋白,也是潜在的治疗药物或诊断用药。企业和学术界都在努力地去识别新的、天然的分泌性蛋白质。多数研究都集中在筛选哺乳动物重组 DNA 库,以识别构建合成新分泌蛋白质的编码序列。关于筛选方法以及技术的实例已有文献报道(参见,例如 Klein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93 :7108-7113 (1996); U. S. Patent No. 5, 536, 637)。

[0383] 膜结合蛋白以及受体,在其它情况下,可在多细胞生物体的形成、分化和维持扮演着重要的角色。多数单个细胞的命运,例如增殖、迁移、分化或与其它细胞反应,是典型地由

接受的来自其它细胞和 / 或直接环境的信息所控制。该信息通常由分泌性多肽 (例如促有丝分裂因子、存活因子、细胞毒性因子、分化因子、神经肽和激素) 传递, 这些分泌性多肽依次被不同的细胞受体或膜结合蛋白接受和翻译。这些膜结合蛋白和细胞受体包括但不限于细胞因子受体、受体激酶、受体磷酸酯酶、细胞间相互作用涉及的受体以及细胞粘附分子如选择蛋白和整合蛋白。例如, 调节细胞生长和分化的信号传递是由各种细胞蛋白质磷酸化部分调节。催化所述过程的蛋白酪氨酸激酶也可起生长因子受体的作用。具体例子包括纤维母细胞生长因子受体和神经生长因子受体。

[0384] 膜结合蛋白以及受体分子具有多种工业用途, 包括如药物制剂、诊断用药。例如免疫粘合物受体可用作治疗药物来阻断受体配体相互作用。所述膜结合蛋白也可用于筛选受体 / 配体相互作用相关的潜在的肽或小分子抑制剂。

[0385] 包括 EGF 和生长因子的肽的实施例

[0386] 表皮生长因子 (EGF) 是常规的促有丝分裂因子, 可刺激各种类型的细胞包括上皮细胞核成纤维细胞的增殖。EGF 结合并激活所述 EGF 受体 (EGFR), EGF 受体启动细胞内信号传递及产生连续的效应。除中枢神经系统的其它区域之外, EGFR 在大脑皮质、小脑和海马的神经元被表达。此外, EGF 也在中枢神经系统的各种区域被表达。因此, EGF 不仅作用于有丝分裂细胞, 而且也作用于有丝分裂期后的神经元。事实上, 多数研究表明 EGF 对中枢神经系统的各种神经元具有神经营养性或神经调节的作用。例如, EGF 直接作用于培养的大脑皮质和小脑的神经元, 促进轴突向外生长及提高存活率。另一方面, EGF 也通过神经胶质细胞直接作用于其它细胞类型, 包括隔区胆碱能神经元和中脑多巴胺能神经元。目前关于 EGF 对中枢神经系统神经元的作用的证据正在积累, 但其作用的机制实质上仍是未知。EGF 诱导的信号传递在有丝分裂细胞中比在有丝分裂期后的神经元重更易于理解。在对嗜铬细胞瘤 PC12 细胞和培养的大脑皮质神经元的研 究已表明 EGF 诱导的神经营养性作用是由应答 EGF 的 EGFR 及细胞分裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 的持续激活作用所介导。该持续细胞内的信号传递与 EGFR 下调的减少率有关, 这可能决定神经干细胞对 EGF 的应答。EGF 很可能是一种多潜能生长因子, 作用于包括有丝分裂细胞和有丝分裂期后神经元的各种细胞。

[0387] EGF 由消化道系统的唾液腺和十二指肠腺、肾脏、胰腺、甲状腺、脑垂体腺以及神经系统产生, 并且在体液例如唾液、血液、脑脊液 (CSF)、尿液、羊水、前列腺液胰液和母乳中被发现, Plata-Salaman, Peptides 12 :653-663(1991)。

[0388] EGF 由其膜特异性受体调节, 所述膜特异性受体包含有内在的酪氨酸激酶。Stoscheck 等, J. Cell Biochem. 31 :135-152(1986)。EGF 被认为是通过与其受体的细胞外部分结合而起作用, 这诱导产生一激活内在的酪氨酸激酶的跨膜信号。

[0389] 对 EGF 样结构域 (EGF-like domain) 提纯及序列分析的结果表明存在有六个保守的半胱氨酸残基, 它们交叉结合可产生三个肽环状结构, Savage 等, J. Biol. Chem. 248 :7669-7672(1979)。目前普遍已知若干个其它肽可与所述 EGF 受体发生反应, 这些肽共享同样的无显著特点的基序 $X_n CX_7 CX_{4/5} CX_{10} CXCX_5 GX_2 CX_n$, 其中 X 表示任意的非半胱氨酸, n 表示可变的重复数量。具有该基序的非离体的肽包括 TGF- α (TGF-alpha)、双向调节因子、神经鞘瘤源性生长因子 (SDGF)、肝素结合的 EGF 样生长因子以及一些病毒编码的肽 (例如, 痘苗病毒, Reisner, Nature 313 :801-803(1985), 纤维瘤病毒, Chang et al., Mol Cell Biol. 7 :535-540(1987), 传染性软疣 (Molluscum contagiosum), Porter

and Archard, *J. Gen. Virol.* 68 :673-682(1987), 以及粘液瘤病毒, Upton 等, *J. Virol.* 61 :1271-1275(1987), Prigent 和 Lemoine, *Prog. Growth Factor Res.* 4 :1-24(1992)。

[0390] EGF 样结构域不限于生长因子,还被观察到在许多种细胞表面及细胞外的蛋白质中,这些蛋白质在细胞粘附、蛋白质-蛋白质相互作用和发育方面具有令人感兴趣的性质, Laurence 和 Gusterson, *Tumor Biol.* 11 :229-261(1990)。这些蛋白质包括血液凝血因子(因子 VI、IX、X、XII, 蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、组织纤维蛋白溶酶原激活剂、尿激酶)、细胞外基质成分(层粘连蛋白、肌链抗原、内毒素)、细胞表面受体(低密度脂蛋白受体(LDL receptor)、血栓调节蛋白受体)以及免疫相关蛋白(补体 C1r、尿调节素)。

[0391] 甚至更有趣的是, EGF 样前体的一般结构形式通过低等有机体以及在哺乳动物细胞中被保持。许多具有进化重要性的基因已被鉴别在无脊椎动物中具有 EGF 样重复基因。例如,果蝇属 notch 基因编码 36 个串联排列的 40 个氨基酸重复,这显示了与 EGF 的同源性, Wharton 等, *Cell* 43 :557-581(1985)。亲水性图指出有一有争议的具有 EGF 相关序列的跨膜结构域被定位于膜的细胞外一侧。其它具有 EGF 样重复的同源异形基因包括基于 Notch 的用探针鉴定的 Delta、95F 和 5ZD, 以及线虫基因 Lin-12, 该线虫基因 Lin-12 编码一用于在两个特定细胞之间的进化的信号传递的有争议的受体。

[0392] 具体地, EGF 已被证明在胃肠粘膜的保护和维持以及急性和慢性粘膜损伤的修复方面, Konturek 等, *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* 7(10), 933-37(1995), 包括在治疗坏死性小肠结肠炎、佐林格-埃利森综合征(Zollinger-Ellison syndrome)、胃十二指肠溃疡和先天性微绒毛萎缩症方面具有潜力, Guglietta 和 Sullivan, *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* 7(10), 945-50(1995)。此外, EGF 与毛囊分化有关; du Cros, *J. Invest. Dermatol.* 101(1Suppl.), 106S-113S(1993), Hillier, *Clin. Endocrinol.* 33(4), 427-28(1990); 与肾脏功能有关, Hamm 等, *Semin. Nephrol.* 13(1) :109-15(1993), Harris, *Am. J. Kidney Dis.* 17(6) :627-30(1991); 与泪液有关, van Setten 等, *Int. Ophthalmol* 15(6) :359-62(1991); 维生素 K 介导的血液凝固有关, Stenflo 等, *Blood* 78(7) :1637-51(1991)。EGF 也与各种皮肤疾病有关,所述皮肤疾病具有的特征包括异常的角质化细胞分化(例如银屑病)、上皮癌例如肺鳞状上皮细胞癌、外阴表皮样癌以及神经胶质瘤。King 等, *Am. J. Med. Sci.* 296 :154-158(1988)。

[0393] 更大的兴趣是,生长因子信号传递途径的基因改变的封片证据与进化异常和慢性疾病包括癌症是紧密关联的。Aaronson, *Science* 254 :1146-1153(1991)。例如, c-erb-2(又称 HER-2), 是一具有类似于 EGF 受体蛋白的相近结构的原癌基因, 其在人乳腺癌中被过度表达。King 等, *Science* 229 :974-976(1985); Gullick, 激素和它们的作用, Cooke 等, eds, Amsterdam, Elsevier, pp 349-360(1986)。

[0394] 生长因子是分子信号或介质,其通过结合特异细胞表面受体单独或协同地促进细胞生长或增殖。然而,在生长因子表达上存在有其它细胞反应而不仅是生长。因此,生长因子更好的表现作为多功能的有效的细胞调节器的特征。它们的生物效应包括增殖、趋化性和细胞外基质产生的刺激作用。生长因子可同时具有刺激和抑制效应。例如,转化生长因子(TGF- β)是高度多效的,可刺激一些细胞增殖,尤其是结缔组织,然而在其它的细胞例如淋巴细胞核上皮细胞中却是有效的增殖抑制剂。

[0395] 生长因子的生长刺激或抑制的生理效应取决于靶组织的发育和分化状况。由经典

的内分泌物分子调节局部细胞的机制包括综合自分泌途径（相同细胞）、近分泌途径（邻近细胞）和旁分泌途径（周围细胞）。肽生长因子是一复杂的生物学语言元素，为细胞间通讯系统提供基础。它们允许细胞相互间传递信息、调节细胞间相互作用以及改变基因表达。这些多功能的多向性的因子的效应取决于其它肽的存在或缺失。

[0396] FGF-8 是成纤维细胞生长因子 (FGFs) 的成员之一，该 FGFs 是对正常的二倍体成纤维细胞和建立的细胞株的肝素结合的、有效的促有丝分裂剂家族，Gospodarowicz 等 (1984), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81 :6963。该 FGF 家族包括酸性 FGF (FGF-1)、碱性 FGF (FGF-2)、INT-2 (FGF-3)、K-FGF/HST (FGF-4)、FGF-5、FGF-6、KGF (FGF-7)、AIGF (FGF-8) 等。所有 FGFs 具有两个保守的半胱氨酸残基以及在氨基酸水平上共享 30-50% 序列同源性。这些因子对正常的二倍体中胚层源性和神经嵴源性细胞是促有丝分裂的，包括颗粒细胞、肾上腺皮层细胞、软骨细胞、成肌细胞、角膜和血管内皮细胞（牛或人的）、血管平滑肌细胞、晶状体、视网膜和前列腺上皮细胞、少突神经胶质细胞、星形胶质细胞、chondrocytes、成肌细胞和成骨细胞。

[0397] 成纤维细胞生长因子也可以非促有丝分裂的方式刺激大量的细胞种类。这些活动包括促进细胞在伤口区域内迁移（趋化性）、启动新的血管形成（血管发生）、调节神经再生和存活（神经营养）、调节内分泌功能，及刺激或抑制表达特异细胞蛋白、细胞外基质产生和细胞存活。Baird&Bohlen, *Handbook of Exp. Pharmacol.* 95(1) :369418, Springer, (1990)。这些性质为采用成纤维细胞因子加速伤口愈合、神经修复、侧血管形成等的治疗方法提供了基础。例如，成纤维细胞生长因子被建议用于使心脏病和外科手术中心肌膜损伤降到最低 (U. S. Pat. No. 4, 378, 347)。

[0398] FGF-8, 又名雄激素诱导的生长因子 (AIGF), 是含有 215 个氨基酸的蛋白质，与 FGF 家族的其它成员共享 30-40% 的序列同源性。FGF-8 已被提出在小鼠乳房癌细胞系 SC3 中减少促成雄性性状的调节和诱导作用。Tanaka 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 8928-8932(1992) ;Sato 等, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 47 :91-98(1993)。因此，FGF-8 可能在前列腺（已知是雄激素 - 应答的器官）具有局部作用。FGF-8 也可是致癌的，因为当它被转染入 NIH-3T3 成纤维细胞时表现出转化活性。Kouhara 等, *Oncogene* 9455462(1994)。当 FGF-8 已被检测存在于心脏、脑、肺、肾脏、睾丸、前列腺及卵巢时，在缺失外源性雄激素时也检测到表达。Schmitt 等, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 57(34) : 173-78(1996)。

[0399] FGF-8 与若干其它 FGFs 共享在鼠的胚胎发生的多种阶段被表达的性质，这证明了所述理论即不同的 FGFs 在分化和胚胎发生时具有多重的和可能协调的作用。然而，FGF-8 也被证明在乳房肿瘤发生过程中作为与 Wnt-1 合作的原癌基因。(Shackelford 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 740-744(1993) ;Heikinheimo 等, *Mech. Dev.* 48 :129-138(1994))。

[0400] 与其它 FGFs 不同，由于前转录物的选择剪接，FGF-8 存在有三种蛋白质异形体。Tanaka 等, *supra*。正常成人的 FGF-8 表达不强，并且受限性腺组织，然而 northern 印迹分析表明 FGF-8 mRNA 从 10 天一直到 12 天或鼠的妊娠期都存在，这暗示着 FGF-8 对于正常发育是重要的。Heikinheimo 等, *Mech Dev.* 48(2) :129-38(1994)。在妊娠期 8 天到 16 天之间的原位杂交进一步指出了在第一个鳃弓、额鼻突、前脑以及中脑 - 后脑接合处的表面外胚层的最初的表达。在 10-12 天，FGF-8 在前肢和后肢芽、鼻和鼻咽、漏斗状器官以及端

脑、间脑和后脑的表面外胚层表达。在发育的后肢的表达持续直到妊娠期的 13 天,但在此之后未被检测到。这些结果表明 FGF-8 在胚胎发生具有唯一的时间和空间模式,还表示了其在原肠胚形成后胚胎的外胚层分化的多重结构域中具有生长因子的作用。

[0401] TGF- β (TGF-beta) 超基因家族或仅是 TGF- β 超家族,是一群分泌性蛋白质,包括大量的相关的生长和分化因子在所有门的实际表达。超家族成员结合特异细胞表面受体,激活信号转导机制以引起它们的多功能细胞因子效应。Kolodziejczyk 和 Hall, *Biochem. Cell. Biol.*, 74 :299-314(1996); Attisano 和 Wrana, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 7 :327-339(1996); 以及 Hill, *Cellular Signaling*, 8 :533-544(1996)。

[0402] 该家族的成员包括五种不同 TGF- β 形式 (Sporn 和 Roberts, in *Peptide Growth Factors and Their Receptors*, Sporn 和 Roberts, eds. (Springer-Verlag: Berlin, 1990) pp. 419-472) 以及分化因子 vgl (Weeks 和 Melton, *Cell*, 51 :861-867(1987)) 和 DPP-C 多肽 (Padgett 等, *Nature*, 325 :81-84(1987))、激素激活素和抑制素 (Mason 等, *Nature* 318-659-663(1985); Mason 等, *Growth Factors*, 1 :77-88(1987))、缪勒氏管抑制物 (MIS) (Cate 等, *Cell*, 45 :685-698(1986))、骨形成蛋白 (BMPs) (Wozney 等, *Science*, 242 :1528-1534(1988); PCTWO 88/00205 published Jan. 14, 1988; U. S. Pat. No. 4, 877, 864 issued Oct. 31, 1989)、发育调节蛋白 Vgr-1 (Lyons 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86 :45544558(1989)) 和 Vgr-2 (Jones 等, *Molec. Endocrinol.*, 6 :1961-1968(1992))、小鼠生长分化因子 (GDF) 例如 GDF-3 和 GDF-9 (Kingsley, *Genes Dev.*, 8 :133-146(1994); McPherron 和 Lee, *J. Biol. Chem.*, 268 :3444-3449(1993))、小鼠 lefty/Stral (Meno 等, *Nature*, 381 :151-155(1996); Bouillet 等, *Dev. Biol.*, 170 :420-433(1995))、神经胶质细胞株源性神经营养因子 (GDNF) (Lin 等, *Science*, 260 :1130-1132(1993)) 神经营养因子 (Kotzbauer et al., *Nature*, 384 :467-470(1996)) 以及子宫内膜出血相关因子 (EBAF) (Kothapalli 等, *J. Clin. Invest.*, 99 :2342-2350(1997))。BMP-2A 和 BMP-2B 亚型与 DPP-C 的序列同源性为 75%, 并可代表所述蛋白质的哺乳动物同等物。

[0403] TGF- β 超家族蛋白是二硫键连接的同二聚体或异二聚体,由较大的前体多肽链编码,该前体多肽链包含有一疏水信号序列、一几百个氨基酸的长的相对不保守的 N-末端前 (pro) 结构域、一切割位点 (通常是多元的) 以及一短的更高保守的 C-末端结构域。该 C-末端结构域对应于处理的成熟蛋白质,并包含有近似 100 个氨基酸,所述氨基酸具有特征性的半胱氨酸模体,例如保持有在所有已知的家族成员中 TGF- β 的九个半胱氨酸残基中的七个。虽然在成熟的和前结构域之间的所述切割位点的位置在家族成员中变化,但是所有蛋白质的 C-末端是在相同的位置上,并以 Cys-X-Cys-X 序列结尾,但是在每一种实例中都与 TGF- β 一致的 C-末端 Cys-Lys-Cys-Ser 的不同。Sporn 和 Roberts, 1990, supra。

[0404] 目前至少有五种形式的 TGF- β 被鉴定: TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 和 TGF- β 5。TGF- β 1 的激活型是同型二聚体,由一 390 个氨基酸前体的羧基末端 112 个氨基酸二聚作用形成。重组体 TGF- β 1 已被克隆 (Derynck 等, *Nature*, 316 :701-705(1985)) 并在中国仓鼠卵巢细胞表达 (Gentry 等, *Mol. Cell. Biol.* 7 :3418-3427(1987))。此外,重组体人 TGF- β 2 (deMartin 等, *EMBO J.*, 6 :3673(1987)) 以及人和猪的 TGF- β 3 (Derynck 等, *EMBO J.*, 7 :3737-3743(1988); ten Dijke 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 :4715(1988)) 已被克隆。TGF- β 2 具有一 414 个氨基酸的前体形式,也被从羧基末端 112 个氨基酸处

理成一同型二聚体,该二聚体与 TGF- β 1 的激活型的同源性为近似 70% (Marquardt 等, J. Biol. Chem., 262 :12127(1987))。参见 EP200,341 ;169,016 ;268,561 ; 和 267,463 ; U. S. Pat. No. 4,774,322 ;Cheifetz 等, Cell, 48 :409-415(1987) ;Jakowlew 等, Molecular Endocrin., 2 :747-755(1988) ;Derynck 等, J. Biol. Chem., 261 :4377-4379(1986) ; Sharpies 等, DNA, 6 :239-244(1987) ;Derynck 等, Nucl. Acids. Res., 15 :3188-3189(1987) ; Derynck 等, Nucl. Acids. Res. 15 :3187(1987) ;Seyedin 等, J. Biol. Chem., 261 :5693-5695(1986) ;Madisen 等, DNA 7 :1-8(1988) ; 和 Hanks 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.), 85 :79-82(1988)。

[0405] TGF- β 4 和 TGF- β 5 被分别从鸡的软骨细胞 cDNA 库 (Jakowlew 等, Molec. Endocrinol., 2 :1186-1195(1988)) 和蛙卵母细胞 cDNA 库中克隆。

[0406] TGF- β 的前结构域与成熟 TGF- β 二聚体非共价结合 (Wakefield 等, J. Biol. Chem., 263 :7646-7654(1988) ;Wakefield 等, Growth Factors, 1 :203-218(1989)), 且该前结构域被发现对于 TGF- β 和激活素的活化的成熟二聚体的正确折叠和分泌是必需的 (Gray 和 Mason, Science, 247 :1328-1330(1990))。TGF- β 的成熟结构域和前结构域之间的结合掩盖了成熟二聚体的生物活性,导致形成一无活性的潜伏态。潜伏态不是 TGF- β 超家族的常态,因为所述前结构域的存在对激活素或抑制素的生物活性无影响。

[0407] TGF- β 超家族蛋白质形式的生物学统一特征是它们能够调节发育过程。有研究已表明 TGF- β 对普遍各种正常细胞和赘生性细胞具有众多的调节作用。TGF- β 是多功能的,因为它可以刺激或抑制细胞增殖、分化和细胞功能中的其它关键过程 (Sporn 和 Roberts, supra)。

[0408] TGF- β 超家族的一个成员, EBAF, 仅在晚期分泌阶段和异常子宫内膜出血期间在子宫内膜表达。Kothapalli 等, J. Clin. Invest., 99 :2342-2350(1997)。人子宫内膜是独特的因为他是机体唯一的每隔一定间隔时间出血的组织。此外异常子宫出血妇科疾病最常见的症状,也是子宫切除术的主要的适应症。原位杂交显示 EBAF 的 mRNA 在间质表达,而在子宫内膜腺体或上皮细胞没有显著的 mRNA 表达。

[0409] EBAF 预测的蛋白质序列显示与小鼠 TGF- β 超家族的 lefty/stra3 编码的蛋白质具有极高的同源性。一模体调查显示预测的 EBAF 蛋白包含大部分的半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基在 TGF- β - 相关的蛋白质中是保守的,也是形成半胱氨酸结结构所必需的。该 EBAF 保函一额外的半胱氨酸残基、第一保守的半胱氨酸残基上游的 12 个氨基酸。已知含有额外半胱氨酸残基的唯一其它的家族成员是 TGF-betas、抑制素和 GDF-3。EBAF 与 LEFTY、GDF-3/Vgr2 及 GDF-9 相似,缺少所述已知能形成分子间二硫链的半胱氨酸残基。因此,EBAF 看来是 TGF- β 超家族的额外成员,具有不成对的半胱氨酸残基,且可能不以二聚体形式存在。然而,在所述两个单体亚基之间的疏水接触可以促进二聚体形成。荧光原位杂交显示 ebafe 基因被定位在人染色体 1 带 q42.1 (1 at band q42.1)。

[0410] 上述细胞外蛋白质的进一步实例已为本领域技术人员所熟知,例如参见 U. S. Patent No. 6,723,535。

[0411] 结合物

[0412] 本发明也涉及对称粘附素 / 免疫对称粘附素 (symmetroadhesins / immunosymmetroadhesins) 的结合物。因此该组合物可结合一细胞毒素剂例如一化学治疗

药物、毒素（例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素，或其片段）或一放射性同位素（例如一放射性结合物）。

[0413] 本领域已熟知化学治疗药物有利于产生上述免疫交联物。可被使用的酶活性毒素和其片段包括白喉 A 链、白喉毒素的未结合活性片段、外毒素 A 链（来源于绿脓杆菌）、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -八叠球菌（alpha-sarcin）、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白（PAPI、PAPH 和 PAP-S）、苦瓜抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、sapaonaria officinalis 抑制剂、白树毒素、米托洁林（mitogellin）、局限曲菌素、依诺霉素及新月毒素（trichothecenes）。许多种放射性核素可用于制备放射结合的抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{113}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0414] 包括细胞毒素剂的本发明所述的组合物的交联物是采用多种双功能蛋白偶联剂制备，所述多种双功能蛋白偶联剂为例如 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯（SPDP）、亚氨基硫醇（iminothiolane）（IT）、亚氨酸酯的双功能衍生物（例如二亚胺代己二酸二甲酯盐酸盐（dimethyl adipimidate HCL）、活性酯（例如辛二酸双琥珀酰亚胺酯（disuccinimidylsuberate）、醛（例如戊二醛（glutareldehyde）、双叠氮基化合物（例如双-(间-叠氮基苯甲酰基)己二胺（bis(p-azidobenzoyl)hexanediamine）、双重氨基衍生物（例如双-(间-重氮基苯甲酰基)-乙烯双胺（bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine）、二异氰酸酯（例如 2,6-二异氰酸根合甲苯（tolylene 2,6-diisocyanate）以及双活性氟化合物（例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯）。例如，蓖麻毒素免疫毒素可如 Vitetta 等，Science, 238:1098(1987) 中所描述的方法制备。14C 标记的 1-异硫氰酸根合苯甲基-3-甲基二乙烯基三胺五醋酸（MX-DTPA）一可示范的络合剂用于放射性核素与所述抗体结合。参见 W094111026。

[0415] 遗传装置的合成

[0416] 这里所述的遗传装置可通过各种途径合成。一个特定的途径是通过重组体 DNA 技术体内合成组件，然后对分泌的或获得的产品在条件下进行化学改性，以形成所述化合物。备选的途径包括固相合成。

[0417] 总的技术

[0418] 说明书下文主要是涉及一段连续氨基酸或感兴趣多肽的制备，其是通过培养由包含一编码核苷酸的载体转化或转染的细胞。当然，人们也期望本领域所熟知的备选的方法可以被采用。例如，所述氨基酸序列或其蛋白质可通过采用固相技术直接肽合成来制备（参见，例如 Stewart 等，Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, Calif. (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc, 85:2149-2154(1963)）。体外蛋白质合成可采用手工技术活自动化技术。自动化合成可通过，采用例如实用的生物肽合成仪（Foster City, Calif.）采用制造者指令（manufacturer's instructions）来实现。一段连续氨基酸或感兴趣多肽的不同部分可通过单独化学合成和通过组合采用化学或酶法，来制备一段连续氨基酸或感兴趣多肽的。

[0419] 1、分离 DNA 编码的一段连续氨基酸或感兴趣多肽的

[0420] 从由组织制备的 cDNA 库获得的编码 DNA 可被认为具有感兴趣 mRNA 并在可探测水平表达。因此，人 DNA 可方便地从由人组织等制备的 cDNA 库获得。一编码基因也可从一基因组库获得或由已知的合成方法制备得到（例如自动化的核苷酸合成）。

[0421] 库可用被设计用于鉴定感兴趣基因或由其编码的蛋白质的探针筛选（例如抗体对该段连续氨基酸或至少月 20-80 个碱基的寡核苷酸）。用选择的探针筛选所述 cDNA 或基因组库用标准程序引导，所述标准程序是例如 Sambrook 等，分子克隆：实验指南中所描述的方法（New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）。分离该编码基因的备选方法是采用 PCR 方法（Sambrook 等, *supra*; Dieffenbach 等, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)）。

[0422] 选择作为探针的寡核苷酸序列应具有足够的长度和足够明确即假阳性被减到最小。所述寡核苷酸优选被标记以致于它可在与库中被筛选的 DNA 杂交时被检测出。标记的方法是本领域所熟知的方法，包括使用放射标记物如 ^{32}P - 标记的 ATP、生物素酰化或酶的标记。杂交条件，包括适度严密和高度严密（*moderate stringency and high stringency*），是由 Sambrook 等 *supra* 提供。

[0423] 在所述库筛选方法鉴别的序列可由其它已知的序列比较和校准，这些已知序列储存在公共的数据库例如 GenBank 或其它私人序列数据库并可以取得。在所述分子或跨过整个序列的确定区域内的序列鉴别可由本领域已知方法检测，且的确如这里所述。

[0424] 具有蛋白质编码序列的核苷酸可通过筛选选择的 cDNA 或基因组库获得，采用这里首次揭示的推导的氨基酸序列以及（如果必需的话）采用如 Sambrook 等在 *supra* 所描述的常规的引物延伸方法来检测前体和可能未被逆转录成 cDNA 的 mRNA 加工中间体。

[0425] 2、宿主细胞的选择和转化

[0426] 用这里所述的表达或克隆载体转染或转化宿主细胞以用于制备生产，然后在常规的培养基中培养修饰使得适合用于产生诱导作用的启动子、选择转化体或扩增编码期望序列的基因。培养条件例如培养基、温度、pH 等，可由本领域技术人员在不需做过多的实验情况下就能进行选择。一般而言，用于细胞培养产率最大化的原理、实验设计和实践技术可参见哺乳动物细胞生物工程：应用技术，M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook 等, *supra*。

[0427] 本领域普通技术人员已熟知真核细胞转染和原核细胞转化的方法，例如 CaCl_2 、 CaPO_4 脂质体 - 介导的和电穿孔术。根据所使用的宿主细胞，采用适于该种稀薄啊的标准技术来进行转化。采用氯化钙的钙处理（如 Sambrook 等, *supra* 所述）或电穿孔术通常用于原核生物。根瘤土壤杆菌感染用于一些植物细胞转化，参见 Shaw 等, *Gene*, 23 :315 (1983) 和 WO 89/05859 published Jun. 29, 1989。对于没有上述细胞壁的哺乳动物细胞，可采用磷酸钙沉淀方法，参见 Graham and van der Eb, *Virology*, 52 :456-457 (1978)。哺乳动物细胞宿主系统转染的总的方面已在 U. S. Patent No. 4, 399, 216 中描述。酵母菌的转化是典型地按照 Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130 :946 (1977) 和 Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76 :3829 (1979) 所述的方法执行。然而，也可采用其它用于将 DNA 引入细胞的方法，例如通过核显微注射法、电穿孔术、细菌原生质体融合完整细胞或多聚阳离子例如 1,5- 二甲基 -1,5- 二氮十一亚甲基聚甲溴化物 (polybrene)、多鸟氨酸。对于转化哺乳动物细胞的各种技术，参见 Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185 :527-537 (1990) 和 Mansour et al., *Nature*, 336 :348-352 (1988)。

[0428] 这里合适的用于克隆或表达载体中 DNA 的宿主细胞包括原核生物、酵母或高等真核生物。适合的原核生物包括但不限于真杆菌，例如革兰氏阴性或革兰氏阳性有机体例如

肠杆菌科如 *E. coli*。各种 *E. coli* 菌株可公开获得,例如 *E. coli* K12 菌株 MM294(ATCC 31, 446);*E. coli*X1776(ATCC 31,537);*E. coli* 菌株 W3110(ATCC 27,325) 和 K5772(ATCC 53, 635)。其它合适的原核宿主细胞包括肠杆菌科如埃希杆菌属(例如 *E. coli*)、肠道细菌属、欧文菌属、克雷白杆菌属、变形菌、沙门氏菌(例如鼠伤寒沙门氏菌)、沙雷氏菌属(例如粘质沙雷氏菌)和志贺氏杆菌属,以及芽孢杆菌(例如枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌(例如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD 266,710 所述的地衣芽孢杆菌 41P))、假单胞菌属(例如绿脓杆菌)和链霉菌属。这些实例是作为举例说明而并不是限制。W3110 菌株是一尤其首选的宿主或母体宿主,因为它是用于重组 DNA 产物发酵的常用宿主菌株。优选地,所述宿主细胞分泌最小量的蛋白水解酶。例如,W3110 菌株可被修饰用于使宿主内源性的基因编码蛋白发生遗传突变,所述宿主的实例包括 *E. coli* W3110 菌株 1A2(其具有完整的基因型 tonA);*E. coli* W3110 菌株 9E4(其具有完整的基因型 tonA ptr3);*E. coli* W3110 菌株 27C7(ATCC 55,244)(其具有完整的基因型 tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan. sup. r);*E. coli* W3110 菌株 40B4(是具有非卡那霉素耐受 degP 缺失突变的君主 37D6);和如 1990 年 8 月 7 日出版的 U. S. Patent No. 4, 946, 783 所述的具有胞质蛋白酶突变体的 *E. coli* 菌株。备选地,体外克隆例如 PCR 或其它核苷酸聚合酶反应是合适的。

[0429] 除了原核生物之外,真核微生物如丝状真菌或酵母对编码的载体来说是适合的克隆或表达宿主。酿酒酵母是一常用的低等真核宿主微生物。其它的包括裂殖酵母属(Beach and Nurse, Nature, 290:140(1981);EP 139,383 published May 2, 1985);克鲁维酵母属(U. S. Pat. No. 4, 943, 529;Fleer 等, Bio/Technology, 9:968-975(1991))例如 *K. lactis*(MW98-8C, CBS683, CBS4574;Lourencourt et al., J. Bacteriol., 737(1983))、*K. fragilis*(ATCC 12,424)、*K. wickerhamii*(ATCC 24,178)、*K. waltii*(ATCC 56,500)、*K. drosophilum*(ATCC 36,906;Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135(1990))、*K. thermotolerans* 和 *K. marxianus*;耶氏酵母(EP 402,226);*Pichia pastoris*(毕赤酵母属)(EP 183,070;Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278(1988));念珠菌属;里氏木霉(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234);粗糙链孢霉(Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263(1979));*Schwanniomyces* 例如 *Schwanniomyces occidentalis*(EP 394,538 published Oct. 31, 1990);和丝状真菌例如 *A. nidulans*(Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289(1983);Tilburn et al., Gene, 26:205-221(1983);Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474(1984)) 和 *A. niger*(Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475479(1985))。在这里甲醇酵母(Methylotropic yeasts)是适用的,并包括但不限于能在甲醇上生长的酵母,这些酵母选自下列属包括汉森氏酵母属、念珠菌属、克勒克酵母属、毕赤酵母属、酵母菌、球拟酵母菌属和红酵母属。该类酵母中可作模范的一系列特定种类可参见 C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269(1982)。

[0430] 用于表达糖基化的连续氨基酸或感兴趣多肽的合适的宿主细胞从多细胞生物体获得。无脊椎动物细胞的实例包括昆虫细胞(例如果蝇属 S2 和 *Spodoptera Sf9*) 以及植物细胞。有用的哺乳动物宿主细胞株实例包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和 COS 细胞。更多具体的实例包括猿猴病毒 40(SV40)转化的猴子肾 CV1 株(COS-7, ATCC CRL 1651);人类胚胎肾株(293 或 293 细胞亚克隆用于在悬浮培养中生长, Graham et al., J. Gen Virol.,

36 :59(1977)) ;中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR(CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :4216(1980)) ;鼠塞尔托利细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. , 23 :243-251(1980)) ;人肺细胞 (W138, ATCC CCL75) ;人肝细胞 (Hep G2, HB 8065) ;和小鼠乳房肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51)。适当的宿主细胞的选择被认为是属于本领域技术。

[0431] 3、可复制载体的选择和利用

[0432] 编码所述多段连续氨基酸或感兴趣多肽的核苷酸 (例如 cDNA 或基因组 DNA) 可被出入一可复制载体用于克隆 (DNA 扩增) 或表达。各种载体可公开获得。所述载体可以, 例如, 是质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体。所述适当的核苷酸序列可通过多种方法被插入所述载体。一般而言, 可采用本领域已知技术将 DNA 插入一适当的限制性内切核酸酶位点。载体组分一般包括但不限于一段或多段信号序列、一复制起点、一段或多段标记基因、一增强子元件、一启动子和一转录终止序列。构建包含一段或多段这些组分的适当的载体可采用本领域技术人员已知的标准连接技术。

[0433] 所述连续氨基酸或感兴趣多肽不但可以直接重组制备, 而且也可作为一融合多肽, 所述融合多肽具有一可以是一信号序列的异源多肽或其它具有一位于所述成熟蛋白质或多肽的 N-末端的特定切割位点的多肽。一般而言, 所述信号序列可以是所述载体的组分, 或者是插入所述载体的编码 DNA 的一部分。所述信号序列可以是一原核信号序列, 该序列选自例如下列组包括碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp 或耐热肠毒素 II 前导 (leaders)。对于酵母分泌的所述信号序列可以是例如所述酵母转化酶前导、 α 因子前导 (包括酵母菌和克鲁维酵母属 α 因子前导, 后者参见 U. S. Pat. No. 5, 010, 182)、或酸性磷酸酯酶前导、白色念珠菌葡萄糖淀粉酶前导 (*C. albicans* glucoamylase leader) (1990 年 4 月 4 日出版的 EP 362, 179)、或如 1990 年 11 月 15 日出版的 WO 90/13646 中所述的信号。对于哺乳动物细胞表达, 哺乳动物的信号序列可被用于直接分泌所述蛋白质, 例如来源于分泌的相同种类或相关种类的多肽的信号序列, 以及病毒分泌前导 (secretory leaders)。

[0434] 表达和克隆用载体都包含有一可使所述载体在一种或多种选择的宿主细胞复制的核苷酸序列。对于各种细菌、酵母和病毒, 该序列已熟知。质粒 pBR322 的复制起点适合于大多数革兰氏阴性菌, 所述 2 μ 质粒起点适合于酵母, 以及各种病毒起点 (猿猴病毒 40 (SV40)、多瘤、腺病毒、水泡性口炎病毒或牛乳头状瘤病毒) 对在哺乳动物细胞内的克隆载体是有用的。

[0435] 表达和克隆用载体将典型地包括一选择基因 (也称可选标记)。典型的选择基因编码蛋白质, 即 (a) 给予对抗生素或其它毒素例如氨苄西林、新霉素、甲氨喋呤或四环素的耐药性、(b) 补充营养缺陷型的不足 (complement auxotrophic deficiencies)、或 (c) 供给复合培养基所述没有的关键营养素, 例如芽胞杆菌属的基因编码 D-丙氨酸消旋酶。

[0436] 对合适的哺乳动物细胞可选标记的实例, 是那些可使细胞感受态的鉴定吸收所述编码核苷酸例如 DHFR 或胸苷激酶的实例。当采用野生型 DHFR 时, 适当的宿主细胞为所述缺乏 DHFR 活性的 CHO 细胞株, 并如 Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :4216(1980) 所述的方法制备和增殖。用于酵母的适合的选择基因是存在于酵母质粒 YRp7 的所述 trp1 基因 (Stinchcomb et al., Nature, 282 :39(1979) ;Kingsman et al., Gene, 7 :141(1979) ;Tschemper et al., Gene, 10 :157(1980))。所述 trp1 基因给缺乏生长色氨酸能力的酵母突变株提供一可选标记, 例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1 (Jones, Genetics, 85 :12(1977))。

[0437] 表达和克隆用载体通常包括一可连接所述编码核苷酸序列的启动子以直接合成 mRNA。已知启动子被多种可能的宿主细胞所识别。原核宿主适用的启动子包括所述 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统 (Chang et al., *Nature*, 275 :615(1978) ;Goeddel et al., *Nature*, 281 :544(1979))、碱性磷酸酶、色氨酸 (trp) 启动子系统 (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8 :4057(1980) ;EP 36, 776) 和杂合启动子例如 tac 启动子 (deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 :21-25(1983))。细菌系统适用的启动子也将包括可连接所述编码 DNA 的一核糖体结合位点 (Shine-Dalgarno) (S. D.) 序列。

[0438] 用于酵母宿主的合适的启动序列的实例包括启动子, 所述启动子适用于 3-磷酸甘油酸酯激酶 (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255 :2073(1980)) 或其它糖酵解酶 (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Re. g.*, 7 :149(1968) ;Holland, *Biochemistry*, 17 :4900(1978)) 例如烯醇化酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、果糖磷酸激酶、6-磷酸葡萄糖异构酶、磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶。

[0439] 其它酵母启动子, 是具有由生长条件控制的转录的额外优点的诱导型启动子, 它是醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酯酶、氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、3-磷酸甘油醛脱氢酶和负责利用麦芽糖及半乳糖的酶的启动子区。用于酵母表达的适合的载体和启动子在 EP73, 657 中进一步描述。

[0440] 哺乳动物宿主细胞中的载体转录是由, 例如, 从病毒 (例如多瘤病毒、鸡痘病毒 (UK2, 211, 504 published Jul. 5, 1989)、腺病毒 (例如腺病毒 2)、牛乳头状瘤病毒、鸟类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒 40 (Simian Virus 40) (SV40)) 的基因组获得的启动子、异源哺乳动物启动子 (例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子) 和热休克启动子所控制, 条件是所述启动子适合于所述宿主细胞系统。

[0441] 由更高等真核生物的编码所述多段连续氨基酸或感兴趣多肽的 DNA 的转录可通过在所述载体插入一增强子序列来增强。增强子是 DNA 的顺式作用元件, 通常大约为 10 到 300bp, 其作用于启动子以增强它的转录。目前已知多数哺乳动物基因 (珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 α 胎儿蛋白和胰岛素) 的增强子序列。然而典型地, 一将采用来源于真核细胞病毒的增强子。实例包括所述位于复制起点 (bp100-270) 近侧的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起点近侧的多瘤增强子和腺病毒增强子。所述增强子可被拼接入所述载体的编码序列的 5' or 3' 位置, 但优选定位于靠近启动子的 5' 位置。

[0442] 用于真核生物宿主细胞 (酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人类或其它多细胞有机体的有核细胞) 的表达载体也将包含对转录终止和 mRNA 稳定所必需的序列。所述序列一般来自 5' 端 (偶尔来自 3' 端) 和真核生物或病毒 DNAs 或 cDNAs 的非翻译区。这些区包括转录的核苷酸片段, 例如编码所述多段连续氨基酸或感兴趣多肽的 mRNA 的非翻译部分的多聚腺苷酸片段。

[0443] 然而适于在重组体脊椎动物细胞培养中合成所述多段连续氨基酸或多肽的适合的其它方法、载体和宿主细胞在 Gething et al., *Nature* 293 :620-625(1981) ;Mantei et al., *Nature*, 281 :4046(1979) ;EP117, 060 ;和 EP 117, 058 中已有描述。

[0444] 4、检测基因扩增 / 表达

[0445] 基于这里所提供的所述序列, 在一样本里基因扩增和 / 或表达可通过, 例如传统

的 Southern 印迹、用于定量 mRNA 转录的 Northern 印迹 (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :5201-5205 (1980))、斑点印迹 (DNA 分析) 或原位杂交并采用一适当的标记的探针来直接测定。备选地, 抗体可采用能识别特异的二倍体包括 DNA 双链体、RNA 双链体和 DNA-RNA 杂交双链体或 DNA-蛋白质双链体。所述抗体可被依次标记且当所述双链体被结合到表面时可执行试验, 以便紧接着在表面的双链体形成后, 可检测出结合所述双链体的抗体的存在。

[0446] 备选地, 基因表达可由免疫方法 (例如细胞或组织切片的免疫组织化学染色法和细胞培养方法或体液方法) 测定, 以直接定量基因产物的表达。用于免疫组织化学染色法和 / 或样本液体试验的抗体可以是单克隆的或多克隆的, 并且可以被任意哺乳动物制备。所述抗体可被方便地制备成对抗一天然序列多段连续氨基酸或感兴趣多肽, 或对抗一基于这里所提供的 DNA 序列的合成肽, 或对抗与编码一段连续氨基酸或感兴趣多肽和编码一特定抗体表位的 DNA 融合的外源性序列。

[0447] 5、多肽的提纯

[0448] 所述多段连续氨基酸或感兴趣多肽的结构可从培养基或宿主细胞溶胞产物中恢复。如果膜结合, 可采用一合适的去污剂溶液 (例如 Triton-X 100) 或酶法分析产物使它从所述膜释放。在表达所述多段连续氨基酸或感兴趣多肽时采用的细胞可采用各种物理或化学方法 (例如冷冻-融化循环、声裂法、机械破碎或细胞溶解试剂) 断裂。

[0449] 人们希望从重组体细胞蛋白或多肽提纯所述多段连续氨基酸或感兴趣多肽。下列方法是可作模范的适当的提纯方法: 在离子交换柱上分级分离; 乙醇沉淀; 反相高压液相层析; 二氧化硅层析或阳离子交换树脂 (例如 DEAE) 层析; 色谱聚焦; SDS-PAGE; 硫酸铵沉淀; 凝胶过滤 (采用例如葡聚糖凝胶 G-75); A 蛋白凝胶柱以除去污染物 (例如 IgG); 和金属螯合物柱以结合已附加表位的结构。可采用各种不同的蛋白质提纯的方法, 且所述方法已被本领域所熟知, 并在 Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982) 中举例描述。该选择的提纯步骤将依赖于, 例如, 所采用的制备方法的特点和和制备的所述特定的多段连续氨基酸或感兴趣多肽的特点。

[0450] 在 *E. coli* 中表达所述段连续氨基酸或感兴趣多肽成分的实施例

[0451] 编码所期望的感兴趣氨基酸序列或多肽的 DNA 序列最初采用选择的 PCR 引物扩增。所述引物应包括对应于选择的表达载体的限制性内切酶位点的限制性内切酶位点。可采用许多种表达载体。一适合的载体实例是 pBR322 (来源于 *E. coli*; 参见 Bolivar et al., Gene, 2 :95 (1977)), 它包含有氨苄西林和四环素抗药性的基因。所述载体由限制性内切酶消化并脱去磷酸。所述 PCR 扩增的序列然后被连接入所述载体。所述载体将优选地包括编码抗生素耐药性的基因、trp 启动子、polyhis 前导 (polyhis leader) (包括第一个六个 STII 密码子、polyhis 序列和肠激酶切割位点) 的序列、感兴趣的特定的氨基酸序列 / 多肽编码区、lambda 转录终止子和一 argU 基因。

[0452] 所述连接的混合物然后被用于转化一选择的 *E. coli* 菌株, 采用 Sambrook et al., supra 所描述的方法。通过转化体在 LB 皿上的生长来鉴别它们, 然后选择抗生素耐药菌落。质粒 DNA 可被分离, 并由限制性分析和 DNA 序列测定来证实。

[0453] 选择的菌落在液体培养基 (例如补充抗生素的 LB 肉汤) 中生长过夜。该过夜的

培养物接着被用于接种大规模的培养。然后细胞生长到期望的密度,在期间开启表达启动子。

[0454] 在培养所述细胞几小时后,通过离心分离采集细胞。离心分离得到的细胞团粒用本领域已知的各种不同的试剂溶解,然后采用金属螯合的柱在允许该蛋白质紧密结合的条件下分离提纯溶解的感兴趣氨基酸序列或多肽。

[0455] 所述引物可包括对应于选择的表达载体的限制性内切酶位点的限制性内切酶位点,和其他提供有效的可靠的翻译起始、在金属螯合柱上快速提纯及肠激酶的蛋白质水解移除的有用的序列。所述 PCR- 扩增的、聚-His 标记的序列可被连接入表达载体,用于转化 *E. coli* 宿主,基于例如菌株 52(W3110 fuhA(tonA)lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq))。转化体首先在 30°C 包含 50mg/ml 羧苄青霉素的 LB 上种植并摇动直到达到 3-5 的 O. D. 600。然后培养物被稀释 50-100 倍成 C RAP 培养基 (prepared by mixing 混合 3.57g(NH₄)₂SO₄、0.71g 柠檬酸钠 -2H₂O、1.07g KCl、5.36g Difco 酵母提取液、溶于 500mL 水中的 5.36g Sheffield hycase SF、以及 110mMMPOS、pH 7.3,0.55% (w/v) 的葡萄糖和 7mM MgSO₄),然后在 30°C 摇动生长将近 20-30 小时。SDS-PAGE 分析验证样本被移除来用于用于表达,大批的培养物被离心式细胞成团粒状。冷冻细胞团粒直到提纯和重折叠。

[0456] 0.5 到 1L 的 *E. coli* 糊团发酵 (6-10g 团粒) 在 10 体积 (w/v) 7M 胍、20mM Tris、pH8 缓冲液中再悬浮。分别加入固体亚硫酸钠和连四硫酸钠,得到最后浓度为 0.1M 和 0.02M,溶液在 4°C 搅拌过夜。这步导致产生一具有所有由 sulfitolization 阻滞的半胱氨酸残基的变性蛋白质。该溶液在 Beckman 超速离心机以 40,000rpm 离心 30 分钟。上清液用 3-5 体积的金属螯合柱缓冲液 (6M 胍,20mM Tris, pH 7.4) 稀释,通过 0.22 微米过滤器过滤直到澄清。经过处理的澄清提取液装载到用金属螯合柱缓冲液平衡的 5ml Qiagen Ni-NTA 金属螯合柱上。用另外的包含有 50mM 咪唑 (Calbiochem, Utrol 等级)、pH 7.4 的缓冲液淋洗。用包含有 250mM 咪唑的缓冲液稀释所述蛋白质。合并包含有期望的蛋白质的馏分,在 4°C 储存。基于蛋白质的氨基酸序列,通过采用计算的吸光系数得到它在 280nm 的吸光度来估计它的浓度。

[0457] 在哺乳动物细胞中表达连续的多段氨基酸

[0458] 该总的实施例说明通过重组体在哺乳动物细胞中表达来制备期望的感兴趣氨基酸序列或多肽组分的糖基化结构。

[0459] 载体 pRK5 (参见 EP 307,247,published Mar. 15,1989) 可用作为表达载体。任选地,编码 DNA 被连接入具有选择的限制性内切酶以允许 DNA 采用连接方法插入的 pRK5,所述连接方法如 Sambrook et al., supra 所述。

[0460] 在一实施例中,所述选择的宿主细胞可以是 293 细胞。人类 293 细胞 (ATCC CCL 1573) 在组织培养皿的补充小牛胎儿血清和任选地营养素组分和 / 或抗生素的培养基 (例如 DMEM) 中集合生长。大约 10 μg 连接的载体 DNA 与大约 1 μg 编码所述 VA RNA 基因的 DNA (Thimmappaya et al., Cell 31:543(1982)) 混合,溶于 500 μl 的 1 mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、0.227M CaCl₂。向该混合液中逐滴加入 500 μl 的 50mM HEPES (pH 7.35)、280mM NaCl、1.5mM NaPO₄,在 25°C、10 分钟后得到沉淀物。悬浮该沉淀物,加入到 293 细胞,在 37°C 接受 4 小时。抽去培养基介质,在 30 秒钟内加入 2ml 20% 甘油的 PBS 溶液。然后没有血清的培养基冲洗 293 细胞,加入新鲜培养基,细胞孵化约 5 天。

[0461] 转染后将近 24 小时, 移除培养基, 并用培养基 (单独) 或包含有 200 μ Ci/ml 35 S- 半胱氨酸和 200 μ Ci/ml 35 S- 蛋氨酸的培养基取代。孵化 12 小时后, 在旋转过滤器上收集、浓缩条件培养基, 然后加载到 15% SDS 凝胶上。干燥处理过的凝胶, 并暴露于胶片 (film) 一段选择的时间, 以揭示感兴趣氨基酸序列或多肽组分的存在。包含转染细胞的培养物进行进一步的孵化 (在没有血清的培养基中), 用选择的生物测定测试所述培养基。

[0462] 在一备选地技术中, 所述感兴趣的核苷酸氨基酸序列或多肽组分通过采用 Somparac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12 :7575 (1981) 所述的硫酸葡聚糖方法可被短暂地引入 293 细胞。293 细胞在旋转烧瓶中生长至最大浓度, 加入 700 μ g 连接的载体。所述细胞首先通过离心从该旋转烧瓶中浓缩, 然后用 PBS 冲洗。在细胞托盘上孵化 DNA- 葡聚糖沉淀物 4 小时。用 20% 甘油处理细胞 90 秒钟, 用组织培养基冲洗, 再次引入包含有组织培养基、5 μ g/ml 牛胰岛素和 1 μ g/ml 牛运铁蛋白的旋转烧瓶中。约 4 天后, 离心条件培养基, 过滤以移除细胞和碎屑。包含有表达的感兴趣氨基酸序列或多肽组分的样本然后被浓缩, 采用任意选择的方法 (例如透析和 / 或柱层析) 提纯。

[0463] 在另一实施例中, 所述感兴趣氨基酸序列或多肽组分可在 CHO 细胞中被表达。所述感兴趣氨基酸序列或多肽组分可通过采用已知试剂 (例如 CaPO_4 或 DEAE- 葡聚糖) 被转染到 CHO 细胞。如上所述, 所述细胞培养可被孵化, 且所述培养基被培养基 (单独) 或包含有放射标记物 (例如 35 S- 蛋氨酸) 的培养基取代。在检测感兴趣氨基酸序列或多肽组分的存在后, 所述培养基可被没有血清的培养基取代。优选地, 孵化所述培养基约 6 天, 然后收集该条件培养基。然后包含有表达的感兴趣氨基酸序列或多肽组分的培养基可被浓缩, 并采用任意选择的方法提纯。

[0464] 已附加表位的感兴趣氨基酸序列或多肽组分也可在宿主 CHO 细胞中被表达。所述感兴趣氨基酸序列或多肽组分可在 pRK5 载体外被亚克隆。所述亚克隆插入物可进行 PCR 以便在结构上与一选择的附加表位 (例如聚 -his 标记) 在杆状病毒表达载体中融合。然后该聚 -his 标记的感兴趣氨基酸序列或多肽组分插入物被亚克隆入包含有用于选择稳定克隆的可选标记 (例如 DHFR) 的 SV40 驱动的载体中。最后, 所述 CHO 细胞可被所述 SV40 驱动的载体转染 (如上所述)。然后包含有表达的感兴趣氨基酸序列或多肽组分的培养基被浓缩, 并采用任选的方法 (例如 Ni^{2+} - 螯合亲和层析) 进行提纯。

[0465] 在一实施例中, 所述感兴趣氨基酸或多肽组分被表达成 IgG 构成物 (免疫粘合物), 其中作为各自的蛋白质的可溶的结构 (例如细胞外的区域) 的所述编码序列被融合到一包含有铰链、CH2 和 CH2 区域的 IgG1 恒定区序列, 和 / 或是一聚 -His 标记的结构。

[0466] 在 PCR 扩增后, 所述各个 DNAs 采用如 Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997) 所述的标准技术在 CHO 表达载体中亚克隆。CHO 表达载体被构建具有相容的感兴趣 DNA 的限制性位点 5' 和 3', 以允许 cDNA' s 的便利的穿梭运动。用于在 CHO 细胞中表达的载体是如 Lucas et al., Nucl. Acids Res. 24 :9 (1774-1779 (1996) 所述, 并使用所述 SV40 早期启动子 / 增强子来驱动表达所述感兴趣 cDNA 和表达二氢叶酸还原酶 (DHFR)。DHFR 表达允许在转染后选择质粒的稳定维持。

[0467] 在酵母中表达所述段连续氨基酸

[0468] 以下方法描述在酵母中一期望的感兴趣氨基酸序列或多肽组分的重组体表达。

[0469] 首先,酵母表达载体被构建成用于细胞内从 ADH2/GAPDH 启动子生产或分泌一段连续氨基酸。编码一期望的感兴趣氨基酸序列或多肽组分、一选择的信号肽和所述启动子的 DNA 被插入选择的质粒的适合的限制性内切酶,以便直接细胞内表达所述感兴趣氨基酸序列或多肽组分。对于分泌,编码所述段连续氨基酸的 DNA 可被克隆如选择的质粒,伴随有用于表达所述段连续氨基酸的编码 ADH2/GAPDH 启动子的 DNA、酵母 α -因子分泌信号/前导序列以及连接子序列(如果需要)。

[0470] 然后酵母细胞(例如酵母菌株 AB110)可被上述表达质粒转化,并在选择的发酵培养基中培养。所述转化的酵母上清液可通过 10%三氯醋酸沉淀、SDS-PAGE 法分离、然后用考马斯蓝染色剂对凝胶染色被分析。

[0471] 随后重组体感兴趣氨基酸序列或多肽组分可被分离,并通过离心法从所述发酵培养基中移除所述酵母细胞而提纯,然后采用选择的筒过滤器(cartridge filters)浓缩所述培养基。包含所述感兴趣氨基酸序列或多肽组分的浓缩物可进一步采用选择的柱层析树脂进行提纯。

[0472] 在杆状病毒感染的昆虫细胞中表达多段连续氨基酸

[0473] 以下方法描述在杆状病毒感染的昆虫细胞中多段连续氨基酸的重组体表达。

[0474] 编码所述段连续氨基酸的期望的核苷酸向包含的附加表位上游与杆状病毒表达载体融合。所述附加表位包括聚-his 标记和免疫球蛋白标记(如 IgG 的 Fc 区域)。可采用多种质粒,包括来源于商业可售质粒(例如 pVL1393(Novagen))的质粒。简要地,所述感兴趣氨基酸序列或多肽组分或所述感兴趣氨基酸序列或多肽组分(例如编码一跨膜蛋白的细胞外域的序列)的期望部分通过 PCR 扩增,伴随引物补充到所述 5' 和 3' 区域。所述 5' 引物可掺入侧面的(flanking)(选择的)限制性内切酶位点。然后所述产品用那些选择的限制性内切酶消化,并在所述表达载体中亚克隆。

[0475] 重组体杆状病毒通过采用 lipofectin(从 GIBCO-BRL 购买)由共同转染(co-transfecting)上述质粒和 BaculoGold™ 病毒 DNA(Pharmlngen)进入 *Spodoptera frugiperda*("Sf9")细胞(ATCC CRL 1711)来制备。在 28°C 孵化 4-5 天后,收集所述释放的病毒并用于进一步扩增。病毒感染和蛋白质表达的操作如 O' Reilley et al., *Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press(1994)中所述。

[0476] 然后表达的聚-his 标记的感兴趣氨基酸序列或多肽组分可被提纯,例如采用下述的 Ni^{2+} -螯合的亲合层析提纯。从重组体病毒-感染的 Sf9 细胞制备提取物,如 Rupert et al., *Nature*, 362:175-179(1993)所述。简要地,冲洗 Sf9 细胞,在声裂法缓冲液(25mL HEPES, pH 7.9; 12.5mM MgCl_2 ; 0.1mM EDTA; 10%甘油; 0.1% NP40; 0.4M KCl)中再悬浮,并在冰上 20 秒钟声处理两次。离心清除所述声处理物,上清液在加样缓冲液中稀释 50 倍(50mM 磷酸盐, 300mM NaCl, 10%甘油, pH 7.8),通过 0.45 μm 过滤器过滤。— Ni^{2+} -NTA 琼脂糖柱(从 Qiagen 购买)用 5ml 的柱床体积制备, 25ml 水淋洗, 25ml 加样缓冲液平衡。所述过滤的细胞提取液以每分钟 0.5ml 被加载到柱上。用加样缓冲液淋洗柱直到基线 A_{280} , 这时开始收集馏分。然后,用第二淋洗缓冲液(50mM 磷酸盐; 300mM NaCl, 10%甘油, pH 6.0)淋洗该柱,洗脱非特异性结合蛋白质。在再次到达基线 A_{280} 后,在第二淋洗缓冲液中按梯度加入 0 到 500mM 的咪唑并淋洗所述柱。收集 1ml 馏分,用 SDS-PAGE 分析,用 Ni^{2+} -NTA-结合

到碱性磷酸酶 (Qiagen) 的银染色或 western 印迹。混合包含有稀释的 His10- 标记的序列的馏分并透析出去加样缓冲液。

[0477] 备选地, IgG 标记的 (或 Fc 标记的) 氨基酸序列的提纯可采用已知的层析技术, 包括例如 A 蛋白或 G 蛋白柱层析。

[0478] 免疫粘合素 (包含 Fc) 构建蛋白质可从下述条件培养基中提纯。所述条件培养基被注入 5ml 的 A 蛋白柱 (Pharmacia) 中, 所述 A 蛋白柱在 pH6.8、20mM 钠磷酸盐缓冲液中平衡。加载后, 用平衡缓冲液充分冲洗该柱, 然后用 pH 3.5、100mM 柠檬酸洗脱。洗脱的蛋白质直接用收集的 1ml 馏分在包含 pH 9、275mL 的 1M Tris 缓冲液中中和。所述高度纯化的蛋白质接着在缓冲存储器中除去盐分, 如上所述为了聚 -His 标记的蛋白质。所述蛋白质的同源性由 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (PEG) 电泳法验证, N- 末端氨基酸测序采用埃德曼降解 (Edmandegradation)。

[0479] 基于内蛋白的 C- 末端合成

[0480] 例如, 如 U. S. Patent No. 6, 849, 428, issued Feb. 1, 2005 所描述, 内蛋白是 RNA 内蛋白自我剪接的蛋白质等价物 (参见 Perler et al., NucleicAcids Res. 22: 1125-1127 (1994)), 所述 RNA 内蛋白催化它们的从前体蛋白质的自我切除, 伴有所述侧蛋白质序列的并发的融合, 已知类似外显肽 (综述 Perler et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 292-299 (1997); Perler, F. B. Cell 92 (1): 1-4 (1998); Xu et al., EMBO J. 15 (19): 5146-5153 (1996))。

[0481] 在内蛋白剪接机制方面的研究导致蛋白质提纯系统的发展, 该系统利用巯基 - 诱导在 SceVMA 内蛋白的 N- 端的肽键断裂 (Chong et al., Gene 192 (2): 271-281 (1997))。用该中间的系统提纯产生一具有 C- 端硫酯的细菌表达的蛋白质 (Chong et al., (1997))。在一应用中, 当描述到分离一细胞毒素的蛋白质, 所述具有 C- 端硫酯的细菌表达的蛋白质然后与一具有 N- 端半胱氨酸的化学合成的肽融合, 采用描述的用于“天然化学连接”的化学方法 ((Evans et al., ProteinSci. 7: 2256-2264 (1998); Muir et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6705-6710 (1998))。

[0482] 该技术, 指的是“内蛋白介导的蛋白质连接” (IPL), 代表在蛋白质半合成技术中的重要进步。然而, 由于很难制备得到大于 100 个残基的化学合成的肽, IPL 的普遍应用受化学合成的肽的需求限制, 并局限于作为连接的辅助方法。

[0483] 当一表达的具有一预定的 N- 末端 (例如半胱氨酸) 蛋白质产生时, IPL 技术被显著地展开, 这作为实例被描述在 U. S. Patent No. 6, 849, 428 中。这允许一个或多个表达的蛋白质从一宿主细胞 (例如细菌、酵母或哺乳动物细胞) 中融合。在一非限制的实施例中, 所述内蛋白 (一修饰的嗜热自养甲烷杆菌 RIR1) 是采用在 C- 末端或 N- 末端分断裂 (cleaves) 以允许在一个柱体积提纯期间释放细菌表达的蛋白质, 因此完全消除了蛋白酶的需要。

[0484] 内蛋白技术是一种获得组分的途径的一实例。在一实施例中, 本发明所述化合物的亚单位通过转染合适的细胞获得, 能表达和分泌成熟嵌合体的多肽, 其中所述多肽包括, 例如一与一可分离的 C- 末端内蛋白域邻近的粘附素域 (参见 U. S. Patent No. 6, 849, 428, Evans et al., issued February 1, 2005, 在这里合并作为参考)。所述细胞, 例如哺乳动物细胞或细菌细胞, 采用已知的重组体 DNA 技术转染。然后所述分泌的嵌合体多肽可被分离, 例如在一内蛋白 - 壳多糖结合域的实例中采用壳多糖衍生的树脂 (参见 U. S. Patent

No. 6, 897, 285, Xu et al., issued May 24, 2005, 在这里合并作为参考), 然后在允许巯基介导断裂的条件下被处理, 并释放目前所述的 C- 末端硫酯结尾的粘附亚单位。所述硫酯结尾的粘附亚单位容易地被更换成 C- 末端半胱氨酸结尾的亚单位。

[0485] 这些亚单位可在氧化条件下被处理成允许形成例如一在两个末端半胱氨酸残基之间的二硫键, 因此形成一对称粘附素 (symmetroadhesin)。此外, 该技术可通过在允许在所述异二聚体的 Fc 部分之间形成键的条件下处理单个粘附素-Fc 异二聚体, 被用于制备所述对称粘附素 (symmetroadhesin)-Fc 杂种亚单位。

[0486] 实施例 1

[0487] 制备具有 N- 末端 -S- 末端的免疫球蛋白 Fc (S-Fc)

[0488] 用木瓜蛋白酶消化免疫球蛋白 (IgG) 得到两个 Fab 片段和一个 Fc 片段 (Porter (1959) Biochem. 73, 119-126)。人类 IgG 蛋白水解的位点是重链铰链区, 在 cys-5 和 cys-11 残基之间, EPKSCDKTHTCPPCP, (Fleischman et al., Biochem J. (1963) 88, 220-227; Edelman et al. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. 63, 78-85)。所述 cys-5 残基正常地与人类 IgG 轻链形成二硫键, 所述键在温和的还原条件下容易被断裂, 这使得它成为具有 N- 末端 -S- 末端的 Fc 类分子 (S-Fc) 的理想候选。

[0489] 因此, 宿主细胞被表达载体转染, 所述表达载体编码 IgG1 前 -Fc 嵌合体的多肽, 所述多肽由一在 C- 末端以肽键连接一 Fc 区域的起始于 cys-5 残基的 N- 末端 (CDKTHTCPPCP) (图 35A) 的信号肽组成。所述采用的异源信号肽选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质 (部分 i)。因此, 由细胞信号肽酶引起的断裂将提供一在 N- 末端具有 cys-5 的成熟 S-Fc 蛋白质 (部分 ii)。

[0490] 图 35A 所示 IgG1 前体多肽的序列为 SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33 和 SEQ ID NO :34 所示。图 35A 所示成熟 IgG1 多肽的序列为 SEQ ID NO :35 所示。其它按实施例 1 至 5 所述方法制备的成熟 IgG1 多肽为 SEQ ID NO :36 直到 SEQ ID NO :46 所示。

[0491] 宿主细胞被表达载体转染, 所述表达载体编码 IgG2 前 -Fc 嵌合体多肽, 所述多肽由一在 C- 末端以肽键连接一 Fc 区域的起始于 cys-4 残基的 N- 末端 (CCVECPPCP) (图 35B) 的信号肽组成。所述采用的异源信号肽选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质 (部分 i)。因此, 由细胞信号肽酶引起的断裂将提供一在 N- 末端具有 cys-4 的成熟 S-Fc 蛋白质 (部分 ii)。

[0492] 图 35B 所示 IgG2 前体多肽的序列为 SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :51 和 SEQ ID NO :52 所示。图 35B 所示成熟 IgG2 多肽的序列为 SEQ ID NO :53 所示。其它按实施例 1 至 5 所述方法制备的成熟 IgG2 多肽为 SEQ ID NO :54 直到 SEQ ID NO :67 所示。

[0493] 宿主细胞被表达载体转染, 所述表达载体编码 IgG3 前 -Fc 嵌合体多肽, 所述多肽由一在 C- 末端以肽键连接一 Fc 区域的起始于 cys-13 残基的 N- 末端 (CPRCP) (图 35C) 的信号肽组成。所述采用的异源信号肽选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质 (部分 i)。因此, 由细胞信号肽酶引起的断裂将提供一在 N- 末端具有 cys-13 的成熟 S-Fc 蛋白质 (部分 ii)。

[0494] 图 35C 所示 IgG3 前体多肽的序列为 SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :72 和 SEQ ID NO :73 所示。图 35C 所示成熟 IgG3 多肽的序列为 SEQ ID NO :74 所示。其它按实施例 1 至 5 所述方法制备的成熟 IgG2 多肽为 SEQ ID NO :75 直到 SEQ ID NO :82 所示。

[0495] 宿主细胞被表达载体转染, 所述表达载体编码 IgG4 前 -Fc 嵌合体多肽, 所述多肽

由一在 C- 末端以肽键连接一 Fc 区域的起始于 cys-8 残基的 N- 末端 (CPSCP) (图 35D) 的信号肽组成。所述采用的异源信号肽选自具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质 (部分 i)。因此, 由细胞信号肽酶引起的断裂将提供一在 N- 末端具有 cys-8 的成熟 S-Fc 蛋白质 (部分 ii)。

[0496] 图 35D 所示 IgG4 前体多肽的序列为 SEQ ID NO :86、SEQ ID NO :87 和 SEQ ID NO :88 所示。图 35D 所示成熟 IgG4 多肽的序列为 SEQ ID NO :89 所示。其它按实施例 1 至 5 所述方法制备的成熟 IgG4 多肽为 SEQ ID NO :90 直到 SEQ ID NO :97 所示。

[0497] 合适的宿主细胞包括 293 人类胚胎细胞 (ATCC CRL-1573) 和来源于美国标准菌库 CHO-K1 仓鼠卵巢细胞 (ATCC CCL-61) (Rockville, Maryland)。细胞在 37°C, 95% 空气、5% 二氧化碳的大气下生长。293 细胞与 2mM L- 谷氨酰胺和 Earle' s BSS 在最小量必需的培养基 (Eagle) 中保养, 所述培养基被调整成包括有 90% 的 1.5g/L 碳酸氢钠、0.1mM 非必需的氨基酸和 1.0mM 丙酮酸钠混合液, 以及 10% 的胎牛血清。CHO-K1 细胞与 2mM L- 谷氨酰胺在 Ham' s F12K 培养基中保养, 所述培养基被调整成包含有 90% 的 1.5g/L 碳酸氢钠以及 10% 的胎牛血清。其它合适的宿主细胞包括 CV1 猴子肾细胞 (ATCC CCL-70)、COS-7 猴子肾细胞 (ATCC CRL-1651)、VERO-76 猴子肾细胞 (ATCC CRL-1587)、HELA 人类颈细胞 (ATCC CCL-2)、W138 人类肺细胞 (ATCC CCL-75)、MDCK 犬肾细胞 (ATCC CCL-34)、BRL3A 鼠肝细胞 (ATCC CRL-1442)、BHK 仓鼠肾细胞 (ATCC CCL-10)、MMT060562 小鼠乳房细胞 (ATCC CCL-51) 以及人类 CD8⁺T 淋巴细胞 (如这里合并并作为参考的 U. S. S. N. 08/258, 152 所述)。

[0498] 一合适的表达载体的实施例是质粒 pSA (SEQ ID NO :1)。质粒 pSA 包括以下 DNA 顺序元件: 1) pBluescript I IKS (+) (核苷酸 912 至 2941/1 至 619, GenBank 登记号 . X52327), 2) 人巨细胞病毒启动子、增强子和第一外显子左拼接剪接 (核苷酸 63 至 912, GenBank 登记号 . K03104), 3) 人 α - 珠蛋白第二外显子剪接受体 (核苷酸 6808 至 6919, GenBank 登记号 . J00153), 4) SV40T 抗原多腺苷酸化位点 (核苷酸 2770 至 2533, Reddy et al. (1978) Science 200, 494-502), 和 5) SV40 复制起点 (核苷酸 5725 至 5578, Reddy et al., ibid)。对于感兴趣多肽表达, 编码所述多肽的 EcoRI-BgIII DNA 片段被插入质粒 pSA 的分别位于 1,608 和 1,632 位置的 EcoRI 和 BgIII 的限制性位点之间。其它适合的表达载体包括质粒 pSveCD4DHFR 和 pRKCD4 (U. S. Pat. No. 5, 336, 603)、质粒 pIK. 1. 1 (U. S. Pat. No. 5, 359, 046)、质粒 pVL-2 (U. S. Pat. No. 5, 838, 464)、质粒 pRT43. 2F3 (如这里合并并作为参考的 U. S. S. N. 08/258, 152 所述)、和质粒 pCDNA3. 1 (+) (Invitrogen, Inc.)。

[0499] 合适的可选标记包括 Tn5 转座子新霉素磷酸转移酶 (NEO) 基因 (Southern and Berg (1982) J. Mol. Appl. Gen. 1, 327-341) 和所述二氢叶酸还原酶 (DHFR) cDNA (Lucas et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24, 1774-1779)。一结合 NEO 基因的合适的表达载体的实例是质粒 pSA-NEO, 通过连接一采用 EcoRI 和 BgIII 消化 SEQ ID NO :2 而制备的第一 DNA 片段构成, 以及一采用 EcoRI 和 BgIII 消化 SEQ ID NO :1 而制备的第二 DNA 片段构成。SEQ ID NO :2 合并一前面有用于翻译的开始的序列 (Kozak (1991) J. Biol. Chem, 266, 19867-19870) 的 NEO 基因 (核苷酸 1551 至 2345, GenBank 登记号 . U00004)。另一个结合 NEO 基因和 DHFR cDNA 的合适的表达载体的实例是质粒 pSve-NEO-DHFR, 通过连接一采用 EcoRI 和 BgIII 消化 SEQ ID NO :2 而制备的第一 DNA 片段, 以及一采用 EcoRI 和 BgIII 消化 pSveCD4DHFR 而制备的第二 DNA 片段。质粒 pSve-NEO-DHFR 采用 SV40 早期启动子 / 增强子来驱动 NEO 基因和 DHFR cDNA 的表达。其它合适的可选标记包括 XPGT 基因 (Mulligan and Berg (1980) Science

209,1422-1427) 和潮霉素抗性基因 (Sugden et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 410-413)。

[0500] 人 IgG1DNA 序列如 Ellison et al. (1982) *Nuc. Acids Res.* 10, 4071-4079 (Genbank 登记号 . Z17370) 所述。

[0501] 信号肽合适的实例是音猬 (SHH) (GenBank 登记号 . NM 000193)、干扰素 α -2 (IFN) (GenBank 登记号 . NP_000596) 和胆固醇酯转移酶 (CETP) (GenBank 登记号 . NM 000078)。

[0502] 其它合适的实例包括 Indian hedgehog (GenBank 登记号 . NM_002181)、desert hedgehog (GenBank 登记号 . NM_021044)、IFN α -1 (GenBank 登记号 . NP_076918)、IFN α -4 (GenBank 登记号 . NM_021068)、IFN α -5 (GenBank 登记号 . NM_002169)、IFN α -6 (GenBank 登记号 . NM_021002)、IFN α -7 (GenBank 登记号 . NM_021057)、IFN α -8 (GenBank 登记号 . NM_002170)、IFN α -10 (GenBank 登记号 . NM_002171)、IFN α -13 (GenBank 登记号 . NM_006900)、IFN α -14 (GenBank 登记号 . NM_002172)、IFN α -16 (GenBank 登记号 . NM_002173)、IFN α -17 (GenBank 登记号 . NM_021268) 和 IFN α -21 (GenBank 登记号 . NM_002175)。

[0503] 合适的表达载体通过连接一插入片段和采用 EcoRI 和 BgIII 消化而制备的一载体片段构成。对于未扩增的表达, 质粒 pSHH-Fc5 (SHH 信号) 采用 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :1 构成, 质粒 pIFN-Fc5 (IFN 信号) 采用 SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :1 构成, 以及质粒 pCETP-Fc5 (CETP 信号) 采用 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :1 构成。对于扩增的表达, 质粒 pSHH-Fc5-DHFR 采用 SEQ ID NO :3 和 pSVeCD4DHFR (U. S. Patent No. 5, 336, 603) 构成, pIFN-Fc5-DHFR 采用 SEQ ID NO :4 和 pSVeCD4DHFR 构成, 以及 pCETP-Fc5-DHFR 采用 SEQ ID NO :5 和 pSVeCD4DHFR 构成。

[0504] 对于人 IgG1 Fc 多肽的合适的表达载体是通过连接一采用 Hind III 和 EagI 消化而制备的插入片段和一采用 Hind III 和 PspOM1 消化而制备的载体片段构成。质粒 pCDNA3-SHH-IgG1-Fc (SHH 信号) 采用 SEQ ID NO :29 和 pCDNA3. 1(+) 构成, 质粒 pCDNA3-IFN-IgG1-Fc (IFN 信号) 采用 SEQ ID NO :30 和 pCDNA3. 1(+) 构成, 以及质粒 pCDNA3-IgG1-Fc (CETP 信号) 采用 SEQ ID NO :31 和 pCDNA3. 1(+) 构成。

[0505] 对于人 IgG2Fc 多肽的合适的表达载体是通过连接一采用 Hind III 和 EagI 消化而制备的插入片段和一采用 Hind III 和 PspOM1 消化而制备的载体片段构成。质粒 pCDNA3-SHH-IgG2-Fc (SHH 信号) 采用 SEQ ID NO :47 和 pCDNA3. 1(+) 构成, 质粒 pCDNA3-IFN-IgG2-Fc (IFN 信号) 采用 SEQ ID NO :48 和 pCDNA3. 1(+) 构成, 以及质粒 pCDNA3-IgG2-Fc (CETP 信号) 采用 SEQ ID NO :49 和 pCDNA3. 1(+) 构成。

[0506] 对于人 IgG3Fc 多肽的合适的表达载体是通过连接一采用 Hind III 和 EagI 消化而制备的插入片段和一采用 Hind III 和 PspOM1 消化而制备的载体片段构成。质粒 pCDNA3-SHH-IgG3-Fc (SHH 信号) 采用 SEQ ID NO :68 和 pCDNA3. 1(+) 构成, 质粒 pCDNA3-IFN-IgG3-Fc (IFN 信号) 采用 SEQ ID NO :69 和 pCDNA3. 1(+) 构成, 以及质粒 pCDNA3-IgG3-Fc (CETP 信号) 采用 SEQ ID NO :70 和 pCDNA3. 1(+) 构成。

[0507] 对于人 IgG4Fc 多肽的合适的表达载体是通过连接一采用 Hind III 和 EagI 消化而制备的插入片段和一采用 Hind III 和 PspOM1 消化而制备的载体片段构成。质粒 pCDNA3-SHH-IgG4-Fc (SHH 信号) 采用 SEQ ID NO :83 和 pCDNA3. 1(+) 构成, 质粒 pCDNA3-IFN-IgG4-Fc (IFN 信号) 采用 SEQ ID NO :84 和 pCDNA3. 1(+) 构成, 以及质粒

pCDNA3-IgG4-Fc (CETP 信号) 采用 SEQ ID NO :85 和 pCDNA3.1(+) 构成。

[0508] 在一实施例中,细胞被如 Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. 36, 59-74 所述磷酸钙方法转染。一 DNA 混合物 (10 微克) 溶解于 0.5ml 的 1mM Tris-HCl、0.1mM EDTA 和 227mM CaCl_2 的混合溶液中。所述 DNA 混合物包括 (比例为 10 : 1 : 1) 表达载体 DNA、可选标记 DNA 和编码所述 VA RNA 基因的 DNA (Thimmappaya et al. (1982) Cell 31, 543-551)。向所述混合物中逐滴加入 0.5ml 的 50mM Hepes (pH 7.35)、280mM NaCl 和 1.5mM NaPO_4 的混合溶液。所述 DNA 沉淀物在 25°C 形成 10 分钟,然后悬浮,并加到成熟的细胞以会合到 100mm 塑料的组织培养皿中。在 37°C 4 小时后,抽吸所述培养基,在 0.5 分钟加入 2ml 的 20% 甘油 PBS 溶液。然后用无血清培养基冲洗细胞,加入新鲜培养基,细胞孵化 5 天。

[0509] 在另一实施例中,细胞被 Sompanyrac et al. (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. 12, 7575-7579 所述的硫酸葡聚糖方法短暂地转染。细胞在旋转烧瓶中生长到最大密度,离心浓缩,用 PBS 冲洗。所述 DNA-葡聚糖沉淀物在细胞团块孵化。在 37°C 4 小时后,抽吸所述 DEAE-葡聚糖,在 1.5 分钟加入 20% 甘油 PBS 溶液。然后用无血清培养基冲洗细胞,再放入包含有具有 5 微克/ml 牛胰岛素和 0.1 微克/ml 牛转移的新鲜培养基的旋转烧瓶中,所述细胞孵化 4 天。在任一方法转化后,条件培养基被离心,过滤以除去宿主细胞和碎屑。然后包含有所述 S-Fc 区域的样品被浓缩,用任选的方法 (例如透析和 / 或柱层析 (参见下文)) 进行提纯。

[0510] 为了鉴定细胞培养上清液中的 S-Fc,在转染 24 小时后除去所述培养基,用含有 ^{35}S -蛋氨酸和 ^{35}S -半胱氨酸各 200microCi/ml 的培养基取代。孵化 12 小时后,离心除去宿主细胞核碎屑,收集所述条件培养基,在旋转透析过滤器上浓缩。在没有添加的抗体的情况下用 A 蛋白琼脂糖珠 (beads) 进行免疫沉淀作用,分析所述标记的上清液。所述沉淀的蛋白质在进行或不进行巯基乙醇还原的情况下在 7.5% 聚丙烯酰胺-SDS 凝胶上分析。干燥所述处理过的凝胶,曝露于 X 射线胶片 (x-ray film) 以揭示所述 S-Fc 区域的存在。

[0511] 对于未扩增的表达,质粒 pSHH-Fc-5、pIFN-Fc-5 和 pCETP-Fc-5 被转染入人 293 细胞 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 :5974(1977)),采用一高效方法 (Gorman et al., DNAProt. Eng. Tech. 2 :310(1990))。将培养基换成无血清的培养基,并每日采集直到 5 天。所述 S-Fc 蛋白质采用 A 蛋白-琼脂糖 CL-4B((Pharmacia) 从细胞培养上清液中提纯。被洗脱的 S-Fc 蛋白质更换缓冲液成采用 Centricon-30(Amicon) 的 PBS,浓缩至 0.5ml,采用 Millex-GV(Millipore) 进行无菌过滤,在 4°C 储存。

[0512] 对于未扩增的表达,质粒 pCDNA3-SHH-IgG1-Fc、pCDA3-IFN-IgG1-Fc 和 pCDA-3-CETP-IgG1-Fc 被转染入人 293 细胞 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 : 5974(1977)),采用一高效方法 (Gorman et al., DNAProt. Eng. Tech. 2 :310(1990))。将培养基换成无血清的培养基,并每日采集直到 5 天。所述 S-Fc 蛋白质采用 A 蛋白-琼脂糖 CL-4B((Pharmacia) 从细胞培养上清液中提纯。被洗脱的 S-Fc 蛋白质更换缓冲液成采用 Centricon-30(Amicon) 的 PBS,浓缩至 0.5ml,采用 Millex-GV(Millipore) 进行无菌过滤,在 4°C 储存。

[0513] 图 52 显示在 293 肾细胞表达具有 N-末端-S-末端的人 IgG1 Fc symmetroadhesin 亚单位。1-6 道和 7-12 道分别显示图 35A(ii) 和图 36A(ii) 的 IgG1Fc 多肽。细胞上清液: 1、3、5、7、9 和 11 道;细胞溶胞产物:2、4、6、8、10 和 12 道。采用的信号序列:SHH(1、2、7 和

8 道) ;IFNA(3、4、9、10 道) ;CETP(5、6、11 和 12 道)。

[0514] 图 53 显示在 293 肾细胞表达人 IgG1 Fc symmetroadhesin 亚单位。1-2、3-4 和 5-6 道分别显示图 35A(ii)、图 36A(ii) 和图 37B(ii) 的 IgG1 Fc 多肽。细胞上清液:(1-6 道)。采用的信号序列:SHH(1-6 道)。

[0515] 图 54 显示 A 蛋白提纯在 293 肾细胞中表达的人 IgG1 Fc symmetroadhesin 亚单位。2 和 8 道分别表示图 36A 和图 35A 的 IgG1 Fc 多肽。1-7 道:A- 蛋白-琼脂糖柱馏分对应于图 36A 的 IgG1 Fc 多肽。

[0516] 图 55 显示巯基-琼脂糖结合图 54 所示的 A 蛋白提纯的人 IgG1 Fc 对称粘附素亚单位。1-3 道和 4-6 道分别表示图 35A 和图 36A 的人 IgG1 Fc 多肽。1 和 4 道:原料;2 和 5 道:巯基-琼脂糖流动馏分(flow-thru fraction);3 和 6 道:巯基-琼脂糖结合馏分。

[0517] 对于扩增表达,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞被 dicistronic 载体 pSHH-Fc5-DHFR、载体 pIFN-Fc-5-DHFR 和一 DHFR cDNA 共表达的载体 pCETP-Fc-5-DHFR 转染。质粒通过脂转染法被引入 L.Chasin(Columbia University)开发的 CHO-K1 DUX B11 细胞,然后被选择用于在无 GHT 的培养基(Chisholm(1996)High efficiency gene transfer in mammalian cells. In :Glover, D M, Hames, B D. DNA Cloning vol 4. Mammalian systems. Oxford Univ. Press, pp 1-41) 中生长。将近 20 未扩增的克隆被随机选择,再在 96 孔板上培养。每个菌落的相对特定的产率采用 ELISA 监测定量 3 天后在每个孔中累积的 S-Fc 蛋白,以及一荧光染料(钙黄绿素-AM)作为每孔存活细胞数量的替代标记。根据这些数据,若干未扩增克隆被选择用于进一步在增加甲氨喋呤浓度的存在下扩增。在 10、50 和 100nm 甲氨喋呤中存活的单克隆被选择并转移到 96 孔板用于筛选产率。合适的克隆,重复显现高特定的产率,被展开进 T- 烧瓶中,用于移植旋转培养。在若干传代后,适应悬浮的细胞用于在包含 GHT、无血清培养基并补充各种激素和蛋白水解物中移植生产培养。包含所述 S-Fc 蛋白的采集的细胞培养液采用 A 蛋白-琼脂糖 CL-4B 提纯。

[0518] 实施例 2

[0519] 制备具有 N- 末端-X- 末端的免疫球蛋白 Fc(X-Fc)

[0520] 硒代半胱氨酸(sec)是在核糖体-介导的蛋白质合成过程中掺入的第 21 个氨基酸(Zinoniet al. (1986)Proc. Natl Acad. Sci. 83, 4650-4654; Chambers et al. (1986)EMBO J. 5, 1221-1227)。所述过程是复杂的,且不同于半胱氨酸的掺入,需要 mRNA 硒代半胱氨酸插入元件以解码 UGA 终止密码子。蛋白质半合成提供了一制备起始于半胱氨酸(cys)和/或硒代半胱氨酸(sec)的具有 N- 末端-X- 末端的 Fc 类分子(X-Fc)的备选方法。

[0521] 因此,宿主细胞被编码前-Fc 嵌合体多肽的构成物转染,所述前-Fc 嵌合体多肽由一在 C- 末端以肽键连接一起始于 cys-11(CDKTHTCPPCP)(图 36A)和 cys-14(CDKTHTCPPCP)(图 36B)的 Fc 域的 N- 末端的信号肽组成。所述采用的异源信号肽从具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质(部分 i)中选择。因此,由细胞信号肽酶引起的断裂将提供一在 N- 末端具有 cys-11 的成熟 S-Fc 蛋白(部分 ii)。然后采用天然化学连接制备在 N- 末端具有 cys-5 或 sec-5(XDKTHTCPPCP)(部分 iii)的成熟 X-Fc 蛋白。

[0522] 图 36A 中所述 IgG1 前体多肽的序列为 SEQ ID NO:101、SEQ IDNO:102 和 SEQ ID NO:103 所示。图 35A 中所述成熟 IgG1 多肽的序列为 SEQ ID NO:104 所示。图 36B 中所述 IgG1 前体多肽的序列为 SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110 和 SEQ ID NO:111 所示。图 35B

中所述成熟 IgG1 多肽的序列为 SEQ ID NO :112 所示。

[0523] 因此,宿主细胞被构成物转染,所述构成物编码前 -Fc 嵌合体多肽,所述前 -Fc 嵌合体多肽由一在其 C- 末端以肽键连接一起始于 cys-14(CDKTHTCPPCP) (图 36B) 的 Fc 域的 N- 末端的信号肽组成。所述采用的异源信号肽从具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质 (部分 i) 中选择。因此,由细胞信号肽酶引起的断裂将提供一在 N- 末端具有 cys-11 的成熟 S-Fc 蛋白 (部分 ii)。然后采用天然化学连接法制备在 N- 末端具有 cys-11 或 sec-11(XPPCP) (部分 iii) 的成熟 X-Fc 蛋白。

[0524] 所述在 N- 末端具有 cys-11 和 cys-14 的 S-Fc 蛋白首先采用如实施例 1 所述方法制备。采用天然化学连接法连接 S-Fc 蛋白和肽 Fc-A(5-11 :cys-asp-lys-thr-his-thr), 或 S-Fc 蛋白和肽 Fc-B(5-11 :sec-asp-lys-thr-his-thr)。合适的表达载体通过连接一插入片段和由 EcoRI 和 BglIII 消化的载体片段来构建。对于未扩增的表达,质粒 pSHH-Fc11(SHH 信号)采用 SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :1 构建,质粒 pIFN-Fc11(IFN 信号)采用 SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :1 构建,以及质粒 pCETP-Fc11(CETP 信号)采用 SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :1 构建。对于扩增的表达,质粒 pSHH-Fc11-DHFR 采用 SEQ ID NO :6 和 pSVeCD4DHFR 构建,质粒 pIFN-Fc11-DHFR 采用 SEQ ID NO :7 和 pSVeCD4DHFR 构建,以及质粒 pCETP-Fc11-DHFR 采用 SEQ ID NO :8 和 pSVeCD4DHFR 构建。

[0525] 对人 IgG1 Fc 的合适的表达载体通过连接一采用 Hind III 和 EagI 消化而制备的插入片段和一采用 Hind III 和 PspOM1 消化而制备的载体片段构成。质粒 pCDNA3-SHH-IgG1-Fc11(SHH 信号)采用 SEQ ID NO :98 和 pCDNA3.1(+) 构成,质粒 pCDNA3-IFN-IgG1-Fc11(IFN 信号)采用 SEQ ID NO :99 和 pCDNA3.1(+) 构成,以及质粒 pCDNA3-IgG1-Fc11(CETP 信号)采用 SEQ ID NO :100 和 pCDNA3.1(+) 构成。质粒 pCDNA3-SHH-IgG1-Fc14(SHH 信号)采用 SEQ ID NO :106 和 pCDNA3.1(+) 构成,质粒 pCDNA3-IFN-IgG1-Fc14(IFN 信号)采用 SEQ ID NO :107 和 pCDNA3.1(+) 构成,以及 pCDNA3-IgG1-Fc14(CETP 信号)采用 SEQ ID NO :108 和 pCDNA3.1(+) 构成。

[0526] 天然化学连接法的一般原理在 U. S. Pat. No. 6, 184, 344 已有描述,并在这里合并作为参考。肽 Fc-A 和 Fc-B 采用能容易制备任何期望的硫酯的 TAMPAL 树脂来合成。在侧链保护基团去保护后,得到的 C- 末端活性肽不需进一步修饰,用于天然化学连接反应。为防止双功能肽的环化或聚合,巯基部分 (肽 Fc-A) 和硒基 (selenohydryl) 部分 (肽 Fc-B) 被 Msc 可逆地阻滞。

[0527] 肽合成通过采用手工操作一采用用于 Boc 化学 (Schnolzer et al. (1992) Int. J. Pept. Protein Res. 40, 180-193) 的原位中和 /HBTU 激活方法的固相方法来实现。在每个偶合步骤,通过定量的水合茚三酮实验 (Sarin et al. (1981) Anal. Biochem. 117, 147-157) 测定残留物不含有胺来决定收率。侧链保护氨基酸是 Boc- 天冬氨酸 (O- 环己基)-OH, Boc- 半胱氨酸 (4- 甲苄基)-OH, Boc- 赖氨酸 (2-C1-Z)-OH 和 Boc- 苏氨酸 (苄基)-OH。在链装配完成后,肽脱保护并用无水 HF 和作为清除剂的 4% 苯甲醚在 0°C 处理 1 小时,与树脂断裂。

[0528] 肽 Fc-A 和 Fc-B 在三苯甲基-联合的巯基丙酸亮氨酸 (TAMPAL) 树脂上合成,得到 C- 末端 MPAL- 活化的硫酯 (Hackeng et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 10068-10073)。在与活化 Msc 硝基苯酚酯溶于最小体积二甲基甲酰胺 /5% 二异丙基乙胺的

2 小时反应 (10 倍过量), 所述硫酯肽的 N- 末端 cys/sec 残基得到 2-(甲磺酰基) 碳酸乙酯 (Msc) 基团保护。所述硫酯 - 活化的肽被脱保护, 从 TAMPAL 树脂断裂, HPLC- 提纯, 低压冻干, 并在 -20°C 储存直到使用。所述结合肽采用一乙腈 - 水溶液 /10% 三氟乙酸混合液线性梯度洗脱。

[0529] 以提纯的 C- 末端 S-Fc 蛋白为起始, 天然化学连接反应以 Msc-NH-cys⁵-thr¹⁰-α- 硫酯肽 (Fc-A) 或 Msc-NH-sec⁵-thr¹⁰-α- 硫酯肽 (Fc-B) 在如前所述的无变性条件 (Evans et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 3923-3926) 下进行。所述硫酯 - 活化的肽以过量摩尔数与新鲜制备的 S-Fc 蛋白 (起始浓度, 1-200 微摩尔) 混合。所述溶液用一 Centriprep 3/30 仪器 (Millipore, MA) 浓缩, 然后用一 Centricon 3/10 仪器浓缩得到所述 S-Fc 的最后浓度为 0.15 至 1.2mM。在 4°C 孵化连接产物过夜, 并采用 SDS-page 电泳使其可视化。在天然化学连接反应后, 所述 N- 末端 Msc 保护基团通过在 pH13 短暂 (< 5 分钟) 孵化后被除去。所述 X-Fc 产物通过与采用实施例 1 所述的 A 蛋白琼脂糖亲和层析而被提纯, 以除去未反应的肽。

[0530] 图 36A 所示的所述天然连接产物的序列为 SEQ ID NO:105 所示。图 36B 所示的所述天然连接产物的序列为 SEQ ID NO:113 所示。

[0531] 实施例 3

[0532] 制备具有 C- 末端 -X- 末端的免疫球蛋白 Fc (Fc-X)

[0533] IgG 被表达成两种丰富的形式, 可溶的抗体分子和细胞 - 结合 B- 细胞受体。两种形式来源于一单一的信使 RNA, 起源于被选择剪接导致两个额外的外显子被加到 IgG 重链编码区域 (Tyler et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 2008-2012; Yamawaki-Kataoka et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 2623-2627)。添加的第一外显子 (M1 外显子) 编码一段 18 个氨基酸 (ELQLEESCAEAQDGLDG), 这灵活地使 IgG 延伸 (tether) 到细胞表面, 使其很好地选择新颖的具有 C- 末端 -X- 末端的 Fc- 类分子 (Fc-X)。所述 M1 区域的 C- 末端甘氨酸 -18 残基也非常适于制备用于产生 C- 末端活化硫酯的 Fc- 内蛋白融合蛋白。在内蛋白自动断裂反应后, 产生一硫酯中间体, 允许通过天然化学连接反应温和地将半胱氨酸或硒代半胱氨酸加到 C- 末端。

[0534] 因此, 宿主细胞被编码前 -Fc- 内蛋白嵌合体多肽的表达载体转染, 所述前 -Fc- 内蛋白嵌合体多肽由在 C- 末端 (ELQLEESCAEAQDGLDG) 以肽键与一自我 - 剪接内蛋白的 N- 末端在自动断裂位点 (图 37A) 或与所述包含一部分 M1 区域 (ELQLEESC) (图 37B) 的 Fc 蛋白连接的所述 M1 区域。为了确保所述 Fc-X 蛋白不含有 N- 末端 -X- 末端, 采用在赖氨酸残基前被细胞信号肽酶催化断裂的异源性信号肽 (部分 i)。因此, 由细胞信号肽酶催化的断裂将提供一在 N- 末端具有 lys-7 (EPKSCDKTHTCPPCP) Fc- 内蛋白融合蛋白 (部分 ii)。通过蛋白质剪接的内蛋白区域切除提供一 Fc- 硫酯中间体 (部分 iii)。最后, 具有无半胱氨酸和 / 或硒代半胱氨酸的 Fc- 硫酯进行天然化学连接反应, 以制备具有 C- 末端 -X- 末端 (ELQLEESCAEAQDGLDGX) 的 Fc-X 蛋白 (部分 iv)。

[0535] 图 37A 所示的所述 IgG1 前体多肽的序列为 SEQ ID NO:116 和 SEQ ID NO:117 所示。图 37A 所示的所述成熟的修饰的 IgG1 多肽的序列为 SEQ ID NO:118 至 SEQ ID NO:120 所示。图 37B 所示的所述 IgG1 前体多肽的序列为 SEQ ID NO:123 和 SEQ ID NO:124 所示。图 37B 所示的所述成熟 IgG1 多肽的序列为 SEQ ID NO:125 所示。

[0536] 在 N- 末端具有 lys-7 的所述 Fc- 内蛋白融合蛋白采用如实施例 1 所述的方法制备。采用具有壳多糖树脂而不是 A 蛋白琼脂糖的亲亲和层析开始最初的提纯步骤。在从树脂断裂后,所述活化的 Fc- 硫酯中间体被直接用于与半胱氨酸和 / 或硒代半胱氨酸天然连接。

[0537] 对于人 IgG1 M1 膜区域的合适的 DNA 序列在 Strausberg et. al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 16899-16903 (GenBank 登记号 . BC019046) 中已有描述。

[0538] 信号肽的合适的实例是 CD2 T- 细胞表面糖蛋白 (CD2) (GenBank 登记号 . NM_001767), 和 CD4 T- 细胞表面糖蛋白 (CD4) (GenBank 登记号 . NP_000616)。

[0539] 自我剪接内蛋白的合适的实例被发现存在于嗜热自养甲烷杆菌 (Methanobacterium thermoautotrophicum) 核苷酸还原酶大亚基 (MthRIR1) 中 (Genbank 登记号 . AE000845)。为限制内蛋白在与 Fc- 内蛋白融合结合处的自我断裂反应, 通过将位置 -1 的脯氨酸更改成甘氨酸及 C- 末端的位置 134 的天冬氨酸更改成丙氨酸来制备具有仅 N- 末端断裂活性的 MthRIR1 内蛋白变体 (Evans et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 3923-3926)。此外, 融合一环状芽胞杆菌壳多糖结合区域的 Mth RRI 内蛋白序列被用于促进采用亲和层析来提纯 Fc- 内蛋白嵌合体多肽。对修饰的 MthRIR1 内蛋白合适的序列在质粒 pTWIN-2 (New England BioLabs, MA) 中被发现。

[0540] 其它合适的实例被发现存在于蟾蜍分枝杆菌回旋酶亚单位 A (Mycobacterium xenopigyrase subunit A) (Mxe GyrA) (Genbank 登记号 . MXU67876) 和酿酒酵母空泡三磷酸腺苷酶 (Saccharomyces cerevisiae vacuolar ATPase) (参见 VMA1) (GenBank 登记号 . NC_001136)。自我剪接内蛋白的多数其它合适的实例在 Inbase : 内蛋白数据库 (Perler (2002) Nucl. Acids Res. 30, 383-384) 中已有描述。

[0541] 合适的表达载体通过连接一插入片段和由 EcoRI 和 BglIII 消化的载体片段来构建。对于未扩增的表达, 质粒 pCD2-Fc7-Mth (CD2 信号) 采用 SEQ ID NO : 9 和 SEQ ID NO : 1 构建, 和质粒 pCD4-Fc7-Mth (CD4 信号) 采用 SEQ ID NO : 10 和 SEQ ID NO : 1 构建。对于扩增的表达, 质粒 pCD2-Fc7-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO : 9 和 pSveCD4DHFR 构建, 和质粒 pCD4-Fc7-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO : 10 和 pSveCD4DHFR 构建。

[0542] 合适的表达载体通过连接一由 Hind III 和 EagIII 消化的插入片段和一由 Hind III 和 PspOM1 消化的载体片段来构建。质粒 pCDNA3-CD2-Fc7-Mth (CD2 信号) 采用 SEQ ID NO : 114 和 pCDNA3. 1 (+) 构建, 和质粒 pCDNA3-CD4-Fc7-Mth (CD4 信号) 采用 SEQ ID NO : 115 和 pCDNA3. 1 (+) 构建。质粒 pCDNA3-CD2-Fc7-ELQLEESC (CD2 信号) 采用 SEQ ID NO : 121 和 pCDNA3. 1 (+) 构建, 和质粒 pCDNA3-CD4-Fc7-ELQLEESC (CD4 信号) 采用 SEQ ID NO : 122 和 pCDNA3. 1 (+) 构建。

[0543] 壳多糖亲和提纯和自我剪接内蛋白自动断裂反应的一般原理已在 U. S. Patent No. 5, 834, 247 中描述, 该专利在这里已被合并作为参考。

[0544] 在宿主细胞转染后, 细胞培养上清液被加载到用壳多糖树脂 (New England BioLabs, MA) 填充的柱上, 所述壳多糖树脂采用缓冲液 A (包含 500mM NaCl 的 20mM Tris-HCl, pH 7.5) 平衡。用 10 个柱体积缓冲液 A 将未结合的蛋白质从柱上洗脱。通过在缓冲液 B (包含 0.5M NaCl 和 0.1M 2- 巯基乙磺酸 (MESNA) 的 20mM Tris-HCl, pH 8) 中快速平衡所述壳多糖树脂而开始巯基试剂 - 诱导的断裂。在所述蛋白质从柱上洗脱后, 在所述靶蛋白上同时产生一 C- 末端硫酯的所述断裂在 4°C 执行过夜。

[0545] 以纯化的 Fc- 硫酯中间体起始,天然化学连接反应以半胱氨酸或硒代半胱氨酸采用实施例 2 所述的方法执行。所述最后的 Fc-X 产物通过采用 A 蛋白琼脂糖的亲和层析来提纯以除去未反应的半胱氨酸和硒代半胱氨酸。

[0546] 实施例 4

[0547] 制备具有 N- 末端 -S- 末端和 C- 末端 -X- 末端的免疫球蛋白 Fc(S-Fc-X)

[0548] 所述 S-Fc 和 Fc-X 蛋白有助于制备具有与单一 Fc 区域结合的两个结合区域的免疫对称粘附素 (immunosymmetroadhesins) (参见下文)。结合区域被加到所述 N- 末端 -S- 末端 (S-Fc) 或 C- 末端 -X- 末端 (Fc-X)。有助于制备具有与单一 Fc 区域结合的两个结合区域的 bi-symmetroadhesins 的 S-Fc-X 区域采用如实施例 1 和实施例 3 所述的方法制备。

[0549] 因此,宿主细胞被编码前 -Fc- 内蛋白嵌合体多肽的表达载体转染,所述前 -Fc- 内蛋白嵌合体多肽包含在 C- 末端 (ELQLEESCAEAQDGLDG) 以肽键与一自我 - 剪接内蛋白的 N- 末端在自动断裂位点 (图 38) 连接的所述 M1 区域。异源的信号肽从具有 N- 末端半胱氨酸的蛋白质中选择 (部分 i)。因此,由细胞信号肽酶催化的断裂将提供一在 N- 末端具有 cys-5(CDKTHTCPPCP) 的 S-Fc- 内蛋白融合蛋白 (部分 ii)。通过蛋白质剪接的内蛋白切除提供一 Fc- 硫酯中间体 (部分 iii)。最后,具有无半胱氨酸和 / 或硒代半胱氨酸的 Fc- 硫酯进行天然化学连接反应,以制备具有 C- 末端 -X- 末端 (ELQLEESCAEAQDGLDGX) 的 S-Fc-X 蛋白 (部分 iv)。

[0550] 图 38A-38B 所示的所述 IgG1 前体多肽的序列为 SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:127 和 SEQ ID NO:128 所示。图 38A-38B 所示的所述成熟的修饰的 IgG1 多肽的序列为 SEQ ID NO:129 至 SEQ ID NO:131 所示。

[0551] 合适的表达载体通过连接一插入片段和一采用 EcoRI 和 BglIII 消化而制备的载体片段构成。对于未扩增的表达, pSHH-Fc5-Mth 采用 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:1 构成, pIFN-Fc5-Mth 采用 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:1 构成,以及 pCETP-Fc5-Mth 采用 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:1 构成。对于扩增的表达, pSHH-Fc5-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:11 和 pSveCD4DHFR 构成, pIFN-Fc5-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:12 和 pSveCD4DHFR 构成,以及 pCETP-Fc5-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:13 和 pSveCD4DHFR 构成。

[0552] 首先采用壳多糖亲和层析法从转染的宿主细胞的培养基上清液中提纯所述 S-Fc- 内蛋白融合蛋白。在从所述壳多糖树脂断裂后,所述 Fc- 硫酯中间体被直接加到 A 蛋白琼脂糖柱上,以便防止环化或聚合的副反应。所述柱结合活化的 S-Fc- 硫酯被直接用于与半胱氨酸和 / 或硒代半胱氨酸进行天然连接。然后冲洗所述柱,除去过量的氨基酸,所述 S-Fc-X 被从 A 蛋白琼脂糖中洗脱下来。

[0553] 实施例 5

[0554] 制备具有 N- 末端 -X- 末端和 C- 末端 -X- 末端的免疫球蛋白 Fc(X-Fc-X)

[0555] 所述 X-Fc 和 Fc-X 蛋白有助于制备具有与单一 Fc 区域结合的两个结合区域的免疫对称粘附素 (immunosymmetroadhesins) (参见下文)。结合区域被加到所述 N- 末端 -X- 末端 (X-Fc) 或 C- 末端 -X- 末端 (Fc-X)。有助于制备具有与单一 Fc 区域结合的两个结合区域的双 - 对称粘附素 (bi-symmetroadhesins) 的 X-Fc-X 区域采用如实施例 2 和实施例 3 所述的方法制备。

[0556] 因此,宿主细胞被编码前-Fc-内蛋白嵌合体多肽的表达载体转染,所述前-Fc-内蛋白嵌合体多肽包含在C-末端(ELQLEESCAEAQDGELDG)以肽键与一自我-剪接内蛋白的N-末端在自动断裂位点(图39)连接的所述M1区域。异源的信号肽从具有N-末端半胱氨酸的蛋白质中选择(部分i)。因此,由细胞信号肽酶催化的断裂将提供一在N-末端具有cys-11的成熟S-Fc-内蛋白融合蛋白(部分ii)。然后采用天然化学连接方法制备在N-末端具有cys-5或sec-5(XDKTHTCPPCP)的X-Fc-内蛋白融合蛋白(部分iii)。通过蛋白质剪接的内蛋白切除提供一Fc-硫酯中间体(部分iv)。最后,具有无半胱氨酸和/或硒代半胱氨酸的Fc-硫酯进行第二次天然化学连接反应,以制备具有C-末端-X-末端(ELQLEESCAEAQDGELDGX)的X-Fc-X蛋白(部分v)。备选地,部分iii可在部分iv和v后执行。

[0557] 图39A-39B所示的所述IgG1前体多肽的序列为SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:133和SEQ ID NO:134所示。图38A-38B所示的所述成熟的修饰的IgG1多肽的序列为SEQ ID NO:135至SEQ ID NO:138所示。

[0558] 合适的表达载体通过连接一插入片段和一采用EcoRI和Bg1III消化而制备的载体片段构成。对于未扩增的表达,质粒pSHH-Fc11-Mth采用SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:1构成,pIFN-Fc11-Mth采用SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:1构成,以及pCETP-Fc11-Mth采用SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:1构成。对于扩增的表达,pSHH-Fc11-Mth-DHFR采用SEQ ID NO:14和pSVeCD4DHFR构成,pIFN-Fc11-Mth-DHFR采用SEQ ID NO:15和pSVeCD4DHFR构成,以及pCETP-Fc11-Mth-DHFR采用SEQ ID NO:16和pSVeCD4DHFR构成。

[0559] 首先采用壳多糖亲和层析法从转染的宿主细胞的培养基上清液中提纯所述S-Fc-内蛋白融合蛋白。天然化学连接反应以Msc-NH-cys⁵-thr¹⁰- α -硫酯肽(Fc-A)或如(实施例2)所述的Msc-NH-sec⁵-thr¹⁰- α -硫酯肽(Fc-B)在所述壳多糖柱上进行。然后充分冲洗所述壳多糖柱以除去未反应的肽。然后进行内蛋白自动断裂反应。在断裂后,所述X-Fc-硫酯中间体被直接加到A蛋白琼脂糖上。然后冲洗所述柱,除去过量的氨基酸。所述Msc-阻滞的X-Fc-X被从柱上洗脱下来,处理一除去所述Msc保护基团,采用A蛋白琼脂糖再次提纯,得到最终的X-Fc-X产物。

[0560] 实施例6

[0561] CD4对称粘附素(Symmetroadhesins)

[0562] 一治疗HIV-1感染的治疗策略是基于人CD4,所述HIV-1受体的组分。CD4免疫粘附素(immunoadhesins)(Capon et al. (1989)Nature 337,525-531)能通过结合所述gp120包膜蛋白,有效地阻止HIV-1感染。所述阻止的活性存在于CD4的细胞外的区域(残基1至371)。

[0563] 因此,采用CD4-X蛋白制备不同的CD4对称粘附素,并分析它们结合gp120的能力和阻止HIV-1感染的能力。CD4对称粘附素的活性与如(Capon et al., ibid)所述方法而制备的CD4免疫粘附素的活性进行比较。

[0564] CD4-X蛋白采用实施例3所述方法制备。宿主细胞被编码前-CD4嵌合体多肽的表达载体转染,所述前-Fc-内蛋白嵌合体多肽包含在C-末端以肽键与一自我-剪接内蛋白的N-末端在自动断裂位点(图40A-40B)连接的所述CD4胞外域。

[0565] 由细胞信号肽酶引起的CD4信号序列(部分i)的断裂提供成熟CD4-内蛋白融合

蛋白(部分 ii)。内蛋白区域的切除提供一 CD4- 硫酯中间体(部分 iii)。最后,具有无半胱氨酸和/或硒代半胱氨酸的 CD4- 硫酯进行天然化学连接以制备具有 C-末端-X-末端的 CD4 区域(部分 iv)。

[0566] 这些多肽的序列为 SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142 和 SEQ ID NO:143 所示。

[0567] 合适的表达载体通过连接一插入片段和一采用 EcoRI 和 BglIII 消化而制备的载体片段构成。对于未扩增的表达,质粒 pCD4-Mth 采用 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:1 构成。对于扩增的表达,pCD4-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:17 和 pSVeCD4DHFR 构成。

[0568] 合适的表达载体通过连接一采用 Hind III 和 EagI 消化而制备的插入片段和一采用 Hind III 和 PspOM1 消化而制备的载体片段构成。质粒 pCDNA3-CD4-Mth 采用 SEQ ID NO:139 和 pCDNA3.1(+) 构成。

[0569] 图 56 显示在人 293 肾细胞表达人 CD4- 内蛋白融合蛋白。1-4 道表示图 40A 所示的 CD4- 内蛋白融合蛋白(ii)。细胞上清液:1 和 3 道;细胞溶胞产物:2 和 4 道。

[0570] CD4-X 被用于制备各种 CD4 对称粘附素(表 2)。半-对称粘附素(Hemi-symmetroadhesins)仅采用 CD4-X 蛋白制备,免疫对称粘附素(immunosymmetroadhesins)是采用具有 S-Fc、X-Fc 或 Fc-X 的 CD4-X 蛋白制备,以及双-对称粘附素是采用具有 S-Fc-X 或 X-Fc-X 的 CD4-X 蛋白制备。

[0571] CD4- 半-对称粘附素是采用 CD4-X 蛋白在温和的还原条件即激活 X-末端但不使所述蛋白变性下制备(Fleischman et al. (1962) Arch. Biochem. Biophys. 1(Suppl.), 174-180; Edelman et al. (1963) Proc. Nat. Acad. Sci. (1963) 50, 753-761)。CD4-X 蛋白(0.5 至 2.0mg/ml)溶于还原缓冲液(0.05M Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0,在 2-巯基乙醇中配制成 0.1M(made 0.1M in 2-mercaptoethanol)),室温孵化 1 小时。然后用葡聚糖凝胶 G-100 层析将蛋白转换到氧化缓冲液(0.1M K_2HPO_4)中,在带有松散填充的棉花塞的圆底玻璃试管中缓慢摇动,并允许在室温先继续 20 小时(Haber and Anfinsen(1961) J. Biol. Chem. 236, 422-424)。

[0572] CD4 免疫对称粘附素和 CD4 双-对称粘附素通过采用如上所述的 S-Fc、X-Fc、Fc-X、S-Fc-X 或 X-Fc-X 蛋白(表 2)在 A 蛋白琼脂糖珠上制备。所述结合蛋白质在还原缓冲液中室温温和搅拌 1 小时,然后用氧化缓冲液冲洗。CD4-X 用还原缓冲液处理,加到所述珠上,所述反应被允许在室温下继续进行 20 小时。

[0573] CD4-gp120 结合饱和和分析采用如(Lasky et al. (1987) Cell 50, 975-985)所述的放射性碘化的 gp120,按照(Smith et al. (1987) Science 238, 1704-1707)所述的方法进行。反应物(0.2)包括 0.25% NP-40、0.1% 去氧胆酸钠(sodium deoxycholate)、0.06M NaCl、具有 ^{125}I -gp120(3ng 至 670ng 在 2.9nCi/ng)的 pH 8.0,0.01M Tris-HCl(1× 缓冲液 A)。结合反应在 0°C、具有或缺失 50 微克未标记的纯化的 gp120 条件下进行 1 小时。然后由免疫沉淀作用来测定结合的 ^{125}I -gp120。结合反应物采用 5 微克正常兔血清在 0°C 预吸收(preabsorbed)1 小时,然后采用 40 微克 10% w/v Pansorbin(Calbiochem)在 30°C 清洁 30 分钟,接着在 0°C 与 2 微升政策血清或 5 微升(0.25 微克)的 OKT4 单克隆抗体(Ortho Biotech)孵化过夜。用 10 微升 Pansorbin 收集免疫沉淀物,2× 缓冲液中洗两次,水中洗一次,然后在 100°C、0.12M Tris-HCl pH 6.8,4% SDS,0.7M 巯基乙醇中洗脱 2 分钟。结合

^{125}I -gp120 的馏分在 γ 计数器中测定并采用 Scatchard 分析测定明显的解离 constant。

[0574] HIV-1 阻滞研究如 (Robert-Guroff et al. (1985) Nature 316, 72-74) 所述。相等体积的抑制剂和 HIV-1 (60 微升) 在 4°C 孵化 1 小时, 然后加入 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 的相同体积的 H9 细胞 (Gallo et al. (1984) Science 224, 500-503), 在 37°C 继续孵化 1 小时。在病毒吸收后, 150 微升的 2.5×10^5 细胞被转移到 2ml 的孵化培养基中。在 37°C 孵化 4 天后, 用新鲜培养基将所述培养物分成 1:2, 再另外孵化 3 天。采集培养物, 检测逆转录活性 (Groopman et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses (1987) 3, 71-85), 用 HIV-1 阳性血清进行免疫荧光反应如 (Poiesz et al. (1980) Proc. Acad. Nat. Sci. 77, 7415-7419) 所述。病毒的攻击剂量是 100 TCID₅₀ 的生长在 H9 细胞的相同系统中的 HIV-1 菌株 HTLV-III_B。孵化培养基是包含有 2mM L-谷氨酰胺、100 单位/ml 青霉素、100 微克/ml 链霉素、2 微克/ml 1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物 (polybrene) 以及 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。

[0575] 实施例 7

[0576] 肿瘤坏死因子受体对称粘附素

[0577] 治疗自身免疫疾病的治疗策略是基于肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和它与 TNF- α 抗体及受体 (TNR) 的结合反应。在成人风湿性关节炎、青少年型类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、银屑病关节炎、节段性回肠炎和溃疡性结肠炎中, 这些都是重要的治疗选择。

[0578] 因此各种 TNR 对称粘附素通过采用 TNR-X 蛋白制备, 并分析它们与 TNF- α 的结合能力和阻止 TNF- α 生物活性的能力。TNR 对称粘附素的活性与 TNR 免疫粘附素的活性比较 (Ashkenazi et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 10535-10539)。

[0579] 人 TNR 包括 TNR1A (Genbank 登记号 .NM_001065) 和 TNR1B (GenBank 登记号 .NM_001066)。TNF- α 抗体 Di62 包括 Di62 重链 (Genbank 登记号 .AJ002433) 和 Di62 轻链 (Genbank 登记号 .AJ002434) (此后, TNR1A = TNR₁; TNR1B = TNR₂; 以及 Di62-VH-CH+Di62-VkCk = TNR_{Fab})。

[0580] Di62-Vk 制备方法根据实施例 1 所述方法。Di62-VH-X、TNR1A-X 和 TNR1B-X 根据实施例 3 所述方法制备。

[0581] 宿主细胞与编码 Di62-VH-CH-内蛋白嵌合体多肽和 Di62-VkCk 蛋白的两种表达载体共转染, 导致所述 Di62-VH-CH-intein:Di62-Vk-Ck 蛋白的共表达, 共表达的产物用于制备所述 TNF_{Fab}-X 蛋白:

[0582] 1) 包括在 C-末端以肽键与一自我剪接内蛋白的 N-末端在自动断裂位点结合的所述 Di62-VH-CH1 域的前 -Di62-VH-内蛋白嵌合体多肽 (图 41A-41B); 和

[0583] 2) 包含 Di62-Vk-Ck 域的前 -Di62-Vk 多肽 (图 42)。

[0584] 由细胞信号肽酶引起的同源 Di62-VH-CH 信号序列 (部分 i) 的断裂提供成熟 Di62-VH-CH-内蛋白融合蛋白 (部分 ii)。由蛋白质剪接反应进行的内蛋白切除提供所述 Di62-VH-CH-硫酯中间体 (部分 iii)。最后, 具有无半胱氨酸和 / 或硒代半胱氨酸的 Di62-VH-CH-硫酯进行天然化学连接以制备具有 C-末端 -X-末端的 Di62-VH-CH-X 蛋白 (部分 iv) (参考图 41A-41B)。

[0585] 由细胞信号肽酶引起的同源 Di62-Vk-Ck 信号序列 (部分 i) 的断裂提供成熟 Di62-Vk-Ck-蛋白 (部分 ii) (参考图 42)。

[0586] 宿主细胞用编码所述 TNR1A-内蛋白嵌合体多肽和 TNR1B-内蛋白嵌合体多肽的表

达载体转染,以分别制备所述 TNF₁-X 和 TNF₂-X 蛋白:

[0587] 1) 包括在 C-末端以肽键与一自我剪接内蛋白的 N-末端在自动断裂位点结合的所述 TNR1A 胞外域的前-TNR1A-内蛋白嵌合体多肽(图 43);和

[0588] 2) 包括在 C-末端以肽键与一自我剪接内蛋白的 N-末端在自动断裂位点结合的所述 TNR1B 胞外域的前-TNR1B-内蛋白嵌合体多肽(图 44A)。

[0589] 由细胞信号肽酶引起的同源 TNR 信号序列(部分 i)的断裂提供成熟 TNR-内蛋白融合蛋白(部分 ii)。由蛋白质剪接反应进行的内蛋白切除提供所述 TNR-硫酯中间体(部分 iii)。最后,具有无半胱氨酸和/或硒代半胱氨酸的 TNR-硫酯进行天然化学连接以制备具有 C-末端-X-末端的 TNR-X 蛋白(部分 iv)(参考图 43、44A)。

[0590] 这些多肽的序列为 SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、SEQ ID NO:147 和 SEQ ID NO:148(Di62-VHCH)所示;为 SEQ ID NO:150 和 SEQ ID NO:151(Di62-VkCk)所示;为 SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155 和 SEQ ID NO:156(TNR1A)所示;为 SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160 和 SEQ ID NO:161(TNR1B)所示;以及为 SEQ ID NO:163、和 SEQ ID NO:164(TNR1B 免疫粘附素)所示。

[0591] 合适的表达载体通过连接一插入片段和一采用 EcoRI 和 BglIII 消化而制备的载体片段构成。对于未扩增的表达,质粒 pDi62-VHCH-Mth 采用 SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:1 构成,质粒 pDi62-VkCk 采用 SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:1 构成,质粒 pTNR1A-Mth 采用 SEQ ID NO:20 和 SEQ ID NO:1 构成,以及质粒 pTNR1A-Mth 采用 SEQ ID NO:22 和 SEQ ID NO:1 构成。对于扩增的表达,质粒 pDi62-VHCH-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:18 和 pSveCD4DHFR 构成,质粒 pDi62-VkCk-DHFR 采用 SEQ ID NO:19 和 pSveCD4DHFR 构成,质粒 pTNR1A-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:20 和 pSveCD4DHFR 构成,以及质粒 pTNR1A-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:22 和 pSveCD4DHFR 构成。

[0592] 合适的表达载体通过连接一采用 Hind III 和 EagI 消化而制备的插入片段和一采用 Hind III 和 PspOM1 消化而制备的载体片段构成。质粒 pCDA3-Di62-VHCH-Mth 采用 SEQ ID NO:144 和 pCDNA3.1(+) 构成。质粒 pCDA3-Di62-VkCk 采用 SEQ ID NO:149 和 pCDNA3.1(+) 构成。质粒 pCDNA-3-TNR1A-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:152 和 pCDNA3.1(+) 构成。质粒 pCDNA-3-TNR1B-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:157 和 pCDNA3.1(+) 构成。质粒 pCDNA-3-TNR1B-免疫粘附素采用 SEQ ID NO:162 和 pCDNA3.1(+) 构成。

[0593] 图 57 显示在人 293 肾细胞表达人 TNR1B 融合蛋白。2 和 5 道表示图 44A 所示的 TNR1B-内蛋白融合蛋白(ii)。1 和 3 道表示图 44B 所示的 TNR1B-免疫粘附素融合蛋白(ii)。3 和 6 道表示来源于模拟-转染细胞的蛋白。细胞上清液:1-3 道;细胞溶胞产物:4-7 道。7 道:TNR1B-免疫粘附素对照(R&D Systems)。

[0594] 图 58 显示具有 C-末端-S-末端的 TNR1B 对称粘附素亚单位。1-2 道表示在用壳多糖亲和层析提纯以及用 MESNA 断裂/洗脱后的图 44A 所示的 TNR1B 多肽(iii)。3 道表示图 44A 所示的 TNR1B 多肽(iii)与一荧光标记的肽(New England Biolabs)之间的天然连接产物。面(i):直接荧光;面(ii):与抗-TNR1B 抗体(R&D Systems)的 western 印迹;面(iii):SYPRORuby 染色(Sigma-Aldrich)。

[0595] 图 59 显示具有 C-末端-S-末端的 TNR1B 对称粘附素亚单位。5 道表示在用壳多糖亲和层析提纯以及用半胱氨酸断裂/洗脱后的图 44A 所示的 TNR1B 多肽(iv)。1-4 道表

示 TNR1B- 免疫粘附素。

[0596] 图 60 显示 TNR1B 对称粘附素。1-4 道表示图 44A 所示的在 10mM CuSO_4 存在下氧化前 (1 和 4 道) 以及氧化后的 TNR1B 对称粘附素 (iv)。3 和 6 道表示 TNR1B- 免疫粘附素对照。1-3 道:还原条件;4-6 道:非还原条件。TNR1B 对称粘附素单体 (42kd) 和二聚体 (84kd) 分别在 2 和 5 道以及 5 道上很明显。

[0597] 图 61A-61C 显示在 Biacore T-100 上对各种 TNR1B 多肽的 TNF- α 结合饱和和分析。(A) 采用标准 Biacore 胺化学方法将图 44A 所示的 TNR1B 对称粘附素 (iv) 共价结合到 Biacore CM-5 片上。(B) 采用标准 Biacore 胺化学方法将 TNR1B 免疫粘附素 (R&D Systems) 共价结合到 Biacore CM-5 片上。(C) 采用标准 Biacore 硫醇化学方法将图 44A 所示的 TNR1B 对称粘附素 (iv) 共价结合到 Biacore CM-5 片上。结合后,采用指示浓度的 TNF- α (R&D Systems) 进行结合饱和和分析。

[0598] 图 62A-62C 显示对图 61A-61C 所示的 TNF- α 结合饱和和分析的 Scatchard 分析。(A) 图 44A 所示的 TNR1B 对称粘附素 (iv) 采用胺化学共价结合; $K_d = K_d = 4.697 \times 10^{-9}\text{M}$ 。(B) TNR1B 免疫粘附素 (R&D Systems) 采用胺化学共价结合; $K_d = 4.089 \times 10^{-9}\text{M}$ 。(C) 图 44A 所示的 TNR1B 对称粘附素 (iv) 采用硫醇化学共价结合; $K_d = 0.8476 \times 10^{-9}\text{M}$ 。

[0599] 所述 TNR_i-X、TNR₂-X 和 TNR_{Fab}-X 蛋白单独地和以不同的组合方式用于制备各种 VEGFR 对称粘附素 (表 3、4 和 5)。也描述了对于每个组合的所获得的不同构型的数量以及一般结构。

[0600] 半-对称粘附素单独采用 TNR-X 蛋白来制备,免疫对称粘附素采用具有 S-Fc、X-Fc 或 Fc-X 的 TNR-X 蛋白来制备,以及双-对称粘附素采用具有 S-Fc-X 或 X-Fc-X 的 TNR-X 蛋白来制备。

[0601] 每个 TNR-X 蛋白或 TNR 对称粘附素由采用针对 TNR1A、TNR1B 和 Di62 (山羊-抗-小鼠) 的亚型-特定的、亲和-纯化的多克隆抗体的定量免疫试验来测定,以及免疫粘附素 (TNR1A-Ig 和 TNR2A-Ig) 作为参考标准。TNR 抗体、TNR-Ig 免疫粘附素和 TNF- α 蛋白从 R&D Systems (MN) 获得。

[0602] TNGR 对称粘附素与 TNF- α 结合的研究已有描述 (Ashkenazi et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 10535-10539)。单独样品 (1 微克/ml) 被固定到用山羊-抗-人 Ig Fc 抗体包覆的微量测试孔上。在包含 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 中与重组体人 ^{125}I -TNF- α (采用乳酸过氧化物酶进行放射性碘标记得到 $19.1\text{microCi}/\text{微克}$ 的特定活性; $1\text{microCi} = 37\text{kBq}$) 在 24°C 反应 1 小时。通过略去所述样品来测定非特异的结合。在竞争结合分析中, ^{125}I -TNF- α 在增加浓度的未标记的 TNF- α 的存在下与固定的样品孵化。根据下列方程式从竞争 IC_{50} 的值来测定所述 K_d : $K_d = \text{IC}_{50}/(1+[T]/K_{dT})$,其中 [T] 是示踪剂的浓度 (0.1nM) 以及 K_{dT} 是由结合饱和决定的示踪剂的 K_d (80pM)。

[0603] 对 TNF 细胞毒性的研究已有描述 (Kawade and Watanabe (1984) J. Interferon Res. 4, 571-584)。小鼠 L-M 细胞被移入微量测试板 (每孔 4×10^4 个细胞),然后在所述样品或其它抑制剂存在或缺失的条件下用更生霉素 (3 微克/ml) 和 TNF- α 或 TNF- β (1 纳克/ml) 处理。在 39°C 孵化 20 小时后,用结晶紫染色排除实验测定细胞存活率。

[0604] 通过对年龄为 6 周至 8 周的 BALB/c 大鼠注射内毒素来研究感染性休克的鼠模型。给动物静脉注射 LD_{100} 剂量的沙门氏菌流产儿源性内毒素 (每只鼠 175 微克) 的磷酸盐缓

冲生理盐水 (PBS) 溶液, 然后存活至少 78 小时。TNR1- 免疫粘附素和 CD4- 免疫粘附素分别用作阳性和阴性对照。每个用 PBS 稀释, 在内毒素给药前或后静脉注射。

[0605] 实施例 8

[0606] 血管内皮生长因子受体对称粘附素

[0607] 治疗血管原性疾病的治疗策略是基于血管内皮生长因子 (VEGF) 和它们与 VEGF 受体 (VGFR) 结合相互作用。VEGF- 抗体和 VGFR- 免疫粘附素是有希望的候选对于治疗许多转移癌包括结肠、直肠、肺和乳房以及与年龄相关的黄斑退行性改变。

[0608] 因此, 各种 VGFR 对称粘附素通过采用 VGFR-X 蛋白来制备, 并分析它们结合 VEGF 的能力和阻止 VEGF 生物活性的能力。VGFR 对称粘附素的活性与 VGFR 免疫粘附素的活性比较 (Park et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 25646-25654)。

[0609] 人 VGFR 包括 VGFR1 (Genbank 登记号 .NM_002019)、VGFR2 (GenBank 登记号 .NM_002253) 和 VGFR3 (GenBank 登记号 .NM_002020)。VGFR1-X、VGFR2-X 和 VGFR3-X 根据实施例 3 所述方法制备。宿主细胞用表达载体转染, 所述表达载体编码:

[0610] 1) 包括在 C- 末端以肽键与一自我剪接内蛋白的 N- 末端在自动断裂位点结合的所述 VGFR1 胞外域的前 -VGFR1- 内蛋白嵌合体多肽 (图 45A-45C);

[0611] 2) 包括在 C- 末端以肽键与一自我剪接内蛋白的 N- 末端在自动断裂位点结合的所述 VGFR1 胞外域的前 -VGFR2- 内蛋白嵌合体多肽 (图 46A-46C); 和

[0612] 3) 包括在 C- 末端以肽键与一自我剪接内蛋白的 N- 末端在自动断裂位点结合的所述 VGFR1 胞外域的前 -VGFR1- 内蛋白嵌合体多肽 (图 47A-47C)。

[0613] 由细胞信号肽酶引起的 VGFR 信号序列 (部分 i) 的断裂提供成熟 VGFR- 内蛋白融合蛋白 (部分 ii)。内蛋白切除提供一 VGFR- 硫酯中间体 (部分 iii)。最后, 具有无半胱氨酸和 / 或硒代半胱氨酸的 VGFR- 硫酯进行天然化学连接以制备具有 C- 末端 -X- 末端的 VGFR 域 (部分 iv)。

[0614] 这些多肽的序列为 SEQ ID NO :166、SEQ ID NO :167、SEQ ID NO :168 和 SEQ ID NO :169 (VGFR1) 所示; 为 SEQ ID NO :171、SEQ ID NO :172、SEQ ID NO :173 和 SEQ ID NO :174 (VGFR2) 所示; 以及为 SEQ ID NO :176、SEQ ID NO :177、SEQ ID NO :178 和 SEQ ID NO :179 (VGFR3) 所示。

[0615] 合适的表达载体通过连接一插入片段和一采用 EcoRI 和 BglIII 消化而制备的载体片段构成。对于未扩增的表达, 质粒 pVGFR1-Mth 采用 SEQ ID NO :22 和 SEQ ID NO :1 构成, 质粒 pVGR1-Mth 采用 SEQ ID NO :23 和 SEQ ID NO :1 构成, 以及质粒 pVGR1-Mth 采用 SEQ ID NO :24 和 SEQ ID NO :1 构成。对于未扩增的表达, 质粒 pVGFR1-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO :22 和 pSVeCD4DHFR 构成, 质粒 pVGR1-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO :23 和 pSVeCD4DHFR 构成, 以及质粒 pVGR1-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO :24 和 pSVeCD4DHFR 构成。

[0616] 合适的表达载体通过连接一采用 Hind III 和 EagI 消化而制备的插入片段和一采用 Hind III 和 PspOM1 消化而制备的载体片段构成。质粒 pCDNA3-VGFR1-Mth 采用 SEQ ID NO :165 和 pCDNA3.1 (+) 构成。质粒 pCDNA3-VGFR2-Mth 采用 SEQ ID NO :170 和 pCDNA3.1 (+) 构成。质粒 pCDNA3-VGFR3-Mth 采用 SEQ ID NO :175 和 pCDNA3.1 (+) 构成。

[0617] 所述 VGFR1-X、VGFR2-X 和 VGFR3-X 蛋白单独地和以不同的组合方式用于制备各种 VGFR 对称粘附素 (表 6、7 和 8)。也描述了对于每个组合的所获得的不同构型的数量以

及一般结构。

[0618] 半-对称粘附素单独采用 VEGFR-X 蛋白来制备,免疫对称粘附素采用具有 S-Fc、X-Fc 或 Fc-X 的 VEGFR-X 蛋白来制备,以及双-对称粘附素采用具有 S-Fc-X 或 X-Fc-X 的 VEGFR-X 蛋白来制备。

[0619] 每个 VEGFR-X 蛋白或 VEGFR 对称粘附素由采用针对 VEGFR1、VEGFR2 和 VEGFR3 的亚型-特定的、亲和-纯化的多克隆抗体的定量免疫试验来测定,以及免疫粘附素 (VEGFR1-Ig、VEGFR2-Ig 和 VEGFR3-Ig) 作为参考标准。VEGFR 抗体、VEGFR-Ig 免疫粘附素和 VEGF₁₆₅ 蛋白从 R&D Systems(MN) 获得。

[0620] VEGFR 对称粘附素与 VEGF 结合的研究是采用 VEGF 结合饱和分析。反应物 (0.1ml) 包括具有 ¹²⁵I-VEGF₁₆₅ (< 9000cpm/孔, 5.69×10^7 cpm/微克) 的 0.10% 胎牛血清的 PBS 溶液 (缓冲液 A)。氯胺-T(Chloramine T) 用于碘化 VEGF₁₆₅, 如 (Keyt et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 5638-5646) 所述。结合反应在 4°C、具有或缺失 50 纳克未标记的纯化的 VEGF₁₆₅ 条件下进行过夜。然后通过 96-孔分离免疫吸附剂实验板中获得用来测定结合的 ¹²⁵I-VEGF₁₆₅。所述板用在 pH 9.6 的 50mM Na₂CO₃ 中的 2 微克/ml 亲和-纯化的山羊抗-人 Fc IgG (Organon-Teknika) 在 4°C 包覆过夜,并在缓冲液 A 中预阻止一小时。然后在包覆的孔中室温下孵化结合反应物 4 小时,接着用缓冲液 A 冲洗 4 次。结合 ¹²⁵I-VEGF₁₆₅ 的馏分在 γ 计数器中测定。采用 4-参数非线性曲线拟合程序来分析数据 (Kalidagraph, Abelbeck Software, PA)。

[0621] VEGF 与 VEGFR 对称粘附素的结合也可采用竞争结合试验研究。ELISA 板用 2 微克/ml 兔 F(ab')₂ 对人 IgG Fc (Jackson ImmunoResearch, PA) 进行包覆,并用缓冲液 A 阻滞。KDR-IgG (3 纳克/ml) 的缓冲液 A 溶液被加到所述板,并孵化 1 小时。连续稀释的样品与 2nM 生物素酰化的 VEGF 在试管中孵化 1 小时。反应物然后被转移到 ELISA 板中并孵化 1 小时。冲洗后,生物素酰化的 VEGF 与 KDR-Ig 结合的部分采用山葵过氧化物酶-标记的抗生物素蛋白链菌素 (Sigma, MO) 检测,接着用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物检测。采用 4-参数非线性回归曲线拟合分析来分析数据。

[0622] 内皮细胞生长抑制研究如 (Leung et al. (1989) Science 246, 1306-1309) 所述。牛肾上腺皮质毛细管内皮细胞在补充 10% 小牛血清和 2mM 谷氨酰胺 (生长培养基) 的低葡萄糖达尔伯克改良伊格尔培养基 (GIBCO) 中培养。以 6×10^3 细胞/孔的密度在 6 孔板上接种细胞。向细胞加入浓度为 1 至 5000 纳克/ml 的连续稀释的样品,孵化 2 至 3 小时。加入纯化的 VEGF₁₆₅, 得到最后浓度为 3 纳克/ml。然后孵化细胞 5 至 6 天,用胰岛素从板上移除,用库尔特粒度仪 (Coulter Electronics, FL) 测定细胞数量。采用 4-参数非线性回归曲线拟合分析来分析数据。

[0623] 体内肿瘤研究如 (Kim et al. (1993) Nature 362, 841-844; Borgstrom et al. (1996) Cancer Res. 56, 4032-4039) 所述。在补充 10% 胎牛血清和 2mM 谷氨酰胺的 DMEM/F12 中培养人 A673 横纹肌肉瘤细胞 (ATCC CRL-1598)。给年龄 6 至 10 周的雌性 BALB/c 裸鼠在背部皮下注射 200 微升的 2×10^6 肿瘤细胞。肿瘤细胞接种 (24 小时) 后,用连续稀释的样品以 0.05mg/kg、0.5mg/kg 和 5mg/kg 的剂量处理动物 (每组 10 只),以 0.1ml 体积每周腹膜给药两次。每隔一周检测肿瘤大小。肿瘤细胞接种后四周,处死动物,移除肿瘤病称重。采用 ANOVA 进行统计分析。

[0624] 实施例 9

[0625] ErbB 对称粘附素

[0626] 治疗恶性病的治疗策略是基于表皮生长因子-类受体 (ErbB) 和它们的配体,包括 neu 基因调节剂/hereregulins (NRG/HRG),以及 EGF- 相关的蛋白质配体家族。ErbB- 抗体和 ErbB- 免疫粘附素正处于临床研究,并被很好的证明能治疗转移乳腺癌多度表达 ErbB2。

[0627] 因此,各种 ErbB 对称粘附素采用 ErbB-X 蛋白来制备,并分析它们与 heregulins 结合的能力以及阻止 heregulin 生物活性的能力。ErbB 对称粘附素的活性与 ErbB 免疫粘附素的活性比较 (Sliwkowski et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 14661-14665)。

[0628] 人 ErbB 包括 ErbB1 (Genbank 登记号 .NM_005228); ErbB2 (GenBank 登记号 .NM_004448); ErbB3 (GenBank 登记号 .NM_001982); 和 ErbB4 (GenBank 登记号 .NM_005235)。根据实施例 3 所述方法制备 ErbB1-X、ErbB2-X、ErbB3-X 和 ErbB4-X。宿主细胞被表达载体转染,所述表达载体编码:

[0629] 1) 包括在 C-末端以肽键与一自我剪接内蛋白的 N-末端在自动断裂位点结合的所述 ErbB1 胞外域的前-ErbB1-内蛋白嵌合体多肽(图 48A-48B);

[0630] 2) 包括在 C-末端以肽键与一自我剪接内蛋白的 N-末端在自动断裂位点结合的所述 ErbB2 胞外域的前-ErbB2-内蛋白嵌合体多肽(图 49A-49B);

[0631] 3) 包括在 C-末端以肽键与一自我剪接内蛋白的 N-末端在自动断裂位点结合的所述 ErbB3 胞外域的前-ErbB3-内蛋白嵌合体多肽(图 50A-50B);和

[0632] 4) 包括在 C-末端以肽键与一自我剪接内蛋白的 N-末端在自动断裂位点结合的所述 ErbB4 胞外域的前-ErbB4-内蛋白嵌合体多肽(图 51A-50B)。

[0633] 由细胞信号肽酶引起的同源 ErbB 信号序列(部分 i)的断裂提供成熟 ErbB-内蛋白融合蛋白(部分 ii)。由蛋白质剪接引起的内蛋白区域切除提供一 ErbB- 硫酯中间体(部分 iii)。最后,具有无半胱氨酸和/或硒代半胱氨酸的 ErbB- 硫酯进行天然化学连接以制备具有 C-末端-X-末端的 VGFR 域(部分 iv)。

[0634] 这些多肽的序列为 SEQ ID NO:181、SEQ ID NO:182、SEQ ID NO:183 和 SEQ ID NO:184 (ERBB1) 所示;为 SEQ ID NO:186、SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:188 和 SEQ ID NO:189 (ERBB2) 所示;为 SEQ ID NO:191、SEQ ID NO:192、SEQ ID NO:193 和 SEQ ID NO:194 (ERBB3) 所示;以及为 SEQ ID NO:196、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:198 和 SEQ ID NO:199 (ERBB4) 所示。

[0635] 合适的表达载体通过连接一插入片段和一采用 EcoRI 和 BglIII 消化而制备的载体片段构成。对于未扩增的表达,质粒 pErbB1-Mth 采用 SEQ ID NO:25 和 SEQ ID NO:1 构成,质粒 pErbB2-Mth 采用 SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:1 构成,质粒 pErbB3-Mth 采用 SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:1 构成,以及质粒 pErbB4-Mth 采用 SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:1 构成。对于扩增的表达,质粒 pErbB1-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:25 和 pSVeCD4DHFR 构成,质粒 pErbB2-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:26 和 pSVeCD4DHFR 构成,质粒 pErbB3-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:27 和 pSVeCD4DHFR 构成,以及质粒 pErbB4-Mth-DHFR 采用 SEQ ID NO:28 和 pSVeCD4DHFR 构成。

[0636] 合适的表达载体通过连接一采用 Hind III 和 EagI 消化而制备的插入片段和一采用 Hind III 和 PspOM1 消化而制备的载体片段构成。质粒 pCDNA3-ERBB1-Mth 采用

SEQ ID NO :180 和 pCDNA3.1(+) 构成。质粒 pCDNA3-ERBB2-Mth 采用 SEQ ID NO :185 和 pCDNA3.1(+) 构成。质粒 pCDNA3-ERBB3-Mth 采用 SEQ ID NO :190 和 pCDNA3.1(+) 构成。质粒 pCDNA3-ERBB4-Mth 采用 SEQ ID NO :195 和 pCDNA3.1(+) 构成。

[0637] 所述 ErbB1-X、ErbB2-X、ErbB3-X 和 ErbB4-X 蛋白单独地和以不同的组合方式用于制备各种 VGFR 对称粘附素 (表 9、10 和 11)。也描述了对于每个组合的所获得的不同构型的数量以及一般结构。

[0638] 半 - 对称粘附素单独采用 ErbB-X 蛋白来制备,免疫对称粘附素采用具有 S-Fc、X-Fc 或 Fc-X 的 ErbB-X 蛋白来制备,以及双 - 对称粘附素采用具有 S-Fc-X 或 X-Fc-X 的 ErbB-X 蛋白来制备。

[0639] 每个 ErbB-X 蛋白或 ErbB 对称粘附素由采用针对 ErbB1、ErbB2、Erb3 和 ErbB4 的亚型 - 特定的、亲和 - 纯化的多克隆抗体的定量免疫试验来测定,以及免疫粘附素 (ErbB1-Ig、ErbB2-Ig、ErbB3-Ig 和 ErbB4-Ig) 作为参考标准。ErbB 抗体、ErbB-Ig 免疫粘附素、NRG1- α ₁₇₇₋₂₄₁ 蛋白、NRG1- β ₁₇₆₋₂₄₆ 蛋白、NRG1- β ₁₋₂₄₆ 蛋白和 NRG1-SMDF₁₋₂₉₆ 蛋白从 R&D Systems (MN) 获得。

[0640] ErbB 对称粘附素与 neu 基因调节剂结合的研究是采用 HRG 结合饱和测定 (Sliwkowski et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 14661-14665)。反应在 Nunc breakapart 免疫 - 模板上进行。板孔用 100 微升的 5 微克 /ml 山羊 - 抗 - 人抗体 (Boehringer Mannheim) 溶于 50mM 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 的溶液在 4°C 包覆过夜。用 200 微升冲洗缓冲液 (PBS/0.05% 吐温 -20TM) 冲洗板两次,然后与 100 微升 1% BSA/PBS 在室温简单孵化 30 分钟。除去缓冲液,每个孔用 100 微升样品溶于 1% BSA/PBS 的溶液在剧烈的从一边到另一边的旋转下孵化 1 小时。用冲洗缓冲液冲洗板三次,加入不同量的冷竞争者 γ -HRG 和 ¹²⁵I-HRG β 1 进行竞争结合,在剧烈的从一边到另一边的旋转下室温孵化 2 至 3 小时。用冲洗缓冲液快速冲洗孔三次,排出液体,每个孔用 γ 计数器计数。采用修饰的配体程序进行 Scatchard 分析 (Munson, P. and Robard, D. (1980) Analytical Biochemistry 107 :220-239)。

[0641] ErbB 对称粘附素抑制 HRG- 依赖的增殖的能力可在 MCF7 乳腺癌细胞株中研究 (Lewis et al. (1996) Cancer Res. 56, 1457-1465)。³H- 胸腺嘧啶脱氧核苷掺入可在 96- 孔格式中进行。50 :50F12/DMEM (高糖) 的血清 - 饥饿的 MCF7-7 细胞以 10,000 细胞 / 孔的密度接种于板上。多样化浓度的样品与 1nM HRG 孵化,并加到所述细胞中。孵化 15 小时后,用 ³H- 胸腺嘧啶脱氧核苷标记细胞,测量 DNA 合成 (20mL 的 1/20 稀释的氘化胸腺嘧啶品种 : Amersham TRA120B363, 1mCi/ml)。然后采用 Packard Filtermate 196 采集器采集细胞到 GF/C unifilters (96 孔格式)。采用 Packard Topcount 仪器计数过滤器。

[0642] 筛选

[0643] 本发明尤其有助于通过采用连续氨基酸序列 / 或包括所述任意种药物的化合物筛选技术筛选化合物。在该实验中采用的化合物可以是在溶液中游离的、附着于固体载体的、长在细胞表面的或位于细胞内的。药物筛选的一种方法是利用可被表达所述化合物的重组体核苷酸稳定转化的真核或原核宿主细胞。所述细胞,可以是存活形式或固定形式,可被用于标准结合试验。例如,一种可能测量在化合物或一片段与被测试的所述因子之间形成的合成物的形成。备选地,一种可检测由被测试因子引起的在缩水化合物和它的靶细胞或靶受体之间合成物形成的减少。

[0644] 因此,本发明提供方法用于筛选药物或任何其他能影响疾病或障碍的与所述化合物的一段连续氨基酸相关的因子。这些方法包括将所述因子与所述化合物或它的片段接触并分析实验 (I) 用于测定所述因子和所述化合物或它的片段之间的合成物的存在,或 (ii) 用于测定所述化合物或其片段与所述细胞之间的合成物的存在,通过本领域所熟知的方法。在所述竞争性结合试验中,所述化合物或其片段被典型地标记。在适当的孵化后,从以束缚型存在的形式中分离游离的化合物或其片段,然后测量游离的或未合成的标记的数量,以检测所述特定的因子与所述化合物或其片段结合或干扰所述化合物 / 细胞合成物的能力。

[0645] 药物筛选的另一个技术提供高通量筛选对多肽具有合适亲合力的化合物,并在 W084/03564, published on Sep. 13, 1984 中详细描述。简要说明,在固体基质 (例如塑针 (pin) 或一些其它表面) 上合成大量的不同的小肽测试化合物。与应用到上述化合物或其片段一样,所述肽测试化合物与化合物或其片段反应,并冲洗。结合化合物或其片段采用本领域所熟知的方法检测。纯化的化合物或其片段也可直接被包覆到板上,用于前述药物筛选技术。此外,可用非中和抗体捕获所述肽,并将其固定在固体载体上。

[0646] 本发明也涉及竞争药物筛选试验的使用,其中能特定地结合化合物或其片段中和抗体与测试化合物竞争结合化合物或其片段。在这种方式里,所述抗体可用于检测与所述化合物的所述段连续氨基酸共享一或多个抗原决定簇的任意肽的存在。

[0647] 推理性药物设计

[0648] 推理性药物设计的目的是提出感兴趣的生物活性多肽的结构类似物 (例如本发明所述的一化合物或本发明所述化合物的一氨基酸序列) 或与例如激动剂拮抗剂或抑制剂反应的小分子的结构类似物。这些实例中的任一个可被用于形成药物,所述药物是本发明所述化合物或本发明所述化合物的氨基酸序列的更高活性或稳定形式,或在体内增强或干扰本发明所述化合物或本发明所述化合物的氨基酸序列的功能 (cf., Hodgson, *Bio/Technology*, 9 :19-21 (1991))。

[0649] 在一种方法中,本发明所述化合物或本发明所述化合物的氨基酸序列,或化合物 - 抑制剂合成物的三维结构采用 X 射线衍射晶体分析法,计算机模型设计或更典型地,采用两种方法的组合来测定。本发明所述化合物或本发明所述化合物的氨基酸序列的形状和电荷,都必须明确以揭示所述结构和测定活性位点。然后相关的结构信息被用于设计类似的分子或用于鉴别有效地抑制剂。推理性药物设计的有用的实例可包括具有提高的活性或稳定性的分子,如 Braxton and Wells, *Biochemistry*, 31 :7796-7801 (1992) 所示,或充当天然肽的抑制剂、激动剂或拮抗剂的分子,如 Athauda et al., *J. Biochem.*, 113 : 742-746 (1993) 所述。

[0650] 也可以分离一通过功能试验选择的特定 - 靶点的抗体,如上所述,然后分离它的晶体结构。该方法基本上得到一作为随后药物设计基础的药效团。可以通过产生针对一功能的药理学活性的抗体的抗独特型抗体 (抗 -ids) 一起避免蛋白质晶体学。作为一镜像的镜像,所述抗 -ids 的结合位点被期望是所述原始受体的类似物。所述抗 -ids 然后被用于从化学或生物学制备的肽库鉴别并分离肽。所述分离的肽然后充当所述药效团。

[0651] 因为本发明,充足数量的本发明所述化合物或本发明所述化合物的氨基酸序列可被制造成可用于实现所述分析研究例如 X 射线衍射晶体分析。

[0652] 生物活性试验

[0653] 这里所揭露的化合物,包括它的组分例如一化合物的一段连续氨基酸,是容易地通过采用本领域已知的一个或多个标准生物活性试验来测定。以下是所述试验的非限制实例:

[0654] 所述化合物抑制刺激内皮细胞生长的血管内皮生长因子 (VEGF) 的能力

[0655] 本发明所述各种化合物抑制刺激内皮细胞生长的 VEGF 的能力已被测定。在该试验中阳性的试验表明所述化合物有助于抑制哺乳动物中内皮细胞生长,其中该效果对于例如抑制肿瘤生长是有益的。

[0656] 在所述试验的特定实例中,牛肾上腺皮质毛细管内皮细胞 (ACE) (来源于初期的培养,12-14 传代的最大量) 以 500 个细胞 / 孔每 100 微升的密度接种于 96 孔板。试验培养基包括低糖 DMEM、10% 小牛血清、2mM 谷氨酰胺和 $1 \times$ 青霉素 / 链霉素 / 两性霉素 B。对照孔包括下列: (1) 不加 ACE 细胞; (2) 仅仅 ACE 细胞; (3) ACE 细胞加 5ng/ml FGF; (4) ACE 细胞加 3ng/ml VEGF; (5) ACE 细胞加 3ng/ml VEGF 加 1ng/ml TGF- β ; 以及 (6) ACE 细胞加 3ng/ml VEGF 加 5ng/ml LIF。所述试样,聚-his 标记的化合物 (在 100 微升体积中),然后被加到所述孔 (分别稀释 1%、0.1% 和 0.01%)。所述细胞培养在 37°C / 5% CO₂ 条件下孵化 6-7 天。孵化后,孔中的培养基被吸走,用 PBS 冲洗细胞 1 次。酸性磷酸酯酶反应混合物 (100 微升; 0.1M 醋酸钠, pH 5.5, 0.1% Triton X-100, 10mM 磷酸对硝基苯酯) 然后被加到每个孔中。在 37°C 孵化 2 小时后,加入 10 微升 1M NaOH 终止反应。用全自动定量绘图酶标仪在 405nm 测定吸光度 (OD)。

[0657] 测定的化合物的活性被计算作为相对于没有刺激的细胞 VEGF (3ng/ml) 刺激增殖的 (在 OD405nm 通过测量酸性磷酸酯酶活性来测定) 抑制百分率。TGF- β 可被采用充当在 1ng/ml 活性参照物,因为 TGF- β 阻止 70-90% 的 VEGF- 刺激的 ACE 细胞增殖。该结果预示了在癌症治疗中利用测定的化合物以及尤其是在抑制肿瘤血管发生中。计算相对于没有刺激的细胞,由所述测定的化合物导致的抑制 VEGF 刺激增殖的百分率,来测定数值 (相对抑制),然后将用已知能阻止 70-90% VEGF 刺激细胞增殖的 1ng/ml 的 TGF- β 除以该百分数得到抑制百分率。该结果被认为是积极的,如果所述测定的化合物显示 30% 或更大的抑制 VEGF 刺激内皮细胞生长 (相对的抑制 30% 或更大)。

[0658] 视网膜神经元存活率

[0659] 该实验可证明如果所述已实验的化合物在增强视网膜神经元细胞存活率是有效的,因此是有助于治疗视网膜病症或损伤包括,例如治疗哺乳动物由于色素性视网膜炎导致的失明、AMD 等。

[0660] Sprague Dawley 大鼠 (rat pups) 在出生后第 7 天 (混合种群:神经胶质和视网膜神经类型) 用 CO₂ 麻醉后采用断头术处死,并在无菌条件下移去眼睛。神经视网膜被从色素上皮和其它视觉组织切开,然后在采用 0.25% 胰蛋白酶在 Ca²⁺, Mg²⁺- 无 PBS 的单细胞悬浮液中离解 (dissociate)。所述视网膜在 37°C 孵化 7-10 分钟后,加入 1ml 大豆胰蛋白酶抑制剂灭活所述胰蛋白酶。在补充 N₂ 和具有或缺乏所述特定的测试化合物的 DMEM/F12 中细胞以 100,000 细胞每孔接种于 96 孔板中。用于所有试验的细胞在 5% CO₂ 的水饱和的大气中 37°C 生长。培养 2-3 天后用钙黄绿素染色细胞,然后采用 4% 多聚甲醛固定,DAPI 染色用于测定总的细胞计数。通过采用 CCD 照相机和 MacIntosh 的 NIH 图像软件在 20 \times 物

镜放大下定量总的细胞（荧光的）。随机选择孔中的 Fields。

[0661] 在这里描述了所述各种浓度的已试验的化合物的效应，其中用 DAPI- 标记的细胞培养 2-3 天后的总数除以钙黄绿素阳性细胞的培养 2-3 天后的总数，计算得到存活百分率。任何高于 30% 存活率被认为是阳性。

[0662] 视杆细胞存活率

[0663] 本实验用于证明是否本发明一些化合物作用于增强视杆细胞的存活率 / 增殖从而有助于治疗视网膜病症或损伤包括例如治疗哺乳动物由于色素性视网膜炎导致的失明、AMD 等。Sprague Dawley 大鼠 (rat pups) 在出生后第 7 天（混合种群：神经胶质和视网膜神经类型）用 CO₂ 麻醉后采用断头术处死，并在无菌条件下移去眼睛。神经视网膜被从色素上皮和其它视觉组织切开，然后在采用 0.25% 胰蛋白酶的无 Ca²⁺, Mg²⁺ 的 PBS 溶液的单细胞悬浮液中离解 (dissociate)。所述视网膜在该溶液中 37°C 孵化 7-10 分钟后，加入 1ml 大豆胰蛋白酶抑制剂灭活所述胰蛋白酶。在补充 N₂ 和具有或缺乏所述特定的测试化合物的 DMEM/F12 中的细胞以 100,000 细胞每 ml 接种于 96 孔板中。用于所有试验的细胞在 5% CO₂ 的水饱和的大气中 37°C 生长。培养 2-3 天后，细胞用 4% 多聚甲醛固定，然后用 CellTracker Green CMFDA. Rho4D2 (腹水 (ascites) 或 IgG 1:100) 染色，采用定向于视色素视紫红质的单克隆抗体通过间接免疫荧光法检测视杆细胞。结果被计算作为存活%：用培养 2-3 天的视紫红质阳性细胞总数除以培养 2-3 天钙黄绿素阳性细胞总数。通过采用 CCD 照相机和 MacIntosh 的 NIH 图像软件在 20× 物镜放大下定量总的细胞（荧光的）。随机选择孔中的 Fields。

[0664] 诱导内皮细胞凋亡

[0665] 本发明所揭示的化合物诱导内皮细胞凋亡的能力可在人静脉的脐静脉内皮细胞 (HUVEC, Cell Systems) 中测试。在所述实验中阳性测试是指示所述化合物在治疗上有助于治疗肿瘤以及血管病症，其中包括有益的内皮细胞凋亡。

[0666] 在 10% 血清 (CSG- 培养基, Cell Systems) 中的细胞以总体积 100 μl 密度为 2×10⁴ 细胞每孔接种于 96 孔微量滴定板 (Amersham Life Science, cytostar-T scintillating microplate, RPNQ160, 无菌, 组织培养处理的, 各自包装的)。在第 2 天，加入三份稀释成 1%、0.33% 和 0.11% 的包含已试验的化合物的测试样本。没有细胞的孔作为空白对照，仅有细胞的孔作为阴性对照。作为阳性对照，采用 1 : 3 连续稀释的 50 μl 3× 种十字孢碱。所述化合物诱导凋亡的能力通过处理用于检测锚定蛋白 (AnnexinV) (钙和磷脂结合蛋白的一员) 的 96 孔板检测凋亡来测定。

[0667] 0.2ml 锚定蛋白 - 维生素 H 原液 (100 μg/ml) 用 4.6ml 2×Ca²⁺ 结合缓冲液和 2.5% BSA (1 : 25 稀释) 来稀释。50 μl 稀释的锚定蛋白 - 维生素 H 溶液被加到每个孔 (除了对照孔外) 中得到最后浓度为 1.0 μg/ml。样本与膜联蛋白 - 维生素 H 孵化 10-15 分钟，然后直接加入 ³⁵S- 抗生物素蛋白链菌素。³⁵S- 抗生物素蛋白链菌素在 2×Ca²⁺ 结合缓冲液、2.5% BSA 中稀释，并加到所有孔中，得到最后浓度为 3×10⁴cpm/ 孔。然后封板，在 1000rpm 离心 15 分钟，放置在定轨振荡器上 2 小时。在 1450Microbeta Trilux (Wallac) 上进行分析。上述背景的百分率代表高于阴性对照的每分钟计数的量的百分比。百分比高于或等于上述背景的 30% 被认为是阳性。

[0668] PDB12 细胞抑制

[0669] 本实验将证明是否本发明所述化合物具有有效抑制 PDB12 胰管细胞产生蛋白质从而有助于治疗有关于胰腺分泌蛋白质的疾病（包括糖尿病等）。

[0670] 在 100 μ L/180 μ L 生长培养基中的 PDB12 胰管细胞以 5×10^3 细胞每孔的密度接种于纤维连接蛋白包覆的 96 孔板。然后向孔中加入具有所述化合物测试样本或缺乏所述化合物的阴性对照的 100 μ L 生长培养基，得到最后体积为 200 μ L。对照包括包含在本实验中显示无活性的蛋白质的生长培养基。细胞在 37 $^{\circ}$ C 孵化 4 天。然后向每个孔中加入 20 μ L 的 Alamar Blue Dye (AB)，4 小时后在一激发波长 530nm 和发射波长 590nm 的微量滴定板读数仪上检测荧光读数。采用的标准是缺乏牛垂体浸膏 (BPE) 的细胞和具有各种浓度的 BPE 的细胞。来源于未知的缓冲液对照或 CM 对照在每个 96 孔板上运行 2 次。

[0671] 这些试验通过将由所述化合物处理的细胞产生的 Alamar Blue Dye 计算的蛋白质浓度与由阴性对照细胞产生的 Alamar Blue Dye 计算的蛋白质浓度对比，允许人们去计算产生蛋白质的下降的百分比。当与所述阴性对照细胞相比较，产生蛋白质的下降的百分比高于或等于 25% 时，被认为是阳性。

[0672] 刺激成年心脏肥大

[0673] 该试验被设计用于检测本发明所述各种化合物刺激成年心脏肥大的能力。本试验中的阳性测试表示所述化合物被预期有助于治疗各种心功能不全疾病。

[0674] 从成年 (250g) Sprague Dawley 大鼠新鲜分离的心室肌细胞以总体积 180 μ l 密度为 2000 细胞每孔接种于板中。第一天分离细胞并接种于板中，第二天加入包含化合物的测试样本或仅仅生长培养基（阴性对照）(20 μ l 体积)，然后在第 5 天固定和染色细胞。染色后，观察细胞大小，其中对比对照细胞显示没有生长增强的细胞的值是 1.0，对比对照细胞显示很大的生长增强的细胞的值是 2.0。对比阴性对照细胞的本试验的任何程度的生长增强被认为是阳性。

[0675] PDB12 细胞增殖

[0676] 该试验证明是否本发明所述各种化合物能有效诱导 PDB12 胰管细胞增殖，从而有助于治疗有关于胰腺分泌蛋白质的疾病（包括糖尿病等）。

[0677] 在 100 μ L/180 μ L 生长培养基中的 PDB12 胰管细胞以 5×10^3 细胞每孔的密度接种于纤维连接蛋白包覆的 96 孔板。然后向孔中加入具有所述化合物测试样本或缺乏所述化合物的阴性对照的 100 μ L 生长培养基，得到最后体积为 200 μ L。对照包括包含在本实验中显示无活性的蛋白质的生长培养基。细胞在 37 $^{\circ}$ C 孵化 4 天。然后向每个孔中加入 20 μ L 的 Alamar Blue Dye (AB)，4 小时后在一激发波长 530nm 和发射波长 590nm 的微量滴定板读数仪上检测荧光读数。采用的标准是缺乏牛垂体浸膏 (BPE) 的细胞和具有各种浓度的 BPE 的细胞。来源于未知的缓冲液对照或 CM 对照在每个 96 孔板上运行 2 次。

[0678] 通过将由所述已测试的化合物处理的细胞产生的 Alamar Blue Dye 计算的蛋白质浓度与由阴性对照细胞产生的 Alamar Blue Dye 计算的蛋白质浓度对比，来计算产生蛋白质的增加的百分比。当与所述阴性对照细胞相比较，产生蛋白质的增加的百分比高于或等于 25% 时，被认为是阳性。

[0679] 促进心脏新生肥大 (Heart Neonatal Hypertrophy)

[0680] 该试验被设计用于检测本发明所述化合物刺激新生儿心脏肥大的能力。本试验中的阳性测试表示所述化合物被预期有助于治疗各种心功能不全疾病。

[0681] 从年龄为1天的Sprague Dawley大鼠分离心肌细胞。在第一天将细胞($180 \mu\text{l}$ at $7.5 \times 10^4/\text{ml}$, 血清 $< 0.1\%$, 新鲜分离的)注入DMEM/F12+4% FCS预先包覆的96孔板。在第一天将包含所述已试验的化合物的测试样本或仅仅培养基(阴性对照)($20 \mu\text{l}/\text{孔}$)直接加到所述孔中。然后第二天加入PGF($20 \mu\text{l}/\text{孔}$), 得到最后浓度为 10^{-6}M 。然后在第四天将细胞染色, 第五天观察评分, 其中对比阴性对照显示大小没有增加的细胞被评分为0.0, 对比阴性对照显示大小有较小的至中等的增加的细胞被评分为1.0, 对比阴性对照显示大小有大量增加的细胞被评分为2.0。本试验的阳性结果是分值为1.0或更高。

[0682] 混合淋巴细胞反应试验中的刺激活性

[0683] 该试验用于检测是否本发明所述化合物是有活性的刺激的T淋巴细胞增殖的刺激剂。刺激淋巴细胞增殖的化合物有助于促进有益的免疫应答。治疗剂可采用本发明所述化合物的拮抗物形式, 例如, 对抗所述化合物的鼠-人嵌合体的、人化的或人类抗体。

[0684] 本试验的基本实验设计被描述在Current Protocols in Immunology, unit 3.12; edited by J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober, National Institutes of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc.

[0685] 更具体地, 在一试验变型(variant)中, 外周血单核细胞(PBMC)通过白细胞分离法被从哺乳动物个体, 例如人类志愿者中分离(一个捐赠者提供PBMCs刺激剂, 另一个捐赠者提供PBMCs应答剂)。如果希望, 分离后将细胞在胎牛血清和DMSO中冷冻。冷冻的细胞可在试验培养基中被解冻过夜(37°C , $5\% \text{CO}_2$), 然后冲洗, 在 3×10^6 细胞/ ml 的试验培养基(RPMI; 10% 胎牛血清, 1% 青霉素/链霉素, 1% 谷氨酰胺, 1% HEPES, 1% 非必需氨基酸, 1% 丙酮酸酯)中再悬浮。PBMCs刺激剂通过照射所述细胞(约3000Rads)而制备。

[0686] 通过将混合物注入三份孔中准备该试验, 所述混合物为: $100 : 1$ 的稀释成 1% 或 0.1% 的测试样本、 $50 : 1$ 的被照射的刺激剂细胞和 $50 : 1$ 的PBMC细胞应答剂。

[0687] 采用100微升的细胞培养基或100微升的CD4-IgG作为对照。然后 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 中孵化所述孔4天。在第5天, 每个孔用氙化胸腺嘧啶脉冲(pulsed)($1.0\text{mC}/\text{孔}$; Amersham)。6小时后冲洗细胞3次, 然后评价被吸走的标记物。

[0688] 在本试验的另一个变型中, PBMCs被从Balb/c小鼠和C57B6小鼠的脾脏分离。所述从脾脏新鲜采集的细胞被置入试验培养基中(RPMI; 10% 胎牛血清, 1% 青霉素/链霉素, 1% 谷氨酰胺, 1% HEPES, 1% 非必需氨基酸, 1% 丙酮酸酯), 并通过将这些细胞放置在LympholyteM(Organon Teknika)上, 分离所述PBMCs, 在2000rpm离心20分钟, 收集并冲洗在试验培养基中的单核细胞层, 然后在 1×10^7 细胞/ ml 的试验培养基中再悬浮所述细胞。然后按上述方法进行试验。

[0689] 具有增加大于或等于 180% 的超过对照的阳性增加被认为是优选的。然而, 任何大于对照的值显示对所述测试蛋白质的刺激效应。

[0690] 诱导周细胞c-Fos

[0691] 该试验证明本发明所述化合物诱导在周细胞中的c-Fos表达的能力, 从而它们的用途不仅是作为对于周细胞相关的肿瘤的特异性诊断标记, 也是产生将被预期有助于治疗周细胞相关的肿瘤的拮抗物的诊断标记。具体地, 在第一天, 从VEC(工艺) Technologies获得周细胞, 从烧瓶移去所有的培养物除了5ml培养基。在第二天, 所述周细胞受胰蛋白酶作用, 冲洗, 旋转, 然后注入96孔板。在第7天, 除去培养基, 用 $100 \mu\text{l}$ 的测

试化合物和对照物（阳性对照 = 500ng/ml 的 (DME+5%血清 +/-PDGF) ;阴性对照 = 蛋白质 32) 处理所述周细胞。平均复制,并测量 SD/CV。由化学发光单位 (RLU) 光度计读数比频率表示的超过蛋白质 32(缓冲液对照) 的增加倍数被绘制成直方图。超过蛋白质 32 值的 2 倍被认为是本试验的阳性结果。ASY 基质 :生长培养基 = 低糖 DMEM = 20% FBS+1× 青霉素 / 链霉素 +1× 两性霉素 B。试验培养基 = 低糖 DMEM+5% FBS。

[0692] 本发明所述化合物刺激蛋白聚糖从软骨释放的能力

[0693] 本发明所述化合物刺激蛋白聚糖从软骨组织释放的能力可按如下方法测试。

[0694] 无菌分离年龄 4-6 个月大的猪的掌指关节,通过小心切割单个掌以避免下面的骨头来移开关节软骨。绞碎所述软骨,在 95% 空气、5% CO₂ 的潮湿大气,具有 0.1% BSA 和 100U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的无血清 (SF) 的培养基 (DME/F12 1 : 1) 中成批培养 24 小时。冲洗 3 次后,将近 100mg 的关节软骨被等分放入微管中,在上述 SF 培养基中再孵化 24 小时。然后单独加入所述化合物到 1%或加入所述化合物与 18ng/ml 白介素 -1 α (已知的蛋白聚糖从软骨组织释放的刺激剂) 的组合物。然后采集上清液,采用 1,9- 二甲基 - 亚甲蓝 (DMB) 测热试验 (Farndale and Buttle, Biochem. Biophys. Acta 883 : 173-177 (1985)) 测试蛋白聚糖的数量。本试验的阳性结果表明所述测试化合物将发现,例如被用于治疗运动相关的关节问题、关节软骨故障、骨关节炎或类风湿性关节炎。

[0695] 皮肤血管渗透性试验

[0696] 该试验被用于测试是否本发明所述化合物刺激免疫应答和诱发炎症通过在动物的注射部位诱导单核细胞、嗜曙红细胞和 PMN 浸润。刺激免疫应答的化合物在治疗上有助于刺激有益的免疫应答。该皮肤血管渗透性试验按下述方法进行。重 350g 或更重的无毛豚鼠用氯胺酮 (75-80mg/Kg) 麻醉,并肌内注射 (IM) 5mg/Kg 赛拉嗪。将本发明纯化的化合物样本或条件培养基测试样本肌内注射到测试动物背部,每注射部位 100 μl。可以每只动物约 10-30,优选约 16-24 个注射部位。心内注射 1 μl 的偶氮蓝 (Evans blue) 染色 (1% 的生理缓冲盐水溶液)。然后在注射后 1 小时和 6 小时测量注射部位的斑点 (mm 直径)。注射后 6 小时处死动物。活检每个皮肤注射部位并用福尔马林固定。然后制备所述皮肤用于组织病理学的评价。评价每个位点的炎症细胞浸润入皮肤。具有可视的炎症细胞炎症的部位被评分作为阳性。炎症细胞可以是嗜中性的、嗜曙红的、单核细胞的或淋巴细胞的。在注射部位至少最小量的血管周围的浸润被评分为阳性,在注射部位无浸润被评分为阴性。

[0697] 促进 F2a 诱导的心脏新生的肥大

[0698] 该试验被设计用于检测本发明所述化合物刺激新生儿心脏肥大的能力,阳性测试表示所述化合物有助于治疗各种心功能不全疾病。

[0699] 从年龄为 1 天的 Harlan Sprague Dawley 大鼠分离心肌细胞。在第一天将细胞 (180 μl 的 7.5×10^4 /ml,血清 < 0.1%,新鲜分离的) 接种于 DMEM/F12+4% FCS 预先包覆的 96 孔板。在第一天将包含所述已试验的化合物的测试样本 (20 μl/ 孔) 直接加到所述孔中。然后第二天加入 PGF (20 μl/ 孔),得到最后浓度为 10^{-6} M。然后在第四天将细胞染色,第五天观察评分。根据细胞大小进行可视评分,其中对比阴性对照显示大小没有增加的细胞被评分为 0.0,对比阴性对照显示大小有较小的至中等的增加的细胞被评分为 1.0,以及对对比阴性对照显示大小有大量增加的细胞被评分为 2.0。分值为 1.0 或更高被认为是阳性。

[0700] 不包括 PBS,因为钙浓度对于测试应答是关键的。用 DMEM/F12+4% FCS (200 μl/

孔) 包覆所述板。测试培养基包括:DMEM/F12(具有 2.44g 重碳酸盐), μ g/ml 运铁蛋白, 1 μ g/ml 胰岛素, 1 μ g/ml 抑酞酶 (aprotinin), 2mmol/L 谷氨酰胺, 100U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素。包括甘露醇 (4%) 的蛋白质缓冲液在 1/10 (0.4%) 和 1/100 (0.04%) 产生阳性信号 (分值 3.5), 但在 1/1000 (0.004%) 不产生。因此采用包含甘露醇的测试样本缓冲液。

[0701] 在混合淋巴细胞反应 (MLR) 试验中的抑制活性

[0702] 该样本证明一个或多个本发明所述化合物是有活性的刺激的 T 淋巴细胞增殖的抑制剂。抑制淋巴细胞增殖的化合物在治疗上有助于抑制有益的免疫应答。

[0703] 本试验的基本实验设计被描述在 Current Protocols in Immunology, unit 3.12; edited by J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober, National Institutes of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc.

[0704] 更具体地, 在一试验变型中, 外周血单核细胞 (PBMC) 通过白细胞分离法被从哺乳动物个体, 例如人类志愿者中分离 (一个捐赠者提供 PBMCs 刺激剂, 另一个捐赠者提供 PBMCs 应答剂)。如果希望, 分离后将细胞在胎牛血清和 DMSO 中冷冻。冷冻的细胞可在试验培养基中被解冻过夜 (37°C, 5% CO₂), 然后冲洗, 在 3 × 10⁶ 细胞 /ml 的试验培养基 (RPMI; 10% 胎牛血清, 1% 青霉素 / 链霉素, 1% 谷氨酰胺, 1% HEPES, 1% 非必需氨基酸, 1% 丙酮酸酯) 中再悬浮。PBMCs 刺激剂通过照射所述细胞 (约 3000 Rads) 而制备。

[0705] 通过将混合物注入三份孔中准备该试验, 所述混合物为: 100 : 1 的稀释成 1% 或 0.1% 的测试样本、50 : 1 的被照射的刺激剂细胞和 50 : 1 的 PBMC 细胞应答剂。

[0706] 采用 100 微升的细胞培养基或 100 微升的 CD4-IgG 作为对照。然后 37°C, 5% CO₂ 中孵化所述孔 4 天。在第 5 天, 每个孔用氙化胸腺嘧啶脉冲 (pulsed) (1.0mCi/孔; Amersham)。6 小时后冲洗细胞 3 次, 然后评价被吸走的标记物。

[0707] 在本试验的另一个变型中, PBMCs 被从 Balb/c 小鼠和 C57B6 小鼠的脾脏分离。所述从脾脏新鲜采集的细胞被置入试验培养基中 (RPMI; 10% 胎牛血清, 1% 青霉素 / 链霉素, 1% 谷氨酰胺, 1% HEPES, 1% 非必需氨基酸, 1% 丙酮酸酯), 并通过将这些细胞放置在 Lympholyte M (Organon Teknika) 上, 分离所述 PBMCs, 在 2000rpm 离心 20 分钟, 收集并冲洗在试验培养基中的单核细胞层, 然后在 1 × 10⁷ 细胞 /ml 的试验培养基中再悬浮所述细胞。然后按上述方法进行试验。

[0708] 对于抑制化合物, 任何下降小于对照的被认为是阳性结果, 其中少于或等于 80% 的降低是优选的。然而, 任何小于对照的值显示对所述测试蛋白质的抑制效应。

[0709] 诱导内皮细胞凋亡 (ELISA)

[0710] 本发明所揭示的化合物诱导内皮细胞凋亡的能力可在人静脉的脐静脉内皮细胞 (HUVEC, Cell Systems) 中测试, 通过在补充 100ng/ml 血管内皮细胞生长因子、0.1% BSA、1 × 青霉素 / 链霉素的 0% 血清培养基中, 采用 96 孔格式测试。

[0711] 在所述实验中阳性测试是指示所述化合物在治疗上有助于治疗任意各种与不希望的內皮细胞生长包括例如抑制肿瘤生长相关的条件。允许用 100 μ l 0.2% 凝胶的 PBS 溶液包覆 96 孔板, 凝胶化发生 > 30 分钟。完全吸走所述凝胶混合物, 接种总体积 100 μ l 每孔、终浓度为 2 × 10⁴ 细胞 /ml、在 10% 包含血清的培养基中的 HUVEC 细胞。所述细胞生长 24 小时, 加入包含感兴趣化合物的测试样本。

[0712] 对于所有孔,加入 100 μ l 的补充 100ng/ml 血管内皮细胞生长因子、0.1% BSA、1 \times 青霉素 / 链霉素的 0% 血清培养基 (Cell Systems)。加入稀释成 1%、0.33% 和 0.11% 的三份包含所述已测试的化合物的测试样本。采用缺乏细胞的孔作为空白,仅有细胞的孔作为阴性对照。作为阳性对照,采用 1 : 3 连续稀释的 50 μ l 3 \times 种十字孢碱。在进行 ELISA 前孵化细胞 24 至 35 小时。

[0713] ELISA 被用于检测制备溶液的凋亡水平,所述制备溶液根据 Boehringer 手册 [Boehringer, Cell Death Detection ELISA plus, Cat No. 1920685]。样本制备:在 1krpm 旋转 96 孔板 10 分钟 (200g);通过快速翻转,把所述板倒置在纸巾上除去残留液体来除去上清液。对于每个孔,加入 200 μ l 1 \times 溶胞缓冲液,不需振摇在室温孵化 30 分钟。在 1krpm 旋转 96 孔板 10 分钟,转移 20 μ l 的溶胞产物 (胞质部分) 到抗生物素蛋白链菌素包覆的 MTP 中。80 μ l 免疫试剂混合物被加到每个孔的 20 μ l 溶胞产物中。所述 MTP 用粘合箔包覆,通过将其放置在一定轨振荡器 (200rpm) 上室温孵化 2 小时。两小时后,抽吸移去上清液,用 250 μ l 1 \times 孵化缓冲液每孔冲洗所述孔 3 次 (抽吸移去)。在每个孔加入基质溶液 (100 μ l),在定轨振荡器上室温 250rpm 孵化直到用于光量分析的颜色发展充分 (大约在 10-20 分钟后)。采用一 96 孔读数仪在 405nm 计数所述板,参考波长是 492nm。对于 PIN 32 (缓冲液对照) 获得的水平被定为 100%。对于诱导凋亡作用,具有水平 > 130% 的样本被认为是阳性。

[0714] 人静脉内皮细胞钙流通测试

[0715] 该测试被设计用于检测是否本发明所述化合物显示具有刺激人脐静脉内皮细胞 (HUVEC, Cell Systems) 钙流通的能力。在一定的配体结合它们的受体时钙内流是很好的证明应答。在本钙内流测试中导致阳性应答的测试化合物可被认为是去结合特定受体并激活人内皮细胞中生物信号途径。这可最终导致,例如内皮细胞分裂、内皮细胞增殖抑制、内皮血管形成、细胞迁移、凋亡等。

[0716] 在生长培养基 (50 : 50 缺乏甘氨酸,1% 谷氨酰胺,10mM Hepes,10% FBS,10ng/ml bFGF) 中的人静脉脐静脉内皮细胞 (HUVEC, Cell Systems),以 2×10^4 细胞 / 孔的细胞密度接种于 96 孔微量滴定可视板 -96 (Packard Instrument Company Part#6005182) 微量滴定板。注入后第二天,用缓冲液 (HBSS 加 10mM Hepes) 冲洗所述细胞 3 次,并剩余 100 μ l / 孔。然后加入 100 μ l / 孔的 8 μ M 的 Fluo-3 (2 \times)。所述细胞在 37 $^{\circ}$ C / 5% CO₂ 中孵化 1.5 小时。孵化后,用缓冲液 (如上所述) 冲洗细胞 3 次,剩余 100 μ l / 孔。所述化合物的测试样本在不同的 96 孔板以在缓冲液中 5 \times 浓度来制备。阳性对照对应 50 μ M 伊屋诺霉素 (5 \times);阴性对照对应蛋白质 32。在一 FLIPR (Molecular Devices) 仪器上运行细胞板和样本板。所述 FLIPR 仪器添加 25 μ l 测试样本到所述细胞,并在一分钟的每一秒计数,然后下三分钟的每 3 秒计数。

[0717] 计算所述曲线从基线到上升的最大值的荧光变化 (Δ 变化),平均重复 (replicates averaged)。检测荧光增加率,仅那些具有 Δ 变化大于 1000 及在 60 秒内上升的样本被认为是阳性。

[0718] 成纤维细胞 (BEK-21) 增殖

[0719] 该测试证明是否本发明所述化合物作用于诱导在培养基中的哺乳动物成纤维细胞增殖,从而功能是哺乳动物系统中的有用的生长因子。

[0720] 该测试按如下进行。BHK-21 成纤维细胞加入标准生长培养基中,以总体积 100 μ l、2500 细胞 / 孔接种。然后在 1 μ g/ml 的肝素存在下向所述孔加入所述化合物、 β -FGF (阳性对照) 或不加 (阴性对照),得到最终总体积为 200 μ l。然后细胞在 37 $^{\circ}$ C 孵化 6 至 7 天。孵化后,移去所述培养基,用 PBS 冲洗细胞,然后加入一酸性磷酸酯酶底物反应混合物 (100 μ l/ 孔)。然后在 37 $^{\circ}$ C 孵化细胞 2 小时。加入 10 μ l/ 孔的 1N NaOH,终止酸性磷酸酯酶底反应。然后在 OD405nm 计数所述板。本实验的阳性是酸性磷酸酯酶活性,其至少 50% 大于阴性对照。

[0721] 抑制成年心脏肥大

[0722] 该试验被设计用于检测抑制成年心脏肥大的作用。在本试验中测试阳性的化合物可被发现有助于治疗心脏肥厚相关的心脏疾病。

[0723] 从成年 (250g) Harlan Sprague Dawley 大鼠新鲜分离心室肌细胞,所述细胞以体积 180 μ l 密度为 2000/ 孔接种于板中。在第二天,加入包含所述已测试的化合物的测试样本 (20 μ L)。在第五天,固定细胞,然后染色。在几小时后,也可通过 PCR 从细胞检测 ANP 信息的增加。结果基于细胞大小的可视分数: 0 = 无抑制, -1 = 低抑制, -2 = 高抑制。小于 0 的分数被认为 *ishi* 阳性。对应 0.1mM 的去氧肾上腺素 (PE) 的活性参考,是阳性对照。实验培养基包括: M199 (修饰的) - 无谷氨酰胺, NaHCO₃, 酚磺酞 (phenol red), 补充 100nM 胰岛素、0.2% BSA、5mM 肌酸、2mM L- 肉毒碱、5mM 牛磺酸、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素 (CCT 培养基)。仅使用 96 孔板内部的 60 孔。在这些孔中,6 孔被保留用于阴性对照和阳性 (PE) 对照。

[0724] 诱导内皮细胞的 *c-fos*

[0725] 该实验被设计用于检测是否本发明所述化合物显示诱导内皮细胞 *c-fos* 的能力。在本试验中测试阳性的化合物将被预期有助于治疗当血管发生是有益时的条件或疾病,包括例如伤口愈合等 (是这些化合物的激动剂)。在本试验中测试阳性的化合物的拮抗剂将被预期有助于治疗癌性肿瘤。

[0726] 在生长培养基 (50% Ham' s F12w/o GHT: 低糖, 和 50% 无甘氨酸的 DMEM: 具有 NaHCO₃、1% 谷氨酰胺、10mM HEPES、10% FBS、10ng/ml bFGF) 中的人静脉脐静脉内皮细胞 (HUVEC, Cell Systems), 以 1×10^4 细胞 / 孔的细胞密度接种于 96 孔微量滴定板。注入后第二天,移去所述生长培养基使细胞饥饿,用 100 μ l/ 孔的测试样本和对照 (阳性对照 = 生长培养基; 阴性对照 = 蛋白 32, 缓冲液 = 10mM HEPES、140mM NaCl、4% (w/v) 甘露醇、pH 6.8) 处理所述细胞。所述细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 中孵化 30 分钟。移去所述样本,接着进行 bDNA kit 实验设计 (ChironDiagnostics, cat. #6005-037) 的第一部分,其中下面列出的每个被利用的 (capitalized) 试剂 / 缓冲液可从 kit 获得。

[0727] 简要地,基于制造商提供的信息计算试验所需的 TM Lysis 缓冲液和探针的数量。向 TMLysis 缓冲液中加入适当量的解冻的探针。将 Capture Hybridization 缓冲液加热至室温。所述 bDNA 针被安装在金属针支架,将 100 μ l Capture 杂交缓冲液加到每个需要的 b-DNA 孔中,接着孵化至少 30 分钟。具有细胞的所述测试板从培养箱中移出,采用多头抽真空装置温和地移去所述培养基。100 μ l 的具有探针的 Lysis 杂交缓冲液被快速地移入微量滴定板的每个孔中。然后在 55 $^{\circ}$ C 孵化所述板 15 分钟。从培养箱移出后,所述板被放置在具有微量滴定转接头 (microtiter adapter head) 的涡旋混合机上,在所述 #2 装置上涡旋

1 分钟。80 μ l 的溶胞产物被移去,并加到包含有所述 Capture 杂交缓冲液的 bDNA 孔中,用移液管吸上吸下至混合。所述板在 53°C 孵化至少 16 小时。

[0728] 在第二天,进行 bDNA kit 实验设计的第二部分。具体地,从培养箱移出所述板,放在实验台上冷却 10 分钟。基于制造商提供的信息计算所需的加入体积。通过在 AL 杂交缓冲液中以 1 : 100 稀释所述放大的浓度 (Amplifier Concentrate) (20fm/ μ l) 来制备一放大的使用溶液 (Amplifier Working Solution)。从所述板移去所述杂交混合物,用 WashA 冲洗两次。50 μ l 放大的使用溶液被加到每个孔中,所述孔在 53°C 孵化 30 分钟。然后从培养箱中移出所述板,冷却 10 分钟。通过在 AL 杂交缓冲液中以 1 : 100 稀释所述标记浓度 (Label Concentrate) (40pmoles/ μ l) 来制备所述标记探针使用溶液 (Label Probe Working Solution)。在 10 分钟的冷却后,所述放大杂交混合物被移去,用 Wash A 冲洗所述板两次。50 μ l 的标记探针使用溶液被加到每个孔中,所述孔在 53°C 孵化 15 分钟。冷却 10 分钟后,所述底物被加热到室温。在将 3 μ l 底物增强子加入到用于试验的每 ml 的需要的底物后,所述板被允许冷却 10 分钟,移去所述标记杂交混合物,用 WashA 冲洗所述板两次, Wash D 冲洗三次。将 50 μ l 的具有增强子的所述底物溶液加到每个孔中。所述板在 37°C 孵化 30 分钟,在合适的光度计中读取 RLU。

[0729] 平均复制,检测变异系数。检测超过阴性对照 (如上所述的蛋白 32/HEPES 缓冲液) 值的活性增加倍数由化学发光单位 (RLU)。如果所述化合物表现出超过所述阴性缓冲液对照的至少 2 倍值,所述结果被认为是阳性。阴性对照 = 1.00RLU 在 1.00% 稀释液。阳性对照 = 8.39RLU 在 1.00% 稀释液。

[0730] 豚鼠血管渗透

[0731] 该实验被设计用于检测是否本发明所述化合物显示诱导血管渗透的能力。在本试验中测试阳性的化合物将被预期有助于治疗从增强血管渗透受益的条件,包括例如从增强局部免疫系统细胞浸润受益的条件。

[0732] 采用肌肉注射氯胺酮 (75-80mg/kg) 和 5mg/kg 赛拉嗪麻醉称重 350g 或更重的无毛豚鼠。包含所述已试验的化合物的测试样本或无已试验的化合物的生理缓冲液以 100 μ l 每注射位点给测试动物在背部皮肤进行皮内注射。每个动物有将近 16-24 个注射位点。然后心内注射 1ml 的偶氮蓝 (Evans blue) 染色 (1% 的 PBS 溶液)。对所述化合物的皮肤血管渗透应答 (例如在注射的注射位点的斑点) 通过测量在施用所述试验材料后 1 和 6 小时从注射位点蓝色渗透的直径 (mm) 来观察评分。观察记录在注射位点的蓝色的 mm 直径以及血管渗透的严重度。对于本实验,当测试纯化的蛋白质,直径至少 5mm 的斑点被认为是阳性,预示诱导血管渗漏或渗透的能力。对于条件培养基样本,应答大于 7mm 直径被认为是阳性。0.1 μ g/100 μ l 的人类 VEGF 被用作为阳性对照,诱导 15-23mm 直径的应答。

[0733] 检测内皮细胞凋亡 (FACS)

[0734] 在凝胶化的 T175 烧瓶中采用 10 传代以下的 HUVEC 细胞,检测在这里揭示的所述化合物在人静脉脐静脉内皮细胞 (HUVEC, Cell Systems) 诱导内皮细胞凋亡。本实验中测试阳性的化合物被预期在治疗上有助于治疗当内皮细胞凋亡是有益时的条件,包括例如治疗肿瘤。

[0735] 在第 1 天,分裂细胞 [420,000 细胞每凝胶化的 6cm 皿 ($H \times 10^3$ cells/cm² Falcon, Primaria)],并在包含血清的培养基 (CS-C, Cell System) 中生长过夜或 16 小时至 24 小

时。

[0736] 在第 2 天,用 5ml PBS 冲洗细胞 $1\times$;加入具有 VEGF(100ng/ml) 的 3ml 的 0% 血清培养基;和加入 30 μ l 的 PRO 测试化合物(最后稀释 1%)或 0% 血清培养基(阴性对照)。孵化所述混合物 48 小时,收获。

[0737] 采集细胞用于 FACS 分析。抽吸培养基,用 PBS 冲洗细胞 1 次,在 T-175 烧瓶中向细胞添加 5ml $1\times$ 胰蛋白酶,静置细胞直到从所述板释放(约 5-10 分钟)。加入 5ml 生长培养基终止胰蛋白酶消化。在 1000rpm、4°C 旋转细胞 5 分钟。抽吸培养基,细胞在 10ml 的 10% 血清补充的培养基(Cell Systems)中再悬浮,加入 5 μ l 的 Annexin-FITC(BioVison),冷却的导管用于 FACS。阳性结果被检测为对比所述阴性对照,在所述化合物处理的样本中增强凋亡。

[0738] 诱导皮质神经元中的 c-fos

[0739] 该实验被设计用于检测是否本发明所述化合物显示诱导皮质神经元 c-fos 的能力。在本试验中测试阳性的化合物将被预期有助于治疗当神经元增殖是有益时的神经系统障碍和损伤。

[0740] 离解皮质神经元并加入生长培养基,以 10,000 细胞每孔的密度接种于 96 孔板。在将近 2 细胞分裂后,用所述化合物或不用(阴性对照)处理所述细胞 30 分钟。然后用冷甲醇固定细胞 5 分钟,用定向拮抗磷酸化 CREB 的抗体染色。然后采用化学发光计算 mRNA 水平。在本实验中的阳性是对比阴性对照,导致 c-fos 信息增加至少 2 倍的任意因素。

[0741] 刺激内皮血管形成

[0742] 该实验被设计用于检测是否本发明所述化合物显示在缺乏外源性生长因子的条件下促进内皮空泡和管腔形成的能力。在本试验中测试阳性的化合物将被预期有助于治疗当内皮空泡和/或管腔形成是有益时的障碍,包括例如其中胞饮作用、离子泵、血管渗透和/或连接形成的刺激将是有益的。

[0743] HUVEC 细胞(从原始传代 < 8)以 6×10^5 细胞每 ml 的密度与 I 型鼠尾胶原混合(最后浓度 2.6mg/ml),然后在所述已试验的化合物存在下加入 1% FBS 和在空泡形成的时候染色所述空泡的 1 μ M 6-FAM-FIT 染料补充的 M199 培养基,以 50 μ l 每孔被接种。所述细胞然后在 37°C /5% CO₂ 被孵化 48 小时,用 3.7% 福尔马林室温固定 10 分钟,用 M199 培养基冲洗 5 次,然后用 Rh-Phalloidin 在 4°C 染色过夜,接着用 4 μ M DAPI 核染色。在本实验中的阳性结果是当空泡的存在超过 50% 的所述细胞。

[0744] 检测影响葡萄糖和/或 FFA 在骨骼肌的吸收的本发明所述化合物

[0745] 该实验被设计用于检测是否本发明所述化合物显示影响葡萄糖或 FFA 被骨骼肌细胞吸收的能力。在本实验中测试阳性的化合物将被预期有助于治疗当刺激或抑制葡萄糖被骨骼肌吸收将是有益时的障碍包括,例如糖尿病或高胰岛素血症或低胰岛素血症。

[0746] 在 96 孔格式中,要被测试的化合物被加到初级的大鼠分化的骨骼肌中,孵化过夜。然后向所述孔中加入具有所述化合物和 +/- 胰岛素的新鲜培养基。然后监测样本培养基以测量被骨骼肌细胞吸收的葡萄糖和 FFA。胰岛素将刺激葡萄糖和 FFA 被骨骼肌吸收,缺乏所述化合物的胰岛素培养基被用作阳性对照和评分的界限。由于正被测试的化合物可能刺激或抑制葡萄糖和 FFA 吸收,如果本实验被评分的结果超过胰岛素对照的 1.5 倍或小于 0.5 倍则被认为是阳性的。

[0747] 视杆细胞存活实验

[0748] 该实验测试本发明所述化合物作用于增强视杆细胞存活 / 增殖的能力和,从而有助于治疗视网膜病症或损伤包括,例如治疗哺乳动物由于色素性视网膜炎导致的失明、AMD 等。

[0749] Sprague Dawley 大鼠, (出生后第 7 天,混合种群:神经胶质和视网膜神经类型) 用 CO₂ 麻醉后采用断头术处死,并在无菌条件下移去眼睛。神经视网膜被从色素上皮和其它视觉组织切开,然后在采用 0.25% 胰蛋白酶的无 Ca²⁺, Mg²⁺ 的 PBS 溶液的单细胞悬浮液中离解 (dissociate)。所述视网膜在该溶液中 37°C 孵化 7-10 分钟后,加入 1ml 大豆胰蛋白酶抑制剂灭活所述胰蛋白酶。在补充 N₂ 和具有或缺乏所述特定的测试化合物的 DMEM/F12 中的细胞,以将近 100,000 细胞每 ml 的密度接种于 96 孔板中。用于所有试验的细胞在 5% CO₂ 的水饱和的大气中 37°C 生长。培养 7-10 天后,先用钙黄绿素 AM 或 CellTracker Green CMFDA 染色所述细胞,然后用 4% 多聚甲醛固定。然后用 CellTracker Green CMFDA. Rho 4D2 (腹水 (ascites) 或 IgG 1:100) 染色,采用定向于视色素视紫红质的 Rho 4D2 (腹水或 IgG 1 : 100) 单克隆抗体进行间接免疫荧光法来检测视杆细胞。计算的结果是存活% :用培养 7-10 天的视紫红质阳性细胞总数除以培养 7-10 天钙黄绿素 - 视紫红质阳性细胞总数。通过采用 CCD 照相机和 MacIntosh 的 NIH 图像软件在 20× 物镜放大下定量总的细胞 (荧光的)。随机选择孔中的 Fields。

[0750] 体外抗肿瘤试验

[0751] 通过采用基本上如 Skehan et al., J. Natl. Cancer Inst. 82 :1107-1112(1990) 所述的硫氰酸盐 B (sulforhodamine B) (SRB) 染色结合试验,在国家癌症研究所 (NCI) 的调查研究、疾病 - 定向的体外抗癌药物发现试验中检测本发明所述化合物的抗增殖活性。在该研究 (“NCI 小组 (panel)”) 中采用的 60 个肿瘤细胞株,以及维持它们的条件和体外培养基,已在 Monks et al., J. Natl. Cancer Inst. 83 :757-766(1991) 中有所描述。该筛选的最初目的是评价所述测试化合物对不同类型的肿瘤的细胞毒性和 / 或抑制细胞活性 (Monks et al., supra ;Boyd, Cancer :Princ. Pract. Oncol. Update 3(10) :1-12[1989])。

[0752] 来源于将近 60 个人肿瘤细胞株的细胞用胰岛素 /EDTA (Gibco) 采集,冲洗一次,在 IMEM 中再悬浮,并检测它们的生存能力。用移液管 (100 μ L 体积) 将细胞悬浮液加到分开的 96 孔微量滴定板。6 天孵化的细胞密度少于 2 天孵化的细胞密度以预防过度生长。移植允许一起稳定作用的 37°C 为时 24 小时的前孵化期。100 μ L 2 倍于预期的测试浓度的稀释液在 0 时被等分加到微量滴定板孔中 (1 : 2 稀释)。在 5 半对数稀释液中评价测试化合物 (1000 到 100,000- 倍)。孵化在 5% CO₂ 大气和 100% 湿度下进行 2 天和 6 天。

[0753] 孵化后,移去培养基,在 40°C、0.1ml 的 10% 三氯乙酸中固定所述细胞。用去离子水冲洗所述板 5 次,干燥,用 0.1ml 的溶于 1% 醋酸的 0.4% 硫氰酸盐 B 染料 (Sigma) 染色 30 分钟,用 1% 醋酸冲洗 4 次以除去未结合的染料,干燥,用 0.1ml 的 pH 10.5、10mM Tris 碱 [三 (羟甲基) 氨基甲烷] 萃取所述染色物。采用计算机接口的 96 孔微量滴定板阅读器测量 492nm 的硫氰酸盐 B 的吸光度 (OD)。

[0754] 如果测试样本在一个或多个浓度时显示至少 50% 生长抑制效应,它被认为是阳性的。

[0755] 检测影响葡萄糖或 FFA 被早期鼠脂肪细胞吸收的本发明所述化合物

[0756] 该试验被设计用于检测是否本发明所述化合物显示影响葡萄糖或 FFA 被脂肪细胞吸收的能力。在本实验中测试阳性的化合物将被预期有助于治疗当刺激或抑制葡萄糖脂肪细胞吸收是有益时的障碍包括,例如肥胖症、糖尿病或高胰岛素血症或低胰岛素血症。

[0757] 在 96 孔格式中,要被测试的化合物被加到初级的大鼠脂肪细胞中,孵化过夜。在 4 和 16 小时采集样本用于甘油、葡萄糖和 FFA 吸收。在孵化 16 小时后,向所述培养基加入胰岛素,并孵化 4 小时。此时,采集一样本,检测甘油、葡萄糖和 FFA 吸收。缺乏所述化合物的包含胰岛素的培养基被用作为阳性参考对照。由于正被测试的化合物可能刺激或抑制葡萄糖和 FFA 吸收,如果本实验被评分的结果超过胰岛素对照的 1.5 倍或小于 0.5 倍则被认为是阳性的。

[0758] 软骨细胞再分化试验

[0759] 该试验证明是否本发明所述化合物作用于诱导软骨细胞再分化,及从而被预期有助于治疗各种骨和 / 或软骨疾病例如,运动损伤和关节炎。本实验按如下方法进行。通过胶原蛋白酶消化 4-6 个月大的雌性猪的掌指关节的关节软骨过夜,分离得到猪软骨细胞。然后分离的细胞加入包含 10% FBS 和 $4 \mu\text{g/ml}$ 庆大霉素的 Ham F-12,以 25,000 细胞 / cm^2 密度被接种。每三天更换培养基,然后细胞被加入 $100 \mu\text{l}$ 的缺乏血清的相同的培养基和 $100 \mu\text{l}$ 的测试化合物、5nM 癌基因抑活药 (阳性对照) 或单独培养基 (阴性对照) 被加入以产生最后体积为 $200 \mu\text{l}$ / 孔中,以 5,000 细胞 / 孔密度接种于 96 孔板中。在 37°C 孵化 5 天后,给每个孔照相,检测软骨细胞的分化状态。当软骨细胞分化被检测是较阴性对照更接近于阳性对照时,被认为是本试验的阳性结果。

[0760] 在成红细胞株中胎儿血红蛋白诱导作用

[0761] 该试验有助于筛选具有诱导在成红细胞株中从成人血红蛋白转换到胎儿血红蛋白的能力的化合物。在本试验中测试阳性的化合物被预期有助于治疗各种哺乳动物血红蛋白相关疾病 (例如各种地中海贫血)。本试验按以下所述方法进行。在标准生长培养基中的成红细胞以 1000 细胞 / 孔密度接种于 96 孔格式中。向生长培养基加入所述已测试的化合物得到浓度为 0.2% 或 2%, 37°C 孵化所述细胞 5 天。作为阳性对照,细胞用 $100 \mu\text{M}$ 氯化高铁血红素 (hemin) 处理,以及作为阴性对照,细胞不需处理。5 天后,制备细胞溶胞产物,并分析 γ 珠蛋白 (一胎儿标记) 的表达。本试验中的阳性是 γ 珠蛋白水平至少高于阴性对照 2 倍。

[0762] 鼠肾肾小球膜细胞增殖试验

[0763] 该试验证明是否本发明所述化合物作用于诱导哺乳动物肾肾小球膜细胞增殖,以及从而有助于治疗关于肾小球膜细胞功能下降的肾疾病 (例如 Berger 疾病) 或其它关于过敏性紫癜、乳糜泻、疱疹样皮炎或节段性结肠炎的肾病。本试验按以下所述方法进行。在第一天,在生长培养基 (Dulbecco' s 修饰的 Eagle' s 培养基和 Ham' s F12 培养基的 3 : 1 混合物、95% 胎牛血清、5% 补充的 14mM HEPES) 中的小鼠肾肾小球膜细胞接种于 96 孔板,并生长过夜。在第二天,所述测试化合物在无血清培养基中被稀释成 2 个浓度 (1% 和 0.1%), 并加到所述细胞中。对照样本是单独的无血清培养基。在第四天, $20 \mu\text{l}$ 的 Cell Titer 96 Aqueous, 一溶液试剂 (Progema) 被加到每个孔中,进行比色反应 2 小时。然后在 490nm 测量吸光度 (OD)。本试验的阳性结果是吸光度读数至少高于对照读数 15%。

[0764] 大鼠椭圆囊支持细胞的增殖

[0765] 该试验被用于检测本发明所述化合物作为对于听毛细胞的前体细胞的内耳支持细胞的有效促细胞分裂剂以及,从而有助于诱导听毛细胞再生并治疗哺乳动物的听力损失。本试验按以下所述方法进行。在 33°C、200 μ l 的包含血清的培养基中的大鼠 UEC-4 椭圆囊内皮细胞以 3000 细胞/孔的密度被注入 96 孔板中。所述细胞被孵化过夜,然后转换到 37°C 无血清培养基中。然后所述化合物的各种稀释液(或缺乏化合物作为对照)被加到培养基中,细胞孵化 24 小时。在 24 小时孵化后,加入 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷(1 μ Ci/孔),然后孵化 24 小时。冲洗培养物以除去未掺入的放射标记,采集细胞,并检测每孔 Cpm。测试化合物处理的培养基中的 Cpm 至少是对照培养基的 30% 或更高时被认为是本试验的阳性结果。

[0766] 软骨细胞增殖试验

[0767] 该试验被设计用于检测是否本发明所述化合物显示诱导培养基中的软骨细胞增殖和/或再分化的能力。在本试验中测试阳性的化合物将被预期有助于治疗各种骨和/或软骨疾病例如运动损伤和关节炎。

[0768] 通过胶原蛋白酶消化 4-6 个月大的雌性猪的掌指关节的关节软骨过夜,分离得到猪软骨细胞。然后分离的在包含 10% FBS 和 4 μ g/ml 庆大霉素的 Ham F-12 中的细胞以 25,000 细胞/ cm^2 密度接种。每三天更换培养基,细胞每 5 天再接种到 25,000 细胞/ cm^2 。在第 12 天,然后在 100 μ l 的缺乏血清的相同的培养基和 100 μ l 的无血清培养基(阴性对照)、癌基因抑活药(最后浓度 5nM;阳性对照)或被加入以得到最后体积 200 μ l/孔的测试化合物中的细胞以 5,000 细胞/孔密度被接种到 96 孔板中。在 37°C、5 天后,给每个孔添加 20 μ l Alamar blue,在 37°C 额外孵化所述板 3 小时。然后检测每个孔中的荧光(Ex: 530nm;Em: 590nm)。包含 200 μ l 的无血清培养基的板的荧光被检测以获得背景。当所述化合物处理的样本的荧光较阴性对照更接近于阳性对照,则被认为是本试验的阳性结果。

[0769] 抑制由 LIF+ET-1 诱导的新生儿心脏肥大

[0770] 该试样被设计用于检测是否本发明所述化合物显示抑制有 LIF 和内皮素-1(ET-1)诱导的新生儿心脏肥大。在本实验中提供阳性应答的测试化合物将有助于治疗具有特征为或关于非希望的心肌肥大的心功能不全疾病或障碍。

[0771] 从年龄为 1 天的 Harlan Sprague Dawley 大鼠分离的心肌细胞(180 μ l 在 $7.5 \times 10^4/\text{ml}$,血清 < 0.1,新鲜分离的)在第一天被注入到用 DMEM/F12+4% FCS 预先包覆的 96 孔板。然后在第二天直接向孔中加入 20 μ l 体积的测试化合物样本或单独的生长培养基(阴性对照)。然后在第三天将 LIF+ET-1 加到孔中。在培养基中额外 2 天的染色后,然后第二天观察评分。当观察到得所述化合物处理的肌细胞少于平均值或少得多于未处理的肌细胞时,被认为是本试验的阳性结果。

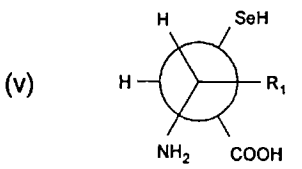
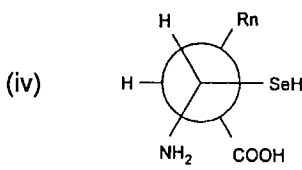
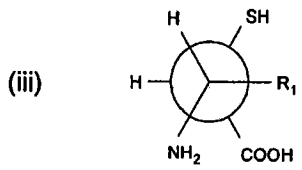
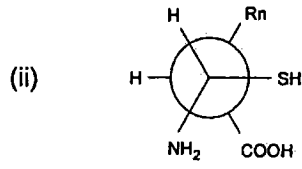
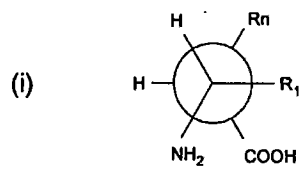


图 1

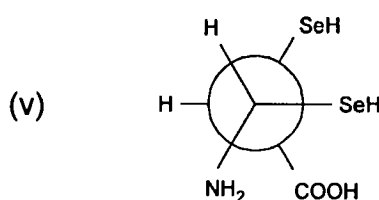
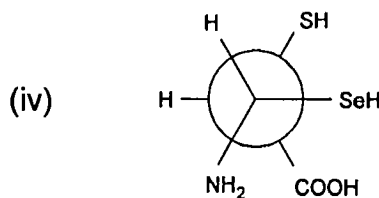
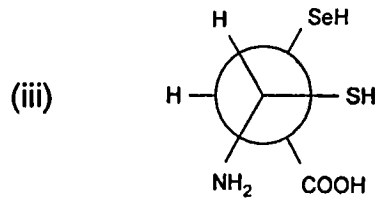
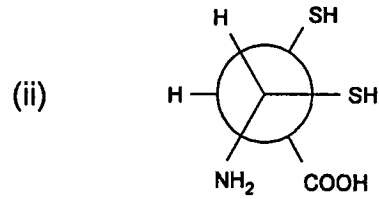
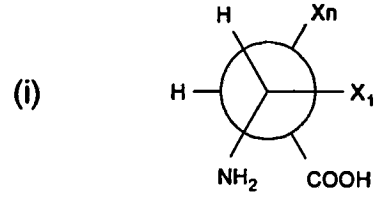


图 2

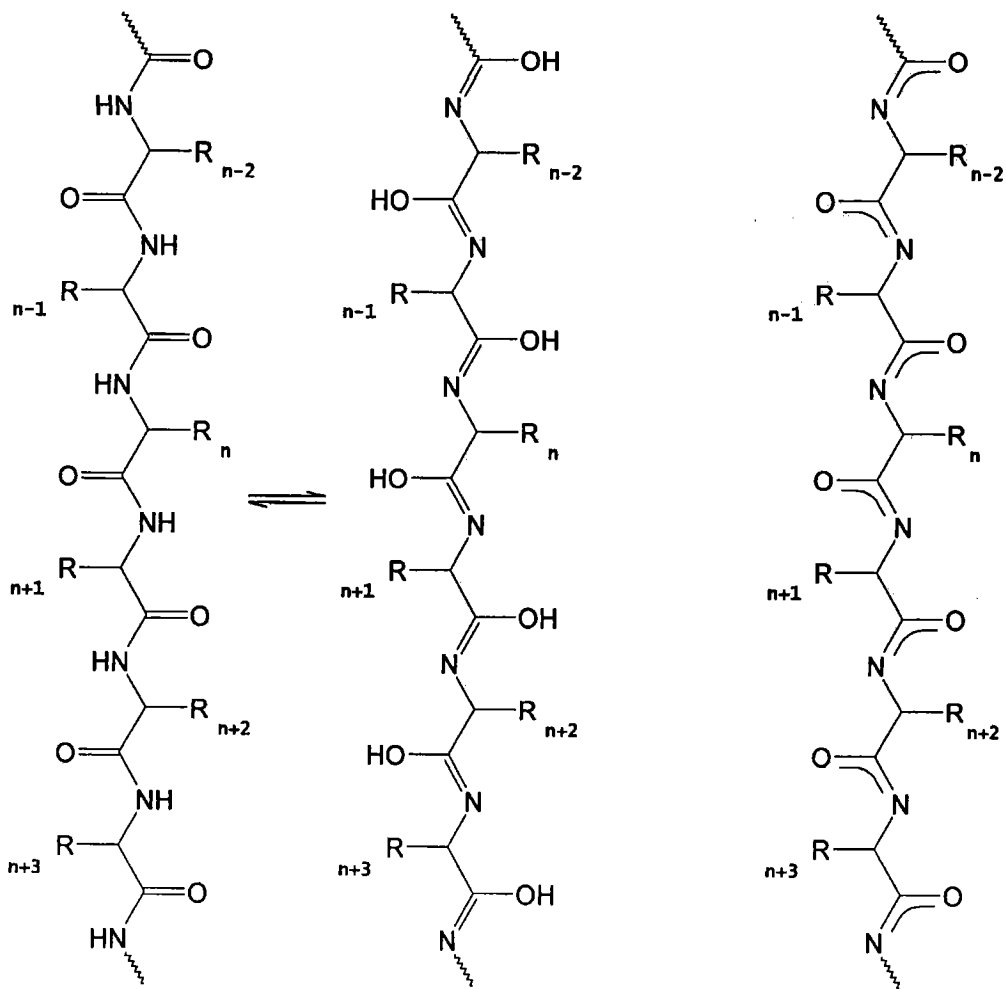


图 3

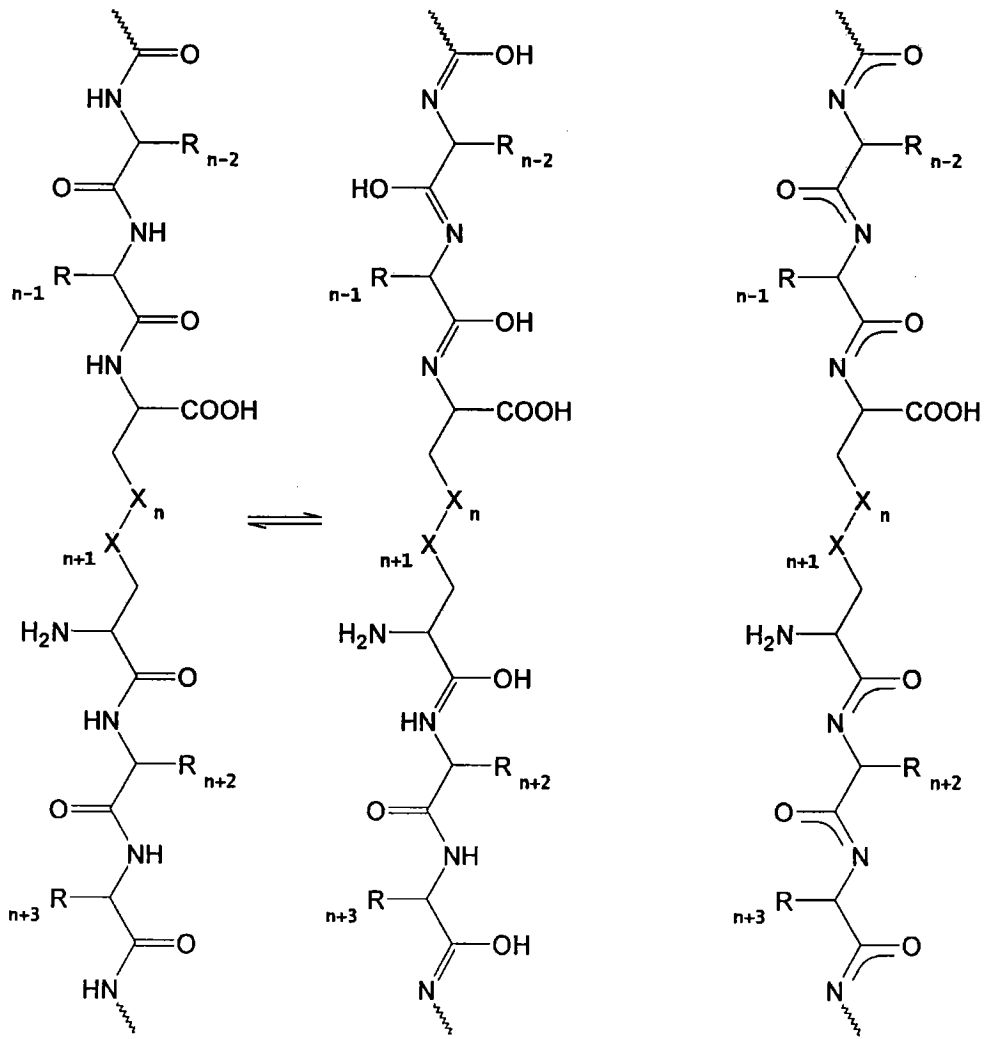


图 4A

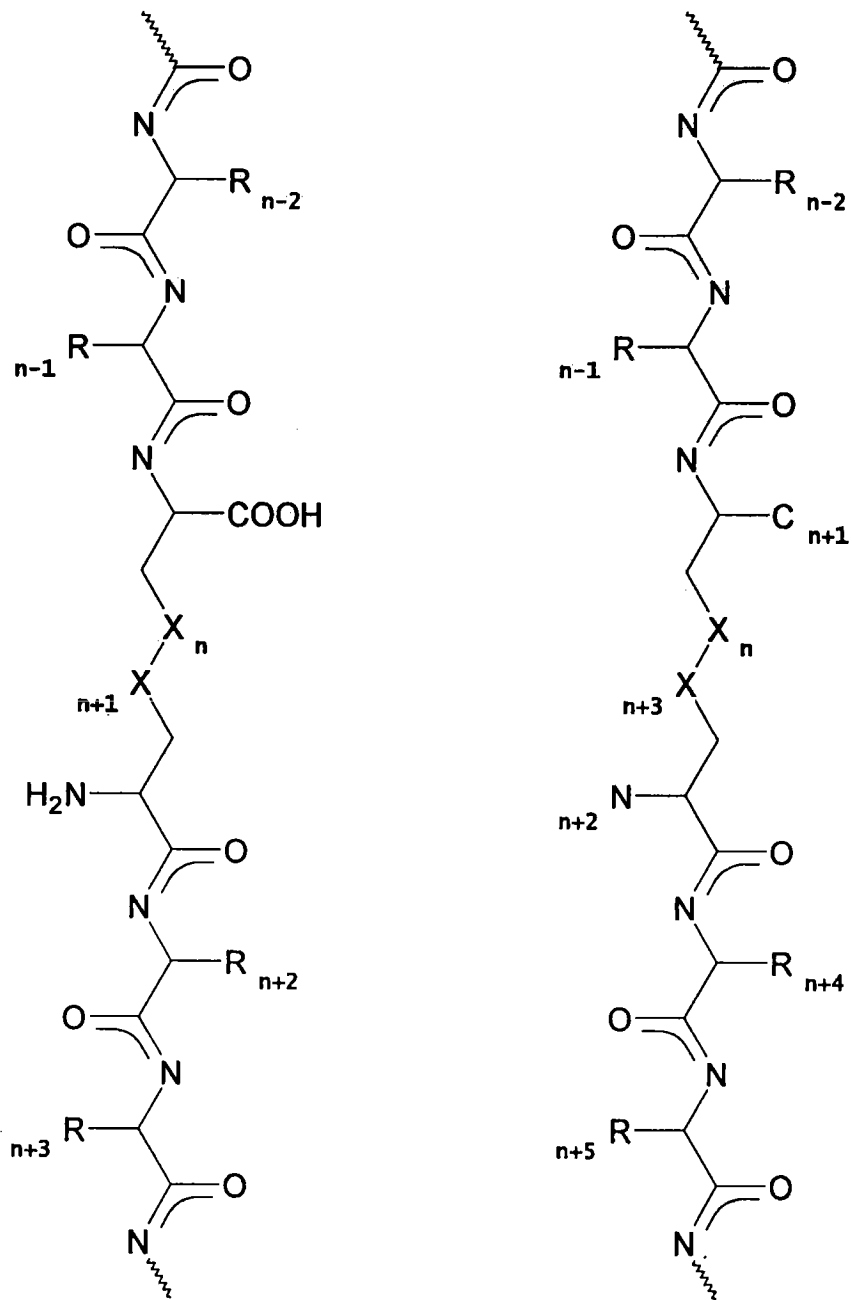


图 4B

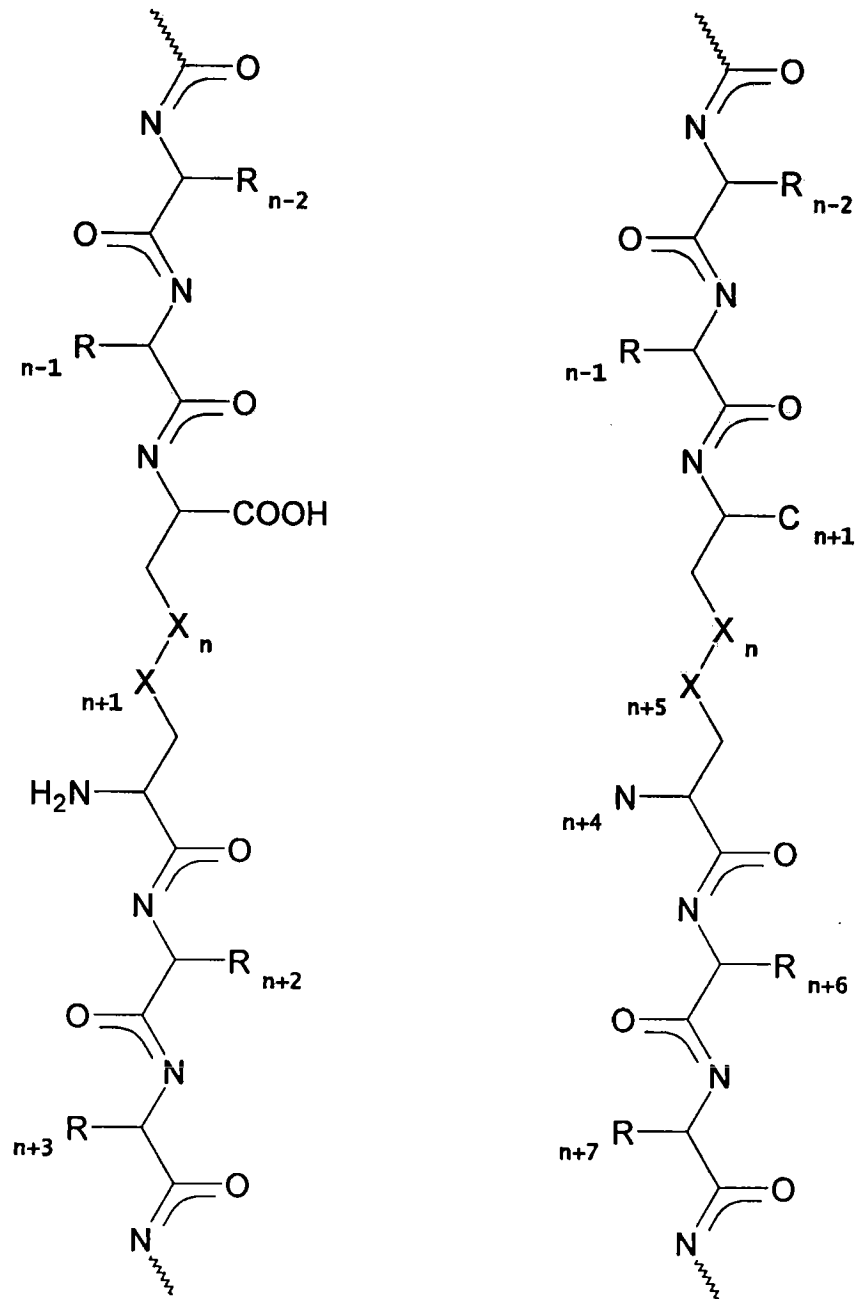


图 4C

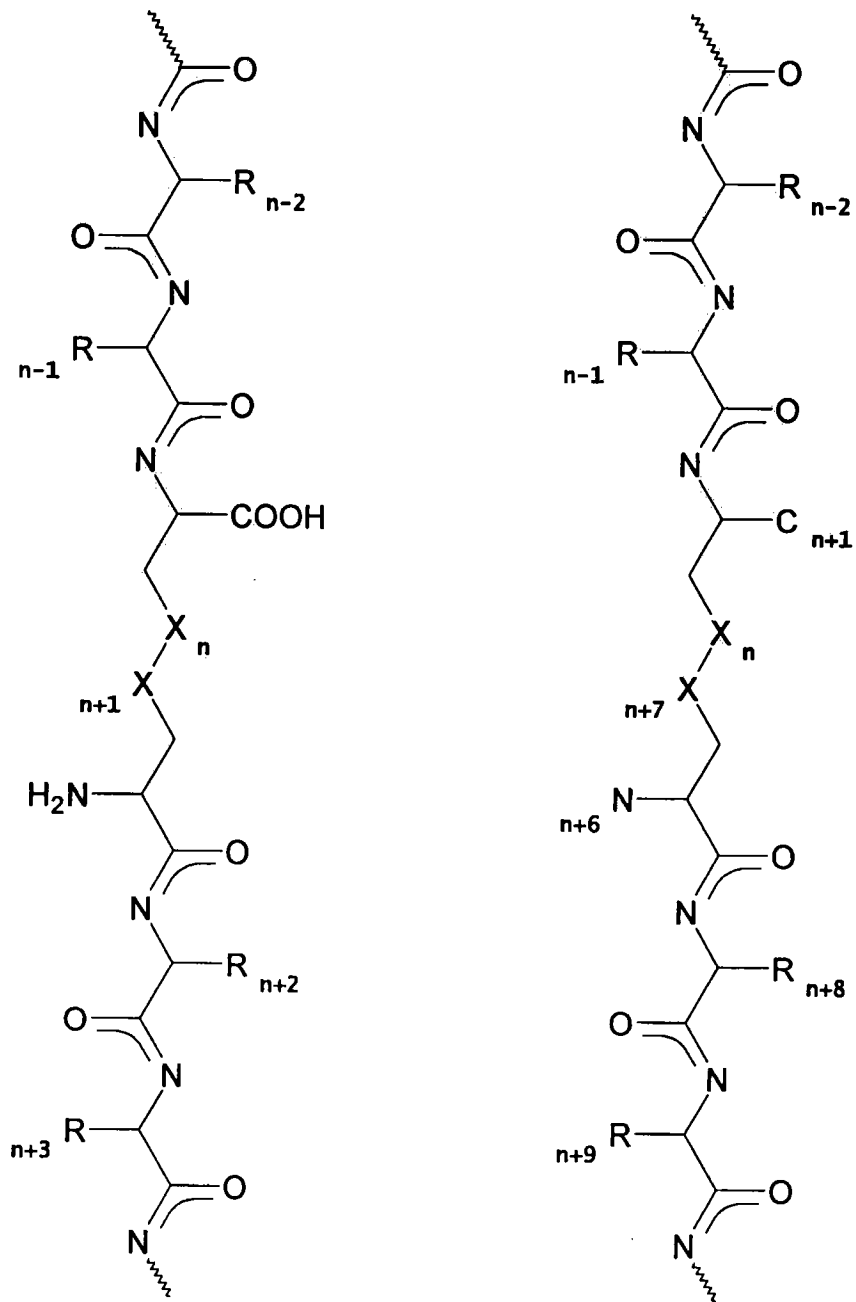


图 4D

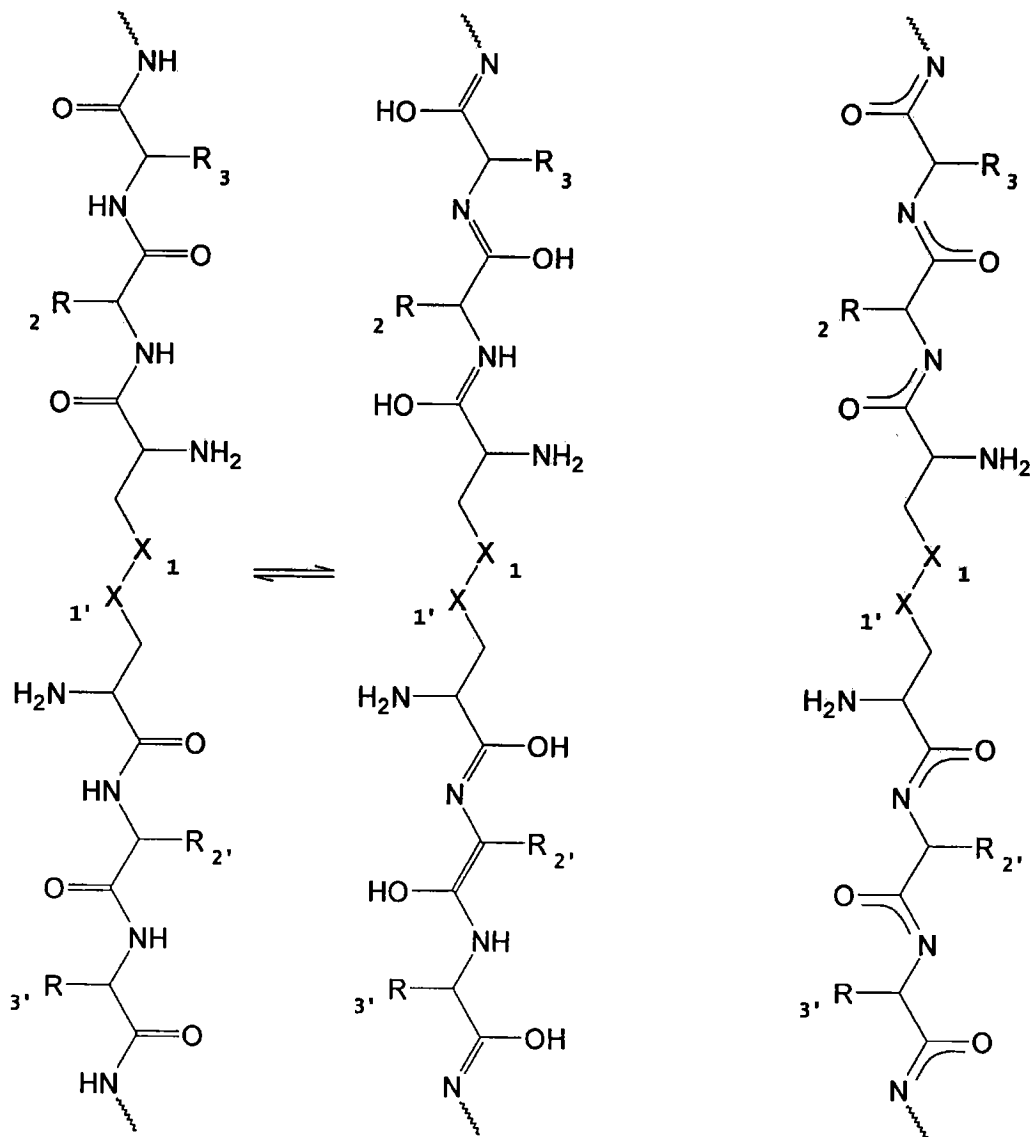


图 5

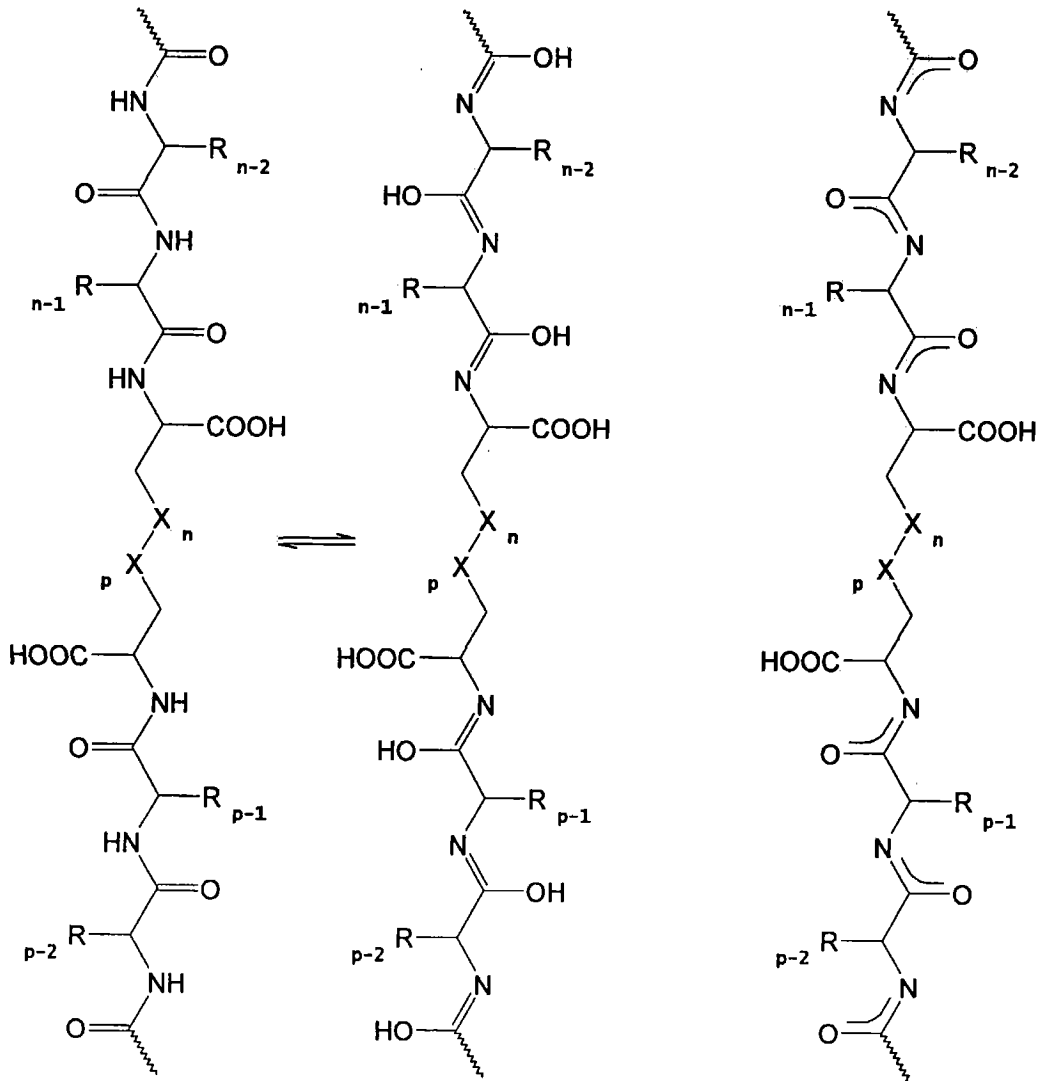


图 6

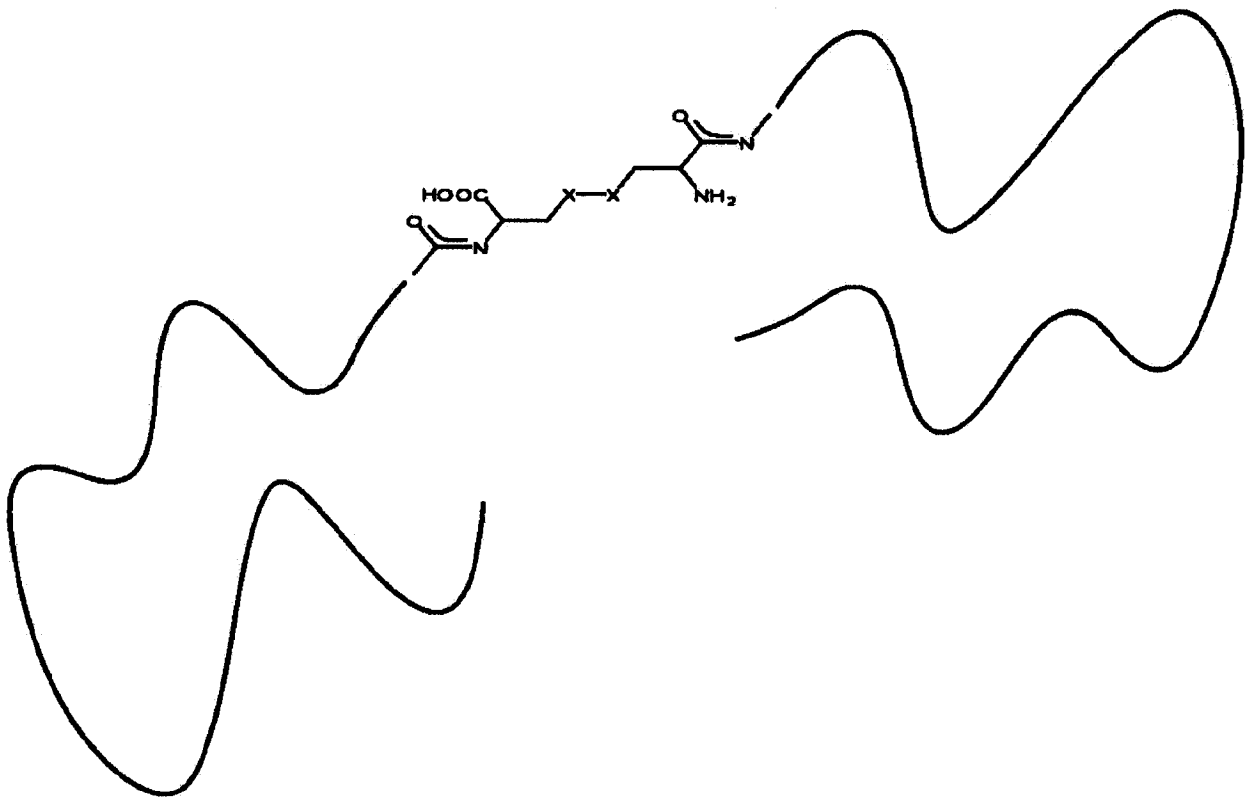


图 7

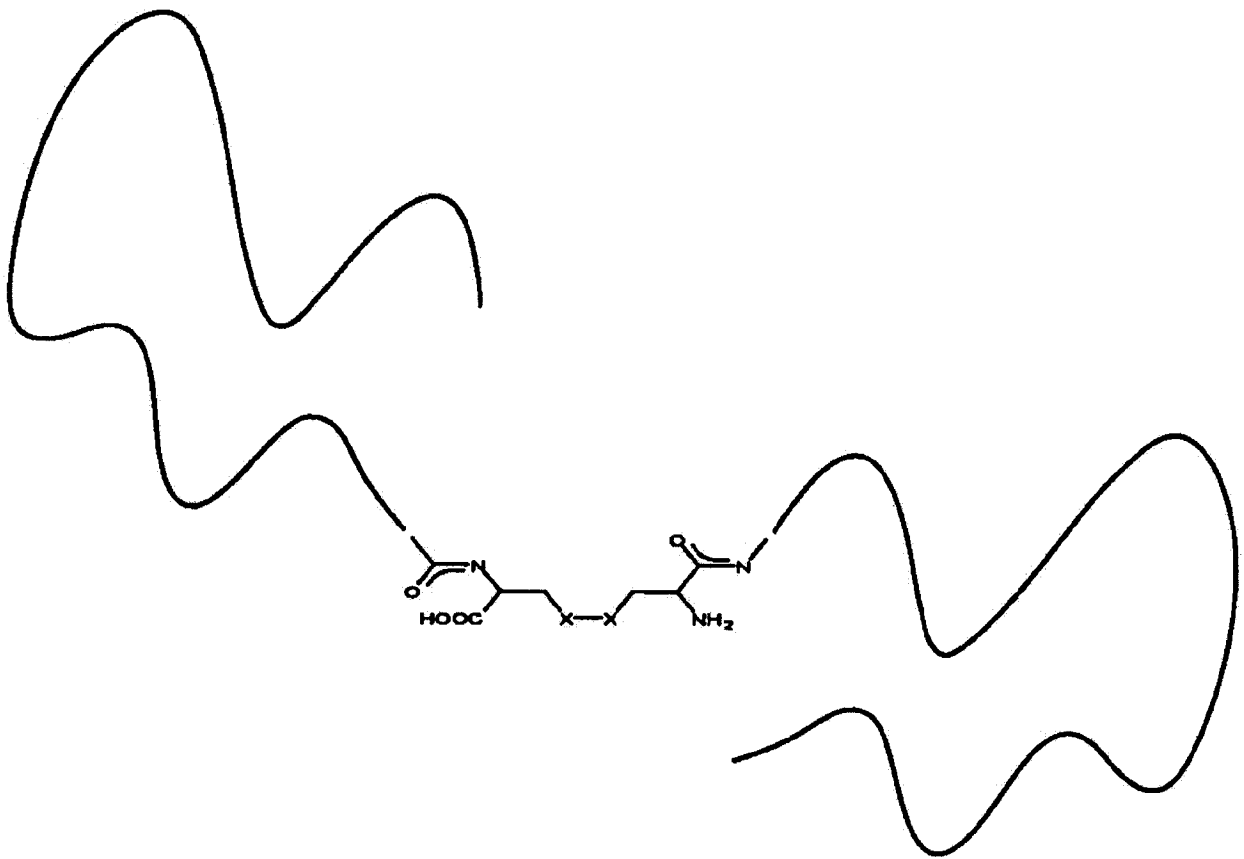


图 8

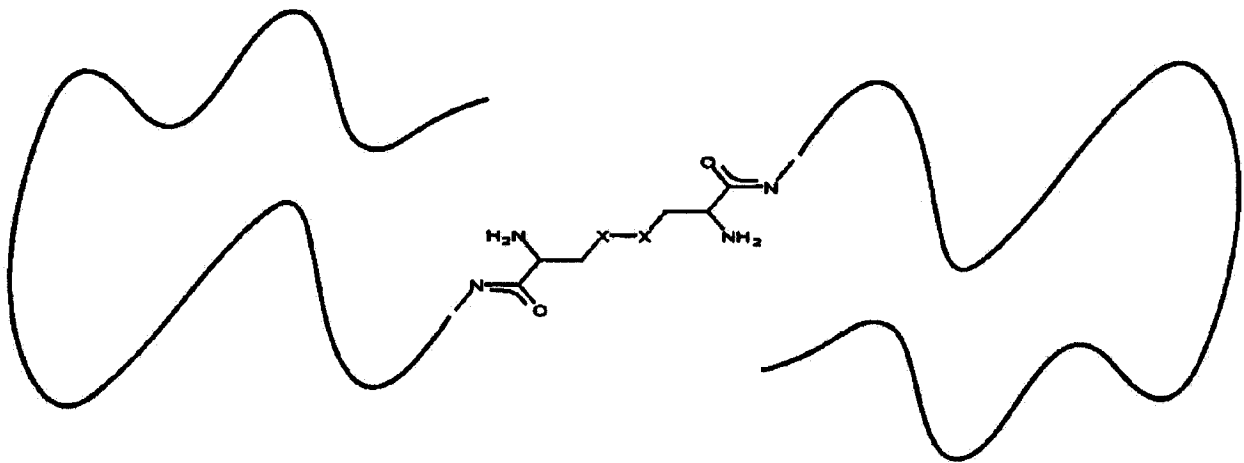


图 9

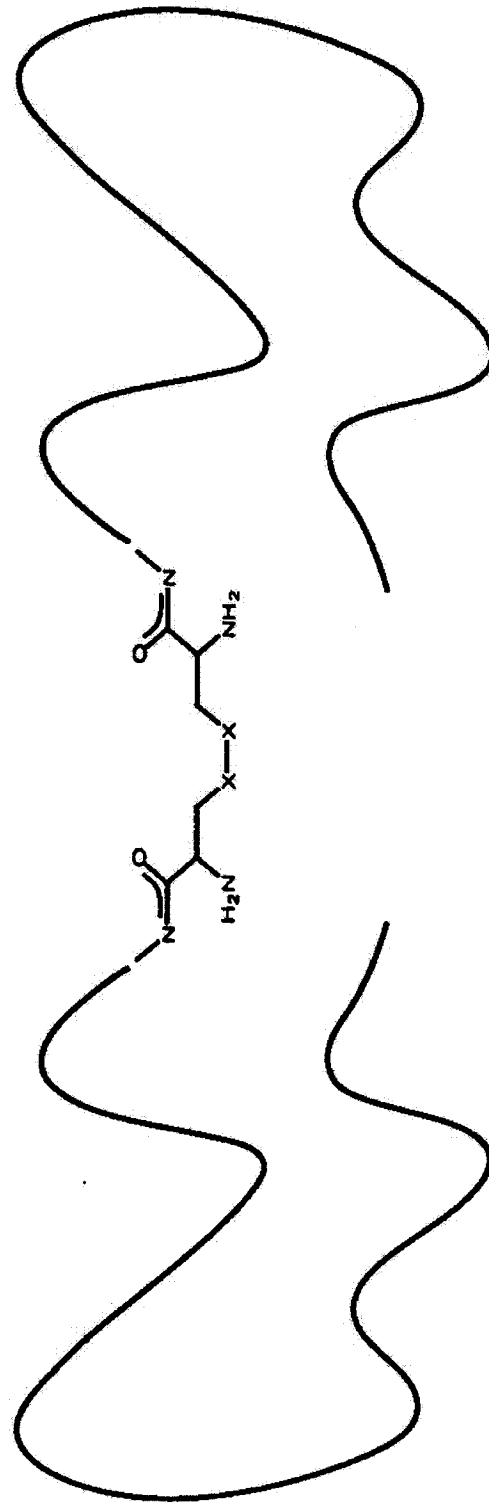


图 10

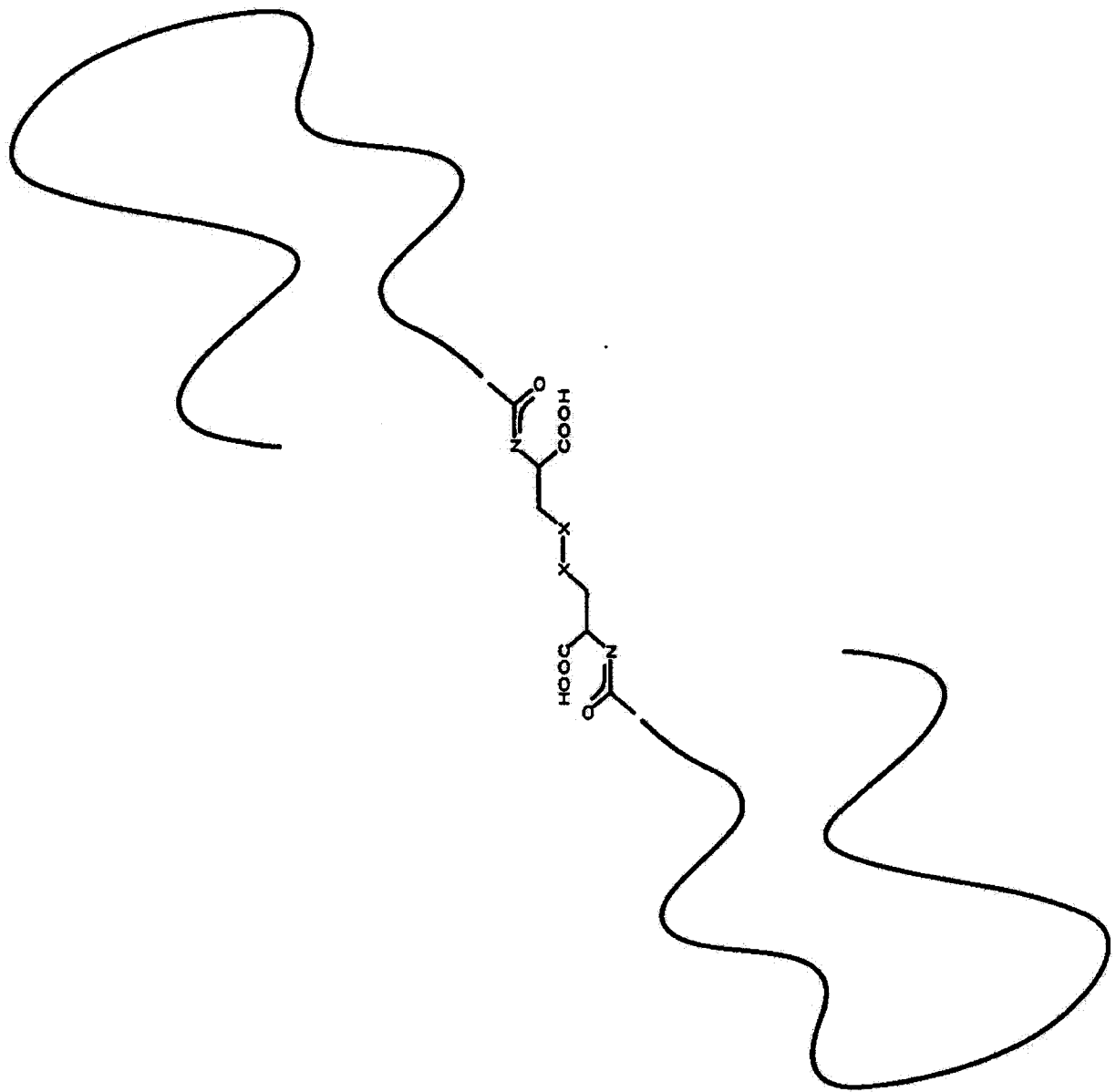


图 11

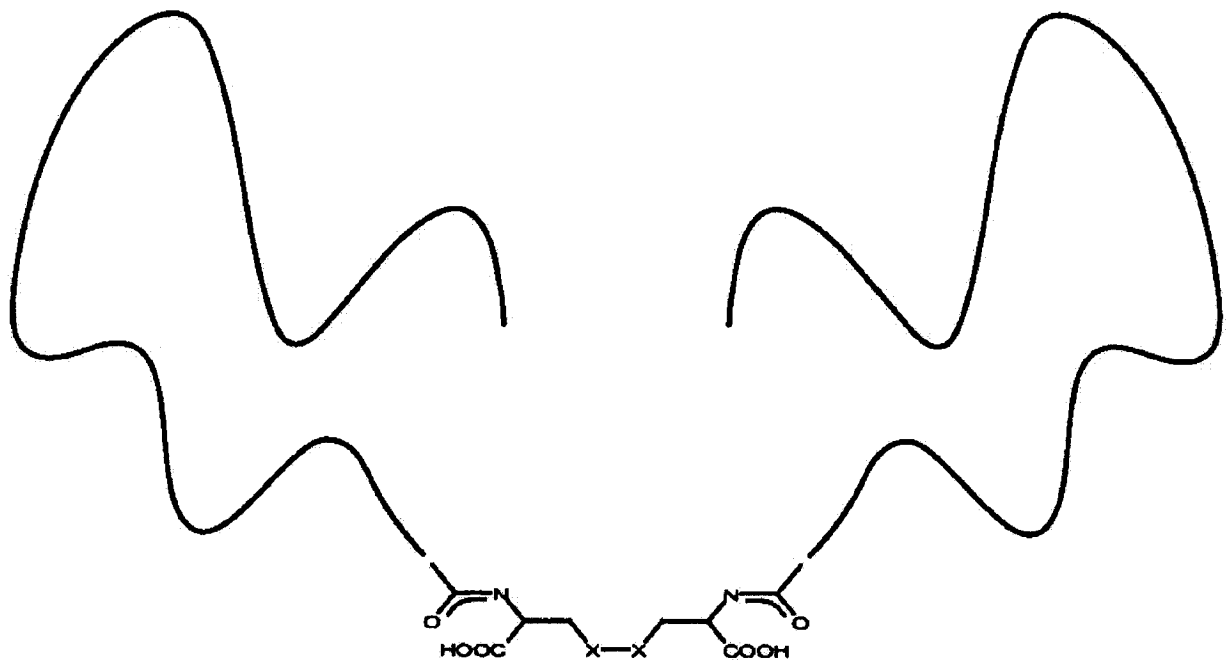


图 12

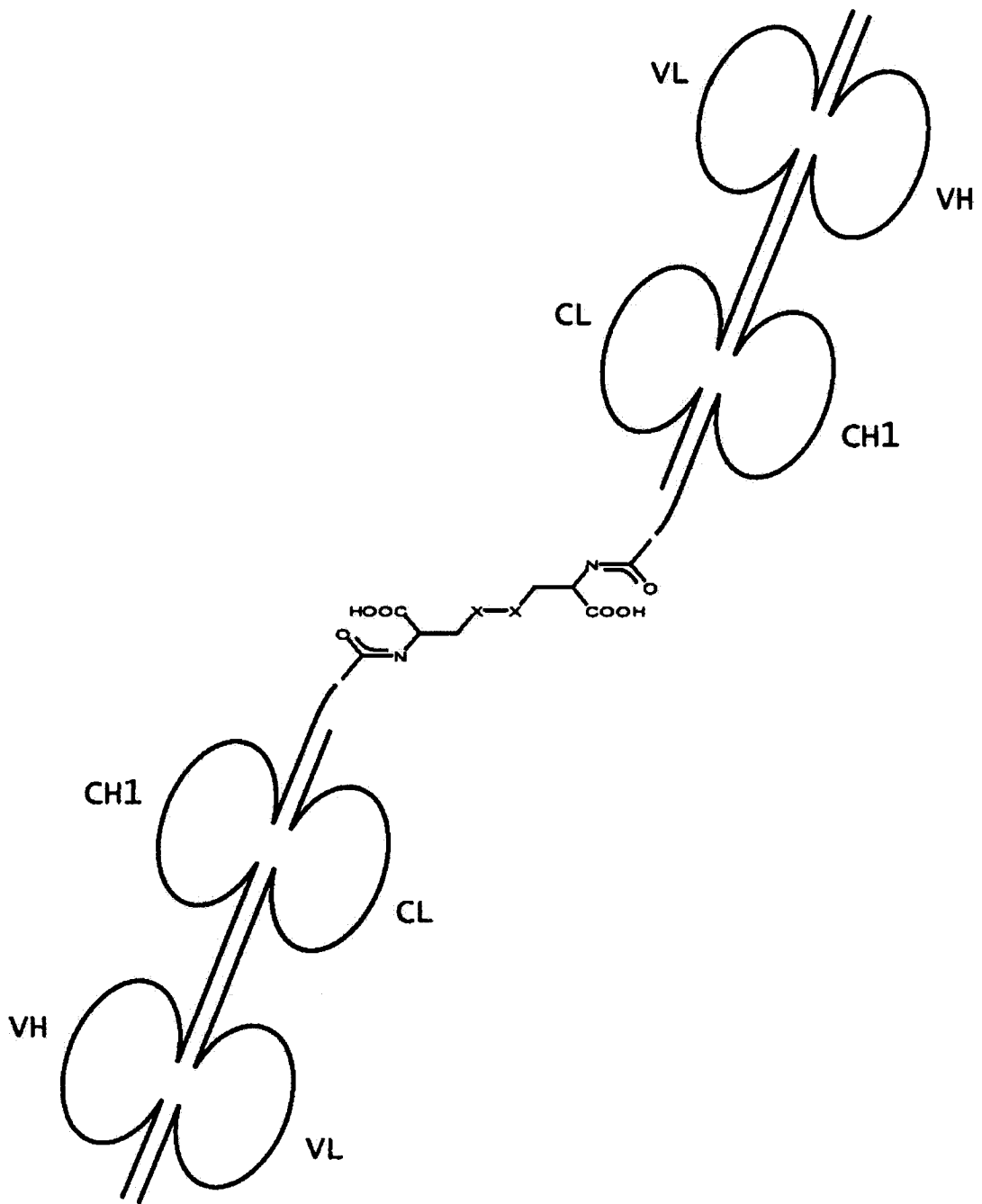


图 13

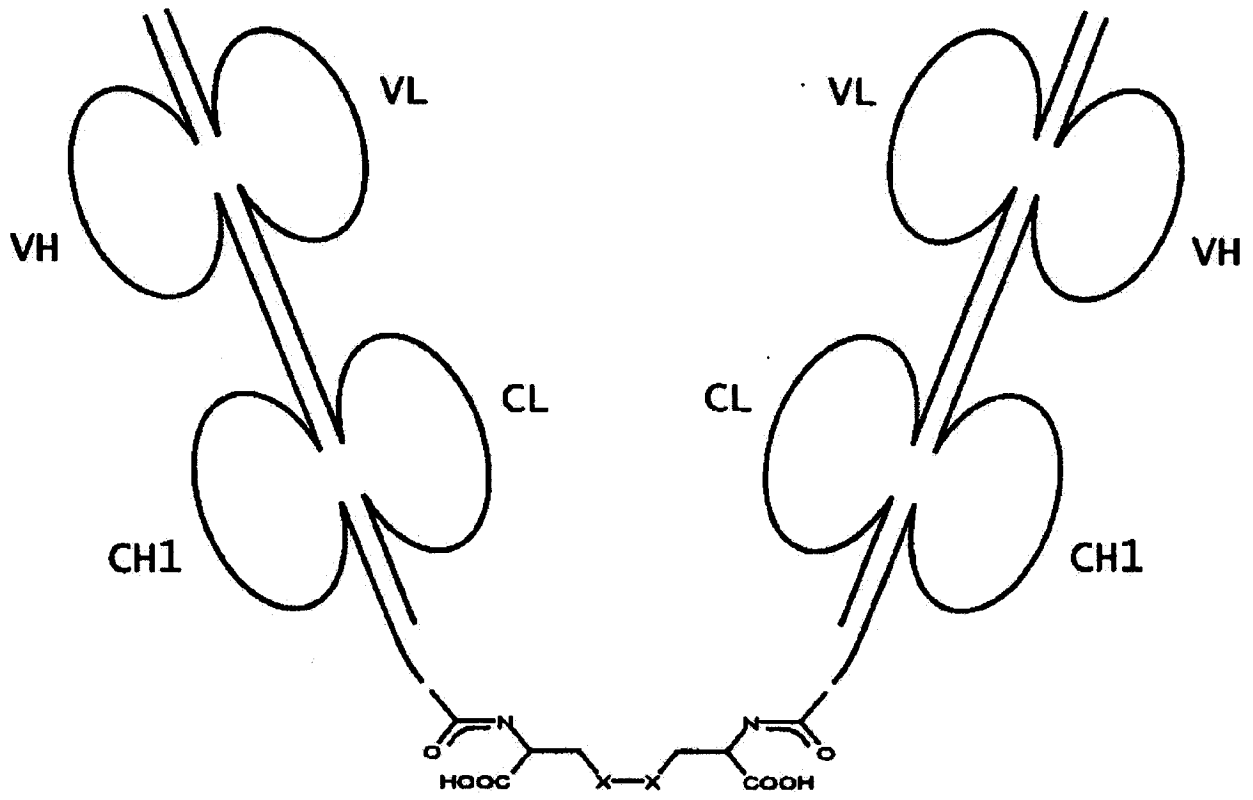


图 14

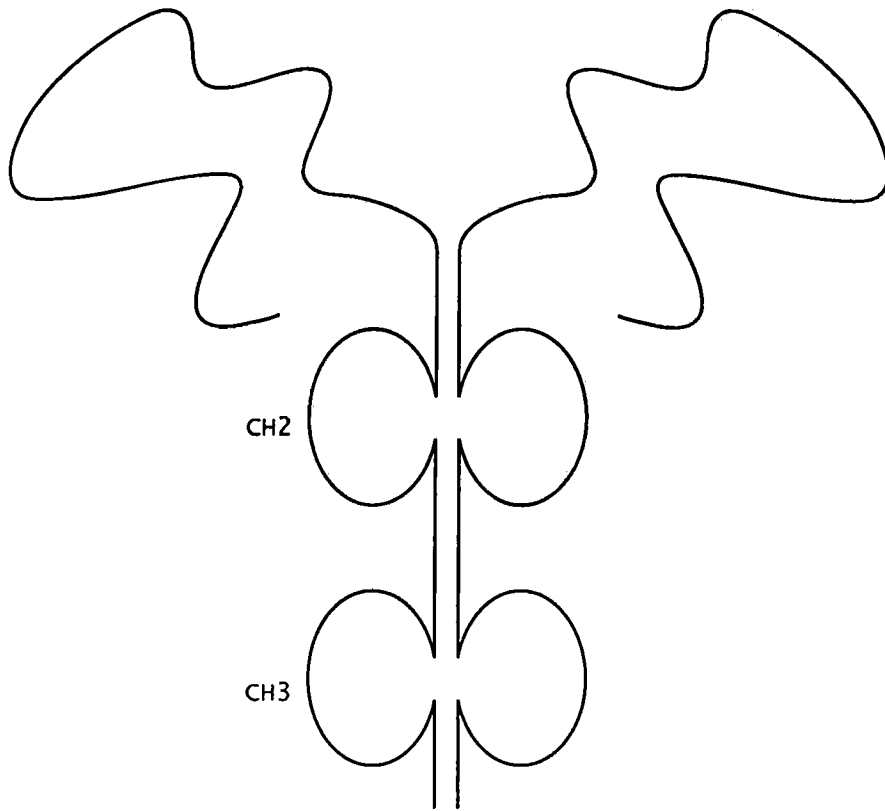


图 15

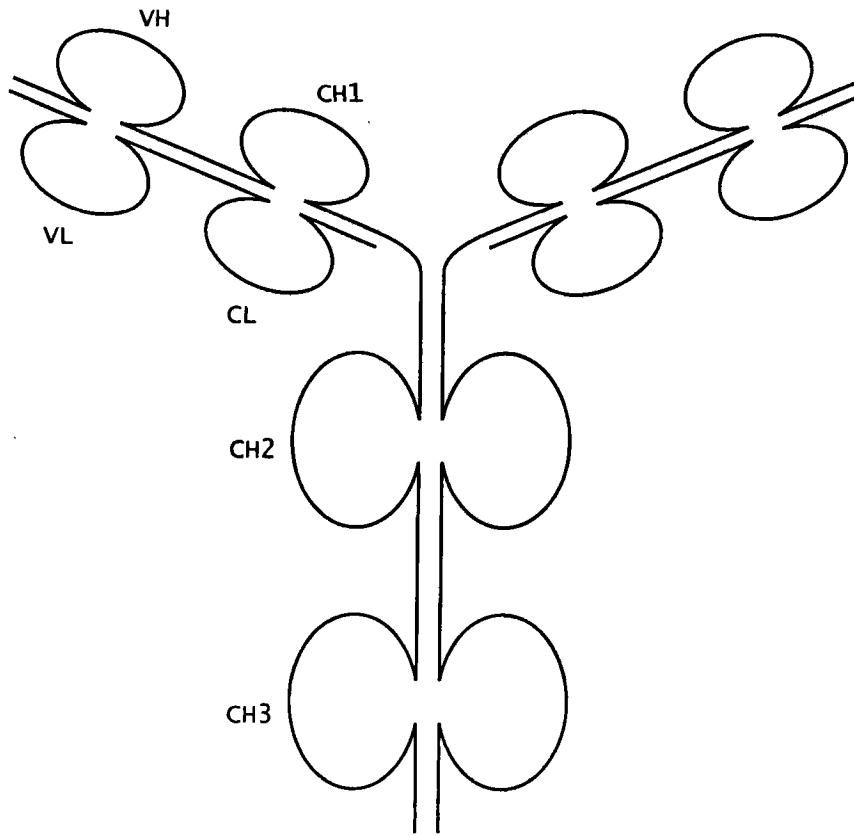


图 16

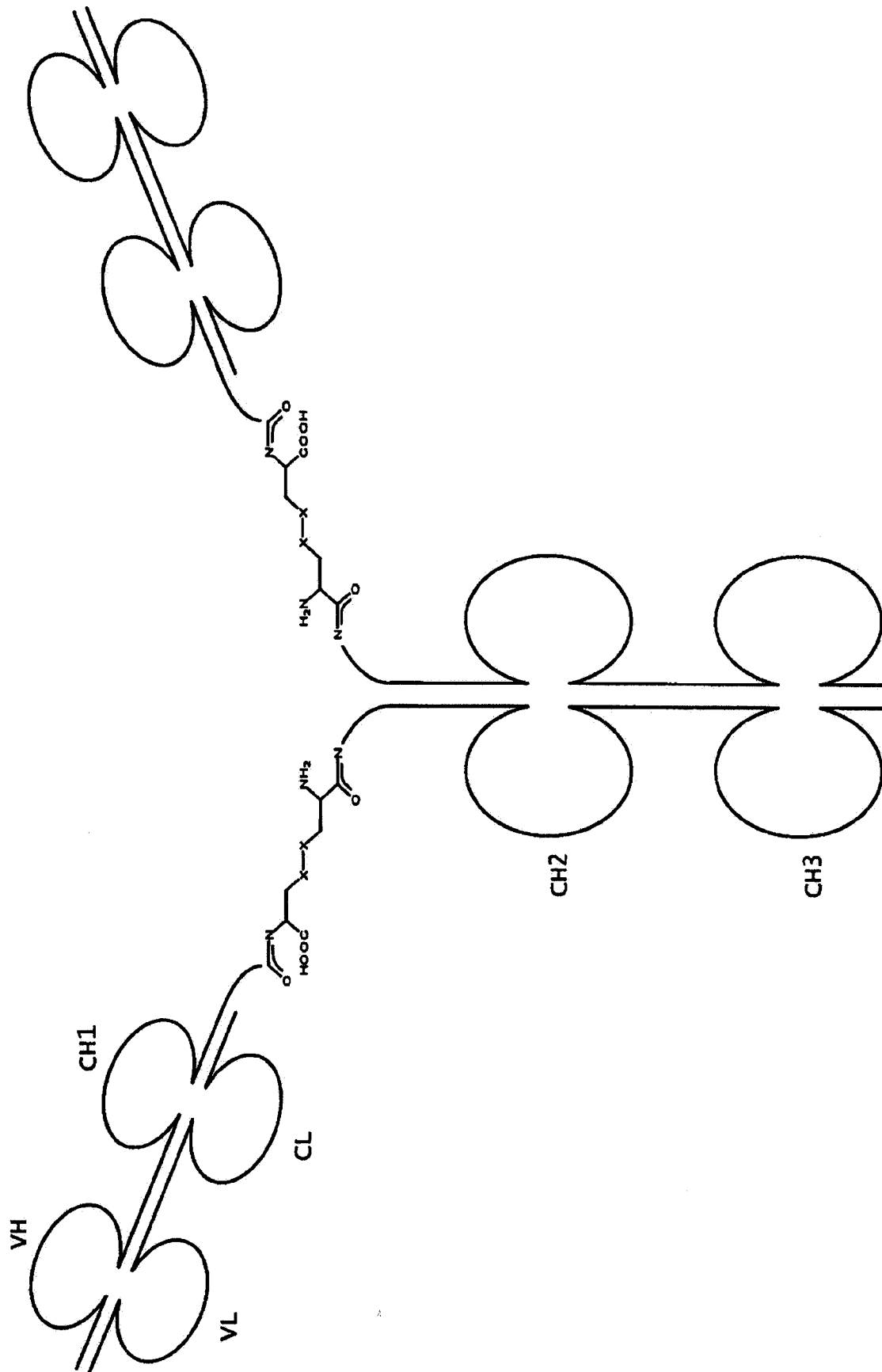


图 17

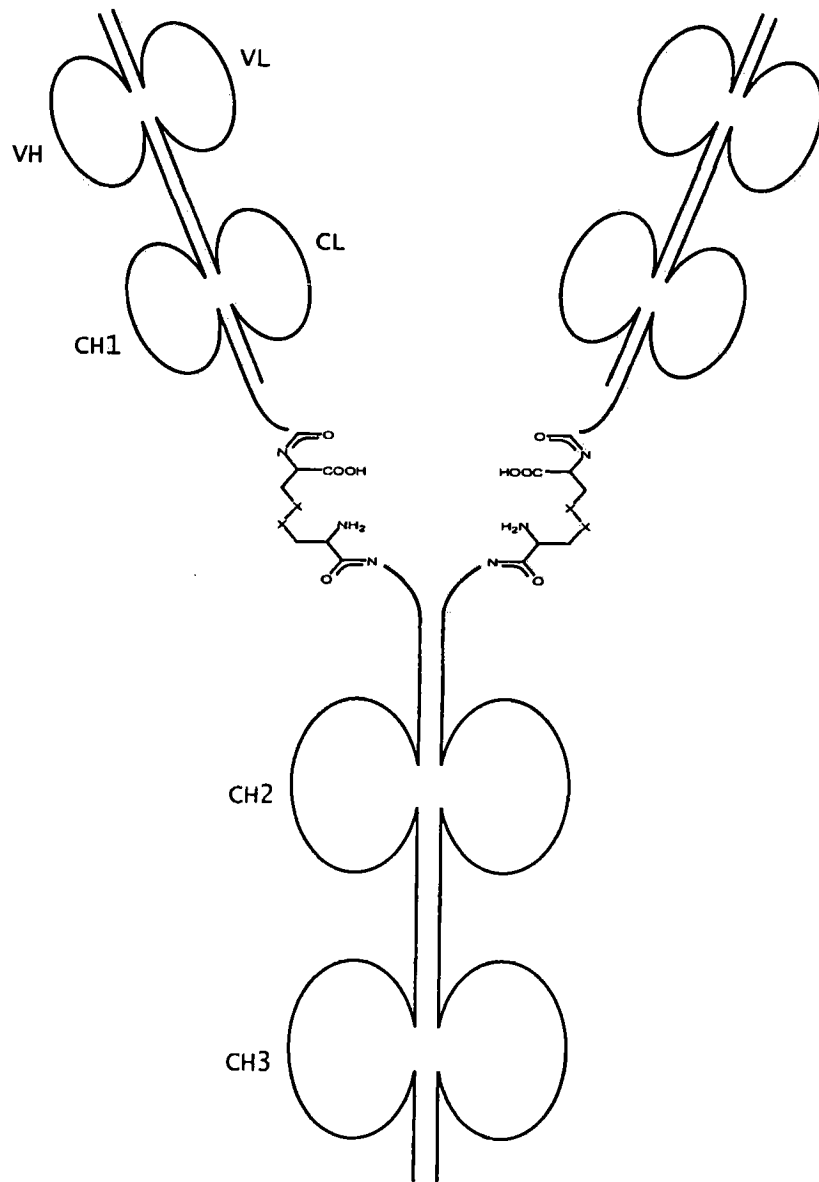


图 18

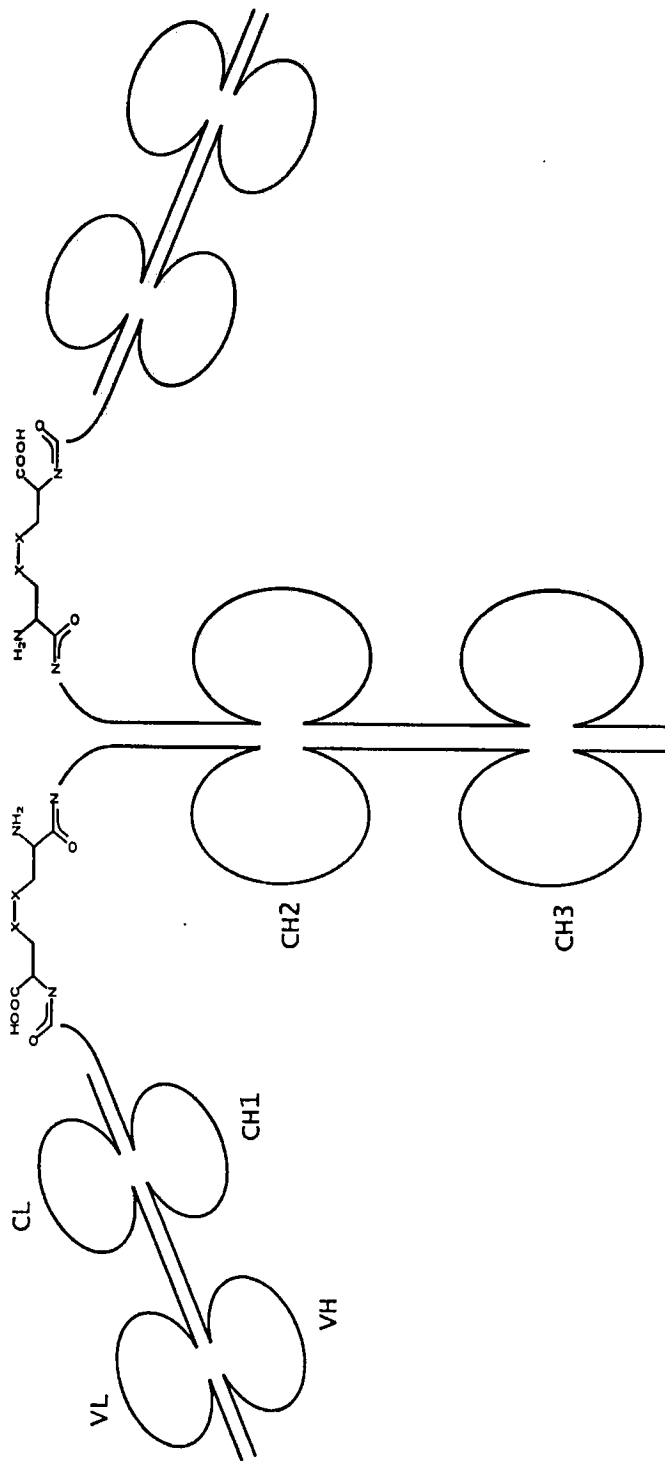


图 19

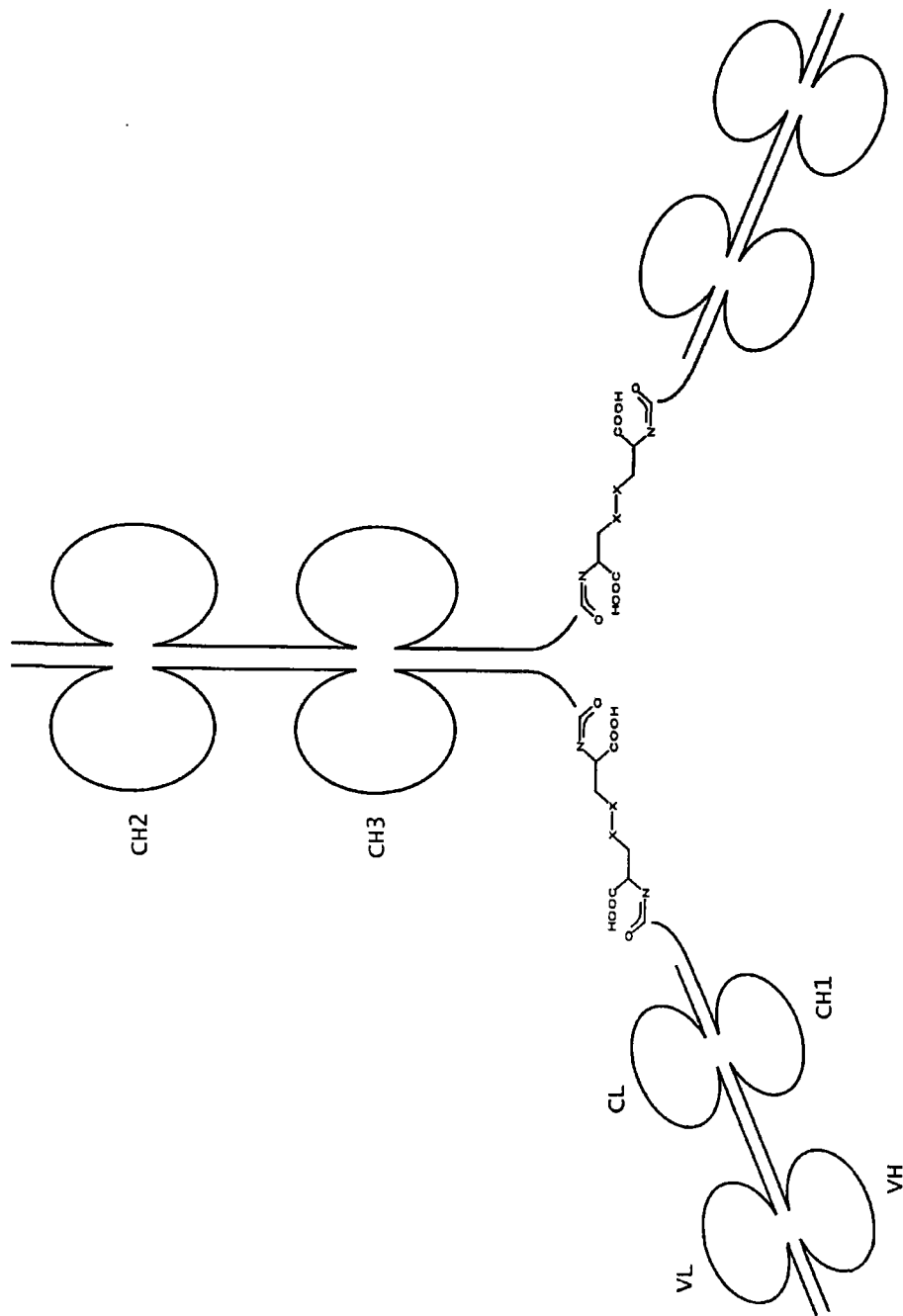


图 20

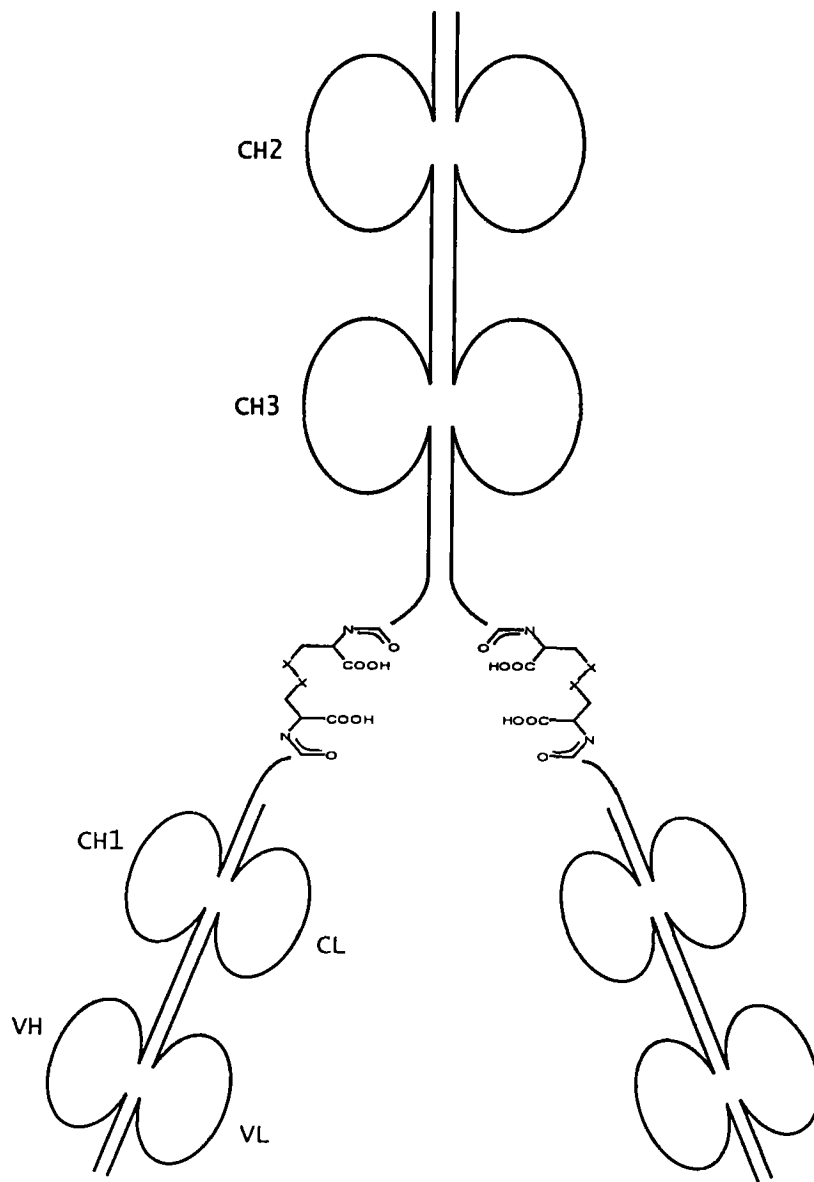


图 21

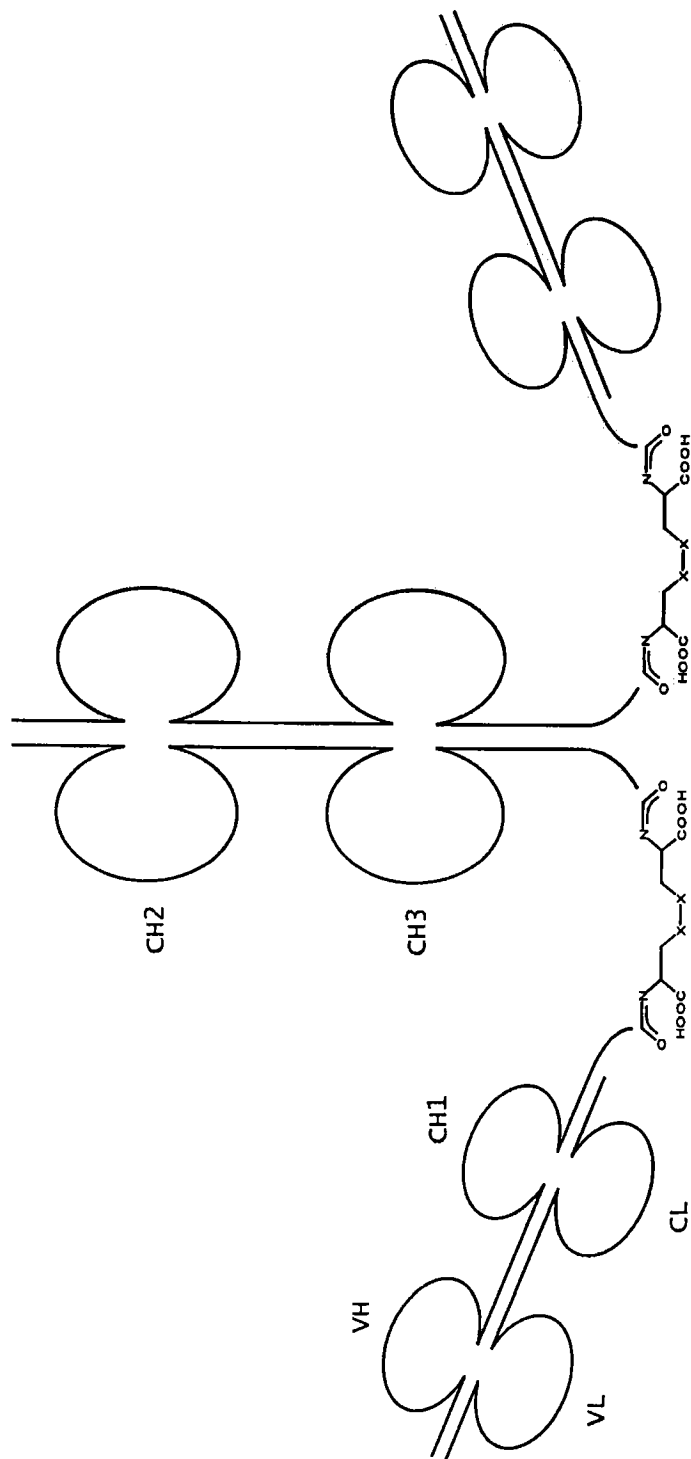


图 22

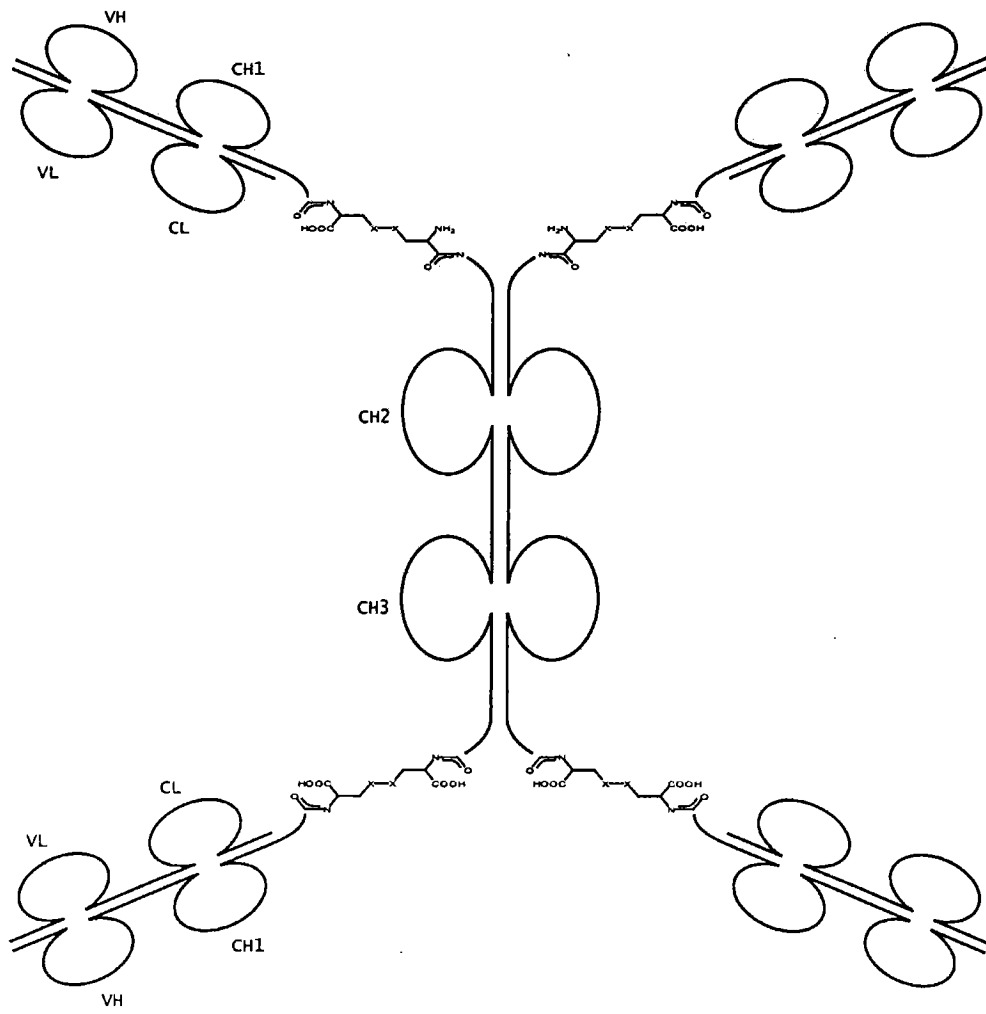


图 23

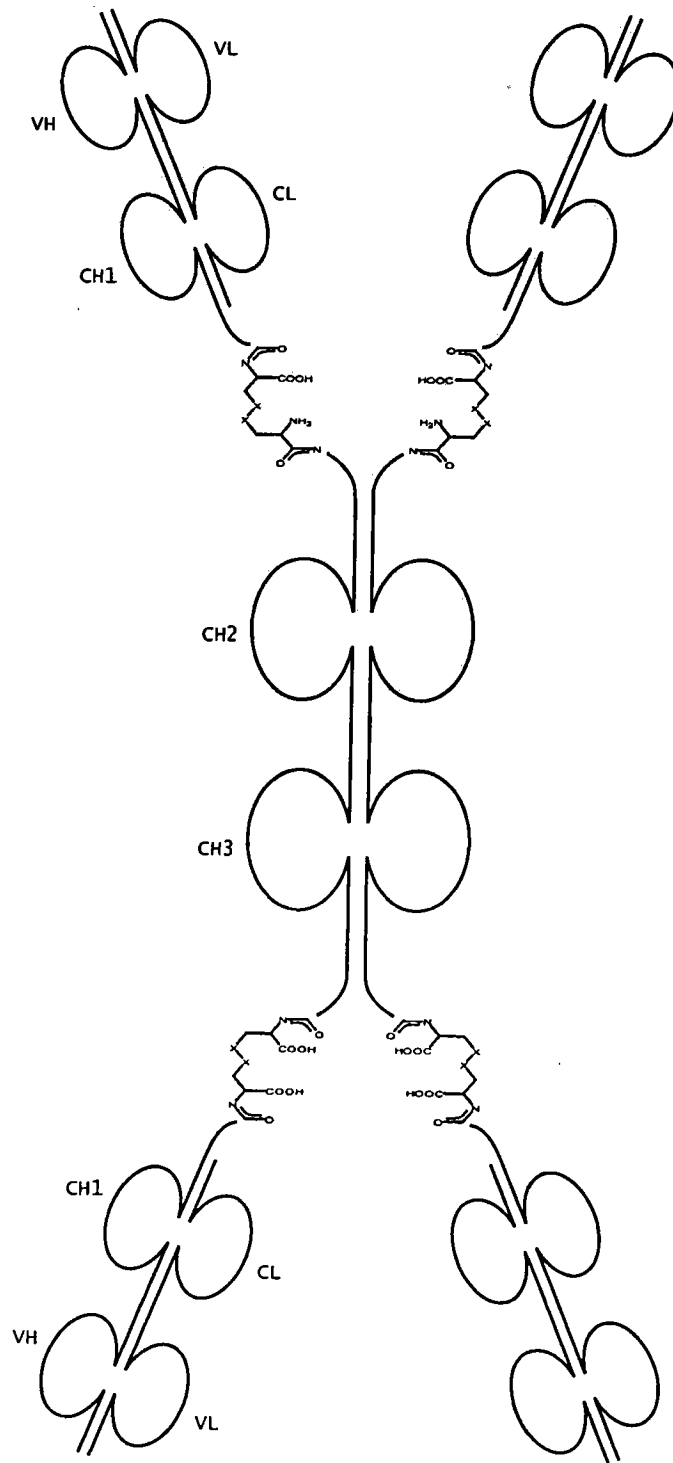


图 24

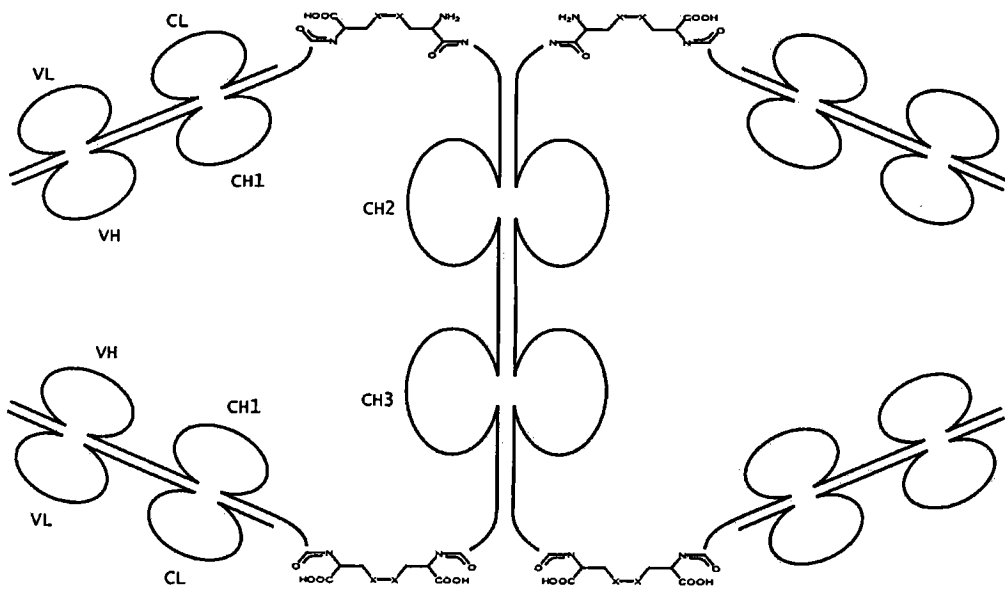


图 25

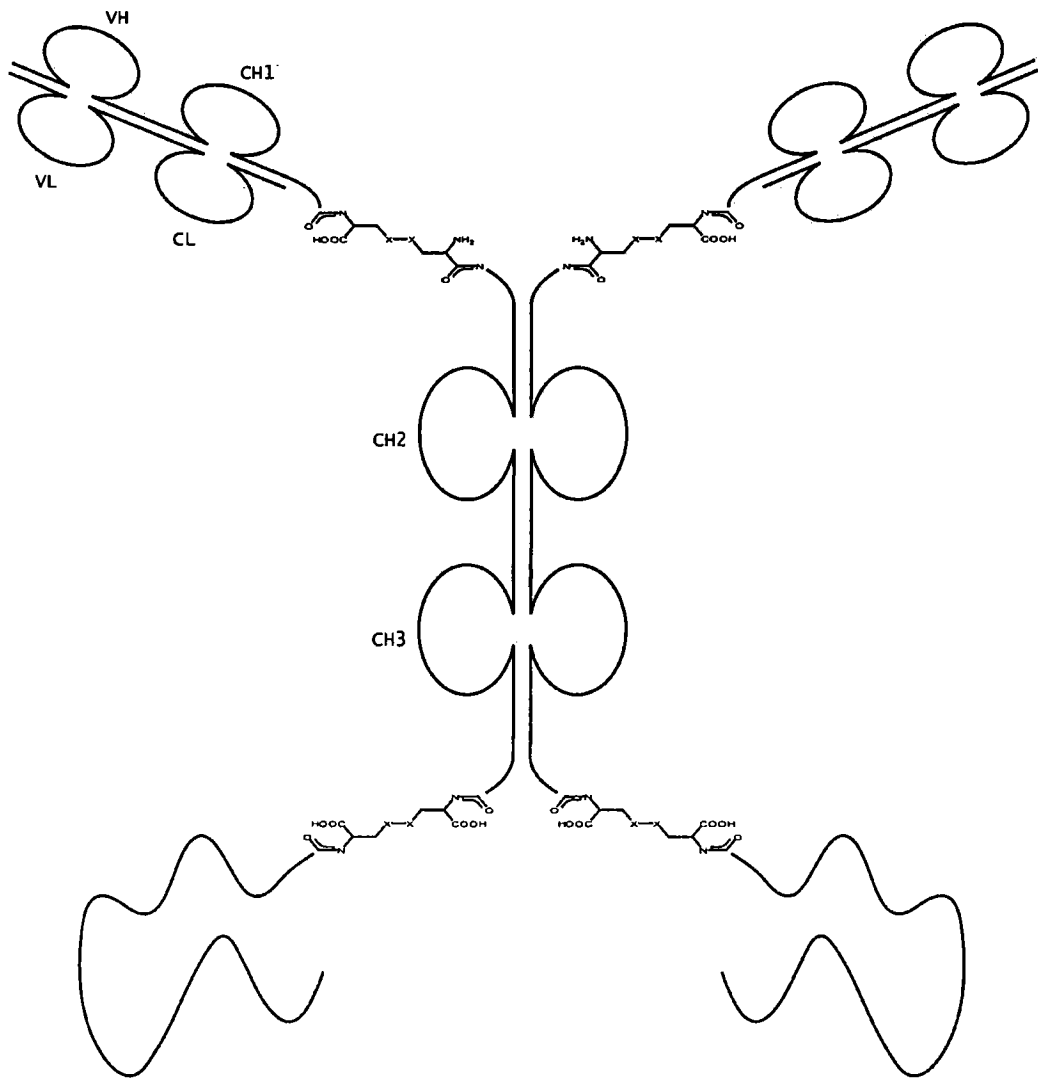


图 26

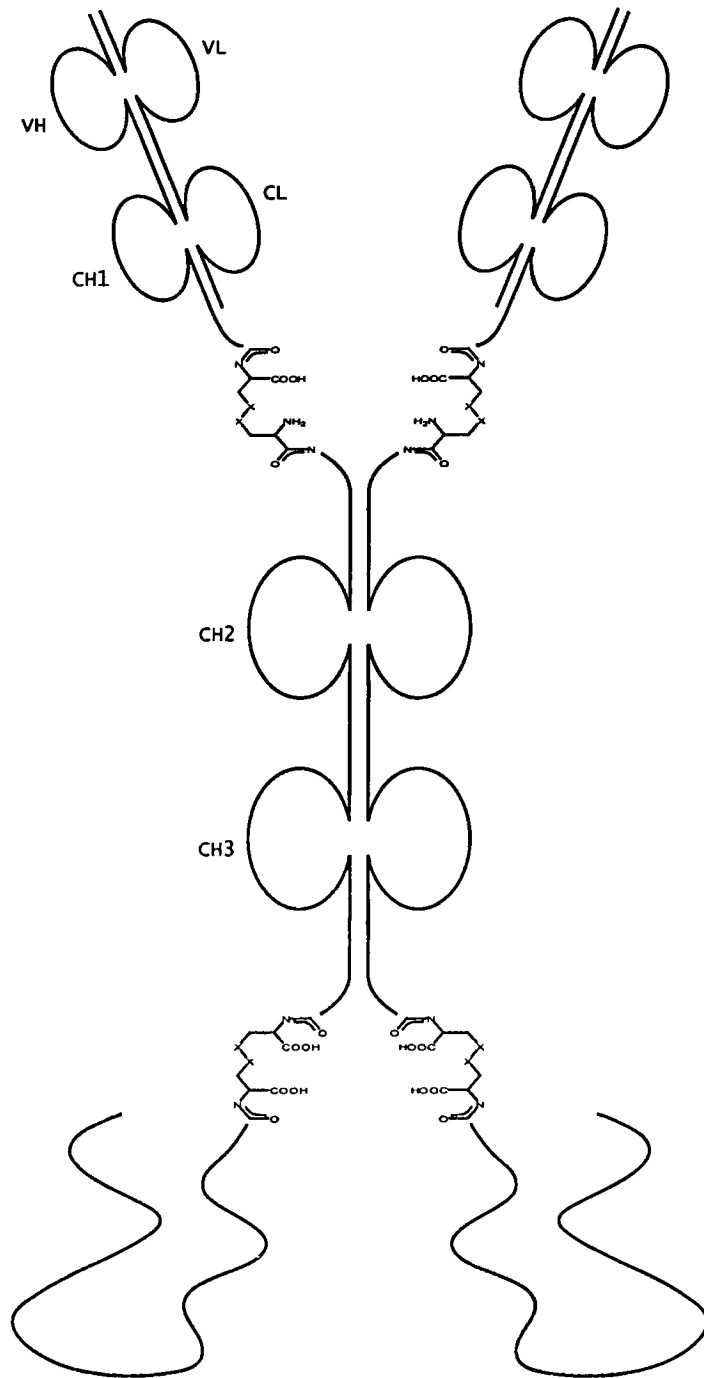


图 27

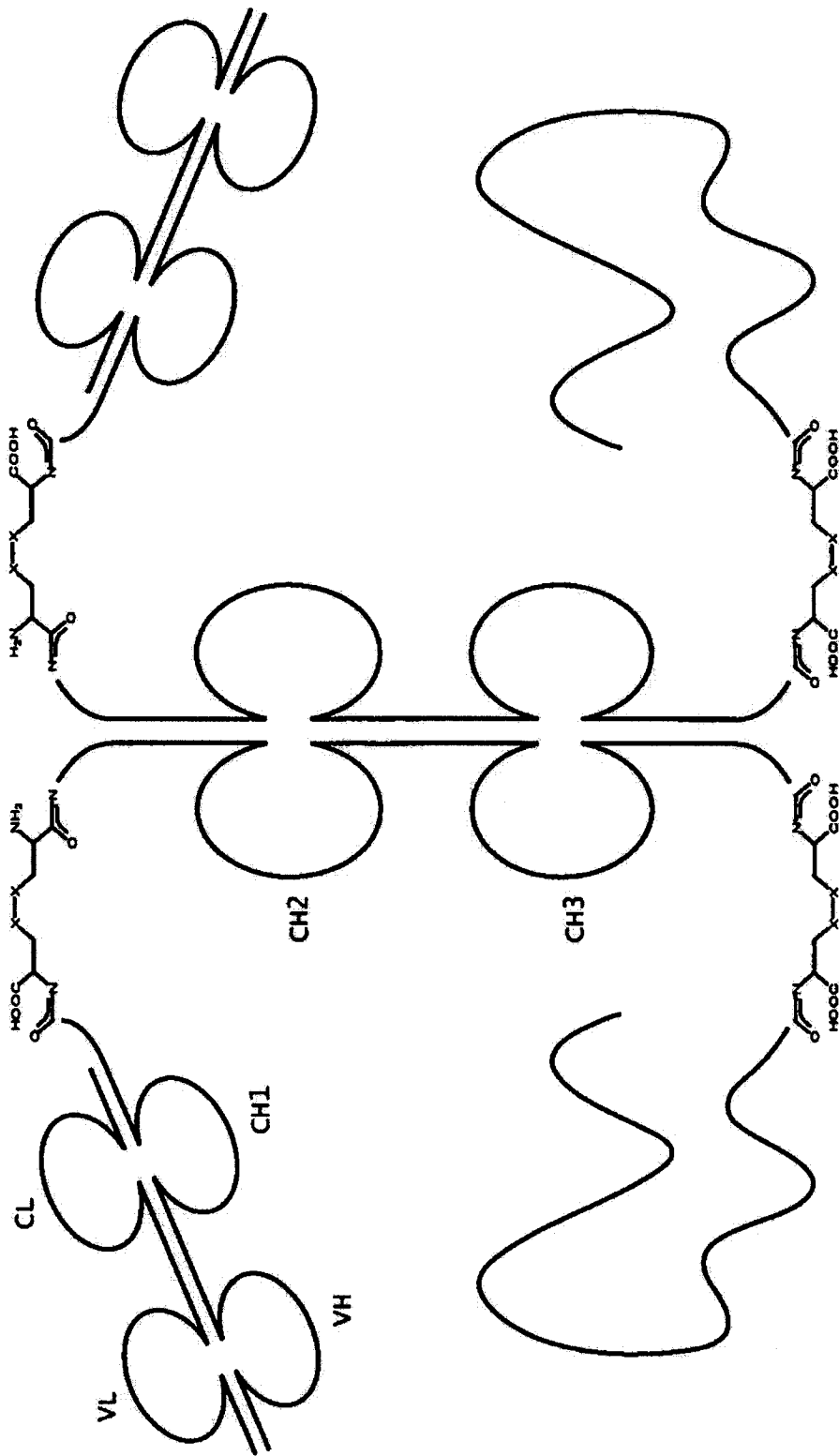


图 28

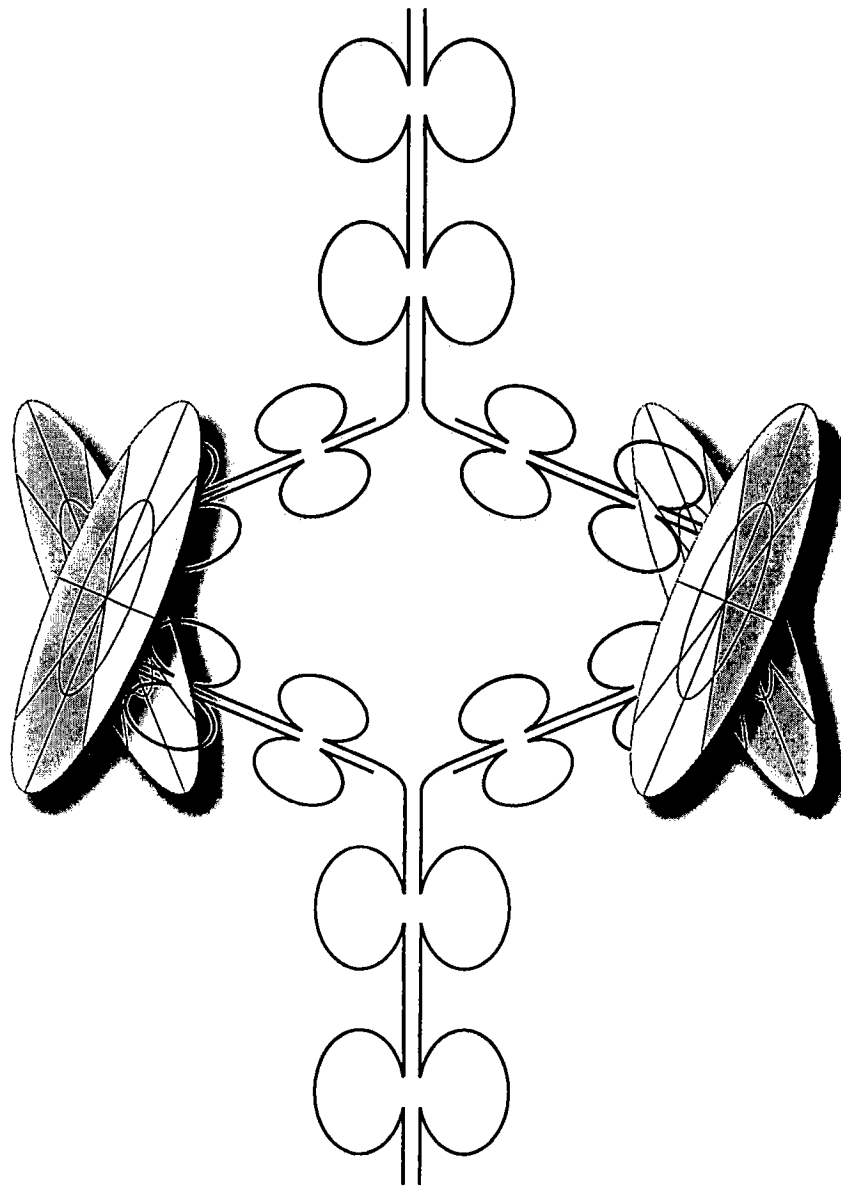


图 29

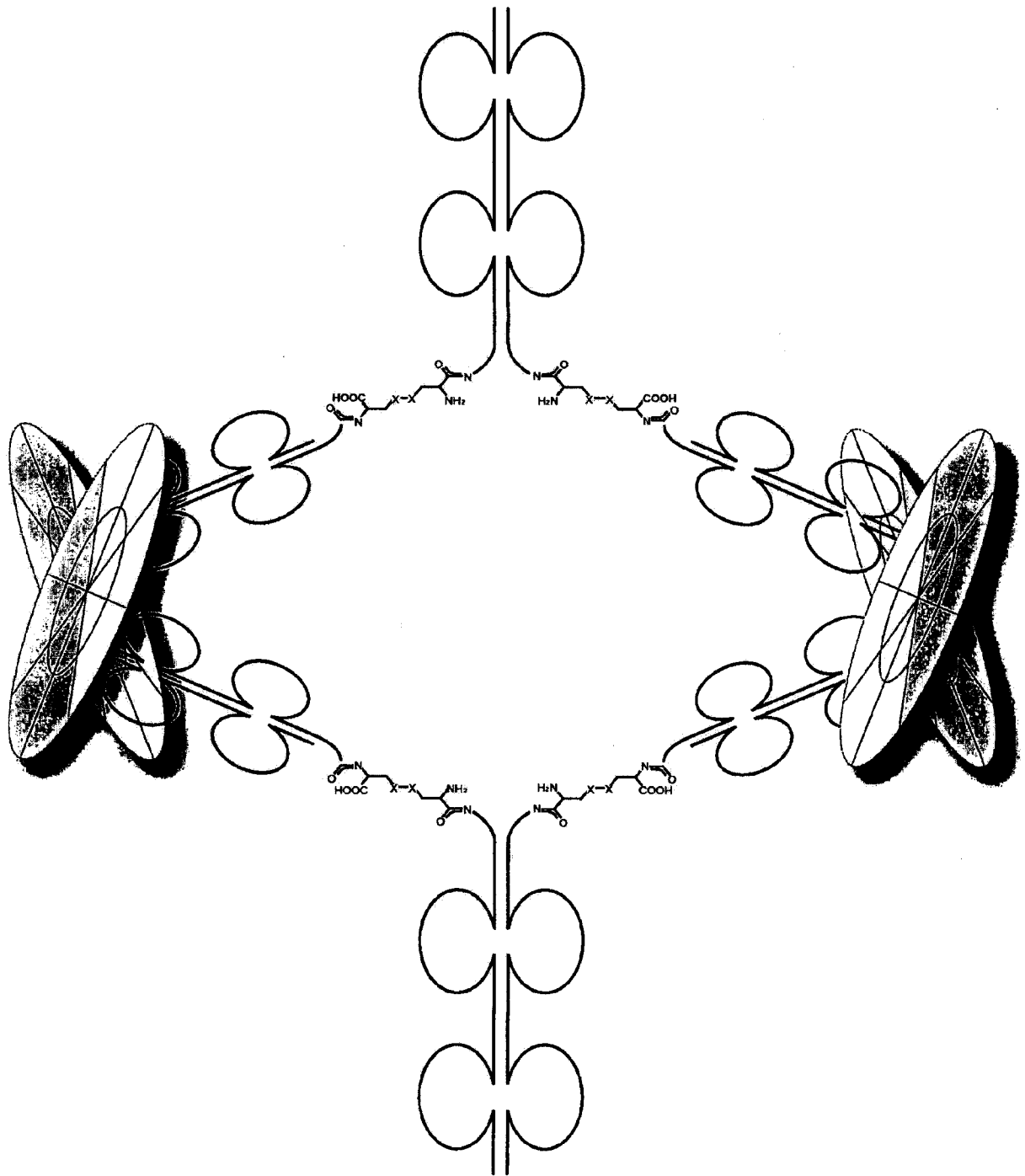


图 30

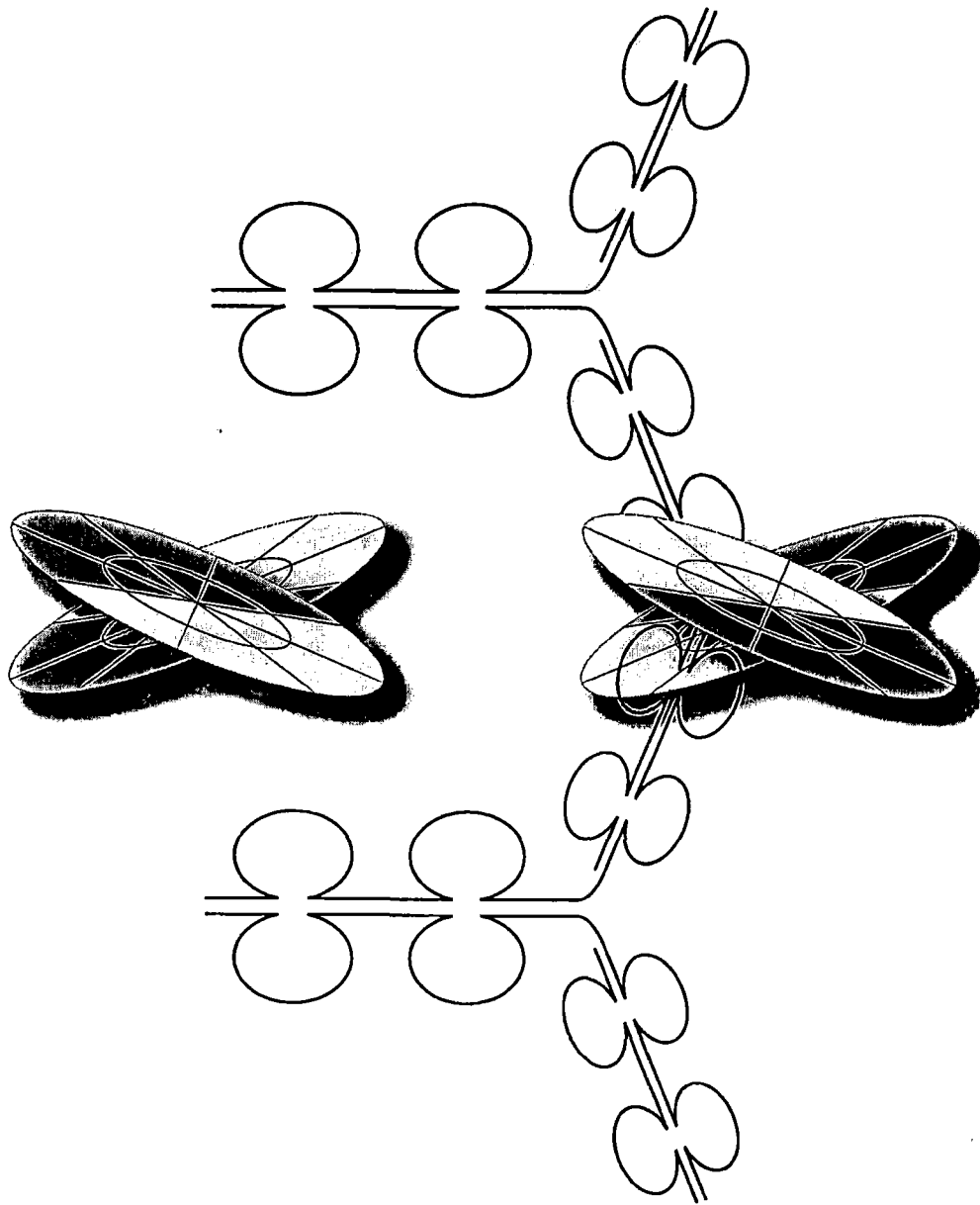


图 31

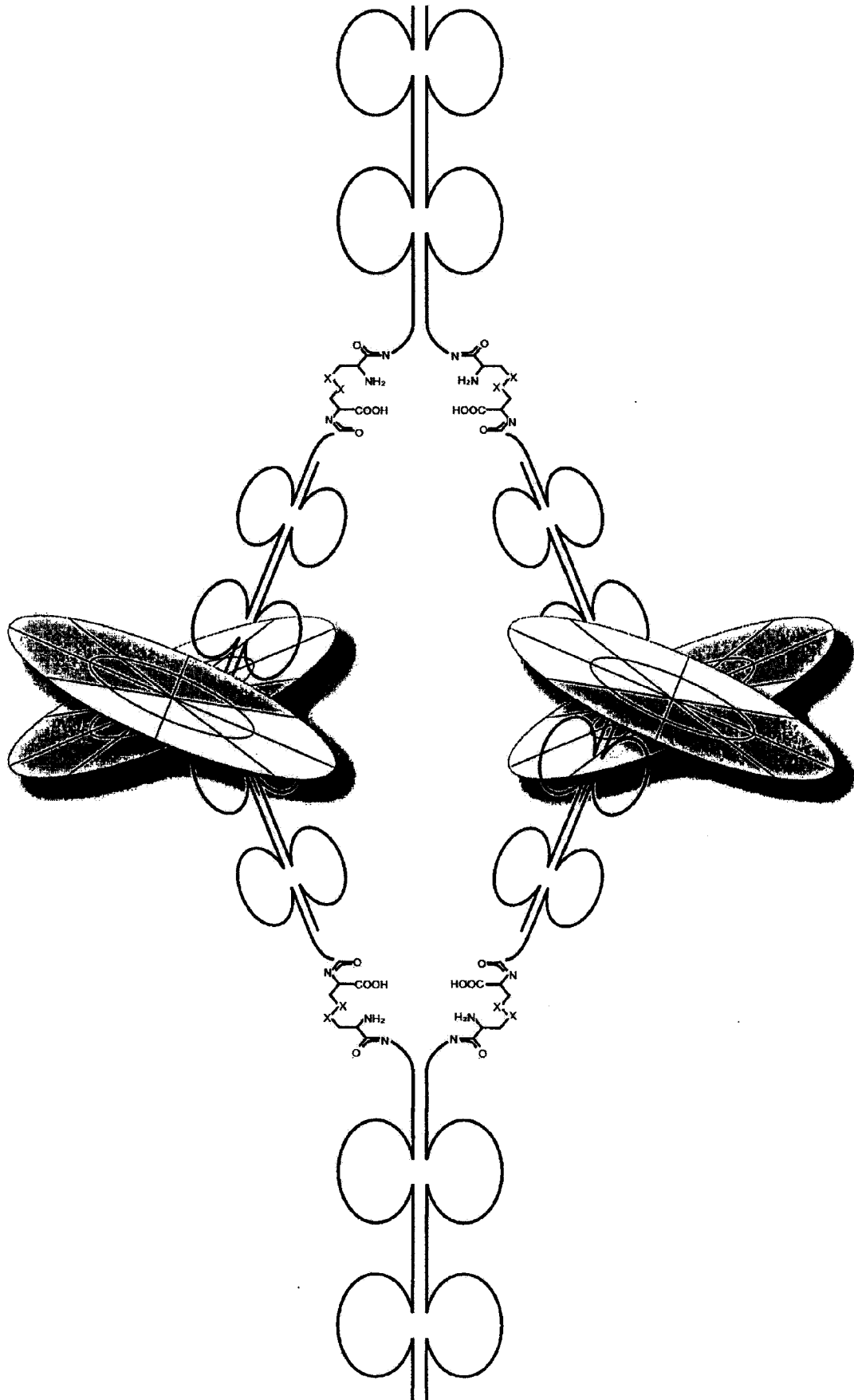


图 32

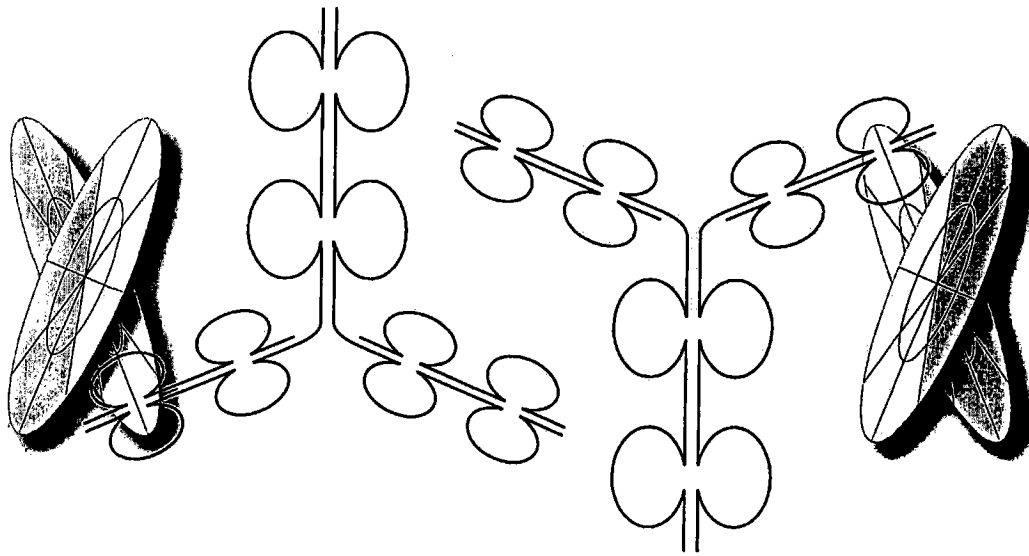


图 33

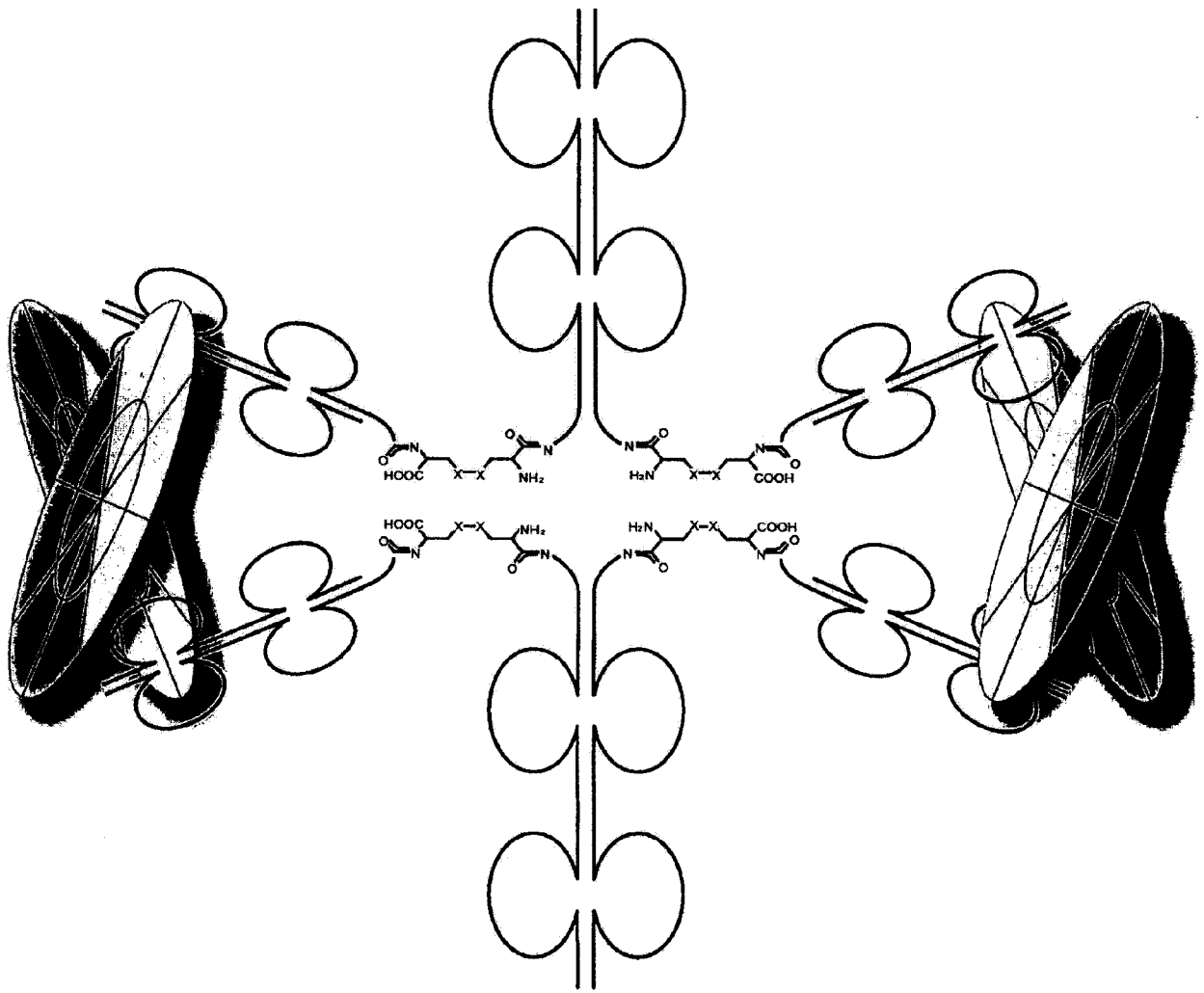


图 34

IgG1 Fc N-terminal-S-terminus

(i)	PRE-FC		
	SHH	MLLLARCLLLVLSLLVCSGLA	-23
	IFN	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23
	CETP	MLAATVLTLLALLGNAHA	-17
	CDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV		60
	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		120
			180
			228
(ii)	S-FC		
	CDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV		60
	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		120
			180
			228

图 35A

IgG2 Fc N-terminal-S-terminus

(i) PRE-Fc		
SHH	MLLLARCLLLVLSLLVCSGLA	-23
IFN	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23
CETP	MLAATVLTLLALLGNAHA	-17
	CCVECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV	60
	EVHNAKTPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQ	120
	PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMFLDSDG	180
	SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	225
(ii) S-Fc		
	CCVECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV	60
	EVHNAKTPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQ	120
	PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMFLDSDG	180
	SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	225

图 35B

IgG3 Fc N-terminal-S-terminus

(i)	PRE-FC		
	SHH	MLLLARCLLLVLSLLVCSGLA	-23
	IFN	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23
	CETP	MLAATVLTLLGNAHA	-17
		CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSV	60
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF	120
		RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK	180
		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESGQPENNYNTTPPMLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQG	240
		NIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	267
(ii)	S-FC		
		CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSV	60
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF	120
		RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK	180
		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESGQPENNYNTTPPMLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQG	240
		NIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	267

图 35C

IgG4 Fc N-terminal-S-terminus

(i) PRE-Fc

SHH
IFN
CETP

MLLLARCLLLVLSLLVCSGLA
MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG
MLAATVLTLLALLGNAHA

-23
-23
-17

CPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD^{TL}MISRTP^{EV}TCWVDV^{SQ}EDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDS^DSGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL^SLGK

60
120
180
222

(ii) S-Fc

CPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD^{TL}MISRTP^{EV}TCWVDV^{SQ}EDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDS^DSGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL^SLGK

60
120
180
222

图 35D

Fc N-terminal-X-terminus

(i) PRE-FC			
SHH	MLLLARCLLLVLVSSLLVCSGLA	-23	
IFNA	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23	
CETP	MLAATVLTLLGNAHA	-17	
	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH	60	
	NAKTKPREEQNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE	120	
	PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF	180	
	LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	222	
(ii) S-FC			
	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH	60	
	NAKTKPREEQNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE	120	
	PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF	180	
	LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	222	
(iii) X-FC			
	XDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV	60	
	DGVEVHNAKTKPREEQNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAK	120	
	KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD	180	
	SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	228	

图 36A

Fc N-terminal-X-terminus

(i)	PRE-Fc		
	SHH	MLLLARCLLLVLSLLVCSGLA	-23
	IFNA	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23
	CETP	MLAATVLTALLGNAHA	-17
		CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	60
		TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV	120
		YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS	180
		KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	219
(ii)	S-Fc		
		CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	60
		TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV	120
		YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS	180
		KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	219
(iii)	X-Fc		
		XPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH	60
		NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE	120
		PQWYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF	180
		LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	222

图 36B

Fc C-terminal X-terminus		
(i)	PRE-Fc-AUTOCLEAVAGE	
	CD2	MSFPCKFVASFLLIFNVSSKGAVS
	CD4	MNRGVPPFRHLLLVLQLALLPAATQG
		KTHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDG
		VEVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG
		QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
		GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLPELQLEESCAEAQDDEL
		DGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEKGFPTALIRGSGYPCPSGFFRTCDVYDLRTREGHC
		LRLTHDHRVLMVMDGGLEWRAAGELEERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDAT
		VYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTPGVSQVNTAYTAGQLVTVYNGKTYKCL
		QPHTSLAGWEPNVPALWQLQ
	Fc-AUTOCLEAVAGE	
		KTHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDG
		VEVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG
		QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
		GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLPELQLEESCAEAQDDEL
		DGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEKGFPTALIRGSGYPCPSGFFRTCDVYDLRTREGHC
		LRLTHDHRVLMVMDGGLEWRAAGELEERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDAT
		VYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTPGVSQVNTAYTAGQLVTVYNGKTYKCL
		QPHTSLAGWEPNVPALWQLQ
(ii)	Fc-THIOESTER	
		KTHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDG
		VEVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG
		QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
		GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLPELQLEESCAEAQDDEL
	DX	
(iv)	Fc-X	
		KTHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDG
		VEVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG
		QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
		GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLPELQLEESCAEAQDDEL
	DGX	

图 37A

Fc C-terminal-s-terminus

(i) PRE-FC

CD2	MSFPCKFVASFLLI FNVSSKGAVS	-24
CD4	MNRGVPPFRHLLLV LQLALLPAATQG	-25
	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDG	60
	VEVHNAKTKPREEQNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG	120
	QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD	180
	GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPQLQEESC	232

(ii) Fc-S

	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDG	60
	VEVHNAKTKPREEQNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG	120
	QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD	180
	GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPQLQEESC	232

图 37B

Fc N-terminal-S-terminus AND C-terminal-X-terminus

(i) PRE-Fc-AUTOCLEAVAGE

SHH	MLLLARCLLLVSSLLVCSGLA	-23
IFN	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23
CETP	MLAATVLTALLGNAHA	-17
CDKTHTCP	CDKTHTCP	60
PAPPELLGGPSVFLFPPKPKD	PAPPELLGGPSVFLFPPKPKD	120
TLMSRTP	TLMSRTP	180
EVTVVSHEDPEVKFNWYV	EVTVVSHEDPEVKFNWYV	240
DGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVS	DGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVS	300
LVTLHQDWLNGKEYCKVSNKAL	LVTLHQDWLNGKEYCKVSNKAL	360
PAPIEKTISKA	PAPIEKTISKA	420
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKN	KGQPREPQVYTLPPSRDELTKN	443
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES	QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES	
NGQPENNYKTTTPVLD	NGQPENNYKTTTPVLD	
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN	SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN	
VFSCVMHEALHNHYTQKSLS	VFSCVMHEALHNHYTQKSLS	
PELQLEESCAEAQDG	PELQLEESCAEAQDG	
ELDGCVSGDTIVMTSGGPR	ELDGCVSGDTIVMTSGGPR	
TVAELEGKFTALIRGSGYPC	TVAELEGKFTALIRGSGYPC	
SPGFFRT	SPGFFRT	
CERDVYDLRTREG	CERDVYDLRTREG	
HCLRLTHDHRVLMDDGGL	HCLRLTHDHRVLMDDGGL	
EWRAAGELERGDRLVMDDA	EWRAAGELERGDRLVMDDA	
AAGEFPALATFRGLRG	AAGEFPALATFRGLRG	
AGRQDVYD	AGRQDVYD	
ATVYGASAF	ATVYGASAF	
TANGFIVHACGEQPGTGL	TANGFIVHACGEQPGTGL	
NSGLTTNPGVSAWQVNT	NSGLTTNPGVSAWQVNT	
AYTAGQLV	AYTAGQLV	
TYNGKTYK	TYNGKTYK	
CLQPHTSLAGWEP	CLQPHTSLAGWEP	
SNVPALWQLQ	SNVPALWQLQ	

(ii) S-Fc-AUTOCLEAVAGE

CDKTHTCP	CDKTHTCP	60
PAPPELLGGPSVFLFPPKPKD	PAPPELLGGPSVFLFPPKPKD	120
TLMSRTP	TLMSRTP	180
EVTVVSHEDPEVKFNWYV	EVTVVSHEDPEVKFNWYV	240
DGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVS	DGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVS	300
LVTLHQDWLNGKEYCKVSNKAL	LVTLHQDWLNGKEYCKVSNKAL	360
PAPIEKTISKA	PAPIEKTISKA	420
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKN	KGQPREPQVYTLPPSRDELTKN	443
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES	QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES	
NGQPENNYKTTTPVLD	NGQPENNYKTTTPVLD	
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN	SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN	
VFSCVMHEALHNHYTQKSLS	VFSCVMHEALHNHYTQKSLS	
PELQLEESCAEAQDG	PELQLEESCAEAQDG	
ELDGCVSGDTIVMTSGGPR	ELDGCVSGDTIVMTSGGPR	
TVAELEGKFTALIRGSGYPC	TVAELEGKFTALIRGSGYPC	
SPGFFRT	SPGFFRT	
CERDVYDLRTREG	CERDVYDLRTREG	
HCLRLTHDHRVLMDDGGL	HCLRLTHDHRVLMDDGGL	
EWRAAGELERGDRLVMDDA	EWRAAGELERGDRLVMDDA	
AAGEFPALATFRGLRG	AAGEFPALATFRGLRG	
AGRQDVYD	AGRQDVYD	
ATVYGASAF	ATVYGASAF	
TANGFIVHACGEQPGTGL	TANGFIVHACGEQPGTGL	
NSGLTTNPGVSAWQVNT	NSGLTTNPGVSAWQVNT	
AYTAGQLV	AYTAGQLV	
TYNGKTYK	TYNGKTYK	
CLQPHTSLAGWEP	CLQPHTSLAGWEP	
SNVPALWQLQ	SNVPALWQLQ	

图 38A

Fc N-terminal-S-terminus AND C-terminal-X-terminus (cont' d)

(iii) S-Fc-THIOESTER

CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPQLLEESCAEAQDG
 ELDX

60
120
180
240
244

(iv) S-Fc-X

CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPQLLEESCAEAQDG
 ELDGX

60
120
180
240
245

图 38B

Fc N-terminal-X-terminus AND C-terminal-X-terminus

(i) PRE-Fc-AUTOCLEAVAGE

SHH	MLLLARCLLLVLSLLVCSGLA	-23
IFN	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23
CETP	MLAATVLTLLALLGNAHA	-17
CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH		60
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE		120
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF		180
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPQLQEESCAEAQDGEDGCV		240
SGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFATALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTRREGHCLRLT		300
HDHRLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGA		360
SAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHT		420
SLAGWEPSNVPALWQLQ		437

(ii) S-Fc-AUTOCLEAVAGE

CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH	60
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE	120
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF	180
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPQLQEESCAEAQDGEDGCV	240
SGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFATALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTRREGHCLRLT	300
HDHRLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGA	360
SAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHT	420
SLAGWEPSNVPALWQLQ	437

图 39A

Fc N-terminal-X-terminus AND C-terminal-X-terminus (cont'd)

(iii) X-Fc-AUTOCLEAVAGE

XDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV 60
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKKA 120
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD 180
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPQLLEESCAEAQDG 240
 ELDGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFALIRGSGYPCPSGFFRT CERDVYDLRTREG 300
 HCLRLTHDHRVLMIDGGLLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYD 360
 ATVYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYK 420
 CLQPHTSLAGWEP SNVPALWQLQ 443

(iv) X-Fc-THIOESTER

XDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV 60
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKKA 120
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD 180
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPQLLEESCAEAQDG 240
 ELDX 244

(v) X-Fc-X

XDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV 60
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKKA 120
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD 180
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPQLLEESCAEAQDG 240
 ELDGX 245

图 39B

CD4 C-terminal-X-terminus

(i) PRE-CD4-AUTOCLEAVAGE

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSQIFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADSRRS
 LWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGQSLTLTLES
 PPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLVSQLELQDSGTWCTVLQNKQKVEFKIDIVVLAFAQ
 KASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWQAERASSKSWITFDLKNKEVSVKR
 VTQDPKLMGKKLPLHLTPQALPQYAGSGNLTALAEAKTGKHHQEVNLVVMRATQLQKN
 LTCEVWGPTSPKLMLSLKENKEAKVSKREKAVWVLPNPEAGMWQCLLSDSGQVLLLESNIK
 VLPWTSTPVQPGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFALIRGSGYPCPSGFFRTCERDV
 YDLRTREGHCLRLTHDHRVLMDDGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRG
 AGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLV
 TYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSPNVPALWQLQ

(ii) CD4-AUTOCLEAVAGE

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSQIFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADSRRS
 LWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGQSLTLTLES
 PPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLVSQLELQDSGTWCTVLQNKQKVEFKIDIVVLAFAQ
 KASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWQAERASSKSWITFDLKNKEVSVKR
 VTQDPKLMGKKLPLHLTPQALPQYAGSGNLTALAEAKTGKHHQEVNLVVMRATQLQKN
 LTCEVWGPTSPKLMLSLKENKEAKVSKREKAVWVLPNPEAGMWQCLLSDSGQVLLLESNIK
 VLPWTSTPVQPGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFALIRGSGYPCPSGFFRTCERDV
 YDLRTREGHCLRLTHDHRVLMDDGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRG
 AGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLV
 TYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSPNVPALWQLQ

图 40A

CD4 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(iii)

CD4-THIOESTER

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADSRRS 60
 LWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGQSLTLTLES 120
 PPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLVSQLELQDSGTWCTVLQNQKKVEFKIDIVVLAFAQ 180
 KASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWQAEARASSSSKSWITFDLKNKEVSVKR 240
 VTQDPKLMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTALAEAKTGKLNHVEVNLVVMRATQLQKN 300
 LTCEVWGPTSPKLMLSLKLLENKEAKVSKREKAVVVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLNESNIK 360
 VLPTWSTPVQPX 372

(iv)

CD4-X

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADSRRS 60
 LWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGQSLTLTLES 120
 PPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLVSQLELQDSGTWCTVLQNQKKVEFKIDIVVLAFAQ 180
 KASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWQAEARASSSSKSWITFDLKNKEVSVKR 240
 VTQDPKLMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTALAEAKTGKLNHVEVNLVVMRATQLQKN 300
 LTCEVWGPTSPKLMLSLKLLENKEAKVSKREKAVVVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLNESNIK 360
 VLPTWSTPVQPX 373

图 40B

VH-CH1 C-terminal-x-terminus

(i) PRE-Di62-VH-CH1-AUTOCLEAVAGE

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYGMNWKQAPGKGLKMMGWINTYTGEPTY
 ADDFKEHFASFLETSASTVFLQINLNKEDTATYFCARERGDAMDYWGQGSTVTVSSAST
 KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGCVSGDTIVMTSGGP
 RTVAELEKPFATALIRGSGYPCPSGFFRTCERDYYDLRTREGHCLRLTHDHRVLMDDGGL
 EWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHA
 CGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHNTSLAGWEPNSVPA
 LWQLQ

-19
 60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 425

(ii) Di62-VH-CH1-AUTOCLEAVAGE

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYGMNWKQAPGKGLKMMGWINTYTGEPTY
 ADDFKEHFASFLETSASTVFLQINLNKEDTATYFCARERGDAMDYWGQGSTVTVSSAST
 KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGCVSGDTIVMTSGGP
 RTVAELEKPFATALIRGSGYPCPSGFFRTCERDYYDLRTREGHCLRLTHDHRVLMDDGGL
 EWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHA
 CGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHNTSLAGWEPNSVPA
 LWQLQ

60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 425

图 41A

VH-CH1 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(iii) D162-VH-CH1-THIOESTER

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYGMNWKQAPGKGLKMMGWINTYTGPTY
 ADDFKEHFASFLETSASTVFLQINNLKNETATYFCARERGDAMDYWGQTSVTVSSAST
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTX

60
 120
 180
 226

(iv) D162-VH-CH1-X

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYGMNWKQAPGKGLKMMGWINTYTGPTY
 ADDFKEHFASFLETSASTVFLQINNLKNETATYFCARERGDAMDYWGQTSVTVSSAST
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTGX

60
 120
 180
 227

图 41B

Vk-Ck

(i) PRE-Di62-Vk-Ck

SIVMTQTPKFLLSAGDRVTITCTASQSVSNDVWVYQQKPGQSPKMLMYSAFNRYTGVPD
 RFTGRGYGTDFTTISSVQAEDLAVYFCQQDYNSPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVWCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 MKSQTQVVFVFLLLCVSGAHG
 -20
 60
 120
 180
 214

(ii) Di62-Vk-Ck

SIVMTQTPKFLLSAGDRVTITCTASQSVSNDVWVYQQKPGQSPKMLMYSAFNRYTGVPD
 RFTGRGYGTDFTTISSVQAEDLAVYFCQQDYNSPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVWCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 60
 120
 180
 214

图 42

TNR1B C-terminal-X-terminus

(i) **PRE-TNR1B-AUTOCLEAVAGE**

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCPGQHAHVFKTSDTVCDSCEDST
 YQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK
 CRPGFGVARPGTETSDVWCKPCAPGTFSENTTSDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS
 TSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTFLLPMGPPPAEGSTGDGCVSG
 DTIVMTSGGPRTVAELEGKPFALIRGSGYPCPSGFFRTERDYYDLRTREGHCLRLTHD
 HRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASA
 FTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSL
 AGWEP SNVPALWQLQ

MAPVAVMAALAVGLELWAAAHA
 -22
 60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 435

(ii) **TNR1B-AUTOCLEAVAGE**

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCPGQHAHVFKTSDTVCDSCEDST
 YQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK
 CRPGFGVARPGTETSDVWCKPCAPGTFSENTTSDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS
 TSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTFLLPMGPPPAEGSTGDGCVSG
 DTIVMTSGGPRTVAELEGKPFALIRGSGYPCPSGFFRTERDYYDLRTREGHCLRLTHD
 HRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASA
 FTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSL
 AGWEP SNVPALWQLQ

60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 435

(iii) **TNR1B-THIOESTER**

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCPGQHAHVFKTSDTVCDSCEDST
 YQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK
 CRPGFGVARPGTETSDVWCKPCAPGTFSENTTSDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS
 TSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTFLLPMGPPPAEGSTGDGCVSG

60
 120
 180
 236

(iv) **TNR1B-X**

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCPGQHAHVFKTSDTVCDSCEDST
 YQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK
 CRPGFGVARPGTETSDVWCKPCAPGTFSENTTSDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS
 TSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTFLLPMGPPPAEGSTGDGX

60
 120
 180
 237

图 44A

TNR1B-immunoadhesin

(i) PRE-TNR1B-immunoadhesin

MAPVAVWAALAVGLELWAAHA
 LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDST -22
 YQLWNWPECLSCGRSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK 60
 CRPGFGVARPGTETSDVCKPCAPGTFSTSSDIDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS 120
 TSPTRSMAPGAVHLPQVSTRSQHTQTPPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDEPKSC 180
 DKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD 240
 GVEVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK 300
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD 360
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 420
 467

(ii) TNR1B-immunoadhesin

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDST 60
 YQLWNWPECLSCGRSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK 120
 CRPGFGVARPGTETSDVCKPCAPGTFSTSSDIDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS 180
 TSPTRSMAPGAVHLPQVSTRSQHTQTPPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDEPKSC 240
 DKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD 300
 GVEVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK 360
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD 420
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 467

图 44B

VGFR1 C-terminal-X-terminus

(i) PRE-VGFR1-AUTOCLEAVAGE

SKLKDPELSLKGTHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGK QFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII HMTGRELVI PCRV TSPNITVTLLKKFPLD TLIPDGKRII WDSRKGFIISNATYKEIGLLT CEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTW SYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDGLYTCRVRSGPSFKSVNTSV HIYDKAFITVKHRKQVLETVAGKRSYRLSMKVKA FPS EVWLKDGLPATEKSARYLTR GYSLIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVK PQI YEKAVSSFPDPALYPL GSRQIL CTAYGIPQPTIKWF HPCNHNHSEARCD FCSN NEESFIL DADS MGNRIESIT QRM AI IEGKNKMASTLVADSRISGIYICIASNKVGT VGRNIS FYITDVPNGFHVNLEKM PTEGEDLKL SCTV NKFLYRDVTWILLRTVNNRTM HYSISKQ MAITKEHSITLNLTIMNV SLQDSGT YACR ARNVYT GEEILQKKEIT IRDQEAPYLLRNLS DHTVA ISSST TL DCHANG VPEPQITWFKNNHKIQE PGIILG PGSSTLFIERVTEED EGVYHCK ATNQKGSVESAYL TVQGTSDKSNLE GCVSGD TI VMTSGGPR TVAELEGK PFTALIRG SGYPCPSGFFRT CERD VYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELER GDR LVMD DAAGE FPALATFRGLR GAGRQDVYDATVYGASAF TANGFIVHACGE QPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQL VTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEP SNVPAL WQLQ	MVS Y WDTGVLLCALLSCLLLTGSSSG -26 60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 932
--	---

图 45A

VGFR1 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(ii) VGFR1-AUTOCLEAVAGE

SKLKDPELSLKGTHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGK
 QFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII
 HMTGRELVI PCRVTSPIITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLT
 CEATVNGHLYKTNYLTHRQNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVNCTATTPLNTRVQMTW
 SYPDEKNKRASVRRRIDQNSHANI FYSVLTIDKMQNKDGLYTCRVRSGPSFKSVNTSV
 HIYDKAFITVKHRKQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFFSPEVWVWLDGLPATEKSARYLTR
 GYSIIKDVT EEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKQIYEKAVSSFPDPALYPL
 GSRQILTCTAYGIPQTIKWFHPCNHNHSEARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESIT
 QRMAIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLEKM
 PTEGEDLKL SCTVNFLYRDVTWILLRTVNNRTMHSISKQMAITKEHSITLNLTIMNV
 SLQDSGTYACRARNVYTGEELQKKEITIRDQEAPYLLRNLS DHTVAISSSTLDC HANG
 VPEPQITWFKNNHKIQEPGII LGPGSSTLFIERVTEEDEGVYHCKATNQKGSVESSAYL
 TVQGTSDKSNLEGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPF TALIRGSGYPCPSGFFRT CERD
 VYDLRTREGHCLRLTHDHRVLMDDGGLWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLR
 GAGRQDVYDATVYGASAF TANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQL
 VTYNGKTYKCLQPH TSLAGWEP SNVPALWQLQ

60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 480
 540
 600
 660
 720
 780
 840
 900
 932

图 45B

VGFR1 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(iii)

VGFR1-THIOESTER

SKLKDPELSLKGTHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGK
 QFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKEETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII
 HMTGRELVI PCRVTSPIITVTLKFFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLT
 CEATVNGHLYKTNLTHRQNTIIDVQISTPRVKLLRGHTLVNCTATTPLNTRVQMTW
 SYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSV
 HIYDKAFITVKHRKQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFFSPEVWVKDGLPATEKSARYLTR
 GYSLIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKPKIYEKAVSSFPDPALYPL
 GSRQILCTAYGIPQPTIKWFHPCNHNHSEARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESIT
 QRMALIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLEKM
 PTEGEDLKL SCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMHSYSKQKMAITKEHSITLNLTIMNV
 SLQDSGTYACRARNVYTGEIILQKKEITIRDQEAPYLLRNLSDHTVAISSSTLLDCHANG
 VPEPQITWFKNNHKIQEPGIIIGPGSSTLFIERVTEEDGEVYHCKATNQKGSVCESSAYL
 TVQGTSDKSNLEX

60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 480
 540
 600
 660
 720
 733

(iv)

VGFR1-X

SKLKDPELSLKGTHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGK
 QFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKEETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII
 HMTGRELVI PCRVTSPIITVTLKFFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLT
 CEATVNGHLYKTNLTHRQNTIIDVQISTPRVKLLRGHTLVNCTATTPLNTRVQMTW
 SYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSV
 HIYDKAFITVKHRKQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFFSPEVWVKDGLPATEKSARYLTR
 GYSLIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKPKIYEKAVSSFPDPALYPL
 GSRQILCTAYGIPQPTIKWFHPCNHNHSEARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESIT
 QRMALIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLEKM
 PTEGEDLKL SCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMHSYSKQKMAITKEHSITLNLTIMNV
 SLQDSGTYACRARNVYTGEIILQKKEITIRDQEAPYLLRNLSDHTVAISSSTLLDCHANG
 VPEPQITWFKNNHKIQEPGIIIGPGSSTLFIERVTEEDGEVYHCKATNQKGSVCESSAYL
 TVQGTSDKSNLEX

60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 480
 540
 600
 660
 720
 734

图 45C

VGFR2 C-terminal-X-terminus

(i) PRE-VGFR2-AUTOCLEAVAGE

ASVGLPSVSLDL SDGLFCKTLTIPK ENKNTVWIPCLGS CEAKINDESYQSI WEYPSSKHQHKLV TFVRVHEKPFVAF GHVLTIMESERDT TQTLTCTVYAI NKNQFALIEGKNK QPTEQESVSLWCT STNDILIMELKNAS IGESIEVSTASGN CSVLGCAKVEAFF PCPSGFFRTCERD GEFPALATFRGLR AWQVNTAYTAGQL	PRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDL WLVKIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYQDYRSPFIASVSDQHGVVYIT SLSNLNVS LCARYPEKRFVDPGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVF IYVWVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDFN VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS VEGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPILESNHTIKA TILTNPISKEKQSHVSLVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGT IHWYQLEEEECANEPSQAVSTNYPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEV TVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDM STFENLTWYKLGQPPLPIHVGE LPTPVCKNLDTLWKLNATMFSN VCLAQDRKTKRHCVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSS IMWFKDNELVEDSGIVLKDGNRNLTI RRVKEDGLYTCQA IIEGAQEKTNLEGCVSGDTIVMTSGGPR TVAELEGKPF TALIRGSGY VDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDDAA VYDATVYGASAF TANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVS	MQSKVLLAVALWLCVETRA WPNNQSGSEQRVEVTEC SFIASVSDQHGVVYIT FTIPSYMISYAGMVF SVGEKLVLNCTARTELVNGIDFN YTCAASSGLMTKKNS PEIKWYKNGIPILESNHTIKA VYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGT VTNYPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEV SFHVTRGPEITLQPDM TLWKLNATMFSN TIRRVKEDGLYTCQA VAEELEGKPF TALIRGSGY WRAAGELERGDRLVMDDDAA TANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVS VNPALWQLQ	-19 60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 945
--	---	---	--

图 46A

VGFR2 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(ii) VGFR2-AUTOCLEAVAGE

```

ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLWLWPNNQSGSEQRVEVTEC 60
SDGLFCKTLTIIPKVIIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVYIT 120
ENKNKTVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVDPGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVF 180
CEAKINDESYQSIMYIYVYVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFN 240
WEYPSKHKHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS 300
TFVRVHEKPFVAFSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPILESNHTIKA 360
GHVLTIMEVSEKDTGNYTVILTNPISKEKQSHVSLVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGT 420
TQTLTCTVYAIPPPHHIHWYQLEEECANEPSQAVSVTNYPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEV 480
NKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDM 540
QPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPPPIHVGEPLTPVCKNLDTLWKLNATMFSN 600
STNDILIMELKNASLQDQDYVCLAQDRKTKRHCVVRQLTVLERVAPTTIGNLENQTTTS 660
IGESIEVSCTASGNPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIIRVRKEDEGLYTCQA 720
CSVLGCAKVEAFFIIEGAQEKTNLEGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFALIRGSGY 780
PCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLMDDGLEWRAAGELERGDRLVMDDAA 840
GEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVS 900
AWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSPALWQLQ 945

```

图 46B

VGFR2 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(iii) VGFR2-THIOESTER

ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIIKANTTLQITCRGQRDLDLWPNNQSGSEQRVEVTEC 60
 SDGLFCKTLTIIPKVIIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFFIASVSDQHGWWYIT 120
 ENKNTVVIPLGSIISNLNLSLCARYPEKRFVDPGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVF 180
 CEAKINDESYQSIMYIVVVGRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDFN 240
 WEYPSKHKHKKLVNRDLKTSQSGSEMKKFLSTLTIDGVTSDQGLYTCAASSGLMTKKNS 300
 TFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPILESNHTIKA 360
 GHVLTIMEVSEKTDGNYTVILTNPISKEKQSHVSVLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGT 420
 TQTLTCTVYAIPPPHHIHWYQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVDFQGGNKIEV 480
 NKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDM 540
 QPTEQESVSLWCTADRSSTFENLTWYKLGQPPLPIHVGELPTPVCKNLDLTLWKLNATMFSN 600
 STNDILIMELKNASLQDQDYVCLAQDRKTKKRHCVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSS 660
 IGESIEVSTASGNPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIIRVRKEDEGLYTCQA 720
 CSVLGCACVFAFFIIIEGAQEKTNLEX 746

(iv) VGFR2-X

ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIIKANTTLQITCRGQRDLDLWPNNQSGSEQRVEVTEC 60
 SDGLFCKTLTIIPKVIIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFFIASVSDQHGWWYIT 120
 ENKNTVVIPLGSIISNLNLSLCARYPEKRFVDPGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVF 180
 CEAKINDESYQSIMYIVVVGRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDFN 240
 WEYPSKHKHKKLVNRDLKTSQSGSEMKKFLSTLTIDGVTSDQGLYTCAASSGLMTKKNS 300
 TFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPILESNHTIKA 360
 GHVLTIMEVSEKTDGNYTVILTNPISKEKQSHVSVLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGT 420
 TQTLTCTVYAIPPPHHIHWYQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVDFQGGNKIEV 480
 NKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDM 540
 QPTEQESVSLWCTADRSSTFENLTWYKLGQPPLPIHVGELPTPVCKNLDLTLWKLNATMFSN 600
 STNDILIMELKNASLQDQDYVCLAQDRKTKKRHCVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSS 660
 IGESIEVSTASGNPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIIRVRKEDEGLYTCQA 720
 CSVLGCACVFAFFIIIEGAQEKTNLEX 747

图 46C

VGFR3 C-terminal-X-terminus

(i) PRE-VGFR3-AUTOCLEAVAGE

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHPLEWAWPGAQEA PATGDKDSEDTGVVRDC
 EGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYKYIKARIEGTTAASSYVFRDFEQPFINKPD
 TLLVNRK DAMWV PCLVSI PGLNVT LRSQSSVLPDGGQEVWDDRRGMLVSTPLLHDALYL
 QCETTWGDQDFLSNPFVHITGNELYDIQLPRKSLELLVGEKLVNCTVWAEFNSGVTF
 DWDPGKQAEERKWPERRSQQTHTELSSILTIHNVSQHDLGSYCKANNGIQRFRESTE
 VIVHENPFI SVEW LKGP ILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSGRHSPHAL
 VLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRNISLELVNVPPIHEKEASSPSIYSRHSRQALT
 CTAYGVPLPLSIQWHWRPWTCKMFAQRSLRRRQQQLMPQCRDWRVTTQDAVNPIESL
 DTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNAVNSAMYKCVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKP
 SEELLEGPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASI
 EEVAPGARHATLSL S IPRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKCHKKYL SVQALEAPRLTQNL
 TDLLVNSDSL EMQCLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAG
 RYLCSVCNAKGCVNSSASVAVEGSEDKGSMEGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPF TAL
 IRGSGYPCPSGFFRT CERD VYDLRTREGHCLRLTHDHRVLMVDGGLWRAAGELERGDRL
 VMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRDVYDATVYGASAF TANGFIVHACGEQPGTGLNSGLT
 TNPVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPNSVPALWQLQ

-24
 60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 480
 540
 600
 660
 720
 780
 840
 900
 951

图 47A

VGFR3 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(i1) VGFR3-AUTOCLEAVAGE

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHPLEWAWPGAQEAEPATGDKSEDTGVVRDC
 EGTDARPYCKVLLHEVHANDTGSVYCYKYIKARIEGTTAASSYVFRDFEQPFINKPD
 TLLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSVLPDGGQEVWDDRRGMLVSTPLLDALYL
 QCETTWGDDQDFLSNPFVHTGNELYDIQLLPRKSLELLVGEKLVNCTVWAEFNSGVTF
 DWDPGKQAERGKWPERRSQQTHTESSILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRESTE
 VIVHENPFISVEWLKGPILLEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSGRHSFHAL
 VLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRNISLELVNVPPIHEKEASSPSIYSRHSRQALT
 CTAYGVPLPLSIQWHRPWTCKMFAQRSRRRQQDLMPCQCRDWRVTTQDAVNPIESL
 DTWTEFVEGKNKTVSKLVIQANVSAMYKCVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFIESKP
 SEELLEGPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLDCKNVHLFATPLAASL
 EEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKKCHKKYL SVQALEAPRLTQNL
 TDLLVNVSDSLEMQCLVAGAHAPSIWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAG
 RYLCVNAKGCVNSSASVAVEGSEDKGSMEGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFATAL
 IRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTRREGHCLRLTHDHRVLMVDGGLWRAAGELEGERDRL
 VMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLT
 TNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSPNVPALWQLQ

60

120

180

240

300

360

420

480

540

600

660

720

780

840

900

951

图 47B

VGFR3 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(iii) VGFR3-THIOESTER

```

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHPLEWAWPGAQEA PATGDKDSEDTGVVRDC 60
EGTDARPYCKVLLHEVHANDTGSVYCYKYIKARIEGTTAASSYV FVRDFEQPFINKPD 120
TLLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVWDDRRGMLVSTPLLHDALYL 180
QCETTWGDDQDFLSNPFVHITGNELYDIQLPRKSELLVGEKLVNCTVWAEFNSGVTF 240
DWDYPGKQAEKRWPERRSQQTHTELSILTIHNVSQHDLGSYCKANNGIQRFRESTE 300
VIVHENPFLSVEWLKGPILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWKDGKALSGRHSPHAL 360
VLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRNISLELVNVVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQALT 420
CTAYGVPLPLSIQWHRPWTCKMFAQRSLRRRQQDLMPCQRDWRVAVTTQDAVNPIESL 480
DTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNAVVSAMYKCVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTTIESKP 540
SEELLEGQPVLSCQADSYKYEHLRWYRLNLTLDHAGNPLLLDCKNVHLFATPLAASL 600
EEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRSRHDKHCHKKYL SVQALEAPRLTQNL 660
TDLLVNVSDSLEMQCLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAG 720
RYLCSVCNAKGCVNSASVAVEGSEDKGSMEX 752

```

(iv) VGFR3-X

```

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHPLEWAWPGAQEA PATGDKDSEDTGVVRDC 60
EGTDARPYCKVLLHEVHANDTGSVYCYKYIKARIEGTTAASSYV FVRDFEQPFINKPD 120
TLLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVWDDRRGMLVSTPLLHDALYL 180
QCETTWGDDQDFLSNPFVHITGNELYDIQLPRKSELLVGEKLVNCTVWAEFNSGVTF 240
DWDYPGKQAEKRWPERRSQQTHTELSILTIHNVSQHDLGSYCKANNGIQRFRESTE 300
VIVHENPFLSVEWLKGPILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWKDGKALSGRHSPHAL 360
VLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRNISLELVNVVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQALT 420
CTAYGVPLPLSIQWHRPWTCKMFAQRSLRRRQQDLMPCQRDWRVAVTTQDAVNPIESL 480
DTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNAVVSAMYKCVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTTIESKP 540
SEELLEGQPVLSCQADSYKYEHLRWYRLNLTLDHAGNPLLLDCKNVHLFATPLAASL 600
EEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRSRHDKHCHKKYL SVQALEAPRLTQNL 660
TDLLVNVSDSLEMQCLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAG 720
RYLCSVCNAKGCVNSASVAVEGSEDKGSMEX 753

```

图 47C

ERBB1 C-terminal-X-terminus

(i) PRE-ERBB1-AUTOCLEAVAGE

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRA
 LEEKKVCQGTSNKLTLQGTFFEDHFLSLQRMFNCEWVWLGNLNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE
 VAGYVLIALNTVERIPILENLQIIRGNMYEENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIL
 HGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIISSDFLSNMSMDFQHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGE
 ENCQKLTIIICAQQCSGRCRGSPSDCCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTC
 PPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKCPRNYVTDHGSCVRACGADSYEMEEEDGVR
 KCKKCEGPCRKCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISSGDLHILPVAFRGDSFTHT
 PPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAWVSLN
 ITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIISNRGENSCKATGQ
 VCHALCSPEGCGPEPRDVCVSRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECICHPECLP
 QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC
 TYGCTGPGLEGCTNGPKIPSGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKFTALIRGSGYPCPS
 GFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFP
 ALATFRGLRGAGRDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQGTGLNSGLTTNPGVSAWQV
 NTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPNSVNPALWQLQ

-24
 60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 480
 540
 600
 660
 720
 780
 821

(ii)

ERBB1-AUTOCLEAVAGE

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRA
 LEEKKVCQGTSNKLTLQGTFFEDHFLSLQRMFNCEWVWLGNLNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE
 VAGYVLIALNTVERIPILENLQIIRGNMYEENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIL
 HGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIISSDFLSNMSMDFQHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGE
 ENCQKLTIIICAQQCSGRCRGSPSDCCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTC
 PPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKCPRNYVTDHGSCVRACGADSYEMEEEDGVR
 KCKKCEGPCRKCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISSGDLHILPVAFRGDSFTHT
 PPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAWVSLN
 ITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIISNRGENSCKATGQ
 VCHALCSPEGCGPEPRDVCVSRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECICHPECLP
 QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC
 TYGCTGPGLEGCTNGPKIPSGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKFTALIRGSGYPCPS
 GFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFP
 ALATFRGLRGAGRDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQGTGLNSGLTTNPGVSAWQV
 NTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPNSVNPALWQLQ

60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 480
 540
 600
 660
 720
 780
 821

图 48A

ERBB1 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(iii)

ERBB1-THIOESTER

LEEKVCQGTSNKLTLQGTFFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE 60
 VAGYVLIALNTVERIPILENLQIIRGNMYEENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIL 120
 HGAVRFSNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSDFQNHLSGSCQKCDPSCPNGSCWGAGE 180
 ENCQKLTIIICAQQCSGRCRKGKSPDCCHNQCAAGCTGPRESDECLVCRKFRDEATCKDTC 240
 PPLMLYNPTTYQMDVNPPEGKYSFGATCVKCCPRNYVVDHSGCVRACGADSYEMEEDGVR 300
 KCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSGDLHILPVAFRGDSFTH 360
 PPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN 420
 ITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKIIISNRGENSCKATGQ 480
 VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLP 540
 QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC 600
 TYGCTGPGLEGCPNGPKIPSGX 622

(iv)

ERBB1-X

LEEKVCQGTSNKLTLQGTFFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE 60
 VAGYVLIALNTVERIPILENLQIIRGNMYEENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIL 120
 HGAVRFSNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSDFQNHLSGSCQKCDPSCPNGSCWGAGE 180
 ENCQKLTIIICAQQCSGRCRKGKSPDCCHNQCAAGCTGPRESDECLVCRKFRDEATCKDTC 240
 PPLMLYNPTTYQMDVNPPEGKYSFGATCVKCCPRNYVVDHSGCVRACGADSYEMEEDGVR 300
 KCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSGDLHILPVAFRGDSFTH 360
 PPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN 420
 ITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKIIISNRGENSCKATGQ 480
 VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLP 540
 QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC 600
 TYGCTGPGLEGCPNGPKIPSGX 623

图 48B

ERBB2 C-terminal-X-terminus

(i) PRE-ERBB2-AUTOCLEAVAGE

TQVCTGDMKRLPASPETHLDMLRHL YQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQG
 YVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPTVTGASPGGLRELQL
 RSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQAL TLIDTNRSRACHPCSPMCKGS
 RCWGESSEDCQSLTRTVAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSG
 ICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPHMQEV
 TAEDGTQRCEKSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFD
 GDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL PDLVSFQNLQVIRGRILHNGAYS
 LTLQGLISWLGRLSRELGSGLALIHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED
 ECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNRHCLP
 CHPECQPQNGSVTCFGEADQCVACAHYKDPFCVARCPGSKVPDLSYMPIWKFPDEEGA
 CQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFPTALI
 RSGGYPCPSGFFRTICERDVYDLRTREGHCLRLTHDRVLMVDGGL EWRRAAGELEGRDRLV
 MDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTT
 NPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEP SNVPALWQLQ

-22
60
120
180
240
300
360
420
480
540
600
660
720
780
830

(ii)

ERBB2-AUTOCLEAVAGE

TQVCTGDMKRLPASPETHLDMLRHL YQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQG
 YVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPTVTGASPGGLRELQL
 RSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQAL TLIDTNRSRACHPCSPMCKGS
 RCWGESSEDCQSLTRTVAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSG
 ICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPHMQEV
 TAEDGTQRCEKSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFD
 GDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL PDLVSFQNLQVIRGRILHNGAYS
 LTLQGLISWLGRLSRELGSGLALIHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED
 ECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNRHCLP
 CHPECQPQNGSVTCFGEADQCVACAHYKDPFCVARCPGSKVPDLSYMPIWKFPDEEGA
 CQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFPTALI
 RSGGYPCPSGFFRTICERDVYDLRTREGHCLRLTHDRVLMVDGGL EWRRAAGELEGRDRLV
 MDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTT
 NPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEP SNVPALWQLQ

60
120
180
240
300
360
420
480
540
600
660
720
780
830

图 49A

ERBB2 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(iii) ERBB2-THIOESTER

TQVCTGDMKRLR PASPETHLDMRLRHL YQGCVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQG 60
 YVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPTVTGASPGGLRELQL 120
 RSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGS 180
 RCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAGCTGPKHSDCLACLHFNHSG 240
 ICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYSVDVGSCTLVCPLNQEV 300
 TAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFD 360
 GDPASNTAPLQPELQVFEETLEETGYLYISAWPDSL PDL SVFQNLQVIRGRILHNGAYS 420
 LTLQGLGISWLGRLSRELGSLALIHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED 480
 ECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGECVEECRVLQGLPREYVVARHCLP 540
 CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCACAHYKDPFCVARCPGKPDLSYMPIWKFPDEEGA 600
 CQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTX 631

(iv) ERBB2-X

TQVCTGDMKRLR PASPETHLDMRLRHL YQGCVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQG 60
 YVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPTVTGASPGGLRELQL 120
 RSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGS 180
 RCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAGCTGPKHSDCLACLHFNHSG 240
 ICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYSVDVGSCTLVCPLNQEV 300
 TAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFD 360
 GDPASNTAPLQPELQVFEETLEETGYLYISAWPDSL PDL SVFQNLQVIRGRILHNGAYS 420
 LTLQGLGISWLGRLSRELGSLALIHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED 480
 ECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGECVEECRVLQGLPREYVVARHCLP 540
 CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCACAHYKDPFCVARCPGKPDLSYMPIWKFPDEEGA 600
 CQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTGX 632

图 49B

ERBB3 C-terminal-X-terminus

(i) PRE-ERBB3-AUTOCLEAVAGE

```

SEVGNQAVCPGTLNGLSVTGDENYQTL YKLYERCEVMGNLEIVL TGHNADLSFLQW
IREVTGYVLVAMNEFSTLPLNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQL
TEILSGGYIEKNDKLCHEMDTIDWRDIEVDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKRCWGPGS
EDCQTLTKTICAPQCNGHCFGNPNQCCHDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRC
PQPLVYNKLTFLQEPNHTKYQGGVCAVSCPHNFVVDQTSVCRACPPDKMEVDKNGLKM
CEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPAL
DPEKLNVRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVSFNLTTIGGRSLYNRGSLLIMKNLNV
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKV
CDPLCSSGGCWGPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFNENGEPRFAHEAECFSCHPECCQM
EGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPHGVLGAKPIYKYPDVQNECRPCHENCTQ
GCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLTGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFPTALIRGSGYP
CPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLMDDGGLWRAAGELERGDRLVMDDAAG
EFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSA
WQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPNSVNPALWQLQ

```

(ii)

ERBB3-AUTOCLEAVAGE

```

SEVGNQAVCPGTLNGLSVTGDENYQTL YKLYERCEVMGNLEIVL TGHNADLSFLQW
IREVTGYVLVAMNEFSTLPLNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQL
TEILSGGYIEKNDKLCHEMDTIDWRDIEVDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKRCWGPGS
EDCQTLTKTICAPQCNGHCFGNPNQCCHDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRC
PQPLVYNKLTFLQEPNHTKYQGGVCAVSCPHNFVVDQTSVCRACPPDKMEVDKNGLKM
CEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPAL
DPEKLNVRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVSFNLTTIGGRSLYNRGSLLIMKNLNV
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKV
CDPLCSSGGCWGPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFNENGEPRFAHEAECFSCHPECCQM
EGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPHGVLGAKPIYKYPDVQNECRPCHENCTQ
GCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLTGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFPTALIRGSGYP
CPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLMDDGGLWRAAGELERGDRLVMDDAAG
EFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSA
WQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPNSVNPALWQLQ

```

图 50A

ERBB3 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(iii)

ERBB3-THIOESTER

SEVGN**SQAVCPGTLNGLSVT**GDAENQYQTL**YKLYERCEV**WMGNLEIVL**TGHNADLSFLQW**
 IREVTGYVL**VAMNEFSTLPLNLRVVRGTQVYDGKFAIFV**MLNYNTNSSHALRQLRL**TQL**
 TEILSGGVYIEKNDK**LCHMDTIDWRD**IVRDRDAEIV**VKDNGRSCPPCHEVCKGR**CWGPGS
 EDCQTLTK**TICAPQCNHCFGNPNQCCHDECAGGCSG**PQD**TDFACRHF**ND**SGACVPRC**
 PQLVY**NKLT**FQLEPN**HTKYQYGGV**CVASCP**HN**FV**DDQTS**CV**RACPPDK**MEV**DKNGLKM**
 CEP**CGGLCPKACEGTSGSR**FQ**TVDS**SNIDGFV**NCTKILGNL**D**FLITGLNGDP**PHK**I**PAL
 DPEK**LN**V**RTVREITGYLNIQSWPPHMHNF**S**VSFNLTTIGGRSLY**NR**GFSL**IM**KNLN**V**T**
 SLGFR**SLKEISAGRIYISANRQLCYHHS**LN**WTKVLRGPT**EE**RLDIKHNR**PRR**DCVAEGKV**
 CD**PLCSSGGCWGPGQCLSCR**NY**SRGGVCVTHCN**FL**NGEP**RE**FAHEAECFSCH**PE**CQPM**
 EGTAT**CNGSGSDTCAQCAHFRD**GP**HCVSSCPHGVL**GAK**GP**IYKY**PDVQNECR**P**CHENCTQ**
 GCKG**PELQDCLGQTLVLIGK**THL**TX**
 60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 480
 540
 600
 625

(iv)

ERBB3-X

SEVGN**SQAVCPGTLNGLSVT**GDAENQYQTL**YKLYERCEV**WMGNLEIVL**TGHNADLSFLQW**
 IREVTGYVL**VAMNEFSTLPLNLRVVRGTQVYDGKFAIFV**MLNYNTNSSHALRQLRL**TQL**
 TEILSGGVYIEKNDK**LCHMDTIDWRD**IVRDRDAEIV**VKDNGRSCPPCHEVCKGR**CWGPGS
 EDCQTLTK**TICAPQCNHCFGNPNQCCHDECAGGCSG**PQD**TDFACRHF**ND**SGACVPRC**
 PQLVY**NKLT**FQLEPN**HTKYQYGGV**CVASCP**HN**FV**DDQTS**CV**RACPPDK**MEV**DKNGLKM**
 CEP**CGGLCPKACEGTSGSR**FQ**TVDS**SNIDGFV**NCTKILGNL**D**FLITGLNGDP**PHK**I**PAL
 DPEK**LN**V**RTVREITGYLNIQSWPPHMHNF**S**VSFNLTTIGGRSLY**NR**GFSL**IM**KNLN**V**T**
 SLGFR**SLKEISAGRIYISANRQLCYHHS**LN**WTKVLRGPT**EE**RLDIKHNR**PRR**DCVAEGKV**
 CD**PLCSSGGCWGPGQCLSCR**NY**SRGGVCVTHCN**FL**NGEP**RE**FAHEAECFSCH**PE**CQPM**
 EGTAT**CNGSGSDTCAQCAHFRD**GP**HCVSSCPHGVL**GAK**GP**IYKY**PDVQNECR**P**CHENCTQ**
 GCKG**PELQDCLGQTLVLIGK**THL**TGX**
 60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 480
 540
 600
 626

图 50B

ERBB4 C-terminal-X-terminus

(i) **PRE-ERBB4-AUTOCLEAVAGE**

MKPATGLMWVWVLLVAAGTVQPSDS

QSV CAGTENKLSLSDLEQQYRALRKYENCEVVMGNLEITTSIEHNRDLSFLRSVREVTG -25
 YVLVALNQFRYLPLENRIIRGTKLYEDRYALAIFLNRYKDGNGFLQELGLKNLTEILNG 60
 GVVVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWPSNLTLVSTNGSSGGRCHKSCCTGRGWPTENHC 120
 QTLTRTVCAEQDGRGYPVSDCCHRECAGGSGPKDTCFACMNFNDSGACVTCQPQT 180
 FVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAFVCVKKCPHFWDSSSVCVACPSKMEVEEENGKMKCP 240
 CTDICPKACDGI GTGSLMSAQTVDSNIDKFINCTKINGNLI FLVTGIHGDPYNAIEAID 300
 PEKLNVFRVREITGFLNIQSWPPNMTDFSVFNSLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQGITSL 360
 QFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYHHTINWTTLFTINQRIVIRDNRKAENCTAEGMVCNH 420
 LCSSDGCWGPDPQCLSCRRFSRGRICIESCNLYDGEFREFENGSI CVECDPQCEKMEDG 480
 LLTCHGPGDNCTKSHFKDGNPCVEKCPDGLQGANSFIKYPADPDRECHPCHPNCCTQGC 540
 NGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHARTPGCVSGDITVMTSGGPRTVAELEGKPF TALIRGSG 600
 YPCPSGFFRT CERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLMDDGLEWRAAGELERGDRLVMDDA 660
 AGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGV 720
 SAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEP SNVPALWQLQ 826

ERBB4-AUTOCLEAVAGE

(ii)

QSV CAGTENKLSLSDLEQQYRALRKYENCEVVMGNLEITTSIEHNRDLSFLRSVREVTG 60
 YVLVALNQFRYLPLENRIIRGTKLYEDRYALAIFLNRYKDGNGFLQELGLKNLTEILNG 120
 GVVVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWPSNLTLVSTNGSSGGRCHKSCCTGRGWPTENHC 180
 QTLTRTVCAEQDGRGYPVSDCCHRECAGGSGPKDTCFACMNFNDSGACVTCQPQT 240
 FVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAFVCVKKCPHFWDSSSVCVACPSKMEVEEENGKMKCP 300
 CTDICPKACDGI GTGSLMSAQTVDSNIDKFINCTKINGNLI FLVTGIHGDPYNAIEAID 360
 PEKLNVFRVREITGFLNIQSWPPNMTDFSVFNSLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQGITSL 420
 QFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYHHTINWTTLFTINQRIVIRDNRKAENCTAEGMVCNH 480
 LCSSDGCWGPDPQCLSCRRFSRGRICIESCNLYDGEFREFENGSI CVECDPQCEKMEDG 540
 LLTCHGPGDNCTKSHFKDGNPCVEKCPDGLQGANSFIKYPADPDRECHPCHPNCCTQGC 600
 NGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHARTPGCVSGDITVMTSGGPRTVAELEGKPF TALIRGSG 660
 YPCPSGFFRT CERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLMDDGLEWRAAGELERGDRLVMDDA 720
 AGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGV 780
 SAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEP SNVPALWQLQ 826

图 51A

ERBB4 C-terminal-X-terminus (cont'd)

(iii) ERBB4-THIOESTER

QSV CAGTENKLSLSDLEQQYRALRKYYENCEVVMGNLEITTSIEHNRLDSFLRSVREVTG 60
 YVLVALNQFRYLPLENLRIRGKLYEDRYALAIFLNRYKDGNGFLQELGLKNLTEILNG 120
 GYVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWPSNLTLVSTNGSSGGRCHKSCCTGRGWPTENHC 180
 QTLTRTVCAEQDGRGYPYVSDCCHREAGGCGPKDTCFACMNFNDSGACVTQCPQT 240
 FVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAFCKKCPHNFVWDS SSVRAC P SSKMEVEEENGIMCKP 300
 CTDICPKACDGI GTSMSAQTVDS SNI D K F I N C T K I N G N L I F L V T G I H G D P Y N A I E A I D 360
 PEKLNVRTVREITGFLNIQSWPPNMTDFSVFSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQGITSL 420
 QFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYYHTINWTTLFSTINQIRIVIRDNRKAENCTAEGMVCNH 480
 LCSSDGCWGPDPQCLSCRRFSRGRICIESCNLYDGEFREFENGSI C V E C D P Q C E K M E D G 540
 LLTCHGPGPDNCTKCSHFKDGPNCEKCPDGLQGAN S F I F K Y A D P D R E C H P C H P N C T Q G C 600
 NGPTSHDCIYYPW TGHSTLPQHARTPX 627

(iv) ERBB4-X

QSV CAGTENKLSLSDLEQQYRALRKYYENCEVVMGNLEITTSIEHNRLDSFLRSVREVTG 60
 YVLVALNQFRYLPLENLRIRGKLYEDRYALAIFLNRYKDGNGFLQELGLKNLTEILNG 120
 GYVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWPSNLTLVSTNGSSGGRCHKSCCTGRGWPTENHC 180
 QTLTRTVCAEQDGRGYPYVSDCCHREAGGCGPKDTCFACMNFNDSGACVTQCPQT 240
 FVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAFCKKCPHNFVWDS SSVRAC P SSKMEVEEENGIMCKP 300
 CTDICPKACDGI GTSMSAQTVDS SNI D K F I N C T K I N G N L I F L V T G I H G D P Y N A I E A I D 360
 PEKLNVRTVREITGFLNIQSWPPNMTDFSVFSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQGITSL 420
 QFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYYHTINWTTLFSTINQIRIVIRDNRKAENCTAEGMVCNH 480
 LCSSDGCWGPDPQCLSCRRFSRGRICIESCNLYDGEFREFENGSI C V E C D P Q C E K M E D G 540
 LLTCHGPGPDNCTKCSHFKDGPNCEKCPDGLQGAN S F I F K Y A D P D R E C H P C H P N C T Q G C 600
 NGPTSHDCIYYPW TGHSTLPQHARTPGX 628

图 51B

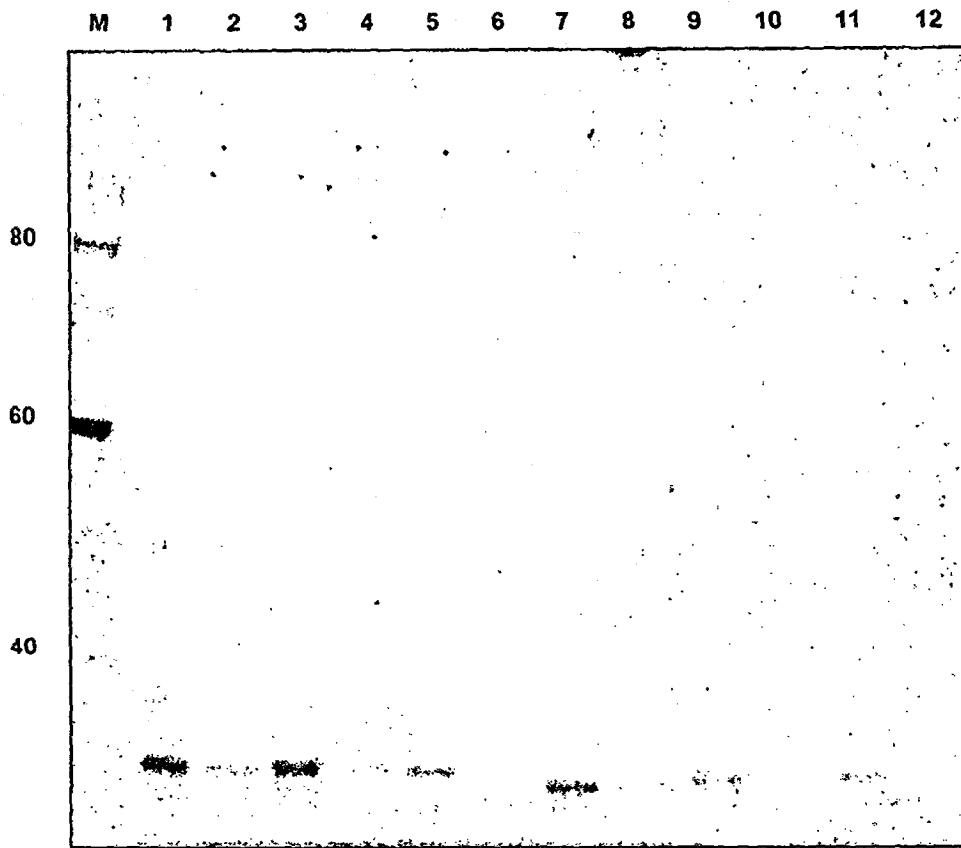


图 52

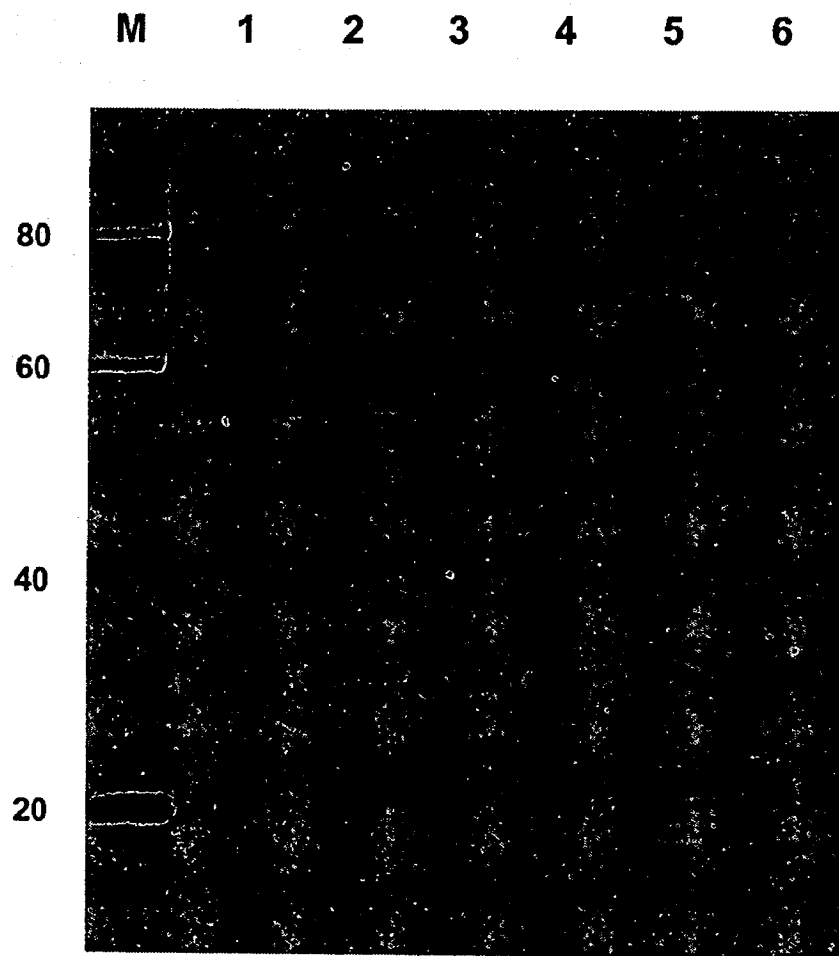


图 53



图 54

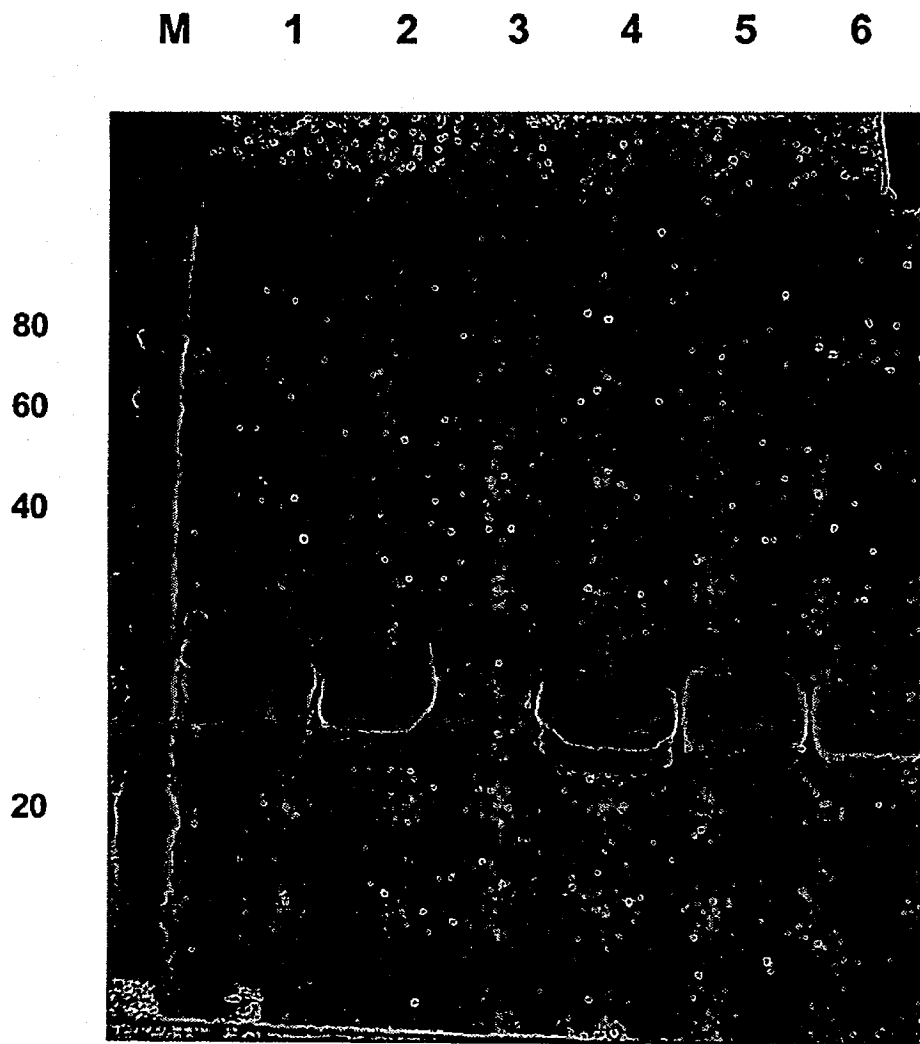


图 55

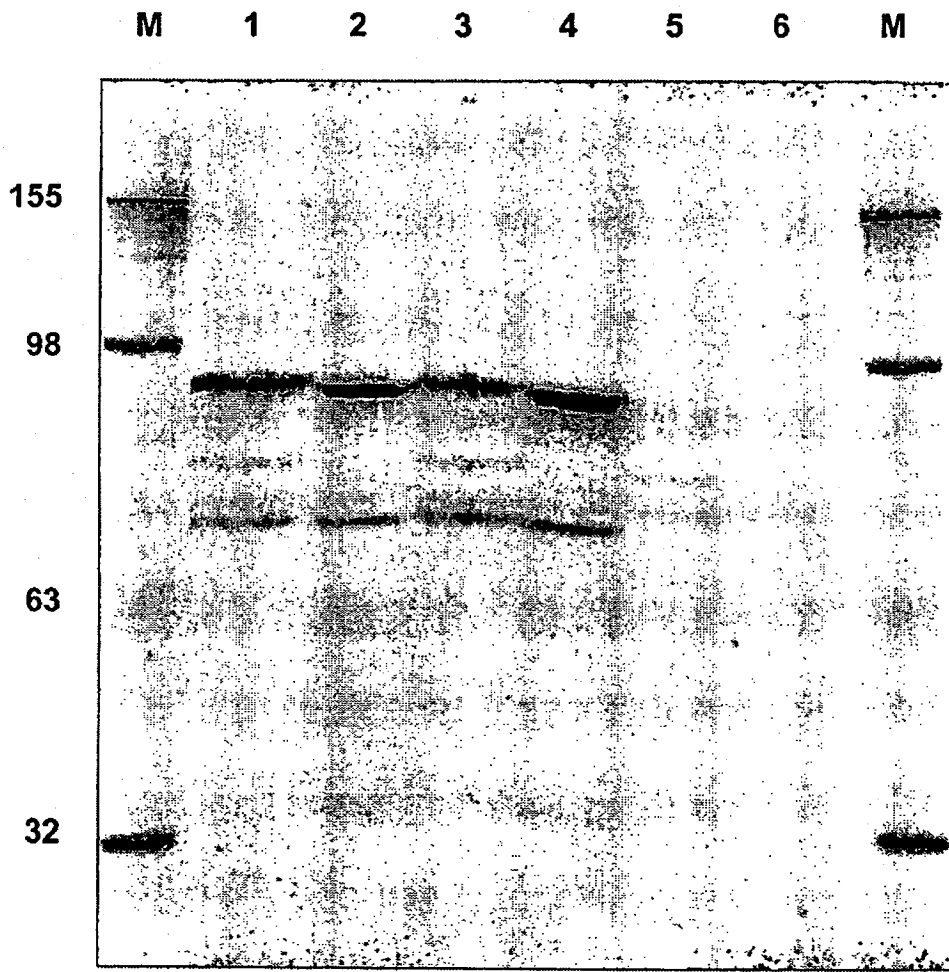


图 56

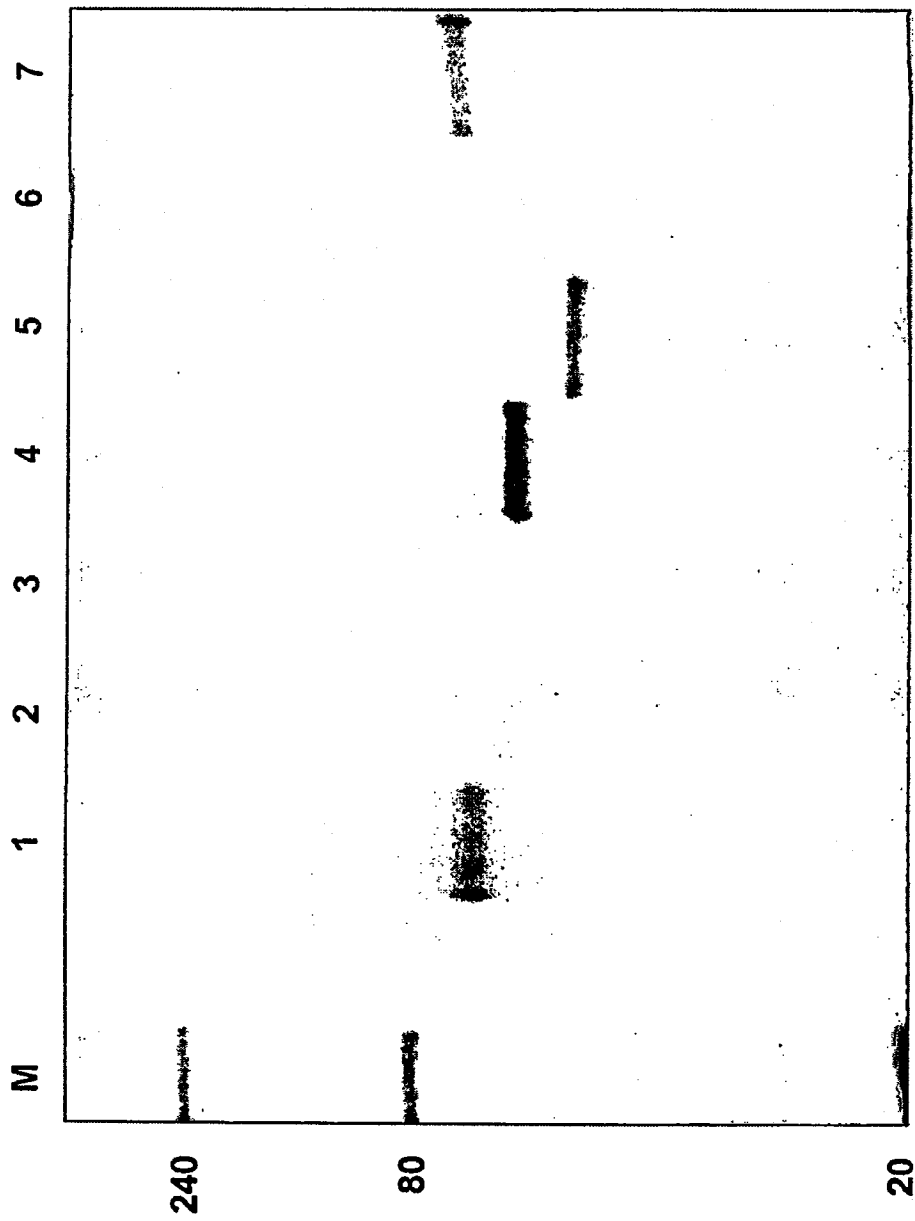


图 57

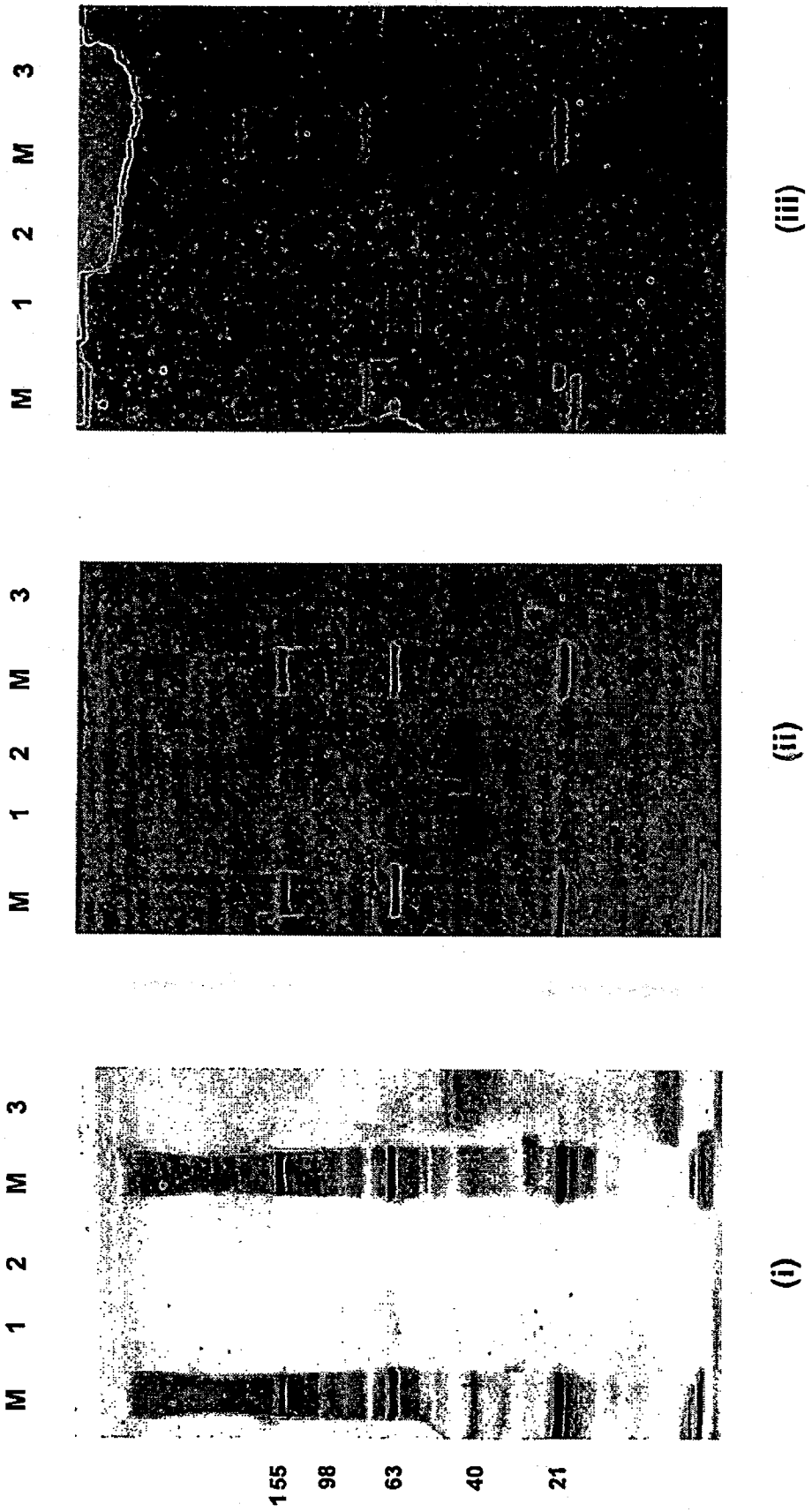


图 58

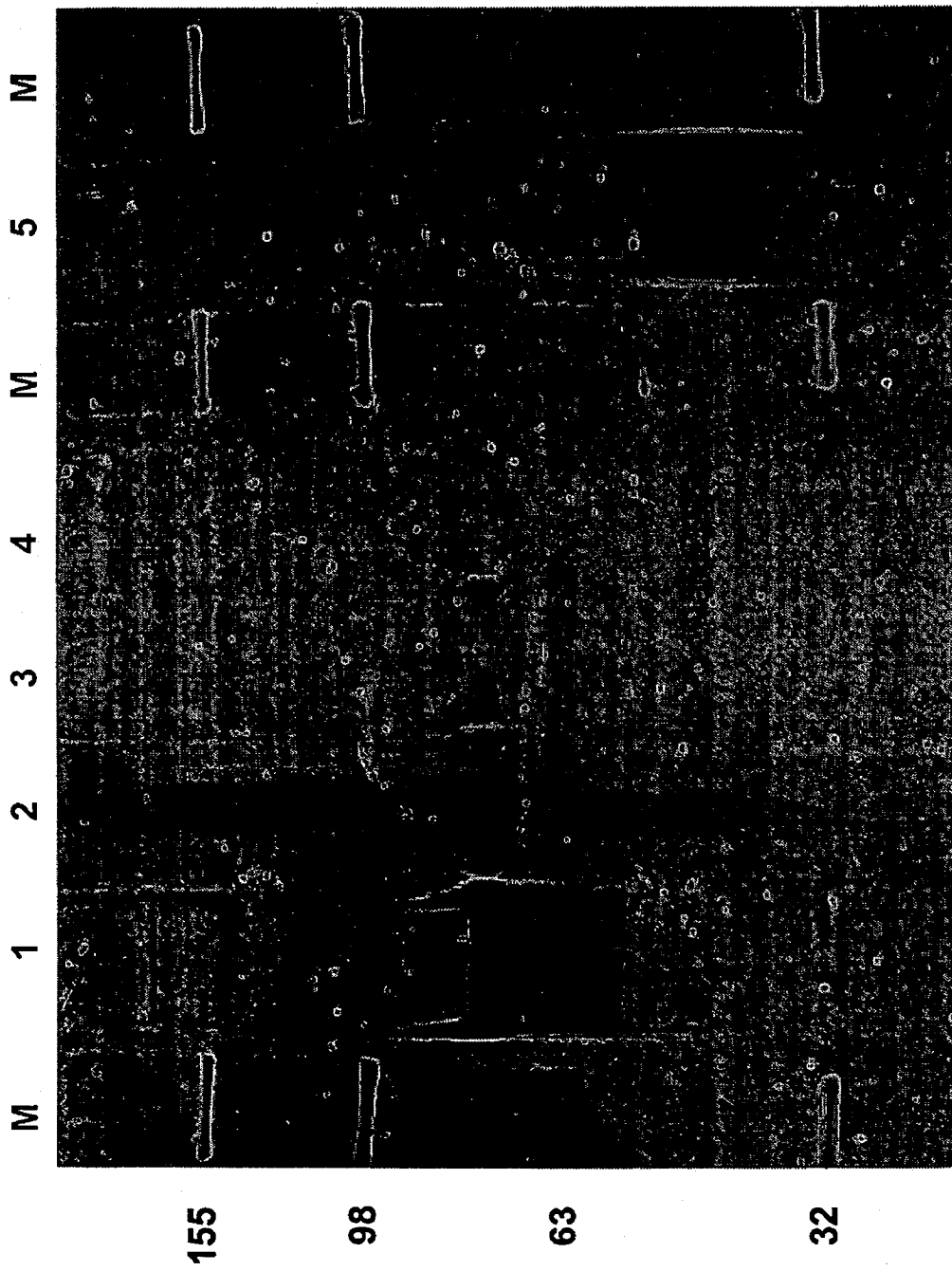


图 59

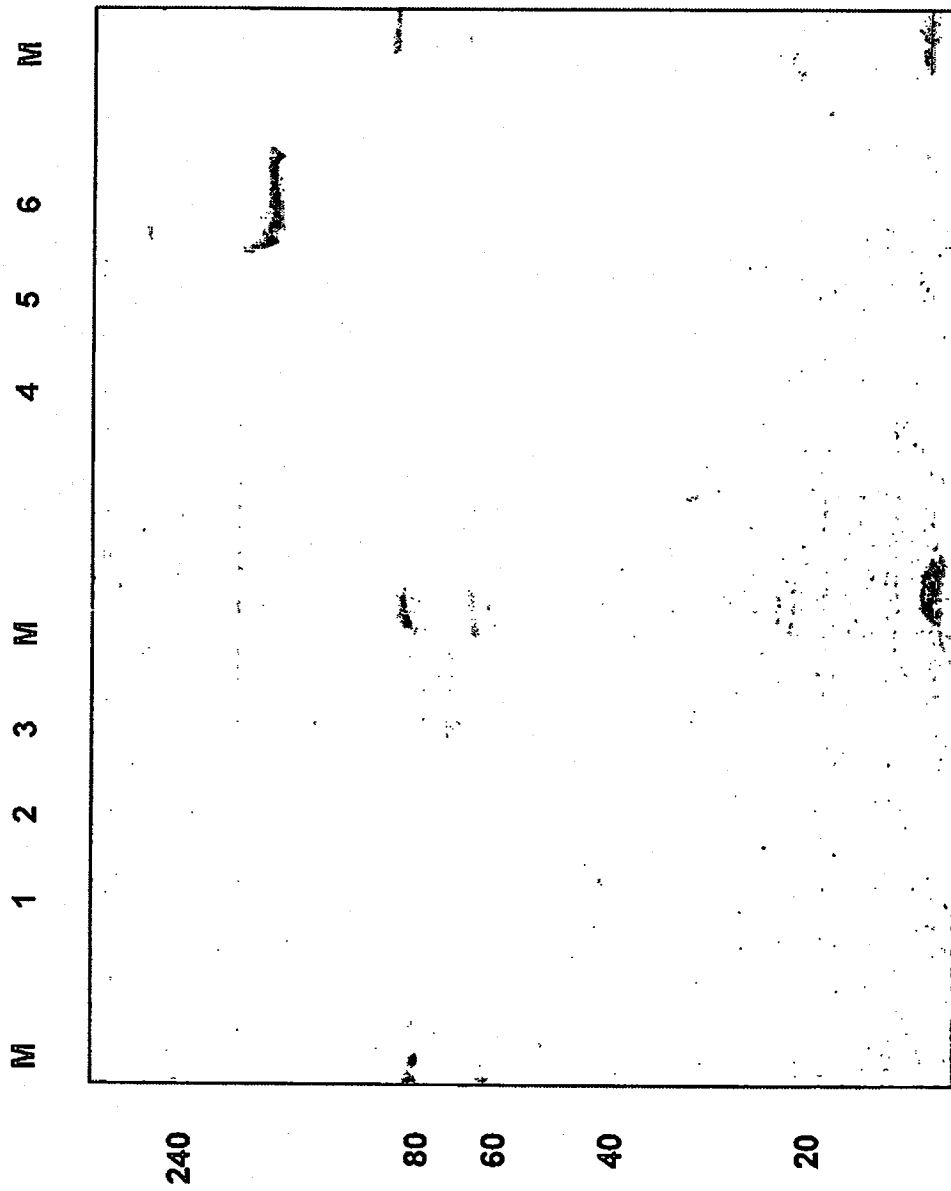


图 60

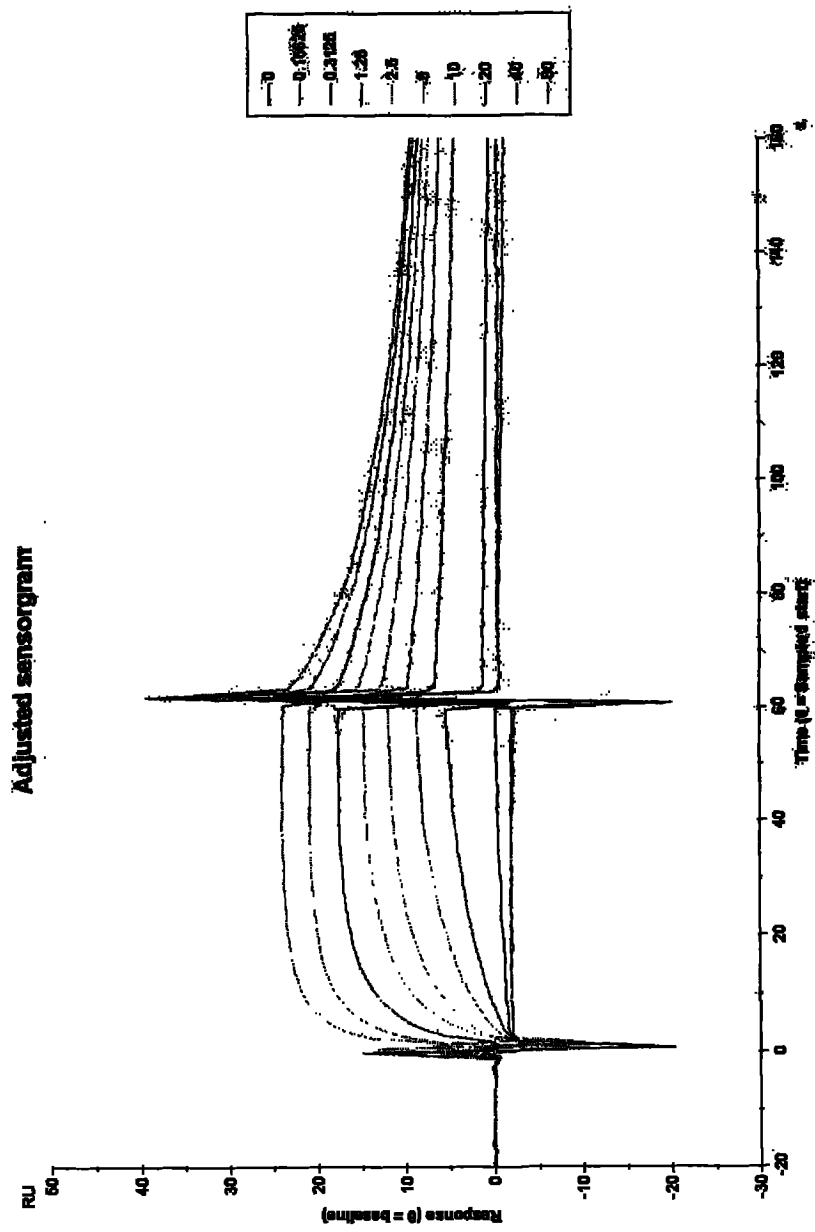


图 61A

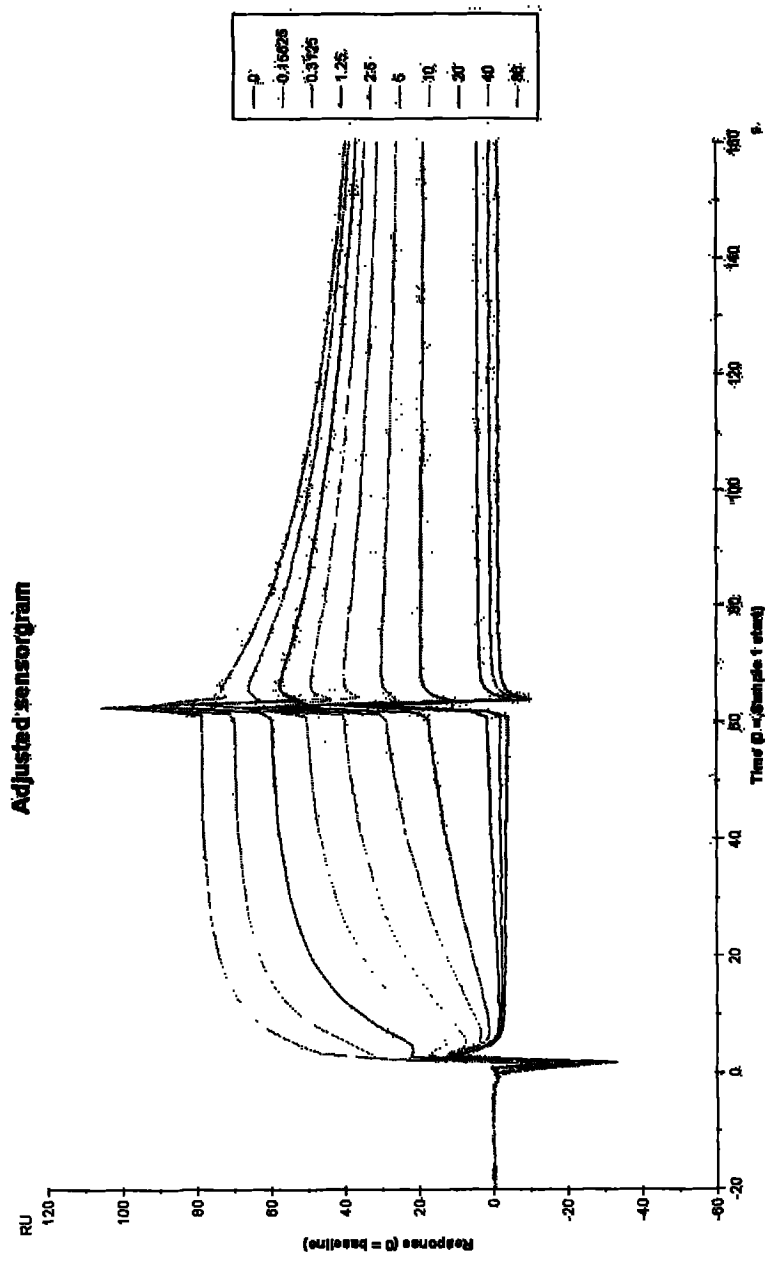


图 61B

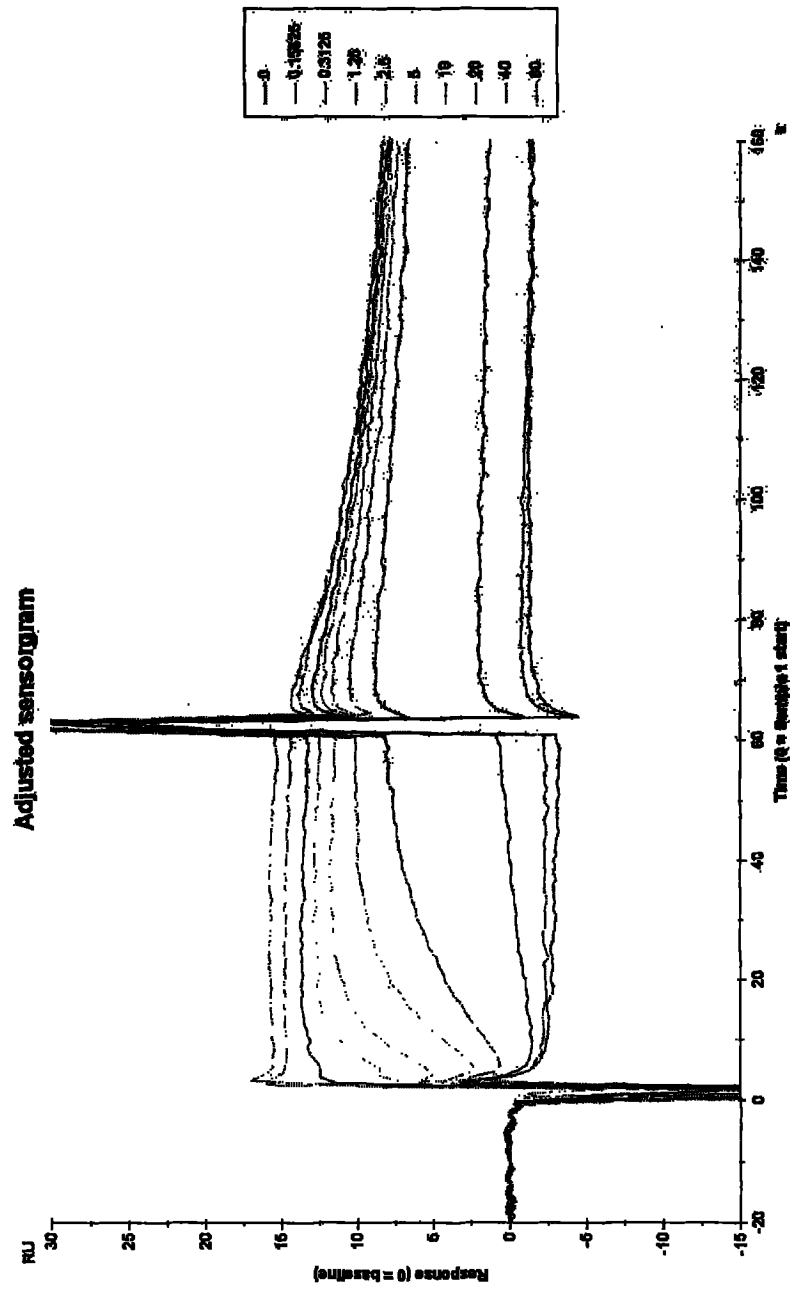


图 61C

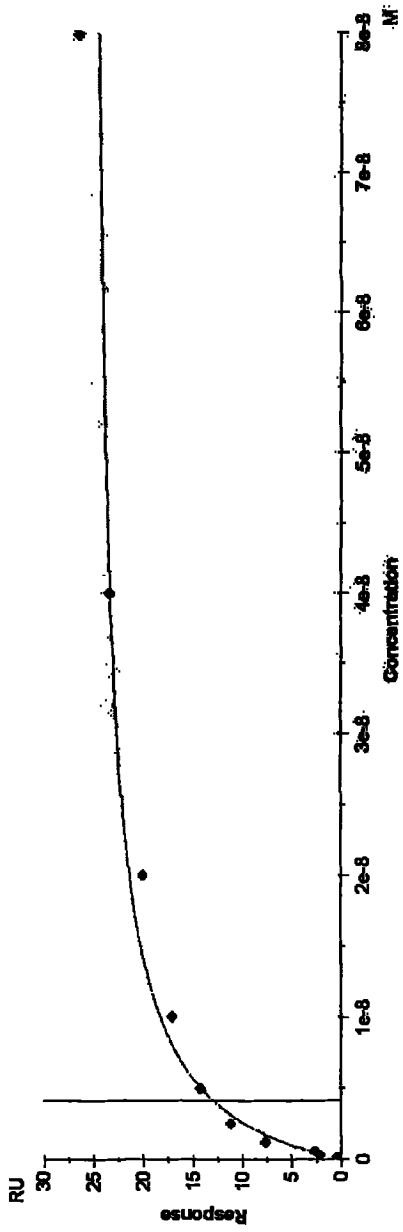


图 62A

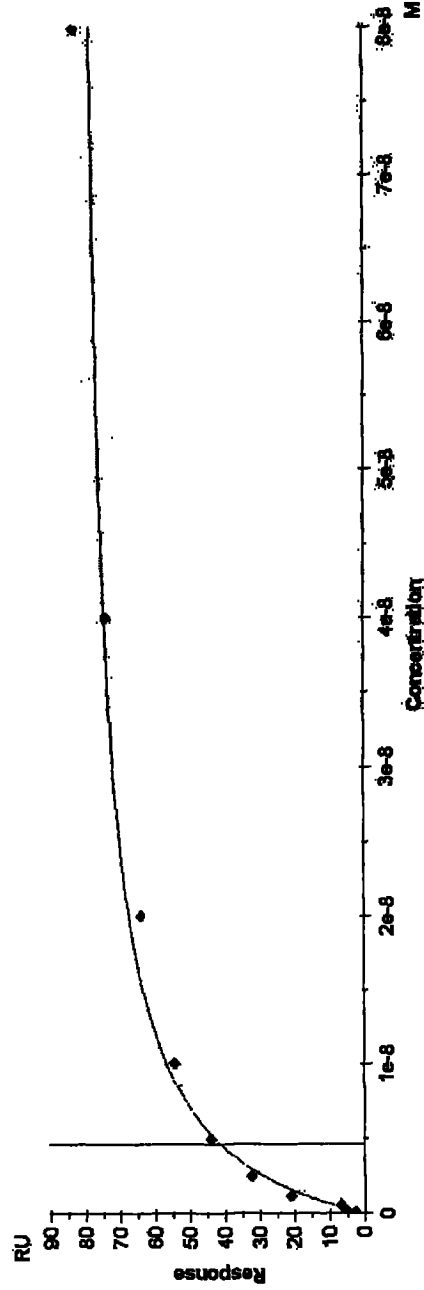


图 62B

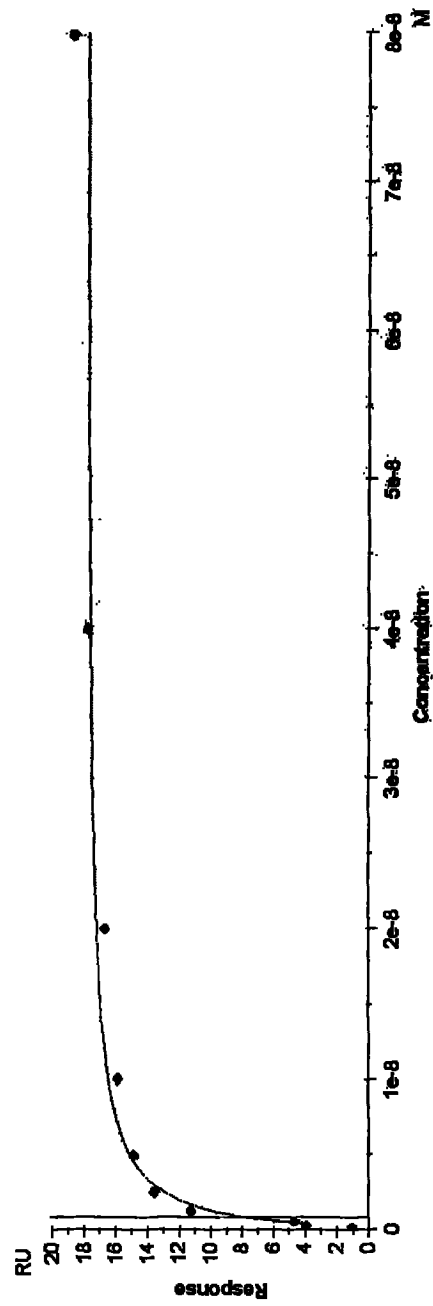


图 62C