



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105543279 A

(43) 申请公布日 2016.05.04

(21) 申请号 201410597561.4

A61K 38/20(2006.01)

(22) 申请日 2014.10.30

A61K 47/48(2006.01)

(71) 申请人 常州卡斯比生物科技有限公司

A61P 17/16(2006.01)

地址 213164 江苏省常州市武进区常武中路
801号(常州科教城惠研楼三楼308室)

A61P 35/00(2006.01)

申请人 胡培声 艾伦·爱普斯坦 李忠俊
中国人民解放军第三军医大学第二
附属医院

(72) 发明人 李忠俊 张蓉

(74) 专利代理机构 北京安博达知识产权代理有
限公司 11271

代理人 徐国文

(51) Int. Cl.

C12N 15/85(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页
序列表12页 附图7页

(54) 发明名称

一种防治辐射线损伤、肿瘤治疗的 IL-12/Fc
融合蛋白的制备方法及其药剂

(57) 摘要

本发明提供了一种 IL-12-Fc 融合蛋白 (IL-12/Fc) 涉及辐射损伤防治、肿瘤治疗领域。本发明通过分别构建 pN24-Fc-muIL-12_P35、p64-muIL-12_P40 质粒,连接后转化大肠杆菌获得 pN24-Fc-muIL12(p35+p40) 质粒,然后转染 NS0 细胞,通过细胞翻译后自然组装表达并纯化 muIL-12/Fc 融合蛋白,获得的 IL-12/Fc 具有表达量高、兼具 IL-12 以及 Fc 片段高活性且稳定、纯度高特点。本发明提供的 IL-12/Fc 具有生物利用度高,诱导 IL-12 受体表达,促进内源性 IL-12 及 IFN- γ 的分泌的特性,能有效改善因辐射线照射引起的骨髓造血功能障碍,促进修复胃肠道结构和功能损伤,调节机体免疫力,并具有显著的抑制肿瘤功效。

1. 一种 IL-12-Fc 融合蛋白的制备方法,其特征在于所述融合蛋白由 Fc 片段与 IL-12 中的一个亚基 (p35 或 p40) 直接融合后再和另一个亚基在同一细胞内共同表达,进而组建成具有生物活性的 IL12-Fc 融合蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:所述 Fc 片段直接与白介 12 中 p35 亚基融合形成 Fc-p35 融合蛋白,其氨基酸序列为 SEQ 6 或 SEQ 8。

3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:所述 Fc-p35 融合蛋白,其核苷酸序列为 SEQ 5 或 SEQ 7。

4. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:所述 Fc 片段直接与 IL-12 中 p40 亚基融合形成 Fc-p40 融合蛋白,其氨基酸序列为 SEQ 10 或 SEQ 12。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于:所述 Fc-p40 融合蛋白,其核苷酸序列为 SEQ 9 或 SEQ 11。

6. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:所述 Fc 片段包括人 IgG Fc 片段或其经过修饰的 Fc 片段。

7. 根据权利要求 6 所述的制备方法,其特征在于:所述 Fc 片段为人 IgG Fc 片段。

8. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:所述表达载体为真核载体。

9. 根据权利要求 8 所述的制备方法,其特征在于:所述载体为哺乳细胞表达载体。

10. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于所述含有 Fc-(p35+p40) 表达载体中 p35 和 p40 前均含有启动子。

11. 根据权利要求 10 所述的制备方法,其特征在于所述启动子包括 CMV 启动子。

12. 一种含有 IL-12-Fc 融合蛋白的药剂,其特征在于所述药物为用权利要求 1-11 的任一项权利要求所述方法制的 IL-12/Fc 融合蛋白所制得的。

13. 一种如权利要求 12 所述的含有 IL-12/Fc 的药剂,其特征在于所述药物用于制备防治辐射线损伤、肿瘤治疗的药物中。

一种防治辐射线损伤、肿瘤治疗的 IL-12/Fc 融合蛋白的制备方法及其药剂

【技术领域】

[0001] 本发明涉及一种辐射线损伤防治和肿瘤治疗的药物,具体讲涉及一种防治辐射线损伤、治疗肿瘤的 IL-12-Fc 融合蛋白的制备方法及其药剂。

【背景技术】

[0002] 辐射给人类健康带来的损伤巨大,易损的机体主要器官有:骨髓、胃肠道、大脑等。众所周知,大于 10Gy 放射所致的胃肠道与大脑放射综合征多因严重的多器官功能衰竭所致的患者死亡率几近 100%,4-10Gy 放射所致骨髓放射综合征患者则可通过诸如细胞因子治疗、造血干细胞移植等综合救治挽救生命。研究、探索辐射损伤的防治手段,积极寻找有效抗辐射损伤药物已成为一个迫切需要解决的问题,目前抗辐射损伤药物研究已取得瞩目的成就,但是仍然存在很多问题,如:药物的毒性、药物的稳定性、有效时间、用药途径等,很多药物的化学成分及活性成分的研究还不够深入,药物应用的最佳时机和剂量也需要进一步研究。

[0003] 白介素是免疫系统分泌的主要起免疫调节作用的蛋白,其大部分生物学作用都与抗肿瘤的调节有关,特别是新命名的几种白介素一开始就展示出诱人的抗癌前景,白介素-12 就是其中之一。IL-12 又称自然杀伤细胞刺激因子 (NKSF) 和细胞毒淋巴细胞成熟因子 (CTMF),能促进细胞介导的免疫应答能力,包括增强 NK 细胞活性、扩增 CTL 细胞、激活巨噬细胞,能够促进 Th0 细胞向 Th1 细胞的分化,促进 NK 细胞成熟,并产生 INF- γ 、TNF- α 等,促进细胞免疫,因而在抗肿瘤免疫中发挥重要作用。提高体内细胞因子水平的具体途径有多种,主要为外源性细胞因子注入疗法和细胞因子的基因疗法即导入细胞因子基因在体内持续高效的产生细胞因子而发挥抗肿瘤作用。NANNI 等用反转录病毒载体将白介素-12 的融合基因导入 MHC 抗原阴性肿瘤细胞作为疫苗,IL-12 产量达到每 24h (400 ~ 2500) pg/ 10^6 。MEKO 用重组疫苗病毒载体在 Metha 肉瘤细胞中高表达白介素-12 达每 24h 1.5ug/ 10^6 ,并可以持续 9d。

[0004] 细胞因子已广泛应用于辐射损伤的临床救治,成为当今抗辐射药物的研究热点。但对用于辐射损伤防治时的作用机制、用药剂量和用药时机等问题仍处在研究之中。而因 IL-12 (IL-12) 具有造血促进、免疫调节功能,所以在放射损伤防治、肿瘤治疗中一度受到人们的重视。IL-12 是由 α 亚基 (P35) 和 β 亚基 (P40) 组成的异二聚体,主要由抗原递呈细胞、T 细胞、B 细胞等分泌,其特殊性在于 α 亚基 (P35) 和 β 亚基 (P40) 必须由同一个细胞通过转录后翻译组装而成的异二聚体才具有生物学活性。不同细胞表达分泌的亚基即使组合成异二聚体仍然无生物学活性。且由于 IL-12 的半衰期短,从而导致连续用药多次,机体敏感性逐渐下降,药物剂量逐渐增加,受者随之出现发热、感染甚至死亡等明显副作用,而代谢动力学快的缺陷又限制了其进一步的深入研发进程。但其特殊的生物学功能吸引了广大学者致力于其低剂量、单次给药的临床研究。

[0005] 近年来,不同实验室曾使用不同载体系统构建含人 (h) IL-12p40 和 p35 表达元

件的载体,将 IL-12 基因导入成纤维细胞或肿瘤细胞使其分泌 IL-12,提高局部 IL-12 的浓度。另有将延长蛋白血清半衰期的已知 Fc 片段连接形成的融合蛋白,已有研究采用 P40-P35-Fc 直接连接形成 IL-12/Fc 单链融合蛋白的。这些方法不但复杂,且表达量低、单链融合蛋白稳定性差,容易降解或形成多聚体,不合适大规模工业化生产。

【发明内容】

[0006] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种具有诱导 IL-12 受体表达、内源性 IL-12 分泌、IFN- γ 分泌的特性,能有效促进辐射线照射致骨髓造血功能抑制的快速重建,促进损伤后的胃肠道结构和功能的修复,调节机体免疫功能,具有显著肿瘤抑制功能。本发明提供的含有 IL-12/Fc 蛋白的药物,具有低剂量、高效、副作用小预防、治疗辐射引起的机体损伤以及肿瘤治疗。

[0007] 上述发明目的采用下述技术方案实现:本发明提供了一种 IL-12-Fc 融合蛋白的制备方法,融合蛋白由 Fc 片段与 IL-12 中的一个亚基 (p35 或 p40) 直接融合后再和另一个亚基在同一细胞内共同表达,进而组成具有生物活性的 IL12-Fc 融合蛋白。

[0008] 本发明提供的制备方法中,Fc 片段直接与白介 12 中 p35 亚基融合形成 Fc-p35 融合蛋白,其氨基酸序列为 SEQ 6 或 SEQ 8。

[0009] 本发明提供的制备方法中,Fc-p35 融合蛋白,其核苷酸序列为 SEQ 5 或 SEQ 7。

[0010] 本发明提供的制备方法中,Fc 片段直接与 IL-12 中 p40 亚基融合形成 Fc-p40 融合蛋白,其氨基酸序列为 SEQ 10 或 SEQ 12。

[0011] 本发明提供的制备方法中,Fc-p40 融合蛋白,其核苷酸序列为 SEQ 9 或 SEQ 11。

[0012] 本发明提供的制备方法中,Fc 片段包括人 IgG Fc 片段或其经过修饰的 Fc 片段。

[0013] 本发明提供的制备方法中 Fc 片段为人 IgG Fc 片段。

[0014] 本发明提供的制备方法中表达载体为真核载体。

[0015] 本发明提供的制备方法中载体为哺乳细胞表达载体。

[0016] 本发明提供的制备方法中,含有 Fc-(p35+p40) 表达载体中 p35 和 p40 前均含有启动子;启动子包括 CMV 启动子。

[0017] 利用本发明提供的制备方法制得的 IL-12/Fc 融合蛋白制备含有 IL-12-Fc 融合蛋白的药剂,用于制备防治辐射线损伤、肿瘤治疗的药物中。

[0018] 本发明提供了一种 IL-12-Fc 融合蛋白的制备方法,由 Fc 片段与 IL-12 中的一个亚基 (p35 或 p40) 再和另一个亚基在同一细胞内共同表达,最终得到具有生物活性的 IL-12-Fc 融合蛋白。目前已有的构建 IL12-Fc 的方法是将 P40-P35-Fc 融合成一条链来表达,主要是表达不理想,单链融合蛋白容易降解。而用本方法制备表达量高,稳定性好,适合产业化。采用 Fc 片段与 p34 或 p40 融合时,不采用连接蛋白,可有效保持表达、纯化后 IL-12 的生物学结构与功能,利用 Fc 片段的生物学特性延长体内 IL-12 的生物半衰期,从而为实现辐射损伤防治、肿瘤治疗的低剂量、单次给药的临床应用奠定理论与实验基础。

[0019] 本发明提供的制备方法中的 Fc 片段包括但不限于人或动物的 IgG 或它们的亚型,Fc 片段选自天然型 Fc 时较优。

[0020] 本发明提供的制备方法中的表达载体为真核载体,也可根据需要选用哺乳细胞表达载体。

[0021] 本发明提供的制备方法为分别构建 p35-Fc 和 p40 质粒,转化获得含有 Fc-(p35+p40) 表达载体,转染同一细胞表达;或者分别构建 p40-Fc 和 p35 质粒,转化获得含有 Fc-(p35+p40) 表达载体,转染同一细胞表达。本发明提供的制备方法中含有 Fc-(p35+p40) 表达载体中 p35 和 p40 前均含有启动子,启动子包括但不限于 CMV 启动子。本发明还提供了一种含有 IL-12/Fc 药物,并将药物用于制备治疗辐射线损伤、肿瘤防治的药物中。

[0022] 本发明利用 huFc 直接与 p35 或 p40 融合并不限定其连接端,huFc 可以与 p35 或 p40 的 C 端或 N 端连接,4 种连接方式均可以用于实现本发明。本发明为验证 Fc 与 IL-12 亚基融合并表达,采用小鼠 IL-12/Fc 融合蛋白进行具体的模拟实验,以证实本发明提供的技术方案具有的可实施性。

[0023] 本发明提供了一种具体的制备方法,包括下述步骤:

[0024] 构建 pN24-Fc-muIL-12_P35 质粒:

[0025] 1) 扩增小鼠 IL-12P35 基因引物序列如 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2 所示:

[0026] 2) 采用 Sma1 和 EcoRI 对 PCR 产物进行双酶切,将获取的片段插入经 Sma1 和 EcoRI 双酶切的含 CMV 启动子和人免疫球蛋白 IgG1 恒定区的 pN24-Fc 质粒,链接后的 DNA 转化大肠杆菌菌株 XL-1;

[0027] 3) 氨苄抗性的克隆经 PCR 和 DNA 测序筛选、鉴定,选择 DNA 序列正确的质粒并命名为 pN24-Fc-muP35;

[0028] 构建 p64-muIL-12_P40 质粒:

[0029] 1) 扩增小鼠 IL-12P40 基因引物序列如 SEQ ID No. 3 和 SEQ ID No. 4 所示:

[0030] 2) 采用 Hind3 和 EcoRI 对 PCR 产物进行双酶切,将获取的片段插入经 Hind3 和 EcoRI 双酶切的含 CMV 启动子的 pN64 质粒,链接后的 DNA 转化大肠杆菌菌株 XL-1;

[0031] 3) 氨苄抗性的克隆经 PCR 和 DNA 测序筛选、鉴定,选择 DNA 序列正确的质粒并命名为 pN64-muP40;

[0032] 构建表达载体 pN24-Fc-muIL12(p35+p40) 质粒:

[0033] 采用 Not1/Sa11 酶切 pN64-muP40 质粒,纯化获取包含 CMV 启动子和小鼠 IL-12p40 基因的片段,纯化的片段与经 Not1/Sa11 酶切 pN24-Fc-muP35 的纯化片段连接,并转化大肠杆菌菌株 XL-1,氨苄抗性的克隆经 PCR 和 DNA 测序验证,选取序列正确的质粒并命名为 pN24-Fc-muIL12(p35+p40);

[0034] 转染与表达通过转染同一个小鼠骨髓瘤 NS0 细胞,获得具有完全生物学活性的 IL-12/Fc 融合蛋白。具体采用 muIL-12/Fc,将质粒 pN24-Fc-muIL12(p35+p40) 电转小鼠骨髓瘤 NS0 细胞后 4 周,用间接酶联免疫检测方法筛选细胞培养上清,高表达 muIL12/Fc 的克隆采用 5%胎牛血清培养基于 3 升搅拌罐培养扩增;纯化得到的 muIL-12/Fc 融合蛋白。其中采用蛋白 A 亲和层析以及离子交换层析纯化得到的 IL-12/Fc 融合蛋白。

[0035] 根据本发明的 IL-12/Fc 的制备理念,但不限于下述具体实施方式,仅通过下述这一种具体的操作方法制备 IL-12/Fc 并进行试验:

[0036] 1、pN24-Fc-muIL-12_P35 质粒构建:

[0037] 小鼠 IL-12P35 基因扩增引物序列如下:

[0038] SEQ ID No. 1 5' -CTGTCCCCGGGGAGGGTCATTCCAGTCTCTGGA,

[0039] SEQ ID No. 2 5' -ATCAATGAATTCTCAGCGGAGCTCAGATAGCC。

[0040] 用限制性内切酶 Sma1 和 EcoRI 对 PCR 产物酶切,获取片段插入经 Sma1 和 EcoRI 酶切的含 CMV 启动子和人免疫球蛋白 IgG1 恒定区的 pN24-Fc 质粒。链接后的 DNA 转化大肠杆菌菌株 XL-1,氨苄抗性的克隆经 PCR 和 DNA 测序筛选、鉴定。选择 DNA 序列正确的质粒并命名为 pN24-Fc-muP35。

[0041] 2、p64-muIL-12_P40 质粒的构建:

[0042] 小鼠 IL-12P40 基因扩增引物如下:

[0043] SEQ ID No. 3 5' -GTTAAGCTTGCCGCCACCATGTGTCCTCAGAAGCTAACC

[0044] SEQ ID No. 4 5' -CTACGTGAATTCCTAGGATCGGACCCTGCAGGGAAC

[0045] 用限制性内切酶 Hind3 和 EcoRI 对 PCR 产物进行酶切,获取片段插入经 Hind3 和 EcoRI 酶切的含 CMV 启动子 pN64 质粒。链接后的 DNA 转化大肠杆菌菌株 XL-1,氨苄抗性的克隆经 PCR 和 DNA 测序筛选、鉴定。选择 DNA 序列正确的质粒并命名为 pN64-muP40。

[0046] 3、表达载体构建:用 Not1/Sa11 酶切 pN64-muP40 质粒,纯化获取包含 CMV 启动子和小鼠 IL-12p40 基因的片段。纯化的片段与经 Not1/Sa11 酶切 pN24-Fc-muP35 连接,并转化大肠杆菌菌株 XL-1。氨苄抗性的克隆经 PCR 和 DNA 测序验证,选取序列正确的质粒并命名为 pN24-Fc-muIL12(p35+p40),质粒 DNA 纯化后保存于 4℃ (图 1)。

[0047] 4、muIL12/Fc 在 NS0 细胞的转染与表达

[0048] 采用小鼠骨髓瘤 NS0 细胞表达小鼠 muIL12/Fc。目标质粒电转 NS0 细胞后 4 周,采用间接酶联免疫检测方法筛选细胞培养上清,高表达 muIL12/Fc 的克隆采用 5%胎牛血清培养基中培养扩增。分泌的融合蛋白采取蛋白 A 亲和层析以及离子交换层析纯化。

[0049] 5、muIL12/Fc 融合蛋白的筛选

[0050] 移取活性克隆细胞上清后用酶联免疫技术检测蛋白产物:100u1 抗 Fc 单克隆抗体(碳酸盐缓冲液:0.01M Na₂CO₃, 0.035M NaHCO₃, pH 9.6)加入 96 孔板,4℃过夜孵育,含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗涤 3 次。每孔加入经倍比稀释后上清 100u1,室温孵育 60 分钟,洗涤 3 次后加入二抗(初次筛选使用 100u1 经 PBS-Tween 缓冲液 1:5000 稀释辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IL-12 单克隆抗体),洗涤 3 次后加入底物(1.0mg/ml 的 2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐,0.1M、pH4.0 柠檬酸盐缓冲液,0.03%过氧化氢)显色 15 分钟,酶标仪(Bio-Tek)检测 450nm 吸光度值(OD450),用标准曲线计算蛋白浓度(图 2)。

[0051] 6、Western Blot 分析融合蛋白 Fc-IL-12

[0052] 将融合蛋白 muIL12/Fc 和人 IgG 稀释至终浓度 20ug/ml,加入上样缓冲液,水浴煮沸 5 分钟,SDS 聚丙烯酰胺凝胶每孔加样 5u1 (0.1ug),120mV 电泳 45 分钟,凝胶转纤维素膜,加入羊抗鼠 IL-12(P35+P40) 或者抗人 IgG-辣根过氧化物酶 4℃过夜,化学发光底物显色。Western Blot 实验结果显示,成功表达 muIL12/Fc(图 3)。

[0053] 目前构建含 IL-12 基因载体的主要困难在于 IL-12 自身结构的特殊性。天然 IL-12 具有独特的异源二聚体结构,由 p35 和 p40 两个亚基通过二硫键公家连接而成的糖基化肽链。IL-12p35 和 p40 基因定位于不同的染色体,各自受不同的启动子和增强子调节,按需生成有活性的 p70 或拮抗性 p(40)₂,及单体 p40。活性形成的 IL-12p70 需要两条亚基共同表达,并以 1:1 形式进行自然组合。对已报到的 IL-12 基因载体来说,存在 p40 和 p35 不匹配

的组合形式。

【0054】 该具体实施方式中分别构建 p35/Fc 和 p40 质粒（或者 p40/Fc 和 p35 质粒）并采用两个 CMV 启动子分别启动 p35/Fc、p40 亚基（或者 p40/Fc、p35 亚基）的转录，利用转染同一个 NS0 细胞的技术方案，实现了同一细胞表达组装具有完全生物学活性的 IL-12/Fc 融合蛋白。构建融合基因，可使其在启动子的控制下，翻译表达活性蛋白，保证 p35 和 p40 以 1:1 比例形成异二聚体。与天然 IL-12 相比，本发明提供的 IL-12/Fc 是将编码 p40 或 p35 亚基与片段直接相连，而不采用 linker，使得 IL-12/Fc 融合蛋白具有天然 IL-12 类似的空间构象，具有与天然 IL-12 相同的生物学功能。试验证据提示，IL-12/Fc 融合蛋白具有显著延长的生物半衰期，且其血清药物浓度水平及峰值显著高于 IL-12 蛋白，其改良的生物学特性为降低给药剂量、降低毒副作用、维持生物学功能提供了可靠的依据。肿瘤治疗的动物模型试验研究结果亦证实，IL-12/Fc 融合蛋白具有更显著的肿瘤抑制作用，推测可能源于其基于生物半衰期长促进的生物学功能：诱导内源性 IL-12、IFN- γ 分泌水平显著高于 IL-12。急性放射骨髓综合征、肠道综合征的救治研究发现，融合蛋白具有缓解外周血细胞计数下降、促进骨髓造血恢复、诱导肠道细胞 IL-12R β 表达水平、改善肠道辐射后损伤、促进损伤后恢复的效果，且显著优于 IL-12 蛋白处理组。（质粒是有由 Lonza Biologics 的 PEE12 和 PEE6 衍生而来，细胞株来源于 ATCC。）

【0055】 总之，IL-12/Fc 融合蛋白利用 Fc 片段的生物学特性，有效改善了其在血清中生物利用度，既增强了其生物学作用又延长了其半衰期，为其进一步的单次低剂量注射治疗肿瘤、救治急性放射综合征的应用研究提供了有效可靠的依据。

【0056】 通过小鼠、大鼠实验表明，本发明技术方案的实施具有以下有益效果：

【0057】 1. 本发明制备的 IL-12/Fc 具有表达量高、兼具 IL-12 以及 Fc 片段高活性且稳定、纯度高特征；

【0058】 2. 本发明制备的 IL-12/Fc 用于治疗时，具有低剂量、高效、副作用小等优点；

【0059】 3. 本发明提供的 IL-12/Fc 融合蛋白可显著提高辐射线照射损伤后小鼠存活率；

【0060】 4. 本发明提供的 IL-12/Fc 融合蛋白可具有调节机体免疫系统功能，诱导内源性 IL-12 受体、IL-12 表达，显著提高 IFN- γ 的分泌水平；

【0061】 5. 本发明提供的 IL-12/Fc 融合蛋白可显著抑制实验性肿瘤生长。

【0062】 通过小鼠实验验证可知，应用于人体或其他动物中，应产生或达到具有相同 / 相似的技术效果。

【附图说明】

【0063】 图 1 为 IL-12/Fc 融合蛋白载体构建及基因序列结构图，图 1pN24-Fc-muIL12(p35+p40)；

【0064】 图 2 为 ELISA 分析 muIL-12/Fc 的 Fc 活性，酶标仪 (Bio-Tek) 检测 450nm 吸光度值 (OD450)，采用标准曲线计算蛋白浓度图；

【0065】 图 3 为 Western Blot 分析融合蛋白 Fc-IL-12 的 SDS 电泳图片，SDS-PAGE 和 WB 分析 muIL-12/Fc 融合蛋白 A. SDS-PAGE. a1 : 分子量, a2 : 纯化的 muIL12/Fc, a3: 纯化的 IgG ; B WB (羊抗鼠 IL-12 抗体), b1 : 纯化的 muIL12/Fc ; b2: 纯化的 IgG ; C WB (羊抗人 Fc 抗体) ; c1 : 纯化的 muIL12/Fc, c2: 纯化的 IgG ;

[0066] 图 4 为 IL-12/Fc 融合蛋白诱导鼠 T 细胞活化分泌 IFN- γ 表达量图,鼠 IL-12/Fc 融合蛋白诱导鼠 T 细胞分泌 IFN- γ ;每个浓度值中 3 个柱形图从左到右依次为 rmIL-12, muIL-12/Fc, chTNF-3;

[0067] 图 5 为 5Gy 辐照后小鼠存活率;

[0068] 图 6 为骨髓细胞形态学 A 小鼠骨髓像;B 骨髓造血组织所占面积;C 巨核细胞数量/高倍视野;

[0069] 图 7 为外周血血常规结果;

[0070] 图 8 为 muIL-12/Fc 治疗后小鼠内源性 IL-12、EPO、IFN- γ 水平;

[0071] 图 9 为大鼠空场肠道组织 HE 染色 ($\times 400$),A 腹腔大体图;B 空肠 HE 染色图;C 空肠 IL-12 受体免疫组化图;

[0072] 图 10 为 muIL-12/Fc 融合蛋白抑制实验性小鼠肾癌的生长。A,肿瘤生长曲线;B 处理后 25 天肿瘤包块;C 处理后 25 天剥离肿瘤体积。

【具体实施方式】

[0073] 以下结合具体实施例,进一步阐述本发明,应理解,下述实施例仅用于说明本发明,而不应理解为对本发明保护范围的限定,本领域技术人员可以根据本发明提供的创造思路而选择具体的表达方式来实现本发明。

[0074] 一、muIL-12/Fc 融合蛋白表达载体构建及其体外活性鉴定

[0075] 1、pN24-Fc-muIL-12_P35 质粒构建:

[0076] 小鼠 IL-12P35 基因扩增引物序列如下:

[0077] SEQ ID No. 1 5' -CTGTCCCCGGGGAGGGTCATTCCAGTCTCTGGA,

[0078] SEQ ID No. 2 5' -ATCAATGAATTCTCAGGCGGAGCTCAGATAGCC。

[0079] 用限制性内切酶 Sma1 和 EcoRI 对 PCR 产物酶切,获取片段插入经 Sma1 和 EcoRI 酶切的含 CMV 启动子和人免疫球蛋白 IgG1 恒定区的 pN24-Fc 质粒。链接后的 DNA 转化大肠杆菌菌株 XL-1,氨苄抗性的克隆经 PCR 和 DNA 测序筛选、鉴定。选择 DNA 序列正确的质粒并命名为 pN24-Fc-muP35。

[0080] 2、p64-muIL-12_P40 质粒的构建:

[0081] 小鼠 IL-12P40 基因扩增引物如下:

[0082] SEQ ID No. 3 5' -GTTAAGCTTGCCGCCACCATGTGTCCTCAGAAGCTAACC

[0083] SEQ ID No. 4 5' -CTACGTGAATTCCTAGGATCGGACCCTGCAGGGAAC

[0084] 用限制性内切酶 Hind3 和 EcoRI 对 PCR 产物进行酶切,获取片段插入经 Hind3 和 EcoRI 酶切的含 CMV 启动子 pN64 质粒。链接后的 DNA 转化大肠杆菌菌株 XL-1,氨苄抗性的克隆经 PCR 和 DNA 测序筛选、鉴定。选择 DNA 序列正确的质粒并命名为 pN64-muP40。

[0085] 3、表达载体构建:用 Not1/Sal1 酶切 pN64-muP40 质粒,纯化获取包含 CMV 启动子和小鼠 IL-12p40 基因的片段。纯化的片段与经 Not1/Sal1 酶切 pN24-Fc-muP35 连接,并转化大肠杆菌菌株 XL-1。氨苄抗性的克隆经 PCR 和 DNA 测序验证,选取序列正确的质粒并命名为 pN24-Fc-muIL12 (p35+p40),质粒 DNA 纯化后保存于 4 $^{\circ}$ C (图 1)。

[0086] 4、muIL12/Fc 在 NS0 细胞的转染与表达

[0087] 采用小鼠骨髓瘤 NS0 细胞表达小鼠 muIL12/Fc。目标质粒电转 NS0 细胞后 4 周,

采用间接酶联免疫检测方法筛选细胞培养上清,高表达 muIL12/Fc 的克隆采用 5%胎牛血清培养基 3 升搅拌罐培养扩增。分泌的融合蛋白采取蛋白 A 亲和层析以及离子交换层析纯化。

[0088] 5、muIL12/Fc 融合蛋白的筛选

[0089] 移取活性克隆细胞上清后用酶联免疫技术检测蛋白产物:100ul 抗 Fc 单克隆抗体(碳酸盐缓冲液:0.01M Na₂CO₃, 0.035M NaHCO₃, pH 9.6)加入 96 孔板,4℃过夜孵育,含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗涤 3 次。每孔加入经倍比稀释后上清 100ul,室温孵育 60 分钟,洗涤 3 次后加入二抗(初次筛选使用 100ul 经 PBS-Tween 缓冲液 1:5000 稀释辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IL-12 单克隆抗体),洗涤 3 次后加入底物(1.0mg/ml 的 2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐,0.1M、pH4.0 柠檬酸盐缓冲液,0.03%过氧化氢)显色 15 分钟,酶标仪(Bio-Tek)检测 450nm 吸光度值(OD450),用标准曲线计算蛋白浓度(图 2)。

[0090] 6、Western Blot 分析融合蛋白 Fc-IL-12

[0091] 将融合蛋白 muIL12/Fc 和人 IgG 稀释至终浓度 20ug/ml,加入上样缓冲液,水浴煮沸 5 分钟,SDS 聚丙烯酰胺凝胶每孔加样 5ul(0.1ug),120mV 电泳 45 分钟,凝胶转纤维素膜,加入羊抗鼠 IL-12(P35+P40)或者抗人 IgG-辣根过氧化物酶 4℃过夜,化学发光底物显色。Western Blot 实验结果显示,成功表达 muIL12/Fc(图 3)。

[0092] 7、体外鉴定 muIL-12/Fc 融合蛋白生物活性

[0093] 小鼠脾细胞提取与 T 细胞纯化的体外生物学分析

[0094] C57BL/6 小鼠处死后分离脾脏,含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基保存,于培养皿中用 27G 注射器冲洗细胞,70um 过滤器过滤细胞。1.077 的 Fico11 细胞分离液分离单个核细胞,0.5%牛血清白蛋白的 PBS 复苏、洗涤细胞 2 次。

[0095] 用磁珠 T 细胞分选试剂盒分选脾细胞中的 T 细胞,加入生物素-抗体孵育 4℃下 5 分钟。加入抗-生物素微珠 4℃下孵育 10 分钟。磁珠分选系统收集抗体-微珠-脾细胞悬液中的 T 细胞,新鲜培养基悬浮细胞 37℃,5% CO₂条件下孵育,流式鉴定分选的 T 细胞。

[0096] 抗-CD3 抗体活化的鼠 T 细胞分析鼠 IL-12 和 muIL-12/Fc 融合蛋白生物学活性

[0097] 5ug/ml 羊抗鼠 CD₃抗体(Clone:17A2 ;eBioscience ;San Diego, CA)4℃过夜包被 24 孔板,每孔加入纯化的 T 细胞 4×10^4 (400ulRPMI1640 培养基,10%胎牛血清),重组鼠 IL-12、IL-12/Fc 融合蛋白以及重组人 TNT-3(经 RPMI1740 培养基、10%胎牛血清稀释),重复 3 孔,37℃,5% CO₂条件下孵育 2 天。

[0098] PBS 稀释的抗鼠 IFN γ 抗体 4℃过夜包被 96 孔板,PBS,0.5% Tween-20 洗 3 次,酪蛋白阻滞剂封闭 2 小时。T 细胞离心去上清后加入 96 孔板,重组鼠 IFN- γ 蛋白经倍比稀释后建立标注曲线,均 4℃过夜孵育,加入 PBS 1% BSA 稀释的生物素标记抗 IFN- γ 抗体孵育 1 小时,辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(含 1% BSA 的 PBS)孵育 30 分钟,加入显色底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺,最后加入终止液 2N 硫酸,490nm 检测吸光度值。实验结果显示,IL-12/Fc 融合蛋白诱导鼠 T 细胞活化分泌 IFN- γ ,IFN- γ 水平与 IL-12 组比较无显著差异,显著高于 chTNT3 组(图 4)。

[0099] 8、IL-12/Fc 融合蛋白载体构建及基因序列

[0100] 二、所述融合蛋白浓度为 3.8mg/ml,采用 PBS 稀释至 0.5 μ g/ml,1 μ g/ml,2 μ g/

ml, 供动物实验使用。

[0101] 三、muIL-12/Fc 融合蛋白药代动力学

[0102] 检测原理与方法: 为检测 muIL-12/Fc 融合蛋白在小鼠体内的药物代谢动力学, 取 4-6 周龄体重 18-20g 的 Balb/c 小鼠 90 只, 雌性。按如下处理: 分为 muIL-12 与 muIL-12/FC 融合蛋白组, 每组 45 只, 分别皮下注射 muIL-12 或 muIL-12/FC, 剂量为 20ng/200ul/ 只。于注射后 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 48h 摘除眼球, 取 0.5-1ml 血液, 注入 1.5ml EP 管中。4℃ 静置 60min, 10000r/min 4℃ 离心 5min, 分离血清保存于 -80℃, 用于下一步实验。ELISA 法检测血清 IL-12 水平, 采用 DAS 2.0 对 muIL-12/Fc 在 Balb/c 体内的代谢情况进行药物代谢动力学分析。

[0103] 结果: 如表一所示: muIL-12/Fc 融合蛋白在小鼠体内的半衰期较 muIL-12 显著延长。

[0104] Table1. Plasma PK characteristics of muIL-12/Fc and muIL-12 in Non-irradiated mice

[0105]

	Dose(ng/mouse)	C _{max} (pg/ml)	AUC _{last} (pg.h/ml)	T _{max} (hours)	t _{1/2} (hours)
muIL-12/Fc	20	186.117	5067.929	24	13.27
muIL-12	20	16.632	73.510	2	2.446

[0106] 四、融合蛋白促辐射线照射动物损伤修复作用

[0107] 检测原理和方法:

[0108] (一)、融合蛋白提高辐照损伤动物生存率

[0109] 为检测融合蛋白提高辐照动物损伤生存率情况, 使用 50 只 18-20 克的 Balb/c 小鼠分成 5 组每组 10 只进行以下处理: 第 1-5 组 (A、B、C、D、E 组) 分别接受单次 7Gy, ⁶⁰Co-γ 射线全身照射, 随后在射线照射后 1 小时内分别对第 1-5 组进行皮下注射 (200ul PBS, A 组)、(20ng Fc/ 只, B 组)、(20ng LHR/Fc/ 只, C 组)、(20ng muIL-12/ 只, D 组)、(20ng muIL-12/Fc/ 只, E 组) 进行治疗, 观察 30 天小鼠存活情况。这种辐照剂量是特异性针对小鼠设定的, 5 个分组设计可直接反应 IL-12/Fc 融合蛋白的促辐照损伤后动物存活效果。

[0110] 结果: 如图 5 所示: muIL-12/Fc 融合蛋白显著提高辐照损伤后小鼠存活率。

[0111] (二)、该融合蛋白促进辐照动物骨髓抑制、肠道损伤修复功能

[0112] 为检测融合蛋白促辐照动物损伤的修复功能, 使用 25 只 18-20 克的 Balb/c 小鼠分成 5 组每组 5 只进行以下处理: 第 1 组 (Blank 组) 不作辐射线照射, 第 2-5 组 (A、B、C、D、E 组) 分别接受单次 5Gy, ⁶⁰Co-γ 射线全身照射, 随后在射线照射后 1 小时内分别对第 2-5 组进行皮下注射 (200ul PBS, A 组)、(20ng LHR/Fc/ 只, B 组)、(20ng muIL-12/ 只, C 组)、(20ng muIL-12/Fc/ 只, D 组) 进行治疗。这种辐照剂量是特异性针对小鼠设定的, 5 个分组设计可直接反应 IL-12/Fc 融合蛋白的促辐照损伤修复的功能。

[0113] 1) 融合蛋白的促进血障碍恢复作用

[0114] 检测原理和方法:

[0115] 骨髓细胞形态学观察在给药之后的第 3 天从 (二) 所述 5 组随机选取小鼠各 3 只, 取其股骨骨髓活检切片, 瑞氏-吉姆萨染色观察骨髓象。本发明所述骨髓象为骨髓造血判

断的常规方法,为本领域技术人员熟知。

[0116] 外周血常规检测分别于辐照后 1、3、7、14、21 天断尾取血检测外周血常规。

[0117] 结果:如图 6 和图 7 所示:IL-12/Fc 融合蛋白具有明显的促进骨髓造血功能。

[0118] 2) 促进机体免疫调节

[0119] 检测原理和方法:外周血 EPO(Erythropoietin,促红细胞生成素)水平上升是辐射照射损伤的生理反应;IFN- γ (干扰素 γ)具有重要的免疫调节功能,尤其是在机体感染起始阶段,在体液免疫和细胞免疫发生作用之前,发挥着重要作用。

[0120] 在给药后的 1h、4h、8h、12h、1d、3d 分别从(二)所述 5 组中随机取小鼠 5 只,采用乙醚麻醉 1-2 分钟,摘除眼球取血 0.5-1.0 毫升,4℃冰箱静置 30min 后离心 4000rpm \times 5 分钟,分离血清储存于 -80℃,测定时,采用 ELISA kit 检测上述血清中 IL-12(Mouse IL-12p70 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems 供应商品)、IFN- γ (Mouse IFN-gamma Quantikine ELISA Kit, R&D Systems 供应商品)、EPO(Mouse Erythropoietin Quantikine ELISA Kit, R&D Systems 供应商品)水平。

[0121] 结果:如图 8 所示:muIL-12/Fc 诱导小鼠内源性 IL-12 分泌;在采用 muIL-12/Fc 融合蛋白治疗后的鼠中 EPO 水平明显高于辐射线照射诱导产生的 EPO 水平, muIL-12/Fc 促进了辐射线照射引起的由 EPO 介导的生理反应;muIL-12/Fc 融合蛋白治疗组 IFN- γ 水平明显高于 PBS 组合 Blank 组,表明 muIL-12/Fc 融合蛋白能有效提升辐射线照射小鼠 IFN- γ 分泌水平。

[0122] 3) 促进肠道功能修复,诱导内源性 IL-12 受体表达

[0123] 原理和方法:基于小鼠 IL-12 与大鼠 IL-12 同源性高达 90%,且 9Gy 辐射线照射致小鼠死亡率达 100%(7 天),为有效建立辐射线照射致肠道损伤模型,本实验选择大鼠进行研究。肠道形态结构的完整性是肠道一切功能正常发挥的基础,检测大鼠空肠组织结构来反应肠道功能。

[0124] 使用 25 只 180-200 克的 Sprague-Dawley 雄性大鼠分成 5 组,每组 5 只进行以下处理:第 1 组(Blank 组)不作辐射线照射,第 2-5 组(A、B、C、D、E 组)分别接受单次 9Gy,⁶⁰Co- γ 射线全身照射,随后在射线照射后 1 小时内分别对第 2-5 组进行尾静脉注射(200ul PBS, A 组)、(200ng LHR/Fc/ 只, B 组)、(200ng muIL-12/ 只, C 组)、(200ng muIL-12/Fc/ 只, D 组)进行治疗。这种辐照剂量是特异性针对大鼠设定的,5 个分组设计可直接反应 IL-12/Fc 融合蛋白的促辐照肠道损伤修复的功能。

[0125] 在给药之后的第 3 天从 2 所述 5 组随机选取大鼠各 3 只,取其空肠,10%甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色观察肠道组织结构。另取空肠,10%甲醛固定,石蜡包埋切片免疫荧光检测 IL-12 受体表达。一抗:IL-12R β 2(IL-12 受体,为 Santa Cruz Biotechnology 公司供应商品,货号为 SC-18652),二抗:辣根酶标记抗山羊 IgG(为北京中杉金桥生物技术有限公司供应商品,货号为 ZB-2306),染色剂:DAB kit(为上海奇康生物科技有限公司供应商品,货号为 ZLI9018)。

[0126] 结果:如图 9 所示:muIL-12、muIL-12/Fc 融合蛋白治疗组(E 组)大鼠肠道组织结构明显较 PBS、LHR/Fc、Fc 组完整。诱导大鼠空肠组织表达 IL-12R β ₂水平显著增高。

[0127] 4) muIL-12/Fc 融合蛋白抑制实验性肿瘤生长功能

[0128] 检测原理与方法为检测 muIL-12/Fc 融合蛋白抑制实验性肿瘤生长的功能,采用

20 只 Balb/c 小鼠 (4-6W), 雌性, 体重约 18-20g, RPMI-1640 培养基, 10% 胎牛血清培养小鼠肾癌 Renca 细胞。 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照小鼠全身 3.5Gy, 4h 内皮下接种 Renca 细胞 $5.0 \times 10^6/200\text{u1/}$ 只。每 2 天测量接种部位肿瘤大小, 计算肿瘤体积 ($V = \text{长径} \times \text{短径}^2 \div 2$) mm^3 。待有小鼠肿瘤体积达到 100mm^3 时, 按如下分组处理: 皮下注射 ① muIL-12/Fc (20ng/200u1/ 只); ② muIL-12 (20ng/200u1/ 只); ③ LHR-Fc (20ng/200u1/ 只); ④ PBS (200u1/ 只)。25 天后处死小鼠, 剥离肿瘤, 计算剥离肿瘤体积。以上设计可直接反应 muIL-12/Fc 融合蛋白抑制实验性肿瘤生长功能。

[0129] 结果: 如图 10 所示: muIL-12、muIL-12/Fc 均可抑制实验性小鼠肾癌的生长, muIL-12/Fc 抑制效果显著强于 muIL-12。

[0130] 尽管本申请结合优选实施例对本发明进行了说明, 但本发明并不局限于上述实施例当中, 应该理解, 在本发明构思的引导下, 本领域技术人员可进行各种修改和改进, 这些变更和修改均在申请待批的权利要求保护范围之内。

[0001]

序列表

<110>常州卡斯比生物科技有限公司、胡培声 (Peisheng Hu)、艾伦·爱普斯坦 (Epstein .L .Alan)、李忠俊

<120>一种防治辐射线损伤、肿瘤的 IL-12/Fc 融合蛋白的制备方法及其药剂

<210>12

<211>33

<212>人工序列引物

<222>(1)...(33)

<400>1

5'-CTGTC CCCGG GGAGG GTCAT TCCAG TCTCT GGA 33

<210>12

<211>33

<212>人工序列引物

<222>(1)...(33)

<400>2

5'-ATCAA TGAAT TCTCA GGCGG AGCTC AGATA GCC 33

<210>12

<211>39

<212>人工序列引物

<222>(1)...(39)

<400>3

5'-GTAA GCTTG CCGCC ACCAT GTGTC CTCAG AAGCT AACC 39

<210>12

<211>36

<212>人工序列引物

<222>(1)...(36)

<400>4

5'-CTACG TGAAT TCCTA GGATC GGACC CTGCA GGGAA C 36

<210>12

<211>1272

<212>DNA

<213> Fc-huP35

<222>(1)...(1272)

<400>5

GACAAAACCTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG 50

ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT 100

CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC 150

CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCCTGGAGG TGCATAATGC 200

[0002]

CAAGACAAAAG	CCGCGGGAGG	AGCAGTACAA	CAGCACGTAC	CGGGTGGTCA	250
GCGTCCTCAC	CGTCCTGCAC	CAGGACTGGC	TGAATGGCAA	GGAGTACAAG	300
TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC	CCTCCCAGCC	CCCATCGAGA	AAACCATCTC	350
CAAAGCCAAA	GGGCAGCCCC	GAGAACCACA	GGTGTACACC	CTGCCCCCAT	400
CTCGGGATGA	GCTGACCAAG	AACCAGGTCA	GCCTGACCTG	CCTGGTCAAA	450
GGCTTCTATC	CCAGCGACAT	CGCCGTGGAG	TGGGAGAGCA	ATGGGCAGCC	500
GGAGAACAAC	TACAAGACCA	CGCCTCCCGT	GCTGGACTCC	GACGGCTCCT	550
TCTTCCTCTA	CAGCAAGCTC	ACCGTGGACA	AGAGCAGGTG	GCAGCAGGGG	600
AACGTCTTCT	CATGCTCCGT	GATGCATGAG	GCTCTGCACA	ACCACTACAC	650
GCAGAAGAGC	CTCTCCCTGT	CCCCGGGGAA	AAGAAACCTC	CCCGTGGCCA	700
CTCCAGACCC	AGGAATGTTC	CCATGCCTTC	ACCACTCCCA	AAACCTGCTG	750
AGGGCCGTCA	GCAACATGCT	CCAGAAGGCC	AGACAAACTC	TAGAATTTTA	800
CCCTTGCACT	TCTGAAGAGA	TTGATCATGA	AGATATCACA	AAAGATAAAA	850
CCAGCACAGT	GGAGGCCTGT	TTACCATTGG	AATTAACCAA	GAATGAGAGT	900
TGCCTAAATT	CCAGAGAGAC	CTCTTTCATA	ACTAATGGGA	GTTGCCTGGC	950
CTCCAGAAAG	ACCTCTTTTA	TGATGGCCCT	GTGCCTTAGT	AGTATTTATG	1000
AAGACTTGAA	GATGTACCAG	GTGGAGTTCA	AGACCATGAA	TGCAAAGCTT	1050
CTGATGGATC	CTAAGAGGCA	GATCTTTCTA	GATCAAAACA	TGCTGGCAGT	1100
TATTGATGAG	CTGATGCAGG	CCCTGAATTT	CAACAGTGAG	ACTGTGCCAC	1150
AAAAATCCTC	CCTTGAAGAA	CCGGATTTTT	ATAAAACTAA	AATCAAGCTC	1200
TGCATACTTC	TTCATGCTTT	CAGAATTCGG	GCAGTGAFTA	TTGATAGAGT	1250
GATGAGCTAT	CTGAATGCTT	CC			1272

<210>12

<211>848

<212>Protein

<213>Fc-huP35

<222>(1)...(848)

<400>6

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	15
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	30
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	45

[0003]

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Tyr Tyr Val Asp	60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	75
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	90
Gln Asp Tyr Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	105
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	120
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	135
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	150
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Tyr Glu Ser Asn Gly	165
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	180
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	195
Arg Tyr Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	210
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	225
Gly Lys Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe	240
Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn	255
Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr	270
Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser	285
Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser	300
Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys	315
Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser	330
Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr	345
Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu	360
Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu	375
Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu	390
Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His	405
Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr	420
Leu Asn Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	435
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	450
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	465
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn	480
Tyr Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	495

[0004]

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 510
 Thr Val Leu His Gln Asp Tyr Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 525
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile 540
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu 555
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 570
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Tyr 585
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro 600
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 615
 Val Asp Lys Ser Arg Tyr Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser 630
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 645
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp 660
 Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg 675
 Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe 690
 Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys 705
 Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr 720
 Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr 735
 Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala 750
 Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val 765
 Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg 780
 Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu 795
 Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser 810
 Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys 825
 Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg 840
 Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser 848

<210>12

<211>1272

<212>DNA

<213> huP35-Fc

<222>(1)...(1272)

<400>7

AGAAACCTCC	CCGTGGCCAC	TCCAGACCCA	GGAATGTTCC	CATGCCTTCA	50
CCACTCCCAA	AACCTGCTGA	GGGCCGTCAG	CAACATGCTC	CAGAAGGCCA	100

[0005]

GACAAACTCT	AGAATTTTAC	CCTTGCACTT	CTGAAGAGAT	TGATCATGAA	150
GATATCACAA	AAGATAAAAC	CAGCACAGTG	GAGGCCTGTT	TACCATTGGA	200
ATTAACCAAG	AATGAGAGTT	GCCTAAATTC	CAGAGAGACC	TCTTTCATAA	250
CTAATGGGAG	TTGCCTGGCC	TCCAGAAAGA	CCTCTTTTAT	GATGGCCCTG	300
TGCCTTAGTA	GTATTTATGA	AGACTTGAAG	ATGTACCAGG	TGGAGTTCAA	350
GACCATGAAT	GCAAAGCTTC	TGATGGATCC	TAAGAGGCAG	ATCTTICTAG	400
ATCAAAACAT	GCTGGCAGTT	ATTGATGAGC	TGATGCAGGC	CCTGAATTC	450
AACAGTGAGA	CTGTGCCACA	AAAATCCTCC	CTTGAAGAAC	CGGATTTTAA	500
TAAAATAAAA	ATCAAGCTCT	GCATACTTCT	TCATGCTTTC	AGAATTCGGG	550
CAGTGACTAT	TGATAGAGTG	ATGAGCTATC	TGAATGCTTC	CGACAAAAC	600
CACACATGCC	CACCGTGCCC	AGCACCTGAA	CTCCTGGGGG	GACCGTCAGT	650
CTTCTCTTC	CCCCAAAAC	CCAAGGACAC	CCTCATGATC	TCCCGGACCC	700
CTGAGGTCAC	ATGCGTGGTG	GTGGACGTGA	GCCACGAAGA	CCCTGAGGTC	750
AAGTTCAACT	GGTACGTGGA	CGGCGTGGAG	GTGCATAATG	CCAAGACAAA	800
GCCGCGGGAG	GAGCAGTACA	ACAGCACGTA	CCGGGTGGTC	AGCGTCCTCA	850
CCGTCCTGCA	CCAGGACTGG	CTGAATGGCA	AGGAGTACAA	GTGCAAGGTC	900
TCCAACAAAG	CCCTCCAGC	CCCCATCGAG	AAAACCATCT	CCAAAGCCAA	950
AGGGCAGCCC	GAGAACCACC	AGGTGTACAC	CCTGCCCCCA	TCTCGGGATG	1000
AGCTGACCAA	GAACCAGGTC	AGCCTGACCT	GCCTGGTCAA	AGGCTTCTAT	1050
CCCAGCGACA	TCGCCGTGGA	GTGGGAGAGC	AATGGGCAGC	CGGAGAACAA	1100
CTACAAGACC	ACGCCTCCCG	TGCTGGACTC	CGACGGCTCC	TTCTTCTCT	1150
ACAGCAAGCT	CACCGTGGAC	AAGAGCAGGT	GGCAGCAGGG	GAACGTCTTC	1200
TCATGCTCCG	TGATGCATGA	GGCTCTGCAC	AACCACTACA	CGCAGAAGAG	1250
CCTCTCCCTG	TCCCCGGGGA	AA			1272

<210>12

<211>848

<212>Protein

<213> huP35-Fc

<222>(1)...(848)

<400>8

Arg	Asn	Leu	Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Asp	Pro	Gly	Met	Phe	Pro	Cys	15
Leu	His	His	Ser	Gln	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Val	Ser	Asn	Met	Leu	30
Gln	Lys	Ala	Arg	Gln	Thr	Leu	Glu	Phe	Tyr	Pro	Cys	Thr	Ser	Glu	45
Glu	Ile	Asp	His	Glu	Asp	Ile	Thr	Lys	Asp	Lys	Thr	Ser	Thr	Val	60
Glu	Ala	Cys	Leu	Pro	Leu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Glu	Ser	Cys	Leu	75
Asn	Ser	Arg	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Thr	Asn	Gly	Ser	Cys	Leu	Ala	90
Ser	Arg	Lys	Thr	Ser	Phe	Met	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Ser	Ser	Ile	105
Tyr	Glu	Asp	Leu	Lys	Met	Tyr	Gln	Val	Glu	Phe	Lys	Thr	Met	Asn	120
Ala	Lys	Leu	Leu	Met	Asp	Pro	Lys	Arg	Gln	Ile	Phe	Leu	Asp	Gln	135
Asn	Met	Leu	Ala	Val	Ile	Asp	Glu	Leu	Met	Gln	Ala	Leu	Asn	Phe	150
Asn	Ser	Glu	Thr	Val	Pro	Gln	Lys	Ser	Ser	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	165

[0006]

Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe	180
Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn	195
Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu	210
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	225
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	240
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Tyr Tyr	255
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	270
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val	285
Leu His Gln Asp Tyr Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	300
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	315
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	330
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	345
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Tyr Glu Ser	350
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	365
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp	380
Lys Ser Arg Tyr Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	395
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu	410
Ser Pro Gly Lys Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly	425
Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val	440
Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro	455
Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys	470
Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn	485
Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly	500
Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys	515
Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe	530
Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile	545
Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln	560
Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu	575
Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu	590
Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met	605
Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	620
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	635
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	650
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys	665
Phe Asn Tyr Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Th	680
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	705
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Tyr Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	720
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys	735
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	750
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	765
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	780
Glu Tyr Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	795
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys	810
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Tyr Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	825
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	840
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	848

<210>12

[0007]

<211>1599

<212>DNA

<213> huP40-Fc

<222>(1)...(1599)

<400>9

ATATGGGAAC	TGAAGAAAGA	TGTTTATGTC	GTAGAATTGG	ATTGGTATCC	50
GGATGCCCT	GGAGAAATGG	TGGTCCTCAC	CTGTGACACC	CCTGAAGAAG	100
ATGGTATCAC	CTGGACCTTG	GACCAGAGCA	GTGAGGTCTT	AGGCTCTGGC	150
AAAACCTGA	CCATCCAAGT	CAAAGAGTTT	GGAGATGCTG	GCCAGTACAC	200
CTGTCACAAA	GGAGGCGAGG	TTCTAAGCCA	TTCGCTCCTG	CTGCTCACA	250
AAAAGGAAGA	TGGAATTTGG	TCCACTGATA	TTTTAAAGGA	CCAGAAAGAA	300
CCCAAAAATA	AGACCTTCT	AAGATGCGAG	GCCAAGAATT	ATTCTGGACG	350
TTTCACCTGC	TGGTGGCTGA	CGACAATCAG	TACTGATTG	ACATTCAGTG	400
TCAAAAGCAG	CAGAGGCTCT	TCTGACCCCC	AAGGGGTGAC	GTGCGGAGCT	450
GCTACACTCT	CTGCAGAGAG	AGTCAGAGGG	GACAACAAGG	AGTATGAGTA	500
CTCAGTGGAG	TGCCAGGAGG	ACAGTGCCCTG	CCCAGCTGCT	GAGGAGAGTC	550
TGCCCATTGA	GGTCATGGTG	GATGCCGTTT	ACAAGCTCAA	GTATGAAAAC	600
TACACCAGCA	GCTTCTTCAT	CAGGGACATC	ATCAAACCTG	ACCCACCCAA	650
GAACCTGCAG	CTGAAGCCAT	TAAAGAATTC	TCGGCAGGTG	GAGGTCAGCT	700
GGGAGTACCC	TGACACCTGG	AGIACTCCAC	ATTCCTACTT	CTCCCTGACA	750
TTCTGCGTTC	AGGTCCAGGG	CAAGAGCAAG	AGAGAAAAGA	AAGATAGAGT	800
CTTCACGGAC	AAGACCTCAG	CCACGGTCAT	CTGCCGCAA	AATGCCAGCA	850
TTAGCGTGCG	GGCCCAGGAC	CGCTACTATA	GCTCATCTTG	GAGCGAATGG	900
GCATCTGTGC	CCTGCAGTGA	CAAACTCAC	ACATGCCAC	CGTGCCCAGC	950
ACCTGAACTC	CTGGGGGGAC	CGTCAGTCTT	CTCTTECCC	CCAAAACCCA	1000
AGGACACCCT	CATGATCTCC	CGGACCCCTG	AGGTCACATG	CGTGGTGGTG	1050
GACGTGAGCC	ACGAAGACCC	TGAGGTCAAG	TTCAACTGGT	ACGTGGACGG	1100
CGTGGAGGTG	CATAATGCCA	AGACAAAGCC	GCGGGAGGAG	CAGTACAACA	1150
GCACGTACCG	GGTGGTCAGC	GTCCTACCG	TCCTGCACCA	GGACTGGCTG	1200
AATGGCAAGG	AGTACAAGTG	CAAGGTCTCC	AACAAAGCCC	TCCCAGCCCC	1250
CATCGAGAAA	ACCATCTCCA	AAGCCAAAGG	GCAGCCCCGA	GAACCACAGG	1300

[0008]

TGTACACCCT	GCCCCCATCT	CGGGATGAGC	TGACCAAGAA	CCAGGTCAGC	1350
CTGACCTGCC	TGGTCAAAGG	CTTCTATCCC	AGCGACATCG	CCGTGGAGTG	1400
GGAGAGCAAT	GGGCAGCCGG	AGAACAATA	CAAGACCACG	CCTCCCGTGC	1450
TGGACTCCGA	CGGCTCCTTC	TTCCTCTACA	GCAAGCTCAC	CGTGGACAAG	1500
AGCAGGTGGC	AGCAGGGGAA	CGTCTTCTCA	TGCTCCGTGA	TGCATGAGGC	1550
TCTGCACAAC	CACTACACGC	AGAAGAGCCT	CTCCCTGTCC	CCGGGGAAA	1599

<210>12

<211>1066

<212>Protein

<213> huP40-Fc

<222>(1)...(1066)

<400>10

Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	Lys	Asp	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Asp	Tyr	15
Tyr	Pro	Asp	Ala	Pro	Gly	Glu	Met	Val	Val	Leu	Thr	Cys	Asp	Thr	30
Pro	Glu	Glu	Asp	Gly	Ile	Thr	Tyr	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Ser	Glu	45
Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Phe	60
Gly	Asp	Ala	Gly	Gln	Tyr	Thr	Cys	His	Lys	Gly	Gly	Glu	Val	Leu	75
Ser	His	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	His	Lys	Lys	Glu	Asp	Gly	Ile	Tyr	90
Ser	Thr	Asp	Ile	Leu	Lys	Asp	Gln	Lys	Glu	Pro	Lys	Asn	Lys	Thr	105
Phe	Leu	Arg	Cys	Glu	Ala	Lys	Asn	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys	120
Tyr	Tyr	Leu	Thr	Thr	Ile	Ser	Thr	Asp	Leu	Thr	Phe	Ser	Val	Lys	135
Ser	Ser	Arg	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Gln	Gly	Val	Thr	Cys	Gly	Ala	150
Ala	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Arg	Val	Arg	Gly	Asp	Asn	Lys	Glu	Tyr	165
Glu	Tyr	Ser	Val	Glu	Cys	Gln	Glu	Asp	Ser	Ala	Cys	Pro	Ala	Ala	180
Glu	Glu	Ser	Leu	Pro	Ile	Glu	Val	Met	Val	Asp	Ala	Val	His	Lys	195
Leu	Lys	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Ser	Ser	Phe	Phe	Ile	Arg	Asp	Ile	210
Ile	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Lys	Asn	Leu	Gln	Leu	Lys	Pro	Leu	Lys	225
Asn	Ser	Arg	Gln	Val	Glu	Val	Ser	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Asp	Thr	Tyr	240
Ser	Thr	Pro	His	Ser	Tyr	Phe	Ser	Leu	Thr	Phe	Cys	Val	Gln	Val	255
Gln	Gly	Lys	Ser	Lys	Arg	Glu	Lys	Lys	Asp	Arg	Val	Phe	Thr	Asp	270
Lys	Thr	Ser	Ala	Thr	Val	Ile	Cys	Arg	Lys	Asn	Ala	Ser	Ile	Ser	285
Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ser	Glu	Tyr	300
Ala	Ser	Val	Pro	Cys	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	315
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	330
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	345
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	360
Phe	Asn	Tyr	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	375
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	390
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Tyr	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	405
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	420
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	435
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	450

[0009]

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	465
Glu Tyr Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	480
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys	495
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Tyr Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	510
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	525
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ile Tyr Glu Leu Lys Lys Asp	540
Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Tyr Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu	555
Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr	570
Typ Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr	585
Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr	600
Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu	615
His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Tyr Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp	630
Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys	645
Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Typ Typ Leu Thr Thr Ile Ser	660
Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp	675
Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg	690
Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln	705
Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu	720
Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr	735
Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys	750
Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val	765
Ser Typ Glu Tyr Pro Asp Thr Typ Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe	780
Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu	795
Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile	810
Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr	825
Tyr Ser Ser Ser Typ Ser Glu Typ Ala Ser Val Pro Cys Ser Asp	840
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	855
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	870
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	885
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Tyr Tyr Val Asp Gly	900
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	915
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	930
Asp Typ Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	945
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	960
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp	975
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	990
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Typ Glu Ser Asn Gly Gln	1005
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	1020
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	1035
Typ Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	1050
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	1065
Lys	1066
<210>12	
<211>1599	
<212>DNA	
<213>Fc-huP40	

[0010]

<22>(1)...(1599)

<400>11

GACAAAΔCTC	ACACATGCCC	ACCGTGCCCA	GCACCTGAAC	TCCTGGGGGG	50
ACCGTCAGTC	TTCCTCTTCC	CCCCAAAACC	CAAGGACACC	CTCATGATCT	100
CCCGGACCCC	TGAGGTCACA	TGCGTGGTGG	TGGACGTGAG	CCACGAAGAC	150
CCTGAGGTCA	AGTTCAACTG	GTACGTGGAC	GGCGTGGAGG	TGCATAATGC	200
CAAGACAAAG	CCGCGGGAGG	AGCAGTACAA	CAGCACGTAC	CGGGTGGTCA	250
GCGTCTCAC	CGTCCTGCAC	CAGGACTGGC	TGAATGGCAA	GGAGTACAAG	300
TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC	CCTCCCAGCC	CCCATCGAGA	AAACCATCTC	350
CAAAGCCAAA	GGGCAGCCCC	GAGAACCACA	GGTGTACACC	CTGCCCCCAT	400
CTCGGGATGA	GCTGACCAAG	AACCAGGTCA	GCCTGACCTG	CCTGGTCAAA	450
GGCTTCTATC	CCAGCGACAT	CGCCGTGGAG	TGGGAGAGCA	ATGGGCAGCC	500
GGAGAACAAC	TACAAGACCA	CGCCTCCCGT	GCTGGACTCC	GACGGCTCCT	550
TCTTCCTCTA	CAGCAAGCTC	ACCGTGGACA	AGAGCAGGTG	GCAGCAGGGG	600
AACGTCTTCT	CATGCTCCGT	GATGCATGAG	GCTCTGCACA	ACCACTACAC	650
GCAGAAGAGC	CTCTCCCTGT	CCCCGGGGAA	AAIATGGGAA	CTGAAGAAAG	700
ATGTTTATGT	CGTAGAATTG	GATTGGTATC	CGGATGCCCC	TGGAGAAATG	750
GTGGTCCCTA	CCTGTGACAC	CCCTGAAAGAA	GATGGTATCA	CCTGGACCTT	800
GGACCAGAGC	AGTGAGGTCT	TAGGCTCTGG	CAAAACCCTG	ACCATCCAAG	850
TCAAAGAGTT	TGGAGATGCT	GGCCAGTACA	CCTGTCACAA	AGGAGGCGAG	900
GTTCTAAGCC	ATTCGCTCCT	GCTGCTTCAC	AAAAAGGAAG	ATGGAATTTG	950
GTCCACTGAT	ATTTTAAAGG	ACCAGAAAGA	ACCCAAAAAT	AAGACCTTTC	1000
TAAGATGCGA	GGCCAAGAAT	TATTCTGGAC	GTTTCACCTG	CTGGTGGCTG	1050
ACGACAATCA	GTACTGATTT	GACATTCAGT	GTCAAAGCA	GCAGAGGCTC	1100
TTCTGACCCC	CAAGGGGTGA	CGTGCGGAGC	TGCTACACTC	TCTGCAGAGA	1150
GAGTCAGAGG	GGACAACAAG	GAGTATGAGT	ACTCAGTGGA	GTGCCAGGAG	1200
GACAGTGCCT	GCCCAGCTGC	TGAGGAGAGT	CTGCCATTG	AGGTCATGGT	1250
GGATGCCGTT	CACAAGCTCA	AGTATGAAAA	CTACACCAGC	AGCTTCTTCA	1300
TCAGGGACAT	CATCAAACCT	GACCCACCCA	AGAACTTGCA	GCTGAAGCCA	1350
TTAAAGAATT	CTCGGCAGGT	GGAGGTCAGC	TGGGAGTACC	CTGACACCTG	1400
GAGTACTCCA	CATTCCTACT	TCTCCCTGAC	ATTCTGCGTT	CAGGTCCAGG	1450
GCAAGAGCAA	GAGAGAAAAG	AAAGATAGAG	TCTTCACGGA	CAAGACCTCA	1500
GCCACGGTCA	TCTGCCGCAA	AAATGCCAGC	ATTAGCGTGC	GGGCCAGGA	1550
CCGCTACTAT	ΔGCTCATCTT	GGAGCGAATG	GGCATCTGTG	CCCTGCAGT	1599

<210>12

<211>533

<212>Protein

<213>Fc-huP40

<222>(1)...(533)

[0011]

<400>12

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	15
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	30
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	45
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Tyr Tyr Val Asp	60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	75
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	90
Gln Asp Tyr Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	105
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	120
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	135
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	150
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Tyr Glu Ser Asn Gly	165
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	180
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	195
Arg Tyr Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	210
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	225
Gly Lys Ile Tyr Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu	240
Asp Tyr Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys	255
Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Tyr Thr Leu Asp Gln Ser	270
Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys	285
Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu	300
Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly	315
Ile Tyr Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn	330
Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe	345
Thr Cys Tyr Tyr Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser	360
Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys	375
Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys	390
Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro	405
Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala Val	420
His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg	435

[0012]

Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro	450
Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Tyr Glu Tyr Pro Asp	465
Thr Tyr Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val	480
Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe	495
Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser	510
Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Ser	525
Glu Tyr Ala Ser Val Pro Cys Ser	533

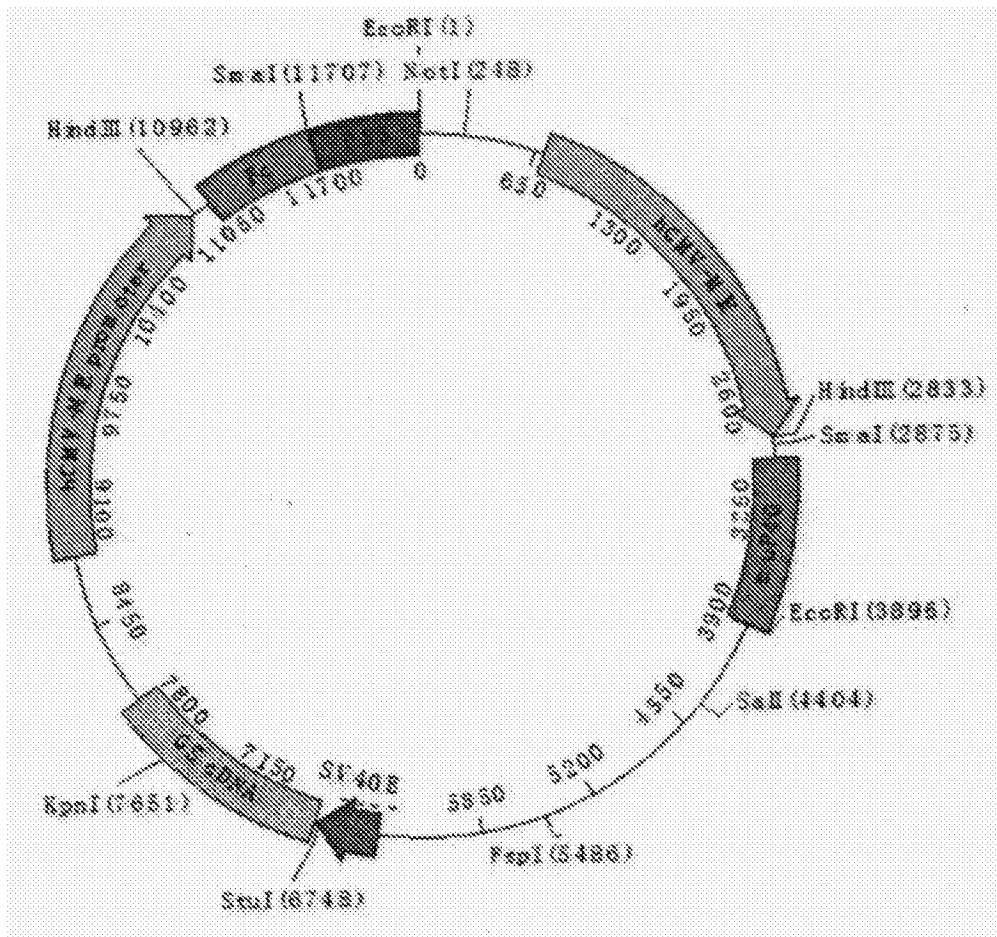


图 1

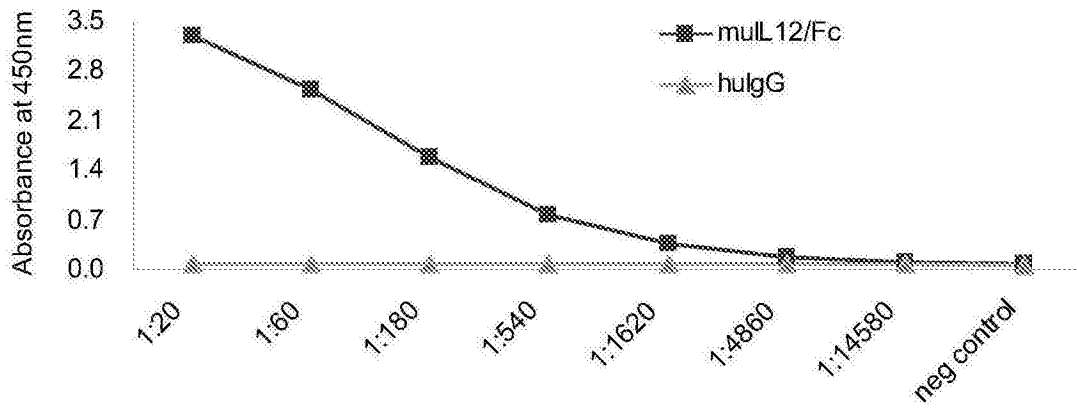


图 2

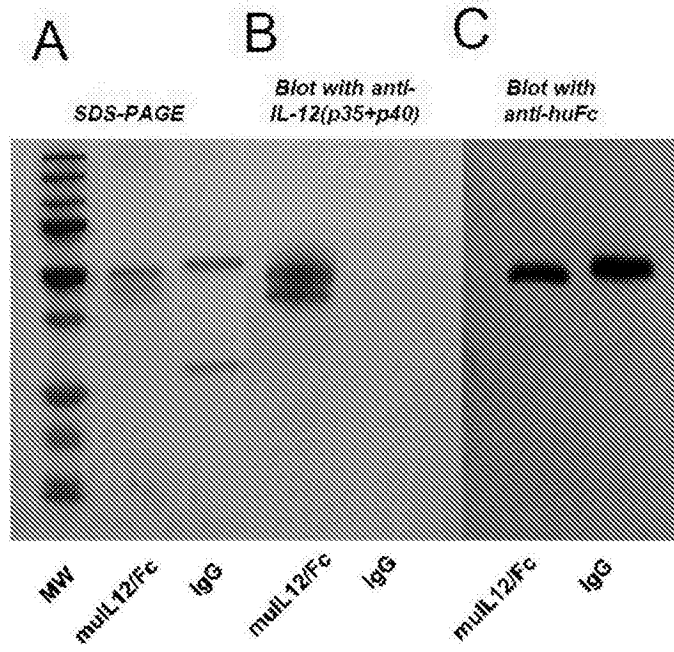


图 3

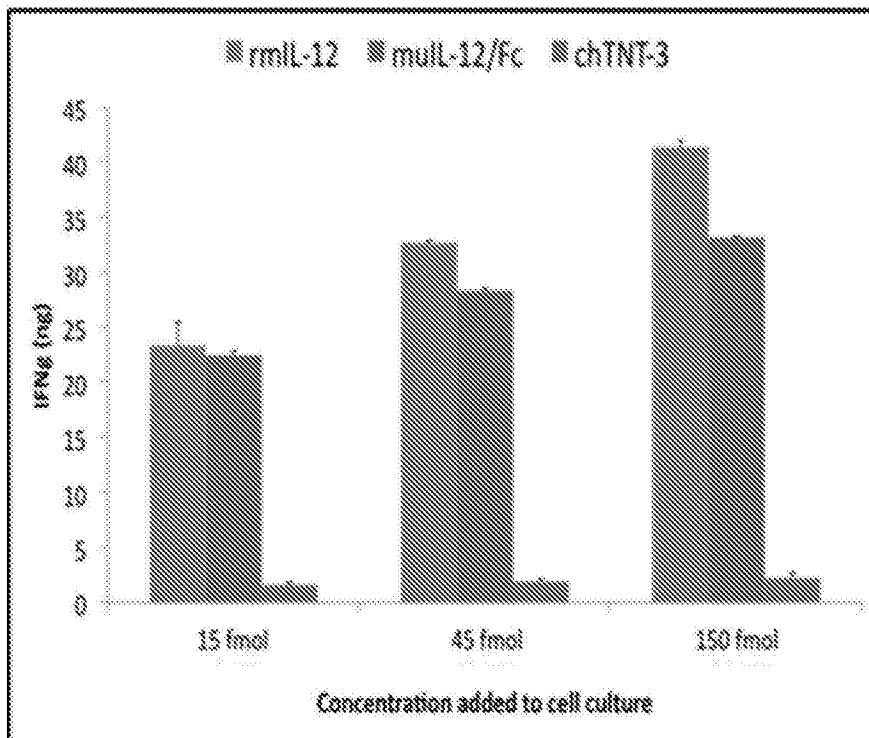


图 4

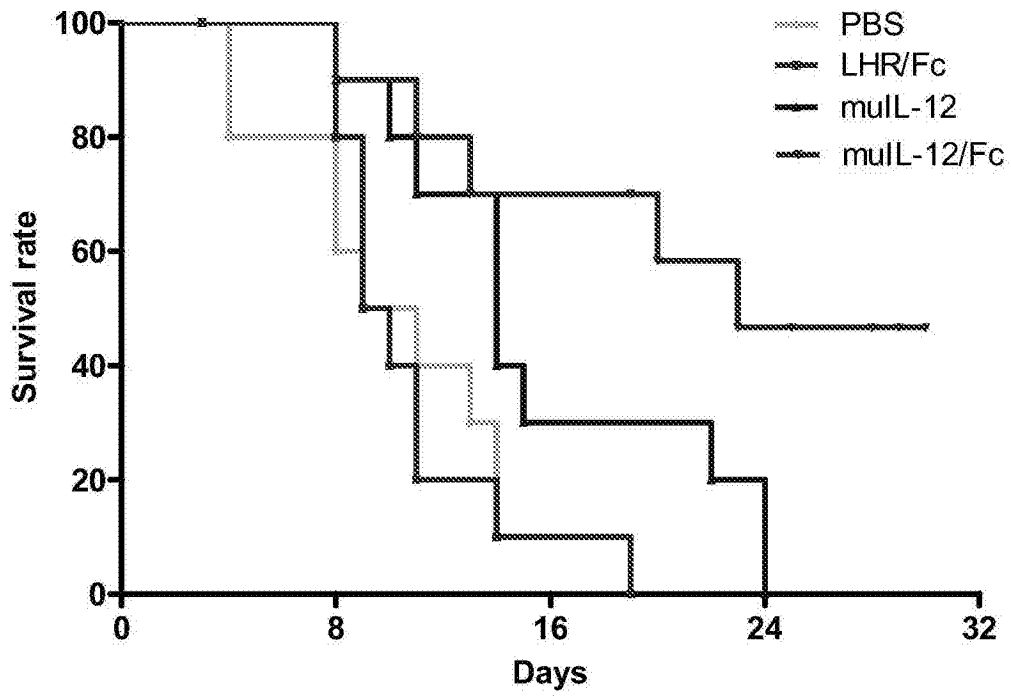


图 5

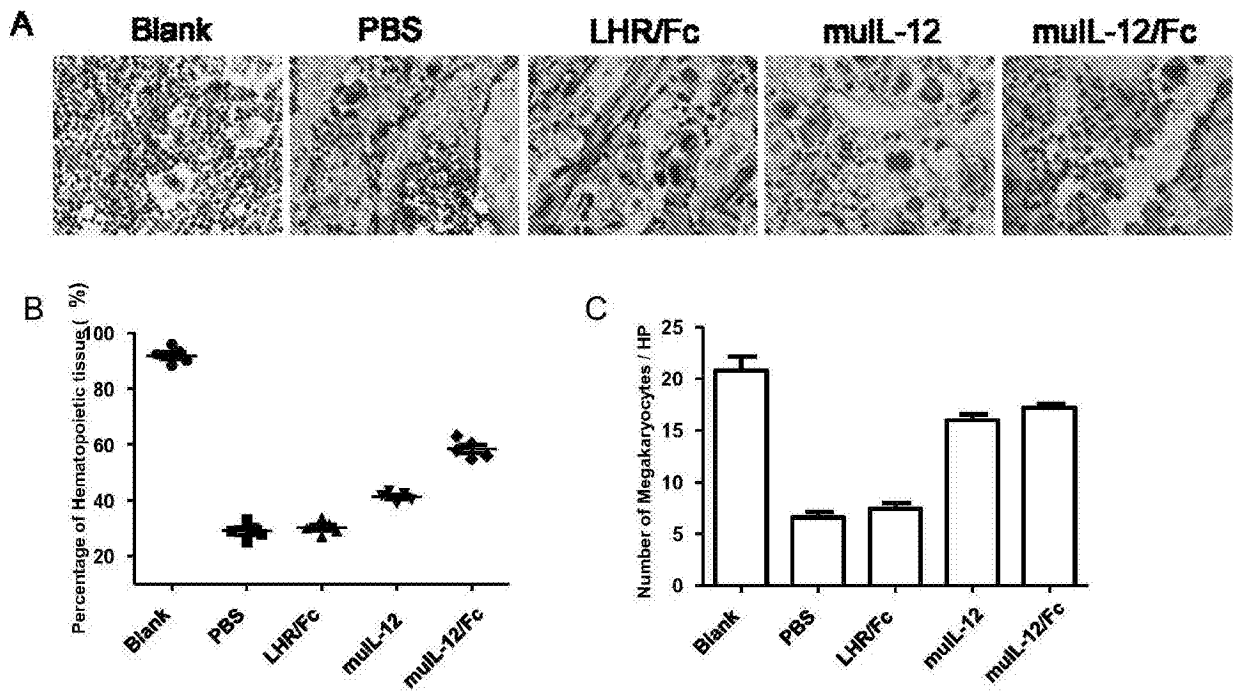


图 6

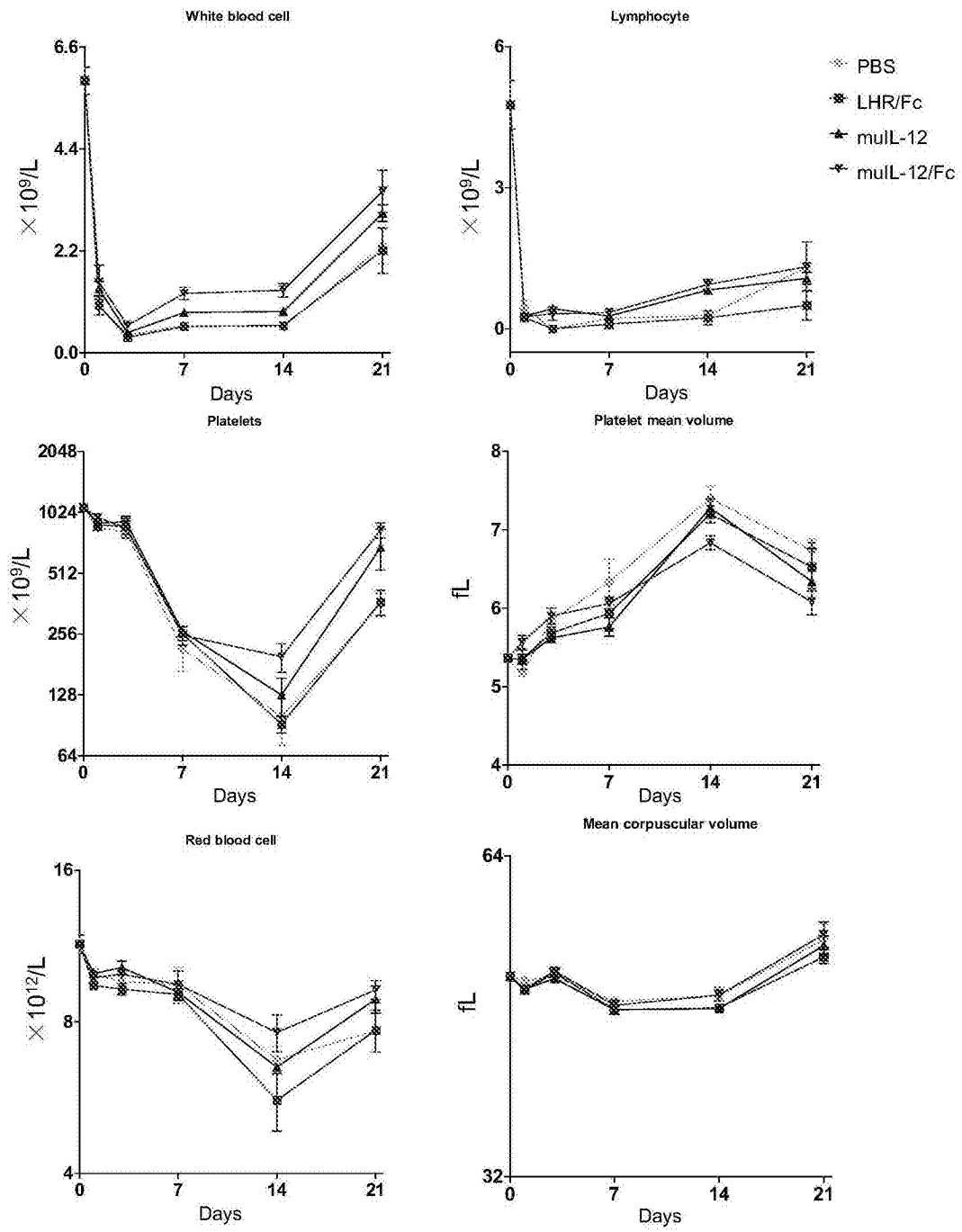


图 7

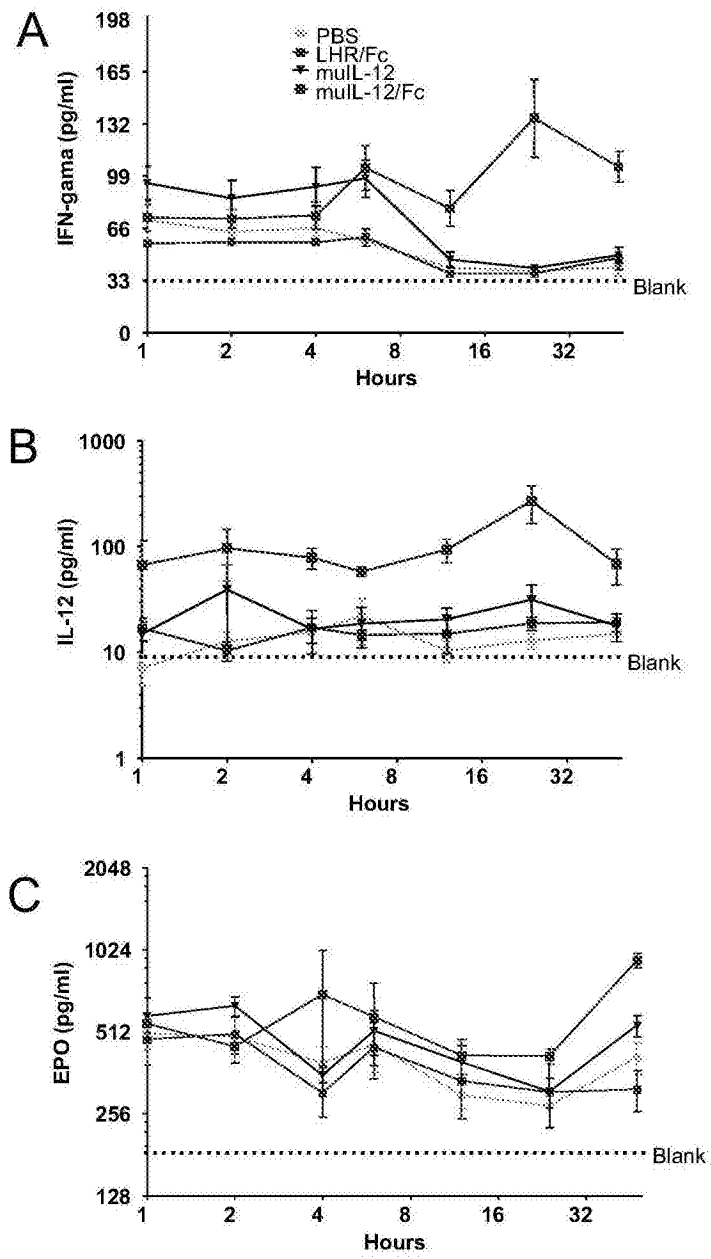


图 8

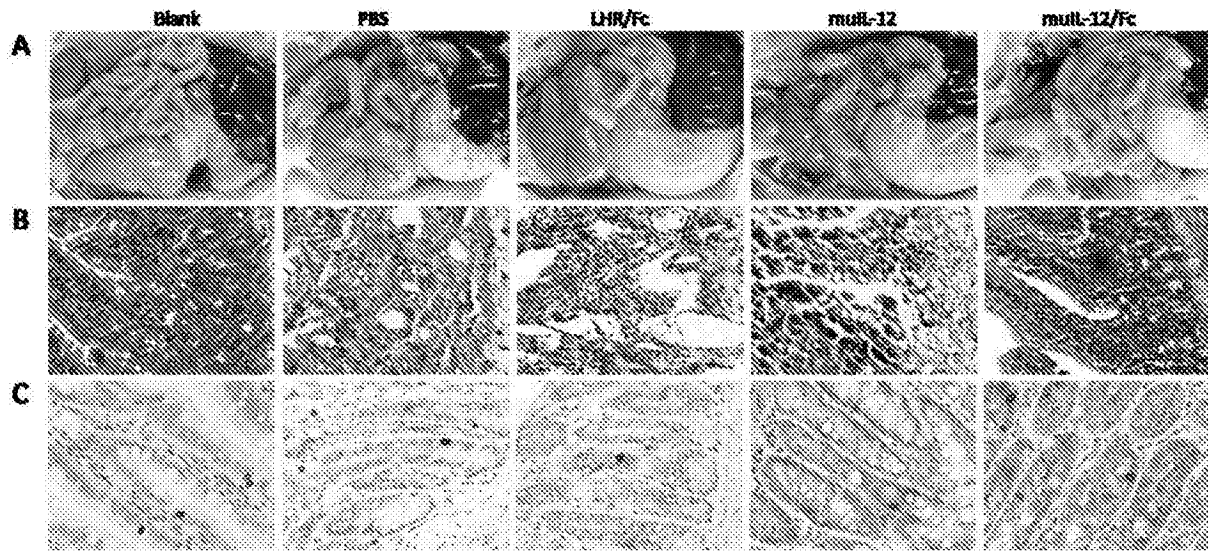


图 9

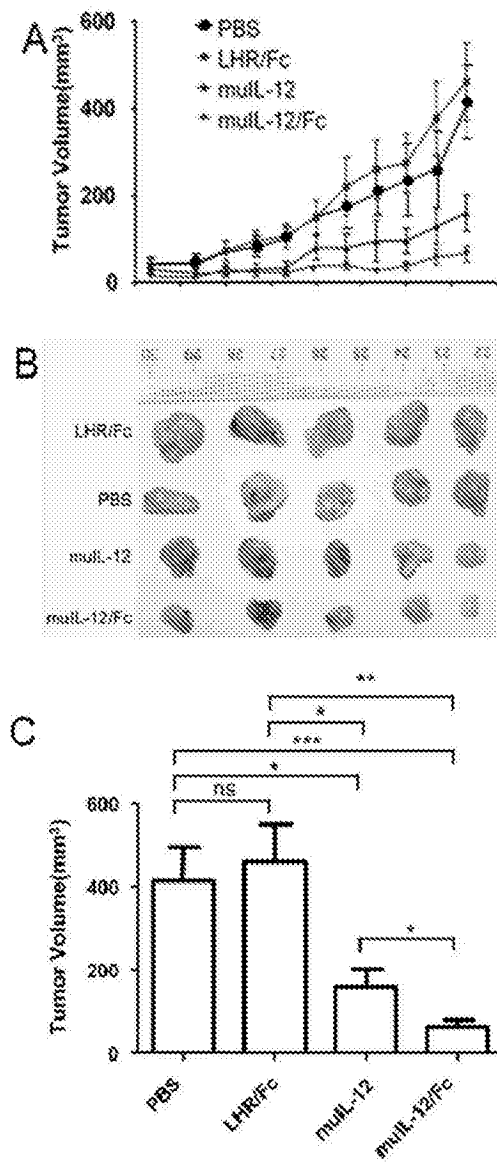


图 10