

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/12

# [12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/63 C12N 5/10

C07K 14/715 C07K 16/28

[21] 申请号 98801836.5

[43]公开日 2000年3月15日

[11]公开号 CN 1247567A

[22]申请日 1998.1.13 [21]申请号 98801836.5

[30]优先权

[32]1997.1.14 [33]US [31]60/035,496

[86]国际申请 PCT/US98/00153 1998.1.13

[87]国际公布 WO98/30694 英 1998.7.16

[85]进入国家阶段日期 1999.7.14

[71]申请人 人体基因组科学有限公司

地址 美国马里兰州

[72]发明人 莱纳·L·根茨 倪 健

莱因哈德·艾伯纳 余国良

斯蒂文·M·鲁宾

冯 平

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 5 页 说明书 61 页 附图页数 22 页

[54]发明名称 肿瘤坏死因子受体 6 $\alpha$  和 6 $\beta$

[57]摘要

本发明涉及新的肿瘤坏死因子受体蛋白。尤其是提供了分离的用以编码人 TNFR- $\alpha$  和 -6 $\beta$  蛋白的核酸分子。本文还提供了 TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  多肽,以及产生它们的载体、宿主细胞和重组方法。本发明还进一步涉及用于鉴定 TNFR-6 $\alpha$  和 -6 $\beta$  活性的兴奋剂和拮抗剂的筛选方法。还提供了检测免疫系统相关疾病的诊断方法和对免疫系统相关疾病的治疗方法。

ISSN 1008-4274

## 权利要求书

1. 一种分离的核酸分子，其包括具有与选自下列一组中的序列至少 95% 相同的核苷酸序列的多核苷酸：

(a) 编码 TNFR 多肽的核苷酸序列，该 TNFR 多肽具有 SEQ ID NO:2 或 4 的，或者 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的完整的氨基酸序列；

(b) 编码成熟的 TNFR 多肽的核苷酸序列，该成熟的 TNFR 多肽具有 SEQ ID NO:2 中的第 31-300 位，或 SEQ ID NO:4 中的第 31-170 位的氨基酸序列，或者 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列；

(c) 编码 TNFR 多肽的可溶性胞外功能区的核苷酸序列，该 TNFR 多肽的可溶性胞外功能区具有 SEQ ID NO:2 中的第 31-283 位，或 SEQ ID NO:4 中的第 31-161 位的氨基酸序列；和

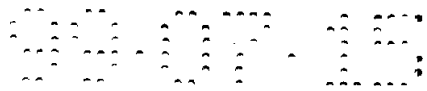
(d) 与上述(a), (b)和 (c) 中任何一个核苷酸序列相互补的核苷酸序列。

2. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其中所说的多核苷酸具有选自 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 所构成的一组中的一完整的核苷酸序列。

3. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其中所说的多核苷酸具有编码 TNFR 多肽的核苷酸序列，其中的 TNFR 多肽具有选自 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 所构成的一组中的一完整的氨基酸序列。

4. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其中所说的多核苷酸具有编码具有 SEQ ID NO:2 中的约第 31 到约第 300 位，或 SEQ ID NO:4 中的约第 31 位到约第 170 位的氨基酸序列的成熟形式的 TNFR 多肽的核苷酸序列。

5. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其中所说的多核苷酸具有编码具有 SEQ ID NO:2 中的约第 31 位到约第 283 位，或 SEQ ID NO:4



中的约第 31 位到约第 166 位的氨基酸序列的 TNFR 多肽可溶性胞外功能区的核苷酸序列。

6. 一种分离的核酸分子，其包括具有与选自下列一组中的序列至少 95% 相同的核苷酸序列的多核苷酸：

- (a) 编码包括 SEQ ID NO:2 中第 m-300 位残基的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列，其中 m 是一个 1-49 范围内的整数；
- (b) 编码包括 SEQ ID NO:4 中第 n-170 位残基的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列，其中 n 是一个 1-49 范围内的整数；
- (c) 编码包括 SEQ ID NO:2 中第 1-y 位残基的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列，其中 y 是一个 193-300 范围内的整数；
- (d) 编码包括 SEQ ID NO:4 中第 1-z 位残基的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列，其中 z 是一个 132-170 范围内的整数；和
- (e) 编码具有 SEQ ID NO:2 中第 m-y 位或者 SEQ ID NO:4 中第 n-z 位残基的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列，其中 m, n, y 和 z 如上面(a), (b), (c)和(d)中所定义的。

7. 一种分离的核酸分子，其包括具有与选自下列一组中的序列至少 95% 相同的核苷酸序列的多核苷酸：

- (a) 编码一种多肽的核苷酸序列，该多肽由 ATCC 保藏号 97810 或者 97809 中的 cDNA 克隆所编码的完整的 TNFR 氨基酸序列的一部分组成，其中所说的一部分不包括所说的 ATCC 保藏号 97810 和 97809 中的一个 cDNA 克隆所编码的完整氨基酸序列的氨基末端的第 1 位到约第 48 位的氨基酸；
- (b) 编码一种多肽的核苷酸序列，该多肽由 ATCC 保藏号 97810 或者 97809 中的 cDNA 克隆所编码的完整的 TNFR 氨基酸序列的一部分组成，其中所说的一部分分别不包括 ATCC 保藏号 97810 和 97809 中的 cDNA 克隆所编码的所说的完整的氨基酸序列的羧基末端的第 1 位到约第 107 位和第 1 位到约第 38 位的氨基酸；

(c)编码一种多肽的核苷酸序列，该多肽由 ATCC 保藏号 97810 或者 97809 中的 cDNA 克隆所编码的完整的 TNFR 氨基酸序列的一部分组成，其中所说的一部分包括分别如上面(a)和(b)中的克隆的任何氨基末端和羧基末端缺失的联合。

8. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其中所说的多核苷酸具有 ATCC 保藏号 97810 或者 97809 中 cDNA 克隆的完整的核苷酸序列。

9. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其中所说的多核苷酸具有编码一种 TNFR 多肽的核苷酸序列，该 TNFR 多肽具有由 ATCC 保藏号 97810 或者 97809 中 cDNA 克隆所编码的完整的氨基酸序列。

10. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其中所说的多核苷酸具有编码一种成熟的 TNFR 多肽的核苷酸序列，该成熟的 TNFR 多肽具有由 ATCC 保藏号 97810 或者 97809 中 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列。

11. 一种分离的核酸分子，其包括一多核苷酸，该多核苷酸在严格的杂交 1 条件下能与具有与权利要求 1 的(a), (b), (c)或(d)的核苷酸序列相同的核苷酸序列的多核苷酸杂交，1 其中所说的能杂交的多核苷酸在严格杂交条件下不能与具有仅由 A 残基或仅由 T 残基组成的核苷酸序列的多核苷酸杂交。

12. 一种分离的核酸分子，其包括一编码具有权利要求 1 的 (a)、(b) (c) 或 (d) 中的氨基酸序列的 TNFR 多肽的带表位部分的氨基酸序列的多核苷酸。

13. 如权利要求 12 所述的核酸分子，其编码一个包括选自下述一组的氨基酸残基的 TNFR 多肽的带表位部分，所述的组为：SEQ ID NO:2 中的从大约 Ala-31 到大约 Thr-46，SEQ ID NO:2 中的从大约 Phe-57 到大约 Thr-117，SEQ ID NO:2 中的从大约 Cys-132 到大约 Thr-175，SEQ ID NO:2 中的从大约 Gly-185 到大约 Thr-194，SEQ ID NO:2 中的从大约 Val-205 到大约 Asp-217，SEQ ID NO:2 中的从大约 Pro-239 到大约 Leu-264，和 SEQ ID NO:2 中的从大约 Ala-283 到

大约 Pro-298，以及 SEQ ID NO:4 中的从大约 Ala-31 到大约 Thr-46，SEQ ID NO:4 中的从大约 Phe-57 到大约 Gln-80，SEQ ID NO:4 中的从大约 Glu-86 到大约 His-106，SEQ ID NO:4 中的从大约 Thr-108 到大约 Phe-119，SEQ ID NO:4 中的从大约 His-129 到大约 Val-138，和 SEQ ID NO: 4 中的从大约 Gly-142 到大约 Pro-166。

14. 一种制备重组载体方法，包括在一个载体中插入权利要求 1 的分离核酸分子。

15. 通过权利要求 14 的方法产生的重组载体。

16. 一种制备重组宿主细胞的方法，包括将权利要求 15 的重组载体导入宿主细胞。

17. 通过权利要求 15 的方法产生的重组宿主细胞。

18. 生产 TNFR 多肽的重组方法，包括在使所说的多肽能够表达并能回收所说的多肽的条件下培养权利要求 17 的重组宿主细胞。

19. 分离的 TNFR 多肽，其包括与选自下述一组中的一个序列至少 95%相同的氨基酸序列：

(a)具有 SEQ ID NO:2 或 4 所示的，或者由 ATCC 保藏号 97810 或者 97809 中的 cDNA 克隆编码的完整氨基酸序列的全长的 TNFR 多肽的氨基酸序列；

(b) 具有 SEQ ID NO:2 中第 31-300 位的或 SEQ ID NO:4 中第 31-170 位的，或者由 ATCC 保藏号 97810 或者 97809 中的 cDNA 克隆编码的氨基酸序列的成熟的 TNFR 多肽的氨基酸序列；

(c)具有 SEQ ID NO:2 中第 31-283 位的或 SEQ ID NO:4 中第 31-166 位的，或者由 ATCC 保藏号 97810 或者 97809 中的 cDNA 克隆编码的氨基酸序列的 TNFR 多肽的可溶性胞外功能区的氨基酸序列。

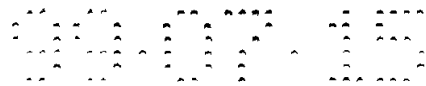
20. 一种包括 TNFR 蛋白的带表位部分的分离的多肽，其中所说的部分选自包括下列氨基酸残基的一组多肽：SEQ ID NO:2 中的从大约 Ala-31 到大约 Thr-46，SEQ ID NO:2 中的从大约 Phe-57 到大

约 Thr-117, SEQ ID NO:2 中的从大约 Cys-132 到大约 Thr-175, SEQ ID NO:2 中的从大约 Gly-185 到大约 Thr-194, SEQ ID NO:2 中的从大约 Val-205 到大约 Asp-217, SEQ ID NO:2 中的从大约 Pro-239 到大约 Leu-264, 和 SEQ ID NO:2 中的从大约 Ala-283 到大约 Pro-298, 以及 SEQ ID NO:4 中的从大约 Ala-31 到大约 Thr-46, SEQ ID NO:4 中的从大约 Phe-57 到大约 Gln-80, SEQ ID NO:4 中的从大约 Glu-86 到大约 His-106, SEQ ID NO:4 中的从大约 Thr-108 到大约 Phe-119, SEQ ID NO:4 中的从大约 His-129 到大约 Val-138, 和 SEQ ID NO:4 中的从大约 Gly-142 到大约 Pro-166。

21. 一种分离的能特异结合权利要求 19 的 TNFR 多肽的抗体。

22. 一种治疗需要 TNFR 多肽活性的患者的方法, 包括对该患者施用权利要求 19 的 TNFR 多肽。

23. 一种治疗需要 TNFR 多肽活性的患者的方法, 包括对该患者施用权利要求 1 的核酸。



## 说明书

### 肿瘤坏死因子受体 6 $\alpha$ 和 6 $\beta$

#### 本发明的领域

本发明涉及编码 TNF 受体家族成员多肽的新的人基因。特别是，提供了分离的用以编码人的称做肿瘤坏死因子受体 6 $\alpha$  和 6 $\beta$ ，在此记为“TNFR-6 $\alpha$  和-6 $\beta$ ”或通称为“TNFR 多肽”的多肽的核酸分子。本文还提供了 TNFR 多肽，以及产生它们的载体、宿主细胞和重组方法。本发明还进一步涉及了用于鉴定 TNFR 多肽活性的兴奋剂和拮抗剂的筛选方法。还提供了利用该组合物的诊断和治疗方法。

#### 本发明的背景

许多生物学作用，例如对某种刺激和正常的生物学过程的反应，都被一些因子比如细胞因子所调控。许多细胞因子通过利用受体并产生细胞内反应而起作用。

例如，肿瘤坏死因子（TNF） $\alpha$  和  $\beta$  就是这样的一类的细胞因子，通过 TNF 受体作用来调控大量的生物学过程，包括抗感染的保护和休克和炎症疾病的感应。TNF 分子属于“TNF 配体”超家族，与它们的受体或反配体，“TNF 受体”超家族，一起作用，迄今已经鉴定了 TNF-配体超家族的 9 个成员并鉴定了 TNF 受体超家族的 10 个成员。

这些配体中包括 TNF- $\alpha$ ，淋巴毒素- $\alpha$ （LT- $\alpha$ ，也被称作 TNF- $\beta$ ），LT- $\beta$ （在复合的异源三聚体 LT- $\alpha$  2- $\beta$  中发现），FasL, CD40L, CD27L, CD30L, 4-1BBL, OX40L 和神经生长因子（NGF）。TNF-受体超家族包括 p55TNF 受体, p75TNF 受体, TNF 受体相关蛋白, FAS 抗原或 APO-1, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, OX40, 低亲和 p75 和 NGF 受体（Meager, A., 生物学, 22: 291-295 (1994)）。

许多的 TNF-配体超家族成员通过活化的 T 细胞表达，这意味着

它们对于 T 细胞与其他细胞类型之间的相互作用是必需的，这是细胞个体发育和执行功能的基础 (Meager, A., 同上)。

通过鉴定和制造突变体而抑制蛋白的表达，已经对几个 TNF-受体超家族成员的基本功能获得了可观的了解。例如，FAS 抗原和其配体中天然存在的突变导致淋巴增生性疾病 (Watanabe-Fukunage, R., 等, 自然, 356: 314 (1992)), 可能反映了细胞程序化死亡失败。CD40 配体的突变可导致 X 连锁的免疫缺损状态，反映为血浆中高水平的免疫球蛋白 M 和低水平的免疫球蛋白 G，表明 T 细胞依赖的 B 细胞的错误活化 (Allen, R.C.等, 科学 259: 990 (1993))。低亲和神经生长因子受体的定向突变可导致一种疾病，其特征为周围组织的错误的感觉更新 (Lee, K.F.等, 细胞 69: 737 (1992))。

TNF 和 LT- $\alpha$  能够结合两种 TNF 受体 (55kd 和 75kd 的 TNF 受体)。TNF 和 LT- $\alpha$  经其受体作用，可引发大量的生物学效应，包括移植肿瘤的出血性坏死，细胞毒性，在内毒性休克中的作用，炎症，免疫调节，增生和抗病毒反应，以及对电离辐射伤害的保护作用。TNF 和 LT- $\alpha$  与大量的疾病的病理发生有关，包括内毒性休克，大脑炎，肿瘤，自身免疫病，艾滋病和移植物-宿主排斥 (Beutler, B.和 Bon Huffel, C., 科学 264:667-668(1994))。p55 受体的突变可导致微生物感染的易感性增加。

此外，接近 TNFR1(p55)和 Fas 的 C 末端的一个约 80 个氨基酸的功能区据报道是一个“死亡功能区”，它与细胞程序化死亡的传导信号相关 (Tartaglia 等, 细胞, 74: 845 (1993))。

细胞凋亡，或细胞程序化死亡是多细胞生物正常发育和动态平衡一个基本的生理过程 (H. Steeler, 科学, 267, 1445-1449 (1995))。细胞凋亡的紊乱可导致几种人类疾病包括癌症，神经变性疾病，和获得性免疫缺损综合症 (C.B.Thompson, 科学, 267, 1456-1462 (1995))。最近的关注集中于两个细胞表面死亡受体 Fas/APO-1 和 TNFR-1 的信号转导和生物学功能 (J.L. Cleveland, J.N. Ihle, 细胞,



81, 479-482 (1995); A. Fraser, G. Evan, 细胞, 85, 781-784 (1996); S.Nagata, P. Golstein, 科学 267, 1449-56 (1995)。两者都是 TNF 受体超家族的成员, 该超家族还包括 TNFR-2, 低亲和 NGFR, CD40, 和 CD30 等等 (C.A.Smith,等, 科学, 248, 1019-23 (1990); M.Tewari, V.M.Dixit, 分子和细胞生物学, M.Purton, Heldin, Carl, 编辑 (Chapman and Hall 出版社, 伦敦, 1995)。通过在其胞外功能区存在富含半胱氨酸的重复序列而确定其家族成员, Fas/APO-1 和 TNFR-1 还具有一个胞内的同源区域, 恰为“死亡功能区”, 它与果蝇的自杀基因 reaper 远源相关 (P. Golstein, D. Marguet, V. Depraetere, 细胞, 81, 185-95 (1995); K.White 等, 科学 264, 677-83 (1994))。从这个共有的死亡功能区推测, 两个受体都作用于一个至今尚未确定的信号转导分子。Fas/APO-1 的活化激活含有死亡功能区的适配分子 FADD/MORT1 (A.M.Chinnaiyan, K.O'Rourke, M. Tewari, V.M.Dixit, 细胞 81, 505-12 (1995)); M.P.Boldin 等, 生物化学杂志 270, 7795-8 (1995); F.C.Kischkel, 等, EMBO 14, 5579-5588(1995)), 后者结合并可能激活细胞凋亡蛋白酶原家族 ICE/CED-3 的一个成员 FLICE/MACH1 (M.Muzio 等, 细胞 85, 817-827 (1996); M.P.Boldin, T.M. Goncharov, Y.V.Goltsev, D.Wallach, 细胞 85, 803-815 (1996))。Fas/APO-1 的中心任务是开启细胞死亡, 而 TNFR-1 可以发出信号指令一系列不同的生物学活性--大多都是从它对 NF- $\kappa$ B 的激活作用分化出来 (L.A.Tartaglia, D.V.Goeddel, 今日免疫学 13, 151-3 (1992))。因此, TNFR-1 结合多价的适配分子 TRADD, 它类似于 FADD, 也含有一个死亡功能区 (H.Hsu, J.Xiong, D.V.Goeddel, 细胞 81, 495-504 (1995); H.Hsu, H.-B. Shu, M.-P. Pan, D.V.Goeddel, 细胞 84, 299-308 (1996))。通过它与一些信号分子包括 FADD, TRAF2, 和 RIP 的结合, TRADD 可以对细胞凋亡和 NF- $\kappa$ B 活化都有信号作用 (H.-B. Shu, M.-P. Pan, D.V.Goeddel, 细胞 84, 299-308 (1996); H.Hsu, J.Huang, H.-B. Shu, V. Baichwal, D.B.Goeddel, 免疫 4, 387-396 (1996))。

TNF 家族配体和 TNF 家族受体的作用是不同的，它们在哺乳动物系统的生物学过程中影响着大量的功能，正常的和异常的都有。因此很明显需要对这些影响生物活性（包括正常的和疾病状态）的受体和配体进行鉴定与确认。特别是需要分离并鉴定 TNF 受体家族中新的成员。

### 本发明概述

本发明提供了分离的核酸分子，其包括一个编码至少一部分的 TNFR-6 $\alpha$  或者 TNFR-6 $\beta$  多肽的多核苷酸，该多肽分别具有如 SEQ ID NOS:2 和 4 所示的完整的氨基酸序列，或者分别由作为 ATCC 保藏号 97810 和 97809 的质粒 DNA 保藏的 cDNA 克隆所编码的完整的氨基酸序列。通过对保藏的 TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  克隆的测序所确定的核苷酸序列，如图 1 和 2 所示（分别为 SEQ ID NOS: 1 和 3），其分别含有编码 300 和 170 个氨基酸残基的开放阅读框，其分别包括在 SEQ ID NOS: 1 和 3 上核苷酸位点 25-27 和 73-75 的编码 N 端甲硫氨酸的起始密码。

本发明的 TNFR 蛋白与其他的 TNF 受体具有序列同源性。剪切变异体 TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  具有与人 TNFR-I 和-II 的 mRNA（图 3）（分别为 SEQ ID NOS:5 和 6）最高水平的序列同源性，也包括多个保守的半胱氨酸富含区。

TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  多肽预计各具有一个 30 个氨基酸的前导序列；预计的成熟的 TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  多肽的氨基酸序列分别如图 1 和图 2 中所示的第 31-300 位（SEQ ID NO:2）和第 31-170 位（SEQ ID NO:4）的氨基酸残基。

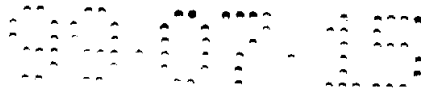
因而，本发明的一个方面是提供了一个分离的核酸分子，其包括一种多核苷酸，其具有选自：（a）编码 TNFR 多肽的核苷酸序列，该 TNFR 多肽具有 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4，或者 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的完整的氨基酸序列；（b）编码成熟的 TNFR 多肽的核苷酸序列，该成熟 TNFR 多肽具有 SEQ ID

NO:2 中的第 31-300 位, 或 SEQ ID NO:4 中的第 31-170 位的氨基酸序列, 或者 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列; (c)编码 TNFR 多肽的可溶性胞外功能区的核苷酸序列, 该 TNFR 多肽的可溶性胞外功能区具有 SEQ ID NO:2 中的第 31-283 位, 或 SEQ ID NO:4 中的第 31-166 位的氨基酸序列, 或者 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列; 和 (d) 与上述(a), (b)和 (c) 中任何一个核苷酸序列互补的核苷酸序列。

本发明的更进一步的实施方案包括分离的核酸分子, 其包括一种多核苷酸, 其具有与上述(a), (b), (c)和 (d) 中任何一个核苷酸序列至少有 90%相同, 优选的至少 95%, 96%, 97%, 98%或 99% 相同的核苷酸序列, 或者一种在严格杂交条件下能与上述(a), (b), (c) 和 (d) 中任何一个多核苷酸杂交的多核苷酸。此可杂交的多核苷酸在严格杂交条件下不能与包括仅由 A 残基或仅由 T 残基组成的核苷酸序列的多核苷酸相杂交。本发明的另一个核酸的实施方案涉及一种分离的核酸分子, 其包括编码具有上述(a), (b)或(c) 中的氨基酸序列的 TNFR 多肽的带表位部分的氨基酸序列的多核苷酸。

本发明还涉及重组载体, 其包括本发明的分离的核酸分子, 及含有该重组载体的宿主细胞, 以及制造此载体和宿主细胞和通过重组技术用以产生 TNFR 多肽或肽的方法。

本发明进而还提供了—个分离的 TNFR 多肽, 其氨基酸序列选自: (a)全长 TNFR 多肽的氨基酸序列, 其具有完整的如 SEQ ID NO:2 或 4 所示的, 或者 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列; (b)成熟的 TNFR 多肽的氨基酸序列, 其具有 SEQ ID NO:2 中的第 31-300 位, 或 SEQ ID NO:4 中的第 31-170 位的氨基酸序列, 或者 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列; (c)TNFR 多肽的可溶性胞外功能区的氨基酸序列, 其具有 SEQ ID NO:2 中的第 31-283 位, 或 SEQ ID NO:4 中的第 31-166 位的氨基酸序列, 或者 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆



所编码的氨基酸序列。

本发明的多肽还包括具有与上述(a), (b)或(c)中所述的任何一个序列至少 80%相同, 优选的至少 90%相同, 更为优选的 95%, 96%, 97%, 98%或 99%相同的氨基酸序列的多肽, 以及具有与以上序列至少 90%相似, 优选的至少 95%相似的氨基酸序列的多肽。

本发明这一方面的另一个实施方案涉及一种肽或多肽, 其包括具有如上述(a), (b)或(c)中所述的氨基酸序列的 TNFR 多肽的带表位部分的氨基酸序列。本发明的具有 TNFR 多肽表位部分的氨基酸序列的肽或多肽包括带有至少 6 个或 7 个, 优选地至少 9 个, 更优选地至少 30 至 50 个氨基酸的这种多肽的部分, 当然任何长度的, 长到包括上述本发明多肽的整个氨基酸序列的带表位多肽也涵盖于本发明之内。

另一个实施方案中, 本发明提供了分离的抗体, 该抗体与具有上述(a), (b)和(c)中所述的任何一个氨基酸序列的 TNFR 多肽特异结合。本发明进而提供了与具有所述氨基酸序列的 TNFR 多肽特异结合的抗体的分离方法。此抗体可如下所述用于诊断和治疗。

肿瘤坏死因子(TNF)家族配体据知属于最为多效的细胞因子, 其导致大量的细胞应答, 包括细胞毒性、抗病毒活性、免疫调节活性和多个基因的转录调控。本发明还提供了包括 TNFR 多肽, 特别是人 TNFR 多肽的药物组合物, 可用于例如治疗感染性疾病如 HIV 感染、内毒性休克、癌症、自身免疫疾病、移植-宿主疾病、急性移植排斥、慢性移植排斥、神经变性疾病、脊髓发育不良综合症、缺血性损伤、毒素诱导的肝病、败血性休克、萎靡不振和食欲减退。还提供了治疗需要 TNFR 多肽个体的方法。

本发明进而提供了包括 TNFR 多核苷酸或 TNFR 多肽的组合物, 用于对细胞或对一个多细胞生物进行体外、回体和体内施用。在本发明这一方面的一个特别优选的实施方案中, 该组合物包括 TNFR 多核苷酸, 用于在宿主生物内表达 TNFR 多肽而治疗疾病。特别优

选的是在人类患者体内表达，以治疗与 TNFR 多肽内源活性的异常相关的功能紊乱。

另一方面，还提供了用于兴奋剂和拮抗剂的筛选试验，其包括确定一个候选化合物对 TNFR 多肽结合 TNF 家族配体的影响。特别是本方法涉及将 TNF 家族配体与 TNFR 多肽和一个候选化合物相接触，并确定 TNFR 多肽与 TNF 家族配体的结合在候选化合物存在下是加强了还是减弱了。在此试验中，TNFR 多肽的结合比标准结合增强了则表明该候选化合物为 TNFR 多肽结合活性的兴奋剂，而 TNFR 多肽的结合比标准结合减弱了则表明该候选化合物为 TNFR 多肽结合活性的拮抗剂。

TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  在内皮细胞、角质化细胞、正常的前列腺和前列腺肿瘤组织中表达。相对于“标准的”TNFR 基因表达水平，即来自无免疫疾病个体的健康组织的 TNFR 基因表达水平而言，在大量的此类组织或细胞的疾病，特别是免疫系统的疾病中，从患病个体的特定组织（如癌变组织）或体液（如血清、血浆、尿、滑液或脊髓液）测出的 TNFR 基因的表达水平显著地增高或降低了。因此，本发明提供了一个诊断方法，可用于此类疾病的诊断，所述方法包括(a)测试一个个体的细胞或体液的 TNFR 基因的表达水平；(b)将此 TNFR 基因表达水平与标准的 TNFR 基因表达水平相比较，当测出的 TNFR 基因表达水平比标准增高了或降低了，则指示出免疫系统存在疾病。

本发明的另一个方面涉及对需要增加体内 TNFR 多肽活性水平的个体进行治疗的方法，包括对该个体施用包括有效治疗剂量的本发明的分离的 TNFR 多肽或其兴奋剂的组合物。

本发明的另一个方面涉及对需要降低体内 TNFR 多肽活性水平的个体进行治疗的方法，包括对该个体施用包括有效治疗剂量的 TNFR 拮抗剂的组合物。用于本发明的优选的拮抗剂是 TNFR 特异性抗体。

## 附图的简要描述

图 1 表示 TNFR-6 $\alpha$  的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1) 和导出的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。

图 2 表示 TNFR-6 $\beta$  的核苷酸序列 (SEQ ID NO:3) 和导出的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)。

图 3 表示使用 DANstar 套件中的 Megline 程序, 通过 Clustal 方法将 TNFR-6 $\alpha$  (“TNFR-6a”) 和 TNFR-6 $\beta$  (“TNFR-6b”) 的氨基酸序列与如下所示的其他 TNF 受体的氨基酸序列做出的排列比较:

TNFR1 (SEQ ID NO: 5); TNFR2 (SEQ ID NO: 6); NGFR (SEQ ID NO: 7); LT $\beta$ R (SEQ ID NO: 8); FAS (SEQ ID NO: 9); CD 27 (SEQ ID NO: 10); CD 30 (SEQ ID NO: 11); CD 40 (SEQ ID NO: 12); 4-1BB (SEQ ID NO: 13); OX40 (SEQ ID NO: 14); VC22 (SEQ ID NO: 15) 和 CRMB (SEQ ID NO: 16)。

图 4 和 5 表示分别对 TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  氨基酸序列的单独分析。表示了  $\alpha$ 、 $\beta$ 、回转和螺旋区; 亲水性和疏水性; 两亲性区; 柔性区; 抗原性指数和表面概率。在“抗原性指数-Jameson-Wolf”图中可能得出蛋白的高抗原区域的位置, 如本发明的表位多肽的区域。

图 6 表示相关于 SEQ ID NO:1 和 3 的 HELDI06R 和 HCEOW38R 的核苷酸序列。

## 详细描述

本发明提供了包括编码 TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  多肽的多核苷酸的分离的核酸分子, 通常, “TNFR 多肽” 分别具有如 SEQ ID NO:2 和 4 所示的氨基酸序列, 它是通过对克隆的 cDNA 测序所确定的。图 1 和 2 中所示的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1 和 3) 通过对 HPHA52 和 HTPCH84 克隆测序而获得, 这两个克隆于 1996 年 11 月 22 日保

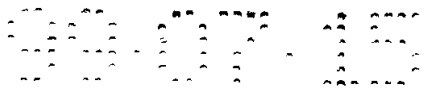
藏于美国典型培养物保藏中心, 12301 Park Lawn Drive, Rockville, Maryland 20852, 保藏号分别为 ATCC97810 和 97809。所保藏的克隆载于 pBluescript SK(-)质粒 (Stratagene, La Jolla, CA) 上。

本发明的 TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  蛋白为剪切变异体, 两个蛋白的 N 末端的 142 个残基具有相同的核苷酸和氨基酸序列。这两个蛋白的氨基酸序列与人 TNFR-2 mRNA 的翻译产物 (图 3) (SEQ ID NO:6) 大约有 23% 相似性, 并与其共享多个保守的半胱氨酸富含区。重要的是, 这些蛋白在它们的胞外功能区具有极高的序列相似性, 其中包括显著亚基间同源的四个重复半胱氨酸富含基序。TNFR-2 被认为专门为 TNF 介导人 T 细胞的增殖 (PCT WO/94/09137)。

## 核酸分子

除非另外说明, 本文中所有的 DNA 测序确定的核酸序列都是通过自动 DNA 测序仪 (如 373 型, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 完成的, 本文中所有的多肽的氨基酸序列都是通过对上面所确定的 DNA 序列翻译推导出的。因此, 正如本领域所知道的, 通过此自动化方法确定的任何 DNA 序列, 以及本文确定的核苷酸序列都可能有一些错误。自动化确定的核苷酸序列相对于所测序的 DNA 分子的真实的核苷酸序列, 典型地至少有 90% 的相同性, 更为典型地至少有大约 95% 至 99.5% 的相同性。真实的序列可以通过本领域所熟知的其他方法包括手动测序方法进行更为精确的测定。同样正如本领域所知道的, 相对于真实的序列, 所测定核苷酸序列中一个单一的插入或缺失将导致该核苷酸序列翻译的移框, 而从所确定的序列导出的氨基酸序列, 从此插入或缺失点之后, 则完全不同于该测序的 DNA 分子所真实编码的氨基酸序列。

一个核酸分子或多核苷酸的“核苷酸序列”, 对于一个 DNA 分子或多核苷酸是指脱氧核糖核苷酸的序列, 对于一个 RNA 分子或多核苷酸是指相应的核糖核苷酸序列 (A,G,C 和 U), 其中在脱氧核糖



核苷酸序列中的胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸(T)被尿嘧啶核糖核苷酸(U)替代。

利用本文所提供的信息，如图 1 和 2 中的序列 (SEQ ID NO:1 和 3)，通过标准的克隆和筛选步骤，诸如以 mRNA 为起始材料克隆 cDNA，可以获得本发明提供的编码 TNFR 多肽的核酸分子。作为本发明的一个例证的是，从下列组织的 cDNA 文库中鉴定出了 TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  克隆 (分别见图 1 和 2)：内皮细胞、角质化细胞、正常的前列腺组织和前列腺肿瘤组织。

图 1 和 2 中确定的 TNFR cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1 和 3) 含有编码 300 和 170 个氨基酸残基的蛋白质的开放阅读框，分别在图 1 和 2 中的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1 和 3) 的第 25-27 和 73-75 位带有一个起始密码子。

TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  基因的开放阅读框与人 TNFR-2 的 mRNA 翻译产物具有序列同源性，包括分别位于 SEQ ID NO: 2 的第 31-283 位残基和 SEQ ID NO:4 的第 31-166 位残基的可溶性胞外功能区。

正如一般技术人员所理解的，由于存在前面所述的测序误差的可能性，保藏的 cDNA 所编码的准确的完整 TNFR 多肽，其中包括大约 300 和 170 个氨基酸，可能长一些或短一些。更为通常的情况下，准确的开放阅读框可能开始于图 1 和 2 (SEQ ID NO:1 和 3) 中的 N 端第一个甲硫氨酸的 $\pm 20$  个氨基酸，更可能的是 $\pm 10$  个氨基酸范围之内，并与各自的翻译序列同框。还应当理解的是，根据用于鉴定不同的功能区的分析标准，TNFR 多肽胞外和跨膜功能区的精确“地址”可能与上面推导的有少许的不同。例如，根据用于鉴定功能区的标准，SEQ ID NO: 2 的胞外功能区的精确位置可能稍微变化 (如移位 1 至 20 个残基，更可能的是 1 至 5 个残基)。在各种情形下，如下文所讨论的，本发明进而提供了在完整多肽的 N 端具有不同的残基缺失的多肽，包括本文所述的在胞外功能区 N 端缺失了一个或多个氨基酸的多肽，其组成了 TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  蛋白



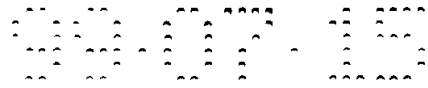
的胞外功能区的可溶性形式。

### **前导和成熟序列**

完整的 TNFR 蛋白的氨基酸序列包括一个前导序列和一个成熟蛋白,如 SEQ ID NO:2 和 4 所示。更具体地,本发明提供了编码 TNFR 蛋白的成熟形式的核酸分子。因此,根据信号假说,一旦通过粗面内质网开始输出生长的蛋白肽链,哺乳动物细胞分泌的蛋白就具有一个信号或分泌前导序列,它可被从完整的多肽上切割下来产生该蛋白的分泌的“成熟的”形式。大多数的哺乳动物细胞和昆虫细胞以相同的特异性切割分泌的蛋白。然而在某些情况下,分泌蛋白的切割并非完全相同的,可能产生两个或多个该蛋白的成熟形式。而且,早已知道的是,一个分泌蛋白的切割特异性最终决定于该完整蛋白的一级结构,即它是该多肽的氨基酸序列所固有的。所以,本发明提供了一个核苷酸序列,其编码具有由 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 编码的氨基酸序列的成熟的 TNFR 多肽。“具有由 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 编码的氨基酸序列的成熟多肽”是指,在哺乳动物细胞(如 COS 细胞,如下所述)中表达产生的该蛋白的成熟形式,它是由保藏的载体内该克隆的人 DNA 序列所编码的完整的开放阅读框所表达的。

此外,预测一个蛋白是否含有分泌前导肽以及该前导序列的切割位点的方法是现有的。例如,McGeoch 的方法(病毒研究,3:271-286 (1985))是利用一个短的 N 端带电荷区和随后的一个完整(未切割的)蛋白的非电荷区的信息。Von Heinje 的方法(核酸研究,14:4683-4690 (1986))是利用切割位点周围的,典型的是-13 至+2 的残基的信息,这里+1 是指成熟蛋白的氨基端。利用这些方法对已知的哺乳动物细胞分泌蛋白这两种方法切割位点的预测的精确性为 75-80% (von Heinje, 同上)。但是,对于一个给定的蛋白这两种方法并不总能得出相同的预测的切割位点。

本文中,推导的完整 TNFR 多肽的氨基酸序列用计算机程序



"PSORT"进行分析，该程序可从 Dr. Kenta Nakai，京都大学化学研究所获得（见 K.Nakai 和 M.Kanehisa，基因组学，14：897-911（1992）），它是一个用于根据氨基酸序列预测蛋白的细胞定位的专业系统。作为计算机预测定位的一部分，McGeoch 和 von Heinje 的方法被结合使用。利用该程序对 TNFR 氨基酸序列的分析得出以下的结果：TNFR-6 $\alpha$  和 TNFR-6 $\beta$  编码的成熟多肽分别具有 SEQ ID NO:2 和 4 的第 31-300 和第 31-170 位残基的氨基酸序列。

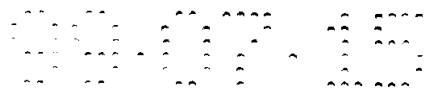
正如所表明的，本发明的核酸分子可是 RNA 形式，如 mRNA，或 DNA 形式，包括，例如 cDNA 和基因组 DNA，它们可通过克隆获得或合成产生。DNA 可以是双链或单链的。单链 DNA 或 RNA 可以是编码链，也称作有义链，或者是非编码链，也被称作反义链。

“分离的”核酸分子是指，一个从其天然环境中取出的核酸分子，DNA 或 RNA。例如，用于本发明目的中的位于载体上的重组 DNA 分子被认为是分离的。另外的分离的 DNA 分子的例子包括保存于异源宿主细胞中的重组 DNA 分子或溶液状态的纯化的（部分或基本）DNA 分子。分离的 RNA 分子包括本发明的 DNA 分子的体内或体外 RNA 转录本。根据本发明，分离的核酸分子进一步还包括经合成产生的这些分子。

本发明中分离的核酸分子包括含有一个开放阅读框(ORF)的 DNA 分子，其带有一个起始密码子，分别位于图 1 和 2 中所示的核苷酸序列（SEQ ID NO:1 和 3）的第 25-27 和 73-75 位残基。

还包括的核酸分子是含有分别编码 SEQ ID NO:2 和 4 中的第 31-300 和 31-170 位残基所示的成熟 TNFR 多肽的 DNA 分子。

此外，本发明中分离的核酸分子包括所含的序列基本上不同于上述的那些序列，但是根据遗传密码简并性仍编码一个 TNFR 蛋白的 DNA 分子。当然，遗传密码和种属特异的密码偏爱性是本领域所熟知的。因此，对于本领域的熟练技术人员来说，常规方法就能产生上述的简并形变异体，例如，以对一特定宿主中的表达优化密



码（如，将人 mRNA 的密码子改变成为细菌宿主如大肠杆菌优选的密码子）。

另一方面，本发明提供了编码 TNFR 多肽的分离的核酸分子，该多肽具有由 ATCC 保藏号 97810 或 97809 保藏质粒上的 cDNA 克隆编码的氨基酸序列。优选地，该核酸分子编码由上述的保藏 cDNA 克隆所编码的成熟多肽。

本发明进而提供了一个分离的核酸分子，其具有图 1 和 2 (SEQ ID NO:1 和 3) 中所示的核苷酸序列，或具有上述保藏克隆所含有的 TNFR cDNA 的核苷酸序列，或具有上述任一序列的互补序列的核酸分子。该分离的分子，特别是 DNA 分子，可作为探针，通过与染色体的原位杂交进行基因作图，并可通过例如 Northern 印记分析，用于检测人组织中 TNFR 基因的表达。

进一步，本发明涉及编码本文所述核苷酸一部分的核酸分子，以及本文所述的分离的核酸分子的片段。特别是，本发明提供了分别具有由 SEQ ID NO:1 和 3 中第 25-924 和 73-582 位部分的序列所组成的多核苷酸。同样提供了编码缺失了末端甲硫氨酸的 TNFR 多肽的多核苷酸，该多核苷酸具有分别相应于 SEQ ID NO:1 和 3 中第 28-924 和 76-582 位部分的序列所组成的核苷酸序列。还提供了此类多核苷酸编码的多肽，此多肽分别具有位于 SEQ ID NO:2 和 4 中第 2-300 和 2-170 位的氨基酸序列。

此外，本发明提供了具有与大部分 SEQ ID NO:1 和 3 相关的核苷酸序列的核酸分子，如下所示：HELDI06R (SEQ ID NO:17) 和 HCEOW38R (SEQ ID NO:18) 与 SEQ ID NO:1 和 3 都相关。优选的是 SEQ ID NO:1 和 3 的多肽片段，但不是 SEQ ID NO:19 或 20，或者 SEQ ID NO:19 或 20 的亚片段。HELDI06R 和 HCEOW38R 的序列如图 6 所示。

更为通常的情况下，具有保藏的 cDNA 的核苷酸序列或者图 1 或 2 所示的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1 和 3) 的分离的核酸分子的

片段是指，至少大约 15 个核苷酸，优选的至少 20 个核苷酸，更为优选的至少 30 个核苷酸，最为优选的至少 40 个核苷酸的片段，它们可如本文所述用作诊断探针或引物。当然，长度 50-300 个核苷酸的大片段也是本发明中有用的，相应于大部分的，如果不是全部的，保藏的 cDNA 的核苷酸序列或者图 1 或 2 所示的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1 和 3) 的片段也是有用的。特别优选的片段含有至少 500 个核苷酸，其与 SEQ ID NO:1 中 500 个连续的核苷酸至少有 95% 相同性。至少 20 个核苷酸长度的片段是指，例如，包括 20 个或更多个，来自保藏的 cDNA 的核苷酸序列或者图 1 或 2 所示的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1 和 3) 的连续的碱基的片段。本发明优选的核酸片段包括编码 TNFR 多肽的带表位部分的核酸分子，如图 4 和 5 所确定的以及下面详细描述。

在另一方面，本发明提供了分离的核酸分子，它包括一种多核苷酸，能在严格杂交条件下与本发明上述的核酸分子例如 ATCC 保藏号 97810 或 97809 保藏的 cDNA 克隆的多核苷酸的部分相杂交。

“严格杂交条件”是指，在下述溶液中 42°C 保温过夜：50% 甲酰胺，5×SSC (150mM NaCl, 15mM 柠檬酸钠)，50mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH7.6)，5×Denhardt's 溶液，10% 硫酸葡聚糖，和 20 μg/ml 变性的，剪切的鲑精 DNA，然后用 0.1×SSC 于 65°C 洗膜。

与多核苷酸的一“部分”杂交的多核苷酸是指，与参照多核苷酸的至少 15 个核苷酸，优选的是至少 20 个核苷酸，更为优选的是 30 个核苷酸，最为优选的是 30-70 个核苷酸 (如 50 个) 杂交的多核苷酸 (DNA 或 RNA)。它们可如上所述或如下面详细描述的，用作诊断探针或引物。

多核苷酸的，例如，“至少 20 个核苷酸长度”的一部分是指，20 个或更多个连续的核苷酸，来自参照多核苷酸的核苷酸序列 (例如，保藏的 cDNA 或者图 1 或 2 所示的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1 或 3))。当然，一个只与聚 A 序列 (如 TNFR cDNA 的 3' 末端的 poly(A))

部分), 或只与互补的 T(或 U)残基延伸序列杂交的多核苷酸, 不包括在本发明的用于与本发明的核酸的一部分杂交的多核苷酸中, 因为这样的多核苷酸可与任何含有聚 A 或其互补延伸序列的核酸分子 (事实上是任何双链的 cDNA 克隆) 相杂交。

正如所表明的, 本发明的编码 TNFR 多肽的核酸分子可包括, 但不限于, 那些本身编码成熟多肽的氨基酸序列的分子; 以及编码成熟多肽的序列和附加序列, 如编码大约 26-35 个氨基酸前导或分泌序列的序列, 诸如前蛋白、原蛋白或前蛋白原序列的核酸分子; 带有或不带有上述的附加编码序列的成熟多肽的编码序列。

本发明的核酸所编码的还有具有附加的、非编码的序列的上述的蛋白序列, 其包括, 但不限于, 例如内含子或非编码的 5'和 3'序列, 诸如转录的、非翻译的序列, 它们在转录、mRNA 加工, 包括剪切和聚腺苷酸化信号中起作用, 如结合核糖体和稳定 mRNA; 附加的编码序列, 可编码附加的氨基酸, 诸如那些可提供其他功能的氨基酸。

因此, 多肽的编码序列可融合一个标记序列, 诸如编码利于纯化融合多肽的肽的序列。在本发明这一方面的某些实施方案中, 标记氨基酸序列是一个六组氨酸肽, 例如 pQE 载体 (QIAGEN, In., 9259 Eton 大街, Chastsworth, CA, 91311) 以及其他载体 (多数可以商业购得) 所提供的标记。如 Gents 等在美国国家科学院进展 86: 821-824 (1989) 所述, 例如, 六组氨酸可方便于融合蛋白的纯化。“HA”标记是另一个有利于纯化的肽, 它相应于流感病毒的血细胞凝聚素蛋白的表位, 在 Wilson 等, 细胞, 37: 767 (1984) 中有所描述。如下面所讨论的, 其他的此类融合蛋白包括在 N-或 C-端与 Fc 融合的 TNFR-5, -6 $\alpha$  或-6 $\beta$ 。

### 变异与突变的多核苷酸

本发明进一步涉及本发明的核酸分子的变体, 其编码 TNFR

多肽的部分、类似物或衍生物。变异体可以是天然存在的，诸如天然的等位基因变异体。“等位基因变异体”是指，占据生物体的一个染色体上特定位置的基因的几种变化形式中的一种。基因 第 II 版，Lewin, B., 主编，John Wiley & Sons, New York (1985)。非天然存在的变异体可利用本领域所知的诱变技术产生。

这些变异体包括那些通过核苷酸取代、缺失或添加产生的变异体。取代、缺失或添加可涉及一个或多个核苷酸。变异体可在编码区，非编码区或同时两者内变异。在编码区内的变化可产生保守的或非保守的氨基酸取代、缺失或添加。这其中特别优选的是沉默取代、缺失或添加，它不改变 TNFR 多肽或其部分的特征和活性。这一点上还特别优选的是保守型取代。

较为优选的是编码具有如 SEQ ID NO:2 和 4 所示氨基酸序列的成熟蛋白或者由保藏的 cDNA 克隆编码的成熟 TNFR 多肽序列的核酸分子。

更为优选的是编码具有如 SEQ ID NO:2 或 4 所示氨基酸序列的蛋白的胞外功能区或者由保藏的 cDNA 克隆编码的 TNFR 氨基酸序列的胞外功能区的核酸分子。

进一步的实施方案包括一种分离的核酸分子，其包括一多核苷酸，该多核苷酸的核苷酸序列与选自下列一组的多核苷酸具有至少 90% 的相同性，优选的是至少 95%，96%，97%，98% 或 99% 的相同性：(a) 编码具有 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4，或者 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的完整的氨基酸序列的 TNFR 多肽的核苷酸序列；(b) 编码具有 SEQ ID NO:2 中的第 31-300 位，或 SEQ ID NO:4 中的第 31-170 位的氨基酸序列，或者 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列的成熟 TNFR 多肽的核苷酸序列；(c) 编码具有 SEQ ID NO:2 中的第 31-283 位，或 SEQ ID NO:4 中的第 31-166 位的氨基酸序列，或者 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列的 TNFR 多肽的可溶性



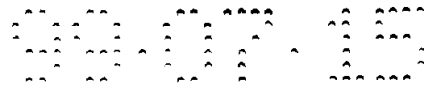
胞外功能区的核苷酸序列；和 (d) 与上述(a), (b)或 (c) 中任何一个核苷酸序列相互补的核苷酸序列。

本发明的更进一步的实施方案包括分离的核酸分子，其包括一种多核苷酸，该多核苷酸具有的序列与上述(a), (b), (c)和 (d) 中任何一个的核苷酸序列至少有 90%相同，优选的至少 95%，96%，97%，98%或 99%相同，或者在严格杂交条件下能与上述(a), (b), (c) 或 (d) 的多核苷酸杂交的多核苷酸。此杂交的多核苷酸在严格的杂交条件下不能与具有仅由 A 残基或仅由 T 残基组成的核苷酸序列的多核苷酸相杂交。本发明的另一个核酸的实施方案涉及一个分离的核酸分子，其包括编码具有上述(a), (b), (c)或 (d) 的氨基酸序列的 TNFR 多肽的带表位部分的氨基酸序列的多核苷酸。

本发明还涉及重组载体，其包括本发明的分离的核酸分子，还涉及含有该重组载体的宿主细胞，以及制造此载体和宿主细胞和通过重组技术用以产生 TNFR 多肽或肽的方法。

具有与编码 TNFR 多肽的参照核苷酸序列至少例如 95% “相同”的核苷酸序列的多核苷酸是指，除了该多核苷酸序列在编码 TNFR 多肽的参照核苷酸序列每 100 个核苷酸中可引入最多 5 个点突变之外，该多核苷酸的核苷酸序列与参照序列相同。就是说，为了获得具有与参照核苷酸序列至少例如 95%相同的核苷酸序列的多核苷酸，最多可将参照序列中的 5%的核苷酸缺失或用其他的核苷酸核苷酸，或者在参照序列中可插入最多相当于参照序列总数的 5%的核苷酸。参照序列上的这些突变可以发生在参照核苷酸序列的 5 ‘或 3’ 端位置或者在两个末端之间的任何地方，在参照序列中它们既可是分散分布的也可是成一组或几组连续分布的。

实际中，确定一特定的核酸分子是否与例如图 1 或 2 中的核苷酸序列或者与保藏的 cDNA 克隆的核苷酸序列具有至少 90%，95%，96%，97%，98%或 99%的相同性，可以方便地利用已知的计算机程序计算，例如 Bestfit 程序 (Wisconsin 序列分析软件包, Version 8 for

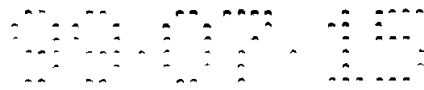


Unix, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)。Bestfit 程序利用 Smith 和 Waterman 的位点同源性算法（应用数学进展 2：482-489（1981））找出两个序列间的同源性最佳片段。当利用 Bestfit 或者其他的程序来确定某一个特定序列与一个参照序列是否具有本发明所说的例如 95%的相同性时，应当设置好参数，诸如在全部长度的参照核苷酸序列上计算相同性的百分比以及允许最高可达参照序列核苷酸总数的 5%的同源性缺口。

本申请涉及与图 1 或 2 所示的核酸序列（SEQ ID NO:1 和 3）或者与保藏的 cDNA 的核酸序列具有至少 90%，95%，96%，97%，98% 或 99%的相同性的核酸分子，而不管其是否编码具有 TNFR 活性的多肽。这是因为即使一个特定的核酸分子并不编码具有 TNFR 活性的多肽，本领域的熟练技术人员也知道如何利用该核酸分子，例如用作杂交探针或聚合酶链反应。本发明的不编码具有 TNFR 活性的多肽的核酸分子的用途特别包括；（1）从一个 cDNA 文库中分离 TNFR 基因或其等位基因变异体；（2）与中期染色体涂片原位杂交（如“FISH”）以确定 TNFR 基因的精确的染色体定位，如 Verma 等在‘人类染色体：基本技术手册’，Pergamon Press, New York(1988) 中所述的；以及 Northern 印迹分析以检测 TNFR mRNA 在特异组织中的表达。

然而优选的是，与图 1 或 2 中的核酸序列（SEQ ID NO:1 和 3）或者与保藏的 cDNA 的核酸序列具有至少 90%，95%，96%，97%，98%或 99%的相同性的，并且确实编码具有 TNFR 活性的多肽的核酸分子。“具有 TNFR 活性的多肽”是指，经某种生物学试验测定，显示出的活性与本发明的成熟型或胞外型 TNFR-6 $\alpha$  或-6 $\beta$  蛋白活性相似、并不需要相同的多肽。TNF 家族配体通过与 TNF 家族受体，包括本发明的 TNFR-6 $\alpha$  和-6 $\beta$ ，的结合诱导各种细胞应答。据信表达 TNFR 蛋白的细胞对 TNFR-I 受体配体，包括 B 淋巴细胞（CD19+），CD4 和 CD8+两种 T 淋巴细胞，单核细胞和内皮细胞具





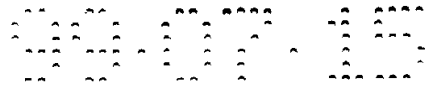
有很强的细胞应答。“对 TNF 家族配体的细胞应答”是指，由 TNF 家族配体诱导的细胞、细胞系、组织、组织培养物或患者中任何基因型、表型、和/或形态学的改变。正如所表明的，这种细胞应答不仅包括对 TNF 家族配体正常的生理应答，也包括与增加的细胞增殖或抑制增加的细胞增殖相关的疾病，如由于细胞凋亡的抑制所导致的增加的细胞增殖。

上述的筛选试验是本领域所熟知的。其中一个这样的筛选试验涉及在一个系统中使用表达该受体的细胞（例如转染的 CHO 细胞），测量由于受体激活而导致的胞外 pH 的变化，如科学 264: 181-296（10 月,1989）中所述。例如，可将一个 TNF 家族配体与表达成熟形式的本发明的受体多肽的细胞接触，并测量第二信使应答，如信号转导或 pH 变化，以确定 TNFR 多肽是否具有活性。

当然，根据遗传密码的简并性，一个本领域中普通的技术人员能够立刻认识到，具有与保藏的 cDNA 的核酸序列或者与图 1 或 2 中的核苷酸序列（SEQ ID NO:1 和 3）具有至少 90%，95%，96%，97%，98%或 99%的相同性的大量的核酸分子编码“具有 TNFR 活性的多肽”。实际上，这些核苷酸序列的简并性变异体都编码相同的多肽，这点对于熟练的技术人员即使不进行上述的比较试验也很清楚。在本领域中还应该认识到，对于非简并性变异体的核酸分子，其中一部分也能编码具有 TNFR 蛋白活性的多肽。这是因为熟练的技术人员非常精通那些不可能或不会明显影响蛋白质功能的氨基酸取代（例如，用一个脂族氨基酸来替换另一个脂族氨基酸），如下文进一步描述的。

### **载体和宿主细胞**

本发明还涉及包括本发明的分离的 DNA 分子的载体，通过基因工程得到的带有重组载体的宿主细胞，以及通过重组技术生产 TNFR 多肽或其片段的方法。载体可以是，例如，噬菌体、质粒、病毒或逆病毒载体。逆病毒载体可以是能够复制的或者复制缺陷的。在后



一种情况下，病毒的繁殖通常只能发生在互补的宿主细胞中。

可将多核苷酸连接到一个含有选择性标记的载体上在宿主中繁殖。通常，将一个质粒载体通过一种沉淀物如磷酸钙沉淀物，或含有带电荷的脂质混合物导入细胞中。如果载体是病毒，可将其用一个适当的包装细胞系体外包装，然后再转导到宿主细胞中。

插入的 DNA 应当可操作地连接于一个适当的启动子，如  $\lambda$  噬菌体的 PL 启动子，大肠杆菌的 lac, trp, phoA 和 tac 启动子，SV40 早期或晚期启动子和逆病毒 LTRs 的启动子，等等。其他合适的启动子为本领域熟练技术人员所熟知。表达构建体进一步还应含有转录起始、终止位点，以及在转录区的一个翻译所需的核糖体结合位点。该构建体表达的转录本编码部分应当优选地包括开始处的一个起始密码子和在多肽翻译结尾处适当位置的一个终止密码子 (UAA, UGA 或 UAG)。

正如所指出的，表达载体优选地应当包括至少一个选择性标记。此类标记包括对于真核细胞培养物的二氢叶酸还原酶，G418 或新霉素抗性以及对大肠杆菌和其他细菌的卡那霉素或氨苄青霉素抗性基因。适当宿主的典型实例包括，但不限于，细菌细胞，诸如大肠杆菌、链霉菌属和鼠伤寒沙门氏杆菌细胞；真菌细胞，诸如酵母细胞；昆虫细胞，诸如果蝇 S2 和秋粘虫 Sf9 细胞；动物细胞，诸如 CHO, COS,293 和 Bowes 黑素瘤细胞；以及植物细胞。上述宿主细胞所用的适当的培养基是本领域所熟知的。细菌中优选使用的载体包括 pQE70, pQE60 和 pQE-9, 可从 QIAGEN,Inc.购得；Phagescript 载体, Bluescript 载体, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, 可从 Stratagene 购得；以及 ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, 可从 Pharmacia 购得。优选的真核载体包括 pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 和 pSG, 可从 Stratagene 购得；以及 pSVK3, pBPV, pMSG 和 pSVL, 可从 Pharmacia 购得。其他合适的载体对于熟练的技术人员很容易找到。可通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离

子脂质体介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他方法有效地将构建体引入宿主细胞。这些方法在许多标准的实验手册中都有描述，诸如 Davis 等的“分子生物学基本方法”（1986）。多肽可以一种修饰的形式表达，诸如融合蛋白，并且不仅可以包括分泌信号，也可以包括附加的异源功能区。例如，可以将一个附加的氨基酸区，尤其是带电荷的氨基酸，加到多肽的 N 端以便在纯化中或在随后的操作和储藏中，提高其在宿主细胞中的稳定性和持久性。也可以在多肽上加入肽基序以利于纯化。这种区域可在多肽最后的制备以前去除掉。在多肽上加入肽基序使之分泌或排出而提高其稳定性并利于纯化，这一点是本领域所熟悉的常规的技术。一个优选的融合蛋白含有一个来自免疫球蛋白的异源区域，以用于稳定和纯化蛋白。例如 EP-A-O 464 533 (加拿大专利 2045869)公开的融合蛋白含有免疫球蛋白分子恒定区的不同部分，及另一种人蛋白或其部分。在许多情况下，融合蛋白的 Fc 部分非常有利于在治疗和诊断中的应用，能导致例如提高的药物动力学特性（EP-A 0232 262）。另一方面，在一些应用中可以设计成在融合蛋白表达、检测和纯化之后能够以有利的方式将 Fc 部分去掉。当 Fc 部分被证明阻碍在治疗和诊断中的应用时应如此操作，例如，当融合蛋白被用作免疫抗原时。在药物发现中，例如，人蛋白如 hIL-5，曾与 Fc 部分融合，为的是在鉴定 hIL-5 的拮抗剂时的高效筛选试验。见 D.Bennett 等，分子识别杂志 8: 52-58 (1995) 和 K. Johanson 等，生物化学杂志 270: 9459-9471 (1995)。

TNFR 蛋白可以通过所熟知的方法，包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水反应层析、亲和层析、羟磷灰石层析、凝聚素层析从重组细胞培养物中回收和纯化。更为优选的是用高效液相层析来纯化。本发明的多肽包括：从天然原料中纯化的产物，包括从体液、组织和细胞中，不论是直接分离或培养的产物；化学合成的产物；以及通过重组技术从

原核或真核细胞中生产的产物，包括例如从细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞中生产的产物。根据重组生产过程中所使用的宿主，本发明的多肽可能是糖基化的或非糖基化的。另外，本发明的多肽在某些情况下由于宿主介导的过程，还可能引入一个起始的甲硫氨酸残基。

### 多肽和片段

本发明进而提供了分离的 TNFR 多肽，其具有由保藏的 cDNA 所编码的氨基酸序列，或者具有 SEQ ID NOS:2 和 4 中的氨基酸序列，或者包括上述多肽的部分的肽或多肽。

### 变异和突变的多肽

为了提高或改变 TNFR 的特性，运用了蛋白质工程技术。可利用本领域熟练技术人员所知道的重组 DNA 技术产生新的突变蛋白，包括单个或多个氨基酸置取代、缺失、增加或融合蛋白。这种修饰的蛋白可表现出例如增强了的活性或增加的稳定性。另外，至少在某些纯化和贮存条件下，它们可比相应的天然多肽以更高的产量纯化并表现出更好的稳定性。

### N 端和 C 端缺失突变体

例如，对于多数蛋白，包括膜相关蛋白的胞外功能区或分泌蛋白的成熟形式，本领域的人员都知道可以将 N 端或 C 端的一个或多个氨基酸去除而不会导致其生物功能的根本丧失。例如 Ron 等，生物化学杂志，268: 2984-2988 (1993) 报道了修饰的 KGF 蛋白即使当 3, 8 或 27 个 N 端残基氨基酸缺失时，仍然具有肝素结合活性。在此，由于本发明的蛋白是 TNFR 多肽家族的成员，因而将 SEQ ID NO:2 和 4 (TNFR-6 $\alpha$  和 -6 $\beta$ ) 中 N 端的氨基酸直至第 49 位的半胱氨酸缺失，仍可保持其一些例如调控淋巴样细胞增殖和凋亡的生物学活性。更进一步包括 SEQ ID NO:2 和 4 中 C49 残基在内的缺失的多肽，据推测将不再保持这些生物活性，因为已知 TNFR 相关多肽



的这些残基要用于形成二硫键以提供受体结合和信号转导所需的结构稳定性。

但是，即使蛋白缺失了一个或多个 N 端氨基酸的修饰而导致该蛋白丧失了一个或多个生物学活性，其他的生物学活性仍然可能还保持着。因此，当 TNFR 的完整蛋白或其胞外部分的非大部分的 N 端残基缺失后，变短的蛋白仍然可以保持诱导和/或结合抗体的能力，该抗体可识别 TNFR 的完整蛋白或其胞外部分。一个特定的缺失了完整蛋白的 N 端残基的多肽是否能够保持这种免疫活性，可以方便地通过本文所述的或其他本领域所知道的常规方法来确定。

因此，本发明还进一步提供了在 SEQ ID NO:2 和 4 中所示的 TNFR 序列的 N 端氨基酸中缺失了一个或多个残基直至第 49 位的半胱氨酸的多肽，以及编码这些多肽的多核苷酸。特别是，本发明提供了分别含有 SEQ ID NO:2 和 4 中的第 m-300 和 n-170 位残基的氨基酸序列的 TNFR-5 多肽，这里的 m 和 n 是 1-49 的整数，49 是完整的 TNFR-6 $\alpha$  和-6 $\beta$  多肽（分别如 SEQ ID NO:2 和 4 所示）中第一个半胱氨酸的位置，据信它是 TNFR-6 $\alpha$  和-6 $\beta$  多肽活性所必需的。

尤其是，本表明提供了编码具有下列氨基酸残基序列的多肽的多核苷酸：SEQ ID NO:2 的第 1-300, 2-300, 3-300, 4-300, 5-300, 6-300, 7-300, 8-300, 9-300, 10-300, 11-300, 12-300, 13-300, 14-300, 15-300, 16-300, 17-300, 18-300, 19-300, 20-300, 21-300, 22-300, 23-300, 24-300, 25-300, 26-300, 27-300, 28-300, 29-300, 30-300, 31-300, 32-300, 33-300, 34-300, 35-300, 36-300, 37-300, 38-300, 39-300, 40-300, 41-300, 42-300, 43-300, 44-300, 45-300, 46-300, 47-300, 48-300 和 49-300 位；以及 SEQ ID NO:4 的第 1-170, 2-170, 3-170, 4-170, 5-170, 6-170, 7-170, 8-170, 9-170, 10-170, 11-170, 12-170, 13-170, 14-170, 15-170, 16-170, 17-170, 18-170, 19-170, 20-170, 21-170, 22-170, 23-170, 24-170, 25-170, 26-170, 27-170, 28-170, 29-170, 30-170, 31-170, 32-170, 33-170, 34-170, 35-170, 36-170, 37-170, 38-170, 39-170, 40-170, 41-170, 42-170, 43-170, 44-170,

45-170, 46-170, 47-170, 48-170 和 49-170 位。还提供了编码这些多肽的多核苷酸。

类似地，也已知许多具有生物学活性的 C 端缺失的突变蛋白的例子。例如， $\gamma$  白介素缺失了羧基端 8-10 个氨基酸残基后表现出高 10 倍的活性 (Dobeli 等, 生物技术杂志, 7: 199-216 (1988))。在此, 本发明的蛋白是 TNFR 多肽家族的成员, 因而分别将 SEQ ID NO:2 和 4 中 C 端的氨基酸直至第 193 位和 132 位的半胱氨酸缺失, 仍可保持其一些例如调控淋巴样细胞增殖和凋亡的生物学活性。更进一步包括 SEQ ID NO:2 和 4 中第 193 位和 132 位的半胱氨酸在内的缺失多肽, 据推测将不再保持这些生物活性, 因为我们知道 TNFR 相关多肽中的的这些残基要用于形成二硫键, 以提供受体结合所需的结构稳定性。

但是, 即使蛋白缺失了一个或多个 C 端氨基酸的修饰而导致该蛋白丧失了一个或多个生物学活性, 其他的生物学活性仍然可能还保持着。因此, 当 TNFR 的完整蛋白或其成熟形式的非大部分的 C 端残基缺失后, 变短的蛋白仍然可以保持诱导和/或结合抗体的能力, 该抗体可识别 TNFR 的完整蛋白或其成熟形式。一个特定的缺失了完整蛋白的 C 端残基的多肽是否能够保持这种免疫活性, 可以方便地通过本文所述的或其他本领域所知道的常规方法来确定。

因此, 本发明进一步提供了在 SEQ ID NO:2 和 4 中所示的 TNFR-6  $\alpha$  和 6  $\beta$  序列的羧基端氨基酸中缺失了一个或多个残基直至分别位于 SEQ ID NO:2 和 4 中的第 193 和 132 位的半胱氨酸的多肽, 以及编码这些多肽的多核苷酸。特别是, 本发明提供了具有分别在 SEQ ID NO:2 和 4 的氨基酸序列的第 1-y 和 1-z 位残基的氨基酸序列的多肽, 这里的 y 是 193-300 范围内的整数, z 是 132-170 内的整数。还提供了编码这些多肽的多核苷酸。

本发明还提供了在氨基端和羧基端都有一个或多个氨基酸缺失的多肽, 其可通常描述为具有 SEQ ID NO:2 的第 m-y 位残基和 SEQ ID

NO:4 的第  $n-z$  位残基，这里的  $m, n, y$  和  $z$  是如上所述的整数。

本发明还包括一个核苷酸序列，其编码的多肽由 ATCC 保藏号 97810 和 97809 的 cDNA 所编码的完整的 TNFR 氨基酸序列的一部分组成，该部分不包括分别由 ATCC 保藏号 97810 和 97809 的 cDNA 所编码的完整的氨基酸序列中氨基端的第 1 至约 49 位氨基酸；或者不包括分别由 ATCC 保藏号 97810 和 97809 的 cDNA 所编码的完整的氨基酸序列中羧基端的第 1 至约 107 或 58 位氨基酸；或者分别由 ATCC 保藏号 97810 和 97809 的 cDNA 所编码的完整的氨基酸序列中上述的氨基端和羧基端的缺失的任何联合形式。还提供了编码所有上述的缺失突变多肽形式的多核苷酸。

### 其他突变体

除了上述讨论的蛋白末端缺失形式之外，本领域普通的技术人员可认识到，可以改变 TNFR 多肽中的一些氨基酸序列而对蛋白的结构或功能没有显著的影响。如果考虑序列中的这些改变，则应考虑该蛋白中存在的决定活性的关键区域。

因此，本发明进而包括表现出基本的 TNFR 多肽的活性或含有如下文所讨论的蛋白部分的 TNFR 蛋白区域的 TNFR 多肽变异体。这种突变体包括缺失、插入、翻转、重复和根据本领域所知道的基本规则选择的几乎不影响活性的类型取代。例如，关于如何制造表型沉默型氨基酸取代的指导可参见 Bowie, J. U.等“蛋白质科学中的信息解译：氨基酸取代的耐受性”，科学 247：1306-1310（1990），文中作者指出，有两个方法来研究氨基酸改变的耐受性。第一种方法基于进化的过程，即突变被自然选择接受或被拒绝。第二种方法利用遗传工程在克隆基因的特定位点引入氨基酸变化，并选择或筛选来确定保持功能的序列。正如作者所述，这些研究揭示出蛋白质具有惊人的氨基酸取代的耐受性。作者进一步指出，氨基酸的改变在蛋白质的某一位点是可能被许可的。例如，大部分埋藏在内部的氨基酸残基要求非极性侧链，而表面氨基酸侧链特性很少是保守的。

其他的这类表型沉默型取代如 Bowie, J. U 等 同上, 的文中所述, 可参阅。典型的保守取代是在脂族氨基酸 Ala, Val, Leu 和 Ile 中以一个替换另一个; 羟基残基的 Ser 和 Thr 间的互换, 酸性残基 Asp 和 Glu 间的互换, 酰胺残基 Asn 和 Gln 之间的互换, 碱性残基 Lys 和 Arg 之间的互换以及芳香族残基 Phe, Tyr 之间的替换。因此, SEQ ID NO:2, 4 或 6 中多肽的, 或者由保藏的 cDNA 编码的多肽的片段、衍生物或类似物可以是 (i) 其中的一个或多个氨基酸残基被保守的或非保守的氨基酸残基 (优选的是保守的氨基酸残基) 所取代, 且取代的氨基酸残基可以由或不由遗传密码所编码, 或 (ii) 其中的一个或多个氨基酸残基包括一个取代基团, 或 (iii) 其中的成熟的或可溶性胞外多肽与另一个化合物融合, 诸如延长该多肽半衰期的化合物 (例如聚乙二醇), 或 (iv) 其中附加的氨基酸与上述的多肽形式融合, 诸如 IgG Fc 融合区域肽、或前导或分泌序列、或可用于纯化上述多肽形式的一个序列或蛋白原序列。这些片段、衍生物或类似物被认为是本领域熟练技术人员能够从本文的教导中了解到的。

因此, 本发明的 TNFR 可包括一个或多个氨基酸取代、缺失或插入, 可以是来自天然的突变体也可以是人工制造的。正如所指出的, 优选的是较小的特性变化, 诸如不显著影响蛋白的折叠或活性的保守的氨基酸取代 (见表 1)。



表 1: 保守的氨基酸取代

芳香类	苯丙氨酸 色氨酸 酪氨酸
疏水类	亮氨酸 异亮氨酸 缬氨酸
极性	谷氨酰胺 天冬酰胺
碱性	精氨酸 赖氨酸 组氨酸
酸性	天冬氨酸 谷氨酸
小分子的	丙氨酸 丝氨酸 苏氨酸 甲硫氨酸 甘氨酸

本发明的 TNFR 多肽中对功能关键的氨基酸可以通过本领域所熟知的方法来确定，诸如定点突变或丙氨酸筛选诱变（Cunningham 和 Wells, 科学 244:1081-1085(1989)）。后一种方法在分子的各个残基上引入单个丙氨酸。然后检测得到的突变分子的生物学活性，如受体结合或体内或体外的增殖活性。

特别令人感兴趣的是，将带电荷的氨基酸用其他的带电荷的或中性的氨基酸来取代，以产生具有改进特性如低聚集作用的蛋白。聚集作用可能不仅会降低活性而且可能会在制备药物配制品中产生问题，因为聚集物可能是免疫原性的（Pinckard 等，临床实验免疫 2: 331-340 (1967); Robbins 等，糖尿病 36: 838-845 (1987)); Cleland 等，治疗药物载体系统 10: 307-377 (1993)）。

氨基酸的替换也可以改变配体对细胞表面受体结合的选择性。例如，Ostade 等，自然 361: 266-268 (1993) 描述了某种突变导致了 TNF- $\alpha$  只与两种已知类型 TNF 受体中的一种选择性地结合。对于配体-受体结合关键的位点可以通过结构分析来确定，诸如晶体稳定性，核磁共振或光亲和标记 (Smith 等，分子生物学杂志 224: 899-904 (1992)) 和 de Vos 等，科学 255: 306-312 (1992))。

由于 TNFR-6  $\alpha$  和-6  $\beta$  是 TNF 受体相关蛋白家族的成员，所以产生的突变优选的是在编码 TNFR 保守的胞外功能区的氨基酸的序列上，更为优选的是在此区域上 TNF 受体家族成员中不保守的残基，从而调整而非完全消除 TNFR 的活性。包括编码上述的 TNFR 突变体的核酸序列的分离的多核苷酸也是本发明的一个组成部分。

本发明的多肽优选地以分离的形式提供，且优选地是基本纯化的。重组生产的 TNFR 多肽可以通过 Smith 和 Johnson, 基因 67:31-40(1988)所描述的一步法进行基本的纯化。本发明的多肽也可以利用本发明的抗 TNFR-6  $\alpha$  和-6  $\beta$  的抗体，按照本领域所熟知的蛋白纯化的方法，从天然或重组资源中纯化。

本发明进而提供了分离的 TNFR 多肽，其包括选自以下一组之中的氨基酸序列：(a) 全长 TNFR 多肽的氨基酸序列，它具有如 SEQ ID NO:2 或 4 所示的，或者由 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的完整的氨基酸序列；(b)成熟的 TNFR 多肽的氨基酸序列，它具有如 SEQ ID NO:2 中第 31-300 位或 SEQ ID NO:4 中第 31-170 位所示的，或者由 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列；(c)TNFR 多肽的可溶性胞外功能区的氨基酸序列，它具有如 SEQ ID NO:2 中第 31-283 位或 SEQ ID NO:4 中第 31-166 位所示的，或者由 ATCC 保藏号 97810 或 97809 的 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列。

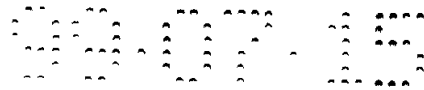
进一步，本发明的多肽还包括与上述的那些多肽具有至少 90% 相似性的，优选的是至少 95%相似性的，且更为优选的是至少 96%，

97%，98%或 99%相似性的多肽。本发明的多肽还包括那些与由保藏的 cDNA 所编码的多肽或者与如 SEQ ID NO:2 或 4 的多肽具有至少 80%相同性的，优选的是至少 90%或 95%相同性的，且更为优选的是至少 96%，97%，98%或 99%相同性的多肽，还包括由这些多肽的至少 30 个氨基酸且优选的至少 50 个氨基酸形成的部分。

两个多肽的“%相似性”是指，利用 Bestfit 程序（Wisconsin 序列分析软件包，Version 8 for Unix, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711）并以相似性确定的省缺参数设置，比较两个多肽的氨基酸序列而获得的相似性得分。Bestfit 程序利用 Smith 和 Waterman 的位点同源性算法（应用数学进展 2：482-489（1981））找出两个序列间的相似性的最佳片段。

一个多肽具有的氨基酸序列与一个 TNFR 多肽的参照氨基酸序列至少例如 95%以上“相同”是指，除了在 TNFR 多肽的参照氨基酸序列每 100 个氨基酸中可引入最多 5 个氨基酸改变之外，该多肽的氨基酸序列与参照序列相同。就是说，为了获得一个具有与参照氨基酸序列至少例如 95%以上的相同的氨基酸序列的多肽，最多可将 5%的参照序列中的氨基酸缺失或用其他的氨基酸取代，或者在参照序列中可插入最多相当于参照序列总数的 5%的氨基酸。参照序列上的这些改变可以发生在参照的氨基酸序列的氨基或羧基端位置或者在两个末端之间的任何地方，在参照序列中它们既可是分散分布的也可是成一组或几组连续分布的。

实际中，确定一特定的多肽是否与例如 SEQ ID NO:2 或 4 中的氨基酸序列或者与由保藏的 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列具有至少 90%，95%，96%，97%，98%或 99%的相同，可以方便地利用已有的计算机程序计算，例如 Bestfit 程序（Wisconsin Sequence Analysis Package 软件包，Version 8 for Unix, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711）。当利用 Bestfit 或者其他的程序来确定某一个特定序列与一个参照序列是否具有本发明所说的例如



95%的相同性时，应当设置好参数，诸如在全部长度的参照的氨基酸序列上计算相同性的百分比以及允许最高可达参照序列氨基酸总数的 5%的同源性缺口。

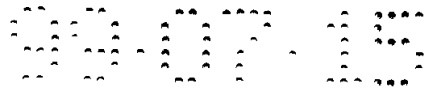
本发明的多肽可以通过本领域所熟知的方法，在 SDS-PAGE 或分子筛凝胶过滤柱上用作分子量标准。

如下面所详细描述，本发明的多肽也可以用来产生多克隆和单克隆抗体，其可用于检测 TNFR 蛋白的表达的试验中或者作为能够增强或抑制 TNFR 蛋白功能的兴奋剂或拮抗剂。而且，这些多肽可以用于酵母的双杂交系统以“捕获”TNFR 蛋白的结合蛋白，它们也是本发明所说的候选的兴奋剂或拮抗剂。酵母的双杂交系统描述于 Field 和 Song, 自然 340: 245-246 (1989)。

### 带表位的部分

另一方面，本发明提供了一种肽或多肽，其包括本发明多肽的带表位的部分。该多肽部分的表位是本发明多肽的一个免疫原性的或抗原性的表位。“免疫原性表位”是指当整个蛋白是一个免疫原时，蛋白上引起抗体反应的部分。另一方面，蛋白分子上能够与抗体结合的区域被称作“抗原性表位”。一个蛋白的免疫原性表位的数量通常比抗原性表位的数量要少。可参见，例如 Geysen 等, 美国科学院进展 81: 3988-4002 (1983)。

对于选择带有一个抗原性表位（即含有能被抗体结合的蛋白分子的区域）的肽或多肽，本领域的技术人员都知道，相对短的、模拟部分蛋白序列的合成肽通常能够引起与该部分模拟的蛋白反应的抗血清。见，例如，Sutcliffe, J. G., Shinnick, T.M., Green, N.和 Learner, R. A.(1983)"与蛋白上预定位点反应的抗体" 科学, 219: 660-666。能够引起与蛋白反应的血清的肽常常体现在蛋白的初级结构上，可以通过一套简单的化学法则鉴定，并且限于既非完整蛋白的免疫功能区（如免疫原性表位）也非氨基或羧基末端。本发明的带抗原性表位的肽和多肽因而可用于产生与本发明的多肽特异结合的抗体，



包括单克隆抗体。见，例如，Wilson 等，细胞 37:767-778(1984)的 777 页。

本发明的带抗原性表位的肽和多肽优选地含有至少 7 个，更优选的是至少 9 个及更为优选的是 15 到 30 个本发明的多肽的氨基酸序列中的氨基酸的序列。能够用于产生 TNFR 特异性抗体的抗原性肽或多肽的非限制性实例包括：一个含有 SEQ ID NO:2 中从大约 Ala-31 到大约 Thr-46，从大约 Phe-57 到大约 Thr-117，从大约 Cys-132 到大约 Thr-175，从大约 Gly-185 到大约 Thr-194，从大约 Val-205 到大约 Asp-217，从大约 Pro-239 到大约 Leu-264，和从大约 Ala-283 到大约 Pro-298，以及 SEQ ID NO:4 中从大约 Ala-31 到大约 Thr-46，从大约 Phe-57 到大约 Gln-80，从大约 Glu-86 到大约 His-106，从大约 Thr-108 到大约 Phe-119，从大约 His-129 到大约 Val-138，和从大约 Gly-142 到大约 Pro-166 的氨基酸残基的序列。通过 Jameson-Wolf 抗原性指数分析，如图 4 和 5 所示，这些多肽片段已经确定分别带有 TNFR-6 $\alpha$  和-6 $\beta$  多肽的表位。

本发明的带表位的肽和多肽可通过任何方便的方法生产。见，例如，Houghten, R. A. (1985)"大量肽的快速固相合成的一般方法：在各个氨基酸水平上的抗原性抗体反应的特异性" 美国科学院研究进展 82: 5131-5135；“同时多个肽合成 (SMPS)”过程在 Houghten 等的美国专利 No. 4,631,211 中有所描述。

按照本领域所熟知的方法，本发明的带表位的肽和多肽可用于诱导抗体。见，例如，Wilson 等，同上；Chow, M.等，美国科学院研究进展 82: 910-914；和 Bittle, F. J.等，遗传病毒学杂志 66: 2347-2354 (1985)。本发明的带免疫原性表位的肽，例如，当整个蛋白是一个免疫原时，蛋白上引起抗体反应的部分，它可按照本领域所熟知的方法得到鉴定。见，例如，Geysen 等，同上。另外，Geysen 的美国专利 No.5,194,392(1990)中描述了一个一般的方法，用以检测或确定在拓扑学上相当一个表位的单体（氨基酸或其他化合物）的

序列，该单体与所研究的抗体特定的互补位（抗原的结合位点）相互补。更通常的时，Geysen 的美国专利 No.4,433,092(1989)中描述了一个方法，用以检测或确定在拓扑学上相当一个表位的单体的序列，该单体与所研究的特定受体的配体结合位点相互补。类似的，Huoghten 等在关于过烷基化寡肽化合物的美国专利 No. 5,480,971 中公开了线性 C1-C7-烷基过烷基化的寡肽和这类肽的套件和文库，以及将此类寡肽套件和文库用于确定优选结合所研究受体的过烷基化寡肽序列的方法。因此，可以通过这些方法来制造本发明的带表位的肽的非肽类似物。

### 融合蛋白

正如本领域熟练技术人员所理解的，上述的本发明的 TNFR 多肽和带表位的片段可以与免疫球蛋白（IgG）的恒定区的部分相联合，形成嵌合蛋白。这种融合蛋白有利于纯化并在体内表现出半衰期延长。显示出这点的比如，含有人 CD4-多肽的前两个功能区和哺乳动物免疫球蛋白的重链或轻链的恒定区中不同功能区域的融合蛋白（EP A 394,827; Traunecker 等，自然 331: 84-86 (1988)）。具有二硫键连接的二聚体的融合蛋白由于 IgG 部分的原因，可以比单体的 TNFR 蛋白或单独的蛋白片段更为有效地结合并中和其他的分子（Founto  $\mu$  lakis 等，生物化学 270: 3958-3964 (1995)）。

### 抗体

用于本发明的 TNFR 特异性蛋白，可以通过抗完整的 TNFR-6  $\alpha$  和-6  $\beta$  多肽或其抗原性多肽片段而产生，这些蛋白或片段可以与一个载体蛋白，诸如白蛋白，一起提供给一个动物系统，或者，如果足够长（至少 25 个氨基酸），也可不带载体。

在此使用的术语“抗体”（Ab）或“单克隆抗体”（Mab）是指，包括能够特异结合一个 TNFR 蛋白的完整分子以及抗体片段（诸如，例如，Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段）。Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段缺少完整抗体的 Fc 片段，在循环中可迅速清除，且比完整抗体可具有更少的非特异组

织结合 (Wahl 等, 核医学杂志 24: 316-325 (1983))。因而这些片段是优选的。

本发明的抗体可通过各种方法制备。例如, 将细胞表达的 TNFR 蛋白或其片段对一个动物施用, 以诱导含有多克隆抗体的血清的产生。在一个优选的方法中, TNFR 蛋白产物的制备和纯化应当使其基本上没有天然污染。在将这样的制备物引入一个动物体内以生产高特异活性的多克隆抗血清。

在更为优选的方法中, 本发明的抗体是单克隆抗体。这样的单克隆抗体可以通过杂交瘤技术制备(Kohler 等, 自然 256: 495 (1975); Kohler 等, 欧洲免疫学杂志 6:511(1976); Kohler 等, 欧洲免疫学杂志 6:292(1976); Hammerling 等, 单克隆抗体和 T 细胞杂交瘤, Elsevier, N.Y., (1981) pp. 563-681)。通常, 这些方法涉及, 用 TNFR 蛋白抗原或, 更优选的是, 表达 TNFR 的细胞, 免疫动物 (优选的是小鼠)。适当的细胞可以根据它结合抗-TNFR-6 $\alpha$  和-6 $\beta$  蛋白的能力来选择。该细胞可以培养于任何适当的组织培养基中; 但是, 优选的是将细胞培养于 Earle 修改的 Eagle 培养基中, 补加 10%胎牛血清 (56°C 灭活), 并补加约 10g/l 的非必需氨基酸, 约 1000U/ml 青霉素, 和约 100  $\mu$  g/ml 链霉素。抽提该小鼠的脾细胞并与适当的骨髓瘤细胞系融合。任何适当的骨髓瘤细胞系都可用于本发明; 但是优选的是使用亲代骨髓瘤细胞系 (SP2O), 可从美国类型培养物保藏中心, Rockville, Maryland 获得。融合后, 得到的杂交瘤细胞在 HAT 培养基中选择性保存, 然后按照 Wands 等 (胃肠病学, 80: 225-232 (1981)) 中所述的限制稀释克隆。然后, 对这样选择的杂交瘤细胞试验, 确定能分泌可结合目的 TNFR 抗原的克隆。

另外, 通过利用抗独特型抗体的两步法, 生产可结合 TNFR 抗原的其他抗体。这种方法是利用抗体本身是一种抗原的原理, 因而, 可以获得一个结合另一个抗体的抗体。根据此方法, 将 TNFR 蛋白特异抗体用于免疫动物, 优选的是小鼠。用该动物的脾细胞产生杂

交瘤细胞，筛选该杂交瘤细胞以鉴定产生抗体的克隆，该抗体能够与可被 TNFR 蛋白抗原阻断的 TNFR 蛋白特异性抗体相结合。该抗体包括抗 TNFR 蛋白特异性抗体的抗独特型抗体，可用以免疫动物以产生进一步的 TNFR 蛋白特异性抗体。

可以理解的是，本发明的抗体的 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 和其他的片段可按照本文在此公开的方法使用。这些片段典型地可以通过蛋白水解裂解产生，利用诸如木瓜蛋白酶（产生 Fab 片段）或胃蛋白酶（产生 F(ab')<sub>2</sub> 片段）。或者，可通过应用重组 DNA 技术或通过化学合成，生产 TNFR 蛋白结合片段。

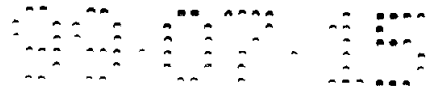
对于抗-TNFR 在人体内的应用，优选的是使用“人源的”嵌合单克隆抗体。这种抗体可利用上述的产生单克隆抗体的杂交瘤细胞衍生的遗传构建体来生产。用于产生嵌合抗体的方法为本领域所熟知。见，综述，Morrison, 科学 229: 1202 (1985); Oi 等, 生物技术 4: 214 (1986); Cabilly 等, 美国专利号 4,816,567; Taniguchi 等, EP 171496; Morrison 等, EP 173494; Neuberger 等, WO 8601533; Robinson 等, WO8702671; Boulianne 等, 自然 312: 643 (1984); Neuberger 等, 自然 314: 268 (1985)。

## 免疫系统相关疾病

### 诊断

本发明发现 TNFR-6 $\alpha$  和-6 $\beta$  在造血和转化组织中表达。对于大量的免疫系统相关疾病，可以检测来自患此疾病的个体的免疫系统组织或其他细胞或体液中 TNFR 基因表达水平的实质变化（增高或降低），比较于一个“标准的” TNFR 基因表达水平，即来自未患免疫系统疾病的个体的免疫系统组织或体液中 TNFR 基因表达水平。因此，本发明提供了一种用于诊断免疫系统疾病的方法，即测量来自一个个体的免疫系统组织或其他细胞或体液中编码 TNFR 蛋白的基因表达水平，将测出表达水平与的一个标准的 TNFR 基因表





达水平相比较，如果该基因的表达水平比标准的增高或降低，则表示出免疫系统的疾病。

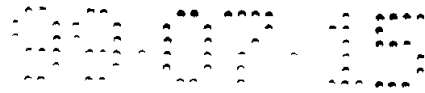
特别是，据信患有癌症的哺乳动物某些组织，表达的 TNFR 蛋白和编码 TNFR 蛋白的 mRNA 的水平，比相应的“标准”水平显著降低。而且，据信，与未患癌症的该中哺乳动物的血清相比较，可以检测出降低的 TNFR 蛋白水平。

因此，本发明提供了一种用于诊断免疫系统疾病包括癌症的方法，即测量来自一个个体的免疫系统组织或其他细胞或体液中编码 TNFR 蛋白的基因表达水平，将测出表达水平与的一个标准的 TNFR 基因表达水平相比较，如果该基因的表达水平比标准的增高或降低，则表示出免疫系统的疾病。

诊断免疫系统疾病包括诊断肿瘤已有常规的方法可以进行，但是本发明可用作一种预测性指示，表现出低下的基因表达水平的患者，相对于基因表达水平接近标准的患者来说，将会遇到更糟的临床问题。

“测定编码 TNFR 蛋白的基因的表达水平”是指，在第一个生物样品中，直接地（例如，通过测量或估算绝对的蛋白水平或 mRNA 水平）或者相对地（例如，通过比较第二个生物样品中 TNFR 蛋白水平或 mRNA 水平），定性或定量地测量或估算 TNFR-6 $\alpha$  和/或 6 $\beta$  的水平或编码 TNFR-6 $\alpha$  和/或 6 $\beta$  的 mRNA 的水平。优选的是，在第一个生物样品中测量或估算绝对的蛋白水平或 mRNA 水平，并与一个标准的 TNFR 蛋白水平或 mRNA 水平相比较，该标准是从一个未患有该疾病的个体的第二个生物样品学中获得，或者是通过未患有免疫系统疾病的个体的群体平均水平而确定的。正如本领域人员所理解的，一旦知道了标准的 TNFR 蛋白水平或 mRNA 水平，它们就可以作为标准重复地用于比较中。

“生物样品”是指，从一个个体中获得的任何生物样品，体液、细胞系、组织培养物、或者其他含有 TNFR 蛋白或 mRNA 的



来源。正如所指出的，生物学样品包括体液（诸如血清、血浆、尿、滑液和脊髓液），它们含有 TNFR 蛋白的游离的胞外功能区（或可溶性形式），免疫系统组织，和其他的发现有表达完整的 TNFR 或其胞外功能区的组织来源。从哺乳动物中获得活组织或体液的方法是本领域所熟知的。当生物学样品包括 mRNA 时，活组织是优选的来源。

本发明还涉及将本发明的基因用于诊断 TNFR 基因中的突变。例如，如果有一个突变存在于本发明的基因中，那么，本发明的受体多肽产物的缺乏将会导致疾病状态。而且，增强受体多肽活性的突变将会导致与受体多肽过量表达相关的疾病，例如，内毒性休克。基因中的突变可以通过对缺陷基因和正常基因的比较来检测。然后就可以查证突变基因与一种疾病状态相关或者对一种疾病状态的易感性。就是说，导致本发明的受体多肽低表达的突变将导致 TNF 不能够抑制肿瘤的生长。

其他可以通过上述试验诊断的免疫系统疾病包括高敏反应、变态反应、感染性疾病、移植-宿主疾病、免疫缺损、自身免疫疾病、等等。

在本发明的基因上带有突变的个体可以在 DNA 水平上通过各种技术检测。用于诊断的核酸可以从患者的细胞，诸如血液、尿、唾液和其他组织的活组织中获得。基因组 DNA 可以直接用于检测或者在分析前通过 PCR(Saiki 等，自然，324：163-164（1986）)进行酶学扩增。RNA 或 cDNA 也可用于同样的目的。作为一个实例，于本发明的核酸互补的 PCR 引物可用于鉴定和分析本发明的人基因中的突变。例如，缺失和插入可以通过与正常的基因型相比较，扩增产物大小的变化而检测出来。点突变的鉴定可以通过将扩增的 DNA 与放射性标记的 RNA 或者放射性标记的本发明的反义 DNA 相杂交。通过 Rnase A 消化或通过溶解温度的不同，完整配对的序列可以和错配双链区别出来。这种诊断在胎儿或者甚至新生儿检测中特别有用。



在参照基因与“突变”之间的序列差异可以通过直接的 DNA 测序的方法发现。另外，克隆的 DNA 片段也可以用作探针，检测特异的 DNA 片段。与 PCR 结合，该方法的灵敏度可大大增强。例如，一个测序引物和双链 PCR 产物或由修饰的 PCR 产物产生的一个单链模板分子一起使用。序列的测定通过使用放射性核苷酸的常规方法或者使用荧光标记的自动测序方法进行。

特异为点的序列改变可以通过核酸保护试验来发现，诸如 Rnase 和 S1 保护或化学切割方法（例如，Cotton 等，PNAS, 85: 4397-4401 (1985)）。

检测生物学样品中 TNFR 蛋白的水平可以运用基于抗体的技术进行。例如，组织中的 TNFR 蛋白的表达可运用经典的免疫组织学方法来研究（Jalkanen, M.等，细胞生物学杂志 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M.等，细胞生物学杂志 105: 3087-3096 (1987)）。其他的用于检测 TNFR 基因表达的基于抗体的方法包括免疫试验，诸如酶联免疫吸附试验（ELISA）和放射免疫试验(RIA)。适当的抗体试验标记是本领域所熟知的，包括酶标记，诸如，葡萄糖氧化酶、和放射性同位素诸如碘 ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), 碳 ( $^{14}\text{C}$ ), 硫 ( $^{35}\text{S}$ ), 氘 ( $^3\text{H}$ ), 铟 ( $^{112}\text{In}$ ), 和锝 ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), 和荧光标记，诸如荧光素和若丹明，和生物素。

除了检测从一个个体获得的生物学样品中 TNFR 蛋白的水平，还可以通过体内成像来检测 TNFR 蛋白。TNFR 蛋白体内成像的抗体标记或标记包括那些可被 X-射线，NMB 或 ESR 检测的标记，适当的标记包括放射性同位素诸如钷或铯，它们能放出可检测的放射线而又不会对个体造成明显的伤害。适当的 NMR 和 ESR 的标记包括那些带有可检测的特征自旋的标记，诸如氘，它能通过标记相应的杂交瘤的营养成分而掺入抗体。

将一个适当的可检测成像半族，诸如一个放射性同位素（例如， $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）标记的 TNFR 特异性抗体或抗体片段，一个反射性不透性物质，或一个可被核磁共振检测的材料，引入（例如，不经

肠道的，皮下地或腹膜内地）到哺乳动物中，检测其免疫系统疾病。本领域的人员会理解，物体的大小和所用的成像系统将决定产生诊断成像的成像基元的数量。在放射性同位素的情况下，对于一个人患者，注入的放射性同位素正常地应含有 5 至 20 微居里的  $^{99m}\text{Tc}$ 。标记的抗体或抗体片段优选地聚集在含有 TNFR 蛋白的细胞处。体内肿瘤成像在 S. W. Burchiel 等，“放射性标记抗体和其片段的免疫药物动力学”（第 13 章，肿瘤成像：癌的放射性检测，S. W. Burchiel 和 B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)）。

### 治疗

肿瘤坏死因子(TNF)家族配体属于最为多效的细胞因子，包括大量的细胞应答，包括细胞毒性、抗体或型、免疫调节活性，和几个基因的转录调控（Goeddel, D. V.等，“肿瘤坏死因子：基因结构和生物活性” Symp. Quant. Biol. 51:97-609(1986), 冷泉港；Beutler, B., 和 Cerami, A., 年度综述生物化学 57: 505-518 (1998)；Old, L.J., 科学美国人 258: 59-75 (1988)；Fiers, W., FEBS Lett. 285:199-224(1991)。TNF 家族配体通过与 TNF 家族受体结合诱导这些不同的细胞应答。表达 TNFR 多肽并对 TNFR-6 $\alpha$  和-6 $\beta$  配体具有有效的细胞应答的细胞包括淋巴细胞，内皮细胞、角质化细胞和牵连县组织。“对 TNFR-6 $\alpha$  和-6 $\beta$  家族配体的细胞应答”是指，受到一个 TNF 家族配体诱导的一个细胞、细胞系、组织、组织培养物或患者上任何基因型、表型、和/或形态变化。正如说指出的，这些细胞应答不仅包括对 TNF 家族配体的正常的生理应答，还包括与增强的细胞凋亡或者细胞凋亡被抑制相关的疾病。

与增加细胞存活或抑制细胞凋亡相关的疾病包括癌症（诸如小囊淋巴瘤，p53 突变的癌症，和激素依赖的肿瘤，诸如如乳房癌，前列腺癌，Kaposi 肉瘤和卵巢癌）；自身免疫疾病（诸如系统红斑狼疮和免疫相关的血管球性肾炎，风湿性关节炎）以及病毒感染（诸如肝炎病毒，疱疹病毒和腺病毒），信息移植-宿主疾病，急性移植

排斥和慢性移植排斥。与增强了细胞凋亡相关的疾病包括 AIDS；神经变性疾病（诸如 Alzheimer 疾病，Parkinson 疾病，肌萎缩侧向硬化症，视网膜炎眼点，小脑退化）；骨髓发育不良综合症（诸如发育不良性贫血），缺血性损伤（诸如心肌梗塞所导致的，冲击损伤），毒素诱导的肝疾病（诸如酒精导致的），败血性休克，萎靡不振和食欲减退。

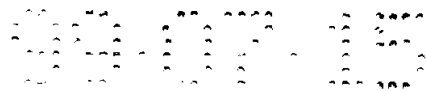
因此，一方面，本发明可用于增强由 TNF 家族配体诱导的细胞凋亡的方法，即对表达 TNFR 多肽的细胞施用一个有效剂量的 TNFR 多肽，类似物或者一个能够增加 TNFR 介导信号的兴奋剂。优选地，通过增加 TNFR 介导信号治疗一种表现出细胞凋亡下降的疾病。拮抗剂可以包括可溶性形式的 TNFR 和针对 TNFR 多肽的单克隆抗体。

“兴奋剂”是指，天然存在的和合成的能够增强或加强细胞凋亡的化合物。“拮抗剂”是指天然存在的和合成的能够抑制细胞凋亡的化合物。本发明的能够增强或抑制细胞凋亡的候选的“兴奋剂”和“拮抗剂”可以通过本领域所知道的 TNF 家族配体/受体细胞应答试验，包括下面所详细描述，来确定。

这样的一种筛选方法涉及转染表达本发明的受体的黑素细胞。该筛选技术在 PCT WO 92/01810,1992 年 2 月 6 日出版的专利中有所描述。运用这样的一个试验，例如，通过将编码受体的黑素细胞与 TNF 家族配体和候选的拮抗剂（或兴奋剂）接触，筛选抑制（或增强）部分明受体多肽活性的化合物。配体产生的信号的抑制或增强表明该化合物是此配体/受体信号途径的一个拮抗剂或兴奋剂。

其他的筛选技术包括利用表达受体的细胞（例如转染的 CHO 细胞），在该系统中测量因受体活性而导致的胞外 pH 变化，例如，科学 246: 181-296（1989）所述的。例如，将化合物接触与一个表达本发明的受体多肽的细胞，测量第二信使应答，例如信号转导或 pH 变化，以确定该化合物是否激活或抑制了该受体。

另一种这类筛选技术涉及，将编码受体的 RNA 引入非洲爪蟾的



卵母细胞中以短暂表达该受体。然后将受体卵母细胞与受体配体和一个需要筛选的化合物接触，然后通过检测钙信号的抑制或激活来筛选对该受体有抑制或激活作用的化合物。

另外的筛选技术涉及在细胞中表达一个将受体与一个磷酸脂酶 C 或 D 连接的构建体。这些细胞包括内皮细胞，平滑肌细胞，胚胎肾细胞等等。筛选的完成按照如上所述，从磷酸脂酶信号检测受体的活性或者受体活性的抑制。

其他的方法涉及，通过确定对标记的配体与在其表面具有受体的细胞相结合的抑制来筛选抑制本发明的受体多肽活性的化合物。此方法中，用编码受体的 DNA 转染一个真核细胞以使细胞表达该受体，并在一个标记形式的已知配体存在的情况下，将该细胞与一个化合物接触。配体可以用例如放射性标记。测量标记的配体与受体结合的数量，例如，通过测量受体的放射性。如果确定出结合受体的化合物使得结合受体的标记配体减少，那么，标记的配体与受体的结合被抑制了。

其他的筛选本发明的兴奋剂和拮抗剂的试验在 Tartaglia, L.a.,和 Goeddel,D.V., 生物化学杂志 267 (7): 4304-4307 (1992) 中有所描述。

因此，另一方面，提供了一种筛选方法，用于确定一个候选兴奋剂和拮抗剂能否增强或抑制对 TNF 家族配体的细胞应答。该方法涉及，将表达 TNFR 多肽的细胞于一个候选化合物和一个 TNF 家族配体接触，测验细胞应答，将细胞应答与一个标准的细胞应答相比较，标准是在没有候选化合物的条件下与配体接触测出的，比标准增强的细胞应答表明该候选化合物是一个配体/受体信号途径的兴奋剂，而比标准降低的细胞应答表明该候选化合物是一个配体/受体信号途径的拮抗剂。“测验细胞应答”是指，定性或定量地测量对一个候选化合物和/或一个 TNF 家族配体的细胞应答（例如，确定或估算 T 细胞增殖或者氘标记的胸腺嘧啶核苷）。根据本发明，表达 TNFR

多肽的细胞可以与内源性的或者外源性的 TNF 家族配体接触。

本发明的兴奋剂包括天然存在的和合成的化合物诸如，TNF 家族配体多肽片段，转化生长因子，神经递质（如谷氨酸，多巴胺，N-甲酰-D-天冬氨酸），肿瘤抑制子(p53)，细胞溶解型的 T 细胞和抗代谢物。优选的兴奋剂包括化学疗法的药物，诸如，顺氯氨铂，阿霉素，胞嘧啶阿拉伯糖，氮芥子，氨甲蝶呤和长春新碱。其他还包括乙醇和淀粉状肽（科学 267: 1457-1458（1995））。进一步优选的兴奋剂包括针对 TNFR 多肽或其片段产生的多克隆和单克隆抗体。这些针对 TNF 家族受体产生的兴奋剂抗体在公开的 Tartaglia, L. A. 等，美国科学院研究进展 88: 9292-9296（1991）；和 Tartaglia, L. A. 和 Goeddel, D.V.生物化学杂志 267（7）: 4304-4307（1992）中有所描述，也可见 PCT 申请 WO 94/09137。

本发明的拮抗剂包括天然存在的和合成的化合物诸如，CD40 配体，中性氨基酸，锌，雌激素，雄鸡素，病毒基因（诸如腺病毒 E1B，棒状病毒 p53 和 IAP，牛痘病毒 crmA，Epstein-Barr 病毒 BHRF1，LMP-1，非洲猪热病毒 LMW5-HL 和疱疹病毒 y1 34.4），钙激活中性蛋白酶抑制剂，半胱氨酸蛋白酶抑制剂，和肿瘤启动子（诸如 PMA，苯巴比妥，和六氯环己烷）。其他的拮抗剂还包括针对 TNFR 多肽或其片段产生的多克隆和单克隆拮抗剂抗体。这些针对 TNF 家族受体产生的拮抗剂抗体在公开的 Tartaglia, L. A.,和 Goeddel, D.V., 生物化学杂志 267（7）: 4304-4307（1992）以及 Tartaglia, L.A.等，细胞 73: 213-216（1993）中有所描述，也可见 PCT 申请 WO 94/09137。

其他可能的拮抗剂包括反义分子。可利用反义技术通过反义 DNA 或 RNA 或者通过三螺旋结构调控基因表达。反义技术的讨论可见，例如，Okano, J. 神经化学 56: 560（1991）；作为基因表达反义抑制剂的寡聚脱氧核苷酸，CRC Press, Boca Raton, FL(1988)。对三螺旋结构的讨论可见，例如核酸研究 6: 3073（1979）；Cooney 等，科学 241: 456（1988）；以及 Dervan 等，科学 251: 1360（1991）。

此类方法基于一个多核苷酸与一个互补的 DNA 或 RNA 的结合。

例如，可以利用编码本发明的成熟多肽的一个多核苷酸的 5' 编码部分设计出一个约 10 至 40 碱基对长度的本发明的反义 RNA 寡核苷酸。设计一个 DNA 寡核苷酸，使其与基因转录相关的一段区域互补，控制受体的转录和生产。反义 RNA 寡核苷酸与 mRNA 体内杂交并阻断 mRNA 分子翻译出受体多肽。上述的寡核苷酸可以转移至细胞中，从而这些反义 RNA 或 DNA 可以体内表达，抑制受体的产生。

其他的本发明的拮抗剂包括 TNFR 可溶性形式，例如，包括全长受体的胞外区域的配体结合功能区的 TNFR 片段。这种受体的可溶性形式，可以是天然存在的或合成的，它们通过与结合 TNF 家族配体的细胞表面的 TNFR 受体竞争，从而拮抗 TNFR 介导的信号传递。因此，包括配体结合功能区的受体可溶性形式是新型的细胞因子，能够抑制由 TNF 家族配体所诱导的肿瘤坏死。其他此类的细胞因子是本领域所熟知的，包括 Fas B（一种鼠 Fas 受体的可溶性形式），其生理作用可以限制由 Fas 配体所诱导的细胞凋亡（Hughes, D.P.和 Crispe, I.N., 实验医学杂志 182: 1395-1401 (1995)）。

正如所指出的，本发明的多克隆和单克隆抗体的兴奋剂和拮抗剂可以按照 Tartaglia, L. A., 和 Goeddel, D.V., 生物化学杂志 267 (7): 4304-4307 (1992); Tartaglia, L.A.等, 细胞 73: 213-216 (1993) 以及 PCT 申请 WO 94/09137 中所公开的方法产生。

本文所使用的术语“抗体”(Ab)或“单克隆抗体”(mAb)是指，包括能够结合一个抗原的完整分子及其片段（诸如 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段）。Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段，缺少完整抗体的 Fc 片段，在循环中可迅速清除，比完整抗体可具有更少的非特异组织结合（Wahl 等, 核医学杂志 24: 316-325 (1983)）。

本发明的抗体可通过上述的多种方法或本领域所熟知的方法制备。



结合胞外功能区的蛋白和其他化合物也是本发明的候选兴奋剂和拮抗剂。这些结合化合物可以通过酵母双杂交系统(Fields 和 Song, 自然 340: 245-246 (1989))“捕获”。一个修正版的酵母双杂交系统在 Roger Brent 和他的同事的 (Gyuris, J 等, 细胞 75: 791-803 (1993); Zervos, A.S.等, 细胞 72: 223-232 (1993)) 中有所描述。

“TNF 家族配体”是指,天然存在的、重组的、和合成的配体,它能够结合 TNF 受体家族成员以及包括配体/受体信号途径。TNF 受体家族配体成员包括,但不限于, TNFR-6 $\alpha$  和-6 $\beta$  配体、TNF- $\alpha$ 、淋巴毒素- $\alpha$  (LT- $\alpha$ , 也被称作 TNF- $\beta$ )、LT- $\beta$ , FasL, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, OX40, TRAIL 和神经生长因子 (NGF)。

本发明的典型的治疗应用在下面有更为详细的描述。AIDS 的免疫缺损病症是 CD4<sup>+</sup> T-淋巴细胞在数量和功能上的疾病所次生的。最近的报道估计每天损失的 CD4<sup>+</sup> T 细胞在  $3.5 \times 10^7$  至  $2 \times 10^9$  之间 (Wei X.等, 自然 373: 117-122 (1995))。HIV 感染背景下的 CD4<sup>+</sup> T 细胞衰竭的一个原因据信是 HIV 诱导的细胞凋亡。实际上, HIV 诱导的凋亡细胞的死亡不仅在体外有显示,更重要的是在该感染的个体中 (Ameisen, J.C., AIDS 8: 1197-1213 (1994); Finkel, T.H., 和 Banda, N.K., 当代免疫学观点 6: 605-615 (1995); Muro-Cacho, C.A.等, 免疫学杂志 154: 5555-5556 (1995))。而且,细胞凋亡和 CD4<sup>+</sup> T 细胞衰竭在不同的 AIDS 的动物模型中是紧密联系的 (Brunner, T.等, 自然 373: 441-444 (1995); Gougeon, M.L.等, AIDS 研究 人类反转录病毒 9: 553-563 (1993)), 而且,在病毒复制不导致 AIDS 的动物模型中,并未发现细胞凋亡 (Gougeon, M.L. 等, AIDS 研究 人类反转录病毒 9: 553-563 (1993))。进一步的数据表明,未被感染但是被 HIV 感染的个体激发或激活 T 淋巴细胞的个体,在遇到 TNF 家族配体 FasL 后,发生细胞凋亡。利用 HIV 感染后导致死亡的单核细胞系表明, HIV 的 U937 细胞感染导致 FasL 的重新表达以及 Fas 介导下 HIV 诱导的细胞凋亡 (Badley, A.D.等, 病毒学杂志 70: 199-

206 (1996))。另外, TNF 家族配体在未感染的巨噬细胞中可以检测到, 而且它的表达在 HIV 感染后上调, 导致选择性杀伤未感染的 CD4T 淋巴细胞 (Badley, A.D.等, 病毒学杂志 70: 199-206 (1996)。因此, 本发明提供了一个用于治疗 HIV<sup>+</sup>个体的方法, 涉及施用一种本发明的拮抗剂以对 CD4T 淋巴细胞的选择性杀伤。施用的形式和剂量如下有详细描述。

在同种异体移植的排斥中, 受体动物的免疫系统未被预先激发应答, 因为免疫系统最多也只被环境中的抗原激发。来自同种其他个体的组织不是以相同的方式提供的, 例如, 病毒和细菌的方式。在同种异体移植的排斥的情况中, 免疫抑制方式是防止免疫系统达到效益物水平。但是在异种移植排斥中的免疫状态比同种移植排斥更类似于疾病复发。在疾病复发的情况中, 免疫系统已经被激活, 自身胰岛细胞的破坏就是例证。因此, 在疾病复发中, 免疫系统已经处于效益物水平。本发明的兴奋剂能够抑制对同种移植排和异种移植制免疫应答, 因为, 淋巴细胞激活并分化的效应细胞将表达 TNFR 多肽, 并可能因而具有增强 TNFR 活性的化合物。因此, 本发明进而提供了一个用于产生免疫特许组织的方法。本发明的拮抗剂还可用于炎症型 Bowel 疾病的治疗。

### 配制品

根据良好的医学实践, 可将 TNFR 多肽组份制成方剂形式, 这需要考虑患者的临床状况 (尤其是单独的 TNFR6 $\alpha$  和-6 $\beta$  治疗的副作用), TNFR 多肽组份的给药位置, 给药时序安排, 以及医师所知道的其他的因素。在此为治疗目的所需的 TNFR 多肽的“有效剂量”根据这些考虑来确定。

作为一般考虑, TNFR 多肽非肠道给药每剂的总药理学有效剂量在约 1 $\mu$ g/kg/天到 10mg/kg/天之间的范围内, 虽然, 如上所述, 这基于上述的治疗考虑。更为优选的, 该激素的剂量至少为 1mg/kg/天, 对人最为优选的, 在 0.01 至 1mg/kg/天之间。如果连续给药, TNFR

含有本发明的 TNFR 的药物组份可以通过口服、直肠、皮下、intracistemally、阴道内、腹膜内、局部地（通过粉剂、软膏、滴剂或超常规的修补）、口腔、或口腔或鼻腔喷雾形式给药。“药物学可接受的载体”是指，任何形式的非毒性的固体、半固体或液体填充物、稀释剂、胶囊材料或剂方辅料。本文所用的术语“非肠道”是指施用形式包括静脉内、肌肉内、腹膜内、胸内、皮下和关节内注射和灌输。

TNFR 多肽也可以通过连续释放系统来适当地施用。合适的连续释放系统的实例包括在定型材料，例如，薄膜或微型胶囊，上的半渗透多聚体基质。连续释放的基质包括聚交酯（美国专利号 3,773,919, EP 5,481），L-谷氨酸和  $\gamma$ -乙基-L-谷氨酸的共多聚体（Sidman, U.等，生物多聚体 22: 547-556（1983）），聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)（R.Langer 等，J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277(1981)，和 R. Langer, 化学技术 12: 98-105(1982)，乙烯乙基乙酸(R. Langer 等，Id.)或聚-D-(-)3-羟丁酸（EP 133,988）。连续释放的 TNFR 多肽组份还包括脂质体包裹的 TNFR 多肽。含有 TNFR 多肽的脂质体通过该领域所知道的方法制备：DE 3,218,121; Epstein 等，美国科学院研究进展 82: 3688-3692（1985）；Hwang 等，美国科学院研究进展 77: 4030-4034(1980)；EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 日本专利申请 83-118008; 美国专利号 4,485,045 和 4,544,545; 和 EP 102,324。通常，脂质体是微小的（约 200-800 埃）单层脂质体，脂容量大于约 30mol.胆固醇百分率，并根据最佳的 TNFR 治疗调节所需比例。

在一个实施方案，对于非肠道给药，TNFR 多肽通常经混合按

所要求的纯度水平，以单位剂量的注射形式（溶剂、悬浮剂、或乳剂），与一个药理学可接受的，如，一种在所用的剂量和浓度下对受者非毒性的并且与配制品中其他成分相容的载体一起，制成药剂。例如，该配制品优选地不包括氧化剂和其他已知的会消除多肽的化合物。

通常，配制品经 TNFR 多肽均匀且致密地与液体载体或精细粉碎的固体载体或两者一起向混合制备。然后，如果需要，将产物在所要求的配制品中定型。优选地，载体是一个非肠道载体，更为优选地是与受者血液等渗的溶液。这样的载体赋型剂的实例包括水、盐水、Ringer's 溶液、和葡聚糖溶液。非极性赋型剂诸如不挥发性油和乙基油酸以及脂质体也可在此使用。

载体应适当地含有少量附加剂，诸如增加等渗性和化学稳定性的物质。这类材料在所用的剂量和浓度下对受者是非毒性的，包括缓冲液诸如磷酸、柠檬酸、琥珀酸、醋酸、和其他有机酸或其他盐；抗氧化剂诸如抗坏血酸、低分子量（少于 10 个残基）多肽，如多聚精氨酸或三肽；蛋白，诸如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白；亲水性多聚体，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、或精氨酸；单糖，二糖，和其他的碳水化合物包括纤维素或其衍生物，葡萄糖，甘露糖，或糊精；螯合剂诸如 EDTA；糖醇诸如甘露醇或山梨醇；抗衡离子诸如钠；和/或非离子性表面活性剂诸如聚山梨醇酯、poloxamers、或 PEG。

TNFR 多肽典型地在这些赋型剂中以约 0.1mg/ml 至 100mg/ml 的浓度，以 pH3 至 8 制成药剂。应当理解的是，使用上述的赋型剂、载体、或稳定基会导致 TNFR 多肽盐的形成。

用于治疗给药的 TNFR 多肽必须是无菌的。灭菌可以方便地通过无菌滤膜（如 0.2 微米膜）过滤而完成。治疗用 TNFR 多肽组份通常置于一个带有无菌出口的容器中，例如，带有可连接皮下注射针头的塞子的静脉溶液袋或瓶。

TNFR 多肽通常以溶液或可重新溶解的冷干组份储存于单位或多剂量容器中，例如，封装的安瓿瓶或管形瓶。在一个冷干组份实例中，10ml 管形瓶内加入 5ml 无菌过滤的 1%(w/v)TNFR 多肽溶液，并将混合物冷冻干燥。灌输溶液通过用无菌的注射用水重新溶解冷干的 TNFR 多肽而制备。

本发明还提供了一个含有一个或多个装有一个或多个本发明的药物组合物成分容器的药物包装或试剂盒。与这些容器一起可有一个由管理药物或生物制品的制造，使用或销售的政府部门所规定的说明，说明中反映了制造，使用或销售部门对人体施用的认可。此外，本发明的多肽还可以与其他治疗组份联合使用。

#### 染色体试验

本发明的核酸分子对染色体鉴定也很有价值。该序列是特异靶向的并能够与一个个体的人染色体的特定位点杂交。而且，目前需要对染色体的特定位点鉴定。目前很少有基于实际的序列数据（重复多态型）的染色体标记物可用于标记染色体位点。本发明的染色体的 DNA 作图对于用疾病相关基因来修正那些序列是重要的第一步。

基此考虑在一个特别优选的实施方案，本文公开的 cDNA 可用于克隆 TNFR 蛋白基因的基因组 DNA。这可以利用许多熟知的技术和文库，通常可以商业购得，来完成，然后基因组 DNA 可以通过熟知的这方面的技术用于原位染色体作图。

此外，在某些情况下，可以通过从 cDNA 制备 PCR 引物（优选地 15-25bp）进行序列的染色体作图。利用对该基因的 3'非翻译区的计算机分析，快速筛选出基因组中不跨越一个以上的外显子的引物，从而使扩增过程复杂化。然后将引物用于含有个体人染色体的体细胞杂种的 PCR 筛选。可以利用 cDNA 与伸展开来的中期染色体的荧光原位杂交（“FISH”），一步获得精确的染色体定位。此技术可利用来自 cDNA 的 50bp 至 60bp 的探针。此技术的综述可见 Verma 等

在'人类染色体：基本技术手册'，Pergamon Press, New York(1988)。

当一个序列进行了精确的染色体位点作图，该序列在染色体上的物理位置可以用遗传图数据来修正。这类数据可在，例如 V. McKusick 的人类孟德尔遗传学 (可从 Johns Hopkins University, Welch Medical Library 在线获得)中找到。然后通过连锁分析 (物理上接近的基因的共同遗传) 鉴定基因与定位于统一染色体区域的疾病的关系。

接着，需要确定受影响的或未受影响的个体之间在 cDNA 或基因组序列中的差异。如果一个突变在一些或所有的受影响个体中被发现，而没在正常个体中发现，则该突变很可能是该疾病的治病源。

经过对本发明总的描述后，参阅下列的实施例可以更为容易地理解本发明，实施例的提供是为了对本发明解释而非限制。

## 实施例

### 实施例 1: TNFR-6 $\alpha$ 和-6 $\beta$ 在大肠杆菌中的表达和纯化

在本实施例中，细菌中的表达利用细菌表达载体 pQE60 (QIAGEN 公司，9259 Eton 大街，Chatsworth,CA,91311)。pQE60 载体编码氨苄青霉素抗性基因 (“Amp<sup>r</sup>”)，含有一个细菌的复制起点 (“ori”)，一个受 IPTG 诱导的启动子，一个核糖体结合位点 (“RBS”)，编码组氨酸残基的六个密码子，这些组氨酸残基可用于利用 QIAGEN 公司所售的镍-腈-三-乙酸 (Ni-NTA) 亲和树脂的亲和纯化，以及适当的单一限制性内切酶切割位点。这些元件有机的组合使得编码特定多肽的 DNA 片段可以插入并且产生带有六组氨酸残基 (即 6X 组氨酸标签) 的多肽片段，这 6X 组氨酸标签共价结合于多肽片段的羧基端。但在本实施例中，多肽编码序列的插入阻止了六个组氨酸密码子的翻译，产生不带 6X 组氨酸标签的多肽。

编码目的 TNFR-6 $\alpha$ 和 TNFR-6 $\beta$ 氨基酸片段，含成熟 TNFR-6 $\alpha$



和 TNF-6 $\beta$  的 DNA 序列用 PCR 方法由保藏的 cDNA 克隆中扩增得到。PCR 寡核苷酸引物分别同编码 TNFR-6 $\alpha$ 或 TNFR-6 $\beta$ 目的片段氮端的序列和 cDNA 编码序列 3' 的构建体序列退火。为便于克隆入 pQE60 载体，分别在其 5' 和 3' 加有含限制性酶切位点的核苷酸。

为克隆成熟形式的 TNFR-6 $\alpha$ 蛋白，5' 引物序列设计为：5' CGCCCATGGCAGAAACACCCACCTAC 3' (SEQ ID NO: 19)，其中划线部分为 NcoI 限制性位点。本领域中的一般熟练技术人员很容易理解，5'引物的蛋白编码序列的变化可以扩增出长于或短于成熟蛋白形式的目的片段。3' 引物序列为：5' CGCAAGCTTCTCTTTCAGTGCAAGTG 3' (SEQ ID NO:20)，划线部分为 HindIII 限制性位点。为克隆成熟形式的 TNFR- $\beta$ 蛋白，5' 引物设计同上，SEQ ID NO:19，3' 引物为：5' CGCAAGCTTCTCCTCAGCTCCTGCAGTG 3' (SEQ ID NO: NO21)，划线部分为 HindIII 限制性位点。

扩增的 TNFR-6 $\alpha$ 和-6 $\beta$  DNA 片段及 pQE60 载体经 NcoI 和 HindIII 切割并连接。插入的 TNFR-6 $\alpha$ 和 -6 $\beta$  DNA 片段在有限的 pQE60 载体中加入 TNFR-6 $\alpha$ 和 TNFR-6 $\beta$ 蛋白编码区域，包括位于 IPTG 可诱导启动子下游的蛋白相关终止密码子和带有起始密码子的片段。相关的终止密码子阻碍了插入位点下游六个组氨酸密码子的翻译。

采用常规方法，如 Sambrook 等在《分子克隆实验手册》第二版，冷泉港实验室出版社，冷泉港，NY (1989) 中所描述的，将连接混合物转化入 E.coli 感受态细胞。E.coli 菌株 M15/rep4 在本实施例中作为典型的实例。它含有多拷贝的 pREP4 质粒，此质粒表达 lac 阻遏子，可提供卡那霉素抗性 (“Kam”)。M15/rep4 菌株只是许多易于表达 TNFR-6 $\alpha$ 和-6 $\beta$ 蛋白的菌株中的一个，可购于 QIAGEN 公司，如上。转染效率通过在含有氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 培养基上的生长状况来判断。从抗性克隆中分离质粒 DNA，通过限制性酶切分析，PCR，和 DNA 测序进一步确定克隆的 DNA。



含有目的构建体的克隆在有氨苄青霉素 ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) 和卡那霉素 ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) 的液体培养基中生长过夜 (“O/N”)。过夜培养通常用来进行大规模培养, 稀释度大约为 1: 25 到 1: 250。细胞生长至 600nm 光密度 (“OD600”) 为 0.4 到 0.6 之间。加入异丙基-硫代- $\beta$ -半乳糖苷 (“IPTG”) 至终浓度为 1mM。IPTG 可以使 lacI 阻遏子失活, 诱导 lac 敏感性启动子的转录。细胞继续培养 3~4 小时, 离心收获。

为了纯化 TNFR-6 $\alpha$ 和-6 $\beta$ 多肽, 细胞在 6M 盐酸胍, pH8 溶液中 4 $^{\circ}\text{C}$  搅拌 3-4 小时。离心去除细胞残渣。含 TNFR-6 $\alpha$ 和-6 $\beta$  的上清用 50mM 乙酸钠缓冲液 pH6 透稀, 补充 200mM NaCl。或者, 在 500mM NaCl, 20%甘油, 25mM Tris/HCL pH7.4, 及蛋白酶抑制剂的缓冲液中蛋白也能够很好得重新折叠。或者也可以用亲和层析如抗体柱等方法获得纯化的 TNFR-6 $\alpha$ 和 -6 $\beta$ 蛋白。纯化的蛋白 4 $^{\circ}\text{C}$  贮藏或冻存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

下面供选择的方法适用于以包涵体形式在 E.coli 中表达的 TNFR-6 $\alpha$ 和 -6 $\beta$ 。除特殊说明, 以下步骤在 4 $^{\circ}\text{C}$  完成。

E.coli 发酵生产过程完成以后, 细胞培养物 4-10 $^{\circ}\text{C}$  冷却, 15000 转每分 (Heraeus Sepatech) 持续离心收获细胞。在预计的细胞沉淀物每单位重量产物以及所需的蛋白量的基础上, 称取适量细胞沉淀物, 悬浮在含有 100 mM Tris, 50mM EDTA, pH7.4 的缓冲液中。细胞利用高度剪切混合器, 分散成匀质悬液。

然后细胞通过 microfluizer (Microfluidics, 公司或 APV Ga  $\mu$  lin, 公司) 4000-6000psi 过滤 2 次, 匀浆里加入 NaCl 溶液, 至终浓度为 0.5M NaCl, 7000 x g 离心, 产生的沉淀物用 0.5M NaCl, 100mM Tris, 50mM EDTA, pH7.4 的溶液洗涤。

产生的洗涤过的包涵体用 1.5M 盐酸胍 (GuHCl) 溶解 2-4 小时。7000 x g 离心 15 分钟后弃沉淀, 含 TNFR-6 $\alpha$ 和 -6 $\beta$ 多肽的上清 4 $^{\circ}\text{C}$  放置过夜, 以利于进一步 GuHCl 提取。



随后，高速离心（30,000xg）去除不溶解颗粒，GuHCl 溶解的蛋白通过在 GuHCl 提取物中迅速加入 20 倍体积的缓冲液强力搅拌而重新折叠，缓冲液为 50mM Na<sup>+</sup>, pH4.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA。重新折叠的蛋白溶液在进一步纯化前 4°C 放置 12 小时，无需混合。

为了澄清重新折叠的 TNF 受体多肽溶液，使用一个事先准备的粗滤系统。此系统带有适当表面积的 0.16 μm 滤膜（如 Filtron），用 40mM 乙酸钠溶液平衡。过滤的样品上样于阳离子交换树脂（如 Poros HS-50, Perseptive Biosystems），柱子由 40mM 乙酸钠，pH6.0 洗涤，利用含 250mM, 500mM, 1000mM, 1500mM NaCl 的相同溶液全程洗脱。连续监测洗脱液的 280nm 光吸收，部分收集洗脱液，进一步 SDS-PAGE 分析。

合并含有 TNF 受体多肽的收集物，用 4 倍体积的水混合。稀释的样品上样于事先准备的串连的强阴离子（Poros HQ-50, Perseptive Biosystems）和弱阴离子（Poros CM-20, Perseptive Biosystems）交换树脂柱。柱子由 40mM 乙酸钠，pH6.0 溶液平衡。两种柱子都由 40mM 乙酸钠，pH6.0, 200mM NaCl 溶液洗涤。CM-20 柱用 10 倍体积的线性梯度，从 0.2M NaCl, 50mM 乙酸钠，pH 6.0 到 1.0M NaCl, 50mM 乙酸钠，pH 6.5 洗脱。在持续监测 280nm 光吸收情况下，部分收集洗脱液，合并含有 TNFR-6α 和 -6β 多肽的部分收集物（比如通过 16% SDS-PAGE 鉴定）。

经过以上的重折叠和纯化步骤，产生的 TNF 受体多肽纯度大于 95%。当纯化蛋白上样量为 5 μg 时，16% SDS-PAGE 凝胶电泳经考马斯亮蓝染色不见大的污染条带。纯化蛋白还经过内毒素/LPS 污染物检测，经过 LAL 检测 LPS 浓度小于 0.1ng/ml。

## **实施例 2: TNFR-6α 和 -6β 蛋白在杆状病毒表达体系中的克隆和表达**

在详细描述的本实施例中，利用穿梭质粒载体 pA2 将编码完整蛋白的克隆 DNA，包括它的天然相连的分泌（前导）信号序列插入到杆状病毒中，表达成熟的 TNFR-6α 和 -6β 蛋白。这一过程中采用

常规方法，如 S μ Mmers 等人所描述：杆状病毒载体及昆虫细胞培养方法手册，德克萨斯农业实验园公布栏 NO1555 (1987)。这一表达载体含有强的 苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 (AcMNPV) 启动子，其后跟随常规的限制性酶切位点如 BamHI, Xba I, 和 Asp718。猿病毒 40 (“SV40”) 的多聚腺苷酸位点被用来有效地多聚腺苷酸化。为了便于重组病毒的筛选，此质粒还含有来自 E.coli 的受弱的果蝇启动子控制的β-半乳糖苷酶基因，其后带有多角体蛋白基因的多聚腺苷酸信号。在插入的基因两侧有病毒的序列，便于同野生型病毒 DNA 进行同源重组，产生表达多聚核苷酸的有生存能力的病毒。

也可用许多其它的杆状病毒载体来替换上面的载体，如 pAc373, pVL941 和 pAcIMI。正如本领域熟练的研究人员所能理解的，只要构建体提供有转录，翻译，分泌等等适当的定位信号，包含信号肽，以及所需的同框 AUG 密码子。这样的载体有很多介绍，如 Luckow 等，病毒学：170：31-39 (1989)。

保藏的克隆中的编码全长 TNFR-6α 和 -6β 蛋白的 cDNA 序列，包括 AUG 起始密码子，天然相联的前导序列如 SEQ ID NO2 或 4 所示，通过 PCR 反应扩增。PCR 寡核苷酸引物对应于基因 5' 和 3' 序列。

TNFR-6α 和 -6β 的 5' 引物序列为：5' CGCGGATCCGCCATCATGAGGGCGTGGAGGGGCCAG 3' (SEQ ID NO:24)，划线部分为 BamHI 限制性酶切位点。所有上述的引物编码一个原核细胞中起始翻译有效信号，如 Kozak, M 等所述，分子生物学杂志，196：947-950 (1987)。TNFR-6α 的 3' 引物序列为：5' CGCGGTACCCTCTTTCAGTGCAAGTG 3' (SEQ ID NO:25)，其划线部分为 Asp718 限制性酶切位点。TNFR-6β 的 3' 引物序列为：5' CGCGGTACCCTCCTCAGCTCCTGCAGTG 3' (SEQ ID NO:27)，包含划线的 Asp718 限制性酶切位点。

扩增的片段利用商品化的试剂盒 (“GeneClean” BIO 101 公司，La Jolla, Ca) 通过 1% 琼脂糖凝胶分离。然后将片段用如上所定的各

个引物中所含的限制性内切酶进行切割，再次用 1%琼脂糖凝胶纯化。

质粒用相同的内切酶切割。用实验中的常规方法进行牛肠磷酸酶去磷酸化反应，此步也可不要求。DNA 采用商业化的试剂盒 (“GeneClean” BIO 101 公司,La Jolla,Ca) 从 1%琼脂糖凝胶中分离。

DNA 片段及去磷酸化的质粒用 T4 DNA 连接酶连接。连接混合物转化 E.coli HB101 或其它适当的 E.coli 宿主细胞,如 XL 蓝(Stragene cloning systems, La Jolla,Ca) 细胞,涂布培养板。通过用以上内切酶切割来自单个克隆的质粒 DNA 并电泳分析酶切片段来鉴定带有 TNF 受体质粒的细菌细胞。克隆片段的序列进一步通过 DNA 测序确定。这个质粒在此记为 pA2-TNFR-6 $\alpha$  或 pA2-TNFR-6 $\beta$  (合起来为 pA2-TNFR)。

5  $\mu$ g 质粒 pA2-TNFR 和 1.0  $\mu$ g 商业化的线性杆状病毒 DNA (“BaculoGoldTM 杆状病毒 DNA “ Pharmingen, San Diego,CA) 共转染,采用 Felgner 等于美国科学院科学进展 84: 7413-7417 (1987) 所述的脂质体转染的方法。将 1  $\mu$ g Bac  $\mu$  loGoldTM 病毒 DNA 和 5  $\mu$ g 质粒 pA2-TNFR DNA 在盛有 50  $\mu$ l 无血清 Grace' s 培养基(生命技术公司, Gaithersburg,MD) 的显微滴定盘的无菌壁上混合。然后加入 10ml Lipofectin 和 90ml Grace' s 培养基,混合,室温温育 15 分钟。转染混合物点滴于接种在含 1ml Grace' s 无血清培养基的 35mm 组织培养板上的 Sf9 昆虫细胞(ATCC CRL 1711)。培养板 27 $^{\circ}$ C 温育 5 小时,去掉转染溶液,向盘中加入 1ml 含 10%胎牛血清的 Grace' s 昆虫培养基。27 $^{\circ}$ C 继续培养 4 天。

4 天后收集上清,进行噬斑检验,如 Summers 和 Smith 所描述,如上。利用 “Blue Gal” (生命技术公司 Gaiphersburg) 琼脂糖凝胶,鉴定和分离 gal 表达克隆,后者产生蓝色噬斑。(这类 “噬斑检验” 的方法的详细介绍,也可参见生命技术公司 Gaiphersburg 提供的昆虫细胞培养的杆状病毒使用手册 9-10 页) 经过一定的培养,用显微

注射枪头（如 Eppendorf）挑取蓝色噬斑。将含有重组病毒的琼脂悬浮于 200ml Grace' s 培养基的微量离心管中。将含有重组杆状病毒的悬浮液感染接种于 35mm 培养盘的 Sf9 细胞。4 天以后收集培养板中的上清，4℃保存。

为了证实 TNF 受体基因的表达，将 Sf9 细胞在含有 10%热灭活的 FBS 的 Grace' s 培养基中生长，细胞受到重组杆状病毒的感染。如果需要放射性标记的蛋白，6 小时后去掉培养基，替换为不含蛋氨酸和半胱氨酸的 SF900II 培养基（生命技术公司，Rockville, MD 提供）。42 小时后，加入 5  $\mu$  Ci  $^{35}$ S-蛋氨酸和 5  $\mu$  Ci  $^{35}$ S-半胱氨酸（Amersham 提供）。细胞继续培养 16 小时离心收获，上清及细胞内的蛋白通过 SDS-PAGE 及随后的放射自显影分析（如果放射性标记）。

纯化蛋白氨基端的氨基酸序列显微分析用来决定 TNF 受体蛋白成熟形式的氨基酸序列。

### **实施例 3: TNFR-6 $\alpha$ 和 -6 $\beta$ 在哺乳动物细胞的表达**

典型的哺乳动物细胞表达载体包含启动子元件，介导 mRNA 转录起始，蛋白编码序列和转录终止及转录本多聚腺苷酸化所需信号序列。另外还包括增强子元件，Kozak 序列和位于 RNA 剪接供体和受体位点两侧的插入序列。高效转录可以从 SV40 早晚启动子，逆转录病毒，如 RSV、HTLVI、HIVI 长末端重复（LTRs）序列和巨细胞病毒（CMV）早期启动子获得，另外，一些细胞元件也可以用（如人肌动蛋白启动子）。用来演示本发明的适宜表达载体包括如，pSVL 和 pMSG（Pharmacia, Uppsala, Sweden），pRSVcat（ATCC 37152），pSV2dhfr（ATCC 37146）和 pBC12MI（ATCC 67109）载体。能够被使用的哺乳动物宿主细胞包括：人 Hela, 293, H9 和 Jurkat 细胞，小鼠 NIH3T3 和 C127 细胞，Cos1, Cos7 和 CV1，鹤鹑 QC1-3 细胞，小鼠 L 细胞和中国仓鼠卵巢细胞（CHO）。

另外，如果基因整合进染色体中，它就可以在稳定的细胞系中表达。共转染选择性标记如 dhfr,gpt,新霉素，潮霉素利于转染细胞的鉴定和分离。

转染的细胞也可用来扩增表达大量的编码蛋白。DHFR（二氢叶酸还原酶）标记可用来产生携带含数百或数千目的基因的细胞系。另外常用的及选择标记为谷苷酸合成酶（Murphy 等，生物化学杂志，227：277-279（1991）；Bebbington 等，生物技术 10：169-175（1992））。使用这些标记，哺乳动物细胞在选择性培养基中生长，高抗性细胞被选择出来。这些细胞系中含有整合入染色体的扩增得基因。中国仓鼠卵巢细胞（CHO）和 NSO 细胞常用来产生蛋白。

表达载体 pCI 和 pC4 携带有鲁斯氏肉瘤病毒强的启动子（LTR）（Cullen 等，分子和细胞生物学，438-447（March,1985））和 CMV-增强子的片段（Boshart 等，细胞 41：521-530（1985））。多克隆位点，如限制性内切酶 BamHI,XbaI 和 Asp718 切割位点，便于目的基因的克隆。这些载体另外还含有大鼠早期前胰岛素基因 3 ‘内含子，多腺苷酸 和终止信号。

### **实施例 3(a): COS 细胞中的克隆与表达**

表达质粒 pTNFR-6 $\alpha$ -HA 和-6 $\beta$ -HA 构建自将编码成熟形式 TNF 受体蛋白的部分 cDNA 插入表达载体 pcDNA1/AMP 或 pcDNAIII 中（从 Invitrogen 公司获得）。

表达载体 pcDNA1/AMP 含有：（1）E.coli 复制起点，可有效地在 E.coli 或其它原核细胞中繁殖；（2）氨苄青霉素抗性基因，可筛选带有质粒的原核细胞；（3）SV40 复制起点，可在真核细胞中扩增；（4）一个 CMV 启动子，一个多连接子位点，一个 SV40 的内含子；（5）编码血球凝集素片段的几个密码子（如，便于纯化的“HA”标签），位于终止密码子和多聚腺苷酸信号之后。这样的处理便于将 cDNA 序列利用多连接子上的内切酶位点放置于 CMV 启动子的表达

调控之下，同时与 SV40 内含子和多聚腺苷酸信号连接。HA 标签来源于 Wilson 等，细胞 37: 767 (1984) 所描述的流感病毒血细胞凝集素表面抗原。HA 标签与目的蛋白的融合便于利用可识别 HA 表位的抗体进行重组蛋白的检测与回收。pcDNAIII 载体另外还含有选择性新霉素标记。

编码完整 TNF 受体多肽的 DNA 片段整合入载体上的多连接子位点，这样重组蛋白的表达受 CMV 启动子的调控。质粒的构建策略如下：堆积克隆中的 TNF 受体 cDNA 通过 PCR 扩增。PCR 引物中含有适宜的内切酶位点，如同构建在 E.coli 中表达的 TNF 受体载体一样。通过业内常用的方法设计适宜引物。

PCR 扩增的 DNA 片段及 pcDNAI/AMP 载体被 XbaI 和 EcoRI 切割并连接。连接混合物转化 E.coli 菌株 SURE (Stratagene 克隆系统, 11099 North Torrey Road, La Jolla CA 92037 提供), 转化培养物涂布于氨苄青霉素培养盘中，在其中允许氨苄抗性克隆生长。从抗性克隆中分离质粒 DNA，用限制性酶切或其它方法鉴定是否存在 TNFR- $\alpha$ 和 TNFR- $\beta$  多肽的编码片段。

为了表达重组子 TNFR- $\alpha$ 和 TNFR- $\beta$ ，COS 细胞被如上所构建的表达载体用 DEAE-DEXTRAN 方法转染，如 Sambrook 等在分子克隆实验手册，冷泉港出版社，冷泉港，纽约 (1989) 中所介绍。细胞在适宜载体表达 TNFR 的条件下培养。

表达的 pTNFR-6 $\alpha$ -HA 和 pTNFR-6 $\beta$ -HA 融合蛋白通过放射性标记或免疫沉淀的方法鉴定。这些方法如 Harlow 等在抗体：实验手册第二版，冷泉港出版社，冷泉港，纽约 (1988) 中所介绍。转染后 2 天，细胞在含 <sup>35</sup>S-半胱氨酸的培养基中生长 8 小时后标记上放射性。收集细胞和培养基，洗涤细胞并将其在含去污剂的 RIPA 缓冲液：150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% DOC, 50mM Tris, pH7.5，中裂解，如 Wilson 等，如上引用，所描述。从细胞裂解物和培养基中利用 HA-特异性单克隆抗体沉淀获得目的蛋白。沉淀

的蛋白通过 SDS-PAGE 电泳和放射自显影分析。具有预期大小片段的表达产物仅见于细胞裂解物中，在阴性对照中不存在。

### 实施例 3 (b): 在 CHO 细胞中的克隆和表达

pC4 载体用来表达 TNFR-6 $\alpha$  和 -6 $\beta$  多肽，pC4 质粒衍生于 pSV2-dhfr (ATCC 收录号 No.37146) 质粒。此质粒含有在 SV40 早期启动子控制下的 DAFR 基因。中国仓鼠卵巢或其它缺乏二氢叶酸活性的细胞，经过此质粒的转染，能够在含有化疗药物氨甲基叶酸的选择性培养基中生长。细胞中扩增的 DHFR 基因对氨甲基叶酸的抗性已经证实 (见 Alt,F.W.,Kellems,R.M.,Bertino,J.R., 和 Schinke,R.T.,1978 生物化学杂志, 253: 1357-1370; Hamlin J.L.,和 Ma,C.1990 生物物理和生物化学杂志 1097:107-143;Page,M.J.和 Sydnham,M.A.1991 生物技术 9: 64-68)。DHFR 基因扩增的结果使得细胞在不断增加的氨甲基叶酸浓度的培养基中生长，由于过度表达靶酶，DNFR，而产生药物抗性。如果第二个基因与 DHFR 基因相连，它也会共同扩增，过度表达。这种方法通常用来产生携带 1000 多拷贝扩增基因的细胞系。结果，当去除氨甲基叶酸后，可以获得含有整合入一条或多条染色体上的扩增基因的细胞系。

为了表达目的基因，pC4 载体中含有鲁斯氏肉瘤病毒长末端重复的强启动子 (C $\mu$ llen 等，分子和细胞生物学, 3 月, 1985: 438-447) 和人巨细胞病毒 (CMV) (Boshatr 等，细胞 41: 521-530 (1985)) 即刻早期基因启动子片段。启动子下游有便于基因整合的单个内切酶 BamHI, XbaI 和 Asp7218 切割位点。在这些克隆位点的下游，质粒还含有大鼠早期前胰岛素基因 3' 内含子和多聚腺苷酸位点。另外一些高效启动子也可用于表达，如人-肌动蛋白启动子，SV40 早期或晚期启动子，其它逆转录病毒诸如 HIV 和 HTLVI 的长末端重复序列。克隆技术公司的 Tet-Off 和 Tet-On 基因表达系统和其它类似的系统都可在哺乳细胞中进行可控的 TNF 受体多肽表达

(Gossen,M.,&Bujard,H.,1992,美国科学院研究进展 89: 5547-5551)。  
mRNA 其它信号多聚腺苷酸化, 例如来自人生长激素或珠蛋白基因的也可以使用。携带有整合进染色体的目的基因的的稳定表达细胞系也可以通过共转染选择性标记如 gpt,G418 或潮霉素等来筛选。在初始阶段用一个以上的筛选标记如 G418 加氨甲基叶酸来进行筛选更为有利。

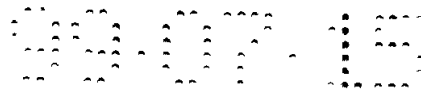
pC4 载体用扩增 TNF 受体选定片段的如下 PCR 引物中所含的限制性内切酶切割, 用常规方法进行牛肠磷酸酶的去磷酸化反应, 同过 1%琼脂糖凝胶分离回收。

TNF 受体多肽的 DNA 序列通过 PCR 扩增。PCR 寡核苷酸引物对映于目的片段 DNA 的 3'和 5' 序列。TNFR-6 $\alpha$ 和 TNFR-6 $\beta$  5' 引物, 含划线部分的 BamHI 位点, 如下: 5' CGCGGATCCGCCATCATGCGGGCGTGGAGGGCCAG 3' (SEQ ID NO:25) TNFR-6 $\alpha$  3' 引物序列为: 5' CGCGGTACCCTCTTTCAGTGCAAGTG 3' (SEQ ID NO:26), 含划线部分的 Asp718 位点。TNFR-6 $\beta$  3' 引物序列为: 5' CGCGGTACCCTCCTCAGCTCCTGCAGTG 3' (SEQ ID NO:27), 含有划线部分的 Asp718 限制性位点。

扩增的片段用内切酶对引入的限制性位点进行切割, 1%琼脂糖凝胶纯化。分离的片段和去磷酸化的载体通过 T4DNA 连接酶连接。连接混合物转化 E.coli 或 XL-1 蓝细胞, 用限制性内切酶分析方法对含插入片段的 pC4 载体的细胞进行鉴定。

中国仓鼠卵巢细胞缺乏 DHFR 基因活性, 可用来做转染。5  $\mu$ g pC4 表达质粒和 0.5  $\mu$ g pSVneo 质粒通过脂质体转染方法共转染 (Felgner 等, 同上)。pSVneo 质粒含有重要的选择标记, neo 基因。此基因来自 Tn5, 编码的酶可对许多抗生素包括 G418 产生抗性。细胞接种于含 1mg/ml G418 的 $\alpha$ 基本 MEM 培养基。2 天后, 细胞经胰蛋白酶消化, 接种于含 10, 25 或 50ng/ml 氨甲基叶酸和 1mg/ml G418 $\alpha$





基本 MEM 培养基的杂交瘤克隆盘。10~14 天后，单个克隆经胰蛋白酶消化接种于含不同浓度氨甲基叶酸（50nM，100nM，200 nM，400nM，800nM）的 6 孔培替氏培养皿或 10 ml 培养瓶中。能够在最高浓度氨甲基叶酸中生长的克隆接种于含更高浓度氨甲基叶酸（1  $\mu$ M，2  $\mu$ M，5  $\mu$ M，10  $\mu$ M，20  $\mu$ M，30  $\mu$ M）的培养皿中。如法炮制，直至选出能够在 100-200  $\mu$ M 氨甲基叶酸中生长的克隆。目的基因产物表达通过 SDS-PAGE 电泳和 Western 杂交或反相 HPLC 分析判断。

#### **实施例 4：TNF 受体 mRNA 表达的组织分布**

采用 Northern 印记的方法分析 TNFR-6 和 TNFE-6 基因在人组织中的分布，Sambrook 等，同上引用，介绍了这个及其它方法。包括完整 TNF 受体蛋白核苷酸序列的 cDNA 探针用 rediprime™ 标记系统（Amersham Life Science），根据供应商提供的操作程序进行 32P 标记。标记过后，探针用 CHROMA SPIN-100™ 柱（克隆技术实验室公司），根据供应商的操作手册 PT1200-1 号进行纯化。纯化的探针用来检验不同组织 TNF 受体 mRNA 的表达。

含人各种组织（H）或人免疫系统组织（IM）的多组织 Northern 杂交膜从克隆技术公司获得，并且根据供应商的操作手册 PT1190-1 号，用 ExpressHyb™ 杂交溶液（克隆技术公司）进行标记探针的杂交。杂交和洗涤之后，杂交膜封固，-70°C 对感光胶片曝光过夜。感光胶片用标准方法进一步处理。

显然，本发明不仅可以应用于上述的描述和实施例中。本发明也可以根据上述的教导进行各种的修改和变化，因而，这些改进和变化也在本文后面的权利要求的范围之内。。

本文在此提及的各种公开的出版物（包括专利，专利申请，杂志文章，实验指南，书或其它文件），可供参考。

关于微生物保藏的说明  
(细则 13 之二)

A. 对说明书第 <u>4</u> 页, 第 <u>9-10</u> 行所述的微生物的说明。	
B. 保藏事项 <span style="float: right;">其它保藏在补充页中 <input type="checkbox"/></span>	
保藏单位名称 美国典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 美国马里兰州洛克维尔帕克兰大道 12301 号 (20852)	
保藏日期 1996 年 11 月 22 日	保藏编号 97809
C. 补充说明 (必要时) <span style="float: right;">本栏有补充页 <input type="checkbox"/></span>	
D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
E. 补充说明 (必要时)	
下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”)	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
受权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
受权官员

PCT/RO/134 表 (1992 年 7 月)

关于微生物保藏的说明  
(细则 13 之二)

A. 对说明书第 <u>4</u> 页, 第 <u>9-10</u> 行所述的微生物的说明。	
B. 保藏事项 <span style="float: right;">其它保藏在补充页中 <input type="checkbox"/></span>	
保藏单位名称 美国典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 美国马里兰州洛克维尔帕克兰大道 12301 号 (20852)	
保藏日期 1996 年 11 月 22 日	保藏编号 97810
C. 补充说明 (必要时) <span style="float: right;">本栏有补充页 <input type="checkbox"/></span>	
D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
E. 补充说明 (必要时)	
下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”)	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
受权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
受权官员

PCT/RO/134 表 (1992 年 7 月)

# 说明书附图

GCTCTCCCTGCTCCAGCAAGGACCATGAGGGCGCTGGAGGGGCCAGGCCTGTCGCTGCTG  
M R A L E G P G L S L L

TGCCTGGTGTGGCGCTGCCTGCCCTGCTGCCGGTGCCGGCTGTACGGGAGTGCCAGAA  
C L V L A L P A L L P V P A V R G V A E

ACACCCACCTACCCCTGGCGGGACGCAGAGACAGGGGAGCGGCTGGTGTGCCCCAGTGC  
T P T Y P W R D A E T G E R L V C A Q C

CCCCAGGCACCTTTGTGCAGCGGCCGTGCCGCCGAGACAGCCCCACGACGTGTGGCCCG  
P P G T F V Q R P C R R D S P T T C G P

TGTCCACCGGCCACTACACGCAGTTCTGGAACCTGGAGCGCTGCCGCTACTGCAAC  
C P P R H Y T Q F W N Y L E R C R Y C N

GTCTCTGCGGGGAGCGTGAGGAGGAGGCACGGCTTGCCACGCCACCCACAACCGTGCC  
V L C G E R E E E A R A C H A T H N R A

TGCCGCTGCCGCACCGCTTCTTCGCGCACGCTGGTTTCTGCTTGAGCAGCATCGTGT  
C R C R T G F F A H A G F C L E H A S C

CCACCTGGTGCCGGCGTGATTGCCCGGGCACCCAGCCAGAACACGCAGTGCCAGCCG  
P P G A G V I A P G T P S Q N T Q C Q P

TGCCCCCAGGCACCTTCTCAGCCAGCAGCTCCAGCTCAGAGCAGTGCCAGCCCCACCGC  
C P P G T F S A S S S S S E Q C Q P H R

AACTGCACGGCCCTGGGCTGGCCCTCAATGTGCCAGGCTCTTCCTCCCATGACACCCTG  
N C T A L G L A L N V P G S S S H D T L

TGCACCAGCTGCACTGGCTTCCCCCTCAGCACCAGGGTACCAGGAGCTGAGGAGTGTGAG  
C T S C T G F P L S T R V P G A E E C E

CGTGCCGTCATCGACTTTGTGGCTTCCAGGACATCTCCATCAAGAGGCTGCAGCGGCTG  
R A V I D F V A F Q D I S I K R L Q R L

CTGCAGGCCCTCGAGGCCCGGAGGGCTGGGCTCCGACACCAAGGGCGGGCCGCGCGGCC  
L Q A L E A P E G W G P T P R A G R A A

TTGCAGCTGAAGCTGCGTGGCGGCTCAGGAGCTCCTGGGGCGCAGGACGGGGCGCTG  
L Q L K L R R R L T E L L G A Q D G A L

CTGGTGGGCTGCTGCAGGCGCTGCCGCTGGCCAGGATGCCCGGGCTGGAGCGGAGCGTC  
L V R L L Q A L R V A R M P G L E R S V

CGTGAGCGCTTCTCCCTGTGCACTGATCCTGGCCCCCTTATTTATTCTACATCCTTG  
R E R F L P V H \*

GCACCCACTTGCACTGAAAGAGGCTTTTTTTTAAATAGAAGAAATGAGGTTTCTTAAG  
CTTATTTTTATAAGCTTTTTTCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 1

TGGCATGTCCGGTCAGGCACAGCAGGGTCTGTGTCCGCGCTGAGCCGCGCTCTCCCTGCT  
 CCAGCAAGGACCATGAGGGCGCTGGAGGGGCCAGGCCGTGTCGCTGCTGTGCCTGGTGTG  
M R A L E G P G L S L L C L V L  
 GCGCTGCCTGCCCTGCTGCCGGTGCCGGCTGTACGCGGAGTGGCAGAAACACCCACCTAC  
A L P A L L P V P A V R G V A E T P T Y  
 CCCTGGCGGGACGCAGAGACAGGGGAGCGGCTGGTGTGCGCCAGTGCCCCCAGGCACC  
 P W R D A E T G E R L V C A Q C P P G T  
 TTTGTGCAGCGGCCGTGCCGCCGAGACAGCCCCACGACGTGTGGCCCGTGTCCACCGCGC  
 F V Q R P C R R D S P T T C G P C P P R  
 CACTACAGCAGTTCTGGAACCTGAGGCGCTGCCGCTACTGCAACGTCTCTGCCGG  
 H Y T Q F W N Y L E R C R Y C N V L C G  
 GAGCGTGAGGAGGAGGCACGGGCTTGCCACGCCACCCACAACCGTGCCTGCCGCTGCCGC  
 E R E E E A R A C H A T H N R A C R C R  
 ACCGGCTTCTTCGCGCACGCTGGTTTCTGCTTGGAGCACGCATCGTGTCCACCTGGTGCC  
 T G F F A H A G F C L E H A S C P P G A  
 GCGGTGATTGCCCCGGGTGAGAGCTGGGCGAGGGGAGGGGCCCCCAGGAGTGGTGGCCGG  
 G V I A P G E S W A R G G A P R S G G R  
 AGGTGTGGCAGGGGTGAGTTGCTGGTCCCAGCCTTGACCCTGAGCTAGGACACCAGTT  
 R C G R G Q V A G P S L A P \*  
 CCCCTGACCCTGTTCTTCCCTCCTGGCTGCAGGCACCCCCAGCCAGAACACGCAGTGCCA  
 GCCGTGCCCCCAGGCACCTTCTCAGCCAGCAGCTCCAGCTCAGAGCAGTGCCAGCCCCA  
 CCGCAACTGCACGGCCCTGGGCCTGGCCCTCAATGTGCCAGGCTCTTCTCCCATGACAC  
 CCTGTGCACCAGCTGCACTGGCTTCCCCCTCAGCACCAGGGTACCAGGTGAGCCAGAGGC  
 CTGAGGGGGCAGCACACTGCAGGCCAGGCCACTTGTGCCCTCACTCCTGCCCTGCACG  
 TGCATCTAGCCTGAGGCATGCCAGCTGGCTCTGGGAAGGGGCCACAGTGGATTTGAGGGG  
 TCAGGGGTCCCTCCACTAGATCCCCACCAAGTCTGCCCTCTCAGGGGTGGCTGAGAATTT  
 GGATCTGAGCCAGGGCACAGCCTCCCCTGGAGAGCTCTGGGAAAGTGGGCAGCAATCTCC

图2A

TAACTGCCCGAGGGGAAGGTGGCTGGCTCCTCTGACACGGGGAAACCGAGGCCTGATGGT  
AACTCTCCTAACTGCCTGAGAGGAAGGTGGCTGCCTCCTCTGACATGGGGAAACCGAGGC  
CCAATGTTAACCACTGTTGAGAAGTCACAGGGGAAGTGACCCCTTAACATCAAGTCAG  
GTCCGGTCCATCTGCAGGTCCCAACTCGCCCTTCCGATGGCCAGGAGCCCCAAGCCCT  
TGCCTGGGCCCCCTTGCCTCTTGCAGCCAAGGTCCGAGTGGCCGCTCCTGCCCCCTAGGC  
CTTTGCTCCAGCTCTCTGACCGAAGGCTCCTGCCCCCTTCTCCAGTCCCATCGTTGCACT  
GCCCTCTCCAGCAGGCTCACTGCACAGGGATTTCTCTCCTGCAAACCCCCGAGTGG  
GGCCAGAAAGCAGGGTACCTGGCAGCCCCCGCCAGTGTGTGGGTGAAATGATCGGAC  
CGCTGCCTCCCCACCCCACTGCAGGAGCTGAGGAGTGTGAGCGTGCCGTCATCGACTTTG  
TGGCTTTCAGGACATCTCCATCAAGAGGAGCGGCTGCTGCAGGCC

图2B

I	M	-	G	L	S	T	V	P	D	L	L	V	L	E	V	G	I	P	S	G	V	I	G	L	V	P	H	L	G	D	R	E	-	TNFR1	
I	M	A	P	V	A	T	W	A	L	A	V	G	L	A	H	A	L	P	A	Q	V	A	-	-	-	-	-	F	T	P	-	-	TNFR2		
I	M	G	A	G	A	R	-	-	G	P	R	L	L	L	L	L	L	D	G	V	S	L	G	G	A	K	E	-	A	C	P	-	-	NGFR	
I	M	-	R	L	P	R	-	-	L	A	W	G	P	L	L	L	S	S	G	L	L	V	A	S	Q	P	L	V	P	P	-	-	LTr		
I	M	L	G	T	W	-	A	R	P	H	-	-	-	V	-	A	R	L	S	S	V	N	A	Q	V	T	D	I	N	S	K	G	L	FAS	
I	M	-	V	R	L	-	-	-	-	W	L	C	V	L	G	L	L	V	G	L	S	-	A	T	P	A	-	-	S	C	P	-	-	CD27	
I	M	R	V	R	L	-	-	-	-	L	A	A	L	L	L	L	F	D	G	A	L	R	A	-	-	-	-	P	Q	-	-	-	CD30		
I	M	G	N	-	-	-	-	-	-	L	-	W	G	C	L	L	-	-	-	-	-	T	A	V	H	P	E	-	P	P	-	-	-	CD40	
I	M	C	V	G	A	-	-	-	-	C	Y	N	I	V	A	L	L	L	N	-	-	-	-	-	-	-	-	F	E	R	-	-	-	41BB	
I	M	K	S	V	-	-	-	-	-	L	F	L	S	C	I	I	I	L	D	G	L	G	L	S	T	V	T	G	L	H	C	V	-	-	OX40
I	M	K	S	-	-	-	-	-	-	L	L	L	S	C	I	I	I	I	N	S	D	I	T	P	-	-	-	H	E	P	-	-	-	VC22	
I	M	R	A	L	E	-	-	-	-	G	P	G	L	S	L	L	C	L	V	L	A	L	P	-	-	-	-	V	P	A	-	-	-	TNFR-6a	
I	M	R	A	L	E	-	-	-	-	G	P	G	L	S	L	L	C	L	V	L	A	L	P	-	-	-	-	V	P	A	-	-	-	TNFR-6b	

图 3A

39	-	K	R	D	S	V	C	P	Q	G	K	T	C	C	I	S	I	C	C	T	K	C	H	K	P	C	C	P	K	G	T	Y	L	Y	N	D	C	P	G	TNFR1
32	-	-	A	P	E	P	G	S	T	-	-	-	-	-	M	A	Q	M	C	S	K	C	C	N	L	C	C	S	P	G	Q	H	A	K	V	F	C	-	-	TNFR2
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	E	-	C	C	K	A	C	P	P	G	G	E	G	V	A	Q	P	C	G	A	NGFR			
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	D	V	C	S	R	C	P	P	G	G	E	F	V	F	A	V	C	-	-	T	V	LT6R		
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	Q	F	C	H	K	R	C	P	P	G	G	E	R	K	A	R	D	C	T	V	FAS			
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	K	L	C	Q	M	C	E	P	P	G	G	T	F	L	V	K	D	C	D	Q	CD27			
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	C	C	Y	R	C	P	M	G	L	F	F	P	T	Q	Q	C	C	P	Q	CD30			
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	N	S	C	S	L	C	Q	P	G	G	Q	K	L	V	S	D	C	-	-	CD40				
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	N	C	P	A	G	T	F	-	-	-	-	-	-	-	-	D	N	41BB		
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	H	E	C	R	P	G	N	G	M	V	S	R	C	S	R	O	X	40		
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	L	S	C	P	P	G	T	Y	A	S	R	L	C	D	S	V	C	22		
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	L	S	C	P	P	G	T	Y	A	S	R	L	C	D	S	C	R	M		

27	-	V	R	G	V	A	E	T	P	T	Y	P	W	R	D	A	-	E	T	G	E	R	L	V	C	A	Q	C	P	P	G	T	F	V	Q	R	P	C	-	-	TNFR-6a
27	-	V	R	G	V	A	E	T	P	T	Y	P	W	R	D	A	-	E	T	G	E	R	L	V	C	A	Q	C	P	P	G	T	F	V	Q	R	P	C	-	-	TNFR-6b

3B





111	-	Q	V	E	I	S	C	T	V	D	R	D	T	V	C	G	C	R	K	N	Q	Y	R	H	Y	W	S	E	N	L	F	Q	C	F	N	C	S	L	-	TNFR1		
106	-	-	E	T	Q	A	-	-	C	T	R	Q	N	R	I	C	T	C	R	P	G	W	Y	C	A	L	S	K	Q	E	-	G	C	R	L	C	A	P	L	-	TNFR2	
95	M	S	A	P	-	-	-	-	C	V	E	D	A	V	C	R	C	A	Y	G	M	Y	-	Q	D	E	T	T	G	-	R	C	E	A	C	R	V	D	NGFR			
110	F	E	V	A	P	-	-	-	C	T	S	D	K	A	E	C	R	Q	P	G	S	C	V	Y	L	D	N	E	-	-	C	V	H	C	E	E	E	L	toR			
113	L	E	V	E	I	N	-	-	C	T	R	T	Q	N	T	K	C	R	K	P	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FAS		
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	H	H	T	R	P	-	-	H	C	E	S	C	R	H	-	CD27			
92	L	V	E	K	T	P	-	-	C	A	W	S	S	R	V	C	E	C	R	P	G	M	F	C	S	T	A	V	N	-	-	S	C	A	R	C	F	H	-	CD30		
89	L	R	V	Q	Q	K	-	-	G	T	S	E	T	D	T	I	C	T	C	E	E	G	W	H	C	T	-	-	-	-	S	C	E	S	C	V	L	H	-	CD40		
71	V	R	T	R	K	E	-	-	C	S	S	T	S	H	A	E	C	D	C	T	P	G	F	H	C	L	-	-	-	-	G	C	S	M	C	E	Q	D	-	41BB		
92	G	S	E	R	K	Q	L	-	C	T	A	T	Q	D	T	V	C	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OX40		
96	-	-	E	T	R	S	-	-	C	N	T	T	H	H	R	I	C	E	C	S	P	G	Y	Y	C	L	L	K	G	S	S	-	G	C	K	A	C	V	S	Q	VC22	
96	-	-	E	T	R	S	-	-	C	N	T	T	H	H	R	I	C	D	C	A	P	G	Y	Y	C	F	L	K	G	S	S	-	G	C	K	A	C	V	S	Q	CRMB	
101	-	-	E	A	R	A	-	-	C	H	A	T	H	N	R	A	C	R	C	R	T	G	F	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TNFR-6a
101	-	-	E	A	R	A	-	-	C	H	A	T	H	N	R	A	C	R	C	R	T	G	F	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TNFR-6b	

3D











264	T	K	P	L	A	P	N	P	S	P	T	P	G	F	T	P	T	L	G	F	S	P	V	P	S	S	T	F	T	S	S	S	T	Y	T	P	G	D	TNFR1	
294	-	-	-	-	-	L	Q	R	E	A	K	V	P	H	L	P	A	-	D	K	A	R	G	T	Q	G	P	E	Q	Q	H	L	L	I	T	A	-	-	TNFR2	
281	-	-	-	-	-	-	N	K	Q	G	A	N	S	R	P	V	-	N	Q	T	P	P	P	E	G	E	K	L	H	S	D	S	G	I	S	V	D	NGFR		
262	-	-	-	-	-	-	P	E	G	E	S	P	P	C	P	A	-	P	R	A	D	P	H	F	F	D	L	A	E	P	L	-	-	-	-	-	-	LTbR		
212	-	-	-	-	-	S	P	T	L	N	P	E	-	-	-	T	V	A	I	N	L	S	D	V	D	L	S	K	Y	I	T	-	-	-	-	-	-	FAS		
169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L P CD27			
322	T	T	F	E	A	P	L	G	T	Q	P	D	C	N	P	T	P	E	-	N	G	E	A	P	A	S	T	S	P	T	Q	S	L	L	V	D	S	Q	A	CD30
222	-	-	-	-	-	-	P	T	N	K	A	P	H	P	K	Q	E	-	P	Q	-	E	I	N	F	F	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CD40
193	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41BB	
198	-	-	-	-	-	-	-	T	S	Q	G	P	S	T	R	P	V	-	E	-	-	-	V	P	G	G	R	A	V	A	I	L	G	L	G	L	-	-	CK40	
255	-	-	-	-	-	-	L	N	F	E	I	K	C	N	N	-	-	-	-	-	-	-	K	G	S	-	-	S	F	K	Q	-	-	-	L	T	K	-	VC22	
255	-	-	-	-	-	-	L	N	F	E	I	K	C	N	N	-	-	-	-	-	-	-	K	D	S	Y	S	S	S	K	Q	-	-	-	L	T	K	-	CRMB	
229	-	-	-	-	-	-	L	Q	R	L	L	Q	A	L	E	A	P	E	-	G	W	-	-	G	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TNFR-6a	
143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TNFR-6b	

图 3J





329	- - -	L A S D P I P N P L Q K W E D S A H K P Q S L D I D D P A T L Y A V V E	TNFR1
339	- - -	- - - D R R A P T R N Q P Q A P G V E A S G A G E A R A S T G S S D S S	TNFR2
347	V E K L L	- -	NGS NGFR
303	- - -	- - - A P S L E E V V L Q Q S P L - - - - - V Q A R E L - - - E A E	LT6R
240	- - -	M T L S Q V -	FAS
207	G A L F L	- -	CD27
401	S S A F L L C H R R A C R K R I R Q K L H L C Y P V Q T S Q P K L E L V D S R P	CD30	
253	- - -	- - - - - Q E T L -	CD40
217	G R K K L L	- -	41BB
245	- - -	- -	OX40
281	- - -	- - - M S H S E T V T L A G D C L S S V D I Y I L Y S N T N	VC22
284	- - -	- - - M P H S E S V T L V G D C L S S V D I Y I L Y S N T N	CRMB
258	- - -	R R R L T E L L G A Q D G A L L V R L L Q A L R - - - - - - - - -	TNFR-6a
155	- - -	- -	TNFR-6b

图3L





```

434  - - - - - L E D I E E A L C G P A A L P - - - - - T N F R I
431  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - T N F R 2
401  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - E K
386  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - A D
312  - - - - - T I I L K D I T S D - S E N S N F R - - - - - P G P S E L S T P Y Q E D G K A W L T b R
246  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - F A S
520  M K A D T V I V G T V K A E L P E G R G L A G P A E P E L E E L E A D H T P H C D 30
263  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - Q E D G K E S C D 40
225  F K - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - Q P F M R P V Q T T 41 B B
260  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - R T P O X 40
345  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - P T R F - - - - - V C 22
351  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - P T H F - - - - - C R M B

291  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S V R E R T N F R - 6a
162  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - V A G P S T N F R - 6b

```

图 30



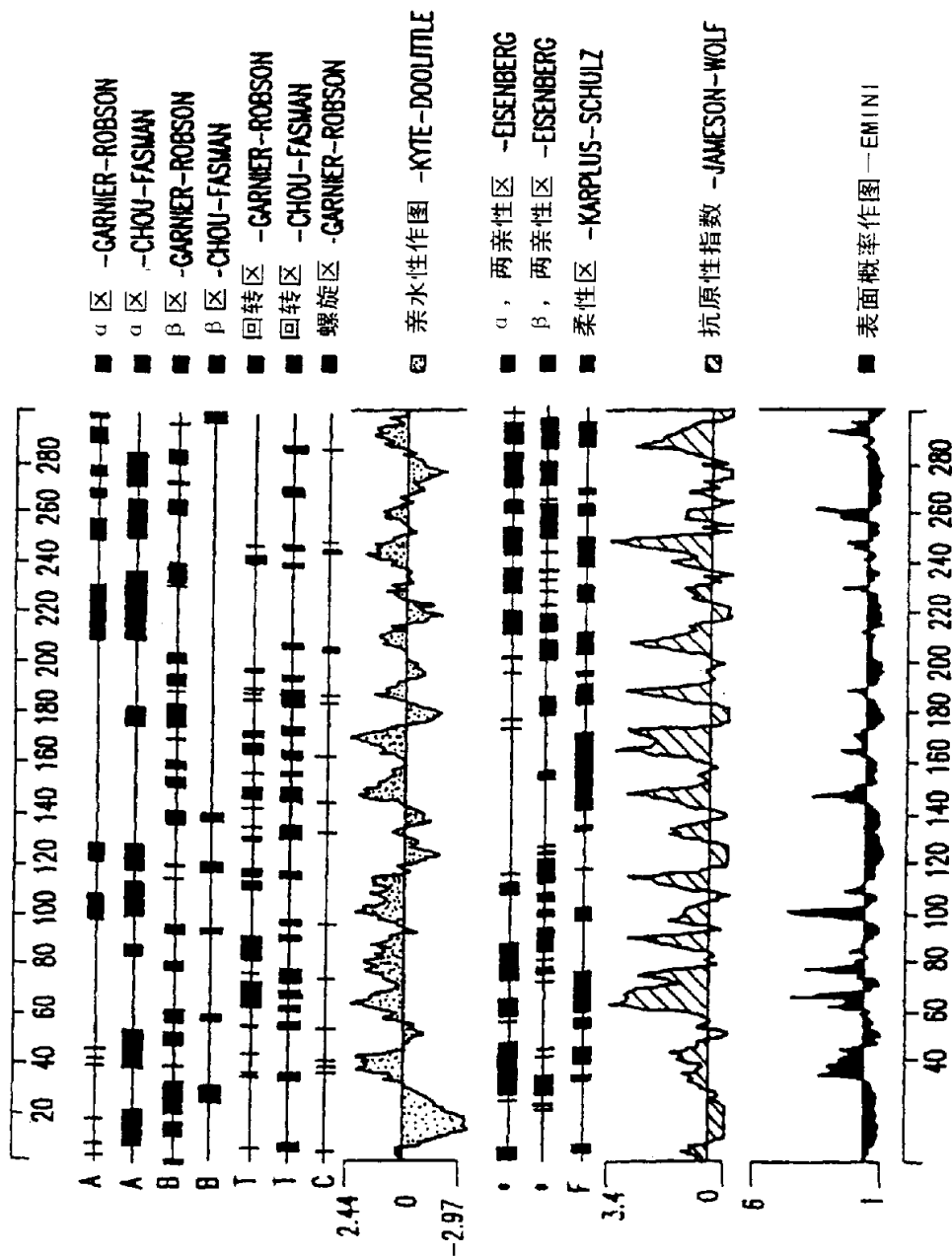


图4

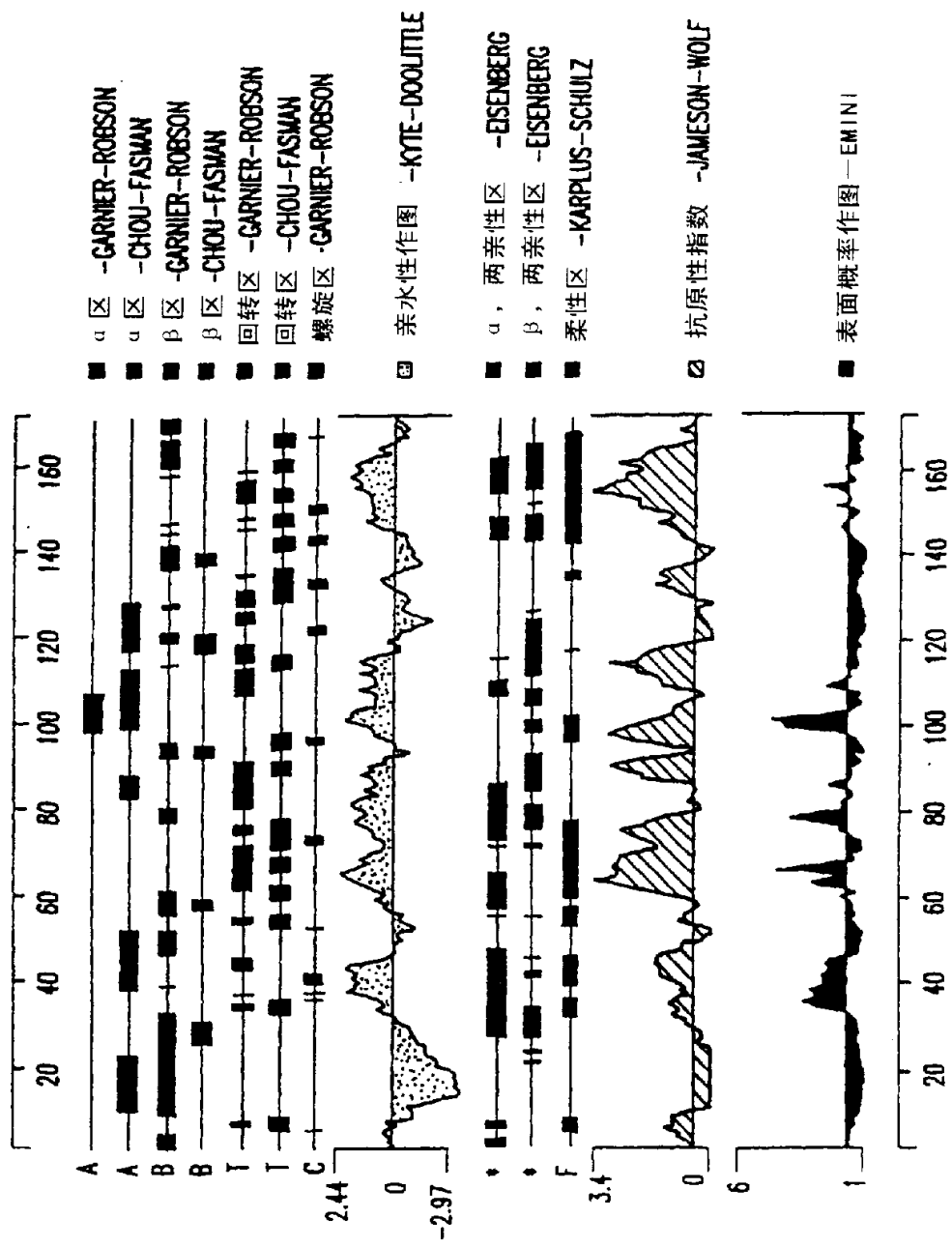


图5



**HELDI06R**

GGCAGAGCA GGGTCCTGTN TCCGCCCTGA GCCGCGCTCT NCCTGCTCCA GCAAGGACCA  
TGAGGGCGCT GGAGGGGCCA GGCCTGTGCG TGCTGTGCCT GGTGTTGGCG CTGCCTGCCC  
TGCTGCCGGT GCCGGCTGTA CGCGGAGTGG CAGAAACACN NACNTACCCC TGGCGGGACG  
NAGAGACAGG GGAGCGGCTG GTGTNTNCCC ANTGCCCCC AGGCACCTTT NTGCAGCGGC  
CGTGCCGNCG AGACAGCCCC ACGACGTGTG GCCCGTNTCC ACCGCGCCAC TACACGCATT  
CTGGA ACTAC CTGGAGCGCT GNCGTTACTN CAACGTCTC TGCGGGGAGC GTNAGGAGGA  
GGCAGGGTT TNCCACGNCA ACCACAACCG NGGNTTACCG TNGCCGNACC GGTTCCTTCG  
NGGCAAGTTG GTTTTNNNTT TGGAGNAAGG ATTCGTGTTN CAATTNATTG ACGNAGTGAT  
TNNNCNCGGG AACTNAAA

**HCEOW38R**

CGCAACTGCA CGGCCCTGGG ACTGGCCCTC AATGTGCCAG GNTCTTCCTC CCATGACACC  
CTGTGCACCA GCTGCACTGG CTTCCCCCTC AGCACCAGGG TACCANGAGC TGAGGAGTGT  
GAGCNTGCCG TCATCGACTT TTTGGCTTTC CAGGACATCT CCATCAAGAG GCTGCAGCGG  
CTGCTCANGC C

图6