

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680044009.6

[51] Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

[43] 公开日 2008年11月26日

[11] 公开号 CN 101313069A

[22] 申请日 2006.11.21

[21] 申请号 200680044009.6

[30] 优先权

[32] 2005.11.24 [33] GB [31] 0523954.6

[86] 国际申请 PCT/GB2006/004332 2006.11.21

[87] 国际公布 WO2007/060406 英 2007.5.31

[85] 进入国家阶段日期 2008.5.23

[71] 申请人 UCB 医药有限公司

地址 比利时布鲁塞尔

[72] 发明人 H·M·芬尼 A·D·G·劳森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所  
代理人 罗菊华

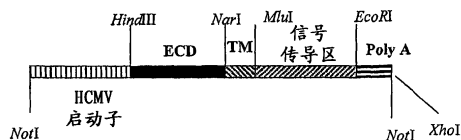
权利要求书 3 页 说明书 18 页 序列表 20 页  
附图 8 页

[54] 发明名称

生物测定法

[57] 摘要

本发明涉及编码生物测定法受体的载体和使用所述生物测定法受体来评估目的化合物的体外生物测定法。特别地，所述生物测定法为比较不同配体在目的化合物存在和/或不存在下与其各自受体或结合伙伴的结合提供了通用平台。



1. 编码生物测定法受体的载体，所述生物测定法受体包含：

(a) 能够结合配体的细胞外配体结合区；

(b) 跨膜区；

(c) 一个或多个能够传递信号的细胞内信号传导区，其中所述细胞外配体结合区和细胞内信号传导区非天然地融合在一起；和

(d) 报告子区；

其中当所述DNA序列在适合于载体表达的条件下在所选择的宿主细胞中表达时，配体与细胞外配体结合区的结合导致从报告子区产生可检测的信号。

2. 权利要求1的载体，其中膜结合的细胞外配体结合区来源于细胞因子受体、细胞表面受体或可溶性蛋白。

3. 权利要求2的载体，其中所述细胞因子受体是IL-17R。

4. 权利要求2的载体，其中所述细胞表面受体是KDR。

5. 权利要求1至4中任一项的载体，其中所述DNA序列编码两个细胞内信号传导区，所述区域之一来源于CD28。

6. 权利要求5的载体，其中第二个细胞内信号传导区来源于TCR $\zeta$ 。

7. 权利要求5的载体，其中第二个细胞内信号传导区来源于合成的信号传导区。

8. 权利要求7的载体，其中所述合成的信号传导区基于ITAM。

9. 权利要求1至8中任一项的载体，其中所述跨膜区来源于CD28。

10. 权利要求1至9中任一项的载体，其中所述报告子区是荧光素酶。

11. 权利要求1至9中任一项的载体，其中所述报告子区是SEAP。

12. 包含权利要求1至11中任一项的载体的哺乳动物细胞。

13. 包含权利要求1至9中任一项的载体的哺乳动物细胞，所述

宿主细胞另外还包含编码第二生物测定法受体的载体，所述第二生物测定法受体包含：

(a) 细胞外配体结合区；

(b) 跨膜区；

(c) 一个或多个能够传递信号的细胞内信号传导区，其中所述细胞外配体结合区和细胞内信号传导区非天然地融合在一起；和任选地

(d) 报告子区；

其中当所述DNA序列在适合于载体表达的条件下在所选择的宿主细胞中表达时，配体与细胞外配体结合区的结合导致从细胞内信号传导区产生信号，和当存在时，导致由报告子区产生的可检测的信号。

14. 权利要求 13 的哺乳动物细胞，其中所述细胞是人 Jurkat 细胞。

15. 多核苷酸，其包含：

(a) 能够结合配体的细胞外配体结合区；

(b) 跨膜区；

(c) 一个或多个能够传递信号的细胞内信号传导区，其中所述细胞外配体结合区和细胞内信号传导区非天然地融合在一起；和

(d) 报告子区；

其中配体与细胞外配体结合区的结合导致从报告子区产生可检测的信号。

16. 用于评估目的化合物的体外方法，所述方法包括：

(a) 提供权利要求 12 至 14 中任一项的哺乳动物宿主细胞；

(b) 提供包含配体的第一样品；

(c) 提供包含目的化合物的第二样品；和

(d) 测量由细胞内信号传导区产生的信号和/或由报告子区产生的可检测的信号。

17. 权利要求 16 的方法，所述方法另外还包括下述步骤：在根据部分 (c) 提供第二样品之前测量由细胞内信号传导区产生的信号和/或由报告子区产生的可检测的信号。

18. 权利要求 16 或 17 的方法，其中所述目的化合物是抗体。

## 生物测定法

此处公开的发明涉及编码生物测定法 (bioassay) 受体的载体和使用所述生物测定法受体来评估目的化合物的体外生物测定法。特别地,所述生物测定法为比较不同配体在目的化合物存在和/或不存在下与其各自受体或结合伙伴的结合提供了通用平台。

很大程度上考虑到利用抗体-抗原相互作用的高度特异性和亲和力的组合,抗体很久以来就被视为通过靶向的药物递送进行治疗干预的潜在试剂。可通过就抗体与抗原例如配体或其受体的结合来检验生物测定法的输出,测量抗体的结合。因此,常规的体外生物测定法依赖于且受限于内源性的细胞表面表达的受体的数目。事实上,必需鉴定表达所选择的受体的合适的细胞系。此外,依赖于所考虑的细胞类型和受体,受体数目变化很大。必须通过生物测定法来评估潜在的治疗性抗体。然而,通常,对于每种产物开发出不同的测定法。许多测定法具有长的数据读出 (read-outs), 从而极可能出错。合适的生物测定法数据读出在类型、时间点和对所牵涉的生物学的理解水平方面变化很大。因此比较具有不同数据读出的此类测定法通常是无意义的。通用测定法平台使得能够开发出对于每种潜在的治疗性抗体产物来说基本上相似的强有力的测定法形式 (assay format), 从而有助于更好地理解产物的稳定性和允许直接、有意义地比较不同批次的产物。这样的通用测定法平台可用于产物的最初筛选、产物效力的分析、产物的稳定性和批次间重现性的监测。最有利地,这样的通用测定法平台将允许比较针对相同抗原而产生的不同抗体的功效。通用测定法也有助于报告提交和管理部门的理解。

此处公开的发明克服了上述困难,并且提供了使用表达重组目的受体的细胞的标准化的体外生物测定法。特别地,本发明的测定法提供了用于使用本发明的生物测定法受体来体外评估配体结合的通用平

台，并允许评估拮抗或激动所述结合的试剂。

因此，提供了编码生物测定法受体的载体，所述生物测定法受体包含：

- (a) 能够结合配体的细胞外配体结合区；
- (b) 跨膜区；
- (c) 一个或多个能够传递信号的细胞内信号传导区，其中所述细胞外配体结合区和细胞内信号传导区非天然地融合在一起；和
- (d) 报告子区；

其中当所述载体在适合于表达的条件下在所选择的宿主细胞中表达为膜结合蛋白时，配体与细胞外配体结合区的结合导致从报告子区产生可检测的信号。

本领域技术人员将理解，如果使用信号序列将细胞外区域靶向宿主细胞的细胞表面，那么所述信号序列将存在于所述生物测定法受体的N-末端，其后接着是细胞外配体结合区、跨膜区和细胞内信号传导区。任选地，可通过在DNA密码中整合入间隔子序列而将一个或多个区域与邻近区域分开。例如，在构建编码生物测定法受体的载体的过程中，一个或多个限制位点可在将区域衔接在一起时在区域之间留下一个或多个间隔子氨基酸残基。在一个实施方案中，通过间隔子序列将各区域与其相邻的区域分开。间隔子序列可以是2个氨基酸或3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸。

细胞外配体结合区包括能够结合配体的任何蛋白质（或编码此类蛋白质的核酸）。最优选地，配体是可溶性配体。本发明的生物测定法受体的膜结合细胞外配体结合区包括表面膜受体，例如激酶受体，G蛋白偶联受体（GPCR），生长因子受体，细胞因子受体例如白细胞介素受体，例如IL-1R（I和II型），IL-2R（ $\alpha$ ， $\beta$ 和 $\gamma$ 亚基），IL-3R，IL-4R，IL-5R，IL-6R；gp130，IL-8R，IL-13R $\alpha$ 1，IL-4R $\alpha$ ，IL-15R（ $\alpha$ ， $\beta$ 和 $\gamma$ 亚基），IL-17R；TNF受体（TNF-RI和TNF-RII）；IL- $\beta$ ，IL-2，IL-10，IL-15，G-CSF，CSF-1，M-CSF，GM-CSF，HGF，EGF，PDGF，IGF，FGF，TGF- $\beta$ ，IP-10，ITAC，MIG和VEGF的受体；CD标

记物例如 CD2, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD16, CD19, CD20, CD22, CD24, CD28, CD33, CD40, CD48, CD69, CD70, CD122 和 CD244; 和 ICOS-L, OX-40-L, CD40L 和 CD137-L 的受体。生物测定法受体的膜结合细胞外配体结合区还可以包括作为通常未在细胞膜上或细胞膜中发现的结合区的分子, 例如胞质蛋白或可溶性蛋白, 例如但不限于, 通常被分泌的蛋白质。因此, 细胞外配体结合区还可以包括 SOST, 和 LDL 相关蛋白例如 LRP5 和 LRP6, 趋化因子, 细胞因子, 和生长因子, 其依靠跨膜区而呈现在细胞外。本领域技术人员将会理解, 在编码生物测定法受体的载体的 DNA 序列中包含将细胞外配体结合区靶向细胞表面的信号序列。此类信号序列在本领域内是已知的, 并且包括与细胞外配体结合区天然相连的序列(信号序列/前导序列)。在将细胞外配体结合区靶向细胞表面的过程中信号序列通常将被加工和除去。

在一个实施方案中, 可以选择细胞外配体结合区, 从而使其与一个或多个其他细胞外配体结合区相互作用以获得能够识别(结合)配体的多联(multiply-associated)细胞外配体结合区。因此, 在一个实施方案中, 本发明的生物测定法受体包含超过一个的膜结合细胞外配体结合区。更优选地, 可在宿主细胞中表达包含不同配体结合区的两种或更多种生物测定法受体以获得能够识别(结合)配体的多联细胞外配体结合区。

跨膜区通常用于将生物测定法受体锚定至细胞膜(从而细胞外配体结合区是膜结合的)并且包括任何蛋白质(或编码此类蛋白质的核酸)。这样的区域可以来源于各种来源, 例如 T 细胞受体(TCR)的  $\alpha$ 、 $\beta$  或  $\zeta$  链(TCR), CD28, CD4, CD5, CD8, CD3 $\epsilon$ , CD16, CD22, CD23, CD45, CD80, CD86, CD64, CD9, CD37, CD122, CD137 或 CD154, 细胞因子受体例如白细胞介素受体, TNF-R, 酪氨酸激酶受体或干扰素受体, 或集落刺激因子受体的全部或一部分。备选地, 跨膜区可以是合成的。合适的合成的跨膜区将主要包含疏水氨基酸例如亮氨酸和缬氨酸。

细胞内信号传导区包括任何蛋白质(或编码此类蛋白质的核酸),所述蛋白质可以参与导致直接或间接产生细胞内信使系统的信号的产生。特定的细胞内信使系统包括一个或多个激酶途径例如酪氨酸激酶途径、MAP 激酶途径或蛋白激酶 C 途径; G 蛋白或磷脂酶介导的途径; 钙介导的途径; cAMP 或 cGMP 介导的途径; 或一个或多个牵涉一种或多种细胞因子例如白细胞介素(例如 IL-2)或转录因子例如 NF $\kappa$ B、NFAT 或 AP-1 的合成的途径。最优选地,这样选择细胞内信号传导区域,即使得它们协同作用。

细胞内信号传导区可来源于一种或多种天然发生的蛋白质信号传导序列。合适的实例包括但不限于,来源于 TCR 的序列例如  $\zeta$ 、 $\eta$  或  $\epsilon$  链的部分,和包括 TCR $\zeta$  链的第一(TCR $\zeta$ 1)、第二(TCR $\zeta$ 2)和第三(TCR $\zeta$ 3)免疫受体的基于酪氨酸的激活基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)(ITAM), FcR $\gamma$  例如 FcRIII $\gamma$  或 FcRI $\gamma$ , FcR $\beta$  例如 FcRI $\beta$ ; CD3 $\gamma$ ; CD3 $\delta$ ; CD3 $\epsilon$ ; 和 CD5、CD22、CD79a、CD79b 或 CD66d。特别优选的 ITAM 包括来源于 TCR $\zeta$ 1、TCR $\zeta$ 2、TCR $\zeta$ 3 和 Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ ; CD4; CD8; 和 Fc 受体的  $\gamma$  链的那些。还包括 SB28 (GSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAGS; SEQ ID NO: 1) 和 SB29 (GSMIETYNQTSPRSAATGLPISMKGS; SEQ ID NO: 2); 可在每个序列的任一端省略一个或两个 GS 连接体。特别希望细胞内信号传导区包括合成的信号传导区,例如基于上述细胞内信号传导区中的任一个的序列的合成区域。合成的 ITAM 和合成的信号传导区以及制备其的方法描述于 WO 00/63372 和 WO 00/132867 中,所述申请通过引用以其整体合并入本文(作为例子参见表 1)。可如 WO 00/63372 和 WO 00/132867 中所描述的,使用这些信号传导基序的组合。

还包括例如来自下列的信号传导组分:细胞因子受体例如 IL-1 $\beta$ 、TNF-RI 和 TNFRII, 和干扰素受体; Toll 样受体(TLR)例如 TLR4; 集落刺激因子例如 GM-CSF; 酪氨酸激酶例如 ZAP-70、fyn、lyk、ltk、syk 和其结合性组分例如 Vav、Crk、LAT 和 Grb-2; 磷脂酶 C 和磷酸肌醇-3 激酶; 粘着分子例如 LFA-1 和 LFA-2、B29、MB-1、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、



CD5、CD2 和 CD154，以及共刺激分子例如 CD28、ICOS、CD134 和 CD137。还包括免疫受体的基于酪氨酸的抑制基序 (ITIM)。ITIM 的特定实例包括 Fc $\gamma$ R (例如 Fc $\gamma$ RIIB)、CD22、EPOR、IL-2s $\alpha$ R 和 IL-3pR。

表 1. 特别地用于本发明的主要信号传导基序的来源和氨基酸序列。  
共有氨基酸序列的位置以粗体强调。

来源	细胞内 信号传导区	氨基酸序列
TCR $\zeta$ 1	SB1 <sup>a</sup>	GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEM (SEQ ID NO: 3)
TCR $\zeta$ 2	SB2 <sup>a</sup>	RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER (SEQ ID NO: 4)
TCR $\zeta$ 3	SB3 <sup>a</sup>	RGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA (SEQ ID NO: 5)
FcR $\gamma$	SB4 <sup>a</sup>	YEKSDGVYTG <b>LSTRNQETYETL</b> KHEKP (SEQ ID NO: 6)
FcR $\beta$	SB5 <sup>a</sup>	GNKBPEDRVYEELNIYSATYSELEDPGEMSP (SEQ ID NO: 7)
CD3 $\gamma$	SB6 <sup>a</sup>	KQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLR (SEQ ID NO: 8)
CD3 $\delta$	SB7 <sup>a</sup>	ALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO: 9)
CD3 $\epsilon$	SB8 <sup>a</sup>	QNKERPPPVPNPDYEP <b>IRKGRDLYSGLNQRRI</b> (SEQ ID NO: 10)
CD5	SB9 <sup>a</sup>	HVDNEYSQPPRNSRLSAYPALEGVLHRS (SEQ ID NO: 11)
CD22	SB10 <sup>a</sup>	PPRTCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDE (SEQ ID NO: 12)
CD79a	SB11 <sup>a</sup>	EYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDV (SEQ ID NO: 13)
CD79b	SB12 <sup>a</sup>	KAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEV (SEQ ID NO: 14)
CD66d	SB13 <sup>a</sup>	PLPNPRTAASIYEELLKHDTNIYCRMDHKAEVA (SEQ ID NO: 15)
FcR $\gamma$	SB4* <sup>a</sup>	YEKSDGVYTG <b>LSTRNQETYDTL</b> KHEKP (SEQ ID NO: 16)

非天然的	SB14 <sup>a</sup>	GQDGLYQELNTRSRDEYSVLEGRKAR (SEQ ID NO: 17)
非天然的	SB15 <sup>a</sup>	GQDGLYQELNTRSRDEAYSVLEGRKAR (SEQ ID NO: 18)
非天然的	SB16 <sup>a</sup>	GQDGLYQELNTRSRDEAAYSVLEGRKAR (SEQ ID NO: 19)
非天然的	SBX <sup>a</sup>	RKNPQEGLYNELQKDKMAEDTYDALHMQA (SEQ ID NO: 20)
非天然的	SBQ9 <sup>a</sup>	GQNQLYNELQQQQQQQQQYDVLRRGRDPEM (SEQ ID NO: 21)

正如本领域技术人员将会意识到的，可根据生物测定法受体的要求，从天然序列产生氨基酸缺失、插入和/或突变以改变所述区域的准确性质 (precise nature)。

正如对于本领域技术人员来说是很清楚的，细胞内信号传导区的组合可以在分开的生物测定法受体内使用，或者可以在单个生物测定法受体内以串联的方式使用。最优选地，以串联的方式使用它们。

在一个实施方案中，生物测定法受体的细胞内信号传导区包含来源于 CD28 的一个细胞内信号传导区和来源于 TCR 的组分例如 TCR  $\zeta$  或来源于与所述信号传导区相关联的信号传导级联反应的组分的第二个细胞内信号传导区。在另一个实施方案中，一个细胞内信号传导区来源于 CD28，第二个细胞内信号传导区导致直接或间接产生信使。

细胞内信号传导区的最优选组合包括 CD28 和 TCR  $\zeta$ ，ICOS 和 TCR  $\zeta$ ，CD134 和 TCR  $\zeta$ ，以及 CD28 和来源于一种或多种上述 ITAM 的合成信号传导区。

报告子区包括能够产生可测量的 (可检测的) 信号的化合物，例如但不限于萤光素酶、分泌型碱性磷酸酶 (SEAP)、绿色荧光蛋白或红色荧光蛋白。因此，报告子区信号测量包括测量光的发射、荧光或碱性磷酸酶产生。最优选地，所测量的信号是萤光素酶产生或 SEAP 产生。依赖于由细胞内信号传导区产生的信号，还可使用本领域已知的方法来测量用于评估目的化合物的信号。优选的信号包括测量细胞因子产生 (例如，IL-2 产生)、细胞增殖或凋亡。

在一个优选的实施方案中，用于表达本发明的生物测定法受体的载体包含编码 IL-17R 的细胞外区域、CD28 跨膜区、CD28 细胞内信号传导区和 TCR  $\zeta$  信号传导区以及编码萤光素酶的报告子区的 DNA 序列。在另一个优选的实施方案中，编码生物测定法受体的载体包含编码 KDR (VEGF 受体) 的细胞外结合区、CD28 跨膜区、CD28 细胞内信号传导区和 TCR  $\zeta$  信号传导区以及任选的编码萤光素酶的报告子区的 DNA 序列。

在最优选的实施方案中，本发明的方法的载体包含编码来源于 CD28 的跨膜区 (SEQ ID NO: 28)、来源于 CD28 的细胞内信号传导区 (SEQ ID NO: 29) 和来源于 TCR 的  $\zeta$  链的细胞内信号传导区 (SEQ ID NO: 30) 以及来源于 TNF- $\alpha$ 、IL-17 受体或 KDR 的细胞外配体结合区的 DNA。CD28 跨膜区和细胞内信号传导区和 TCR 的  $\zeta$  链可以用间隔子序列进行连接，如 SEQ ID NO: 31 中所示。优选地，报告子区是萤光素酶或 SEAP。最优选地，所述 DNA 编码细胞外配体结合区的氨基酸序列，所述氨基酸序列包含或由 SEQ ID NO: 24 或 25 的 IL-17 受体序列组成，或者包含或由 SEQ ID NO: 26 或 27 的 KDR 序列组成。

本发明还提供了包含至少一种编码本发明生物测定法受体的载体 (即第一载体) 的哺乳动物宿主细胞。宿主细胞可以是可被转染或转化的任何细胞或细胞系，包括 Jurkat 细胞、HEK293、CHO、NIH3T3、NS0、Cos-7、Hela、MCF-7、HL-60、EL4、A549 和 K562 细胞。最优选地，使用 Jurkat 细胞。

在优选地实施方案中，哺乳动物宿主细胞包含编码生物测定法受体的额外载体 (即与本发明的第一载体不同的载体)，所述受体包含：

(e) 细胞外配体结合区；

(f) 跨膜区；

(g) 一个或多个能够传递信号的细胞内信号传导区，其中所述细胞外配体结合区和细胞内信号传导区非天然地融合在一起；和任选地

(h) 报告子区；

其中当所述 DNA 序列在适合于载体表达的条件下在所选择的宿主

细胞中表达时，配体与细胞外配体结合区的结合导致从细胞内信号传导区产生信号，和当存在时，导致从报告子区产生可检测的信号。在一个实施方案中，部分(h)的报告子区与存在于第一载体中的报告子区相同。备选地，该报告子区是不相同的。因此，例如，一个报告子区可以是萤光素酶，而另一个可以是 SEAP。

最优选地，当宿主细胞包含 2 种均包含报告子区的本发明生物测定法受体时，所述区域不相同。例如，一个可以是萤光素酶报告子区，第二个可以是 SEAP 报告子区。备选地，它们可以是相同的报告子区。

可使用任何常规技术例如电穿孔、磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、转介(transvection)、显微注射、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、刮擦加载(scrape loading)、射弹引入或转染(ballistic introduction or infection)(参见，例如 Davis 等人, Basic Methods in Molecular Biology, 1986; 和 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989)，用本发明的载体转染哺乳动物宿主细胞。用于在宿主细胞内诱导载体表达的合适条件在本领域内是熟知的。转染可以是瞬时的，或者备选地，可产生稳定表达生物测定法受体的细胞系，如本领域内已知的。特别地，参见 Methods in Molecular Biology 7. Gene Transfer and Expression Protocols. Edited EJ. Murray 1991。

因此，本发明还提供了多肽，所述多肽包含：

(i) 能够结合配体的细胞外配体结合区；

(j) 跨膜区；

(k) 一个或多个能够传递信号的细胞内信号传导区，其中所述细胞外配体结合区和细胞内信号传导区非天然地融合在一起；和

(l) 报告子区；

其中配体与细胞外配体结合区的结合导致从报告子区产生可检测的信号。在一个实施方案中，细胞外配体结合区来源于细胞因子受体、细胞表面受体或可溶性蛋白。在优选的实施方案中，细胞因子受体是

IL-17R。在另一个优选的实施方案中，细胞表面报告子是 KDR

本发明还提供了包含至少一个编码在上面 (a) 至 (d) 中定义的生物测定法受体的载体的哺乳动物细胞。进一步提供了包含在上面 (i) 至 (1) 中描述的多肽作为表面膜蛋白的哺乳动物细胞。优选地，哺乳动物细胞是人细胞，最优选地是 Jurkat 细胞。

本发明还提供了用于评估目的化合物的方法，其包括使用任何一种或多种本发明的载体。因此，提供了用于评估目的化合物的方法，该方法包括：

(i) 提供哺乳动物细胞，其包含编码在上面 (a) 至 (d) 中和任选地 在上面 (e) 至 (h) 中定义的生物测定法受体的本发明载体；

(ii) 提供包含配体的第一样品；

(iii) 提供包含目的化合物的第二样品；和

(iv) 测量由细胞内信号传导区产生的信号和/或由报告子区产生的可检测的信号。

该方法是特别有利的，因为其允许开发对于每种潜在的治疗性抗体产物来说基本上相似的强有力的测定法形式，从而有助于更好地理解产物的稳定性和允许直接、有意义地比较不同批次的产物。之前，重组受体被公开为有助于细胞激活过程的手段，其中可通过对有此需要的患者进行施用来将激活的细胞用作治疗剂；参见例如，WO 97/23613、WO 99/57268、EP0517895、WO 96/23814 和 W00132709；但其中没有暗示，在那里所描述的受体可用于强有力的且可重现的生物测定法方法中。

在最优选的实施方案中，本发明的方法的载体包含编码来源于 CD28 的跨膜区 (SEQ ID NO: 28)、来源于 CD28 的细胞内信号传导区 (SEQ ID NO: 29) 和来源于 TCR 的  $\zeta$  链的细胞内信号传导区 (SEQ ID NO: 30) 以及来源于 TNF- $\alpha$ 、IL-17 受体或 KDR 的细胞外配体结合区的氨基酸序列的 DNA。CD28 跨膜区和细胞内信号传导区和 TCR 的  $\zeta$  链可以用间隔子序列进行连接，如 SEQ ID NO: 31 中所示。优选地，报告子区是萤光素酶或 SEAP。最优选地，所述 DNA 编码细胞外配体结合区

的氨基酸序列，所述氨基酸序列包含或由 SEQ ID NO: 24 或 25 的 IL-17 受体序列组成，或者包含或由 SEQ ID NO: 26 或 27 的 KDR 序列组成。

在一个实施方案中，本发明的方法另外还包括下述步骤：在根据上面的部分 (iii) 提供第二样品之前测量由细胞内信号传导区产生的信号和/或由报告子区产生的可检测的信号。

所述配体包括任何目的核酸、蛋白质或抗原，例如但不限于，CD 标记物配体例如 CD48, CD40L, CD40, CD122, 细胞因子和趋化因子例如 IL-2, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-10, IP-10, ITAC, MIG, VEGF, 共同刺激配体例如 ICOS-L, OX-40-L, CD137-L, 信号传导途径的组分，和事实上，任何目的抗原。所述配体还包括抗体。在本发明的方法中，所述配体最优选地是可溶性配体。所述方法还可用于呈现在哺乳动物细胞、细菌、病毒、酵母细胞或其他颗粒例如合成的颗粒（例如琼脂糖珠或磁性珠）的表面上的配体。对于本领域技术人员来说很清楚的是，这样的配体具有至少一个结合伙伴，为本发明的目的，所述结合伙伴是在宿主细胞表面上表达的生物测定法受体的细胞外配体结合区。

第二样品包含或由目的化合物组成，所述目的化合物与配体竞争结合细胞外配体结合区或者备选地结合配体。因此，“目的化合物”包括抗体，小分子（例如 NCE）和其他药物，蛋白质，多肽和肽，肽模拟物（peptidomimetics），脂质，碳水化合物和核酸。最优选地，存在于第二样品内的目的化合物是抗体。因此，在一个优选的实施方案中，第二样品包含与生物测定法受体的细胞外配体结合区特异性地相互作用的抗体，在第二个优选的实施方案中，第二样品包含特异性地与配体结合的抗体。“与...特异性地相互作用”（例如识别或结合）是指，目的化合物，最优选抗体，对于所选择的细胞外配体结合区或配体具有比对于其他区域或配体更大的亲和力。抗体可以与生物测定法受体的细胞外配体结合区直接或间接相互作用。要理解，第二样品还可用作对照、标准或比较样品。因此，可多次进行本发明的方法以允许进行样品的比较。

此处使用的术语“抗体”包括完整的抗体和其功能活性片段或衍生物，并且可以是但不限于单链抗体，二、三或四价抗体，Bis-scFv，双抗体，三链抗体，四链抗体，单结构域抗体，改造的 Fab 片段，Fab 片段，Fab' 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段和上述任一种的表位结合片段（参见例如 Holliger 和 Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136）。在一个实例中，抗体是具有天然的或经修饰的铰链区的 Fab' 片段。已在例如 US 5,677,425、W09915549 和 W09825971 中描述了许多经修饰的铰链区，所述参考资料通过引用合并入本文。在另一个实例中，抗体包括在 W02005003169、W02005003170 和 W02005003171 中描述的那些。

抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分，即包含特异性地结合抗原的抗原结合位点的分子。本发明的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白分子的任一类（例如 IgG、IgE、IgM、IgD 或 IgA）或亚类。可选择与所提出的抗体分子功能，特别是可能需要的效应器功能相关的恒定区结构域（如果存在）。例如，恒定区结构域可以是人 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM 结构域。特别地，当抗体分子希望用于治疗性用途且需要抗体的效应器功能（例如依赖抗体的细胞毒性（ADCC）和/或依赖补体的细胞毒性（CDCC））时，可使用人 IgG 恒定区结构域，特别是 IgG1 和 IgG3 同种型的恒定区结构域。备选地，当抗体分子希望用于治疗目的但不需要抗体的效应器功能时，可使用 IgG2 和 IgG4 同种型。

可通过本领域内已知的任何合适的方法来产生用于本发明的抗体。此类抗体包括但不限于多克隆、单克隆、人源化、噬菌体展示来源的抗体或嵌合抗体。

可通过本领域内已知的任何方法例如杂交瘤技术（Kohler & Milstein, Nature, 1975, 256: 495-497）、三源杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术（Kozbor 等人, Immunology Today, 1983, 4, 72）和 EBV-杂交瘤技术（Cole 等人, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985）来制备单克隆

抗体。

还可使用单淋巴细胞抗体法，通过克隆和表达免疫球蛋白可变区 cDNA 来产生用于本发明的抗体，所述 cDNA 是使用例如由 Babcook, J. 等人, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(15), 7843-7848; WO 92/02551; WO2004/051268 和 WO2004/106377 描述的方法从被选择用于产生特异性抗体的单个淋巴细胞产生的。

嵌合抗体是由免疫球蛋白基因编码的那些抗体，所述免疫球蛋白基因已进行了基因工程改造从而轻链和重链基因由属于不同物种的免疫球蛋白基因区段组成。

人源化抗体是具有一个或多个来自非人物种的互补决定区 (CDR) 和来自人免疫球蛋白分子的构架区的抗体分子 (参见, 例如, US 5, 585, 089)。

用于产生和制造重组抗体的方法在本领域内是熟知的 (参见, 例如, Boss 等人, US 4, 816, 397; Cabilly 等人, US 6, 331, 415; Simmons 等人, 2002, Journal of Immunological Methods, 263, 133-147; Shrader 等人, WO 92/02551; Orlandi 等人, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833; Riechmann 等人, 1988, Nature, 322, 323; Queen 等人, US 5, 585, 089; Adair, WO91/09967; Mountain 和 Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma 等人, 1998, J. Immunol. Methods, 216: 165-181; Holliger 和 Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136)。

用于本发明的抗体还可以使用本领域内已知的各种噬菌体展示方法来产生, 并且包括由 Brinkman 等人, 1995, J. Immunol. Methods, 182: 41-50; Ames 等人, 1995, J. Immunol. Methods, 184, 177-186; Kettleborough 等人 1994, Eur. J. Immunol., 24, 952-958; Persic 等人, 1997, Gene, 187, 9-18; 和 Burton 等人, 1994, Advances in Immunol., 57, 191-280; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; 和 WO 95/20401; 和 US 5, 698, 426; 5, 223, 409; 5, 403, 484; 5, 580, 717; 5, 427, 908;



5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743; 和 5,969,108 公开的那些。

此外,还可使用转基因小鼠或其他生物(包括其他哺乳动物)来产生抗体(参见例如 US 6,300,129)。

本发明的载体可包含对于在宿主细胞中表达本发明的生物测定法受体来说所必需的所有必需基序和信号。因此,载体将包含转录起始区、启动子区和终止区。启动子区将与包含生物测定法受体的编码区有效连接,并且可以是可诱导的或具有组成型活性。如果想要,可提供非编码区,例如以稳定 mRNA。可使用标准的克隆和筛选技术从 cDNA 文库获得编码本发明生物测定法受体的组分的核酸,所述 cDNA 文库是使用表达序列标签(EST)分析(Adams, M. 等人,1991, Science, 252:1651-1656; Adams, M. 等人,1992, Nature 355:632-634; Adams, M. 等人,1995, Nature, 377:Suppl: 3-174)从人细胞中的 mRNA 产生的。还可从天然来源例如基因组 DNA 文库获得编码本发明生物测定法受体的组分的核酸,或可使用熟知的和商购可获得的技术合成编码本发明生物测定法受体的组分的核酸。

图 1 显示了表达盒,其被克隆入 pBluescript<sup>®</sup> II SK(+) 的大的 NotI 和 XhoI 限制性片段从而产生生物测定法受体穿梭载体。

图 2 显示了 IL-17 诱导的来自 IL-17R/CD28-TCR  $\zeta$  生物测定法受体的荧光素酶应答。

图 3 显示了抗-IL-17 抗体在用 500 ng/ml 浓度的 IL-17 处理的细胞中阻断荧光素酶产生。

图 4 显示了 VEGF 诱导的来自 KDR/CD28-TCR  $\zeta$  生物测定法受体的荧光素酶应答。(■)表示在 hVEGF 不存在的情况下处理的细胞。

图 5 显示了抗-KDR 抗体在用 200 ng/ml 浓度的 hVEGF (◆) 和不用 hVEGF (■) 处理的细胞中阻断荧光素酶产生。还分别用 (▲) 和 (●) 显示在抗体不存在的情况下(即,只使用 hVEGF, 和只使用培养基)处理的细胞。

图 6 显示了具有前导序列(图板(a)(SEQ ID NO: 24))和不具有

前导序列（图板(b) (SEQ ID NO: 25)）的 IL-17 细胞外区域的氨基酸序列。

图 7 显示了具有前导序列（图板(a) (SEQ ID NO: 26)）和不具有前导序列（图板(b) (SEQ ID NO: 27)）的 KDR 细胞外区域和跨膜区域的氨基酸序列。

图 8 显示了所使用的 CD28 跨膜区（图板(a) (SEQ ID NO: 28)）、CD28 细胞内区域（图板(b) (SEQ ID NO: 29)）和 TCR  $\zeta$  细胞内区域（图板(c) (SEQ ID NO: 30)）的氨基酸序列。

图 9 显示了通过以粗体显示的间隔子序列连接的 CD28 跨膜区、CD28 细胞内区域和 TCR  $\zeta$  细胞内区域的氨基酸序列（SEQ ID NO: 31）。

## 实施例

### 实施例 1: 生物测定法表达克隆盒和穿梭载体的构建

为了有助于构建不同的生物测定法受体，设计了中间穿梭载体。该穿梭载体包含对于生物测定法受体的表达来说所必需的完整表达盒。该载体包含先前在 J. Immunol. 2004, 172:104 中描述的设计在 pBluescript SK(+) (Stratagene) 中的克隆盒。该克隆盒的 5' 是 HCMV 启动子，和该克隆盒的 3' 是 SV40 多腺苷酸化信号。所述克隆盒由细胞外结构域 (ECD) 结合组分 (细胞外配体结合区)、跨膜组分和信号传导区组分构成，并且有助于各单个组分的容易的交换。

组合下列 DNA 片段，从而产生穿梭载体：

(a) pBluescript II SK(+) (Stratagene) 的载体主链，以 NotI 至 XhoI 片段的形式；

(b) 上面和图 1 中所描述的克隆盒，以 HindIII 至 EcoRI 片段的形式；

(c) HCMV 启动子，以 NotI 至 HindIII 片段的形式；和

(d) SV40 多腺苷酸化信号, 以 EcoRI 至 XhoI 片段的形式。

该穿梭载体用于从在实施例 2 中描述的结合、跨膜和信号传导组分片段产生各种不同的生物测定法受体。然后将完整的生物测定法受体表达盒亚克隆入在实施例 3 中描述的报告基因载体中。

## 实施例 2: 结合、跨膜和信号传导区域片段的构建

### A) 作为 HindIII 至 NarI 片段的人 IL-17 受体细胞外配体结合区

使用寡核苷酸: 5'-cggggaagcttccaccatgggggcccgcacgcagcccgccgtccgctgtcccggggcccctgctggggctgctcctgctgctcctgggcgtgctggcccggggtggtgcctccctgcgactcctggaccac-3' (SEQ ID NO: 22) 和 5'-cccggcgccccacaggggcatgtagtccggaattgg-3' (SEQ ID NO: 23) 从包含全长人 IL-17 受体基因的质粒中 PCR 克隆出包含人 IL-17 受体的前导序列和细胞外区域残基 1 至 320 (GenBank ref: NM 014339) 的片段。SEQ ID NO: 22 寡核苷酸导入 5' HindIII 位点和 Kosak 序列, 并且除去 NarI 限制位点。SEQ ID NO: 23 寡核苷酸导入了 3' NarI 位点。然后, 用限制酶 HindIII 和 NarI 消化 PCR 产物。所使用的 IL-17 受体的氨基酸序列显示于图 6 中。本领域技术人员将会理解可使用通常在表达时被切割的不同的前导序列, 和将能够使用公知的技术整合编码此类前导序列的 DNA。

### B) 作为 HindIII 至 MluI 片段的人 KDR 细胞外配体结合区和跨膜区

通过合成 (GENEART) 产生包含人激酶插入结构域受体 (KDR) 的前导序列、细胞外结构域和跨膜结构域残基 1 至 789 (GenBank ref: NM 00002253) 的片段, 其中除去了任何天然的内部 HindIII、MluI、BamHI、EcoRI、BglII、NarI、NotI 和 SpeI 位点。用限制酶 HindIII 和 MluI 从提供的质粒 (042016pPCR-Script) 中消化出该片段。所使用的 KDR 的氨基酸序列显示于图 7 中。本领域技术人员将会理解可使用通常在表达时被切割的不同的前导序列, 和将能够使用公知的技术整合编码

此类前导序列的 DNA。

C) 作为 NarI 至 EcoRI 片段的人 CD28 跨膜区和细胞内信号传导区和人 TCR  $\zeta$  细胞内信号传导区

用限制酶 NarI 和 EcoRI 从先前描述的质粒 (J. Immunol. 2004, 172: 104) 中消化出包含人 CD28 跨膜区和细胞内信号传导区的残基 135 至 202 以及人 TCR  $\zeta$  细胞内信号传导区的残基 31 至 142 的片段。所使用的 CD28 跨膜区、CD28 细胞内信号传导区和 TCR  $\zeta$  细胞内信号传导区的氨基酸序列显示于图 8 中。使用间隔子序列进行连接的所有 3 个区域的氨基酸序列 (包括间隔子序列) 显示于图 9 中。

D) 作为 MluI 至 EcoRI 片段的人 CD28 信号传导区和人 TCR  $\zeta$  细胞内信号传导区

使用限制酶 NarI 和 EcoRI 从先前描述的质粒 (J. Immunol. 2004 172: 104) 中消化出包含人 CD28 细胞内信号传导区的残基 162 至 202 和人 TCR  $\zeta$  细胞内信号传导区的残基 31 至 142 的片段。所使用的 CD28 细胞内信号传导区和 TCR  $\zeta$  细胞内信号传导区的氨基酸序列显示于图 8 中。

### 实施例 3: 生物测定法受体报告基因载体的构建

然后, 将通过在实施例 1 中描述的穿梭载体内组合实施例 2 中描述的组件而产生的各生物测定法受体的全长表达盒亚克隆入报告基因载体 pNifty2-Luc 或 pNifty2-SEAP (Invivogen) 中。后面所述的载体包含在 NF- $\kappa$ B 诱导型启动子的控制下的萤光素酶报告基因 (pNifty2-Luc) 或分泌型碱性磷酸酶报告基因 (pNifty2-SEAP)。除此以外, 它们还包含用于在大肠杆菌 (*E. coli*) 和哺乳动物中进行选择的选择标记 Zeocin<sup>™</sup>。以 NotI 至 NotI 片段的形式从穿梭载体 (实施例 1) 中取出生物测定法受体表达盒, 然后克隆入 pNifty2-Luc 或

pNifty2-SEAP 的 NotI 位点中。可以以任一方向克隆表达盒，并选择和分析两个方向的实例。

#### 实施例 4: 稳定的生物测定法受体报告基因细胞系的产生

按照厂商说明书 (Amaya Biosystems), 使用 Amaya Nucleofector 装置将如实施例 3 中所述而产生的载体的质粒 DNA 转染入人 T 细胞白血病细胞系 Jurkat E6.1 中。然后, 通过在浓度为 200、300 或 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 Zeocin™ 中进行培养而产生稳定的细胞系。

#### 实施例 5: 使用 IL-17R/CD28-TCR $\zeta$ 生物测定法受体来分析抗人 IL-17 抗体

产生表达生物测定法受体的稳定细胞系, 所述生物测定法受体包含人 IL-17 受体细胞外配体结合区组分、人 CD28 跨膜区和细胞内信号传导区以及人 TCR  $\zeta$  细胞内信号传导区组分。向这些细胞中加入一定滴度的人 IL-17, 4 小时后按照厂商说明书使用 LucLite 测定法试剂盒 (Perkin Elmer) 确定产生的萤光素酶的量 (参见图 2)。对于表达 IL-17R/CD28-TCR  $\zeta$  生物测定法受体的各种不同细胞系所进行的分析表明, 以与报告基因盒相反的方向包含生物测定法受体表达盒的载体更为有效。从该滴定 (图 2) 中选择出 IL-17 的浓度, 并用于评估抗 IL-17 抗体阻断经由 IL-17R/CD28-TCR  $\zeta$  生物测定法受体而发生的萤光素酶产生的能力 (参见图 3)。

#### 实施例 6: 使用 KDR/CD28-TCR $\zeta$ 生物测定法受体来分析抗人 KDR 抗体

产生表达生物测定法受体的稳定细胞系, 所述生物测定法受体包含人 KDR (VEGF 受体) 细胞外配体结合区组分和跨膜区、人 CD28 细胞内信号传导区以及人 TCR  $\zeta$  细胞内信号传导区组分。向这些细胞中加

入一定滴度的人 VEGF-A (hVEGF)，4 小时后按照厂商说明书使用 LucLite 测定法试剂盒 (Perkin Elmer) 确定产生的萤光素酶的量 (参见图 4)。对于表达 KDR/CD28-TCR  $\zeta$  生物测定法受体的各种不同细胞系所进行的分析显示，以与报告基因盒相反的方向包含生物测定法受体表达盒的载体更为有效。从该滴定 (图 4) 中选择出 hVEGF 的浓度，并用于评估抗 KDR 抗体阻断经由 KDR/CD28-TCR  $\zeta$  生物测定法受体而发生的萤光素酶产生的能力 (参见图 5)。

<110> UCB S. A.  
FINNEY, Helene  
LAWSON, Alastair

<120> 生物测定法

<130> G0016-W001

<150> GB0523954.6

<151> 2005-11-24

<160> 31

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Gly Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg  
1                   5                   10                   15

Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp  
                  20                   25                   30

Phe Ala Gly Ser  
                  35

<210> 2

<211> 26

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Gly Ser Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala  
1                   5                   10                   15

Thr Gly Leu Pro Ile Ser Met Lys Gly Ser  
                  20                   25

<210> 3  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 3  
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu  
 1                   5                   10                   15  
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met  
                   20                   25                   30

<210> 4  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 4  
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys  
 1                   5                   10                   15  
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
                   20                   25                   30

<210> 5  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 5  
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
                   20                   25

<210> 6  
 <211> 27  
 <212> PRT



<213> 智人

<400> 6

Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln  
1                   5                   10                   15

Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro  
                  20                   25

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Gly Asn Lys Asx Pro Glu Asp Arg Val Tyr Glu Glu Leu Asn Ile Tyr  
1                   5                   10                   15

Ser Ala Thr Tyr Ser Glu Leu Glu Asp Pro Gly Glu Met Ser Pro  
                  20                   25                   30

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp  
1                   5                   10                   15

Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gln Leu Arg  
                  20                   25                   30

<210> 9

<211> 31

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp  
1                   5                   10                   15

Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys  
 20 25 30

<210> 10  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 10  
 Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro  
 1 5 10 15

Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg  
 20 25 30

Ile

<210> 11  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 11  
 His Val Asp Asn Glu Tyr Ser Gln Pro Pro Arg Asn Ser Arg Leu Ser  
 1 5 10 15

Ala Tyr Pro Ala Leu Glu Gly Val Leu His Arg Ser  
 20 25

<210> 12  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 12  
 Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys  
 1 5 10 15

Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp



Lys His Asp Thr Asn Ile Tyr Cys Arg Met Asp His Lys Ala Glu Val  
 20 25 30

Ala

<210> 16  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 16  
 Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln  
 1 5 10 15

Glu Thr Tyr Asp Thr Leu Lys His Glu Lys Pro  
 20 25

<210> 17  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 17  
 Gly Gln Asp Gly Leu Tyr Gln Glu Leu Asn Thr Arg Ser Arg Asp Glu  
 1 5 10 15

Tyr Ser Val Leu Glu Gly Arg Lys Ala Arg  
 20 25

<210> 18  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 18  
 Gly Gln Asp Gly Leu Tyr Gln Glu Leu Asn Thr Arg Ser Arg Asp Glu  
 1 5 10 15

Ala Tyr Ser Val Leu Glu Gly Arg Lys Ala Arg  
 20 25

<210> 19  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 19  
 Gly Gln Asp Gly Leu Tyr Gln Glu Leu Asn Thr Arg Ser Arg Asp Glu  
 1 5 10 15

Ala Ala Tyr Ser Val Leu Glu Gly Arg Lys Ala Arg  
 20 25

<210> 20  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 20  
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys  
 1 5 10 15

Met Ala Glu Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
 20 25

<210> 21  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 21  
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 1 5 10 15

Gln Gln Tyr Asp Val Leu Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met  
 20 25 30

<210> 22  
 <211> 129  
 <212> DNA

<213> 智人

<400> 22

cggaagctt ccacatggg ggccgcacgc agcccgccgt ccgctgtccc ggggccctg 60

ctggggctgc tctgtctgct cctgggcgtg ctggccccgg gtggtgcctc cctgcgactc 120

ctggaccac 129

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> 智人

<400> 23

cccggcgccc cacaggggca tgtagtccgg aattgg 36

<210> 24

<211> 323

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

Met Gly Ala Ala Arg Ser Pro Pro Ser Ala Val Pro Gly Pro Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Pro Gly Gly Ala Ser  
20 25 30

Leu Arg Leu Leu Asp His Arg Ala Leu Val Cys Ser Gln Pro Gly Leu  
35 40 45

Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp Ser Trp Ile His  
50 55 60

Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp Leu Gln Ile Gln Leu  
65 70 75 80

His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu Phe Pro Val Ala His Ile  
85 90 95

Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Ala

100	105	110
Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn Thr Asn Glu Arg Leu Cys Val Arg		
115	120	125
Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu Arg His His His Arg Arg Trp Arg Phe		
130	135	140
Thr Phe Ser His Phe Val Val Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val Thr		
145	150	155
Val His His Leu Pro Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln		
165	170	175
Ser Lys Asn Phe Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val		
180	185	190
Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr		
195	200	205
Val Glu Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp		
210	215	220
Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met		
225	230	235
Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro Arg		
245	250	255
Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu Arg Asn		
260	265	270
Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro Phe Phe Ser		
275	280	285
Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr Val Ser Cys Pro		
290	295	300
Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp Tyr Met Pro Leu Trp		
305	310	315
Gly Ala Gly		

<210> 25  
 <211> 292  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 25  
 Ser Leu Arg Leu Leu Asp His Arg Ala Leu Val Cys Ser Gln Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
  
 Leu Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp Ser Trp Ile  
                   20                   25                   30  
  
 His Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp Leu Gln Ile Gln  
                   35                   40                   45  
  
 Leu His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu Phe Pro Val Ala His  
                   50                   55                   60  
  
 Ile Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser Ile Leu Tyr Leu Glu Gly  
 65                   70                   75                   80  
  
 Ala Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn Thr Asn Glu Arg Leu Cys Val  
                   85                   90                   95  
  
 Arg Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu Arg His His His Arg Arg Trp Arg  
                   100                   105                   110  
  
 Phe Thr Phe Ser His Phe Val Val Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val  
                   115                   120                   125  
  
 Thr Val His His Leu Pro Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His  
                   130                   135                   140  
  
 Gln Ser Lys Asn Phe Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys  
 145                   150                   155                   160  
  
 Val Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile  
                   165                   170                   175  
  
 Thr Val Glu Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu  
                   180                   185                   190  
  
 Trp Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His





Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser  
 100 105 110

Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser  
 115 120 125

Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys  
 130 135 140

Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser  
 145 150 155 160

Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg  
 165 170 175

Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile  
 180 185 190

Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser  
 195 200 205

Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr  
 210 215 220

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu  
 225 230 235 240

Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile  
 245 250 255

Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu  
 260 265 270

Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe  
 275 280 285

Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu  
 290 295 300

Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr  
 305 310 315 320

Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met

---

	325		330		335
Glu Ser Leu Val	Glu Ala Thr Val	Gly Glu Arg Val Arg	Ile Pro Ala		
	340		345		350
Lys Tyr Leu Gly Tyr	Pro Pro Pro	Glu Ile Lys Trp Tyr	Lys Asn Gly		
	355		360		365
Ile Pro Leu Glu Ser	Asn His Thr Ile	Lys Ala Gly His	Val Leu Thr		
	370		375		380
Ile Met Glu Val Ser	Glu Arg Asp Thr	Gly Asn Tyr Thr	Val Ile Leu		
385		390		395	400
Thr Asn Pro Ile Ser	Lys Glu Lys Gln	Ser His Val Val	Ser Leu Val		
	405		410		415
Val Tyr Val Pro Pro	Gln Ile Gly Glu	Lys Ser Leu Ile	Ser Pro Val		
	420		425		430
Asp Ser Tyr Gln Tyr	Gly Thr Thr Gln	Thr Leu Thr Cys	Thr Val Tyr		
	435		440		445
Ala Ile Pro Pro Pro	His His Ile His	Trp Tyr Trp Gln	Leu Glu Glu		
	450		455		460
Glu Cys Ala Asn Glu	Pro Ser Gln Ala	Val Ser Val Thr	Asn Pro Tyr		
465		470		475	480
Pro Cys Glu Glu Trp	Arg Ser Val Glu	Asp Phe Gln Gly	Gly Asn Lys		
	485		490		495
Ile Glu Val Asn Lys	Asn Gln Phe Ala	Leu Ile Glu Gly	Lys Asn Lys		
	500		505		510
Thr Val Ser Thr Leu	Val Ile Gln Ala	Ala Asn Val Ser	Ala Leu Tyr		
	515		520		525
Lys Cys Glu Ala Val	Asn Lys Val Gly	Arg Gly Glu Arg	Val Ile Ser		
	530		535		540
Phe His Val Thr Arg	Gly Pro Glu Ile	Thr Leu Gln Pro	Asp Met Gln		
545		550		555	560

Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser  
565 570 575

Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro  
580 585 590

Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr  
595 600 605

Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile  
610 615 620

Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr  
625 630 635 640

Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val  
645 650 655

Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn  
660 665 670

Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys  
675 680 685

Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn  
690 695 700

Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg  
705 710 715 720

Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr  
725 730 735

Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe  
740 745 750

Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu  
755 760 765

Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Val Ile  
770 775 780

Ile Leu Arg Thr Val  
785

<210> 27

<211> 770

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro Arg Leu Ser  
 1                   5                   10                   15

Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr Leu Gln Ile  
                   20                   25                   30

Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro Asn Asn Gln  
           35                   40                   45

Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser Asp Gly Leu  
   50                   55                   60

Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn Asp Thr Gly  
 65                   70                   75                   80

Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser Val Ile Tyr  
                   85                   90                   95

Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser Val Ser Asp  
           100                   105                   110

Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys Thr Val Val  
           115                   120                   125

Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser Leu Cys Ala  
   130                   135                   140

Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile Ser Trp  
 145                   150                   155                   160

Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala  
           165                   170                   175

Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser Tyr Gln Ser  
           180                   185                   190

---

Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr Asp Val Val  
 195 200 205

Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val  
 210 215 220

Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn  
 225 230 235 240

Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg  
 245 250 255

Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr  
 260 265 270

Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys  
 275 280 285

Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg  
 290 295 300

Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu  
 305 310 315 320

Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala Lys Tyr Leu  
 325 330 335

Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly Ile Pro Leu  
 340 345 350

Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr Ile Met Glu  
 355 360 365

Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro  
 370 375 380

Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val Val Tyr Val  
 385 390 395 400

Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val Asp Ser Tyr  
 405 410 415

Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Pro  
 420 425 430

---

Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu Glu Cys Ala  
 435 440 445

Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr Pro Cys Glu  
 450 455 460

Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu Val  
 465 470 475 480

Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser  
 485 490 495

Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr Lys Cys Glu  
 500 505 510

Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His Val  
 515 520 525

Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln Pro Thr Glu  
 530 535 540

Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser Thr Phe Glu  
 545 550 555 560

Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro Ile His Val  
 565 570 575

Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys  
 580 585 590

Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Met  
 595 600 605

Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys Leu  
 610 615 620

Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val Arg Gln Leu  
 625 630 635 640

Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn Leu Glu Asn  
 645 650 655

Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys Thr Ala Ser

660	665	670
Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu 675	680	685
Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg Asn Leu Thr 690	695	700
Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala 705	710	715 720
Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe Ile Ile Glu 725	730	735
Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu Val Gly Thr 740	745	750
Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile Ile Leu Arg 755	760	765

Thr Val  
770

<210> 28  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 28  
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu  
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val  
20 25

<210> 29  
<211> 41  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 29  
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr



1                    5                    10                    15  
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
                   20                    25                    30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
                   35                    40

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 1                    5                    10                    15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
                   20                    25                    30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
                   35                    40                    45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
                   50                    55                    60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 65                    70                    75                    80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
                   85                    90                    95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
                   100                    105                    110

<210> 31

<211> 186

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu  
1                   5                   10                   15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Thr Arg Gly Ser Arg  
                  20                   25                   30

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro  
                  35                   40                   45

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro  
50                   55                   60

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gly Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg  
65                   70                   75                   80

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn  
                  85                   90                   95

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg  
                  100                   105                   110

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro  
                  115                   120                   125

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala  
130                   135                   140

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His  
145                   150                   155                   160

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp  
                  165                   170                   175

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
                  180                   185

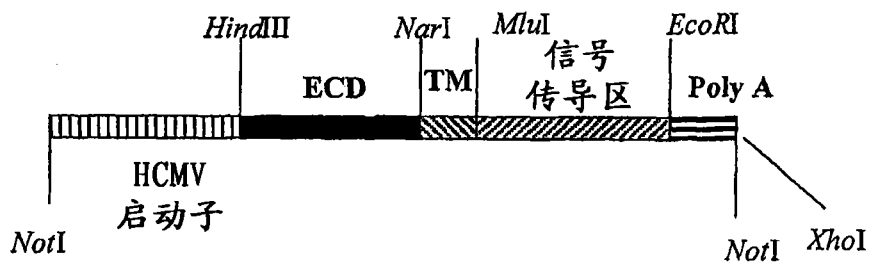


图1

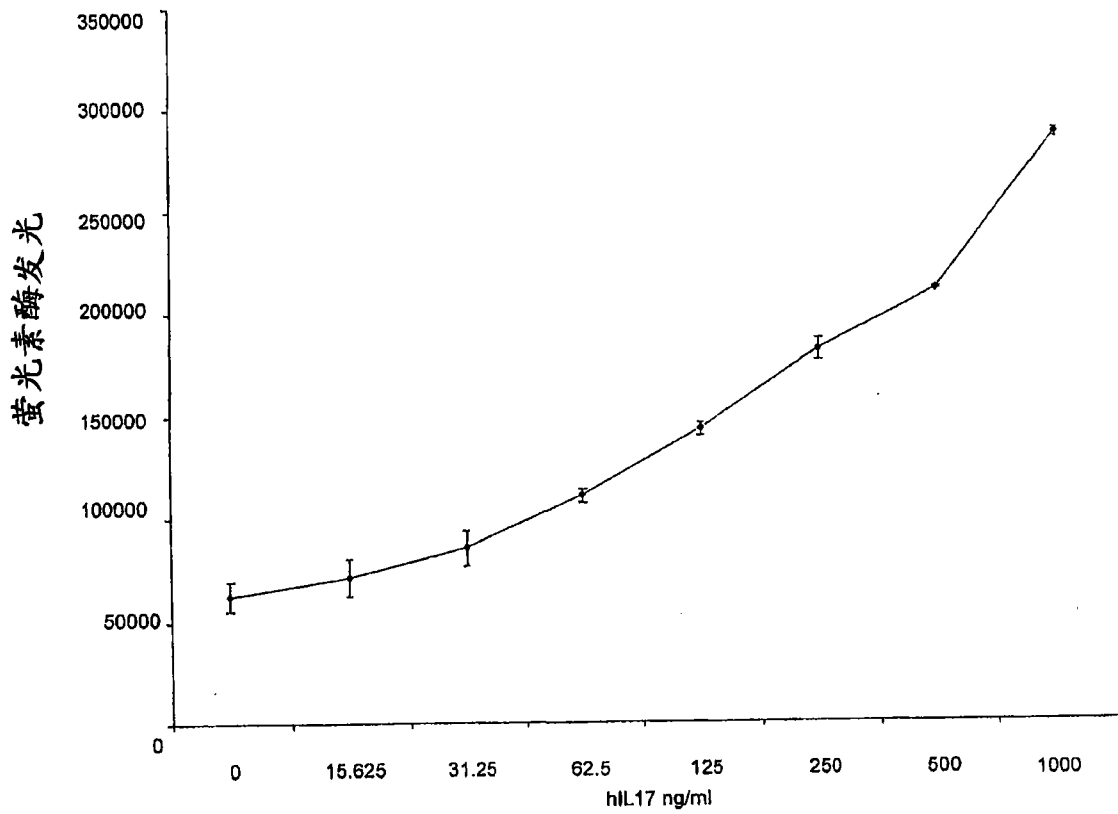


图 2

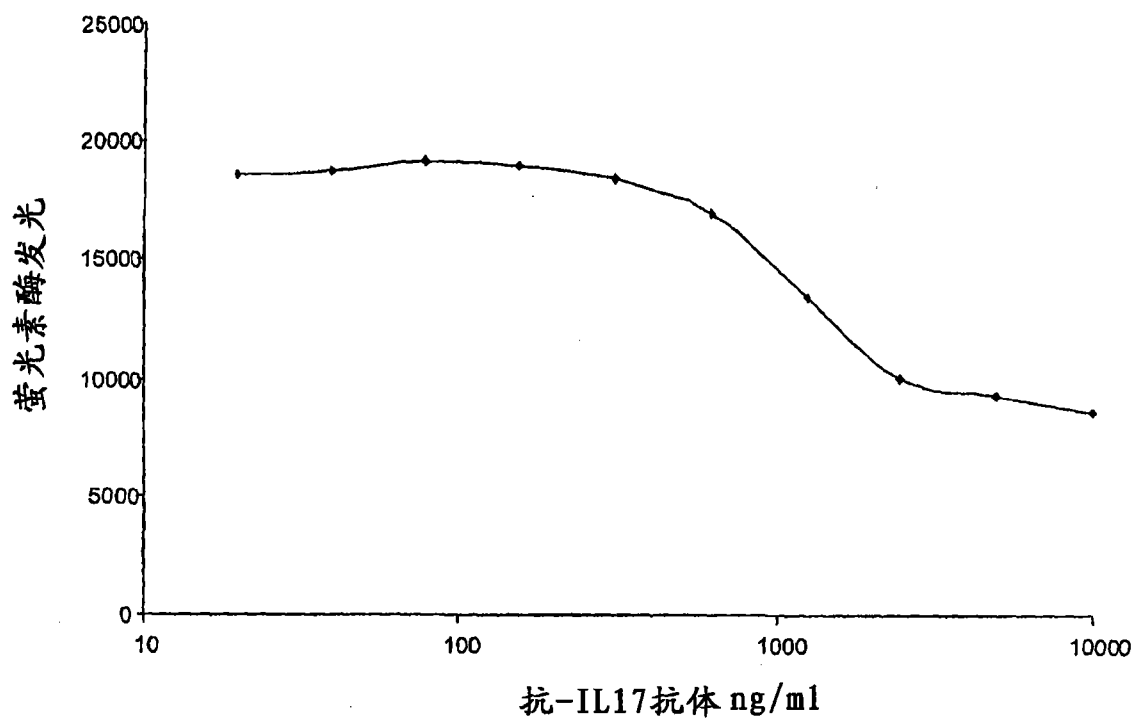


图 3

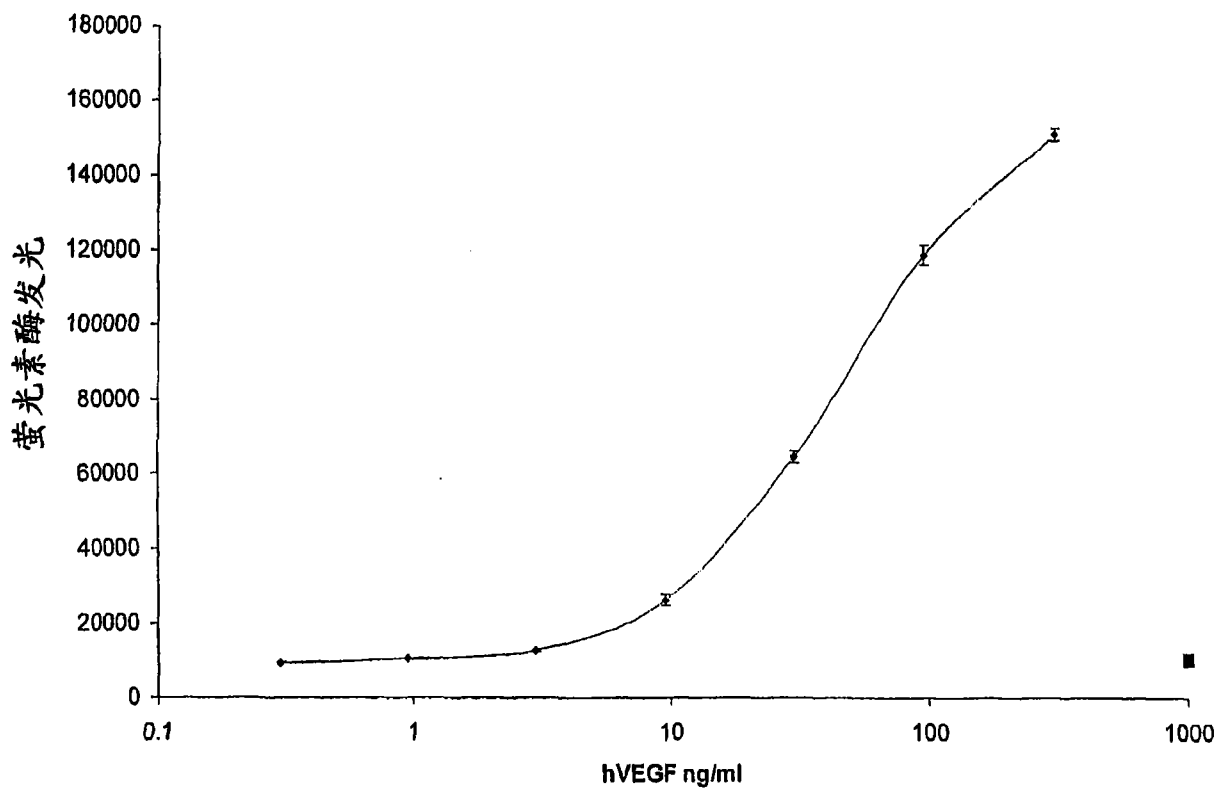


图 4

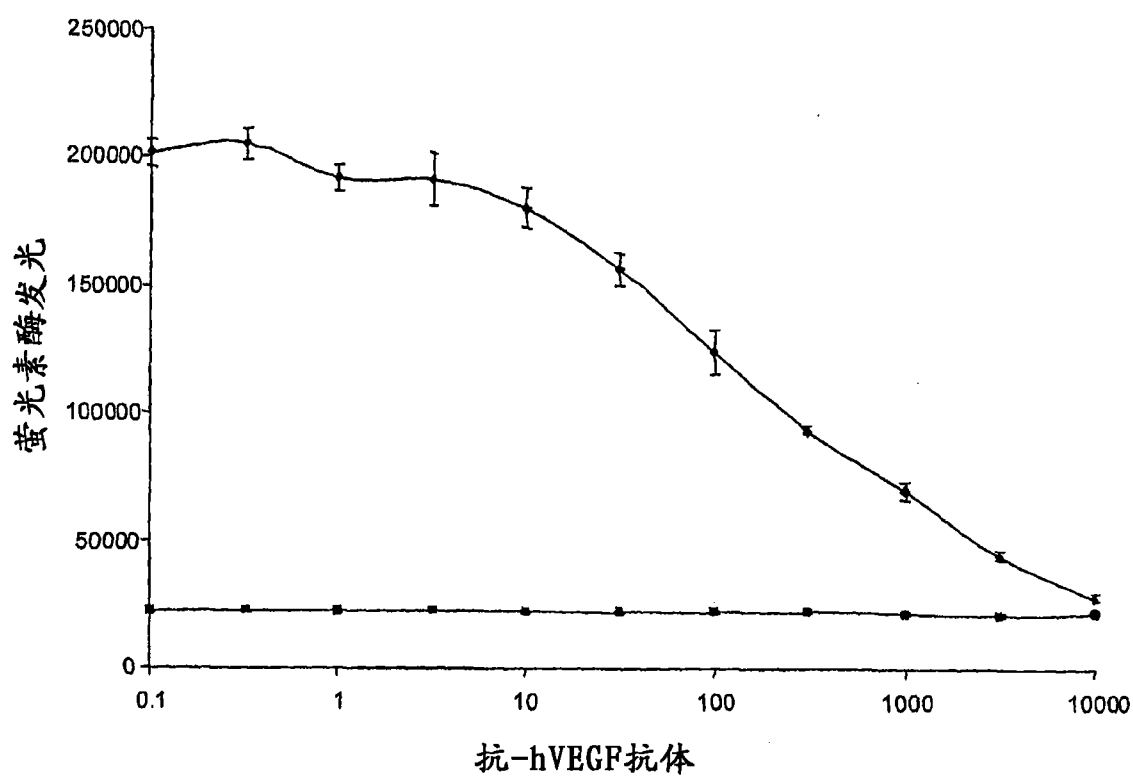


图 5

(a)

MGAARSPPSAVPGPLLGLLLLLLGV LAPGGASLRLLDHRALVCSQPGLNCTV  
KNSTCLDDSWIHPRNLTPSSPKDLQIQLHFAHTQQGDLFPVAHIEWTLQTDASI  
LYLEGAELSVLQLNTNERLCVRFEFLSKLRHHHRRWRFTFSHFVVPDQEYE  
VTVHHLPKPIPDGDPNHQSKNFLVPDCEHARMKVTTPCMSSGSLWDPNITVE  
TLEAHQLRVSFTLWNETHYQILLTSFPHMENHSCFEHMHIPAPRPEEFHQ  
SNVTLTLRNLKGCCRHQVQIQPFSSCLNDCLRHSATVSCPEMPDTPEPIP  
DY  
MPLWGAG

(b)

SLRLLDHRALVCSQPGLNCTVKNSTCLDDSWIHPRNLTPSSPKDLQIQLHFAH  
TQQGDLFPVAHIEWTLQTDASILEGAELSVLQLNTNERLCVRFEFLSKLRH  
HHRRWRFTFSHFVVPDQEYEVTVHHLPKPIPDGDPNHQSKNFLVPDCEHAR  
MKVTTPCMSSGSLWDPNITVETLEAHQLRVSFTLWNETHYQILLTSFPHMEN  
HSCFEHMHIPAPRPEEFHQSNVTLTLRNLKGCCRHQVQIQPFSSCLNDCL  
RHSATVSCPEMPDTPEPIPDMPLWGAG

图6



(a)

MOSKVLLAVALWLCVETRAASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCR  
 GQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTECSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYR  
 ETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSIISNLNVS  
 LCARYPEKRFVDPGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIM  
 YIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSK  
 HQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKK  
 NSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIP  
 LESNHTIKAGHVLTIMEVSEKDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIG  
 EKSLISPVDSYQYGTTQTLTCTVYAIPPPHHIHWYWQLEEBECANEPSQAVSVT  
 NPYPCEEWRSEDFQGGNKIEVNKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYK  
 CEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDMQPTEQESVSLWCTADRSTFENLT  
 WYKLGPPQLPIHVGELPTPVCKNLDLWKLNATMFSNSTNDILMELKNASL  
 QDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSIGESIEVS  
 CTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRRVRKEDEGLYTCQA  
 CSVLGCAKVEAFFIIEGAQEKTNLEIILVGTAVIAMFFWLLLVIILRTV

(b)

ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQ  
 RVEVTECSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFI  
 ASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSIISNLNVS LCARYPEKRFVDPGNRISW  
 DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSH  
 GIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSE  
 MKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGM  
 ESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSE  
 RDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGTTQTLT  
 CTVYAIPPPHHIHWYWQLEEBECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSEDFQGGNK  
 IEVNKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTR  
 GPEITLQPDMQPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPPQLPIHVGELPTPV  
 CKNLDLWKLNATMFSNSTNDILMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRH  
 CVVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSIGESIEVSCTASGNPPPQIMWFKDNETL  
 VEDSGIVLKDGNRNLTIRRVRKEDEGLYTCQACSVLGCAKVEAFFIIEGAQEK  
 TNLEIILVGTAVIAMFFWLLLVIILRTV

图 7

**(a)**

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

**(b)**

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

**(c)**RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR  
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  
DALHMQALPPR**图 8**FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVTRGSRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP  
GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR  
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG  
ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**图 9**