

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380110152.7

[51] Int. Cl.

*A61K 48/00 (2006.01)*

*A61K 38/02 (2006.01)*

*A61K 31/7088 (2006.01)*

*A61P 43/00 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

*C12N 15/16 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100346834C

[22] 申请日 2003.12.26

[21] 申请号 200380110152.7

[30] 优先权

[32] 2003.1.10 [33] JP [31] 3967/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2003/016956 2003.12.26

[87] 国际公布 WO2004/062693 日 2004.7.29

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.12

[73] 专利权人 株式会社新潟 TLO

地址 日本新潟县

[72] 发明人 埴晴雄

[56] 参考文献

WO0246227A2 2002.6.13

EP0009147A2 1980.4.2

CN1230595A 1999.10.6

审查员 辜学英

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭文洁 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 33 页 附图 21 页

[54] 发明名称

基因治疗用载体以及利用该基因治疗用载体  
在哺乳动物中或培养细胞中进行目的蛋白定  
量的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种基因治疗用载体，其能够在  
进行基因治疗时以更高敏感度监控目的蛋白质的血  
液中浓度，并且标记肽不具有生理作用而在多种动  
物中无免疫原性。基因治疗用载体具有如下结构：  
在哺乳动物细胞用表达载体中整合了编码由胰高血  
糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸肽区域和有待在体  
内生产的蛋白质区域的融合蛋白质的核酸。

1、一种基因治疗用载体，其特征在于，该载体具有在哺乳动物细胞用表达载体中整合了编码下述融合蛋白质的核酸的结构，并能够在哺乳动物细胞中生产上述融合蛋白质，所述融合蛋白质是SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列构成的肽和有待在体内生产的目的蛋白质区域相融合形成的融合蛋白质。

2、根据权利要求1所述的载体，其中，所述SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列构成的肽结合于所述目的蛋白质区域的C末端。

3、根据权利要求1所述的载体，其中，所述目的蛋白质为细胞因子或对细胞因子附加了免疫球蛋白恒定区的融合蛋白质、生长因子、激素或细胞粘着因子或其受体。

4、根据权利要求2所述的载体，其中，所述目的蛋白质为细胞因子或对细胞因子附加了免疫球蛋白恒定区的融合蛋白质、生长因子、激素或细胞粘着因子或其受体。

5、根据权利要求3所述的载体，其中，所述细胞因子或其受体选自：干扰素及其受体、CTLA4、白介素及其受体。

6、根据权利要求4所述的载体，其中，所述细胞因子或其受体选自：干扰素及其受体、CTLA4、白介素及其受体。

7、权利要求1至6任一项中所述的基因治疗用载体在制备基因治疗用药物中的用途。

8、通过权利要求1至6中任一项所述的基因治疗用载体的表达对培养细胞内生产的目的蛋白质进行定量的方法，其包括对被检试样中SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列构成的肽区域进行免疫测定，其中所述的被检试样是从施用了权利要求1至6中任一项所述的基因治疗用载体的培养哺乳动物细胞收集的。

9、哺乳动物体内或培养哺乳动物细胞中由外部施用的表达载体的表达所生产的目的蛋白质的标记剂，该标记剂由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列构成的肽构成。

10、哺乳动物体内由外部施用的表达载体的表达所生产的蛋白质的标记剂，其由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列构成的肽构成。

11、一种培养细胞内生产的蛋白质的标记方法，其包括在培养哺乳动物细胞内，以与作为标记剂的SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列构

成的肽的融合蛋白质形式表达由外部施用的表达载体的表达所产生的目的蛋白质，从而以 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列构成的肽对培养细胞内生产的目的肽进行标记。

12、SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列构成的肽作为在培养哺乳动物细胞内施用的表达载体的表达所产生的目的蛋白质的标记剂的用途。

## 基因治疗用载体以及利用该基因治疗用载体 在哺乳动物中或培养细胞中进行目的蛋白定量的方法

### 技术领域

本发明涉及可以对在生物体内或培养细胞内生产的目的蛋白质进行简便定量的，用于在生物体内生产目的蛋白质的基因治疗用载体。

### 背景技术

在患者体内生产目的蛋白质进行基因治疗时，目的蛋白质的血浓度只有在可以建立该蛋白质的 ELISA 法等测定方法时可以进行确定，在不能建立上述测定方法时不能进行确定。利用标记蛋白测定上述蛋白浓度的分析方法已实际应用并作为商品销售。但是，这种测定的灵敏度低，尚没有建立用于在基因治疗测定血液浓度的方法。参考文献 (Treatment of Murine Lupus with cDNA encoding IFN- $\gamma$  R/Fc, The Journal of Clinical Investigation, 2000 年 7 月，第 106 卷,第 2 期, p207-215) 中通过不测定目的蛋白质而对受其影响的蛋白质定量化间接地证明了目的蛋白质的表达。显示出血液中浓度测定的难度。

### 发明的公开

本发明的目的在于提供一种基因治疗用载体，其能够在进行基因治疗时高敏感度地监控目的蛋白质的血液中浓度，几乎不会引起由标记引起的不希望的生理作用以及抗原抗体反应。

本申请的发明人进行深入的研究结果发现，通过以整合了编码由通过基因治疗有待在体内生产的目的蛋白质和胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸肽的融合蛋白质的核酸的载体进行基因治疗，以上述胰高血糖素肽为标记可高敏感度地测定目的蛋白质的血液中浓度，并且发现几乎不会诱导由标记引起的不希望的生理作用以及抗原抗体反应，从而完成本发明。

换言之，本发明提供了一种基因治疗用载体，该载体具有如下结构：在哺乳动物细胞用表达载体中整合了编码由胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸肽区域和有待在体内生产的目的蛋白质区域的融合

蛋白质的核酸，其能够在哺乳动物细胞内生产前述融合蛋白质。此外，本发明提供了一种基因治疗方法，其包括将有效量的上述本发明的基因治疗用载体施用于有待上述目的蛋白质在体内或细胞内表达的哺乳动物或培养哺乳动物细胞。进而，本发明还提供了上述本发明的基因治疗用载体在制备基因治疗用药物中的用途。进而，本发明还提供了，通过前述基因治疗用载体的表达对体内或培养哺乳动物细胞内生产的目的蛋白质的定量方法，其包括对从施用了上述本发明的基因治疗用载体的哺乳动物或培养哺乳动物细胞中收集的被检试样中的 C 末端侧 19-29 个氨基酸肽区域进行免疫测定。进而，本发明还提供了在哺乳动物体内或培养哺乳动物细胞中由外部施用的表达载体的表达所生产的目的蛋白质的标记剂，其包含胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸的肽。进而，本发明还提供了一种体内或培养细胞内生产的蛋白质的标记方法，其包括通过以与作为标记剂的胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸肽的融合蛋白质形式表达由外部施用的表达载体产生的目的蛋白质，从而在哺乳动物体内或培养哺乳动物细胞内以胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸肽对体内或培养细胞内生产的目的肽进行标记。进而，本发明还提供了胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸肽作为在哺乳动物体内或培养哺乳动物细胞内由外部施用的表达载体产生的目的蛋白质的标记剂的用途。

通过本发明，首次提供了下述基因治疗用载体，其能够以高敏感度测定目的蛋白质的血液中浓度且其标记肽不具有生理作用。胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸肽由于其没有自体生理作用，在各种哺乳动物中十分保守，且基本不引起免疫反应，因此通过采用市售的免疫测定试剂盒的高敏感度地免疫测定可对其定量。

#### 附图的简要说明

图 1 表示实施例 1 中制备的插入基因治疗用载体中的插入核酸片段的碱基序列以及其编码的氨基酸序列。

图 2 是图 1 的续。

图 3 是图 2 的续。

图 4 表示实施例 1-5 中使用的用于哺乳动物表达的载体 pCAGGS 的基因图谱。

图 5 表示实施例 1 中施用基因治疗用载体后的天数与通过测定来自胰高血糖素的标记肽测定的目的蛋白质的血液中浓度之间的关系。

图 6 表示实施例 1 中测定的，在采用本发明的载体进行基因治疗时的目的蛋白质的血液中浓度，以及采用本发明的载体进行基因治疗时和采用插入了编码没有融合来自胰高血糖素的标记肽的目的蛋白质的核酸的载体进行基因治疗时的血糖值随时间的变化。

图 7 表示实施例 2 中制备的插入基因治疗用载体中的插入核酸片段的碱基序列以及其编码的氨基酸序列的图。

图 8 是图 7 的续。

图 9 是图 8 的续。

图 10 表示实施例 2 中施用基因治疗用载体后的天数与通过测定来自胰高血糖素的标记肽测定的目的蛋白质的血液中浓度之间的关系。

图 11 表示实施例 2 和比较例 2 中，大鼠的移植心脏的附着生长天数。

图 12 表示实施例 3 中制备的插入基因治疗用载体中的插入核酸片段的碱基序列以及其编码的氨基酸序列的图。

图 13 是图 12 的续。

图 14 是图 13 的续。

图 15 表示比较例 3 中制备的插入基因治疗用载体中的插入核酸片段的碱基序列以及其编码的氨基酸序列的图。

图 16 是图 15 的续。

图 17 表示实施例 3 中施用基因治疗用载体后的天数与通过测定来自胰高血糖素的标记肽测定的目的蛋白质的血液中浓度之间的关系。

图 18 表示实施例 3 和比较例 3 中，大鼠的心肌炎病变部位的面积比率。

图 19 表示实施例 4 中制备的插入基因治疗用载体中的插入核酸片段的碱基序列以及其编码的氨基酸序列的图。

图 20 是图 19 的续。

图 21 是图 20 的续。

图 22 表示实施例 4 中施用基因治疗用载体后的天数与通过测定来自胰高血糖素的标记肽测定的目的蛋白质的血液中浓度之间的关系。

图 23 表示实施例 4 和比较例 4 中，大鼠的心肌炎病变部位的面积

比率。

图 24 表示实施例 5 中制备的插入基因治疗用载体中的插入核酸片段的碱基序列以及其编码的氨基酸序列的图。

图 25 表示实施例 5 中用于通过测定来自胰高血糖素的标记肽测定的目的蛋白质的血液中浓度，与通过人白介素 8 测定的目的蛋白质的血液中浓度之间的相互关系。

### 发明的最佳实施方式

通过本发明的载体与目的蛋白质融合表达的所谓“胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸肽”是指从胰高血糖素的 C 末端算起从第 19 位至第 29 位的合计 11 个氨基酸构成的肽。即，该肽是具有序列表的序列号 1 所示的氨基酸序列的肽。这个“胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸肽”作为目的蛋白质的标记使用，下面，方便起见称为“来自胰高血糖素的标记肽”。

本发明的载体中整合了编码来自胰高血糖素的标记肽区域与目的蛋白质区域的融合蛋白质的核酸。

本发明中使用的用于哺乳类动物的表达载体是基因治疗领域公知的，其没有限制只要是用于哺乳类动物的表达载体即可。本发明的特征在于作为目的蛋白质的标记的来自胰高血糖素的肽的区域与目的蛋白质相融合的形式表达，用于哺乳类细胞的表达载体没有任何限定，可以使用在基因治疗领域中使用的公知的任一用于哺乳类细胞的表达载体。可以是质粒载体也可以是病毒载体，从安全性角度考虑，优选使用质粒载体。各种用于哺乳类细胞的表达载体是众所周知的，此外也有市售的，可以优选使用这些周知的或市售的载体。周知或市售的载体的例子可列举为 pCAGGS(Efficient selection for high expression transfectants with a novel eukaryotic vector, Gene 1991 Dec.15,108(2)p193-199，基因图谱示于图 4，其碱基序列示于序列表的序列号 3)、PROMEGA 公司的 pCI 载体、pSI 载体和 pTARGET 载体以及 INVITROGEN 公司的 pcDNA5/TO 等，其不受上述限定。

通过基因治疗于体内生产的目的蛋白质没有任何限定，可举例为如干扰素、白介素和 CTLA4 之类的各种细胞因子、生长因子、胰岛素等激素和细胞粘着因子等及其受体。此外，任意的抗原蛋白质可通过

基因疫苗形式在体内得以生产。此外，目的蛋白质本身也可以是融合蛋白质。例如，也可以在需要与 Fc 受体结合的所需的细胞因子的一端融合免疫球蛋白，优选 IgG，尤其是 IgG1 的恒定区域(Fc)，以提高与 Fc 受体的结合能力的目的蛋白质(参照下述实施例 1-4)。编码 IgG 的 Fc 区域的核酸的碱基序列是周知的，例如编码人的 IgG 的 Fc 区域的核酸的碱基序列记载于例如 Genbank 登录号：BC020823 等处，编码大鼠的 IgG 的 Fc 区域的核酸的碱基序列示于本申请的图 1-3 等中。

本发明的载体通过在哺乳动物细胞用表达载体的克隆位点处插入编码目的蛋白质与上述标记肽的融合蛋白质的核酸获得。并且，标记肽优选融合于目的蛋白质的一端尤其是 C 末端。

基因治疗可通过将本发明的基因治疗用载体施用于哺乳动物来进行。施用途径优选静脉注射或肌肉注射之类的非经口腔施用途径。载体的施用量可根据目的蛋白质的性质、有待治疗的疾病的种类和程度等进行相应设定，每 1kg 体重的载体施用量通常是 1mg-10mg 左右，优选 2mg-4mg 左右。作为制剂，可以使用例如溶解于林格氏(ringer)溶液中的基因治疗用载体溶液作为注射液，可以在其中添加医药制剂领域中周知的注射用添加剂。或者，也可以将本发明的基因治疗用载体施用于体外培养的哺乳动物细胞。即，将淋巴细胞或骨髓细胞等细胞取出进行体外培养，对培养细胞施以基因载体，再以获得具有目的蛋白质生产能力的细胞对患者进行的基因治疗，本发明的基因治疗用载体也可施用于培养哺乳动物细胞。或者，可在体外研究基因治疗用载体的治疗效果的实验中施用培养的哺乳动物细胞。

在基因治疗中，通过向体内导入的载体生产上述目的蛋白质与来自胰高血糖素的标记肽的融合蛋白质。另外，对体外培养的哺乳动物细胞施用基因治疗用载体时，该培养细胞内生产出上述目的蛋白质与来自胰高血糖素的标记肽的融合蛋白质。由于目的蛋白质与标记肽融合，可以通过测定来自胰高血糖素的标记肽的浓度来测定目的蛋白质的浓度。并且，由于免疫测定本发明中使用的来自胰高血糖素的标记肽的试剂盒是市售的(DAICHI RADIOISOTOPE LABORATORIES, 公司等制备的胰高血糖素 RIA 试剂盒)，可以使用这种市售免疫测定试剂盒容易地进行测定。

定量来自胰高血糖素的标记肽的被检试样是来自施用了本发明的

基因治疗用载体的个体的各种体液或组织等或其稀释物，优选是全血，血清或血浆或其稀释物等血液试样。此外是，基因治疗用载体施用于体外培养的哺乳动物的情况下，被检试样是培养细胞的匀浆或培养上清液等。

### 实施例 1、比较例 1

以经凝集素刺激的大鼠的脾培养细胞的 cDNA 为模板，用 5'-gagaattcatttaaagagagcgccgcccgtgcccagaaactgtg-3', 5'-tcaaccactgcacaaaatcttgggctttaccggagagtgggagagact-3' 作为引物进行 PCR，进而用以该 PCR 产物的 300 倍稀释物为模板，用 5'-gagaattcatttaaagagagcgccgcccgtgcccagaaactgtg-3', 5'-gagagagagaattctcaggtattcatcaaccaactgcacaaaatcttgggc-3' 作为引物进行 PCR，用 EcoR I 将扩增产物整合入用于哺乳类细胞的表达载体 pCAGGS 的克隆位点。通过这些步骤，获得插入 Swa I 和 Not I 的限制性酶切位点的 pCAGGS-IgG-glu19-29(在免疫球蛋白 G1(IgG1)的 Fc 区域的编码区域的下游，结合编码来自胰高血糖素的标记肽的区域的核酸片段插入 pCAGGS 的 EcoR I 部位)。

下面，以大鼠心肌炎的心脏的 cDNA 为模板，用 5'-gagaattcatttaaagattctgctgggtggtcctgatg-3', 5'-gcagcatcgccgcttcttctctgtcatcatggagaaa-3' 作为引物进行 PCR，用 Swa I 和 Not I 将 PCR 产物整合入前面制备的 pCAGGS-IgG-glu19-29 中。

通过这些步骤，在上述用于哺乳类细胞的表达载体 pCAGGS 的 EcoR I 位点插入具有序列表的序列号 2 所示的碱基序列(显示含有限制性酶切位点)的 DNA 片段，制备出本发明的载体(实施例 1)。并且，图 1-图 3 还显示了序列号 2 的其它信息。如图 1 至图 3 所示，插入的核酸片段为，在两端都有 EcoR I 位点的，且位于编码干扰素  $\gamma$  受体(IFN  $\gamma$  R)蛋白质与免疫球蛋白 G1(IgG1)的 Fc 区域的融合蛋白质的区域的下游，结合编码来自胰高血糖素的标记肽的区域的核酸片段(IFN  $\gamma$  R-IgG-胰高血糖素<sup>19-29</sup>)。

对 7 只大鼠每一只的尾静脉注射不含来自胰高血糖素的标记肽的质粒载体(比较例 1)和以上述方式制备的含有来自胰高血糖素的标记肽的本发明的质粒载体(实施例 1)，进行基因治疗。注射液的组成是在

20ml 的林格氏溶液中溶解了 800  $\mu\text{g}$  的质粒每只。注射后, 随时间推移采血, 将采血获得的 1-10  $\mu\text{l}$  的血浆稀释 100-1000 倍, 用市售的 RIA 试剂盒, 按照该试剂盒附带的说明书测定来自胰高血糖素的标记肽的浓度, 进而测定目的蛋白质(本实施例中是 IFN  $\gamma$  R/ IgG1Fc 融合蛋白质)的浓度。即, RIA 具体是按以下方式进行。在 400  $\mu\text{l}$  检测用缓冲液中添加 200  $\mu\text{l}$  标准胰高血糖素溶液或稀释的被检血浆, 进而添加 100  $\mu\text{l}$  胰高血糖素- $^{125}\text{I}$  溶液, 添加 100  $\mu\text{l}$  胰高血糖素抗血清, 4 $^{\circ}\text{C}$  下放置 48 小时。之后, 添加 100  $\mu\text{l}$  第二抗体, 400  $\mu\text{l}$  胰高血糖素 RIA 用沉淀稳定剂, 4 $^{\circ}\text{C}$  下放置 30 分钟, 离心分离(2000  $\times g$  30 分钟, 4 $^{\circ}\text{C}$ )后, 除去上清液后测定计数率求出浓度。

图 5 是血液中浓度的测定结果。实施例 1 中, 静脉注射后第 1 天结果为  $2870 \pm 1062\text{ng/ml}$ (平均  $\pm$  标准偏差), 第 3 天为  $1440 \pm 334\text{ng/ml}$ , 第 7 天为  $1120 \pm 433\text{ng/ml}$ , 第 16 天为  $281 \pm 162\text{ng/ml}$ , 所有的例子均可被测定。另一方面, 用不含来自胰高血糖素的标记肽的质粒载体的基因治疗中, 以同样方式检测, 其结果低于检测限。

图 6 是质粒静脉注射 4, 8, 12 小时后的血糖值和以上述同样方式用 RIA 测定法检测的蛋白血液中浓度的值。实施例 1 中, 血糖浓度 4 小时后显示为  $2815 \pm 2318\text{ng/ml}$ , 8 小时后为  $6061 \pm 2789\text{ng/ml}$ , 12 小时后为  $5752 \pm 2270\text{ng/ml}$ , 显示出最大血液中浓度的 8-12 小时后的血糖为 8 小时后  $89.3 \pm 15.1\text{mg/dl}$ (实施例 1) vs  $81.8 \pm 7.5\text{mg/dl}$ (比较例 1), 12 小时后  $63.5 \pm 5.7\text{mg/dl}$ (实施例 1) vs  $71.4 \pm 6.9\text{mg/dl}$ (比较例 1), 没有差异。

从以上结果表明, 通过使用本发明的载体, 能够在施用载体的数十天后, 从极少量的血浆样品中足以测定出目的蛋白质的血液中浓度。

## 实施例 2、比较例 2

以经凝集素刺激的大鼠的脾培养细胞的 cDNA 为模板, 用 5'-gagaattcatttaaatggccttgcttggactccagagg-3', 5'-gcagcatcgcgccgcgtctgaatctgggcatggttctgg-3' 作为引物进行 PCR, 用 *Swa* I 和 *Not* I 将 PCR 扩增产物整合到按实施例 1 所述的方法制备的 pCAGGS-IgG-glu19-29 中。

通过这些步骤, 制备出在上述用于哺乳类细胞的表达载体 pCAGGS 的 EcoR I 位点插入具有图 7 至 9 以及序列号 4 所示的碱基序列(显示含有限制性酶切位点)的大鼠 CTLA4- IgG -胰高血糖素<sup>19-29</sup>(在大鼠 CTLA4 编码区域的下游结合大鼠 IgG Fc 编码区域, 其下游结合来自胰高血糖素的标记肽编码区域的核酸片段), 在大鼠细胞中表达 CTLA4- IgG -胰高血糖素<sup>19-29</sup>的重组载体(实施例 2)。为了比较, 制备了插入有不合 CTLA4 编码区域仅插入 IgG -胰高血糖素<sup>19-29</sup>编码区域的重组载体(比较例 2)。

对心脏移植后的大鼠以与实施例 1 同样方式施用重组载体, 测定血液中浓度。同时, 研究移植心脏的附着生长天数。

结果示于图 10 和图 11 中。如图 10 所示, 实施例 2 中, CTLA4- IgG -胰高血糖素<sup>19-29</sup>蛋白的变化如图 7 所示。就是说, 尽管在 100 倍稀释物中无法测定胰高血糖素之前的值, 但一天后急剧上升, 显示出超过 5000 ng/ml 的蛋白浓度, 尽管这之后缓慢下降, 仍然呈现出超过 1000 ng/ml 的蛋白浓度直至为检测进行宰杀后的第 105 天后。此外, 如图 11 所示, 实施例 2 中, 10 只中有 1 只在 14 天时被排斥, 直至检测的第 105 天剩下的 9 只都附着生长。用不含 CTLA4 的 pCAGGS-SP-IgG-glu<sup>19-29</sup>治疗的组中(实施例 2), 5 只中有 1 只第 5 天时, 1 只第 6 天时, 3 只第 7 天时被排斥, 这些显著地显示出 pCAGGS- CTLA4-IgG-glu<sup>19-29</sup>治疗的有效性。

### 实施例 3、比较例 3

以经凝集素刺激的大鼠的脾培养细胞的 cDNA 为模板, 用 5'-gagaattcatttaaatggcactctgggtgactgcagtc-3', 5'-gcagcatcgcgccgcgtggccatagcggaaaagttgctt-3' 作为引物进行 PCR, 用 Swa I 和 Not I 将 PCR 扩增产物整合到按实施例 1 所述的方法制备的 pCAGGS-IgG-glu<sup>19-29</sup> 中。

通过这些步骤, 制备出在上述用于哺乳类细胞的表达载体 pCAGGS 的 EcoR I 位点插入具有图 12 至 14 以及序列号 5 所示的碱基序列(显示含有限制性酶切位点)的大鼠 IL13- IgG -胰高血糖素<sup>19-29</sup>(在大鼠白介素 13(IL13)编码区域的下游结合大鼠 IgG Fc 编码区域, 其下游结合来自胰高血糖素的标记肽编码区域的核酸片段), 在大鼠细胞中

表达 IL13- IgG -胰高血糖素<sup>19-29</sup> 的重组载体(实施例 3)。为了比较, 制备了插入有不合 IL13 编码区域的仅插入有 SP-IgG -胰高血糖素<sup>19-29</sup> 编码区域(序列号 6 及图 15 和图 16)的重组载体(比较例 3)。

对自身免疫性心肌炎大鼠(A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. Clinical immunology and immunopathology, 1990 年 11 月, 第 57 卷, p250-262), 按与实施例 1 同样方式施用重组载体, 测定血液中浓度。同时, 在施用 16 后宰杀, 解剖, 研究心肌炎病变部位的病变面积率。

结果示于图 17 和图 18 中。IL13- IgG -胰高血糖素<sup>19-29</sup> 蛋白的变化如图 17 所示。换句话说, 第 1 天时呈现超过 2000 ng/ml 的蛋白浓度, 尽管这之后缓慢下降, 仍然呈现出约 8 ng/ml 的蛋白浓度直至检测的宰杀后的第 16 天后。此外, 如图 18 所示, 施用本发明基因治疗用载体 pCAGGS- IL13-IgG-glu<sup>19-29</sup>(插入 IL13-IgG-glu<sup>19-29</sup> 的载体 pCAGGS)的组, 与施用不含 IL13 的 pCAGGS-SP-IgG-glu<sup>19-29</sup> 的组相比, 心肌炎病变部位的面积明显更小, 显示出了 pCAGGS- IL13-IgG-glu<sup>19-29</sup> 治疗的有效性。

#### 实施例 4、比较例 4

以经凝集素刺激的大鼠的脾培养细胞的 cDNA 为模板, 用 5'-gagaattcatttaaatggaaatctgctggggaccctac-3', 5'-gcagcatcgcgccgcttggtcttctggaagtagaactt-3' 作为引物进行 PCR, 用 Swa I 和 Not I 将 PCR 扩增产物整合到按实施例 1 所述的方法制备的 pCAGGS-IgG-glu<sup>19-29</sup> 中。

通过这些步骤, 制备出在上述用于哺乳类细胞的表达载体 pCAGGS 的 EcoR I 位点插入具有图 19 至 21 以及序列号 7 所示的碱基序列(显示含有限制性酶切位点)的大鼠 IL1RA- IgG -胰高血糖素<sup>19-29</sup>(在大鼠白介素 1 受体拮抗剂编码区域的下游结合大鼠 IgG Fc 编码区域, 其下游结合来自胰高血糖素的标记肽编码区域的核酸片段), 在大鼠细胞中表达 IL1RA- IgG -胰高血糖素<sup>19-29</sup> 的重组载体(实施例 4)。

对自身免疫性心肌炎大鼠(A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin

fraction. Clinical immunology and immunopathology, 1990 年 11 月,第 57 卷, p250-262), 按与实施例 1 同样方式施用重组载体, 测定血液中浓度。同时, 在施用 16 后宰杀, 解剖, 研究心肌炎病变部位的病变面积率。为了比较, 施用比较例 3 的载体(比较例 4)。

结果示于图 22 和图 23 中。如图 22 所示, 实施例 4 中, IL1RA- IgG-胰高血糖素<sup>19-29</sup>蛋白的变化如图 22 所示。就是说, 第 1 天时呈现超过 2000 ng/ml 的蛋白浓度, 尽管这之后缓慢下降, 呈现出约 20 ng/ml 的蛋白浓度直至为检测进行宰杀后的第 16 天后。此外, 如图 23 所示, 实施例 4 与比较例 4 相比, 心肌炎病变部位的面积明显更小, 显示出了 pCAGGS- IL1RA -IgG-glu<sup>19-29</sup> 治疗的有效性。

#### 实施例 5

为了制备插入 Swa I 和 Not I 的限制性酶切位点的 pCAGGS-glu<sup>19-29</sup>, 以 5'-gagaattcatttaaagtgagagcgccgccccgggttaaagcccaagatt ttgtgcagtgggtg-3', 5'-gagagagagaattctcaggtattcatcaaccactgca caaatcttgggc-3'作为引物进行 PCR, 用 EcoR I 整合入 pCAGGS 的克隆位点。

接着, 以 Cos7 细胞的 cDNA 为模板, 以 5'-gagaattcatttaaagtgacttccaagctggccgtggct-3', 5'-gcagcatcgccg ccgctgaattctcagccctcttcaaaaa-3'作为引物进行 PCR, 用 Swa I 和 Not I 将这些 PCR 产物整合入前面制备的 pCAGGS-glu<sup>19-29</sup> 中。

通过这些步骤, 制备出在上述用于哺乳类细胞的表达载体 pCAGGS 的 EcoR I 位点插入具有图 24 以及序列号 8 所示的碱基序列(显示含有限制性酶切位点)的人 IL8-胰高血糖素<sup>19-29</sup>(在人白介素 8 编码区域的下流结合来自胰高血糖素的标记肽编码区域的核酸片段), 在大鼠细胞中表达 IL8-胰高血糖素<sup>19-29</sup> 的重组载体(实施例 5)。

对大鼠, 按与实施例 1 同样方式施用重组载体, 1 天后采血, 测定血液中浓度。同时, 定量相同试样中人 IL-8 的浓度。人 IL-8 的浓度的定量采用 BIOSOURCE 公司(Nivelles,Belgium)制造的 IL-8 EASIA 试剂盒按照其说明书进行。

结果示于图 25 中。如图 25 所示, 两者的摩尔浓度大致相同, 这证明了用胰高血糖素<sup>19-29</sup> 标记肽的方法的正确性。

## 序列表

<110> NIIGATA TLO CORPORATION

<120> 基因治疗用载体以及利用该基因治疗用载体  
在哺乳动物中或培养细胞中进行目的蛋白定量的方法

<130> 03PF275-PCT

<150> JP 2003-3967

<151> 2003-01-10

<160> 24

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码人, 小鼠或大鼠胰高血糖素 C19-29 区域的寡肽

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Gln | Asp | Phe | Val | Gln | Trp | Leu | Met | Asn | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

<210> 2

<211> 1471

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(1461)

<223> 编码大鼠 IFN-r 受体, 大鼠 IgG Fc 区域和胰高血糖素 C19-29 区域的 DNA 插入物

<400> 2

|            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| gaattcattt | aa  | atg | att | ctg | ctg | gtg | gtc | ctg | atg | ctg | tct | gcg | gag | atc | 51 |
|            | Met | Ile | Leu | Leu | Val | Val | Leu | Met | Leu | Ser | Ala | Glu | Ile |     |    |
|            | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| ggg | agt | gga | gct | ttg | atg | agc | acc | gag | gat | cct | aag | ccg | ccc | tcg | gtg | 99 |
| Gly | Ser | Gly | Ala | Leu | Met | Ser | Thr | Glu | Asp | Pro | Lys | Pro | Pro | Ser | Val |    |

| 15                                                              | 20  | 25  |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| cct gcg cca aca aat gtt cta att acg tcc tat gac ttg aac cct gtc |     |     | 147 |
| Pro Ala Pro Thr Asn Val Leu Ile Thr Ser Tyr Asp Leu Asn Pro Val |     |     |     |
| 30                                                              | 35  | 40  | 45  |
| gta cat tgg aag cac cag aac gtg tcg cag gct gcc gtc ttc act gta |     |     | 195 |
| Val His Trp Lys His Gln Asn Val Ser Gln Ala Ala Val Phe Thr Val |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| cag gta aag atg tat cca gaa tac tgg act gat gcc tgc acc aac att |     |     | 243 |
| Gln Val Lys Met Tyr Pro Glu Tyr Trp Thr Asp Ala Cys Thr Asn Ile |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |     |
| gcc cat cat tat tgt aat atc tac aaa cac att tcc tat cct gac tca |     |     | 291 |
| Ala His His Tyr Cys Asn Ile Tyr Lys His Ile Ser Tyr Pro Asp Ser |     |     |     |
| 80                                                              | 85  | 90  |     |
| tct gcc tgg gcc aga gtt aag gcc aag gtt gga caa aga gaa tct gcc |     |     | 339 |
| Ser Ala Trp Ala Arg Val Lys Ala Lys Val Gly Gln Arg Glu Ser Ala |     |     |     |
| 95                                                              | 100 | 105 |     |
| tat gcg cag tca gaa gag ttt att atg tgc cga aag ggg aag gtt gga |     |     | 387 |
| Tyr Ala Gln Ser Glu Glu Phe Ile Met Cys Arg Lys Gly Lys Val Gly |     |     |     |
| 110                                                             | 115 | 120 | 125 |
| ccg cct ggc ctg gac atc gga agg aag gaa gat cag ctg att gtc cac |     |     | 435 |
| Pro Pro Gly Leu Asp Ile Gly Arg Lys Glu Asp Gln Leu Ile Val His |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| ata ttt cac cct aag gtc aat gtg agt cag gaa acc atg ttt ggt gac |     |     | 483 |
| Ile Phe His Pro Lys Val Asn Val Ser Gln Glu Thr Met Phe Gly Asp |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |     |
| gga aat acc tgt tac aca ttc gac tac act gtg ttt gtg aaa cat tac |     |     | 531 |
| Gly Asn Thr Cys Tyr Thr Phe Asp Tyr Thr Val Phe Val Lys His Tyr |     |     |     |
| 160                                                             | 165 | 170 |     |
| agg agt ggg gag atc cta cat aca gaa cat agc gtc cta aaa gaa gat |     |     | 579 |
| Arg Ser Gly Glu Ile Leu His Thr Glu His Ser Val Leu Lys Glu Asp |     |     |     |
| 175                                                             | 180 | 185 |     |
| tgt agc gaa act ctg tgt gag tta aac atc tca gtg tcc acg ctg aat |     |     | 627 |
| Cys Ser Glu Thr Leu Cys Glu Leu Asn Ile Ser Val Ser Thr Leu Asn |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |      |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|------|
| 190                                                             | 195 | 200 | 205 |      |
| tcc aat tac tgt gtt tca gta gtt gga aag tog tct ttc tgg caa gtt |     |     |     | 675  |
| Ser Asn Tyr Cys Val Ser Val Val Gly Lys Ser Ser Phe Trp Gln Val |     |     |     |      |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |      |
| aat aca gaa aca tca aaa gac gcc tgt atc ccc ttt ctc cat gat gac |     |     |     | 723  |
| Asn Thr Glu Thr Ser Lys Asp Ala Cys Ile Pro Phe Leu His Asp Asp |     |     |     |      |
|                                                                 | 225 | 230 | 235 |      |
| aga gaa gaa gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc aag |     |     |     | 771  |
| Arg Glu Glu Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys |     |     |     |      |
|                                                                 | 240 | 245 | 250 |      |
| cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc atc ttc ccc |     |     |     | 819  |
| Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro |     |     |     |      |
|                                                                 | 255 | 260 | 265 |      |
| cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct aag gtc acg |     |     |     | 867  |
| Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr |     |     |     |      |
|                                                                 | 270 | 275 | 280 | 285  |
| tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat ttc agc |     |     |     | 915  |
| Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe Ser |     |     |     |      |
|                                                                 | 290 | 295 | 300 |      |
| tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act cga cca cca |     |     |     | 963  |
| Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro |     |     |     |      |
|                                                                 | 305 | 310 | 315 |      |
| gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctc ccc atc |     |     |     | 1011 |
| Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile |     |     |     |      |
|                                                                 | 320 | 325 | 330 |      |
| ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc aag gtc acc |     |     |     | 1059 |
| Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr |     |     |     |      |
|                                                                 | 335 | 340 | 345 |      |
| agt gea gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa ccc gaa |     |     |     | 1107 |
| Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu |     |     |     |      |
|                                                                 | 350 | 355 | 360 | 365  |
| ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct acc aag gaa |     |     |     | 1155 |
| Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu |     |     |     |      |

| 370                                                             | 375 | 380 |      |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta aaa ggc ttc |     |     | 1203 |
| Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly Phe |     |     |      |
| 385                                                             | 390 | 395 |      |
| tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg cag cca cag |     |     | 1251 |
| Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln |     |     |      |
| 400                                                             | 405 | 410 |      |
| gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat ggg agt tac |     |     | 1299 |
| Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr |     |     |      |
| 415                                                             | 420 | 425 |      |
| ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag gga |     |     | 1347 |
| Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly |     |     |      |
| 430                                                             | 435 | 440 | 445  |
| aac acg ttc acg tgt tct gtg ctg cat gaa ggc ctg cac aac cac cat |     |     | 1395 |
| Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His |     |     |      |
| 450                                                             | 455 | 460 |      |
| act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt aaa gcc caa gat ttt gtg |     |     | 1443 |
| Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe Val |     |     |      |
| 465                                                             | 470 | 475 |      |
| cag tgg ttg atg aat acc tgagaattct                              |     |     | 1471 |
| Gln Trp Leu Met Asn Thr                                         |     |     |      |
| 480                                                             |     |     |      |

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 4790

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工表达载体 pCAGGS 的 DNA 序列

&lt;400&gt; 3

gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 60

gcccataatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120

ccaacgaccc ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180

---

```

ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacgta aactgcccac ttggcagtac    240
atcaagtgtg tcatatgccg agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc    300
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg    360
tattagtcac cgtattacc atgggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc    420
atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta tttttaatt attttgtgca    480
gcgatggggg cggggggggg gggggcgcg cccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg    540
gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcgcgcgcg tcgaaagtt    600
tccttttatg gcgagggcg ggcggcgcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc    660
gggagtcgct gcgttgctt cggccgtgc cccgtccgc gccgcctgc gccgcccgc    720
ccggctctga ctgaccgct tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctctcc    780
gggctgtaat tagcgcttg ttaatgacg gctcgttct tttctgtggt gcgtgaaag    840
cctaaaggg ctccgggagg gccctttgt cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg    900
tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgc gcccgcgctg cccggcggt gtgagcgctg    960
cgggcgggc gcggggcttt gtgcgtccg cgtgtgcgc aggggagcgc ggccgggggc    1020
ggtgccccgc ggtgcgggg ggtgcgagg ggaacaaagg ctgcgtcgg ggtgtgtgcg    1080
tgggggggtg agcagggggt gtgggcgagg cggtcggggt gtaaccccc cctgcacccc    1140
cctccccgag ttgctgagca cgccccggt tcgggtcgg ggctccgtgc ggggcgtggc    1200
gcggggctcg ccgtgccgg cggggggtgg cggcaggtgg gggtcgggg cggggcgggg    1260
ccgcctcgg ccggggagg ctcgggggag gggcgcgcg gccccggag gccggcggt    1320
gtcgagggcg ggcgagcgc agccattgc tttatggta atcgtgcgag agggcgag    1380
gaattccttt gtccaaatc tggcggagc gaaatctgg aggcgcgcgc gcacccctc    1440
tagcgggcgc gggcgaagc gtgcggcgcc ggcaggaag aaatgggcgg ggagggcctt    1500

```

cgtgcgtgcg cgcgcgcgcg tccccttctc catctccagc ctccgggctg ccgcaggggg 1560  
 acggctgcct tcggggggga cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg 1620  
 gctctagagc ctctgctaac catgttcatt cttcttctt tttcctacag ctcttgggca 1680  
 acgtgctggg tgttgtgtg tctcatcatt ttggcaaaga attcctcgag gaattcactc 1740  
 ctcagggtga ggotgcctat cagaaggtag tggttggtgt ggccaatgcc ctggctcaca 1800  
 aataccactg agatcttttt cctcttgcca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg 1860  
 agcatctgac ttctggctaa taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttgaatt 1920  
 ttttgtgtct ctcactcgga aggacatatg ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg 1980  
 agtatttggg ttagagtttg gcaacatatg ccatatgtg gctgccatga acaaaggtag 2040  
 ctataaagag gtcacagta tatgaaacag cccctgtg tccattcctt attccataga 2100  
 aaagccttga cttgaggtta gatTTTTTTT atattttgtt ttgtgttatt tttttcttta 2160  
 acatccctaa aattttcctt acatgtttta ctageccagat tttcctcct ctctgacta 2220  
 ctcccagtcg tagctgtccc tcttctctta tgaagatccc tcgacctgca gcccaagctt 2280  
 ggcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 2340  
 caacatacga gcgggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaatgag tgagctaact 2400  
 cacattaatt gcggtgcgt cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagcg 2460  
 gatccgcatc tcaattagtc agcaaccata gtcccgcccc taactccgce catcccgccc 2520  
 ctaactccgc ccagttccgc ccattctcgc ccccatggct gactaatttt ttttatttat 2580  
 gcagaggcgc aggcgcctc ggctctgag ctattccaga agtagtgagg aggcTTTTT 2640  
 ggaggcctag gcttttgcaa aaagctaact tgtttattgc agcttataat ggttaciaat 2700  
 aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg 2760  
 gtttgccaa actcatcaat gtatcttctc atgtctggat ccgtgcatt aatgaatcgg 2820

ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgcctct tccgcttccet cgtcactga 2880  
 ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat 2940  
 acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca 3000  
 aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc 3060  
 tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg cgaaaccca caggactata 3120  
 aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc 3180  
 gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttgggaagc gtggcgcttt ctcaatgtc 3240  
 acgtgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgttcgcctc aagctgggt gtgtgcacga 3300  
 accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc 3360  
 ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 3420  
 gtatgtaggc ggtgtacag agttcttgaa gtgggtggct aactacggt acactagaag 3480  
 gacagtattt ggtatctgcg ctctgtgaa gccagttacc ttcggaataa gagttggtag 3540  
 ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgtgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca 3600  
 gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta cggggtctga 3660  
 cgtcagtggt aacgaaaact caggttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 3720  
 cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga 3780  
 gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 3840  
 tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga 3900  
 gggettacca tctggccccg gtgctgcaat gataccgga gaccacgct cacggctcc 3960  
 agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggcggag cgcagaagtg gtcctgcaac 4020  
 tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgcgggaa gctagagtaa gtagttcgcc 4080  
 agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgcct tgcacagc atcgtggtgt cagctcgtc 4140

```

gtttggtatg gcttcattca gctccgggtc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 4200
catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt 4260
ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 4320
atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtg gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 4380
tatggggcga ccgagttget cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag 4440
cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 4500
cttaccgctg ttgagatcca gttegatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 4560
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgcgcgaaa 4620
aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 4680
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gacgggatac atatttgaat gtatttagaa 4740
aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg 4790

```

<210> 4

<211> 1233

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(1224)

<223> 编码大鼠 CTLA4, 大鼠 IgG Fc 区域和胰高血糖素 C19-29 区域的 DNA 插入物

<400> 4

```

gaattcatatt aa atg gct tgt ctt gga ctc cag agg tac aaa act cac ctg 51

```

```

Met Ala Cys Leu Gly Leu Gln Arg Tyr Lys Thr His Leu

```

1

5

10

```

cag ctg cct tct agg act tgg cct ttt gga gtc ctg ctt tct ctt ctc 99

```

```

Gln Leu Pro Ser Arg Thr Trp Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Leu Leu

```

15

20

25

```

ttc atc cca atc ttc tct gaa gcc ata caa gtg acc caa cct tca gtg 147

```

```

Phe Ile Pro Ile Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val

```

|                                                                 |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 30                                                              | 35  | 40  | 45  |     |
| gtg ttg gcc agc agc cac ggt gtc gcc agc ttt cca tgt gaa tat gca |     |     |     | 195 |
| Val Leu Ala Ser Ser His Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ala |     |     |     |     |
|                                                                 | 50  | 55  | 60  |     |
| tct tca cac aac act gat gag gtc cgg gtg acg gtg ctg cgg cag aca |     |     |     | 243 |
| Ser Ser His Asn Thr Asp Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr |     |     |     |     |
|                                                                 | 65  | 70  | 75  |     |
| aat gac caa gtg aca gag gtc tgt gcc acg aca ttc aca gtg aag aac |     |     |     | 291 |
| Asn Asp Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Val Lys Asn |     |     |     |     |
|                                                                 | 80  | 85  | 90  |     |
| acg ttg ggc ttc cta gat gac ccc ttc tgc agt ggt acc ttt aat gaa |     |     |     | 339 |
| Thr Leu Gly Phe Leu Asp Asp Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu |     |     |     |     |
|                                                                 | 95  | 100 | 105 |     |
| agc aga gtg aac ctc acc atc caa gga ctg agg gct gct gac acc gga |     |     |     | 387 |
| Ser Arg Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly |     |     |     |     |
| 110                                                             | 115 | 120 | 125 |     |
| ctg tac ttc tgc aag gtg gaa ctc atg tac cca ccg cca tac ttt gtg |     |     |     | 435 |
| Leu Tyr Phe Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val |     |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |     |
| ggc atg ggc aac ggg acc cag att tat gtc atc gat cca gaa cca tgc |     |     |     | 483 |
| Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys |     |     |     |     |
|                                                                 | 145 | 150 | 155 |     |
| cca gat tca gac gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc |     |     |     | 531 |
| Pro Asp Ser Asp Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys |     |     |     |     |
|                                                                 | 160 | 165 | 170 |     |
| aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc atc ttc |     |     |     | 579 |
| Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe |     |     |     |     |
|                                                                 | 175 | 180 | 185 |     |
| ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct aag gtc |     |     |     | 627 |
| Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val |     |     |     |     |
|                                                                 | 190 | 195 | 200 | 205 |
| acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat ttc |     |     |     | 675 |
| Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe |     |     |     |     |

| 210                                                             | 215 | 220 |      |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act cga cca |     |     | 723  |
| Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro |     |     |      |
| 225                                                             | 230 | 235 |      |
| cca gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctc ccc |     |     | 771  |
| Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro |     |     |      |
| 240                                                             | 245 | 250 |      |
| atc ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc aag gtc |     |     | 819  |
| Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val |     |     |      |
| 255                                                             | 260 | 265 |      |
| acc agt gca gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa ccc |     |     | 867  |
| Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro |     |     |      |
| 270                                                             | 275 | 280 | 285  |
| gaa ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct acc aag |     |     | 915  |
| Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys |     |     |      |
| 290                                                             | 295 | 300 |      |
| gaa gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta aaa ggc |     |     | 963  |
| Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly |     |     |      |
| 305                                                             | 310 | 315 |      |
| ttc tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg cag cca |     |     | 1011 |
| Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro |     |     |      |
| 320                                                             | 325 | 330 |      |
| cag gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat ggg agt |     |     | 1059 |
| Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser |     |     |      |
| 335                                                             | 340 | 345 |      |
| tac ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag |     |     | 1107 |
| Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln |     |     |      |
| 350                                                             | 355 | 360 | 365  |
| gga aac acg ttc acg tgt tct gtg ctg cat gaa ggc ctg cac aac cac |     |     | 1155 |
| Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His |     |     |      |
| 370                                                             | 375 | 380 |      |
| cat act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt aaa gcc caa gat ttt |     |     | 1203 |
| His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe |     |     |      |

| 385                                                               | 390 | 395 |      |
|-------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaattc                             |     |     | 1233 |
| Val Gln Trp Leu Met Asn Thr                                       |     |     |      |
| 400                                                               |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| <210> 5                                                           |     |     |      |
| <211> 1143                                                        |     |     |      |
| <212> DNA                                                         |     |     |      |
| <213> 人工序列                                                        |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| <220>                                                             |     |     |      |
| <221> CDS                                                         |     |     |      |
| <222> (13)..(1134)                                                |     |     |      |
| <223> 编码大鼠 CTLA4, 大鼠 IgG Fc 区域和胰高血糖素 C19-29 区域的 DNA 插入物           |     |     |      |
| <400> 5                                                           |     |     |      |
| gaattcattt aa atg gca ctc tgg gtg act gca gtc ctg gct ctc gct tgc |     |     | 51   |
| Met Ala Leu Trp Val Thr Ala Val Leu Ala Leu Ala Cys               |     |     |      |
| 1 5 10                                                            |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| ctt ggt ggt ctt gcc acc cca ggg cca gtg cgg aga tcc aca tct ccc   |     |     | 99   |
| Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Gly Pro Val Arg Arg Ser Thr Ser Pro   |     |     |      |
| 15 20 25                                                          |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| cct gtg gcc ctc agg gag ctt atc gag gag ctg agc aac atc aca caa   |     |     | 147  |
| Pro Val Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gln   |     |     |      |
| 30 35 40 45                                                       |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| gac cag aag act tcc ctg tgc aac agc agc atg gta tgg agc gtg gac   |     |     | 195  |
| Asp Gln Lys Thr Ser Leu Cys Asn Ser Ser Met Val Trp Ser Val Asp   |     |     |      |
| 50 55 60                                                          |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| ctg aca gct ggc ggg ttc tgt gca gcc ctg gaa tcc ctg acc aac atc   |     |     | 243  |
| Leu Thr Ala Gly Gly Phe Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Thr Asn Ile   |     |     |      |
| 65 70 75                                                          |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| tcc agt tgc aat gcc atc cac agg acc cag agg ata ttg aat ggc ctc   |     |     | 291  |
| Ser Ser Cys Asn Ala Ile His Arg Thr Gln Arg Ile Leu Asn Gly Leu   |     |     |      |
| 80 85 90                                                          |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| tgt aac caa aag gcc tgc gat gtg gct tcc agc ccc cca gat acc aaa   |     |     | 339  |
| Cys Asn Gln Lys Ala Ser Asp Val Ala Ser Ser Pro Pro Asp Thr Lys   |     |     |      |
| 95 100 105                                                        |     |     |      |

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| atc gaa gta gcc cag ttt ata tca aaa ctg ctc aat tac tcc aag caa | 387 |
| Ile Glu Val Ala Gln Phe Ile Ser Lys Leu Leu Asn Tyr Ser Lys Gln |     |
| 110 115 120 125                                                 |     |
| ctt ttc cgc tat ggc cac gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt | 435 |
| Leu Phe Arg Tyr Gly His Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| gat tgc aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc | 483 |
| Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe |     |
| 145 150 155                                                     |     |
| atc ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct | 531 |
| Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro |     |
| 160 165 170                                                     |     |
| aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc | 579 |
| Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val |     |
| 175 180 185                                                     |     |
| cat ttc agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act | 627 |
| His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr |     |
| 190 195 200 205                                                 |     |
| cga cca cca gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa | 675 |
| Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu |     |
| 210 215 220                                                     |     |
| ctc ccc atc ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc | 723 |
| Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys |     |
| 225 230 235                                                     |     |
| aag gtc acc agt gca get ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc | 771 |
| Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser |     |
| 240 245 250                                                     |     |
| aaa ccc gaa ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct | 819 |
| Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro |     |
| 255 260 265                                                     |     |
| acc aag gaa gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta | 867 |
| Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val |     |
| 270 275 280 285                                                 |     |

aaa ggc ttc tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg 915  
Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly  
290 295 300

cag cca cag gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat 963  
Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp  
305 310 315

ggg agt tac ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg 1011  
Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp  
320 325 330

cag cag gga aac acg ttc acg tgt tct gtg ctg cat gaa ggc ctg cac 1059  
Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His  
335 340 345

aac cac cat act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt aaa gcc caa 1107  
Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln  
350 355 360 365

gat ttt gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaattc 1143  
Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
370

<210> 6

<211> 825

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(816)

<223> 编码大鼠信号肽，大鼠 IgG Fc 区域和胰高血糖素 C19-29 区域的 DNA 插入物

<400> 6

gaattcattt aa atg aag tcc tgc ggc ctg ttc cct ctc atg gtg etc ett 51  
Met Lys Ser Cys Gly Leu Phe Pro Leu Met Val Leu Leu  
1 5 10

gct ctg ggt gta ctg gca ccc tgg agt gtg gaa gga gcg gcc gcc gtg 99  
Ala Leu Gly Val Leu Ala Pro Trp Ser Val Glu Gly Ala Ala Ala Val  
15 20 25

ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc aag cct tgt ata tgt aca ggc tca 147



Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn  
210 215 220

gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag gga aac acg ttc acg tgt tct gtg 723  
Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val  
225 230 235

ctg cat gaa ggc ctg cac aac cac cat act gag aag agt ctc tcc cac 771  
Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His  
240 245 250

tct ccg ggt aaa gcc caa gat ttt gtg cag tgg ttg atg aat acc 816  
Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
255 260 265

tgagaattc 825

<210> 7  
<211> 1284  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> CDS  
<222> (13)..(1275)  
<223> 编码大鼠 IL1 受体拮抗剂, 大鼠 IgG Fc 区域和胰高血糖素 C19-29 区域的 DNA 插入物

<400> 7  
gaattcattt aa atg gaa atc tgc tgg gga ccc tac agt cac cta atc tct 51  
Met Glu Ile Cys Trp Gly Pro Tyr Ser His Leu Ile Ser  
1 5 10

ctc ctt ctc atc ctt ctg ttt cat tca gag gca gcc tgc cgc cct tct 99  
Leu Leu Leu Ile Leu Leu Phe His Ser Glu Ala Ala Cys Arg Pro Ser  
15 20 25

ggg aaa aga ccc tgc aag atg caa gcc ttc aga atc tgg gat act aac 147  
Gly Lys Arg Pro Cys Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Thr Asn  
30 35 40 45

cag aag acc ttt tac ctg aga aac aac cag ctc att gct ggg tac tta 195  
Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Ile Ala Gly Tyr Leu

| 50                                                              | 55  | 60  |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| caa gga cca aat ate aaa cta gaa gaa aag ata gac atg gtg cct att |     |     | 243 |
| Gln Gly Pro Asn Ile Lys Leu Glu Glu Lys Ile Asp Met Val Pro Ile |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |     |
| gac ctt cat agt gtg ttc ttg ggc atc cac ggg ggc aag ctg tgc ctg |     |     | 291 |
| Asp Leu His Ser Val Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Leu Cys Leu |     |     |     |
| 80                                                              | 85  | 90  |     |
| tct tgt gcc aag tct gga gat gat atc aag ctc cag ctg gag gaa gtt |     |     | 339 |
| Ser Cys Ala Lys Ser Gly Asp Asp Ile Lys Leu Gln Leu Glu Glu Val |     |     |     |
| 95                                                              | 100 | 105 |     |
| aac atc act gat ctg agc aag aac aaa gaa gaa gac aag cgc ttt acc |     |     | 387 |
| Asn Ile Thr Asp Leu Ser Lys Asn Lys Glu Glu Asp Lys Arg Phe Thr |     |     |     |
| 110                                                             | 115 | 120 | 125 |
| ttc atc cgc tct gag aaa ggc ccc acc acc agc ttt gag tca gct gcc |     |     | 435 |
| Phe Ile Arg Ser Glu Lys Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| tgt cca gga tgg ttc ctc tgc aca aca cta gag gct gac cgt cct gtg |     |     | 483 |
| Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Thr Leu Glu Ala Asp Arg Pro Val |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |     |
| agc ctc acc aac aca ccg gaa gag ccc ctt ata gtc acg aag ttc tac |     |     | 531 |
| Ser Leu Thr Asn Thr Pro Glu Glu Pro Leu Ile Val Thr Lys Phe Tyr |     |     |     |
| 160                                                             | 165 | 170 |     |
| ttc cag gaa gac caa gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat |     |     | 579 |
| Phe Gln Glu Asp Gln Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp |     |     |     |
| 175                                                             | 180 | 185 |     |
| tgc aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc atc |     |     | 627 |
| Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile |     |     |     |
| 190                                                             | 195 | 200 | 205 |
| ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct aag |     |     | 675 |
| Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat |     |     | 723 |
| Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His |     |     |     |

| 225                                                             | 230 | 235 |      |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| ttc agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act cga |     |     | 771  |
| Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg |     |     |      |
| 240                                                             | 245 | 250 |      |
| cca cca gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctc |     |     | 819  |
| Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu |     |     |      |
| 255                                                             | 260 | 265 |      |
| ccc atc ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc aag |     |     | 867  |
| Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys |     |     |      |
| 270                                                             | 275 | 280 | 285  |
| gtc acc agt gca gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa |     |     | 915  |
| Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys |     |     |      |
| 290                                                             | 295 | 300 |      |
| ccc gaa ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct acc |     |     | 963  |
| Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr |     |     |      |
| 305                                                             | 310 | 315 |      |
| aag gaa gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta aaa |     |     | 1011 |
| Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys |     |     |      |
| 320                                                             | 325 | 330 |      |
| ggc ttc tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg cag |     |     | 1059 |
| Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln |     |     |      |
| 335                                                             | 340 | 345 |      |
| cca cag gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat ggg |     |     | 1107 |
| Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly |     |     |      |
| 350                                                             | 355 | 360 | 365  |
| agt tac ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg cag |     |     | 1155 |
| Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln |     |     |      |
| 370                                                             | 375 | 380 |      |
| cag gga aac acg ttc acg tgt tct gtg ctg cat gaa ggc ctg cac aac |     |     | 1203 |
| Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn |     |     |      |
| 385                                                             | 390 | 395 |      |
| cac cat act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt aaa gcc caa gat |     |     | 1251 |
| His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp |     |     |      |

| 400                                                               | 405 | 410 |      |
|-------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| ttt gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaattc                         |     |     | 1284 |
| Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr                                   |     |     |      |
| 415                                                               | 420 |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| <210> 8                                                           |     |     |      |
| <211> 369                                                         |     |     |      |
| <212> DNA                                                         |     |     |      |
| <213> 人工序列                                                        |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| <220>                                                             |     |     |      |
| <221> CDS                                                         |     |     |      |
| <222> (13)..(360)                                                 |     |     |      |
| <223> 编码人 IL8 和胰高血糖素 C19-29 区域的 DNA 插入物                           |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| <400> 8                                                           |     |     |      |
| gaattcattt aa atg act tcc aag ctg gcc gtg get ctc ttg gca gcc ttc |     |     | 51   |
| Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Phe               |     |     |      |
| 1 5 10                                                            |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| ctg att tct gca gct ctg tgt gaa ggt gca gtt ttg cca agg agt get   |     |     | 99   |
| Leu Ile Ser Ala Ala Leu Cys Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala   |     |     |      |
| 15 20 25                                                          |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| aaa gaa ctt aga tgt cag tgc ata aag aca tac tcc aaa cct ttc cac   |     |     | 147  |
| Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His   |     |     |      |
| 30 35 40 45                                                       |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| ccc aaa ttt atc aaa gaa ctg aga gtg att gag agt gga cca cac tgc   |     |     | 195  |
| Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys   |     |     |      |
| 50 55 60                                                          |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| gcc aac aca gaa att att gta aag ctt tct gat gga aga gag ctc tgt   |     |     | 243  |
| Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys   |     |     |      |
| 65 70 75                                                          |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| ctg gac ccc aag gaa aac tgg gtg cag agg gtt gtg gag aag ttt ttg   |     |     | 291  |
| Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu   |     |     |      |
| 80 85 90                                                          |     |     |      |
|                                                                   |     |     |      |
| aag agg get gag aat tca gcg gcc gcc ccg ggt aaa gcc caa gat ttt   |     |     | 339  |
| Lys Arg Ala Glu Asn Ser Ala Ala Ala Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe   |     |     |      |

| 95                                                    | 100 | 105 |     |
|-------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaattc                 |     |     | 369 |
| Val Gln Trp Leu Met Asn Thr                           |     |     |     |
| 110                                                   | 115 |     |     |
| <210> 9                                               |     |     |     |
| <211> 45                                              |     |     |     |
| <212> DNA                                             |     |     |     |
| <213> 人工序列                                            |     |     |     |
| <220>                                                 |     |     |     |
| <223> 用于构建载体 pCAGGS-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物              |     |     |     |
| <400> 9                                               |     |     |     |
| gagaattcat ttaaattgaga gcggccgccg tgcccagaaa ctgtg    |     |     | 45  |
| <210> 10                                              |     |     |     |
| <211> 49                                              |     |     |     |
| <212> DNA                                             |     |     |     |
| <213> 人工序列                                            |     |     |     |
| <220>                                                 |     |     |     |
| <223> 用于构建载体 pCAGGS-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物              |     |     |     |
| <400> 10                                              |     |     |     |
| tcaaccactg cacaaaatct tgggctttac ccggagagtg ggagagact |     |     | 49  |
| <210> 11                                              |     |     |     |
| <211> 45                                              |     |     |     |
| <212> DNA                                             |     |     |     |
| <213> 人工序列                                            |     |     |     |
| <220>                                                 |     |     |     |
| <223> 用于构建载体 pCAGGS-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物              |     |     |     |
| <400> 11                                              |     |     |     |
| gagaattcat ttaaattgaga gcggccgccg tgcccagaaa ctgtg    |     |     | 45  |
| <210> 12                                              |     |     |     |
| <211> 50                                              |     |     |     |
| <212> DNA                                             |     |     |     |
| <213> 人工序列                                            |     |     |     |

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 12

gagagagaga attctcaggt attcatcaac cactgcacaa aatcttgggc 50

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-IFN-rR-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 13

gagaattcat ttaaatgatt ctgctggtgg tcttgatg 38

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-IFN-rR-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 14

gcagcategc ggccgcttct tctctgtcat catggagaaa 40

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-CTLA4-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 15

gagaattcat ttaaatggct tgtcttggac tccagagg 38

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-CTLA4-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 16

gcagcatcgc ggccgcgtct gaatctgggc atggttctgg

40

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-IL13-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 17

gagaattcat ttaaattggca ctctgggtga ctgcagtc

38

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-IL13-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 18

gcagcatcgc ggccgcgtgg ccatagcgga aaagttgctt

40

<210> 19

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-IL1RA-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 19

gagaattcat ttaaattgga atctgctggg gaccctac

38

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-IL1RA-IgG-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 20

gcagcatcgc ggccgcttgg tcttcctgga agtagaactt

40

<210> 21

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 21

gagaattcat ttaaattgaga gcggccgccc egggtaaagc ccaagatttt gtgcagtggg  
tg

60

62

<210> 22

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 22

gagagagaga attctcaggt attcatcaac cactgcacaa aatcttgggc

50

<210> 23

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-IL8-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 23

gagaattcat ttaaattgact tccaagctgg ccgtggct

38

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于构建载体 pCAGGS-IL8-glu19-29 的寡核苷酸引物

<400> 24

gcagcatcgc ggccgctgaa ttctcagccc tcttcaaaaa

40

文件名 : IFN-rR-IgG-glu19-29

区域 : 1 - 1470 模式: 正常

密码表: 通用

EcoRI      SmaI ←      IFN $\gamma$ R

```

      9      18      27      36      45      54
5' GAA TTC ATT TAA ATG ATT CTG CTG GTG GTC CTG ATG CTG TCT GCG GAG ATC GGG
   ---
       M I L L V V L M L S A E I G

      63      72      81      90      99      108
AGT GGA GCT TTG ATG AGC ACC GAG GAT CCT AAG CCG CCC TCG GTG CCT GCG CCA
   ---
   S G A L M S T E D P K P P S V P A P

      117      126      135      144      153      162
ACA AAT GTT CTA ATT ACG TCC TAT GAC TTG AAC CCT GTC GTA CAT TGG AAG CAC
   ---
   T N V L I T S Y D L N P V V H W K H

      171      180      189      198      207      216
CAG AAC GTG TCG CAG GCT GCC GTC TTC ACT GTA CAG GTA AAG ATG TAT CCA GAA
   ---
   Q N V S Q A A V F T V Q V K M Y P E

      225      234      243      252      261      270
TAC TGG ACT GAT GCC TGC ACC AAC ATT GCC CAT CAT TAT TGT AAT ATC TAC AAA
   ---
   Y W T D A C T N I A H H Y C N I Y K

      279      288      297      306      315      324
CAC ATT TCC TAT CCT GAC TCA TCT GCC TGG GCC AGA GTT AAG GCC AAG GTT GGA
   ---
   H I S Y P D S S A W A R V K A K V G

      333      342      351      360      369      378
CAA AGA GAA TCT GCC TAT GCG CAG TCA GAA GAG TTT ATT ATG TGC CGA AAG GGG
   ---
   Q R E S A Y A Q S E E F I M C R K G

      387      396      405      414      423      432
AAG GTT GGA CCG CCT GGC CTG GAC ATC GGA AGG AAG GAA GAT CAG CTG ATT GTC
   ---
   K V G P P G L D I G R K E D Q L I V

      441      450      459      468      477      486
CAC ATA TTT CAC CCT AAG GTC AAT GTG AGT CAG GAA ACC ATG TTT GGT GAC GGA
   ---
   H I F H P K V N V S Q E T M F G D G

      495      504      513      522      531      540
AAT ACC TGT TAC ACA TTC GAC TAC ACT GTG TTT GTG AAA CAT TAC AGG AGT GGG
   ---
   N T C Y T F D Y T V F V K H Y R S G

```

图 1

|                                                                                                    |     |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|
|                                                                                                    |     | 549  |     |     | 558  |     |     | 567  |     |     | 576  |     |     | 585  |     |     | 594  |
| GAG                                                                                                | ATC | CTA  | CAT | ACA | GAA  | CAT | AGC | GTC  | CTA | AAA | GAA  | GAT | TGT | AGC  | GAA | ACT | CTG  |
| ---                                                                                                | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| E                                                                                                  | I   | L    | H   | T   | E    | H   | S   | V    | L   | K   | E    | D   | C   | S    | E   | T   | L    |
|                                                                                                    |     | 603  |     |     | 612  |     |     | 621  |     |     | 630  |     |     | 639  |     |     | 648  |
| TGT                                                                                                | GAG | TTA  | AAC | ATC | TCA  | GTG | TCC | ACG  | CTG | AAT | TCC  | AAT | TAC | TGT  | GTT | TCA | GTA  |
| ---                                                                                                | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| C                                                                                                  | E   | L    | N   | I   | S    | V   | S   | T    | L   | N   | S    | N   | Y   | C    | V   | S   | V    |
|                                                                                                    |     | 657  |     |     | 666  |     |     | 675  |     |     | 684  |     |     | 693  |     |     | 702  |
| GTT                                                                                                | GGA | AAG  | TCG | TCT | TTC  | TGG | CAA | GTT  | AAT | ACA | GAA  | ACA | TCA | AAA  | GAC | GCC | TGT  |
| ---                                                                                                | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| V                                                                                                  | G   | K    | S   | S   | F    | W   | Q   | V    | N   | T   | E    | T   | S   | K    | D   | A   | C    |
| <div> <div>IFN</div> <div>γR</div> <div>→</div> <div>NotI</div> <div>←</div> <div>IgG</div> </div> |     |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|                                                                                                    |     | 711  |     |     | 720  |     |     | 729  |     |     | 738  |     |     | 747  |     |     | 756  |
| ATC                                                                                                | CCC | TTT  | CTC | CAT | GAT  | GAC | AGA | GAA  | GAA | GCG | GCC  | GCC | GTG | CCC  | AGA | AAC | TGT  |
| ---                                                                                                | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| I                                                                                                  | P   | F    | L   | H   | D    | D   | R   | E    | E   | A   | A    | A   | V   | P    | R   | N   | C    |
|                                                                                                    |     | 765  |     |     | 774  |     |     | 783  |     |     | 792  |     |     | 801  |     |     | 810  |
| GGA                                                                                                | GGT | GAT  | TGC | AAG | CCT  | TGT | ATA | TGT  | ACA | GGC | TCA  | GAA | GTA | TCA  | TCT | GTC | TTC  |
| ---                                                                                                | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| G                                                                                                  | G   | D    | C   | K   | P    | C   | I   | C    | T   | G   | S    | E   | V   | S    | S   | V   | F    |
|                                                                                                    |     | 819  |     |     | 828  |     |     | 837  |     |     | 846  |     |     | 855  |     |     | 864  |
| ATC                                                                                                | TTC | CCC  | CCA | AAG | CCC  | AAA | GAT | GTG  | CTC | ACC | ATC  | ACT | CTG | ACT  | CCT | AAG | GTC  |
| ---                                                                                                | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| I                                                                                                  | F   | P    | P   | K   | P    | K   | D   | V    | L   | T   | I    | T   | L   | T    | P   | K   | V    |
|                                                                                                    |     | 873  |     |     | 882  |     |     | 891  |     |     | 900  |     |     | 909  |     |     | 918  |
| ACG                                                                                                | TGT | GTT  | GTG | GTA | GAC  | ATT | AGC | CAG  | GAC | GAT | CCC  | GAG | GTC | CAT  | TTC | AGC | TGG  |
| ---                                                                                                | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| T                                                                                                  | C   | V    | V   | V   | D    | I   | S   | Q    | D   | D   | P    | E   | V   | H    | F   | S   | W    |
|                                                                                                    |     | 927  |     |     | 936  |     |     | 945  |     |     | 954  |     |     | 963  |     |     | 972  |
| TTT                                                                                                | GTA | GAT  | GAC | GTG | GAA  | GTC | CAC | ACA  | GCT | CAG | ACT  | CGA | CCA | CCA  | GAG | GAG | CAG  |
| ---                                                                                                | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| F                                                                                                  | V   | D    | D   | V   | E    | V   | H   | T    | A   | Q   | T    | R   | P   | P    | E   | E   | Q    |
|                                                                                                    |     | 981  |     |     | 990  |     |     | 999  |     |     | 1008 |     |     | 1017 |     |     | 1026 |
| TTC                                                                                                | AAC | AGC  | ACT | TTC | CGC  | TCA | GTC | AGT  | GAA | CTC | CCC  | ATC | CTG | CAC  | CAG | GAC | TGG  |
| ---                                                                                                | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| F                                                                                                  | N   | S    | T   | F   | R    | S   | V   | S    | E   | L   | P    | I   | L   | H    | Q   | D   | W    |
|                                                                                                    |     | 1035 |     |     | 1044 |     |     | 1053 |     |     | 1062 |     |     | 1071 |     |     | 1080 |
| CTC                                                                                                | AAT | GGC  | AGG | ACG | TTC  | AGA | TGC | AAG  | GTC | ACC | AGT  | GCA | GCT | TTC  | CCA | TCC | CCC  |
| ---                                                                                                | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| L                                                                                                  | N   | G    | R   | T   | F    | R   | C   | K    | V   | T   | S    | A   | A   | F    | P   | S   | P    |

图 2

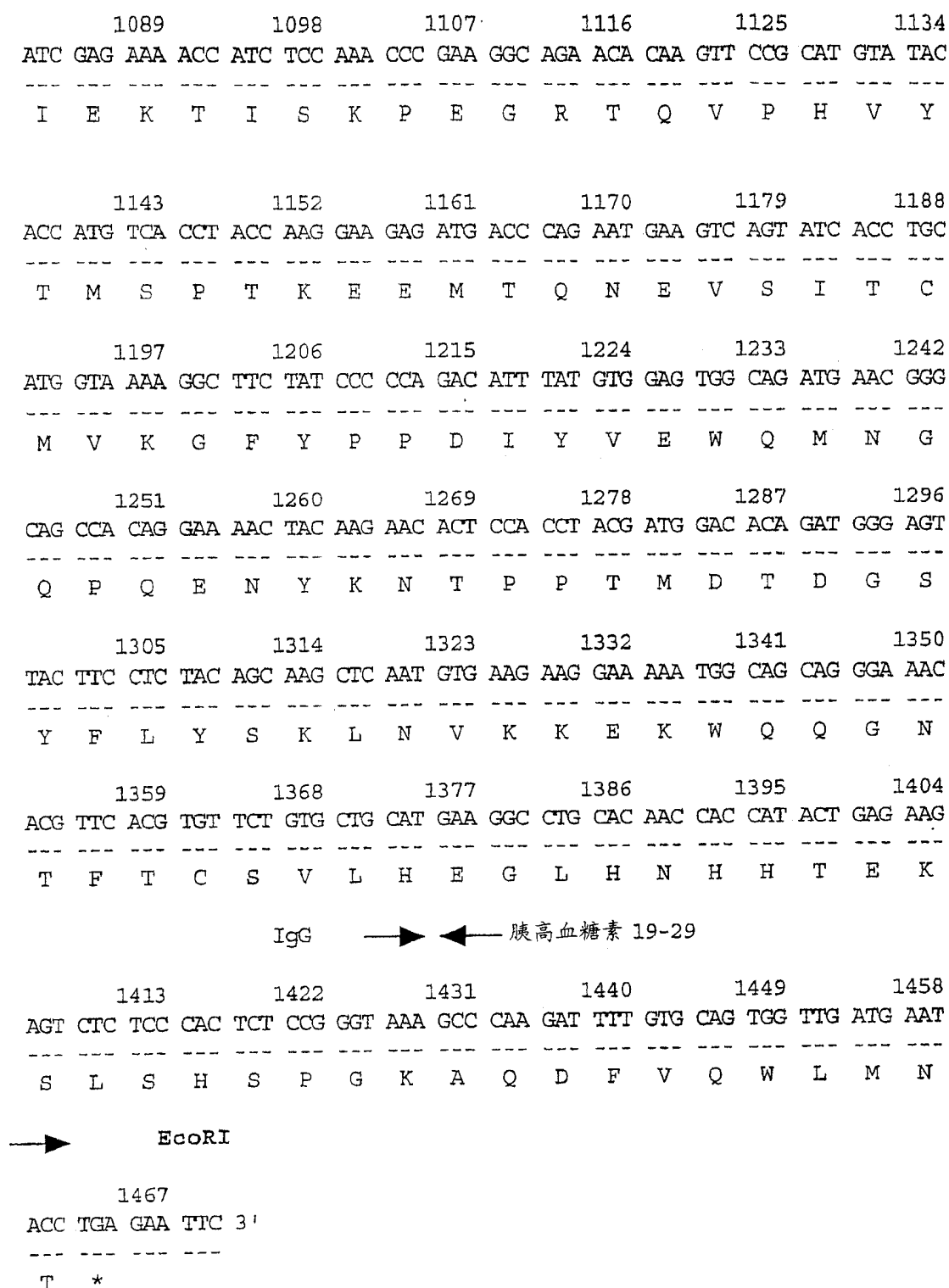


图 3

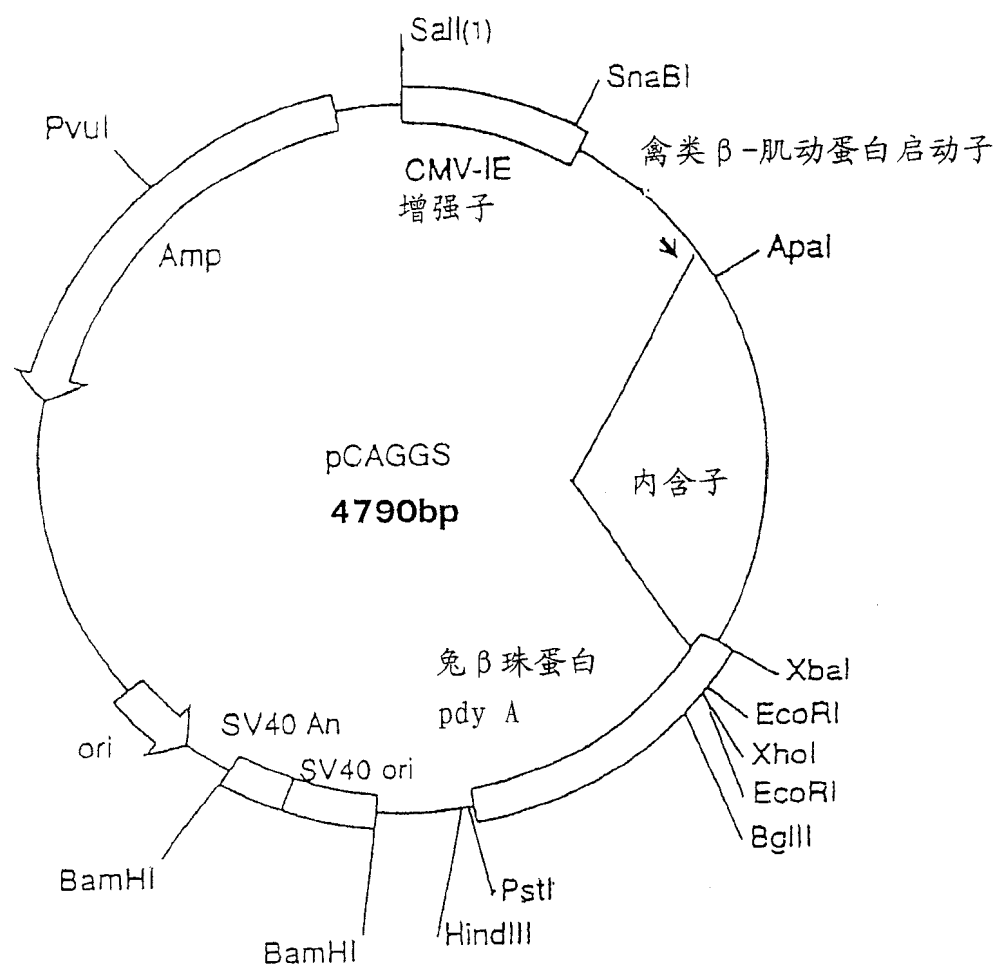


图 4

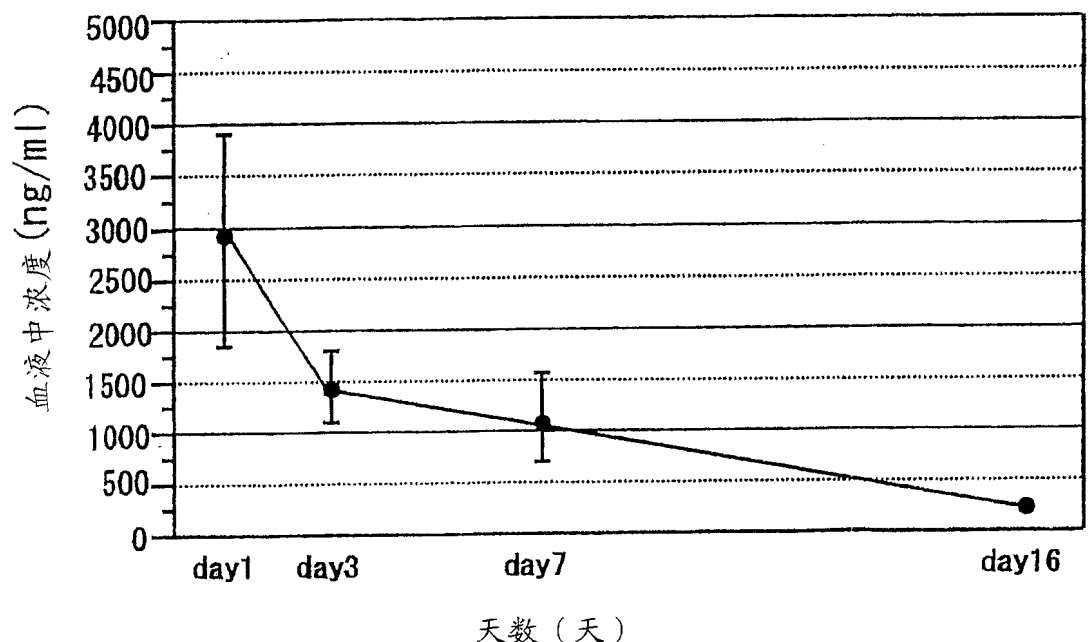
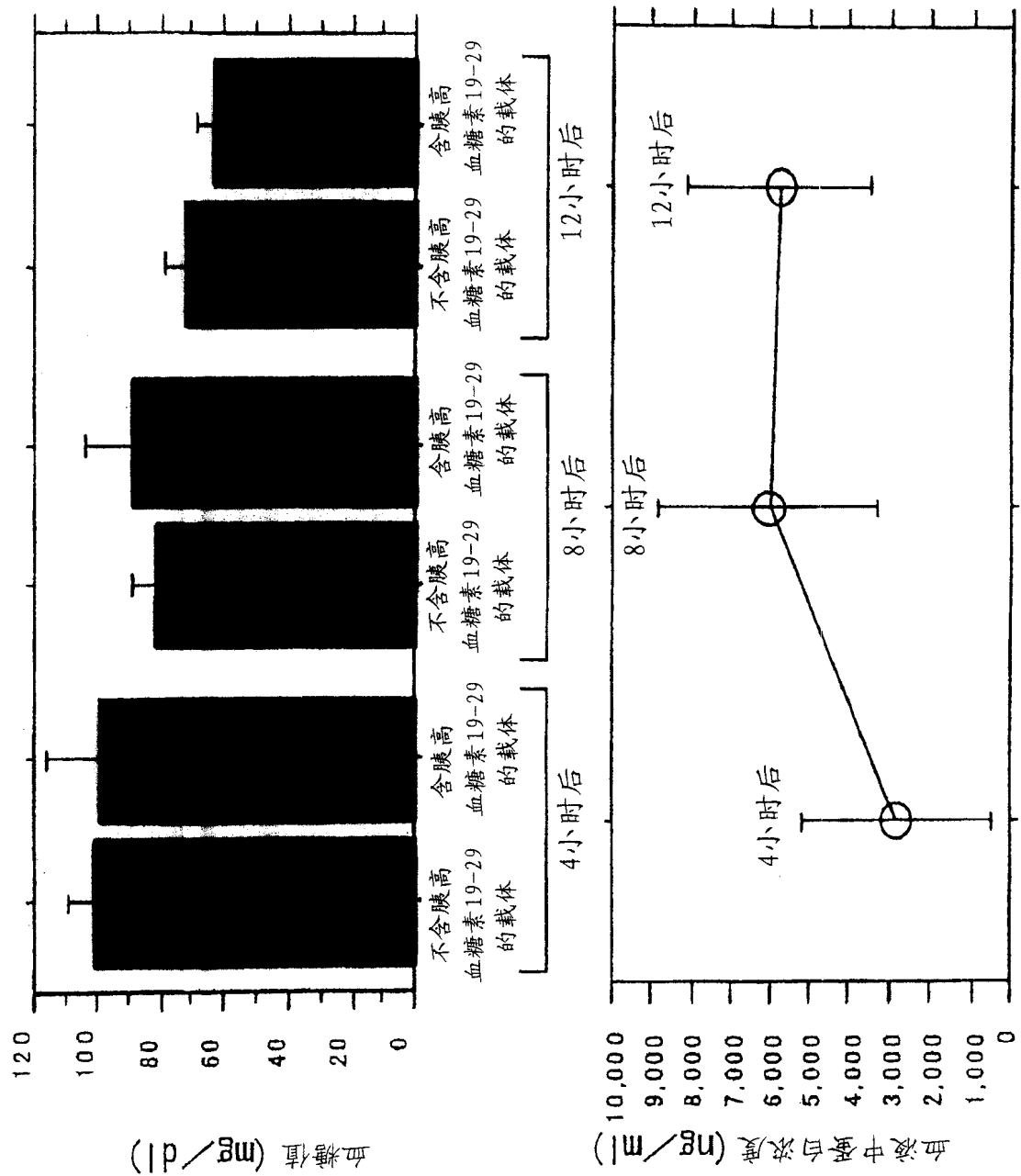


图 5



快速注射含胰高血糖素19-29的载体（大鼠干扰素受体-IgGFc-胰高血糖素19-29融合蛋白的载体）后的血液中蛋白质浓度

图 6

文件名 : CTLA4-IgG- glu19-29  
 区域 : 1 - 1233 模式: 正常  
 密码表: 通用

EcoRI      SmaI ← CTLA4

```

      9      18      27      36      45      54
5'  GAA TTC ATT TAA ATG GCT TGT CTT GGA CTC CAG AGG TAC AAA ACT CAC CTG CAG
    ---
      M  A  C  L  G  L  Q  R  Y  K  T  H  L  Q

      63      72      81      90      99      108
CTG CCT TCT AGG ACT TGG CCT TTT GGA GTC CTG CTT TCT CTT CTC TTC ATC CCA
    ---
    L  P  S  R  T  W  P  F  G  V  L  L  S  L  L  F  I  P

      117      126      135      144      153      162
ATC TTC TCT GAA GCC ATA CAA GTG ACC CAA CCT TCA GTG GTG TTG GCC AGC AGC
    ---
    I  F  S  E  A  I  Q  V  T  Q  P  S  V  V  L  A  S  S

      171      180      189      198      207      216
CAC GGT GTC GCC AGC TTT CCA TGT GAA TAT GCA TCT TCA CAC AAC ACT GAT GAG
    ---
    H  G  V  A  S  F  P  C  E  Y  A  S  S  H  N  T  D  E

      225      234      243      252      261      270
GTC CGG GTG ACG GTG CTG CGG CAG ACA AAT GAC CAA GTG ACA GAG GTC TGT GCC
    ---
    V  R  V  T  V  L  R  Q  T  N  D  Q  V  T  E  V  C  A

      279      288      297      306      315      324
ACG ACA TTC ACA GTG AAG AAC ACG TTG GGC TTC CTA GAT GAC CCC TTC TGC AGT
    ---
    T  T  F  T  V  K  N  T  L  G  F  L  D  D  P  F  C  S

      333      342      351      360      369      378
GGT ACC TTT AAT GAA AGC AGA GTG AAC CTC ACC ATC CAA GGA CTG AGG GCT GCT
    ---
    G  T  F  N  E  S  R  V  N  L  T  I  Q  G  L  R  A  A

      387      396      405      414      423      432
GAC ACC GGA CTG TAC TTC TGC AAG GTG GAA CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TTT
    ---
    D  T  G  L  Y  F  C  K  V  E  L  M  Y  P  P  P  Y  F

      441      450      459      468      477      486
GTG GGC ATG GGC AAC GGG ACC CAG ATT TAT GTC ATC GAT CCA GAA CCA TGC CCA
    ---
    V  G  M  G  N  G  T  Q  I  Y  V  I  D  P  E  P  C  P
  
```

图 7

CTLA4 → NotI ← IgG

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|
|     |     | 495 |     |     | 504 |     |     | 513 |     |     | 522  |     |     | 531  |     |     | 540  |
| GAT | TCA | GAC | GCG | GCC | GCC | GTG | CCC | AGA | AAC | TGT | GGA  | GGT | GAT | TGC  | AAG | CCT | TGT  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| D   | S   | D   | A   | A   | A   | V   | P   | R   | N   | C   | G    | G   | D   | C    | K   | P   | C    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|     |     | 549 |     |     | 558 |     |     | 567 |     |     | 576  |     |     | 585  |     |     | 594  |
| ATA | TGT | ACA | GGC | TCA | GAA | GTA | TCA | TCT | GTC | TTC | ATC  | TTC | CCC | CCA  | AAG | CCC | AAA  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| I   | C   | T   | G   | S   | E   | V   | S   | S   | V   | F   | I    | F   | P   | P    | K   | P   | K    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|     |     | 603 |     |     | 612 |     |     | 621 |     |     | 630  |     |     | 639  |     |     | 648  |
| GAT | GTG | CTC | ACC | ATC | ACT | CTG | ACT | CCT | AAG | GTC | ACG  | TGT | GTT | GTG  | GTA | GAC | ATT  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| D   | V   | L   | T   | I   | T   | L   | T   | P   | K   | V   | T    | C   | V   | V    | V   | D   | I    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|     |     | 657 |     |     | 666 |     |     | 675 |     |     | 684  |     |     | 693  |     |     | 702  |
| AGC | CAG | GAC | GAT | CCC | GAG | GTC | CAT | TTC | AGC | TGG | TTT  | GTA | GAT | GAC  | GTG | GAA | GTC  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| S   | Q   | D   | D   | P   | E   | V   | H   | F   | S   | W   | F    | V   | D   | D    | V   | E   | V    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|     |     | 711 |     |     | 720 |     |     | 729 |     |     | 738  |     |     | 747  |     |     | 756  |
| CAC | ACA | GCT | CAG | ACT | CGA | CCA | CCA | GAG | GAG | CAG | TTC  | AAC | AGC | ACT  | TTC | CGC | TCA  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| H   | T   | A   | Q   | T   | R   | P   | P   | E   | E   | Q   | F    | N   | S   | T    | F   | R   | S    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|     |     | 765 |     |     | 774 |     |     | 783 |     |     | 792  |     |     | 801  |     |     | 810  |
| GTC | AGT | GAA | CTC | CCC | ATC | CTG | CAC | CAG | GAC | TGG | CTC  | AAT | GGC | AGG  | ACG | TTC | AGA  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| V   | S   | E   | L   | P   | I   | L   | H   | Q   | D   | W   | L    | N   | G   | R    | T   | F   | R    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|     |     | 819 |     |     | 828 |     |     | 837 |     |     | 846  |     |     | 855  |     |     | 864  |
| TGC | AAG | GTC | ACC | AGT | GCA | GCT | TTC | CCA | TCC | CCC | ATC  | GAG | AAA | ACC  | ATC | TCC | AAA  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| C   | K   | V   | T   | S   | A   | A   | F   | P   | S   | P   | I    | E   | K   | T    | I   | S   | K    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|     |     | 873 |     |     | 882 |     |     | 891 |     |     | 900  |     |     | 909  |     |     | 918  |
| CCC | GAA | GGC | AGA | ACA | CAA | GTT | CCG | CAT | GTA | TAC | ACC  | ATG | TCA | CCT  | ACC | AAG | GAA  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| P   | E   | G   | R   | T   | Q   | V   | P   | H   | V   | Y   | T    | M   | S   | P    | T   | K   | E    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|     |     | 927 |     |     | 936 |     |     | 945 |     |     | 954  |     |     | 963  |     |     | 972  |
| GAG | ATG | ACC | CAG | AAT | GAA | GTC | AGT | ATC | ACC | TGC | ATG  | GTA | AAA | GGC  | TTC | TAT | CCC  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| E   | M   | T   | Q   | N   | E   | V   | S   | I   | T   | C   | M    | V   | K   | G    | F   | Y   | P    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|     |     | 981 |     |     | 990 |     |     | 999 |     |     | 1008 |     |     | 1017 |     |     | 1026 |
| CCA | GAC | ATT | TAT | GTG | GAG | TGG | CAG | ATG | AAC | GGG | CAG  | CCA | CAG | GAA  | AAC | TAC | AAG  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  | --- | --- | ---  |
| P   | D   | I   | Y   | V   | E   | W   | Q   | M   | N   | G   | Q    | P   | Q   | E    | N   | Y   | K    |

图 8

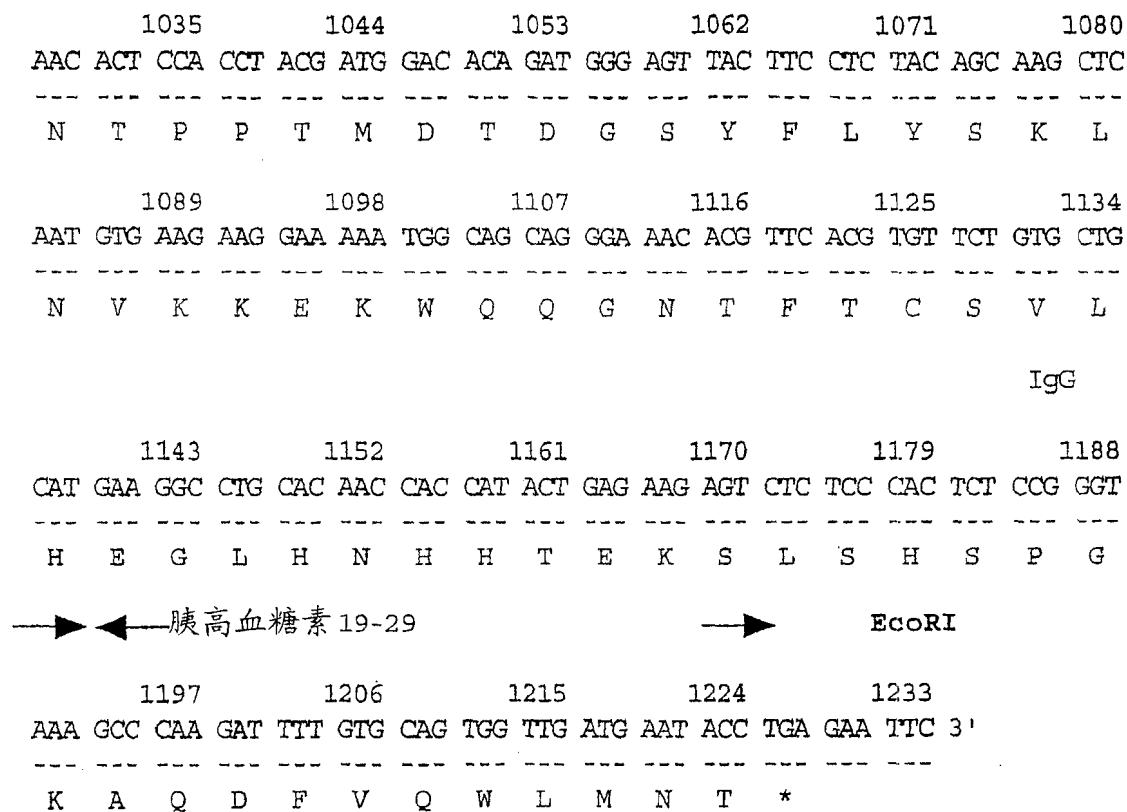


图 9

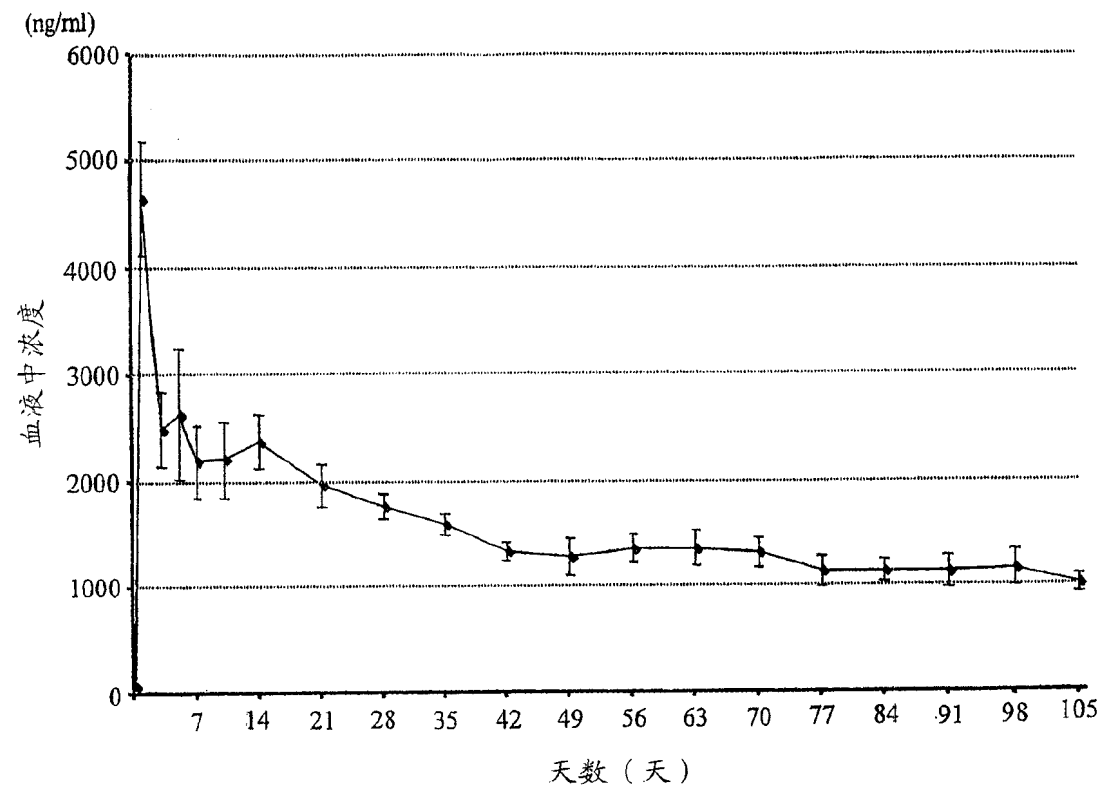


图 10

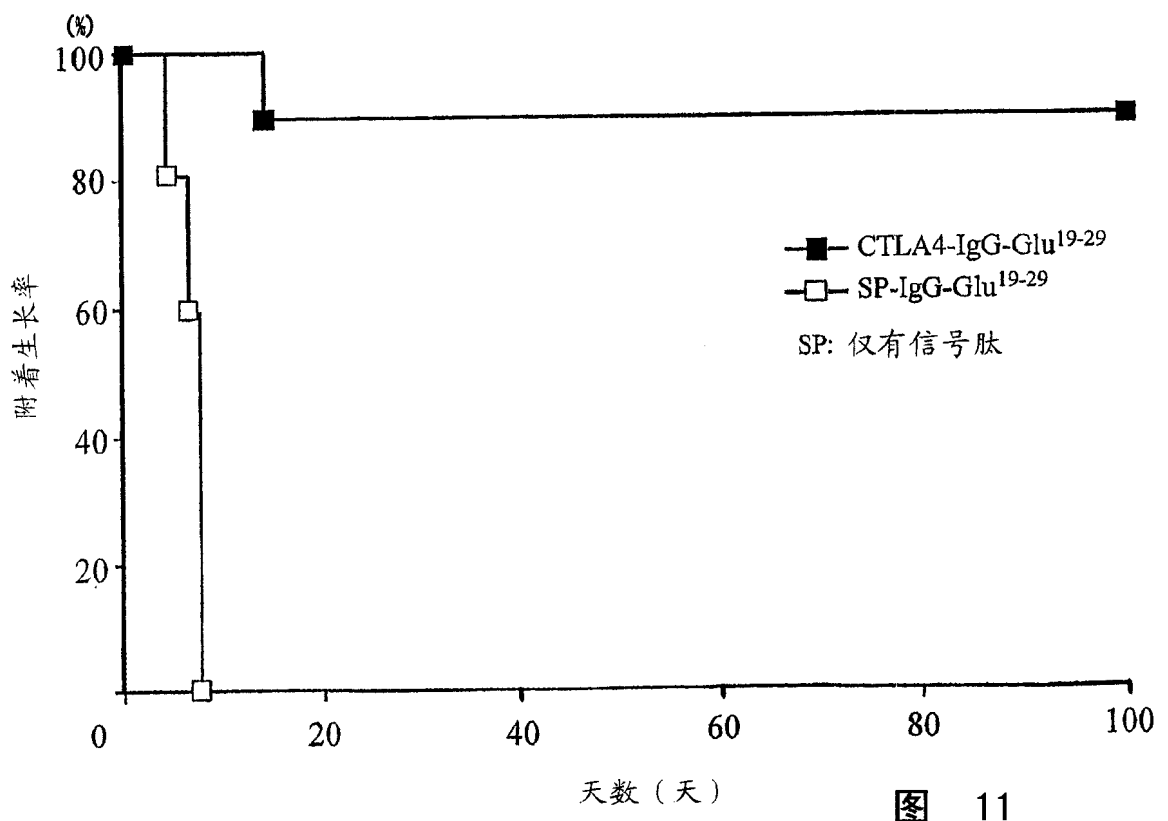


图 11

文件名 : IL13-IgG-glu19-29  
 区域 : 1 - 1143 模式: 正常  
 密码表: 通用

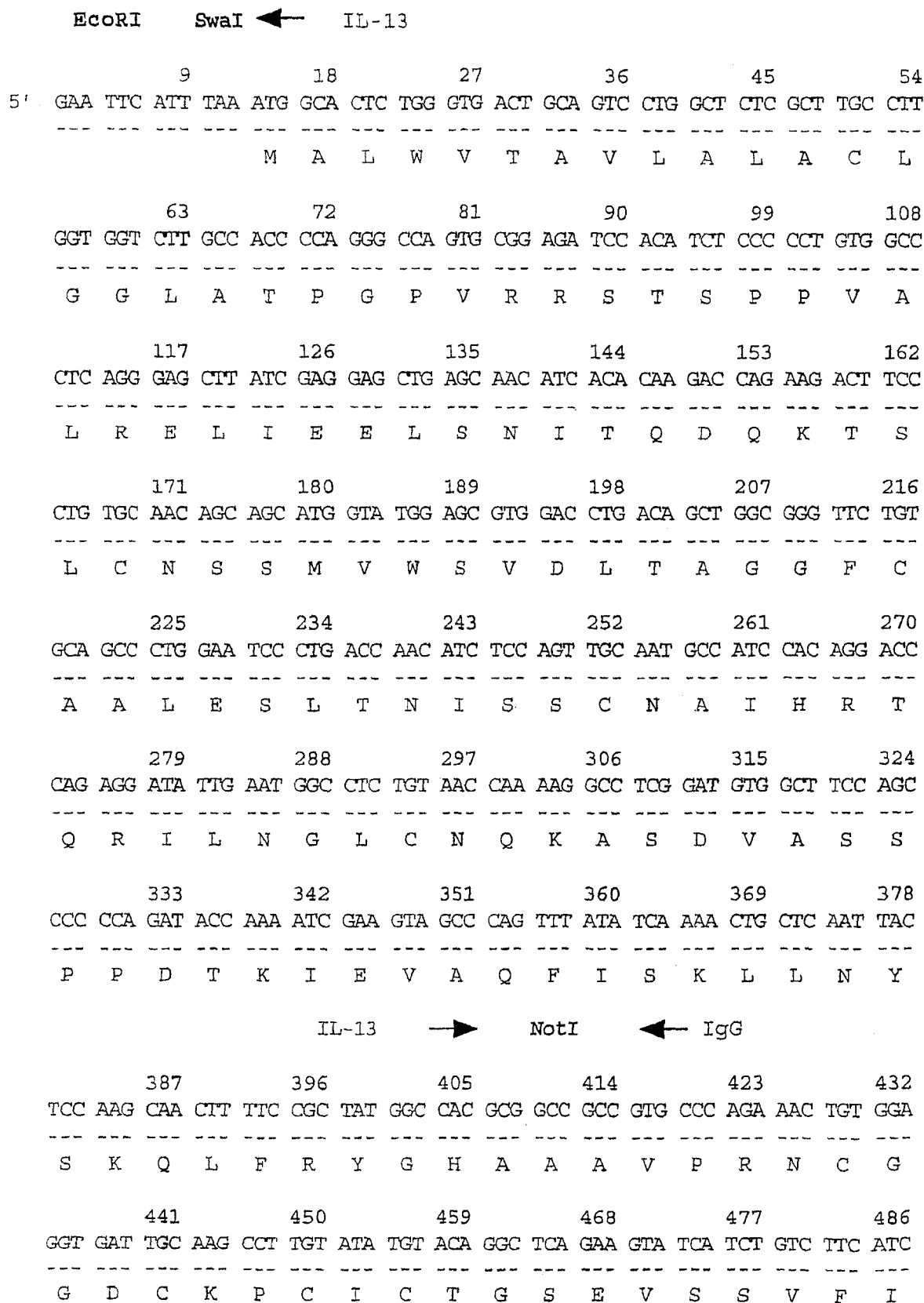


图 12

|                                                                         |      |      |      |      |      |
|-------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 495                                                                     | 504  | 513  | 522  | 531  | 540  |
| TTC CCC CCA AAG CCC AAA GAT GTG CTC ACC ATC ACT CTG ACT CCT AAG GTC ACG |      |      |      |      |      |
| ---                                                                     | ---  | ---  | ---  | ---  | ---  |
| F P P K P K D V L T I T L T P K V T                                     |      |      |      |      |      |
| 549                                                                     | 558  | 567  | 576  | 585  | 594  |
| TGT GTT GTG GTA GAC ATT AGC CAG GAC GAT CCC GAG GTC CAT TTC AGC TGG TTT |      |      |      |      |      |
| ---                                                                     | ---  | ---  | ---  | ---  | ---  |
| C V V V D I S Q D D P E V H F S W F                                     |      |      |      |      |      |
| 603                                                                     | 612  | 621  | 630  | 639  | 648  |
| GTA GAT GAC GTG GAA GTC CAC ACA GCT CAG ACT CGA CCA CCA GAG GAG CAG TTC |      |      |      |      |      |
| ---                                                                     | ---  | ---  | ---  | ---  | ---  |
| V D D V E V H T A Q T R P P E E Q F                                     |      |      |      |      |      |
| 657                                                                     | 666  | 675  | 684  | 693  | 702  |
| AAC AGC ACT TTC CGC TCA GTC AGT GAA CTC CCC ATC CTG CAC CAG GAC TGG CTC |      |      |      |      |      |
| ---                                                                     | ---  | ---  | ---  | ---  | ---  |
| N S T F R S V S E L P I L H Q D W L                                     |      |      |      |      |      |
| 711                                                                     | 720  | 729  | 738  | 747  | 756  |
| AAT GGC AGG ACG TTC AGA TGC AAG GTC ACC AGT GCA GCT TTC CCA TCC CCC ATC |      |      |      |      |      |
| ---                                                                     | ---  | ---  | ---  | ---  | ---  |
| N G R T F R C K V T S A A F P S P I                                     |      |      |      |      |      |
| 765                                                                     | 774  | 783  | 792  | 801  | 810  |
| GAG AAA ACC ATC TCC AAA CCC GAA GGC AGA ACA CAA GTT CCG CAT GTA TAC ACC |      |      |      |      |      |
| ---                                                                     | ---  | ---  | ---  | ---  | ---  |
| E K T I S K P E G R T Q V P H V Y T                                     |      |      |      |      |      |
| 819                                                                     | 828  | 837  | 846  | 855  | 864  |
| ATG TCA CCT ACC AAG GAA GAG ATG ACC CAG AAT GAA GTC AGT ATC ACC TGC ATG |      |      |      |      |      |
| ---                                                                     | ---  | ---  | ---  | ---  | ---  |
| M S P T K E E M T Q N E V S I T C M                                     |      |      |      |      |      |
| 873                                                                     | 882  | 891  | 900  | 909  | 918  |
| GTA AAA GGC TTC TAT CCC CCA GAC ATT TAT GTG GAG TGG CAG ATG AAC GGG CAG |      |      |      |      |      |
| ---                                                                     | ---  | ---  | ---  | ---  | ---  |
| V K G F Y P P D I Y V E W Q M N G Q                                     |      |      |      |      |      |
| 927                                                                     | 936  | 945  | 954  | 963  | 972  |
| CCA CAG GAA AAC TAC AAG AAC ACT CCA CCT ACG ATG GAC ACA GAT GGG AGT TAC |      |      |      |      |      |
| ---                                                                     | ---  | ---  | ---  | ---  | ---  |
| P Q E N Y K N T P P T M D T D G S Y                                     |      |      |      |      |      |
| 981                                                                     | 990  | 999  | 1008 | 1017 | 1026 |
| TTC CTC TAC AGC AAG CTC AAT GTG AAG AAG GAA AAA TGG CAG CAG GGA AAC ACG |      |      |      |      |      |
| ---                                                                     | ---  | ---  | ---  | ---  | ---  |
| F L Y S K L N V K K E K W Q Q G N T                                     |      |      |      |      |      |
| 1035                                                                    | 1044 | 1053 | 1062 | 1071 | 1080 |
| TTC ACG TGT TCT GTG CTG CAT GAA GGC CTG CAC AAC CAC CAT ACT GAG AAG AGT |      |      |      |      |      |
| ---                                                                     | ---  | ---  | ---  | ---  | ---  |
| F T C S V L H E G L H N H H T E K S                                     |      |      |      |      |      |

图 13

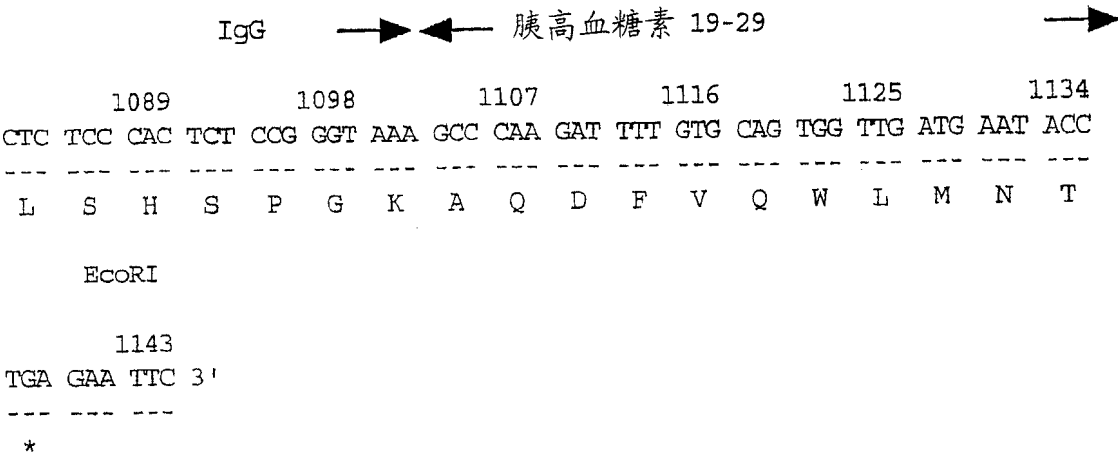


图 14



[illegible]

图 16

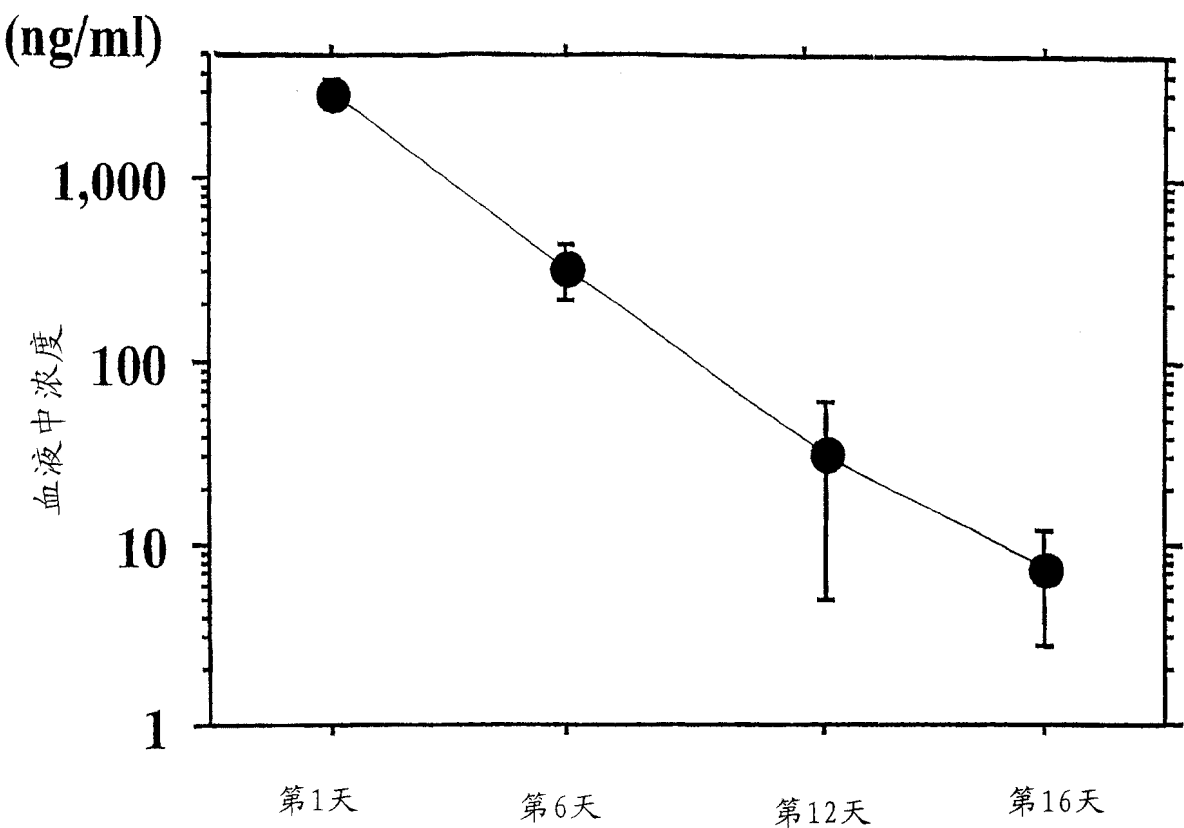


图 17

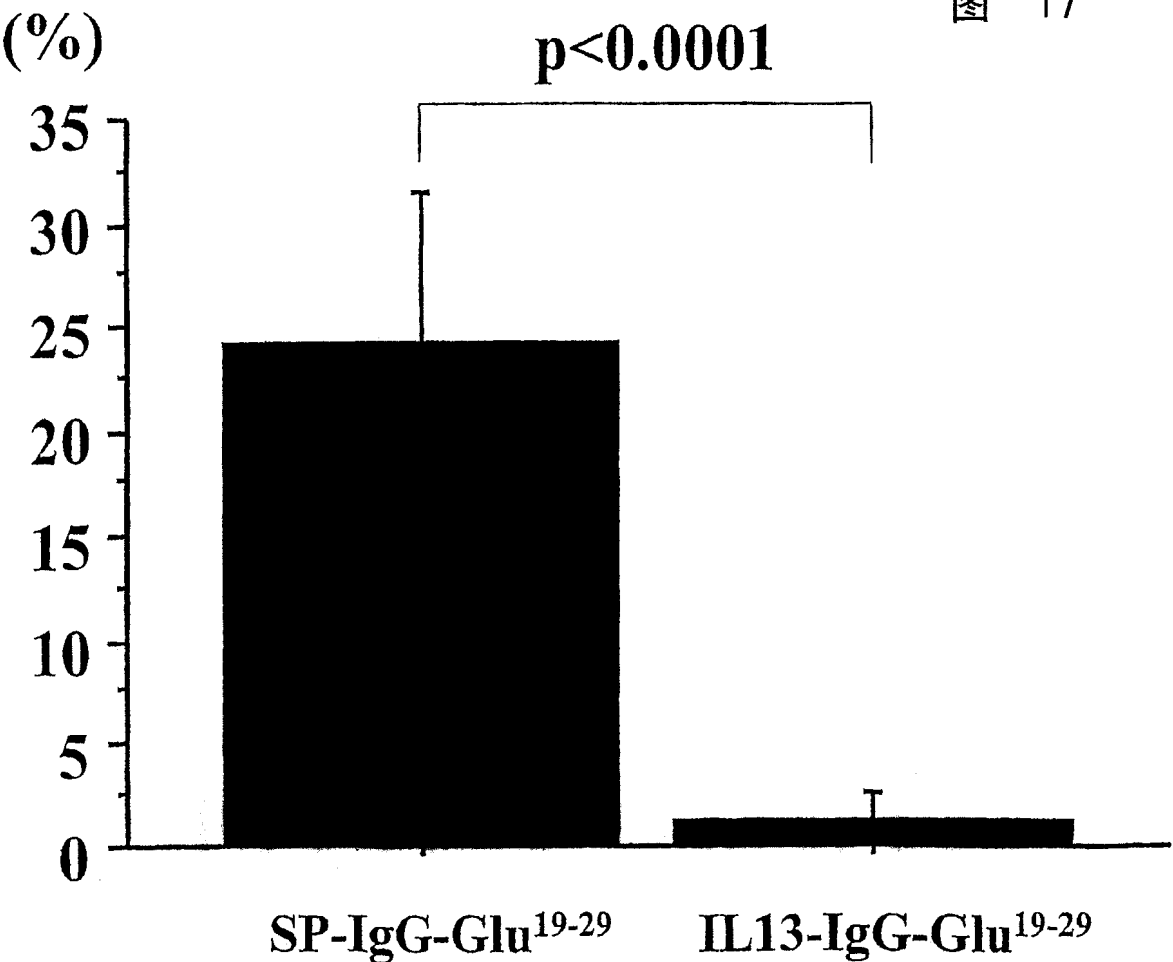


图 18

文件名 : IL1RA-IgG-glu19-29

区域 : 1 - 1284 模式: 正常

密码表: 通用

EcoRI      SmaI ← IL-1RA

```

      9      18      27      36      45      54
5' GAA TTC ATT TAA ATG GAA ATC TGC TGG GGA CCC TAC AGT CAC CTA ATC TCT CTC
   ---
       M   E   I   C   W   G   P   Y   S   H   L   I   S   L

      63      72      81      90      99      108
CIT CTC ATC CTT CTG TTT CAT TCA GAG GCA GCC TGC CGC CCT TCT GGG AAA AGA
   ---
   L   L   I   L   L   F   H   S   E   A   A   C   R   P   S   G   K   R

     117      126      135      144      153      162
CCC TGC AAG ATG CAA GCC TTC AGA ATC TGG GAT ACT AAC CAG AAG ACC TTT TAC
   ---
   P   C   K   M   Q   A   F   R   I   W   D   T   N   Q   K   T   F   Y

     171      180      189      198      207      216
CTG AGA AAC AAC CAG CTC ATT GCT GGG TAC TTA CAA GGA CCA AAT ATC AAA CTA
   ---
   L   R   N   N   Q   L   I   A   G   Y   L   Q   G   P   N   I   K   L

     225      234      243      252      261      270
GAA GAA AAG ATA GAC ATG GTG CCT ATT GAC CTT CAT AGT GTG TTC TTG GGC ATC
   ---
   E   E   K   I   D   M   V   P   I   D   L   H   S   V   F   L   G   I

     279      288      297      306      315      324
CAC GGG GGC AAG CTG TGC CTG TCT TGT GCC AAG TCT GGA GAT GAT ATC AAG CTC
   ---
   H   G   G   K   L   C   L   S   C   A   K   S   G   D   D   I   K   L

     333      342      351      360      369      378
CAG CTG GAG GAA GTT AAC ATC ACT GAT CTG AGC AAG AAC AAA GAA GAA GAC AAG
   ---
   Q   L   E   E   V   N   I   T   D   L   S   K   N   K   E   E   D   K

     387      396      405      414      423      432
CGC TTT ACC TTC ATC CGC TCT GAG AAA GGC CCC ACC ACC AGC TTT GAG TCA GCT
   ---
   R   F   T   F   I   R   S   E   K   G   P   T   T   S   F   E   S   A

     441      450      459      468      477      486
GCC TGT CCA GGA TGG TTC CTC TGC ACA ACA CTA GAG GCT GAC CGT CCT GTG AGC
   ---
   A   C   P   G   W   F   L   C   T   T   L   E   A   D   R   P   V   S

```

图 19

## IL-1RA

|                                                                                                                                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CTC                                                                                                                                          | ACC | AAC | ACA | CCG | GAA | GAG | CCC | CTT | ATA | GTC | ACG | AAG | TTC | TAC | TTC | CAG | GAA |
| L                                                                                                                                            | T   | N   | T   | P   | E   | E   | P   | L   | I   | V   | T   | K   | F   | Y   | F   | Q   | E   |
| <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div> <p>→ NotI ←</p> </div> <div> <p>IgG</p> </div> </div> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GAC                                                                                                                                          | CAA | GCG | GCC | GCC | GTG | CCC | AGA | AAC | TGT | GGA | GGT | GAT | TGC | AAG | CCT | TGT | ATA |
| D                                                                                                                                            | Q   | A   | A   | A   | V   | P   | R   | N   | C   | G   | G   | D   | C   | K   | P   | C   | I   |
| TGT                                                                                                                                          | ACA | GGC | TCA | GAA | GTA | TCA | TCT | GTC | TTC | ATC | TTC | CCC | CCA | AAG | CCC | AAA | GAT |
| C                                                                                                                                            | T   | G   | S   | E   | V   | S   | S   | V   | F   | I   | F   | P   | P   | K   | P   | K   | D   |
| GTG                                                                                                                                          | CTC | ACC | ATC | ACT | CTG | ACT | CCT | AAG | GTC | ACG | TGT | GTT | GTG | GTA | GAC | ATT | AGC |
| V                                                                                                                                            | L   | T   | I   | T   | L   | T   | P   | K   | V   | T   | C   | V   | V   | V   | D   | I   | S   |
| CAG                                                                                                                                          | GAC | GAT | CCC | GAG | GTC | CAT | TTC | AGC | TGG | TTT | GTA | GAT | GAC | GTG | GAA | GTC | CAC |
| Q                                                                                                                                            | D   | D   | P   | E   | V   | H   | F   | S   | W   | F   | V   | D   | D   | V   | E   | V   | H   |
| ACA                                                                                                                                          | GCT | CAG | ACT | CGA | CCA | CCA | GAG | GAG | CAG | TTC | AAC | AGC | ACT | TTC | CGC | TCA | GTC |
| T                                                                                                                                            | A   | Q   | T   | R   | P   | P   | E   | E   | Q   | F   | N   | S   | T   | F   | R   | S   | V   |
| AGT                                                                                                                                          | GAA | CTC | CCC | ATC | CTG | CAC | CAG | GAC | TGG | CTC | AAT | GGC | AGG | ACG | TTC | AGA | TGC |
| S                                                                                                                                            | E   | L   | P   | I   | L   | H   | Q   | D   | W   | L   | N   | G   | R   | T   | F   | R   | C   |
| AAG                                                                                                                                          | GTC | ACC | AGT | GCA | GCT | TTC | CCA | TCC | CCC | ATC | GAG | AAA | ACC | ATC | TCC | AAA | CCC |
| K                                                                                                                                            | V   | T   | S   | A   | A   | F   | P   | S   | P   | I   | E   | K   | T   | I   | S   | K   | P   |
| GAA                                                                                                                                          | GGC | AGA | ACA | CAA | GTT | CCG | CAT | GTA | TAC | ACC | ATG | TCA | CCT | ACC | AAG | GAA | GAG |
| E                                                                                                                                            | G   | R   | T   | Q   | V   | P   | H   | V   | Y   | T   | M   | S   | P   | T   | K   | E   | E   |
| ATG                                                                                                                                          | ACC | CAG | AAT | GAA | GTC | AGT | ATC | ACC | TGC | ATG | GTA | AAA | GGC | TTC | TAT | CCC | CCA |
| M                                                                                                                                            | T   | Q   | N   | E   | V   | S   | I   | T   | C   | M   | V   | K   | G   | F   | Y   | P   | P   |

图 20

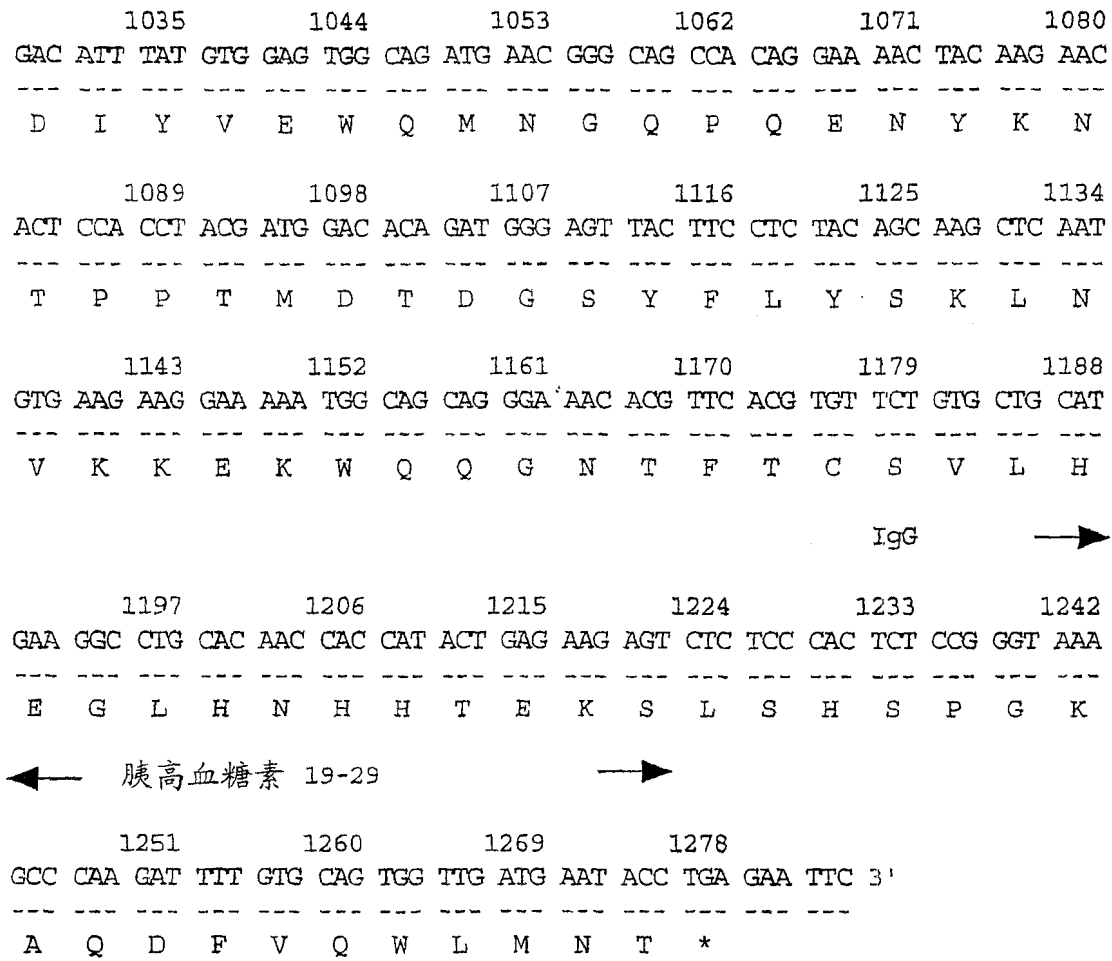


图 21

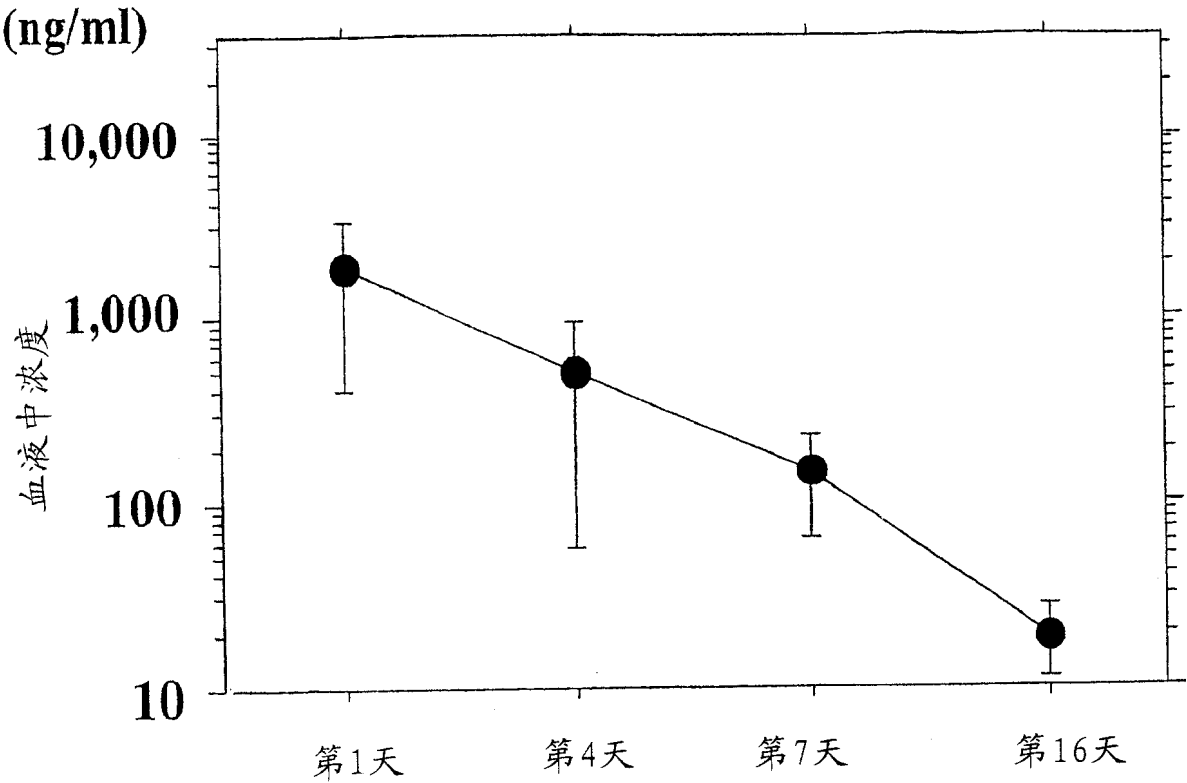


图 22

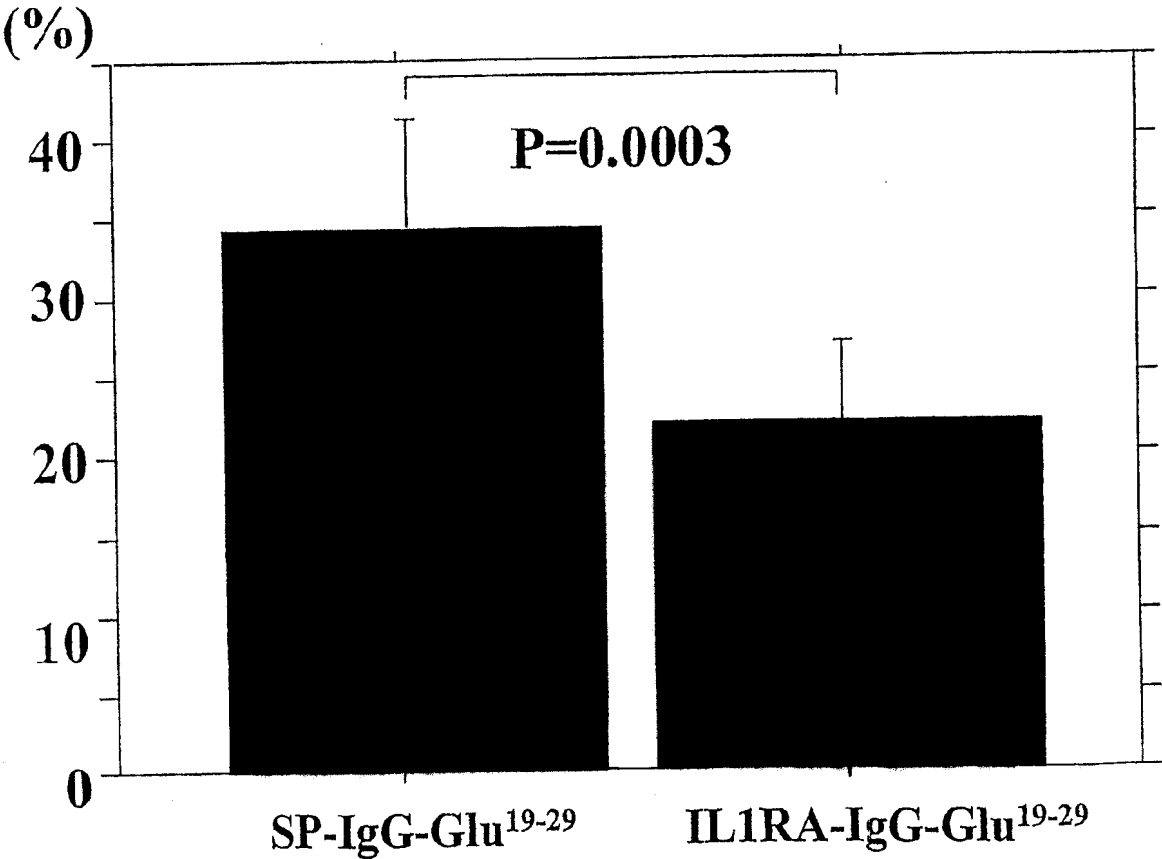
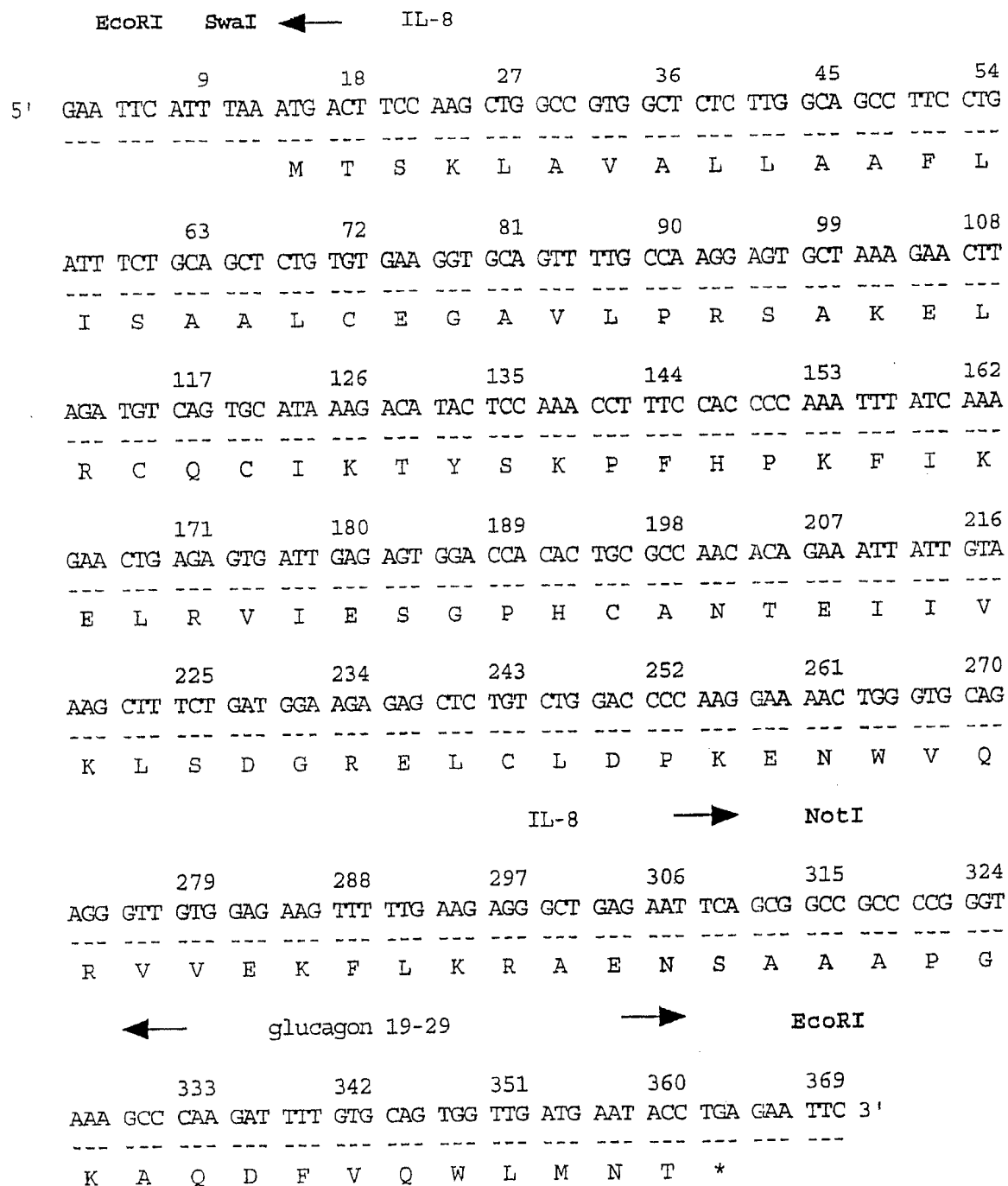


图 23

```

文件名  : IL8-glu 19-29
区域    :      1 ~      369      模式: 正常
密码表: 通用

```



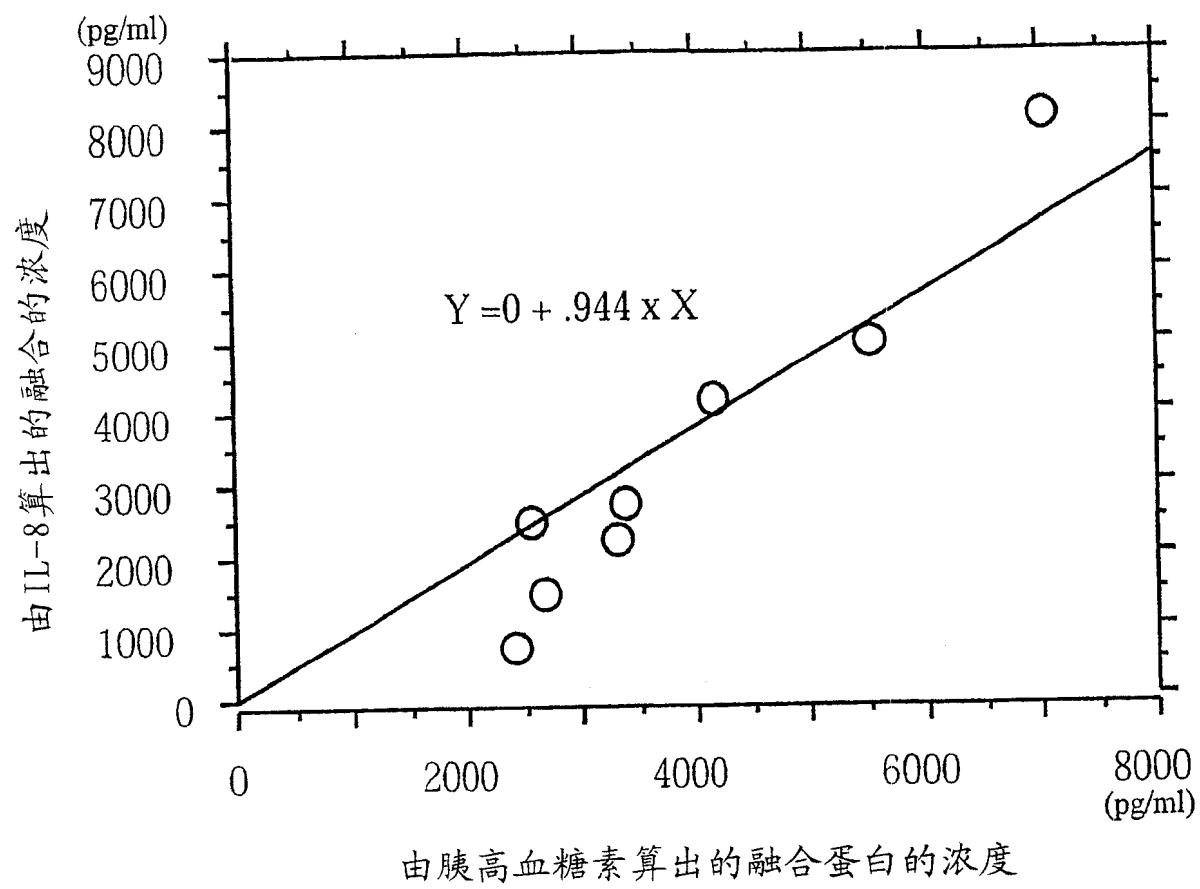


图 25

|                |                                                                                                                   |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 基因治疗用载体以及利用该基因治疗用载体在哺乳动物中或培养细胞中进行目的蛋白定量的方法                                                                        |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN100346834C</a>                                                                                      | 公开(公告)日 | 2007-11-07 |
| 申请号            | CN200380110152.7                                                                                                  | 申请日     | 2003-12-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 有限公司新泻TLO                                                                                                         |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 有限公司新泻TLO                                                                                                         |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 有限公司新泻TLO                                                                                                         |         |            |
| [标]发明人         | 埴晴雄                                                                                                               |         |            |
| 发明人            | 埴晴雄                                                                                                               |         |            |
| IPC分类号         | A61K48/00 A61K38/02 A61K31/7088 A61P43/00 G01N33/53 C12N15/16 A61K47/48 C12N15/85                                 |         |            |
| CPC分类号         | A61K31/7088 A61K48/00 A61K47/48246 C12N2830/42 C12N15/85 C12N2800/108 G01N2333/605 A61K48/005 A61K47/64 A61P43/00 |         |            |
| 代理人(译)         | 郭文洁<br>王景朝                                                                                                        |         |            |
| 优先权            | 2003003967 2003-01-10 JP                                                                                          |         |            |
| 其他公开文献         | CN1758924A                                                                                                        |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                                                    |         |            |

## 摘要(译)

本发明公开了一种基因治疗用载体，其能够在进行基因治疗时以更高敏感度监控目的蛋白质的血液中浓度，并且标记肽不具有生理作用而在多种动物中无免疫原性。基因治疗用载体具有如下结构：在哺乳动物细胞用表达载体中整合了编码由胰高血糖素的C末端侧19-29个氨基酸肽区域和有待在体内生产的的目的蛋白质区域的融合蛋白质的核酸。

文件名 : IFN- $\gamma$ -IgG-glu19-29  
区域 : 1 - 1470 模式 : 正常  
密码表 : 通用

```

      5'  GAA  TTC  ATT  TAA  ATG  ATT  CTG  CTG  GTG  GTC  CTG  ATG  CTG  TCT  GCG  GAG  ATC  GCG  54
            N  T  L  L  V  V  L  M  L  S  A  E  I  G
      AGT  GGA  GCT  TTG  ATG  AGC  ACC  GAG  GAT  CCT  AAG  CCG  CCC  TCG  GTG  CCT  GCG  108
            S  G  A  L  M  S  T  E  D  F  K  P  P  S  V  P  A  P
      ACA  AAT  GTT  CTA  ATT  ACG  TCC  TAT  GAC  TTG  AAC  CCT  GTC  GTA  CAT  TGG  AAG  CAC  162
            T  N  V  L  I  T  S  Y  D  L  N  P  V  V  H  W  K  H
      CAG  AAC  GTG  TCG  CAG  GCT  GCC  GTC  TTC  ACT  GGA  CAG  GGA  AAG  ATG  TAT  CCA  CAA  216
            Q  N  V  S  Q  A  A  V  F  T  V  Q  V  K  M  Y  D  E
      TAC  TCG  ACT  GAT  CCC  TGC  ACC  AAC  ATT  GCC  CAT  CAT  TAT  TGT  AAT  ATC  TAC  270
            Y  W  T  D  A  C  T  N  I  A  H  H  Y  C  N  I  Y  K
      CAC  ATT  TCC  TAT  CCT  GAC  TCA  TCT  GCG  TCG  GCG  AAG  GTT  AAG  GCC  AAG  GTT  CCA  324
            H  I  S  Y  P  D  S  S  A  W  A  R  V  K  A  K  V  G
      CAA  AGA  GAA  TCT  GCG  TAC  GCG  CAG  TCA  GAA  GAG  TTT  ATT  ATG  TCG  CCA  AAG  GAG  378
            Q  R  E  S  A  Y  A  Q  S  S  E  F  I  M  C  R  K  G
      AAG  GTT  GGA  CCG  CCT  GGC  CTG  GAC  ATC  GGA  AGG  AAG  GAA  GAT  CAG  CTG  ATT  GTC  432
            K  V  G  E  F  G  L  D  I  G  R  K  E  D  Q  L  I  V
      CAC  ATA  TTT  CAC  CCT  AAG  GTC  AAT  GTG  AGT  CAG  GAA  ACC  ATG  TTT  GGT  GAC  GGA  486
            H  I  P  H  F  K  V  N  V  S  Q  E  T  M  F  G  D  S
      AAT  ACC  TGT  TAC  ACA  TTC  GAC  TAC  ACT  GTG  TTT  GTG  AAA  CAT  TAC  ACG  AGT  GAG  540
            N  T  C  Y  T  F  D  Y  T  V  P  V  K  H  Y  R  S  G

```