

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 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)

[43] 公开日 2006 年 4 月 12 日

[11] 公开号 CN 1758924A

[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

[71] 申请人 株式会社新潟 TLO

地址 日本新潟县

[72] 发明人 堀晴雄

[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 10 页 序列表 23 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
内生产的目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，所述胰高血糖素C末端侧19-29个氨基酸肽区域结合于所述目的蛋白质区域的C末端。

3、根据权利要求1或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。

4、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。

5、一种基因治疗方法，其包括向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中，施用有效量的权利要求1至4中任一项所述的基因治疗用载体。

6、根据权利要求5所述的方法，其中，将所述基因治疗用载体施用于哺乳动物。

7、权利要求1至4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进行定量的方法，其包括对从施用了权利要求1至4中任一项所述的基因治疗用载体的哺乳动物或培养哺乳动物细胞收集的被检试样中的胰高血糖素C末端侧19-29个氨基酸的肽区域进行免疫测定。

9、根据权利要求8所述的方法，所述被检试样是从施用了前述基因治疗用载体的哺乳动物收集的。

10、根据权利要求9所述的方法，所述被检试样是血液试样。

11、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，该标记剂包含胰高血糖素的C末端侧19-29个氨基酸的肽。

12、哺乳动物体内由外部施用的表达载体的表达所生产的目的蛋

白质标记剂，其包含胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸的肽。

13、一种体内或培养细胞内生产的蛋白质的标记方法，其包括在哺乳动物体内或培养哺乳动物细胞内，以与作为标记剂的胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸的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。

14、根据权利要求 13 所述的方法，其包括在哺乳动物体内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，从而以胰高血糖素的 C 末端侧 19-29 个氨基酸肽对体内生产的目的肽进行标记。

15、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。

16、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。

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方法

5 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

10 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
15 (Treatment of Murine Lupus with cDNA encoding IFN- γ 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。

20 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
25 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。

30 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Genebank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。

5

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'-gagaattcatttaaagagagcgccgccgtgccagaaactgtg-3', 5'-tcaaccactgcacaaaatcttgggtttaccggagagtgggagagact-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'-gagaattcatttaaagagagcgccgccgtgccagaaactgtg-3', 5'-gagagagagaattctcaggtattcatcaaccactgcacaaaatcttgggc-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

10 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'-gagaattcatttaaagattctgtgtggtgctctgatg-3', 5'-gcagcatcgcggccgcttcttctctgtcatcatggagaaa-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。

20

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 γ 受体(IFN γ 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

25 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 γ R-IgG-胰高血糖素¹⁹⁻²⁹)。

30 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 μ g 的质粒每只。注射后, 随时间推移采血, 将采血获得的 1-10 μ 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 γ R/ IgG1Fc 融合蛋白质)的浓度。即, RIA 具体是按以下方式进行。在 400 μ l 检测用缓冲液中添加 200 μ l 标准胰高血糖素溶液或稀释的被检血浆, 进而添加 100 μ l 胰高血糖素- 125 I 溶液, 添加 100 μ l 胰高血糖素抗血清, 4 $^{\circ}$ C 下放置 48 小时。之后, 添加 100 μ l 第二抗体, 400 μ l 胰高血糖素 RIA 用沉淀稳定剂, 4 $^{\circ}$ C 下放置 30 分钟, 离心分离(2000 $\times$ g 30 分钟, 4 $^{\circ}$ 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 ± 1062 ng/ml(平均 $\pm$ 标准偏差), 第 3 天为 1440 ± 334 ng/ml, 第 7 天为 1120 ± 433 ng/ml, 第 16 天为 281 ± 162 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 ± 2318 ng/ml, 8 小时后为 6061 ± 2789 ng/ml, 12 小时后为 5752 ± 2270 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 ± 15.1 mg/dl(实施例 1) vs 81.8 ± 7.5 mg/dl(比较例 1), 12 小时后 63.5 ± 5.7 mg/dl(实施例 1) vs 71.4 ± 6.9 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'-gagaattcattttaaattggcttgtcttggactccagagg-3', 5'-gcagcatcgcgcccgctgtgaatctggcatggttctgg-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¹⁹⁻²⁹(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¹⁹⁻²⁹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¹⁹⁻²⁹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¹⁹⁻²⁹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-glu¹⁹⁻²⁹治疗的组中(实施例 2), 5 只中有 1 只在第 5 天时, 1 只在第 6 天时, 3 只在第 7 天时被排斥, 这些显著地显示出 pCAGGS- CTLA4-IgG-glu¹⁹⁻²⁹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'-gcagcatcg cgcccgctggccatagcggaaaagttgctt-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 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¹⁹⁻²⁹(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¹⁹⁻²⁹的重组载体(实施例 3)。为了比较, 制备了插入有不含 IL13 编码区域的仅插入有 SP-IgG -胰高血糖素¹⁹⁻²⁹ 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¹⁹⁻²⁹ 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-glu¹⁹⁻²⁹(插入 IL13-IgG-glu¹⁹⁻²⁹ 的载体 pCAGGS)的组, 与施用不含 IL13 的 pCAGGS-SP-IgG-glu¹⁹⁻²⁹ 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-glu¹⁹⁻²⁹ 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'-gcagcatcgcgccgcttggtcttctctggaagtagaactt-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 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¹⁹⁻²⁹(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¹⁹⁻²⁹ 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)。

5 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¹⁹⁻²⁹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-glu¹⁹⁻²⁹ 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-glu¹⁹⁻²⁹, 以 5'-gagaattcatttaaatgagagcgccgcccgggttaaagecccaagatt
15 ttgtgcagtgttg-3', 5'-gagagagagaattctcaggtattcatcaaccactgca
caaaatcttgggc-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'-gagaattcatttaaatgacttccaagctggccgtggct-3', 5'-gcagcatcgccg
20 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-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 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¹⁹⁻²⁹(在人白介素 8 编码区域的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 IL8-胰高血糖素¹⁹⁻²⁹ 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
30 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¹⁹⁻²⁹ 标记肽的方法的正确性。

<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- γ 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
cct cct gcc 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 tcg 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 gca 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			
<210> 3			
<211> 4790			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工表达载体 pCAGGS 的 DNA 序列			
<400> 3			
gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata			60
gccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgccct ggctgaccgc			120
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag			180

ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta aactgcccac ttggcagtac	240
atcaagtgtg tcatatgccg agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc	300
cctggcatta tggccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	360
tattagtcat cgtattacc atgggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc	420
atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta tttttaatt attttgtgca	480
gcgatggggg cggggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg gcgagggcg	540
gggcgggggg agggggagag gtgcggcggc agccaatcag agcgcgcggc tccgaaagtt	600
tccttttatg gcgagggcg gcggcgggc gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc	660
gggagtcgct gcgttgctt cggcccgctg ccgcctcgc gccgcctgc gccgccgccc	720
cggctctga ctgaccggt tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctctcc	780
gggctgtaat tagcgcttg tttaatgacg gctcgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag	840
ccttaaaggg ctccgggagg gccctttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg	900
tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgc gcccgcgct cccggcggt gtgagcgctg	960
cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cgtgtgcgc aggggagcgc ggccgggggc	1020
ggtgccccgc ggtgcggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg	1080
tgggggggtg agcagggggg gtgggcgcgg cggctcgggt gtaaccccc cctgcacccc	1140
cctccccgag ttgctgagca cggcccggt tcgggtgcgg ggctccgtgc ggggcgtggc	1200
gcggggctcg cgtgccggg cgggggggtg cggcaggtgg gggtgccgg cggggcgggg	1260
ccgcctcggg cgggggaggg ctgggggag gggcgcgcg gccccggagc gccggcggt	1320
gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgagg	1380
gacttccttt gtcccaaacc tggcggagcc gaaatctggg aggcgcgcgc gcacccccctc	1440
tagcgggcgc gggcgaagcg gtgcggcgcc ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt	1500

cgtgcgtcgc cgcgcgcgcg tccccctctc catctccagc ctcggggctg ccgcaggggg	1560
acggctgcct tcggggggga cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg	1620
gctctagagc ctctgctaac catgttcatg ccttcttctt tttcctacag ctcttgggca	1680
acgtgctggg tgttgtctg tctcatcatt ttggcaaaga attcctcgag gaattcactc	1740
ctcaggigca ggctgcctat cagaagggtg tggtggtgt ggccaatgcc ctggctcaca	1800
aataccactg agatcttttt cctctgccca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg	1860
agcatctgac ttctggctaa taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt	1920
ttttgtgtct ctcactcgga aggacatatg ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg	1980
agtatttggg ttagagtttg gcaacatatg ccatatgctg gctgccatga acaaagggtg	2040
ctataaagag gtcacagta tatgaaacag cccctgctg tccattcctt attccataga	2100
aaagccttga cttgaggtta gatttttttt atattttgtt ttgtgttatt tttttcttta	2160
acatccctaa aattttcctt acatgtttta ctageccagat tttcctcct ctctgacta	2220
ctcccagtea tagctgtccc ttttctctta tgaagatccc tcgacctgca gcccagctt	2280
ggcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca	2340
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagag tgagctaact	2400
cacattaatt gcgttgctc cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagcg	2460
gatecgcac tcaattagtc agcaaccata gtcccgcgcc taactccgcc catcccgcc	2520
ctaaectcgc ccagttccgc ccattctcgc ccccatggct gactaatttt ttttatttat	2580
gcagaggccg aggcgcctc ggctctgag ctattccaga agtagtgagg aggccttttt	2640
ggaggccctag gcttttgcaa aaagetaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat	2700
aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg	2760
gtttgtccaa actcatcaat gtatcttata atgtctggat ccgctgcatt aatgaatcgg	2820

ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgcctct tccgcttccct cgcactactga	2880
ctcgcctgcgc tcggctcgttc ggctgcggcg agcgggtatca gctcactcaa aggcggtaat	2940
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaagc atgtgagcaa aaggccagca	3000
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc	3060
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg cgaaaccgca caggactata	3120
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc	3180
gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc	3240
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgctcgcctc aagctgggct gtgtgcacga	3300
acccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	3360
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag	3420
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct aactagaag	3480
gacagtattt ggtatctgcg ctctgtgaa gccagttacc ttggaaaaa gagttggtag	3540
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca	3600
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	3660
cgcctcagtg aacgaaaact cacgttaagg 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
gggcttacca tctggcccc a gtgctgcaat gataccgca gaccacgct caccggtcc	3960
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtctgcaac	4020
tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc	4080
agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtgggtg cagctcgtc	4140

```

gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 4200
catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcett cggctectccg atcgttgtca gaagtaagtt 4260
ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 4320
atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 4380
tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag 4440
cagaacttta aaagtgetca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 4500
cttaccgctg ttgagatcca gttegatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 4560
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 4620
aaaggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 4680
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gageggatac 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
gaattcattt 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 tet agg act tgg cct ttt gga gtc ctg ctt tet 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 tet 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 tog 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 Ile Glu Val Ala Gln Phe Ile Ser Lys Leu Leu Asn Tyr Ser Lys Gln 110 115 120 125	387
ctt ttc cgc tat ggc cac gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt Leu Phe Arg Tyr Gly His Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly 130 135 140	435
gat tgc aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe 145 150 155	483
atc ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro 160 165 170	531
aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val 175 180 185	579
cat ttc agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr 190 195 200 205	627
cga cca cca gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu 210 215 220	675
ctc ccc atc ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys 225 230 235	723
aag gtc acc agt gca gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser 240 245 250	771
aaa ccc gaa ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro 255 260 265	819
acc aag gaa gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val 270 275 280 285	867

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

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 cag 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 atc 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 tot 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 gct 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 gct			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 gct 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 ttaaatgaga gggccgccg 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 ttaaatgaga gggccgccg 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 ttaaattgatt 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

gcagcatcgc 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 ttaaattggct 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 ttaaatggca 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 ttaaatggaa 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 ttaaatgaga gcggccgccc cgggtaaagc ccaagatitt gtgcagtggt 60
tg 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 ttaaatgact 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 ttttcaaaaa

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 γ 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		
IFN γ R $\rightarrow$ NotI $\leftarrow$ IgG					
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

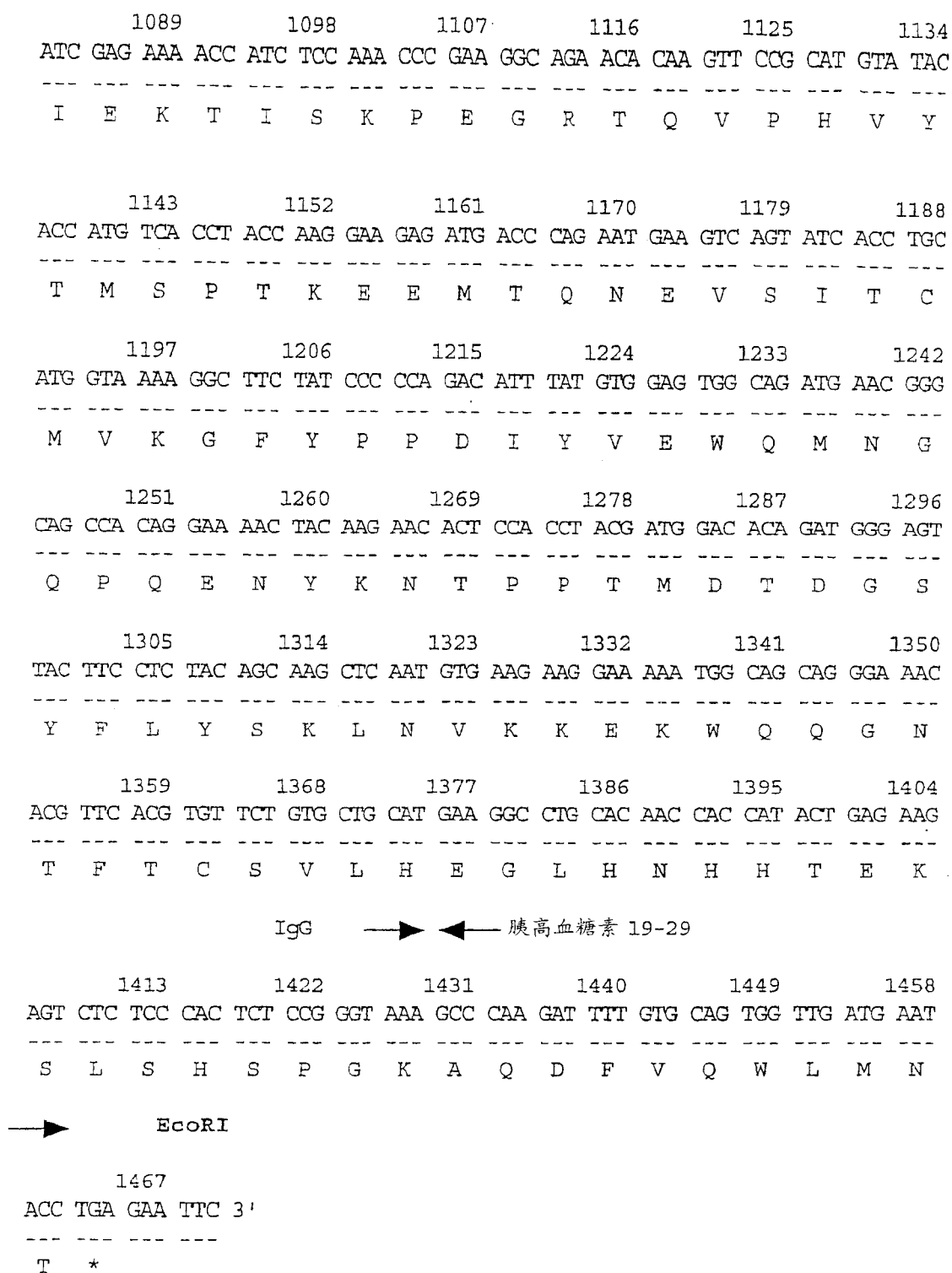


图 3

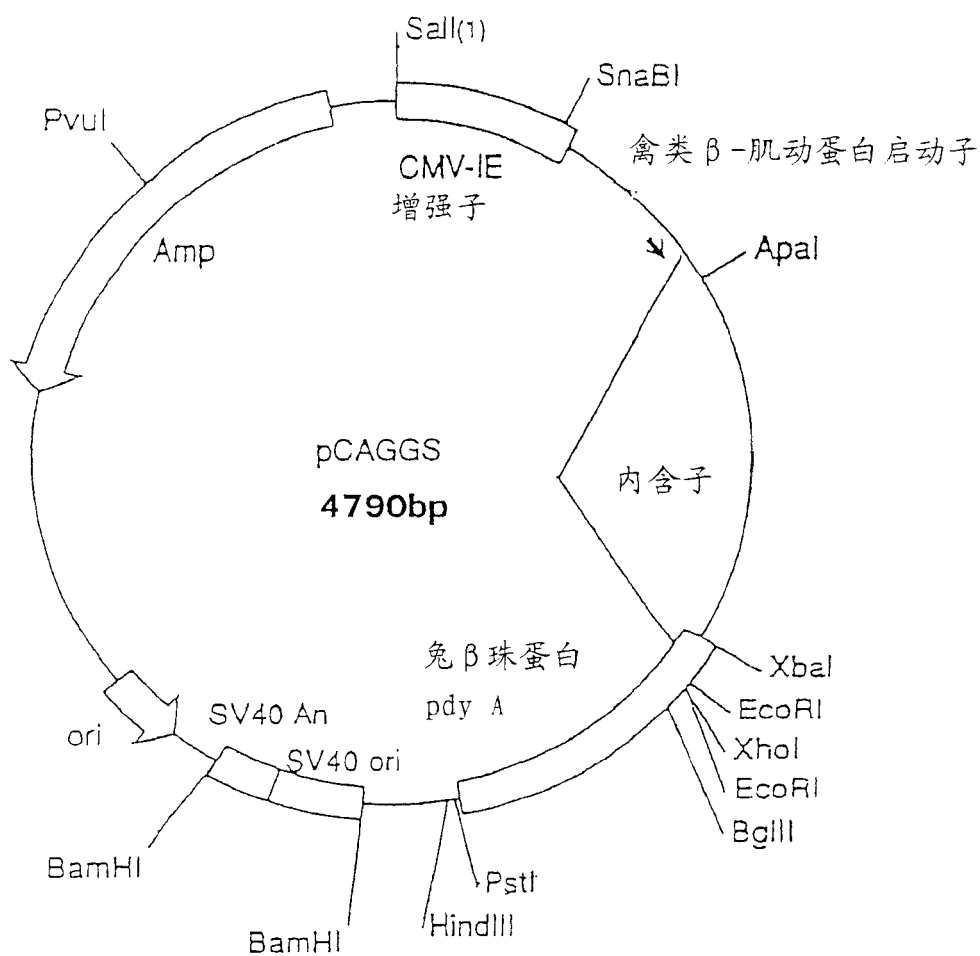


图 4

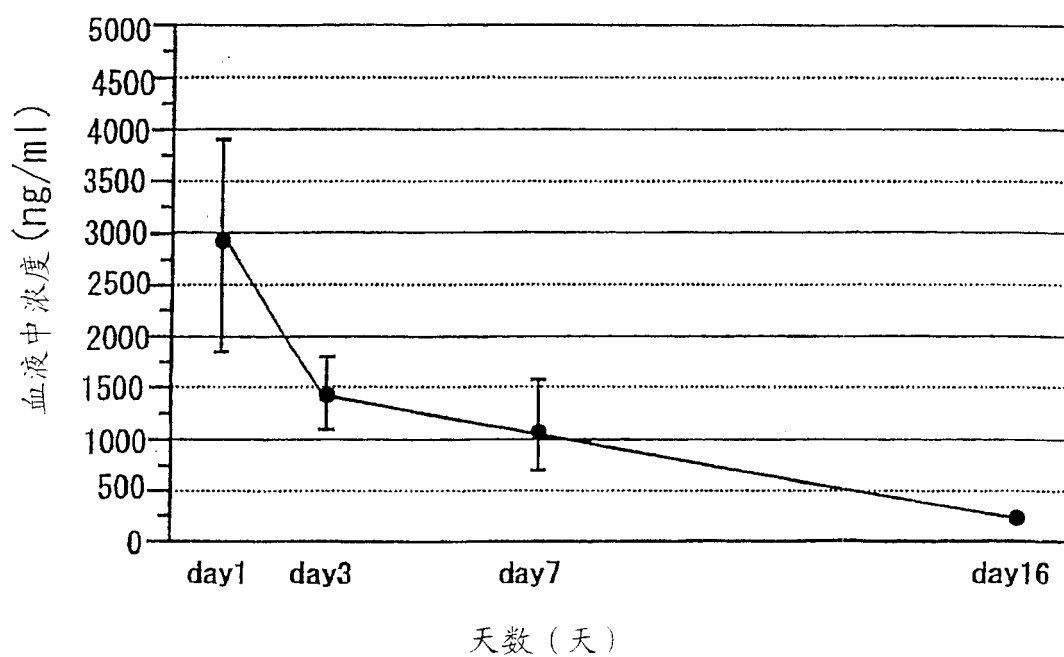
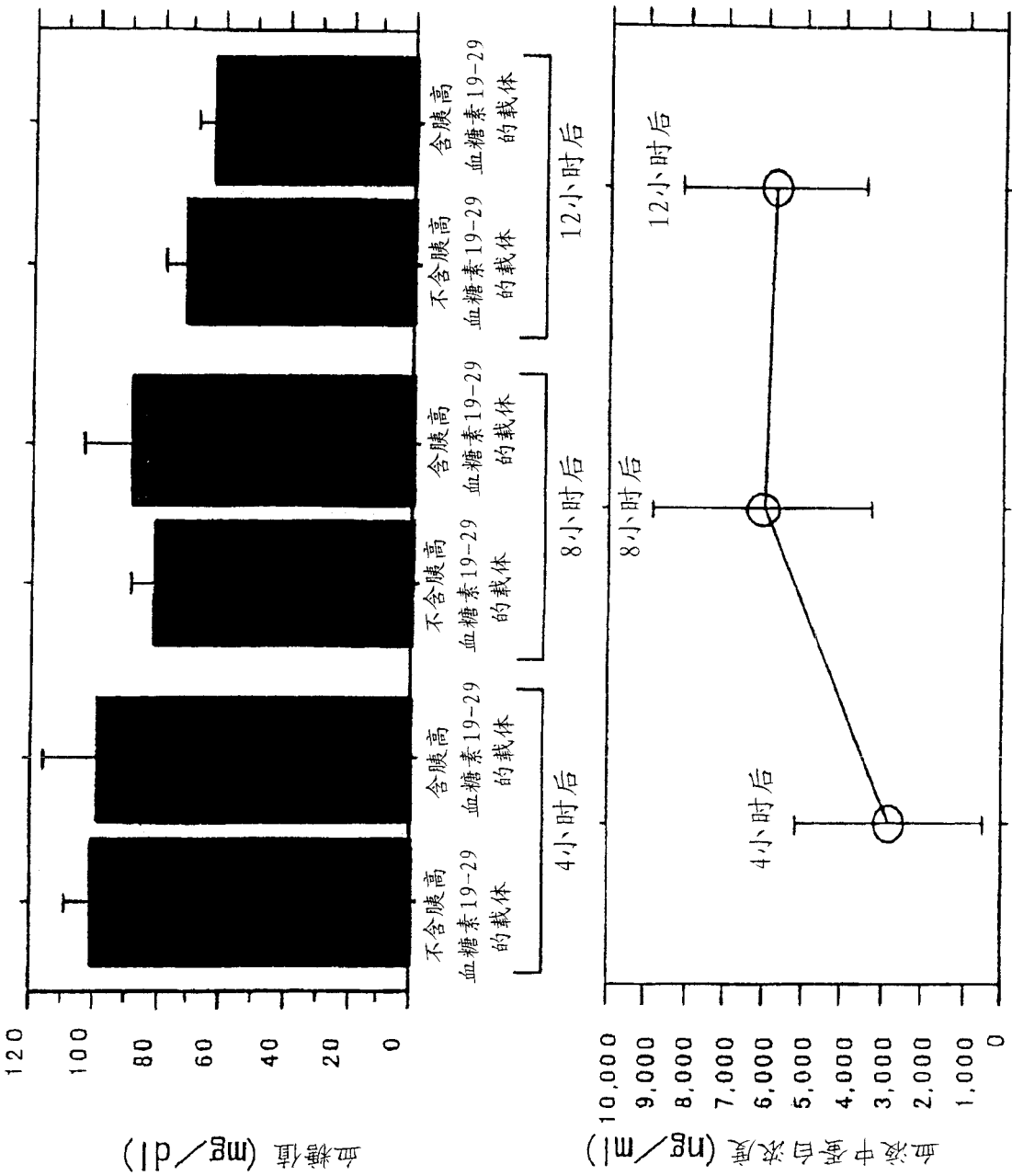


图 5



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 COG 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

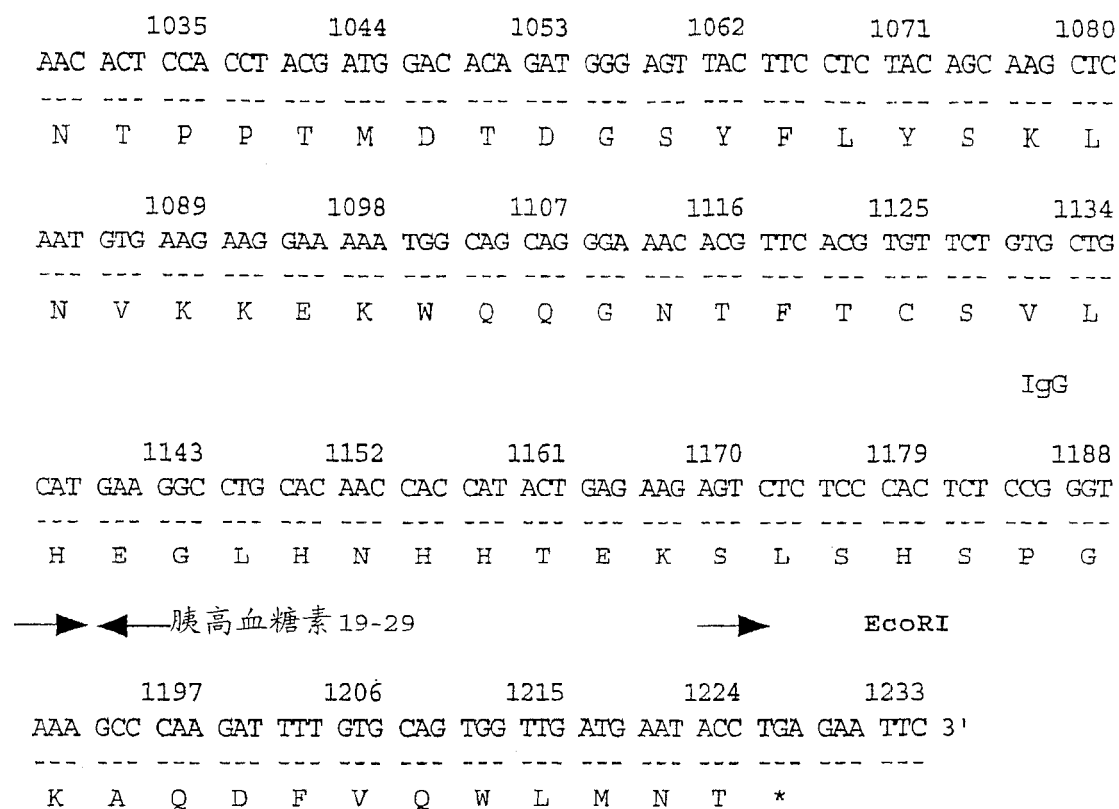


图 9

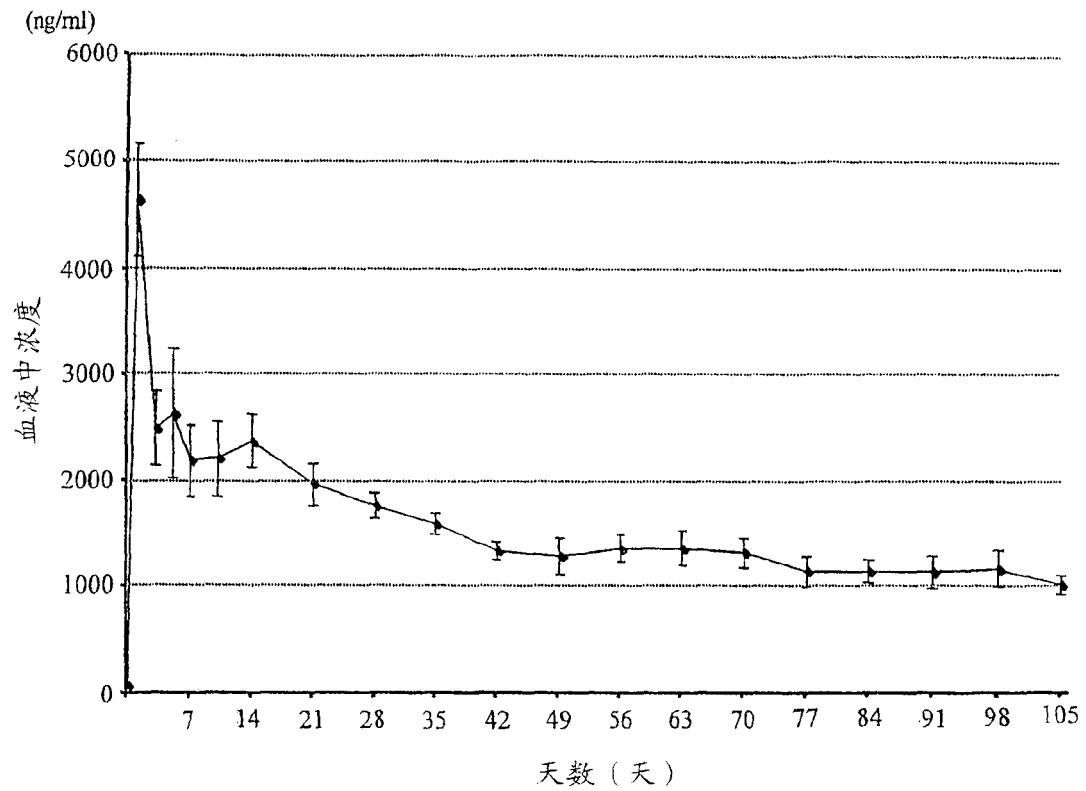


图 10

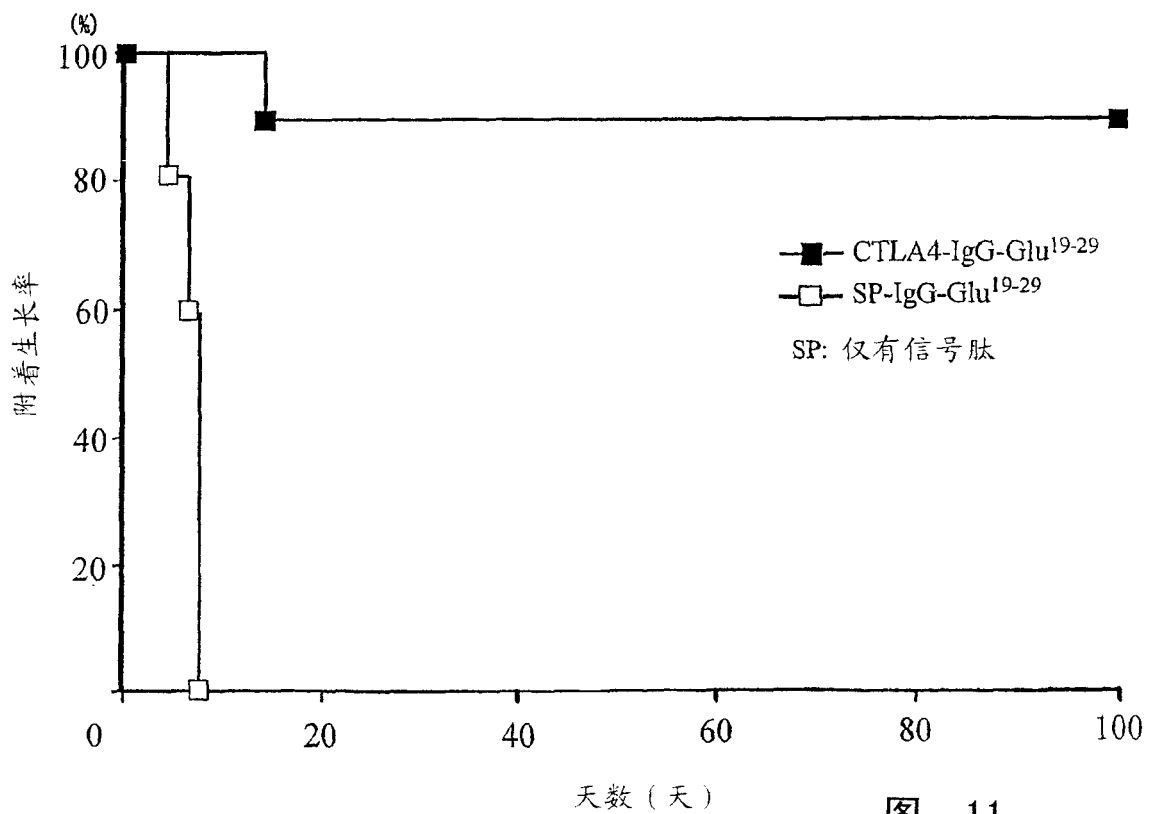


图 11

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

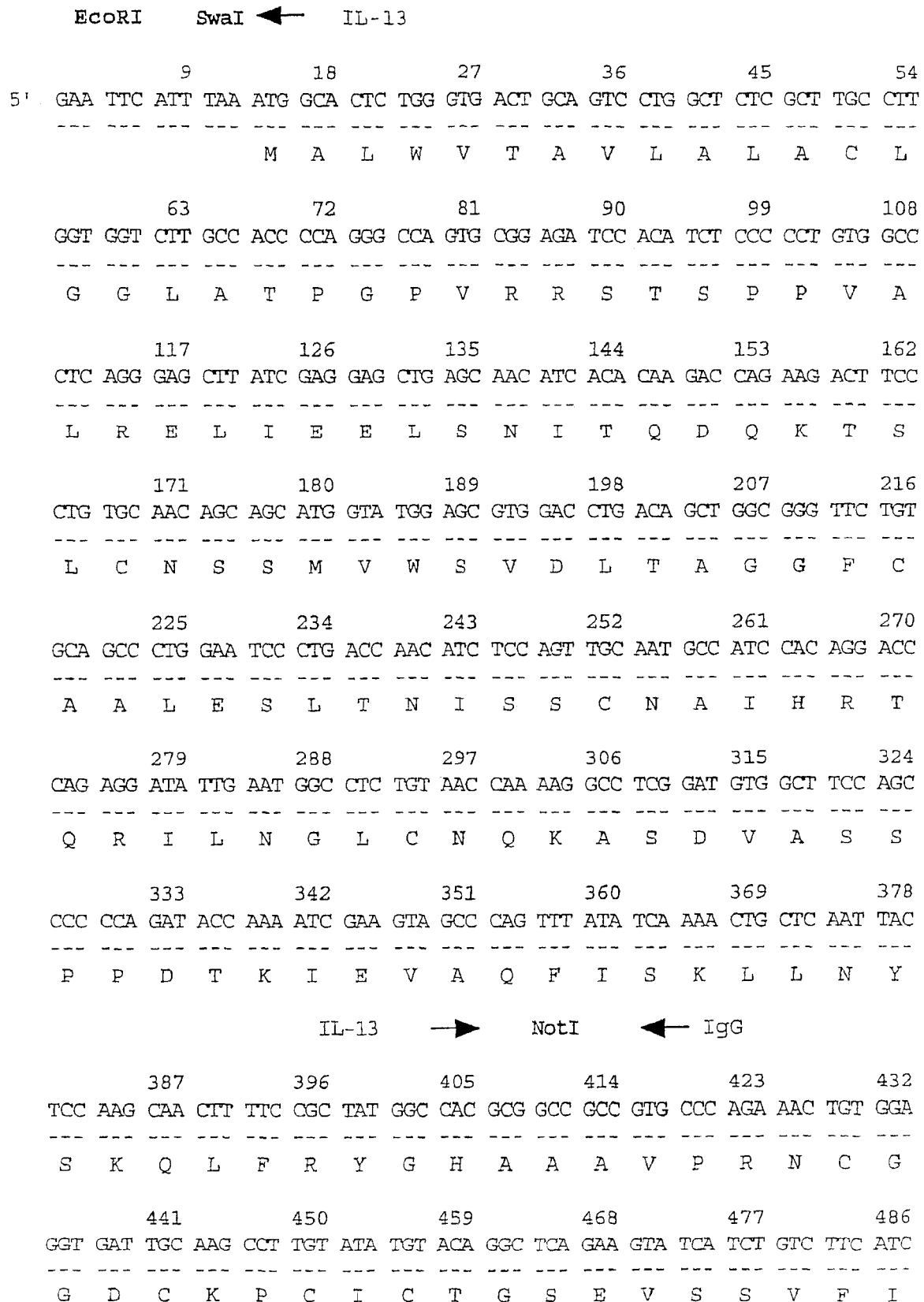


图 12

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

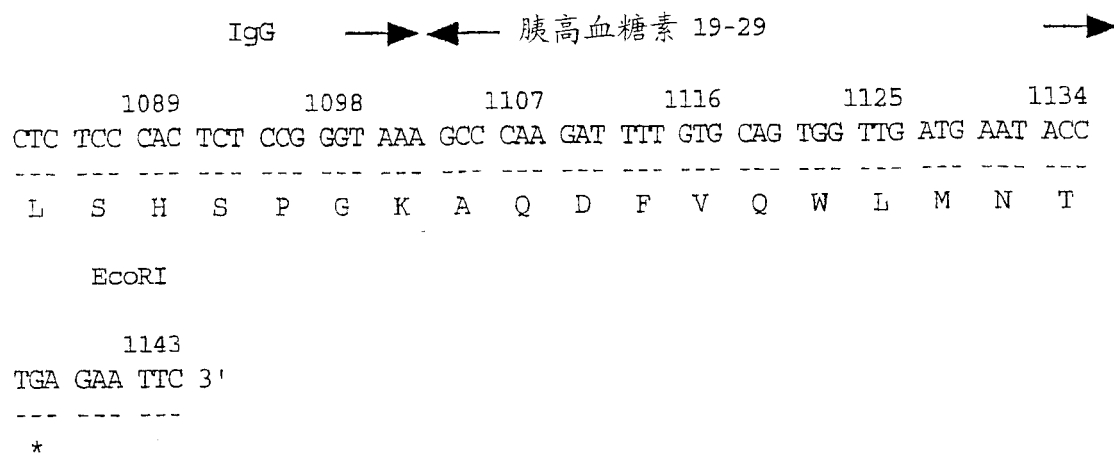


图 14

文件名 : SP-IgG-glu-19-29
 区域 : 1 - 825 模式: 正常
 密码表: 通用

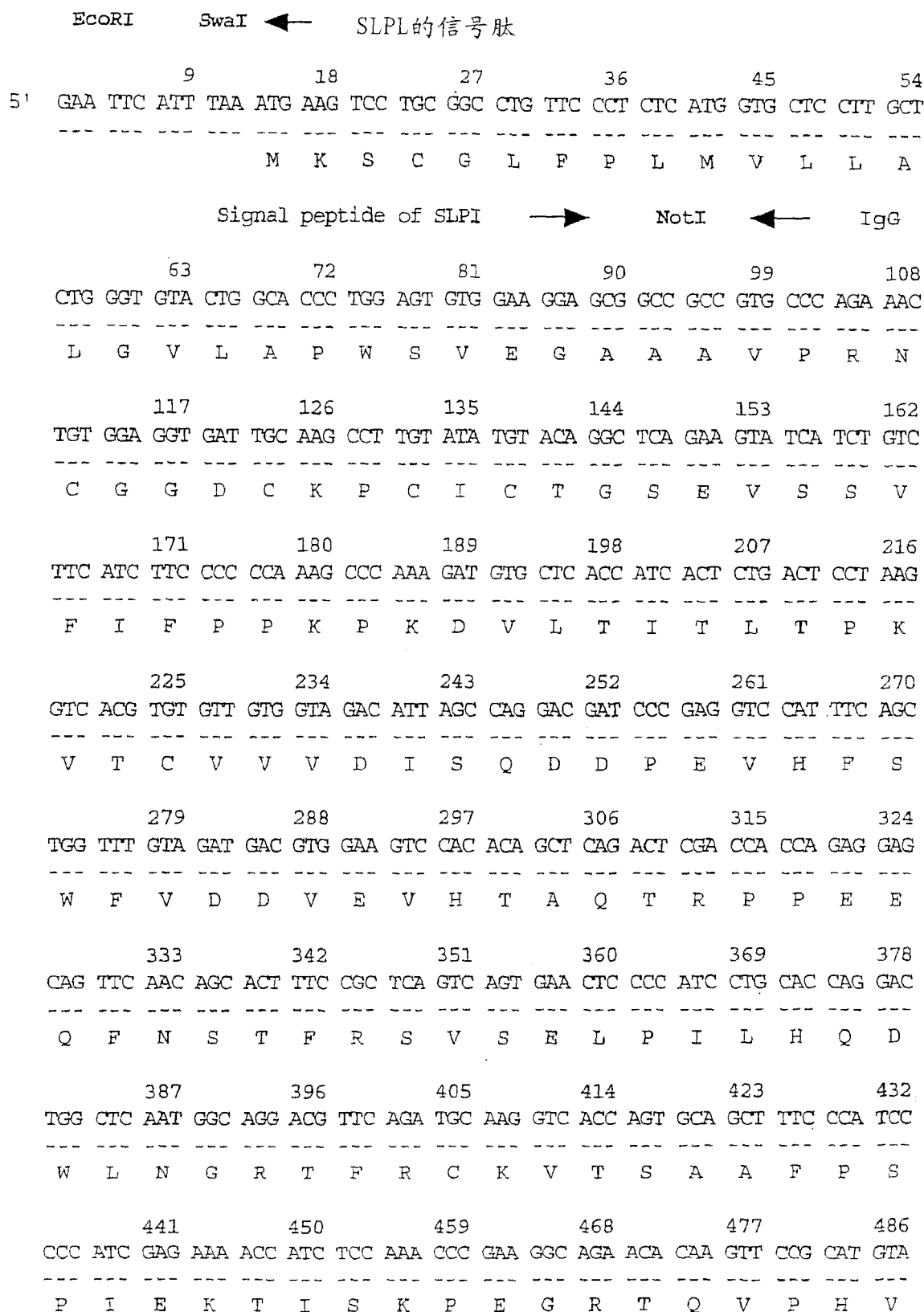


图 15

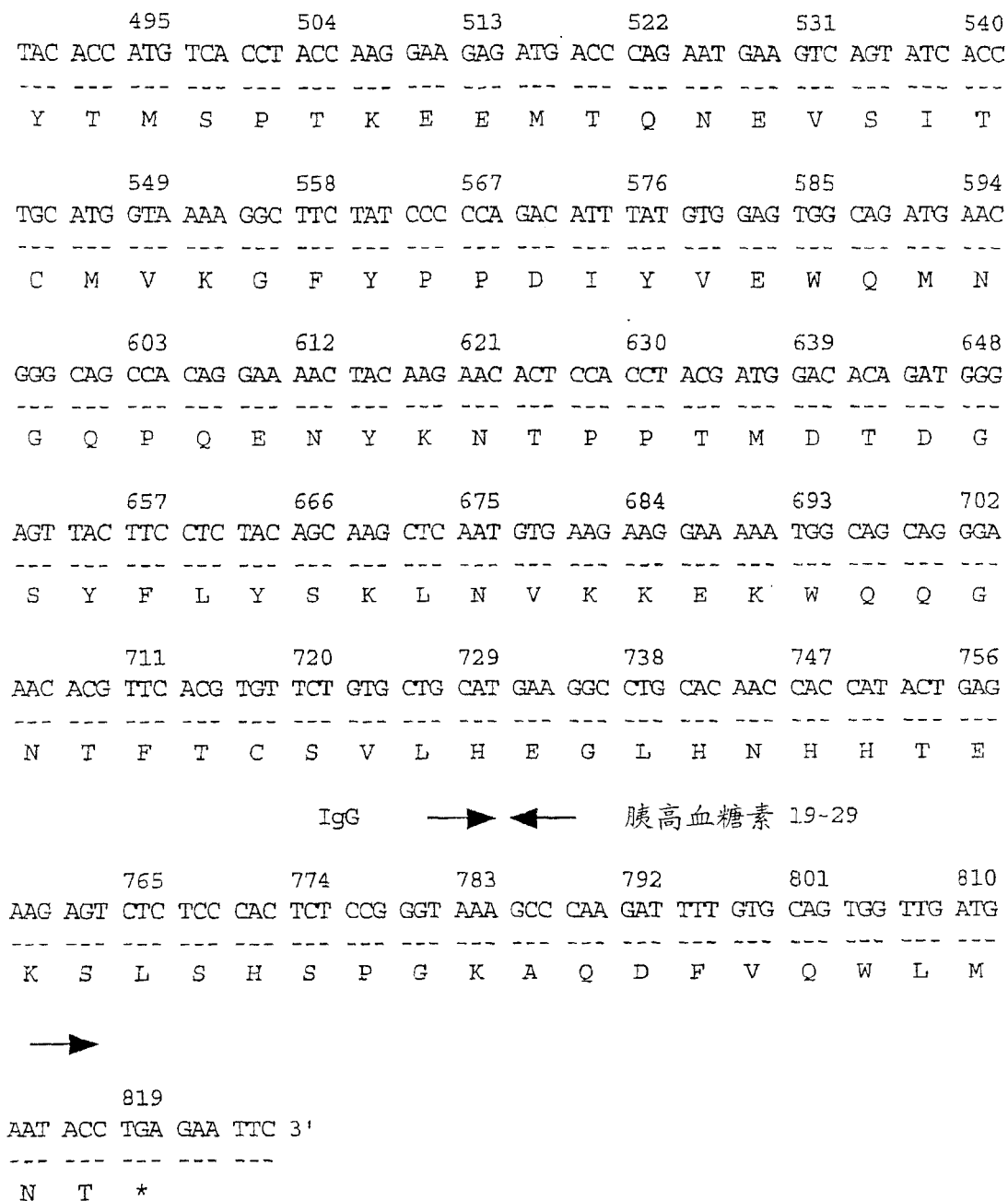


图 16

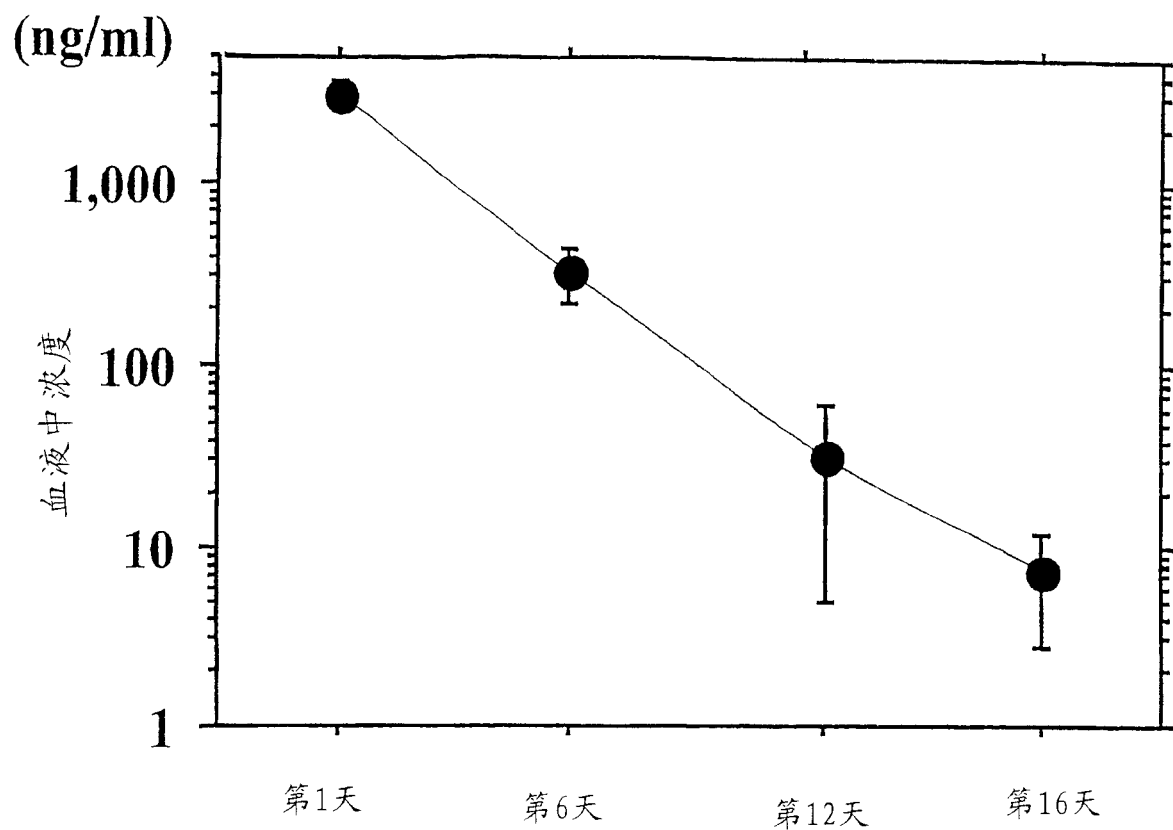


图 17

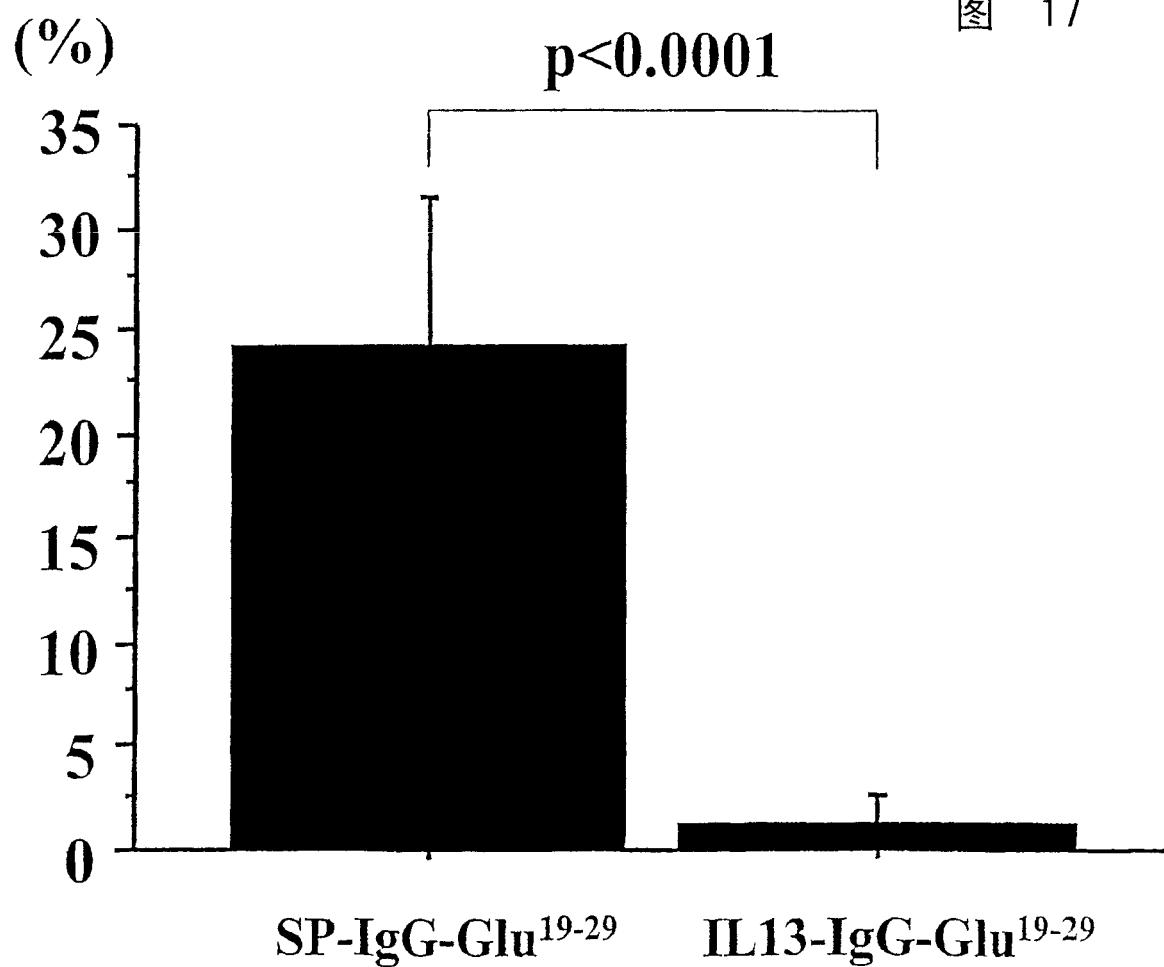


图 18

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
CTT 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

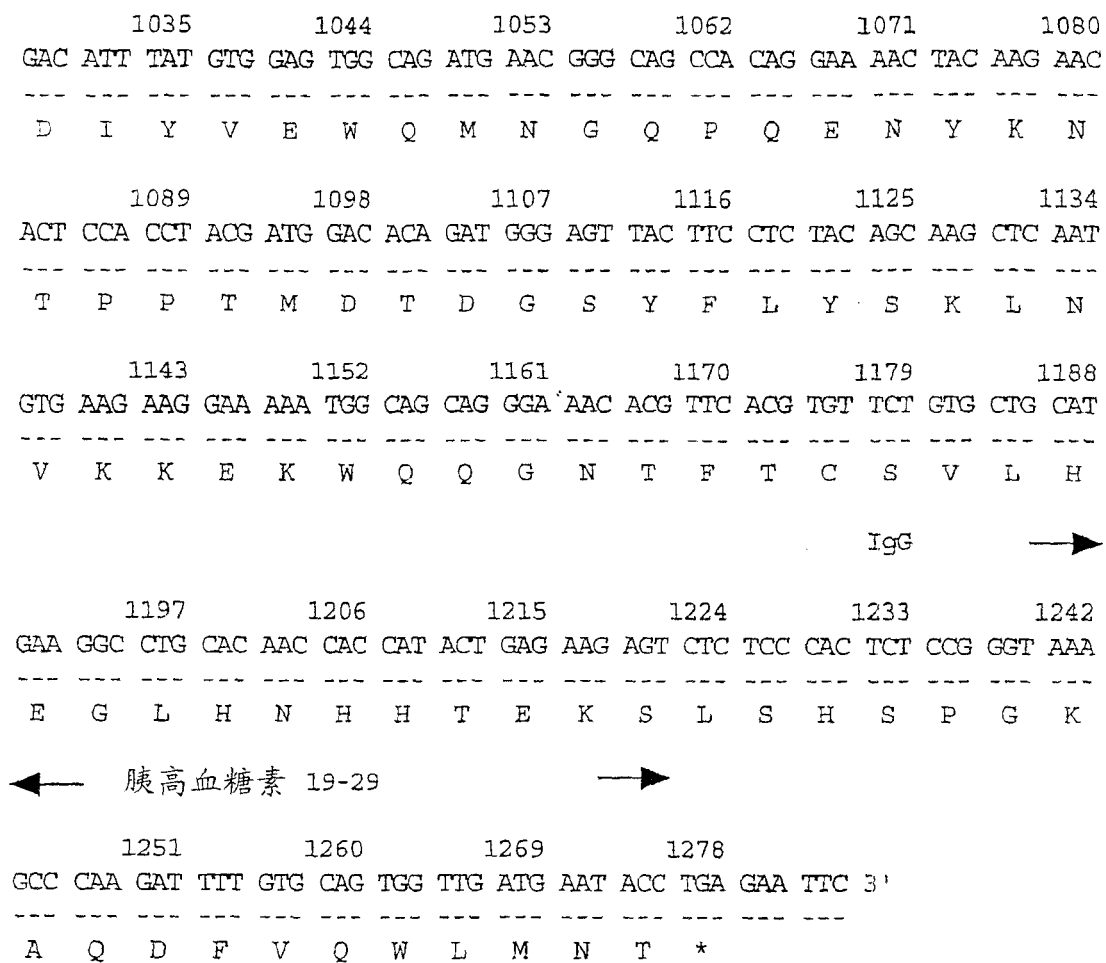


图 21

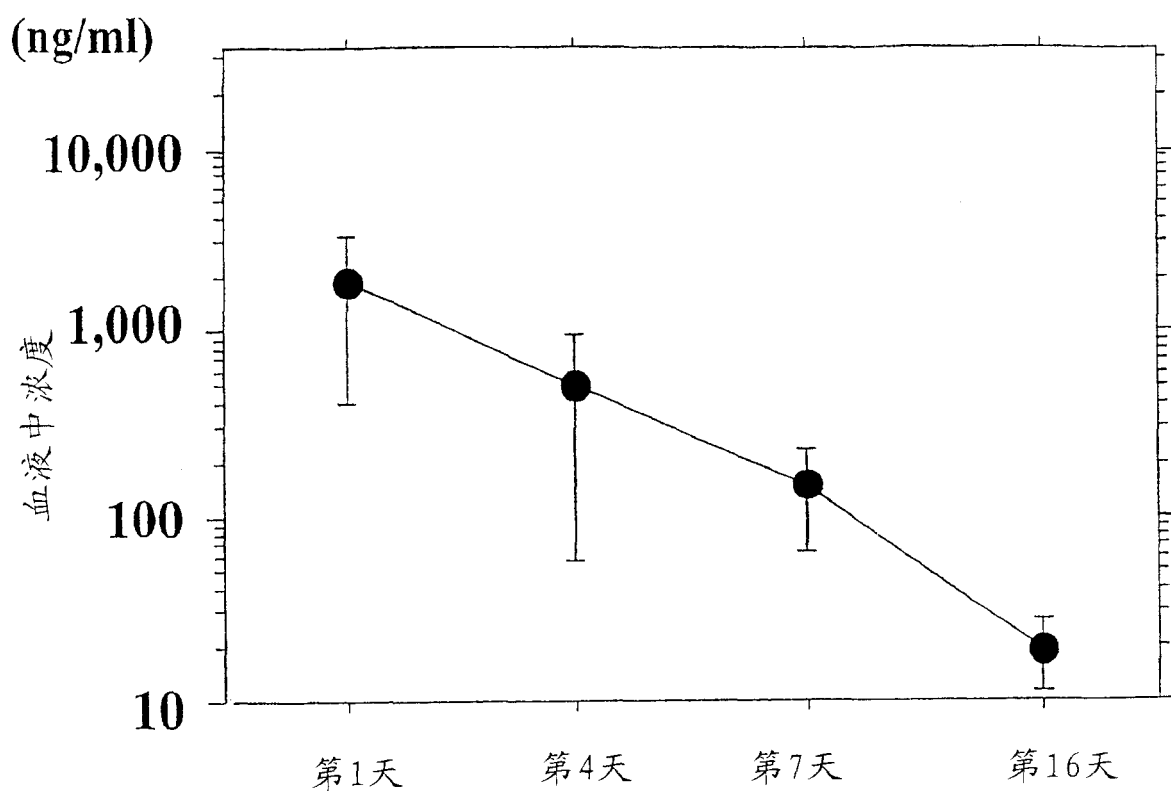


图 22

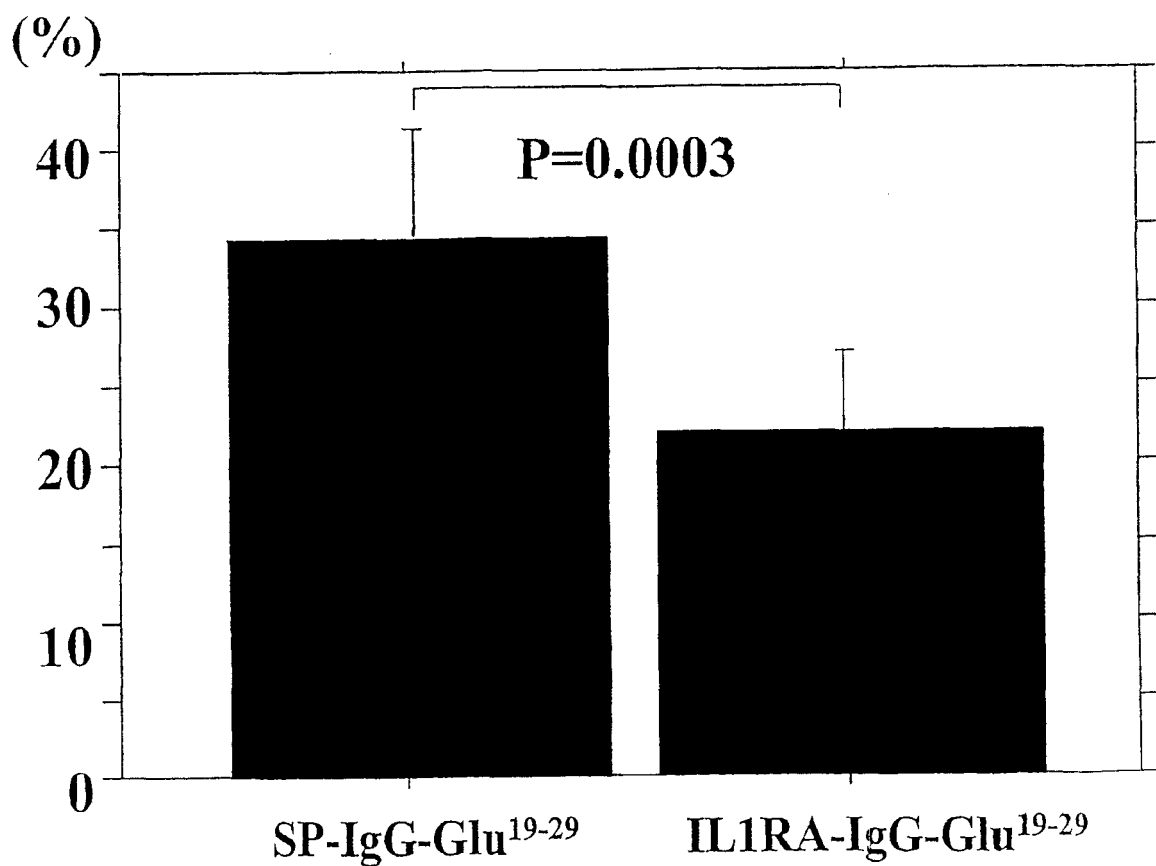


图 23

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

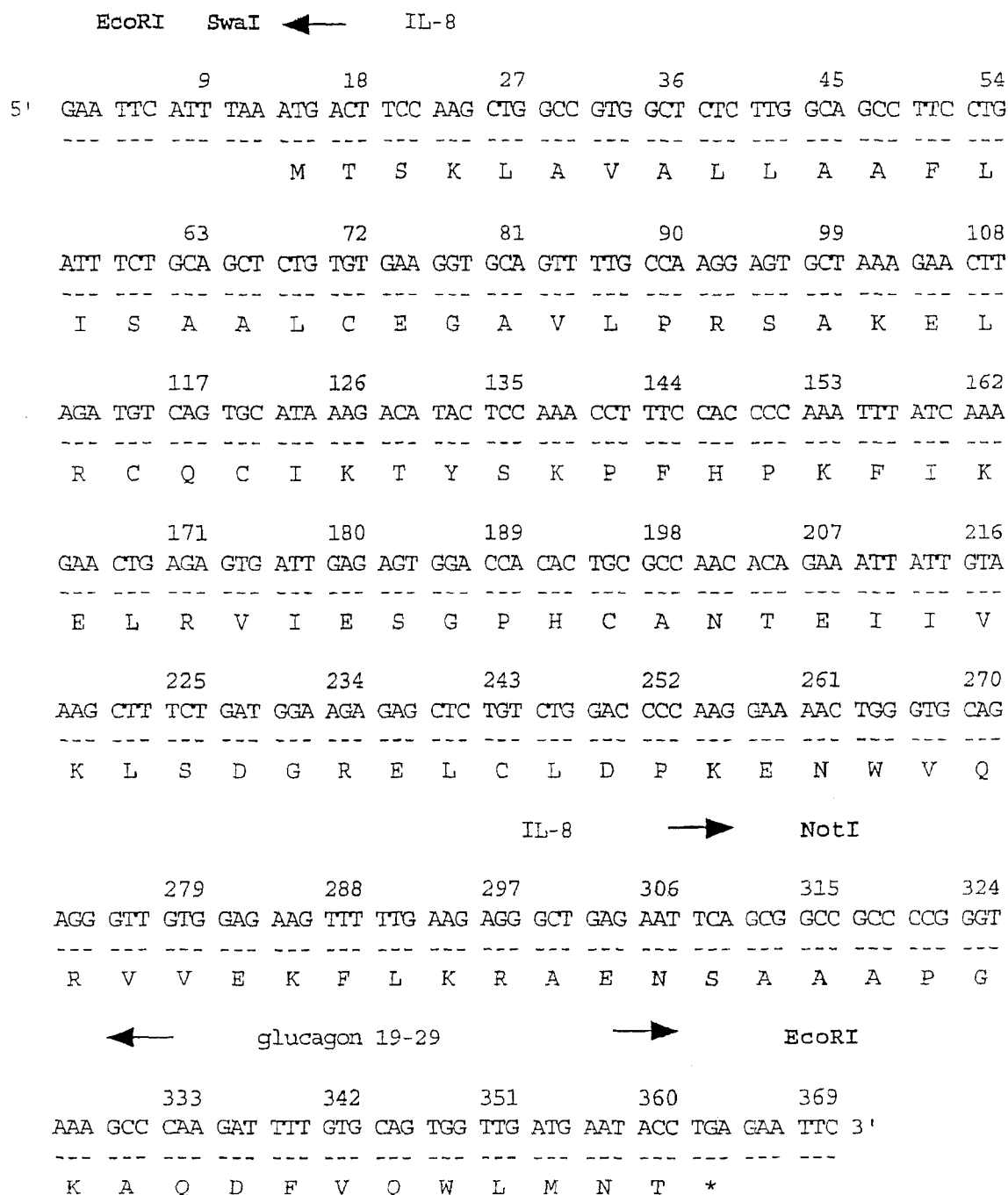


图 24

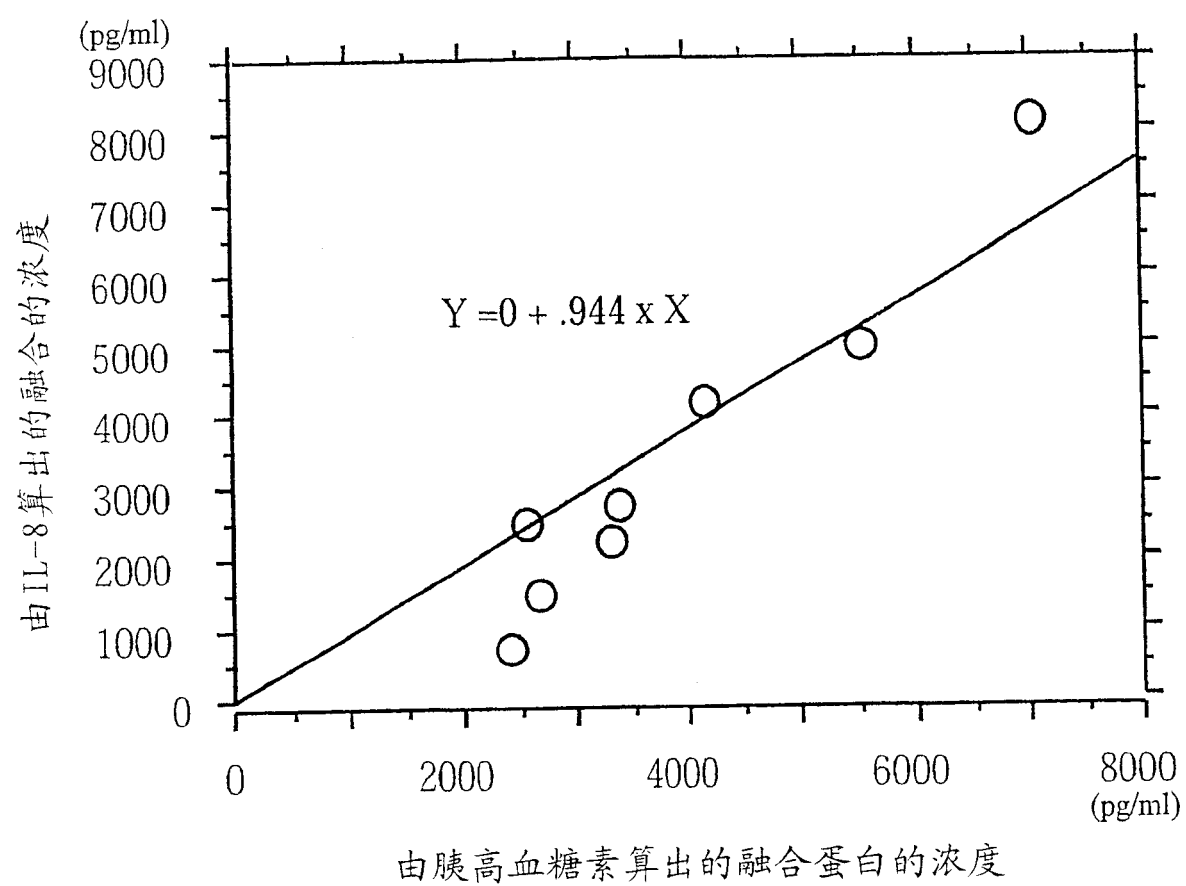


图 25

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方法		
公开(公告)号	CN1758924A	公开(公告)日	2006-04-12
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	搞晴雄		
发明人	搞晴雄		
IPC分类号	A61K48/00 A61K38/02 A61K31/7088 A61P43/00 G01N33/53 C12N15/16 A61K47/48 C12N15/85		
CPC分类号	A61K48/005 A61K47/48246 A61K31/7088 C12N2830/42 C12N2800/108 A61K48/00 G01N2333/605 C12N15/85 A61K47/64 A61P43/00		
代理人(译)	郭文洁 王景朝		
优先权	2003003967 2003-01-10 JP		
其他公开文献	CN100346834C		
外部链接	Espacenet SIPO		

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目的蛋白质区域的融合蛋白质的核酸。

