



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102732550 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 17

(21) 申请号	201110085003. 6	<i>A61P 19/04</i> (2006. 01)
(22) 申请日	2011. 04. 06	<i>A61P 19/02</i> (2006. 01)
(83) 生物保藏信息		<i>A61P 21/04</i> (2006. 01)
4560	2011. 01. 19	<i>A61P 29/00</i> (2006. 01)
		<i>A61P 11/02</i> (2006. 01)
(71) 申请人	上海市普陀区中心医院	<i>A61P 11/06</i> (2006. 01)
地址	200062 上海市普陀区兰溪路中心医院	<i>A61P 31/12</i> (2006. 01)
	164 号 7 号楼	<i>A61P 35/00</i> (2006. 01)
(72) 发明人	王雄彪 倪振华 陈清阁	<i>G01N 33/53</i> (2006. 01)
(74) 专利代理机构	苏州威世朋知识产权代理事	<i>C12R 1/84</i> (2006. 01)
	务所 (普通合伙) 32235	
代理人	杨林洁 东楠	

(51) Int. Cl.

C12N 15/81 (2006. 01)
C12N 1/19 (2006. 01)
C12N 15/66 (2006. 01)
C12P 21/02 (2006. 01)
C07K 16/28 (2006. 01)
A61K 39/395 (2006. 01)
A61K 45/00 (2006. 01)
A61K 38/17 (2006. 01)
A61P 37/02 (2006. 01)
A61P 37/06 (2006. 01)
A61P 19/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 11 页
序列表 7 页 附图 3 页

(54) 发明名称

人 s1CD80 蛋白在毕赤酵母系统中的表达

(57) 摘要

本发明提供了包含人源可溶性 s1CD80 重组蛋白的重组载体,提供了经该载体转化的宿主细胞,本发明还提供了该重组载体所编码的重组蛋白的制备方法及其应用。

1. 一种重组载体,其特征在于包含 SEQ ID No 1 所示的序列。
2. 一种宿主细胞,其特征在于它被权利要求 1 所述的载体转化。
3. 根据权利要求 2 所述的宿主细胞,其特征在于所述宿主细胞为酵母细胞。
4. 根据权利要求 3 所述的宿主细胞,其特征在于所述酵母细胞为毕赤酵母细胞。
5. 根据权利要求 4 所述的宿主细胞,其特征在于所述毕赤酵母细胞为毕赤酵母 GS115。
6. 权利要求 1 所述重组载体的构建方法,包括如下步骤:
 - (a) 将毕赤酵母表达载体 pPIC9K 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,回收大小为 290bp 的酶切产物;
 - (b) 将载体 puc18 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,回收大小为 2.6kb 的酶切产物;
 - (c) 连接 (a) (b) 步骤获得的回收产物;
 - (d) 将 (c) 所获得的载体用 Xho I 和 EcoR I 进行双酶切,回收酶切产物大片段;
 - (e) 体外制备 SEQ ID No2 所示的核酸序列,用 Xho I 和 EcoR I 进行双酶切,回收酶切产物片段;
 - (f) 连接 (d) (e) 步骤获得的回收产物;
 - (g) 将 (f) 所获得的载体用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,回收大小为 1001bp 的酶切产物;
 - (h) 将毕赤酵母表达载体 pPIC9K 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,回收大小为 8986bp 的酶切产物;
 - (i) 连接 (g) (h) 步骤获得的回收产物。
7. 一种产生重组蛋白 s1CD80 的方法,其特征在于,该方法包括:
 - (a) 提供一宿主细胞,该宿主细胞包含权利要求 1 所述的表达载体;
 - (b) 在适合蛋白表达的条件下,培养步骤 (a) 所述的宿主细胞;
 - (c) 分离所述的重组蛋白。
8. 一种与权利要求 7 所制备的重组蛋白 s1CD80 特异性结合的抗体或拮抗剂。
9. 一种药物组合物,其特征在于所述药物组合物含有权利要求 8 所述的抗体和 / 或拮抗剂以及药学上可接受的载体。
10. 权利要求 8 所述抗体或拮抗剂在制备治疗自身免疫性疾病或异体移植药物中的用途。

人 s1CD80 蛋白在毕赤酵母系统中的表达

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种人免疫球蛋白超家族成员可溶性 CD80(s1CD80) 的重组蛋白基因、含有该基因的重组载体和转化体,以及该重组载体表达的重组蛋白及其用途等。

背景技术

[0002] B7-1(又称 CD80) 分子是 1982 年被鉴定的分子量约 50KD 的 B 细胞活化抗原,是属于免疫球蛋白超家族成员的跨膜糖蛋白,基因定位于 3q21。B7-1 分子以寡聚体的形式主要表达于大部分抗原递呈细胞的表面,如活化的 B 细胞、T 细胞、树突状细胞及单核细胞上。B7-1 分子与表达在 T 细胞上的 CD28 分子相互作用产生的信号,被公认为 T 细胞活化的最基本的协同刺激信号。B7-CD28 信号主要涉及 APC 与 T 细胞相互作用的起始阶段,该信号修饰和补充 TCR 信号,并将多种信号整合后,启动免疫应答。在免疫应答的进展中,进一步通过 CD28 调节并维持适量 T 细胞的存活,持续产生特异性免疫反应。同时,通过细胞因子网络的平衡和调节 CTLA-4 的表达,维持免疫应答的有效性和适度性。增强该信号,有利于肿瘤的排斥和肿瘤细胞的杀伤;而阻断 B7-1 介导的第二信号,可诱导 T 细胞特异性免疫耐受的产生,有助于自身免疫性疾病或超敏反应及异体移植物排斥的预防和治疗。

[0003] 近年来的研究表明,B7-CD28 信号通路可在介导抗肿瘤免疫应答、移植排斥反应和自身免疫性疾病的过程中发挥重要作用。将 B7-1 转入多种肿瘤细胞,可见所有这些肿瘤在转染 B7-1 分子后均被排斥。实验证实,B7-1/B7-2 双敲基因小鼠可以出现严重的糖尿病和胰岛炎症,由此表明,抗原递呈细胞表面低水平表达的 B7-1 和 B7-2 分子有利于自身抗原诱导的免疫耐受的形成。若用 B7-1 和 B7-1 的拮抗剂 CTLA-Ig 可以阻断自身抗体的产生,改善由于免疫复合物沉积于肾小球基底膜而引发的肾小球肾炎的症状。可见,B7-1 可能是一个理想的免疫干预的靶分子。而抗 B7-1 单克隆抗体则将有希望成为临床干预自身免疫性疾病、移植排斥反应和肿瘤的理想的治疗剂。

[0004] CD80 基因编码 5 个区域:信号肽区、IgV- 样区、IgC- 样区、跨膜区和胞内段。除了全长的 mRNA 转录,鼠、狗和猪均已发现有数种异型剪切形式。之前的研究已发现部分人血清中存在可溶性的 CD80(s1CD80),其为外周血单个核细胞在转录水平上的一种跨膜段缺失的异型剪切模式。在静态单核细胞和 B 细胞中,s1CD80(跨膜段外显子缺失) 是转录的主要形式,而膜型的 CD80 在细胞活化后 24-48h 占主要成分。已有的研究结果发现,同一基因不同的基因表达产物具有不同的功能,甚至是相反的功能,因此,不同亚型的 CD80 蛋白表达可能调节 CD80 基因触发的信号。CD80 与 CD28 的作用是启动 T 细胞活化所必需的,用 ELISA 系统证实,s1CD80 重组蛋白与 CD28 有结合活性。但同时体外试验又证实,s1CD80 重组蛋白在体外有抑制功能,能抑制抑制 T 细胞增殖,抑制混合 T 淋巴细胞反应,并呈明显的剂量依赖性。上述的结果显示 s1CD80 起着一种重要的免疫调节作用。在由免疫反应过度引发的疾病如自身免疫性疾病和器官移植中,可以通过施加可溶性 s1CD80 分子抑制免疫反应。并且在抑制过度的 T 细胞活化方面,s1CD80 可能比 CD152Ig 更有优势,因为 sCD80 直

接作用于 T 细胞,而 CD152Ig 需先作用于 APC 细胞。

[0005] 可溶性共刺激分子在疾病诊断中同样具有重要的应用价值,研究结果发现其血清水平与多种自身免疫性疾病有关。有报道显示 sCD86 在恶性血液病、哮喘、SLE 病人中升高, sCD28 在自身免疫性疾病如 SLE 和 Sjogren's 综合症病人中升高, sCD152 在重症肌无力、甲状腺炎、硬皮病、SLE 病人和 SPA 病人中升高,可溶性共刺激分子升高被认为可能是免疫系统激活的灵敏指标。类似的 s1CD80 也被发现在类风湿性关节炎、恶性血液病、哮喘和系统性红斑狼疮病人血清中有升高,因此 s1CD80 有可能作为一种潜在的自身免疫疾病的诊断标志物。

[0006] 目前 s1CD80 重组蛋白的获取方法有限,主要采用原核表达系统进行表达,但是 s1CD80 在大肠杆菌中的表达产物是以包涵体形式存在,后续的蛋白复性工艺成本高、收率较低。本发明最主要的目的在于克服现有技术的缺陷,提供一种低成本、表达量高的 s1CD80 制备方法。

发明内容

[0007] 本发明要求保护下述段落定义的主题:

[0008] 1、一种重组载体,其特征在于包含 SEQ ID No 1 所示的序列。

[0009] 2、一种宿主细胞,其特征在于它被段落 1 所述的载体转化。

[0010] 3、根据段落 2 所述的宿主细胞,其特征在于所述宿主细胞为酵母细胞。

[0011] 4、根据段落 3 所述的宿主细胞,其特征在于所述酵母细胞为毕赤酵母细胞。

[0012] 5、根据段落 4 所述的宿主细胞,其特征在于所述毕赤酵母细胞为毕赤酵母 GS115。

[0013] 6、段落 1 所述重组载体的构建方法,包括如下步骤:

[0014] a) 将毕赤酵母表达载体 pPIC9K 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,回收大小为 290bp 的酶切产物;

[0015] b) 将载体 puc18 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,回收大小为 2.6kb 的酶切产物;

[0016] c) 连接 (a) (b) 步骤获得的回收产物;

[0017] d) 将 (c) 所获得的载体用 Xho I 和 EcoR I 进行双酶切,回收酶切产物大片段;

[0018] e) 体外制备 SEQ ID No2 所示的核酸序列,用 Xho I 和 EcoR I 进行双酶切,回收酶切产物片段;

[0019] f) 连接 (d) (e) 步骤获得的回收产物;

[0020] g) 将 (f) 所获得的载体用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,回收大小为 1001bp 的酶切产物;

[0021] h) 将毕赤酵母表达载体 pPIC9K 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,回收大小为 8986bp 的酶切产物;

[0022] i) 连接 (g) (h) 步骤获得的回收产物。

[0023] 7、一种产生重组蛋白 s1CD80 的方法,其特征在于,该方法包括:

[0024] a) 提供一宿主细胞,该宿主细胞包含段落 1 所述的表达载体;

[0025] b) 在适合蛋白表达的条件下,培养步骤 (a) 所述的宿主细胞;

[0026] c) 分离所述的重组蛋白。

[0027] 8、一种与段落 7 所制备的重组蛋白 s1CD80 特异性结合的抗体或拮抗剂。

[0028] 9、一种药物组合物,其特征在于所述药物组合物含有段落 8 所述的抗体和 / 或拮抗剂以及药学上可接受的载体。

[0029] 10、段落 8 所述抗体或拮抗剂在制备治疗自身免疫性疾病或异体移植药物中的用途。

[0030] 11、根据段落 10 所述自身免疫性疾病为系统性红斑狼疮、重症肌无力、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、变态反应性鼻炎或哮喘。

[0031] 12、一种药物组合物,其特征在于所述药物组合物含有段落 7 所制备的重组蛋白以及药学上可接受的载体。

[0032] 13、段落 7 制备的重组蛋白在制备治疗免疫抑制性疾病药物中的用途。

[0033] 14、根据段落 13 所述免疫抑制性疾病为病毒感染、肿瘤。

[0034] 15、一种检测自身免疫性疾病的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有段落 8 所述的 s1CD80 特异性抗体。

[0035] 本发明要解决的技术问题是提供一种成本低、表达量高,并且分离纯化过程简单易操作的重组人源可溶性 CD80(s1CD80) 及其制备方法。

[0036] 为解决上述问题,本发明一方面涉及一种重组载体,该载体具有 SEQ ID NO1 所示的序列。该重组载体通过如下方法构建:(a) 将毕赤酵母表达载体 pPIC9K 用 BamH I 和 EcoRI 进行双酶切,回收大小为 290bp 的酶切产物;(b) 将载体 puc18 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,回收大小为 2.6kb 的酶切产物;(c) 连接 (a) (b) 步骤获得的回收产物;(d) 将 (c) 所获得的连接产物用 Xho I 和 EcoR I 进行双酶切,回收酶切产物大片段;(e) 体外制备 SEQ ID No2(His6/ 人 s1CD80 基因) 所示的核酸序列,用 Xho I 和 EcoR I 进行双酶切,回收酶切产物片段;(f) 连接 (d) (e) 步骤获得的回收产物;(g) 将 (f) 所获得的载体用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,回收大小为 1001bp 的酶切产物;(h) 将毕赤酵母表达载体 pPIC9K 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,回收大小为 8986bp 的酶切产物;(i) 连接 (g) (h) 步骤获得的回收产物。

[0037] 本发明另一方面还提供了一种宿主细胞,该宿主细胞被上述载体转化。在较佳的实施例中,所述宿主细胞为酵母细胞,优选为毕赤酵母细胞,更优选的为毕赤酵母细胞 GS115。通过筛选获得的高表达 s1CD80 的转化酵母菌株于 2011 年 1 月 19 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,它的保藏名称为巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*),保藏号为 CGMCC 4560。

[0038] 本发明还提供了一种产生重组蛋白的方法,该方法包括:(a) 提供一宿主细胞,该宿主细胞包含具有 SEQ ID NO 1 所示序列的重组载体;(b) 在适合蛋白表达的条件下,培养步骤 (a) 所述的宿主细胞;(c) 分离所述的重组蛋白。

[0039] 本发明另一方面还涉及与上述重组蛋白 s1CD80 特异性结合的抗体或其拮抗剂以及上述抗体或拮抗剂在制备药物中的用途。在较佳的实施方案中,上述抗体或拮抗剂可用于制备治疗自身免疫性疾病及异体器官移植的药物,所述自身免疫性疾病可以为系统性红斑狼疮、重症肌无力、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、变态反应性鼻炎或哮喘等。

[0040] 本发明还涉及一种药物组合物,其包含上述重组蛋白的抗体和 / 或拮抗剂及药学上可接受的载体。

[0041] 本发明还涉及另一种药物组合物,所述药物组合物含有通过上述方法制备的重组

蛋白以及药学上可接受的载体。

[0042] 本发明还涉及通过上述方法制备的重组蛋白在制备治疗免疫抑制性疾病药物中的用途；所述免疫抑制性疾病为病毒感染、肿瘤。

[0043] 本发明还涉及一种自身免疫性疾病的诊断试剂盒，所述试剂盒含有上述的能够与 s1CD80 特异性结合的抗体。本发明还提供了检测样品中是否存在 s1CD80 蛋白的方法，它包括：将样品与 s1CD80 蛋白特异性抗体接触，观察是否形成抗原-抗体复合物，形成了复合物就表示样品中存在 s1CD80 蛋白。还提供了一种检测自身免疫性疾病的方法，包括步骤：检测病人的样品（如血液、尿液、体液、唾液等）中是否存在 s1CD80 蛋白。

附图说明

[0044] 图 1 显示了本发明所用的表达载体质粒图谱，图中 Ampicillin 表示氨苄青霉素抗性基因。其中 A 为毕赤酵母表达载体 pPIC9k 载体，购自 Invitrogen 公司；B 为 pUC18 原核表达载体，购自 Takara 公司；C 为中转载体 pUC18-9k；D 为重组载体 pPIC9k-s1CD80。

[0045] 图 2 显示了筛选得到的工程菌进行 AOX1 PCR 之后的电泳图，电泳结果表明存在两条 DNA 条带，一条是野生型的 AOX1 基因（2kb 左右），另一条是含有 s1CD80 基因的 1.2kb 左右的条带。

[0046] 图 3 显示了重组蛋白表达的 SDS-PAGE 电泳结果。

[0047] 图 4 显示了重组蛋白表达的 Western 印迹结果。

具体实施方案

[0048] 本发明一方面涉及一种重组载体，该载体具有 SEQ ID NO 1 所示的序列。该载体通过如下方法构建：(a) 将毕赤酵母表达载体 pPIC9K 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切，回收大小为 290bp 的酶切产物；(b) 将载体 puc18 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切，回收大小为 2.6kb 的酶切产物；(c) 连接 (a) (b) 步骤获得的回收产物；(d) 将 (c) 所获得的连接产物用 Xho I 和 EcoR I 进行双酶切，回收酶切产物大片段；(e) 体外制备 SEQ ID No2 (His6/人 s1CD80 基因) 所示的核酸序列，用 Xho I 和 EcoR I 进行双酶切，回收酶切产物片段；(f) 连接 (d) (e) 步骤获得的回收产物；(g) 将 (f) 所获得的载体用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切，回收大小为 1001bp 的酶切产物；(h) 将毕赤酵母表达载体 pPIC9K 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切，回收大小为 8986bp 的酶切产物；(i) 连接 (g) (h) 步骤获得的回收产物。

[0049] 另外，本发明的 His6/人 s1CD80 基因序列的范围内还涵盖了与相同（同源）或基本上相同（同源）以下的核酸序列，如有至少 60%、更佳 70%、还要佳 80%、90%、甚至 95% 以上的同源性或相同性的核酸序列。两个核酸序列基本上相同/同源的另一个指标是两个核酸序列在高度严谨条件下相互杂交。因此，本发明的核酸序列的范围内还涵盖了在中度严谨条件下，更佳的在高度严谨条件下与本发明外源基因序列（尤其是 SEQ ID NO2 的核酸序列）杂交的核酸序列。

[0050] 本发明的外源基因序列通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，通常可通过重叠 (overlapping) 扩增，例如进行两次或

多次 PCR 扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0051] 然后,将上述表达载体转化重组工程细胞宿主内,从而构建表达 His6/s1CD80 蛋白的重组工程细胞宿主。这些重组工程细胞可以是来源于动物,植物,昆虫,真菌,酵母,细菌等。本发明构建的重组载体适合在酵母工程菌中表达融合蛋白,因此优选的重组工程细胞宿主为酵母细胞,更优选的酵母细胞为毕赤酵母细胞 GS115。本文所用的术语“转化”是指用本领域技术人员熟知的方法将含有感兴趣的核酸的表达载体直接导入宿主细胞内。转化方法因宿主细胞类型而异,通常包括:电转化;采用氯化钙、DEAE-葡聚糖或其它物质的转染;微粒轰击;脂转染;感染和其它方法(见 Sambrook 等人的《分子克隆实验指南》第 2 版,1989 年)。较佳的方法是电转化方法。

[0052] 随后,在适合本发明重组蛋白表达的条件下,培养转化所得的宿主细胞。本领域技术人员根据常规试验就能选择和确定培养基、培养温度、时间等条件。采用本领域常规检测手段,如 SDS-PAGE, Western 印迹等,可以检测出本发明融合蛋白的表达。最后,可用常规的蛋白分离纯化技术,进行融合蛋白的纯化,其包括离心,沉淀,过滤,层析等手段。具体地,层析方法又包括亲和法,凝胶过滤,离子交换,疏水层析,以及反向层析等。本发明提供的 His6/s1CD80 蛋白的分离纯化方法也包括上述各种方法的适当组合。

[0053] 本发明还提供了上述重组蛋白的抗体或拮抗剂。本文所用的术语“抗体”指由至少一个抗体结合位点组成的一个或一组多肽,其具体包括:单克隆抗体(包括全长的单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、和抗体片段(例如 Fab、F(ab')₂ 和 Fv),只要它们表现出所需的生物活性。术语“抗体片段”指全长抗体的一部分,通常是抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab, Fab', F(ab')₂ 和 Fv 片段。木瓜蛋白酶消化抗体产生了两个相同的抗原结合片段(称为 Fab 片段,每个片段有单个抗原结合部位),以及一个残余的“Fc”片段(如此称呼是因为它很容易结晶)。用胃蛋白酶处理产生一个 F(ab')₂ 片段(它具有两个能与抗原交联的抗原结合片段)以及一个残余的其它片段(称为 pFc')。其它片段可包括二抗体、线性抗体、单链抗体分子和抗体片段形成的多特异性抗体。如本文所用的,关于抗体的术语“功能性片段”是指 Fv, F(ab) 和 F(ab')₂ 片段。

[0054] 本文所用的术语“单克隆抗体”指从一群基本均一抗体获得的抗体,即该群体中包含的各个抗体是相同的,除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体是高特异性的,针对单个抗原位点。而且,与常规(多克隆)抗体制剂(通常是包括针对不同的决定簇(表位)的不同抗体)相反,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体的优点还在于它们是通过杂交瘤培养来合成的,不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性,是从基本均一的抗体群中获得的,这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。本文的单克隆抗体还包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)(其中重链和/或轻链的一部分与特定动物种类衍生的、或是属于特定的抗体类或亚类的抗体的对应序列相同或同源,而链的其余部分则与另一动物衍生的、或是属于另一抗体类或亚类的抗体的对应序列相同或同源)以及这些抗体的片段,只要这些片段具有所需的生物活性即可。

[0055] 针对 His/s1CD80 的单克隆抗体可用常规方法制得。通常,首先用 His/s1CD80 蛋白来免疫合适的动物,较佳的是小鼠、大鼠、家兔或山羊。由于可获得的血清体积多,能获得标记的抗家兔和抗山羊抗体,因此对于制备多克隆抗血清来说,家兔和山羊是较佳的。免疫通常这样进行:将蛋白以盐水(较佳的以佐剂如弗氏完全佐剂)混合或乳化,然后肠胃外(通常是皮下或肌内)注射该混合物或乳剂。随后用盐水(较佳的是用弗氏不完全佐剂)配的蛋白质注射一次或多次以强化免疫。另外可以用本领域已知的方法进行体外免疫来产生抗体。

[0056] 用 Kohler 和 Milstein 的标准方法 [Nature(1975) 256 :495-96] 或其改进方法可制得单克隆抗体。通常,如上所述对啮齿类动物如小鼠和大鼠进行免疫。当然,也可用家兔、羊或蛙细胞。采用大鼠可能会有某些优点,但是小鼠是较佳的,其中 BALB/c 小鼠是最佳的,它是最常用的动物,通常能提供较高比例的稳定融合。为了产生单克隆抗体,在免疫接种后,选择具有生产抗体潜力的体细胞,具体是 B 淋巴细胞(B 细胞),以用于单克隆抗体生产程序。这些细胞可从活检的脾脏、扁桃体或淋巴结、或周围血液样品获得。脾细胞和周围血细胞是较佳的,因为前者是处于分裂的浆母细胞阶段的抗体产生细胞的丰富来源,而后者周围血液很容易获得。通常是对一组动物免疫接种,取出抗体滴度最高的动物的脾脏。用注射器将脾脏匀浆,获得脾淋巴细胞。免疫接种过的小鼠的脾脏通常含有约 5×10^7 至 2×10^8 的淋巴细胞。

[0057] 然后,使免疫接种的动物的产生抗体的 B 细胞与无限增殖骨髓瘤细胞系(通常与免疫接种动物的种类相同)融合。适用于产生杂交瘤融合程序的骨髓瘤细胞系最好不产生抗体,融合效率较高,且有酶缺陷,使得它们不能在某些只支持所需融合细胞(称为杂交瘤)生长的选择性培养基中生长。可采用许多骨髓瘤细胞中的任何一种,它们是本领域技术人员中已知的。例如,当免疫接种的动物是小鼠时,可采用 P3-X63/Ag8、X63-Ag8.653、NS1/1.Ag41、Sp2/0、F0、NS0/U、MPC-11、MPC 11-X45-GTG 1.7 和 S194/5XX0 Bu1;对于大鼠,可采用 R210、RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F 和 4B210;U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2 和 UC729-6 均可与人细胞融合结合。一种较佳的小鼠骨髓瘤细胞系是 NS-1 骨髓瘤细胞系(也称为 P3-NS-1-Ag4-1),它可从 NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository 通过要求细胞系保藏号 GM3573 获得。可采用的另一种小鼠骨髓瘤细胞系是 8-氮鸟嘌呤抗性的小鼠骨髓瘤 SP2/0 非生产型细胞系。

[0058] 产生抗体产生性脾或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂交物的方法通常包括在促进细胞膜融合的一种或数种试剂(化学或电)存在下,以 2:1 的比例混合体细胞和骨髓瘤细胞,但是比例也可分别从约 20:1 至约 1:1。Kohler&Milstein(1975;1976)已经描述了采用 Sendai 病毒的融合方法,Geftter 等(1977)描述了采用聚乙二醇(PEG)(如 37%(v/v)PEG)。采用电诱导的方法也是适用的。

[0059] 融合步骤产生存活杂交细胞的频率通常较低。然而,这并不成问题,因为通过在选择性培养基中培养可将存活的融合杂交细胞与亲代未融合细胞(特别是会继续正常无限分裂的未融合骨髓瘤细胞)中区分开来。选择性培养基通常含有阻断组织培养基中核苷酸从头合成的试剂。典型的较佳的试剂是氨基嘌呤、氨甲嘌呤和重氮丝氨酸。氨基嘌呤和氨甲嘌呤阻断了嘌呤和嘧啶的从头合成,而重氮丝氨酸仅仅阻断嘌呤的合成。当采用氨甲嘌呤或氨甲嘌呤时,在培养基中补充入次黄嘌呤和胸苷作为核苷酸源(HAT 培养基)。当采用

重氮丝氨酸时,在培养基中补充加入次黄嘌呤。

[0060] 较佳的选择培养基是 HAT。只有能进行核苷酸补救途径的细胞才能在 HAT 培养基中存活。骨髓瘤在补救途径中缺少关键性酶,如次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT),它们不能存活。B 细胞能进行该途径,但是它们在培养基中的生命期有限,通常会在大约两周内死亡。因此在选择性培养基中存活的细胞只有骨髓瘤和 B 细胞形成的杂交瘤细胞。

[0061] 这一培育提供了一群杂交瘤,从中选出具体的杂交瘤。通常,杂交瘤的选择是:在微量滴定板中单克隆稀释,然后测试各个克隆的上清液是否具有所需反应性。该试验应当灵敏、简单而迅速,例如放射性免疫试验、酶免疫试验、细胞毒性试验、空斑试验、斑点免疫结合试验、酶联免疫吸附试验等。然后系列稀释所选杂交瘤,并克隆成单个的抗体产生细胞系,然后就可使克隆无限增殖以提供单克隆抗体。

[0062] 本发明所述的拮抗剂可以是小分子化合物拮抗剂,也可以是重组蛋白的受体或者配体等大分子拮抗剂。

[0063] 本发明另一方面还提供了一种药物组合物,该组合物含有药学上有效量的本发明重组蛋白的抗体和 / 或拮抗剂以及药学上可接受的载体。本发明还提供了另一种药物组合物,该组合物含有药学上有效量的本发明重组蛋白以及药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的”是指当分子本体和组合物适当地给予动物或人时,它们不会产生不利的、过敏的或其它不良反应。本文所用的“载体”应当与本发明的重组蛋白、或重组蛋白的抗体和 / 或拮抗剂相容,即能与其共混而不会在通常情况下大幅度降低药物组合物的药效。可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体例子是糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和土豆淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和甲基纤维素;西黄蓍胶粉末;麦芽;明胶;滑石;固体润滑剂,如硬脂酸和硬脂酸镁;硫酸钙;植物油,如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油;多元醇,如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;海藻酸;乳化剂,如 Tween[®];润湿剂,如月桂基硫酸钠;着色剂;调味剂;压片剂、稳定剂;抗氧化剂;防腐剂;无热原水;等渗盐溶液;和磷酸盐缓冲液等。

[0064] 本发明的药物组合物可根据需要制成各种剂型,并可由医师根据患者种类、年龄、体重和大致疾病状况、给药方式等因素确定对病人有益的剂量,通过是注射,口服,鼻内,呼吸道等方式进行施用。为了提高用药效果,本发明的药物组合物也可以与其他药物共同使用。

[0065] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。除非另有描述,本发明的实施将采用分子生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术,这些均是本领域技术人员所知的。这些技术在下列文献中有完整的描述:例如,Sambrook《分子克隆实验指南》第 2 版 (1989);《DNA 克隆》第 I 和 II 卷 (D. N. Glover 编辑 1985);《寡核苷酸合成》(M. J. Gait 编辑,1984);《核酸杂交》(B. D. Hames 和 S. J. Higgins 编辑,1984);《蛋白质纯化:原理和实践》第 2 版 (Springer-Verlag, N. Y.), 以及《实验免疫学手册》I-IV 卷 (D. C. Weir 和 C. C. Blackwell 编辑 1986)。或者,可按照试剂生产商所提供的说明书进行。

具体实施方式

[0066] 实施例 1 带有 His-tag 标签的 s1CD80 基因制备

[0067] His/s1CD80 基因可以通过 RT-PCR 获得。首先取正常人外周血单核细胞 (PBMC)，并从中制备 RNA。然后通过反转录方法获得 cDNA。再用 PCR 分子克隆技术扩增获得 His/s1CD80 基因。具体说明如下：

[0068] 首先制备总 RNA。具体是取正常人 PBMC 细胞，然后在 PBMC 细胞中加入 1ml Trizol 试剂裂解细胞，再以氯仿和异丙醇进行抽提 RNA，用乙醇进行洗涤，RNA 便可以进行 RT-PCR 反转录了。

[0069] RT-PCR 使用 Fermentas 公司 First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒。具体条件如下：

[0070] 5×PCR 缓冲液，4 μl；dNTP/ 类似物混合物，2 μl；RNase 抑制剂，1 μl；M-MuLV Reverse Transcriptase，1 μl；random hexamer primer 引物，1 μl；RNA，1 μl；RNase Free dH₂O，10 μl。根据下列的程序进行反应：25℃，5min；42℃，60min；70℃，5min。合成的 cDNA 可以在 -20℃ 保存。

[0071] 然后用常规的 PCR 方法扩增 s1CD80 基因。条件如下：

[0072] 扩增 s1CD80 所用的引物为：s1CD80 引物 1：5-GCCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTCA -3' 和 s1CD80 引物 2：5-CCGGAATTCTTAATGATGAT GATGATGATGTTCAAGTACAGGGCGTACAC TTTC-3'。

[0073] 反应条件为：cDNA，2 μl；s1CD80 引物 1，0.5 μl；s1CD80 引物 2，0.5 μl；Premix Taq (ExTaq)，12.5 μl；ddH₂O，9.5 μl。

[0074] PCR 根据下列的程序进行反应。开始，94℃；5min；然后，94℃，1min；58℃ 1min，72℃，1min，一共 35 个循环。最后，72℃，10min。

[0075] 然后用常用的分子生物学方法，分离获得 His/s1CD80 基因。具体是用 1% 的琼脂糖胶电泳酶切产物，然后切下 754bp 左右的目的条带，再用天根公司《琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒》回收切胶产物。电泳检测回收产物的粗浓度后 -20℃ 保存。

[0076] 实施例 2 载体构建

[0077] 本实验采用 puc18 和 pPIC9K 为表达载体质粒，其制备方法为常用分子生物学方法。即，通过培养含有表达载体的菌种，提取获得该质粒。制备好的质粒 -20℃ 保存待用。

[0078] 中转载体 puc18-9k 的构建

[0079] 首先将毕赤酵母表达载体 pPIC9K 载体 (Invitrogen) 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切，回收大小为 290bp 左右的酶切产物。将载体 puc18 (Takara) 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切，回收大小为 2.6kb 左右的酶切产物。具体条件如下：

[0080] 37℃ 恒温水浴锅内反应 3 小时，酶切体系如下：

[0081] 酶切体系：表达载体质粒 pPIC9k 或 puc18，16ul；BamH I，1ul；EcoR I，1ul；10× 酶切缓冲液，2ul。

[0082] 然后用常用的分子生物学方法，分离获得大小为 290bp 和 2.6kb 的酶切产物。具体是用琼脂糖凝胶电泳酶切产物，然后切下目的条带，再用天根公司《琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒》回收切胶产物。电泳检测回收产物的粗浓度后 -20℃ 保存。

[0083] 然后，对酶切产物进行连接，融合表达载体。具体如下：连接体系一般为 10ul，其中连接酶 1ul，pPIC9k 小片段与 puc18 大片段的摩尔比为 1：2-10，不足补加无菌水。16℃ 恒温水浴锅内反应 6 小时。连接产物转化感受态 DH5 α 细胞。

[0084] 转化体系为：连接产物，10 μ l。

[0085] 取一管感受态 DH5 α 细胞加入上述混合液中，轻柔混匀后冰上放置 30 分钟再 37 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟。加入 500 μ l LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 180rpm 摇 30 分钟。取 100 μ l 转化液涂氨苄（浓度 100 μ g/ml）抗性的 LB 固体培养基，37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12-16 小时。

[0086] 阳性克隆的鉴定是通过挑选阳性克隆抽提质粒，进行酶切和测序结果来确定。此载体命名为 puc18-9k。

[0087] puc18-9k-s1CD80 表达载体的构建

[0088] 将实施例 1 得到的 His/s1CD80 片段用限制性内切酶 Xho I 和 EcoR I 酶切，酶切体系为：His/s1CD80，25 μ l；Xho I，1 μ l；EcoR I，1 μ l；10x 酶切缓冲液，3 μ l。然后回收酶切产物。将 puc18-9k 载体用 Xho I 和 EcoR I 进行双酶切，酶切体系为：puc18-9k，16 μ l；XhoI，1 μ l；EcoR I，1 μ l；10x 酶切缓冲液，2 μ l。回收酶切产物大片段。将回收的 His/s1CD80 酶切片段和 puc18-9k 载体片段在 16 $^{\circ}$ C 下进行连接反应，连接反应体系为：连接酶 1 μ l，10x 连接缓冲液，1 μ l，puc18-9k 载体片段和 His/s1CD80 酶切片段摩尔比为 1：2-10，16 $^{\circ}$ C 连接时间 6 小时。

[0089] 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞后，涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板，37 $^{\circ}$ C 过夜培养。阳性克隆的鉴定是通过挑选阳性克隆抽提质粒，进行酶切和测序结果来确定。最终将此载体命名为 puc18-9k-s1CD80。

[0090] pPIC9K-s1CD80 表达载体的构建

[0091] 将得到的 puc18-9k-s1CD80 载体用限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 酶切，酶切体系为：puc18-9k-s1CD80 载体，16 μ l；BamH I，1 μ l；EcoR I，1 μ l；10x 酶切缓冲液，2 μ l。然后回收酶切产物小片段，约为 1001bp。将 pPIC9k 载体用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切，酶切体系为：pPIC9k 载体，16 μ l；BamH I，1 μ l；EcoR I，1 μ l；10 $\times$ 酶切缓冲液，2 μ l。回收酶切产物大片段，约为 8986bp。将回收的 pPIC9k 大片段与 puc18-9k-s1CD80 小片段在 16 $^{\circ}$ C 下进行连接反应，连接反应体系为：连接酶 1 μ l，10x 连接缓冲液，1 μ l，pPIC9k 大片段和 puc18-9k-s1CD80 小片段摩尔比为 1：2-10，16 $^{\circ}$ C 连接时间 6 小时。

[0092] 然后转化大肠杆菌感受态细胞，涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板，37 $^{\circ}$ C 过夜培养。阳性克隆的鉴定是通过挑选阳性克隆抽提质粒，进行酶切和测序结果来确定。最终将此载体命名为 pPIC9K-s1CD80，该重组载体具有序列表中 SEQ ID NO 1 所示的序列。

[0093] 实施例 3 酵母表达工程菌构建及筛选

[0094] 用限制性内切酶 Sal I 将 pPIC9K-s1CD80 线性化，酶切条件为：pPIC9K-s1CD80 载体，42 μ l；Sal I，3 μ l；10x 酶切缓冲液，5 μ l)，电转化（采用 ECM 830 电转仪，设定电压为 270v，电击时间 11msec）入毕赤酵母宿主菌 GS115 感受态细胞（根据 Invitrogen 公司的《Pichia Expression Kit》说明书制备），将电转后的细胞涂布于组氨酸缺陷型 MGY 平板，放在 30 $^{\circ}$ C 培养箱培养 72-96 小时，将生长出的克隆转涂不同浓度的 G418 平板，浓度分别为 1、2、3、4mg/ml，96 小时后选取在最高浓度 G418 平板上长出的克隆进行摇瓶培养（30 $^{\circ}$ C），采用天根公司的《酵母基因组 DNA 提取试剂盒》抽提基因组 DNA，用 AOX 引物（AOX1 上游引物，5-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3，AOX1 下游引物，5-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3）进行验证。反应体系为：基因组 DNA，2 μ l；AOX1 上游引物，0.5 μ l；AOX1 下游引物，0.5 μ l；Premix Taq (Ex Taq)，12.5 μ l；ddH₂O，9.5 μ l。反应条件为：开始，94 $^{\circ}$ C；5min；然后，94 $^{\circ}$ C，1min；

55℃ 1min, 72℃, 1.5min, 一共 30 个循环。最后, 72℃, 10min。如果构建质粒整合到染色体的同源序列上, 并且没有破坏野生的 AOX1 基因, 那么 PCR 时就应该出现两条带, 一条是野生型的 AOX1 基因 (2kb 左右), 另一条是含有 s1CD80 基因的 1.2kb 左右的条带, 此类型菌株属于 Mut⁺ 型 (如图 2 所示)。

[0095] 实施例 4 s1CD80 高表达菌株的筛选

[0096] 将实施例 3 中挑选的 Mut⁺ 型 s1CD80 表达菌株进行摇瓶表达, 每隔 24 小时取样, 共取样 4 次, 取得的样本放入 -20℃ 保存。用 ELISA 方法检测样本中 s1CD80 的表达量高低, 结果表明 3 号菌的 s1CD80 蛋白表达量是各菌株中最高的。该菌株于 2011 年 1 月 19 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC), 保藏号为 CGMCC4560。

[0097] ELISA 方法如下:

[0098] 1. 包被: 把 anti-CD80 单抗 (购自 R&D 公司) 稀释成所需浓度, 用包被液稀释, 100u1/孔加至酶标板, 浓度为 1.0mg/1, 4℃ 过夜。

[0099] 2. 封闭: 洗去包被液, 用 1% 的 BSA 封闭, 每孔 300u1, 37℃ 放置 2 小时。

[0100] 3. 拍干。

[0101] 4. 加样品: 每孔加 100u1 检测样本, 37℃ 放置 2 小时。

[0102] 5. 用洗板机洗涤三次, 200u1/次, 拍干。

[0103] 6. 加生物素标记的二抗: 为生物素标记的羊抗人 CD80 多抗 (购自 R&D 公司), 用 0.5% 的 BSA (牛血清白蛋白) 稀释, 100u1/孔, 浓度为 1.0mg/1, 37℃ 放置 1 小时。

[0104] 7. 重复步骤 5。

[0105] 8. 加 HRP 标记的二链霉素亲合素: HRP 标记的二链霉素亲合素按 1 : 8000 稀释, 37℃ 放置 0.5 小时。

[0106] 9. 重复步骤 5。

[0107] 10. 加底物 TMB: A 液 + B 液 (1 : 1), 即用即配, 100u1/孔, 37℃ 放 10 分钟。

[0108] 11. 终止: 加 2M 的硫酸, 50u1/孔。

[0109] 12. 酶标仪读数: 450nm 波长测定。

[0110] 实施例 5 重组蛋白表达、纯化及鉴定

[0111] 将筛选到的 3 号菌株接种于含 250ml MGY 培养基的摇瓶中, 30℃ 摇床 (250-300rpm) 培养至 OD₆₀₀ = 2-6 (对数生长期)。室温下 3000g 离心 5 分钟收集细胞, 倒掉上清, 用 MM 培养基重悬细胞至 OD₆₀₀ 为 1.0 诱导表达 (200ml)。将菌液倒入 1L 的摇瓶中, 放回摇床继续培养。

[0112] 每隔 24 小时加入 100% 的甲醇至甲醇终浓度为 0.5% 保持诱导。诱导 96hr 后收集表达菌液 3000g 离心 10 分钟, 弃菌体保留上清。Ni 亲和层析柱分离纯化, 样品上样至 Ni 柱之后, 先用含 20mM 咪唑平衡液的平衡, 再用 250mM 咪唑洗脱液洗脱, 250mM 咪唑洗脱峰即为目标蛋白峰。

[0113] 洗脱的蛋白经过 10% 的 SDS-PAGE 电泳后进行考马斯亮蓝染色, 结果如图 3 所示, 可见明显的分子量为 27KD 左右的重组 s1CD80 蛋白条带。洗脱的蛋白进行 SDS-PAGE, 转移到硝酸纤维素膜, 先后与抗 s1CD80 单克隆抗体 (一抗, 购自 R&D 公司), 抗小鼠 IgG 抗体 (二抗, 购自联科公司) 杂交, 最后用 ECL 试剂盒检测, X 光片曝光。根据相应蛋白条带的大小 (27KD 左右), 可以判断蛋白为重组 s1CD80 蛋白。

[0114] 实施例 6 重组蛋白活性测定

[0115] 取两个不同个体 A 和 B 的抗凝外周血,用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞。洗涤后用 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 96 孔板,100u1/ 孔,分别加入不同浓度的 s1CD80 纯化蛋白 (8ug 和 4ug),对照组加入相同体积的 PBS 溶液,培养 48 小时后,每孔加入 10u1WST-1 (Roche 公司),37℃放置 4hr,检测每个孔的吸光度 (检测波长 450nm,参考波长 630nm)。抑制率的计算公式为: (对照组吸光度 - 加药组吸光度) / 对照组吸光度。实验结果表明 s1CD80 蛋白能够抑制混合淋巴细胞的增殖, s1CD80 蛋白在体外具有一定的免疫抑制活性。

[0116]

	8ug	4ug
抑制率	25.7%	20.1%

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 上海市普陀区中心医院

<120> 人 s1CD80 蛋白在毕赤酵母系统中的表达

<130> 123456

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9987

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> vector

<400> 1

agatctaaca tccaaagacg aaagggtgaa tgaaaccttt ttgcatccg acatccacag	60
gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt	120
tgcaaacgca ggacctccac tctcttctc ctcaacaccc acttttgcca tcgaaaaacc	180
agcccgatta ttgggcttga ttggagctcg ctcatlcaa ttcttctat taggtacta	240
acaccatgac ttattagcc tgtctatcct ggccccctg gcgaggttca tgttgttta	300
ttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg	360
agtgtggggt caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaagct	420
gtcttggaac ctaatatgac aaaagcgtga tctatccaa gatgaactaa gtttggtcg	480
ttgaaatgct aacggccagt tggcaaaaa gaaactcca aaagtcgcca taccgtttgt	540
cttgtttggg attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct	600
ctctatcgct tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacacccgct	660
ttttggatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact	720
gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat	780
atataaacag aagggaagctg ccctgtctta aacctttttt ttatcatca ttattagctt	840
actttcataa ttgcgactgg ttcaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga	900
caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaagga tccaaacgat gagatttctt	960
tcaattttta ctgcagtttt attcgcagca tctccgcat tagctgtctc agtcaacact	1020

[0002]

acaacagaag atgaacggc acaaatccg gctgaagctg tcacgggta ctcagattta	1080
gaaggggatt tcgatgttgc tgtttgccca tttccaaca gcacaaataa cgggttattg	1140
ttataaata ctactattgc cagcattgct gctaaagaag aaggggtatc tctcgagaaa	1200
agagaggctg aagctggctt ttctacttc tgttcagggt ttatccacgt gaccaaggaa	1260
gtgaaagaag tggcaacgct gtcctgtggt cacaatgtt ctgtgaaga gctggcacia	1320
actgcacat actggcaaaa ggagaagaaa atggtgctga ctatgatgc tggggacatg	1380
aatatatggc ccgagtacaa gaaccggacc atctttgata tcactaataa cctctccatt	1440
gtgacatctg ctctgcgcc atctgacgag ggcacatacg agtgtgtgt tctgaagtat	1500
gaaaaagacg cttcaagcg ggaacacctg gctgaagtga cgttatcagt caaagctgac	1560
ttccctacac ctagtatac tgactttgaa attccaacti ctaatattag aaggataatt	1620
tgtcaacct ctggagggtt tccagagcct cacctctct ggttggaataa tggagaagaa	1680
ttaatgccca tcaacacaac agtttccaa gatcctgaaa ctgagctcta tgcgtttagc	1740
agcaaactgg atttcaatat gacaaccaac cacagcttca tgtgtctcat caagtatgga	1800
catttaagag tgaatcagac cttcaactgg aatacaagct ttgccccaa atgcagagag	1860
agaaggagga atgagagatt gagaaggga agtgtacgcc ctgtactga acatcatcat	1920
catcatcatt aagaattccc tagggcgcc gcgaattaat tcgccttaga catgactgtt	1980
cctcagttca agttggcac ttacgagaag accggtcttg ctgattcta atcaagagga	2040
tgtcagaatg ccatttgcct gagagatgca ggcttcatt ttgatacti tttatttga	2100
acctatatag tataggattt ttttgtcat ttgtttctt ctgtacgag ctgtctctg	2160
atcagcctat ctgcagctg atgaatatct tgtggtagg gtttgggaaa atcattcgag	2220
tttgatgtt ttcttggtat ttccactcc tcttcagag acagaagatt aagtgagaag	2280
ttcgttttg caagcttacc gataagctt aatgcggtag ttatcacag ttaaattgct	2340
aacgcagtc ggcaccgtgt atgaaatcta acaatgcgt catcgtcatc ctggcaccg	2400
tcacctgga tgcgttaggc ataggcttg ttatgccgt actgccgggc ctcttgcggg	2460
atatcgtcca ttccgacagc atgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt	2520
tgatgcaatt tctatgcga cccgttctg gagcactgc cgaccgttt ggccgccgcc	2580
cagtcctgct cgttcgcta cttggagcca ctatgacta cgcgatcatg gcgaccacac	2640
ccgtcctgtg gatctatga atctaaatgt aagttaaaat ctctaaataa ttaaataagt	2700
cccagttct ccatacgaac cttacagca ttgcggtgag catctagacc ttcaacagca	2760
gccagatcca tctactgttg gccaatatgt ttcagtcct caggagtac gtcttggaa	2820
gtgatgaact tctggaaggt tgcagtgtta actccgctgt attgacgggc atatccgtac	2880

[0003]

gttggcaaag tgtggttggt accggaggag taatctccac aactctctgg agagtaggca	2940
ccaacaaaca cagatccagc gtgtgtact tgatcaacat aagaagaagc attctcgatt	3000
tgcaggatca agtgttcagg agcgtactga ttggacattt ccaaagcctg ctcgtaggtt	3060
gcaaccgata ggggtttaga gtgtgcaata cacttgcgta caatttcaac ccttggcaac	3120
tgcacagctt ggttgtgaac agcatcttca attctggcaa gctccttgc tgcataatcg	3180
acagccaaca gaatcacctg ggaatcaata ccatgttcag cttgagacag aaggtctgag	3240
gcaacgaaat ctggatcagc gtatttatca gcaataacta gaacttcaga aggcccagca	3300
ggcatgtcaa tactacacag ggctgatgtg tcattttgaa ccatcatctt ggcagcagta	3360
acgaactggt ttctggacc aaatatattg tcacacttag gaacagtctt tgttccgtaa	3420
gccatagcag ctactgcctg ggcgcctcct gctagcacga tacacttagc accaaccttg	3480
tgggcaacgt agatgacttc tggggttaagg gtaccatcct tcttaggtgg agatgcaaaa	3540
acaatttctt tgcaaccagc aactttggca ggaacacca gcatcaggga agtgggaaggc	3600
agaattgcgg ttccaccagg aatatagagg ccaactttct caataggtct tgcaaaacga	3660
gagcagacta caccagggca agtctcaact tgcaacgtct ccgttagttg agcttcatgg	3720
aatttctga cgttatctat agagagatca atggctctct taacgttctc tggcaattgc	3780
ataagttcct ctgggaaagg agcttctaac acaggtgtct tcaaagcgac tccatcaaac	3840
ttggcagtta gtctaaaaag ggctttgtca ccattttgac gaacattgtc gacaattggt	3900
ttgactaatt ccataatctg ttccgttttc tggataggac gacgaagggc atcttcaatt	3960
tcttgtgagg aggccctaga aacgtcaatt tgcacaatt caatacgacc ttcagaaggg	4020
acttctttag gtttggattc ttcttttaggt tgttcttgg tgtatcctgg cttggcatct	4080
cttttcttc tagtgacctt tagggacttc ataccaggt ttctctccac ctcgtccaac	4140
gtcacaccgt acttggcaca tctaactaat gcaaaataaa ataagtcagc acattcccag	4200
gctatatctt ccttggattt agcttctgca agttcatcag ctctctcctt aattttagcg	4260
ttcaacaaaa ctctgcctgc aaataaccgt ttgttataag aaccttctgg agcattgctc	4320
ttacgatccc acaaggtggc ttccatggct ctaagacctt ttgattggcc aaaacaggaa	4380
gtgcgttcca agtgacagaa accaacacct gtttgttcaa ccacaaattt caagcagtct	4440
ccatcacaat ccaattcgat acccagcaac tttgagttg ctccagatgt agcaccttta	4500
taccacaaac cgtgacgacg agattggtag actccagttt gtgtccttat agcctccgga	4560
atagactttt tggacgagta caccaggccc aacgagtaat tagaagagtc agccacaaa	4620
gtagtgaata gaccatcggg gcggtcagta gtcaaagacg ccaacaaaat ttactgaca	4680
gggaactttt tgacatcttc agaaagtctg tattcagtag tcaattgccg agcatcaata	4740

[0004]

atgggggatta taccagaagc aacagtggaa gtcacatcta ccaactttgc ggtctcagaa	4800
aaagcataaa cagtctact accgccatta gtgaaacttt tcaaatcgcc cagtggagaa	4860
gaaaaaggca cagcgatact agcattagcg ggcaaggatg caactttatc aaccagggtc	4920
ctatagataa ccctagcgcc tgggatac ctttggacaa ctctttctgc caaatctagg	4980
tccaaaatca ctctattgat accattattg tacaacttga gcaagttgct gatcagctcc	5040
tcaaattggt cctctgtaac ggatgactca acttgcacat taacttgaag ctcatgcat	5100
tgagtgaact tgatcaggtt gtgcagctgg tcagcagcat agggaaacac ggcttttct	5160
accaaactca aggaattatc aaactctgca acacttgcgt atgcaggtag caagggaat	5220
gtcatacttg aagtcggaca gtgagttag tcttgagaaa ttctgaagcc gtattttat	5280
tatcagttag tcagtcatca ggagatcctc tacgccggac gcatcgtggc cgacctgcag	5340
gggggggggg ggcgctgagg tctgcctcgt gaagaagggtg ttgctgactc ataccaggcc	5400
tgaatcgccc catcatccag ccagaaagtg agggagccac ggttgatgag agctttgtg	5460
tagtgagacc agttggtgat tttgaacttt tgccttgcca cggaacggtc tgcgttgctg	5520
ggaagatgctg tgatctgac cttcaactca gcaaaagttc gatttattca acaaagccgc	5580
cgtcccgta agtcagcgta atgctctgcc agtggttaca ccaattaacc aattctgatt	5640
agaaaaactc atcgagcatc aatgaaact gcaatttatt catatcagga ttatcaatac	5700
catatttttg aaaaagccgt ttctgtaatg aaggagaaaa ctcaccgagg cagttccata	5760
ggatggcaag atcctggtat cggctcgcga ttccgactcg tccaacatca atacaaccta	5820
ttaatttccc ctctcaaaa ataagggtat caagtgagaa atcaccatga gtgacgactg	5880
aatccggtga gaatggcaaa agcttatgca ttctttcca gacttggtca acaggccagc	5940
cattacgctc gtcatcaaaa tcactgcat caaccaaac gttattcatt cgtgattgctg	6000
cctgagcgag acgaaatacg cgatcgctgt taaaaggaca attacaaca ggaatcgaat	6060
gcaaccggcg caggaacact gccagcgcat caacaatatt ttcacctgaa tcaggatatt	6120
cttctaatac ctggaatgct gtttcccg ggatcgcatg ggtgagtaac catgcatcat	6180
caggagtacg gataaaatgc ttgatggtcg gaagaggcat aaattccgtc agccagtta	6240
gtctgacctc ctcatctgta acatcattgg caacgctacc tttgcatgt ttcagaaaca	6300
actctggcgc atcgggcttc ccatacaatc gatagattgt cgcacctgat tgcccacat	6360
tatcgcgagc ccatttatac ccataaaat cagcatccat gttggaattt aatcgcgcc	6420
tcgagcaaga cgtttcccg tgaatatggc tcataacacc ccttgattta ctgtttatgt	6480
aagcagacag ttttattgtt catgatgata tatttttacc ttgtgcaatg taacatcaga	6540
gattttgaga cacaacgtgg ctttcccc cccccctgca ggtcggcac accggcgcca	6600

[0005]

cagggtgcggt tgctggcgcc tatatcgccg acatcaccca tggggaagat cgggctcgcc	6660
acttcgggct catgagcgct tgttcggcg tgggtatggt ggcaggcccc gtggccgggg	6720
gactgttggg cgecatctcc ttgatgcac cattccttgc ggcggcggtg ctcaacggcc	6780
tcaacctact actgggctgc ttctaatagc aggagtcgca taaggagag cgtcgagtat	6840
ctatgattgg aagtatggga atggtgatac ccgcattctt cagtgtcttg aggtctccta	6900
tcagattatg cccaactaaa gcaaccggag gaggagattt catggtaaatt ttcttgact	6960
tttggctatc agtagactcg aactgtgaga ctatctcggt tatgacagca gaaatgtcct	7020
tcttgagac agtaaataaa gtccaccaa taaagaaatc cttgttatca ggaacaaact	7080
tctgttttcg aactttttcg gtgccttgaa ctataaatg tagagtggat atgtcgggta	7140
ggaatggagc gggcaaatgc ttacctctg gaccttaag aggtatgtag ggtttgtaga	7200
tactgatgcc aatttcagt acaacgttgc tatttcgttc aaaccattcc gaatccagag	7260
aaatcaaaagt tgtttgtcta ctattgatcc aagccagtgc ggtcttgaat ctgacaatag	7320
tgtgctcgtg ttttgaggtc atctttgtat gaataaatct agtctttgat ctataataatc	7380
ttgacgagcc aaggcgataa ataccctaat ctataactct ttataaacgt taaaaggaca	7440
agtatgtctg cctgtattaa accccaaatc agctcgtagt ctgacctca tcaactgag	7500
gggcactatc ttgttttaga gaaatttgcg gagatgcgat atcgagaaaa aggtacgctg	7560
attttaaacg tgaaatttat ctcaagatct ctgcctcgcg cgttcgggtg atgacggtga	7620
aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg	7680
gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgtggc ggggtgtcggg gcgcagccat	7740
gacctcagtc cgtagcgata gcggagtgta tactggctta actatgcggc atcagagcag	7800
attgtactga gagtgacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa	7860
taccgcatca ggcgctcttc cgttctctcg ctactgact cgtgcgctc ggtcgttcgg	7920
ctgcggcgag cggatcagc tcaactaaag gcggtatac ggttatccac agaatacagg	7980
gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag	8040
gccgcgttgc tggcggtttt ccataggtc cgcctctg acgagcatca caaaaatcga	8100
cgtcaagtc agaggtggcg aaaccgcga ggactataaa gataccaggc gtttccccct	8160
ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg acctgcccgc ttaccggata cctgtccgcc	8220
tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgtcac gctgtaggta tctcagttcg	8280
gtgtaggctc ttgcctcaa gctggggtgt gtgcacgaac ccccggtca gcccgaccgc	8340
tgcgccttat ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga cttatcgcca	8400
ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag	8460

[0006]

ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgt	8520
ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc	8580
accgctggtg gcggtggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgag aaaaaagga	8640
tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctcgacg ctacgtggaa cgaaaactca	8700
cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat cttttaaat	8760
taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac	8820
caatgcttaa tcagtgggc acctatctca gcgatctgtc ttttcgttc atccatagtt	8880
gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt	8940
gctgcaatga taccgcgaga cccacgtca ccggtccag attatcagc aataaaccag	9000
ccagccggaa ggcccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct	9060
attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt	9120
gttgccattg ctgcaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttattcagc	9180
tccggtccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgtgtgcaa aaaagcgtt	9240
agtccttcg gtctccgat cgtgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg	9300
gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgcat ccgtaagatg cttttctgtg	9360
actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtga tgcggcgacc gattgtctt	9420
tgcccggtc caacacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgcctac	9480
attggaaaac gtcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgtgtt gagatccagt	9540
tcgatgtaac cactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt	9600
tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg	9660
aaatgttgaa tactcatact ctctctttt caatattatt gaagcattta tcagggttat	9720
tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataacaaat aggggttccg	9780
cgcacattc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccatattat catgacatta	9840
acctataaaa ataggcgtat cagaggccc ttcgtcttc aagaattaat tctcatgtt	9900
gacagcttat catcgataag ctgactcatg ttggtattgt gaaatagacg cagatcggga	9960
aactgaaaa ataacagttt ttattcg	9987
<210> 2	
<211> 754	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	

[0007]

gccgctcgag aaaagagagg ctgaagctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca	60
cgtgaccaag gaagtgaag aagtggaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgtga	120
agagctggca caaacgcga tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat	180
gtctggggac atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatcttg atatcactaa	240
taacctctcc attgtgatcc tggtctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt	300
tgttctgaag tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggtgaag tgacgttacc	360
agtcaaagct gacttccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat	420
tagaaggata attgtctcaa cctctggagg tttccagag cctcacctct cctggttgga	480
aaatggagaa gaattaaatg ccatcaacac aacagttcc caagatcctg aaactgagct	540
ctatgtctgt agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct	600
catcaagtat ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa gctttgcccc	660
aagatgcaga gagagaagga ggaatgagag attgagaagg gaaagtgtac gccctgtact	720
tgaacatcat catcatcatc attaagaatt ccgg	754

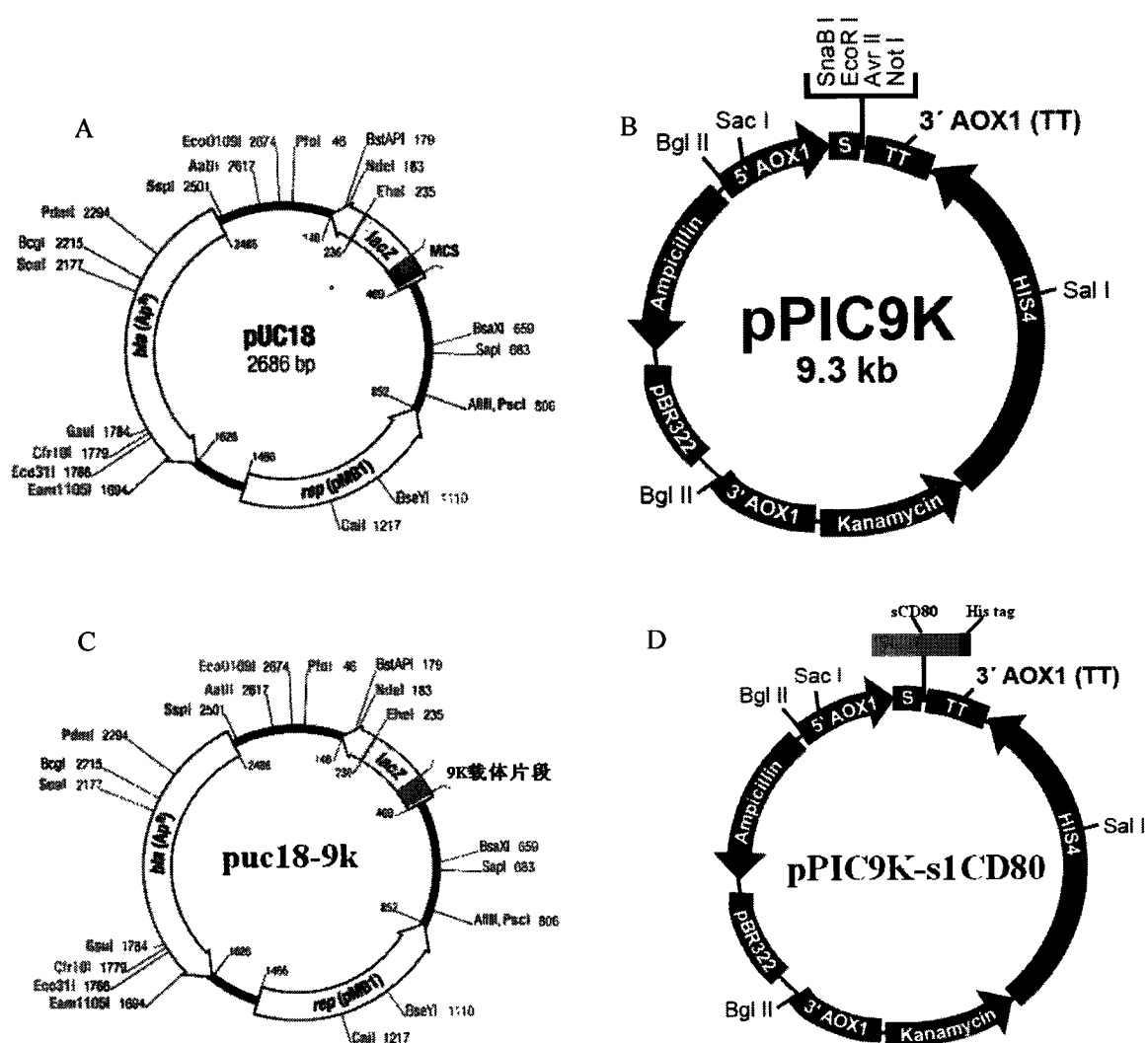


图 1

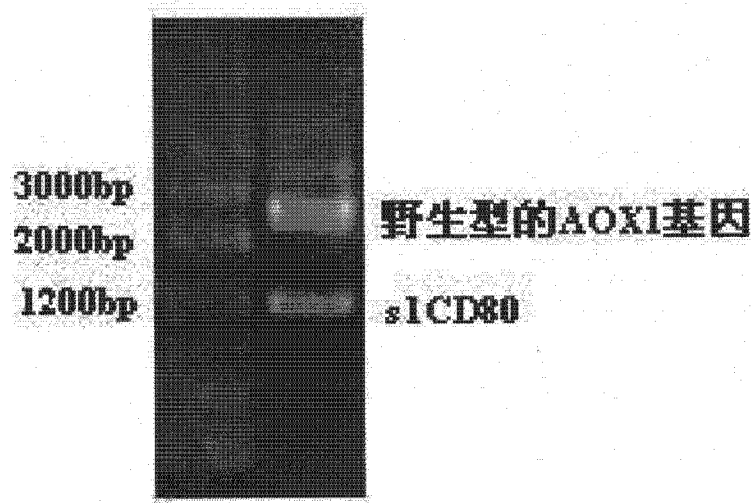


图 2

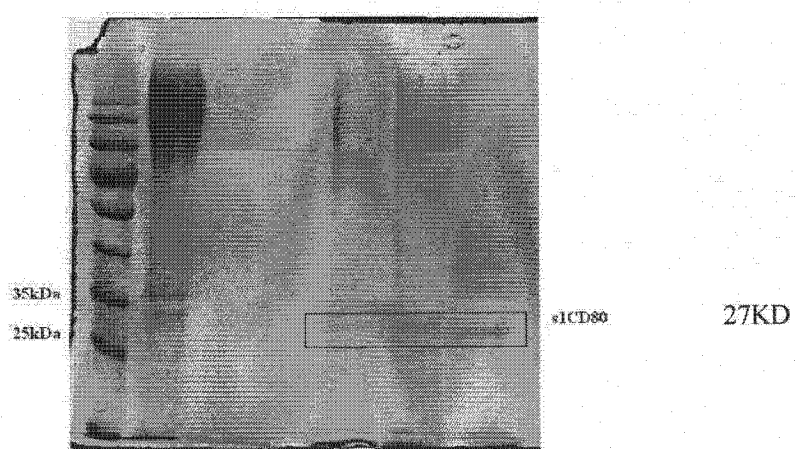


图 3

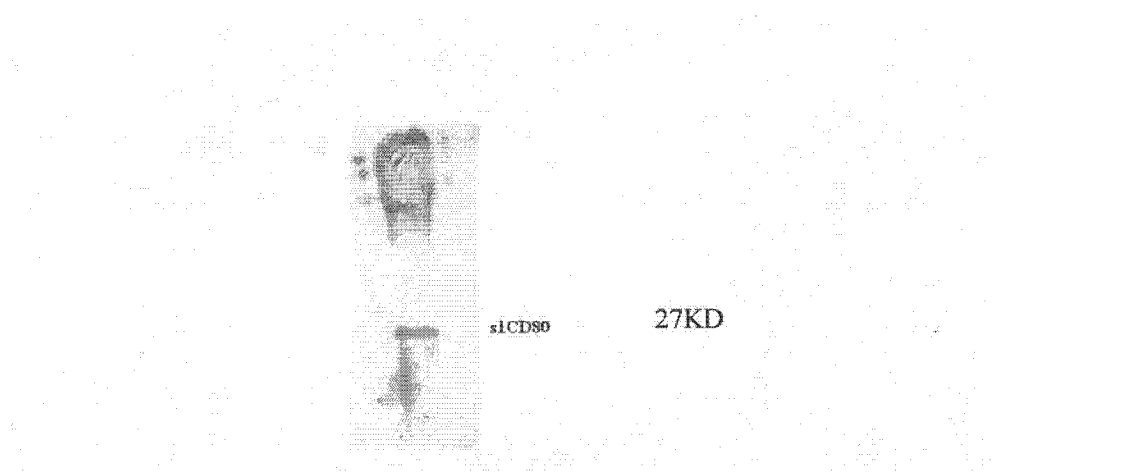


图 4

专利名称(译)	人s1CD80蛋白在毕赤酵母系统中的表达		
公开(公告)号	CN102732550A	公开(公告)日	2012-10-17
申请号	CN201110085003.6	申请日	2011-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	上海市普陀区中心医院		
申请(专利权)人(译)	上海市普陀区中心医院		
当前申请(专利权)人(译)	上海市普陀区中心医院		
[标]发明人	王雄彪 倪振华 陈清阁		
发明人	王雄彪 倪振华 陈清阁		
IPC分类号	C12N15/81 C12N1/19 C12N15/66 C12P21/02 C07K16/28 A61K39/395 A61K45/00 A61K38/17 A61P37/02 A61P37/06 A61P19/00 A61P19/04 A61P19/02 A61P21/04 A61P29/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P31/12 A61P35/00 G01N33/53 C12R1/84		
代理人(译)	杨林洁 东楠		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了包含人源可溶性s1CD80重组蛋白的重组载体，提供了经该载体转化的宿主细胞，本发明还提供了该重组载体所编码的重组蛋白的制备方法及其应用。

