

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02819540. X

G01N 33/53

C07H 21/04

C12N 15/63

C12N 5/06

C12N 5/08

C12N 5/10

[43] 公开日 2005 年 6 月 29 日

[11] 公开号 CN 1633598A

[22] 申请日 2002. 10. 3 [21] 申请号 02819540. X

[30] 优先权

[32] 2001. 10. 5 [33] US [31] 60/327,520

[86] 国际申请 PCT/US2002/031460 2002. 10. 3

[87] 国际公布 WO2003/031573 英 2003. 4. 17

[85] 进入国家阶段日期 2004. 4. 2

[71] 申请人 科勒制药股份公司

地址 德国兰格费尔德

[72] 发明人 格雷森·利甫福德

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 6 页 说明书 53 页 序列表 56 页
附图 8 页

[54] 发明名称 Toll 样受体 3 信号传导的激动剂和拮抗剂

[57] 摘要

本发明提供了用于鉴定、表征和优化通过 TLR3 起作用的免疫刺激化合物及其激动剂和拮抗剂的组合和方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于鉴定免疫刺激化合物的筛选方法，该方法包括：

将功能性 TLR3 与待测化合物进行接触，其条件为：在不存在该待测化合物的情况下，可以获得由 TLR3 信号传导通路所介导的阴性对照反应；

检测由 TLR3 信号传导通路所介导的测试反应；以及

当所述测试反应超过所述阴性对照反应时，确定该待测化合物是免疫刺激化合物。

2. 一种用于鉴定免疫刺激化合物的筛选方法，该方法包括：

将功能性 TLR3 与待测化合物进行接触，其条件为：在参比免疫刺激化合物存在时，可以获得由 TLR3 信号传导通路所介导的参比反应；

检测由 TLR3 信号传导通路所介导的测试反应；以及

当所述测试反应等于或超过所述参比反应时，确定该待测化合物是免疫刺激化合物。

3. 一种筛选方法，用于鉴定调节 TLR3 信号传导活性的化合物，该方法包括：

将功能性 TLR3 与待测化合物以及参比免疫刺激化合物进行接触，其条件为：在所述参比免疫刺激化合物单独存在的情况下，可以获得由 TLR3 信号传导通路所介导的参比反应；

检测由 TLR3 信号传导通路所介导的测试 - 参比反应；

当所述测试 - 参比反应超过所述参比反应时，确定该待测化合物是 TLR3 信号传导活性的激动剂；以及

当所述参比反应超过所述测试 - 参比反应时，确定该待测化合物是 TLR3 信号传导活性的拮抗剂。

4. 一种筛选方法，用于鉴定免疫刺激化合物的物种特异性，该方法包括：

当第一个物种的功能性 TLR3 与待测化合物进行接触时，测定由 TLR3 信号传导通路所介导的第一个物种特异性的反应；

当第二个物种的功能性 TLR3 与所述待测化合物进行接触时，测定由 TLR3 信号传导通路所介导的第二个物种特异性的反应；以及

对所述第一个物种特异性反应和所述第二个物种特异性反应进行比较。

5. 如权利要求 1-4 之一所述的方法，其中，所述的筛选方法针对多个待测化合物进行。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其中，所述由 TLR3 信号传导通路所介导的反应被定量测定。
7. 如权利要求 1-4 之一所述的方法，其中，所述的功能性 TLR3 在细胞中表达。
8. 如权利要求 7 所述的方法，其中，所述的细胞是天然地表达功能性 TLR3 的分离的哺乳动物细胞。

9. 如权利要求 7 所述的方法, 其中, 所述的细胞是不能天然地表达功能性 TLR3 的分离的哺乳动物细胞, 并且所述细胞中含有 TLR3 的表达载体。
10. 如权利要求 9 所述的方法, 其中, 所述的细胞是人 293 成纤维细胞。
11. 如权利要求 7 所述的方法, 其中, 所述的细胞中包括表达载体, 所述表达载体中含有分离的核酸, 所述分离的核酸编码选自由如下成员所构成的组的报告基因构建物: 白细胞介素-6-荧光素酶 (IL-6-luc), IL-8-luc, IL-12 p40-luc, IL-12 p40- β -Gal, NF- κ B-luc, AP1-luc, IFN- α -luc, IFN- β -luc, RANTES-luc, TNF-luc, IP-10-luc, I-TAC-luc, 以及 ISRE-luc。
12. 如权利要求 11 所述的方法, 其中, 所述的报告基因构建物是 ISRE-luc。
13. 如权利要求 1-4 之一所述的方法, 其中, 所述的功能性 TLR3 是无细胞体系的一部分。
14. 如权利要求 1-4 之一所述的方法, 其中, 所述的功能性 TLR3 是其与非 TLR 蛋白所形成的复合物的一部分, 其中所述非 TLR 蛋白选自由如下成员所构成的组: MyD88、IL-1 受体相关激酶 1-3 (IRAK1, IRAK2, IRAK3)、肿瘤坏死因子受体相关因子 1-6 (TRAF1 - TRAF6)、I κ B、NF- κ B, MyD88-适配器-like (Mal)、含有 Toll-白细胞介素 1 受体 (TIR) 结构域的适配器蛋白 (TIRAP)、Tollip、Rac 及其功能性同源物及衍生物。
15. 如权利要求 14 所述的方法, 其中, 所述的非 TLR 蛋白中不包括 MyD88。

16. 如权利要求 2 或 3 所述的方法，其中，所述的参比免疫刺激化合物是核酸。
17. 如权利要求 16 所述的方法，其中，所述的核酸是 CpG 核酸。
18. 如权利要求 2 或 3 所述的方法，其中，所述的参比免疫刺激化合物是小分子。
19. 如权利要求 1-4 之一所述的方法，其中，所述的待测化合物是化合物组合化学库的一部分。
20. 如权利要求 1-4 之一所述的方法，其中，所述的待测化合物是核酸。
21. 如权利要求 20 所述的方法，其中，所述的核酸是 CpG 核酸。
22. 如权利要求 1-4 之一所述的方法，其中，所述的待测化合物是小分子。
23. 如权利要求 1-4 之一所述的方法，其中，所述的待测化合物是多肽。
24. 如权利要求 1-4 之一所述的方法，其中，所述由 TLR3 信号传导通路所介导的反应是报告基因的诱导，所述报告基因置于启动子反应元件的控制之下，所述启动子反应元件选自由如下成员所构成的组：ISRE, IL-6, IL-8, IL-12 p40, IFN- α , IFN- β , IFN- ω , RANTES, TNF, IP-10 以及 I-TAC。

25. 如权利要求 24 所述的方法, 其中, 所述的置于启动子反应元件控制之下的报告基因选自由如下成员所构成的组: ISRE-luc, IL-6-luc, IL-8-luc, IL-12 p40-luc, IL-12 p40- β -Gal, IFN- α -luc, IFN- β -luc, RANTES-luc, TNF-luc, IP-10-luc 以及 I-TAC-luc。
26. 如权利要求 25 所述的方法, 其中, 所述的置于启动子反应元件控制之下的报告基因是 ISRE-luc。
27. 如权利要求 24 所述的方法, 其中, 所述的报告基因选自由 IFN- α 1-luc 和 IFN- α 4-luc 构成的组。
28. 如权利要求 1-4 之一所述的方法, 其中, 所述的由 TLR3 信号传导通路所介导的反应选自由如下成员所构成的组: (a) 置于最小启动子控制之下的报告基因的诱导, 其中所述最小启动子可以对选自由 AP1、NF- κ B、ATF2、IRF3 和 IRF7 所构成的组的转录因子做出反应; (b) 趋化因子的分泌; 以及 (c) 细胞因子的分泌。
29. 如权利要求 28 所述的方法, 其中, 所述的由 TLR3 信号传导通路所介导的反应是报告基因的诱导, 其中所述报告基因选自由 AP1-luc 和 NF- κ B -luc 所构成的组。
30. 如权利要求 28 所述的方法, 其中, 所述的由 TLR3 信号传导通路所介导的反应是 1 型 IFN 的分泌。
31. 如权利要求 28 所述的方法, 其中, 所述的由 TLR3 信号传导通路所介导的反应是趋化因子的分泌, 其中所述趋化因子选自由 CCL5 (RANTES)、CXCL9 (Mig)、CXCL10 (IP-10)和 CXCL11 (I-TAC) 所构成的组。

-
- 32.** 如权利要求 1-3 之一所述的方法，其中，所述的将功能性 TLR3 与待测化合物相接触还包括：就每一个待测化合物而言，在多种浓度的每一种浓度上与待测化合物相接触。
- 33.** 如权利要求 1-3 之一所述的方法，其中，所述的检测是在接触后 6-12 小时进行的。
- 34.** 如权利要求 1-3 之一所述的方法，其中，所述的检测是在接触后 16-24 小时进行的。

Toll 样受体 3 信号传导的激动剂和拮抗剂

技术领域

本发明涉及通过 Toll 样受体 3 (TLR3) 的信号传导, 人们相信在天然免疫中涉及这种信号传导。更具体地说, 本发明涉及用于鉴定和表征 TLR3 配体、TLR3 信号传导激动剂以及 TLR3 信号传导拮抗剂的筛选方法。

背景技术

Toll 样受体 (TLRs) 是由至少十个高度保守的受体蛋白质 (TLR1 - TLR10) 构成的家族, 这些受体蛋白质识别病原体相关的分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, 简称为 PAMPs), 并且在天然免疫中扮演了重要的角色。作为前炎症白细胞介素 1 受体 (IL-1R) 家族的成员, TLRs 在其胞浆结构域上具有同源性, 它们的胞浆结构域被称为 Toll / IL-1R 同源 (TIR) 结构域。已经公布的 PCT 申请 PCT/US98/08979 以及 PCT/US01/16766。一般来讲, 由 TIRs 介导的细胞内信号传导机制似乎是相似的, 其中, 人们认为 MyD88 (Wesche H et al. (1997) *Immunity* 7: 837-47; Medzhitov R et al. (1998) *Mol Cell* 2: 253-8; Adachi O et al. (1998) *Immunity* 9: 143-50; Kawai T et al. (1999) *Immunity* 11: 115-22) 以及肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, 简称为 TRAF6; Cao Z et al. (1996) *Nature* 383: 443-6; Lomaga MA et al. (1999) *Genes Dev* 13: 1015-24) 具有重要作用。目前已经知道, 在 MyD88 和 TRAF6 之间的信号传导涉及丝氨酸 - 苏氨酸激酶 IL-1 受体相关

激酶 (IRAK) 家族, 至少包括 IRAK-1 和 IRAK-2. Muzio M et al. (1997) Science 278: 1612-5.

已经描述了很多, 但不是全部, TLRs 的配体。例如, 已经报道 TLR2 响应于肽聚糖和脂肽而进行信号传导 (signal)。Yoshimura A et al. (1999) J Immunol 163: 1-5; Brightbill HD et al. (1999) Science 285: 732-6; Aliprantis AO et al. (1999) Science 285: 736-9; Takeuchi O et al. (1999) Immunity 11: 443-51; Underhill DM et al. (1999) Nature 401: 811-5。已经报道 TLR4 响应于肽多糖 (LPS) 而进行信号传导。Hoshino K et al. (1999) J Immunol 162 : 3749-52; Poltorak A et al. (1998) Science 282: 2085-8; Medzhitov R et al. (1997) Nature 388: 394-7。已经报道细菌鞭毛蛋白是 TLR5 的天然配体。Hayashi F et al. (2001) Nature 410: 1099-1103。TLR6 与 TLR2 一起, 已经被报道响应于蛋白聚糖而进行信号传导。Ozinsky A et al. (2000) PNAS USA 97: 13766-71; Takeuchi O et al. (2001) Int Immunol 13: 933-40。最近报道, TLR9 是 CpG DNA 的受体。Hemmi H et al. (2000) Nature 408: 740-5。

发明内容

本发明提供了用于鉴定和表征化合物的方法和组合物, 其中, 所述化合物或者自身通过 Toll 样受体 3 (TLR3) 进行信号传导, 或者影响通过 TLR3 进行的信号传导。其自身通过 TLR3 进行信号传导的化合物据推测是免疫刺激性的 (immunostimulatory)。影响通过 TLR3 进行的信号传导的化合物包括 TLR3 信号传导活性 (signaling activity) 的激动剂和拮抗剂。本发明所提供的方法适用于高通量筛选, 因此促进了先前未知的 TLR3 信号传导活性的诱导剂、激动剂和拮抗剂的鉴定和表征 (identification and characterization)。

本发明的方法至少部分地依赖于评价 TLR3 信号传导活性的能力。根据本发明，我们意外地发现，报告基因构建物可以用于本发明的筛选试验中，在所述构建物中，报告基因被置于某些对 TLR3 信号传导活性敏感的启动子反应元件（promoter response element）控制之下。例如，根据本发明，我们意外地发现，置于干扰素特异性反应元件（interferon specific response element，简称为 ISRE）控制之下的报告基因对 TLR3 信号传导活性敏感。

根据本发明，我们还意外地发现，用于 TLR 配体的筛选试验以及其他涉及 TLR 信号传导活性的试验可以从下述变量中的至少一个变量的优化中受益：(a) 待测化合物和/或参比化合物；(b) 试验动力学；以及 (c) 报告基因的选择。试验数据的解释可能会受到这些变量中的每一个的影响。

本发明一方面提供了一种筛选方法，用于鉴定免疫刺激化合物。根据本发明这一方面的方法涉及如下步骤：(a) 将功能性 TLR3 与待测化合物进行接触，其条件为：在不存在该待测化合物的情况下，可以获得由 TLR3 信号传导通路所介导的阴性对照反应；(b) 检测由 TLR3 信号传导通路所介导的测试反应；以及 (c) 当所述测试反应超过阴性对照反应时，确定该待测化合物是免疫刺激化合物。在本发明的这一方面以及所有方面中，在一个实施方式中，所述筛选方法是对多个待测化合物进行的。根据本发明的这一方面以及所有方面，在一个实施方式中，待测化合物是化合物库中的成员，优选为化合物的组合化学库。在本发明的这一方面以及所有方面中，待测化合物优选为小分子、核酸、多肽、寡肽或脂类。在某些更加优选的实施方式中，待测化合物为小分子或核酸。在一个实施方式中，待测化合物是核酸，而且是 CpG 核酸。

本发明的另一个方面提供了一种筛选方法，用于鉴定免疫刺激化合物。根据本发明这一方面的方法涉及如下步骤：(a) 将功能性 TLR3 与待测化合物进行接触，其条件为：在参比免疫刺激化合物（reference immunostimulatory compound）存在时，可以获得由 TLR3 信号传导通路所介导的参比反应（reference response）；(b) 检测由 TLR3 信号传导通路所介导的测试反应；以及 (c) 当所述测试反应等于或超过参比反应时，确定该待测化合物是免疫刺激化合物。在本发明的这一方面以及其他方面中，参比免疫刺激化合物优选为小分子、核酸、多肽、寡肽或脂类。在一个实施方式中，参比免疫刺激化合物是 CpG 核酸。

本发明的又一个方面提供了一种筛选方法，用于鉴定调节 TLR3 信号传导（signaling）活性的化合物。根据本发明这一方面的方法涉及如下步骤：(a) 将功能性 TLR3 与待测化合物以及参比免疫刺激化合物进行接触，其条件为：在所述参比免疫刺激化合物单独存在的情况下，可以获得由 TLR3 信号传导通路所介导的参比反应；(b) 检测由 TLR3 信号传导通路所介导的测试 - 参比反应；(c) 当所述测试 - 参比反应超过所述参比反应时，确定该待测化合物是 TLR3 信号传导活性的激动剂；以及 (d) 当所述参比反应超过所述测试 - 参比反应时，确定该待测化合物是 TLR3 信号传导活性的拮抗剂。

本发明的再一个方面提供了一种筛选方法，用于鉴定免疫刺激化合物的物种特异性。根据本发明这一方面的方法涉及如下步骤：(a) 当第一个物种的功能性 TLR3 与待测化合物进行接触时，测定由 TLR3 信号传导通路所介导的第一个物种特异性的反应；(b) 当第二个物种的功能性 TLR3 与待测化合物进行接触时，测定由 TLR3 信号传导通路所介导的第二个物种特异性的反应；以及 (c) 对所述第一个物种特异性反应和所述第二个物种特异性反

应进行比较。在一个优选实施方式中，第一个物种的功能性 TLR3 是人 TLR3。在一个优选实施方式中，第一个物种的功能性 TLR3 是人 TLR3，第二个物种的功能性 TLR3 是小鼠 TLR3。

在本发明上述方面的优选实施方式中，由 TLR3 信号传导通路所介导的反应被定量测定。

在本发明上述方面的优选实施方式中，所述功能性 TLR3 在细胞中表达。例如，在一个实施方式中，所述的细胞是天然地表达功能性 TLR3 的分离的哺乳动物细胞。与此相应，在另一个实施方式中，所述的细胞是不能天然地表达功能性 TLR3 的分离的哺乳动物细胞，并且所述细胞中含有 TLR3 的表达载体。例如，在一个优选实施方式中，所述细胞是人 293 成纤维细胞。在另一些实施方式中，所述的功能性 TLR3 是无细胞体系 (cell-free system) 的一部分。

在本发明涉及表达功能性 TLR3 的细胞的实施方式中特别有用的是，其中包括对 TLR3 信号传导敏感的报告基因构建物的细胞。在一个实施方式中，所述细胞中包括表达载体，所述表达载体中含有分离的核酸，所述分离的核酸编码选自由如下成员所构成的组的报告基因构建物：核因子- κ B-荧光素酶 (NF- κ B-luc)，IFN-特异性反应元件-荧光素酶 (ISRE-luc)，白细胞介素-6-荧光素酶 (IL-6-luc)，白细胞介素 8-荧光素酶 (IL-8-luc)，白细胞介素 12 p40 亚基-荧光素酶 (IL-12 p40-luc)，白细胞介素 12 p40 亚基-beta 半乳糖苷酶 (IL-12 p40- β -Gal)，活化蛋白 1-荧光素酶 (AP1-luc)，干扰素 alpha-荧光素酶 (IFN- α -luc)，干扰素 beta-荧光素酶 (IFN- β -luc)，RANTES- 荧光素酶 (RANTES-luc)，肿瘤坏死因子 -荧光素酶 (TNF-luc)，IP-10-荧光素酶 (IP-10-luc)，以及干扰素可诱导的 T 细胞 alpha 趋化-荧光素酶 (interferon-inducible T cell alpha chemoattractant-luciferase) (I-TAC- luc)。

在根据本发明上述每一方面的一个实施方式中，所述功能性 TLR3 是其与非 TLR 蛋白所形成的复合物的一部分，其中，所述非 TLR 蛋白选自由如下成员所构成的组：MyD88、IL-1 受体相关激酶 1-3 (IRAK1, IRAK2, IRAK3)、肿瘤坏死因子受体相关因子 1-6 (TRAF1-TRAF6)、 $I\kappa B$ 、NF- κB 、MyD88-适配器-like (Mal)、含有 Toll-白细胞介素 1 受体 (TIR) 结构域的适配器蛋白 (TIRAP)、Tollip、Rac 及其功能性同源物及衍生物。在一个相关的实施方式中，功能性 TLR3 是其与上面所列出的非 TLR 蛋白所形成的复合物的一部分，但所述非 TLR 蛋白中不包括 MyD88。

根据本发明的上述每一方面，在一个实施方式中，所述由 TLR3 信号传导通路所介导的反应是报告基因的诱导，所述报告基因置于启动子反应元件的控制之下，所述启动子反应元件选自由如下成员所构成的组：ISRE, IL-6, IL-8, IL-12 p40, IFN- α , IFN- β , IFN- ω , RANTES, TNF, IP-10 以及 I-TAC。例如，在一个优选实施方式中，置于启动子反应元件控制之下的报告基因选自由如下成员所构成的组：ISRE-luc, IL-6-luc, IL-8-luc, IL-12 p40-luc, IL-12 p40- β -Gal, IFN- α -luc, IFN- β -luc, RANTES-luc, TNF-luc, IP-10-luc, 以及 I-TAC-luc。在一个优选实施方式中，置于启动子反应元件控制之下的报告基因是 ISRE-luc。在另一个优选实施方式中，所述报告基因选自由 IFN- α 1-luc 和 IFN- α 4-luc 构成的组。

在根据本发明上述每一方面的又一个实施方式中，所述由 TLR3 信号传导通路所介导的反应选自由如下成员所构成的组：
(a) 置于最小启动子控制之下的报告基因的诱导，其中所述最小启动子可以对选自由 AP1、NF- κB 、ATF2、IRF3 和 IRF7 所构成的组的转录因子做出反应；(b) 趋化因子的分泌；以及 (c) 细胞因子的分泌。例如，在一个优选实施方式中，所述由 TLR3 信号传导通路所介导的反应是报告基因的诱导，其中所述报告基因选自由 AP1-luc 和 NF- κB -luc 所构成的组。在另一个优选实施方式

中,所述由 TLR3 信号传导通路所介导的反应是 1 型 IFN 的分泌。在又一个优选实施方式中,所述由 TLR3 信号传导通路所介导的反应是趋化因子的分泌,所述趋化因子选自由 CCL5 (RANTES)、CXCL9 (Mig)、CXCL10 (IP-10)和 CXCL11 (I-TAC) 所构成的组。

本发明筛选方法的敏感度和解释可以被优化。这种优化涉及对下述成员的任何一个或其组合的正确选择: (a) 待测化合物和/或参比化合物的浓度, (b) 试验动力学; 以及 (c) 报告基因。因此,进一步根据本发明前三个方面中的任何一方面,在一个实施方式中,将功能性 TLR3 与待测化合物相接触时,就每一个待测化合物而言,还需要在多种浓度的每一种浓度上与待测化合物相接触。例如,可以在不同浓度时对每一个待测化合物进行评价,这些浓度通过 log 的增加 (log increments) 相区别。根据本发明上述方面中的任何一方面,在一个实施方式中,所述检测是在接触后 4-12 小时进行的,优选为 6-8 小时。类似地,在根据本发明上述方面中的任何一方面的又一个实施方式中,所述检测是在接触后 16-24 小时进行的。我们认为,在接触后 4-12 小时,优选为 6-8 小时,进行的检测,与在晚些时候进行的检测相比,其对相互作用亲和力的敏感度更高。在接触后 16-24 小时进行的检测被认为对受体/配体相互作用的稳定性和持续时间更为敏感。而且,由于某些报告基因构建物对某些 TLRs 的敏感度要比另外一些更高,因此,报告基因与 TLR 试验的正确匹配对于在对具体试验进行读数时提高信噪比而言很重要。

附图说明

本申请中所包括的某些实施例参考了附图或其他图形。应当理解,所参考的附图仅仅是说明性的,它们对于实施本申请所要求保护的发明而言并非必需。

图 1 是两幅匹配的柱状图，示出了 (A) NF- κ B 的诱导，以及 (B) 经人 TLR9 转染的 293 成纤维细胞在被暴露于各种刺激之后做出反应时所生产的 IL-8 的量，所述的刺激包括 CpG-ODN, GpC-ODN, LPS 以及培养基。

图 2 是一幅柱状图，示出了经鼠 TLR9 转染的 293 成纤维细胞在被暴露于各种刺激之后做出反应时所生产的 NF- κ B 的诱导，所述的刺激包括 CpG-ODN, 甲基化 CpG-ODN (Me-CpG-ODN), GpC-ODN, LPS 以及培养基。

图 3 是一系列凝胶图像，示出了在未经转染的对照 293 细胞、经 mTLR9 转染的 293 细胞 (293-mTLR9) 以及经 hTLR9 转染的 293 细胞 (293-hTLR9) 中对鼠 TLR9 (mTLR9)、人 TLR9 (hTLR9) 以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 所进行的反转录酶聚合酶链式反应 (RT-PCR) 试验的结果。

图 4 中示出了在稳定转染的 293-hTLR9 细胞中，各种刺激对 NF- κ B-luc 的诱导程度。

图 5 中示出了在稳定转染的 293-mTLR9 细胞中，各种刺激对 NF- κ B-luc 的诱导程度。

图 6 示出了反应的诱导倍数 (fold induction of response) 对浓度的函数，试验是针对一系列共四种相关的免疫刺激核酸进行的，这些核酸与经鼠 TLR9 和 NF- κ B-luc 稳定转染的人 293 成纤维细胞进行了接触。所列出的浓度对应于每种配体的 EC50。

图 7 示出了确定 EC50 的动力学，试验是针对一系列共五种免疫刺激核酸进行的，这些核酸与经鼠 TLR9 和 NF- κ B-luc 稳定转染的人 293 成纤维细胞进行了接触。

图 8 示出了确定 EC50 的动力学，试验是针对与图 7 相同的同一系列共五种免疫刺激核酸进行的，这些核酸与经人 TLR9 和 NF- κ B-luc 稳定转染的人 293 成纤维细胞进行了接触。

图 9 示出了最大活性（反应的诱导倍数）的动力学，试验是针对与图 7 相同的同一系列共五种免疫刺激核酸进行的，这些核酸与经鼠 TLR9 和 NF- κ B-luc 稳定转染的人 293 成纤维细胞进行了接触。

图 10 示出了最大活性（反应的诱导倍数）的动力学，试验是针对与图 7 相同的同一系列共五种免疫刺激核酸进行的，这些核酸与经人 TLR9 和 NF- κ B-luc 稳定转染的人 293 成纤维细胞进行了接触。

图 11 是一幅柱状图，示出了反应的诱导倍数，是通过将各种荧光素酶报告基因构建物 (NF- κ B-luc, IP-10-luc, RANTES-luc, ISRE-luc 以及 IL-8-luc) 与 TLR7, TLR8 以及 TLR9 结合使用而测定的，其中每种 TLR 都与特定的参比 TLR 配体相接触。

具体实施方式

本发明的某些方面提供了用于鉴定、表征以及优化免疫刺激化合物的筛选方法，其中，所述的免疫刺激化合物包括但不限于免疫刺激核酸以及免疫刺激小分子；本发明还提供了用于 TLR3 信号传导的激动剂和拮抗剂的鉴定和优化的试验。根据本发明的方法包括基于细胞的试验和不使用细胞的试验。在某些优选实施方式中，所述筛选方法以高通量的方式进行。所述方法可以用于对化合物库进行筛选，筛选中所针对的是这些化合物调节涉及 TLR3 信号传导的免疫活化的能力。

本发明一方面提供了一种筛选方法，用于鉴定免疫刺激化合物。根据本发明这一方面的方法涉及如下步骤：(a) 将功能性 TLR3 与待测化合物进行接触，其条件为：在不存在该待测化合物的情况下，可以获得由 TLR3 信号传导通路所介导的阴性对照反应；(b) 检测由 TLR3 信号传导通路所介导的测试反应；以及 (c) 当所述测试反应超过阴性对照反应时，确定该待测化合物是免疫刺激化合物。本发明的第二个方面提供了一种筛选方法，用于鉴定免疫刺激化合物。根据本发明这一方面的方法涉及如下步骤：(a) 将功能性 TLR3 与待测化合物进行接触，其条件为：在参比免疫刺激化合物存在时，可以获得由 TLR3 信号传导通路所介导的参比反应；(b) 检测由 TLR3 信号传导通路所介导的测试反应；以及 (c) 当所述测试反应等于或超过参比反应时，确定该待测化合物是免疫刺激化合物。应当理解，本发明这两个方面的不同之处在于，一种方法涉及将待测化合物与阴性对照进行比较，而一种方法涉及将待测化合物与阳性对照进行比较。

在本发明的这些方面以及其他方面中，TLR3 优选为哺乳动物 TLR3，例如人 TLR3 或小鼠 TLR3。此前已经描述过人 TLR3 和鼠 TLR3 的核苷酸序列以及氨基酸序列。人 TLR3 cDNA 的核苷酸序列可以根据 GenBank 入藏登记号 NM_003265 (SEQ ID NO : 1) 获得，由其所衍生的人 TLR3 的氨基酸序列包括 904 个氨基酸，可以根据 GenBank 入藏登记号 NP_003256 (SEQ ID NO : 2) 获得。鼠 TLR3 cDNA 的核苷酸序列可以根据 GenBank 入藏登记号 AF355152 (SEQ ID NO : 3) 获得，由其所衍生的鼠 TLR3 的氨基酸序列包括 905 个氨基酸，可以根据 GenBank 入藏登记号 AAK26117 (SEQ ID NO : 4) 获得。

此处所使用的术语“功能性 TLR3”是指与 TLR3 配体特异性结合并通过 Toll/白细胞介素-1 受体 (TIR) 结构域进行信号传

导的多肽，包括前面所描述的全长天然 TLR3 多肽。因此，除了全长天然 TLR3 多肽以外，功能性 TLR3 也指其等位基因突变体 (allelic variants)、融合蛋白以及截短型多肽衍生物，其前提条件是 该多肽与 TLR3 配体特异性结合并通过 TIR 结构域进行信号传导。在一个优选实施方式中，功能性 TLR3 包括人 TLR3 胞外结构域，其氨基酸序列由 SEQ ID NO:2 的氨基酸 38-707 提供。在另一个优选实施方式中，功能性 TLR3 包括鼠 TLR3 胞外结构域，其氨基酸序列由 SEQ ID NO:4 的氨基酸 39-708 提供。所述功能性 TLR3 最好能通过 TLR3 的 TIR 结构域进行信号传导。

在本发明这个方面以及其他方面的某些实施方式中，功能性 TLR3 在细胞中表达，或者是天然地，或者是人工地。在某些实施方式中，用于本发明的方法中的表达 TLR3 的细胞表达 TLR3，但不表达其他 TLR。或者，在某些实施方式中，用于本发明方法中的表达 TLR3 的细胞表达 TLR3 以及至少一种其他 TLR，例如 TLR7、TLR8 或 TLR9。在一个实施方式中，所述的细胞是天然地表达功能性 TLR3 的分离的哺乳动物细胞。已知的表达 TLR3 的细胞和组织包括树突状细胞 (DCs)、上皮内细胞 (intraepithelial cell) 以及胎盘。Muzio M et al. (2000) J Immunol 164 : 5998-6004; Cario E et al. (2000) Infect Immun 68: 7010-7; Rock FL et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:588-93。此处所使用的术语“分离的”，当用于指代细胞或化合物时，是指基本上不含在自然状态下通常与所述细胞或化合物相联的成分 (例如其他细胞、核酸、蛋白质、脂类、糖类或者体内系统)，或者基本上与所述成分相分离，并达到一定的程度，使之对于其预期用途来说是实用的和适当的。

在另一个实施方式中，所述细胞可以是在天然状态下不能表达 TLR3 的细胞，但可以通过人工引入 TLR3 的表达载体而使之能够表达 TLR3。缺乏 TLR3 的细胞系的实例包括但不限于：人 293 成纤维细胞 (ATCC CRL-1573) 以及 HEP-2 人上皮细胞

(ATCC CCL-23)。缺乏 TLR9 的细胞系的实例包括但不限于：人 293 成纤维细胞 (ATCC CRL-1573)、MonoMac-6、THP-1、U937、CHO 以及任何一种 TLR9 敲除的细胞系。所述细胞，不管其天然地表达 TLR3 还是人工地表达 TLR3，通常最好具有通过 TLR3 受体所启动的信号传导所要求的全部必需元件。例如，人们认为 TLR9 信号传导 (signaling) 在信号传导 (signal transduction) 的早期阶段需要适配器分子 MyD88。与此相反，TLR3 似乎并不需要 MyD88，但可能需要其他更为下游的因子，例如诱导有丝分裂素活化的蛋白质激酶 (mitogen-activated protein kinase, 简称为 MAPK) 的因子，以及 MAPK 下游因子。

当特别指明时，将特定的 TLR 引入到细胞或细胞系中，优选为通过短暂地或稳定地转染所述细胞或细胞系而完成，其中利用了可操作地连接于基因表达序列 (如本文中所述) 的编码 TLR 的核酸序列。例如，用于本发明方法中的通过人工诱导而表达 TLR3 的细胞，包括利用 TLR3 表达载体短暂转染或稳定转染的细胞。任何适用于短暂转染或稳定转染的方法均可用于该目的。

TLR3 的表达载体至少包括可操作地连接于基因表达序列的编码功能性 TLR3 多肽的核苷酸序列，其中，所述基因表达序列可以在真核或原核细胞内指导 TLR3 核酸的表达。“基因表达序列” (gene expression sequence) 是指有助于与其可操作连接的核酸的有效转录和翻译的任何调控核苷酸序列 (regulatory nucleotide sequence)，例如启动子序列或者启动子-增强子的结合。对于 TLR3 核酸而言，“基因表达序列”是指有助于与其可操作连接的 TLR3 核酸的有效转录和翻译的任何调控核苷酸序列，例如启动子序列或者启动子-增强子的结合。所述基因表达序列可以是，例如，哺乳动物启动子或病毒启动子，例如组成性或诱导性启动子。组成性哺乳动物启动子包括但不限于如下基因

的启动子：次黄嘌呤磷酸核糖转移酶（hypoxanthine phosphoribosyl transferase，简称为 HPRT）、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶， β -肌动蛋白启动子，以及其他组成性启动子。在真核细胞中发挥组成性功能的示例性病毒启动子包括：例如，来自猴病毒（例如 SV40）、乳头状瘤病毒、腺病毒、人类免疫缺陷病毒（HIV）、劳斯肉瘤病毒（Rous sarcoma virus, RSV）、细胞巨化病毒（CMV）、莫洛尼氏鼠白血病毒（Moloney murine leukemia virus, MMLV）的长末端重复区（long terminal repeats, LTR）以及其他反转录病毒的启动子，以及单纯疱疹病毒（herpes simplex virus）的胸腺嘧啶核苷激酶（thymidine kinase, TK）启动子。其他的组成性启动子对本领域普通技术人员来说是公知的。可以用作本发明基因表达序列的启动子也包括诱导性启动子（inducible promoter）。诱导性启动子在诱导剂存在时表达。例如，金属硫蛋白（metallothionein，简称 MT）启动子在某些金属离子存在时被诱导，从而促进转录和翻译。其他的诱导性启动子对本领域普通技术人员来说是公知的。

一般来讲，基因表达序列应当包括在转录和翻译的起始中分别涉及的必要的 5'不转录序列以及 5'不翻译序列，例如 TATA 框、加帽序列、CAAT 序列等。特别地，此类 5'不转录序列包括启动子区域，其中包括启动子序列，用于与其可操作连接的 TLR3 核酸的转录控制。如果希望的话，基因表达序列中也可以包括增强子序列或上游活化序列（activator sequence）。

一般来讲，如果核酸编码序列（nucleic acid coding sequence）和基因表达序列被共价连接，并使得核酸编码序列的转录和/或翻译被置于基因表达序列的影响或控制之下，则该核酸编码序列和基因表达序列被称为“可操作地连接”。因此，如果 TLR3 核酸序列和基因表达序列被共价连接，并使得 TLR3 编码序列的转录

和/或翻译被置于基因表达序列的影响或控制之下,则该 TLR3 核酸序列和基因表达序列被称为“可操作地连接”。如果希望将 TLR3 序列翻译为功能性蛋白质的话,那么,如果 5'基因表达序列启动子的诱导导致了 TLR3 序列的转录,并且如果这两个 DNA 序列之间的连接不会(1)引入移码突变,(2)干扰启动子区域指导 TLR3 序列转录的能力,(3)干扰相应 RNA 转录产物被翻译为蛋白质的能力,则上述两个 DNA 序列被称为“可操作地连接”。这样,如果基因表达序列能够导致该 TLR3 核酸序列的转录,从而使得所获得的转录产物可以被翻译为所希望的蛋白质或多肽,那么可以认为该基因表达序列被可操作地连接于 TLR3 核酸序列。

在某些实施方式中,构建了 TLR 表达载体,从而使得可以对两个不同的 TLRs,例如 TLR3 与第二个 TLR,进行串联表达(tandem expression)。当希望通过一次转化或转染而表达两种 TLRs 时,可以使用这种串联表达载体。或者,也可以组合使用 TLR3 表达载体和第二个表达载体,其中,构建第二个表达载体的目的是表达第二种 TLR。

筛选试验中可以使用多种可能的基于 TLR/IL-1R 信号传导通路的数据读取系统(readout system)中的任何一种。在一些优选实施方式中,用于筛选试验的数据读取系统是基于天然基因或者报告基因构建物的使用,其中,所述报告基因构建物是以转染或以其他方式人工引入的,可以对涉及 MyD88、TRAF、p38 和/或 ERK 的 TLR/IL-1R 信号传导通路作出反应。Häcker H et al. (1999) EMBO J 18 : 6973-82。这些通路活化了包括 κ B 激酶复合物以及 c-Jun N-末端激酶在内的激酶。因此,特别适用于所述试验的报告基因和报告基因构建物包括:例如,可操作地连接于对 NF- κ B 敏感的启动子的报告基因。此类启动子的实例包括但不限于下列

对象的启动子：NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、p40、CD80、CD86 以及 TNF- α 。可操作地连接于对 TLR 敏感的启动子的报告基因可以包括但不限于：酶（例如荧光素酶，碱性磷酸酶， β -半乳糖苷酶，氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 等），生物荧光标记（例如绿色荧光蛋白 (GFP, 美国专利 5,491,084) 等），表达于表面的分子（例如 CD25），分泌分子（例如 IL-8、IL-12 p40、TNF- α ）。在某些优选实施例中，所述报告基因选自 IL-8、TNF- α 、NF- κ B-荧光素酶 (NF- κ B-luc; Häcker H et al. (1999) EMBO J 18: 6973-82)、IL-12 p40-luc (Murphy TL et al. (1995) Mol Cell Biol 15: 5258-67) 以及 TNF-luc (Häcker H et al. (1999) EMBO J 18: 6973-82)。在依赖于酶活性读数的试验中，可以将底物 (substrate) 作为试验的一部分而提供，并且检测中可能会涉及对化学荧光、荧光、显色 (color development) 的测定，以及放射性标记、抗药性或其他酶活性标记的引入。在依赖于分子表面表达的试验中，可能通过使用流式细胞术 (FACS) 分析或功能性试验而完成检测。分泌分子的检测可以通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 或生物试验来完成。这些数据读取系统以及其他合适的的数据读取系统在本领域中是公知的，并且可以从商业上获得。

因此，在某些实施方式中，适用于本发明方法的表达功能性 TLR3 的细胞中含有表达载体，其中包括编码报告基因构建物的分离的核酸，所述报告基因构建物用于检测 TLR 信号传导。其中包括编码报告基因构建物（用于检测 TLR 信号传导）的分离的核酸的表达载体中，可以包括置于最小启动子 (minimal promoter) 控制之下的报告基因，所述最小启动子可以对某种转录因子做出反应，而本申请人相信，这种转录因子是由 TLR3 信号传导所活化的。此类最小启动子的实例包括但不限于下述基因的启动子：API, NF- κ B, ATF2, IRF3 以及 IRF7。在另一些实施方式中，其中包括编码报告基因构建物（用于检测 TLR 信号传导）

的分离的核酸的表达载体中，可以包括置于启动子反应元件（promoter response element）控制之下的报告基因，其中所述的启动子反应元件选自 IL-6, IL-8, IL-12 p40 亚基, 1 型 IFN, RANTES, TNF, IP-10, I-TAC 以及 ISRE。启动子反应元件一般存在多个拷贝，例如，以串联单元的形式存在。例如，用于本发明的 ISRE-荧光素酶报告基因构建物可以从 Stratagene (catalog no. 219092) 处获得，其中包括与荧光素酶报告基因上游 TATA 框相连的 5x ISRE 串联单元。正如本文的其他地方进一步讨论的那样，报告基因本身可以是任何适合于以本领域已知的方法进行检测的基因产品。此类检测方法可以包括：例如，检测自发或受激光发射、酶活性、可溶分子的表达、细胞表面分子的表达等。

如上所述，将功能性 TLR3 与待测化合物相接触，以便鉴定免疫刺激化合物。免疫刺激化合物是当与免疫细胞相接触时能够诱发免疫反应的天然或合成化合物。在本发明的方法中，免疫刺激化合物是指当其与表达功能性 TLR3 多肽的免疫细胞相接触时能够诱发免疫反应的天然或合成化合物。所述免疫反应最好是或涉及 TLR3 信号传导通路的活化。这样，通过本发明的方法所鉴定和表征的免疫刺激化合物特别地包括 TLR3 配体，也就是选择性地与 TLR3 相结合并诱导 TLR3 信号传导通路的化合物。一般来讲，免疫刺激化合物包括但不限于：核酸，包括寡聚核苷酸以及多聚核苷酸；寡肽；多肽；脂类，包括脂多糖；糖类，包括寡糖和多糖；以及小分子。相应地，“待测化合物”是指：核酸，包括寡聚核苷酸以及多聚核苷酸；寡肽；多肽；脂类，包括脂多糖；糖类，包括寡糖和多糖；以及小分子。待测化合物包括其生物学活性已知的化合物以及生物学活性未知的化合物。

“参比免疫刺激化合物”（reference immunostimulatory compound）是指当其与表达功能性 TLR 多肽的免疫细胞相接触

时能够特征性地诱发免疫反应的免疫刺激化合物。在本发明的筛选方法中，参比免疫刺激化合物是指当其与表达功能性 TLR3 多肽的免疫细胞相接触时能够特征性地诱发免疫反应的天然或合成化合物。所述免疫反应最好是或涉及 TLR3 信号传导通路的活化。因此，当参比免疫刺激化合物与功能性 TLR3 在适当条件下相接触时，将会特征性地诱发由 TLR3 信号传导通路所介导的参比反应。所述参比反应可以根据本文中所描述的任何一种方法进行测定。较为重要的是，参比免疫刺激化合物特别地包括按照本发明的任何一种方法而被鉴定为免疫刺激化合物的待测化合物。因此，参比免疫刺激化合物可以是：核酸，包括寡聚核苷酸以及多聚核苷酸；寡肽；多肽；脂类，包括脂多糖；糖类，包括寡糖和多糖；或者小分子。

小分子包括分子量小于约 1.5 kDa 的天然的、合成的以及半合成的有机化合物以及有机金属化合物。小分子的实例包括：大部分的药物、高分子材料的亚单元及其类似物和衍生物。

本文中所使用的术语“核酸”，当用于指代本发明的方法中所使用的待测化合物和参比化合物时，是指任何由两个或多个个别的核苷或核苷酸单元所构成的聚合物。通常来讲，个别的核苷或核苷酸单元包括下述中的任何一种或其组合：脱氧核糖核苷、核糖核苷、脱氧核糖核苷酸以及核糖核苷酸。核酸的个别核苷或核苷酸单元可以是天然的，也可以是非天然的。例如，个别的核苷酸单元可以包括脱氧腺苷、脱氧胞苷、脱氧鸟苷、胸腺嘧啶核苷以及尿嘧啶。除了天然的 2'-脱氧和 2'-羟基形式以外，个别的核苷也包括具有经修饰的碱基部分 (moieties) 和/或经修饰的糖部分的合成核苷，例如 Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90: 543-84 中所述。在个别的核苷或核苷酸单元之间的连接 (linkages) 可以是天然的，也可以是非天然的。例如，所述连接可以是磷酸二酯键、

硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、氨基磷酸酯键、肽键，以及本领域公知的适合于将相邻的核苷或核苷酸单元联结在一起的其他共价连接。核酸待测化合物和核酸参比化合物的大小通常在 3-4 个单元到数十个单元（例如 18-40 个单元）之间。

ISNAs 的经取代的嘌呤和嘧啶包括标准的嘌呤和嘧啶，例如胞嘧啶，以及碱基类似物，例如 C-5 丙炔取代的碱基。Wagner RW et al. (1996) Nat Biotechnol 14 : 840-4。嘌呤和嘧啶包括但不限于：腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、5-甲基胞嘧啶、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、次黄嘌呤以及其他天然或非天然的核酸碱基（nucleobase），取代及未取代的芳香部分（aromatic moieties）。

可以用作待测化合物的化合物的库可以从多个供应商处获得，这些化合物库可以通过本领域公知的技术（包括组合化学技术）制备并且可以订购。按照本发明的方法，可以对待测化合物的较大的库进行筛选，特别是与高通量筛选方法结合使用时，此类高通量筛选方法具体包括自动化多通道筛选方法（automated multichannel methods of screening）。较大的库中可能包括数百、数千、数万、数十万、甚至数百万的化合物。

因此，在某些优选实施方式中，可以通过引入例如基于阵列的试验系统以及至少一种自动化或半自动化步骤，而使得筛选待测化合物的方法可以在大尺度和高通量的水平上进行。例如，试验中可以使用多孔板（multiple-well plates），将细胞分散在多孔板的单个孔中，并通过适应于该多孔板几何形状的多孔加样设备（multiwell delivery devices）以系统方式添加试剂。适用于高通量筛选试验的手工多孔加样设备以及机器人多孔加样设备对本领域普通技术人员来说是公知的。可以对每一个孔或阵列元素进行安排，使其可以通过一对一的方式与特定的测试条件（例如待

测化合物)对应起来。也可以在该多孔阵列中读取数据,最好使用多孔板读数装置等。此类装置的实例对本领域普通技术人员来说是公知的,并且可以通过商业途径获得。样品和试剂的处理可以被自动化,以便进一步提高筛选试验的通量,从而使得可以在一天或一周之内进行数十、数百、数千甚至数百万的平行试验。完全自动化的系统对本领域普通技术人员来说是公知的,例如,用于合成化合物组合化学库(combinatorial library)的产生和分析方面的完全自动化的系统。可以参见美国专利 5,443,791 和 5,708,158。

本文中所使用的“CpG 核酸”或“CpG 免疫刺激核酸”是指含有至少一个未甲基化 CpG 二核苷酸(胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸序列,也就是“CpG DNA”,或者含有 5'胞嘧啶、3'鸟嘌呤并且二者通过磷酸键相连的 DNA)并活化免疫系统组成部分的核酸。整个 CpG 核酸可以都是未甲基化的,或者其中的某些部分可以是未甲基化的,但至少 5'CG 3'中的 C 必须得是未甲基化的。

在一个实施方式中,CpG 核酸至少通过如下式子表示:



其中, X_1 和 X_2 是核苷酸,N是任何核苷酸, N_1 和 N_2 分别为由约 0-25 个 N 所组成的核酸序列。在某些实施方式中, X_1 是腺嘌呤、鸟嘌呤或胸腺嘧啶,并且/或者 X_2 是胞嘧啶、腺嘌呤或胸腺嘧啶。在另一些实施方式中, X_1 是胞嘧啶,并且/或者 X_2 是鸟嘌呤。

按照本发明的 CpG 核酸的实例包括但不限于表 1 中所列的核酸序列。

表 1. 示例性的 CpG 核酸

AACGTTCT	
AAGCGAAAATGAAATTGACT	SEQ ID NO:39
ACCATGGACGAACTGTTTCCCCTC	SEQ ID NO:40
ACCATGGACGACCTGTTTCCCCTC	SEQ ID NO:41
ACCATGGACGAGCTGTTTCCCCTC	SEQ ID NO:42
ACCATGGACGATCTGTTTCCCCTC	SEQ ID NO:43
ACCATGGACGGTCTGTTTCCCCTC	SEQ ID NO:44
ACCATGGACGTA CTGTTTCCCCTC	SEQ ID NO:45
ACCATGGACGTTCTGTTTCCCCTC	SEQ ID NO:46
AGCGGGGGCGAGCGGGGGCG	SEQ ID NO:47
AGCTATGACGTTCCAAGG	SEQ ID NO:48
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC	SEQ ID NO:49
ATGACGTTCTGACGTT	SEQ ID NO:50
ATGGAAGGTCCAACGTTCTC	SEQ ID NO:51
ATGGAAGGTCCAGCGTTCTC	SEQ ID NO:52
ATGGACTCTCCAGCGTTCTC	SEQ ID NO:53
ATGGAGGCTCCATCGTTCTC	SEQ ID NO:54
CAACGTT	
CACGTTGAGGGGCAT	SEQ ID NO:55
CAGGCATAACGGTTCCG TAG	SEQ ID NO:56
CCAACGTT	
CTGATTTCCCCGAAATGATG	SEQ ID NO:57
GAGAACGATGGACCTTCCAT	SEQ ID NO:58
GAGAACGCTCCAGCACTGAT	SEQ ID NO:59
GAGAACGCTCGACCTTCCAT	SEQ ID NO:60
GAGAACGCTCGACCTTCGAT	SEQ ID NO:61
GAGAACGCTGGACCTTCCAT	SEQ ID NO:62
GATTGCCTGACGTCAGAGAG	SEQ ID NO:63
GCATGACGTTGAGCT	SEQ ID NO:64
GCGGCGGGCGGCGCGCGCCC	SEQ ID NO:65
GCGTGCGTTGTCGTTGTCGTT	SEQ ID NO:66
GCTAGACGTTAGCGT	SEQ ID NO:67
GCTAGACGTTAGTGT	SEQ ID NO:68
GCTAGATGTTAGCGT	SEQ ID NO:69
GCTTGATGACTCAGCCGGAA	SEQ ID NO:70
GGAATGACGTTCCCTGTG	SEQ ID NO:71
GGGGTCAACGTTGACGGGG	SEQ ID NO:72

GGGGTCAGTCTTGAC <u>CGGGG</u>	SEQ ID NO:73
GTCCATTTCC <u>CGTAAATCTT</u>	SEQ ID NO:74
GTC <u>GCT</u>	
GTC <u>GTT</u>	
TAC <u>CGCGTGCGACCCTCT</u>	SEQ ID NO:75
TCAAC <u>GTC</u>	
TCAAC <u>GTT</u>	
TCAG <u>GCT</u>	
TCAG <u>GCTGCGCC</u>	SEQ ID NO:76
TCAT <u>GAT</u>	
TCCAC <u>GACGTTTTTCGACGTT</u>	SEQ ID NO:77
TCCATAAC <u>GTTCCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:78
TCCATAG <u>GTTCCCTAGCGTT</u>	SEQ ID NO:79
TCCATCAC <u>GTCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:80
TCCATGAC <u>GTCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:81
TCCATGAC <u>GTCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO: 82
TCCATGAC <u>GTCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:83
TCCATGAC <u>GTTCCCTGACGTT</u>	SEQ ID NO:84
TCCATGAC <u>GTTCCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:18
TCCATGCC <u>GTCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:85
TCCATGCGT <u>GCGTGCGTTTT</u>	SEQ ID NO:86
TCCATGCGT <u>TGCGTTGCGTT</u>	SEQ ID NO:87
TCCATGGC <u>GTCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:88
TCCATGTC <u>GATCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:89
TCCATGTC <u>GCTCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:90
TCCATGTC <u>GTCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:91
TCCATGTC <u>GTCCTGCTGAT</u>	SEQ ID NO:92
TCCATGTC <u>GTCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:93
TCCATGTC <u>GTTCCCTGATGCT</u>	SEQ ID NO:94
TCCATGTC <u>GTTCCCTGTCGTT</u>	SEQ ID NO:95
TCCATGTC <u>GTTTTTTGTCGTT</u>	SEQ ID NO:96
TCCTGAC <u>GTTCCCTGACGTT</u>	SEQ ID NO:97
TCCTGTC <u>GTTCCCTGTCGTT</u>	SEQ ID NO:98
TCCTGTC <u>GTTCCCTTGTCGTT</u>	SEQ ID NO:99
TCCTGTC <u>GTTTTTTGTCGTT</u>	SEQ ID NO:100
TCCTTGTC <u>GTTCCCTGTCGTT</u>	SEQ ID NO:101
T <u>CGATCGGGGCGGGGCGAGC</u>	SEQ ID NO:102
T <u>CGTCGCTGTCTCCGCTTCTT</u>	SEQ ID NO:103

TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTGCC	SEQ ID NO:104
TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT	SEQ ID NO:105
TCGTCGCTGTTGTCGTTTCTT	SEQ ID NO:106
TCGTCGTCGTCGTT	SEQ ID NO:107
TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT	SEQ ID NO:108
TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT	SEQ ID NO:109
TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	SEQ ID NO:15
TCTCCAGCGCGCCAT	SEQ ID NO:110
TCTCCAGCGGGCGCAT	SEQ ID NO:111
TCTCCAGCGTGCGCCAT	SEQ ID NO:112
TCTTCGAA	
TGCAGATTGCGCAATCTGCA	SEQ ID NO:113
TGTCGCT	
TGTCGTT	
TGTCGTTGTCGTT	SEQ ID NO:114
TGTCGTTGTCGTTGTCGTT	SEQ ID NO: 115
TGTCGTTGTCGTTGTCGTTGTCGTT	SEQ ID NO:116
TGTCGTTTGTGCGTTTGTGCGTT	SEQ ID NO:117

本文中所使用的术语“由 TLR 信号传导通路所介导的反应”是指某一类反应，该反应是 TLR 和免疫刺激化合物之间相互作用的一个特征，其中，所述免疫刺激化合物诱发了通过 TLR 的信号传导事件(signaling events)。典型地，此类反应涉及 Toll / IL-1R 信号传导的常规元件，例如 MyD88、TRAF 以及 IRAK 分子，但是对于 TLR3 而言，MyD88 的作用并不像对其他的 TLR 家族成员那么明显。正如本文中所证明的，此类反应包括在特定启动子（例如 NF- κ B 启动子）控制下的基因的诱导，特定细胞因子水平的提高，特定趋化因子水平的提高等。在 NF- κ B 启动子控制下的基因可以是其中天然地包括 NF- κ B 启动子的基因，也可以是位于构建物中的基因，其中所述构建物中已插入 NF- κ B 启动子。其中天然地包括 NF- κ B 启动子的基因包括但不限于：IL-8、IL-12 p40、NF- κ B-luc、IL-12 p40-luc 以及 TNF-luc。细胞因子水平的提高可能是由于响应于 TLR - 免疫刺激化合物相互作用的细胞因子生产量增加、稳定性提高或者分泌增加。Th1 细胞因子包括

但不限于：IL-2、IFN- γ 以及IL-12。根据本发明，我们意外地发现，由于经 TLR3 信号传导通路的信号传导，启动子反应元件（promoter response element）ISRE 被直接活化，也就是说，不依赖于 IFN- γ 的生产。Th2 细胞因子包括但不限于：IL-4、IL-5 以及 IL-10。在本发明中特别重要的趋化因子包括但不限于：CCL5 (RANTES)、CXCL9 (Mig)、CXCL10 (IP-10) 以及 CXCL11 (I-TAC)。

本发明另一方面提供了一种筛选方法，用于鉴定调节 TLR3 信号传导活性的化合物。根据本发明这一方面的方法涉及如下步骤：(a) 将功能性 TLR3 与待测化合物以及参比免疫刺激化合物进行接触，其条件为：在所述参比免疫刺激化合物单独存在的情况下，可以获得由 TLR3 信号传导通路所介导的参比反应；(b) 检测由 TLR3 信号传导通路所介导的测试 - 参比反应；(c) 当所述测试 - 参比反应超过所述参比反应时，确定该待测化合物是 TLR3 信号传导活性的激动剂；以及 (d) 当所述参比反应超过所述测试 - 参比反应时，确定该待测化合物是 TLR3 信号传导活性的拮抗剂。测试 - 参比反应是指一种类型的测试反应，例如当待测化合物和参比免疫刺激化合物同时与 TLR3 相接触时所确定的测试反应。当一种待测化合物既不是 TLR3 信号传导活性的激动剂，也不是其拮抗剂时，所述测试 - 参比反应和所述参比反应之间是区别不开的。

本文中所使用的术语激动剂是指那些导致 TLR 对参比刺激的反应增强的化合物。相对于由参比刺激本身所引发的反应而言，所述增强的反应可以是增加的（additive）或者增效的（synergistic）。而且，激动剂可以直接或间接地导致反应的增强。因此，本文中所使用的术语 TLR3 信号传导活性的激动剂是指那些导致 TLR 对参比刺激的反应增强的化合物。

本文中所使用的术语拮抗剂是指那些导致 TLR 对参比刺激的反应减弱的化合物。而且，激动剂可以直接或间接地导致反应的减弱。因此，本文中所使用的术语 TLR3 信号传导活性的拮抗剂是指那些导致 TLR 对参比刺激的反应减弱的化合物。

除了对免疫刺激化合物、TLR3 信号传导激动剂以及 TLR3 信号传导拮抗剂的鉴定和表征以外，本发明的方法也可以对先导化合物进行优化。先导化合物的优化涉及本发明筛选方法的反复应用，而且还进一步包括在筛选的任一给定阶段或轮次中选择最佳候选物，然后在下一个筛选轮次中将其作为基准或参比。这后一个过程中也可以进一步包括：在选择和产生用于筛选的候选待测化合物时，选择有待修改的参数。例如，来自某一具体筛选轮次的先导化合物可以被用作发展更为集中的（focused）新待测化合物库的基础，其中所述的新待测化合物库用于下一个筛选轮次。

本发明另一方面提供了一种筛选方法，用于鉴定免疫刺激化合物的物种特异性。根据本发明这一方面的方法涉及如下步骤：(a) 当第一个物种的功能性 TLR3 与待测化合物进行接触时，测定由 TLR3 信号传导通路所介导的第一个物种特异性的反应；(b) 当第二个物种的功能性 TLR3 与待测化合物进行接触时，测定由 TLR3 信号传导通路所介导的第二个物种特异性的反应；以及 (c) 对所述第一个物种特异性反应和所述第二个物种特异性反应进行比较。

物种特异性 TLR（包括 TLR3）不限于人 TLR，但还可以包括来源于人或非人（non-human）来源的 TLR。非人来源的实例包括但不限于：鼠、大鼠、牛、狗、猫、绵羊、猪以及马。其他物种包括鸡以及鱼，例如水产业物种。

物种特异性 TLR (包括 TLR3) 也不限于天然 TLR 多肽。在某些实施方式中, TLR 可以是, 例如, 嵌合 TLR, 其中胞外结构域和胞浆结构域来自于其他物种的 TLR 多肽。如前所述, 此类嵌合 TLR 多肽可以包括例如人 TLR 胞外结构域和鼠 TLR 胞浆结构域, 其中的每一个结构域来源于每个物种的相应 TLR。在另外的一些实施例中, 此类嵌合 TLR 多肽可以包括由不同 TLR 拼接突变体或同种异型体 (splice variants or allotypes) 制造出来的嵌合体。可以用于本发明筛选方法的其他嵌合 TLR 多肽包括: 由第一种类型的 TLR (例如 TLR3) 和另一种类型的 TLR (例如 TLR7、TLR8 或 TLR9) 制造出来的嵌合体, 其中, 第二种类型的 TLR 和第一种类型的 TLR 可以来自同一物种或者不同物种。我们也考虑过另一种类型的嵌合多肽, 其中引入了来自两个以上多肽, 例如来自不同多肽来源的胞外结构域、跨膜结构域以及胞浆结构域, 的序列, 其前提是至少一个此类结构域来源于 TLR3 多肽。作为另一个实例, 我们也考虑过构建物, 例如包括一个 TLR3 的胞外结构域、另一个 TLR3 的胞内结构域以及非 TLR 的报告基因 (例如荧光素酶、GFP 等)。本领域普通技术人员知道应如何设计和制造编码此类嵌合 TLR 多肽的 DNA 序列。

根据本发明, 我们也已经发现, 基于 TLR 的筛选方法, 包括但不限于本文中所描述的基于 TLR3 的试验, 对参数例如待测化合物的浓度、待测化合物的稳定性、检测动力学以及报告基因的选择等较为敏感。可以对这些参数进行优化, 以便从给定的筛选试验中获得最多的信息。重要的是, 检测动力学似乎提供了信息类型, 例如相互作用亲和力以及相互作用的稳定性或持续时间, 的分离。例如, 在较早的时间点处进行的测定, 例如在 TLR 和待测化合物以及/或者参比化合物相接触 6-8 小时之后, 似乎反应了关于相互作用亲和力的更多信息, 多于在较晚的时间点处进行的测定, 例如在接触 16-24 小时或更长时间之后。此外, 虽然

NF- κ B 驱动的报告基因一般可以用在基于 TLR 的筛选试验中，就像本发明的其他报告基因一样，但是在某些情况下，选用不同于 NF- κ B 驱动的报告基因的报告基因可以提供更大的敏感性。例如，与 NF- κ B-luc 相比，IL-8-luc 报告基因对 TLR7 和 TLR8 的敏感性要显著大得多。因此，对报告基因的选择似乎是依赖于 TLR 的，但是与动力学和浓度有关的参数似乎是更加依赖于化合物的。因此，在实施本发明的筛选方法时，如果将对每种待测化合物通过至少两种浓度和两个时间点而获得的测定结果包括进来，那么可以预期本发明的方法将会被改善。通常至少会使用三种浓度，覆盖二到三个 log 量级的浓度范围 (log-fold range of concentrations)。在合适的情况下，当然可以利用更为精细的浓度范围，所述合适的情况例如基于早先进行的筛选结果而进行的筛选，而在所述早先进行的筛选中利用了更宽的初始浓度范围。

在参考下述实施例之后，对本发明的理解将会更为充分。但是，这些实施例的目的仅仅是解释本发明的某些实施方式，不应被解释为对本发明范围的限制。

实施例

实施例 1. 人 TLR3 (hTLR3) 和 鼠 TLR3 (mTLR3) 的表达载体

为了构建人 TLR3 的表达载体，我们根据从人 293 细胞中所获得的 cDNA，通过聚合酶链式反应 (PCR) 方法扩增人 TLR3 cDNA，所使用的引物为：5'-GAAACTCGAGCCACCATGAGACAGACTTTGCCTTGT ATCTAC-3' (正意, SEQ ID NO : 9)，以及 5'-GAAAGAATTCTTAA TGTACAGAGTTTTTGGATCCAAG-3' (反意, SEQ ID NO : 10)。在引物的 5' 末端引入了 Xho I 和 EcoRI

限制性内切酶位点，用于在后续步骤里向表达载体中进行克隆。将获得的扩增产物片段克隆至 pGEM-T Easy 载体中(Promega)，分离，利用 Xho I 和 EcoRI 限制性内切酶进行酶切，连接到 XhoI / EcoRI 消化的 pcDNA 3.1 表达载体(Invitrogen)中。对插入物进行全长测序，并将其翻译为蛋白质。该 cDNA 序列对应于所公开的 hTLR3 cDNA 序列，其 GenBank 入藏登记号 (accession no.) 为 NM_003265 (SEQ ID NO : 1)。开放阅读框编码长度为 904 个氨基酸的蛋白质，该蛋白质包含对应于 GenBank 入藏登记号 NP_003256 (SEQ ID NO : 2) 的序列。

表 2. 人 TRL3 的 cDNA 序列

(GenBank 入藏登记号为 NM_003265; SEQ ID NO : 1)

gogggccgct	cgacgaaatg	tctggatttg	gactaaagaa	aaaaggaaag	gctagcagtc	60
atccaacaga	atcatgagac	agactttgcc	ttgtatctac	ttttgggggg	gccttttgcc	120
ctttgggatg	ctgtgtgcat	cctccaccac	caagtgcact	gtagccatg	aagttgctga	180
ctgcagccac	ctgaagttga	ctcaggtacc	cgatgatcta	cccacaaaca	taacagtgtt	240
gaaccttacc	cataatcaac	tcagaagatt	accagccgcc	aacttcacaa	ggtatagcca	300
gctaactagc	ttggatgtag	gatttaacac	catctcaaaa	ctggagccag	aattgtgcca	360
gaaacttccc	atgttaaaag	ttttgaacct	ccagcacaat	gagctatctc	aactttctga	420
taaaaccttt	gccttctgca	cgaatttgac	tgaactccat	ctcatgtcca	actcaatcca	480
gaaaattaaa	aataatecct	ttgtcaagca	gaagaattta	atcacattag	atctgtctca	540
taatggcttg	tcatctacaa	aattaggaac	tcaggttcag	ctggaaaatc	tccaagagct	600
tctattatca	aacaataaaa	ttcaagcget	aaaaagtga	gaactggata	tctttgccaa	660
ttcatcttta	aaaaaattag	agttgtcacc	gaatcaaat	aaagagtttt	ctccagggtg	720
ttttcacgca	attggaagat	tatttggcct	ctttctgaac	aatgtccagc	tgggtcccag	780
ccttacagag	aagctatggt	tggaattagc	aaacacaagc	attcggaatc	tgtctctgag	840
taacagccag	ctgtccacca	ccagcaatac	aactttcttg	ggactaaagt	ggacaaatct	900
caactatgctc	gatctttcct	acaacaactt	aaatgtggtt	ggtaacgatt	cctttgcttg	960
gcttccacaa	ctagaatatt	tcttcctaga	gtataataat	atacagcatt	tgttttctca	1020
ctctttgcac	gggcttttca	atgtgaggta	cctgaatttg	aaacggtctt	ttactaaaca	1080
aagtatttcc	cttgcctcac	tccccaaagat	tgatgatttt	tcttttcagt	ggctaaaatg	1140
tttgagacac	cttaacatgg	aagataatga	tattccaggc	ataaaaagca	atatgttccac	1200
aggattgata	aacctgaaat	acttaagtct	atccaactcc	tttacaagtt	tgcgaacttt	1260
gacaaatgaa	acatttgtat	cacttgctca	ttctccctta	cacatactca	acctaaccac	1320

gaataaaatc	tcaaaaatag	agagtgatgc	tttctcttgg	ttgggccacc	tagaagtact	1380
tgacctgggc	cttaatgaaa	ttgggcaaga	actcacaggc	caggaatgga	gaggtctaga	1440
aaatatTTTT	gaaatctatc	tttctacaa	caagtacctg	cagctgacta	ggaactcctt	1500
tgccttggtc	ccaagccttc	aacgactgat	gctccgaagg	gtggccctta	aaaatgtgga	1560
tagctctcct	tcaccattcc	agcctcttcg	taacttgacc	attctggatc	taagcaacaa	1620
caacatagcc	aacataaatg	atgacatggt	ggagggtctt	gagaaactag	aaattctcga	1680
tttgcagcat	aacaacttag	cacggctctg	gaaacacgca	aacctgggtg	gtcccattta	1740
tttctaaag	ggtctgtctc	acctccacat	ccttaacttg	gagtccaacg	gctttgacga	1800
gatcccagtt	gaggtettca	aggatttatt	tgaactaaag	atcatcgatt	taggattgaa	1860
taatttaaac	acacttccag	catctgtctt	taataatcag	gtgtctctaa	agtcattgaa	1920
ccttcagaag	aatctcataa	catccgttga	gaagaagggt	ttcgggccag	ctttcaggaa	1980
cctgactgag	ttagatatgc	gctttaatcc	ctttgattgc	acgtgtgaaa	gtattgccctg	2040
gtttgttaat	tggattaacg	agaccatac	caacatccct	gagctgtcaa	gccactacct	2100
ttgcaacact	ccacctcact	atcatgggtt	cccagtgaga	ctttttgata	catcatcttg	2160
caaagacagt	gccccctttg	aactcttttt	catgatcaat	accaglatcc	tgttgatttt	2220
tatctttatt	gtacttctca	tccactttga	gggctggagg	atatcttttt	attggaatgt	2280
ttcagtacat	cgagttcttg	gtttcaaaaga	aatagacaga	cagacagaac	agtttgaata	2340
tgcagcatat	ataattcatg	cctataaaga	taaggattgg	gtctgggaac	atttctcttc	2400
aatggaaaag	gaagaccaat	ctctcaaatt	ttgtctggaa	gaaagggact	ttgaggeggg	2460
tgtttttgaa	ctagaagcaa	ttgttaacag	catcaaaaaga	agcagaaaaa	ttatTTTTgt	2520
tataacacac	catctattaa	aagaccatt	atgcaaaaaga	ttcaaggtag	atcatgcagt	2580
tcaacaagct	attgaacaaa	atctggattc	cattatattg	gttttccttg	aggagattcc	2640
agattataaa	ctgaaccatg	cactctgttt	gcaagagga	atgtttaaat	ctcactgcat	2700
cttgaactgg	ccagttcaga	aagaacggat	aggtgccttt	cgtcataaat	tgcaagtagc	2760
acttgatcc	aaaaactctg	tacattaaat	ttatTTTaaat	attcaattag	caaaggagaa	2820
actttctcaa	tttaaaaagt	tctatggcaa	atttaagttt	tccataaagg	tgttataatt	2880
tgtttattca	tatttgtaaa	tgattatatt	ctatcacaat	tacatctctt	ctaggaaaat	2940
gtgtctcctt	atttcaggcc	tatTTTTgac	aattgactta	atTTTaccca	aaataaaaca	3000
tataagcacg	caaaaaaaaa	aaaaaaaaa				3029

表3 人 TLR3 的氨基酸序列

(GenBank 入藏登记号 NP_003256; SEQ ID NO : 2)

MRQTLPCIYF	WGGLLPFGML	CASSTTKCTV	SHEVADCSHL	KLTQVPDDL	TNITVLNLTH	60
NQLRRLPAAN	FTRYSQLTSL	DVGFNTISKL	EPELCOQKLP	LKVLNLQHNE	LSQLSDKTFA	120
FCTNLTELHL	MSNSIQIKIN	NPFVKQKNLI	TLDSLHNGLS	STKLGTVQVQL	ENLQELLSN	180
NKIQALKSEE	LDIFANSSLK	KLELSSNQIK	EFSPGCFHAI	GRLFGLFLNN	VQLGPSLTEK	240
LCLELANTSI	RNLSLSNSQL	STTSNTTFLG	LKWTNLMLD	LSYNNLNVVG	NDSFAWLPQL	300
EYFFLEYNNI	QHLSHSLHG	LFNVRYLNLK	RSFTKQSISL	ASLPKIDDFS	FQWLKCLEHL	360
NMEDNDIPGI	KSNMFTGLIN	LKYLSSNSF	TSLRTLNET	FVSLAHSPLH	ILNLTKNKIS	420
KIESDAFSWL	GHLEVLDLGL	NEIGQELTQ	EWRGLENIFE	IYLSYNKYLQ	LTRNSFALVP	480
SLQRMLRRV	ALKNVDSPPS	PFQPLRNLI	LDLSNANNAN	INDDMLEGLE	KLEILDQLHN	540
NLARLWKHAN	PGGPIYFLKG	LSHLHILNLE	SNGFDEIPVE	VFKDLFELKI	IDLGLNNLNT	600
LPASVFNNQV	SLKSLNLQKN	LITSVEKKVF	GPAFRNLTEL	DMRFNPFDC	CESIAWVFNW	660
INETHTNIFE	LSSHLYCNTP	PHYHGFVRL	FDTSSCKDSA	PFLEFFMINT	SILLIFIFIV	720
LLIHFEGWRI	SFYWNVSVHR	VLGFKEIDRQ	TEQFEYAAYI	IHAYKDKDWV	WEHFSSMEKE	780
DQSLKFCLEE	RDFEAGVFEL	EAIVNSIKRS	RKIIFVITHH	LLKDPLCKRF	KVHHAVQQA	840
EQNLDSIILV	FLEEIPDYKL	NHALCLRRGM	FKSHCILNWP	VQKERIGAFR	HKLQVALGSK	900
NSVH						904

鼠 TLR3 (m TLR3) 的相应核苷酸序列和氨基酸序列是公知的。已经报道了 m TLR3 cDNA 的核苷酸序列, 其 GenBank 入藏登记号为 AF355152; m TLR3 的氨基酸序列也已经报道, 其 GenBank 入藏登记号为 AAK26117。

表4 鼠 TLR3 的 cDNA 序列

(GenBank 入藏登记号为 AF355152; SEQ ID NO : 3)

tagaatatga	tacagggatt	gcaccataa	tctgggctga	atcatgaaag	ggtgttctc	60
ttatctaagt	tactectttg	ggggactttt	gtccctatgg	attcttctgg	tgtcttccac	120
aaaccaatgc	actgtgagat	acaacgtagc	tgactgcagc	catttgaagc	taacacacat	180
acctgatgat	cttcccteta	acataacagt	gttgaatctt	actcacaacc	aactcagaag	240
attaccacct	accaacttta	caagatacag	ccaacttget	atcttggatg	caggatttaa	300
ctccattica	aaactggagc	cagaactgtg	caaatactc	cctttgttga	aagtattgaa	360
cctgcaacat	aatgagctct	ctcagatttc	tgatcaaacc	tttgtcttct	gcacgaacct	420
gacagaactc	gatctaattg	ctaactcaat	acacaaaatt	aaaagcaacc	ctttcaaaaa	480
ccagaagaat	ctaatcaaat	tagatttgc	tcataatggt	ttatcatcta	caaagttggg	540
aacggggggtc	caactggaga	acctccaaga	actgctctta	gcaaaaaata	aaatccttgc	600

gttgcgaagt	gaagaacttg	agtttcttgg	caattcttct	ttacgaaagt	tggaacttgtc	660
atcaaatcca	cttaaagagt	tctccccggg	gtgtttccag	acaattggca	agttatctgc	720
cctcctcttg	aacaacgccc	aactgaaccc	ccacctcaca	gagaagcttt	gctgggaact	780
ttcaaacaca	agcatccaga	atctctctct	ggctaacaac	cagctgctgg	ccaccagcga	840
gagcaacttc	tctgggctga	agtggacaaa	tctcaccag	ctcgatcttt	cctacaacaa	900
cctccatgat	gtcggcaacg	gttccttctc	ctatctccca	agcctgaggt	atctgtctct	960
ggagtacaac	aatatacagc	gtctgtcccc	tcgctctttt	tatggactct	ccaacctgag	1020
gtacctgagt	ttgaagcgag	catttactaa	gcaaagtggt	tcacttgctt	cacatcccaa	1080
cattgacgat	ttttcctttc	aatggttaaa	atatttgga	tatctcaaca	tggaatgaca	1140
taatattcca	agtacaaaa	gcaatacctt	cacgggattg	gtgagtctga	agtacctaag	1200
tctttccaaa	actttcacia	gtttgcaaac	tttaacaaat	gaaacatttg	tgtcacttgc	1260
tcattctccc	ttgctcactc	tcaacttaac	gaaaaatcac	atctcaaaaa	tagcaaatgg	1320
tactttctct	tggttaggcc	aactcaggat	acttgatctc	ggccttaatg	aaattgaaca	1380
aaaactcagc	ggccaggaat	ggagaggtct	gagaaatata	tttgagatct	acctatccta	1440
taacaaatac	ctccaactgt	ctaccagttc	ctttgcattg	gtccccagcc	ttcaagact	1500
gatgctcagg	agggtggccc	ttaaaaatgt	ggatatctcc	ccttcacctt	tcgcccctct	1560
tcgtaacttg	accattctgg	acttaagcaa	caacaacata	gccaacataa	atgaggactt	1620
gctggagggt	cttgagaatc	tagaaatcct	ggattttcag	cacaataact	tagccaggct	1680
ctggaaacgc	gcaaaccctg	gtgggtcccgt	taatttcttg	aaggggctgt	ctcacctcca	1740
catcttgaat	ttagagtcca	acggcttaga	tgaaatccca	gtcgggggtt	tcaagaactt	1800
attcgaacta	aagagcatca	atctaggact	gaataactta	aacaaacttg	aaccattcat	1860
ttttgatgac	cagacatctc	taaggctact	gaacctccag	aagaacctca	taacatctgt	1920
tgagaaggat	gttttcgggc	cgccttttca	aaacctgaac	agtttagata	tgcgcttcaa	1980
tccgttcgac	tgcacgtgtg	aaagtatttc	ctggtttggt	aactggatca	accagacca	2040
cactaatatc	ttlgagctgt	ccactcacta	cctctgtaac	actccacatc	attattatgg	2100
cttccccctg	aagcttttctg	atacatcact	ctgtaaagac	agegccccct	ttgaactcct	2160
cttcataatc	agcaccagta	tgctcctggt	ttttataact	gtggacttgc	tcattcacat	2220
cgagggtctgg	aggatctctt	tttactggaa	tgtttcagtg	catcggatc	ttggtttcaa	2280
ggaaatagac	acacaggctg	agcagtttga	atatacagcc	tacataatc	atgcccataa	2340
agacagagac	tggtctctgg	aacatttctc	cccaatggaa	gaacaagacc	aatctctcaa	2400
atthttgccta	gaagaaaggg	actttgaagc	agcgctcctt	ggacttgaag	caattgttaa	2460
tagcatcaaa	agaagccgaa	aaatcatttt	cgttatcaca	caccatttat	taaaagacct	2520
tctgtgcaga	agattcaagg	tacatcacgc	agttcagcaa	gctattgagc	aaaatctgga	2580
ttcaattata	ctgatttttc	tccagaatat	tccagattat	aaactaaacc	atgcactctg	2640
tttgcgaaga	ggaatgttta	aatctcattg	catcttgaac	tggccagttc	agaaagaacg	2700
gataaatgcc	tttcatcata	aattgcaagt	agcacttggg	tctcgggaatt	cagcacatta	2760
aactcatttg	aagatttggg	gtcggtaaag	ggatagatcc	aatttataaa	ggtccatcat	2820
gaatctaagt	tttacttgaa	agttttgtat	atthttttat	atgtatagat	gatgatatta	2880

```

catcacaatc caatctcagt ttgaaatat ttcggcttat ttcattgaca tctggtttat 2940
tcactccaaa taaacacatg ggcagttaaa aacatcctct attaatagat taccattaa 3000
ttcttgagggt gtatcacage tttaaagggt tttaaatatt tttatataaa taagactgag 3060
agttttataa atgtaatgtt ttaaaactcg agtcttactg tgtagctcag aaaggcctgg 3120
aaattaatat attagagagt catgtcttga acttatttat ctctgcctcc ctctgtctcc 3180
agagtgttgc ttttaagggc atgtagcacc acaccagct atgtacgtgt gggattttat 3240
aatgctcatt tttgagacgt ttatagaata aaagataatt gcttttatgg tataaggcta 3300
cttgaggtaa 3310

```

表 5 鼠 TLR3 的氨基酸序列

(GenBank 入藏登记号为 AAK26117 ; SEQ ID NO : 4)

MKGCSSYLMY	SFGGLLSLWI	LLVSSTNQCT	VRYNVADCSH	LKLTHIPDDL	PSNITVLNLT	60
HNQLRRLPPT	NFTRYSQLAI	LDAGFNSISK	LEPELCQILP	LLKVLNLQHN	ELSQISDQTF	120
VFCTNLTELD	LMSNSIHKIK	SNPFKNQKNL	IKLDLSHNGL	SSTKLGTGVQ	LENLQELLA	180
KNKILALRS	E ELEFLGNSSL	RKLDLSSNPL	KEFSPGCFQT	IGKLFALLN	NAQLNPHLTE	240
KLCWELSNTS	IQNLSLANNQ	LLATSESTFS	GLKWTNLTQL	DLSYNNLHDV	GNGSFSYLPS	300
LRYLSLEYNN	IQRLSPRSFY	GLSNLRYLSL	KRAFTKQSVS	LASHPNIDDF	SFQWLKYLEY	360
LNMDNNIPS	TKSNTFTGLV	SLKYLSLSKT	FTSLQTLTNE	TFVSLAHSPL	LTLNLTKNHI	420
SKIANGTFSW	LGQLRILDG	LNEIEQKLSG	QEWGRLRNIF	EIYLSYNKYL	QLSTSSFALV	480
PSLQRLMLRR	VALKNVDISP	SPFRPLRNLT	ILDLSNNNIA	NINEDLLEGL	ENLEILDFQH	540
NNLARLWKRA	NPGGPVNFLK	GLSHLHILNL	ESNGLDEIPV	GVFKNLFELK	SINLGLNNLN	600
KLEPFIFDDQ	TSLRSLNLQK	NLITSVEKDV	FGPPFQNLNS	LDMRFNPFDC	TCESISWFVN	660
WINQTHTNIF	ELSTHYLCNT	PHHYYGFLK	LFDTSCKDS	APFELLFIIS	TSMLLVFILV	720
VLLIHIEGWR	ISFYWNVSVH	RILGFKEIDT	QAEQFEYAY	IHAHKDRDW	VWEHFSPMEE	780
QDQSLKFCLE	ERDFEAGVLG	LEAIVNSIKR	SRKIIFVITH	HLLKDPLCRR	FKVHHAVQQA	840
IEQNLDIIL	IFLQNIPTYK	LNHALCLRRG	MFKSHCILNW	PVQKERINAF	HHKLQVALGS	900
RNSAH						905

实施例 2. IFN- α 4 报告基因载体的制备方法

在实施本发明时，可以使用多种报告基因载体（reporter vectors）。一部分报告基因载体可以从市面上购得，例如荧光素酶报告基因载体 pNF- κ B-Luc (Stratagene) 以及 pAP 1-Luc (Stratagene)。在这两种报告基因载体中，荧光素酶基因置于上游（5'）启动子区域的控制之下，所述启动子区域分别来源于 NF- κ B

或 AP 1 的基因组 DNA。其他的报告基因载体可以通过标准方法，利用所希望的启动子和含有适当报告基因的载体而构建出来，此处，适当报告基因的实例有荧光素酶、 β -半乳糖苷酶 (β -gal)、氯霉素乙酰转移酶 (CAT)，以及本领域普通技术人员公知的其他报告基因。下面是用于本发明的构建出来的报告基因的例子。

IFN- α 4 是一种即刻早期 1 型 IFN (an immediate-early type 1 IFN)。IFN- α 4 的 -620 到 +50 启动子区域的序列特异性 PCR 产物来源于人 293 细胞的基因组 DNA，并被克隆到 pGL3-Basic Vector (Promega) 的 *Sma*I 位点上。所获得的表达载体包括置于 IFN- α 4 上游 (5') -620 到 +50 启动子区域的控制之下的荧光素酶基因。IFN- α 4 的 -620 到 +50 启动子区域的序列为表 6 的 SEQ ID NO:11。

表 6. 人 IFN- α 4 的 -620 到 +50 启动子区域的核苷酸序列

(SEQ ID NO : 11)

agaaaaattt	taaaaaatta	ttcattcata	ttttaggag	ttttgaatga	ttggatatgt	60
aattatattc	atattattaa	tgtgtatcta	tatagatttt	tattttgcat	atgtactttg	120
atacaaaatt	tacatgaaca	aattacacta	aaagttattc	cacaaatata	cttatcaaat	180
taagttaa	gtcaatagct	tttaaaactta	aatttttagtt	taacttttct	gtcattcttt	240
actttgaa	aaaagagcaa	actttgtagt	ttttatctgt	gaagtagagg	tatacgtaat	300
atacataaat	agatatgcca	aatctgtggt	attaaaattt	catgaagatt	tcaattagaa	360
aaaaatacca	taaaaggctt	tgagtgagg	tgaaaaatag	gcaatgatga	aaaaaaatga	420
aaaacttttt	aaacacatgt	agagagtgcg	taaagaaagc	aaaaacagag	atagaaagta	480
caactagga	atttagaaaa	tggaattag	tatggttact	atttaagacc	tatgcacaga	540
gcaaagtctt	cagaaaacct	agaggccgaa	gttcaagggt	atccatctca	agtagcctag	600
caatatttgc	aacatcccaa	tgccctgtc	cttttcttta	ctgatggccg	tgctggtgct	660
cagctacaaa						670

实施例 3. IFN- α 1 报告基因载体的制备方法

IFN- α 1 是一种晚期 1 型 IFN (a late type 1 IFN)。IFN- α 1 的 -140 到 +9 启动子区域的序列特异性 PCR 产物来源于人 293 细胞的基因组 DNA, 并被克隆到 pGL3-Basic Vector (Promega) 的 *Sma*I 位点上。所获得的表达载体包括置于 IFN- α 1 上游(5')-140 到 +9 启动子区域的控制之下的荧光素酶基因。

实施例 4. IFN- β 报告基因载体的制备方法

IFN- β 是一种即刻早期 1 型 IFN。IFN- β 的 -280 到 +20 启动子区域来源于 pUC β 26 载体 (Algarté M et al. (1999) *J Virol* 73 (4): 2694-702), 其中采用了在 *Eco*RI 和 *Taq*I 位点上进行限制性酶切。300 bp 的限制性酶切片段通过 Klenow 酶填充, 并被克隆到 *Nhe*I 消化并填充的 pGL3 - Basic Vector (Promega) 中。所获得的表达载体包括置于 IFN- β 上游 (5') - 280 到 +20 启动子区域的控制之下的荧光素酶基因。IFN- β 的 -280 到 +20 启动子区域的序列为表 7 中的 SEQ ID NO : 12。

表 7. 人 IFN- β 的 -280 到 +20 启动子区域的核苷酸序列
(SEQ ID NO : 12)

ttctcaggtc	gtttgctttc	ctttgctttc	tccaagtct	tgttttacaa	tttgctttag	60
tcattcactg	aaactttaaa	aaacattaga	aaacctcaca	gtttgtaaat	ctttttccct	120
attatatata	tcataagata	ggagcttaaa	taaagagttt	tagaaactac	taaaatgtaa	180
atgacatagg	aaaactgaaa	gggagaagtg	aaagtgggaa	attcctctga	atagagagag	240
gaccatctca	tataaatagg	ccatacccac	ggagaaagga	cattctaact	gcaacctttc	300

实施例 4. RANTES 报告基因载体的制备方法

人们认为，趋化因子 RANTES 的转录至少部分地受 IRF3 和 NF- κ B 的调控。Lin R et al. (1999) J Mol Cell Biol 19 (2): 959-66; Genin P et al. (2000) J Immunol 164 : 5352-61。长度为 483 bp 的、包括 RANTES -397 到+5 启动子区域的序列特异性 PCR 产物来源于人 293 细胞的基因组 DNA, 利用 *Pst*I 进行限制性酶切, 并 HindIII (利用 Klenow 填充) 和 *Pst*I 位点 (填充) 而克隆到 pCAT-Basic Vector (Promega) 中。然后, 从所获得的 RANTES/氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 报告基因质粒中分离出 RANTES 的 -397 到+5 启动子区域, 在该过程中, 利用 BglII 和 Sail 进行限制性酶切, 利用 Klenow 酶进行填充, 并将其克隆到 pGL3-Basic Vector (Promega) 的 NheI 位点(利用 Klenow 填充)。所获得的表达载体包括置于 RANTES 上游 (5') -397 到+5 启动子区域的控制之下的荧光素酶基因。对插入序列 Genin P et al. (2000) J Immunol 164 : 5352-61 的-397 到+5 和 GenBank 入藏登记号 AB023652 (SEQ ID NO : 13) 进行的比较, 揭示了两个点删除(在 SEQ ID NO : 13 的 105 和 273 号位点), 这两个点删除没有形成新的限制性位点。RANTES -397 到+5 启动子区域的序列为表 8 中的 SEQ ID NO : 14。

表 8. 人 RANTES 的 -397 到+5 启动子区域的核苷酸序列 (SEQ ID NO : 14)

gatctgtaat	gaataagcag	gaactttgaa	gactcagtga	ctcagtgagt	aataaagact	60
cagtgacttc	tgatcctgtc	ctaactgcca	ctccttgttg	tccaagaaa	gcggcttcct	120
gctctctgag	gaggaccct	tcctggaag	gtaaaactaa	ggatgtcagc	agagaaattt	180
ttccaccatt	ggtgcttgg	caaagaggaa	actgatgagc	tcactctaga	tgagagagca	240
gtgagggaga	gacagagact	cgaatttccg	gagctatttc	agttttcttt	tccgttttgt	300
gcaatttcac	ttatgatacc	ggccaatgct	tggttgctat	tttgaaaact	ccccttaggg	360
gatgccctc	aactggccct	ataaagggcc	agcctgagct	g		401

表 9. GenBank 入藏登记号 AB023652 的核苷酸序列
(SEQ ID NO : 13)

agaaggcctt	acagtgagat	gggatcccag	tatttattga	gtttcctcat	tcataaaatg	60
gggataataa	tagtaaataa	gttgacacgc	gctaagacag	tggaatagtg	gctggcacag	120
ataagccctc	ggtaaattgt	agccaataat	gatagagtat	gctgtaagat	atctttctct	180
ccctctgctt	ctcaacaagt	ctctaataca	ttattccact	ttataaacia	ggaaatagaa	240
ctcaaagaca	ttaagcactt	ttcccaaagg	tcgcttagca	agtaaattggg	agagacccta	300
tgaccaggat	gaaagcaaga	aattcccaca	agaggactca	ttccaactca	tatcttgtga	360
aaaggttccc	aatgcccagc	tcagatcaac	tgccctcaatt	tacagtgtga	gtgtgctcac	420
ctcctttggg	gactgtatat	ccagaggacc	ctcctcaata	aaacacttta	taaataacat	480
ccttccatgg	atgagggaaa	ggaggtaaga	tctgtaatga	ataagcagga	actttgaaga	540
ctcagtgact	cagtgagtaa	taaagactca	gtgacttctg	atcctgtcct	aactgccact	600
ccttgttgtc	cccaagaaag	cggttctctg	ctctctgagg	aggaccctt	ccctggaagg	660
taaaactaag	gatgtcagca	gagaaatfff	tccaccattg	gtgcttggtc	aaagaggaaa	720
ctgatgagct	cactctagat	gagagagcag	tgaggagag	acagagactc	gaatttccgg	780
aggctatttc	agttttcttt	tccgttttgt	gcaatttcac	ttatgatacc	ggccaatgct	840
tggttgctat	tttgaaact	ccccttaggg	gatgcccctc	aactggccct	ataaagggcc	900
agcctgagct	gcagaggatt	cctgcagagg	atcaagacag	cacgtggacc	tcgcacagcc	960
tctcccacag	gtacatgaa	ggtctccgcg	gcagccctcg	ctgtcatcct	cattgctact	1020
gccctctgcg	c					1031

实施例 6. 人 IL-12 p40 报告基因载体的制备方法

制备了报告基因构建物，其中采用了来源于人 IL-12 p40 基因组 DNA 的截短型 (-250 到+30)和全长型 (-860 到+30)启动子区域。在一个报告基因构建物中，截短型 IL-12 p40 启动子以 KpnI-XhoI 插入物的形式被克隆到 p β gal- Basic (Promega)中。所获得的表达载体包括置于人 IL-12 p40 上游 (5') -250 到+30 启动子区域的控制之下的 β gal 基因。在第二个报告基因构建物中，全长型 IL-12 p40 启动子以 KpnI-XhoI 插入物的形式被克隆到 p β gal- Basic (Promega)中。所获得的表达载体包括置于人 IL-12 p40 上游 (5') -860 到+30 启动子区域的控制之下的 β gal 基因。在第三个报告基因构建物中，人 IL-12 p40 的截短型-250 到+30

启动子区域被克隆到 pGL3-Basic Vector (Promega)中。所获得的表达载体包括置于人 IL-12 p40 上游 (5') -250 到+30 启动子区域的控制之下的荧光素酶基因。在第四个报告基因构建物中, 人 IL-12 p40 的全长型 IL-12 p40 启动子被克隆到 pGL3-Basic Vector (Promega)中。所获得的表达载体包括置于人 IL-12 p40 上游 (5') -860 到+30 启动子区域的控制之下的荧光素酶基因。

实施例 7. 人 IL-6 报告基因载体的制备方法

制备了报告基因构建物, 其中采用了来源于人 IL-6 基因组 DNA 的-235 到+7 启动子区域。在一个报告基因构建物中, IL-6 启动子区域以 KpnI-XhoI 插入物的形式被克隆到 pGL3-Basic Vector (Promega)中。所获得的表达载体包括置于来源于人 IL-6 基因组 DNA 的上游 (5') -235 到+7 启动子区域控制之下的荧光素酶基因。

实施例 8. 人 IL-8 报告基因载体的制备方法

制备了报告基因构建物, 其中采用了来源于人 IL-8 基因组 DNA 的-546 到+44 以及截短型-133 到+44 启动子区域。Mukaida N et al. (1989) J Immunol 143 : 1366 -71。在每一个报告基因构建物中, IL-8 启动子区域以 KpnI-XhoI 插入物的形式被克隆到 pGL3-Basic Vector (Promega) 中。其中一种所获得的表达载体包括置于来源于人 IL-8 基因组 DNA 的上游 (5') -546 到+44 启动子区域控制之下的荧光素酶基因。另外一种所获得的表达载体包括置于来源于人 IL-8 基因组 DNA 的上游 (5') -133 到+44 启动子区域控制之下的荧光素酶基因。

实施例 9. 人 TLR3 和人 TLR9 的序列比较

人的 TLR3 和 TLR9 是同源蛋白质，它们在结构上具有不少共同之处。它们似乎都是跨膜蛋白质，具有一个胞外结构域和一个胞内结构域。共同特征包括信号序列和跨膜结构域。为大多数 TLRs 所共有的相似之处包括一个富含半胱氨酸的结构域和一个 TIR 结构域。大多数 TLRs 在其胞外结构域中包含富含亮氨酸的重复区 (LRR)。TLR3, TLR7, TLR8 和 TLR9 似乎具有相似的结构。下面示出了 TLR3 和 TLR9 亮氨酸重复区的规律性。这四种 TLRs 可以通过一个结构松散的铰链区而被分为两个胞外亚结构域 (extracellular subdomains)。TLR7、TLR8 和 TLR9 在结构域 1 上具有 14 LRR，在结构域 2 上具有 12 LRR。TLR9 是一种公知的核酸结合剂，可以与 CpG-DNA 发生相互作用。已经有人怀疑 TLR7 和 TLR8 也很有可能与核酸发生相互作用。TLR3 在结构域 1 上具有相似的 11 LRR，在结构域 2 上具有 12 LRR，但是缺少 TLR7、TLR8 和 TLR9 所共有的最初的三个重复区。基于结构上的考虑，假定 TLR3 与核酸或类似结构有相互作用。

TLR3 的结构不同于 TLR7、TLR8 和 TLR9，这种不同表现在一种有趣的特性上。参见表 13，在 TIR 结构域内，已经表明脯氨酸 (以粗体示出) 对 MyD88 的作用来说是必需的。TLR9 需要 MyD88 以便在 NF- κ B 的活化中传导信号。TLR7 和 TLR8 也都含有该脯氨酸。但是，TLR3 在该位点上却具有一个丙氨酸 (也以粗体示出)。申请人相信，这种差别可能不允许 MyD88 与 TLR3 发生相互作用，从而产生一个改变了的 (例如，与 TLR9 相比) 信号传导模式。

表 10. hTLR9 (SEQ ID NO : 6) 和
hTLR3 (SEQ ID NO :2)的序列比对

信号序列

hTLR9	MGFCRSALHPLSLLVQAIMLAMTLALGTLPAFLPCELQPHGLVNCNW	47
hTLR3	MRQTLPCIYFWGGLLPFGMLCASSTTKCTVSHEVADC	37

结构域 1 富含亮氨酸重复区

hTLR9	LFLKSVPHFMSMAAPRGNVTSLSLSSN	73
hTLR9	RIHHLHDSDF AHLPSLRHLNLKWN	97
hTLR9	CPPVGLSPMHFPCHMTIEPSTFLAVPTLEELNLSYN	133
hTLR9	NIMTVPALPKSLISLSLSHT	153
hTLR3	SHLKLTVQVPDDLPTNITVLNLTHN	61
hTLR9	NILMLDSASLAGLHALRFLFMDGN	177
hTLR3	QLRRLPAANFTRYSQLTSLDVGFN	85
hTLR9	CYYKNPCRQALEVAPGALLGLGNLTHLSLKYN	209
hTLR3	TISKLEPELCQKLPMLKVLNLQHN	109
hTLR9	NLTWPRNLPSSLEYLLLSYN	230
hTLR3	ELSQLSDKTFAFCTNLTELHLMSN	133
hTLR9	RIVKLAPEDLANLTALRVLDVGGN	254
hTLR3	SIQKIKNNPFVKQKNLITLDLSHN	157
hTLR9	<u>CRRCDHAPNPCMECPRHFPQLHPDTFSHLSRLEGLVLKDS</u>	294
hTLR3	GLSSTKLGTVQVQLENLQELLSNN	181
hTLR9	SLSWLNASWFRGLGNLRVLDLSEN	318
hTLR3	KIQALKSEELDIFANSSLKKLELSSN	207
hTLR9	FLYKCITKTKAFQGLTQLRKLNLSFN	344
hTLR3	QIKEFSPGCFHAIGRLFGLFLNNV	231

hTLR9	YQKRVSFAHLSLAPSFGLVALKELDMHGI	374
hTLR3	QLGPSLTEKLCLELANTSIRNLSLSNS	258
hTLR9	FFRSLDETTLRPLARLPMLQTLRLQMN	401
hTLR3	QLSTTSNTTFLGLKWTNLTMLDLSYN	284
hTLR9	FINQAQLGIFRAFPGLRYVDLSDN	425
hTLR3	NLNVVGNDSEAWLPQLEYFFLEYN	308
绞链区		
hTLR9	RISGASELTATMGEADGGEKVWLQPGDLAPAPV	458
hTLR3	NIQHLSHSLHGLFNVRYLNLKRSFTKQSLA	341
结构域 2 富含亮氨酸重复区		
hTLR9	DTPSSEDFRPNCSLNFNFTLDLSRN	482
hTLR3	SLPKIDDFSQWLKCLEHLNEMEDN	365
hTLR9	NLVTVQPEMFAQLSHLQCLRLSHN	506
hTLR3	DIPGIKSNMFTGLINLKYLSLSNS	389
hTLR9	CISQAVNGSQFLPLTGLQVLDLSHN	531
hTLR3	FTSLRSLTNETFVSLAHSPLHILNLTKN	417
hTLR9	KLDLYHEHSFTELPRLEALDLSYN	555
hTLR3	KISKIESDAFSWLGHLEVLDLGLN	441
hTLR9	SQPFGMQGVGHNFVVAHLRTRLRHLSLAHN	585
hTLR3	EIQELTGQEWGLENIFEIYLSYN	466
hTLR9	NIHSQVSQQLCSTSLRALDFSGN	608
hTLR3	KYLQLTRNSFALVPSLQRLMLRRV	490
hTLR9	ALGHMWAEGDLYLHFFQGLSGLIWLDSLQN	638
hTLR3	ALKNVDSSPSPFQPLRNLTILDLSNN	516
hTLR9	RLHTLLPQTLRNLPKSLQVLRRLRDN	663
hTLR3	NIANINDDMLEGLEKLEILDQLQN	540

hTLR9	YLAFKWWSLHFLPKLEVLDLAGN	687
hTLR3	NLARLWKHANPGGPIYFLKGLSHLHILNLESN	572
hTLR9	QLKALTNGSLPAGTRLRRLDVSCN	711
hTLR3	GFDEIPVEVFKDLFELKIIDLGLN	596
hTLR9	SISFVAPGFFSKAKELRELNLSAN	735
hTLR3	NLNTLPASVFNNQVSLKSLNLQKN	620
hTLR9	ALKTVDHSWFGPLASALQILDVSAN	760
hTLR3	LITSVEKKVFGPAFRNLTELDMRFN	645

富含半胱氨酸结构域

hTLR9	PLHCACG**AAFMDLLEVQAAVPGLPSRVKCGSPGQLQGLSIFAQD	805
hTLR3	PFDCTCESIAWFVNWINETHHTNIPELSSHYLCNTPPHYHGFPVRLFD	692
hTLR9	LRLCLDEALSWDCFA	820
hTLR3	TSSCKDSAPFELFFM	707

跨膜结构域

hTLR9	LSLLAVALGLGVPMLHHL	838
hTLR3	INTSILLIFIFIVLLIHF	725

TIR 结构域

hTLR9	CGWDLWYCFHLCLAWLPWRGRQSGRDEDALPYDAFWFDKTQSAVAD	885
hTLR3	EGWRISFYWNVSVHRVLGFKEIDRQTEQFE*YAAYIIHAYK***DKD	768
hTLR9	WVYNELRGQLEECRGRWALRLCLEERDWLPGKTLFENLWASVYGSRK	932
hTLR3	WVW***EHFSSMEKEDQSLKFCLEERDFEAGVFELEAIVNSIKRSRK	812
hTLR9	TLFVLAHTD*RVSGLLRASFLLAQQRLLEDKDVWLVLSPDGRRS	978
hTLR3	IIFVITHHLLKDPLCKRFKVVHAVQQAIEQNLDIILVFLEEIPDYK	859
hTLR9	***RYVRLRQRLCRQSVLLWPHQPSGQRSFWAQLGMALTRDNHHFYN	1022
hTLR3	LNHALCLRRGMFKSHCILNWPVQKERIGAFRHKLQVALGSKNSVH	904
hTLR9	RNFCQGPTAE	1032

实施例 10. 在 293 成纤维细胞中 TLR9 信号传导的重构

正在审查过程中的美国专利申请 09/954,987 以及相应的已公开的 PCT 申请 PCT/US01/29229 之中, 描述了鼠和人 TLR9 的克隆方法, 上述两项专利申请的申请日均为 2001 年 9 月 7 日, 在此以引用的方式将其内容包括在本文中。利用 EcoRI 位点, 将位于 pT-Adv vector (来自 Clonetech) 中的人 TLR9 cDNA 和鼠 TLR9 cDNA 分别克隆到表达载体 pcDNA3.1 (-) (来自 Invitrogen) 中。利用“功能获得”(gain of function) 试验, 有可能在对 CpG-DNA 不反应(non-responsive)的人 293 成纤维细胞(ATCC, CRL-1573)中重构人 TLR9 (hTLR9) 和鼠 TLR9 (mTLR9) 的信号传导。利用磷酸钙方法将上面所提到的表达载体转染到 293 成纤维细胞中。

表 11. 人 TLR9 的 cDNA 序列

(GenBank 入藏登记号 AF245704 ; SEQ ID NO : 5)

aggctggtat	aaaaatetta	cttcctctat	tctctgagcc	gctgctgccc	ctgtgggaag	60
ggacctcgag	tgtgaagcat	ccttcctgt	agctgctgtc	cagtctgccc	gccagacct	120
ctggagaagc	ccctgcccc	cagcatgggt	ttctgccgca	gcgccctgca	cccgtgtct	180
ctcctggtgc	aggccatcat	gctggccatg	accctggccc	tgggtacctt	gcctgccttc	240
ctacctgtg	agctccagcc	ccacggcctg	gtgaactgca	actggetgtt	cctgaagtct	300
gtgccccact	tctccatggc	agcaccctgt	ggcaatgtca	ccagccttc	cttgtcctcc	360
aaccgeatcc	accacctcca	tgattctgac	tttgcccacc	tgcccagcct	gcggcatctc	420
aacctcaagt	ggaactgccc	gccggttggc	ctcagcccca	tgcacttccc	ctgccacatg	480
accatcgagc	ccagcacctt	cttggetgtg	cccaccctgg	aagagctaaa	cctgagctac	540
aacaacatca	tgactgtgcc	tgcgetgccc	aatccctca	tatcctgtc	cctcagccat	600
accaacatcc	tgatgctaga	ctctgccagc	ctcgccggcc	tgcattgccct	gcgttctcta	660
ttcatggacg	gcaactgtta	ttacaagaac	cctgcaggc	aggcaactgga	ggtggccccg	720
ggtgccctcc	ttggcctggg	caacctcacc	cacctgtcac	tcaagtacaa	caacctcact	780
gtggtgcccc	gcaacctgcc	ttccagcctg	gagtatctgc	tgttgtccta	caaccgcatc	840
gtcaaactgg	cgctgagga	cctggccaat	ctgaccgccc	tgcgtgtgct	cgatgtgggc	900
ggaaattgcc	gccgctgcca	ccacgctccc	aaccctgca	tggagtgccc	tcgtcacttc	960
ccccagctac	atcccgatac	cttcagccac	ctgagcctgc	ttgaaggcct	ggtgttgaag	1020
gacagttctc	tctcctggct	gaatgccagt	tggttccgtg	ggctgggaaa	cctccagctg	1080
ctggacctga	gtgagaactt	cctctacaaa	tgcattcacta	aaaccaaggc	cttccagggc	1140

ctaacacagc	tgcgcaagct	taacctgtcc	ttcaattacc	aaaagagggt	gtcctttgcc	1200
cacctgtctc	tggccccctc	cttcgggagc	ctggtcgccc	tgaaggagct	ggacatgcac	1260
ggcatcttct	tccgctcact	cgatgagacc	acgctccggc	cactggcccc	cctgccccatg	1320
ctccagactc	tgcgtctgca	gatgaacttc	atcaaccagg	cccagctcgg	catcttcagg	1380
gccttccttg	gcctgcgcta	cgtggacctg	tcggacaacc	gcatcagcgg	agcttcggag	1440
ctgacagcca	ccatggggga	ggcagatgga	ggggagaagg	tctggctgca	gcctggggac	1500
cttgcctccg	ccccagtgga	cactcccagc	tctgaagact	tcaggcccaa	ctgcagcacc	1560
ctcaacttca	ccttgatct	gtcacggaac	aacctggtga	ccgtgcagcc	ggagatgttt	1620
gcccagctct	cgcacctgca	gtgcctgcgc	ctgagccaca	actgcatctc	gcaggcagtc	1680
aatggctccc	agttcctgcc	gctgaccggt	ctgcaggtgc	tagacctgtc	ccgcaataag	1740
ctggacctct	accacgagca	ctcattcacg	gagctaccgc	gactggaggc	cctggacctc	1800
agctacaaca	gccagccctt	tggcatgcag	ggcgtgggcc	acaacttcag	cttcgtggct	1860
cacctgcgca	ccctgcgcca	cctcagcctg	gcccacaaca	acatccacag	ccaagtgtcc	1920
cagcagctct	gcagtacgtc	gctgcgggcc	ctggacttca	gcggcaatgc	actgggccat	1980
atgtgggccc	agggagacct	ctatctgcac	ttcttccaag	gcctgagcgg	ttgatctgg	2040
ctggacttgt	cccagaaccg	cctgcacacc	ctcctgcccc	aaacctgcg	caacctcccc	2100
aagagcctac	aggtgctgcg	tctccgtgac	aattacctgg	ccttctttaa	gtggtggagc	2160
ctccacttcc	tgccccaaact	ggaagtctct	gacctggcag	gaaaccggct	gaaggccctg	2220
accaatggca	gctgacctgc	tggcaccg	ctccggaggc	tggatgtcag	ctgcaacagc	2280
atcagcttcg	tggcccccg	cttcttttcc	aaggccaagg	agctgcgaga	gctcaacctt	2340
agcgccaacg	ccctcaagac	agtggaccac	tcttggtttg	ggcccctggc	gagtgcctg	2400
caaatactag	atgtaagcgc	caacctctg	cactgcgcct	gtggggcggc	ctttatggac	2460
ttcctgctgg	aggtgcaggc	tgccgtgccc	ggtctgcccc	gccgggtgaa	gtgtggcagt	2520
ccgggccagc	tccagggcct	cagcatcttt	gcacaggacc	tgcgcctctg	cctggatgag	2580
gccctctcct	gggactgttt	cgcctctctg	ctgctggctg	tggctctggg	cctgggtgtg	2640
cccatgctgc	atcacctctg	tggctgggac	ctctggtact	gcttccacct	gtgcctggcc	2700
tggcttccct	ggcggggg	gcaaagtggg	cgagatgagg	atgccctgcc	ctacgatgcc	2760
ttcgtggtct	tcgacaaaac	gcagagcgca	gtggcagact	gggtgtacaa	cgagcttcgg	2820
gggcagctgg	aggagtgccg	tgggcgctgg	gcactccgcc	tgtgcctgga	ggaacgcgac	2880
tggctgcctg	gcaaaacct	ctttgagaac	ctgtgggcct	cggtctatgg	cagccgcaag	2940
acgctgtttg	tgctggccca	cacggaccgg	gtcagtggtc	tcttgcgcgc	cagcttctctg	3000
ctggcccagc	agcgcctgct	ggaggaccgc	aaggacgtcg	tggctgtggt	gatcctgagc	3060
cctgacggcc	gccgctcccc	ctacgtgcgg	ctgcgccagc	gcctctgccg	ccagagtgtc	3120
ctcctctggc	cccaccagcc	cagtggtcag	cgcagcttct	gggcccagct	gggcatggcc	3180
ctgaccaggg	acaaccacca	cttctataac	cggaacttct	gccagggacc	cacggccgaa	3240
tagccgtgag	ccggaatcct	gcacggtgcc	acctccacac	tcacctcacc	tctgcctgcc	3300
tggctctgacc	ctccccctgct	cgcctcctc	acccacacacc	tgacacagag	ca	3352

表 12. 人 TLR9 的氨基酸序列

(GenBank 入藏登记号 AAF78037 ; SEQ ID NO : 6)

MGFCRSALHP	LSELLVQAIML	AMTLALGTLF	AFLPCELQPH	GLVNCNWLFL	KSVPHFSMAA	60
PRGNVTSLSL	SSNRIHHLHD	SDF AHLPSLR	HLNLKWNCPP	VGLSPMHFPC	HMTIEPSTFL	120
AVPTLEELNL	SYNNIMTVPA	LPKSLISLSL	SHTNILMLDS	ASLAGLHALR	FLFMDGNCYY	180
KNPCRQALEV	APGALLGLGN	LTHLSLKYNN	LTVVPRNLPS	SLEYLLLSYN	RIVKLAPEDL	240
ANLTALRVLD	VGGNCRRCDH	APNPCMECPR	HFPQLHPDTF	SHLSRLEGLV	LKDSSLSWLN	300
ASWFRGLGNL	RVLDLSENFL	YKCITKTKAF	QGLTQLRKLN	LSFNYQKRVS	FAHLSLAPSF	360
GSLVALKELD	MHGIFFRSLD	ETTLRPLARL	PMLQTLRLQM	NFINQAQLGI	FRAFPGLRYV	420
DLSDNRISGA	SELTATMGEA	DGGEKVWLQP	GDLAPAPVDT	PSEDFRPNC	STLNFTLDLS	480
RNNLVTVQPE	MFAQLSHLQC	LRLSHNCISQ	AVNGSQFLPL	TGLQVLDLSR	NKLDLYHEHS	540
FTELPRLAL	DLSYNSQPFQ	MOGVGHNFSF	VAHLRTRLRHL	SLAHNNIHSQ	VSQQLCSTSL	600
RALDFSGNAL	GHMWAEGDLY	LHFFQGLSGL	IWLDSLQNR	HTLLPQTLRN	LPKSLQVLR	660
RDNYLAFFK	WWSLHFLPKLE	VLDLAGNRLK	ALTNGSLPAG	TRLRRLDVSC	NSISFVAPGF	720
FSKAKELREL	NLSANALKTV	DHSWFGPLAS	ALQILDVSAN	PLHCACGAAF	MDFLLEVQAA	780
VPGLPSRVKC	GSPGQLQGLS	IFAQDLRLCL	DEALSWDCFA	LSLLAVALGL	GVPMLHHLCG	840
WDLWYCFHLC	LAWLPWRGRQ	SGRDEDALPY	DAFVVFDKTQ	SAVADWVYNE	LRGQLEECRG	900
RWALRLCLEE	RDWLPGKTLF	ENLWASVYGS	RKTLFVLAHT	DRVSGLLRAS	FLLAQQRLL	960
DRKDVVVLVI	LSPDGRRSRY	VRLRQRLCRQ	SVLLWPHQPS	GQRSFWAQLG	MALTRDNHFF	1020
YNRNFCQGPT	AE					1032

表 13. 鼠 TLR9 的 cDNA 序列

(GenBank 入藏登记号 AF348140 ; SEQ ID NO : 7)

tgtcagaggg	agcctcgga	gaatcctcca	tetcccaaca	tggttctccg	tgaaggact	60
ctgeaccct	tgtccctcct	ggtacaggct	gcagtgtg	ctgagactct	ggccctgggt	120
accctgcctg	ccttctacc	ctgtgagctg	aagcctcatg	gcctggtgga	ctgcaattgg	180
ctgttctga	agtctgtacc	ccgtttctct	gcggcagcat	cctgctccaa	catcaccgc	240
ctctccttga	tetccaaccg	tatccaccac	ctgcacaact	ccgacttcgt	ccacctgtcc	300
aacctgcggc	agctgaacct	caagtggaac	tgtccacca	ctggccttag	cccctgcac	360
ttctcttgcc	acatgaccat	tgagcccaga	accttctg	ctatgcgtac	actggaggag	420
ctgaacctga	gctataatgg	tatcaccact	gtgccccgac	tgcccagctc	cctggtgaat	480
ctgagcctga	gccacaccaa	catcctggtt	ctagatgcta	acagcctcgc	cggcctatac	540
agcctgcg	ttctcttc at	ggacgggaac	tgtactaca	agaaccctg	cacaggagcg	600
gtgaaggtga	ccccaggcgc	cctcctgggc	ctgagcaatc	tcaccatct	gtctctgaag	660
tataacaacc	tcacaaaggt	gccccgcaa	ctgccccca	gcctggagta	cctcctggtg	720
tcctataacc	tcattgtcaa	gctggggcct	gaagacctgg	ccaatctgac	ctcccttcga	780
gtacttgatg	tggttgga	ttgccgtcgc	tgcgacctg	ccccaatcc	ctgtatagaa	840
tgtggccaaa	agtcctcca	cctgcacct	gagacctcc	atcacctgag	ccatctggaa	900

ggcctggtgc	tgaaggacag	ctctctccat	acactgaact	cttcttggtt	ccaaggtctg	960
gtcaacctct	cggtgctgga	cctaagcgag	aactttctct	atgaaagcat	caaccacacc	1020
aatgcctttc	agaacctaac	ccgcctgcgc	aagctcaacc	tgtccttcaa	ttaccgcaag	1080
aaggtatcct	ttgcccgcct	ccacctggca	agttecttca	agaacctggt	gtcactgcag	1140
gagctgaaca	tgaacggcat	cttcttccgc	tcgctcaaca	agtacacgct	cagatggctg	1200
gccgatctgc	ccaaactcca	cactctgcat	cttcaaatga	acttcatcaa	ccaggcacag	1260
ctcagcatct	ttggtagcct	ccgagccctt	cgctttgtgg	acttgtcaga	caatcgcctc	1320
agtgggcctt	caacgctgtc	agaagccacc	cctgaagagg	cagatgatgc	agagcaggag	1380
gagctgttgt	ctgcggatcc	tcaccagct	ccactgagca	cccctgcttc	taagaacttc	1440
atggacaggt	gtaagaactt	caagttcacc	atggacctgt	ctcggaaaca	cctggtgact	1500
atcaagccag	agatgtttgt	caatctctca	cgcttccagt	gtcttagcct	gagccacaac	1560
tccattgcac	aggctgtcaa	tggctctcag	ttcttgcgcg	tgactaatct	gcaggtgctg	1620
gacctgtccc	ataacaaact	ggacttgtac	cactggaaat	cgttcagtga	gctaccacag	1680
ttgcaggccc	tggacctgag	ctacaacagc	cagcccttta	gcatgaaggg	tataggccac	1740
aatttcagtt	ttgtggccca	tctgtccatg	ctacacagcc	ttagcctggc	acacaatgac	1800
attcataccc	gtgtgtcctc	acatctcaac	agcaactcag	tgaggtttct	tgacttcagc	1860
ggcaacggta	tgggccgcat	gtgggatgag	gggggccttt	atctccattt	ctccaaggc	1920
ctgagtggcc	tgctgaagct	ggacctgtct	caaataacc	tgcatactct	ccggccccag	1980
aaccttgaca	acctcccaa	gagcctgaag	ctgctgagcc	tccgagacaa	ctacctatct	2040
ttctttaact	ggaccagtct	gtccttctctg	cccaacctgg	aagtcctaga	cctggcaggc	2100
aaccagctaa	aggccctgac	caatggcacc	ctgcctaag	gcacctctct	ccagaaactg	2160
gatgtcagca	gcaacagtat	cgtctctgtg	gtcccagcct	tcttcgctct	ggcggctgag	2220
ctgaaagagg	tcaacctcag	ccacaacatt	ctcaagacgg	tggatcgctc	ctggtttggg	2280
cccattgtga	tgaacctgac	agttctagac	gtgagaagca	accctctgca	ctgtgcctgt	2340
ggggcagcct	tcgtagactt	actgttggag	gtgcagacca	aggtgcctgg	cctggctaata	2400
ggtgtgaagt	gtggcagccc	cgccagctg	cagggccgta	gcatcttcgc	acaggacctg	2460
cggctgtgcc	tggatgaggt	cctctcttgg	gactgctttg	gcctttcact	cttggctgtg	2520
gccgtgggca	tggtaggtgcc	tatactgcac	catctctgcg	gctgggacgt	ctggtactgt	2580
tttcatctgt	gctggcatg	gctacctttg	ctggcccga	gccgacgcag	cgcccaagct	2640
ctcccctatg	atgccttcgt	ggtgttcgat	aaggcacaga	gcgcagttgc	ggactgggtg	2700
tataacgagc	tgcggtgctg	gctggaggag	cggcgcggtc	gccgagccct	acgcttgtgt	2760
ctggaggacc	gagattggct	gcctggccag	acgctcttcg	agaacctctg	ggcttccatc	2820
tatgggagcc	gcaagactct	atttgtctg	gcccacacgg	accgcctcag	tggcctcctg	2880
cgcaccagct	tcctgctggc	tcagcagcgc	ctgttgaag	accgcaagga	cgtggtggtg	2940
ttggtgatcc	tgcgtccgga	tgccaccgc	tcccgctatg	tgcgactgcg	ccagcgtctc	3000
tgccgccaga	gtgtgctctt	ctggccccag	cagcccaacg	ggcagggggg	cttctgggcc	3060
cagctgagta	cagccctgac	tagggacaac	cgccacttct	ataaccagaa	cttctgccgg	3120
ggacctacag	cagaatagct	cagagcaaca	gctggaaaca	gctgcatctt	catgcctggt	3180
tcccgagttg	ctctgcctgc					3200

表 14. 鼠 TLR9 的氨基酸序列

(GenBank 入藏登记号 AAK29625 ; SEQ ID NO : 8)

MVLRRTLHP	LSELLVQAAVL	AETLALGTLP	AFLPCELKPH	GLVDCNWLFL	KSVPRFSAAA	60
SCSNITRLSL	ISNRIHHLHN	SDFVHLSNLR	QLNLKWNCPP	TGLSPLHFSC	HMTIEPRTFL	120
AMRTLEELNL	SYNGITTVPR	LPSSLVNLSL	SHTNILVLDA	NSLAGLYSLR	VLFMDGNCYYY	180
KNPCTGAVKV	TPGALLGLSN	LTHLSLKYNN	LTKVPRQLPP	SLEYLLVSYN	LIVKLGPEDL	240
ANLTSRLVLD	VGGNCRRCDH	APNPCIECGQ	KSLHLHPETF	HHLSHLEGLV	LKDSSLHTLN	300
SSWFQGLVNL	SVLDLSENFL	YESINHTNAF	QNLTRLRKLN	LSFNRYRKKVS	FARLHLASSF	360
KNLVSLQELN	MNGIFFRSLN	KYTLRWLADL	PKLHTLHLQM	NFINQAQLSI	FGTFRALRFV	420
DLSDNRISGP	STLSEATPEE	ADDAEQEELL	SADPHPAPLS	TPASKNFMDR	CKNFKFTMDL	480
SRNNLVTIKP	EMFVNLSRLQ	CLSLSHNSIA	QAVNGSQFLP	LTNLQVLDLS	HNKLDLYHWK	540
SFSELPQLQA	LDLSYNSQPF	SMKGIGHNFS	FVAHLSMLHS	LSLAHNDIHT	RVSSHLNSNS	600
VRFLDFSGNG	MGRMWDEGGL	YLHFFQGLSG	LLKLDLSQNN	LHILRPQNLD	NLPKSLKLLS	660
LRDNYLSFFN	WTSLSFLPNL	EVLDLAGNQL	KALTNGTLPN	GTLLQKLDVS	SNSIVSVVPA	720
FFALAVELKE	VNLSHNILKT	VDRSWFGPIV	MNLTVLDVRS	NPLHCACGAA	FVDLLLEVQT	780
KVPGLANGVK	CGSPGQLQGR	SIFAQDLRLC	LDEVLSWDCF	GLSLLAVAVG	MVVPILHHLIC	840
GWDVWYCFHL	CLAWLPLLAR	SRRSAQALPY	DAFVVFDKAQ	SAVADWVYNE	LRVRLEERRG	900
RRALRLCLED	RDWLPGQTLF	ENLWASIYGS	RKTLFVLAHT	DRVSGLLRTS	FLLAQQRLLLE	960
DRKDVVVLVI	LRPDAHRSRY	VRLRQRLCRQ	SVLFWPQQPN	GQGGFWAQLS	TALTRDNRHF	1020
YNQNFCRGPT	AE					1032

由于 NF- κ B 活化对于 IL-1/ TLR 信号传导通路而言具有重要作用 (Medzhitov R et al. (1998) Mol Cell 2 : 253 - 258 (1998); Muzio M et al. (1998) J Exp Med 187: 2097 - 101), 因此, 利用 hTLR9 对细胞进行转染, 或者利用 hTLR9 和 NF- κ B 驱动的荧光素酶报告基因构建物对细胞进行共转染。利用 hTLR9 和六倍 (six-times) 的 NF- κ B 驱动的荧光素酶报告基因构建物 (NF- κ B-luc, 由 Patrick Baeuerle 提供, 慕尼黑, 德国) 对人 293 成纤维细胞进行短暂的转染 (图 1A), 或者单独用 hTLR9 进行转染 (图 1B)。在用 CpG-ODN (2006, 2 μ M, TCGTCGTTTTGT CGTTTTGTCTGTT, SEQ ID NO : 15), GpC-ODN (2006-GC, 2 μ M, TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT, SEQ ID NO : 16), LPS (100 ng/ml) 或培养基刺激之后, 对 NF- κ B 的活化 (8h, 图 1A) 或 IL-8 的生产 (48h, 图 1B) 进行监控, 其中, NF- κ B 的活化是通过荧光素酶读数 (luciferase readout) 表示的, IL-8 的生产是通过 ELISA

测定的。结果是三次独立实验的代表。图 1 表明，表达 hTLR9 的细胞可以对 CpG-DNA 做出反应，但对 LPS 则不反应。

图 2 表明了 mTLR9 转染的同样的原理。利用 mTLR9 和 NF- κ B-luc 构建物对人 293 成纤维细胞进行短暂的转染（图 2）。在 IL-8 的生产方面获得了相似的数据（未示出）。因此，293 细胞中 TLR9（人或鼠）的表达导致了 CpG-DNA 刺激的功能获得，其中，所述 CpG-DNA 刺激与 hTLR4 对 LPS 的反应重构相似。

为了获得表达人 TLR9、鼠 TLR9 或带有 NF- κ B-luc 报告基因质粒的上述任何一种 TLR9 的稳定克隆，在 10 cm 平板（ 2×10^6 细胞/平板）上利用 16 μ g DNA 对 293 细胞进行转染，并利用 0.7 mg/ml 的 G418（PAA Laboratories GmbH, Colbe, 德国）进行选择。通过 RT-PCR 对克隆进行检测，看其是否表达 TLR9，例如图 3 所示。在用 ODN 刺激之后，也对克隆进行 IL-8 生产或 NF- κ B-荧光素酶活性的筛选。产生了四种不同类型的克隆。

293-hTLR9-luc: 表达人 TLR9 以及 6 倍的 NF- κ B-荧光素酶报告基因

293-mTLR9-luc: 表达鼠 TLR9 以及 6 倍的 NF- κ B-荧光素酶报告基因

293-hTLR9: 表达人 TLR9

293-mTLR9: 表达鼠 TLR9

图 4 证明了在用 CpG-ODN (2006, 2 μ M)、GpC-ODN (2006-GC, 2 μ M)、Me-CpG-ODN (2006 甲基化, 2 μ M ; TZGTZGTTTTGTZGTT TTGTZGTT, Z = 5-甲基胞苷, SEQ ID NO : 17)、LPS (100 ng/ml) 或培养基刺激之后，稳定的 293-hTLR9-luc 克隆的反应性

(responsiveness), 上述内容是通过监控 NF- κ B 的活化而测定的。利用 IL-8 的生产对稳定克隆 293-hTLR9 所进行的实验得到了相似的结果。也用 CpG-ODN (1668, 2 μ M; TCCATGACGTTTCCTGATGCT, SEQ ID NO : 18), GpC-ODN (1668-GC, 2 μ M; TCCATGAGCTTCCTGATGCT, SEQ ID NO : 19), Me-CpG-ODN (1668 甲基化, 2 μ M; TCCATGAZGTTTCCTGATGCT, Z = 5-甲基胞苷, SEQ ID NO:20), LPS (100 ng/ml) 或培养基刺激 293-mTLR9-luc, 通过监控 NF- κ B 的活化进行测定(图 5)。利用 IL-8 的生产对稳定克隆 293-mTLR9 所进行的实验得到了相似的结果。结果是至少二次独立实验的代表。这些结果表明, 可以利用 TLR9 对 CpG-DNA 不反应的细胞系进行稳定的遗传学补充, 使其变为可以通过模体特异性 (motif-specific) 方式对 CpG-DNA 做出反应。可以将这些细胞用于在多个物种中筛选由 TLR9 所驱动的天然免疫反应的理想配体。

实施例 11. 在 293 成纤维细胞中 TLR3 信号传导的重构

利用 EcoRI 位点, 将位于 pT-Adv vector (来自 Clontech) 中的人 TLR3 cDNA 和鼠 TLR3 cDNA 分别克隆到表达载体 pcDNA3.1 (-) (来自 Invitrogen) 中。利用磷酸钙法将前面所获得的表达载体转染到 CpG-DNA 不反应的人 293 成纤维细胞(ATCC, CRL-1573)中。利用“功能获得”试验, 有可能在 293 成纤维细胞中重构人 TLR3 (hTLR3) 和鼠 TLR3 (mTLR3) 的信号传导。

由于 NF- κ B 活化对于 IL-1/TLR 信号传导通路而言具有重要作用 (Medzhitov R et al. (1998) Mol Cell 2 : 253 - 258 (1998); Muzio M et al. (1998) J Exp Med 187: 2097 - 101), 因此, 在第一组实验中, 单独利用 hTLR3 对人 293 成纤维细胞进行转染, 或者利用 hTLR3 和 NF- κ B 驱动的荧光素酶报告基因构建物对人 293 成纤维细胞进行共转染。

相似地，在第二组实验中，单独利用 hTLR3 对 293 成纤维细胞进行转染，或者利用 hTLR3 和 NF- α 4 驱动的荧光素酶报告基因构建物对 293 成纤维细胞进行共转染（在前面的实施例 2 中已经对其进行了描述）。

在第三组实验中，单独利用 hTLR3 对 293 成纤维细胞进行转染，或者利用 hTLR3 和 RANTES 驱动的荧光素酶报告基因构建物对 293 成纤维细胞进行共转染（在前面的实施例 5 中已经对其进行了描述）。

实施例 12. 在人和鼠 TLR9 的 TIR 结构域中脯氨酸到组氨酸的突变 P915H 改变了 TLR9 的信号传导

Toll 样受体具有胞浆 Toll / IL-1 受体 (Toll/IL-1 receptor, 简称 TIR) 同源结构域，在与适配器分子 (adapter molecule) MyD88 结合之后，该同源结构域启动了信号传导。Medzhitov R et al. (1998) Mol Cell 2 : 253-8; Kopp EB et al. (1999) Curr Opin Immunol 11: 15-8。其他人的研究报告已经表明，鼠 TLR4 或人 TLR2 的 TIR 结构域中一个单独的点突变（分别为 Pro 712 到 His, P712H; Pro 681 到 His, P681H），使得宿主分别丧失了对脂多糖或格兰氏阳性细菌的免疫反应。Poltorak A et al. (1998) Science 282: 2085-8; Underhill DM et al. (1999) Nature 401: 811-5。通过定点突变 (site-specific mutagenesis) 技术将人 TLR9 和鼠 TLR9 第 915 号位点上的等价脯氨酸 (P) 突变为组氨酸 (H; P915H)。产生这些突变时采用了下列引物：用于人 TLR9 的 5'-GCGACTGGCTGCATGGCAA AACCTCTTTG-3' (SEQ ID NO : 21) 和 5'-CAAAGAGGGTTTTG CCATGCAGCCAGTCGC-3' (SEQ ID NO : 22); 以及用于鼠 TLR9 的 5'-CGAGATTGGCTGCATGGCCAGACGCT CTTC-3' (SEQ ID NO : 23) 和 5'-GAAGAGCGTCTGGCCATGCAGCCAA TCTCG-3' (SEQ ID NO : 24)。利用标准的重组 DNA 技术构建并验证用于突变体 TLR9s, hTLR9-P915H 和 mTLR9-P915H 的表达载体。

对于人 TLR9 的突变体 hTLR9-P915H 的刺激,利用 hTLR9 或 hTLR9-P915H 的表达载体对 293 细胞进行短暂转染,并在 16 小时之后,利用不同浓度的 ODN 2006 或 ODN 1668 进行刺激。类似地,对于鼠 TLR9 突变体 mTLR9-P915H 的刺激,利用 mTLR9 或 mTLR9-P915H 的表达载体对 293 细胞进行短暂转染,并在 16 小时之后,利用不同浓度的 ODN 2006 或 ODN 1668 进行刺激。在刺激 48 小时之后,收集上清液,并通过 ELISA 测定 IL-8 的生产量。结果表明,在人和鼠 TLR9 中,TIR 结构域上的 P915H 突变可以破坏 TLR9 的活性。

实施例 13. 人 TLR3 和人 TLR9 之间 TIR 结构域的互换 (hTLR3-TIR9 和 hTLR9-TIR3)

虽然 TLR3 和 TLR9 在结构上有很多共同特征,但由于 TLR3 在 TIR 结构域的一个关键位点上具有一个丙氨酸而不是脯氨酸,因此,TLR3 可能无法像 TLR9 那样通过 MyD88 进行信号传导。此处所描述的嵌合 TLRs (chimeric TLRs) 可以用于本发明的筛选试验。为了获得由人 TLR3 的胞外区以及人 TLR9 的 TIR 结构域所构成的分子 (hTLR3-TIR9),可以使用下面的方法。通过定点突变技术在人 TLR3 和人 TLR9 中引入一个 ClaI 限制性酶切位点。对于人 TLR9,将 DNA 序列 5'-GGCCTCAGCATCTTT-3' (3026-3040, SEQ ID NO : 25) 突变为 5'GGCCTATCGATTTTT-3' (SEQ ID NO : 26), 引入了一个 ClaI 位点 (在序列中以下划线标示), 但没有改变氨基酸序列 (GLSIF, aa 798-802)。对于人 TLR3, 将 DNA 序列 5'-GGGTTCCCAGTGAGA-3' (2112-2126, SEQ ID NO : 27) 突变为 5'-GGGTTATCGATTAGA-3' (SEQ ID NO : 28), 引入了一个 ClaI 位点,并创造了与野生型人 TLR3 序列 (GFPVR, aa 685-689) 在三个位点 (aa 686, 687, 688) 上不相同的氨基酸序列 (GLSIR, aa 685-689)。

hTLR3-TIR9 用于人 TLR9 的引物是 5'-CAGCTCCAGG GCCTATCGATTTTTTGCACAGGACC-3' (SEQ ID NO : 29) 以及 5'-GGTCCTGTG CAAAAATCGATAGGCCCTGGAGCTG-3' (SEQ ID NO : 30)。为了构建含有与人 TLR9 的 TIR 结构域相连的人 TLR3 胞外部分的表达载体, 利用 ClaI 和有限量 (limiting amounts) 的 EcoRI 对人 TLR3 表达载体进行酶切, 编码人 TLR9 TIR 结构域的片段被连接到含有 hTLR3 胞外部分的载体片段中, 其中, 所述的编码人 TLR9 TIR 结构域的片段是通过利用 ClaI 和 EcoRI 对人 TLR9 表达载体进行酶切而获得的。转染至 *E. coli* 中对 hTLR3-TIR9 (人 TLR3 胞外区 - 人 TLR9 TIR 结构域) 的表达载体进行生产。hTLR3-TIR9 的表达产物可以与 TLR3 的配体 (例如 CpG DNA) 发生相互作用, 也可以通过信号传导通路以与 TLR3 相似的方式进行信号传导。

实施例 14. 用于检测 TLR 配体亲和力差异的灵敏体外试验

将人 293 成纤维细胞用鼠 TLR9 和 NF- κ B-荧光素酶报告基因进行稳定的转染, 并利用下列充分硫代磷酸化 (phosphorothioated) 的寡聚脱氧核苷酸 (ODN) 刺激 16 小时:

5890: T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T (SEQ ID NO: 31)
 5895: T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G (SEQ ID NO: 32)
 5896: T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A (SEQ ID NO: 33)
 5897: T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*T (SEQ ID NO: 34)

通过滴定法确定刺激浓度在 10 μ M 到 2 nM 之间。在图 6 中对数据进行作图, 其中, 纵坐标为相对于未刺激本底的 NF- κ B-荧光素酶的诱导倍数 (fold induction), 横坐标为 ODN 的浓度。这些数据显示出了典型的一级结合 (first-order binding), 可以由其确定 EC50 或最大活性。EC50 被定义为产生最大活化值的 50% 时的配体刺激浓度。如图所示, EC50 的范围在 42 nM (对于

ODN 5890) 到 1220 nM (对于 ODN 5897) 之间。该试验显示出了对配体微小变化的敏感区别 (sensitive differentiation)。

实施例 15. 试验动力学对 TLR 筛选试验的影响

利用实施例 14 中所述的方法, 利用下列 ODN 配体得到了曲线, 其中, “*” 指出了硫代磷酸基 (phosphorothioate), “_” 指出了磷酸二酯键连接:

5890:	T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	(SEQ ID NO: 35)
5497:	T*C*G*T*C*G*T*T*T*TGTCGT*T*T*T*G*T*C*G*T*T	(SEQ ID NO: 36)
5746:	T*CG*T*CG*T*T*T*TG*T*CG*T*T*T*T*G*T*CG*T*T	(SEQ ID NO: 37)
2006:	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T	(SEQ ID NO: 15)
5902:	T*C*C*A*T*G*A*CGT*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	(SEQ ID NO:38)

测定了一组刺激曲线, 其中试验中所采用的培养时间不同, 在 1 小时到 24 小时之间。在每一个时间点处针对每一种配体测定了 EC50。然后将 EC50 对时间作图, 从而获得图 7 中所示的曲线。

从图 7 中可以明显看出, 活化动力学根据所测试配体的不同而有所变化。由于荧光素酶的半寿期为三小时, 因此信号较为短暂, 并且需要保持连续的由启动子驱动的活化。所述的保持与配体/受体复合物所传递的信号直接相关。因此, 以此种方式进行的对时间动力学的分析使得人们可以确定配体/受体相互作用的亲和力以及配体对受体在时间上的可得性 (availability)。该原理如下所示。与 ODN 2006 相比, ODN 5890 的亲和力更高。当通过引入稳定性更差的二酯键而使所述配体更易于被破坏时, 活性曲线随着时间向上走, 例如对于 ODN 5746, 5902 以及 5497。

在对 TLR/配体相互作用进行筛选试验的时候, 将试验局限到一个时间点上会使试验产生偏差。在 24 小时处, 似乎只有 ODN

2006 和 5890 是候选配体，但是很明显，实际情况并不是这样的。该试验也证明，更早的时间点，例如该实施例中的 6 小时，可能是确定受体/配体亲和力最大差异的最佳时间点。因此，可以依据人们期望从筛选中所获得的信息，例如更高的相互作用亲和力以及与之相对的受体/配体互作用的稳定性和持续时间，而调整筛选试验的优化过程。

图 8 表明，在本实施例中通过鼠 TLR 示出的同样的原理，可以不依赖于所使用的 TLR 而加以应用。在这一组数据中，使用了通过人 TLR9 和 NF- κ B-荧光素酶而稳定转染的 293 细胞。

实施例 16. 在 TLR 筛选试验中试验动力学对最大活性的影响

通过与前面的实施例 15 相似的方式收集数据，但是，在图 9 和图 10 中，以最大活性(最大诱导倍数)(maximal fold induction)为纵坐标，以时间为横坐标作图。这样的数据分析可以得到对生物有效性的预测。从这些附图中我们可以明显看出，亲和力较低的 ODN，例如 ODN 2006 和 5890 (这一点可以从实施例 15 中的 EC50 曲线中看出)，在获得 (deliver) 较高的活性方面效率要更低一些。

实施例 17. 根据所使用启动子的不同 TLR 筛选试验可以有不同结果

对人 293 成纤维细胞进行短暂转染，其中使用了 TLR 7、TLR8 或 TLR9 的表达载体，以及下面所列出的具有下列启动子(用于驱动荧光素酶基因)的报告基因构建物中的一种：NF- κ B-luc, IP-10-luc, RANTES-luc, ISRE-luc 以及 IL-8-luc。在具体配体的最大活性浓度下，刺激细胞 16 小时。利用 CpG ODN 2006 刺激

TLR9; 利用 imidazoliquinalone R848 刺激 TLR8 和 TLR7; 结果示于图 11 中。从图中可以明显看出, 根据所研究的 TLR 的不同, 所使用的启动子影响了筛选试验的结果, 例如, 对于所有待检测的 TLRs 而言, NF- κ B 都是一种可靠的标志; 但是在这组实验中, ISRE 仅仅在某种程度上对 TLR8 是有功能的。IL-8 启动子对于 TLR7 或 TLR8 筛选试验来说特别敏感, 但在 TLR9 的试验中, 其效率要差很多。

<110> 科勒制药股份公司

<120> Toll 样受体 3 信号传导的激动剂和拮抗剂

<130> C01041.70031

<160> 117

<170> PatentIn 3.1 版

<210> 1

<211> 3029

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gcggccgcgt cgacgaaatg tctggattg gactaaagaa aaaaggaaag gctagcagtc      60
atccaacaga atcatgagac agactttgcc ttgtatctac ttttgggggg gccttttgcc      120
ctttgggatg ctgtgtgcat cctccaccac caagtgcact gttagccatg aagttgctga      180
ctgcagccac ctgaagtga ctcaggtacc cgatgatcta cccacaaaca taacagtgtt      240
gaaccttacc cataatcaac tcagaagatt accagccgcc aacttcacaa ggtatagcca      300
gctaactagc ttggatgtag gatttaacac catctcaaaa ctggagccag aatttgcca      360
gaaacttccc atgttaaag tttgaacct ccagcacaat gagctatctc aactttctga      420
taaaccttt gcctctgca cgaattgac tgaactccat ctcatgtcca actcaatcca      480
gaaaattaa aataatccct ttgtcaagca gaagaattta atcacattag atctgtctca      540
taatggcttg tcatctacaa aattaggaac tcaggttcag ctggaaaatc tccaagagct      600
tctattatca aacaataaaa ttcaagcgt aaaaagtga gaactggata tctttgcca      660
tcatcttta aaaaattag agttgtcatc gaatcaaatt aaagatttt ctccagggtg      720
tttcacgca attggaagat tatttggcct cttctgaac aatgtccagc tgggtcccag      780
ccttacagag aagctatgtt tggaattagc aaacacaagc attcggaatc tgtctctgag      840
taacagccag ctgtccacca ccagcaatac aactttcttg ggactaaagt ggacaaatct      900
cactatgctc gatctttcct acaacaactt aaatgtggtt ggtaacgatt cctttgcttg      960

```

gctccacaa ctagaatatt tcttcctaga gtataataat atacagcatt tgttttctca	1020
ctctttgcac gggcttttca atgtgaggta cctgaattg aaacggcttt ttactaaaca	1080
aagtattcc cttgcctcac tccccaagat tgatgatttt tcttttcagt ggctaaaatg	1140
ttggagcac cttaacatgg aagataatga tattccagge ataaaaagca atatgttcac	1200
aggattgata aacctgaaat acttaagtct atccaactcc ttacaagtt tgccaacttt	1260
gacaaatgaa acatttgtat cacttgctca ttctccctta cacatactca acctaaccaa	1320
gaataaaatc tcaaaaatag agagtgatgc ttctcttgg ttgggccacc tagaagtact	1380
tgacctgggc cttaatgaaa ttgggcaaga actcacaggc caggaatgga gaggtctaga	1440
aaatatttc gaaatctatc ttcttacia caagtacctg cagctgacta ggaactcctt	1500
tgctttggc ccaagccttc aacgactgat gctccgaagg gtggccctta aaaatgtgga	1560
tagctctcct tcaccattcc agcctcttcg taacttgacc attctggatc taagcaacaa	1620
caacatagcc aacataaatg atgacatgtt ggagggtctt gagaaactag aaattctcga	1680
ttgcagcat aacaacttag cacggctctg gaaacacgca aacctggtg gtcccattta	1740
tttctaaag ggtctgtctc acctccacat ccttaacttg gactccaacg gctttgacga	1800
gatcccagtt gaggtcttca aggatttatt tgaactaaag atcatcgatt taggattgaa	1860
taatttaaac acacttcag catctgtctt taataatcag gtgtctctaa agtcattgaa	1920
cctcagaag aatctcataa catccgttga gaagaagggt ttcgggccag ctttcaggaa	1980
cctgactgag ttagatatgc gctttaatcc ctttgattgc acgttgaaa gtattgcctg	2040
gtttgtaat tggattaacg agaccatac caacatccct gagctgtcaa gccactacct	2100
ttgcaacact ccacctact atcatgggtt cccagtgaga cttttgata catcatcttg	2160
caaagacagt gcccccttg aactctttt catgatcaat accagatcc tgttgatttt	2220
tatctttatt gtacttctca tccacttga gggctggagg atatctttt attggaatgt	2280
ttcagtacat cgagttcttg gtttcaaaga aatagacaga cagacagaac agtttgaata	2340
tgcagcatat ataattcatg cctataaaga taaggattgg gtctgggaac atttctcttc	2400
aatggaaaag gaagaccaat ctctcaaatt ttgtctggaa gaaagggact ttgaggcggg	2460

tgttttgaa ctagaagcaa ttgtaacag catcaaaaga agcagaaaa ttattttgt 2520
 tataacacac catctattaa aagaccatt atgcaaaaga ttcaaggtac atcatgcagt 2580
 tcaacaagct attgaacaaa atctggattc cattatattg gtttccttg aggagattcc 2640
 agattataaa ctgaacctg cactctgttt gcgaagagga atgtttaat ctactgcat 2700
 ctggaactgg ccagttcaga aagaacggat aggtgccttt cgtcataaat tgcaagtagc 2760
 acttggatcc aaaaactctg tacattaaat ttattttaaattt attcaattag caaaggagaa 2820
 actttctcaa tttaaaaagt tctatggcaa atttaagttt tccataaagg tgttataatt 2880
 tgtttattca tatttgtaa tgattatatt ctatcacaat tacatctctt ctaggaaaat 2940
 gtgtctctt atttcaggcc tatttttgac aattgactta atttaccca aaataaaaca 3000
 tataagcagc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3029

<210> 2
 <211> 904
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Gln Thr Leu Pro Cys Ile Tyr Phe Trp Gly Gly Leu Leu Pro 15
 1 5 10
 Phe Gly Met Leu Cys Ala Ser Ser Thr Thr Lys Cys Thr Val Ser His 30
 20 25 30
 Glu Val Ala Asp Cys Ser His Leu Lys Leu Thr Gln Val Pro Asp Asp 45
 35 40 45
 Leu Pro Thr Asn Ile Thr Val Leu Asn Leu Thr His Asn Gln Leu Arg 60
 50 55 60
 Arg Leu Pro Ala Ala Asn Phe Thr Arg Tyr Ser Gln Leu Thr Ser Leu 80
 65 70 75 80
 Asp Val Gly Phe Asn Thr Ile Ser Lys Leu Glu Pro Glu Leu Cys Gln 95
 85 90 95

Lys Leu Pro Met Leu Lys Val Leu Asn Leu Gln His Asn Glu Leu Ser
 100 105 110

Gln Leu Ser Asp Lys Thr Phe Ala Phe Cys Thr Asn Leu Thr Glu Leu
 115 120 125

His Leu Met Ser Asn Ser Ile Gln Lys Ile Lys Asn Asn Pro Phe Val
 130 135 140

Lys Gln Lys Asn Leu Ile Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gly Leu Ser
 145 150 155 160

Ser Thr Lys Leu Gly Thr Gln Val Gln Leu Glu Asn Leu Gln Glu Leu
 165 170 175

Leu Leu Ser Asn Asn Lys Ile Gln Ala Leu Lys Ser Glu Glu Leu Asp
 180 185 190

Ile Phe Ala Asn Ser Ser Leu Lys Lys Leu Glu Leu Ser Ser Asn Gln
 195 200 205

Ile Lys Glu Phe Ser Pro Gly Cys Phe His Ala Ile Gly Arg Leu Phe
 210 215 220

Gly Leu Phe Leu Asn Asn Val Gln Leu Gly Pro Ser Leu Thr Glu Lys
 225 230 235 240

Leu Cys Leu Glu Leu Ala Asn Thr Ser Ile Arg Asn Leu Ser Leu Ser
 245 250 255

Asn Ser Gln Leu Ser Thr Thr Ser Asn Thr Thr Phe Leu Gly Leu Lys
 260 265 270

Trp Thr Asn Leu Thr Met Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu Asn Val
 275 280 285

Val Gly Asn Asp Ser Phe Ala Trp Leu Pro Gln Leu Glu Tyr Phe Phe
 290 295 300

Leu Glu Tyr Asn Asn Ile Gln His Leu Phe Ser His Ser Leu His Gly			
305	310	315	320
Leu Phe Asn Val Arg Tyr Leu Asn Leu Lys Arg Ser Phe Thr Lys Gln			
	325	330	335
Ser Ile Ser Leu Ala Ser Leu Pro Lys Ile Asp Asp Phe Ser Phe Gln			
	340	345	350
Trp Leu Lys Cys Leu Glu His Leu Asn Met Glu Asp Asn Asp Ile Pro			
	355	360	365
Gly Ile Lys Ser Asn Met Phe Thr Gly Leu Ile Asn Leu Lys Tyr Leu			
	370	375	380
Ser Leu Ser Asn Ser Phe Thr Ser Leu Arg Thr Leu Thr Asn Glu Thr			
385	390	395	400
Phe Val Ser Leu Ala His Ser Pro Leu His Ile Leu Asn Leu Thr Lys			
	405	410	415
Asn Lys Ile Ser Lys Ile Glu Ser Asp Ala Phe Ser Trp Leu Gly His			
	420	425	430
Leu Glu Val Leu Asp Leu Gly Leu Asn Glu Ile Gly Gln Glu Leu Thr			
	435	440	445
Gly Gln Glu Trp Arg Gly Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ile Tyr Leu Ser			
	450	455	460
Tyr Asn Lys Tyr Leu Gln Leu Thr Arg Asn Ser Phe Ala Leu Val Pro			
465	470	475	480
Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Arg Arg Val Ala Leu Lys Asn Val Asp			
	485	490	495
Ser Ser Pro Ser Pro Phe Gln Pro Leu Arg Asn Leu Thr Ile Leu Asp			
	500	505	510

Leu Ser Asn Asn Asn Ile Ala Asn Ile Asn Asp Asp Met Leu Glu Gly
 515 520 525

Leu Glu Lys Leu Glu Ile Leu Asp Leu Gln His Asn Asn Leu Ala Arg
 530 535 540

Leu Trp Lys His Ala Asn Pro Gly Gly Pro Ile Tyr Phe Leu Lys Gly
 545 550 555 560

Leu Ser His Leu His Ile Leu Asn Leu Glu Ser Asn Gly Phe Asp Glu
 565 570 575

Ile Pro Val Glu Val Phe Lys Asp Leu Phe Glu Leu Lys Ile Ile Asp
 580 585 590

Leu Gly Leu Asn Asn Leu Asn Thr Leu Pro Ala Ser Val Phe Asn Asn
 595 600 605

Gln Val Ser Leu Lys Ser Leu Asn Leu Gln Lys Asn Leu Ile Thr Ser
 610 615 620

Val Glu Lys Lys Val Phe Gly Pro Ala Phe Arg Asn Leu Thr Glu Leu
 625 630 635 640

Asp Met Arg Phe Asn Pro Phe Asp Cys Thr Cys Glu Ser Ile Ala Trp
 645 650 655

Phe Val Asn Trp Ile Asn Glu Thr His Thr Asn Ile Pro Glu Leu Ser
 660 665 670

Ser His Tyr Leu Cys Asn Thr Pro Pro His Tyr His Gly Phe Pro Val
 675 680 685

Arg Leu Phe Asp Thr Ser Ser Cys Lys Asp Ser Ala Pro Phe Glu Leu
 690 695 700

Phe Phe Met Ile Asn Thr Ser Ile Leu Leu Ile Phe Ile Phe Ile Val
 705 710 715 720

Leu Leu Ile His Phe Glu Gly Trp Arg Ile Ser Phe Tyr Trp Asn Val	725	730	735	
Ser Val His Arg Val Leu Gly Phe Lys Glu Ile Asp Arg Gln Thr Glu	740	745	750	
Gln Phe Glu Tyr Ala Ala Tyr Ile Ile His Ala Tyr Lys Asp Lys Asp	755	760	765	
Trp Val Trp Glu His Phe Ser Ser Met Glu Lys Glu Asp Gln Ser Leu	770	775	780	
Lys Phe Cys Leu Glu Glu Arg Asp Phe Glu Ala Gly Val Phe Glu Leu	785	790	795	800
Glu Ala Ile Val Asn Ser Ile Lys Arg Ser Arg Lys Ile Ile Phe Val	805	810	815	
Ile Thr His His Leu Leu Lys Asp Pro Leu Cys Lys Arg Phe Lys Val	820	825	830	
His His Ala Val Gln Gln Ala Ile Glu Gln Asn Leu Asp Ser Ile Ile	835	840	845	
Leu Val Phe Leu Glu Glu Ile Pro Asp Tyr Lys Leu Asn His Ala Leu	850	855	860	
Cys Leu Arg Arg Gly Met Phe Lys Ser His Cys Ile Leu Asn Trp Pro	865	870	875	880
Val Gln Lys Glu Arg Ile Gly Ala Phe Arg His Lys Leu Gln Val Ala	885	890	895	
Leu Gly Ser Lys Asn Ser Val His	900			

<210> 3
 <211> 3310
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 3
 tagaataatga tacaggatt gcaccataa tctgggctga atcatgaaag ggtgttctc 60
 ttatctaatag tactcctttg ggggactttt gtcctatgg attcttctgg tgtcttccac 120
 aaaccaatgc actgtgagat acaacgtagc tgactgcagc catttgaagc taacacacat 180
 acctgatgat ctccctcta acataacagt gttgaatctt actcacaacc aactcagaag 240
 attaccacct accaacttta caagatacag ccaacttgct atcttggatg caggatttaa 300
 ctccatttca aaactggagc cagaactgtg ccaataactc cctttgttga aagtattgaa 360
 cctgcaacat aatgagctct ctgagattc tgatcaaacc tttgtcttct gcacgaacct 420
 gacagaactc gatctaagt ctaactcaat acacaaaatt aaaagcaacc ctttcaaaaa 480
 ccagaagaat ctaatcaat tagattgtc tcataatgg ttatcatcta caaagttggg 540
 aacggggggtc caactggaga acctccaaga actgctctta gcaaaaaata aaatccttgc 600
 gttgcgaagt gaagaactg agtttcttgg caattcttct ttacgaaagt tggacttgc 660
 atcaaatcca cttaaagagt tctccccggg gtgtttccag acaattggca agttatcgc 720
 cctctcttg aacaacgecc aactgaacct ccacctcaca gagaagcttt gctggaact 780
 ttcaaacaca agcatccaga atctctctct ggctaacaac cagctgctgg ccaccagcga 840
 gagcacttc tctgggctga agtggacaaa tctcaccag ctgatcttt cctacaacaa 900
 cctcatgat gtcggcaacg gttccttctc ctatctcca agcctgaggt atctgtctc 960
 ggagtacaac aatatacagc gtctgtcccc tcgtctttt tatggactct ccaacctgag 1020
 gtacctgagt ttgaagcgag catttactaa gcaaagtgtt tcaactgctt cacatcccaa 1080
 cattgacgat tttccttctc aatggttaa atattggaa tatctcaaca tggatgacaa 1140
 taatattcca agtacaaaa gcaatacctt cacgggattg gtgagtctga agtacctaag 1200
 tctttccaaa actttcacia gtttgcacaa ttaacaaat gaaacattt gtgcacttgc 1260
 tcattctccc ttgtcactc tcaactaac gaaaaatcac atctcaaaaa tagcaaatgg 1320
 tactttctct tggtaggcc aactcaggat acttgatctc ggccttaatg aaattgaaca 1380

aaaactcagc ggccaggaat ggagaggtct gagaatata tttgagatct acctatccta 1440
 taacaaatac ctccaactgt ctaccagttc ctttgattg gtccccagcc ttcaaagact 1500
 gatgctcagg aggggtggccc ttaaaaatgt ggatatctcc ccttcacctt tccgccctct 1560
 tcgtaacttg accattctgg acttaagcaa caacaacata gccaacataa atgaggactt 1620
 gctggagggt cttgagaatc tagaaatcct ggatttcag cacaataact tagccaggtc 1680
 ctggaaacgc gcaaaccocg gtggtcccgt taatttctg aaggggctgt ctcacctca 1740
 catcttgaat ttagagtcca acggcttaga tgaaatccca gtcggggttt tcaagaactt 1800
 attcgaacta aagagcatca atctaggact gaataactta aacaaactg aaccattcat 1860
 tttgatgac cagacatctc taaggctact gaacctccag aagaacctca taacatctgt 1920
 tgagaaggat gtttcgggc cgcctttca aaacctgaac agtttagata tgcgctcaa 1980
 tccgttcgac tgcacgtgtg aaagtattc ctggtttgtt aactggatca accagacca 2040
 cactaatatc tttgagctgt ccactcacta cctctgtaac actccacatc attattatgg 2100
 ctccccctg aagcttttcg atacatcctc ctgtaaagac agcggcccct ttgaactcct 2160
 cttcataatc agcaccagta tgcctctggt tttatactt gtggtactgc tcattcacat 2220
 cgagggtctg aggatctctt ttactggaa tgttcagtg catcggattc ttggttcaa 2280
 ggaaatagac acacaggctg agcagtttga atatacagcc tacataatc atgcccataa 2340
 agacagagac tgggtctggg aacattctc cccaatggaa gaacaagacc aatctctcaa 2400
 atttgccta gaagaaaggg actttgaagc aggcgtcctt ggacttgaag caattgttaa 2460
 tagcatcaaa agaagccgaa aatcatttt cgttatcaca caccatttat taaaagacc 2520
 tctgtgcaga agattcaagg tacatcacgc agttcagcaa gctattgagc aaaatctgga 2580
 ttcaattata ctgattttc tccagaatat tccagattat aaactaaacc atgcactctg 2640
 tttgcgaaga ggaatgttta aatctcattg catcttgaac tggccagttc agaaagaacg 2700
 gataaatgcc tttcatcata aattgcaagt agcacttggg tctcggaatt cagcacatta 2760
 aactcattg aagatttggg gtcggtaaag ggatagatcc aattataaa ggtccatcat 2820
 gaatctaagt ttacttgaa agttttgtat atttattat atgtatagat gatgatatta 2880

Ser Gln Ile Ser Asp Gln Thr Phe Val Phe Cys Thr Asn Leu Thr Glu
 115 120 125

Leu Asp Leu Met Ser Asn Ser Ile His Lys Ile Lys Ser Asn Pro Phe
 130 135 140

Lys Asn Gln Lys Asn Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser His Asn Gly Leu
 145 150 155 160

Ser Ser Thr Lys Leu Gly Thr Gly Val Gln Leu Glu Asn Leu Gln Glu
 165 170 175

Leu Leu Leu Ala Lys Asn Lys Ile Leu Ala Leu Arg Ser Glu Glu Leu
 180 185 190

Glu Phe Leu Gly Asn Ser Ser Leu Arg Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn
 195 200 205

Pro Leu Lys Glu Phe Ser Pro Gly Cys Phe Gln Thr Ile Gly Lys Leu
 210 215 220

Phe Ala Leu Leu Leu Asn Asn Ala Gln Leu Asn Pro His Leu Thr Glu
 225 230 235 240

Lys Leu Cys Trp Glu Leu Ser Asn Thr Ser Ile Gln Asn Leu Ser Leu
 245 250 255

Ala Asn Asn Gln Leu Leu Ala Thr Ser Glu Ser Thr Phe Ser Gly Leu
 260 265 270

Lys Trp Thr Asn Leu Thr Gln Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu His
 275 280 285

Asp Val Gly Asn Gly Ser Phe Ser Tyr Leu Pro Ser Leu Arg Tyr Leu
 290 295 300

Ser Leu Glu Tyr Asn Asn Ile Gln Arg Leu Ser Pro Arg Ser Phe Tyr
 305 310 315 320

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

Gly Leu Glu Asn Leu Glu Ile Leu Asp Phe Gln His Asn Asn Leu Ala	
530	540
Arg Leu Trp Lys Arg Ala Asn Pro Gly Gly Pro Val Asn Phe Leu Lys	
545	555
	560
Gly Leu Ser His Leu His Ile Leu Asn Leu Glu Ser Asn Gly Leu Asp	
565	570
	575
Glu Ile Pro Val Gly Val Phe Lys Asn Leu Phe Glu Leu Lys Ser Ile	
580	585
	590
Asn Leu Gly Leu Asn Asn Leu Asn Lys Leu Glu Pro Phe Ile Phe Asp	
595	600
	605
Asp Gln Thr Ser Leu Arg Ser Leu Asn Leu Gln Lys Asn Leu Ile Thr	
610	615
	620
Ser Val Glu Lys Asp Val Phe Gly Pro Pro Phe Gln Asn Leu Asn Ser	
625	630
	635
	640
Leu Asp Met Arg Phe Asn Pro Phe Asp Cys Thr Cys Glu Ser Ile Ser	
645	650
	655
Trp Phe Val Asn Trp Ile Asn Gln Thr His Thr Asn Ile Phe Glu Leu	
660	665
	670
Ser Thr His Tyr Leu Cys Asn Thr Pro His His Tyr Tyr Gly Phe Pro	
675	680
	685
Leu Lys Leu Phe Asp Thr Ser Ser Cys Lys Asp Ser Ala Pro Phe Glu	
690	695
	700
Leu Leu Phe Ile Ile Ser Thr Ser Met Leu Leu Val Phe Ile Leu Val	
705	710
	715
	720
Val Leu Leu Ile His Ile Glu Gly Trp Arg Ile Ser Phe Tyr Trp Asn	
725	730
	735

Val Ser Val His Arg Ile Leu Gly Phe Lys Glu Ile Asp Thr Gln Ala
740 745 750

Glu Gln Phe Glu Tyr Thr Ala Tyr Ile Ile His Ala His Lys Asp Arg
755 760 765

Asp Trp Val Trp Glu His Phe Ser Pro Met Glu Glu Gln Asp Gln Ser
770 775 780

Leu Lys Phe Cys Leu Glu Glu Arg Asp Phe Glu Ala Gly Val Leu Gly
785 790 795 800

Leu Glu Ala Ile Val Asn Ser Ile Lys Arg Ser Arg Lys Ile Ile Phe
805 810 815

Val Ile Thr His His Leu Leu Lys Asp Pro Leu Cys Arg Arg Phe Lys
820 825 830

Val His His Ala Val Gln Gln Ala Ile Glu Gln Asn Leu Asp Ser Ile
835 840 845

Ile Leu Ile Phe Leu Gln Asn Ile Pro Asp Tyr Lys Leu Asn His Ala
850 855 860

Leu Cys Leu Arg Arg Gly Met Phe Lys Ser His Cys Ile Leu Asn Trp
865 870 875 880

Pro Val Gln Lys Glu Arg Ile Asn Ala Phe His His Lys Leu Gln Val
885 890 895

Ala Leu Gly Ser Arg Asn Ser Ala His
900 905

<210> 5
<211> 3352
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5

aggctggtat aaaaatctta cttcctctat tctctgagcc gctgctgccc ctgtgggaag 60
 ggacctcgag tgtgaagcat ccttcctgt agctgctgtc cagtctgccc gccagacct 120
 ctggagaagc cctgcccc cagcatgggt ttctgccga gcgcctgca cccgctgtct 180
 ctctgggtgc aggcatcat gctggccatg acctggccc tgggtacctt gcctgcctc 240
 ctacctgtg agtccagcc ccacggcctg gtgaactgca actggctgtt cctgaagtct 300
 gtgccccact tctccatggc agcacccctg ggcaatgca ccagccttc cttgtcctcc 360
 aaccgcatcc accacctcca tgattctgac ttgcccacc tgcccagcct gcggcatctc 420
 aacctcaagt ggaactgccc gccggtggc ctcagcccca tgcacttccc ctgccacatg 480
 accatcgagc ccagcacctt cttggctgtg cccaccctgg aagagctaaa cctgagctac 540
 aacaacatca tgactgtgcc tgcgctgccc aaatccctca taccctgtc cctcagccat 600
 accaacaatcc tgatgctaga ctctgccagc ctcgccggcc tgcattccct gcgcttcta 660
 ttcatggagc gcaactgtta ttacaagaac cctgcaggc aggcaactgga ggtggccccg 720
 ggtgccctcc ttggcctggg caacctcacc cacctgtcac tcaagtaca caacctcact 780
 gtggtgcccc gcaacctgcc ttccagcctg gagtatctgc tgtgtccta caaccgcatc 840
 gtcaaaactgg cgctgagga cctggccaat ctgaccgccc tgcgtgtgct cgatgtgggc 900
 ggaaattgcc gccgctgca ccacgtccc aaccctgca tggagtgccc tcgtcacttc 960
 ccccagctac atcccgatac cttcagccac ctgagccgtc ttgaaggcct ggtgttgaag 1020
 gacagttctc tctctggct gaatgccagt tggttccgtg ggctgggaaa cctccgagtg 1080
 ctggacctga gtgagaactt cctctacaaa tgcatactaa aaaccaaggc cttccagggc 1140
 ctaacacagc tgcgcaagct taacctgtcc ttcaattacc aaaagagggt gtcctttgcc 1200
 cacctgtctc tggccccctc cttcgggagc ctggtgccc tgaaggagct ggacatgcac 1260
 ggcatcttct tccgtcact cgatgagacc acgctccggc cactggcccc cctgcccattg 1320
 ctccagactc tgcgtctgca gatgaactc atcaaccagg cccagctcgg catcttcagg 1380
 gccttcctg gcctgcgcta ctggacctg tcggacaacc gcatcagcgg agcttcggag 1440
 ctgacagcca ccatggggga ggcagatgga ggggagaagg tctggctgca gcctggggac 1500

cttgcctcgg cccagtgga cactcccagc tctgaagact tcaggcccaa ctgcagcacc	1560
ctcaactca ccttggatct gtcacggaac aacctggtga ccgtgcagcc ggagatgttt	1620
gcccagctct cgcacctgca gtgcctgcgc ctgagccaca actgcatctc gcaggcagtc	1680
aatggctccc agttcctgcc gctgaccggt ctgcaggtgc tagacctgtc ccgaataag	1740
ctggacctct accacgagca ctattcacg gagctaccgc gactggaggc cctggacctc	1800
agctacaaca gccagccctt tggcatgcag ggcgtgggcc acaactcag ctctgtggt	1860
cacctgcgca ccctgcgcca cctcagcctg gccacaaca acatccacag ccaagtgtcc	1920
cagcagctct gcagtagtc gctgcgggcc ctggacttca gcggcaatgc actgggcat	1980
atgtgggccc agggagacct ctatctgcac ttctccaag gcctgagcgg tttgatctgg	2040
ctggacttgt cccagaaccg cctgcacacc ctctgcccc aaacctgcg caacctcccc	2100
aagagcctac aggtgtgcg tctccgtgac aattacctgg ccttctttaa gtggtggagc	2160
ctccacttc tgccaaact ggaagtctc gacctggcag gaaaccggct gaaggccctg	2220
accaatggca gctgcctgc tggcaccgg ctccggaggc tggatgtcag ctgcaacagc	2280
atcagcttcg tggccccgg ctcttttcc aaggccaagg agctgcgaga gctcaacctt	2340
agcgccaacg cctcaagac agtggaccac tctggtttg ggcccctggc gactgccctg	2400
caaatactag atgtaagcgc caacctctg cactgcgct gtggggcggc ctttatggac	2460
ttctgtctgg aggtgcagc tgccgtgcc ggtctgcca gccgggtgaa gtgtggcagt	2520
ccgggccagc tccaggcct cagcatctt gcacaggacc tgcgcctctg cctggatgag	2580
gccctctct gggactgtt cgcctctcg ctgctggctg tggctctggg cctgggtgtg	2640
cccatgtgc atcacctctg tggctgggac ctctgttact gttccacct gtgcctggcc	2700
tggcttccct ggcggggggc gcaaagtgg cgagatgagg atgccctgcc ctacgatgcc	2760
ttctgtgtct tcgacaaaac gcagagcgc gtggcagact ggtgtataa cgagcttcgg	2820
gggcagctgg aggagtccc tgggcgtgg gcactccgcc tgtgcctgga ggaacgcgac	2880
tggctgcctg gaaaaccct cttgagaac ctgtggcct cgtctatgg cagccgcaag	2940
acgctgtttg tgctggcca cacggaccgg gtcagtgtc tctgcgcg cagcttctg	3000

ctggcccagc agcgcctgct ggaggaccgc aaggacgtcg tggctgctgt gatcctgagc 3060
 cctgacggcc gccgctcccg ctacgtgctg ctgcgccagc gcctotgccg ccagagtgtc 3120
 ctctctggc cccaccagcc cagtggctag cgcagcttct gggcccagct gggcatggcc 3180
 ctgaccaggg acaaccacca cttctataac cggaacttct gccagggacc cacggccgaa 3240
 tagccgtgag ccggaatcct gcacgggtgcc acctccacac tcacctcacc tctgcctgcc 3300
 tggctgacc ctcccctgct cgctccctc accccacacc tgacacagag ca 3352

<210> 6

<211> 1032

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Phe Cys Arg Ser Ala Leu His Pro Leu Ser Leu Leu Val Gln
 1 5 10 15

Ala Ile Met Leu Ala Met Thr Leu Ala Leu Gly Thr Leu Pro Ala Phe
 20 25 30

Leu Pro Cys Glu Leu Gln Pro His Gly Leu Val Asn Cys Asn Trp Leu
 35 40 45

Phe Leu Lys Ser Val Pro His Phe Ser Met Ala Ala Pro Arg Gly Asn
 50 55 60

Val Thr Ser Leu Ser Leu Ser Ser Asn Arg Ile His His Leu His Asp
 65 70 75 80

Ser Asp Phe Ala His Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asn Leu Lys Trp
 85 90 95

Asn Cys Pro Pro Val Gly Leu Ser Pro Met His Phe Pro Cys His Met
 100 105 110

Thr Ile Glu Pro Ser Thr Phe Leu Ala Val Pro Thr Leu Glu Glu Leu
 115 120 125

Asn Leu Ser Tyr Asn Asn Ile Met Thr Val Pro Ala Leu Pro Lys Ser
 130 135 140

Leu Ile Ser Leu Ser Leu Ser His Thr Asn Ile Leu Met Leu Asp Ser
 145 150 155 160

Ala Ser Leu Ala Gly Leu His Ala Leu Arg Phe Leu Phe Met Asp Gly
 165 170 175

Asn Cys Tyr Tyr Lys Asn Pro Cys Arg Gln Ala Leu Glu Val Ala Pro
 180 185 190

Gly Ala Leu Leu Gly Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Ser Leu Lys Tyr
 195 200 205

Asn Asn Leu Thr Val Val Pro Arg Asn Leu Pro Ser Ser Leu Glu Tyr
 210 215 220

Leu Leu Leu Ser Tyr Asn Arg Ile Val Lys Leu Ala Pro Glu Asp Leu
 225 230 235 240

Ala Asn Leu Thr Ala Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg
 245 250 255

Arg Cys Asp His Ala Pro Asn Pro Cys Met Glu Cys Pro Arg His Phe
 260 265 270

Pro Gln Leu His Pro Asp Thr Phe Ser His Leu Ser Arg Leu Glu Gly
 275 280 285

Leu Val Leu Lys Asp Ser Ser Leu Ser Trp Leu Asn Ala Ser Trp Phe
 290 295 300

Arg Gly Leu Gly Asn Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Glu Asn Phe Leu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Ile Thr Lys Thr Lys Ala Phe Gln Gly Leu Thr Gln Leu
 325 330 335

Arg Lys Leu Asn Leu Ser Phe Asn Tyr Gln Lys Arg Val Ser Phe Ala
 340 345 350

His Leu Ser Leu Ala Pro Ser Phe Gly Ser Leu Val Ala Leu Lys Glu
 355 360 365

Leu Asp Met His Gly Ile Phe Phe Arg Ser Leu Asp Glu Thr Thr Leu
 370 375 380

Arg Pro Leu Ala Arg Leu Pro Met Leu Gln Thr Leu Arg Leu Gln Met
 385 390 395 400

Asn Phe Ile Asn Gln Ala Gln Leu Gly Ile Phe Arg Ala Phe Pro Gly
 405 410 415

Leu Arg Tyr Val Asp Leu Ser Asp Asn Arg Ile Ser Gly Ala Ser Glu
 420 425 430

Leu Thr Ala Thr Met Gly Glu Ala Asp Gly Gly Glu Lys Val Trp Leu
 435 440 445

Gln Pro Gly Asp Leu Ala Pro Ala Pro Val Asp Thr Pro Ser Ser Glu
 450 455 460

Asp Phe Arg Pro Asn Cys Ser Thr Leu Asn Phe Thr Leu Asp Leu Ser
 465 470 475 480

Arg Asn Asn Leu Val Thr Val Gln Pro Glu Met Phe Ala Gln Leu Ser
 485 490 495

His Leu Gln Cys Leu Arg Leu Ser His Asn Cys Ile Ser Gln Ala Val
 500 505 510

Asn Gly Ser Gln Phe Leu Pro Leu Thr Gly Leu Gln Val Leu Asp Leu
 515 520 525

Ser Arg Asn Lys Leu Asp Leu Tyr His Glu His Ser Phe Thr Glu Leu
 530 535 540

Pro Arg Leu Glu Ala Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Ser Gln Pro Phe Gly			
545	550	555	560
Met Gln Gly Val Gly His Asn Phe Ser Phe Val Ala His Leu Arg Thr			
	565	570	575
Leu Arg His Leu Ser Leu Ala His Asn Asn Ile His Ser Gln Val Ser			
	580	585	590
Gln Gln Leu Cys Ser Thr Ser Leu Arg Ala Leu Asp Phe Ser Gly Asn			
	595	600	605
Ala Leu Gly His Met Trp Ala Glu Gly Asp Leu Tyr Leu His Phe Phe			
	610	615	620
Gln Gly Leu Ser Gly Leu Ile Trp Leu Asp Leu Ser Gln Asn Arg Leu			
625	630	635	640
His Thr Leu Leu Pro Gln Thr Leu Arg Asn Leu Pro Lys Ser Leu Gln			
	645	650	655
Val Leu Arg Leu Arg Asp Asn Tyr Leu Ala Phe Phe Lys Trp Trp Ser			
	660	665	670
Leu His Phe Leu Pro Lys Leu Glu Val Leu Asp Leu Ala Gly Asn Arg			
	675	680	685
Leu Lys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Leu Pro Ala Gly Thr Arg Leu Arg			
	690	695	700
Arg Leu Asp Val Ser Cys Asn Ser Ile Ser Phe Val Ala Pro Gly Phe			
705	710	715	720
Phe Ser Lys Ala Lys Glu Leu Arg Glu Leu Asn Leu Ser Ala Asn Ala			
	725	730	735
Leu Lys Thr Val Asp His Ser Trp Phe Gly Pro Leu Ala Ser Ala Leu			
	740	745	750

Gln Ile Leu Asp Val Ser Ala Asn Pro Leu His Cys Ala Cys Gly Ala
755 760 765

Ala Phe Met Asp Phe Leu Leu Glu Val Gln Ala Ala Val Pro Gly Leu
770 775 780

Pro Ser Arg Val Lys Cys Gly Ser Pro Gly Gln Leu Gln Gly Leu Ser
785 790 795 800

Ile Phe Ala Gln Asp Leu Arg Leu Cys Leu Asp Glu Ala Leu Ser Trp
805 810 815

Asp Cys Phe Ala Leu Ser Leu Leu Ala Val Ala Leu Gly Leu Gly Val
820 825 830

Pro Met Leu His His Leu Cys Gly Trp Asp Leu Trp Tyr Cys Phe His
835 840 845

Leu Cys Leu Ala Trp Leu Pro Trp Arg Gly Arg Gln Ser Gly Arg Asp
850 855 860

Glu Asp Ala Leu Pro Tyr Asp Ala Phe Val Val Phe Asp Lys Thr Gln
865 870 875 880

Ser Ala Val Ala Asp Trp Val Tyr Asn Glu Leu Arg Gly Gln Leu Glu
885 890 895

Glu Cys Arg Gly Arg Trp Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp
900 905 910

Trp Leu Pro Gly Lys Thr Leu Phe Glu Asn Leu Trp Ala Ser Val Tyr
915 920 925

Gly Ser Arg Lys Thr Leu Phe Val Leu Ala His Thr Asp Arg Val Ser
930 935 940

Gly Leu Leu Arg Ala Ser Phe Leu Leu Ala Gln Gln Arg Leu Leu Glu
945 950 955 960

Asp Arg Lys Asp Val Val Val Leu Val Ile Leu Ser Pro Asp Gly Arg
 965 970 975

Arg Ser Arg Tyr Val Arg Leu Arg Gln Arg Leu Cys Arg Gln Ser Val
 980 985 990

Leu Leu Trp Pro His Gln Pro Ser Gly Gln Arg Ser Phe Trp Ala Gln
 995 1000 1005

Leu Gly Met Ala Leu Thr Arg Asp Asn His His Phe Tyr Asn Arg
 1010 1015 1020

Asn Phe Cys Gln Gly Pro Thr Ala Glu
 1025 1030

<210> 7

<211> 3200

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

tgtcagaggg agcctcgga gaatcctcca tctccaaca tggttctccg tcgaaggact 60
 ctgcaccct tgtcctct ggtacaggct gcagtgtgg ctgagactct ggcctgggt 120
 acctgcctg ccttctacc ctgtgagctg aagcctcatg gcctgggtga ctgcaattgg 180
 ctgttctga agtctgtacc ccgtttctct gcggcagcat cctgctcaa catcaccgc 240
 ctctcttga tctccaaccg tatcaccac ctgcacaact ccgacttctg ccacctgtcc 300
 aacctgcggc agctgaacct caagtggaac tgtccacca ctggccttag cccctgcac 360
 ttctcttgcc acatgaccat tgagcccaga accttctgg ctatgcgtac actggaggag 420
 ctgaacctga gctataatgg tatcaccact gtgccccgac tgcccagctc cctgggtaat 480
 ctgagcctga gccacacaa catcctgggt ctgatgcta acagcctcgc cggcctatac 540
 agcctgcgct ttcttctcat ggacgggaac tgetactaca agaaccctg cacaggagcg 600
 gtgaaggatga cccagggcgc cctctgggc ctgagcaatc tcaccatct gtctctgaag 660
 tataacaacc tcacaaggt gccccgcaa ctgccccca gcttgagta cctctggtg 720

tctataacc tcattgtcaa gctggggcct gaagacctgg ccaatctgac ctcccttga	780
gtacttgatg tgggtgggaa ttgccgtcgc tgcgacctg cccccaatcc ctgtatagaa	840
tgtggccaaa agtccctcca cctgcacct gagaccttcc atcacctgag ccatctggaa	900
ggcctggtgc tgaaggacag ctctctccat aactgaact ctctctggtt ccaaggtctg	960
gtcaacctct cgggtctgga cctaagcgag aactttctct atgaaagcat caaccacacc	1020
aatgccttc agaacctaac ccgctgcgc aagctcaacc tgtcttcaa ttaccgcaag	1080
aaggtatcct ttgcccgcct ccacctggca agttcttca agaacctggt gtcactgcag	1140
gagctgaaca tgaacggcat ctctctccgc tcgctcaaca agtacacgct cagatggctg	1200
gccgatctgc ccaaactcca cactctgcat ctcaaatga acttcatcaa ccaggcacag	1260
ctcagcatct ttggtacctt ccgagccctt cgtttgtgg acttgcaga caatcgcac	1320
agtgggcctt caacgtgtc agaagccacc cctgaagagg cagatgatgc agagcaggag	1380
gagctgtgt ctgcgatcc tcaccagct cactgagca cccctgttc taagaactc	1440
atggacaggt gtaagaactt caagttacc atggacctgt ctggaacaa cctggtgact	1500
atcaagccag agatgtttgt caatctctca cgcctccagt gtcttagcct gagccacaac	1560
tccattgcac aggotgtcaa tggtctcag ttctgccgc tgactaatct gcaggtgctg	1620
gacctgtccc ataacaact ggactgtac cactggaaat cgttcagtga gctaccacag	1680
ttgcaggccc tggacctgag ctacaacagc cagccctta gcatgaaggg tataggccac	1740
aatttcagtt ttgtggcca tctgtccatg ctacacagcc ttagcctggc acacaatgac	1800
atcataccc gtgtgcctc acatctcaac agcaactcag tgaggtttct tgacttcagc	1860
ggcaacggta tgggccgcat tgggatgag gggggccttt atctccattt ctccaaggc	1920
ctgagtggcc tgetgaagct ggacctgtct caaataacc tgcatacct ccggccccag	1980
aacctgaca acctcccaa gagcctgaag ctgctgagcc tccgagaaa ctacctatct	2040
ttctttaat ggaccagtct gtccttctg cccaacctgg aagtcctaga cctggcaggc	2100
aaccagctaa aggcctgac caatggcacc ctgcctaatg gcacctctct ccagaaactg	2160
gatgtcagca gcaacagtat cgtctctgtg gtcccagcct tcttcgctct ggcggtcgag	2220
ctgaaagagg tcaacctcag ccacaacatt ctcaagacgg tggatcgctc ctggtttggg	2280

cccattgtga tgaacctgac agttctagac gtgagaagca accctctgca ctgtgcctgt 2340
 ggggcagcct tcgtagactt actgttgag gtgcagacca aggtgcctgg cctggctaata 2400
 ggtgtgaagt gtggcagccc cggccagctg cagggccgta gcatcttcgc acaggacctg 2460
 cggctgtgcc tggatgaggt cctctcttgg gactgctttg gcctttcact ctggctgtg 2520
 gccgtgggca tggtggtgcc tatactgcac catctctcgc gctgggacgt ctgttactgt 2580
 ttatctctgt gcctggcatg gctacctttg ctggcccgca gccgacgcag cgcccaagct 2640
 ctcccctatg atgccttcgt ggtgttcgat aaggcacaga gcgcagttgc ggactgggtg 2700
 tataacgagc tgcgggtgcg gctggaggag cggcgcggtc gccgagccct acgcttgtgt 2760
 ctggaggacc gagattggct gcctggccag acgctcttcg agaacctctg ggcttccatc 2820
 tatgggagcc gcaagactct atttgtgctg gcccacaagg accgcgtcag tggcctcctg 2880
 cgcaccagct tctgctggc tcagcagcgc ctgttgaag accgcaagga cgtggtggtg 2940
 ttggtgatcc tgcgtccgga tgcccaccgc tcccgtatg tgcgactgcg ccagcgtctc 3000
 tgccgccaga gtgtgctctt ctggccccag cagcccaacg ggcagggggg cttctgggcc 3060
 cagctgagta cagccctgac tagggacaac cgccactct ataaccagaa cttctgccgg 3120
 ggacctacag cagaatagct cagagcaaca gctggaaca gctgcatctt catgcctggt 3180
 tcccagattg ctctgcctgc 3200

<210> 8

<211> 1032

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Val Leu Arg Arg Arg Thr Leu His Pro Leu Ser Leu Leu Val Gln
 1 5 10 15

Ala Ala Val Leu Ala Glu Thr Leu Ala Leu Gly Thr Leu Pro Ala Phe
 20 25 30

Leu Pro Cys Glu Leu Lys Pro His Gly Leu Val Asp Cys Asn Trp Leu
 35 40 45

Phe Leu Lys Ser Val Pro Arg Phe Ser Ala Ala Ala Ser Cys Ser Asn
 50 55 60

Ile Thr Arg Leu Ser Leu Ile Ser Asn Arg Ile His His Leu His Asn
 65 70 75 80

Ser Asp Phe Val His Leu Ser Asn Leu Arg Gln Leu Asn Leu Lys Trp
 85 90 95

Asn Cys Pro Pro Thr Gly Leu Ser Pro Leu His Phe Ser Cys His Met
 100 105 110

Thr Ile Glu Pro Arg Thr Phe Leu Ala Met Arg Thr Leu Glu Glu Leu
 115 120 125

Asn Leu Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Thr Val Pro Arg Leu Pro Ser Ser
 130 135 140

Leu Val Asn Leu Ser Leu Ser His Thr Asn Ile Leu Val Leu Asp Ala
 145 150 155 160

Asn Ser Leu Ala Gly Leu Tyr Ser Leu Arg Val Leu Phe Met Asp Gly
 165 170 175

Asn Cys Tyr Tyr Lys Asn Pro Cys Thr Gly Ala Val Lys Val Thr Pro
 180 185 190

Gly Ala Leu Leu Gly Leu Ser Asn Leu Thr His Leu Ser Leu Lys Tyr
 195 200 205

Asn Asn Leu Thr Lys Val Pro Arg Gln Leu Pro Pro Ser Leu Glu Tyr
 210 215 220

Leu Leu Val Ser Tyr Asn Leu Ile Val Lys Leu Gly Pro Glu Asp Leu
 225 230 235 240

Ala Asn Leu Thr Ser Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg
 245 250 255

Arg Cys Asp His Ala Pro Asn Pro Cys Ile Glu Cys Gly Gln Lys Ser
 260 265 270

Leu His Leu His Pro Glu Thr Phe His His Leu Ser His Leu Glu Gly
 275 280 285

Leu Val Leu Lys Asp Ser Ser Leu His Thr Leu Asn Ser Ser Trp Phe
 290 295 300

Gln Gly Leu Val Asn Leu Ser Val Leu Asp Leu Ser Glu Asn Phe Leu
 305 310 315 320

Tyr Glu Ser Ile Asn His Thr Asn Ala Phe Gln Asn Leu Thr Arg Leu
 325 330 335

Arg Lys Leu Asn Leu Ser Phe Asn Tyr Arg Lys Lys Val Ser Phe Ala
 340 345 350

Arg Leu His Leu Ala Ser Ser Phe Lys Asn Leu Val Ser Leu Gln Glu
 355 360 365

Leu Asn Met Asn Gly Ile Phe Phe Arg Ser Leu Asn Lys Tyr Thr Leu
 370 375 380

Arg Trp Leu Ala Asp Leu Pro Lys Leu His Thr Leu His Leu Gln Met
 385 390 395 400

Asn Phe Ile Asn Gln Ala Gln Leu Ser Ile Phe Gly Thr Phe Arg Ala
 405 410 415

Leu Arg Phe Val Asp Leu Ser Asp Asn Arg Ile Ser Gly Pro Ser Thr
 420 425 430

Leu Ser Glu Ala Thr Pro Glu Glu Ala Asp Asp Ala Glu Gln Glu Glu
 435 440 445

Leu Leu Ser Ala Asp Pro His Pro Ala Pro Leu Ser Thr Pro Ala Ser
 450 455 460

Lys Asn Phe Met Asp Arg Cys Lys Asn Phe Lys Phe Thr Met Asp Leu	465	470	475	480
Ser Arg Asn Asn Leu Val Thr Ile Lys Pro Glu Met Phe Val Asn Leu		485	490	495
Ser Arg Leu Gln Cys Leu Ser Leu Ser His Asn Ser Ile Ala Gln Ala		500	505	510
Val Asn Gly Ser Gln Phe Leu Pro Leu Thr Asn Leu Gln Val Leu Asp	515		520	525
Leu Ser His Asn Lys Leu Asp Leu Tyr His Trp Lys Ser Phe Ser Glu	530		535	540
Leu Pro Gln Leu Gln Ala Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Ser Gln Pro Phe	545		550	555
				560
Ser Met Lys Gly Ile Gly His Asn Phe Ser Phe Val Ala His Leu Ser		565	570	575
Met Leu His Ser Leu Ser Leu Ala His Asn Asp Ile His Thr Arg Val		580	585	590
Ser Ser His Leu Asn Ser Asn Ser Val Arg Phe Leu Asp Phe Ser Gly	595		600	605
Asn Gly Met Gly Arg Met Trp Asp Glu Gly Gly Leu Tyr Leu His Phe	610		615	620
Phe Gln Gly Leu Ser Gly Leu Leu Lys Leu Asp Leu Ser Gln Asn Asn	625		630	635
				640
Leu His Ile Leu Arg Pro Gln Asn Leu Asp Asn Leu Pro Lys Ser Leu		645	650	655
Lys Leu Leu Ser Leu Arg Asp Asn Tyr Leu Ser Phe Phe Asn Trp Thr		660	665	670

Ser Leu Ser Phe Leu Pro Asn Leu Glu Val Leu Asp Leu Ala Gly Asn			
675	685		
Gln Leu Lys Ala Leu Thr Asn Gly Thr Leu Pro Asn Gly Thr Leu Leu			
690	700		
Gln Lys Leu Asp Val Ser Ser Asn Ser Ile Val Ser Val Val Pro Ala			
705	715	720	
Phe Phe Ala Leu Ala Val Glu Leu Lys Glu Val Asn Leu Ser His Asn			
725	730	735	
Ile Leu Lys Thr Val Asp Arg Ser Trp Phe Gly Pro Ile Val Met Asn			
740	745	750	
Leu Thr Val Leu Asp Val Arg Ser Asn Pro Leu His Cys Ala Cys Gly			
755	760	765	
Ala Ala Phe Val Asp Leu Leu Leu Glu Val Gln Thr Lys Val Pro Gly			
770	775	780	
Leu Ala Asn Gly Val Lys Cys Gly Ser Pro Gly Gln Leu Gln Gly Arg			
785	790	795	800
Ser Ile Phe Ala Gln Asp Leu Arg Leu Cys Leu Asp Glu Val Leu Ser			
805	810	815	
Trp Asp Cys Phe Gly Leu Ser Leu Leu Ala Val Ala Val Gly Met Val			
820	825	830	
Val Pro Ile Leu His His Leu Cys Gly Trp Asp Val Trp Tyr Cys Phe			
835	840	845	
His Leu Cys Leu Ala Trp Leu Pro Leu Leu Ala Arg Ser Arg Arg Ser			
850	855	860	
Ala Gln Ala Leu Pro Tyr Asp Ala Phe Val Val Phe Asp Lys Ala Gln			
865	870	875	880

Ser Ala Val Ala Asp Trp Val Tyr Asn Glu Leu Arg Val Arg Leu Glu
885 890 895

Glu Arg Arg Gly Arg Arg Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Asp Arg Asp
900 905 910

Trp Leu Pro Gly Gln Thr Leu Phe Glu Asn Leu Trp Ala Ser Ile Tyr
915 920 925

Gly Ser Arg Lys Thr Leu Phe Val Leu Ala His Thr Asp Arg Val Ser
930 935 940

Gly Leu Leu Arg Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gln Gln Arg Leu Leu Glu
945 950 955 960

Asp Arg Lys Asp Val Val Val Leu Val Ile Leu Arg Pro Asp Ala His
965 970 975

Arg Ser Arg Tyr Val Arg Leu Arg Gln Arg Leu Cys Arg Gln Ser Val
980 985 990

Leu Phe Trp Pro Gln Gln Pro Asn Gly Gln Gly Gly Phe Trp Ala Gln
995 1000 1005

Leu Ser Thr Ala Leu Thr Arg Asp Asn Arg His Phe Tyr Asn Gln
1010 1015 1020

Asn Phe Cys Arg Gly Pro Thr Ala Glu
1025 1030

<210> 9
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 9	
gaaactcgag ccacatgag acagacttgg ccttgatct ac	42
<210> 10	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 10	
gaaagaattc ttaatgtaca gagttttgg atccaag	37
<210> 11	
<211> 670	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 11	
agaaaaattt taaaaatta ttcattcata ttttaggag tttgaaatga ttggatatgt	60
aattatattc atattattaa tgtgtatcta tatagatttt tattttgcat atgtactttg	120
atacaaaatt tacatgaaca aattacacta aaagttattc cacaaatata cttatcaaat	180
taagttaaat gtcaataget tttaaactta aattttagtt taacttttct gtcattcttt	240
actttgaata aaaagagcaa actttgtagt ttttatctgt gaagtagagg tatacgtaat	300
atacataaat agatagcca aatctgtgtt attaaaattt catgaagatt tcaattagaa	360
aaaaatacca taaaaggctt tgagtgcagg tgaaaaatag gcaatgatga aaaaaaatga	420
aaaacttttt aaacacatgt agagagtgcg taaagaaagc aaaacagag atagaaagta	480
caactagggg atttagaaaa tggaaattag tatgttcaact atttaagacc tatgcacaga	540
gcaaagtctt cagaaaacct agaggccgaa gttcaagggt atccatctca agtagcctag	600
caatatttgc aacatcccaa tggccctgtc cttttcttta ctgatggccg tgctggtgct	660
cagctacaaa	670
<210> 12	
<211> 300	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	

<400> 12	
ttctcagtc gtttctttc ctttgcttc tccaagtct tgtttacaa tttgcttag	60
tcattcactg aaactttaa aaacattaga aaacctaca gtttgtaaat cttttccct	120
attatatata tcataagata ggagcttaa taaagagttt tagaaactac taaatgtaa	180
atgacatagg aaaactgaaa gggagaagtg aaagtgggaa attcctctga atagagagag	240
gaccatctca tataaatagg ccataccac ggagaaagga cattctaact gcaaccttc	300
<210> 13	
<211> 1031	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 13	
agaaggcctt acagtgat gggatcccag tattattga gtttctcat tcataaatg	60
gggataataa tagtaaatga gttgacacgc gctaagacag tggaatagt gctggcacag	120
ataagcctc ggtaaatggt agccaataat gatagagtat gctgtaagat atctttctct	180
ccctctgctt ctcaacaagt ctctaatcaa ttattccact ttataacaa ggaaatagaa	240
ctcaaagaca ttaagcactt ttccaaagg tcgcttagca agtaaatggg agagacccta	300
tgaccaggat gaaagcaaga aattcccaca agaggactca ttccaactca tatcttgta	360
aaaggtccc aatgccagc tcagatcaac tgcctcaatt tacagtgtga gtgtgctcac	420
ctccttggg gactgtatat ccagaggacc ctctcaata aaacttta taaataacat	480
ccttccatgg atgagggaaa ggagtaaga tctgtaatga ataagcagga actttgaaga	540
ctcagtgact cagtgagtaa taaagactca gtgactctg atcctgtcct aactgccact	600
cctgtgtgc cccaagaaag cggttctg ctctctgagg aggaccctt cctggaagg	660
taaaactaag gatgtcagca gagaaatft tccaccattg gtgcttggtc aaagaggaaa	720
ctgatgagct cactctagat gagagagcag tgaggagag acagagactc gaattccgg	780
aggctattc agtttctt tccgtttgt gcaattcac ttatgatacc ggccaatgct	840
tggtgctat ttggaaact cccttaggg gatgccctc aactggcct ataaaggcc	900
agcctgagct gcagaggatt cctgcagagg atcaagacag cacgtggacc tcgcacagcc	960

tctcccacag gtaccatgaa ggtctccgcg gcagccctcg ctgtcatcct cattgctact	1020	
gccctctgcg c		1031
<210> 14		
<211> 401		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 14		
gatctgtaat gaataagcag gaactttgaa gactcagtga ctcagtgagt aataaagact	60	
cagtgacttc tgatcctgtc ctaactgccca ctcttgttg tccaagaaa gcggttctct	120	
gctctctgag gaggaccctc tccttgggaag gtaaaactaa ggatgtcagc agagaaattt	180	
ttccaccatt ggtgcttggc caaagaggaa actgatgagc tactctaga tgagagagca	240	
gtgagggaga gacagagact cgaatttccg gagctatttc agttttctt tccgttttgt	300	
gcaatttcac ttatgatacc ggccaatgct tggttgctat tttggaaact cccttaggg	360	
gatgcccctc aactggccct ataaagggcc agcctgagct g		401
<210> 15		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的寡核苷酸		
<400> 15		
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt		24
<210> 16		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的寡核苷酸		
<400> 16		
tgctgctttt gtgcttttgt gctt		24
<210> 17		
<211> 24		

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (2)..(2)	
<223> n = m5c	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (5)..(5)	
<223> n = m5c	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (13)..(13)	
<223> n = m5c	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (21)..(21)	
<223> n = m5c	
<400> 17	
tngtngtttt gtngttttgt ngtt	24
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 18	
tccatgacgt tctgatgct	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 19	
tccatgagct tctgatgct	20

<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(8)..(8)	
<223>	n = m5c	
<400>	20	
	tccatgangt tcctgatgct	20
<210>	21	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	21	
	gcgactggct gcatggcaaa accctctttg	30
<210>	22	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	22	
	caaagagggt tttgcatgc agccagtcgc	30
<210>	23	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	23	
	cgagattggc tgcatggcca gacgctcttc	30

<210> 24	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 24	
gaagagcgtc tggccatgca gccaatctcg	30
<210> 25	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 25	
ggcctcagca tcttt	15
<210> 26	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 26	
ggcctatcga ttttt	15
<210> 27	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 27	
gggtcccag tgaga	15
<210> 28	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 28

gggttatcga ttaga

15

<210> 29

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 29

cagctccagg gcctatcgat tttgacacag gacc

34

<210> 30

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 30

ggtcctgtgc aaaaatcgat aggcctgga gctg

34

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 31

tccatgacgt tttgatggt

20

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 32 tccatgacgt tttgatg	18
<210> 33 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 33 tccatgacgt tttga	16
<210> 34 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 34 tccatgacgt tttt	14
<210> 35 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 35 tccatgacgt tttgatggt	20
<210> 36 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 36 tcgctgtttt gtcgtttgt cggt	24

<210> 37
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 37
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 38
 tccatgacgt tttgatgtt 20

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 39
 aagcgaaaat gaaattgact 20

<210> 40
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 40
 accatggacg aactgtttcc cctc 24

<210> 41
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	41	
	accatggacg acctgtttcc cctc	24
<210>	42	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	42	
	accatggacg agctgtttcc cctc	24
<210>	43	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	43	
	accatggacg atctgtttcc cctc	24
<210>	44	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	44	
	accatggacg gtctgtttcc cctc	24
<210>	45	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	

<400> 45 accatggacg tactgtttcc cctc	24
<210> 46 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 46 accatggacg ttctgtttcc cctc	24
<210> 47 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 47 agcgggggcg agcgggggcg	20
<210> 48 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 48 agctatgacg ttccaagg	18
<210> 49 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 49 atcgactctc gacggttctc	20

<210> 50	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 50	
atgacgttc tgacgtt	17
<210> 51	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 51	
atggaaggtc caacgttctc	20
<210> 52	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 52	
atggaaggtc cagcgttctc	20
<210> 53	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 53	
atggactctc cagcgttctc	20
<210> 54	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	54	
	atggaggctc catcgttctc	20
<210>	55	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	55	
	cacgttgagg ggcac	15
<210>	56	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	56	
	caggcataac ggttccgtag	20
<210>	57	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	57	
	ctgatttccc cgaaatgatg	20
<210>	58	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	

<400> 58 gagaacgatg gaccttccat	20
<210> 59 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 59 gagaacgctc cagcactgat	20
<210> 60 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 60 gagaacgctc gaccttccat	20
<210> 61 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 61 gagaacgctc gaccttcgat	20
<210> 62 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 62 gagaacgctg gaccttccat	20

<210> 63	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 63	
gattgcctga cgtcagagag	20
<210> 64	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 64	
gcatgacggtt gagct	15
<210> 65	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 65	
gcggcgggcg gcgcgcgcc	20
<210> 66	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 66	
gcgtgcgttg tcgtgtcgt t	21
<210> 67	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	67	
	gctagacgtt agcgt	15
<210>	68	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	68	
	gctagacgtt agtgt	15
<210>	69	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	69	
	gctagatgtt agcgt	15
<210>	70	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	70	
	gcttgatgac tcagccgaa	20
<210>	71	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	

<400> 71 ggaatgacgt tccctgtg	18
<210> 72 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 72 ggggtcaacg ttgacgggg	19
<210> 73 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 73 ggggtcagtc ttgacgggg	19
<210> 74 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 74 gtccatttc cgtaaatctt	20
<210> 75 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 75 taccgctgc gaccctct	18

<210>	76	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	76	
	tcagcgtgcg cc	12
<210>	77	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	77	
	tccacgacgt ttgcgacgtt	20
<210>	78	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	78	
	tccataacgt tcctgatgct	20
<210>	79	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	79	
	tccatagcgt tcttagcggt	20
<210>	80	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 80

tccatcacgt gcctgatgct

20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 81

tccatgacgg tcctgatgct

20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 82

tccatgacgt ccctgatgct

20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 83

tccatgacgt gcctgatgct

20

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 84	
tccatgacgt tctgacggt	20
<210> 85	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 85	
tccatgccgg tctgatgct	20
<210> 86	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 86	
tccatgcgtg cgtgcgttt	20
<210> 87	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 87	
tccatgcgtt gcgttgcgtt	20
<210> 88	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 88	
tccatggcgg tctgatgct	20

<210>	89	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	89	
	tccatgtcga tctgatgct	20
<210>	90	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	90	
	tccatgtcgc tctgatgct	20
<210>	91	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	91	
	tccatgtcgg tctgatgct	20
<210>	92	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	92	
	tccatgtcgg tctgctgat	20
<210>	93	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	93	
	tccatgctgt ccctgatgct	20
<210>	94	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	94	
	tccatgctgt tctgatgct	20
<210>	95	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	95	
	tccatgctgt tctgtcgtt	20
<210>	96	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	96	
	tccatgctgt tttgtcgtt	20
<210>	97	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	

<400> 97 tcctgacgtt cctgacgtt	19
<210> 98 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 98 tcctgtcgtt cctgtcgtt	19
<210> 99 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 99 tcctgtcgtt cctgtcgtt	20
<210> 100 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 100 tcctgtcgtt tttgtcgtt	20
<210> 101 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 101 tcctgtcgtt tcctgtcgtt	20

<210>	102	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	102	
	tcgatcgggg cggggcgagc	20
<210>	103	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	103	
	tcgtcgctgt ctccgcttct t	21
<210>	104	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	104	
	tcgtcgctgt ctccgcttct tcttgcc	27
<210>	105	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	105	
	tcgtcgctgt ctgcccttct t	21
<210>	106	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	106	
	tcgctgctgt tgctgttct t	21
<210>	107	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	107	
	tcgctgctgt cggt	14
<210>	108	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	108	
	tcgctggtgt cggtgtcgtt	20
<210>	109	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	109	
	tcgctggtgt cgttttgtcg tt	22
<210>	110	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	

<400> 110 tctcccagcg cgcgcat	18
<210> 111 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 111 tctcccagcg ggcgcat	17
<210> 112 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 112 tctcccagcg tgcgcat	18
<210> 113 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 113 tgcagattgc gcaatctgca	20
<210> 114 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 114 tgtcgttgc gtt	13

<210>	115	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	115	
	tgctggtgct gttgctgtt	19
<210>	116	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	116	
	tgctggtgct gttgctgttg tctgtt	25
<210>	117	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	117	
	tgctggttgt cgtttgctgt t	21

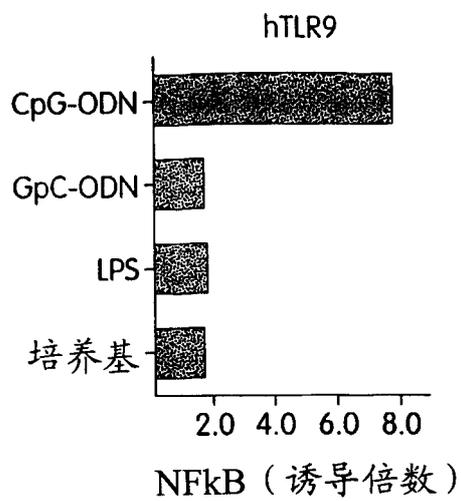


图 1A

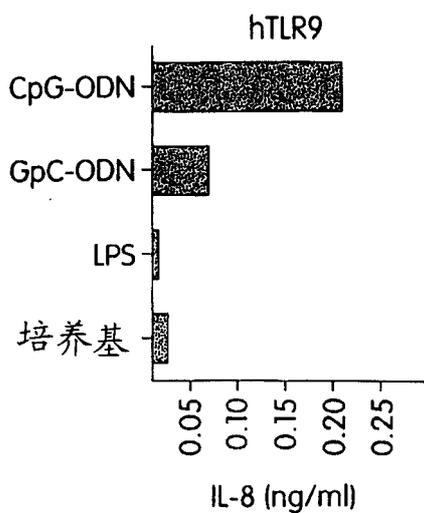


图 1B

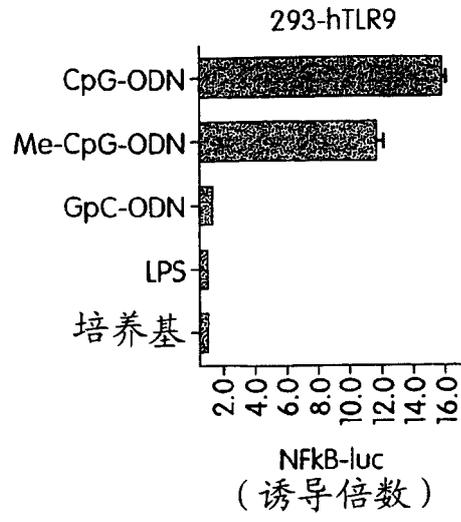


图 2

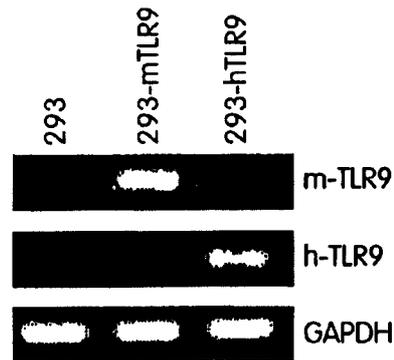


图 3

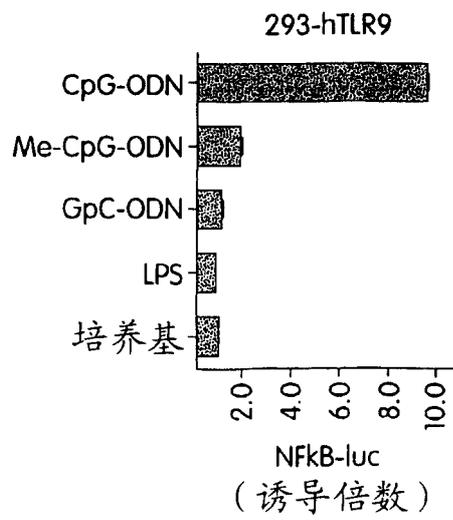


图 4

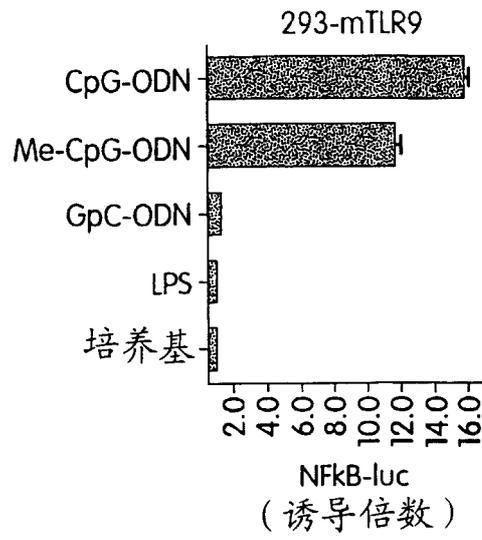


图 5

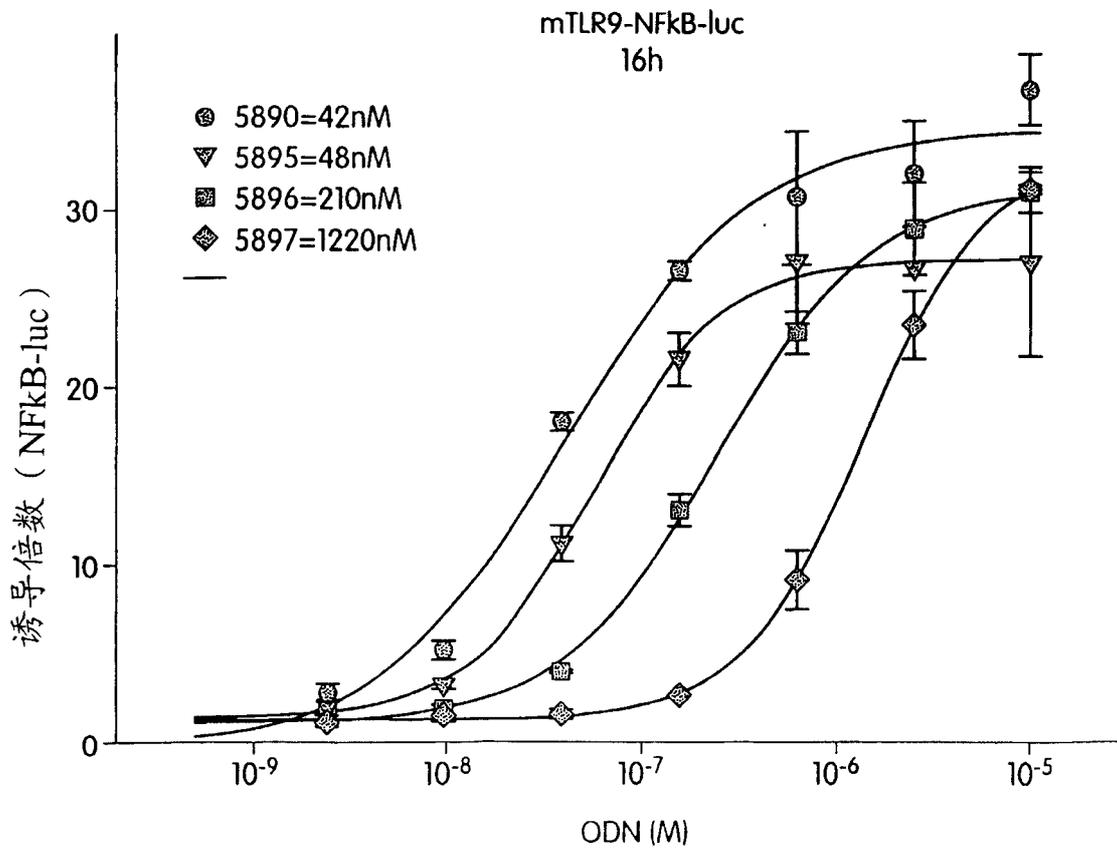


图 6

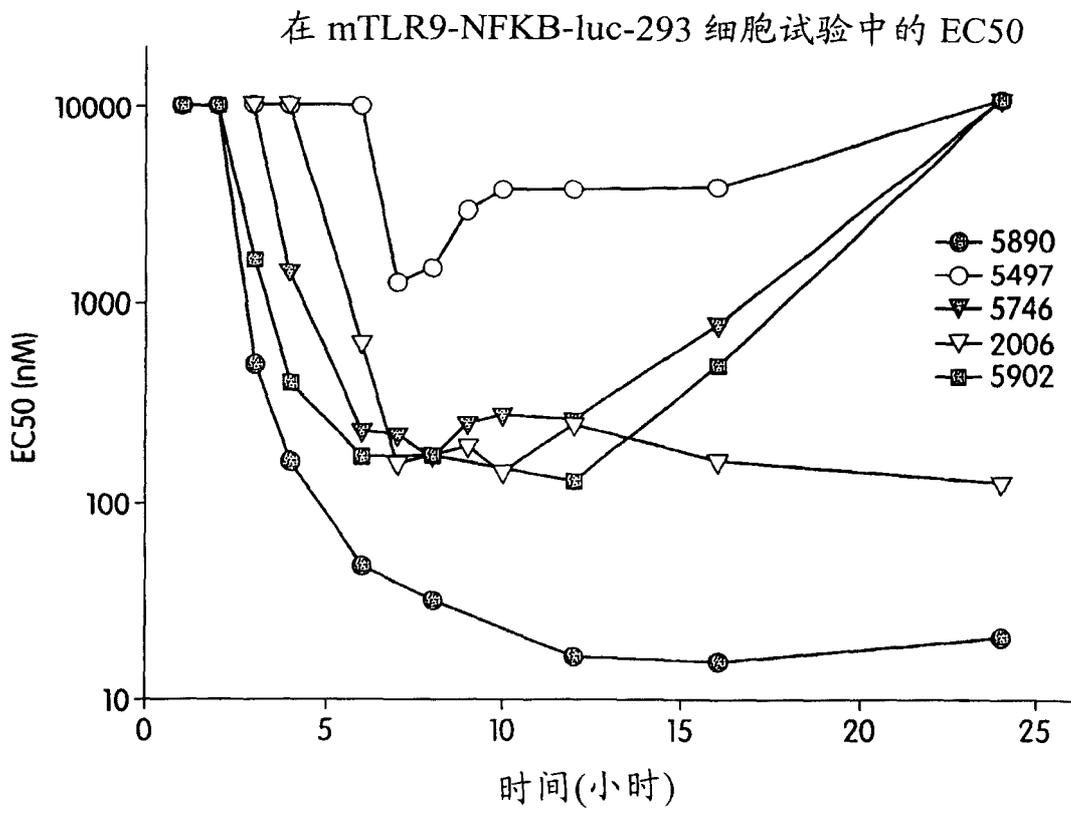


图 7

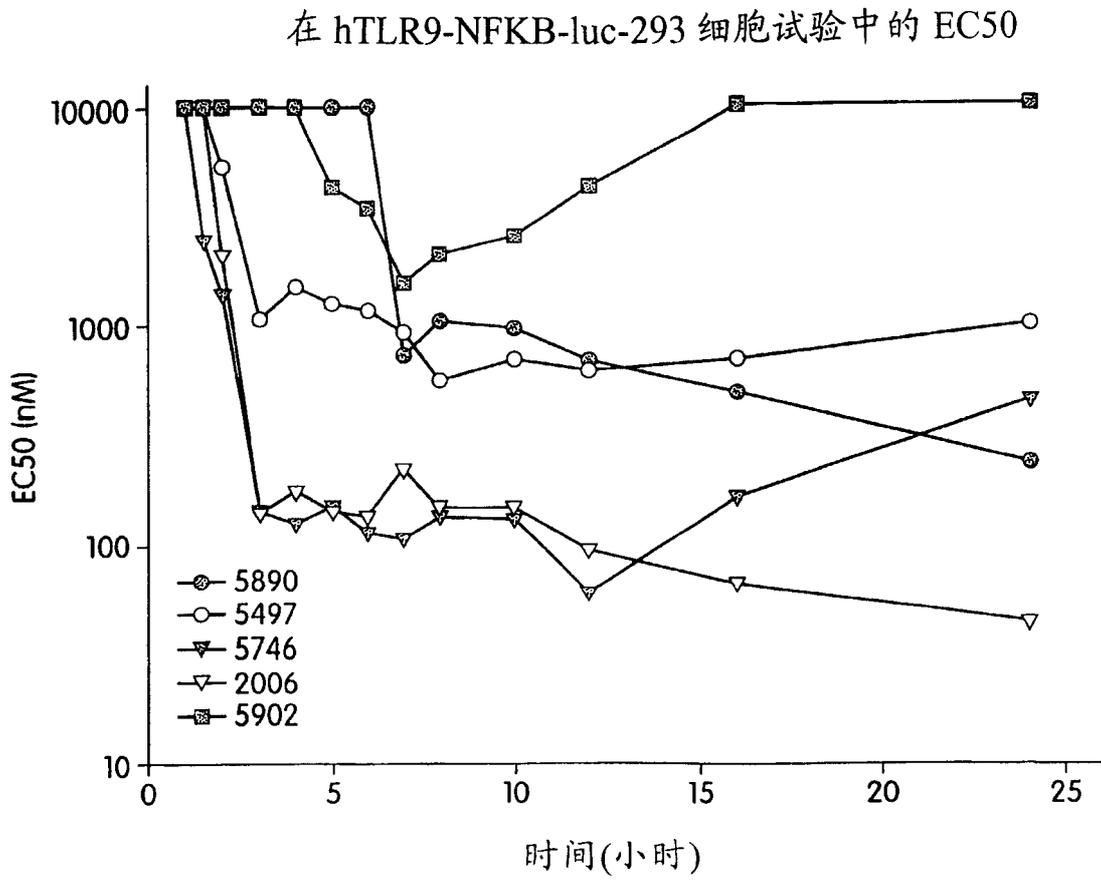


图 8

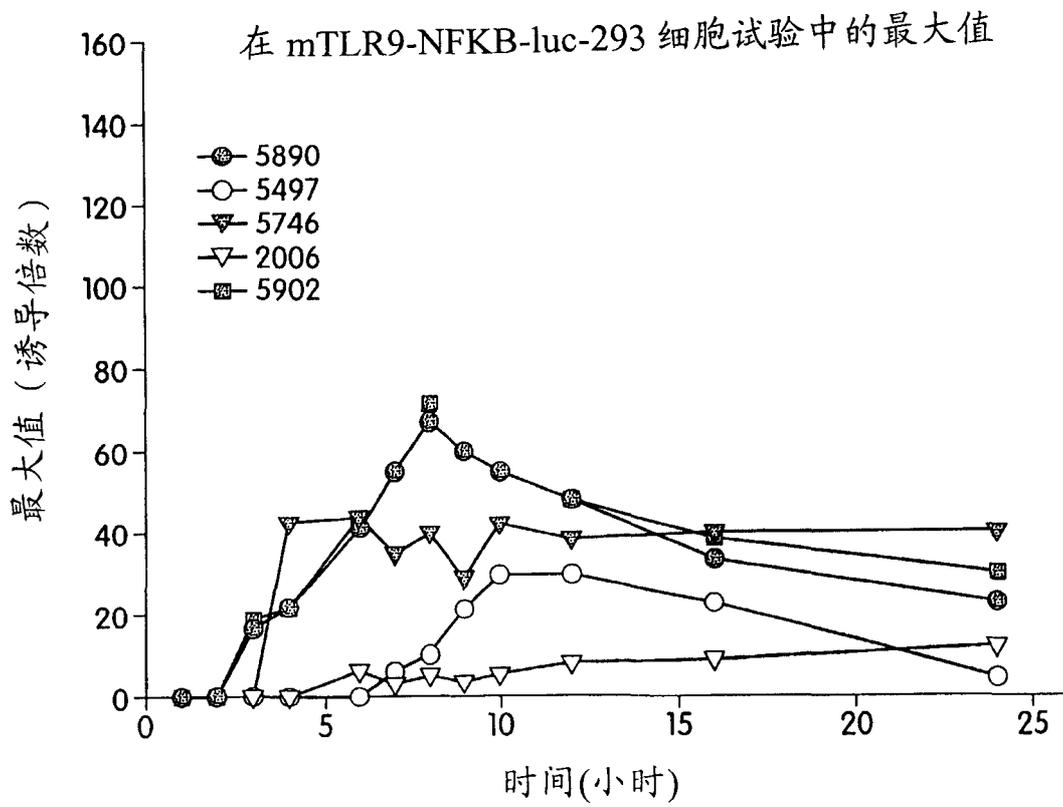


图 9

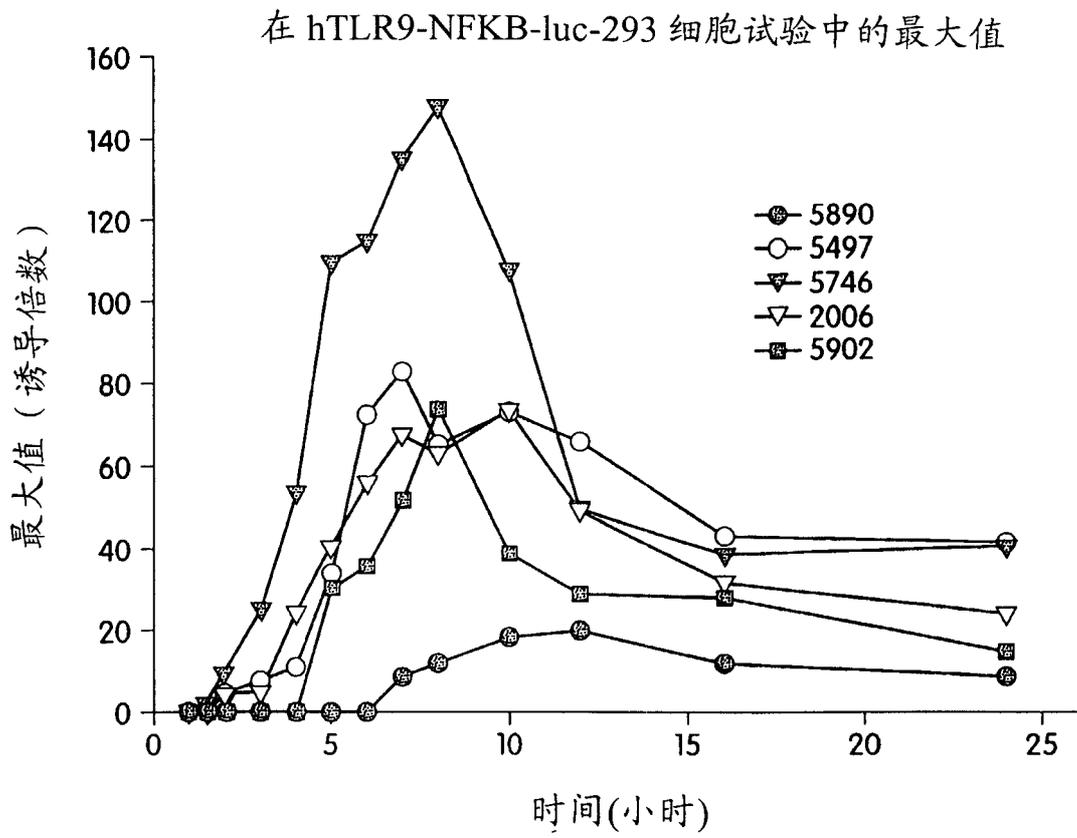


图 10

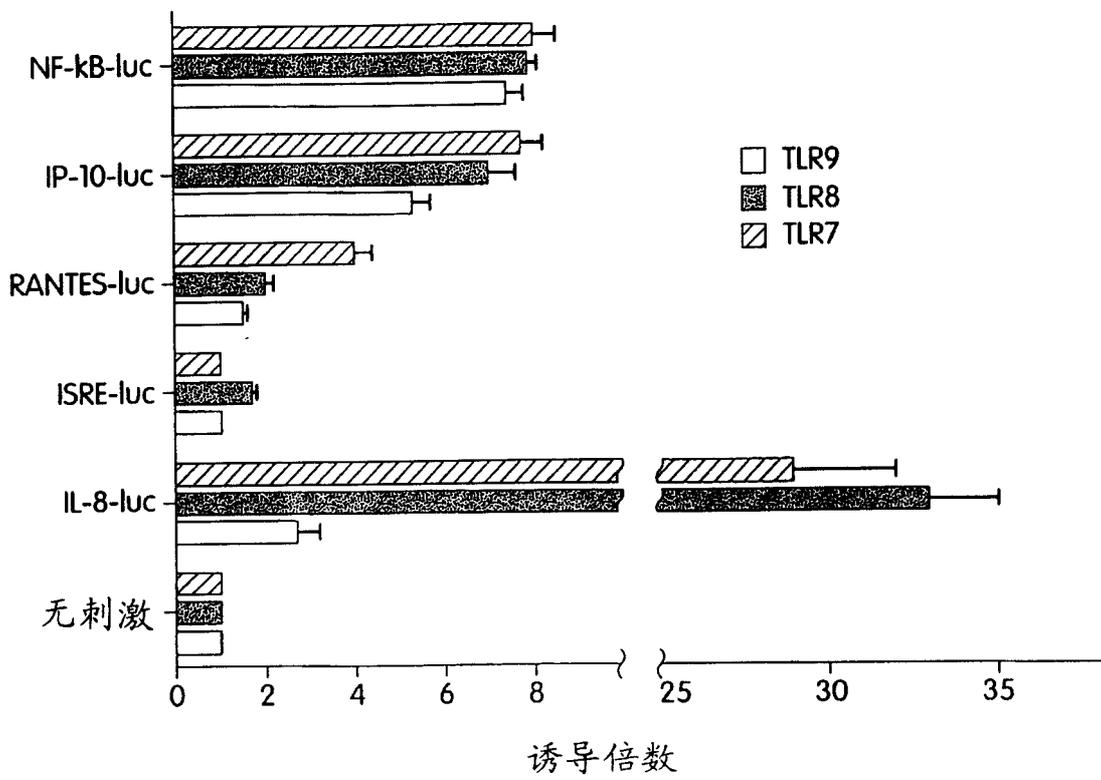


图 11

专利名称(译)	Toll样受体3信号传导的激动剂和拮抗剂		
公开(公告)号	CN1633598A	公开(公告)日	2005-06-29
申请号	CN02819540.X	申请日	2002-10-03
申请(专利权)人(译)	科勒制药股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	COLEY制药GMBH		
[标]发明人	格雷森利甫福德		
发明人	格雷森·利甫福德		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/52 C07K14/54 C07K14/56 C07K14/565 C07K14/705 C12N5/08 C12N15/09 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 C07H21/04 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/63		
CPC分类号	C07K14/5412 C07K14/523 C07K14/5421 C07K14/5434 C07K14/56 C07K14/565 C07K14/705		
优先权	60/327520 2001-10-05 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于鉴定、表征和优化通过TLR3起作用的免疫刺激化合物及其激动剂和拮抗剂的组合物和方法。

