

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/57

C12N 9/50

A61K 38/48

A61K 39/39



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98802825.5

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1204258C

[22] 申请日 1998.2.25 [21] 申请号 98802825.5

[30] 优先权

[32] 1997. 2. 25 [33] GB [31] 9703827. 7

[32] 1997. 2. 25 [33] GB [31] 9703850. 9

[32] 1997. 2. 28 [33] GB [31] 9704252. 7

[32] 1997. 3. 25 [33] GB [31] 9706119. 6

[86] 国际申请 PCT/GB1998/000591 1998. 2. 25

[87] 国际公布 WO1998/038319 英 1998. 9. 3

[85] 进入国家阶段日期 1999. 8. 25

[71] 专利权人 科特克斯(英国)有限公司

地址 英国弗林特郡

[72] 发明人 T·L·迈诺特 C·恩格沃达

K·皮克

审查员 刘红霞

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 周中琦

权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图 9 页

[54] 发明名称 菠萝蛋白酶成分

[57] 摘要

一种新的菠萝蛋白酶成分是免疫刺激剂、抗微生物剂和抗癌剂。它可用于治疗免疫系统受抑制的病症或作为疫苗佐剂或可用于治疗实体瘤或软体瘤或其它肿瘤。

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

1. 一种分离的蛋白，由 SDS - PAGE 测定其分子量为 27.45KDa，由等电聚焦测定其等电点为 9.7，并具有氨基端序列：

Val-Leu-Pro-Asp-Ser-Ile-Asp-Trp-Arg-Gln-Lys-Gly-Ala-Val-Thr-Glu-Val-Lys-Asn-Arg-Gly;

该分离蛋白是可通过下列方法得到的菠萝蛋白酶组分：

i.将菠萝蛋白酶溶解于含有 0.1mM EDTA 钠的 pH5.0 的 20mM 乙酸缓冲液中；

ii.通过在 SP - Sepharose HP 上快速蛋白液相层析，用 300ml 以上的溶于乙酸缓冲液中的 0 - 0.8M 氯化钠线性梯度洗脱以分离菠萝蛋白酶成分；并且

iii.收集对应于从柱上下来的第三个峰的组分，其出现在第一个主要的茎菠萝蛋白水解酶峰的上升边缘。

2. 编码如权利要求 1 中所述的分离蛋白的分离核酸。

3. 一种分离的核酸，其与权利要求 2 所述的分离核酸互补。

4. 如权利要求 1 所述的分离蛋白在制备用于人或兽医的药物中的用途。

5. 如权利要求 1 所述的分离蛋白在制备免疫刺激剂中的用途。

6. 如权利要求 5 中所述的用途，其中的免疫刺激剂用于治疗初级免疫缺陷或者由营养不良、感染、肿瘤、创伤、利用药物进行的医学治疗、蛋白丢失、糖尿病或老龄导致的次级免疫缺陷。

7. 如权利要求 6 中所述的用途，其中的免疫刺激剂是疫苗佐剂。

8. 如权利要求 1 所述的分离蛋白在制备抗微生物剂方面的用途。

9. 如权利要求 1 所述的分离蛋白在制备抗癌剂方面的用途。

10. 如权利要求 9 中所述的用途，其中抗癌剂用于治疗卵巢瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌、黑色素瘤、白血病或淋巴瘤。

11. 一种兽医组合物，其中包含权利要求 1 的分离蛋白及兽医上可接受的赋形剂或载体。

12. 一种疫苗组合物,其中包含疫苗、含有权利要求1的分离蛋白的佐剂及药学上或兽医上可接受的赋形剂或载体。

13. 如权利要求12所述的疫苗组合物,其被配制成用于肠道、鼻、颊或肛门施用。

14. 如权利要求12所述的疫苗组合物,其被配制成用于非肠道施用。

15. 如权利要求14所述的疫苗组合物,其被配制成经静脉内、皮下、肌内或腹膜内途径给药。

菠萝蛋白酶成分

本发明涉及菠萝蛋白酶成分。具体地，本发明涉及含有新型蛋白并具有免疫调节和抗肿瘤活性的菠萝蛋白酶组分。

茎菠萝蛋白酶（菠萝蛋白酶）是在凤梨科植物组织中发现的蛋白水解酶的统称。它是来自凤梨植物（*Ananas comosus*）茎的各种成分的混合物。已知菠萝蛋白酶包含至少五种蛋白水解酶，也包含非蛋白水解酶，包括酸性磷酸酶和过氧化物酶；它也可包含淀粉酶和纤维素酶活性。另外，也存在多种其它成分。

菠萝蛋白酶曾用于治疗多种病症包括炎症，具体地，它已用于治疗腹泻。菠萝蛋白酶在治疗感染性腹泻方面的用途在 WO-A-9301800 中得到，其中证明菠萝蛋白酶通过蛋白水解作用破坏病原体的肠道受体从而发挥作用，在 WO-A-8801506 中，认为菠萝蛋白酶使病原体从肠道受体上脱离下来。

Taussig 等，*Planta Medica*, 1985, 538-539 和 Maurer 等，*Planta Medica*, 1988, 377-381 都提出菠萝蛋白酶可用于抑制肿瘤生长。US 5, 233, 406、DE-A-4302060 和 JP-A-59225122 也说明了菠萝蛋白酶在治疗癌症方面的用途。US 5, 223, 406 认为菠萝蛋白酶能够诱导肿瘤坏死因子（TNF），而 DE-A-4302060 认为菠萝蛋白酶能够通过肿瘤表面蛋白 CD44 的结构修饰防止转移。

在 WO-A-9400147 中描述了各种实验，这些实验证明蛋白水解酶，尤其是菠萝蛋白酶能抑制分泌。此申请也公开了菠萝蛋白酶能降低毒素结合活性并能抑制诸如热不稳定毒素（LT）和霍乱毒素（CT）的毒素及诸如热稳定毒素（ST）的毒素的分泌效应，尽管 ST 具有与 LT 和 CT 非常不同的作用模式。这些观察结果通过菠萝蛋白酶混合物的一个成分茎菠萝蛋白酶看来能调节环核苷

酸途径这一事实得到解释，并且这一点在 WO-A-9500169 中得到进一步讨论。另外，也证明菠萝蛋白酶抑制由钙依赖的途径导致的分泌。

WO-A-9600082 也涉及了菠萝蛋白酶并且公开了粗制菠萝蛋白酶能够干涉对生长重要的信号传导途径，尤其是导致生长因子如白细胞介素-2 (IL-2)、血小板衍生的生长因子 (PDGF) 和胰岛素样生长因子 (IGF) 产生的信号传导途径。此文献认为作为其封闭信号传导途径的能力的结果，菠萝蛋白酶能作用为抗癌剂。另外，依据要处理的细胞类型以及细胞以前是否已活化，菠萝蛋白酶可用作免疫抑制剂或免疫刺激剂。

从现有技术看，菠萝蛋白酶很明显是具有多种不同生理效应的混合物。并不是所有的菠萝蛋白酶组分都已得到鉴定，因此除了我们已描述了其活性的茎菠萝蛋白酶，还不清楚哪一个成分负责菠萝蛋白酶各种不同效应的哪一种。如果菠萝蛋白酶混合物要用作药物，这当然是主要缺点，因为尽管菠萝蛋白酶的一个成分可能产生希望的效果，菠萝蛋白酶混合物的某些其它成分的作用可能产生不利的副作用。

因此，如果产生特定医学活性的菠萝蛋白酶单独成分可以得到分离并且单独施用以便减少副作用的可能性，这将是有益的。

本发明涉及已从菠萝蛋白酶混合物分离的特定组分，该组分看来至少部分地负责免疫调节和抗肿瘤活性。

本发明的组分可以用常规方法，例如层析从菠萝蛋白酶混合物分离。高效液相层析 (HPLC) 适于此目的，通过快速蛋白液相层析 (FPLC™)，使用装有诸如 SP-sepharose 的物质的柱子可以得到特别好的菠萝蛋白酶蛋白的分离。正如将在实施例更详细描述，在 SP-sepharose 上使用 300ml 以上的乙酸缓冲液中的 0-0.8M 氯化钠线性梯度进行层析，本发明的蛋白是从柱上下来的第三个峰，出现在第一个主要的茎菠萝蛋白酶峰 (从柱下下来的第四个峰) 的上升边缘上。

在本发明的第一个方面中，提供了具有由 SDS-PAGE 测定

的约 27.45kDa 分子量的菠萝蛋白酶组分，它可通过下列方法得到：

i 将菠萝蛋白酶溶解于含有 0.1mM EDTA 钠的 pH5.0 的 20mM 乙酸缓冲液中；

ii 通过在 SP-sepharose HP 上快速蛋白液相层析并用 300ml 以上的溶于乙酸缓冲液中的 0-0.8M 氯化钠线性梯度洗脱以分离菠萝蛋白酶组分，并且

iii 收集对应于从柱下下来的第三个峰的组分，出现在第一个主要的茎菠萝蛋白酶水解酶峰的上升边缘上。

本发明的菠萝蛋白酶组分，本发明人命名为 CCZ，主要负责菠萝蛋白酶的免疫刺激活性，因为已发现其它已知的成分如茎菠萝蛋白酶 (SBP)、comosain 和 ananain 几乎不具有免疫刺激活性并且实际上可能作用为免疫抑制剂。本发明人已发现由本发明人命名为 CCU 的菠萝蛋白酶组分具有 F9 具有的某些免疫调节活性，F9 也包含在菠萝蛋白酶中 (Garbin 等, 国际肿瘤学杂志, (1994)5, 197-203)。

同样，因为本发明的菠萝蛋白酶组分含有比粗制菠萝蛋白酶低得多数量的成分，所以它不可能有这么多副作用，并且当用作药剂时其活性可以更清楚地确定。

本发明人已知鉴定并得到了 CCZ 组分的主要成分的氨基酸序列。认为此蛋白负责 CCZ 组分的生物学活性。

因此，在本发明的第二方面，提供了作为菠萝蛋白酶组分的蛋白，具有由 SDA-PAGE 测定的约 27.45kDa 分子量，具有由等电聚焦测定的等电点 9.7，并具有氨基酸序列：

Val Leu Pro Asp Ser Ile Asp Trp Arg Gln Lys Gly Ala Val
Thr Glu Val Lys Asn Arg Gly

本发明的 CCZ 组分能作用为免疫刺激剂和抗癌剂并且认为第二方面的蛋白可能负责这些活性。例如，从 WO-A-9301800 可知，菠萝蛋白酶混合物是非特异的免疫刺激剂，但是以前已假定一个已知的菠萝蛋白酶成分，可能是茎菠萝蛋白酶负责此活性。现已发现事实并非如此，本发明的蛋白是免疫刺激剂而茎菠萝蛋

白酶几乎不具有免疫刺激剂活性。

在本发明另一方面，提供了具有编码第二方面蛋白的序列或与其互补的序列的核酸。这样的核酸的序列可使用标准方法测定。

在本发明另一方面，提供了用于人或畜医药的本发明第一方面的 CCZ 组分或根据本发明第二方面所述的蛋白。

本发明的 CCZ 组分的一个用途是免疫刺激剂，因此，也提供了本发明第一方面的 CCZ 组分和第二方面的蛋白在制备免疫刺激剂方面的用途。

因此，CCZ 组分或作为其主要成分的纯化蛋白可用于治疗其中免疫系统受抑制的病症的方法。此方法包括给病人施用有效量的本发明第一方面的 CCZ 组分或第二方面的蛋白。

因为其刺激免疫反应的能力，菠萝蛋白酶的 CCZ 组分具有相当大的用于其中病人无免疫应答的很多临床情况的潜力。初级免疫缺陷是遗传异常的结果，而次级免疫缺陷可由营养不良、感染（例如 HIV 和疟疾）、肿瘤（例如淋巴瘤、骨髓瘤及其它）、创伤（例如灼伤、击伤和手术）、医学治疗（例如用药如类固醇、环孢菌素和环磷酰胺）、蛋白质丢失（如腹泻和灼伤）、糖尿病和老龄引起。

免疫缺陷导致对病毒、原生动物、细菌及真菌感染的易感性提高，并且它与每年的很多死亡相关，对许多国家中相当一部分健康消费负责。

免疫反应具有两个功能性分类：先天免疫系统和获得性免疫系统。当病原体侵入机体时，获得性免疫反应和先天免疫反应都会活化。先天免疫反应在感染因子和大多数潜在病原体建立感染前提供针对它们的第一道防线。在先天免疫的初始阶段，获得性免疫反应正在发展。如果第一道防御被突破，获得性免疫系统应当充分地发展以产生针对感染因子的特异反应，特异反应在正常情况下清除此因子。

本发明的菠萝蛋白酶组分通过刺激获得性和先天免疫作用为免疫调节剂。

首先，它通过增强 T 细胞活化和增加 B 细胞产生的抗体来增强获得性免疫。增强的 T 细胞活化将导致细胞因子如 IL-2、IL-3、IL-4、干扰素- γ (IFN- γ)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、IL-1、IL-5、IL-6、IL-10、转化生长因子- β (TGF- β) 和 FWF- α 的产生增加。另外，此蛋白可在病原体特异的获得性免疫反应发展所需的时间期间促进由巨噬细胞、天然杀伤细胞 (NK) 和嗜中性粒细胞介导的先天免疫反应。

先天免疫反应的刺激使菠萝蛋白酶的 CCZ 组分可用于 T 或 B 细胞反应功能不完全的情况。这可发生在次生免疫缺陷如上述的那些免疫缺陷中以及由遗传异常引起的病症如在缺乏功能性 T 和/或 B 细胞的严重复合免疫缺陷病人中存在的病症中。

本发明的菠萝蛋白酶组分也可促进 T 细胞亚类分化并补偿选择性 T 细胞亚类缺陷。

T 细胞分为两个亚群，促进抗体和细胞介导的免疫反应的 CD4⁺ 或“辅助” T 细胞以及杀细胞的 CD8⁺ 或“细胞毒性” T 细胞。两种 T 细胞群对于机体抵御多种病原体是必需的，任一 T 细胞群的减少都将有破坏性效应。这可通过 CD4⁺ T 细胞数目减少的 AIDS 病人对机会感染的高易感性而得到证明。

CCZ 组分在另一 T 细胞群缺乏时刺激一个 T 细胞群的能力意味着它可用于治疗其中一个 T 细胞亚群减少的病人；例如患有 bare lymphocyte syndrome (缺乏功能性 CD8⁺ 细胞) 的病人或患有 MHC I 类缺陷 (缺乏功能性 CD4⁺ 细胞) 或患有诸如 AIDS 病人中发生的各种次生免疫缺陷的病人。

刺激后，CD4⁺ T 细胞可分化成参与细胞介导的免疫反应的 Th1 细胞和参与体液 (抗体) 介导的反应产生的 Th2 细胞。已知本发明的蛋白刺激 T 细胞并且可选择性地影响 Th1 和/或 Th2 细胞的发生。因此它可能刺激由 Th1 细胞产生的细胞因子如 IL-2、IL-3、IFN- γ 、TNF 和 GM-CSF 介导的反应和/或由 Th2 细胞产生的细胞因子如 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 TFG- β 介导的反应。

最后，CCZ组分也有刺激T细胞介导的免疫反应的潜力并因此可作用为疫苗佐剂。

除了其作为免疫刺激剂的用途，本发明人已证明CCZ组分能提高干扰素- γ 介导的氧化氮(NO)的产生。因此，菠萝蛋白酶的CCZ组分可用于治疗对增加的NO产生应答的疾病或症状。

NO及其衍生物对包括真菌、细菌和病毒的许多病原体具有强的抗微生物活性。这包括寄生虫如 *baesia*、*Brugia*、*Cryptosporidium*、*Encephalitozoon*、*entamoeba*、*Leishmania*、*Naegleria*、*Ochocerca*、*Opisthorchis*、*Plasmodium*、*Schistosoma*、*Toxoplasma* 和 *Trypanosom*。受NO影响的细菌包括芽孢杆菌属、布鲁氏菌属、伯克氏菌属、梭状芽孢杆菌属、埃里希氏体属、弗朗西丝氏菌属、克雷伯氏菌属、军团菌属、利斯特氏小菌属、微球菌属、*Pseudomonas Rickettsia*、沙门氏菌属、葡萄球菌属、耶尔森氏菌属、衣原体尤其是沙眼衣原体和分枝杆菌属如贪食分枝杆菌、麻风分枝杆菌和结核分枝杆菌。NO具有抵抗真菌如曲霉属、念珠菌属、隐球酵母属、组织胞浆菌属和酵母属和病毒如柯萨奇病毒、*Ectomelia virus*、脑心肌炎病毒、Epstein-Barr病毒、单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus)、人免疫缺陷病毒I型、日本脑炎病毒、小鼠肝炎病毒、细小病毒属、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、猿猴病毒40、牛痘病毒和水疱性口腔炎病毒的活性。

CCZ组分在增加NO产生方面的活性赋予其免疫刺激剂活性并意味着CCZ可用作针对诸如上面所列出的寄生虫、细菌、真菌和病毒的抗微生物剂。

因此，在本发明另一方面，提供了本发明的菠萝蛋白酶的CCZ组分或第二方面的蛋白在制备抗微生物剂方面的用途。

本发明人也发现菠萝蛋白酶的CCZ组分具有抗肿瘤活性。多个公开文献也将NO产生与抗肿瘤活性联系起来。例如，Hibbs (1991,免疫学研究 142, 565-569)已证明在体外，巨噬细胞产生NO时杀死肿瘤细胞。因此，NO的产生增加可能是CCZ组分针对肿瘤作用的机制。然而，CCZ作为抗癌剂的效力不依赖于此理论的

正确性。

在另一方面，本发明提供 CCZ 组分或本发明的第二方面的蛋白在制备抗癌剂方面的用途。

CCZ 组分或此蛋白可用于治疗实体瘤或软体瘤或其它肿瘤。可用本发明的蛋白治疗的肿瘤的例子包括卵巢瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌、黑色素瘤、白血病和淋巴瘤。另外，此蛋白可施用于接受癌症化疗的病人以保护免受机会感染。

CCZ 组分或此蛋白通常在施用给病人之前经过配制，因此在本发明的另一方面，提供包含本发明第一方面的 CCZ 组分或本发明第二方面的蛋白及药学上或畜医学上可接受的赋形剂的药物或兽医组合物。

除了其本身作为药剂的用途，CCZ 组分或其作为主要成分的蛋白可用作疫苗佐剂，因为在施用疫苗后它刺激免疫系统产生大量的抗体。

当用作佐剂时，CCZ 组分可在疫苗施用之前或之后单独施用。选择性地，它可包含于疫苗组合物中。

因此，在另一方面中，本发明提供包含疫苗、菠萝蛋白酶的 CCZ 组分或本发明第二方面的蛋白作为佐剂以及药学上或兽医学上可接受的赋形剂或载体的疫苗组合物。

菠萝蛋白酶的 CCZ 组分可在人或动物疫苗中用作佐剂。此疫苗可以是针对疾病如由病毒、细菌、真菌或原生动物因子引起的疾病或诸如癌症的疾病的疫苗。选择性地，此疫苗可以是设计来为某些其它目的例如在实验动物中产生抗体的制剂。此蛋白也可用于设计为产生针对自身抗原的宿主系统的治疗，例如在自身免疫中。

CCZ 组分或此蛋白可通过多种途径施用包括肠道如口、鼻、颊、局部或肛门施用或非肠道施用通过静脉、皮下、肌内或腹膜内途径。

在许多情况下，口腔途径是优选的，因为这是常常病人发现最可接受的途径。如果需要许多剂量的蛋白，例如当 CCZ 用于治

疗其中免疫系统受抑制的病症时，口服途径可能是特别有用的。

如果选择口腔施用，应该将 CCZ 组分或此蛋白配制成肠衣包的制剂以帮助其经过胃后仍然有效。选择性地，可选用另外一种可口服施用的剂量形式如糖浆、配剂或被肠衣包被的硬或软的明胶胶囊，它们任何之一者可以以肠衣包被。

然而，如果只施用单一剂量，例如当将 CCZ 组分或蛋白作疫苗佐剂时，用非肠道途径将更为方便。

对非肠道施用，CCZ 组分或蛋白可在去离子水或另一种药物上可接受的溶剂或悬浮剂中制成制剂。

由临床医生决定给病人施用的 CCZ 组分或蛋白的合适剂量。然而，作为指导，合适的剂量为约 0.5-20mg/kg 体重。期望在大多数情况下，此剂量将为约 1-15mg/kg 体重，优选地 1-10mg/kg 体重。对于体重约 70kg 的人，通常剂量为约 70-700mg。

本发明将参照下列实施例和附图得到进一步描述，其中：

图 1 是在 SP Sepharose 高效介质中经阳离子交换层析后粗制菠萝蛋白酶的紫外洗脱轮廓；

图 2 是，表示在 SP Sepharose 高效介质上经阳离子交换层析后粗制菠萝蛋白酶组分的蛋白水解活性及其蛋白含量的曲线图；

图 3 是 SP Sepharose 高效层析汇集的组分在 4-20% T 梯度胶上的 SDS-PAGE，其中 1-4 泳道和 6-9 泳道分别包含组分 CCT、CCV、CCX 和 CCZ 及 CCY、CCW、CCU 和 CCS，5 和 10 泳道包含分子量标记；

图 4 表示在 pH3-11 梯度胶上电泳汇集的组分的等电聚焦，其中 1、11 和 12 泳道表示高 IEF 标记，2 和 13 泳道表示粗制菠萝蛋白酶，3 至 10 泳道分别表示组分 CCT、CCV、CCX、CCZ、CCY、CCW、CCU 和 CCS；并且

图 5 是表示从粗制菠萝蛋白酶的 HPLC 得到的组分的比较免疫调节活性的曲线图。CCZ 和 CCU 提高了对 T 细胞依赖的抗原的 B 细胞，因此增强了获得性免疫。

图 6 表示了 CCZ 提高 IFN- γ 介导的巨噬细胞产生的亚硝酸

盐由此刺激了先天免疫。

图 7 是一系列曲线，表示了菠萝蛋白酶 (SBP) 和 CCZ 对肿瘤细胞的体外生长抑制效应。结果通过相当的蛋白数量代表。

图 8 是与图 7 中的曲线相似的曲线，但其中的数据被变为代表菠萝蛋白酶和 CCZ 的相当的蛋白水解活性。

图 9 是菠萝蛋白酶和 CCZ 对 CHI 卵巢瘤体外生长的生长抑制活性的比较。

实施例 1 - 菠萝蛋白酶蛋白的纯化

a. 材料

菠萝蛋白酶来自 Solvay Enzymes Inc (德国)。快流速 SP Sepharose、Pharmalyse 3-10TM、Ampholine 9-11TM、Ready Mix IEFTM(丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺)和 IEFTM 标记来自 Pharmacia Biotech。预灌制的 4-20% 丙烯酰胺凝胶和大范围分子量标记来自 Bio-Rad Laboratories。所有其它试剂是分析级来自 Sigma Chemical Co.或 British Drug House。

b. 蛋白酶测定

用合成的底物 Z-Arg-Arg-pNA 通过使用室内微量滴度板为基础的测定菠萝蛋白酶的水解活性。此测定根据 Filippova 等在 *Anal Biochem* 143, 293-297(1984)描述的为基础进行。底物 Z-Arg-Arg-pNA 是根据 Napper 等在 *生物化学杂志*, 301, 727-735(1994)描述的。

c. 蛋白测定

用 Bio-Rad 提供的试剂盒测定蛋白，它是 Lowry 等 (*生物化学杂志*(1951) 193, 265-275) 方法的改进。样品与由 0.9% 盐或 20mM 乙酸缓冲液 pH5.0 中的牛血清白蛋白标准 (0-1.5mg/ml) 进行比较。

d. 菠萝蛋白酶的制备

所有的下列步骤在室温 (20-25℃) 下进行。将 450mg 粉末溶于 15ml 含 0.1mMEDTA 钠的 20mM 乙酸缓冲液 (pH5.0) 中制备菠萝蛋白酶溶液 (30mg/ml)。溶液被分散在 10 个 1.5ml 微量离心管

中于 $13.000 \times g$ 离心 10 分钟以去除不溶物质。汇集澄清的上清用于层析。

e. SP-Sepharose 高效层析

将 25ml 介质填充到 XK 16/50TM 柱中制备了 SP-sepharose 柱 (pharmacia Biotech) 并用含 0.1mM EDTA 的 20mM 乙酸缓冲液 (pH5.0) 在 FPLCTM 系统上以 3ml/min 的速度平衡柱子。将 5ml 的菠萝蛋白酶溶液加到柱上。收集未结合蛋白并用 100ml 乙酸缓冲液洗柱。用 300ml 以上的溶于乙酸缓冲液中的 0 - 0.8M NaCl 线性梯度洗脱与柱子结合的蛋白。通过整个梯度收集 5ml 组分, 图 1 表示从此方法得到的粗菠萝蛋白酶的典型的紫外层析谱。

根据上述分析组分的蛋白和蛋白水解活性, 图 2 表示了对合成肽 Z-Arg-Arg-pNA 的蛋白水解活性及单个组分的蛋白含量。蛋白含量图反映了 u.v.图, 这与期望的一致, 但主要的蛋白水解活性局限于与菠萝蛋白酶 (SBP) 一致的两个主要峰。在层析谱其它区域中观察到的小活性可能与菠萝蛋白酶明显不同的其它蛋白酶相一致, 如后来洗脱的 Ananain 和 Comasain (CCS)。

从紫外模式图确定的主要峰被从三个连续循环中汇集并根据表 1 所示的命名。汇集的部分用于物理化学定性。汇集的组分通过超滤浓缩, 用 PD10 柱将缓冲液换成等渗盐溶液 (0.9% 重量/体积 NaCl)。在进行生物检测前计算蛋白浓度和 Z-Arg-Arg-pNA 活性, 示于表 2。

根据下文所述对汇集组分进行分析。

表 1 从 SP Sepharose HP 分级分离
的菠萝蛋白酶 (QC2322) 的汇集组分总结

组分	描述	汇集的组分 (包含的)
CCT	流过的 (未结合成分)	未结合柱流过的
CCV	从柱上下来的第一个峰	8 - 9
CCX	从柱上下来的第二个尖峰	13 - 14
CCZ	在第三个主要菠萝蛋白酶峰的上升边缘的小峰	19 - 20
CCY	第一个主要的菠萝蛋白酶峰	23 - 24
CCW	第二个主要的菠萝蛋白酶峰	27 - 29
CCU	在第二个主要菠萝蛋白酶峰的下降边缘上的小峰	33 - 34
CCS	从柱上下来的最后两个峰	39 - 44

表 2 用于检测生物学活性的汇集的组分的计算蛋白含量和 Z-Arg-Arg-pNA 活性

汇集的组分	Z-Arg-Arg-pNA 活性 ($\mu\text{Moles}/\text{min}/\text{ml}$)	蛋白含量 (mg/ml)
CCT	11.30	1.00
CCV	9.78	1.00
CCX	71.71	1.00
CCZ	688.81	1.00
CCY	1500.0	0.574
CCW	1500.0	0.543
CCU	1500.0	0.421
CCS	379.76	1.00

f 汇集组分的加工

测定汇集组分的蛋白水解活性和蛋白含量，用含有最小排阻分子量 10kDa 的超滤膜的 Filtron™ 搅拌水室调节浓度至约 1.4mg/ml 蛋白或 105nmoles/min/ml 蛋白活性。然后用 PD10™ 柱 (Pharmacia Biotech) 将组分缓冲液换成等渗盐 (0.9% wv/NaCl)，无菌过滤 (0.2μm)，然后调节蛋白含量或蛋白水解活性。将样品冻存于 -20℃，并用 Jerne Hemolytic Plaque Assay 检测免疫调节活性。

g 十二烷基磺酸钠聚丙烯凝胶电泳 (SDS - PAGE)

通过十二烷基磺酸钠聚丙烯凝胶电泳 (SDS - PAGE) 在预制的 4 - 20% T 梯度凝胶上分析汇集的 FPLC™ 样品。将 100μl 样品与等体积的 20% w/v 三氯乙酸 (TCA) 混合通过酸沉淀制备用于电泳的样品。以 13,000xg 离心 10 分钟收集沉淀的蛋白，弃去上清。用 0.5ml 二乙醚洗涤沉淀两次，室温下空气中干燥沉淀。将沉淀溶解于 300μl SDS - PAGE 样品缓冲液中 (62.5mM Tris - HCl pH6.8 含 10% v/v 甘油、2% w/v 十二烷基磺酸钠和 40mM 二硫苏糖醇) 并在水浴中于 95℃ 加热。

SDS - PAGE 大范围分子量标准以 1:20 于 SDS - PAGE 样品缓冲液中稀释经过相似的处理后与样品同时电泳。根据 Bio-Rad's 说明书以 240V 在微型 Protean II™ 电泳系统上进行凝胶电泳，直到染色前沿到达凝胶底端 (30 - 45 分钟)。

电泳结束后，分离的蛋白在轨道混合器上于含 0.075%w/v 胶体亮蓝 G - 250、1.5% v/v 磷酸、11.25% w/v 硫酸铵和 25% v/v 甲醇的溶液染色过夜。在含有 25% v/v 甲醇和 10% v/v 乙酸的溶液中对凝胶进行脱色以得到清楚的背景。

结果

组分的纯度通过 SDS - PAGE 示于图 3。除了柱流过 (CCT) 以外的所有汇集的组分表明存在的主要蛋白的分子量约 25 - 28KDa。这与由其他作者从菠萝蛋白酶分离到的半胱氨酸蛋白酶的分子量相一致 (Rowan 等, 酶学方法; (1994), 244, 555 -

568)。组分 CCX、CCZ、CCY 和 CCW 的纯度看上去很高。在某些组分中可观察到低分子量的次要组分，特别是 CCT、CCV、CCX 和 CCS 中。汇集的 CCU 和 CCS 组分中包含 25-28kDa 的双重线；较高的 CCX、CCZ、CCY 和 CCW 的凝胶上样意味着双重线带可能也存在于这些组分中。组分及其由 SDS-PAGE 测定的汇集组分的计算的分子量的概括示于表 3。

汇集的 CCX、CCZ、CCY + CCW 和 CCU 组分中的蛋白经 SDS-PAGE 后被 Western 印迹转移至硝酸纤维素膜并用针对纯化的茎菠萝蛋白酶蛋白 (SBP) 的免抗血清进行探测 (结果未显示)。汇集的组分中的所有蛋白带都被血清中的抗体识别，表明免疫性相似的蛋白也许属于半胱氨酸蛋白酶家族。

表 3 存在于 SP Sepharose HP 汇集的组分中的蛋白根据 SDS-PAGE 测定的分子量总结

汇集的组分	主要蛋白条带的分子量 (kDa)	次要蛋白条带的分子量 (kDa)
CCT	76.03	15.07
CCV	15.07, 25.85, 28.28, 76.03	
CCX	25.08	15.07, 76.03
CCZ	27.45	13.37, 16.49, 76.03
CCY	27.45	6.5
CCW	27.45	
CCU	27.45, 28.28	
CCS	15.07, 25.85, 27.45	

h 等电聚集

汇集的组分 (0.5-1.0mg/ml) 以 1:3 稀释于去离子水中并在 pH3-11 的梯度凝胶上进行电泳。用 Ready Mix IEF™ 灌制凝胶产

生含有 10% v/v 甘油、5.0% Phrmalyfe 3-10™t 2.5% Ampholine 9-11™的 5.5% T、3% C 的聚丙烯酰胺凝胶。在 700V 预聚集后，10 μ l 样品和高 pI 标记被加到凝胶上。500V 电泳 10 分钟使样品进入，2500V 电泳 1.5 小时进行聚焦，3000V 电泳 10 分钟使条带变细。电泳后，蛋白在含有 20% W/V TCA 的溶液中固定 30 分钟，在脱色液中洗 30 分钟以去除 TCA，根据 SDS - PAGE 部分描述的（见上文），用亮蓝 G - 250 进行染色。

结果

图 4 表示除 CCX 外所有组分包含 9.3pI 标记之外聚焦的碱性蛋白。与层析介质功能基团的局部电荷相互作用可解释为什么 CCX 中 pI3.8 和 3.85 的蛋白在 pH5.0 时吸附到阳离子交换树脂上。CCZ 在 pI9.7 处表现出一条单一的带，而汇集的 CCY、CCW 和 CCU 组分包含在 pH9.5-9.8 范围内的多条等电点带。至少这种异源性部分可由共同的菠萝蛋白酶主链上碳水化合物部分的差异解释。此值与文献中报道的菠萝蛋白酶的 pI9.45-9.55 相一致（Rowan 等，酶学方法，（1994），244，555 - 568）。汇集的 CCS 组分包含两个 pI 大于 10.25 的碱性蛋白。外推估计 pI 为 10.4 和 10.45。这相当于 ananain 和 comasain，并且与其它的（Rowan 等，上述）pI 大于 10 的估计一致。在每一个汇集的组分的蛋白质 pI 概括于表 4。

表 4 SP Sepharose HP 汇集组分中存在的蛋白的估计等电点总结

汇集的组分	蛋白的等电点
CCT	未测定
CCV	未测定
CCX	3.8, 3.85
CCZ	9.7
CCY	9.6, 9.7
CCW	9.57, 9.6, 9.7
CCU	9.57, 9.6, 9.75
CCS	10.4, 10.45

i Western 印迹

根据厂商说明，用 Transblot™ 仪器 (Bio-Rad) 以 100V 在 Towbin 缓冲液中转移 1 小时将按上述 SDS - PAGE 电泳的样品转移至硝酸纤维素膜上 (0.45μm 孔径)。蛋白转移后，用蒸馏水洗膜然后在 60℃ 培养箱中干燥过夜。干燥后，膜在含有 500mM NaCl (Tris 缓冲液) 的 20mM Tris-HCl (pH7.5) 的 1% BSA 溶液中封闭 30 分钟，然后用 Tris 缓冲液将膜洗两次，每次 10 分钟。然后用含 0.05% v/v Tween20™ 的 Tris 缓冲液中含有的以 1:50 稀释的抗菠萝蛋白酶抗血清 (兔) 探测膜 2 小时。用包含 Tween20™ 的 Tris 缓冲液洗膜 3 次并用抗兔辣根过氧化物酶与膜孵育 2 小时后对印迹显色。通过与四氯茶酚物温育观察免疫反应条带。

实施例 2 - CCZ 蛋白的 N 端氨基酸分析

在一个单独的实验中，汇集的 CCZ 组分进行 SDS PAGE 电泳，按上述方法转移至 PVDF 膜上。用 0.025% w/v 考马斯蓝 R-250 对膜染色，在 40% v/v 甲醇中溶解 10 分钟，然后在 50% v/v 甲醇中脱色。膜在室温下空气干燥，然后对染色的蛋白进行 N-端氨基酸序列测定。简单地，将蛋白带从膜上切下放在测序仪的上半部分用装配有联机乙内酰苯硫脲氨基酸分析仪的气相测序仪 (Applied Biosystems)，通过 Edman 降解进行 CCZ 蛋白 N-端氨基酸分析。

表 5 CCZ 蛋白与已知的从菠萝蛋白酶分离的蛋白酶 N 端序列的相似性

蛋白酶	距 N 端的位置
CCZ	VLPDSIDWRQKGAVTEVKNRG 1 5 10 15 20
茎菠萝蛋白酶	AVPQSIDWRDYGAVTSVKNQN 1 5 10 15 20
Ananain	VPQSIDWRDSGAVTSVKNQG 1 4 9 14 19
Comasain	VPQSIDWRNYGAVTSVKNQG 1 4 9 14 19

所有蛋白具有序列同源性。与茎菠萝蛋白酶相比，Ananain 和 Comasain 在 20 个氨基酸中只有 2 个不同。相反，与茎菠萝蛋白酶相比，CCZ 中的 21 个氨基酸有 8 个不同。CCZ 与 ananain 和 comasain 的 20 个氨基酸中有 6 个不同。尽管很明显这些蛋白是结构相关的，但是 CCZ 蛋白是最不同的，表明与从菠萝蛋白酶分离的其它蛋白酶有明显差异。CCZ 代表粗制菠萝蛋白酶提取物中以前未知的新型蛋白，看来它是植物半胱氨酸蛋白酶家族的新成员。

实施例 3 - 分析分级分离的蛋白的免疫调节活性 a 材料

雌性 BAL B/A 小鼠来自 A.Tuck 和 Son Ltd.(UK)。在所有实施中采用 8-10 周龄之间的小鼠。Alsevers 溶液中的绵羊红血细胞 (SRBC) 购自 TCS Biologicals (Buckingham, UK)。豚鼠补体购自 Gibco Laboratories。其它试剂均为分析级，购自 Sigma Chemical Co。

b Jerne 溶血板实验

Jerne 溶血板实验 (Weir, D. M. (编辑), 1986, 实验免疫学手册, 1-4, 第 4 段, Blackwell Scientific Publications, Oxford UK) 用于分析分级分离蛋白的佐剂潜力。实验用两次单独制备的

菠萝蛋白酶分级分离样品进行。每一个样品有一个独特的编号（表 1），如果适合，通过超滤（见实施例 1（f））将样品渗滤浓缩到等渗盐溶液中。所有的实验以双盲方式进行。

根据表 6 所示，用粗制菠萝蛋白酶、分级分离的蛋白或盐溶液静脉注射小鼠一次。粗制菠萝蛋白酶（200 μ g; 1500 μ moles/min/ml）被悬浮于 0.9%（200 μ l）盐溶液中并在施用前立即过滤除菌。分级分离样品（200 μ l）同样地过滤除菌。用灭菌盐溶液处理的小鼠用作对照。1500 μ moles/min/ml 粗制菠萝蛋白酶的剂量速度相当于 Sigma Aldrich Ltd 的 Materials Safety Data sheet 所给出的菠萝蛋白酶 LD50 的约三分之一。在施用粗制菠萝蛋白酶、分级分离蛋白或盐溶液后，通过腹膜内注射绵羊红细胞（SRBC）（100 μ l; 10^7 细胞）免疫小鼠。用盐溶液（100 μ l）单独处理的小鼠作为阴性对照。免疫后 3 天处死小鼠，在这个时候取出脾并通过尼龙网过滤器过滤分离脾细胞。用 Jerne 溶血板实验测定产生针对 SRBC 抗原抗体的 B 细胞的数目（即每 10^6 脾细胞的蚀斑形成细胞（PFC））。

c 数据分析

以平均数 \pm 标准差表示数值。用独立 t-检验（斯氏 t 检验；2-向）检验 PFC 平均数之间的差异。当一个以上的处理的平均数与对照相比时，采用方差分析（ANOVA）。

d 结果

Jerne 溶血板实验结果示于图 5 和表 6。

表 6 PFC 形成 (分泌针对 SRBC 抗体的 B 细胞数目)

组	处理	动物号	平均 PFC/ 10 ⁶ 脾细胞	中间值 (范围)	标准 差
F	茎菠萝蛋白酶+SRBC	8	68	65 (1-147)	47
L	盐溶液+SRBC	8	29	28 (21-40)	7
S	CCS + SRBC	6	50	47 (13-90)	28
T	CCT + SRBC	3	42	26 (13-86)	32
U	CCU + SRBC	6	86	94 (25-123)	35
V	CCV + SRBC	6	44	35 (3-90)	34
W/Y	SBP + SRBC	9	46	37 (4-112)	29
X	CCX + SRBC	6	49	39 (8-98)	33
Z	CCZ + SRBC	6	102	95 (68-106)	31

与盐溶液对照相比,粗制菠萝蛋白酶(QC2322)的施用导致了PFC的明显增加(菠萝蛋白酶 PFC/10⁶ 脾细胞, 68±47; 盐溶液对照, 29±7; $P<0.05$)。分级分离的蛋白 CCZ 和 CCU 也诱导比盐溶液对照明显高的 PFC (分别为 102±31 和 86±31 PFC/10⁶ 脾细胞; $P<0.002$), 比粗制菠萝蛋白酶提取物产生的 PFC 多。CCZ 和 CCU 成分与描述详尽的茎菠萝蛋白酶、comosain、ananain 和 F9 酶从 FPLC™ 柱的洗脱不同, 表明 CCZ 和 CCU 是不同的分子。当检测纯化的茎菠萝蛋白酶 (CCW 和 CCY 成分的联合) 的佐剂效应时, 结果显示很小的 PFC 增加 (46±29 PFC/10⁶ 脾细胞) 表明茎菠萝蛋白酶不是负责菠萝蛋白酶佐剂活性的成分。相似地,

ananain 和 comosain (CCS) 也具有很小的免疫调节活性。所以, 粗菠萝蛋白酶具有很小的佐剂效应并不归因于原来认为具有免疫用的粗制混合物的成分。某些检验的成分有比对照高的 PFC (与茎菠萝蛋白酶相似), 但这些值没有明显的不同。这些成分及茎菠萝蛋白酶中观察到的 PFC 的轻微升高与以前将胰蛋白酶施用于小鼠时观察到的相似, 反应或许应归功于非特异的蛋白水解效应。

实施例 4 - CCZ 提高巨噬细胞产生硝酸盐, 所以能刺激先天免疫反应

实施例 3 表明 CCZ 通过增强对 T 细胞依赖抗原的 B 细胞反应提高获得性免疫反应。我们下一步通过探讨其对参与先天免疫的主要细胞群, 巨噬细胞的效应探讨 CCZ 是否能增强先天免疫。

对细胞内寄生虫的主要的宿主防御机制是巨噬细胞产生氧化氮 (NO)。所以, 我们探讨了是否 CCZ 能够影响 NO 产生。

a 材料

用重组 IFN- γ (100u/ml) 刺激培养的鼠巨噬细胞系 RAW264。用 Greiss 实验 (Roach 等 (1991), 感染与免疫, 59, 3935 - 3944) 测定培养上清中的硝酸盐水平。

b 方法

用 CCZ (50 μ g/ml)、粗制菠萝蛋白酶 (50 μ g/ml) 或茎菠萝蛋白酶 (50 μ g/ml) 处理或以盐溶液模拟处理 RAW264 巨噬细胞。然后洗细胞三次去除处理剂并用 IFN- γ 刺激细胞。

c 结果

粗制菠萝蛋白酶和 CCZ, 而不是茎菠萝蛋白酶显著提高 IFN- γ 介导的硝酸盐产生 (图 6)。在 CCZ 处理的细胞中, IFN- γ 硝酸盐产生增加比盐溶液处理细胞明显高, 表明 CCZ 与 IFN- γ 协同作用提高 NO 产生。当用 CCZ 或菠萝蛋白酶单独刺激巨噬细胞时, 几乎不产生硝酸盐, 提示 CCZ 和茎菠萝蛋白酶都不能刺激硝酸盐产生。为了保证已经存在于 CCZ 混合物中的可能污染的内毒素负责 NO 的提高, 实验中包含了多粘菌素 B (内毒素的强有力的抑制剂)。多粘菌素 B 的包含并不影响 IFN- γ 诱导的 CCZ

处理细胞中 NO 的产生，暗示可能污染的内毒素不负责观察到的效应（数据未显示）。

考虑到氧化氮产生对于宿主对细胞内病原体抵御的重要性，CCZ 刺激巨噬细胞特定产生这种代谢物的能力暗示它可控制多种细胞内感染。

实施例 5 - 菠萝蛋白酶片段对一系列人肿瘤细胞系的体外生长抑制。

除了在宿主对感染防御中的关键作用外，NO 也表明是强有力的杀肿瘤细胞剂。Hibbs (1991, 免疫学研究, 142, 565 - 569) 已表明当巨噬细胞产生 NO 时，它们在体外杀死肿瘤细胞。因此氧化氮在肿瘤治疗中可能有用 (Sagar 等, (1995), 肿瘤治疗综述, 21, 159 - 181)。因此，我们研究 (CCZ 是否能够在体外阻断几种不同人肿瘤细胞系的生长并因此作用为抗癌剂。测定了 CCZ 蛋白和茎菠萝蛋白酶对代表五种最常见人实体瘤十五种人肿瘤细胞系的比较生长抑制特性：卵巢瘤、结肠癌、乳腺癌、肺癌和黑色素瘤。

消化细胞系并将单个活细胞以每孔 4×10^3 的密度用 160:1 生长培养基接种于 96 孔微量滴定板上。贴壁培养过夜后，将 CCZ、SBP 或菠萝蛋白酶加到四个孔的生长培养基中，得到孔中的终浓度范围为 50、10、2.5、1 和 0.25g/ml。8 个孔作为未处理细胞对照。在加到孔中之前立即用无菌水稀释提取物。根据以前描述的 (Kelland 等于, 癌症研究, 53, 2581 - 2586 (1993))，抽提物暴露 96 小时后，用溶于 1% 乙酸中的 0.4% 硫氰酸盐染色以测定每个孔中的细胞数目。从浓度比 % 对照吸光度 (在 540nm 处读) 曲线上计算 50% 抑制浓度 (IC50 以 g/ml)。

结果

提取物被成功地溶解，IC 值示于图 7。

从图 7 中看出，CCZ 蛋白在体外表现出对所有细胞系的能力与 QC2322 (粗制菠萝蛋白酶) 和茎菠萝蛋白酶的相当。CCZ 对所有 15 个系表现的平均 IC50 为 11.9 μ g/ml，对 SKOV-3 (卵巢

瘤)、LOVO(结肠癌)、MDA231(乳腺癌)、MDA361(乳腺癌)和MOR(肺癌)的活性普遍较低。

在此实施例中所用的方法依赖于检测吸附于微量板孔上的细胞。用菠萝蛋白酶组分处理后对细胞染色测定生长抑制活性。死的或将要死的细胞从孔上脱离下来从而不被染色。用高浓度的酶如胰蛋白酶处理也能使细胞从孔上下来;一种被称为“胰酶消化”的方法。因此,CCZ和菠萝蛋白酶的生长抑制活性由于蛋白水解活性使细胞从孔上非特异的移下来导致的而不是这些组分的特异的“抗肿瘤”效应。

鉴于此,图7中给出的结果调整每一组分的蛋白水解活性。调整的结果示于图8。

用这种解释,从图8看出得到了有些不同的结果分析。一旦考虑到每一组分的蛋白水解活性,可以看出CCZ比粗制菠萝蛋白酶或茎菠萝蛋白酶明显更高的抗癌活性。

为了证实CCZ的确具有生长抑制活性,粗制菠萝蛋白酶、茎菠萝蛋白酶和CCZ被稀释成包含有相当量的蛋白水解活性($5.7\mu\text{moles}/\text{min}/\text{nl}$)并检测其阻止CH1卵巢瘤生长的能力。图9证实CCZ的确比粗菠萝蛋白酶或茎菠萝蛋白酶更强有力的生长抑制活性。

序列表

(1) 基本信息

(i) 申请人:

(A) 名称: CORTECS (UK) LIMITED

(B) 街道: FIRST FLOOR, OSPREY HOUSE

(C) 城市: LOWER SQUARE

(D) 州名: ISLEWORTH, MIDDLESEX

(E) 国家: LONDON, ENGLAND

(F) 邮政编号: TW7 6BN

(A) 名称: MYNOTT, Tracey, Lehanne

(B) 街道: IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE

TECHNOLOGY & MEDICINE

(C) 城市: DEPT OF BIOCHEMISTRY

(D) 州名: EXHIBITION RD,

(E) 国家: LONDON, UNITED KINGDOM

(F) 邮政编号: SW7 2AZ

(A) 名称: ENGWERDA, Christian

(B) 街道: LONDON SCHOOL OF HYGIENE &

TROPICAL MEDICINE

(C) 城市: DEPT OF MEDICAL PARASITOLOGY

(D) 州名: KEPPEL STREET,

(E) 国家: LONDON, UNITED KINGDOM

(F) 邮政编号: WC1E 7HT

(A) 名称: PEEK, Keith

(B) 街道: CORTECS (UK) LIMITED

- (A) 长度: 21 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线型
- (ii) 分子类型: 肽
- (iii) 假设: 否
- (v) 片段类型: N 末端
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:2 :

Ala Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser
 1 5 10 15

Val Lys Asn Gln Asn
 20

(2) 关于 SEQ ID NO:3 的信息:

- (i) 序列特征
 - (A) 长度: 20 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线型
- (ii) 分子类型: 肽
- (iii) 假设: 否
- (v) 片段类型: N 末端
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:3 :

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser Gly Ala Val Thr Ser Val
 1 5 10 15

Lys Asn Gln Gly
 20

(2) 关于 SEQ ID NO:4 的信息:

- (i) 序列特征
 - (A) 长度: 20 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 否

(v) 片段类型: N末端

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

```
Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asn Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val  
1           5           10           15  
  
Lys Asn Gln Gly  
                20
```

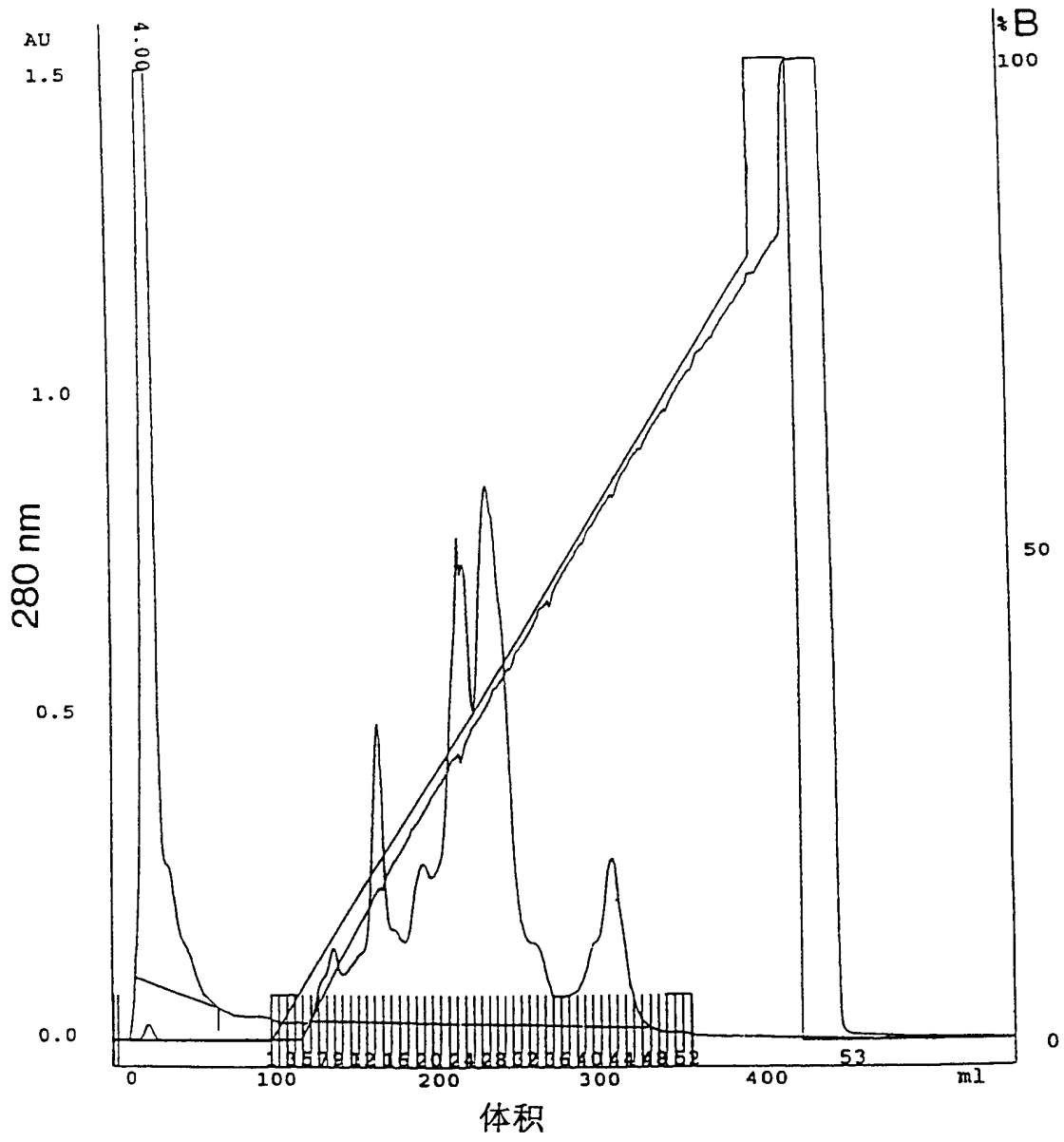


图 1

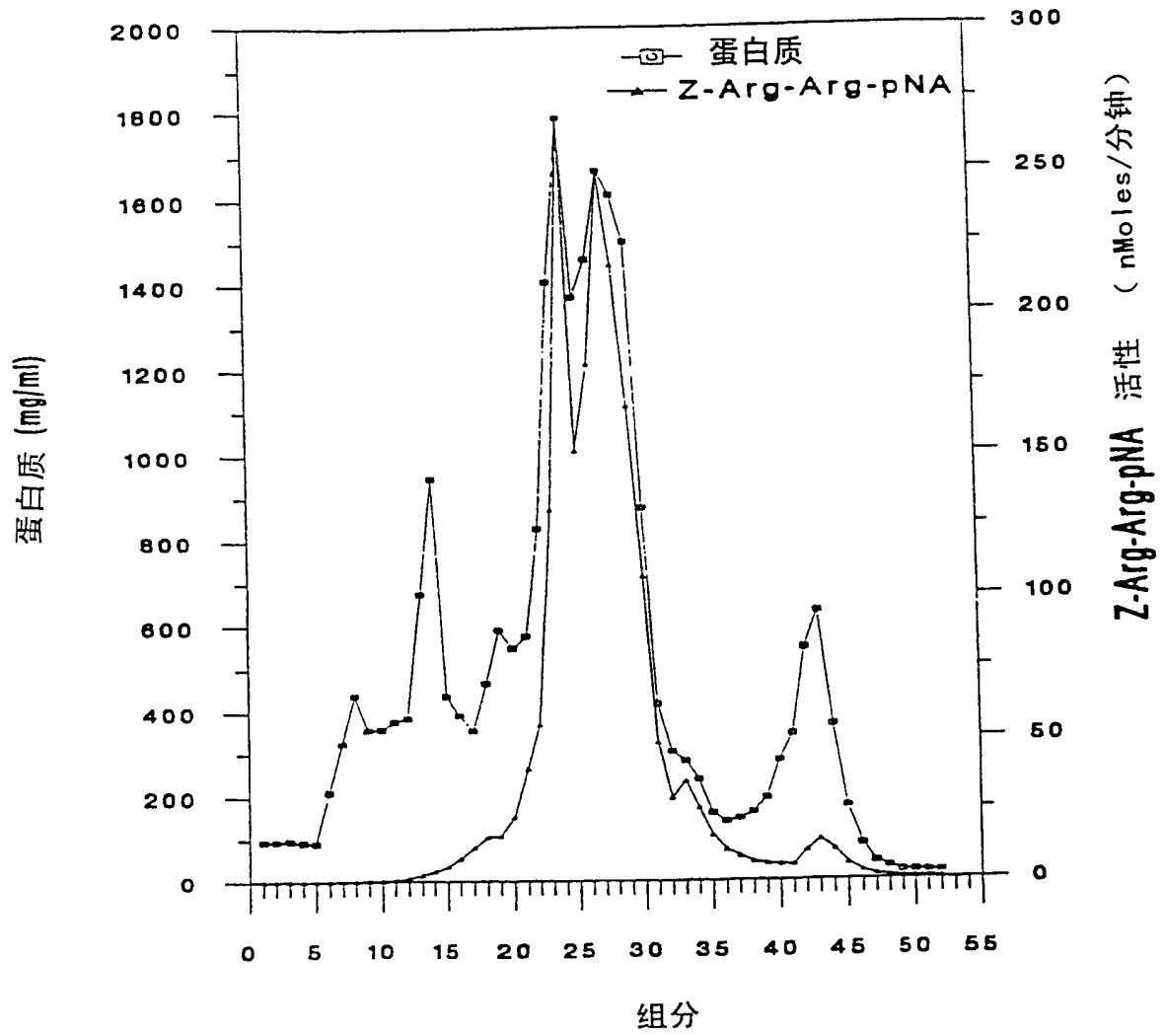


图 2

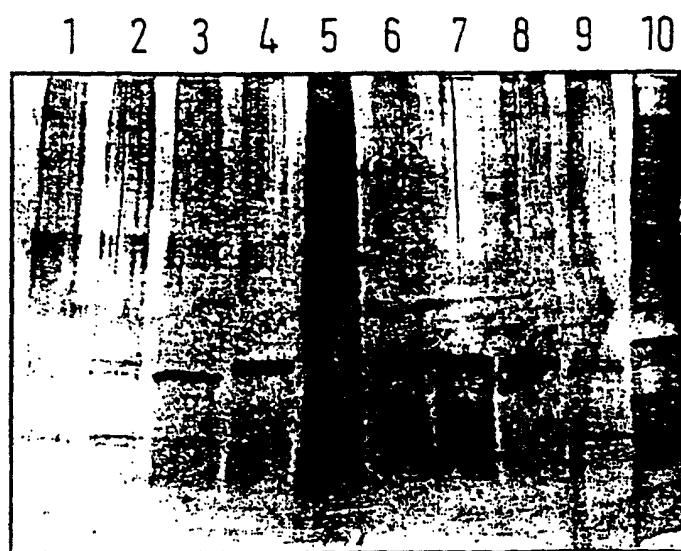


图 3

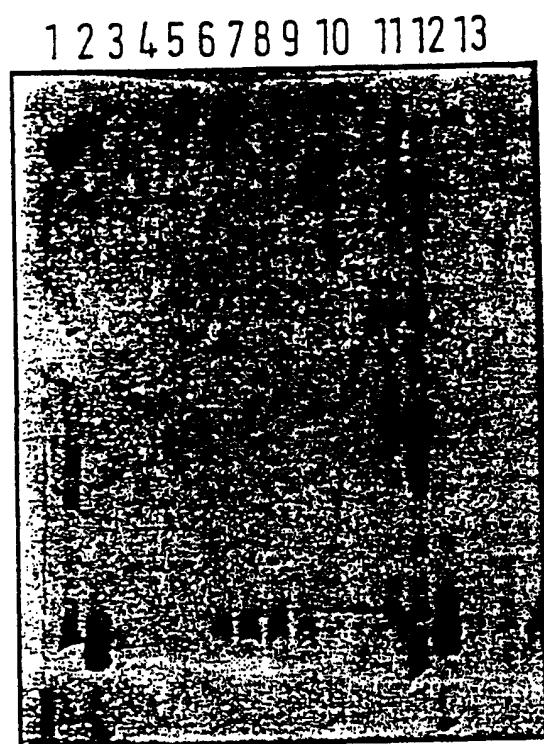


图 4

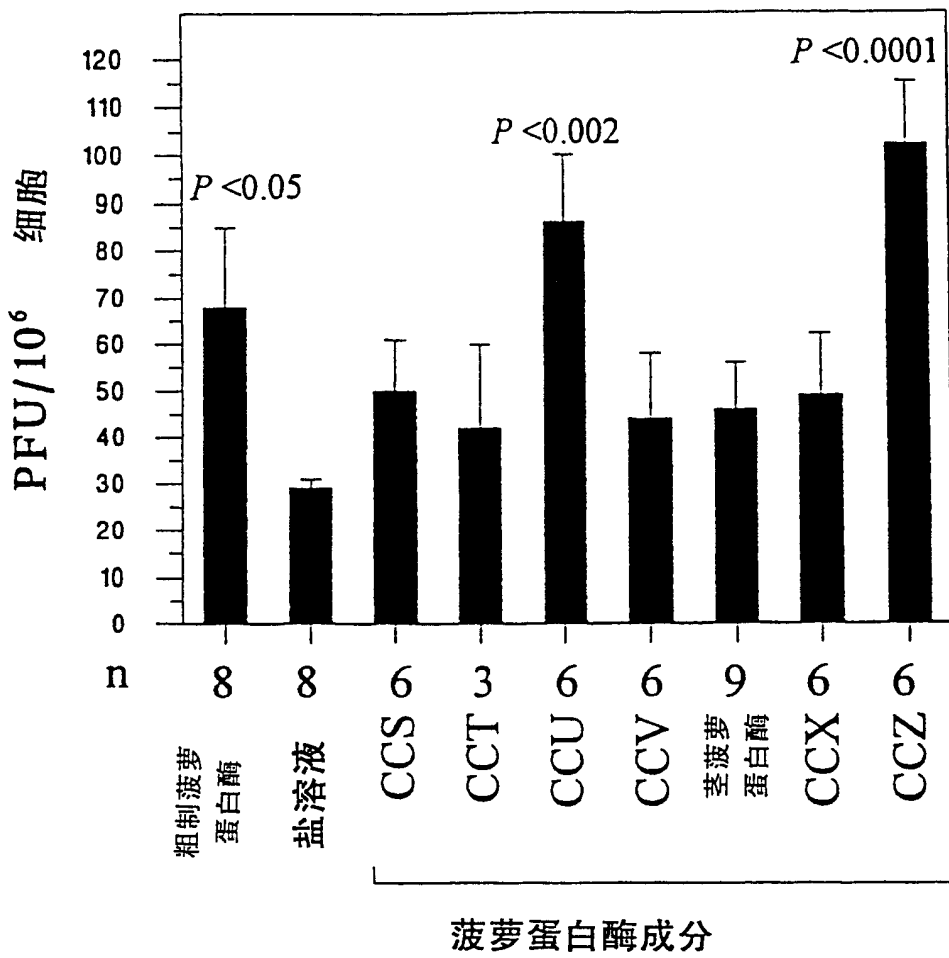


图 5

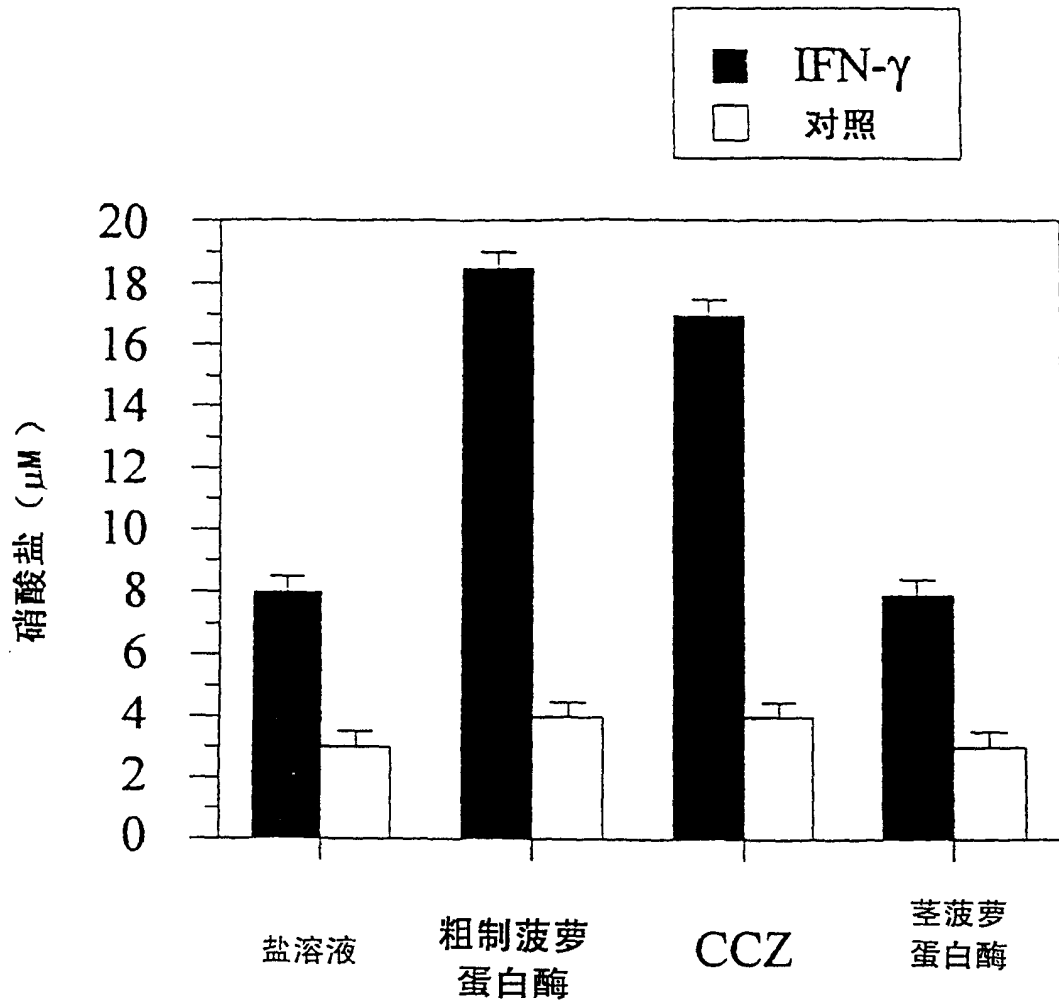


图 6

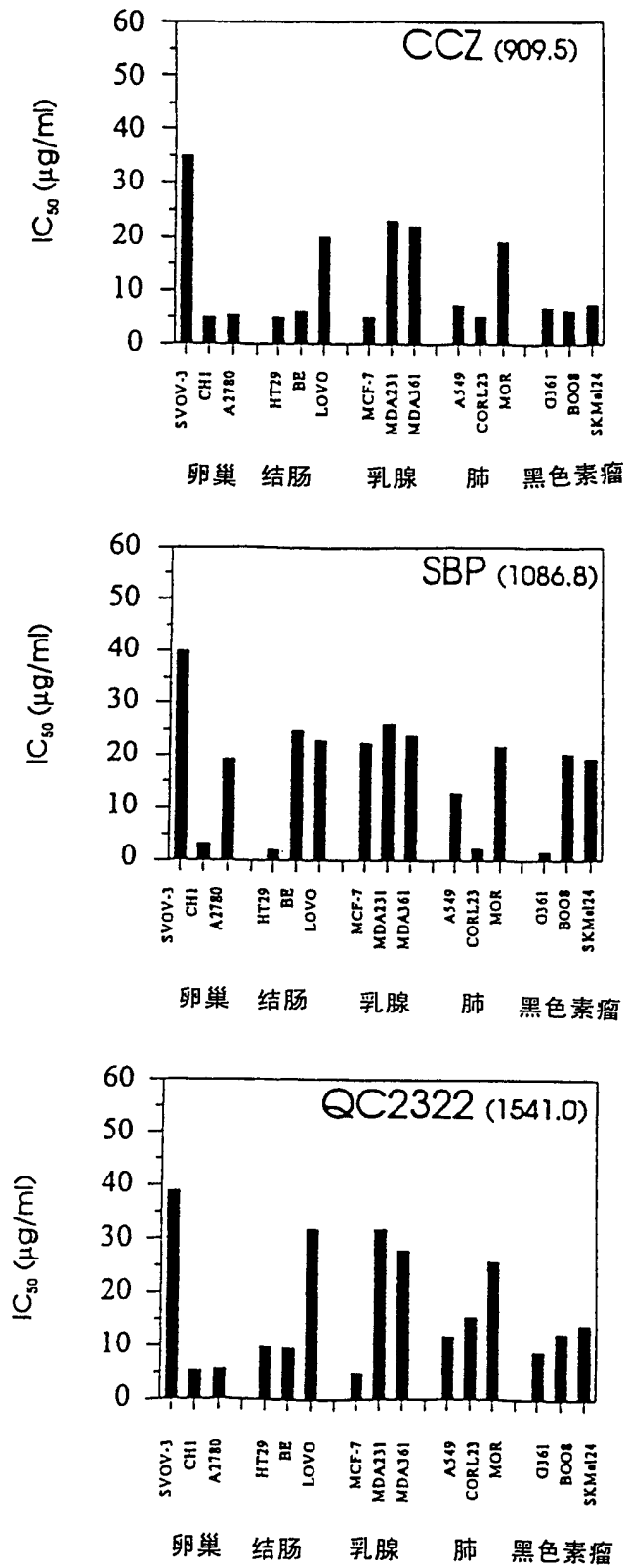


图 7

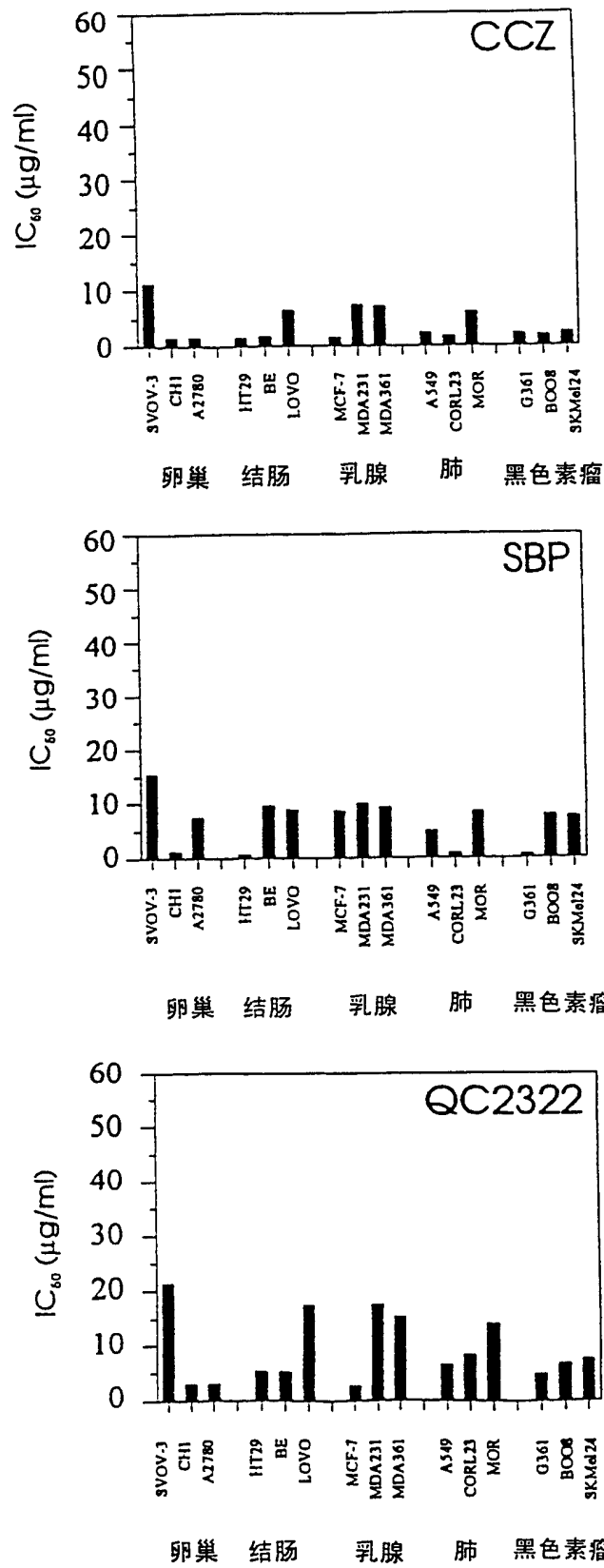


图 8

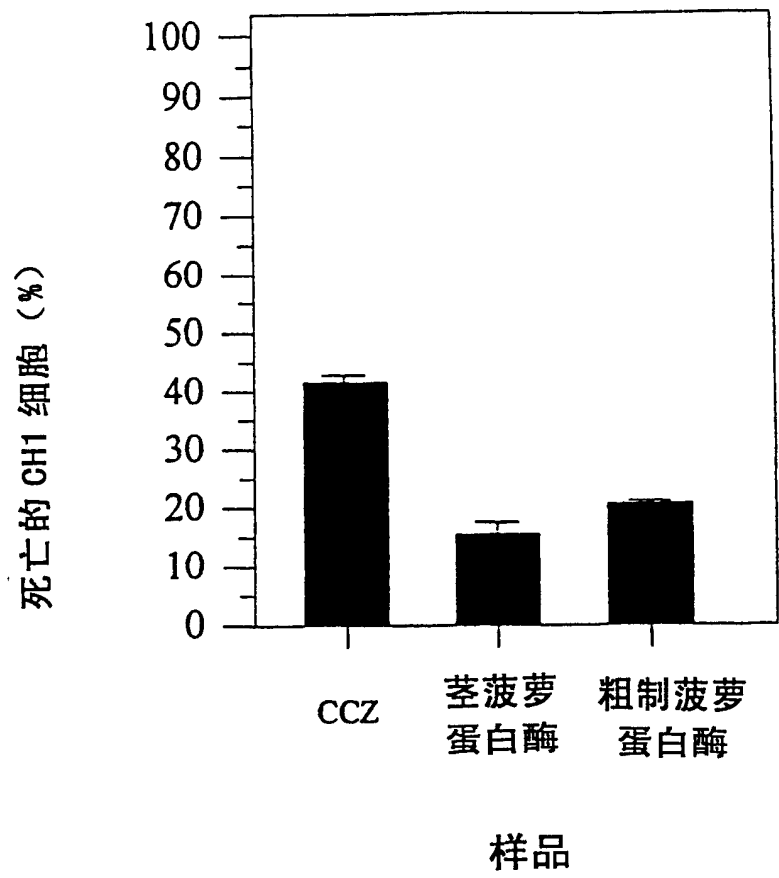


图 9