

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610117923.0

[51] Int. Cl.

*C07K 14/435 (2006.01)*

*C12N 9/50 (2006.01)*

*C12N 15/57 (2006.01)*

*C12P 21/02 (2006.01)*

*A61K 38/17 (2006.01)*

*A61K 38/48 (2006.01)*

[43] 公开日 2008年5月7日

[11] 公开号 CN 101173003A

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 7/04 (2006.01)*

[22] 申请日 2006.11.3

[21] 申请号 200610117923.0

[71] 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市岳阳路320号

[72] 发明人 刘小龙 焦浩滢 朱洪 周元聪

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐迅

权利要求书1页 说明书20页 附图3页

[54] 发明名称

尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂、其编码序列及用途

[57] 摘要

本发明提供了一种新的凝血酶原激活剂 - 尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂(简称:凝血酶原激活剂 DaPA), 编码凝血酶原激活剂 DaPA 的多核苷酸和经重组技术产生这种凝血酶原激活剂 DaPA 的方法。本发明的凝血酶原激活剂 DaPA 可激活凝血酶原从而可在临床上用作止血药物。

- 1.一种分离的蛋白质，其特征在于，该蛋白质选自下组：
  - (a)具有SEQ ID NO: 2氨基酸序列的多肽；
  - (b)将SEQ ID NO:2氨基酸序列经过1-10个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的，且具有激活凝血酶原生成凝血酶的功能的由(a)衍生的多肽。
- 2.如权利要求1所述的蛋白质，其特征在于，所述的蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。
- 3.一种分离的多核苷酸，其特征在于，它编码权利要求1所述的蛋白。
- 4.如权利要求3所述的多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸编码具有SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列的蛋白质。
- 5.如权利要求3所述的多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸含有SEQ ID NO: 1中1-678位的序列。
- 6.一种载体，其特征在于，它含有权利要求3所述的多核苷酸。
- 7.一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，它含有权利要求6所述的载体。
- 8.一种权利要求1所述的蛋白质的制备方法，其特征在于，该方法包含步骤：
  - (a)在表达条件下，培养权利要求7所述的宿主细胞，从而表达权利要求1所述的蛋白质；
  - (c)从培养物中分离出权利要求1所述的蛋白质。
- 9.一种药物组合物，其特征在于，它含有安全有效量的权利要求1所述的蛋白质以及药学上可接受的载体。
- 10.一种权利要求1所述的蛋白质的用途，其特征在于，用于制备止血的药物。

## 尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂、其编码序列及用途

### 技术领域

本发明属于生物技术和医学领域，具体地说，本发明涉及新的凝血酶原激活剂-尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂（简称：凝血酶原激活剂DaPA）以及编码凝血酶原激活剂DaPA的多核苷酸。本发明还涉及此多核苷酸和蛋白质的制法和用途，以及含该凝血酶原激活剂DaPA的组合物。

### 背景技术

凝血酶原的激活是血液凝结过程中一个关键性步骤，通常在凝血系统中凝血酶原是由凝血因子Xa激活成凝血酶的，后者使血纤维蛋白原变成血纤维蛋白，从而完成血凝作用。

目前已知在多种来源的蛇毒中同样存在着能使凝血酶原激活成凝血酶的激活剂，已报道的蛇毒凝血酶原激活剂的分子量均在40KD以上，为多结构域的蛋白酶。

鉴于凝血酶原激活剂具有临床止血等用途，因此，本领域迫切需要开发新的凝血酶原激活剂。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种新的凝血酶原激活剂-DaPA蛋白以及其片段、类似物和衍生物。

本发明的另一目的是提供编码这些蛋白质的多核苷酸。

本发明的另一目的是提供生产这些蛋白质的方法以及该蛋白质和编码序列的用途。

在本发明的第一方面，提供了一种分离的凝血酶原激活剂DaPA，它包含：具有SEQ ID NO: 2氨基酸序列的蛋白质、或其保守性变异蛋白质、或其活性片段、或其活性衍生物。

较佳地，该蛋白质选自下组：

(a) 具有SEQ ID NO: 2氨基酸序列的多肽；

(b) 将SEQ ID NO: 2氨基酸序列经过一个或多个(如1-10，较佳地1-8个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的，且具有激活凝血酶原生成凝血酶的功能的由(a)衍生的多肽。

更佳地，所述蛋白是氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示的蛋白质。

在本发明的第二方面，提供了一种分离的多核苷酸，它编码上述的DaPA蛋白。

较佳地，所述的多核苷酸多核苷酸编码具有SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列的蛋白质。更佳地，该多核苷酸含有SEQ ID NO: 1中1-678位的序列。

在本发明的第三方面，提供了一种载体，它含有上述编码DaPA蛋白的多核苷酸。以及被该载体转化或转导的宿主细胞或者被上述多核苷酸直接转化或转导的宿主细胞。

在本发明的第四方面，提供了一种本发明DaPA蛋白质的制备方法，该方法包含步骤：

(a) 在表达条件下，培养上述的宿主细胞，从而表达将DaPA蛋白；

(c) 从培养物中分离出DaPA蛋白质。

本发明还提供了从尖吻蝮蛇毒中制备凝血酶原激活剂的方法。

在本发明的第五方面，提供了一种能与上述的凝血酶原激活剂DaPA特异性结合的抗体。

在本发明的第六方面，提供了一种药物组合物，它含有安全有效量的(如0.001-99.9wt%，更佳地0.01-99wt%)上述的凝血酶原激活剂DaPA以及药学上可接受的载体。

在本发明的第7方面，提供了本发明的DaPA蛋白质的用途，它被用于制备止血的药物。

## 附图说明

下列附图用于说明本发明的具体实施方案，而不用于限定由权利要求书所界定的本发明范围。

图1显示了本发明的尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂DaPA的多核苷酸和氨基酸

序列(SEQ ID NO:1和2)。

图2显示了尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂激活凝血酶原后的产物水解凝血酶发色底物Chromozym TH。

图3显示了复钙时间测定结果。其中，A为塑料管中测定结果，B为玻璃管中测定结果。

图4显示了活化部分凝血活酶时间测定结果。

### 具体实施方式

本发明人从尖吻蝮蛇(*Agkistrodon acutus*)的蛇毒中分离纯化到一种能激活凝血酶原的蛋白质，分子量仅约25KD，是一种单结构域的金属蛋白酶。实验表明，该凝血酶原激活剂DaPA分别作用于牛凝血酶原上的P<sup>166</sup>—L<sup>167</sup>，A<sup>269</sup>—A<sup>270</sup>及R<sup>323</sup>—I<sup>324</sup>肽键，使凝血酶原激活成凝血酶。

具体地，本发明人首先从尖吻蝮蛇毒中分离了一种分子量为25KD的蛇毒凝血酶原激活剂，测定了它的N—端一段氨基酸序列，并以此为依据合成了相应的引物，然后从尖吻蝮蛇毒腺中分离了有关的mRNA为模板，经反转录获得cDNA，用PCR法扩增和克隆了蛇毒凝血酶原激活剂基因，并测定了基因序列，研究了它的酶学性质及其激活凝原的作用机理以及体外药理活性。

此外，本发明还制备了凝血酶原激活剂DaPA的衍生物并测定了其活性。

在本发明中，术语“凝血酶原激活剂DaPA”、“DaPA蛋白”或“DaPA多肽”可互换使用，都指基本上具有凝血酶原激活剂DaPA氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的多肽或蛋白质。它们包括含有或不含起始甲硫氨酸的凝血酶原激活剂DaPA。这些术语还包括含有或不含有信号肽的凝血酶原激活剂DaPA。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质，原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和蛋白质是没有分离纯化的，但同样的多聚核苷酸或蛋白质如从天然状态中与存在的其他物质中分开，则为分离纯化。

如本文所用，“分离的DaPA多肽蛋白质”基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术(尤其是FPLC)分离纯化出凝血酶原激活剂DaPA。

本发明的蛋白质可以是重组蛋白质、天然蛋白质、合成蛋白质，优选重组蛋白质。本发明的蛋白质可以是天然纯化的产物，或是化学合成的产物，或使用重组技术从原核或真核宿主(例如，细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主，本发明的蛋白质可以是糖基化的，或可以是非糖基化的。本发明的蛋白质还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

本发明还包括凝血酶原激活剂DaPA的片段、衍生物和类似物。如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然凝血酶原激活剂DaPA相同的生物学功能或活性的蛋白质。本发明的蛋白质片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的蛋白质，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的蛋白质，或(iii)成熟蛋白质与另一个化合物(比如延长蛋白质半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的蛋白质，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此蛋白质序列而形成的蛋白质(如前导序列或分泌序列或用来纯化此蛋白质的序列或酶原序列，或与抗原IgG片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

在本发明中，术语“凝血酶原激活剂DaPA”指具有凝血酶原激活剂DaPA活性的SEQ ID NO. 2序列的蛋白质。该术语还包括具有与凝血酶原激活剂DaPA相同功能的、SEQ ID NO. 2序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于)：一个或多个(通常为1-50个，较佳地1-30个，更佳地1-20个，最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内，较佳地为10个以内，更佳地为5个以内)氨基酸残基如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸残基取代时，通常不会改变蛋白质的功能。又比如，在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸残基也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括凝血酶原激活剂DaPA的活性片段和活性衍生物。

该蛋白质的变异形式包括：同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与DaPA DNA 杂交的DNA所编码的蛋白质以及利用抗凝血酶原激活剂DaPA的抗血清获得的多肽或蛋白质。本发明还提供了其他蛋白质，如包含凝血酶原激活剂DaPA或其片段的融合蛋

白。除了几乎全长的蛋白质外，本发明还包括了凝血酶原激活剂DaPA序列的可溶性片段。通常，该片段具有凝血酶原激活剂DaPA序列的至少约10个连续氨基酸残基，通常至少约30个连续氨基酸残基，较佳地至少约50个连续氨基酸残基，更佳地至少约80个连续氨基酸残基，最佳地至少约100个连续氨基酸残基。

发明还提供凝血酶原激活剂DaPA的类似物。这些类似物与天然凝血酶原激活剂DaPA的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。这些蛋白质包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到，如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变，还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸残基(如D-氨基酸)的类似物，以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 $\beta$ 、 $\gamma$ -氨基酸)的类似物。应理解，本发明的蛋白质并不限于上述列举的代表性的蛋白质。

修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外的蛋白质的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在蛋白质的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的蛋白质。这种修饰可以通过将蛋白质暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其蛋白水解性能或优化了溶解性能的蛋白质。

在本发明中，“DaPA保守性变异蛋白质”指与SEQ ID NO: 2的氨基酸序列相比，有至多10个，较佳地至多8个，更佳地至多5个，最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸残基所替换而形成蛋白质。这些保守性变异蛋白质最好根据表1进行氨基酸替换而产生。

表 1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn

Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。编码成熟蛋白质的编码区序列可以与SEQ ID NO:1所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用，“简并的变异体”在本发明中是指编码具有SEQ ID NO:2的蛋白质，但与SEQ ID NO:1所示的编码区序列有差别的核酸序列。

编码SEQ ID NO:2的成熟蛋白质的多核苷酸包括：只编码成熟蛋白质的编码序列；成熟蛋白质的编码序列和各种附加编码序列；成熟蛋白质的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

术语“编码蛋白质的多核苷酸”可以是包括编码此蛋白质的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体，其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或蛋白质的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的，等位变异体是一个多核苷酸的替

换形式，它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入，但不会从实质上改变其编码的蛋白质的功能。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%，较佳地至少70%，更佳地至少80%同源性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如0.1%SDS, 60°C；或(2)杂交时加有变性剂，如50%(v/v)甲酰胺，0.1%小牛血清/0.1% Ficoll, 42°C等；或(3)仅在两条序列之间的同源性至少在90%以上,更好是95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的蛋白质与SEQ ID NO:2所示的成熟蛋白质有相同的生物学功能和活性。

本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。如本文所用，“核酸片段”的长度至少含15个核苷酸，较好是至少30个核苷酸，更好是至少50个核苷酸，最好是至少100个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如PCR)以确定和/或分离编码凝血酶原激活剂DaPA的多聚核苷酸。

本发明中的蛋白质和多核苷酸优选以分离的形式提供，更佳地被纯化至均质。

本发明的DaPA核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板，扩增而得到有关序列。也可直接通过RT-PCR的方法扩增得到有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次PCR扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白质(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋

白质序列中。

应用PCR技术扩增DNA/RNA的方法(Saiki, et al. Science 1985;230:1350-1354)被优选用于获得本发明的基因。特别是很难从文库中得到全长的cDNA时,可优选使用RACE法(RACE-cDNA末端快速扩增法),用于PCR的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择,并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的DNA/RNA片段。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体,以及用本发明的载体或凝血酶原激活剂DaPA编码序列经基因工程产生的宿主细胞,以及经重组技术产生本发明所述蛋白质的方法。

通过常规的重组DNA技术(Science, 1984; 224: 1431),可利用本发明的多聚核苷酸序列可用来表达或生产重组的凝血酶原激活剂DaPA。一般来说有以下步骤:

(1).用本发明的编码凝血酶原激活剂DaPA的多核苷酸(或变异体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

(2).在合适的培养基中培养的宿主细胞;

(3).从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

本发明中,凝血酶原激活剂DaPA多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。在本发明中适用的载体包括但不限于:在细菌中表达的基于T7的表达载体;在哺乳动物细胞中表达的pMSXND表达载体和在昆虫细胞中表达的来源于杆状病毒的载体。总之,只要能在宿主体内复制和稳定,任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含凝血酶原激活剂DaPA编码DNA序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导mRNA合成。这些启动子的代表性例子有:大肠杆菌的lac或trp启动子; $\lambda$ 噬菌体P<sub>L</sub>启动子;真核启动子包括CMV立即早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、早期和晚期SV40启动子、反转录病毒的LTRs和其他一些已知的可控制基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体

还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；植物细胞；果蝇S2或Sf9的昆虫细胞；CHO、COS、293细胞的动物细胞等。

本发明的多核苷酸在高等真核细胞中表达时，如果在载体中插入增强子序列时将会使转录得到增强。增强子是DNA的顺式作用因子，通常大约有10到300个碱基对，作用于启动子以增强基因的转录。可举的例子包括在复制起始点晚期一侧的100到270个碱基对的SV40增强子、在复制起始点晚期一侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子等。

本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获，用CaCl<sub>2</sub>法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl<sub>2</sub>。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的DNA转染方法：原生质体法磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的蛋白质。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组蛋白质可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白质。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例

子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白质沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

重组的DaPA蛋白质有多方面的用途。这些用途包括(但不限于)：用于激活凝血酶原从而止血，和用于筛选促进或对抗DaPA蛋白功能的抗体、蛋白质或其它配体。用表达的重组凝血酶原激活剂DaPA筛选蛋白质库可用于寻找有治疗价值的能抑制或刺激凝血酶原激活剂DaPA功能的蛋白质分子。

另一方面，本发明还包括对凝血酶原激活剂DaPA编码 DNA或是其片段编码的蛋白质具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于凝血酶原激活剂DaPA或片段。较佳地，指那些能与凝血酶原激活剂DaPA或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制凝血酶原激活剂DaPA的分子，也包括那些并不影响凝血酶原激活剂DaPA功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的凝血酶原激活剂DaPA结合的抗体。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如Fab'或(Fab)<sub>2</sub>片段；抗体重链；抗体轻链；遗传工程改造的单链Fv分子；或嵌合抗体，如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的凝血酶原激活剂DaPA或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的，表达凝血酶原激活剂DaPA或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备。本发明的各类抗体可以利用凝血酶原激活剂DaPA的片段或功能区，通过常规免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用蛋白质合成仪合成。与凝血酶原激活剂DaPA的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如*E. Coli*)中生产的基因产物来免疫动物而产生；与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽)，可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

利用本发明凝血酶原激活剂DaPA，通过各种常规筛选方法，可筛选出与凝血酶原激活剂DaPA发生相互作用的物质，如受体、抑制剂、激动剂或拮抗剂等。

本发明凝血酶原激活剂DaPA及其抗体、抑制剂、激动剂、或拮抗剂等，当在治疗上进行施用(给药)时，可提供不同的效果。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中pH通常约为6-8，较佳地pH约为7-8，尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但并不限于)：肌内、静脉内、或局部给药。

本发明的蛋白质可直接用于临床上止血。在使用本发明凝血酶原激活剂DaPA时，还可同时使用其他治疗剂，如已知的止血药物等。

本发明还提供了一种药物组合物，它含有安全有效量的本发明凝血酶原激活剂DaPA以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物，可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约0.1纳克/千克体重-约0.01毫克/千克体重。此外，本发明的蛋白质还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的凝血酶原激活剂DaPA施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约1微克/天，而且在大多数情况下不超过约0.01毫克/千克体重，较佳地该剂量是约1微克/天-约0.002毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围之内的。

一种检测样品中是否存在凝血酶原激活剂DaPA的方法是利用凝血酶原激活剂DaPA的特异性抗体进行检测，它包括：将样品与凝血酶原激活剂DaPA特异性抗体接触；观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在凝血酶原激活剂DaPA。

本发明的主要优点在于：首次从尖吻蝮蛇的蛇毒中分离纯化到能激活凝血酶原的新的蛋白质，其分子量仅约25KD，是一种单结构域的金属蛋白酶。该蛋白酶直接作用于凝血瀑布反应中较下游的反应，从而见效更快，便于急救使用。其分子量相对较小，从而具有较低的免疫原性。同时尖吻蝮蛇(五步蛇)来源较

丰富。因而具有巨大的应用前景。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

### 实施例1 从尖吻蝮蛇毒中分离纯化的蛇毒凝血酶原激活剂

在本实施例中，采用了尖吻蝮蛇的蛇毒，在本实施例及以下实施例中，除非特别注明，否则指以上这种蝮蛇。

取尖吻蝮蛇毒，经pH7.6 Tris-HCl缓冲液溶解后，离心，取上清上DEAE—SephroseCL—6B柱分离，将具有凝血酶原激活剂活性的组分再通过FPLC MonoQ柱分离，便得到SDS—PAGE单一条带的蛇毒凝血酶原激活剂，测得其表观分子量为25KD。

该凝血酶原激活剂被命名为凝血酶原激活剂DaPA。

### 实施例2 尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂N端10个氨基酸序列的测定

将纯化的蛇毒凝血酶原激活剂样品，在市售的PE491蛋白质测定仪上经过10个循环，测得如下N端序列：STEFQRYMEI。

### 实施例3 引物的设计和合成

根据实施例2中测得的尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂的N端序列以及蛇类密码子偏爱性设计上游简并引物。

所设计上游寡核苷酸的引物为：

5'-CGAGTACTTC(A/G/C/T)AC(A/G/C/T)GA(A/G)TT(C/T)CA(A/G)AG-3' (SEQ ID NO:3)

下游引物为：oligodT(18)，

引物的合成委托上海生工生物公司完成。

#### 实施例4 总RNA的提取

取尖吻蝮蛇毒在液氮中研磨成粉，然后按上海生工生物工程公司总RNA抽提试剂盒说明书所载方法抽取毒腺总RNA。

#### 实施例5 RT—PCR扩增蛇毒凝血酶原激活剂基因

以实施例4中制得的尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂总RNA为模板，用上海生工生物公司MMLV cDNA第一链合成试剂盒反转录，按操作说明书进行。

利用实施例3中合成的引物，以上述所得的cDNA为模板，进行PCR扩增，总反应体系为50 $\mu$ l，加灭菌ddH<sub>2</sub>O 35 $\mu$ l，10 $\times$ PCR缓冲液 5 $\mu$ l，dNTP 4 $\mu$ l，cDNA1 $\mu$ l，上游引物2 $\mu$ l，oligo(dT)<sub>18</sub> 2 $\mu$ l，Taq酶1 $\mu$ l，反应条件为：先94 $^{\circ}$ C变性5min，然后进入循环，94 $^{\circ}$ C变性1min;42 $^{\circ}$ C退火1min;72 $^{\circ}$ C延伸1.5min,进行5个循环后，改变退火温度为40 $^{\circ}$ C，进行30个循环，最后在72 $^{\circ}$ C保温10min。PCR产物取5 $\mu$ l进行1%的琼脂糖电泳检查。

结果表明，扩增获得了一条约1000bp的DNA片段。将该DNA产物以氯仿抽提，乙醇沉淀回收，溶于30 $\mu$ l的灭菌水中备用。

#### 实施例6 蛇毒凝血酶原激活剂的基因克隆

取实施例5中获得的PCR回收产物4 $\mu$ l与pMD18—T载体（购自Takara公司）1 $\mu$ l连接，转化大肠杆菌DH<sub>16B</sub>，经蓝白斑筛选，酶切和PCR鉴定，获得阳性克隆。

#### 实施例7 尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂基因的鉴定

实施例6中获得的阳性克隆委托上海基康生物技术公司测序，基因序列和编码的蛋白质序列见图1和SEQ ID NO:1-2所示。该基因全长849bp，其中读码框长681bp，编码226个氨基酸，从蛇毒凝血酶原激活剂基因编码的氨基酸序列，经电脑软件Vector NTI 分析，该蛋白质的分子量为25354.5D，其等电点为4.82，是一个酸性蛋白质。

#### 实施例8 尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂激活凝血酶原的活性测定

##### (1) 纤维蛋白凝结法

取纤维蛋白原适量溶于pH7.6, 0.04mmol/L Tris-HCl缓冲液中, 配成0.8%的纤维蛋白原溶液, 另外再分别配制浓度为1mg/ml的凝血酶原溶液和浓度为50  $\mu$ g/ml的蛇毒凝血酶原激活剂溶液, 测定时取内径为1cm, 长10cm的试管3支, 各加入0.2ml纤维蛋白原溶液, 置37 $^{\circ}$ C水浴上保温5min, 然后向这3支试管中加入A) 0.1ml凝血酶原溶液+0.1ml缓冲液, B) 0.1ml蛇毒凝血酶原激活剂溶液+0.1ml缓冲液, C) 0.1ml凝血酶原溶液+0.1ml蛇毒凝血酶原激活剂溶液(预先混合后在37 $^{\circ}$ C水浴保温半个小时), 立即摇匀, 结果可见仅C管中产生了纤维蛋白凝结, A管和B管均未凝结。

## (2) 发色底物测定法

取凝血酶的发色底物Chromozym TH(Cbz-Gly-Pro-Arg-pNA)少量, 溶于pH7.6, 0.04mmol/L Tris-HCl缓冲液中, 配成浓度为1mmol/L的底物溶液, 另外再分别配制浓度为10mg/ml的凝血酶原溶液和浓度为500  $\mu$ g/ml的蛇毒凝血酶原激活剂溶液, 测活前取0.1ml凝血酶原溶液与0.1ml蛇毒凝血酶原激活剂溶液(Prothrombin+DaPA)及0.8ml pH7.6, 0.04mmol/L Tris-HCl混合, 并在室温预保温8 min, 测活时取底物溶液10  $\mu$ l及缓冲液80  $\mu$ l, 加上上述混合溶液10  $\mu$ l, 在405nm记录吸光度变化, 对照分别为只加凝血酶原(Prothrombin)溶液, 或只加蛇毒凝血酶原激活剂(DaPA)溶液。结果见图2, 表明凝血酶原经蛇毒凝血酶原激活剂激活后, 能水解凝血酶的发色底物Chromozym TH, 对照无任何变化。

## 实施例9、尖吻蝮蛇毒凝血酶原激活剂体外药理活性的测定

### (1) 复钙时间测定

取兔动脉血, 加入1/10体积3.8%柠檬酸钠抗凝, 室温3000g离心20min, 上清液为兔贫血小板血浆。取0.1  $\mu$ l兔贫血小板血浆, 0.1  $\mu$ l不同浓度的蛇毒凝血酶原激活剂样品(溶于0.02mmol/L, pH7.4 Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl, 0.05mol/L CaCl<sub>2</sub>中), 37 $^{\circ}$ C水浴2min后混合, 记录自混合起止纤维蛋白出现的时间, 0.02mol/L pH7.4 Tris-HCl(0.15mol/L NaCl, 0.05mol/L CaCl<sub>2</sub>)作为阴性对照, 分别将兔贫血小板血浆置于塑料离心管及玻璃试管中进行测定, 每种测定重复3次, 取平均值。

结果见图3, 图3A为塑料管中测定结果, 图3B为玻璃管中测定结果, 在塑

料管和玻璃管中测得的复钙时间存在明显差异，这是由于玻璃管壁可促进凝血瀑布反应。

## (2) 活化部分凝血活酶时间(APTT)测定

取健康自愿者静脉血，加入1/10体积3.8%柠檬酸钠抗凝，室温3000g离心20min，上清为人贫血小板血浆，使用希森美康CA-530型全自动血小板凝仪，进样系统按程序设置吸取人贫血小板血浆、碘脂及兔脑磷脂混合稀释液，Ca<sup>++</sup>各50 μ l，以含不同浓度的蛇毒凝血酶原激活剂的Ca<sup>++</sup>代替血凝仪试剂瓶中所含的Ca<sup>++</sup>，测定两次取平均值。结果见图4。

上述两种方法测定结果均表明随着蛇毒凝血酶原激活剂样品量的不断增加，兔贫血小板血浆的复钙时间及人贫血小板血浆的活化部分凝血活酶时间(APTT)逐渐缩短，这一结果也表明了蛇毒凝血酶原激活剂能促进血凝反应。

## 实施例10、蛇毒凝血酶原激活剂激活凝血酶原的产物分析

牛凝血酶原与蛇毒凝血酶原激活剂DaPA在PMSF存在下各时间点的反应产物与5 × loading 缓冲液混合后进行SDS-PAGE，转PVDF膜后切取各主要条带，送交测序，根据测序结果和条带分子量分析各主要条带对应的凝血酶原水解产物，最后确定蛇毒凝血酶原激活剂激活牛凝血酶原的切割位点分别为P<sup>166</sup>-L<sup>167</sup>, A<sup>269</sup>-A<sup>270</sup>及R<sup>323</sup>-<sup>324</sup>I肽键。

## 实施例11 凝血酶原激活剂DaPA的重组表达

在该实施例中，将DaPA基因的翻译区在原核载体pET-40b(+) (Invitrogen公司)中重组表达。

根据分泌型表达载体pET-40b(+)(该载体自带二硫键异构酶基因，DsbC)和DaPA基因序列特征，对pET-40b(+)载体用限制性内切酶ScaI和EcoRI进行消化，克隆有DaPA基因的pMD-18T质粒用PstI和EcoRI酶消化切胶回收条带后再用ScaI和EcoRI进行消化，并分别切胶回收，取1 μ l 载体回收溶液和5 μ l DaPA基因片段用T4连接酶于10 μ l体系中连接过夜。连接产物全量转化大肠杆菌DH5 α，在含有卡那霉素(Kanamycin)的琼脂平板上培养，挑取菌落于含3ml

LB培养基的试管中振摇过夜，抽取质粒进行酶切鉴定。阳性克隆经PCR鉴定后，转化感受态细胞BL21(DE3)，送交博亚公司测序验证。

将克隆有DaPA基因的pET-40b质粒转化感受态细胞BL21(DE3)，接种于新鲜的200mL LB培养基中在37℃剧烈振摇(每分钟200转以上)，培养至OD<sub>600</sub>为0.6左右，加入终浓度为1mmol/L的IPTG在30℃诱导表达5小时。然后，5000g 4℃离心10分钟，收集表达菌，将其悬浮于冰上预冷的20mL 1×NTA0 buffer (0.5mol/L NaCl, 10%甘油, 20mmol/L Tris-HCl, pH8.0)中，添加PMSF至终浓度1mmol/L。置于冰浴上超声破菌，15,000g 4℃离心30分钟，收集上清，进行亲和层析，整个层析过程均在4℃恒温下进行。取1~2mL Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析树脂(每毫升树脂可吸附约10mg 6×His融合蛋白)预先在4℃用含1mmol/L PMSF的NTA0buffer平衡，细菌裂解上清经0.45μm滤膜过滤后留取60 μl样，吸取其中20 μl用于SDS-PAGE分析，剩余的上清缓慢过柱吸附，流速不高于15ml/h，收集吸附后流出液并取样20 μl用于SDS-PAGE分析；用10倍柱体积的NTA0 buffer洗柱，流速30 ml/h，收集洗脱液并取样20 μl用于SDS-PAGE分析。用各5倍柱体积的NTA20 buffer、NTA60 buffer、NTA200 buffer、NTA800 buffer(在NTA0buffer基础上分别包含20 mmol/L咪唑、60 mmol/L咪唑、200 mmol/L咪唑、800 mmol/L咪唑，用预先配制的NTA800 buffer和NTA0 buffer兑制出所需浓度)和Strip buffer (100mmol/L EDTA, 0.5mol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl)依次洗柱，控制流速为15ml/h，以1.5ml塑料离心管分别收集洗脱液，测定各管的OD<sub>280</sub>，从每一步中OD<sub>280</sub>最高的各管中取样20 μl进行SDS-PAGE分析，确定DsbC-DaPA融合蛋白所在。

结果表明，NTA200洗脱液中蛋白条带分子量为43kD，与DsbC-DaPA融合蛋白预期值相当。Western鉴定表明针对DaPA的多克隆抗体与该蛋白有明显免疫交叉反应。

采用常规的分割方法，将DaPA蛋白从DsbC-DaPA融合蛋白上分离下来，获得有活性的DaPA蛋白。

按实施例8所述的方法(纤维蛋白凝结法和发色底物测定法)，测定所获得的DaPA蛋白以及所述DsbC-DaPA融合蛋白的激活凝血酶原的活性，结果表明本实施例获得的DaPA蛋白以及所述DsbC-DaPA融合蛋白与从蛇毒中分离的天然DaPA蛋白活性相近。

### 实施例12 携带组氨酸标签的DaPA衍生多肽的制备和活性鉴定

采用常规的方法，在SEQ ID NO:1的5'端添加对应于6his的编码序列，然后用常规的DNA重组方法表达出N端携带6组氨酸标签的DaPA蛋白。对于表达产物用Ni亲和柱进行分离，从而获得纯化的带有6His的DaPA衍生多肽。

按实施例8所述的方法(纤维蛋白凝结法)，测定所获得的DaPA衍生多肽的激活凝血酶原的活性。结果表明，该DaPA衍生多肽的激活凝血酶原的活性与从蛇毒中分离的天然DaPA蛋白活性相同。

### 实施例 13 含凝血酶原激活剂DaPA的药物组合物

按以下配方，用常规方法制备药物组合物：

DaPA 蛋白(提取的或重组表达的)	5 微克
右旋糖酐	1 毫克
100 毫摩尔磷酸缓冲液	1毫升

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。



```

His Ser Ser Val Asn Arg Leu Val Ala Ile Thr Leu Ala His Glu Met
   130                               135                               140
gct cat aat ctg ggc gtt cgt cat gac gaa ggt tcc tgt tct tgt ggt      480
Ala His Asn Leu Gly Val Arg His Asp Glu Gly Ser Cys Ser Cys Gly
145                               150                               155                               160
agt ggt tac aca tgc atc atg tct cct gtg ata aac tct gaa gtt atc      528
Ser Gly Tyr Thr Cys Ile Met Ser Pro Val Ile Asn Ser Glu Val Ile
                               165                               170                               175
aaa tat ttc agc gat tgt agt tat atc caa tgt cgg gag tat ata tcg      576
Lys Tyr Phe Ser Asp Cys Ser Tyr Ile Gln Cys Arg Glu Tyr Ile Ser
                               180                               185                               190
aag gag aac cca cct tgc att ctc aat aaa ccc ttg aga aca gat act      624
Lys Glu Asn Pro Pro Cys Ile Leu Asn Lys Pro Leu Arg Thr Asp Thr
                               195                               200                               205
gtt tca act cca gtt tct gga aat gaa ctt ttg gag gcg gaa aaa gat      672
Val Ser Thr Pro Val Ser Gly Asn Glu Leu Leu Glu Ala Glu Lys Asp
                               210                               215                               220
tat gac tgagactctt ctgcagtctg cggcaacggg cattgtgttg atgtgactac      728
Tyr Asp
225
agcctactaa tcaactgctg gcttctctca gatttgattt tggagatcct tcttcagaa      788
ggtttcactt cctcaagtc caaagagatc catctgcctg cattctacta gtaaactact      848
cttagctttc gtaggaatc taaattcgc aatatttctt ctccatattt aatctgttta      908
ccttttgctg taatcaaacc tttcccccgc cacaaagctc catgggcatg gacaacacac      968
caagggctta ttgctgtca aagaaaagaa atggccattt taccatttgc caaagcaca      1028
ttaaagcaa caagttctgc cttttgagc tgggtgtattc aaagtcaatg cttcctctcc      1088
caaaatttca tcttgcttt tccaagatgt ggctgcttcc atcaataaac aactatttct      1148
cattcgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa      1205

```

<210> 2

<211> 226

<212> PRT

<213> 尖吻腹蛇(Agkistrodon acutus)

<400> 2

```

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

```

```

          100              105              110
Val Ala Ser Met Cys Asp Pro Lys Arg Ser Val Gly Val Val Gln Asp
          115              120              125
His Ser Ser Val Asn Arg Leu Val Ala Ile Thr Leu Ala His Glu Met
          130              135              140
Ala His Asn Leu Gly Val Arg His Asp Glu Gly Ser Cys Ser Cys Gly
145              150              155              160
Ser Gly Tyr Thr Cys Ile Met Ser Pro Val Ile Asn Ser Glu Val Ile
          165              170              175
Lys Tyr Phe Ser Asp Cys Ser Tyr Ile Gln Cys Arg Glu Tyr Ile Ser
          180              185              190
Lys Glu Asn Pro Pro Cys Ile Leu Asn Lys Pro Leu Arg Thr Asp Thr
          195              200              205
Val Ser Thr Pro Val Ser Gly Asn Glu Leu Leu Glu Ala Glu Lys Asp
          210              215              220
Tyr Asp
225

```

```

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n=a, t, c 或 g

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n=a, t, c 或 g

```

```

<400> 3
cgagtacttc nacngartty carag

```

25

```

1                               30                               60
TCTACTGAATTTTCAGAGATACATGGAGATTGTTATTGTTGTGGACCATTCAATGGTCAA
S T E F Q R Y M E I V I V V D H S M V K
                               90                               120
AAATACAATGGCGATTTCAGATAAGATAAAAGCATGGGTATATGAAATGATCAACACTATA
K Y N G D S D K I K A W V Y E M I N T I
                               150                               180
ACGGAGAGTTACAGCTATTTGTATATCGATATAAATATTGTCTGGCTTGAAATTTGGTCC
T E S Y S Y L Y I D I I L S G L E I W S
                               210                               240
GAGAAAGATTTGATTAATGTGGAGACATCAGCGGAAAATACTTTGAAATCATTTGGAGAA
E K D L I N V E T S A E N T L K S F G E
                               270                               300
TGGAGAGCGAAAGATTTGATTCATCGCATAAGTCATGATAATGCTCAGTTACTCACGGCC
W R A K D L I H R I S H D N A Q L L T A
                               330                               360
ACTGACTTCGATGGACCAACTATAGGATTGGCTTACGTGGCCAGCATGTGTGACCCAAAG
T D F D G P T I G L A Y V A S M C D P K
                               390                               420
CGTTCTGTAGGAGTTGTTTCAGGATCATAGCTCAGTAAATCGTTTGGTTGCCATTACCCTG
R S V G V V Q D H S S V N R L V A I T L
                               450                               480
GCCCATGAGATGGCTCATAATCTGGGCGTTTCGTCATGACGAAGGTTCTGTCTTGTGGT
A H E M A H N L G V R H D E G S C S C G
                               510                               540
AGTGGTTACACATGCATCATGTCTCCTGTGATAAACTCTGAAGTTATCAAATATTTTCAGC
S G Y T C I M S P V I N S E V I K Y F S
                               570                               600
GATTGTAGTTATATCCAATGTCGGGAGTATATATCGAAGGAGAACCACCTTGCATTCTC
D C S Y I Q C R E Y I S K E N P P C I L
                               630                               660
AATAAACCTTGAGAACAGATACTGTTTCAACTCCAGTTTCTGGAAATGAACTTTTGGAG
N K P L R T D T V S T P V S G N E L L E
                               678
GCGGAAAAAGATTATGACTGAGACTCTTCTGCAGTCTGCGGCAACGGGCATTGTGTTGAT
A E K D Y D *
GTGACTACAGCCTACTAATCAACTGCTGGCTTCTCTCAGATTTGATTTTGGAGATCCTTCTCCAGAA
GGTTTCACCTCCCTCAAGTCCAAAGAGATCCATCTGCCTGCATTCTACTAGTAAATCACTCTTAGCTT
TCGTATGGAATCTAAATCCGCAATATTTCTTCCATATTTAATCTGTTTACCTTTTGTGTAATCA
AACCTTTTCCCGCCACAAAGCTCCATGGGCATGGACAACACACCAAGGGCTTATTTGCTGTCAAAGA
AAAGAAATGGCCATTTTACCATTTGCCAAAAGCACATTTAATGCAACAAGTTCTGCCTTTTGGAGCTG
GTGTATCAAAGTCAATGCTTCTCTCCAAAATTTTCATGCTGGCTTTTCCAAGATGTGGCTGCTTCC
ATCAATAAACACACTATTCTCATTTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAA

```

图 1

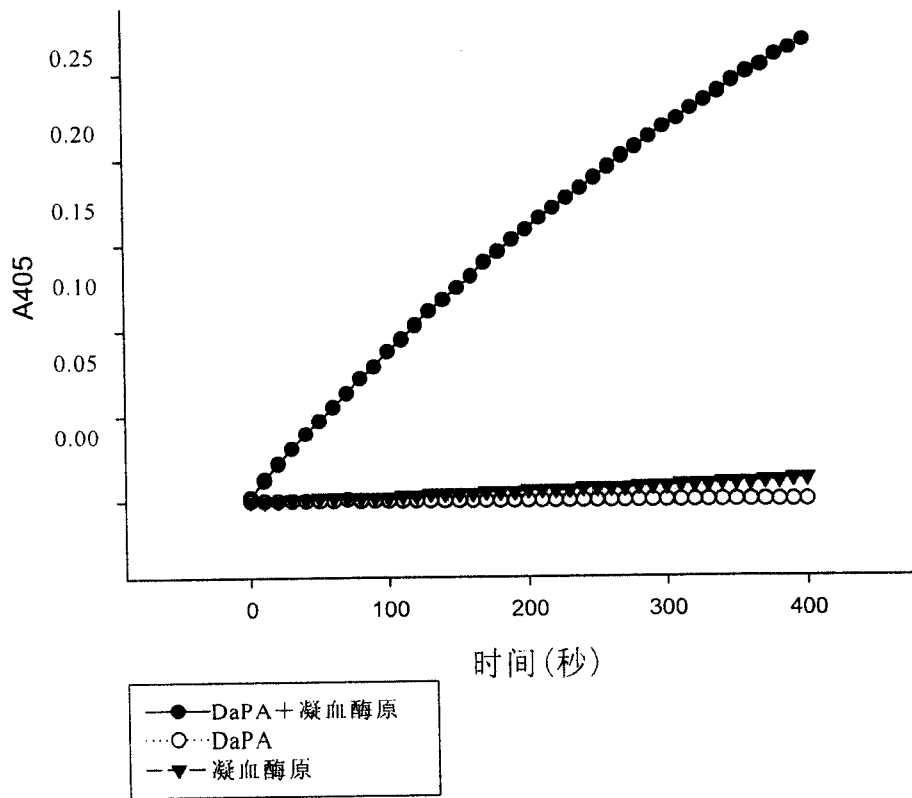


图 2

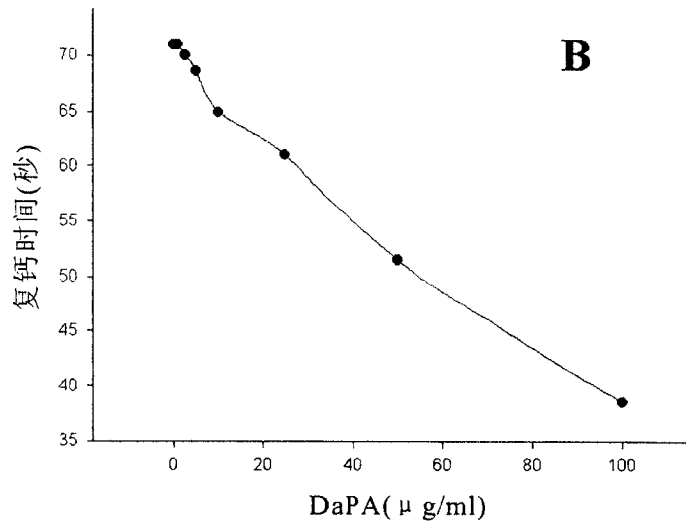
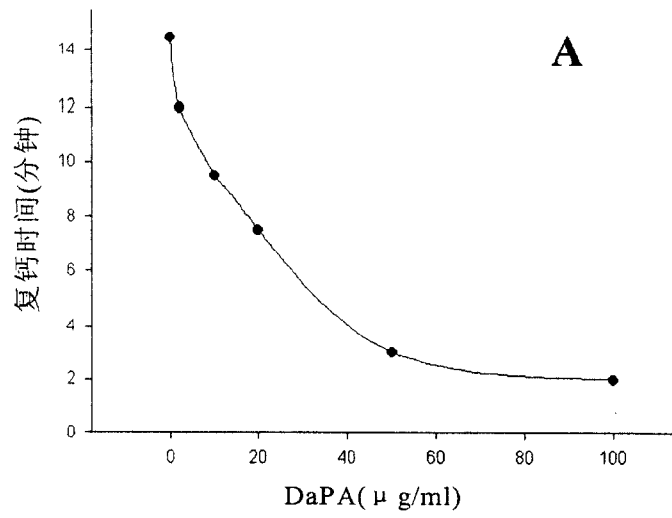


图 3

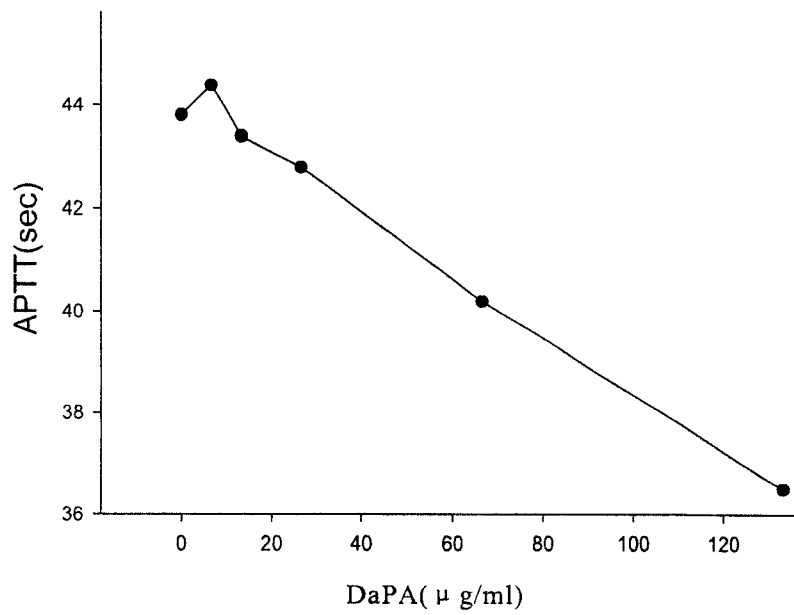


图 4