



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107208107 B

(45) 授权公告日 2021.07.09

(21) 申请号 201580070791.8

(73) 专利权人 伊利亚制药公司

(22) 申请日 2015.12.23

地址 瑞典乌普萨拉

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 埃维利纳·威格斯乔

申请公布号 CN 107208107 A

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201

(43) 申请公布日 2017.09.26

代理人 宋融冰

(30) 优先权数据

(51) Int.CI.

1451658-7 2014.12.23 SE

C12N 15/74 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 1/21 (2006.01)

2017.06.23

A61K 35/744 (2015.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 17/02 (2006.01)

PCT/EP2015/081146 2015.12.23

C12R 1/225 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 吕小蒙

W02016/102660 EN 2016.06.30

权利要求书2页 说明书29页

序列表36页 附图25页

(54) 发明名称

伤口愈合的方法

(57) 摘要

本发明涉及当被转化进入乳酸细菌细胞时能够表达靶向免疫细胞的蛋白质的质粒，其中所述蛋白质选自由鼠和人CXCL12 1^a; CXCL17和Ym1组成的组。本发明还涉及利用所述质粒转化的乳酸细菌，以及所述乳酸细菌用于人和动物伤口愈合的用途。

1. 乳酸细菌在制备用于人或动物受试者中的皮肤伤口愈合的治疗性产品中的用途, 其中所述乳酸细菌是用质粒转化的罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*), 所述质粒能够在所述罗伊氏乳杆菌中表达选自由 CXCL12、CXCL17 和 Ym1 组成的组的蛋白质。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述质粒包含编码蛋白质的核苷酸序列, 所述蛋白质选自:

- (i) 鼠 CXCL12-1 α , 如 SEQ ID NO:3 或 2 所示的氨基酸序列;
- (ii) 人 CXCL12-1 α , 如 SEQ ID NO:6 或 5 所示的氨基酸序列;
- (iii) 鼠 CXCL17, 如 SEQ ID NO:9 或 8 所示的氨基酸序列;
- (iv) 人 CXCL17, 如 SEQ ID NO:12 或 11 所示的氨基酸序列;
- (v) 鼠 Ym1, 如 SEQ ID NO:15 或 14 所示的氨基酸序列; 和
- (vi) 人 Ym1, 如 SEQ ID NO:18 或 17 所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述质粒包含允许在所述乳酸细菌中表达的一种或多种调控序列, 其中所述调控序列获得于或来源于所述乳酸细菌。

4. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述蛋白质的表达是可调控的。

5. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述质粒包含在诱导型启动子控制下编码一种或多种所述蛋白质的一种或多种核苷酸序列。

6. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述质粒包含来自所述乳酸细菌的乳链菌肽调节子、sakacin A 调节子或 sakacin P 调节子的诱导型启动子和调控元件。

7. 根据权利要求5所述的用途, 其中所述诱导型启动子是来自 sakacin P 调节子的 PorfX 启动子。

8. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述质粒来源于具有 SEQ ID NO:20 序列的命名为 pSIP411 的质粒。

9. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中编码所述蛋白质的核苷酸序列经密码子优化以在所述乳酸细菌中表达。

10. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途, 所述质粒包含选自由以下组成的组的一个或多个核苷酸序列: 包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:16 的序列的核苷酸序列。

11. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述乳酸细菌被制备为直接施用至伤口部位。

12. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述治疗性产品是以伤口敷料的形式, 所述伤口敷料包含所述乳酸细菌。

13. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述治疗性产品是以局部施用至皮肤的药物组合物的形式, 所述药物组合物包含所述乳酸细菌。

14. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述治疗性产品是以医疗装置的形式, 所述医疗装置包含所述乳酸细菌。

15. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述乳酸细菌是冷冻干燥的。

16. 根据权利要求6所述的用途, 其中所述诱导型启动子是来自 sakacin P 调节子的 PorfX 启动子。

17. 乳酸细菌在制备用于人或动物受试者中的皮肤伤口愈合的试剂盒中的用途, 所述

试剂盒包含：

(i) 包含如权利要求1至10中任一项定义的所述乳酸细菌,其中所述质粒包含在诱导型启动子控制下编码所述蛋白质的核苷酸序列,所述质粒能够在所述乳酸细菌中表达所述蛋白质;和

(ii) 用于所述启动子的诱导剂。

18. 根据权利要求17所述的用途,其中所述乳酸细菌是冷冻干燥的。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述试剂盒还包含用于重新悬浮冷冻干燥的所述乳酸细菌的液体。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述液体包含诱导剂。

21. 根据权利要求17至20中任一项所述的用途,其中所述试剂盒包含含有所述乳酸细菌的伤口敷料。

22. 根据权利要求17至20中任一项所述的用途,其中所述试剂盒还包含伤口敷料。

伤口愈合的方法

技术领域

[0001] 本发明一般涉及重组质粒,特别涉及当被转化进入乳酸细菌细胞时能够表达靶向免疫细胞的重组蛋白质的质粒,其中所述蛋白质选自由鼠和人CXCL12 1 α 、CXCL17和YM1组成的组。本发明还涉及用所述质粒转化的乳酸细菌,以及所述乳酸细菌用于人和动物伤口愈合的用途。

背景技术

[0002] 伤口愈合的过程具有重叠的阶段(凝血期、炎症期和增殖/重塑期),其中局部微环境的组成随着时间的推移而变化,不同的细胞类型发挥不同的作用。愈合过程中的关键细胞参与者是血小板、角质形成细胞/上皮细胞、成纤维细胞/肌成纤维细胞、不同的免疫细胞和内皮细胞。机体中的所有组织都可能受伤,并且愈合过程对器官有一定的特异性,但受损细胞引起的初始信号是相似的。最受关注的伤口愈合形式是在皮肤上。

[0003] 组织损伤破坏体内平衡,引发凝血过程并激活交感神经系统。形成血块的血小板释放信号,主要是PDGF(血小板衍生生长因子)和TGF(转化生长因子)改变局部环境(参考文献1)。受伤的和应激细胞释放引发免疫细胞如嗜中性粒细胞和单核细胞募集的报警信号。在伤口组织内,免疫细胞分泌各种趋化因子、生长因子如VEGF-A、FGF和EGF(血管内皮生长因子A、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子),ROS(活性氧类)和基质消化酶,其改变微环境并允许愈合过程进入巨噬细胞去除坏死组织和死组织的增生期。来自伤口边缘的细胞,如成纤维细胞和角质形成细胞向内移动到伤口中心,并用一层胶原和细胞外基质覆盖伤口表面。然后使伤口内的成纤维细胞转化为表达收缩性 α -SMA(α -平滑肌肌动蛋白)的肌成纤维细胞,使伤口收缩并最终闭合。从成纤维细胞向肌成纤维细胞的转变取决于来自微环境的信号,其中一些来源于免疫细胞,主要是巨噬细胞。在此过程中,血管生成新形成的组织、肉芽组织。在这个阶段,除了免疫细胞募集和迁移到病变部位之外,通常还会增加流向相邻区域的血流量以增加氧气和营养物的可用性。

[0004] 伤口闭合后,病变部位由角质形成细胞/上皮细胞重新上皮化,从而恢复器官屏障的完整性。即使在伤口闭合后,也会发生一些组织重塑以使基质结构正常化,并且大多数涉及的免疫细胞死亡或离开该部位。此外,在这个阶段,死亡或垂死的细胞被剩余的组织巨噬细胞摄取并清除(吞噬)(参考文献1)。更快的伤口愈合减轻患者的并发症和不适。

[0005] 受伤或延迟的皮肤或粘膜伤口愈合是导致疼痛、直接暴露于病原体、丧失组织功能和丧失温度和流体平衡调节的全球临床问题。有几种情况,其中严格控制的伤口愈合过程受损,并且皮肤或粘膜伤口比正常情况下更长时间保持不愈合,在最坏的情况下变成慢性的。

[0006] 减少血液流向皮肤,特别是在四肢,显著降低愈合过程的效率。皮肤灌注减少或脉管系统功能受损的几种临床情况如PAD(外周动脉疾病)、间歇性跛行、静脉功能不全或动脉硬化斑块的血管阻塞。受损的流向伤口区域的血流量导致氧气和营养物质不足,辅助组织重建的细胞死于坏死或无法在位点处执行任务。此外,如果无法被充分供应,周围的组织将

失去功能并最终开始死亡。组织在重塑阶段代谢非常活跃，并且耗氧量高。

[0007] 妨碍皮肤伤口愈合的另一个因素是高血糖症和糖尿病。在高血糖条件下，细胞信号传导和免疫系统功能受损。糖尿病导致的并发症包括微血管变化和周围神经元的损伤。因此，糖尿病患者经常在脚上发展出慢性创伤，通常称为糖尿病足。今天针对这些患者的可用治疗方法是采用手术清创或胶原酶来去除死亡组织并配合全身抗生素治疗和闭合伤口敷料。在一些实验研究中，生长因子和生物材料已被应用于慢性伤口（参考文献2）。

[0008] 基质细胞衍生因子1（SDF-1），也被称为C-X-C基序趋化因子12（CXCL12），其是在机体中由CXCL12基因编码的趋化因子蛋白。WO2009/079451公开了一种用于促进受试者中伤口愈合的方法，其包括直接对伤口或接近伤口的区域施用有效地促进受试者伤口愈合的量的SDF-1。

[0009] 已证实如果在愈合过程中在饮用水中补充某些益生菌（罗伊氏乳杆菌（*Lactobacillus reuteri*）ATCC PTA 6475）能够促进伤口愈合（参考文献9），即摄取细菌。此外，植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）的培养物的上清液已被证明可抑制通常感染慢性伤口的铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）产生的生物膜（参考文献10）。

[0010] 已经令人惊奇地发现，根据本发明经过修饰以表达特定蛋白质（例如细胞因子）的乳酸细菌可用于促进伤口愈合。乳酸细菌稀疏存在于人体皮肤上（参考文献13），并且不是用于任何介入皮肤的细菌的预期选择。乳杆菌（*Lactobacilli*）难以发挥作用，因为它们生长相对缓慢，并且与更常用的细菌如大肠杆菌（*E.coli*）和金黄色葡萄球菌（*S.aureus*）相比需要特殊的培养基和条件。此外，乳杆菌具有有限的关于转录、翻译和蛋白质折叠的细胞内机制。为此，有必要优化编码异源蛋白质的核苷酸序列以适应特异性细菌菌株。

[0011] 伤口愈合的不同阶段包括可以变化以改变愈合过程的不同关键事件。愈合过程中的血管重构高度依赖于调节VEGF-A（血管内皮生长因子A）和一系列趋化因子例如CXCL12（也称为SDF-1；SEQ ID NO:3和6）表达的缺氧诱导因子1α（HIF-1α）的诱导。CXCL12在组织中组成性表达，并通过在白细胞和内皮细胞上发现的受体CXCR4发挥诱导多种细胞行为的作用（参考文献3）。发现CXCL12在专注于组织重塑的巨噬细胞中具有高水平（参考文献4）。利用慢病毒载体的CXCL12的皮肤过表达改善了糖尿病小鼠的伤口愈合（参考文献5）。

[0012] 另一个最近发现的趋化因子是CXCL17（SEQ ID NO:9和12），其对组织巨噬细胞的表型与CXCL12具有相似的作用。与CXCL12相似，CXCL17与细胞培养物中测量的VEGF-A共同调节（参考文献6）。CXCL17主要发现在粘膜组织中，据报道对皮肤上也发现的病原菌具有直接抗菌作用，而对干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）的存活没有影响（参考文献7）。

[0013] 另一种目标蛋白质是几丁质酶样蛋白质Ym1（SEQ ID NO:15和18）。壳多糖是细菌生物膜中常见的多糖。Ym1既能阻碍生物膜的生成，又能诱导对组织重塑和伤口愈合很重要的巨噬细胞功能，并由于它不被血管细胞或上皮细胞吸收而对巨噬细胞具有特异性（参考文献8）。

发明内容

[0014] 因此，在第一方面，本发明提供了能够在乳酸细菌中表达蛋白质（即，当被转化进入乳酸细菌细胞时）的重组质粒，其中所述蛋白质可用于改善人或动物受试者的伤口愈合，例如皮肤或粘膜伤口愈合。优选地，所述蛋白质由于其靶向免疫细胞如巨噬细胞及其前体

的能力而可用于伤口愈合。优选地，所述蛋白质是细胞因子或趋化因子。最优先地，所述蛋白质选自由鼠CXCL12，特别是鼠CXCL12-1 α (SEQ ID NO:3)；人CXCL12，特别是人CXCL12-1 α (SEQ ID NO:6)；鼠CXCL17 (SEQ ID NO:9)；人CXCL17 (SEQ ID NO:12)；鼠Ym1 (SEQ ID NO:15)；和人Ym1 (SEQ ID NO:18) 组成的组。

[0015] 本发明的第一方面更具体地提供了能够在乳酸细菌中表达重组蛋白(即，当被转化进入乳酸细菌细胞)的质粒，其中所述质粒包含编码选自CXCL12、CXCL17和Ym1的蛋白质的核苷酸序列。

[0016] 更具体地，核苷酸序列可以编码鼠CXCL12，特别是鼠CXCL12-1 α ；人CXCL12，特别是人CXCL12-1 α ；鼠CXCL17；人CXCL17；鼠Ym1；或人Ym1。

[0017] 在一个实施方案中，质粒包含编码蛋白质的核苷酸序列，所述蛋白质选自具有SEQ ID NO:3或2所示氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的鼠CXCL12-1 α ；具有SEQ ID NO:6或5所示氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的人CXCL12-1 α ；具有SEQ ID NO:9或8所示氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的鼠CXCL17；具有SEQ ID NO:12或11所示氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的人CXCL17；具有SEQ ID NO:15或14所示氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的鼠Ym1；和如SEQ ID NO:18或17所示或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的人Ym1。

[0018] 更具体地说，质粒用于在乳酸细菌中表达蛋白质，因此提供或适应于这种用途(例如，其被设计、选择、适应或修饰以用于在乳酸细菌中的特异性或特别的用途)。因此，在一个实施方案中，质粒用于在相对于一般的细菌或微生物的乳酸细菌中的特异性表达。该质粒可以通过调控元件(调节序列)和/或编码序列(例如被选择或修饰以用于在乳酸细菌中表达)而适用于在乳酸细菌中表达。

[0019] 因此，在更具体的方面，质粒包含允许在乳酸细菌中表达或特异性表达的一种或多种调节(即表达控制)序列。因此，质粒可以含有来源于或适合于或特异于在乳酸细菌中表达的表达控制序列。合适的表达控制序列包括例如在匹配阅读框中与编码要表达的蛋白质的核苷酸序列连接的翻译(例如起始密码子和终止密码子、核糖体结合位点)和转录控制元件(例如启动子-操纵子区、终止停止序列)。调节序列可操纵地连接至编码所述蛋白质的核苷酸序列，以使得它们驱动或控制蛋白质的表达。可将质粒引入乳酸细菌细胞。合适的转化技术在文献中有很好的描述。可以在允许从质粒表达所述蛋白质的条件下培养或以其它方式保持细菌细胞。这可以包括受试者的伤口中的状况。

[0020] 在一个实施方案中，控制蛋白质表达的质粒中的启动子是允许或特异于在乳酸细菌中表达的启动子。因此，质粒可以包含在能够在乳酸细菌中表达蛋白质的(或可操纵连接至)启动子的控制下编码蛋白质的核苷酸序列。在特别优选的实施方案中，质粒包含乳酸细菌启动子，即控制蛋白质表达的启动子是来源于乳酸细菌的启动子，或更特别是获得于或来源于乳酸细菌中表达的基因。

[0021] 在一些实施方案中，除了乳酸细菌启动子之外，质粒还可以包含获得于或来源于乳酸细菌的其它控制蛋白质表达的调控元件或序列。因此，例如这样的其它乳酸细菌细胞表达控制元件或序列可以包括增强子、终止子和/或翻译控制元件或如上所述的序列。在一些实施方案中，质粒还可包含控制或调控从启动子开始表达的调控元件或序列，例如，操纵

子序列等或如下面进一步讨论的一种或多种调控基因。

[0022] 可选地或另外地,通过针对在乳酸细菌中表达而对编码蛋白质的核苷酸序列进行密码子优化,可以使质粒适用于(或经过修饰等)在乳酸细菌中的使用。

[0023] 在优选的实施方案中,用于表达蛋白质的启动子是受调控的(可调控的)或可诱导的启动子。因此,通过提供或使细菌与激活或启动(诱导)启动子的调控分子或诱导剂接触,可以控制或调控蛋白质的表达(例如引发,如在期望的或合适的时间)。这在将蛋白质递送到伤口的情况下是有利的。

[0024] 因此,本发明的另一方面提供了用于在乳酸细菌中表达蛋白质的表达系统,所述表达系统包含(i)如本文所定义的质粒,其中所述质粒包含在诱导型启动子控制下编码所述蛋白质的核苷酸序列,所述质粒能够在乳酸细菌中表达所述蛋白质;和(ii)用于启动子的诱导剂(或调控分子)。表达系统可以方便地以包含上述组分(i)和(ii)的试剂盒的形式提供。

[0025] 本发明的另一方面是用如本文定义的本发明的质粒转化的(即包含)细菌(bacterium)或细菌(bacteria)(即细菌细胞或菌株)。特别地,细菌是乳酸细菌,并且因此本发明提供了包含本文定义的本发明的质粒的乳酸细菌(或乳酸细菌)。可替换地表示为,本发明的这个方面提供了已经引入了本发明的质粒的细菌(或细菌细胞)。

[0026] 如本文进一步描述的,本发明的质粒和细菌可用于促进愈合,并因此在促进伤口愈合方面具有特别的用途,本文定义的伤口通常包括受损组织(见下文)。因此,本发明的另外的方面提供了这种质粒和细菌在治疗中的用途,更具体地在伤口愈合中的用途。

[0027] 可以将细菌以药物组合物形式施用于待治疗的受试者的伤口。因此,本发明的另一方面提供了包含本文定义的本发明的细菌以及至少一种药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

[0028] 更一般地,本发明提供了包含本发明细菌的益生菌产品。

[0029] 这样的产品或药物组合物可以方便地采取包含本发明的细菌的伤口敷料的形式。因此,在另一方面,本发明提供了包含如上文所定义的本发明细菌和至少一种敷料材料的伤口敷料。

[0030] 本发明的另一方面提供了本文所定义的本发明的质粒或细菌用于制造用于伤口愈合的药物(或益生菌产品)的用途。

[0031] 还提供了治疗受试者以愈合伤口的方法,所述方法包括向所述受试者或所述受试者的伤口施用有效促进伤口愈合的量的本文所定义的本发明的细菌。

[0032] 本发明的另一方面提供了用于愈合伤口的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0033] (i)包含本文所定义的本发明的质粒的乳酸细菌,其中所述质粒包含在诱导型启动子控制下编码所述蛋白质的核苷酸序列,所述质粒能够在乳酸细菌中表达所述蛋白质;和

[0034] (ii)用于启动子的诱导剂(或调控分子)。

[0035] 本发明的另一方面包括药物产品(例如试剂盒或组合产品),其包含:

[0036] (i)包含本文所定义的本发明的质粒的乳酸细菌,其中所述质粒包含在诱导型启动子控制下编码所述蛋白质的核苷酸序列,所述质粒能够在乳酸细菌中表达所述蛋白质;和

[0037] (ii) 用于启动子的诱导剂(或调控分子)，

[0038] 所述药物产品作为组合制剂用于在伤口愈合(或用于处理受试者伤口)中分开、顺序或同时使用。

[0039] 本文广义地使用术语“伤口愈合”包括促进或改善伤口愈合的任何方面。因此，上文阐述的本发明的各个方面可以替代地用关于质粒或细菌在促进或增强或改善伤口愈合或仅仅促进或增强愈合中的用途来定义。

[0040] 因此，伤口愈合可以包括或包含导致更快伤口愈合或伤口更完全愈合的任何效果，或者甚至在伤口愈合中任何改良或改善伤口愈合，例如减少愈合时间，如实现伤口部分或完全闭合的时间减少，改善伤口外观(例如已愈合的或正在愈合的伤口的外观)，减少或改善瘢痕形成，促进慢性或顽固性伤口愈合等(即将本发明的细菌应用于伤口可以诱导或引起或开始伤口的愈合，该伤口迄今尚未愈合或未出现任何愈合迹象)。伤口将在下面更详细地讨论。

[0041] 具有待治疗伤口的受试者可以是任何人或动物受试者，包括例如家畜、牲畜、实验室动物、竞技动物(sports animals)或动物园动物。动物优选是哺乳动物，但是也包括其它动物，例如，鸟类。因此，动物可以是灵长类动物、啮齿动物(例如小鼠或大鼠)或马、狗或猫。最优先受试者是人。

[0042] 乳酸细菌(LAB)或乳杆菌属(*Lactobacillales*)是具有共同的代谢和生理特征的革兰氏阳性、低GC、耐酸、通常非孢子生成的、非呼吸性的棒状(芽孢杆菌(*bacillus*))或球形(球菌(*coccus*))细菌的分支。这些细菌产生乳酸作为碳水化合物发酵的主要代谢最终产物，其以耐酸性(低pH范围)增加为特征。LAB的这些特征允许它们在天然发酵中优于其它细菌，因为LAB可以承受由有机酸产生(例如乳酸)而增加的酸度。因此，LAB在食物发酵中起重要作用，因为酸化抑制腐败剂的生长。几种LAB菌株还产生蛋白质细菌素，其进一步抑制病原微生物的腐败和生长。LAB通常被认为是安全(GRAS)的状态，并且是食品工业中采用的最重要的微生物群体之一。

[0043] 包含乳酸细菌分支的核心属是乳杆菌属(*Lactobacillus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、和链球菌属(*Streptococcus*)、以及更外围的气球菌属(*Aerococcus*)、肉杆菌属(*Carnobacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、酒球菌属(*Oenococcus*)、芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*)、四联球菌属(*Tetragenococcus*)、漫游球菌属(*Vagococcus*)和魏斯氏菌属(*Weissella*)。这些属的任何乳酸细菌都包括在本发明的范围内，特别是来自乳杆菌属(*Lactobacillus*)或乳球菌属(*Lactococcus*)的细菌。

[0044] 质粒可以编码一种或多种所述蛋白质。因此，它可以编码CXCL12、CXCL17和/或Ym1蛋白(例如CXCL12、CXCL17或Ym1的2个或更多个)的组合。可选地，它可以编码2种或更多种类型的CXCL12、CXCL17和/或Ym1蛋白(例如鼠和人CXCL12等)。当编码多于一种蛋白质时，由在单个启动子控制下可以从编码蛋白质的核苷酸序列表达该蛋白质，或者可以使用多于一种的启动子。例如，每种蛋白质可以由单独的启动子表达，其可以相同或不同。用于从同一质粒一起表达2种或更多种蛋白质的技术在本领域中是众所周知的，并且包括例如翻译偶联技术等，用于实现这一点的手段是本领域已知和可获得的。例如，采用P2A和T2A序列可以在一个启动子下同时表达多个转基因。

[0045] CXCL12、CXCL17或Ym1蛋白可以是自然或天然蛋白质(即,核苷酸序列可以编码具有自然中发现的氨基酸序列的蛋白质),并且可以来自产生这些蛋白质的任何物质。通常,蛋白质将是哺乳动物蛋白质,且如上所述,人和鼠蛋白质是优选的。然而,天然核苷酸序列或蛋白质序列可以被修饰,例如通过一个或多个氨基酸增加、插入、缺失和/或取代,只要蛋白质的功能或活性没有实质上或显著的改变,例如,只要蛋白质的活性基本上被保留。蛋白质可以是天然蛋白质的片段或截短的变体。例如,序列修饰的变体蛋白质可以表现出从其来源的亲本蛋白质的至少80%、85%、90%或95%的活性。这可以根据本领域已知的用于上述蛋白质的活性的测试进行评估。例如,活性测试可以在结扎后所述蛋白质处理的培养细胞内受体磷酸化或钙通流量体系中,在对受感染蛋白质的细胞募集模型中的细胞体外或体内趋化性的体系中进行。基于趋化性的体外测定描述于参考文献22和32中。参考文献33描述了可以采用的另外的体外趋化因子活性测试。因此,术语“CXCL12”、“CXCL17”或“Ym1”不仅包括天然蛋白质,还包括它们的功能性等同变体或衍生物。因此,蛋白质可以是合成的或序列修饰的变体,或者可以包括一种或多种其它修饰,例如,翻译后修饰等。

[0046] 如上所述,被编码的蛋白质可以具有如上所述的天然的人或鼠蛋白质的氨基酸序列,即SEQ ID NO:3和6分别为鼠和人CXCL12、9和12分别为鼠和人CXCL17、15和18分别为鼠和人Ym1,或者与任何上述序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。有利地,如上所述,可以对编码这些天然蛋白质的核苷酸序列进行密码子优化以用于在乳酸细菌中表达。这可产生具有经过修饰的氨基酸序列的被编码的蛋白质。例如,经密码子优化的序列可以编码序列,例如适合(或更适合)乳酸细菌的分泌序列。因此,与天然蛋白质相比,由经密码子优化的核苷酸序列编码的“优化”蛋白质可以包括改变的或取代的前导序列或信号序列(例如分泌序列)。在优选的实施方案中,由密码子优化的序列编码的蛋白质的成熟或裂解形式与天然蛋白质相同。由经密码子优化的核苷酸序列编码的蛋白质可以具有如SEQ ID NO:2、5、8、11、14或17所示的氨基酸序列,如下表IV所列。因此,由质粒编码的蛋白质可以具有如SEQ ID NO:2和5所示的分别为鼠和人CXCL12的氨基酸序列,8和11分别为鼠和人CXCL17,以及14和17分别为鼠和人Ym1,或与任何上述序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0047] 在其它实施方案中,被编码的蛋白质可以与任何上述氨基酸序列具有至少81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的氨基酸序列。

[0048] 序列同一性可以容易地通过本领域已知和且容易获得的方法和软件来确定。因此,可以通过任何方便的方法来评估序列同一性。然而,为了确定序列之间的序列同一性程度,进行序列多重比对的计算机程序是有用的,例如Clustal W(参考文献24)。比较和对齐成对序列的程序,如ALIGN(参考文献25)、FASTA(参考文献26和参考文献27)、BLAST和空位BLAST(gapped BLAST)(参考文献28)也可用于此目的,并且可以采用默认设置。此外,欧洲生物信息学研究所的Dali服务器提供基于结构的蛋白质序列比对(参考文献29、参考文献30和参考文献31)。采用标准BLAST参数(例如采用来自所有可获得有机体的序列,矩阵BLOSUM62,缺口成本:存在11,延伸1)可以确定多重序列比对和百分比同一性计算。或者,可以采用以下程序和参数:程序:Align Plus 4,版本4.10(Sci Ed Central Clone Manager Professional Suite)。DNA比较:全局比较,标准线性评分矩阵,不匹配罚分=2,开放缺口罚分=4,延伸缺口罚分=1。氨基酸比较:全局比较,BLOSUM 62评分矩阵。

[0049] 如本文所定义的天然存在的多肽序列的变体可以以合成的方式生成,例如通过采用本领域已知的标准分子生物学技术,例如标准诱变技术,诸如定点或随机诱变(例如采用基因改组或易错PCR)。

[0050] 本文定义的蛋白质的衍生物也可以被编码。衍生物是指如上所述的蛋白质或其变体,其中氨基酸是经过化学修饰的,例如通过糖基化等等。

[0051] 当蛋白质相对于天然蛋白质的序列包含氨基酸取代时,取代可优选为保守取代。术语“保守氨基酸取代”是指氨基酸被具有相似物理化学性质的氨基酸(即相同类别/组的氨基酸)替代(取代)的任何氨基酸取代。例如,小残基甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T);疏水性或脂肪族残基亮氨酸(L)、异亮氨酸(I);缬氨酸(V)或甲硫氨酸(M);亲水性残基天冬酰胺(N)和谷氨酰胺(Q);酸性残基天冬氨酸(D)和谷氨酸(E);带正电(碱性)残基精氨酸(R)、赖氨酸(K)或组氨酸(H);或芳香族残基苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)可以互换取代,而基本上不改变蛋白质的功能或活性。

[0052] 如上所述,优选使用诱导型启动子来表达蛋白质。“诱导型”是指可以调控或控制其功能(即,允许或引起编码核苷酸序列的转录的活性或作用)的任何启动子。术语“诱导型”因此是同义词,可以与“可调控”(或“受调控的”)互换使用。因此,不存在蛋白质的组成型表达。因此,蛋白质的表达可以被诱导或启动(或更特别地启动和关闭)。更具体地,可以在有限的或限定的时间内诱导或启动表达。这可能是因为表达在一段时间后停止,和/或因为细菌细胞死亡。

[0053] 在一些实施方案中,可能没有从启动子的表达(转录),直到启动子被诱导(或者可选地被称为活化)。然而,与任何生物系统一样,缺乏活性可能不是绝对的,并且在不存在启动子活化或诱导的情况下可能存在一些基础启动子活性。然而,在优选的实施方案中,未诱导的启动子的任何基础表达是低的、最小的或不显著的,或者更优选的是微量的或可忽略的。因此,与启动子未被诱导时相比,当启动子被诱导时,从诱导型启动子的表达有利地可测量或显著地增加。

[0054] 可诱导的启动子是本领域熟知的,包括用于在乳酸细菌中使用的诱导型启动子,并且可以使用任何合适的适合于在乳酸细菌中表达的诱导型启动子。

[0055] 诱导型启动子可以在诱导剂或活化剂分子的存在下被诱导(或活化),诱导剂或活化剂分子可以直接或间接地作用在启动子上,并且可以加入以诱导启动子,或更一般地引起或实现启动子诱导或激活,并允许蛋白质的表达,或者通过含有质粒的细菌的条件的改变可以诱导(或激活),例如通过引入乳酸细菌中条件的改变,例如,饥饿或消耗特定营养物质。启动子的诱导剂可以由调控基因编码,在一个实施方案中调控基因本身可以被诱导或活化。因此,术语“诱导剂”在本文中广泛地用于包括任何调控分子,或实际上任何许可条件,其可以激活或启动诱导型启动子,或者允许或引起诱导型启动子被诱导。因此,诱导型启动子的诱导可以包括引入(例如接触包含质粒的乳酸细菌)调控分子或允许启动子诱导(活化)的条件。在一些实施方案中,诱导剂可以是活化肽。这可以直接或间接地诱导启动子,例如如下文进一步描述的。

[0056] 如上所述,优选获得于或来源于乳酸细菌的启动子。这些可以是天然启动子或经修饰的或突变的启动子。例如可以通过使乳酸细菌在伤口中生长,并通过确定哪些基因在伤口中的细菌中表达或上调来鉴定合适的启动子。然后可以鉴定来自这些基因的启动子。

可替换的,乳酸细菌中的或用于乳酸细菌中的许多不同的启动子和表达系统是已经被鉴定出来并进行描述的,或者是本领域可获得的,包括含有此类启动子的表达质粒或用于LAB的表达系统。可以使用任何这样的已知质粒或表达系统作为本发明的重组质粒的基础。

[0057] 本领域已知各种诱导型表达系统用于LAB例如乳杆菌。一个实例包括基于参考文献19中所述的植物乳杆菌(*L.plantarum*)NC8的锰转运体的锰饥饿诱导型启动子的自动诱导系统。该系统不需要添加用于重组蛋白质生产的外部诱导物。

[0058] Duong等人(参考文献20)描述了基于宽范围的pWV01复制子乳杆菌使用的表达载体,并含有来自涉及低聚果糖(FOS)、乳糖或海藻糖代谢或转运或糖酵解的操纵子的启动子。这样的启动子可以被其特异性碳水化合物诱导并被葡萄糖抑制。

[0059] 更具体地,诱导型表达系统可以包含参与生产LAB蛋白质,特别是细菌素的诱导型启动子。这种启动子的活性可以由基于细菌素调节子的同源调控系统来控制,例如双组分调控(信号转导)系统,该系统响应于外部添加的活化肽(即肽形式的诱导剂/调控分子)和编码组氨酸蛋白激酶和响应调节因子的基因,这些基因是由活化肽诱导后激活该启动子所需要的。

[0060] 在一个实施方案中,表达系统可以基于乳链菌肽控制的表达(NICE)系统,基于nisA启动子和nisRK调控基因的组合。该系统基于来自乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)乳链菌肽基因簇的启动子和调控基因,并且已经用于开发用于乳酸球菌(*lactococci*)、乳酸杆菌和其它革兰氏阳性菌的调控基因表达系统(在参考文献15和参考文献21中简要叙述)。虽然NICE系统在乳酸球菌中效率高且受到很好的调控,但这些系统可以表现出显著的基础活性。这可以通过将组氨酸激酶和响应调控基因整合到染色体中,将表达系统限制到特定设计的宿主菌株进行规避。

[0061] 在另一个实施方案中,表达系统可以基于参与由sakacin A调节子产生II类细菌素sakacin A(sap基因)或由sakacin P调节子产生sakacin P(spp基因)的基因和启动子。这样的载体被称为pSIP载体,含有来源于sakacin A或sakacin P结构基因的启动子元件,并具有用于翻译融合克隆的工程化NcoI位点。含有来自调节子和/或不同复制子的不同启动子的各种这样的载体在参考文献21和参考文献15中有描述,任何这些载体可以用作本发明的重组质粒的基础。

[0062] 在代表性的实施方案中,启动子可以是来自sakacin A或P调节子的P_{sapA}、P_{sppA}或P_{orfX}启动子,以及其相关或同源的调控基因。

[0063] 在特别优选的实施方案中,基于图12所示的并描述于参考文献21中的载体pSIP411,质粒含有pSH71复制子、来自sakacin P调节子的P_{orfX}启动子和同源调控基因。本申请中质粒pSIP411被命名为pLAB112。在这样的实施方案中使用的诱导剂优选为基于肽SppIP的活化肽,例如具有SEQ ID NO:19的序列的活化肽或与其具有至少80% (或更特别是至少85、90或95) 序列同一性的氨基酸序列。在优选的实施方案中,所述重组质粒来源于具有SEQ ID NO:20所示核苷酸序列的命名为pLAB112的质粒。

[0064] 使用诱导型启动子(或诱导型表达系统)可以提供更受控制的、特别是在伤口环境中延长蛋白质表达的优点,即当将细菌施用于受试者或伤口时。为了在促进伤口愈合方面有更好的效果,有利的是利用细菌使蛋白质在伤口部位(例如伤口表面)表达一段时间,例如至少40、45、50、55或60分钟,特别是至少1小时或更长时间。因此,蛋白质可以在有限的,

定义的或延长的时间段内表达。下面实施例中呈现的结果表明,利用根据本发明的质粒和细菌,可以使蛋白质在伤口表面表达约1小时的时间段。在一些实施方案中,质粒和细菌可以被优化以允许蛋白质(例如在伤口中)表达2、3或4小时或更长时间。

[0065] 因此,蛋白质的连续表达和递送是期望的,并且这可以通过利用本发明的经过转化细菌来提供。“连续”或“延长”是指在一段时间内(例如在至少一个小时的时间段(或类似地,如上所述))存在蛋白质表达、和由此的蛋白质递送。特别地,这允许蛋白质在与直接施用蛋白质(即作为蛋白质产品而不是由细菌表达)相比在一段时间内更加有效。

[0066] 如上所述,编码蛋白质的核苷酸序列可以被密码子优化以用于在LAB中表达。因此,在优选实施方案中,重组质粒中编码蛋白质的核苷酸序列(或插入片段)可以选自SEQ ID NO:1、4、7、10、13和16所示的分别编码鼠CXCL12、人CXCL12、鼠CXCL17、人CXCL17、鼠Ym1和人Ym1或与其具有至少80%序列同一性的核苷酸序列的密码子优化的核苷酸序列。

[0067] 因此,在代表性实施方案中,重组质粒可以选自由以下质粒组成的组:命名为mLrCK1的质粒,其包含如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列;mLrCK1.4,其包含SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列;mLrCK1.7,其包含SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列;hLrCK1,其包含SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列;mLrCK2,其包含SEQ ID NO:7所示的核苷酸序列;hLrCK2,其包含SEQ ID NO:10所示的核苷酸序列;hLrMP1,其包含SEQ ID NO:13所示的核苷酸序列;以及mLrMP2,其包含如SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列。

[0068] 在一些实施方案中,本发明的质粒包含与以下密经码子优化的插入片段mLrCK1(即与SEQ ID NO:1的核苷酸序列)、mLrCK1.4(即与SEQ ID NO:1的核苷酸序列)、mLrCK1.7(即与SEQ ID NO:1的核苷酸序列)、hLrCK1(即与SEQ ID NO:4的核苷酸序列)、mLrCK2(即与SEQ ID NO:7的核苷酸序列)、hLrCK2(即与SEQ ID NO:10的核苷酸序列)、hLrMP1(即与SEQ ID NO:13的核苷酸序列)、和mLrMP2(即与SEQ ID NO:16的核苷酸序列)的核苷酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0069] 核苷酸分子的序列同一性可以通过本领域已知和广泛可获得的方法和软件来确定,例如通过利用用GCG包的FASTA搜索,其具有默认值和可变pam因子(pamfactor),和在12.0处设置的缺口建立罚分和在4.0处设置的缺口延伸罚分(具有6个核苷酸的窗口)。

[0070] 这样的序列同一性的相关核苷酸序列可以在功能上等同于SEQ ID NO:1、4、10、13或16所示的核苷酸序列。如果这些核苷酸序列编码会被认为与相应的CXCL12、CXCL17或Ym1蛋白质的功能等同物的多肽,则这些核苷酸序列可以被认为在功能上等同。优选的功能等同物是编码如上所述的优选蛋白质的那些。

[0071] 另一方面,本发明提供用上述重组质粒转化的细菌菌株。所述细菌菌株优选乳酸细菌菌株如乳杆菌属菌株或乳球菌属(例如乳酸乳球菌)菌株。更优选地,细菌菌株是罗伊氏乳杆菌,例如罗伊氏乳杆菌R2LC或者罗伊氏乳杆菌DSM20016。通过对六名受试者的前臂皮肤生物群进行系统发育分析而确定在人皮肤上没有发现所述菌株(罗伊氏乳杆菌R2LC/DSM20016和乳酸乳球菌)(参考文献13)。

[0072] 除了质粒、表达系统、细菌和试剂盒之外,本发明的另外的产品还包括含有细菌的药物组合物和医疗装置。这样的组合物和装置可以特别包括伤口敷料、包装材料、拭子,植入物等,或甚至可以引入或存在于伤口部位(例如在手术伤口部位)处的任何全部或部分内

在的医疗装置,例如线或导管或植入物。还包括益生菌产品,即含有细菌用于施用给受试者的产品,例如,用于口服施用,例如用于食用或摄取,或局部施用于伤口或直接施用于伤口部位,例如,在手术期间,或经直肠途径、经阴道途径等。

[0073] 因此,根据本发明的产品(例如质粒、细菌菌株、益生菌和伤口敷料等)可用于医学治疗,特别是用于促进人或动物受试者的伤口愈合。如本文所用,术语“促进伤口愈合”是指提高、改善、增加或诱导伤口的闭合、愈合或修复。在本发明的优选方面,人或动物受试者由于潜在医学状况导致伤口愈合受损而需要伤口愈合,例如减少的外周血液灌注(周围动脉疾病)、高血糖或神经病变,或者受试者可能由于任何原因的免疫功能低下,例如由于潜在疾病(无论是获得性还是遗传性)或作为治疗的效果。特别地,受试者可能患有糖尿病。

[0074] 要治愈的伤口可以包括对受试者机体的任何部分的任何伤害、创伤或损伤。可以通过该方法治疗的伤口的实例包括急性病症或伤口;例如热灼伤(热或冷)、化学灼伤、辐射灼伤、电灼伤、过度暴露于紫外线辐射引起的灼伤(如晒伤);对身体组织的损害,例如由于劳动和分娩而产生的会阴;在医疗过程中受的伤,例如外阴切开术、创伤性损伤,包括切口、手术切口、擦伤;意外伤害;手术后损伤以及慢性病情;例如压疮、褥疮、溃疡、与糖尿病和循环不良相关的病症,以及所有类型的痤疮。此外,伤口可以包括皮炎、牙科手术后的伤口;牙周疾病;创伤后的伤口;和肿瘤相关的伤口。其它实例是例如胃炎或炎症性肠病期间发生的胃肠道创伤。

[0075] 因此,术语“伤口”在本文中广泛地用于包括任何违反组织的完整性或对组织的任何伤害或损伤。因此,该术语包括组织的任何伤害、创伤或损伤或任何损伤,无论如何(例如由于意外损伤或创伤、手术或其它预期或有目的的损伤或疾病)引起的。创伤可能包括任何物理或机械损伤或由包括病原体或生物或化学试剂的外部试剂引起的任何伤害。组织伤害也可能由缺氧、缺血或再灌注引起。伤口可以包括任何类型的烧伤。伤口可以是急性或慢性的。慢性伤口可以描述为在愈合阶段停滞不前的任何伤口,例如在炎症期,或在30、40、50或60天或更长时间内未愈合的任何伤口。伤口可以存在于机体的内表面或外表面或组织中。

[0076] 在特定实施例中,伤口在机体的外表面上或组织上,例如皮肤(skin)(即皮肤,cutaneous)伤口或粘膜伤口,特别是机体的外部粘膜组织或表面(例如在眼睛、耳朵或鼻子上等)上的伤口。在另一个实施方案中,它是胃肠道伤口。在不同的实施方案中,它不是胃肠道伤口(即它是不同于胃肠道伤口的伤口)。

[0077] 细菌可以以任何方便或期望的方式施用,例如以经口的方式或以局部的方式,或者通过直接给施用至伤口部位,例如通过直接注射或输注或应用或引入含有细菌的药物组合物或敷料或装置。在其它实施方案中,其可以施用于口腔、或以鼻内方式或通过吸入、以直肠或阴道的方式施用。因此,可以将细菌施用于、或经由身体的任何孔。为了施用至胃肠道伤口,可以以经口的方式施用细菌。

[0078] 根据规程并采用本领域公知的手段和途径,细菌可以以任何方便或期望的方式配制或制备并通过任何上述途径施用。因此,除了药物组合物、医疗装置和敷料等之外,本发明的益生菌产品可以以营养补充剂或食品或在营养补充剂或食品中配制和提供,例如功能性食品。

[0079] 口服施用给药形式包括粉剂、片剂、胶囊剂和溶液剂等。对于局部施用,产物可以配制成液体例如悬浮液或喷雾剂或气雾剂(粉末或液体)、凝胶、霜剂、洗剂、糊剂、软膏或药

膏等,或作为任何形式的敷料,例如绷带、石膏、衬垫、条、拭子、海绵、垫等、带有或不带有固体支撑物或基底。此外,细菌可以设置(例如涂覆)在诸如植入物(例如假体植入物)、管、线或导管等的医疗装置的表面上。

[0080] 细菌可以以任何方便或期望的形式提供,例如,作为活性或生长中培养物或以冻干的或冷冻干燥的形式。

[0081] 根据本发明的细菌菌株可以配制成用于局部或口服施用以治疗皮肤或粘膜的表面伤口。因此,本发明进一步提供了包含根据本发明的细菌菌株的益生菌产品。所述益生菌产品是例如药物组合物,优选用于口服施用。可选地,对于局部应用,益生菌产品是例如洗剂或洗剂浸泡的伤口敷料,其包含根据本发明的细菌菌株。

[0082] 本发明的产品(即药物组合物或装置或敷料等)也可含有诱导剂(其中使用诱导型启动子)。这可以作为产品的一部分提供(例如掺入或包括在敷料中)或单独提供,例如作为试剂盒或组合产品的一部分,如上所定义。

[0083] 当共同配制在产品(例如敷料或装置)中时,可以以细菌与诱导物分开并在使用时放在一起(或使二者接触)的形式提供细菌和诱导剂。例如,细菌和诱导剂可以在分开的隔室中,并在使用时放在一起(例如接触或混合),或者可以由屏障(例如膜或其它分隔物)分隔开,在使用时可以破坏或瓦解或打开该屏障。

[0084] 可选地,可以将诱导剂单独配制和提供(例如,在还含有细菌的试剂盒,或含有细菌的产品中),并且可以在使用期间将诱导剂和细菌(或含有细菌的产品)放在一起(例如接触)。这可以在施用给受试者之前、期间或之后进行。例如,可以首先施用包含细菌的产品,然后可以将诱导剂加入或应用于细菌。在另一个实施方案中,可以在施用前(例如,就在之前或紧接前)或在施用期间对细菌和诱导剂进行预混合。

[0085] 当以冻干或冷冻干燥的形式提供细菌时,可能期望在施用之前(例如在使用之前或使用期间)将细菌重构或重新悬浮。这可以取决于伤口和所使用的产品的格式。例如,在存在一些伤口的情况下,可能出现足够的液体以允许细菌被重构/重新悬浮并变得活跃。然而,在其它实施方案中,可能需要提供用于将细菌重构(或可替换地表达为,用于悬浮或重新悬浮)的液体。这可以在单独的器皿(vessel)或容器(container)(例如作为试剂盒或组合产品的一部分)中或在容器或器皿或装置的单独隔室中提供。液体可以包含或含有诱导剂,或者当存在诱导剂时,可以在单独的器皿或容器或隔室中提供诱导剂。液体可以是任何用于重构或悬浮冷冻干燥的细菌的合适的液体,例如,水或水溶液,或缓冲液或生长基或培养基。

[0086] 因此,作为示例,两隔室系统(例如在敷料或装置或容器或器皿(例如瓶)中)可以在包括一个隔室中的冷冻干燥的细菌和在另一个隔室中的液体。液体可以任选地含有诱导剂。在使用中或使用前,可以混合两个隔室或使两个隔室接触,并施用于伤口。在更具体的实施方案中,可以以液体形式将细菌施用于伤口,然后可以施加单独的敷料。因此,在一个简单的实施方案中可以看出,试剂盒可以简单地包含含有冷冻干燥的细菌的第一器皿或容器和含有用于重构细菌的液体的第二器皿或容器。任选地,试剂盒还可以含有诱导剂,其也包含在第二器皿中或单独的第三器皿或容器中。

[0087] 因此,例如,所述益生菌产品优选包含能够激活需要在乳酸细菌株中表达的蛋白质的表达的活化肽。所述活化肽优选为肽SppIP(即包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的肽或

与其具有至少80%序列同一性的序列)。

[0088] 对于皮肤伤口,所述伤口敷料可以包含在一个隔室中的冷冻干燥的细菌和另一隔室中的活化肽。当施加于伤口时,将两个隔室放在一起,以使细菌与活化肽接触。可选地,细菌可以包含在防水石膏的粘合剂侧上的凝胶状结构中或与渗出物接触的敷料的一侧。在使用时,将活化肽手工施加于细菌,并将膏药或敷料施加于伤口部位。

[0089] 活菌也可以包含在水胶体中,例如天然明胶。通过交联可以将细菌掺入水胶体例如明胶膜中,对其进行塑化和干燥,并在储存期间使细菌保持活性直到水合作用。活菌也可以包封在交联的电纺丝水凝胶纤维中。在这种形式下,不需要对细菌进行冷冻干燥。

[0090] 对于胃肠道中的伤口,设计包含至少两个单独的隔室的片剂,其中一个隔室包含冷冻干燥的细菌,而另一个隔室包含液体和活化肽。在摄取前挤压片剂,以使分隔两个隔室的内膜被破坏并将内容物混合在一起。对于口腔中(例如在牙龈上)的伤口,可以以高粘性糊剂施用根据本发明的细菌。

[0091] 具体地,用于局部施用于皮肤的制剂可以包括以药学上可接受的载体施用的膏剂、霜剂、凝胶剂和糊剂。可以采用如本领域技术人员所熟知的油性或水溶性软膏基质来制备局部制剂。例如,这些制剂可以包括植物油、动物脂肪、更优选从石油获得的半固体烃类。采用的特定成分可以包括白色软膏、黄色软膏、乙酰酯蜡、油酸、橄榄油、石蜡、凡士林、白凡士林、鲸蜡、淀粉甘油酯、白蜡、黄蜡、羊毛脂、无水羊毛脂和单硬脂酸甘油酯。还可以使用各种水溶性软膏基质,包括例如二醇醚和衍生物、聚乙二醇、聚氧乙烯40硬脂酸酯和聚山梨醇酯。

[0092] 细菌菌株可以在提供基质、固体支持物和/或伤口敷料中和/或上,以将活性物质递送到伤口。固体支持体或基质可以是医疗装置或其一部分。如本文所用,术语“基质”或“固体支持物”和“伤口敷料”广泛地指任何在针对伤口制备、并施加至伤口时以用于保护、吸收、引流伤口等的基质。

[0093] 在一个实施方案中,本发明提供了附着于或包含转化的细菌菌株的伤口愈合材料或敷料,即敷料是用于施用本发明的转化的细菌的载体。可选地,载体可以是石膏或绷带。本发明可以包括市售可得的多种类型的基质和/或衬垫物中的任何一种,伤口愈合材料的选择将取决于待治疗的伤口的性质。下面简要描述最常用的伤口敷料。

[0094] 透明膜敷料由例如聚氨酯、聚酰胺或明胶制成。这些合成膜对水蒸气氧气和其它气体是可透过的,但对水和细菌是不可透过的,具有低吸水性,适用于低渗出物的伤口),凝胶(与聚氨酯泡沫结合的亲水胶体颗粒),水胶体(含有大约至少60%的水的交联聚合物,具有较高的吸收能力并且从伤口床中除去有毒成分并保持伤口部位的湿度水平和温度),泡沫(亲水或疏水性,例如通过改性聚氨酯泡沫制成的聚合物泡沫敷料,具有良好的吸收性且对水蒸气是可透过的),海藻酸钙(来自藻胶基团的海藻酸钙的非织造纤维复合物,藻酸盐具有非常高的吸收能力。它们还促进自溶清创,因为藻酸盐和渗出物之间的离子交换将不溶性的藻酸钙转变成可溶性海藻酸钠,为伤口床提供理想用于伤口愈合的湿润的、完整的表面)和玻璃纸(纤维素与增塑剂)。根据为伤口提供的测量结果可以确定伤口的形状和尺寸并根据确切部位定制伤口敷料。由于伤口部位在机械强度、厚度、敏感性等方面可能不同,所以可以将基质模制成具体地解决该部位的机械需求和/或其它需求。例如,对于高度受神经支配的位置,例如指尖,可以最小化衬底的厚度。其它伤口部位,例如手指、脚踝、膝

盖、肘部等可能暴露于更高的机械应力并且需要多层基底。

[0095] 在另一方面,本发明提供了用于愈合人或动物受试者中伤口的方法,包括向需要其的人或动物受试者施用根据本发明的细菌菌株。所述细菌菌株优选包含在如上所述的药物组合物或伤口敷料中。在这样的方法中,人或动物受试者由于潜在的医疗状况优选需要伤口愈合,该潜在的医疗状况导致受损伤伤口愈合,例如减少的外周血液灌注(周围动脉疾病)、高血糖或神经病变。

[0096] 以下实施例中获得并包含的结果证明了本发明的优点。特别地,与例如直接的蛋白质制剂(即仅蛋白质,无细菌)或只是单独的细菌(未被修饰以表达蛋白质的细菌,例如不含重组质粒)相比,通过利用本发明的表达蛋白质的转化细菌可以获得改善的伤口愈合(例如,在更好或更快的伤口闭合方面)。此外,与施用从转化的细菌培养物获得的上清液相比,可以看到当给伤口施用细菌时的改善的效果。因此,通过表达蛋白质的乳酸细菌宿主将蛋白质递送到伤口是有利的。相信可能会有协同效应。换句话说,细菌在伤口愈合的作用和蛋白质在伤口愈合的作用之间可能存在协同作用。因此,在一些实施方案中,相对于相应的未转化细菌(即不含质粒)的作用和蛋白质当作为蛋白质提供时的作用(即不是从原位细菌表达),可能比转化细菌对伤口愈合具有更大的累积效应。

[0097] 在这方面相信细菌降低pH的作用,例如,在伤口部位可能有助于提高或增强或促进蛋白质的活性。虽然不希望受理论束缚,但还认为根据本发明的转化细菌的施用可以在提升创伤部位的巨噬细胞活性方面具有有益的作用。例如,可以增加巨噬细胞的数量。

[0098] 转化细菌对伤口愈合的影响可能是或可能不是立即的,并且可能需要一些时间才能看到(在可以观察到改善伤口愈合之前,例如,1、2、3、4、5或6个或更多小时可以看到或更长,例如8、10、12、15、18、20或24小时或更长,或1、2、3、4、5或6天或更多天可以看到,例如8、10、12、15、18、20或24天或更多天)。对于老年人的慢性伤口,可能需要更长时间才能看到治疗组与对照组之间的差异,例如可能需要约12周。

[0099] 本发明的特别和重要的用途在于治疗慢性伤口,特别是溃疡,特别是治疗糖尿病足溃疡。

[0100] 糖尿病患者慢性足溃疡患病率约为18%。2013年,欧洲人口达74250万人,转化成糖尿病患病人数达3270万人,其中290-580万人有慢性足溃疡。这种类型的溃疡的平均持续时间在几个月的范围内,当给予标准护理时,少于25%的伤口在12周内愈合。这种情况的最终阶段是患肢的截肢。目前患有慢性足溃疡的人的治疗分为初级保健、家庭护理、养老院、亲属、自我管理和到医院伤口诊所的访问。目前的治疗依赖于采用手术清创术卸载、去除死亡组织、反复更换伤口敷料、全身性抗生素,并且在特殊情况下,用活的幼虫或胶原酶治疗以及在瑞典的几个地方提供高压氧治疗。如果潜在病因还包括较大动脉阻塞,可以通过旁路静脉移植来以手术方式矫正。如今,伤口每两到三天进行治疗。用建议的经过修饰的乳酸细菌以任何建议的形式或制剂进行治疗不会破坏该常规途径。因此,通过本发明的治疗来改善这些伤口的愈合因此将具有相当大的经济利益以及对患者的个人利益。

[0101] 细菌是活性的,并且在体内产生编码的蛋白质并将其递送到伤口表面一段时间(例如约1小时)。它们可能会变得不活跃而死亡。缓慢的或死亡的乳酸细菌能够在伤口/敷料环境中没有风险,直到敷料正常更换为止。

[0102] 与蛋白质药物化合物相比,根据本发明的生物治疗剂将具有显著更低的生产成

本。这是因为生物治疗剂直接在伤口中产生活性蛋白本身。

[0103] 开放性伤口如糖尿病足溃疡以及足部功能丧失,引起相当的不适,甚至致使患者的残疾,并可能对生活质量产生显著的负面影响,包括重大风险或感染以及因此长期使用抗生素,最终截肢。因此,改善的伤口愈合对患者将具有巨大的个人利益,并且还具有减少抗生素使用(以及因此抗生素耐药性的扩散)的益处。相信根据本发明治疗这样的慢性伤口可以增加伤口中的内源性报警信号,并且在停滞不前的或慢性的伤口中开始愈合过程,并加速愈合时间。

[0104] 此外,本发明可以具有医疗人员使用的灵活性和易用性的优点。

附图说明

[0105] 将参考以下非限制性实施例和附图进一步描述根据本发明的代表性方法和优选实施方案,其中:

[0106] 图1、mLrCK1乳酸乳球菌随着时间推移的生长(A)和pH(B),mLrCK1乳酸乳球菌来自过夜培养物的再次接种且起始OD 0.285和0.51时加入10或50ng/ml启动子活化肽SppIP。

[0107] 图2、罗伊氏乳杆菌R2LC中通过随着时间进行生物成像体外测量的pLAB112_Luc的表达,罗伊氏乳杆菌R2LC来自起始OD 0.5的过夜培养物的再次接种。获取时间0的基线图像。之后立即加入启动子活化肽SppIP(50ng/ml)和底物D-萤光素(150μg/ml)。在5分钟时对板进行成像,然后每30分钟进行成像持续1400分钟。所有样品中采用的介质均为MRS。肽是启动子活化肽SppIP。每组由八个样品组成。

[0108] 图3、罗伊氏乳杆菌R2LC中的pLAB112_Luc的表达,从过夜培养物重新接种至起始OD 0.5并施用于1天龄的皮肤全层伤口。通过随时间进行非侵入性生物成像测量体内表达。在具有1天龄皮肤全层伤口的5只麻醉小鼠上获得时间0的基线图像。然后将25μl用启动子活化肽SppIP(5 0ng/ml)激活的罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_Luc和底物D-荧光素(150μg/ml)加入到伤口中间,在5分钟的时候对小鼠进行成像,然后每15分钟进行成像持续270分钟。

[0109] 图4、健康小鼠的伤口愈合时间。至伤口表面50% (A)、75% (B) 或全部 (100%) (C) 愈合的时间,所有组n=5。A、B、C,单因素方差分析,Bonferroni比较所有列。

[0110] 图5、健康小鼠随时间推移的伤口尺寸(A)和伤口暴露(B)。每天从包含比例尺的图像中测量伤口尺寸,所有组n=5。A,双因素方差分析,Bonferroni比较所有列,d0-d5分析。由于时间和处理而改变。R2LC_pLAB112_LrCK1.4在d1和d2与对照组相比使伤口的尺寸变小。B,单因素方差分析,Bonferroni比较所有列,分析所有天。对于整个愈合过程,R2LC_pLAB112_LrCK1.4使伤口暴露减少。

[0111] 图6、伤口诱导前股动脉结扎的缺血诱导,所有组中n=4。采用激光散斑对比分析,随着时间的推移,在麻醉小鼠的缺血肢体(A)和对侧相应的未受影响的肢体(B)中测量皮肤血流量。数据按灌注单位(PFU)表示。A和B,双因素方差分析,Bonferroni比较所有列,分析d0-d7。没有观察到因为时间或处理的变化。

[0112] 图7、伤口诱导时缺血小鼠的伤口愈合时间。至伤口表面50% (A)、75% (B) 或全部 (100%) (C) 愈合的时间,所有组n=4。A、B、C,单因素方差分析,Bonferroni比较所有列。

[0113] 图8、局部缺血的小鼠在伤口诱导时间和部位的随时间推移的伤口尺寸和伤口暴

露。每天从包含比例尺的图像中测量伤口尺寸,所有组n=4。A,双因素方差分析,Bonferroni比较所有列,分析d0-d7。由于时间和处理而改变。通过R2LC_pLAB112_LrCK1.4在d1和d2与对照组相比伤口的尺寸变小。B,单因素方差分析,Bonferroni比较所有列,分析所有天。对于整个愈合过程,R2LC_pLAB112_LrCK1.4使伤口暴露减少。

[0114] 图9、在采用单次注射一水合四氧嘧啶诱发糖尿病之后的体重(A)和血糖(B)。糖尿病对照组,n=4,糖尿病R2LC_pLAB112_Luc,n=5,糖尿病R2LC_pLAB_LrCK1.4,n=4。A和B,双因素方差分析,Bonferroni比较所有列,分析d0-d6。没有观察到因为时间或处理的变化。

[0115] 图10、伤口诱导的糖尿病小鼠的伤口愈合时间。至伤口表面50%(A)、75%(B)或全部(100%)(C)愈合的时间,糖尿病对照组,n=4,糖尿病R2LC_pLAB112_Luc,n=5,糖尿病R2LC_pLAB_LrCK1.4,n=4。A,B,C,单因素方差分析,Bonferroni比较所有列。

[0116] 图11、伤口诱导的糖尿病小鼠随时间推移的伤口尺寸和伤口暴露。每天从含有比例尺的图像中测量伤口尺寸,糖尿病对照组,n=4,糖尿病R2LC_pLAB112_Luc,n=5,糖尿病R2LC_pLAB_LrCK1.4,n=4。A,双因素方差分析,Bonferroni比较所有列,分析d0-d6。由于时间而改变。B,单因素方差分析,Bonferroni比较所有列,分析所有天。没有差异(p=0.08)。

[0117] 图12、pSIP411质粒。

[0118] 图13、通过非侵入性生物成像(IVIS Spectrum)在11天(n=10)内通过检测发光信号,定量在伤口边缘的真皮中的质粒表达(40 μ g DNA)。

[0119] 图14、健康小鼠的伤口愈合时间。至伤口表面50%(A)、75%(B)或全部(100%)(C)愈合的时间,(n=8pCTR,n=9pCXCL12)。A,B,C,学生非配对双尾t检验。

[0120] 图15、健康小鼠随时间推移的伤口尺寸(A)和伤口暴露(B)。每天从包含比例尺的图像中测量伤口尺寸(n=8pCTR,n=9pCXCL12)。(A)双因素方差分析,Bonferroni比较所有列,分析d0-d7。由于时间而改变。(B)学生双尾非配对t检验。整个愈合过程pCXCL12使伤口暴露的趋势(p=0.08)减少。

[0121] 表16、以光密度(OD)和菌落形成单位/ml(CFU/ml)表示的罗伊氏乳杆菌R2LC的细菌浓度的测量。

[0122] 图17、用不同浓度的罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_LrCK1.4处理的健康小鼠随时间推移的伤口尺寸(A)和伤口暴露(B)。每天从包含标度的图像中测量伤口尺寸。A,双因素方差分析,Bonferroni比较所有列,分析d0-d2。由于时间和处理而改变。(A)双因素方差分析Bonferroni比较所有列,(B)单因素方差分析,Bonferroni比较所有列(p<0.05)。与没有接受处理的伤口相比,用罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_LrCK1.4处理,在OD 0.2、0.5、1.0和1.25处,使伤口暴露减少。(对照,n=15;OD 0.2,n=4;0.5,n=10,OD 1.0,n=4;OD1.25,n=5)。

[0123] 图18、在以不同浓度的鼠CXCL12 1 α 处理的健康小鼠中,每天在一个时间点随时间推移(持续两天)的伤口尺寸(A)和伤口暴露(B)。每天从包含比例尺的图像中测量伤口尺寸。A,双因素方差分析,Bonferroni比较所有列,分析d0-d2。由于时间而改变。B,伤口暴露的最初两天。(对照组,n=15;0.2 μ g CXCL12 1 α ,n=4;0.6 μ g CXCL12 1 α ,n=5,1.0 μ g CXCL12 1 α ,n=4)。

[0124] 图19、每天每10分钟一次持续1小时用0.2 μ g重组蛋白处理的健康小鼠随时间推移的伤口尺寸(A)和伤口暴露(B)。每天从包含比例尺的图像中测量伤口尺寸。A,双因素方差

分析,Bonferroni比较所有列,分析d0-d2。由于时间而改变。B,伤口暴露的最初两天。(无处理,n=15;CXCL12_1α,n=6;CXCL17,n=9,Ym1,n=9)。

[0125] 图20、在人皮肤表皮穿刺活检伤口中测量的再上皮化。图A显示了在未使用或使用LB_Luc或LB_LrCK1处理的带有具有表皮伤口的圆形皮肤培养24小时后在培养基中测量的pH。图B显示了在培养14天后,从伤口边缘新长出的表皮套在暴露的真皮上的长度.*表示差异,单因素方差分析,Bonferroni比较所选列(p<0.05)。

[0126] 图21、通过随时间推移进行的生物成像在体外测量的从冷冻干燥状态复苏后立即在罗伊氏乳杆菌R2LC中体外表达pLAB112_Luc。获取时间0的基线图像。然后立即加入启动子活化肽SppIP(50ng/ml)和底物D-荧光素(150μg/ml)。在5分钟时对板成像,然后每5-15分钟进行成像持续930分钟。所有样品中使用的介质均为MRS。肽是启动子活化肽SppIP。每组由四个样品组成。

[0127] 图22、通过随时间推移进行的生物成像在体内测量的从冷冻干燥状态复苏并应用于1天龄皮肤全层伤口上后立即在罗伊氏乳杆菌R2LC中体内表达pLAB112_Luc。在带有两个分开的1天龄皮肤全层伤口的3只麻醉小鼠上获得时间0的基线图像。然后将25μl用启动子活化肽SppIP(50ng/ml)激活的罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_Luc和底物D-荧光素(150μg/ml)加入到伤口中间,并在5分钟的时候对小鼠进行成像,然后每15分钟进行成像持续270分钟。

[0128] 图23、用冷冻干燥、复苏和诱导的罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_LrCK1.4处理的健康小鼠随时间推移的伤口尺寸(A)和伤口暴露(B)。每天从包含比例尺的图像中测量伤口尺寸。(A)双因素方差分析,Bonferroni比较所有列,分析d0-d2。由于时间和处理而改变。(B)单因素方差分析,Bonferroni比较所有列(p<0.05)。用罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_LrCK1.4处理后,与当细菌被冷冻干燥并直接复苏,诱导并施用于伤口时的罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_Luc相比,观察到伤口尺寸减小,(R2LC_pLAB112_Luc,n=4,R2LC_pLAB112_LrCK1.4,n=5)。

[0129] 图24、健康小鼠随时间推移的伤口尺寸(A)和伤口暴露(B)。每天从包含比例尺的图像中测量伤口尺寸。这种变化是随着时间而变化,并且与pH 7.35(p=0.07)的悬浮液相比,CXCL121α在pH 6.35中存在减小的伤口尺寸的趋势(pH 7.35;n=8,pH 6.35;n=5,pH 5.35;n=4)。单因素方差分析,Bonferroni比较所有列。

[0130] 图25、健康小鼠随时间推移的伤口尺寸(A)和伤口暴露(B)。每天从包含比例尺的图像中测量伤口尺寸。观察到的变化仅仅是由于时间的变化,在两种不同细菌悬浮液(R2LC_pLAB112_Luc;n=4,R2LC_pLAB112_LrCK1;n=5)之间没有差异。学生双尾非配对t检验。

[0131] 图26、伤口诱导后两天紧邻伤口的皮肤中的在真皮(A)、表皮(B)和毛囊(C)切片中的CXCL121α水平的测量,其中伤口用罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_LrCK1以OD 0.5、1.0和OD 1.25处理。单因素方差分析,Bonferroni比较所有列。

[0132] 图27、在对照伤口和使用罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_LrCK1以OD 0.5、1.0和OD 1.25处理后的伤口,伤口诱导后2天在紧邻伤口处的皮肤真皮(A)和表皮(B)中的F4/80⁺巨噬细胞密度的测量(对照,n=15;0.5,n=10,OD 1.0,n=4,OD 1.25,n=5)。单因素方差分析,Bonferroni比较所有列。

[0133] 图28、健康小鼠的伤口愈合时间。用以pLAB112转化的乳酸乳球菌(L.L_pLAB112_LrCK1)或对照乳酸乳球菌处理伤口。至伤口表面50% (A)、75% (B) 或全部(100%) (C) 愈合的时间,两组n=5。学生双尾非配对t检验。

[0134] 图29、健康小鼠随时间推移的伤口尺寸(A) 和伤口暴露(B)。每天从包含比例尺的图像中测量伤口尺寸,两组均为n=5。由于时间和处理而变化,并且与对照乳酸乳球菌相比,L.L_pLAB112_LrCK1在d1至d4时使伤口尺寸减小。学生双尾非配对t检验。

[0135] 图30、用重组趋化因子处理1小时的健康小鼠中伤口愈合的时间。至伤口表面50% (A)、75% (B) 或全部(100%) (C) 愈合的时间,(对照;n=11,mCXCL121 α ;n=6,mCXCL17;n=8,mYm1;n=9)。单因素方差分析,Bonferroni比较所有列。

[0136] 图31、用重组趋化因子处理1小时的健康小鼠随时间推移的伤口大小(A) 和伤口暴露(B)。每天从包含比例尺的图像测量伤口尺寸(对照;n=11,mCXCL12_1 α ;n=6,mCXCL17;n=8,mYm1;n=9)。由于时间和处理而变化。与对照相比,CXCL12_1 α 、CXCL17和Ym1使伤口尺寸减小。单因素方差分析,Bonferroni比较所有列。

[0137] 图32、不经过或经过不同处理的健康小鼠的最初24小时期间的伤口闭合。(无处理,n=15;0.2 μ g CXCL12_1 α ,n=4;0.6 μ g CXCL12_1 α ,n=5;1.0 μ g CXCL12_1 α ,n=4;0.2 μ g CXCL12_1 α 1小时,n=6;0.2 μ g CXCL17_1小时,n=9,0.2 μ g Ym1_1小时,n=9;R2LC_pLAB112_Luc_0D_0.5,n=4;R2LC_pLAB112_LrCK1.40D_0.2,n=4;R2LC_pLAB112_LrCK1.40D_0.5,n=10,R2LC_pLAB112_LrCK1.40D_1.0,n=4;R2LC_pLAB112_LrCK1.40D_1.25;n=5,冷冻干燥的R2LC_pLAB112_Luc,n=4,冷冻干燥的R2LC_pLAB112_LrCK1.4,n=5,R2LC_pLAB112_Luc上清液;n=4,R2LC_pLAB112_LrCK1.4上清液,n=5,pCTR,n=8;pCXCL12,n=9)。对此数据集没有进行统计分析。

[0138] 图33、评估DSS诱导的每日疾病活动(A) 和第1-7天总疾病负担(B)。以罗伊氏乳杆菌pLAB112_Luc和pLAB112_LrCK1.4(DSS+载体;n=5,DSS+R2LC_pLAB112_Luc;n=6,DSS+R2LC_pLAB112_LrCK1.4;n=7)进行的处理使DSS诱导的结肠炎疾病活动与用载体处理的对照组具有相似的改善,单因素方差分析,Bonferroni比较所有列。

[0139] 图34、评估DSS诱导的每日疾病活动(A) 和第1-8天总疾病负担(B)。通过如前所述(参考文献16)测量相关的临床症状,评估疾病活动。箭头表示开始处理。与用pLAB112_Luc进行处理相比,通过用罗伊氏乳杆菌pLAB112_LrCK1.4的处理改善了DSS诱发的结肠炎疾病活动。(DSS+R2LC_pLAB112_Luc;n=6,DSS+R2LC_pLAB112_LrCK1.4;n=6),学生的双尾非配对t检验。

[0140] 图35、在时间0和无处理、用R2LC_Luc或R2LC_LrCK1处理24小时后,健康小鼠中诱导的皮肤全层伤口(5mm直径)的代表性图像。用在麻醉小鼠中拍摄包含比例尺的图像。

具体实施方式

[0141] 材料和方法

[0142] 基因构建体设计和生产

[0143] 质粒骨架pLAB112(等同于pSIP411;参考文献11和15;表I)由Lars Axelsson教授(挪威食品研究所)提供。乳酸乳球菌MG1363细菌用pLAB112转化并扩增24小时。然后纯化质粒,并在凝胶上验证DNA产物。

[0144] 表I:pSIP411/pLAB112的主要特征

[0145]

特征	位置 (SEQ ID NO:20)
复制决定簇(复制子区域)	260-2010
ermB(红霉素抗性标记物)	2342-2840
P _{spp} IP(诱导型启动子)	3139-3290
sppK(组氨酸蛋白激酶)	3305-4647
sppR(反应调控因子)	4653-5396
gusA(β-葡萄糖醛酸酶)	5853-7658
P _{orf} X(诱导型启动子)	5689-5835
转录终止子	129-155;5428-5460;5602-5624
多克隆位点	1-35;5851-5856;7662-7673

[0146] 由瑞典农业大学(SLU)的Stefan Roos使用DNA 2.0(Menlo Park, CA, USA)对鼠CXCL12-1α的序列进行优化以利于在罗伊氏乳杆菌中翻译。由质粒载体pJ204中的DNA 2.0在合成优化的序列(SEQ ID NO:1)。由瑞典农业大学(SLU)的Stefan Roos使用GenScript(Piscataway, NJ, USA)对人CXCL12-1α、鼠CXCL17、人CXCL17、鼠Ym1和人Ym1的序列进行优化以利于在罗伊氏乳杆菌中翻译。经过优化的序列显示为SEQ ID NO:4(人CXCL12-1α);SEQ ID NO:7(鼠CXCL17);SEQ ID NO:10(人CXCL17);SEQ ID NO:13(鼠Ym1);和SEQ ID NO:16(人Ym1)。

[0147] 设计引物用于检测pLAB112中的插入片段(hCXCL12opt),171bp:

[0148] 5' GCAGCCTAACAGTCGGCACCT3' (SEQ ID NO:22);

[0149] 5' ACGTGCAACAATCTGCAAAGCAC3' (SEQ ID NO:23)。

[0150] 插入片段的末端也被优化用于继续分子处理使得插入片段适合新的载体pLAB112。经过优化的mCXCL12opt序列在质粒PJ204中递送。用pJ204转化大肠杆菌PK401。用NEB2缓冲液中限制酶XhoI和NcoI切割质粒(pLAB112和pJ204)。然后将片段mCXCL12opt在凝胶上纯化。然后使用T4DNA连接酶将mCXCL12opt插入片段连接到pLAB112载体中,得到构建体mLrCK1。通过PCR验证pLAB112载体中的插入构建体。然后通过序列分析(Macrogen)验证构建体。最后,用mLrCK1转化罗伊氏乳杆菌菌株R2LC和DSM 20016,收集构建体阳性的两个R2LC克隆(4和7),并通过序列分析(Macrogen)再次验证来自这些菌落的质粒mLrCK1(现在为mLrCK1.4和mLrCK1.7)。

[0151] 以类似的方式按照相同的方案和程序生产质粒hLrCK1、mLrCK2、hLrCK2、mLrMP1和hLrMP2(见下表II)。

[0152] 表II:质粒概述

[0153]

质粒	描述
pLAB112	与pSIP411相同(参考文献15,SEQ ID NO:20)
mLrCK1	带有经过优化的mCXCL12-1α插入片段的pLAB112
mLrCK1.4	来自经过转化的罗伊氏乳杆菌R2LC克隆4的mLrCK1
mLrCK1.7	来自经过转化的罗伊氏乳杆菌R2LC克隆7的mLrCK1
hLrCK1	带有经过优化的hCXCL12-1α插入片段的pLAB112
mLrCK2	带有经过优化的mCXCL17插入片段的pLAB112

hLrCK2	带有经过优化的hCXCL17插入片段的pLAB112
hLrMP1	带有经过优化的人Ym1插入片段的pLAB112
mLrMP2	带有经过优化的小鼠Ym1插入片段的pLAB112
pLAB112_Luc	带有荧光素酶插入片段的pLAB112

[0154] 质粒表达的体外分析

[0155] 过夜培养罗伊氏乳杆菌R2LC pLAB112_Lcc，再次接种并培养至OD 0.5时在96孔板上铺板(200μl/孔)或立即从冷冻干燥制剂中直接重新悬浮。采用非侵入性生物成像(IVIS Spectrum, Perkin Elmer)测定发光强度。获取时间0的基线图像。然后立即加入活化肽SppIP(50ng/ml)和D-荧光素(150μg/ml)。在5分钟时对板进行成像，然后1400分钟内每30分钟进行成像。利用Living Image 3.1软件(Perkin Elmer)量化数据，并保留成像参数以进行比较分析。发光强度被认为与质粒表达成比例。

[0156] 动物

[0157] 实验由乌普萨拉地区实验动物伦理委员会批准。使用小鼠C57B1/6(Taconic)和C57B1/6背景的CX3CR1^{+/GFP}(最初来自Jackson实验室)。动物在实验过程中可以自由获取水分和食物。

[0158] 伤口诱导

[0159] 将小鼠麻醉(1-3%异氟醚,200ml/min)，通过剃毛然后将脱毛霜(Veet®)敷用1分钟(用水洗去)而去除后肢上的毛。使用无菌穿刺活检针(5mm直径)诱导全层(表皮、真皮和皮下)伤口。最初5天每日局部敷用外用止痛药(Embla霜)。

[0160] 局部伤口处理

[0161] 每天用25μl盐水、罗伊氏乳杆菌R2LC pLAB112_Luc或R2LC pLAB112_LrCK1处理伤口。过夜培养细菌，再次接种并培养至OD 0.5，在施用活化肽SppIP(50ng/ml)前预活化5分钟，并局部地添加到伤口表面的中间。对于剂量实验，每天用25μl盐水或来自过夜培养物再次接种并生长至OD 0.5、施用活化肽SppIP(50ng/ml)前预活化5分钟、并且并以OD 0.2、0.5、1.0或1.25的浓度局部地添加到伤口表面的中间的罗伊氏乳杆菌R2LC pLAB112_LrCK1处理伤口。对于各种蛋白质的比较实验，每天用10μl盐水或鼠CXCL12、CXCL17或Ym1(60μl盐水中总共200ng蛋白质，以10分钟间隔给予1小时)处理伤口。对于CXCL12的剂量递增研究，每天一次在同一个时间点，将10μl盐水中200ng、600ng或1μg CXCL12添加到伤口。

[0162] 质粒表达的体内分析

[0163] 将罗伊氏乳杆菌R2LC pLAB112_Luc过夜培养，再次接种并培养至OD 0.5。采用非侵入性生物成像(IVIS Spectrum, Perkin Elmer)测定发光强度。获取时间0的基线图像。然后在伤口中间加入25μl的罗伊氏乳杆菌R2LC pLAB112_Luc。在施用活化肽SppIP(50ng/ml)和D-荧光素(150μg/ml)前将细菌预活化5分钟。270分钟内每15分钟对小鼠进行成像。利用Living Image 3.1软件(Perkin Elmer)量化数据，并保留成像参数以进行比较分析。发光强度被认为与质粒表达成比例。

[0164] 伤口尺寸和外观监测

[0165] 通过获取常规照片，中每日监测麻醉小鼠(1-3%异氟烷,200ml/min)的伤口尺寸和外观。在采集图像中包括比例尺，并利用Image J(NIH的免费软件)分析伤口尺寸。当尺寸<0.5mm²时，伤口被认为是愈合的。

[0166] 皮肤血流监测

[0167] 采用非侵入性激光散斑对比分析测量麻醉(1-3%异氟烷,200ml/min)小鼠带有愈合中伤口的整个后肢中的血流量,并分析数据PIMSoft 3 (Perimed)。在两分钟内以10幅图像/秒对肢体(读框1.4×1.4cm)成像,平均为20次。数据按灌注单位(PFU)表示。

[0168] 减少灌注

[0169] 麻醉小鼠(1-3%异氟醚,200ml/min),并通过结扎和切除腹壁浅动脉分支上方的股动脉诱导后肢缺血。

[0170] 诱导高血糖症

[0171] 将单次剂量的即溶于无菌盐水中的一水合四氢嘧啶(8mg/ml,1μl/g体重)注入尾静脉。在整个实验中每天监测血糖和体重。高血糖定义为血糖>16.7mmol/l。

[0172] 统计分析

[0173] 数据以平均值±SEM表示。采用双因素方差分析与Bonferroni比较所有列的事后检验以分析愈合过程随时间的变化。采用单因素方差分析与Bonferroni比较所有列的事后检验以分析n>2的组的一个时间点的愈合过程,并且当n=2采用学生非配对双尾t检验来分析一个时间点的愈合过程。p<0.05被认为具有统计学意义。

[0174] 实施例1:用质粒LrCK1转化的细菌的生长

[0175] 过夜培养含有mLrCK1的乳酸乳球菌,再次接种并生长至OD 0.3或0.5时,当加入10或50ng/ml活化肽SppIP (SEQ ID NO:19)时,显示无生长障碍。在这些生长实验期间,测量pH,并且在生长阶段中降低最多,然后当生长为中间培养基(Mes-medium)时稳定在pH6.7左右(图1)。(皮肤pH=5.5,伤口pH=7.15-8.9,其中碱性pH与较低的愈合率相关(参考文献14))

[0176] 实施例2:质粒pLAB112_Luc的表达

[0177] 从过夜培养物再次接种并生长2小时的罗伊氏乳杆菌R2LC中的质粒pLAB112_Luc的体外表达保持高达超过600分钟(10小时)。未经活化肽SppIP活化的质粒没有泄漏/表达(图2)。

[0178] 当将从过夜培养物再次接种并生长2小时罗伊氏乳杆菌R2LC(具有pLAB112_Luc)置于麻醉小鼠的1天龄皮肤全层伤口中时,细菌仅限于伤口部位,质粒表达在第一小时高,但是超过4小时检测到信号(图3)。

[0179] 实施例3:健康小鼠中改善的伤口愈合

[0180] 在愈合过程中每天监测伤口。与伤口未施加任何物质的对照小鼠以及每天施加对照罗伊氏乳杆菌R2LC(pLAB112_Luc)的小鼠相比,每天单次施加罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_mLrCK1.4的健康小鼠减少了至伤口表面75%闭合和至伤口表面100%闭合的时间(图4)。伤口诱导后最初几天,罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_mLrCK1.4对伤口愈合的影响最为突出。当与伤口没有施用任何物质的对照小鼠进行比较时,通过每天施用(伤口诱导后一天和两天)罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_mLrCK1.4进一步减小伤口的尺寸。与伤口没有施加任何物质的对照小鼠相比,该组中作为曲线下的面积测定的总伤口暴露量也减少(图5)。图35显示了在健康小鼠中诱导的全层皮肤伤口在时间0以及不进行处理、用R2LC_Luc或R2LC_LrCK1处理后24小时的代表性图像。

[0181] 实施例4:在具有组织灌注受损的健康小鼠中改善的伤口愈合

[0182] 通过结扎伤口所在肢体的股动脉,在伤口诱导的那一天,皮肤灌注减少了50% (图6和表III)。与伤口未施加任何物质的对照小鼠以及每天施加对照罗伊氏乳杆菌R2LC (pLAB112_Luc) 的小鼠相比,在局部缺血的小鼠中,每天单次施用罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_mLrCK1.4导致至伤口表面50% 和75% 闭合的时间减少(图7)。另外在皮肤灌注减少的小鼠中,伤口诱导后的最初几天,罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_mLrCK1.4对伤口愈合的影响最为突出。与伤口没有施加任何物质的对照小鼠相比,在伤口诱导后一天和两天通过每天施用罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_mLrCK1.4减小伤口的尺寸。与伤口没有施加任何物质的对照小鼠相比,该组的总伤口暴露量也降低(图8)。

[0183] 表III:通过激光斑点对比分析测量麻醉小鼠的基础皮肤灌注。数据表示为按灌注单位(PFU)计的平均值±SEM,n=4。

[0184]

	健康的	缺血的	减少量 (%)
对照	62.5±4.3	34.0±1.8	46
R2LC_pLAB112_Luc	57.3±2.7	31.3±1.1	46
R2LC_pLAB112_LrCK1.4	65.0±7.2	30.8±0.4	52

[0185] 实施例5:在高血糖小鼠中的改善的伤口愈合

[0186] 使用四氧嘧啶使小鼠成为糖尿病患者,之后其在伤口愈合过程中保持高血糖(>16.7mmol/l),并且体重不降低(图9)。与伤口未施加任何物质的对照小鼠以及每天施加对照罗伊氏乳杆菌R2LC (pLAB112_Luc) 的小鼠相比,每天单次施加罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_mLrCK1.4的糖尿病小鼠中减少了至75% 伤口表面闭合的时间(图10)。与每天施用含有Luc的罗伊氏乳杆菌R2LC以及伤口没有施加任何物质的对照小鼠相比,每天施加罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_mLrCK1.4的糖尿病小鼠中具有减少伤口暴露的趋势 (p=0.08) (图11)。

[0187] 实施例6:用编码CXCL12的质粒转染的伤口边缘的真皮中的CXCL12皮肤过表达

[0188] 在具有CMV启动子 (SEQ ID NO:24) (V260-20, Invitrogen, Waltham, MA, USA) 的pVAX1骨架上构建质粒,并如前所述(参考文献18)引入被称为pCTR (SEQ ID NO:25) 的插入片段-copGFP-T2A-Luc2-或被称为pCXCL12 (SEQ ID NO:26) 的-CXCL12-P2A-copGFP-T2A-Luc2-。将CXCL12的分泌序列用鼠 IgG分泌序列替代。因此,pCTR质粒编码GFP(绿色荧光蛋白)和荧光素酶,但没有趋化因子。将质粒(40μg在总体积为100μl盐水中)注射到伤口边缘四个位置的真皮中。基于麻醉前10分钟腹膜内注射D-萤光素(150mg/kg, #122796, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)后的荧光素酶活性随时间而进行测量转基因表达,利用生物成像装置 (IVIS Spectrum, Perkin Elmer) 进行图像采集。利用Living Image 3.1软件 (Perkin Elmer) 量化数据,并保留成像参数以进行比较分析。还保留了选择感兴趣区域减去对侧参考区域的设置。发光强度被认为与质粒表达成比例。

[0189] 采用非侵入性生物成像测量来自伤口边缘真皮的质粒表达,并与由与CXCL12表达相当的质粒编码的荧光素酶产生的光相关联。表达在第2天达到峰值,然后随着伤口闭合和真皮重建而下降(图13)。与pCTR相比,CXCL12的过度表达并没有导致加速完全伤口愈合,而是导致伤口表面75% 闭合的时间缩短(图14)。在伤口诱导和真皮转染后第4-6天,与pCTR相比,通过pCXCL12真皮表达使伤口表面减小(图15)。这些结果表明,利用该系统将CXCL12递送到伤口,开始的24小时没有明显的效果,而在稍后的时间点效果更小。

[0190] 实施例7:使用Luc和LrCK1进行局部处理的罗伊氏乳杆菌剂量效应

[0191] 将乳杆菌从过夜培养物中再次接种并生长至OD 0.5,然后在MRS中稀释或浓缩至OD0.2、0.5、1.0和1.25。将四种不同浓度稀释10倍至 10^{-9} ,将10 μ l每个样品铺板在含有红霉素的MRS琼脂上,并在37°C、5%二氧化碳过夜的厌氧培养室中过夜培养。对板上的菌落进行计数,浓度以每ml菌落形成单位(CFU/ml)表示。

[0192] 对于剂量实验,用25 μ l生理盐水或罗伊氏乳酸杆菌R2LC pLAB112_LrCK1.4每天处理伤口持续两天,该罗伊氏乳酸杆菌R2LC pLAB112_LrCK1.4来自过夜培养物的再次接种并培养至OD 0.5,在施用活化肽SppIP(50ng/ml)前预活化5分钟,然后并以OD 0.2、0.5、1.0或1.25的浓度局部地添加到伤口表面的中间。在25 μ l的OD 0.5中有 5×10^7 个细菌(2×10^9 cfu/ml),意味着1000倍的剂量跨度。

[0193] 通过光密度测量细菌浓度,并且每毫升的菌落形成单位显示在图16中。在施用至伤口之前培养并活化的最低剂量(OD 0.2等于 2×10^7 细菌)的R2LC_pLAB112_LrCK1.4导致在24小时后最小的伤口尺寸,所有四种不同浓度导致伤口诱导后24和48小时显著加速的伤口闭合(图17A),因此导致与没有接受处理的伤口相比,前48小时伤口暴露减少(图17B)。这些结果表明,与未接受处理的伤口相比,开始的48小时施用的剂量是最低剂量 10^3 倍(OD 1.25等于 1×10^{10} 细菌),这产生了最大效果也显著加速了伤口愈合,并且与产生最大伤口闭合的剂量达到相同的程度。对于给予最高剂量的伤口,没有观察到引起炎症或其它负面副作用的迹象。数据显示即使低剂量的罗伊氏乳杆菌R2LC_LrCK1也能加速伤口愈合。

[0194] 实施例8:作为局部处理的mCXCL121 α 蛋白质的剂量递增

[0195] 为了研究施用至伤口表面的mCXCL12 1 α 的剂量的影响,将0.2 μ g、0.6 μ g或1 μ g的mCXCL12 1 α (RnD Systems)溶解在10 μ l盐水中每日递送至伤口,共两日。施用是每天一次。

[0196] 与无处理相比,每天一次在单独的时间点递送mCXCL12 1 α 在最初两天不会加速伤口愈合(图18A,B)。这些数据表明,CXCL12 1 α 的连续递送导致加速的伤口愈合,因为在最初48小时,每天在一小时内以10分钟间隔给予总共0.2 μ g mCXCL12 1 α 使愈合加速(图18和19)。

[0197] 实施例9:人皮肤活组织检查中的再上皮化测定

[0198] 在乌普萨拉大学医院进行常规乳房缩小术的健康白人妇女同意捐赠而获得无菌正常人体皮肤。用补充有2%小牛血清(Hyclone,HyClone Laboratories,Logan USA)的生理DMEM覆盖样品,并在无菌条件下运送至实验室。

[0199] 如前所述(参考文献17),除去皮下组织,并利用6mm皮肤活检穿孔机(Integra Miltex,York,PA,USA)和无菌剪刀切下剩余的真皮和表皮。在每个6毫米直径的圆形皮肤的中心,利用3mm皮肤活检穿孔机和无菌剪刀去除表皮。然后将样品逐个置于无菌的24孔板中,使表皮面向上。所有培养基(DMEM)补充有BSA,2或10%和抗生素(红霉素Sigma Aldrich,Buchs,Swizerland,10 μ g/ml)。为了维持真皮侧的营养物质,即皮肤真皮侧最高浓度的营养物质,向每个孔中加入0.5ml培养基且每天更换培养基。随着更换培养基的同时,将10 μ l MRS中的 10^6 个罗伊氏乳杆菌R2LC_Luc或罗伊氏乳杆菌R2LC_LrCK1置于浮动圆形皮肤中表皮伤口的中间。接种细菌并使其生长在MRS中2-4小时,以使其处于指数期。将样品在37°C、5%二氧化碳和95%湿度下孵育14天。

[0200] 将样品从中间切开,将一半在4%、pH7.38甲醛中过夜固定,并通过乙醇-二甲苯系

列脱水,最后将其包埋在石蜡中。对从样品中心部分开始的横截面(10 μm)进行安装、脱蜡、再水化,并用苏木精和曙红染色。利用具有徕卡DFC420C相机和Plan Fluot 40 \times 0.7NA物镜的Leica Leits DmrB拍摄图像。利用Image J(NIH)在图像中测量再上皮化或表皮套长度。

[0201] 向培养物中的圆形皮肤加入乳杆菌,在24小时后测量时,降低了培养基的pH(图20A)。当培养基中存在10%FCS时,圆形皮肤中诱导的伤口边缘的表皮增殖以覆盖暴露的真皮,并且当被培养在含有2%FCS的培养基中14天后培养物中圆形皮肤的几乎没有增殖(图20B)。在用R2LC pLAB112Luc或R2LC pLAB112_LrCK1处理的圆形皮肤中检测不到肉眼可见的有害影响,并且在用R2LC pLAB112_LrCK1处理14天的圆形皮肤盘中的伤口上测量到增加的再上皮化(图20B)。

[0202] 实施例10:冷冻干燥和复苏后细菌的功能

[0203] 测试了不同的方案和35种不同的冷冻干燥配方,并且测定了直到两个月的活力。另外,以与大规模工业化生产相同的设置,并且根据良好的制造实践,还生产了一大批冷冻干燥的罗伊氏乳杆菌。在-20至40°C的温度范围内储存长达两个月后,对该批次的冷冻干燥样品的活性进行了分析。通过加入等量体积的水或含有SppIP(50ng/ml)的MRS培养基来复苏冷冻干燥的细菌,然后通过将其铺板于96孔板中或将其直接施加于如上所述的1日龄的伤口上以立即分析体内和体外的表达。

[0204] 采用最有前景的配方,活性从冷冻干燥后即刻至两个月时对储存在+4°C的样品进行测量是稳定。活性在目前作为膳食补充剂销售的冷冻干燥的细菌的可接受的范围之内。在冷冻干燥的罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_Luc复苏后直接测量质粒表达显示出立即诱导表达,其在450分钟后达到峰值,然后下降(图21)。24小时后(1440分钟)没有表达,没有活细菌。当冷冻干燥的罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_Luc被复苏时,用50ng/ml(SppIP)诱导并立即置于小鼠的皮肤伤口上($5 \times 10^7/25\mu\text{l}$),表达直接增加并在约1小时内都高(图22),以在溶液中添加新鲜的生长阶段的细菌时所见的相似模式(图3)。

[0205] 测试对伤口愈合的影响,其中冷冻干燥细菌($5 \times 10^7/25\mu\text{l}$)再次复苏、诱导并立即置于小鼠的皮肤伤口上。每天监测伤口持续两天,用罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_LrCK1处理的伤口与使用该方案的罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_Luc(图23)处理的伤口相比,显示出加速的愈合。这些数据显示,罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112不必被预先培养成指数生长期以便产生和递送足够的CXCL12以加速体内伤口愈合。

[0206] 实施例11:趋化因子信号传导的pH依赖性作用

[0207] 趋化因子可以作为单体、与自身或与其它趋化因子相互作用的二聚体或多聚体出现(参考文献22)。不同的组合和构象诱导不同的受体信号传导和因此不同的细胞反应(参考文献34)。这是一个新的未开发的领域,可能性的组合取决于局部组织微环境。局部pH也会影响局部巨噬细胞功能(参考文献23)。

[0208] 为了研究趋化因子效力的pH依赖性影响,将pH为7.35、6.35或5.35的10 μl 盐水中的0.2 μg CXCL12 α 每天施加于伤口施加两天。

[0209] 改变含有趋化因子的缓冲液中的pH对于经过处理的伤口的愈合模式具有影响,并且与CXCL12悬浮在pH为7.35的盐水中相比,当CXCL12悬浮于pH为6.35的盐水中时,在伤口诱导后一天存在较小伤口尺寸的趋势($p=0.07$) (图24)。这些数据表明,在诱导加速的伤口愈合的方面,6.35的pH增强了施加于伤口表面的重组CXCL12的作用。

[0210] 实施例12:细菌在趋化因子递送到的伤口表面位点的效果重要性

[0211] 为了用新鲜上清液进行伤口治疗,将罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_Luc和R2LC_pLAB112_LrCK1在37°C下接种至10ml MRS中,生长至OD 0.5,离心(>2000rpm,5分钟),重悬于1ml MRS中,活化(SppIP,50ng/ml)并生长4小时。然后将样品离心(>2000rpm,5分钟),并保留上清液。然后将25μl的该上清液每日一次施用于伤口持续两天。

[0212] 在将来自诱导的罗伊氏乳杆菌的新鲜上清液在伤口诱导之后每天添加至伤口中添加两天的模型中证实了通过罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_LrCK1直接向伤口表面细菌递送CXCL12_{1α}的重要性。用来自罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_Luc或R2LC_pLAB112_LrCK1的新鲜上清液处理的伤口尺寸或总伤口暴露($p=0.2595$)没有差异(图25)。

[0213] 实施例13:乳酸杆菌(Lactobacillus)递送的CXCL12增加伤口周围皮肤中CXCL12的水平

[0214] 为了定量分析,在实验的最后一天除去伤口周围的皮肤(距离伤口0-100μm),并在液氮中快速冷冻并切片(10μm)。固定于冰冷的甲醇中(10分钟)并在0.5%Triton-X中透化(15分钟)后,将组织与靶向CXCL12_{1α}的抗体(多克隆抗体,Abcam)孵育,用巨噬细胞抗原F4/80(克隆BM8,eBioscience)冲洗,并与匹配的偶联到Alexa Fluor488和Nordic Lights 557(Invitrogen)上的二抗进行孵育。在利用在线扫描共聚焦显微镜(Zeiss LSM 5Live,带有0.5光学变焦的压电电机控制的WPlanApo 40×/1.0,Zeiss,Oberkochen,Germany)之前,对组织进行最后洗涤并安装(Fluoromount,#0100-10,Southern Biotech,Birmingham,AL,USA)。利用Image J(NIH)和IMARIS软件8.2(Bitplane,Zurich,Switzerland)在图像中定量蛋白质水平和巨噬细胞。在采集期间保持显微镜设置以进行比较。CXCL12_{1α}测量值以平均荧光强度(MFI)表示。

[0215] 与未接受处理的伤口旁边的皮肤相比,用不同剂量的罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_LrCK1每日一次处理伤口两天,导致伤口旁边皮肤中的CXCL12_{1α}的皮肤组织水平增加(图26)。这在真皮和表皮和在毛囊中都是一样的。

[0216] 实施例14:递送的乳酸杆菌CXCL12增加伤口周围皮肤的巨噬细胞

[0217] 当将OD 0.2和OD 0.5的罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_LrCK1施加于伤口时,与没有接受处理的伤口旁边的真皮相比,用不同剂量的罗伊氏乳杆菌R2TC_pLAB112_LrCK1每日一次处理伤口两天,导致伤口诱导后两天伤口附近真皮中F4/80⁺巨噬细胞的密度增加(图27A)。当将OD 1.25的罗伊氏乳杆菌R2LC_pLAB112_LrCK1施加于伤口表面时,与没有接受处理的伤口旁边的表皮相比,在伤口诱导后2天的伤口旁边的表皮中的F4/80⁺巨噬细胞增加(图27B)。

[0218] 实施例15:使用乳酸乳球菌对伤口愈合加速的影响的验证

[0219] 为了表明由细菌产生的特定趋化因子的局部和连续递送对于与细菌菌株无关的机制是重要的,另外一种菌株被用于产生并将趋化因子直接递送到伤口表面,乳酸乳球菌用pLAB112(mLrCK1)进行转化。按照与采用罗伊氏乳杆菌处理的相同方案,将细菌每天一次施用于健康小鼠的全层伤口。

[0220] 有明显的趋势,mCXCL12_{1α}递送加速了伤口闭合(图28),并减少了该模型中的伤口尺寸和暴露(图29)。

[0221] 实施例16:通过用作为重组蛋白递送的mCXCL12_{1α}、mCXCL17和mYm1处理对伤口闭

合的随时间的适度作用

[0222] 为了说明乳酸细菌的输送方式和连续蛋白质生产对于机制是重要的,将鼠重组mCXCL121 α 、mCXCL17、mYm1(总共200ng在60 μ l中,全部RnD系统)或作为对照的盐水(10 μ l)每天递送至伤口每次10分钟持续一小时。

[0223] 对mCXCL121 α ,将30ng递送至腹膜腔在3小时内诱导了免疫细胞募集的显著增加,这就是将200ng递送至25 μ m²的面积视为高剂量的原因。

[0224] 当趋化因子在一个单独时间点作为重组蛋白质给药时,伤口中的高蛋白酶活性可能降解趋化因子,因此由细菌重新产生的蛋白质是增加伤口闭合所需要的。此外,乳酸细菌也可能为伤口愈合提供有益的局部环境(图1B、4、5、24、30和31)。

[0225] 实施例17:不同处理对健康小鼠伤口闭合的影响的比较

[0226] 对所有进行的不同处理分析健康小鼠中最初24小时的伤口闭合(图32)。很明显,在一个时间点施用于伤口的罗伊氏乳杆菌R2LC_Luc或低单剂量CXCL121 α 的处理可以影响最初24小时期间的愈合。虽然在一个小时内每隔10分钟将CXCL121 α 、CXCL17和Ym1递送至伤口表面在最初24小时内有加速伤口闭合的趋势,但是当通过罗伊氏乳杆菌R2LC_LrCK1在一个小时内将CXCL121 α 连续递送至伤口表面时,这种作用更为明显。通过真皮过表达递送CXCL12,而对24小时伤口闭合有不利影响。

[0227] 实施例18:通过含有pLAB112_mLrCK1.4的罗伊氏乳杆菌在粘膜表面加速伤口愈合

[0228] 为了测试CXCL12局部连续递送到受伤的表面是否通过皮肤上皮和肠上皮的总体机制起作用,采用DSS诱导的结肠炎的两个实验方案。已知DSS(葡聚糖硫酸钠)在结肠粘膜表面诱导创伤(参考文献16)。

[0229] 对于第一个方案,在14天内每天一次灌胃罗伊氏乳杆菌(1ml OD 0.5,旋转并重悬于0.1ml)来处理小鼠,同时饮用水中第7-14天给予DSS。由于这种采用该方案的罗伊氏乳杆菌菌株定居在结肠中,所以目的是评估当引起结肠炎时,与罗伊氏乳杆菌pLAB112_Luc相比,在结肠中是否存在罗伊氏乳杆菌pLAB112_mLrCK1是有益的。

[0230] 第二个方案旨在治疗明显的结肠炎,小鼠在1-8日饮用水中给予DSS,而在第5-8天,每天通过灌胃接受罗伊氏乳杆菌三次。

[0231] 基于临床参数(包括体重减轻、粪便一致性和血容量)评估结肠炎的严重程度,并且使用疾病活动指数(DAI)表示,DAI是Cooper及其同事详细描述的评分方法(参考文献16)。

[0232] 通过用罗伊氏乳杆菌pLAB112_Luc和pLAB112_LrCK1.4进行预处理,DSS诱导的结肠炎疾病活动有类似的改善(图33),其表明影响仅是由于罗伊氏乳杆菌。

[0233] 相比之下,当将罗伊氏乳杆菌pLAB112_LrCK1.4施用于结肠炎的小鼠时,疾病进程得到改善,该现象在用pLAB112_Luc处理时未观察到,表明所递送的趋化因子的作用。

[0234] 参考文献

[0235] 1.Demidova-Rice TN,Hamblin MR and Herman IM.Acute and impaired wound healing:pathophysiology and current methods for drug delivery,part 1:normal and chronic wounds:biology,causes, and approaches to care.Advances in skin&wound care.2012;25:304-14.

[0236] 2.Demidova-Rice TN,Hamblin MR and Herman IM.Acute and impaired wound

healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Advances in skin&wound care.* 2012; 25:349-70.

[0237] 3. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OMZ, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ and Oppenheim JJ. Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells: In Vivo Neovascularization Induced by Stromal-Derived Factor-1 α . *The American Journal of Pathology.* 1999; 154:1125-1135.

[0238] 4. Hattermann K, Sebens S, Helm O, Schmitt AD, Mentlein R, Mehdorn HM and Held-Feindt J. Chemokine expression profile of freshly isolated human glioblastoma-associated macrophages/microglia. *Oncology reports.* 2014; 32:270-6.

[0239] 5. Badillo AT, Chung S, Zhang L, Zoltick P and Liechty KW. Lentiviral gene transfer of SDF-1alpha to wounds improves diabetic wound healing. *The Journal of surgical research.* 2007; 143:35-42.

[0240] 6. Lee WY, Wang CJ, Lin TY, Hsiao CL and Luo CW. CXCL17, an orphan chemokine, acts as a novel angiogenic and anti-inflammatory factor. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* 2013; 304:E32-40.

[0241] 7. Burkhardt AM, Tai KP, Flores-Guiterrez JP, Vilches-Cisneros N, Kamdar K, Barbosa-Quintana O, Valle-Rios R, Hevezi PA, Zuñiga J, Selman M, Ouellette AJ and Zlotnik A. CXCL17 Is a Mucosal Chemokine Elevated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis That Exhibits Broad Antimicrobial Activity. *The Journal of Immunology.* 2012; 188:6399-6406.

[0242] 8. Goren I, Pfeilschifter J and Frank S. Uptake of Neutrophil-Derived Ym1 Protein Distinguishes Wound Macrophages in the Absence of Interleukin-4 Signaling in Murine Wound Healing. *Am J Pathol.* 2014.

[0243] 9. Poutahidis T, Kearney SM, Levkovich T, Qi P, Varian BJ, Lakritz JR, Ibrahim YM, Chatzigiagkos A, Alm EJ and Erdman SE. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS One.* 2013; 8:e78898.

[0244] 10. Ramos AN, Cabral ME, Noseda D, Bosch A, Yantorno OM and Valdez JC. Antipathogenic properties of *Lactobacillus plantarum* on *Pseudomonas aeruginosa*: the potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society.* 2012; 20:552-62.

[0245] 11. Sørvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VGH and Axelsson L. High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology.* 2005; 151:2439-2449.

[0246] 12. Eijsink VG, Axelsson L, Diep DB, Havarstein LS, Holo H and Nes IF. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of

- biological warfare and communication. Antonie van Leeuwenhoek. 2002; 81:639-54.
- [0247] 13. Gao Z, Tseng C-h, Pei Z and Blaser MJ. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007; 104:2927-2932.
- [0248] 14. Gethin G. The significance of surface pH in chronic wounds. Wounds UK. 2007; 3:52-56.
- [0249] 15. Sørvig E, Grönqvist S, Naterstad K, Mathiesen G, Eijsink VG, and Axelsson L. Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. FEMS Microbiol Lett. 2003; 229(1): 119-126.
- [0250] 16. Cooper H.S., Murthy S.N., Shah R.S., Sedergran D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Lab. Invest. 1993; 69 (2): 238-249.
- [0251] 17. Nyman E, Huss F, Nyman T, Junker J, Kratz G. Hyaluronic acid, an important factor in the wound healing properties of amniotic fluid: in vitro studies of re-epithelialisation in human skin wounds. J Plast Surg Hand Surg. 2013 Apr; 47 (2): 89-92.
- [0252] 18. Vågesjö E, Christoffersson G, Waldén T, Carlsson P, Essand M, Korsgren O, and Phillipson M. Immunological shielding by induced recruitment of regulatory T lymphocytes delays rejection of islets transplanted to muscle. Cell transplantation. 2015; 24(2): 263-76.
- [0253] 19. Böhmer N, König S and Fischer L. A novel manganese starvation-inducible expression system for *Lactobacillus plantarum*. FEMS Microbiol Lett. 342 (2013) 37-44.
- [0254] 20. Duong, T, Miller, M., Barrangou, R., Azcarate-Peril A. and Klaenhammer T., Construction of vectors for inducible and constitutive gene expression in *Lactobacillus* _200357.. Microbial Biotechnology (2010) 4 (3), 357-367.
- [0255] 21. Sørvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VG, and Axelsson L. High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. Microbiology. 2005 Jul; 151 (Pt 7): 2439-49.
- [0256] 22. Nesmelova I, Sham Y, Gao J, and Mayo K. CXC and CC chemokines form mixed heterodimers association free energies from molecular dynamics simulations and experimental correlations. JBC Papers in Press, June 12, 2008, DOI 10.1074/jbc.M803308200
- [0257] 23. Bellocq A, Suberville S, Philippe C, Bertrand F, Perez J, Fouqueray B, Cherqui G, Baud L. Low environmental pH is responsible for the induction of

nitric-oxide synthase in macrophages. Evidence for involvement of nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem.* 1998 Feb 27;273(9):5086-92.

[0258] 24.Thompson J,Higgins DG,Gibson TJ.CLUSTAL W:improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,position-specific gap penalties and weight matrix choice.(1994) *Nucleic Acids Res.*,22:4673-4680.

[0259] 25.Myers E and Miller W,Optimal alignments in linear space.(1988) *CABIOS*,4:11-17.

[0260] 26.W.R.Pearson and D.J.Lipman.Improved Tools for Biological Sequence Analysis(1988) *PNAS*,85:2444-2448.

[0261] 27.W,R.Pearson (1990) ,Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA.*Methods Enzymol.*,183:63-98,

[0262] 28.Altschul SF,Madden TL,**Schäffer AA**,Zhang J,Zhang Z,Miller W,Lipman DJ.(1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs.*Nucleic Acids Res.*,25:3389-3402.

[0263] 29.Holm L and Sander C.Protein structure comparison by alignment of distance matrices(1993) *J.Mol.Biol.*,233:123-38;9.

[0264] 30.Holm L and Sander C.Dali:a network tool for protein structure comparison. (1995) *Trends Biochem.Sci.*,20:478-480.

[0265] 31.Holm L and Sander C.Touring protein fold space with Dali/FSSP. (1998) *Nucleic Acid Res.*,26:316-9) .

[0266] 32.Massena S,Christoffersson G, Vågesjö E,Seignez C,Gustafsson K,Binet F,Herrera Hidalgo C,Giraud A,Lomei J, Weström S,Shibuya M,Claesson-Welsh L, Gerwins P,Welsh M,Kreuger J,Phillipson M.Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d,VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood.* 2015 Oct 22;126(17):2016-26.doi:10.1182/blood-2015-03-631572.Epub 2015 Aug 18.

[0267] 33.Hatse S,Princen K,Liekens S,Vermeire K,De Clercq E,Schols D.Fluorescent CXCL12AF647 as a novel probe for nonradioactive CXCL12/CXCR4 cellular interaction studies. *Cytometry A.* 2004 Oct;61(2):178-88.

[0268] 34.Drury L,Ziarekb J,Gravelc,S,Veldkampb C,Takekoshif T,Hwangf S, Heveker N,Volkmanb B and Dwinella M.Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways. *PNAS* October 25,2011,vol.108,no.43,pages17655-17660.

[0269] 序列

[0270] 表IV:序列表的概要

序列号	描述
1.	mLrCK1_opt DNA

说 明 书

29/29 页

2.	mLrCK1_opt蛋白质
3.	mCXCL12天然蛋白质
4.	hLrCK1_opt DNA
5.	hLrCK1_opt蛋白质
6.	hCXCL12天然蛋白质
7.	mLrCK2_opt DNA
8.	mLrCK2_opt蛋白质
9.	mCXCL17天然蛋白质
10.	hLrCK2_opt DNA
11.	hLrCK2_opt蛋白质
12.	hCXCL17天然蛋白质
13.	mYm1_opt DNA
14.	mYm1蛋白质
15.	mYm1天然蛋白质
16.	hYm1_opt DNA
17.	hYm1蛋白质
18.	hYm1天然蛋白质
19.	SppIP;活化肽
20.	pSIP411DNA
21.	pSIP411蛋白质
22.	PCR引物
23.	PCR引物
24.	pVAX1 DNA
25.	pCTR DNA插入片段
26.	pCXCL12DNA插入片段

序列表

<110>	米亚 菲利普森 斯特凡 鲁斯 埃维利纳 威格斯乔	
<120>	伤口愈合的方法	
<130>	27. 34. 126097	
<150>	1451658-7	
<151>	2014-12-23	
<160>	26	
<170>	PatentIn 3.5版本	
<210>	1	
<211>	299	
<212>	DNA	
<213>	小鼠	
<220>		
<221>	CDS	
[0001]	<222> (3)..(293)	
<400>	1	
cc atg gca aaa ttt tgg aag aaa gca cta tta aca att gca gcc tta		47
Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu		
1 5 10 15		
aca gtc ggc acc tcc gca gga att aca agc gtt tct gcc aaa ccg gta		95
Thr Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Lys Pro Val		
20 25 30		
agt ttg tca tat cga tgt cca tgc cggtt ttc gaa tct cat att gca		143
Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Ile Ala		
35 40 45		
cgc gct aat gtc aaa cac tta aag att ctt aat act cct aat tgt gct		191
Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala		
50 55 60		
ttg cag att gtt gca cgt tta aag aat aac aat cgt caa gtt tgt atc		239
Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile		
65 70 75		
gat cca aag ctt aaa tgg att caa gag tac tta gaa aag gcc tta aac		287
Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn		
80 85 90 95		
aaa taa ctgcgag		299
Lys		

<210> 2
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 2

Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Lys Pro Val Ser
 20 25 30

Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Ile Ala Arg
 35 40 45

Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu
 50 55 60

Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp
 65 70 75 80

[0002]

Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
 85 90 95

<210> 3
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 3

Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Cys Ile Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
 20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Ile Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
 35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
 50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
85

<210> 4
<211> 299
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(293)

<400> 4
cc atg gca aaa ttt tgg aag aaa gca cta tta aca att gca gcc tta 47
Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu
1 5 10 15

aca gtc ggc acc tcc gca gga att aca agc gtt tct gcc aaa ccg gta 95
Thr Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Lys Pro Val
20 25 30

[0003] agt ttg tca tat cga tgt cca tgc cggtt ttc gaa tct cat gtt gca 143
Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala
35 40 45

cgc gct aat gtc aaa cac tta aag att ctt aat act cct aat tgt gct 191
Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala
50 55 60

ttg cag att gtt gca cgt tta aag aat aac aat cgt caa gtt tgt atc 239
Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile
65 70 75

gat cca aag ctt aaa tgg att caa gag tac tta gaa aag gcc tta aac 287
Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn
80 85 90 95

aaa taa ctgcag 299
Lys

<210> 5
<211> 96
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr
1 5 10 15

Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Lys Pro Val Ser
20 25 30

Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg
35 40 45

Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu
50 55 60

Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp
65 70 75 80

Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
85 90 95

<210> 6

<211> 89

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

[0004] Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
85

<210> 7

<211> 386

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>				
<221>	CDS			
<222>	(3).. (380)			
<400>	7			
cc atg gca aaa ttt tgg aag aaa gca cta tta aca att gca gcc tta				47
Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu				
1	5	10	15	
aca gtc ggc acc tcc gca gga att aca agc gtt tct gcc agc cca aat				95
Thr Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Ser Pro Asn				
20	25	30		
cca ggg gtc gcc aga tct cac ggc gac cag cac ctg gct cct agg aga				143
Pro Gly Val Ala Arg Ser His Gly Asp Gln His Leu Ala Pro Arg Arg				
35	40	45		
tgg ctc ctg gaa ggc ggc caa gaa tgt gag tgc aaa gat tgg ttc ctg				191
Trp Leu Leu Glu Gly Gln Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu				
50	55	60		
caa gcc ccg aag aga aaa gcc aca gct gtg ctg ggg cca cca aga aag				239
Gln Ala Pro Lys Arg Lys Ala Thr Ala Val Leu Gly Pro Pro Arg Lys				
65	70	75		
[0005] cag tgc ccc tgt gat cat gtg aag ggc aga gaa aag aaa aat aga cac				287
Gln Cys Pro Cys Asp His Val Lys Gly Arg Glu Lys Lys Asn Arg His				
80	85	90	95	
caa aag cac cac aga aag agc caa aga ccc tcc aga gcc tgc cag caa				335
Gln Lys His His Arg Lys Ser Gln Arg Pro Ser Arg Ala Cys Gln Gln				
100	105	110		
ttt ctc aaa agg tgt cac cta gcc agc ttt gct ctg cct ttg tag				380
Phe Leu Lys Arg Cys His Leu Ala Ser Phe Ala Leu Pro Leu				
115	120	125		
ctcgag				386
<210>	8			
<211>	125			
<212>	PRT			
<213>	小鼠			
<400>	8			
Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr				
1	5	10	15	
Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Ser Pro Asn Pro				
20	25	30		

Gly Val Ala Arg Ser His Gly Asp Gln His Leu Ala Pro Arg Arg Trp
35 40 45

Leu Leu Glu Gly Gly Gln Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu Gln
50 55 60

Ala Pro Lys Arg Lys Ala Thr Ala Val Leu Gly Pro Pro Arg Lys Gln
65 70 75 80

Cys Pro Cys Asp His Val Lys Gly Arg Glu Lys Lys Asn Arg His Gln
85 90 95

Lys His His Arg Lys Ser Gln Arg Pro Ser Arg Ala Cys Gln Gln Phe
100 105 110

Leu Lys Arg Cys His Leu Ala Ser Phe Ala Leu Pro Leu
115 120 125

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> 小鼠

[0006]

<400> 9

Met Lys Leu Leu Ala Ser Pro Phe Leu Leu Leu Pro Val Met Leu
1 5 10 15

Met Ser Met Val Phe Ser Ser Pro Asn Pro Gly Val Ala Arg Ser His
20 25 30

Gly Asp Gln His Leu Ala Pro Arg Arg Trp Leu Leu Glu Gly Gly Gln
35 40 45

Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu Gln Ala Pro Lys Arg Lys Ala
50 55 60

Thr Ala Val Leu Gly Pro Pro Arg Lys Gln Cys Pro Cys Asp His Val
65 70 75 80

Lys Gly Arg Glu Lys Lys Asn Arg His Gln Lys His His Arg Lys Ser
85 90 95

Gln Arg Pro Ser Arg Ala Cys Gln Gln Phe Leu Lys Arg Cys His Leu
100 105 110

Ala Ser Phe Ala Leu Pro Leu
115

<210> 10
<211> 386
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(380)

<400> 10
cc atg gca aaa ttt tgg aag aaa gca cta tta aca att gca gcc tta 47
Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu
1 5 10 15

aca gtc ggc acc tcc gca gga att aca agc gtt tct gcc tca tta aat 95
Thr Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Ser Leu Asn
20 25 30

cca gga gta gca cggt cat cga gat cggt gga caa gca agt cggt cgt 143
Pro Gly Val Ala Arg Gly His Arg Asp Arg Gly Gln Ala Ser Arg Arg
35 40 45

[0007] tgg tta caa gaa gggt ggt caa gaa tgt gaa tgt aaa gat tgg ttt tta 191
Trp Leu Gln Glu Gly Gln Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu
50 55 60

cgt gct cca cgt cggt aag ttt atg act gtt agt gggt ctt cca aag aaa 239
Arg Ala Pro Arg Arg Lys Phe Met Thr Val Ser Gly Leu Pro Lys Lys
65 70 75

caa tgt cct tgt gat cat ttt aag gga aat gtt aag aaa act cga cac 287
Gln Cys Pro Cys Asp His Phe Lys Gly Asn Val Lys Lys Thr Arg His
80 85 90 95

caa cgt cat cac cggt aaa cct aat aag cat tca cggt gca tgt caa caa 335
Gln Arg His His Arg Lys Pro Asn Lys His Ser Arg Ala Cys Gln Gln
100 105 110

ttt ctt aaa caa tgt caa ctt cgt tct ttt gct ctt cct ctt taa 380
Phe Leu Lys Gln Cys Gln Leu Arg Ser Phe Ala Leu Pro Leu
115 120 125

ctcgag 386

<210> 11
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr
1 5 10 15

Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Ser Leu Asn Pro
20 25 30

Gly Val Ala Arg Gly His Arg Asp Arg Gly Gln Ala Ser Arg Arg Trp
35 40 45

Leu Gln Glu Gly Gln Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu Arg
50 55 60

Ala Pro Arg Arg Lys Phe Met Thr Val Ser Gly Leu Pro Lys Lys Gln
65 70 75 80

Cys Pro Cys Asp His Phe Lys Gly Asn Val Lys Lys Thr Arg His Gln
85 90 95

Arg His His Arg Lys Pro Asn Lys His Ser Arg Ala Cys Gln Gln Phe
[0008] 100 105 110

Leu Lys Gln Cys Gln Leu Arg Ser Phe Ala Leu Pro Leu
115 120 125

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Met Lys Val Leu Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Pro Leu Met Leu
1 5 10 15

Met Ser Met Val Ser Ser Ser Leu Asn Pro Gly Val Ala Arg Gly His
20 25 30

Arg Asp Arg Gly Gln Ala Ser Arg Arg Trp Leu Gln Glu Gly Gly Gln
35 40 45

Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu Arg Ala Pro Arg Arg Lys Phe
50 55 60

Met Thr Val Ser Gly Leu Pro Lys Lys Gln Cys Pro Cys Asp His Phe
65 70 75 80

Lys Gly Asn Val Lys Lys Thr Arg His Gln Arg His His Arg Lys Pro
85 90 95

Asn Lys His Ser Arg Ala Cys Gln Gln Phe Leu Lys Gln Cys Gln Leu
100 105 110

Arg Ser Phe Ala Leu Pro Leu
115

<210> 13
<211> 1226
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(1220)

<p><400> 13 [0009] cc atg gca aaa ttt tgg aag aaa gca cta tta aca att gca gcc tta Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu 1 5 10 15</p> <p>aca gtc ggc acc tcc gca gga att aca agc gtt tct gcc tac caa ctt Thr Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Tyr Gln Leu 20 25 30</p> <p>atg tgt tac tac act tca tgg gct aaa gat cgt cca att gaa ggt tct Met Cys Tyr Tyr Ser Trp Ala Lys Asp Arg Pro Ile Glu Gly Ser 35 40 45</p> <p>ttt aag cca gga aat att gat cct tgt ctt tgt aca cat ctt att tac Phe Lys Pro Gly Asn Ile Asp Pro Cys Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr 50 55 60</p> <p>gct ttt gct ggt atg caa aat gaa att act tac aca cac gaa caa Ala Phe Ala Gly Met Gln Asn Asn Glu Ile Thr Tyr Thr His Glu Gln 65 70 75</p> <p>gat tta cgt gat tac gaa gct ctt aat ggt ctt aag gat aag aat act Asp Leu Arg Asp Tyr Glu Ala Leu Asn Gly Leu Lys Asp Lys Asn Thr 80 85 90 95</p> <p>gaa ctt aag aca ctt ctt gca att ggt gga tgg aag ttt gga cca gct Glu Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile Gly Gly Trp Lys Phe Gly Pro Ala 100 105 110</p> <p>cct ttt agt gca atg gtt tca act cca caa aat cgg caa att ttt att Pro Phe Ser Ala Met Val Ser Thr Pro Gln Asn Arg Gln Ile Phe Ile</p>	47 95 143 191 239 287 335 383
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------

	115	120	125	
	caa agt gta att cgg ttt tta cg	caa tac aat ttt gat gga ctt aat		431
	Gln Ser Val Ile Arg Phe Leu Arg Gln Tyr Asn Phe Gly Leu Asn			
	130	135	140	
	ctt gat tgg caa tac cca ggt agt cga gga tca cca cct aag gat aag			479
	Leu Asp Trp Gln Tyr Pro Gly Ser Arg Gly Ser Pro Pro Lys Asp Lys			
	145	150	155	
	cat tta ttt agt gtt ctt gta aaa gaa atg cga aag gct ttt gaa gaa			527
	His Leu Phe Ser Val Leu Val Lys Glu Met Arg Lys Ala Phe Glu Glu			
	160	165	170	175
	gaa agt gtt gaa aag gat att cca cgt ctt ctt act agt aca ggt			575
	Glu Ser Val Glu Lys Asp Ile Pro Arg Leu Leu Leu Thr Ser Thr Gly			
	180	185	190	
	gca gga att att gat gta att aag tca ggt tac aag att cca gaa ctt			623
	Ala Gly Ile Ile Asp Val Ile Lys Ser Gly Tyr Lys Ile Pro Glu Leu			
	195	200	205	
	agt caa tca ctt gat tac att caa gtt atg act tac gat tta cac gat			671
	Ser Gln Ser Leu Asp Tyr Ile Gln Val Met Thr Tyr Asp Leu His Asp			
	210	215	220	
[0010]	cct aag gat ggt tac aca gga gaa aat tct cca ctt tac aag agt cct			719
	Pro Lys Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Asn Ser Pro Leu Tyr Lys Ser Pro			
	225	230	235	
	tac gat att gga aag agt gct gat ctt aat gtt gat tct att att agt			767
	Tyr Asp Ile Gly Lys Ser Ala Asp Leu Asn Val Asp Ser Ile Ile Ser			
	240	245	250	255
	tac tgg aaa gat cat gga gct gca tca gaa aag ctt att gtt ggt ttt			815
	Tyr Trp Lys Asp His Gly Ala Ala Ser Glu Lys Leu Ile Val Gly Phe			
	260	265	270	
	cca gct tac gga cac act ttt att ctt tca gat cca tct aag aca ggt			863
	Pro Ala Tyr Gly His Thr Phe Ile Leu Ser Asp Pro Ser Lys Thr Gly			
	275	280	285	
	att gga gca cct act att tct aca ggt cca cct gga aag tat act gat			911
	Ile Gly Ala Pro Thr Ile Ser Thr Gly Pro Pro Gly Lys Tyr Thr Asp			
	290	295	300	
	gaa agt ggt ctt tta gct tac tac gaa gtt tgt aca ttt tta aat gaa			959
	Glu Ser Gly Leu Leu Ala Tyr Tyr Glu Val Cys Thr Phe Leu Asn Glu			
	305	310	315	
	gga gct aca gaa gtt tgg gat gca cca caa gaa gta cct tat gca tac			1007
	Gly Ala Thr Glu Val Trp Asp Ala Pro Gln Glu Val Pro Tyr Ala Tyr			
	320	325	330	335
	cag ggt aat gaa tgg gtt gga tac gat aat gta cgt agt ttt aag ctt			1055
	Gln Gly Asn Glu Trp Val Gly Tyr Asp Asn Val Arg Ser Phe Lys Leu			
	340	345	350	

aag gct caa tgg ctt aag gat aat aat tta ggt gga gca gtt gta tgg Lys Ala Gln Trp Leu Lys Asp Asn Asn Leu Gly Gly Ala Val Val Trp 355	360	365	1103
cca ctt gat atg gat gat ttt tct ggt agt ttt tgt cat caa cgg cac Pro Leu Asp Met Asp Asp Phe Ser Gly Ser Phe Cys His Gln Arg His 370	375	380	1151
ttt cct ctt act tca aca ctt aag ggt gat ctt aat att cat tca gca Phe Pro Leu Thr Ser Thr Leu Lys Gly Asp Leu Asn Ile His Ser Ala 385	390	395	1199
tct tgt aag gga cca tat taa ctcgag Ser Cys Lys Gly Pro Tyr 400	405		1226
<210> 14 <211> 405 <212> PRT <213> 小鼠			
<400> 14			
Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr 1 5 10 15			
[0011]			
Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Tyr Gln Leu Met 20 25 30			
Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ala Lys Asp Arg Pro Ile Glu Gly Ser Phe 35 40 45			
Lys Pro Gly Asn Ile Asp Pro Cys Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr Ala 50 55 60			
Phe Ala Gly Met Gln Asn Asn Glu Ile Thr Tyr Thr His Glu Gln Asp 65 70 75 80			
Leu Arg Asp Tyr Glu Ala Leu Asn Gly Leu Lys Asp Lys Asn Thr Glu 85 90 95			
Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile Gly Gly Trp Lys Phe Gly Pro Ala Pro 100 105 110			
Phe Ser Ala Met Val Ser Thr Pro Gln Asn Arg Gln Ile Phe Ile Gln 115 120 125			

Ser Val Ile Arg Phe Leu Arg Gln Tyr Asn Phe Asp Gly Leu Asn Leu
 130 135 140

Asp Trp Gln Tyr Pro Gly Ser Arg Gly Ser Pro Pro Lys Asp Lys His
 145 150 155 160

Leu Phe Ser Val Leu Val Lys Glu Met Arg Lys Ala Phe Glu Glu Glu
 165 170 175

Ser Val Glu Lys Asp Ile Pro Arg Leu Leu Leu Thr Ser Thr Gly Ala
 180 185 190

Gly Ile Ile Asp Val Ile Lys Ser Gly Tyr Lys Ile Pro Glu Leu Ser
 195 200

Gln Ser Leu Asp Tyr Ile Gln Val Met Thr Tyr Asp Leu His Asp Pro
 210 215 220

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

[0012] Asp Ile Gly Lys Ser Ala Asp Leu Asn Val Asp Ser Ile Ile Ser Tyr
 245 250 255

Trp Lys Asp His Gly Ala Ala Ser Glu Lys Leu Ile Val Gly Phe Pro
 260 265 270

Ala Tyr Gly His Thr Phe Ile Leu Ser Asp Pro Ser Lys Thr Gly Ile
 275 280 285

Gly Ala Pro Thr Ile Ser Thr Gly Pro Pro Gly Lys Tyr Thr Asp Glu
 290 295 300

Ser Gly Leu Leu Ala Tyr Tyr Glu Val Cys Thr Phe Leu Asn Glu Gly
 305 310 315 320

Ala Thr Glu Val Trp Asp Ala Pro Gln Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln
 325 330 335

Gly Asn Glu Trp Val Gly Tyr Asp Asn Val Arg Ser Phe Lys Leu Lys
 340 345 350

Ala Gln Trp Leu Lys Asp Asn Asn Leu Gly Gly Ala Val Val Trp Pro

355

360

365

Leu Asp Met Asp Asp Phe Ser Gly Ser Phe Cys His Gln Arg His Phe
 370 375 380

Pro Leu Thr Ser Thr Leu Lys Gly Asp Leu Asn Ile His Ser Ala Ser
 385 390 395 400

Cys Lys Gly Pro Tyr
 405

<210> 15
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 15

Met Ala Lys Leu Ile Leu Val Thr Gly Leu Ala Ile Leu Leu Asn Val
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Met Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ala
 [0013] 20 25 30

Lys Asp Arg Pro Ile Glu Gly Ser Phe Lys Pro Gly Asn Ile Asp Pro
 35 40 45

Cys Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Met Gln Asn Asn
 50 55 60

Glu Ile Thr Tyr Thr His Glu Gln Asp Leu Arg Asp Tyr Glu Ala Leu
 65 70 75 80

Asn Gly Leu Lys Asp Lys Asn Thr Glu Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile
 85 90 95

Gly Gly Trp Lys Phe Gly Pro Ala Pro Phe Ser Ala Met Val Ser Thr
 100 105 110

Pro Gln Asn Arg Gln Ile Phe Ile Gln Ser Val Ile Arg Phe Leu Arg
 115 120 125

Gln Tyr Asn Phe Asp Gly Leu Asn Leu Asp Trp Gln Tyr Pro Gly Ser
 130 135 140

Arg Gly Ser Pro Pro Lys Asp Lys His Leu Phe Ser Val Leu Val Lys
145 150 155 160

Glu Met Arg Lys Ala Phe Glu Glu Ser Val Glu Lys Asp Ile Pro
165 170 175

Arg Leu Leu Leu Thr Ser Thr Gly Ala Gly Ile Ile Asp Val Ile Lys
180 185 190

Ser Gly Tyr Lys Ile Pro Glu Leu Ser Gln Ser Leu Asp Tyr Ile Gln
195 200 205

Val Met Thr Tyr Asp Leu His Asp Pro Lys Asp Gly Tyr Thr Gly Glu
210 215 220

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

Leu Asn Val Asp Ser Ile Ile Ser Tyr Trp Lys Asp His Gly Ala Ala
245 250 255

[0014]

Ser Glu Lys Leu Ile Val Gly Phe Pro Ala Tyr Gly His Thr Phe Ile
260 265 270

Leu Ser Asp Pro Ser Lys Thr Gly Ile Gly Ala Pro Thr Ile Ser Thr
275 280 285

Gly Pro Pro Gly Lys Tyr Thr Asp Glu Ser Gly Leu Leu Ala Tyr Tyr
290 295 300

Glu Val Cys Thr Phe Leu Asn Glu Gly Ala Thr Glu Val Trp Asp Ala
305 310 315 320

Pro Gln Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln Gly Asn Glu Trp Val Gly Tyr
325 330 335

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

Asn Leu Gly Gly Ala Val Val Trp Pro Leu Asp Met Asp Asp Phe Ser
355 360 365

Gly Ser Phe Cys His Gln Arg His Phe Pro Leu Thr Ser Thr Leu Lys
370 375 380

Gly Asp Leu Asn Ile His Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Tyr
385 390 395

<210> 16
<211> 1181
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(1175)

<400> 16
cc atg gca aaa ttt tgg aag aaa gca cta tta aca att gca gcc tta 47
Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu
1 5 10 15

aca gtc ggc acc tcc gca gga att aca agc gtt tct gcc tac aag ctt 95
Thr Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Tyr Lys Leu
20 25 30

[0015] gtt tgt tac tac act tca tgg tct caa tac cga gaa ggt gat gga agt 143
Val Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ser Gln Tyr Arg Glu Gly Asp Gly Ser
35 40 45

tgt ttt cca gat gct ctt gat cgg ttt tta tgt aca cat att att tac 191
Cys Phe Pro Asp Ala Leu Asp Arg Phe Leu Cys Thr His Ile Ile Tyr
50 55 60

tct ttt gca aat att agt aat gat cac att gat aca tgg gaa tgg aat 239
Ser Phe Ala Asn Ile Ser Asn Asp His Ile Asp Thr Trp Glu Trp Asn
65 70 75

gat gtt act ctt tac ggt atg ctt aat aca ctt aag aat cgt aat cca 287
Asp Val Thr Leu Tyr Gly Met Leu Asn Thr Leu Lys Asn Arg Asn Pro
80 85 90 95

aat tta aag act tta ctt agt gta ggt gga tgg aat ttt ggt tct caa 335
Asn Leu Lys Thr Leu Leu Ser Val Gly Gly Trp Asn Phe Gly Ser Gln
100 105 110

cgg ttt agt aag att gct tca aat act caa tct cgt cgg aca ttt att 383
Arg Phe Ser Lys Ile Ala Ser Asn Thr Gln Ser Arg Arg Thr Phe Ile
115 120 125

aaa agt gtt cca cca ttt tta cgt act cat ggt ttt gat gga ctt gat 431
Lys Ser Val Pro Pro Phe Leu Arg Thr His Gly Phe Asp Gly Leu Asp
130 135 140

tta gca tgg ctt tat cca ggt cga cgt gat aag caa cac ttt act aca 479
Leu Ala Trp Leu Tyr Pro Gly Arg Arg Asp Lys Gln His Phe Thr Thr

145	150	155	
ctt att aaa gaa atg aag gct gaa ttt att aag gaa gca caa cct ggt Leu Ile Lys Glu Met Lys Ala Glu Phe Ile Lys Glu Ala Gln Pro Gly 160 165 170 175			527
aaa aag caa ctt ctt agt gct gca tta tca gct gga aag gtt act Lys Lys Gln Leu Leu Ser Ala Ala Leu Ser Ala Gly Lys Val Thr 180 185 190			575
att gat agt tca tac gat att gca aag att agt caa cat ctt gat ttt Ile Asp Ser Ser Tyr Asp Ile Ala Lys Ile Ser Gln His Leu Asp Phe 195 200 205			623
att tca att atg aca tac gat ttt cac ggt gct tgg cggt act aca Ile Ser Ile Met Thr Tyr Asp Phe His Gly Ala Trp Arg Gly Thr Thr 210 215 220			671
gga cat cac agt cca tta ttt cgt gga caa gaa gat gct tca cct gat Gly His His Ser Pro Leu Phe Arg Gly Gln Glu Asp Ala Ser Pro Asp 225 230 235			719
cgg ttt tct aat act gat tat gca gtt ggt tac atg ctt cggt tta gga Arg Phe Ser Asn Thr Asp Tyr Ala Val Gly Tyr Met Leu Arg Leu Gly 240 245 250 255			767
[0016] gct cca gca tct aaa ctt gta atg ggt att cct act ttt gga cga tca Ala Pro Ala Ser Lys Leu Val Met Gly Ile Pro Thr Phe Gly Arg Ser 260 265 270			815
ttt aca tta gct tct agt gaa act ggt gtt gga gca cca att tca ggt Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly Ala Pro Ile Ser Gly 275 280 285			863
cca gga att cct ggt cgt ttt act aag gaa gct gga aca ctt gca tac Pro Gly Ile Pro Gly Arg Phe Thr Lys Glu Ala Gly Thr Leu Ala Tyr 290 295 300			911
tac gaa att tgt gat ttt ctt cggt ggt act gtt cat cga aca ctt Tyr Glu Ile Cys Asp Phe Leu Arg Gly Ala Thr Val His Arg Thr Leu 305 310 315			959
gga caa caa gta cct tat gca act aaa ggt aat caa tgg gtt gga tac Gly Gln Gln Val Pro Tyr Ala Thr Lys Gly Asn Gln Trp Val Gly Tyr 320 325 330 335			1007
gat gat caa gaa agt gtt aag tca aag gta caa tac ctt aag gat cga Asp Asp Gln Glu Ser Val Lys Ser Lys Val Gln Tyr Leu Lys Asp Arg 340 345 350			1055
caa tta gct ggt gca atg gta tgg gct ctt gat ctt gat gat ttt caa Gln Leu Ala Gly Ala Met Val Trp Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Gln 355 360 365			1103
ggt agt ttt tgt gga caa gat ctt cgt ttt cca ctt act aat gct att Gly Ser Phe Cys Gly Gln Asp Leu Arg Phe Pro Leu Thr Asn Ala Ile 370 375 380			1151

aag gat gca tta gct gca aca taa ctcgag
 Lys Asp Ala Leu Ala Ala Thr
 385 390

<210> 17
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 17

Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Tyr Lys Leu Val
 20 25 30

Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ser Gln Tyr Arg Glu Gly Asp Gly Ser Cys
 35 40 45

Phe Pro Asp Ala Leu Asp Arg Phe Leu Cys Thr His Ile Ile Tyr Ser
 50 55 60

[0017]

Phe Ala Asn Ile Ser Asn Asp His Ile Asp Thr Trp Glu Trp Asn Asp
 65 70 75 80

Val Thr Leu Tyr Gly Met Leu Asn Thr Leu Lys Asn Arg Asn Pro Asn
 85 90 95

Leu Lys Thr Leu Leu Ser Val Gly Gly Trp Asn Phe Gly Ser Gln Arg
 100 105 110

Phe Ser Lys Ile Ala Ser Asn Thr Gln Ser Arg Arg Thr Phe Ile Lys
 115 120 125

Ser Val Pro Pro Phe Leu Arg Thr His Gly Phe Asp Gly Leu Asp Leu
 130 135 140

Ala Trp Leu Tyr Pro Gly Arg Arg Asp Lys Gln His Phe Thr Thr Leu
 145 150 155 160

Ile Lys Glu Met Lys Ala Glu Phe Ile Lys Glu Ala Gln Pro Gly Lys
 165 170 175

Lys Gln Leu Leu Leu Ser Ala Ala Leu Ser Ala Gly Lys Val Thr Ile
180 185 190

Asp Ser Ser Tyr Asp Ile Ala Lys Ile Ser Gln His Leu Asp Phe Ile
195 200 205

Ser Ile Met Thr Tyr Asp Phe His Gly Ala Trp Arg Gly Thr Thr Gly
210 215 220

His His Ser Pro Leu Phe Arg Gly Gln Glu Asp Ala Ser Pro Asp Arg
225 230 235 240

Phe Ser Asn Thr Asp Tyr Ala Val Gly Tyr Met Leu Arg Leu Gly Ala
245 250 255

Pro Ala Ser Lys Leu Val Met Gly Ile Pro Thr Phe Gly Arg Ser Phe
260 265 270

Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly Ala Pro Ile Ser Gly Pro
275 280 285

[0018] Gly Ile Pro Gly Arg Phe Thr Lys Glu Ala Gly Thr Leu Ala Tyr Tyr
290 295 300

Glu Ile Cys Asp Phe Leu Arg Gly Ala Thr Val His Arg Thr Leu Gly
305 310 315 320

Gln Gln Val Pro Tyr Ala Thr Lys Gly Asn Gln Trp Val Gly Tyr Asp
325 330 335

Asp Gln Glu Ser Val Lys Ser Lys Val Gln Tyr Leu Lys Asp Arg Gln
340 345 350

Leu Ala Gly Ala Met Val Trp Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Gln Gly
355 360 365

Ser Phe Cys Gly Gln Asp Leu Arg Phe Pro Leu Thr Asn Ala Ile Lys
370 375 380

Asp Ala Leu Ala Ala Thr
385 390

<210> 18

<211> 383
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18

Met Gly Val Lys Ala Ser Gln Thr Gly Phe Val Val Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Gln Cys Cys Ser Ala Tyr Lys Leu Val Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ser
 20 25 30

Gln Tyr Arg Glu Gly Asp Gly Ser Cys Phe Pro Asp Ala Leu Asp Arg
 35 40 45

Phe Leu Cys Thr His Ile Ile Tyr Ser Phe Ala Asn Ile Ser Asn Asp
 50 55 60

His Ile Asp Thr Trp Glu Trp Asn Asp Val Thr Leu Tyr Gly Met Leu
 65 70 75 80

Asn Thr Leu Lys Asn Arg Asn Pro Asn Leu Lys Thr Leu Leu Ser Val
 [0019] 85 90 95

Gly Gly Trp Asn Phe Gly Ser Gln Arg Phe Ser Lys Ile Ala Ser Asn
 100 105 110

Thr Gln Ser Arg Arg Thr Phe Ile Lys Ser Val Pro Pro Phe Leu Arg
 115 120 125

Thr His Gly Phe Asp Gly Leu Asp Leu Ala Trp Leu Tyr Pro Gly Arg
 130 135 140

Arg Asp Lys Gln His Phe Thr Thr Leu Ile Lys Glu Met Lys Ala Glu
 145 150 155 160

Phe Ile Lys Glu Ala Gln Pro Gly Lys Lys Gln Leu Leu Leu Ser Ala
 165 170 175

Ala Leu Ser Ala Gly Lys Val Thr Ile Asp Ser Ser Tyr Asp Ile Ala
 180 185 190

Lys Ile Ser Gln His Leu Asp Phe Ile Ser Ile Met Thr Tyr Asp Phe
 195 200 205

His Gly Ala Trp Arg Gly Thr Thr Gly His His Ser Pro Leu Phe Arg
210 215 220

Gly Gln Glu Asp Ala Ser Pro Asp Arg Phe Ser Asn Thr Asp Tyr Ala
225 230 235 240

Val Gly Tyr Met Leu Arg Leu Gly Ala Pro Ala Ser Lys Leu Val Met
245 250 255

Gly Ile Pro Thr Phe Gly Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr
260 265 270

Gly Val Gly Ala Pro Ile Ser Gly Pro Gly Ile Pro Gly Arg Phe Thr
275 280 285

Lys Glu Ala Gly Thr Leu Ala Tyr Tyr Glu Ile Cys Asp Phe Leu Arg
290 295 300

Gly Ala Thr Val His Arg Thr Leu Gly Gln Gln Val Pro Tyr Ala Thr
305 310 315 320

[0020] Lys Gly Asn Gln Trp Val Gly Tyr Asp Asp Gln Glu Ser Val Lys Ser
325 330 335

Lys Val Gln Tyr Leu Lys Asp Arg Gln Leu Ala Gly Ala Met Val Trp
340 345 350

Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Gln Gly Ser Phe Cys Gly Gln Asp Leu
355 360 365

Arg Phe Pro Leu Thr Asn Ala Ile Lys Asp Ala Leu Ala Ala Thr
370 375 380

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> 乳杆菌属

<400> 19

Met Ala Gly Asn Ser Ser Asn Phe Ile His Lys Ile Ile Lys Gln Ile
1 5 10 15

Phe Thr His Arg

<210>	20			
<211>	7673			
<212>	DNA			
<213>	人工			
<220>				
<223>	重组质粒			
<220>				
<221>	CDS			
<222>	(5853)..(7658)			
<400>	20			
gaattcggtta	ccccgggttc	gaaggcgcca	agcttcaa at tacagcac gt gttgctt ga	60
ttgatagcc a	aaaagcagca	gttgataa ag	caattactga tattgctgaa aaattgtat	120
ttataaataa a	aatcacctt	ttagaggtgg	tttttttatt tataaattat tcgtttgatt	180
tcgc ttgc a	tagaacaatc	aaagcgagaa	taaggaagat aaatcccata agggcgggag	240
cagaatgtcc	gagactaatt	catgagatcg	at ttttttatt aaaacgtctc aaaatcg ttt	300
[0021] ctgagacgtt	ttagcg tta	tttcg ttag	ttatcgcat aatcg taaa acaggcgtt a	360
tcgtacgt a	aaagccctt g	agcgtacgt	gc ttgc agc gaagatgtt g tctgttagat	420
tatgaaagcc	gatgactgaa	t gaaataata	agcgcac g ctttctattt cggttggagg	480
aggctcaagg	gagttt gagg	gaatgaaatt	ccctcatggg tttgatttta aaaattgctt	540
gcaatttgc	cgagcgtt tag	cgctggaaaa	at tttt gaaa aaaattt gga atttggaaaa	600
aaatgggggg	aaaggaagcg	aatttgc tt	ccgtactacg acccccatt aagtgccgag	660
tgccaaattt	tgtgcca aaaa	acgctt atc	ccaactggct caagggtt g agggtttt	720
caatcgcc a	cgaatcgcc a	acgttttgc	caacgtttt tataaatcta tatttaagta	780
gcttattt	tgtt tattt	attacaaatg	gatacactaa ttttataaaa ttattt gatt	840
ggagttttt	aaatggtgat	ttcagaatcg	aaaaaaagag ttatgattt c tgc aaaaaa	900
gagcaagata	aaaaattaac	agatatggcg	aaacaaaaag gttttcaaa atctgcgtt	960
gcggcgtt tag	ctatagaaga	at atgcaaga	aaggaatcag aataaaaaaaa ataagcgaaa	1020
gctcgcgtt	ttagaaggat	acgagttt c	gctactt gtt tttgataagg taatata tca	1080
tggctattaa	atactaaagc	tagaaattt	ggat tttat tatatcctga ctcaattcct	1140
aatgattt gga	aagaaaaatt	agagat tttg	ggcgtatcta tggctgtcag tccttacac	1200

	gatatggacg aaaaaaaaaga taaagataca tggaatagta gtgatgttat acgaaatgga	1260
	aagcactata aaaaaccaca ctatcacgtt atatatattg cacgaaatcc tgtaacaata	1320
	gaaagcgta ggaacaagat taagcgaaaa ttgggaaata gttcagttgc tcatgttgag	1380
	atacttgatt atatcaaagg ttcatatgaa tatttgactc atgaatcaaa ggacgctatt	1440
	gctaagaata aacatatata cgacaaaaaa gatatttga acattaatga ttttgatatt	1500
	gaccgctata taacacttga tgaagccaa aaaagagaat tgaagaattt acttttagat	1560
	atagtggatg actataattt ggttaataca aaagatttaa tggctttat tcgccttagg	1620
	ggagcggagt ttggaatttt aaatacgaat gatgtaaaag atattgttc aacaaactct	1680
	agcgcctta gattatggtt tgaggcaat tatcagtgtg gatataagagc aagttatgca	1740
	aaggttcttgc atgctgaaac gggggaaata aatgacaaa caaagaaaaa gagttatttgc	1800
	ctgaaaatga ggaattaaaa aaagaaatta aggactaaa agagcgtatt gaaagataca	1860
	gagaaatgga agttgaatta agtacaacaa tagatttatt gagaggaggg attattgaat	1920
	aaataaaagc ccccctgacg aaagtcaag ggggctttta tttgggttg atgttgcgat	1980
	taatagcaat acgattgcaa taaacaaaat gatcccctta gaagcaaact taagagtgt	2040
[0022]	ttgatagtgc attatcttaa aattttgtat aataggaatt gaagttaat tagatgctaa	2100
	aaataggaat tgaagttaaa ttagatgcta aaaatttgc attaagaagg agggattcgt	2160
	catgttggta ttccaaatgc gtaatgtaga taaaacatct actgtttga aacagactaa	2220
	aaacagtgt tacgcagata aataaatacg ttagattaat tcctaccagt gactaatctt	2280
	atgactttt aaacagataa ctaaaattac aaacaaatcg tttaacttca ggagagatta	2340
	catgaacaaa aatataaata tctcaaactt tttaacgagt gaaaaagtac tcaaccaaata	2400
	aataaaacaa ttgaatttaa aagaaaccga taccgttac gaaattggaa caggtaaagg	2460
	gcatttaacg acgaaactgg ctaaaataag taaacaggtt acgtctattt aattagacag	2520
	tcatctattt aacttatcgt cagaaaaattt aaaactgaat actcgtgtca cttaattca	2580
	ccaagatattt ctacagtttca aattccctaa caaacagagg tataaaattt ttggaaat	2640
	tccttacaat ttaagcacac aaattttaa aaaagtggtt tttgaaagcc gtgcgtctga	2700
	catctatctg actgttgaag aaggattcta caagcgtacc ttggatattt accgaacact	2760
	agggttgctc ttgcacactc aagtctcgat tcagcaattt cttaagctgc cagcgaaatg	2820
	ctttcatcct aaaccaaaag taaacagtgt cttaataaaa cttacccgcc ataccacaga	2880
	tgttccagat aaatatttggaa agcttatataa gtactttgtt tcaaaatggg tcaatcgaga	2940

[0023]	atatcgtaa ctgtttacta aaaatcagtt tcgtcaagca atgaaacacg ccaaagtaaa	3000
	caatttaagt accattactt atgagcaagt attgtcttatt tttaatagtt atctattatt	3060
	taacgggagg aaataattct atgagtcgct ttttaaatt tgaaaagttt cacgttacta	3120
	aagggaatgg agaccggggt cgacccttca atagagttct taacgttaat ccgaaaaaaa	3180
	ctaacgttaa tattaaaaaa taagatccgc ttgtgaatta tgtataattt gattagacta	3240
	aagaatagga gaaagtatga tgatatttaa aaaactttct cgttaagata gtttgttgg	3300
	gagcatgtta tatacggatg tatcggttcc cttaatgcaaa aattttgtt cttatcttatt	3360
	aattttctta ttatatacat atattcaaag aaagataaca tttaaacggta tcattttaga	3420
	tattttataa gcgatttattt tttcaatattt atatctgttt atttcagatg cgtcattact	3480
	tgtatggta ttaatgcgt tagggtggca ttttcatcaa caaaaagaaaa ataagataaaa	3540
	aacgactgat acagctaatt taattctaat tattcgatc cagttattgt tagttcggt	3600
	tgggactatt attagtcgt ttaccatatc gattatcaaa agtgatttca gccaaaatat	3660
	attgaacaat agtgcacacag atataacttt attaggtatt ttcttgctg ttttatttga	3720
	cggcttggc ttttatattt tgaagaataa gcggactgaa ttacaacatt taaatcaaga	3780
	aatcattgaa ttttcgttag aaaaacaata ttttatattt atatttattt tatttatagt	3840
	aatagaaattt atttttagcag ttggaaatct tcaaggagta acagccacga tattttaac	3900
	cattatcatt attttttgtg tccttatcg gatgactttt tggcaagtga tgctttttt	3960
	gaaggcttat tcgattcgcc aagaagccaa tgaccaattt gtccggaaatc aacaacttca	4020
	agattatcta gtcaatatcg aacagcagta caccgaatta cggcgatttta agcatgatta	4080
	tcaaaaacatc ttattatcgt tggagagttt tgccgaaaag ggcgatcagc aacagttaa	4140
	ggcgtattac caagaattat tagcacaacg gccaattcaa agtgaatcc aagggcagt	4200
	cattgcacaa ctgcactact taaaaatga tcctattcga ggattagtca ttcaaaatgtt	4260
	tttggcagcc aaacaggctg gtgttacttt aaaattcgaa atgaccgaac caatcgaatt	4320
	agcaaccgct aatctattaa cggttattcg gattatcggt attttattag acaatgcgt	4380
	tgaacaagcc gttcaagaaa ccgatcaatt ggtgagttgt gctttcttac aatctgtatgg	4440
	ttaatcgaa attacgatttggaaaatacggc cagtcaagtt aagaatctcc aagcattttc	4500
	agagtttaggc tattcaacga aaggcgctgg tcggggact ggtttagcta atgtgcagga	4560
	tttgattgcc aaacaaacca atttattctt agaaaacacag attgaaaata gaaagttacg	4620

acagacattt	atgattacgg	aggaaactta	atttgatcc	cgttatata	ttagaggatg	4680	
atttacagca	acaagcgatt	tatcagcaaa	ttatcgcgaa	tacgattatg	attaacgaat	4740	
ttgcaatgac	tttaacatgc	gctgccagt	atactgagac	attgttggcg	gcaattaagg	4800	
atcagcaacg	aggtttattc	ttttggata	tggaaattga	ggataaccgc	caagccggtt	4860	
tagaagtggc	aactaagatt	cggcagatga	tgccgttgc	gcaaattgtc	ttcattacaa	4920	
cccacgagga	actgacatta	ttaacgttag	aacgaaaaat	agcgcctta	gattacattc	4980	
tcaaggacca	aacaatggct	gaaatcaaaa	ggcaattgtat	tgtatgtcta	ttgttagctg	5040	
agaagcaaaa	cgaggcggca	gcgtatcacc	gagaaaattt	atttagttat	aaaataggtc	5100	
ctcgctttt	ctcattacca	ttaaaggaag	ttgttattt	atatactgaa	aaagaaaaatc	5160	
cgggtcatat	taatttgtt	gccgttacca	gaaaggttac	tttccagga	aatttaaatg	5220	
cgctgaaagc	ccaatatcca	atgctttc	ggtgtgataa	aagttactta	gttaacctat	5280	
ctaataattgc	caattatgac	agtaaaacac	ggagttaaa	attttagat	ggcagtgagg	5340	
caaaagtctc	gttccggaaa	tcacggAAC	tagtggccaa	attaaaacaa	atgatgtagc	5400	
gcctgcaggc	acgccaaatg	atcccagtaa	aaagccaccc	gcatggcggg	tggctttta	5460	
[0024]	ttagccctag	aaggcTTCC	cacacgcatt	tcagccctt	agtgccttag	tttgtgaatc	5520
	ataggtggta	tagcccgaa	ataccgtct	aaggaattgt	cagataggcc	taatgactgg	5580
	ctttataat	atgagataat	gccgactgta	cttttacag	tcggtttct	aatgtcacta	5640
	acctgccccg	ttagttgaag	aaggTTTTA	tattacagct	ccagatctac	cggTTTAAATT	5700
	tgaaaattga	tattacgTT	taacagttaa	attaatacgt	taataatttt	tttgtcttta	5760
	aatagggatt	tgaagcataa	tgggttata	gcgtacttag	ctggccagca	tatatgtatt	5820
	ctataaaata	ctattacaag	gagattttag	cc atg gta cgt cct gta gaa acc			5873
				Met Val Arg Pro Val Glu Thr			
			1		5		
	cca acc cgt gaa atc aaa aaa ctc gac ggc ctg tgg gca ttc agt ctg						5921
	Pro Thr Arg Glu Ile Lys Lys Leu Asp Gly Leu Trp Ala Phe Ser Leu						
	10	15	20				
	gat cgc gaa aac tgt gga att gat cag cgt tgg tgg gaa agc gcg tta						5969
	Asp Arg Glu Asn Cys Gly Ile Asp Gln Arg Trp Trp Glu Ser Ala Leu						
	25	30	35				
	caa gaa agc cgg gca att gct gtg cca ggc agt ttt aac gat cag ttc						6017
	Gln Glu Ser Arg Ala Ile Ala Val Pro Gly Ser Phe Asn Asp Gln Phe						
	40	45	50	55			
	gcc gat gca gat att cgt aat tat gcg ggc aac gtc tgg tat cag cgc						6065

	Ala Asp Ala Asp Ile Arg Asn Tyr Ala Gly Asn Val Trp Tyr Gln Arg	60	65	70	
	gaa gtc ttt ata ccg aaa ggt tgg gca ggc cag cgt atc gtc ctg cgt Glu Val Phe Ile Pro Lys Gly Trp Ala Gly Gln Arg Ile Val Leu Arg	75	80	85	6113
	ttc gat gcg gtc act cat tac ggc aaa gtg tgg gtc aat aat cag gaa Phe Asp Ala Val Thr His Tyr Gly Lys Val Trp Val Asn Asn Gln Glu	90	95	100	6161
	gtg atg gag cat cag ggc ggc tat acg cca ttt gaa gcc gat gtc acg Val Met Glu His Gln Gly Gly Tyr Thr Pro Phe Glu Ala Asp Val Thr	105	110	115	6209
	ccg tat gtt att gcc ggg aaa agt gta cgt atc acc gtt tgt gtg aac Pro Tyr Val Ile Ala Gly Lys Ser Val Arg Ile Thr Val Cys Val Asn	120	125	130	6257
	aac gaa ctg aac tgg cag act atc ccg ccg gga atg gtg att acc gac Asn Glu Leu Asn Trp Gln Thr Ile Pro Pro Gly Met Val Ile Thr Asp	140	145	150	6305
	gaa aac ggc aag aaa aag cag tct tac ttc cat gat ttc ttt aac tat Glu Asn Gly Lys Lys Gln Ser Tyr Phe His Asp Phe Phe Asn Tyr	155	160	165	6353
[0025]	gcc gga atc cat cgc agc gta atg ctc tac acc acg ccg aac acc tgg Ala Gly Ile His Arg Ser Val Met Leu Tyr Thr Thr Pro Asn Thr Trp	170	175	180	6401
	gtg gac gat atc acc gtg gtg acg cat gtc gcg caa gac tgt aac cac Val Asp Asp Ile Thr Val Val Thr His Val Ala Gln Asp Cys Asn His	185	190	195	6449
	gcg tct gtt gac tgg cag gtg gtg gcc aat ggt gat gtc agc gtt gaa Ala Ser Val Asp Trp Gln Val Val Ala Asn Gly Asp Val Ser Val Glu	200	205	210	6497
	ctg cgt gat gcg gat caa cag gtg gtt gca act gga caa ggc act agc Leu Arg Asp Ala Asp Gln Gln Val Val Ala Thr Gly Gln Gly Thr Ser	220	225	230	6545
	ggg act ttg caa gtg gtg aat ccg cac ctc tgg caa ccg ggt gaa ggt Gly Thr Leu Gln Val Val Asn Pro His Leu Trp Gln Pro Gly Glu Gly	235	240	245	6593
	tat ctc tat gaa ctg tgc gtc aca gcc aaa agc cag aca gag tgt gat Tyr Leu Tyr Glu Leu Cys Val Thr Ala Lys Ser Gln Thr Glu Cys Asp	250	255	260	6641
	atc tac ccg ctt cgc gtc ggc atc ccg tca gtg gca gtg aag ggc gaa Ile Tyr Pro Leu Arg Val Gly Ile Arg Ser Val Ala Val Lys Gly Glu	265	270	275	6689
	cag ttc ctg att aac cac aaa ccg ttc tac ttt act ggc ttt ggt cgt Gln Phe Leu Ile Asn His Lys Pro Phe Tyr Phe Thr Gly Phe Gly Arg				6737

280	285	290	295	
cat gaa gat gcg gac ttg cgt ggc aaa gga ttc gat aac gtg ctg atg His Glu Asp Ala Asp Leu Arg Gly Lys Gly Phe Asp Asn Val Leu Met 300		305		6785
gtg cac gac cac gca tta atg gac tgg att ggg gcc aac tcc tac cgt Val His Asp His Ala Leu Met Asp Trp Ile Gly Ala Asn Ser Tyr Arg 315		320		6833
acc tcg cat tac cct tac gct gaa gag atg ctc gac tgg gca gat gaa Thr Ser His Tyr Pro Tyr Ala Glu Glu Met Leu Asp Trp Ala Asp Glu 330		335		6881
cat ggc atc gtg gtg att gat gaa act gct gtc ggc ttt aac ctc His Gly Ile Val Val Ile Asp Glu Thr Ala Ala Val Gly Phe Asn Leu 345		350		6929
tct tta ggc att ggt ttc gaa gcg ggc aac aag ccg aaa gaa ctg tac Ser Leu Gly Ile Gly Phe Glu Ala Gly Asn Lys Pro Lys Glu Leu Tyr 360		365		6977
agc gaa gag gca gtc aac ggg gaa act cag caa gcg cac tta cag gcg Ser Glu Glu Ala Val Asn Gly Glu Thr Gln Gln Ala His Leu Gln Ala 380		385		7025
att aaa gag ctg ata gcg cgt gac aaa aac cac cca agc gtg gtg atg Ile Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asp Lys Asn His Pro Ser Val Val Met [0026] 395		400		7073
tgg agt att gcc aac gaa ccg gat acc cgt ccg caa ggt gca cg gaa Trp Ser Ile Ala Asn Glu Pro Asp Thr Arg Pro Gln Gly Ala Arg Glu 410		415		7121
tat ttc gcg cca ctg gcg gaa gca acg cgt aaa ctc gac ccg acg cgt Tyr Phe Ala Pro Leu Ala Glu Ala Thr Arg Lys Leu Asp Pro Thr Arg 425		430		7169
ccg atc acc tgc aat gta atg ttc tgc gac gct cac acc gat acc Pro Ile Thr Cys Val Asn Val Met Phe Cys Asp Ala His Thr Asp Thr 440		445		7217
atc agc gat ctc ttt gat gtg ctg tgc ctg aac cgt tat tac gga tgg Ile Ser Asp Leu Phe Asp Val Leu Cys Leu Asn Arg Tyr Tyr Gly Trp 460		465		7265
tat gtc caa agc ggc gat ttg gaa acg gca gag aag gta ctg gaa aaa Tyr Val Gln Ser Gly Asp Leu Glu Thr Ala Glu Lys Val Leu Glu Lys 475		480		7313
gaa ctt ctg gcc tgg cag gag aaa ctg cat cag ccg att atc atc acc Glu Leu Leu Ala Trp Gln Glu Lys Leu His Gln Pro Ile Ile Thr 490		495		7361
gaa tac ggc gtg gat acg tta gcc ggg ctg cac tca atg tac acc gac Glu Tyr Gly Val Asp Thr Leu Ala Gly Leu His Ser Met Tyr Thr Asp 505		510		7409
		515		

atg tgg agt gaa gag tat cag tgt gca tgg ctg gat atg tat cac cgc Met Trp Ser Glu Glu Tyr Gln Cys Ala Trp Leu Asp Met Tyr His Arg 520 525 530 535	7457
gtc ttt gat cgc gtc agc gcc gtc ggt gaa cag gta tgg aat ttc Val Phe Asp Arg Val Ser Ala Val Val Gly Glu Gln Val Trp Asn Phe 540 545 550	7505
gcc gat ttt gcg acc tcg caa ggc ata ttg cgc gtt ggc ggt aac aag Ala Asp Phe Ala Thr Ser Gln Gly Ile Leu Arg Val Gly Gly Asn Lys 555 560 565	7553
aaa ggg atc ttc act cgc gac cgc aaa ccg aag tcg gcg gct ttt ctg Lys Gly Ile Phe Thr Arg Asp Arg Lys Pro Lys Ser Ala Ala Phe Leu 570 575 580	7601
ctg caa aaa cgc tgg act ggc atg aac ttc ggt gaa aaa ccg cag gga Leu Gln Lys Arg Trp Thr Gly Met Asn Phe Gly Glu Lys Pro Gln Gly 585 590 595	7649
ggc aaa caa tgatcttagac tcgag Gly Lys Gln 600	7673
[0027] <210> 21 <211> 602 <212> PRT <213> 人工	
<220> <223> 合成的构建体	
<400> 21	
Met Val Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Arg Glu Ile Lys Lys Leu Asp 1 5 10 15	
Gly Leu Trp Ala Phe Ser Leu Asp Arg Glu Asn Cys Gly Ile Asp Gln 20 25 30	
Arg Trp Trp Glu Ser Ala Leu Gln Glu Ser Arg Ala Ile Ala Val Pro 35 40 45	
Gly Ser Phe Asn Asp Gln Phe Ala Asp Ala Asp Ile Arg Asn Tyr Ala 50 55 60	
Gly Asn Val Trp Tyr Gln Arg Glu Val Phe Ile Pro Lys Gly Trp Ala 65 70 75 80	
Gly Gln Arg Ile Val Leu Arg Phe Asp Ala Val Thr His Tyr Gly Lys	

85

90

95

Val Trp Val Asn Asn Gln Glu Val Met Glu His Gln Gly Gly Tyr Thr
 100 105 110

Pro Phe Glu Ala Asp Val Thr Pro Tyr Val Ile Ala Gly Lys Ser Val
 115 120 125

Arg Ile Thr Val Cys Val Asn Asn Glu Leu Asn Trp Gln Thr Ile Pro
 130 135 140

Pro Gly Met Val Ile Thr Asp Glu Asn Gly Lys Lys Lys Gln Ser Tyr
 145 150 155 160

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

Tyr Thr Thr Pro Asn Thr Trp Val Asp Asp Ile Thr Val Val Thr His
 180 185 190

Val Ala Gln Asp Cys Asn His Ala Ser Val Asp Trp Gln Val Val Ala
 [0028] 195 200 205

Asn Gly Asp Val Ser Val Glu Leu Arg Asp Ala Asp Gln Gln Val Val
 210 215 220

Ala Thr Gly Gln Gly Thr Ser Gly Thr Leu Gln Val Val Asn Pro His
 225 230 235 240

Leu Trp Gln Pro Gly Glu Gly Tyr Leu Tyr Glu Leu Cys Val Thr Ala
 245 250 255

Lys Ser Gln Thr Glu Cys Asp Ile Tyr Pro Leu Arg Val Gly Ile Arg
 260 265 270

Ser Val Ala Val Lys Gly Glu Gln Phe Leu Ile Asn His Lys Pro Phe
 275 280 285

Tyr Phe Thr Gly Phe Gly Arg His Glu Asp Ala Asp Leu Arg Gly Lys
 290 295 300

Gly Phe Asp Asn Val Leu Met Val His Asp His Ala Leu Met Asp Trp
 305 310 315 320

Ile Gly Ala Asn Ser Tyr Arg Thr Ser His Tyr Pro Tyr Ala Glu Glu
 325 330 335

Met Leu Asp Trp Ala Asp Glu His Gly Ile Val Val Ile Asp Glu Thr
 340 345 350

Ala Ala Val Gly Phe Asn Leu Ser Leu Gly Ile Gly Phe Glu Ala Gly
 355 360 365

Asn Lys Pro Lys Glu Leu Tyr Ser Glu Glu Ala Val Asn Gly Glu Thr
 370 375 380

Gln Gln Ala His Leu Gln Ala Ile Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asp Lys
 385 390 395 400

Asn His Pro Ser Val Val Met Trp Ser Ile Ala Asn Glu Pro Asp Thr
 405 410 415

Arg Pro Gln Gly Ala Arg Glu Tyr Phe Ala Pro Leu Ala Glu Ala Thr
 420 425 430

[0029]

Arg Lys Leu Asp Pro Thr Arg Pro Ile Thr Cys Val Asn Val Met Phe
 435 440 445

Cys Asp Ala His Thr Asp Thr Ile Ser Asp Leu Phe Asp Val Leu Cys
 450 455 460

Leu Asn Arg Tyr Tyr Gly Trp Tyr Val Gln Ser Gly Asp Leu Glu Thr
 465 470 475 480

Ala Glu Lys Val Leu Glu Lys Glu Leu Leu Ala Trp Gln Glu Lys Leu
 485 490 495

His Gln Pro Ile Ile Thr Glu Tyr Gly Val Asp Thr Leu Ala Gly
 500 505 510

Leu His Ser Met Tyr Thr Asp Met Trp Ser Glu Glu Tyr Gln Cys Ala
 515 520 525

Trp Leu Asp Met Tyr His Arg Val Phe Asp Arg Val Ser Ala Val Val
 530 535 540

Gly	Glu	Gln	Val	Trp	Asn	Phe	Ala	Asp	Phe	Ala	Thr	Ser	Gln	Gly	Ile
545					550					555					560
Leu	Arg	Val	Gly	Gly	Asn	Lys	Lys	Gly	Ile	Phe	Thr	Arg	Asp	Arg	Lys
					565					570					575
Pro	Lys	Ser	Ala	Ala	Phe	Leu	Leu	Gln	Lys	Arg	Trp	Thr	Gly	Met	Asn
						580			585					590	
Phe	Gly	Glu	Lys	Pro	Gln	Gly	Gly	Lys	Gln						
					595					600					
<210>	22														
<211>	22														
<212>	DNA														
<213>	人工														
<220>															
<223>	PCR 引物														
<400>	22														
gcagccttaaa cagtccggcac ct															22
[0030]															
<210>	23														
<211>	23														
<212>	DNA														
<213>	人工														
<220>															
<223>	PCR 引物														
<400>	23														
acgtgcaaca atctgcaaag cac															23
<210>	24														
<211>	2999														
<212>	DNA														
<213>	人工														
<220>															
<223>	pVAX 载体														
<400>	24														
gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta															60
atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata															120
acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgccccat tgacgtcaat															180
aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggacttgc cattgacgtc aatgggtgga															240

[0031]	ctatttacgg taaaactgccc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc	300
	ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccaagt acatgaccctt	360
	atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgcttata ccatggtgat	420
	gcggttttgg cagtacatca atggcgtgg atagcggtt gactcacggg gatttccaag	480
	tctccacccc attgacgtca atggaggttt gtttggcac caaaatcaac gggactttcc	540
	aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaattggc ggtaggcgtg tacggtgga	600
	ggtctatata agcagagctc tctggcta ac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga	660
	aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaact taagcttggt	720
	accgagctcg gatccactag tccagtgtgg tggattctg cagatatcca gcacagtggc	780
	ggccgctcga gtcttagaggg cccgtttaaa cccgctgatc agcctcgact gtgccttcta	840
	gtgccagcc atctgtgtt tgcccctccc ccgtgccttc ctgaccctg gaaggtgcca	900
	ctccccactgt ctttcctaa taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg agtaggtgtc	960
	attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata	1020
	gcaggcatgc tggggatgcg gtggctcta tggcttctac tggcggttt tatggacagc	1080
	aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag gttgggaagc cctgcaaagt	1140
	aaactggatg gcttcctcgc cgccaaggat ctgatggcgc agggatcaa gctctgatca	1200
	agagacagga tgaggatcgt ttgcgtatgat tgaacaagat ggattgcacg cagttctcc	1260
	ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactggca caacagacaa tcggctgctc	1320
	tgtgccgccc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcggc gttcttttg tcaagaccga	1380
	cctgtccggc gccctgaatg aactgcaaga cgaggcagcg cggttatcgt ggctggccac	1440
	gacggcggtt cttgcgcag ctgtgctga cggtgtcact gaagcggaa gggactggct	1500
	gctattggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct cacttgctc ctgccgagaa	1560
	agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgccc	1620
	attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt actcgatgg aagccggct	1680
	tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcagggctc gcggcagccg aactgttcgc	1740
	caggctcaag gcgagcatgc ccgacggcga ggatctcgatc gtgaccctatg gcatgcctg	1800
	cttgcgaat atcatggtgg aaaatggccg ctttctgga ttcatcgact gtggccggct	1860
	gggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct	1920

tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcggt gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca	1980
gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga attattaacg cttacaattt	2040
cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggatt tcacaccgca tacaggtggc	2100
acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccctt atttgtttat ttttctaaat acattcaaata	2160
atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatagca cgtgctaaaa	2220
cttcattttt aatttaaaag gatctaggta aagatcctt ttgataatct catgaccaaaa	2280
atcccttaac gtgagtttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga	2340
tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccc	2400
ctaccagcgg tggtttgtt gccggatcaa gagctaccaa ctcttttcc gaaggtaact	2460
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtcctttag tgtagccgta gttaggccac	2520
cacttcaaga actctgttagc accgcctaca tacctcgctc tgctaattct gttaccagt	2580
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg	2640
gataaggcgc agcggcggg ctgaacgggg ggttcgtca cacagcccac cttggagcga	2700
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaagcgc cacgcttccc	2760
[0032] gaagggagaa aggccggacag gatatcggtt agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg	2820
agggagcttc cagggggaaa cgcctggat cttagatgc ctgtcgggtt tcgccaccc	2880
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcagggggc ggagcctatg gaaaaacgc	2940
agcaacgcgg ccttttacg gttcctggc tttgctggc ctggctca catgttctt	2999
<210> 25	
<211> 347	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 插入片段	
<400> 25	
gttagcatgg acgccaaggt cgtcgccgtg ctggccctgg tgctggccgc gctctgcata	60
agtgacggta aaccagttag cctgagctac cgatgcccct gccgggttctt cgagagccac	120
atcgccagag ccaacgtcaa gcatctgaaa atcctcaaca ctccaaactg tgcccttcag	180
attgttgacac ggctgaagaa caacaacaga caagtgtgca ttgacccgaa attaaagtgg	240
atccaagagt acctggagaa agccttaaac aagggtatcg gtgccacgaa cttctctctg	300
ttaaagcaag caggagacgt ggaagaaaac cccggccccaa aaagctt	347

<210>	26					
<211>	5395					
<212>	DNA					
<213>	人工					
<220>						
<223>	载体					
<400>	26					
gactcttcgc	gatgtacggg	ccagatatac	gcgttgacat	tgattattga	ctagttatta	60
atagtaatca	attacgggt	cattagttca	tagccatat	atggagttcc	gcgttacata	120
acttacggta	aatggcccgc	ctggctgacc	gcccaacgac	ccccgcccatt	tgacgtcaat	180
aatgacgtat	gttcccatag	taacgccaat	agggacttcc	cattgacgtc	aatgggtgga	240
ctatttacgg	taaaactgccc	acttggcagt	acatcaagtg	tatcatatgc	caagtacgcc	300
ccctattgac	gtcaatgacg	gtaaatggcc	cgcctggcat	tatgcccagt	acatgacacctt	360
atgggacttt	cctacttggc	agtacatcta	cgtatttagtc	atcgcttatt	ccatggtgat	420
gcggtttgg	cagtacatca	atggcggtgg	atagcggttt	gactcacggg	gatttccaag	480
[0033]	tctccacccc	attgacgtca	atgggagttt	gttttggcac	caaaatcaac	gggactttcc
aaaatgtcgt	aacaactccg	ccccattgac	gcaaattggc	ggtaggcgtg	tacggtgggaa	540
ggtctatata	agcagagctc	tctggctaac	tagagaaccc	actgcttact	ggcttatcga	600
aattaatacg	actcactata	gggagaccca	agctggctag	cgtttaact	taagcttcgc	660
caccatggag	agcgacgaga	gccccctgcc	cgcattggag	atcgagtgcc	gcatcaccgg	720
caccctgaac	ggcgtggagt	tcgagctgg	ggcgccggaa	gagggcaccc	ccaagcagg	780
ccgcatgacc	aacaagatga	agagcaccaa	aggcgccctg	accttcagecc	cctacctgct	840
gagccacgt	atggcgtacg	gcttctacca	cttcggcacc	tacccagcg	gctacgagaa	900
cccccctctg	cacgcatca	acaacggcgg	ctacaccaac	acccgcac	agaagtacga	960
ggacggcggc	gtgctgcacg	ttagcttcag	ctaccgctgc	gaggccggcc	gcgtgatcg	1020
cgacttcaag	gtgggtggca	ccggcttccc	cgaggacagc	gtgatcttca	ccgacaagat	1080
catccgcagc	aacgccaccg	tggagcacct	gcaccccatg	ggcgataacg	tgctggtg	1140
cagcttcgccc	cgcacccatca	gcctgcgcga	cggcggtac	cacagcttcg	tggtggacaa	1200
ccacatgcac	ttcaagagcg	ccatccaccc	cagcatcctg	cagaacgggg	gccccatgtt	1260
cgccttcgccc	cgcgtggagg	agctgcacag	caacaccgag	ctggcgtac	tggagtgacca	1320
						1380

gcacgccttc aagaccrrrra tcgccttcgc cagatccgc gctcagtctgtt ccaattctgc	1440
cgtggacggc accggccggac ccggctccac cgatctcgcc gagggcagag gaagtcttct	1500
aacatgcggt gacgtggagg agaatcccgg ccctatggaa gatccaaaaa acattaagaa	1560
gggcccagcg ccattctacc cactgaaga cgggaccgcc ggcgagcagc tgcacaaagc	1620
catgaagcgc tacgccctgg tgccggcac catgccttt accgacgcac atatcgaggt	1680
ggacattacc tacgcccagt acttcgagat gagcgttcgg ctggcagaag ctatgaagcg	1740
ctatggctg aatacaaacc atcggatcgt ggtgtgcagc gagaatagct tgcagtttt	1800
catgcccgtg ttgggtgccc tttcatcggttgtggctgtg gcccccagcta acgacatcta	1860
caacgagcgc gagctgctga acagcatggg catcagccag cccaccgtcg tattcgttag	1920
caagaaaggctgcaaaaaga tcctcaacgt gcaaaaagaag ctaccgatca tacaaaagat	1980
catcatcatg gatagcaaga ccgactacca gggcttccaa agcatgtaca cttcgtgac	2040
ttcccatatttgcacccggct tcaacgagta cgacttcgtg cccgagagct tcgaccggga	2100
caaaaccatc gccctgatca tgaacagtag tggcagtacc ggattgccc agggcgttagc	2160
cctaccgcac cgacccgctt gtgtccgatt cagtcatgcc cgcacccca tcttcggcaa	2220
[0034] ccagatcatc cccgacacccg ctatcctcag cgtggtgcca tttcaccacg gcttcggcat	2280
gttcaccacg ctgggctact tgcgtcggtttcgggtc gtgcgtatgt accgcttcga	2340
ggaggagcta ttcttgcgca gtttgcaga ctataagatt caatctgccc tgctgggcc	2400
cacactattt agtttttcg ctaagagcac tctcatgcac aagtacgacc taagcaactt	2460
gcacgagatc gccagcggcg gggcgccgct cagcaaggag gtaggtgagg ccgtggccaa	2520
acgcttccac ctaccaggca tccgccagg ctacggctg acagaaacaa ccagcgccat	2580
tctgatcacc cccgaagggg acgacaagcc tggcgcagta ggcaagggtgg tgcccttctt	2640
cgaggctaag gtggtgact tggacaccgg taagacactg ggtgtgaacc agcgcggcga	2700
gctgtcgctc cgtggccca tgcgtcgatcg cggctacgtt aacaaccccg aggctacaaa	2760
cgctctcatc gacaaggacg gctggctgca cagcggcgac atgcctact gggacgagga	2820
cgagcacttc ttcatcggtt accggctgaa gagcctgatc aaatacaagg gctaccaggt	2880
agccccagcc gaactggaga gcacccctgct gcaacacccca aacatcttcg acgcccgggt	2940
cgccggcctg cccgacacgcg atgcccggca gctgcccggcc gcagtcgtcg tgctggaaaca	3000
cggtaaaacc atgaccgaga aggagatcgt ggactatgtg gccagccagg ttacaaccgc	3060
caagaagctg cgccgtgggtt ttgtgttcgtt ggacgagggtg cctaaaggac tgaccggcaa	3120

[0035]

gttggacgcc	cgcaagatcc	gcgagattct	cattaaggcc	aagaaggcgc	gcaagatcgc	3180
cgtgtaatct	agagggcccg	tttaaacccg	ctgatcagcc	tcgactgtgc	cttctagttg	3240
ccagccatct	gttggggcc	cctccccgt	gccttccttgc	accctggaag	gtgccactcc	3300
cactgtcctt	tcctaataaaa	atgagggaaat	tgcacatcgcat	tgtctgagta	ggtgtcattc	3360
tattctgggg	ggtgggggtgg	ggcaggacag	caagggggag	gattgggaag	acaatagcag	3420
gcatgctggg	gatgcgggtgg	gctctatggc	ttctactggg	cggttttatg	gacagcaagc	3480
gaaccggaat	tgccagctgg	ggcgccctct	ggtaagggttgc	ggaagccctg	caaagttaaac	3540
tggatggcctt	tctcgccgccc	aaggatctga	tggcgcaggg	gatcaagctc	tgatcaagag	3600
acaggatgag	gatcggttcg	catgattgaa	caagatggat	tgcacgcagg	ttctccggcc	3660
gcttgggtgg	agaggctatt	cggctatgac	tggcacaac	agacaatcgg	ctgctctgat	3720
gccgcccgtgt	tccggctgtc	agcgcagggg	cggccgggttc	ttttgtcaa	gaccgacactg	3780
tccgggtgccc	tgaatgaact	gcaagacgag	gcagcgcggc	tatcgtggct	ggccacgacg	3840
ggcggttcctt	gcmcagctgt	gctcgacgtt	gtcactgaag	cggaaaggga	ctggctgcta	3900
ttgggcgaag	tgccggggca	ggatctcctg	tcatctcacc	ttgctcctgc	cgagaaagta	3960
tccatcatgg	ctgatgcaat	gcccggctg	catacgcttgc	atccggctac	ctgcccattc	4020
gaccaccaag	cgaaacatcg	catcgagcga	gcacgtactc	ggatggaagc	cggcttgc	4080
gatcaggatg	atctggacga	agagcatcag	gggctcgccgc	cagccgaact	gttcgcccagg	4140
ctcaaggcga	gcatgcccga	cggcgaggat	ctcgctgtca	cccatggcga	tgcctgcttgc	4200
ccgaatatca	tggggaaaa	tggccgttt	tctggattca	tcgactgtgg	ccggctgggt	4260
gtggcggacc	gctatcagga	catagcggttgc	gctaccgttgc	atattgctga	agagcttggc	4320
ggcgaatggg	ctgaccgctt	cctcgctgttgc	tacggtatcg	ccgctcccgaa	ttcgcagcgc	4380
atccgccttct	atccgccttct	tgacgagttc	ttctgaatttca	ttaacgctta	caatttcctg	4440
atgcggattt	ttctcccttac	gcatctgtgc	ggtatttcac	accgcataca	ggtggcactt	4500
ttcggggaaa	tgtgcgcgga	acccttattt	gtttatTTT	ctaaatacat	tcaaataatgt	4560
atccgctcat	gagacaataa	ccctgataaa	tgcttcaata	atagcacgt	ctaaaacttc	4620
attttaattt	taaaaggatc	taggtgaaga	tccttttgc	taatctcatg	accaaaatcc	4680
cttaacgtga	gtttcggttc	cactgagcgt	cagacccgt	agaaaagatc	aaaggatctt	4740
cttggatcc	ttttttctg	cgcgtaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaaaa	ccaccgctac	4800

[0036]	cagcgggtgg tttttgcgg gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct	4860
	tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtt gccgttagtta ggccaccact	4920
	tcaagaactc tgttagcaccc cctacatacc tcgctctgct aatcctgtt ccagtggctg	4980
	ctgccagtg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata	5040
	aggcgccagcg gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca gcccagctt gagcgaacga	5100
	cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgeccacg cttcccgaag	5160
	ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg	5220
	agttccagg gggaaacgcc tggtatctt atagtcctgt cgggttcgc cacctctgac	5280
	ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca	5340
	acgcggcatt tttacggttc ctggccttt gctggccttt tgctcacatg ttctt	5395

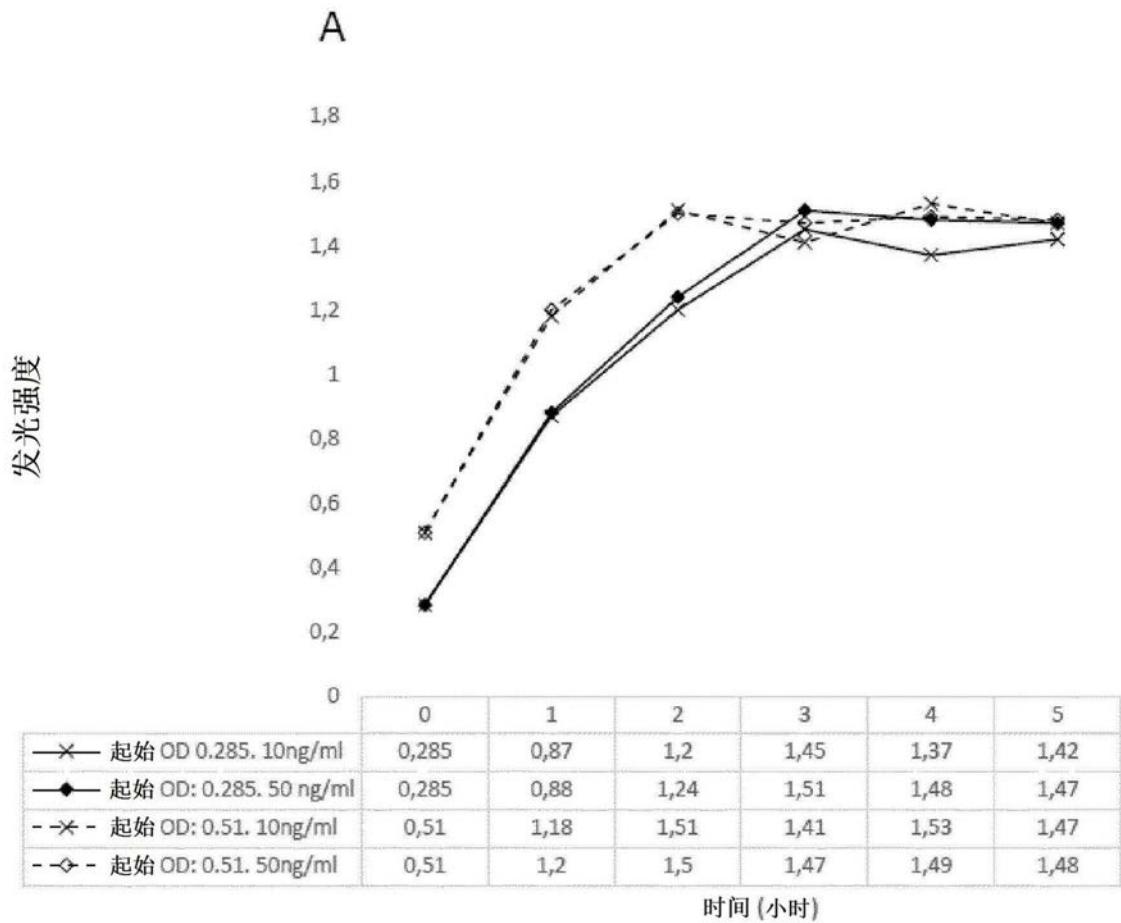


图1A

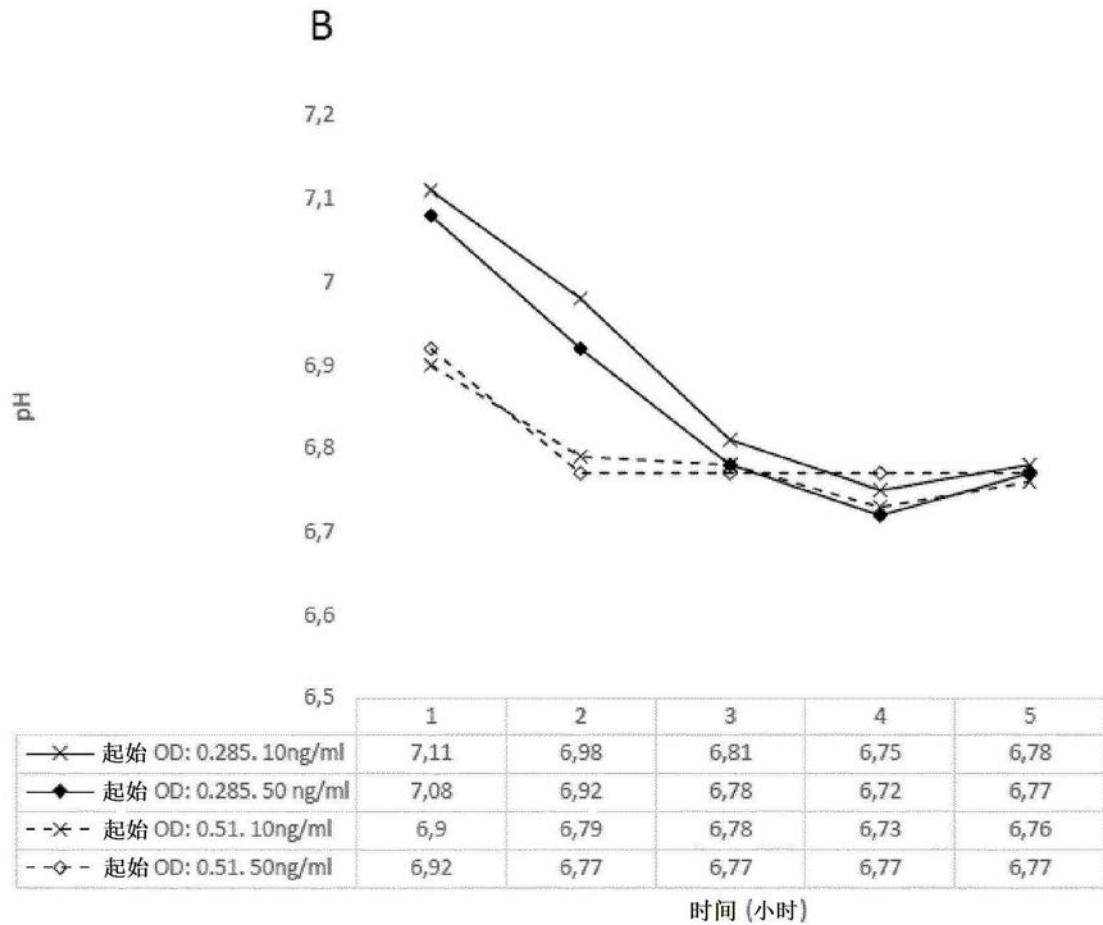


图1B

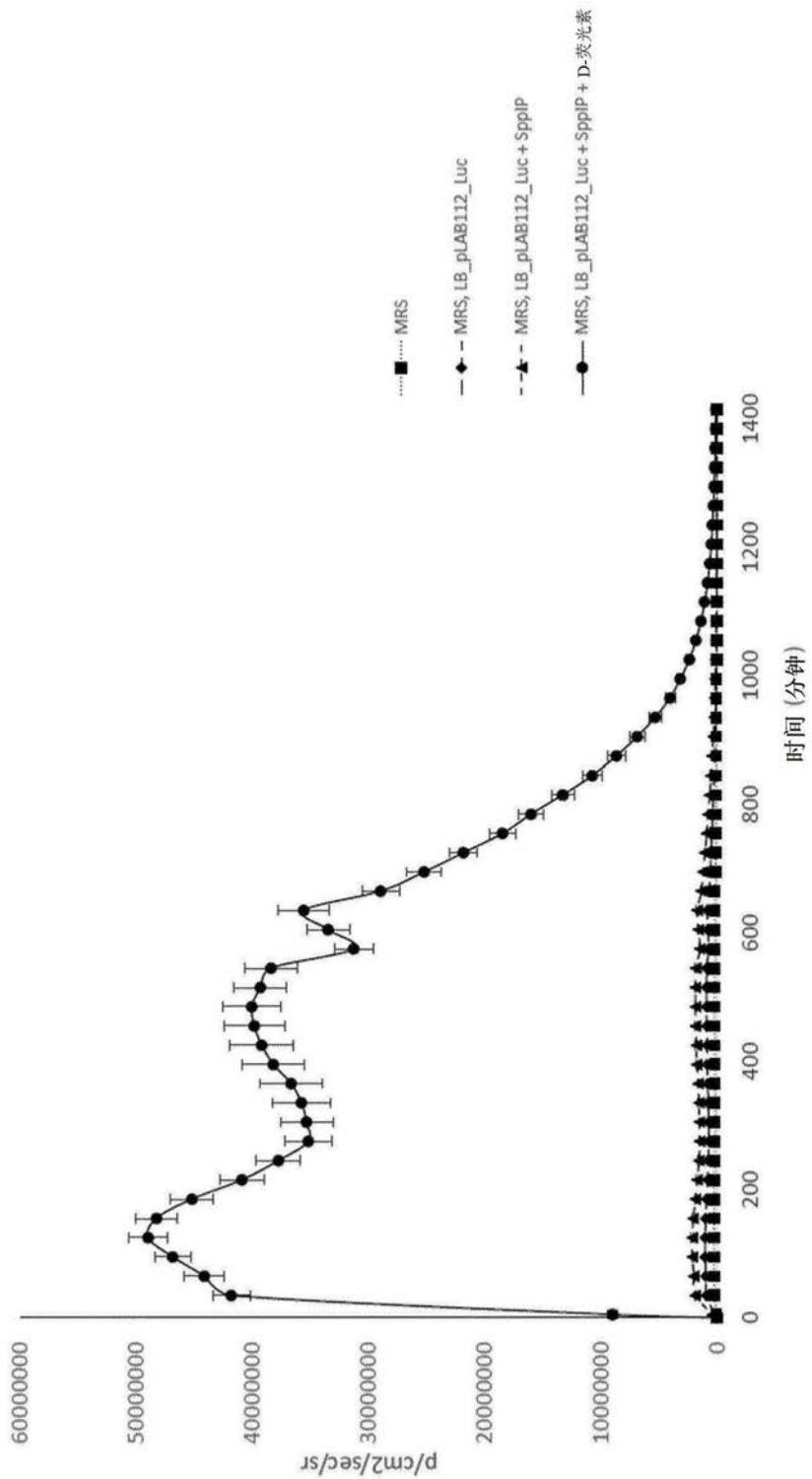


图2

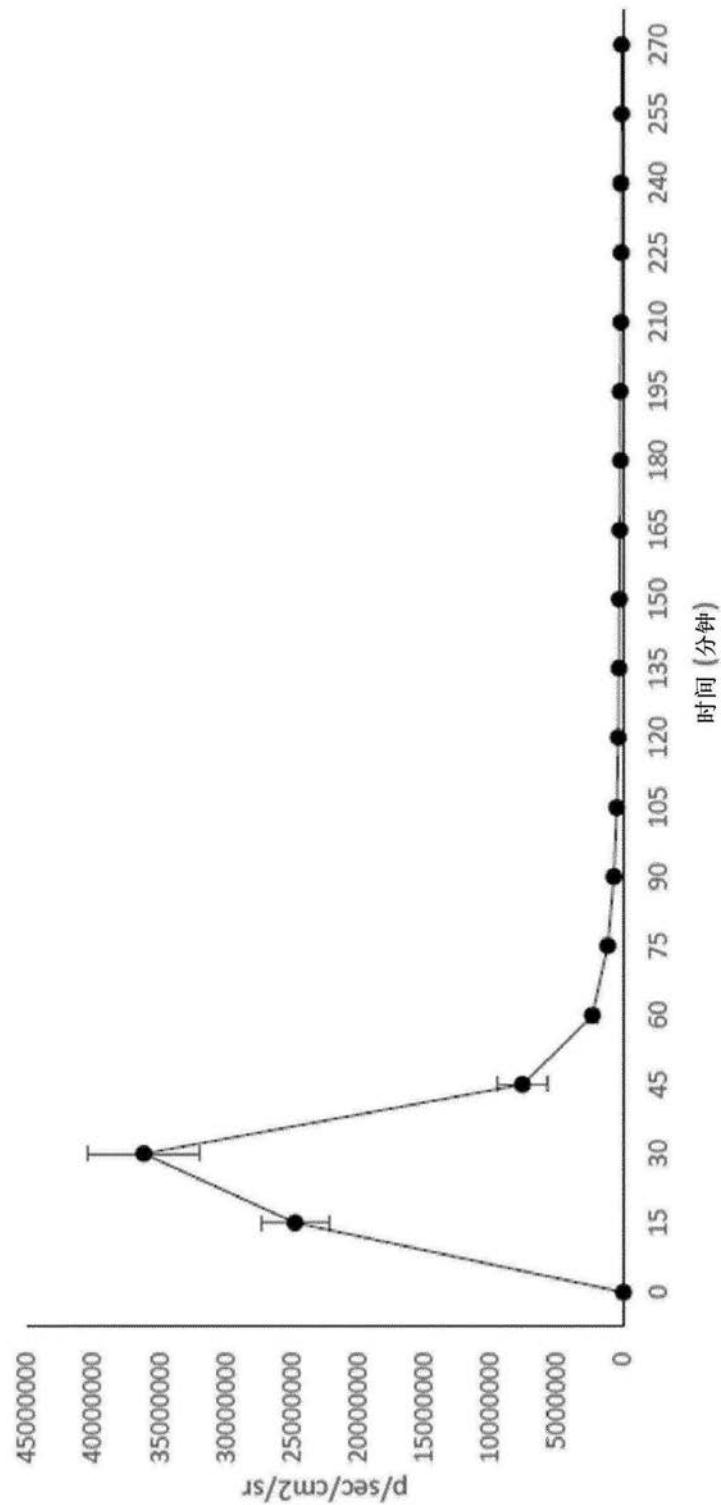


图3

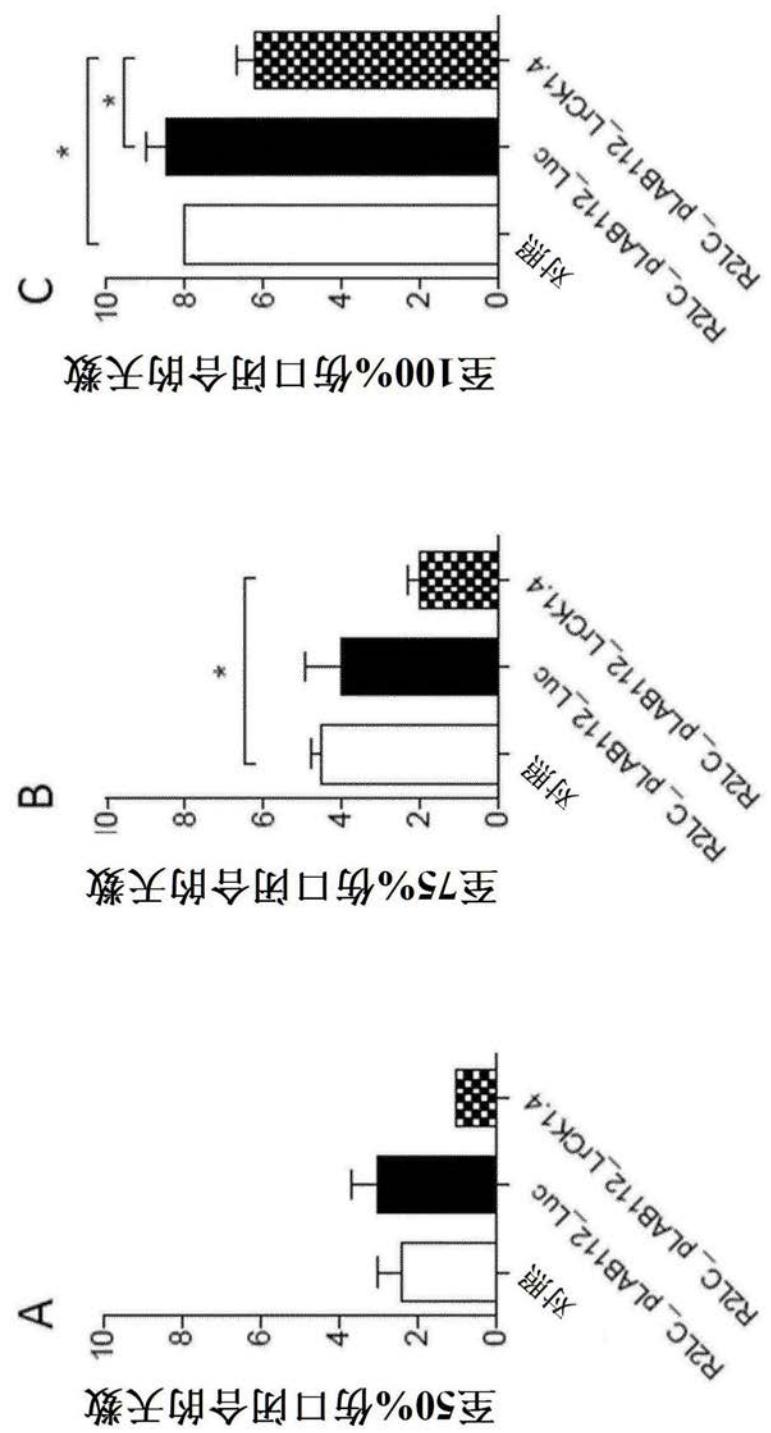


图4

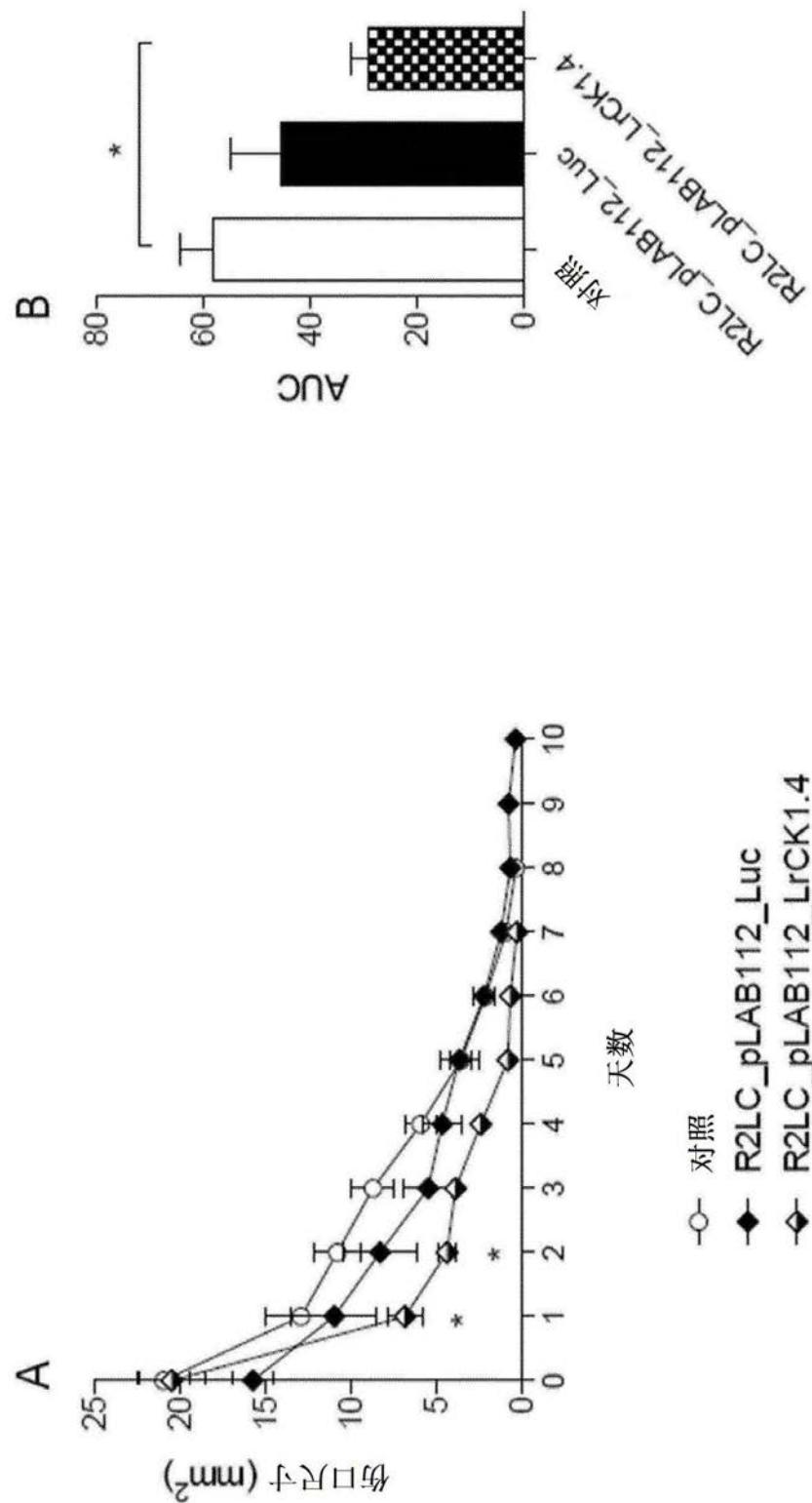


图5

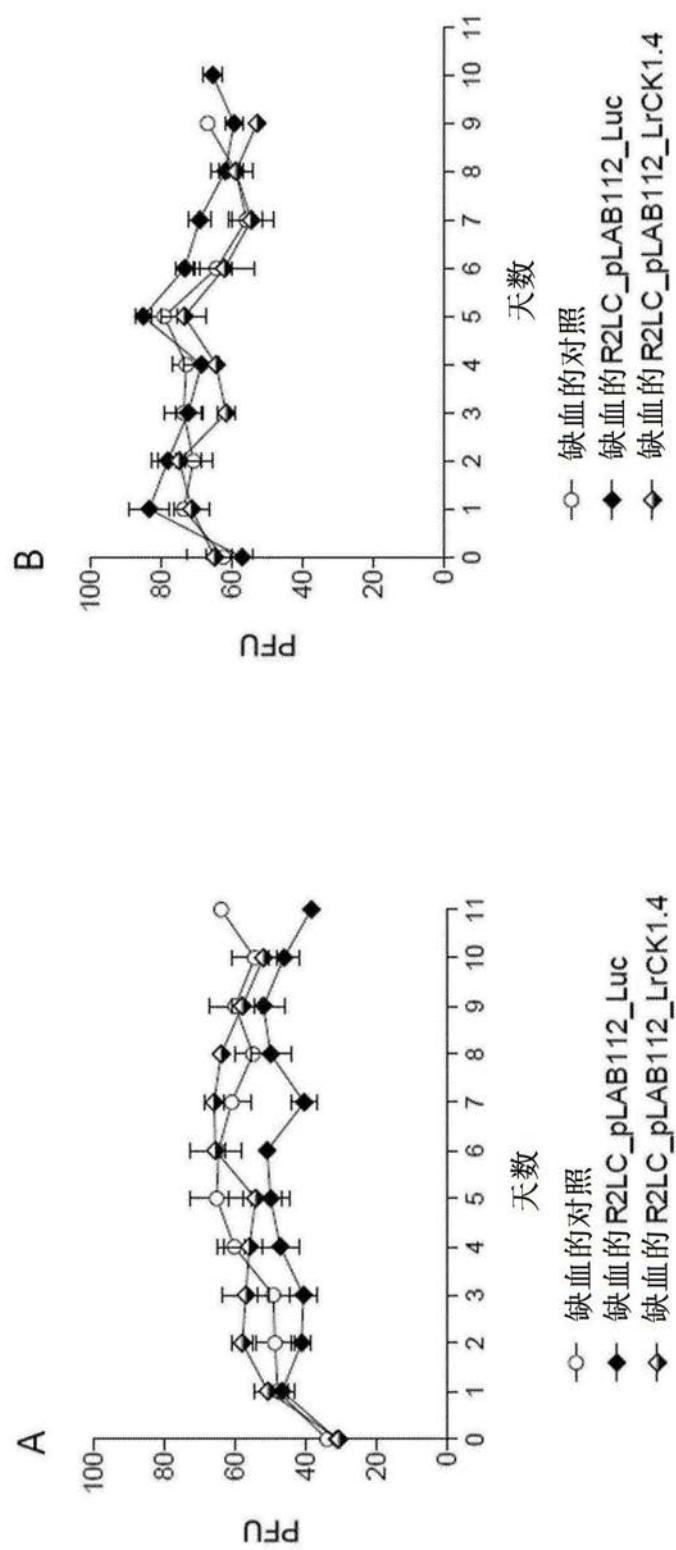


图6

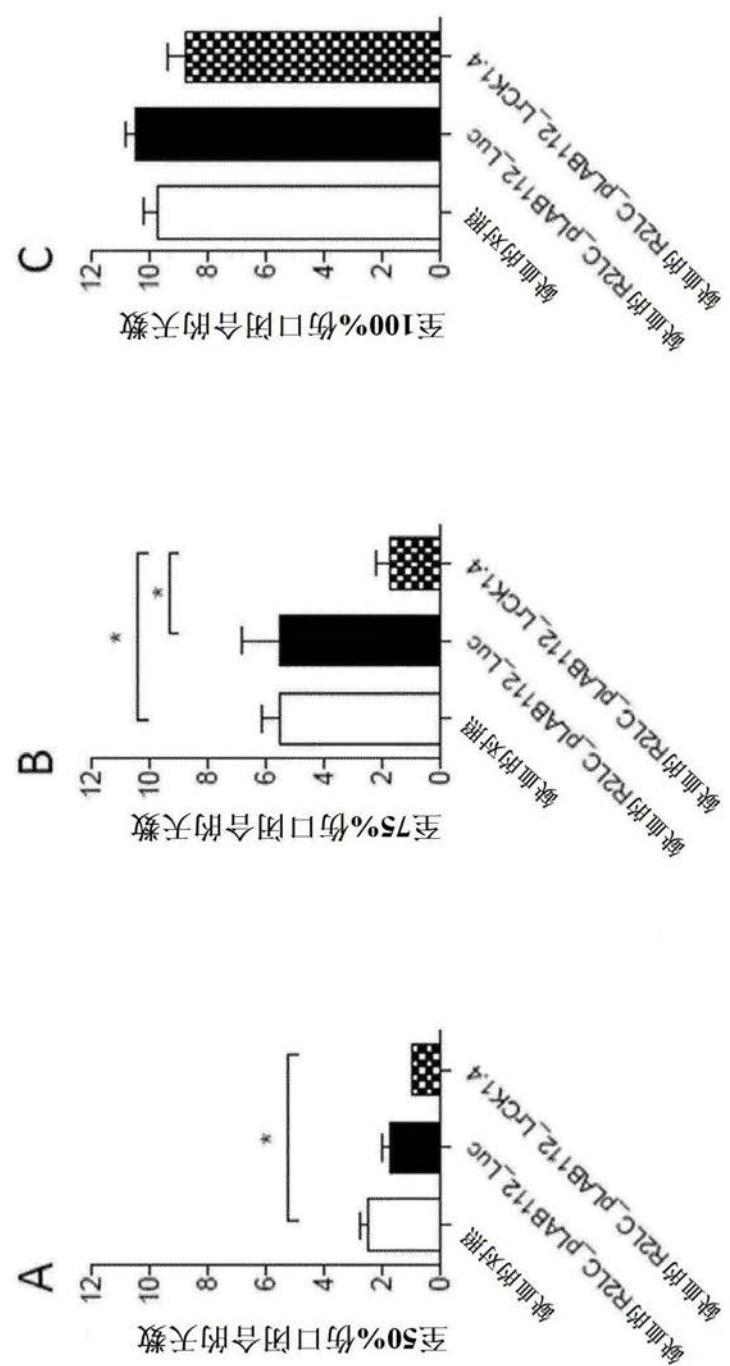


图7

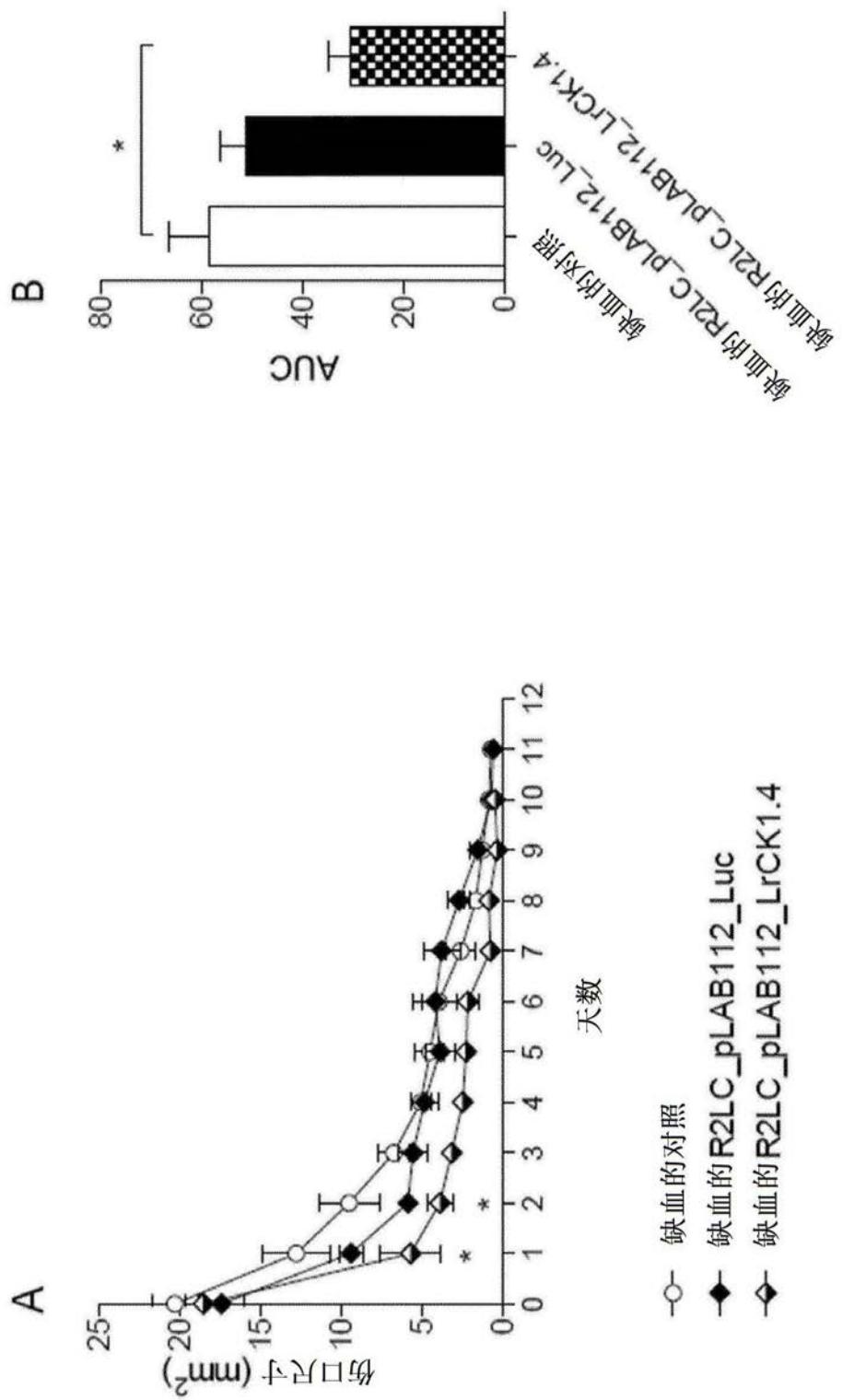


图8

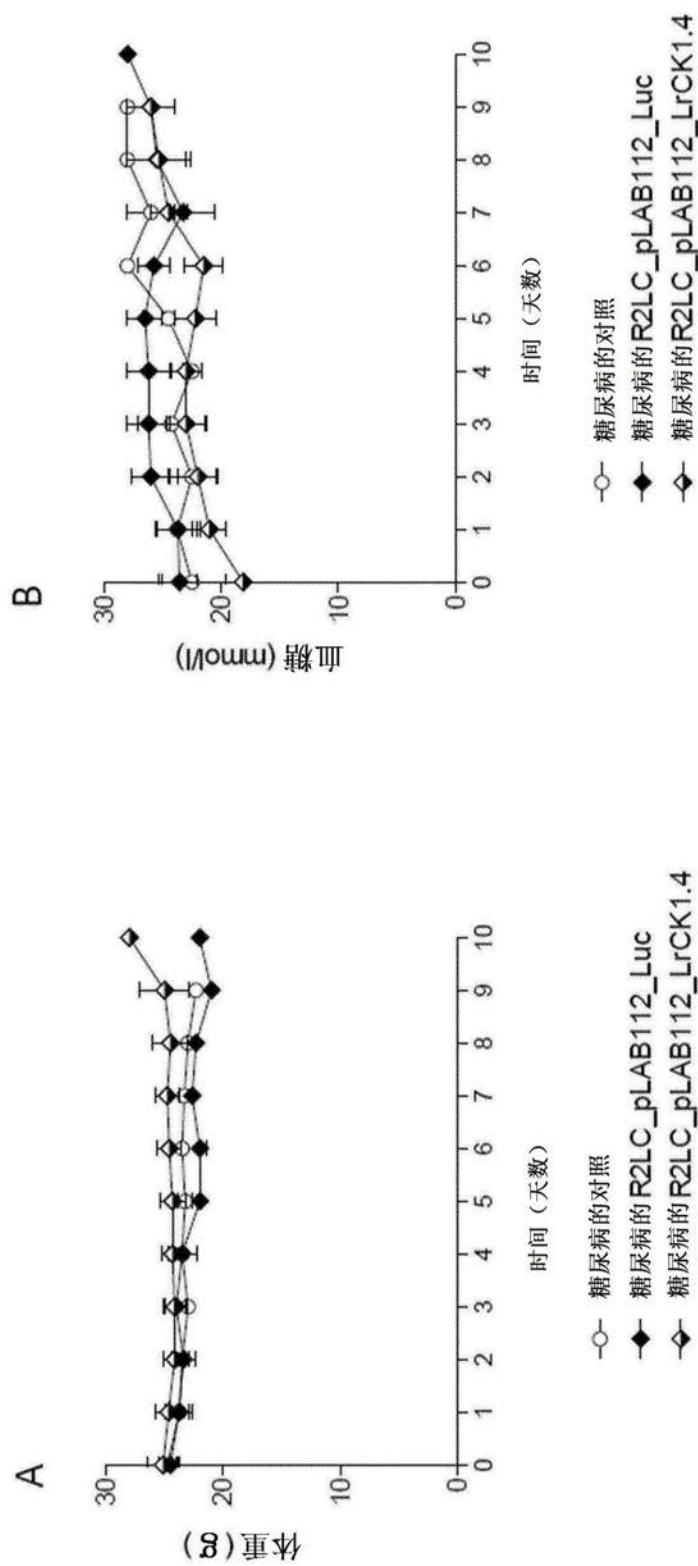


图9

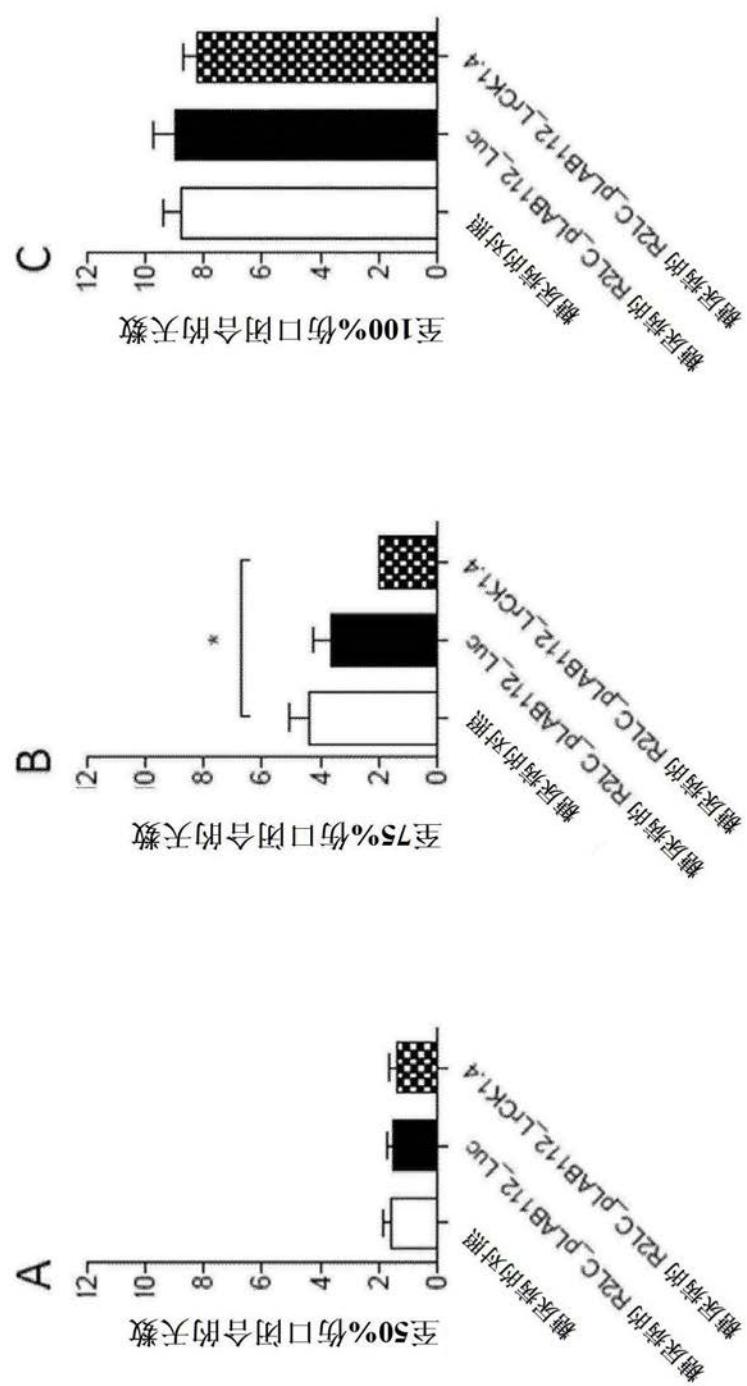


图10

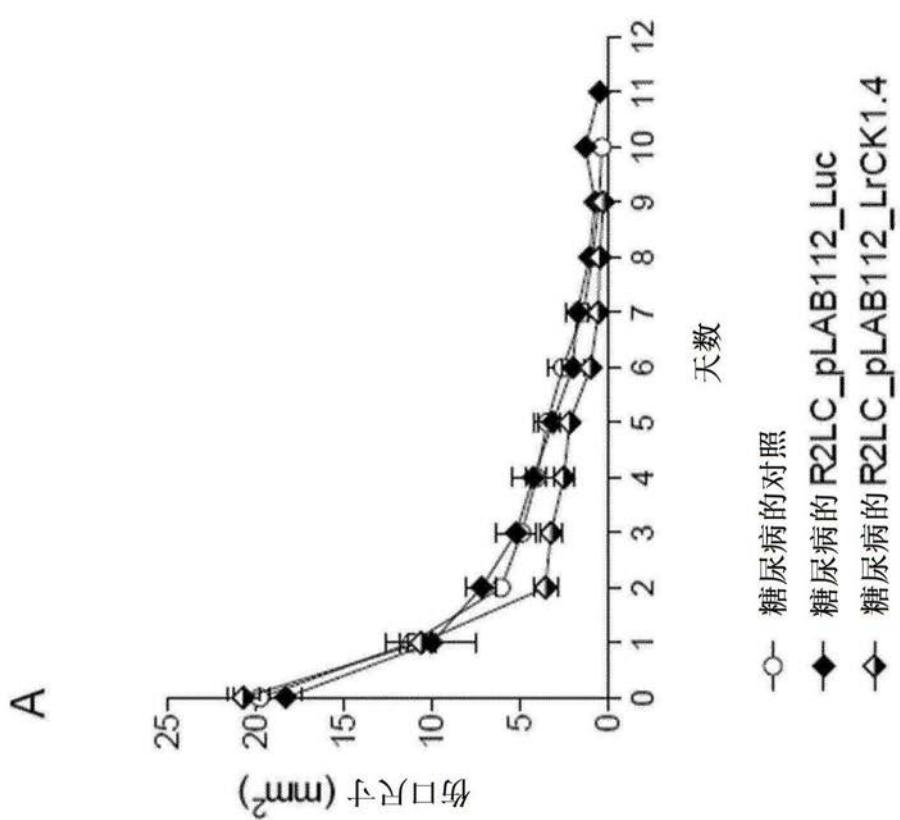
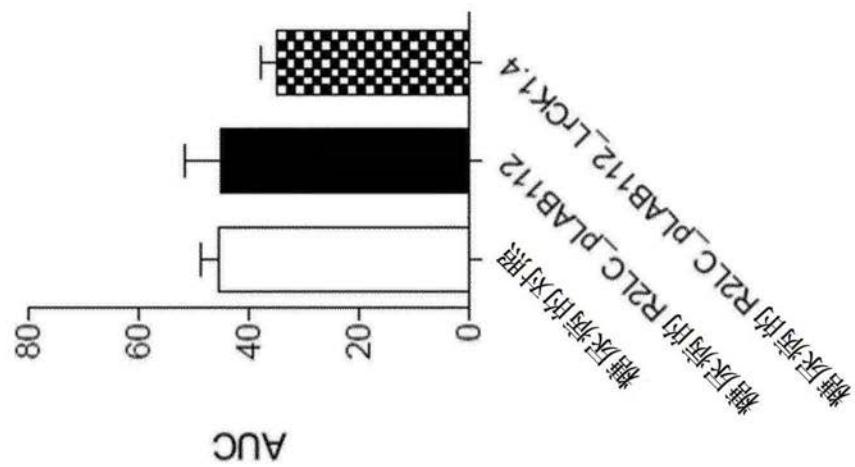


图11

B



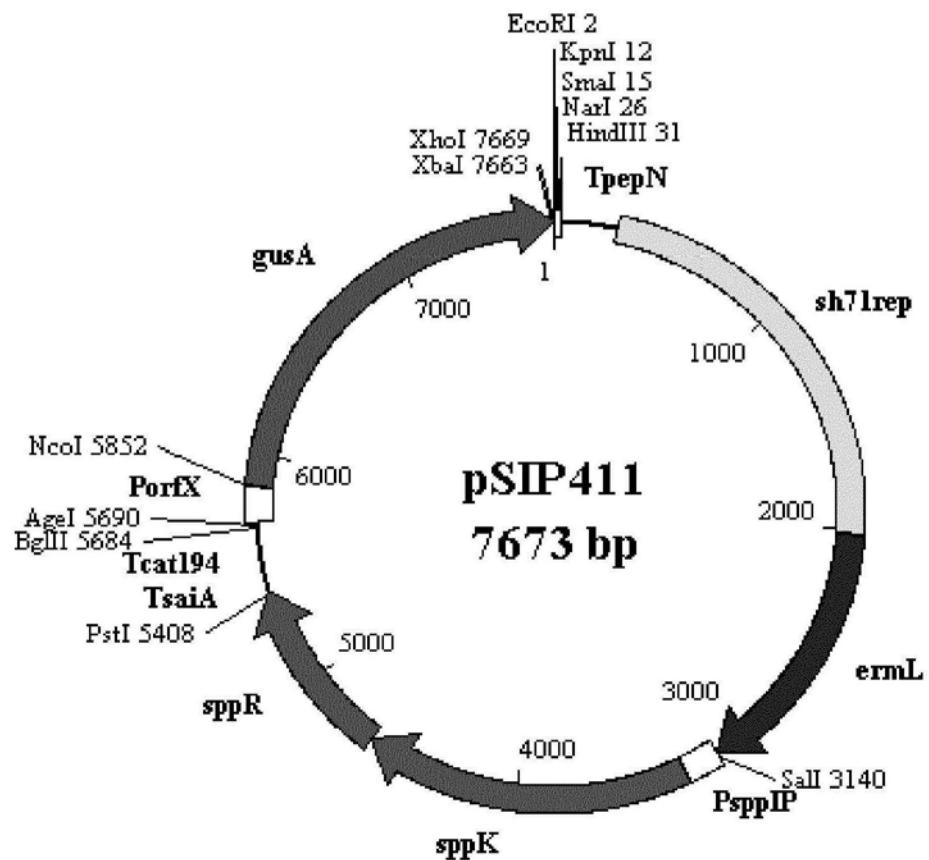


图12

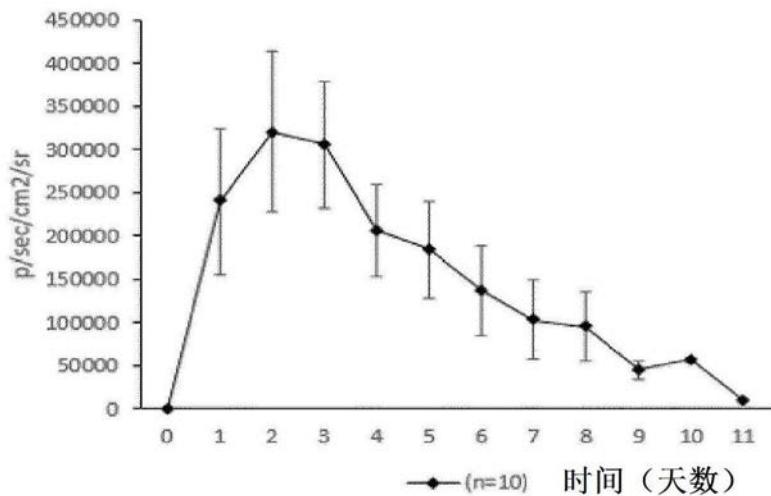


图13

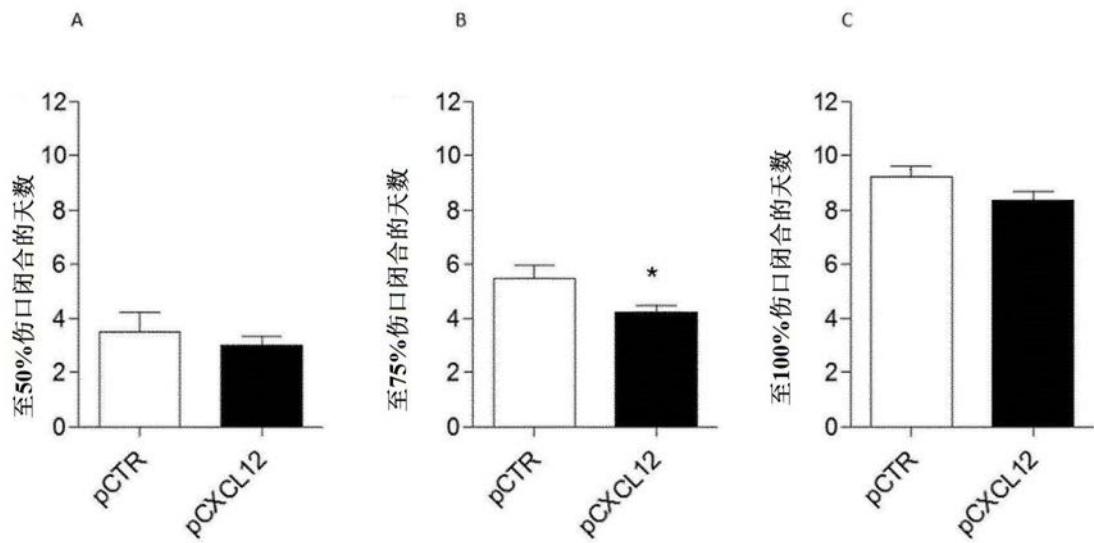


图14

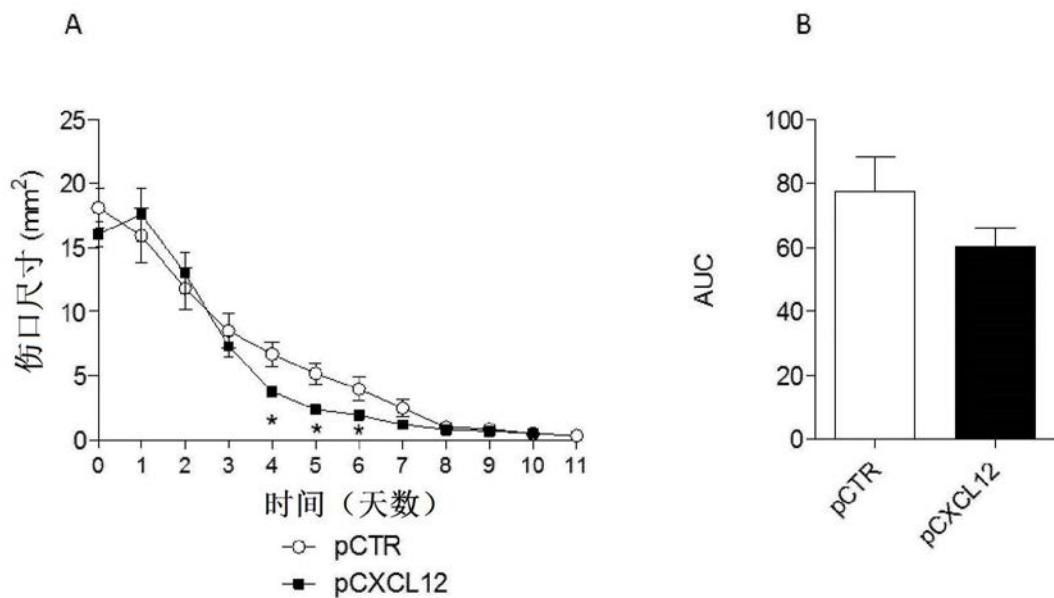


图15

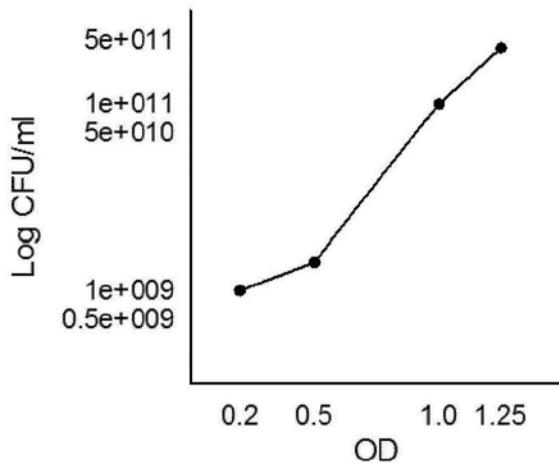


图16

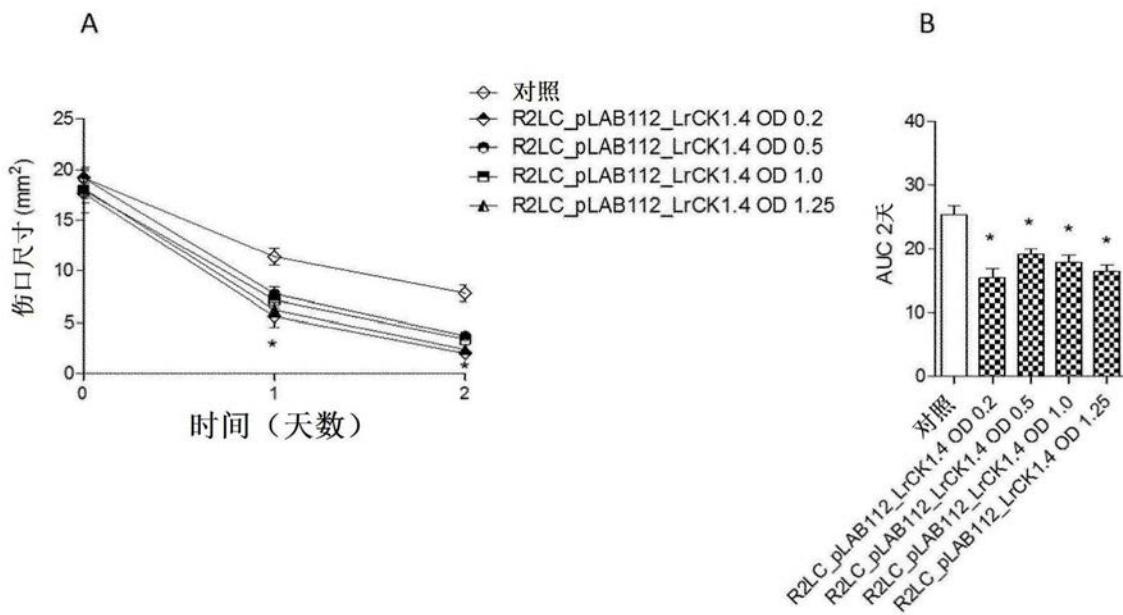


图17

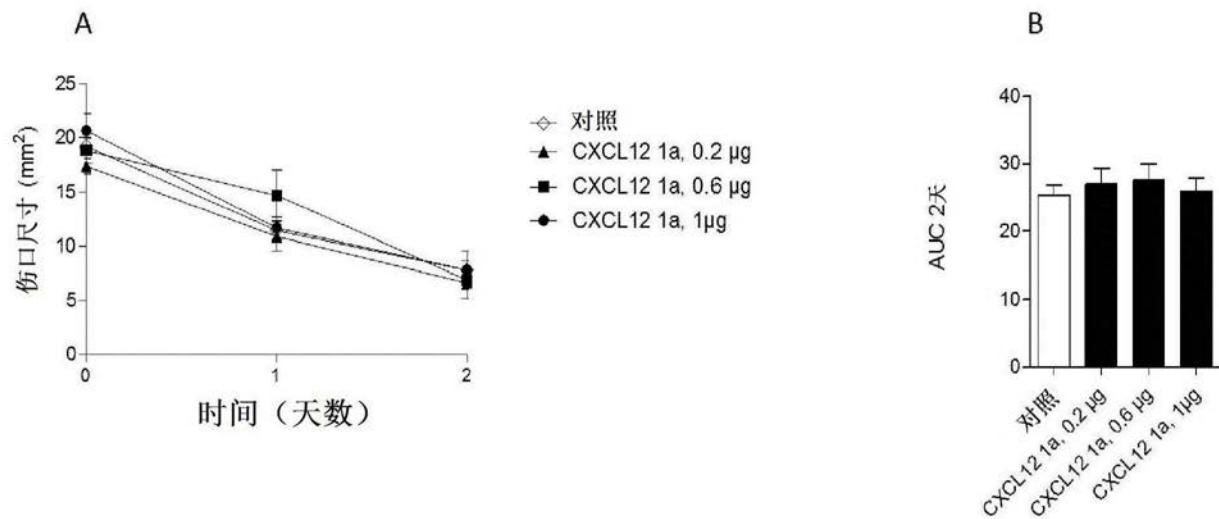


图18

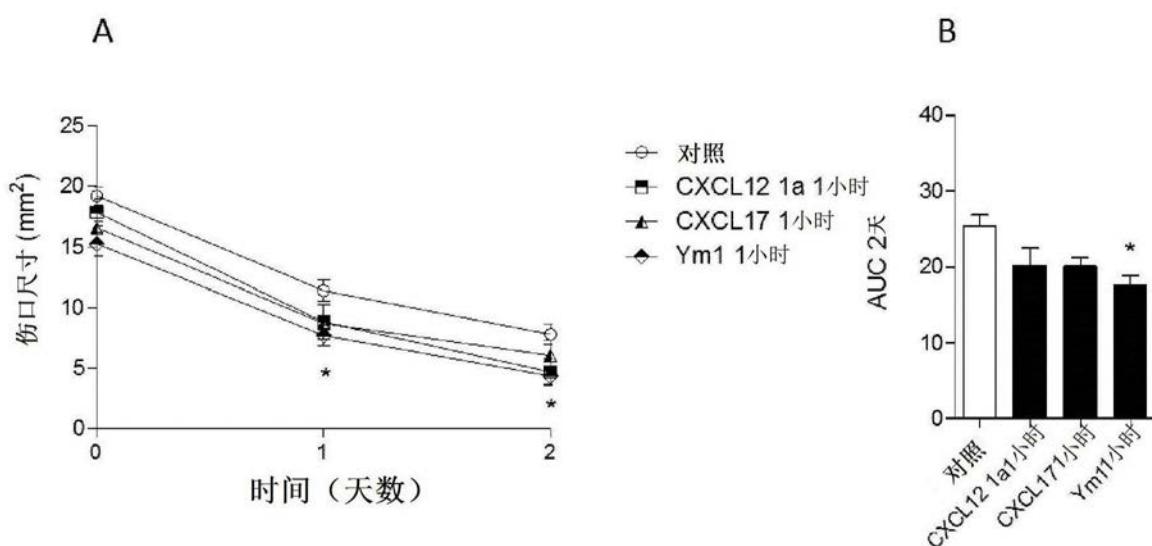


图19

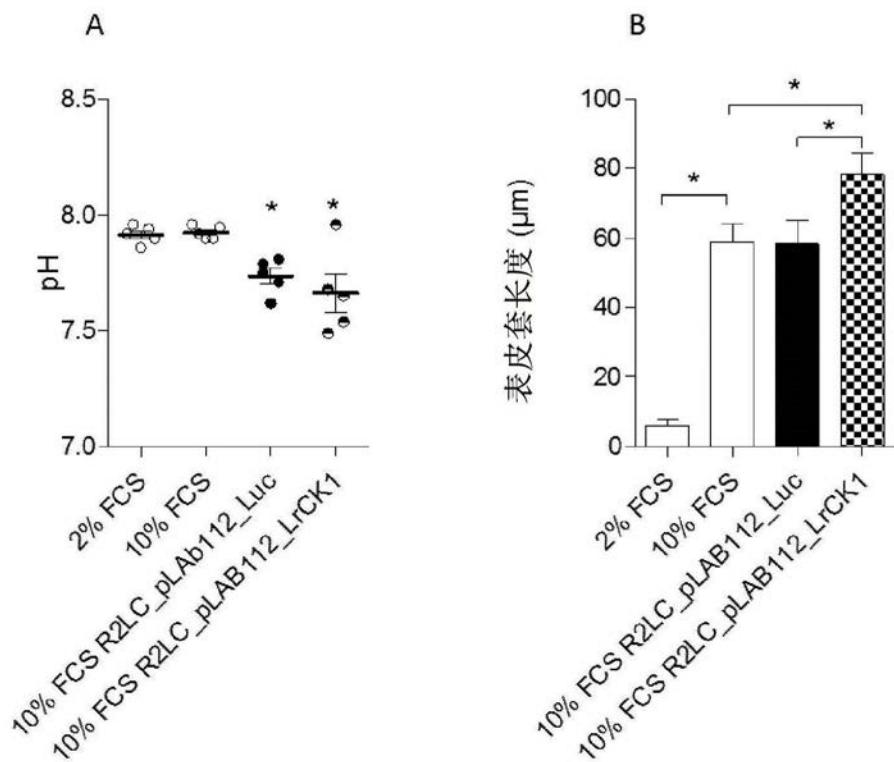


图20

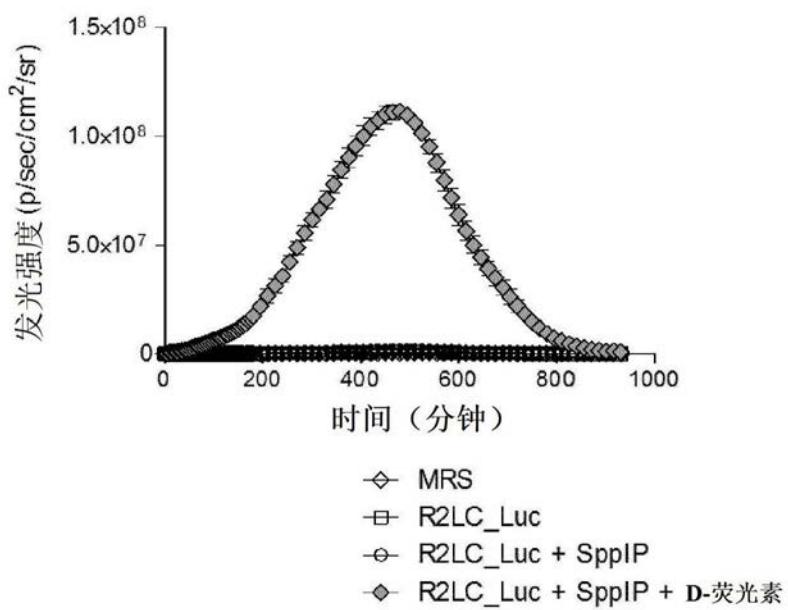


图21

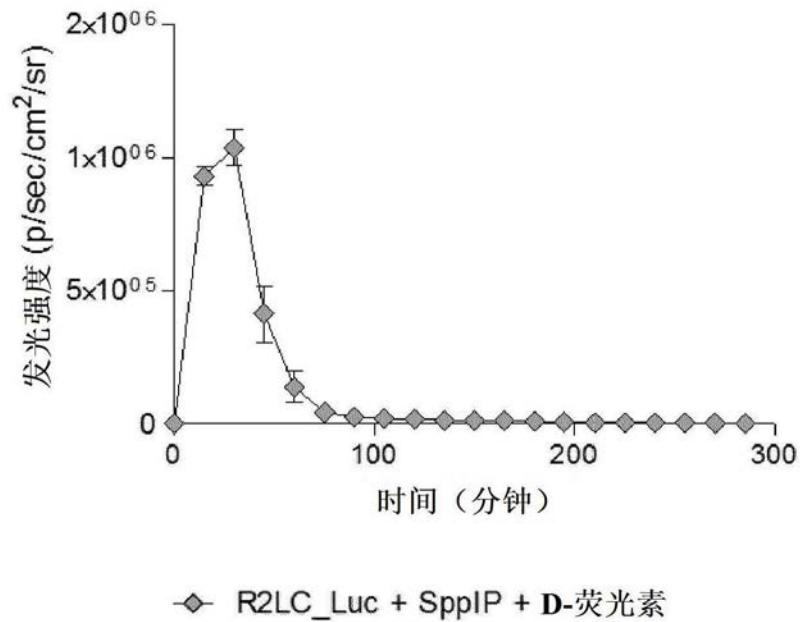


图22

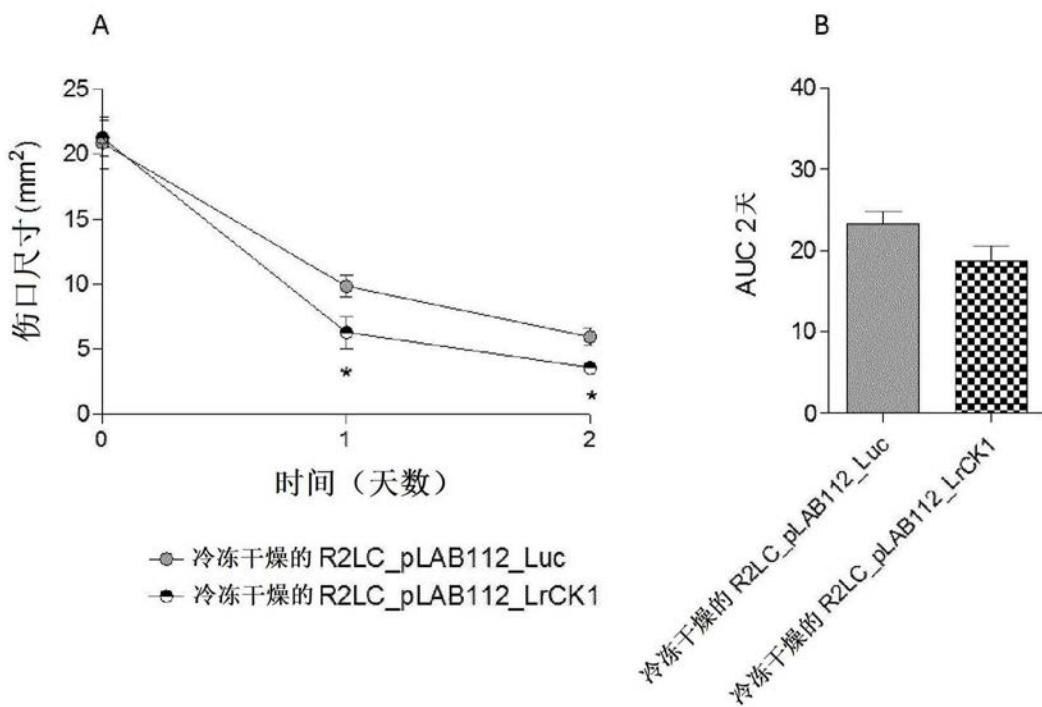


图23

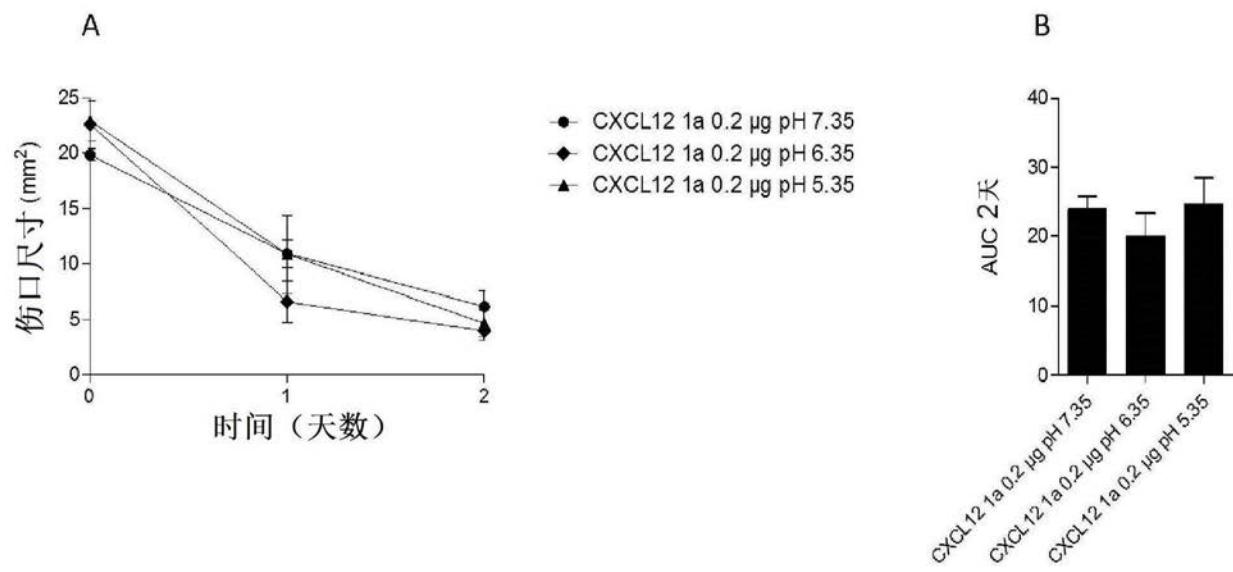


图24

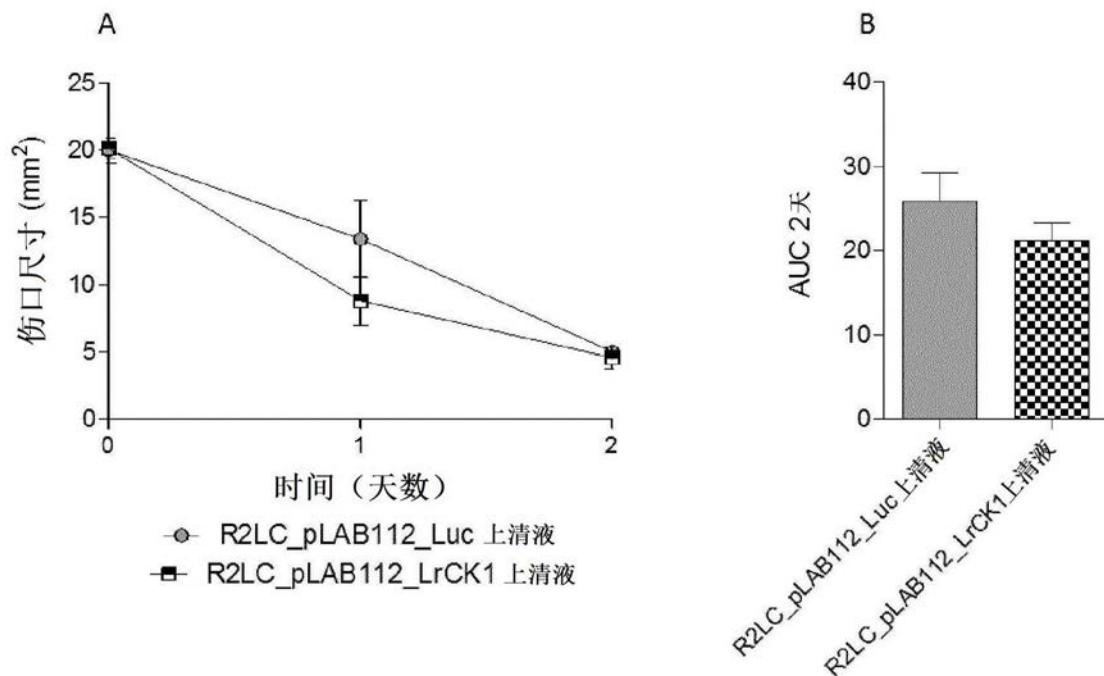


图25

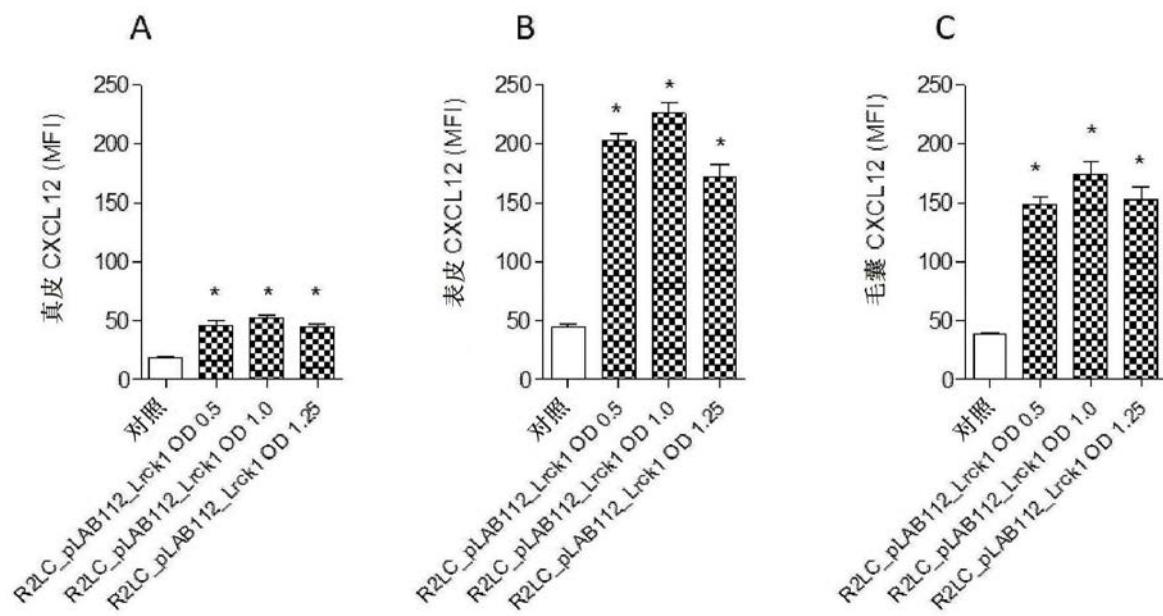


图26

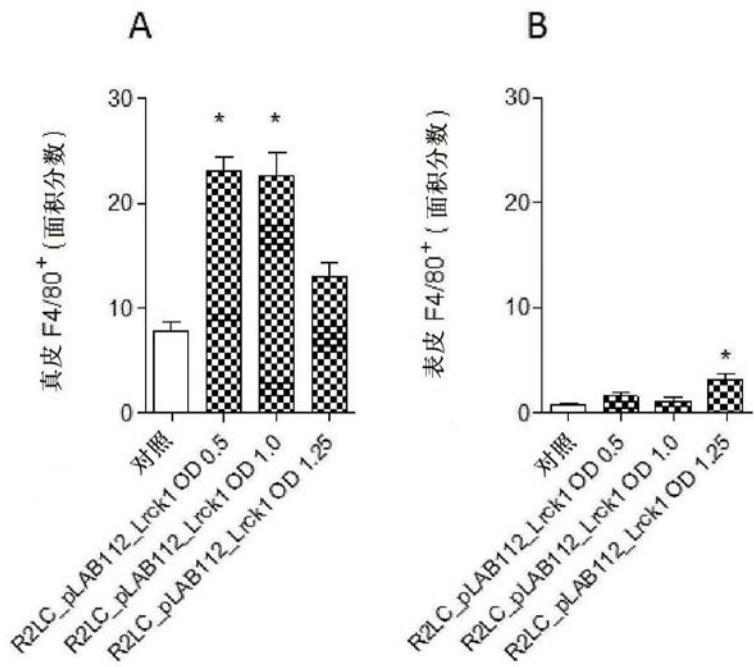


图27

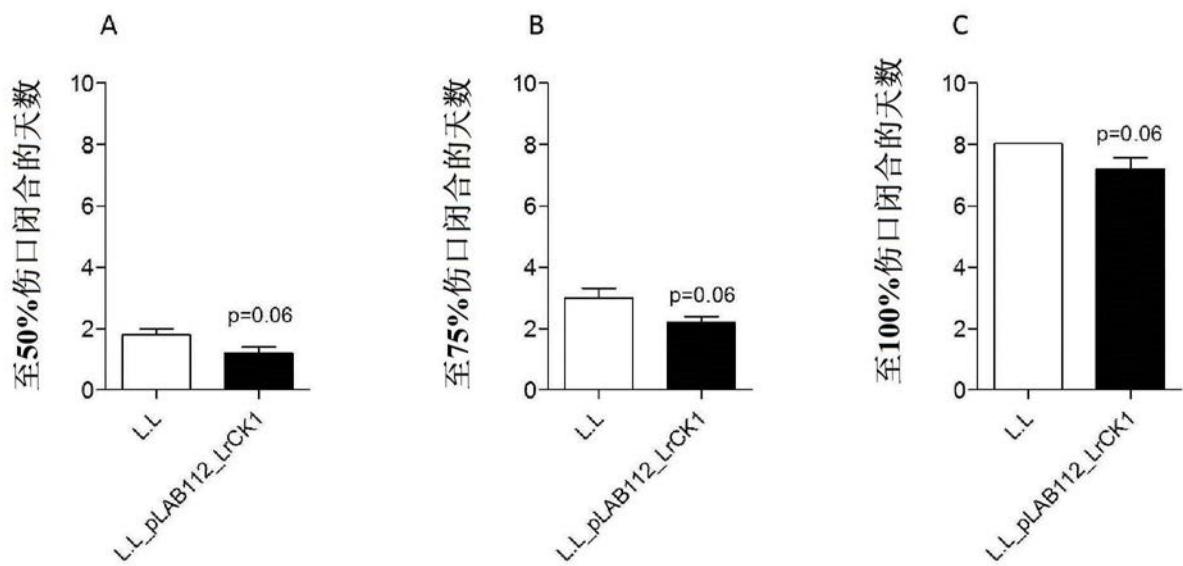


图28

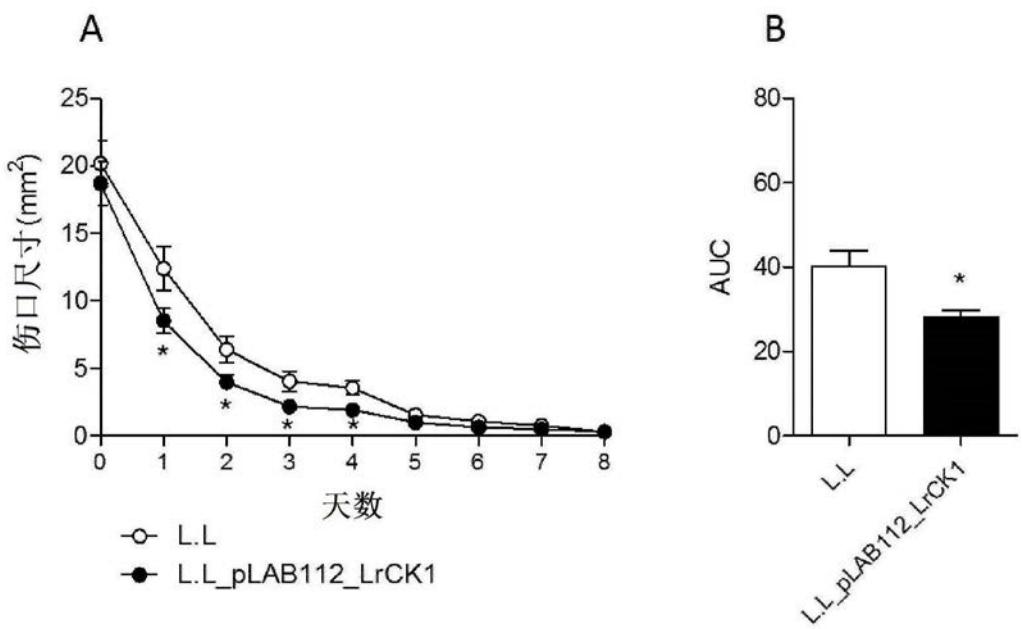


图29

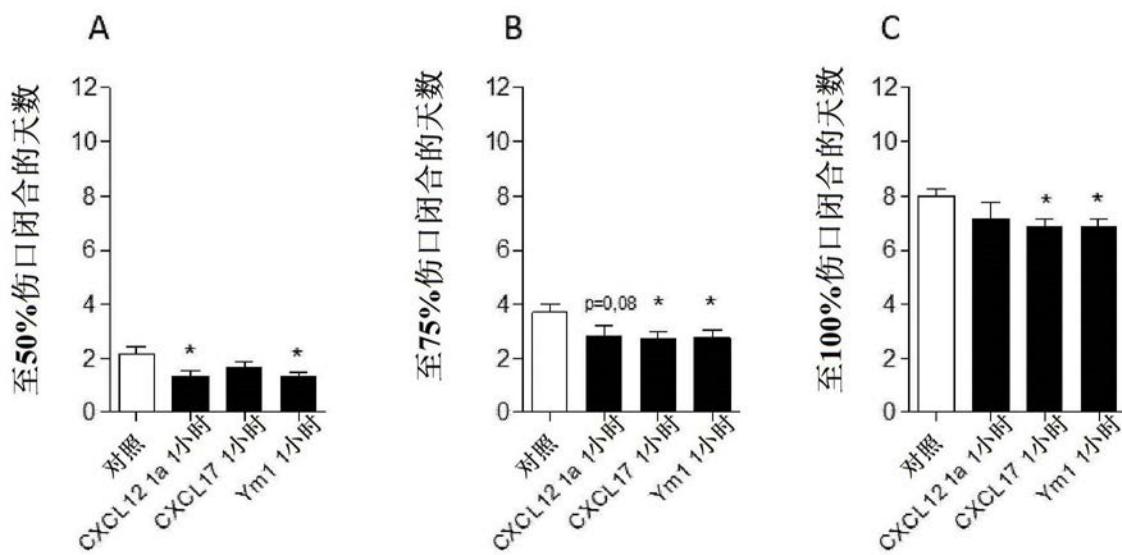


图30

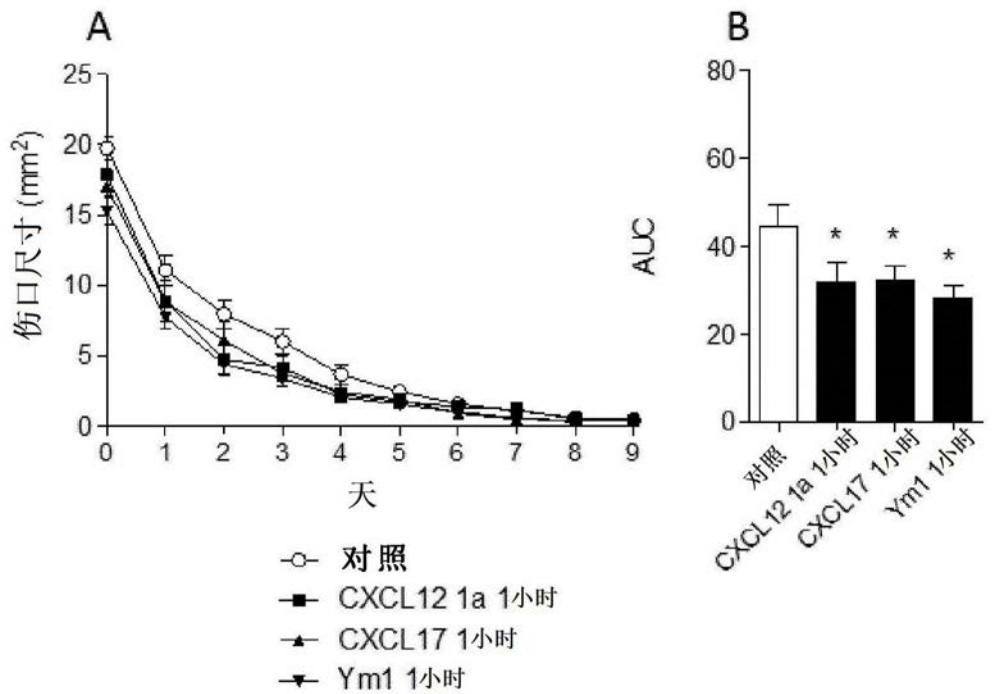


图31

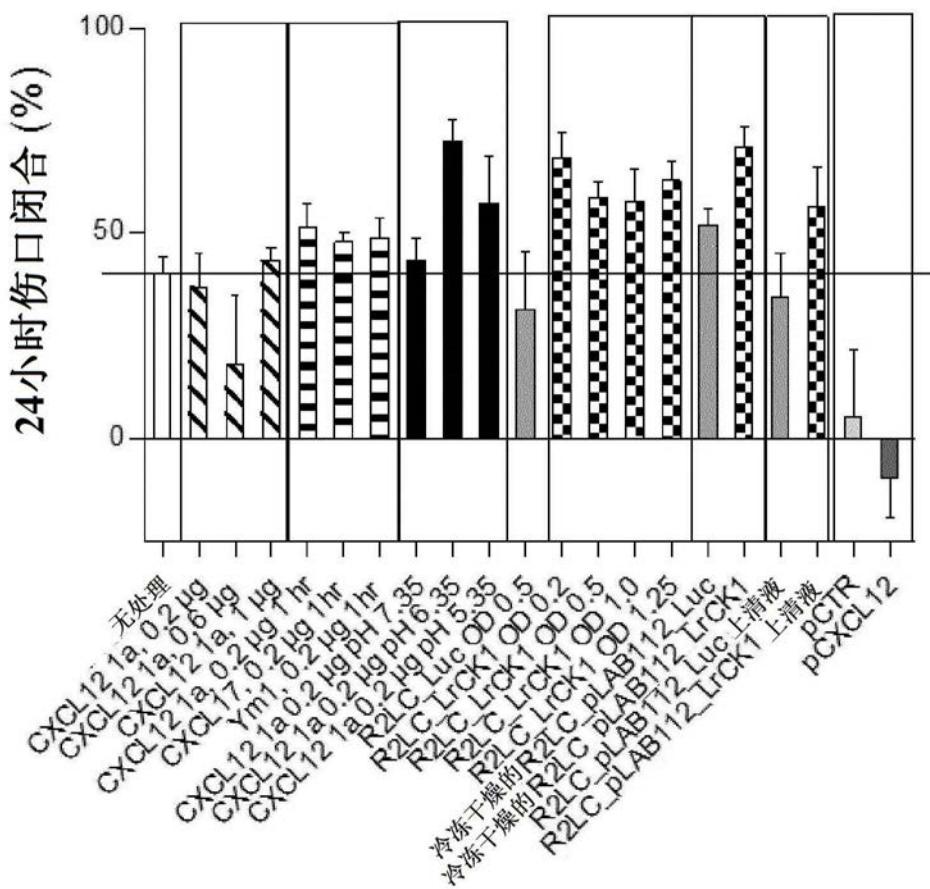


图32

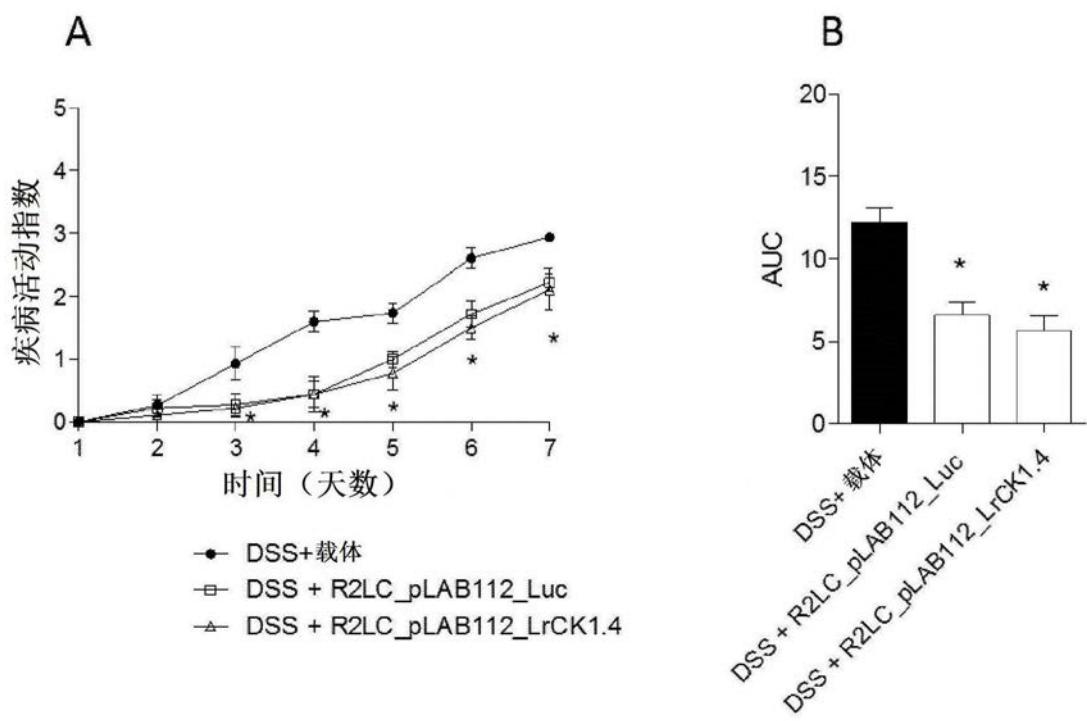


图33

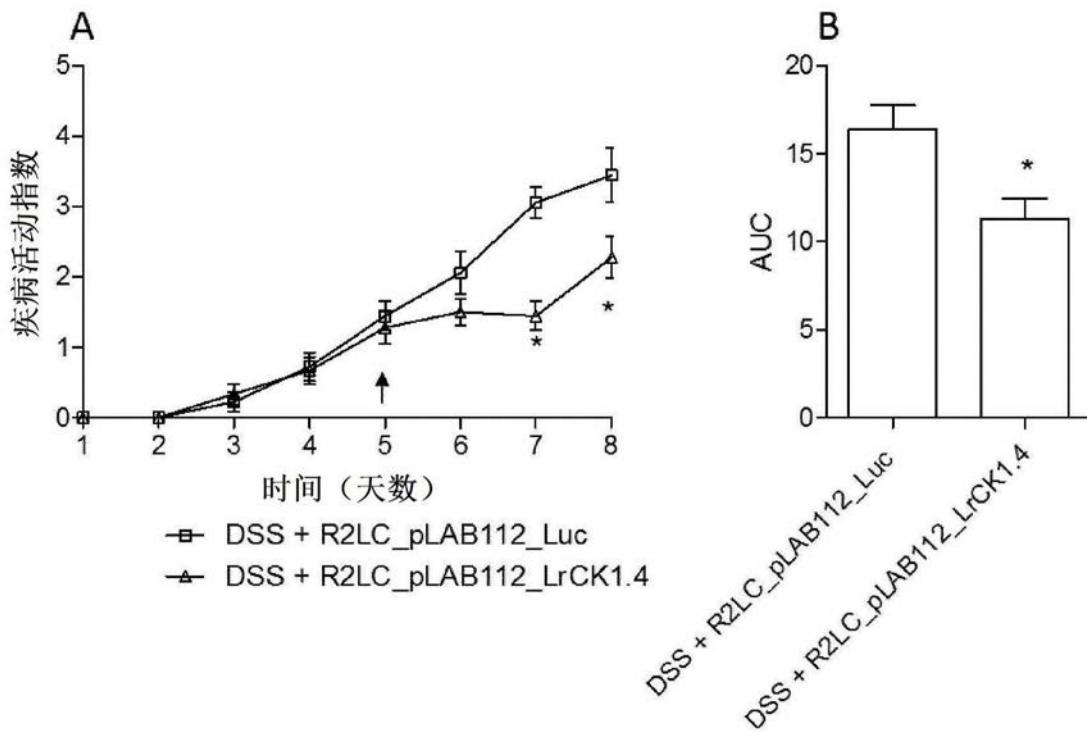


图34

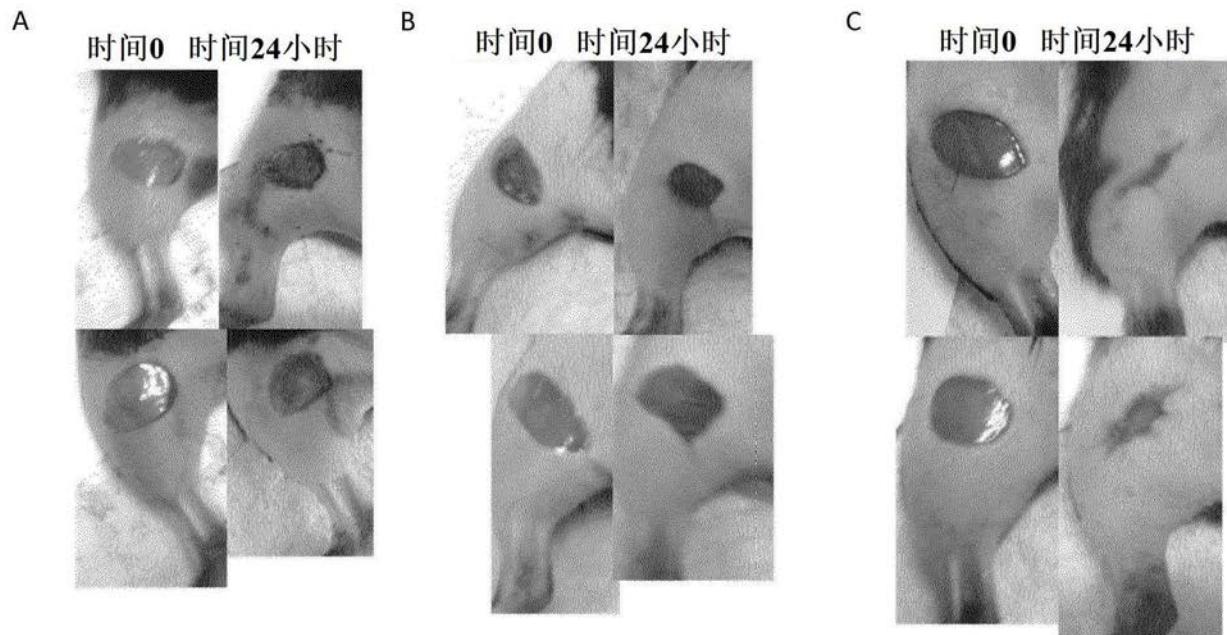


图35