

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/57

A61P 11/12



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99816145.4

[45] 授权公告日 2005 年 11 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1229138C

[22] 申请日 1999.12.22 [21] 申请号 99816145.4

[30] 优先权

[32] 1998.12.22 [33] US [31] 09/218,913

[32] 1999.11.17 [33] US [31] 09/441,966

[86] 国际申请 PCT/GB1999/004381 1999.12.22

[87] 国际公布 WO2000/037099 英 2000.6.29

[85] 进入国家阶段日期 2001.8.13

[71] 专利权人 拜尔公开股份有限公司

地址 德国莱沃库森

[72] 发明人 R·霍尔 C·T·波洛

B·B·纽顿 W·J·A·泰勒

审查员 吴通义

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 5 页 说明书 100 页 附图 52 页

[54] 发明名称 加速粘液纤毛的清除速率的方法

[57] 摘要

本发明提供一种组合物和方法，是用 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂如抑蛋白酶肽或比库蛋白，来刺激患粘液纤毛功能紊乱如囊性纤维变性患者的肺气道中粘液和痰液的粘液纤毛清除速率。

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

1. Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂的用途, 其特征在于, 用于制备加速患者肺气道中粘液纤毛的清除速率的药物, 所述的药物包含刺激粘液纤毛清除有效量的组合物, 所述组合物含有 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂和生理上可接受的载体, 所述 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂选自:

MAQLCGL RRSRAFLALL GSLLLLSGVLA -1
 ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN 50
 10 YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF 100
 NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNYSRSEE 200
 ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN 225
 QERALRTVWS SGDDKEQLVK NTYVL
 (SEQ ID NO:49);

15
 AGSFLAWL GSLLLLSGVLA -1
 ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN 50
 YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF 100
 NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNYSRSEE 150
 20 ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLGAVS 179
 (SEQ ID NO:2);

MLR AEADGVSRLI GSLLLLSGVLA -1
 ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN 50
 25 YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF 100
 NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNYSRSEE 150
 ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN 200
 QERALRTVWS SGDDKEQLVK NTYVL 225
 (SEQ ID NO: 45);

30
 MAQLCGL RRSRAFLALL GSLLLLSGVLA -1
 ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN 50
 YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF 100
 NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNYSRSEE 150

	ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN	200
	QERALRTVWS FGD	213
	(SEQ ID NO: 47);	
5	ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	50
	YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF	100
	NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE	150
	ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN	200
	QERALRTVWS FGD	213
10	(SEQ ID NO: 71);	
	ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	50
	YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF	100
	NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE	150
15	ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN	200
	QERALRTVWS SGDDKEQLVK NTYVL	225
	(SEQ ID NO: 70);	
	IHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	50
20	YLTKEECLKK CATV	64
	(SEQ ID NO:4);	
	CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	50
	YLTKEECLKK C	61
25	(SEQ ID NO:5);	
	YEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE	150
	ACMLRCFRQ	159
	(SEQ ID NO:6);	
30		
	CTANAVTGPC RASFPRWYFD VERNSCNNFI YGGCRGNKNS YRSEE	150
	ACMLRC	159
	(SEQ ID NO:7);	
35	IHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	50

	YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF	75
	NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE	125
	ACMLRCFRQ	159
	(SEQ ID NO:3) ;	
5		
	CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	50
	YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF	100
	NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE	150
	ACMLRC	156
10	(SEQ ID NO:50) ;	
	ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	25
	YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF	75
	NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE	125
15	ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLGAVS	179
	(SEQ ID NO:1) ;	
	ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	50
	YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF	100
20	NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE	150
	ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK	170
	(SEQ ID NO:52) ; 和	
	ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	50
25	YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DS	92
	(SEQ ID NO:8) 。	

2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述药物为气溶胶悬液。

3. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述的气溶胶悬液包括大小范
30 围从 1 到 10 微米的可吸入颗粒。

4. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述的气溶胶悬液包括大小范
围从 1 到 5 微米的可吸入颗粒。

5. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的载体选自：生理缓冲溶
液、等渗盐水、普通盐水和它们的混合物。

35 6. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶

抑制剂是如下的氨基酸序列：

ADRRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN 50
 YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DS 92
 5 (SEQ ID NO:8)。

7. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂为：

10 ADRRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN 50
 YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF 100
 NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE 150
 ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK 170
 (SEQ ID NO:52)。

15

8. 如权利要求 1、6 或 7 任一所述的用途，其特征在于，所述的 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂是糖基化的。

9. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂包含至少一个选自以下半胱氨酸-半胱氨酸对的链内的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键：SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:52 任一序列的 CYS11-CYS61、CYS20-CYS44、CYS36-CYS57、CYS106-CYS156、CYS115-CYS139 和 CYS131-CYS152，其中按 SEQ ID NO: 52 的氨基酸序列编号所述半胱氨酸残基。

25 10. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂包含至少一个选自以下半胱氨酸-半胱氨酸对的链内的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:8 任一序列中的 CYS11-CYS61、CYS20-CYS44、CYS36-CYS57，其中按 SEQ ID NO:52 氨基酸序列编号所述半胱氨酸残基。

30 11. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂包含至少一个选自以下半胱氨酸-半胱氨酸对的链内的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键：SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 任一序列中的 CYS106-CYS156、CYS115-CYS139 和 CYS131-CYS152，其中按 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列编号所述半胱氨酸残基。

12. 如权利要求 6 所述的用途, 其特征在于, 所述的 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂包含至少一个选自以下半胱氨酸-半胱氨酸对的链内的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键: CYS11-CYS61、CYS20-CYS44、CYS36-CYS57, 其中按 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列编号所述半胱氨酸残基。

5

加速粘液纤毛的清除速率的方法

5 相关申请

本申请是 1998 年 12 月 22 日注册的美国专利申请 No.09/218,913 的部分续展。

发明领域

10 本发明涉及包含丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白的组合物,其刺激肺部气道中粘液和痰液的粘液纤毛清除速率。本发明还涉及刺激哺乳动物粘液纤毛清除速率的方法。

发明背景

涉及的问题

15 特征为纤毛上皮不能清除肺气道中的粘液和痰液的粘液纤毛功能紊乱,是慢性阻塞性肺病(如慢性支气管炎(CB)、支气管扩张(BE)、哮喘和尤其是囊性纤维变性(CF))的严重并发症。粘液纤毛功能紊乱的患者特别易受继发性细菌感染。已有人描述了对 CF 和其他与粘液纤毛功能紊乱相关的呼吸系统疾病的治疗和维持用药,及需要改进治疗方法。见如 Braga“支气管 mucology 的药物”, Raven Press, New York, 1989; Lethem 等人, Am Rev. Respir. Dis. 142:1053-1058, 1990; 美国专利
20 No. 5,830,436。

囊性纤维变性

25 囊性纤维变性(CF)是一种导致外分泌上皮中液体和电解质运输异常的常染色体隐性疾病。事实上在所有 CF 患者中都已发现编码称为囊性纤维变性跨膜传导调节器(CFTR)的蛋白质的 DNA 中有突变。肺细胞尤其受影响。Di Santagrese 等人, Am J. Med. 66:121-132(1979)。

30 在 CF 中,气道粘膜细胞的腔边缘对膜氯离子通道的 cAMP 依赖性蛋白激酶活化没有反应。细胞对 Cl^- 的渗透性受损,且透过细胞膜对 Na^+ 的吸收加速。这些电解质的失衡导致气道粘液水合水平的降低,产生 CF 的粘滞性肺分泌特征。Knowles, Clin. Chest. Med. 11:75(1986)。偶然细菌和支原体进入肺气道,并在粘液中定居。与 CF 相关的稠厚的粘液将这些病原体与免疫系统隔离。由于在 CF 患者中粘液纤毛的清除作用降低,细菌的清除也降低。因此肺充血和感染是常见的。这些

病原性因子的长期存在必然引发损害肺功能的炎症反应。Bedrossian 等人, *Human Pathol.*7:195-204,1976。

CF 肺中粘液的粘度部分由于粘液水合的减少, 其与气道表面液体(ASL)中 Cl^- 通道的机能紊乱和钠(Na^+)离子浓度的调整有关, 它们改变了气道粘液纤毛的清除能力(MCC)。已在体内和体外研究了参与粘液转运的机理。除去粘液的牛气道(MDBT)的哺乳动物纤毛上皮缓慢地转运 CB、CF 和 BE 痰液(Wills 等人, *J.Clin.Invest.*97(1):9-13,1995)。MDBT 中病理痰液的缓慢转运可能与其电解质/渗透成分低相联系(Wills 等人, *J.Resp.Crit. Care Med.*151(4):1255-1258,1997)。的确, 已知相对于血浆, 病理痰液的电解质含量低(Matthews 等人, *Am.Rev.Resp.Dis.* 88:199-204,1963;Potter 等人, *Am.Rev.Resp.Dis.*67(1):83-87,1967;Tomkiewicz 等人, *Am. Rev.Resp.Dis.*1484(4,Pt.1):1002-1007,1993)。

对 MDBT 的进一步研究显示: 用氯化钠处理后病理粘液的转运性得到明显改善(Wills 等人, 1995)。另外, 临床研究显示吸入高渗盐水或上皮钠通道(ENaC)阻滞剂阿米洛利能明显增加患者的 MCC(Robinson 等人, *Thorax* 52(10):900-903,1997;App 等人, *Am.Rev.Resp.Dis.*141,605-612,1990)。最近, 已有人阐明了在气道粘液清除速度(TMV)的豚鼠模型体内粘液清除与其离子组合物之间的关系。体内研究显示 5 分钟喷雾高渗盐水将暂时增加 TMV。喷雾高渗盐水(14.4%)后 1 分钟观察到 TMV 增加。用 0.9% 盐水处理的动物的 TMV 为 $5.1 \pm 1.0\text{mm/分钟}$ ($n=9$), 与此相比用高渗盐水处理的动物则为 $11.3 \pm 1.3\text{mm/分钟}$ ($n=9$; $p \leq 0.001$)(Newton & Hall, 1997)。吸入阿米洛利也增加 TMV。20 分钟喷雾阿米洛利(10mM)后 15 分钟观察到 TMV 明显增加。用水处理的动物的 TMV 为 $3.2 \pm 2.5\text{mm/分钟}$ ($n=9$), 与此相比用阿米洛利处理的动物则为 $8.1 \pm 0.3\text{mm/分钟}$ ($n=8$, $p \leq 0.05$)(Newton 等人, *Ped.Pulm.S17,Abs.364*,1998)。这些制剂看来是通过增加气道表面液体(ASL)的离子含量来起作用的。

从患全身假性醛固酮减少症(SPHA)病人得到的临床遗传证据也支持以下的观点: 下调气道上皮钠通道的活性将加强肺中粘液纤毛的清除作用。丧失上皮钠通道基因功能性突变的 SPHA 患者, 气道表面不吸收钠, 与正常人相比他们的鼻表面液体中钠离子浓度增加, 而且与正常人相比他们的肺粘液纤毛清除率增加了 4 倍(Kerem 等人, *New England J.Med.*341,156-162,1999)。

最近, 在两栖动物非洲蟾蜍(*Xenopus*)肾上皮细胞(A6 细胞)的顶膜中发现了称为通道活化蛋白酶 1(CAP-1)的丝氨酸蛋白酶(Vallet 等人, *Nature* 389(6651):607-610,1997)。CAP-1 看来调节这些细胞的 Na^+ 通道活性。将顶膜与原型牛 Kunitz(孔

尼兹)抑制剂—抑肽酶接触,减少了透上皮 Na^+ 转运(Vallet 等人, 1997; Chraibi 等人, *J.Gen.Physio.*111(1):127-138,1998)。比库蛋白 (Bikunin) (1-170)(牛抑肽酶的人同源物的两个 Kunitz 结构域)的作用,已用体外培养的人正常支气管上皮细胞 (HBE)的短环电流(Isc)进行了评估(McAulay 等人, *Ped.Pulm.S17,Abs.141,1988*)。在

5 正常 HBE 细胞中比库蛋白(人体 inter- α -inhibitor 的双突变蛋白酶)(1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 70nM)明显抑制了 54% Na^+ Isc(n=5-8, $p \leq 0.05$)。总的来说,比库蛋白(70nM)在 90 分钟内抑制了 Isc 基线的 58%,在另一研究中比库蛋白(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)明显抑制了正常 HBE 细胞 84% Na^+ Isc(n=6, $p \leq 0.01$),而丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的丝氨酸蛋白酶抑制剂 α_1 (1)-蛋白酶抑制剂(α_1 -PI)(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)却没有明显的作用。在体外培养的人

10 人囊性纤维变性气道上皮细胞中,比库蛋白(1-170)(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)抑制了 Isc',且抑蛋白酶肽(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)也抑制 Isc。

一研究组最近的两项研究证明了蛋白酶抑制剂诱导对 TMV 的作用。在抗原攻击前 30 分钟或在攻击后 1 小时给予 α_1 -PI(10mg),攻击后 6 小时弱化抗原诱导了变应性羊的 TMV 降低(O'Riordan 等人, *Am.J.Resp.Crit.Care Med.*97(5): 1522-1528,1997)。在 O'Riordan 等人 1997 文献的图 1 中,作者显示了对变应性羊的气道仅给予 α_1 -PI 本身(无抗原攻击),在 6 小时过程中对基线 TMV 无影响。在第二项研究中,抗原攻击后 6 小时给予 α_1 -PI,仅在攻击后 24 小时明显逆转了抗原诱导的 TMV 下降(O'Riordan 等人, *J.App.Physio.*85(3):1086-1091,1998)。作者指出 α_1 -PI 的作用机理与其抗嗜中性白细胞弹性蛋白酶特性相关,其中认为嗜中性白细胞

15 弹性蛋白酶是负责降低模型中粘液纤毛清除速率的酶。他们推论可用 α_1 -PI 来治疗由于哮喘中变应原诱导的嗜中性白细胞弹性蛋白酶的释放所造成的粘液纤毛功能紊乱(O'Riordan 等人, 1998);他们没有考虑在其他呼吸系统疾病中的潜在作用。

发明概述

25 本发明涉及 Kunitz 家族的丝氨酸蛋白酶抑制剂的使用,其刺激肺气道中粘液和痰液的粘液纤毛清除(MCC)速率。可用 Kunitz-丝氨酸蛋白酶抑制剂来治疗肺病如囊性纤维变性(CF)、慢性支气管炎(CB)和支气管扩张(BE),这些疾病中粘液的滞留和堆积是主要的临床问题。迄今,已有的技术都从未将蛋白酶抑制剂与增加 MCC 速率高于基线速率的能力相关连。还可用 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂来治疗慢性

30 性鼻窦炎和胶耳病(咽鼓管堵塞),这些疾病的临床问题也是粘液滞留和堆积。

本发明考虑了丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白质的用途,其包括 Kunitz 结构域或 Kunitz 样结构域用于刺激 MCC 的方法。在本发明的一个实施例中,牛丝氨酸蛋白

酶抑制剂蛋白质如抑蛋白酶肽和其变体或片段(如 1998 年 1 月 28 日公开的 EP821007 中所描述的)可用于本发明的实践中。

在本发明的另一实施例中,设想将人丝氨酸蛋白酶抑制剂用于刺激 MCC 速率的方法中。人丝氨酸蛋白酶抑制剂的代表性例子包括比库蛋白及其变体和片段,如
5 1997 年 9 月 18 日公开的 WO 97/33996(Bayer Corp.)和 1995 年 4 月 18 日公开的美国专利 No.5,407,915(Bayer AG)中所述的, 本文将它们全部纳入作为参考。

附图简述

由以下的详述和权利要求并结合附图将会对本发明有更好的理解, 其中:

10 图 1 显示了 EST R35464(SEQ ID NO:12)的核苷酸序列和该 DNA 序列的翻译 (SEQ ID NO:13), 得到一个某些序列与抑蛋白酶肽类似的开放读框。此翻译产物以正确的间距包含六个半胱氨酸中的五个, 这是 Kunitz 样抑制剂结构域的特征(以粗体显示)。通常由剩下的半胱氨酸(密码子 38)所占据部位包含一个苯丙氨酸(以星号表示)。

15 图 2 显示了 EST R74593(SEQ ID NO:14)的核苷酸序列和该 DNA 序列的翻译 (SEQ ID NO:15), 得到一个与 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域同源的开放读框。此翻译产物以正确的间距包含六个半胱氨酸, 这是 Kunitz 样抑制剂结构域的特征(以粗体显示)。但此开放读框序列在密码子 3 和 23 包含终止密码子。

图 3 显示了人胎盘比库蛋白推导出的核苷酸序列(SEQ ID NO:9)标记为“共有
20 序列”和相配的翻译蛋白质氨基酸序列标记为“翻译的”(SEQ ID NO:10)。作为比较, 还显示了 ESTs H94519(SEQ ID NO:16)、N39798(SEQ ID NO:17)、R74593(SEQ ID NO:14)和 R35464(SEQ ID NO:12)的核苷酸序列。共有序列中加下划线的核苷酸相应于实施例中所述的 PCR 引物的位置。在翻译的共有序列中加下划线的氨基酸是其身份已通过纯化的天然人胎盘比库蛋白的氨基酸测序而确认的残基, 核苷酸和
25 氨基酸密码子用标准单字母代码表示, 核酸密码子中的“N”表示未命名的核酸, “*”表示氨基酸序列中的终止密码子。

图 4A 显示含有某些与编码人胎盘比库蛋白的 ESTs 或其蛋白质同源的核酸序列的一系列 ESTs 起始重叠情况。以参考比库蛋白(7-64)和比库蛋白(102-159)(分别标记为 KID1 和 KID2)的相对位置显示。

30 图 4B 显示了其他更典型的 ESTs 重叠渗入额外的 EST。X 轴上部的数字指碱基对的长度, 起始于大部分 5'EST 序列的第一个碱基。各长方块的长度与各 ESTs(包括间隙)碱基对的长度成比例。在各个 EST 长方块的右边显示了它们的 EST 登录号。

图 4C 显示了图 4B 中所列出的各重叠 ESTs 寡核苷酸序列的相应排列对比。标记为比库蛋白的上部序列(SEQ ID NO:51)表示在各位置由重叠核苷酸衍生出的共有寡核苷酸序列。数字指 EST 图中碱基对的位置。EST R74593 中加粗下划线的寡核苷酸(在图中位置 994 和 1005)是在 R74593 中观察到的插入碱基, 其他各重叠 ESTs 中均没有。

图 4D 显示了图 4C 显示的比库蛋白共有寡核苷酸序列的氨基酸翻译(SEQ ID NO:45)。

图 4E 显示了自人胎盘 cDNA 文库通过 PCR 扩增衍生出的胎盘比库蛋白编码序列的核苷酸序列(SEQ ID NO:46)和相应的氨基酸翻译(SEQ ID NO:47)。

图 4F 显示了菌落杂交自人胎盘 λ cDNA 文库分离出的天然人胎盘比库蛋白编码克隆的核苷酸序列(SEQ ID NO:48)和相应的氨基酸翻译(SEQ ID NO:49)。

图 4G 比较了由 EST 重叠(SEQ ID NO:45)、PCR 克隆(SEQ ID NO:47)和常规 λ 菌落杂交(SEQ ID NO:49)得到的胎盘比库蛋白翻译寡核苷酸序列的氨基酸排列对比。

图 5 显示了 Superdex 75 凝胶过滤后从胎盘组织中纯化的人胎盘比库蛋白的图。绘制了由 OD280nm 测得的蛋白质洗脱曲线(实线), 胰蛋白酶抑制试验中洗脱的蛋白质的活性(用圆圈显示%抑制), 和激肽释放酶抑制试验中洗脱的蛋白质的活性(用方框显示%抑制)。

图 6 显示了用 C18 反相层析从胎盘组织纯化的人胎盘比库蛋白的图。绘制了由 OD215nm 测得的蛋白质洗脱曲线(实线), 胰蛋白酶抑制试验中洗脱的蛋白质的活性(用圆圈显示%抑制), 和激肽释放酶抑制试验中洗脱的蛋白质的活性(用方框显示%抑制)。

图 7 显示了高度纯化的胎盘比库蛋白的银染色 SDS-PAGE 凝胶(泳道 2), 和一系列分子大小标记物蛋白质(泳道 1)(以千道尔顿表示大小)。自顶部到底部迁移。

图 8 显示了生长酵母菌株 SC101(图 8A)或 WHL341(图 8B)的无细胞发酵肉汤中的胰蛋白酶抑制活性量, 其中 SC101 和 WHL341 已用指导胎盘比库蛋白(102-159)表达的质粒(pS604)稳定地转化。

图 9 显示了用指导牛抑蛋白酶肽或胎盘比库蛋白(102-159)表达的质粒稳定转化的酵母菌株 SC101(重组 2.4 和 2.5)生长的无细胞发酵肉汤作的银染色 SDS-PAGE(图 9A)和用抗胎盘比库蛋白(102-159)pAb 作的 Western 印迹(9B)。

图 10 显示了高度纯化的胎盘比库蛋白(102-159)(泳道 2)和一系列分子大小标记物蛋白质(泳道 1)的银染色 SDS-PAGE(以千道尔顿表示大小)。自顶部到底部迁

移。

图 11 显示了各种人组织的 mRNA 作的 Northern 印迹结果,其中 mRNA 与 ^{32}P 标记的编码胎盘比库蛋白(102-159)(图 11A)或编码胎盘比库蛋白(1-213)(图 11B)的 cDNA 探针杂交。自顶部到底部迁移。各图右边的数据表示相邻 RNA 标记物的大小(以千道尔顿表示)。图中各泳道下方显示了衍生出 mRNA 的器官。

图 12 显示了胎盘衍生的胎盘 Bkiunin 与抗合成性还原的胎盘比库蛋白(7-64)(图 12A)或 102-159(图 12B)的兔抗血清的免疫印迹。在各图中表示分子大小标记物(泳道 1);分离自人胎盘的天然胎盘比库蛋白(泳道 2);合成的胎盘比库蛋白(7-64)(泳道 3)和合成的胎盘比库蛋白(102-159)(泳道 4)。N-三(羟甲基)甲基甘氨酸 (Tricine)10-20%SDS-PAGE 凝胶印迹,用蛋白质 A 纯化的第一多克隆抗体(8 μg IgG,用 20ml 0.1%BSA/Tris 缓冲盐水(pH 7.5)配制),然后再用碱性磷酸酶偶联的山羊抗兔第二抗体显色。自顶部到底部迁移。

图 13 显示了 3 微克杆状病毒/Sf9 表达系统(泳道 2)衍生的高度纯化的胎盘比库蛋白(1-170)考马斯蓝染色的 10-20%N-三(羟甲基)甲基甘氨酸 SDS-PAGE 凝胶。泳道 1 含有分子大小标记物。自顶部到底部迁移。

图 14 比较了浓度增加的 Sf9-衍生的人胎盘比库蛋白(1-170)(实心圆)、合成的胎盘比库蛋白(102-159)(空心圆)或抑蛋白酶肽(空心方块)对人血浆活化的部分促凝血酶原激酶时间的作用。用 CaCl_2 启动凝血。绘制这些蛋白质的浓度相对于凝血时间延长倍数的图。未抑制的凝血时间为 30.8 秒。

图 15 显示了在剂量 2 μM 和 0.2 μM ,比库蛋白相对于阿米洛利(100 μM)和 Hanks 平衡盐水溶液(HBSS)运载体(对照)对豚鼠气道(处理后 3 小时)电势差的作用。

图 16 显示了(a)滴注针筒和 β 探针相对于豚鼠气道的位置;(b)用 ^{32}P 标记的啤酒八叠球菌(*S.cerevisae*)测定气道平均(清除)速度(TMV)的代表性图;和(c)相对于 HBSS 运载体对照,在气道滴注比库蛋白(5 μg)1.5、1.75、2.0、2.25 和 2.5 小时后,对比库蛋白反应豚鼠体内 TMV 的持续增加。

图 17 显示了相对于阿米洛利(10 μM),比库蛋白(70nM)降低了体外培养的人支气管上皮细胞中的钠流动。

图 18 显示了豚鼠气道中 5 分钟喷雾高渗盐水(14.4%)对提高 TMV 的作用。

图 19 显示了豚鼠气道中 20 分钟喷雾阿米洛利(10mM)对 TMV 的作用。

图 20 显示了比库蛋白(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、抑蛋白酶肽(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和抑蛋白酶肽双突变蛋白(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)降低体外培养的人支气管细胞中的钠短环电流。

图 21 显示了抑蛋白酶肽(1mg/ml)抑制体外人 CF 支气管上皮细胞的 I_{sc} 。

图 22 显示了相对于 PBS 对照, 比库蛋白气雾剂(3ml 3mg/ml)明显增加羊的 TMV。

图 23 显示了比库蛋白(100 μ g/ml)抑制体外豚鼠气道上皮细胞的钠流达 30 分钟。

5 图 24 显示了比库蛋白(100 μ g/ml)明显抑制体外牛气道上皮细胞的钠流达 90 分钟。

图 25 显示了(a)与 LPS 接触引起 PMN 流明显增加, 和(b)比库蛋白明显抑制预先接触 LPS 豚鼠的电势差。

10 图 26 显示了相对于 HBSS, 抑蛋白酶肽双突变蛋白(10 μ g)在给予后 1.5-2.5 小时的持续时间内提高体外豚鼠的 TMV。

图 27 显示了 pBC-BK(CMV-IE=巨细胞病毒立即早期; DHFR=二氢叶酸还原酶; AMP-r=氨苄青霉素抗性)的质粒图。

15 图 28 显示了(a)CHO 表达的比库蛋白(1-170)(10 μ g/ml)降低体外人 CF 支气管上皮细胞的钠流超过 90 分钟, 和(b)喷雾给予 1、5 和 10 μ g/ml 的 CHO 比库蛋白(1-170)和 20 μ g/ml 抑蛋白酶肽后, 降低体外人 CF 支气管上皮细胞钠流超过 90 分钟。

图 29 显示了从 CHO 细胞表达系统纯化比库蛋白(1-170)的加工步骤。

图 30A 显示了用 C18 反相层析纯化的 CHO 比库蛋白(1-170)同种型的迁移图。该图是在 280nm 吸光度测定的蛋白质洗脱曲线(实线), 用 0.1%三氟乙酸配制的乙腈的百分比来洗脱此蛋白(菱形)。

20 图 30B 显示 CHO 细胞表达系统表达的纯化比库蛋白(1-170)糖基化同种型(泳道 45-55)和一系列分子大小标记物蛋白(泳道 54 和 55 间)(以千道尔顿表示)的银染色 SDS-PAGE 的照片。自顶部到底部迁移。

25 图 31 是显示 N-糖苷酶 F 处理的(泳道 2 和 4)和未处理的(泳道 1 和 3)CHO 纯化比库蛋白(1-170)同种型和一系列分子大小标记物蛋白(以千道尔顿表示)的银染色 SDS-PAGE 的照片。自顶部到底部迁移。

发明概述

30 本发明涉及包含 Kunitz 类型丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白质及其片段的组合物, 它们能刺激肺气道中粘液和痰液的粘液纤毛清除速率。该组合物还包含新鉴定的称为人胎盘比库蛋白的人蛋白质, 其含有 Kunitz 类的两个丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域。

本发明还提供刺激粘液纤毛功能紊乱患者的粘液纤毛清除速率, 其中给予患者有效剂量的本发明所公开的丝氨酸蛋白酶抑制剂和生物相容的运载体。

胎盘比库蛋白、分离的结构域和其他变体的优选应用是刺激 CF 患者的粘液纤毛清除，作为疾病治疗和处理的一部分。这些方法和组合物能减少或消除慢性阻塞性肺病患者肺气道中累积的粘液和痰液，从而降低继发性肺感染和其他不良的副作用的危险，并避免或延迟 CF 患者对肺移植手术的需要。

5 本发明的方法设想用抑蛋白酶肽来刺激 MCC。抑蛋白酶肽已显示出能降低两栖非洲蟾蜍肾上皮细胞顶膜中的透上皮 Na^+ 转运 (Vallet 等人, 1997; Chraibi 等人, 1998)。估计抑蛋白酶肽作用的机理是参与抑制 CAP-1, A6 细胞中一种参与调节 Na^+ 通道活性的蛋白酶。比库蛋白(1-170), 牛抑蛋白酶肽的两个 Kunitz 结构域的人同源物 (Delaria 等人 1997; Marlor 等人, 1997), 已显示出能明显抑制体外体外培养的正常人支气管上皮细胞 (HBE) 短环电流 (Isc) (McAulay 等人, 1998)。比库蛋白 (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 70nM) 明显抑制正常 HBE 细胞 ($n=5-8$, $p \leq 0.05$) 的 Na^+ Isc。总而言之, 在 90 分钟内比库蛋白 (70nM) 抑制了 58% 基线 Isc。在进一步的研究中, 比库蛋白 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 明显抑制了正常 HBE 细胞 ($n=6$, $p \leq 0.01$) 的 84% Na^+ Isc, 而丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的丝氨酸蛋白酶抑制剂 $\alpha(1)$ -蛋白酶抑制剂 (α_1 -PI) (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 没有明显作用。在体外培养的人囊性纤维变性气道上皮细胞中, 比库蛋白 (1-170) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 抑制 Isc, 而且抑蛋白酶肽 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 也抑制 Isc。

根据上述观察考虑用 Kunitz 类型的丝氨酸抑制剂如抑蛋白酶肽、胎盘比库蛋白和它们的片段作为治疗剂来治疗粘液纤毛功能紊乱, 包括囊性纤维变性。

“Kunitz 抑制剂”指蛋白酶抑制剂; 从结构而言, “Kunitz 抑制剂”或“Kunitz 结构域”是一种蛋白质或蛋白质结构域, 通常长约 60 个氨基酸, 含有三个二硫键 (见 Laskowske & Kato, Ann.Rev.Biochem.49,593-626,1980)。

本发明丝氨酸蛋白酶抑制剂比库蛋白及其片段和类似物的 Kunitz 结构域的明显优点是它们是人蛋白质, 且比 Trasylo1® (实施例 1) 带的正电荷少, 从而降低了给予大剂量该蛋白质伤害肾的危险性。由于来源于人, 可将本发明的蛋白质给予病人, 与给予相似剂量的 Trasylo1® 相比, 引起不良免疫反应的危险性明显降低。另外, 还发现 Bkiunin (102-159)、比库蛋白 (7-64) 和比库蛋白 (1-170) 与 Trasylo1® 相比, 在体外明显是血浆激肽释放酶更强的抑制剂 (实施例 3, 4 和 10)。所以预计比库蛋白及其片段在体内比抑蛋白酶肽更有效。

药物组合物所用的量取决于待治疗的接受者和其病症。无需过多的实验本领域技术人员靠已知的规程就可确定所需的用量。另外, 根据治疗疾病必需抑制的靶蛋白酶如纤溶酶、激肽释放酶或前列腺蛋白酶所确定的量可计算出所需的用量。由于本发明所考虑的活性物质认为是无毒的, 因而治疗较佳地可包括给予的活性物质

量超过最佳所需剂量。

5 为了刺激慢性阻塞性肺病患者粘液纤毛清除速率，可如抑蛋白酶肽 Trasylo[®]那样使用本发明的蛋白质，同时考虑效力的差异。在 Physician Desk Reference, 1995 (Trasylo[®] 添加剂 A 的名单) 中列出了 Trasylo[®] 的使用方法。简单地说，对仰卧的患者而言，通过为时 20 分钟到 30 分钟的缓慢注射，给予胎盘比库蛋白其分离的结构域或其他变异体的负荷剂量，通常所用的总剂量在 2×10^6 KIU (血管舒缓素抑制剂单位) 到 8×10^6 KIU，这取决于许多因素如患者的体重及其病症。优选的负荷剂量是那些含有总剂量为 1—2 百万单位 (KIU) 的血管舒缓素抑制剂剂量。

10 可按本领域已知的方法将本发明的蛋白质用于药物组合物。这种组合物含有活性组分和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、填充剂、黏合剂和其他赋形剂，取决于给药的形式和所考虑的剂型。治疗用惰性无机或有机载体的例子是本领域技术人员已知的，包括(但不限于)乳糖、玉米粉或其衍生物、滑石粉、植物油、石蜡、脂肪、聚烯烃(如聚乙二醇)、水、蔗糖、乙醇、甘油等。也可添加各种防腐
15 剂、乳化剂、分散剂、香料、润湿剂、抗氧化剂、甜味剂、色素、稳定剂、盐、缓冲剂等，以帮助稳定制剂，或帮助增加活性成分的生物可利用性，或在口服、鼻用或肺用剂型时产生可接受的香味或气味。在这种组合物中可用的抑制剂可以是该化合物本身的最初形式或任选地以药学上可接受的盐的形式。可用本领域技术人员已知的适当模式按照给予该抑制剂所需选择如此配制的组合物。

20 肠胃外给药模式包括静脉(i.v.)、皮下(s.c.)、腹腔内(i.p.)和肌内(i.m.)途径。静脉给药可用于获得可能需要的迅速调节药物血浆浓度的峰值。另外，可用 i.v. 导管以所需的速度连续给药。合适的运载体包括无菌、无热源水性稀释剂，如注射用的无菌水、无菌缓冲液或无菌盐水。在手术前和/或手术间通过静脉注射或输液给予患者如此制备的组合物。

25 通过将药物包裹在脂质体中可实现药物半衰期的改善和药物对吞噬体(如参与炎症的嗜中性白细胞和巨噬细胞)的靶向。通过将其掺入到脂质体配体(结合于对靶器官/组织(如肠胃道和肺)特异性的大分子)的外部，可改善脂质体靶向的选择性。另外，可用 i.m. 或 s.c. 沉降注射(deposit injection)，将或不将药物包裹到可降解的微球体(如含有聚-DL-丙交酯-共乙交酯)中或含有胶原的保护性制剂中，从而延长
30 药物的缓慢释放。为了改善剂型使用的方便性，可以使用 i.p. 植入式储器和隔膜如 Percuseal 系统。也可用注射笔(injector pen)(如 Novo Pin 或 Q-pen) 或无针喷射注射器(如购自 Bioject 的 Mediject 或 Becton Dickinson)，来改善其方便性使患者易接受。

可用可植入的泵通过套管送递到所需的位点，进行精确控制的释放。例子包括购自 ALZA 的皮下植入式渗透泵如 ALZET 渗透泵。

5 将药物掺入片剂、糖衣药片、糖衣丸、硬或软明胶胶囊、溶液、乳剂、悬浮液或肠溶衣胶囊(被设计成将药物释放到消化蛋白酶活性低的结肠中)，可实现口服给药。肠溶衣胶囊的例子包括 ALZA 的 OROS-CT/Osmet™ 系统、和 Scherer Drug Delivery Systems 的 PULSINCAP™ 系统。其他系统使用偶氮交联的聚合物(可被结肠特异性细菌的偶氮还原酶降解)或 pH 敏感性聚丙烯酸聚合物(被结肠中升高的 pH 激活)。上述系统可以与大范围的吸收增强剂联合使用。将药物掺入栓剂可实现直肠给药。

10 将药物掺入生物附着性颗粒载体(<200mm)如那些含有纤维素、聚丙烯酸酯或聚卡波非，并与适当的吸收增强剂(如磷脂或酰肉碱)联用，可实现鼻腔给药。可购得的系统包括由 Dan Biosys 和 Scios Nova 开发的系统。

15 为了刺激粘液纤毛的清除速率，本发明胎盘 Bikinin 变体的优选给药模式是肺给药。本文所公开的 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂可用适当的装置给予患者的肺部，但优选的是给予患者含有活性化合物的可吸入的颗粒的气雾悬浮剂。可吸入的颗粒可以是液态或固态的。在适当的载体如甘露醇、蔗糖或乳糖中含有该药物的微米级干粉，可用干粉吸入器如 Inhale™、Dura™、Fisons(Spinaler™)和 Glaxo (Rotahaler™)或 Astra(Turbohaler™)的那些推进式计量的吸入器输送至肺气道表面。可用喷雾器输送含有或无脂质体的溶液制剂。

20 可用任何合适的方法如用压力驱动的喷雾式汽化器或超声波雾化器，产生含有蛋白质的液态颗粒的气溶胶。见如美国专利 No.4,501,729。喷雾器是可以购得的装置，通过压缩气体(通常为空气或氧气)加速通过狭窄的细管，或通过超声搅拌，可将活性组分的溶液或悬浮液转化成治疗性气溶胶喷雾。适用于气雾剂的制剂由液态载体中的活性组分构成。载体通常是水(最优选无菌、无热源水)或稀释的含水酒精溶液，优选添加例如氯化钠的体液形成的等渗溶液。如果制剂不是无菌的，任
25 选的添加剂包括防腐剂，如羟基苯甲酸甲酯、抗氧化剂、香精、挥发油、缓冲剂和表面活性剂。

30 同样，也可用任何固态颗粒药物气溶胶生成器，可同样制备含蛋白质的固态颗粒气溶胶。将固态颗粒药物送递给患者的气溶胶生成器产生的颗粒是可吸入的(如上所述)，且以适用于人给药的速率，产生含预定剂量药物体积的气溶胶。固态颗粒气溶胶发生器的一典型实例是吹药器。适用于由吹药器给药的制剂包括粉碎得很细的粉末，可通过吹药器输送或以鼻烟的形式吸入鼻腔。在吹药器中，粉末(如

含有能有效进行上述治疗的剂量)包含在通常由明胶或塑料制成的胶囊或药筒中, 在原位穿入或打开, 由吸入装置或手动的泵通过引流气体来输送粉末。吹药器中所用的粉末由单独的蛋白质或含有蛋白质、合适的粉末稀释剂(如乳糖)和任选的表面活性剂的粉末混合物构成。气溶胶生成器的另一种说明性例子包括计量吸入器。5 计量吸入器是增压气溶胶分送器, 通常在液化发射剂中包含活性组分的悬浮液或溶液制剂。在使用过程中, 这些装置将制剂排出通过一阀门以输送确定的容量(通常为10到200 μ L), 以产生含蛋白质的细颗粒喷雾。合适的发射剂包括某些氟氯化物如二氟二氯甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷和它们的混合物。制剂可附带含有一种或多种共溶剂(如乙醇)、表面活性剂(如油酸或去水山梨糖醇三油酸酯)、抗氧化剂10 和合适的芳香剂。

对计量吸入器或干粉吸入器装置而言, 可以约5—150升/分钟, 较佳地以10—100升/分钟, 最佳的是以约10—50升/分钟(对计量吸入器而言)和60升/分钟(对干粉气雾剂而言)的速率, 用气溶胶生成器制备由固态或液态颗粒形成的气雾。可以约1—100升/分钟、较佳地是以4—10升/分钟的速度, 用气溶胶生成器制备可由喷雾器、喷射或超声波产生的气溶胶。含有较多蛋白质的气溶胶可更迅速地给药。15

蛋白酶抑制剂的剂量可以变化, 取决于治疗的病症和患者的状况。每天的剂量可以分成一或若干单位剂量给药。对病人而言, 每天的剂量(重量)的范围为约0.01到20毫克可吸入的颗粒, 取决于患者的年龄和病症。

含有本发明蛋白酶抑制剂的固态或液态颗粒药物制剂包括可吸入尺寸的颗粒, 即颗粒的尺寸足够小, 吸入时能通过嘴和喉, 并进入肺的支气管和肺泡。通常, 尺寸范围为约1—8微米(更佳的是小于约6微米)的颗粒是可吸入的。气溶胶中所含的不能吸入尺寸的颗粒倾向于沉积在喉道中并被吞咽, 所以较佳地要将气溶胶中不能吸入的颗粒的量降至最低。对鼻腔给药而言, 颗粒大小范围在10—500微米是20 优选的以确保在鼻腔中滞留。

在本发明制剂的制备中, 通常将蛋白酶抑制剂与可接受的载体混合。当然载体可接受意味必须与制剂中其他任何成分相容, 且对患者无害。载体可以是固态或液态, 或两者都可, 且较佳地与化合物一起配制成单位剂量制剂(如胶囊), 可含有0.5%—99%(重量)的活性化合物。在本发明的制剂中可掺有一种或多种活性化合物, 可用任何熟知的药学方法来制备此制剂, 基本上包括将这些化合物混合起来。25

用研钵和研棒研磨抑制剂, 然后让微米级的组合物通过400目筛以分散或分出大的团粒, 来制备含有可吸入的蛋白酶抑制剂干颗粒的组合物。30

此药物组合物可任选地含有分散剂, 以便于气溶胶的形成。合适的分散剂是

乳糖,可将其以合适的比例(如 1:1 的重量比例)与活性组分混合。

如果需要,可用活体外和体内基因治疗策略,来输送编码 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白质如比库蛋白、抑蛋白酶肽或其片断和变体(如在 WO97/33996 (Bayer Corp.)和美国专利 No.5,407,915(Bayer AG)中所述的)的核酸构建物。可用主要
5 要以病毒为基础的基因治疗技术来转化肺细胞,作为治疗肺和相关肺外组织中的 CF 症状。见 1993 年 3 月 3 日出版的 WO93/03709,其描述了用逆转录病毒和非病毒载体(如腺病毒和腺病毒相关病毒)来稳定地表达 CF 患者的 CFTR 基因。另外,也已知可用非病毒方法来输送外源核酸,本发明中也考虑到此种用法。见于 1993 年 6 月 24 日出版的 WO93/12240 及本文的参考文献,描述了将包含 CFTR 分子编
10 码序列的表达盒或转录盒操作性地连接于哺乳动物的功能性调节序列。然后可用许多方法包括单独或与脂类复合物(如 Lipofectin™)混合,气雾化输送,将此核酸构建物输送到肺的气道和肺泡。于 1995 年 10 月 5 日出版的 WO95/26356 描述了用于转染的脂质的代表性例子。本发明以合适的基因治疗方法作为对需要该治疗的患者刺激其粘液和痰液的粘液纤毛清除速率的手段,将编码 Kunitz 类丝氨酸蛋白酶抑制
15 剂(如比库蛋白、抑蛋白酶肽或其变体和片断)的核酸分子以类似方法给予肺气道。

人序列数据的检索

在 NCBI(国家生物信息中心, Maryland)对输入到表达—序列—标记数据库(以下称为 dbEST)的序列进行唯一分析后,推导出存在一种与抑蛋白酶肽功能同源的
20 独特人蛋白质。用 TblastN 算法(BLAST,或使用 Altschul 等人(1990)J.Mol Biol 215-00 403-410 方法的基本局部排列对比检索工具,检索了查询序列和数据库中所有序列之间,任何组合中蛋白质或核酸的相似性),检索了数据库中与牛预—前一抑蛋白酶肽 Trasylo1®序列同源的核苷酸序列。对众多克隆的该种检索选择性地局
25 限到两个特殊的克隆,它们可编码相应于与抑蛋白酶肽功能同源的人蛋白质推导出的氨基酸序列。选出的核酸序列是 R35464(SEQ ID NO:12)和 R74593(SEQ ID NO:14),它们是从人胎盘核酸文库产生的。在 R35464(SEQ ID NO:13)最长开放读框中翻译的蛋白质序列缺失了 6 个半胱氨酸中的一个(对形成 Kunitz 结构域共价结构是关键的),意味着 R35464 的核酸序列不能产生功能性抑制剂。类似地,克隆
30 R74593(SEQ ID NO:15)的最长翻译的开放读框在编码 Kunitz 类序列区域的 5' 含有一终止密码子,这意味着不能翻译该序列以产生功能性分泌的 Kunitz 结构域。这些序列单独的重要性尚不清楚。它们可能代表 a)假基因的产生, b)未翻译的 mRNA 的区域,或 c)不正确定序的活 mRNA 的产物。

人比库蛋白的发现

为了特异性分离和测定人的实际序列,设计 cDNA 引物,其能与 R35464 和 R74593 中发现的编码我们所建议的 Kunitz 样序列的 cDNA 片断的 5'和 3'位置的序列杂交。用于扩增编码 R74593 的 Kunitz 样序列的片断的引物是 CGAAGCTTCATC
5 TCCGAAGCTCCAGACG(3'引物含有一 HindIII 位点, SEQ ID NO:33)和 AGGATC TAGACAATAATTACCTGACCAAGGA(5'引物含有一 XbaI 位点, SEQ ID NO:34)。

用这些引物从购自 Clontech(MATCHMAKER,Cat#HL4003AB, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)的人胎盘 cDNA 文库中,以 PCR(30 轮)扩增一 500 碱基
10 对的产物,随后将其亚克隆入 Bluescript-SK+中,用 Sequenase™ 试剂盒 2.0 版本用 T3 引物测序。令人惊讶的是,用我们引物产生的该片断的序列与克隆 R74593 的 dbEST 数据库中所列出的序列不同。具体说,我们的新序列含有一个额外的鸟苷碱基,其 3'插入在该推定的终止密码子处,5'插入在编码 Kunitz 样序列的片断处(图 3)。一个额外的 G 的插入使该终止密码子迁移出 Kunitz 样结构域的开放读框(G 在
15 R74593 校正序列的碱基对 114 处;图 3)。

随后查询 dbEST 中与 R74593 的 Kunitz 样肽序列同源的序列,得到人视网膜文库衍生的 H94519 和 N39798。这二序列含有 Kunitz 样序列,与 R35464 中编码的 Kunitz 样结构域几乎相同,除了它的含有所有 6 个特征性半胱氨酸外。每个核苷酸序列 R74593(在 bp144 插入 G 以校正)和 R35464 的核苷酸序列的重叠,获得部
20 分的人胎盘比库蛋白的共有核苷酸序列(SEQ ID NO:9,图 3)。翻译的共有序列产生了从残基-18 延伸到+179(图 3; SEQ ID NO:10 的全翻译)的一个开放读框,其分别在氨基酸残基 17-64 和 102-159 区域中含有两个完全的 Kunitz 样结构域序列。

通过用 R35466 的序列查询 dbEST,进一步努力尝试得到其他 5'序列。然后进
25 而利用这些检索得到的拥有其他 5'序列的可能匹配来再查询 dbEST。以这种重复模式,鉴定了一系列重叠的 5'序列,其中包括克隆 H16866、T66058、R34808、R87894、N40851 和 N39876(图 4)。对这些序列中的一些作排列对比提示存在一个与 5'ATG,它可能作为该共有序列翻译的蛋白质序列合成的起始位点。由这种所选定的信息来看,选择性地筛选和鉴定与抑蛋白酶肽功能同源的人蛋白质的核酸和多肽序列目前已有可能。
30

重查询 dbEST 揭示了许多新的 EST 输入(如图 4B 所显示)。与这些其他的 EST 重叠使我们构建长得多的共有寡核苷酸序列(图 4C),它的 5'和 3'延伸都超过了原

始的寡核苷酸序列(如图 3 所示)。事实上, 总长为 1.6 千个碱基的该新序列一直延伸至 3' 聚-A 尾部。沿该序列中各碱基对位置上重叠性 EST 数量的增加, 改善了某些区域(如与 EST R74593 的 3' 末端重叠的序列)的置信水平(图 3)。在该区域若干重叠的 EST 确证了两个关系到 R74593 的关键性碱基缺失(位于图 4C 中粗下划线显示的 994 和 1005 位置)。翻译编码比库蛋白读框中该新的共有序列(图 4D), 产生了一种形式的胎盘比库蛋白, 比原始共有序列(SEQ ID NO:1)编码的成熟序列(179 氨基酸)大(248 个氨基酸), 并终止于该寡核苷酸共有序列内一框终止密码子。大小的增加是由于读框在 3' 编码区域的迁移, 这是除去 EST R74593 独有的两个碱基插入件而产生的结果。读框的迁移将原始共有序列(图 3)的终止密码子移出读框外, 从而使能够读入新的编码其他氨基酸序列的读框。新翻译产物在残基 +1 到 +175(编码 Kunitz 结构域)之间与原始蛋白质共有序列(SEQ ID NO:1)相同, 但其含有新的 C 端延伸, 展示出推定的 24 个残基长度的跨膜结构域(图 4D 下划线)随后为一短的 31 个残基的胞质结构域。启动子甲硫氨酸和信号肽周围的精确序列是有点假定的, 因为在该区域重叠性 EST 中有相当的不均匀性。

用 Geneworks™ 分析该蛋白质序列突出了 30 和 67 位的天冬酰胺残基为推定的 N-连接的糖基化的共有序列。在人胎盘分离的该全长蛋白质 N 端测序时未观察到天冬酰胺 30, 这与其被糖基化一致。

人比库蛋白的克隆

如下确证了相应于推定的人比库蛋白核苷酸序列(图 3 分析中推测的)的人 mRNA 的存在。使用核酸引物将 5' 杂交于 R35464(图 3 中的 b.p.3-27 共有核苷酸序列)编码 Kunitz 的 cDNA 序列: GGTCTAGAGGCCGGGTCGTTTCTCGCCTGGCTGGGA(自 R35464 序列衍生的 5' 引物, 含有一 XbaI 位点, SEQ ID NO:35), 并将核酸引物 3' 杂交于 R74593(图 3 中的 b.p.680-770 共有核苷酸序列), 进行 PCR 扩增, 从 Clontech 人胎盘文库中扩增到一片断(ca.670b.p.), 是根据从编码图 3 中的胎盘比库蛋白序列的 cDNA 共有核苷酸序列所预计的大小(如图 4A 所示)。

用杂交于 R87894 中某序列的 5' 引物(从 5' 到上述的推定 ATG 起始位点为 126b.p.), 加上对 R74593 相同的 3' 引物(如图 4A 所示在 b.p.110), 有可能从 Clontech 人胎盘文库扩增到一段根据 EST 重叠所预计的预定大小的片断(约 872b.p.)(如图 4 所示)。

该 872b.p. 片断的测序显示: 在其 5' 端含有相应于 EST R87894 的 b.p.110 到 218 的核苷酸节断, 在其 3' 端含有 EST 重叠分析(图 3)推定的胎盘比库蛋白的共有序列

的 b.p.310—542。该 3'核苷酸序列含有胎盘比库蛋白(102—159)编码的所有 Kunitz 样结构域。

5 为了获得编码此蛋白质的整个细胞外结构域的 cDNA, 使设计的如下 5'PCR 引物: CACCTGATCGCGAGACCCC(SEQ ID NO: 36)与 EST R34808 中的一序列杂交, 和与 EST 74593 相同的 3'引物一起使用, 从人胎盘 cDNA 文库扩增(30 轮)到一条长约 780 个碱基对的 cDNA 产物。将此产物进行凝胶纯化, 克隆入 TA 载体 (Invitrogen) 中, 用以下引物以双脱氧方法 (Sanger F., 等人 (1977)Proc. Natl.Acad.Sci(USA),74,第 5463—5467 页)进行 DNA 测序:

特异性载体: GATTTAGGTGACACTATAG(SP6)(SEQ ID NO:37)
 10 TAATACGACTCACTATAGGG(T7)(SEQ ID NO: 38)
 特异性基因: TTACCTGACCAAGGAGGATGTGC (SEQ ID NO: 39)
 AATCCGCTGCATTCCTGCTGGTG (SEQ ID NO:40)
 CAGTCACTGGGCCTTGCCGT (SEQ ID NO: 41)

15 图 4E 这显示了得到的 cDNA 序列及其翻译产物。在核苷酸水平, 该序列显示出与共有 EST 序列只有微小差异(图 4D)。翻译此序列得到包含一框内启动子 ATG 位点、信号肽和成熟胎盘比库蛋白序列和跨膜结构域的编码序列。该 PCR 产物的翻译序列缺失了胞浆结构域的最后 12 个氨基酸残基, 这是选择此 3'引物进行 PCR 扩增所造成的。3'PCR 引物的这种选择(基于 R74593 的序列命名)也导致在翻译的 PCR 衍生序列的氨基酸 211 位引入了一个人造的 S 到 F 的突变。从该 PCR 片断翻
 20 译推导的信号肽与 EST 共有序列所推导的有些差异。

为了得到全长的胎盘比库蛋白 cDNA, 凝胶纯化了该 PCR 衍生的产物(图 4E), 并由于分离代表比库蛋白序列的非 PCR 为基础的全长克隆。通过 High Prime(Boehringer Mannheim)用 ³²P-CTP 标记该 PCR 衍生的 cDNA 序列, 并通过克隆杂交技术用于探测胎盘 cDNA 文库(Stratagene,UnizapTM λ 文库)。对约 2×10⁶ 个
 25 噬菌体空斑进行 3 轮筛选和空斑纯化。由限制酶分析并依据与 EST 共有序列大小的比较(如上), 确定了推测为全长(~1.5 千碱基)的两个克隆。用双脱氧方法测定这二克隆中一个的序列, 产生图 4F 所示的寡核苷酸序列。该序列的翻译产物产生一个含框内启动子甲硫氨酸、信号肽和成熟胎盘比库蛋白序列的蛋白质。此成熟胎盘比库蛋白序列与 EST 共有序列翻译所衍生的成熟蛋白质的序列相同, 而信号肽序
 30 列长度及序列不同。与该 PCR 衍生的产物不同, 菌落杂交衍生的 cDNA 含有完整的胞外结构域、跨膜结构域、胞浆结构域和框内终止密码子。实际上, 该克隆一直延伸至 3'聚-A 尾部。启动子甲硫氨酸后跟随着一疏水信号肽, 其与该 PCR 衍生

的克隆中所编码的信号肽相同。由此，我们从 Sf9 细胞(实施例 9)和 CHO 细胞(实施例 17)表达和纯化了胎盘比库蛋白的可溶性片断比库蛋白(1-170)，并发现它们是功能性蛋白酶抑制剂(实施例 10 和 18)。另外，我们从人胎盘分离到胎盘比库蛋白的一种可溶性片断，它也是一种活性蛋白酶抑制剂(实施例 7)。

5 根据上述观察，看来全长胎盘比库蛋白具有呈细胞表面呈跨膜蛋白质以及可溶性蛋白质存在的能力。已知其他含有 Kunitz 结构域的跨膜蛋白质经历解蛋白水解加工，产生可溶性和膜相连形式的混合物。这包括两种形式的淀粉样蛋白前体，称为 APP751(Esch F., 等人, (1990)Science, 248, 第 1122-1124 页)和 APP770(Wang R., 等人(1991), J.Biol Chem, 266, 第 16960-16964 页)。

10 接触激活是一种使受损伤的血管表面与血凝级联反应成分接触而被激活的过程。血管生成的过程包括在内皮表面局部激活血纤蛋白溶酶。胎盘比库蛋白的特异性及其推定的锚定于细胞表面的能力，提示跨膜性胎盘比库蛋白的生理功能可能包括调节接触激活和血管生成。

用 Genetics Computer Group program Fast A，对 PIR(版本 46.0)和 PatchX(版本 15 46.0)蛋白质数据库以及 GeneSeq(版本 20.0)专利序列的蛋白质数据库，检索了胎盘比库蛋白(7-64)、比库蛋白(102-159)和全长胎盘比库蛋白(图 4F)的氨基酸序列。用 Genetics Computer Group program Fast A(Pearson 和 Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448)对 GenBank(版本 92.0, 1/26/96 更新的数据)和 EMBL(改进的版本 45.0)核苷酸数据库及 GeneSeq(版本 20.0)专利序列的核苷酸数据库中的 20 一 读框翻译，检索了这些相同的蛋白质序列。GenBank 和 EMBL 的 EST 和 STS 亚组不包括在本次检索中。由这些检索产生的最佳匹配包括的序列，全长上与我们分析的克隆 R74593 和 R35464 衍生的 58 个氨基酸蛋白质序列仅有大约 50% 相同。

人比库蛋白的分离

25 如上所述，可再重叠以下合成肽：相应于由比库蛋白翻译的共有序列所确定的比库蛋白(7-64)和比库蛋白(102-159)，产生活性激肽释放酶抑制剂蛋白质(分别为实施例 3 和 4)。我们利用该出人意料特性，来设计纯化方案从人组织分离出天然胎盘比库蛋白。

30 用一种纯化方案(其中使用激肽释放酶-琼脂糖亲和层析作为第一步)，分离得到了高度纯化的天然的强激肽释放酶抑制剂。该分离的天然人比库蛋白具有与预测的序列(通过翻译共有核酸序列(图 3)氨基酸残基+1 到+50)相同的 N 末端(50 氨基酸残基序列)。这首次证实存在着一种新的分离自人胎盘的天然激肽释放酶抑制剂。

以下列出了已知的 Kunitz 样结构域。其中强调(加粗/下划线)了有特殊兴趣的、认为导致与靶蛋白酶接触的残基。如标记 Xaa 所示, 这些特殊的残基以位置 Xaa1-16 为具体参考命名。

比库蛋白(7-64)(SEQ ID NO:4)

5 xaa 1 1 111 1 1
1 2 3 456789 0 1 234 5 6

IHDFCLVSKVY GRCRASMPRW WYNVTDGSCQ LFVYGGCDGN SNNYLTKEEC LKKCATV

比库蛋白(102-159)(SEQ ID NO:6)

YEEYCTANAVT GPCRASFPRW YEDVERNSCN NFIYGGCRGN KNSYRSEEAC MLRCFRQ

10 组织因子路径抑制剂前体 1(SEQ ID NO:18)

-HSFCAFKADD GPCKIMAKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC KKMCTRD

组织因子路径抑制剂前体 1(SEQ ID NO:19)

-PDFCFLEEDP GICRGYITRY FYNNQTKQCE REKYGGCLGN MNNFETLEEC KNICEDG

组织因子路径抑制剂前体(SEQ ID NO:20)

15 -PSWCLTPADR GLCRANENRF YNSVIGKCR PFKYSGCGGN ENNFTSKQEC LRACKKG

组织因子路径抑制剂前体 2(SEQ ID NO:21)

-AEICLLPLDY GPCRALLLRY YYRYRTQSCR QFLYGGCEGN ANNFYTWEAC DDACWRI

组织因子路径抑制剂前体 2(SEQ ID NO:22)

-PSFCYSPKDE GLCSANVTRY YFNPRYRTCD AFTYTGCGGN DNNFVSREDC KRACAKA

20 淀粉样蛋白前体同源物(SEQ ID NO:23)

-KAVCSEAMT GPCRAVMPRT TFDLSKGKCV RFITGGCGGN RNNFESEDYC MAVCKAM

抑蛋白酶肽(SEQ ID NO:24)

RPDFCLEPPYT GPCKARIIRY FYNAKAGLCQ TFVYGGCRAK RNNFKSAEDC MRTCGGA

内- α -胰蛋白酶抑制剂前体(SEQ ID NO:25)

25 ----CQLGYSA GPCMGMTSRY FYNGTSMACE TFQYGGCMGN GNNFVTEKEC LQTC

内- α -胰蛋白酶抑制剂前体 2(SEQ ID NO:26)VAACNLPIVR GPCRAFIOLW

AFDAVKGKCV LFPYGGCOGN GNKFYSEKEC REYCGVP

淀粉样蛋白前体(SEQ ID NO:27)

-EVCCSEQAET GPCRAMISRW YFDVTEGKCA PFFYGGCGGN RNNFDTEEYC MAVCGSA

30 胶原 α -3(VI)前体(SEQ ID NO:28)

----CKLPKDE GTCRDFILKW YYDPNTKSCA RFWYGGCGGN ENKFGSQKEC EKVC

HKI-B9(SEQ ID NO: 29)

-PNVCAFPMEK GPCOTYMRW FFNFETGECE LFAYGGCGGN SNNFLRKEKC EKFCKFT

可用标准的固相肽合成，使用 Merrifield R.B.和 Barany G.在“肽、分析、合成”，Biology,2,Gross E.等编辑，Academic Press(1980)第一章中所述的 t-Boc 化学方法，或使用 Carpino L.A.,和 Han G.Y.,(1970)J.Amer Chem Soc.,92,57480-5749 中所述的 F-moc 化学方法，产生本发明的胎盘比库蛋白、其分离的结构域或其他变体，且见实施例 2 的叙述。另外，可用编码胎盘比库蛋白变体的 DNA 的表达来生成重组胎盘比库蛋白变体。

本发明提供了纯化的人丝氨酸蛋白酶抑制剂的用途，它可特异性抑制激肽释放酶，它是通过亲和层析从人胎盘组织分离出的。人丝氨酸蛋白酶抑制剂，本文称为人胎盘比库蛋白，含有两个 Kunitz 类型的丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域。在一实施例中，本发明包括具有如下氨基酸序列的蛋白质：

10 ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN 50
 YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF 100
 NYEEYCTAN AVTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE 150
 15 ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLGAVS 179
 (SEQ ID NO:1)

在一优选实施例中，本发明提供了具有如下氨基酸序列的比库蛋白(比库蛋白(1-170))：

20 ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN 50
 YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF 100
 NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE 150
 ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK
 170
 (SEQ ID NO:52)

25 一方面，用于实施本发明的蛋白质的生物活性是，其能结合于并基本抑制胰蛋白酶、人血浆和组织激肽释放酶、人血纤蛋白溶酶和因子 XIIa 的生物活性。在一优选实施例中，本发明提供糖基化形式的天然人胎盘比库蛋白。在另一实施例中，本发明包括的天然人比库蛋白，含有至少一个半胱氨酸一半胱氨酸二硫键。在一优选实施例中，该蛋白质含有至少一个在选自以下的一对半胱氨酸：

30 CYS11-CYS61、CYS20-CYS44、CYS36-CYS57、CYS-106-CYS156、
 CYS115-CYS139 和 CYS131-CYS152 之间，形成的链内半胱氨酸一半胱氨酸二硫键，其中半胱氨酸的码号根据天然人胎盘比库蛋白的氨基酸序列。普通技术人员可以懂得本发明的蛋白质可以折叠成适当的三维构象，从而能维持天然人比库蛋白的生物活性，其中不存在或存在一个或多个或全部的天然链内半胱氨酸一半胱氨酸二硫键。在一最优选实施例中，本发明的蛋白质适当折叠，形

35 成具有全部适当的天然半胱氨酸一半胱氨酸二硫键。

通过从人组织如胎盘纯化，或通过以下实施例所述的合成蛋白质化学方法，可得到本发明的活性蛋白质。也可以理解，可用分子生物方法获得用于本发明的蛋白质，其中自我复制的载体能够从转化的细胞表达本发明的蛋白质。这些蛋白质可以制成非分泌型的或从转化的细胞分泌。为了有利于转化细胞的分泌，为了提高翻译的蛋白质的功能稳定性，或为了帮助比库蛋白的折叠，可将一些信号肽序列加到天然人比库蛋白的 NH₂-末端部分。

在一实施例中，本发明还提供带有至少一部分天然信号肽序列的天然人比库蛋白。在本发明的另一实施例中，提供了至少带有部分信号肽的天然人比库蛋白，具有如下的氨基酸序列：

10	AGSFL AWLGS LLLSG VLA	-1
	ADRER SIHDF CLVSK VVGRC RASMP	25
	RWWYN VTDGS CQLFV YGGCD GNSNN	50
	YLTKE ECLKK CATVT ENATG DLATS	75
	RNAAD SSVPS APRRQ DSEDH SSDMF	100
15	NYEEY CTANA VTGPC RASFP RWYFD	125
	VERNS CNNFI YGGCR GNKNS YRSEE	150
	ACMLR CFRQQ ENPPL PLGSK VVVLA	175
	GAVS	179

(SEQ ID NO:2)

20 在一优选实施例中，本发明提供了天然人胎盘比库蛋白的用途，该蛋白质包含完整前导序列的一部分、具有 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列，完整前导节段具有如下氨基酸序列：

MLR AEADGVSRLG GSLLSGVLA -1

(SEQ ID NO:54)

25 在本文所用的优选编号系统中，编号为+1 的氨基酸为天然人胎盘比库蛋白的氨基酸序列的 NH₂ 末端。不难明白可从天然人胎盘比库蛋白衍生出功能性蛋白质片断，其能至少能维持天然人胎盘比库蛋白的部分生物活性，可作为丝氨酸蛋白酶抑制剂。

30 在一实施例中，用于本发明方法的蛋白质含有天然人胎盘比库蛋白的片断，其中含有至少一个功能性 Kunitz-样结构域，具有天然人胎盘比库蛋白氨基酸 7-159 的氨基酸序列，本文以后称其为“比库蛋白(7-159)”。因此本发明包括使用如下氨基酸序列的蛋白质的方法：

	IHDF CLVSK VVGRC RASMP	25
	RWWYN VTDGS CQLFV YGGCD GNSNN	50
	YLTKE ECLKK CATVT ENATG DLATS	75
	RNAAD SSVPS APRRQ DSEDH SSDMF	100
5	NYEEY CTANA VTGPC RASFP RWYFD	125
	VERNS CNNFI YGGCR GNKNS YRSEE	150
	ACMLR CFRQ	159
	(SEQ ID NO:3)	

其中氨基酸的编号对应于天然人胎盘比库蛋白的氨基酸序列。该实例的另一功能性变体可以是天然人胎盘比库蛋白的片断，其包含至少一个功能性 Kunitz 样结构域，具有天然人胎盘比库蛋白氨基酸 11-156 的氨基酸序列，比库蛋白(11-156)

	CLVSK VVGRC RASMP	25
	RWWYN VTDGS CQLFV YGGCD GNSNN	50
15	YLTKE ECLKK CATVT ENATG DLATS	75
	RNAAD SSVPS APRRQ DSEDH SSDMF	100
	NYEEY CTANA VTGPC RASFP RWYFD	125
	VERNS CNNFI YGGCR GNKNS YRSEE	150
	ACMLR C	159
20	(SEQ ID NO:50)	

可以看出单个的 Kunitz 样结构域也是天然胎盘比库蛋白的片断。具体说，本发明考虑了含有第一 Kunitz 样结构域的氨基酸序列的蛋白质的用途，其中 Kunitz 样结构域由天然人胎盘比库蛋白氨基酸 7-64(本文以后称其为“比库蛋白(7-64)”)的氨基酸序列组成。因此在一实施例中，本发明包括的蛋白质含有至少一个具有以下氨基酸序列的 Kunitz 样结构域：

	IHDF CLVSK VVGRC RASMP	25
	RWWYN VTDGS CQLFV YGGCD GNSNN	50
	YLTKE ECLKK CATV	64
	(SEQ ID NO:4)	

其中氨基酸的编号对应于天然人胎盘比库蛋白的氨基酸序列。本发明蛋白质的另一种形式可以由天然人胎盘比库蛋白氨基酸 11-61 的氨基酸序列构成的第一 Kunitz 样结构域，“比库蛋白(11-61)”具有以下的氨基酸序列：

	CLVSK VVGRC RASMP	25
	RWWYN VTDGS CQLFV YGGCD GNSNN	50
35	YLTKE ECLKK C	61
	(SEQ ID NO:5)	

本发明还提供具有 Kunitz 样结构域的氨基酸序列的蛋白质，其中 Kunitz 样结构域由天然人胎盘比库蛋白氨基酸 102-159 的氨基酸序列构成，本文以

下称为“比库蛋白(102-159)”。因此在一实施例中，本发明包括的蛋白质含有至少一个具有以下氨基酸序列的 Kunitz 样结构域：

	YEEY CTANA VTGPC RASFP RWYFD	125
	VERNS CNNFI YGGCR GNKNS YRSEE	150
5	ACMLR CFRQ	159

(SEQ ID NO:6)

其中氨基酸的编号对应于天然人胎盘比库蛋白的氨基酸序列。这种结构域的另一形式可以是由天然人胎盘比库蛋白氨基酸 106-156 的氨基酸序列构成的 Kunitz 样结构域，其中“比库蛋白(106-156)”具有如下的氨基酸序列：

10	CTANA VTGPC RASFP RWYFD	125
	VERNS CNNFI YGGCR GNKNS YRSEE	150
	ACMLR C	156

(SEQ ID NO: 7)

因此普通技术人员可以明白产生的天然人比库蛋白的这些片断将至少保留部分该天然蛋白质的生物活性。这些片断可以不同取向混合或多重混合，以提供能部分保留、相同或更好的天然人比库蛋白活性的蛋白质。

不难明白用于本发明方法的生物活性蛋白质可包括一个或多个 Kunitz 样结构域，并结合其他来源的 Kunitz 样结构域。本发明方法的生物活性蛋白质可包含一个或多个 Kunitz 样结构域，并结合其他来源的其他蛋白质结构域(具有各种生物活性)。用于实施本发明的生物活性蛋白质可与其他已知的蛋白质联合，以提供具有预定生物活性的多功能融合蛋白。因此在一实施例中，本发明的方法包括一种蛋白质的用途，该蛋白质包含至少一个与 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:7 氨基酸序列相同或功能相当的氨基酸序列片断。

终止于早期终止密码子的开放读框还可编码一种功能性蛋白质。本发明包括这种可供选择的终止，在一实施例中提供了如下氨基酸序列的蛋白质的用途：

	ADRER SIHDF CLVSK VVGRC RASMP	25
	RWWYN VTDGS CQLFV YGGCD GNSNN	50
	YLTKE ECLKK CATVT ENATG DLATS	75
30	RNAAD SSVPS APRRQ DS	92

(SEQ ID NO:8)

在一实施例中，本发明提供了基本纯的或重组产生的天然人比库蛋白的用途，该蛋白质具有前导序列的完整节段和完整天然跨膜结构域的至少一部分。因此本发明的一个实施例提供了天然人比库蛋白的用途，该蛋白质具有完整前导序列和跨膜结构域的(下划线)至少一部分，具有选自如下的氨基酸序列：

EST			MLR	AEADGVSRLI	GSLLLSGVLA	-1
PCR			MAQLCGL	RRSRAFLALL	GSLLLSGVLA	-1
λ cDNA			MAQLCGL	RRSRAFLALL	GSLLLSGVLA	-1
EST	ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWYN	VTDGSCQLFV	YGGCDGNSNN	50
PCR	ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWYN	VTDGSCQLFV	YGGCDGNSNN	50
λ cDNA	ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWYN	VTDGSCQLFV	YGGCDGNSNN	50
EST	YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
PCR	YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
λ cDNA	YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
EST	NYEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
PCR	NYEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
λ cDNA	NYEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
EST	ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSK	<u>VVVLAGLFVM</u>	<u>VLILFLGASM</u>	<u>VYLIRVARRN</u>	200
PCR	ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSK	<u>VVVLAGLFVM</u>	<u>VLILFLGASM</u>	<u>VYLIRVARRN</u>	200
λ cDNA	ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSK	<u>VVVLAGLFVM</u>	<u>VLILFLGASM</u>	<u>VYLIRVARRN</u>	200
EST	QERALRTVWS	SGDDKEQLVK	NTYVL			225
PCR	QERALRTVWS	FGD				213
λ cDNA	QERALRTVWS	SGDDKEQLVK	NTYVL			225

其中 EST 是 EST 衍生的共有序列 SEQ ID NO:45, PCR 是 PCR 克隆 SEQ ID NO:47, λ cDNA 是 λ cDNA 克隆 SEQ ID NO:49。在一优选实施例中,用于本发明方法的蛋白质包含 SEQ ID NO:45、47 或 49 的氨基酸序列之一,其中在最后的 Kunitz 结构域末端和跨膜结构域(下划线)之间的区域切断该蛋白质。

本发明还包括信号肽缺失的蛋白质的用途。由此,本发明的方法提供了具有 SEQ ID NO:52 氨基酸序列并续有如下跨膜氨基酸序列的蛋白质:

EST	<u>VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN</u>	200
EST	QERALRTVWS SGDDKEQLVK NTYVL	225

10 (SEQ ID NO:69)

如下的跨膜氨基酸序列:

PCR	<u>VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN</u>	200
PCR	QERALRTVWS FGD	213

15 (SEQ ID NO:68)

或如下的跨膜氨基酸序列:

λ cDNA	VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN	200
λ cDNA	QERALRTVWS SGDDKEQLVK NTYVL	225

15 (SEQ ID NO:67)

用于本发明的蛋白质氨基酸序列可以使本领域技术人员清楚知道:适当的核酸序列,其可用于分子生物方法中产生用于本发明的蛋白质。所以,本发明的一实施例提供了编码具有图 3 共有 DNA 序列(SEQ ID NO:9)的人比库蛋白的核酸序列的用途,其将翻译成图 3 天然人胎盘比库蛋白序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:10)。在另一实施例中,本发明提供了图 4C 的共有核酸序列(SEQ ID NO:51),其编码图 4D 的氨基酸序列(SEQ ID NO:45)。

在一优选实施例中，本发明提供了编码具有图 4F 的 DNA 序列(SEQ ID NO:48)的天然人胎盘比库蛋白的核酸序列，其编码 SEQ ID NO:49 的蛋白质序列。在另一实施例中，本发明提供了图 4E 的核酸序列(SEQ ID NO:46)，其编码 SEQ ID NO:47 的蛋白质序列。

- 5 不难明白可以在该核酸序列中产生某些等位基因突变和保守性替换，其仍将产生本发明方法所包含的蛋白质氨基酸序列。本领域技术人员可以懂得本发明蛋白质的某些天然等位基因突变，和本发明蛋白质中氨基酸的保守性替换，不会明显改变该蛋白质的生物活性，这些也包括在本发明的范围内。

10 本发明还提供了含人胎盘比库蛋白及其片断的药物组合物，可用于刺激粘液纤毛功能紊乱患者的 MCC。

本发明还提供了刺激患粘液纤毛功能紊乱患者的 MCC 的方法，其中在生物相容性载体中将有效剂量的本发明所公开的人丝氨酸蛋白酶抑制剂给予患者。

15 本发明还提供了刺激 MCC 的方法，其中使用了胎盘比库蛋白的变体和上述的特异性 Kunitz 结构域，它们含有能改变该蛋白酶特异性的氨基酸替换。以下描述了优选的替换位置，如在天然胎盘比库蛋白的氨基酸序列中的位置 Xaa¹ 到 Xaa³²。在 Xaa¹ 到 Xaa¹⁶ 的替换对比库蛋白(7-64)变体而言也是优选的，而在 Xaa¹⁷ 到 Xaa³² 的替换对比库蛋白(102-159)变体而言是优选的。

由此，本发明的方法包括具有如下氨基酸序列的蛋白质的用途：

20	Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile Xaa ¹ Asp Phe	10
	Cys Leu Val Ser Lys Val Xaa ² Gly Xaa ³ Cys	20
	Xaa ⁴ Xaa ⁵ Xaa ⁶ Xaa ⁷ Xaa ⁸ Xaa ⁹ Trp Trp Tyr Asn	30
	Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Xaa ¹⁰	40
	Tyr Xaa ¹¹ Gly Cys Xaa ¹² Xaa ¹³ Xaa ¹⁴ Ser Asn Asn	50
25	Tyr Xaa ¹⁵ Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys	60
	Cys Ala Thr Xaa ¹⁶ Thr Glu Asn Ala Thr Gly	70
	Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp	80
	Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln	90
	Asp Ser Glu Asp His Ser Ser Asp Met Phe	100
30	Asn Tyr Xaa ¹⁷ Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala	110
	Val Xaa ¹⁸ Gly Xaa ¹⁹ Cys Xaa ²⁰ Xaa ²¹ Xaa ²² Xaa ²³ Xaa ²⁴	120
	Xaa ²⁵ Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser	130
	Cys Asn Asn Phe Xaa ²⁶ Tyr Xaa ²⁷ Gly Cys Xaa ²⁸	140
	Xaa ²⁹ Xaa ³⁰ Lys Asn Ser Tyr Xaa ³¹ er Glu Glu	150
35	Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Xaa ³² Gln	160
	Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys	170
	Val Val Val Leu Ala GlyAla Val Ser	179
	(SEQ ID NO:11)	

其中 Xaa¹—Xaa³² 各自代表除 Cys 以外的天然氨基酸残基，条件是氨基酸残基 Xaa¹—Xaa³² 中至少一个与天然序列中相应的氨基酸残基不同。

在本发明的说明书中，术语“天然氨基酸残基”指 20 个常见氨基酸中的任何一个，即 Ala、Arg、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、
5 Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 和 Val。

如上所述，在一个或单个位置上一个或多个氨基酸的替换，可以改变天然胎盘比库蛋白或各 Kunitz 样结构域、比库蛋白(7—64)或比库蛋白(102—159)的抑制剂特异性，从而其可较佳地抑制其他丝氨酸蛋白酶如(但不限于)补体级联反应中的酶、TF/FVIIa、Fxa、prostasin、凝血酶、嗜中性白细胞弹性蛋白酶、
10 组织蛋白酶 G 或蛋白酶-3。

胎盘比库蛋白优选变体的例子包括 Xaa¹ 是选自以下的氨基酸残基：His、Glu、Pro、Ala、Val 或 Lys，尤其当 Xaa² 是 His 或 Pro 时，或 Xaa² 是选自以下的氨基酸残基：Val、Thr、Asp、Pro、Arg、Tyr、Glu、Ala、Lys，尤其当 Xaa² 是 Val 或 Thr 时；或其中 Xaa³ 是选自以下的氨基酸残基：Arg、Pro、Ile、Leu、
15 Thr，尤其当 Xaa³ 是 Arg 或 Pro 时；或 Xaa⁴ 是选自以下的氨基酸残基：Arg、Lys、和 Ser、Gln，尤其当 Xaa⁴ 是 Arg 或 Lys 时；或 Xaa⁵ 是选自以下的氨基酸残基：Ala、Gly、Asp、Thr，尤其当 Xaa⁵ 是 Ala 时；或 Xaa⁶ 是选自以下的氨基酸残基：Ser、Ile、Tyr、Asn、Leu、Val、Arg、Phe，尤其当 Xaa⁶ 是 Ser 或 Arg 时；或 Xaa⁷ 是选自以下的氨基酸残基：Met、Phe、Ile、Glu、Leu、Thr 和
20 Val，尤其当 Xaa⁷ 是 Met 或 Ile 时；或 Xaa⁸ 是选自以下的氨基酸残基：Pro、Lys、Thr、Gln、Asn、Leu、Ser 或 Ile，尤其当 Xaa⁸ 是 Pro 或 Ile 时；或 Xaa⁹ 是选自以下的氨基酸残基：Arg、Lys 或 Leu，尤其当 Xaa⁹ 是 Arg 时；或 Xaa¹⁰ 是选自以下的氨基酸残基：Val、Ile、Lys、Ala、Pro、Phe、Trp、Gln、Leu 和 Thr，尤其当 Xaa¹⁰ 是 Val 时；或 Xaa¹¹ 是选自以下的氨基酸残基：Gly、Ser 和 Thr，
25 尤其当 Xaa¹¹ 是 Gly 时；或 Xaa¹² 是选自以下的氨基酸残基：Asp、Arg、Glu、Leu、Gln、Gly，尤其当 Xaa¹² 是 Asp 或 Arg 时；或 Xaa¹³ 是选自以下的氨基酸残基：Gly 和 Ala；或 Xaa¹⁴ 是选自以下的氨基酸残基：Asn 或 Lys；或 Xaa¹⁵ 是选自以下的氨基酸残基：Gly、Asp、Leu、Arg、Glu、Thr、Tyr、Val 和 Lys，尤其当 Xaa¹⁵ 是 Leu 和 Lys 时；或 Xaa¹⁶ 是选自以下的氨基酸残基：Val、Gln、
30 Asp、Gly、Ile、Ala、Met 和 Val，尤其当 Xaa¹⁶ 是 Val 和 Ala 时；或 Xaa¹⁷ 是选自以下的氨基酸残基：His、Glu、Pro、Ala、Lys 和 Val，尤其当 Xaa¹⁷ 是 Glu 和 Pro 时；或 Xaa¹⁸ 是选自以下的氨基酸残基：Val、Thr、Asp、Pro、Arg、Tyr、

Glu、Ala 或 Tys, 尤其当 Xaa¹⁸ 是 Thr 时; 或 Xaa¹⁹ 是选自以下的氨基酸残基: Arg、Pro、Ile、Leu 或 Thr, 尤其当 Xaa¹⁹ 是 Pro 时; 或 Xaa²⁰ 是选自以下的氨基酸残基: Arg、Lys、Gln 和 Ser, 尤其当 Xaa²⁰ 是 Arg 或 Lys 时; 或 Xaa²¹ 是选自以下的氨基酸残基: Ala、Asp、Thr 或 Gly, 尤其当 Xaa²¹ 是 Ala 时; 或
5 Xaa²² 是选自以下的氨基酸残基: Ser、Ile、Tyr、Asn、Leu、Val、Arg 或 Phe, 尤其当 Xaa²² 是 Ser 或 Arg 时; 或 Xaa²³ 是选自以下的氨基酸残基: Met、Phe、Ile、Glu、Thr 和 Val, 尤其当 Xaa²³ 是 Phe 或 Ile 时; 或 Xaa²⁴ 是选自以下的氨基酸残基: Pro、Lys、Thr、Asn、Leu、Gln、Ser 或 Ile, 尤其当 Xaa²⁴ 是 Pro 或 Ile 时; 或 Xaa²⁵ 是选自以下的氨基酸残基: Arg、Lys 或 Leu, 尤其当 Xaa²⁵
10 是 Arg 时; 或 Xaa²⁶ 是选自以下的氨基酸残基: Val、Ile、Lys、Leu、Ala、Pro、Phe、Gln、Trp 和 Thr, 尤其当 Xaa²⁶ 是 Val 或 Ile 时; 或 Xaa²⁷ 是选自以下的氨基酸残基: Gly、Ser 和 Thr, 尤其当 Xaa²⁷ 是 Gly 时; 或 Xaa²⁸ 是选自以下的氨基酸残基: Asp、Arg、Glu、Leu、Gly 或 Gln, 尤其当 Xaa²⁸ 是 Arg 时; 或 Xaa²⁹ 是选自以下的氨基酸残基: Gly 和 Ala; 或 Xaa³⁰ 是选自以下的氨基酸残基: Asn
15 或 Lys; 或 Xaa³¹ 是选自以下的氨基酸残基: Gly、Asp、Leu、Arg、Glu、Thr、Tyr、Val 和 Lys, 尤其当 Xaa³¹ 是 Arg 或 Lys 时; 或 Xaa³² 是选自以下的氨基酸残基: Val、Gln、Asp、Gly、Ile、Ala、Met 和 Thr, 尤其当 Xaa³² 是 Gln 或 Ala 时。

本发明还涉及编码本发明胎盘比库蛋白变体的 DNA 构建物。可用合成方
20 法(如 Beaucage S.L.和 Caruthers M.H.(1981) Tetrahedron Lett,22 第 1859—1862 页; Matteucci M.D 和 Caruthers M.H.(1981),J.Am.Chem.Soc.103 第 3185 页中所述的)制备这些构建物, 或用 cDNA 探针(设计成与编码胎盘比库蛋白的 DNA 序杂交)筛选基因组或 cDNA 文库得到的基因组或 cDNA 来制备。可在一个或多个位置修饰基因组或 cDNA 序列, 以得到编码任何本文所述的氨基酸替换或缺失的 cDNA。
25

本发明还涉及含有编码本发明胎盘比库蛋白、分离的结构域或其他变体的 DNA 构建物的表达载体, 可用于产生重组胎盘比库蛋白变体。将 cDNA 连接于合适的启动子序列(该启动子在所选的宿主细胞中显示出转录活性), 具有合适的终止子和聚腺苷酰化信号。可将编码胎盘比库蛋白变体的 cDNA 融合于 5'
30 信号肽, 这将导致该 cDNA 编码的蛋白质分泌。信号肽可以是宿主生物能识别的信号肽。对哺乳动物宿主细胞而言, 信号肽可以是全长胎盘比库蛋白中存在的天然信号肽。用于制备表达胎盘比库蛋白变体的载体的方法是本领域熟知

的，如 Sambrook 等人在“分子克隆：实验室手册”，Cold Spring Harbor, New York, (1989) 中所述。

本发明还涉及含有编码本发明胎盘比库蛋白、分离的结构域或其他变体的 DNA 构建物的转化细胞，可用于产生重组胎盘比库蛋白变体。存在各种不同的表达载体和宿主生物的组合，可用于产生胎盘比库蛋白变体。合适的宿主细胞包括杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞、哺乳动物细胞如 BHK、CHO、Hela 和 C-127，细菌如大肠杆菌和酵母菌如酿酒酵母。用于哺乳动物、昆虫和微生物表达系统来实现胎盘比库蛋白表达的方法是本领域熟知的，且可参见如 Ausubel F.M. 等人的“最新分子生物学方案”，John Wiley & Sons (1995)，第 16 章。对含有单个 Kunitz 抑制剂结构域的胎盘比库蛋白片断，如比库蛋白(7-64)和(102-159)而言，酵母菌和大肠杆菌表达系统是优选的，且酵母菌系统是最优选的。通常，可如美国专利 5,164,482 对抑蛋白酶肽变体所述，进行酵母菌的表达，且适用于本发明实施例 5 的胎盘比库蛋白(102-159)。可按美国专利 5,032,573 所述的方法进行大肠杆菌的表达。对表达含有两个抑制剂结构域的较大胎盘比库蛋白变体如变体比库蛋白(7-159)而言，用哺乳动物和酵母菌系统是优选的。

可用 Kunkel T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 第 488-492 页的方法，制备编码胎盘比库蛋白变体(在天然氨基酸序列中含有氨基酸替换)的 DNA，来表达重组蛋白质。简单地说，可将待诱变处理的 DNA 克隆入单链噬菌体载体如 M13 中。将跨越待改变区域和编码取代基的寡核苷酸杂交于此单链 DNA，并用标准分子生物学方法制成双链。然后将此 DNA 转化入适当的细菌宿主，用双脱氧核苷酸测序法验证。然后将正确的 DNA 克隆入表达质粒。另外，可用标准 PCR 方法诱变靶 DNA、测序并插入到合适的表达质粒中。

以下提供了用于说明而非限制的实施例、本发明的某些方面和优选实施例。本文所引用的所有专利、专利出版物和参考文献本文都全部纳入作为参考。

实施例 1

合成的胎盘比库蛋白(102-159)的制备

所用的材料和方法/试剂 从 Bachem BioScience Inc (King of Prussia, PA) 购得荧光底物 Tos-Gly-Pro-Lys-AMC。从 Sigma (St. Louis, MO) 购得 PNGB、Pro-Phe-Arg-AMC、Ala-Ala-Pro-Met-AMC、牛胰蛋白酶(III 型)、人血浆激肽释放酶和人血纤蛋白溶酶。

从 Bayer AG(Wuppertal,Germany)购得重组抑蛋白酶肽(Trasylo1®)。预加样的 Gln Wang 树脂是从 Novabiochem(La Jolla, CA)购得的。从 Aldrich (Milwaukee,WI)购得苯硫基甲烷、乙二硫醇(ethanedithiol)和叔丁基甲醚。

功能性胎盘比库蛋白(7-64)(SEQ ID NO:4)和(102-159)的定量

5 用 GPK-AMC 作为底物,测定了纯化不同阶段重折叠样品中存在的胰蛋白酶抑制活性的量。将牛胰蛋白酶(200pmol)与纯化不同阶段的比库蛋白(7-64)或(102-159),在缓冲液 A(50mM HEPES,pH 7.5,0.1M NaCl,2mM CaCl₂和 0.01 % triton X-100)中 37℃培育 5 分钟。加入 GPK-AMC(20μM 终浓度),在 Perkin-Elmer LS-508 荧光计上测定荧光(ex=370nm, em=432nm)2 分钟,来确
10 定产生的香豆素的量。按方程式 1 计算了各测试样品的 %抑制,方程式 1 中 R₀是存在抑制剂时荧光增加的速率, R₁是未加入样品时所测得的速率。抑制剂一个单位活性定义为用所述的条件在该试验中达到 50%抑制所需的量。

$$\% \text{抑制} = 100 \times [1 - R_0/R_1] \quad (1)$$

合成。用 NMP-HBTU Fmoc 化学物,在 Applied Biosystems 420A 型肽合成
15 仪上合成胎盘比库蛋白(102-159)(SEQ ID NO:6)。每次偶联用 8 倍过量的氨基酸,在预填装 Gln 树脂上合成此肽。室温在 84.6%三氟乙酸(TFA)、4.4%苯硫基甲烷、2.2%乙二硫醇、4.4%液态苯酚和 4.4%H₂O 中,进行切割和去保护 2 小时。将粗制的肽沉淀下,离心,用叔丁基甲醚洗涤 2 次。在 Dynamax 60A C18 反相 HPLC 柱上,用 TFA/乙腈梯度,纯化该肽。最终制备物(61.0mg)得到正确的
20 氨基酸组合物,用 Electrospray 质谱对预定的序列进行分子质量分析 (MH=6836.1;计算值=6835.5):

YEEYCTANAV TGPCRASFPW WYFDVERNSC NNFIYGGCRG
NKNSYRSEEA CMLRCFRQ(SEQ ID NO:6)

纯化。按 Tam 等人(J.Am.Chem.Soc.1991,113;6657-62)所述的方法,进行胎
25 盘比库蛋白(102-159)的重折叠。将部分纯化的肽(15.2mg)溶解于 4.0ml 0.1M Tris(pH 6.0)和 8M 脲中。滴加含有 23%DMSO 和 0.1M Tris(pH6.0)的溶液,进行二硫键的氧化得到在 20%DMSO、0.1M Tris(pH 6.0)和 1M 脲的溶液中终浓度为 0.5mg/ml 的肽。25℃搅拌溶液 24 小时,然后用含有 50mM Tris(pH 8.0)和 0.1M NaCl 的缓冲液 1:10 稀释。用激肽释放酶亲和柱(按制造商的说明,将 30mg
30 牛胰腺激肽释放酶(Bayer AG)共价附着于 3.5ml CNBr 活化的琼脂糖(Pharmacia)纯化该物质。以 1ml/分钟流速,将重折叠的物质加样到此亲和柱上,用 50mM Tris(pH 8.0)和 0.1M NaCl 洗涤,直到不再能测到洗液 280nm 的吸光度。用各 3

5 体积的 0.2M 乙酸(pH 8.0 和 pH 1.7)洗脱该柱。合并活性组分(见下), 将溶液的 pH 调节至 2.5。直接将该物质加样到 Vydac C18 反相柱(5 微米, 0.46×25cm), 该柱已用 0.1% TFA 配制的 22.5% 乙腈平衡。用 22.5—40% 乙腈(在 0.1% TFA 中)的线性梯度, 以 1.0ml/分钟进行分离 40 分钟。合并活性组分, 冻干, 再溶解在 0.1% TFA 中, 储存于 -20℃ 直至使用。

结果。如上所述用 20% DMSO 作为氧化剂, 重叠了合成的胎盘比库蛋白(102-159), 如下所述分两步纯化, 得到活性胰蛋白酶抑制剂(下表 1)。

表 1 合成的胎盘比库蛋白(102-159)的分离纯化表

纯化步骤	体积(ml)	mg/ml	mg	单位(U) ^c	SpA(U/mg)	收率
8.0M 尿素	4.0	3.75 ^a	15.0	0	0	-
20% DMSO	32.0	0.47 ^a	15.0	16, 162	1, 078	100
激肽释放酶亲和柱	9.8	0.009 ^b	0.09	15, 700	170, 000	97
C18 柱	3.0	0.013 ^{ab}	0.04	11, 964	300, 000	74

^a 蛋白质是由 AAA 测定的

10 ^b 蛋白质是在 OD280nm, 用消光系数测定的纯化蛋白质($1.7 \times 10^4 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)。

^c 一个单位定义为在标准试验中抑制 50% 胰蛋白酶活性所需的物质的量。

15 在固定牛胰腺激肽释放酶的柱上层析该粗制重折叠产物, 选择性分离得到 6.0% 蛋白质, 和存在的 97% 胰蛋白酶抑制剂活性。随后用 C18 反相层析进一步两倍纯化, 总回收率为 74%。在 RPHPLC 中, 还原和重折叠的胎盘比库蛋白(102—159)的洗脱时间分别为 26.3 和 20.1 分钟。质谱分析纯化的物质揭示其分子量为 6829.8, 相当于起始物丢失了 6 个质量单位。这证明从该肽序列预测的 3 个二硫键完全形成。

20 用 Multiphor II Electrophoresis 系统(Pharmacia), 按制造商的建议, 与 pI 标准品一起, 用预制的 Ampholine®PAG 板(pH 3.5 到 9.5)测定了纯化的、重折叠的、合成胎盘比库蛋白(102—159)的等电点, 聚焦进行 1.5 小时。染色后, 测定了从凝胶阴极边缘到不同蛋白质条带的迁移距离。用标准品迁移距离对相应的 pI's 绘图产生的标准曲线确定各未知物质的 pI。用这种技术, 测得胎盘比库蛋白(102-159)的 pI 为 8.3, 这与氨基酸序列预计的相符。这比抑蛋白酶肽的 pI 25 所确定的值 10.5 低(Tenstad 等人, 1994, Acta Physiol.Scand.152:33-50)。

实施例 2

合成的胎盘比库蛋白(7-64)的制备

基本如实施例 1 中对于胎盘比库蛋白(102-159)(SEQ ID NO:6)所述,合成、重折叠和纯化了胎盘比库蛋白(7-64)(SEQ ID NO:4),但在修饰后,重折叠过程中,将合成的肽在 25°C, 20% DMSO 溶液中搅拌 30 小时;以 25-45% 乙腈(在 0.1% TFA 中)的线性梯度,用 C18 RP-HPLC 纯化 40 分钟(1ml/分钟)。将第一次 C18 跑样后的活性组分再加样到柱中,用 20-40% 乙腈(在 0.1% TFA 中)线性梯度分级(60 分钟, 1ml/分钟)。

结果。最终纯化的还原肽显示 $MH^+ = 6563$, 与以下序列一致:
 10 IHDFCLVSKV VGRCRASMPR WWYNVTDGSC QLFVYGGCDG NSNNYLTKKEE
 CLKKCATV (SEQ ID NO:4)

重折叠和纯化产生了功能性 Kunitz 结构域,其具有胰蛋白酶抑制剂活性(下表 2)。

表 2A 分离合成的胎盘比库蛋白(7-64)的纯化表

纯化步骤	体积(ml)	mg/ml	mg	单位(U)	SpA(U/mg)	收率
8.0M 尿素	8.0	2.5	20.0	0	0	-
20% DMSO	64.0	0.31	20.0	68,699	3,435	100
激肽释放酶亲和柱 pH4.0	11.7	0.10	1.16	43,333	36,110	62
激肽释放酶亲和柱 pH1.7	9.0	0.64	5.8	4972	857	7.2
C18-1	4.6	0.14	0.06	21,905	350,143	31.9
C18-2	1.0	0.08	0.02	7,937	466,882	11.5

15 纯化的重折叠蛋白质显示 $MH^+ = 6558$, 即 5 ± 1 质量单位小于还原肽。这表明重折叠导致形成了至少一个适当的二硫键。

用测定胎盘比库蛋白(102-159)pI 的方法确定了胎盘比库蛋白(7-64)的 pI。胎盘比库蛋白(7-64)显示 pI 比预计的值(pI=7.9)高许多。重折叠的胎盘比库蛋白(7-64)迁移到凝胶的阴极边缘(pH 9.5),在这种条件下不能确定精确的 pI。

20 合成的胎盘比库蛋白(7-64)的连续制备

由于在纯化和重折叠前,合成的胎盘比库蛋白(7-64)可能没有经过完全的去保护,用已确定完全去保护的蛋白质重复重折叠。基本采用制备胎盘比库蛋白(102-159)所述的方法,合成、重折叠和纯化了胎盘比库蛋白(7-64),但在修饰后:重折叠过程中,将合成的肽(0.37mg/ml)在 20% DMSO 中 25°C 搅拌 30 小时;以 22.5-50% 乙腈(在 0.1% TFA 中)线性梯度,用 C18 RP-HPLC 进行纯化

40 分钟(1ml/分钟)。

结果。纯化的还原肽显示 $MH^+ = 6567.5$ ，与以下序列一致：

IHDFCLVSKV VGRCRASMPR WWYNVTDGSC QLFVYGGCDG NSNNYLTKEE
CLKKCATV (SEQ ID NO:4)

- 5 重折叠和纯化产生了功能性 Kunitz 结构域，其具有胰蛋白酶抑制剂的活性(下表 2B)。

表 2B 分离合成的胎盘比库蛋白(7-64)的纯化表

纯化步骤	体积(ml)	mg/ml	mg	单位(U)	SpA(U/mg)	收率
8.0M 尿素	4.9	2.1	10.5	0	0	-
20% DMSO	39.0	0.27	10.5	236,000	22,500	100
激肽释放酶亲和柱(pH2)	14.5	0.3	0.43	120,000	279,070	50.9
C18 反相柱	0.2	1.2	0.24	70,676	294,483	30.0

纯化的重折叠蛋白质显示 $MH^+ = 6561.2$ ，即小于还原肽 6.3 质量单位。这证明重折叠导致形成预计的三个二硫键。

- 10 用测定胎盘比库蛋白(102-159)pI 的方法来测定胎盘比库蛋白(7-64)的 pI。重折叠的胎盘比库蛋白(7-64)的 pI 值为 8.85，比预计值(pI=7.9)略高。

实施例 3

功能性胎盘比库蛋白片断(102-159)的体外特异性

- 15 蛋白酶：用上述的 HCl 胍基苯甲酸叔一硝基苯酯，通过活性位点滴定进行牛胰蛋白酶、人血纤蛋白溶酶和牛胰腺激肽释放酶的定量测定(Chase,T.,和 Shaw,E., (1970)Methods Enzymol.19,20-27)。用牛抑蛋白酶肽作为标准品、PFR-AMC 作底物(假定 1:1 复合物形成)，通过活性位点滴定定量测定人激肽释放酶。在各酶作用的条件下，GPK-AMC 与胰蛋白酶和血纤蛋白溶酶的 K_m 分别为
- 20 $29\mu\text{M}$ 和 $726\mu\text{M}$ ；PFR-AMC 对人血浆激肽释放酶和牛胰腺激肽释放酶的 K_m 分别为 $457\mu\text{M}$ 和 $81.5\mu\text{M}$ ；AAPR-AMC 与弹性蛋白酶的 K_m 为 $1600\mu\text{M}$ 。如上所述，用 HCl 胍基苯甲酸叔一硝基苯酯，通过活性位点滴定进行了人组织激肽释放酶(Bayer Germany)的定量测定(Chase,T.,和 Shaw,E.,(1970)Methods Enzymol.19,20-27)。

- 25 抑制动力学：将 50pM 胰蛋白酶与胎盘比库蛋白(102-159)($0-2\text{nM}$)或抑蛋白酶肽($0-3\text{nM}$)在缓冲液 A(终体积为 1.0ml)中培育，测定了胎盘比库蛋白(102-159)(实施例 1 所述)或抑蛋白酶肽对胰蛋白酶的抑制。5 分钟后， 37°C ，加

入 15 μ l 2mM GPK-AMC, 监测荧光(上述)的变化。用血纤蛋白溶酶(50pM)和胎盘比库蛋白(102-159)(0-10nM)或抑蛋白酶肽(0-4nM), 在含有 50mM Tris-HCl(pH7.5)、0.1M NaCl 和 0.02% triton x-100 的缓冲液中, 测定胎盘比库蛋白(102-159)和抑蛋白酶肽对人血纤蛋白溶酶的抑制。37 $^{\circ}$ C 培育 5 分钟后, 加入 25 μ l 20mM GPK-AMC, 监测荧光的变化。用激肽释放酶(2.5nM)和胎盘比库蛋白(102-159)(0-3nM)或抑蛋白酶肽(0-45nM), 在含有 50mM Tris-HCl(pH8.0)、50mM NaCl 和 0.02% triton x-100 的缓冲液中, 测定了胎盘比库蛋白(102-159)或抑蛋白酶肽对人血浆激肽释放酶的抑制。5 分钟后, 37 $^{\circ}$ C 加入 15 μ l 20mM PFR-AMC, 监测荧光的变化。以类似的方法, 用激肽释放酶(92pM)、胎盘比库蛋白(102-159)(0-1.6nM)和抑蛋白酶肽(0-14pM), 最终底物浓度 100 μ M, 测定了胎盘比库蛋白(102-159)和抑蛋白酶肽对牛胰腺激肽释放酶的抑制。用非线性回归数据分析程序 Enzfitter 软件(Biosoft,Cambridge,UK)测定表观抑制常数 K_i^* : 按紧密结合性抑制剂方程式, 分析了各试验的动力学数据:

$$V_i/V_o = 1 - (E_o + I_o + K_i^* - [(E_o + I_o + K_i^*)^2 - 4E_o I_o]^{1/2}) / 2E_o \quad (2)$$

其中 V_i/V_o 是分数酶活性(被抑制的对未被抑制的比例), E_o 和 I_o 分别是酶和抑制剂的总浓度。按以下方程式, 通过校正底物的作用获得 K_i 值:

$$K_i = K_i^* / (1 + [S_o] / K_m) \quad (3)$$

(Boudier,C.,和 Bieth,J.G.,(1989)Biochim Biophys Acta,995:36-41)

对胎盘比库蛋白(102-159)和抑蛋白酶肽抑制人嗜中性白细胞弹性蛋白酶而言, 在含有 0.1M Tris-HCl(pH 8.0)和 0.05% triton x-100 的缓冲液中, 与胎盘比库蛋白(102-159)(150nM)或抑蛋白酶肽(0-7.5 μ M)一起, 培育弹性蛋白酶(19nM)。在 37 $^{\circ}$ C 5 分钟后, 加入 AAPM-AMC(500 μ M 或 1000 μ M), 测定荧光 2 分钟。以两种不同的底物浓度进行, 从 $1/V$ 对 $[I]$ 绘制的 Dixon 图确定 K_i 值 (Dixon 等人, 1979)。

在 1ml 含有 50mM Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0)、50mM NaCl 和 0.1% triton x-100 的反应容量中, 将胎盘比库蛋白(7-64)(0-40nM)或胎盘比库蛋白(102-159)(0-2.5nM)或抑蛋白酶肽(0-0.5nM)与 0.35nM 人组织激肽释放酶一起培育, 来测定抑蛋白酶肽、胎盘比库蛋白片断(7-64)或胎盘比库蛋白片断(102-159)对人组织激肽释放酶的抑制。37 $^{\circ}$ C, 5 分钟后, 加入 5 μ l 2mM PFR-AMC, 至终浓度 10 μ M, 监测荧光的变化。在所用的条件下, 人组织激肽释放酶对 PFR-AMC 的 K_m 为 5.7 μ M。通过在含有 20mM Tris(pH 7.5)、0.1M NaCl 和 0.1% BSA 的缓冲液中, 与递增量的抑制剂一起培育 0.87nM 人因子 Xa, 测定了合成的胎盘

比库蛋白(102-159)、重组胎盘比库蛋白和抑蛋白酶肽对人因子 Xa(American Diagnostica, Inc, Greenwich, CT)的抑制。37°C 5 分钟后, 加入 30 μ l 20mM LGR-AMC(Sigma), 监测荧光的变化。通过在总体积为 1ml 的含有 50mM Tris-HCl(pH 8.0)、50mM NaCl 和 0.1% triton x-100 的缓冲液中, 与抑制剂一起培育尿激酶 5 (2.7ng), 测定了 Kunitz 抑制剂对人尿激酶(Sigma)的抑制。37°C 5 分钟后, 加入 35 μ l 20mM GGR-AMC(Sigma), 监测荧光的变化。在含有 50mM Hepes(pH 7.5)、100mM NaCl、2mM CaCl₂、0.01% triton x-100 和 1% BSA 的总体积为 1ml 的缓冲液中, 与 0-800nM 胎盘比库蛋白(7-64)、0-140nM 胎盘比库蛋白(102-159)或 0-40 μ M 抑蛋白酶肽一起培育因子 XIa(0.1nM), 测定了对因子 Xia(由 Enzyme 10 Research Labs, Southbend, IN 提供)的抑制。37°C 5 分钟后, 加入 10 μ l 40mM Boc-Glu(Obzl)-Ala-AMC(Bachem Biosciences, King of Prussia, PA), 监测荧光的变化。

结果: 在相同的条件下, 测定它们与各种不同蛋白酶的抑制常数, 直接比较了胎盘(102-159)和抑蛋白酶肽的抑制特性。下表 3 列出了 Ki 值。

15 表 3 比库蛋白(102-159)抑制各种蛋白酶的 Ki 值

蛋白酶 (浓度)	比库蛋白(102-159) Ki(nM)	抑蛋白酶 肽 Ki(nM)	底物 (浓度)	Km (mM)
胰蛋白酶 (48.5pM)	0.4	0.8	GPK-AMC (0.03mM)	0.022
胰凝乳蛋白酶 (5nM)	0.24	0.86	AAPF-Pna (0.08mM)	0.027
牛胰腺激肽释放酶 (92.0pM)	0.4	0.02	PFR-AMC (0.1Mm)	0.08
人血浆激肽释放酶 (2.5nM)	0.3	19.0	PFR-AMC (0.3Mm)	0.46
人血纤蛋白溶酶 (50pM)	1.8	1.3	GPK-AMC (0.5Mm)	0.73
人嗜中性白细胞弹性 蛋白酶(19nM)	323.0	8500.0	AAPM-AMC (1.0 μ M)	1.6
因子 XIIa	>300.0	12, 000.0	PFR-AMC (0.2 μ M)	0.35

人组织激肽释放酶 (0.35nM)	0.13	0.004	PFR-AMC (10 μ M)	0.005 7
因子 Xa (0.87nM)	274	在 3 μ M 为 N.I.	LGR-AMC (0.6Mm)	N.D.
尿激酶	11000	4500	GGR-AMC (0.7Mm)	N.D.
因子 Xia (0.1nM)	15	288	E(Obz)AR- AMC (0.4Mm)	0.46

在所用的条件下，胎盘比库蛋白(102-159)和抑蛋白酶肽抑制牛胰蛋白酶和人血纤蛋白溶酶达到相同的程度。抑蛋白酶肽抑制弹性蛋白酶的 K_i 为 8.5 μ M。胎盘比库蛋白(102-159)对牛胰腺激肽释放酶抑制的 K_i 值比抑蛋白酶肽的抑制高 20 倍。与此相反，与抑蛋白酶肽相比，胎盘比库蛋白(102-159)是人血浆激肽释放酶更强的抑制剂，它的结合亲和力要高 56 倍。

由于作为激肽释放酶的抑制剂，胎盘比库蛋白(102-159)比 Trasylo[®]要强 50 倍，为维持有效的患者抑制剂剂量(单位为 KIU)，人胎盘比库蛋白或其片断(即胎盘比库蛋白(102-159)所需的量比 Trasylo[®]小。这就降低了该药物每剂的成本，还降低了患者重复服用药物而产生不良肾中毒的可能性。另外，这种蛋白质是从人衍生的，因而在人体中比从牛衍生的抑蛋白酶肽的免疫原性要低得多。这明显降低了反复服用药物对患者产生难治愈的不良免疫反应的危险性。

实施例 4

功能性胎盘比库蛋白片断(7-64)的体外特异性

用上述实施例所述的材料和方法测定了实施例 2 所述的功能性人胎盘比库蛋白(7-64)的体外特异性。

结果：下表显示了体外胎盘比库蛋白(7-64)作为各种不同丝氨酸蛋白酶抑制剂的效果。比较了用胎盘比库蛋白(102-159)或抑蛋白酶肽(Trasylo[®])筛选抑制得到的数据，显示以下数据。

表 4A 比库蛋白(7-64)对各种不同蛋白酶抑制的 Ki 值

蛋白酶 (浓度)	比库蛋白(7-64) Ki(nM)	抑蛋白酶肽 Ki(nM)	比库蛋白(102-159) Ki(nM)
胰蛋白酶(48.5pM)	0.17	0.8	0.4
牛胰腺激肽释放酶 (92.0pM)	0.4	0.02	0.4
人血浆激肽释放酶 (2.5nM)	2.4	19.0	0.3
人血纤蛋白溶酶(50pM)	3.1	1.3	1.8
牛凝乳蛋白酶(5nM)	0.6	0.9	0.2
因子 XIIa	>300	12000	>300
弹性蛋白酶	>100	8500	323

结果显示编码胎盘比库蛋白(7-64)的氨基酸序列可以重折叠, 形成能有效对抗至少四种胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶的活性丝氨酸蛋白酶抑制剂。

5 下表 4B 显示了体外重折叠的胎盘比库蛋白(7-64)作为各种不同丝氨酸蛋白酶抑制剂的效果。从已确定在纯化和重折叠前完全去保护的蛋白质制备了重折叠的胎盘比库蛋白(7-64)。比较了用胎盘比库蛋白(102-159)或抑蛋白酶肽(Trasylol®)进行筛选抑制得到的数据, 显示以下数据。

表 4B 重折叠的比库蛋白(7-64)抑制各种不同蛋白酶的 Ki 值

蛋白酶 (浓度)	比库蛋白(7-64) Ki(nM)	抑蛋白酶肽 Ki(nM)	比库蛋白(102-159) Ki(nM)
胰蛋白酶(50pM)	0.2	0.8	0.3
人血浆激肽释放酶 (0.2nM)	0.7	19.0	0.7
人血纤蛋白溶酶(50pM)	3.7	1.3	1.8
因子 XIIa	未进行试验	12, 000	4, 500
因子 Xia(0.1nM)	200	288	15
人组织激肽释放酶	2.3	0.004	0.13

10 令人惊奇地, 在抑制人血浆激肽释放酶时, 胎盘比库蛋白(7-64)比抑蛋白酶肽更强, 且效果至少与血纤蛋白溶酶抑制剂的相似。这些数据显示胎盘比库

蛋白(7-64)至少与抑蛋白酶肽一样有效(用体外试验),且预计在体内的效力将更好或类似。

实施例 5

5 胎盘比库蛋白变体(102-159)在酵母中的表达

用合成的寡核苷酸产生编码胎盘 BB102-159(SEQ ID NO:6)的 DNA 序列。最终的 DNA 产物由 15 个核苷酸(5'到 3')构成,自融合的酵母的 α -交配因子前肽序列到编码胎盘比库蛋白(102-159)的框内 cDNA 序列,然后为框内终止密码子。克隆入酵母表达载体 pS604 后, cDNA 将指导融合蛋白的表达,包括融合
10 的 N 端酵母 α -交配因子前肽到胎盘比库蛋白(102-159)的 58 氨基酸序列。在 KEX-2 加工此融合蛋白,切断 α -交配因子和 Kunitz 结构域之间的连接部位,设计此部位用于在 Kunitz 结构域的天然 N 端释放此 Kunitz 结构域。

合成了以下序列的 5'有义寡核苷酸,其含有用于克隆的 HindIII 位点:

15 GAA GGG GTA AGC TTG GAT AAA AGA TAT GAA GAA TAC TGC ACC GCC
AAC GCA GTC ACT GGG CCT TGC CGT GCA TCC TTC CCA CGC TGG TAC
TTT GAC GTG GAG AGG (SEQ ID NO:42)

合成了以下序列的 3'反义寡核苷酸,其含有用于克隆的 BamHI 位点和终止密码子:

20 CGC GGA TCC CTA CTG GCG GAA GCA GCG GAG CAT GCA GGC CTC CTC
AGA GCG GTA GCT GTT CTT ATT GCC CCG GCA GCC TCC ATA GAT GAA
GTT ATT GCA GGA GTT CCT CTC CAC GTC AAA GTA CCA GCG
(SEQ ID NO:43)

将寡核苷酸溶解在含有 1mM EDTA 的 10mM Tris 缓冲液(pH 8.0)中,加入
12 μ g 各寡核苷酸,混合,加入 0.25M NaCl。为了杂交,煮沸 5 分钟使寡核苷
25 酸变性,然后从 65 $^{\circ}$ C 冷却至室温 2 小时。用 Klenow 片断延伸重叠序列,用 HindIII
和 BamIII 消化。将得到的消化的双链片断克隆入 pUC19 中,测序确认。用
BamHI/HindIII 消化含有正确序列的克隆,以释放出含有如下 + 链序列的比库
蛋白片断:

30 GAA GGG GTA AGC TTG GAT AAA AGA TAT GAA GAA TAC TGC ACC GCC
AAC GCA GTC ACT GGG CCT TGC CGT GCA TCC TTC CCA CGC TGG TAC
TTT GAC GTG GAG AGG AAC TCC TGC AAT AAC TTC ATC TAT GGA GGC
TGC CGG GGC AAT AAG AAC AGC TAC CGC TCT GAG GAG GCC TGC ATG
CTC CGC TGC TTC CGC CAG TAG GGA TCC (SEQ ID NO:44)

然后凝胶纯化,连接入 BamHI/HindIII 切割的 pS604 中。用苯酚/氯仿提取
35 连接混合物,在 S-200 微型旋转柱上纯化。直接将连接的产物转化入酵母菌株
SC101 和 WHL341 中,接种尿嘧啶选择平板。将单个克隆接种入 2ml 尿嘧啶

DO 培养基中，30℃培育过夜。1400×g 离心 2 分钟沉淀细胞，评估上清液中胎盘比库蛋白(102-159)的含量。

在转化的酵母中指导胎盘比库蛋白(102-159)的表达

5 首先用实施例 1 所述的试验方法(1ml 试验体积)，评估了上清液(每次试验用 50μl)体外抑制胰蛋白酶活性的能力。以无培养基仅含有样品以及表达抑蛋白酶肽失活变体的酵母克隆，作为阴性对照。表达天然抑蛋白酶肽的酵母克隆作为阳性对照，进行比较显示。

10 第二种定量测定胎盘比库蛋白(102-159)表达的方法，使用了针对该合成肽的多克隆抗体(pAbs)，用 Western 印迹来监测该重组肽的积累。这些研究只用菌株 SC101 衍生的重组体，因为这些重组体比 WHL341 菌株衍生的重组体产生的抑制活性强。

15 为了产生 pAb，在第 0 天，用以完全弗氏佐剂(Complete Freund)配制的 250μg 纯化的还原的合成胎盘比库蛋白(102-159)，免疫接种了 2 只 6—8 周龄的老新西兰白色雌兔(Hazelton Research Labs, Denver, Pa)，然后在第 14、35 和 56 和 77 天各用不完全弗氏佐剂配的 125μg 同一抗原加强。本研究所用的抗血清是在第三次加强免疫后收集的。用蛋白质 A 从抗血清中纯化得到多克隆抗体。

20 30℃在 50ml 尿嘧啶 DO 培养基中，培育转化酵母 SC101(图 8)的克隆 2.4 和 2.5 以及抑蛋白酶肽对照。沉淀细胞，用 Centriprep 3(Amicon,Beverly, MA)浓缩器浓缩上清液 100 倍。按供应商的流程，将各(30μl)样品加样到 10—20% N—三(羟甲基)甲基甘氨酸缓冲凝胶上进行 SDS—PAGE(Novex,San Diego,CA)。用银染色试剂盒(Integrated Separation Systems,Nantick,MA)显影一式两份的凝胶，或将它们转移到硝基纤维素上，再用纯化的针对合成比库蛋白(102-159)的多克隆抗体显影。按供应商的说明，用碱性磷酸酶偶联羊抗兔抗体作为第二抗
25 体(Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD)。

从转化的 SC101 菌株纯化胎盘比库蛋白(102-159)

30 通过离心(4,000g×30 分钟)，收获 1L 培养的 SC101 菌株 2.4 的发酵肉汤，然后将其加到 1.0ml 无水凝乳蛋白酶—琼脂糖(Takara Biochemical Inc., CA)柱上，该柱预先用 50mM HEPES 缓冲液(pH 7.5)(含有 0.1M NaCl、2mM CaCl₂ 和 0.01%(v/v)triton X-100)平衡。用同一缓冲液但所含的 NaCl 为 1.0M，洗涤该柱，直到 A280nm 降至 0，然后用 0.1M 甲酸(pH 2.5)洗脱该柱。合并洗脱的组分，

加到 C18 柱(Vydac, 5 μ m, 4.6 \times 250mm)上, 该柱预先用 0.1%TFA 平衡, 然后用 0.1%TFA 配的 20%–80%乙腈线性梯度洗脱 50 分钟。合并含有胎盘比库蛋白(102-159)的组分, 在 C18 柱上重层析, 用 0.1%TFA 配的 22.5%–50%乙腈梯度洗脱。

5

结果: 图 8 显示了各菌株 SC101 和 WHL341 转化衍生的 12 个克隆所抑制的胰蛋白酶活性的百分比。结果显示, 与不能抑制胰蛋白酶的阴性对照相比, 用胰蛋白酶抑制剂胎盘比库蛋白(102-159)转化的酵母菌株 SC101 的所有 12 个菌落都有能力产生充足量的胰蛋白酶抑制活性。因此该活性与胎盘比库蛋白变体(102–159)转化的细胞中特异性抑制剂的表达相关。酵母 WHL341 样品含有最小胰蛋白酶抑制剂活性。这可能与在所用的条件下观察到该菌株的生长缓慢相关。

图 9 显示了酵母 SC101 上清液的 SDS-PAGE 和 Western 分析。表达胎盘比库蛋白(102-159) 的重组酵母 2.4 和 2.5 的上清液和表达抑蛋白酶肽酵母的上清液银染色的 SDS–PAGE, 得到大约 6kDa 的一蛋白质条带, 其相应于各重组 Kunitz 结构域的预计大小。Western 分析显示菌株 2.4 和 2.5 表达的 6kDa 条带能与针对胎盘比库蛋白(102-159)的 pAb 反应。在抑蛋白酶肽对照中相同的 6kDa 条带不与上述抗体反应, 表明该抗体对胎盘比库蛋白变体(102–159)有特异性。

银染色 SDS-PAGE 显示胎盘比库蛋白 C 端结构域的最终制品是高纯的(图 10)。该最终制品中肉汤衍生的胰蛋白酶抑制剂的活性总回收率为 31%。该纯化抑制剂的 N 端测序表明 40%该蛋白质是正确加工的, 从而得到了胎盘比库蛋白(102-159)的正确 N 端, 而约 60%物质含有部分酵母 α -交配因子。该纯化物质由活性丝氨酸蛋白酶抑制剂组成, 在体外抑制血浆激肽释放酶中它的表观 K_i 为 0.35nM。

总之, 蛋白酶抑制剂活性和在免疫化学上与合成的比库蛋白(102-159)相关的蛋白质二者的累积性, 以及自某一转化细胞系分离出胎盘比库蛋白(102-159), 证明了本文所述的重组酵母菌株中有胎盘比库蛋白的表达, 首次显示可用酵母来产生胎盘比库蛋白片断。

为了提高胎盘比库蛋白 102–159 中 Kunitz 结构域的表达水平, 以及为了提高包含正确 N 端的蛋白质的产量, 制备了其他构建物。我们假设胎盘比库蛋白 102–159 的 N 端残基(YEEY–)可能存在一酵母 KEX–2 蛋白酶弱识别的切割位点, 此酶经酶促作用去除此酵母–因子–前区。因此, 我们制备了用于产

生胎盘 BB103-159(EEY...的 N 端)、101-159(NYEEY...的 N 端)和 98-159(DMFNYEEY...)的酵母表达构建物,以修饰 KEX-2 切割位点周围的 P'亚位点(subsite)。为了提高重组蛋白质表达的水平,我们用酵母偏爱的密码子而不是哺乳动物偏爱的密码子来制备以下的一些构建物。基本上如胎盘 BB102-5 159(称为构建物#1)所述制备了这些构建物,但具有以下修饰:

构建物#2

胎盘比库蛋白 103-159, 酵母密码子使用 A 5'有义寡核苷酸

GAAGGGGTAA GCTTGGATAA AAGAGAAGAA TACTGTACTG CTAATGCTGT
TACTGGTCCATGTAGAGCTT CTTTTCCAAG ATGGTACTTT GATGTTGAAA

10 GA (SEQ ID NO: 55)

和 3'反义寡核苷酸

ACTGGATCCT CATTGGCGAA AACATCTCAA CATA CAGGCT TCTTCAGATC
TGTAAGAATT TTTATTACCT CTACAACCAC CGTAAATAAA ATTATTACAA
GAATTTCTTT CAACATCAAA GTACCATCT (SEQ ID NO: 56)

15 如上述产生表达胎盘比库蛋白 102-159 的表达构建物(上述的构建物#1)那样进行操作。

构建物#3

胎盘比库蛋白 101-159, 酵母密码子使用 A 5'有义寡核苷酸

GAAGGGGTAA GCTTGGATAA AAGAAATTAC GAAGAATACT GTACTGCTAA
20 TGCTGTTACT GGTC CATGTA GAGCTTCTTT TCCAAGATGG TACTTTGATG
TTGAAAGA (SEQ ID NO: 57)

和与用于构建物#2 的相同的 3'反义寡核苷酸,如上述产生表达胎盘比库蛋白 102-159 的表达构建物(上述的构建物#1)那样进行操作。

构建物#4

25 胎盘比库蛋白 98-159, 酵母密码子使用 A 5'有义寡核苷酸

GAAGGGGTAA GCTTGGATAA AAGAGATATG TTTAATTACG AAGAATACTG
TACTGCTAAT GCTGTTACTG GTCCATGTAG AGCTTCTTTT CCAAGATGGT
ACTTTGATGT TGAAAGA (SEQ ID NO: 58)

30 和与用于构建物#2 的相同的 3'反义寡核苷酸,如上述产生表达胎盘比库蛋白 102-159 的表达构建物(上述的构建物#1)那样进行操作。

用含有上述各 cDNA 的质粒转化酵母菌株 SC101(MAT α , Ura3-52, suc2), 并用上述使用人密码子产生胎盘比库蛋白 102-159 的方法表达了这些蛋白质。

得到约 250ml 各酵母培养物，分别将离心(15 分钟×3000RPM)得到的上清液在上述的 1ml 激肽释放酶-琼脂糖柱上纯化。下表 7 列出了测试中胰蛋白酶抑制活性的相对量，回收的纯化蛋白质的量和纯化蛋白质的 N 端序列。

5 表 7 含有胎盘比库蛋白的 C 端 Kunitz 结构域的不同蛋白质的相对生产水平

表 7

构建物	测试中抑制剂的 相对浓度	N 端测序 量 序列 (pmol)		注释
#2 103-159	没有检测到	无	无	没有表达
#3 101-159	25%抑制	无	无	低表达
#4 98-159 产物	93%抑制	910	DMFNYE-	很好表达，正确
#1 102-159	82%抑制	480	AKEEGV-	表达了活性、不正确加工的蛋白质

结果显示：含有 C 端 Kunitz 结构域的不同长度的胎盘比库蛋白片断，表现出表达功能性分泌的蛋白质的能力有很大的差异。在纯化前，上清液中表达片断 101-159 和 103-159 的构建物产生极少或低的酶活性，且对 0.05ml 等分的各纯化组分进行 N 端测序产生不能检测到可数量的抑制剂。另一方面，纯化前胎盘比库蛋白 102-159 或 98-159 的表达产生了明显量的蛋白酶活性。但 N 端测序显示：由 102-159 表达回收的纯化蛋白质仍旧在很大程度上未正确加工，显示 N 端与酵母 α -交配因子前序列中某位点上的大部分前蛋白的加工相一致。而从胎盘比库蛋白 98-159 表达回收的纯化蛋白质是在正确位点加工的，产生正确的 N 端。另外，与胎盘 102-159 的回收相比，回收了约多 2 15 倍的蛋白质。所以对通过 α -交配因子前一原序列/酿酒酵母的 KEX-2 加工系统，产生胎盘比库蛋白的 C 端 Kunitz 结构域而言，胎盘比库蛋白 98-159 是优选的片断长度。

实施例 6

20 酵母表达的其他方法

在 DNA 测序后，还可从克隆入 TA 载体 TM(Invitrogen, San Diego, CA)的 R87894-R74593 PCR 产物或从人胎盘 cDNA 中，经 PCR 扩增产生 R74593 翻译产物衍生的 58 个氨基酸的肽。扩增的 DNA 产物由酵母 α -交配因子前导序列的 19

个核苷酸(与编码 YEEY-CFRQ(58 个残基)的 R74593 序列匹配)构成,从而产生框内的翻译产物,构建 α 交配因子/Kunitz 结构域融合蛋白。该蛋白序列还包含 kex2 切割,将在其天然 N 端释放出 Kunitz 结构域。

含有用于克隆的 HindIII 位点的 5'有义寡核苷酸包含以下序列:

5 GCCAAGCTTG GATAAAAGAT ATGAAGAATA CTGCACCGCC AACGCA
(SEQ ID NO:30)

含有用于克隆的 BamHI 位点以及终止密码子的 3'反义寡核苷酸为以下序列:

GGGGATCCTC ACTGCTGGCG GAAGCAGCGG AGCAT(SEQ ID NO:31)

10 将以下序列的全部 206 个核苷酸的 cDNA 序列克隆入酵母表达载体:

CCAAGCTTGG ATAAAAGATA TGAAGAATAC TGCACCGCCA
ACGCAGTCAC TGGGCCTTGC CGTGCATCCT TCCCACGCTG
GTACTTTGAC GTGGAGAGGA ACTCCTGCAA TAACTTCATC
TATGGAGGCT GCCGGGGCAA TAAGAACAGC TACCGCTCTG
15 AGGAGGCCTG CATGCTCCGC TGCTTCCGCC AGCAGTGAGG
ATCCCC(SEQ ID NO: 32)

PCR 扩增后,用 HindIII、BamHI 消化此 DNA,并克隆入经 HindIII 和 BamHI 消化的酵母表达载体 pMT15(见美国专利 No. 5,164,482,本文将全部纳入作为参考)中。用美国专利 No. 5,164,482 中所述的方法,将得到的质粒载体用于
20 转化酵母菌株 SC106。分离 URA³酵母转化体,在可诱导的条件下培养。用上述体外试验方法根据培养物上清液中累积的胰蛋白酶抑制剂活性的量,确定重组胎盘比库蛋白变体的产量。9000rpm 离心发酵肉汤 30 分钟。然后用 0.4 μ m 过滤器过滤上清液,再用 0.2 μ m 过滤器过滤,稀释至电导率为 7.5ms,用柠檬酸将 pH 调节至 3。然后将样品批量吸附到 50mM 柠檬酸钠(pH 3)中的 200ml 快速流动 S
25 琼脂糖上,搅拌 60 分钟。随后依次用各 2L 的 50mM 柠檬酸钠(pH 3.0)、50mM Tris-HCl(pH 9.0)、20mM HEPES(pH 6.0)洗涤该凝胶。将洗涤后的凝胶移入合适的柱中,用 20mM HEPES(pH 6.0)配的 0 到 1M 氯化钠线性梯度洗脱。然后合并含有体外胰蛋白酶抑制活性的洗脱组分,进一步纯化 a)用固定有无水胰蛋白酶的柱层析(基本如实施例 2 所述);b)用固定有牛激肽释放酶的柱层析;或 c)
30 合用常规的层析步骤包括凝胶过滤和/或阴离子交换层析。

实施例 7

从胎盘分离天然人胎盘比库蛋白及其特性分析

从完整的冷冻胎盘 (Analytical Biological Services, Inc, Wilmington, DE) 将比库蛋白纯化至表观均一。将胎盘 (740gm) 解冻至室温, 切成 0.5 到 1.0cm 的薄片, 置于冰上, 用 600ml PBS 缓冲液洗涤。倾析掉洗涤液, 5 将 240ml 胎盘薄片置于 Waring 搅拌器中。加入含有 0.1M Tris (pH 8.0) 和 0.1M NaCl 的 300ml 缓冲液后, 高速混合此混合物, 倾倒入 750.0ml 离心管中, 置于冰上。重复此流程直到处理完所有材料。4°C 4500 × g 离心此混合浆液 60 分钟。用粗棉布过滤上清液, 然后按制造商的说明, 将 70mg 牛胰腺激肽释放酶 (Bayer AG) 共价结合于 5.0ml CNBr 活化琼脂糖上 (Pharmacia), 制成的激肽释放酶亲和柱纯化胎盘比库蛋白。以 2.0ml/分钟流速将材料加样到该亲和柱上, 用 0.1M Tris (pH 8.0)、0.1M NaCl 洗涤, 直至不再探测到 280nm 时洗涤液的吸光度。用 0.1M Tris (pH 8.0)、0.5M NaCl 进一步洗涤该柱, 然后用 3 倍体积的 0.2M 乙酸 (pH 4.0) 洗脱。将含有激肽释放酶和胰蛋白酶 (见下文) 抑制活性的组分合并, 冷冻并冻干。用连接 Beckman System Gold HPLC 系统的 Superdex 7510/30 15 (Pharmacia) 柱凝胶过滤层析进一步纯化胎盘比库蛋白。简单地说, 该柱以 0.5ml/分钟的流速, 用 0.1M Tris、0.15M NaCl 和 0.1% triton X-100 平衡。以 1.0ml 0.1M Tris (pH 8.0) 重建冻干的样品, 以 200μl 等分将其注入凝胶过滤柱中。收集各组分 (0.5ml), 分析胰蛋白酶和激肽释放酶抑制活性。合并活性组分, 加入 TFA 将溶液的 pH 调节至 2.5。直接将材料加样到 Vydac C18 反相柱 (5 微米, 0.46 × 25cm) 上, 该柱预先用 0.1% TFA 中的 20% 乙腈平衡。最初用 0.1% TFA 配的 20% 乙腈洗涤 20 分钟后, 以 1.0ml/分钟, 用 0.1% TFA 配的 20% - 80% 乙腈线性梯度进行分离 50 分钟。收集各组分 (1ml), 分析胰蛋白酶和激肽释放酶抑制活性。用快速真空浓缩器 (Savant) 浓缩含有抑制活性的组分, 并作 N 端序列分析。

25

胎盘比库蛋白的功能试验

通过测定其抑制牛胰蛋白酶和人血浆激肽释放酶的能力, 鉴定了功能性胎盘比库蛋白。胰蛋白酶抑制活性是在室温 96 孔微量滴定板 (Perkin Elmer) 中, 用 Gly-Pro-Lys-氨基甲基香豆素为底物, 在试验缓冲液 (50mM Hepes, pH 30 7.5, 0.1M NaCl, 2.0mM CaCl₂, 0.1% triton X-100) 中测定的。用配备有平板读数计的 Perkin-Elmer LS-50B 荧光计测定荧光 (ex = 370nm, em = 432nm), 来确定胰蛋白酶产生的香豆素的量。将肺蛋白酶 (100 μ l 缓冲液 23μg) 与 20μl 待测

试的样品混合，25℃培育 10 分钟。加入试验缓冲液配制的 50μl 底物 GPK-AMC (终浓度 33μM) 开始反应。测定荧光强度，并用以下方程式确定各组分的%抑制：

$$\% \text{抑制} = 100 \times [1 - F_0/F_1]$$

- 5 其中 F_0 为未知荧光， F_1 为仅对照的胰蛋白酶荧光。类似地，用试验缓冲液 (50mM Tris, pH 8.0, 50mM NaCl, 0.1% triton x-100) 配的 7.0nM 激肽释放酶和 66.0μM Pro-Phe-Arg-AMC 作为底物类似地测定了各组分中激肽释放酶的抑制活性。

10 确定胎盘比库蛋白的体外特异性

用上述实施例的材料和方法测定了天然人胎盘比库蛋白的体外特异性。用 GPK-AMC 为底物，通过对已知浓度的胰蛋白酶活性位点的滴定定量测定了胎盘比库蛋白，以监测未结合的胰蛋白酶组分。

15 蛋白质的测序

- 在 Speed Vac 中将 1ml 组分 (C18-29 Delaria) 浓缩至体积 300ml，以减少有机溶剂的量。然后将样品加样到 Hewlett-Packard 微型二相反应柱中，用 1ml 2% 三氟乙酸洗涤。用 Edman 降解方法，在 Hewlett-Packard G1005A 型蛋白质测序系统上测序该样品。Hewlett-Packard 提供了所有试剂和 3.0 版本的测序方法。测序进行 50 轮。

结果

依次用激肽释放酶亲和层析、凝胶过滤和反相层析将胎盘比库蛋白纯化至表观均一 (见以下纯化表)：

25 表 5 天然胎盘比库蛋白 (1-179) 的纯化表

表 5					
步骤	体积 (ml)	OD280 (/ml)	OD280	单位 ^a (U)	单位/OD 280
胎盘上清液	1800.0	41.7	75,060	3,000,000	40.0
激肽释放酶亲和层析 Ph4.0	20.0	0.17	3.36	16,000	4,880
激肽释放酶亲和层析 pH1.7	10.2	0.45	4.56	12,000	2,630

Superdex 75	15.0	0.0085	0.13	3,191	24,546
-------------	------	--------	------	-------	--------

^a 一个单位定义为在标准试验中抑制 50% 胰蛋白酶活性的量。

用 pH4.0 洗脱液从激肽释放酶亲和柱洗脱得到大部分激肽释放酶和胰蛋白酶抑制剂活性。随后的凝胶过滤层析(图 5)得到了激肽释放酶和胰蛋白酶抑制剂活性的一个峰，在相同条件下跑样分子量标准品产生的标准曲线判断其分子量范围为 10 到 40kDa。反相 C18 层析(图 6)得到在约 30% 乙腈最强洗脱的抑制剂活性 4 个峰。与从 C18 洗脱的第一峰相关的活性(组分 29)显示，一氨基酸序列起始于胎盘比库蛋白的预计氨基酸序列的氨基酸 1(ADRER...;SEQ ID NO: 1)，并且与 50 轮测序的预计序列(图 3 中加下划线的氨基酸)相同。如氧化蛋白测序所预计的那样，该序列一段中的半胱氨酸是沉默的。此后由 S-吡啶基乙基化蛋白测序鉴定到在成熟胎盘比库蛋白的氨基酸位置 11 和 20 为半胱氨酸残基，在第 11 和 20 轮回收得到 PTH-吡啶基乙基半胱氨酸。

令人感兴趣的是，该序列的 30 号氨基酸残基天冬酰胺是沉默的，显示该位点易被糖基化。组分 29 得到一主要的序列，其相应于在残基#1 上起始的胎盘比库蛋白序列的序列加上在残基 6 起始的也由胎盘比库蛋白(SIHD...)衍生的微小序列(2pmol)。这表明组分 29 中测序的终产物是高纯的，此蛋白酶抑制活性很可能与此组分相关(图 6)。

另外，根据银染色 SDS-PAGE 分析(图 7)可知，经 C18 层析的胎盘比库蛋白的终产物是高纯的，在 10-20% 丙烯酰胺 N-三(羟甲基)甲基甘氨酸凝胶(Novex, San Diego, CA)上该蛋白质迁移的表观分子量为 24kDa，该分子量用以下分子量标记物标准化：胰岛素(2.9kDa)、牛胰蛋白酶抑制剂(5.8kDa)、溶菌酶(14.7kDa)、β-乳白蛋白(lactaglobulin)(18.4kDa)、碳酸酐酶(29kDa)和卵白蛋白(43kDa)。在 SDS-PAGE 上胎盘比库蛋白的上述大小与全长编码序列(图 4F)所预计的相一致。

如同根据上述 N 端测序结果所预计的那样，纯化的该蛋白质能与针对胎盘比库蛋白(7-64)的抗体反应，产生的条带与在银染色的凝胶上(图 7)所观察到的纯化制备物的分子量(图 12A)相同。但，当将相同的制备物与针对合成的胎盘比库蛋白(102-159)的抗体反应时，未观察到相应于该全长蛋白质的条带。却观察到与大约 6kDa 的合成性比库蛋白(102-159)共迁移的片断。将这些结果的解释简单化就是：在纯化后，纯的制备物发生了降解，产生了含有 N 端结构域的 N 端片断和含有 C 端结构域的 C 端片断。估计对胎盘比库蛋白(7-64)抗血清反应的片断无该全长蛋白质的 C 端，其 24kDa 的大小提示糖基化状态高。表

6 显示胎盘比库蛋白体外抑制各种丝氨酸蛋白酶的能力，数据与用抑蛋白酶肽获得的数据相比较。

表 6: 胎盘比库蛋白抑制各种蛋白酶的 Ki 值

蛋白酶(浓度)	胎盘比库蛋白 Ki (nM)	抑蛋白酶肽 Ki (nM)
胰蛋白酶(48.5pM)	0.13	0.8
人血纤蛋白溶酶(50pM)	1.9	1.3

5 结果显示从天然来源(人胎盘)分离的胎盘比库蛋白是胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶的强抑制剂。

实施例 8

胎盘比库蛋白在不同人器官和组织中的表达模式

10 从 Clontech 购得多种组织的 Northern, 包含 2 μ g 人心脏、脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾和胰的聚 A⁺RNA。使用两种不同的 cDNA 探针: 1) 编码胎盘比库蛋白(102-159)的凝胶纯化的 cDNA; 2) 780 碱基对 PCR 衍生的 cDNA(图 4E), 它是由 EcoRI 消化和凝胶纯化的 TA 克隆释放出的。将各探针用 ³²P-dCTP 和随机引发标记试剂盒(Boehringer Mannheim Biochemicals(Indiana))标记, 然后按制造商的说明, 用于与多种组织的 Northern 杂交。用 Biomax 底片曝光 15 小时得到放射自显影照片, 用 Umax Scanner 显影, 并用 Adobe Photoshop 扫描。

结果

20 用胎盘比库蛋白(102-159)探针(图 11A)或较大的含有胎盘比库蛋白的两个 Kunitz 结构域的探针所观察到的组织表达模式, 基本与预计的相同。在胰和胎盘中最为丰富的是胎盘比库蛋白 mRNA。还在肺、脑和肾中观察到明显水平, 而在心脏和肝中观察到的水平较低, 骨骼肌中未检测到该 mRNA。所有情况下转录物大小为 1.95 千碱基, 这与从 EST 重叠和全长 cDNA 克隆(上述)推导的胎盘比库蛋白的预计大小非常接近。

25 该 mRNA 在组织中的广泛分布表明胎盘比库蛋白是广泛表达的。由于该蛋白质还包含一前导序列, 它可能充分接触人免疫系统, 要求它能作为自身蛋白质被识别。其他表明胎盘比库蛋白 mRNA 表达在组织中广泛分布的证据, 是从

如下事实推论的：存在着成年人和婴儿脑和人视网膜、乳房、卵巢、嗅上皮和胎盘衍生的胎盘比库蛋白同源的一些 EST 进入位点(entry)。因此结论是：将这种天然的人蛋白质给予人类患者不可能引发免疫应答。

令人感兴趣的是，胎盘比库蛋白的表达模式使人有所联想到牛抑蛋白酶
5 (在牛肺和胰腺中高水平存在)肽的表达模式。为了进一步阐明胎盘比库蛋白的表达模式，测定了以下人细胞总 RNA 的 RT-PCR：没有刺激过的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)、HK-2(从肾近曲小管(proxiaml tubule)衍生的细胞系)，TF-1(红白细胞白血病细胞系)和佛波酯(PMA)刺激的人外周血白细胞。设计使用了以下探针：

10 CACCTGATCG CGAAGACCCC(有义； SEQ ID NO:59)；

CTGGCGGAAG CAGCGGAGCA TGC(反义； SEQ ID NO:60)

来扩增 600b.p 编码胎盘比库蛋白的 cDNA 片断。通过包括用肌动蛋白引物来扩
增 800b.p.肌动蛋白片断对比较进行归一化。用溴化乙锭在琼脂糖凝胶上所鉴定的
800b.p.片断在所有泳道上强度相同，而 HUVECs 中无 600b.p.胎盘比库蛋白
15 片断，但在其他各细胞系中存在的量都非常明显。我们得到如下结论：胎盘比
库蛋白至少在一些内皮细胞中不表达，但在一些白细胞群中表达。

实施例 9

从杆状病毒/Sf9 表达系统高度纯化的胎盘比库蛋白(1-170)的纯度和特性
20 鉴定

如下在 Sf9 细胞中表达了含有两个 Kunitz 结构域(比库蛋白(1-170)(SEQ
ID NO: 52)的胎盘比库蛋白大片断。用 HindIII 和 XbaI 消化释放出由 PCR 获
得的和包含在 TA 载体中的胎盘比库蛋白 cDNA(图 4E) (见上述实施例)，产生
了侧翼为 5'XbaI 位点和 3'HindIII 位点的一片断。将该片断凝胶纯化，然后克
25 隆入 M13mp19 载体(New England Biolabs, Beverly, MA)中。用体外诱变(Kunkel
T. A., (1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-492)，产生 PstI 位点 3'至 5'
端的 XbaI 位点，而 5'至编码 ATG 起始位点的序列、天然胎盘比库蛋白信号肽
和成熟胎盘比库蛋白编码序列。用于诱变的寡核苷酸的序列如下：

5'CGC GTC TCG GCT GAC CTG GCC CTG CAG ATG GCG CAC GTG TGC

30 GGG3'(SEQ ID NO: 61)

类似地，用如下寡核苷酸，将终止密码子(TAG)和 BgIII/XmaI 位点工程改造入
此 cDNA 的 3'端：

5'CTG CCC CTT GGC TCA AAG TAG GAA GAT CTT CCC CCC GGG GGG

GTG GTT CTG GCG GGG CTG3'(SEQ ID NO: 62)

此终止密码子在编码胎盘比库蛋白序列的读框内，并在紧靠氨基酸残基 170 位赖氨酸后引起终止，从而编码了一缺失推定的跨膜结构域的截短的胎盘比库蛋白片断。分离了用 PstI 和 BglIII 消化的产物，并克隆入 BacPac8 载体中以表达胎盘比库蛋白片断(1-170)，其包含两个 Kunitz 结构域，但在紧靠推定的跨膜节段的 N 端被截断。

当感染后 72 小时收获培养基时，在感染复数 1 对 1 优化 Sf-9 昆虫细胞表达比库蛋白。收获后，加入 Tris-HCl 将杆状病毒细胞培养物上清液(2L)的 pH 调节至 8.0。用 5ml 牛胰腺激肽释放酶亲和柱(如实施例 7 从胎盘纯化天然胎盘比库蛋白所述)层析纯化比库蛋白。用 TFA 将洗脱物质的 pH 调节至 2.5，以 1ml/分钟流速，用 10% 乙腈(以 0.1% TFA 配)平衡 C18 反相柱(1.0×2.5cm)后，进行层析。用 10%—80% 线性梯度乙腈(以 0.1% TFA 配)洗脱比库蛋白 40 分钟。合并活性组分、冻干，重溶于 50mM Hepes(pH 7.5)、0.1M NaCl、2mM CaCl₂ 和 0.1% triton x-100 中，-20℃ 储存直至使用。通过氨基酸分析测定重组比库蛋白的浓度。

结果

使用以下的纯化程序从杆状病毒细胞培养上清液纯化重组比库蛋白，得到活性胰蛋白酶抑制剂(如下表 8)。

20 表 8 从转化的培养物上清液纯化重组比库蛋白

纯化步骤	体积 (ml)	OD280 /ml	总 OD280	单位 (U)	特异性活性 (U/OD)
上清液	2300.0	9.0	20,700	6,150,000	297
激肽释放酶亲和层析	23.0	0.12	2.76	40,700	14,746
C18 反相层析	0.4	3.84	1.54	11,111	72,150

用固定有牛胰腺激肽释放酶的亲和柱层析上进行粗制材料层析，选择性分离得到 0.013% 蛋白质，其存在 0.67% 胰蛋白酶抑制活性。在起始上清液中存在的大部分胰蛋白酶抑制活性不结合于固定的激肽释放酶，且与比库蛋白无关(没有显示结果)。随后用 C18 反相层析进行一步得到 5 倍纯化，回收率 0.2%。

25 SDS-PAGE 证明最终制备物是高纯的(图 13)，Mr 为 21.3kDa，在免疫印迹中能

与兔抗胎盘比库蛋白 102-159 反应(未显示)。N 端测序(26 轮)得到预计的成熟胎盘比库蛋白的序列(图 4F), 起始于残基+1(ADRER...), 显示该信号肽在 Sf9 细胞中已被正确加工。

- 使 Sf9 细胞的纯化胎盘比库蛋白(100pmol)吡啶基乙基烷基化, CNBr 消化, 然后未将得到的片断重溶解就进行测序。20 轮测序得到如下的 N-末端:

序列	量	胎盘比库蛋白残基#
LRCFRQQENPP-PLG----	21pmol	154-168(SEQ ID NO: 63)
ADRERSIHDFCLVSKVVGRC	20pmol	1-20(SEQ ID NO: 64)
FNYEEYCTANAVTGPCRASf	16pmol	100-119(SEQ ID NO: 65)
Pr—Y-V-dGS-Q-F-Y-G	6pmol	25-43(SEQ ID NO: 66)

所以回收得到了相应于各预计的四个片断的 N-末端。这证实 Sf9 表达的蛋白质包含了胎盘比库蛋白(1-170)的整个胞外结构域序列。

实施例 10

- 10 纯化的 Sf9 细胞衍生的胎盘比库蛋白(1-170)的特异性抑制

用实施例 3、4 和 7 所述的材料和方法测定了重组比库蛋白的体外特异性。另外, 通过在含有 50mM Tris(pH 9.0)、50mM NaCl 和 0.01% triton x-100 的缓冲液中培育 0.35nM 人组织激肽释放酶重组比库蛋白, 测定了比库蛋白对人组织激肽释放酶的抑制作用。37°C 5 分钟后, 加入 5 μ l 2mMPFR-AMC, 监测荧光的变化。

- 15 如下还测定了对组织血纤蛋白溶酶原激活剂(tPA)的抑制: 室温在 20mM Tris 缓冲液(pH 7.2)(含有 150mM NaCl 和 0.02% 叠氮钠)中, 与抑制剂一起预培育 tPA(从 Sigma Chemical Co, St Louis, MO 购得的人黑色素瘤细胞培养物得到的单链形式)2 小时。随后将反应物转移到含有以下引发成分浓度的反应系统中以引发反应: tPA(7.5nM), 抑制剂 0-6.6 μ M, 以 28mM Tris 缓冲液(pH 8.5) 20 配的 Dile-Lpro-Larg-对硝基苯胺(1mM), 该缓冲液含有 0.004% (v/v) triton x-100 和 0.005% (v/v) 叠氮钠。37°C 培育 2 小时后, 经 A405 测定确定形成了对硝基苯胺。

- 25 下表显示了体外重组比库蛋白作为各种丝氨酸蛋白酶抑制剂的效果。将显示的数据与用重组比库蛋白或抑蛋白酶肽进行筛选抑制得到的数据相比较。

表 9 比较重组胎盘比库蛋白(1-170)或抑蛋白酶肽对各种蛋白酶抑制的 Ki 值

表 9

蛋白酶(浓度)	重组比库蛋白 Ki(nM)	抑蛋白酶肽 Ki(nM)
胰蛋白酶(48.5pM)	0.064	0.8
人血浆激肽释放酶(2.5nM)	0.18	19.0
人组织激肽释放酶(0.35nM)	0.04	0.004
牛胰腺激肽释放酶(100pM)	0.12	0.02
人血纤蛋白溶酶(50pM)	0.23	1.3
因子 Xa(0.87nM)	180	在 31 μ M 时为 5%抑制
因子 Xia(0.1nM)	3.0	288
组织血纤蛋白溶酶原激活剂 (7.5 μ M)	<60	在 6.6 μ M 时无抑制
组织因子 VIIa	800	在 1 μ M 时无抑制

结果显示在昆虫细胞中可以表达重组比库蛋白，得到的活性蛋白酶抑制剂对至少五种不同的丝氨酸蛋白酶抑制剂有效。对人血浆激肽释放酶、胰蛋白酶和血纤蛋白溶酶而言，重组比库蛋白比抑蛋白酶肽更强。令人惊奇的是，对所有测试的酶重组比库蛋白比合成衍生的比库蛋白片断(7-64)和(101-159)更强。这些数据显示重组比库蛋白比抑蛋白酶肽更有效(用体外试验)，且可以预计其在体内效力更好。

除了测定对特定蛋白酶的效力外，还评估了胎盘比库蛋白(1-170)延长激活的部分促凝血酶原激酶时间(APTT)的能力，并与抑蛋白酶肽相关活性相比较。将抑制剂以 20mM Tris 缓冲液(pH 7.2)(含有 150mM NaCl 和 0.02%叠氮钠)稀释，加到 MLA Electra^R 800 自动凝血时间血凝测定仪(Medical Laboratory Automation, Inc., Pleasantville, N. Y.)所附带的比色杯中。将该装置设置到 APTT 模式，300 秒激活时间及一式二份模式。然后自动将 0.1ml 血浆(特制试验参考用血浆批号 1-6-5185, Helena Laboratories, Beaumont, TX)、APTT 试剂(Automated APTT 批号 102345, 由 Organon Teknika Corp., Durham, NC 提供)和 25mM CaCl₂ 加入以引发凝结，并自动监测凝结时间。结果(图 14)显示：两倍的凝结时间需要约 2 μ M 终浓度的抑蛋白酶肽，而只需要 0.3 μ M Sf9 产生的胎盘比库蛋白。这些数据表明胎盘比库蛋白是一种有效的抗凝剂，可用作药物来治疗包括病理性激活凝固内源路径等疾病。

实施例 11

测定豚鼠气道电位差

本研究的目的是研究 Kunitz 丝氨酸蛋白酶抑制剂比库蛋白和钠通道阻断剂阿米洛利对豚鼠气道电位差(处理后 3 小时)的影响。将这些试剂以局部滴注法送递到向头侧气道。2 小时后监测 TPD 60 分钟。本实施例所用流程的描述见 Newton 等人的“纤毛、粘液和粘液纤毛间的相互作用”，Baum, G. L. 等人编辑，Marcel Dekker, New York, 1998; Newton 等人，Ped. Pulm, S17, Abs. 364, 1998)。

所用的材料和方法/试剂

10 制备比库蛋白(1-170) (5 和 50 μ g/ml (SEQ ID NO: 52)) (如下实施例 17 所述)和阿米洛利(由 Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA 提供) (100 μ M) 的含水制剂，无菌过滤，且在试验前进行内毒素测试。以 Hank 平衡盐溶液(HBSS)制备这些制剂，制剂含 137mM NaCl、3mM KCl、3mM KH₂PO₄、8mM Na₂HPO₄、0.2% Tween-80 (pH 7.1)，无菌过滤，进行内毒素测试以用于本实施例。将 HBSS 用作对照溶液。从 Janssen Animal Health 得到 Hypnorm®(枸橼酸芬太尼 0.315mg/ml 和氟阿尼酮 10mg/ml)，由 Roche 提供 Hypnovel®(Midazolam 5mg/ml)。由 David Hall, UK 提供雄性 Dunkin-Hartley 豚鼠。由 Kane-Mary Letd, UK 提供热敏电阻探头。

20 进行麻醉并将比库蛋白送递到气管气道中

用氟烷麻醉动物。一旦麻醉水平令人满意在下颌作一小切口。暴露气道，用针和注射器将 100 μ l 体积的载体、比库蛋白(0.5 μ g 或 5 μ g)或阿米洛利(100 μ M)滴注到气道表面。一旦注射完，用 Vetbond®(氰基 cacrylate 组织胶)将皮肤切口封闭。然后让动物复苏。

25

准备豚鼠用于测定气道电位差

给予试剂后 2 小时，用 Hypnom®和 Hypnovel®第二次麻醉豚鼠，并将它们固定于仰卧位置。用热敏电阻探头测定直肠温度，并人工调节加热灯将肛温维持在 37 $^{\circ}$ C。从下颌到锁骨作一腹侧面中线切口。用钝器解剖法暴露气道的长度，并在胸骨上缘对切二等分。暴露外颈静脉并插入导管。然后在气道的尾部插入导管让动物能自发地呼吸室内空气。然后将动物仰卧，用加热灯维持动物的体温。肌内麻醉后 20 分钟，将气道琼脂电极插入向头侧的气道，测定气道电位

差 60 分钟。

结果

如图 15 所示，相对于运载体而言，用比库蛋白 (5 μ g) 体内处理后 3 小时，
5 比库蛋白抑制了豚鼠气道的电位差。显示阿米洛利 (100 μ M) 和比库蛋白 (0.5 μ g) 的效果以进行比较。

实施例 12

比库蛋白对豚鼠气道粘液速度的影响

10 本研究的目的是研究 Kunitz 家族丝氨酸蛋白酶抑制剂比库蛋白对豚鼠气道粘液速度的作用 (处理后 1.5 小时)。通过局部滴注将该试剂送递到向头侧气道中。1.5 小时后监测 TMV60 分钟。本实施例所用流程的描述见 Newton 等人的“纤毛、粘液和粘液纤毛间的相互作用”，Baum, G. L. 等人编辑，Marcel Dekker, New York, 1998; Newton 等人，Ped. Pulm, S17, Abs. 364, 1998)。

15

所用的材料和方法/试剂

以 HBBS (含有 137mM NaCl, 3mM KCl, 3mM KH₂PO₄, 8mM Na₂HPO₄, 0.2% Tween-80, pH 7.1) 制备比库蛋白 (1-170) 制剂。无菌过滤该制剂，在用于本实施例之前进行内毒素测试。将 HBSS 用作对照溶液。从 Janssen Animal Health 得到 Hypnorm® (枸橼酸芬太尼 0.315mg/ml 和氟阿尼酮 10mg/ml)，由 Roche 提供 Hypnovel® (Midazolam 5mg/ml)。由 David Hall, UK 提供雄性 Dunkin-Hartley 豚鼠 (550-750 克)。由 Kane-Mary Letd, UK 提供热敏电阻探头。

进行麻醉并将比库蛋白送递到气道

25 用氟烷麻醉动物。一旦麻醉水平令人满意在下颌作一小切口。暴露气道，用针和注射器将 100 μ l 体积的运载体、比库蛋白 (5 μ g) 滴注到气道表面。一旦注射完，用 Vetbond® (氰基 cacrylate 组织胶) 将皮肤切口封闭。然后让动物复苏。

30 测定气道粘液速度 (TMV)

用铅准垂直校准的 β 微粒探测器探头监测 TMV，安置该探头探测注入的等分 ³²P-标记的酿酒酵母菌发射的放射性 (当将其移到被麻醉的豚鼠的气道粘液纤

毛层时) (Newton 和 Hall 1998)。图 16(a) 显示注射器和 β 探头的配置。图 16(b) 显示当将 ^{32}P 标记的酿酒酵母移到气道粘液纤毛层时, 该探头所测到的计数。

滴注比库蛋白后 70 分钟, 用 Hypnom®和 Hypnovel®第二次麻醉各动物, 并将它们固定于仰卧位置。20 分钟后进行第一次 TMV 测定。随后每 15 分钟测定一次。TMV 测定流程的描述详见 Newton 等人的“纤毛、粘液和粘液纤毛间的相互作用”, Baum, G. L. Preil, Z., Roth, Y., Liron., Ostfield, E., Marcel Dekker. New York, 1990 和 Newton 等人, “儿科肺学”, S17, Abs364, 1998。

结果

10 如图 16(c) 所示, 在给药后 1.5 到 2.5 小时的持续过程中, 相对于盐水, 比库蛋白 ($5\mu\text{g}$) 增加了豚鼠体内的 TMV。

实施例 13

15 比库蛋白降低了体外培养的人支气管上皮 (HBE) 细胞短环电流 (Isc) 中的钠流

将生长至汇合 (confluence) 的第三代 HBE 细胞单层固定在改进的 Ussing 室内, 浸泡在 Krebs 缓冲液 (KBR) 中, 用 95% O_2 /5% CO_2 吹气, 升温至 37°C 。

在校准背景噪音和流体阻力之前, 将细胞平衡 20 分钟。然后用 WPI EVC 4000 电压夹板将透上皮电位差夹在 0mV。用 Ag/AgCl 电极监测 Isc。一旦实现基线稳定 (通常为 10-20 分钟), 用阿米洛利 ($10\mu\text{M}$) 处理细胞。一旦观察到对阿米洛利的反应, 就用 KBR 溶液将其洗涤掉。回到基线并平衡, 加入比库蛋白 (1-170) (如下实施例 17 所述) ($0.5-50\mu\text{g}/\text{ml}$, 以 PBS 配) 或 PBS 对照。用试剂处理后 90 分钟, 加入阿米洛利 ($10\mu\text{M}$)。一旦电流稳定, 加入毛喉萜 ($10\mu\text{M}$), 然后加入丁尿胺 ($100\mu\text{M}$)。

25

结果

如图 17 所示, 在 90 分钟的过程中, 比库蛋白 (70nM) 抑制了体外人支气管上皮细胞中的钠流。毛喉萜诱导的 cAMP 介导的氯分泌和单层阻力未受影响。

30 实施例 14

高渗盐水对豚鼠 TMV 的影响

本对比研究的目的是研究高渗盐水 (14.4% \times 5 分钟) 对豚鼠气道粘液速度

的影响。用气雾剂将此试剂送入向头侧气道。立即监测 TMV，每 15 分钟一次监测 30 分钟。本实施例所用流程的描述见 Newton 等人的“纤毛、粘液和粘液纤毛间的相互作用”，Baum, G. L. 等人编辑, Marcel Dekker, New York, 1998; Newton 等人, Ped. Pulm, S17, Abs. 364, 1998)。

5

所用的材料和方法/试剂

从 Janssen Animal Health 得到 Hypnorm®(枸橼酸芬太尼 0.315mg/ml 和氟阿尼酮 10mg/ml)，由 Roche 提供 Hypnovel®(Midazolam 5mg/ml)。由 Harlan UK Ltd. 提供雄性 Dunkin-Hartley 豚鼠 (550—750 克)。由 Kane-Mary Letd, UK 提供热敏电阻探头。

10

测定气道粘液速度:

用 Hypnorm®和 Hypnovel®麻醉动物。用铅准垂直校准的β微粒探测器探头监测 TMV, 安置该探头探测注入的等分 ^{32}P —标记的酿酒酵母菌发射的放射性(当将其移到被麻醉的豚鼠的气道粘液纤毛层时) (Newton 和 Hall 1998)。

15

给药后 20 分钟进行第一次 TMV 测定(第一次)。随后每 15 分钟进行一次测定。在第二次测定前 6 分钟时，喷雾 5 分钟给予盐水(0.9%)或高渗盐水(14.4%)。通过气道上作的 $0.5\mu\text{m}$ 孔给予放射标记的示踪颗粒。用 Pari 压力喷雾器产生乙醚盐水(0.9%)或高渗盐水(14.4%)气溶胶。在第二次测定前 1 分钟关闭气溶胶。所述的 TMV 测定流程详见 Newton 等人的“纤毛、粘液和粘液纤毛间的相互作用”，Baum, G. L. Preil, Z., Roth, Y., Liron., Ostfield, E., Marcel Dekker 编辑. New York, 1990 和 Newton 等人, “儿科肺学”, S17, Abs364, 1998。

20

结果

如图 18 所示，用气雾剂后，高渗盐水(14.4%×5 分钟)立即引起了 TMV 的瞬时增加。

25

实施例 15

阿米洛利对豚鼠 TMV 的影响

本研究的目的是研究阿米洛利(10mM×20 分钟)对麻醉的、自发性呼吸的豚鼠的气道粘液的影响。如实施例 14 所述，通过雾化将该试剂送入向头侧气道。本实施例所用的 TMV 测定流程的描述见 Newton 等人的“纤毛、粘液和粘

30

液纤毛间的相互作用”， Baum, G. L. 等人编辑， Marcel Dekker, New York, 1998; Newton 等人， 儿科肺学 S17, Abs. 364, 1998)。

所用的材料和方法/试剂

5 在本实施例中，用水制备了阿米洛利制剂(10mM)。从 Janssen Animal Health 得到 Hypnorm®(枸橼酸芬太尼 0.315mg/ml 和氟阿尼酮 10mg/ml)，由 Roche 提供 Hypnovel®(Midazolam 5mg/ml)。由 Harlan, UK Ltd. 提供雄性 Dunkin-Hartley 豚鼠(550—750 克)。由 Kane-Mary Letd, UK 提供热敏电阻探头。

10

气道粘液速度的测定

用 Hypnorm®和 Hypnovel®麻醉动物。用铅准垂直校准的β微粒探测器监测 TMV, 安置探头探测由注入的等分 ³²P-标记的酿酒酵母菌发射的放射性(当将其转移到被麻醉的豚鼠的气道粘液纤毛层时)(Newton 和 Hall 1998)。在 0 时用
15 Hypnorm®和 Hyponovel®麻醉豚鼠。通过气雾剂给予阿米洛利(10mM×20 分钟)。然后立即进行第一次 TMV 测定，随后每 15 分钟进行一次测定。

结果

20 如图 19 所示，在喷雾后 5 分钟，阿米洛利(10mM×20 分钟)引起了 TMV 有统计学意义的增加。

实施例 16

抑蛋白酶肽双突变蛋白降低了培养的人支气管上皮(HBE)细胞的短环电流(Isc)

25 本研究的目的是研究 Kunitz 家族丝氨酸蛋白酶抑制剂抑蛋白酶肽双突变蛋白体外对 Isc 的影响。将生长至汇合(confluence)的第三代 HBE 细胞单层固定在改进的 Ussing 室内，浸泡在 Krebs 缓冲液(KBR)中，用 95%O₂/5%CO₂ 吹气，升温至 37℃。抑蛋白酶肽双突变蛋白是 Des Pro2-Ser10-Arg15-Asp24-Thr26-Glu31-Asn41-Glu53-抑蛋白酶肽，见 EP 821 007 的实施例 1 中的描述(于
30 1998 年 1 月 28 日公开)，本文将全部纳入作为参考。

在校准背景嘈音和流体阻力之前，将细胞平衡 20 分钟。然后用 WPI EVC 4000 电压夹板将透上皮电位差夹在 0mV。用 Ag/AgCl 电极监测 Isc。一旦实现基线

稳定(通常为 10—20 分钟),用阿米洛利(10 μ M)处理细胞。一旦观察到对阿米洛利的反应,就用 KBR 溶液将其洗涤掉。回到基线并平衡,加入比库蛋白(5 μ g/ml)、抑蛋白酶肽双突变蛋白(0.5 到 5 μ g/ml)、抑蛋白酶肽(1.5 到 5 μ g/ml)或 PBS 对照。试剂处理后 90 分钟,加入阿米洛利(10 μ M)。

5

结果

如图 20 所示,在 90 分钟的过程中抑蛋白酶肽双突变蛋白(0.5 到 5 μ g/ml)剂量依赖性地抑制了体外人支气管上皮细胞中的钠流。

10 实施例 17

在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达的胎盘比库蛋白(1-170)的表达、纯化和蛋白酶抑制剂活性的比较

(a)开发稳定的、高产地表达比库蛋白的 CHO 细胞系

用图 27 所示的表达载体转染 CHO(dhfr-)细胞,开发了分泌大量比库蛋白的稳定的生产细胞系。用标准重组 DNA 技术构建此载体。可以在发明人 Sam Chan 于 1999 年 11 月 12 日申请的题为“产生糖基化比库蛋白的方法”的 U. S. S. N. 09/441,654 中找到对构建表达载体和 CHO 细胞表达系统的描述。简单地说,表达载体 pBC-BK 的构建可通过将比库蛋白 cDNA 克隆于紧接巨细胞病毒立即早期启动子的下游和聚腺苷信号序列的上游。此表达载体 pBC-BK 由比库蛋白的转录组件、二氢叶酸还原酶和氨苄青霉素抗性构成。通过限制性内切酶从此克隆载体中释放出比库蛋白 cDNA,将其平头,连接到线性化的 pBC 中。pBC 的线性化是通过用一限制性内切酶消化完成的。测序确认比库蛋白 cDNA 的方向。

按制造商的说明,通过 Lipofectin 试剂(Life Technology, Bethesda, Maryland)用 10 μ g pBC-BK 转染约 1×10^6 CHO(中国仓鼠卵巢)细胞。然后在 50nM 氨甲蝶呤存在下筛选细胞,在无胸苷和次黄嘌呤的 DME/F12 培养基(加入 5%透析过的胎牛血清)中培养。用显色试验筛选细胞的比库蛋白产物。简单地说,将比库蛋白标准品或培养液连续稀释,37 $^{\circ}$ C 与等体积的激肽释放酶培养 30 分钟,然后加入显色底物 N-苯甲酰基-Pro-Phe-Arg-pNA。培育此反应物 15 分钟,随后加入 50%乙酸。在 405nm 测定释放出的对一硝基酰苯胺的量。在含有递增浓度的氨甲蝶呤(100 到 400nM 氨甲蝶呤)的培养基中进一步筛选高产细胞群,以筛选产生比库蛋白。然后应用有限稀释克隆来衍生具有高和稳定产量的克隆。用标准组织培养技术,在缺少氨甲蝶呤时,于 96 孔板上每孔 1 个细

胞进行克隆。选出一命名为 FD3-1 的克隆，在生物反应器中进行产量评估，该克隆于 1999 年 11 月 12 日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC), Rockville, MD, 命名为专利保藏号 PTA-940。

(b) 在灌流生物反应器中无血清生产比库蛋白

5 用连续灌流发酵进行比库蛋白的连续生产。在 1.5 升 Wheaton 发酵器中以 2×10^6 个细胞/ml 接种稳定的 CHO 细胞系，以 0.5 升/天的交换速率灌流。生产培养基是 DME/F12-基培养基，补充有胰岛素(10 μ g/ml)和 FeSO₄·EDTA(50 μ M)。将细胞密度维持在 4×10^6 个细胞/ml。发酵器每天的平均收率为 ~20mg/天。比库蛋白的产物可稳定维持 21 天。

10

(c) 对 CHO 细胞表达系统产生的比库蛋白(1-170)的纯化

用标准层析方法，包括图 29 所列出的离子交换、金属螯合和大小排阻层析，纯化了 CHO 细胞产生的比库蛋白。

用快速流动的 SP-琼脂糖(Pharmacia)准备 SP 柱(18 \times 10cm, 2.5L)，并平衡。冷过滤的 CHO 细胞收获物用冷无菌水以 1: 2.5 稀释，将 pH 调节至 5.0。室温用冷缓冲液进行层析。将冷起始原料以 800ml/分钟(189cm/小时)速度加样到该柱上。加样到该柱上的比库蛋白量范围为 0.888-1.938g(约 14mg/L)。加样后，用平衡缓冲液洗涤该柱，用洗脱缓冲液洗脱比库蛋白。在 2-8 $^{\circ}$ C(冰浴)中收集洗脱物，并用 6N NaOH 立即将 pH 调节至 7。洗涤柱，用冷(2-8 $^{\circ}$ C)1N NaOH 消毒，保存于 2-8 $^{\circ}$ C 的 20%乙醇中直至使用。平衡和洗涤缓冲液含有 50mM NaCl、30mM NaH₂PO₄，pH 5.0；洗脱缓冲液含 350mM NaCl、30mM NaH₂PO₄ pH 5.0；pH 调节缓冲液是 1M 柠檬酸、1M NaH₂PO₄，pH 2.4。

超滤(UF)浓缩解冻的 SP-琼脂糖洗脱物约 10 倍，以减少体积，然后进行 5 到 7 倍渗滤(DF)以准备上阴离子交换层析。所有操作都在室温、水平流超净台中进行。UF/DF 使用了 Millipore(Bedford, MA)的 Pellicon 2 “迷你”过滤系统和双 10kDa 再生纤维素柱(P2C010C01)。该双柱系统的流通速率约为 130 \pm 20ml/分钟，并通过将输入和输出压力分别调节到 22-26psi 和 12-16psi 之间来维持。用蠕动泵进行循环；在跨膜压力调节前将循环设置在 500 到 600ml/分钟。用冷 10mM NaH₂PO₄ 缓冲液(pH 8.1)进行渗滤。

30 如下进行 Q-琼脂糖柱层析。用 5 倍柱体积(CV)的无菌水洗涤 13 \times 9cm, 1.2L 体积的 Q-琼脂糖快速流动柱(Pharmacia)，用约 10 倍 CV 的平衡缓冲液平衡。将渗滤的 SP 洗脱物调节至 pH 8.1，并以 100ml/分钟(45cm/小时)加样

到 Q-琼脂糖柱上。加样到该柱上的比库蛋白的量范围为 1121—2607mg (约 15mg/ml)。加样后,用平衡缓冲液洗涤该柱,直至 A280 的 UV 吸光度达到基线;然后将比库蛋白洗脱。收集洗脱物,作为 Zn-IMAC (固定锌的金属离子吸附层析)的进样原料。用 1M NaOH 洗涤该柱,用无菌水淋洗,保存在 20% 乙醇中。所有

5 操作都在 2—8℃ 进行。用于 Q-琼脂糖柱的平衡和洗涤缓冲液含有 10mM NaH₂PO₄, pH 为 8.1。洗脱缓冲液含有 10mM NaH₂PO₄、100mM NaCl, pH 为 8.1。

含大约 200ml 整合快速流琼脂糖的流床体积的 Zn-IMAC 柱 (5×10cm) (Pharmacia) 用 3 体积 ZnSO₄ 溶液 (如下) 加料;用 2 体积无菌水洗涤,用 6 体积缓冲液 (如下) 平衡。将 Q-琼脂糖洗脱物调节至 pH 7.4,以 30ml/分钟 (92cm/

10 小时的线性速度) 速度将 300mM NaCl (通过加入 NaCl 固体) 加入 Zn-IMAC 中,然后用平衡缓冲液洗涤该柱直到 UV 吸光度达到基线。加到该柱的比库蛋白量的范围为 0.097—1.681g (约 0.63mg/ml)。收集流穿液和洗液用于 UF。解吸附该柱,用 0.5M NaOH 消毒。该步骤的所有操作都在 2—8℃ 进行。Zn-IMAC 的平衡缓冲液含有 10mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、pH 7.4;解吸缓冲液含有 50mM EDTA、

15 10mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、pH 7.4;加料溶液含有 2mg/ml ZnSO₄·7H₂O。

用 Sephacryl S-200 层析的 Pellicon 2 系统 (Millipore) 5 倍超滤浓缩 Zn-IMAC 流穿物。渗流速率约为 60—70ml/分钟,且如上所述地维持。以 400—500ml/分钟再循环。用 137mM NaCl、2.7mM KCl、2.9mM KH₂PO₄、10mM NaH₂PO₄、8mM Na₂HPO₄、2mg/L Tween 80、pH 7.2 平衡含有 4.59L Sephacryl S-200 High

20 Resolution (Pharmacia) 的柱 (10×58.5cm)。流速为 30ml/分钟 (23cm/小时)。在一典型运作中,将含有 1475mg 比库蛋白的 95ml 体积的溶液加到该柱中。

以分批模式用 Etox 树脂处理 S-200 后的合并物,以除去任何潜在的热源。用 1M NaOH 洗涤 ActiClean Etox, 2705 树脂 (Sterogene Bioseparations, Inc), 室温在 1M NaOH 中搅拌培育 5 小时。用 PBS (pH 7.2) 洗涤该树脂并平衡。

25 将 80ml 过滤过的和平衡过的树脂加到 1063ml 比库蛋白 S200 合并物 (5460.11mg) 中, 2—8℃ 搅拌过夜。用 0.2 微米的 Nelgene 细瓶过滤器过滤除去 ETOX 树脂。

结果

30 表 10 列出了各步骤的平均收率。

表 10

纯化步骤	平均收率(%)
SP-琼脂糖	88.1
UF/DF 加过滤	81
Q-琼脂糖	59±14
Zn-IMAC	99.5
Sephacryl S-200	81
ETOX 树脂	93

比库蛋白的总收率约为 30%，纯度为 95%。质谱数据表明在纯蛋白质合并物中除了全长比库蛋白(1-170)分子外，存在比库蛋白(1-170)的羧基端缺少三个氨基酸(G-S-K)和缺少四个氨基酸(L-G-S-K)的品种。当在室温或 37℃ (中性 pH) 培育 72 小时时，这些产生的物质表现稳定不降解。N 端测序、凝胶电泳、免疫印迹和氨基酸分析表明：该比库蛋白是基本纯的(没有测到其他序列)。其他反相测序步骤表明：CHO-衍生的纯化的比库蛋白依旧能被组分成几个品种(图 30A)。用三氟乙酸(TFA, 终浓度为 0.1%)将 CHO 比库蛋白(8.5mg)调节至 pH 2.5，并以 2ml/分钟的流速在 17.5%乙腈和 0.1%TFA 平衡的 C18 反相柱(Vydac, 2.5×25cm)上层析。用线性梯度的 17.5-40%乙腈(以 0.1%TFA 配)洗脱 CHO 比库蛋白 60 分钟。图 30B 显示这些组分的银染色 SDS-PAGE 图(54 和 55 之间的泳道代表分子大小标记物)。

在糖基化的同工型 CHO 比库蛋白(MW 范围约为 21kDa 到约 38kDa)上进行初步碳水化合物分析。发现总糖含量为 7.5%。发现两个 N-连接的位点(Asn-30 和 Asn-67)都被碳水化合物结构所占据。层析和质谱分析证实存在非常异源的高度分支的寡核苷酸结构，其导致纯化的比库蛋白所观察到的大小异源性。约 90%寡糖是唾液酸化(sialylated)的，其余的结构为中性。当用 N-糖苷酶 F 处理时，CHO 比库蛋白的糖基化同工型(图 30)转化成一种 18kDa 同工型(见图 31)。

在带帽的微型离心管(microfuge)中，与 15mM 乙酸钠缓冲液(pH 5.0)配的唾液酸酶一起培育 18 小时，分析了比库蛋白的唾液酸含量。以 1ml/分钟的流速，在 Carbo Pac PA1 阴离子交换柱上，用 20-250mM 乙酸钠缓冲液梯度(在 100mM NaOH 中)分离唾液酸 50 分钟。用脉冲电化学探测器进行探测，并将样品的保持时间和峰面积与标准唾液酸(N-乙酰神经氨酸和 N-戊二酰神经氨酸)相比。表 11 列出了结果。

表 11 比库蛋白的唾液酸组成

唾液酸	含量(g/100g 比库蛋白)
N-乙酰神经氨酸	5.4
N-戊二酰神经氨酸	0

实施例 18

比较中国仓鼠卵巢(CHO)细胞表达的胎盘比库蛋白(1-170)的蛋白酶抑制剂活性

概述.用实施例 3、4、7 和 10 所述的材料和方法测定了重组比库蛋白的体外特异性。下表 12 显示重组比库蛋白作为各种不同丝氨酸蛋白酶抑制剂的体外效果。所显示的数据是用重组比库蛋白或抑蛋白酶肽作的试验。

蛋白酶.如上所述(Chase, T., 和 Shaw, E., (1970)Methods Enzymol. 19, 20-27), 用对-硝基苯基 p'-胍基苯甲酸酯 HCl, 通过活性位点滴定进行了人血纤蛋白溶酶和人血浆激肽释放酶的定量测定。用牛抑蛋白酶肽作为标准品、PFR-AMC 为底物(采取 1: 1 复合物形式), 通过活性位点滴定对人组织激肽释放酶(Bayer, Germany)定量。在所用条件下, 血纤蛋白溶酶与 GPK-AMC 的 K_m 为 726 μ M; 人血浆激肽释放酶与 PFR-AMC 的 K_m 为 457 μ M; 人组织激肽释放酶与 PFR-AMC 的 K_m 为 5.7 μ M。

抑制动力学:在含有 50mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.1M NaCl 和 0.02% triton x-100 的缓冲液中, 用血纤蛋白溶酶(50pM)和 CHO 表达的胎盘比库蛋白(1-170) (0-2nM)或抑蛋白酶肽(0-4nM), 测定了 CHO 表达的胎盘比库蛋白(1-170)和抑蛋白酶肽对人血纤蛋白溶酶的抑制。37 $^{\circ}$ C 培育 30 分钟后, 加入 25 μ l 20mM GPK-AMC, 监测荧光的变化。在 50mM Tris-HCl(pH 8.0)、50mM NaCl 和 0.02% triton x-100 中, 用激肽释放酶和 CHO 表达的胎盘比库蛋白(1-170) (0-4nM)或抑蛋白酶肽(0-45nM), 测定了 CHO 表达的胎盘比库蛋白(1-170)或抑蛋白酶肽对人血浆激肽释放酶的抑制。37 $^{\circ}$ C 30 分钟后, 加入 5 μ l 20mM PFR-AMC, 监测荧光的变化。

在含有 50mM Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0)、50mM NaCl 和 0.1% triton x-100 的 1ml 反应体积中, 与 CHO 表达的胎盘比库蛋白(1-170) (0-10nM)或抑蛋白酶肽(0-0.5nM)一起培育 0.35nM 人组织激肽释放酶, 测定了抑蛋白酶肽或 CHO

表达的胎盘比库蛋白(1-170)对人组织激肽释放酶的抑制。37°C 5 分钟后, 加入 2mM PFR-AMC, 达到终浓度 10 μ M, 监测荧光的变化。

在含有 50mM Hepes (pH 7.5)、100mM NaCl、2mM CaCl₂、0.01% triton x-100 和 1% BSA 的总体积为 1ml 的缓冲液中, 与 0-40nM CHO 表达的胎盘比库蛋白(1-170)或 0-4 μ M 抑蛋白酶肽一起培育 FXIa(0.1nM), 测定了对因子 Xia(由 Enzyme Research Labs, South Bend, IN 提供)的抑制。37°C 30 分钟后, 加入 10 μ l 40mM Boc-Glu(Obzl)-Ala-Arg-AMC(Bachem Biosciences, King of Prussia, PA), 监测荧光的变化。

用非线性回归数据分析程序 Enzfitter 软件(Biosoft, Cambridge, UK)确定了表观抑制常数 K_i^* 。用紧密结合抑制剂方程式的形式, 分析了各试验的动力学数据:

$$V_i/V_o = 1 - (E_o + I_o + K_i^* - [(E_o + I_o + K_i^*)^2 - 4E_o I_o]^{1/2}) / 2E_o \quad (2)$$

式中 V_i/V_o 是酶活性分数(抑制对未抑制的比例), E_o 和 I_o 分别是酶和抑制剂的总浓度。按以下方程式校正底物的作用得到 K_i 值:

$$K_i = K_i^* / (1 + [S_o] / K_m) \quad (3)$$

(Boudier, C., 和 Bieth, J. G., (1989) Biochim Biophys Acta. 995:36-41)。

结果: 下表 12 列出了 K_i 值。

表 12. 比较 CHO 比库蛋白(1-170)或抑蛋白酶肽对各种蛋白酶抑制的 K_i 值

蛋白酶	CHO 比库蛋白(1-170) K_i (nM)	抑蛋白酶肽 K_i (nM)
人血浆激肽释放酶	0.5	23.0
人组织激肽释放酶	0.3	0.004
人血纤蛋白溶酶	0.2	0.2
人 FXIa	1.9	270.0

结果显示 CHO 细胞可表达的重组比库蛋白, 能得到活性蛋白酶抑制剂对至少三种不同丝氨酸蛋白酶有效。对人血浆激肽释放酶和人 FXIa 而言, 重组比库蛋白比抑蛋白酶肽更强。对抑制人血纤蛋白溶酶而言其与抑蛋白酶肽相当。

实施例 19

抑蛋白酶肽降低体外培养的人囊性纤维变性支气管上皮细胞短环电流 (Isc) 中的钠流

从 CF 患者的肺移植组织中分离出 HBE 细胞, 并在涂有胶原的烧瓶中培养 1

星期。然后传代细胞，接种在涂有胶原的 Costar Transwell 滤器(0.33cm²)上，在补充有 2%Ultrosor G 的 DMEM/F12 培养基中培养。细胞在气液界面生长，接种后 2—4 周使用。

5 将 Transwell 滤器上的细胞固定到改进的 Costar Ussing 室中，在 Isc 条件下进行研究。记录(0—10 分钟)基线 Isc 值，然后将抑蛋白酶肽(1mg/ml，以 PBS 配)加入到顶面。记录 Isc100 分钟，用新鲜缓冲液替换顶部浴液。将胰蛋白酶(100BAEE 单位/ml)加到顶面，记录 Isc10 分钟。然后将阿米洛利(10μM)加到顶部，再记录 Isc10 分钟。

10 结果

如图 21 所示，抑蛋白酶肽(1mg/ml，以 PBS 配)抑制了体外人 CF 支气管上皮细胞中的 Isc100 分钟。洗涤后，用丝氨酸蛋白酶、胰蛋白酶处理顶表面增加了 Isc。最后，加入阿米洛利(10μM)表明 Isc 的变化是钠流变化造成的。

15 实施例 20

喷雾后评估比库蛋白(1—170)的活性

本研究的目的是评估喷雾后实施例 17 所述的比库蛋白(1—170)的抗蛋白酶活性。所有研究都是用磷酸盐缓冲盐水(pH 7.4)(137mM NaCl、3mM KCl、3mM KH₂PO₄、8mM Na₂HPO₄、0.02g/L Tween 80)配制的比库蛋白进行的。

20

喷雾的方法

Raindrop®药物喷雾器：以 1 和 3mg/ml 浓度将比库蛋白制成气溶胶。用 2.5ml 比库蛋白溶液填满喷雾器杯。以 7.35L/分钟或 35psi 下进行气溶胶化。

25 Collison 喷雾器：以 4.7mg/ml 浓度将比库蛋白制成气溶胶。用 2.5ml 比库蛋白溶液填满喷雾器杯。在 35psi 下进行气溶胶化。

收集喷雾的样品

30 用双重撞击器(在 60L/分钟的系统中平均空气动力颗粒截留尺寸为 6.4μm)收集气溶胶化的比库蛋白。该撞击器的工作原理是液体撞击和将气雾分成不能吸入的成分(在阶段 1 收集的成分，>6.4μm)和可吸入的成分(在阶段 2 收集的成分，<6.4μm)。

抗蛋白酶活性的测定

比库蛋白活性的测定是体外通过其对入血浆激肽释放酶的抑制测定的。

结果

5 Raindrop®药物喷雾器：喷雾化前和后样品活性(Ki)值如下：1mg/ml 比库蛋白：Ki 值分别为 0.47(±0.02)和 0.76(±0.04)；对 3mg/mlBB(1-170)的 Ki 值分别为 0.52(±0.03)和 0.62(±0.03)。

Collison 喷雾器：喷雾化前和后样品的活性(Ki)值分别为 0.27(±0.03)和 0.45(±0.03)。

10

结论：

Raindrop 和 Collison 喷雾器喷雾化之前和之后的比库蛋白样品表现出相似活性(试验变化中的 Ki 值类似)，表明比库蛋白(1-170)对气溶胶化稳定，且在喷雾化后保留了其抗蛋白酶活性。

15

实施例 21

比库蛋白对羊气道粘液速度的作用

20 本研究的目的是研究实施例 17 所述的 Kunitz 家族丝氨酸蛋白酶抑制剂比库蛋白(1-170)对羊气道粘液速度的作用(在处理 8 小时的过程中)。通过喷雾式气溶胶给药将此试剂送入气道。本实施例所用流程的描述见 O'Riordan 等人, J. Applied Physiol. 85(3), 1086-1091, 1998。

TMV 的测定

25 将成年羊限制在直立位置，将它们的头固定在特殊的身体套具中。在它们的鼻内插入气道内导管，封套(cuff)置于声带正下面。加热和润湿吸入的空气。为了最大程度减少充气封套可能造成的 TMV 损伤，除气雾给药期间外，在整个研究过程中抽掉气道内管封套的气。

30 为了测定 TMV，通过气道内导管中所安置的导管将 5-10 个不透射线的 Teflon 颗粒(约 1mm 直径，0.8mm 厚，1.5-2mg 重量)吹入气道。然后在 1 分钟过程中测定 Teflon 颗粒的运动。本实施例所用流程的描述见 Russi 等人, J. Applied Physiol. 59(5), 1416-1422, 1985。将包含已知长度的不透射线标记物的套环用于动物的外部，用作将颗粒在电视屏幕上穿程距离转化成精确移动

距离的标准。根据每分钟 5—10 个 Teflon 颗粒在向头侧移动的平均距离，计算出 TMV。在给予气溶胶之前立即测定基线 TMV。

5 测试底物：PBS、以 PBS 配的 1mg/ml 比库蛋白、或以 PBS 配的 3mg/ml 比库蛋白；将 Raindrop 喷雾器产生的气溶胶(3ml)送入羊的气道，以能产生中等质量空气动力学直径为 3.6 μ m 的滴液的流速进行。在给予测试底物(0 小时)后立即测定 TMV，然后在第 0.5、1、2、3、4、5、6、7 和 8 小时测定。

结果

10 如图 22 所示，送入羊气道的 9mg 比库蛋白气溶胶(3ml 3mg/ml)明显增加了第 0、0.5、3、4、5、6、7 和 8 小时的 TMV(与接受 PBS 载体气溶胶的动物组的相同时间点相比)。在第 24 小时，比库蛋白和 PBS 载体处理组中 TMV 都回复到基线速度。

15 在较低的剂量(3mg 比库蛋白气溶胶(3ml 1mg/ml))，在任何研究的时间点处理组和载体组间 TMV 没有观察到明显的差异。

实施例 22

比库蛋白(50 μ g/ml)降低培养的豚鼠气道上皮(GPTE)细胞短环电流(Isc)中的钠流

20 本研究的目的是研究比库蛋白(1-170)(见实施例 17)对体外 GPTE 细胞的 Isc 的作用。将 GPTE 细胞接种在 1.2cm 直径、0.4 μ m 孔径的 Snapwell™ 衬垫(Costar UK)上。在置于气液界面后 2—4 天后，细胞生长至汇合，固定到改进的 Ussing 室中。将衬垫浸泡在 Kerbs 缓冲液(KBR)中，用 95%O₂/5%CO₂ 鼓气(升温至 37℃)。

25 平衡 20 分钟后，用 WPI EVC 4000 电压夹板将透上皮电位差夹在 0mV。用 Ag/AgCl 电极监测 Isc。一旦实现基线稳定(通常为 20—30 分钟)，用阿米洛利(30 μ M)处理细胞。一旦观察到对阿米洛利的反应，就用 KBR 溶液将其洗涤掉。回到基线并平衡，加入如实施例 17 所述的比库蛋白(1-170)(10-50 μ g/ml)或 PBS。试剂处理后 30 分钟，加入阿米洛利(30 μ M)。

30

结果

如图 23 所示，比库蛋白(1-170)(50 μ g/ml)抑制了体外豚鼠气道上皮细胞

中的钠流 30 分钟。

实施例 23

比库蛋白(1-170) (100 μ g/ml)降低培养的绵羊气道上皮(OTE)细胞短环电
5 流(Isc)中的钠流

本研究的目的是研究比库蛋白(1-170)(见实施例 17)对体外 OTE 细胞中
Isc 的作用。将 GPTE 细胞接种在 1.2cm 直径、0.4 μ m 孔径的 Snapwell™ 衬垫
(Costar UK)上。在置于气液界面后 3-5 天后,细胞生长至汇合,固定到改进
10 的 Ussing 室中。将衬垫浸泡在 Kerbs 缓冲液(KBR)中,用 95%O₂/5%CO₂ 鼓气(升
温至 37°C)。

平衡 20 分钟后,用 WPI EVC 4000 电压夹板将透上皮电位差夹在 0mV。用
Ag/AgCl 电极监测 Isc。一旦实现基线稳定(通常为 30 分钟),用阿米洛利(10 μ M)
处理细胞。一旦观察到对阿米洛利的反应,就用 KBR 溶液将其洗涤掉。回到基
15 线后,加入如实施例 17 所述的比库蛋白(1-170)(25、50 或 100 μ g/ml)或 PBS。
试剂处理后 90 分钟,加入阿米洛利(10 μ M)。

结果

如图 24 所示,比库蛋白(1-170)(100 μ g/ml)明显抑制了体外绵羊气道上皮
20 细胞中的钠流 90 分钟。

实施例 24

比库蛋白(1-170)对用 LPS 预处理的豚鼠中气道电位差的作用

通常多形核(PMN)白细胞(嗜中性白细胞)占优势的气道炎症是 CF 肺病的特
25 征。在豚鼠,与大肠杆菌脂多糖(LPS)气雾剂接触,诱导了明显的 PMN 流入支
气管肺泡洗液(攻击后 24 小时)。本研究的目的是研究权利要求 17 所述的比库
蛋白(1-170)对预接触过 PLS 气雾剂的豚鼠气道电位差的作用。通过局部滴注
将该试剂送入向头侧气道。与 LPS 接触后 23 小时,监测 TPD60 分钟。

材料/试剂

30 以 Hank 平衡盐水溶液(HBSS)配制比库蛋白(1-170)。从 Sigma Chemicals 得到
阿米洛利,并以 HBSS 配制。HBSS 作为载体对照。从 Janssen Animal Health
得到 Hypnorm®(枸橼酸芬太尼 0.315mg/ml 和氟阿尼酮 10mg/ml),由 Roche 提

供 Hypnovel®(Midazolam 5mg/ml)。由 Harlan, UK 提供雄性 Dunkin-Hartley 豚鼠。由 Kane-Mary Ltd, UK 提供热敏电阻探头。

PMN 流入的诱导

- 5 使各动物与 0.03mg/ml LPS 或 PBS 气溶胶接触 10 分钟。

准备豚鼠用于测定气道电位差

- 10 在 LPS 处理后 23.4 小时, 用 Hypnorm 和 Hypnovel 麻醉豚鼠, 且将它们固定于仰卧位置。从下颌到锁骨作一腹侧面中线切口。用钝器解剖法暴露气道的长度, 并在胸骨上缘对切二等分。暴露外颈静脉并插入导管。然后在气道的尾部插入导管让动物能自发地呼吸室内空气。然后将动物仰卧, 并人工调节加热灯将体温维持在 37°C。用热敏电阻探头监测直肠温度。

- 15 肌内麻醉后 20 分钟, 将比库蛋白(50µg/ml)或阿米洛利(100µM)局部滴注入向头侧气道。然后将气道琼脂电极插入向头侧气道, 测定气道电位差 60 分钟。将参比电极置于向头侧气道下与气道软骨接触。覆盖伤口以防止干燥。

结果

如图 25(a)所示; 接触 LPS, 使 PMN 明显流入。如图 25(b)所示比库蛋白明显抑制了预先接触 LPS 的豚鼠的电位差。

20

实施例 25

抑蛋白酶肽双突变蛋白对豚鼠气道粘液速度的作用

- 25 本研究的目的是研究实施例 16 所述的抑蛋白酶肽双突变蛋白对豚鼠气道粘液速度的作用(处理后 1.5 小时)。通过局部滴注将该试剂送入向头侧气道。1.5 小时后监测 TMV60 分钟。

材料/试剂

- 30 从 Biotechnologie, Bayer AG, Germany USA 得到抑蛋白酶肽双突变蛋白(见实施例 16), 并用 Hank 平衡缓冲液(HBSS)配制。从 Janssen Animal Health 得到 Hypnorm(枸橼酸芬太尼 0.315mg/ml 和氟阿尼酮 10mg/ml), 由 Roche 提供 Hypnovel(Midazolam 5mg/ml)。由 Harlan, UK 提供雄性 Dunkin-Hartley 豚鼠。由 Kane-Mary Ltd, UK 提供热敏电阻探头。

进行麻醉

用氟烷麻醉动物。一旦麻醉水平令人满意在下颌作一小切口。暴露气道，用针和注射器将 100ml 体积的载体或抑蛋白酶肽双突变蛋白(10 μ g)注射到气道腔内。一旦注射完，就修补气道注射位置上的皮肤。然后让动物复苏。

5

气道粘液速度的测定

用铅准垂直校准的 β 微粒探测器监测气道粘液速度(TMV)，安置探头探测注入的等分 32 P-标记的酿酒酵母菌发出的放射性(当将其移到被麻醉的豚鼠的气道粘液纤毛层时)(Newton 和 Hall 1998)。滴注测试试剂后 70 分钟，用 Hypnorm
10 和 Hypnovel 第二次麻醉豚鼠，并将它们固定于仰卧位置。20 分钟后进行第一次 TMV 测定。

结果

如图 26 所示，在给药后 1.5 到 2.5 小时的持续过程中，相对于 HBSS，抑
15 蛋白酶肽双突变蛋白(10 μ g)增加了豚鼠体内的 TMV。

实施例 26

比库蛋白(1-170)降低体外培养的人囊性纤维变性支气管上皮细胞短环电
流(Isc)中的钠流

20 从 CF 患者的肺移植组织中分离出 HBE 细胞，并在涂有胶原的烧瓶中培养 1 星期。然后传代细胞，接种在涂有胶原的 Costar Transwell 滤膜(0.33cm²)上，在补充有 2%Ultrosor G 的 DMEM/F12 培养基中培养。细胞在气液界面生长，接种后 2-4 周使用。

将 Transwell 滤膜上的细胞固定到改进的 Costar Ussing 室中，在 Isc 条
25 件下进行研究。记录(0-10 分钟)的基线 Isc 值，然后将比库蛋白(1-170)(见实施例 17)(10 μ g/ml，以 PBS 配)加到顶面。记录 Isc90 分钟，然后加入阿米洛利(10 μ M)，再记录 Isc10 分钟。用新鲜缓冲液替换顶部浴液，再记录 Isc15 分钟。将胰蛋白酶(1 μ M)加到顶面，记录 Isc15 分钟。然后将阿米洛利(10 μ M)加到顶部，再记录 Isc10 分钟。

30

结果

如图 28(a)所示，比库蛋白(1-170)(10 μ g/ml，以 PBS 配)抑制了体外人 CF

支气管细胞中的 I_{sc} 90 分钟。加入阿米洛利 ($10\mu\text{M}$) 后进一步降低了 I_{sc} 。洗涤后, I_{sc} 增加返回到加入阿米洛利之前所达到的电流。15 分钟后, 用胰蛋白酶 ($1\mu\text{M}$) 处理顶面, 这进一步将 I_{sc} 增加至基线电流水平 (即在 20 分钟所观察到的)。最后, 加入阿米洛利 ($10\mu\text{M}$) 抑制了大部分电流, 表明 I_{sc} 的变化是钠电

5 流变化造成的。

图 28(b) 显示顶部给予体外人 CF 支气管上皮细胞后 90 分钟, 1、5 和 $10\mu\text{g/ml}$ 的比库蛋白 (1-170) 和 $20\mu\text{g/ml}$ 抑蛋白酶肽对 I_{sc} 的抑制。

虽然出于说明的目的, 已详细描述了本发明的一些实施例, 但本领域技术人员能理解本文所述的方法和制剂可进一步改进, 但它们依旧在本发明的精神

10 和范围之中。另外, 本发明仅受所附带的权利要求的限制。

非文本序列表

- <210> 9
<223>/注 = “在 622、679、707 位置的 n 是任何核酸”
- 5 <210> 10
<223>/注 = “在 201、226 和 233 位置的 Xaa 是反义或终止密码子”
- <210> 11
<223>/注 = “在 8、17、21-26、40、42、45-47、52、64、103、112、
10 114、116-121、135、137、140-142、147 和 159 位置上的 Xaa 是任何氨基酸
残基”
- <210> 12
<223>/注 = “残基 361 是任何核酸”
15 <223>/注 = “残基 367 是任何核酸”
<223>/注 = “残基 384 是任何核酸”
<223>/注 = “残基 390 是任何核酸”
- <210> 13
20 <223>/标记 = 信号肽
<223>/注 = “在 111、120、122、128 和 130 位置上的 Xaa 代表反义或终
止密码子”
- <210> 14
25 <223>/注 = “在 425、482 和 510 位置上的 n 是任何核酸”
- <210> 15
<223>/注 = “在 2、23、132、160 和 167 位置上的 Xaa 代表反义或终止密
码子”
30
- <210> 16
<223>/注 = “在 3、11、12、17、51 和 429 位置上的 n 是任何核酸”

-
- <210> 17
<223>/注 = “在 6、310 和 408 位置上的 n 代表任何核酸”
- 5 <210> 18
<223>/注 = “组织因子途径抑制剂前体 1”
- <210> 19
<223>/注 = “组织因子途径抑制剂前体 1”
- 10 <210> 20
<223>/注 = “组织因子途径抑制剂前体”
- <210> 21
<223>/注 = “组织因子途径抑制剂前体 2”
- 15 <210> 22
<223>/注 = “组织因子途径抑制剂前体 2”
- <210> 23
<223>/注 = “淀粉样蛋白前体蛋白质同系物”
- 20 <210> 24
<223>/注 = “抑蛋白酶肽”
- 25 <210> 25
<223>/注 = “内 α -胰蛋白酶抑制剂前体”
- <210> 26
<223>/注 = “内 α -胰蛋白酶抑制剂前体”
- 30 <210> 27
<223>/注 = “淀粉样蛋白前体蛋白质”

-
- <210> 28
<223>/注 = “胶原 α -3(VI)前体”
- 5 <210> 29
<223>/注 = “HKI-B9”
- <210> 32
<223>/注 = “人比库蛋白片断的 cDNA”
- 10 <210> 45
<223>/标记 = 信号肽
- <210> 47
<223>/标记 = 信号肽
- 15 <210> 49
<223>/标记 = 信号肽
- <210> 50
<223>/注 = “人比库蛋白片断”
- 20 <210> 51
<223>/注 = “人比库蛋白片断”
- 25 <210> 52
<223>/注 = “人比库蛋白片断”
- <210> 53
<223>/注 = “人比库蛋白的一信号肽”
- 30 <210> 54
<223>人比库蛋白片断

-
- <210> 55
<223>/注 = “制备表达构建物的低聚物”
- 5 <210> 56
<223>制备表达构建物的低聚物
- <210> 57
<223>/注 = “制备表达构建物的低聚物”
- 10 <210> 58
<223>/注 = “制备表达构建物的低聚物”
- <210> 61
<223>/注 = “制备比库蛋白表达构建物的低聚物”
- 15 <210> 62
<223>/注 = “制备比库蛋白构建物的低聚物”
- <210> 63
<223>/注 = “人比库蛋白片断”
- 20 <210> 64
<223>/注 = “人比库蛋白片断”
- <210> 65
<223>/注 = “人比库蛋白片断”
- 25 <210> 66
<223>/注 = “人比库蛋白片断”
- 30 <210> 67
<223>/注 = “人比库蛋白片断”

<210> 68

<223>/注 = “人比库蛋白片断”

<210> 69

5 <223>/注 = “人比库蛋白片断”

<210> 70

<223>/注 = “人比库蛋白片断”

10 <210> 71

<223>/注 = “人比库蛋白片断”

序列表

- 5 <110>Hall, Roderick L
Poll, Christopher T.
Newton, Benjamin B.
Taylor, William J.A.
- <120> 加速粘液纤毛的清除速率的方法
- 10 <130> 98,736-J
- <140>
<141>
- 15 <150> 09/218,913
<151> 1999年12月22日
- <160> 71
- 20 <170> Microsoft Word 97版本
- <210> 1
<211> 179
<212> PRT
25 <213> 智人
- <400> 1
Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val
1 5 10 15
30 Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr
20 25 30
35 Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser
35 40 45
Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val
50 55 60
40 Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp
65 70 75 80
Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser
85 90 95
45 Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr
100 105 110
50 Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg
115 120 125
Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn
130 135 140
55 Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln
145 150 155 160
60 Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu Ala Gly
165 170 175

Ala Val Ser

5 <210> 2
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> 智人

10 <220>
 <221> 信号肽
 <222> 1..18

15 <400> 2
 Ala Gly Ser Phe Leu Ala Trp Leu Gly Ser Leu Leu Leu Ser Gly Val
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser
 20 25 30
 Lys Val Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn
 35 40 45
 Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly
 50 55 60
 25 Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala
 65 70 75 80
 Thr Val Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala
 30 85 90 95
 Ala Asp Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp
 100 105 110
 35 His Ser Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala
 115 120 125
 Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val
 130 135 140
 40 Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn
 145 150 155 160
 Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg
 45 165 170 175
 Gln Gln Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu
 180 185 190

50 Ala Gly Ala Val Ser
 195

55 <210> 3
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 智人

60 <400> 3
 Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val Val Gly Arg Cys Arg Ala
 1 5 10 15

Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu
 20 25 30

5 Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr Lys
 35 40 45

Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val Thr Glu Asn Ala Thr Gly
 50 55 60

10 Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp Ser Ser Val Pro Ser Ala
 65 70 75 80

Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser Ser Asp Met Phe Asn Tyr
 85 90 95

15 Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala Ser
 100 105 110

Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn Phe
 115 120 125

Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Glu
 130 135 140

25 Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln
 145 150

<210> 4
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4
 Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val Val Gly Arg Cys Arg Ala
 1 5 10 15

35 Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu
 20 25 30

40 Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr Lys
 35 40 45

Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val
 50 55

45 <210> 5
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> 智人

50 <400> 5
 Cys Leu Val Ser Lys Val Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg
 1 5 10 15

55 Trp Trp Tyr Asn Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly
 20 25 30

Gly Cys Asp Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu
 35 40 45

60 Lys Lys Cys

50

<210> 6
 <211> 58
 5 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6
 10 Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn
 20 25 30
 15 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu
 35 40 45
 Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln
 50 55
 20

<210> 7
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> 智人
 25

<400> 7
 Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg
 1 5 10 15
 30 Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly
 20 25 30
 Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met
 35 40 45
 35 Leu Arg Cys
 50

<210> 8
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> 智人
 40

<400> 8
 45 Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr
 20 25 30
 50 Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val
 55 50 55 60
 Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp
 65 70 75 80
 60 Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser
 85 90

<210> 9
 <211> 708
 <212> DNA
 5 <213> 智人

<220>
 <221> 杂项特征
 <222> 679..708
 10 <223> /注= "在622, 679, 707位的n是任何核酸"

<400> 9
 ggccgggtcg tttctcgct ggctgggac gctgctcctc tctgggtcc tggcggccga 60
 15 ccgagaacgc agcatccacg acttctgcct ggtgtcgaag gtggtggca gatgccgggc 120
 ctccatgcct aggtgggtgt acaatgtcac tgacggatcc tgccagctgt ttgtgtatgg 180
 20 gggctgtgac ggaaacagca ataattacct gaccaaggag gactgcctca agaaatgtgc 240
 cactgtcaca gagaatgcca cgggtgacct ggccaccagc aggaatgcag cggattcctc 300
 tgtcccaagt gctcccagaa ggcaggatc tgaagaccac tccagcgata tgttcaacta 360
 25 tgaagaatac tgcaccgcca acgcagtcac tgggccttgc cgtgcatcct tcccacgctg 420
 gtactttgac gtggagagga actcctgcaa taacttcac tatggaggct gccggggcaa 480
 taagaacagc taccgctctg aggaggcctg catgctccgc tgcttccgcc agcaggagaa 540
 30 tctcccctg cccctggct caaaggtggt ggttctggcc ggggctgttt cgtgatggtg 600
 ttgatccttt tctggggag cntccatggt cttactgatt ccgggtggca aggaggaacc 660
 35 aggagcgtgc cctgcganc gtctggagct tcggagatga caaggnt 708

<210> 10
 <211> 235
 <212> PRT
 40 <213> 智人

<220>
 <221> 肽
 <222> 1..235
 45 <223> /注= "在201, 226, 和233位的Xaa是反义或终止密码子"

<400> 10
 Ala Gly Ser Phe Leu Ala Trp Leu Gly Ser Leu Leu Leu Ser Gly Val
 1 5 10 15
 50 Leu Ala Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser
 20 25 30
 55 Lys Val Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn
 35 40 45
 Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly
 50 55 60
 60 Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala
 65 70 75 80

Thr Val Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala
 85 90 95

5 Ala Asp Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp
 100 105 110

His Ser Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala
 115 120 125

10 Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val
 130 135 140

15 Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn
 145 150 155 160

Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg
 165 170 175

20 Gln Gln Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu
 180 185 190

Ala Gly Ala Val Ser Xaa Trp Cys Xaa Ser Phe Ser Trp Gly Ala Ser
 195 200 205

25 Met Val Leu Leu Ile Pro Gly Gly Lys Glu Glu Pro Gly Ala Cys Pro
 210 215 220

30 Ala Xaa Arg Leu Glu Leu Arg Arg Xaa Gln Gly
 225 230 235

<210> 11
 <211> 170
 <212> PRT
 35 <213> 智人

<220>
 <221> 肽
 <222> 1..170
 40 <223> /注= "在8, 17, 21-26, 40, 42, 45-47, 52, 64, 103, 112, 114, 116-121, 135, 137, 140-142, 147, 和159 位的Xaa是任何氨基酸残基"

<400> 11

45 Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile Xaa Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val
 1 5 10 15

Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Trp Tyr Asn Val Thr
 20 25 30

50 Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Xaa Tyr Xaa Gly Cys Xaa Xaa Xaa Ser
 35 40 45

Asn Asn Tyr Xaa Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Xaa
 50 55 60

55 Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp
 65 70 75 80

60 Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser
 85 90 95

	Ser Asp Met Phe Asn Tyr Xaa Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Xaa	
	100 105 110	
5	Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg	
	115 120 125	
	Asn Ser Cys Asn Asn Phe Xaa Tyr Xaa Gly Cys Xaa Xaa Xaa Lys Asn	
	130 135 140	
10	Ser Tyr Xaa Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Xaa Gln	
	145 150 155 160	
	Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu Ala Gly	
15	165 170 175	
	Ala Val Ser	
	<210> 12	
20	<211> 393	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<220>	
25	<221> 杂项特征	
	<222> 390..391	
	<223> /注= "361残基是任何核酸"	
	<220>	
30	<221> 杂项特征	
	<222> 390..391	
	<223> /注= "残基367是任何核酸"	
	<220>	
35	<221> 杂项特征	
	<222> 384..385	
	<223> /注= "残基384是任何核酸"	
	<220>	
40	<221> 杂项特征	
	<222> 367..368	
	<223> /注= "残基390是任何核酸"	
	<400> 12	
45	ggccgggtcg ttctcgct ggctgggac gctgctctc tctgggtcc tggccggccg 60	
	accgagaacg cagcatccac gacttctgcc tgggtcga ggtggtggc agattccggg 120	
	cctccatgcc taggtggtgg tacaatgca ctgacggac ctgccagctg ttgtgtatg 180	
50	ggggctgtga cggaacagc aataattacc tgaccaagga ggagtgcctc aagaaatgtg 240	
	ccactgtcac agagaatgcc acgggtgacc tggccaccag caggaatgca gcggattcct 300	
	ctgtcccaag tgctcccaga aggcaggatt cttgaagacc acttcagcga tatgtttcaa 360	
55	ntattgnaag aataattgca ccgnaacgn att 393	
	<210> 13	
60	<211> 130	
	<212> PRT	
	<213> 智人	

<220>
 <221> 结构域
 <222> 1..18
 5 <223> /标记=信号肽

<220>
 <221> 肽
 <222> 111..130
 10 <223> /注= "在111, 120, 122, 128, 和130位置的Xaa表示反义或终止密码子"

<400> 13
 Pro Gly Arg Phe Ser Pro Gly Trp Asp Arg Cys Ser Ser Leu Gly Ser
 1 5 10 15
 15 Trp Pro Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser
 20 25 30
 20 Lys Val Val Gly Arg Glu Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn
 35 40 45
 Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly
 50 55 60
 25 Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala
 65 70 75 80
 Thr Val Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala
 85 90 95
 30 Ala Asp Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Xaa Arg
 100 105 110
 Pro Leu Gln Arg Tyr Val Ser Xaa Ile Xaa Arg Ile Ile Ala Pro Xaa
 35 115 120 125
 Thr Xaa
 130

40 <210> 14
 <211> 511
 <212> DNA
 <213> 智人

45 <220>
 <221> 杂项特征
 <222> 425..510
 <223> /注= "在425, 482, 和510位置上的n表示任何核酸"

50 <400> 14
 gcaataatta cctgaccaag gaggagtgcc tcaagaaatg tgccactgtc acagagaatg 60
 ccacgggtga cctggccacc agcaggaatg cagcggattc cctctgtccca agtgetccca 120
 55 gaaggcagga ttctgaagac cactccagcg atatgttcaa ctatgaagaa tactgcaccg 180
 ccaacgcagt cactgggcct tgccgtgcat ctttcccacg ctggtacttt gaògtggaga 240
 ggaactcctg caataacttc atctatggag gctgccgggg caataagaac agctaccgct 300
 60 ctgaggaggc ctgcatgctc cgctgcttcc gccagcagga gaatcctccc ctgcccttg 360

	<code>gctcaaaggt ggtggttctg gccggggctg tttcgtgatg gtggtgatcc ttttcctggg</code>	420
5	<code>gagcncat ggtcttactg attccgggtg gcaaggagga accaggagcg tgcctgcgg</code>	480
	<code>ancgtctgga gcttcggaga tgacaagggn t</code>	511
	<210> 15	
	<211> 169	
10	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<220>	
	<221> 肽	
15	<222> 1..169	
	<223> /注= "在2, 23, 132, 160, 和167位置上的n代表反义或终止密码子"	
	<400> 15	
20	Gln Xaa Leu Pro Asp Gln Gly Gly Val Pro Gln Glu Met Cys His Cys	
	1 5 10 15	
	His Arg Glu Cys His Gly Xaa Pro Gly His Gln Gln Glu Cys Ser Gly	
	20 25 30	
25	Phe Leu Cys Pro Lys Ser Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser	
	35 40 45	
	Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr	
	50 55 60	
30	Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg	
	65 70 75 80	
	Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn	
35	85 90 95	
	Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln	
	100 105 110	
40	Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu Ala Gly	
	115 120 125	
	Ala Val Ser Xaa Trp Cys Xaa Ser Phe Ser Trp Gly Ala Ser Met Val	
	130 135 140	
45	Leu Leu Ile Pro Gly Gly Lys Glu Glu Pro Gly Ala Cys Pro Ala Xaa	
	145 150 155 160	
	Arg Leu Glu Leu Arg Arg Xaa Gln Gly	
50	165	
	<210> 16	
	<211> 428	
	<212> DNA	
55	<213> 智人	
	<220>	
	<221> 杂项特征	
	<222> 1..430	
60	<223> /注= "在3, 11, 12, 17, 51和429位上的n代表任何核酸"	

	<400> 16	
	gcngcgcggt nntcgcntgc tgggatcgct gctgcacctc tctggggctc nggcggccga	60
5	ccgagaacgc agcatccacg acttctgcct ggtgtcgaag gtggtggca gatgccgggc	120
	ctccatgcct aggtggtggt acaatgtcac tgacggatcc tgccagctgt ttgtgtatgg	180
	gggctgtgac ggaacagca ataattacct gaccaaggag gagtgcctca agaaatgtgc	240
10	cactgtcaca gagaatgcca cgggtgacct ggccaccagc aggaatgcag cggattcctc	300
	tgtcccaagt gctcccagaa ggcaggattc ttgaagacca cttcagcgat atgttcaact	360
	atgaagaata ctggcaccgc caacgcattc actgggcctg cgtgcatcct tcccacgctg	420
15	gtactttgnc g	431
	<210> 17	
20	<211> 424	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<220>	
25	<221> 杂项特征	
	<222> 1..424	
	<223> /注= "在6, 310和408位置上的n代表任何核酸"	
	<400> 17	
30	tgggantcgc tgctcctctc tggggctctg gcggccgacc gagaacgcag catccacgac	60
	ttctgcctgg tgctgaaggt ggtgggcaga tgccggcct ccatgcctag gtggtgtac	120
	aatgtcactg acggatcctg ccagctgttt gtgtatggg gctgtgacgg aaacagcaat	180
35	aattacctga ccaaggagga gtgcctcaag aaatgtcca ctgtcacaga gaatgccag	240
	ggtgacctgg ccaccagcag gaatgcagcg gattcctctg tccaagtgc tcccagaagg	300
	caggattctn gaagaccact ccagcgatat gtcaactat gaagaatact gcaccgcaa	360
40	cgcagtcact gggccttgcg tggaatcctt tcccacgctg gnaattnga cgttgagaag	420
	gaac	424
45	<210> 18	
	<211> 57	
	<212> PRT	
	<213> 未知	
50	<220>	
	<221>	
	<222>	
	<223> /注= "组织因子途径抑制剂前体1"	
55	<400> 18	
	His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile	
	1 5 10 15	
60	Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe	
	20 25 30	

Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu
 35 40 45

5 Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

<210> 19
 <211> 57
 <212> PRT
 10 <213> 未知

<220>
 <223> /注= "组织因子途径抑制剂前体1"

15 <400> 19
 Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr
 1 5 10 15

20 Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe
 20 25 30

Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu
 35 40 45

25 Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu Asp Gly
 50 55

<210> 20
 <211> 57
 30 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> /注= "组织因子途径抑制剂前体"

35 <400> 20
 Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn
 1 5 10 15

40 Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe
 20 25 30

Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln
 35 40 45

45 Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly
 50 55

<210> 21
 <211> 57
 50 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 55 <223> /注= "组织因子途径抑制剂前体2"

<400> 21
 Ala Glu Ile Cys Leu Leu Pro Leu Asp Tyr Gly Pro Cys Arg Ala Leu
 1 5 10 15

60 Leu Leu Arg Tyr Tyr Tyr Arg Tyr Arg Thr Gln Ser Cys Arg Gln Phe

	20	25	30
	Leu Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Ala Asn Asn Phe Tyr Thr Trp Glu		
	35	40	45
5	Ala Cys Asp Asp Ala Cys Trp Arg Ile		
	50	55	
10	<210> 22		
	<211> 57		
	<212> PRT		
	<213> 未知		
15	<220>		
	<223> /注= "组织因子途径抑制剂前体2"		
	<400> 22		
	Pro Ser Phe Cys Tyr Ser Pro Lys Asp Glu Gly Leu Cys Ser Ala Asn		
20	1	5	10 15
	Val Thr Arg Tyr Tyr Phe Asn Pro Arg Tyr Arg Thr Cys Asp Ala Phe		
	20	25	30
25	Thr Tyr Thr Gly Cys Gly Asn Asn Asp Asn Asn Phe Val Ser Arg Glu		
	35	40	45
	Asp Ser Lys Arg Ala Cys Ala Lys Ala		
	50	55	
30	<210> 23		
	<211> 57		
	<212> PRT		
	<213> 未知		
35	<220>		
	<223> /注= "淀粉样蛋白前体蛋白同系物"		
	<400> 23		
	Lys Ala Val Cys Ser Gln Glu Ala Met Thr Gly Pro Cys Arg Ala Val		
40	1	5	10 15
	Met Pro Arg Thr Thr Phe Asp Leu Ser Lys Gly Lys Cys Val Arg Phe		
	20	25	30
45	Ile Thr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Glu Ser Glu Asp		
	35	40	45
	Tyr Cys Met Ala Val Cys Lys Ala Met		
	50	55	
50	<210> 24		
	<211> 58		
	<212> PRT		
	<213> 未知		
55	<220>		
	<223> /注= "抑蛋白酶肽"		
	<400> 24		
60	Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala		
	1	5	10 15

Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
 20 25 30

5 Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
 35 40 45

Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
 50 55

10 <210> 25
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> 未知

15 <220>
 <223> /注= "内α-胰蛋白酶抑制剂前体"

20 <400> 25
 Cys Gln Leu Gly Tyr Ser Ala Gly Pro Cys Met Gly Met Thr Ser Arg
 1 5 10 15

Tyr Phe Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Cys Glu Thr Phe Gln Tyr Gly
 20 25 30

25 Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr Glu Lys Glu Cys Leu
 35 40 45

30 Gln Thr Cys
 50

35 <210> 26
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> /注= "内α-胰蛋白酶抑制剂前体"

40 <400> 26
 Val Ala Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala Phe
 1 5 10 15

45 Ile Gln Leu Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe
 20 25 30

Pro Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys
 35 40 45

50 Glu Cys Arg Glu Tyr Cys Gly Val Pro
 50 55

55 <210> 27
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> /注= "淀粉样蛋白前体蛋白"

60 <400> 27

Glu Val Cys Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met
 1 5 10 15

5 Ile Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe
 20 25 30

Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu
 35 40 45

10 Tyr Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala
 50 55

<210> 28
 <211> 51
 15 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> /注= "胶原 α -3 (VI)前体"
 20 <400> 28
 Cys Lys Leu Pro Lys Asp Glu Gly Thr Cys Arg Asp Phe Ile Leu Lys
 1 5 10 15

25 Trp Tyr Tyr Asp Pro Asn Thr Lys Ser Cys Ala Arg Phe Trp Tyr Gly
 20 25 30

Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Lys Phe Gly Ser Gln Lys Glu Cys Glu
 35 40 45

30 Lys Val Cys
 50

<210> 29
 35 <211> 57
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 40 <223> /注= "HKI-B9"

<400> 29
 Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Lys Gly Pro Cys Gln Thr Tyr
 1 5 10 15

45 Met Thr Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys Glu Leu Phe
 20 25 30

Ala Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Ser Asn Asn Phe Leu Arg Lys Glu
 50 35 40 45

Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr
 50 55

55 <210> 30
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> 酿酒酵母

60 <400> 30
 gccaaagcttg gataaaagat atgaagaata ctgcaccgcc aacgca

	<210> 31	
	<211> 35	
	<212> DNA	
5	<213> 酿酒酵母	
	<400> 31	
	ggggatcctc actgctggcg gaagcagcg agcat	35
10	<210> 32	
	<211> 206	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
15	<220>	
	<223> /注= "人比库蛋白蛋白片断的cDNA"	
	<400> 32	
20	ccaagcttgg ataaaagata tgaagaatac tgcaccgcca acgcagtcac tgggccttgc	60
	cgtgcatcct tcccacgctg gtactttgac gtggagagga actcctgcaa taacttcac	120
	tatggaggct gccggggcaa taagaacagc taccgctctg aggaggcctg catgctccgc	180
25	tgcttccgcc agcagtgagg atcccc	206
	<210> 33	
	<211> 28	
	<212> DNA	
30	<213> 智人	
	<400> 33	
	cgaagcttca tctccgaagc tccagacg	28
35	<210> 34	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
40	<400> 34	
	aggatctaga caataattac ctgaccaagg a	31
	<210> 35	
	<211> 36	
	<212> DNA	
45	<213> 智人	
	<400> 35	
	ggtctagagg ccgggtcgtt tctcgcttg ctggga	37
50	<210> 36	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
55	<400> 36	
	cacctgatcg cgagacccc	19
	<210> 37	
	<211> 19	
60	<212> DNA	

	<213> 智人	
	<400> 37	
5	gatttaggtg acactatag	19
	<210> 38	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> 智人	
	<400> 38	
	taatacgact cactataggg	20
	<210> 39	
15	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 39	
20	ttacctgacc aaggaggagt gc	22
	<210> 40	
	<211> 23	
	<212> DNA	
25	<213> 智人	
	<400> 40	
	aatccgctgc attcctgctg gtg	23
30	<210> 41	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
35	<400> 41	
	cagtcactgg gccttgccgt	20
	<210> 42	
40	<211> 105	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 42	
45	gaaggggtaa gcttgataa aagatatgaa gaatactgca ccgccaacgc agtcactggg	60
	ccttgccgtg catccttccc acgctgttac ttgacgtgg agagg	105
	<210> 43	
	<211> 129	
50	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 43	
55	cgcggatccc tactggcgga agcagcggag catgcaggcc tcctcagagc ggtagctgtt	60
	cttattgccc cggcagcctc catagatgaa gttattgcag gagttcctct ccacgtcaaa	120
	gtaccagcg	129
60	<210> 44	
	<211> 207	

<212> DNA
 <213> 智人

<400> 44
 5 gaaggggtaa gcttggataa aagatatgaa gaactactgca ccgccaacgc agtcactggg 60
 ccttgccgtg catccttccc acgctggtac tttgacgtgg agaggaactc ctgcaataac 120
 10 ttcatctatg gaggctgccc gggcaataag aacagctacc gctctgagga ggcttgcattg 180
 ctccgctgct tccgccagta gggatcc 207

<210> 45
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 区域
 20 <222> 1..18
 <223> /标记=信号肽

<400> 45
 25 Met Leu Arg Ala Glu Ala Asp Gly Val Ser Arg Leu Leu Gly Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ser Gly Val Leu Ala Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp
 20 25 30
 30 Phe Cys Leu Val Ser Lys Val Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro
 35 40 45
 Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr
 50 55 60
 35 Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys
 65 70 75 80
 40 Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala
 85 90 95
 Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg
 100 105 110
 45 Gln Asp Ser Glu Asp His Ser Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr
 115 120 125
 Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg
 130 135 140
 50 Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly
 145 150 155 160
 55 Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met
 165 170 175
 Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser
 180 185 190
 60 Lys Val Val Val Leu Ala Gly Leu Phe Val Met Val Leu Ile Leu Phe
 195 200 205

Leu Gly Ala Ser Met Val Tyr Leu Ile Arg Val Ala Arg Arg Asn Gln
 210 215 220

5 Glu Arg Ala Leu Arg Thr Val Trp Ser Ser Gly Asp Asp Lys Glu Gln
 225 230 235 240

Leu Val Lys Asn Thr Tyr Val Leu
 245

10 <210> 46
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 智人

15 <400> 46
 Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val
 1 5 10 15

20 Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr
 20 25 30

Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser
 35 40 45

25 Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val
 50 55 60

30 Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser
 85 90 95

35 Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr
 100 105 110

Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg
 115 120 125

40 Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn
 130 135 140

45 Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln
 145 150 155 160

Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu Ala Gly
 165 170 175

50 Leu Phe Val Met Val Leu Ile Leu Phe Leu Gly Ala Ser Met Val Tyr
 180 185 190

Leu Ile Arg Val Ala Arg Arg Asn Gln Glu Arg Ala Leu Arg Thr Val
 195 200 205

55 Trp Ser Phe Gly Asp
 210

60 <210> 47
 <211> 240
 <212> PRT

<213> 智人
 <220>
 <221> 区域
 5 <222> 1..18
 <223> /标记=信号肽
 <400> 47
 10 Met Ala Gln Leu Cys Gly Leu Arg Arg Ser Arg Ala Phe Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Ser Leu Leu Leu Ser Gly Val Leu Ala Ala Asp Arg Glu Arg
 20 25 30
 15 Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val Val Gly Arg Cys Arg
 35 40 45
 Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln
 50 55 60
 20 Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr
 65 70 75 80
 Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val Thr Glu Asn Ala Thr
 25 85 90 95
 Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp Ser Ser Val Pro Ser
 100 105 110
 30 Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser Ser Asp Met Phe Asn
 115 120 125
 Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala
 130 135 140
 35 Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu
 40 165 170 175
 Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln Glu Asn Pro Pro Leu
 180 185 190
 45 Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu Ala Gly Leu Phe Val Met Val
 195 200 205
 Leu Ile Leu Phe Leu Gly Ala Ser Met Val Tyr Leu Ile Arg Val Ala
 210 215 220
 50 Arg Arg Asn Gln Glu Arg Ala Leu Arg Thr Val Trp Ser Phe Gly Asp
 225 230 235 240
 <210> 48
 55 <211> 225
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 48
 60 Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val
 1 5 10 15

Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr
 20 25 30

5 Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser
 35 40 45

Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val
 50 55 60

10 Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser
 15 85 90 95

Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr
 100 105 110

20 Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg
 115 120 125

Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn
 130 135 140

25 Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln
 145 150 155 160

Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu Ala Gly
 165 170 175

30 Leu Phe Val Met Val Leu Ile Leu Phe Leu Gly Ala Ser Met Val Tyr
 180 185 190

35 Leu Ile Arg Val Ala Arg Arg Asn Gln Glu Arg Ala Leu Arg Thr Val
 195 200 205

Trp Ser Ser Gly Asp Asp Lys Glu Gln Leu Val Lys Asn Thr Tyr Val
 210 215 220

40 Leu
 225

45 <210> 49
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 智人

50 <220>
 <221> 区域
 <222> 1..18
 <223> /标记=信号肽

55 <400> 49
 Met Ala Gln Leu Cys Gly Leu Arg Arg Ser Arg Ala Phe Leu Ala Leu
 1 5 10 15

60 Leu Gly Ser Leu Leu Leu Ser Gly Val Leu Ala Ala Asp Arg Glu Arg
 20 25 30

Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val Val Gly Arg Cys Arg

	35	40	45
	Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln		
	50	55	60
5	Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr		
	65	70	75 80
	Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val Thr Glu Asn Ala Thr		
10		85	90 95
	Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp Ser Ser Val Pro Ser		
	100	105	110
15	Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser Ser Asp Met Phe Asn		
	115	120	125
	Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala		
20	130	135	140
	Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn		
	145	150	155 160
	Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu		
25		165	170 175
	Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln Glu Asn Pro Pro Leu		
	180	185	190
30	Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu Ala Gly Leu Phe Val Met Val		
	195	200	205
	Leu Ile Leu Phe Leu Gly Ala Ser Met Val Tyr Leu Ile Arg Val Ala		
35	210	215	220
	Arg Arg Asn Gln Glu Arg Ala Leu Arg Thr Val Trp Ser Ser Gly Asp		
	225	230	235 240
	Asp Lys Glu Gln Leu Val Lys Asn Thr Tyr Val Leu		
40		245	250
	<210> 50		
	<211> 146		
	<212> PRT		
45	<213> 智人		
	<220>		
	<223> /注= “人比库蛋白蛋白片断”		
50	<400> 50		
	Cys Leu Val Ser Lys Val Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg		
	1	5	10 15
	Trp Trp Tyr Asn Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly		
55		20	25 30
	Gly Cys Asp Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu		
	35	40	45
60	Lys Lys Cys Ala Thr Val Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr		
	50	55	60

Ser Arg Asn Ala Ala Asp Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln
 65 70 75 80
 5 Asp Ser Glu Asp His Ser Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp
 100 105 110
 10 Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly
 115 120 125
 Cys Arg Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu
 15 130 135 140
 Arg Cys
 145
 20 <210> 51
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> 智人
 25 <220>
 <223> /注= "人比库蛋白蛋白片断"
 <400> 51
 30 Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr
 20 25 30
 35 Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val
 50 55 60
 40 Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser
 45 85 90 95
 Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr
 100 105 110
 50 Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg
 115 120 125
 Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn
 130 135 140
 55 Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln
 145 150 155 160
 60 Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys
 165 170

- <210> 52
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> 智人
 5
 <220>
 <223> /注= "人比库蛋白蛋白片断"
 <400> 52
 10 Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr
 20 25 30
 15 Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser
 35 40 45
 20 Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val
 50 55 60
 Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp
 65 70 75 80
 25 Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser
 85 90 95
 Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr
 100 105 110
 30 Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg
 115 120 125
 Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn
 130 135 140
 Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln
 145 150 155 160
 40 Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys
 165 170
 <210> 53
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 智人
 45
 <220>
 <223> /注= "人比库蛋白蛋白的信号肽"
 50
 <400> 53
 Met Ala Gln Leu Cys Gly Leu Arg Arg Ser Arg Ala Phe Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 55 Leu Gly Ser Leu Leu Leu Ser Gly Val Leu Ala
 20 25
 <210> 54
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 智人
 60

	<220>		
	<223> 人比库蛋白蛋白片断		
5	<400> 54		
	Met Leu Arg Ala Glu Ala Asp Gly Asn Ser Arg Leu Leu Gly Ser Leu		
	1 5 10 15		
10	Leu Leu Ser Gly Val Leu Ala		
	20		
	<210> 55		
	<211> 102		
	<212> DNA		
15	<213> 智人工序列		
	<220>		
	<223> /注= "制备表达构建物的低聚物"		
20	<400> 55		
	gaaggggtaa gcttggataa aagagaagaa tactgtactg ctaatgctgt tactggtcca	60	
	tgtagagcct cttttccaag atggtacttt gatggtgaaa ga	102	
25	<210> 56		
	<211> 129		
	<212> DNA		
	<213>人工序列		
30	<220>		
	<223> 制备表达构建物的低聚物		
	<400> 56		
35	actggatcct cattggcgaa aacatctcaa catacaggct tcttcagatc tgtaagaatt	60	
	tttattacct ctacaaccac cgtaaataaa attattacaa gaatttcttt caacatcaaa	120	
	gtaccatct	129	
40	<210> 57		
	<211> 108		
	<212> DNA		
	<213> 智人工序列		
45	<220>		
	<223> /注= "制备表达构建物的低聚物"		
	<400> 57		
50	gaaggggtaa gcttggataa aagaaattac gaagaatact gtactgctaa tgctgttact	60	
	ggtccatgta gagcttcttt tccaagatgg tactttgatg ttgaaaga	108	
	<210> 58		
	<211> 117		
55	<212> DNA		
	<213> 智人工序列		
	<220>		
	<223> /注= "制备表达构建物的低聚物"		
60	<400> 58		

	gaaggggtaa gcttggataa aagagatatg ttaattacg aagaatactg tactgctaata	60
	gctgttactg gtccatgtag agcttctttt ccaagatggt actttgatgt tgaaga	117
5	<210> 59 <211> 20 <212> DNA <213> 智人	
10	<400> 59 cacctgatcg cgaagacccc	20
15	<210> 60 <211> 23 <212> DNA <213> 智人	
20	<400> 60 ctggcgggaag cagcggagca tgc	23
25	<210> 61 <211> 45 <212> DNA <213> 智人工序列	
30	<220> <223> /注= "制备比库蛋白表达构建物的低聚物"	
35	<400> 61 cgcgtctcgg ctgacctggc cctgcagatg gcgcacgtgt gcggg	45
40	<210> 62 <211> 60 <212> DNA <213> 智人工序列	
45	<220> <223> /注= "Oligomer for preparing 比库蛋白 construct"	
50	<400> 62 ctgcccttg gctcaaagta ggaagatett cccccgggg ggggtggttct ggcggggctg	60
55	<210> 63 <211> 14 <212> PRT <213> 智人	
60	<220> <223> /注= "人比库蛋白蛋白片断"	
	<400> 63 Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln Glu Asn Pro Pro Leu Gly 1 5 10	
65	<210> 64 <211> 20 <212> PRT <213> 智人	
70	<220> <223> /注= "人比库蛋白蛋白片断"	

<400> 64
 Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val
 1 5 10 15
 5 Val Gly Arg Cys
 20
 <210> 65
 <211> 20
 10 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <223> /注= "人比库蛋白蛋白片断"
 15 <400> 65
 Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Pro Cys
 1 5 10 15
 20 Arg Ala Ser Phe
 20
 <210> 66
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <223> /注= "人比库蛋白蛋白片断"
 30 <400> 66
 Pro Tyr Val Asp Gly Ser Gln Phe Tyr Gly
 1 5 10
 35 <210> 67
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> 智人
 40 <220>
 <223> /注= "人比库蛋白蛋白片断"
 <400> 67
 45 Val Val Val Leu Ala Gly Leu Phe Val Met Val Leu Ile Leu Phe Leu
 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Met Val Tyr Leu Ile Arg Val Ala Arg Arg Asn Gln Glu
 20 25 30
 50 Arg Ala Leu Arg Thr Val Trp Ser Ser Gly Asp Asp Lys Glu Gln Leu
 35 40 45
 Val Lys Asn Thr Tyr Val Leu
 50 55
 55 <210> 68
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> 智人
 60 <220>

<223> /注= “人比库蛋白蛋白片断”
 <400> 68
 Val Val Val Leu Ala Gly Leu Phe Val Met Val Leu Ile Leu Phe Leu
 5 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Met Val Tyr Leu Ile Arg Val Ala Arg Arg Asn Gln Glu
 20 25 30
 10 Arg Ala Leu Arg Thr Val Trp Ser Phe Gly Asp
 35 40
 <210> 69
 <211> 55
 15 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <223> /注= “人比库蛋白蛋白片断”
 20 <400> 69
 Val Val Val Leu Ala Gly Leu Phe Val Met Val Leu Ile Leu Phe Leu
 1 5 10 15
 25 Gly Ala Ser Met Val Tyr Leu Ile Arg Val Ala Arg Arg Asn Gln Glu
 20 25 30
 Arg Ala Leu Arg Thr Val Trp Ser Ser Gly Asp Asp Lys Glu Gln Leu
 35 40 45
 30 Val Lys Asn Thr Tyr Val Leu
 50 55
 <210> 70
 35 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 40 <223> /注= “人比库蛋白蛋白片断”
 <400> 70
 Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val
 1 5 10 15
 45 Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr
 20 25 30
 Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser
 50 35 40 45
 Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val
 50 55 60
 55 Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser
 85 90 95
 60 Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr

	100	105	110
	Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg		
	115	120	125
5	Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn		
	130	135	140
10	Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln		
	145	150	155 160
	Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu Ala Gly		
	165	170	175
15	Leu Phe Val Met Val Leu Ile Leu Phe Leu Gly Ala Ser Met Val Tyr		
	180	185	190
20	Leu Ile Arg Val Ala Arg Arg Asn Gln Glu Arg Ala Leu Arg Thr Val		
	195	200	205
	Trp Ser Phe Gly Asp		
	210		
25	<210> 71		
	<211> 225		
	<212> PRT		
	<213> 智人		
30	<220>		
	<223> /注= "人比库蛋白蛋白片断"		
	<400> 71		
35	Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val		
	1 5 10 15		
	Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr		
	20 25 30		
40	Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser		
	35 40 45		
	Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val		
	50 55 60		
45	Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp		
	65 70 75 80		
	Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser		
	85 90 95		
50	Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr		
	100 105 110		
55	Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg		
	115 120 125		
	Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn		
	130 135 140		
60	Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln		
	145 150 155 160		

Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu Ala Gly
165 170 175

5 Leu Phe Val Met Val Leu Ile Leu Phe Leu Gly Ala Ser Met Val Tyr
180 185 190

Leu Ile Arg Val Ala Arg Arg Asn Gln Glu Arg Ala Leu Arg Thr Val
195 200 205

10 Trp Ser Ser Gly Asp Asp Lys Glu Gln Leu Val Lys Asn Thr Tyr Val
210 215 220

15 Leu
225

R35464	GGCCGGGTCG TTTCTCGCCT GGCTGGGATC GCTGCTCCTC TCTGGGGTCC	50
ORF	P G R F S P G W D R C S S L G S	16
R35464	TGGCCCGCCG ACCGAGAACG CAGCATCCAC GACTTCTGCC TGGTGTGCGAA	100
ORF	W P A D R E R S I H D F C L V S K	33
R35464	GGTGGTGGGC AGATTCGGG CCTCCATGCC TAGGTGGTGG TACAATGTCA	150
ORF	V V G R F R A S M P R W W Y N V T	50
R35464	CTGACGGATC CTGCCAGCTG TTTGTGTATG GGGGCTGTGA CGGAACAGC	200
ORF	D G S C Q L F V Y G G C D G N S	66
R35464	AATAATTACC TGACCAAGGA GGAGTGCCTC AAGAAATGTG CCACTGTAC	250
ORF	N N Y L T K E E C L K K C A T V T	83
R35464	AGAGAATGCC ACGGGTGACC TGGCCACCAG CAGGAATGCA GCGGATTCCT	300
ORF	E N A T G D L A T S R N A A D S S	100
R35464	CTGTCCCAAG TGCTCCAGAG AGGCAGGATT CTTGAAGACC ACTTCAGCGA	350
ORF	V P S A P R R Q D S * R P L Q R	116
R35464	TATGTTTCAA NTATTGNAAG AATAATTGCA CCGNCAACGN ATT-----	393
ORF	Y V S * I * R I I A P * T *	130

关键词

R35464 = EST R35464的核酸序列(SEQ ID NO: 12)

ORF = EST R35464开放读框翻译(SEQ ID NO: 13)

图 1

R74593	GCAATAATTA CCTGACCAAG GAGGAGTGCC TCAAGAAATG TGCCACTGTC	50
ORF	Q * L P D Q G G V P Q E M C H C H	17
R74593	ACAGAGAATG CCACGGGTGA CCTGGCCACC AGCAGGAATG CAGCGGATTC	100
ORF	R E C H G * P G H Q Q E C S G F	33
R74593	CTCTGTCCCA AGTCTCCCAG AAGGCAGGAT TCTGAAGACC ACTCCAGCGA	150
ORF	L C P K S P R R Q D S E D H S S D	50
R74593	TATGTTCAAC TATGAAGAAT ACTGCACCGC CAACGCAGTC ACTGGGCCTT	200
ORF	M F N Y E E Y C T A N A V T G P C	67
R74593	GCCGTGCATC CTTCCACCGC TGGTACTTTG ACGTGGAGAG GAACTCCTGC	250
ORF	R A S F P R W Y F D V E R N S C	83
R74593	AATAACTTCA TCTATGGAGG CTGCCGGGGC AATAAGAACA GCTACCGCTC	300
ORF	N N F I Y G G C R G N K N S Y R S	100
R74593	TGAGGAGGCC TGCATGCTCC GCTGCTTCCG CCAGCAGGAG AATCCTCCCC	350
ORF	E E A C M L R C F R Q Q E N P P L	117
R74593	TGCCCCTTGG CTCAAAGGTG GTGGTTCTGG CCGGGGCTGT TTCGTGATGG	400
ORF	P L G S K V V V L A G A V S * W	133
R74593	TGTTGATCCT TTTCCTGGGG AGCNTCCATG GTCTTACTGA TTCCGGGTGG	450
ORF	C * S F S W G A S M V L L I P G G	150
R74593	CAAGGAGGAA CCAGGAGCGT GCCCTGCCGA NCGTCTGGAG CTTCCGGAGAT	500
ORF	K E E P G A C P A X R L E L R R *	167
R74593	GACAAGGGNT	510
ORF	Q G	169

关键词

R74593 = EST R74593的核酸序列 (SEQ ID NO: 14)

ORF = EST R74593开放读框翻译 (SEQ ID NO: 15)



2

R35464	GGCCGGTTCGT TTCTCGCCTG GCTGGGA-TC GCTGCTCCTC TCTGGGGTCC	50
N39798	TGGGANTC GCTGCTCCTC TCTGGGGTCC	28
H94519	GCNCGC-CGT TNNTCGCNT- GCTGGGA-TC GCTGCACCTC TCTGGGGTCC	47
R74593	corr. -----	
共有序列	GGCCGGTTCGT TTCTCGCCTG GCTGGGA-TC GCTGCTCCTC TCTGGGGTCC	50
翻译	A G S F L A W L G S L L L S G V	-3
R35464	TGGCCGGCCG ACCGAGAACG CAGCATCCAC GACTTCTGCC TGGTGTGGAA	100
N39798	TGG-CGGCCG ACCGAGAACG CAGCATCCAC GACTTCTGCC TGGTGTGGAA	77
H94519	NGG-CGGCCG ACCGAGAACG CAGCATCCAC GACTTCTGCC TGGTGTGGAA	96
R74593	corr. -----	
共有序列	TGG-CGGCCG ACCGAGAACG CAGCATCCAC GACTTCTGCC TGGTGTGGAA	99
翻译	L A A D R E E R S I H D F C L Y S K	15
R35464	GGTGGTGGGC AGATCCCGG CCTCCATGCC TAGGTGGTGG TACAATGTCA	150
N39798	GGTGGTGGGC AGATCCCGG CCTCCATGCC TAGGTGGTGG TACAATGTCA	127
H94519	GGTGGTGGGC AGATCCCGG CCTCCATGCC TAGGTGGTGG TACAATGTCA	146
R74593	corr. -----	
共有序列	GGTGGTGGGC AGATCCCGG CCTCCATGCC TAGGTGGTGG TACAATGTCA	149
翻译	V Y G E C R A S M E R H H Y N Y T	32
R35464	CTGACGGATC CTGCCAGCTG TTTGTGTATG GGGGCTGTGA CCGAAACAGC	200
N39798	CTGACGGATC CTGCCAGCTG TTTGTGTATG GGGGCTGTGA CCGAAACAGC	177
H94519	CTGACGGATC CTGCCAGCTG TTTGTGTATG GGGGCTGTGA CCGAAACAGC	196
R74593	corr. -----	
共有序列	CTGACGGATC CTGCCAGCTG TTTGTGTATG GGGGCTGTGA CCGAAACAGC	199
翻译	D G S C Q L E Y Y Q Q C D Q N S	48
R35464	AATAATTACC TGACCAAGGA GGAGTGCCTC AAGAAATGTG CCACTGTCCAC	250
N39798	AATAATTACC TGACCAAGGA GGAGTGCCTC AAGAAATGTG CCACTGTCCAC	227
H94519	AATAATTACC TGACCAAGGA GGAGTGCCTC AAGAAATGTG CCACTGTCCAC	246
R74593	corr. AATAATTACC TGACCAAGGA GGAGTGCCTC AAGAAATGTG CCACTGTCCAC	52
共有序列	AATAATTACC TGACCAAGGA GGAGTGCCTC AAGAAATGTG CCACTGTCCAC	249
翻译	N N Y L T K E E C L K K C A T V T	65
R35464	AGAGAATGCC ACGGGTGACC TGGCCACCAG CAGGAATGCA GCGGATTCCCT	300
N39798	AGAGAATGCC ACGGGTGACC TGGCCACCAG CAGGAATGCA GCGGATTCCCT	277
H94519	AGAGAATGCC ACGGGTGACC TGGCCACCAG CAGGAATGCA GCGGATTCCCT	296
R74593	corr. AGAGAATGCC ACGGGTGACC TGGCCACCAG CAGGAATGCA GCGGATTCCCT	102
共有序列	AGAGAATGCC ACGGGTGACC TGGCCACCAG CAGGAATGCA GCGGATTCCCT	299
翻译	E N A T G D L A T S R N A A D S S	82
R35464	CTGTCCCAAG TGCTCCCAGA AGGCAGGATT CTTGAAGACC ACTCCAGCGA	350
N39798	CTGTCCCAAG TGCTCCCAGA AGGCAGGATT CT-GAAGACC ACTCCAGCGA	326
H94519	CTGTCCCAAG TGCTCCCAGA AGGCAGGATT CT-GAAGACC ACTCCAGCGA	345
R74593	corr. CTGTCCCAAG TGCTCCCAGA AGGCAGGATT CT-GAAGACC ACTCCAGCGA	151
共有序列	CTGTCCCAAG TGCTCCCAGA AGGCAGGATT CT-GAAGACC ACTCCAGCGA	348
翻译	V P S A P R R Q D S E D H S S D	98

图 3

R35464	TATGTTTCAA	NTATTGNAAG	AATAATGCA	CCGNCAACGN	ATT-----	393	
N39798	TATGTT-CAA	CTA-TG-AAG	AATACT-GCA	CCGCCAACGC	AGTCACTGGG	372	
H94519	TATGTT-CAA	CTA-TG-AAG	AATACTGGCA	CCGCCAACGC	ATTCACTGGG	392	
R74593	corr.	TATGTT-CAA	CTA-TG-AAG	AATACT-GCA	CCGCCAACGC	AGTCACTGGG	197
共有序列	TATGTT-CAA	CTA-TG-AAG	AATACT-GCA	CCGCCAACGC	AGTCACTGGG	394	
翻译	M	F	N	Y	E	E	
					Y	C	
					T	A	
					N	A	
					V	T	
					G		
R35464	-----	-----	-----	-----	-----		
N39798	CCTTGC-GTG	GAATCCTTTC	CCACGCTGGN	AATTTNGACG	TTGAGAAGGA	421	
H94519	CCT-GC-GTG	-CATCCTT-C	CCACGCTGGT	ACTTT-GNCG	-----	427	
R74593	corr.	CCTTGCCTGTG	-CATCCTT-C	CCACGCTGGT	ACTTT-GACG	TGGAGA-GGA	243
共有序列	CCTTGCCTGTG	-CATCCTT-C	CCACGCTGGT	ACTTT-GACG	TGGAGA-GGA	440	
翻译	P	C	R	A	S	F	
					P	R	
					W	Y	
					F	D	
					V	E	
					R	N	
R35464	-----	-----	-----	-----	-----		
N39798	AC-----	-----	-----	-----	-----	423	
H94519	-----	-----	-----	-----	-----		
R74593	corr.	ACTCCTGCAA	TAACCTCATC	TATGGAGGCT	GCCGGGGCAA	TAAGAACAGC	293
共有序列	ACTCCTGCAA	TAACCTCATC	TATGGAGGCT	GCCGGGGCAA	TAAGAACAGC	490	
翻译	S	C	N	N	F	I	
					Y	G	
					G	C	
					R	G	
					N	K	
					N	S	
R35464	-----	-----	-----	-----	-----		
N39798	-----	-----	-----	-----	-----		
H94519	-----	-----	-----	-----	-----		
R74593	corr.	TACCGCTCTG	AGGAGGCCTG	CATGCTCCGC	TGCTTCCGCC	AGCAGGAGAA	343
共有序列	TACCGCTCTG	AGGAGGCCTG	CATGCTCCGC	TGCTTCCGCC	AGCAGGAGAA	540	
翻译	Y	R	S	E	E	A	
					C	M	
					L	R	
					C	F	
					R	Q	
					Q	E	
					N		
R35464	-----	-----	-----	-----	-----		
N39798	-----	-----	-----	-----	-----		
H94519	-----	-----	-----	-----	-----		
R74593	corr.	TCCTCCCCTG	CCCCTTGGCT	CAAAGGTGST	GGTTCGTGCC	GGGGCTGTTT	393
共有序列	TCCTCCCCTG	CCCCTTGGCT	CAAAGGTGST	GGTTCGTGCC	GGGGCTGTTT	590	
翻译	P	P	L	P	L	G	
					S	K	
					V	V	
					V	L	
					A	G	
					A	V	
					S		
R35464	-----	-----	-----	-----	-----		
N39798	-----	-----	-----	-----	-----		
H94519	-----	-----	-----	-----	-----		
R74593	corr.	CGTGATGGTG	TTGATCCTTT	TCCTGGGGAG	CNTCCATGGT	CTTACTGATT	443
共有序列	CGTGATGGTG	TTGATCCTTT	TCCTGGGGAG	CNTCCATGGT	CTTACTGATT	640	
翻译	*	W	C	*	S	F	
					S	W	
					G	A	
					S	M	
					V	L	
					L	L	
					I		
R35464	-----	-----	-----	-----	-----		
N39798	-----	-----	-----	-----	-----		
H94519	-----	-----	-----	-----	-----		
R74593	corr.	CCGGTGGCA	AGGAGGAACC	AGGAGCGTGC	CCTGCGGANC	GTCTGGAGCT	493
共有序列	CCGGTGGCA	AGGAGGAACC	AGGAGCGTGC	CCTGCGGANC	<u>GTCTGGAGCT</u>	690	
翻译	P	G	G	K	E	E	
					P	G	
					A	C	
					P	A	
					*	R	
					L	E	
					L		
R35464	-----	-----	-----	-----	-----		
N39798	-----	-----	-----	-----	-----		
H94519	-----	-----	-----	-----	-----		
R74593	corr.	TCGGAGATGA	CAAGGGNT				511
共有序列	TCGGAGATGA	CAAGGGNT					708
翻译	R	R	*	Q	G		217



3(续)

关键词**R35464** = EST R35464的核酸序列 (SEQ ID NO: 12)**N39798** = EST N39798的核酸序列 (SEQ ID NO: 17)**H94519** = EST H94519的核酸序列 (SEQ ID NO: 16)**R74593 corr** =在b. p. 114的G的正确译本**共有序列**=人比库蛋白的核酸序列 (SEQ ID NO. 9)**翻译物** =共有序列的氨基酸翻译物**图 3(续)**

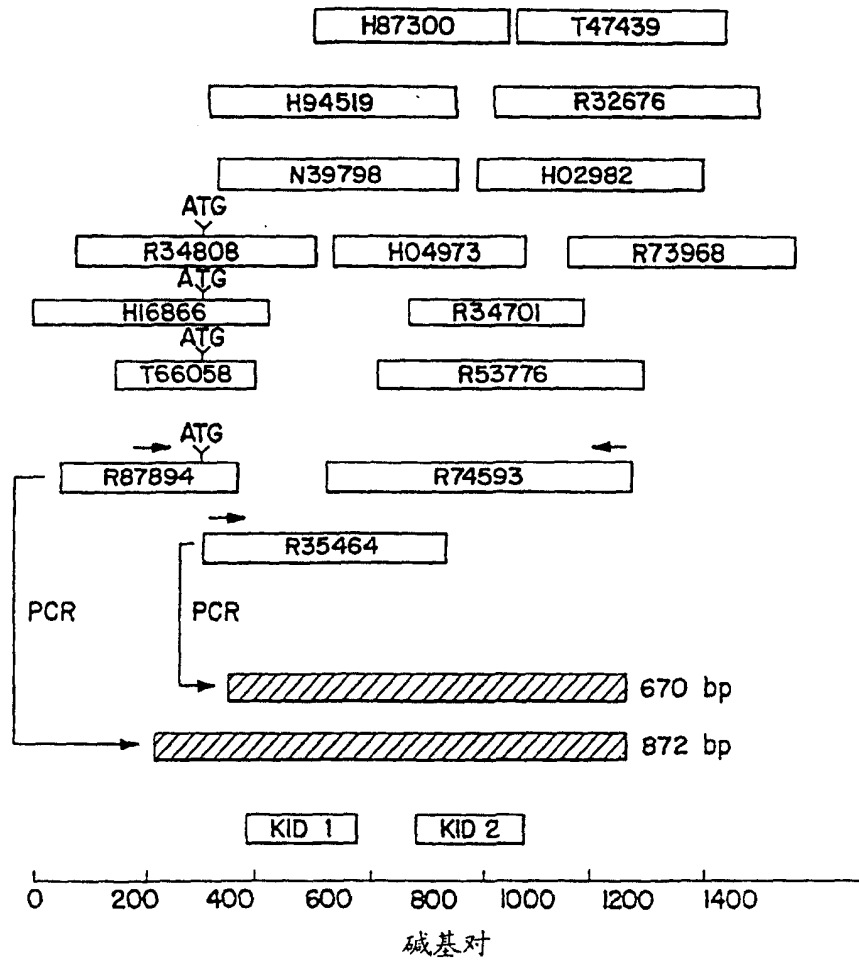


图 4A

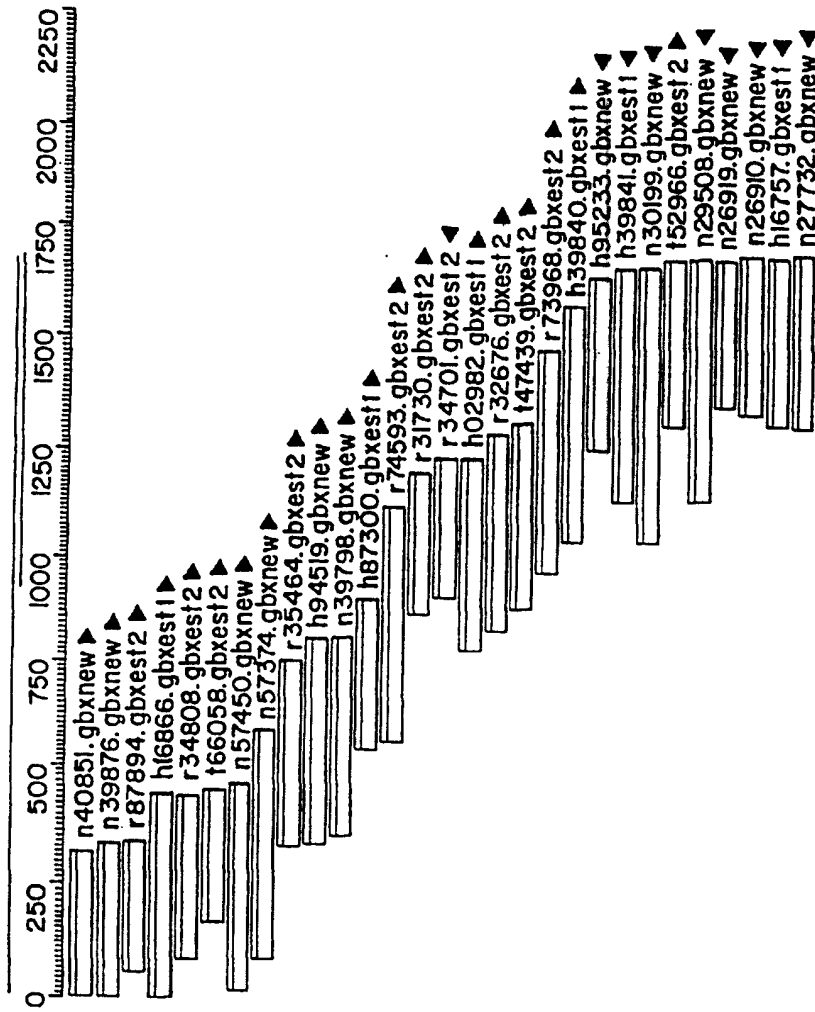


图 4B

	1		50
BikuninGCGA	CCTCCGCGCG	TTGGGAGGTG TAGCGCGGCT CTGAACGCGT
N40851GCGA	CCTCCGCGCG	TTGGGAGGTG TAGCGCGGCT CTGAACGCGT
N39876GCGA	CCTCCGCGCG	TTGGGAGGTG TAGCGCGGCT CTGAACGCGT
R87894
H16866GGCGA	CCTCCGCGCG	TTGGGAGGTG TAGCGCG.CT CTGAACGGGN
R34808
T66058
N57450T TAGCGCGGCT CTGAACGCNA
N57374
R35464
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C

	51				100
Bikunin	GNA GGGCCG	TTGAGTGTCTG	CAGGCGGCGA	GGGCGCGAGT	GAGGAGCAGA
N40851	NGAGNGGCCG	TTGAGTGTCTG	CAGGCGGCGA	GGGCGCGAGT	GAGGAGCAGA
N39876	GCA.GGGCCG	TTGAGTGTCTG	CAGGCGGCGA	GGGCGCGAGT	GAGGAGCAGA
R87894	TTGAGTGTNG	NAGGCGGCGA	GGGCGCGAGT	GAGGAGCAGA
H16866	..ANGGCCG	TTGAGTGTCTG	CAGGCGGC.A	GGGCN.GAGT	GAGGAGCAGA
R34808G	GAGGAGCAGA
T66058
N57450	GAAGNGGCCG	TTGAGTGTCTG	CAGGCGGCGA	GGGCGCGAGT	GAGGAGCAGA
N57374AGA
R35464
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R12676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C(续)

	101				150
Bikunin	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
N40851	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
N39876	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	GGGC	NTCCCCACAC TGAAGGTCCG
R87894	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
H16866	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
R34808	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
T66058
N57450	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
N57374	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
R35464
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C(续)

	151				200
Bikunin	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
N40851	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
N39876	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
R87894	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
H16866	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACG.T	CCCCGAGCN.
R34808	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
T66058GGACCCT	CCCCGAGCGT
N57450	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
N57374	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
R35464
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
H27732

图 4C(续)

	201				250
Bikunin	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCG	CTCCATTGCG	CGTGCCTTTG	.AGGGGCTTC
N40851	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCG	CTCCATTGCG	CGTGCCTNTG	.AGGGGCTTC
N39876	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCG	CTCCATTGCG	CGTGCCTTTG	.AGGGGCTTC
R87894	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCG	CTCCATTGCG	CGTGCCTTTG	.AGGGGCTTC
H16866	.GGCACCTGA	ACGCGAGGCG	CTCCATTGCG	CGTGCCTTTG	.AGGGGCTTC
R34808	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCG	CTCCATTGCG	CGTGCCTNTG	GAGGGGCTTC
T66058	CGGCACCTGA	ACGCGAGGC.	CTCCATTGCG	.GTGCCTGTG	NAGGGGCTTC
N57450	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCG	CTCCATTGCG	CGTGCCTTTG	.AGGGGCTTC
N57374	CGGCACCTGA	ACGCGAGGC.	CTCCATTGC.	CGTGCCTTNG	.AGGGGCTTC
R35464
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C(续)

	251				300
Bikunin	CCGCACCT G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG CGTC	GC TG CGCG
N40851	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG.CGTC	GCCTG.CGCG
N39876	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG.CGTC	GCCTG.CGCG
R87894	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTNG.CGTC	GC.TN.CGCG
H16866	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTNG.CGTC	GC.TGGCGCG
R34808	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGGGGCTC	GC.TG.CGCG
T66058	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG.CGTC	GC.TG.CGCG
N57450	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG.CGTC	GCCTG.CGCG
N57374	CCGGAACCTG	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG.CGTC	GC.TG.CGCG
R35464
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C(续)

	301	350
Bikunin	TC TCGGCTG AGCT GGCCA TGGCGCANT	GTTGC GGGC T GAGGC GG
N40851	TC.TCGGCTG AGCT.GGCA TGTCG	
N39876	TC.TCGGCTG AGCT.GGCCA TGGCGCACT.	G.TCGCGNGC T.GAGGC.G
R87894	TC.TCGGCTG AGCTTGGCCA TGGCGCANT.	GTTNC.GGGC T.NAGGC.GG
H16866	TCTTCGGCTG AGCT.GGCCA TGGCGCANT.	GTTGC.GNGC T.GAGGC.GG
R34808	TCTTCGGCTG AGCTGGGCCA TGGCGCANTT	GTTGC.GGGC T.GAGGC.GG
T66058	TC.TCGGCTG AGCT.GGCCA TGGCGCANT.	GTTGC.GNGC T.GAGGC.GG
N57450	TC.TCGGCTG AGCT.GGCCA TGGCGCANT.	GGTGC.GGGC TTGAGGC.GG
N57374	TCCTCGGCTG AGCT.GGCCA TGGCGCANT.	GGTGCCGNGC T.GAGGCCGG
R35464GGCCGG
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C(续)

	351				400
Bikunin	AC GG CG	TTTCTCG	CC TGCTGGG	A TCGCT GC T	CCTCTCT
R87894	ACG.				
H16866	AC..CGNCGT	TTTTCTTCG.	CCTTGCTGGG	ATTGCTTGC	TTCCINTCTG
R34808	ACGCGGNCG.	.TTTTTCGN	CCTTGCTGGG	ATCG.TTG.	TTNCTCTCTN
T66058	...CGNCG.	.TTTTCTCG.	CC.TGCTGGG	A.TCGCT.GC	T.CCTCTCT.
N57450	ANN.NGCCG.	.TTTCTCG.	CC.TGCTGGG	A.TCGCT.GC	T.CCTCTCT.
N57374	AG..GGCCGG	.TTTCTCG.	CCTTGCTGGG	A.TCGCT.GC	T.CCTCTCTG
R35464GTCC.	.TTTCTCG.	CCTTGCTGGG	A.TCGCT.GC	T.CCTCTCT.
H94519	.GCNGCCG.	.TTNNTCG.	CN.TGCTGGG	A.TCGCT.GC	A.CCTCTCT.
N39798CTGGG	ANTCGCT.GC	T.CCTCTCT.
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C(续)

	401					450
Bikunin	GGGG TCCTG	G	CGGCCGA	CCGA	GAACG	CA GCA TCC ACGACTT CT
H16866	GGGGTTCCTG	GG	CGGCCGA	CCGA	GAACG	CA.GCA.TCC AAGAATTTTT
R34808	GGGGTTC	TG	GGGNGGCCGA	NCGA	GAACG	CAAGCA.TTC ACGA.TTT
T66058	GGGG.TCCTG	G	.CGGCCGA	CCGA	GAACG	CA.GCA.TCC ACGANTT.CT
N57450	GGGG.TCCTG	G	.CGGCCGA	CCGA	GAACG	CA.GCA.TCC ACGACTT.CT
N57374	GGGG.TCCTG	G	.CGGCCGA	NCGAAGAANG		CA.GCAATCC ANGAATTNCT
R35464	GGGG.TCCTG	G	CCGGCCGA	CCGA	GAACG	CA.GCA.TCC ACGACTT.CT
H94519	GGGG.TCGNG	G	.CGGCCGA	CCGA	GAACG	CA.GCA.TCC ACGACTT.CT
N39798	GGGG.TCCTG	G	.CGGCCGA	CCGA	GAACG	CA.GCA.TCC ACGACTT.CT
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C(续)

	451					500
Bikunin	GCCTGGTGT	CGAAGGT GG	TGGGCAGATG	CCGGG	CCTC	CATGCCTA G
H16866	GCC					
T66058	TCCTGGTGT	CGAAGG				
N57450	GCCTGGTGT.	CGAAGGT.GG	TGGGCAG			
N57374	GCCTGGTGT	CGAAAGTTGG	TGGGCANATT	CCGGGGCCTT	CATGNCTAAG	
R35464	GCCTGGTGT.	CGAAGGT.GG	TGGGCAGATT	CCGGG.CCTC	CATGCCTA.G	
H94519	GCCTGGTGT.	CGAAGGT.GG	TGGGCAGATG	CCGGG.CCTC	CATGCCTA.G	
N39798	GCCTGGTGT.	CGAAGGT.GG	TGGGCAGATG	CCGGG.CCTC	CATGCCTA.G	
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C(续)

	501		550
Bikunin	G TGGT GGT ACAATGTCAC TGACGGATCC TGCCAGCTGT TTGTGT ATG		
N57374	GTTGGTTGGT ANAATGTAAC TTAANGATTC TTGCAACTGT TTGTGTNATT		
R35464	G . TGGT . GGT ACAATGTCAC TGACGGATCC TGCCAGCTGT TTGTGT . ATG		
H94519	G . TGGT . GGT ACAATGTCAC TGACGGATCC TGCCAGCTGT TTGTGT . ATG		
N39798	G . TGGT . GGT ACAATGTCAC TGACGGATCC TGCCAGCTGT TTGTGT . ATG		
H87300		
R74593		
R31730		
R34701		
H02982		
R32676		
T47439		
R73968		
H39840		
H95233		
H39841		
N30199		
T52966		
N29508		
N26919		
N26910		
H16757		
N27732		
	551		600
Bikunin	GGGGCTGTGA CCGAAACA GCAATAATTA CCTGACCAAG GA GGAGTGC		
N57374	GGGGCTNTTA AACCGAAANA .CAATAATNA CCTGACCAA GAAQNAAT .		
R35464	GGGGCTGTGA ..CGGAAACA GCAATAATTA CCTGACCAAG GA .GGAGTGC		
H94519	GGGGCTGTGA ..CGGAAACA GCAATAATTA CCTGACCAAG GA .GGAGTGC		
N39798	GGGGCTGTGA ..CGGAAACA GCAATAATTA CCTGACCAAG GA .GGAGTGC		
H87300	GATTCGGCAC AGGGGAAACA GCAATAATTA CCTGACCAAG GA .GGAGTNC		
R74593 GCAATAATTA CCTGACCAAG GA .GGAGTGC		
R31730		
R34701		
H02982		
R32676		
T47439		
R73968		
H39840		
H95233		
H39841		
N30199		
T52966		
N29508		
N26919		
N26910		
H16757		
N27732		

图 4C (续)

	601				650
Bikunin	CTCAAGAAAT	GTGCCACTGT	CACAGAGAAT	GCCACGGGTG	ACCTGGCCAC
R35464	CTCAAGAAAT	GTGCCACTGT	CACAGAGAAT	GCCACGGGTG	ACCTGGCCAC
H94519	CTCAAGAAAT	GTGCCACTGT	CACAGAGAAT	GCCACGGGTG	ACCTGGCCAC
N39798	CTCAAGAAAT	GTGCCACTGT	CACAGAGAAT	GCCACGGGTG	ACCTGGCCAC
H87300	CTCAAGAAAT	GTGCCACTGT	CACAGAGAAT	GCCACGGGTG	ACCTGGCCAC
R74593	CTCAAGAAAT	GTGCCACTGT	CACAGAGAAT	GCCACGGGTG	ACCTGGCCAC
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732
	651				700
Bikunin	CAGCAGGAAT	GCAGCGGATT	CCTCTGTCCC	AAGTGCTCCC	AGAAGGCAGG
R35464	CAGCAGGAAT	GCAGCGGATT	CCTCTGTCCC	AAGTGCTCCC	AGAAGGCAGG
H94519	CAGCAGGAAT	GCAGCGGATT	CCTCTGTCCC	AAGTGCTCCC	AGAAGGCAGG
N39798	CAGCAGGAAT	GCAGCGGATT	CCTCTGTCCC	AAGTGCTCCC	AGAAGGCAGG
H87300	CAGCAGGAAT	GCAGCGGATT	CCTCTGTCCC	AAGTGCTCCC	AGAAGGCAGG
R74593	CAGCAGGAAT	GCAGCGGATT	CCTCTGTCCC	AAGT. CTCCC	AGAAGGCAGG
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C (续)

	701		750
Bikunin	ATTCT GAAG ACCACTCCAG CGATATGTT CAACTAT G AAGAATACTG		
R35464	ATTCTTGAAG ACCACTTCAG CGATATGTTT CAANTATTGN AAGAATAATT		
H94519	ATTCT.GAAG ACCACTCCAG CGATATGTT. CAACTAT..G AAGAATACTG		
N39798	ATTCT.GAAG ACCACTCCAG CGATATGTT. CAACTAT..G AAGAATACTG		
H87300	ATTCT.GAAG ACCACTCCAG CGATATGTT. CAACTAT..G AAGAATACTG		
R74593	ATTCT.GAAG ACCACTCCAG CGATATGTT. CAACTAT..G AAGAATACTG		
R31730		
R34701		
H02982		
R32676		
T47439		
R73968		
H39840		
H95233		
H39841		
N30199		
T52966		
N29508		
N26919		
N26910		
H16757		
N27732		
	751		800
Bikunin	CACCGCCAA CGCAGT CAC TGGGCC TTG CCGTG CAT CCTT CCCAC		
R35464	GCACCGNCAA CGNATT		
H94519	GCACCGCCAA CGCATT.CAC TGGGCC..TG C.GTG.CAT. CCTT.CCCAC		
N39798	.CACCGCCAA CGCAGT.CAC TGGGGCCTTG C.GTGGAA. CCTTCCCAC		
H87300	.CACCGCCAA CGCAGTNCAC TGGGCC.TTG C.GTGGCATN CCTT.CCCAC		
R74593	.CACCGCCAA CGCAGT.CAC TGGGCC.TTG CCGTG.CAT. CCTT.CCCAC		
R31730		
R34701		
H02982		
R32676		
T47439		
R73968		
H39840		
H95233		
H39841		
N30199		
T52966		
N29508		
N26919		
N26910		
H16757		
N27732		

图 4C (续)

	801				850
Bikunin	GCTGGTACTT	T GACGTGGA	GA GGAACTC	CTG CAATAA	CTTCATCTAT
H94519	GCTGGTACTT	T.GNCGT			
N39798	GCTGGNAATT	TNGACGTTGA	GAAGGAAC		
H87300	GCTNGTACTT	T.GACGTGGA	GA.GGAACTC	CTGGCAATAA	CTTCATCTAT
R74593	GCTGGTACTT	T.GACGTGGA	GA.GGAACTC	CTG.CAATAA	CTTCATCTAT
R31730
R34701
H02982GA	GA.GGAACTC	CTG.CAATAA	CTTCATCTAT
R32676G	ATTC..GGAA
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732
	851				900
Bikunin	GGAGGCT GC	CGGGCAAT	AAGAACAG C	TACCGCTC T	GAGGAGGCCT
H87300	GGAGGCTTGC	CGGGCAATN	AAGAACAGNT	TACCGCTCTT	TAGGAGGCCT
R74593	GGAGGCT.GC	CGGGCAAT.	AAGAACAG.C	TACCGCTC.T	GAGGAGGCCT
R31730G.C	TACCGCTC.T	GAGGAGGCCT
R34701
H02982	GGNGGCT.GC	CGGG.AAT.	AAGAACA.NC	TACCGCTC.T	GAGGAGGCCT
R32676	CGAGGA..GC	CGGGCAAT.	AAGAACAG.C	TACCGCTC.T	GAGGAGGCCT
T47439NGGCCT
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C (续)

	901		950
Bikunin	GCA TGCTC CGCTGCTTCC GC		CA GCAGGA
H87300	.GCA.T....		
R74593	.GCA.TGCTC CGCTGCTTCC GC.....		.CA.GCAGGA
R31730	.GCA.TGCTC CGCTGCTTCC GC.....		.CA.GCAGGA
R34701TTCC GC.....		.CAAGCAGGA
H02982	.GCG.TGCTC CGCTGCTTCC GCTGTGTGT CTCTCCAGG		CCA.GCAGGA
R32676	.GCA.TGCTC CGCTGCTTCC GC.....		.CA.GCAGGA
T47439	TGCAGTGCTC CGCTGCTTCC GC.....		.CA.GCAGGA
R73968		
H39840		
H95233		
H39841		
N30199		
T52966		
N29508		
N26919		
N26910		
H16757		
N27732		
	951		1000
Bikunin	GAA TCCTCC CCTGCCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC		TGG CGGGGC
R74593	GAA.TCCTCC CCTGCCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC		TGGCGGGGC
R31730	GAA.TCCTCC CCTGCCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC		TGG.CGGGGC
R34701	AAANTCCTCC CCTGCCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC		TGG.CGGGGC
H02982	GAA.TCCTCC CCTGCCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC		TGG.CGGGGC
R32676	GAA.TCCTCC CCTGCCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC		TGG.CGGGGC
T47439	GAA.TCCTCC CCTGCCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC		TGG.CGGGGC
R73968CGGGGC
H39840		
H95233		
H39841		
N30199		
T52966		
N29508		
N26919		
N26910		
H16757		
N27732		

图 4C(续)

	1001					1050
Bikunin	TGTT CGTGA	TGGTGTGAT	CC T CTTCC	TGGG AGCCT	CC ATGGTC	
R74593	TGTTTCGTGA	TGGTGTGAT	CCTT..TTCC	TGGGGAGCNT	CC.ATGGTCT	
R31730	TGTT.CGTGA	TGGTGTGAT	CC.T.CTTCC	TGGGGAGCCT	CC.ATGGTC.	
R34701	TGTT.CGTGA	TGGTGTGAT	CCCTCCTCC	CGGG.AGCCT	CCCATGGTCC	
H02982	TGTT.CGTGA	TGGTGTGAT	CC.T.CTTCC	TGGG.AGCCT	CC.ATGGTN.	
R32676	TGTT.CGTGA	TGGTGTGAT	CC.T.CTTCC	TGGG.AGCCT	CC.ATGGTC.	
T47439	TGTT.CGTGA	TGGTGTGAT	CC.T.CTTCC	TGGG.AGCCT	CC.ATGGTC.	
R73968	TGTT.CGTGA	TGGTGTGAT	CC.T.CTTCC	TGGG.AGCCT	CC.ATGGTC.	
H39840	
H95233	
H39841	
N30199	
T52966	
N29508	
N26919	
N26910	
H16757	
N27732	
	1051					1100
Bikunin	TACC TGAT	CCGGGTGGCA	CGGAGG AAC	C AGG AGCG	TGCCCTGCCG	
R74593	TAC..TGATT	CCGGGTGGCA	AGGAGG.AAC	C.AGG.AGCG	TGCCCTGCCG	
R31730	TACC.TGAT.	CCGGGTGGCA	CGGAGGGAAC	C.AGGGAGCG	TGCCCTGCCG	
R34701	TACCCTGAT.	CCGGGTGGCA	CGGAGG.AAC	CCAGG.ANCG	TGCCCTGCCG	
H02982	TACC.TGAT.	CCGGGTNGCA	CGGAGG.AAC	C.AGGGAGCG	TGCCCTGCCN	
R32676	TACC.TGAT.	CCGGGTGGCA	CGGAGG.AAC	C.AGGGAGCG	TGCCCTGCCG	
T47439	TACC.TGAT.	CCGGGTNGCA	CGGAGG.AAC	C.AGG.AGCG	TGCCCTGCCG	
R73968	TACC.TGAT.	CCGGGTGGCA	CGGAGG.AAC	C.AGG.AGCG	TGCCCTGCCG	
H39840GGG.AAC	C.AGG.AGCG	TGCCCTGCCG	
H95233	
H39841	
N30199GAGGAACC	C.ANG.AGCT	TGCCCTGCCG	
T52966	
N29508	
N26919	
N26910	
H16757	
N27732	

图 4C (续)

	1101				1150
Bikunin	ACCG TCT G	GAGCTCCGGA	GATGACAAGG	AGCAGCTGG	TGAAGAAC
R74593	ANCG.TCT.G	GAGCTTCGGA	GATGACAAGG	GNT	
R31730	ACCG.TCTGG	GAGCTCCGGA	GATGACAAGG	GAGCAGCTGG	GTGAAGAAC.
R34701	ACCG.TCT.G	GAGCTCCGGA	GATGACAAGG	.AGCAGCTGG	.TGAAGAAC.
H02982	ACCG.TCTNG	GAGCTCCGGA	GATGACAAGG	.AGCAGCTGG	.TGAAGAAC.
R32676	ACCG.TCTGG	GAGCTCCGGA	GATGACAAGG	GAGCAGCTGG	.TGAAGAAC.
T47439	ACCG.TCT.G	GAGCTCCGGA	GATGACAAGG	.AGCAGCTGG	.TGAAGAAC.
R73968	ACCG.TCT.G	GAGCTCCGGA	GATGACAAGG	.AGCAGCTGG	.TGAAGAAC.
H39840	ACCGGTCT.G	GAGCTCCGGA	GATGACAAGG	.AGCAGCTGG	.TGAAGAAC.
H95233
H39841
N30199	ACCG.TCT.G	GAGCTCCGGA	GATNACAANG	.AGCAGCTGN	.TGAAGAACC
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732
	1151				1200
Bikunin	ACATATGT C	CTGT GACCG	CCCTGT CGC	C AAGAGG A	CT GGGGAA
R31730	ACATATGTTC	CTGTTGACCG	NCCTGTTCCG	C.AAGAGG.A	TTGGGGGAA.
R34701	ACATATGT.C	CTGT.GACCG	CCCTGT.CGC	C.AAGAGG.A	CT.GGGGAA.
H02982	ACATATGT.C	CTGT.GACCG	NCCTGTTCCG	C.AAGAGG.A	CTNGGGGAAA
R32676	ACATATGTTC	CTGTTGACCG	CCCTGTTCCG	C.AAGAGGGA	NTGGGGGAA.
T47439	ACATATGT.C	CTGT.GACCG	CCCTGT.CGC	C.AAGAGG.A	CT.GGGGAA.
R73968	ACATATGT.C	CTGT.GACCG	CCCTGT.CGC	C.AAGAGG.A	CT.GGGGAA.
H39840	ACATATGT.C	CTGT.GACCG	CCCTGT.CGC	C.AAGAGG.A	CT.NGGGAA.
H95233
H39841C.	CCCTGT.CGC	CCAAAAGG.A	CT.GGGGAA.
N30199	ACATATGT.C	CTGT.GACCG	CCCTNT.CGC	C.AAGAGG.A	CT.GGGNAAA
T52966
N29508CC.	CCCTNT.CGC	C.AAGAGG.A	CT.GGG.AA.
N26919
N26910
H16757
N27732

图 4C (续)

```

1201                                     1250
Bikunin  GGGAGGGG AGACTAT G TGT GA GCT TTTTTT AA A TAGA GG
R31730    .GGGAGGGG A
R34701    .GGGAGGGG. AGACTAT.G. TGT.GA.GCT TTTTTT..AA A.TA
H02982    GGGAGGGG. AGATTAT.G. TGTGA.GTT TTTTTT..AA ANTAG
R32676    GGGAGGGGG AGANTATTGT TGTGA.GNT TTTTTTAA ATTAGGAGGG
T47439    .GGGAGGGG. AGACTAT.G. TGT.GA.GCT TTTTTT..AA A.TAGA..GG
R73968    .GGGAGGGG. AGACTAT.G. TGT.GA.GCT TTTTTT..AA A.TAGA..GG
H39840    .GGGAGGGG. AGACTAT.G. TGT.GA.GCT TTTTTT..AA A.TAGA..GG
H95233    .....
H39841    .GGGAGGGGA AAACNAT.G. TGT.GAACCT TTTTTT.AAA A.TAGA..GG
N30199    .GGGAGGNG. AGACTAT.G. TGT.AA.GCT TTTTTT..AA A.TAGA..GG
T52966    .....
N29508    .GGGAGGGG. AGACTA..G. TGT.GA.GCT TTTTTT..AA A.TAGA..GG
N26919    .....
N26910    .....
H16757    .....
N27732    .....

1251                                     1300
Bikunin  GATTGACTC GGATTTG A GT GATC A TTAGGG CT GAGGTCGTGT
R32676    GNTTGANTTC GGGNTTTTNA GTTGATCCAT TTAGGGGNT GAG
T47439    GATTGACTC..GGATTTG.A GT.GATC.A. TTAGGG..CT GAGGTCINTT
R73968    GATTGACTC..GGATTTG.A GT.GATC.A. TTAGGG..CT GAGGTCGTGT
H39840    GATTGACTC..GGATTTG.A GT.GATC.A. TTAGGG..CT GAGGTCGTGT
H95233    .....A. TTAGGG..CT GAGGTCGTGT
H39841    GATTGACTC..GGATTTG.A GT.GATC.A. TTAGGG..CT GAGGTCGTGT
N30199    GATTGACTC..GGATTTGA GT.GATC.A. TTAGGG..CT GAGGTCGTGT
T52966    .....
N29508    GATTGACTC..GGATTTG.A GT.GATCNA. TTAGGG..CT GAGGTCGTGT
N26919    .....
N26910    .....
H16757    .....
N27732    .....

1301                                     1350
Bikunin  TCTCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTTCC TG G TC TGGCA GGGATGGG
T47439    TCTCTNGGAG GTAGGACGA
R73968    TCTCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTTCC.TG GGTCTTGGCA .GGGATGGG
H39840    TCTCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTTCC.TG G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
H95233    NCTCTGGGAG NTAGGACGGC TGCCTTCCCTG G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
H39841    TCNCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTCCCTG G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
N30199    TCTCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTTCC.TG G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
T52966    .....TC.TGGCA .GGGATGGG.
N29508    TCTCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTTCA.TG G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
N26919    .....
N26910    .....
H16757    .....G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
N27732    .....CCCTG GGTCTCTGCA AGGNATGGG
    
```

图 4C (续)

```

1351                                     1400
Bikunin TTTG CTTTG G AAATCCTC T AGGAGGCT CCTCCT CGC ATGG CC TG
R73968 TTTG.CTTTG GGAAATCCTC TTNGGAGGCT CCTCCTCGC ATGGCCCTTG
H39840 TTTG.CTTTG GAGAATCCTC T.ANGAGGCT CCTCCT.CGC ATGG.CC.TG
H95233 TTTG.CTTTG G.AAATCCTC T.AGGAGGCT CCTCCT.CGC ATGG.CC.TG
H39841 TTTG.CTTTG G.AAANCCNC T.AGGAGGCT CCTCCT.CGC ATGG.CC.TG
N30199 TTTG.CTTTG G.AAATCCTC T.AGGAGGCT CCTCCTCGC ATGG.CC.TG
T52966 TTTG.CTTTG G.AAATCCTC T.AGGAGGCT CCTCCT.CGC ATGG.CC.TG
N29508 TTTG.CTTTG G.AAATCCTC T.AGGAGGCT CCTCCT.CGC ATGG.CC.TG
N26919 ..... GAGGCT CCTCCT.CGC ATGG.CC.TG
N26910 .....CTTTT GNAATCCTC T.AGGAGGCT CCTCCT.CGC ATGG.CC.TG
H16757 TTTGCCCTTTG G.AAANCCTC T.AGGAGGCT CCTCCT.CGC ATGG.CC.TG
N27732 TTTG.CTTTG G.AAATCCTC TTAGGAGGCT CCTCCT.CGC ATGG.CC.TG

1401                                     1450
Bikunin CAGT CT GG CAGCAG CCC CGAGTTGTTT CC TCGCTG ATC GATTTC
R73968 CAGT.CTGG CAGCANCCCC CGAGTTTTTT TCCTTCGCTG ATCCGATTTC
H39840 CAGT.CT.GG CAGCAG.CCC CGAGTTGTTT .CC.TCGCTG ATC.GATTTC
H95233 CAGTTCT..G CAGCAG.CCC CGAGTTGTTT .CC.TCGCTG ATC.GATTTC
H39841 CAGT.CT.GG CAGCAG.CCC CGAGTTGTTT .CC.TCGCTG ATC.GATTTC
N30199 CAGT.CT.GG CAGCAG.CCC CGAGTTGTTT .CC.TCGCTG ATC.GATTTC
T52966 CAGT.CT.GG CAGCAG..CC CGAGTTGTTT .CC.TCGCTG ATC.GATTTC
N29508 CAGT.CT..G CAGCAG.CCC CGAGTTGTTT .CC.TCGCTG ATC.GATTTC
N26919 CAGT.CTTGG CAGCAG.CCC CGAGTTGTTT .CC.TCGCTG ANC.GATTTC
N26910 CAGT.CT..G CAGCAG.CCC CGAGTTGTTT .CC.TCGCTG ATCCGATTTC
H16757 CAGTNCCT.GG CAGCAGACCC CGAGTTGTTT .CC.TCGCTG ATC.GATTTC
N27732 CAGT.CT.GG CAGCAG.CCC CGAGTTGTTT .CC.TCGCTG ANC.GATTTC

1451                                     1500
Bikunin TTT CCTCCA GGTAG AGT TTTC TTG CTTATGTTGA ATTCCATTGC
R73968 TTTTCCTCCA GGTAAAGAATT TTTCCTTT
H39840 TTT.CCTCCA GGTAG..AGT TTTC.TTTG. CTTATGTTGA ATTCCATTGC
H95233 TTT.CCTCCA GGTAG..AGT TTTC.TTTG. CTTATGTTGA ATTCCATTGC
H39841 TTT.CCCCCA GGTAG..AGT TTTC.TTTG. CTTATGTTGA ANTCCATTGC
N30199 TTT.CCTCCA GGTAG..AGT TTTC.TTTG. CTTATGTTGA ATTCCATTGC
T52966 TTT.CCTCCA GGTAG..AGT TTTC.TTTG. CTTATGTTGA ATTCCATTGC
N29508 TTT.CCTCCA GGTAG..AGT TTTC.TTTG. CTTATGTTGA ATTCCATTGC
N26919 TTT.CCNCCA GGTAG..AGT TTTC.TTTG. CTTATGTTGA ATTCCATTGC
N26910 TTT.CCTCCA GGTAG..AGT TTTC.TTTG. CTTATGTTGA ATTCCATTGC
H16757 TTTACCCCA GGTAG..AGT TTTCCTTTGN CTTATGTTGA ATTCCATTGC
N27732 TTT.CCTCCA GGTAG..AGT TTTC.TTTG. CTTATGTTGA ATTCCATTGC

```

图 4C (续)

	1501		1550
Bikunin	CTCTTTT CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT GT		
H39840	CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTTGT		
H95233	CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT		
H39841	CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT		
N30199	CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT		
T52966	CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT		
N29508	CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT		
N26919	CTCTTTT.CN CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT		
N26910	CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT		
H16757	CTCTTTTACT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT		
N27732	CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT		
	1551		1600
Bikunin	CTGATTTATG G TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTT TATTAGCATT		
H39840	CTGATTTATG GGTTTTTTTT AAGTAT		
H95233	CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTT TATTAGCATT		
H39841	CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTT TATTAGCATT		
N30199	CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTT TATTAGCATT		
T52966	CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTT TATTAGCATT		
N29508	CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTT TATTAGCATT		
N26919	CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTT TATTAGCATT		
N26910	CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTT TATTAGCATT		
H16757	CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTT TATTAGCATT		
N27732	CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTT TATTAGCATT		
	1601		1650
Bikunin	CTGAAAGAAG GAAAGTAAA TGTACAAGT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC		
H95233	CTGAAAGAAG GAAAGTAAA TGTACAAGT TAATAAA		
H39841	CTGAAAGAAG GAAAGTAAAN TGTACAAGT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC		
N30199	CTGAAAGAAG GAAAGTAAA TGTACAAGT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC		
T52966	CTGAAAGAAG GAAAGTAAA TGTACAAGT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC		
N29508	CTGAAAGAAG GAAAGTAAA TGTACAAGT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC		
N26919	CTGAAAGAAG GAAAGTAAA TGTACAAGT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC		
N26910	CTGAAAGAAG GAAAGTAAA TGTACAAGT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC		
H16757	CTGAAAGAAG GAAAGTAAA TGTACAAGT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC		
N27732	CTGAAAGAAG GAAAGTAAA TGTACAAGT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC		
	1651		1689
Bikunin	CTTTAG AAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA		
H39841	CTTTAA.		
N30199	CTTTAG.AAT AAA		
T52966	CTTTAGGAAT NAAAAA AAAAGGTG		
N29508	CTTTAG.AAT AAATTCAGC ATGTGCTTTC AA		
N26919	CTTTAG.AAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A		
N26910	CTTTAG.AAT AAATTCAGC ATGTGCTTTC AAAAAA		
H16757	CTTTAG.AAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA		
N27732	CTTTAG.AAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA		

图 4C(续)

EST共有序列 MLRAEADGVS RLLGSLLLSG VLAADRERSI HDFCLVSKVV GRCRASMPRW 50
EST共有序列 WYNVTDGSCQ LFVYGGCDGN SMNYLTKEEC LKKCATVTEN ATGDLATSRN 100
EST共有序列 AADSSVPSAP RRQDSEDHSS DMFNYYEYCT ANAVTGPCRA SFPRWYFDVE 150
EST共有序列 RNSCNNFIYG GCRGNKNSYR SEEACMLRCF RQENPFLPL GSKVVVLAGL 200
EST共有序列 FVMVLILFLG ASMYYLIRVA RRNQERALRT VWSSGDDKEQ LVKNTYVL 248

图 4D

cDNA		ACC	3
翻译产物		T	-47
cDNA	TGATCGCGAG ACCCCAACGG CTGGTGGCGT CGCCTGCGCG TCTCGGCTGA		53
翻译产物	. S R D P N G W W R R L R V S A E		-30
cDNA	GCTGGCCATG GCGCAGCTGT GCGGGCTGAG GCGGAGCCGG GCGTTTCTCG		103
翻译产物	L A M A Q L C G L R R S R A F L A		-13
cDNA	CCCTGCTGGG ATCGCTGCTC CTCTCTGGGG TCCTGGCGGC CGACCGAGAA		153
翻译产物	L L G S L L L S G V L A A D R E		4
cDNA	CGCAGCATCC ACGACTTCTG CCTGGTGTGC AAGGTGGTGG GCAGATGCCG		203
翻译产物	R S I H D F C L V S K V V G R C R		21
cDNA	GGCCTCCATG CCTAGGTGGT GGTACAATGT CACTGACGGA TCCTGCCAGC		253
翻译产物	A S M P R W W Y N V T D G S C Q L		38
cDNA	TGTTTGTGTA TGGGGCTGT GACGGAACA GCAATAATTA CCTGACCAAG		303
翻译产物	F V Y G G C D G N S N N Y L T K		54
cDNA	GAGGAGTGCC TCAAGAAATG TGCCACTGTC ACAGAGAATG CCACGGGTGA		353
翻译产物	E E C L K K C A T V T E N A T G D		71
cDNA	CCTGGCCACC AGCAGGAATG CAGCGGATTC CTCTGTCCCA AGTGCTCCCA		403
翻译产物	L A T S R N A A D S S V P S A P R		88
cDNA	GAAGGCAGGA TTCTGAAGAC CACTCCAGCG ATATGTTCAA CTATGAAGAA		453
翻译产物	R Q D S E D H S S D M F N Y E E		104
cDNA	TACTGCACCG CCAACGCAGT CACTGGGCCT TGCCGTGCAT CCTTCCCACG		503
翻译产物	Y C T A N A V T G P C R A S F P R		121
cDNA	CTGGTACTTT GACGTGGAGA GGAACCTCTG CAATACTTC ATCTATGGAG		553
翻译产物	W Y F D V E R N S C N N F I Y G G		138
cDNA	GCTGCCGGGG CAATAAGAAC AGCTACCGCT CTGAGGAGGC CTGCATGCTC		603
翻译产物	C R G N K N S Y R S E E A C M L		154
cDNA	CGCTGCTTCC GCCAGCAGGA GAATCCTCCC CTGCCCCTTG GCTCAAAGGT		653
翻译产物	R C F R Q Q E N P P L P L G S K Y		171
cDNA	GGTGGTCTG GCGGGCTGT TCGTGATGGT GTTGATCCTC TTCCTGGGAG		703
翻译产物	<u>V V L A G L F V M V L I L F L G A</u>		188
cDNA	CCTCCATGGT CTACCTGATC CGGGTGGCAC GGAGGAACCA GGAGCGTGCC		753
翻译产物	<u>S M V V L I</u> R V A R R N Q E R A		204
cDNA	CTGCGCACCG TCTGGAGCTT CGGAGATGA		782
翻译产物	L R T V W S F G D		213

4E

cDNA	GCACGAGTTG GGAGGTGTAG CGCGGCTCTG AACCGGCTGA GGGCCGTTGA	50
cDNA	GTGTCCGAGG CGGCGAGGGC GCGAGTGAGG AGCAGACCCA GGCATCGCGC	100
cDNA	GCCGAGAAGG CCGGGCGTCC CCACACTGAA GGTCCGAAA GGCAGCTTCC	150
cDNA	GGGGGCTTTG GCACCTGGCG GACCTCCCG GAGCGTCGGC ACCTGAACGC	200
cDNA	GAGGCGCTCC ATTGCGCGTG CGCGTTGAGG GGCTTCCCGC ACCTGATCGC	250
cDNA	GAGACCCCAA CGGCTGGTGG CGTCGCCTGC GCGTCTCGGC TGAGCTGGCC	300
cDNA	ATGGCGCAGC TGTGCGGGCT GAGGCGGAGC CGGGCGTTTC TCGCCCTGCT	350
翻译产物	M A Q L C G L R R S R A F L A L L	-11
cDNA	GGGATCGCTG CTCCTCTCTG GGGTCTTGGC GGCCGACCGA GAACGCAGCA	400
翻译产物	G S L L L S G V L A A D R E R S I	7
cDNA	TCCACGACTT CTGCTGGTG TCGAAGGTGG TGGGAGATG CCGGGCCTCC	450
翻译产物	H D F C L V S K V V G R C R A S	23
cDNA	ATGCCTAGGT GGTGGTACAA TGTCACTGAC GGATCCTGCC AGCTGTTTGT	500
翻译产物	M P R W W Y N V T D G S C Q L F V	40
cDNA	GTATGGGGGC TGTGACGGAA ACAGCAATAA TTACCTGACC AAGGAGGAGT	550
翻译产物	Y G G C D G N S N N Y L T K E E C	57
cDNA	GCCTCAAGAA ATGTGCCACT GTCACAGAGA ATGCCACGGG TGACCTGGCC	600
翻译产物	L X X C A T V T E N A T G D L A	73
cDNA	ACCAGCAGGA ATGCAGCGGA TTCCTCTGTC CCAAGTGCTC CCAGAAGGCA	650
翻译产物	T S R N A A D S S V P S A P R R Q	90
cDNA	GGATTCTGAA GACCACTCCA GCGATATGTT CAACTATGAA GAATACTGCA	700
翻译产物	D S E D H S S D M F N Y E E Y C T	107
cDNA	CCGCCAACGC AGTCACTGGG CTTGCGCTG CATCCTTCCC ACGCTGGTAC	750
翻译产物	A N A V T G P C R A S F P R W Y	123
cDNA	TTTGACGTGG AGAGGAACTC CTGCAATAAC TTCATCTATG GAGGCTGCCG	800
翻译产物	F D V E R N S C N N F I Y G G C R	140
cDNA	GGGCAATAAG AACAGCTACC GCTCTGAGGA GGCCTGCATG CTCCGCTGCT	850
翻译产物	G N K N S Y R S E E A C M L R C F	157
cDNA	TCCGCCAGCA GGAGAATCCT CCCCTGCCCC TTGGCTCAA GGTGGTGGTT	900
翻译产物	R Q Q E N P P L P L G S K <u>V V V</u>	173
cDNA	CTGGCGGGGC TGITCGTGAT GGTGTTGATC CTCITCCTGG GAGCCTCCAT	950
翻译产物	<u>L A G L F V M V L I L F L G A S M</u>	190
cDNA	GGTCTACCTG ATCCGGGTGG CACGGAGGAA CCAGGAGCOT GCCCTGCGCA	1000
翻译产物	<u>V Y L I R V A R R N Q E R A L R T</u>	207
cDNA	CCGTCTGGAG CTCGGGAGAT GACAAGGAGC AGCTGGTGAA GAACACATAT	1050
翻译产物	V W S S G D D K E Q L V K N T Y	223
cDNA	GTCCTGTGAC CGCCCTGTGC CCAAGAGGAC TGGGGAAGGG AGGGGAGACT	1100
翻译产物	V L *	225

图 4F


```

cDNA      ATGTGTGAGC TTTTTTAAA TAGAGGGATT GACTCGGATT TGAGTGATCA 1150
cDNA      TTAGGGCTGA GGTCTGTTT TCTGGGAGGT AGGACGGCTG CTCCTGGTC 1200
cDNA      TGGCAGGGAT GGGTTTGCTT TGGAAATCCT CTAGGAGGCT CCTCCTCGCA 1250
cDNA      TGGCCTGCAG TCTGGCAGCA GCCCCGAGTT GTTTCCTCGC TGATCGATTT 1300
cDNA      CTTTCCTCCA GGTAGAGTTT TCITTGCTTA TGTIGAATTC CATTGCCTCC 1350
cDNA      TTTTCTCNAT CACAGAAGTG ATGTTGGAAT CGTTTCTTTT GTTTGTCTGA 1400
cDNA      TTTATGGTTT TTTTAAGTAT AAACAAAAGT TTTTATTAG CATTCTGAAA 1450
cDNA      GAAGGAAAGT AAAATGTACA AGTTAATAA AAAGGGGCCT TCCCCTTAG 1500
cDNA      AATAAATTC  CAGCATGTTG CTTTCAAAA AAAAAAAAAA AAAA      1550

```

图 4F (续)

EST 共有序列		MLR AEADGVSRL	GSLLLSGVLA	-1
PCR 克隆		MAQLCGL RRSRAFLALL	GSLLLSGVLA	-1
λcDNA 克隆		MAQLCGL RRSRAFLALL	GSLLLSGVLA	-1
EST 共有序列	ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYN	VTDGSCQLFV	YGGCDGNSNN	50
PCR 克隆	ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYN	VTDGSCQLFV	YGGCDGNSNN	50
λcDNA 克隆	ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYN	VTDGSCQLFV	YGGCDGNSNN	50
EST 共有序列	YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
PCR 克隆	YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
λcDNA 克隆	YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
EST 共有序列	NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
PCR 克隆	NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
λcDNA 克隆	NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
EST 共有序列	ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK <u>VVVLAGLFVM</u>	<u>VLILELGASM</u>	<u>VYLIRVARRN</u>	200
PCR 克隆	ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK <u>VVVLAGLFVM</u>	<u>VLILELGASM</u>	<u>VYLIRVARRN</u>	200
λcDNA 克隆	ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK <u>VVVLAGLFVM</u>	<u>VLILELGASM</u>	<u>VYLIRVARRN</u>	200
EST 共有序列	QERALRTVWS SGDDKEQLVK	NTYVL		225
PCR 克隆	QERALRTVWS	FGD		213
λcDNA 克隆	QERALRTVWS SGDDKEQLVK	NTYVL		225

4G

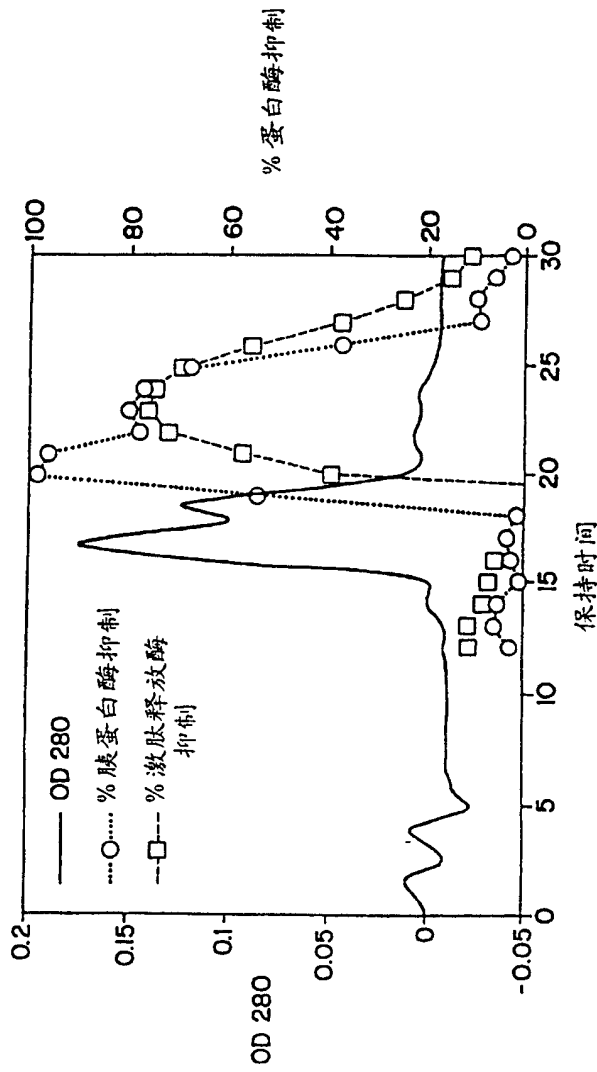


图 5

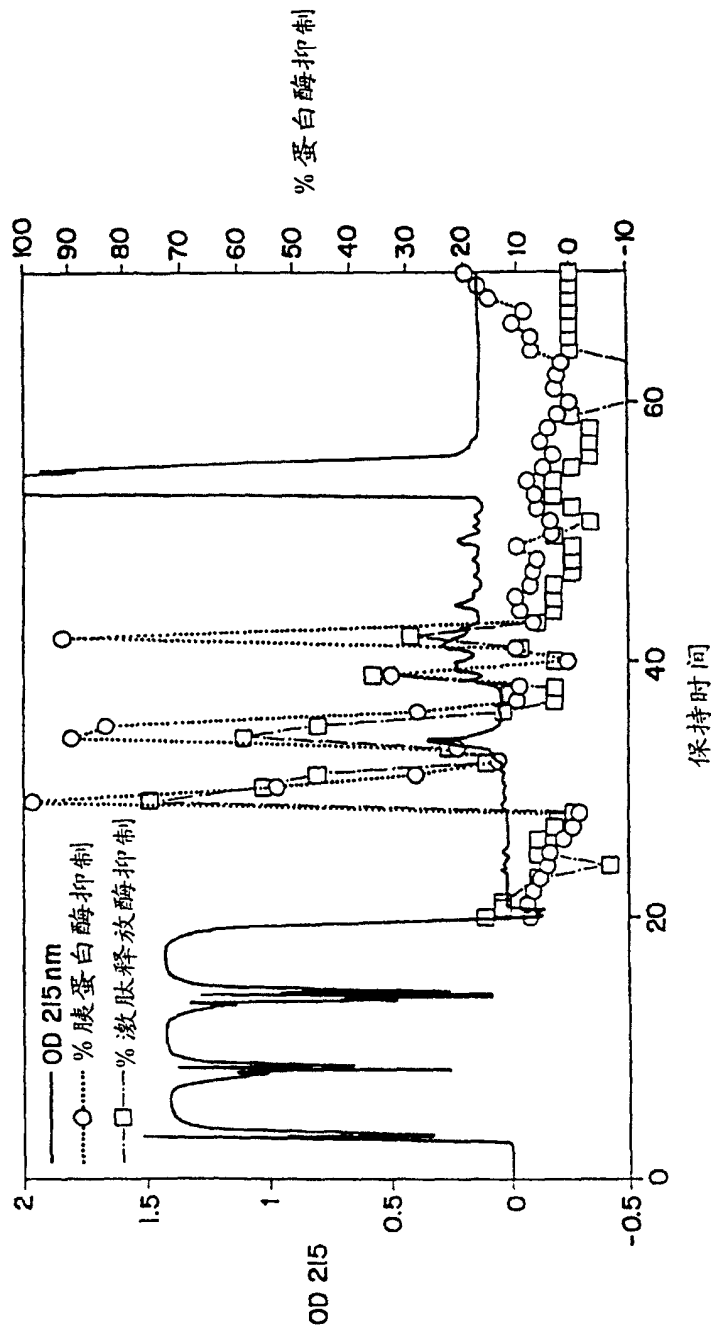


图 6

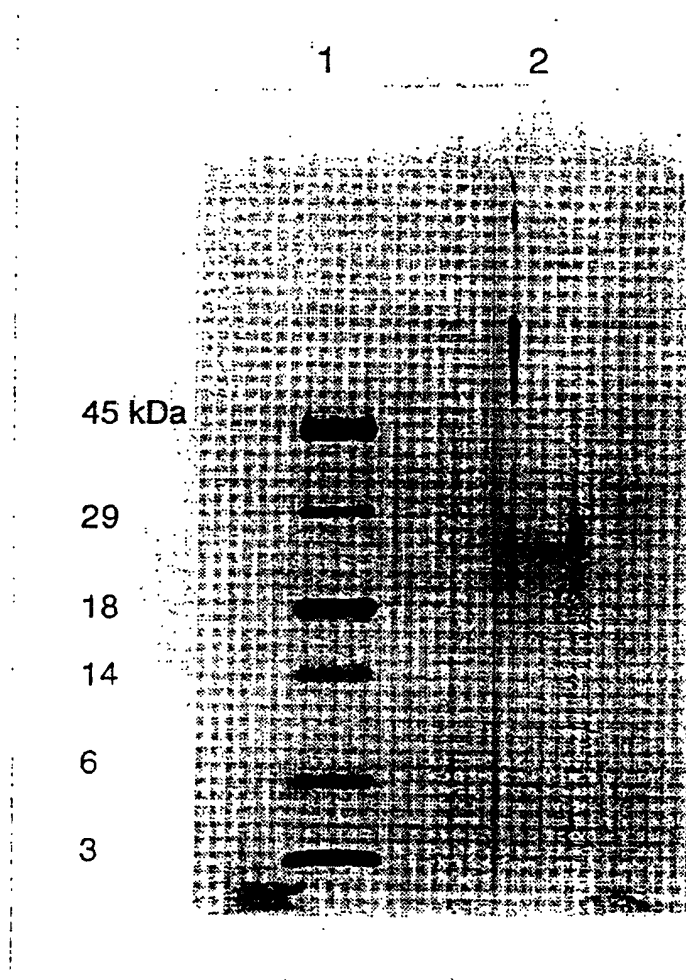


图 7

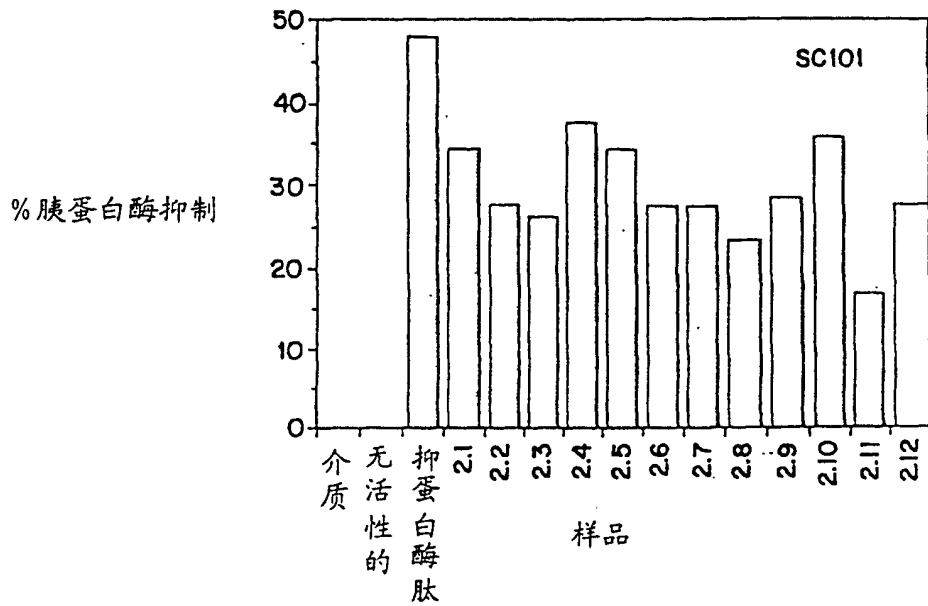


图 8A

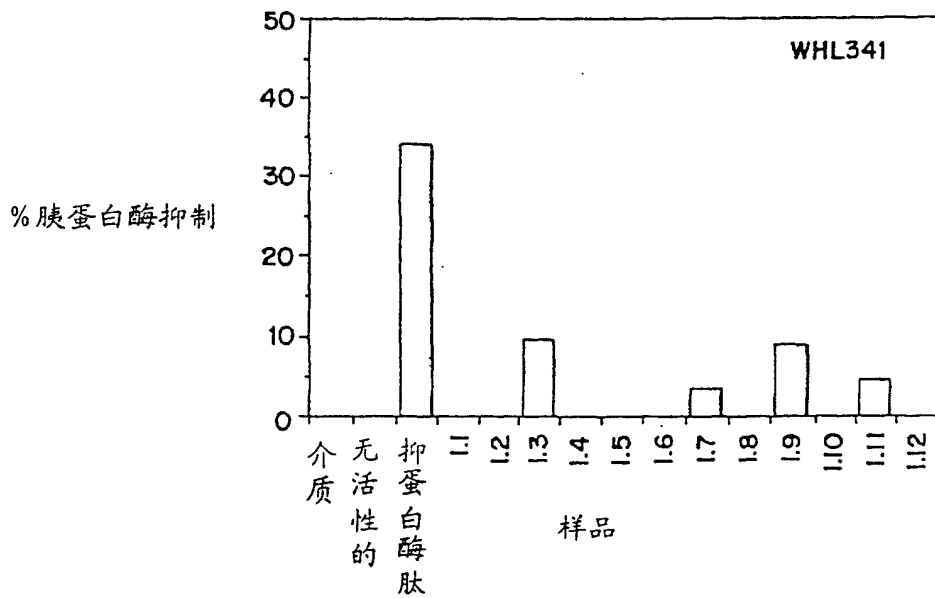
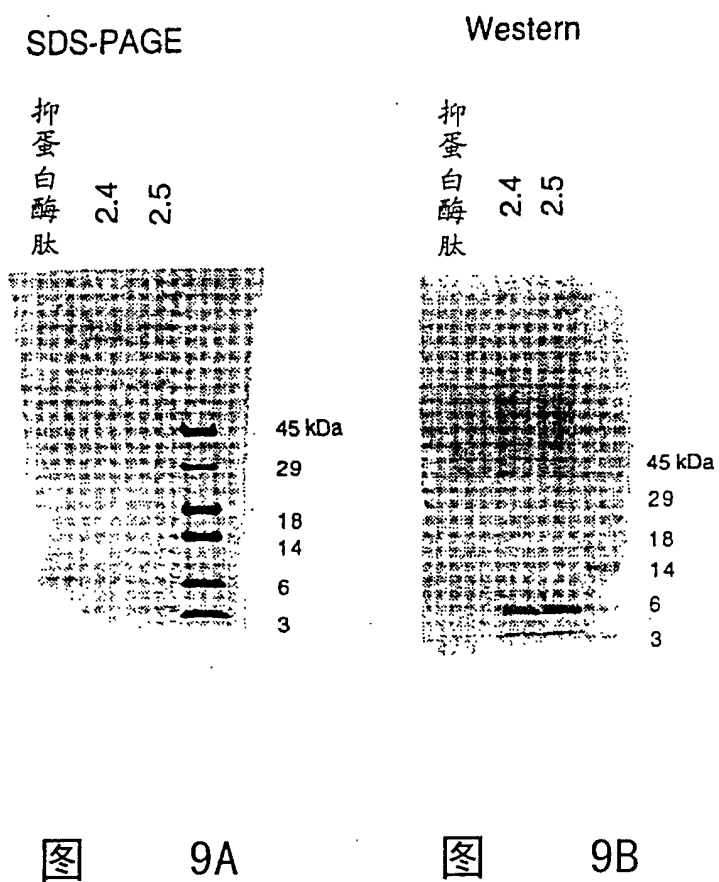


图 8B



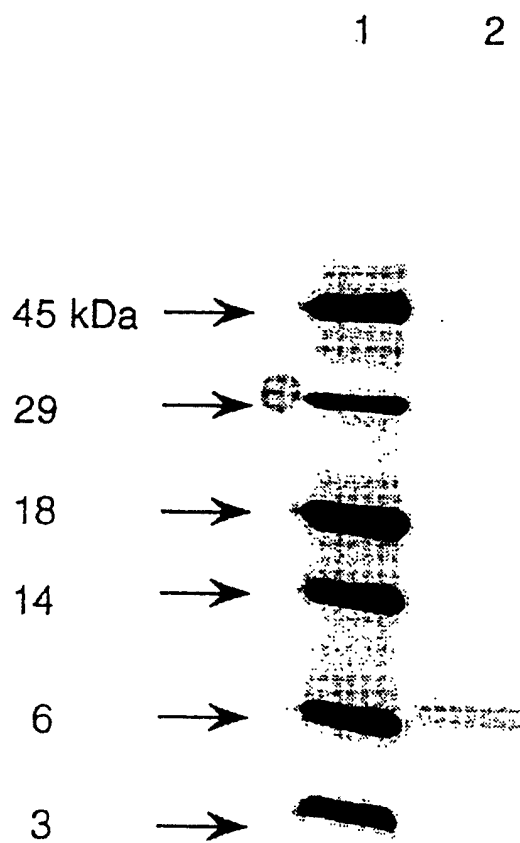


图 10

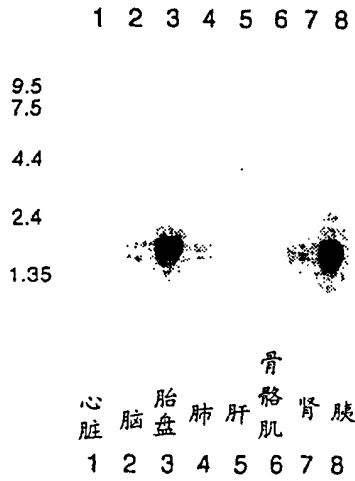


图 11A

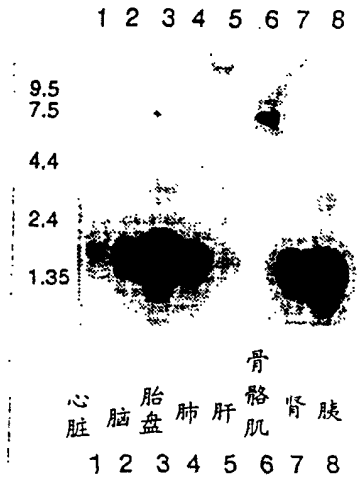


图 11B

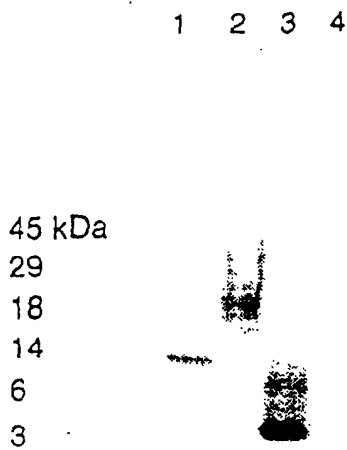


图 12A

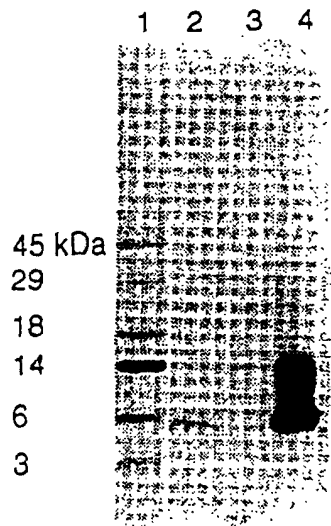


图 12B

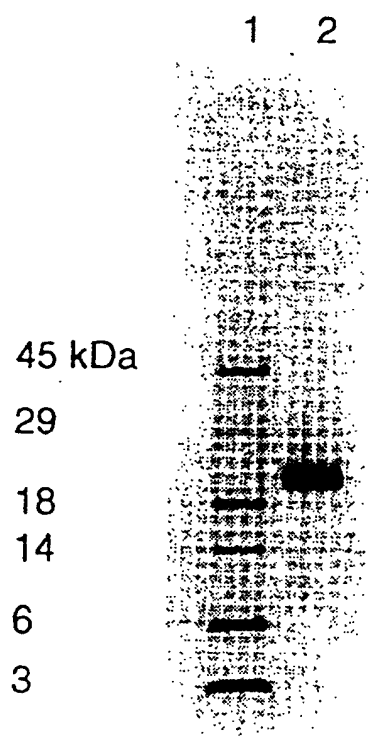


图 13

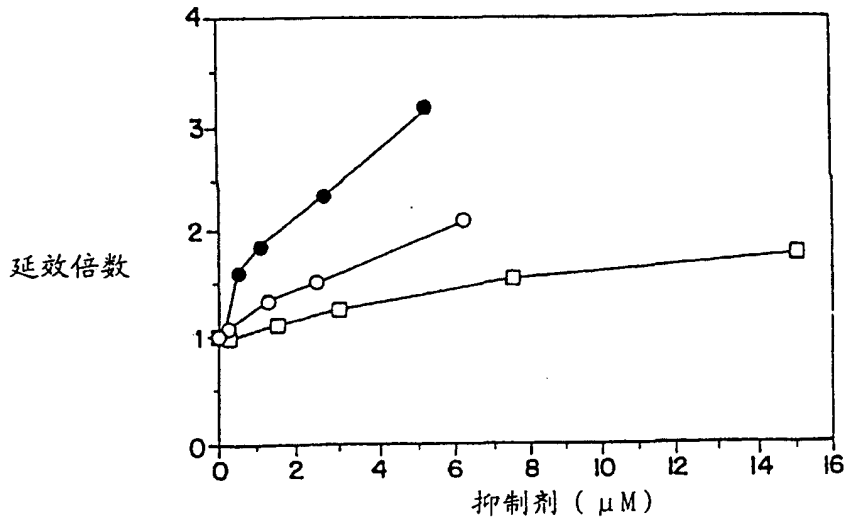


图 14

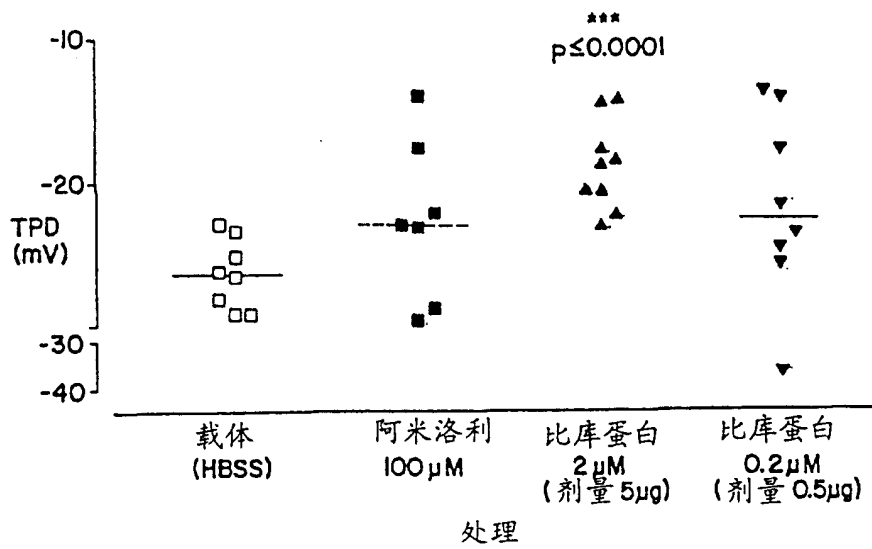
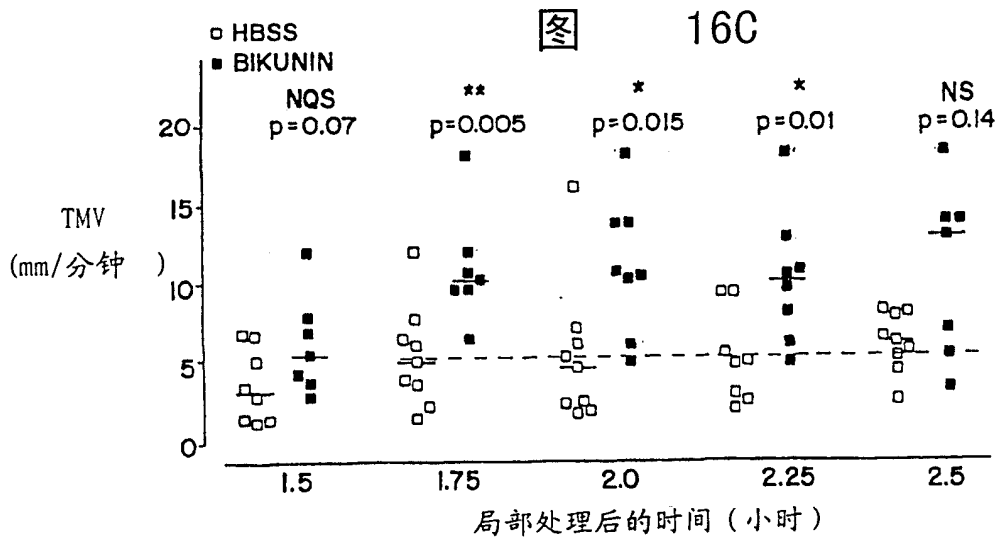
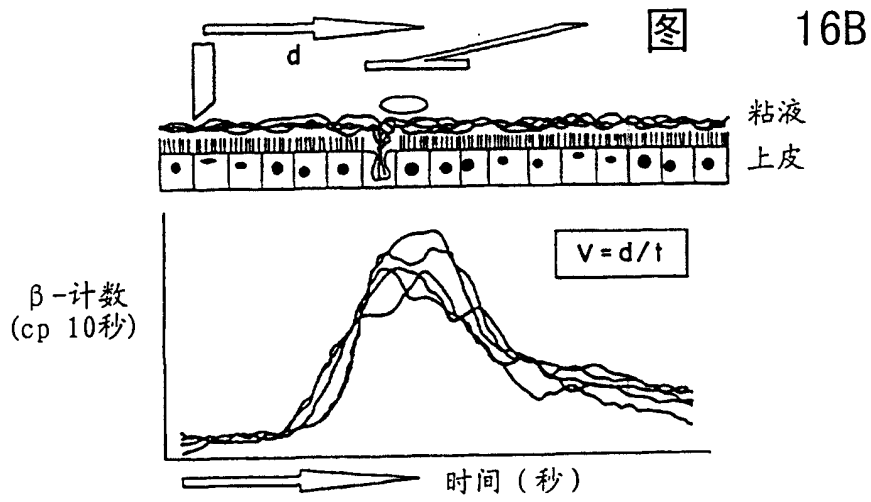
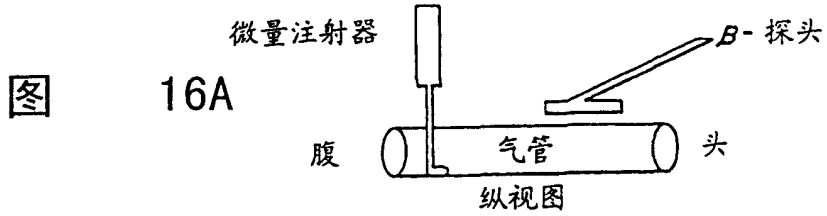


图 15



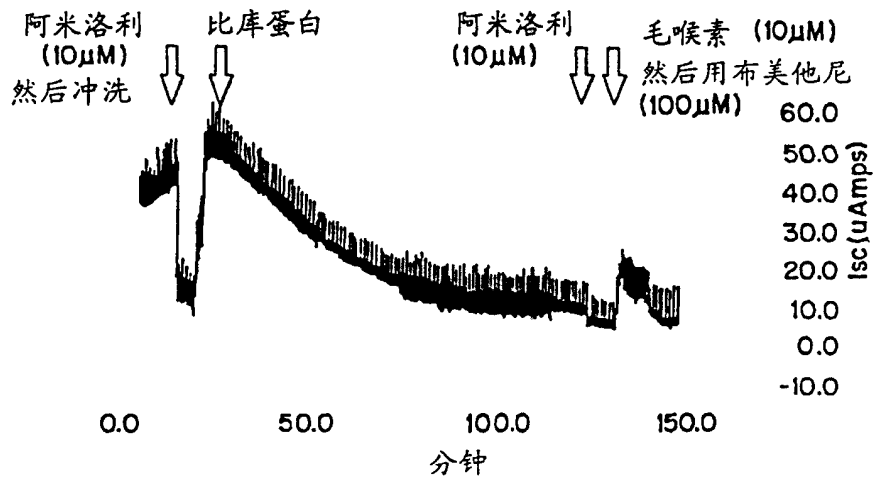


图 17

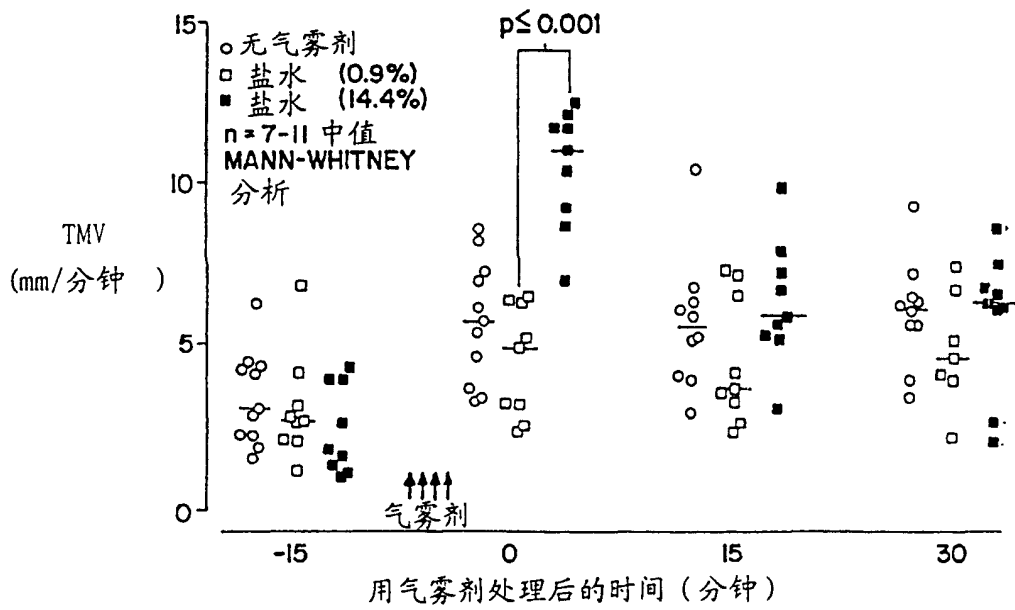


图 18

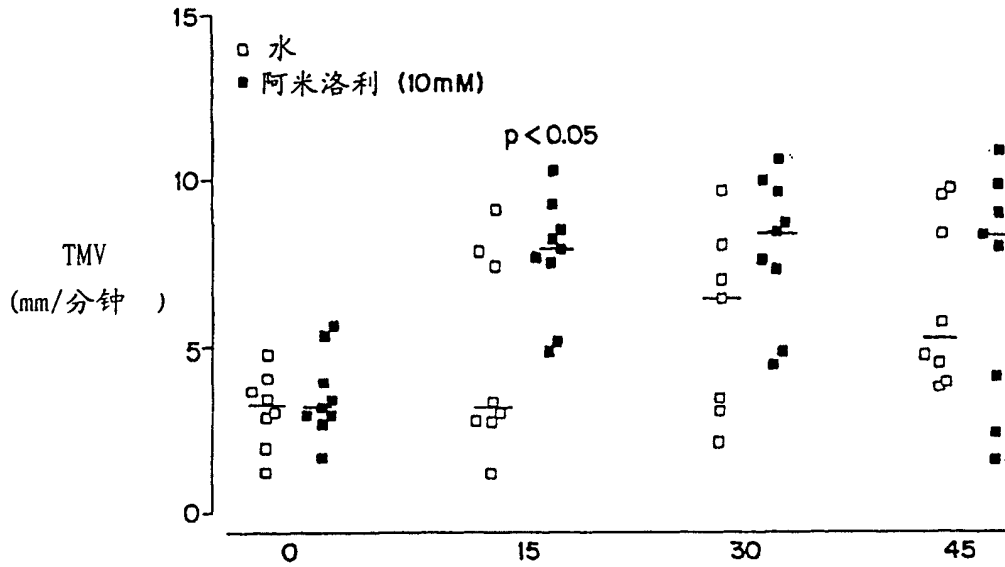


图 19

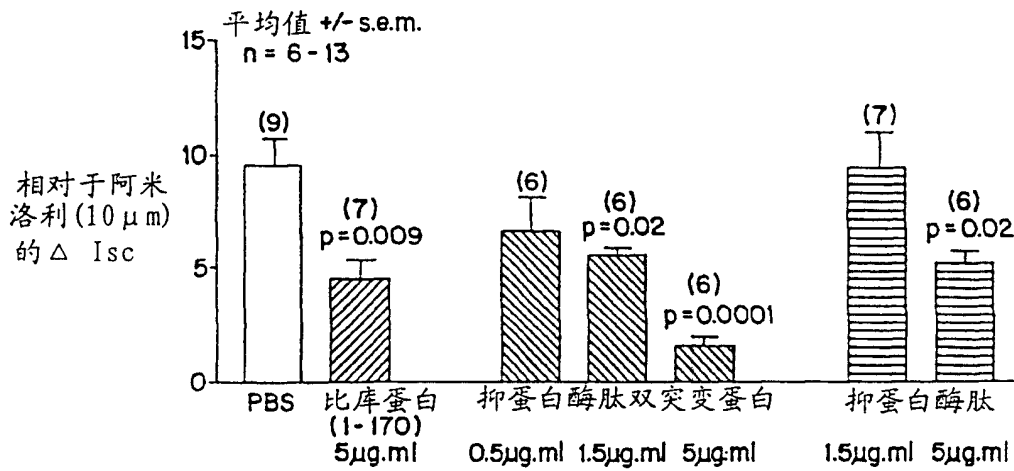


图 20

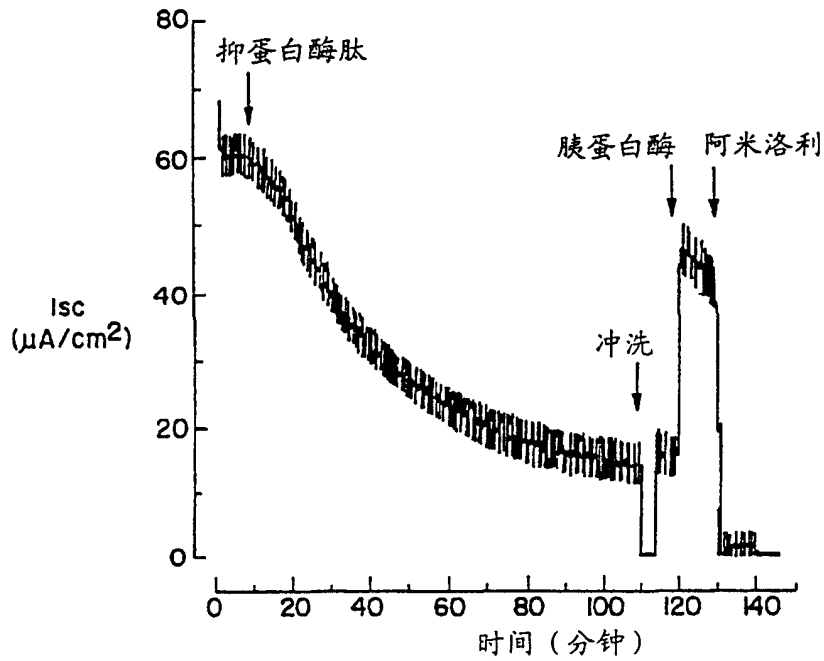


图 21

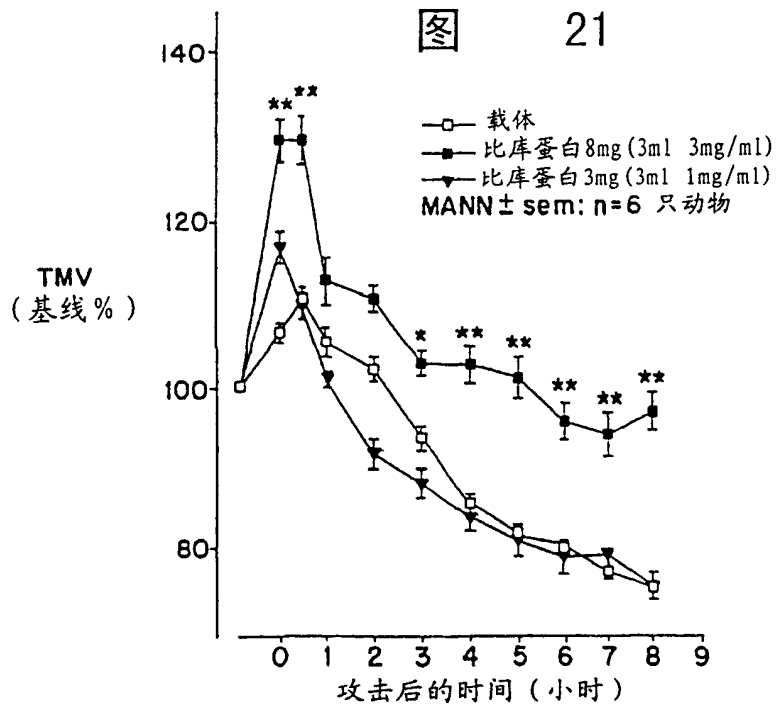


图 22

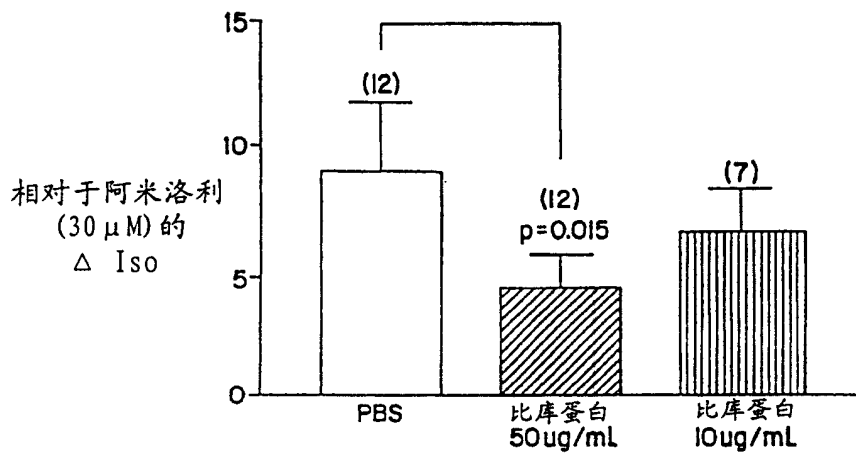


图 23

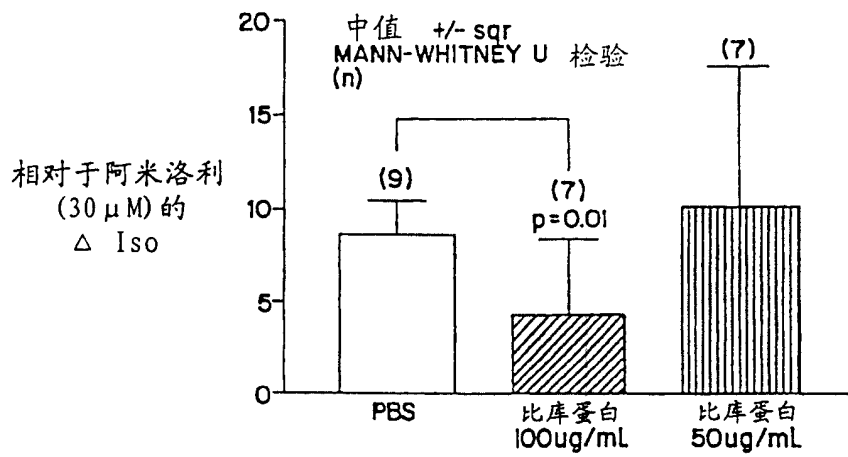


图 24

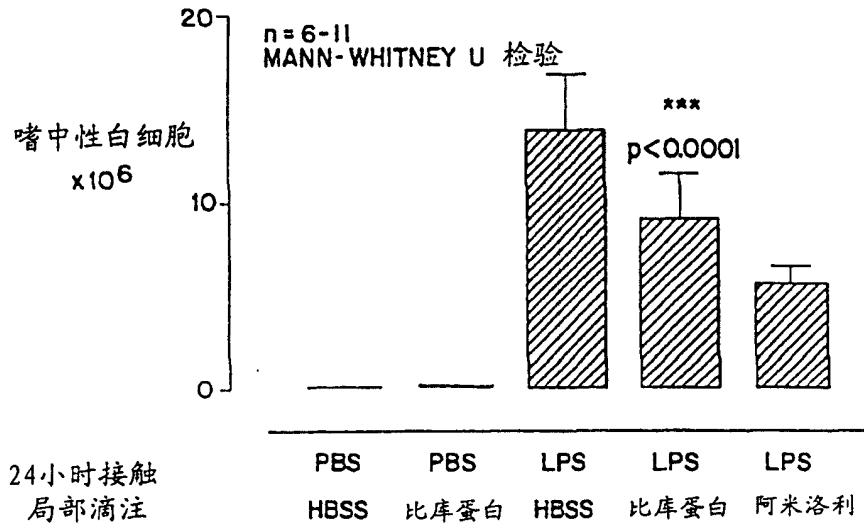


图 25A

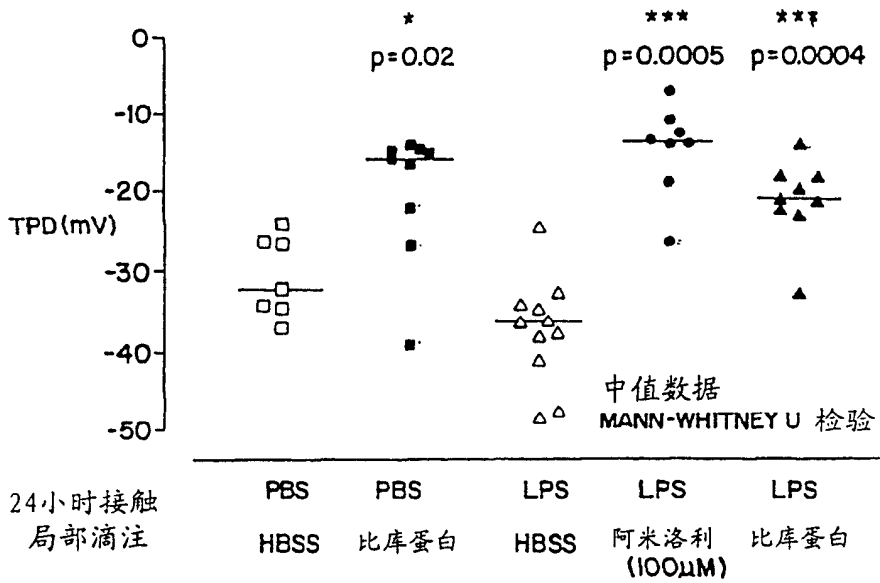


图 25B

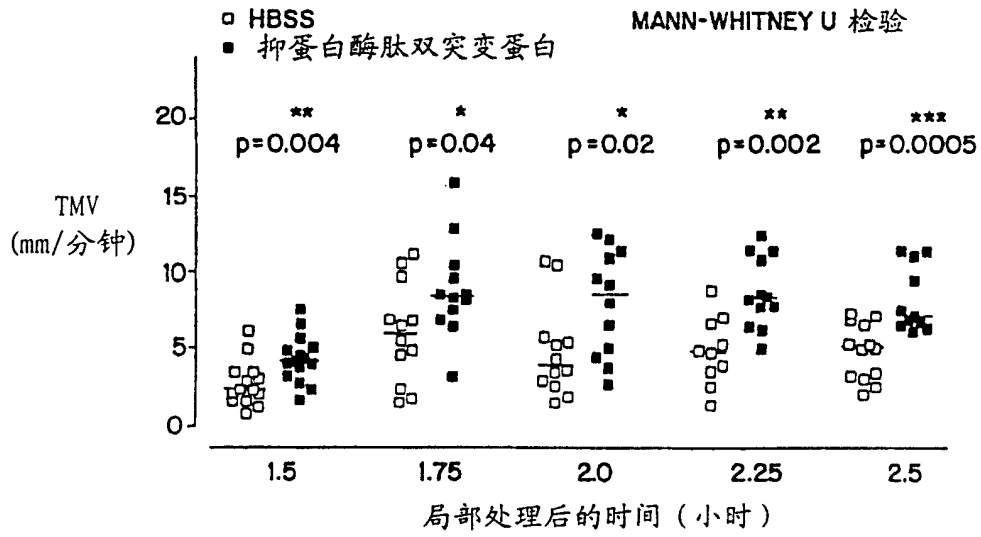


图 26

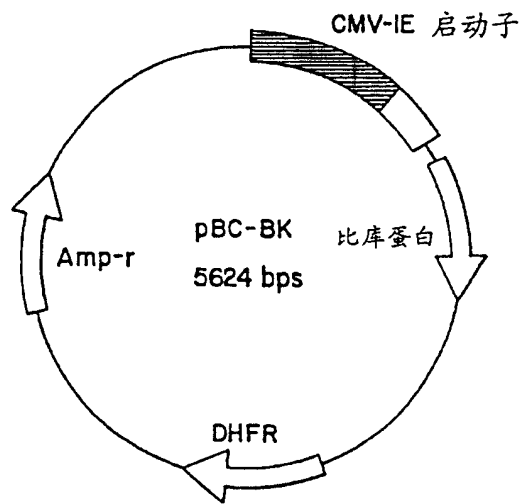


图 27

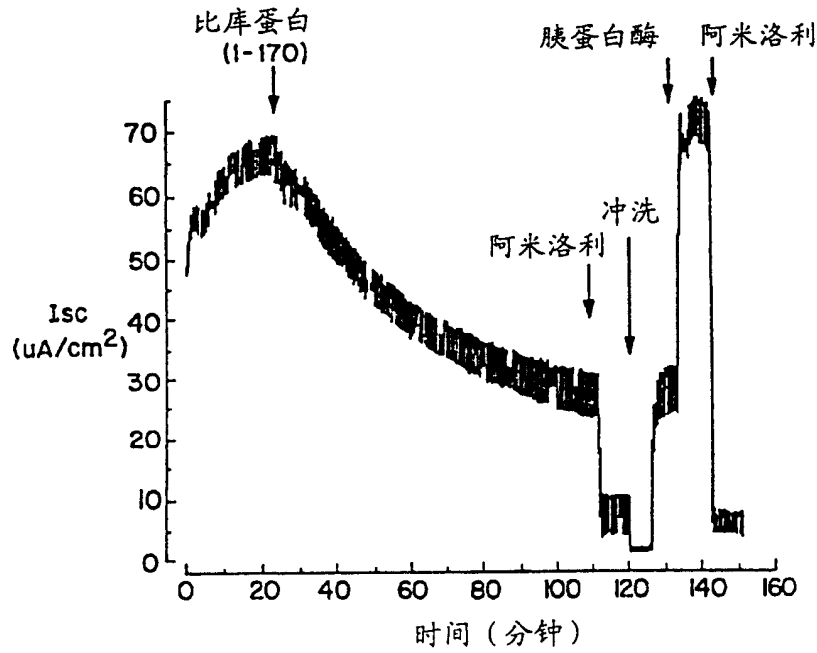


图 28A

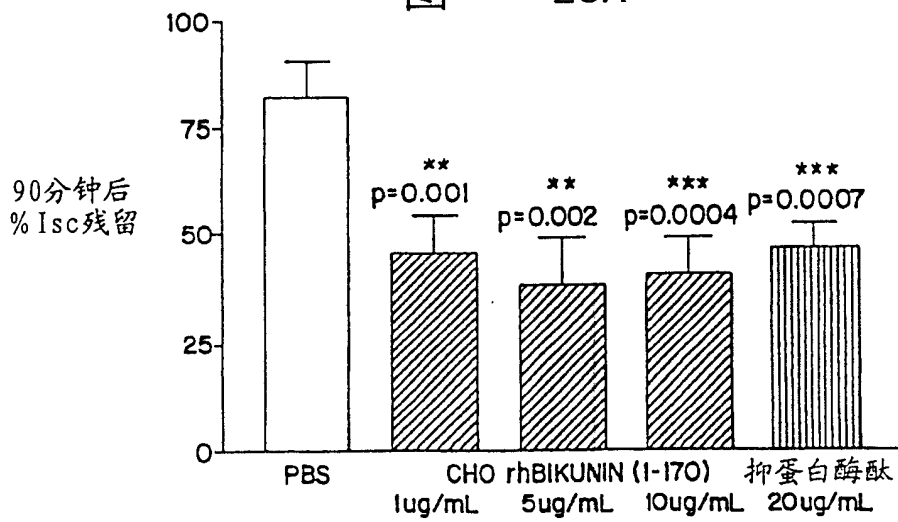


图 28B

纯化加工顺序的流程图

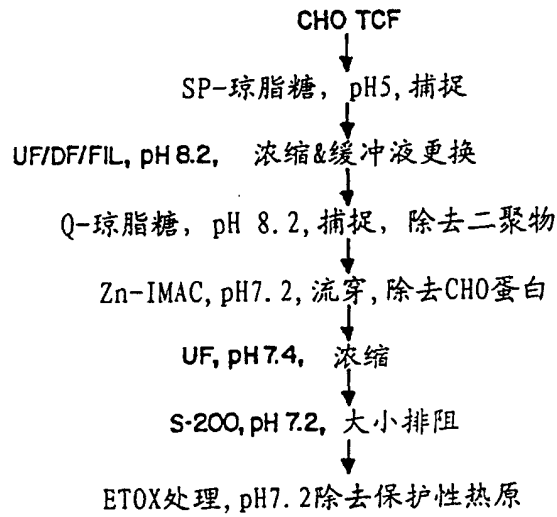


图 29

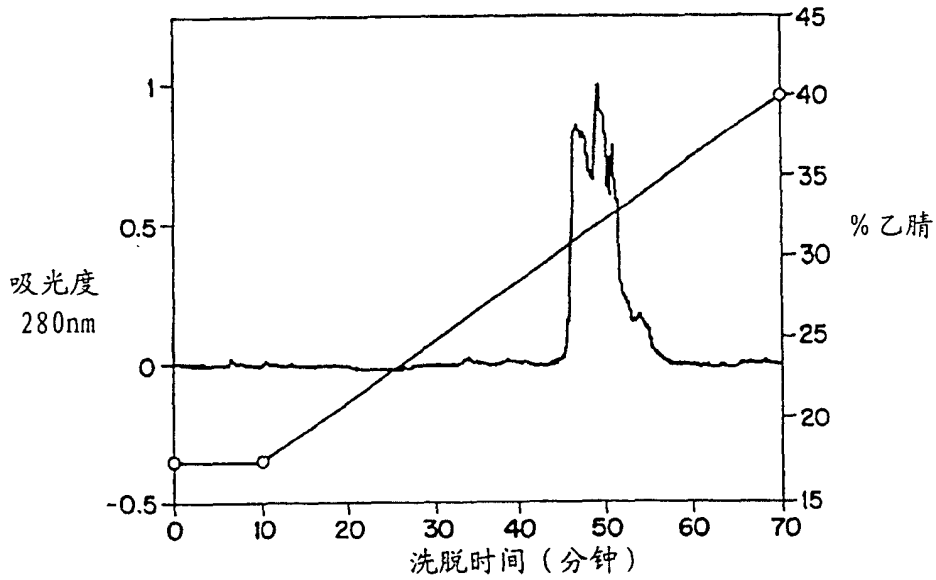
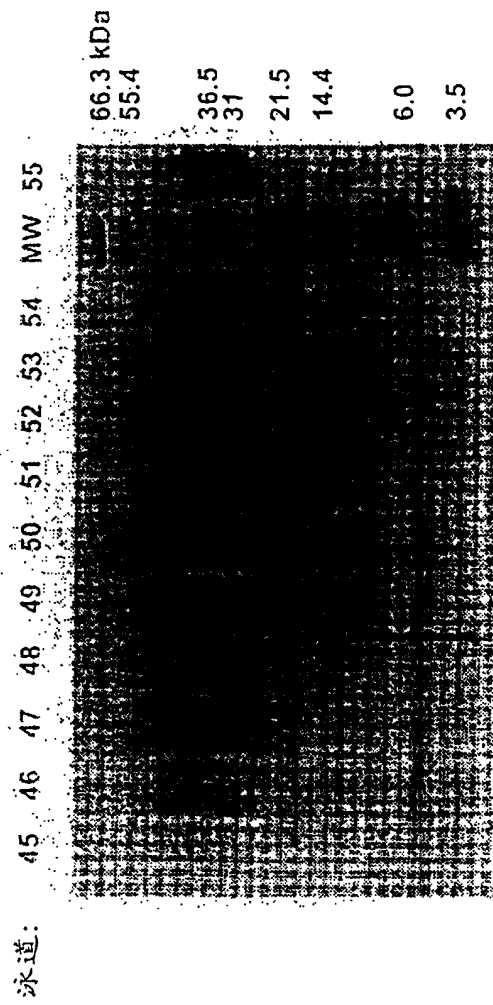



图 30A



 30B

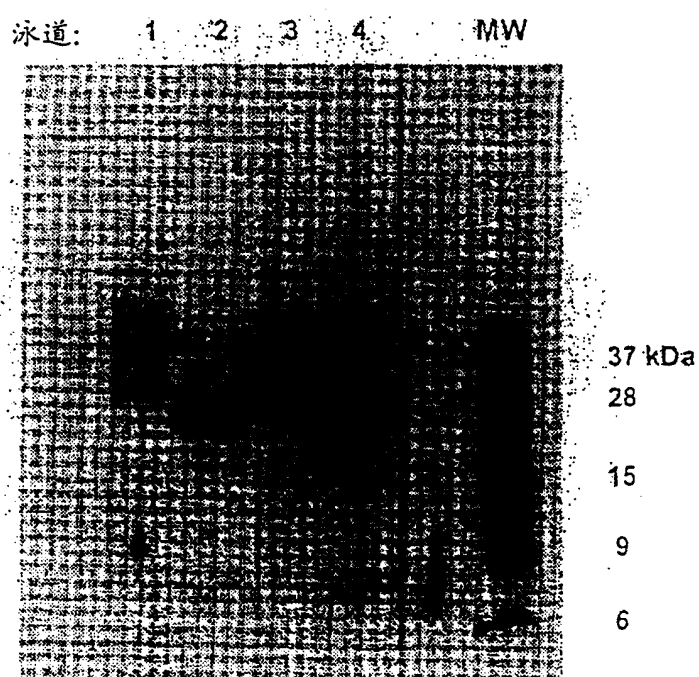


图 31