



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109890404 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201780066838.2

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

(22)申请日 2017.09.01

务所(普通合伙) 11277

(30)优先权数据

代理人 刘新宇 李茂家

2016-172149 2016.09.02 JP

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/7088(2006.01)

2019.04.26

A61K 35/76(2015.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 48/00(2006.01)

PCT/JP2017/031579 2017.09.01

A61P 27/02(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

C12N 15/09(2006.01)

W02018/043707 JA 2018.03.08

C07K 14/195(2006.01)

(71)申请人 学校法人庆应义塾

C07K 14/705(2006.01)

地址 日本东京都

C07K 19/00(2006.01)

申请人 国立大学法人名古屋工业大学

(72)发明人 栗原俊英 坚田侑作 国见洋光

权利要求书1页 说明书9页

坪田一男 神取秀树

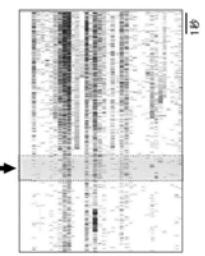
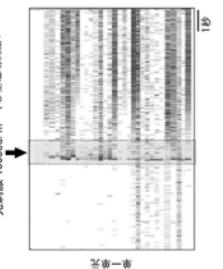
序列表9页 附图3页

(54)发明名称

视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂

(57)摘要

提供具有优异的视觉功能的再生功能的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂。本发明的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂含有嵌合蛋白作为有效成分,所述嵌合蛋白具有微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列和动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质的氨基酸序列。嵌合蛋白优选为微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列中的、细胞质侧的第2环路和/或细胞质侧的第3环路的氨基酸序列被置换为G蛋白偶联型受体视紫红质的细胞质侧的第2环路和/或细胞质侧的第3环路的氨基酸序列的蛋白。



1. 一种视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂, 其含有嵌合蛋白作为有效成分, 所述嵌合蛋白具有微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列和动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂, 其中, 所述嵌合蛋白是微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列中的、细胞质侧的第2环路和/或细胞质侧的第3环路的氨基酸序列被置换为G蛋白偶联型受体视紫红质的细胞质侧的第2环路和/或细胞质侧的第3环路的氨基酸序列的蛋白。

3. 根据权利要求1或2所述的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂, 其中, 所述微生物来源的离子转运型受体视紫红质为属于粘杆菌 (Gloeobacter) 属的微生物来源的视紫红质, 且所述G蛋白偶联型受体视紫红质为牛或人来源的视紫红质。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂, 其中, 所述嵌合蛋白具有以下的(a)~(d)的任一项所述的DNA所编码的氨基酸序列,

(a) 具有编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列的DNA;

(b) 具有和与编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列互补的碱基序列在严格的条件下能够杂交的碱基序列的DNA;

(c) 具有编码在序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列中置换、缺失和/或添加了1个或多个的氨基酸的氨基酸序列的碱基序列、且具有视觉功能再生功能或视觉功能降低预防功能的DNA;

(d) 由编码与序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列具有90%以上的同源性的氨基酸序列的碱基序列组成、且具有视觉功能再生功能或视觉功能降低预防功能的DNA。

5. 一种视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂, 其含有嵌入了编码权利要求1~4的任一项所述的嵌合蛋白的氨基酸序列的DNA的表达载体作为有效成分。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂, 其用于色素性视网膜炎的治疗或预防。

7. 一种腺相关病毒 (AAV) 载体或慢病毒载体, 其插入了嵌合蛋白的序列, 所述嵌合蛋白具有微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列和动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质的氨基酸序列。

8. 一种腺相关病毒 (AAV) 载体或慢病毒载体在制造视觉功能再生或视觉功能降低预防的药物中的应用, 其中, 所述腺相关病毒 (AAV) 载体或慢病毒载体插入了嵌合蛋白的序列, 所述嵌合蛋白具有微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列和动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质的氨基酸序列。

## 视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂。

### 背景技术

[0002] 视紫红质是在人和动物的视网膜中具有7次跨膜型结构 (seven transmembrane structure) 的光敏性的受体,已知还有源自微生物的离子通道型、离子泵型的视紫红质。

[0003] 例如,非专利文献1中公开了作为离子通道型的视紫红质的通道视紫红质2 (ChR2)。另外,非专利文献2中报道了,通过将突变型通道视紫红质导入视网膜神经节细胞中,而在小鼠/大鼠中再生了一定的视觉功能。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献1:Bi et al., “Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration.” *Neuron*. 2006;50 (1) :23-33

[0007] 非专利文献2:Tomita et al., “Restoration of the Majority of the Visual Spectrum by Using Modified Volvox Channelrhodopsin-1”, *Molecular Therapy* (2014) ;22 8,1434-1440

### 发明内容

[0008] 发明要解决的问题

[0009] 然而,离子通道型视紫红质的视觉功能的再生效果并不充分,存在改善的余地。

[0010] 本发明是鉴于以上的实际情况而完成的,目的在于提供具有优异的视觉功能的再生功能的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂。

[0011] 用于解决问题的方案

[0012] 本发明人等发现:融合了源自微生物的离子转运视紫红质和动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质这两种完全不同的视紫红质而成的嵌合蛋白实际上具有优异的视觉功能的再生功能,以至完成了本发明。更具体而言,本发明由以下的特征构成。

[0013] (1)一种视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂,其含有嵌合蛋白作为有效成分,所述嵌合蛋白具有微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列和动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质的氨基酸序列。

[0014] (2)根据(1)所述的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂,其中,前述嵌合蛋白是微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列中的、细胞质侧的第2环路和/或细胞质侧的第3环路的氨基酸序列被置换为G蛋白偶联型受体视紫红质的细胞质侧的第2环路和/或细胞质侧的第3环路的氨基酸序列的蛋白。

[0015] (3)根据(1)或(2)所述的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂,其中,前述微生物来源的离子转运型受体视紫红质为属于粘杆菌 (Gloeobacter) 属的微生物来源的视紫红

质,且前述G蛋白偶联型受体视紫红质为牛或人来源的视紫红质。

[0016] (4)根据(1)~(3)中任一项所述的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂,其中,前述嵌合蛋白具有以下的(a)~(d)的任一项所述的DNA所编码的氨基酸序列,

[0017] (a)具有编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列的DNA

[0018] (b)具有和与编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列互补的碱基序列在严格的条件下能够杂交的碱基序列的DNA

[0019] (c)具有编码在序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列中置换、缺失和/或添加了1个或多个的氨基酸的氨基酸序列的碱基序列、且具有视觉功能再生功能或视觉功能降低预防功能的DNA

[0020] (d)由编码与序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列具有90%以上的同源性的氨基酸序列的碱基序列组成、且具有视觉功能再生功能或视觉功能降低预防功能的DNA。

[0021] (5)一种视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂,其含有嵌入了编码(1)~(4)的任一项所述的嵌合蛋白的氨基酸序列的DNA的表达载体作为有效成分。

[0022] (6)根据(1)~(5)中任一项所述的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂,其用于色素性视网膜炎的治疗或预防。

[0023] (7)一种腺相关病毒(AAV)载体或慢病毒载体,其插入了嵌合蛋白的序列,所述嵌合蛋白具有微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列和动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质的氨基酸序列。

[0024] (8)一种腺相关病毒(AAV)载体或慢病毒载体在制造视觉功能再生或视觉功能降低预防的药物中的应用,其中,所述腺相关病毒(AAV)载体或慢病毒载体插入了嵌合蛋白的序列,所述嵌合蛋白具有微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列和动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质的氨基酸序列。

[0025] 发明的效果

[0026] 根据本发明,能够发挥优异的视觉功能的再生功能。

## 附图说明

[0027] 图1是利用荧光显微镜观察玻璃体内注射了AAV2-CAGGS-EGFP-WPRE-pA的野生型小鼠的视网膜的图像。

[0028] 图2的(a)是对于作为对照的色素性视网膜炎模型(rd1)小鼠,通过多电极阵列(MEA)进行了视网膜神经节细胞的细胞外电位记录的结果的图。图2的(b)是对于注射了AAV2-CAGGS-GR/BvRh-WPRE-pA的色素性视网膜炎模型(rd1)小鼠,通过MEA进行了视网膜神经节细胞的细胞外电位记录的结果的图。

[0029] 图3的(a)是示出对于对照的色素性视网膜炎模型(rd1)小鼠,通过多电极阵列(MEA)进行了视网膜神经节细胞的细胞外电位记录的结果的图;及、图3的(b)是示出对于注射了AAV2-CAGGS-GR/BvRh-WPRE-pA的色素性视网膜炎模型(rd1)小鼠,通过多电极阵列(MEA)进行了视网膜神经节细胞的细胞外电位记录的结果的图。图3的上半部分是用光栅图显示10次视网膜神经节细胞的发射的图,图3的下半部分是在纵轴每1秒的发射频率的直方图。

## 具体实施方式

[0030] 以下对本发明的具体的实施方式进行详细地说明,但本发明不受以下的实施方式任何限定,可以在本发明的目的的范围内进行适宜变更地实施。需要说明的是,对于重复说明的部分,有时适宜省略说明,但不用于限定发明的主旨。

[0031] <视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂>

[0032] 本发明的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂含有嵌合蛋白作为有效成分,所述嵌合蛋白具有微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列和动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质的氨基酸序列。

[0033] 视紫红质在内部具有视黄醛(retinal)这样的色素,使其通过接受光而激活并将视觉信号传递至脑。由于微生物来源的离子转运型受体视紫红质即使照射光视黄醛也不会脱落,因此通过能够吸收光而重复活化,但不能像动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质那样激活G蛋白。相对于此,根据本发明,推测出:通过使动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质与能够重复使用的微生物来源的离子转运型受体视紫红质融合,从而保持微生物来源的离子转运型受体离子通道型受体视紫红质所具有的重复活化功能,且能够得到借由基于G蛋白偶联型受体的内源性的G蛋白的高的活性,可以得到优异的视觉再生效果。由此,本发明人等实际发现:微生物来源的视紫红质与动物来源的G蛋白偶联型受体是功能完全不同的类型的受体,组合这2种受体的嵌合蛋白具有优异的视觉功能的再生功能。另外,如上所述,由于得到高的活性的同时能够重复活化,因此还可以期待视觉功能的降低的预防效果(例如,抑制色素性视网膜炎等视网膜疾病的加剧)。

[0034] 作为离子转运型受体视紫红质,可列举出:离子泵型受体视紫红质、离子通道型受体视紫红质。

[0035] 本发明的嵌合蛋白是微生物来源的离子转运型受体视紫红质与G蛋白偶联型受体视紫红质的嵌合蛋白,具有7次跨膜型结构。本发明中,微生物来源的离子转运型受体视紫红质与G蛋白偶联型受体视紫红质的嵌合蛋白优选被设计为:以高水平具有微生物来源的离子转运型受体视紫红质的重复活化的功能和基于G蛋白偶联型受体视紫红质的G蛋白活性这两者。从该观点出发,由于以高水平维持两者的活性、特别是发挥高的视觉功能再生功能,因此本发明的嵌合蛋白优选为微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列中的、细胞质侧的第2环路和/或细胞质侧的第3环路的氨基酸序列被置换为G蛋白偶联型受体视紫红质的细胞质侧的第2环路和/或细胞质侧的第3环路的氨基酸序列的蛋白。需要说明的是,“细胞质侧的第2环路”、“细胞质侧的第3环路”分别是指位于7个环路中的从N末端侧起第2位、从N末端侧起第3位的环路。

[0036] 作为微生物来源的离子转运型受体视紫红质,例如可列举出:粘杆菌(Gloeobacter)属等真细菌、团藻(Volvox)属、衣藻(Chlamydomonas)属、黄藻(Guillardia)属等属于真核生物等的微生物来源的视紫红质。作为粘杆菌(Gloeobacter)属,可列举出:紫色粘杆菌(Gloeobacter violaceus)等。作为团藻(Volvox)属,可列举出团藻(Volvox carteri)等。作为衣藻(Chlamydomonas)属,可列举出莱茵衣藻(Chlamydomonas reinhardtii)等。作为黄藻(Guillardia)属,可列举出蓝隐藻(Guillardia theta)等。为了得到更高的视觉再生/预防效果,可以认为重要的是与G蛋白活化环路的立体结构的相容性和膜转移效率,但微生物来源的离子转运型受体视紫红质尤其与G蛋白活化环路的立体结

构的相容性和膜转移效率良好,因此优选为粘杆菌 (Gloeobacter) 属。特别是,属于粘杆菌 (Gloeobacter) 属的微生物中,优选紫色粘杆菌。另外,属于粘杆菌属的微生物优选与动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质中的、牛或人来源的G蛋白偶联型受体视紫红质组合而融合。另外,粘杆菌 (Gloeobacter) 属具有在作为真细菌的大肠杆菌及作为真核生物的人的细胞中均可表达这样重要的性质,在这方面也是优选的。

[0037] 作为动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质,例如可列举出:牛、人、小鼠、大鼠、猫、狗、猪、羊、马等来源的视紫红质。其中,特别优选牛或人来源的视紫红质。

[0038] 更具体而言,嵌合蛋白优选具有以下的(a)~(d)的任一项所述的DNA所编码的氨基酸序列。

[0039] (a) 具有编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列的DNA

[0040] (b) 具有和与编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列互补的碱基序列在严格的条件下能够杂交的碱基序列的DNA

[0041] (c) 具有编码在序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列中置换、缺失和/或添加了1个或多个的氨基酸的氨基酸序列的碱基序列、且具有视觉功能再生功能或视觉功能降低预防功能的DNA

[0042] (d) 由编码与序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列具有90%以上的同源性的氨基酸序列的碱基序列组成、且具有视觉功能再生功能或视觉功能降低预防功能的DNA。

[0043] 作为上述的G蛋白偶联型受体视紫红质的细胞质侧的第2环路,优选具有以下的(e)~(h)所述的DNA所编码的氨基酸序列。

[0044] (e) 具有编码序列号5或6所述的氨基酸序列的碱基序列的DNA

[0045] (f) 具有和与编码序列号5或6所述的氨基酸序列的碱基序列互补的碱基序列在严格的条件下能够杂交的碱基序列的DNA

[0046] (g) 具有编码在序列号5或6所述的氨基酸序列中置换、缺失和/或添加了1个或多个的氨基酸的氨基酸序列的碱基序列的DNA

[0047] (h) 由编码与序列号5或6所述的氨基酸序列具有90%以上的同源性的氨基酸序列的碱基序列组成的DNA。

[0048] 作为上述的G蛋白偶联型受体视紫红质的细胞质侧的第3环路,优选具有以下的(i)~(l)所述的DNA所编码的氨基酸序列。

[0049] (i) 具有编码序列号7所述的氨基酸序列的碱基序列的DNA

[0050] (j) 具有和与编码序列号7所述的氨基酸序列的碱基序列互补的碱基序列在严格的条件下能够杂交的碱基序列的DNA

[0051] (k) 具有编码在序列号7所述的氨基酸序列中置换、缺失和/或添加了1个或多个的氨基酸的氨基酸序列的碱基序列的DNA

[0052] (l) 由编码与序列号7所述的氨基酸序列具有90%以上的同源性的氨基酸序列的碱基序列组成的DNA。

[0053] 编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列为编码本发明的嵌合蛋白的碱基序列的优选序列。编码该序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列具有视觉功能再生功能或视觉功能降低预防功能。需要说明的是,本说明书中,“碱基序列具有视觉功能再生功能或视觉功能降低预防功能”是指:碱基序列所编码的多肽具有视觉功能

再生功能或视觉功能降低预防功能。另外,具有编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列的DNA中还包括:具有视觉功能再生功能或视觉功能降低预防功能的各种突变体、同系物(homologs)。具有编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列的DNA的突变体、同系物中,包括例如:具有和编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列在严格的条件下能够杂交的碱基序列的DNA。另外,具有编码序列号5~7的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列的DNA的突变体、同系物中包括:具有和编码序列号5~7的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列在严格的条件下能够杂交的碱基序列的DNA。作为“严格的条件”,例如可列举出:在通常的杂交分析缓冲液中、在40~70℃(优选为50~67℃、更优选为60~65℃)下进行反应,在盐浓度15~300mM(优选为15~150mM、更优选为15~60mM、进一步优选为30~50mM)的清洗液中进行清洗的条件。

[0054] 序列号1~4的任一项可以作为本发明的嵌合蛋白的氨基酸序列使用。编码本发明的嵌合蛋白的氨基酸序列的DNA中还包括:具有编码在上述序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列中置换、缺失和/或添加了1个或多个的氨基酸的氨基酸序列的碱基序列的DNA。此处,序列号1~4的任一项中,“1个或多个”通常为50个氨基酸以内,优选为30个氨基酸以内,进一步优选为10个氨基酸以内(例如,5个氨基酸以内、3个氨基酸以内、1个氨基酸)。另外,在序列号5~7的任一项中,“1个或多个”通常为6个氨基酸以内,优选为5个氨基酸以内,进一步优选为4个氨基酸以内(例如,3个氨基酸以内、2个氨基酸以内、1个氨基酸)。在维持嵌合蛋白的视觉功能再生功能或视觉功能降低预防功能的情况下,理想的是:将待突变的氨基酸残基突变为保存有氨基酸侧链的性质的其它氨基酸。例如作为氨基酸侧链的性质,可以列举出:疏水性氨基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、亲水性氨基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、具有脂肪族侧链的氨基酸(G、A、V、L、I、P)、具有含有羟基的侧链的氨基酸(S、T、Y)、具有含有硫原子的侧链的氨基酸(C、M)、具有含有羧酸和酰胺的侧链的氨基酸(D、N、E、Q)、具有含有碱基的侧链的氨基酸(R、K、H)、具有含有芳香族的侧链的氨基酸(H、F、Y、W)(括号内均表示氨基酸的一个字符标记)。需要说明的是,已知的是:具有相对于某氨基酸序列通过1个或多个氨基酸残基缺失、添加和/或置换为其它氨基酸而被修饰的氨基酸序列的蛋白质维持其生物学活性(Mark,D.F. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller,M.J.&Smith,M.Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang,A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland,G. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1982) 79, 6409-6413)。

[0055] 具有编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列的DNA的突变体、同系物中包括:由与编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列具有高的同源性的碱基序列组成的DNA。这样的DNA优选与编码序列号1~4的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列具有90%以上、进一步优选具有95%以上(96%以上、97%以上、98%以上、99%以上)的同源性。另外,具有编码序列号5~7的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列的DNA的突变体、同系物中包括:由与编码序列号5~7的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列具有高的同源性的碱基序列组成的DNA。这样的DNA优选与编码序列号5~7的任一项所述的氨基酸序列的碱基序列具有90%以上、进一步优选具有95%以上(96%以上、97%以上、98%以上、99%以上)的同源性。氨基酸序列、碱基序列的同源性可以通过基于Karlin and Altschul的算法BLAST(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877,1993)来确定。基于该算

法,开发出了被称为BLASTN、BLASTX的程序(Altschul et al.J.Mol.Biol.215:403-410,1990)。基于BLAST并通过BLASTN来解析碱基序列时,参数例如为score(得分)=100、wordlength(字长)=12。另外,基于BLAST并通过BLASTX来解析氨基酸序列时,参数例如为score=50、wordlength=3。使用BLAST和Gapped BLAST程序时,使用各程序的默认参数(default parameter)。这些解析方法的具体的方法是公知的(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.>)。

[0056] 本发明中的“DNA”可以是正义链或反义链(例如,可以用作探针),其形状可以是单链或双链。另外,可以是基因组DNA,还可以是cDNA或被合成的DNA。

[0057] 作为获得本发明的DNA的方法,没有特别限定,可列举出如下方法:通过由mRNA逆转录来获得cDNA的方法(例如,RT-PCR法);由基因组DNA制备的方法;利用化学合成来合成的方法;由基因组DNA文库、cDNA文库分离的方法等公知的方法(例如,参照日本特开平11-29599号公报)。

[0058] 本发明的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂中所使用的嵌合蛋白的制备,例如可以通过使用导入了包含编码前述的嵌合蛋白的DNA的表达载体的转化体来进行。例如,首先,在适宜的条件下培养该转化体,合成该DNA所编码的嵌合蛋白。接着,从转化体或培养液中回收所合成的蛋白,由此能够得到本发明的嵌合蛋白。

[0059] 进行更具体的说明,可以通过将编码上述的嵌合蛋白的DNA插入适合的表达载体中来制作。“适合的载体”只要是在原核生物和/或真核生物的各种宿主内能够保持复制或自体繁殖(self-proliferate)的载体即可,可以根据使用目的进行适宜选择。例如,欲获得大量DNA时可以选择高拷贝数载体,欲获得多肽(嵌合蛋白)时可以选择表达载体。作为其具体例,没有特别限定,例如可列举出日本特开平11-29599号公报中记载的公知的载体。

[0060] 另外,表达载体不仅能用来合成嵌合蛋白,而且还能用于本发明的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂。即,本发明的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂可以含有嵌入了编码上述的嵌合蛋白的氨基酸序列的DNA的表达载体作为有效成分。通过将上述表达载体直接导入人体中而能够用于视觉功能再生、视觉功能降低预防。此时的载体使用能导入人的细胞内的载体。作为上述载体,例如腺相关病毒载体(AAV载体)、慢病毒载体是适合的。

[0061] 载体的导入方法可以根据载体、宿主的种类等进行适宜选择。作为其具体例,没有特别限定,例如将细菌作为宿主时,可列举出原生质体(protoplast)法、感受态(competent)法等公知的方法(例如,参照日本特开平11-29599号公报)。另外,使用表达载体作为本发明的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂的有效成分时,例如,可以通过将上述的AAV载体等注射至眼内来导入。

[0062] 导入表达载体的宿主只要适于表达载体且可进行转化即可,作为其具体例,没有特别限定,可列举出:细菌、酵母、动物细胞、昆虫细胞等公知的天然细胞或人工建立的细胞(参照日本特开平11-29599号公报)、或者人、小鼠等动物。对于转化体的培养,可以能够大量且容易获得嵌合蛋白的方式、根据转化体的种类等从公知的营养培养基中适宜选择,适宜调节温度、营养培养基的pH、培养时间等来进行(例如,参照日本特开平11-29599号公报)。

[0063] 作为嵌合蛋白的分离方法和纯化方法,没有特别限定,可列举出:利用溶解度的方

法、利用分子量的差的方法、利用电荷的方法等公知的方法(例如,参照日本特开平11-29599号公报)。

[0064] 本说明书中的“有效成分”是指以为得到视觉功能再生效果或视觉功能降低预防效果所需的量所含有的成分,在不损害效果直至低于期望的水平的范围内,还可以含有其它成分。另外,本发明的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂可以是经制剂化的物质。另外,本发明的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂的给药途径可以是口服或非口服,可以根据制剂的形态等进行适宜设定。

[0065] 口服给药的情况,可以制剂化成片剂、颗粒剂、细粒剂、散剂、胶囊剂等各种形状来使用,还可以含有在制剂中通常使用的粘合剂、遮盖剂、赋形剂、润滑剂、崩解剂、湿润剂之类的添加剂。另外,除了这些之外,口服给药时的制剂还可以制剂化成内服水溶液、悬浮剂、乳剂、浆液剂等液体状态,还可以制剂化成在使用时再溶解的干燥状态的物质。

[0066] 非口服给药的情况,可以制剂化成收纳于单次给药量安瓿或多次给药量容器或管内的状态,另外,还可以含有稳定剂、缓冲剂、保存剂、等渗剂等添加剂。另外,非口服给药时的制剂还可以制成在使用时能用适合的载体(灭菌水等)进行再溶解的粉体。

[0067] 作为非口服给药,可列举出:玻璃体内给药、结膜下给药、前房内给药、滴眼给药等,优选为玻璃体内给药。

[0068] 以上叙述的本发明的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂可以利用如上述那样的方法对人给药而用于视觉功能再生或视觉功能降低预防。

[0069] 本发明中,“视觉功能再生”是指使降低了的视觉功能得以改善,可以是一部分视觉功能的再生,还可以是完全再生。另外,“视觉功能降低预防”是指防止视觉功能降低、或者抑制视觉功能降低的发展等。作为这样的视觉功能,可列举出:视力、对比敏感度、亮暗适应、色觉等。

[0070] 本发明的视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂还可以用作通过视觉功能再生或视觉功能降低预防而可期待的用途,例如,可以用于与视觉功能降低相关的疾病的治疗或预防。作为与视觉功能降低相关的疾病,可列举出:色素性视网膜炎、老年性黄斑变性、近视性黄斑病变、黄斑营养不良、糖尿病视网膜病变、葡萄膜炎、视网膜剥离等。

[0071] <载体>

[0072] 本发明包括:插入了嵌合蛋白的序列的腺相关病毒(AAV)载体或慢病毒载体,所述嵌合蛋白的序列具有微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列和动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质的氨基酸序列。

[0073] 另外,本发明包括:插入了嵌合蛋白的序列的腺相关病毒(AAV)载体或慢病毒载体在制造视觉功能再生或视觉功能降低预防的药物中的应用,所述嵌合蛋白具有微生物来源的离子转运型受体视紫红质的氨基酸序列和动物来源的G蛋白偶联型受体视紫红质的氨基酸序列。

[0074] 嵌合蛋白可以使用与上述情况同样的物质。

[0075] 实施例

[0076] 如下所述,使用小鼠进行了有关视觉功能的实验。

[0077] (实验动物)

[0078] 实验使用野生型小鼠(C57BL/6J, CLEA Japan Inc.)和色素性视网膜炎模型(rd1)

小鼠(C3H/HeJ Jcls, CLEA Japan Inc.), 均使用3周龄雄性小鼠。

[0079] (编码嵌合蛋白(GR/BvRh)的DNA的制作)

[0080] 将从相当于紫色粘杆菌的视紫红质(Gloeobacter violaceus Rhodopsin (GR)、序列号8)的细胞质侧的第2环路的N末端的相当于第137-145位的氨基酸的序列置换为牛视紫红质(BvRh)(序列号9)的第137-145位的氨基酸相当序列,另外,将从相当于紫色粘杆菌的视紫红质的细胞质侧的第3环路的N末端的第198-206位的氨基酸的序列置换为牛视紫红质的第225-252位的氨基酸相当序列,进而将编码作为紫色粘杆菌的视紫红质的第132位的氨基酸的谷氨酸置换为谷氨酰胺的嵌合蛋白的DNA插入pCDNA3.1载体。突变体的制作利用QuicChange法进行。

[0081] (插入了嵌合蛋白的序列的腺相关病毒(AAV)载体的制作)

[0082] 将EGFP或GR/BvRh基因亚克隆至AAV2穿梭质粒(shuttle plasmid),来制作AAV2-CAGGS-EGFP-WPRE-pA(EGFP的表达用的载体)和AAV2-CAGGS-GR/BvRh-WPRE-pA(嵌合蛋白表达用的载体)作为病毒表达构建体。病毒载体的包装通过将载体质粒、AAV载体质粒、腺病毒辅助质粒这3种质粒转染至HEK293细胞中来进行,病毒载体的纯化使用氯化铯法。需要说明的是,载体中“ITR”是“Inverted Terminal Repeat(反向末端重复)”的简称。“CAGGS”是指CAG启动子的区域的序列。“WPRE”是“woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element(土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件)”的简称。“pA”是指肽/标签。“EGFP”是“enhanced green fluorescent protein(增强型绿色荧光蛋白)”的简称。

[0083] (玻璃体注射)

[0084] 对于野生型小鼠或色素性视网膜炎模型(rd1)小鼠,将美托咪定盐酸盐(0.75mg/kg)、咪达唑仑(4mg/kg)、酒石酸布托啡诺(5mg/kg)的混合液进行腹腔内给药,在全身麻醉下使用安装有32号针头的微型注射器将上述AAV载体(“AAV2-CAGGS-EGFP-WPRE-pA”或“AAV2-CAGGS-GR/BvRh-WPRE-pA”)以各 $1 \times 10^{12}$ vg/ml 1μl从锯齿缘(ora serrata)附近注射至玻璃体内。

[0085] (报道观察)

[0086] 在注射7周后、从注射了AAV2-CAGGS-EGFP-WPRE-pA的野生型小鼠中摘取视网膜,用4%多聚甲醛固定1小时,利用荧光显微镜观察经整体制片(whole-mount)的视网膜。将其结果示于图1。图1中,GCL:神经节细胞层,INL:内核层,ONL:外核层。观察的结果是:在视网膜中可观察到绿色的荧光(例如,图1的箭头),因此确认到载体的导入、目的基因的表达得以正常进行。

[0087] (Multielectrode Array Recording (MEA):多电极阵列测定)

[0088] 对色素性视网膜炎模型(rd1)小鼠注射了AAV2-CAGGS-GR/BvRh-WPRE-pA起7周后,在全身麻醉下摘取眼球,然后将眼球静置于用95%O<sub>2</sub>和5%CO<sub>2</sub>鼓泡的Ames培养基(Sigma-Aldrich, St Louis, MO; A1420)内,摘取视网膜。对于视网膜以神经节细胞层朝下与电极接触的方式进行固定,进行光刺激(白色光、1000cd/m<sup>2</sup>、1秒)并记录了视网膜神经节细胞的细胞外电位。另外,将未注射AAV2-CAGGS-GR/BvRh-WPRE-pA的色素性视网膜炎模型(rd1)小鼠作为对照,利用同样的方法记录了视网膜神经节细胞的细胞外电位。多电极阵列测定使用MEA2100-Lite system(Multi-Channel Systems(多通系统), Reutlingen, Germany)。将其结果示于图2。图2的(a)表示对照小鼠的图,图2中的(b)表示注射了AAV2-CAGGS-GR/BvRh-

WPRE-pA的小鼠的图。需要说明的是,图2的图中,横轴表示经过时间,箭头所示的区域表示进行了光刺激的区域。

[0089] 如图2所示,可知:对照在进行了光刺激的区域也未观察到任何变化,但在注射了AAV2-CAGGS-GR/BvRh-WPRE-pA的小鼠中,电位得以增加。由该结果可知,GR/BvRh对于色素性视网膜炎具有视觉功能再生效果。

[0090] 另外,利用与上述同样的方法进行多电极阵列测定,得到了用光栅图显示10次视网膜神经节细胞的发射的图(图3的上半部分)、及纵轴以每1秒的发射频率进行的直方图(图3的下半部分)。以0~1秒进行光刺激。图3的(a)表示对照小鼠的图,图3的(b)表示注射了AAV2-CAGGS-GR/BvRh-WPRE-pA的小鼠的图。

[0091] 如图3所示,对照小鼠中未观察到光应答,而注射了AAV2-CAGGS-GR/BvRh-WPRE-pA的小鼠中可观察到神经节细胞的发射,确认了视觉再生效果。

## 序列表

<110> 学校法人庆应义塾(Keio University)

国立大学法人名古屋工业大学(Nagoya Institute of Technology)

<120> 视觉功能再生剂或视觉功能降低预防剂

<130> P10000002765

<150> JP2016-172149

<151> 2016-09-02

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 317

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工肽

<400> 1

Met Leu Met Thr Val Phe Ser Ser Ala Pro Glu Leu Ala Leu Leu Gly

1 5 10 15

Ser Thr Phe Ala Gln Val Asp Pro Ser Asn Leu Ser Val Ser Asp Ser

20 25 30

Leu Thr Tyr Gly Gln Phe Asn Leu Val Tyr Asn Ala Phe Ser Phe Ala

35 40 45

Ile Ala Ala Met Phe Ala Ser Ala Leu Phe Phe Ser Ala Gln Ala

50 55 60

Leu Val Gly Gln Arg Tyr Arg Leu Ala Leu Leu Val Ser Ala Ile Val

65 70 75 80

Val Ser Ile Ala Gly Tyr His Tyr Phe Arg Ile Phe Asn Ser Trp Asp

85 90 95

Ala Ala Tyr Val Leu Glu Asn Gly Val Tyr Ser Leu Thr Ser Glu Lys

100 105 110

Phe Asn Asp Ala Tyr Arg Tyr Val Asp Trp Leu Leu Thr Val Pro Leu

115 120 125

Leu Leu Val Gln Thr Val Ala Val Ile Glu Arg Tyr Val Val Val Cys

130 135 140

Lys Pro Met Ser Asn Phe Arg Phe Gly Glu Asn His Pro Leu Leu Ile

145 150 155 160

Lys Leu Thr Val Ala Ser Val Leu Met Ile Ala Thr Gly Tyr Pro Gly

165 170 175

Glu	Ile	Ser	Asp	Asp	Ile	Thr	Thr	Arg	Ile	Ile	Trp	Gly	Thr	Val	Ser
					180			185			190				
Thr	Ile	Pro	Phe	Ala	Tyr	Ile	Leu	Tyr	Val	Leu	Trp	Val	Glu	Leu	Ser
					195			200			205				
Phe	Thr	Val	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Gln	Gln	Gln	Glu	Ser	Ala	Thr	Thr
					210			215			220				
Gln	Val	Gln	Thr	Leu	Val	Arg	Asn	Met	Arg	Trp	Leu	Leu	Leu	Ser	
					225			230			235			240	
Trp	Gly	Val	Tyr	Pro	Ile	Ala	Tyr	Leu	Leu	Pro	Met	Leu	Gly	Val	Ser
					245			250			255				
Gly	Thr	Ser	Ala	Ala	Val	Gly	Val	Gln	Val	Gly	Tyr	Thr	Ile	Ala	Asp
					260			265			270				
Val	Leu	Ala	Lys	Pro	Val	Phe	Gly	Leu	Leu	Val	Phe	Ala	Ile	Ala	Leu
					275			280			285				
Val	Lys	Thr	Lys	Ala	Asp	Gln	Glu	Ser	Ser	Glu	Pro	His	Ala	Ala	Ile
					290			295			300				
Gly	Ala	Ala	Ala	Asn	Lys	Ser	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Ser			
					305			310			315				
<210>	2														
<211>	344														
<212>	PRT														
<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
<220>															
<223>	人工肽														
<400>	2														
Met	Leu	Met	Thr	Val	Phe	Ser	Ser	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly
1					5				10			15			
Ser	Thr	Phe	Ala	Gln	Val	Asp	Pro	Ser	Asn	Leu	Ser	Val	Ser	Asp	Ser
					20				25			30			
Leu	Thr	Tyr	Gly	Gln	Phe	Asn	Leu	Val	Tyr	Asn	Ala	Phe	Ser	Phe	Ala
					35				40			45			
Ile	Ala	Ala	Met	Phe	Ala	Ser	Ala	Leu	Phe	Phe	Ser	Ala	Gln	Ala	
					50				55			60			
Leu	Val	Gly	Gln	Arg	Tyr	Arg	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Ile	Val
					65				70			75			80
Val	Ser	Ile	Ala	Gly	Tyr	His	Tyr	Phe	Arg	Ile	Phe	Asn	Ser	Trp	Asp
					85				90			95			
Ala	Ala	Tyr	Val	Leu	Glu	Asn	Gly	Val	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Lys
					100				105			110			

Phe Asn Asp Ala Tyr Arg Tyr Val Asp Trp Leu Leu Thr Val Pro Leu  
 115 120 125  
 Leu Leu Val Gln Thr Val Ala Val Ile Glu Arg Tyr Val Val Val Cys  
 130 135 140  
 Lys Pro Met Ser Asn Phe Arg Phe Gly Glu Asn His Pro Leu Leu Ile  
 145 150 155 160  
 Lys Leu Thr Val Ala Ser Val Leu Met Ile Ala Thr Gly Tyr Pro Gly  
 165 170 175  
 Glu Ile Ser Asp Asp Ile Thr Thr Arg Ile Ile Trp Gly Thr Val Ser  
 180 185 190  
 Thr Ile Pro Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr Val Leu Trp Val Glu Leu Ser  
 195 200 205  
 Phe Thr Val Lys Glu Ala Ala Gln Gln Gln Glu Ser Ala Thr Thr  
 210 215 220  
 Gln Val Gln Thr Leu Val Arg Asn Met Arg Trp Leu Leu Leu Ser  
 225 230 235 240  
 Trp Gly Val Tyr Pro Ile Ala Tyr Leu Leu Pro Met Leu Gly Val Ser  
 245 250 255  
 Gly Thr Ser Ala Ala Val Gly Val Gln Val Gly Tyr Thr Ile Ala Asp  
 260 265 270  
 Val Leu Ala Lys Pro Val Phe Gly Leu Leu Val Phe Ala Ile Ala Leu  
 275 280 285  
 Val Lys Thr Lys Ala Asp Gln Glu Ser Ser Glu Pro His Ala Ala Ile  
 290 295 300  
 Gly Ala Ala Ala Asn Lys Ser Gly Gly Ser Leu Ile Ser Gly Ser Ala  
 305 310 315 320  
 Ser Ala Ser Asn Gly Ala Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Glu  
 325 330 335  
 Phe Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val  
 340  
 <210> 3  
 <211> 344  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 人工肽  
 <400> 3  
 Met Leu Met Thr Val Phe Ser Ser Ala Pro Glu Leu Ala Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

Ser Thr Phe Ala Gln Val Asp Pro Ser Asn Leu Ser Val Ser Asp Ser  
 20 25 30

Leu Thr Tyr Gly Gln Phe Asn Leu Val Tyr Asn Ala Phe Ser Phe Ala  
 35 40 45

Ile Ala Ala Met Phe Ala Ser Ala Leu Phe Phe Ser Ala Gln Ala  
 50 55 60

Leu Val Gly Gln Arg Tyr Arg Leu Ala Leu Leu Val Ser Ala Ile Val  
 65 70 75 80

Val Ser Ile Ala Gly Tyr His Tyr Phe Arg Ile Phe Asn Ser Trp Asp  
 85 90 95

Ala Ala Tyr Val Leu Glu Asn Gly Val Tyr Ser Leu Thr Ser Glu Lys  
 100 105 110

Phe Asn Asp Ala Tyr Arg Tyr Val Asp Trp Leu Leu Thr Val Pro Leu  
 115 120 125

Leu Leu Val Glu Thr Val Ala Val Ile Glu Arg Tyr Val Val Val Cys  
 130 135 140

Lys Pro Met Ser Asn Phe Arg Phe Gly Glu Asn His Pro Leu Leu Ile  
 145 150 155 160

Lys Leu Thr Val Ala Ser Val Leu Met Ile Ala Thr Gly Tyr Pro Gly  
 165 170 175

Glu Ile Ser Asp Asp Ile Thr Thr Arg Ile Ile Trp Gly Thr Val Ser  
 180 185 190

Thr Ile Pro Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr Val Leu Trp Val Glu Leu Ser  
 195 200 205

Phe Thr Val Lys Glu Ala Ala Gln Gln Glu Ser Ala Thr Thr  
 210 215 220

Gln Val Gln Thr Leu Val Arg Asn Met Arg Trp Leu Leu Leu Ser  
 225 230 235 240

Trp Gly Val Tyr Pro Ile Ala Tyr Leu Leu Pro Met Leu Gly Val Ser  
 245 250 255

Gly Thr Ser Ala Ala Val Gly Val Gln Val Gly Tyr Thr Ile Ala Asp  
 260 265 270

Val Leu Ala Lys Pro Val Phe Gly Leu Leu Val Phe Ala Ile Ala Leu  
 275 280 285

Val Lys Thr Lys Ala Asp Gln Glu Ser Ser Glu Pro His Ala Ala Ile  
 290 295 300

Gly Ala Ala Ala Asn Lys Ser Gly Gly Ser Leu Ile Ser Gly Ser Ala  
 305 310 315 320

Ser Ala Ser Asn Gly Ala Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Glu

325	330	335	
Phe Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val			
340			
<210> 4			
<211> 311			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 人工肽			
<400> 4			
Met Ala Ser Gln Val Val Tyr Gly Glu Trp Ala Ser Thr His Thr Glu			
1	5	10	15
Cys Tyr Asn Met Ser Arg Ile Asp Ser Thr Phe Val Ser Leu Leu Gln			
20	25	30	
Leu Val Trp Ala Val Val Ser Gly Cys Gln Thr Ile Phe Met Ile Ser			
35	40	45	
Arg Ala Pro Lys Val Pro Trp Glu Ser Val Tyr Leu Pro Phe Val Glu			
50	55	60	
Ser Ile Thr Tyr Ala Leu Ala Ser Thr Gly Asn Gly Thr Leu Gln Met			
65	70	75	80
Arg Asp Gly Arg Phe Phe Pro Trp Ser Arg Met Ala Ser Trp Leu Cys			
85	90	95	
Thr Cys Pro Ile Met Leu Gly Gln Ile Ser Asn Met Ile Glu Arg Tyr			
100	105	110	
Val Val Val Cys Lys Pro Met Ser Asn Phe Arg Phe Gly Glu Asn His			
115	120	125	
Ile Pro Leu Asn Pro Ile Ala Gln Ala Ala Ser Ile Ile Arg Val Val			
130	135	140	
Met Gly Ile Thr Ala Thr Ile Ser Pro Ala Glu Tyr Met Lys Trp Leu			
145	150	155	160
Phe Phe Phe Gly Ala Thr Cys Leu Val Phe Glu Tyr Ser Val Val			
165	170	175	
Phe Thr Ile Phe Gln Val Gly Leu Phe Thr Val Lys Glu Ala Ala Ala			
180	185	190	
Gln Gln Gln Glu Ser Ala Thr Thr Gln Ala Gln Lys Val Val Val Arg			
195	200	205	
Ile Lys Met Leu Arg Leu Ile Phe Phe Ile Ala Trp Thr Met Phe Pro			
210	215	220	
Ile Val Trp Leu Ile Ser Pro Thr Gly Val Cys Val Ile His Glu Asn			

225	230	235	240
Val Ser Ala Ile Leu Tyr Leu Leu Ala Asp Gly Leu Cys Lys Asn Thr			
245	250	255	
Tyr Gly Val Ile Leu Trp Ser Thr Ala Trp Gly Val Leu Glu Gly Lys			
260	265	270	
Trp Asp Pro Ala Cys Leu Pro Gly Gln Glu Lys Pro Glu Ala Asp Asp			
275	280	285	
Pro Phe Gly Leu Asn His Glu Lys Asn Ala Pro Pro Asn Asp Glu Val			
290	295	300	
Asn Ile Arg Met Phe Gly Arg			
305	310		
<210> 5			
<211> 11			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 人工肽			
<400> 5			
Ile Glu Arg Tyr Val Val Val Cys Lys Pro Met			
1	5	10	
<210> 6			
<211> 20			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 人工肽			
<400> 6			
Ile Glu Arg Tyr Val Val Val Cys Lys Pro Met Ser Asn Phe Arg Phe			
1	5	10	15
Gly Glu Asn His			
20			
<210> 7			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 人工肽			
<400> 7			
Phe Thr Val Lys Glu Ala Ala Ala Gln Gln Gln Glu Ser Ala Thr Thr			

1	5	10	15
Gln			
<210> 8			
<211> 298			
<212> PRT			
<213> 紫色粘杆菌(Gloeobacter violaceus)			
<400> 8			
Met Leu Met Thr Val Phe Ser Ser Ala Pro Glu Leu Ala Leu Leu Gly			
1	5	10	15
Ser Thr Phe Ala Gln Val Asp Pro Ser Asn Leu Ser Val Ser Asp Ser			
20	25	30	
Leu Thr Tyr Gly Gln Phe Asn Leu Val Tyr Asn Ala Phe Ser Phe Ala			
35	40	45	
Ile Ala Ala Met Phe Ala Ser Ala Leu Phe Phe Ser Ala Gln Ala			
50	55	60	
Leu Val Gly Gln Arg Tyr Arg Leu Ala Leu Leu Val Ser Ala Ile Val			
65	70	75	80
Val Ser Ile Ala Gly Tyr His Tyr Phe Arg Ile Phe Asn Ser Trp Asp			
85	90	95	
Ala Ala Tyr Val Leu Glu Asn Gly Val Tyr Ser Leu Thr Ser Glu Lys			
100	105	110	
Phe Asn Asp Ala Tyr Arg Tyr Val Asp Trp Leu Leu Thr Val Pro Leu			
115	120	125	
Leu Leu Val Glu Thr Val Ala Val Leu Thr Leu Pro Ala Lys Glu Ala			
130	135	140	
Arg Pro Leu Leu Ile Lys Leu Thr Val Ala Ser Val Leu Met Ile Ala			
145	150	155	160
Thr Gly Tyr Pro Gly Glu Ile Ser Asp Asp Ile Thr Thr Arg Ile Ile			
165	170	175	
Trp Gly Thr Val Ser Thr Ile Pro Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr Val Leu			
180	185	190	
Trp Val Glu Leu Ser Arg Ser Leu Val Arg Gln Pro Ala Ala Val Gln			
195	200	205	
Thr Leu Val Arg Asn Met Arg Trp Leu Leu Leu Ser Trp Gly Val			
210	215	220	
Tyr Pro Ile Ala Tyr Leu Leu Pro Met Leu Gly Val Ser Gly Thr Ser			
225	230	235	240
Ala Ala Val Gly Val Gln Val Gly Tyr Thr Ile Ala Asp Val Leu Ala			
245	250	255	

Lys Pro Val Phe Gly Leu Leu Val Phe Ala Ile Ala Leu Val Lys Thr  
 260 265 270  
 Lys Ala Asp Gln Glu Ser Ser Glu Pro His Ala Ala Ile Gly Ala Ala  
 275 280 285  
 Ala Asn Lys Ser Gly Gly Ser Leu Ile Ser  
 290 295  
 <210> 9  
 <211> 348  
 <212> PRT  
 <213> 黃牛 (Bos taurus)  
 <400> 9  
 Met Asn Gly Thr Glu Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Lys  
 1 5 10 15  
 Thr Gly Val Val Arg Ser Pro Phe Glu Ala Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala  
 20 25 30  
 Glu Pro Trp Gln Phe Ser Met Leu Ala Ala Tyr Met Phe Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Met Leu Gly Phe Pro Ile Asn Phe Leu Thr Leu Tyr Val Thr Val Gln  
 50 55 60  
 His Lys Lys Leu Arg Thr Pro Leu Asn Tyr Ile Leu Leu Asn Leu Ala  
 65 70 75 80  
 Val Ala Asp Leu Phe Met Val Phe Gly Gly Phe Thr Thr Leu Tyr  
 85 90 95  
 Thr Ser Leu His Gly Tyr Phe Val Phe Gly Pro Thr Gly Cys Asn Leu  
 100 105 110  
 Glu Gly Phe Phe Ala Thr Leu Gly Gly Glu Ile Ala Leu Trp Ser Leu  
 115 120 125  
 Val Val Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Val Val Val Cys Lys Pro Met Ser  
 130 135 140  
 Asn Phe Arg Phe Gly Glu Asn His Ala Ile Met Gly Val Ala Phe Thr  
 145 150 155 160  
 Trp Val Met Ala Leu Ala Cys Ala Ala Pro Pro Leu Val Gly Trp Ser  
 165 170 175  
 Arg Tyr Ile Pro Glu Gly Met Gln Cys Ser Cys Gly Ile Asp Tyr Tyr  
 180 185 190  
 Thr Pro His Glu Glu Thr Asn Asn Glu Ser Phe Val Ile Tyr Met Phe  
 195 200 205  
 Val Val His Phe Ile Ile Pro Leu Ile Val Ile Phe Phe Cys Tyr Gly  
 210 215 220

Gln Leu Val Phe Thr Val Lys Glu Ala Ala Ala Gln Gln Gln Glu Ser  
225 230 235 240  
Ala Thr Thr Gln Lys Ala Glu Lys Glu Val Thr Arg Met Val Ile Ile  
245 250 255  
Met Val Ile Ala Phe Leu Ile Cys Trp Leu Pro Tyr Ala Gly Val Ala  
260 265 270  
Phe Tyr Ile Phe Thr His Gln Gly Ser Asp Phe Gly Pro Ile Phe Met  
275 280 285  
Thr Ile Pro Ala Phe Phe Ala Lys Thr Ser Ala Val Tyr Asn Pro Val  
290 295 300  
Ile Tyr Ile Met Met Asn Lys Gln Phe Arg Asn Cys Met Val Thr Thr  
305 310 315 320  
Leu Cys Cys Gly Lys Asn Pro Leu Gly Asp Asp Glu Ala Ser Thr Thr  
325 330 335  
Val Ser Lys Thr Glu Thr Ser Gln Val Ala Pro Ala  
340 345

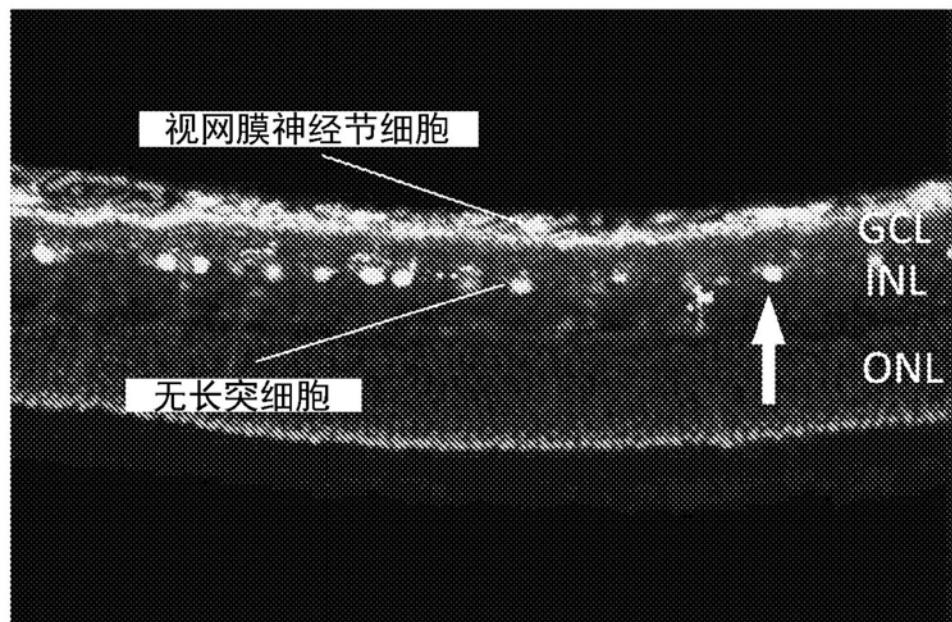


图1

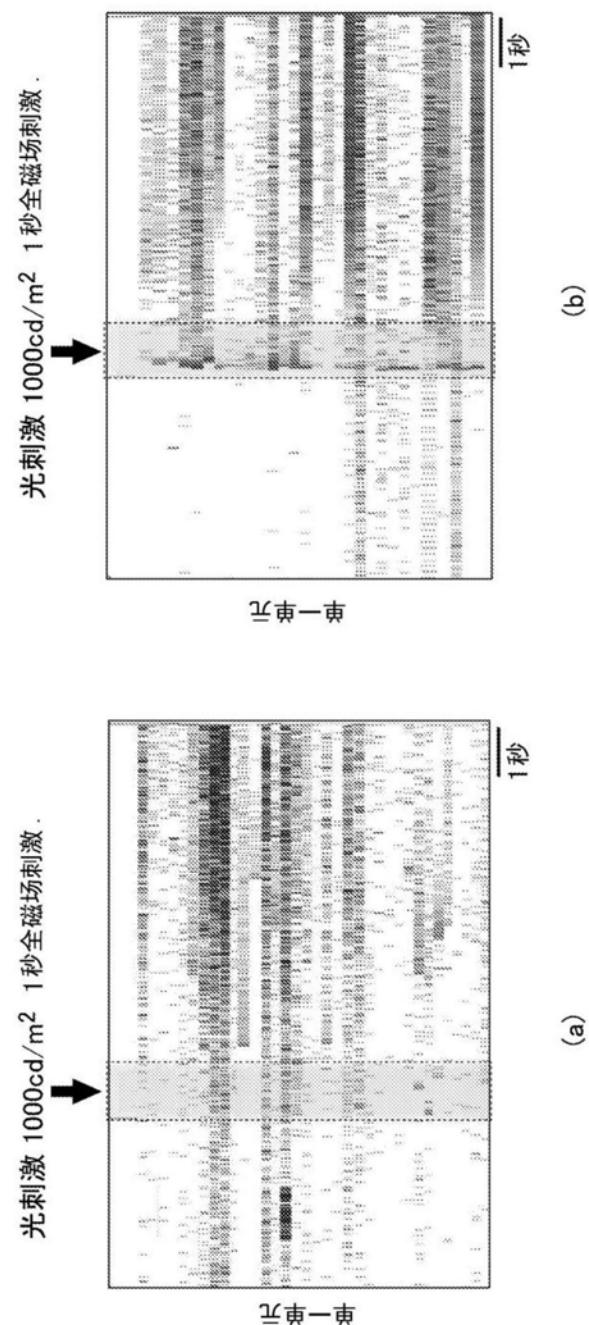


图2

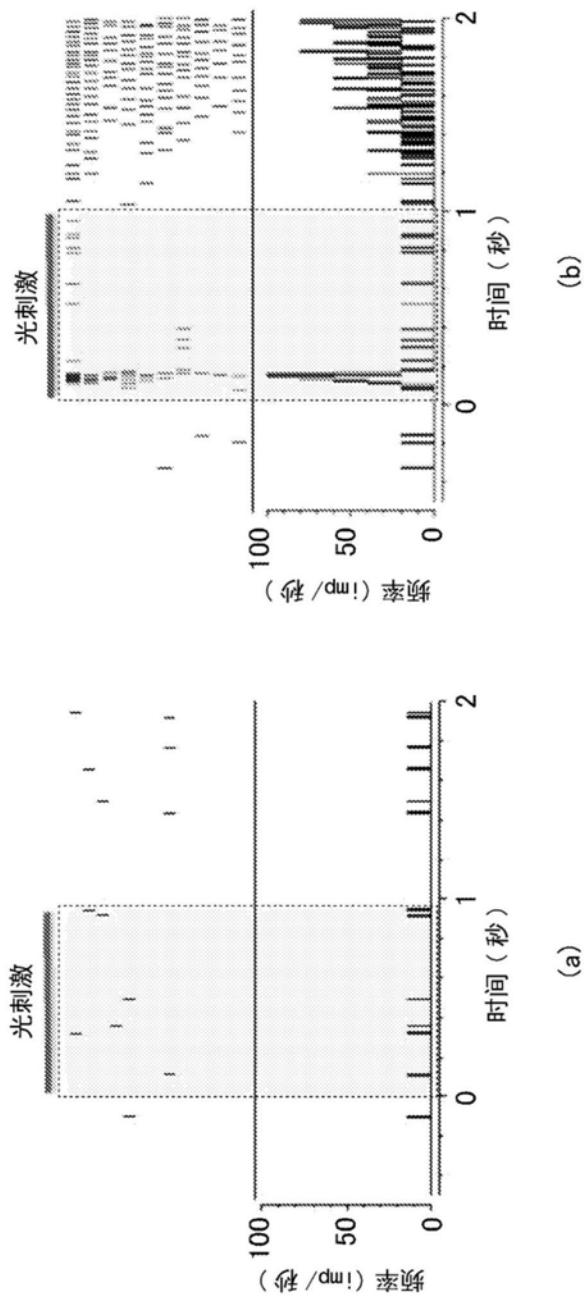


图3