

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102174479 B

(45) 授权公告日 2013.04.03

(21) 申请号 201110050046.0

(22) 申请日 2011.03.02

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :V201031 2010.12.01

(73) 专利权人 北京锤特生物科技有限公司

地址 102206 北京市昌平区生命园路29号1号楼A215室

(72) 发明人 王尧河 姜国忠 王鹏举 高冬玲 尼克莱蒙

(74) 专利代理机构 郑州大通专利商标代理有限公司 41111

代理人 张爱军

(51) Int. Cl.

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

(续)

(56) 对比文件

CN 1298451 A, 2001.06.06, 说明书第4页第9段, 第15页第4段-第16页第1段, 第16页第2段-第17页第1段, 第18页第3-4段, 第19页第5段, 第34页第3-4段.

Daniel Oberg 等. "Improved Potency

and Selectivity of an Oncolytic E1ACR2 and E1B19K Deleted Adenoviral Mutant in Prostate and Pancreatic Cancers". 《Clinical Cancer Research》. 2010, 第16卷(第2期), 第541页摘要.

Yoon C 等. "P29460". 《EBI》. 2011, 第1-7页.

张健 等. "腺病毒介导的IL212基因对Lewis肺癌的抑制作用". 《中国老年学杂志》. 2009, 第29卷(第23期), 第3042-3044页.

Yoon C 等. "P29459". 《EBI》. 2011, 第1-11页.

SC Cheong 等. "E1A-expressing adenoviral E3B mutants act synergistically with chemotherapeutics in immunocompetent tumor models". 《Cancer Gene Therapy》. 2008, 第15卷(第1期), 第40-50页.

刘云会 等. "腺病毒介导的白介素12对恶性脑肿瘤的基因治疗". 《中风与神经疾病杂志》. 2001, 第18卷(第4期), 第223-225页.

鞠全荣 等. "白介素12重组腺病毒载体的构建及其抗肿瘤作用初步观察". 《中国肿瘤》. 2006, 第15卷(第9期), 第614-616页.

审查员 蔺娜

权利要求书 1页 说明书 5页

序列表 6页 附图 5页

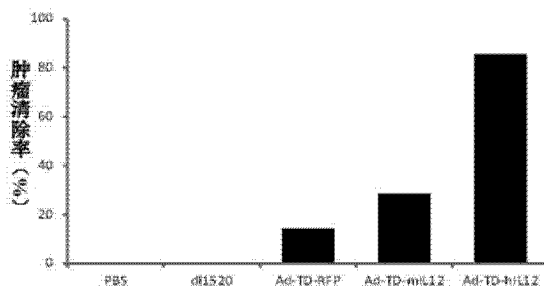
(54) 发明名称

靶向性治疗人肿瘤的溶肿瘤腺病毒及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种靶向性治疗人肿瘤的溶肿瘤腺病毒 Ad-TD-hIL12, 该病毒已在中国典型培养物保藏中心保藏, 其保藏编号为 CCTCC NO : V201031. 该病毒载体为C亚类的5型腺病毒Ad5, 经删除E1A-CR2、E1B19K和E3gp-19K三个基因, 并利用E3gp-19K启动子控制表达人IL12的p35和p40亚基基因序列. 该病毒通过感染肿瘤细胞在肿瘤细胞中复制溶解肿瘤细胞同时, 能在肿瘤组织中产生高水平具有多种抗肿瘤作用的hIL12. hIL12具有抗肿瘤血管形成作用, 能调节人体免

疫能力, 使机体产生抗肿瘤特异免疫能力, 杀死远处转移肿瘤细胞并可防止肿瘤复发, 可作为一种靶向性基因工程药物治疗各种实体瘤, 不但可用于肿瘤内注射, 还可用于腹腔、胸腔内注射, 均不会引起明显副作用, 具有较好的疗效和安全性.



[ 转 续 页 ]

[ 接上页 ]

(51) Int. Cl.

*C12R 1/93*(2006.01)

1. 一种靶向性治疗人肿瘤的溶肿瘤腺病毒(oncolytic adenovirus) Ad-TD-hIL12, 已在中国典型培养物保藏中心保藏, 其保藏编号为 CCTCC NO :V201031 ;所述人肿瘤为胰腺癌或肾癌。

2、权利要求 1 中所述的靶向性治疗人肿瘤的溶肿瘤腺病毒 Ad-TD-hIL12, 其特征是 :该病毒载体为 C 亚类的 5 型腺病毒 Ad5, 经删除 E1A-CR2、E1B19K 和 E3gp-19K 三个基因, 并利用 E3gp-19K 启动子控制表达人 IL12 的 p35 和 p40 亚基基因序列。

3、根据权利要求 2 所述的溶肿瘤腺病毒 Ad-TD-hIL12, 其特征是 :所述 p35 和 p40 亚基基因对应的氨基酸序列分别为 SEQ NO :1 和 SEQ NO :2, 对应的核苷酸序列分别为 SEQ NO :3 和 SEQ NO :4。

4、根据权利要求 2 所述的溶肿瘤腺病毒 Ad-TD-hIL12, 其特征是 :所述 p35 和 p40 亚基序列包括在人 IL12 DNA 序列的增加、删除或点突变得到的序列以及 5' 和 / 或 3' 端缺失得到的序列。

5、根据权利要求 2 所述的溶肿瘤腺病毒 Ad-TD-hIL12, 其特征是 :所述 p35 和 p40 亚基序列包括不同于所述人 IL12 序列的表现出抗肿瘤效果或者引起肿瘤消退的同源 DNA 序列或者编码的多肽。

6、权利要求 1 或 2 所述的靶向性治疗人肿瘤的溶肿瘤腺病毒 Ad-TD-hIL12 在用于制备治疗胰腺癌或肾癌药物中的应用。

## 靶向性治疗人肿瘤的溶肿瘤腺病毒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程生物技术领域,特别是涉及一种靶向性治疗人肿瘤的溶肿瘤腺病毒及其应用。

### 背景技术

[0002] 基因工程腺病毒载体 Ad-TD 是一种肿瘤靶向性载体,经过删除 E1A-CR2、E1B19K 和 E3gp-19K 三个基因,并保留 E3gp-19K 启动子序列的 5 型腺病毒,具有很好的抗肿瘤效果。白介素 12 (IL12) 被称为自然杀伤细胞刺激因子或者细胞毒性淋巴细胞成熟因子,是由二硫键连接的异二聚体的细胞因子,两个亚基通常称为 p35 和 p40。p35 由 T 细胞、B 细胞、NK 细胞及单核细胞等产生;p40 主要由活化的单核细胞及 B 细胞产生。人和小鼠的 p35 和 p40 基因已经被测序,并且它们在体内外显示出 NK 细胞和 T 细胞的生长因子的功能。进一步研究表明,IL12 能有效地使小鼠肿瘤消退和完全消失。但是,IL12 在体内有很短的半衰期,需经持续注射才能够达到治疗效果,需要 IL12 的量相对较大(1-10  $\mu$ g/天),并且给予重组的 IL12 蛋白经常导致严重毒性。目前,利用逆转录病毒载体的 IL12 基因治疗在一些实验室中正在进行,其抗肿瘤效果已经被证实,但是,直接运用 IL12 基因治疗还不能引起建立的肿瘤和肿瘤自发转移灶的消退。

### 发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题是:提供一种靶向性治疗人肿瘤的腺病毒 Ad-TD-hIL12,该病毒可作为治疗肿瘤的基因工程药物,该病毒载体具有靶向性、安全、高效的特点。

[0004] 本发明的技术方案:

[0005] 5 型腺病毒载体为含有编码人 IL12 的 p35 和 p40 亚基基因的复制选择型腺病毒,该病毒能选择性地 在肿瘤细胞中复制,并在进入肿瘤后表达有功能的人 IL12。这些肿瘤包括肉眼能看到或者显微镜下可见的实体瘤、转移瘤和扩散瘤。该病毒载体进入机体后能够选择性地 在肿瘤细胞中复制并溶解肿瘤细胞,释放大量肿瘤相关抗原,与表达的细胞因子人 IL12 协同作用,使机体产生高效、特异的抗肿瘤反应,杀伤未被病毒感染的远处肿瘤细胞,包括转移的微小肿瘤细胞灶。在肿瘤细胞中高表达的 IL12 还具有抗肿瘤血管形成等多种作用。

[0006] 为了解决上述问题,本发明构建了一种肿瘤靶向性腺病毒载体 Ad-TD-hIL12,该病毒载体为 C 亚类的 5 型腺病毒 Ad5,删除该腺病毒的 E1A-CR2、E1B19K 和 E3gp-19K 三个内在基因(Triple Deletion, TD),保留了有助于病毒基因的表达和增强病毒在体内持续时间的 E3B 基因,同时,保留 E3gp-19K 启动子表达外源治疗基因——人白细胞介素 12。

[0007] 白介素 12 是异二聚体,包括 p35 和 p40 亚基,每个亚基有各自的基因编码,IL12 的 p35 和 p40 亚基的编码 DNA 序列可以从包括人的组织中获得。本发明中的人 IL12 序列包括来源于人组织、体外合成或者重组的完整的和改变的具有抗肿瘤效果的编码序列。这些序列包括但不只限定在人 IL12 DNA 序列的增加、删除、点突变及 5' 和 / 或 3' 端的缺失。

不同于本发明中的人 IL12 序列的同源 DNA 序列或者编码的多肽表现出抗肿瘤效果或者引起肿瘤消退的序列也包含其中。

[0008] 所述 p35 和 p40 亚基基因对应的氨基酸序列分别为 SEQ NO :1 和 SEQ NO :2, 对应的核苷酸序列分别为 SEQ NO :3 和 SEQ NO :4。

[0009] 所述的人肿瘤为人的各种实体瘤。

[0010] 所述靶向性治疗人肿瘤的溶肿瘤腺病毒 Ad-TD-hIL12 在用于制备治疗肿瘤药物中的应用。

[0011] 靶向性治疗人肿瘤的溶肿瘤腺病毒的载体 Ad-TD-hIL12 的构建方法, 包括以下步骤:

[0012] (1) 用 NcoI 和 NheI 双酶切 pORF-hIL-12 质粒, 然后用 T4 DNA 聚合酶将切出的 hIL12 基因片段补平, 备用;

[0013] (2) 用平端酶单一切开腺病毒载体 pAd-TD 的 E3gp-19K 缺失区, 将所述的 hIL12 基因按基因组一致顺序插入到病毒载体 pAd-TD 的酶切位点上, 用 PCR 方法鉴定筛选插入方向正确的重组载体;

[0014] (3) 将所述重组载体转染到 293 细胞中, 生产所述的病毒载体 Ad-TD-hIL12。

[0015] 本发明的肿瘤靶向性腺病毒 Ad-TD-hIL12, 已经在中国典型培养物保藏中心进行保藏, 地址: 中国武汉市武汉大学, 保藏编号为: CCTCC NO :V201031, 保藏日期: 2010 年 12 月 1 日。

[0016] 本发明的积极有益效果:

[0017] (1) 本发明的肿瘤靶向性腺病毒 Ad-TD-hIL12, 利用病毒内在基因的启动子, 删除了 E1A-CR2、E1B19K 和 E3gp-19K 三个腺病毒内在基因, 保留了 E3 区的部分基因, 利用 E3gp-19K 基因的启动子表达人的 IL12 基因作为治疗基因。该病毒通过特定靶向人肿瘤细胞中常见的 Rb 基因和抗凋亡基因的异常, 能选择性地地在肿瘤细胞中复制而不在正常细胞中复制, 从而增加特异性和安全性, 复制的病毒能溶解肿瘤细胞, 同时能在肿瘤组织中产生高水平并具有多种抗肿瘤作用的 IL12。

[0018] (2) 本发明的 Ad-TD- hIL12 表达的 hIL12 具有抗肿瘤血管形成的作用, 更为重要的是能调节人体免疫力, 并与在肿瘤细胞中复制的 Ad-TD-hIL12 产生协同作用, 使机体产生抗肿瘤特异免疫能力, 从而杀死远处转移的肿瘤细胞, 并可防止肿瘤复发。经细胞学实验和动物试验表明, 该病毒能选择性地杀死肿瘤细胞, 清除部分免疫缺陷和无免疫缺陷鼠类的荷瘤, 具有较好的疗效和安全性。

[0019] (3) 本发明的肿瘤靶向性腺病毒 Ad-TD-hIL12, 具有肿瘤靶向性和抗肿瘤效果, 可作为一种靶向性基因工程药物, 能治疗的肿瘤包括肉眼能看到或者显微镜下可见的实体瘤、转移瘤和扩散瘤, 也可治疗晚期弥漫播散性肿瘤。

[0020] (4) 本发明的溶肿瘤腺病毒 Ad-TD-hIL12, 不但可用于肿瘤内注射, 还可用于腹腔、胸腔内注射, 并且均不会引起明显的副作用。

[0021] (5) 本发明的靶向性治疗人肿瘤的溶肿瘤腺病毒 Ad-TD-hIL12, 安全、高效, 为作为一种肿瘤靶向性基因工程药物推向临床应用打下基础, 将为肿瘤病人提供一种有效的治疗方法, 将产生较好的社会效益和经济效益。

## 附图说明

[0022] 图 1 :本发明的肿瘤靶向性腺病毒 Ad-TD-hIL12、Ad-TD-gene、*dI*1520 和对照病毒 Ad-TD-RFP 的结构图。

[0023] 图 2 :本发明的病毒 Ad-TD-hIL12 和对照病毒对大负荷肿瘤的治疗效果。

[0024] 图 3 :不同剂量 Ad-TD-hIL12、对照病毒和 *dI*1520 处理荷瘤金黄地鼠的肿瘤生长曲线。

[0025] 图 4 :不同剂量 Ad-TD-hIL12、对照病毒和 *dI*1520 处理荷瘤金黄地鼠的肿瘤停止进展率。

[0026] 图 5 :不同剂量 Ad-TD-hIL12、对照病毒和 *dI*1520 处理荷瘤金黄地鼠的肿瘤清除率。





[0027] 图 6 :低剂量 Ad-TD-hIL12、对照病毒和 *dI*1520 处理荷瘤金黄地鼠的肿瘤生长曲线。

[0028] 图 7 :低剂量 Ad-TD-hIL12、对照病毒和 *dI*1520 处理荷瘤金黄地鼠的肿瘤停止进展率。

[0029] 图 8 :低剂量 Ad-TD-hIL12、对照病毒和 *dI*1520 处理荷瘤金黄地鼠的肿瘤清除率。

[0030] 图 9 :Ad-TD-m/hIL12 治疗荷瘤有免疫能力动物后所产生的肿瘤特异免疫能力。

[0031] 图 10 :不同剂量 Ad-TD-hIL12 对胰腺癌腹腔扩散治疗作用 (其中 1 :PBS ;2 : Ad-TD-hIL12  $1 \times 10^9$  pt/次 ;3 :Ad-TD-hIL12  $2.5 \times 10^9$  pt/次 ;4 :Ad-TD-hIL12  $5 \times 10^9$  pt/次)。

[0032] 其中图 3、图 4、图 6、图 7 中的符号表示,  :PBS ;  :*dI*1520 ;  :Ad-TD-RFP ;  :Ad-TD-hIL12。

## 具体实施方式

[0033] 以下通过实例对本发明进一步说明,并不是限定本发明的保护范围,本领域的技术人员根据说明书可以对这些实施方案进行修改,只要不脱离本发明的精神和范围都可以得到类似或相同的结果,均在本发明的保护范围之内。

[0034] 实例 1 :肿瘤靶向性腺病毒载体 Ad-TD- hIL12 的对应鼠 IL12 基因病毒载体 Ad-TD-mIL12 的构建方法,参见图 1,其步骤如下 :

[0035] (1)首先用 PCR 方法得到要改造序列 E1A-CR2 基因两侧的 DNA 片段,上游序列称为左臂,下游序列称为右臂,用基因工程方法把左臂和右臂按病毒基因一致的顺序连接到质粒载体 pSuperShuttle 上,建成 E1A-CR2 穿梭载体 ;

[0036] 将腺病毒载体 Ad5 和 E1A-CR2 穿梭载体按 1:2~10 的比例转化到 BJ5183 细菌中,进行同源重组 ;用 PCR 方法鉴定阳性重组菌,提取重组质粒,转染到 293 细胞中,得到 E1A-CR2 缺失的 Ad5R-CR2 病毒载体 ;

[0037] (2)用与构建 E1A-CR2 穿梭载体相同的方法构建 E1B19K 穿梭载体,然后与 Ad5R-CR2 病毒载体同源重组,得到 CR2 和 E1B19K 双缺失的 Ad5R-CR2-E1B19K 病毒载体 ;

[0038] (3)用 PCR 方法扩增 E3gp-19K 基因蛋白编码区两侧序列,左臂范围从 -1087bp 到 0bp,其中包含 E3gp-19K 基因的启动子,右臂起始于 E3gp-19K 基因的终止密码向后 1146bp,两臂用酶切位点相连,构建穿梭载体,然后与 Ad5  $\Delta$  R-CR2-E1B19K 病毒载体同源重组,得到

E1A-CR2、E1B19K 和 E3gp-19K 三个编码基因均缺失的腺病毒载体 pAd-TD, 将 pAd-TD 转染到 293 细胞中, 生产肿瘤靶向性腺病毒载体 Ad-TD-gene (Ad-TD)。

[0039] (4) 用 NcoI 和 NheI 双酶切 pORF-mIL-12 质粒, 然后用 T4 DNA 聚合酶将切出的 mIL12 基因片段补平, 备用;

[0040] (5) 用平端酶单一切开腺病毒载体 pAd-TD 的 E3gp-19K 缺失区, 然后将所述的 mIL12 基因按基因组一致顺序插入到病毒载体的酶切位点上, 用 PCR 方法鉴定筛选插入方向正确的重组载体;

[0041] (6) 将插入方向正确的重组载体转染到 293 细胞中, 生产病毒载体 Ad-TD-mIL12。

[0042] 实例 2: 肿瘤靶向性腺病毒 Ad-TD-hIL12 的抗肿瘤应用。

[0043] 在 5-6 周龄的金黄地鼠背部右上侧接种  $1 \times 10^6$  的 HPD1-nr 细胞(金黄地鼠胰腺癌细胞), 肿瘤体积为  $160 \text{mm}^3$  时, 分别用 PBS、*dI1520*、Ad-TD-RFP、Ad-TD-mIL12 和 Ad-TD-hIL12 进行瘤内注射  $5 \times 10^9 \text{pt/次}$ , 分三次治疗, 然后观察治疗效果。

[0044] 结果图 2 表明单独使用 Ad-TD-hIL12 对大负荷肿瘤动物的治愈率为 85.71%, 而 *dI1520* 组动物的治愈率为 0%。

[0045] 实例 3: 不同剂量的 Ad-TD-hIL12、对照病毒和 *dI1520* 体内抗肿瘤效果比较。

[0046] 在 5-6 周龄的金黄地鼠背部右上侧接种  $1 \times 10^6$  的 HPD1-nr 细胞, 当肿瘤生长至较大荷瘤( $160 \text{mm}^3$ ) 时, 在肿瘤内分别注射 PBS、*dI1520*、Ad-TD-RFP、Ad-TD-mIL12 和 Ad-TD-hIL12,  $5 \times 10^9 \text{pt/次}$ , 每天一次, 共五次(与已上市腺病毒药物 H101 临床应用方案一样, 但剂量小 20 倍), 然后观察肿瘤大小和肿瘤清除率。

[0047] 结果见图 3、图 4、图 5。图 3 表明 Ad-TD-hIL12 比 *dI1520* 和对照病毒 Ad-TD-RFP 显示出更强的抗肿瘤效果; 图 4 说明 Ad-TD-hIL12 治疗组动物肿瘤生长进程最慢; 图 5 说明 Ad-TD-hIL12 治疗组动物的肿瘤清除率最高, 可达 100%, 而 *dI1520* 组、Ad-TD-RFP 组动物的肿瘤清除率均为 33.33%。

[0048] 实例 4: 低剂量 Ad-TD-hIL12、对照病毒和 *dI1520* 的体内抗肿瘤效果比较。

[0049] 用金黄地鼠肾癌模型, 在 5-6 周龄的金黄地鼠背部右上侧接种  $5 \times 10^6$  的 HAK 细胞, 当肿瘤生长到较大体积( $230 \text{mm}^3$ ) 时, 用更低剂量的不同病毒( $1 \times 10^9 \text{pt/次}$ , 五次治疗)在瘤内分别注射 PBS、*dI1520* 和 Ad-TD-hIL12, 然后观察肿瘤大小和肿瘤清除率, 结果见图 6、图 7、图 8。图 6 表明低剂量 *dI1520*、对照病毒 Ad-TD-RFP 与 PBS 均没有显著的抗肿瘤能力, 而 Ad-TD-hIL12 显示较强的抗肿瘤能力, 图 7 说明 Ad-TD-hIL12 治疗组动物肿瘤生长进程最慢, 图 8 说明 Ad-TD-hIL12 治疗组动物的肿瘤清除率最高, 可达 71.43%, 而 *dI1520* 组、Ad-TD-RFP 组动物的肿瘤清除率均为 0。

[0050] 实例 5: Ad-TD-m/hIL12 治疗荷瘤有免疫能力动物后所产生的肿瘤特异免疫能力。

[0051] 实例 3 中 m/hIL12 治疗组中肿瘤消失的金黄地鼠在肿瘤消失 60 天后, 在原来接种肿瘤的对侧皮下接种其他肿瘤细胞(金黄地鼠肾癌细胞 HAK,  $5 \times 10^6$  个)或细胞数为原来 2 倍的 HPD1-nr 细胞( $2 \times 10^6$ ), 7 天后, 全部长出肿瘤组织。第 13 天, 7 只重新接种 HPD1-nr 的动物有 5 只肿瘤消失; 第 103 天时, 仍是 7 只中有 5 只肿瘤消失, 产生的肿瘤特异免疫能力比率为 71.43%, 而接种 HAK 的金黄地鼠 5 只一直全部荷瘤, 产生的肿瘤特异免疫能力比率为 0 (见图 9)。

[0052] 实例 6: 不同剂量 Ad-TD-hIL12 对胰腺癌腹腔扩散治疗作用。

[0053] 5-6 周龄的金黄地鼠腹腔注射  $5 \times 10^6$  HPD1-nr 细胞,7 天后开始治疗,每天腹腔注射不同制剂一次,共持续 5 天,然后观察动物生存状态、生存率。注射制剂分别为 PBS 组, Ad-TD-hIL12  $1 \times 10^9$  pt/ 次治疗; Ad-TD-hIL12  $2.5 \times 10^9$  pt/ 次治疗; Ad-TD-hIL12  $5 \times 10^9$  pt/ 次治疗。PBS 组和 Ad-TD-hIL12 用低剂量( $1 \times 10^9$  pt/ 次和  $2.5 \times 10^9$  pt/ 次), 动物于肿瘤注射 37 天后全部出现恶病质,大量腹水和腹腔多发癌转移灶,而 Ad-TD-hIL12  $5 \times 10^9$  pt/ 次治疗组动物仍生存良好,无任何副作用,如肝功能衰竭等。参见图 10。



## SEQUENCE LISTING

<110> 郑州大学

<120> 靶向性治疗人肿瘤的溶肿瘤腺病毒及其应用

<130> 基因工程技术

<160> 4

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 198

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys  
1                    5                    10                    15

Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln  
                  20                    25                    30

Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile  
                  35                    40                    45

Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys  
                  50                    55                    60

Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu  
65                    70                    75                    80

Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser  
85 90 95

Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met  
100 105 110

Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro  
115 120 125

Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu  
130 135 140

Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser  
145 150 155 160

Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile  
165 170 175

Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met  
180 185 190

Ser Tyr Leu Asn Ala Ser  
195

<210> 2

<211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu  
 1                                  5                                  10                                  15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val  
                                 20                                  25                                  30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu  
                                 35                                  40                                  45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln  
                                 50                                  55                                  60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys  
 65                                  70                                  75                                  80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val  
                                 85                                  90                                  95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp  
                                 100                                  105                                  110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe  
                                 115                                  120                                  125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp  
                                 130                                  135                                  140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg  
 145                                  150                                  155                                  160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser  
 165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu  
 180 185 190

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile  
 195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr  
 210 215 220

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn  
 225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp  
 245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr  
 260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg  
 275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala  
 290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser

305

310

315

320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser

325

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 597

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

gccagaaacc tccccgtggc cactccagac ccaggaatgt tcccatgcct tcaccactcc 60

caaaacctgc tgagggccgt cagcaacatg ctccagaagg ccagacaaac tctagaattt 120

tacccttgca cttctgaaga gattgatcat gaagatatca caaaagataa aaccagcaca 180

gtggaggcct gtttaccatt ggaattaacc aagaatgaga gttgcctaaa ttccagagag 240

acctctttca taactaatgg gagttgcctg gcctccagaa agacctcttt tatgatggcc 300

ctgtgcctta gtagtattta tgaagacttg aagatgtacc aggtggagtt caagaccatg 360

aatgcaaagc tgctgatgga tcctaagagg cagatctttc tagatcaaaa catgctggca 420

gttattgatg agctgatgca ggccctgaat ttcaacagtg agactgtgcc acaaaaaatcc 480

tcccttgaag aaccggattt ttataaaaact aaaatcaagc tctgcatact tcttcatget 540

ttcagaattc gggcagtgac tattgataga gtgatgagct atctgaatgc ttcttaa 597

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 997

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 4	
atgggtcacc agcagttggt catctcttgg ttttccctgg tttttctggc atctcccctc	60
gtggccatat gggaactgaa gaaagatggt tatgtcgtag aattggattg gtatccggat	120
gcccttgag aatggtggt cctcacctgt gacaccctg aagaagatgg taccacctgg	180
accttgacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa ccctgacat ccaagtcaaa	240
gagtttgag atgctggcca gtacacctgt cacaaaggag gcgaggttct aagccattcg	300
ctcctgctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttggtcca ctgatatttt aaaggaccag	360
aaagaacca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattattc tggacgtttc	420
acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga	480
ggctcttctg accccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagagtc	540
agaggggaca acaaggagta tgagtactca gtggagtgcc aggaggacag tgcctgcca	600
gctgctgagg agagtctgcc cattgaggtc atggtggatg ccgttcacia gctcaagtat	660
gaaaactaca ccagcagctt ctcatcagg gacatcatca aacctgacc acccaagaac	720
ttgcagctga agccattaaa gaattctcgg caggtggagg tcagctggga gtaccctgac	780
acctggagta ctccacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt ccagggaag	840
agcaagagag aaaagaaaga tagagtcttc acggacaaga cctcagccac ggtcatctgc	900
cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcgggcc caggaccgct actatagctc atcttgagc	960
gaatgggcat ctgtgccctg cagtgttctt ggagtag	997

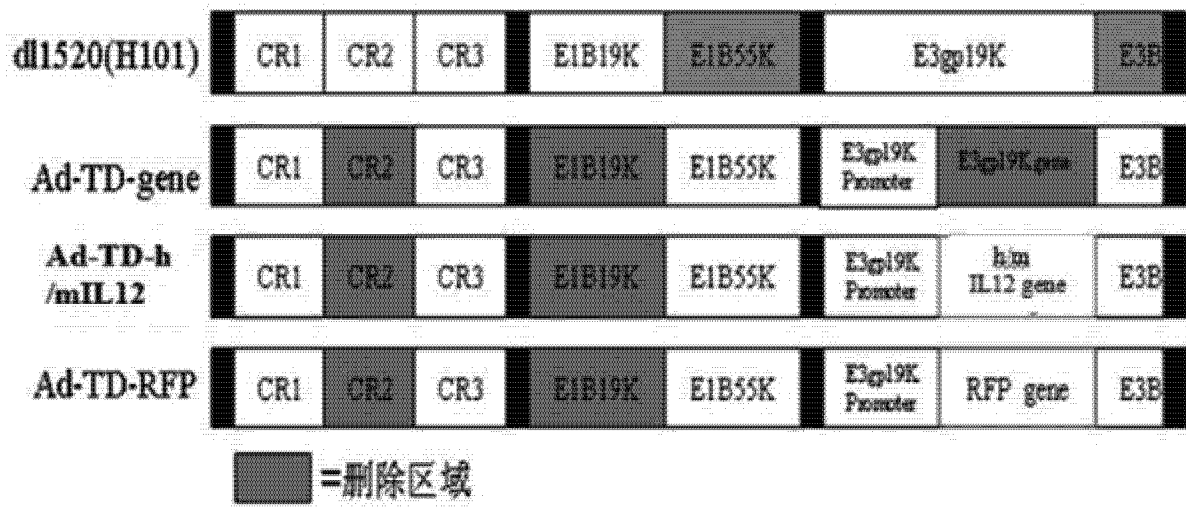


图 1

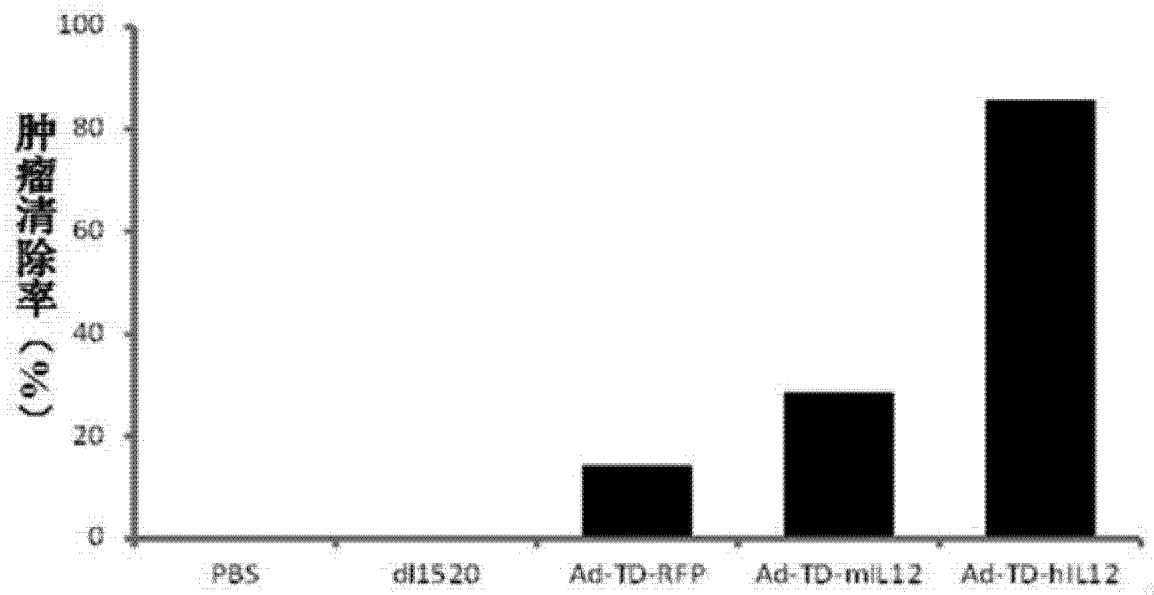


图 2

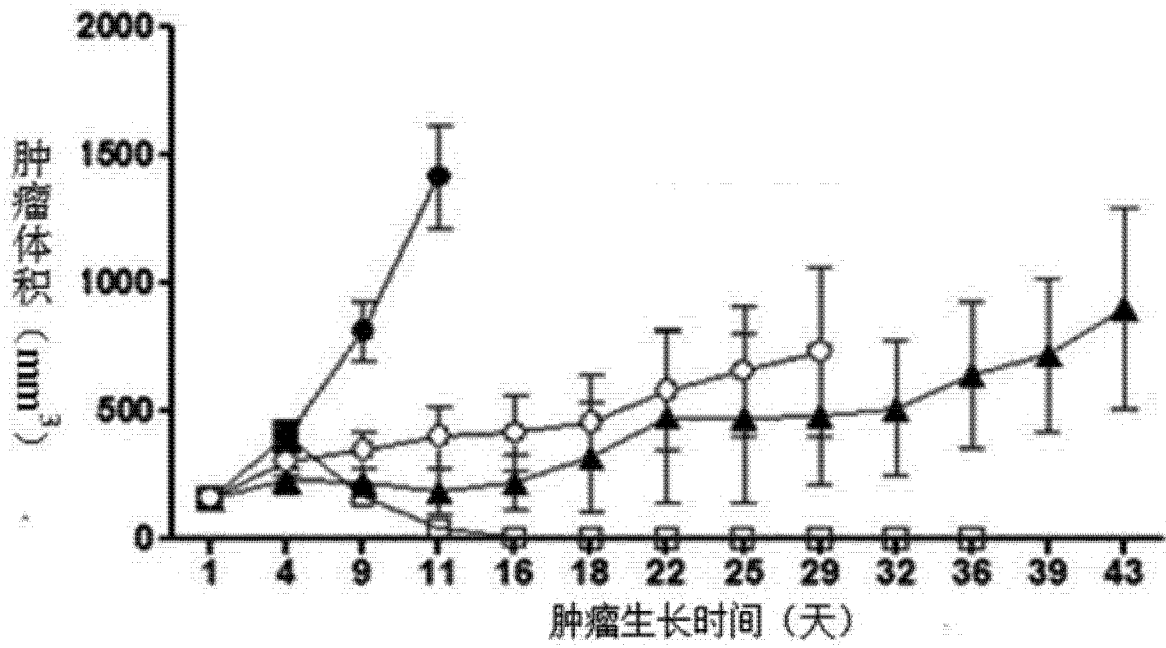


图 3

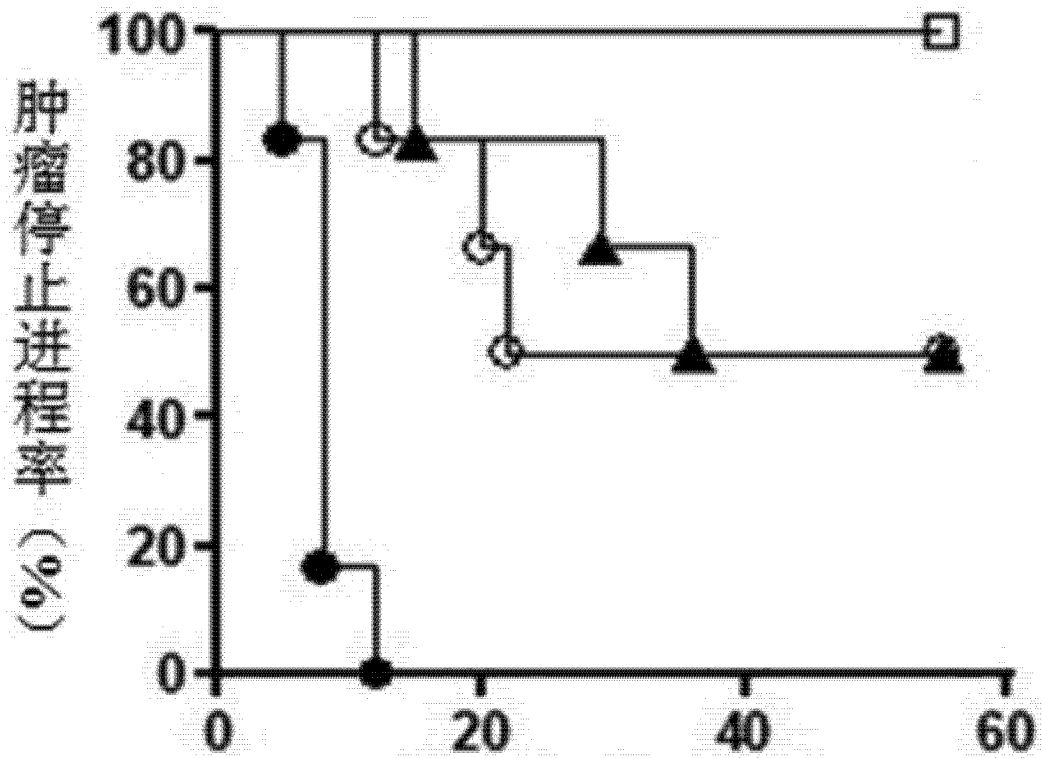


图 4



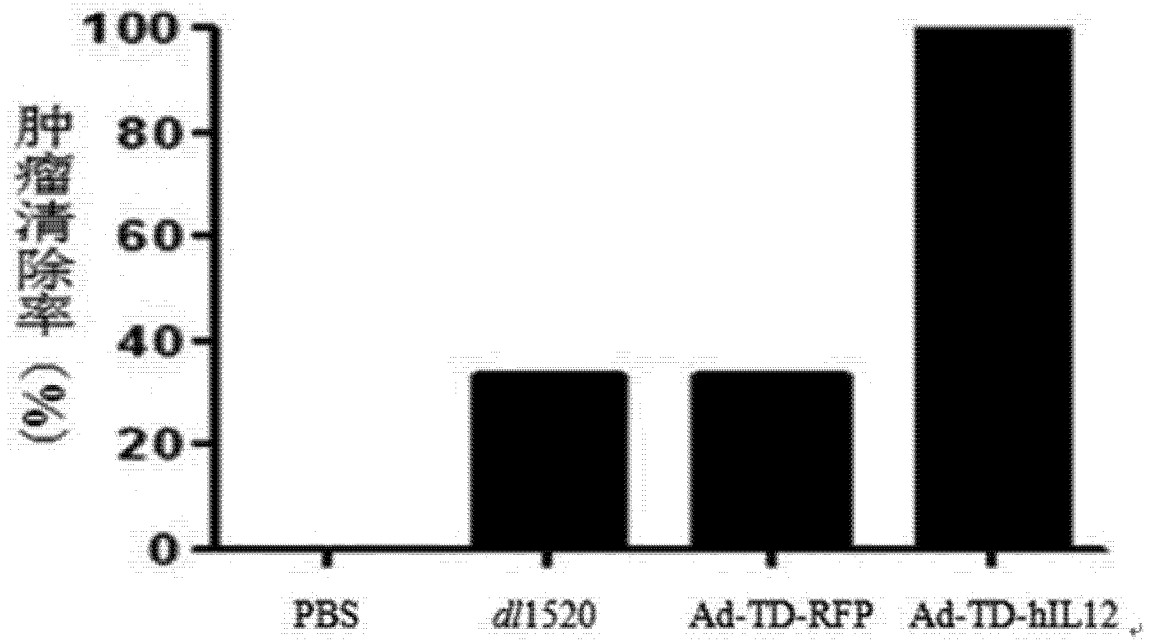


图 5

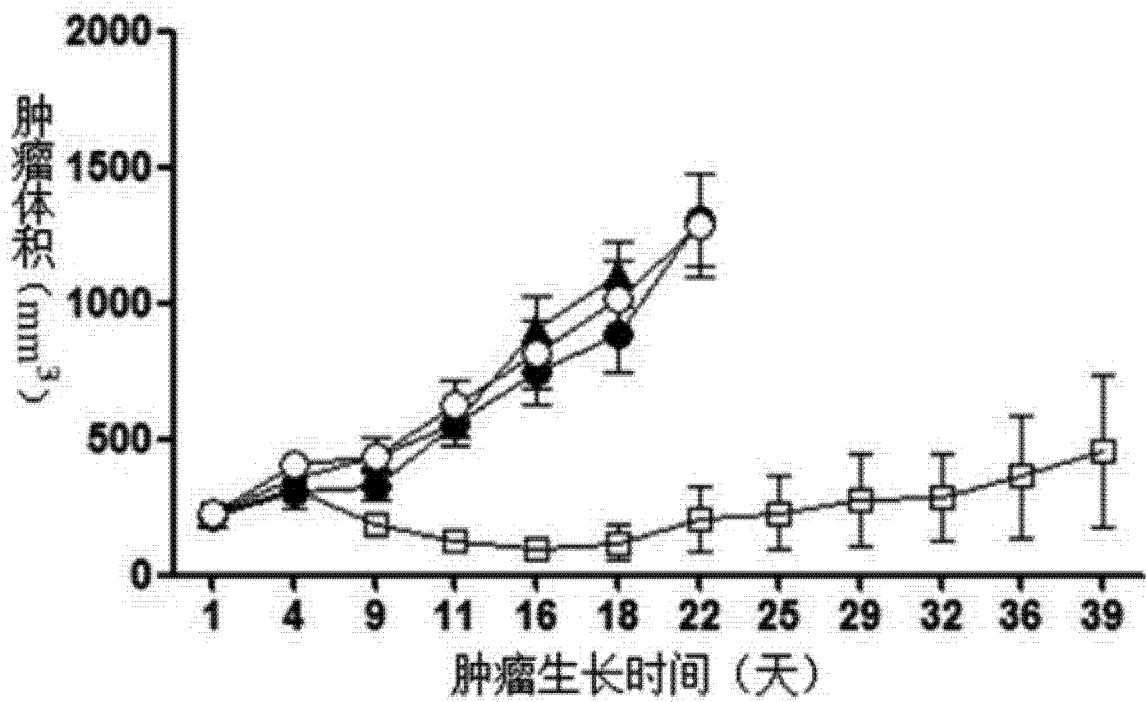


图 6

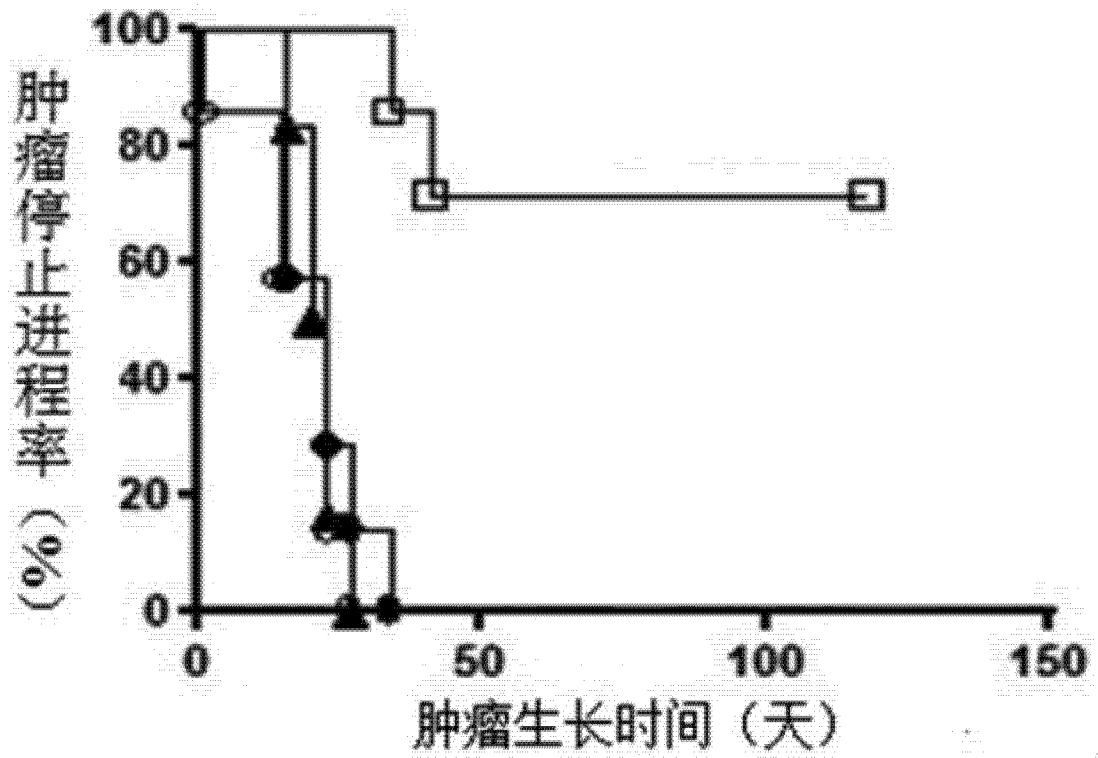


图 7

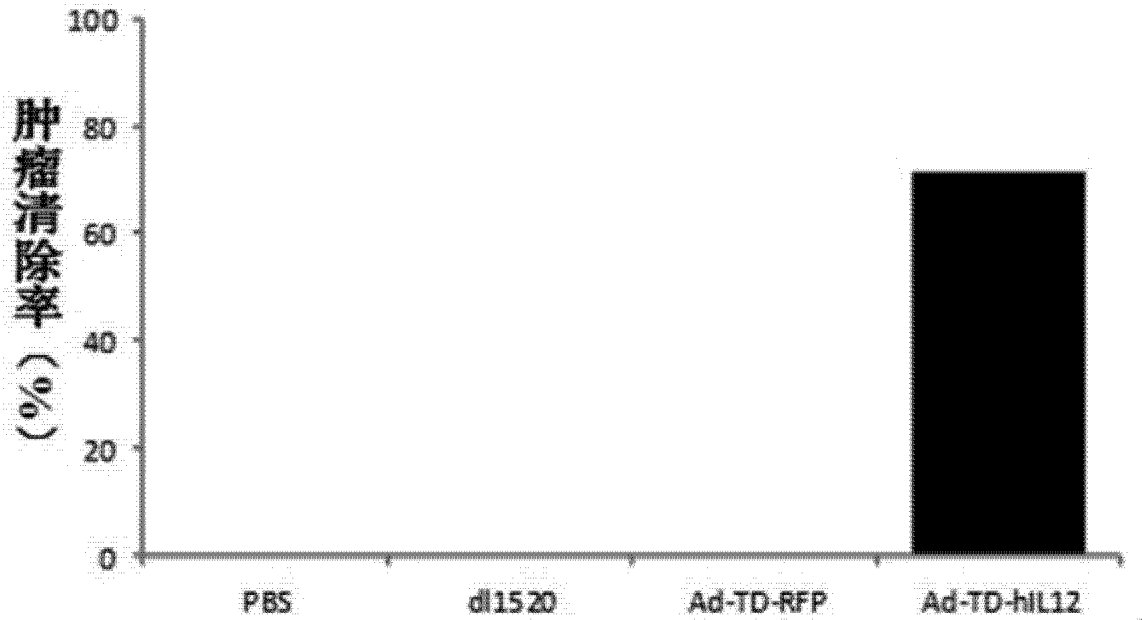


图 8

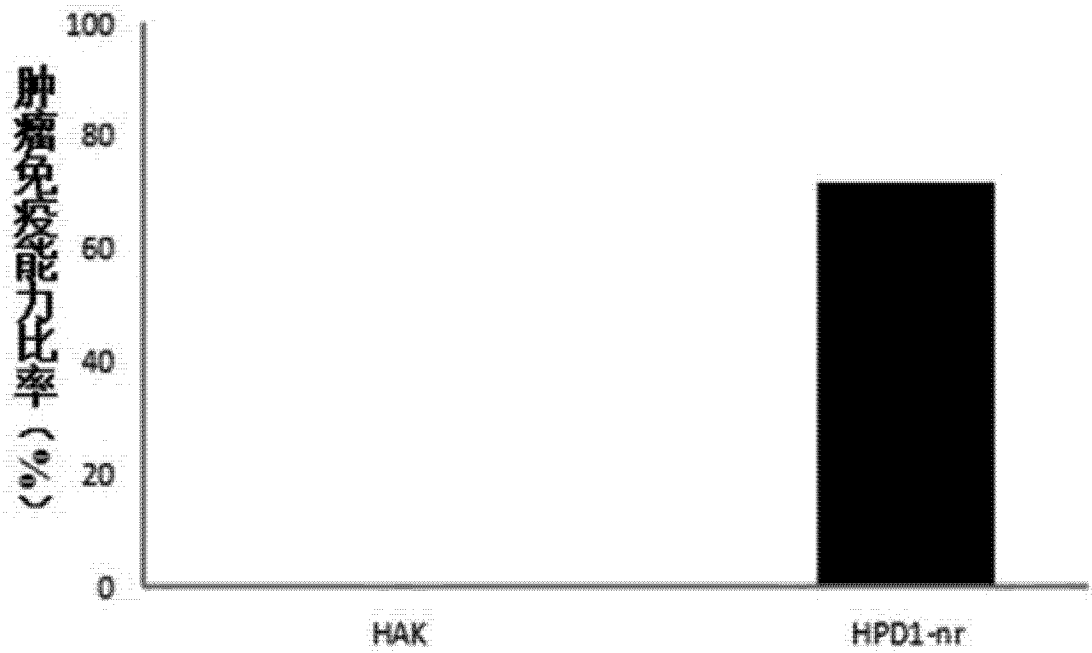


图 9

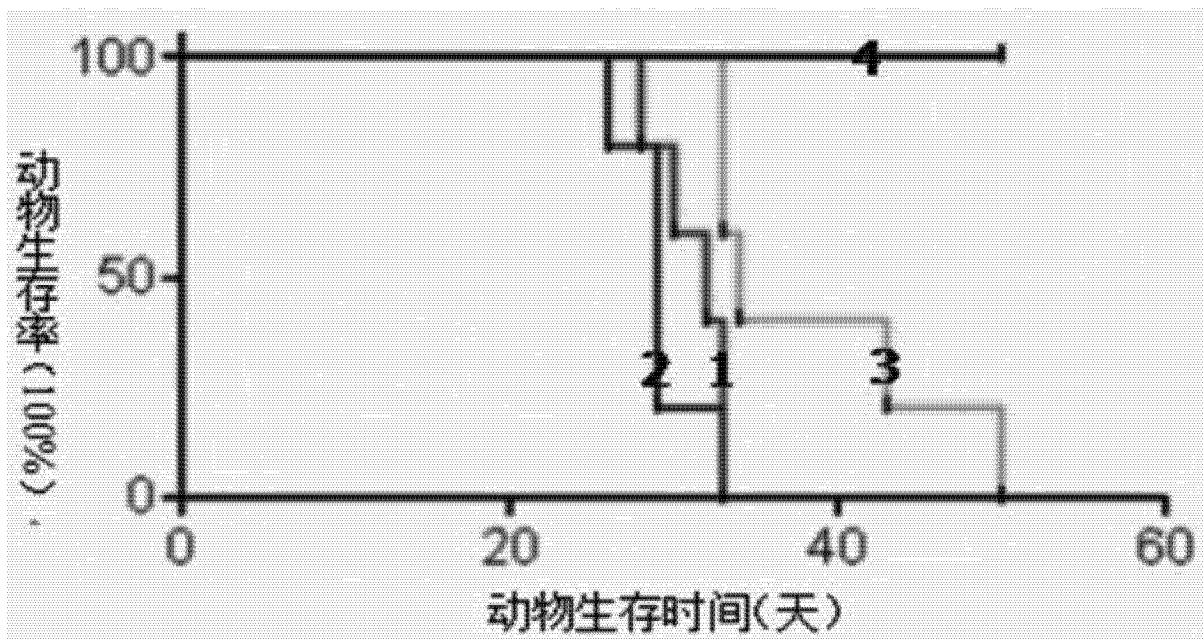


图 10