[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12P 21/00
C12N 5/00
C12N 15/00

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93109452.6

[45]授权公告日 2001 年 1 月 3 日

[11]授权公告号 CN 1060216C

[22]申请日 1993.6.21 [24]颁证日 2000.11.25

[21]申请号 93109452.6

[73]专利权人 索马公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 L·S·格林纳

[56]参考文献

US5,198,541 1993. 3. 1 _

WO8905157 1989. 6. 1 _

审查员 孙广秀

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 制备内毒素结合蛋白质的改进方法

[57]摘要

本发明公开了一种改进的分离内毒素结合蛋白质的方法,该蛋白质由在合适细 胞培养基中的转染宿主细胞分泌。在优选的实施例中,本发明包括向培养基中 加入阳离子交换材料,作为提高重组内毒素结合的蛋白质,如杀菌性/通透性 提高的蛋白质以及脂多糖结合蛋白质的产量的手段。

ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

00.06.30

权 利 要 求 书

1. 一种生产内毒素结合蛋白质的方法，其中在适合细胞生长和维持的培养基中培养遗传转化的宿主细胞，并且所述蛋白质分泌到所说培养基中，该方法包括下列顺序的步骤:

将宿主细胞和颗粒状阳离子交换材料一起培养以允许所说的宿主细胞所分泌的内毒素结合蛋白质可逆地结合至所说的阳离子交换材料;

从所说培养基中分离所说的结合了内毒素结合蛋白质的阳离子交换材料: 以及

从所说的阳离子交换材料中分离所说的内毒素结合蛋白质。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中所说的阳离子交换材料是 S－琼脂糖。

3. 根据权利要求 1 的方法，其中所说的内毒素结合蛋白质结合至细菌脂多糖的类脂 A 区域。

4. 根据权利要求 1 的方法，其中所说的内毒素结合蛋白质是杀菌性/渗透性增加的蛋白质。

5. 根据权利要求 1 的方法，其中所说的内毒素结合蛋白质是杀菌性/渗透性增加的蛋白质的氨基末端片段，所说蛋白质能够结合脂多糖。

6. 根据权利要求 1 的方法，其中所说的内毒素结合蛋白质是一种融合蛋白，其包含杀菌性/渗透性增加的蛋白质以及免疫球蛋白重链的不变区。

7. 根据权利要求 1 的方法，其中所说的内毒素结合蛋白质是脂多糖结合蛋白质。

8. 根据权利要求 1 的方法，其中所说的内毒素结合蛋白质是能够结合脂多糖的脂多糖结合蛋白质的氨基末端片段。

9. 根据权利要求 1 的方法，其中所说的分离步骤包括将所说的阳离子交换材料依次与等级或梯度增加的离子强度接触。

说　明　书

制备内毒素结合蛋白质的改进方法

本申请是１９９２年5月１９日申请的美国专利申请系列号Ｎｏ０７／８８５，５０１的继续部分。

大体上说本发明涉及由重组方法制备内毒素结合蛋白质的改进技术，更具体地说本发明涉及通过将遗传工程技术转化的宿主细胞在培养液，包括在发酵罐的培养液中生长，从而大规模地生产重组体内毒素结合蛋白质，如杀菌渗透性增加（ＢＰＩ）的蛋白质、脂多糖结合蛋白质（ＬＢＰ）、高密度脂蛋白、鲎抗－ＬＰＳ因子、tachyplesin 以及结构相关蛋白质的方法。

内毒素，或脂多糖，是革兰氏阴性细菌细胞壁的一种成分，并且牵涉到急性细菌感染的临床表现。已有人报道了许多可与内毒素，脂多糖（“ＬＰＳ”）的骨架结构相结合的蛋白质。这样的ＬＰＳ结合蛋白质的实例是杀菌性通透性增加的蛋白质（“ＢＰＩ蛋白质”）、脂多糖结合蛋白质（“ＬＢＰ”）[引入本文作为参考]、高密度脂蛋白以及 tachyplesin [Nakamura, et al., J. Biol. Chem., 263：16709－16713（1988）]，引入本文作为参考。

特定的这类蛋白质具有明显的结构同源性。例如，ＢＰＩ和ＬＢＰ都具有大约２５ｋＤａ的带正电荷的氨基末端区域，该区域是各个与ＬＰＳ的类脂Ａ部分相结合的例子的一部分，参见 Schumann

et al., Science 249:1429-1431(1990)。

BPI蛋白质与膜结合的LPS结合可以提高敏感的革兰氏阴性细菌的包膜的通透性，Ooi, et al., J. Biol. Chem.,262:14891(1987)。BPI蛋白质也结合到可溶性LPS，并且通过利用酸提取以及与离子交换层析或大肠杆菌亲和层析相结合的方法已从多形核白细胞嗜中性粒细胞（“PMNs”）中分离出人BPI蛋白质，Elsbach et al., J.Biol. Chem., 254:11000(1979)；Weiss et al., Blood, 69:652(1987)。从人PMNs中分离的完整BPI蛋白质具有潜在的针对广谱革兰氏阴性细菌的杀菌活性，Elsbach ,et al., J. Biol. Chem.,254:11000(1979)。该抗菌活性表现为与分离到的人完整BPI蛋白质的氨基末端区域相关联。相反，分离到的人BPI蛋白质的羧基末端区域仅显示微弱的可检测的抗菌活性，Ooi, et al., J. Exp. Med.,174:649(1991)。

已将编码BPI的人DNA进行克隆并且所编码的蛋白质的氨基酸序列已经得到阐明[参见，Gray et al., J. Biol. Chem., 264:9505(1989)，下文中称之为“Gray”；美国专利证书No.5,198,541，这两篇文献引入本文作参考]，因而可以大规模地生产重组BPI及其生物活性[例如，氨基和羧基末端]片段。开始的试验是利用传统的蛋白质纯化方法从被转染细胞培养基中纯化重组BPI和BPI相关的蛋白质，但仅得到低产量，利用35S标记的蛋氨酸以及在能表达含有成熟BPI蛋白质的氨基末端199个氨基酸重组产物（下文中称为rBPI(1-199)）的转染的中国仓鼠卵巢细胞（CHO）的细胞培养物上进行的脉冲跟

踪试验表明，在3．5小时至7小时跟踪时期内培养基中重组BPI片段消失了。目的在于测定该低产量产品的主要成分的初试方法表明，该蛋白质产品显示有显著的“粘性”，并且，事实上该蛋白质本身相互吸附，吸附至培养基中其他成分（包括宿主细胞），以及吸附至塑料和玻璃培养容器上。但是，还不能解释该蛋白质丢失的确切的原因。

类似于BPI蛋白质，LBP结合至LPS的类脂A部分。由肝脏分泌的完整LBP蛋白质是60KD蛋白质并且已有报道该蛋白质负责将LPS传递至巨噬细胞，Ooi, et al., J. Exp. Med., 174：649-65（1991）。与BPI蛋白质不同的是，通常LBP加强由LPS产生的炎症反应。例如，LBP刺激LPS诱导的肿瘤坏死因子（“TNF”）产生。

本发明的兴趣在于利用离子交换材料分离和纯化蛋白质和相关物质。例如，由 Prior 等人的PCT公开申请No．WO89／05157报道了借助于将细胞培养基通过色谱柱而将重组免疫球蛋白分离和纯化，其中免疫球蛋白吸附至交换物质上。然后通过提高柱子中的盐浓度而洗脱该免疫球蛋白，作为另一个实例，Robins 等人的PCT公开申请No．WO90／08159报道了通过在阴离子交换材料存在时进行培养而从蛋白质制备物中除去DNA。Wang. Ann. N. Y. Acad. Sci., 413：313-321（1983）提供了利用非离子树脂从发酵培养物中生产和分离典型的抗菌素环己酰亚胺的“杂合”发酵和提取方法的结果，并且指出对于一种树脂（XAD-4，Rohm and Haas，Philadelphia，PA），产品吸附至该树脂表面，以方便地从该树脂上收集该产品。

由于利用内毒素结合蛋白质如BPI蛋白质和LBP作为细菌感染

以及其后遗症的调节因子，因而该领域中需要一种从细胞培养基中分离该蛋白质的改进方法。

本发明提供了有助于高产量地分离内毒素结合蛋白质，尤其是类脂A结合蛋白质的改进方法。

大体上说该改进方法包括将颗粒状阳离子交换材料掺入到含有宿主细胞的细胞培养基中，该宿主细胞已用编码内毒素结合蛋白质的DNA遗传转染。由所说宿主细胞分泌至细胞培养基中的这些蛋白质可逆地结合至所说阳离子交换材料上。然后从细胞培养基上分离带有结合蛋白质的阳离子交换材料。最后，再从阳离子交换材料上分离出所需的内毒素结合蛋白质。

该改进方法包括将颗粒状阳离子交换材料（优选的是S－琼脂糖颗粒）掺入到含有宿主细胞（优选的是CHO－KI或CHO－DG44细胞）的细胞培养基中，该宿主细胞已用表达内毒素结合蛋白质或其片段的DNA进行遗传转化。由所说宿主细胞分泌至细胞培养基中的该蛋白质可逆地结合至所说阳离子交换材料上。然后从细胞培养基中分离带有结合蛋白的阳离子交换树脂。最后，从阳离子交换材料上分离该蛋白质。

目前优选用于实施本发明的阳离子交换材料是S－琼脂糖并且现在优选的分离方法包括将阳离子交换材料依次与梯度或等级增加的离子强度接触。

在本发明的一个优选实施例中，将该改进方法用于生产重组BPI产物，包括但不限于杀菌性／通透性增加的蛋白质及其生物活性片段，也可以生产与BPI相关的产品，如融合蛋白包括在他们的氨基末端是BPI蛋白或其一种生物学活性片段，在它们的羧基末端，

至少有免疫球蛋白重链区域的一个不变区或其等位变异体。由遗传工程转化的宿主细胞分泌所需的蛋白质，该宿主细胞在适合于其生长以及该蛋白质产物分泌的培养基中生长并维持。

在本发明的另一个实施例中，还将本发明的改进方法应用于分离脂多糖结合蛋白质和其氨基末端片段。

前文的概述举例说明了本发明的优选实施方案。通过阅读下面的详细描述，本领域的技术人员能显而易见地知道本发明的许多方面和优点。

图1．描绘了利用本发明的方法以及传统的层析方法分离rBPI（1－199）蛋白质的比较实验的结果。

图2．描绘了从S－琼脂糖中逐步洗脱rBPI（1－99）的结果。

图3．描绘了利用 Western 印迹技术分析根据本发明制备的产品的结果。

图4．描绘了根据本发明方法制备的rBPI－Ig融合产品的 Western 印迹。

图5．描述了表明分离根据本发明方法制备的LBP的凝胶的考马斯亮蓝染色的结果。

下面的详细描述举例说明本发明方法的实施过程，具体涉及从动物细胞培养物中重组制备三种特定的内毒素结合蛋白质重组BPI蛋白质融合蛋白质的氨基末端部分（“rBPI蛋白质”）、重组LBP的氨基末端部分（“rLBP”）、以及rBPI免疫球蛋白融合蛋白质（“rBPI－Ig融合”）。本文采用特定的具体内毒素结合蛋白质举例说明本发明的实施，由于其一般结构和功能的相似性，

所以利用本发明方法可以分离任何内毒素结合蛋白质对本领域内技术来说是显而易见的。这样的蛋白质包括但不限于多粘菌素B、高密度脂蛋白、蕈抗-LPS因子以及 tachyplesin。

更具体地讲，实施例1说明向细胞培养基中加入阳离子交换材料、S-琼脂糖导致rBPI蛋白质产量提高。实施例2进一步提供了表明将阳离子交换材料导入细胞培养物中导致rBPI蛋白质产量增加的结果。实施例3举例说明用改进方法分离rBPI-免疫球蛋白融合蛋白的实施过程，实施例4举例说明阳离子交换材料在LBP分离过程中应用。

实 施 例 1

重组BPI产品的分离

利用本发明的方法分离重组BPI蛋白，该蛋白质是编码31个残基信号序列以及成熟人BPI的N-末端的头199个氨基酸的DNA的表达产物，其序列列于SEQ ID NoS：1和2，并且在本文中称作为“rBPI(1-199)”。该DNA序列与Gray, et al.,（见前）报道的编码BPI的DNA序列的不同之处在于，其中rBPI(1-199)表达产物的第151位的缬氨酸（具体为GTG），而不是 Gray 等人序列中的GTC，而且在rBPI(1-199)中185位编码的是谷氨酸（具体为GAG）而不是在 Gray 等人报道的序列的相应位点上的赖氨酸（具体为AAG）。在 Gazzano-Santoro, et al., Infection and Immunity, 60：4754-4761(1992)中报道了rBPI(1-199)蛋白质的重组产物，其中的蛋白质称作为“rBPI-23”。

在该实施例中使用的宿主细胞是用ＤＮＡ载体转化的ＣＨＯ－Ｋ１细胞，该载体包括编码人ＢＰＩ的初始１９９个氨基末端氨基酸及其前面的内源性３１个残基分泌信号序列的ＤＮＡ，所需的表达产物ｒＢＰＩ（１－１９９）是人ＢＰＩ蛋白质的生物学活性片段，该片段含有起始的１９９个氨基末端残基，在由宿主细胞进行的转译后分泌加工过程中已将信号序列残基从该片段上除去。

制备在添加了５％胎牛血清的 Ham's Ｆ１２培养基中含有转染的ＣＨＯ宿主细胞的两个旋转摇瓶，并将细胞生长至融合（大约３天）。一旦达到融合，移走 Hams Ｆ１２培养基并用５００ml ＨＢ－ＣＨＯ无血清培养基（ Irvine Scientific ,Irvine Ca .）替代。向作为第一旋转摇瓶的两个摇瓶之一中加入约８ｇｍ（湿重）的无菌Ｓ－琼脂糖（ Pharmacia , fast flow , #１７－０５１１－０１，Uppsula ,Sweden ）３天。然后分离Ｓ－琼脂糖以便制备第一个柱。从摇瓶中移走生长培养基以及Ｓ－琼脂糖树脂，收集后放置至少１５分钟以便使Ｓ－琼脂糖沉至容器的底部。通过倾析移走大部分不含树脂的培养基，然后将培养基通过一个装置如热处理的玻璃盘过滤，以便移走细胞并滞留Ｓ－琼脂糖。在倾析培养基后，将Ｓ－琼脂糖悬浮于乙酸盐缓冲液，该缓冲液（ＰＨ４．０）包括含有０．１Ｍ ＮａＣｌ的２０ｍＭ乙酸钠盐／乙酸，缓慢搅拌，并使之沉淀１０分钟。然后倾去缓冲液并将小体积的Ｓ－琼脂糖转移至合适大小的液相色谱柱（１×１０cm，Econocolumn ,BioRad, Richmond , ＣＡ）。

第二个摇瓶含有的细胞在上面所述条件但没有Ｓ－琼脂糖存在的情况下生长。从该摇瓶中移出培养基。通过离心移走ＣＨＯ细胞并调

整澄清的培养基使之含有20mM醋酸钠／醋酸，PH4.0。稀释该培养基至导电率为10-15ms／cm，然后上样于第二个即传统的S-琼脂糖柱子上，该柱子已用含0.1M NaCl的20mM乙酸钠／乙酸（乙酸缓冲液PH4.0）平衡，以便最大程度地结合rBPI(1-199)蛋白质。

用0.1M NaCl-乙酸缓冲液洗涤第一和第二个S-琼脂糖柱，直至洗脱液的A_{280}吸收度相同于仅含0.1M NaCl-乙酸缓冲液的A_{280}吸收度。然后用1.0M NaCl-乙酸缓冲液以单一步骤洗脱结合至每个柱子上的蛋白质。

将来自两个柱子上的洗脱液进行ELISA分析，在4℃，PBS存在下将来自洗脱液的样品结合至 Immulon -平底多孔平板（Dynetech Labs ）上过夜。然后将这些平板用溶于PBS中的0.05%吐温-20洗涤，再与溶于含0.05%吐温-20的PBS中的1:1000稀释的兔抗-rBPI(1-199)抗血清，在室温下共同孵育1小时。孵育后，再一次用含0.05%吐温-20的PBS洗涤平板，并按照制造商的说明用TMB试剂（Pierce Rockford II）显色ELISA，并在450nm处在EL309微滴板读数器中读数（Biotek Instruments，Winooski Vt.）。

ELISA结果显示，源自于细胞培养基的S-琼脂糖柱的洗脱液比已加入培养基的S-琼脂糖柱的洗脱液所产生的反应性强3-8倍。

实施例2提供的结果进一步证明与转染的CHO细胞一起培养S-琼脂糖提高了由转染细胞产生的rBPI(1-199)蛋白质的

产量。

实 施 例 2

定量分析分离的rBPI（1-199）

为了进一步定量地证明向细胞培养基中加入阳离子交换材料时，从实施例1中的CHO细胞培养物中获得的rBPI（1-199）蛋白质产物的产量更高，在上面描述的洗脱液样品上进行凝胶染色和Western 分析。

通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分离从实施例1描述的1.0M NaCl-乙酸缓冲液洗脱液中获得的蛋白质样品。首先将rBPI（1-199）样品调节至含有少于0.5M的NaCl，然后通过加入冰冷丙酮至终浓度为75%而沉淀样本。通过以大于10，000rpm转速离心5-10分钟而使得到的蛋白质沉淀形成团丸。移去上清液，将该沉淀悬浮于含8M脲，2%SDS，6-mM Tris HCl，PH6.8的凝胶缓冲液中。将悬浮的样品和合适的蛋白质分子量标准物（BioRad Richmond，CA和BRL，Bethesda，MD）加热至95℃，保持3-5分钟，然后上样于特定百分数或梯度百分数的聚丙烯酰胺凝胶（BioRad）上并用微型 Protean Ⅱ凝胶电泳设备（BioRad）进行分离。电泳后，直接将凝胶进行考马斯染色（0.5%考马斯亮蓝-R，25%异丙醇，10%甲醇，10%乙酸）或进行电转移。将通过SDS-PAGE 分离的蛋白质与合适的预染色的标准蛋白质（BioRad）一起转移至硝酸纤维素（BA85，Schleicher and Schuell Keene，NH）或PVDF（Immobilon-P，Millipore，Bedford，MA）膜上。转移是在0.5大气压，10%CAPS（环己胺-1-丙烷

-磺酸），10%甲醇，PH11.5中进行20分钟。根据制造商的说明用1：1000稀释的兔抗-人BPI（全蛋白）抗血清和 Western Lite Chemiluminescent Detection System （Tropix System，Bedford，MA）加工处理所得到的印迹。用0.25%的明胶取代 Tropix I-Block 并且在电转移后不干燥膜。经加工的膜曝光于 Cronex 4 胶片（Dupont，Wilmington，DE）。

染色的凝胶和 Western 分析的结果显示于图1中，其中正方形A和B分别表示由与培养物培养基一起孵育的S-琼脂糖珠形成的柱子的流出物（FT）0.1M Nacl 和1.0M NaCl 洗脱物的考马斯染色和 Western 印迹分析。正方形C和D相应地表示从“传统的”S-琼脂糖柱上得到的洗脱物的考马斯染色和 Western 吸印分析。方块A和C的箭头表明相应于rBPI（1-199）蛋白质产物的分子量的区域。当在细胞生长期间向培养基中加入阳离子交换树脂，S-琼脂糖，估测rBPI（1-199）蛋白质产量至少提高10倍。

随后的实验包括从3-5个旋转援瓶中获得的20-40克S-琼脂糖中分离rBPI（1-199）。用NaCl浓度逐渐提高的乙酸盐缓冲液洗脱结合的样品。如图2所示，发现在用0.8，0.9，1.0和1.5MNaCl-乙酸盐缓冲液洗脱S-琼脂糖柱的洗脱液中由考马斯蓝染色后观察到的rBPI（1-199）产物为23Kd蛋白质。在0.2M至0.7MNaCl-乙酸盐缓冲液洗脱物中观察到少量或没有rBPI（1-199）蛋白质。Western 印迹结果（图3）表明在S-琼脂糖柱的0.8M至1.0MNaCl-乙酸盐缓

冲液的洗脱液中获得最强的可检测的rBPI（1－199）蛋白质信号。

来自S－琼脂糖柱的1.5MNaCl洗脱液也含有识别为rBPI（1－199）的蛋白质（见图2，右边泳道）。S－琼脂糖柱的1.5MNaCl－乙酸盐缓冲液洗脱液含有具有分子量为约40KDa和大于66K.Da蛋白质（图2），在用二硫苏糖醇处理后，能将它们还原为一条约23KDa单谱带。还原的蛋白质与抗－BPI抗血清有交叉反应，并有正确加工的rBPI（1－199）的N－末端序列。40KDa和大于66KDa的蛋白质显示出是rBPI（1－199）的二硫键相连的多体。

前面提到的结果表明向细胞培养基中加入阳离子交换材料提高了rBPI（1－199）蛋白质的回收率。为了测定S－琼脂糖的最适浓度，向含有500ml培养基和转染CHO细胞的旋转摇瓶中加入1.25克至10克量的S－琼脂糖柱，并按如上所述进行孵育。然后按如上所述将含有阳离子交换材料的培养基倾倒至柱上。先用0.1MNaCl乙酸盐缓冲液，然后用0.7MNaCl－乙酸盐缓冲液洗涤柱子。并用1.0MNaCl－乙酸盐缓冲液洗脱rBPI（1－199）样品。在C_4反相HPLC上进行层析而测定rBPI（1－199）的产量，对于加入2.5克，5.0克和10克量的S－琼脂糖柱，该产量基本上是不变的。在每瓶仅含有1.25克S－琼脂糖柱的旋转瓶中产量约降低50%。

实施例3提供的结果证明利用本发明方法获得的rBPI融合蛋白产量提高。

实施例3

rBPI-Ig融合蛋白的分离。

在本实施例中使用的宿主细胞是用DNA载体转染的CHO-DG44细胞，该载体含有编码与至少一种免疫球蛋白重链的一个不变区融合的BPI蛋白起始的199个氨基酸的DNA。在互补的共同拥有的美国专利申请序列号No.07/885,911，以及共同拥有的目前申请的继续部分申请系列号-（Attorney Docket No.27129/31429，两文献引入本文做参考）中提供了这样的“rBPI融合体”的构建过程。在旋转摇瓶中生长转染的CHO-DG44细胞。对于每个旋转摇瓶，用转染细胞接种每个T150烧瓶（含50ml无核苷α-MEM以及10%经渗析的胎牛血清），使细胞生长至融合（约3-4天）。然后将细胞用胰蛋白酶处理，并转移至含500mlHam's F12培养基和10%胎牛血清的900cm² 旋转瓶中，约生长3天至融合。一旦达到融合后，除去Ham's F12培养基并用500mlHB-CHO无血清培养基（Irvine Scientific, Irvine, CA）替代。

首先用 Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水（PBS）洗涤S-琼脂糖并在120℃高压蒸汽灭菌20分钟，然后经无菌操作将它加入到旋转瓶中。将细胞在37℃培养3天，此时移走珠子和生长培养基并不受干扰地放置至少15分钟。通过倾析移去大部分不含树脂的培养基，并通过一个装置，如加热处理的玻璃盘进行过滤，以便除去细胞并滞留S-琼脂糖。在滗去培养基后，将S-琼脂糖悬浮于含有20mM乙酸钠/乙酸，0.1M NaCl，PH4.0的乙酸缓冲液中，缓慢搅拌并将它放置10分钟。然后滗去缓冲液并将小体积的S

-琼脂糖转移至合适大小的液相色谱柱。用 Econocolumn（2.5×10cm，BioRad，Richmond，CA）分析从3至5个旋转瓶收集的20至40克贮存的S-琼脂糖样品。用0.1M NaCl-乙酸钠缓冲液洗涤经填充的S-琼脂糖柱，直至洗脱液的A280吸收值等同于仅含0.1M NaCl-乙酸盐缓冲液的吸收值，然后用0.5M NaCl-乙酸盐缓冲液，用1.0M NaCl-乙酸盐缓冲液，并再用1.5MNaCl-乙酸盐缓冲液洗涤。

按上面所述制备其它的CHO-DG44细胞，不同的是培养基中不加入S-琼脂糖珠。与前面不同，制定一个方案，利用两个不同的蛋白质A柱纯化rBPI融合表达产物。将HB-CHO培养基的第一个样品（见上文）通过一个0.45μm滤器过滤，以便从剩余的培养基中分离CHO-DG44细胞。将该样品PH调至8.0并置于 Pro SepA （Bioprocessing）柱上。将第二种制备物置于AvidGel（Bioprocessing）柱上。用25mM柠檬酸盐缓冲液（PH5.5）洗脱两个柱子。从这两种蛋白质A柱上都没有回收到rBPI融合产物。并且在还原后也未从 ProSepA 柱上观察到产物（图4，泳道1）。但是，用100mM柠檬酸盐缓冲液（PH3.0）洗涤 ProSepA 和 Avidgel 柱时，检测到rBPI融合蛋白，分别显示于图4的泳道2和3。图4的泳道4-6表示来自S-琼脂糖柱的0.5M，1.0M和1.5M洗脱液。在S-琼脂糖柱的洗脱液中，1.5M洗脱液含有相应于约100KD的融合二聚体。

实施例4提供的结果证明，如果将用编码LBP的DNA转染细胞与阳离子交换树脂一起孵育时也可以获得产量增加的LBP产品。

实施例4

脂多糖结合蛋白质的分离

已得到的相对于LBP的25KD氨基末端的DNA序列显示于SEQ ID No.3中。该序列与 Schumann et al.，Science，249：1429-1431（1990）报道的序列中的两个区域（SEQ ID No.4）不同。这些不同之处导致129-132位以及149位的氨基酸不同（在 Schumann，supra 中148位的天冬酰胺残基是由GAT编码的，而在SEQ ID No.3中由GAC编码）。也可参见PCT公开申请93/06228。

在该实施例中使用的宿主细胞是用DNA载体转染的CHO-DG44细胞，该载体含有编码LBP的起始197个氨基酸即表达产物的DNA。

将转染的DG44细胞在旋转摇瓶中生长。对于每一种旋转瓶，用转染细胞接种T150烧瓶（含有50ml无核苷的α-MEM以及10%经渗析的胎牛血清），并将细胞生长至融合（大约3-4天）。然后用胰蛋白酶处理细胞，并转移至含有500ml Ham's F12培养基和10%胎牛血清的900cm^2旋转瓶中，大约生长3天至融合。一旦达到融合，除去Ham's F12培养基，并用500ml HB-CHO无血清培养基（Irvine Scientific，Irvine，CA）代替。

将S-琼脂糖珠首先用PBS洗涤，并在120℃高压灭菌20分钟，然后经无菌操作加至旋转瓶中。将细胞在37℃培养3天，此时除去珠和生长培养基并不受干扰至少保留15分钟。通过倾析除去

大部分不含树脂的培养基，并使培养基通过一个装置过滤，如热处理的玻璃碟，以便移走细胞而滞留S－琼脂糖。在倾去培养基后，将S－琼脂糖悬浮于含20mM乙酸钠／乙酸，0.1MNaCl（PH4.0）的乙酸盐缓冲液中，缓慢搅拌，并使之沉淀10分钟。然后滗去缓冲液，并转移小体积的S－琼脂糖至大小合适的液相色谱柱上。将一个 Econocolumn （2.5×10cm，BioRad， Richmond，CA）应用于从3至5个旋转瓶收集的20至40克S－琼脂糖贮存样品。用0.1MNaCl－乙酸盐缓冲液洗涤已填充的S－琼脂糖柱直至洗脱液的吸收值相等于仅含0.1MNaCl－乙酸盐缓冲液的吸收值，再用0.7NNaCl－乙酸盐缓冲液以及再用1.0MNaCl－乙酸盐缓冲液洗涤。

从已加入S－琼脂糖珠的细胞培养物收获的rLBP的产量显示于图5中，该图为上文描述的0.7M（泳道1和3）和1.0M（泳道2和4）洗脱液的考马斯染色凝胶。如图所示，在1.0M时洗脱出显著量的LBP。基于其计算到的PI（6.6），S－琼脂糖能够促进LBP从细胞培养物中产生是未曾预料到的。在上面使用的培养基中，其PH约为7.0，基于LBP的PI值，所期望的是LBP应不带电荷或微带负电荷，并因此而不能与阳离子交换树脂，如S－琼脂糖起反应。

在实施本发明时，对本领域内熟练技术人员而言显然能够在前面描述的目前优选的实施例基础上进行许多修饰和改变。例如，在本发明中使用的阳离子交换材料的浓度可以依据所使用的细胞的数目和类型（即，生产重组产品的效率）而变化。作为另一个例子，在本发明方法中可以使用除S－琼脂糖以外的阳离子交换树脂［例如，

Biorex 70，以及SP（硫丙基）型材料如SP-葡聚糖凝胶，以及CM（羧甲基）型材料如CM环脂糖和CM葡聚糖凝胶]，由于其最容易操作，易于无菌处理等等原因，S-琼脂糖是优选的。还有另一个例子，虽然上面描述的实施例指出内毒素结合蛋白质的重组制备是在旋转瓶中进行，但本发明的方法也可以简便地扩大规模至发酵罐中生产。用于生产rBPI(1-199)的方法的典型的发酵条件包括在750L Chemap (Woodbury ，N.Y.)发酵罐中使用600L操作体积，其中用pING4502质粒[参见，Gazzano et al., supra)转染的CHO-K1细胞在ExCell301培养基(JRH Scirntific)中生长，该培养基中已补充了0.05%FBS和0.01%消珠剂(U Carferm Adjuvant 27.Union Carbide)并加入了1%SP琼脂糖"大珠"[100-300微米直径，Pharmacia)。最后，期望根据本发明方法分离到的重组内毒素结合蛋白质的精确洗脱曲线依据所涉及的被确切识别的蛋白质的不同而变化。作为一个实例，在用0.7M NaCl-乙酸盐缓冲液洗涤后可简便地从树脂珠上分离到rBPI(1-199)。但是，在用0.6MNaCl-乙酸盐缓冲液洗涤后进行的分离可以增加如由 Theofan 等人在共有的互补美国专利申请系列号No.08/013,801中描述的BPI蛋白质的胱氨酸取代类似物的产量。最后，本发明的范围应该仅限制于所附的权利要求的范围。

序列目录

(1)一般资料

(i)申请人: Grinna , Lynn

（ｉｉ）发明名称：制备内毒素结合蛋白质的改进方法

（ｉｉｉ）序列数：4

（ｉｖ）通讯地址：

（Ａ）地址：Marshall，O'Toole，Gerstern，Murray & Borun

（Ｂ）街道：６３００ Sears Tower，２３３ South Wacker Drive

（Ｃ）城市：芝加哥

（Ｄ）州：伊利诺斯

（Ｅ）国家：美国

（Ｆ）邮编：６０６０６－６４０２

（ｖ）计算机可读格式

（Ａ）介质类型：Floppy 盘

（Ｂ）计算机：ＩＢＭ ＰＣ兼容

（Ｃ）操作系统：ＰＣ－ＤＯＳ／ＭＳ－ＤＯＳ

（Ｄ）软件：PatentIn Release #１．０，Version #１．２５

（ｖｉ）目前的申请资料：

（Ａ）申请号：

（Ｂ）申请日：

（Ｃ）分类号：

（ｖｉｉ）以前申请的资料：

（Ａ）申请号：ＵＳ０７／８８５，５０１

（Ｂ）申请日：１９９２年５月１９日

（ｖｉｉｉ）代理人／代理商资料：

（Ａ）姓名： Meyers ,Thomas C.

（Ｂ）登记号：３６，９８９

（Ｃ）委托／案件目录编号：３１４０５

（ｉｘ）电讯资料：

（Ａ）电话：３１２／４７４－６３００

（Ｂ）传真：３１２／４７４－０４４８

（Ｃ）电传：２５－３８５６

（２）ＳＥＱ ＩＤ Ｎｏ．１的资料

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：１８１３个碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）股数：单股

（Ｄ）结构：线性

（ｉｉ）分子类型：ｃＤＮＡ

（ｉｘ）特征：

（Ａ）名称／键：ＣＤＳ

（Ｂ）定位：３１..１４９１

（ｉｘ）特征：

（Ａ）名称／键：ｍａｔ－肽

（Ｂ）定位：１２４．１４９１

（ｘｉ）序列描述：ＳＥＱ ＩＤ Ｎｏ．１

```
CAGGCCTTGA GGTTTTGGCA GCTCTGGAGG ATG AGA GAG AAC ATG GCC AGG GGC      54
                                 Met Arg Glu Asn Met Ala Arg Gly
                                 -31 -30                 -25

CCT TGC AAC GCG CCG AGA TGG GTG TCC CTG ATG GTG CTC GTC GCC ATA      102
Pro Cys Asn Ala Pro Arg Trp Val Ser Leu Met Val Leu Val Ala Ile
            -20                 -15                 -10

GGC ACC GCC GTG ACA GCG GCC GTC AAC CCT GGC GTC GTG GTC AGG ATC      150
Gly Thr Ala Val Thr Ala Ala Val Asn Pro Gly Val Val Val Arg Ile
         -5                  1                   5

TCC CAG AAG GGC CTG GAC TAC GCC AGC CAG CAG GGG ACG GCC GCT CTG      198
Ser Gln Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Ser Gln Gln Gly Thr Ala Ala Leu
 10                  15                  20                  25

CAG AAG GAG CTG AAG AGG ATC AAG ATT CCT GAC TAC TCA GAC AGC TTT      246
Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys Ile Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Phe
                30                  35                  40

AAG ATC AAG CAT CTT GGG AAG GGG CAT TAT AGC TTC TAC AGC ATG GAC      294
Lys Ile Lys His Leu Gly Lys Gly His Tyr Ser Phe Tyr Ser Met Asp
            45                  50                  55

ATC CGT GAA TTC CAG CTT CCC AGT TCC CAG ATA AGC ATG GTG CCC AAT      342
Ile Arg Glu Phe Gln Leu Pro Ser Ser Gln Ile Ser Met Val Pro Asn
         60                  65                  70

GTG GGC CTT AAG TTC TCC ATC AGC AAC GCC AAT ATC AAG ATC AGC GGG      390
Val Gly Leu Lys Phe Ser Ile Ser Asn Ala Asn Ile Lys Ile Ser Gly
     75                  80                  85

AAA TGG AAG GCA CAA AAG AGA TTC TTA AAA ATG AGC GGC AAT TTT GAC      438
Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys Met Ser Gly Asn Phe Asp
 90                  95                  100                 105
```

```
CTG AGC ATA GAA GGC ATG TCC ATT TCG GCT GAT CTG AAG CTG GGC AGT        486
Leu Ser Ile Glu Gly Met Ser Ile Ser Ala Asp Leu Lys Leu Gly Ser
                110                 115                 120

AAC CCC ACG TCA GGC AAG CCC ACC ATC ACC TGC TCC AGC TGC AGC AGC        534
Asn Pro Thr Ser Gly Lys Pro Thr Ile Thr Cys Ser Ser Cys Ser Ser
            125                 130                 135

CAC ATC AAC AGT GTC CAC GTG CAC ATC TCA AAG AGC AAA GTG GGG TGG        582
His Ile Asn Ser Val His Val His Ile Ser Lys Ser Lys Val Gly Trp
        140                 145                 150

CTG ATC CAA CTC TTC CAC AAA AAA ATT GAG TCT GCG CTT CGA AAC AAG        630
Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys Ile Glu Ser Ala Leu Arg Asn Lys
    155                 160                 165

ATG AAC AGC CAG GTC TGC GAG AAA GTG ACC AAT TCT GTA TCC TCC GAG        678
Met Asn Ser Gln Val Cys Glu Lys Val Thr Asn Ser Val Ser Ser Glu
170                 175                 180                 185

CTG CAA CCT TAT TTC CAG ACT CTG CCA GTA ATG ACC AAA ATA GAT TCT        726
Leu Gln Pro Tyr Phe Gln Thr Leu Pro Val Met Thr Lys Ile Asp Ser
                190                 195                 200

GTG GCT GGA ATC AAC TAT GGT CTG GTG GCA CCT CCA GCA ACC ACG GCT        774
Val Ala Gly Ile Asn Tyr Gly Leu Val Ala Pro Pro Ala Thr Thr Ala
            205                 210                 215

GAG ACC CTG GAT GTA CAG ATG AAG GGG GAG TTT TAC AGT GAG AAC CAC        822
Glu Thr Leu Asp Val Gln Met Lys Gly Glu Phe Tyr Ser Glu Asn His
        220                 225                 230

CAC AAT CCA CCT CCC TTT GCT CCA CCA GTG ATG GAG TTT CCC GCT GCC        870
His Asn Pro Pro Pro Phe Ala Pro Pro Val Met Glu Phe Pro Ala Ala
    235                 240                 245

CAT GAC CGC ATG GTA TAC CTG GGC CTC TCA GAC TAC TTC TTC AAC ACA        918
His Asp Arg Met Val Tyr Leu Gly Leu Ser Asp Tyr Phe Phe Asn Thr
250                 255                 260                 265

GCC GGG CTT GTA TAC CAA GAG GCT GGG GTC TTG AAG ATG ACC CTT AGA        966
Ala Gly Leu Val Tyr Gln Glu Ala Gly Val Leu Lys Met Thr Leu Arg
                270                 275                 280

GAT GAC ATG ATT CCA AAG GAG TCC AAA TTT CGA CTG ACA ACC AAG TTC       1014
Asp Asp Met Ile Pro Lys Glu Ser Lys Phe Arg Leu Thr Thr Lys Phe
            285                 290                 295

TTT GGA ACC TTC CTA CCT GAG GTG GCC AAG AAG TTT CCC AAC ATG AAG       1062
Phe Gly Thr Phe Leu Pro Glu Val Ala Lys Lys Phe Pro Asn Met Lys
        300                 305                 310
```

```
ATA CAG ATC CAT GTC TCA GCC TCC ACC CCG CCA CAC CTG TCT GTG CAG      1110
Ile Gln Ile His Val Ser Ala Ser Thr Pro Pro His Leu Ser Val Gln
    315                 320                 325

CCC ACC GGC CTT ACC TTC TAC CCT GCC GTG GAT GTC CAG GCC TTT GCC      1158
Pro Thr Gly Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Val Asp Val Gln Ala Phe Ala
330                 335                 340                 345

GTC CTC CCC AAC TCC TCC CTG GCT TCC CTC TTC CTG ATT GGC ATG CAC      1206
Val Leu Pro Asn Ser Ser Leu Ala Ser Leu Phe Leu Ile Gly Met His
                350                 355                 360

ACA ACT GGT TCC ATG GAG GTC AGC GCC GAG TCC AAC AGG CTT GTT GGA      1254
Thr Thr Gly Ser Met Glu Val Ser Ala Glu Ser Asn Arg Leu Val Gly
            365                 370                 375

GAG CTC AAG CTG GAT AGG CTG CTC CTG GAA CTG AAG CAC TCA AAT ATT      1302
Glu Leu Lys Leu Asp Arg Leu Leu Leu Glu Leu Lys His Ser Asn Ile
        380                 385                 390

GGC CCC TTC CCG GTT GAA TTG CTG CAG GAT ATC ATG AAC TAC ATT GTA      1350
Gly Pro Phe Pro Val Glu Leu Leu Gln Asp Ile Met Asn Tyr Ile Val
    395                 400                 405

CCC ATT CTT GTG CTG CCC AGG GTT AAC GAG AAA CTA CAG AAA GGC TTC      1398
Pro Ile Leu Val Leu Pro Arg Val Asn Glu Lys Leu Gln Lys Gly Phe
410                 415                 420                 425

CCT CTC CCG ACG CCG GCC AGA GTC CAG CTC TAC AAC GTA GTG CTT CAG      1446
Pro Leu Pro Thr Pro Ala Arg Val Gln Leu Tyr Asn Val Val Leu Gln
                430                 435                 440

CCT CAC CAG AAC TTC CTG CTG TTC GGT GCA GAC GTT GTC TAT AAA          1491
Pro His Gln Asn Phe Leu Leu Phe Gly Ala Asp Val Val Tyr Lys
            445                 450                 455

TGAAGGCACC AGGGGTGCCG GGGGCTGTCA GCCGCACCTG TTCCTGATGG GCTGTGGGGC    1551

ACCGGCTGCC TTTCCCCAGG GAATCCTCTC CAGATCTTAA CCAAGAGCCC CTTGCAAACT    1611

TCTTCGACTC AGATTCAGAA ATGATCTAAA CACGAGGAAA CATTATTCAT TGGAAAAGTG    1671

CATGGTGTGT ATTTTAGGGA TTATGAGCTT CTTTCAAGGG CTAAGGCTGC AGAGATATTT    1731

CCTCCAGGAA TCGTGTTTCA ATTGTAACCA AGAAATTTCC ATTTGTGCTT CATGAAAAAA    1791

AACTTCTGGT TTTTTTCATG TG                                              1813
```

(2)SEQ ID No.2的资料

(i)序列特征：

(A)长度：487氨基酸

(B)类型：氨基酸

(C)结构：线性

(ii)分子类型：蛋白质

(xi)序列描述：SEQ ID No.2

```
Met Arg Glu Asn Met Ala Arg Gly Pro Cys Asn Ala Pro Arg Trp Val
-31 -30                 -25                 -20

Ser Leu Met Val Leu Val Ala Ile Gly Thr Ala Val Thr Ala Ala Val
-15                 -10                  -5                   1

Asn Pro Gly Val Val Val Arg Ile Ser Gln Lys Gly Leu Asp Tyr Ala
                5                   10                  15

Ser Gln Gln Gly Thr Ala Ala Leu Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys
        20                  25                  30

Ile Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Phe Lys Ile Lys His Leu Gly Lys Gly
    35                  40                  45

His Tyr Ser Phe Tyr Ser Met Asp Ile Arg Glu Phe Gln Leu Pro Ser
50                  55                  60                  65

Ser Gln Ile Ser Met Val Pro Asn Val Gly Leu Lys Phe Ser Ile Ser
                70                  75                  80

Asn Ala Asn Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe
            85                  90                  95

Leu Lys Met Ser Gly Asn Phe Asp Leu Ser Ile Glu Gly Met Ser Ile
        100                 105                 110

Ser Ala Asp Leu Lys Leu Gly Ser Asn Pro Thr Ser Gly Lys Pro Thr
    115                 120                 125

Ile Thr Cys Ser Ser Cys Ser Ser His Ile Asn Ser Val His Val His
130                 135                 140                 145

Ile Ser Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys
                150                 155                 160

Ile Glu Ser Ala Leu Arg Asn Lys Met Asn Ser Gln Val Cys Glu Lys
            165                 170                 175

Val Thr Asn Ser Val Ser Ser Glu Leu Gln Pro Tyr Phe Gln Thr Leu
        180                 185                 190

Pro Val Met Thr Lys Ile Asp Ser Val Ala Gly Ile Asn Tyr Gly Leu
    195                 200                 205
```

Val Ala Pro Pro Ala Thr Thr Ala Glu Thr Leu Asp Val Gln Met Lys
210 215 220 225

Gly Glu Phe Tyr Ser Glu Asn His His Asn Pro Pro Pro Phe Ala Pro
230 235 240

Pro Val Met Glu Phe Pro Ala Ala His Asp Arg Met Val Tyr Leu Gly
245 250 255

Leu Ser Asp Tyr Phe Phe Asn Thr Ala Gly Leu Val Tyr Gln Glu Ala
260 265 270

Gly Val Leu Lys Met Thr Leu Arg Asp Asp Met Ile Pro Lys Glu Ser
275 280 285

Lys Phe Arg Leu Thr Thr Lys Phe Phe Gly Thr Phe Leu Pro Glu Val
290 295 300 305

Ala Lys Lys Phe Pro Asn Met Lys Ile Gln Ile His Val Ser Ala Ser
310 315 320

Thr Pro Pro His Leu Ser Val Gln Pro Thr Gly Leu Thr Phe Tyr Pro
325 330 335

Ala Val Asp Val Gln Ala Phe Ala Val Leu Pro Asn Ser Ser Leu Ala
340 345 350

Ser Leu Phe Leu Ile Gly Met His Thr Thr Gly Ser Met Glu Val Ser
355 360 365

Ala Glu Ser Asn Arg Leu Val Gly Glu Leu Lys Leu Asp Arg Leu Leu
370 375 380 385

Leu Glu Leu Lys His Ser Asn Ile Gly Pro Phe Pro Val Glu Leu Leu
390 395 400

Gln Asp Ile Met Asn Tyr Ile Val Pro Ile Leu Val Leu Pro Arg Val
405 410 415

Asn Glu Lys Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu Pro Thr Pro Ala Arg Val
420 425 430

Gln Leu Tyr Asn Val Val Leu Gln Pro His Gln Asn Phe Leu Leu Phe
435 440 445

Gly Ala Asp Val Val Tyr Lys
450 455

(2)SEQ ID No.3的资料

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度５９１碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）股数：单股

（Ｄ）结构：线性

（ｉｉ）分子类型：ｃＤＮＡ

（ｉｘ）特征：

（Ａ）名称／键：ＣＤＳ

（Ｂ）定位：１．．５９１

（ｘｉ）序列描述：ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．３

```
GCC AAC CCC GGC TTG GTC GCC AGG ATC ACC GAC AAG GGA CTG CAG TAT          48
Ala Asn Pro Gly Leu Val Ala Arg Ile Thr Asp Lys Gly Leu Gln Tyr
 1               5                  10                  15

GCG GCC CAG GAG GGG CTA TTG GCT CTG CAG AGT GAG CTG CTC AGG ATC          96
Ala Ala Gln Glu Gly Leu Leu Ala Leu Gln Ser Glu Leu Leu Arg Ile
            20                  25                  30

ACG CTG CCT GAC TTC ACC GGG GAC TTG AGG ATC CCC CAC GTC GGC CGT         144
Thr Leu Pro Asp Phe Thr Gly Asp Leu Arg Ile Pro His Val Gly Arg
        35                  40                  45

GGG CGC TAT GAG TTC CAC AGC CTG AAC ATC CAC AGC TGT GAG CTG CTT         192
Gly Arg Tyr Glu Phe His Ser Leu Asn Ile His Ser Cys Glu Leu Leu
    50                  55                  60

CAC TCT GCG CTG AGG CCT GTC CCC GGC CAG GGC CTG AGT CTC AGC ATC         240
His Ser Ala Leu Arg Pro Val Pro Gly Gln Gly Leu Ser Leu Ser Ile
65                  70                  75                  80

TCC GAC TCC TCC ATC CGG GTC CAG GGC AGG TGG AAG GTG CGC AAG TCA         288
Ser Asp Ser Ser Ile Arg Val Gln Gly Arg Trp Lys Val Arg Lys Ser
                85                  90                  95

TTC TTC AAA CTA CAG GGC TCC TTT GAT GTC AGT GTC AAG GGC ATC AGC         336
Phe Phe Lys Leu Gln Gly Ser Phe Asp Val Ser Val Lys Gly Ile Ser
            100                 105                 110

ATT TCG GTC AAC CTC CTG TTG GGC AGC GAG TCC TCC GGG AGG CCC ACA         384
Ile Ser Val Asn Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ser Ser Gly Arg Pro Thr
        115                 120                 125

GTT ACT GCC TCC AGC TGC AGC AGT GAC ATC GCT GAC GTG GAG GTG GAC         432
Val Thr Ala Ser Ser Cys Ser Ser Asp Ile Ala Asp Val Glu Val Asp
    130                 135                 140

ATG TCG GGA GAC TTG GGG TGG CTC TTG AAC CTC TTC CAC AAC CAG ATT         480
Met Ser Gly Asp Leu Gly Trp Leu Leu Asn Leu Phe His Asn Gln Ile

145                 150                 155                 160

GAG TCC AAG TTC CAG AAA GTA CTG GAG AGC AGG ATT TGC GAA ATG ATC         528
Glu Ser Lys Phe Gln Lys Val Leu Glu Ser Arg Ile Cys Glu Met Ile
                165                 170                 175

CAG AAA TCA GTG TCC TCC GAT CTA CAG CCT TAT CTC CAA ACT CTG CCA         576
Gln Lys Ser Val Ser Ser Asp Leu Gln Pro Tyr Leu Gln Thr Leu Pro
            180                 185                 190

GTT ACA ACA GAG ATT                                                    591
Val Thr Thr Glu Ile
        195
```

(2)SEQ ID No.4的资料

(ⅰ)序列特征：

(A)长度：197个氨基酸

(B)类型：氨基酸

(D)结构：线性

(ⅱ)分子类型：蛋白质

(xi)序列描述：SEQ ID No.4

```
Ala Asn Pro Gly Leu Val Ala Arg Ile Thr Asp Lys Gly Leu Gln Tyr
 1               5                  10                  15

Ala Ala Gln Glu Gly Leu Leu Ala Leu Gln Ser Glu Leu Leu Arg Ile
            20                  25                  30

Thr Leu Pro Asp Phe Thr Gly Asp Leu Arg Ile Pro His Val Gly Arg
        35                  40                  45

Gly Arg Tyr Glu Phe His Ser Leu Asn Ile His Ser Cys Glu Leu Leu
    50                  55                  60

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

Ser Asp Ser Ser Ile Arg Val Gln Gly Arg Trp Lys Val Arg Lys Ser
                85                  90                  95

Phe Phe Lys Leu Gln Gly Ser Phe Asp Val Ser Val Lys Gly Ile Ser
            100                 105                 110

Ile Ser Val Asn Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ser Ser Gly Arg Pro Thr
        115                 120                 125

Val Thr Ala Ser Ser Cys Ser Ser Asp Ile Ala Asp Val Glu Val Asp
    130                 135                 140

Met Ser Gly Asp Leu Gly Trp Leu Leu Asn Leu Phe His Asn Gln Ile
145                 150                 155                 160

Glu Ser Lys Phe Gln Lys Val Leu Glu Ser Arg Ile Cys Glu Met Ile
            165                 170                 175

Gln Lys Ser Val Ser Ser Asp Leu Gln Pro Tyr Leu Gln Thr Leu Arg
        180                 185                 190

Val Thr Thr Glu Ile
    195
```

说 明 书 附 图

图 1A 图 1B

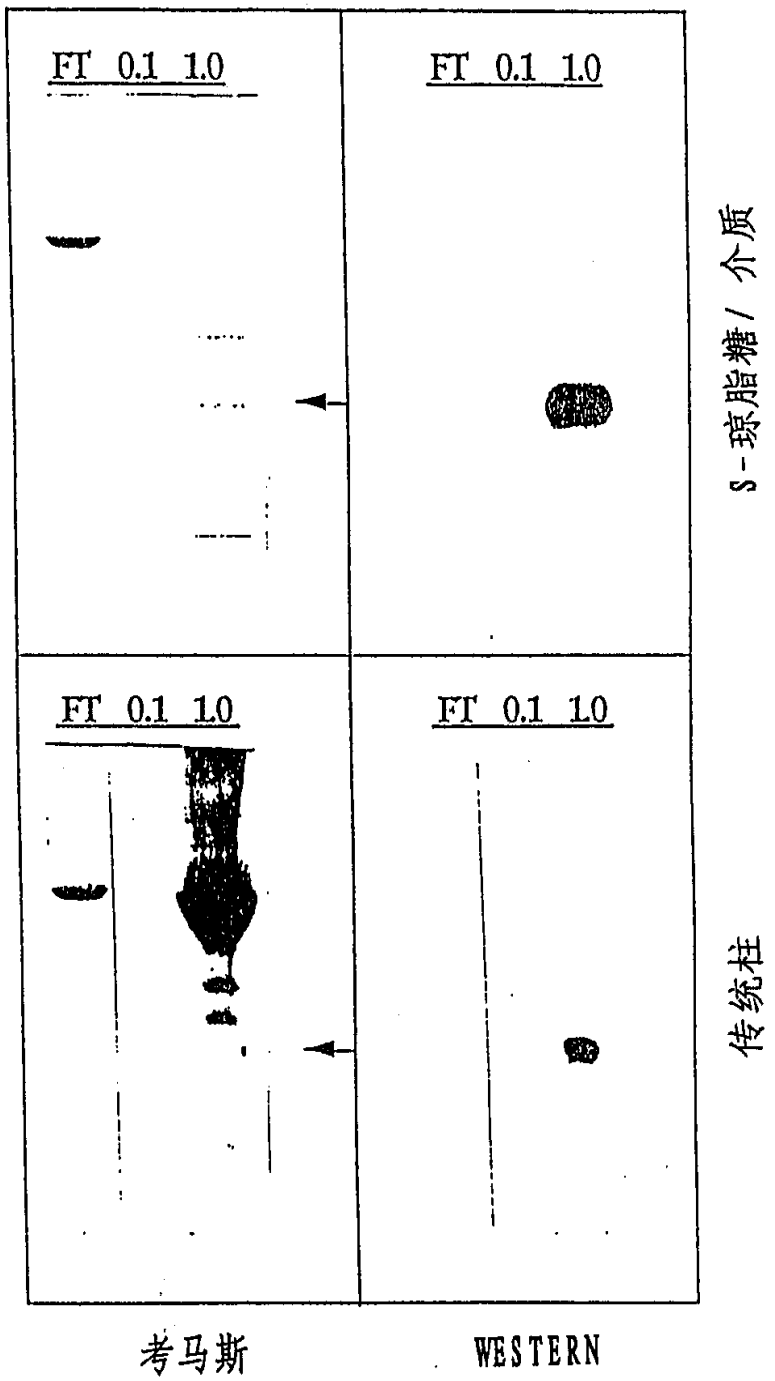


图 1C 图 1D

图 2

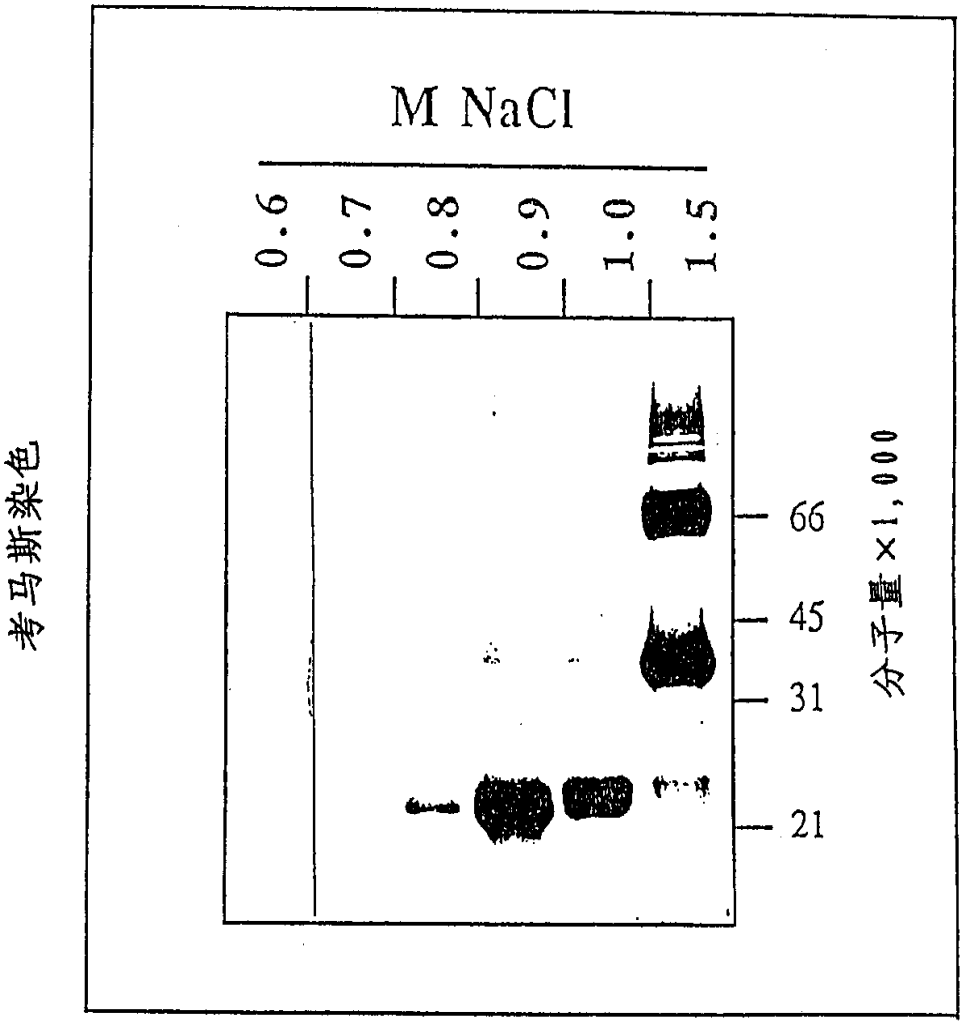


图 3

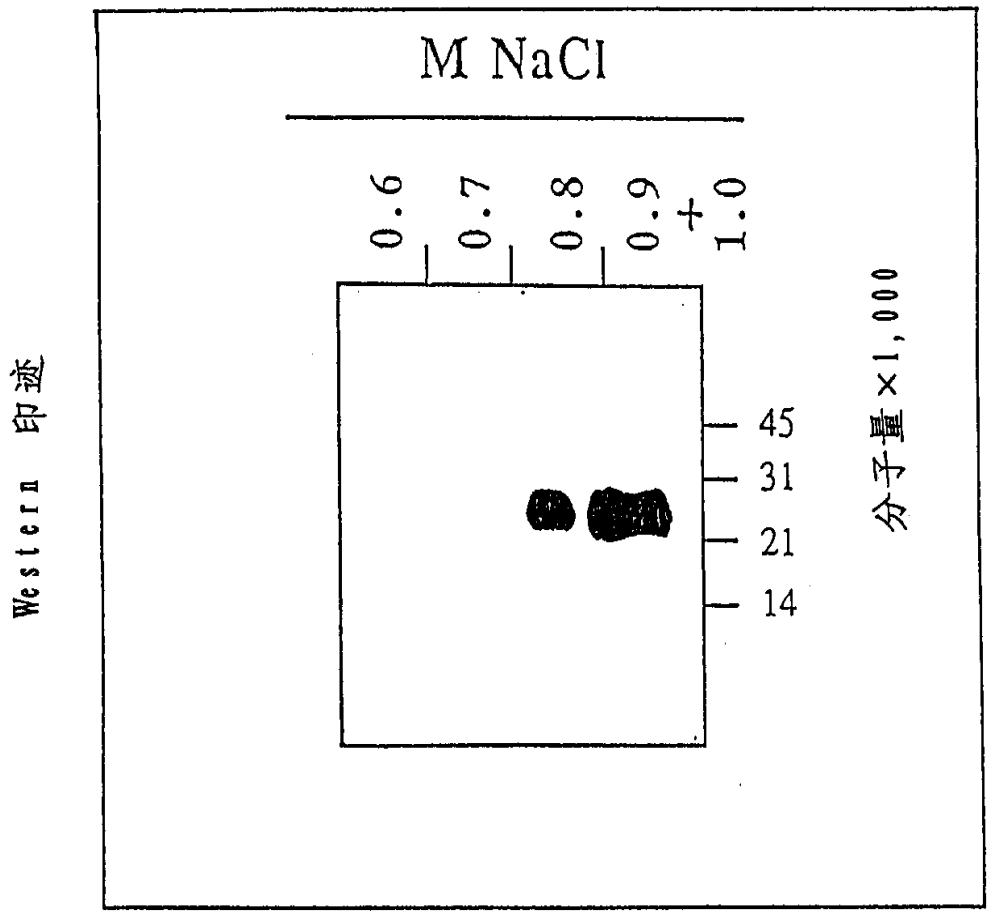


图 4



图 5

