



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101747437 B

(45) 授权公告日 2012.09.26

(21) 申请号 200810044084.3

(22) 申请日 2008.12.10

(73) 专利权人 浙江日升昌药业有限公司

地址 322100 浙江省东阳市江北新区歌山路

(72) 发明人 赵健 范立强 王富军 傅龙云
张涛铸 单含文

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限公司 31224

代理人 王裕

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56) 对比文件

OORSCHOT. apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. 《proceedings of the national academy of sciences of the United States of America》. 1997, 第94卷第5843-5847页.

张文毅等. 凋亡素诱导肿瘤细胞凋亡机制研究及其进展. 《临床泌尿外科杂志》. 2007, 第22卷(第7期), 第551-553页.

傅文彬等. 凋亡蛋白质的原核表达与纯化. 《食品与药品》. 2008, 第10卷(第3期), 第7-11页.

审查员 张锦广

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 5 页

(54) 发明名称

凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,具体涉及本发明涉及的一种凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白、基因、重组载体、转化体及其用途和制备方法。本发明公开了一种凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白,其特征在于该融合蛋白含有与氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所述 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域或其突变体融合的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所述凋亡素或其突变体。同时也公开了其基因、重组载体、转化体及其用途和制备方法。本发明所述凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白具有很强的诱导肿瘤细胞凋亡的能力,可以用来制备治疗肿瘤的药物。

CN 101747437 B

1. 一种凋亡素 -EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白,其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所述。
2. 一种编码权利要求 1 所述凋亡素 -EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的多核苷酸分子。
3. 如权利要求 2 所述的多核苷酸分子,其特征在于所述多核苷酸分子的核酸序列如 SEQ ID NO. 4 所述。
4. 一种包含如权利要求 2 所述多核苷酸分子的重组表达载体。
5. 一种包含如权利要求 4 所述重组表达载体的转化体。
6. 如权利要求 5 所述的转化体,其特征在于所述转化体为大肠杆菌。
7. 一种权利要求 1 所述凋亡素 -EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的制备方法,包括如下步骤:
 - ①权利要求 1 所述凋亡素 -EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的表达载体的构建;
 - ②权利要求 1 所述凋亡素 -EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的转化体的制备;
 - ③权利要求 1 所述凋亡素 -EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的表达;
 - ④权利要求 1 所述凋亡素 -EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的纯化。
8. 如权利要求 7 中所述的制备方法,其特征在于所述凋亡素 -EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的转化体为大肠杆菌。
9. 一种组合物,其特征在于其包括权利要求 1 所述凋亡素 -EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白和药学上可接受的载体。
10. 权利要求 1 所述凋亡素 -EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白在制备治疗肿瘤疾病药物中的用途。
11. 如权利要求 10 中所述的用途,其特征在于所述肿瘤疾病为肺癌或子宫颈癌。

凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及本发明涉及的一种凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白、基因、重组载体、转化体及其用途和制备方法。

背景技术

[0002] 超氧化歧化酶 (superoxide dismutase 简称 SOD) 是一种催化超氧化物阴离子 (O_2^-) 歧化反应的酶。人和哺乳动物的 SOD 有 3 种同工酶:胞内 SOD (Cu, Zn-SOD)、线粒体 SOD (Mn-SOD) 和胞外 SOD (EC-SOD, 也是 Cu, Zn-SOD)。EC-SOD [Marklund SL, Bjelle A, Elmqvist LG, et al. Ann Rheum Dis. 1986, 45 :847-851] 在人体内的含量最少,主要存在于组织的胞外基质和细胞表面,其氨基酸序列按功能可分成四个结构域:N 端先是一个 18 个氨基酸残基的信号肽;然后是 95 个残基的与 EC-SOD 形成四聚体有关的结构域;后面是 98 个残基的 SOD 活性结构域;最后是 29 个残基的富含碱性氨基酸残基的细胞转导结构域 (PTD, protein transduction domains) [Hjalmarsson K, Marklund SL, Engstrom A, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1987, 84 :6340-6344]。这个结构域能与细胞表面的肝素类多糖组织结合 [Karlsson K, Marklund SL. Lab Invest. 1989, 60 :659-666],并能以内吞作用实现跨膜转导,将其定位到细胞核。

[0003] 源于鸡贫血病毒的凋亡素 (Apoptin),或称凋亡蛋白,由 121 个氨基酸残基的组成,它能够在人的各种肿瘤细胞中诱导一种不依赖于 p53,并且对 Bcl-2 不敏感的细胞凋亡,但对正常人体细胞没有影响,是一个非常有应用前景的肿瘤选择性治疗的候选药物 [Zhuang SM, Shvarts A, van Ormondt H, et al. Cancer Res. 1995, 55(3) :486-489]。研究表明,凋亡素诱导的细胞凋亡需要凋亡素本身被转运到细胞内,然后依靠凋亡素本身所具有的核定位序列 (NLS, nuclear localization sequence) 在细胞核中聚集,以目前尚不太清楚的机制,导致细胞的凋亡。凋亡素诱导的细胞凋亡与其本身的特殊氨基酸残基的磷酸化过程有关,其凋亡过程与 Caspase-3 通路有密切联系 [Noteborn MH. VetMicrobiol. 2004, 98(2) :89-94]。

[0004] 由上可知,由凋亡素诱导的肿瘤细胞凋亡的关键点是如何将凋亡素快速、高效的转运入肿瘤细胞,实现跨膜蛋白质分子的转运。目前,已经有许多具有蛋白质转运功能的跨膜结构域 (PTD) 被研究发现,典型的有来自于人 HIV 病毒的 TAT 结构域,黑腹果蝇的触足肽 (Antp),单纯疱疹病毒转录调节蛋白 (VP22),多聚精氨酸序列以及 EC-SOD 的羧基末端蛋白转导域等等。PTD 一般由长度多数小于 20 个氨基酸序列组成,含有一个高度正电荷区和一个螺旋结构。PTD 可以携带多种物质,包括亲水性蛋白、多肽、DNA 甚至颗粒性物质等进行细胞间/内的传输,且不受细胞类型的限制 [Schwarze SR, Dowdy SF. Trends Pharmacol Sci. 2000, 21(2) :45-48]。不过,其转运的效率与 PTD 本身以及与其融合的蛋白质性质有密切关系。因此,要实现一个蛋白质分子的高效跨膜转移,选择一个合适的 PTD 至关重要。对于加强凋亡素诱导肿瘤细胞凋亡的效应来说,就是需要寻找合适的 PTD,帮助将凋亡素快速、高效的转运入细胞内部,发挥其凋亡作用,达到控制肿瘤细胞生长,治疗疾病的目的。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题提供了一种凋亡素融合蛋白,以便于其能快速、高效的转运入细胞内部,发挥其凋亡作用,达到控制肿瘤细胞生长,治疗疾病的目的。

[0006] 为此本发明一方面公开了,一种凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白,其特征在于该融合蛋白含有与氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所述 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域或其突变体融合的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所述凋亡素或其突变体。

[0007] 本发明的发明思路为通过基因工程技术人为将 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域或其突变体与凋亡素或其突变体构成融合蛋白,通过 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域或其突变体实现跨膜蛋白质分子的转运,从而发挥凋亡素或其突变体的诱导凋亡作用,达到控制肿瘤细胞生长,治疗疾病的目的。在这一思路下,本发明所保护范围包括但不限于上述融合蛋白。

[0008] 在一实施方式中,所述凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白可具有下式:R2-R1、R1-R2、R1-L-R2-L-R1、R1-L-R2、R2-L-R1 或 R2-L-R1-L-R1,其中 R1 是氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所述 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域或其突变体,L 是连接肽,R2 是至少一个氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所述凋亡素或其突变体,但不必是相同的治疗性蛋白质。连接肽包括例如:(GGGGS)_N 或 (GGGS)_N 或 (GGS)_N,其中 N 是大于或等于 1 的整数,G 表示甘氨酸,S 表示丝氨酸。

[0009] 在一实施方式中,所述凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白中,氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所述 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域或其突变体位于所述融合蛋白的羧基末端。

[0010] 在一实施方式中,所述凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白,为如下 (a) 或 (b) 的蛋白:

[0011] (a) 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所述的蛋白;(b) 至少与 (a) 中的氨基酸序列 60% 同源性且具有诱导细胞凋亡作用活性的蛋白。

[0012] 一方面,本发明公开了一种编码本发明所述凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的多核苷酸分子。

[0013] 在一实施方式中,所述多核苷酸分子的核酸序列如 SEQ ID NO. 4 所述。

[0014] 一方面,本发明公开了一种包含本发明所述多核苷酸分子的重组表达载体。

[0015] 一方面,本发明公开了一种包含本发明所述重组表达载体的转化体。

[0016] 在一实施方式中,所述转化体为大肠杆菌。

[0017] 另一方面,本发明公开了一种本发明所述凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的制备方法,包括如下步骤:

[0018] ①凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白表达载体的构建;

[0019] ②凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白转化体的制备;

[0020] ③凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的表达;

[0021] ④凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的纯化。

[0022] 另一方面,本发明公开了一种组合物,包括本发明所述凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白和药学上可接受的载体。

[0023] 另一方面,本发明公开了本发明所述凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白在制备治疗由细胞增殖过度引起的疾病药物中应用。

[0024] 在一实施方式中,所述由细胞增殖过度引起的疾病为肿瘤。

[0025] 另一方面,本发明包括预防、治疗或改善由细胞增殖过度引起的相关疾病或失调的方法,所述方法包括给需要所述预防、治疗或改善的哺乳动物施用含有有效量凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白,以治疗、预防或改善疾病或失调。

[0026] 通过体外培养的肿瘤细胞凋亡试验和小鼠腹水瘤抑制试验证明,本发明制备的凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白具有很强的诱导肿瘤细胞凋亡的能力,可以用来制备治疗肿瘤的药物。

附图说明

[0027] 图 1 PGR 扩增的 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域基因片段 2%琼脂糖凝胶电泳图谱;

[0028] 图 2 表达质粒 C-pET28a 构建过程示意图;

[0029] 图 3 PCR 扩增的凋亡素基因片段 1.5%琼脂糖凝胶电泳图谱;

[0030] 图 4 克隆质粒 Apop-pMD18T 构建过程示意图;

[0031] 图 5 表达质粒 ApopC-pET28a 构建过程示意图;

[0032] 图 6 菌落 PCR 检测重组菌插入片段的 1.5%琼脂糖凝胶电泳图谱;

[0033] 图 7 纯化的重组 Apoptin-EC-SOD-PTD SDS-PAGE 电泳分析图谱;

[0034] 图 8 不同浓度重组 Apoptin-EC-SOD-PTD 对 HeLa 细胞的存活率的影响;

[0035] 图 9 重组 Apoptin-EC-SOD-PTD 对体外培养的人正常肝细胞的存活率的影响。

具体实施方式

[0036] 在本文,术语“突变体”是指氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所述 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域或氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所述凋亡素的突变体。相比于天然的 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域或所述凋亡素蛋白,该突变体与它们野生型相比,具有增强的活性和/或改变了的立体专一性。天然蛋白的氨基酸序列突变体可通过向本发明的核苷酸中引入适当的核苷酸变化、或通过体外合成所需多肽来制备。这些突变体包括,例如缺失、插入或替换该氨基酸序列中的残基。可以通过缺失、插入和替换的组合以得到最终的构建体,提供最终的蛋白产品。

[0037] 蛋白的同源性百分比由 GAP (Needleman 和 Wunsh, 1970) 分析 (GCG 程序) 确定,其中参数 gap creation penalty = 5, gap extension penalty = 0.3。被分析的序列长度至少为 15 个氨基酸时, GAP 分析就在参与测试的两个序列的至少为 15 个氨基酸的区域进行测试。更优选地,被分析的序列长度至少为 50 个氨基酸时, GAP 分析就在参与测试的两个序列的至少为 50 个氨基酸的区域进行测试。更优选地,被分析的序列长度至少为 100 个氨基酸时, GAP 分析就在参与测试的两个序列的至少为 100 个氨基酸的区域进行测试。更优选地,被分析的序列长度至少为 250 个氨基酸时, GAP 分析就在参与测试的两个序列的至少为 250 个氨基酸的区域进行测试。甚至更优选地,被分析的序列长度至少为 500 个氨基酸时, GAP 分析就在参与测试的两个序列的至少为 500 个氨基酸的区域进行测试。

[0038] 本发明涉及的方面还包括凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白类似物,

在它们合成期间或合成后进行了不同的修饰,例如,通过生物素化、苄基化、糖基化、乙酰化、磷酸化、由已知保护/封闭基团的衍生作用、蛋白水解的切割作用、连接到抗体分子或其它细胞配体上等。这些修饰可以用来增加本发明凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的稳定性和/或生物活性。

[0039] 融合蛋白的表达

[0040] 本发明包括编码本发明的凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的 DNA 以及含有这些 DNA 的载体、转化体。

[0041] 本发明中,使用的术语“转化体”(transformant),即带有异源 DNA 分子的宿主细胞。

[0042] 本发明还包括通过合成和重组技术生产本发明的凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的方法。通过本领域已知的方法可以分离和纯化多核苷酸(DNA 或 RNA)、载体、转化体和生物体。

[0043] 用于本发明的载体可以是如噬菌体、质粒、粘粒、微型染色体、病毒或逆转录病毒载体。可用于克隆和/或表达本发明的多核苷酸的载体是能在需复制和/或表达多核苷酸的宿主细胞中复制和/或表达多核苷酸的载体。一般说来,多核苷酸和/或载体可用于任何真核或原核细胞,包括哺乳动物细胞(如人(如 HeLa)、猴(如 Cos)、兔(如兔网织红细胞)、大鼠、仓鼠(如 CHO、NSO 和幼仓鼠肾细胞)或小鼠细胞(如 L 细胞)、植物细胞、酵母细胞、昆虫细胞或细菌细胞(如大肠杆菌)。有关适用于多种类型宿主细胞的适当载体的例子可参见例如 F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(1992) 和 Sambrook et al. (1989)。可以使用含有这些多核苷酸的宿主细胞来大量表达可用于例如药物、诊断试剂、疫苗和治疗剂的蛋白质。

[0044] 已开发出多种方法用于经由互补的粘性末端使多核苷酸与载体可操作相连。例如,可在欲插入载体 DNA 内的 DNA 区段添加互补的同聚体序列片段。然后通过互补同聚体尾之间的氢键连接载体和 DNA 区段以形成重组 DNA 分子。

[0045] 含有一或多种限制性位点的合成接头提供了另一种连接 DNA 区段与载体的方法。用噬菌体 T4 DNA 聚合酶或大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 处理通过内切核酸酶限制性消化产生的 DNA 区段,所述的两种聚合酶用其 3', 5' - 核酸外切活性除去突出的 γ - 单链末端,并用其聚合活性补平 3' - 凹端。因此,这些活性的联合产生了平端 DNA 区段。然后在能催化平端 DNA 分子连接的酶,如噬菌体 T4 DNA 连接酶的存在下将平端区段与大摩尔过量的接头分子一起保温。因此,反应产物是末端携有聚合接头序列的 DNA 区段。然后用适当的限制性酶裂解这些 DNA 区段,并连接至已用酶裂解的表达载体中,所述酶能产生与所述 DNA 区段相容的末端。从多个商家可以买到含有多个限制性内切核酸酶位点的合成接头。

[0046] 多核苷酸插入物应该可操作地连接于同表达多核苷酸的宿主细胞相容的适当启动子上。启动子可以是强启动子和/或诱导型启动子。列举的一些启动子的例子包括噬菌体 λ PL 启动子、大肠杆菌 lac、trP、phoA、tac 启动子、SV40 早期和晚期启动子以及逆转录病毒 LTR 启动子。其它适当启动子是本领域技术人员已知的。表达重组载体进一步含有转录起始、终止位点,并在转录区含有用于翻译的核糖体结合位点。重组载体表达的转录物的编码部分可包括位于起点处的翻译起始密码子和适当地位于被翻译多肽的末端的终止密

码子 (UAA, UGA 或 UAG)。

[0047] 如上所述,表达载体可包括至少一个选择标记。所述标记包括对真核细胞培养物而言的二氢叶酸还原酶、G418、谷氨酰胺合酶或新霉素抗性;以及用于大肠杆菌和其它细菌培养的四环素、卡那霉素或氨卞青霉素抗性基因。适当宿主的代表性例子包括但不限于:细菌细胞,如大肠杆菌、链霉菌和鼠伤寒沙门氏菌细胞;真菌细胞,如酵母细胞(如酿酒酵母或巴斯德毕赤酵母);昆虫细胞,如果蝇 S2 和夜蛾 SF9 细胞;动物细胞,如 CHO, COS, NS0, 293 和 Bowes 黑素瘤细胞;和植物细胞。上述宿主细胞的适当培养基和培养条件是本领域已知的。

[0048] 为了有效地分离纯化或分泌目标蛋白,常常还可利用便于分离纯化的标签蛋白或标签多肽(Tag)。常用的有谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、六聚组氨酸肽(His.Tag)、蛋白质 A(protein A)和纤维素结合位点(cellulose binding domain)等。通过特殊性蛋白或多肽与目标蛋白构成融合蛋白的形式,表达后利用所述的标签蛋白或标签多肽的特殊性质可对目标蛋白进行分离和纯化。如 His.Tag 与 Ni-Chelating Sepharose 柱特异性结合。所述的标签蛋白或标签多肽可以在纯化后用位点特异性蛋白酶消化去除融合序列,如可用凝血酶、胰激酶和 Xa 因子等,以获得目标蛋白。

[0049] 本发明还包括含有本发明的核苷酸序列的宿主细胞,所述核苷酸序列经本领域已知的技术与一或多种异源控制区(如启动子和/或增强子)可操作相连。可以选择能调节插入的基因序列的表达,或能按照所需的特殊方式修饰和加工基因产物的宿主菌株。在某些诱导物的存在下,某些启动子启动的表达会升高;因此,可以控制经基因改造的多肽的表达。另外,不同宿主细胞具有特征性的和特殊的翻译、翻译后加工和修饰(如磷酸化、裂解)蛋白质的机制。可以选择适当的细胞系以确保对表达的外源蛋白质进行合乎需要的修饰和加工。

[0050] 通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其它方法,即可将本发明的核酸和核酸重组载体导入宿主细胞。所述方法描述于多个标准的实验室手册中,如 Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology(1986)。

[0051] 编码本发明的所述融合蛋白的多核苷酸可以与含有选择标记的载体连接以在宿主中增殖。一般说来,可在沉淀物,如磷酸钙沉淀物或其与带电脂质的复合物中导入质粒载体。如果载体是病毒,可使用适当的包装细胞系在体外对其进行包装,再转导至宿主细胞。

[0052] 通过众所周知的技术可以鉴定出被成功转化的细胞,即含有本发明的 DNA 重组载体的细胞。例如,可培养导入表达重组载体所得的细胞以产生所需多肽。收集并裂解细胞,使用如 Southern(1975) J. Mol. Biol. 95, 503 或 Berent et al(1985) Biotech. 3, 208 所述的方法,检测其 DNA 内容物中 DNA 的存在。或者,使用抗体检测上清液中蛋白质的存在。

[0053] 通过众所周知的方法从重组细胞培养物中回收和纯化本发明的所述融合蛋白较为有利,所述方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析、疏水电荷作用层析和凝集素层析。在一些实施方案中,可使用高效液相层析(HPLC)进行纯化。

[0054] 在一些实施方案中,可使用上述的一种或多种层析方法纯化本发明的所述融合蛋白。在其它实施方案中,可使用下述的一种或多种层析柱纯化本发明的所述融合蛋白,所

述层析柱有:Q sepharose FF 柱、SP sepharose FF 柱、Q sepharose High Performance 柱、Blue sepharose FF 柱、Blue 柱、Phenyl Sepharose FF 柱、DEAE Sepharose FF、Ni-Chelating Sepharose FF 柱或 Methyl 柱等。

[0055] 另外,可使用国际公开号 W000/44772(全文列入本文作为参考)中描述的方法纯化本发明的融合蛋白。本领域技术人员可以容易地改动其中所述的方法以用于纯化本发明的融合体蛋白。可以从包括例如细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞的原核或真核宿主经重组技术产生的产物中回收本发明的融合蛋白。

[0056] 在一较优实施例中,本发明提供的凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白制备方法包括以下步骤:

[0057] a. 构建克隆有 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域基因的表达质粒 C-pET28a;

[0058] b. 构建克隆有凋亡素基因的克隆质粒 Apop-pMD18T;

[0059] c. 构建克隆有凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白基因的表达质粒 ApopC-pET28a;

[0060] d. 凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的表达和纯化;

[0061] 上述 a. 中所述的表达质粒 C-pET28a 的构建方法是:设计 5' 端和 3' 端引物,采用 PCR 的方法从克隆有 EC-SOD 全长基因的 EC-SOD-pSK 质粒中将 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域(第 196-222 位氨基酸残基)克隆,在此片段的 N- 末端接上一端 8 个氨基酸残基长度的连接肽,然后将此片段克隆入 pET28a 的 Hind III 和 Xho I 位点,构成 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域基因的表达质粒 C-pET28a。

[0062] 上述 b. 中所述的克隆质粒 Apop-pMD18T 的构建方法是:设计 5' 端和 3' 端引物,采用 PCR 的方法从克隆有凋亡素全长基因的 Apoptin-pVK 质粒中将凋亡素全长基因(第 1-121 位氨基酸残基)克隆,此基因的 5' 端和 3' 端两侧分别接上了 Nde I 和 BamH I 酶切位点,然后将此片段克隆入 pMD-18T 质粒,构成克隆有凋亡素基因的克隆质粒 Apop-pMD18T。

[0063] 上述 c. 中所述的表达质粒 ApopC-pET28a 的构建方法是:将克隆质粒 Apop-pMD18T 分别用,分离得目标片段,然后将此片段插入已同样经 Nde I 和 BamH I 双酶切的 C-pET28a 表达载体中,构建成克隆有凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白基因的表达质粒 ApopC-pET28a。

[0064] 上述 d. 中所述的凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的表达和纯化的方法是:将构建的 ApopC-pET28a 重组质粒转入融合有 T7 RNA 聚合酶基因的大肠杆菌宿主中。转入的宿主可以是 E. coli BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, JM109(DE3), Rosetta(DE3), Rosetta DE3 pLysS 等。将构建的工程菌在添加有 50ug/ml 终浓度卡那霉素的 LB 培养基 37°C 振荡培养至 OD600nm 达到 0.3-0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.5-3mM,诱导培养 3-5hr,收集菌体进行超声破碎,离心收集包涵体,经 SDS-PAGE 电泳检测后,采用 8M 尿素变性溶解包涵体,上镍柱进行亲和层析分离,分段收集目的蛋白组分,进行稀释法复性,浓缩。除菌过滤后进行蛋白含量测定,保存待用。

[0065] 用途

[0066] 本发明所示的融合蛋白作为活性成分可用以治疗各种由细胞增殖过度引起的疾病,如肿瘤,包括但不限于:骨癌类,包括:尤因肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤等;脑和 CNS 肿瘤,包括:听神经瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤和其他脑肿瘤,脊髓肿瘤、乳癌、结肠直肠癌、进展

期结肠直肠癌；内分泌癌类，包括：肾上腺皮质癌、胰癌、脑垂体癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、胸腺癌、多发性内分泌肿瘤；胃肠癌类，包括：胃癌、食道癌、小肠癌、肝癌、肝外胆管癌、胃肠类癌性肿瘤、胆囊癌；泌尿生殖器癌类，包括：睾丸癌、阴茎癌、前列腺癌；妇科癌类，包括：子宫颈癌、卵巢癌、阴道癌、子宫/子宫内膜癌、阴部癌、妊娠滋养细胞肿瘤、输卵管癌、子宫肉瘤；头和颈部肿瘤类，包括：口腔癌、唇癌、唾液腺癌、喉头癌、下咽癌、正咽癌、鼻癌、鼻窦癌、鼻咽癌；血癌类，包括：儿童白血病、急性淋巴性白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、发状细胞性白血病、急性早幼粒细胞白血病、浆细胞性白血病；骨髓癌血液病症，包括：骨髓分化不良症候群、骨髓增生性病症、再生障碍性贫血、范可尼贫血、特发性巨球蛋白血症；肺癌类，包括：小细胞肺癌、非小细胞肺癌；淋巴瘤类，包括：霍奇金病、非霍奇金氏淋巴瘤、皮肤型 T- 细胞淋巴瘤、周围 T- 细胞淋巴瘤、AIDS 相关性淋巴瘤；眼癌类，包括：视网膜母细胞瘤、葡萄膜黑色素瘤；皮肤癌类，包括：黑色素瘤、非黑色素瘤皮肤癌、梅克尔细胞癌；软组织肉瘤类，例如：儿童软组织肉瘤、成人软组织肉瘤、卡波希肉瘤；泌尿系统癌症，包括：肾癌维尔姆斯肿瘤、膀胱癌、尿道癌或转移性细胞癌。

[0067] 本发明所公开的融合蛋白，可以用来治疗的癌类首先为肝癌或肺癌。

[0068] 可藉由本发明的融合蛋白加以治疗的优选肿瘤类为固态肿瘤和血液恶性疾病。

[0069] 本文所使用的术语“肿瘤”一般是指广泛的以细胞的失控性异常生长为特征的病症。

[0070] 所用的活性成分的有效剂量可随给药模式和待治疗疾病的严重程度而变化。对大部分大型哺乳动物而言，每天施以有效成分的总剂量约为 0.01-1000mg。通常，成人临床给药量的范围为 0.01-200mg/日，优选为 0.05-100mg/日。

[0071] “有效剂量”或“治疗量”均是指足以产生疗效的量。有效量可分一或多次给药。通常，有效量足以缓和、改善、稳定、减慢或延迟疾病的进一步发展。

[0072] 组合物

[0073] 用于本发明或者含有本发明所述融合蛋白的组合物。通常，当本发明组合物用于上述用途时，所述融合蛋白可与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂混合制成不同给药途径的药物剂型，如片剂、胶囊、散剂、颗粒剂、糖浆剂、溶液剂、口服液、酞剂、酞剂、气雾剂、粉雾剂、注射剂、注射用无菌粉末、栓剂等。

[0074] “药学上可接受的”成分是适用于人和/或动物而无过度不良副反应（如毒性、刺激和变态反应）即有合理的效益/风险比的物质。“药学上可接受的载体”是用于将本发明的融合体蛋白传送给动物或人的药学上或食品上可接受的溶剂、悬浮剂或赋形剂。载体可以是液体或固体。

[0075] 本发明的融合蛋白可经过口服、静脉内、肌内或皮下途径给药。

[0076] 上述剂型中可经口服给药的剂型为：片剂、胶囊、散剂、颗粒剂、糖浆剂、溶液剂、酞剂。固态载体包括：淀粉、乳糖、磷酸氢钙、微晶纤维素、蔗糖、白陶土、微粉硅胶、滑石粉、低取代羟丙基纤维素、羧甲基淀粉钠、聚乙烯吡咯烷酮。而液态载体包括：无菌水、乙醇、聚乙二醇、非离子型表面活性剂和食用油（如玉米油、花生油和芝麻油）。在制备药物组合物的过程中通常使用的佐剂包括：调味剂、着色剂、防腐剂（如羟苯烷基丁酯、苯甲酸钠、山梨酸）和抗氧化剂（如维生素 E、维生素 C、焦亚硫酸钠和二丁基羟基甲苯）。

[0077] 上述剂型中可用于注射途径给药的剂型包括：注射剂、注射用无菌粉末，它们是将

药物与一种或多种药学上可接受的赋形剂混合制成以供注射给药的形式。溶剂包括：无菌水、乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇。此外，还需加入抑菌剂（如苯甲醇、羟苯丁酯、硫柳汞）、等渗调节剂（如氯化钠、葡萄糖）、助悬剂（如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素）、增溶剂（吐温-80、卵磷脂）、抗氧化剂（如维生素 E、维生素 C、焦亚硫酸钠）和填充剂（如乳糖、甘露醇）。

[0078] 从易于制备和给药的立场看，优选的药物组合物是固态组合物，尤其是冻干粉针剂。优选静脉给药。

[0079] 以下结合具体实施例，进一步阐明本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。比例和百分比基于重量，除非特别说明。

[0080] 实施例 1：

[0081] 构建克隆有 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域基因的表达质粒 C-pET28a

[0082] 1. EC-SOD 羧基末端蛋白转导域基因的 PCR 扩增

[0083] (1) 根据 Genbank 公布的人 EC-SOD 的基因序列，设计亚克隆 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域基因的正向和反向引物：

[0084] P1 :5' -TAATAAGCTTCCGCTGGAGGCGGTGGAAGCGGGCCCGGGCTC-3'

[0085] P2 :5' -ATCTCGAGGGCGGCCTTGCACTCGCTCT-3'

[0086] 在正向引物 P1 中，导入了一个 Hind III 酶切位点和一段 8 个氨基酸残基的连接肽 (AlaSerAlaGlyGlyGlyGlySer)；在反向引物 P2 中，导入了一个 Xho I 酶切位点。

[0087] (2) PCR 扩增的反应条件为：先 94℃，变性 5min，然后 94℃，变性 30s → 60℃，复性 30s → 72℃，延伸 1min，循环 30 次，最后 72℃，5min。

[0088] (3) 将 PCR 产物回收后用 Hind III 和 Xho I 双酶切待用。

[0089] 2. 重组表达质粒 C-pET28a 的构建

[0090] 将 PCR 扩增、酶切得到的插入片段，与已经用同样的酶水解、回收的 pET28a 质粒 DNA 连接，转化 E. coli DH5 α 菌株，培养，回收重组质粒 DNA，测序验证。

[0091] 3. PCR 扩增所得的目标片段 2% 琼脂糖电泳图谱见图 1。图中，M 为标准分子量 DNAMarker；1 为扩增得到的约 120bp 的 EC-SOD 羧基末端蛋白转导域基因片段。

[0092] 4. 表达质粒构建过程示意图见图 2。

[0093] 实施例 2：

[0094] 构建克隆有凋亡素基因的克隆质粒 Apop-pMD18T

[0095] 1. 凋亡素基因的 PCR 扩增

[0096] (1) 根据 Genbank 公布的鸡贫血病毒 VP3 蛋白的基因序列，设计亚克隆凋亡素全长基因的正向和反向引物：

[0097] P3 :5' -GACATATGATGAACGCTCTCCAAGAAGA-3'

[0098] P4 :5' -TGGGATCCTTACAGTCTTATACGCCTTTTTG-3'

[0099] 在正向引物 P3 中，导入了一个 Nde I 酶切位点；在反向引物 P2 中，导入了一个 BamH I 酶切位点和终止密码子。

[0100] (2) PCR 扩增的反应条件为：先 94℃，变性 5min，然后 94℃，变性 30s → 55℃，复性 30s → 72℃，延伸 45s，循环 30 次，最后 72℃，5min。

[0101] (3) 将 PCR 产物回收待用。

[0102] 2. 重组克隆质粒 Apop-pMD18T 的构建

[0103] 将 PCR 扩增回收得到的插入片段与市售 pMD18T 载体 (购自宝生物工程公司) DNA 连接, 转化 *E. coli* DH5 α 菌株, 培养, 通过蓝白斑筛选阳性克隆, 再经液体培养基培养后回收重组质粒 DNA, 测序验证。

[0104] 3. PCR 扩增所得的凋亡素全长基因片段 1.5% 琼脂糖电泳图谱见图 3。图中 1 为 PCR 扩增得的约 370bp 的凋亡素全长基因; M 为标准分子量 DNA Marker。

[0105] 4. 表达质粒构建过程示意图见图 4。

[0106] 实施例 3:

[0107] 构建克隆有凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白基因的表达质粒 ApopC-pET28a

[0108] 1. 凋亡素基因插入片段的获取

[0109] 将制备并经测序验证的 Apop-pMD18T 质粒 DNA 用 Nde I 和 BamH I 双酶切, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段, 采用胶回收试剂盒回收目标片段 DNA。

[0110] 2. 载体的准备

[0111] 将构建并扩增制备的 C-pET28a 质粒 DNA 同样也用 Nde I 和 BamH I 双酶切, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段, 采用胶回收试剂盒回收质粒 DNA。

[0112] 3. 重组表达质粒 ApopC-pET28a 的构建

[0113] 将回收的凋亡素插入片段 DNA 和 C-pET28a 质粒 DNA 连接, 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株, 37 $^{\circ}$ C 培养, 回收质粒 DNA, 测序验证。

[0114] 4. 表达质粒构建过程示意图见图 5。

[0115] 5. 重组菌菌落 PCR 检测 1.5% 琼脂糖电泳图谱见图 6。图中, 1 为以 pET28a 空载质粒 DNA 为模板的阴性对照; 2 为构建的 ApopC-pET28a PCR 检测的结果, 采用的引物为引物 P3 和引物 P2, 片段大小约为 500bp; M 为标准分子量 DNA Marker。

[0116] 实施例 4:

[0117] 凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白的表达和纯化

[0118] 1. 将带有 ApopC-pET28a 的 *E. coli* BL21 (DE3) 重组工程菌在含卡那霉素的 LB 固体平皿上培养, 挑取单克隆, 在 37 $^{\circ}$ C 采用含卡那霉素 50ug/ml 的 LB 培养基进行过夜培养。然后以此培养液按 1% 接种量转接新的含卡那霉素 50ug/ml 的 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ = 0.3-0.6, 加入终浓度为 0.5-3mM 的 IPTG 进行诱导, 于 37 $^{\circ}$ C 继续培养 3-5 小时, 收集菌体, 超声波破碎, 离心收集包涵体。

[0119] 2. 诱导表达的菌体经超声波破碎, 进行 15% SDS-PAGE 电泳分析, 见图 7。图中, 1 为诱导前菌体破碎上清液; 2, 3, 4, 5, 6 分别为诱导后 1, 2, 3, 4, 5 小时的菌体破碎上清液; 7, 8 为诱导后 4, 5 小时菌体破碎沉淀部分; M 为标准分子量蛋白质。

[0120] 3. 将经洗涤纯化的融合蛋白包涵体用 8M 尿素溶液溶解 1-2hr, 离心去除沉淀。调节 pH 至 7.4-9.0, 加入镍亲和层析凝胶进行柱外吸附 1-2hr。吸附完毕后, 将凝胶装入玻璃层析柱中经洗涤后用 20-500mM 咪唑分段洗脱, 收集纯化的重组凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白 (Apoptin-EC-SOD-PTD)。

[0121] 4. 洗脱的目标蛋白 SDS-PAGE 电泳分析结果见图 7。图中, 1 为上样液, 2 为穿出液,

3、4、5、6 为 20mM 咪唑洗脱分段收集液, M 为标准分子量蛋白质, 7、8、9 为 100mM 咪唑洗脱分段收集液, 10、11、12 为 500mM 咪唑洗脱分段收集液。

[0122] 实施例 5:

[0123] 凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白对体外培养的肿瘤细胞的诱导凋亡作用。

[0124] 1. 将 HeLa 细胞在 96 孔细胞培养板中于 37℃ 培养至细胞密度达到 60% 左右。将表达后分离纯化得到的重组 Apoptin-EC-SOD-PTD 经多次透析去除咪唑。然后进行无菌过滤, 加入不同体积的 DMEM 细胞培养基稀释成不同蛋白浓度, 从最高蛋白浓度起, 逐步对半降低浓度, 至蛋白浓度为零, 以此作为阴性对照, 每组蛋白浓度取 3-4 个孔作为平行对照。同时, 将采用类似的方法由原核表达系统表达后分离纯化的重组 Apoptin 蛋白作为对照样品进行相同的实验操作。两组样品都在培养 24 小时后, 吸取培养基, 加入 100 μ l 含有 5ug/ml MTT 的 DMEM, 37℃ 孵育 4 小时, 吸去培养基, 加入 100 μ l DMSO 溶解紫色结晶, 37℃ 孵育 10 分钟, 于酶标仪 490nm 测定吸光值。在重组 Apoptin-EC-SOD-PTD 浓度在 100 μ g/ml 时, HeLa 细胞的存活率为 47% ($IC_{50} = 105 \mu$ g/ml)。而同样情况下, 作为对照组的重组 Apoptin(100 μ g/ml) 和空白对照的缓冲液对 HeLa 细胞生长影响不明显。

[0125] 2. 采用重组 Apoptin-EC-SOD-PTD 及重组 Apoptin 对培养的 HeLa 细胞诱导凋亡处理的结果见图 8。以 MTT 法检测经不同浓度样品处理后的 HeLa 细胞存活率。

[0126] 实施例 6:

[0127] 凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白对体外培养的正常动物细胞的影响。

[0128] 采用 MTT 法测定重组 Apoptin-EC-SOD-PTD 对体外培养的正常人体肝细胞 L02 的 IC_{50} 值, 观察给药剂量与药物细胞毒性的关系。

[0129] 1. 将正常人肝细胞 L02 以 RPMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清) 培养。用胰酶消化后, 以 1640 培养液配成单细胞悬液, 按 1×10^5 /ml 细胞浓度接种到 96 孔细胞培养板中, 每孔体积 100 μ l。37℃, 5% CO_2 培养箱中培养 4h。

[0130] 2 用培养液以终浓度分别为 200、100、50、25、0 μ g/ml 配制试验药物, 每孔 100 μ l, 每组设 3 个平行孔, 置 37℃, 5% CO_2 及饱和湿度的培养箱继续培养 48h。

[0131] 3. 在每个培养孔中加入 MTT 溶液进行检测, 采用酶标仪比色法测定、计算细胞的存活率。试验数据以平均值 \pm 标准偏差表示。

[0132] 4. 凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白对体外培养的正常动物细胞的毒性影响见图 9。表明, 重组 Apoptin-EC-SOD-PTD 对体外培养的人正常肝细胞无明显毒性影响。

[0133] 实施例 7:

[0134] 凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白对小鼠腹水瘤动物模型的抑瘤作用。

[0135] 采用 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型验证重组 Apoptin-EC-SOD-PTD 对肿瘤的增殖抑制作用。实验设空白对照组, 阳性对照组, 重组 Apoptin-EC-SOD-PTD 试验组, 重组多聚精氨酸-凋亡素试验组 (Poly Arg-Apoptin) 四个组别, 每组 8 只动物。空白对照组在接种肿瘤后, 以生理盐水腹腔注射。阳性对照组则以注射环磷酰胺溶液 (20mg/kgBW/天)。试验组

分别注射经纯化透析、无菌过滤的重组 Apoptin-EC-SOD-PTD(10mg/kgBW/天)和重组 Poly Arg-Apoptin(40mg/kgBW/天)。

[0136] 1. 接瘤:在6周龄,体重约20g的C57BL/6(雄性)小鼠腋下接种0.2ml的Lewis肺癌细胞悬液,喂养3-4天后,观察小鼠腋下肿瘤生长情况。待注射部位的肿瘤长至直径数毫米大小时即可开始给药试验。

[0137] 2. 给药:采用腹腔注射的方式给药,连续给药7-8天。每天给药前进行体重测量。

[0138] 3. 抑瘤率测定:停止给药2天后,采用断颈法处死动物,将小鼠体内的肿瘤组织剥离,取出称重,计算抑瘤率。

[0139] 抑瘤率 = (空白组平均瘤重 - 药物组平均瘤重) / 空白组平均瘤重 X 100%

[0140] 4. 重组 Apoptin-EC-SOD-PTD 对 Lewis 肺癌的抑瘤率为 37.8%, 高于重组 Poly Arg-Apoptin 组, 与阳性对照组接近 (阳性对照组抑瘤率为 47.4%)。说明凋亡素在接有 EC-SOD-PTD 后, 大大提高了其跨膜转运效果, 对肿瘤细胞具有很好的抑制生长作用。

[0141] 凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白对实体瘤的抑制作用

[0142]

组别	剂量 (mg/kgBW/d)	给药 方式	动物数		瘤体重量 X±SD	抑制 率
			开始	最后		
对照组	--	i.p	8	7	2.3 ± 0.32	--
环磷酰胺	20	i.p	8	8	1.21 ± 0.119	47.4%
Poly Arg-Apoptin	40	i.p	8	8	1.90 ± 0.418	17.4%
Apoptin-EC-SOD-PTD	10	i.p	8	8	1.43 ± 0.281	37.8%

[0143] 本发明的范围不受所述具体实施方案的限制,所述实施方案只欲作为阐明本发明各个方面的单个例子,本发明范围内还包括功能等同的方法和组分。实际上,除了本文所述的内容外,本领域技术人员参照上文的描述和附图可以容易地掌握对本发明的多种改进。所述改进也落入所附权利要求书的范围之内。上文提及的每篇参考文献皆全文列入本文作为参考。

[0144] 序列表

[0145] <110>浙江日升昌药业有限公司

[0146] <120>凋亡素-EC-SOD 羧基末端蛋白转导域融合蛋白

[0147] <130>说明书序列表

[0148] <160>4

[0149] <170>PatentIn version 3.3

[0150] <210>1

[0151] <211>29

[0152] <212>PRT

[0153] <213>Homo sapiens

[0154] <400>1

[0155] Val Cys Gly Pro Gly Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu His Ser Glu

[0156] 1 5 10 15
 [0157] Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala
 [0158] 20 25
 [0159] <210>2
 [0160] <211>121
 [0161] <212>PRT
 [0162] <213>Chicken anemia virus
 [0163] <400>2
 [0164] Met Asn Ala Leu Gln Glu Asp Thr Pro Pro Gly Pro Ser Thr Val Phe
 [0165] 1 5 10 15
 [0166] Arg Pro Pro Thr Ser Ser Arg Pro Leu Glu Thr Pro His Cys Arg Glu
 [0167] 20 25 30
 [0168] Ile Arg Ile Gly Ile Ala Gly Ile Thr Ile Thr Leu Ser Leu Cys Gly
 [0169] 35 40 45
 [0170] Cys Ala Asn Ala Arg Ala Pro Thr Leu Arg Ser Ala Thr Ala Asp Asn
 [0171] 50 55 60
 [0172] Ser Glu Ser Thr Gly Phe Lys Asn Val Pro Asp Leu Arg Thr Asp Gln
 [0173] 65 70 75 80
 [0174] Pro Lys Pro Pro Ser Lys Lys Arg Ser Cys Asp Pro Ser Glu Tyr Arg
 [0175] 85 90 95
 [0176] Val Ser Glu Leu Lys Glu Ser Leu Ile Thr Thr Thr Pro Ser Arg Pro
 [0177] 100 105 110
 [0178] Arg Thr Ala Lys Arg Arg Ile Arg Leu
 [0179] 115 120
 [0180] <210>3
 [0181] <211>185
 [0182] <212>PRT
 [0183] <213>artificial sequence
 [0184] <220>
 [0185] <223>artificial sequence
 [0186] <400>3
 [0187] Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 [0188] 1 5 10 15
 [0189] Arg Gly Ser His Met Asn Ala Leu Gln Glu Asp Thr Pro Pro Gly Pro
 [0190] 20 25 30
 [0191] Ser Thr Val Phe Arg Pro Pro Thr Ser Ser Arg Pro Leu Glu Thr Pro
 [0192] 35 40 45
 [0193] His Cys Arg Glu Ile Arg Ile Gly Ile Ala Gly Ile Thr Ile Thr Leu
 [0194] 50 55 60

[0195]	Ser Leu Cys Gly Cys Ala Asn Ala Arg Ala Pro Thr Leu Arg Ser Ala	
[0196]	65	70
[0197]	Thr Ala Asp Asn Ser Glu Ser Thr Gly Phe Lys Asn Val Pro Asp Leu	
[0198]	85	90
[0199]	Arg Thr Asp Gln Pro Lys Pro Pro Ser Lys Lys Arg Ser Cys Asp Pro	
[0200]	100	105
[0201]	Ser Glu Tyr Arg Val Ser Glu Leu Lys Glu Ser Leu Ile Thr Thr Thr	
[0202]	115	120
[0203]	Pro Ser Arg Pro Arg Thr Ala Lys Arg Arg Ile Arg Leu Gly Ser Glu	
[0204]	130	135
[0205]	Phe Glu Leu Arg Arg Gln Ala Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro	
[0206]	145	150
[0207]	Gly Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg	
[0208]	165	170
[0209]	Arg Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala	
[0210]	180	185
[0211]	<210>4	
[0212]	<211>555	
[0213]	<212>DNA	
[0214]	<213>artificial sequence	
[0215]	<220>	
[0216]	<223>artificial sequence	
[0217]	<400>4	
[0218]	atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tgggtccgcg cggcagccat	60
[0219]	atgaacgctc tccaagaaga tactccacc ggaccatcaa cgggtgtcag gccaccaaca	120
[0220]	agttcacggc cgttgaaac ccctcactgc agagagatcc ggattggtat cgctggaatt	180
[0221]	acaatcactc tatcgtgtg tggtgcgcg aatgctcgcg ctcccacgct aagatctgca	240
[0222]	actgcggaaca attcagaaag cactggtttc aagaatgtgc cggacttgag gaccgatcaa	300
[0223]	cccaagcctc cctcgaagaa gcgactctgc gaccctcgc agtacagggt aagcgagcta	360
[0224]	aaagaaagct tgattaccac tactcccagc cgacccgaa ccgcaaaaag gcgtataaga	420
[0225]	ctgggatccg aattcgagct ccgctcgaaa gcttccgctg gaggcggtgg aagcgggccc	480
[0226]	gggctctggg agcgcaggc gcgggagcac tcagagcgca agaagcggcg gcgcgagagc	540
[0227]	gagtgcaagg ccgc	555

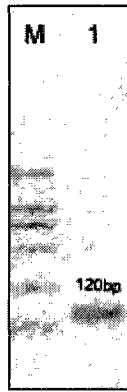


图 1

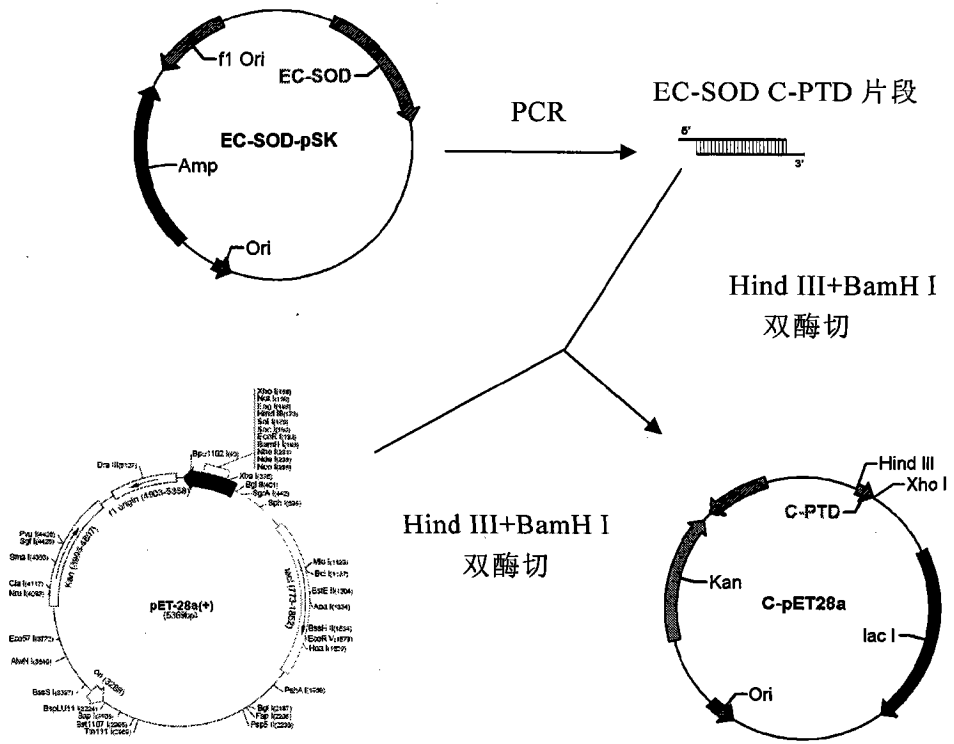


图 2

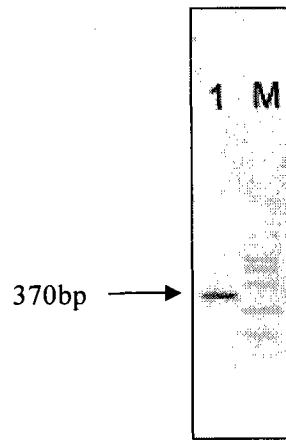


图 3

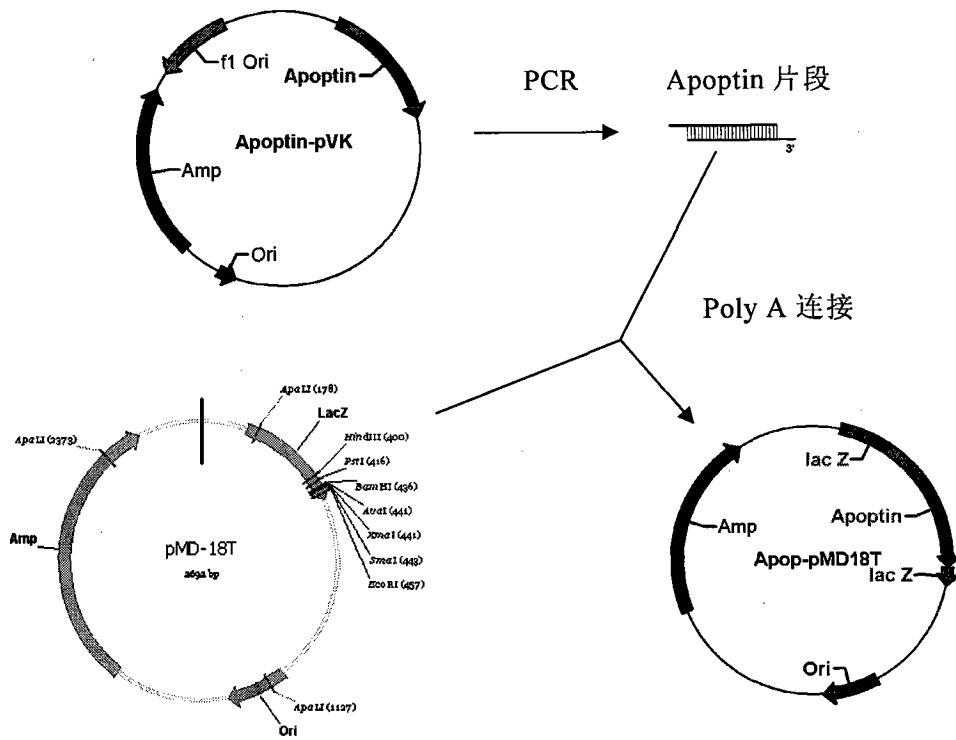


图 4

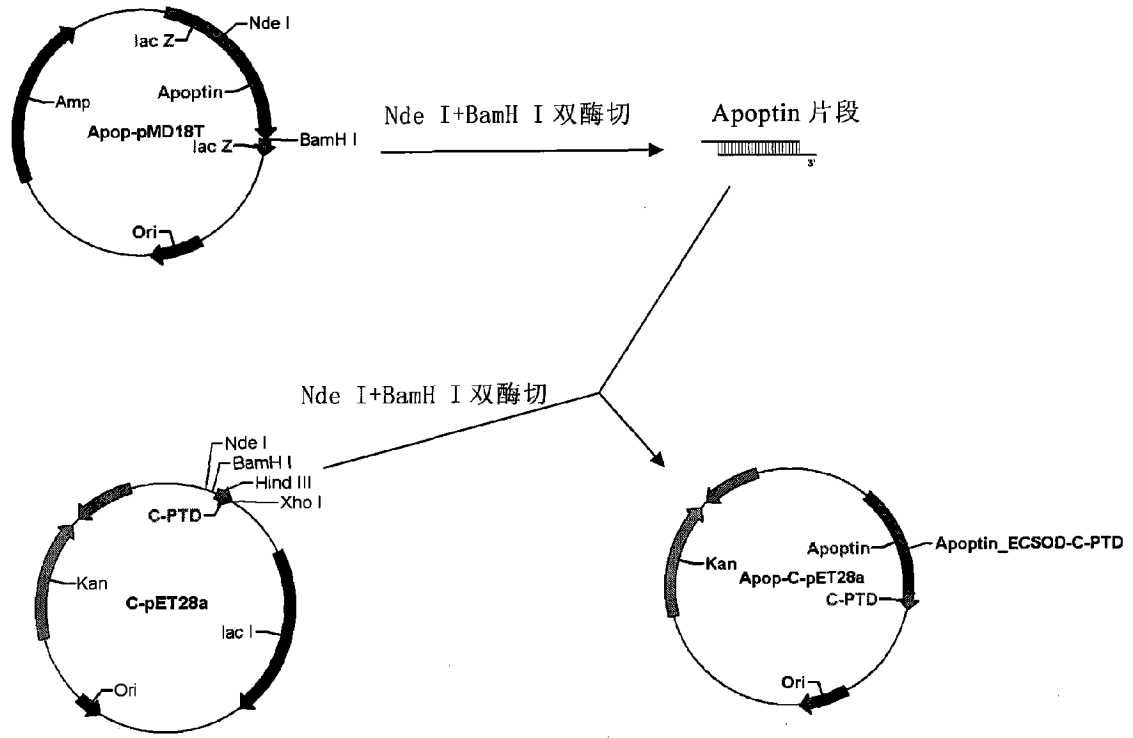


图 5

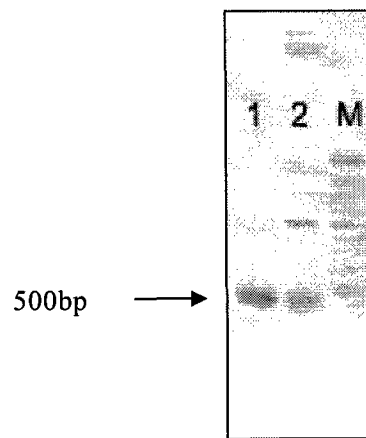


图 6

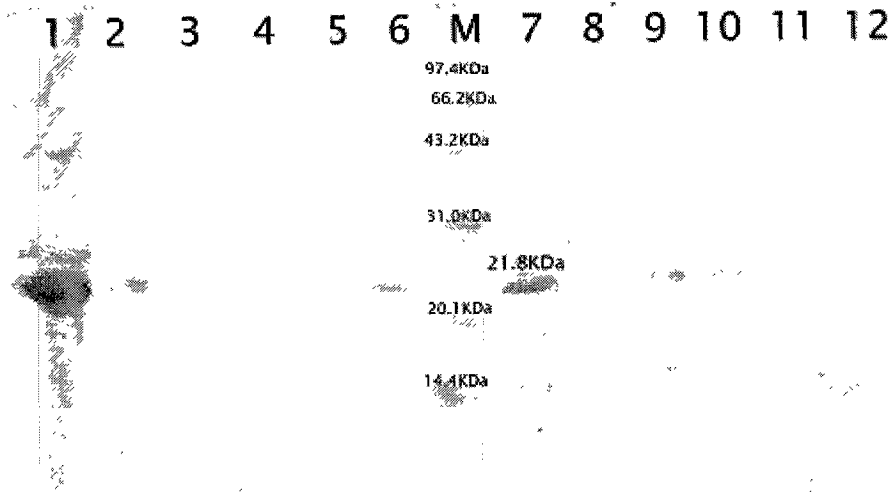


图 7

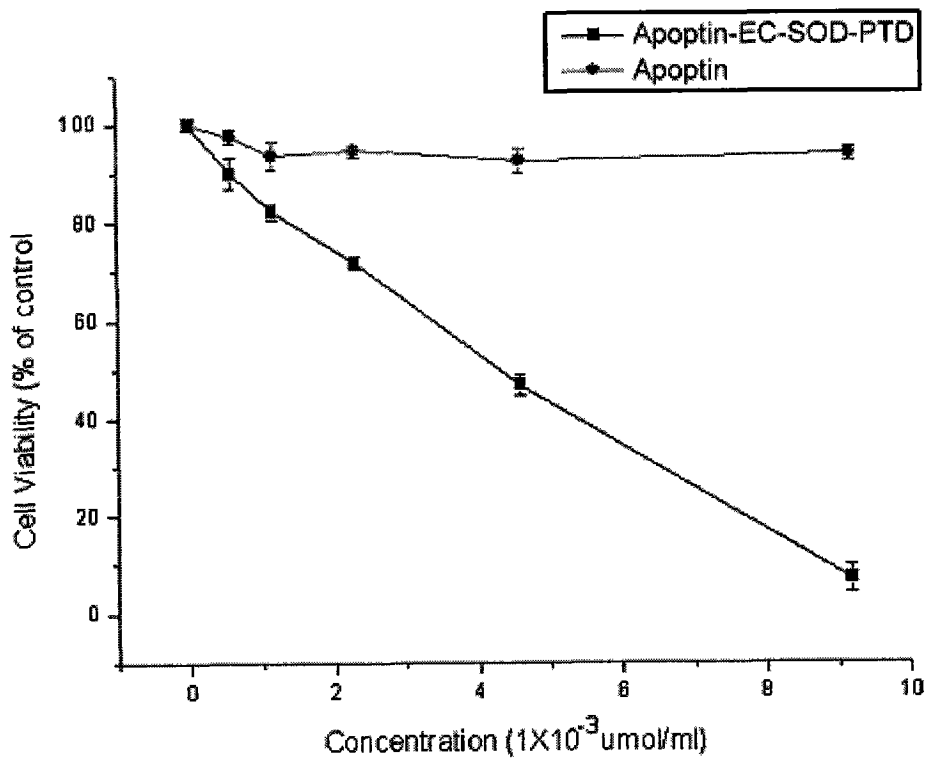


图 8

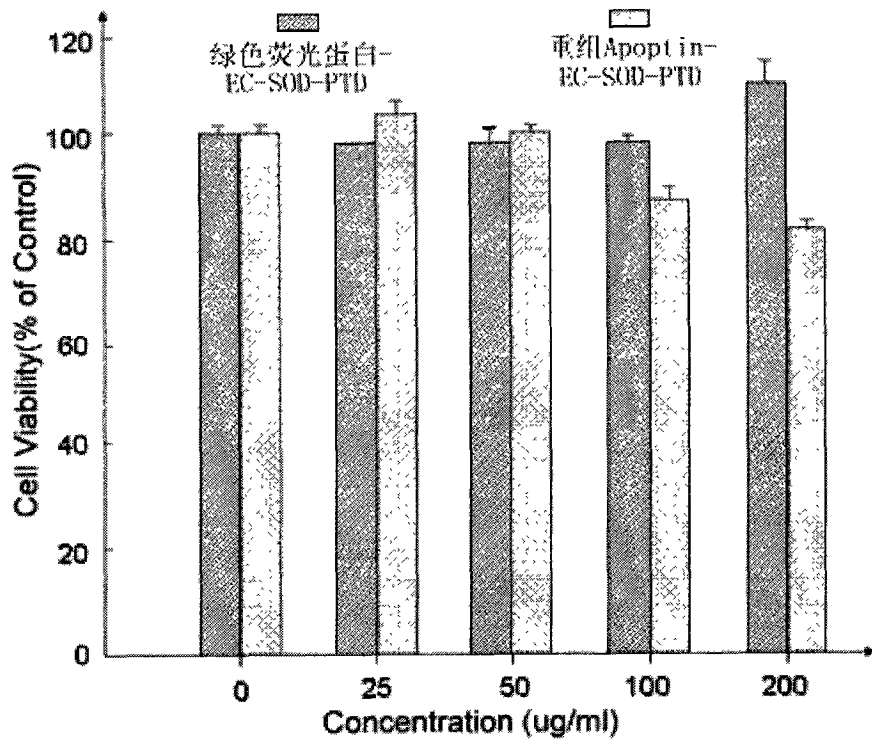


图 9