



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 107428809 B

(45) 授权公告日 2021.10.01

(21) 申请号 201680010044.X

A61K 38/17 (2006.01)

(22) 申请日 2016.02.14

A61P 35/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 3/04 (2006.01)

申请公布号 CN 107428809 A

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 5/50 (2006.01)

(43) 申请公布日 2017.12.01

(66) 本国优先权数据

201510079486.7 2015.02.13 CN

201510736184.2 2015.11.02 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2017.08.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2016/073773 2016.02.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/127948 ZH 2016.08.18

(73) 专利权人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区清华园1号

专利权人 北京普罗吉科技发展有限公司

(72) 发明人 罗永章 刘鹏 鲁薪安

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11436

代理人 程淼

(51) Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101890155 A, 2010.11.24

W0 2013034116 A1, 2013.03.14

殷秀丽等.内皮抑素基因定点突变体的构建.《国际眼科杂志》.2009,第9卷(第2期),第277-279页.

Xia Qi等.Effects of the C-terminal of endostatin on the tumorigenic potential of H22 cells.《Biomed Rep.》.2013,第1卷(第5期),

Y Yokoyama等.Improved biological activity of a mutant endostatin containing a single amino-acid substitution.《British Journal of Cancer》.2004,第90卷(第8期),第1627-1635页.

Yujing Bai等.Anti-angiogenic effects of a mutant endostatin: a new prospect for treating retinal and choroidal neovascularization.《PLoS One》.2014,第9卷(第11期),

审查员 梁亚茹

权利要求书1页 说明书13页 附图16页

(54) 发明名称

一种重组蛋白质药物的分子设计

(57) 摘要

提供了一种血管内皮抑制素的突变体,所述突变体具有提高的ATPase活性和提高的抑制新生血管生成和抑制肿瘤的活性。还提供了所述突变体在治疗肿瘤等新生血管生成相关疾病中的用途。

1. 血管内皮抑制素的突变体,所述突变体由选自由SEQ ID NO:3、4、7、9、10、11、14、18-21、24、25、28-33、37-39构成的组的序列组成。
2. 权利要求1的突变体,其中所述突变体由选自下组的序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。
3. 药物组合物,包含权利要求1或2所述的突变体和可药用载体。
4. 权利要求3的药物组合物,其中所述突变体共价连接于PEG分子。
5. 权利要求4的药物组合物,其中所述PEG分子的分子量为5-40kD。
6. 权利要求4的药物组合物,其中所述PEG分子共价连接于所述突变体的N-末端 α 氨基。
7. 权利要求4的药物组合物,其中所述PEG分子是单甲氧基聚乙二醇。
8. 权利要求4的药物组合物,其中所述单甲氧基聚乙二醇是单甲氧基聚乙二醇丙醛(mPEG-ALD)。
9. 权利要求1或2所述的突变体在制备治疗新生血管相关疾病的药物中的用途;其中所述新生血管相关疾病是肿瘤。

一种重组蛋白质药物的分子设计

技术领域

[0001] 本发明涉及新的重组蛋白质药物。具体而言,本发明提供血管内皮抑制素的变体,所述变体具有比天然血管内皮抑制素更高的ATPase活性和抑制新生血管及肿瘤生长的活性。本发明还提供所述变体在治疗肿瘤等新生血管生成相关疾病中的用途。

背景技术

[0002] 1997年,美国哈佛大学Judah Folkman教授发现了内源性血管抑制剂——血管内皮抑制素(Endostatin,以下简称ES)。ES是胶原XVIII羧基端分子量为20kDa的酶切产物,包含183个氨基酸残基。重组ES可以抑制甚至治愈多种小鼠肿瘤,且不产生耐药性(Folkman J.et al.Cell 1997;88:277-285;Folkman J.et al.Nature 1997;390:404-407)。ES抑制肿瘤的机理是抑制肿瘤新生血管生成,阻断肿瘤营养和氧气的供给。

[0003] 三磷酸腺苷(ATP)是最基本的生命能量物质,对于维持生命活动具有非常重要的意义。正常生理条件下,ATP在细胞和血液中的摩尔浓度分别是1-10mM和100 μ M。ATP酶(ATPase)又称三磷酸腺苷酶,是一类可以催化ATP水解释放能量的酶,同时产生二磷酸腺苷(ADP)和磷酸根离子(Pi)。除此之外,三磷酸鸟苷(GTP)所含的高能键也可以为蛋白质的生物合成提供能量。

[0004] 许多重要的蛋白质,包括Hsp90、myosin等,都依赖于ATP供能。这些蛋白质本身通常都具有ATP酶(ATPase)活性。尽管各种ATPase在序列和三级结构上各异,但通常都含有结合ATP的部位,即P-loop结构(Andrea T.Deyrup,et al.,1998,JBC,273(16):9450-9456)。一种典型的P-loop结构序列是GXXGXXK(Driscoll,W.J.,et al.,1995,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,92:12328-12332)。其中,X代表任意氨基酸残基,其余氨基酸残基(两个G和一个K)相比之下更加保守。通常,这些ATPase中的ATP结合部位也可以结合GTP,因此很多ATPase同时也具有GTPase活性。

[0005] 荷瘤状态下,癌细胞和新生血管内皮细胞代谢异常旺盛,代谢方式与正常成熟细胞相比存在巨大差异。一方面,癌细胞和旺盛增殖的细胞需要消耗大量ATP;另一方面,癌细胞和旺盛增殖的细胞利用葡萄糖产生ATP的效率却很低,这种低效率有氧糖酵解产生ATP的方式被称作“Warburg Effect”。虽然这种代谢方式产生ATP的效率很低,但由于该过程中会产生大量可用于细胞结构组装的堆砌单位(building blocks),反而更有利于细胞增殖(Matthew G.,et al.,2009,Science,324:1029-1033)。

[0006] 现有技术表明,天然ES具有很高的ATP酶(ATPase)活性,其序列(SEQ ID NO:1)中第89-95位氨基酸Gly-Ser-Glu-Gly-Pro-Leu-Lys具有GXXGXXK形式的经典ATP结合基序(ATP-binding motif)。现有技术显示,除个别情况外,ATPase活性与ES抑制内皮细胞迁移的活性负相关,且这种现象可以通过Warburg Effect来解释。这一规律已经在一系列ATPase活性降低的ES突变体中得到验证和揭示(PCT/CN2012/081210)。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及ES的ATP酶活性,即ATPase活性,并公开了以该种活性为基础的ES药物

设计和具有更高抑瘤活性的ES突变体。

[0009] 本发明发现,除具有形式为GXXGXXK的经典ATP结合基序以外,天然ES分子还具有另一个与ATP酶活性相关的部位,即位于天然ES序列(SEQ ID NO:1)中第171-175位的辅助结合基序Val-Leu-Cys-Ile-Glu,该基序符合ATP结合基序的另一种经典形式hhhhE(其中h代表疏水氨基酸残基)。

[0010] 本发明还发现,只有这两个ATP结合基序相互配合,才能保证ES正常行使ATPase活性。其中,具有GXXGXXK结合基序的部位行使主要的结合及催化作用,具有hhhhE形式的结合基序则通过影响ES与底物ATP的结合状况对ATPase活性产生重要影响。因此,通过对这两个ATP结合基序中的氨基酸残基进行删除、插入或替换,可以改变ES的ATPase活性。

[0011] 本发明将ES分子中具有GXXGXXK形式的ATP结合基序叫做Walker A Motif(即:A基序)。A基序起主要的催化作用。通过对A基序氨基酸残基进行删除、插入或替换,可以提高或降低ES的ATPase活性。

[0012] 本发明将ES分子中具有hhhhE形式的ATP结合基序叫做Walker B Motif(B基序)。B基序主要帮助ES与ATP相结合,并不直接催化ATP的水解反应。因此,单独对B基序中的氨基酸残基进行删除、插入或替换,通常会降低ES的ATPase活性。但理论上,对于特定的A基序,B基序的适当变化可也能引起ATPase活性升高。因此,如果希望获得ATPase活性提高的ES突变体,则应该在药物设计中对A基序和B基序做出相适应的调整。

[0013] 本发明意外的发现,ATPase活性显著提高的ES突变体,其抑制内皮细胞迁移和抑制肿瘤的活性显著高于天然ES以及ATPase活性降低的ES突变体。

[0014] ES是一个血管抑制剂蛋白,其最基本的功能是通过抑制内皮细胞活性来抑制新生血管生成,从而治疗与新生血管生成相关的疾病,如肿瘤、视网膜黄斑变性、肥胖症和糖尿病等。我们发现,与天然ES以及ATPase活性降低的ES突变体相比,ATPase活性升高的ES突变体可以具有更强的抑制新生血管生成相关疾病(如肿瘤、肥胖、脂肪肝、胰岛素耐受等)的活性。

[0015] 此外,基于ES的抗新生血管活性与其ATPase活性相关性的发现,可以利用分子克隆手段进一步通过改变(如升高)ATPase活性来设计ES突变体,从而得到更好的抑制肿瘤等新生血管生成相关疾病的ES药物。

[0016] 本发明还提供提高ES或其变体的抑制肿瘤活性的方法,其包括提高ES或其变体的ATPase活性。具体地,可以通过基因工程手段对ES或其变体的两个ATP结合基序进行突变,从而获得具有升高的ATPase活性的ES或其变体的突变体,所述突变体具有提高的生物学活性,例如提高的抑制内皮细胞迁移的活性和提高的抑制肿瘤的活性。

[0017] 本发明还提供ES突变体,所述突变体具有提高的抑制新生血管生成的活性,其中所述突变体在其ATP结合基序包含突变,且与相应的野生型ES或其某些变体相比,所述突变体的ATPase活性升高。

[0018] 优选地,与野生型ES相比,所述ES突变体的ATPase活性升高至少100%,即所述突变体的ATPase活性为野生型ES的200%,为野生型ES的300%或更高。与降低ATPase活性的改造方案相比,升高ATPase活性的改造具有更大的优化空间。

[0019] 在一些实施方式中,与相应的野生型ES或其变体相比,ATPase活性升高的突变体在其ATP结合基序的A基序中包含突变。例如,所述突变体在相应于由SEQ ID NO:1的第89-

95位氨基酸残基组成的Gly-Ser-Glu-Gly-Pro-Leu-Lys基序的序列中包含突变,其中所述突变选自一个或几个氨基酸残基的删除、插入、替换或其组合,其中所述突变导致所述突变体的ATPase活性升高。

[0020] 在一些实施方式中,所述突变体的相应于A基序的由SEQ ID NO:1第89-95位氨基酸残基组成的Gly-Ser-Glu-Gly-Pro-Leu-Lys基序的序列被突变,其中所述突变导致所述突变体的ATPase活性升高。

[0021] 在一些实施方式中,与相应的野生型ES或其变体相比,所述突变体在B基序中包含突变。

[0022] 在一些实施方式中,所述突变体中相应于B基序的由SEQ ID NO:1第171-175位氨基酸组成的Val-Leu-Cys-Ile-Glu辅助结合基序的序列被部分或全部突变。

[0023] 本发明还发现,在ES中还存在一个C基序(Walker C motif),由SEQ ID NO:1第141-144位氨基酸组成的Glu-Ala-Pro-Ser基序,对于ES抑制肿瘤新生血管等功能起到重要的作用。

[0024] 在一些实施方式中,所述突变体中相应于C基序的由SEQ ID NO:1第141-144位氨基酸组成的Glu-Ala-Pro-Ser被部分或全部突变,可提高ES的ATPase活性和抑制肿瘤新生血管等功能。

[0025] 优选的,所述突变体中相应于C基序的由SEQ ID NO:1第141-144位氨基酸组成的Glu-Ala-Pro-Ser被全部突变为Asp-Ser-Arg-Ala,可增强ES抑制肿瘤新生血管等功能。

[0026] 优选的,所述突变体中相应于C基序的突变改造可同时配合A、B基序的突变改造,从而进一步增强ES抑制肿瘤新生血管等功能。

[0027] 优选地,对ES或其变体采取以下改造方案会有效提高其ATPase活性:(1)保持对应于SEQ ID NO:1中A基序GXXGXXK中的保守氨基酸残基G89、G92、K95不发生改变;(2)通过调整A基序GXXGXXK中的可变残基X,使A基序对应肽段的空间构象柔性增加;(3)可在A基序经典序列GXXGXXK中的K95残基之后插入一个Ser或者Thr;(4)根据A基序的改变,对B基序做出相应调整;(5)对C基序的氨基酸残基进行部分或全部突变;(6)根据B基序的改变,对C基序做出相应调整;(7)根据A基序的改变,对C基序做出相应调整;(8)同时改变A、B和C三个基序。

[0028] 以上8个方案可以分别单独使用,更优选的,以上8个方案可以组合使用,以得到更好的、ATPase活性升高的ES突变体。

[0029] 在具体的实施方式中,本发明的ES突变体包含选自如下一组的序列:SEQ ID NO:3-34和SEQ ID NO:37-39。优选地,本发明的血管内皮抑制素突变体包含选自如下一组的序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。

[0030] 优选地,本发明的上述ES突变体是人ES的突变体。

[0031] 更优选地,本发明的上述ES突变体在ATPase结合部位包含突变。

[0032] 本发明还提供药物组合物,其包含如上所述的本发明的ES突变体以及可药用载体。在本发明的药物组合物中,所述ES突变体可以共价连接于聚乙二醇(PEG)分子。优选地,所述PEG分子是单甲氧基聚乙二醇(mPEG),所述PEG分子的分子量可以是5-40kD,例如5-20kD,或者20-40kD,优选地所述PEG分子的分子量为20kD,例如为20kD的单甲氧基聚乙二醇

(mPEG), 例如单甲氧基聚乙二醇丙醛 (mPEG-ALD) 或单甲氧基聚乙二醇丁醛 (mPEG-Buty)。

[0033] 优选地, 所述PEG分子共价连接于所述ES突变体的N-末端的 α 氨基。

[0034] 本发明的药物组合物可以采用现有技术中公知的可药用载体通过常规方法获得, 例如制成粉剂或注射剂。

[0035] 本文所用的术语“治疗有效量”指的是足以在人体内引起临床医师所寻找的生物学或医学反应的活性化合物的量。应当意识到给药剂量将随着所用的化合物、给药方式和病情等因素而变化。患者接受的典型的日剂量范围可以为每kg体重0.01mg至100mg活性成分。

[0036] 本发明还提供治疗肿瘤的方法, 包括给肿瘤患者施用如上所述的本发明的ES突变体或如上所述的本发明的药物组合物。可以通过本领域技术人员熟知的方式方便地给予受试者, 例如静脉注射。

[0037] 本发明还提供治疗肥胖、脂肪肝和胰岛素耐受症的方法, 包括给患有肥胖症、脂肪肝或对胰岛素耐受的患者施用如上所述的本发明的ES突变体或如上所述的本发明的药物组合物。

[0038] 本发明还涉及如上所述的ES突变体在制备治疗新生血管相关疾病的药物中的用途。例如, 所述新生血管相关疾病可以是肿瘤、肥胖、脂肪肝和胰岛素耐受症等。

附图说明

[0039] 图1: ES突变体S03工程菌的表达。

[0040] 图2: ES突变体S03及其mPEG修饰产物的纯化:

[0041] (A) 包含体蛋白纯化

[0042] (B) 复性蛋白纯化

[0043] (C) 修饰后蛋白纯化。

[0044] 图3: 天然人ES序列, 其中N-末端第一个氨基酸M可在大肠杆菌重组表达时被随机删除。

[0045] 图4: 大肠杆菌重组表达的S03序列, 其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0046] 图5: 大肠杆菌重组表达的S04序列, 其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0047] 图6: 大肠杆菌重组表达的S05序列, 其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0048] 图7: 大肠杆菌重组表达的S06序列, 其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0049] 图8: 大肠杆菌重组表达的S07序列, 其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0050] 图9: 大肠杆菌重组表达的S08序列, 其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0051] 图10: 大肠杆菌重组表达的S11序列, 其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0052] 图11:大肠杆菌重组表达的S13序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0053] 图12:大肠杆菌重组表达的S14序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0054] 图13:大肠杆菌重组表达的S15序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0055] 图14:大肠杆菌重组表达的S16序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0056] 图15:大肠杆菌重组表达的S17序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0057] 图16:大肠杆菌重组表达的S18序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0058] 图17:大肠杆菌重组表达的S19序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0059] 图18:大肠杆菌重组表达的S20序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0060] 图19:大肠杆菌重组表达的NSN1序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0061] 图20:大肠杆菌重组表达的NSN2序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0062] 图21:大肠杆菌重组表达的NSN3序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0063] 图22:大肠杆菌重组表达的NSN4序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0064] 图23:大肠杆菌重组表达的E176A序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0065] 图24:大肠杆菌重组表达的C174E序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0066] 图25:大肠杆菌重组表达的E-M序列,其中N-末端第一个氨基酸M可在重组表达时被随机删除。

[0067] 图26:未修饰的ES突变体S03、NSN4、E-M抑制内皮细胞迁移活性的比较。

[0068] 图27:ES突变体E176A和C174E抑制内皮细胞迁移活性的比较。

[0069] 图28:修饰的ES突变体MS03、MS04、MS05、MS06、MS07、MS08、MS11、MS13抑制内皮细胞迁移活性的比较。

[0070] 图29:修饰的ES突变体MS03、MS14、MS15、MS16、MS17、MS18、MS19、MS20抑制内皮细胞迁移活性的比较。

[0071] 图30:修饰的ES突变体MS03、MNSN1、MNSN2、MNSN3、MNSN4抑制内皮细胞迁移活性的比较。

[0072] 图31:ES扩增的PCR正向引物序列。(SEQ ID NO:35)

[0073] 图32:ES扩增的PCR反向引物序列。(SEQ ID NO:36)

[0074] 图33:ES突变体36 (SEQ ID NO:25)、249 (SEQ ID NO:26)、381 (SEQ ID NO:27)、57 (SEQ ID NO:28)、114 (SEQ ID NO:29)、124 (SEQ ID NO:30)、125 (SEQ ID NO:31)的序列。

[0075] 图34:ES突变体160 (SEQ ID NO:32)、163 (SEQ ID NO:33)、119 (SEQ ID NO:34)的序列。

[0076] 图35:未修饰的ES突变体36、249、381及修饰的ES突变体M36、M249、M381抑制内皮细胞迁移活性的比较。

[0077] 图36:修饰的ES突变体NSN4、M249、M119、M160、M163、M125、M57、M124、M114抑制内皮细胞迁移活性的比较。

[0078] 图37:未修饰的ES突变体Endu-E-M (SEQ ID NO:37)、Endu-114 (SEQ ID NO:38)、Endu-57 (SEQ ID NO:39)的序列。

[0079] 图38:未修饰的ES突变体Endu-E-M、Endu-114、Endu-57抑制内皮细胞迁移的活性比较。

[0080] 发明详述

[0081] 除非另有说明,否则本说明书中所使用的科学及技术术语应具有本领域普通技术人员通常所了解的含义。通常,本说明书中所使用的与细胞及组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学及蛋白质与核酸化学有关的命名及其技术是本领域公知和常用的。

[0082] 除非另有说明,否则本说明书中所使用的方法及技术一般根据本领域公知的和常规的方法和本说明书中所阐述的或引用的各种参考文献中所述的方式来进行。

[0083] ES、ES突变体、及PEG修饰产物

[0084] ES (Endostatin) 指天然的血管内皮抑制素,例如具有SEQ ID NO:1的序列的人血管内皮抑制素,其中当人ES在大肠杆菌中重组表达时,其部分产物的N-末端会被随机添加上氨基酸残基M (图3)。在本申请中,ES突变体指的是对ES变体的某个或者某些氨基酸位点进行突变,例如对ATP结合基序进行氨基酸删除、插入或替换而获得的突变体蛋白质。ES突变体可以是天然产生的,例如:当ES在酵母中重组表达时,由于N-末端发生随机删除,可产生N-末端缺失4个氨基酸的ES突变体,进一步地,其中C-末端的K还可被随机删除。ES突变体也可以是人工构建的,例如:为了促进蛋白表达和提高稳定性,恩度 (Endu) 是通过基因工程手段在天然ES的N-末端添加了序列为MGGSHHHHH的9个附加氨基酸残基获得的突变体,其中第一个氨基酸M可在大肠杆菌重组表达时被随机删除,具有SEQ ID NO:2的序列。

[0085] 本发明中使用的未修饰的及修饰的ES和ES突变体蛋白均由北京普罗吉公司提供。

[0086] 聚乙二醇 (PEG) 修饰的ES命名为M2ES,PEG修饰的ES突变体在命名时通过在突变体代号前加“M”区分:例如PEG修饰的ES突变体S03命名为MS03,PEG修饰的ES突变体NSN1命名为MNSN1。例如,在本发明的一些具体实施方式中,代号为MS03和MNSN1的分子可以是一个分子量为20kDa的单甲氧基聚乙二醇丙醛 (mPEG-ALD) 修饰一个代号为S03或NSN1的突变体得到的产物,偶联的位点是活化的mPEG-ALD醛基与S03或NSN1的N-末端 α -氨基。

[0087] ATP结合基序 (ATP-binding motif) 指具有ATPase活性的蛋白质分子中与ATP结合的、典型的氨基酸序列。ATP结合基序通常具有P-loop结构,这个P-loop结构主要有以下几种典型序列:GXXGXXK, (G/A) XXXXGK (T/S), GXXXXGKS和GXXGXGKS。对人ES而言,ATP结合基序主要指具有GXXGXXK形式的这段序列。其中,没有用X取代的氨基酸残基相比之下更加保守。

通常,这些ATP结合基序也可以结合GTP、UTP、CTP等。

[0088] 本发明中所指的ATP结合基序包括A基序(Walker A motif)、B基序(Walker B motif)和C基序(Walker C motif)。其中A基序是ES分子中具有形式为GXXGXXK的序列的部位,其中X是可变氨基酸残基。A基序是ES与ATP结合及催化水解反应的主要部位。B基序指ES分子中具有hhhhE序列的部位,其中h是疏水性氨基酸残基。B基序参与ATP与ES的结合,通过影响ES与ATP的结合影响ES的ATPase活性。C基序是指ES分子中具有Glu-Ala-Pro-Ser序列(即EAPS)的部位,很可能通过间接影响ES与ATP的结合来影响ES的ATPase活性,这一点需要通过ES-ATP复合物的晶体结构信息来验证。此外,由于蛋白质的空间构象由肽链折叠形成,在一级序列中邻近的氨基酸残基往往在空间构象中并不靠近;反之,在一级序列中相距较远的氨基酸残基在空间构象中却彼此靠近。蛋白质分子局部构象的稳定性很大程度上依赖于分子整体构象的稳定性,局部氨基酸序列的改变有可能带来分子构象的改变。因此,本领域技术人员完全可以理解,在A、B、C三个基序以外存在其他参与调节ES与ATP相互作用的部位,同样可以影响ES的ATPase活性和抑制血管新生功能。这些部位可能单独发挥上述作用,也可能通过与A、B、C基序或其任意组合相配合来影响ES的ATPase活性和抑制血管新生功能。因此,在本发明的一些实施例中,除了对A、B、C基序或其组合进行突变以外,还在这三个基序以外的位点引入了突变,以达到更好的效果。

[0089] 我们发现了所检测的ES、ES变体、ES突变体及它们的mPEG修饰产物的ATPase活性与抑制内皮细胞迁移的活性正相关的规律,即抑制内皮细胞迁移活性高的ES突变体其ATPase活性也高。基于此项发现,为了得到具有更高抑制内皮细胞迁移活性的ES,我们可以通过对ES的ATP结合基序进行氨基酸删除、插入或替换的方法提高ES的ATPase活性。

[0090] 因此,本发明还提供提高ES或其变体抑制血管新生和抑制肿瘤的生物活性的方法,其包括提高ES或其变体的ATPase活性。具体地,可以通过基因工程手段对ES或其变体中参与ATP结合的A基序GXXGXXK进行突变,或者对A基序和B基序同时进行突变,或者对C基序进行突变,或者对A、B、C基序的任意组合进行突变,从而获得具有提高的ATPase活性的ES或其变体的突变体,所述突变体具有提高的生物活性,例如提高的抑制血管新生的活性(如抑制内皮细胞迁移的活性)和提高的抑制肿瘤的活性。其中,B基序的突变通常会导致ES抑制血管新生和抑制动物肿瘤活性的降低,因此针对B基序实施突变应该格外慎重。

[0091] 因此,在本发明的一个实施例中,针对ES中的A基序或B基序引入了如下突变形式:

[0092] S03——SEQ ID NO:3(图4)

[0093] S04——SEQ ID NO:4(图5)

[0094] S05——SEQ ID NO:5(图6)

[0095] S06——SEQ ID NO:6(图7)

[0096] S07——SEQ ID NO:7(图8)

[0097] S08——SEQ ID NO:8(图9)

[0098] S11——SEQ ID NO:9(图10)

[0099] S13——SEQ ID NO:10(图11)

[0100] S14——SEQ ID NO:11(图12)

[0101] S15——SEQ ID NO:12(图13)

[0102] S16——SEQ ID NO:13(图14)

- [0103] S17——SEQ ID NO:14 (图15)
- [0104] S18——SEQ ID NO:15 (图16)
- [0105] S19——SEQ ID NO:16 (图17)
- [0106] S20——SEQ ID NO:17 (图18)
- [0107] NSN1——SEQ ID NO:18 (图19)
- [0108] NSN2——SEQ ID NO:19 (图20)
- [0109] NSN3——SEQ ID NO:20 (图21)
- [0110] NSN4——SEQ ID NO:21 (图22)
- [0111] E176A——SEQ ID NO:22 (图23)
- [0112] C174E——SEQ ID NO:23 (图24)
- [0113] E-M——SEQ ID NO:24 (图25)
- [0114] 36——SEQ ID NO:25 (图33)
- [0115] 249——SEQ ID NO:26 (图33)
- [0116] 381——SEQ ID NO:27 (图33)
- [0117] 57——SEQ ID NO:28 (图33)
- [0118] 114——SEQ ID NO:29 (图33)
- [0119] 124——SEQ ID NO:30 (图33)
- [0120] 125——SEQ ID NO:31 (图33)
- [0121] 160——SEQ ID NO:32 (图34)
- [0122] 163——SEQ ID NO:33 (图34)
- [0123] 119——SEQ ID NO:34 (图34)
- [0124] Endu-E-M——SEQ ID NO:37 (图37)
- [0125] Endu-57——SEQ ID NO:38 (图37)
- [0126] Endu-114——SEQ ID NO:39 (图37)

[0127] 利用生化方法检测ATPase活性时发现,抑制内皮细胞迁移活性提高的突变体的ATPase活性与ES相比明显升高(表1)。

[0128] 发现ATP结合基序突变对Endu的ATPase活性和抑制内皮细胞迁移活性的改变与相同突变方式对ES相关活性的改变相类似。因此,我们认为,通过对ATP结合基序进行突变来改变ES的ATPase活性及抑制内皮细胞迁移活性的方法也适用于ES突变体。

[0129] 因此,本发明还提供ES突变体,所述突变体具有提高的抑制新生血管生成的活性,其中所述突变体在其A基序和/或B基序和/或C基序包含突变,且与相应的野生型ES或其变体相比,所述突变体的ATPase活性升高。

[0130] 优选地,与野生型ES相比,所述ES突变体的ATPase活性升高至少100%,即所述突变体的ATPase活性为野生型ES的200%,为野生型ES的300%或更高。

[0131] 在一些实施方式中,与相应的野生型ES或其变体相比,所述突变体在其ATP结合基序中包含突变。例如,所述突变体在相应于由SEQ ID NO:1的第89-95位氨基酸残基组成的Gly-Ser-Glu-Gly-Pro-Leu-Lys基序的序列中包含突变,其中所述突变选自一或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加或其组合,其中所述突变导致所述突变体的ATPase活性升高。

[0132] 优选地,对ES采取以下改造方案会有效提高其ATPase活性:1)保持对应于SEQ ID

N0:1中A基序GXXGXXK中的保守氨基酸残基G89、G92、K95不发生改变;2)通过调整A基序GXXGXXK中的可变残基X,使A基序对应肽段的空间构象柔性增加;3)可在A基序经典序列GXXGXXK中的K95残基之后插入一个Ser或者Thr;4)根据A基序的改变,对B基序做出相应调整;5)对C基序的氨基酸残基进行部分或全部突变;6)根据B基序的改变,对C基序做出相应调整;7)根据A基序的改变,对C基序做出相应调整;8)同时改变A、B和C三个基序。

[0133] 在具体的实施方式中,本发明的血管内皮抑制素突变体包含选自如下一组的序列:SEQ ID NO:3-21和24。优选地,本发明的血管内皮抑制素突变体包含选自如下一组的序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:24。

[0134] 优选地,本发明的上述ES突变体是人ES的突变体。

[0135] 本发明还提供治疗新生血管相关疾病的方法,包括给患者施用有效量的如上所述的本发明的血管内皮抑制素突变体或如上所述的本发明的药物组合物。所述新生血管相关疾病包括肿瘤、肥胖、脂肪肝和胰岛素耐受症。优选地,所述新生血管相关疾病是肿瘤。

[0136] 本发明还涉及如上所述的血管内皮抑制素突变体在制备治疗新生血管相关疾病的药物中的用途。优选地,所述新生血管相关疾病是肿瘤。

[0137] 通过以下非限制性的实施例进一步阐述本发明。应该理解,本发明并不限于这些实施例。

实施例

[0138] 实施例1:构建ES重组菌株

[0139] 本实施例中,从人肺癌细胞A549的cDNA中克隆出Endostatin,并连接到pET30a质粒中。基因扩增使用的5'端引物为GGAATTCATATGCACAGCCACCGCGACTTC(图31,SEQ ID NO:35),3'端引物为CCGCTCGAGT TACTTGGAGGCAGTCATGAAGCTG(图32,SEQ ID NO:36)。内切酶分别是NdeI和XhoI。

[0140] 将上述重组质粒按照常规分子克隆技术转化到大肠杆菌中,并进行表达。

[0141] 实施例2:构建ATP结合基序突变的ES突变体菌株

[0142] 本实施例中,对野生型人ES的ATP结合基序进行突变改造,上、下游引物及转化方法同实施例1。突变体编号及发生的改变如下:

[0143] S03——SEQ ID NO:3(图4)删除N-末端四个氨基酸残基HSHR,同时A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T;

[0144] S04——SEQ ID NO:4(图5)删除N-末端四个氨基酸残基HSHR,在A基序后插入S,同时删除了B基序中的E及其后氨基酸残基NSFMTASK;

[0145] S05——SEQ ID NO:5(图6)删除N-末端四个氨基酸残基HSHR,在A基序后插入T,同时删除了B基序中的E及其后氨基酸残基NSFMTASK;

[0146] S06——SEQ ID NO:6(图7)删除N-末端四个氨基酸残基HSHR,A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T,同时删除了B基序中的E及其后氨基酸残基NSFMTASK;

[0147] S07——SEQ ID NO:7(图8)A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T,同时删除了C末端氨基酸残基SFMTASK;

[0148] S08——SEQ ID NO:8(图9)A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T,同时删除了C末端氨基酸残基TASK;

- [0149] S11——SEQ ID NO:9 (图10) 删除了C末端氨基酸残基SFMTASK;
- [0150] S13——SEQ ID NO:10 (图11) 删除了N-末端HS残基,A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T,同时删除了C末端SFMTASK;
- [0151] S14——SEQ ID NO:11 (图12) 删除了N-末端HS残基,A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T,同时删除了C末端TASK;
- [0152] S15——SEQ ID NO:12 (图13) 删除了N-末端HS残基,A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T,同时删除了C末端K;
- [0153] S16——SEQ ID NO:13 (图14) 删除了N-末端H残基,A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T,同时删除了C末端K;
- [0154] S17——SEQ ID NO:14 (图15) 删除了N-末端H残基,A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T,同时删除了C末端SFMTASK;
- [0155] S18——SEQ ID NO:15 (图16) 删除了N-末端H残基,A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T,同时删除了C末端TASK;
- [0156] S19——SEQ ID NO:16 (图17) 删除了N-末端H残基,A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T;
- [0157] S20——SEQ ID NO:17 (图18) 删除了N-末端HS残基,A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T;
- [0158] NSN1——SEQ ID NO:18 (图19) 删除了Ser-88,A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T;
- [0159] NSN2——SEQ ID NO:19 (图20) A基序突变为GESGAGK,P96T&G97P;
- [0160] NSN3——SEQ ID NO:20 (图21) A基序突变为GESGAGK,P96T;
- [0161] NSN4——SEQ ID NO:21 (图22) A基序突变为GESGAGK,P96T,插入Gly-98;
- [0162] E176A——SEQ ID NO:22 (图23) E176A
- [0163] C174E——SEQ ID NO:23 (图24) C174E
- [0164] E-M——SEQ ID NO:24 (图25) A基序突变为GESGAGK,并在其后插入T。
- [0165] 实施例3:重组ES及其突变体的表达制备
- [0166] 本实施例中,以S03为例简述ES及其突变体的表达及制备方法如下:ES或其突变体工程菌经LB培养基摇瓶扩培过夜,接种到5L发酵罐(Sartorius),适时加入IPTG诱导,诱导后继续培养约4小时后收集菌体,并电泳检测(图1)。
- [0167] 菌体用PBS缓冲液重悬,并用高压均质机彻底破碎,反复破碎3次,每一次破碎后均离心留沉淀,再用PBS缓冲液重悬。破菌沉淀用含有8M尿素的Tris-HCl缓冲液溶解(pH 8.5),然后用DEAE层析介质(GE Healthcare)在pH 8.5的Tris-HCl缓冲液下洗脱,收取穿透部分,得到纯化的复性前蛋白。蛋白复性后,使用CM层析介质(GE Healthcare)在pH 8.5的Tris-HCl缓冲液下梯度洗脱,盐浓度范围为0-500mM NaCl,得到纯度大于95%的复性蛋白(图2A、B)。将复性蛋白浓缩后对NaAc-HAc(pH 6.0)透析,用平均分子量为20kD的单甲氧基聚乙二醇丙醛(mPEG-ALD,20kDa,北京键凯科技有限公司)按照产品说明书提示的操作方法对复性蛋白进行N-末端单修饰,修饰产物用SP柱(GE Healthcare)纯化,在浓度为0-500mM的NaCl范围进行梯度洗脱,得到目标组分(图2C)。
- [0168] 其他ES突变体及其修饰物的制备方法同上。

[0169] 实施例4:ES、ES突变体及其mPEG修饰产物的ATPase活性检测

[0170] 本实施例采用现有技术中公开的ATPase活性检测方法(PCT/CN2012/081210),检测了ES、ES突变体及其mPEG修饰产物的ATPase活性,结果见表1。试验采用具有较高ATPase活性的蛋白Myosin(提取自猪心,Sigma)作为阳性对照。

[0171] 实施例5:ES、ES突变体抑制内皮细胞迁移的活性

[0172] 本实施例采用现有技术公开的Transwell内皮细胞测活方法(PCT/CN2012/081210),其中,内皮细胞HMEC被分成如下各组加以不同处理。第一组:阴性对照组,无ES(加入等量缓冲溶液)处理;第二组,加入ES(20 μ g/mL)处理;第三组,加入ES突变体YH-16(20 μ g/mL)处理;第四组:加入ES突变体S03(20 μ g/mL)处理;第五组,加入ES突变体NSN4(20 μ g/mL)处理;第六组,加入ES突变体E-M(20 μ g/mL)处理。结果显示,S03、NSN4和E-M抑制内皮细胞迁移的活性与ES相比显著增加,S03、NSN4和E-M处理组迁移细胞数分别约为ES处理组的30%、16%和40%(图26)。

[0173] 用相同的方法检测了ES突变体E176A和C174E抑制内皮细胞迁移的活性,E176A和C174E抑制内皮细胞迁移的活性都低于ES(图27)。

[0174] 实施例6:mPEG修饰的ES、ES突变体抑制内皮细胞迁移的活性

[0175] 用实施例5中所述的方法检测了mPEG修饰的ES、ES突变体抑制内皮细胞迁移的活性,由于很多突变体蛋白抑制内皮细胞迁移的活性增强显著,为了更明显地体现各突变体蛋白之间活性的差异,本实施例采用降低的剂量(即5 μ g/mL)处理细胞,仍能够看到明显的抑制效果,具体如下:

[0176] mPEG修饰的ES突变体MS03、MS04、MS05、MS06、MS07、MS08、MS11、MS13抑制内皮细胞迁移的活性(图28)。其中,MS03、MS04、MS07、MS11、MS13抑制内皮细胞迁移的活性显著优于M2ES:MS03处理组迁移细胞数大约是M2ES处理组的1/8,MS04、MS07、MS11、MS13处理组迁移细胞数约为M2ES处理组的1/2;而MS05、MS06、MS08抑制内皮细胞迁移的活性低于M2ES。

[0177] mPEG修饰的ES突变体MS03、MS14、MS15、MS16、MS17、MS18、MS19、MS20抑制内皮细胞迁移的活性(图29)。其中,MS03、MS14、MS17抑制内皮细胞迁移的活性显著优于M2ES;MS15、MS19抑制内皮细胞迁移的活性与M2ES无显著性差异;MS16、MS18、MS20抑制内皮细胞迁移的活性低于M2ES。

[0178] mPEG修饰的ES突变体MS03、MNSN1、MNSN2、MNSN3、MNSN4抑制内皮细胞迁移的活性(图30)。MS03、MNSN1、MNSN2、MNSN3、MNSN4抑制内皮细胞迁移的活性均显著优于M2ES;其中,MNSN4处理组迁移细胞数约为M2ES处理组的1/20。

[0179] ATPase活性升高的突变体显示了与ES相当或显著提高的抑制内皮细胞迁移的活性,符合ATPase活性与抑制内皮细胞迁移的活性正相关的规律。

[0180] 实施例7:构建ES突变体菌株

[0181] 本实施例中,对野生型人ES进行突变改造,具体方法以及上、下游引物及转化方法同实施例1。突变体编号及其序列见图33、图34。

[0182] 36——SEQ ID NO:25(图33)删除N-末端3个氨基酸残基HSH,A39Q,删除Gly-89

[0183] 249——SEQ ID NO:26(图33)删除N-末端3个氨基酸残基HSH,A基序突变为GSQQLQ,C基序突变为DERG;

[0184] 381——SEQ ID NO:27(图33)A基序突变为GSEAPLR;

- [0185] 57——SEQ ID NO:28 (图33) A基序突变为GESGAGK, C基序突变为DSRA;
- [0186] 114——SEQ ID NO:29 (图33) B基序突变为VLCIA, C基序突变为DSRA;
- [0187] 124——SEQ ID NO:30 (图33) 删除N-末端4个氨基酸残基HSHR, A基序突变为GSEGPLR, C基序突变为DSRA;
- [0188] 125——SEQ ID NO:31 (图33) 删除N-末端4个氨基酸残基, A基序突变为GSEGPLR, C基序突变为DSRA, 并在C-末端添加K;
- [0189] 160——SEQ ID NO:32 (图34) 突变了A、B、C基序以外的氨基酸残基, 见序列。
- [0190] 163——SEQ ID NO:33 (图34) A基序突变为GSQGQLQ, C基序突变为ETTG;
- [0191] 119——SEQ ID NO:34 (图34) A基序突变为VSQGQLQ。
- [0192] 实施例8:mPEG修饰的ES、ES突变体抑制内皮细胞迁移的活性
- [0193] 用实施例6中所述的方法检测了mPEG修饰的ES、ES突变体抑制内皮细胞迁移的活性, 具体如下:
- [0194] mPEG修饰的ES突变体36、249、381及修饰的ES突变体M36、M249、M381抑制内皮细胞迁移的活性(图35); 其中, 36处理组迁移细胞数约为ES处理组的70%, 249和381抑制内皮细胞活性与ES无显著性差异; 修饰后的突变体M36处理组迁移细胞数约为ES处理组的50%, M249、M381抑制内皮细胞活性与ES无显著性差异。
- [0195] mPEG修饰的ES突变体NSN4、M249、M119、M160、M163、M125、M57、M124、M114抑制内皮细胞迁移的活性(图36)。NSN4、M249、M160、M163、M125、M57、M124、M114抑制内皮细胞活性与M2ES相比均显著提高, M119与M2ES相比无显著性差异。其中, M57、M124和M114处理组迁移细胞数约为M2ES处理组的34%、28%和24%。
- [0196] 实施例9:构建ES突变体菌株
- [0197] 本实施例中, 对Endu进行突变改造, 具体方法以及上、下游引物及转化方法同实施例1。突变体编号及其序列见图37。
- [0198] Endu-E-M——SEQ ID NO:37 (图37) N-末端添加MGGSHHHHH, A基序突变为GESGAGK, 并在其后插入T;
- [0199] Endu-57——SEQ ID NO:38 (图37) N-末端添加MGGSHHHHH, A基序突变为GESGAGK, 并在其后插入T;
- [0200] Endu-114——SEQ ID NO:39 (图37) N-末端添加MGGSHHHHH, A基序突变为GESGAGK, 并在其后插入T。
- [0201] 实施例10:mPEG修饰的ES突变体抑制内皮细胞迁移的活性
- [0202] 用实施例6中所述的方法检测了mPEG修饰的ES突变体Endu-E-M、Endu-57、Endu-114抑制内皮细胞迁移的活性(图38)。
- [0203] Endu-E-M、Endu-57和Endu-114抑制内皮细胞迁移的活性均显著优于Endu, 以Endu为对照, 抑制率分别为64%、50%和34%。
- [0204] 表1

[0205]

序号	样品名称	ATPase活性 (nM/mg/min)	样品名称	ATPase活性 (nM/mg/min)
1	ES	14920	mPEG-ES	2596
2	Endu	5586	mPEG-Endu	1626
3	S03	26110	MS03	4585
4	S04	24021	MS04	4057
5	S05	22828	MS05	4269
6	S06	19693	MS06	3474
7	S07	23128	MS07	3987
8	S08	19995	MS08	3571
9	S11	24322	MS11	4286
10	S13	24737	MS13	4275
11	S14	23250	MS14	4051
12	S15	20679	MS15	3520
13	S16	21082	MS16	3780
14	S17	22866	MS17	4011
15	S18	21421	MS18	3716
16	S19	22160	MS19	3874
17	S20	21025	MS20	3652
18	NSN1	23754	MNSN1	4131
19	NSN2	23345	MNSN2	4136
20	NSN3	26605	MNSN3	4869
21	NSN4	31809	MNSN4	5807
22	E176A	5626	ME176A	1012
23	C174E	7809	MC174E	1405
24	E-M	19396	ME-M	3463

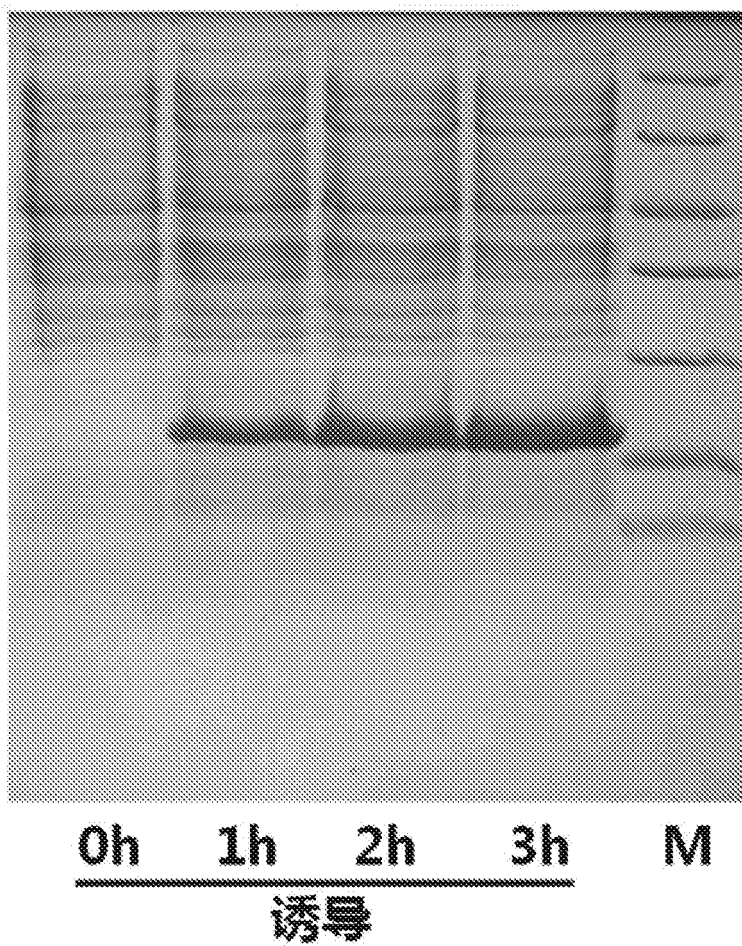
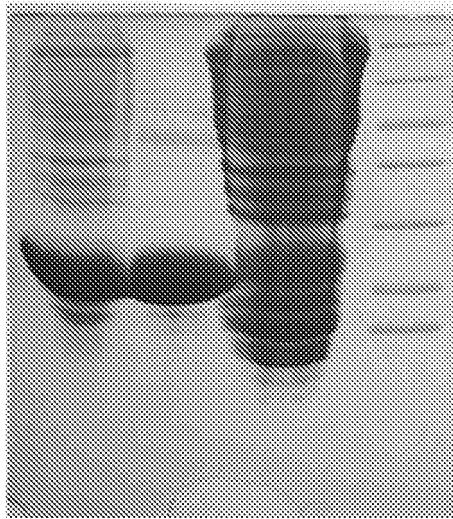
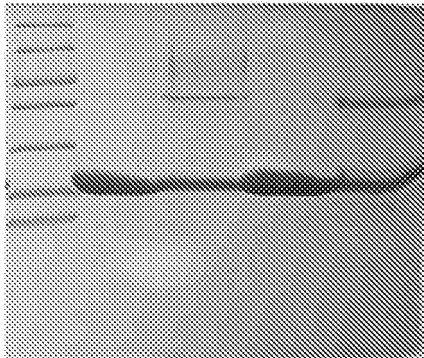


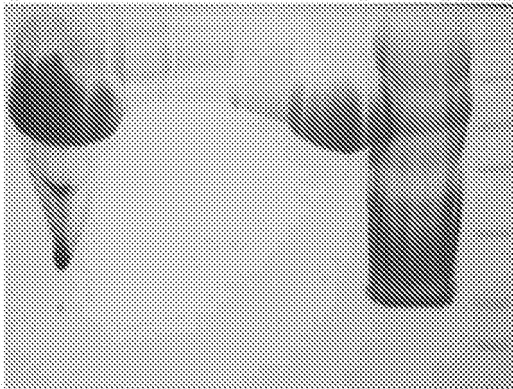
图1



上样 穿透 清柱 M
(A)



M 上样 150 300 500 mM NaCl
(B)



mM NaCl 上样 50 80 150 200 500 M
(C)

图2

(M) HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMR
GIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLS
SRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELL
FPSWEALFSGSEGPLKPGARIFSFDGKD
VLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTES
YCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ
SAASCHHAYIVLCIENSFMTASK

图3

(M) DFQPVHLHLVALNSPLSGGMRGIRGA
DFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQD
LYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPSWE
ALFSGESGAGKTPGARIFSFDGKDVLRH
PTWPQKSVWHGSDPNRRRLTESYCET
WRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAAS
CHHAYIVLCIENSFMTASK

图4

(M) DFQPVHLHLVALNSPLSGGMRGIRGA
DFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQD
LYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPSWE
ALFSGSEGPLKSPGARIFSFDGKDVLRH
PTWPQKSVWHGSDPNRRRLTESYCET
WRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAAS
CHHAYIVLCI

图5

(M)DFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGA
DFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQD
LYSIVRRADRAAAVPIVNLKDELLFPSWE
ALFSGSEGPLKTPGARIFSFDGKDVL RH
PTWPQKSVWHGSDPNRRRLTESYCET
WRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAAS
CHHAYIVLCI

图6

(M)DFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGA
DFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQD
LYSIVRRADRAAAVPIVNLKDELLFPSWE
ALFSGESGAGKTPGARIFSFDGKDVL RH
PTWPQKSVWHGSDPNRRRLTESYCET
WRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAAS
CHHAYIVLCI

图7

(M)HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMR
GIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLS
SRLQDLYSIVRRADRAAAVPIVNLKDELL
FPSWEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGK
DVL RHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTE
SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLG
QSAASCHHAYIVLCIEN

图8

(M) HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMR
GIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLS
SRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELL
FPSWEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGK
DVL RHPTWPQKSVWHGSDPNRRLTE
SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLG
QSAASCHHAYIVLCIENSFM

图9

(M) HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMR
GIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLS
SRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELL
FPSWEALFSGSEGPKPGARIFSFDGKD
VLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRLTES
YCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ
SAASCHHAYIVLCIEN

图10

(M) HRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIR
GADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRL
QDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPS
WEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGKDV
LRHPTWPQKSVWHGSDPNRRLTESY
CETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQS
AASCHHAYIVLCIEN

图11

(M)HRDFQPV LHLVALNSPLSGGMRGIR
GADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRL
QDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPS
WEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGKDV
LRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTESY
CETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQS
AASCHHAYIVLCIENSFMM

图12

(M)HRDFQPV LHLVALNSPLSGGMRGIR
GADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRL
QDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPS
WEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGKDV
LRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTESY
CETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQS
AASCHHAYIVLCIENSFMTAS

图13

(M)SHRDFQPV LHLVALNSPLSGGMRGI
RGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSR
LQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFP
SWEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGKD
VLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTES
YCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ
SAASCHHAYIVLCIENSFMTAS

图14

(M)SHRDFQPVHLVALNSPLSGGMRGI
RGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSR
LQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFP
SWEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGKD
VLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTES
YCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ
SAASCHHAYIVLCIEN

图15

(M)SHRDFQPVHLVALNSPLSGGMRGI
RGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSR
LQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFP
SWEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGKD
VLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTES
YCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ
SAASCHHAYIVLCIENSFM

图16

(M)SHRDFQPVHLVALNSPLSGGMRGI
RGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSR
LQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFP
SWEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGKD
VLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTES
YCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ
SAASCHHAYIVLCIENSFM TASK

图17

(M)HRDFQPV LHLVALNSPLSGGMRGIR
GADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRL
QDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPS
WEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGKDV
LRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTESY
CETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQS
AASCHHAYIVLCIENSFMTASK

图18

(M)HSHRDFQPV LHLVALNSPLSGGMR
GIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLS
SRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELL
FPSWEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGK
DVLRRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTE
SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLG
QSAASCHHAYIVLCIENSFMTASK

图19

(M)HSHRDFQPV LHLVALNSPLSGGMR
GIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLS
SRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELL
FPSWEALFSGESGAGKTPARIFSFDGKD
VLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTES
YCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ
SAASCHHAYIVLCIENSFMTASK

图20

(M)HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMR
GIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLS
SRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELL
FPSWEALFSGESGAGKTGARIFSFDGK
DVLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTE
SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLG
QSAASCHHAYIVLCIENSFMTASK

图21

(M)HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMR
GIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLS
SRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELL
FPSWEALFSGESGAGKTGGARIFSFDG
KDVLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLT
ESYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLL
GQSAASCHHAYIVLCIENSFMTASK

图22

(M)HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMR
GIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLS
SRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELL
FPSWEALFSGSEGPKPGARIFSFDGKD
VLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTES
YCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ
SAASCHHAYIVLCIANSFMTASK

图23

(M) HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMR
 GIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLS
 SRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELL
 FPSWEALFSGSEGPKPGARIFSFDGKD
 VLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTES
 YCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ
 SAASCHHAYIVLEIENSFMTASK

图24

(M) HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMR
 GIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLS
 SRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELL
 FPSWEALFSGESGAGKTPGARIFSFDGK
 DVL RHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTE
 SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLG
 QSAASCHHAYIVLCIENSFMTASK

图25

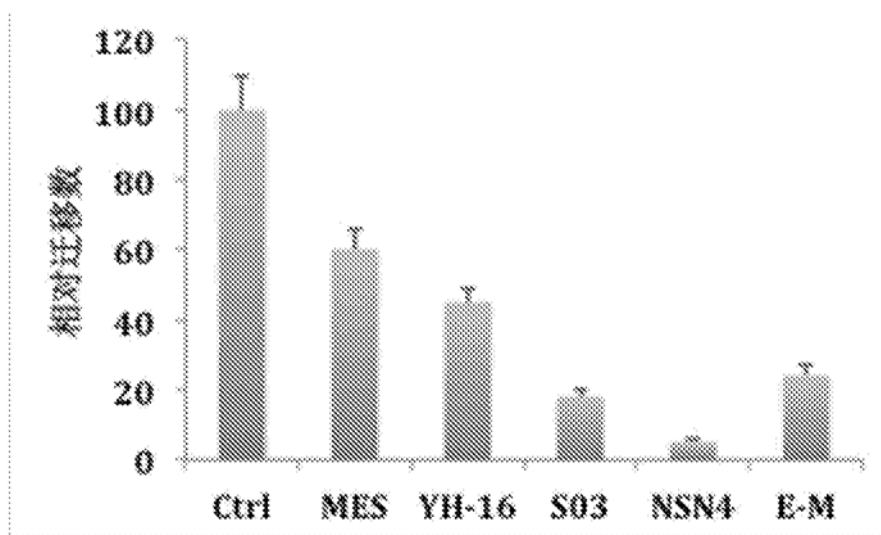


图26

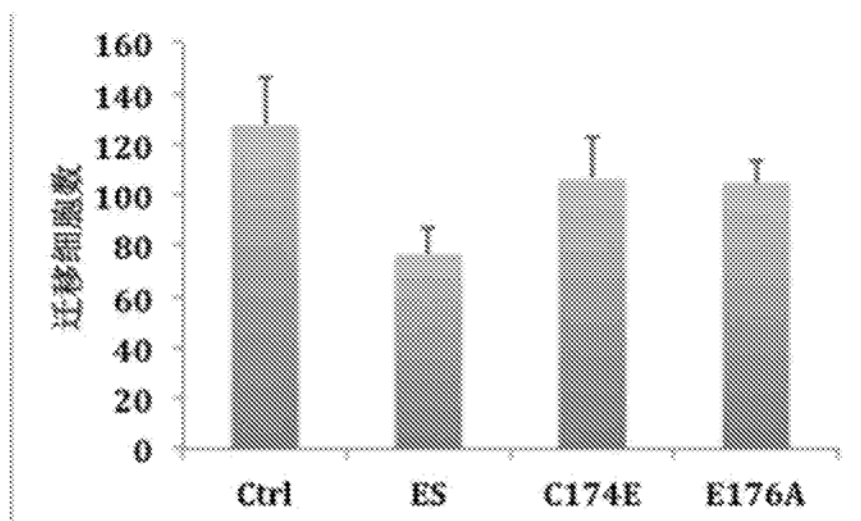


图27

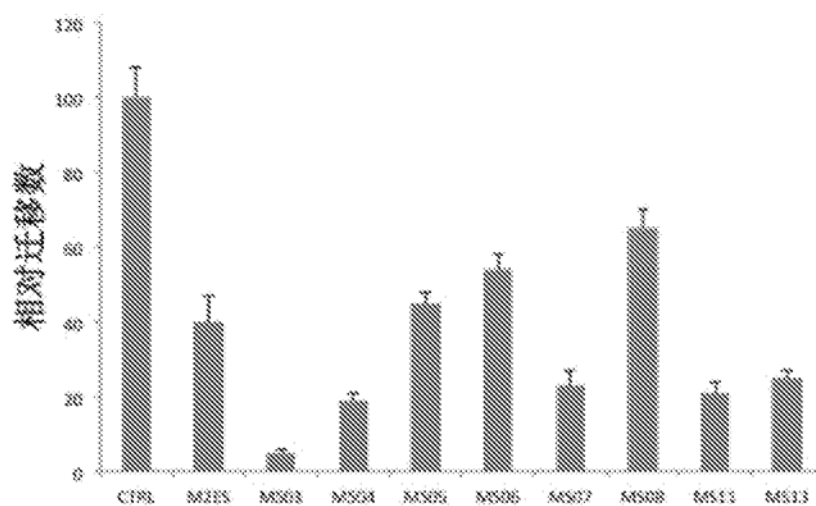


图28

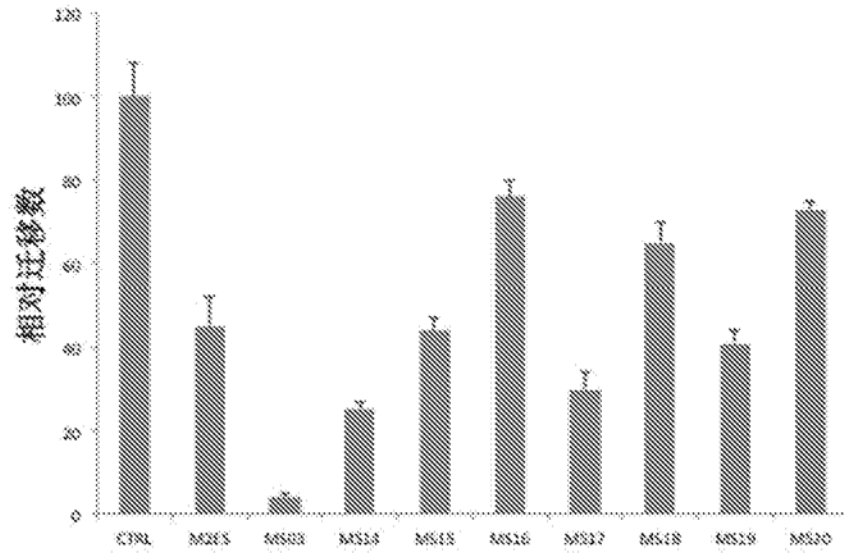


图29

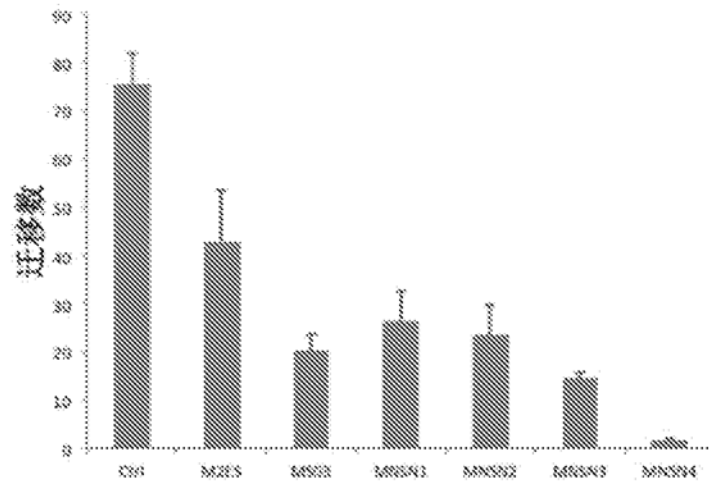


图30

GGAATTCCATATGCACAGCCACCGCGACTTC

图31

CCGCTCGAGTTACTTGGAGGCAGTCATGAAGCTG

图32

36

(M)RDFQPVHLHLVALNSPLSGGMRGI RGADFQCFQQARQVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSI VRR
ADRAAVPI VNLKDELLFPSWEALFSGEPLKPGARI FSFDGKDVLRHPTWPQKSVWHGSDPNG
RRLTESYCETWRTTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYI VLICI ENSFMTASK

249

(M)RDFQPVHLHLVALNSPLSGGMRGI RGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSI VRR
ADRGSVPI VNLKDEVLSPSWDSLFSGSQGQLQPGARI FSFDGRDILQDSAWPQKSVWHGSDA
KGRRLPESYCEAWRTDERGTSGQASSLLSGRILLEQKAASCHNSYI VLICI ENSFMTASK

381

(M)HVBHDFQPALHLVALNTPLSGGMRGI RGADFQCFQQARQVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSI
VRRADRTAVPI VNLKDEVLSNWEALFTGSEAPLRAGARI FSFDGRDVL RHPTWPQKSVWHG
SDPNGRRLTESYCETWRTTEAPSATGQASSLLAGRILLEQKAAGCHNAFI VLICI ENSFMTSSSK

57

(M)HTHQDFHPVLHLVALNTPLSGGMRGI RGADFQCFQQARAVGLSGTFRAFLSSRLQDLYSI
VRRADRAAVPI VNLKDELLFPSWEALFSGESGAGKTGGARI FSFDGRDVL RHPAWPQKSVWH
GSDPSGRRLTESYCETWRTDSRAATGQASSLLAGRILLEQKAAGCHNAFI VLICI ENSFMTSSSK

114

(M)HSHRDFQPVHLHLVALNSPLSGGMRGI RGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSI
VRRADRAAVPI VNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLKPGARI FSFDGRDVL RHPTWPQKSVWHGS
DPSGHRRLTESYCETWRTDSRAATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYI VLICI ANSFMTASK

124

(M)DFQPVHLHLVALNSPLSGGMRGI RGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSI VRR
DRAAVPI VNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLRPGARI FSFDGKDVLRHPTLPQKSVWHGSDPSG
RRLTESYCETWRTDSRAATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYI VLICI ENSFMTASK

125

(M)DFQPVHLHLVALNSPLSGGMRGI RGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSI VRR
DRAAVPI VNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLRPGARI FSFDGKDVLRHPTLPQKSVWHGSDPSG
RRLTESYCETWRTDSRAATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYI VLICI ENSFMTASKK

图33

160

(M)HTHQDFHPVLHLVALNTPLSGGMIRGADFCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSI
 VRRADRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLKPGARIFSFDGRDILQDSAWPQKSVWHGS
 DPNGRRLTESYCETWRTEAPSATGQASSLSSGKLEQSVSSCQHAFVVLCIENSFMTAAKK

163

(M)TPTWYPRMLRVAALNEPSTGDLQGI RGADFCFQQARAVGLSGTFRAFLSSRLQDLYSI V
 RRADRAAVPIVNLKDEVLSPSWDSLFSGSQGQLQPGARIFSFDGKDVL RHPTWPQKSVWHGS
 DPSGRRLMESYCETWRTETT GATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYI VLCIENSFMTNNRK

119

(M)HTHTSGPGLHLIALNSPQVGNMRGIRGADFCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSI V
 RRADRSSVPIVNLKDEVLSPSWDSLFSVSQGQLQPGARIFSFDGRDILQDSAWPQKSVWHGS
 DPNGRRLTESYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYI VLCIENSFMTASK

图34

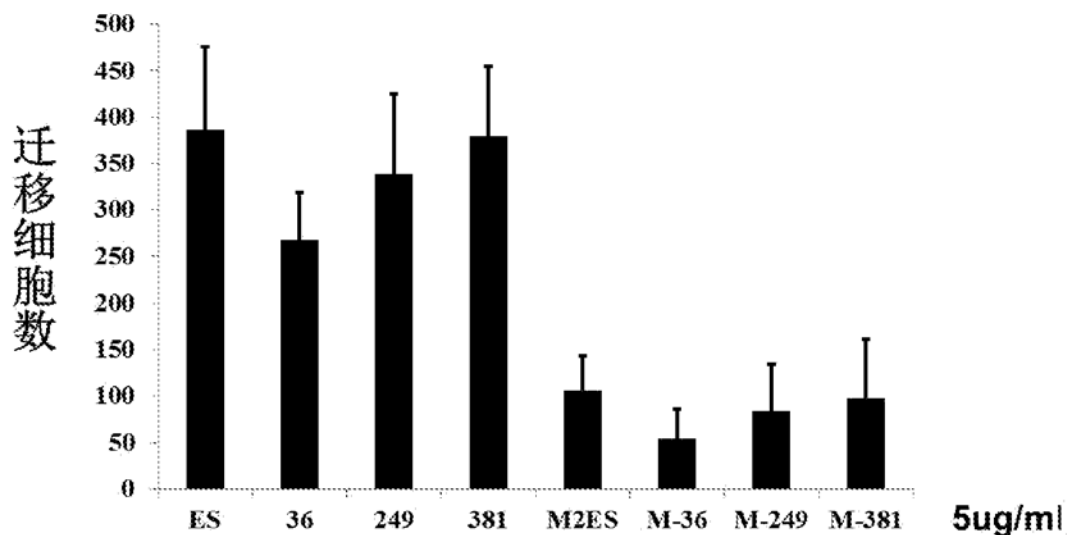


图35

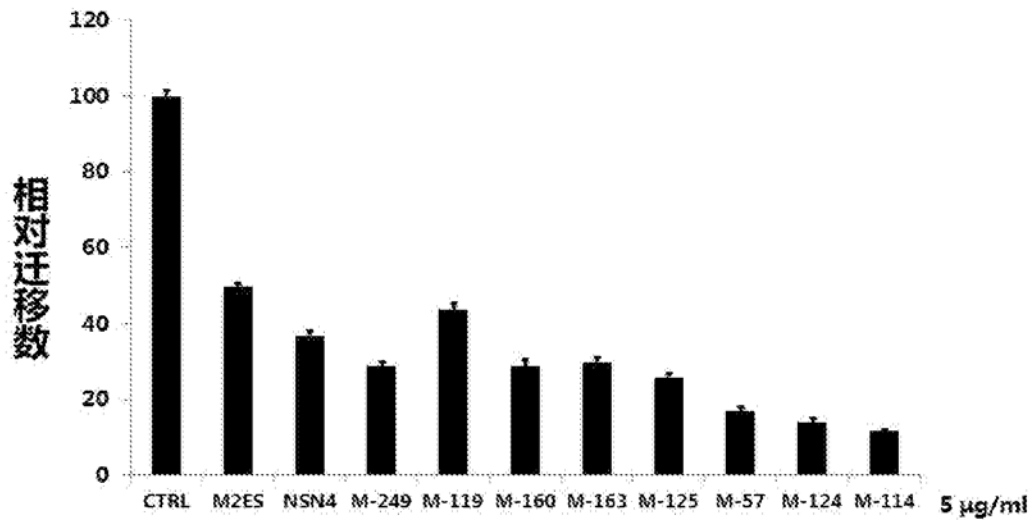


图36

Endu-E-M

MGGSHHHHHSHRDFQPVHLHVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRR
ADRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGESGAGKTPGARIFSDGKDVLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRLTESYC
ETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMTASK

Endu-114

MGGSHHHHHSHRDFQPVHLHVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRR
ADRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLKPGARIFSDGRDVLRLHPTWPQKSVWHGSDPSGHRITESYCET
WRTDSRAATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIANSFMTASK

Endu-57

MGGSHHHHHHHTHQQDFHPVLHLVALNTPLSGGMRGIRGADFQCFQQARAVGLSGTFRAFLSSRLQDLYSIVRR
ADRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGESGAGKTGGARIFSDGRDVLRLHPAWPQKSVWHGSDPSGRRRLTESYC
ETWRTDSRAATGQASSLLAGRLLEQKAAGCHNAFIVLCIENSFMTSSSK

图37

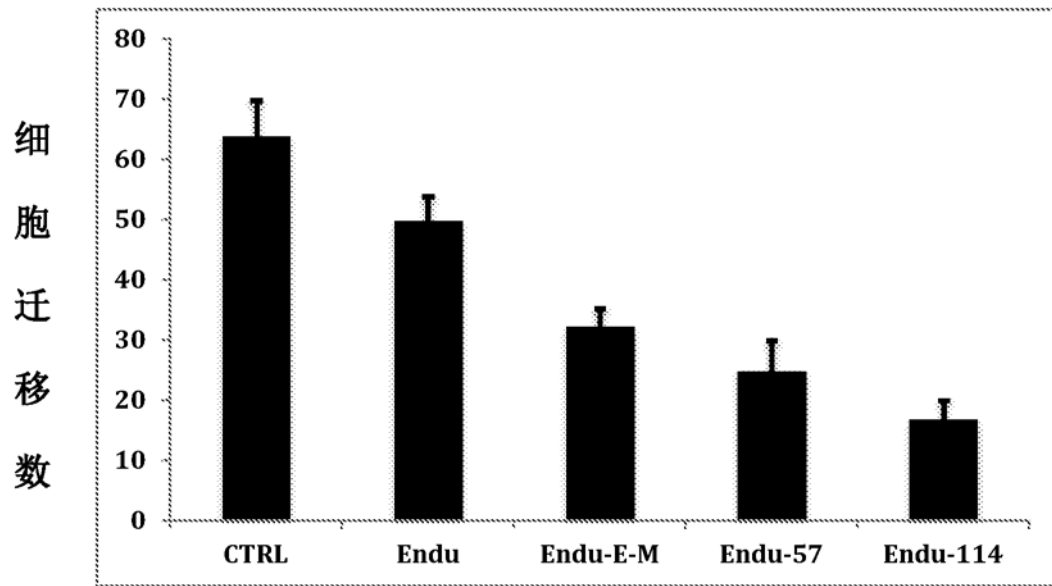


图38