



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103987728 B

(45)授权公告日 2017.05.10

(21)申请号 201280060782.7

(22)申请日 2012.12.22

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103987728 A

(43)申请公布日 2014.08.13

(30)优先权数据

P.397595 2011.12.28 PL

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.06.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/057657 2012.12.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/098755 EN 2013.07.04

(73)专利权人 阿达梅德公司

地址 波兰华沙

(72)发明人 J·S·皮耶奇克

S·D·帕夫拉克 B·M·泽雷克

P·K·鲁兹加

(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 11038

代理人 李程达

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 2009094634 A1,2009.07.30,

Jin Na Shin et al..Generation of a
novel proform of tumor necrosis factor-
related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)
protein that can be reactivated by matrix
metalloproteinases.《Experimental Cell
Research》.2006,第312卷(第19期),第3892-
3898页.

审查员 王奇

权利要求书2页 说明书63页

序列表88页 附图13页

(54)发明名称

抗癌融合蛋白

(57)摘要

融合蛋白,包含:结构域(a),其为hTRAIL蛋白序列的功能片段,所述片段起始于不低于hTRAIL95的位置处的氨基酸并终止于氨基酸hTRAIL281,或具有至少70%序列同一性、优选85%的同一性的所述功能片段的同源物;和至少一个结构域(b),其为在细胞膜中形成孔的溶细胞效应子肽的序列,其中结构域(b)的序列连接于结构域(a)的C末端或N末端。所述融合蛋白可用于治疗癌症疾病。

1. 一种融合蛋白,其包含:
 - 结构域(a),其为可溶性hTRAIL蛋白的序列的功能片段,该片段起始于hTRAIL95至hTRAIL121的位置处的氨基酸,含端点,并终止于位置hTRAIL281处的氨基酸,和
 - 结构域(b),其为在细胞膜中形成孔的溶细胞效应子肽的序列,其中结构域(b)的序列连接于结构域(a)的C末端或N末端,并且选自:
 - SEQ.No.37的pilosulin-5,
 - SEQ.No.41的14个氨基酸的合成裂解肽,和
 - SEQ.No.48的流感病毒血凝素的HA2结构域的片段。
2. 权利要求1的融合蛋白,其中结构域(a)选自hTRAIL95-281、hTRAIL114-281、hTRAIL115-281、hTRAIL116-281、hTRAIL119-281和hTRAIL121-281。
3. 权利要求1至2的任一项的融合蛋白,其在结构域(a)与结构域(b)之间或结构域(b)之间包含含有蛋白酶切割位点的结构域(c),其选自被金属蛋白酶MMP识别的序列、被尿激酶uPA识别的序列和被furin识别的序列。
4. 权利要求3的融合蛋白,其中被金属蛋白酶MMP识别的序列是Pro Leu Gly Leu Ala Gly,被尿激酶uPA识别的序列是Arg Val Val Arg,被furin识别的序列是Arg Lys Lys Arg,被furin识别的序列是Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu或His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln。
5. 权利要求3的融合蛋白,其中结构域(c)是彼此相邻的被金属蛋白酶MMP识别的序列与被尿激酶uPA识别的序列的组合。
6. 权利要求3的融合蛋白,其中结构域(b)的效应子肽额外地连接有转运结构域(d),所述转运结构域选自:
 - (d1) 转运通过细胞膜的多聚组氨酸序列,其包含6、7、8、9、10或11个His残基,
 - (d2) 转运通过细胞膜的多聚精氨酸序列,其由6、7、8、9、10或11个Arg残基组成,
 - (d3) PD4转运序列(蛋白质转导结构域4) Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala,
 - (d4) 由转铁蛋白受体结合序列组成的转运序列Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro,和
 - (d5) PD5转运序列(蛋白质转导结构域5,TAT蛋白) Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg,及其组合。
7. 权利要求6的融合蛋白,其中序列(d)位于效应子肽结构域(b)的C末端或N末端。
8. 权利要求6的融合蛋白,其中转运结构域(d)位于结构域(b)与结构域(c)之间,或位于结构域(a)与结构域(c)之间,或位于两个结构域(c)之间。
9. 权利要求6的融合蛋白,其中序列(d)位于融合蛋白的C末端。
10. 权利要求3的融合蛋白,其在两个(c)结构域之间包含作为用于PEG分子的连接的接头的结构域(e),其选自Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly和Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu。
11. 权利要求3的融合蛋白,其在结构域a)、(b)和/或(c)之间额外地包含柔性空间接头。

12. 权利要求11的融合蛋白,其中所述空间接头选自Gly Gly、Gly Gly Gly、Gly Ser Gly、Gly Gly Gly Gly Ser、Gly Gly Gly Gly Gly Ser、Gly Gly Ser Gly Gly、Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly、Gly Gly Gly Gly Ser Gly、Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser、Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly、Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly、Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Cys、Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys、Ser Gly Gly、单个甘氨酸残基Gly和单个半胱氨酸残基Cys,及其组合。

13. 权利要求1的融合蛋白,其具有选自如下序列的氨基酸序列:SEQ.No.6;SEQ.No.11;SEQ.No.12;SEQ.No.13;SEQ.No.14;SEQ.No.15;SEQ.No.16;SEQ.No.23;SEQ.No.92;SEQ.No.93;SEQ.No.94;和SEQ.No.98。

14. 权利要求3的融合蛋白,其为重组蛋白。

15. 编码如权利要求1至13的任一项中定义的融合蛋白的多核苷酸序列。

16. 权利要求15的多核苷酸序列,其针对在大肠杆菌中的遗传表达进行了优化。

17. 权利要求16的序列,其选自SEQ.No.62;SEQ.No.67;SEQ.No.68;SEQ.No.69;SEQ.No.70;SEQ.No.71;SEQ.No.72;SEQ.No.79;SEQ.No.109;SEQ.No.110;SEQ.No.111;和SEQ.No.115。

18. 表达载体,其包含权利要求15至17的任一项的多核苷酸序列。

19. 宿主细胞,其包含权利要求18中定义的表达载体。

20. 权利要求19的宿主细胞,其为大肠杆菌细胞。

21. 药物组合物,其包含与药学上可接受的载体组合的作为活性成分的权利要求1至14的任一项中定义的融合蛋白。

22. 权利要求21的药物组合物,其为用于胃肠外施用的形式。

23. 权利要求3中定义的融合蛋白,其用于治疗哺乳动物包括人的肿瘤疾病。

24. 权利要求1至14中定义的融合蛋白,或权利要求21或22中定义的药物组合物在制备用于治疗哺乳动物包括人的癌症疾病的试剂中的用途。

抗癌融合蛋白

[0001] 本发明涉及治疗性融合蛋白、特别是重组融合蛋白的领域。更具体地,本发明涉及包含可溶性人TRAIL蛋白序列的片段和在细胞膜或线粒体膜中形成孔的肽的序列的融合蛋白,包含它们的药物组合物,它们在治疗、特别是抗癌试剂中的用途,以及编码所述融合蛋白的多核苷酸序列,包含所述多核苷酸序列的表达载体,以及包含这些表达载体的宿主细胞。

[0002] TRAIL (肿瘤坏死因子相关的细胞凋亡诱导性配体) 蛋白,细胞因子家族的成员,也被称作Apo2L (Apo2-配体),是肿瘤细胞和被病毒感染的细胞中的细胞凋亡的强有力的激活子。TRAIL是体内天然产生的配体。TRAIL蛋白,其氨基酸序列,编码DNA序列和蛋白表达系统首次公开于EP0835305A1。

[0003] TRAIL蛋白通过与促细胞凋亡表面TRAIL受体1和2 (TRAIL-R1/R2) 结合并随后激活这些受体来发挥其抗癌活性。这些受体,也被称作DR4和DR5 (死亡受体4和死亡受体5),是TNF受体家族的成员并且在不同类型的癌症细胞上过表达。这些受体的激活能诱导阻抑基因p53非依赖性细胞凋亡的外部信号传导途径,其通过激活的胱天蛋白酶-8引起执行性胱天蛋白酶的激活,从而降解核酸。在TRAIL激活后释放的胱天蛋白酶-8也可引起截短的Bid蛋白的释放,所述截短的Bid蛋白转位至线粒体,在那里其刺激细胞色素c的释放,因此间接扩大来自死亡受体的细胞凋亡信号。

[0004] TRAIL选择性作用于肿瘤细胞,基本上不诱导健康细胞的凋亡,健康细胞显示对该蛋白的抗性。因此,认识到TRAIL作为抗癌试剂的巨大潜力,其作用于多种不同类型的癌症,包括血液恶性肿瘤和实体肿瘤,同时极少影响正常细胞并显示出潜在相对小的副作用。

[0005] TRAIL蛋白是II型膜蛋白,其具有281个氨基酸的长度,在被蛋白酶切割后,它的包含氨基酸残基114-281的细胞外区域形成大小为20kDa的可溶性sTRAIL分子,其也是具有生物活性的。TRAIL和sTRAIL这两种形式都能通过与存在于靶细胞上的TRAIL受体相互作用而激发细胞凋亡。使用细胞系测试证明了TRAIL分子的可溶性部分的强烈的抗肿瘤活性和非常低的系统性毒性。同样,对于具有对应于hTRAIL的氨基酸114-281的氨基酸序列的重组人可溶性TRAIL (rhTRAIL) (在INN下称作dulcanermin) 的初步人类临床研究显示出其良好的耐受性并且没有剂量限制性毒性。到目前为止所报道的重组TRAIL蛋白对于肝细胞的毒性效应似乎与修饰即多聚组氨酸标签的存在相关,而非标签化的TRAIL不显示系统性毒性。

[0006] 短于114-281的TRAIL片段也能结合膜死亡受体并通过这些受体诱导细胞凋亡,如最近就122-281hTRAIL的重组循环序列改变的突变体所报道的,例如见EP1688498。

[0007] 然而,在对患者的进一步临床试验中,TRAIL作为单一疗法的实际功效被证明是低的。同样有问题的是,通过很多癌细胞显示出对于TRAIL的原发性或获得性抗性 (见例如WO2007/022214)。抗性可因不同机制产生,并且对于癌症类型是特异性的和/或是患者依赖性的 (Thorburn A, Behbakht K, Ford H. TRAIL receptor-targeted therapeutics: resistance mechanisms and strategies to avoid them. Drug Resist Updat 2008;11: 17-24)。该抗性限制TRAIL作为抗癌剂的有用性。虽然对于TRAIL的抗性的机理尚未完全了解,但是相信其可在TRAIL诱导的细胞凋亡途径的不同水平表现其自己,从细胞表面受体水

平到信号传导途径内的执行性胱天蛋白酶的水平。

[0008] 为了克服这种低的效率和肿瘤对TRAIL的抗性,设计了与放疗和化疗试剂的多种组合治疗,其产生了协同性细胞调亡效应(WO2009/002947;A.Almasan and A.Ashkenazi, Cytokine Growth Factor Reviews 14(2003)337-348;RK Srivastava,Neoplasia,Vol 3, No 6,2001,535-546,Soria JC et al.,J.Clin.Oncology,Vol 28,No 9(2010),p.1527-1533)。在WO2009/140469中描述了rhTRAIL与所选择的常规的化疗试剂(紫杉醇、卡铂)和单克隆抗-VEGF抗体组合用于癌症治疗的用途。然而,此类组合必然意味着公知的常规化疗或放疗的缺陷。然而,关于表明通过将TRAIL蛋白与其它蛋白质或其片段融合获得的细胞对TRAIL的抗性的消除的任何数据,现有技术没有提及。

[0009] 此外,与TRAIL治疗法相关的问题表现为其低稳定性以及在施用之后迅速从身体清除。

[0010] 作为细胞膜或线粒体膜的破裂(不连续性)的结果的癌细胞的破坏和肿瘤增殖的抑制的作用是已知的。还尝试使用具有能够破裂膜的溶细胞作用的物质作为抗癌疗法和辅助抗癌疗法。

[0011] 许多具有溶细胞活性的天然和合成肽及蛋白质是已知的。溶细胞肽也被描述为成孔肽或溶细胞素。成孔肽与膜表面的相互作用可基于带正电荷的肽与带负电荷的细胞膜表面的非特异性静电相互作用。

[0012] 这些肽通常具有阳离子特征,以便它们能够与具有主要带负电荷的颗粒的表面发生静电相互作用。当溶细胞肽与细胞表面上的脂质接触并相互作用时,以及在渗入细胞后与线粒体膜表面上的脂质相互作用时,发生细胞膜的连续性的中断,随后形成小尺寸的跨膜孔,发生细胞质的内容物包括离子至细胞外的渗漏,从而导致细胞内快速且不可逆的电解质失衡、细胞裂解和死亡。

[0013] 成孔肽与膜表面的相互作用还可包括与存在于表面上的特定受体的相互作用。

[0014] 细菌、植物或哺乳动物来源的能够在细胞膜中形成孔的已知的天然存在的溶细胞肽通常称为溶血素,因为它们引起红细胞和其它真核细胞的裂解。这些毒素包括天蚕抗菌肽A和B、aurein 1.2、citropin 1.1、防卫素(HNP-2)、牛乳铁蛋白(lactoferricin B)、速普肽、PR-39、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的溶细胞素、 δ 溶血素、白喉毒素、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)的溶细胞素、来自红海葵(*Actinia equina*)的毒素、粒溶素、来自中链球菌(*Streptococcus intermedius*)的裂解肽、慢病毒裂解肽、伴放射菌放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)的白细胞毒素、爪蟾抗菌肽、蜂毒肽、淋巴毒素、脑啡肽、摩西鱼毒肽(paradaxin)、穿孔素(特别是其N末端片段)、来自产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)的细胞溶素O(PFO/ θ 毒素)和链球菌溶血素。它们作为药剂的有用性受到它们引起溶血的能力限制。

[0015] 天然溶细胞肽描述于例如R.Smolarczyk et al., **Postępy Hig.Med. Dośw.**, 2009;63:360-368中。

[0016] 还存在已知的合成溶细胞成孔肽。它们被设计来避免溶血性质,具有不太强的免疫原性,或具有使得能够具有对细胞靶例如VEGFR(血管内皮生长因子受体)家族受体和EGFR(表皮生长因子受体)家族的受体的高结合特异性的表面。它们是天然溶细胞肽片段的杂合体,例如天蚕抗菌肽A片段与爪蟾抗菌肽2的杂合体CA(1-8)MA(1-12)片段,或天蚕抗菌

肽A片段与蜂毒肽CAMEL的杂合体(CA(1-7)MEL(2-9))片段。还存在已知的合成溶细胞肽D-K₄-L₂-R₉和D-K₆-L₉,其由氨基酸赖氨酸、精氨酸和亮氨酸组成,其部分以D-氨基酸的形式存在。还存在已知的合成嵌合肽RGD-4C_D(KLAKLAK)₂,其包含与整合蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 结合的RGD基序和由D-氨基酸KLAKLAKKLAKLAK组成的效应子结构域,以及包含允许渗入细胞的PTD-5基序和由D-氨基酸KLAKLAKKLAKLAK组成的效应子结构域的PTD-5_D(KLAKLAK)₂(参见,例如,R.Smolarczyk et al.,**Postępy Hig.Med. Dośw.**,2009,63:360-368)。其它公知的溶细胞合成肽描述于例如Regen et al.,*Biochem.Biophys.Res.Comm.*159:566-571,1989中。

[0017] 在将肽粘附于膜后发生的膜的破裂可通过“桶板”的机制(桶板模型)、“圆环形”(圆环柱心模型)的机制或“地毯(carpet)”机制发生(参见,例如,R.Smolarczyk et al.,**Postępy Hig.Med. Dośw.**,2009;63:360-368)。

[0018] 对于长度为至少23个氨基酸的具有 α 螺旋构象的两亲性肽观察到“桶板”的机制。例如,通过“桶板”的机制引起膜的碎裂的肽为短杆菌肽A、alametecin、穿孔素、pilosulin、具有重复KLAK基序的合成肽、cathelicidin、从溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)分离的肽、巴拉波任和蛾血素。通过“圆环柱心模型”引起膜的破裂的肽包括例如蜂毒肽和爪蟾抗菌肽。例如通过“地毯”模型引起膜的破裂的肽为蛾血素A和B。

[0019] 因孔的形成而引起的细胞膜的崩解还可通过高度带正电荷的肽与带负荷的膜组分的相互作用造成。这样的性质显示,除其它以外,粒溶素、蜂毒肽的类似物和衍生物、包含K(L)_xR基序的肽、速普肽、铃蟾肽、爪蟾抗菌肽和槲寄生毒肽。

[0020] 靶细胞的膜中的孔的形成还可与肽的酶促活性相关。磷脂酶A的酶促活性例如通过具有针对磷脂酰胆碱和鞘磷脂的特异性磷酸二酯酶活性的磷脂酶、具有非特异性溶细胞活性的溶血素和溶细胞素,或具有针对包含例如胆固醇的生物膜的溶细胞活性的溶血素和溶细胞素来显示。李斯特菌溶胞素、equinatoxin、磷脂酶PC-PLC和来自产气荚膜梭菌的 α 毒素显示了在细胞膜或线粒体膜中导致孔形成的该类型的酶促活性。

[0021] 还存在具有能够靶向肿瘤细胞的结构域的成孔肽的已知缀合物和嵌合物。为了进行靶向,使用在肿瘤细胞表面上过表达的抗原、碳水化合物部分或生长因子受体。靶向的递送在细胞表面上提供了高水平的成孔肽,这是溶细胞活性所必需的。

[0022] 靶向的成孔actinoporin的使用描述于Panchal RG.et al.,*Poreforming proteins and their application in biotechnology.Curr Pharm Biotechnol*2002,3:99-115;Panchal RG:Novel therapeutic strategies to selectively kill cancer cells.*Biochem Pharmacol*1998,55:247-252和Hoskin DW,Ramamoorthy A:Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides.*Biochim Biophys Acta-Biomembr*2008,1778:357-87中。

[0023] 还已知成孔肽和蛋白质可通过适当的遗传修饰以及通过化学地连接于适当的配体或抗体而被赋予导向肿瘤相关抗原和受体的能力。已描述了苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的d-外毒素、来自红海葵(*Actinia equina*)的equinatoxin II、海葵的sticholysin I和白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)的白喉毒素的这样的修饰(Soletti RC.,*Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells.Anti-Cancer Drugs*2008,19:517-525;Pederzolli C.,*Biochemical and cytotoxic properties of conjugates of*

transferrin with equinatoxin-II, a cytolysin from a sea anemone. Bioconjugate Chem 1995, 6:166-173, van der Spek JC.: Fusion protein toxins based on diphtheria toxin: Selective targeting of growth factor receptors of eukaryotic cells. Appl Chimeric Genes Hybrid Proteins Pt B 2000, 327:239-249)。

[0024] 还描述了由成孔sticholysin毒素I和针对肿瘤特异性抗原C2的单克隆抗体组成的融合蛋白, 以及其在结肠癌细胞系模型的治疗中的有用性 (Tejuca M. et al., Construction of an immunotoxin with the pore forming protein St1 and/or C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line, Int. Immunopharmacol. 2004, 4:731-744)。还描述了许多包含白喉毒素和白细胞介素-2或EGF的融合蛋白以及它们破坏过表达靶受体的细胞的潜能 (Murphy JR, van der Spek JC, Targeting diphtheria-toxin to growth-factor receptors, Semin Cancer Biol 1995, 6:259-267)。

[0025] 还已知在包含溶细胞肽的融合蛋白中使用被特定蛋白酶识别的切割位点, 以使得能够在肿瘤环境中释放效应子蛋白, 从而使得它们它们能够内化入肿瘤细胞。例如, Panchal R. et al. (Nat Biotechnol 1996, 14:852-856) 公开了在它们的序列中包含被组织蛋白酶B识别的切割位点的 α -溶血素, 其可被存在于肿瘤环境中的蛋白酶激活。

[0026] 还存在已知修饰的气单胞菌溶素原 (PA) (细菌的溶菌成孔蛋白的无活性前体), 当被前列腺癌细胞 (PSA) 的蛋白酶切割时被激活 (Williams S.A. et al., JNCI J. Natl. Cancer Inst. (2007) 99 (5):376-385)。

[0027] US5817771B1公开了缀合物, 包括成孔溶细胞肽与抗体或抗原 (作为在肿瘤细胞上选择性结合的元件) 的融合蛋白, 和使得溶细胞肽在肿瘤环境中能够被选择性激活的接头, 例如被酶例如蛋白酶, 特别地在肿瘤环境中特异性过表达的蛋白酶识别的切割位点。

[0028] Barua et al. (Cancer Letters 293 (2010) 240-253) 报道了对TRAIL具有抗性并且对利用死亡受体激动剂抗体DR4和DR5的处理不敏感的前列腺癌细胞系在用包含KLAK序列的合成阳离子两亲性裂解肽处理这些细胞后变得对这些抗体敏感。

[0029] 本发明提供了具有抗癌性质的融合蛋白, 其包含来源于TRAIL的结构域和具有针对哺乳动物细胞的细胞膜和/或线粒体膜的孔形成性质的溶细胞效应子肽的结构域。

[0030] 本发明的蛋白质的两个结构域的每一个具有不同的功能。由于源自TRAIL的结构域的存在, 根据本发明的蛋白选择性针对癌细胞, 其中蛋白的元件发挥它们的效应。具体地, 在与细胞结合后TRAIL结构域可发挥其触发细胞凋亡的活性, 并且效应子肽可发挥在细胞膜和/或线粒体膜中形成孔, 从而引起癌细胞裂解的活性。

[0031] 本发明的蛋白向肿瘤环境的递送使得针对体内的健康细胞的毒性以及副作用最小化, 并且减小了药剂的施用频率。此外, 通过使用本发明的蛋白的靶向治疗允许避免之前已知的由高毒性和施用高剂量的必要性引起的基于使用植物或细菌毒素在细胞膜或线粒体膜中形成孔的非特异性治疗法的低效率问题。

[0032] 在很多情况下, 本发明的融合蛋白比可溶性TRAIL及其变体、包括序列的片段更强。

[0033] 直至目前, 用于本发明的融合蛋白中的效应子肽未被用于药物, 因为例如不理想的动力学、被非特异性蛋白酶迅速降解以及由于缺乏正确的激活途径次序 (这对于使效应

子肽在靶位点的正确作用是必须的)而在体内积累。效应子肽向融合蛋白中的掺入允许使它们选择性地递送至需要它们发挥作用的位点。此外,效应子肽的连接增大了蛋白的质量,这产生了延长的半衰期并增加了肿瘤中蛋白的保持以及其增强的效率。

[0034] 新型融合蛋白还具有相较于它们各自的天然溶细胞肽至少减小的或有限的,或甚至大体上消除的溶血活性。

[0035] 另外,在很多情况下,新型融合蛋白还克服了对于TRAIL的天然或诱导的抗性。最可能地,克服抗性是由于细胞膜电位的去稳定化,其作为融合蛋白对细胞膜或线粒体膜的脂质的结合和孔的形成的结果,引起二价离子渗漏出细胞。作为对线粒体膜的脂质的结合的结果,发生细胞色素C、SMAC/Diablo蛋白和AIF因子至细胞质的释放,这引起受累细胞的促细胞凋亡胱天蛋白酶激活。线粒体膜的分解还导致胱天蛋白酶-9的激活,导致细胞凋亡的诱导。

[0036] 附图概述

[0037] 图1显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有肺癌A549的Cby.Cg-foxn1(nu)/J小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0038] 图2显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有肺癌A549的Cby.Cg-foxn1(nu)/J小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0039] 图3显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有肺癌A549的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0040] 图4显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有肺癌A549的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0041] 图5显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有肺癌NCI-H460-Luc2的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0042] 图6显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有肺癌NCI-H460-Luc2的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0043] 图7显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有前列腺癌PC3的Cby.Cg-foxn1(nu)/J小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0044] 图8显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有前列腺癌PC3的Cby.Cg-foxn1(nu)/J小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0045] 图9显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有胰腺癌PANC-1的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0046] 图10显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有胰腺癌PANC-1的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0047] 图11显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有结肠癌HCT116的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0048] 图12显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有结肠癌HCT116的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0049] 图13显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^a的本发明的融合蛋白处理的具有结肠癌SW620的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0050] 图14显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^a的本发明的融合蛋白处理的具有结肠癌SW620的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0051] 图15显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^a的本发明的融合蛋白处理的具有结肠癌205的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0052] 图16显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^a的本发明的融合蛋白处理的具有结肠癌205的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0053] 图17显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有子宫肉瘤MES-SA/Dx5的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0054] 图18显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的具有子宫肉瘤MES-SA/Dx5的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0055] 图19显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^b的本发明的融合蛋白处理的具有胰腺癌MIA Paca-2的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0056] 图20显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^b的本发明的融合蛋白处理的具有胰腺癌MIA Paca-2的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0057] 图21显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^b的本发明的融合蛋白处理的具有结肠癌HCT116的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0058] 图22显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^b的本发明的融合蛋白处理的具有结肠癌HCT116的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0059] 图23显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^b的本发明的融合蛋白处理的具有肝细胞癌HepG2的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0060] 图24显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^b的本发明的融合蛋白处理的具有肝细胞癌HepG2的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI);

[0061] 图25显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^b的本发明的融合蛋白处理的具有肝细胞癌PLC/PRF/5的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤体积变化(初始阶段的百分率);

[0062] 图26显示了,相对于以rhTRAIL 114-281处理,以Ex.16^b的本发明的融合蛋白处理的具有肝细胞癌PLC/PRF/5的Cr1:SH0-PrkdcscidHrhr小鼠中的肿瘤生长抑制值(%TGI)。

[0063] 发明详述

[0064] 本发明涉及融合蛋白,其包含:

[0065] -结构域(a),其为可溶性hTRAIL蛋白的序列的功能片段,该片段起始于不低于hTRAIL95的位置处的氨基酸并终于氨基酸hTRAIL281,或具有至少70%序列同一性,优选85%的同一性的所述功能片段的同源物;和

[0066] -至少一个结构域(b),其为在细胞膜中形成孔的溶细胞效应子肽的序列,

[0067] 其中结构域(b)的序列连接于结构域(a)的C末端和/或N末端。

[0068] 根据本发明的术语“肽”应被理解为从通过肽键连接在一起的多个氨基酸的分子构建物。因此,根据本发明的术语“肽”包括寡肽、多肽和蛋白质。

[0069] 在本发明中,肽的氨基酸序列将以本领域采纳的常规方式表示,从肽的N末端(N-端)至其C末端(C-端)。因此,任何序列均为左侧为N末端,右侧为C末端。

[0070] 术语“可溶性hTRAIL的序列的功能性可溶性片段”应该被理解为指可溶性hTRAIL蛋白的任何这样的片段,即能够在结合于哺乳动物细胞表面上的其受体之后在该细胞中诱导细胞凋亡信号的片段。

[0071] 本领域技术人员还应理解TRAIL序列的至少70%或85%的同源性的存在在本领域中是已知的。

[0072] 应理解本发明的融合蛋白中的效应子肽的结构域(b)既不是hTRAIL蛋白也不是hTRAIL蛋白的部分或片段。

[0073] 本发明的融合蛋白在结构域(a)的C末端和/或N末端连接至少一个效应子肽结构域(b)。

[0074] 就序列hTRAIL而言,应理解已知的hTRAIL序列在登录号P505591下公布于GenBank数据库中以及EP0835305A1中,在本发明的序列表中显示为SEQ.No.90。

[0075] 在具体的实施方式中,结构域(a)是TRAIL序列的片段,起始于hTRAIL95至hTRAIL121的氨基酸,含端点,结束于氨基酸TRAIL281。

[0076] 具体地,结构域(a)可选自对应于hTRAIL95-281、hTRAIL114-281、hTRAIL115-281、hTRAIL119-281和hTRAIL121-281的序列。本领域技术人员将认识到,hTRAIL95-281、hTRAIL114-281、hTRAIL115-281、hTRAIL116-281、hTRAIL119-281和hTRAIL121-281分别代表TRAIL的已知序列中的起始于编号95、114、115、116、119和121的氨基酸和终止于最后一个氨基酸281的人TRAIL蛋白的片段。

[0077] 在另一个具体实施方式中,结构域(a)是起始于不低于hTRAIL95的氨基酸位置并结束于氨基酸hTRAIL281的可溶性TRAIL蛋白序列的功能片段的同源物,该序列与原始序列至少70%、优选85%同一。

[0078] 在该实施方式的具体变体中,结构域(a)是选自对应于hTRAIL95-281、hTRAIL114-281、hTRAIL115-281、hTRAIL116-281、hTRAIL119-281和hTRAIL121-281的序列的片段的同源物。

[0079] 应该理解,TRAIL片段的同源物是该片段的氨基酸序列的变体/修饰,其中至少一个氨基酸被改变,包括1个氨基酸、2个氨基酸、3个氨基酸、4个氨基酸、5个氨基酸、6个氨基酸,和不超过15%的氨基酸,并且其中修饰的序列的片段具有TRAIL序列的保留的功能,即结合细胞表面死亡受体和在哺乳动物细胞中诱导细胞凋亡的能力。氨基酸序列的修饰可以包括例如,置换、缺失和/或添加氨基酸。

[0080] 优选地,具有修饰的序列的TRAIL片段的同源物显示出相对于TRAIL的天然片段而言,与死亡受体DR4 (TRAIL-R1) 或DR5 (TRAIL-R2) 的改变的亲合性。

[0081] 术语“改变的亲合性”是指增加的亲合性和/或具有改变的受体选择性的亲合性。

[0082] 优选地,具有修饰的序列的TRAIL片段的同源物显示出相对于TRAIL的天然片段而

言对于死亡受体DR4和DR5的增加的亲和性。

[0083] 特别优选地,具有修饰的序列的TRAIL片段的同源物显示出相对于死亡受体DR5比对于死亡受体DR4增加的亲和性,即增加的选择性DR5/DR4。

[0084] 同样优选地,具有修饰的序列的TRAIL片段的同源物显示出对于死亡受体DR4和/或DR5的比对于受体DR1 (TRAIL-R3) 和/或DR2 (TRAIL-R4) 的与亲和性相关的增加的选择性。

[0085] 产生对于死亡受体DR4和DR5的增加的亲和性和/或选择性的TRAIL的修饰对于本领域技术人员来说是已知的,例如Tur V, van der Sloot AM, Reis CR, Szegedzi E, Cool RH, Samali A, Serrano L, Quax WJ. DR4-selective tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) variants obtained by structure-based design. *J. Biol. Chem.* 2008 Jul 18; 283 (29): 20560-8 描述了D218H突变具有对于DR4的增加的选择性; Gasparian ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Yagolovich AV, Popova EN, Sycheva AM, Moshkovskii SA, Kirpichnikov MP. Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor5, *Apoptosis*. 2009 Jun; 14 (6): 778-87 描述了D269H突变对于DR4具有降低的亲和性。产生对于选自DR4和DR5的一种受体的增加的亲和性(相对于DR1和DR2受体)和对于受体DR5的增加的亲和性(相对于DR4)的hTRAIL突变体也描述于W02009077857和W02009066174。

[0086] 合适的突变是选自下列的天然hTRAIL位置中的一个或多个氨基酸突变: 131、149、159、193、199、201、204、204、212、215、218和251, 特别地, 涉及以碱性氨基酸例如赖氨酸、组氨酸或精氨酸, 或酸性氨基酸诸如谷氨酸或天冬氨酸的氨基酸置换某氨基酸的突变。特别地可提及选自下列的一个或多个突变: G131R、G131K、R149I、R149M、R149N、R149K、S159R、Q193H、Q193K、N199H、N199R、K201H、K201R、K204E、K204D、K204L、K204Y、K212R、S215E、S215H、S215K、S215D、D218Y、D218H、K251D、K251E和K251Q, 描述于W02009066174。

[0087] 合适的突变还有选自氨基酸195、269和214的天然hTRAIL位置中的一个或多个突变, 特别是涉及以碱性氨基酸例如赖氨酸、组氨酸或精氨酸置换某氨基酸的突变。具体地可提及选自D269H、E195R和T214R的一个或多个突变, 如于W02009077857中描述的。

[0088] 在具体的实施方式中, 为hTRAIL的片段的同源物的结构域(a) 选自天然TRAIL序列的D218H突变体, 如W02009066174所描述, 或天然TRAIL序列的Y189N-R191K-Q193R-H264R-I266R-D269H突变体, 如Gasparian ME等人. Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor5, *Apoptosis*. 2009 Jun; 14 (6): 778-87中所描述。

[0089] 结构域(a), 即TRAIL的片段, 是负责融合蛋白的构建体对细胞表面上的死亡受体的结合的结构域。此外, 结构域(a) 在结合后, 将发挥其已知的激动活性, 即细胞凋亡的外部途径的活化。

[0090] 本发明的融合蛋白的结构域(b) 是具有针对真核细胞的溶细胞活性的效应子肽的结构域。

[0091] 在本发明的融合蛋白的具体实施方案中, 融合蛋白的结构域(b) 的效应子肽是具有针对癌细胞的孔形成活性的肽, 其选自SEQ. No. 34至SEQ. No. 56, 和SEQ. No. 125至SEQ. No. 132。

[0092] 对于具有溶细胞活性的肽, 其意指具有在细胞膜中以及在渗入细胞后还在线粒体

膜中形成孔、从而中断膜的连续性的能力的肽。作为膜破裂的结果,发生细胞质的内容物包括离子至细胞外的渗漏,这引起细胞内快速且不可逆的电解质不平衡,以及其破坏(细胞裂解)。

[0093] 肽在细胞膜或线粒体膜中形成孔,从而引起细胞裂解的能力可通过本领域技术人员已知的测试细胞膜的透化的方法,例如通过测量先前已给细胞施用的细胞内物质例如ATP或放射性标记的标志物从细胞的释放,或通过测量染料的例如台盼蓝的摄取(当细胞完整时这不发生)来测定。

[0094] 本发明的溶细胞效应子肽可以是天然肽或合成肽。

[0095] 天然溶细胞成孔肽可以是细菌外毒素例如 α -HL、气单胞菌溶素、perfringolysin、肺炎球菌溶血素、链球菌溶血素O、李斯特菌溶胞素、苏云金芽孢杆菌毒素、苏云金芽孢杆菌的巴拉波任、来自大肠杆菌的裂解分子例如溶血素或大肠菌素。

[0096] 天然溶细胞成孔肽还可以是真核生物的肽例如人粒溶素、pilosulins家族,包括来自澳大利亚蚂蚁澳洲蚂蚁(*Myrmecia Pilosula*)的毒液的pilosulin1和pilosulin-5、爪蟾抗菌肽例如来自非洲蛙光滑爪蟾的皮肤的爪蟾抗菌肽-2、来自非洲蛙咆哮草蛙的皮肤的aurein1.2、来自树蛙(*Litoria citropa*)的皮肤的citropin1.1、来自蜜蜂西方蜜蜂的毒液的蜂毒肽、防卫素例如从人细胞分离的 α -防卫素和 β -防卫素、乳铁蛋白(lactoferricin)例如来自牛奶的乳铁蛋白B、来自螃蟹中国鲎(*Tachyplesus tridentatus*)的白细胞的速普肽、蛾血素A和B,或从美洲鲽(*Pleuronectes americanus*)分离的pleurocidin。

[0097] 合成溶细胞成孔肽可以是已知的溶细胞肽例如天蚕抗菌肽A片段与爪蟾抗菌肽2片段的杂合体CA(1-8)MA(1-12)、天蚕抗菌肽A片段与蜂毒肽CAMEL的杂合体(CA(1-7)MEL(2-9))、由带正电荷的氨基酸赖氨酸、精氨酸和亮氨酸组成的合成溶细胞肽,其部分以D-氨基酸例如D-K₄-L₂-R₉和D-K₆-L₉的形式存在,和包含由D-氨基酸基序KLAKLAK或其重复例如(KLAKLAK)₂组成的结构域的肽、两个裂解肽的合成杂合肽例如杂合的爪蟾抗菌肽-铃蟾肽和天蚕抗菌肽-蜂毒肽、包含合成溶细胞肽和结合存在于细胞表面上的除TRAIL受体外的受体的结构域或允许渗入细胞的结构域的合成融合肽、或由KLLLK和KLLK系列组成的基于两亲性螺旋模型的裂解肽或哺乳动物来源的修饰的和/或截短的肽(优选以与转导或靶向结构域的融合物的形式存在)。

[0098] 本发明的融合蛋白的结构域(b)的效应子肽可以通过具有高度正电荷的肽与带负电荷的膜的直接相互作用而在细胞膜或线粒体膜中形成孔的肽。

[0099] 本实施方案中的效应子肽的示例性序列被指定为SEQ.No.34(人粒溶素的活性形式)、SEQ.No.35(15个氨基酸的合成裂解肽)、SEQ.No.38(来自速普肽的肽)、SEQ.No.39(融合肽铃蟾肽-爪蟾抗菌肽2)、SEQ.No.40(爪蟾抗菌肽-2)、SEQ.No.42(26个氨基酸的杂合肽天蚕抗菌肽-蜂毒肽)、SEQ.No.53(栅寄生毒肽A3(VtA3))和SEQ.No.56(包含EGF抑制剂和合成裂解肽的融合肽)、SEQ.No.132(蜂毒肽)、SEQ.No.129和SEQ.No.131(包含铃蟾肽和BMAP27(B27)或BMAP28(B28)的截短形式的融合肽)、SEQ.No.130(17个氨基酸的合成肽)。

[0100] 本发明的融合蛋白的结构域(b)的效应子肽可以是具有使得能够与生物膜相互作用的两亲性 α -螺旋构象的成孔肽。

[0101] 本实施方案中的效应子肽的示例性序列被指定为SEQ.No.36(pilosulin-1)、SEQ.No.37(pilosulin-5)、SEQ.No.41(14个氨基酸的合成裂解肽)、SEQ.No.43(27个氨基酸

的肽FF/CAP-18)、SEQ.No.44(BAMP-28肽)、SEQ.No.45(来自溶组织内阿米巴的裂解肽的同种型C的类似物)、SEQ.No.46(来自溶组织内阿米巴的裂解肽的同种型A的类似物)、SEQ.No.47(来自溶组织内阿米巴的裂解肽的同种型B的类似物)、SEQ.No.48(流感病毒血凝素的HA2结构域的活性片段)、SEQ.No.54(人穿孔素的活性片段)、SEQ.No.55(来自苏云金芽孢杆菌的巴拉波任-2)、SEQ.No.125(具有KLLK基序的合成融合肽)、SEQ.No.126和SEQ.No.127(pleurocidin类似物)、SEQ.No.128(具有KLLK基序的合成肽)。

[0102] 本发明的融合蛋白的结构域(b)的效应子肽可以是具有选自磷脂酶、溶血素或溶细胞素的酶促活性的成孔肽。本实施方案中的效应子肽的示例性序列被指定为SEQ.No.49(来自产气荚膜梭菌的 α -毒素的具有磷脂酶C活性的N末端结构域)、SEQ.No.50(李斯特菌溶胞素O)、SEQ.No.51(磷脂酶PC-PLC)和SEQ.No.52(equinatoxin EqTx-II)。

[0103] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的效应子肽可以是作为人粒溶素的活性形式的肽,其属于皂苷-样家族,显示对膜脂的强结合能力(P.M.Lydyard,A.Wheelan,M.W.Fanger,"Krótkie **wyklady**:Immunologia",Wydawnictwo Naukowe PWN2001)。由于结合膜的能力,粒溶素能够分解线粒体膜。该过程导致细胞色素C、蛋白质SMAC/Diablo和AIF因子至细胞质的释放,这引起细胞凋亡级联的活化和胱天蛋白酶-9的激活,还导致细胞凋亡的诱导。粒溶素还将Bid蛋白激活成形式tBid,其直接参与线粒体膜中孔的形成(Zhang et al,The Journal of Immunology,182:6993-7000,2009)。

[0104] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列中显示为SEQ.No.34的83个氨基酸的肽。

[0105] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽可以由亮氨酸(L)和赖氨酸(K)组成并且在结构上与来自蜜蜂毒液的天然裂解肽或来自阿米巴原虫的肽相似的合成溶细胞肽(Makovitzki,A.,Suppression of Human Solid Tumor Growth in Mice by Intratumor and Systemic Inoculation of Histidine-Rich and pH-Dependent Host Defense-like Lytic Peptides,cancer Research,2009)。由于所述氨基酸的高浓度的原因,肽具有强正电荷,从而允许其与肿瘤转化细胞的膜选择性相互作用,并通过按照“桶板”机制形成孔来渗入它们的结构。

[0106] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列中显示为SEQ.No.35的15个氨基酸的肽。

[0107] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽可以是肽pilosulin-1,其为来源于澳大利亚蚂蚁澳洲蚂蚁的毒液的阳离子分子。Pilosulin1是在序列中具有高含量的规律重复的赖氨酸和精氨酸的肽。由于具有高含量的这些氨基酸,因此肽具有强正电荷,从而允许其与癌细胞的膜选择性相互作用并通过“桶板”机制形成孔(Kourie et al.,Am J Physiol Cell Physiol,278:1063-1087,2000)。

[0108] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列中显示为SEQ.No.36的56个氨基酸的肽。

[0109] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽可以是肽pilosulin-5,其负责与细胞膜的离子相互作用,从而导致孔的形成,并作为结果,抑制肿瘤生长。Pilosulin5是属于来源于澳大利亚蚂蚁澳洲蚂蚁的毒液的pilosulin家族的肽。该肽在其结构中具有氨基酸赖氨酸、精氨酸和天冬氨酸的周期重复模式,从而提供正电荷,这能够加强与肿瘤细胞表面相互作用。

[0110] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列中显示为SEQ.No.37的100个氨基酸的肽。

[0111] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽可以是速普肽,

从螃蟹中国鲎的白细胞分离的阳离子肽。在渗入白细胞后,速普肽显示对线粒体膜的高亲和力并通过“桶板”机制引起它们的去稳定化,以及因子例如细胞色素C、蛋白SMAC/DIABLO和AIF因子从线粒体至细胞质内的渗漏,这导致细胞死亡(Chen,Y.,et al.,RGD-Tachyplesin inhibits tumor growth.Cancer Res,2001.61(6):p.2434-8;Ouyang,G.L.,et al.,Effects of tachyplesin on proliferation and differentiation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721cells.World J Gastroenterol,2002.8(6):p.1053-8.)。

[0112] 具体地,这样的效应子肽为所附序列中显示为SEQ.No.38的17个氨基酸的肽。

[0113] 结构域(b)的另一个效应子肽可以是具有针对真核细胞的溶细胞活性的融合肽铃蟾肽-爪蟾抗菌肽。

[0114] 爪蟾抗菌肽家族由从非洲蛙非洲爪蟾的皮肤分离的21-27个氨基酸的多肽。肽的两亲性 α -螺旋结构允许它们通过“桶板”机制在细胞膜中形成孔(Matsuzaki et al, Biochim Biophys Acta,1327:119-130,1997)。铃蟾肽,从蛙的皮肤分离的具有高正电荷的14个氨基酸的肽属于肿瘤归巢肽的组,显示了对一些类型的实体瘤和血癌的表面的高亲和力,其特征在于细胞膜的强负电荷(Moody et al,Peptides,1983;volume4:683-686)。铃蟾肽能够结合在肿瘤细胞表面上高度表达的神经营素B(存在于人体中的铃蟾肽的近缘同源物)的细胞受体。这显著地升高了铃蟾肽的特异性的水平及其在被肿瘤占据的组织中的积累,同时使系统毒性降至最低。毒性肽与铃蟾肽的缀合物显示相较于单个蛋白质增强的抗肿瘤活性(Huawei et al,Mol.Pharmaceutics,2010;2:586-596)。爪蟾抗菌肽的特征在于有限的对肿瘤细胞受体的结合性质,因此其细胞毒性仅在高浓度时表现出来。已显示包含爪蟾抗菌肽和铃蟾肽的融合肽允许增强针对肿瘤细胞的特异性和细胞毒性(Liu S.et al.,Enhancement of cytotoxicity of antimicrobial peptide magainin II in tumor cells by bombesin-targeted delivery.Acta Pharmacol Sin.2011Jan;32(1):79-88)。

[0115] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列中显示为SEQ.No.39的40个氨基酸的肽。

[0116] 结构域(b)的另一个效应子肽还可以是包含铃蟾肽和具有针对真核细胞的溶细胞活性的BMAP27(B27)或BMAP28(B28)的截短形式的融合肽。这样的嵌合肽显示细胞毒性活性和减小的系统毒性(Cai H.et al.,Selective apoptotic killing of solid and hematologic tumor cells by bombesin-targeted delivery of mitochondria-disrupting peptides,Mol.Pharmaceutics,2010,7(2),pp.586-596)。

[0117] 具体地,这样的效应子肽是在所附序列中显示为SEQ.No.129的31个氨基酸的肽和在所附序列中显示为SEQ.No.131的29个氨基酸的肽。

[0118] 结构域(b)的另一个效应子肽可以是具有针对真核细胞的溶细胞活性的爪蟾抗菌肽-2肽,其在细胞膜和线粒体膜中形成孔。具体地,这样的效应子肽为在所附序列中显示为SEQ.No.40的23个氨基酸的肽。

[0119] 具有针对真核细胞的活性的结构域(b)的另一个溶细胞效应子肽可以是合成裂解肽。具有式(KLAKKLA)_n(其中n为基序的重复次数)的作为两亲性和 α -螺旋蛋白的合成肽在渗入细胞后在带负电荷的线粒体膜中选择性积累,从而引起孔的形成和线粒体的静电势的去稳定化,从而选择性地消除选择的癌细胞系的细胞(Javadpour et al,J Med Chem,39:3107-13,1996)。

- [0120] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.41的14个氨基酸的肽。
- [0121] 具有针对真核细胞的细胞毒性活性的结构域(b)的另一个效应子肽可以是以去垢剂样方式崩解细胞膜的另一种合成裂解肽。(Papo N,Shai Y.New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells.Biochemistry.2003Aug12;42(31):9346-54)。
- [0122] 具体地,这样的效应子肽是在所附序列表中显示为SEQ.No.128的17个氨基酸的肽。
- [0123] 具有针对真核细胞的细胞毒性活性的结构域(b)的另一个效应子肽可以是天蚕抗菌肽-蜂毒肽杂合肽,其引起细胞膜的孔形成,从而导致肿瘤生长的抑制。天蚕抗菌肽A在其结构中包含大量带正电荷的氨基酸例如赖氨酸、亮氨酸和丙氨酸(Quellette,A.,J.,and Selsted,M.,E.,1996,FASEB.J.,10(11),1280-9),因而在真核细胞的膜中形成孔。此外,天蚕抗菌肽A具有毒性活性,从而通过使微管的结构去稳定化来破坏细胞骨架结构的结构(Jaynes,J.et al.,1989,Peptide Res.,2(2),157-60)。
- [0124] 蜂毒肽是由25个氨基酸构成的肽,其具有高正电荷和 α 螺旋结构,从而与肿瘤细胞的膜强相互作用,通过“桶板”机制形成孔(Smolarczyk,R.et al Peptydy-nowa klasa leków przeciwnowotworowych, **Postępy Hig and Med. Doświadczalnej**, 2009,63:360-368)。此外,蜂毒肽刺激负责膜磷脂的分解的膜酶磷脂酶A2,这导致为细胞膜的脂双层的组分的脂肪酸的释放。从天蚕抗菌肽的带正电荷的N末端与蜂毒肽的疏水N末端的遗传融合物获得的合成嵌合肽天蚕抗菌肽A\蜂毒肽显示更大的针对靶细胞的细胞毒性活性并且不存在天蚕抗菌肽和蜂毒肽的特征性溶血活性(Boman,H.,G.et al(1989)FEBS Lett259,103-106;Andreu,D.et al(1992)FEBS Lett.296,190-194)。
- [0125] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.42的26个氨基酸的肽。
- [0126] 具有孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽为由 Isogai E.在“Antimicrobial and Lipopolysaccharide-Binding Activities of C-Terminal Domain of Human CAP18Peptides to Genus Leptospira”,The Journal of Applied Research, Vol.4,No.1,2004,180-185)中描述的肽FF/CAP18.FF/CAP18为人cathelicidin hCAP18₁₀₉₋₁₃₅的27个氨基酸的末端序列的类似物,其通过用苯丙氨酸替代2个氨基酸残基修饰而来。FF/CAP18因掺入的修饰而具有相对于天然序列增加的强阳离子特征,并且强烈结合真核细胞膜。在结合至膜的表面后,FF/CAP18形成通道和离子孔,导致细胞的电解质平衡的去稳定化,另外,在渗入细胞后,所述类似物成为线粒体膜的部分以形成离子通道,从而使线粒体的静电势去稳定化,并导致因子例如细胞色素C、SMAC/Diablo或AIF因子从线粒体至细胞质的释放,这抑制了细胞凋亡的过程。
- [0127] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.43的27个氨基酸的肽。
- [0128] 具有孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽为属于cathelicidin家族的具有强正电荷的肽BAMP-28。该肽也是人富组蛋白(一组由唾液腺细胞产生的具有具有低于4k Da的质量并且显示抗细菌和抗真菌性质的12个肽)的结构类似物(W.Kamysz et al., Histatyny-**białka** liniowe bogate w**histydyne**,Nowa Stomatologia 2004)。BAMP-28肽的N末端结构域带有强正电荷并且负责至细胞膜的停靠,而C末端部分负责细胞毒性活

性。(Hugosson,M.,D.et al.,1994)。抗细菌肽和线粒体前导序列(presequences)影响线粒体偶联、呼吸和蛋白质输入。Eur.J.Biochem.223:1027-1033.)。BMAP-28肽活性的机制主要基于细胞膜和线粒体膜中的孔的形成(A.Risso et al.,BMAP-28,an Antibiotic Peptide of Innate Immunity,Induces Cell Death through Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore,MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY,Mar.2002,p.1926-1935)。

[0129] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.44的27个氨基酸的肽。

[0130] 具有孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽是来自溶组织内阿米巴的裂解肽的同种型A的类似物,负责在细胞表面上积累(从而导致孔形成),其因此而导致肿瘤生长的抑制。溶组织内阿米巴的肽的3个同种型A、B和C已被鉴定,位于寄生虫的颗粒细胞质中。这些肽是通过3个硫化物桥稳定的77个氨基酸的多肽,其在二级结构中包含4个两亲性螺旋(Leippe,M et al EMBO J.11,3501-3506,1992)。这些肽具有针对真核细胞的裂解性质(Leippe,M.and Müller-Eberhard,H.J.Toxicology87,5-18,1994)。这些肽的结构中的第三螺旋具有适合于穿过细胞膜和形成孔的长度。基于所有3个同种型的仅包含第三螺旋结构域的氨基酸序列,已构建了一系列具有针对人癌细胞系的孔形成和细胞毒性活性并且特征在于低溶血活性的类似物合成肽(A3、B3和C3)(Andrä et al.,FEBS Letters385:96-100,1996)。

[0131] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.45的24个氨基酸的肽。

[0132] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽是来自溶组织内阿米巴的裂解肽的同种型B的类似物。

[0133] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.46的24个氨基酸的肽。

[0134] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽是来自溶组织内阿米巴的裂解肽的同种型C的类似物。

[0135] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.47的24个氨基酸的肽。

[0136] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽是流感病毒血细胞凝集素的HA2结构域的20个氨基酸的N末端片段的类似物(所谓的“融合肽”),负责病毒衣壳与宿主细胞膜的相互作用(嵌入),从而导致在宿主的细胞膜中形成孔。流感病毒的血细胞凝集素(HA)是负责病毒衣壳与宿主细胞膜的融合的同源三聚体糖蛋白。两个结构域在蛋白质的结构上是可区别的,HA1负责受体结合,H2负责与细胞膜的相互作用。在HA2结构域的结构中,仅N末端部分(20个氨基酸)(所谓的“融合肽”),直接嵌入细胞膜的结构(Dürer P et al.,J Biol Chem271:13417-13421,1996)。融合肽同源物的结构分析显示其活性与导致两亲性 α 螺旋的形成的构象变化相关,所述 α 螺旋能够贯穿内体膜(Takahashi S.,Biochemistry29:6257-6264,1990)。因此,“融合肽”的衍生物可用作生物活性物质的有效载体,从而提供从内体的高效快速“逃逸”。

[0137] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.48的12个氨基酸的肽。

[0138] 具有针对真核细胞的结构域(b)的另一个效应子肽为来自产气荚膜梭菌的 α 毒素的N末端结构域,其具有针对来自细胞膜的磷脂酰胆碱和鞘磷脂的磷脂酶C活性,从而允许孔的形成。产气荚膜梭菌的 α -毒素的N末端结构域包括磷脂酶C的活性中心。

[0139] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.49的247个氨基酸的

肽。

[0140] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域 (b) 的另一个效应子肽为李斯特菌溶胞素 O 的片段,属于由病原体分泌的并且在内体环境酸化后被激活的溶血素的组的胆固醇依赖性成孔肽 (Schnupf P,Portnoy DA.Listeriolysin O:a phagosome-specific lysin.Microbes Infect.2007Aug;9 (10):1176-87.Epub2007May7)。已显示以与靶向蛋白的融合蛋白的形式存在的李斯特菌溶胞素 O 可特异性地消除肿瘤细胞 (Bergelt S,Frost S,Lilie H.Listeriolysin O as cytotoxic component of an immunotoxin.Protein Sci.2009Jun;18 (6):1210-20)。

[0141] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为 SEQ.No.50 的 468 个氨基酸的肽。

[0142] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域 (b) 的另一个效应子肽为磷脂酶 PC-PLC 的活性片段。磷脂酶 PC-PLC 负责原代内皮细胞中的液泡的高效裂解并且在初级和次级液泡的裂解中与李斯特菌溶胞素协同作用。PC-PLC 的底物是磷脂酰胆碱 (Smith GA,Marquis H,Jones S,Johnston NC,Portnoy DA,Goldfine H.The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread.Infect Immun.1995 Nov;63 (11):4231-7)。

[0143] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为 SEQ.No.51 的 288 个氨基酸的肽。

[0144] 针对真核细胞具有孔形成活性的结构域 (b) 的另一个效应子肽为 equinatoxin 蛋白。equinatoxin EqTx-II 为从等指海葵分离的成孔溶细胞素,其特征针对于针对哺乳动物细胞的非特异性高细胞毒性。

[0145] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为 SEQ.No.52 的 179 个氨基酸的肽。

[0146] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域 (b) 的另一个效应子肽为槲寄生毒肽 A3 (VtA3)。槲寄生毒肽 A3 是来自槲寄灌木 (槲寄生) 的硫堇之一。在结构上其由具有对于家族是典型的 3 个二硫化物桥的 46 个氨基酸的链组成 (Coulon A.et al.,Comparative membrane interaction study of viscotoxins A3,A2 and B from mistletoe (*Viscum album*) and connections with their structures.Biochem J.2003Aug 15;374 (Pt1):71-8)。槲寄生毒肽对癌细胞系的毒性性质是已知的 (Tabiasco J.et al Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity.Eur J Biochem.2002May;269 (10):2591-600)。VtA3 的确切的分子作用机制未曾描述过。然而,已知其牵涉离子通道的形成和通过透化对膜结构的破坏。分子的强正电荷有利于对核酸和磷脂的结合 (Giudici M,Pascual R,de la Canal L,Pfüller K,Pfüller U,Villalain J.Interaction of viscotoxins A3 and B with membrane model systems: implications to their mechanism of action.Biophys J.2003Aug;85 (2):971-81)。

[0147] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为 SEQ.No.53 的 46 个氨基酸的肽。

[0148] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域 (b) 的另一个效应子肽是作为人穿孔素的活性片段的肽。对于免疫系统是“不可见”的人来源的蛋白质包括人穿孔素的使用可解决因为产生的强免疫原性而导致的包含细菌、动物或植物来源的毒素的蛋白嵌合体的有限的

临床有用性的问题(Frankel AE.Reducing the immune response to immunotoxin.Clin Cancer Res.2004Jan1;10(1Pt1):13-5)。在细胞膜中形成非特异性孔的人穿孔素的N-末端34个氨基酸的片段保留全蛋白的选择性细胞毒性活性(Liu CC,Walsh CM,Young JD.Perforin:structure and function.Immunol Today.1995Apr;16(4):194-201)。与靶向癌细胞的抗体融合的穿孔素片段保留全蛋白的选择性细胞毒性活性(Wan L.Expression,purification,and refolding of a novel immunotoxin containing humanized single-chain fragment variable antibody against CTLA4and the N-terminal fragment of human perforin.Protein Expr.Purif.2006Aug;48(2):307-13.Epub2006Mar9)。

[0149] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.54的33个氨基酸的肽。

[0150] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽是来自苏云金芽孢杆菌的巴拉波任-2。巴拉波任家族包含属于亚组PS1、PS2-PS3、PS4的13个不同毒素(Ohba M.Parasporin,a new anticancer protein group from Bacillus thuringiensis.Anticancer Res.2009 Jan;29(1):427-33)。巴拉波任-2显示针对癌细胞(MOLT-4、Jurkat、HL60、HepG2、CACO-2)的特异性并且以37-kDa的原毒素(通过被蛋白酶K切去分别地具有51和36个氨基酸的N和C末端片段的部分激活的)的形式存在。巴拉波任-2的至关重要的作用在于在细胞膜内寡聚化以形成具有约3nm的直径的孔,从而导致增加其通透性。巴拉波任-2活性的作用取决于测试的细胞系的类型,并且包括通过细胞质从细胞的流出引起的所谓的“小泡(blebbs)”或凸起的形成以及它们的裂解(HepG2和NIH-3T3细胞)或液泡样结构的形成(从而导致细胞(MOLT-4)的破裂)(Kitada S.Cytocidal actions of parasporin-2,an anti-tumor crystal toxin from Bacillus thuringiensis.J.Biol.Chem.2006Sep8;281(36):26350-60)。此外,巴拉波任-2的活性导致微管结构的破坏、肌动蛋白丝缠绕、线粒体和内质网的破碎(Akiba T.Crystal structure of the parasporin-2Bacillus thuringiensis toxin that recognizes cancer cells.J.Mol.Biol.2009Feb13;386(1):121-33)。

[0151] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.55的251个氨基酸的肽。

[0152] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽是包含合成裂解肽和细胞表面上的EGF受体的肽抑制剂的融合蛋白。细胞表面上EGFR的抑制剂的结合允许裂解肽定位至细胞表面,并且另外地抑制局域化的细胞内受体酪氨酸激酶。激酶活性的抑制导致生物化学信号的级联的缺乏,导致细胞质Ca²⁺离子的释放和导致RAS信号转导途径的活化,从而导致增强的糖酵解途径、蛋白质合成的活性,从而引起减少的细胞增殖和有限的肿瘤进展(Carpenter G,Cohen S.,(May1990).“Epidermal growth factor”.The Journal of Biological Chemistry265(14):7709-12)。作为两亲性螺旋蛋白的包含重复的亮氨酸和赖氨酸残基的合成肽选择性地消除选择的癌细胞系(Javadpour et al.,J.Med.Chem.,39:3107-13,1996)。

[0153] 具体地,这样的效应子肽是32个氨基酸的肽,在所附序列表中显示为SEQ.No.56。

[0154] 包含EGF抑制剂和合成裂解肽的在所附序列表中显示为SEQ.No.56的融合蛋白是新型的并且先前从未被描述过。

[0155] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽是包含具有KLLK基序的合成裂解肽和为细胞表面上的PDGF受体的拮抗剂的肽的融合蛋白。细胞表面上PDGF的抑制剂的结合允许裂解肽定位至细胞表面,并且另外地结合影响细胞增殖和血管生成(Ostman A.et al.,PDGF Receptors as Targets in Tumor Treatment,Adv.Cancer Res.,2007;97:247-74.)。

[0156] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.125的39个氨基酸的肽。

[0157] 在所附序列表中显示为SEQ.No.125的融合肽以及SEQ.No.125的PDGF拮抗剂与合成裂解肽的融合变体是新型的并且之前从未被描述过。

[0158] 具有针对真核细胞的孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽是作为pleurocidin的类似物的蛋白。Pleurocidin是与细胞膜相互作用的阳离子 α -螺旋蛋白(Cole AM et al.,Isolation and characterization of pleurocidin,an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder.J Biol Chem.1997May2;272(18):12008-13)。Pleurocidin-样肽具有抗乳腺癌细胞包括抗药性和缓慢生长的乳腺癌细胞的活性。(Hilchie AL et al.,Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts.Breast Cancer Res.2011Oct24;13(5):R102)。

[0159] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.126的25个氨基酸的肽和在所附序列表中显示为SEQ.No.127的26个氨基酸的肽。

[0160] 针对真核细胞具有孔形成活性的结构域(b)的另一个效应子肽为B27肽-从牛髓系细胞分离的属于cathelicidin家族的BMAP27蛋白的截短形式。(Donati M.et al.,Activity of Cathelicidin Peptides against Chlamydia spp.,Antimicrob Agents Chemother.2005March;49(3):1201-1202)。

[0161] 具体地,这样的效应子肽为在所附序列表中显示为SEQ.No.130的25个氨基酸的肽。

[0162] 在结合存在于癌细胞表面上的TRAIL受体后,融合蛋白显示双重效应。结构域(a),其为TRAIL的功能片段或具有保留的功能的其同源物,将显示出其已知的激动剂活性,即结合细胞表面上的死亡受体并激活细胞凋亡的外部途径。融合蛋白的结构域(b)的效应子肽将能够与TRAIL结构域的活性平行地潜在地细胞外或细胞内地发挥其作用。

[0163] 在根据本发明的融合蛋白中,抗肿瘤TRAIL活性通过在细胞膜或线粒体膜中形成孔,从而导致细胞的静电荷的扰乱、离子从细胞质的渗漏,或线粒体静电势的去稳定化以及因子例如细胞色素C、SMAC/DIABLO或因子AIF至细胞质的释放来增强,这继而激活与来自TRAIL至DR系列的功能受体的附着的信号协同地内部诱导细胞凋亡。

[0164] 新的融合蛋白还显示至少减小的或有限的,或甚至大体上消除的单个天然溶细胞肽的特征性溶血活性。

[0165] 在本发明的实施方案之一中,结构域(a)和结构域(b)通过至少一个结构域(c)连接,结构域(c)包含被存在于细胞环境、特别是肿瘤细胞环境中的蛋白酶例如金属蛋白酶、尿激酶或furin识别的切割位点序列。

[0166] 被蛋白酶识别的序列可选自:

[0167] -被金属蛋白酶MMP识别的序列Pro Leu Gly Leu Ala Gly Glu Pro/PLGLAGEP,或其片段,其与其所结合的序列的最后一个氨基酸形成被金属蛋白酶MMP识别的序列,

[0168] -被尿激酶uPA识别的序列Arg Val Val Arg/RVVR,或其片段,其与其所结合的序列的最后一个氨基酸形成被尿激酶识别的序列,

[0169] 及其组合,或

[0170] -被furin识别的序列(Arg Gln Pro Arg/RQPR、Arg Gln Pro Arg Gly/RQPRG、Arg Lys Lys Arg/RKKR)或被由M.Gordon et al.,在Inf.and Immun,1995,63,No.1,p.82-87中公开的furin识别的其它非典型序列或由furin识别的天然序列Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu/RHRQPRGWEL或HisArgGlnProArgGlyTrpGluGln/HRQPRGWEQ)或其片段,所述片段通过其所连接于的序列的最后一个氨基酸形成被furin识别的序列。

[0171] 在本发明的一个实施方式中,蛋白酶切割位点是以任何顺序彼此相邻的被金属蛋白酶MMP识别的序列和/或被尿激酶uPA识别的序列和/或被furin识别的序列的组合。

[0172] 优选地,在实施方案之一中,结构域(c)是被furin识别的序列,其选自Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly/RVVRPLGLAG和Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg/PLGLAGRVVR。

[0173] 蛋白酶金属蛋白酶MMP、尿激酶uPA和furin在肿瘤环境中过表达。被蛋白酶识别的序列的存在能够使结构域(a)从结构域(b)切割下来,即释放功能性结构域(b)并由此加速其激活。

[0174] 在融合蛋白至细胞内的内化后效应子肽-功能结构域(b)的激活可通过溶酶体酶(非特异性蛋白酶)从本发明的融合蛋白的结构域(b)切离结构域(a)来非特异性地发生。

[0175] 蛋白酶切割位点的存在允许迅速释放效应子肽,增加融合蛋白被非特异性蛋白酶随机降解之前,作为通过在肿瘤环境中过表达的蛋白酶从hTRAIL片段切离的结果肽向其作用位点转运的机会。

[0176] 此外,转运结构域(d)可连接于本发明的融合蛋白的效应子肽的结构域(b)。

[0177] 结构域(d)可以选自:

[0178] (d1)由6、7、8、9、10或11个组氨酸残基(His/H)组成的转运通过细胞膜的多聚组氨酸序列;

[0179] 和

[0180] (d2)由6,7,8,9,10或11个精氨酸残基(Arg/R)残基组成的转运通过细胞膜的多聚精氨酸序列,

[0181] (d3)PD4转运序列(蛋白质转导结构域4)TyrAlaArgAlaAlaAlaArgGlnAlaArgAla/YARAAARQARA,

[0182] (d4)由转铁蛋白受体结合序列ThrHisArgProProMetTrpSerProValTrpPro/THRPPMWSPVWP组成的转运序列,

[0183] (d5)PD5转运序列(蛋白质转导结构域5,TAT蛋白)TyrGlyArgLysLysArgArgGlnArgArgArg/YGRKKRRQRRR,

[0184] 或其片段,其通过它们所结合于的序列的最后一个氨基酸序列形成转运结构域(d1)或(d2)的序列,

[0185] 以及

[0186] -其组合。

[0187] 结构域(d1)和(d2)的组合可具体地包括(d1)/(d2)和(d2)/(d1)的组合。

[0188] 此外,结构域例如(d1)和(d2)的组合可包括彼此相邻的并且连接于结构域(b)的一个末端和/或连接于结构域(b)的不同末端的结构域。

[0189] 应当理解,在当融合蛋白具有连接于结构域(b)的转运结构域(d)和在结构域(a)和(b)之间具有切割位点的结构域(c)的情况下,结构域(c)以在切割构建体转运结构域(d)后仍然连接于结构域(b)的方式定位。换句话说,如果融合蛋白包含转运结构域(d)和切割位点结构域(c),则结构域(d)位于结构域(b)和结构域(c)之间,或位于与结构域(d)的连接位置相对的结构域(b)的末端。

[0190] 本发明还包括变体,其中结构域(d)位于两个(c)结构域之间,所述变体是其中在构建体切割之后,转运结构域优选易位结构域既未连接于TRAIL结构域也未连接于效应子肽结构域的变体。

[0191] 本发明不包括其中结构域(d)位于结构域(c)和结构域(a)之间的这样的变体,即为在切割构建体后转运结构域仍然连接于TRAIL结构域的变体。

[0192] 在另一个实施方案中,包含适合用于将PEG分子连接于融合蛋白的序列(PEG化接头)的结构域(e)位于结构域(a)与结构域(b)之间。这样的接头可以是已知的序列Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly/ASGCGPEG或其片段,所述片段通过其所连接于的序列的最后一个氨基酸形成适合用于PEG分子的连接的序列。PEG化接头还可选自下列序列:

[0193] Ala Ala Cys Ala Ala/AACAA,

[0194] Ser Gly Gly Cys Gly Gly Ser/SGGCGGS,和

[0195] Ser Gly Cys Gly Ser/SGCGS,

[0196] 或其片段,其通过其所连接于的序列的最后一个氨基酸形成适合于PEG分子连接的序列。

[0197] 优选地,PEG化接头的序列为Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly/ASGCGPEG。

[0198] 除了融合蛋白的主要功能元件和,切割位点结构域之外,本发明的融合蛋白可包含中性序列/柔性空间接头的序列。此类空间接头是本领域熟知的并且在文献中有描述。将它们掺入融合蛋白的序列中是为了使得通过在宿主细胞中过表达而产生的蛋白的正确折叠。具体地,空间接头可以是甘氨酸、甘氨酸-丝氨酸或甘氨酸-半胱氨酸-丙氨酸接头。

[0199] 具体地,空间接头可以是甘氨酸和丝氨酸残基的组合,例如Gly Gly Gly Gly Ser/GGGGS或用作空间接头的其任何片段,例如片段Gly Gly Gly Ser/GGGS、Gly Gly Gly/GGG或Gly Gly Gly Gly/GGGG、GlyGlySerGly Gly,Gly Gly Ser Gly/GGSG、Gly Ser Gly/GSG或SerGlyGly/SGG或其组合。

[0200] 在其它实施方案中,空间接头可以是甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸残基的任组合,例如Ala Ser Gly Gly/ASGG或用作空间接头的其任何片段,例如AlaSerGly/ASG。还可能使用空间接头例如序列Gly GlyGlySerGly/GGGGS,或用作空间接头的其任何片段例如片段Gly Gly Gly/GGG,与用作空间接头的另一个片段的组合。在这样的情况下,空间接头可以是甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸残基的组合,例如Gly Gly Gly Ser Ala Ser Gly Gly/GGGSASGG、Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly/GSGGGSGGG、Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser/GSGGGGGGS或Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser/GGGGGGS。在另一个实施方案

中,空间接头可以是丝氨酸与组氨酸残基的组合Ser His His Ser/SHHS或Ser His His Ala Ser/SHHAS。

[0201] 在另一个实施方案中,空间接头还可选自单个氨基酸残基,例如单个甘氨酸或半胱氨酸残基,特别地1或2个多至4个甘氨酸或半胱氨酸残基。

[0202] 在另一个实施方案中,接头还可通过上述空间接头的片段形成,所述片段通过其所连接于的序列的末端氨基酸形成空间接头序列。

[0203] 在另一个实施方案中,空间接头可促进本发明的融合蛋白的三聚体的结构的形成和稳定化,从而增加其在血液循环中的半衰期,从而在施用入血液循环系统后阻止可影响蛋白质的活性的解离。在该情况下,接头为半胱氨酸与丙氨酸的组合,例如片段CysCysAlaAlaAlaAlaAlaCys/CAACAAC或CysCysAlaAlaAlaAlaAlaCys/CAACAAAC或其片段,所述片段是其所连接于并且形成稳定三聚体结构的空间接头序列的末端氨基酸序列。

[0204] 此外,空间接头对于以非特异性方式发生的功能性结构域(b)的激活也是有用的。以非特异性方式激活结构域(b)可通过因空间接头的pH依赖性水解而从根据本发明的融合蛋白的结构域(b)切离结构域(a)来进行。

[0205] 本发明的融合蛋白的特定实施方案是包含成孔肽的融合蛋白,所述成孔肽选自由如下标识代表的肽的组:

[0206] SEQ.No.34、SEQ.No.35;SEQ.No.36、SEQ.No.37、SEQ.No.38、SEQ.No.39、SEQ.No.40、SEQ.No.41、SEQ.No.42、SEQ.No.43、SEQ.No.44、SEQ.No.45、SEQ.No.46、SEQ.No.47、SEQ.No.48、SEQ.No.49、SEQ.No.50、SEQ.No.51、SEQ.No.52、SEQ.No.53、SEQ.No.54、SEQ.No.55m SEQ.No.56、SEQ.No.125、SEQ.No.126、SEQ.No.127、SEQ.No.128、SEQ.No.129、SEQ.No.130、SEQ.No.131和SEQ.No.132。

[0207] 上述代表性融合蛋白的结构详细说明显示于下文提供的实施例中。

[0208] 根据本发明,融合蛋白意思是包含2个或更多个蛋白或其片段的单一的蛋白分子,所述2个或更多个蛋白或其片段通过它们各自的肽链内的肽键共价连接而无另外的化学接头。

[0209] 融合蛋白也可另外被描述为蛋白构建体或嵌合蛋白。根据本发明,术语“构建体”或“嵌合蛋白”如果被使用的话,应该被理解是指上文定义的融合蛋白。

[0210] 对于本领域技术人员,显而易见的是由此定义的融合蛋白可通过肽和蛋白的已知的化学合成方法来合成。

[0211] 融合蛋白可通过化学肽合成的方法来合成,特别是使用合适的树脂作为载体,使用固相肽合成技术进行。此类技术是常规的和本领域已知的,特别描述于例如下列专论中: Bodanszky和Bodanszky,The Practice of Peptide Synthesis,1984,Springer-Verlag, New York,Stewart等人,Solid Phase Peptide Synthesis,2nd Edition,1984,Pierce Chemical Company。

[0212] 融合蛋白可通过肽的化学合成方法作为连续蛋白来合成。或者,可以单独合成蛋白的各个片段(结构域),然后通过一个肽片段的氨基末端与另一个肽的羧基末端的缩合经由肽键而组合在一起。此类技术是常规的和本领域已知的。

[0213] 然而,优选地,本发明的融合蛋白是重组蛋白,通过编码融合蛋白的多核苷酸序列在宿主细胞中的基因表达的方法来产生。

[0214] 为了验证得到的肽的结构,可以使用肽的氨基酸组成的已知的分析方法,例如高分辨率质谱技术,以确定肽的分子量。为了确认肽的序列,也可以使用蛋白测序仪,其依次降解肽并鉴定氨基酸的序列。

[0215] 本发明的另一方面是编码如上所述的融合蛋白的多核苷酸序列、特别是DNA序列。

[0216] 优选地,根据本发明的编码如上所述的融合蛋白的多核苷酸序列、特别是DNA序列是针对在大肠杆菌中表达而优化的序列。

[0217] 本发明的另一个方面也是包含多核苷酸序列、特别是如上所述的本发明的DNA序列的表达载体。

[0218] 本发明的另一个方面是包含上文所述的表达载体的宿主细胞。

[0219] 用于表达本发明的融合蛋白的优选宿主细胞是大肠杆菌细胞。

[0220] 用于产生重组蛋白、包括融合蛋白的方法是熟知的。简而言之,该技术为:产生编码靶蛋白的氨基酸序列和在宿主中指导靶蛋白的表达的多核苷酸分子例如DNA分子。然后,将编码靶蛋白的多核苷酸分子掺入合适的表达载体,其确保多肽的有效表达。然后将重组表达载体导入宿主细胞以进行转染/转化,由此产生转化的宿主细胞。然后培养转化的细胞以过表达靶蛋白,纯化所获得的蛋白,任选地通过切割用于表达或纯化蛋白的标签序列而切下来。

[0221] 用于表达和纯化的合适的技术描述于例如下列专著:Goeddel, Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) 和 A. Staron 等人, Advances Mikrobiol., 2008, 47, 2, 1983-1995。

[0222] 作为用于导入和在宿主细胞中复制DNA序列的表达载体,可以使用粘粒、质粒或修饰的病毒。通常使用质粒作为表达载体。合适的质粒是熟知的和商业上可获得的。

[0223] 本发明的表达载体包含编码本发明的融合蛋白的多核苷酸分子和用于转录和翻译掺入合适的宿主细胞的编码序列的必要的调节序列。调节序列的选择取决于宿主细胞的类型,可以由本领域技术人员容易地进行。此类调节序列的实例是包含转录起始信号的、插入编码序列之前的转录启动子和增强子或RNA聚合酶结合序列,核糖体结合序列,和插入编码序列之后的转录终止序列。此外,取决于所用的宿主细胞和载体,可以将其它序列导入表达载体,例如复制起始子,另外的DNA限制性位点,增强子和允许诱导转录的序列。

[0224] 表达载体还包含标记物基因序列,其赋予转化的细胞确定的表型并使得能够特异性选择转化的细胞。此外,载体还可以包含第二标记物序列,其允许将以包含插入的编码靶蛋白序列的重组质粒转化的细胞与摄取了无插入物的质粒的细胞区分开。通常,使用典型的抗生素抗性标记物,然而,任何其它本领域已知的报告子基因均可使用,其在细胞(在体内)中的存在可使用放射自显影技术、分光光度法或生物和化学发光法容易地确定。例如,取决于宿主细胞,可使用例如下列报告基因: β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酸酶、萤光素酶、氯霉素乙酰转移酶或绿色荧光蛋白。

[0225] 此外,表达载体可包含信号序列,将蛋白转运至合适的细胞腔室,例如周质,在那里促进折叠。另外,可以存在编码标记物/标签例如连接于N末端的HisTag或连接于C末端的GST的序列,其促进后续使用亲和法、通过镍柱上的亲和层析纯化所产生的蛋白。也可以存在另外的序列,其保护蛋白免于宿主细胞中的蛋白水解降解,以及增强其溶解性的序列。

[0226] 连接于靶蛋白的序列的辅助元件可能阻断其活性,或者由于别的原因而具有有害

效应,例如由于毒性。此类元件必须被除掉,这可通过酶促或化学切割来完成。特别地,为了允许通过亲和层析纯化蛋白而连接的6个组氨酸的标签HisTag或这种类型的其它标记物应该被除去,因为其被描述对于可溶性TRAIL蛋白的肝毒性具有影响。可以使用基于多种熟知的宿主细胞的异源表达系统,包括原核细胞:细菌,例如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌;酵母,例如酿酒酵母或巴斯德毕赤酵母;和真核细胞系(昆虫、哺乳动物、植物)。

[0227] 优选地,由于培养和遗传操作的容易性和大量的获得的产物,使用大肠杆菌表达系统。因此,包含编码本发明的融合蛋白的靶序列的多核苷酸序列将针对在大肠杆菌中的表达而进行优化,即,其将包含在大肠杆菌中表达优化的编码序列密码子,选自本领域已知的可能的序列变体。此外,表达载体将包含适合大肠杆菌的连接于编码序列的上述元件。

[0228] 因此,在本发明的优选实施方式中,针对在大肠杆菌中表达而优化的包含编码本发明的融合蛋白的序列的多核苷酸序列选自下组的多核苷酸序列:

[0229] SEQ.No.57;SEQ.No.58;SEQ.No.59;SEQ.No.60;SEQ.No.61;SEQ.No.62;SEQ.No.63;SEQ.No.64;SEQ.No.65;SEQ.No.66;SEQ.No.67;SEQ.No.68;SEQ.No.69;SEQ.No.70;SEQ.No.71;SEQ.No.72;SEQ.No.73;SEQ.No.74;SEQ.No.75;SEQ.No.76;SEQ.No.77;SEQ.No.78;SEQ.No.79;SEQ.No.80;SEQ.No.81;SEQ.No.82;SEQ.No.83;SEQ.No.84;SEQ.No.85;SEQ.No.86;SEQ.No.87;SEQ.No.88;SEQ.No.89;SEQ.No.108;SEQ.No.109;SEQ.No.110;SEQ.No.111;SEQ.No.112;SEQ.No.113;SEQ.No.114;SEQ.No.115;SEQ.No.116;SEQ.No.117;SEQ.No.118;SEQ.No.119;SEQ.No.120;SEQ.No.121;SEQ.No.122;SEQ.No.123和SEQ.No.124,其分别编码具有对应于选自下列的氨基酸序列的氨基酸序列的融合蛋白:

[0230] SEQ.No.1;SEQ.No.2;SEQ.No.3;SEQ.No.4;SEQ.No.5;SEQ.No.6;SEQ.No.7;SEQ.No.8;SEQ.No.9;SEQ.No.10;SEQ.No.11;SEQ.No.12;SEQ.No.13;SEQ.No.14;SEQ.No.15;SEQ.No.16;SEQ.No.17;SEQ.No.18;SEQ.No.19;SEQ.No.20;SEQ.No.21;SEQ.No.22;SEQ.No.23;SEQ.No.24;SEQ.No.25;SEQ.No.26;SEQ.No.27;SEQ.No.28;SEQ.No.29;SEQ.No.30;SEQ.No.31;SEQ.No.32;SEQ.No.33;SEQ.No.91;SEQ.No.92;SEQ.No.93;SEQ.No.94;SEQ.No.95;SEQ.No.96;SEQ.No.97;SEQ.No.98;SEQ.No.99;SEQ.No.100;SEQ.No.101;SEQ.No.102;SEQ.No.103;SEQ.No.104;SEQ.No.105;SEQ.No.106和SEQ.No.107。

[0231] 在优选实施方式中,本发明还提供了适合于转化大肠杆菌的表达载体,其包含上述选自SEQ.No.57至SEQ.No.87和SEQ.No.108至SEQ.No.124的多核苷酸序列,以及以此类表达载体转化的大肠杆菌细胞。

[0232] 转化,即将DNA序列导入细菌宿主细胞特别是大肠杆菌,通常在准备好摄取DNA的感受态细胞上进行,例如通过以钙离子在低温(4℃)处理,然后进行热击(37-42℃)或通过电穿孔进行。此类技术是熟知的并且通常由表达系统的生产商确定,或描述于文献和实验室工作手册中,例如Maniatis等人,Molecular Cloning.Cold Spring Harbor,N.Y.,1982)。

[0233] 在大肠杆菌表达系统中过表达本发明的融合蛋白的程序将在下文详述。

[0234] 本发明还提供了包含如上文所述的本发明的融合蛋白作为活性成分以及合适的药学上可接受的载体、稀释剂和常规辅助性成分的药物组合物。药物组合物将包含有效量

的本发明的融合蛋白和药学上可接受的溶解或分散于载体或稀释剂中的辅助性成分,优选是配制为单元剂型或包含多剂的制剂的药物制剂的形式。药物形式和其配制方法以及其它成分、载体和稀释剂是本领域技术人员已知的并且在文献中有描述。例如,描述于下列专著:Remington's Pharmaceutical Sciences,ed.20,2000,Mack Publishing Company,Easton,USA。

[0235] 术语“药学上可接受的载体、稀释剂和辅助性成分”包含本领域已知的任何溶剂、分散介质、表面活性剂、抗氧化剂、稳定剂、防腐剂(例如抗细菌剂、抗真菌剂)、等渗剂。本发明的药学上可接受的载体可包含多种类型的载体、稀释剂和赋形剂,这取决于所选的施用途径和需要的剂型,例如液体、固体和气雾剂形式,用于口服、胃肠外、吸入、表面,以及所选的形式对于施用途径(例如注射)是否必须是无菌的。本发明的药物组合物的优选施用途径是胃肠外,包括注射途径,例如静脉内、肌内、皮下、腹膜内、肿瘤内或通过单次或连续静脉内输注。

[0236] 在一个实施方式中,本发明的药物组合物可以通过直接注射至肿瘤来施用。在另一实施方式中,本发明的药物组合物可通过静脉内施用。在另一实施方式中,本发明的药物组合物可皮下或腹膜内施用。用于胃肠外施用的药物组合物可以是药学上可接受的水性或非水性介质中的溶液或分散体,所述介质缓冲至合适的pH并与体液等渗(如果必要),并且还可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和可溶性物质,其使得组合物与受体的组织或血液相容。可包含于组合物中的其它成分是例如水、醇例如乙醇、多元醇例如甘油、丙二醇,液体聚乙二醇,脂质例如甘油三酯,植物油,脂质体。合适的流动性和物质粒度可通过涂覆性物质例如卵磷脂和表面活性剂例如羟丙基纤维素、聚山梨酸酯等来提供。

[0237] 用于液体胃肠外组合物的合适的等渗剂是例如糖,例如葡萄糖,和氯化钠,及其组合。

[0238] 或者,用于通过注射或输注施用的药物组合物可以是粉末形式,例如冻干的粉末,用于在临使用前以合适的载体例如无菌无热源水进行重构。

[0239] 用于胃肠外施用的本发明的药物组合物也可具有经鼻施用的形式,包括溶液、喷雾剂或气雾剂。优选地,用于经鼻施用的形式可以是水溶液,并且是等渗的或缓冲至保持从大约5.5至大约6.5的pH,以维持类似于鼻分泌物的性质。此外,其将包含防腐剂或稳定剂,例如熟知的鼻内制剂中包含的那些。

[0240] 组合物可包含多种抗氧化剂,其延迟一种或多种成分的氧化。此外,为了防止微生物的作用,组合物可包含多种抗细菌和抗真菌试剂,包括例如,但不限于,尼铂金酯类,氯丁醇,硫柳汞,山梨酸和这种类型的类似的已知物质。一般地,本发明的药物组合物可以包含例如至少大约0.01wt%的活性成分。更具体地,组合物可包含1%至75%重量的活性成分,或例如25%至60%重量,但不限于这些数值。施用于患者包括人类的根据本发明的组合物的实际剂量将由物理和生理因素决定,例如体重、病况的严重性、被治疗的疾病的类型,之前或同时的治疗性干预,患者和施用途径。合适的单元剂量,总剂量和组合物中的活性成分的浓度将由主治医生决定。

[0241] 组合物可例如以下列剂量施用:大约1 μ g/kg体重至大约1000mg/kg患者体重,例如5mg/kg体重至100mg/kg体重,或5mg/kg体重至500mg/kg体重。融合蛋白和包含它的组合物显示出抗癌或抗肿瘤活性,可用于治疗癌症疾病。本发明还提供了如上所述的本发明的融

合蛋白用于治疗哺乳动物包括人类中的癌症疾病的用途。本发明还提供了治疗哺乳动物包括人类中的肿瘤/癌症的方法,包括向有此需要的受试者施用抗肿瘤/抗癌有效量的如上所述的本发明的融合蛋白,任选为合适的药物组合物的形式。

[0242] 本发明的融合蛋白可用于治疗血液恶性肿瘤,例如白血病,肉芽肿病,骨髓瘤和其它血液恶性肿瘤。融合蛋白也可用于治疗实体瘤,例如乳腺癌、肺癌包括非小细胞肺癌,结肠癌,胰腺癌,卵巢癌,膀胱癌,前列腺癌,肾癌,脑癌等。用于治疗癌症的融合蛋白的合适的施用途特别为胃肠外途径:以注射或输注的形式、在组合物中和以适合于该施用途的形式施用本发明的融合蛋白。本发明将以下列一般性程序和具体融合蛋白的实例进行更详细的描述。

[0243] 用于过表达融合蛋白的一般性程序

[0244] 质粒的制备

[0245] 靶融合蛋白的氨基酸序列用作模板以产生编码它的DNA序列,包含针对在大肠杆菌中的表达优化了的密码子。此程序允许增大在大肠杆菌中进行靶蛋白合成的后续步骤的效率。然后自动化合成得到的核苷酸序列。另外,将限制性酶NdeI (在引导链的5'末端)和XhoI (在引导链的3'末端)的切割位点添加到得到的编码靶蛋白的基因中。它们用于将基因克隆进入载体pET28a (Novagen)。它们也可用于将编码蛋白的基因克隆进入其它载体。从该构建体表达而来的靶蛋白在N末端可以任选地具有多聚组氨酸标签(6个组氨酸),其之前是凝血酶识别的位点,该位点用于后续通过亲和层析进行纯化。一些靶在不使用任何标签的情况下表达,特别是不使用组氨酸标签,随后在SP琼脂糖上纯化。首先通过使用酶NdeI和XhoI对分离的质粒进行限制性分析、然后通过靶蛋白的整个阅读框的自动化测序来确认得到的构建体的正确性。用于测序的引物互补于存在于载体中的T7启动子的序列(5'-TAATACGACTCACTATAGG-3')和T7终止子的序列(5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3')。得到的质粒用于在商业化大肠杆菌菌株中过表达靶融合蛋白,其根据生产商的推荐进行转化。在选择性培养基(LB琼脂,卡那霉素50 μ g/ml,1%葡萄糖)上获得的菌落用于制备LB液体培养基(补充了50 μ g/ml的卡那霉素和1%葡萄糖)中的过夜培养物。在摇动的温育箱中生长大约15小时之后,培养物用于接种合适的培养物。

[0246] 融合蛋白的过表达和纯化——一般程序A

[0247] 以过夜培养物接种含有卡那霉素(30 μ g/ml)和100 μ M硫酸锌的LB培养基。将培养物在37 $^{\circ}$ C温育直至600nm下的光密度(OD)达到0.60-0.80。然后加入IPTG至终浓度为0.25-1mM。在25 $^{\circ}$ C摇动温育后(3.5-20h),将培养物在6,000g离心25分钟。将细菌沉淀物重悬于含有50mM KH₂PO₄,0.5M NaCl,10mM咪唑,pH7.4的缓冲液中。将悬浮液在冰上超声8分钟(40%振幅,15秒脉冲,10秒间隔)。通过在20000g、4 $^{\circ}$ C离心40分钟而使得到的提取物澄清。以用于制备细菌细胞提取物的缓冲液平衡来预处理Ni-Sephrose树脂(GEHealthcare)。然后使用离心提取物后获得的上清液将树脂在4 $^{\circ}$ C过夜温育。然后将其载入色谱柱并以15-50倍体积的缓冲液50mM KH₂PO₄,0.5M NaCl,20mM咪唑,pH7.4洗涤。使用含有0.5M NaCl pH7.4的50mM KH₂PO₄缓冲液中的咪唑梯度从柱洗脱获得的蛋白。通过SDS-PAGE分析获得的级份。将合适的级份组合并针对50mM Tris缓冲液,pH7.2,150mM NaCl,500mM L-精氨酸,0.1mM ZnSO₄,0.01%Tween20在4 $^{\circ}$ C过夜透析,同时,以凝血酶(1:50)切割Histag(如果存在的话)。切割之后,通过使用Benzamidine SepharoseTM树脂纯化而从与Histag一起表达的靶融合蛋白分离

凝血酶。在SP琼脂糖上进行不与Histag一起表达的靶融合蛋白的纯化。通过SDS-PAGE电泳分析产物的纯度(Maniatis等人,Molecular Cloning.Cold Spring Harbor,NY,1982)。

[0248] 融合蛋白的过表达和纯化——一般程序B

[0249] 以过夜培养物接种含有卡那霉素(30 μ g/ml)和100 μ M硫酸锌的LB培养基。将培养物在37 $^{\circ}$ C温育直至600nm下的光密度(OD)达到0.60-0.80。然后加入IPTG至终浓度为0.5-1mM。在25 $^{\circ}$ C摇动温育20h后,将培养物在6000g离心25分钟。将过表达后的细菌细胞在弗氏细胞压碎器中在含有50mM KH₂PO₄,0.5M NaCl,10mM咪唑,5mM β -巯基乙醇,0.5mM PMSF(苯基甲基磺酰氟),pH7.8的缓冲液中破碎。通过在8000g离心50分钟使得到的提取物澄清。使用获得的上清液过夜温育Ni-Sepharose树脂。然后将结合了蛋白的树脂载入色谱柱。为了洗掉含有非结合性蛋白的级份,以15-50倍体积的缓冲液50mM KH₂PO₄,0.5M NaCl,10mM咪唑,5mM β -巯基乙醇,0.5mMPMSF(苯基甲基磺酰氟),pH7.8洗涤柱。然后,为了洗掉大部分的特异性与床结合的蛋白,以含有50mM KH₂PO₄,0.5M NaCl,500mM咪唑,10%甘油,0.5mM PMSF,pH7.5的缓冲液洗涤柱。通过SDS-PAGE分析获得的级份(Maniatis等人,Molecular Cloning.ColdSpring Harbor,NY,1982)。将含有靶蛋白的级份组合(如果蛋白是与组氨酸标签一起表达),以凝血酶切割(1U/4mg蛋白,16 $^{\circ}$ C,8小时)以除掉多聚组氨酸标签。然后将级份针对配制缓冲液(500mM L-精氨酸,50mM Tris,2.5mM ZnSO₄,pH7.4)透析。

[0250] 在本说明书中,最初经表达具有组氨酸标签(随后被除去)的蛋白质在实施例编号后具有上标a)。最初表达为不具有组氨酸标签的蛋白质在实施例编号之后利用上标b)来指明。

[0251] 通过2-D电泳表征融合蛋白

[0252] 为了进一步表征获得的蛋白质和精确地选择色谱条件,测定蛋白质的等电点。为此目的,根据下列方案在两个阶段使用二维电泳(2-D)。

[0253] 步骤1.将蛋白质在pH梯度和变性条件下等电聚焦。

[0254] 通过以1:1的比率与含有10%三氯醋酸和0.07%的丙酮中的 β -巯基乙醇的沉淀溶液混合来沉淀浓度为1-2mg/ml的蛋白质制剂。将混合物在-20 $^{\circ}$ C温育30min,随后在15,000g和4 $^{\circ}$ C离心25min。除去上清液,用具有0.07%的 β -巯基乙醇的冷丙酮洗涤沉淀2次。随后将丙酮的残留物蒸发直至无可检测的气味。取决于随后使用的小条,将蛋白质沉淀悬浮于250ml的具有pH3-11或6-11的廓图的再水化缓冲液8M尿素、1%CHAPS、15mM DTT、0.5%两性电解质(GE Healthcare)。将蛋白质溶液置于陶瓷小室中以进行等电聚焦,随后在具有适当pH廓图(3-11或6-11)的13cm干条(GE Healthcare)上进行电泳。整个表面覆盖一层矿物油。将小室置于Ettan IPGphor III装置中,在所述装置中根据按照小条和pH廓图的维度设定的下列参数进行等电聚焦:

[0255] 在20 $^{\circ}$ C脱水16h。

[0256] 在固定的pH梯度上在电场中聚焦

[0257]

时间	电压
1h	500V
1h	梯度500-1000V
2h30min	梯度1000-8000V

30min	8000V
-------	-------

[0258] 随后,将包含聚焦的蛋白质的小条在去离子水中洗涤1min,用考马斯亮染色,随后脱色,将其为图像归档以标记蛋白质的位置。将脱色的小条用具有下列组成的缓冲液平衡2x15min:50mM Tris-HCl pH8.8、6M尿素、1%DTT、2%SDS、30%甘油。

[0259] 步骤2.利用SDS-PAGE在第二方向上进行分离。

[0260] 将小条置于12.5%的包含每标准尺寸单个孔的聚丙烯酰胺凝胶上方,随后在用于SDS-PAGE的装置中,以200V的电压进行3小时。用考马斯亮蓝对凝胶进行染色,随后与应用的范围一起归档。通过基于尺寸的标准测定其重量来鉴定蛋白质,随后针对基于由制造商(GE Healthcare)提供的曲线(pH对小条离标记为正极的末端的长度的百分比的比率)的6-11的范围或基于通过等电聚集校准试剂盒(GE Healthcare)实验性测定的曲线的3-11的范围读取其IPI。

实施例

[0261] 本发明的融合蛋白的代表性实例示于下列实施例中。

[0262] 在实例中,将融合蛋白的氨基酸序列从蛋白质的N端至C端书写。在实例中,TRAIL总是指hTRAIL。

[0263] 使用氨基酸序列组分的下列名称,其中紧接三字母名称,提供了等同的单字母名称。

[0264] 接头1:空间接头Gly Gly/GG

[0265] 接头2:空间接头Gly Gly Gly/GGG

[0266] 接头3:空间接头Gly Ser Gly/GSG

[0267] 接头4:空间接头Gly Gly Gly Gly Ser/GGGGS

[0268] 接头5:空间接头Gly Gly Gly Gly Gly Ser/GGGGS

[0269] 接头6:空间接头Gly Gly Ser Gly Gly/GGSGG

[0270] 接头7:空间接头Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly/GGSGGG

[0271] 接头8:空间接头Gly Gly Gly Gly Ser Gly/GGGSG

[0272] 接头9:空间接头

[0273] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser/GGGSGGGGS

[0274] 接头10:空间接头

[0275] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly/GGGSGGGG

[0276] 接头11:空间接头

[0277] Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly/GSGGGSGGG

[0278] 接头12:空间接头

[0279] Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Cys/CAACAAAC

[0280] 接头13:空间接头

[0281] Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys/CAAACAAC

[0282] 接头14:空间接头Cys/C

[0283] 接头15:空间接头Gly/G

[0284] 接头16:空间接头Ser Gly Gly/SGG

- [0285] furin:被furin切割的序列Arg Lys Lys Arg/RKKR
- [0286] furin.NAT:被furin切割的天然序列HisArgGlnProArgGlyTrpGluGln/HRQPRGWEEQ
- [0287] UROKIN:被尿激酶切割的序列Arg Val Val Arg/RVVR
- [0288] MMP:被金属蛋白酶切割的序列Pro Leu Gly Leu Ala Gly/PLGLAG
- [0289] PEG1:PEG化接头Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu/ASGCGPE
- [0290] PEG2:PEG化接头
- [0291] Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly/ASGCGPEG
- [0292] TRANS1:转运序列His His His His His His/HHHHHH
- [0293] TRANS2:转运序列Arg Arg Arg Arg Arg Arg/RRRRRRR
- [0294] TRANS3:转运序列
- [0295] Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg/RRRRRRRR
- [0296] TRANS4:转运序列
- [0297] TyrAlaArgAlaAlaAlaArgGlnAlaArgAla/YARAAARQARA
- [0298] TRANS5:转运序列
- [0299] ThrHisArgProProMetTrpSerProValTrpPro/THRPPMWSPVWP
- [0300] TRANS6:转运序列
- [0301] TyrGlyArgLysLysArgArgGlnArgArgArg/YGRKKRRQRRR
- [0302] 实施例1.SEQ.No.1的融合蛋白
- [0303] SEQ ID NO:1的蛋白是具有258个氨基酸的长度和29.5kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为83个氨基酸的人粒溶素的活性形式(SEQ.No.34),并且连接于结构域(a)的C末端。
- [0304] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头序列G、空间接头(GSG)、金属蛋白酶MMP切割位点(PLGLAG)和尿激酶切割位点(RVVR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:
- [0305] (TRAIL121-281)-接头15-接头3-MMP-UROKIN-(SEQ.No.34)
- [0306] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:57。
- [0307] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:1用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:57。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。
- [0308] 实施例2.SEQ.No.2的融合蛋白
- [0309] SEQ ID NO:2的蛋白是具有261个氨基酸的长度和30.09kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL119-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的83个氨基酸的人粒溶素的活性形式(SEQ.No.34)。
- [0310] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了尿激酶切割位点(RVVR)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和空间接头(GGGGS)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:
- [0311] (SEQ.No.34)-UROKIN-MMP-接头4-(TRAIL119-281)
- [0312] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为

所附序列表中所示的SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:58。

[0313] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:2用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:58。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签 (Ex.2^a) 和不具有组氨酸标签 (Ex.2^b)。

[0314] 实施例3.SEQ.No.3的融合蛋白

[0315] SEQ ID NO:3的蛋白是具有186个氨基酸的长度和21.5kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为15个氨基酸的合成裂解肽(SEQ.No.35),并且连接于结构域(a)的C末端。

[0316] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和尿激酶切割位点(RVVR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0317] (TRAIL121-281)-MMP-UROKIN-(SEQ.No.35)

[0318] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:59。

[0319] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:3用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:59。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0320] 实施例4.SEQ.No.4的融合蛋白

[0321] SEQ ID NO:4的蛋白是具有227个氨基酸的长度和25.7kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的56个氨基酸的pilosulin-1 (SEQ.No.36)。

[0322] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了尿激酶切割位点(RVVR)和金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0323] (SEQ.No.36)-UROKIN-MMP-(TRAIL121-281)

[0324] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:60。

[0325] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:4用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:60。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0326] 实施例5.SEQ.No.5的融合蛋白

[0327] SEQ ID NO:5的蛋白是具有264个氨基酸的长度和29.5kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL95-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为56个氨基酸的pilosulin-1 (SEQ.No.36),并且连接于结构域(a)的C末端。

[0328] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(CAACAC)、空间接头(GGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和尿激酶切割位点(RVVR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0329] (TRAIL95-281)-接头12-接头2-MMP-UROKIN-(SEQ.No.36)

[0330] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:61。

[0331] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:5用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:61。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0332] 实施例6.SEQ.No.6的融合蛋白

[0333] SEQ ID NO:6的蛋白是具有299个氨基酸的长度和33.2kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL95-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的90个氨基酸的肽pilosulin5 (SEQ.No.37)。

[0334] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GSG)、空间接头(CAACAAAC)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)和空间接头(G)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0335] (TRAIL95-281)-接头3-接头12-MMP-UROKIN-接头15-(SEQ.No.37)

[0336] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:62。

[0337] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:6用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:62。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签(Ex.6^a)和不具有组氨酸标签(Ex.6^b)。

[0338] 实施例7.SEQ.No.7的融合蛋白

[0339] SEQ ID NO:7的蛋白是具有224个氨基酸的长度和25.6kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL95-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的17个氨基酸的来自速普肽的活性肽(SEQ.No.38)。

[0340] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(CAACAAAC)、空间接头(GG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和尿激酶切割位点(RVVR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0341] (TRAIL95-281)-接头12-接头1-MMP-UROKIN-(SEQ.No.38)

[0342] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:63。

[0343] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:7用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:63。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签(Ex.7^a)和不具有组氨酸标签(Ex.7^b)。

[0344] 实施例8.SEQ.No.8的融合蛋白

[0345] SEQ ID NO:8的蛋白是具有202个氨基酸的长度和23.8kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL114-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的17个氨基酸的来自速普肽的活性肽(SEQ.No.38)。

[0346] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了金属蛋白酶切割位点

(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)和7个精氨酸的转运序列(RRRRRRR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0347] (TRAIL114-281)-MMP-UROKIN-TRANS2-(SEQ.No.38)

[0348] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:64。

[0349] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:8用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:64。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner(DE3)菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签(Ex.8^a)和不具有组氨酸标签(Ex.8^b)。

[0350] 实施例9.SEQ.No.9的融合蛋白

[0351] SEQ ID NO:9的蛋白是具有243个氨基酸的长度和27.6kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL95-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的38个氨基酸的融合肽铃蟾肽-爪蟾抗菌肽(SEQ.No.39)。

[0352] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了尿激酶切割位点(RVVR)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和空间接头(CAAACAAC)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0353] (SEQ.No.39)-UROKIN-MMP-接头13-(TRAIL95-281)

[0354] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:65。

[0355] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:9用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:65。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner(DE3)菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0356] 实施例10.SEQ.No.10的融合蛋白

[0357] SEQ ID NO:10的蛋白是具有196个氨基酸的长度和22.4kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL119-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的23个氨基酸的爪蟾抗菌肽-2(SEQ.No.40)。

[0358] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了尿激酶切割位点(RVVR)和金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0359] (SEQ.No.40)-UROKIN-MMP-(TRAIL119-281)

[0360] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:66。

[0361] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:10用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:66。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner(DE3)菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0362] 实施例11.SEQ.No.11的融合蛋白

[0363] SEQ ID NO:11的蛋白是具有202个氨基酸的长度和23kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的14个氨基酸的合成裂解肽(SEQ.No.41)。

[0364] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、尿激酶切割位点(RVVR)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和8个精氨酸的转运序列(RRRRRRRR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0365] (TRAIL121-281)-接头10-UROKIN-MMP-TRANS3-(SEQ.No.41)

[0366] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:67。

[0367] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:11用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:67。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner(DE3)菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签(Ex.11^a)和不具有组氨酸标签(Ex.11^b)。

[0368] 实施例12.SEQ.No.12的融合蛋白

[0369] SEQ ID NO:12的蛋白是具有205个氨基酸的长度和23.2kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的14个氨基酸的合成裂解肽(SEQ.No.41)。

[0370] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GG)、PEG化接头的序列(ASGCGPEG)、空间接头序列(GGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)和多多聚精氨酸转运序列(RRRRRRRR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0371] (TRAIL121-281)-接头1-PEG2-接头

[0372] 2-MMP-UROKIN-TRANS2-(SEQ.No.41)

[0373] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:68。

[0374] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:12用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:68。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner(DE3)菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0375] 实施例13.SEQ.No.13的融合蛋白

[0376] SEQ ID NO:13的蛋白是具有228个氨基酸的长度和25.9kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL95-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的14个氨基酸的合成裂解肽(SEQ.No.41)。

[0377] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、尿激酶切割位点(RVVR)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和8个精氨酸的转运序列(RRRRRRRR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0378] (TRAIL95-281)-接头10-UROKIN-MMP-TRANS3-(SEQ.No.41)

[0379] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:69。

[0380] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:13用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:69。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner(DE3)菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签(Ex.13^a)和不具有组氨酸标签(Ex.13^b)。

[0381] 实施例14.SEQ.No.14的融合蛋白

[0382] SEQ ID NO:14的蛋白是具有192个氨基酸的长度和22.1kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的14个氨基酸的合成裂解肽(SEQ.No.41)。

[0383] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了空间接头(C)、尿激酶切割位点(RVVR)和金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)。此外在效应子肽的N末端连接有多聚组氨酸转运结构域(HHHHHH)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0384] TRANS1-(SEQ.No.41)-接头14-UROKIN-MMP-(TRAIL121-281)

[0385] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:70。

[0386] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:14用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:70。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0387] 实施例15.SEQ.No.15的融合蛋白

[0388] SEQ ID NO:15的蛋白是具有200个氨基酸的长度和23.3kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的14个氨基酸的合成裂解肽(SEQ.No.41)。

[0389] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了空间接头(C)、8个精氨酸的转运序列(RRRRRRRR)、尿激酶切割位点(RVVR)和金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)。此外在效应子肽的N末端连接有多聚组氨酸转运结构域(HHHHHH)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0390] TRANS1-(SEQ.No.41)-接头

[0391] 14-TRANS3-UROKIN-MMP-(TRAIL121-281)

[0392] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:71。

[0393] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:15用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:71。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0394] 实施例16.SEQ.No.16的融合蛋白

[0395] SEQ ID NO:16的蛋白是具有202个氨基酸的长度和23.1kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的14个氨基酸的合成裂解肽(SEQ.No.41)。

[0396] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)和8个精氨酸的转运序列(RRRRRRRR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0397] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN TRANS3-(SEQ.No.41)

[0398] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为

所附序列表中所示的SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:72。

[0399] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:16用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:72。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签 (Ex.16^a) 和不具有组氨酸标签 (Ex.16^b)。

[0400] 实施例17.SEQ.No.17的融合蛋白

[0401] SEQ ID NO:17的蛋白是具有208个氨基酸的长度和23.5kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL116-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的26个氨基酸的杂合肽天蚕抗菌肽A-蜂毒肽(SEQ.No.42)。

[0402] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了尿激酶切割位点(RVVR)和金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0403] (SEQ.No.42)-UROKIN-MMP-(TRAIL116-281)

[0404] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:73。

[0405] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:17用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:73。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0406] 实施例18.SEQ.No.18的融合蛋白

[0407] SEQ ID NO:18的蛋白是具有203个氨基酸的长度和23.6kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL116-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的27个氨基酸的肽hCAP-18/LL-37(SEQ.No.43)。

[0408] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了尿激酶切割位点(RVVR)和金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0409] (SEQ.No.43)-UROKIN-MMP-(TRAIL116-281)

[0410] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:74。

[0411] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:18用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:74。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0412] 实施例19.SEQ.No.19的融合蛋白

[0413] SEQ ID NO:19的蛋白是具有203个氨基酸的长度和23.3kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL116-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的27个氨基酸的肽BAMP-28(SEQ.No.44)。

[0414] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了尿激酶切割位点(RVVR)和金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0415] (SEQ.No.44)-UROKIN-MMP-(TRAIL116-281)

[0416] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为

所附序列表中所示的SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:75。

[0417] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:19用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:75。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0418] 实施例20.SEQ.No.20的融合蛋白

[0419] SEQ ID NO:20的蛋白是具有200个氨基酸的长度和22.8kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的24个氨基酸的来自溶组织内阿米巴的裂解肽的同种型C的类似物(SEQ.No.45)。

[0420] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGSGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和尿激酶切割位点(RVVR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0421] (TRAIL121-281)-接头6-MMP-UROKIN-(SEQ.No.45)

[0422] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:76。

[0423] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:20用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:76。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0424] 实施例21.SEQ.No.21的融合蛋白

[0425] SEQ ID NO:21的蛋白是具有200个氨基酸的长度和22.8kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的24个氨基酸的来自溶组织内阿米巴的裂解肽的同种型A的类似物(SEQ.No.46)。

[0426] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGSGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和尿激酶切割位点(RVVR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0427] (TRAIL121-281)-接头6-MMP-UROKIN-(SEQ.No.46)

[0428] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:77。

[0429] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:21用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:77。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0430] 实施例22.SEQ.No.22的融合蛋白

[0431] SEQ ID NO:22的蛋白是具有200个氨基酸的长度和22.8kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的24个氨基酸的来自溶组织内阿米巴的裂解肽的同种型B的类似物(SEQ.No.47)。

[0432] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGSGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和尿激酶切割位点(RVVR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0433] (TRAIL121-281)-接头6-MMP-UROKIN-(SEQ.No.47)

[0434] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为

所附序列表中所示的SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:78。

[0435] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:22用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:78。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0436] 实施例23.SEQ.No.23的融合蛋白

[0437] SEQ ID NO:23的蛋白是具有190个氨基酸的长度和22.1kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的12个氨基酸的流感病毒血细胞凝集素的HA2结构域的片段(SEQ.No.48)。

[0438] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了7个精氨酸的转运序列(RRRRRRRR)、尿激酶切割位点(RVVR)和金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0439] (SEQ.No.48)-TRANS2-UROKIN-MMP-(TRAIL121-281)

[0440] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:79。

[0441] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:23用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:79。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序B,使用来自Novagen的大肠杆菌BL21 (DE3) 或Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签(Ex.23^a)和不具有组氨酸标签(Ex.23^b)。

[0442] 实施例24.SEQ.No.24的融合蛋白

[0443] SEQ ID NO:24的蛋白是具有429个氨基酸的长度和48.6kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的247个氨基酸的具有磷脂酶C活性的来自产气荚膜梭菌的 α 毒素的N末端结构域的片段(SEQ.No.49)。

[0444] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了空间接头(G)、空间接头(GGGGGS)、PEG化接头(ASGCGPE)和空间接头(GGGGGS)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0445] (SEQ.No.49)-接头15-接头5-PEG2-接头5-(TRAIL121-281)

[0446] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:80。

[0447] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:24用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:80。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0448] 实施例25.SEQ.No.25的融合蛋白

[0449] SEQ ID NO:25的蛋白是具有658个氨基酸的长度和73kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的468个氨基酸的肽李斯特菌溶胞素O(SEQ.No.50)。

[0450] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了空间接头(G)、空间接头(GGGSGGGGS)、furin切割位点(RKKR)、PEG化接头(ASGCGPEG)和空间接头序列(GGGGS)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0451] (SEQ.No.50)-接头15-接头9-furin-PEG2-接头5-(TRAIL121-281)

[0452] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:81。

[0453] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:25用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:81。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0454] 实施例26.SEQ.No.26的融合蛋白

[0455] SEQ ID NO:26的蛋白是具有478个氨基酸的长度和54kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的289个氨基酸的磷脂酶PC-PLC (SEQ.No.51)。

[0456] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了空间接头(GGGSGGGGS)、furin切割位点(RKKR)、PEG化接头(ASGCGPEG)和空间接头(GGGGS)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0457] (SEQ.No.51)-接头9-furin-PEG2-接头5-(TRAIL121-281)

[0458] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:82。

[0459] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:26用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:82。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0460] 实施例27.SEQ.No.27的融合蛋白

[0461] SEQ ID NO:27的蛋白是具有361个氨基酸的长度和40.2kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的179个氨基酸的equinatoxin EqTx-II (SEQ.No.52)。

[0462] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了空间接头(GGGGS)、furin切割位点(RKKR)、PEG化接头(ASGCGPE)和空间接头(GGGGS)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0463] (SEQ.No.52)-接头4-furin-PEG1-接头4-(TRAIL121-281)

[0464] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:83。

[0465] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:27用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:83。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序B,使用来自Novagen的大肠杆菌BL21 (DE3) 或Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0466] 实施例28.SEQ.No.28的融合蛋白

[0467] SEQ ID NO:28的蛋白是具有227个氨基酸的长度和25.5kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL116-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的46个氨基酸的肽酶寄生毒肽A3(VtA3)(SEQ.No.53)。

[0468] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)和空间接头(GGSGG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0469] (SEQ.No.53)-MMP-UROKIN-接头6-(TRAIL116-281)

[0470] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:84。

[0471] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:28用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:84。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner(DE3)菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0472] 实施例29.SEQ.No.29的融合蛋白

[0473] SEQ ID NO:29的蛋白是具有224个氨基酸的长度和24.9kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的46个氨基酸的肽酶寄生毒肽A3(VtA3)(SEQ.No.53)。

[0474] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGSGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0475] (TRAIL121-281)-接头7-MMP-UROKIN-(SEQ.No.53)

[0476] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:85。

[0477] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:29用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:85。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner(DE3)菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0478] 实施例30.SEQ.No.30的融合蛋白

[0479] SEQ ID NO:30的蛋白是具有200个氨基酸的长度和22.5kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的33个氨基酸的人穿孔素的活性片段(SEQ.No.54)。

[0480] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头序列(GGGGSG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0481] (TRAIL121-281)-接头8-(SEQ.No.54)

[0482] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:86。

[0483] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:30用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:86。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner(DE3)菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0484] 实施例31.SEQ.No.31的融合蛋白

[0485] SEQ ID NO:31的蛋白是具有210个氨基酸的长度和23.5kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的33个氨基酸的人穿孔素的活性片段(SEQ.No.54)。

[0486] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSG)、尿激酶切割位点(RVVR)和金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0487] (TRAIL121-281)-接头8-UROKIN-MMP-(SEQ.No.54)

[0488] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:87。

[0489] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:31用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:87。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序B,使用来自Novagen的大肠杆菌BL21 (DE3) 或Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0490] 实施例32.SEQ.No.32的融合蛋白

[0491] SEQ ID NO:32的蛋白是具有436个氨基酸的长度和48kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL116-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的251个氨基酸的来自苏云金芽孢杆菌的巴拉波任-2 (SEQ.No.55)。

[0492] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了尿激酶切割位点(RVVR)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和空间接头(GSGGGSGGG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0493] (SEQ.No.55)-UROKIN-MMP-接头11-(TRAIL116-281)

[0494] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:88。

[0495] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:32用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:88。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序B,使用来自Novagen的大肠杆菌BL21 (DE3) 或Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0496] 实施例33.SEQ.No.33的融合蛋白

[0497] SEQ ID NO:33的蛋白是具有215个氨基酸的长度和24.3kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的32个氨基酸的包含EGF抑制剂和合成裂裂解肽的融合肽(SEQ.No.56)。

[0498] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(G)、空间接头(CAACAAAC)、空间接头(GGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和尿激酶切割位点(RVVR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0499] (TRAIL121-281)-接头15-接头12-接头2-MMP-UROKIN-(SEQ.No.56)

[0500] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:89。

[0501] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:33用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:89。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序

通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达具有组氨酸标签。

[0502] 实施例34.SEQ.No.91的融合蛋白

[0503] SEQ ID NO:91的蛋白是具有223个氨基酸的长度和25.2kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的39个氨基酸的包含PDGFR抑制剂和合成裂解肽的融合肽(SEQ.No.125)。

[0504] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了尿激酶切割位点(RVVR)和金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、空间接头(GG)、空间接头(CAAACAAC)和空间接头(SGG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0505] (SEQ.No.125)-UROKIN-MMP-接头1-接头13-接头16-(TRAIL121-281)

[0506] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:108。

[0507] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:91用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:108。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner(DE3)菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0508] 实施例35.SEQ.No.92的融合蛋白

[0509] SEQ ID NO:92的蛋白是具有223个氨基酸的长度和25.6kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL95-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的14个氨基酸的融合合成裂解肽(SEQ.No.41)。

[0510] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了多聚精氨酸转运结构域(RRRRRRRR)、furin切割位点(RKKR)、空间接头(GGG)和空间接头(CAAACAAC)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0511] (SEQ.No.41)-TRANS2-furin-接头2-接头13-(TRAIL95-281)

[0512] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:109。

[0513] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:92用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:109。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner(DE3)菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。

[0514] 蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0515] 实施例36SEQ.No.93的融合蛋白

[0516] SEQ ID NO:93的蛋白是具有232个氨基酸的长度和26.7kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL95-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的N末端的14个氨基酸的融合合成裂解肽(SEQ.No.41)。

[0517] 此外,在结构域(b)与结构域(a)之间,连续地插入了多聚精氨酸转运结构域(RRRRRRRR)、furin切割位点(RKKR)、天然furin切割位点(HRQPRGWEQ)、空间接头(GGG)和空间接头(CAAACAAC)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0518] (SEQ.No.41)-TRANS2-furin-FURN.NAT-接头2-接头13-(TRAIL95-281)

[0519] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为

所附序列表中所示的SEQ ID NO:93和SEQ ID NO:110。

[0520] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:93用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:110。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0521] 实施例37.SEQ.No.94的融合蛋白

[0522] SEQ ID NO:94的蛋白是具有207个氨基酸的长度和23kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的14个氨基酸的融合合成裂解肽(SEQ.No.41)。

[0523] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)、转运结构域(YARAAARQARA)和空间接头(GG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0524] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-TRANS4-接头1-(SEQ.No.41)

[0525] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:111。

[0526] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:94用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:111。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0527] 实施例38SEQ.No.95的融合蛋白

[0528] SEQ ID NO:95的蛋白是具有218个氨基酸的长度和24.4kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的25个氨基酸的pleurocidine类似物(SEQ.No.126)。

[0529] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)、转运结构域(YARAAARQARA)和空间接头(GG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0530] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-TRANS4-接头1-(SEQ.No.126)

[0531] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:112。

[0532] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:95用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:112。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0533] 实施例39SEQ.No.96的融合蛋白

[0534] SEQ ID NO:96的蛋白是具有219个氨基酸的长度和24.5kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的26个氨基酸的pleurocidine类似物(SEQ.No.127)。

[0535] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)、转运结构域(YARAAARQARA)和空间接头

(GG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0536] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-TRANS4-接头1-(SEQ.No.127)

[0537] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:96和SEQ ID NO:113。

[0538] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:96用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:113。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0539] 实施例40SEQ.No.97的融合蛋白

[0540] SEQ ID NO:97的蛋白是具有212个氨基酸的长度和23.9kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的17个氨基酸的合成裂解肽(SEQ.No.128)。

[0541] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)、转运结构域(THRPPMWSPWP)和空间接头(GGG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0542] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-TRANS5-接头2-(SEQ.No.127)

[0543] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:114。

[0544] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:97用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:114。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0545] 实施例41SEQ.No.98的融合蛋白

[0546] SEQ ID NO:98的蛋白是具有207个氨基酸的长度和23.3kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的14个氨基酸的合成裂解肽(SEQ.No.41)。

[0547] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)、转运结构域(YGRKKRRQRRR)和空间接头(GG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0548] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-TRANS6-接头1-(SEQ.No.41)

[0549] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:115。

[0550] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:98用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:115。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0551] 实施例42.SEQ.No.99的融合蛋白

[0552] SEQ ID NO:99的蛋白是具有207个氨基酸的长度和24kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端

的31个氨基酸的合成肽 (SEQ.No.129)。

[0553] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和尿激酶切割位点(RVVVR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0554] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-(SEQ.No.129)

[0555] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:116。

[0556] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:99用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:116。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0557] 实施例43.SEQ.No.100的融合蛋白

[0558] SEQ ID NO:100的蛋白是具有210个氨基酸的长度和24.1kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的17个氨基酸的合成肽 (SEQ.No.130)。

[0559] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和尿激酶切割位点(RVVVR)、转运结构域(YGRKKRRQRRR)和空间接头(GG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0560] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-TRANS6-接头1-(SEQ.No.130)

[0561] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:100和SEQ ID NO:117。

[0562] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:100用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:117。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0563] 实施例44.SEQ.No.101的融合蛋白

[0564] SEQ ID NO:101的蛋白是具有211个氨基酸的长度和23.7kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的29个氨基酸的合成裂解肽 (SEQ.No.131)。

[0565] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)以及尿激酶切割位点(RVVVR)和空间接头(GG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0566] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-接头1-(SEQ.No.131)

[0567] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:101和SEQ ID NO:118。

[0568] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:101用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:118。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0569] 实施例45.SEQ.No.102的融合蛋白

[0570] SEQ ID NO:102的蛋白是具有234个氨基酸的长度和26.2kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的两个结构域(b)为依次连接于结构域(a)的C末端的25个氨基酸的蜂毒肽(SEQ.No.132)和14个氨基酸的裂解肽(SEQ.No.41)。

[0571] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)以及尿激酶切割位点(RVVR)和空间接头(GG)。另外,在两个效应子结构域之间插入了空间接头(GGGGS)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0572] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-接头1-(SEQ.No.132)-接头4-(SEQ.No.41)

[0573] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:102和SEQ ID NO:119。

[0574] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:102用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:119。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0575] 实施例46SEQ.No.103的融合蛋白

[0576] SEQ ID NO:103的蛋白是具有205个氨基酸的长度和23kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的25个氨基酸的蜂毒肽(SEQ.No.132)。

[0577] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)和尿激酶切割位点(RVVR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0578] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-(SEQ.No.132)

[0579] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:103和SEQ ID NO:120。

[0580] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:103用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:120。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0581] 实施例47SEQ.No.104的融合蛋白

[0582] SEQ ID NO:104的蛋白是具有215个氨基酸的长度和24.5kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的25个氨基酸的蜂毒肽(SEQ.No.132)。

[0583] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)、多聚精氨酸转运结构域(RRRRRRRR)和空间接头(GG)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0584] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-TRANS3-接头1-(SEQ.No.132)

[0585] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:121。

[0586] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:104用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:121。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般

程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0587] 实施例48.SEQ.No.105的融合蛋白

[0588] SEQ ID NO:105的蛋白是具有215个氨基酸的长度和24.4kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的25个氨基酸的蜂毒肽(SEQ.No.132)。

[0589] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG),金属蛋白酶切割位点(PLGLAG),尿激酶切割位点(RVVR)和空间接头(GG)。另外,结构域(b)的C末端连接了多聚精氨酸转运结构域(RRRRRRRR),形成整个构建体的C-末端片段。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0590] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-接头1-(SEQ.No.132)-TRANS3

[0591] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:122。

[0592] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:105用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:122。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。

[0593] 蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0594] 实施例49.SEQ.No.106的融合蛋白

[0595] SEQ ID NO:106的蛋白是具有203个氨基酸的长度和23.3kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的15个氨基酸的合成裂解肽(SEQ.No.35)。

[0596] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG)、金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)和多聚精氨酸转运结构域(RRRRRRRR)。因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0597] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-TRANS3-(SEQ.No.35)

[0598] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:106和SEQ ID NO:123。

[0599] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:106用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:123。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0600] 实施例50.SEQ.No.107的融合蛋白

[0601] SEQ ID NO:107的蛋白是具有208个氨基酸的长度和23.7kDa的质量的融合蛋白,其中结构域(a)为TRAIL121-281的序列,并且效应子肽的结构域(b)为连接于结构域(a)的C末端的15个氨基酸的合成裂解肽(SEQ.No.35)。

[0602] 此外,在结构域(a)与结构域(b)之间,连续地插入了空间接头(GGGGSGGGG),金属蛋白酶切割位点(PLGLAG)、尿激酶切割位点(RVVR)、转运结构域(YGRKKRRQRRR)和空间接头(GG)。

[0603] 因此,本发明的融合蛋白的结构如下:

[0604] (TRAIL121-281)-接头10-MMP-UROKIN-TRANS6-接头1-(SEQ.No.35)

[0605] 氨基酸序列和包含针对在大肠杆菌中表达而优化的密码子的DNA编码序列分别为所附序列表中所示的SEQ ID NO:107和SEQ ID NO:124。

[0606] 上述结构的氨基酸序列SEQ ID NO:107用作模板以产生其编码DNA序列SEQ ID NO:124。产生包含DNA的编码序列的质粒,根据上述一般程序进行融合蛋白的过表达。根据上述一般程序A,使用来自Novagen的大肠杆菌Tuner (DE3) 菌株进行过表达。根据上述一般程序通过电泳分离蛋白。蛋白质经表达不具有组氨酸标签。

[0607] 实施例51.融合蛋白的抗肿瘤活性的测定

[0608] 在体外在肿瘤细胞系中在细胞毒性测定中以及在体内在小鼠中进行了融合蛋白的抗肿瘤活性的测定。为了比较目的,使用了rhTRAIL 114-281蛋白和安慰剂。

[0609] 1.圆二色性(circular dichroism)测定:获得的蛋白质的二级结构组成的测定

[0610] 通过Ex.23、Ex.11和Ex.13的融合蛋白的圆二色性测定融合蛋白的制备物的质量(就它们的结构而言)。

[0611] 圆二色性用于测定蛋白质的二级结构和构象。CD方法使用蛋白结构的光学活性,表现为使光偏振平面旋转和椭圆偏振的出现。远紫外(UV)中的蛋白的CD光谱提供了关于主要多肽链的构象的精确数据。

[0612] 透析

[0613] 将待分析的蛋白的样品在配制于由50mM Tris-HCl pH8.0,100mM NaCl,10%甘油,0.1mM ZnCl₂,80mM蔗糖,5mM DTT组成的缓冲液后于具有12kD截留值的透析袋(Sigma-Aldrich)中透析。针对相对于蛋白制剂100倍过量(v/v)的缓冲液进行透析,同时搅拌,在4℃持续数个小时。透析完成之后,将每个制剂离心(25000rpm,10min,4℃),收集上清液。通过Bradford法测定由此获得的样品中的蛋白浓度。

[0614] 在Jasco J-710分光偏振计中,在具有0.2mm或1mm光程的石英杯中进行浓度范围为0.1-2.7mg/ml的蛋白的圆二色性测定。在71/min的氮气流下进行该测定,这允许在195至250nm波长范围内进行测定。测量参数:光谱分辨率-1nm;光束的半宽1nm;灵敏性20mdeg,一个波长的平均时间-8s,扫描速度10nm/min。

[0615] 使用CDPro软件在193-250nm范围内对获得的光谱进行数值分析。忽略掉光电倍增管中的电压超过700V的点,因为该波长范围内的信噪比太低。

[0616] 获得的数据用于计算所分析的蛋白质中的特定二级结构含量,使用CDPro软件(表1)。

[0617] 表1:所分析的蛋白质中的二级结构的含量

[0618]

蛋白质	NRMSD (Exp-Cal)	α -螺旋	β -层	Schift	无序
Ex. 23	0.149	3.7%	42.0%	21.1%	33.2%
Ex. 11	0.079	25.1%	22.7%	21.2%	30.9%
Ex. 13	0.047	15.0%	32.2%	20.6%	32.2%
hTRAIL*		1.94%	50.97%	7.74%	39.35%
hTRAIL	0.389	4.9%	33.7%	23.1%	38.3%

[0619] *基于晶体结构1D4V获得的值

[0620] **基于晶体结构1IKQ、1R4Q、1ABR、3PX8获得的值

[0621] 对照分子 (rhTRAIL114-281) 显示出蛋白的特征性CD光谱, 主要类型为 β -层结构 (在220nm的波长处锐利刻画出最小椭圆率)。这确认了二级结构成分的计算, 表明有少量的 α -螺旋元件。

[0622] 获得的结果与来自hTRAIL蛋白的晶体结构和本发明的融合蛋白 (Ex. 23) 的特征的数据也是一致的, 其中 β 元件构成42%的其结构。对于Ex. 11和Ex. 13的蛋白质, 观察到更高的 α -螺旋含量 (在波长208nm处光谱的另外的最小值)。这归因于具有强两亲性特征并形成 α -螺旋样结构的KLAKLAK基序在构建体中的存在。不幸地, 由于来自Ex. 23、Ex. 11和Ex. 13的蛋白质在用于CD测量的缓冲液中的低稳定性以及分析的制备物的低浓度, 它们的光谱的特征在于高噪声水平和具有低分辨率。因此, 它们可能不能完全反映实际情况, 并且仅提示该结果。

[0623] 2. 对体外细胞系的测试[0624] 细胞系

[0625] 细胞系获自ATCC和CLS, 随后进行增殖, 并保藏在Adamed's Laboratory of Biology Cell Line Bank。在实验过程中, 使用试剂盒 **Venor®** GeM Mycoplasma PCR Detection Kit (Minerva Biolabs, Berlin, Germany) 通过PCR技术常规地检查细胞的支原体的存在。在标准条件: 37°C, 5% CO₂ (在DMEM的情况下-10% CO₂) 和85% 相对湿度下维持培养物。将特定细胞系培养在由ATCC推荐的适当的培养基中。

[0626] 表2. 粘附性细胞

[0627]

细胞系	癌症类型	培养基	每孔细胞数 (千)
Colo 205 ATCC #CCL-222	人结直肠癌	RPMI+10% FBS+青霉素+ 链霉素	5
HT-29 ATCC # CCL-2	人结直肠癌	McCoy's+10% FBS+青霉素 +链霉素	5
DU-145 ATCC # HTB-81	人前列腺癌	RPMI+10% FBS+青霉素+ 链霉素	3
PC-3 ATCC # CRL-1435	人前列腺癌	RPMI+10% FBS+青霉素+ 链霉素	4
MCF-7 ATCC #HTB-22	人乳腺癌	MEM+10% FBS+青霉素+链 霉素	4.5
MDA-MB-231 ATCC # HTB-26	人乳腺癌	DMEM+10% FBS+青霉素+ 链霉素	4.5

[0628]

MDA-MB-435s ATCC# HTB-129	人乳腺癌	DMEM+10% FBS+青霉素+ 链霉素	4
UM-UC-3 ATCC # CLR-1749	人膀胱癌	MEM+10% FBS+青霉素+链 霉素	3.5
SW780 ATCC #CRL-2169	人膀胱癌	DMEM+10% FBS+青霉素+ 链霉素	3
SW620 ATCC #CCL-227	人结直肠癌	DMEM+10% FBS+青霉素+ 链霉素	5
BxPC-3 ATCC #CRL-1687	人胰腺癌	RPMI+10% FBS+青霉素+ 链霉素	4.5
SK-OV-3 ATCC # HTB-77	人卵巢癌	McCoy's+10% FBS+青霉素 +链霉素	4
NIH: OVCAR-3 ATCC #HTB-161	人卵巢癌	RPMI+20% FBS+0,01mg/ml 胰岛素+青霉素+链霉素	7
HepG2 ATCC # HB-8065	人肝癌	MEM+10% FBS+青霉素+链 霉素	7
293 ATCC # CLR-1573	人胚肾细胞	MEM+10% FBS+青霉素+链 霉素	4

[0629]

ACHN ATCC #CCL-222	人肾癌	MEM+10% FBS+青霉素+链霉素	4
CAKI 1 ATCC #HTB-46	人肾癌	McCoy's+10% FBS+青霉素+链霉素	3.5
CAKI 2 ATCC # HTB-47	人肾癌	McCoy's+10% FBS+青霉素+链霉素	3.5
NCI- H69AR ATCC #CRL-11351	人小细胞肺癌	RPMI+10% FBS+青霉素+链霉素	10
HT144 ATCC # HTB-63	人黑色素瘤细胞	McCoy's+10% FBS+青霉素+链霉素	7
NCI-H460 ATCC #HTB-177	人肺癌	RPMI+10% FBS+青霉素+链霉素	2.5
A549 ATCC # CCL-185	人肺癌	RPMI+10% FBS+青霉素+链霉素	2.5
MES-SA ATCC # CRL-1976	人子宫肉瘤	McCoy's+10% FBS+青霉素+链霉素	3.5
MES-SA/Dx5 ATCC #CRL-1977	多重耐药人子宫肉瘤	McCoy's+10% FBS+青霉素+链霉素	4

[0630]

MES-SA/Mx2 ATCC #CRL-2274	人子宫肉瘤	Waymouth's MB 752/1+McCoy's (1 : 1) + 10% FBS+青霉素+链霉素	4
SK-MES-1 ATCC # HTB-58	人肺癌	MEM+10% FBS+青霉素+链 霉素	5
HCT-116 ATCC # CCL-247	人结直肠癌	McCoy's+10% FBS+青霉素 +链霉素	3
MCF10A ATCC # CRL-10317	乳房上皮细胞	DMEM:F12+5%马血浆+0.5 μg/ml 氢化可的松+10 μg/ml 胰岛素+20 ng/ml 生长因子 EGF	5
Panc-1 CLS 330228	人胰腺癌	DMEM+10% FBS+青霉素+ 链霉素	5
Panc03.27 ATCC # CRL-2549	人胰腺癌	RPMI+10% FBS+青霉素+ 链霉素	5
PLC/PRF/5 CLS 330315	人肝癌	DMEM+10% FBS+青霉素+ 链霉素	5
LNCaP ATCC # CRL-1740	人前列腺癌	RPMI+10% FBS+青霉素+ 链霉素	4.5
SK-Hep-1 CLS300334	人肝癌	RPMI+10% FBS+青霉素+ 链霉素	10
A498 CLS 300113	人肾癌	MEM+10% FBS+青霉素+链 霉素	3

[0631]

HT1080 ATCC #CCL-121	人纤维肉瘤	MEM+10% FBS+青霉素+链霉素	3
HUV-EC-C ATCC # CRL-1730	人脐静脉内皮细胞	M199+20% FBS+青霉素 +0,05 mg/ml ECGS+0,1 mg/ml 肝素+青霉素+链霉素	8.5

[0632] 表3.非粘附性细胞:

[0633]

细胞系	癌症类型	培养基	每孔的细胞数(千)
NCI-H69 ATCC # HTB-119	人小细胞肺癌	RPMI+10% FBS+青霉素 +链霉素	22
Jurkat A3 ATCC #CRL-2570	人白血病	RPMI+10% FBS +青霉素+链霉素	10
HL60 ATCC # CCL-240	人白血病	RPMI+20% FBS +青霉素+链霉素	10
CCRF-CEM ATCC # CCL-119	人白血病	RPMI+20% FBS +青霉素+ 链霉素	10

[0634] MTT细胞毒性测试

[0635] MTT测试法是用于测定细胞增殖、存活性和细胞毒性的比色测定法。其在于黄色的四唑盐MTT (4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基溴化四唑) 通过线粒体酶琥珀酸盐-四唑还原酶1分解为不溶于水的紫色染料甲瓖。MTT还原仅在活细胞中发生。数据分析:测定蛋白质的IC₅₀浓度 (ng/ml), 即相对于对照细胞, 经处理的群体中的细胞数目减少50%时的蛋白浓度。使用GraphPad Prism5.0软件分析结果。根据文献中的描述进行测试 (Celis, JE, (1998). Cell Biology, a Laboratory Handbook, second edition, Academic Press, San

Diego;Yang,Y.,Koh,LW,Tsai,JH.,(2004);Involvement of viral and chemical factors with oral cancer in Taiwan,Jpn J Clin Oncol,34(4),176-183)。

[0636] 将细胞培养基稀释至确定的密度(10^4 – 10^5 个细胞/100 μ l)。然后将100 μ l适当稀释的细胞悬浮液加至96孔板中,一式三份。将所制备的细胞在37℃在5%或10%CO₂(取决于所用的培养基)中温育24小时,然后向细胞(在100 μ l培养基中)中再加入100 μ l含有各种浓度的测试蛋白的培养基。将细胞与测试蛋白温育72小时,相当于3-4次细胞分裂,然后向含有测试蛋白的培养基中加入20ml MTT工作溶液[5mg/ml],并在37℃在5%CO₂中温育3小时。然后除去含有MTT溶液的培养基,通过加入100 μ l DMSO溶解甲瓚晶体。搅拌之后,在570nm(参考滤波器690nm)测定吸收值。

[0637] EZ4U细胞毒性测试

[0638] EZ4U(Biomedica)测试用于测定非粘附性细胞系中的蛋白质的细胞毒性活性。该测试是MTT法的改进形式,其中还原四唑盐而形成的甲瓚是可溶于水的。将细胞与蛋白(7个蛋白浓度,每个一式三份)连续温育72小时之后进行细胞存活性研究。基于此,使用GraphPadPrism5软件测定IC₅₀值(两次独立实验的平均值)。对照细胞仅用溶剂温育。

[0639] 体外细胞毒性测试的结果以IC₅₀值(ng/ml)总结,IC₅₀值对应于:相对于仅以溶剂处理的对照细胞,在50%水平观察到融合蛋白的细胞毒性效应时的蛋白浓度。每个实验代表以一式三份进行的至少2次独立实验的平均值。作为缺乏蛋白质制剂活性的标准,采用了2000ng/ml的IC₅₀限值。具有大于2000的IC₅₀值的融合蛋白被认为是无活性的。

[0640] 被选择用于此测试的细胞包括对于TRAIL蛋白具有天然抗性的肿瘤细胞系(对于TRAIL的天然抗性的标准:对于TRAIL蛋白的IC₅₀>2000),以及对于TRAIL蛋白敏感的肿瘤细胞系,对于多柔比星有抗性的细胞系MES-SA/DX5作为对于常规抗癌药物有抗性的癌细胞系。

[0641] 未分化的HUVCEC细胞系用作健康对照细胞系,用于估量融合蛋白对于非癌细胞的影响/毒性。

[0642] 获得的结果确认了通过向对于TRAIL具有天然抗性的细胞施用本发明的某些融合蛋白而克服细胞系对于TRAIL的抗性的可能性。当将本发明的融合蛋白施用于对于TRAIL敏感的细胞时,在一些情况下观察到作用效力的明显的、强烈的加强,这表现为融合蛋白的IC₅₀值相对于单独的TRAIL的IC₅₀降低。此外,在对于常规抗癌药多柔比星有抗性的细胞中获得了本发明的融合蛋白的细胞毒性活性,在一些情况下其比单独的TRAIL的活性更强。

[0643] 对于非癌细胞系所获得的大于2000的IC₅₀值显示:对于健康细胞使用本发明的蛋白,不存在毒性效应,这表明这些蛋白的潜在的低系统性毒性。

[0644] 选择的蛋白质制剂对于扩展的肿瘤细胞系小组的细胞毒性活性的测定

[0645] 表4显示了选择的本发明的融合蛋白针对来自不同器官的一大组肿瘤细胞(对应于宽范围的多数常见癌症)的体外细胞毒性活性测试结果。

[0646] 实验结果表示为平均值±标准差(SD)。使用GraphPad Prism5.0软件产生所有计算和图表。

[0647] 获得的IC₅₀值确认了融合蛋白的高细胞毒性活性,由此确认了它们对于治疗癌症的潜在有用性。

[0648]

表 4. 本发明的融合蛋白的细胞毒性活性

蛋白质	将制剂与细胞持续温育 72 小时(测试 MTT, ng/ml)											
	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1	
	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD
rhTRAIL95-281	>10000		7557	3454	>10000		>10000		29.15	12.66	39.35	8.13
Ex. 11 ^a	115.5	60.1	6.81	4.13	103.02	18.07	7.3	1.67	1.46	0.46	1.93	0.37
Ex. 13 ^a	909.35	169.21	112		750.5	156.27	110.85	9.69			29.04	0.65
Ex. 2 ^a	170.50	7.78	45.45	14.78			26.20	6.16	2.902	0.36	8.39	3.21
Ex. 6 ^a	915.2		205.8		995.7		126.1					
Ex. 23 ^a	1054.7	406.3	1054.7	406.3	245.45	25.67			48.06	1.75	22.1	0.18
Ex. 7 ^a			9.465									
Ex. 8 ^a			3.894				101.3		0.5475		2.058	
Ex.3 ^a			1878.5	171								
	NCI-H460											
rhTRAIL95-281	5889	111										
Ex. 6 ^a	96.85											
Ex.2 ^a	23.50	3.54										

[0649]

表 4a. 本发明的融合蛋白的细胞毒性活性

蛋白质	将制剂与细胞持续温育 72 小时(测试 MTT, ng/ml)											
	COLO 205		DU 145		MDA-MB-231		PC 3		SW 620		SW 780	
	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD
rhTRAIL95-281												
Ex. 11 ^a	0.42	0.57	4.74	0.104	12.54	0.74	948	42.43	735.25	45.89	0.79	0.41
	UM-UC-3		HT 29		293		ACHN		CAKI 2		BxPC3	
TRAIL 95-281	2242	1367	>10000		>10000		>10000		>10000		64.71	31.81
Ex. 11 ^a	0.64	0.04	4185.5	981	1152	77.78	4.86	1.06	25.42	3.22	0.43	0.114
	HepG2		HT 144		NCI-H460		LNCaP		OV-CAR-3		JURKAT A3	
rhTRAIL 95-281	>10000		1730	218.5	5889	111	2052	466	963.00	144.25	>10000	
Ex. 11 ^a	5.63	0.45	0.26	0.065	1.8	0.34	408.15	11.8	0.114	0.07	0.29	0.24
	PLC/PRF/5		PANC-1		NCI-H460							
rhTRAIL95-281	>9000		>10000		5889	111						
Ex. 11 ^a	436.8		142.25	56.78								
Ex.8 ^a					5.897							

[0650]

表 4b. 本发明的融合蛋白的细胞毒性活性

蛋白质	将制剂与细胞持续温育 72 小时 (测试 MTT, ng/ml)											
	A549		MCF10A		HCT116		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1	
	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD
TRAIL 95-281	>2000		>2000		>2000		>2000		27.59	13.34	100.7	26.4
Ex. 6 ^b	915		996		206		126		56.2		53.3	
Ex. 23 ^b	550		1342		245	26	99		48.1	1.8	22.11	0.18
Ex. 16 ^b	10.96	2.14	4.71	1.26	1.5	0.19	0.08	0.07	0.0001		0.06	0.03
Ex. 2 ^b	171	8			45.5	14.8	26.2	6.2	2.9	0.36	8.39	3.21
Ex. 7 ^b			>2000		9.47				3.48		7.2	
Ex. 8 ^b			>2000		3.89		101		0.55		2.06	
Ex. 11 ^b	89.2	11.1			13.73	1.34						
Ex. 13 ^b	405											

[0651]

表 4c. 本发明的融合蛋白的细胞毒性活性

蛋白质	将制剂与细胞持续温育 72 小时(测试 MTT, ng/ml)											
	SW620		Panc-1		PLC/PRF/5		HT-29		Caki-1		SK-HEP-1	
	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD
TRAIL 95-281	>2000		>2000		>2000		>2000		13.42	2.16	>2000	
Ex. 11 ^b	325	24	10.87	1.8	46.4	20	893		11.57		75.1	11.3
Ex. 16 ^b	1688	917	0.68	0.93	2.89	2.02	1063	480	3.29	1.44	4.27	2.36
Ex. 13 ^b	4.42		26		5.8							
	Caki-2		SK-OV-3		BxPC-3		HT-144		OV-CAR-3		HT-1080	
	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD
TRAIL 95-281	>2000		>2000		60.6	22.8	1134	375	963	144	>2000	
Ex. 16 ^b	3.54	0.52	161.2	1.8	0.55	0.12	0.13	0.05	0.12		1025	395
	MES-SA/Mx2		Colo205		MCF-7		MDA-MB-231		MDA-MB-435S		ACHN	
	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD
TRAIL 95-281	38.95	6.14	59.02	21.16	>2000		>2000		>2000		>2000	
Ex. 16 ^b	0.0001		0.48	0.65	1.74	0.51	1.71	1.19	0.86	1.08	0.38	0.32

[0652]

表 4d. 本发明的融合蛋白的细胞毒性活性

蛋白质	将制剂与细胞持续温育 72 小时(测试 MTT, ng/ml)											
	NCI-H460		HepG2		Panc03.27		A498		HUV-EC-C			
	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD
TRAIL 95-281	438	77	>2000		315		1611	103	>2000			
Ex. 16 ^b	0.47	0.22	11.27	1.3	11.3	0.4	0.06	0.07	>2000			
Ex. 13 ^b	6,78		13									
Ex. 11 ^b					42.1	17.4	2.6	0.15				
Ex. 7 ^b	15.8											
Ex. 8 ^b	5.9											

[0653] 3. 融合蛋白在体内对异种移植物的抗肿瘤有效性

[0654] 在人结肠癌Colo205和HCT-116、人肺癌A549和NCI-H460-Luc、人前列腺癌PC-3、人

胰腺癌Panc-1和MIA PaCa-2、人肝癌PCL/PRF/5和HepG2,以及人多药耐药性MES子宫肉瘤-SA.Dx5的小鼠模型中测试蛋白质制剂的抗肿瘤活性。

[0655] 细胞

[0656] 将人肺癌A549和NCI-H460-Luc2以及人前列腺癌PC3的细胞维持于补充了10%胎牛血清和2mM谷氨酰胺的RPMI1640培养基 (HyClone, Logan, UT, USA) 中。

[0657] 将人结肠癌Co1o205的细胞维持于补充了10%胎牛血清和2mM谷氨酰胺的RPMI1640培养基 (HyClone, Logan, UT, USA) (任选地以1:1比例与Opto-MEM (Invitrogen, Cat. 22600-134) 混合) 中。

[0658] 将人胰腺癌PANC-1、人肝癌PCL/PRF/5、胰腺癌MIA PaCa-2和人结肠癌SW-620的细胞维持于补充了10%胎牛血清和2mM谷氨酰胺的DMEM培养基 (HyClone, Logan, UT, USA) 中。

[0659] 将人结肠癌HCT-116的细胞维持于补充了10%胎牛血清和2mM谷氨酰胺的McCoy's培养基 (HyClone, Logan, UT, USA) 中。

[0660] 将多重耐药MES子宫肉瘤-SA.Dx5的细胞维持于补充了10%胎牛血清和2mM谷氨酰胺和1μM盐酸多柔比星 (Sigma, Cat.No.D1515-10MG) 的McCoy's培养基 (HyClone, Logan, UT, USA) 中。在小鼠移植前3天,将细胞培养在无多柔比星的培养基中。

[0661] 将人肝癌HepG2的细胞维持于补充了10%胎牛血清和2mM谷氨酰胺的MEM培养基 (HyClone, Logan, UT, USA) 中。在小鼠移植之日,通过以胰蛋白酶 (Invitrogen) 洗涤细胞将细胞从支持物分离下来,然后将细胞在1300rpm, 4℃离心8分钟,悬于HBSS缓冲液 (Hanks培养基) 中。

[0662] 在小鼠移植之日,通过以胰蛋白酶 (Invitrogen) 洗涤细胞将细胞从支持物分离下来,然后将细胞在1300rpm, 4℃离心8分钟,悬于HBSS缓冲液 (Hanks培养基) 中。

[0663] 小鼠

[0664] 在获自 **Białystok** 的Centrum Medycyny **Doświadczalnej** 的4-6周龄Cby.Cg-foxn1 (nu) /J小鼠 (肺癌模型)、或9-10周龄小鼠 (前列腺癌模型)、获自Charles River Germany的4-5周龄雌性Cr1:SH0-Prkdc^{scid}Hr^h小鼠中进行本发明的蛋白的抗肿瘤活性测定。将小鼠保持于特定的无病原体条件下,自由获取食物和去矿物水 (随意)。所有的动物实验根据下列指引进行:“Interdisciplinary Principles and Guidelines for the Use of Animals in Research, Marketing and Education”,由New York Academy of Sciences' Ad Hoc Committee on Animal Research颁布并由IV Local Ethics Committee on Animal Experimentation in Warsaw (No.71/2009) 批准。

[0665] 实验进程和评价

[0666] 使用电子卡尺测定肿瘤大小,使用公式 $(a^2 \times b)/2$ 计算肿瘤体积,其中a=肿瘤的较短的对角线 (mm), b=肿瘤的较长的对角线 (mm)。使用下列公式计算肿瘤生长的抑制:

[0667] $TGI [\%] (\text{肿瘤生长抑制}) = (WT/WC) \times 100 - 100\%$

[0668] 其中WT是指处理组中的平均肿瘤体积,WC是指对照组中的平均肿瘤体积。

[0669] 实验结果表示为平均值±标准偏差 (SD)。使用GraphPad Prism 5.0软件进行所有计算和作图。

[0670] 肺癌模型c

[0671] 实验A.

[0672] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cby.Cg-foxn1(nu)/J小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml的HBSS:基质胶4:1的混合物中的 5×10^6 个A549细胞。在实验的第19天,将小鼠随机化以获得 $\sim 75\text{mm}^3$ 的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.11^a(15mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281(20mg/kg)作为对比,注射用水作为对照。每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次,每天一次。在实验的第35天,通过破坏脊髓杀死小鼠。

[0673] 实验结果示于图1和图2中,作为利用Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的小鼠相较于利用rhTRAIL114-281的处理的肿瘤体积的变化和以相对于对照的百分率表示的肿瘤生长抑制(%TGI)的图。

[0674] 图1和图2中显示的实验结果显示:施用Ex.11^a的本发明的融合蛋白引起A549肿瘤生长抑制,在实验的第35天相对于对照的TGI是28%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281,相对于对照获得了对于肿瘤细胞生长的轻微抑制效应,TGI水平为0%。因此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL显示出强得多的效应。

[0675] 实验B. 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cr1:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml的HBSS:基质胶3:1的混合物中的 7×10^6 个A549细胞。在实验的第17天,将小鼠随机化以获得 $\sim 100\text{--}120\text{mm}^3$ 的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.11^a(40mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281(20mg/kg)作为对比,配制缓冲液(19mM NaH₂PO₄,81mM Na₂HPO₄,50mM NaCl,5mM谷胱甘肽,0.1mM ZnCl₂,10%甘油,pH7.4)作为对照。每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次,每天一次。在实验的第34天,通过破坏脊髓杀死小鼠。

[0676] 实验结果示于图3和图4中,作为利用Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的小鼠相较于利用rhTRAIL114-281的处理的肿瘤体积的变化和以相对于对照的百分率表示的肿瘤生长抑制(%TGI)的图。

[0677] 图3和图4中显示的实验结果显示:施用Ex.11^a的本发明的融合蛋白引起A549肿瘤生长抑制,在实验的第34天相对于对照的TGI是45%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281,相对于对照获得了对于肿瘤细胞生长的轻微抑制效应,TGI水平为21.8%。因此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL显示出强得多的效应。

[0678] 实验C.

[0679] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cr1:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml的HBSS缓冲液中的 5×10^6 个NCI-H460-Luc2细胞。在实验的第11天,将小鼠随机化以获得 $\sim 100\text{--}120\text{mm}^3$ 的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.11^a(40mg/kg和30mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281(20mg/kg)作为对比,配制缓冲液(19mM NaH₂PO₄,81mM Na₂HPO₄,50mM NaCl,5mM谷胱甘肽,0.1mM ZnCl₂,10%甘油,pH7.4)作为对照。每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次,每天一次(在Ex.11^a的本发明的融合蛋白的情况下首先施用40mg/kg的剂量,随后施用30mg/kg的剂量)。在实验的第29天,通过破坏脊髓杀死小鼠。

[0680] 实验结果示于图5和图6中,作为利用Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的小鼠相较于利用rhTRAIL114-281的处理的肿瘤体积的变化和以相对于对照的百分率表示的肿瘤生长抑制(%TGI)的图。

[0681] 图5和图6中显示的实验结果显示:施用Ex.11^a的本发明的融合蛋白引起NCI-H460-Luc2肿瘤生长抑制,在实验的第29天相对于对照的TGI是93%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281,相对于对照获得了对于肿瘤细胞生长的轻微抑制效应,TGI水平为76%。因此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL显示出强得多的效应。

[0682] 所测试的融合蛋白未引起显著的副作用(表现为小鼠体重的下降)(即小于10%的基线体重)。这显示出本发明的蛋白的低系统性毒性。

[0683] 前列腺癌模型

[0684] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cby.Cg-foxn1(nu)/J小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.18ml HBSS培养基和0.02ml的基质胶中的5x10⁶个PC3细胞。在实验的第29天时,将小鼠随机化以获得~90mm³的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.11^a(15mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以0.9%NaCl作为对照。每天一次静脉内(i.v.)施用制剂,进行6天。在实验的第60天,通过破坏脊髓杀死小鼠。

[0685] 实验结果示于图7和图8中,作为利用Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的小鼠的肿瘤体积的变化和以相对于对照的百分率表示的肿瘤生长抑制(%TGI)的图。

[0686] 图7和图8中显示的实验结果显示:施用Ex.11^a的本发明的融合蛋白引起PC3肿瘤生长抑制,在实验的第60天相对于对照的TGI是33%。

[0687] 所测试的融合蛋白未引起显著的副作用(表现为小鼠体重的下降)(即小于10%的基线体重)。这显示出本发明的蛋白的低系统性毒性。

[0688] 胰腺癌模型

[0689] 针对PANC-1细胞的实验A

[0690] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cr1:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml HBSS培养基与基质胶的混合物(3:1)中的5x10⁶个PANC-1细胞。在实验的第31天时,将小鼠随机化以获得~110mm³的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.11^a(40mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281(20mg/kg)作为对比,配制缓冲液(19mM NaH₂PO₄,81mM Na₂HPO₄,50mM NaCl,5mM谷胱甘肽,0.1mM ZnCl₂,10%甘油,pH7.4)作为对照。每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次,每天一次。在实验的第42天,通过破坏脊髓杀死小鼠。

[0691] 实验结果示于图9和图10中,作为利用Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的小鼠相较于利用rhTRAIL114-281的处理的肿瘤体积的变化和以相对于对照的百分率表示的肿瘤生长抑制(%TGI)的图。

[0692] 图9和图10中显示的实验结果显示:施用Ex.11^a的本发明的融合蛋白引起PANC-1肿瘤生长抑制,在实验的第42天相对于对照的TGI是32.6%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281,相对于对照获得了对于肿瘤细胞生长的轻微抑制效应,TGI水平为26%。因此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL显示出强得多的效应。

[0693] 所测试的融合蛋白未引起显著的副作用(表现为小鼠体重的下降)(即小于10%的基线体重)。这显示出本发明的蛋白的低系统性毒性。

[0694] 针对MIA PaCa-2细胞的实验B

[0695] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cr1:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml HBSS培养基:基质胶的3:1混合物中的5x10⁶个MIA

PaCa-2细胞。当肿瘤达到60–398mm³的尺寸(第20天)时,将小鼠随机化以获得~170mm³的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.16^b(50mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281(50mg/kg)作为对比,化合物gemcytabine(Gemzar,Eli Lilly)(50mg/kg)作为对比。每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次。按照相同的方案腹膜内(i.p.)施用gemcytabine。对照组接受配制缓冲液。

[0696] 当治疗组达到~1000mm³的平均肿瘤尺寸时,通过破坏脊髓杀死小鼠。

[0697] 在利用Ex.16^b的本发明的融合蛋白和相比较地利用rhTRAIL114-281和gemcytabine处理的具有MIA PaCa-2胰腺癌的Cr1:SH0-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠中获得的实验结果显示于图19作为肿瘤体积的变化图,和显示于图20,其显示作为对照的百分率的瘤生长抑制(%TGI)。

[0698] 图19和图20中显示的实验结果显示:施用Ex.16^b的本发明的融合蛋白引起MIA PaCa-2肿瘤生长抑制,在实验的第61天相对于对照的TGI是93%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281和gemcytabine,相对于对照获得了对于肿瘤细胞生长的轻微抑制效应,TGI水平分别为68%和42.6%。因此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL和标准化疗法显示出强得多的效应。

[0699] 结肠癌模型

[0700] 针对HCT116细胞的实验A

[0701] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cr1:SH0-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml的HBSS缓冲液中的5x10⁶个HCT116细胞。当实验的第18天,将小鼠随机化以获得~400mm³的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.11^a(35mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281(20mg/kg)作为对比,配制缓冲液(5mM NaH₂PO₄,95mM Na₂HPO₄,200mM NaCl,5mM谷胱甘肽,0.1mM ZnCl₂,10%甘油,80mM蔗糖,pH8.0)作为对照。每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次,每天一次。在实验的第32天,通过破坏脊髓杀死小鼠。

[0702] 实验结果示于图11和图12中,作为利用Ex.11^a的本发明的融合蛋白处理的小鼠相较于利用rhTRAIL114-281的处理的肿瘤体积的变化和以相对于对照的百分率表示的肿瘤生长抑制(%TGI)的图。

[0703] 图11和图12中显示的实验结果显示:施用Ex.11^a的本发明的融合蛋白引起HCT116肿瘤生长抑制,在实验的第32天相对于对照的TGI是33.5%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281,相对于对照获得了对于肿瘤细胞生长的轻微抑制效应,TGI水平为5.6%。因此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL显示出强得多的效应。

[0704] 所测试的融合蛋白未引起显著的副作用(表现为小鼠体重的下降)(即小于10%的基线体重)。这显示出本发明的蛋白的低系统性毒性。

[0705] 对HCT116细胞进行的实验A1

[0706] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cr1:SH0-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml的HBSS缓冲液:基质胶的3:1混合物中的5x10⁶个HCT116细胞。当肿瘤达到71–432mm³的尺寸(第13天)时,将小鼠随机化以获得~180mm³的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.16^b(90mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281(65mg/kg)作为对比。每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次。对照组接受配制

缓冲液。

[0707] 当实验组达到 $\sim 1000\text{mm}^3$ 的平均肿瘤尺寸时,通过颈椎脱位杀死小鼠。

[0708] 在利用Ex.16^b的本发明的融合蛋白和相比较地利用rhTRAIL114-281处理的具有HCT116结肠癌的Cr1:SH0-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠中获得的实验结果显示于图21作为肿瘤体积的变化图,和显示于图22,其显示作为对照的百分率的瘤生长抑制(%TGI)。

[0709] 图21和图22中显示的实验结果显示:施用Ex.16^b的本发明的融合蛋白引起HCT116肿瘤生长抑制,在实验的第24天相对于对照的TGI是65.8%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281,相对于对照获得了对于肿瘤细胞生长的轻微抑制效应,TGI水平为37.9%。因此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL显示出强得多的效应。

[0710] 针对SW620细胞的实验B

[0711] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cr1:SH0-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml HBSS培养基:基质胶的混合物(3:1)中的 5×10^6 个SW620细胞。在实验的第17天时,将小鼠随机化以获得 $\sim 320\text{mm}^3$ 的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.16^a(20mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281(30mg/kg)作为对比,配制缓冲液(19mM NaH₂PO₄,81mM Na₂HPO₄,50mM NaCl,5mM谷胱甘肽,0.1mM ZnCl₂,10%甘油,pH7.4)作为对照。每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次,每天一次。在实验的第31天,通过破坏脊髓杀死小鼠。

[0712] 在利用Ex.16^a的本发明的融合蛋白和相比较地利用rhTRAIL114-281处理的具有SW620的Cr1:SH0-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠中获得的实验结果显示于图13作为肿瘤体积的变化图,和显示于图14,其显示作为对照的百分率的瘤生长抑制(%TGI)。

[0713] 图13和图14中显示的实验结果显示:施用Ex.16^a的本发明的融合蛋白引起SW620肿瘤生长抑制,在实验的第31天相对于对照的TGI是25%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281,相对于对照未获得对于肿瘤细胞生长的抑制效应,TGI水平为-9%。因此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL显示出强得多的效应。

[0714] 所测试的融合蛋白未引起显著的副作用(表现为小鼠体重的下降)(即小于10%的基线体重)。这显示出本发明的蛋白的低系统性毒性。

[0715] 针对Co1o205细胞的实验C

[0716] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cr1:SH0-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml HBSS缓冲液中的 5×10^6 个Co1o205细胞。在实验的第13天时,将小鼠随机化以获得 $\sim 115\text{mm}^3$ 的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。

[0717] 处理组施以Ex.16^a(30mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281(30mg/kg)作为对比,配制缓冲液(19mM NaH₂PO₄,81mM Na₂HPO₄,50mM NaCl,5mM谷胱甘肽,0.1mM ZnCl₂,10%甘油,pH7.4)作为对照。每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次,每天一次。在实验的第33天,通过破坏脊髓杀死小鼠。

[0718] 实验结果示于图15和图16中,作为肿瘤体积的变化图和作为对照的百分率的肿瘤生长抑制(%TGI)的图。

[0719] 图15和图16中显示的实验结果显示:施用Ex.16^a的本发明的融合蛋白引起Co1o205肿瘤生长抑制,在实验的第33天相对于对照的TGI是80%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281,相对于对照未获得对于肿瘤细胞生长的抑制效应,TGI水平为18.8%。因

此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL显示出强得多的效应。

[0720] 所测试的融合蛋白未引起显著的副作用(表现为小鼠体重的下降)(即小于10%的基线体重)。这显示出本发明的蛋白的低系统性毒性。

[0721] 多重耐药子宫肉瘤模型

[0722] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cr1:SH0-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml HBSS:基质胶10:1的混合物中的 7×10^6 个MES-SA/Dx5细胞。在实验的第19天,将小鼠随机化以获得 $\sim 180\text{mm}^3$ 的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.11^a(30mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281(10mg/kg)作为对比,配制缓冲液(19mM NaH₂PO₄,81mM Na₂HPO₄,50mM NaCl,5mM谷胱甘肽,0,1mM ZnCl₂,10%甘油,pH7.4)作为对照。每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次,每天一次。在实验的第35天,通过破坏脊髓杀死小鼠。

[0723] 实验结果示于图17和图18中,作为肿瘤体积的变化图和作为对照的百分率的肿瘤生长抑制(%TGI)的图。

[0724] 图17和图18中显示的实验结果显示:施用Ex.11^a的本发明的融合蛋白引起MES-SA/Dx5肿瘤生长抑制,在实验的第35天相对于对照的TGI是81%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281,相对于对照未获得对于肿瘤细胞生长的抑制效应,TGI水平为29%。因此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL显示出强得多的效应。

[0725] 所测试的融合蛋白未引起显著的副作用(表现为小鼠体重的下降)(即小于10%的基线体重)。这显示出本发明的蛋白的低系统性毒性。

[0726] 肝癌模型

[0727] 针对HepG2细胞的实验A

[0728] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在小鼠Cr1:SH0-Prkdc^{scid}Hr^{hr}的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml HBSS缓冲液:基质胶的3:1混合物中的 7×10^6 个HepG2细胞。当肿瘤达到 $64\text{--}529\text{mm}^3$ 的大小(第25天)时,将小鼠随机化以获得 $\sim 230\text{mm}^3$ 的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.16^b(80mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281(50mg/kg)作为对比,以化合物5-FU(5-氟尿嘧啶,Sigma-Aldrich)(20mg/kg)作为参照。每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次,腹膜内施用(i.p.)5-FU。对照组接受配制缓冲液。

[0729] 当治疗组达到 $\sim 1000\text{mm}^3$ 的平均肿瘤尺寸时,通过颈椎脱位杀死小鼠。

[0730] 获得的实验结果显示于图23作为肿瘤体积的变化图,和显示于图24,其显示作为对照的百分率的瘤生长抑制(%TGI)。

[0731] 图23和图24中显示的实验结果显示:施用Ex.16^b的本发明的融合蛋白引起HepG2肿瘤生长抑制,在实验的第42天相对于对照的TGI是94.6%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281,相对于对照获得了对于肿瘤细胞生长的轻微抑制效应,TGI水平为23.2%。参照化合物5-FU对HepG2肿瘤未显示任何效应。因此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL和标准化疗法显示出强得多的效应。

[0732] 针对PLC/PRF/5细胞的实验B

[0733] 在第0天通过使用装有0.5x25mm针头(Bogmark)的注射器在Cr1:SH0-Prkdc^{scid}Hr^{hr}小鼠的右侧皮下(s.c.)移植悬于0.1ml HBSS缓冲液:基质胶的3:1混合物中的 7×10^6 个PLC/

PRF/5细胞。当肿瘤达到72-536mm³的大小(第29天)时,将小鼠随机化以获得~205mm³的平均肿瘤尺寸的组,并分至处理组。处理组施以Ex.16^b (50mg/kg)的本发明的融合蛋白制剂,以rhTRAIL114-281 (50mg/kg)作为对比,以化合物5-FU (5-氟尿嘧啶, Sigma-Aldrich) (30mg/kg)作为参照。除5-FU(在方案(q1dx5) x2中腹膜内(i.p.)施用)外,每2天静脉内(i.v.)施用制剂6次。对照组接受配制缓冲液。

[0734] 当实验组达到~1000mm³的平均肿瘤尺寸时,通过颈椎脱位杀死小鼠。

[0735] 获得的实验结果显示于图25作为肿瘤体积的变化图,和显示于图26,其显示作为对照的百分率的瘤生长抑制(%TGI)。

[0736] 图25和图26中显示的实验结果显示:施用Ex.16^b的本发明的融合蛋白引起PLC/PRF/5肿瘤生长抑制,在实验的第43天相对于对照的TGI是53%。对于用作比较参考的rhTRAIL114-281和5-FU,相对于对照获得了对于肿瘤细胞生长的轻微抑制效应,TGI水平分别为25.2%和32.2%。因此,本发明的融合蛋白相对于单独的TRAIL和标准化疗法显示出强得多的效应。

序列表

<110> ADAMED
 PIECZYKOLAN Jerzy Szczepan
 PAWLAK Sebastian Dominik
 ZEREK Bartłomiej Maciej
 ROZGA Piotr Kamil
 <120> 抗癌融合蛋白
 <130> P070 02 PL
 <160> 132
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 融合肽
 <400> 1
 Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
 35 40 45
 [0001] Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60
 Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95
 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140
 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Ser Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg Gly
 165 170 175
 Arg Asp Tyr Arg Thr Cys Leu Thr Ile Val Gln Lys Leu Lys Lys Met
 180 185 190
 Val Asp Lys Pro Thr Gln Arg Ser Val Ser Asn Ala Ala Thr Arg Val
 195 200 205

Cys Arg Thr Gly Arg Ser Arg Trp Arg Asp Val Cys Arg Asn Phe Met
210 215 220

Arg Arg Tyr Gln Ser Arg Val Thr Gln Gly Leu Val Ala Gly Glu Thr
225 230 235 240

Ala Gln Gln Ile Cys Glu Asp Leu Arg Leu Cys Ile Pro Ser Thr Gly
245 250 255

Pro Leu

<210> 2
<211> 261
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合肽

<400> 2

Gly Arg Asp Tyr Arg Thr Cys Leu Thr Ile Val Gln Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Met Val Asp Lys Pro Thr Gln Arg Ser Val Ser Asn Ala Ala Thr Arg
20 25 30

Val Cys Arg Thr Gly Arg Ser Arg Trp Arg Asp Val Cys Arg Asn Phe
35 40 45

[0002]

Met Arg Arg Tyr Gln Ser Arg Val Thr Gln Gly Leu Val Ala Gly Glu
50 55 60

Thr Ala Gln Gln Ile Cys Glu Asp Leu Arg Leu Cys Ile Pro Ser Thr
65 70 75 80

Gly Pro Leu Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg
100 105 110

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

Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu
130 135 140

Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly
145 150 155 160

Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile
165 170 175

Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys
180 185 190

Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn
 195 200 205

Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln
 210 215 220

Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val
 225 230 235 240

Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly
 245 250 255

Ala Phe Leu Val Gly
 260

<210> 3
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 3

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30

[0003]

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
 35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160

Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg Lys Leu Leu Leu Arg
 165 170 175

Leu Leu Lys Lys Leu Leu Arg Leu Leu Lys
 180 185

<210> 4
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 4

Gly Leu Gly Ser Val Phe Gly Arg Leu Ala Arg Ile Leu Gly Arg Val
 1 5 10 15

Ile Pro Lys Val Ala Lys Lys Leu Gly Pro Lys Val Ala Lys Val Leu
 20 25 30

Pro Lys Val Met Lys Glu Ala Ile Pro Met Ala Val Glu Met Ala Lys
 35 40 45

Ser Gln Glu Glu Gln Gln Pro Gln Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu
 50 55 60

Ala Gly Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn
 65 70 75 80

Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys
 85 90 95

Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn
 100 105 110

[0004]

Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr
 115 120 125

Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu
 130 135 140

Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr
 145 150 155 160

Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys
 165 170 175

Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly
 180 185 190

Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn
 195 200 205

Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe
 210 215 220

Leu Val Gly
 225

<210> 5
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 5

Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile
1 5 10 15

Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile
20 25 30

Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg
50 55 60

Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu
65 70 75 80

Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe
85 90 95

Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met
100 105 110

Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu
115 120 125

[0005]

Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
130 135 140

Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp
145 150 155 160

Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
165 170 175

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Cys Ala Ala Cys Ala
180 185 190

Ala Ala Cys Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg
195 200 205

Gly Leu Gly Ser Val Phe Gly Arg Leu Ala Arg Ile Leu Gly Arg Val
210 215 220

Ile Pro Lys Val Ala Lys Lys Leu Gly Pro Lys Val Ala Lys Val Leu
225 230 235 240

Pro Lys Val Met Lys Glu Ala Ile Pro Met Ala Val Glu Met Ala Lys
245 250 255

Ser Gln Glu Glu Gln Gln Pro Gln
260

<210> 6

<211> 299

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 6

Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile
1 5 10 15

Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile
20 25 30

Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg
50 55 60

Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu
65 70 75 80

Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe
85 90 95

Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met
100 105 110

[0006]

Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu
115 120 125

Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
130 135 140

Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp
145 150 155 160

Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
165 170 175

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Cys Ala
180 185 190

Ala Cys Ala Ala Ala Cys Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg
195 200 205

Gly Lys Leu Ser Cys Leu Ser Leu Ala Leu Ala Ile Ile Leu Ile Leu
210 215 220

Ala Ile Val His Ser Pro Asn Met Glu Val Lys Ala Leu Ala Asp Pro
225 230 235 240

Glu Ala Asp Ala Phe Gly Glu Ala Asn Ala Phe Gly Glu Ala Asp Ala
245 250 255

Phe Ala Glu Ala Asn Ala Asp Val Lys Gly Met Lys Lys Ala Ile Lys
260 265 270

Glu Ile Leu Asp Cys Val Ile Glu Lys Gly Tyr Asp Lys Leu Ala Ala
275 280 285

Lys Leu Lys Lys Val Ile Gln Gln Leu Trp Glu
290 295

<210> 7
<211> 224
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合肽

<400> 7

Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile
1 5 10 15

Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile
20 25 30

Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg
50 55 60

Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu
65 70 75 80

[0007]

Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe
85 90 95

Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met
100 105 110

Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu
115 120 125

Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
130 135 140

Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Gln Asn Asp
145 150 155 160

Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
165 170 175

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Cys Ala Ala Cys Ala
180 185 190

Ala Ala Cys Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg Lys
195 200 205

Trp Cys Phe Arg Val Cys Tyr Arg Gly Ile Cys Tyr Arg Arg Cys Arg
210 215 220

<210> 8
<211> 202

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 融合肽

 <400> 8
 Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
 1 5 10 15
 Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
 20 25 30
 Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
 35 40 45
 Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
 50 55 60
 Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
 65 70 75 80
 Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
 85 90 95
 Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
 100 105 110
 Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser
 115 120 125
 Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
 130 135 140
 Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser
 145 150 155 160
 Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val
 165 170 175
 Val Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Trp Cys Phe Arg Val Cys
 180 185 190
 Tyr Arg Gly Ile Cys Tyr Arg Arg Cys Arg
 195 200

[0008]

<210> 9
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 融合肽

 <400> 9
 Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe
 1 5 10 15
 Val Gly Glu Ile Met Asn Ser Gly Gly Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp
 20 25 30

Ala Val Gly His Leu Met Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly
35 40 45

Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr
50 55 60

Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly
65 70 75 80

Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn
85 90 95

Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys
100 105 110

Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn
115 120 125

Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr
130 135 140

Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu
145 150 155 160

Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr
165 170 175

[0009]

Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys
180 185 190

Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly
195 200 205

Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn
210 215 220

Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe
225 230 235 240

Leu Val Gly

<210> 10

<211> 196

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 10

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe
1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala
20 25 30

Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser
 35 40 45
 Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg
 50 55 60
 Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser
 65 70 75 80
 Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe
 85 90 95
 Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr
 115 120 125
 Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser
 130 135 140
 Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly
 145 150 155 160
 Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr
 165 170 175
 Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala
 180 185 190

[0010]

Phe Leu Val Gly
195

<210> 11
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 11

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
 35 40 45
 Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60
 Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Arg Val Val Arg Pro Leu
165 170 175

Gly Leu Ala Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Leu Ala Lys
180 185 190

Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys
195 200

<210> 12
<211> 205
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合肽

[0011]

<400> 12

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85 90 95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly Gly Gly Gly Pro Leu
165 170 175

Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys
180 185 190

Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys
195 200 205

<210> 13
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白

<400> I3

Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile
1 5 10 15

Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile
20 25 30

Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
35 40 45

[0012]

Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg
50 55 60

Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu
65 70 75 80

Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe
85 90 95

Arg Phe Glu Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met
100 105 110

Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu
115 120 125

Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
130 135 140

Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp
145 150 155 160

Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
165 170 175

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Gly Gly Gly Ser
180 185 190

Gly Gly Gly Gly Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Arg
195 200 205

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala
210 215 220

Lys Leu Ala Lys
225

<210> 14
<211> 192
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合肽

<400> 14

His His His His His His Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala
1 5 10 15

Lys Leu Ala Lys Cys Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg
20 25 30

Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser
35 40 45

Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser
50 55 60

Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu
65 70 75 80

[0013]

Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr
85 90 95

Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys
100 105 110

Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro
115 120 125

Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys
130 135 140

Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu
145 150 155 160

Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu
165 170 175

Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
180 185 190

<210> 15
<211> 200
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合肽

<400> 15

His His His His His His Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala
1 5 10 15

Lys Leu Ala Lys Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Val Val
20 25 30

Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
35 40 45

Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
65 70 75 80

Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
85 90 95

Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
100 105 110

Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
115 120 125

Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
130 135 140

[0014]

Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser
145 150 155 160

Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
165 170 175

Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser
180 185 190

Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
195 200

<210> 16

<211> 202

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 16

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60
 Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95
 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140
 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
 165 170 175
 Arg Val Val Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Leu Ala Lys
 180 185 190
 Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys
 195 200

[0015]

<210> 17
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 17

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val
 1 5 10 15
 Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Arg Val Val Arg Pro Leu
 20 25 30
 Gly Leu Ala Gly Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr
 35 40 45
 Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn
 50 55 60
 Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser
 65 70 75 80
 Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val
 85 90 95
 Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg
 100 105 110

Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val
115 120 125

Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met
130 135 140

Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu
145 150 155 160

Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg
165 170 175

Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu
180 185 190

Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
195 200 205

<210> 18

<211> 203

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 18

[0016]

Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Phe Phe Lys Arg Ile Val
1 5 10 15

Gln Arg Ile Phe Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val Arg Val Val Arg Pro
20 25 30

Leu Gly Leu Ala Gly Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile
35 40 45

Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
50 55 60

Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg
65 70 75 80

Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu
85 90 95

Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe
100 105 110

Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met
115 120 125

Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu
130 135 140

Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
145 150 155 160

Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp
 165 170 175
 Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
 180 185 190
 Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 195 200
 <210> 19
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 融合肽
 <400> 19
 Gly Gly Leu Arg Ser Leu Gly Arg Lys Ile Leu Arg Ala Trp Lys Lys
 1 5 10 15
 Tyr Gly Pro Ile Ile Val Pro Ile Ile Arg Ile Arg Val Val Arg Pro
 20 25 30
 Leu Gly Leu Ala Gly Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile
 35 40 45
 Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
 50 55 60
 [0017] Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg
 65 70 75 80
 Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu
 85 90 95
 Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe
 100 105 110
 Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met
 115 120 125
 Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu
 130 135 140
 Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
 145 150 155 160
 Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp
 165 170 175
 Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
 180 185 190
 Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 195 200
 <210> 20
 <211> 200

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 融合肽

 <400> 20
 Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15

 Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30

 Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
 35 40 45

 Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60

 Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80

 Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95

 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110

 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125

 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140

 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160

 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg
 165 170 175

 Gly Leu Val Glu Thr Leu Thr Lys Ile Val Ser Tyr Gly Ile Asp Lys
 180 185 190

 Leu Ile Glu Lys Ile Leu Glu Gly
 195 200

[0018]

<210> 21
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 融合肽

 <400> 21
 Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15

 Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85 90 95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg
165 170 175

[0019]

Gly Phe Ile Ala Thr Leu Thr Lys Val Leu Asp Phe Gly Ile Asp Lys
180 185 190

Leu Ile Gln Leu Ile Glu Asp Lys
195 200

<210> 22
<211> 200
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合肽

<400> 22

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95
 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140
 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg
 165 170 175
 Gly Phe Leu Gly Thr Leu Glu Lys Ile Leu Ser Phe Gly Val Asp Glu
 180 185 190
 Leu Val Lys Leu Ile Glu Asn His
 195 200

<210> 23
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0020]

<220>
 <223> 融合肽

<400> 23

Gly Leu Leu Glu Ala Leu Ala Glu Leu Leu Glu Gly Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15
 Arg Arg Arg Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Ala
 20 25 30
 Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro
 35 40 45
 Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu
 50 55 60
 Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn
 65 70 75 80
 Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln
 85 90 95
 Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp
 100 105 110
 Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro
 115 120 125
 Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala
 130 135 140

Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys
145 150 155 160

Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp
165 170 175

Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
180 185 190

<210> 24
<211> 429
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合肽

<400> 24

Trp Asp Gly Lys Ile Asp Gly Thr Gly Thr His Ala Met Ile Val Thr
1 5 10 15

Gln Gly Val Ser Ile Leu Glu Asn Asp Met Ser Lys Asn Glu Pro Glu
20 25 30

Ser Val Arg Lys Asn Leu Glu Ile Leu Lys Asp Asn Met His Glu Leu
35 40 45

Gln Leu Gly Ser Thr Tyr Pro Asp Tyr Asp Lys Asn Ala Tyr Asp Leu
50 55 60

[0021]

Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro Asp Thr Asn Asn Asn Phe Ser Lys
65 70 75 80

Asp Asn Ser Trp Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Asp Thr Gly Glu Ser
85 90 95

Gln Ile Arg Lys Phe Ser Ala Leu Ala Arg Tyr Glu Trp Gln Arg Gly
100 105 110

Asn Tyr Lys Gln Ala Thr Phe Tyr Leu Gly Glu Ala Met His Tyr Phe
115 120 125

Gly Asp Ile Asp Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn Val Thr Ala Val Asp
130 135 140

Ser Ala Gly His Val Lys Phe Glu Thr Phe Ala Glu Glu Arg Lys Glu
145 150 155 160

Gln Tyr Lys Ile Asn Thr Val Gly Cys Lys Thr Asn Glu Asp Phe Tyr
165 170 175

Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Asp Phe Asn Ala Trp Ser Lys Glu Tyr
180 185 190

Ala Arg Gly Phe Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ser His Ala
195 200 205

Ser Met Ser His Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr Ala Ala Lys Val Thr
210 215 220

Leu Ala Asn Ser Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr Ile Tyr Arg Phe Leu
225 230 235 240

His Asp Val Ser Glu Gly Asn Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser
245 250 255

Gly Cys Gly Pro Glu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Val Ala Ala
260 265 270

His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn
275 280 285

Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser
290 295 300

Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly
305 310 315 320

Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr
325 330 335

Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys
340 345 350

Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile
355 360 365

[0022]

Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu
370 375 380

Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu
385 390 395 400

Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met
405 410 415

Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
420 425

<210> 25

<211> 658

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 25

His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys
1 5 10 15

Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro
20 25 30

Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys
35 40 45

[0023]

Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala
 50 55 60
 Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu
 65 70 75 80
 Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu
 85 90 95
 Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile
 100 105 110
 Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr
 115 120 125
 Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys Tyr Ala Gln Ala Tyr Pro Asn Val
 130 135 140
 Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln
 145 150 155 160
 Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu
 165 170 175
 Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val
 180 185 190
 Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr
 195 200 205
 Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys Ala Val Thr Lys Glu Gln Leu Gln
 210 215 220
 Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val
 225 230 235 240
 Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser
 245 250 255
 Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val
 260 265 270
 Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys
 275 280 285
 Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp
 290 295 300
 Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe
 305 310 315 320
 Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu
 325 330 335
 Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu
 340 345 350

[0024]

Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser
 355 360 365
 Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn Ile Ser Trp Asp Glu Ile Asn Tyr
 370 375 380
 Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys Asn Trp Ser Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser Ile Tyr Leu Pro Gly
 405 410 415
 Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu Cys Thr Gly Leu Ala
 420 425 430
 Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg Asn Leu Pro Leu Val
 435 440 445
 Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Lys Tyr
 450 455 460
 Ser Asn Ser Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg
 465 470 475 480
 Lys Lys Arg Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 485 490 495
 Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr
 500 505 510
 Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile
 515 520 525
 Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu
 530 535 540
 His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr
 545 550 555 560
 Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Ile Lys Glu Asn
 565 570 575
 Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser
 580 585 590
 Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp
 595 600 605
 Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile
 610 615 620
 Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu
 625 630 635 640
 His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu
 645 650 655

Val Gly

<210> 26

<211> 478

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 26

Lys Phe Lys Lys Val Val Leu Gly Met Cys Leu Thr Ala Ser Val Leu
1 5 10 15

Val Phe Pro Val Thr Ile Lys Ala Ser Ala Cys Cys Asp Glu Tyr Leu
20 25 30

Lys Pro Pro Ala Ala Pro His Asp Ile Asp Ser Lys Leu Pro His Lys
35 40 45

Leu Ser Trp Ser Ala Asp Asn Pro Thr Asn Thr Asp Val Asn Thr His
50 55 60

Tyr Trp Leu Phe Lys Gln Ala Glu Lys Ile Leu Ala Lys Asp Val Asp
65 70 75 80

His Met Arg Ala Asn Leu Met Asn Glu Leu Lys Asn Phe Asp Lys Gln
85 90 95

[0025]

Ile Ala Gln Gly Ile Tyr Asp Ala Asp His Lys Asn Pro Tyr Tyr Asp
100 105 110

Thr Ser Thr Phe Leu Ser His Phe Tyr Asn Pro Asp Lys Asp Asn Thr
115 120 125

Tyr Leu Pro Gly Phe Ala Asn Ala Lys Ile Thr Gly Ala Lys Tyr Phe
130 135 140

Asn Gln Ser Val Ala Asp Tyr Arg Glu Gly Lys Phe Asp Thr Ala Phe
145 150 155 160

Tyr Lys Leu Gly Leu Ala Ile His Tyr Tyr Thr Asp Ile Ser Gln Pro
165 170 175

Met His Ala Asn Asn Phe Thr Ala Ile Ser Tyr Pro Pro Gly Tyr His
180 185 190

Cys Ala Tyr Glu Asn Tyr Val Asp Thr Ile Lys His Asn Tyr Gln Ala
195 200 205

Thr Glu Asp Met Val Val Gln Arg Phe Cys Ser Asn Asp Val Lys Glu
210 215 220

Trp Leu Tyr Glu Asn Ala Lys Arg Ala Lys Ala Asp Tyr Pro Lys Ile
225 230 235 240

[0026]

Val Asn Ala Lys Thr Lys Lys Ser Tyr Leu Val Gly Asn Ser Glu Trp
 245 250 255
 Lys Lys Asp Thr Val Glu Pro Thr Gly Ala Arg Leu Arg Asp Ser Gln
 260 265 270
 Gln Thr Leu Ala Gly Phe Leu Glu Phe Trp Ser Lys Lys Thr Asn Glu
 275 280 285
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Lys Arg Ala
 290 295 300
 Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Val Ala
 305 310 315 320
 Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro
 325 330 335
 Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu
 340 345 350
 Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn
 355 360 365
 Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln
 370 375 380
 Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp
 385 390 395 400
 Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro
 405 410 415
 Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala
 420 425 430
 Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys
 435 440 445
 Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp
 450 455 460
 Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 465 470 475
 <210> 27
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 融合肽
 <400> 27
 Ser Ala Asp Val Ala Gly Ala Val Ile Asp Gly Ala Ser Leu Ser Phe
 1 5 10 15
 Asp Ile Leu Lys Thr Val Leu Glu Ala Leu Gly Asn Val Lys Arg Lys
 20 25 30

[0027]

Ile Ala Val Gly Val Asp Asn Glu Ser Gly Lys Thr Trp Thr Ala Leu
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Phe Arg Ser Gly Thr Ser Asp Ile Val Leu Pro His Lys
 50 55 60
 Val Pro His Gly Lys Ala Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Asp Arg Gly
 65 70 75 80
 Pro Val Ala Thr Gly Ala Val Gly Val Leu Ala Tyr Leu Met Ser Asp
 85 90 95
 Gly Asn Thr Leu Ala Val Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Trp
 100 105 110
 Tyr Ser Asn Trp Trp Asn Val Arg Ile Tyr Lys Gly Lys Arg Arg Ala
 115 120 125
 Asp Gln Arg Met Tyr Glu Glu Leu Tyr Tyr Asn Leu Ser Pro Phe Arg
 130 135 140
 Gly Asp Asn Gly Trp His Thr Arg Asn Leu Gly Tyr Gly Leu Lys Ser
 145 150 155 160
 Arg Gly Phe Met Asn Ser Ser Gly His Ala Ile Leu Glu Ile His Val
 165 170 175
 Thr Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Lys Arg Ala Ser Gly Cys
 180 185 190
 Gly Pro Glu Gly Gly Gly Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
 195 200 205
 Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
 210 215 220
 Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
 225 230 235 240
 His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
 245 250 255
 His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
 260 265 270
 Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 275 280 285
 Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 290 295 300
 Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 305 310 315 320
 Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
 325 330 335

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
340 345 350

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
355 360

<210> 28
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合肽

<400> 28

Lys Ser Cys Cys Pro Asn Thr Thr Gly Arg Asn Ile Tyr Asn Ala Cys
1 5 10 15

Arg Leu Thr Gly Ala Pro Arg Pro Thr Cys Ala Lys Leu Ser Gly Cys
20 25 30

Lys Ile Ile Ser Gly Ser Thr Cys Pro Ser Asp Tyr Pro Lys Pro Leu
35 40 45

Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg Gly Gly Ser Gly Gly Glu Arg Gly
50 55 60

[0028]

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

Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys
85 90 95

Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn
100 105 110

Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr
115 120 125

Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu
130 135 140

Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr
145 150 155 160

Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys
165 170 175

Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly
180 185 190

Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn
195 200 205

Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe
210 215 220

Leu Val Gly
225

<210> 29
<211> 224
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合肽

<400> 29

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85 90 95

[0029]

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val
165 170 175

Val Arg Lys Ser Cys Cys Pro Asn Thr Thr Gly Arg Asn Ile Tyr Asn
180 185 190

Ala Cys Arg Leu Thr Gly Ala Pro Arg Pro Thr Cys Ala Lys Leu Ser
195 200 205

Gly Cys Lys Ile Ile Ser Gly Ser Thr Cys Pro Ser Asp Tyr Pro Lys
210 215 220

<210> 30
<211> 200
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 30

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Glu Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85 90 95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

[0030]

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Cys His Thr Ala Ala Arg Ser
165 170 175

Glu Cys Lys Arg Ser His Lys Phe Val Pro Gly Ala Trp Leu Ala Gly
180 185 190

Glu Gly Val Asp Val Thr Ser Leu
195 200

<210> 31

<211> 210

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 31

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60
 Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95
 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140
 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala
 165 170 175
 Gly Ala Pro Cys His Thr Ala Ala Arg Ser Glu Cys Lys Arg Ser His
 180 185 190
 [0031] Lys Phe Val Pro Gly Ala Trp Leu Ala Gly Glu Gly Val Asp Val Thr
 195 200 205
 Ser Leu
 210
 <210> 32
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 融合肽
 <400> 32
 Asp Val Ile Arg Glu Tyr Leu Met Phe Asn Glu Leu Ser Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Glu Ser Val Arg Ser Arg Phe Ser Ser Ile Tyr Gly Thr
 20 25 30
 Asn Pro Asp Gly Ile Ala Leu Asn Asn Glu Thr Tyr Phe Asn Ala Val
 35 40 45
 Lys Pro Pro Ile Thr Ala Gln Tyr Gly Tyr Tyr Cys Tyr Lys Asn Val
 50 55 60
 Gly Thr Val Gln Tyr Val Asn Arg Pro Thr Asp Ile Asn Pro Asn Val
 65 70 75 80

	Ile	Leu	Ala	Gln	Asp	Thr	Leu	Thr	Asn	Asn	Thr	Asn	Glu	Pro	Phe	Thr	
					85					90						95	
	Thr	Thr	Ile	Thr	Ile	Thr	Gly	Ser	Phe	Thr	Asn	Thr	Ser	Thr	Val	Thr	
				100					105						110		
	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Gly	Phe	Lys	Phe	Thr	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Lys	
			115					120					125				
	Lys	Val	Phe	Glu	Ile	Gly	Gly	Glu	Val	Ser	Phe	Ser	Thr	Thr	Ile	Gly	
		130					135						140				
	Thr	Ser	Glu	Thr	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Val	Ser	Lys	Ser	Val	Thr	
	145						150				155					160	
	Val	Thr	Val	Pro	Ala	Gln	Ser	Arg	Arg	Thr	Ile	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	
					165					170					175		
	Ile	Ala	Lys	Glu	Ser	Ala	Asp	Phe	Ser	Ala	Pro	Ile	Thr	Val	Asp	Gly	
				180					185						190		
	Tyr	Phe	Gly	Ala	Asn	Phe	Pro	Lys	Arg	Val	Gly	Pro	Gly	Gly	His	Tyr	
			195					200					205				
	Phe	Trp	Phe	Asn	Pro	Ala	Arg	Asp	Val	Leu	Asn	Thr	Thr	Ser	Gly	Thr	
		210					215					220					
[0032]	Leu	Arg	Gly	Thr	Val	Thr	Asn	Val	Ser	Ser	Phe	Asp	Phe	Gln	Thr	Ile	
	225					230					235				240		
	Val	Gln	Pro	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Asp	Glu	Gln	Arg	Val	Val	Arg	Pro	
				245					250						255		
	Leu	Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Glu	Arg	
			260					265							270		
	Gly	Pro	Gln	Arg	Val	Ala	Ala	His	Ile	Thr	Gly	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	
		275						280					285				
	Asn	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Lys	Asn	Glu	Lys	Ala	Leu	Gly	Arg	
		290					295					300					
	Lys	Ile	Asn	Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly	His	Ser	Phe	Leu	Ser	
	305					310					315					320	
	Asn	Leu	His	Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Val	Ile	His	Glu	Lys	Gly	Phe	
				325						330					335		
	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gln	Thr	Tyr	Phe	Arg	Phe	Gln	Glu	Glu	Ile	Lys	
				340					345						350		
	Glu	Asn	Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Val	Gln	Tyr	Ile	Tyr	Lys	Tyr	
			355					360					365				
	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Met	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn	Ser	
		370					375						380				

Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly
 385 390 395 400
 Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr
 405 410 415
 Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala
 420 425 430
 Phe Leu Val Gly
 435
 <210> 33
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 融合肽
 <400> 33
 Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
 35 40 45
 [0033] Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60
 Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95
 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140
 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Gly Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Cys Gly Gly Gly Pro Leu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Gly Arg Val Val Arg Tyr Lys Trp Tyr Gly Tyr Thr Pro Gln
 180 185 190
 Asn Val Ile Gly Gly Gly Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu
 195 200 205

Leu Lys Leu Leu Lys Lys Lys
210 215

<210> 34
<211> 83
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 效应子

<300>
<308> GenBank/AAH23576.1
<309> 2006-07-15
<313> (63)..(145)

<400> 34

Gly Arg Asp Tyr Arg Thr Cys Leu Thr Ile Val Gln Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Met Val Asp Lys Pro Thr Gln Arg Ser Val Ser Asn Ala Ala Thr Arg
20 25 30

Val Cys Arg Thr Gly Arg Ser Arg Trp Arg Asp Val Cys Arg Asn Phe
35 40 45

Met Arg Arg Tyr Gln Ser Arg Val Thr Gln Gly Leu Val Ala Gly Glu
50 55 60

[0034]

Thr Ala Gln Gln Ile Cys Glu Asp Leu Arg Leu Cys Ile Pro Ser Thr
65 70 75 80

Gly Pro Leu

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 效应子

<300>
<301> Papo N, Shahar M, Eisenbach L, Shai Y.
<302> A novel lytic peptide composed of DL-amino acids selectively
kills cancer cells in culture and in mice.
<303> J. Biol. Chem.
<304> 278
<305> 3
<306> 21018-23
<307> 2003-06-06

<400> 35

Lys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Lys Lys Leu Leu Arg Leu Leu Lys
1 5 10 15

<210> 36
<211> 56
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 效应子

<300>
 <308> Swiss-Prot/Q07932.1
 <309> 2011-01-11
 <313> (57).. (112)
 <400> 36
 Gly Leu Gly Ser Val Phe Gly Arg Leu Ala Arg Ile Leu Gly Arg Val
 1 5 10 15
 Ile Pro Lys Val Ala Lys Lys Leu Gly Pro Lys Val Ala Lys Val Leu
 20 25 30
 Pro Lys Val Met Lys Glu Ala Ile Pro Met Ala Val Glu Met Ala Lys
 35 40 45
 Ser Gln Glu Glu Gln Gln Pro Gln
 50 55
 <210> 37
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 效应子
 <300>
 <308> GenBank/BAF95069.1
 <309> 2008-08-04
 <313> (2).. (91)
 <400> 37
 Lys Leu Ser Cys Leu Ser Leu Ala Leu Ala Ile Ile Leu Ile Leu Ala
 1 5 10 15
 Ile Val His Ser Pro Asn Met Glu Val Lys Ala Leu Ala Asp Pro Glu
 20 25 30
 Ala Asp Ala Phe Gly Glu Ala Asn Ala Phe Gly Glu Ala Asp Ala Phe
 35 40 45
 Ala Glu Ala Asn Ala Asp Val Lys Gly Met Lys Lys Ala Ile Lys Glu
 50 55 60
 Ile Leu Asp Cys Val Ile Glu Lys Gly Tyr Asp Lys Leu Ala Ala Lys
 65 70 75 80
 Leu Lys Lys Val Ile Gln Gln Leu Trp Glu
 85 90
 <210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 效应子
 <300>
 <308> GenBank/AAA63538.1
 <309> 1995-03-07
 <313> (24).. (40)

[0035]

<400> 38

Lys Trp Cys Phe Arg Val Cys Tyr Arg Gly Ile Cys Tyr Arg Arg Cys
1 5 10 15

Arg

<210> 39

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 效应子

<300>

<301> Liu S, Yang H, Wan L, Cai HW, Li SF, Li YP, Cheng JQ, Lu XF.

<302> Enhancement of cytotoxicity of antimicrobial peptide magainin II
in tumor cells by bombesin-targeted delivery

<303> Acta Pharmacol. Sin.

<304> 32

<305> 1

<306> 79-88

<307> 2011-01-01

<400> 39

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe
1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser Gly Gly Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp
20 25 30

[0036]

Ala Val Gly His Leu Met
35

<210> 40

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 效应子

<300>

<308> Swiss-Prot/PI1006.1

<309> 2010-11-30

<313> (83).. (105)

<400> 40

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe
1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser
20

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 效应子

<300>

<301> avadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM,
Becker CL, McLaughlin ML

<302> De novo antimicrobial Peptides with low mammalian cell toxicity
 <303> J. Med. Chem.
 <304> 39
 <305> 16
 <306> 3107-13
 <307> 1996-08-02

<400> 41

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys
 1 5 10

<210> 42
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 效应子

<300>
 <301> M., Velasco, M., J., Diaz-Guerra, P., Diaz-Achirica, D., Andreu,
 L., Rivas and L., Bosca,
 <302> Macrophage triggering with cecropin A and melittin-derived
 peptides induces type II nitric oxide synthase expression
 <303> The Journal of Immunology
 <304> 158
 <305> 9
 <306> 4437-4443
 <307> 1997-09-13

<400> 42

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val
 1 5 10 15

[0037]

Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser
 20 25

<210> 43
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 效应子

<300>
 <301> Isogai E.
 <302> Antimicrobial and Lipopolysaccharide-Binding Activities of
 C-Terminal Domain of Human CAP18 Peptides to Genus Leptospira
 <303> The Journal of Applied Research
 <304> 4
 <305> 1
 <306> 180-185
 <307> 2004-12-01

<400> 43

Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Phe Phe Lys Arg Ile Val
 1 5 10 15

Gln Arg Ile Phe Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
 20 25

<210> 44
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

	<223> 效应子
	<300>
	<301> Risso A, Braidot E, Sordano MC, Vianello A, Macr? F, Skerlavaj B, Zanetti M, Gennaro R, Bernardi P.
	<302> MAP-28, an antibiotic oepptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore.
	<303> Mol. Cell. Biol.
	<304> 22
	<305> 6
	<306> 1926-35
	<307> 2002-03
	<400> 44
	Gly Gly Leu Arg Ser Leu Gly Arg Lys Ile Leu Arg Ala Trp Lys Lys
	1 5 10 15
	Tyr Gly Pro Ile Ile Val Pro Ile Ile Arg Ile
	20 25
	<210> 45
	<211> 24
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 效应子
	<300>
	<301> Andr?J, Berninghausen O, Wulfken J, Leippe M.
	<302> Shortened amoebapore analogs with enhanced antibacterial and cytolytic activity.
[0038]	<303> FEBS Lett.
	<304> 385
	<305> 12
	<306> 96-100
	<307> 1996-04-29
	<400> 45
	Gly Leu Val Glu Thr Leu Thr Lys Ile Val Ser Tyr Gly Ile Asp Lys
	1 5 10 15
	Leu Ile Glu Lys Ile Leu Glu Gly
	20
	<210> 46
	<211> 24
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 效应子
	<300>
	<301> AndraJ, Berninghausen O, Wulfken J, Leippe M.
	<302> Shortened amoebapore analogs with enhanced antibacterial and cytolytic activity.
	<303> FEBS Lett.
	<304> 385
	<305> 1
	<306> 96-100
	<307> 1996-04-29
	<400> 46
	Gly Phe Ile Ala Thr Leu Thr Lys Val Leu Asp Phe Gly Ile Asp Lys
	1 5 10 15

Leu Ile Gln Leu Ile Glu Asp Lys
20

<210> 47
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 效应子

<300>
<301> AndraJ, Berninghausen O, Wulfken J, Leippe M.
<302> Shortened amoebapore analogs with enhanced antibacterial and
cytolytic activity.
<303> FEBS Lett.
<304> 385
<305> 1
<306> 96-100
<307> 1996-04-29

<400> 47

Gly Phe Leu Gly Thr Leu Glu Lys Ile Leu Ser Phe Gly Val Asp Glu
1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ile Glu Asn His
20

<210> 48
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

[0039]

<220>
<223> 效应子

<300>
<301> Ines Neundorff, Robert Rennert, Jan Hoyer, Franziska Schramm,
Kristin Lobner Igor Kitanovic and Stefan Wolfl
<302> Fusion of a Short HA2-Derived Peptide Sequence to
Cell-Penetrating Peptides Improves Cytosolic Uptake, but Enhances
Cytotoxic Activity.
<303> Pharmaceuticals
<304> 2
<305> 2
<306> 49-65
<307> 2009

<400> 48

Gly Leu Leu Glu Ala Leu Ala Glu Leu Leu Glu Gly
1 5 10

<210> 49
<211> 247
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 效应子

<300>
<308> GenBank/AAPI5462.1
<309> 2003-04-27
<313> (D.), (247)

<400> 49

Trp Asp Gly Lys Ile Asp Gly Thr Gly Thr His Ala Met Ile Val Thr
1 5 10 15

[0040]

Gln Gly Val Ser Ile Leu Glu Asn Asp Met Ser Lys Asn Glu Pro Glu
 20 25 30
 Ser Val Arg Lys Asn Leu Glu Ile Leu Lys Asp Asn Met His Glu Leu
 35 40 45
 Gln Leu Gly Ser Thr Tyr Pro Asp Tyr Asp Lys Asn Ala Tyr Asp Leu
 50 55 60
 Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro Asp Thr Asn Asn Asn Phe Ser Lys
 65 70 75 80
 Asp Asn Ser Trp Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Asp Thr Gly Glu Ser
 85 90 95
 Gln Ile Arg Lys Phe Ser Ala Leu Ala Arg Tyr Glu Trp Gln Arg Gly
 100 105 110
 Asn Tyr Lys Gln Ala Thr Phe Tyr Leu Gly Glu Ala Met His Tyr Phe
 115 120 125
 Gly Asp Ile Asp Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn Val Thr Ala Val Asp
 130 135 140
 Ser Ala Gly His Val Lys Phe Glu Thr Phe Ala Glu Glu Arg Lys Glu
 145 150 155 160
 Gln Tyr Lys Ile Asn Thr Val Gly Cys Lys Thr Asn Glu Asp Phe Tyr
 165 170 175
 Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Asp Phe Asn Ala Trp Ser Lys Glu Tyr
 180 185 190
 Ala Arg Gly Phe Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ser His Ala
 195 200 205
 Ser Met Ser His Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr Ala Ala Lys Val Thr
 210 215 220
 Leu Ala Asn Ser Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr Ile Tyr Arg Phe Leu
 225 230 235 240
 His Asp Val Ser Glu Gly Asn
 245

<210> 50
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 效应子

<300>
 <308> GenBank/AAS85208.1
 <309> 2008-08-26
 <313> (57)...(524)

<400> 50

[0041]

His	Ala	Asp	Glu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Ile	Gln	Gly	Leu	Asp	Tyr	Asn	Lys	1	5	10	15
Asn	Asn	Val	Leu	Val	Tyr	His	Gly	Asp	Ala	Val	Thr	Asn	Val	Pro	Pro	20	25	30	
Arg	Lys	Gly	Tyr	Lys	Asp	Gly	Asn	Glu	Tyr	Ile	Val	Val	Glu	Lys	Lys	35	40	45	
Lys	Lys	Ser	Ile	Asn	Gln	Asn	Asn	Ala	Asp	Ile	Gln	Val	Val	Asn	Ala	50	55	60	
Ile	Ser	Ser	Leu	Thr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	Ser	Glu	65	70	75	80
Leu	Val	Glu	Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Leu	Pro	Val	Lys	Arg	Asp	Ser	Leu	85	90	95	
Thr	Leu	Ser	Ile	Asp	Leu	Pro	Gly	Met	Thr	Asn	Gln	Asp	Asn	Lys	Ile	100	105	110	
Val	Val	Lys	Asn	Ala	Thr	Lys	Ser	Asn	Val	Asn	Asn	Ala	Val	Asn	Thr	115	120	125	
Leu	Val	Glu	Arg	Trp	Asn	Glu	Lys	Tyr	Ala	Gln	Ala	Tyr	Pro	Asn	Val	130	135	140	
Ser	Ala	Lys	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Glu	Met	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ser	Gln	145	150	155	160
Leu	Ile	Ala	Lys	Phe	Gly	Thr	Ala	Phe	Lys	Ala	Val	Asn	Asn	Ser	Leu	165	170	175	
Asn	Val	Asn	Phe	Gly	Ala	Ile	Ser	Glu	Gly	Lys	Met	Gln	Glu	Glu	Val	180	185	190	
Ile	Ser	Phe	Lys	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Val	Asn	Val	Asn	Glu	Pro	Thr	195	200	205	
Arg	Pro	Ser	Arg	Phe	Phe	Gly	Lys	Ala	Val	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Gln	210	215	220	
Ala	Leu	Gly	Val	Asn	Ala	Glu	Asn	Pro	Pro	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Val	225	230	235	240
Ala	Tyr	Gly	Arg	Gln	Val	Tyr	Leu	Lys	Leu	Ser	Thr	Asn	Ser	His	Ser	245	250	255	
Thr	Lys	Val	Lys	Ala	Ala	Phe	Asp	Ala	Ala	Val	Ser	Gly	Lys	Ser	Val	260	265	270	
Ser	Gly	Asp	Val	Glu	Leu	Thr	Asn	Ile	Ile	Lys	Asn	Ser	Ser	Phe	Lys	275	280	285	
Ala	Val	Ile	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ala	Lys	Asp	Glu	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	290	295	300	

Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe
 305 310 315 320
 Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu
 325 330 335
 Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu
 340 345 350
 Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser
 355 360 365
 Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn Ile Ser Trp Asp Glu Ile Asn Tyr
 370 375 380
 Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys Asn Trp Ser Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser Ile Tyr Leu Pro Gly
 405 410 415
 Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu Cys Thr Gly Leu Ala
 420 425 430
 Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg Asn Leu Pro Leu Val
 435 440 445
 Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Lys Tyr
 450 455 460

[0042]

Ser Asn Ser Val
 465

<210> 51
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 效应子

<300>
 <308> genbank/AB657041.1
 <309> 2011-05-06
 <313> (5)..(292)

<400> 51

Lys Phe Lys Lys Val Val Leu Gly Met Cys Leu Thr Ala Ser Val Leu
 1 5 10 15

Val Phe Pro Val Thr Ile Lys Ala Ser Ala Cys Cys Asp Glu Tyr Leu
 20 25 30

Lys Pro Pro Ala Ala Pro His Asp Ile Asp Ser Lys Leu Pro His Lys
 35 40 45

Leu Ser Trp Ser Ala Asp Asn Pro Thr Asn Thr Asp Val Asn Thr His
 50 55 60

Tyr Trp Leu Phe Lys Gln Ala Glu Lys Ile Leu Ala Lys Asp Val Asp

65	70	75	80
His Met Arg Ala Asn Leu Met Asn Glu Leu Lys Asn Phe Asp Lys Gln			
	85	90	95
Ile Ala Gln Gly Ile Tyr Asp Ala Asp His Lys Asn Pro Tyr Tyr Asp			
	100	105	110
Thr Ser Thr Phe Leu Ser His Phe Tyr Asn Pro Asp Lys Asp Asn Thr			
	115	120	125
Tyr Leu Pro Gly Phe Ala Asn Ala Lys Ile Thr Gly Ala Lys Tyr Phe			
	130	135	140
Asn Gln Ser Val Ala Asp Tyr Arg Glu Gly Lys Phe Asp Thr Ala Phe			
	145	150	155
Tyr Lys Leu Gly Leu Ala Ile His Tyr Tyr Thr Asp Ile Ser Gln Pro			
	165	170	175
Met His Ala Asn Asn Phe Thr Ala Ile Ser Tyr Pro Pro Gly Tyr His			
	180	185	190
Cys Ala Tyr Glu Asn Tyr Val Asp Thr Ile Lys His Asn Tyr Gln Ala			
	195	200	205
Thr Glu Asp Met Val Val Gln Arg Phe Cys Ser Asn Asp Val Lys Glu			
	210	215	220
Trp Leu Tyr Glu Asn Ala Lys Arg Ala Lys Ala Asp Tyr Pro Lys Ile			
	225	230	235
Val Asn Ala Lys Thr Lys Lys Ser Tyr Leu Val Gly Asn Ser Glu Trp			
	245	250	255
Lys Lys Asp Thr Val Glu Pro Thr Gly Ala Arg Leu Arg Asp Ser Gln			
	260	265	270
Gln Thr Leu Ala Gly Phe Leu Glu Phe Trp Ser Lys Lys Thr Asn Glu			
	275	280	285
Gly			

[0043]

<210> 52
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 效应子

<300>
 <308> PDB/1KD6_A
 <309> 2009-07-10
 <313> (1).. (179)

<400> 52

Ser Ala Asp Val Ala Gly Ala Val Ile Asp Gly Ala Ser Leu Ser Phe			
1	5	10	15

Asp Ile Leu Lys Thr Val Leu Glu Ala Leu Gly Asn Val Lys Arg Lys
 20 25 30
 Ile Ala Val Gly Val Asp Asn Glu Ser Gly Lys Thr Trp Thr Ala Leu
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Phe Arg Ser Gly Thr Ser Asp Ile Val Leu Pro His Lys
 50 55 60
 Val Pro His Gly Lys Ala Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Asp Arg Gly
 65 70 75 80
 Pro Val Ala Thr Gly Ala Val Gly Val Leu Ala Tyr Leu Met Ser Asp
 85 90 95
 Gly Asn Thr Leu Ala Val Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Trp
 100 105 110
 Tyr Ser Asn Trp Trp Asn Val Arg Ile Tyr Lys Gly Lys Arg Arg Ala
 115 120 125
 Asp Gln Arg Met Tyr Glu Glu Leu Tyr Tyr Asn Leu Ser Pro Phe Arg
 130 135 140
 Gly Asp Asn Gly Trp His Thr Arg Asn Leu Gly Tyr Gly Leu Lys Ser
 145 150 155 160
 [0044] Arg Gly Phe Met Asn Ser Ser Gly His Ala Ile Leu Glu Ile His Val
 165 170 175

Thr Lys Ala

<210> 53
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 效应子

<300>
 <308> Swiss-Prot/P01538.2
 <309> 2011-05-31
 <313> (27)..(72)

<400> 53

Lys Ser Cys Cys Pro Asn Thr Thr Gly Arg Asn Ile Tyr Asn Ala Cys
 1 5 10 15

Arg Leu Thr Gly Ala Pro Arg Pro Thr Cys Ala Lys Leu Ser Gly Cys
 20 25 30

Lys Ile Ile Ser Gly Ser Thr Cys Pro Ser Asp Tyr Pro Lys
 35 40 45

<210> 54
 <211> 33
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 效应子

<300>

<308> GenBank/CAA31612.1

<309> 2008-10-07

<313> (21).. (53)

<400> 54

Ala Pro Cys His Thr Ala Ala Arg Ser Glu Cys Lys Arg Ser His Lys
1 5 10 15

Phe Val Pro Gly Ala Trp Leu Ala Gly Glu Gly Val Asp Val Thr Ser
20 25 30

Leu

<210> 55

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 效应子

<300>

<308> PDB/2ZTB_A

<309> 2009-03-27

<313> (2).. (251)

[0045]

<400> 55

Asp Val Ile Arg Glu Tyr Leu Met Phe Asn Glu Leu Ser Ala Leu Ser
1 5 10 15

Ser Ser Pro Glu Ser Val Arg Ser Arg Phe Ser Ser Ile Tyr Gly Thr
20 25 30

Asn Pro Asp Gly Ile Ala Leu Asn Asn Glu Thr Tyr Phe Asn Ala Val
35 40 45

Lys Pro Pro Ile Thr Ala Gln Tyr Gly Tyr Tyr Cys Tyr Lys Asn Val
50 55 60

Gly Thr Val Gln Tyr Val Asn Arg Pro Thr Asp Ile Asn Pro Asn Val
65 70 75 80

Ile Leu Ala Gln Asp Thr Leu Thr Asn Asn Thr Asn Glu Pro Phe Thr
85 90 95

Thr Thr Ile Thr Ile Thr Gly Ser Phe Thr Asn Thr Ser Thr Val Thr
100 105 110

Ser Ser Thr Thr Thr Gly Phe Lys Phe Thr Ser Lys Leu Ser Ile Lys
115 120 125

Lys Val Phe Glu Ile Gly Gly Glu Val Ser Phe Ser Thr Thr Ile Gly
130 135 140

Thr Ser Glu Thr Thr Thr Glu Thr Ile Thr Val Ser Lys Ser Val Thr

	145	150	155	160
	Val Thr Val Pro Ala Gln Ser Arg Arg Thr Ile Gln Leu Thr Ala Lys	165	170	175
	Ile Ala Lys Glu Ser Ala Asp Phe Ser Ala Pro Ile Thr Val Asp Gly	180	185	190
	Tyr Phe Gly Ala Asn Phe Pro Lys Arg Val Gly Pro Gly Gly His Tyr	195	200	205
	Phe Trp Phe Asn Pro Ala Arg Asp Val Leu Asn Thr Thr Ser Gly Thr	210	215	220
	Leu Arg Gly Thr Val Thr Asn Val Ser Ser Phe Asp Phe Gln Thr Ile	225	230	235
	Val Gln Pro Ala Arg Ser Leu Leu Asp Glu Gln	245	250	
	<210> 56			
	<211> 32			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 效应子			
	<300>			
	<302> SELECTIVE ANTICANCER CHIMERIC PEPTIDE			
[0046]	<310> WO2010064207			
	<311> 2009-12-03			
	<312> 2010-06-10			
	<400> 56			
	Tyr Lys Trp Tyr Gly Tyr Thr Pro Gln Asn Val Ile Gly Gly Gly Lys	1	5	10
	Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Lys	20	25	30
	<210> 57			
	<211> 774			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 融合肽			
	<400> 57			
	cgtgttcag cacatattac cggcaccgt ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaa	60		
	agcaaaaatg aaaaagccct gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcgt	120		
	catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggtagaac tggtagattca tgaanaagc	180		
	ttttattata ttatagcca gacctatitt cgctttcagg aagaaattaa agaaaatacc	240		
	aaaaatgaca acaaatggt gcagtatate tacaatata ccagctatcc ggaaccgatt	300		
	ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaag atgcagaata tggcctgtat	360		
	agcatttate agggiggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatitt tgtgagcgtg	420		
	accaatgaac atctgattga tatgatacat gaagccagct tttttggtag atttctggtt	480		

	ggtaggtgga gcggfecgct gggctcggca ggtegtgttg ttctgtggtcg tgattatcgt	540
	acctgtctga ccattgtgca gaaactgaaa aaaatggtgg ataaaccgac ccagcgtagc	600
	gttagcaatg cagcaacccg tgtttgtcgt accggtcgta gccgttggcg tgaigtgtgt	660
	cgtaatctca tgcgtcgta tcagagccgt gttaccagg gtctggttgc cggfgaaacc	720
	gcacagcaga ttgtgaaga tctgcgtctg tgtattccga gcaccggtcc gctg	774
	<210> 58	
	<211> 783	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 融合肽	
	<400> 58	
	ggtegtgatt atcgtaacctg tctgaccatt gtacagaaac tgaaaaaaat ggtagataaa	60
	ccgacccagc gtagcgttag caatgcagca acccgtgttt gtctgaccgg tctgagccgt	120
	tggcgtgatg tttgtcgtaa ctttatgcgt cgttatcaga gccgtgttac ccagggtctg	180
	gttgccggtg aaaccgcaca gcagatttgt gaagatctgc gtctgtgtat tccgagcacc	240
	ggteccgtgc gtgtgttctg tccgtgggt ctggcaggcg gtggtggtgg tagtccgag	300
	cgtgttcgag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaa	360
	agcaaaaatg aaaaagcaact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcgg	420
	catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggatgaac tggtagttca tgaaaaaggc	480
[0047]	ttttattata ttatagcca gacctatfff cgtttcagg aagaaattaa agaaaatacc	540
	aaaaatgata agcagatggt gcagtatata tataaatata ccagctatcc ggaaccgatt	600
	ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctgtat	660
	agcatttate aggggtggcat tttgaactg aaagaaaatg atgcatttt tgtgagcgtg	720
	accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct ttttgggtgc atttctggtt	780
	ggt	783
	<210> 59	
	<211> 558	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 融合肽	
	<400> 59	
	cgtgttcgag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagea ataccctgag cagcccgaa	60
	agcaaaaatg aaaaagccct gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcgg	120
	catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggatgaac tggtagttca tgaaaaaggc	180
	ttttattata ttatagcca gacctatfff cgtttcagg aagaaattaa agaaaatacc	240
	aaaaatgata acaaatggt gcagtatata tataaatata ccagctatcc ggaaccgatt	300
	ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggcctgtat	360
	agcatttate aggggtggcat tttgaactg aaagaaaatg atgcatttt tgtgagcgtg	420
	accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct ttttgggtgc atttctggtt	480
	ggteccgtgg gtetggcagg tctgttgttt cgtaaactgc tctgtgttt actgaaaaaa	540

	ttactgcgcc tgcgtgaaa	558
	<210> 60	
	<211> 681	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 融合肽	
	<400> 60	
	ggtctgggta gcgtttttgg tcgtctggca cgtattctgg gtcgtgttat tccgaaagtt	60
	gcataaaaaac tgggtccgaa agtggccaaa gtctctgccg aagttatgaa agaagcaatt	120
	ccgatggcag ttgaaatggc aaaaagccaa gaagaacagc agccgcagcg tgttgctcgt	180
	ccgctgggtc tggcaggtcg tgttcagca catattaccg gcaccctgg tcgtagcaat	240
	accttgagca gcccgaaatag caaaaatgaa aaagcactgg gtcgcaaaat caatagctgg	300
	gaaagcagcc gtagcggta tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggtagaactg	360
	gtgattcatg aaaaaggcct ttattatatt tatagccaga cctattttcg ctticaagaa	420
	gagattaaag aaaataccaa aaatgataaa caaatgggtgc agtatattta caaatatacc	480
	agctatccgg acccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaagat	540
	gcagaatatg gctctgtatag catttatcag ggtggcattt ttgagctgaa agaaaatgat	600
	cgcattcttg ttagcgtgac caacgaacat ctgatcgata tggatcatga agccagcttt	660
	tttgggtcat ttctgggtgg t	681
[0048]	<210> 61	
	<211> 792	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 融合肽	
	<400> 61	
	accagcgaag aaaccattag caccgttcaa gaaaaacagc agaattattag tccgttggtt	60
	cgtgaacgtg gtccgcagcg tgttcagca catattaccg gcaccctgg tcgtagcaat	120
	accttgagca gcccgaaatag caaaaatgaa aaagccctgg gtcgcaaaat taacagctgg	180
	gaaagcagcc gtagcggta tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggtagaactg	240
	gtgattcacg agaaaggctt ctattatate tatagccaga cctattttcg ctttcaagaa	300
	gaaattaaag aaaacaccaa aaatgataaa caaatgggtgc agtatattta caaatatacc	360
	agetatccgg atccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaagat	420
	gcagaatatg gcctgtatag catctatcag ggtggcattt ttgaactgaa agaaaacgat	480
	cgcattcttg tgagcgtgac caatgaacat ctgattgata tggatcacga agccagcttt	540
	tttgggtcat ttctgggttg ttgtgcagca tgtgcagcgc catgtggtgg tggccgctg	600
	ggctcggcag gtcgtgttgt tcgtggtctg ggtagcgttt ttggtcgtct ggcacgtatt	660
	ctgggtcgtg ttattccgaa agttgcaaaa aaactgggtc cgaaagtggc caaagttctg	720
	ccgaaagtta tgaagaagc aattccgatg gccgttgaaa tggcaaaaag ccaagaagaa	780
	cagcagccgc ag	792
	<210> 62	

<211> 897
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 62
 accagcgaag aaaccattag caccgttcaa gaaaaacagc agaatattag tccgttggtt 60
 cgtgaacgtg gtccgcagcg tgttcagca cataattacc gcaccctgg tcgtagcaat 120
 accctgagca gcccgaaatag caaaaatgaa aaagcactgg gtgcgaaat caatnctgg 180
 gaaagcagcc gtacgggtca tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggtagaactg 240
 gtgattcatg aaaaaggctt ctactatct tatagccaga cctatttccg ctccaagaa 300
 gaaatcaag aaaaatacaa aaatgataa caaatgggtgc agtatattta caaatatacc 360
 agctatccgg atccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat 420
 gcagaatatg gtctgtatag catttatcag ggtggcattt ttgagctgaa agaaaatgat 480
 cgcatttttg ttacggtgac caacgaacat ctgattgata tggatcatga agccagcttt 540
 tttggtgcat ttctggttgg ttgtacggtt tgtgcagcat gtgcagccgc atgtccgctg 600
 ggtctggcag gtctgttgtt tcgttgtaaa ctgagctgta tgagcctggc actggcaatt 660
 attctgattc tggcaattgt tcatagcccg aatatggaag ttaaagcact ggcagatccg 720
 gaagcagatg catttggta agcaaatgcc ttggcggaag ccgattcggt tggcgaagcc 780
 aatgcagatg ttaaaggat gaaaaagcc attaaagaa ttctggattg cgtgatcgag 840
 aaaggctatg ataaactggc agccaaactg aaaaagtta ttcagcagct gtgggaa 897

[0049]

<210> 63
 <211> 672
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 63
 accagcgaag aaaccattag caccgttcaa gaaaaacagc agaatattag tccgttggtt 60
 cgtgaacgtg gtccgcagcg tgttcagca cataattacc gcaccctgg tcgtagcaat 120
 accctgagca gcccgaaatag caaaaatgaa aaagcactgg gtgcgaaat taatagctgg 180
 gaaagcagcc gtacgggtca tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggtagaactg 240
 gtgattcatg aaaaaggctt ttattatatt tatagccaga cctattttcg ctccaagaa 300
 gaaattaaag aaaaacacaa aaatgataa caaatgggtgc agtacattta taaatatacc 360
 agctatccgg atccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat 420
 gcagaatatg gtctgtatag catttatcag ggtggcattt ttgaactgaa agaaaatgat 480
 cgcatttttg tgagcgtgac caatgaacat ctgattgata tggatcatga agccagcttt 540
 tttggtgcat ttctggttgg ttgtcagca tgtcagccgc catgtggtgg tccgttggtt 600
 ctggcaggtc gtgtgttctg taaatggtgt ttctgtgtt gtatcgcggt tattgttat 660
 cgtcgttgc gc 672

<210> 64
 <211> 606
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 64

```
gttcgtgaac gtggtccgca gcgtgttgca gcacataatta ccggcacccg tggtcgtagc      60
aataccctga gcagcccgaa tagcaaaaat gaaaaagcac tgggtcgcaa aattaatagc      120
tgggaanaga gcgtagcgg tcatagcttt ctgagcaatc tgcactctgg taatggtgaa      180
ctggtgatc atgaaaaagg cttttattat atttatagcc agacctatct tgcctttcaa      240
gaggaaatfa aagaaaatac caaaaatgat aaacaaatgg tgcagtacat cfataaatac      300
accagctatc cggatccgat tctgtgatg aaaagcgcac gtaatagctg ttggagcaaa      360
gatgcagaat atggtctgta tagcatttat cagggtggca tttttgaact gaaagaaaat      420
gatcgcattt ttgtgagcgt gaccaatgaa catctgattg atatggatca tgaagccagc      480
ttttttggtg caittctggt tggtcgctg ggcttgccag gtcgtgtgtg gcgtcgtcgc      540
cgtcgcctgc gtctgaaatg gtgttttctg gtttgttctc geggtatttg ttatcgtcgt      600
tgccgc                                           606
```

<210> 65

<211> 729

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

[0050]

<400> 65

```
ggtattggca aatttctgca tagcgccaaa aaattcggca aagcatttgt gggcgaaatt      60
atgaatagcg gtggtcagcg tcgggtaaat cagtgggcag ttggtcatct gatgcgtgtt      120
gttcgtccgc tgggtctggc aggtttgca gcagcatgtg cagcctgtac cagcgaagaa      180
accattagca ccgttcaaga aaaacagcag aatattagtc cgtctggttc tgaacgtggt      240
ccgcagcgtg ttgcagcaca tattaccggc acccgtggtc gtagcaatac cctgagcagc      300
ccgaatagca aaantganaa agcactgggt cgcnaantca atagctggga aagcagccgt      360
agcggtcata gctttctgag caatctgcat ctgcgtaatg gtgaactggt gattcatgaa      420
aaaggettct acfatatcta tagccagacc tatttcgct tccaagaaga aatcaangaa      480
aacacaaaa atgataaaca aatgggtcag tatatctaca aatataccag ctatccggat      540
cagattctgc tgatgaaaag cgcacgtaat agctgttgga gcaaagatgc agaataatgt      600
ctgtatagca tttatcaggg tggcatcttt gagctgaaag aaaaatgatc catctttgtt      660
agcgtgacca acgaacatct gatcgatatg gatcatgaag ccagcttttt tggtgcatit      720
ctggigggt                                           729
```

<210> 66

<211> 588

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 66

```
ggtattggca aatttctgca tagcgccaaa aaatttggca aagcatttgt gggcgaaatt      60
```


atgaatagcc gtgtgtgtcg tccgtgggt ctggcaggtc cgcagcgtgt tgcagcacat 120
 attaccggca cccgtggtcg tagcaatacc ctgagcagcc cgaatagcaa aaatgaaaaa 180
 gcactgggtc gcaaaattaa tagctgggaa agcagccgta gcggtcatag ctttctgagc 240
 aatctgealc tgcglaattg lgaactggig attcatgaaa aaggcillia ttataillat 300
 agccagacct attttcgctt tcaagaggaa attaaagaaa ataccaaaaa tgataaacia 360
 atggtgcagt acatctataa atacaccage tatecggatc cgattctgct gatgaaaagc 420
 gcacgtaata gctgttggag caaagatgca gaatatggtc tgtatagcat ttatcagggt 480
 ggcatttttg aactgaaaga aaatgatcgc atttttctga gcgtgacca tgaacatctg 540
 attgatattg atcatgaagc cagctttttt ggtgcatttc tggtaggt 588

<210> 67
 <211> 606
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 67
 cgtgttcag cacatattac cggcaccgt ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat 60
 agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcggc 120
 catagcttct tgagcaatct gcctctgcgt aatggatgaac tggtagtca tgaaaaaggc 180
 ttttattata ttatagcca gacctatttt cgttttcaag aagaattaa agaaacacc 240
 aaaaatgata acaaatggc gcagtatatt tacaatatata ccagctatcc ggatccgatt 300
 ctgctatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaag atgcagaata tggctctgat 360
 agcatttatc aggttggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatttt tgtgagcgtg 420
 accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttgggc atttctggtt 480
 ggtggtggtg gcgttagcgg tggtaggtgt cgtgtgttc gicccgtggg tctggcaggc 540
 cgtcgtcgtc gccgtcgtc gcgtaaactg gcaaaactgg ccaaaaaact ggcgaaactg 600
 getaaa 606

<210> 68
 <211> 615
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 68
 cgtgttcag cacatattac cggcaccgt ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat 60
 agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcggc 120
 catagcttct tgagcaatct gcctctgcgt aatggatgaac tggtagtca tgaaaaaggc 180
 ttttattata ttatagcca gacctatttt cgttttcaag aagaattaa agaaacacc 240
 aaaaatgata acaaatggc gcagtatatt tacaatatata ccagctatcc ggatccgatt 300
 ctgctatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaag atgcagaata tggctctgat 360
 agcatttatc aggttggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatttt tgtgagcgtg 420
 accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttgggc atttctggtt 480

[0051]

ggtaggtggtg caagcgggtg tggtcgggaa ggtggtggtg gtccgctggg tctggcaggt 540
 cgtgttgttc gtcgtcgtcg tcgcccgtcg cgtaaactgg caaaactggc caaaaaactg 600
 gcgaaactgg ctaaa 615

<210> 69
 <211> 684
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 69
 accagcgaag aaaccattag cnccggtcag gaaaaacagc agaatattag tccgctggtt 60
 cgtgaacgtg gtccgcagcg tgttcagca catattaccg gcacccgtgg tcttagcaat 120
 accctgagca gcccgaaatag caaaaatgaa aaagcactgg gtccgaaat taatagctgg 180
 gaaagcagcc gtagcggica tagctttcig agcaatctgc atctgcgtaa tggtagaactg 240
 gtgattcatg aaaaaggctt ttattatatt tatagccaga cctatcttcg ctttcaggaa 300
 gaaattaaag aaaaatacaa aaatgataaa caaatggcgc agtatatcta taaatacacc 360
 agetatccgg atccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgtg gagcaaagat 420
 gcagaatatg gtctgtatag catttatcag ggtggcattt ttgaactgaa agaaaatgat 480
 cgcatttttg tgagcgtgac caatgaacat ctgattgata tggatcatga agccagcttt 540
 tttagtgcac ttctggttgg tggtagtgcc ggtagcgtg gtggtggtcg tgttgttcgt 600
 ccgctgggtc tggcaggtcg tcgtcgtcgt agacgtcgtc gtaaactggc aaaactggcc 660
 aaaaaactgg cgaaactggc taaa 684

[0052]

<210> 70
 <211> 576
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 70
 catcatcatc accatcaaa actggcaaaa ctggccaaaa aactggcgaa actggctaaa 60
 tgtcgtgttg ttctctcgtt ggtcttgcca ggtcgtgttg cagcacatat taccggcacc 120
 cgtggtcgta gcaataccct gaggagcccg aatagcaaaa atgaaaaagc actgggtcgc 180
 aaaaatcaata gctgggaaag cagccgtagc ggtcatagct ttctgagcaa tctgcatctg 240
 cgtaatggtg aactggtgat tcatgaaaaa ggcttttatt atatttatag ccagacctat 300
 ttctgctttc aagaagagat taaagaaaat accaaaaatg ataaacaaat ggtgcagtat 360
 atctataaat ataccagcta tccggaccgg attctgtgta tgaaaagcgc acgtaatagc 420
 tgttggagca aagatgcaga atatggtctg tatagcattt atcagggtgg catctttgag 480
 ctgaaagaaa atgatcgcat ctttgttagc gtgaccaacg aacatctgat cgatatggat 540
 catgaagcca gcttttttgg tgcatttcig gtgggt 576

<210> 71
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 71

catcatcatc accatcacaa actggcaaaa ctggccaaaa aactggcgaa actggctaaa	60
tgtcgtcgtc gtcccgctcg gcgtcgtcgt gtgttcgtc cgtctgggtct ggcaggtcgt	120
gttcagcagc atattaccgg caccctgggt cgtagcaata ccttagcagc ccgaatagc	180
aaaaatgaaa aagcactggg tcgcaaaatc aatagctggg aaagcagccg tagcggtcct	240
agctttctga gcaatctgca tctgcgtaat ggtgaactgg tgattcatga aaaaggtttt	300
tattatattt atagccagac ctattttcgc ttcaagaag agatttaaga aaataccaaa	360
aatgataaac aaatggtgca gtatatctat aaatacacca gctatccgga ccgattctg	420
ctgatgaaaa gcgcacgtaa tagctgttgg agcaaagatg cagaatatgg tctgtatagc	480
attatcagg gtggcatctt tgagctgaaa gaaaatgac gcattttgt tagcgtgacc	540
aacgaacatc tgatcgatat ggaatgaa gccagctttt ttggtgcatt tetggtgggt	600

<210> 72

<211> 606

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 72

cgtgttcag cacatattac cggcacccgt ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat	60
agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag cgtagcgggt	120
catagctttc tgagcaatct gcattcgtc aaiggtgaac tggtagtcca tgaaaaaggc	180
ttttattata ttatagcca gaactatttt cgcittcagg aagaaattaa agaaaatacc	240
aaaaatgaia acaaatgggt gcagtatct tataaatata ccagctatcc ggaaccgatt	300
cgtcgtatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaag atgcagaata tggctgttat	360
agcatttatc aggggtggcat tttgaactg aaagaaaatg atgcatttt tgtgagcgtg	420
accaatgnae atctgattga tatggtcat gaagccagct tttttgtgc atttctggtt	480
ggtggtggtg gcgtagcgg tgggtgggt cgtgtgttc gtccgctggg tetggcaggt	540
cgtcgtcgtc gtagacgtc tcgtaaactg gcaaaactgg ccaaaaaact ggcgaactg	600
gctaaa	606

<210> 73

<211> 624

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 73

aaatggaaac tgtttaaaa aattggcatt ggtgccttgc tgaaagttct gaccaccggt	60
ctgcctgcac tgattagcgg tgtgttcgt ccgctgggtc tggcaggcga acgtggtccg	120
cagcgtgttg cagcacatc taccggcacc cgtgtgtcga gcaatacct gagcagcccg	180
aatagcaaaa atgaaaagc actgggtcgc aaaattaata gctgggaaag cagccgtagc	240
ggcatagct ttctagcaa tctgcatctg cgtaatgggt aactggtgat tcatgaaaa	300

[0053]

ggcttttatt atatttatag ccagacctat ttctgcttcc aagaggaaat taaagaaaat 360
 accaaaaaat ataacaat ggtgcagtat atctataaat ataccagcta tccggatccg 420
 attctgctga tgaagaagcgc acgtaatagc igttggagca aagatgcaga atatggctcg 480
 tatagcattt atcagggtgg catttttgaa ctgaaagaaa atgatcgcat tttgtgagc 540
 gtgaccaatg aacatctgat tgatatggat catgaagcca gcttttttgg tgcatttctg 600
 gttggctccg tgggcctggc iggt 624

<210> 74
 <211> 609
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 74
 ttctgcacaa gcaaaagaaa aattggcaaa ttttttaaac gcatigtgca gcgcattttt 60
 gattttctgc gtaatctggt tctgttgttt cgtccgctgg gtctggcagg cgaacgtggt 120
 ccgcagcgtg ttgcagcaca tattaccggc acccgtggtc gtagcaatac cctgagcagc 180
 ccgaatagca aaaaatgaaa agcactgggt cgcacaaatta atagctggga aagcagccgt 240
 agcggtcata gctttctgag caatctgcat ctgcgtaatg gtgaactggt gattcatgaa 300
 aaaggctttt attatattta tagccagacc tattttcgtt ttcaagagga aattaaagaa 360
 aataccacaaa atgataaaca aatgggtcag tatatctata aatataccag ctatccggat 420
 ccgattctgc tgaatgaaaag cgcacgtaat agctgttggg gcaaagatgc agaatatggt 480
 ctgtatagca tttatcaggg tggcattttt gaactgaaag aaaaatgatc catttttgtg 540
 agcgtgacca atgaacatct gattgatatg gatcatgaag ccagcttttt tgggtgcattt 600
 ctggtttggt 609

[0054]

<210> 75
 <211> 609
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 75
 gttggtctgc gtagcctggg tctgaaaatt ctgcgtgcat ggaaaaata tggctccgatt 60
 attgtgccga ttattctgat tctgttgttt cgtccgctgg gtctggcagg cgaacgtggt 120
 ccgcagcgtg ttgcagcaca tattaccggc acccgtggtc gtagcaatac cctgagcagc 180
 ccgaatagca aaaaatgaaa agcactgggt cgcacaaatta atagctggga aagcagccgt 240
 agcggtcata gctttctgag caatctgcat ctgcgtaatg gtgaactggt gattcatgaa 300
 aaaggctttt attatattta tagccagacc tattttcgtt ttcaagagga aattaaagaa 360
 aataccacaaa atgataaaca aatgggtcag tatatctata aatataccag ctatccggat 420
 ccgattctgc tgaatgaaaag cgcacgtaat agctgttggg gcaaagatgc agaatatggt 480
 ctgtatagca tttatcaggg tggcattttt gaactgaaag aaaaatgatc catttttgtg 540
 agcgtgacca atgaacatct gattgatatg gatcatgaag ccagcttttt tgggtgcattt 600
 ctggtttggt 609

<210> 76
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 76
 cgtgttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaaat 60
 agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcgggt 120
 catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggggaac tgggtattca tgaaaaaggc 180
 ttttattata tttatagcca gacctatttt cgctttcagg aagaaattaa agaaaaatacc 240
 aaaaatgata agcagatggg gcagtataat tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300
 ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctctgtat 360
 agcattttatc aggggtggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatitt tgtgagcgtg 420
 accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggtt 480
 ggtgggtgga gcggtggtcc gctgggtctg gcaggtcgtg ttgttcgtgg tctggttgaa 540
 accctgacca aaattgttag ctatggtatt gataaactga ttgaaaaaat tctggaagggt 600

<210> 77
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

[0055]

<400> 77
 cgtgttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaaat 60
 agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcgggt 120
 catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggggaac tgggtattca tgaaaaaggc 180
 ttttattata tttatagcca gacctatttt cgctttcagg aagaaattaa agaaaaatacc 240
 aaaaatgata agcagatggg gcagtataat tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300
 ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctctgtat 360
 agcattttatc aggggtggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatitt tgtgagcgtg 420
 accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggtt 480
 ggtgggtgga gcggtggtcc gctgggtctg gcaggtcgtg ttgttcgtgg ttttattgca 540
 accctgacca aagtcttgga ttttggtatt gataaactga ttcagctgat tgaagataaa 600

<210> 78
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 78
 cgtgttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaaat 60
 agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcgggt 120
 catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggggaac tgggtattca tgaaaaaggc 180

	tittattata tttatageca gacctatitt egctttcagg aagaaattaa agaaaatacc	240
	aaaaatgata agcagatggt gcagtataac tataaatata ccagctatcc ggatccgatt	300
	ctgctgatga aaagcgacg iaatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctgtat	360
	agcatttata aggggtggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatitt tgtgagcgtg	420
	accaatgaac atctgatiga tatggatcat gaagccagct tttttgggtg atttctggtt	480
	gggtgggtga ggggtgggcc gctgggtctg gcagggtcgt ttgttcgtgg ttttctgggc	540
	accctggaaa aaattctgag ctttgggtgt gatgaactgg ttaaaactgat tgaaaatcat	600
	<210> 79	
	<211> 570	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 融合肽	
	<400> 79	
	ggtctgtcgg aagcaactggc agaactgctg gaaggtcggc gtcgtcgtcg tggcgtcgt	60
	gtgttcgtc cgtgggtctt ggcaggctgt gttgcagcac atattaccgg caccctgtgt	120
	cgtagcaata cctgagcag ccggaatagc aaaaatgaaa aagcaactggg tcgcaaaatt	180
	aatagctggg aaagcagcgg tagcggctat agctttctga gcaatctgca tctgcgtaat	240
	ggtgaactgg tgattcatga aaaaggtttt tattatattt atagccagac ctattttcgc	300
	tttcagggaag aaattaaaga aaacaccaa aacgataaac aaatgggtgca gtatatctat	360
	aaatacacca gctatccgga tccgattctg ctgatgaaaa gcgcacgtaa tagctgttgg	420
[0056]	agcaaagatg cagaataagg tctgtatagc attatcagg gtggcatitt tgaactgaaa	480
	gaaaatgacg gcatttttgt gagcgtgacc aaigaacatc tgattgatat ggatcatgaa	540
	gccagctitt ttgggtcatt tctgggtgtt	570
	<210> 80	
	<211> 1287	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 融合肽	
	<400> 80	
	tgggatggta aaattgatgg caccggcacc catgcaatga ttgttaccga gggtgttagc	60
	attctggaaa atgataatgag caaaaatgaa ccggaaagcg tgcgtaaaaa tctggaaatt	120
	ctgaaagata atatgcata actgcagctg ggtagcacct atccggatta tgataaaaaat	180
	gcctatgacg tgtatcagga tcattttttg gatccggata ccaataataa ttttagcaaa	240
	gataatagct ggtatctggc ctatagcatt ccggataccg gtgaaagcca gattcgtaaa	300
	tttagcgac tggcagctta tgaatggcag cgtggtaatt ataaacagge aaccttttat	360
	ctgggcgaag ccatgcatta ttttgggtgat attgataccc cgtatcatcc ggcaaatgtt	420
	accgcagttg atagcgcagg tcatgttaaa ttigaaacct ttgccgaaga acgcaaagaa	480
	cagtalaaaa ttaataccgt gggcigcaaa accaatgaag atttttatgc cgatatccig	540
	aaaaataaag attttatgac ctggtccaaa gaatatgcac gtggttttgc aaaaaccggc	600
	aaaagcattt attatagcca tgcgaagcatg agccatagct gggatgatgt ggattatgca	660

gcaaaagtta ccctggcaaa tagccagaaa ggcaccgcag gttatatatta tcgtttttctg 720
 catgatgtga gcgaaggtaa tgggtgggtt ggcgggtgta gcgaagcgg ttgtgggtccg 780
 gaaggcgggtg gtgggtgggtt ttcacgtgtt gcagcacata ttaccggcac ccgtgggtcgt 840
 agcaalaacc tgagcagccc gaataglaaa aalgaaaaag cactgggltcg caaaaataat 900
 agctgggaaa gcagccgtag cggatcatagc tttctgagca atctgcattt gcgtaatggt 960
 gaaatgggtg ttcatgaaaa aggtttttat tatatttata gccagaccia ttttctgttt 1020
 caagaagaaa ttaaagaaaa taccaaaaat gataagcaga tgggtgcagta tatctataaa 1080
 tataccagct atccggatcc gattctgtctg atgaaaagcg cagctaatac ctgttggagc 1140
 aaagatgcag aatatgtgtc gtatagcatt tatcagggtg gcatttttga actgaaagaa 1200
 aatgatcgca tttttgtgag cgtgaccaat gaacatctga ttgatatgga tcatgaagcc 1260
 agcttttttg gtgcatttct ggttgggt 1287

<210> 81

<211> 1974

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合肽

<400> 81

[0057]

catgccgatg aaattgataa atatatteag ggcttggtt ataataaaaa caatgtgctg 60
 gtgtatcatg gtgatgccgt taccantgtt ccaccgcga aaggttataa agatggcaat 120
 gaatatattg ttgtggagaa aaaaaaaaaa tccatcaatc agaataatgc cgatatteag 180
 gtgggtgaatg caattagcag cctgacctat ccgggtgcac tgggttaaagc aaatagcgaa 240
 ctggttgaaa atcagccgga tgttctgccg gttaaaccgtg atagcctgac cctgagcatt 300
 gatctgccctg giatgaccaa tcaggataat aaaattgttg tgaaaaatgc caccaaaagc 360
 aatgttaata atgccgttaa taccctgggtg gaacgcctga aagagaaata tgcacaggca 420
 tatccgaatg tgagcgccaa aattgattat gatgatgaaa tggcctatag cgaaagccag 480
 ctgattgcaa aatttggcac cgcatttaaa gccgttaata atagcctgaa tgtgaatttt 540
 ggtgccatta gcgaaggcaa aatgcaggaa gaagttatta gctttaagca gatctattat 600
 aacgtgaatg tgaatgaacc gaccgcctcg agccgttttt ttggtaaagc agttaccaa 660
 gaacagctgc aggcactggg tgttaatgca gaaaatcctc cggcatatat ttcaagcgtt 720
 gccatgtgtc gtcaggttta tcigaaactg agcaccaata gccatagcac caaagttaaa 780
 gcagcatttg atgcagcagt tagcggtaaa agcgttagcg gtgatgttga actgaccaat 840
 attattaaaa attccagctt taaagccgtg atttatgggt gtagegcaa agatgaagtg 900
 cagattattg atgtaatctt ggtgatctg cgcgatattc tgaaaaaagg tgcaaccttt 960
 aaccgtgaaa caccgggtgt tccgattgca tataccacca attttctgaa agataatgaa 1020
 ctggccgtga ttaaaaataa tagcgaatat attgaaacca cgagcaaagc atataccgat 1080
 ggcaaaaata atattgata tagcgggtgc tatgtgccc agtttaatat tagctgggat 1140
 gaaatgaatt atgatccgga aggcaatgaa attgtgcagc ataaaaattg gagcgaaaat 1200
 aataaaagca aactggccca ttttaaccagc agcatttate tgccgggtan tgcacgtaat 1260
 attaatgtgt atgocaaaga atgtaccgtt ctggcatggg aatggtggcg taccgttatt 1320

	gatgategta atctgccgct ggtgaaaaat cgcaatatta gcatttgggg caccacccctg	1380
	tatccgaaat atagcaatag cgttgggtgt ggtggtagcg gtggtggtgg cggttcacgt	1440
	aaaaaacgtg caagcgggtg tgggccggaa ggtggcgggtg gcggtggtag ccgtgttgca	1500
	gcacalatta ceggeacccg tggctgtagc aalaccctga gcagcccgaa tagcaaaaat	1560
	gaaaaagcac tgggtcgtaa aattaatagc tgggaaagca gccgtagcgg tcatagcttt	1620
	ctgagcaate tgcattctgc taatggigaa ctggtgattc atgaaaaagg cttttattat	1680
	atttatagcc agacctatct tgcctttcag gaagaaatta aagaaaatac caaaaatgat	1740
	aagcagatgg tgcagtatat ctataaatat accagctatc cggatccgat tctgctgatg	1800
	aaaagcgcac gtaatagctg ttggagcaaa gatgcagaat atggtctgta tagcatttat	1860
	cagggtggca tctttgaact gaaagaaaaat gatcgcatct ttgtgagcgt gaccaatgaa	1920
	catctgattg atatggatca tgaagccagc ttttttgggt catttctggt tgggt	1974
	<210> 82	
	<211> 1434	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 融合肽	
	<400> 82	
	aaatttaaaa aagtgggtgt ggttatgtgt ctgaccgcaa gcgttctggt ttttccggtt	60
	accattaaag caagcgcgat ctgtgatgaa tatctgaaac ctccggcagc accgcgatg	120
	attgatagca aactgccgca taaactgagc tggtcagcag ataatccgac caataccgat	180
[0058]	gtgaatacce attattggct gttaaaaacg gccgaaaaaa ttctggccaa agatgttgat	240
	cacatgcgtg caaatctgat gaatgaactg aaaaattttg ataagcagat tgcccagggc	300
	atttatgaig ccgatcataa aaatccgtat tatgatacca gcacctttct gagccatttt	360
	tataatccgg ataaagataa tacttatctg ccaggctttg ccaatgcaaa aattaccggt	420
	gccaaatatt ttaatcagag cgttgccgat tatcggaag gtaaatttga taccgccttt	480
	tataaacctg gectggccat tcattattat accgatatta gccagccgat gcattgccat	540
	aattttaccg caattagcta tcttccgggt tateattgtg cctatgaaaa ttatgtggat	600
	accattaaac ataattatca ggccaccgaa gatatgggtt ttcagcgitt ttgcagcaat	660
	gatgttaaaag aatggctgta tgaaaatgcc aaacgtgcaa aagccgatta tccgaaaatt	720
	gttaatgcea aaacaaaaaa aagctatctg gtgggtaata gegaatggaa aaaagatacc	780
	gttgaaccga cgggtgcacg tctgcgtgat agccagcaga ccttggcagg ttttctggaa	840
	ttttggagca aaaaaaccaa tgaagggtgt ggtggtctgt gtggtggtgg cggtagccgt	900
	aaaaaacgtg caagcgggtg tgggccggaa ggtggcgggt gcggtggtag ccgtgttgca	960
	gcacatatta ceggeacccg tggctgtagc aataccctga gcagcccgaa tagcaaaaat	1020
	gaaaaagcac tgggtcgcaa aattaatagc tgggaaagca gccgtagcgg tcatagcttt	1080
	ctgagcaate tgcattctgc taatggigaa ctggtgattc atgaaaaagg cttttattat	1140
	atttatagcc agacctatct tgcctttcag gaagaaatca aagaaaatac caaaaacgat	1200
	aagcagatgg tgcagtatat ctataaatat accagctatc cggatccgat tctgctgatg	1260
	aaaagcgcac gtaatagctg ttggagcaaa gatgcagaat atggtctgta tagcatttat	1320

cagggtggca tttttgaact gaaagaaaat gategcattt ttgtgagcgt gaccaatgaa	1380
catctgattg atattggatca tgaagccagc ttttttgggt catttctggt tgggt	1434
<210> 83	
<211> 1083	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 融合肽	
<400> 83	
agcgcagatg ttgccgtgc agttattgat ggtgcaagcc tgagctttga tattctgaa	60
accgttctgg aagccctggg taatgtgaaa cgtaaaattg cagtggcgt ggataatgaa	120
agcggtaaaa cctggaccgc actgaatacc tattttcgta gcggcaccag cgatattgtt	180
ctgccgcata aagtccgca tggtaaagca ctgctgtata atggtcagaa agatcgtggt	240
ccggttgcca ccggtgccgt tgggtttctg gcatactga tgagtgatgg taataacctg	300
gcagttcigt ttagegttcc gtaigattat aactggtata gcaattgggt gaacgtgcgt	360
atctataaag gtaaacgtgc tgcagatcag cgcattgatg aagaactgta ttataaccig	420
agcccgtttc gtggcgataa tggttggcat acccgtaac tgggttatgg tctgaaaagc	480
cgtggtttta tgaatagcag cgtcatgca attctgaaa ttcattgtac caaagccggt	540
ggtggtggta gccgtaaaa acgtgcaagc ggttgtggtc cggaaggtag tggcggttca	600
cgtgttcgag cacatattac cggcacccgt ggtcgtagca ataccctgag tagcccgat	660
agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa atcaatagct gggaaagcag ccgtagcgtt	720
catagcttcc tgagcaatct gcactgcgt aatggtagac tggtagttca tgaaaaaggc	780
ttctactata tctatagcca gacctattc cgttccaag aagaaatcaa agaaaatacc	840
aaaaacgata acaaatggt gcagtatct tacaatata ccagctatcc ggatecgatt	900
ctgtatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaag atgcagaata tggctgtat	960
agcattatc agggtagcat cttagagctg aaagaaaatg atcgatctt tgttagcgtg	1020
accaacgaac atctgatega tatggatcat gaagccagct tttttgtgc atttctggtg	1080
ggt	1083
<210> 84	
<211> 681	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 融合肽	
<400> 84	
aaaagctgtt gtccgaatac caccgtgc aatatttata atgcctgtgc tctgaccggt	60
gcacctgtgc cgacctgtgc aaaactgagc ggctgcaaaa ttatttagcgg tagcacctgt	120
ccgagcgatt atccgaacc gctgggtctg gcaggtcgtg ttgttcgtgg tggtagcgtt	180
ggtgaacgtg gtccgcagcg tgttcagca catattaccg gcacccgtgg tcttagcaat	240
accctgagca gcccgatag caaaaatgaa aaagccctgg gtgcgcaaat taatagctgg	300
gaaagcagcc gttagcgta tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggtagaactg	360
gtgattcatg aaaaagctt ttattatatt tatagccaga cctattttcg cttagaggaa	420

[0059]

	gaaattaaag aanaataccaa aatgataag cagatgggtgc agtatatcta taagtataca	480
	agctateccgg atccgattct gcfgatgaaa agcgcaagta atagctgttg gagcaaagat	540
	gcagaataig gccgtlatag catttaicag ggiggcattt tgaacigaa agaaaaigat	600
	cgcatttttg tgagcgtgac caatgaacat ctgattgata tggatcatga agccagcttt	660
	tifgggtgcat ttctgggtggg c	681
	<210> 85	
	<211> 672	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 融合肽	
	<400> 85	
	cgtgttgcag cacatattac cggcacccgt ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaa	60
	agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcgg	120
	catagcttct tgagcaatct gcatctgcgt aatggigaac tggtagttca tgaaaaagc	180
	ttttattata ttatagcca gacctatctt cgtttcagg aagaaattaa agaaaaaac	240
	aaaaatgata acaaatggt gcagtatct tataaatata ccagctatcc ggatccgatt	300
	ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctgtat	360
	agcatttctc aggggtggcat tttggaactg aaagaaaatg atcgcatctt tgtgagcgtg	420
	accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggt	480
	ggtggtggtg gttagcgttg tggtcgctg ggtctggcag gtcgtgtgt tegttaaagc	540
[0060]	tgttgtccga ataccaccgg tcgcaatatt tataatgcat gtcgtctgac cggtcacct	600
	cgtccgacct gtcaaaact gacgggttgt aaaattatta gcggtagcac ctgtccgagc	660
	gattatccga aa	672
	<210> 86	
	<211> 600	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 融合肽	
	<400> 86	
	cgtgttgcag cacatattac cggcacccgt ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaa	60
	agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa atcaatagct gggaaagcag ccgtagcgg	120
	catagcttct tgagcaatct gcatctgcgt aatggigaac tggtagttca tgaaaaagc	180
	ttttattata ttatagcca gacctatctt cgtttcaag aagagattaa agaaaaaac	240
	aaaaatgata acaaatggt gcagtatct tataaatata ccagctatcc ggaccgatt	300
	ctgtgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctgtat	360
	agcatttctc aggggtggcat cttagagctg aaagaaaatg atcgcatctt tgttagcgtg	420
	accaacgaac atctgatga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggt	480
	ggtggtggtg gcggtagcgg agcaccgtgt cataccgcag cacgtagcga atgtaaacgt	540
	agccataaat ttgttccggg tgcattggctg gcaggcgaag gtgttgaigt taccagctg	600
	<210> 87	

<211> 630
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

<400> 87
 cgtgttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaaat 60
 agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa atcaatagct gggaaagcag ccgtagcgggt 120
 catagctttc tgagcaatct gcattctgct aatggtgaac tggtagttca tgaaaaagge 180
 ttttattata tttatagcca gacctatttt cgttttcaag aagagattaa agaaaatacc 240
 aaaaatgata acaaatggt gcagtacatc tataaatata ccagctatcc ggacccgatt 300
 ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctctgat 360
 agcatttate agggtagcat ctttagctg aaagaaaatg atcgcatctt tgttagcgtg 420
 aecaacgaac atctgatga tatggatcat gaagccagct tttttgggc atttctggtt 480
 ggtggtggtg gcggtagcgg tctgttgtt cgtccgctgg gtcggtctgg cgcaccgtgt 540
 cataccgcag cagctagcga atgtaaactg agccataaat ttgttccggg tgcattgctg 600
 gcaggcgaag gtgtgatgt taccagcctg 630

<210> 88
 <211> 1308
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合肽

[0061]

<400> 88
 gatgtgattc gcgaatatct gatgtttaat gaactgagcg cactgagcag cagtccggaa 60
 agcgttctga gccgttttag cagcatttat ggcaccaate cggatggtat tgcactgaat 120
 aatgaacctt atttcaatgc cgtgaaacct ccgattaccg cacagtatgg ttattattgc 180
 tacaaaaatg ttggcaccgt gcagtatgtt aatcgctcca ccgatattaa tccgaatgtt 240
 attctggcac aggataccct gaccnataat accantgaac cgtttaccac caccattacc 300
 attaccggta gcttiacca taccagcacc gttaccagca gcaccaccac cggtttcaaa 360
 ttaccagca aactgagcat caaaaaagt ttigaaattg gtggcgaagt gacgtttagc 420
 accaccattg gcaccagcga aaccaccacc gaaaccatta ccgtgagcaa aagcgttacc 480
 gttaccgttc cggcacagag ccgtcgtacc attcagetga ccgcaaaaat tgcaaaagaa 540
 agcgcagatt ttagcgcacc gattaccgtt gatggttatt ttggtgcaaa ttttcgaaa 600
 cgtgttggtc cgggtggtca ttacttttgg tttaatecgg cactgtatgt gctgaatacc 660
 accagtggca cctgcgtgg tacagtacc aatgtttcta gctttgatit tcagaccatt 720
 gttcagcctg cactagcct getggatgaa cagcgtgttg ttctctcgtt gggctctggca 780
 ggcggtagcg gtgtgtgttc aggtgtgtgt gaacgtggtc cgcagcgtgt tgcagcacat 840
 attaccggca cccgtggtcg tagcaatacc ctgagcagcc cgaatagcaa aaatgaaaaa 900
 gcactgggtc gcaaaaleaa tagctgggaa agcagccgta ggggtcatag ctttctgagc 960
 aatctgcac tgcgtaattg tgaactggtg attcatgaaa aaggtcttca ctatatttac 1020
 agccagacct attttcgtt tcaggaagaa attaaagaaa ataccaaaaa tgataaaca 1080

	atgggtgcagt atatetataa atacaccagc tatccggatc cgattctgct gatgaaaagc	1140
	gcacgtaata gctgttggag caaagatgca gaatatggcc tgtatagcat ttatcagggt	1200
	ggcatttttg aacigaaaaga aaatgatcgc atttttgtga gcgtgaccaa tgaacatctg	1260
	attgatatgg atcatgaagc aagtttcttt ggtgcatttc tggtagggc	1308
	<210> 89	
	<211> 645	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 融合肽	
	<400> 89	
	cgtgtggcgg cgcatattac cggcaccggt ggccgtagca acaccctgag cagcccgaa	60
	agcaaaaacg aaaaagcgct gggccgtaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc	120
	catagctttc tgagcaacct gcattctgct aacggcgaac tggtagttca tgaaaaagc	180
	ttttattata tttatagcca gacctatfff cgttttcagg aagaaattaa agaaaacacc	240
	aaaaacgata aacagatggt gcagtatatt tataaatata ccagctatcc ggatccgatt	300
	ctgctgatga aaagcgcgcg taacagctgc tggagcaaag atgcggaata tggcctgtat	360
	agcattttatc agggcggcat ttttgaacig aaagaaaacg atcgtatfff tgtgagcgtg	420
	accaacgaac atctgattga tatggatcat gaagcgagct tttttggcgc gtttctggtg	480
	ggcggctgcg cggcgtgcgc ggcggcgtgc ggcggcggcc cgttggcctt ggcgggcctt	540
[0062]	gtggtgcgtt ataatggta tggctatacc ccgcagaacg tgattggcgg cggcaactg	600
	ctgctgaaac tgetgaaaaa actgetgaaa ctgetgaaaa aaaaa	645
	<210> 90	
	<211> 281	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 90	
	Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr Cys	
	1 5 10 15	
	Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala	
	20 25 30	
	Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys	
	35 40 45	
	Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr	
	50 55 60	
	Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val	
	65 70 75 80	
	Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser	
	85 90 95	
	Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro	
	100 105 110	

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
 115 120 125
 Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
 130 135 140
 Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
 145 150 155 160
 His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
 165 170 175
 His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Glu Thr Tyr Phe Arg Phe
 180 185 190
 Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 195 200 205
 Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 210 215 220
 Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
 245 250 255
 Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
 260 265 270
 Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 275 280

[0063]

<210> 91
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -

<400> 91

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys
 1 5 10 15
 Lys Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Pro Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Lys
 20 25 30
 Arg Lys Arg Leu Lys Pro Thr Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala
 35 40 45
 Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ser Gly Gly Arg Val
 50 55 60
 Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser
 65 70 75 80
 Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp
 85 90 95

Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg
 100 105 110
 Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser
 115 120 125
 Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn
 130 135 140
 Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp
 145 150 155 160
 Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu
 180 185 190
 Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile
 195 200 205
 Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 210 215 220
 <210> 92
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> -
 <400> 92
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Arg Arg
 1 5 10 15
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala
 20 25 30
 Cys Ala Ala Cys Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys
 35 40 45
 Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val
 50 55 60
 Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser
 65 70 75 80
 Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp
 85 90 95
 Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg
 100 105 110
 Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser
 115 120 125

[0064]

Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn
130 135 140

Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp
145 150 155 160

Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp
165 170 175

Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu
180 185 190

Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile
195 200 205

Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
210 215 220

<210> 93
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 93

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Arg Arg
1 5 10 15

[0065]

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
20 25 30

Glu Gln Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Ser Glu
35 40 45

Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu
50 55 60

Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
65 70 75 80

Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
85 90 95

Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
100 105 110

Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
115 120 125

Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
130 135 140

Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
145 150 155 160

Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
165 170 175

Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
195 200 205

Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser
210 215 220

Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
225 230

<210> 94
<211> 207
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 94

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85 90 95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
165 170 175

Arg Val Val Arg Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Gly
180 185 190

[0066]

Gly Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys
195 200 205

<210> 95
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 95

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85 90 95

[0067]

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
165 170 175

Arg Val Val Arg Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Gly
180 185 190

Gly Arg Trp Gly Lys Trp Phe Lys Lys Ala Thr His Val Gly Lys His
195 200 205

Val Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ala Tyr Leu
210 215

<210> 96
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> -
 <400> 96
 Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
 35 40 45
 Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60
 Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Asn Asp Lys Glu Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95
 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140
 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
 165 170 175
 Arg Val Val Arg Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Gly
 180 185 190
 Gly Gly Arg Arg Lys Arg Lys Trp Leu Arg Arg Ile Gly Lys Gly Val
 195 200 205
 Lys Ile Ile Gly Gly Ala Ala Leu Asp His Leu
 210 215

[0068]

<210> 97
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -
 <400> 97
 Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85 90 95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
165 170 175

[0069]

Arg Val Val Arg Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro
180 185 190

Gly Gly Gly Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu
195 200 205

Leu Lys Lys Lys
210

<210> 98

<211> 207

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> -

<400> 98

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

```

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65          70          75          80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85          90          95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100        105        110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115        120        125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130        135        140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145        150        155        160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
165        170        175

Arg Val Val Arg Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
180        185        190

Gly Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys
195        200        205

```

[0070]

```

<210> 99
<211> 211
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 99

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1          5          10          15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20        25        30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35        40        45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50        55        60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65          70          75          80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85          90          95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100        105        110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115        120        125

```

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
165 170 175

Arg Val Val Arg Gly Arg Phe Lys Arg Phe Arg Lys Lys Phe Lys Lys
180 185 190

Leu Phe Lys Lys Leu Ser Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp Ala Val Gly
195 200 205

His Leu Met
210

<210> 100

<211> 210

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> -

<400> 100

[0071]

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85 90 95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
 165 170 175
 Arg Val Val Arg Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
 180 185 190
 Gly Arg Phe Lys Arg Phe Arg Lys Lys Phe Lys Lys Leu Phe Lys Lys
 195 200 205
 Leu Ser
 210
 <210> 101
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> -
 <400> 101
 Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
 35 40 45
 [0072] Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60
 Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95
 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140
 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
 165 170 175
 Arg Val Val Arg Gly Gly Leu Arg Ser Leu Gly Arg Lys Ile Leu Arg
 180 185 190
 Ala Trp Lys Lys Tyr Gly Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp Ala Val Gly
 195 200 205

His Leu Met
210

<210> 102
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 102

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85 90 95

[0073]

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
165 170 175

Arg Val Val Arg Gly Gly Gly Ile Gly Ala Arg Leu Lys Val Leu Thr
180 185 190

Thr Gly Leu Pro Arg Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln Gly
195 200 205

Gly Gly Gly Ser Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu
210 215 220

Ala Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
225 230

<210> 103
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -

<400> 103

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
 35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110

[0074]

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
 165 170 175

Arg Val Val Arg Gly Ile Gly Ala Arg Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly
 180 185 190

Leu Pro Arg Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
 195 200 205

<210> 104
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -

<400> 104

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
 35 40 45
 Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60
 Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Asn Asp Lys Glu Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95
 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140
 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
 165 170 175
 Arg Val Val Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Ile
 180 185 190
 Gly Ala Arg Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Arg Ile Ser Trp
 195 200 205
 Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
 210 215

[0075]

<210> 105
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -

<400> 105

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85 90 95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
130 135 140

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
165 170 175

Arg Val Val Arg Gly Gly Gly Ile Gly Ala Arg Leu Lys Val Leu Thr
180 185 190

Thr Gly Leu Pro Arg Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln Arg
195 200 205

[0076]

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
210 215

<210> 106

<211> 203

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> -

<400> 106

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
35 40 45

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
50 55 60

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
65 70 75 80

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
85 90 95

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140
 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
 165 170 175
 Arg Val Val Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Leu Leu Leu
 180 185 190
 Arg Leu Leu Lys Lys Leu Leu Arg Leu Leu Lys
 195 200
 <210> 107
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> -
 <400> 107

[0077]

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
 35 40 45
 Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
 50 55 60
 Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
 85 90 95
 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
 100 105 110
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
 115 120 125
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
 130 135 140
 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
 145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly
165 170 175

Arg Val Val Arg Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
180 185 190

Gly Lys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Lys Lys Leu Leu Arg Leu Leu Lys
195 200 205

<210> 108
<211> 669
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 108
aaactgctgc tgaaactgct gaaaaaactg ctgaaactgc tgaaaaaaa aggtggtggt 60
taaggctcgc cgcgtcagag cggtaaaaaa cgtaaacgca aacgtcigaa accgaccgt 120
gttgctcgtc cgtcgggtct ggcaggcggc gttgtgcag cagcatgtgc agcctgtagc 180
gggtgctcgtc ttgcagcaca tattaccggc acccgtggc gtagcaatac cctgagcagc 240
ccgaatagca aaaatgaaaa agcaactggc cgcaaaatta acagctggga aagcagccgt 300
agtggtcata gctttctgag caatctgcat ctgcgtaatg gtgaactggc gattcatgaa 360
aaaggcttct actatatcta cagccagacc tattttcgtc tccaagaaga gattaaagaa 420
aacacaaaaa acgataaaca aatggtgcag tacatctata aatacaccag ctatccggat 480
[0078] ccgattctgc tgatgaaaag cgcacgtaat agctgttgga gcaaagatgc agaatatggc 540
ctgtatagca ttatcagggc tggcatcttt gaactgaaag aaaacgatcg tattttcgtg 600
agcgtgacca atgaacatct gatcgatatg gatcatgaag ccagcttttt tgggtgcattt 660
ctggtgggt 669

<210> 109
<211> 669
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 109
aaactggcaa aactggccaa aaaactggct aaactggcga aacgtcgtcg tcgccgtcgt 60
cggcgtaaaa aactgggtgg tggttgtgca gcagcatgtg cagcctgtac cagcgaagaa 120
accattagca ccgttcaaga aaaacagcag aatattagtc cgttggttcg tgaacgtggt 180
ccgcagcgtg ttgcagcaca tattaccggc acccgtggc gtagcaatac cctgagcagc 240
ccgaatagca aaaatgaaaa agcaactggc cgcaaaatta acagctggga aagcagccgt 300
agcggtcata gctttctgag caatctgcat ctgcgtaatg gtgaactggc gattcatgaa 360
aaaggcttct actatatcta cagccagacc tattttcgtc tccaagaaga gattaaagaa 420
aacacaaaaa acgataaaca aatggtgcag tacatctata aatacaccag ctatccggat 480
ccgattctgc tgatgaaaag cgcacgtaat agctgttgga gcaaagatgc agaatatggc 540
ctgtatagca ttatcagggc tggcatcttt gaactgaaag aaaacgatcg tattttcgtg 600

agcgtgacca atgaacatct gatcgatatg gatcatgaag cgagcttttt tgggtgcattt 660
ctgggtgggt 669

<210> 110
<211> 696
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 110
aaactggcaa aactggccaa aaaactggct aaactggcga aacgtcgtcg tcgccgtcgt 60
cggcgtaaaa aacgtcatcg tcagccacgt ggttgggaac agggiggigg ttgtgcagca 120
gcatgtgcag cctgtaccag cgaagaaacc attagcaccg ttcaagaaaa acagcagaat 180
attagtccgc tggttcgtga acgtggtcgc cagcgtgttg cagcacatat taccgcgacc 240
cgtggtcgtg gcaataccct gagcagcccg aatagcaaaa atgaaaaagc actgggtcgc 300
aaaattaaca gctgggaaag cagccgtagc ggcatagct ttctgagcaa tctgcatctg 360
cgtaatggig aactggtgat tcatgaaaaa ggcttctact atatctacag ccagacctat 420
tttgcettcc aagaagagat taaagaaaac accaaaaacg ataaacaaat ggtgcagtac 480
atctataaat acaccagcta tccggtccg attctgctga tgaaaagcgc acgtaatagc 540
tgttggagca aagatgcaga atatggcctg tatageattt atcagggtgg catctttgaa 600
ctgaaagaaa acgatcgtat tttcgtgagc gtgaccaatg aacatctgat cgatatggat 660
catgaagcga gcttttttgg tgcatttctg gtgggt 696

[0079]

<210> 111
<211> 621
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 111
cgtgiggcgg cgcattttac cggcacccgt ggccgtagca acaccctgag cngcccgaac 60
agcaaaaacg aaaaagcgtt gggccgtaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc 120
catagctttc tgagcaacct gcattctcgt aacggcgaac tggtgattca tgaaaaagc 180
ttttattata ttatagcca gacctatttt cgttttcagg aagaaattaa agaaaacacc 240
aaaaacgata aacagatggt gcagtatatt tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300
ctgcigatga aaagcgcgag taacagctgc tggagcaaaag atgcgggaata tggccctgat 360
agcattttac agggcggcat ttttgaactg aaagaaaacg atcgtatttt tgtgagcgtg 420
accaacgaac atctgattga tatggatcat gaagcgagct ttttggcgc gtttctggtg 480
ggcggcggcg gggcagcgg cggcggcggc ccgtggggcc tggcgggccg tgtggtgcgt 540
tatgcgcgtg cggcggcggc tcagggcgtg gggggggcga aactggcgaa actggcgaaa 600
aaactggcga aactggcgaa a 621

<210> 112
<211> 654
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 112
 cgtgtggcgg cgcataattac cggcaccctgt ggcgtagca acaccctgag cagcccgaac 60
 agcaaaaacg aaaaagcgct gggccgtaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc 120
 catagctttc tgagcaacct gcattctgctt aacggcgaac tggtagattca tgaaaaagge 180
 ttttattata tttatagcca gacctatttt cgttttcagg aagaaattaa agaaaacacc 240
 aaaaacgata aacagatggt gcagtataatt tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300
 ctgctgatga aaagcgcgcg taacagctgc tggagcaaag atcggaata tggcctgtat 360
 agcattttatc agggcgcgcat tttgaactg aaagaaaacg atcgtatttt tgtgagcgtg 420
 accaacgaac atctgattga tatggatcat gaagcgagct ttttggcgc gtttctggtg 480
 ggcggcgcgcg gcggcagcgg cggcgggcgg ccgctgggcc tggcgggccc tgggtgctgt 540
 tatgcgcgtg cggcgcgcgcg tcaggcgctt gcggcgggcg gtgggggcaa atggtttaaa 600
 aaagcgaccc atgtgggcaa acatgtgggc aaagcgcgcg tgaccgcgta tctg 654

<210> 113
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
<223> -

[0080]

<400> 113
 cgtgtggcgg cgcataattac cggcaccctgt ggcgtagca acaccctgag cagcccgaac 60
 agcaaaaacg aaaaagcgct gggccgtaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc 120
 catagctttc tgagcaacct gcattctgctt aacggcgaac tggtagattca tgaaaaagge 180
 ttttattata tttatagcca gacctatttt cgttttcagg aagaaattaa agaaaacacc 240
 aaaaacgata aacagatggt gcagtataatt tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300
 ctgctgatga aaagcgcgcg taacagctgc tggagcaaag atcggaata tggcctgtat 360
 agcattttatc agggcgcgcat tttgaactg aaagaaaacg atcgtatttt tgtgagcgtg 420
 accaacgaac atctgattga tatggatcat gaagcgagct ttttggcgc gtttctggtg 480
 ggcggcgcgcg gcggcagcgg cggcgggcgg ccgctgggcc tggcgggccc tgggtgctgt 540
 tatgcgcgtg cggcgcgcgcg tcaggcgctt gcggcgggcg gccgtcgtaa acgtaaatgg 600
 ctgcgtcgta ttggcaaaag cgtgaaaatt attggcgcg cgccgctgga tcattctg 657

<210> 114
 <211> 636
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 114
 cgtgtggcgg cgcataattac cggcaccctgt ggcgtagca acaccctgag cagcccgaac 60
 agcaaaaacg aaaaagcgct gggccgtaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc 120
 catagctttc tgagcaacct gcattctgctt aacggcgaac tggtagattca tgaaaaagge 180
 ttttattata tttatagcca gacctatttt cgttttcagg aagaaattaa agaaaacacc 240

```

aaaaacgata aacagatggt gcagtatatt tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300
ctgctgatga aaagcgcgcg taacagctgc tggagcaaag atgcggaata tggcctgtat 360
agcatttatac agggcgcat ttttgaactg aaagaaaacg atcgtatitt tgtgagcgtg 420
accaacgaac atctgattga tatggatcat gaagcgagct tttttggcgc gtttctggtg 480
ggcgggcgcg gcggcagcgg cgcgggcggc ccgctgggcc tggcgggcgc tgtgtgcgt 540
accatcgtc cgccgatlg gagcccggtg tggccggcg gcggcaaact gctgctgaaa 600
ctgctgaaaa aactgctgaa actgctgaaa aaaaaa 636

```

<210> 115
 <211> 621
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -

```

<400> 115
cgcgtggcgg cgcataattac cggcaccgcg ggccgcagca acaccctgag cagcccgaa 60
agcaaaaacg aaaaagcgtt ggccgcgaaa attaacagct gggaaagcag ccgcagcggc 120
catagctttc tgagcaacct gcattcgcgc aacggcgaac tgggtattca tgaaaaggc 180
ttttattata ttatagcca gacctatitt cgcttcagg aagaaattaa agaaaacacc 240
aaaaacgata aacagatggt gcagtatatt tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300
ctgctgatga aaagcgcgcg caacagctgc tggagcaaag atgcggaata tggcctgtat 360
agcatttatac agggcgcat ttttgaactg aaagaaaacg atcgtatitt tgtgagcgtg 420
accaacgaac atctgattga tatggatcat gaagcgagct tttttggcgc gtttctggtg 480
ggcgggcgcg gcggcagcgg cgcgggcggc ccgctgggcc tggcgggcgc cgtgtgcgc 540
tatggcgca aaaaacccc ccagcgccgc cgcgggcgca aactggcgaa actggcgaaa 600
aaactggcga aactggcgaa a 621

```

[0081]

<210> 116
 <211> 633
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -

```

<400> 116
cgtgttcag cacataattac cggcaccgcg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaa 60
agcaaaaatg aaaaagcaat gggtcgcaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcgg 120
catagctttc tgagcaatct gcattcgcgt aatggtaga tgggtattca tgaaaaggc 180
ttctactata tctacagcca gacctatitt cgcttcagg aagagattaa agaaaacacc 240
aaaaacgata acaaatggt gcagtacatc tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300
ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaaag atgcggaata tggcctgtat 360
agcatttatac aggttgcat ctttgaactg aaagaaaacg atcgtatitt cgtgagcgtg 420
accaatgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggtg 480
ggtggtggtg gcggtagtgg cgtggtgtgt cctctgggtc tggcaggtcg tgtgttcgt 540
ggtcgtttta aactgtttcg caaaaaattt aaaaaactgt tcaaaaaact gagccagcgc 600

```

ctgggtaatc agtgggcagt tggtcacatcg atg 633

<210> 117
<211> 630
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 117
cgtgttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaaat 60
agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcgggt 120
catagctttc tgagcaatct gcacatcgct aatgggtgaac tggtgattca tgaanaaggc 180
ttctactata tetacagcca gacctatitt cgttccaag aagagattaa agaaaacacc 240
aaaaacgata acaaatggt gcagtacatc tataaataca ccagctatcc ggatccgatt 300
ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggcctgtat 360
agcatttate aggggtgcat ctttgaactg aaagaaaacg atcgtatitt cgtgagcgtg 420
accaatgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggtg 480
ggtaggtggtg gcggtagtgg cggtaggtgt cctctgggtc tggcagggtcg tgttgttcgt 540
tatggctcga aaaaacgtcg tcagcgtcgt cgtggtggtc gttttaaacg ttttcgcaaa 600
aaatttaaaa aactgttcaa aaaactgagc 630

[0082]

<210> 118
<211> 633
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<400> 118
cgtgttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaaat 60
agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcgggt 120
catagctttc tgagcaatct gcacatcgct aatgggtgaac tggtgattca tgaanaaggc 180
ttctactata tetacagcca gacctatitt cgttccaag aagagattaa agaaaacacc 240
aaaaacgata acaaatggt gcagtacatc tataaataca ccagctatcc ggatccgatt 300
ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggcctgtat 360
agcatttate aggggtgcat ctttgaactg aaagaaaacg atcgtatitt cgtgagcgtg 420
accaatgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggtg 480
ggtaggtggtg gcggtagtgg cggtaggtgt cctctgggtc tggcagggtcg tgttgttcgt 540
ggtggtctgc gtagcctggg acgtaaaaat ctgcgtgcat ggaagaaata tggtcagcgt 600
ctgggtaatc agtgggcagt tggtcacatcg atg 633

<210> 119
<211> 702
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> -

	<400> 119	
	cgtgtttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca atacctgag cagcccgaa	60
	agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggt	120
	catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggtgaac tggtagttca tgaanaagc	180
	ttctactata tctacagcca gacctatitt cgtttccaag aagagattaa aganaacacc	240
	aaaaacgata acaaatggt gcagtacatc tataaatata ccagctatcc ggatccgatt	300
	ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggcctgtat	360
	agcatttate aggggtggcat cttigaactg aaagaaaacg atcgtatitt cgtgagcgtg	420
	accaatgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggtg	480
	ggtggtggtg gcggtagtgg cgggtggtgt cctctgggtc tggcaggtcg tgttcttcgc	540
	ggaggtggia ttggtgcacg tctgaaagt ctgaccaacg gtctgcctcg tattagctgg	600
	attaaacgta aacgtcagca ggggtgggtt ggtagcaaac tggcaaaact ggcgaaaaa	660
	ctggctaatac tggcacaacg tctctgtcgc cgtctctgac gt	702
	<210> 120	
	<211> 615	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> -	
[0083]	<400> 120	
	cgtgtttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca atacctgag cagcccgaa	60
	agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggt	120
	catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggtgaac tggtagttca tgaanaagc	180
	ttctactata tctacagcca gacctatitt cgtttccaag aagagattaa aganaacacc	240
	aaaaacgata acaaatggt gcagtacatc tataaatata ccagctatcc ggatccgatt	300
	ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggcctgtat	360
	agcatttate aggggtggcat cttigaactg aaagaaaacg atcgtatitt cgtgagcgtg	420
	accaatgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggtg	480
	ggtggtggtg gcggtagtgg cgggtggtgt cctctgggtc tggcaggtcg tgttcttcgt	540
	ggtattggtg cagctctgaa agttctgacc accggtctgc ctcgtattag ctggattaaa	600
	cgtaaacgtc agcag	615
	<210> 121	
	<211> 645	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> -	
	<400> 121	
	cgtgtttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca atacctgag cagcccgaa	60
	agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggt	120
	catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggtgaac tggtagttca tgaanaagc	180
	ttctactata tctacagcca gacctatitt cgtttccaag aagagattaa aganaacacc	240
	aaaaacgata acaaatggt gcagtacatc tataaatata ccagctatcc ggatccgatt	300

ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggcctgtat 360
 agcattttatc aggggtggcat ctttgaactg aaagaaaacg atcgatatit cgtgagcgtg 420
 accaatgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttgggtc atttctggtg 480
 gggtggtggtg gcggtagtagg cgggtggtgt cctctgggtc tggcaggtag tttgtgtcgt 540
 cgtcgtcgcc gtcggcgtag tgcgggtgtt ggaattgggt cagctctgaa agttctgacc 600
 accggctcgc ctctgtattag ctggattaaa cgtaaacgtc agcag 645

<210> 122
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -

<400> 122
 cgtgttgcag cacatatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat 60
 agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcgtg 120
 catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggtgaac tggtagtica tgaaaaaggc 180
 ttctactata tctacagcca gacctatit cgtttccaag aagagattaa agaaaacacc 240
 aaaaacgata acaaatggt gcagtacatc tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300
 ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggcctgtat 360
 agcattttatc aggggtggcat ctttgaactg aaagaaaacg atcgatatit cgtgagcgtg 420
 accaatgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttgggtc atttctggtg 480
 gggtggtggtg gcggtagtagg cgggtggtgt cctctgggtc tggcaggtag tttgtgtcgc 540
 ggaggtggta ttggtgcacg tctgaaagtt ctgaccaccg gtcgtcctcg tattagctgg 600
 attaaacgta aacgtcagca gcgtcgtcgt cgcgcgtcgc gccgt 645

[0084]

<210> 123
 <211> 609
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -

<400> 123
 cgtgttgcag cacatatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat 60
 agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcgtg 120
 catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggtgaac tggtagtica tgaaaaaggc 180
 ttctactata tctacagcca gacctatit cgtttccaag aagagattaa agaaaacacc 240
 aaaaacgata acaaatggt gcagtacatc tataaafata ccagctatcc ggatccgatt 300
 ctgctgatga aaagcgacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggcctgtat 360
 agcattttatc aggggtggcat ctttgaactg aaagaaaacg atcgatatit cgtgagcgtg 420
 accaatgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttgggtc atttctggtg 480
 gggtggtggtg gcggtagtagg cgggtggtgt cctctgggtc tggcaggtag tttgtgtcgt 540
 cgtcgtcgcc gtcggcgtag tctgaaactg ctgcgcgtc tgcgtgaaaa actgctgcgc 600
 ctgctgaaa 609

<210> 124
 <211> 624
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -

<400> 124
 cgtgttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cageccgaat 60
 agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc 120
 catagctttc tgagcaatct gcattctcgt aatggtgaac tggtagattca tgaanaagc 180
 ttctactata tctacagcca gacctatttt cgcttccaag aagagattaa agaaaacacc 240
 aaaaacgata aacaaatggt gcagtacatc tataaataca ccagctatcc ggatccgatt 300
 ctgcigtatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggcctgtat 360
 agcattttatc aggggtggcat ctttgaactg aaagaaaacg atcgtatttt cgtgagcgtg 420
 accaatgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttggcgc atttctggtg 480
 ggtgggtggtg gcggtagtgg cggtgggtgt cctctgggtc tggcaggctg tgttgttcgt 540
 tatggtcgta aaaaacgtcg tcagcgtcgt cgtgggtgta aactgctgct gcgtctgctg 600
 aaaaaactgc tgcgcctgct gaaa 624

<210> 125
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0085]

<220>
 <223> -

<400> 125

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Lys Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Pro Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Lys
 20 25 30

Arg Lys Arg Leu Lys Pro Thr
 35

<210> 126
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 美洲鲈

<300>
 <301> Hilchie AL, Doucette CD, Pinto DM, Patrzykat A, Douglas S, Hoskin
 DW.
 <302> Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic
 for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts
 <303> Breast Cancer Res.
 <304> 13
 <305> 5
 <306> R102
 <307> 2011-10-24

<400> 126

Arg Trp Gly Lys Trp Phe Lys Lys Ala Thr His Val Gly Lys His Val
 1 5 10 15

Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ala Tyr Leu
20 25

<210> 127
<211> 26
<212> PRT
<213> 美洲鲷

<300>
<301> Hilchie AL, Doucette CD, Pinto DM, Patrzykat A, Douglas S, Hoskin DW.
<302> Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts.
<303> Breast Cancer Res.
<304> 13
<305> 5
<306> R102
<307> 2011-10-24

<400> 127

Gly Arg Arg Lys Arg Lys Trp Leu Arg Arg Ile Gly Lys Gly Val Lys
1 5 10 15

Ile Ile Gly Gly Ala Ala Leu Asp His Leu
20 25

<210> 128
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

[0086]

<220>
<223> -

<300>
<301> Papo N, Shai Y.
<302> New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells.
<303> Biochemistry
<304> 42
<305> 31
<306> 9346-54
<307> 2003-08-12

<400> 128

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Lys

<210> 129
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> -

<300>
<301> Cai H, Yang H, Xiang B, Li S, Liu S, Wan L, Zhang J, Li Y, Cheng J, Lu X.
<302> Selective apoptotic killing of solid and hematologic tumor cells by bombesin-targeted delivery of mitochondria-disrupting peptides.
<303> Molecular Pharmacology

<304> 7
 <305> 2
 <306> 586-96
 <307> 2010-04-05

<400> 129

Gly Arg Phe Lys Arg Phe Arg Lys Lys Phe Lys Lys Leu Phe Lys Lys
 1 5 10 15

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

<210> 130
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -

<300>
 <301> Cai H, Yang H, Xiang B, Li S, Liu S, Wan L, Zhang J, Li Y, Cheng J, Lu X.
 <302> Selective apoptotic killing of solid and hematologic tumor cells by bombesin-targeted delivery of mitochondria-disrupting peptides.
 <303> Molecular Pharmacology
 <304> 7
 <305> 2
 <306> 586-96
 <307> 2010-04-05

<400> 130

[0087]

Arg Phe Lys Arg Phe Arg Lys Lys Phe Lys Lys Leu Phe Lys Lys Leu
 1 5 10 15

Ser

<210> 131
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> -

<300>
 <301> Cai H, Yang H, Xiang B, Li S, Liu S, Wan L, Zhang J, Li Y, Cheng J, Lu X.
 <302> Selective apoptotic killing of solid and hematologic tumor cells by bombesin-targeted delivery of mitochondria-disrupting peptides.
 <303> Molecular Pharmacology
 <304> 7
 <305> 2
 <306> 586-96
 <307> 2010-04-05

<400> 131

Leu Arg Ser Leu Gly Arg Lys Ile Leu Arg Ala Trp Lys Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp Ala Val Gly His Leu Met
 20 25

<210> 132

<211> 25
<212> PRT
<213> 蜜蜂

<300>
<308> genbank/AAU87881
<309> 2004-10-04
<313> (1).. (25)
[0088]
<400> 132

Gly Ile Gly Ala Arg Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Arg Ile
1 5 10 15

Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
20 25

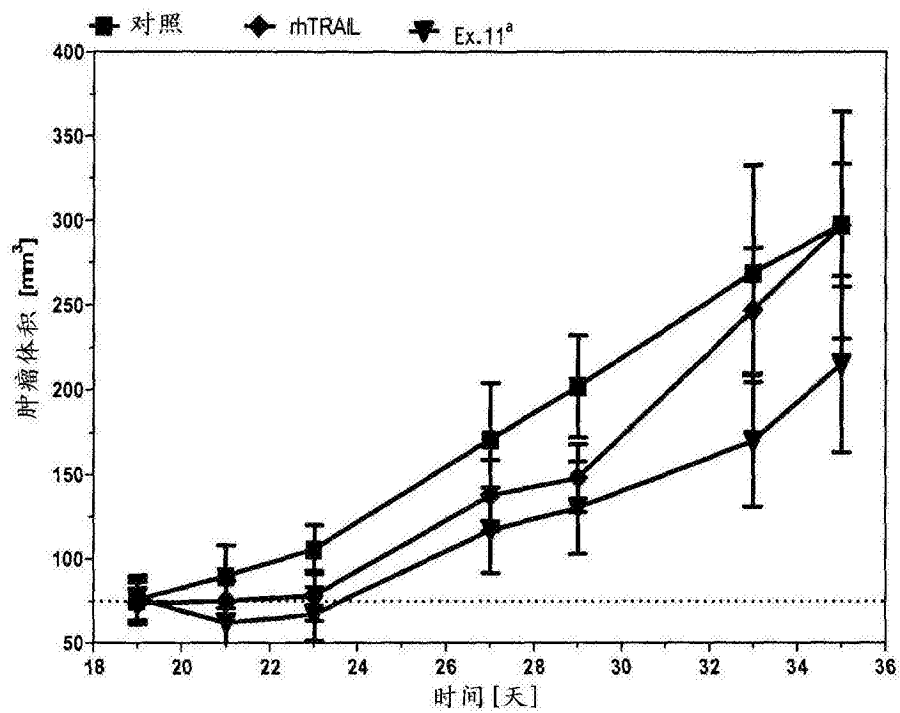


图1

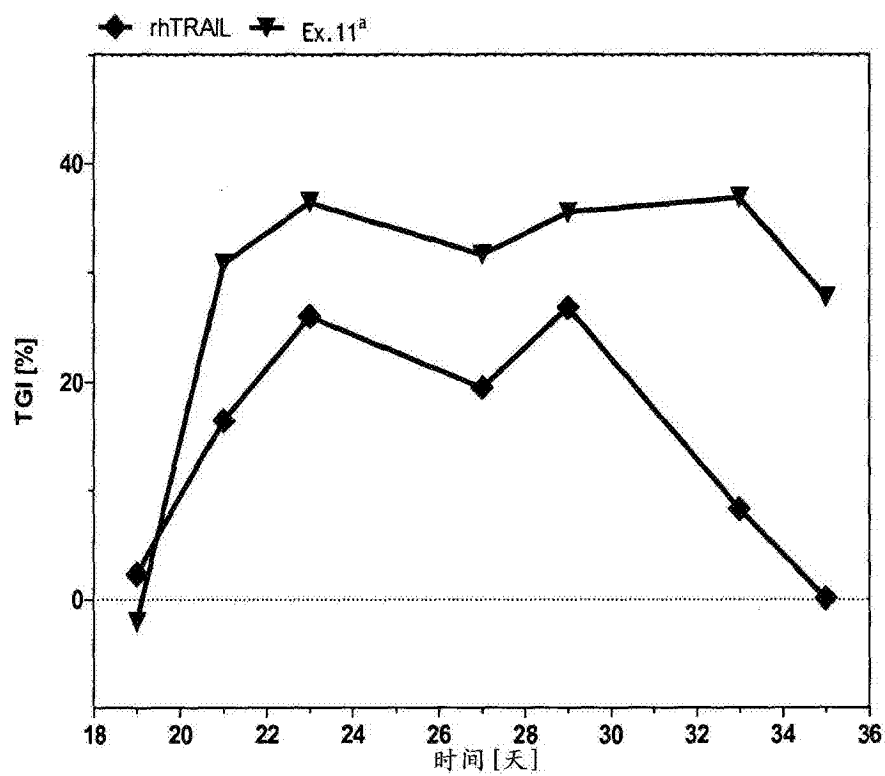


图2

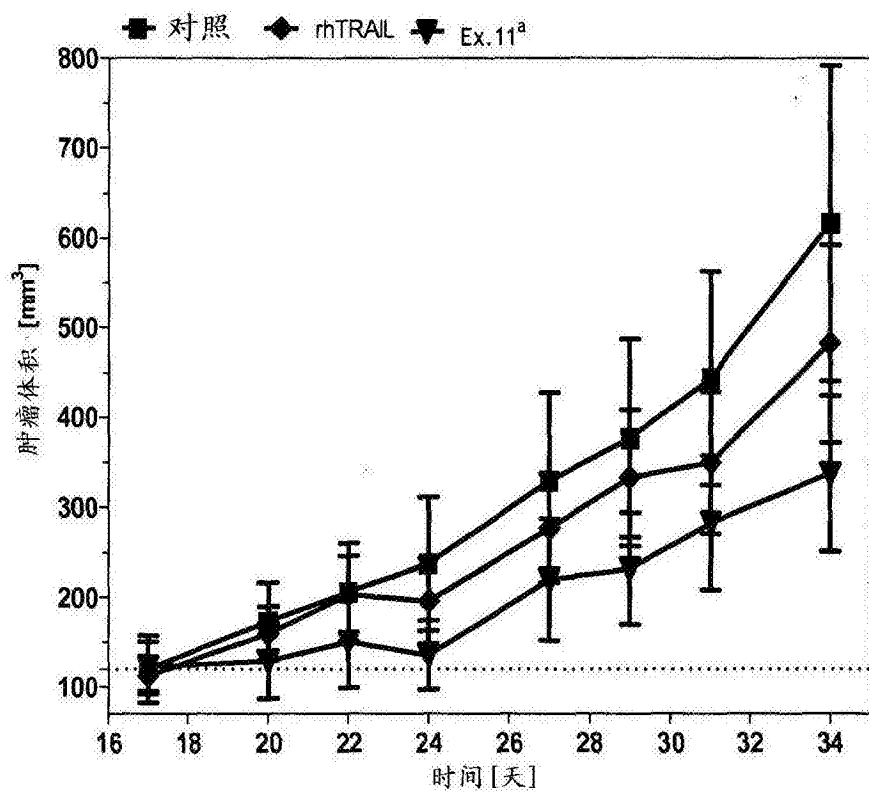


图3

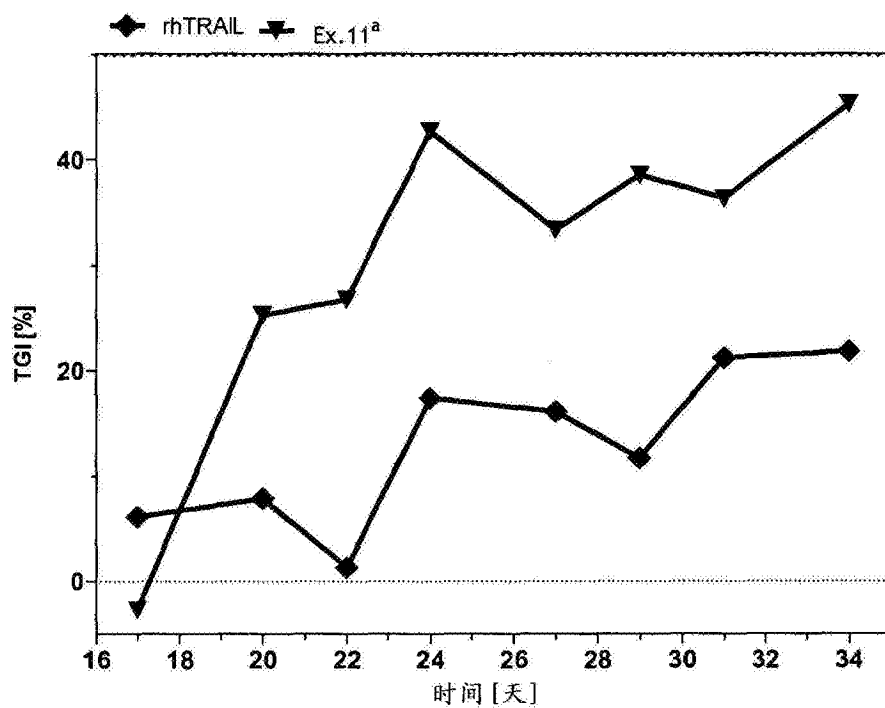


图4

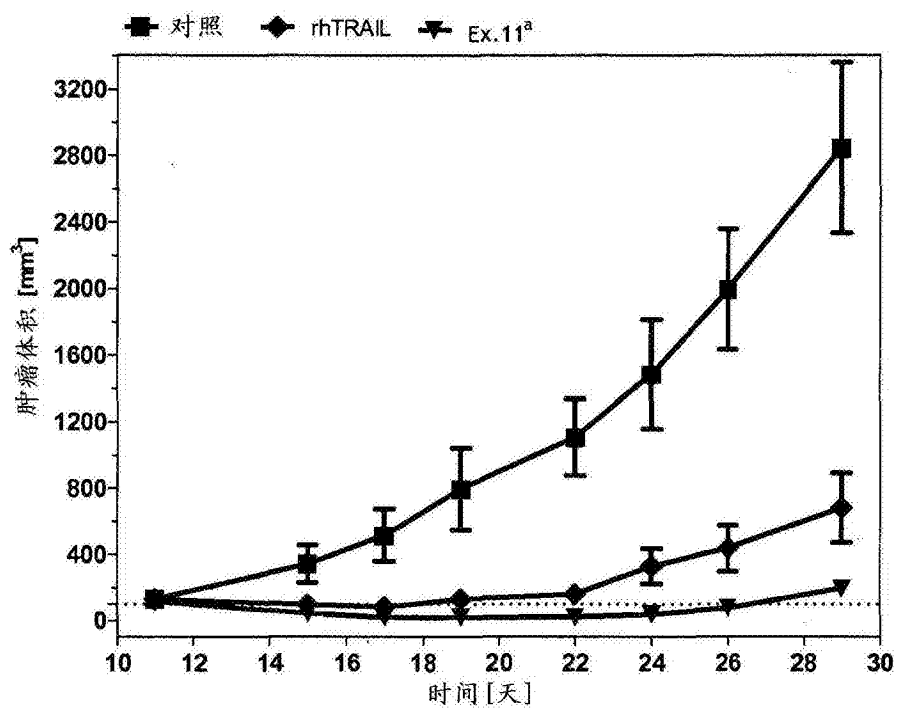


图5

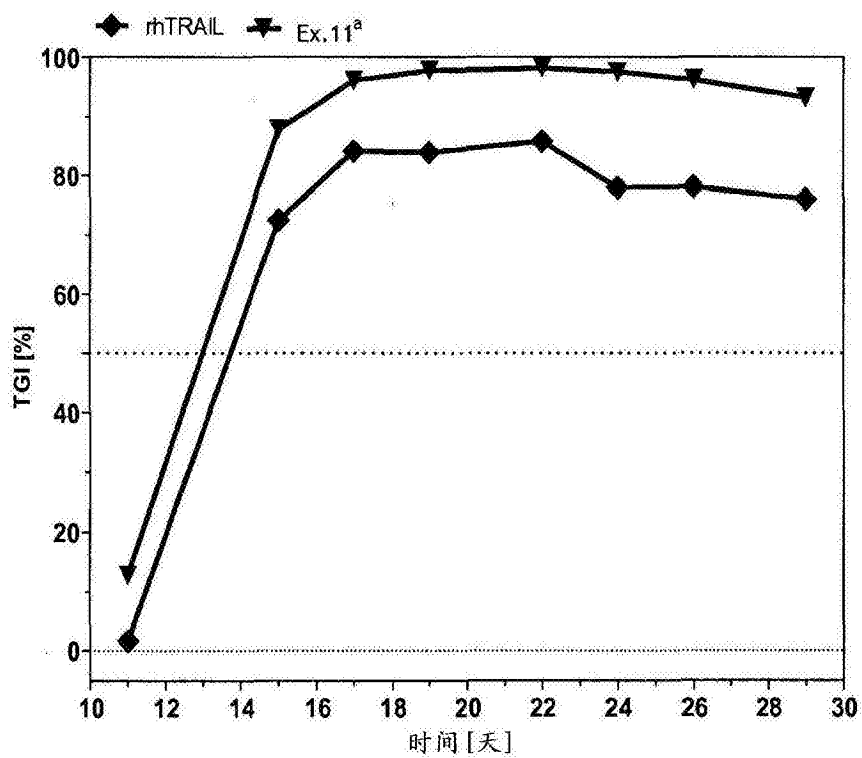


图6

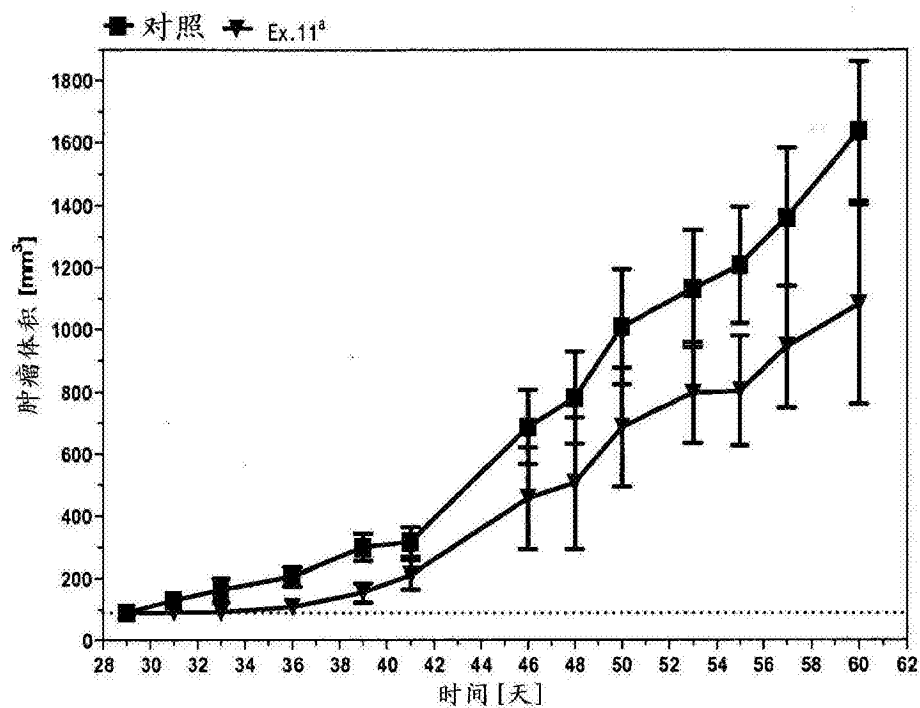


图7

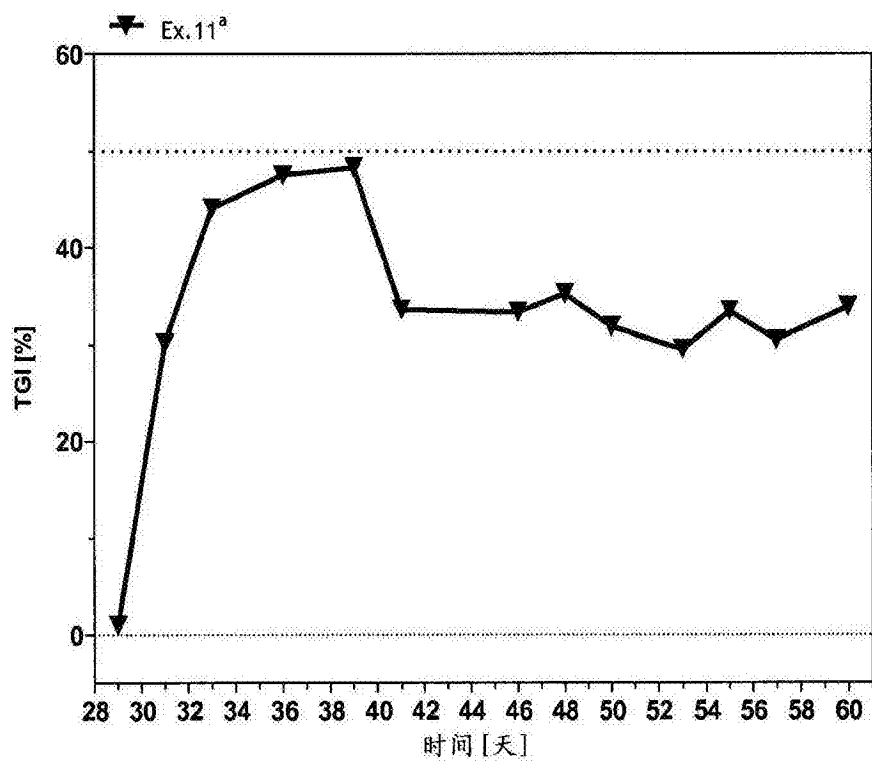


图8

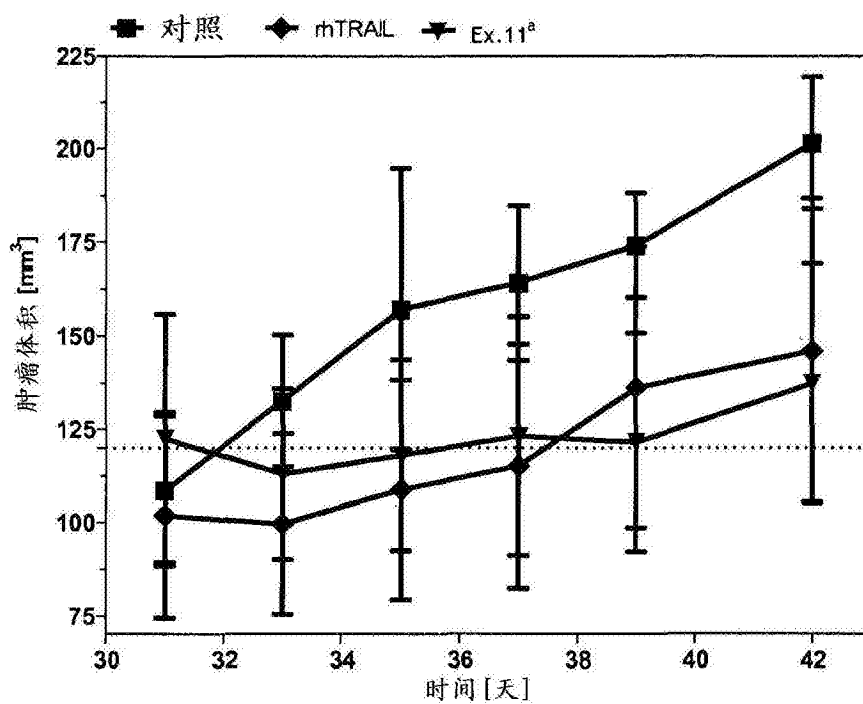


图9

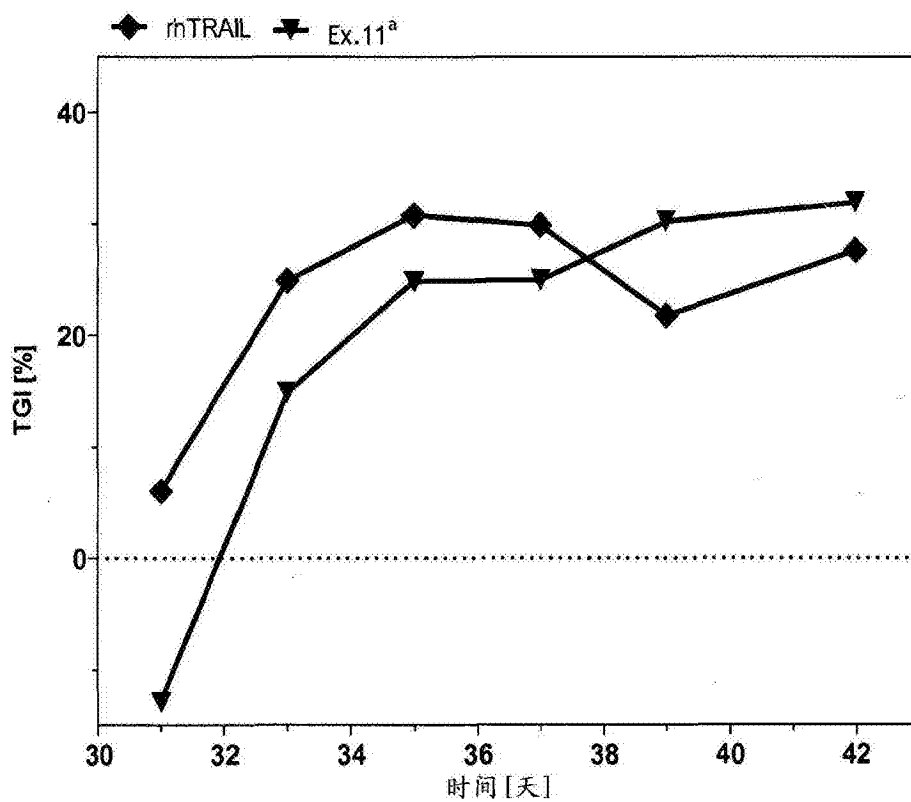


图10

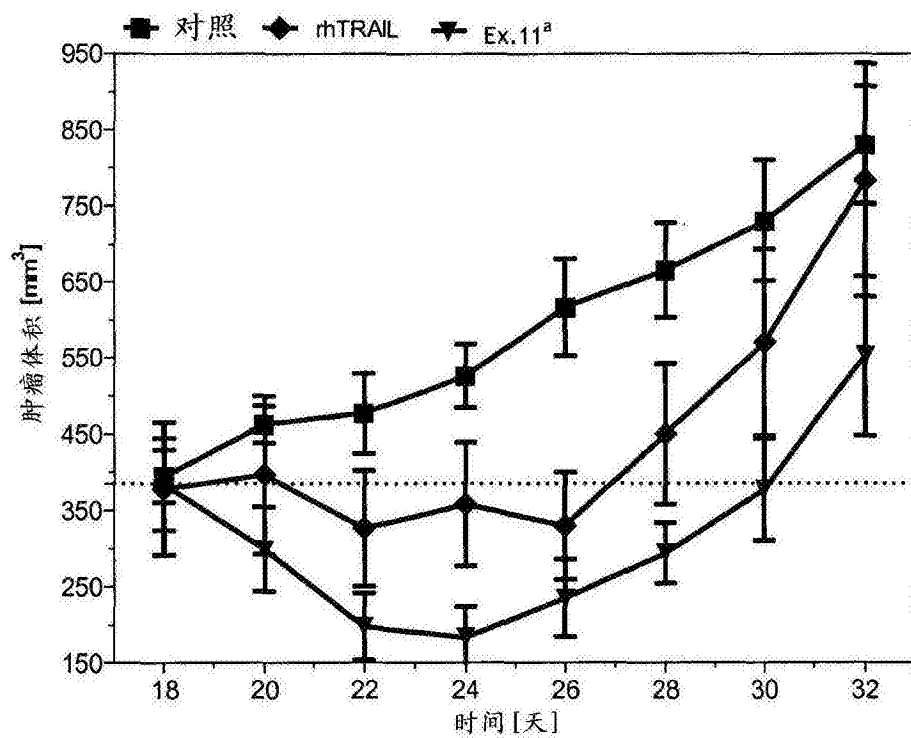


图11

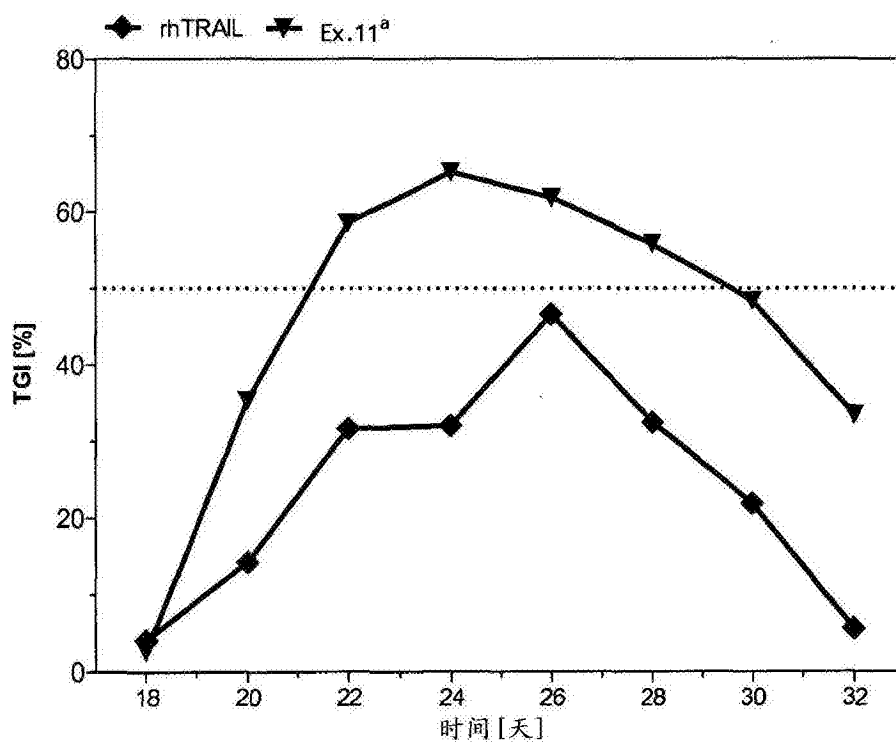


图12

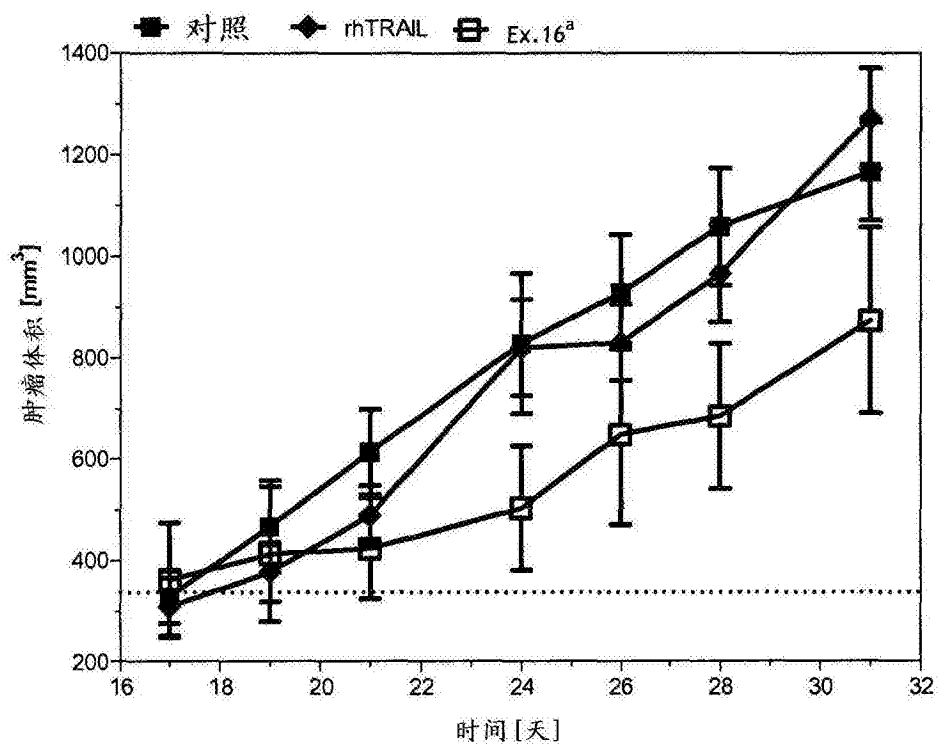


图13

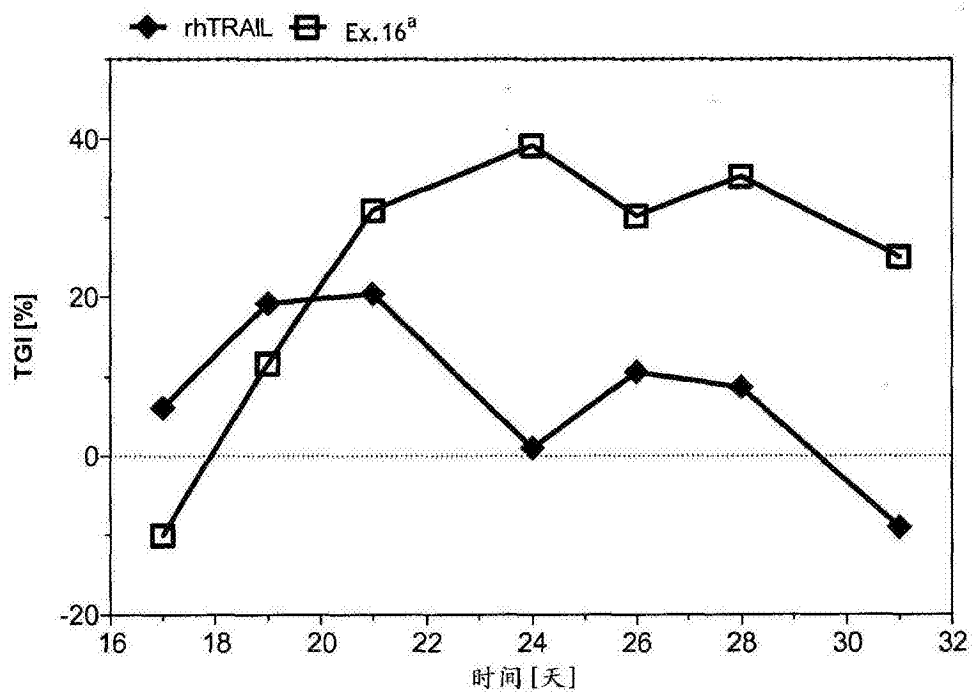


图14

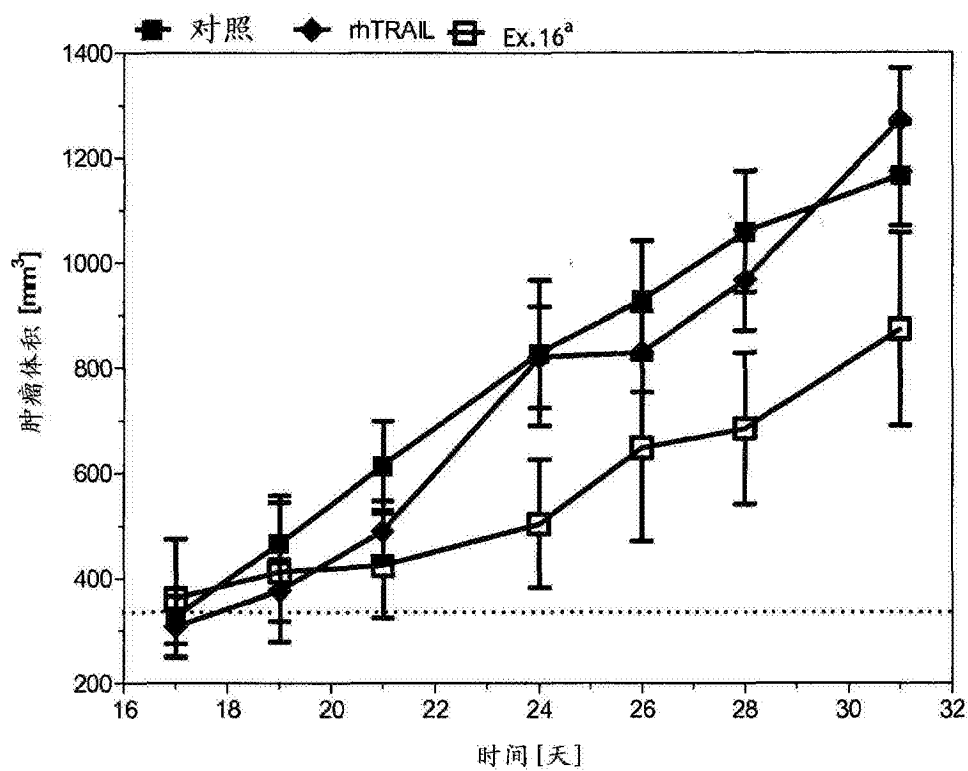


图15

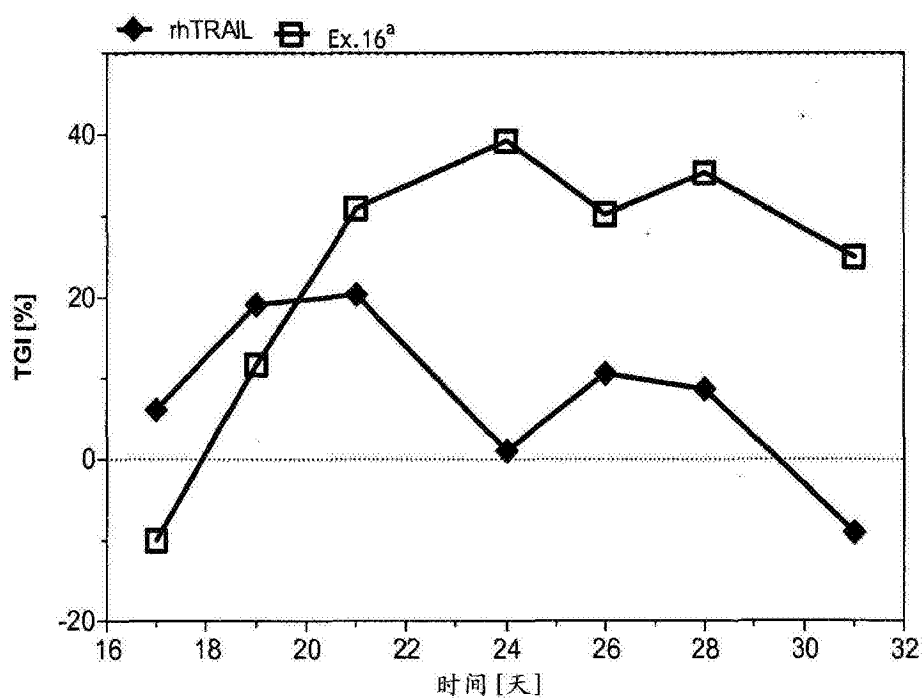


图16

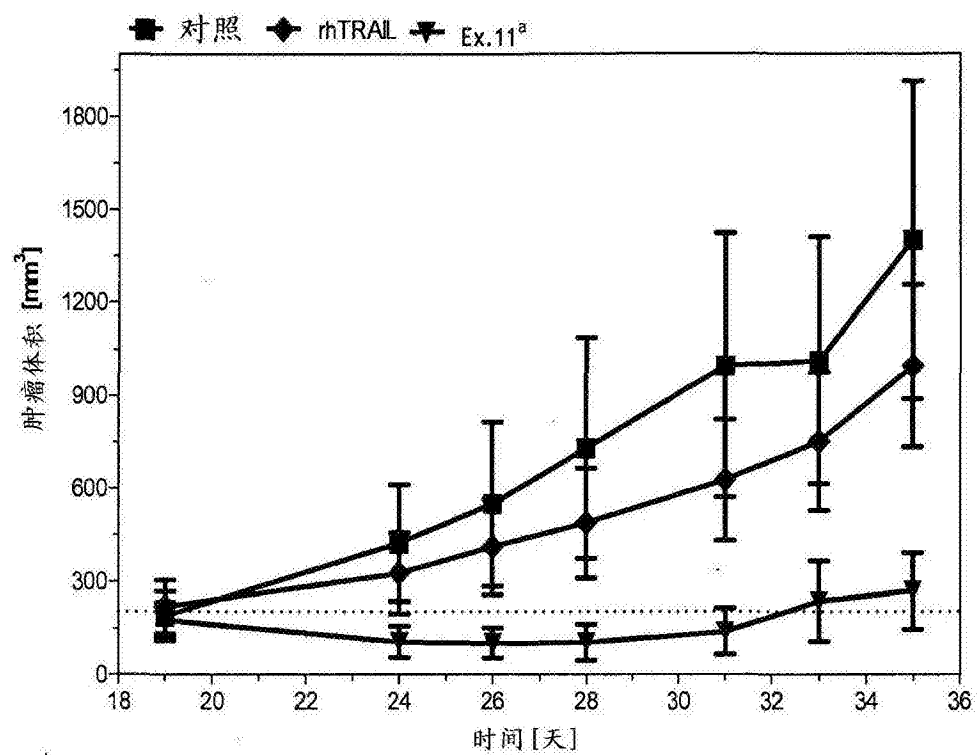


图17

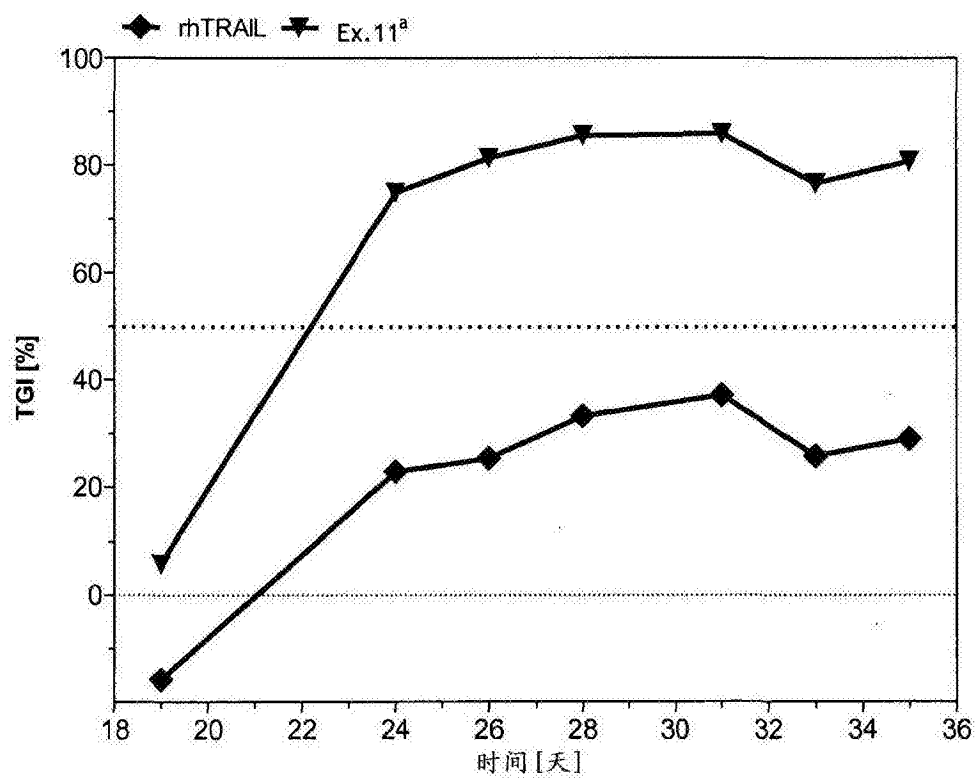


图18

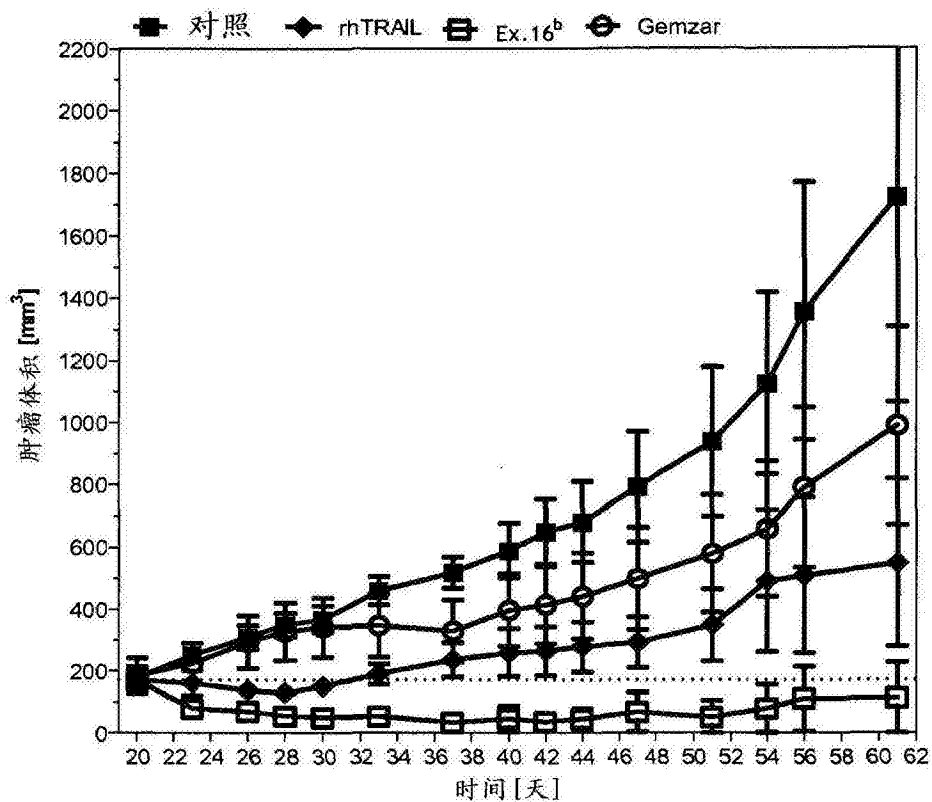


图19

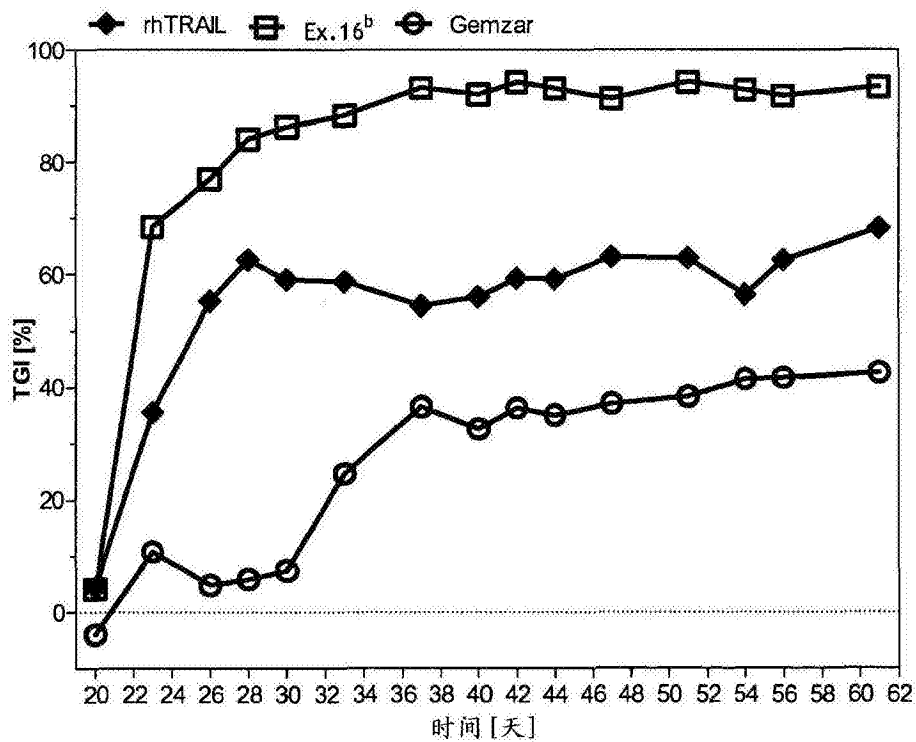


图20

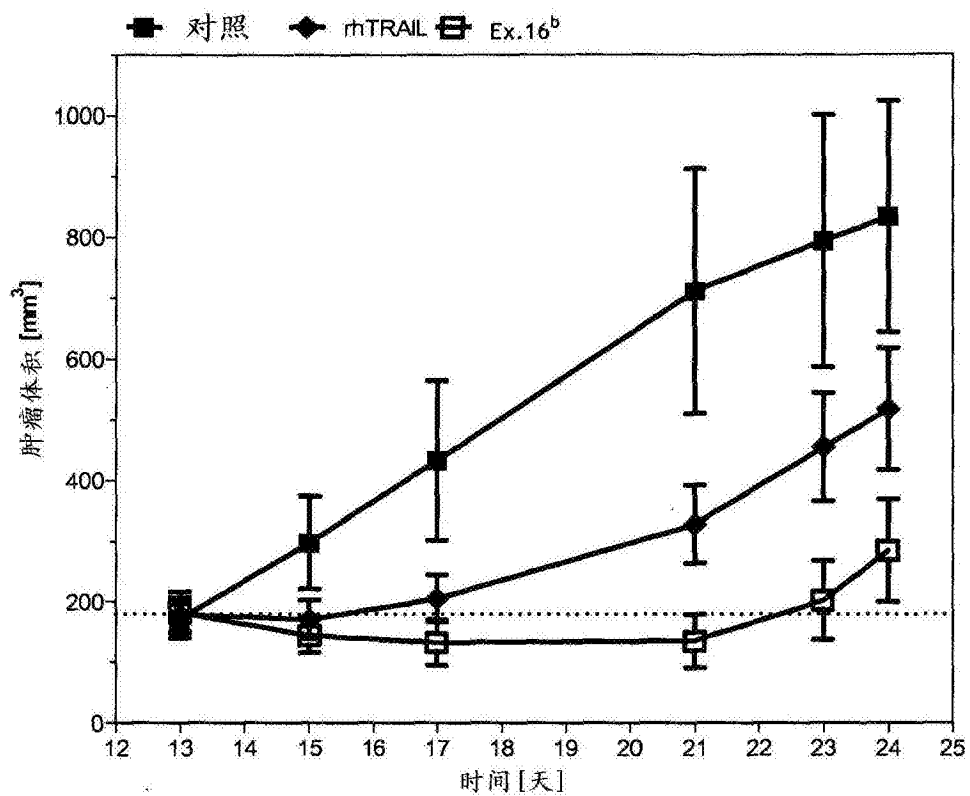


图21

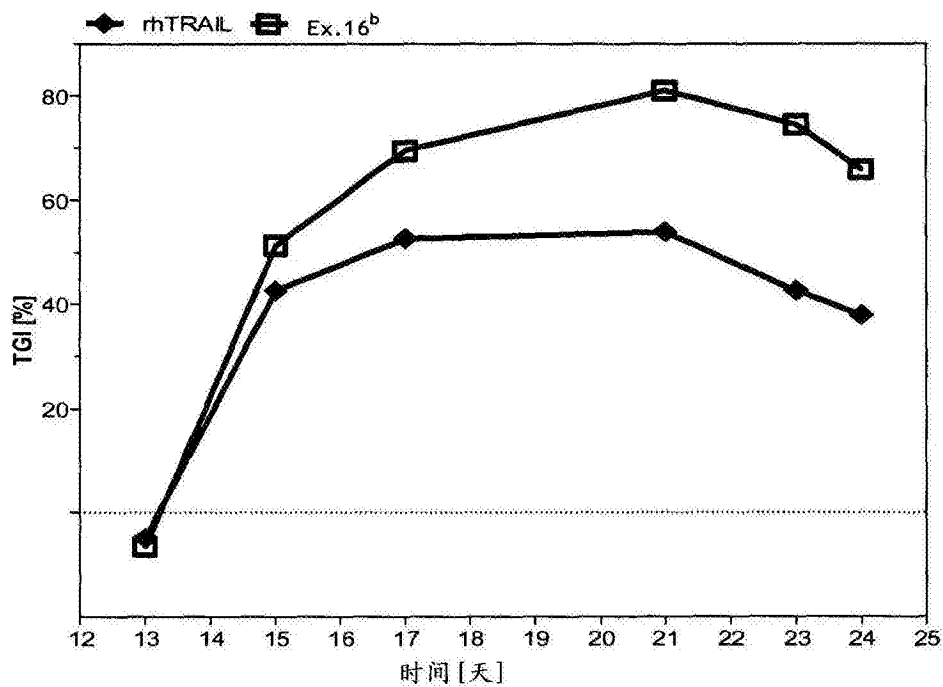


图22

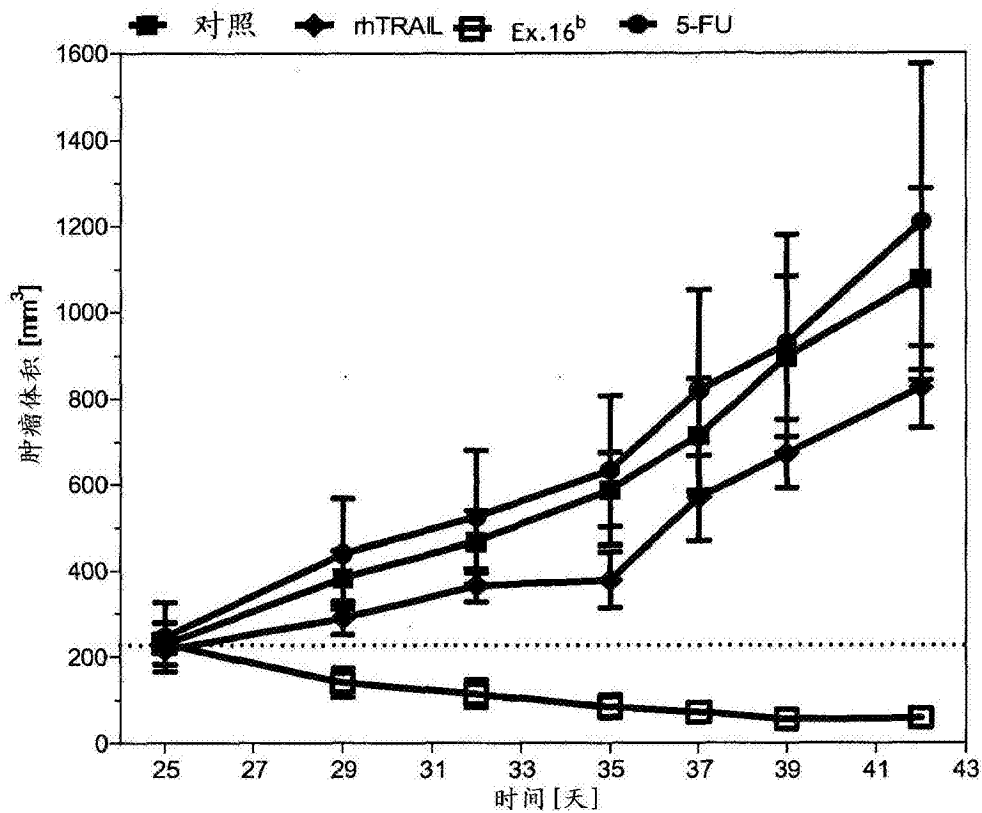


图23

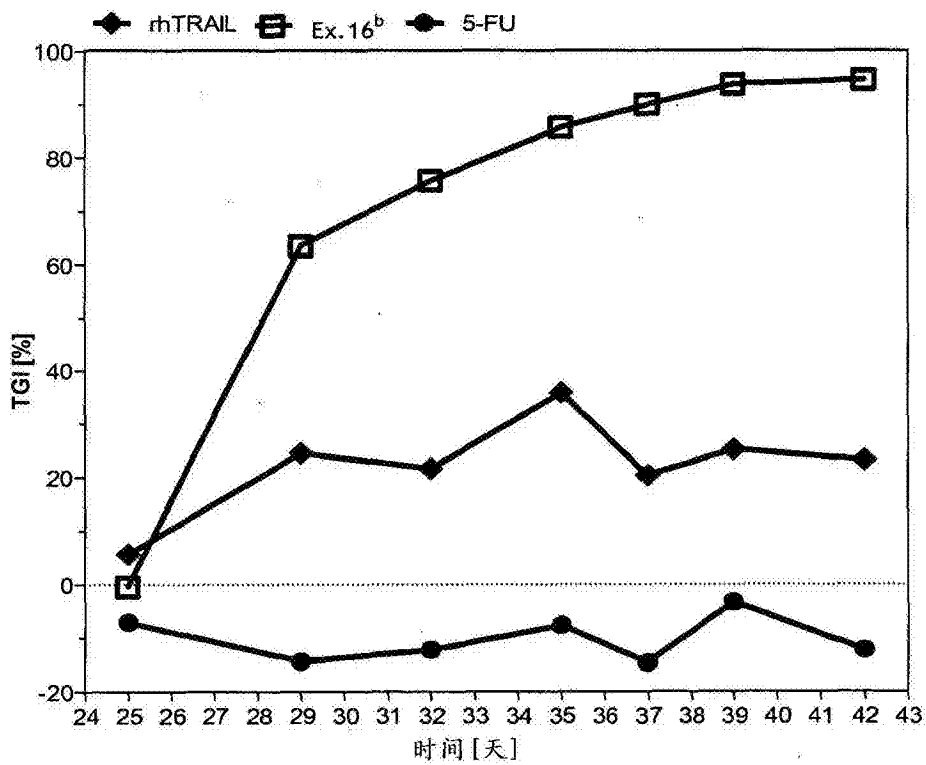


图24

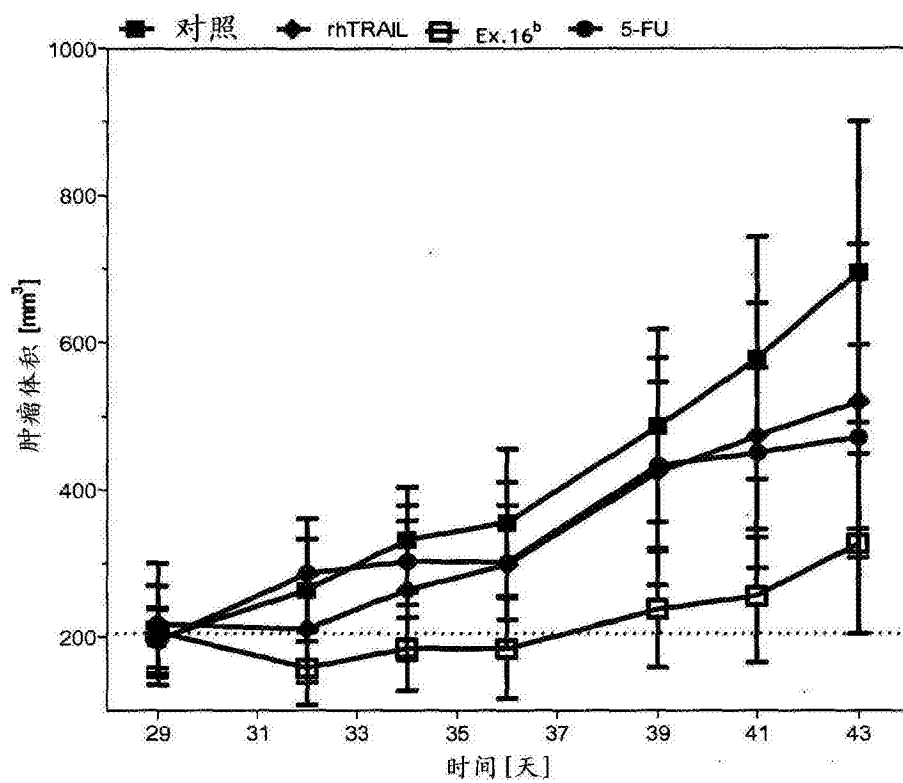


图25

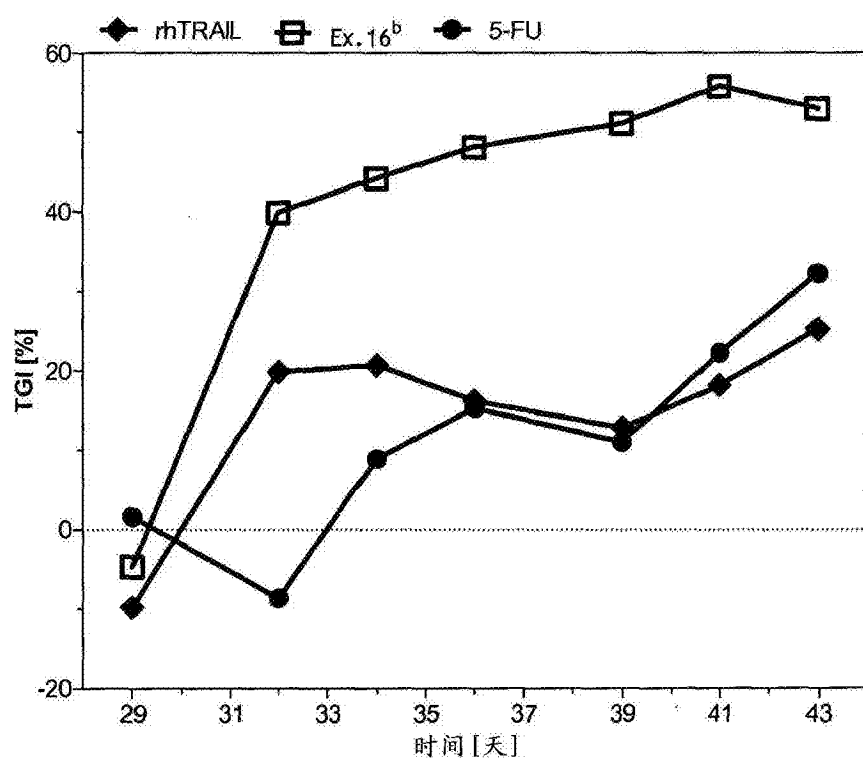


图26