

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
C12N 15/12
C12N 15/11 C07K 14/475
C07K 16/22 G01N 33/68
G01N 33/577 C12Q 1/68
A61K 31/713 A61K 38/18

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813580.0

[43] 公开日 2002 年 10 月 30 日

[11] 公开号 CN 1377408A

[22] 申请日 2000.9.29 [21] 申请号 00813580.0
[30] 优先权
[32] 1999.9.30 [33] DE [31] 19947010.3
[86] 国际申请 PCT/EP00/09594 2000.9.29
[87] 国际公布 WO01/23554 德 2001.4.5
[85] 进入国家阶段日期 2002.3.29
[71] 申请人 弗赖堡大学综合医院
地址 德国弗赖堡
[72] 发明人 海克·帕尔

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书 7 页 说明书 23 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 PRV - 1 基因及其应用
[57] 摘要

本发明描述了一种编码 PRV - 1 蛋白的核苷酸序列,其基本上包含序列 SEQ ID NO. 1 的核苷酸序列。本发明还涉及检测该基因及由该基因编码的 mRNA 和多肽的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



- 1

SEQ ID NO.2的氨基酸1—409;
 SEQ ID NO.2的氨基酸1—401;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—437;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—409;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—401;
 及至少一种药学上可接受的赋形剂。

9、一种包含多核苷酸的药物，所述多核苷酸基本上包含下述核苷酸序列之一：

SEQ ID NO.1的核苷酸1—1600;
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1346;
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1262;
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1238;
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1346;
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1262;
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1238;
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1346;
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1262;
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1238;
 及至少一种药学上可接受的赋形剂。

10、权利要求1所述的多肽或基本上包含下述氨基酸序列之一的多肽或其生物活性片段或其生物活性变体作为生长因子的应用，所述氨基酸序列为：

SEQ ID NO.2的氨基酸1—437;
 SEQ ID NO.2的氨基酸1—409;
 SEQ ID NO.2的氨基酸1—401;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—437;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—409;

SEQ ID NO.2的氨基酸22—401。

11、权利要求1所述的多肽或基本上包含下述氨基酸序列之一的多肽或其生物活性片段或其生物活性变体在生产治疗骨髓和循环中全血细胞减少症及全血细胞病的药物中的应用，所述氨基酸序列为：

SEQ ID NO.2的氨基酸1—437；
SEQ ID NO.2的氨基酸1—409；
SEQ ID NO.2的氨基酸1—401；
SEQ ID NO.2的氨基酸22—437；
SEQ ID NO.2的氨基酸22—409；
SEQ ID NO.2的氨基酸22—401。

12、基本上包含下述核苷酸序列之一的多核苷酸或其片段或变体在生产治疗骨髓和循环中全血细胞减少症及全血细胞病的药物中的应用，所述核苷酸序列为：

SEQ ID NO.1的核苷酸1—1600；
SEQ ID NO.1的核苷酸36—1346；
SEQ ID NO.1的核苷酸36—1262；
SEQ ID NO.1的核苷酸36—1238；
SEQ ID NO.1的核苷酸39—1346；
SEQ ID NO.1的核苷酸39—1262；
SEQ ID NO.1的核苷酸39—1238；
SEQ ID NO.1的核苷酸99—1346；
SEQ ID NO.1的核苷酸99—1262；
SEQ ID NO.1的核苷酸99—1238。

13、权利要求1所述的多肽或基本上包含下述氨基酸序列之一的多肽或其生物活性片段或生物活性变体在治疗和/或增加内源细胞和/或回体或体外建立的细胞系中的应用，所述氨基酸序列为：

SEQ ID NO.2的氨基酸1—437;
 SEQ ID NO.2的氨基酸1—409;
 SEQ ID NO.2的氨基酸1—401;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—437;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—409;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—401。

14、权利要求1所述的多肽或基本上包含下述氨基酸序列之一的多肽或其生物活性片段或生物活性变体在抑制细胞生长中的应用，所述氨基酸序列为：

SEQ ID NO.2的氨基酸1—437;
 SEQ ID NO.2的氨基酸1—409;
 SEQ ID NO.2的氨基酸1—401;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—437;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—409;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—401。

15、如权利要求14所述的应用，其特征在于多肽用作为一种抑制细胞生长剂。

16、权利要求1所述的多肽或基本上包含下述氨基酸序列之一的多肽或其生物活性片段或其生物活性变体在生产治疗增生疾病的药物中的应用，所述氨基酸序列为：

SEQ ID NO.2的氨基酸1—437;
 SEQ ID NO.2的氨基酸1—409;
 SEQ ID NO.2的氨基酸1—401;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—437;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—409;
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—401。

17、如权利要求16所述的应用，其特征在于增生疾病选自于

下面的组：骨髓增生性疾病，红细胞增多症，特发性血小板增多，骨髓纤维变性，CML和所有的白血病，淋巴瘤及实体瘤。

18、一种基本上包含下述核苷酸序列之一的多核苷酸或其片段或变体在抑制细胞生长中的应用，所述核苷酸序列为：

SEQ ID NO.1的核苷酸1—1600；
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1346；
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1262；
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1238；
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1346；
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1262；
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1238；
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1346；
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1262；
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1238。

19、一种基本上包含下述核苷酸序列之一的多核苷酸或其片段或变体在生产治疗增生疾病的药物中的应用，所述核苷酸序列为：

SEQ ID NO.1的核苷酸1—1600；
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1346；
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1262；
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1238；
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1346；
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1262；
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1238；
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1346；
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1262；
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1238。

20、如权利要求19所述的应用，其特征在于增生疾病选自于下面的组：骨髓增生性疾病，红细胞增多症，特发性血小板增多，骨髓纤维变性、CML和所有的白血病、淋巴瘤及实体瘤。

21、一种用于检测红细胞增多症或造血系统紊乱的试剂盒，该试剂盒包含至少一种基本上包含下述核苷酸序列之一的多核苷酸：

SEQ ID NO.1的核苷酸1—1600；
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1346；
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1262；
 SEQ ID NO.1的核苷酸36—1238；
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1346；
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1262；
 SEQ ID NO.1的核苷酸39—1238；
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1346；
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1262；
 SEQ ID NO.1的核苷酸99—1238；
 或其片段或变体，和/或

至少一种如权利要求1所述多肽或基本上包含下述氨基酸序列之一的多肽：

SEQ ID NO.2的氨基酸1—409；
 SEQ ID NO.2的氨基酸1—401；
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—409；
 SEQ ID NO.2的氨基酸22—401；
 或其生物活性片段或生物活性变体，和/或
 至少一种如权利要求3或4所述的抗体。

22、如权利要求21所述的检测PRV—1蛋白的试剂盒，其特征在于它是一种ELISA试剂盒。

23、如权利要求21所述的检测PRV—1蛋白的试剂盒，其特征在于它是一种半定量或定量RT—PCR分析试剂盒。

24、如权利要求21所述的检测PRV—1蛋白的试剂盒，其特征在于它是一种Northern印迹杂交试剂盒。

说明书

PRV-1基因及其应用

描述

本发明涉及编码PRV-1基因的核苷酸序列，含有此核苷酸序列的重组DNA，含有该重组DNA的载体以及用这些载体转化的细胞，本发明还涉及PRV-1多肽，抗此多肽的抗体，检测PRV-1多肽的方法，以及包含PRV-1多肽或抗PRV-1多肽的抗体的药物。

红细胞增多症（Polycythaemia rubra vera）（erythraemia）也称为 Polycythaemia vera 或 P-vera 是一种恶性血液学疾病，其中红细胞、粒细胞和巨核细胞形成增加。该病起源于克隆并且其是由单个造血前体细胞突变所致。在德国，红细胞增多症的发生率为每 100 万居民中 4 到 6 人。如果不进行治疗，该病会在 18 个月内导致死亡。用放血法或化疗治疗会平均延长 13 年以上存活时间。

红细胞增多症由临床指标诊断，临床迹象包括在三分之二患者中有头痛、瘙痒、脾大，在二分之一患者中有出血或血栓、高血压，由尿酸产量升高导致的痛风，以及在某些情况下出现脓毒性溃疡。最重要的实验室发现是血红蛋白、血细胞比容、红细胞计数和总红细胞容积值升高，且在许多情况下出现嗜中性粒细胞增多或血小板增多症。因为一方面多数指标相当模糊，另一方面不是所有患者均出现这些指标，因此通常很难将红细胞增多症与其它骨髓增生性疾病如慢性粒细胞白血病或特发性血小板增多症区分开来，因此不能保证诊断正确性。目前，红细胞增多症的分子学病因完全未知。但是因为如果不进行治疗红细胞增多症将发展成严重病程，因此精确诊断是非常重要的。

因此，本发明的目的是发现红细胞增多症的分子学病因，并且提供诊断该病的可能性。

本发明目的是通过分离一种基因而实现，该基因特异地与红细胞增多症相关表达，而在健康对照个体中不表达。这一基因称为PRV-1基因（*polycythaemia rubra vera*）。

类似的核苷酸序列已在国际申请WO98/50552中公开。

因此，本发明的一方面涉及编码PRV-1基因的多核苷酸，其基本上包含SEQ ID NO.1的序列。本发明的多核苷酸可以是单链或双链DNA或RNA，如果是RNA，本领域技术人员清楚地知道核苷酸U可以代替核苷酸T存在。多核苷酸应理解为是指含有15个或更多个核苷酸的核酸。

本发明的核苷酸序列如图1所示。因此，本发明涉及相应于图1所示序列的多核苷酸，以及核苷酸序列显示微小差异的多核苷酸。在本发明含义内，微小差异是指序列中少数、优选不超过50个、特别优选不超过25个核苷酸可以被置换，但是该核苷酸序列编码的基因的功能不发生改变。本领域技术人员熟悉这一事实，即编码氨基酸的碱基三联体可以用编码相同氨基酸的另一个三联体置换。另外，较不重要的区域可被缺失和/或稍加突变。在一特定实施方案中，所述多核苷酸包含SEQ ID NO.1的36—1346位核苷酸，即PRV-1基因的编码区。另一实施方案包含SEQ ID NO.1的36—1262位核苷酸，这一区域预计编码PRV-1多肽的活性区。最后，本发明的多核苷酸也可包含SEQ ID NO.1的39—1346位、39—1262位或39—1238位核苷酸，从而编码起始甲硫氨酸的密码子不存在。一优选的实施方案是包含SEQ ID NO.1的99—1346位、99—1262位或99—1238位核苷酸的多核苷酸，其导致编码PRV-1多肽的信号肽的5'末端密码子不存在。

本发明的多核苷酸也可以是PRV-1基因的一个片段，通常片段具有多于100个核苷酸，但优选地多于300个核苷酸。片段也可用作引物或探针，特别是用于PCR；在此情况下，片段可以被截

短以适合该目的。通常，引物长度为10—30个核苷酸，探针长度为15—50个核苷酸。

PRV-1基因是一种内源性基因，但是其在健康个体中的表达仅限于少数器官。正常情况下，其主要在造血器官即骨髓和胎肝中表达，在脾中弱表达，在心脏、肌肉、胰腺或肾中不表达。在红细胞增多症患者中，这一基因特别是在造血细胞中非常强地过表达。

PRV-1基因编码的蛋白质序列如图2所示，在所有表面分子的蛋白质序列中存在的并在正常情况下当蛋白质加工时被除去的信号肽以破折号(---)分开。蛋白质具有SEQ ID NO.2的序列。因此，本发明的另一方面为基本上纯化的具有SEQ ID NO.2的序列的多肽，或者具有SEQ ID NO.2的序列但缺少信号肽的多肽（即SEQ ID NO.2的22—437位氨基酸）。其它实施方案包括SEQ ID NO.2的1—409位、22—409位、1—401位或22—401位氨基酸（其可能是该蛋白质的活性区域）。

考虑到生物学活性，本发明多肽优选是糖基化的：其最优选是N-糖基化的。然后其可以在PRV-1多肽的氨基酸Asn-46, Asn-189和Asn-382中的至少一个氨基酸处是糖基化的（氨基酸号参照SEQ ID NO.2）。本发明还包括本发明多肽的片段，其是N-糖基化的。所述片段的长度至少为50个氨基酸，优选至少100个氨基酸，最优选至少150个氨基酸。在另一个实施方案中，多肽可以是O-糖基化的。

本领域技术人员清楚的是，特定的氨基酸可以用其它氨基酸置换而不削弱该蛋白质的生物学活性。这种修饰形式的本发明多肽（变异体）也是本发明的一部分。所述氨基酸置换是对蛋白质的生物学活性没有负面影响的置换，本领域技术人员可利用熟知规则选择置换。

根据制备方法，PRV-1多肽可以例如具有一糖基化磷脂酰肌醇锚，其然后与相应于SEQ ID NO.2中氨基酸407-409的氨基酸结合。GPI锚用于通过细胞膜外侧的脂类锚着蛋白质。但是，由于目前尚未证实的原因，通常观察到GPI连接的蛋白质也释放到培养基中，这一现象称为“脱落”。目前尚不清楚这是否是一特异过程，即这种蛋白质是以受控方式由酶从细胞膜上裂解，还是代表锚的非特异性丧失。因此，非常可能的是PRV-1在细胞膜上和胞外均被发现。分泌形式，即非膜结合的，可能对于该多肽作为生长因子和生长抑制剂的作用更重要，因为作为一种生长因子，这种形式能够扩散并到达其它细胞。

本领域技术人员清楚的是，通过操作这些C-末端氨基酸而可以影响蛋白质对细胞膜的附着。这特别涉及制备特定的DNA构建体，表达PRV-1多肽或这一多肽的片段。编码这些氨基酸的密码子可以被突变或缺失。

所述基因编码uPAR/Ly6家族的表面受体。这一受体家族可以转导促有丝分裂信号，即刺激细胞分裂的信号。因此有假设认为PRV-1基因的过表达，特别是在红细胞增多症患者的骨髓细胞上的过表达，导致这些细胞的过度增殖。

已发现PRV-1在健康个体或患有其它骨髓增生性疾病如慢性粒细胞白血病、急性粒细胞白血病或特发性血小板增多症或第二红血球增多症的患者的粒细胞上不表达。

为了能将PRV-1基因编码的多肽用于分析和检测方法中，其可以方便地从重组DNA中产生，重组DNA优选地包含与一启动子有功能连接的SEQ ID NO.1的核苷酸序列，或者至少PRV-1基因的编码区，即SEQ ID NO.1的36-1346位核苷酸，但至少是39-1262位或39-1238位核苷酸。但是重组DNA也可仅包含SEQ ID NO.1的一个片段。

本发明还涉及含有编码 PRV-1 多肽或其片段的重组 DNA 的载体，以及用该载体转染或转化的宿主细胞。宿主细胞可以是原核的，例如细菌如大肠杆菌，但是其所表达的多肽不是糖基化的。因此优选的是真核宿主细胞，其能够在翻译后糖基化所表达的蛋白质，并以其它方式修饰该蛋白质。真核宿主细胞的例子是昆虫细胞，如 Sf9 细胞，以用于用重组杆状病毒转染后表达，以及哺乳动物细胞，如 COS 细胞、CHO 细胞和 HeLa 细胞。这些例子是非限制性的。还可以使用酵母细胞作为宿主细胞。本领域技术人员很清楚根据宿主细胞不同糖基化模式也不同。表达产物的生物学活性因此也可变化。特别优选的是采用这种方法使宿主细胞中的表达产物糖基化仍能保持该蛋白质的生物学活性。

另一个方面本发明涉及一种制备本发明多肽的方法。在这种方法中，编码本发明多肽的 DNA 在宿主细胞中表达，接着根据表达的多肽是被宿主细胞分泌进了培养介质、还是仍然保留在细胞中，将多肽从培养介质或细胞中分离出来。然后对多肽进行浓缩或纯化，可以采用正式文献公开的方法如色析法，或是采用如在《蛋白纯化原理和实践》（第三版，R., Springer Verlag, 1994,）一书中描述的纯化蛋白的方法。在一个优选方案中，本发明的方法包含了将糖基化的多肽进行浓缩和/或纯化的步骤，而这一步可以在本发明多肽已经基本上被纯化之前或之后。在后一种情形中，纯化多肽的糖基化部分接着被分离掉。在更优选的方法中，N-糖基化多肽被特异性地分离出。在另一个方案中，序列 SEQ ID NO.2 的 Asn-46 位、Asn-189 位和 Asn-382 位中至少有一个氨基酸被糖基化的多肽被分离出。

从粒细胞分离的或重组产生的 PRV-1 多肽可以用于诊断红细胞增多症和治疗该疾病。

一种治疗可能性是“反义治疗”，这一方法采用“反义”RNA

分子，即与PRV RNA互补的RNA。由于PRV-1 RNA在其开始处具有序列5' - AAAAGCAGAAAGAGATTACCAGCC-3' (SEQ ID NO.3)，指向这一序列的必需的反义RNA应具有如下核苷酸序列：5' - GGCTGGTAATCTCTTTCTGCTTTT-3' (SEQ ID NO.4)。这一反义RNA被掺入载体并导入红细胞增多症细胞。例如这一RNA通过转染而导入，用于转染的载体优选被构建成特异地导入红细胞增多症细胞。反义RNA的表达使得PRV-1 mRNA不再能翻译成多肽。以此方式处理的细胞不再形成任何PRV-1蛋白。

本发明因此还涉及检测红细胞增多症的方法，其特征在于检测PRV-1多肽或其表位，并确定表达程度。

这一受体在骨髓外成熟细胞，例如在粒细胞上的过表达是存在红细胞增多症的强指示。这一过表达可方便地采用PRV-1受体的抗体通过免疫分析进行检测。合适的测试方法是已知的免疫分析变化方法，其利用PRV-1多肽特异性抗体和其它标记抗体，它们可以被固定化或存在溶液中。可以用已知方式进行标记，例如采用放射性同位素，经荧光或发光，用酶，经显色反应或用其它适于确定的基团。这些变化方法是本领域技术人员已知的，在此不需详细解释。根据本发明，特别优选的是ELISA测试。

特异检测PRV-1受体所需的抗体可以已知的方式类似地制备。单克隆和多克隆抗体均是合适的，优选使用单克隆抗体。

衍生自该蛋白质的肽也可用于制备抗体。在本发明范畴内，用具有如下序列的肽是成功的：

- a) KVSDLPRQWTPKN (氨基酸34-46) (SEQ ID NO.5)，和
- b) SAREKRDVQPPASQH (氨基酸391-405) (SEQ ID NO.6)。

多克隆抗体通常通过用PRV-1多肽免疫合适的宿主(兔)并

引发免疫应答而产生，当合适时PRV-I多肽与一免疫学支持物（佐剂）结合。单克隆抗体可用杂交瘤技术经已知技术产生。抗体可通过亲和纯化技术纯化。抗体的制备和纯化例如见Harlow和Lane的抗体实验手册，冷泉港实验室出版社。

另外，抗PRV-1的这种多克隆或单克隆抗体也可用于治疗疾病。

在另一个实施方案中，PRV-1受体可用RT-PCR方法检测。为此，首先从通常为粒细胞的过表达PRV-1的细胞中分离RNA，然后用RT引物经已知方式进行逆转录。RT引物优选是具有如下核苷酸序列的引物（SEQ ID NO.7）：

ATTAGGTTATGAGGTCAGAGGGAGGTT

以这种方式，特异的PRV-1 RNA被转化成DNA，这一DNA随后在一PCR反应中以已知方式进行扩增。扩增循环优选采用如下两个引物：

有义引物（SEQ ID NO.8）

GCAGAAAGAGATTACCAGCCACAGACGG

反义引物（SEQ ID NO.9）

GAATCGTGGGGGTAATAGAGTTAGCAGG。

本领域技术人员能够使用公布的序列找到其它合适的引物。

由于RNA用作这一方法的起始材料，因此仅当PRV-1基因也表达时PCR信号才呈阳性。如上所述，只有当患者患有红细胞增多症时才如此。PRV在健康个体的粒细胞中不表达，因此若不存在任何RT-PCR信号则指示不存在红细胞增多症。RT-PCR方法中的量化优选采用TaqMan®技术，该技术需要除引物外的探针。探针优选的序列是5'-TTCTTGTTGAACACACCAGACAAATCGG-3'（SEQ ID NO.10）。因此检测PRV-1的定量化RT-PCR也是本发明的一部分。

或者，也可使用印迹方法，优选Northern印迹，来诊断红细胞增多症。对于这种方法，从粒细胞中分离RNA，然后用印迹方法、例如Northern印迹检查PRV-1的表达。SEQ ID NO.1的cDNA序列或其区段可用作探针。仅当粒细胞来自患有红细胞增多症的患者时杂交才发生，因为只有此时在粒细胞上才有表达。若杂交不存在则指示衍生粒细胞的个体未患有红细胞增多症。

还可用基因片段进行Northern 印迹杂交，所述片段长度通常不超过100个碱基，优选长度不超过300个碱基。或者，可用作Northern印迹探针的该基因不同片段可通过用限制性内切酶消化基因而制备。如果片段来源于cDNA，则它们以双链存在，必须分离成单链以杂交。合适的例子是420bp-831bp的BamHI-PstI片段，或者831bp-1900bp的PstI-PstI片段。

首先将mRNA在一RT-PCR中逆转录，然后扩增cDNA，随后在一杂交方法中用探针检测扩增的DNA，这样也可检测PRV-1mRNA，以及PRV-1的表达。

在阳性诊断情况下，必须治疗该病，因为不然它会在相对较短的时间内导致死亡。对于治疗，可以使用抗PRV-1的特异抗体，如果需要，该抗体可与细胞毒性成分结合。

本发明因此进一步涉及一种药物，该药物除包含常规赋型剂外，还包含抗PRV-1受体的抗体。因为PRV-1抗体在红细胞增多症中过表达，当受损的粒细胞与抗PRV-1抗体接触时，许多抗体结合在其表面。许多抗体与这些细胞的结合刺激免疫学细胞摧毁这些粒细胞，以此方式，可以特异消除红细胞增多症细胞。

令人惊奇地，已发现PRV-1多肽呈造血活性，PRV-1多肽能刺激某些造血前体细胞形成红细胞集落。N-糖基化PRV-1多肽尤其展示这一功能。本发明优选的多肽因此是N-糖基化PRV-1多肽及其展示生长因子活性的片段。

本发明另一方面因此为一种药物，其除了包含药理学可接受的赋型剂外，还包含PRV-1多肽或其生物学活性片段。PRV-1多肽优选是糖基化的PRV-1多肽，更优选是N-糖基化PRV-1多肽或其生物学活性片段。本发明还涉及包含本发明至少一种多核苷酸的药物。

本发明进一步涉及PRV-1或其生物学活性片段作为体内或回体（*ex vivo*）生长因子的应用。PRV-1多肽或其生物学活性片段可用于治疗骨髓和循环中的所有全血细胞减少症和全血细胞病（外周血和骨髓的细胞组分的变化）。本发明的多肽例如可用于治疗肾功能不全、化疗或全身辐射情况下的贫血，治疗化疗或全身辐射过程中的嗜中性白细胞减少症和血小板减少症，回体治疗用于扩增（倍增）和回输入患者的外周血或骨髓干细胞，以及治疗脓毒症、系统性炎症反应综合征（SIRS）或局部炎症反应。本发明的多肽或包含其的药物可以各种方式给予。给予方式包括静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内、口服、经皮和经粘膜给予。

本发明的多肽也可用于治疗全血细胞减少症和全血细胞病，在此情况下，目的是在患者细胞中表达PRV-1多肽或其功能片段，由此首先并且最重要的是利用基因治疗方法。可从患者中分离细胞并用本发明多核苷酸转染（回体操作），随后使它们返回患者。也可以考虑这样的方法，其中本发明的多核苷酸经病毒转移进入靶细胞，插入核酸的表达随后导致造血活性。

令人惊讶地还发现在高浓度时，PRV-1多肽对细胞的生长有抑制作用，因而观察到如增加PRV-1蛋白的数量实际上完全阻止了红细胞和粒细胞/单核细胞集落的形成，这种效应类似于干扰素- α 的作用，后者被用于慢性骨髓白血病（CML, chronic myeloid leukemia）和红细胞增多症的基因治疗。一种内源性的抑制物与抑制细胞生长的化学制剂相比具有更多的优点，后者如当干扰素-

α 还没有获得时而在一定范围内仍在使用的羟基脲。干扰素- α 的一个缺点是这种活性化合物有着严重的副作用，被施用干扰素- α 的病人会觉得他们患了一场严重的流感。本发明涉及一种活性依赖于浓度的造血作用抑制物质。

因此本发明的另一方面涉及在本申请中描述的PRV-1多肽的用途，如抑制细胞生长，特别是作为一种抑制细胞生长剂的用途。本发明还涉及用多肽来生产一种治疗增生疾病的药物。这些疾病尤其是骨髓增生性疾病，红细胞增多症、特发性血小板增多、骨髓纤维变性、CML和所有的白血病、淋巴瘤，还有实体瘤。

本发明的另一方面是本申请中描述的多核苷酸、或是其生物活性片段及生物活性变异体用于抑制细胞的生长的用途。多核苷酸可以被植入一个合适的载体并转染进合适的靶细胞。当PRV-1多肽、其生物活性片段及生物活性变异体表达至一定浓度时，就会产生生长抑制效应。同样地，多核苷酸可以被植入一个病毒载体，适当的靶细胞受病毒感染后，其中的PRV-1基因就会表达。本发明也涉及本申请中的多核苷酸用于生产治疗增生性疾病的药物的用途，如治疗骨髓增生性疾病、红细胞增多症、特发性血小板增多、骨髓纤维变性、CML和所有的白血病、淋巴瘤及有实体瘤。

本发明还涉及用于检测红细胞增多症或造血系统紊乱的试剂盒，这些试剂盒包括本发明的多核苷酸和 / 或本发明的多肽和 / 或本发明的一或多种抗体。除此之外，试剂盒还可包括适于实施检测反应的容器或组合物。这种组合物的例子为缓冲液、封闭膜的试剂、杂交溶液、第二抗体、检测反应的底物溶液等。试剂盒优选用于进行PCR反应、Northern印迹、Southern印迹、Western印迹和ELISA、RIA或类似反应。

下述实施例用于解释本发明。

实施例1

PRV基因的鉴定

进行下述实验以鉴定基因：

一下述方案用于从储存血或放血红细胞增多症患者获得的血分离粒细胞：

一向血中加入等体积的于0.9%NaCl中的3%葡聚糖，混合物置于室温（RT）20分钟。

一混合物分离成两相，除去上层浅色相并在1800g和室温离心10分钟。

一弃去上清，细胞沉淀重悬于同样体积的0.9%NaCl中。

一在每种情况下，将35ml在NaCl中的细胞置于15 ml Ficoll—Hypaque上。

一然后在1800g和RT不用刹车离心在Ficoll—Hypaque上的细胞60分钟。

一形成细胞沉淀和具有中间相的两层。

一将两层和中间相吸去，并将细胞沉淀在10ml冰冷的0.2%NaCl中重悬30秒，之后立即加入10 ml冰冷的1.6%NaCl。

一将细胞在1800g和RT离心10分钟。

一然后在10ml PBS中洗1次，并离心。

一细胞沉淀含有95—99%纯度的粒细胞。

一用标准方法从这些细胞中分离RNA。

一在Northern印迹中检查10mg RNA对PRV—1的表达。用SEQ ID NO.1所示的完整cDNA作为探针。

这一实验在39个红细胞增多症患者和29个储存血对照样品上进行。在红细胞增多症患者情况中发现PRV—1探针强烈杂交。在健康对照样品中未观察到杂交。



实施例2

PRV-1具有生长因子活性

从受精后13.5天的怀孕母鼠中取出胚胎，获取胎肝，用抗体染色胎肝中所含的细胞，并通过柱层析富集特定细胞，耗竭其它细胞类型。这导致在细胞混合物中富含某些造血前体细胞（红细胞集落形成单位，CFU-E）。因此，尽管总体上约2%胎肝由CFU-E组成，但30-40%富集的细胞由CFU-E组成。

用逆转录病毒转染这些CFU-E，为此，称为293-T的包装细胞系在48小时前转染，293-T细胞系是已建立的人胎肾细胞系，用来自逆转录病毒的几种基因稳定转染293-T细胞。如果这些293-T细胞用称为pOS和pKAT的两种质粒转染，其产生能感染鼠胎肝细胞的逆转录病毒。如果293-T细胞用空pOS载体和pKAT转染，则产生仅表达逆转录病毒蛋白的野生型逆转录病毒。另一方面，将人基因例如PRV-1克隆进pOS载体导致产生当其感染细胞时表达这一蛋白的逆转录病毒。所述293-T细胞将逆转录病毒分泌进细胞培养基。

两天后，收获含有逆转录病毒的来自转染的293-T细胞培养物的培养基并通过0.45 μm滤膜1次。为了转染胎肝细胞，将这些细胞与含有逆转录病毒的过滤的细胞培养物培养基混合，并在加入的Polybren的存在下，于1800rpm和20℃离心2小时。转染的胎肝然后在培养基（Methocult，来自Cell Systems）中培养，所述培养基除含有通常的盐和氨基酸外，还含有胎牛血清，0.0001—0.4 IU促红细胞生成素（EPO）/ml和甲基纤维素（0.8%）。CFU-E需要EPO以形成造血集落。甲基纤维素固化培养基成果冻状，从而使它们与液体培养基相反不能流动。因此可观察到从一个单细胞是否能形成造血集落。CFU-E形成红细胞集落，即含有红细胞及其前体细胞的集落。

3天后，计数已形成的造血集落数。比较了各种混合物，在每一实验中没有检测所有混合物，混合物1—3是非常相似的对照，它们中的每一个可与混合物4分别对比。

混合物1：未用逆转录病毒转染的细胞；

混合物2：用空pOS载体转染的细胞；

混合物3：用非造血活性的绿色荧光蛋白（GFP）转染的细胞；

混合物4：用pOS—PRV—1（载体+本发明基因）转染的细胞。

表1：表中列出了如上所述进行的3个实验获得的结果，每一数字代表集落数

	混合物1	混合物2	混合物3	混合物4
	未转染的	空载体 (pOS)	GFP (pOS—GFP)	PRV—1 (pOS—PRV—1)
实验 1	116	156	80	326
实验 2		271	273	410
实验 3	120		131	291

实验证明用PRV—1转染的CFU—E比各种对照CFU—E形成多得非常多的集落（多至3倍），这一结果表明PRV—1是CFU—E的生长因子。

实施例3

PRV—1生长因子的可溶性

进行进一步的实验以研究PRV—1是否是一可溶的生长因子，或者是否需要细胞—细胞接触。包装细胞系293—T被pOS和pKAT载体转染后不仅产生逆转录病毒，另外293—T细胞还合成由克隆在pOS中的基因编码的蛋白质，在本例中是PRV—1。如果基因产物是可溶蛋白，其被分泌进环绕包装细胞系293—T的培养基中。

如果293-T细胞仅用pOS载体而不用pKAT转染，则不形成逆转录病毒，细胞培养物培养基仅含有由细胞产生的可溶蛋白。将来自pOS-PRV-1转染的细胞的不含逆转录病毒的培养基与CFU-E混合，全部涂布在甲基纤维素培养基中，计数获得的集落数。

获得下述结果：

表2：PRV-1的可溶性，每一数字代表集落数

	混合物1	混合物2	混合物3	混合物4
	未转染的	空载体 (pOS)	GFP (pOS-GFP)	PRV-1 (pOS-PRV-1)
实验4		137	187	557

在这一实验中，同样，用含有PRV-1的培养基处理的CFU-E比各种对照细胞形成多得非常多的造血集落，这一结果表明PRV-1是可溶的生长因子。

实施例4

PRV-1抑制细胞生长的作用

这个实验是在外周血细胞中进行的。由于在健康个体的外周血液中循环着一小部分前体细胞，因此有可能在适合介质（甲基纤维素）上由外周血细胞培养出造血细胞。从一个健康供体（首先引入肝磷脂或EDTA作为一种抗凝血剂）提取40ml外周静脉血液，将15ml聚糖体/hypaque加入血液，并以1600rpm转速离心混合40分钟。结果产生一种将血液分馏成细胞要素的密度梯度。在离心后，含有干细胞的单核细胞处于血清和聚糖体的中间相。移出中间相，并用PBS（等分盐溶液）洗涤。这样产生了纯化的单核细胞，其中约0.1%是造血干细胞。

单核细胞在含有一种增加浓度的3%FCS（牛胎血清）的特别

丰富培养基（IMDM）中被吸收，随后这种3%FCS包含有修饰物，如它是否增加了PRV-1。

IMDM中的单核细胞以 7×10^5 个细胞/ml 的密度加入由 Methocult（干细胞技术）提供的商业可获得培养基中，该培养基含有IMDM和30% FCS，1%的BSA（牛血清蛋白），巯基乙醇，2ml L-谷氨酸盐，3 IU EPO（促红细胞生成素）/ ml 和1.0%的甲基纤维素。细胞在培养基中生长14天，少数存在于混合物中的干细胞可以发育成造血集落。通常，每 7×10^5 个细胞发育成100至200个造血细胞。

还构建了一个能高产量表达PRV-1的细胞系。引入这些细胞的PRV-1发生改变，不再含有一个脂类锚。表达产物含有SEQ ID NO:2序列中1—401位的氨基酸，其中缺失了402—437位的氨基酸。因此改变的PRV-1不再象野生型PRV-1那样通过一个脂类锚混合入细胞膜，而是完全由细胞分泌。细胞系包括如实施例3中的能表达蛋白（PRV-1）但不会产生任何逆转录病毒的293细胞。

为了进行造血集落鉴定，单核血细胞或是在与未转染的293细胞温育了48个小时的IMDM培养基中被吸收，或是在与表达改变的PRV-1的细胞（293-GPI-less-PRV-1）温育了48个小时的培养基中被吸收。接着估测出这些细胞形成造血集落的能力。14天后确定红细胞（红色）和骨髓（白色）血细胞集落的数目。该实验重复三次，培养不同的天数，采用不同的血液供体。另外也估计了实验中的重复。获得的结果如下：

实验 1

细胞上清	供体 1		供体 2	
	红色集落	白色集落	红色集落	白色集落
293	248/221	70/114	127/161	25/66
293-GPI-less-PRV-1	7/3	0/0	31/19	0/0

蛋白质的抗体检测，结果表明尽管从粒细胞纯化的PRV-1蛋白大小为60—65kDa，在用N-糖苷酶消化后其大小仅40kDa。这清楚证明PRV-1是在天冬酰胺残基（天冬酰胺=N）上糖基化的。

序列表

<110> 弗赖堡大学综合医院

<120> PRV-1 基因及其应用

<130> E980930

<140> PCT/EP00/09594

<141> 2000-09-29

<150> DE 199 47 010.3

<151> 1999-09-30

<160> 10

<170> PADAT Sequenzmodul, Version 1.0

<210> 1

<211> 1600

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<223>

<400> 1

aaaagcagaa agagattacc agccacagac gggatcatgag cgcggtatta ctgctggccc	60
tcttgggggtt catcctccca ctgccaggag tgcaggcgct gctctgccag tttgggacag	120
ttcagcatgt gtggaagggtg tccgacctgc cccggcaatg gacccctaag aacaccagct	180
gcgacagcgg cttgggggtgc caggacacgt tgatgctcat tgagagcgga cccaagtga	240
gcctgggtgct ctccaagggc tgcacggagg ccaaggacca ggagccccgc gtcactgagc	300
accgatggg ccccggcctc tcctgatct cctacacctt cgtgtgccgc caggaggact	360
tctgcaacaa cctcgttaac tcctccccgc tttgggcccc acagccccca gcagaccag	420
gatccttgag gtgccagtc tgcttgtcta tggaaggctg tctggagggg acaacagaag	480
agatctgccc caaggggacc acacactgtt atgatggcct ctcaggctc aggggaggag	540
gcattttctc caatctgaga gtccagggat gcatgcccc gccaggttgc aacctgctca	600

atgggacaca ggaaattggg cccgtgggta tgactgagaa ctgcaatagg aaagattttc 660
 tgacctgtca tcgggggacc accattatga cacacggaaa cttgggtcaa gaaccactg 720
 attggaccac atcgaatacc gagatgtgcg aggtggggca ggtgtgtcag gagacgctgc 780
 tgctcataga tgtaggactc acatcaacco tgggtggggac aaaaggctgc agcactgttg 840
 gggctcaaaa ttcccagaag accaccatcc actcagcccc tcctgggggtg cttgtggcct 900
 cctataccca cttctgctcc tcggacctgt gcaatagtgc cagcagcagc agcgttctgc 960
 tgaactccct cctcctcaa gctgccctg tcccaggaga ccggcagtgt cctacctgtg 1020
 tgcagccctt tggaacctgt tcaagtggct ccccccgaat gacctgcccc aggggcgcca 1080
 ctcatgttta tgatgggtac attcatctct caggaggtgg gctgtccacc aaaatgagca 1140
 ttcagggtg cgtggcccaa ccttcagct tctgttgaa ccacaccaga caaatcgga 1200
 tcttctctgc gcgtgagaag cgtgatgtgc agcctcctgc ctctcagcat gagggaggtg 1260
 gggctgaggg cctggagtct ctcaattggg ggggtggggct ggcactggcc ccagcgctgt 1320
 ggtggggagt ggtttgcct tcctgctaac tctattacc ccacgattct tcaccgtgc 1380
 tgaccacca cactcaacct cctctgacc tcataacct atggccttg acaccagatt 1440
 ctttccatt ctgtccatga atcatcttc ccacacacaa tcattcatat ctactcacct 1500
 aacagcaaca ctggggagag cctggagcat ccggacttgc cctatgggag aggggacgct 1560
 ggaggagtgg ctgcatgtat ctgataatac agaccctgtc 1600

<210> 2

<211> 437

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Met Ser Ala Val Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Phe Ile Leu Pro Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Gln Phe Gly Thr Val Gln His Val
 20 25 30
 Trp Lys Val Ser Asp Leu Pro Arg Gln Trp Thr Pro Lys Asn Thr Ser

35						40						45					
Cys	Asp	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Gln	Asp	Thr	Leu	Met	Leu	Ile	Glu	Ser		
50						55						60					
Gly	Pro	Gln	Val	Ser	Leu	Val	Leu	Ser	Lys	Gly	Cys	Thr	Glu	Ala	Lys		
65						70						75					
Asp	Gln	Glu	Pro	Arg	Val	Thr	Glu	His	Arg	Met	Gly	Pro	Gly	Leu	Ser		
85						90						95					
Leu	Ile	Ser	Tyr	Thr	Phe	Val	Cys	Arg	Gln	Glu	Asp	Phe	Cys	Asn	Asn		
100						105						110					
Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Pro	Leu	Trp	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Ala	Asp	Pro		
115						120						125					
Gly	Ser	Leu	Arg	Cys	Pro	Val	Cys	Leu	Ser	Met	Glu	Gly	Cys	Leu	Glu		
130						135						140					
Gly	Thr	Thr	Glu	Glu	Ile	Cys	Pro	Lys	Gly	Thr	Thr	His	Cys	Tyr	Asp		
145						150						155					
Gly	Leu	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly	Gly	Ile	Phe	Ser	Asn	Leu	Arg	Val		
165						170						175					
Gln	Gly	Cys	Met	Pro	Gln	Pro	Gly	Cys	Asn	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Gln		
180						185						190					
Glu	Ile	Gly	Pro	Val	Gly	Met	Thr	Glu	Asn	Cys	Asn	Arg	Lys	Asp	Phe		
195						200						205					
Leu	Thr	Cys	His	Arg	Gly	Thr	Thr	Ile	Met	Thr	His	Gly	Asn	Leu	Ala		
210						215						220					
Gln	Glu	Pro	Thr	Asp	Trp	Thr	Thr	Ser	Asn	Thr	Glu	Met	Cys	Glu	Val		
225						230						235					
Gly	Gln	Val	Cys	Gln	Glu	Thr	Leu	Leu	Leu	Ile	Asp	Val	Gly	Leu	Thr		
245						250						255					
Ser	Thr	Leu	Val	Gly	Thr	Lys	Gly	Cys	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Gln	Asn		
260						265						270					
Ser	Gln	Lys	Thr	Thr	Ile	His	Ser	Ala	Pro	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Ala		
275						280						285					
Ser	Tyr	Thr	His	Phe	Cys	Ser	Ser	Asp	Leu	Cys	Asn	Ser	Ala	Ser	Ser		
290						295						300					
Ser	Ser	Val	Leu	Leu	Asn	Ser	Leu	Pro	Pro	Gln	Ala	Ala	Pro	Val	Pro		
305						310						315					
Gly	Asp	Arg	Gln	Cys	Pro	Thr	Cys	Val	Gln	Pro	Leu	Gly	Thr	Cys	Ser		
325						330						335					
Ser	Gly	Ser	Pro	Arg	Met	Thr	Cys	Pro	Arg	Gly	Ala	Thr	His	Cys	Tyr		
340						345						350					
Asp	Gly	Tyr	Ile	His	Leu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	Thr	Lys	Met	Ser		
355						360						365					
Ile	Gln	Gly	Cys	Val	Ala	Gln	Pro	Ser	Ser	Phe	Leu	Leu	Asn	His	Thr		
370						375						380					
Arg	Gln	Ile	Gly	Ile	Phe	Ser	Ala	Arg	Glu	Lys	Arg	Asp	Val	Gln	Pro		
385						390						395					
Pro	Ala	Ser	Gln	His	Glu	Gly	Gly	Gly	Ala	Glu	Gly	Leu	Glu	Ser	Leu		
405						410						415					
Thr	Trp	Gly	Val	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Pro	Ala	Leu	Trp	Trp	Gly	Val		
420						425						430					

Val Cys Pro Ser Cys
435

<210> 3
<211> 24
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PRV-1 序列的 5' 末端

<400> 3

aaaagcagaa agagattacc agcc 24

<210> 4
<211> 24
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义分子

<400> 4

ggctggtaat ctctttctgc tttt 24

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRV-1 的氨基酸 34-46

<400> 5

Lys Val Ser Asp Leu Pro Arg Gln Trp Thr Pro Lys Asn
1 5 10

<210> 6
<211> 15

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRV-1 的氨基酸 391-405

<400> 6

Ser	Ala	Arg	Glu	Lys	Arg	Asp	Val	Gln	Pro	Pro	Ala	Ser	Gln	His
1				5				10				15		

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RT 引物

<400> 7

attagggttat gaggtcagag ggaggtt 27

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 有义引物

<400> 8

gcagaaagag attaccagcc acagacgg 28

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义引物

<400> 9

gaatcgtggg ggtaatagag ttagcagg

28

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针

<400> 10

ttcttggtga accacaccag acaaatcgg

29

说明书附图

AAAAGCAGAAAGAGATTACCAGCCACAGACGGGTCAATGAGCGCGGTATTACTGCTGGCCCTCC
TGGGGTTCATCCTCCCCTGCCCAGGAGTGCCAGGCGCTGCTCTGCCAGTTTGGGACAGTTCAGC
ATGTGTGGAAGGTGTCCGACCTGCCCCGGCAATGGACCCCTAAGAACACCAGCTGCGACAGCG
GCTTGGGGTGCCAGGACACGTTGATGCTCATTGAGAGCGGACCCCAAGTGAGCCTGGTGCTCT
CCAAGGGCTGCACGGAGGCCAAGGACCAGGAGCCCCGCGTCACTGAGCACCGGATGGGCCCCG
GCCTCTCCCTGATCTCCTACACCTTCGTGTGCCGCCAGGAGGACTTCTGCAACAACCTCGTTA
ACTCCCTCCCGCTTTGGGCCCCACAGCCCCCAGCAGACCCAGGATCCTTGAGGTGCCAGTCT
GCTTGTCTATGGAAGGCTGTCTGGAGGGGACAACAGAAGAGATCTGCCCAAGGGGACCACAC
ACTGTTATGATGGCCTCCTCAGGCTCAGGGGAGGAGGCATCTTCTCCAATCTGAGAGTCCAGG
GATGCATGCCCCAGCCAGGTTGCAACCTGCTCAATGGGACACAGGAAATTGGGCCCCTGGGTA
TGACTGAGAACTGCAATAGGAAAGATTTTCTGACCTGTCTATCGGGGACCACCATATGACAC
ACGGAAACTTGGCTCAAGAACCCACTGATTGGACCACATCGAATACCGAGATGTGCGAGGTGG
GGCAGGTGTGTGAGGAGACGCTGCTGCTCATAGATGTAGGACTCACATCAACCCTGGTGGGGA
CAAAAGGCTGCAGCACTGTTGGGGCTCAAAATTCCCAGAAGACCACCATCCACTCAGCCCCCTC
CTGGGGTGCTTGTGGCCTCCTATACCCACTTCTGCTCCTCGGACCTGTGCAATAGTGCCAGCA
GCAGCAGCGTTCTGCTGAACTCCCTCCCTCCTCAAGCTGCCCCCTGTCCCAGGAGACCGGCAGT
GTCCTACCTGTGTGACCCCCCTTGAACCTGTTCAAGTGGCTCCCCCGAATGACCTGCCCCA
GGGGCGCCACTCATTGTTATGATGGGTACATTCATCTCTCAGGAGGTGGGCTGTCCACCAAAA
TGAGCATTACAGGGCTGCGTGGCCCAACCTTCCAGCTTCTTGTGTAACCACACCAGACAAATCG
GGATCTTCTCTGCGCGTGAGAAGCGTGATGTGCAGCCTCCTGCCTCTCAGCATGAGGGAGGTG
GGGCTGAGGGCCTGGAGTCTCTCACTTGGGGGGTGGGGCTGGCACTGGCCCCAGCGCTGTGGT
GGGGAGTGGTTTGCCCTTCCCTGCTAACTCTATTACCCCCACGATTCTTCACCGCTGCTGACCA
CCCACACTCAACCTCCCTCTGACCTCATAACCTAATGGCCTTGGACACCAGATTCTTTCCCAT
TCTGTCCATGAATCATCTTCCCCACACACAATCATTATCTACTCACCTAACAGCAACACT
GGGGAGAGCCTGGAGCATCCGGACTTGCCCTATGGGAGAGGGGACGCTGGAGGAGTGGCTGCA
TGTATCTGATAATACAGACCCTGTC

图 1

MSAVLLLALLGFILPLPGVQA---LLCQFGTVQHVKVSDLPQWTPKNTSCD
SGLGCQDTLMLIESGPQVSLVLSKGCTEAKDQEPRVTEHRMGPGLSLISY
TFVCRQEDFCNNLVNSLPLWAPQPPADPGSLRCPVCLSMEGCLEGTTEEI
CPKGTTHCYDGLLRRLRGGGIFSNLRVQGCMPQPGCNLLNGTQEIGPVGMT
ENCNRKDFLTCHRGTTIMTHGNLAQEPTDWTTSENTEMCEVGQVCQETLLL
IDVGLTSTLVGTRKGCSTVGAQNSQKTTIHSAPPGVLVASYTHFCSSDLCN
SASSSSVLLNSLPPQAAPVPGDRQCPTCVQPLGTCSSGSPRMTCPRGATH
CYDGYIHLSGGGLSTKMSIQGCVAQPSSFLLNHTRQIGIFSAREKRDVQP
PASQHEGGGAEGLESITWGVGLALAPALWWGVVCPSC

图 2