



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104861071 B

(45)授权公告日 2019.04.12

(21)申请号 201510205553.5

A61P 3/06(2006.01)

(22)申请日 2015.04.27

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104861071 A

CN 103476797 A, 2013.12.25,
WO 2015054619 A2, 2015.04.16,
肖文虎等.PCSK9结构与功能.《中国生物化学与分子生物学报》.2009,第25卷(第3期),第213-218页.

(43)申请公布日 2015.08.26

(73)专利权人 南京师范大学
地址 210097 江苏省南京市鼓楼区宁海路122号

G. Tibolla, et al..Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): From structureefunction relation to therapeutic inhibition.《Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 》.2011,第21卷(第11期),835-843.

(72)发明人 郭志刚 曹艳 高婷婷 杨欢

(74)专利代理机构 南京知识律师事务所 32207
代理人 卢亚丽

审查员 高赞

(51) Int. Cl.
C07K 16/40(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

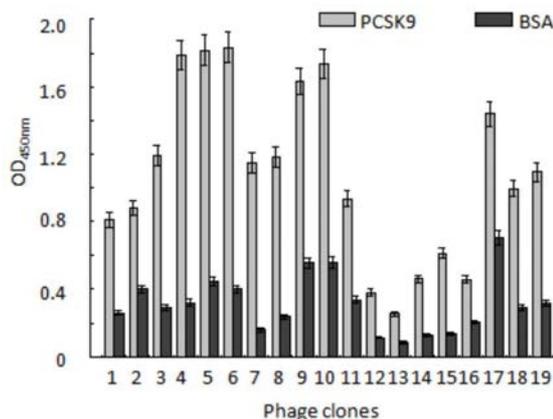
权利要求书1页 说明书6页
序列表6页 附图3页

(54)发明名称

针对PCSK9的全人源单克隆抗体的可变区基因及其应用

(57)摘要

本发明涉及基因工程抗体技术领域,特别涉及一种针对PCSK9的全人源单克隆抗体和全长抗体的制备方法和用途。所述可变区基因,其重链可变区编码的多肽与SEQ ID NO.1所示序列至少有80%同一性,其轻链可变区编码的多肽与SEQ ID NO.2所示序列至少有80%同一性。更具体而言,本发明利用人源单克隆抗体噬菌体展示文库筛选到针对人PCSK9的Fab抗体,并利用基因工程的方法得到完整全长抗体。本发明的抗体可以特异性的结合PCSK9,有效影响PCSK9与LDLR的相互作用,抑制LDLR的降解,可应用于治疗胆固醇及脂类代谢疾病。



1. 一种编码哺乳动物PCSK9的全人源单克隆抗体的基因,其重链可变区的基因序列如SEQ ID NO.9所示;轻链可变区基因序列如SEQ ID NO.10所示。
2. 权利要求1所述的基因编码的哺乳动物PCSK9的全人源单克隆抗体在制备阻断PCSK9/LDLR相互作用的药物中的用途。
3. 权利要求1所述的基因编码的哺乳动物PCSK9的全人源单克隆抗体在制备治疗胆固醇及脂类代谢疾病的药物中的用途。

针对PCSK9的全人源单克隆抗体的可变区基因及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,具体涉及一种新的可与PCSK9特异结合的高亲和力全人源Fab抗体和全长抗体,能够削弱或阻断PCSK9与低密度脂蛋白受体(LDLR)之间的相互作用,抑制PCSK9介导的LDLR降解,从而协助增加低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的摄取,是一种具有降血脂活性的基因工程抗体。

背景技术

[0002] 高胆固醇血症是心血管疾病的重要发病因素。大量临床研究显示降低低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平有助于减少心血管疾病的发病风险,改善临床结果。他汀类药物(Statins)是目前临床上应用最为广泛的降脂药物。作为羟甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶的抑制剂,他汀类药物能够竞争性地抑制内源性胆固醇合成限速酶(HMG-CoA)的还原酶的活性,抑制细胞内羟甲戊酸代谢途径,致使细胞内的总胆固醇合成减少,反馈性调节细胞膜表面(主要为肝细胞)低密度脂蛋白受体(LDLR)的数量和活性,使得血清中胆固醇的清除量增加,降低总胆固醇水平。然而,他汀类药物存在着引起肝脏酶异常、导致横纹肌溶解等副作用,且临床上存在着部分他汀类药物不耐受的患者。因此,开发新型降脂药物具有重要的意义。

[0003] 前蛋白转化酶枯草溶菌素/kexin 9型(PCSK9)是枯草杆菌丝氨酸蛋白酶家族的成员。PCSK9能够竞争性地与LDLR结合,抑制LDLR对血浆中LDL-C的清除,引发血浆中LDL-C水平的持续增加,导致心血管疾病的易感性。研究发现,在人群中存在着PCSK9功能缺失型和功能获得型突变者。PCSK9功能获得型突变者的PCSK9活性升高,血浆中胆固醇含量较高,表现为高胆固醇血症易感。而PCSK9功能缺失型突变者往往具有较低的血浆胆固醇水平,这类人群的LDL-C的血浆水平较正常群体降低约40%左右,其患上冠心病等心血管疾病的风险很低。此外,动物实验表明PCSK9敲除的小鼠LDLR水平显著上升,循环系统中脂蛋白的清除率大大加速,而血浆胆固醇水平明显降低。这些研究表明PCSK9可以作为治疗高胆固醇血症的可行的靶点。因此,PCSK9的抑制剂的开发对于降低LDL-C的血浆浓度,减少由PCSK9介导的胆固醇及脂类代谢疾病具有积极意义。

发明内容

[0004] 本发明的技术目的在于利用噬菌体展示技术获得针对PCSK9的全人源单克隆抗体的重链和轻链序列,并继而利用基因工程的方法得到完整的抗体或其功能片段。

[0005] 本发明公开了一种针对哺乳动物PCSK9的全人源单克隆抗体的重链可变区,其序列与SEQ ID NO.1所示序列至少有80%同一性。其轻链可变区,其序列与SEQ ID NO.2所示序列至少有80%同一性。

[0006] 本发明还公开了编码上述重链可变区的基因和编码上述轻链可变区的基因。

[0007] 本发明还提供了一种针对哺乳动物包括人PCSK9的全人源单克隆抗体、其功能片段或其衍生物,具有上述的重链可变区和轻链可变区。

[0008] 更具体地,本发明第一方面涉及一种针对哺乳动物包括人PCSK9的全人源单克隆抗体、其功能片段或其衍生物,其重链的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的序列分别与SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4和SEQ ID NO.5所示的序列具有至少80%的同一性,其轻链的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的序列与SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7和SEQ ID NO.8所示的序列具有至少80%的同一性。

[0009] 优选地,所述同一性为至少85%,优选地至少90%,更优选地,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,最优选地,100%。

[0010] 优选地,其重链序列与如SEQ ID NO.1所示的序列的同一性为至少80%,优选地,至少85%,优选地至少90%,更优选地,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,最优选地,100%。

[0011] 优选地,其轻链序列与如SEQ ID NO.2所示的序列的同一性为至少80%,优选地,至少85%,优选地至少90%,更优选地,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,最优选地,100%。

[0012] 优选地,所述抗体的类型为IgA、IgD、IgE、IgG或IgM。

[0013] 优选地,所述抗体的类型为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2。

[0014] 优选地,所述功能片段或衍生物为(Fab')₂、Fab、单链抗体、单链sv、多价单链抗体、双特异性抗体或三特异性抗体。

[0015] 本发明第二方面涉及一种编码根据如第一方面所述的针对哺乳动物包括人PCSK9的全人源单克隆抗体,其功能片段或其衍生物的核苷酸序列。

[0016] 优选地,其重链的编码序列与如SEQ ID NO.9所示的序列的同一性为至少80%,优选地,至少85%,优选地至少90%,更优选地,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,最优选地,100%;轻链的序列与如SEQ ID NO.10所示的序列的同一性为至少80%,优选地,至少85%,优选地至少90%,更优选地,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,最优选地,100%。

[0017] 本发明的第三方面涉及根据如上第一方面所述的针对哺乳动物包括人PCSK9的全人源单克隆抗体、其功能片段或其衍生物或根据如上第二方面所述的核苷酸序列在制备阻断PCSK9/LDLR相互作用的药物中的应用。

[0018] 本发明的第四方面涉及根据如上第一方面所述的针对哺乳动物包括人PCSK9的全人源单克隆抗体、其功能片段或其衍生物或根据如上第二方面的核苷酸序列在治疗胆固醇及脂类代谢疾病的药物中的用途。

[0019] 优选地,所述胆固醇及脂类代谢疾病为高脂血症或高胆固醇血症。

[0020] 本发明的第五方面涉及一种主要活性成分为根据如上第一方面所述的针对哺乳动物包括人PCSK9的全人源单克隆抗体、其功能片段或其衍生物或根据如上第二方面所述的核苷酸序列的组合物。

[0021] 优选地,所述的组合物还含有他汀类抑制素,优选阿托伐他汀,氟伐他汀,洛伐他汀,匹伐他汀,普伐他汀,罗舒伐他汀,辛伐他汀。

[0022] 换而言之,本发明的PCSK9单克隆抗体的重链及轻链(包括框架区及CDR区)均是通过噬菌体展示技术得到的全人源序列(通过筛选含有全人源序列的噬菌体文库)。该抗体特异性结合PCSK9,抑制PCSK9与低密度脂蛋白受体(LDLR)之间的相互作用,抑制PCSK9介导的

LDLR降解,从而协助增加低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 的摄取。

[0023] 本发明筛选鉴定的重链及轻链序列可以利用基因工程的方法得到完整的抗体IgA、IgD、IgE、IgG或IgM。这些抗体的重链恒定区分别对应 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ,这些抗体的轻链恒定区可以是kappa (κ)和lambda (λ)。这些抗体可以包括其各亚型,比如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2等等。还可以通过基因工程的方法得到其他形式的单克隆抗体,包括(Fab')₂、Fab、单链抗体、单链sv (SCFV)、多价单链抗体、双特异性抗体、三特异性抗体等其他任何形式的抗体。

[0024] 本领域技术人员公知,决定抗体特异性等性质的关键因素在于其重链和轻链的可变区序列(尤其是重链和轻链的CDR1、CDR2和CDR3的序列),恒定区以及互补决定区间的框架区序列可以做适当的改变而不至于实质性影响抗体的特异性等性质。所述适当的改变如保守氨基酸的替换等。

[0025] 该发明的抗体可以治疗以下胆固醇及脂类代谢疾病包括但不限于以下疾病,包括高脂血症,高胆固醇血症,甘油三酯症等疾病。

[0026] 该发明的抗体可以单独使用,也可以联合其他药物一起使用,包括他汀类药物。

[0027] 本发明的抗体为胆固醇及脂类代谢疾病的治疗提供了新的药物。

附图说明

[0028] 图1 噬菌体Elisa测定结果。

[0029] 图2 PA4Fab蛋白质特异性结合PCSK9。

[0030] 图3 显示SDS-PAGE蛋白质电泳图,通过Protein A柱分离纯化后获得的PA4 IgG1目的蛋白。

[0031] 图4 PA4 IgG1全长抗体阻断PCSK9/LDLR相互作用。

[0032] 图5 PA4 IgG1全长抗体抑制HepG2细胞表面PCSK9对LDLR的降解。

[0033] 图6 PA4 IgG1抗体对于PCSK9介导的HepG2细胞表面LDLR降解的抑制效应具有剂量依赖性。

[0034] 图7 通过高脂饲料喂食构建高胆固醇小鼠模型。

[0035] 图8 PA4 IgG1全长抗体降低高脂小鼠的胆固醇水平。

具体实施方式

[0036] 实施例1、人源单克隆抗体噬菌体展示文库的构建

[0037] 本发明首先根据Hans J.W.de Haard等人的报道(Antibody Phage Display, 2002, p87-100)构建了一个天然人源的Fab噬菌体展示文库,该库的库容超过 1.0×10^{10} ,宿主为大肠杆菌TG1。

[0038] 实施例2、筛选Fab噬菌体文库得到抗人PCSK9的阳性单克隆

[0039] 1、以包被缓冲液(PBS)稀释PCSK9蛋白(购自金斯瑞生物科技有限公司)至 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$;取2ml加入到免疫管中, 4°C 包被过夜;次日,弃上清,PBS洗管3次;2%MPBS(含有2%脱脂奶粉的PBS),室温封闭2h;弃封闭液;将噬菌体抗体库($10^{12} \sim 10^{13}$ pfu)悬浮于2ml 2%MPBS中,置于转台上反复翻转,室温封闭1h;将封闭后的噬菌体抗体库加入到PCSK9包被的免疫管中,置于转台上反复翻转30min后,室温静置90min;以含有0.1%Tween-20的PBS洗管20

次,再以PBS洗管20次;加入1ml 100mM三乙胺,置于转台反复翻转孵育10min,进行特异性洗脱;洗脱下来的噬菌体中迅速加入0.5ml 1M Tris-HCl用于中和pH;中和后的噬菌体用于感染对数期的大肠杆菌TG1,测定滴度并进行扩增浓缩,用于下一轮筛选。

[0040] 2、4轮筛选完成后,将洗脱下来的噬菌体感染大肠杆菌TG1涂平板,随机挑取200个克隆,用于噬菌体Elisa。

[0041] 3、将克隆接种于96孔平板,37℃培养至OD₆₀₀达到0.5左右;加入VSCM13辅助噬菌体,过夜培养;扩增后的噬菌体用2%MPBS阻断,分别加入到包被1μg/ml PCSK9抗原和BSA的ELISA板中(BSA为阴性对照),室温孵育1h,用PBST洗板5次,加入兔抗M13噬菌体-HRP偶联物,室温孵育1h,用PBST洗板5次,加入TMB过氧底物,于450nm波长处读数(图1)。噬菌体Elisa结果显示:4号克隆的OD_{450nm}-PCSK9/OD_{450nm}-BSA的比值最大,表明该克隆对PCSK9蛋白具有很高的亲和力,将该克隆命名为PA4。

[0042] 4、将PA4进行DNA测序,得到PA4重链可变区和轻链可变区序列,其中完整重链可变区序列如SEQ ID NO.1所示,其核苷酸序列编码序列如SEQ ID NO.9所示,其CDR1、CDR2和CDR3的序列分别如SEQ ID NO.3-5所示;轻链可变区序列如SEQ ID NO.2所示,其核苷酸序列编码序列如SEQ ID NO.10所示,其CDR1、CDR2和CDR3的序列分别如SEQ ID NO.6-8所示。

[0043] 实施例3、阳性单克隆PA4抗体Fab片段的表达及纯化

[0044] 1、挑选PA4感染的TG1菌株培养,使用质粒小提试剂盒抽提,收集PA4噬菌粒载体。根据Schoonbroodt S等人的报道(Nucleic Acids Research,Schoonbroodt S,2005,33,e81)将噬菌粒载体使用MluI限制性内切酶,酶切去除Gene III。

[0045] 2、将获得的GeneIII切除的质粒转化大肠杆菌TG1,2YTA培养基中,37℃培养至对数期,加入1mM IPTG,30℃过夜诱导表达。

[0046] 3、离心收集上清,使用Protein A进行纯化,得到PA4Fab蛋白。

[0047] 实施例4、PA4Fab蛋白质特异性结合PCSK9

[0048] 1、采用常规方法将PCSK9包被到96孔板中(200ng/孔)。

[0049] 2、将不同浓度的PA4Fab蛋白(100nM至0.1nM倍比稀释)添加到包被了PCSK9的96孔平板中,同时将不同浓度的PA4Fab蛋白添加到包被了相同浓度BSA(200ng/孔)的平板中作为阴性对照。

[0050] 3、室温温育1h后,平板用PBST洗4次。再加入羊抗人kappa-HRP偶联物。

[0051] 4、室温孵育1h后,平板用PBST洗4次。加入TMB过氧底物,用酶标仪与450nm读数,结果显示单克隆PA4Fab蛋白可特异性结合PCSK9(图2)。

[0052] 实施例5、全长抗体IgG1形式的阳性克隆的表达及纯化

[0053] 1、重链表达质粒的构建:通过PCR,对PA4抗体的Fab片段中CH1-VH部分进行扩增(5'-gaggtgcagctggtggagtctggggggggctggtg-3'(SEQ ID NO.11)and 5'-acatgacttgggttccactttctgtcgactttggt-3'(SEQ ID NO.12)),将CH1-VH部分与实验室保存的Fc片段(SEQ ID NO.13)使用T4连接酶连接。然后将Kozak序列(AAG CTT GCCACC)、信号肽和限制性内切酶位点添加到重链可变区VH的N端(5'-aattggccggcaagccgccaccatgggatggtctctgat tctgc-3'(SEQ ID NO.14)and 5'-aattgctagctcatccaggggacagggacagtgacttctgagtg-3'(SEQ ID NO.15))。使用限制性内切酶NcoMIV和NheI消化扩增后的重链片段和millipore公司的表达载体UCOE-Mu-P,酶切结束后,将片段与载体相连接。

[0054] 2、轻链表达质粒的构建:通过PCR,对PA4抗体的Fab片段中完整的轻链部分进行扩增(5'-gatattgtgatgactcagctctcccattccctggct-3'(SEQ ID NO.16) and 5'-tcaacattcg cctctattgaaggattttgtgactgg-3'(SEQ ID NO.17))。将Kozak序列(AAG CTT GCC ACC)、信号肽和限制性内切酶位点添加到轻链可变区VL的N端(5'-aattgccggccagccgccaccatg cgtgtccccgctcagct-3'(SEQ ID NO.18) and 5'-aattgctagctcaacattcgcctctattgaaggat tttgtgac-3'(SEQ ID NO.19))。使用限制性内切酶NcoMIV和NheI消化扩增后的轻链片段和表达载体UCOE-Mu-P,酶切结束后,将片段与载体相连接。

[0055] 3、诱导表达:将构建好的哺乳动物表达质粒电击转染CHO-S细胞,转染后的细胞添加10ug/ml puromycin作为筛选压力,于37°C,8%CO₂条件下,无血清培养基中培养,待细胞活力回复到90%以后,将回复后的细胞按0.5细胞/孔的密度,铺在10块96孔板中,37°C,8%CO₂条件下,静置培养两周后,对细胞单克隆进行Elisa鉴定,得到阳性克隆。将得到的阳性克隆扩大培养,并进行进一步筛选,获得表达细胞株。将高表达细胞株转入125ml摇瓶中,于37°C,8%CO₂,135rpm条件下培养表达。

[0056] 3、纯化:收集表达后的细胞培养上清,用protein A柱纯化得到全长抗体IgG1形式的蛋白(图3)。

[0057] 实施例6、PA4 IgG1全长抗体阻断PCSK9/LDLR相互作用

[0058] 1、采用常规方法将LDLR包被到96孔板中(200ng/孔)。

[0059] 2、将不同浓度的PA4 IgG1全长抗体(20nM至0.04nM倍比稀释)与Biotin-PCSK9(4ug/ml)混合,室温温育30min后加到包被LDLR的96孔平板中,以标准的人IgG作为阴性对照。

[0060] 3、室温温育2h后,平板PBST洗4次。再加入Avidin-HRP偶联物。

[0061] 4、室温孵育1h后,PBST洗4次。加入TMB过氧底物,用酶标仪于450nm读数,结果显示单克隆PA4的全长蛋白质具有很强的阻断作用(图4)。

[0062] 实施例7、PA4 IgG1全长抗体抑制HepG2细胞表面PCSK9对LDLR的降解

[0063] 1、将HepG2细胞接种于6孔细胞培养板中,每孔有 5×10^6 细胞,选用DMEM培养基,加入10%FBS,在37°C5%CO₂培养箱中过夜孵育后,使用含10%LDS(无脂蛋白血清)的DMEM培养基替换原培养基。将培养的HepG2细胞分为3组:第一组为空白组,无任何添加;第二组添加30ug/ml PCSK9;第三组添加30ug/ml PCSK9和20ug/ml PA4 IgG1抗体。37°C培养48h后,将HepG2细胞裂解,取裂解液进行Western Blot,使用羊抗人LDLR抗体,检测HepG2细胞表面LDLR的变化。实验结果表明:PCSK9可以促进HepG2细胞表面LDLR的降解,而PA4 IgG1抗体能够显著抑制PCSK9对HepG2细胞表面LDLR的降解(图5)。

[0064] 2、将HepG2细胞接种于6孔细胞培养板中,每孔有 5×10^6 细胞,选用DMEM培养基,加入10%FBS,在37°C5%CO₂培养箱中过夜孵育后,使用含10%LDS(无脂蛋白血清)的DMEM培养基替换原培养基。将培养的HepG2细胞分为5组,分别加入20、40、60、80、100ug/ml PA4 IgG1抗体。37°C培养48h后,将HepG2细胞裂解,取裂解液进行Western Blot,使用羊抗人LDLR抗体,检测HepG2细胞表面LDLR的变化。实验结果表明:PA4 IgG1抗体可显著抑制PCSK9对HepG2细胞表面LDLR的降解,该抑制效应具有剂量依赖性(图6)。

[0065] 实施例8、PA4 IgG1全长抗体降低高脂小鼠的胆固醇水平

[0066] 1、购SPF级C57BL/6小鼠6周龄18只,9只/组,分别使用普通饲料和高脂饲料喂养。喂养45天后,尾静脉采血约100μL,分别检测血浆中总胆固醇TC以及低密度脂蛋白胆固醇

LDLC含量。实验结果表明：对比高脂喂食前的实验数据，高脂饲料喂食后，小鼠的总胆固醇TC以及低密度脂蛋白胆固醇LDLC含量明显升高(图7)，说明高脂小鼠模型构建成功。

[0067] 2、将高血脂症小鼠分为两组，阴性对照(N=3)注射生理盐水，实验组(N=6)注射PA4 IgG1抗体，尾静脉注射，注射剂量为10mg/kg。小鼠给药后每隔3天取血测定总胆固醇TC含量。实验结果如图8所示，与对照组相比，实验组TC含量明显下降，在注射后第6-9天的时候出现最低值。结果初步证实PA4 IgG1全长抗体可以显著降低血浆中胆固醇水平。

SEQUENCE LISTING

<110> 南京师范大学

<120> 针对PCSK9的全人源单克隆抗体的可变区基因及其应用

<130>

<160> 19

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Gly
20 25 30

[0001] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys His Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Asn Gln Gly Asn Trp Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Phe Leu Tyr Arg
20 25 30

Gly Asn Asn Arg Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Gln Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

[0002] Tyr Tyr Arg Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Gly Ala Met Asn
1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Asn
1 5

[0003]

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 5

Asp Ser Asn Gln Gly Asn Trp Asp Leu
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 6

Asp Ser Asn Gln Gly Asn Trp Asp Leu
 1 5

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

<400> 7

Trp Ala Ser Thr Gln Glu Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 8

Gln Gln Tyr Tyr Arg Thr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggggg ctggtgcagc ctggcgggaag tctgaggctg 60

tcatgcgccg cttccgggtt cacctttaac aatggggcaa tgaactgggt ccggcaggca 120

ccaggcaagg gactggactg ggtgtccaca atcagtgggt cagggggtgg gacaaattac 180

[0004]

gcagactctg tgaaggtag gttcatcatt agtcgggatt ccagcaaaca cactctgtat 240
 ctgcagatga actctctgag agccgaagat accgccgtgt actattgcgc caaggactcc 300
 aaccagggga attgggatct gtggggggcgc ggtactctgg tcaccgtgtc tagt 354

<210> 10
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 gatattgtga tgactcagtc tcccgattcc ctggctgtga gcctgggaga gagagcaacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagcttctctg tacaggggga acaatcggaa cttcctggga 120
 tggatcagc agaaaccgg gcagccccct aatctgctga tctactgggc ttctacacag 180
 gagagtggcg tgcctgaccg cttcagcggc tctggaagtg ggactgattt tactctgacc 240
 atttctagtc tgcaggcaga agacgtggcc gtctactatt gccagcagta ctatagaaca 300
 ccttatacct tcggtcaggg cacaaagctg gagatcaaa 339

<210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 11
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggggg ctgggtg 36

<210> 12
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 12
 acatgacttg ggttccactt tcttgtcgac tttggt 36

<210> 13
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 13
 gccagcacia agggtcctc cgtgttccca ctggctcct catccaaatc cacaagcggc 60
 ggaactgcag ccctgggatg tctggtgaag gactatttcc cagagccagt caccgtgtcc 120
 tggaactccg gcgctctgac tagcggagtc cataccttcc cagcagtgtc gcagagctct 180

[0005]

gggctgtact ctctgagttc agtggteact gtccctcca gctctctggg tacacagact 240
 tatactgca acgtgaatca caagccaagt aataccaaag tcgacaagaa agtggaaacc 300
 aagtcattgt ataaaacca tacatgcca cttgtctctg caccagagct gctgggaggt 360
 ccaagcgtgt tcctgtttcc acccaagcct aaagacacce tgatgatttc ccgaaccccc 420
 gaagtcacat gcgtggctgt ggacgtgagc cagcaggatc ctgaagtcaa gtttaactgg 480
 tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgct aagacaaaac ctagagagga acagtacaac 540
 agtacctatc gcgtcgtgtc agtctgaca gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 600
 gagtataagt gcaaagtgtc taataaggct ctgcccgcac ctatcgagaa aacaattagt 660
 aaggctaaaag gacagcctcg agaaccacag gtgtacactc tgctccaag ccgtgacgag 720
 ctgacaaaaga accaggtctc tctgacttgt ctggtgaaag gcttctatcc ttcagatatt 780
 gcagtggagt gggaatccaa tggacagcca gagaacaatt acaagactac cccccctgtg 840
 ctggacagcg atggettttt ctttctgtat tccaagctga ccgtcgataa aagccggtgg 900
 cagcagggaa acgtgttctc ctgtagtgtc atgcacgaag cactgcacaa tcaactaact 960
 cagaagtcaac tgtccctgtc cctggatga 990

<210> 14
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 14
 aattggccgg caagccgcca ccatgggatg gtctctgatt ctgc 44

<210> 15
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 15
 aattgctagc tcattccagg gacagggaca gtgacttctg agtg 44

<210> 16
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 16
 gatattgtga tgactcagtc tcccgatcc ctggt 36

[0006]

<210> 17
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 17
tcaacattcg cctctattga aggattttgt gactgg 36

<210> 18
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 18
aattgccggc cgccagccgc caccatgegt gtccccgctc agct 44

<210> 19
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 19
aattgctagc tcaacattcg cctctattga aggattttgt gac 43

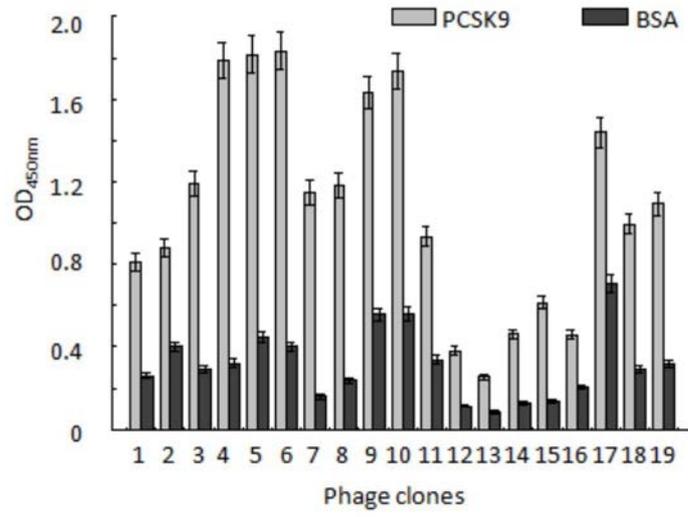


图1

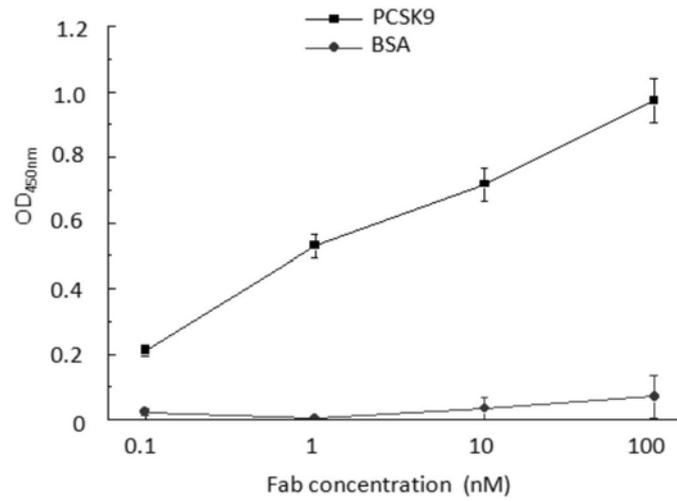


图2

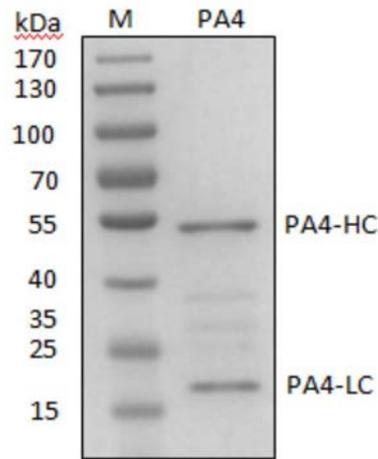


图3

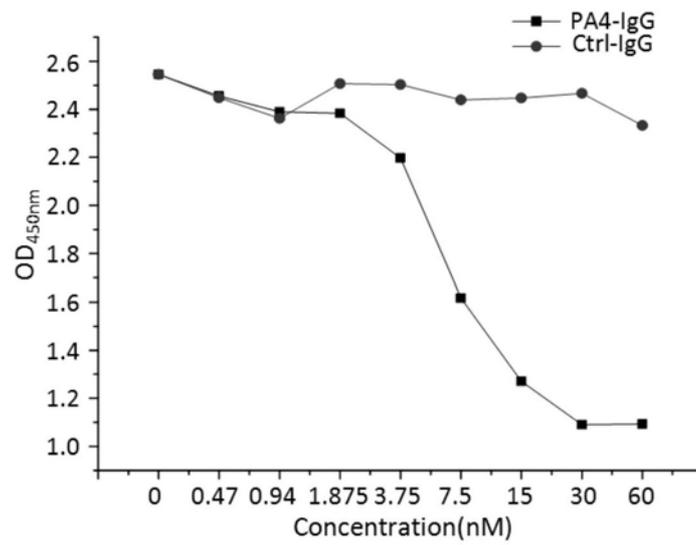


图4

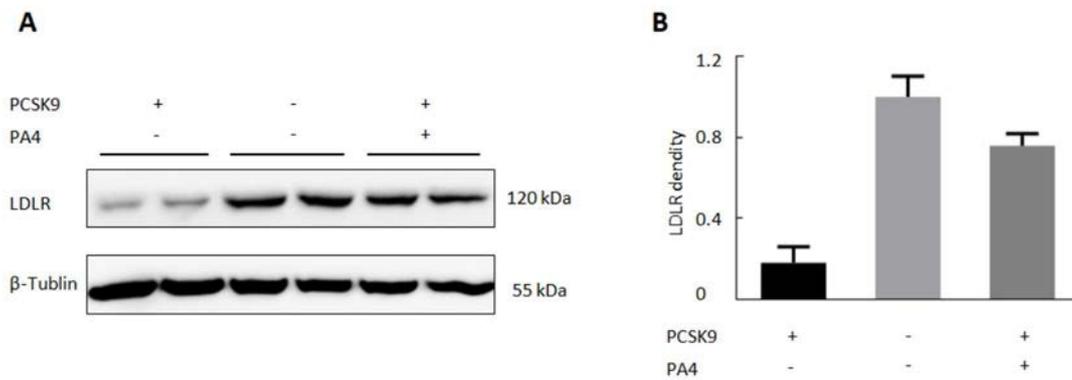


图5

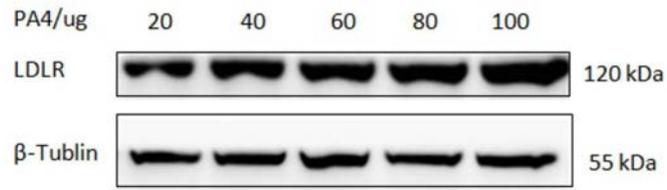


图6

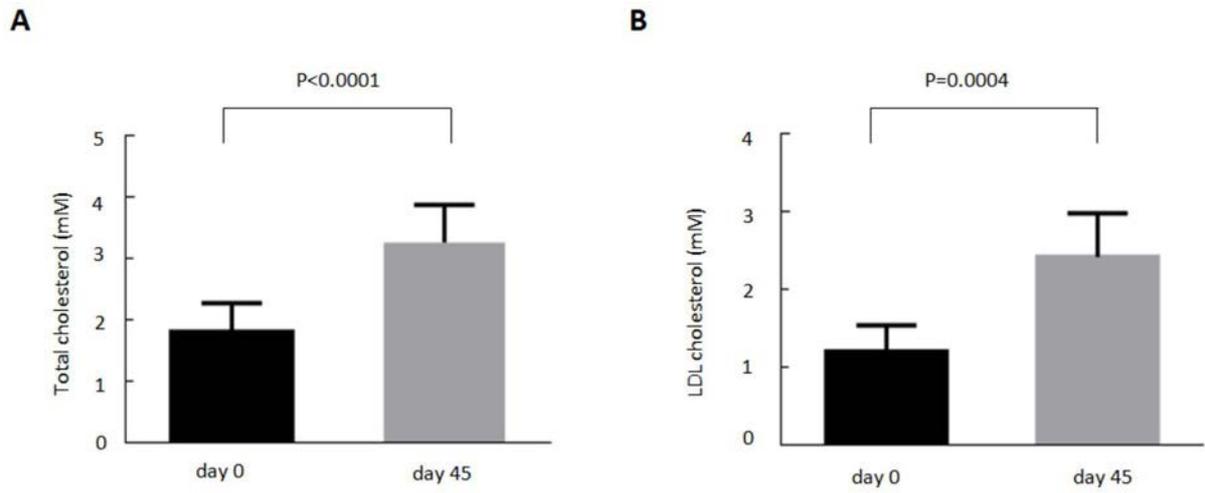


图7

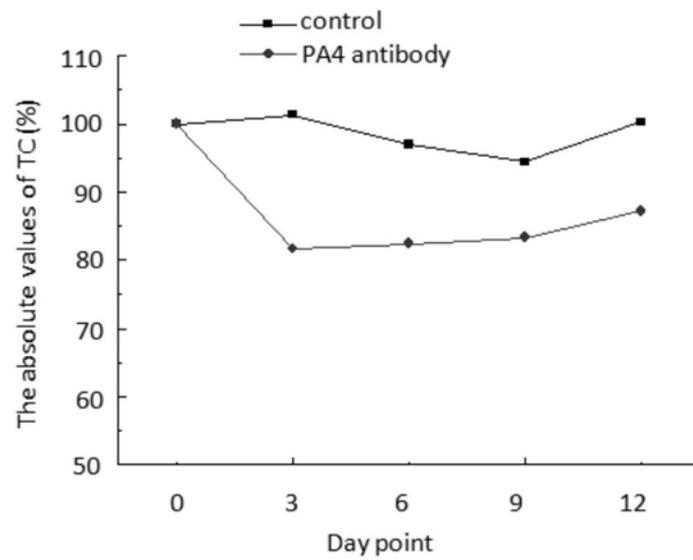


图8