



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110437339 A

(43)申请公布日 2019.11.12

(21)申请号 201810420739.6

(22)申请日 2018.05.04

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 傅阳心 彭华 郭静雅

(74)专利代理机构 北京市诚辉律师事务所
11430

代理人 唐宁

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

A61K 38/20(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

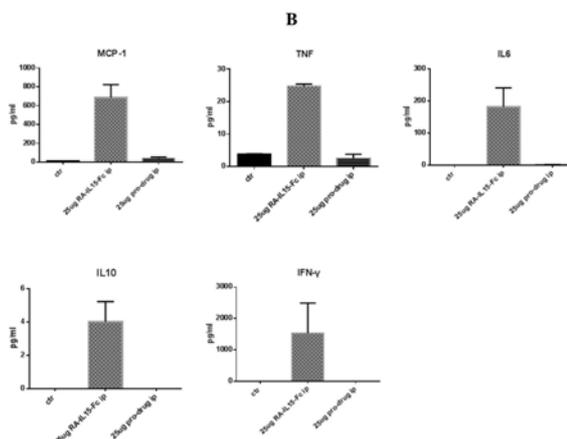
权利要求书2页 说明书9页
序列表9页 附图9页

(54)发明名称

一种以白介素15为活性成分的融合蛋白型药物前体

(57)摘要

本发明涉及一种以白介素15为活性成分的融合蛋白型药物前体,所述的药物前体为融合蛋白,包含如下结构单元:(1)第一结构单元:白介素15(IL15)受体的一个或一个亚基的片段;(2)第二结构单元:具有活性的IL15;(3)位于所述融合蛋白C端的第三结构单元:抗体Fc片段;(4)连接片段1:用于连接所述第一、第二和第三结构单元;(5)位于所述融合蛋白N端的第四结构单元:IL15受体的β亚基的胞外片段;(6)连接片段2:用于连接所述第四结构单元和剩余结构单元。



1. 一组融合蛋白,其特征在于,所述的融合蛋白包括如下结构单元:

- (1) 第一结构单元:白介素15 (IL15) 受体的一个或一个亚基的片段;
- (2) 第二结构单元:具有活性的IL15;
- (3) 位于所述融合蛋白C端的第三结构单元:抗体Fc片段;
- (4) 连接片段1:用于连接所述的第一、第二和第三结构单元;

所述的融合蛋白的N端是第一结构单元时,第二结构单元位于第一结构单元和第三结构单元之间;

所述的融合蛋白的N端是第二结构单元时,第一结构单元位于第二结构单元和第三结构单元之间。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,

(1) 所述的IL15受体的亚基为IL15受体的 α 亚基、 β 亚基或 γ 亚基,优选为 α 亚基;所述的IL15受体的亚基片段优选为 α 亚基sushi结构域,其氨基酸序列如Seq ID No.3所示;

(2) 所述的IL15为人源或鼠源的IL15,优选为氨基酸序列如Seq ID No.1所示的鼠源IL15;

(3) 所述的抗体Fc片段为人Fc,优选为氨基酸序列如Seq ID No.2所示的人源IgG1-Fc;

(4) 所述连接片段1的氨基酸序列为GGGS的整数倍重复,优选的,连接第三结构单元的连接片段1的氨基酸序列如Seq ID No.6所示,位于第一和第二结构单元之间的连接片段1的氨基酸序列如Seq ID No.5所示。

3. 根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其特征在于,所述的融合蛋白还包含:

(5) 位于所述融合蛋白N端的第四结构单元:IL15受体的 β 亚基的胞外片段;

(6) 连接片段2:用于连接所述第四结构单元和剩余结构单元;

连接在所述第四结构单元C端的是第一结构单元时,第二结构单元位于第一结构单元和第三结构单元之间;

连接在所述第四结构单元C端的是第二结构单元时,第一结构单元位于第二结构单元和第三结构单元之间;

所述的连接片段2能够被肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶识别并水解。

4. 根据权利要求3所述的融合蛋白,其特征在于,

所述的IL15受体的 β 亚基的胞外片段的氨基酸序列如Seq ID No.4所示;

所述的肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶为基质金属蛋白酶,优选为基质金属蛋白酶9 (MMP9),最优选的,所述的连接片段2的氨基酸序列如Seq ID No.7所示。

5. 一种药物前体,所述的药物前体为同源或异源二聚体,构成所述的二聚体的单体为权利要求1-4任一所述的融合蛋白。

6. 根据权利要求5所述的药物前体,其特征在于,所述的药物前体为如下药物前体1~3:

(1) 药物前体1 (RA-IL15-Fc)

组成的单体为:IL15受体的 α 亚基sushi结构域、连接片段1、人源或鼠源的IL15、连接片段1、人源IgG1Fc连接成的融合蛋白,其氨基酸序列结构如SEQ ID No.8所示;

(2) 药物前体2 (IL15-RA-Fc)

组成的单体为:人源或鼠源的IL15、连接片段1、IL15受体的 α 亚基sushi结构域、连接片

段1、人源IgG1Fc连接成的融合蛋白,其氨基酸序列结构如SEQ ID No.9所示;

(3) 药物前体3 (RB-IL15-RA-Fc)

组成的单体为:IL15受体的 β 亚基的胞外片段、连接片段2、人源或鼠源的IL15、连接片段1、IL15受体的 α 亚基sushi结构域、连接片段1、人源IgG1Fc连接成的融合蛋白,其氨基酸序列结构如SEQ ID No.10所示。

7. 编码权利要求1~4任一所述融合蛋白的核苷酸片段。

8. 权利要求1~4任一所述融合蛋白及权利要求5或6所述的药物前体在制备药物中的应用;优选的,所述的药物为抗肿瘤药物,最优选的,所述药物为抗B细胞性淋巴瘤或抗结肠癌的药物。

9. 权利要求1~4任一所述的融合蛋白的制备方法,所述的制备方法包括如下步骤:

(1) 构建包含所述编码所述融合蛋白或药物前体的编码基因的表达载体,优选的,所述的表达载体是pEE12.4表达载体;

(2) 通过瞬时转染宿主细胞的方法构建包含所述表达载体的宿主细胞,优选的,所述的宿主细胞是293F细胞;

(3) 培养所述宿主细胞并收集细胞上清;

(4) 通过ProteinA/G的亲合层析柱纯化蛋白纯化所述融合蛋白或药物前体。

一种以白介素15为活性成分的融合蛋白型药物前体

技术领域

[0001] 本发明属于医药生物领域,具体而言,涉及一种以白介素15为活性成分的融合蛋白型药物前体。

背景技术

[0002] 白介素15:1994年,Grabstein等研究者在检测猴肾表皮细胞系cv-1/EBVA上清液中发现了一种能维持CTLL-2细胞增殖的可溶性细胞因子,命名为IL15,即白细胞介素15(interleukin-15, IL15)^[1]。IL-15与IL-2相似,属于4个螺旋细胞因子家族。人IL15的基因定位于5号染色体q25-35。IL15是一种分子量14~15ka的糖蛋白,成熟蛋白由112个氨基酸组成,含有3个可能的N连接糖基化位点。IL15的表达受到严格调控。IL15的mRNA在很多组织和细胞中都可以检测到表达,如纤维组织,肌肉细胞,肾脏细胞,淋巴细胞,肥大细胞,肿瘤细胞等,但成熟的IL15蛋白则主要表达于DC细胞,单核细胞,巨噬细胞和基质细胞中,T细胞不表达。GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), interferons, 和TLR可促进IL15的表达。

[0003] 白介素15受体(IL15R):IL15R属于造血因子超家族,由 α 、 β (又称CD122)、 γ (又称CD132, common gamma chain, γc) 3个亚基构成。IL2和IL15共用 β 链受体。IL2, IL4, IL7, IL9, IL15以及IL21共用 γ 链受体。IL2和IL15的受体共用 β 和 γc 链,但IL2和IL15均有其各自特异性 α 受体链。人IL15R α 属于I型跨膜蛋白,IL2R α 和IL15R α 都有一个保守的蛋白结合基序(sushi domain)。IL2R有三种不同的复合体:单独IL2R α 与IL2的亲合较低,且不能传递信号;IL2R $\beta\gamma$ 异源二聚体以中等亲和力结合IL2并可介导信号传递;IL2R $\alpha\beta\gamma$ 异源三聚体以高亲和力结合IL2并介导信号传递。IL15与IL15R α 亲和力比较高($K_d \sim 10^{-11}M$),但不传递信号。IL15与IL15 $\beta\gamma$ 异源二聚体的亲和力比较中等($K_d \sim 10^{-9}M$),可传导信号;IL15与IL15 $\alpha\beta\gamma$ 异源三聚体亲和力与前者相似($K_d \sim 10^{-9}M$),可传导信号。由于IL2和IL15的受体共用 β 和 γ 链,因此,IL2和IL15之间有许多相似的生物学功能,如都能促进T细胞,NK细胞增殖^[3]。

[0004] IL15与受体的结合:IL15R α 主要表达于DC和单核细胞。在大多数情况下,IL15/IL15R α 以trans-presented的形式与受体结合。即IL-15和IL-15R α 在相同细胞中表达后,在胞内IL-15与IL-15R α 的sushi结构域以高亲和力结合后转运至膜表面,然后与其反应性细胞(如T细胞或NK细胞)膜表面的 $\beta\gamma$ 异源二聚体复合物或 $\alpha\beta\gamma$ 异源三聚体复合物结合, β 和 γ 受体可分别活化下游Jak1和Jak3,导致STAT-3和STAT-5活化,激活级联反应,诱导特异性基因表达。IL15以自分泌的形式作用于效应细胞时,可以cis形式与IL15受体作用,活化下游信号产生效应功能。

[0005] IL-15的免疫功能:IL15是一个多效性的细胞因子,可维持和活化天然免疫和适应性免疫反应。包括:

[0006] (1) 促进CD8+T细胞活化,增殖,活化以及存活;

[0007] (2) 对记忆性T细胞的活化和维持及其重要;

[0008] (3) 对NK细胞和NKT发育至关重要,此外和促进NK和NKT细胞活化和增殖;

[0009] (4) 促进抗肿瘤抗体的产生；

[0010] (5) 通过自分泌的形式促进DC活化,增殖和分化,促进MHCII和CD80/CD86的表达,促进DC诱导CD8+T反应的能力。

[0011] (6) 活化巨噬细胞和单核细胞；

[0012] (7) 还可抑制IL-2诱导的活化诱导的细胞死亡(AICD),保护T细胞免遭Treg的抑制,打破对肿瘤相关抗原的免疫耐受。

[0013] IL-15在肿瘤治疗中的应用:虽然IL-2已被FDA批准用于治疗特异肿瘤,但该细胞因子治疗策略仍然存在一些不足,譬如IL-2在活化效应T细胞的同时也大量扩增Treg细胞,此外IL-2会诱导AICD,这些都限制了IL-2的治疗效果。研究发现IL-15与IL-2有许多相似的生物学功能,并且IL-15几乎不诱导Treg,也会抑制AICD。研究者认为IL-15在肿瘤治疗中具有更好的应用前景。基于IL-15是以trans-presented形式与其受体结合,有研究者将IL-15蛋白与IL-15R α -Fc蛋白体外按照比例将它们混合,发现该复合物与IL-15相比具有更长的半衰期,且扩增T细胞和NK细胞的能力显著提高^[3]。研究者将IL-15与IL-15R α 的sushi结构域融合成融合蛋白,即为IL15-IL15R α sushi-Fc(又称superIL-15),该融合蛋白也可显著提高IL15的半衰期,且扩增T细胞和NK细胞的能力提高了100多倍。在小鼠黑色素瘤(B16F10模型)和化学诱导的肝癌模型中,该融合蛋白可显著抑制肿瘤生长和降低肿瘤的迁移^[4]。此外,IL15可与化疗,或免疫激活性抗体(如anti-CD40mAb),或肿瘤疫苗,或TLR激动剂,或过继T细胞转移,或免疫检查点的阻断抗体如anti-CTLA4,anti-PD1/PDL1联合,具有明显的协同作用,控制肿瘤生长或清除肿瘤^[5]。

[0014] IL15的副作用包括:

[0015] (1) 触发细胞因子级联反应,包括TNF α , IL1, IL6, GM-CSF以及促炎性细胞因子的产生;

[0016] (2) 对有些肿瘤进展是起促进作用,帮助肿瘤的增殖,存活和扩散;

[0017] (3) 可能会活化自身反应性T细胞并参与自身免疫性疾病过程;

[0018] (4) 可能引起冠状心脏疾病;

[0019] (5) 诱导表达免疫抑制性分子PD1/PDL1的表达。

发明内容

[0020] 本发明首先涉及一组融合蛋白,所述的融合蛋白包括如下结构单元:

[0021] (1) 第一结构单元:白介素15(IL15)受体的一个或一个亚基的片段;

[0022] (2) 第二结构单元:具有活性的IL15;

[0023] (3) 位于所述融合蛋白C端的第三结构单元:抗体Fc片段;

[0024] (4) 连接片段1:用于连接所述的第一、第二和第三结构单元。

[0025] 所述的融合蛋白的N端是第一结构单元时,第二结构单元位于第一结构单元和第三结构单元之间;

[0026] 所述的融合蛋白的N端是第二结构单元时,第一结构单元位于第二结构单元和第三结构单元之间。

[0027] 所述的抗体Fc片段为人Fc,优选为人IgG-Fc;最优选为氨基酸序列如Seq ID No.2所示的人IgG1-Fc;

- [0028] 所述的IL15为人源或鼠源的IL15,优选的,其氨基酸序列如Seq ID No.1所示;
- [0029] 所述的IL15受体的亚基为IL15受体的 α 亚基、 β 亚基或 γ 亚基,优选为 α 亚基;
- [0030] 所述的IL15受体的亚基片段优选为 α 亚基sushi结构域,其氨基酸序列如Seq ID No.3所示;
- [0031] 优选的,所述连接片段1的氨基酸序列为GGGS的整数倍重复;最优选的,连接第三结构单位的连接片段1的氨基酸序列如Seq ID No.6所示,位于第一和第二结构单位之间的连接片段1的氨基酸序列如Seq ID No.5所示。
- [0032] 本发明还涉及一组融合蛋白,所述的融合蛋白包括如下结构单元:
- [0033] (1) 第一结构单元:白介素15(IL15)受体的一个或一个亚基的片段;
- [0034] (2) 第二结构单元:具有活性的IL15;
- [0035] (3) 位于所述融合蛋白C端的第三结构单元:抗体Fc片段;
- [0036] (4) 连接片段1:用于连接所述的第一、第二和第三结构单元;
- [0037] (5) 位于所述融合蛋白N端的第四结构单元:IL15受体的 β 亚基的胞外片段;
- [0038] (6) 连接片段2:用于连接所述第四结构单元和剩余结构单元。
- [0039] 连接在所述第四结构单元C端的是第一结构单元时,第二结构单元位于第一结构单元和第三结构单元之间;
- [0040] 连接在所述第四结构单元C端的是第二结构单元时,第一结构单元位于第二结构单元和第三结构单元之间;
- [0041] 所述的连接片段2能够被肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶识别并水解。
- [0042] 所述的抗体Fc片段为人源IgG1Fc,其氨基酸序列如Seq ID No.2所示;
- [0043] 所述的IL15为人源或鼠源的IL15,优选的,其氨基酸序列如Seq ID No.1所示;
- [0044] 所述的IL15受体的亚基为IL15受体的 α 亚基、 β 亚基或 γ 亚基,优选为 α 亚基;
- [0045] 所述的IL15受体的亚基片段优选为IL15受体的 α 亚基sushi结构域,其氨基酸序列如Seq ID No.3所示;
- [0046] 优选的,所述的IL15受体的 β 亚基的胞外片段的氨基酸序列如Seq ID No.4所示;
- [0047] 优选的,所述连接片段1的氨基酸序列如Seq ID No.5所示;
- [0048] 优选的,所述的肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶为基质金属蛋白酶,优选为基质金属蛋白酶9(MMP9),最优选的,所述的连接片段2的氨基酸序列如Seq ID No.7所示。
- [0049] 本发明还涉及一种药物前体,所述的药物前体为同源或异源二聚体,构成所述的二聚体的单体为前述的融合蛋白。
- [0050] 优选的,所述的药物前体为如下药物前体1~3:
- [0051] (1) 药物前体1(RA-IL15-Fc)为同源二聚体
- [0052] 组成的单体为:IL15受体的 α 亚基sushi结构域、连接片段1、人源或鼠源的IL15、连接片段1、人源IgG1Fc连接成的融合蛋白,其氨基酸序列结构如SEQ ID No.8所示;
- [0053] (2) 药物前体2(IL15-RA-Fc)为同源二聚体
- [0054] 组成的单体为:人源或鼠源的IL15、连接片段1、IL15受体的 α 亚基sushi结构域、连接片段1、人源IgG1Fc连接成的融合蛋白,其氨基酸序列结构如SEQ ID No.9所示;
- [0055] (3) 药物前体3(RB-IL15-RA-Fc)为同源二聚体

[0056] 组成的单体为:IL15受体的 β 亚基的胞外片段、连接片段2、人源或鼠源的IL15、连接片段1、IL15受体的 α 亚基sushi结构域、连接片段1、人源IgG1Fc连接成的融合蛋白,其氨基酸序列结构如SEQ ID No.10所示。

[0057] 本发明还涉及编码所述融合蛋白的核苷酸片段。

[0058] 本发明还涉及所述融合蛋白、融合蛋白二聚体、药物前体在制备药物中的应用;

[0059] 优选的,所述的药物为抗肿瘤药物,最优选的,所述药物为抗B细胞性淋巴瘤或抗结直肠癌的药物。

[0060] 本发明还涉及所述的融合蛋白或药物前体的制备方法,所述的制备方法包括如下步骤:

[0061] (1) 构建包含所述编码所述融合蛋白或药物前体的编码基因的表达载体,优选的,所述的表达载体是pEE12.4表达载体;

[0062] (2) 通过瞬时转染宿主细胞的方法构建包含所述表达载体的宿主细胞,优选的,所述的宿主细胞是293F细胞;

[0063] (3) 培养所述宿主细胞并收集细胞上清;

[0064] (4) 通过ProteinA/G的亲亲和层析柱纯化蛋白纯化所述融合蛋白或药物前体。

[0065] 本发明的有益效果包括:

[0066] 1、设计了两种形式的super IL15,它们体外生物学功能是相似的,并且与普通IL15-Fc相比,它们扩增T细胞的能力均增加了100倍。

[0067] 2、在A20肿瘤模型中,super IL15进行瘤内给药可以完全清楚肿瘤。

[0068] 3、Prodrug毒副作用显著降低的,其肿瘤治疗效果与super IL15相似。

附图说明

[0069] 图1、融合蛋白的结构示意图,1A,IL15-Fc融合蛋白结构示意图;1B,两种不同结构的融合了IL15受体 α 亚基的sushi结构域(IL15-RA-Fc)的两种super IL15的结构示意图(RA-IL15-Fc和IL15-RA-Fc);1C,融合了IL15受体 β 亚基的胞外端(IL15RB ECD)的融合蛋白(RB-IL15-RA-Fc)结构示意图。

[0070] 图2、三种融合蛋白的SDS-PAGE电泳图。

[0071] 图3、IL15-Fc和super IL15促淋巴细胞增殖实验结果图。

[0072] 图4、RB-IL15-RA-Fc、super IL15促淋巴细胞增殖实验结果图。

[0073] 图5、Super IL15治疗小鼠A20肿瘤模型结果图,5A,瘤内给药小鼠的肿瘤体积对比图;5B,瘤内和眼静脉给药的小鼠存活时间对比图;5C,瘤内给药治愈后再次接种肿瘤细胞后肿瘤体积对比图。

[0074] 图6、Super IL15治疗小鼠MC38肿瘤模型结果图,6A,瘤内和眼静脉给药小鼠的肿瘤体积对比图;6B,瘤内和眼静脉给药的小鼠存活时间对比图。

[0075] 图7、降低给药剂量后super IL15治疗小鼠A20肿瘤模型结果图。

[0076] 图8、RB-IL15-RA-Fc与super IL15在小鼠A20肿瘤模型中的治疗效果对比图,8A,眼静脉给药后小鼠的肿瘤体积对比图;8B,给药后细胞因子的定量数据图。

[0077] 图9、RB-IL15-RA-Fc与super IL15在小鼠A20肿瘤模型中的治疗效果对比图,9A,腹腔注射给药后的小鼠存活时间数据;9B,给药后细胞因子的定量数据图。

具体实施方式

[0078] 实施例1、融合蛋白的设计构建

[0079] 1、设计构建以下四种融合蛋白：

[0080] (1) IL15-Fc的对照蛋白：

[0081] 将小鼠IL15与hIgG Fc构建成融合蛋白(以下命名为IL15-Fc)结构见图1A；其中，鼠源IL15的氨基酸序列如Seq ID No.1所示，hIgG Fc的氨基酸序列如Seq ID No.2所示；

[0082] (2) 两种不同连接次序的super IL15融合蛋白：

[0083] IL15-IL15R α sushi-Fc(以下命名为IL15-RA-Fc)和IL15R α sushi-IL15-Fc(以下命名为RA-IL15-Fc)结构见图1B；其中，IL15R α sushi为IL15受体 α 亚基的sushi结构域，其氨基酸序列如Seq ID No.3所示，IL15R α sushi与IL15之间的连接片段(Linker)的氨基酸序列如Seq ID No.5所示；

[0084] (3) 在super IL15的基础上进一步融合的IL15受体 β 亚基胞外区片段的RB-IL15-RA-Fc(prodrug)：

[0085] IL15R β ECD-MMP9linker-IL15-IL15R α sushi-Fc(以下命名为RB-IL15-RA-Fc)结构见图1C；其中，IL15R β ECD为IL15受体 β 亚基的胞外结构域，其氨基酸序列如Seq ID No.4所示，MMP9linker为可以被基质金属蛋白酶9水解的连接片段，其氨基酸序列如Seq ID No.7所示。

[0086] 2、融合蛋白的构建，转染，表达以及回收纯化

[0087] 以上四种形式的融合蛋白基因构建于真核表达载体中，通过293F细胞进行瞬时表达，收集的细胞上清通过protein A进行纯化。纯化出的蛋白通过ELISA进行定量。SDS-PAGE方法检测其纯度(每个样品2 μ g进行上样)。

[0088] 具体的方法步骤如下：

[0089] 2.1、质粒的构建

[0090] pEE12.4-IgG κ -hIgG1Fc质粒来自本实验室，包含有小鼠IgG κ 的信号肽和人IgG1恒定区序列。本申请涉及的所有基因(IL15, IL15RA和IL15RB胞外端)都是通过公司合成，然后通过酶切连接到pEE12.4表达载体上。用天根的质粒大提试剂盒提取质粒，-80 $^{\circ}$ C保存。

[0091] 2.2、瞬时转染快速无血清表达目的蛋白

[0092] (1) 293F细胞用CD OptiCHOTM培养基，37 $^{\circ}$ C，8%CO₂，135rpm悬浮培养；

[0093] (2) 转染前两天，293F细胞传代至1L锥形培养瓶，细胞接种密度为0.6-0.8 \times 10⁶cells/ml，细胞体积200ml；

[0094] (3) 预计细胞密度2.5-3.5 \times 10⁶cells/ml可进行转染。离心细胞悬液收集细胞。Freestyle 293培养基再洗1次；

[0095] (4) 用200ml Freestyle 293培养基重悬细胞；

[0096] (5) 用5ml Freestyle 293培养基稀释600 μ g质粒，过滤除菌；

[0097] (6) 用5ml Freestyle 293培养基稀释1.8mg PEI并过滤除菌。随后立即将5ml质粒和5ml的PEI混匀，室温静置5分钟；

[0098] (7) 将质粒/PEI混合物加入细胞悬液中，放置在37 $^{\circ}$ C，8%CO₂，85rpm培养箱中培养，同时补加生长因子50ug/L LONGTMR3IGF-1；

[0099] (8) 4小时后补加200ml EX-CELL™ 293培养基和2mM Glutamine,将转速调至135rpm继续培养;

[0100] (9) 24小时后加入细胞增殖抑制剂3.8mM VPA,72小时后加入40ml medium D继续培养,转然后6-8天(细胞存活率低于70%)收集上清液进行下一步纯化。

[0101] 2.3、利用Protein A进行目的蛋白纯化

[0102] (1) 样品准备:将细胞培养悬液,8,000rpm,离心2小时弃沉淀,上清0.45μM过滤去除杂质,加入终浓度为0.05%Na₃;

[0103] (2) 分别用10倍柱体积的双蒸水和PBS冲洗和平衡Protein A层析柱;

[0104] (3) 利用恒流泵进行上样,流速为10倍柱体积/小时,收集流穿液,重复上样2次;

[0105] (4) 用10倍柱体积以上的PBS冲洗柱子,洗去杂蛋白,冲洗至流出液无蛋白检出;

[0106] (5) 使用Elution Buffer (0.1M Glycine,pH 2.7) 进行洗脱,洗脱液分管收集,每1ml收集1管,并采用蛋白指示液 (Bio-Rad protein assay) 观察洗脱峰。将洗脱峰的收集管混合后加入适量的1M Tris,pH 9.0中和(调节pH值至6-8,应于所纯化蛋白等电点相差0.5以上);

[0107] 利用Zeba脱盐离心柱或浓缩离心柱将目的蛋白溶液置换到所需要的缓冲液中。通过SDS-PAGE电泳,NanoDrop2000以及ELISA确定蛋白浓度和纯度,蛋白分装-80℃保存;

[0108] (6) 洗脱结束后,依次使用20倍柱体积的蒸馏水冲洗柱子,再用10倍柱体积的20%乙醇冲洗柱子,最后乙醇溶液要浸没凝胶介质,4℃保存。

[0109] 对纯化后的融合蛋白的SDS-PAGE的电泳结果见图2,其中,S1泳道上样为IL15-Fc;S2泳道上样为RA-IL15-Fc;S3泳道上样为RB-IL15-RA-Fc。

[0110] 实施例2、super IL15融合蛋白的生物学功能研究

[0111] 1、促淋巴细胞生成的功能,

[0112] 促淋巴细胞增殖实验(CCK8试验)步骤如下:

[0113] (1) CTLL2细胞用含100U/ml商业化重组IL2细胞因子的1640完全培养基培养;

[0114] (2) 实验当天细胞用不含IL2细胞因子的1640完全培养基培养清洗2遍,并计数调整细胞浓度为20000/ml;

[0115] (3) 用不含IL2细胞因子的1640完全培养基培养稀释样品IL15-Fc,IL15-RA-Fc,RA-IL15-Fc以及RB-IL15-RA-Fc。起始浓度为10μg/ml,10倍稀释,做8个稀释梯度;

[0116] (4) 96孔细胞培养板中加入100μl细胞悬液和100μl样品,同时做只有细胞的对照孔和只有培养基的空白孔;

[0117] (5) 培养48~72小时后,加入20μl CCK8,继续培养2~4小时后,酶标仪检测450nm和630nm两个波长的OD值。

[0118] 检测结果如图3所示(ctr为不给药对照组),表明:

[0119] (1) 两种形式的super IL15的生物学活性是相似的:也就是说,在融合蛋白中,不管IL15片段在前,还是IL15R α sushi片段在前,都不影响super IL15的功能;

[0120] (2) super IL15与IL15-Fc相比,生物学活性提高了约100倍。

[0121] 2、IL15R β ECD的融合片段能够封闭super IL15的生物学功能

[0122] 通过CCK8试验检测RB-IL15-RA-Fc和super IL15对CTLL2的促增殖能力,结果如图4所示(ctr为不给药对照组),表明:RB-IL15-RA-Fc与super IL15相比,生物学活性降低了

100倍。说明IL-15Rβ的胞外端是可以封闭super IL-15的生物学功能的。

[0123] 3、在不同的小鼠肿瘤模型中检测super IL15的肿瘤治疗效果和毒副作用

[0124] 3.1、A20model

[0125] 方法1 (给药剂量25μg) : 3×10⁶个A20细胞皮下接种到Balb/c小鼠左下侧。待肿瘤长至60~80mm³, 瘤内或眼静脉给药25μg super IL15, 给药2次, 间隔2天, 对照组采用同样方式给予PBS。测量肿瘤的体积 (体积=长×宽×高/2), 记录小鼠的生存曲线。

[0126] 结果如图5所示, 可见,

[0127] (1) 通过瘤内给药的治疗组, 肿瘤全部消掉, 小鼠痊愈 (图5A); 2个月后, 痊愈的小鼠再次接种5倍数量的A20细胞, 同时以WT小鼠作为对照, 痊愈的小鼠最终没有长出新的肿瘤 (图5C)。说明通过super IL15治疗, 使小鼠产生了记忆性保护反应。

[0128] (2) 通过静脉给药的治疗组, 小鼠在治疗两次后死亡 (图5B)。说明super IL15的毒副作用特别大。

[0129] 方法2 (给药剂量12.5μg) : 3×10⁶A20细胞皮下接种到Balb/c小鼠左下侧。待肿瘤长至60~80mm³, 瘤内或眼静脉给药的super IL15, 给药2次, 间隔2天, 对照组采用同样方式给予PBS。测量肿瘤的体积 (体积=长×宽×高/2)

[0130] 结果如图7所示: 可见, 通过瘤内给药的治疗组, 100%小鼠的肿瘤都彻底清除; 通过静脉给药的小鼠, 20%小鼠发生肿瘤清除, 其余小鼠肿瘤有一定的控制。

[0131] 3.2、MC38model

[0132] 方法: 5×10⁵MC38细胞皮下接种到C57小鼠左下侧。待肿瘤长至60mm³, 瘤内或眼静脉给药25μg super IL15, 给药2次, 间隔3天, 对照组采用同样方式给予PBS。测量肿瘤的体积 (体积=长×宽×高/2), 记录小鼠的生存曲线。

[0133] 结果如图6所示, 可见, 通过瘤内给药的治疗组, 有50%小鼠的肿瘤发生的彻底的清除 (图6A), 存活时间显著增加 (图6B); 通过静脉给药组鼠, 没有肿瘤发生清除, 肿瘤稍微有些控制 (图6A), 存活时间略有增加 (图6B)。

[0134] 以上结果表明: super IL15发挥药用效果的部位主要是肿瘤。

[0135] 实施例3、比较super IL15与RB-IL15-RA-Fc的肿瘤治疗效果和毒副作用

[0136] 1、在小鼠肿瘤模型中检测RB-IL15-RA-Fc对肿瘤的治疗效果和毒副作用

[0137] 方法1: 3×10⁶A20细胞皮下接种到Balb/c小鼠左下侧。待肿瘤长至60~80mm³, 瘤内或眼静脉给药25μg super IL15或者RB-IL15-RA-Fc, 给药2次, 间隔2天, 对照组采用同样方式给予PBS。第二次治疗后的20小时采血, 通过CBA检测血清的炎性因子的水平并另行记录抑瘤效果和小鼠的生存曲线。

[0138] CBA实验步骤如下:

[0139] (1) 小鼠眼静脉采血, 收集血清-80℃保存;

[0140] (2) 用BD公司的CBA试剂盒检测血清中细胞因子IL12p70, IL-6, IFN-γ, TNFα, MCP1和IL-10的水平。以下是主要步骤:

[0141] (3) 稀释标准品: 取一瓶固体标准品, 加入200μl稀释缓冲液配成10×标准品母液, 室温放置15min。取100μl 10×标准品加入含有900μl稀释缓冲液的EP管中, 即为原液管 (5000pg/ml), 取300μl原液管, 加入含有300μl稀释缓冲液的EP管中, 即为1:2。随后倍比稀释依次为1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256;

- [0142] (4) 稀释样品:用稀释缓冲液稀释血清,使其有值在标准曲线的范围内;
- [0143] (5) 混合Beads:根据样品数和标准品管数计算出总管数。由于每管需要每种Beads的量是2 μ l,可以计算出每种Beads的总量,并分别取出所需量的IL12p70,IL-6,IFN- γ ,TNF α ,MCP1和IL-10Beads混在一起;
- [0144] (6) 染色:取流式管标记后,每管加入50 μ l样品或标准品,加入10 μ l混合后的Beads以及10 μ l PE标记的检测抗体,混匀室温避光反应2h;
- [0145] (7) 加入1ml清洗缓冲液,300g离心5min,小心弃掉上清;
- [0146] (8) 300 μ l清洗缓冲液重悬样品,充分混匀;
- [0147] (9) 用BD流式细胞仪收集数据;
- [0148] (10) 分析数据,根据标准品计算出样品中细胞因子的水平。
- [0149] 对肿瘤体积的治疗效果如图8A所示,表明通过静脉给药的RB-IL15-RA-Fc的治疗效果与super IL15相当。
- [0150] 对血清炎性因子水平的比较结果如图8B所示,表明,与super IL15相比,RB-IL15-RA-Fc的毒副作用是有所降低。
- [0151] 方法2:3 \times 10⁶A20细胞皮下接种到Balb/c小鼠左下侧。待肿瘤长至60~80mm³,腹腔注射给药25 μ g super IL15或者RB-IL15-RA-Fc,给药2次,间隔2天,对照组采用同样方式给予PBS。第二次治疗后的20小时采血,通过CBA检测血清的炎性因子的水平。记录小鼠的生存曲线。
- [0152] 小鼠生存实验结果显示,super IL15治疗组中,在第二次给药后第一天,小鼠状态明显不健康,体温降低,皮毛不顺。给药后的第二天,所有小鼠发生了死亡。而RB-IL15-RA-Fc治疗组,治疗两次后,小鼠没有出现不健康状态。生存曲线明显长于super IL15治疗组。给药后小鼠的生存曲线如图9A所示,血清炎性因子水平如图9B所示。
- [0153] 上述说明:RB-IL15-RA-Fc确实可以降低super IL15的毒副作用。
- [0154] 最后需要说明的是,以上实施例仅用作帮助本领域技术人员理解本发明的实质,不用做的本发明保护范围的限定。
- [0155] 参考文献:
- [0156] [1]Grabstein KH,Eisenman J,Shanebeck K,et al.Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor.Science1994 (264) 965-8.
- [0157] [2]Marek Jakobisiak Jakub Golab,Witold Lasek.Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy.Cytokine&Growth Factor Reviews.2011 (22) 99-108.
- [0158] [3]Thomas A.Stoklasek,Kimberly S.Schluns,and Leo Lefranc,ois.Combined IL-15/IL-15R Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo.The Journal of Immunology.2006 (177) 6072-6080.
- [0159] [4]Liang Cheng,Xuexiang Du,Zheng Wang,et al.Hyper-IL-15 suppresses metastatic and autochthonous liver cancer by promoting tumour-specific CD8+T cell responses.Journal of hepatology.2014 (61) 1297-1303.
- [0160] [5]Yin Guo,Liming Luan,Naeem K.Patil,Edward R.Sherwood.Immunobiology

of the IL-15/IL-15R α complex as an antitumor and antiviral agent. Cytokine and Growth Factor Reviews. 2017 (38) 10-21.

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 一种以白介素15为活性成分的融合蛋白型药物前体

<130> CP11802105C

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

```

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

```

Thr Ser

<210> 2

<211> 231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1           5           10           15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
           20           25           30
Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
           35           40           45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

```

50	55	60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
65	70	75
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
	85	90
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
	100	105
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
	115	120
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
130	135	140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
145	150	155
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
	165	170
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser		
	180	185
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
195	200	205
Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
210	215	220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
225	230	
<210> 3		
<211> 78		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 3		
Gly Thr Thr Cys Pro Pro Pro Val Ser Ile Glu His Ala Asp Ile Arg		
1	5	10
Val Lys Asn Tyr Ser Val Asn Ser Arg Glu Arg Tyr Val Cys Asn Ser		
	20	25
Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Thr Leu Ile Glu Cys Val Ile		
	35	40
Asn Lys Asn Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys		
50	55	60
Ile Arg Asp Pro Ser Leu Ala His Tyr Ser Pro Val Pro Thr		
65	70	75
<210> 4		

<211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Ala Val Lys Asn Cys Ser His Leu Glu Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala
 1 5 10 15
 Asn Val Ser Cys Met Trp Ser His Glu Glu Ala Leu Asn Val Thr Thr
 20 25 30
 Cys His Val His Ala Lys Ser Asn Leu Arg His Trp Asn Lys Thr Cys
 35 40 45
 Glu Leu Thr Leu Val Arg Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu
 50 55 60
 Gly Ser Phe Pro Glu Ser Gln Ser Leu Thr Ser Val Asp Leu Leu Asp
 65 70 75 80
 Ile Asn Val Val Cys Trp Glu Glu Lys Gly Trp Arg Arg Val Lys Thr
 85 90 95
 Cys Asp Phe His Pro Phe Asp Asn Leu Arg Leu Val Ala Pro His Ser
 100 105 110
 Leu Gln Val Leu His Ile Asp Thr Gln Arg Cys Asn Ile Ser Trp Lys
 115 120 125
 Val Ser Gln Val Ser His Tyr Ile Glu Pro Tyr Leu Glu Phe Glu Ala
 130 135 140
 Arg Arg Arg Leu Leu Gly His Ser Trp Glu Asp Ala Ser Val Leu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Gln Arg Gln Gln Trp Leu Phe Leu Glu Met Leu Ile Pro Ser
 165 170 175
 Thr Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Val Lys Ala Gln Arg Asn Asn Thr
 180 185 190
 Gly Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Thr Phe Arg Thr Arg Pro
 195 200 205
 Ala Asp Pro Met Lys Glu
 210
 <210> 5
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 5
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gln
 20 25
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 6
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 7
 Gly Gly Gly Gly Ser Pro Val Gly Leu Ile Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 8
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 8
 Gly Thr Thr Cys Pro Pro Pro Val Ser Ile Glu His Ala Asp Ile Arg
 1 5 10 15
 Val Lys Asn Tyr Ser Val Asn Ser Arg Glu Arg Tyr Val Cys Asn Ser
 20 25 30
 Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Thr Leu Ile Glu Cys Val Ile
 35 40 45
 Asn Lys Asn Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60
 Ile Arg Asp Pro Ser Leu Ala His Tyr Ser Pro Val Pro Thr Ser Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 85 90 95
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gln Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp
 100 105 110
 Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr
 115 120 125
 Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met
 130 135 140

Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn
 145 150 155 160
 Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser
 165 170 175
 Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys
 180 185 190
 Glu Glu Leu Glu Glu Lys Thr Phe Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile
 195 200 205
 Arg Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450
 <210> 9
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 9
 Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile
 1 5 10 15
 Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His
 20 25 30
 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 35 40 45
 Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg
 50 55 60
 Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val
 65 70 75 80
 Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Thr Phe
 85 90 95
 Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile Arg Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 100 105 110
 Thr Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gln Gly Thr Thr Cys
 130 135 140
 Pro Pro Pro Val Ser Ile Glu His Ala Asp Ile Arg Val Lys Asn Tyr
 145 150 155 160
 Ser Val Asn Ser Arg Glu Arg Tyr Val Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg
 165 170 175
 Lys Ala Gly Thr Ser Thr Leu Ile Glu Cys Val Ile Asn Lys Asn Thr
 180 185 190
 Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp Pro
 195 200 205
 Ser Leu Ala His Tyr Ser Pro Val Pro Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

260	265	270
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
290	295	300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
	325	330
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
	340	350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
	355	360
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
	370	380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
385	390	395
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys		
	405	410
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
	420	430
Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
	435	440
		445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
450		
<210> 10		
<211> 684		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<400> 10		
Ala Val Lys Asn Cys Ser His Leu Glu Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala		
1	5	10
Asn Val Ser Cys Met Trp Ser His Glu Glu Ala Leu Asn Val Thr Thr		
	20	25
Cys His Val His Ala Lys Ser Asn Leu Arg His Trp Asn Lys Thr Cys		
	35	40
		45
Glu Leu Thr Leu Val Arg Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu		
	50	55
		60
Gly Ser Phe Pro Glu Ser Gln Ser Leu Thr Ser Val Asp Leu Leu Asp		

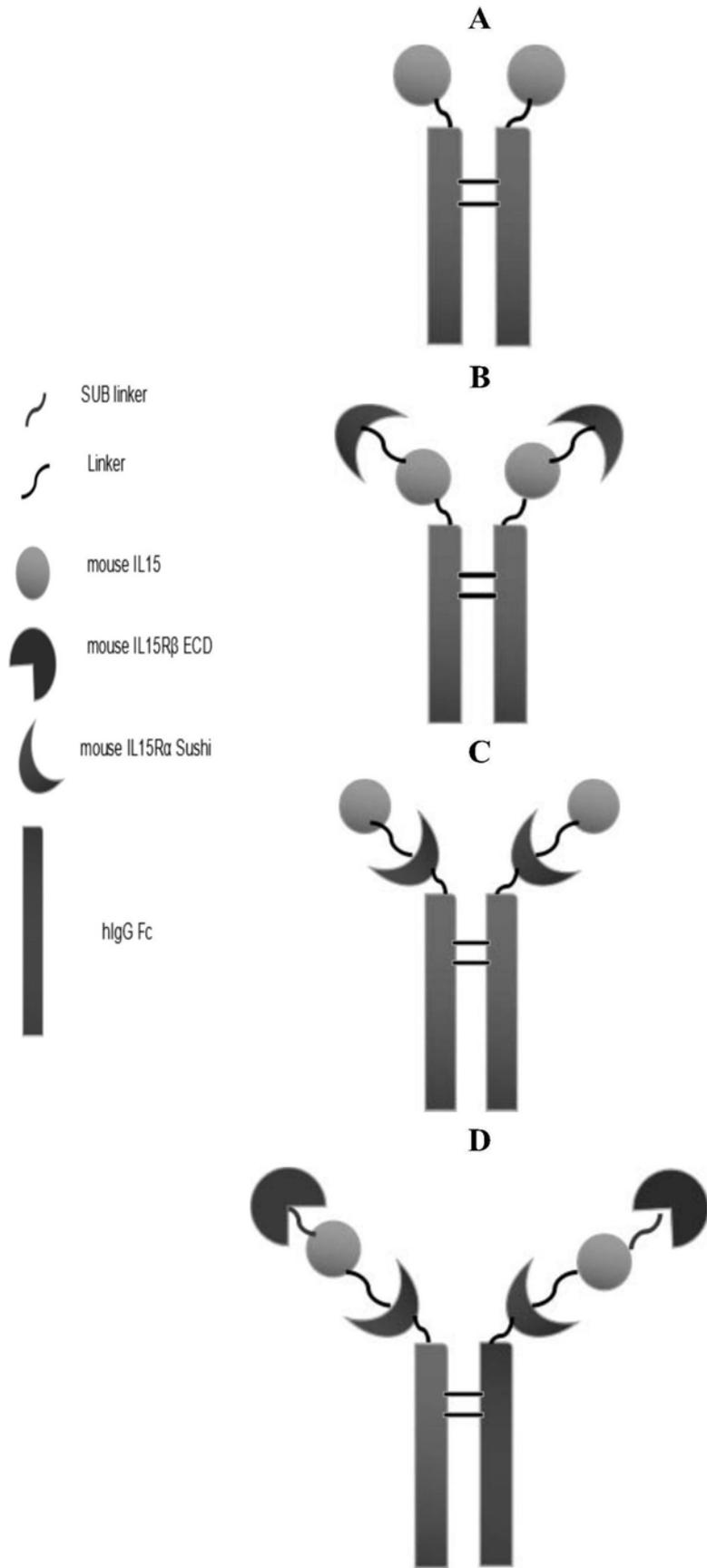


图1

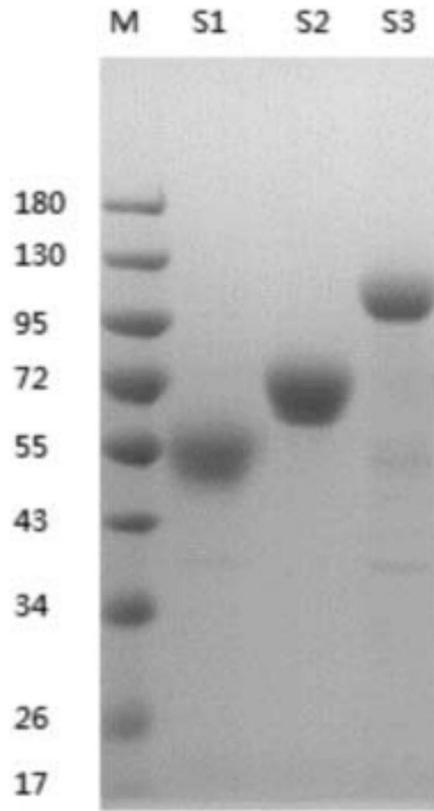


图2

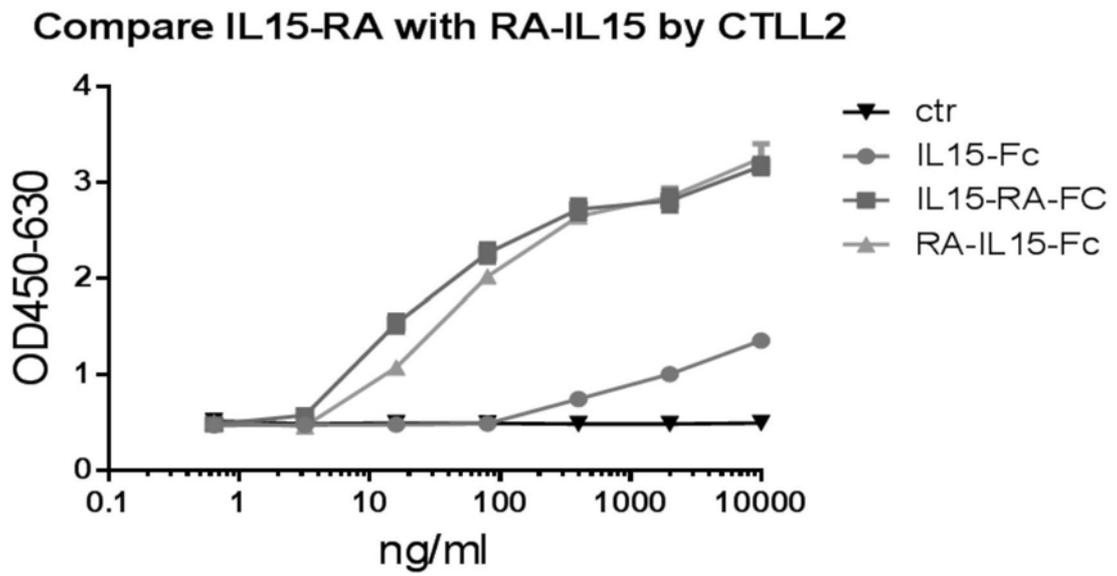


图3

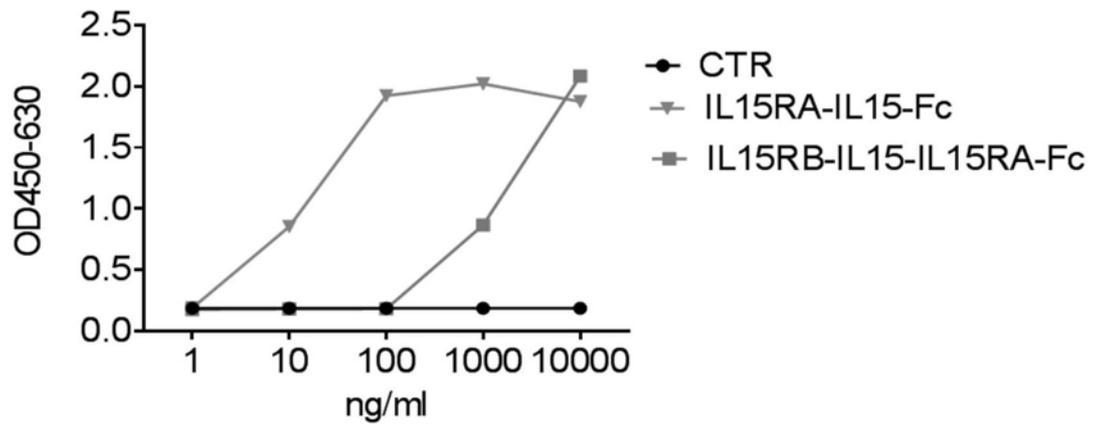
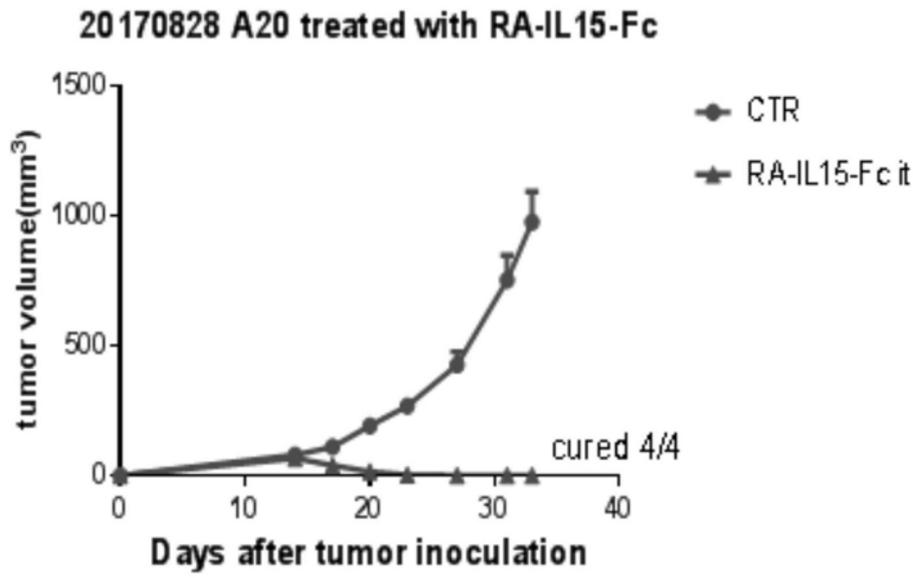
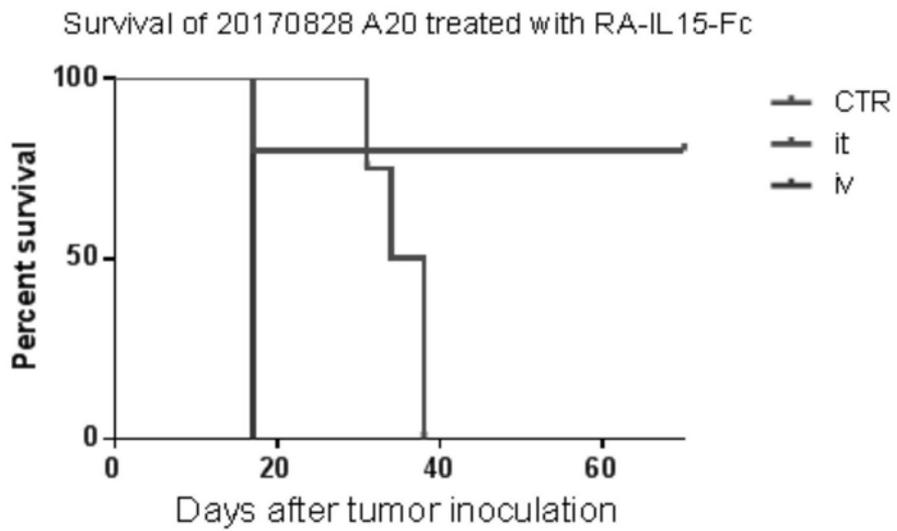


图4

A



B



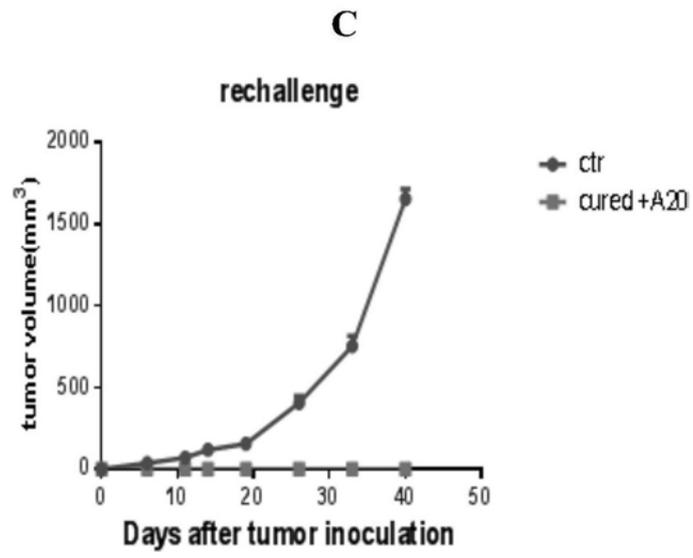


图5

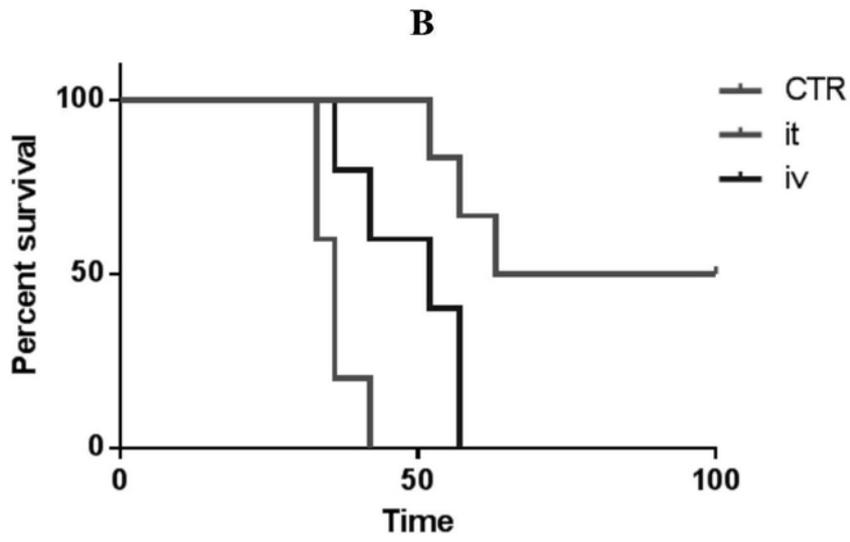
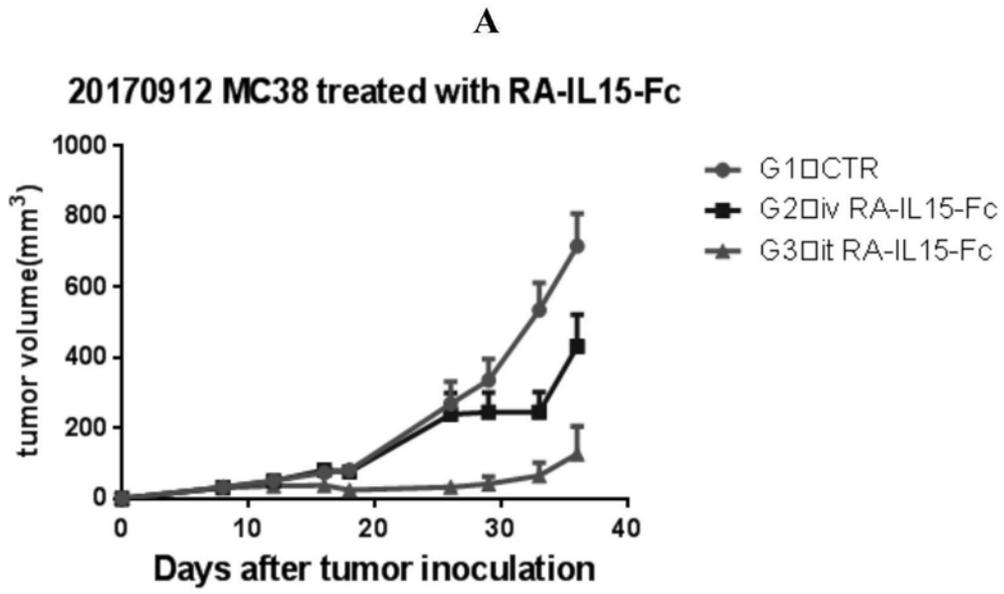


图6

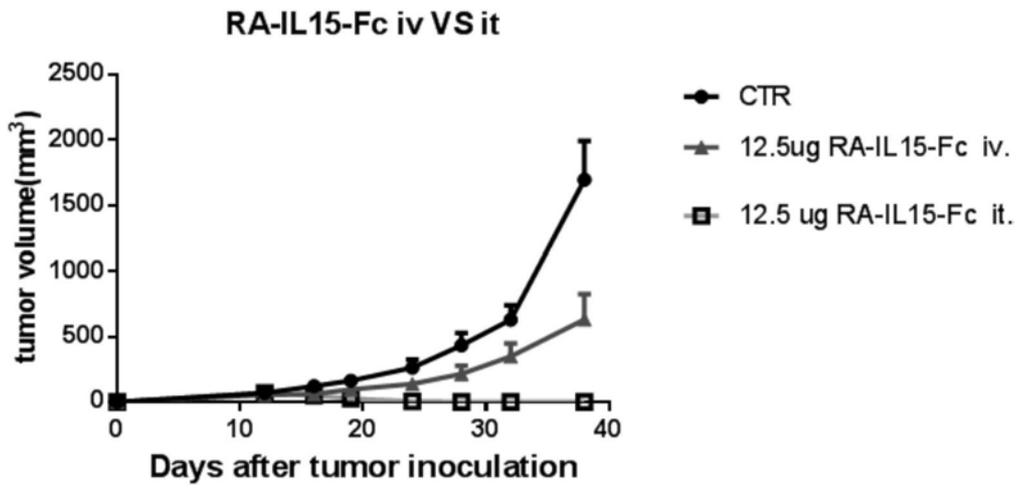
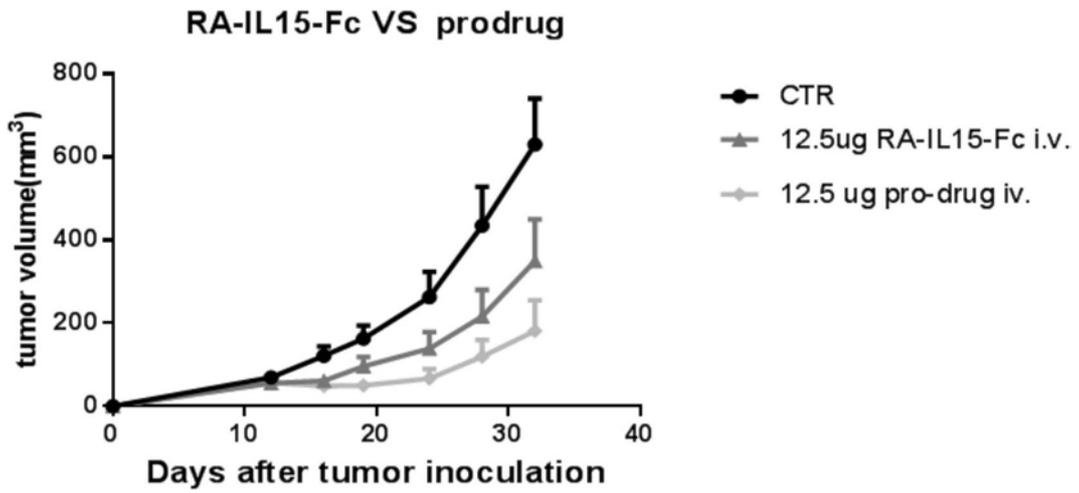


图7

A



B

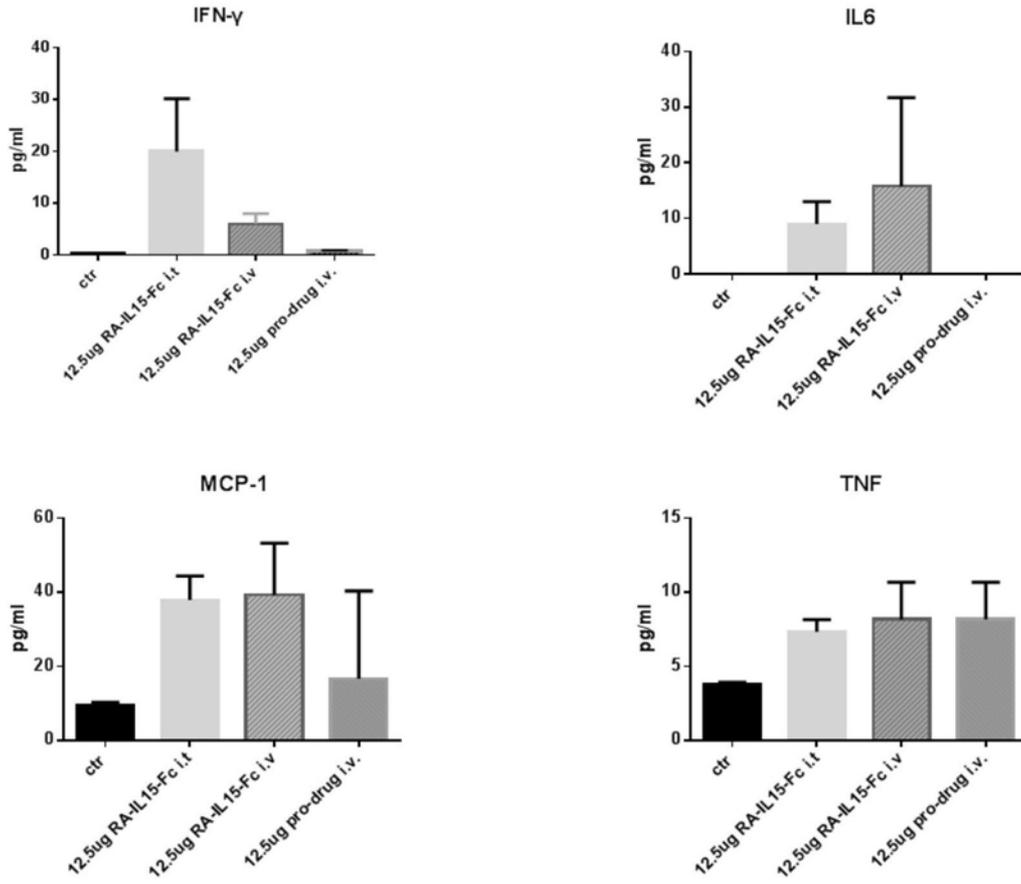
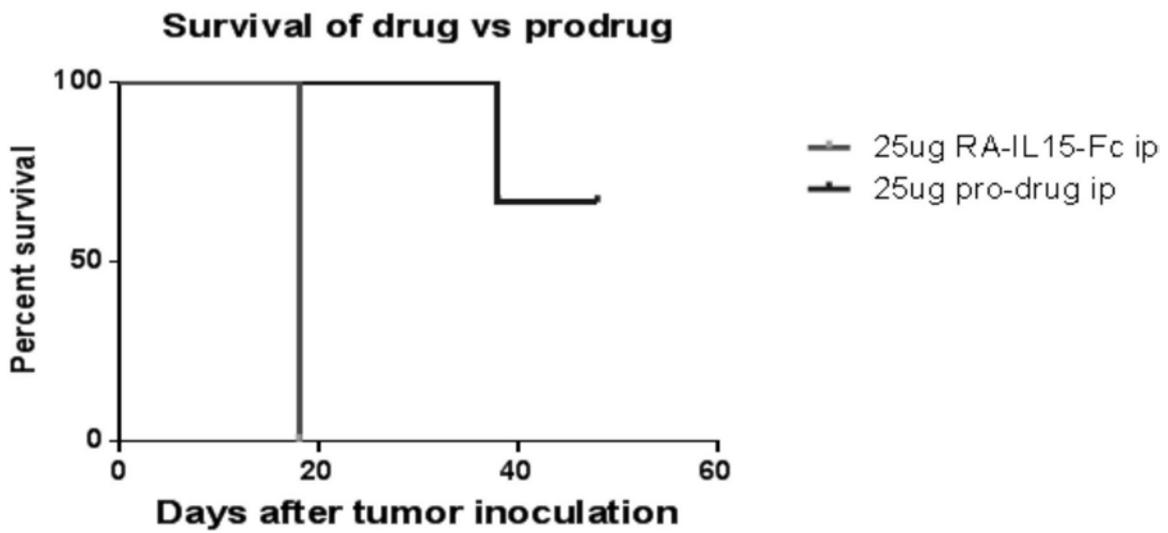


图8

A



B

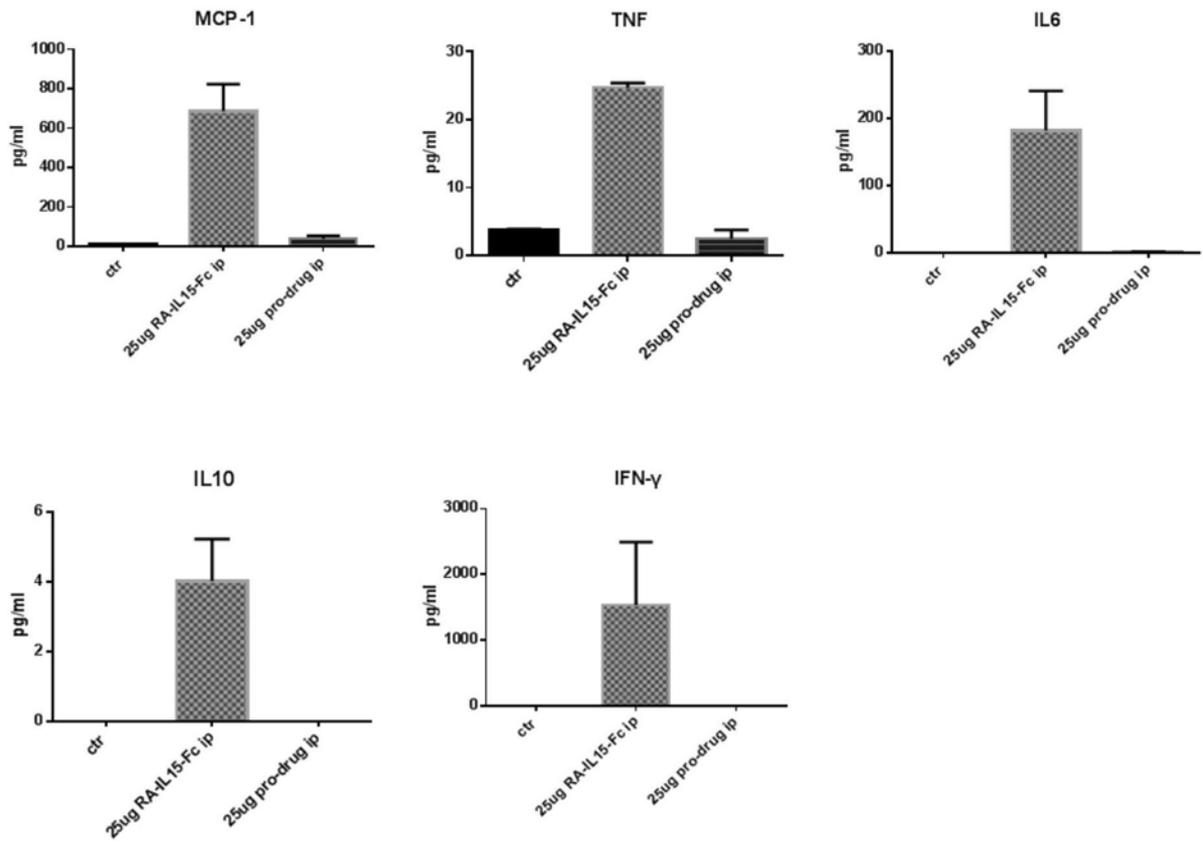


图9