



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113637068 B

(45) 授权公告日 2023.05.16

(21) 申请号 202111080679.6

C07K 1/18 (2006.01)

(22) 申请日 2021.09.15

G12N 15/12 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G12P 21/06 (2006.01)

申请公布号 CN 113637068 A

A61K 38/39 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.11.12

A61P 43/00 (2006.01)

(73) 专利权人 山西锦波生物医药股份有限公司

A61K 8/65 (2006.01)

地址 030032 山西省太原市山西综改示范

A61Q 19/00 (2006.01)

区太原唐槐园区锦波街18号

A61L 27/24 (2006.01)

A23L 33/17 (2016.01)

(72) 发明人 杨霞 武庚风 张永健

审查员 王鹏

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

专利代理师 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

序列表8页 附图2页

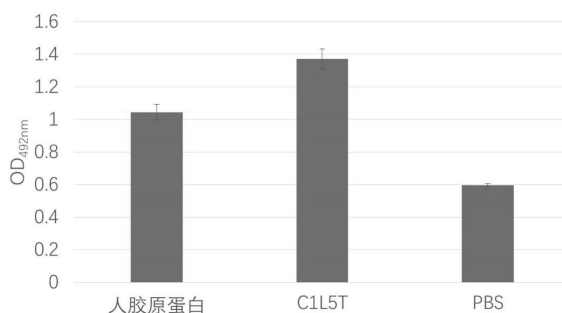
(54) 发明名称

一种重组I型人源化胶原蛋白C1L5T及其制备方法 and 用途

(57) 摘要

本发明公开了一种重组I型人源化胶原蛋白C1L5T及其制备方法和用途。本发明提供的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T包含以SEQ ID No.3所示的序列;所述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T任选地包含以SEQ ID No.2所示的序列;优选地,以SEQ ID No.2所示的序列和以SEQ ID No.3所示的序列的C端直接相连。本发明所制备的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T氨基酸序列来自于天然胶原蛋白氨基酸序列,避免了用于人体出现免疫排斥反应的同时也解决了原始基因序列的胶原蛋白无法在体外正确折叠的问题,此外,该重组I型人源化胶原蛋白C1L5T相比I型胶原蛋白本身具有更加良好的细胞黏附效果。

细胞黏附活性检测C1L5T



1. 一种重组I型人源化胶原蛋白C1L5T,其中,所述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T的氨基酸序列如SEQ ID No.4所示。
2. 多核苷酸,其编码权利要求1所述的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T。
3. 表达载体,其包含权利要求2所述的多核苷酸。
4. 宿主细胞,其包含权利要求3所述的表达载体。
5. 权利要求1所述的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T的生产方法,其包括以下步骤:
 - ①在培养基中培养根据权利要求4所述的宿主细胞并生产蛋白;
 - ②收获并纯化所述蛋白;
 - ③任选地对所述蛋白进行酶切。
6. 根据权利要求5所述的生产方法,其特征在于,在步骤②中,用Ni柱和/或离子交换层析纯化所述蛋白。
7. 根据权利要求5所述的生产方法,其特征在于,在步骤③中,用PPase蛋白酶酶切所述蛋白。
8. 权利要求1所述的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T在制备具有促进细胞黏附作用的产品中的用途。
9. 权利要求1所述的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T在制备产品中的用途,其中所述产品是组织工程产品、化妆品或药物。
10. 包含权利要求1所述的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T的产品,其中所述产品是组织工程产品、化妆品或药物。

一种重组I型人源化胶原蛋白C1L5T及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,涉及一种重组I型人源化胶原蛋白C1L5T及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 胶原蛋白(collagen)是生物高分子,动物结缔组织中的主要成分,也是哺乳动物体内含量最多、分布最广的功能性蛋白,占蛋白质总量的25%~30%,某些生物体甚至高达80%以上。胶原蛋白是人体最丰富的蛋白质之一。

[0003] 胶原蛋白是结缔组织中极其重要的结构蛋白质,对维护细胞、组织及器官的正常生理功能有着重要作用。胶原蛋白被广泛的应用于医学材料及药物方面、美容化妆品、保健品以及各种实用工业中。然而,使用传统方法制备的动物源胶原有一定的病毒隐患如疯牛病、口蹄疫、猪瘟疫等,特别是应用于人体时易引起异体异种的排异反应,从而限制了胶原蛋白在医药方面的应用。

[0004] 胶原蛋白结构相对复杂,在生物体中,胶原蛋白的合成和修饰从原胶原开始,经历了羟基化、糖基化、相互交联等诸多化学变化,受到了多种生物酶的复杂调控。原胶原除了含有胶原链之外,还含有球状的头部和尾部。没有这些头部和尾部,胶原链就不会折叠成为正确的三螺旋,从而缺乏胶原蛋白的生物学活性。因此,按照原始基因序列制备的胶原蛋白不可能在体外自发的组织形成正确的空间结构。这样的困难严重阻碍了人胶原蛋白的研发和生产。

[0005] 因此利用相对低廉的成本生产大量的人源胶原蛋白依然是一种需求,使其能够用于可以起到人体胶原蛋白功能和特性的产品的开发。

发明内容

[0006] 发明要解决的问题

[0007] 针对上述本领域中异源胶原蛋白存在病毒隐患且容易诱发免疫反应导致其应用受限,而人源胶原蛋白生产具有一定难度的问题,本发明提供了重组I型人源化胶原蛋白C1L5T,同时提供了其制备方法和用途。

[0008] 用于解决问题的方案

[0009] 第一方面,本发明提供了一种重组I型人源化胶原蛋白C1L5T,其中,所述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T包含以SEQ ID No.3所示的序列。

[0010] 进一步地,上述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T任选地包含以SEQ ID No.2所示的序列;优选地,以SEQ ID No.2所示的序列和以SEQ ID No.3所示的序列的C端直接相连。

[0011] 进一步地,上述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T包含以下序列中的至少一种:以SEQ ID No.4所示的氨基酸序列;相比以SEQ ID No.4所示的氨基酸序列具有不低于80%的同源性的氨基酸序列,并且其保留以SEQ ID No.4所示的氨基酸序列的细胞黏附效果;以SEQ ID No.4所示的氨基酸序列中添加、取代、缺失或插入1个或多个氨基酸残基的氨基酸序列,并

且其保留以SEQ ID No.4所示的氨基酸序列的细胞黏附效果;由核苷酸序列编码的氨基酸序列,所述核苷酸序列与编码以SEQ ID No.4所示的氨基酸序列的多核苷酸序列在严格条件下杂交,并且所述氨基酸序列保留以SEQ ID No.4所示的氨基酸序列的细胞黏附效果,所述严格条件是中等至非常高等严格条件。

[0012] 第二方面,本发明提供了多核苷酸,其编码上述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T。

[0013] 第三方面,本发明提供了表达载体,其包含上述本发明在第二方面提供的多核苷酸。

[0014] 第四方面,本发明提供了宿主细胞,其包含上述本发明在第三方面提供的表达载体。

[0015] 第五方面,本发明提供了上述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T的生产方法,其包括以下步骤:①在培养基中培养上述本发明在第四方面提供的宿主细胞并生产蛋白;②收获并纯化所述蛋白,优选用Ni柱和/或离子交换层析纯化所述蛋白;③任选地对所述蛋白进行酶切,优选用PPase蛋白酶酶切所述蛋白。

[0016] 第六方面,本发明提供了上述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T在制备具有促进细胞黏附作用的产品中的用途。

[0017] 第七方面,本发明提供了上述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T在制备产品中的用途,其中所述产品优选是组织工程产品、化妆品、保健品或药物。

[0018] 第八方面,本发明提供了包含上述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T的产品,其中所述产品优选是组织工程产品、化妆品、保健品或药物。

[0019] 发明的效果

[0020] 通过上述技术方案的实施,本发明所制备的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T氨基酸序列来自于天然胶原蛋白氨基酸序列,避免了用于人体出现免疫排斥反应的同时也解决了原始基因序列的胶原蛋白无法在体外正确折叠的问题,此外,该重组I型人源化胶原蛋白C1L5T相比I型胶原蛋白本身具有更加良好的细胞黏附效果。

附图说明

[0021] 图1为重组表达质粒pET32a-C1L5T的图谱,其中C1L5T对应的氨基酸序列为SEQ ID No.4。

[0022] 图2为蛋白C1L5T诱导表达及纯化后的凝胶电泳图,第1泳道为分子量Marker,第2泳道为PPase酶切后的蛋白C1L5T,第3泳道为用Ni柱提纯后的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T,第4泳道为用Capto Q柱纯化后的蛋白C1L5T。

[0023] 图3为商品化的人胶原蛋白和蛋白C1L5T的细胞黏附活性检测结果。

具体实施方式

[0024] 以下对本发明的实施方式进行说明,但本发明不限于此。

[0025] 本发明中,使用“可以”表示的含义包括了进行某种处理以及不进行某种处理两方面的含义。

[0026] 在本发明中,“任选的”或“任选地”是指接下来描述的事件或情况可发生或不发生,并且该描述包括该事件发生的情况和该事件不发生的情况。

[0027] 本发明中，“医疗器械”是指直接或者间接用于人体的仪器、设备、器具、体外诊断试剂及校准物、材料以及其他类似或者相关的物品。

[0028] 本发明中，“组织工程产品”是指用于组织工程的产品。组织工程是一门以细胞生物学和材料科学相结合，进行体外或体内构建组织或器官的新兴学科。

[0029] 在本发明中，所述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T的氨基酸序列部分源自I型人胶原蛋白，即以SEQ ID No.1所示的氨基酸序列中粗体下划线部分。所述I型人胶原蛋白序列如下：MFSFVDLRLLLLLAATALLTHGQEEGQVEGQDEDEDIPPITCVQNGLRYHDRDVWKP

EPCRICVCDNGKVLCDDEVICDETKNCPGAEVPEGECCPVCPCDGSSEPTDQETTGVVEGP
 KGDTGPRGPRGPAGPPGRDGIQGLPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLSYGYDEKST
 GGISVPGPMGSPGRGLPGPPGAPGPQGFQGGPPGEPGEPGASGPMGPRGPPGPPGKNG
 DDGEAGKPRPGERGPPGPQGARGLPGTAGLPGMKGHRGFSGLDGAKG DAGPAGPK
 GEPGSPGENGAPGQMGRGLPGERGRPGAPGAPARGNDGATGAAGPPGPTGPAGPP
 GFPGAVGAKGEAGPQGPRGSEGPQGVRRGEPGPPGAPGAAGPAGNPGADGQPGAKGA
 NGAPGIAGAPGFPARGPSGPQGGPPGPKGNSGEPGAPGSKGDTGAKGEPGPVGV
 QGPPGPAGEEGKRGARGEPGPTGLPGPPGERGGPSRGPAGDGVAGPKGPAGERGSP
 GPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPGAKGLTGSPGSPGDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPG
 ARGQAGVMGFPGPKGAAGEPGKAGERGVPPGAVGPAGKDGEAGAQQPPGPAGPA
 GERGEQGPAGSPGFQGLPGPAGPPGEAGKPGEQGVPGDLGAPGSPGARGERGFPGER
 GVQGPAGPRGANGAPGNDGAKGDAGAPGAPGSQGAPGLQGMPGERGAAGLPGP
 KGDRGDAGPKGADGSPGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAPGDKGESGSPGAPPTGARGA
 PGDRGEPGPPGPAGFAGPPGADGQPGAKGEPGDAGAKGDAGPPGPAGPAGPPGPIGN
 VGAPGAKGARGSPGATGFPGAAGRVPVPPGSPGNAGPPGPPGPAGKEGGKGRGE
 TGPAGRPEVGPVPPGPAGEKSPGADGPAGAPGTPGPQGIAGQRGVVGLPGQRGE
 RGFPGLPGPSGEPGKQGPSGASGERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSP
GRDGSPGAKGDRGETGPAGPPGAPGAPGAPGPVGPAGKSGDRGETGPAGPAGPV
GPVGARGPAGPQGRGDKGETGEQGDRIKGHRGFSGLQGPPGPPGSPGEGQGPS
GASGPAGPRGPPGSAGAPGKDGLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPG
PPGPPSAGFDFSLPQPPQEK AHDGGRYYRADDANVVRDRDLEVDTTLSLSQQIENI
 RSPEGSRKNPARTCRDLKMCHSDWKSGEYWIDPNQGCNLDAIKVFCNMETGETCVYP
 TQPSVAQKNWYISKNPDKRHHVWFGESMTDGFQFEYGGQGSADVAIQLTFLRLMS
 TEASQNITYHCKNSVAYMDQQTGNLKKALLLQGSNEIEIRAEGNSRFTYSVTVDGCTS
 HTGAWGKTVIEYKTTKTSRLPIIDVAPLDVGAPDQEFQFDVGPVCFL (SEQ ID No.1)。

[0030] GEPGKQGPSGASGERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPGRDGSPGAKGDRGETGPAGPPGA
 PGAPGAPGPVGPAGKSGDRGETGPAGPAGPVGPVGARGPAGPQGRGDKGETGEQGDRIKGHRGFSGLQGPPGPPG

GSPGEQGPSGASGPAGPRGPPGSAGAPGKDGLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGVGPVGGPPGPPGPPGPP (SEQ ID No.3)

[0031] 在本发明中,所述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T可以包含以SEQ ID No.2所示的序列(GAPGPCCGG),该序列为增强胶原活性的端序列肽段,所述以SEQ ID No.2所示的序列和以SEQ ID No.3所示的序列的C端直接相连。

[0032] GEPGKQGPSGASGERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPGRDGSPPGAKGDRGETGPAGPPGAPGAPGAPVGPAGKSGDRGETGPAGPAGVGPVARGPAGPQGPRGDKGETGEQGDRGIKGRHGFSGLQGGPPGPPGSPGEQGPSGASGPAGPRGPPGSAGAPGKDGLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGVGPVGGPPGPPGPPGPPGPPGAPGPPCCGG (SEQ ID No.4)

[0033] 在本发明中,所述重组I型人源化胶原蛋白C1L5T可以包含以SEQ ID No.4所示的序列或以SEQ ID No.4所示的序列中取代、缺失、插入和/或添加一个或多个氨基酸的序列,只要本发明的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T保留SEQ ID No.4的氨基酸序列的细胞黏附效果。“多个”可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个。

[0034] 在本发明中,所述核酸分子包括编码本发明的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T的核酸序列。核酸可以是DNA或cDNA。核酸分子可以主要由编码本发明所述蛋白的核酸序列组成,或可以仅由编码本发明所述蛋白的核酸序列组成。此类核酸分子可以用本领域已知的方法合成。由于遗传密码具有简并性,不同核酸序列的核酸分子可以编码相同的氨基酸序列。

[0035] 在本发明中,所述载体中包括本发明所述的核酸序列。合适的载体是载体构建领域已知的,包括启动子的选择和其他调控元件,例如增强子元件。本发明所述的载体包括适合引入细胞的序列。例如,载体可以是表达载体,在该载体中,所述蛋白的编码序列受到它自身顺式作用调控元件的控制,载体的设计便于宿主细胞的基因整合或基因替换等。

[0036] 在本发明中,术语“载体”包括DNA分子,例如质粒、噬菌体、病毒或其他载体,它含有一个或多个异源的或重组的核酸序列。合适的噬菌体和病毒载体包括,但不限于: λ -噬菌体、EMBL噬菌体、猿猴病毒、牛痘病毒、Epstein-Barr病毒、腺病毒、疱疹病毒、小鼠肉瘤病毒、鼠类乳癌病毒、慢病毒等。

[0037] 在本发明中,宿主细胞可以是原核细胞,例如肠杆菌科细菌,也可以是真核细胞,例如真菌和酵母。本领域技术人员可以通过用其它表达菌株替换大肠杆菌菌株作为宿主细胞。

[0038] 在本发明中,“同源性”是指两种核酸分子的核苷酸序列之间或两种蛋白质分子的氨基酸序列之间的相似程度。

[0039] 在本发明中,氨基酸“添加”指在氨基酸序列的C端或N端添加氨基酸,只要本发明的蛋白保留原本的氨基酸序列的细胞黏附效果。

[0040] 在本发明中,氨基酸“缺失”指可以从氨基酸序列中删除1、2或3个以上氨基酸,只要本发明的蛋白保留原本的氨基酸序列的细胞黏附效果。

[0041] 在本发明中,氨基酸“插入”指在氨基酸序列中的适当位置插入氨基酸残基,插入的氨基酸残基也可以全部或部分彼此相邻,或插入的氨基酸之间都不彼此相邻,只要本发明的蛋白保留原本的氨基酸序列的细胞黏附效果。

[0042] 在本发明中,氨基酸“取代”指在氨基酸序列中的某个位置的某个氨基酸残基被其

他氨基酸残基替代,只要本发明的蛋白保留原本的氨基酸序列的细胞黏附效果;其中,“取代”可以是保守氨基酸取代,指与原本的氨基酸序列相比,有3个,更佳地2个氨基酸或1个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成肽。这些保守性变异肽可以根据下表进行氨基酸替换而产生。

[0043]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro;Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe	Leu
Leu (L)	Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala	Leu

[0044] 本发明中,“中等至非常高等严格条件”包括“中等严格条件”,“中-高严格条件”,“高严格条件”或“非常高严格条件”,其描述了核酸杂交和洗涤的条件。进行杂交反应的指导参见Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6,其通过引用并入本文。在该文献中描述了含水的和非含水的方法,且可以使用任一种。例如,具体的杂交条件如下:(1)低严格性杂交条件在6×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中,在约45℃,然后在至少50℃,在0.2×SSC,0.1%SDS中洗涤2次(对于低严格性条件,可以将洗涤温度升高到55℃);(2)中等严格性杂交条件在6×SSC,在约45℃,然后在60℃,在0.2×SSC,0.1%SDS中洗涤1次或多次;(3)高严格性杂交条件在6×SSC,在约45℃,然后在65℃,在0.2×SSC,0.1%SDS中洗涤1次或多次且优选;(4)非常高的严格性杂交条件是0.5M磷酸钠,7%SDS,在65℃,然后在65℃,在0.2×SSC,1%SDS中洗涤1次或多次。

[0045] 在本发明中,重组I型人源化胶原蛋白C1L5T可以通过本领域中的常规方法进行制备。例如,可以通过如下步骤生产:(1)大肠杆菌基因工程菌的构建:a.得到目的基因片段;b.将得到的目的基因片段插入pET-32a表达载体中得到重组表达质粒;c.将重组表达质粒转入大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3)中,筛选得到阳性大肠杆菌基因工程菌。(2)大肠杆菌

基因工程菌的发酵培养及蛋白的诱导和表达:a.挑取优选后的大肠杆菌基因工程菌单菌落,置于含有氨苄抗生素的液体培养基中,37℃,220rpm培养5小时,降温至16℃;b.加入终浓度为0.25mM IPTG进行诱导,培养18小时。3000rpm、4℃离心20min收集菌体。(3)蛋白的纯化和任选的酶切:a.用Tris缓冲液(25mM Tris,200mM NaCl,pH8.0)重悬细菌,均质破碎,17000rpm 4℃离心20分钟,收集上清液;b.利用Ni₆FF亲和柱结合蛋白,用含有20mM咪唑的溶液(20mM咪唑,25mM Tris,200mM NaCl,pH8.0)漂洗杂蛋白,用含有250mM咪唑的溶液(250mM咪唑,25mM Tris,200mM NaCl,pH8.0)洗脱目的蛋白;c.在洗脱的蛋白样品中加入适量具有His标签的Prescission Protease (PPase)蛋白酶16℃,酶切2h;d.利用Capto Q离子交换柱纯化目的蛋白,将上述酶切后的蛋白透析换液至A液(20mM Tris,10mM NaCl,pH 8.0)中,并经过Capto Q柱,收集流穿液,即为去除载体蛋白的目的蛋白。

[0046] 在实际应用中,可以将本发明的蛋白多肽或其药用盐、其衍生物或其药用盐、上述偶合物、上述多聚体和上述组合物作为药物直接给予患者、或者与适宜的载体或赋形剂混合后给予患者。这里的载体材料包括但不限于水溶性载体材料(如聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、有机酸等)、难溶性载体材料(如乙基纤维素、胆固醇硬脂酸酯等)、肠溶性载体材料(如醋酸纤维素酞酸酯和羧甲基纤维素等)。其中优选的是水溶性载体材料。使用这些材料可以制成多种剂型,包括但不限于片剂、胶囊、滴丸、气雾剂、丸剂、粉剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、颗粒剂、脂质体、透皮剂、口含片、栓剂、冻干粉针剂等。其中,栓剂可为阴道栓剂,也可以是阴道环,也可以是适于阴道应用的药膏、乳霜或凝胶。所述蛋白多肽剂型可以是普通制剂、缓释制剂、控释制剂及各种微粒给药系统。为了将单位给药剂型制成片剂,可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是,例如稀释剂与吸收剂,如淀粉、糊精、硫酸钙、乳糖、甘露醇、蔗糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、碳酸钙、白陶土、微晶纤维素、硅酸铝等;湿润剂与粘合剂,如水、甘油、聚乙二醇、乙醇、丙醇、淀粉浆、糊精、糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、阿拉伯胶浆、明胶浆、羧甲基纤维素钠、紫胶、甲基纤维素、磷酸钾、聚乙烯吡咯烷酮等;崩解剂,例如干燥淀粉、海藻酸盐、琼脂粉、褐藻淀粉、碳酸氢钠与枸橼酸、碳酸钙、聚氧乙烯、山梨糖醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等;崩解抑制剂,例如蔗糖、三硬脂酸甘油酯、可可脂、氢化油等;吸收促进剂,例如季铵盐、十二烷基硫酸钠等;润滑剂,例如滑石粉、二氧化硅、玉米淀粉、硬脂酸盐、硼酸、液体石蜡、聚乙二醇等。还可以将片剂进一步制成包衣片,例如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片,或双层片和多层片。为了将单位给药剂型制成丸剂,可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是,例如稀释剂与吸收剂,如葡萄糖、乳糖、淀粉、可可脂、氢化植物油、聚乙烯吡咯烷酮、Gelucire、高岭土、滑石粉等;粘合剂如阿拉伯胶、黄蓍胶、明胶、乙醇、蜂蜜、液糖、米糊或面糊等;崩解剂,如琼脂粉、干燥淀粉、海藻酸盐、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等。为了将单位给药剂型制成栓剂,可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是,例如聚乙二醇、卵磷脂、可可脂、高级醇、高级醇的酯、明胶、半合成甘油酯等。为了将单位给药剂型制成注射用制剂,如溶液剂、乳剂、冻干粉针剂和混悬剂,可以使用本领域常用的所有稀释剂,例如,水、乙醇、聚乙二醇、1,3-丙二醇、乙氧基化的异硬脂醇、多氧化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯等。另外,为了制备等渗注射液,可以向注射用制剂中添加适量的氯化钠、葡萄糖或甘油,此外,还可以添加常规的助溶剂、缓冲剂、pH调节剂等。此外,如需要,也可以向药物制剂中添加着色剂、防腐剂、香料、矫味剂、甜味剂或其它材料。

[0047] 使用上述剂型可以经注射给药,包括皮下注射、静脉注射、肌肉注射和腹腔注射、脑池内注射或灌輸等;腔道给药,如经直肠、阴道和舌下;呼吸道给药,如经鼻腔;粘膜给药。上述给药途径优选的是注射给药,优选的注射途径是皮下注射。

[0048] 本发明的蛋白多肽或其药用盐、其衍生物或其药用盐、上述缀合物、上述多聚体和上述组合物的给药剂量取决于许多因素,例如所要预防或治疗疾病的性质和严重程度,患者或动物的性别、年龄、体重及个体反应,所用的具体活性成分,给药途径及给药次数等。上述剂量可以单一剂量形式或分成几个,例如二、三或四个剂量形式给药。对于任何具体的患者,具体的治疗有效剂量水平须根据多种因素而定,所述因素包括所治疗的障碍和该障碍的严重程度;所采用的具体活性成分的活性;所采用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;所采用的具体活性成分的给药时间、给药途径和排泄率;治疗持续时间;与所采用的具体活性成分组合使用或同时使用的药物;及医疗领域公知的类似因素。例如,本领域的做法是,活性成分的剂量从低于为得到所需治疗效果而要求的水平开始,逐渐增加剂量,直到得到所需的效果。

[0049] 为更清楚地表述本发明的技术方案,下面结合具体实施例进一步说明,但不能用于限制本发明,此仅是本发明的部分实施例。

[0050] 实施例1:重组I型人源化胶原蛋白C1L5T的制备

[0051] 1. C1L5T基因表达载体的构建

[0052] 本实施例中使用的人源胶原蛋白C1L5T全长蛋白序列为以SEQ ID No.4所示的序列,全长222aa,对应的基因全长666bp。针对大肠杆菌的密码子进行了密码子优化,优化后的序列为:GGAGAACCAGGAAAACAAGGTCCCTCAGGGGCGTCCGGCGAACGTGGTCCGCCGGGCCCGATGGGTC CGCCGGGCTGGCAGGCCCGCCGGGAGAGAGCGGTCTGTAAGGTGCGCCTGGTGCGGAGGGTTCTCCGGGCAGAGA TGGTTCGCCGGGAGCGAAAGGTGACCGCGGTGAAACCGGTCCGGCGGGTCCGCTGGCGCGCCAGGCGCTCCGGGT GCCCTGGTCCGGTTGGTCCGGCTGGCAAAGCGGCGATCGTGGTGAAGTGGTCCAGCCGGCCGACCGGTCCGG TGGGTCCGGTTGGCGCGGTGGTCCAGCGGGCCACAGGGCCCTCGCGGCGACAAGGGTGAGACGGGCGAGCAGGG TGACCGCGGTATTAAGGTCACCGTGGCTTCAGCGGTCTGCAAGGCCCGCGGGTCCGCCGGGCTCGCCGGGGGAG CAAGGTCCGAGCGGTGCCAGCGGTCTGCGGGCCCGGTGGTCCACCGGGTCTGCAGGTGCTCCGGGTAAGGACG GCTTGAACGGTCTGCCGGGTCCCATCGGTCCGCCGGGTCCGCGCGGCCGTACCGGCGATGCAGGTCTGTGGGCC GCCGGTCCGCCAGGCCCGCCAGGGCCGCCGGGCCCGCCAGGTGCACCGGGTCCGTGTTGTGGTGGT (SEQ ID No.5)。

[0053] 委托北京盛元科萌基因生物科技有限公司对上述基因片段进行合成,并将合成后的基因片段插入pET-32a表达载体的BamHI和XhoI酶切位点之间,得到对应的重组表达质粒pET32a-C1L5T。重组表达质粒的载体图谱参见图1。

[0054] 2. 重组表达质粒的转化

[0055] 将重组表达质粒pET32a-C1L5T转入大肠杆菌感受态细胞BL21 (DE3)中,筛选得到阳性大肠杆菌基因工程菌。具体步骤如下:

[0056] ①将1 μ L的上述质粒置于100 μ L的大肠杆菌感受态细胞BL21 (DE3)中,冰上静置30min;

[0057] ②将上述混合物置于42 $^{\circ}$ C水浴锅中热激90s,然后迅速置于冰上静置2min;

[0058] ③向上述混合物中加入700 μ L无抗性的液体LB (10g/L蛋白胍,5g/L酵母提取物,

10g/L氯化钠),37℃,220rpm条件下培养1h;

[0059] ④取200μL上述菌液均匀的涂布在含有氨苄青霉素的LB平板上(10g/L蛋白胨,5g/L酵母提取物,10g/L氯化钠,15g/L琼脂,100μg/mL氨苄青霉素);

[0060] ⑤将平板倒置培养于37℃恒温箱中,培养约16h,待长出清晰可见的菌落。

[0061] 3.目的蛋白的诱导表达

[0062] 从LB平板中挑取优选后的大肠杆菌基因工程菌单菌落,置于含有氨苄抗生素的培养基中,37℃,220rpm培养5小时,降温至16℃,加入IPTG使其终浓度为0.25mM,进行诱导表达,培养18小时。3000rpm、4℃离心20min收集菌体。

[0063] 4.C1L5T的纯化

[0064] ①粗提纯:用Tris缓冲液(25mM Tris,200mM NaCl,pH8.0)重悬上述菌体沉淀、进行溶菌,均质破碎,17000rpm 4℃离心20分钟,收集上清液;用清水洗涤Ni亲和柱柱材,用buffer 1(25mM Tris,200mM NaCl,pH8.0)平衡柱材,上样,用含有20mM咪唑的洗涤缓冲液(20mM咪唑,25mM Tris,200mM NaCl,pH 8.0)漂洗杂蛋白,用含有250mM咪唑的溶液(250mM咪唑,25mM Tris,200mM NaCl,pH 8.0)洗脱目的蛋白;用含有1M咪唑的溶液洗涤柱材,再用水洗涤柱材,最后用20%乙醇填充柱材。

[0065] ②酶切:在上述洗脱的蛋白样品中加入适量具有His标签的Prescission Protease(PPase)蛋白酶,16℃酶切2h。

[0066] ③精提纯:将酶切后的蛋白透析换液至溶液A(20mM Tris,10mM NaCl,pH 8.0)中;用5倍柱体积的溶液A平衡Capto Q(Cytiva公司,货号:17531610)离子交换柱,将酶切换液后的蛋白流经Capto Q柱,并收集流穿液,即为去除载体蛋白的目的蛋白。

[0067] 5.C1L5T的电泳检测

[0068] 上述所得重组I型人源化胶原蛋白C1L5T通过SDS-PAGE检测纯度。具体过程为:取纯化后的蛋白液20μL,加入5μL 5×的蛋白上样缓冲液(250mM的Tris-HCl(pH 6.8)、10% SDS、0.5%溴酚蓝、50%甘油和5%β-巯基乙醇),置于100℃沸水中煮5min,然后每孔10μL加入SDS-PAGE蛋白胶中,电压150V电泳1h后,用考马斯亮蓝染色液(0.1%考马斯亮蓝R-250,25%乙醇,10%冰醋酸)进行蛋白染色3min,再利用蛋白脱色液(10%醋酸,5%乙醇)进行脱色。

[0069] 检测结果如图2,C1L5T通过电泳所得的表观分子量为33kDa,分子量对应C1L5T的蛋白,表明重组I型人源化胶原蛋白C1L5T得到正确的表达。

[0070] 实施例2:重组I型人源化胶原蛋白C1L5T的生物活性检测

[0071] 胶原蛋白的活性检测方法参考文献Juming Yao,Satoshi Yanagisawa,Tetsuo Asakura,Design,Expression and Characterization of Collagen-Like Proteins Based on the Cell Adhesive and Crosslinking Sequences Derived from Native Collagens,J Biochem.136,643-649(2004)。具体实施方法包括如下步骤:

[0072] (1)利用紫外吸收法检测待测蛋白样品的浓度,包括商品化的人胶原蛋白(Sigma,C7774)、本发明提供的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T。具体为分别测定样品在215nm和225nm下的紫外光吸收,利用经验公式 $C(\mu\text{g}/\text{mL}) = 144 \times (A_{215} - A_{225})$ 计算蛋白质浓度,注意需在 $A_{215} < 1.5$ 的情况下检测。检测完蛋白浓度后,用PBS将所有待测蛋白浓度调整到0.5mg/mL。

[0073] (2) 向96孔板中加入100 μ L各个蛋白溶液和空白PBS溶液对照,室温静置60min。

[0074] (3) 每孔中加入 10^5 个培养状态良好的3T3细胞,37 $^{\circ}$ C孵育60min。

[0075] (4) 每孔用PBS清洗4次。

[0076] (5) 用LDH检测试剂盒 (Roche, 04744926001) 检测在492nm的吸光度 OD_{492nm} 。根据空白对照的数值,可以计算出细胞的贴壁率。计算公式如下:细胞贴壁率 = (测试孔 - 空白孔) \times 100% / (阳性孔 - 空白孔)。

[0077] 结果如图3所示,从对比中可知,相比于商品化的人胶原蛋白,添加了本发明的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T的孔在492nm处具有更大的吸光值,意味着该孔细胞的贴壁率更大。证明本发明的重组I型人源化胶原蛋白C1L5T具有比商品化的人胶原蛋白更高的生物活性,能在更短的时间内给细胞提供优质的外环境,帮助细胞贴壁。

[0001] 序列表

[0002] <110> 山西锦波生物医药股份有限公司

[0003] <120> 一种重组I型人源化胶原蛋白C1L5T及其制备方法和用途

[0004] <130> 6C39-2183054I

[0005] <160> 5

[0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0007] <210> 1

[0008] <211> 1464

[0009] <212> PRT

[0010] <213> Homo sapiens

[0011] <400> 1

[0012] Met Phe Ser Phe Val Asp Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Thr

[0013] 1 5 10 15

[0014] Ala Leu Leu Thr His Gly Gln Glu Glu Gly Gln Val Glu Gly Gln Asp

[0015] 20 25 30

[0016] Glu Asp Ile Pro Pro Ile Thr Cys Val Gln Asn Gly Leu Arg Tyr His

[0017] 35 40 45

[0018] Asp Arg Asp Val Trp Lys Pro Glu Pro Cys Arg Ile Cys Val Cys Asp

[0019] 50 55 60

[0020] Asn Gly Lys Val Leu Cys Asp Asp Val Ile Cys Asp Glu Thr Lys Asn

[0021] 65 70 75 80

[0022] Cys Pro Gly Ala Glu Val Pro Glu Gly Glu Cys Cys Pro Val Cys Pro

[0023] 85 90 95

[0024] Asp Gly Ser Glu Ser Pro Thr Asp Gln Glu Thr Thr Gly Val Glu Gly

[0025] 100 105 110

[0026] Pro Lys Gly Asp Thr Gly Pro Arg Gly Pro Arg Gly Pro Ala Gly Pro

[0027] 115 120 125

[0028] Pro Gly Arg Asp Gly Ile Pro Gly Gln Pro Gly Leu Pro Gly Pro Pro

[0029] 130 135 140

[0030] Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Asn Phe Ala

[0031] 145 150 155 160

[0032] Pro Gln Leu Ser Tyr Gly Tyr Asp Glu Lys Ser Thr Gly Gly Ile Ser

[0033] 165 170 175

[0034] Val Pro Gly Pro Met Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Pro

[0035] 180 185 190

[0036] Pro Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln Gly Pro Pro Gly Glu Pro

[0037] 195 200 205

[0038] Gly Glu Pro Gly Ala Ser Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly

[0039]	210	215	220
[0040]	Pro Pro Gly Lys Asn Gly Asp Asp Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Arg		
[0041]	225	230	235
[0042]	Pro Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly Leu Pro		
[0043]	245	250	255
[0044]	Gly Thr Ala Gly Leu Pro Gly Met Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly		
[0045]	260	265	270
[0046]	Leu Asp Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Glu		
[0047]	275	280	285
[0048]	Pro Gly Ser Pro Gly Glu Asn Gly Ala Pro Gly Gln Met Gly Pro Arg		
[0049]	290	295	300
[0050]	Gly Leu Pro Gly Glu Arg Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly		
[0051]	305	310	315
[0052]	Ala Arg Gly Asn Asp Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro		
[0053]	325	330	335
[0054]	Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly Ala Val Gly Ala Lys		
[0055]	340	345	350
[0056]	Gly Glu Ala Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Ser Glu Gly Pro Gln Gly		
[0057]	355	360	365
[0058]	Val Arg Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Ala Gly Pro		
[0059]	370	375	380
[0060]	Ala Gly Asn Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Ala Asn		
[0061]	385	390	395
[0062]	Gly Ala Pro Gly Ile Ala Gly Ala Pro Gly Phe Pro Gly Ala Arg Gly		
[0063]	405	410	415
[0064]	Pro Ser Gly Pro Gln Gly Pro Gly Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Asn		
[0065]	420	425	430
[0066]	Ser Gly Glu Pro Gly Ala Pro Gly Ser Lys Gly Asp Thr Gly Ala Lys		
[0067]	435	440	445
[0068]	Gly Glu Pro Gly Pro Val Gly Val Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly		
[0069]	450	455	460
[0070]	Glu Glu Gly Lys Arg Gly Ala Arg Gly Glu Pro Gly Pro Thr Gly Leu		
[0071]	465	470	475
[0072]	Pro Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Gly Pro Gly Ser Arg Gly Phe Pro		
[0073]	485	490	495
[0074]	Gly Ala Asp Gly Val Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly		
[0075]	500	505	510
[0076]	Ser Pro Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Ser Pro Gly Glu Ala Gly Arg		
[0077]	515	520	525

[0078]	Pro Gly Glu Ala Gly Leu Pro Gly Ala Lys Gly Leu Thr Gly Ser Pro
[0079]	530 535 540
[0080]	Gly Ser Pro Gly Pro Asp Gly Lys Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly
[0081]	545 550 555 560
[0082]	Gln Asp Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Gln
[0083]	565 570 575
[0084]	Ala Gly Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Ala Gly Glu Pro
[0085]	580 585 590
[0086]	Gly Lys Ala Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Pro Pro Gly Ala Val Gly
[0087]	595 600 605
[0088]	Pro Ala Gly Lys Asp Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro
[0089]	610 615 620
[0090]	Ala Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro
[0091]	625 630 635 640
[0092]	Gly Phe Gln Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly
[0093]	645 650 655
[0094]	Lys Pro Gly Glu Gln Gly Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro
[0095]	660 665 670
[0096]	Ser Gly Ala Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Gln
[0097]	675 680 685
[0098]	Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly
[0099]	690 695 700
[0100]	Asn Asp Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser
[0101]	705 710 715 720
[0102]	Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala
[0103]	725 730 735
[0104]	Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly
[0105]	740 745 750
[0106]	Ala Asp Gly Ser Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Thr Gly Pro
[0107]	755 760 765
[0108]	Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Asp Lys Gly Glu Ser
[0109]	770 775 780
[0110]	Gly Pro Ser Gly Pro Ala Gly Pro Thr Gly Ala Arg Gly Ala Pro Gly
[0111]	785 790 795 800
[0112]	Asp Arg Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Phe Ala Gly Pro
[0113]	805 810 815
[0114]	Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Glu Pro Gly Asp Ala
[0115]	820 825 830
[0116]	Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly

[0117]	835	840	845
[0118]	Pro Pro Gly Pro Ile Gly Asn Val Gly Ala Pro Gly Ala Lys Gly Ala		
[0119]	850	855	860
[0120]	Arg Gly Ser Ala Gly Pro Pro Gly Ala Thr Gly Phe Pro Gly Ala Ala		
[0121]	865	870	875
[0122]	Gly Arg Val Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Asn Ala Gly Pro Pro Gly		
[0123]	885	890	895
[0124]	Pro Pro Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Gly Lys Gly Pro Arg Gly Glu		
[0125]	900	905	910
[0126]	Thr Gly Pro Ala Gly Arg Pro Gly Glu Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro		
[0127]	915	920	925
[0128]	Gly Pro Ala Gly Glu Lys Gly Ser Pro Gly Ala Asp Gly Pro Ala Gly		
[0129]	930	935	940
[0130]	Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Gly Val		
[0131]	945	950	955
[0132]	Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu Pro		
[0133]	965	970	975
[0134]	Gly Pro Ser Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly		
[0135]	980	985	990
[0136]	Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro		
[0137]	995	1000	1005
[0138]	Pro Gly Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro		
[0139]	1010	1015	1020
[0140]	Gly Arg Asp Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly		
[0141]	1025	1030	1035
[0142]	Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro		
[0143]	1045	1050	1055
[0144]	Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala		
[0145]	1060	1065	1070
[0146]	Gly Pro Ala Gly Pro Val Gly Pro Val Gly Ala Arg Gly Pro Ala Gly		
[0147]	1075	1080	1085
[0148]	Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr Gly Glu Gln Gly Asp		
[0149]	1090	1095	1100
[0150]	Arg Gly Ile Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu Gln Gly Pro Pro		
[0151]	1105	1110	1115
[0152]	Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Glu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly		
[0153]	1125	1130	1135
[0154]	Pro Ala Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly Ala Pro Gly Lys		
[0155]	1140	1145	1150

[0156]	Asp Gly Leu Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg
[0157]	1155 1160 1165
[0158]	Gly Arg Thr Gly Asp Ala Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
[0159]	1170 1175 1180
[0160]	Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Ser Ala Gly Phe Asp Phe Ser Phe
[0161]	1185 1190 1195 1200
[0162]	Leu Pro Gln Pro Pro Gln Glu Lys Ala His Asp Gly Gly Arg Tyr Tyr
[0163]	1205 1210 1215
[0164]	Arg Ala Asp Asp Ala Asn Val Val Arg Asp Arg Asp Leu Glu Val Asp
[0165]	1220 1225 1230
[0166]	Thr Thr Leu Lys Ser Leu Ser Gln Gln Ile Glu Asn Ile Arg Ser Pro
[0167]	1235 1240 1245
[0168]	Glu Gly Ser Arg Lys Asn Pro Ala Arg Thr Cys Arg Asp Leu Lys Met
[0169]	1250 1255 1260
[0170]	Cys His Ser Asp Trp Lys Ser Gly Glu Tyr Trp Ile Asp Pro Asn Gln
[0171]	1265 1270 1275 1280
[0172]	Gly Cys Asn Leu Asp Ala Ile Lys Val Phe Cys Asn Met Glu Thr Gly
[0173]	1285 1290 1295
[0174]	Glu Thr Cys Val Tyr Pro Thr Gln Pro Ser Val Ala Gln Lys Asn Trp
[0175]	1300 1305 1310
[0176]	Tyr Ile Ser Lys Asn Pro Lys Asp Lys Arg His Val Trp Phe Gly Glu
[0177]	1315 1320 1325
[0178]	Ser Met Thr Asp Gly Phe Gln Phe Glu Tyr Gly Gly Gln Gly Ser Asp
[0179]	1330 1335 1340
[0180]	Pro Ala Asp Val Ala Ile Gln Leu Thr Phe Leu Arg Leu Met Ser Thr
[0181]	1345 1350 1355 1360
[0182]	Glu Ala Ser Gln Asn Ile Thr Tyr His Cys Lys Asn Ser Val Ala Tyr
[0183]	1365 1370 1375
[0184]	Met Asp Gln Gln Thr Gly Asn Leu Lys Lys Ala Leu Leu Leu Gln Gly
[0185]	1380 1385 1390
[0186]	Ser Asn Glu Ile Glu Ile Arg Ala Glu Gly Asn Ser Arg Phe Thr Tyr
[0187]	1395 1400 1405
[0188]	Ser Val Thr Val Asp Gly Cys Thr Ser His Thr Gly Ala Trp Gly Lys
[0189]	1410 1415 1420
[0190]	Thr Val Ile Glu Tyr Lys Thr Thr Lys Thr Ser Arg Leu Pro Ile Ile
[0191]	1425 1430 1435 1440
[0192]	Asp Val Ala Pro Leu Asp Val Gly Ala Pro Asp Gln Glu Phe Gly Phe
[0193]	1445 1450 1455
[0194]	Asp Val Gly Pro Val Cys Phe Leu

[0195]		1460	
[0196]	<210>	2	
[0197]	<211>	9	
[0198]	<212>	PRT	
[0199]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0200]	<400>	2	
[0201]	Gly Ala Pro Gly Pro Cys Cys Gly Gly		
[0202]	1	5	
[0203]	<210>	3	
[0204]	<211>	213	
[0205]	<212>	PRT	
[0206]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0207]	<400>	3	
[0208]	Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Glu Arg Gly		
[0209]	1	5	10 15
[0210]	Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly Glu		
[0211]		20	25 30
[0212]	Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp		
[0213]		35	40 45
[0214]	Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly		
[0215]		50	55 60
[0216]	Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly Pro		
[0217]		65	70 75 80
[0218]	Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala		
[0219]		85	90 95
[0220]	Gly Pro Val Gly Pro Val Gly Ala Arg Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly		
[0221]		100	105 110
[0222]	Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr Gly Glu Gln Gly Asp Arg Gly Ile		
[0223]		115	120 125
[0224]	Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro		
[0225]		130	135 140
[0226]	Gly Ser Pro Gly Glu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly		
[0227]		145	150 155 160
[0228]	Pro Arg Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Leu		
[0229]		165	170 175
[0230]	Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg Thr		
[0231]		180	185 190
[0232]	Gly Asp Ala Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly		
[0233]		195	200 205

[0234]	Pro Pro Gly Pro Pro
[0235]	210
[0236]	<210> 4
[0237]	<211> 222
[0238]	<212> PRT
[0239]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0240]	<400> 4
[0241]	Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Glu Arg Gly
[0242]	1 5 10 15
[0243]	Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly Glu
[0244]	20 25 30
[0245]	Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp
[0246]	35 40 45
[0247]	Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly
[0248]	50 55 60
[0249]	Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly Pro
[0250]	65 70 75 80
[0251]	Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala
[0252]	85 90 95
[0253]	Gly Pro Val Gly Pro Val Gly Ala Arg Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly
[0254]	100 105 110
[0255]	Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr Gly Glu Gln Gly Asp Arg Gly Ile
[0256]	115 120 125
[0257]	Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro
[0258]	130 135 140
[0259]	Gly Ser Pro Gly Glu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly
[0260]	145 150 155 160
[0261]	Pro Arg Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Leu
[0262]	165 170 175
[0263]	Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg Thr
[0264]	180 185 190
[0265]	Gly Asp Ala Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
[0266]	195 200 205
[0267]	Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Cys Cys Gly Gly
[0268]	210 215 220
[0269]	<210> 5
[0270]	<211> 666
[0271]	<212> DNA
[0272]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0273] <400> 5
[0274] ggagaaccag gaaaacaagg tccctcaggg gcgtccggcg aacgtggtcc gccgggccccg 60
[0275] atgggtccgc cgggcctggc aggcccgccg ggagagagcg gtcgtgaagg tgcgcctggt 120
[0276] gcggagggtt ctccgggcag agatggttcc ccgggagcga aaggtgaccg cggtgaaacc 180
[0277] ggtccggcgg gtccgcctgg cgcgccaggc gtcctgggtg cccctggtcc ggttgggtccg 240
[0278] gctggcaaaa gcggcgatcg tggtgaaact ggtccagccg gcccgaccgg tccggtgggt 300
[0279] ccggttggcg cgcgtggtcc agcgggccca caggccctc gcggcgacaa ggtgagacg 360
[0280] ggcgagcagg gtgaccgcgg tattaaggt caccgtggct tcagcggctt gcaaggccccg 420
[0281] ccgggtccgc cgggctcgcc gggggagcaa ggtccgagcg gtgccagcgg tcctgcgggc 480
[0282] ccgcgtggtc caccgggctc tgcaggtgct ccgggtaagg acggcttgaa cggctgcccg 540
[0283] ggtcccatcg gtccgccggg tccgcgcggc cgtaccggcg atgcaggtcc tgtgggccccg 600
[0284] ccgggtccgc caggcccgcc agggccgccg ggcccgccag gtgcaccggg tccgtgttgt 660
[0285] ggtggt 666

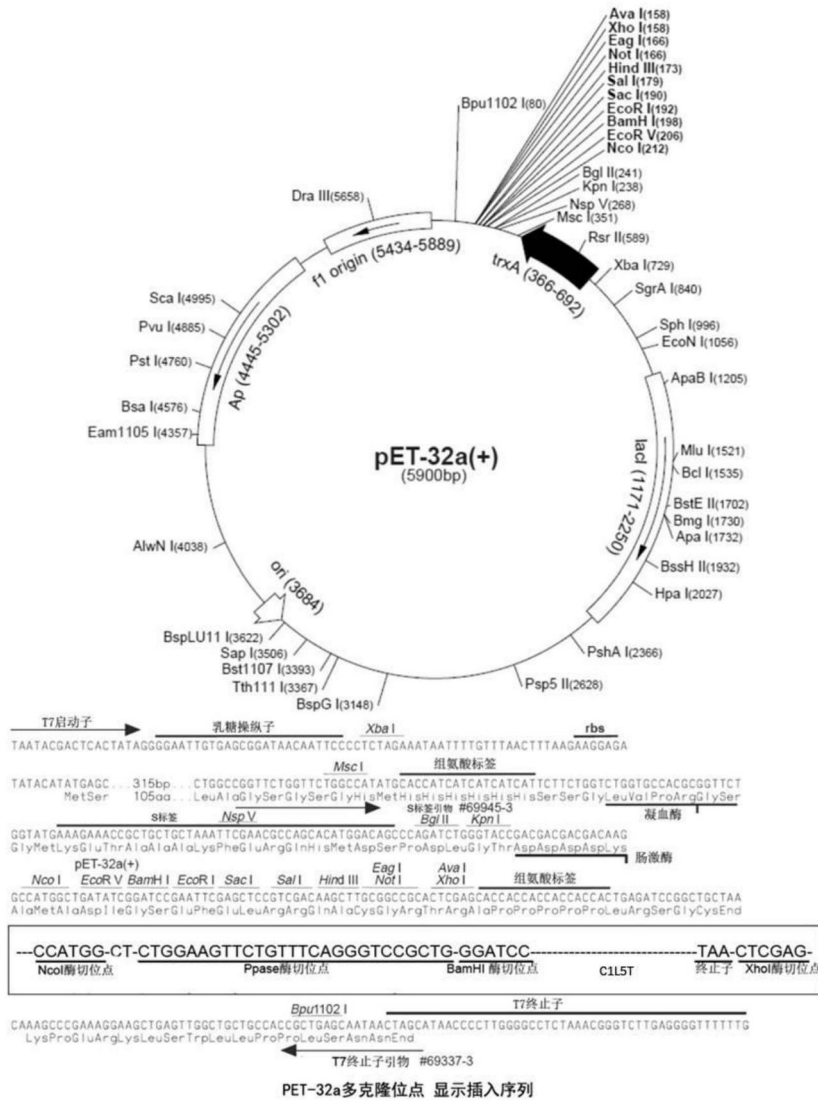


图1

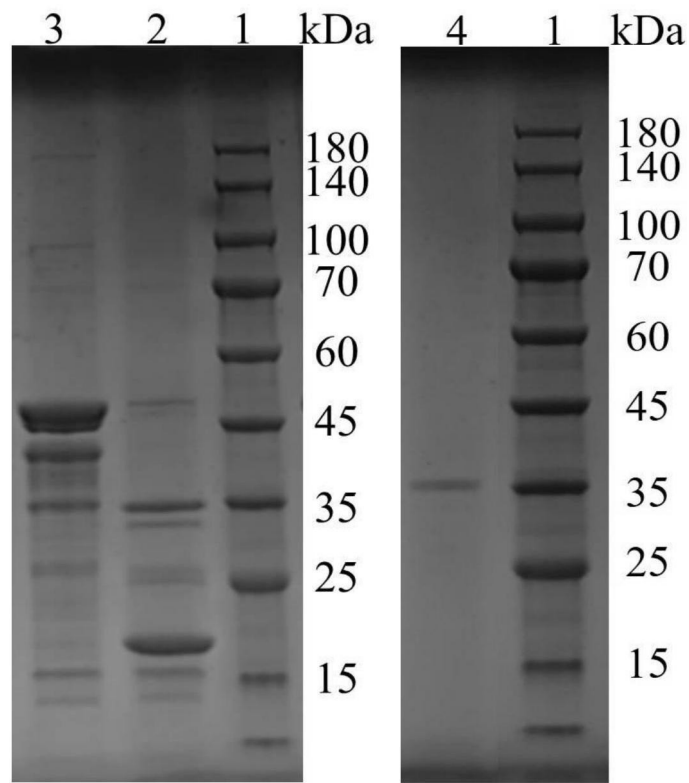


图2

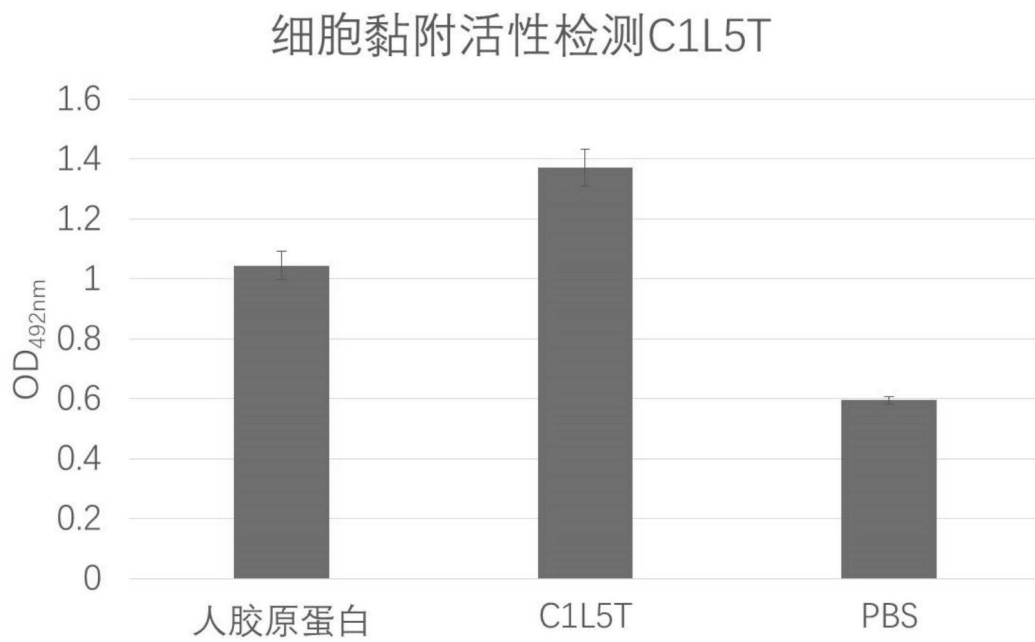


图3