



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101977626 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 16

(21) 申请号 200980109973. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 01. 21

A61K 38/55 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 8/64 (2006. 01)

61/022, 386 2008. 01. 21 US

A61P 17/00 (2006. 01)

61/006, 576 2008. 01. 22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2009/000089 2009. 01. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02009/093119 EN 2009. 07. 30

(71) 申请人 德莫迪斯公司

地址 法国阿尔尚

申请人 国立健康与医学研究所

(72) 发明人 D·德佩尔特 C·昆丁

A·霍夫纳尼安 C·德雷松

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

公司 11285

代理人 张广育 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 65 页 附图 31 页

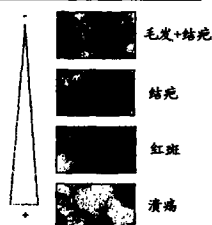
(54) 发明名称

丝氨酸蛋白酶抑制剂在治疗皮肤病中的用途

(57) 摘要

本发明涉及为丝氨酸蛋白酶抑制剂的治疗性化合物, 涉及其药物组合物并且涉及它们在治疗人体或动物体中的用途。更具体而言, 本发明涉及用于治疗、诊断或预后皮肤病的方法, 包括向需要其的受试者给予治疗有效量的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

Tg-KLK5小鼠中的损伤表型



第1级: 低严重度-值=1

第2级: 低中严重度-值=2

第3级: 中高严重度-值=3

第4级: 高严重度-值=4

1. 丝氨酸蛋白酶抑制剂或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段在制备用于治疗皮肤病的药剂中的用途。
2. 权利要求 1 的用途,其中所述丝氨酸蛋白酶抑制剂是重组体抑制剂蛋白。
3. 权利要求 1-2 的用途,其中所述丝氨酸蛋白酶选自激肽释放酶、纤溶酶、胰凝乳蛋白酶 (Chtr)、尿激酶 (uPA)、类胰蛋白酶和中性粒细胞弹性蛋白酶 (HNE)、以及 / 或者它们的结合物。
4. 权利要求 3 的用途,其中所述激肽释放酶选自 hK2、hK5、hK7 和 hK14、和 / 或它们的结合物。
5. 权利要求 1-4 的用途,其中所述皮肤病选自内瑟顿综合征、特应性皮炎、银屑病和脱皮综合征。
6. 权利要求 5 的用途,其中所述皮肤病为内瑟顿综合征。
7. 权利要求 1-6 的用途,其中所述重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂选自 SEQ ID No 2、4、6、8、10、12 和 14、或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段。
8. 权利要求 1-6 的用途,其中所述重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂选自 SEQ ID No 39-59,或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段。
9. 一种用于在哺乳动物中治疗或预防皮肤病的方法,包括向所述哺乳动物给予包含重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段的药物组合物。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述丝氨酸蛋白酶选自激肽释放酶、纤溶酶、胰凝乳蛋白酶 (Chtr)、尿激酶 (uPA)、类胰蛋白酶和中性粒细胞弹性蛋白酶 (HNE)、以及 / 或者它们的结合物。
11. 权利要求 10 的方法,其中所述激肽释放酶选自 hK2、hK5、hK7 和 hK14、和 / 或它们的结合物。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述皮肤病选自内瑟顿综合征、特应性皮炎、银屑病和脱皮综合征。
13. 权利要求 12 的方法,其中所述皮肤病为内瑟顿综合征。
14. 权利要求 9-13 的方法,其中所述重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂选自 SEQ ID No 2、4、6、8、10、12 和 14,或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段。
15. 权利要求 9-13 的方法,其中所述重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂选自 SEQ ID No 39-59,或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段。
16. 一种用于治疗或预防皮肤病的试剂盒,所述试剂盒包含重组体丝氨酸蛋白酶,以及任选的试剂和 / 或使用说明书。
17. 一种用于改善不利皮肤病症的化妆品组合物,包含药物有效量的重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段。
18. 权利要求 17 的化妆品组合物,其中所述丝氨酸蛋白酶抑制剂为重组体抑制剂蛋白。
19. 权利要求 18 的化妆品组合物,其中所述丝氨酸蛋白酶选自激肽释放酶、纤溶酶、胰凝乳蛋白酶 (Chtr)、尿激酶 (uPA)、类胰蛋白酶和中性粒细胞弹性蛋白酶 (HNE)、以及 / 或者它们的结合物。

20. 权利要求 21 的化妆品组合物,其中所述激肽释放酶选自 hK2、hK5、hK7 和 hK14、和 / 或它们的结合物。

21. 丝氨酸蛋白酶抑制剂或其生物学活性片段在制备用于改善不利皮肤病症的化妆品组合物中的用途。

22. 一种用于在组织样品中诊断或预后皮肤病的检测测定法,包括将所述组织样品与具有检测标记的重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂相接触,确定并测量所述检测标记的量,并且将该量与所述组织样品中存在或不存在疾病相关联。

丝氨酸蛋白酶抑制剂在治疗皮肤病中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及为丝氨酸蛋白酶的抑制剂的治疗性化合物、其药物组合物以及其在治疗人体或动物体中的用途。更具体而言,本发明涉及用于治疗、诊断或预后皮肤病的方法,包括向需要其的受试者给予治疗有效量的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

背景技术

[0002] 蛋白酶或蛋白水解酶在生物体——从细菌和病毒至哺乳动物——中是必要的。蛋白酶通过水解肽键消化和降解蛋白质。丝氨酸蛋白酶 (EC. 3. 4. 21) 的活性位点有共同的特征,主要是有活性的丝氨酸残基。有两种主要类型的丝氨酸蛋白酶:胰凝乳蛋白酶/胰蛋白酶/弹性蛋白酶样和枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶,它们具有相同空间排列的催化性 His、Asp 和 Ser,但蛋白骨架完全不同。然而,超过 20 个家族的丝氨酸蛋白酶 (S1-S27) 已被鉴定,基于结构相似性和其他功能证据将它们分成 6 族类:SA、SB、SC、SE、SF 和 SG。胰凝乳蛋白酶/胰蛋白酶/弹性蛋白酶样家族丝氨酸蛋白酶被细分成两类。“大型”类(约 230 个残基)基本上包括哺乳动物酶,例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、激肽释放酶和凝血酶。“小型”类(约 190 个残基)包括细菌酶。

[0003] 催化性 His、Asp 和 Ser 的侧翼是底物 C 末端或“主要 (prime)”侧的称为 S1'、S2'、S3' 等以及 N 末端侧的称为 S1、S2、S3 等的底物氨基酸侧链残基结合袋。该术语记载于 Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding, Alan Fersht, 1999 (W. H. Freeman and Company) pages 40-43 and Brik et al, Org. Biomol. Chem., 2003, 1, 5-14。胰凝乳蛋白酶/胰蛋白酶/弹性蛋白酶样丝氨酸蛋白酶还可通过存在于 S1 袋中的残基进一步细分,如 Introduction to Protein Structure, Carl Branden and John Tooze, 1991 (Garland Publishing Inc) pages 231-241 中所述。细分物为胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白酶 (S1 袋中 Gly-226、Ser-189 和 Gly-216)、胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶 (S1 中 Gly-226、Asp-189 和 Gly-216) 和弹性蛋白酶样丝氨酸蛋白酶 (S1 中 Val-226 和 Thr-216), 其中残基编号依据标准的胰凝乳蛋白酶编号进行。胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶更倾向将 Lys 或 Arg 置于 S1 袋中的底物。

[0004] 丝氨酸蛋白酶具有共同的催化机制,特征在于使用胰凝乳蛋白酶编号体系在位置 195 处有一个特别有反应性的 Ser 残基。丝氨酸蛋白酶的实例包括胰蛋白酶、类胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、凝血酶、纤溶酶、激肽释放酶、补体 C1、顶体蛋白酶、溶酶体蛋白酶、蚕茧酶、 α -水解蛋白酶、蛋白酶 A、蛋白酶 B、丝氨酸羧肽酶 π 、枯草杆菌蛋白酶、尿激酶 (uPA)、因子 VIIa、因子 IXa 和因子 Xa。由于丝氨酸蛋白酶在调节种种生理过程中的作用,它们多年以来已被广泛研究,并且是药物靶向研究的主要焦点。

[0005] 涉及丝氨酸蛋白酶的过程包括血液凝固、纤维蛋白溶解、受精、发育、恶化、神经肌肉形成模式和发炎。公知的是,这些化合物可抑制多种血液蛋白酶,以及在组织中活化或释放的蛋白酶。还已知的是,丝氨酸蛋白酶抑制剂可抑制关键的细胞过程,例如粘附、迁移、自由基产生和凋亡。另外,动物实验表明,静脉内给药的丝氨酸蛋白酶抑制剂、变体或表达丝

氨酸蛋白酶抑制剂的细胞可提供抵御组织损伤的保护。

[0006] 丝氨酸蛋白酶激肽释放酶 (KLK) 被证明在正常的皮肤生理学中起到关键作用。KLK5 和 7 最初从角质层分离和克隆 (Hansson et al., 1994; Brattsand and Egelrud, 1999), 并被证明通过加工角质桥粒 (corneodesmosome) (即角质锁链素 (CDSN)、桥粘素 1 (DSG1) 和桥板素 1 (DSC1)) 的细胞外粘附蛋白参与皮肤脱屑 (Caubet et al., 2004; Descargues et al., 2005)。KLK5 被证明可切割所有 3 种组分, 而 KLK7 仅能够消化 CDSN 和 DSC1 (Caubet et al., 2004)。进一步的 IHC 研究支持提出的 KLK7 在脱屑中的作用 (Sondell et al., 1995)。体外研究证明了通过涉及 KLK5 和 14 的蛋白质水解级联的 KLK7 的潜在活化机制 (Brattsand et al., 2005)。同时, 已经报道了在 SC 中有不同水平的 KLK1、6、8、10、11 和 13 (Komatsu et al., 2005; Borgono et al., 2006), KLK1、5、6 和 14 被认为通过 DSG1 加工参与皮肤脱屑 (Borgono et al., 2006)。KLK14 被认为在皮肤重塑中起到主要作用, 原因是它贡献了 SC 层中大约一半的总胰蛋白酶样蛋白水解活性 (Stefansson et al., 2006)。KLK8 被认为在皮肤脱屑加工 DSG1 和 CDSN 中起到部分相同的作用 (Kishibe et al., 2006)。已在体外 (in vitro) 和体内 (in vivo) 证明了 KLK 通过调节 cathelicidin 肽在皮肤中有着额外的抗微生物功能 (Yamasaki et al., 2006)。

[0007] 已有报道称, 在大量皮肤病变中存在通过基因过表达或活性失调的 KLK 蛋白水解活性不平衡, 所述皮肤病变包括慢性瘙痒性皮炎、脱皮综合征、银屑病、特应性皮炎和内瑟顿综合征 (Netherton syndrome) (Komatsu et al., 2005b; Descargues et al., 2005; Hachem et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Hansson et al., 2002; Ekholm and Egelrud, 1999)。多种 KLK 的表达在银屑病、特应性皮炎、B 型脱皮综合征和特应性皮炎的慢性损伤中显著上调 (Komatsu et al., 2005b; Komatsu et al., 2006; Hansson et al., 2002)。已经证明, 患有内瑟顿综合征 (一种常染色体隐性皮肤病变) 的患者在编码 LEKTI 的 SPINK5 基因中出现了阅读框偏移和无义突变 (Chavanas et al., 2000; Komatsu et al., 2002; Chavanas et al., 2000; Sprecher et al., 2001), LEKTI 为具有对抗多种 KLK (包括 KLK5、6、7、13 和 14) 的活性的丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Borgono et al., 2006; Egelrud et al., 2005; Deraison et al., 2007)。这类基因缺陷会导致抑制结构域的缺失 (Chavanas et al., 2000; Sprecher et al., 2001)。

[0008] 还感兴趣的是, 激肽释放酶可能通过活化蛋白酶活化受体 (PAR) 参与脱屑型病变的皮肤炎症。PAR 1-4 为 G 蛋白偶联受体, 被包括激肽释放酶在内的多种蛋白酶活化。特别感兴趣的是 PAR2, 原因是它通过胰蛋白酶切割被活化, 并且与组织激肽释放酶共存于皮肤组织中。在特应性皮炎和内瑟顿综合征患者的皮肤损伤中, PAR2 受体出现过表达并且与人组织激肽释放酶共存 (Descargues et al., 2006)。这导致了这样的假设, 即这类 KLK-PAR 通路参与这些疾病的发病机制, 并且 KLK 经 PAR2 活化可在这些皮肤病变中诱导炎症。

[0009] Oikonomopoulou et al. (2006) 最近的体外和体内研究已证明, PAR 活性可以被活性 KLK5、6 和 14 靶向。KLK5 和 KLK6 被发现可活化 PAR2, 而 KLK14 被报道可失活 PAR1 以及活化 PAR2 和 PAR4。其他的报道表明了 PAR1 或 PAR2 在不同细胞类型中被 KLK1、2、4、5、6 和 14 活化 (Mize et al., 2008; Stefansson et al., 2008; Vandell et al., 2008)。

[0010] 对皮肤学家和化妆师来说, PAR2 受体是有吸引力的研究靶标, 这是由于它们涉及皮肤炎症、细胞增殖、肿瘤抑制、皮肤色素沉着和皮肤潮湿。激肽释放酶作为 PAR2 受体的

激活剂,正受到研究上文提及的皮肤过程的研究者越来越多的关注。大豆源的天然非变性胰蛋白酶抑制剂被用作靶向皮肤色素沉着、UV 暴露和皮肤潮湿的化妆产品的成分。大豆源的豆种子 (soy seed) 和豆浆分别含有大豆胰蛋白酶抑制剂 (STI) 和包曼 - 毕尔克抑制剂 (Bowman-Birk inhibitor, BBI) (Paine et al., 2001)。这些产品的所需效应归因于导致 PAR2 活化被阻断的胰蛋白酶抑制作用。已经证明 KLK5 和 KLK7 在 UVB 辐照下过表达,同时 LEKTI 表达降低,这表明了这些皮肤激肽释放酶在 UVB 应激下在角质层脱屑中的作用 (Nin M et al., 2008)。

[0011] 已被提出的是, STI 可减少 UV 光诱导的皮肤癌,原因是外用 STI 可停止长期暴露 UVB 的小鼠中的肿瘤进展 (Huang et al., 2004)。已提出,包含天然大豆提取物的产品可通过激肽释放酶抑制来阻断 PAR2 活化。STI 已经被证明可高效率地抑制胰蛋白酶样 KLK5 和 14 (Brattsand et al., 2005)。已经报道了干燥皮肤的上层 SC 中的 KLK5 和 7 表达降低,以及 UV 辐射后 KLK 活性升高 (Voegeli et al., 2007)。

[0012] 丝氨酸蛋白酶抑制剂还已被预测可能在多个临床领域疾病的治疗中具有有益用途,所述临床领域例如肿瘤学、神经病学、血液学、肺医学、免疫学、炎症和传染性疾病。丝氨酸蛋白酶抑制剂还可能有助于如下疾病的治疗:血栓性疾病、哮喘、肺气肿、肝硬化、关节炎、癌、黑色素瘤、再狭窄、动脉粥样硬化、创伤、休克和再灌注损伤。有用的综述参见 Expert Opin. Ther. Patents (2002), 12 (8)。丝氨酸蛋白酶抑制剂公开于美国公布的专利申请 US 2003/0100089 和 2004/0180371, 以及美国专利 6,784,182、6,656,911、6,656,910、6,608,175、6,534,495 和 6,472,393。

[0013] 皮肤病例如接触性超敏反应、特应性皮炎、罕有遗传性皮肤病 (例如内瑟顿综合征) 和银屑病的特征在于超增殖性和炎症性皮肤反应。大量人群患有这些疾病。例如,特应性皮炎——一种遗传性慢性皮肤病——在美国影响大约 8 百万成年人和儿童。人们认为,包括遗传因素、环境因素和免疫因素在内的多因素的组合可能导致皮肤病。虽然大多数皮肤病不是致命的,但是它们大大影响了患有这些疾病的患者的生命质量。

[0014] 通常用于治疗皮肤病的含类固醇软膏或抗组胺剂经常会造成很大的副作用。例如,在长期使用时,外用或口服类固醇可使皮肤层变薄,造成骨质疏松并抑制儿童生长。还出现的情况是,类固醇应用终止后经常会出现损伤复发。

[0015] 因此需要开发改良的非类固醇剂,用在用于治疗皮肤病的治疗性方法、预防性方法或诊断方法中。本发明提供了用于治疗、诊断或预防皮肤病的改良且可靠的方法,包括向需要其的受试者给予治疗有效量的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

[0016] 这些目标以及从前述应明显看出的其他目标已被本发明实现。

发明内容

[0017] 本发明涉及治疗或预防皮肤病的方法,包括向哺乳动物给予包含重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂的药物组合物。

[0018] 还公开了丝氨酸蛋白酶抑制剂在制备用于治疗皮肤病的药剂中的用途。

[0019] 本发明的另一目标是治疗或预防皮肤病的试剂盒,所述试剂盒包含重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂的药物组合物。

[0020] 通过阅读后面的具体实施方式和随附的权利要求书,其他目标和优点对本领域技

术人员将是明显的,所述具体实施方式参考如下示例性附图进行。

附图说明

- [0021] 图 1 表示 hK2 蛋白酶抑制剂 MD 820 的 DNA 和蛋白序列。
- [0022] 图 2 表示 hK2 蛋白酶抑制剂 MD 62 的 DNA 和蛋白序列。
- [0023] 图 3 表示 hK2 蛋白酶抑制剂 MD 83 的 DNA 和蛋白序列。
- [0024] 图 4 表示 hK2 蛋白酶抑制剂 MD 67 的 DNA 和蛋白序列。
- [0025] 图 5 表示 hK2 蛋白酶抑制剂 MD 61 的 DNA 和蛋白序列。
- [0026] 图 6 表示 hK2 蛋白酶抑制剂 MD 518 的 DNA 和蛋白序列。
- [0027] 图 7 表示 hK2 蛋白酶抑制剂 MDCI 的 DNA 和蛋白序列。
- [0028] 图 8 表示野生型 ACT 的 DNA 和蛋白序列。
- [0029] 图 9 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 ACT-G1 的 DNA 和蛋白序列。
- [0030] 图 10 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 ACT-G1G 的 DNA 和蛋白序列。
- [0031] 图 11 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 ACT-C11 的 DNA 和蛋白序列。
- [0032] 图 12 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 ACT-C11G 的 DNA 和蛋白序列。
- [0033] 图 13 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 ACT-E5 的 DNA 和蛋白序列。
- [0034] 图 14 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 ACT-E8 的 DNA 和蛋白序列。
- [0035] 图 15 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 ACT-F11 的 DNA 和蛋白序列。
- [0036] 图 16 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 ACT-F3 的 DNA 和蛋白序列。
- [0037] 图 17 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 ACT-G9 的 DNA 和蛋白序列。
- [0038] 图 18 表示野生型 AAT 的 DNA 和蛋白序列。
- [0039] 图 19 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 AAT-G1 的 DNA 和蛋白序列。
- [0040] 图 20 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 AAT-G1G 的 DNA 和蛋白序列。
- [0041] 图 21 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 AAT-C11 的 DNA 和蛋白序列。
- [0042] 图 22 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 AAT-C11G 的 DNA 和蛋白序列。
- [0043] 图 23 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 AAT-E5 的 DNA 和蛋白序列。
- [0044] 图 24 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 AAT-E8 的 DNA 和蛋白序列。
- [0045] 图 25 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 AAT-F11 的 DNA 和蛋白序列。
- [0046] 图 26 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 AAT-F3 的 DNA 和蛋白序列。
- [0047] 图 27 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 AAT-G9 的 DNA 和蛋白序列。
- [0048] 图 28 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 AAT-G1V 的 DNA 和蛋白序列。
- [0049] 图 29 表示 hK14 蛋白酶抑制剂 AAT-C11D 的 DNA 和蛋白序列。
- [0050] 图 30 示出用于转基因 hKLK5 小鼠内瑟顿模型的皮肤损伤的分级体系。
- [0051] 图 31 示出在内瑟顿综合征小鼠模型上形成的皮肤损伤大小。在外用 2% 羟乙基纤维素 (Natrosol) (第 1 组, 对照) 或溶于 2% 羟乙基纤维素中的 MDPK67b (第 2 组) 后 1、15 和 28 天监测损伤大小和损伤级别。

具体实施方式

- [0052] 本发明涉及丝氨酸蛋白酶抑制剂在制备用于治疗皮肤病的药剂中的用途。丝氨酸

蛋白酶抑制剂的生物学活性片段也可用于制备所述药剂。

[0053] 胰凝乳蛋白酶超家族的一些丝氨酸蛋白酶（包括 t-PA、纤溶酶、u-PA 和血液凝固级联的蛋白酶）是除包含丝氨酸蛋白酶催化结构域还包含部分负责调节其活性的其他结构域的大分子 (Barrett, 1986 ;Gerard et al., 1986 ;Blasi et al., 1986)。重要的丝氨酸蛋白酶有胰蛋白酶样酶, 例如胰蛋白酶、类胰蛋白酶、凝血酶、激肽释放酶和因子 Xa。丝氨酸蛋白酶的靶标与诸如以下过程相关: 血液凝固、补体介导的水解、免疫应答、肾小球肾炎、疼痛感觉、炎症、胰腺炎、癌症、调节受精、细菌感染和病毒成熟。通过抑制对具体靶标有高专一性的丝氨酸蛋白酶, 可以在体内抑制很多生物学过程, 这可能对宿主有明显的作用。

[0054] 丝氨酸蛋白质酶抑制剂 (serpin) 包含多组蛋白质, 这些蛋白质形成已包含超过 100 个来自多种生物体 (例如病毒、植物和人) 的成员的超家族。丝氨酸蛋白酶抑制剂已演化超过 5 亿年, 在系统发生学中分成有抑制功能和非抑制功能的蛋白质 (Hunt and Dayhoff, 1980)。非抑制性丝氨酸蛋白酶抑制剂如卵清蛋白缺乏蛋白酶抑制活性 (Remold-O' Donnell, 1993)。丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员的主要功能似乎是中和过表达的丝氨酸蛋白质酶活性 (Potempa et al., 1994)。丝氨酸蛋白酶抑制剂在细胞外基质重塑、炎症反应的调节和细胞迁移中起作用 (Potempa et al., 1994)。

[0055] 丝氨酸蛋白酶抑制剂分成如下家族: 牛胰腺胰蛋白酶抑制剂 (Kunitz) 家族, 也被称为基础蛋白酶抑制剂 (Ketcham et al., 1978) ;Kazal 家族; 链霉菌属枯草杆菌蛋白酶抑制剂家族; 丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serpin) 家族; 大豆胰蛋白酶抑制剂 (Kunitz) 家族; 马铃薯抑制剂家族; 和包曼 - 毕尔克 (Bowman-Birk) 家族 (Laskowski et al., 1980 ;Read et al., 1986 ;Laskowski et al., 1987)。属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的丝氨酸蛋白酶抑制剂包括纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂 PAI-1、PAI-2 和 PAI-3 ;C1 酯酶抑制剂, α -2- 抗纤维蛋白溶素、contrapsin、 α -1- 抗胰蛋白酶、抗凝血酶 III、蛋白酶连接蛋白 I、 α -1- 抗胰凝乳蛋白酶、蛋白 C 抑制剂、肝素辅助因子 II 和生长激素调节蛋白 (Carrelletal., 1987 ; Sommeretal., 1987 ;Suzuki et al., 1987 ;Stump et al., 1986)。

[0056] 许多丝氨酸蛋白酶抑制剂具有较宽特异性, 能够抑制胰凝乳蛋白酶超家族的蛋白酶 (包括血液凝固丝氨酸蛋白酶) 和链霉菌属枯草杆菌蛋白酶超家族的丝氨酸蛋白酶 (Laskowski et al., 1980)。丝氨酸蛋白酶抑制剂对丝氨酸蛋白酶的抑制已被综述于 Travis et al. (1983)、Carrelletal. (1985) 和 Sprengers et al. (1987) 中。可获得大量完整抑制剂和切割形式的丝氨酸蛋白酶抑制剂 α -1- 抗胰蛋白酶的晶体学数据 (Read et al., 1986), 所述完整抑制剂包括 BPTI、Kazal、SSI、大豆胰蛋白酶和马铃薯抑制剂家族的成员。虽然这些丝氨酸蛋白酶抑制剂是具有不同大小和序列的蛋白质, 但是迄今为止研究的完整抑制剂都共同具有从所述分子表面伸出的特征环, 称为反应位点环, 该环包含所述同源丝氨酸蛋白酶的活性位点的识别序列 (Levin et al., 1983)。不同丝氨酸蛋白酶抑制剂中环的结构相似性是惊人的 (Papamokos et al., 1982)。每种抑制剂的特异性被认为主要是由紧邻丝氨酸蛋白酶对抑制剂的可能的切割位点氨基末端的氨基酸的特性确定。该氨基酸被称为 Pi 位点残基, 被认为可与丝氨酸蛋白酶活性位点的丝氨酸形成酰键 (Laskowski et al., 1980)。丝氨酸蛋白酶抑制剂是否拥有抑制功能强烈依赖于位于编码区羧基末端附近的反应位点环的铰链区中的共有序列。在所述反应位点环外部, 不同家族的丝氨酸蛋白酶抑制剂一般是结构上不相关的, 但 Kazal 家族和链霉菌属枯草杆菌蛋白酶家族的抑制剂

呈现出一些结构和序列的相似性。

[0057] 提供在本文中使用的如下定义,目的是使对本发明的理解更容易。

[0058] “a(一个)”或“an(一种)”是指“至少一种”或“一种或多种”。

[0059] 术语“包含”通常用于表示包括的意思,就是说允许存在一个或多个特征或组分。

[0060] 本文使用的术语“蛋白”、“多肽”、“多肽的”、“肽”和“肽的”或“肽链”在本文中可以互换使用,用于表示通过相邻残基的 α -氨基和羧基之间的肽键连接的一串氨基酸残基。

[0061] 丝氨酸蛋白酶抑制剂优选为重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂并选自 SEQID No 2、4、6、8、10、12 和 14,或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段。

[0062] 所述重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂还优选选自 SEQ ID No 39-59 或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段。

[0063] “氨基酸残基”是指本领域技术人员已知的任何氨基酸残基。这涵盖天然出现的氨基酸(包括例如,使用三字母代码表示的 Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val)以及稀有和/或合成氨基酸及其衍生物(包括例如 Aad、Abu、Acp、Ahe、Aib、Apm、Dbu、Des、Dpm、Hyl、McLys、McVal、Nva 等)。

[0064] 所述氨基酸残基或其衍生物可以是任意异构体,特别是任意手性异构体,例如 L-型或 D-型。

[0065] 氨基酸衍生物在此是指本领域中已知的任意氨基酸衍生物。例如,氨基酸衍生物包括可衍生自天然氨基酸的携带额外侧链(例如烷基侧链)和/或杂原子取代的的残基。

[0066] “生物学活性片段”是指与各自的底物活性位点序列在长度上共享至少 40% 氨基酸的序列。可以使用这些序列的条件是它们呈现与它们的天然来源序列相同的性质。这些序列优选与各自的底物活性位点序列在长度上共享超过 70%,优选超过 80%,特别是超过 90% 氨基酸。

[0067] 本发明还包括丝氨酸蛋白酶抑制剂序列的变体。术语“变体”是指具有在一定程度上不同于天然序列多肽的氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列是通过以下方式成为不同于所述天然序列的氨基酸序列:保守氨基酸置换,藉此一个或多个氨基酸被具有相同特征和构象作用的另一氨基酸置换。所述氨基酸序列变体在天然氨基酸序列的氨基酸序列中的某些位置处具有置换、缺失和/或插入。保守氨基酸置换在本文中定义为如下 5 组的一组中的置换:

[0068] I. 小的脂肪族、非极性或弱极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro、Gly

[0069] II. 极性、带正电荷残基:His、Arg、Lys

[0070] III. 极性、带负电荷残基及其酰胺:Asp、Asn、Glu、Gln

[0071] IV. 大的芳族残基:Phe、Tyr、Trp

[0072] V. 大的脂肪族非极性残基:Met、Leu、Ile、Val、Cys。

[0073] 本发明中应用的“给药”是指药物的、治疗的、诊断的药剂或组合物与受试者(优选人)的接触。

[0074] 术语“激肽释放酶”涉及腺体或组织激肽释放酶。腺体或组织激肽释放酶是丝氨酸蛋白酶亚家族,具有高度的底物特异性,并且在多种组织和生物流体中的表达不同。术语“激肽释放酶”在 20 世纪 30 年代第一次出现于文献中,当时在胰(胰在希腊语中是“Kallikreas”)分离物中发现了大量蛋白酶(Kraut et al. 1930, Werle 1934)。如今,激

肽释放酶被分成两组,血浆激肽释放酶和组织激肽释放酶,这两组激肽释放酶的分子量、底物特异性、免疫学特征、基因结构和所释放激肽的类型显著不同。

[0075] 激肽释放酶包含 15 种~ 25-30kDa 的同源单链的分泌型丝氨酸内肽酶的家族,有直系同源物存在于来自至少 6 个哺乳动物目的物种中。这些激肽释放酶是 hK2、hK3、hK2、hK5、hK6、hK7、hK8、hK9、hK10、hK11、hK12、hK13、hK14 和 hK15。拟被抑制的激肽释放酶优选选自 hK2、hK5、hK7 和 hK14。

[0076] 本文中使用的“疾病”是指多种原因(例如感染、遗传缺陷或环境应激)引起的生物体部位、器官或系统的病理状态,并且其特征在于可辨认的一组体征或症状。

[0077] 表皮已被证明可表达多种丝氨酸蛋白酶,包括激肽释放酶、尿激酶、纤溶酶、typtase 样酶和中性粒细胞弹性蛋白酶。这些丝氨酸蛋白酶参与皮肤中的多种活动,包括表皮细胞增殖、细胞分化、皮肤和脂质屏障平衡以及组织重塑。最重要的是,在最外皮肤层脱落(称为脱屑)之前,丝氨酸蛋白酶和其他酶对角质层(SC)角质桥粒的蛋白水解是至关重要的事件。再者,包括激肽释放酶、纤溶酶和尿激酶在内的蛋白酶活性增加参与到皮肤的炎症反应。炎性皮肤病的列表示于表 XX。

[0078] 还观测到蛋白酶活性增加,形式为对包括如紫外线辐照暴露和温度变化的环境因子的多种刺激的应激反应,或者形式为对不同表面活性剂的反应。

[0079] 多种激肽释放酶(特别是 hK5、hK7 和 hK14)是导致皮肤脱屑中的蛋白质水解级联的原因。通过复杂的抑制和活化过程对这些蛋白水解过程进行控制,并且其去调控可以造成严重的皮肤症。罕有遗传性疾病(内瑟顿综合征、脱皮综合征)以及较常见皮肤病如特应性皮炎或银屑病的特征在于至少部分地由激肽释放酶活性增加造成的皮肤脱屑增加。

[0080] 本发明还涉及丝氨酸蛋白酶在制备用于治疗或改善不良皮肤病症的化妆品或药妆品中的用途。丝氨酸蛋白酶抑制剂的生物学活性片段也可用于所述化妆品或药妆品中的制备。

[0081] “不良皮肤病症”在本发明中是指感染皮肤或皮肤外观的可能通常不将其看作是疾病的问题。

[0082] 本文使用的“化妆品”是用于提升或保护人皮肤外观的组合物。化妆品包括皮肤养护乳膏、洗剂、粉剂、香水、唇膏、指甲和趾甲上光剂、眼睛和面部化妆品、烫发剂、染发剂、头发喷雾剂和凝胶剂、除臭剂、婴儿产品、沐浴油、泡沫剂、沐浴盐、黄油和许多其它类型的产品。

[0083] “药妆品”是被认为具有类似药物益处的化妆品产品。一般标记为药妆品的产品实例包括抗衰老乳膏和保湿剂。药妆品可含声称的活性成分,例如维生素、植物化学品、酶、抗氧化剂和精油。

[0084] 本文使用的“皮肤病”涉及感染皮肤的病症。所述皮肤病通常选自表 XX。本发明优选适合于治疗皮肤病,例如特应性皮炎、接触性皮炎(变应性)、接触性皮炎(刺激性)、湿疹、银屑病、痤疮、表皮过度角化、棘层肥厚、表皮炎症、真皮炎症或搔痒症、酒渣鼻、内瑟顿综合征、A 型和 B 型脱皮综合征、遗传性鱼鳞病、化脓性汗腺炎和红皮病(全身性剥脱性皮炎)。所述皮肤病最优选选自内瑟顿综合征、特应性皮炎、银屑病和脱皮综合征。

[0085] 内瑟顿综合征(NS)是由 SPINK5(LEKTI)(皮肤激肽释放酶级联的一种主要抑制剂)中的突变造成的罕有常染色体隐性遗传性皮肤病。激肽释放酶活性增加已经被证明是

其临床症状的成因。NS(一种多系统鱼鳞病综合征)的特征在于鱼鳞病、红皮病、毛干缺陷和异位性特征。由皮肤的屏障功能严重受损引起的多发性感染非常常见。

[0086] NS 非常罕见,但可获得的关于频率的数据很少,这可能部分地由于难以鉴定 NS。如今,每百万人诊断出不超过 10 例。

[0087] 可选的治疗方法十分有限且是非治愈性的。它们主要集中在处理各种皮肤感染以及减少瘙痒和疼痛(例如皮质醇)。

[0088] 激肽释放酶(hK5、hK7、hK14)活性过大被证明是皮肤病变的症状的成因。天然激肽释放酶抑制剂(LEKTI)活性的降低可以由其他激肽释放酶抑制剂代替。

[0089] 令人惊奇的是,申请人已证明(例如在实施例 4 中),应用包括 MD67(SEQ ID N° 8)的丝氨酸蛋白酶抑制剂在小鼠模型(原位 hK5 过表达)中显著降低了症状的严重度,所述症状出现于未处理的皮肤病(例如 NS)模型中。所述症状的特征在于皮肤的严重脱皮,这一点归因于由成熟前桥粒蛋白的降解导致的角质桥粒的分裂和角质层脱离。这一点会造成皮肤屏障功能的严重丧失,导致严重的脱水、红斑和强擦伤。

[0090] 特应性皮炎(AD)是病因不详的瘙痒性疾病,它通常在婴儿早期开始并且以瘙痒、湿疹损伤和皮肤干厚为特征。AD 与其他特应性病(例如约 30%的患者中的哮喘、变态反应)相关,并且常见有皮肤感染。

[0091] 对 AD 的病理生理学了解很少。似乎有遗传成分。涉及 TH2 细胞异常的免疫缺陷被提出,并且蛋白酶活性的失调被发现参与该疾病。该失调被认为可造成角质层中屏障功能损坏,导致抗原进入,这会致使多种炎症细胞因子产生。在美国,儿童的患病率为 10-12%,成人 0.9%。在其他发达国家中,患病率高达 18%且还在增加,特别是在发达国家中。该疾病是慢性的,但大多数患者从童年期到成年期会有所好转。

[0092] 仍无治愈性疗法。根据症状严重程度,通常开出局部用类固醇、抗组胺剂和免疫调节剂或者抗生素、抗病毒剂和抗真菌剂的处方。

[0093] 银屑病是一种慢性病,它是非接触传染的并且通常呈现为发炎的皮肤水肿损伤,但也出现于口腔粘膜上。10%患者的关节也受到影响(关节炎)。红肿块与多种全身和环境因素包括应激事件或感染有关。银屑病有遗传倾向,并且有越来越多的自身免疫病变迹象的证据。蛋白酶(例如激肽释放酶)活性增加参与典型的皮肤脱屑过多。在美国,2-3%的人群患病,每年出现超过 200,000 新病例。每年大约 150 万患有银屑病关节炎的人就医,每年 4 万人死于银屑病相关原因。银屑病在其他国家的发病率类似,但取决于气候和人群的遗传情况(genetic heritage)。它不常见于热带和深肤色人中。

[0094] 目前,没有治愈性的疗法。根据症状严重程度可开出局部用皮质醇、煤焦油、角质软化剂或类视色素的处方。

[0095] 用于治疗目的的“哺乳动物”是指分类为哺乳动物的任何动物,包括人、家养和农场动物以及动物园动物、体育动物或宠物,例如狗、马、猫、奶牛、猴子等。哺乳动物优选是人。

[0096] “治疗”是指治疗性治疗和预防或防备措施。需要治疗者包括已经患有所述病变的治疗者,以及待防备所述病变的治疗者。因此,待治疗的哺乳动物在本文中可以被诊断为患有所述病变,或者可以对所述病变有倾向或易感。

[0097] 术语“受试者”是指人或其他哺乳动物患者,包括希望使用本发明的方法检查或治

疗的任何个体。然而,应理解“患者”不是自动地表示存在症状或疾病。

[0098] 短语“可药用的”是指这样的分子实体和组合物,即它们是生理耐受的,并且在被给予人时一般不产生变应性反应或类似的不良反应,例如反胃、头晕等。

[0099] 本文使用的术语“蛋白酶”是指一类识别分子并在所述分子中切割活化序列的酶。所述蛋白酶可以是切割内部肽键的内肽酶。或者,所述蛋白酶可以是从小肽或蛋白分子的N末端或C末端水解肽键的外肽酶。所述蛋白酶折叠成一种构象,以形成接受并切割所述活化序列的催化位点。

[0100] “抑制剂”是指优选通过结合激肽释放酶或丝氨酸蛋白酶来特异性抑制所述激肽释放酶或丝氨酸蛋白酶的多肽或化合物。

[0101] “反应性丝氨酸蛋白酶抑制剂环”、“反应位点环”或 RSL 是指出现于丝氨酸蛋白酶抑制剂中并参与与可能的靶蛋白酶相互作用的暴露的柔性反应位点环。从易切断键的氨基侧的残基开始离开所述键往外,残基通常称为 P1、P2、P3 等。所述易切断键后的残基称为 P1'、P2'、P3' 等。RSL 通常由 6-12 个氨基酸残基组成。

[0102] 本发明的“丝氨酸蛋白酶抑制剂”或丝氨酸蛋白酶抑制剂可选自 α -1 抗胰凝乳蛋白酶 (ACT)、蛋白 C 抑制剂 (PCI)、 α -1 抗蛋白质酶 (AAT)、人 α -1 抗胰蛋白酶相关蛋白前体 (ATR)、 α -2- 纤溶酶抑制剂 (AAP)、人抗凝血酶 -III 前体 (ATIII)、蛋白酶抑制剂 10 (PI10)、人胶原结合蛋白 2 前体 (CBP2)、蛋白酶抑制剂 7 (PI7)、蛋白酶抑制剂肝素辅因子 (leuserpin) 2 (HLS2)、人血浆蛋白酶 C1 抑制剂 (C1INH)、单核细胞 / 中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂 (M/NEI)、纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂 -3 (PAI3)、蛋白酶抑制剂 4 (PI4)、蛋白酶抑制剂 5 (PI5)、蛋白酶抑制剂 12 (PI12)、人纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂 -1 前体内皮型 (PAI-1)、人纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂 -2 胎盘型 (PAI2)、人色素上皮衍生因子前体 (PEDF)、蛋白酶抑制剂 6 (PI6)、蛋白酶抑制剂 8 (PI8)、蛋白酶抑制剂 9 (PI9)、人鳞状细胞癌抗原 1 (SCCA-1)、人鳞状细胞癌抗原 2 (SCCA-2)、T4- 结合球蛋白 (TBG)、Megsin、蛋白酶抑制剂 14 (PI14)、它们的片段、它们的分子嵌合体、它们的组合和 / 或它们的变体。

[0103] 由于大多数这些丝氨酸蛋白酶抑制剂具有不同的名称,本申请人给出了下表 I,总结它们的详细说明:

[0104] 表 I

[0105]

丝氨酸蛋白酶抑制剂	登记号	RSL 序列
PI 或 AAT、A1AT_人α-1-抗胰蛋白酶前体 (α-1 蛋白酶抑制剂) (α-1-抗蛋白质酶)	sp P01009 	GTEAAGAMFLE AIPMSIPPE
PIL 或 ATR、A1AU_人α-1-抗胰蛋白酶相关蛋白前体	sp P20848 	GTEATGAPHLEE KAWSKYQT
PLI 或 AAP、A2AP_人α-2-抗纤维蛋白溶素前体 (α-2-纤溶酶抑制剂) (α-2-PI) (α-2-AP)	sp P08697 	GVEAAAATSIAM SRMSLSSF

[0106]

AACT、AACT_人α-1-抗胰凝乳蛋白酶前体 (ACT)	sp P01011 	GTEASAATAVKI TLLSALVE
AT3、ANT3_人抗凝血酶-III 前体 (ATIII)	sp P01008 	GSEAAASTAVVI AGRSLNPN
PI10、BOMA_人 BOMAPIN (蛋白酶抑制剂 10)	sp P48595 	GTEAAAGSGSEI DIRIRVPS
CBP2、CBP2_人胶原结合蛋白 2 前体 (COLLIGIN 2)	sp P50454 	GNPFDQDIYGRE ELRSPKLF
PI7 或 PN1、GDN_人神经胶质衍生连接蛋白前体 (GDN) (蛋白酶连接蛋白 I) (PN-1) (蛋白酶抑制剂 7)	sp P07093 	GTKASAATTAILI ARSSPPW
HCF2、HEP2_人肝素辅助因子 II 前体 (HC-II) (蛋白酶抑制剂肝素辅助因子 2) (HLS2)	sp P05546 	GTQATTVTTVGF MPLSTQVR
C1NH 或 C1IN、IC1_人血浆蛋白酶 C1 抑制剂前体 (C1 INH)	sp P05155 	GVEAAAASAISV ARTLLVFE
ELANH2 或 PI2、ILEU_人白细胞弹性蛋白酶抑制剂 (LEI) (单核细胞/中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂) (M/NEI) (EI)	sp P30740 	GTEAAAATAGIA TFCMLMPE
PCI 或 PLANH3 或 PROCI、IPSP_人血浆丝氨酸蛋白酶抑制剂前体 (PCI) (蛋白 C 抑制剂) (纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂-3) (PAI3)	sp P05154 	GTRAAAATGTIF TFRSARLN
PI4 或 KST、KAIN_人激肽释放酶结合蛋白 (KALLISTATIN) 前体 (激肽释放酶抑制剂) (蛋白酶抑制剂 4)	sp P29622 	GTEAAAATTFAI KFFSAQTN
PI5、MASP_人 MASPIN 前体 (蛋白酶抑制剂 5)	sp P36952 	GGDSIEVPGARIL QHKDELN
PI12、NEUS_人神经丝氨酸蛋白酶抑制剂前体 (蛋白酶抑制剂 12)	sp Q99574 	GSEAAAVSGMIA ISRMAVLY
PAI1 或 PLANH1、sp P05121 PAI1_	sp P05121 	GTVASSSTAVIVS ARMAPEE

[0107]

人纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂-1 前体、内皮型 (PAI-1)		
PAI2 或 PLANH2、PAI2_人纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂-2, 胎盘型 (PAI-2) (单核细胞 ARG-丝氨酸蛋白酶抑制剂) (尿激酶抑制剂)	sp P05120	GTEAAAGTGGV MTGRTGHGG
PEDF、PEDF_人色素上皮衍生因子前体 (PEDF) (EPC-1)	sp P36955	GAGTTPSPGLQP AHLTFPLD
PI6 或 PTI、PTI6_人胎盘凝血酶抑制剂 (细胞质抗蛋白质酶) (CAP) (蛋白酶抑制剂 6)	sp P35237	GTEAAAATAAIM MMRCARFV
PI8、PTI8_人细胞质抗蛋白质酶 2 (CAP2) (CAP-2) (蛋白酶抑制剂 8)	sp P50452	GTEAAAATAVVR NSRCSRME
PI9、PTI9_人细胞质抗蛋白质酶 3 (CAP3) (CAP-3) (蛋白酶抑制剂 9)	sp P50453	GTEAAAASSCFV VAECCMES
SCCA1、SCC1_人鳞状细胞癌抗原 1 (SCCA-1) (蛋白 T4-A)	sp P29508	GAEAAAATAVV GFGSSPAST
SCCA2、SCC2_人鳞状细胞癌抗原 2 (SCCA-2) (LEUPIN)	sp P48594	GVEAAAATAVV VVELSSPST
TBG、THBG_人甲状腺素结合球蛋白前体 (T4 结合球蛋白)	sp P05543	GTEAAAVPEVEL SDQPENTF
MEGSIN	gi 4505149 ref NP_003775.1	GTEATAATGSNI VEKQLPQS
PI14、胰蛋白 (pancpin)、TSA2004	gi 3724282 dbj BAA33766.1	GSEAATSTGIHIP VIMSLAQ

[0108] 有利的是,本发明的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以为丝氨酸蛋白酶胰蛋白酶样酶并优选激肽释放酶的抑制剂。本发明的激肽释放酶抑制剂选自 hK2、hK3、hK4、hK5、hK6、hK7、hK8、hK9、hK10、hK11、hK12、hK13、hK14 或 hK15 抑制剂。激肽释放酶抑制剂优选选自 hK2、hK5、hK7 和 hK14 抑制剂。

[0109] 在所述激肽释放酶抑制剂为 hK2 的抑制剂的情况下,所述抑制剂可选自国际专利申请 PCT/IB2004/001040 中公开的那些抑制剂,该国际专利申请的内容通过引用的方式全

文纳入本文。本发明的激肽释放酶抑制剂优选可选自 MD820、MD62、MD61、MD67 和 MDCI。该抑制剂最优选为 MD67。本申请公开了蛋白酶的重组体抑制剂蛋白, 包含抑制性多肽序列和至少一条蛋白酶特异的底物-酶相互作用位点的多肽序列, 并且还公开了生产蛋白酶的重组体抑制剂蛋白的方法。所述重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂优选选自 SEQ ID No 2、4、6、8、10、12 和 14 或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段。

[0110] 作为本发明的丝氨酸蛋白酶抑制剂的实例, 本申请人意外地发现了如下表 II 中摘要叙述的蛋白酶 hK2 特异的 7 种新重组体抑制剂蛋白, 这些抑制剂是:

[0111] 表 II

	重组体抑 制剂	别名	SEQ ID N° (蛋白)
	rACT_{8.20}	MD820	2
[0112]	rACT_{6.2}	MD62	4
	rACT_{8.3}	MD83	6
	rACT_{6.7}	MD67	8
	rACT_{6.1}	MD61	10
	ACT_{5.18}	MD518	12
	ACT_{PCI}	MDCI	14

[0113] 这些抑制剂蛋白已经通过以下方式获得: 修饰 α 1-抗胰凝乳蛋白酶 (rACT) 的 RSL 以改变该丝氨酸蛋白酶抑制剂的特异性, 已知 rACT 可抑制一大组人类的酶例如胰凝乳蛋白酶、肥大细胞糜酶 (chymase)、组织蛋白酶 G、前列腺激肽释放酶 hK2 和 PSA (hK3)。通过噬菌体展示技术选择作为酶 hK2 底物的肽序列 (如国际专利申请 PCT/IB2004/001040 中所阐述的) 已被用于替换 RSL 的易切断键和邻近氨基酸残基。重组体抑制剂通常用细菌生产并通过亲和色谱法纯化。

[0114] 另外, 本申请人还已发现, 以编码蛋白 C 抑制剂 (PCI) 的 RSL 的底物五肽替换位于 rACTWT 的 RSL 结构中的残基 P3-P3', 会导致能够抑制激肽释放酶 hK2 和 hK3 的重组体抑制剂 (MDCI) 的产生。

[0115] 在所述激肽释放酶抑制剂为 hK14 的抑制剂的情况下, 所述抑制剂可选自国际专利申请 PCT/IB2005/000504 中公开的那些抑制剂, 该国际专利申请的内容通过引用的方式全文纳入本文。所述重组体抑制剂优选可以选自 AAT_{G1}、AAT_{G1G}、AAT_{C11}、AAT_{C11G}、AAT_{E5}、AAT_{E8}、AAT_{F11}、AAT_{F3}、AAT_{G9}、ACT_{G1}、AcT_{G1G}、ACT_{C11}、ACT_{C11G}、ACT_{E5}、ACT_{E8}、ACT_{F11}、ACT_{F3}、ACT_{G9}、ACT_{G1V}、ACT_{WT} 和 ACT_{C11D}。hK14 蛋白酶的所述抑制剂蛋白优选为 AAT_{G1}、AAT_{G1G}、AAT_{C11}、AAT_{C11G}、AAT_{E5}、AAT_{E8}、AAT_{F3}、AAT_{G9}、ACT_{G1G}、ACT_{C11}、ACT_{C11G}、ACT_{E5}、ACT_{E8}、AGT_{F11}、ACT_{F3}、ACT_{G9}、ACT_{G1V} 或 ACT_{C11D}。

[0116] 本申请公开了 hK14 蛋白酶的重组体抑制剂蛋白, 包含抑制性多肽序列和至少一条所述 hK14 蛋白酶特异的底物-酶相互作用位点的多肽序列。hK14 蛋白酶的所述重组体

抑制剂蛋白在生理条件下优选具有：

[0117] i) 孵育至少 4 小时后等于或小于 11.7 的抑制的化学计量 (SI)，

[0118] ii) 至少 $7,500\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的结合速率 (K_a)，

[0119] iii) 孵育至少 30 分钟后 100% 的活性抑制。

[0120] 另外，所述蛋白酶抑制剂的抑制性多肽序列还可选自半胱氨酸蛋白酶，原因是现在在丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制半胱氨酸蛋白酶的大量有充分文献记录的实例 (Gettins P. G. W., 2002 “Serpins structure, mechanism, and function” in Chem. Rev, 102, 4751-4803)。这些实例包括丝氨酸蛋白酶抑制剂鳞状细胞癌抗原 1 对组织蛋白酶 K、L 和 S 的抑制， α -1 抗胰凝乳蛋白酶对激素原硫醇蛋白酶的抑制，以及病毒丝氨酸蛋白酶抑制剂 crmA 对包括半胱天冬酶 1 (白细胞介素 1 β 转换酶)、半胱天冬酶 3 和半胱天冬酶 8 的半胱天冬酶 (caspase) 家族成员的抑制、人丝氨酸蛋白酶抑制剂 PI9 对半胱天冬酶 1、4 和 8 的抑制。

[0121] 所述丝氨酸蛋白酶抑制剂通常为重组体抑制剂蛋白。因此，当重组技术被应用于制备丝氨酸蛋白酶抑制剂时，优选使用编码所述多肽的核酸分子或其片段。

[0122] 因此，本发明还涉及编码上文所述丝氨酸蛋白酶抑制剂的纯化和分离的 DNA 序列。

[0123] 根据本发明，“纯化和分离的 DNA 序列”是指编码本发明的蛋白酶的重组体抑制剂蛋白的核酸分子或者编码蛋白酶的这类重组体抑制剂蛋白的核酸将处的状态。核酸将不含或基本不含其在天然情况下结合的物质，例如在其天然环境或者在其被制备（如细胞培养）——此时所述制备方法是通过在体外或者体内实施的重组 DNA 技术来进行的——的环境中与所述核酸一块出现的多肽或核酸。

[0124] 可用于本文中的 DNA 为任何多脱氧核糖核苷酸序列，包括例如双链 DNA、单链 DNA、其中一条链或两条链由 2 个或多个片段组成的双链 DNA、其中一条链或两条链具有连续磷酸二酯主链的双链 DNA、含一个或多个单链部分和一个或多个双链部分的 DNA、其中 DNA 链完全互补的双链 DNA、其中 DNA 链仅部分互补的双链 DNA、环状 DNA、共价闭合的 DNA、线性 DNA、共价交联的 DNA、cDNA、化学合成的 DNA、半合成的 DNA、生物合成的 DNA、天然分离的 DNA、酶消化的 DNA、剪切的 DNA、标记的 DNA（如放射性标记的 DNA 和荧光染料标记的 DNA）、含一种或多种非天然出现核酸类型的 DNA。

[0125] 编码所述丝氨酸蛋白酶抑制剂的 DNA 序列或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段可通过标准化学技术（例如磷酸三酯法）合成，或者经自动合成方法和 PCR 方法合成。

[0126] 编码本发明的丝氨酸蛋白酶抑制剂的纯化和分离的 DNA 序列还可通过酶技术产生。因此，在预定识别序列处切割核酸分子的限制性内切酶可用于从含所述核酸序列（例如编码重组体抑制剂蛋白或其片段的 DNA（或 RNA））的较大核酸分子中分离核酸序列。

[0127] 本发明还涵盖多核糖核苷酸 (RNA) 形式的核酸，包括例如单链 RNA、双链 RNA、其中一条链或两条链由 2 个或多个片段组成的双链 RNA、其中一条链或两条链具有连续磷酸二酯主链的双链 RNA、含一个或多个单链部分和一个或多个双链部分的 RNA、其中 RNA 链完全互补的双链 RNA、其中 RNA 链仅部分互补的双链 RNA、共价交联的 RNA、酶消化的 RNA、剪切的 RNA、mRNA、化学合成的 RNA、半合成的 RNA、生物合成的 RNA、天然分离的 RNA、标记的 RNA（如

放射性标记的 RNA 和荧光染料标记的 RNA)、含一种或多种非天然出现核酸类型的 RNA。

[0128] 编码丝氨酸蛋白酶抑制剂的纯化和分离的 DNA 序列选自 SEQ ID N° 1、SEQ ID N° 3、SEQ ID N° 5、SEQ ID N° 7、SEQ ID N° 9、SEQ ID N° 11、SEQ ID N° 13、SEQ ID N° 16 至 SEQ ID N° 37。

[0129] 本发明还包括前述序列的变体,这是通过以下方式而不同于参考序列的核苷酸序列:保守核苷酸置换,藉此一个或多个核苷酸被具有相同性质的另一核苷酸替换。

[0130] 本发明还涵盖了编码丝氨酸蛋白酶抑制剂的纯化和分离的 DNA 序列在制备用于治疗皮肤病的药剂中的用途。

[0131] 或者,本发明的激肽释放酶抑制剂或丝氨酸蛋白酶抑制剂包含可检测的标记物,或者可结合于可检测的标记物以形成可检测的复合物。

[0132] “可检测的标记物”是用于诊断目的的可检测的分子或检测部分,例如具有具体结合性质的酶或肽,如链酶亲和素或辣根过氧化物酶。检测部分还包括化学部分,例如可以通过结合于特定同族可检测部分(如标记的抗生物素蛋白)进行检测的生物素。

[0133] 可检测的标记物优选包括荧光标记物 and 在本领域中通常用于 MRI-CT 成像的标记物。多种荧光材料是已知的,并且可用作标记物。它们包括例如荧光素、罗丹明、金胺、得克萨斯红、AMCA 蓝和萤光黄。

[0134] 本发明的激肽释放酶抑制剂或丝氨酸蛋白酶抑制剂可携带作为检测部分的放射性标记物,例如同位素 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{121}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{67}Cu 、 ^{225}Ac 、 ^{213}Bi 、 ^{99}Tc 和 ^{186}Re 。如果使用放射性标记物,那么可以利用已知的现有计数方法来鉴定并定量具体的结合数目。

[0135] 在标记物为酶的情况下,检测可以通过现有技术中已知的任何目前使用的比色技术、分光光度技术、荧光分光光度技术,安培测定技术或气体测量技术完成。

[0136] 放射性标记物可用于体外诊断技术、离体(ex vivo)及体内放射成像技术中。在又一方面中,放射性标记物可用于放射免疫引导的手术技术中,其中它们在手术之前、过程中或之后可识别并指示癌细胞、前癌细胞、肿瘤细胞和过度增殖细胞的存在和/或位置,以除去这类细胞。

[0137] 在体内成像的情况下,本发明的标记物可缀合于成像剂而非放射同位素,所述成像剂包括但不限于磁共振成像增强剂。螯合基团的实例包括 EDTA、卟啉、多胺冠醚和多胍。

[0138] 顺磁离子的实例包括钆、铁、锰、镧、铈、铟、铪、铪。

[0139] 本发明还涉及包含作为活性剂的本文描述的丝氨酸蛋白酶抑制剂的药物组合物,所述丝氨酸蛋白酶抑制剂任选与一种或多种可药用载体结合。

[0140] 优选将作为药物组合物的本发明组合物经任何合适途径给予需要治疗的患者,通常是通过注入至血流或 CSF,或者直接注入至疾病位点或该位点附近。精确剂量将依赖于多种因素,包括所述组合物是用于诊断、预后、预防,还是用于治疗;(例如脱屑的)大小和位置;所述组合物的精确性质;以及连接于所述激肽释放酶抑制剂或所述丝氨酸蛋白酶抑制剂的可检测或功能性标记物的性质。

[0141] 本发明的药物组合物包含作为活性物质的药物有效量的所述组合物,所述组合物任选与可药用的载体、稀释剂和佐剂结合。

[0142] “药物有效量”是指这样的化学物质或化合物,即其在被给予人或动物生物体时会

诱导可检测的药理效应和 / 或生理效应。

[0143] 所述多肽的剂量单位的药物有效量范围通常为每 kg 体重待治疗患者 0.001ng-100 μ g。

[0144] 所述药物组合物可包含一种或多种可药用的载体、稀释剂和佐剂。

[0145] 有利于将所述活性化合物加工成可药用制剂的合适载体、稀释剂和佐剂的应用剂量和浓度对接受者是无毒的,包括缓冲物,例如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;包括抗坏血酸和蛋氨酸在内的抗氧化剂;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁基醇或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如甲基对羟基苯甲酸酯或丙基对羟基苯甲酸酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;及间甲酚);低分子量(少于大约 10 个残基)多肽;蛋白,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖,包括葡萄糖、甘露糖、羟乙基纤维素(**Natrosol[®]**)或糊精;螯合剂,如 EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反荷离子,如钠;金属复合物(例如 Zn-蛋白复合物);以及 / 或者非离子型表面活性剂,如**TWEEN[®]**、**PLURONICS[®]**或聚乙二醇(PEG)。

[0146] 所述药物组合物的给药形式可以是全身性的或局部的。例如,这类组合物的给药可以为多种肠胃外途径,例如皮下途径、静脉内途径、真皮内途径、肌肉内途径、腹膜内途径、鼻内途径、经皮途径、含服途径或者经植入装置,并且还可以通过蠕动工具送递。

[0147] 本文所述的药物组合物还可以结合至或浸渗至可生物吸收的基质中,所述基质以基质悬液、凝胶剂或固体支持物的形式给药。另外,所述基质可以包括生物聚合物,如**Natrosol[®]**。

[0148] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质,这些基质为成形制品例如薄膜或微囊剂的形式。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚乙烯醇)、聚交酯(美国专利 No. 3,773,919)、L-谷氨酸和[γ]乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 LUPRON DEPOT[™](乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球)以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0149] 用于体内给药的制剂必须是无菌的。该目的可以方便地实现,例如利用过滤通过无菌过滤膜。

[0150] 应理解的是,本发明组合物的合适剂量将取决于接受者的年龄、性别、健康和体重,(如果有的话)并行疗法的类型和所需效果的性质。

[0151] 合适的剂型将取决于疾病、抑制剂和给药模式;可能的剂型包括片剂、胶囊剂、锭剂、牙科糊剂、栓剂、吸入剂、溶液、软膏剂、肠胃外贮库剂。

[0152] 由于本发明还涵盖对(例如所述抑制剂的)氨基酸的氨基酸修饰,这可用于将所述抑制剂交联于不溶于水的基质或其他大分子载体,以增加溶解性、吸附性和通过血脑屏障的通透性。这类修饰是本领域中熟知的,并且亦或会消除或减弱所述肽的任何可能的不利副作用等。

[0153] 本发明的另一个主旨是提供一种在哺乳动物中诊断、预后、预防或治疗皮肤病的试剂盒,所述试剂盒包含重组体丝氨酸蛋白酶,以及任选的试剂和 / 或使用说明书。

[0154] 本发明的试剂盒还可包含单独的药物剂型,所述药物剂型包含其他的药物组合物

及其结合物。

[0155] 所述试剂盒一般包括容器以及贴在所述容器上或随所述容器提供的标签或包装说明书。合适的容器包括,例如瓶子、玻璃罐、注射器等。所述容器可由多种材料例如玻璃或塑料制成。所述容器装有有效治疗病症的组合物,并且可具有无菌入口(例如所述容器可以是静脉内溶液袋或具有可以通过皮下注射针头穿透的塞子的小瓶)。所述标签或包装说明书标明了可用所述组合物治疗的首选病症,例如癌症。

[0156] 可选地或额外地,所述试剂盒还可包含第二个(或第三个)容器,其含有可药用缓冲物,例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格溶液和右旋糖溶液。它还可包含根据商业和用户观点来看需要的其他材料,包括其他缓冲物、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0157] 本发明还公开了本发明的组合物作为药理学工具在开发和标准化用于在哺乳动物中诊断、预后、预防或治疗皮肤病的体外和体内测试系统中的用途。

[0158] 本发明还涵盖了用于在组织样品中诊断、预后、预防或治疗皮肤病的检测测定法,包括将所述组织样品与本发明的组合物相接触,确定并测量检测标记物的量并且将该量与所述组织样品中存在或不存在疾病相关联。

[0159] 本发明的再一个目标是提供一种用于杀死表达激肽释放酶分子的皮肤细胞的方法,包括将所述细胞与本发明的组合物相接触,目的是杀死所述细胞,破坏或防止表达激肽释放酶分子的细胞的存活。

[0160] 本发明的目标还是提供一种抑制表达丝氨酸蛋白酶特别是激肽释放酶分子的皮肤细胞的方法,包括将所述皮肤细胞与本发明的组合物相接触。

[0161] 本发明的再一个目标是提供一种含本文描述的丝氨酸蛋白酶抑制剂或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段的化妆品组合物,以及该组合物用于改善不利皮肤病症的用途。

[0162] 所述丝氨酸蛋白酶抑制剂优选为本发明的重组体抑制剂蛋白。

[0163] 所述丝氨酸蛋白酶通常选自激肽释放酶、纤溶酶、胰凝乳蛋白酶(Chtr)、尿激酶(uPA)、类胰蛋白酶、中性粒细胞弹性蛋白酶(HNE)和/或它们的结合物。

[0164] 所述激肽释放酶优选选自 hK2、hK5、hK7、hK14 和/或它们的结合物。

[0165] 本发明还提供了丝氨酸蛋白酶抑制剂或者其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的生物学活性片段在制备用于改善不利皮肤病症的化妆品组合物中的用途。

[0166] 本领域技术人员应了解,本文中描述的发明可以为具体描述之外的变化形式和改进形式。应理解的是,在不偏离本发明的主旨或本质特征的情况下,本发明包括所有这类变化形式和改进形式。本发明还单独地或总体地包括本说明书中提及或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物,并且包括所述步骤或特征的任何和所有组合或者任何两个或多个所述步骤或特征。因此在所有方面中,本公开内容应被认为是示例性的而非限制性的,本发明的范围由随附权利要求书表明,在等价意义和范围内的所有变化意欲被囊括于其中。

[0167] 本申请说明书通篇引用了多篇参考文献,每篇参考文献通过引用的方式全文纳入本文。

[0168] 通过参考以下的实施例可以更充分地理解前面的说明。然而,这些实施例为实施本发明的方法的示例,并不意欲限制本发明的范围。

[0169] 实施例**[0170] 实施例 1 :**

[0171] 使用噬菌体展示选择的底物开发对人 HK2 特异的重组体 ACT 抑制剂

[0172] 申请 PCT/IB2004/001040 (Université de Lausanne) 的内容通过引用的方式全文纳入本文。

[0173] 材料

[0174] 如前人所述 (Frenette G, Gervais Y, Tremblay RR, Dube JY. 1998 "Contamination of purified prostate-specific antigen preparations by kallikrein hK2" J Urol 159, 1375-8), 从人精液纯化 hK2 和 hK3 (PSA), 抗 -hK2 单克隆抗体和抗 -PSA 单克隆抗体获赠自加拿大拉瓦尔大学 (Laval University) 的 RR Tremblay 教授。人胰凝乳蛋白酶 (Chtr)、尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂 (uPA)、人激肽释放酶 hK1、人血浆激肽释放酶 (PK)、人中性粒细胞弹性蛋白酶 (HNE) 和市售的 ACT (人血浆 α 1- 抗胰凝乳蛋白酶) 购自 Calbiochem。Z-Phe-Arg-AMC、Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC、Z-Gly-Gly-Arg-AMC、MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC 购自 Calbiochem。如以前的描述 (Mahajan NP et al. 1999 "Novel mutant green fluorescent protein protease substrates reveal the activation of specific caspases during apoptosis" Chem Biol 6, 401-9) 开发 CFP-TFRSA-YFP 荧光底物。人 α 1- 抗胰凝乳蛋白酶 (ACT) 的 cDNA 获赠自 Harvey Rubin 博士 (宾夕法尼亚大学, University of Pennsylvania)。

[0175] 定向诱变

[0176] 在将 ACT cDNA 亚克隆至 pQE-9 表达载体 (Qiagen, Germany) 并在 rACT_{WT} 的 N 末端导入 His₆ 标签后, 将 2 个限制位点 Sac II 和 Mlu I 分别引入 RSL 结构域的 P1 密码子上游 18bp 和下游 18bp 处。这些位点的形成通过沉默突变, 使用寡核苷酸 5'-GTGATTTTGACCGCGGTGGCAGCAG-3' (对于 Sac II) 和 5'-GCACAATGGTACGCGTCTCCACTAATG-3' (对于 Mlu I 位点), 并依照 Stratagene 提供的 quickchange 诱变方案。

[0177] 底物噬菌体展示文库的构建

[0178] 使用改良的 pH0508b 噬菌粒 (Lowman et al. 1991 "Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display" Biochemistry 12, 10832-8) 形成底物噬菌体文库。所述构建体包含 His₆ 标签, 所述 His₆ 标签位于在 M13 基因 III 的羧基端结构域 (密码子 249-406) 之前富含 Gly-Gly-Gly-Ser 重复区域的任一端处。随机五聚体通过以下方式形成: PCR 延伸具有位于简并密码子两侧合适限制位点的模板寡核苷酸: 5' TGAGCTAGTCTAGATAGGTGGCGGTNNSNNSNNSNNSGCGTCGACGTCGGTCATAGCAGTCGCTGCA-3' (其中 N 为任意核苷酸, S 为 G 或 C), 使用的是对应于侧翼区的 5' 生物素标记引物: 5' TGAGCTAGTCTAGATAGGTG-3' (SEQ ID No 83) 和 5' -TGCAGCGACTGCTATGA-3' (SEQ ID No 84)。

[0179] 将 PCR 模板如以前的描述 (Smith G. P, Scott J. K. 1993 "Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage" Methods Enzymol. 217, 228-57) 消化并纯化, 插入至 XbaI/SalI 消化的 pH0508b 载体中, 并电穿孔至 XL1-Blue (F-) 中。该文库的范围通过将少量的所述转化细胞铺板于含氨苄西林和四环素 (分别为 100 和 15 μ g $\cdot$ mL⁻¹) 的 Luria-Bertani 板上确定的转化率进行估计。将剩余的转化细胞通过以下方式用于制备

噬菌体文库：通过以给出 100 个蚀斑形成单位 (p. f. u.)/mL 的感染复数的浓度加入 M13K07 辅助噬菌体孵育过夜。从上清液收集噬菌体并通过聚乙二醇沉淀纯化。任意选择它们中的 200 个克隆用于测序，以验证所述文库的随机性。

[0180] 噬菌体展示的五肽文库筛选

[0181] 用 hK2 对该新的五肽文库进行 8 轮筛选。将 100 微升偶联于琼脂糖珠的 Ni^{2+} -次氨基三乙酸 (Ni^{2+} -次氨基三乙酸树脂) 以 10mL 含 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA 的 NaCl/P_i 洗涤。将噬菌体颗粒 (10^{11}) 加入经平衡的 Ni^{2+} -次氨基三乙酸树脂中，并在 4°C 下轻轻搅拌使之结合 3 小时。随后将所述树脂洗涤 ($\text{NaCl}/\text{P}_i/\text{BSA}$ $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、5mM 咪唑、0.1% 吐温 20) 以除去未结合的噬菌体，然后在 NaCl/P_i 中平衡。在 37°C 下，将所述底物噬菌体暴露于 27nM (终浓度) 的 hK2 达 45 分钟。还进行了无蛋白酶的对照选择。将释放于上清液中的经切割噬菌体使用 XL1-Blue 大肠杆菌扩增，然后用于随后的多轮选择。在 8 轮淘选 (panning) 后，从第 5 轮、第 6 轮和第 8 轮选择中挑选出约 15 个单个克隆，分离质粒 DNA 并对编码所述底物的区域进行测序。

[0182] 重组体野生型 ACT 及其变体的构建和表达

[0183] 对应于在 P3 和 P3' 之间的位置中的反应位点环变化 (见下文表 III) 的 6 种变体通过以下模板寡核苷酸的 PCR 延伸形成：rACT_{8,20}, 5'-TACCGCGGTCAAAATCACCTCCGTTCTCGAGCAGTGGAGACGCGT GA-3' (SEQ ID No 61)；rACT_{6,3}, 5'-TACCGCGGTCAAAATCACAGGAGGTCTATCGATGTGGAGACGCGTGA-3' ((SEQ ID No 62)；rACT_{8,3}, 5'-TACCGCGGTCAAAATCAGGGGAGATCTGAGTTAGTGGAGACGCGTGA-3' (SEQ ID No 63)；rACT_{6,7}, 5'-TACCGCGGTCAAAATCAAGCTTAGAACAACATTAGTGGAGACGCGTGA-3' ((SEQ ID No 64)；rACT_{6,1}, 5'-TACCGCGGTCAAAATCATGACAAGATCTAACTTAGTGGAGACGCGTGA-3' (SEQ ID No 65)；rACT_{5,18}, 5'-TACCGCGGTCAAAATCACCGAGCGTGTCTCGCCCGTGAGAGACGCGTGA-3' (SEQ ID No 86)，

[0184] (其中下划线序列编码反应位点环中新的切割位点)，使用了对应于侧翼区的引物：5'-TACCGCGGTCAAAATC-3' (SEQ ID No 67) 和 5'-TCACGCGTGTCCAC-3' (SEQ ID No 68)。将 PCR 产物以 Sac II 和 Mlu I 限制性内切酶消化，然后亚克隆至消化的 rACT_{WT} 构建体中。重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂在 TG1 大肠杆菌菌株中产生。在 37°C 下将细胞培养于含 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄西林的 $2 \times \text{TY}$ 培养基 (每 L 中有 16g 胰蛋白胨、10g 酵母提取物、5g NaCl)，直至 $A_{600} = 0.5$ 。然后将异丙基硫代- β -半乳糖苷 (IPTG) 以 0.5mM 的终浓度加入，使得重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂在 16°C 下表达 16 小时。将来自 100ml 培养物的细胞通过离心收集，再悬浮于冷 PBS 中，然后通过弗氏压碎器 (french press) 以回收总的可溶性细胞质蛋白。通过离心除去细胞碎片，并且在 4°C 下将 Ni^{2+} -次氨基三乙酸亲和琼脂糖珠加入上清液，搁置 90 分钟，以结合重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂。随后将所述树脂以 50mM Tris (pH 8.0)、500mM NaCl、25mM 咪唑洗涤，并且将所结合的蛋白以 50mM Tris (pH 8.0)、500mM NaCl 和 150mM 咪唑洗脱 10 分钟。一旦完成纯化，就在 4°C 下将 rACT 相对于 50mM Tris (pH 8.0)、500mM NaCl、0.05% Triton X-100 透析 16 小时。每个纯化物的蛋白浓度通过 Bradford 测定法确定，并通过考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶的密度测定法 (Laemmli UK. 1970 "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" Nature 227, 680-5) 进行标准化。

[0185] 表 III

[0186] 重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂 α 1-胰凝乳蛋白酶抗体 (ACT) 及其变体的 RSL (反应性丝氨酸蛋白酶抑制剂环) 的比对

[0187]

丝氨酸蛋白酶抑制剂	选择的 ^a 底物肽	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5	P'6
rACT _{WT}		V	K	I	T	L	<u>L</u> *	S	A	L	V	E	T
rACT _{8.20}	LR↓SRA	V	K	I	T	<u>L</u>	<u>R</u> *	S	<u>R</u>	<u>A</u>	V	E	T
rACT _{6.2}	RR↓SID	V	K	I	T	<u>R</u>	<u>R</u> *	S	<u>I</u>	<u>D</u>	V	E	T
rACT _{8.3}	RGR↓SE	V	K	I	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>R</u> *	<u>S</u>	<u>E</u>	L	V	E	T
rACT _{6.7}	KLR↓TT	V	K	I	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>R</u> *	<u>T</u>	<u>T</u>	L	V	E	T
rACT _{6.1}	MTR↓SN	V	K	I	<u>M</u>	<u>T</u>	<u>R</u> *	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	V	E	T
ACT _{5.18}	ER↓VSP	V	K	I	T	<u>E</u>	<u>R</u> *	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	V	E	T

[0188] ^a 使用噬菌体展示的随机五肽文库由激肽释放酶 hK2 选择的底物肽。

[0189] 正常字体的残基与 rACT_{WT} 的相同, 黑体和下划线残基对应于重新定位于 ACT 变体的 RSL 中的底物肽。底物肽中可被 hK2 切断的键由 ↓ 标识, 丝氨酸蛋白酶抑制剂中可能的切割位点由 P1-P1' 残基之间的星号标记。

[0190] 抑制测定法和抑制的化学计量 (SI)

[0191] 确定了 rACT_{WT} 及其变体对 hK2 以及其他不同的酶的抑制作用的抑制的化学计量 (SI) 值。以比 hK2、PSA、hK1、胰凝乳蛋白酶 (Chtr)、血浆激肽释放酶 (PK)、尿激酶 (uPA) 和人中性粒细胞弹性蛋白酶 (HNE) 摩尔过量的 rACT (100 倍) 进行初始测试。在 25°C 下, 在反应缓冲物 (50mM Tris (pH 7.5)、150mM NaCl、0.05% Triton X-100、0.01% BSA) 中进行该反应 30 分钟 (对于 PSA 在 37°C 下进行 90 分钟), 并通过加入荧光底物 (对于 hK1、hK2 和 PK: Z-Phe-Arg-AMC; 对于 Chtr: Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC; 对于 uPA: Z-Gly-Gly-Arg-AMC; 对于 HNE: MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC; 以及对于 PSA: CFP-TFRSA-YFP) 测量残余的酶活性。将存在抑制剂下的酶活性与非抑制的反应相比较。对于出现抑制的反应, 通过孵育不同浓度的重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂确定 SI。使用活性分数 (抑制的酶反应的速率 / 非抑制的酶反应的速率) 相对于抑制剂与酶的摩尔比 ($[I_0]/[E_0]$) 的线性回归分析, 获得了对应于横坐标截距的抑制的化学计量。

[0192] 动力学

[0193] 使用进展曲线方法 (Morrison JF, Walsh CT. 1988 "The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors" Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 61, 201-301) 在拟一级反应条件下确定 hK2、胰凝乳蛋白酶、PK 和 HNE 与不同 rACT 相互作用的结合速率常数。在这些条件下, 将固定量的酶 (2nM) 与不同浓度的抑制剂

(0-800nM) 和过量的底物 (10 μ M) 混合。在 25℃ 下, 每个反应在反应缓冲物 (50mM Tris (pH 7.5)、150mM NaCl、0.05% Triton X-100、0.01% BSA) 中进行 45 分钟, 使用 FLx800 荧光 96 孔微板读数仪 (Biotek, USA) 测量产物形成速度。在该模型中, 抑制被认为在反应过程中是不可逆的, 酶活性进展表示为产物形成 (P), 以速率 (v_z) 开始, 并且随时间 (t) 以一级速率 (k_{obs}) 被抑制, k_{obs} 是仅依赖于抑制剂浓度的速率常数。

[0194] $P = (v_z/k_{obs}) \times [1 - e^{(-k_{obs}t)}]$ 等式 1

[0195] 对于每种抑制剂, 使用等式 1 通过数据的非线性回归计算四种不同浓度的抑制剂的 k_{obs} 。通过绘制 k_{obs} 相对于抑制剂浓度 [I] 的曲线, 确定二级速率常数 k' , 其等于该曲线的斜率 ($k' = \Delta k_{obs} / \Delta [I]$)。由于抑制剂和底物之间的竞争关系, 如下等式 2 被用于通过考虑底物浓度 [S] 和酶对底物的 K_m 校正二级速率常数 k' , 得到 k_a 。

[0196] $k_a = (1 + [S]/K_m) \times k'$ 等式 2

[0197] hK2 对 Z-FR-AMC、胰凝乳蛋白酶对 Suc-AAPF-AMC、PK 对 Z-FR-AMC 和 HNE 对 MeOSuc-AAPV-AMC 的 K_m 分别为 67 μ M、145 μ M、170 μ M 和 130 μ M。

[0198] 复合物形成和抑制剂降解的蛋白质印迹分析

[0199] 在 37℃ 下, 将激肽释放酶 hK2 与不同的重组体 ACT 以 100 : 1 的 [I]₀ : [E]₀ 比在 50mM Tris、200mM NaCl、0.05% Triton X-100 中孵育 3 小时。将蛋白样品在 95℃ 加热 5 分钟, 通过 SDS-PAGE (12% 丙烯酰胺 19 : 1T : C 比) 分离, 然后电印迹于 Hybond-ECL (Amersham Pharmacia) 硝酸纤维素上。使用小鼠抗 hK2 单克隆抗体和碱性磷酸酶缀合的山羊抗小鼠的二级抗体检测游离 hK2 和 hK2-ACT 复合物。蛋白质印迹使用 ECL 检测试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech) 显影。还在 25℃ (动力学条件) 下, 将 hK2 与 ACT_{8.3} 或 ACT_{6.7} 以 10 : 1 的 [I]₀ : [E]₀ 比在 50mM Tris、200mM NaCl、0.05% Triton X-100 中孵育 30 分钟。通过以下方式检测蛋白: 使用抗 His₆ 单克隆抗体进行蛋白质印迹, 然后以二抗和上文描述的方案进行检测。

[0200] 可溶性重组体野生型和变体 ACT 的生产

[0201] 将野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂 α 1-抗胰凝乳蛋白酶用于开发激肽释放酶 hK2 的特异抑制剂。位于 rACT_{WT} 的 RSL 结构中的残基 P3-P3' 被如上述通过噬菌体展示技术在先选择的底物五肽替换。表 IV 中所示的 6 个 rACT 变体已经被设计并且被构建。将底物肽中可剪切键依照 Leu-358-Ser-359 排列 (align) 到丝氨酸蛋白酶抑制剂的 RSL 中。rACT_{WT} 及其变体在大肠杆菌 TG1 中被表达为在 N 末端位置含 His 标签的融合蛋白。它们中的每个均在低温下产生, 使得蛋白主要以活性可溶形式积聚。在天然状态下纯化时, 产物水平在 1.0-2.5mg/L 之间变化。纯化的丝氨酸蛋白酶抑制剂 (例如变体 6.1 和野生型 ACT) 的纯度通过 SDS-PAGE 分析估计为超过 98%。

[0202] rACT 变体主要是激肽释放酶 hK2 特异的

[0203] 已对一组酶包括人中性粒细胞弹性蛋白酶、胰凝乳蛋白酶样 (Chtr、PSA 或 hK3) 和胰蛋白酶样 (hK2、hK1、PK、uPA) 蛋白酶进行筛选, 以确定 rACT 变体的抑制特异性 (表 IV)。

[0204] 表 IV

[0205] rACT_{WT} 及其变体的抑制谱

[0206]

	ACT _{8.20} (LR↓SRA) ^a	ACT _{6.2} (RR↓SID) ^a	ACT _{8.3} (RGR↓SE) ^a	ACT _{6.7} (KLR↓TT) ^a	ACT _{6.1} (MTR↓SN) ^a	ACT _{5.18} (ER↓VSP) ^a	ACT _{WT} (LL↓SA) ^a
	MD 820	MD 62	MD 83	MD 67	MD 61	MD518	
蛋白酶							
抑制% ^b							
hK2	95	100	100	100	100	73	0
Chtr	66	0	0	0	0	0	100
PK	54	100	0	36	100	0	0
HNE	30	0	0	0	60	0	15
PSA(hK3)	45	0	0	0	0	0	80
hK1	0	0	0	0	0	0	0
尿激酶	0	0	0	0	0	0	0

[0207] ^a 与 hK2 选择的底物肽对应的重组体 ACT 的 RSL (反应性丝氨酸蛋白酶抑制剂环) 中的切割氨基酸序列。

[0208] ^b 在 25℃ 下, 蛋白酶和丝氨酸蛋白酶抑制剂以 100 : 1 的 [I]₀/[E]₀ 比孵育 30 分钟 (对于 PSA 在 37℃ 下 90 分钟)。抑制百分数对应于 100 × (1 - (存在抑制剂的速率 / 非抑制对照的速率))。

[0209] 与过量抑制剂 (100 : 1 的 [I]₀/[E]₀) 孵育 30 分钟, hK2 被 rACT_{6.2}、rACT_{8.3}、rACT_{6.7} 和 rACT_{6.1} 完全抑制, 而 rACT_{8.20} 和 rACT_{5.18} 分别抑制了 95% 和 73% 的酶活性。在该条件下, 野生型 rACT 对 hK2 未显示抑制活性。这些变体中的 2 种 (rACT_{8.3} 和 rACT_{5.18}) 对 hK2 是特异的, 不抑制其他测试酶。其他两种变体 rACT_{6.7} 和 rACT_{6.2} 也抑制 PK, 分别达 36% 和 100%。和野生型 ACT 一样, 变体 rACT_{8.20} 抑制两种胰凝乳蛋白酶样蛋白酶 Chtr 和 PSA, 另外还抑制 PK 和 HNE。所述重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂中无一显示对抗激肽释放酶 hK1 和 uPA 的抑制活性。

[0210] 与野生型 ACT 相比, 变体 ACT 对 hK2 抑制的化学计量大大提高

[0211] 对于所有酶, 抑制的化学计量的确定是在生理条件的 pH 和离子强度下完成, 以确保最有价值的比较。重组体野生型 ACT 与胰凝乳蛋白酶得到的 SI 值为 2 (表 V), 这与以市购 ACT 在相似条件下得到的值相同 (数据未显示)。

[0212] 表 V

[0213] rACT_{WT} 及其变体与 hK2 和其他蛋白酶的反应的抑制的化学计量值和二级速率常数 (k_a) 的比较

[0214]

	ACT _{8.20}		ACT _{6.2}		ACT _{8.3}		ACT _{6.7}		ACT _{6.1}		ACT _{5.18}		ACT _{WT}	
	(LR↓SRA)		(RR↓SID)		(RGR↓SE)		(KLR↓TT)		(MTR↓SN)		(ER↓VSP)		(LL↓SA)	
	c		MD62		MD83		MD67		MD61		MD518		c	
	MD820		c		c		c		c		c			
	SI	(k _a) ^b	SI	k _a ^b	SI	k _a ^b	SI	k _a ^b	SI	k _a ^b	SI	k _a ^b	S	k _a ^b
蛋白酶	M ¹ S ⁻		M ¹ S ⁻		M ¹ S ⁻¹		M ¹ S ⁻		M ¹ S ⁻		M ¹ S ⁻		I	M ¹ S ⁻¹
	I		I				I		I		I			
hK2	105	1779	25	6261	34	2439	9	8991	19	3442	139	595	-	-
Chtr	134	905	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	61295
PK	150	424	18	6217	-	-	277	201	16	8024	-	-	-	-
HNE	334	158	-	-	-	-	-	-	159	1192	-	-	-	-

[0215] ^a 报告的 SI 值使用线性回归分析外推 I/E 比值确定。

[0216] ^b 丝氨酸蛋白酶抑制剂 - 蛋白酶反应的二级速率常数在如“实验步骤”中描述的拟一级或二级条件下测量。

[0217] ^c 与 hK2 选择的底物肽对应的重组体 ACT 的 RSL (反应性丝氨酸蛋白酶抑制剂环) 中 P3-P3' 残基的氨基酸序列。

[0218] -, 未检测到抑制活性。

[0219] 为了确定所有所述重组体变体的 SI 值, 本发明人已经在 25℃ 下将 hK2 (5nM) 与不同浓度 (6. 25-500nM) 的 rACT_{8.20}、rACT_{6.2}、rACT_{8.3}、rACT_{6.7}、rACT_{6.1}、rACT_{5.18}、rACT_{WT} 在反应缓冲液中孵育 30 分钟。hK2 的残余活性通过加入荧光底物 (10 μ M) Z-FR-AMC 测定。速率分数对应于抑制的酶的速率 (v_i) 与非抑制的对照的速率 (v_o) 的比。SI 使用线性回归分析外推 I/E 比值 (即 x 截距) 确定。

[0220] 与野生型 ACT 相比, 所有新构建的 ACT 变体均显示了更低的与 hK2 的 SI 值。这些变体中, rACT_{6.7}、rACT_{6.1} 和 rACT_{6.2} 对 hK2 的抑制的化学计量值最低 (分别为 9、19 和 25)。而 rACT_{6.2} 和 rACT_{6.1} 对于 PK 也有最低的 SI 值 (18 和 16), rACT_{6.7} 的 SI 要高的多 (277)。对 hK2 特异的两个重组体 rACT——rACT_{8.3} 和 rACT_{5.18}——具有分别为 34 和 139 的较高 SI 比。rACT_{8.20} 抑制剂对包括 hK2 的所有测试蛋白酶的 SI 值均超过 100。

[0221] 变体 ACT 与 hK2 形成稳定的复合体, 无抑制剂的降解

[0222] 在 37℃ 下, 将 hK2 与 rACT_{8.20}、rACT_{6.2}、rACT_{8.3}、rACT_{6.7}、rACT_{6.1}、rACT_{5.18} 和野生型 rACT 以 100 : 1 的 I : E 比孵育 3 小时。已经使用小鼠抗 hK2 抗体在还原条件下进行了对 rACT (rACT_{8.20}、rACT_{6.2}、rACT_{8.3}、rACT_{6.7}、rACT_{6.1}、rACT_{5.18} 和野生型 rACT) 与 hK2 的反应产物的蛋白质印迹分析, 以确定抑制剂在与该酶相互作用后的结局。当 hK2 与 ACT 变体孵育之时, 游离 hK2 (E) 完全消失, 形成共价复合体 (EI)。该共价复合体呈现出高稳定性, 原因是它在 16 小时的孵育时间中未断裂 (数据未显示)。野生型 ACT 较慢地抑制 hK2, 在孵育 3 小

时后 hK2 大多数未发生复合。以 hK2 测量的 SI 值升高并非是由于未形成复合体的 ACT 变体抑制剂的降解。

[0223] 再者,将 ACT_{8.3} 或 ACT_{6.7} 与 hK2 以 10 : 1 的 I : E 比在动力学条件 (在 25℃ 下 30 分钟) 下孵育。在还原条件下使用小鼠的抗 his 标签单克隆抗体通过蛋白质印迹分析复合体形成情况。所有抑制剂蛋白要么与 hK2 组成复合体,要么以未切割的形式存在,表明丝氨酸蛋白酶抑制剂-酶相互作用的可能底物通路介于存在与不存在之间。

[0224] 变体 ACT 显示了最高的与 hK2 的结合常数

[0225] 确定了显示与变体 ACT 有反应性的每种蛋白酶与这些抑制剂的抑制反应的速率。为该目的,使用进展曲线方法在拟一级反应条件下测量了 hK2 和重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂的相互作用。将 hK2 (2nM) 和底物 Z-FR-AMC (10 μ M) 加入至多种量 (20nM-800nM) 的抑制剂 rACT_{8.20}、rACT_{5.18} 和抑制剂 rACT_{6.2}、rACT_{8.3}、rACT_{6.7}、rACT_{6.1} 中 (数据未显示)。将代表性的进程曲线使用等式 1 进行非线性回归分析,并将速率 (k_{obs}) 相对于丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度作图。在确定了 k_{obs} 后,使用蛋白酶与其相应底物的 K_m 计算结合常数 (ka) (表 VI)。野生型 ACT 与胰凝乳蛋白酶的 ka 值与发表的数据相同 (Cooley et al. 2001 “The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites” Biochemistry 40, 15762-70)。重组体 rACT_{6.7} 显示最高的与 hK2 的 ka (8991M⁻¹s⁻¹), 而所得到的与 PK 的 ka 降低到前者的四十五分之一。相反,重组体 rACT_{6.2} 得到的与 hK2 的 ka 和与 PK 的 ka 相等,表明其无法识别这两种蛋白酶。hK2 特异性重组体抑制剂 rACT_{8.3} 和 rACT_{5.18} 对 hK2 的 ka 值较低,分别 2439 和 595M⁻¹s⁻¹, 而非特异性 ACT_{8.20} 呈现了 1779M⁻¹s⁻¹ 对 hK2 的 ka, 优于对 Chtr、PK 和 HNE。所述重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂之一——rACT_{6.1} 与 PK 的反应速率比与 hK2 的反应速率更高。

[0226] 位于 rACT_{WT} 的 RSL 结构中的残基 P3-P3' 被实施例 1 中所述的编码蛋白 C 抑制剂 (PCI) 的 RSL 的底物五肽 (表 VI) 代替。

[0227] 表 VI

[0228] 重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂 ACT、PCI 和 ACT_{PCI} 的 RSL (反应性丝氨酸蛋白酶抑制剂环) 的比对

[0229]

RSL 序列												
丝氨酸蛋白酶抑制剂	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5	P'6
rACT _{WT}	V	K	I	T	L	L	S	A	L	V	E	T
氨基酸序列												
DNA 序列	GTC	AAA	ATC	ACC	CTC	CTT	TCT	GCA	TTA	GTG	GAG	GTC
(密码子)												

[0230]

rPCI_{WT}	氨基酸序列	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L	N	S
rACT_{PCI} (MD CI)	氨基酸序列	V	K	I	T	F	R	S	A	L	V	E	T
	DNA	GTC	AAA	ATC	ACC	TTT	AGA	TCT	GCA	TTA	GTG	GAG	GTC
	(密码子)												

[0231] 正常字体的残基与 rACT_{WT} 的相同,黑体和下划线残基对应于重新定位于 ACT 变体的 RSL 中的底物肽。底物肽中的可切断键由 ↓ 标识,丝氨酸蛋白酶抑制剂中可能的切割位点由 P1-P1' 残基之间的星号标记。

[0232] 简而言之,为了产生重组体蛋白 ACT_{PCI} (MDCI),将 TG1 细胞以相应的构建体转化,然后在合适的培养基中培养。然后将细胞诱导至最佳密度,以在 16℃ 下表达重组体抑制剂 16 小时。

[0233] 从细菌胞质提取重组体抑制剂 ACT_{PCI},并如对于前文实施例所述使用 Ni-NTA 柱通过亲和色谱法分离。

[0234] 通过 SDS-PAGE 对重组体 ACT 表达的分析

[0235] 在实施例 1 和 2 中开发的不同抑制剂的纯度在还原条件下通过 SDS-PAGE 分析进行测试。

[0236] 对所述抑制剂的评估

[0237] 对这些抑制剂进一步分析,以评估它们抑制人激肽释放酶 hK2 和 hK3 以及血浆激肽释放酶、胰蛋白酶、尿激酶、弹性蛋白酶、凝血酶、hK14 和人激肽释放酶 8 的特异性和亲和性(表 VII)。这两种酶具有不同的酶学特征(hK2:胰蛋白酶样,hK3:胰凝乳蛋白酶样),但都天然被 ACT 抑制。虽然 ACT 被认为是血液循环中的天然 hK3 抑制剂,但它对 hK2 的抑制更弱。

[0238] 通过蛋白质印迹分析了 rACT 和人激肽释放酶之间的抑制反应(数据未显示)。对于 ACT 的每个变体,在 37℃ 下将 1 μg 抑制剂与 100ng 的 hK2 或 hK3 在生理条件下孵育 1 小时。

[0239] 使用以对 hK2 特异性来选择的底物序列进行的反应环中的氨基酸改变将 ACT 转化为对 hK2 高度特异但不抑制 hK3 的抑制剂(MD820、MD61、MD62)。这些结果确认了前文表 IV 中显示的结果。基于蛋白 C 的抑制剂(PCI)的反应环,仅 MDCI 能够同时抑制所有两种测试的激肽释放酶(hK2 和 hK3)。

[0240] 与野生型或市售的 α1-抗胰凝乳蛋白酶相比,MD61 和 MD62 是对 hK2 有非常高的亲和性的抑制剂,会在不到 3 分钟内抑制所有 hK2 蛋白(在相同条件下),而野生型或市售的 α1-抗胰凝乳蛋白酶需要孵育超过 12 小时来抑制相同量的 hK2(数据未显示)。

[0241] 表 VII

[0242] MD_{CI} 的抑制谱

	抑制% ^b	SI	k_a	$M^{-1} s^{-1}$
蛋白酶				
胰凝乳蛋白酶	98	1	86216	
血浆激肽释放酶	100	4.6	25900	
[0243] 胰蛋白酶	100	1	1126025	
尿激酶	0	-	-	
弹性蛋白酶	0	-	-	
凝血酶	0	-	-	
hK14	100	3.2	287000	
人激肽释放酶 8	~25	~180		

[0244] 实施例 2

[0245] 开发对人 hK14 特异的底物活性位点。

[0246] 申请 No PCT/IB2006/000574 (Université de Lausanne) 的内容通过引用的方式全文纳入本文。

[0247] 材料

[0248] 如下材料从市售得到：弹性蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和血浆激肽释放酶 (Calbiochem)，人层粘连蛋白 10 和 11 (Chemicon)，人胶原 IV (Life Technologies)，T4DNA 连接酶 (Invitrogen)，T4 多核苷酸激酶 (Qbiogene)， Ni^{2+} -次氨基三乙酸琼脂糖珠 (Qiagen)，限制性内切酶 (Roche, Amersham Pharmacia, Promega)，抗 His 抗体 (Sigma)。寡核苷酸合成由 Invitrogen 进行，DNA 测序由 Synergene Biotech GmbH 进行。如以前的描述 (Frenette et al., 1997; Frenette et al., 1998) 从人精液浆体纯化人激肽释放酶 2 和前列腺特异性抗原。Matrilin-4 获赠自 R. Wagener (Cologne, Germany)。

[0249] 将 KLK14 克隆至毕赤酵母 (*P. pastoris*) 表达载体 pPICZ α A

[0250] 通过逆转录酶进行第一链 cDNA 合成，使用了 Superscript™ 预扩增体系 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)，以 2 μ g 总人小脑 RNA (Clontech, Palo Alto, CA) 作为模板。终反应体积为 20 μ L。为了确认 RT-PCR 的效率，随后以对持家基因肌动蛋白特异的引物 (ActinS: 5' ACAATGAGCTGCGTGTGGCT, ActinAS: 5' TCTCCTTAATGTCACGCACGA) 通过 PCR 扩增 1 μ L 的 cDNA。将具有 372 个碱基对 (bp) 的预计长度的肌动蛋白 PCR 产物在以溴化乙锭染色的 2% 琼脂糖凝胶上显影。使用 Eppendorf master cycler 在 50 μ L 反应混合物中对编码 227 个氨基酸的成熟 hK14 蛋白 (对应于 Genbank 登记号 AAK48524 的第 25-251 位氨基酸) 的 KLK14cDNA 进行 PCR 扩增，所述反应混合物包含作为模板的 1 μ L 小脑 cDNA、100ng 引物 (FPL6: 5' AGG ATG AGG AAT TCA TAA TTG GTGGCC AT (SEQ ID No 69) 和 RPL6: 5' CCC ACC GTC TAG ACCATC ATT TGT CCC GC (SEQ ID No 70))、10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM $MgCl_2$ 、200 μ M 脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 和 0.75 μ L (2.6U) 的 Expand Long Template PCR 聚合酶混合物 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)。PCR 条件为：94℃持续 2 分钟；然后 94℃持续 10 秒，52℃持续 30 秒，68℃持续 1 分钟，40 个循环；最后在 68℃下延伸 7 分钟。在 PCR 后，将扩增的 KLK14 以溴化乙锭在 2% 琼脂糖凝胶上显影，提取，以 EcoRI/

XbaI 消化,并且使用标准技术 (Sambrook et al.,1989) 连接于 Easyselect™ 毕赤酵母表达体系 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的表达载体 pPICZ α A 中相应限制性内切酶位点处。使用载体特异性引物在两个方向上以自动 DNA 测序仪确认所述构建体中的 KLK14 序列。

[0251] 蛋白产生

[0252] 将 PmeI 线性化的 pPICZ α A-KLK14 和空白 pPICZ α A (阴性对照) 转化至化学法感受态化的毕赤酵母株 X-33 中,随后它们通过同源重组整合至酵母基因组中。然后将转化的 X-33 细胞铺板于含选择性试剂 Zeocin™ 的 YPDS (1%酵母提取物、2%蛋白胨、2%右旋糖、1M 山梨糖醇、2%琼脂) 板上。按照制造商的推荐选择稳定的酵母转化体,将其接种于缓冲的基本甘油复合物 (BMGY) 培养基 [1%酵母提取物、2%蛋白胨、100mM 磷酸钾 (pH 6.0)、1.34%酵母氮源、40mg/升生物素和 1%甘油] 中,在 30℃ 下在平板摇动器上以 250rpm 过夜,用 BMMY (除 1%甘油被 0.5%甲醇替换之外与 BMGY 相同) 稀释至 $OD_{600} = 1.0$,并且在与以上相同的条件下孵育 6 天,每天添加 1%甲醇。通过在 $4000 \times g$ 下离心 20 分钟收集上清液。

[0253] 蛋白纯化

[0254] 使用 **AKTAFPLC** 色谱系统 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 上的 5mL HiTrap™ 羧甲基化 (CM) Sepharose Fast Flow 柱,通过阳离子交换从酵母培养物上清液纯化重组体 hK14。首先,将上清液以 $0.22 \mu m$ 的一次性滤器过滤,并使用 Amicon™ YM10 膜 (Millipore Corporation, Bedford, MA) 通过超滤浓缩 50 倍。然后,将经过滤的浓缩上清液导入至 **AKTAFPLC** 系统的注射器中,并以 0.8ml/min 的流速加载于以 5mL 的 10mM MES 缓冲物 (pH 5.3) 预平衡的 CM 琼脂糖柱。将所述柱以前述的平衡缓冲物洗涤,并以 150mL 0-1M 线性连续梯度的 KCl (10mM MES 中, pH 5.3) 以流速 3ml/min 洗脱吸附的 hK14。收集 5mL 洗脱级分并进行分析。将含 hK14 的级分汇集,并使用 Biomax-10 **Ultrafree**®-15 离心过滤器装置 (Millipore Corporation, Bedford, MA) 进一步浓缩 10 倍。纯化 hK14 的蛋白浓度通过二辛可宁酸 (bicinchoninic acid) 法 (Smith et al.,1985) 确定,该方法使用牛血清白蛋白作为校正物 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)。所述重组体 hK14 蛋白的纯度通过如下方式分析:先进行 SDS-PAGE (Laemmli, 1970),随后进行考马斯蓝染色并且/或者使用以前制备的抗 hK14 多克隆兔抗体的蛋白质印迹分析 (Borgono et al., 2003),其身份通过串联质谱法确认,这一点如对于重组体 hK10 的详述 (Luo et al., 2001)。

[0255] 噬菌体展示的五肽文库筛选

[0256] Lowman 博士 (Genentech company, San Francisco, CA) 提供的单价型噬粒以前被修饰过,目的是形成包含六个 His 残基的底物噬菌体文库,所述六个 His 残基位于与 g3p 融合的随机五肽的 N 末端 (Cloutier et al, 2002)。所述六个 His 残基可以使噬菌体固定于 Ni-NTA 柱。

[0257] 插入至所述噬粒中的双链体的制备是通过简并的寡核苷酸的 PCR 反应进行,在所述简并的寡核苷酸中,所述 5 个随机氨基酸编码为 NSS (N = A、T、G、C, S = G、C)。所产生的文库含 1.8×10^8 个转录体,它大到足以呈现所有随机序列。

[0258] 用 hK14 对该噬菌体展示底物文库进行 6 轮筛选。简而言之,将底物噬菌体 (10^{11}) 与 60 微升的 Ni^{2+} -次氨基三乙酸树脂 (在含 1mg/mL BSA 的 PBS 1X) 孵育,洗涤 4 次 (PBS 1X、BSA 1mg/mL、5mM 咪唑、0.1%吐温 20) 以除去未结合的噬菌体,然后在 37℃ 下在 50mM Tris、

100mM NaCl、0.05% Triton(pH 7.5) 中暴露于 65nM(终浓度) 的 hK14, 维持 45 分钟。随后将所释放的噬菌体使用 XL1- 蓝大肠杆菌扩增, 然后在纯化后用于随后的多轮选择。来自最后一轮选择的 32 个单独克隆被测序, 用于确定它们相应的氨基酸序列。

[0259] CFP-YFP 荧光底物的表达

[0260] 使用青色荧光蛋白作为供体和黄色荧光蛋白作为受体的重组体荧光底物如最近所述 (Felber et al., 2004) 进行构建。使用含有合适限制位点 (BssHII ;SalI) 的合成基因构建在 CFP 和 YFP 蛋白之间具有不同五肽 (黑体) 的 CFP-XXXXX-YFP-6xHis 重组体蛋白。所述构建体在 CFP 和 YFP 蛋白之间含有如下氨基酸序列 :Gly-Ala-Leu-Gly-Gly-XXX XX-Gly-Ser-Thr。为了生产重组体蛋白, 将 TG1 细胞以相应的构建体转化, 并使用 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖珠通过亲和色谱法纯化。所述纯化 CFP-YFP 重组体底物的纯度和量通过以下方式评估 :依照 Laemmli 进行 SDS 凝胶电泳, 随后进行考马斯蓝染色, 以及使用特异性抗 His 一抗 (1/3000 稀释度)、小鼠抗 Fab 二抗 (1/50000 稀释度) 和用于检测的 ECL 系统 (Amersham) 的蛋白质印迹分析。在评估之前对所有克隆测序。

[0261] Kcat/Km 的直接确定以及使用 CFP-YFP 荧光底物的特异性研究

[0262] 测试 CFP-底物-YFP 蛋白对不同蛋白酶的底物特异性, 如以前的描述计算 Kcat/Km 值 (Felber et al., 2004)。简而言之, CFP-X₅-YFP 蛋白的荧光使用微板荧光读数仪 (Bio-Tek Instruments, Inc.) 以 440nm(±15) 下的激发和 485nm(±10) 和 528nm(±10) 下的发射在黑色 96 孔板中测量。将浓度为 150nM 的每种重组体底物与终浓度分别为 8nM、0.1nM、0.3nM、2 μ M、10nM、10nM 和 0.5nM 的 hK14、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、PSA、hK2、血浆激肽释放酶或弹性蛋白酶一起孵育。在 37℃ 下, 将所述反应在反应缓冲物 (50mM Tris(pH 7.5)、100mM NaCl、0.05% Triton-X100) 中进行 60 分钟。用于初始速率测定的酶浓度选择为这样的水平, 即该水平预计特异性水解所述底物连接体, 而非被用作阴性对照的 GGGG 底物。对应于产物形成的荧光出现通过光谱测定以 440nm(±15) 下的激发和 485nm(±10) 下的发射进行测量。基于从用 SDS-PAGE 评估的每种肽完全水解得到的校正曲线, 将斜率转换成每秒钟产生的单位为 nmol 的产物。使用远低于估计 Km 的底物浓度在拟一级反应条件下确定动力学参数 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (Felber et al., 2004)。

[0263] 将切割的产物通过 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转移至稳定素聚偏二氟乙烯膜 (Bio-Rad), 并以 Applied Biosystems (型号 ABI493A) 测序仪进行 Edman 自动降解, 以确定切割位点。

[0264] 对 hK14 的噬菌体底物的选择

[0265] 以 hK14 淘选底物噬菌体文库, 以选择被其水解活性切割的底物。将切割的噬菌体在大肠杆菌 TG1 细胞中扩增, 然后再进行 5 轮酶消化和筛选。被释放噬菌体的量在每轮均有增加, 表明在每轮选择后存在更大数目的 hK14 敏感噬菌体。通过测序确定了来自最后一轮选择的 32 个噬菌体肽的氨基酸序列。对应于底物区的序列列于表 I 中。在所有选择并切割的肽中, 有 69% 在 P1 位置具有碱性残基 (如以 hK14 的可能胰蛋白酶样活性预计的一样), 而 31% 肽在 P1 具有胰凝乳蛋白酶样酶特异的酪氨酸残基。

[0266] hK14 进行的底物水解的动力学特征

[0267] 为了验证来自噬菌体展示分析的序列确实是 hK14 的底物并且为了鉴定切割位点, 将所有选择的肽构建为荧光底物形式。申请人的底物体系是基于从都与底物连接的 CFP

至 YFP 的能量转移。蛋白酶对连接体的切割可分出两个荧光团,导致能量转移的丧失。因此,所述底物的水解可通过测量供体在 485nm——对应于 CFP 发射波长——下的荧光强度增加进行评估 (Mitra et al., 1996 ;Felber et al., 2004)。

[0268] 所有底物被 hK14 以不同的效力水平水解, K_{cat}/K_m 值为 2000–481000 $M^{-1}s^{-1}$ 。切割特异性以不被 hK14 水解的 CFP-GGGGG-YFP 证明 (未显示)。

[0269] 结果清晰地表明,对 hK14 敏感性的优选 P1 氨基酸为 Arg (表 1),原因是 K_{cat}/K_m 大于 200,000 $M^{-1}s^{-1}$ 的最好 hK14 底物在 P1 位置具有 Arg。有趣的是,在 hK14 最有效切割的 4 种肽中,有 2 种在 P2 位置含 Gln。相反,多种不同氨基酸出现于 P1' 位置,这证明了在该位置无显著的偏好。然而,两种底物在 P1' 位置具有天冬氨酸并且可被相对有效地切割。

[0270] 另一方面,在 P1 位置有 Lys 的所有底物都以低速率被切割, K_{cat}/K_m 等于或小于 34000 $M^{-1}s^{-1}$ 。类似地,对具有 P1 酪氨酸的底物的切割速率除一底物外都很低,例外的底物为具有 134000 $M^{-1}s^{-1}$ 的 K_{cat}/K_m 的肽 G9。除了 P1' 位置 (在此处甘氨酸残基出现于约 50% 的 P1 赖氨酸或酪氨酸底物中) 外,无氨基酸更频繁地再现 (recover) 在其他位置。然而,必须说明的是,出现于位置 P1' 的大多数甘氨酸残基都源自所选五肽底物侧翼的噬菌体连接体区,在此处 Lys 或 Tyr 残基出现于所选肽的第 5 位置。

[0271] 优选底物的特异性

[0272] 由于许多所选底物包含对其他蛋白酶切割可能敏感的基序,因此本申请人测量了 hK2、血浆激肽释放酶、PSA、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶可能切割这些 hK14 底物的程度 (表 VIII)。每种底物均在这样的酶浓度下测试,即在该浓度下会特异性切割底物连接体,而不水解对照 GGGGG 底物。

[0273] 不出意料地,大多数胰蛋白酶样底物都被胰蛋白酶以不同的效力切割,这不是严格与 hK14 偏好相关。另外,两种五肽 VGSLR 和 RQTND 是 hK14 的最好底物,但与呈现大约 5' 000' 0000 $M^{-1}.s^{-1}$ 的 K_{cat}/K_m 其他肽如 LSGGR 相比,没有被胰蛋白酶非常有效地切割。相反,在 P2 位置具有 Gln 的肽是 hK14 以及胰蛋白酶的优良底物。仅两种具有低胰蛋白酶样 hK14 活性的 hK14 底物 RVTST 和 VVMKD 不被胰蛋白酶切割,而 5 种具有低胰凝乳蛋白酶样 hK14 活性的底物中有 4 种不被胰蛋白酶切割。

[0274] 所有胰凝乳蛋白酶样底物被胰凝乳蛋白酶较被 hK14 更有效地切割,例外的是底物 TVDYA,其与 hK14、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶得到的 k_{cat}/K_m 几乎相同。弹性蛋白酶还蛋白水解两种选择的肽 TSYLN 和 YQSLN, YQSLN 还被 PSA 弱切割。

[0275] 与对其他人激肽释放酶如 hK1、hK2、PSA 和 PK 的选择性相比,优选的底物呈现对 hK14 的高度选择性。仅 hK2 蛋白水解了大多数的胰蛋白酶样底物, K_{cat}/K_m 值总是至少低到 hK14 的 5 分之一。例如, NQRSS 肽对于 hK14 的选择性分别是其对 hK2 和 PK 的选择性的 27 和 78 倍, F3 肽表现出高 hK14 特异性,以另一种激肽释放酶未能检测到切割。

[0276] 表 VIII

[0277] 噬菌体选择的 hK14 底物对不同的人蛋白酶的特异性

[0278]

肽	序列	hK14	胰蛋白酶	胰凝乳蛋白酶	弹性蛋白酶	血浆激肽释放酶	hK1	hK2	PSA
---	----	------	------	--------	-------	---------	-----	-----	-----

胰蛋白酶样底物Kcat/ Km (M-1.s-1)

G1	VGSLR	481'000	270'000	145'000	-	-	-	21'000	-
C11	RQTND	415'000	260'000	251'000	-	-	-	23'000	-
E5	NQRSS	388'000	2'070'000	-	-	5'000	-	14'000	-
E8	LQRAI	367'000	2'270'000	-	209'000	5'000	-	25'000	-
F11	QRLRD	307'000	1'420'000	168'000	-	-	L.C.	32'000	-
F3	PDRHM	243'000	319'000	192'000	-	-	-	-	-
E2	LSGGR	207'000	4'676'000	83'000	-	-	-	14'000	-
E7	LSRDN	127'000	246'000	155'000	-	-	-	16'000	-
D9	RGKTN	80'000	2'111'000	94'000	-	-	-	21'000	-

[0279]

E9	NNKLR	74'000	384'000	77'000	-	-	-	12'000	-
E12	RVTST	26'000	-	100'000	200'000	-	-	-	-
E10	VVMKD	15'000	-	-	65'000	-	-	-	-

胰凝乳蛋白酶样底物Kcat/ Km (M-1.s-1)

G9	TVDYA	134'000	-	145'000	181'000	-	-	-	-
E1	AYGYK	24'000	129'000	618'000	-	-	-	-	-
F6	VGLYD	18'000	-	409'000	-	-	-	-	-
F10	YQSLN	12'000	-	134'000	49'000	-	-	-	L.C.
D7	TSYLN	9'000	-	266'000	90'000	-	-	-	-

[0280] L. C. :低切割,未确定 kcat/Km ; - 未检测到切割

[0281] 实施例 2 :

[0282] 材料

[0283] 如下材料从市售来源得到:弹性蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、凝血酶和血浆激肽释放酶 (Calbiochem), T4DNA 连接酶 (Invitrogen), T4 多核苷酸激酶 (Qbiogene), Ni²⁺-次氨基三乙酸琼脂糖珠 (Qiagen), 限制性内切酶 (Roche, Amersham Pharmacia, Promega), 抗 His 抗体和碱性磷酸酶缀合的山羊抗小鼠二抗

(Sigma)。荧光底物 Z-Phe-Arg-AMC、Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC、Z-Gly-Gly-Arg-AMC 和 MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC 购自 Calbiochem, Boc-Val-Pro-Arg-AMC 购自 Bachem, Abz-Thr-Phe-Arg-Ser-Ala-Dap (Dnp)-NH₂ 购自 Neosystem。寡核苷酸合成由 Invitrogen 进行, DNA 测序由 Synergene Biotech GmbH 进行。人激肽释放酶 2、5、13 和 14 在酵母体系中产生 (Yousef et al., 03c; Kapadia et al., 03; Borgono et al., 03)。人激肽释放酶 6 在 293 人胚胎肾细胞体系中产生, 人激肽释放酶 8 以杆状病毒载体和 HighFive 昆虫细胞产生 (Little et al., 97; Kishi et al., 03)。HK6 和 hK8 以 Lys-C 活化 (Shimizu et al., 98)。

[0284] 重组体野生型 AAT、ACT 及其变体的表达载体的构建

[0285] 使用寡核苷酸 5'-TATGGATCCGATGATCCCCAGGGAGA-3' (SEQ ID No 71) 和 5'-CGCGAAGCTTTTATTTTGGGTGGGA-3' (SEQ ID No 72), 通过 PCR 扩增人 AAT cDNA (Invitrogen, UK)。将扩增的 AAT 基因的 BamHI-HindIII 片段克隆至载体 pQE9 (Qiagen, Germany) 中, 形成质粒 pAAT, 该质粒包含具有 N 末端 His₆ 标签的成熟 AAT 的开放阅读框。将产生 KasI 和 Bsu36I 限制位点的沉默突变引入 pAAT 中, 分别在 RSL 结构域的 P1 密码子上游 24bp 和下游 11bp 处。依照 Stratagene 提供的 QuikChange 诱变方案, 对 KasI 使用寡核苷酸 5'-ACTGAAGCTGCTGGCGCCGAGCTCTTAGAGGCCATA-3' (SEQ ID No 73) 以及对 Bsu36I 位点使用寡核苷酸 5'-GTCTATCCCCCTGAGGTCAAGTTC-3' (SEQ ID No 74) 形成限制位点。表达野生型 ACT 的构建体以前有记载 (Cloutier et al., 2004)。

[0286] rAAT 和 rACT 变体通过以从如下合适的模板寡核苷酸扩增的相应 DNA 片段替换 RSL 区产生: rAAT₈₈, 5'-CCATGTTTCTAGAGGCTCTGCAGCGTGCTATCCCGCCTGAGGTCAAGTT-3' (SEQ ID N° 75); rAAT₆₉, 5'-CCATGTTTCTAGAGACCGTTGACTACGCTATCCCGCCTGAGGTCAAGTT-3' (SEQ ID N° 76); rACT₈₈, 5'-TACCGCGGTCAAAATCCTGCAGCGTGCTATCCTGTGGAGACGCGTGA-3' (SEQ ID N° 77) 和 rACT₆₉, 5'-TACCGCGGTCAAAACCGTTGACTACGCTGCTCTGGTGGAGACGCGTGA-3' (SEQ ID N° 78)。使用对应于其各自侧翼区的引物扩增模板, 对于 AAT 变体为 5'-GCTGGCGCCATGTTTCTAGAG-3' (SEQ ID N° 79; AAT 变体 1) 和 5'-TTGTTGAACTTGACCTCAGG-3' (SEQ ID N° 80; AAT 变体 2), 对于 ACT 变体为 5'-GTACCGCGGTCAAA-3' (SEQ ID N° 81; ACT 变体 1) 和 5'-TCACGCGTGTCCAC-3' (SEQ ID N° 82; ACT 变体 2)。将产生的 PCR 片段以 KasI/Bsu36I 片段的形式克隆至 pAAT 中, 以 MluI/SacII 片段的形式克隆至 rACT_{WT} 构建体中, 并通过 DNA 测序确认。位置 P4 和 P2' 之间的反应位点环中的改变显示于表 IX 中。

[0287] 重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂的表达和纯化

[0288] 重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂在大肠杆菌株 TG1 中制备。在 37℃ 下, 将细胞培养于含 100 μg/ml 氨苄西林的 2×TY 培养基 (每 L 中有 16g 胰蛋白胨、10g 酵母提取物、5g NaCl) 中, 直至 O.D.₆₀₀ = 0.5-0.7。加入异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG): 对于 rACT 蛋白生产, 其终浓度为 0.5mM, 对于 rAAT 蛋白, 其终浓度为 0.1mM, 并且在 18℃ 下使重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂表达 16 小时。将细胞通过离心收集并再次悬浮于 0.1 体积的冷 PBS 2X 中。在与溶菌酶 (0.5mg/ml) 在冰上孵育 45 分钟后, 将总的可溶性细胞质蛋白通过 4 轮冻/融提取, 并将总 DNA 以 DNase I 降解。通过离心 (17'500g, 25 分钟) 除去细胞碎片, 并将 Ni²⁺-次氨基三乙酸亲和性琼脂糖珠加入上清液中, 在 4℃ 下搁置 90 分钟, 以结合重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂。将所述树脂以 50mM Tris (pH 7.5)、150mM NaCl、20mM 咪唑洗涤 3 次,

以 50mM Tris(pH 7.5)、150mM NaCl、150mM 咪唑洗脱结合的蛋白。在 4℃下,将洗脱的蛋白对 50mM Tris(pH 7.5)、150mM NaCl、0.01% Triton X-100 透析 16 小时,并通过考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 评估蛋白纯度。蛋白浓度通过二辛可宁酸法 (Smith et al., 1985) 进行确定,使用牛血清白蛋白作为标准物 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)。将 AAT_{ES}、ACT_{ES} 和 AAT_{G9}、ACT_{G9} 分别以胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶滴定。

[0289] 抑制的化学计量 (SI)

[0290] 以 hK14 (将该蛋白酶与不同浓度的抑制剂孵育) 确定 rAAT、rACT、及其变体的 SI 值。在 37℃下,在反应缓冲物 (50mM Tris(pH 7.5)、150mM NaCl、0.05% Triton X-100、0.01% BSA) 中孵育 4 小时后,通过加入荧光底物 (Boc-Val-Pro-Arg-AMC) 检测残余活性。使用微板荧光读数仪 FL_x800 (Bio-Tek Instruments, Inc.) 以 340nm(±15) 下的激发和 485nm(±10) 下的发射在黑色 96 孔板中测量荧光。SI 值对应于速率分数 (抑制的酶反应的速率 (v_i) / 非抑制的酶反应的速率 (v₀)) 对抑制剂与酶的摩尔比 ([I₀] / [E₀]) 的线性回归分析的横坐标截距。

[0291] 动力学分析

[0292] 使用进展曲线方法 (Morrison and Walsh, 1988) 在拟一级反应条件下确定 hK14 与不同抑制剂相互作用的结合速率常数。在这些条件下,将固定量的酶 (2nM) 与不同浓度的抑制剂 (0-80nM) 和过量的底物 (20 μM) 混合。在 37℃下,反应在反应缓冲物 (50mM Tris(pH 7.5)、150mM NaCl、0.05% Triton X-100、0.01% BSA) 中进行 45 分钟,使用 FL_x800 荧光 96 孔微板读数仪 (Biotek, USA) 测量产物形成速度。抑制被认为在反应过程中是不可逆的,酶活性进展表示为产物形成 (P),以速率 (v_z) 开始,并且随时间 (t) 以一级速率 (k_{obs}) 被抑制,其中该速率常数仅依赖于抑制剂浓度。

[0293]
$$P = (v_z / k_{obs}) \times [1 - e^{(-k_{obs}t)}]$$
 等式 1

[0294] 对于每种抑制剂,使用等式 1 通过数据的非线性回归计算四种不同浓度的抑制剂的 k_{obs}。通过绘制 k_{obs} 相对于抑制剂浓度 [I] 的曲线,确定二级速率常数 k', 其等于该曲线的斜率 (k' = Δk_{obs} / Δ[I])。由于抑制剂和底物之间的竞争关系,如下等式 2 被用于通过考虑底物浓度 [S] 和酶对底物的 K_m 校正二级速率常数 k', 得到 k_a。

[0295]
$$k_a = (1 + [S] / K_m) \times k'$$
 等式 2

[0296] hK14 对 MeOSuc-VPR-AMC 的 K_m 为 8 μM。然后,应理解的是,依赖于 hK14 蛋白酶的纯度级别和具体活性, K_m 可能不同。

[0297] 酶-抑制剂复合体的 SDS-PAGE 分析

[0298] 将恒量的不同抑制剂 (1-2 μg) 与对应于 0.5、1 和 2 倍 SI 值的不同量的 hK14 在反应缓冲物 (50mM Tris(pH 7.5)、150mM NaCl、0.05% Triton X-100) 中孵育 4 小时。将样品在 90℃加热 10 分钟,在还原条件下在 10% SDS 凝胶上分开,并通过考马斯蓝染色显影。

[0299] 重组 rAAT 和 rACT 变体的抑制特异性 (表 IX)

[0300] 在 37℃下,将 2nM 的胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、血浆激肽释放酶、人中性粒细胞弹性蛋白酶和凝血酶以及 10nM 的 hK2、hK3、hK5、hK6、hK8、hK13 和 hK14 分别与 100nM 和 500nM 的重组体抑制剂一起孵育 30 分钟。通过加入荧光底物检测残余活性 (对于胰蛋白酶和血浆激肽释放酶为 Z-Phe-Arg-AMC, 对于胰凝乳蛋白酶为 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, 对于凝血酶为 Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 对于人中性粒细胞弹性蛋白酶为 MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC,

对于人激肽释放酶为 Abz-Thr-Phe-Arg-Ser-Ala-Dap (Dnp)-NH₂。

[0301] 所述复合体的稳定性

[0302] 将 hK14 (2nM) 与对应于 0、1 和 2 倍 SI 值的不同量的抑制剂一起孵育。在 37°C 下，在反应缓冲物 (50mM Tris (pH 7.5)、150mM NaCl、0.05% Triton X-100、0.01% BSA) 中孵育 4、8 和 24 小时后，通过加入 20 μM 荧光底物 Boc-Val-Pro-Arg-AMC 检测残余活性。将每个抑制反应的斜率 (速率) 除以无抑制剂的相应反应的斜率。

[0303] 可溶性重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂的设计和生

[0304] 为了开发 hK14 的特异性抑制剂，本申请人将 rAATwt 和 rACTwt 的易切断键周围的五个残基替换为以前使用噬菌体展示技术以 hK14 选择的两种底物五肽 (Felber et al., 05)。hK14 酶学活性谱证明 hK14 具有胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶样双重活性。本申请人因此决定分别以两种底物肽 E8 和 G9 开发特异性针对胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶样活性的抑制剂。这些底物的易断键依照 rAATwt 和 rACTwt 的 P1-P' 1 排列。所述丝氨酸蛋白酶抑制剂变体的 RSL 区显示于表 IX。

[0305] 表 IX

[0306]

丝氨酸 蛋白酶 抑制剂	选择的 ^a 底物 肽	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'
AAT _{WT}		L	E	A	I	P	M*	S	I	P	P	E
AAT _{E8}	LQR↓AI	L	E	A	L	Q	R*	A	I	P	P	E
AAT _{G9}	TVDY↓A	L	E	T	V	D	Y*	A	I	P	P	E
ACT _{WT}		V	K	I	T	L	L*	S	A	L	V	E
ACT _{E8}	LQR↓AI	V	K	I	L	Q	R*	A	I	L	V	E
ACT _{G9}	TVDY↓A	V	K	T	V	D	Y*	A	A	L	V	E

[0307]

[0308] 野生型 AAT、ACT 及其变体的反应性丝氨酸蛋白酶抑制剂环 (RSL) 的易断键区的氨基酸序列比较。

[0309] ^a 使用噬菌体展示的随机五肽文库由激肽释放酶 hK14 选择的底物肽 (Felber et al., 2004)。

[0310] 正常字体的残基与野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的相同，黑体残基对应于重新定位于 AAT 和 ACT 变体的 RSL 中的底物肽。底物肽中可被 hK14 切断的易断键由 ↓ 标识，丝氨酸蛋白酶抑制剂中可能的切割位点由 P1-P1' 残基之间的星号标记。

[0311] 重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂以可溶性活性形式生产，并且在镍亲和柱上以一步法在天然条件下从细胞质蛋白中纯化。在还原条件下在 SDS-PAGE 上的分析显示每种抑制剂 rAAT 和 rACT 变体有单一条带，迁移表观大小为与其分子量对应的 45-50kDa，例外的是迁移

稍微更快的蛋白 AAT_{E8} (数据未显示)。通过密度测定估计所有抑制剂均有超过 95% 的纯度, 产率范围是 1-5mg/L。

[0312] 抑制的化学计量、结合常数和复合体稳定性

[0313] 在生理条件的 pH 和离子强度下确定抑制的化学计量 (SI)。SI 指示抑制一分子 hK14 需要的抑制剂分子的数目。本申请人发现滴定曲线是线性的, 甚至对于 SI >> 1 时也如此, 这表明反应完全结束。计算的丝氨酸蛋白酶抑制剂变体的 SI 值为约 1-1.5, 例外的是 rAAT_{E8}, 其产生的 SI 为 7.4 (表 X)。而野生型 ACT 在测试条件下不与 hK14 反应, AAT_{WT} 被发现是良好的 hK14 抑制剂, SI 为 1。以 hK14 底物肽替换 ACT RSL 区不仅使得产生对所述酶的反应性, 而且形成高亲和性的抑制剂。在另一方面, 使用 AAT_{WT} 作为支架时, 对 RSL 的修饰较为不利, 原因是所有抑制剂的效率均低于野生型形式 (表 X)。

[0314] 表 X

[0315]

抑制剂	选择的 ^a 底物肽	SI	k _a M ⁻¹ s ⁻¹
AAT _{WT}	IPM*SI	1.0	263 000
AAT _{E8}	LQR↓AI	7.4	n.a.
AAT _{G9}	TVDY↓A	1.2	217 000
ACT _{WT}	TLL*SA	-	-
ACT _{E8}	LQR↓AI	1.2	575 000
ACT _{G9}	TVDY↓A	1.5	74 000

[0317] rAAT_{WT}、rACT_{WT} 及其变体与 hK14 反应的化学计量抑制 (SI) 和二级速率常数 (k_a) 值。a, 以 hK14 通过噬菌体展示技术选择并用于修饰 rAAT_{WT} 和 rACT_{WT} 的底物肽 (Felber et al., 2005)。-, 无可检测的抑制活性。

[0318] 计算的 SI 值与在与 hK14 反应后切割形式和复合形式的丝氨酸蛋白酶抑制剂之间的比值一致, 这通过 SDS-PAGE 分析得以证明 (数据未显示)。将每种变体与不同浓度的 hK14 孵育, 所述浓度与对应于小于、等于和大于 SI 值的抑制剂与蛋白酶之比。SDS-PAGE 分析显示了每种丝氨酸蛋白酶抑制剂变体-hK14 对的共价复合体 (C) 的形成, 具有与预计值一致的表观分子量。当 hK14 浓度 0.5 倍于 SI 值时, 出现了降解形式的复合体, 这必定由未复合的和游离的 hK14 形成。

[0319] 除了形成抑制剂复合体之外, 与 hK14 的反应还产生一部分水解的抑制剂, 其分子大小与在 RSL 的反应位点处或附近被切割的丝氨酸蛋白酶抑制剂一致。当 SI 值接近 1 时 (AAT-G9、ACT-E8 和 ACT-G9), 该部分的量大大降低。相反, 仅 SI 值 >> 1 的变体 (rAAT_{E8}) 呈现与 hK14 的底物性质, 主要导致切割形式的抑制剂的积聚, 而非不可逆复合体的形成。

如预计的,当比值 $[I]_0/[E]_0$ 大于 SI 时观察到了完整抑制剂的存在,并有弱的复合体条带。

[0320] 令人惊奇的是,虽然大多数复合体被发现是 SDS 稳定的(数据未显示),但是观察到以 ATT_{G9} 形成的复合物有相对慢的分解,这致使在孵育 8 小时后再次出现 hK14 活性。

[0321] 重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂对人 hK14 的抑制的动力学分析使用过量抑制剂以多种摩尔比的 hK14 在拟一级条件下进行。不断监测通过与丝氨酸蛋白酶抑制剂反应的时间依赖的酶失活,跟踪底物转换率的降低。将以不同丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度进行的反应的进程曲线拟合于等式 1,以计算描述速率常数 (k_{obs}) 的值。从 k_{obs} 值相对于 hK14 抑制剂浓度的斜率确定所述结合速率常数 (k_a)。不依赖于抑制剂支架 (AAT 或 ACT),以底物 E8 修饰的重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂显示出具有优于对等 G9 抑制剂的 k_a 值。

[0322] 以胰凝乳蛋白酶样底物修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂 $rAAT_{G9}$ 和 $rACT_{G9}$ 表现出对 hK14 仅有温和的亲合性,结合常数分别为 $217'000$ 和 $74'000M^{-1}s^{-1}$,而 $rACT_{E8}$ 具有 $575'000M^{-1}s^{-1}$ 的结合常数。

[0323] 重组 $rAAT$ 和 $rACT$ 变体的抑制特异性

[0324] 为了确定 hK14 抑制剂的抑制特异性,本申请人研究了纯化的变体与一大组蛋白酶的反应。首先,检查了具有广泛特异性的蛋白酶,包括胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、血浆激肽释放酶、人中性粒细胞弹性蛋白酶和凝血酶。另外,本申请人评估了 hK14 抑制剂对属于同一家族蛋白酶的酶即 hK2、hK3、hK5、hK6、hK8 和 hK13 的特异性(表 XI)。在 hK14 与过量抑制剂 ($50:1$ 的 $[I]_0/[E]_0$) 孵育 30 分钟后,对所有修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂和 $rAAT_{wt}$ 都未检测到残余活性。在这些条件下,仅 $rACT_{wt}$ 显示对 hK14 的弱抑制活性,仅抑制 17%。以 E8 底物修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂显示中度特异性,这是因为几种其他酶被这些抑制剂抑制。以 AAT_{G9} 和 ACT_{G9} 观察到了非常高的特异性,除了胰凝乳蛋白酶以及除了 hK5 被较低程度抑制外,无一测试酶被抑制。

[0325] 表 XI

蛋白酶	AAT _{wt}	AAT _{E8}	AAT _{G9}	ACT _{wt}	ACT _{E8}	ACT _{G9}
hK14	100	100	100	17	100	100
胰蛋白酶	100	100	0	0	100	0
Chtr	100	19	100	100	14	100
PK	17	100	0	46	36	0
[0326] HNE	100	0	0	16	0	0
凝血酶	4	0	0	18	0	0
hK2	0	19	0	0	100	0
hK3	0	0	0	100	0	0
hK4	na	na	na	na	100	0
hK5	28	100	30	7	100	0

	hK6	33	100	0	24	72	0
[0327]	hK8	0	36	0	0	34	0
	hK13	0	30	0	0	0	0

[0328] hK14 抑制剂的抑制特异性。抑制百分数对应于 $100 \times [1 - (\text{存在抑制剂的速率} / \text{非抑制对照的速率})]$ 。反应 30 分钟。与过量抑制剂 (50 : 1 的 [I]₀/[E]₀) 孵育。

[0329] **实施例 3:**

[0330] 活性 hK14 的生产和纯化

[0331] 如以前的描述生产并纯化人激肽释放酶 14。

[0332] 使用噬菌体展示技术选择针对 hK14 的底物肽

[0333] 以 hK14 淘选底物噬菌体文库,以选择被其水解活性水解的底物。将切割的噬菌体在大肠杆菌 TG1 细胞中扩增,然后再进行 5 轮酶消化和筛选。释放噬菌体的量在每轮均有增加,因此表明在每轮选择后存在更大数目的 hK14 敏感噬菌体。通过测序确定了来自最后一轮选择的 32 个噬菌体肽的氨基酸序列,所获得的对应于底物区的序列列于表 8 中。在所有选择并切割的肽中,有 69% 在 P1 位置具有至少一个碱性残基 (如以 hK14 的可能胰蛋白酶样活性预计的一样),而 31% 肽在 P1 具有胰凝乳蛋白酶样酶特异的酪氨酸残基。

[0334] hK14 进行的底物水解的动力学特征

[0335] 为了验证来自噬菌体展示分析的序列确实是 hK14 的底物并且鉴定切割位点,将所有选择的肽构建为荧光底物形式。所有底物被 hK14 以不同的效力水平水解, k_{cat}/K_m 为 $2000-481000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。切割特异性以不被 hK14 水解的 CFP-GGGGG-YFP 证明。

[0336] 结果清晰地表明,对 hK14 敏感性的优选 P1 氨基酸为 Arg (表 XII),原因是 k_{cat}/K_m 大于 $200,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 的所有最好 hK14 底物在 P1 位置都具有 Arg。有趣的是,在 hK14 最有效切割的 4 种肽中,有 2 种在 P2 位置含 Glu。相反,多种不同氨基酸出现于 P1' 位置,这证明了在该位置无显著的偏好。然而,两种底物在 P1' 位置具有天冬氨酸并且可被相对有效地切割。

[0337] 另一方面,在 P1 位置有 Lys 的所有底物都以非常低的速率被切割, k_{cat}/K_m 小于 $34000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。类似地,具有 P1 酪氨酸的底物的切割速率除一底物外都很低,例外的底物为具有 $134000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 的 K_{cat}/K_m 的肽 G9。除了 P1' 位置 (在此处甘氨酸残基再现于约 50% 的 P1 赖氨酸或酪氨酸底物中) 外,无氨基酸特别更频繁地再现在其他位置。

[0338] 由于许多所选底物包含对其他蛋白酶切割可能敏感的基序,因此本申请人测量了 hK2、血浆激肽释放酶、PSA、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶可能切割这些 hK14 底物的程度 (表 XII)。每种底物均在特异性切割底物连接体的酶浓度下测试。

[0339] 不出意料地,大多数胰蛋白酶样底物都被胰蛋白酶以不同的效力切割,这不是严格与 hK14 偏好相关。例如,两种五肽 VGSLR 和 RQTND 是 hK14 的最好底物,但与呈现大约 $5'000'0000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 的 K_{cat}/K_m 其他肽如 LSGGR 相比,没有被胰蛋白酶非常有效地切割。相反,在 P2 位置具有 Gln 的肽除是胰蛋白酶也是 hK14 的最好底物。除胰凝乳蛋白酶样底物外,仅两种 hK14 底物 RVTST 和 VVMKD 不被胰蛋白酶切割。

[0340] 胰凝乳蛋白酶样底物被胰凝乳蛋白酶较被 hK14 更有效地切割,例外的是 TVDYA 底物,其与 hK14、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶得到的 k_{cat}/K_m 几乎相同。弹性蛋白酶还蛋白水

解两种选择的肽 TSYLN 和 YQSLN, YQSLN 还被 PSA 弱切割。

[0341] 与对其他人激肽释放酶如 hK1、hK2、PSA 和 PK 的选择性相比,选择的底物呈现对 hK14 的高度选择性。仅 hK2 蛋白水解了大多数的胰蛋白酶样底物, K_{cat}/K_m 值总是至少低到 hK14 的 5 分之一。例如, NQRSS 肽对于 hK14 的选择性分别是其对 hK2 和 PK 的选择性的 27 和 78 倍。

[0342] 表 XII

[0343] 优选底物的特异性

	克隆	序列	$k_{cat}/K_m (M^{-1}.s^{-1})$
[0344]	G1	VGSLR	481'000
	C11	RQTND	415'000
	E5	NQRSS	388'000
	E8	LQRAI	367'000

[0345]

F11	QRLRD	307'000
F3	PDRHM	243'000
E2	LSGGR	207'000
G9	TVDYA	134'000
E7	LSRDN	127'000
D9	RGKTN	80'000
E9	NNKLR	74'000
E6	MQVKH	34'000
E4	TTDLR	27'000
E12	RVTST	26'000
E1	AYGYK	24'000
G3	STKGI	20'000
F5	KLKET	19'000
F6	VGLYD	18'000
E10	VVMKD	15'000
D11	RVDTG	15'000
F7	GHRIN	12'000
F10	YQSLN	12'000
C5	SDKVY	9'000
G11	HETLK	9'000
D7	TSYLN	9'000
F4	MQATK	8'000
G7	EAPAK	8'000
F12	PVHLY	7'000
F1	QPNGY	6'000
G5	AYGLA	6'000
C9	YQNSS	6'000
E11	SAVRP	5'000

[0346] 基于选择的针对 hK14 的底物, CFP-X5-YFP 底物的特异性常数 (kcat/Km) 值的比较 (易断键的 P1 位置为黑体)。

[0347] 表 XIII

[0348] 噬菌体选择的 hK14 底物对不同的人蛋白酶的特异性

[0349]

肽	序列	hK14	胰蛋白酶	胰凝乳蛋白酶	弹性蛋白酶	血浆激肽释放酶	hK1	hK2	PSA
[0350]									
胰蛋白酶样底物									
		$k_{cat}/K_m (M^{-1}.s^{-1})$							
G1	VGSLR	481'000	270'000	145'000	-	-	-	21'000	-
C11	RQTND	415'000	260'000	251'000	-	-	-	23'000	-
E5	NQRSS	388'000	2'070'000	-	-	5'000	-	14'000	-
E8	LQRAI	367'000	2'270'000	-	209'000	5'000	-	25'000	-
F11	QRLRD	307'000	1'420'000	168'000	-	-	L.C.	32'000	-
F3	PDRHM	243'000	319'000	192'000	-	-	-	-	-
E2	LSGGR	207'000	4'676'000	83'000	-	-	-	14'000	-
E7	LSRDN	127'000	246'000	155'000	-	-	-	16'000	-
D9	RGKTN	80'000	2'111'000	94'000	-	-	-	21'000	-
E9	NNKLR	74'000	384'000	77'000	-	-	-	12'000	-
E12	RVTST	26'000	-	100'000	200'000	-	-	--	-
E10	VVMKD	15'000	-	-	65'000	-	-	-	-
-									
胰凝乳蛋白酶样底物									
		$k_{cat}/K_m (M^{-1}.s^{-1})$							
G9	TVDYA	134'000	-	145'000	181'000	-	-	-	-
E1	AYGYK	24'000	129'000	618'000	-	-	-	-	-
F6	VGLYD	18'000	-	409'000	-	-	-	-	-
F10	YQSLN	12'000	-	134'000	49'000	-	-	-	L.C.
D7	TSYLN	9'000	-	266'000	90'000	-	-	-	-
-									

[0351] L. C. :低切割, k_{cat}/K_m 未确定; - 无可检测的切割

[0352] 该研究鉴定了两类 hK14 的五肽底物:胰蛋白酶样底物和胰凝乳蛋白酶样底物。本申请人证明了,尽管选择了数种含芳香残基的底物,但 hK14 具有胰蛋白酶样切割特异性,而非胰凝乳蛋白酶样切割特异性。具有最大 K_{cat}/K_m 的底物在 P1 位置有精氨酸,表明偏好该氨基酸(表 XIV)。另一方面,在 P1 位置,赖氨酸似乎不如酪氨酸适合。如果这两氨基酸存在于同一肽中,hK14 在酪氨酸残基后切割。另外,胰凝乳蛋白酶样底物中的一种——TVDYA 得到了比所有赖氨酸 -P1 底物更大的动力学值 $134,000M^{-1}.s^{-1}$,赖氨酸 -P1 底物的 K_{cat}/K_m 值不大于 $34,000M^{-1}.s^{-1}$ 。没有观察到 hK14 对 P1' 位置的选择性,其中在最佳底物的 P1' 位置再现有不同类型的氨基酸例如不带电荷的小残基、疏水残基、带正电荷的或带负电荷的残基。对周围其他位置的分析证明,hK14 可接受大量不同的氨基酸。该观察结果并不意味着 hK14 具有像胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶的大活性谱,而是证明 hK14 具有根据前后序列

切割不同序列的能力。

[0353] hK14 的胰凝乳蛋白酶样活性 (即便是低于其胰蛋白酶样活性) 是有意义的。据本申请人所知,除了 hK1 在激肽释放酶结合蛋白 (kallistatin) 和一些衍生肽中切割 Phe-Phe 连接外, hK14 是第一种被描述有双重活性的人激肽释放酶。因此, hK14 中的特异性袋的构象应该能够接受在底物 P1 位置的芳香氨基酸侧链和碱性氨基酸侧链,以解释 hK14 的胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶样活性的双重活性。

[0354] hK14 特异性抑制剂的开发

[0355] 已经进行了对 α 1-抗胰凝乳蛋白酶 (ACT) 和 α 1-抗胰蛋白酶 (AT 或 AAT) 的 RSL 的修饰,以改变该抑制剂的特异性。然后将选择的底物 (G1、C11、E5、E8、F3、F11、G9) 转移至丝氨酸蛋白酶抑制剂的反应位点环,以生成能够抑制人激肽释放酶 hK14 的新变体。使用肽 G1 和 C11 的序列已构建了不止一种抑制剂变体。

[0356] 表 XIV

[0357] 重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂 α 1-抗胰凝乳蛋白酶 (ACT) 及其变体的 RSL (反应性丝氨酸蛋白酶抑制剂环) 区的比对。

[0358]

丝氨酸蛋白 酶抑制剂	选择的 ^a 底物肽	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5
ACT_{WT}		V	K	I	T	L	L*	S	A	L	V	V
ACT_{G1}	vGSLR	V	K	<u>G</u>	<u>S</u>	L	R*	S	A	L	V	V
ACT_{G1g}	vGSLRG	V	K	<u>G</u>	<u>S</u>	L	R*	<u>G</u>	A	L	V	V
ACT_{G1v}	VGSLR	V	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	L	R*	S	A	L	V	E
ACT_{C11}	RQTNd	V	K	I	T	L	R*	Q	<u>T</u>	<u>N</u>	V	V
ACT_{C11g}	gRQTNd	V	K	I	T	<u>G</u>	R*	Q	<u>T</u>	<u>N</u>	V	V
ACT_{C11D}	gRQTND	V	K	I	T	L	R*	Q	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	V
ACT_{E5}	NQRSS	V	K	I	<u>N</u>	Q	R*	S	<u>S</u>	L	V	V
ACT_{E8}	LQRAI	V	K	I	<u>L</u>	Q	R*	<u>A</u>	<u>I</u>	L	V	V
ACT_{F11}	QRLRD	V	K	<u>Q</u>	<u>R</u>	L	R*	<u>D</u>	A	L	V	V

[0359]

ACT_{F3}	PDRHM	V	K	I	<u>P</u>	<u>D</u>	R*	<u>H</u>	<u>M</u>	L	V	V
ACT_{G9}	TVDYA	V	K	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	Y*	<u>A</u>	<u>A</u>	L	V	V

[0360] ^a 使用噬菌体展示的随机五肽文库由激肽释放酶 hK14 选择的底物肽。

[0361] 正常字体的残基与 rACT_{WT} 的相同,下划线残基对应于重新定位于 ACT 变体的 RSL 中的底物肽。底物肽中可被 hK14 切断的易断键以黑体标识,丝氨酸蛋白酶抑制剂中可能的切割位点由 P1-P1' 残基之间的星号标记。

[0362] 表 XV

[0363] 重组体丝氨酸蛋白酶抑制剂 α 1-抗胰蛋白酶 (AAT) 及其变体的 RSL (反应性丝

氨酸蛋白酶抑制剂环)区的比对。

[0364]

丝氨酸 蛋白酶 抑制剂	选择的 ^a 底物肽	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5
AAT _{WT}		L	E	A	I	P	M*	S	I	P	P	E
AAT _{G1}	vGSLR	L	E	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	R*	S	I	P	P	E
AAT _{G1g}	vGSLRG	L	E	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	R*	<u>G</u>	I	P	P	E
AAT _{G1v}	VGSLR	L	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	R*	S	I	P	P	E
AAT _{C11}	RQTND	L	E	A	I	P	R*	Q	<u>T</u>	<u>N</u>	P	E
AAT _{C11g}	gRQTND	L	E	A	I	<u>G</u>	R*	Q	<u>T</u>	<u>N</u>	P	E
AAT _{E5}	NQRSS	L	E	A	<u>N</u>	Q	R*	S	<u>S</u>	P	P	E
AAT _{E8}	LQRAI	L	E	A	<u>L</u>	Q	R*	<u>A</u>	I	P	P	E
AAT _{F11}	QRLRD	L	E	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	R*	<u>D</u>	I	P	P	E
AAT _{F3}	PDRHM	L	E	A	<u>P</u>	<u>D</u>	R*	<u>H</u>	<u>M</u>	P	P	E
AAT _{G9}	TVDYA	L	E	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	Y*	<u>A</u>	I	P	P	E

[0365] ^a 使用噬菌体展示的随机五肽文库由激肽释放酶 hK14 选择的底物肽。

[0366] 正常字体的残基与 rAAT_{WT} 的相同,下划线残基对应于重新定位于 AT 变体的 RSL 中的底物肽。底物肽中可被 hK14 切断的易断键以黑体标识,丝氨酸蛋白酶抑制剂中可能的切割位点由 P1-P1' 残基之间的星号标记。

[0367] 抑制的化学计量 (SI) 和抑制反应速率 (ka) 在生理条件的 pH 和离子强度下进行确定,以确保更相关的比较。与野生型 ACT 相比,几乎所有新构建的 ACT 变体都显示了更低的与 hK14 的 SI 值。在些变体中,rACT_{C11}、rACT_{C11D}、rACT_{G9} 和 rACT_{E8} 对 hK14 具有最低的抑制的化学计量 (分别为 4.8、2.8、1.5 和 1.2) 并具有最大的结合常数 (分别为 65000、74000、75000 和 575000M⁻¹s⁻¹)。

[0368] 与 ACT 不同,丝氨酸蛋白酶抑制剂 AAT_{WT} 是 hK14 的良好抑制剂,有 263000M⁻¹s⁻¹ 的结合常数。所有 AAT 变体都具有比 AAT_{WT} 更小的结合常数,但它们中的一些仍以高速率与 hK14 反应,因为 AAT_{G1}、AAT_{G9}、AAT_{E8}、AAT_{G1g} 和 AAT_{C11} 分别表现出 168000、217000、242000、257000 和 63000M⁻¹s⁻¹ 的 ka。仅两种 AT 变体不抑制 hK14。

[0369] 表 XVI

[0370] ACT 变体与 hK14 反应的化学计量抑制值和二级速率常数 (k_a) 的对比。

	克隆	选择的 ^a	SI	k_a	$M^{-1} s^{-1}$
	底物肽				
[0371]	ACT _{WT}		-	-	
	ACT _{G1}	vGSLR↓	13.3	3 200*	
	ACT _{G1g}	vGSLR↓G	-	-	
	ACT _{G1v}	VGSLR↓	11.7	22 000*	
	ACT _{C11}	R↓QTND	4.8	65 000*	
	ACT _{C11g}	gR↓QTND	13.8	7 600*	
	ACT _{C11}	gR↓QTND	2.8	74 000*	
	D				
	ACT _{E5}	NQR↓SS	-	-	
	ACT _{E8}	LQR↓AI	1.2	575 000	
[0372]	ACT _{F11}	QRLR↓D	-	-	
	ACT _{F3}	PDR↓HM	-	-	
	ACT _{G9}	TVDY↓A	1.5	74 000	

[0372] *计算基于 $[I_0]/[E_0] < 5$ * SI 的反应条件。

[0373] 表 XVII

[0374] AT 变体与 hK14 反应的化学计量抑制值和二级速率常数 (k_a) 的对比。

	克隆	选择的 ^a	SI	k_a	$M^{-1} s^{-1}$
	底物肽				
[0376]	AAT _{WT}		1.0	263 000	
	AAT _{G1}	vGSLR↓	3.6	168 00*	
	AAT _{G1g}	vGSLR↓G	2.3	257 000*	
	AAT _{G1v}	VGSLR↓	-	-	
	AAT _{C11}	R↓QTND	2.8	63 000*	
	AAT _{C11g}	gR↓QTND	9	42 000*	
	AAT _{E5}	NQR↓SS	10	28 000*	
	AAT _{E8}	LQR↓AI	7.4	242 000*	
	AAT _{F11}	QRLR↓D	-	-	
	AAT _{F3}	PDR↓HM	11.7	13 000*	
	AAT _{G9}	TVDY↓A	1.2	217 000	

[0377] *计算基于 $[I_0]/[E_0] < 5$ * SI 的反应条件。

[0378] 筛选包括胰蛋白酶、人中性粒细胞弹性蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、血浆激肽释放酶(PK)、尿激酶(uPA)和凝血酶的一组酶,以确定对 hK14 的 SI 小于 10 的 ACT 和 AAT 变体的抑制特异性(表 XVIII)。当与过量抑制剂(50 : 1 的 [I]₀/[E]₀) 孵育 30 分钟时, hK14 被完全抑制(100%)。在这种情况下,野生型 ACT 显示对 hK14 仅 17% 的抑制活性,不同于 AAT_{wt}(抑制 100%)。在 ACT 变体中,两种(rACT_{C11}和 rACT_{C11D})显示了对 hK14 的特异性,不抑制除胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶外的其他测试酶。对于 AAT 变体,这些新抑制剂呈现的对 hK14 的特异性明显比 AAT_{wt} 对 hK14 的特异性更高。AAT_{G9} 被证明对 hK14 有高特异性,表现为与任何胰蛋白酶样蛋白酶无反应性。

[0379] 表 XVIII

[0380] ACT_{WT}、AAT_{WT}、及其变体的抑制谱

[0381]

	ACT _{C11}	ACT _{C11D}	ACT _{E8}	ACT _{WT}	AAT _{G1}	AAT _{G1g}	AAT _{C11}	AAT _{E8}	AAT _{G9}	AAT _{WT}
	%抑制									
蛋白酶										
HK14	100	100	100	17	100	100	100	100	100	100
胰蛋白 酶										
Chtr	84	83	14	100	27	17	18	19	100	100
PK	0	0	36	46	100	100	8	100	0	17
HNE	0	0	0	26	0	0	0	0	0	100
尿激酶	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0
Trombin	0	0	0	18	51	0	100	0	0	4

[0383] ^a 在 37℃ 下,将丝氨酸蛋白酶抑制剂和蛋白酶以 50 : 1 的 [I]₀/[E]₀ 比孵育 30 分钟。抑制百分数对应于 100 × (1 - (存在抑制的速率 / 非抑制对照的速率))。

[0384] 以更大组的与 hK14 相关的组织激肽释放酶筛选另外的 hK14 抑制性 ACT 变体。观察到了对不同亚组的测试激肽释放酶的部分抑制。

[0385] 表 XIX

		ACT _{G1}	ACT _{G1g}	ACT _{C11g}	ACT _{E5}	ACT _{F1}
		1				
		% 抑制 ^a				
蛋白酶						
[0386]	hK2	15	0	25	0	25
	hK4	0	0	0	75	45
	hK5	50	10	5	10	15
	hK6	20	0	0	0	0
	hK8	0	0	0	10	0

[0387] ^a 在 37℃ 下, 将蛋白酶和丝氨酸蛋白酶抑制剂以 50 : 1 的 [I]₀/[E]₀ 比孵育 30 分钟。抑制百分数对应于 $100 \times (1 - (\text{存在抑制的速率} / \text{非抑制对照的速率}))$ 。

[0388] 对 hK14 的噬菌体展示选择的底物的 RSL 切割位点的重排已经将野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂 (ACT 和 AAT) 改变成 hK14 的高敏感抑制剂, 特别是显示独特反应性的 AAT_{G9}。据本申请人所知, 这是第一份描述开发特异性针对 hK14 的抑制剂的报道。一些重组体抑制剂还抑制 hK14 之外的其他酶的事实不使人感到意外, 这是因为胰蛋白酶样蛋白酶之间的底物的同源性。而且, 应确定重组体抑制剂对其他酶的反应速率。

[0389] 表 XX

[0390]

黑棘皮病 (Acanthosis Nigricans),	口腔细菌感染 (Bacterial Mouth Infections),	融合性网状乳头瘤病 (Confluent and Reticulated Papillomatosis),
聚合性痤疮 (Acne Conglobata),	浆细胞性局限性龟头炎 (Balanitis Circumscripta Plasmacellularis),	先天性毳毛性多毛症 (Congenital Hypertrichosis Lanuginosa),
暴发性痤疮 (Acne Fulminans),	闭塞性干燥性龟头炎 (Balanitis Xerotica Obliterans),	先天性痣 (Congenital Nevi),
项部瘢痕疙瘩性痤疮 (Acne Keloidalis Nuchae),	龟头包皮炎 (Balanoposthitis),	食指的先天性甲营养不良 (Congenital Onychodystrophy of the Index Fingers),
寻常痤疮 (Acne Vulgaris),	基底细胞癌 (Basal Cell Carcinoma),	先天性图案状白皮病 (Congenital Patterned Leukodermas),
痤疮状发疹 (Acneiform Eruptions),	基底切除手术 (Basic Excisional Surgery),	结缔组织痣 (Connective Tissue Nevus),
获得性指(趾)部纤维角化瘤 (Acquired Digital Fibrokeratoma),	贝克尔黑变病 (Becker Melanosis),	接触性皮炎 (变应性) (Contact Dermatitis, (Allergic)),
获得性进展性淋巴管瘤 (Acquired Progressive Lymphangioma),	臭虫叮咬 (Bedbug Bites),	接触性皮炎 (刺激性) (Contact Dermatitis, (Irritant)),
软垂疣 (Acrochordon),	白塞氏病 (Behcet Disease),	接触性口腔炎 (Contact Stomatitis),
慢性萎缩性肢端皮炎 (Acrodermatitis Chronica Atrophicans),	化妆品皮炎 (Behcet Disease),	鸡眼 (Corns),
肠病性肢端皮炎 (Acrodermatitis Enteropathica),	Birt-Hogg-Dube 综合征 (Birt-Hogg-Dube Syndrome),	功能化妆品 (Cosmeceuticals),
肢痛症 (Acrodynia),	黑踵病 (足跟瘀斑) (Black Heel (Calcaneal Petechiae)),	
肢端角化类弹力纤维病 (Acrokeratoelastoidosis),	黑寡妇蜘蛛咬伤 (Black Heel (Calcaneal Petechiae)),	
新生物肢端角化病	布卢姆综合征 (先天性毛细血管扩张性红斑) (Bloom	

[0391]

(**Acrokeratosis Syndrome (Congenital Neoplastica)**), 化妆品 (Cosmetics),
Hopf 疣状肢端角化病 (**Acrokeratosis Verruciformis of Hopf**), **Telangiectatic Erythema**), 考登病 (多发性错构瘤综合征) (Cowden Disease
肢端肥大症 (**Acromegaly**), **蓝色橡皮疱样痣综合征 (Blue Rubber Bleb Nevus Syndrome)**, **(Multiple Hamartoma Syndrome)**),
婴儿肢端脓疱病 (**Acropustulosis of Infancy**), **Rubber Bleb Nevus Syndrome**, 人牛痘病毒感染 (Cowpox Infection, Human),
光化性角化病 (Actinic Keratosis), **Bleb Nevus Syndrome**, **CREST 综合征 (CREST Syndrome)**,
光化性痒疹 (Actinic Prurigo), **肉毒杆菌毒素 (Botulinum Toxin)**, 克-卡二氏综合征 (**Cronkhite-Canada Syndrome**),
光化性紫癜 (Actinic Purpura), **南欧斑疹热 (Boutonneuse Fever)**, **Crouzon 综合征 (Crouzon Syndrome)**,
放线菌病 (Actinomycosis), **鲍恩病 (Boutonneuse Fever)**, 冷冻疗法 (Cryotherapy),
急性发热性中性皮肤病 (Acute Febrile Neutrophilic Dermatitis), **鲍恩样丘疹病 (Bowenoid Papulosis)**, 皮肤 CD30+ (Ki-1) 间变性大细胞淋巴瘤 (**Cutaneous CD30+ (Ki-1) Anaplastic Large-Cell Lymphoma**),
婴儿急性出血性水肿 (Acute Hemorrhagic Edema of Infancy), **鳃裂囊肿 (Branchial Cleft Cyst)**, 皮肤胆固醇栓塞 (**Cutaneous Cholesterol Emboli**),
艾迪生病 (Addison Disease), **腋臭 (Bromhidrosis)**, 皮肤柱状囊肿 (**Cutaneous Columnar Cysts**),
痛性肥胖病 (Adiposis Dolorosa), **棕色遁蛛咬伤 (Brown Recluse Spider Bite)**, 皮肤隐球菌 (**Cutaneous Cryptococcus**),
前移皮瓣 (Advancement Flaps), **Bruton 型无丙种球蛋白血症 (Bruton Agammaglobulinemia)**, 皮肤异位脑 (**Cutaneous Ectopic Brain**),
箍趾病 (Ainhum), **糖尿病大疱性疾病 (Bullous Disease of Diabetes)**, 皮角 (**Cutaneous Horn**),
化学烧伤 (Bullous Pemphigoid), **透析型大疱性疾病 (Bullous Disease of Dialysis)**, 皮肤 Kikuchi 病 (**Cutaneous Kikuchi**

[0392]

白化病 (Albinism), 电烧伤 (Burns, Electrical), Disease),
 奥尔布赖特综合征 布鲁里溃疡 (Burns, 皮肤幼虫移行症
 (Albright Syndrome) Electrical), (Cutaneous Larva
 眼 - 皮肤 - 耳综合征 皮肤钙质沉着症 (Calcinosis Migrans),
 (Alezzandrini Cutis), 皮肤激光换肤: 二氧化碳
 Syndrome) 钙过敏症 (Calcinosis (Cutaneous Laser
 斑秃 (Alopecia Areata), Cutis), Resurfacing: Carbon
 黏蛋白性脱发 (Alopecia 口腔粘膜癌症 (Cancers of Dioxide),
 Mucinosi), the Oral Mucosa), 皮肤激光换肤: 铒:YAG
 苔藓状淀粉样变 慢性皮肤粘膜念珠菌病 (Cutaneous Laser
 (Amyloidosis, Lichen), (Cancers of the Oral Resurfacing:
 斑状淀粉样变 Mucosa), Erbium:YAG),
 (Amyloidosis, 皮肤念珠菌 (Candidiasis, 暴露于海上生活后的皮肤
 Macular), Cutaneous), 表征 (Cutaneous
 结节性淀粉样变 黏膜念珠菌 (Candidiasis, Manifestations Following
 (Amyloidosis, Nodular Mucosal), Exposures to Marine
 Localized Cutaneous), 毛细管畸形 (Capillary Life),
 原发全身性淀粉样变 Malformation), 胆固醇栓塞的皮肤表征
 (Amyloidosis, Primary 卡尼综合征 (Carney (Cutaneous
 Systemic), Syndrome), Manifestations of
 生长期脱发 (Anagen 胡萝卜素血症 (Carney Cholesterol Embolism),
 Effluvium), Syndrome), 丙型肝炎的皮肤表征
 皮肤手术中的解剖 猫抓病 (Catscratch (Cutaneous
 (Anatomy in Cutaneous Disease), Manifestations of
 Surgery), 蜂窝组织炎 (Catscratch Hepatitis C),
 雄激素性秃顶 Disease), 艾滋病毒病的皮肤表征
 (Androgenetic 软下疳 (Catscratch (Cutaneous
 Alopecia), Disease), Manifestations of HIV
 皮肤松弛症 白细胞异常色素减退综合征 Disease),
 (Anetoderma), (Catscratch Disease), 吸烟的皮肤表征
 出血性大疱性咽峡炎 颊重建 (Cheek (Cutaneous
 (Angina Bullosa Reconstruction), Manifestations of

[0393]

Hemorrhagica), 腺性唇炎 (Cheek Smoking),
 获得性血管性水肿 Reconstruction), 皮肤黑棘皮瘤 (Cutaneous
 (Angioedema, 肉芽肿性唇炎 (Miescher-Melanoacanthoma),
 Acquired), Melkersson - Rosenthal 综合 皮肤 T 细胞淋巴瘤
 遗传性血管性水肿 征) (Cheilitis (Cutaneous T-Cell
 (Angioedema, Granulomatosa Lymphoma),
 Hereditary), (Miescher-Melkersson-Rose 皮肤结核病 (Cutaneous
 血管内皮细胞瘤病 nthal Syndrome)), Tuberculosis),
 (Angioendotheliomatosis 化学脱皮 (Chemical Peels), 皮肤松弛症 (弹力纤维松
), 化疗性口腔粘膜炎 解症) (Cutis Laxa
 血管免疫母细胞淋巴结病 (Chemotherapy-Induced (Elastolysis)),
 伴有异常蛋白血症 Oral Mucositis), 先天性毛细血管扩张性大
 (Angioimmunoblastic 櫻桃状血管瘤 理石样皮肤 (Cutis
 Lymphadenopathy With (Chemotherapy-Induced Marmorata
 Dysproteinemia), Oral Mucositis), Telangiectatica
 局限性血管角化瘤 水痘 (Chickenpox), Congenita),
 (Angiokeratoma 儿童综合征 (CHILD 回状头皮 (Cutis Verticis
 Circumscriptum), Syndrome), Gyrata),
 弥漫性躯体性血管角化瘤 童年艾滋病病毒病 (Childhood 圆柱瘤 (Cylindroma),
 (法布里综合征) HIV Disease), 血管内乳头状血管内皮瘤
 (Angiokeratoma 耳轮结节性软骨皮炎 (Dabska Tumor),
 Corporis Diffusum (Fabry (Chondrodermatitis 德朗热综合征 (de Lange
 Syndrome)), Nodularis Helicis), Syndrome),
 阴囊毛细管扩张性疣 色汗症 (Chromhidrosis), 德戈斯病 (Degos
 (Angiokeratoma of the 着色芽生菌病 Disease),
 Scrotum), (Chromoblastomycosis), 寄生虫妄想症 (Delusions
 血管淋巴样增生伴嗜酸细 慢性肉芽肿性疾病 (Chronic of Parasitosis),
 胞增多 (Angiolymphoid Granulomatous Disease), 登革热 (Dengue),
 Hyperplasia with Churg - Strauss 症候群 (变 义齿口腔炎 (Denture
 Eosinophilia), 应性肉芽肿病) Stomatitis),
 匍行性血管瘤 (Angioma (Churg-Strauss Syndrome 皮肤磨削
 Serpiginosum), (Allergic Granulomatosis), (Dermabrasion),

[0394]

动物咬伤 (Animal Bites), 瘢痕性类天疱疮皮肤填充剂 (Dermal
 口疮性口腔炎 (Aphthous (Churg-Strauss Syndrome Fillers),
 Stomatitis), (Allergic Granulomatosis), 人为性皮炎 (Dermatitis
 先天性表皮发育不全 鸡眼 (Clavus), Artefacta),
 (Aplasia Cutis 复杂创伤的闭合 (Clavus), 疱疹样皮炎 (Dermatitis
 Congenita), 杵状指甲 (Clavus), Herpetiformis),
 大汗腺囊肿 (Apocrine 科布综合征 (Cobb 皮肤纤维瘤
 Hidrocystoma), Syndrome), (Dermatofibroma),
 溶血隐秘杆菌病 球孢子菌病 (Cobb 隆凸性皮肤纤维肉瘤
 (Arcanobacterium Syndrome), (Dermatofibrosarcoma
 Haemolyticum), 银中毒 科凯恩综合征 (Cobb Protuberans),
 (Argyria), Syndrome) 豆状皮肤纤维瘤病
 砷角化病 (Arsenical 寒冷性脂膜炎 (Cobb (Buschke-Ollendorf 综
 Keratosis), Syndrome), 合征) (Dermatofibrosis
 曲霉病 (Aspergillosis), 胶样粟丘疹 (Cobb Lenticularis
 乏皮脂性湿疹 (Asteatotic Syndrome), (Buschke-Ollendorf
 Eczema), 普通变异免疫缺陷 Syndrome)),
 儿童非对称屈侧周疹 (Common Variable 生物恐怖剂的皮肤学外观
 (Asymmetric Immunodeficiency), (Dermatologic Aspects
 Periflexural Exanthem of 补体受体缺乏 (Complement of Bioterrorism Agents),
 Childhood), Receptor Deficiency), 生物恐怖剂炭疽的皮肤学
 共济失调毛细血管扩张症 皮肤激光手术并发症 外观 (Dermatologic
 (Ataxia-Telangiectasia), (Complications of Aspects of Bioterrorism
 特应性皮炎 (Atopic Dermatologic Laser Agents, Anthrax),
 Dermatitis), Surgery), 心脏病的皮肤学表征
 皮肤痘疮样斑状萎缩 灶性皮肤发育不全菜花样乳 (Dermatologic
 (Atrophia Maculosa 头状瘤病 (Florid Cutaneous Manifestations of
 Varioliformis Cutis), Papillomatosis), Cardiac Disease),
 Pasini 和 Pierini 皮肤萎缩 发育不全综合征 (Focal 胃肠病的皮肤学表征
 (Atrophoderma of Pasini Dermal Hypoplasia (Dermatologic
 and Pierini), Syndrome), Manifestations of
 非典型纤维黄色瘤 巴西天疱疮 (Fogo Gastrointestinal

[0395]

(Atypical Selvagem), Disease),
 Fibroxanthoma), 毛囊漏斗部肿瘤 (Follicular 血液病的皮肤学表征
 非典型痣 (发育不良痣) Infundibulum Tumor), (Dermatologic
 (Atypical Mole 毛囊炎 (Folliculitis), Manifestations of
 (Dysplastic Nevus)), 非 卵泡瘤 (Folliculoma), Hematologic Disease),
 典型分枝杆菌病 (Atypical 前额和太阳穴重建 神经疾病的皮肤学表征
 Mycobacterial Diseases), (Forehead and Temple (Dermatologic
 维生素 A 缺乏症 Reconstruction), Manifestations of
 (Avitaminosis A), 福克斯 - 福代斯病 Neurologic Disease),
 腋粒状角化不全 (Axillary (Fox-Fordyce Disease), 肺病的皮肤学表征
 Granular Parakeratosis), 摩擦水疱 (Friction (Dermatologic
 杆菌性血管瘤 (Bacillary Blisters), Manifestations of
 Angiomatosis), 冻伤 (Frostbite), Pulmonary Disease),
 指(趾)部粘液囊肿 (Digital 加德纳综合征 (Gardner 肾病的皮肤学表征
 Mucous Cyst), Syndrome), (Dermatologic
 指(趾)部摄影 (Digital 泛发性特发性毛细血管扩张 Manifestations of Renal
 Photography), (Generalized Essential Disease),
 温纳孔扩张 (Dilated Pore Telangiectasia) 皮肤病学因特网地址
 of Winer), 地图样舌 (Geographic (Dermatology Internet
 传播性和复发性漏斗部毛 Tongue) Sites),
 囊炎 (Disseminate and Gianotti-Crosti 综合征 (小 皮 肌 炎
 Recurrent Infundibular 儿丘疹性肢端皮炎) (Dermatomyositis),
 Folliculitis), (Gianotti-Crosti Syndrome 网状色素皮病
 唐氏综合征 (Down (Papular Acrodermatitis of (Dermatopathia
 Syndrome), Childhood)) Pigmentosa Reticularis),
 药疹 (Drug Eruptions), 布施克-罗文斯二氏巨大尖 黑色丘疹性皮肤病
 药物性大疱性疾病 锐湿疣 (Giant Condylomata (Dermatosi Papulosa
 (Drug-Induced Bullous Acuminata of Buschke and Nigra),
 Disorders), 药物性牙龈 Lowenstein) 皮样囊肿 (Dermoid
 增生 (Drug-Induced 血管球瘤 (Glomus Tumor) Cyst),
 Gingival Hyperplasia), 胰高血糖素瘤综合征 皮肤镜学 (Dermoscopy),
 药物性光过敏 (Glucagonoma Syndrome) 硬纤维瘤 (Desmoid

[0396]

(**Drug-Induced I-VII 型糖原贮积病 Tumor**), 迪格奥尔格综
Photosensitivity), (**Glycogen Storage 合 征 (DiGeorge**
 药 物 性 色 素 沉 着 **Diseases Types I-VII) Syndrome**),
 (**Drug-Induced 淋球菌血症 (Gonococcemia) 擦烂 (Intertrigo)**
Pigmentation), 移 植 物 抗 宿 主 病 (**Graft 海 蜇 螫 伤 (Jellyfish**
 药 物 性 假 性 淋 巴 瘤 综 合 征 **Versus Host Disease) Stings**)
 (**Drug-Induced Graham-Little-Piccardi-Las Jessner 皮 肤 淋 巴 细 胞 浸**
Pseudolymphoma seur 综 合 征 润 症 (Jessner
Syndrome), (**Graham-Little-Piccardi-L Lymphocytic Infiltration**
 掌 腱 膜 挛 缩 (**Dupuytren asseur Syndrome) of the Skin**)
Contracture), 革 兰 氏 阴 性 菌 毛 囊 炎 乔 布 综 合 征 (**Job**
 汗 疱 性 湿 疹 (**Dyshidrotic (Gram-Negative Syndrome**)
Eczema), **Folliculitis**) 少 年 黄 色 肉 芽 肿 (痣 性 黄
 先 天 性 角 化 不 良 革 兰 阴 性 菌 趾 蹼 感 染 色 内 皮 瘤) (**Juvenile**
 (**Dyskeratosis (Gram-Negative Toe Web Xanthogranuloma**
Congenita), **Infection**) (**Nevoxanthoendotheliom**
 畸 形 恐 惧 环 状 肉 芽 肿 (**Granuloma a)**)
 (**Dysmorphophobia**), **Annulare**) 卡 波 西 肉 瘤 (**Kaposi**
 耳 重 建 (**Ear 面 部 肉 芽 肿 (Granuloma Sarcoma**
Reconstruction), **Faciale**) 卡 波 西 水 痘 样 疹 (**Kaposi**
 小 汗 腺 癌 (**Eccrine 婴 儿 臀 部 肉 芽 肿 (Granuloma Varicelliform Eruption**
Carcinoma), **Gluteale Infantum**) 川 崎 病 (**Kawasaki**
 小 汗 腺 螺 旋 腺 瘤 (**Eccrine 腹 股 沟 肉 芽 肿 (杜 诺 凡 病) Disease**)
Spiradenoma), (**Granuloma Inguinale 痕 痕 疙 瘩 和 肥 厚 性 痕 痕**
Ecthyma), (**Donovanosis**) (**Keloid and**
 坏 疽 性 脓 疮 (**Ecthyma 鼻 红 粒 病 (Granulosis Rubra Hypertrophic Scar**)
Gangrenosum), **Nasi**) 角 化 棘 皮 瘤
 外 胚 层 发 育 不 良 症 格 里 塞 利 综 合 征 (**Griscelli (Keratoacanthoma**)
 (**Ectodermal Syndrome**) 毛 囊 角 化 病 (达 里 耶 病)
Dysplasia), 哈 伯 兰 综 合 征 (**Haberland (Keratosis Follicularis**
 埃 勒 斯 - 当 洛 综 合 征 **Syndrome**) (**Darier Disease**)
 (**Ehlers-Danlos 毛 发 移 植 (Hair 掌 跖 角 化 病 (Keratosis**

[0397]

Syndrome),	Transplantation)	Palmaris et Plantaris)
弹力纤维瘤	毛发移植: 毛囊单位移植法	毛发角化病 (Keratosi-
(Elastofibroma),	(Hair Transplantation:	Pilaris)
匍行性穿通性弹力纤维病	Follicular Unit Transplant	木村病 (Kimura Disease)
(Elastosis Perforans	Method)	金德勒综合征 (Kindler
Serpiginosum),	毛舌 (Hairy Tongue)	Syndrome)
埃勒雅尔德综合征	晕痣 (Halo Nevus)	Klippel-Trenaunay-Webe-
(Elejalde Syndrome),	卤代物皮疹	r 综合征
地方性梅毒 (Endemic	(Halogenoderma)	(Klippel-Trenaunay-We-
Syphilis),	手足和口病	ber Syndrome)
肠道病毒感染	(Hand-Foot-and-Mouth	指节垫 (Knuckle Pads)
(Enteroviral	Disease)	基勒病 (Kyrle Disease)
Infections),	在皮肤科手持式计算机	朗格汉斯细胞组织细胞增
嗜酸细胞增多性肌痛综合	(Handheld Computers in	生症 (Langerhans Cell
征 (Eosinophilia-Myalgia	Dermatology)	Histiocytosis)
Syndrome),	哈特纳普疾病 (Hartnup	疤痕的激光修复 (Laser
嗜酸细胞性筋膜炎	Disease)	Revision of Scars)
(Eosinophilic Fasciitis),	血色病 (Hemochromatosis)	获得性和先天性血管病变
嗜酸细胞性脓疱性毛囊炎	Henoch-Schönlein 综合征	的激光治疗 (Laser
(Eosinophilic Pustular	(过敏性紫癜)	Treatment of Acquired
Folliculitis),	(Henoch-Schönlein	and Congenital Vascular
嗜酸细胞性溃疡	Purpura (Anaphylactoid	Lesions)
(Eosinophilic Ulcer),	Purpura)	良性色素性病变的激光治
雀斑 (Ephelides	赫曼斯基-普德拉克综合征	疗 (Laser Treatment of
(Freckles),	(Hermansky-Pudlak	Benign Pigmented
表皮包涵囊肿 (Epidermal	Syndrome)	Lesions)
Inclusion Cyst),	单纯疱疹 (Herpes Simplex)	小腿静脉的激光治疗
表皮痣综合征 (Epidermal	带状疱疹 (Herpes Zoster)	(Laser Treatment of
Nevus Syndrome),	化脓性汗腺炎 (Hidradenitis	Leg Veins)
疣状表皮发育不良	Suppurativa)	激光辅助脱毛
(Epidermodysplasia	多毛症 (Hirsutism)	(Laser-Assisted Hair
Verruciformis), 大疱性	同型胱氨酸尿症	Removal)

[0398]

表皮松解症 (Homocystinuria)	洛吉耶-亨齐克综合征
(Epidermolysis Bullosa),	(Laugier-Hunziker Syndrome)
获得性大疱性表皮松解症	劳-赛二氏综合征
(Epidermolysis Bullosa Acquisita),	(Lawrence-Seip Syndrome)
表皮过度角化 (先天性大疱性鱼鳞病样红皮病)	平滑肌瘤 (Leiomyoma)
(Epidermolytic Hyperkeratosis (Bullous Congenital Ichthyosiform Erythroderma)),	利什曼病 (Leishmaniasis)
裂隙性龈瘤 (Epulis Fissuratum),	雀斑痣 (Lentigo)
发疹性毳毛囊肿 (Eruptive Vellus Hair Cysts),	豹皮综合征 (LEOPARD Syndrome)
丹毒 (Erysipelas),	麻风 (Leprosy)
类丹毒 (Erysipeloid),	皮肤白血病 (Leukemia Cutis)
火激红斑 (Erythema Ab Igne),	口腔白斑 (Leukoplakia, Oral)
离心性环状红斑 (Erythema Annulare Centrifugum),	虱病 (Lice)
持久性色素异常性红斑 (Erythema Dyschromicum Perstans),	黏液水肿性苔藓 (Lichen Myxedematosus)
持久性隆起性红斑 (Erythema Elevatum Diutinum),	光泽苔藓 (Lichen Nitidus)
匍行性回状红斑 (Erythema Gyrate Repens),	扁平苔藓 (Lichen Planus)
	硬化萎缩性苔藓 (Lichen Sclerosus et Atrophicus)
	慢性单纯性苔藓 (Lichen Simplex Chronicus)
	小棘苔藓 (Lichen Spinulosus)
	条纹状苔藓 (Lichen Striatus)
	线状 IgA 皮肤病 (Linear IgA Dermatitis)
	唇重建 (Lip

[0399]

硬结性红斑 (结节性血管炎)(Erythema Induratum (Nodular Vasculitis)) ,	Fetalis)	Reconstruction)
传染性红斑 (第五病) (Erythema Infectiosum (Fifth Disease)) ,	遗传性和获得性寻常性鱼鳞病 (Ichthyosis Vulgaris, Hereditary and Acquired)	艾滋病病毒型脂质营养不良 (Lipodystrophy, HIV)
多形性红斑 (Erythema Multiforme) ,	片层状鱼鳞癣 (Ichthyosis, Lamellar)	局部脂质营养不良 (Lipodystrophy, Localized)
结节性红斑 (Erythema Nodosum) ,	X 连锁鱼鳞病 (Ichthyosis, X-Linked)	进行性脂肪代谢障碍 (Lipodystrophy, Progressive)
新生儿中毒性红斑 (Erythema Toxicum Neonatorum	自身反应 (自体湿疹化) (Id Reaction	类脂质蛋白沉积症 (Lipoid Proteinosis)
Erythrasma) ,	(Autoeczematization))	脂肪瘤 (Lipomas)
红皮症 (全身性剥脱性皮炎) (Erythroderma (Generalized Exfoliative Dermatitis)) ,	特发性滴状色素减少症 (Idiopathic Guttate Hypomelanosis)	脂肪肉瘤 (Liposarcoma)
可变性红斑角皮症 (Erythrokeratoderma Variabilis) ,	脓疱病 (Impetigo)	青斑样血管病 (Livedoid Vasculopathy)
凯拉增生性红斑 (阴茎头鲍恩病) (Erythroplasia of Queyrat (Bowen Disease of the Glans Penis)) ,	色素失调症 (Incontinentia Pigmenti)	洛博芽生菌病 (Lobomycosis)
红细胞生成性卟啉病 (Erythropoietic Porphyrria) ,	婴儿指 (趾) 部纤维瘤病 (Infantile Digital Fibromatosis)	局部麻醉和区域神经传导阻滞 (Local Anesthesia and Regional Nerve Block Anesthesia)
红细胞生成性原卟啉病 (Erythropoietic Protoporphyrria) ,	婴儿血管瘤 (Infantile Hemangioma)	生长期头发松动症 (Loose Anagen Syndrome)
组织运动要素 (Essentials	昆虫叮咬 (Insect Bites)	急性红斑狼疮 (Lupus Erythematosus, Acute)
	驱昆虫剂 (Insect Repellents)	大疱性红斑狼疮 (Lupus Erythematosus, Bullous)
	交互远程皮肤病学 (Interactive Teledermatology)	盘状红斑狼疮 (Lupus Erythematosus, Discoid)
	口腔检查 (Oral Examination)	药物性红斑性狼疮 (Lupus Erythematosus, Drug-Induced)
	口腔纤维瘤和纤维瘤病 (Oral Fibromas and Fibromatoses)	

[0400]

of Tissue Movement), 口腔菜花样乳头状瘤病 (Oral 亚急性皮肤红斑狼疮
 真菌性足分支菌病 (真菌 Frigid Papillomatosis) (Lupus Erythematosus,
 性足菌肿 (Eumycetoma 口腔摩擦过度角化 (Oral Subacute Cutaneous)
 (Fungal Mycetoma)), Frictional Hyperkeratosis) 颜面播散性粟粒性狼疮
 体外光除去 口腔颗粒细胞瘤 (Oral (Lupus Miliaris
 (Extracorporeal Granular Cell Tumors) Disseminatus Faciei)
 Photopheresis), 口腔血管瘤 (Oral 莱姆病 (Lyme Disease)
 乳房外佩吉特病 Hemangiomas) 淋巴管扩张
 (Extramammary Paget 口腔扁平苔藓 (Oral Lichen (Lymphangiectasia)
 Disease), Planus) 淋巴瘤 (Lymphoma)
 家族性良性天疱疮 口腔淋巴管瘤 (Oral (Lymphangioma)
 (Hailey-Hailey 病) Lymphangiomas) 皮肤淋巴细胞瘤
 (Familial Benign 口腔恶性黑色素瘤 (Oral (Lymphocytoma Cutis)
 Pemphigus (Hailey-Hailey Malignant Melanoma) 性病淋巴肉芽肿
 Disease)), 自身免疫起泡性疾病的口腔 (Lymphogranuloma
 Favre-Racouchot 综合征 表征 (Oral Manifestations of Venereum)
 (结节性弹力纤维病伴囊 Autoimmune Blistering 淋巴瘤样丘疹病
 肿及粉刺) Diseases) (Lymphomatoid
 (Favre-Racouchot 药物反应的口腔表征 (Oral Papulosis)
 Syndrome (Nodular Manifestations of Drug 马富奇综合征 (Maffucci
 Elastosis with Cysts and Reactions) Syndrome)
 Comedones)), 全身性疾病的口腔表征 马约基肉芽肿 (Majocchi
 黄癣 (Favus), (Oral Manifestations of Granuloma)
 骨化性纤维发育不良 Systemic Diseases) 软斑病 (Malakoplakia)
 (Fibrodysplasia 口腔黑棘皮瘤 (Oral 恶性黑色素瘤 (Malignant
 Ossificans), Melanoacanthoma) Melanoma)
 面部纤维性丘疹 (Fibrous 口腔神经纤维瘤 (Oral 肥大细胞增生症
 Papule of the Face), Neurofibroma) (Mastocytosis)
 丝虫病 (Filariasis), 口腔痣 (Oral Nevi) 炎症后色素沉着
 火蚁叮咬 (Fire Ant 口腔化脓性肉芽肿 (Oral (Postinflammatory
 Bites), Pyogenic Granuloma) Hyperpigmentation)
 裂纹舌 (Fissured 口腔粘膜下纤维化 (Oral 耳前窦道 (Preauricular

[0401]

Tongue) ,	Submucous Fibrosis)	Sinuses)
伤口缝合材料 (Materials for Wound Closure)	羊痘 (Orf)	恶变前纤维上皮瘤 (Pinkus 肿 瘤)
麻疹 (Measles) , 风疹 (Rubeola)	Osler-Weber-Rendu 综合征 (Osler-Weber-Rendu Syndrome)	(Premalignant Fibroepithelial Tumor (Pinkus Tumor))
婴儿黑色素神经外胚瘤 (Melanotic Neuroectodermal Tumor of Infancy)	皮肤骨瘤 (Osteoma Cutis)	术前评估与管理 (Preoperative Evaluation and Management)
黑斑病 (Melasma)	门诊手术室 (Outpatient Surgical Suite)	胫前粘液性水肿 (Pretibial Myxedema)
脑膜炎球菌血症 (Meningococemia)	骨膜增生厚皮症 (Pachydermoperiostosis)	增生性毛发肿瘤 (Proliferating Pilar Tumor)
门克斯卷发病 (Menkes Kinky Hair Disease)	先天性甲肥厚 (Pachyonychia Congenita)	蛋白能量营养不良 (Protein-Energy Malnutrition)
梅克尔细胞癌 (Merkel Cell Carcinoma)	乳腺佩吉特病 (Paget Disease, Mammary)	Proteus 综合征 (Proteus Syndrome)
转移性皮肤癌 (Metastatic Carcinoma of the Skin)	丘疹性荨麻疹 (Papular Urticaria)	皮肤原藻病 (Protothecosis, Cutaneous)
口腔转移性肿瘤 (Metastatic Neoplasms to the Oral Cavity)	丘疹坏死性结核疹 (Papulonecrotic Tuberculids)	结节性痒疹 (Prurigo Nodularis)
微囊性附属器癌 (Microcystic Adnexal Carcinoma)	副肿瘤性疾病 (Paraneoplastic Diseases)	妊娠瘙痒性荨麻疹性丘疹及斑块 (Pruritic Urticarial Papules and Plaques of Pregnancy)
粟丘疹 (Milia)	副银屑病 (Parapsoriasis)	瘙痒症和全身性疾病 (Pruritus and Systemic Disease)
痱 (Miliaria)	甲沟炎 (Paronychia)	
挤奶者结节 (Milker's Nodules)	珍珠样阴茎丘疹 (Pearly Penile Papules)	
混合性结缔组织病 (Mixed Connective Tissue Disease)	蒂皮瓣 / 邻位皮瓣 (Pedicle/Interpolation Flaps)	
Mohs 显微外科手术	糙皮病 (Pellagra)	
	妊娠类天疱疮 (Pemphigoid Gestationis)	
	红斑型天疱疮 (Pemphigus)	

[0402]

(Mohs Micrographic Surgery)	Erythematosis)	假性卡波西肉瘤 (肢端血管性皮炎)
保湿剂 (Moisturizers)	落叶型天疱疮 (Pemphigus Foliaceus)	(Pseudo-Kaposi Sarcoma
传染性软疣 (Molluscum Contagiosum)	疱疹样天疱疮 (Pemphigus Herpetiformis)	(Acroangiodermatitis)
胸壁浅表血栓性静脉炎 (Mondor Disease)	寻常型天疱疮 (Pemphigus Vulgaris)	颈部假性斑皮肤萎缩 (Pseudoatrophoderma Colli)
胎斑 (Mongolian Spot)	药物性天疱疮 (Pemphigus, Drug-Induced)	耳廓假囊肿 (Pseudocyst of the Auricle)
念珠状发 (Monilethrix)	IgA 型天疱疮 (Pemphigus, IgA)	胡须假性毛囊炎 (Pseudofolliculitis of the Beard)
硬斑病 (Morphea)	副肿瘤性天疱疮 (Pemphigus, Paraneoplastic)	皮肤假性淋巴瘤 (Pseudolymphoma, Cutaneous)
粘液囊肿及舌下囊肿 (Mucocoele and Ranula)	阴茎鳞状细胞癌 (Penile Squamous Cell Carcinoma)	假单胞菌毛囊炎 (Pseudomonas Folliculitis)
I-VII 型粘多糖贮积症 (Mucopolysaccharidoses Types I-VII)	穿通性毛囊炎 (Perforating Folliculitis)	Brocq 假性斑秃 (Pseudopelade, Brocq)
粘液囊肿 (Mucous Cyst)	头部脓肿性穿掘性毛囊周围炎 (Perifolliculitis Capitis Abscedens Et Suffodiens)	假卟啉症 (Pseudoporphyria)
指甲可有白色横纹 (Muehrcke Lines of the Fingernails)	口周皮炎 (Perioral Dermatitis)	弹性假黄色瘤 (Pseudoxanthoma Elasticum)
Muir-Torre 综合征 (Muir-Torre Syndrome)	外周血巨细胞肉芽肿 (Peripheral Giant Cell Granuloma)	点滴状银屑病 (Psoriasis, Guttate)
多中心网状组织细胞增多症 (Multicentric Reticulohistiocytosis)	冻疮 (Pernio)	甲银屑病 (Psoriasis, Nails)
多核细胞血管组织细胞瘤 (Multinucleate Cell Angiohistiocytoma)	阴茎纤维性海绵体炎 (Peyronie Disease)	斑块状银屑病 (Psoriasis, Plaque)
1 型多发性内分泌瘤病 (Multiple Endocrine Neoplasia Type 1)	苯丙酮尿症 (Phenylketonuria)	
足菌肿 (Mycetoma)	皮肤科光动力学疗法	

[0403]

鸟分枝杆菌胞内感染 (Mycobacterium Avium-Intracellulare Infection)	(Photodynamic Therapy for the Dermatologist)	脓疱型银屑病 (Psoriasis, Pustular)
皮肤海分枝杆菌感染 (Mycobacterium Marinum Infection of the Skin)	植物光皮炎 (Phytophotodermatitis)	银屑病关节炎 (Psoriatic Arthritis)
Naegeli-Franceschetti-Jad assohn 综合征 (Naegeli-Franceschetti-J adassohn Syndrome)	斑驳病 (Piebaldism) 毛结节菌病 (Piedra) 压迫性足部丘疹 (Piezogenic Pedal Papules)	牙髓息肉 (Pulp Polyp) 钻孔活检和手术刀活检 (Punch Biopsy and Scalpel Biopsy)
指(趾)甲化妆品 (Nail Cosmetics)	色素性紫癜性皮炎 (Pigmented Purpuric Dermatitis)	坏疽性脓皮病 (Pyoderma Gangrenosum) 增生性脓皮病 (Pyoderma Vegetans)
指(趾)甲手术 (Nail Surgery)	藏毛囊肿 (Pilar Cyst) 毛母质瘤 (Pilomatrixoma) 窝状角质松解症 (Pitted Keratolysis)	化脓性肉芽肿 (分叶状毛 细血管瘤) (Pyogenic Granuloma (Lobular Capillary Hemangioma))
指(趾)甲髌骨综合征 (Nail-Patella Syndrome)	白色糠疹 (Pityriasis Alba) 苔藓样糠疹 (Pityriasis Lichenoides)	反应性关节炎 (Reactive Arthritis)
鼻重建 (Nasal Reconstruction)	玫瑰糠疹 (Pityriasis Rosea) 圆形糠疹 (Pityriasis Rotunda)	反应性穿通性胶原病 (Reactive Perforating Collagenosis)
鼻腭管囊肿 (Nasopalatine Duct Cyst)	毛发红糠疹 (Pityriasis Rubra Pilaris)	雷夫叙姆病 (Refsum Disease)
脂质渐进性坏死 (Necrobiosis Lipoidica)	糠秕孢子菌毛囊炎 (Pityrosporum Folliculitis)	复发性多软骨炎 (Relapsing Polychondritis)
肢端坏死松解性红斑 (Necrolytic Acral Erythema)	足底纤维瘤病 (Plantar Fibromatosis)	网状色素异常 (Reticulate Pigmented Anomaly)
坏死性筋膜炎 (Necrotizing Fasciitis)	POEMS 综合征 (POEMS Syndrome)	鼻硬结病 (Rhinoscleroma)
坏死性涎腺化生 (Necrotizing Sialometaplasia)	西瓦特皮肤异色症 (Poikiloderma of Civate) 多形性日光疹	里尔黑变病 (Riehl Melanosis)

[0404]

新生儿红斑性狼疮 (Neonatal Lupus Erythematosus)	(Polymorphous Light Eruption)	落矶山斑点热 (Rocky Mountain Spotted Fever)
汗孔角化病 (Porokeratosis)		酒渣鼻 (Rosacea)
肾源性纤维化皮肤病 (Nephrogenic Fibrosing Dermopathy)	炎性硬结 (Poroma)	婴儿玫瑰疹 (Roseola Infantum)
迟发性皮肤卟啉病 (Porphyria Cutanea Tarda)		旋转皮瓣 (Rotation Flaps)
神经鞘瘤 (Neurilemoma)		
神经纤维瘤病 (Neurofibromatosis)	胆碱能性荨麻疹 (Urticaria, Cholinergic)	罗 - 汤二氏综合征 (Rothmund-Thomson Syndrome)
神经功能性表皮剥蚀 (Neurotic Excoriations)	慢性荨麻疹 (Urticaria, Chronic)	风疹 (Rubella)
嗜中性小汗腺炎 (Neutrophilic Eccrine Hidradenitis)	接触性荨麻疹综合征 (Urticaria, Contact Syndrome)	鲁宾斯坦-泰比综合征 (Rubinstein-Taybi Syndrome)
太田痣和伊藤痣 (Nevi of Ota and Ito)	皮肤划痕性荨麻疹 (Urticaria, Dermographism)	鲁德综合征 (Rud Syndrome)
黑素细胞型痣 (Nevi, Melanocytic) ,	压迫性荨麻疹 (Urticaria, Pressure)	结节病 (Sarcoidosis)
痣样基底细胞癌综合征 (Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome)	日光性荨麻疹 (Urticaria, Solar)	疥疮 (Scabies)
贫血痣 (Nevus Anemicus)	荨麻疹性血管炎 (Urticarial Vasculitis)	头皮重建 (Scalp Reconstruction)
蜘蛛血管瘤 (蛛网状痣) (Nevus Araneus (Spider Nevus))	以腔内激光治疗静脉曲张 (Varicose Vein Treatment with Endovenous Laser Therapy)	瘢痕修整 (Scar Revision)
黑头粉刺样痣 (Nevus Comedonicus)		猩红热 (Scarlet Fever)
皮脂腺痣 (Nevus Sebaceus)	静脉曲张和蜘蛛网形静脉 (Varicose Veins and Spider Veins)	Schnitzler 综合征 (Schnitzler Syndrome)
尼古丁口腔炎 (Nicotine Stomatitis)	以非卧床式静脉切除术治疗静脉曲张 (Varicose Veins)	硬肿症 (Scleredema)
尼曼 - 匹克病		新生儿硬肿症 (Sclerema Neonatorum)
		丛林斑疹伤寒 (Scrub Typhus)
		坏血病 (Scurvy)
		海水浴皮疹 (Seabather's Eruption)

[0405]

(Niemann-Pick Disease)	Treated with Ambulatory	皮脂腺腺瘤 (Sebaceous Adenoma)
Nijmegen 破损综合征	Phlebectomy)	
(Nijmegen Breakage Syndrome)	以射频消融疗法治疗静脉曲张 (Varicose Veins Treated with Radiofrequency Ablation Therapy)	皮脂腺癌 (Sebaceous Carcinoma)
诺卡菌病 (Nocardiosis)		皮脂腺增生 (Sebaceous Hyperplasia)
非剥脱式皮肤重建 (Nonablative Resurfacing)	混合型卟啉病 (Variegate Porphyria)	脂溢性皮炎 (Seborrheic Dermatitis)
口腔非假丝酵母真菌感染 (Noncandidal Fungal Infections of the Mouth)	静脉功能不全 (Venous Insufficiency)	脂溢性角化病 (Seborrheic Keratosis)
非激光脱毛技术 (Nonlaser Hair Removal Techniques)	静脉湖 (Venous Lakes)	重症联合免疫缺陷 (Severe Combined Immunodeficiency)
钱币状皮炎 (Nummular Dermatitis)	疣状黄瘤 (Verruciform Xanthoma)	Leser-Trelat 征 (Sign of Leser-Trelat)
褐黄病 (Ochronosis)	疣状癌 (Verrucous Carcinoma)	舍格伦综合征 (Sjogren Syndrome)
盘尾丝虫病 (河盲症) (Onchocerciasis (River Blindness))	水疱性掌跖湿疹 (Vesicular Palmoplantar Eczema)	舍格伦-拉松综合征 (Sjogren-Larsson Syndrome)
甲剥离 (Onycholysis)	创伤弧菌感染 (Vesicular Palmoplantar Eczema)	
灰指 (趾) 甲 (Onychomycosis)	病毒性出血热 (Viral Hemorrhagic Fevers)	皮肤及头发清洁剂 (Skin and Hair Cleansers)
计算机辅助分析的腔口刷拭活检 (Oral Brush Biopsy With Computer-Assisted Analysis)	口腔的病毒感染 (Viral Infections of the Mouth)	皮肤移植 (Skin Grafting)
口腔皮肤瘻 (Oral Cutaneous Fistulas)	白癜风 (Vitiligo)	皮肤美白和脱色剂 (Skin Lightening and Depigmenting Agents)
无烟烟草病变 (Smokeless Tobacco Lesions)	福格特-小柳综合征 (Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome)	天花 (Smallpox)
	残毁性皮肤角化病综合征 (Vohwinkel Syndrome)	转位皮瓣 (Transposition Flaps)
	瓦尔敦堡综合征 (Waardenburg Syndrome)	外伤性溃疡 (Traumatic Ulcers)
	生殖道尖锐湿疣 (Warts,	毛根鞘瘤

[0406]

吸烟者黑变病 (Smoker's Melanosis)	Genital)	(Trichilemmoma)
南美芽生菌病 (South American Blastomycosis)	非生殖道尖锐湿疣 (Warts, Nongenital)	毛发上皮瘤 (Trichoepithelioma)
斑痣 (Speckled Lentiginous Nevus)	疣化角化不良瘤 (Warty Dyskeratoma)	毛囊瘤 (Trichofolliculoma)
斯皮茨痣 (Spitz Nevus)	韦氏肉芽肿病 (Wegener Granulomatosis)	腋毛菌病 (Trichomycosis Axillaris)
孢子丝菌病 (Sporotrichosis)	韦尔斯综合征 (嗜酸细胞性蜂窝织炎) (Wells Syndrome (Eosinophilic Cellulitis))	阴毛菌病 (Trichomycosis Pubis)
鳞状细胞癌 (Squamous Cell Carcinoma)	沃纳综合征 (Werner Syndrome)	套叠性脆发症 (内瑟顿综合征或竹节状发) (Trichorrhexis Invaginata (Netherton Syndrome or Bamboo Hair))
葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征 (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome)	Winchester 综合征 (Winchester Syndrome)	结节性脆发病 (Trichorrhexis Nodosa)
淤积性皮炎 (Stasis Dermatitis)	威斯科特-奥尔德里奇综合征 (Wiskott-Aldrich Syndrome)	小棘毛壅病 (Trichostasis Spinulosa)
多发性皮脂腺囊肿 (Steatocystoma Multiplex)	黄色瘤 (Xanthomas)	拔毛狂 (Trichotillomania)
史-约综合征和中毒性表皮坏死松解症 (Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis)	着色性干皮病 (Xeroderma Pigmentosum)	结节性硬化症 (Tuberous Sclerosis)
斯图尔特-特雷韦斯综合征 (Stewart-Treves Syndrome)	雅司病 (Yaws)	丛状血管瘤 (Tufted Angioma)
存储转发远程皮肤病学 (Store-and-Forward Teledermatology)	股癣 (Tinea Cruris)	簇状发毛囊炎 (Tufted Hair Folliculitis)
膨胀纹 (Striae Distensae)	面癣 (Tinea Faciei)	肿胀吸脂 (Tumescent Liposuction)
类圆线虫病	掌黑癣 (Tinea Nigra)	潜蚤病 (Tungiasis)
	足癣 (Tinea Pedis)	瘢痕性红斑病 (Tungiasis)
	花斑癣 (Tinea Versicolor)	单侧痣样毛细血管扩张 (Unilateral Nevoid)
	牙齿变色 (Tooth Discoloration)	
	中毒性休克综合征 (Toxic Shock Syndrome)	
	牵拉性秃发 (Toxic Shock Syndrome)	

[0407]

(Strongyloidiasis)	暂时性棘层松解性皮肤病	Telangiectasia)
灰泥角化病 (Stucco	(Transient Acantholytic	急性荨麻疹 (Urticaria,
Keratosi s)	Dermatosis)	Acute)
亚急性结节性游走性脂膜炎 (Vilanova 病)		新生儿暂时性脓疱性黑变病 (Transient Neonatal
(Subacute Nodular		Pustular Melanosis)
Migratory Panniculiti s		体癣 (Tinea Corporis)
(Vilanova Disease))		
角层下脓疱性皮肤病		
(Subcorneal Pustular		
Dermatosis)		
新生儿皮下脂肪坏死		
(Subcutaneous Fat		
Necrosis of the Newborn)		
防晒霜和光防护		
(Sunscreens and		
Photoprotection)		
多指(趾) (Supernumerary		
Digit)		
多乳头 (Supernumerary		
Digit)		
手术并发症 (Surgical		
Complications)		
外科敷料 (Surgical		
Dressings)		
缝合技术 (Suturing		
Techniques)		
梅毒 (Syphilis)		
汗管瘤 (Syringoma)		
全身性硬化症 (Systemic		
Sclerosis)		
靶样含铁血黄素沉积性血		

管 瘤 (Targetoid
Hemosiderotic
Hemangioma)

激光文身 (Tattoo Lasers)

文 身 反 应 (Tattoo
Reactions)

远 程 皮 肤 病 学
(Teledermatology)

休止期脱发 (Telogen
Effluvium)

颞 (巨细胞) 动脉炎
(Temporal (Giant Cell)

[0408] Arteritis)

皮肤外科中抗生素的作用
(The Role of Antibiotics
in Cutaneous Surgery)

皮肤癌中前哨淋巴结活检
中的作用 (The Role of
Sentinel Node Biopsy in
Skin Cancer)

热烧伤 (Thermal Burns)

血 栓 性 静 脉 炎
(Thrombophlebitis)

须癣 (Tinea Barbae)

头癣 (Tinea Capitis)

[0409] 实施例 4:

[0410] MDPK67b(rACT_{6,7}) 对皮肤病的可能治疗效果已经以局部应用形式在内瑟顿综合征小鼠模型上进行了测试。

[0411] 试验设计

[0412] 将该分子以 2mg/ml 配制于 2% (w/v) 纤维素羟乙基 (natrosol) 中。已经依照保持 MDPK67b 对胰蛋白酶 (替代体外底物) 的抑制性质的体外扩散标准对该制剂进行了选择。在 4℃ 下,将制备为溶液的 2mg/ml MDPK67b 在缓慢搅拌下配制于 2% (w/v) 纤维素羟乙基、PBS1X(pH7.4) 中,以防止对分子的剪切。在 4℃ 下,将该制品仔细搅拌均匀浆,以确保在

所述水凝胶中合适的抑制剂再分配。纤维素羟乙基必须以粉末形式加入 MDPK67b 溶液中，以避免结块并且以使得形成匀浆而未被剪切的制剂。

[0413] 为了保持无菌性，将溶液高压灭菌或过滤通过 0.22μ 滤器。

[0414] -MDPK67b 2mg/ml/ 羟乙基纤维素制剂包含 4mg MDPK67b、2ml PBS 1x(pH7.4) 和 0.04g 羟乙基纤维素。然后，将所述制剂在 4℃ 下保存，或者冻干过夜并在 -20℃ 下保存。在体内使用前，对制剂体外测试 MDPK67b 的蛋白酶抑制性质。

[0415] MDPK67b 可能的治疗效果已经在 12 只转基因 KLK5 小鼠组上进行了评估，所述小鼠具有不同的损伤级严重度，从低严重度级别（1 级）至更严重级别（4 级）（图 30）。第 1 组每天以 0.3ml 载体——2% 纤维素羟乙基处理 1 次，第 2 组每天以 0.3ml 配制于 2% 纤维素羟乙基中的 2mg/ml MDPK67b 处理 1 次，持续 28 天。该时间对应于小鼠模型中 2 次表皮更新。已经对小鼠监测损伤级别和损伤大小表型的变化。已经每 3 天测量损伤大小，每天监测损伤级别。

[0416] 结果（图 31）

[0417] 对 MDPK67b 处理的 KLK5 转基因小鼠和未处理小鼠的皮肤损伤发展的比较显示：MDPK67b 组（第 2 组）中的损伤大小与载体组（第 1 组）相比有减小。尽管在载体对照组的大多数小鼠中，损伤大小增大，但 MDPK67b 处理组的大多数小鼠却显示了损伤大小的减小。在第 1 组的 3 只和第 2 组的 1 只测试动物中观察到明显的大小增大。在第 2 组的 1 只动物中观察到损伤大小略微增大。在第 1 组的 1 只动物中未观察到变化。在第 1 组的 1 只和第 2 组的 3 只测试动物中观察到损伤大小的减小。保护效应似乎在低级别症状的小鼠中更大。

[0418] 表 XXI

[0419]	损伤大小发展	第 1 组 (对照)	第 2 组 (MDPK67b)
	发展	3	1
[0420]	稍微发展	0	1
	稳定	1	0
	减小	1	3

[0421] 损伤级别发展还受局部给予 MDPK67b 的积极影响。1 只 MDPK67b 处理的测试动物显示了表型的完全逆转。在另一只 MDPK67b 处理动物上观察到部分逆转。保护效应似乎在具有低级别症状的小鼠中更大。

[0422] 参考文献列表

[0423] Barrett. In :Proteinase Inhibitors. Ed. Barrett, A. J. et al, Elsevier, Amsterdam, pages 3-22(1986)

[0424] Blasi. In :Human Genes and Diseases. Ed. Blasi, F., John Wiley&Sons, Ltd., pages 377-414(1986)

[0425] Borgono et al. Cancet Res. 63,9032-9041(2003)

- [0426] Borgono et al. J. Biol. Chem 282(6) :3640-52(2007)
- [0427] Brattsand and Egelrud. J. Biol. Chem. 274,30033-40(1999)
- [0428] Brattsand et al. J Invest Dermatol. 124,198-203(2005)
- [0429] Carrell et al. Trends Biochem Sci. 10 :20-24(1985)
- [0430] Carrell et al. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 52 :527-35(1987)
- [0431] Caubet et al. J. Invest Dermatol. 122,1235-1244(2004)
- [0432] Chavanas et al. Nat. Genet. 25,141-142(2000)
- [0433] Cloutier et al. Eur J Biochem 271,607-613(2004)
- [0434] Cloutier et al. Eur J Biochem. 269,2747-2754(2002)
- [0435] Cooley et al. Biochemistry 40,15762-70(2001)
- [0436] Deraison et al. Mol Biol Cell. 18(9) :3607-19(2007).
- [0437] Descargues et al. J Invest Dermatol. 126(7) :1622-32(2006)
- [0438] Descargues et al. Nat Genet. 37(1) :56-65(2005)
- [0439] Egelrud et al. Br. J. Dermatol. 153,1200-1203(2005)
- [0440] Ekholm and Egelrud. Arch Dermatol Res. 291,195-200. (1999)
- [0441] Felber et al. Biol Chem. 386(3) :291-8(2005)
- [0442] Felber et al. Biotechniques 36,878-885(2004)
- [0443] Felber et al. FEBS J. 273(11) :2505-14(2006)
- [0444] Frenette et al. Biochim Biophys Acta 1334,109-115(1997)
- [0445] Frenette et al. J Urol 159,1375-8(1998)
- [0446] Gerard et al. Mol Biol Med. 2 :449-457(1986)
- [0447] Hachern et al. J. Invest Dermatol. 126,1609-1621(2006)
- [0448] Hansson et al. J. Biol. Chem. 269,19420-19426(1994)
- [0449] Hansson et al. J. Invest Dermatol. 118,444-449. (2002)
- [0450] Huang et al. Oncol Res. 14,387-397. (2004).
- [0451] Hunt and Dayhoff. Biochem Biophys Res Commun. 95(2) :864-71(1980)
- [0452] Kapadia. Clin Chem 49,77-86(2003)
- [0453] Ketcham et al. In :Atlas of Protein Sequence and Structure. Ed. Dayhoff, pages 131-143(1978)
- [0454] Kishi et al. Clin Chem 49,87-96(2003)
- [0455] Kishibe et al. J. Biol. Chem. 282(8) :5834-41(2007)
- [0456] Komatsu et al. Br. J. Dermatol. 153,274-281(2005)
- [0457] Komatsu et al. J. Invest Dermatol. 118,436-443. (2002)
- [0458] Komatsu et al. J. Invest Dermatol. 125,1182-1189. (2005)
- [0459] Komatsu et al. J. Invest Dermatol. 126,2338-2342. (2006)
- [0460] Kraut et al. Z Physiol Chem 192 :1-21(1930)
- [0461] Laemmli. Nature 227,680-5(1970)
- [0462] Laskowski et al. Annu Rev Biochem. 49 :593-626(1980)
- [0463] Laskowski et al. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 545-553(1987)

- [0464] Levin et al. Proc Natl Acad Sci USA. 80 :6804-6808(1983)
- [0465] Little et al. J Biol Chem 272,25135-25142(1997)
- [0466] Lowman et al. Biochemistry 12,10832-8(1991)
- [0467] Luo et al. Clin. Chem. 47,237-246(2001)
- [0468] Mahajan et al. Chem Biol 6,401-9
- [0469] Mitra et al. Gene 173,13-17(1996)
- [0470] Mize et al. Mol Cancer Res. 6(6) :1043-51. 2008
- [0471] Morrison and Walsh. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 61,201-301(1988)
- [0472] Nin et al. J Dermatol Sci. 2008(2008).
- [0473] Oikonomopoulou et al. J. Biol. Chem. 281,32095-32112. (2006).
- [0474] Paine et al. J. Invest. Dermatol. 116,587-595. (2001).
- [0475] Papamokos et al. J Mol Biol. 158(3) :515-37(1982)
- [0476] Potempa et al. J Biol Chem. 269(23) :15957-60(1994)
- [0477] Read, R. J. et al, In :Proteinase Inhibitors. Ed. Barrett, Elsevier, Amsterdam, pages 301-336(1986)
- [0478] Remold-O' Donnell. FEBS Lett. 315(2) :105-8(1993)
- [0479] Shimizu et al. J Biol Chem 273,11189-11196(1998)
- [0480] Smith and Scott. Methods Enzymol. 217,228-57(1993)
- [0481] Sommer et al. Biochemistry. 26(20) :6407-10(1987)
- [0482] Sondell et al. J. Invest Dermatol. 104,819-823. (1995)
- [0483] Sprecher et al. J. Invest Dermatol. 117,179-187(2001)
- [0484] Sprengers et al. Blood. 69(2) :381-7(1987)
- [0485] Stefansson et al. Biol. Chem. 387,761-768(2006)
- [0486] Stefansson et al. J Invest Dermatol. 128(1) :18-25(2008)
- [0487] Stump et al. J Biol Chem. 261(27) :12759-66(1986)
- [0488] Suzuki et al. J Biol Chem. 262(2) :611-6(1987)
- [0489] Travis et al. Annu Rev Biochem. 52 :655-709(1983)
- [0490] Vandell et al. J Neurochem. 107(3) :855-70(2008)
- [0491] Voegeli et al. Int. J. Cosm. Sci. 29,191-200. (2007).
- [0492] Werle. Biochem Z. 269 :415-34.
- [0493] Yamasaki et al. LFASEB J. 20,2068-2080. (2006)
- [0494] Yousef et al. Cancer Res 63,3958-3965(2003)

斜体: 起始密码子ATG

黑体: His-标签

下划线: DNA突变

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

DNA序列ACT突变体: MD 820

SEQ ID N°1

ATG***GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACT******CTAGACACCCTAACAGCCCACCTTGACGAGGAGA***
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTT***CAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC***
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTT***CAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA***
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGGCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGTCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCACCTCCGTTCTCGAGCAGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

蛋白序列ACT突变体: MD 820

SEQ ID N°2

MRGSHHHHH**SRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF**
SPLSISTALAFSLGAHNNTL**TEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNQSSDELQLSMGN**
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFD**PQDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK**
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKA**VLDFEEGTEASAATAVKITLRSRAVETR****TIVRF**
NRPF**LMII****VPTDTQNI****FFMSKVTNPKQA***

图 1

斜体: 起始密码子ATG

黑体: His-标签

下划线: DNA突变

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

DNA序列ACT突变体: MD 62

SEQ ID N°3

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACCTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAATCACCAGGAGGTCTATCGATGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

蛋白序列ACT突变体: MD 62

SEQ ID N°4

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFSLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNOSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPODTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAFLDVFEEGTEASAATAVKITRRSIDVETRITIVRF
NRPFLLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

图 2

斜体: 起始密码子ATG

黑体: His-标签

下划线: DNA突变

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

DNA序列ACT突变体: **MD 83**

SEQ ID N°5

ATGGAGAGGAT**CCCATCACCATCACCATCACT**CTAGACACCCTAACAGCCC**ACTTGACGAGGAGA**
ATCTGACCCAGGAGAA**CCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT**
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGA**ACTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA**
ATGATGGTCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCAGGGGGAGATCTGAGTTAGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

蛋白序列ACT突变体: **MD 83**

SEQ ID N°6

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFPDQDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAFLDVFEEGTEASAATAVKIRGRSELVETRTRIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

图 3

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

斜体: 起始密码子ATG

黑体: His-标签

下划线: DNA突变

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

DNA序列ACT突变体: **MD 61**

SEQ ID N°9

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACCTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCCATATAACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCATGACAAGATCTAACGCAGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

蛋白序列ACT突变体: **MD 61**

SEQ ID N°10

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFSLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTTETSEAEIHQSFOHLLRTLNLQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPDQTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFISRDYNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKIMTRSNAVETRTIVRF
NRPFMLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

图 5

斜体: 起始密码子ATG

黑体: His-标签

下划线: DNA突变

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

DNA序列ACT突变体: MD 518

SEQ ID N°11

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCACCGAGCGTGTCTCGCCCGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

蛋白序列ACT突变体: MD 518

SEQ ID N°12

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNOSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNQTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVHVKAFLDVFEEGTEASAATAVKITERVSPVETRTIVRF
NRPFLLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

图 6

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

DNA序列ACT突变体: MDC1

SEQ ID N°13

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACCCTCTAGACACCCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCCATAAATACCACCCTTG
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAAATGGAAGTAGGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATAACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAAGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCACCTTTAGATCTGCATTAGTGAGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

蛋白序列ACT突变体: MD CI

SEQ ID N°14

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFSLSLGAHNNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQS FQHLLRTL NQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDST
MMVLVNYIFFKAKWEMPFD PQDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISR DYNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKITFRSALVETRTRIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTPKOA*

图 7

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变(添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N° 17:**DNA 序列: ACT-G1**

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACCTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCCATATAACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAC TAGGGGGAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAGGTTCTCTGCGTTCTGCTCTGGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 39:**蛋白序列: ACT-G1**

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变(添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAF~~LSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQS~~FQHLLRTL~~NQSSDELQ~~LSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKN~~GRGKITDLIKD~~LSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFD~~PQDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTI~~PFYFRDEELSCTVV~~ELK~~
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISR~~DYNLNDILLQ~~L
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQV~~VHKAVLDVFEEGTEASAATAVK~~GS~~LSR~~SALVETRTIVRF
NRPF~~LMII~~VPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

图 9

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变(添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N° 18:DNA 序列: **ACT-G1G**

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTC AACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAGGTTCTCTGCGTGGTGTCTGGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTTGTCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 40:蛋白序列: **ACT-G1G**

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变(添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFSLGHNNTLLEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPODTHQSRFYLSKKKWVMPMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSSISRDNLDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVKAVLDVFEEGTEASAATAVKGSLRGALVETRTIVRF
NRPFELMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

图 10

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变 (添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N° 19:**DNA 序列: ACT-C11**

ATG**GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCC****ACTTGACGAGGAGA**
ATCTGACCCAGGAGAAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCCATAAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTTCAAGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGGAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCTTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCACCCCTGCGTCAGACCAACGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTTGTCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 41:**蛋白序列: ACT-C11**

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变 (添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

MRGSHHHHHS**RHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF**
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPODTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAFLDVFEEGTEASAATAVKITL**RQTNVETR****TIVRF**
NRPFLMIIVPTDTQNIFFM**SKVTNPKQA***

图 11

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

DNA 序列 ACT-C11G

蛋白序列: ACT-C11G

下划线和灰色背景: RSL突变

80

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变 (添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N° 24:DNA 序列: **ACT-F3**

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACCTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGCCCTTCTGTCTCTGGGGGCCCATATAACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCCCGGACCGTCACATGCTGGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 46:蛋白序列: **ACT-F3**

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变 (添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNOSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFPDQDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSELEFREIGELYLPKFSISRBYNLDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAFLDVFEEGTEASAATAVKIPDRHMLVETRITVRF
NRPFLLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

图 16

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变 (添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N°27:**DNA 序列: AAT-G1**

ATG**GAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA**
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACCTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTACCCACGATATCATCACCAAGTTCTTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGGGTTCTCTGCGTTCTATCCCGCCTGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 49:**蛋白序列: AAT-G1**

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变 (添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

MRGSHHHHH**GSDDPQGDAAQKTDTS****SHHDQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTN****IFF**
SPVSIATAFAMLSL**GTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTL****NQPDSQLQLTTGN**
GLFLSEGLKLVDK**FLEDVKKLYHSE****AFTVNF****GDTEEAKKQINDYVEKGTQ****GKIVDLVKELDRDT**
VFALVNYIFF**FKGWERPF****EVKDTEEDFHVDQATT****VKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY**
LGNATAIFF**LPDEGKLQHL****ENELTHDIITK****FLNEDRRSASLHLPKLSITGT****YDLKSVLGQLGI**
TKVFSNGADLSGV**TEEAPLKLSKAVHKA****VLTI****DEKGTEAAGAMFLE****GS****LSR****SIPPEVKFNKPFVF**
LMIEQNTKSP**LFMGKV****VVNPTQK***

图 19

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变(添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N°28:DNA 序列: **AAT-G1G**

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACCTCCTCCGTACCCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGTCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCCTTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCCTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGGGTTCTCTGCGTGGTATCCCGCCTGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 50:蛋白序列: **AAT-G1G**

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变(添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

MRGSHHHHHHGSDDPQGDAAQKTDTSHHQDHPFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIEF
SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDKFLEDVKKLYHSEAFVNFVDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDT
VFALVNYIFFKKGWERPFVVKDTEEDFHVDQATTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY
LGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI
TKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAMFLEGSRLGIPPEVKFNKPFVF
LMIEQNTKSPFLMGKVVNPTQK*

图 20

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变(添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N°29:**DNA 序列: AAT-C11**

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACCTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGGCTATCCCGCGTCAGACCAACCCCTGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 51:**蛋白序列: AAT-C11**

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变(添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

MRGSHHHHHHGSDDPQGDAAQKTDTSHHQDQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFF
SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDKFLEDVKKLYHSEFTVNFVDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDT
VFALVNYIFFKGKWERPFVVDTEEEDFHVDQATTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY
LGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI
TKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAMFLEAI**PRO****TNPEVKFNKPFVF**
LMIEQNTKSPFLMGKVVNPTQK*

图 21

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变(添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N°30:**DNA 序列: AAT-C11g**

ATG**AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA**
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGC
TGAGTTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACCTCCTCCGTACCCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCCTGCCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCTTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCCTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGGCTATCGGTCGTCAGACCAACCCCTGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 52:**蛋白序列: AAT-C11g**

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变(添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

MRGSHHHHHHGSDDPQGDAAQKTDTS**SHHDQDHPTFNKITPNLAEF****AFSLYRQLAHQSNSTN****IFF**
SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLN**FNLTETPEAQIHEGFQELLRTL****NQPDSQLQLTTGN**
GLFLSEGLKLVDKFL**EDVKKLYHSE****AFTVNF****GDTEEA****KKQINDYVEKGTQ****GKIVDLVKELDRDT**
VFALVNYIFFK**GKWERPF****EVKDTE****EEDFHVDQATT****VKVPMMKRLGMFNIQHCKLSSWVLLMKY**
LGNATAIFFLPDEGKLQHLE**NELTHDIITK****FLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI**
TKVFSNGADLSGVTEEAPLKL**SKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAMFLEAIGRQTN****PEVKFNKPFVF**
LMIEQNTKSP**LFMGKV****VNPTQK***

图 22

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变(添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N°31:**DNA 序列: AAT-E5**

ATG**GAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA**
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACCTCCGTACCCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTACCCACGATATCATCACCAAGTTCTTGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGGCTAACAGCGTTCTTCCCCGCTGAGGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 53:**蛋白序列: AAT-E5**

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变(添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

MRGSHHHHHHGSDDPQGDAAQKTDTSHHDDQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFF
SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGFQELLRTLNPQDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFVFGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDT
VFALVNYIFFKGKWERPFVVDTEEDFHVDQATTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY
LGNATAIIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI
TKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAMFLEANQRSSSPPEVKFNKPFVF
LMIEQNTKSPFLFMGKVVNPTQK*

图 23

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变(添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N°32:

DNA 序列: AAT-E8

ATG**GAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA**
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCGGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACCTCCTCCGTACCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCTTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGGCTCTGCAGCGTGCTATCCCGCTGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 54:

蛋白序列: AAT-E8

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变(添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

M**RGS****HHHHHGSDDPQGDAAQKTDTS****SHHDQDHPTFNKITPNLA****EF****AFSLYRQLAHQSNSTN****IFF**
SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNENLTEIPEAQIHEGFQELLRLTNQPD**SQLQLTTGN**
GLFLSEGLKLVDKFLEDVKKLYHSEFTVNF**GDTEEA****KKQINDYVEKGTQ****QKIVDLVKELDRDT**
VFALVNYIFFKGKWERPFEVKDTEEDFHVDQATT**TVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY**
LGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL**ENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI**
TKVFSNGADLSGVTEEAPLKL**SKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAMFLEALQRAI****PPEVKFNKPFVF**
LMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK*

图 24

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变(添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N°33:DNA 序列: **AAT-F11**

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAGG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACCTCCTCCGTACCCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTCACCCACGATATCATACCAAGTTCTTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGCAGCGTCTGCGTGACATCCCGCCTGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAATAACCAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N°55:蛋白序列: **AAT-F11**

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变(添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

MRGSHHHHHHGSDDPQGDAQAQKTDTSHHDDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIEF
SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNQPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDKFLEDVKKLYHSEAFVNFVDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDT
VFALVNYIFFKGKWERPFVEKDTTEEDFHVDQATTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY
LGNATAIFFLPDEGKLQHLLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI
TKVFSNGADLSGVTEEAFLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAMFLEQRLRDI PPEVKFNKPFVF
LMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK*

图 25

图注

斜体和黑体: 起始密码子ATG

黑体和下划线: His-标签

下划线: DNA突变(添加的密码子)

下划线和灰色背景: 编码RSL突变的DNA序列

SEQ ID N°34:

DNA 序列: AAT-F3

ATG**GAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA**
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCGGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAATCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGC AATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCTGCCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCTTGGA AAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCCTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGGCTCCGGACCGTCACATGCCGCTGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 56:

蛋白序列: AAT-F3

图注

斜体和黑体: 起始甲硫氨酸

黑体和下划线: His-标签

下划线: 氨基酸突变(添加的)

下划线和灰色背景: RSL突变

MRGSHHHHHHGS**DDPQGDAAQKTDTS****SHHDQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTN****IFF**
SPVSIATAFAMLSL**GTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTL****NQPD****SQLQLTTGN**
GLFLSEGLKLV**DKFLEDVKLYHSEAF****TVNFGDTEEA****KQINDYVEKGTQ****GKIVDLVKELDRDT**
VFALVNYI**FFK****GKWERPFEVKDTEEEDFHVDQATT****VKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY**
LGNATAI**FFLPDEGKLQHL****ENELTHDIITKFL****ENEDRRSASLHLPKLSITGT****YDLKSVLGQLGI**
TKVFSNGADLSGVTEEAPLKL**SKAVHKAVLTI****DEKGTEAAGAMFLEAPDRHMPPEVKFNKPFVF**
LMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK*

图 26

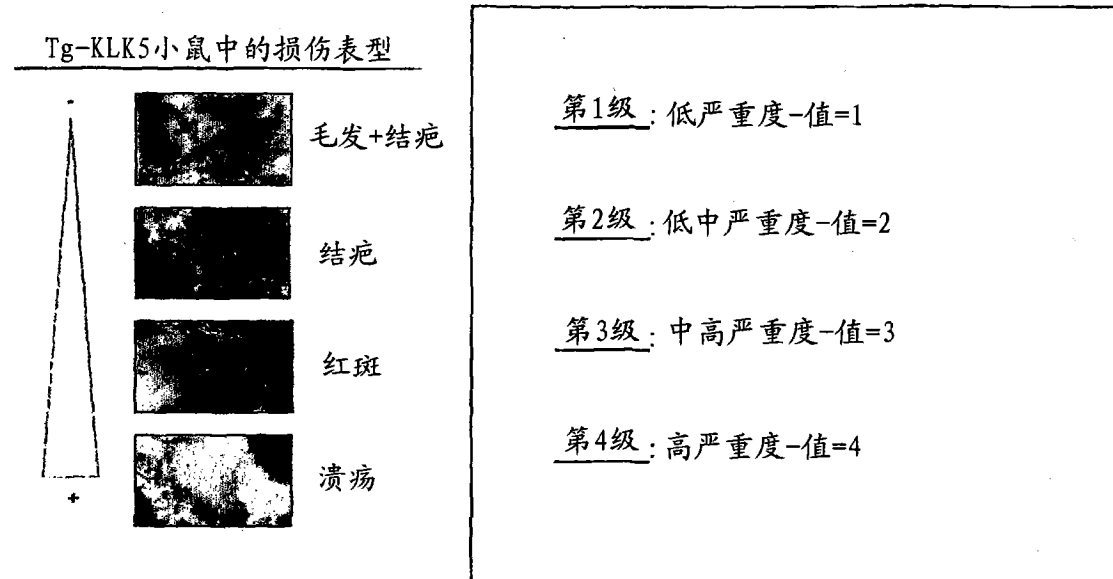


图 30

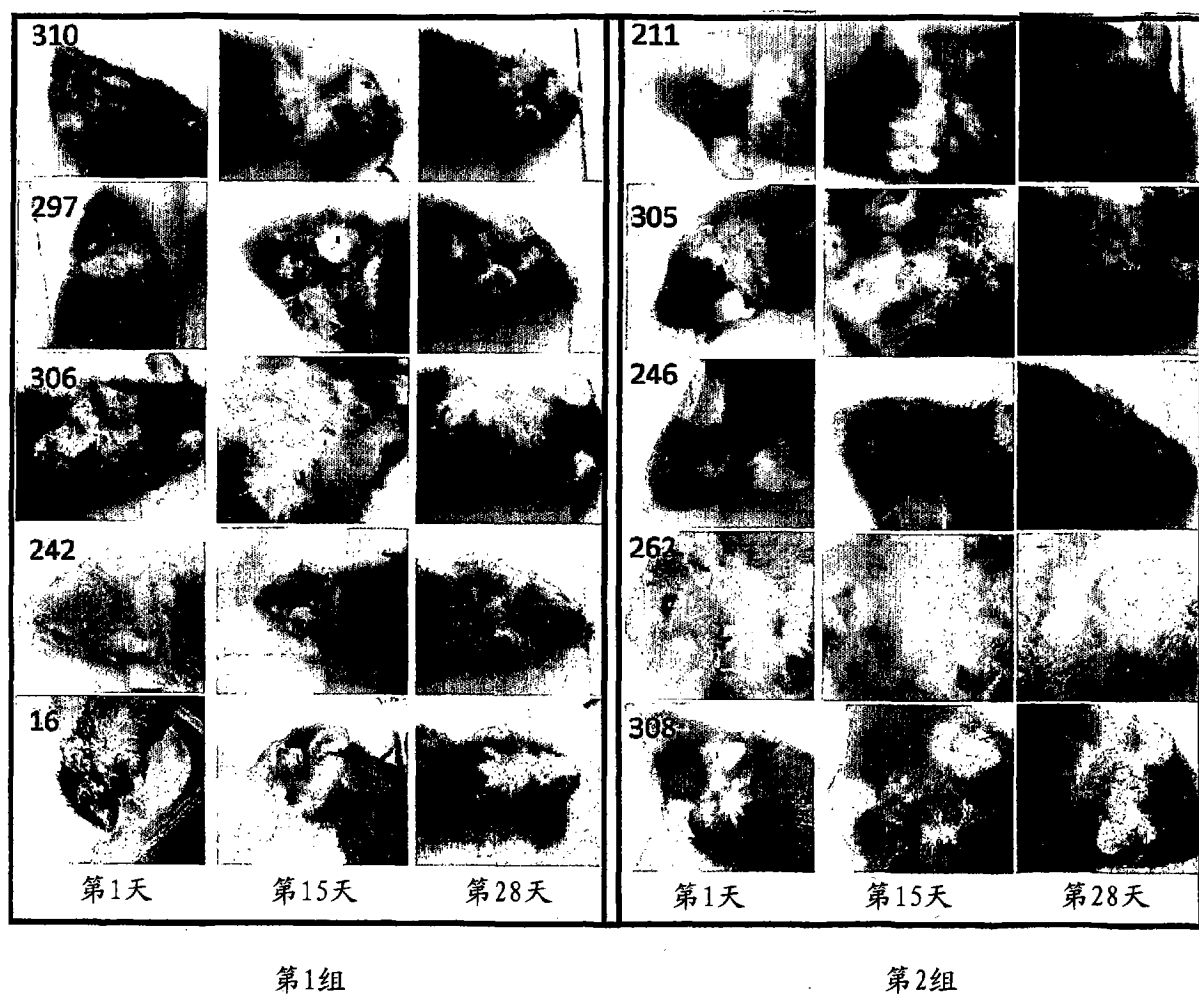


图 31