



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109071621 B

(45) 授权公告日 2023.03.28

(21) 申请号 201680081676.5

G·马茨钦格 C·罗思

(22) 申请日 2016.12.09

A·维登曼 R·S·贝莱巴

(65) 同一申请的已公布的文献号

M·欣纳 A·艾乐斯道夫尔

申请公布号 CN 109071621 A

B·轮德

(43) 申请公布日 2018.12.21

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理
事务所(普通合伙) 11382

(30) 优先权数据

专利代理人 曹津燕 丁磊

62/265,792 2015.12.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 14/47 (2006.01)

2018.08.10

A61K 38/22 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12N 5/00 (2006.01)

PCT/EP2016/080353 2016.12.09

C07K 16/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

(56) 对比文件

W02017/097946 EN 2017.06.15

WO 2010/054025 A, 2010.05.14

(73) 专利权人 皮里斯制药有限公司

WO 2014/076321 A, 2014.05.22

地址 德国弗赖辛-威赫史蒂芬

WO 2014/081980 A, 2014.05.30

(72) 发明人 窪田一史 牧野充裕 高桥笑子

审查员 安玉萍

桥本隆二 高桥亘 大丰卫

权利要求书2页 说明书38页

序列表74页 附图29页

(54) 发明名称

对降钙素基因相关肽特异性的新型蛋白

(57) 摘要

本发明提供了hNGAL突变蛋白，其结合CGRP并且可以用于包括制药应用的各种应用中，例如偏头痛。本发明还涉及制备本文所述的一种或多种突变蛋白以及包含一种或多种该突变蛋白的组合物或组合的方法。本发明进一步涉及编码这种突变蛋白的核酸分子和用于产生这种突变蛋白和核酸分子的方法。此外，本发明公开了这些突变蛋白以及包含一种或多种这种突变蛋白的组合物和组合的治疗性和/或诊断性用途。

1. 一种人嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(hNGAL)突变蛋白，其中，所述突变蛋白能够以可检测的亲和力结合CGRP，其中，所述突变蛋白包含选自SEQ ID NOS:2-40和87-93的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的hNGAL突变蛋白，其中，所述突变蛋白能够以5nM或更低的K_D结合CGRP。

3. 根据权利要求1所述的hNGAL突变蛋白，其中，所述突变蛋白能够以5nM或更低的IC50值抑制或降低CGRP诱导的cAMP生成。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的hNGAL突变蛋白，其中，所述突变蛋白是与人CGRP和大鼠CGRP交叉反应性的。

5. 根据权利要求4所述的hNGAL突变蛋白，其中，所述突变蛋白能够以可检测的亲和力结合大鼠CGRP。

6. 根据权利要求4所述的hNGAL突变蛋白，其中，所述突变蛋白能够以5nM或更低的K_D结合大鼠CGRP。

7. 根据权利要求1所述的hNGAL突变蛋白，其中，在竞争ELISA分析或基于表面等离子体共振的分析中测量对CGRP的结合亲和力。

8. 根据权利要求3所述的hNGAL突变蛋白，其中，在基于SK-N-MC细胞或L6细胞的功能性分析中测量所述CGRP诱导的cAMP生成。

9. 根据权利要求4所述的hNGAL突变蛋白，其中，所述突变蛋白是与人α-CGRP、人β-CGRP、大鼠α-CGRP和大鼠β-CGRP交叉反应性的。

10. 根据权利要求1所述的hNGAL突变蛋白，其中，所述突变蛋白与选自有机分子、酶标记、放射性标记、着色标记、荧光标记、显色标记、发光标记、半抗原、地高辛、生物素、细胞抑制剂、毒素、金属复合物、金属和胶体金的化合物缀合。

11. 根据权利要求1所述的hNGAL突变蛋白，其中，所述突变蛋白在其N-末端和/或其C-末端与融合配偶体融合，所述融合配偶体为蛋白质、蛋白质结构域或肽。

12. 根据权利要求1所述的hNGAL突变蛋白，其中，所述突变蛋白与延长所述突变蛋白的血清半衰期的化合物缀合。

13. 根据权利要求12所述的hNGAL突变蛋白，其中，所述延长血清半衰期的化合物选自聚亚烷基二醇分子、羟乙基淀粉、免疫球蛋白的Fc部分、免疫球蛋白的CH3结构域、免疫球蛋白的CH4结构域、白蛋白结合肽和白蛋白结合蛋白。

14. 根据权利要求13所述的hNGAL突变蛋白，其中，所述聚亚烷基二醇是聚乙二醇(PEG)或其活化衍生物。

15. 一种核酸分子，其包含编码前述权利要求中任一项所述的hNGAL突变蛋白的核苷酸序列。

16. 根据权利要求15所述的核酸分子，其中，所述核酸分子与调控序列可操作地连接，以允许表达所述核酸分子。

17. 根据权利要求15或16所述的核酸分子，其中，所述核酸分子包含在载体或噬菌粒载体中。

18. 一种宿主细胞，其含有权利要求15至17中任一项所述的核酸分子。

19. 一种生产权利要求1-14中任一项所述的hNGAL突变蛋白的方法，其中，所述突变蛋

白是通过基因工程方法从编码所述突变蛋白的核酸开始产生的。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中,所述突变蛋白在细菌或真核宿主生物体中产生,并从该宿主生物体或其培养物中分离。

21. 一种药物组合物,其包含权利要求1-14中任一项所述的hNGAL突变蛋白。

22. 根据权利要求21所述的组合物,其中,所述组合物进一步包括至少一种药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体。

23. 一种诊断或分析试剂盒,其包含权利要求1-14中任一项所述的hNGAL突变蛋白。

24. 一种或多种权利要求1-14中任一项所述的hNGAL突变蛋白或一种或多种包含所述突变蛋白的组合物在制备用于结合或检测受试者中CGRP的组合物中的用途。

25. 一种或多种权利要求1-14中任一项所述的hNGAL突变蛋白或一种或多种包含所述突变蛋白的组合物在制备用于治疗、预防和/或改善与游离CGRP的失调水平相关的疾病或障碍的组合物中的用途。

26. 一种或多种权利要求1-14中任一项所述的hNGAL突变蛋白或一种或多种包含所述突变蛋白的组合物在制备用于抑制或减轻受试者中偏头痛或血浆蛋白渗出的组合物中的用途。

27. 一种或多种权利要求1-14中任一项所述的hNGAL突变蛋白或一种或多种包含所述突变蛋白的组合物在制备用于治疗、预防或改善受试者中与失调的蛋白质血浆外渗相关的疾病或障碍的组合物中的用途。

28. 根据权利要求25或27所述的用途,其中,所述疾病或障碍选自偏头痛、颞下颌关节紊乱、心力衰竭、高血压和败血症。

对降钙素基因相关肽特异性的新型蛋白

背景技术

[0001] 降钙素基因相关肽(CGRP)是由中枢和外周神经系统的神经分泌的血管活性神经肽,其中含有CGRP的神经元与血管密切相关。CGRP介导的血管舒张也与神经源性炎症相关,其作为导致血浆外渗和微血管系统血管舒张的事件级联的一部分并存在于偏头痛中。

[0002] CGRP以高度同源的α和β同种型存在于人和大鼠中,尽管CGRP的α和β同种型由不同的基因编码。在人中,CGRP肽的α与β同种型相差三个氨基酸,而在大鼠中相差一个氨基酸。不同物种间的CGRP肽的氨基酸序列是非常保守的,并被认为是包括胰淀素、降钙素和肾上腺髓质素的肽家族的成员。

[0003] 因此,将CGRP分为至少两个亚型,命名为α-CGRP或CGRP1以及β-CGRP或CGRP2(Pharmacol. Rev 54:233-246,2002)。从多种体内和体外生物测定中的差异拮抗剂亲和力和激动剂效力方面,已经提出了至少两种CGRP亚型的存在(Dennis等,hCGRP8-37,A calcitonin gene-related peptide antagonist revealing calcitonin gene-related peptide receptor heterogeneity in brain and periphery,J.Pharmacol.Exp.Ther.,254:123-128(1990);Dennis等,Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues.Evidence for receptor multiplicity,J.Pharmacol.Exp.Ther.,251:718-725(1989);Dumont等,A potent and selective CGRP agonist,[Cys(Et)2,7]hCGRP alpha:comparison in prototypical CGRP1and CGRP2in vitro bioassays,Can.J.Physiol.Pharmacol,75:671-676(1997))。

[0004] 已经发现,CGRP1亚型对拮抗剂片段CGRP(8-37)敏感(Chiba等,Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37),Am. J. Physiol,256:E331-E335(1989);Dennis等(1990);Mimeault等,Comparative affinities and antagonistic potencies of various human calcitonin gene-related peptide fragments on calcitonin gene-related peptide receptors in brain and periphery,J.Pharmacol.Exp.Ther.,258:1084-1090(1991))。相比之下,所述CGRP对线性人CGRP(hCGRP)类似物敏感,在该类似物中,位置2和7处的半胱氨酸残基被衍生化(例如用乙酰氨基甲基[Cys(ACM)2'7]或乙酰胺[Cys(Et)2'7]),但是CGRP受体对片段CGRP(8-37)不敏感(Dennis等(1989);Dennis等(1990);Dumont等(1997))。在多种哺乳动物物种中,已经识别了三种降钙素受体刺激肽(CRSP);所述CRSP可在CGRP家族中形成新的亚家族(Katafuchi,T和Minamino,N,Structure and biological properties of three calcitonin receptor-stimulating peptides,novel members of the calcitonin gene-related peptide family,Peptides,25(11):2039-2045(2004))。

[0005] CGRP通过由G蛋白偶联受体(称为降钙素受体样受体(CALCRL))和受体活性修饰蛋白(RAMP1)组成的异聚体受体介导其作用。已经在若干组织和细胞(包括脑、心血管、内皮细胞和平滑肌)中识别和药理学地评估了CGRP受体。基于不同的药理学特性,已经表征了多种CGRP受体。降钙素超家族肽通过七跨膜结构域G蛋白偶联受体(GPCR)起作用。降钙素受体(“CT”、“CTR”或“CT受体”)和CGRP受体是II型(“家族B”)GPCR,该家族包括识别调节肽例如

胰泌素、胰高血糖素和血管活性肠肽(vIP)的其它GPCR。人降钙素受体的最佳表征剪接变体根据第一细胞内环中的16个氨基酸的存在(以前称为CTR α +或CTR1,现在称为CT \wedge)或不存在(主要的剪接变体,以前称为CTR π _或CTR2,现在称为CT(a))而不同(Gorn等,Expression of two human skeletal calcitonin receptor isoforms cloned from a giant cell tumor of bone:the first intracellular domain modulates ligand binding and signal transduction,J.Clin.Invest.,95:2680-2691(1995);Hay等,Amylin receptors:molecular composition and pharmacology,Biochem.Soc.Trans.,32:865-867(2004);Poyner等,2002)。

[0006] CGRP广泛分布于外周和中枢神经系统的感觉神经中,并显示出大量不同的生物活性。当CGRP从三叉神经和其它神经纤维释放时,CGRP被认为通过与特定细胞表面受体结合来介导其生物响应。CGRP的生物活性包括调节神经肌肉接头、免疫系统内抗原呈递、血管张力以及感觉神经传递(Poyner,D.R.,Calcitonin gene-related peptide:multiple actions,multiple receptors,Pharmacol.Ther.,56:23-51(1992);Muff等,Calcitonin,calcitonin gene-related peptide,adrenomedullin and amylin:homologous peptides,separate receptors and overlapping biological actions,Eur.J.Endocrinol.,133:17-20(1995))。

[0007] 因此,非常需要鉴定特异性识别并结合CGRP的新化合物。这种化合物可用于与CGRP活性相关的疾病状态的诊断性筛查和治疗性干预。因此,本发明的一个目的是提供CGRP的特异性结合化合物,以用于调节CGRP活性。本文公开的这种化合物采取衍生自人脂质运载蛋白2(也称为嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白,“hNGAL”)的突变蛋白形式。

[0008] 定义

[0009] 以下所列定义了在本说明书中使用的术语、短语和缩写。本文列出和定义的所有术语旨在涵盖所有语法形式。

[0010] 如本文所用,除非指明来自非人物种(例如,“大鼠CGRP”、“猴CGRP”等),否则“CGRP”是指人 α -CGRP和/或人 β -CGRP。

[0011] 如本文所用,除非指明来自非人物种(例如,“大鼠 α -CGRP”、“猴 α -CGRP”等),否则“ α -CGRP”或“alpha CGRP”是指人CGRP1,即由Swiss Prot P06881定义的全长蛋白或其生物活性片段(例如CGRP1蛋白的能够在体外或体内诱导血浆蛋白渗出的片段)。

[0012] 如本文所用,除非指明来自非人物种(例如,“大鼠 β -CGRP”、“猴 β -CGRP”等),否则“ β -CGRP”或“beta CGRP”是指人CGRP2,即由Swiss Prot P10092定义的全长蛋白或其生物活性片段(例如CGRP2蛋白的能够在体外或体内诱导血浆蛋白渗出的片段)。

[0013] 如本文所用,“大鼠CGRP”是指大鼠 α -CGRP和/或大鼠 β -CGRP。大鼠 α -CGRP(alpha CGRP)或大鼠CGRP1是由Swiss Prot P01256定义的全长蛋白或其生物活性片段。大鼠 β -CGRP(beta CGRP)或大鼠CGRP2是由Swiss Prot P10093定义的全长蛋白或其生物活性片段。

[0014] 如本文所用,“可检测的亲和力”是指以通常至少约 10^{-5} M或以下的亲和力常数结合所选靶标的能力。较低的亲和力通常不再能通过常规方法例如ELISA测量,因此是次要的。

[0015] 如本文所用,可以通过本领域技术人员已知的多种方法测量本发明的蛋白(例如人脂质运载蛋白2的突变蛋白)与所选靶标(在本发明中为CGRP)的“结合亲和力”(并由此可

以测定突变蛋白-配体复合物的KD值)。这种方法包括但不限于,荧光滴定、直接ELISA、竞争ELISA、如等温滴定量热法(ITC)的量热法和表面等离子体共振(SPR)。这样的方法在本领域中是成熟的,并且其实例也在下文详述。

[0016] 还注意到,相应结合剂与其配体之间的复合物的形成受许多不同因素的影响,如各自结合配偶体的浓度、竞争者的存在、所采用的缓冲系统的pH和离子强度以及用于测定解离常数 K_D 的实验方法(例如荧光滴定、直接ELISA、竞争ELISA或SPR,仅举几个例子),或甚至用于评估实验数据的数学算法。

[0017] 因此,本领域技术人员也清楚 K_D 值(各自结合剂与其靶标/配体之间形成的复合物的解离常数)可以在某个实验范围内变化,这取决于用于测定特定突变蛋白对给定配体的亲和力的方法和实验设置。这意味着,所测得的 K_D 值可能会有轻微的偏差或公差范围,例如,取决于该 K_D 值是通过SPR、竞争ELISA还是直接ELISA测定的。

[0018] 如本文所用,如果化合物(如本发明的突变蛋白)能够区分靶标和一个或多个参照靶标,则其“特异性结合”此靶标(例如CGPR)或对靶标具有“结合特异性”,因为结合特异性不是绝对的,而是相对的性质。“特异性结合”可以例如根据蛋白质印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-测试、IHC和肽扫描来确定。

[0019] 如本文所用,术语“人脂质运载蛋白2”或“人Lcn 2”或“人NGAL”或“hNGAL”是指具有SWISS-PROT/UniProt数据库登录号P80188的成熟人嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)。本发明的人脂质运载蛋白2突变蛋白还可以在本文中命名为“hNGAL突变蛋白”。可以将SWISS-PROT/UniProt数据库登录号P80188所示的氨基酸序列用作优选的“参考序列”,更优选地将SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列用作参考序列。

[0020] 如本文所用,“突变蛋白”、“突变的”实体(蛋白或核酸)或“突变体”是指与天然存在(野生型)的核酸或蛋白的“参考”骨架相比,一个或多个核苷酸或氨基酸的交换、缺失或插入。如本文所用,所述术语“突变蛋白”还包含其功能片段或变体。优选地,本发明中所述的特定突变蛋白的片段或变体保留了例如以可检测的或甚至更高的亲和力结合CGRP的功能,并且这种片段或变体是本文公开的参考突变蛋白的“功能片段或变体”。

[0021] 如本文与本发明的突变蛋白有关所用的术语“片段”涉及源自全长成熟人脂质运载蛋白2的N-末端和/或C-末端缩短的(即缺少至少一个N-末端和/或C-末端氨基酸)蛋白质或肽。这种片段可包括成熟人脂质运载蛋白2一级序列的至少10个、更多如20或30个或者更多个连续氨基酸,并且通常在成熟人脂质运载蛋白2的免疫实验中可检测到。

[0022] 一般而言,如本文关于本发明的突变蛋白或根据本发明的组合物的相应蛋白配体所用的术语“片段”涉及N-末端和/或C-末端缩短的蛋白或肽配体,其保留了全长配体的被根据本发明的突变蛋白识别和/或结合的能力。

[0023] 如本文所用的术语“诱变”是指,选择实验条件,以使得天然存在于成熟人脂质运载蛋白2给定序列位置处的氨基酸可被至少一个不存在于各天然多肽序列中的此特定位置处的氨基酸置换。术语“诱变”还包括通过缺失或插入一个或多个氨基酸而(另外的)改变序列区段的长度。因此,以下情况在本发明的范围内:例如,一个在所选序列位置处的氨基酸被三个随机突变的延伸段(stretch)替代,从而相比于野生型蛋白相应区段的长度,导致两个氨基酸残基的插入。这样的插入或缺失可以彼此独立地引入到在本发明中可以进行诱变的任何肽区段中。

[0024] 术语“随机诱变”指无预定的单个氨基酸(突变)存在于某个序列位置处,而是至少两个氨基酸可以在诱变期间以某概率掺入在预限定的序列位置处。

[0025] “同一性”是衡量它们的相似性或关系的序列特性。如本发明所用的术语“序列同一性”或“同一性”是指在本发明多肽序列与所讨论的序列(同源性)比对之后,相对于这两个序列中较长一个的残基数量的配对相同残基的百分比。通过将相同氨基酸残基的数量除以残基总数再使结果乘以100来量度序列同一性。

[0026] 如本文所用的术语“同源性”是其一般含义,并包括相同氨基酸以及认为是在本发明的多肽(例如本发明的任意突变蛋白)线性氨基酸序列中的等价位置处的保守置换(例如天冬氨酸残基交换谷氨酸残基)的氨基酸。

[0027] 可以采用例如程序BLASTP,blastp 2.2.5版(2002年11月16日;参见Altschul,S.F等(1997)Nucl.Acids Res.25,3389-3402)测定序列同源性或序列同一性百分比。在本实施方案中,同源性百分比基于包括前肽序列的完整多肽序列比对(矩阵:BLOSUM 62;间隙罚分:11.1;截止值设置为 10^{-3}),优选地在配对比较中使用野生型蛋白骨架作为参考。BLASTP程序输出的结果表示为以“阳性”(同源氨基酸)数除以程序所选的用于比对的氨基酸总数来计算的百分比。

[0028] 具体而言,为了确定与所述野生型人脂质运载蛋白2不同的突变蛋白的氨基酸序列的氨基酸残基是否对应于所述野生型人脂质运载蛋白2的氨基酸序列中的某一位置,技术人员可利用本领域熟知的手段和方法,例如手动地或通过使用计算机程序例如BLAST2.0(其代表基本局部比对搜索工具)或ClustalW或任意适用于产生序列比对的其它合适程序进行比对。因此,所述野生型人脂质运载蛋白2可作为“受试序列”或“参考序列”,而本文所述的与野生型人脂质运载蛋白2不同的突变蛋白的氨基酸序列作为“查询序列”。本文中术语“参考序列”和“野生型序列”可互换使用。

[0029] “间隙”是比对中的添加或缺失氨基酸所导致的空间。因此,两份完全相同的序列具有100%的同一性,但较不高度保守且具有缺失、添加或替换的序列可能具有较低程度的序列同一性。本领域技术人员将会认识到,可以得到数个计算机程序,以用来使用标准参数测定序列同一性,例如Blast(Altschul等(1997)Nucleic Acids Res.25,3389-3402)、Blast2(Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215,403-410)和Smith-Waterman(Smith等(1981)J.Mol.Biol.147,195-197)。

[0030] 如本发明所用的术语“变体”涉及蛋白质或肽的包含氨基酸序列修饰的衍生物,所述氨基酸序列修饰例如通过置换、缺失、插入或化学修饰进行。在一些实施方案中,这种修饰确实不会降低蛋白质或肽的功能。这种变体包括蛋白质,其中一个或多个氨基酸被它们各自的D-立体异构体或除天然存在的20种氨基酸外的氨基酸(比如,例如,鸟氨酸、羟脯氨酸、瓜氨酸,高丝氨酸,羟赖氨酸、戊氨酸)替换。然而,这样的置换也可以是保守的,即氨基酸残基被替代为化学相似的氨基酸残基。保守置换的实例为以下组成员之间的替代:1)丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸;2)天冬氨酸和谷氨酸;3)天冬酰胺和谷氨酰胺;4)精氨酸和赖氨酸;5)异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸;和6)苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。

[0031] “天然序列”人脂质运载蛋白2是指与源自自然界的相应多肽具有相同氨基酸序列的人脂质运载蛋白2。因此,天然序列人脂质运载蛋白2可以具有相应天然存在的人脂质运载蛋白2的氨基酸序列。这种天然序列多肽可以从自然界中分离或者可以通过重组或合成

手段产生。术语“天然序列”多肽具体涵盖人脂质运载蛋白2的天然存在的截短的或分泌的形式、天然存在的变体形式(例如替代地,人脂质运载蛋白2的剪接形式和天然存在的等位基因变体)。多肽“变体”是指与天然序列多肽具有至少约50%、60%、70%、80%或至少约85%的氨基酸序列同一性的生物活性多肽。这种变体包括,例如,在多肽的N-或C-末端添加或缺失一个或多个氨基酸残基的多肽。通常,变体与天然序列多肽具有至少约70%,包括至少约80%,比如至少约85%的氨基酸序列同一性,包括至少约90%的氨基酸序列同一性或至少约95%的氨基酸序列同一性。

[0032] 当根据本发明使用时,术语“位置”是指本文描述的氨基酸序列中的氨基酸的位置或本文描述的核酸序列中的核苷酸的位置。为了理解如本文在一种或多种突变蛋白的氨基酸序列位置的上下文中所用的术语“对应”或“相应”,相应位置不仅由前面的核苷酸/氨基酸的数量决定。因此,由于在(突变体或野生型)人脂质运载蛋白2的其它位置处的氨基酸缺失或添加,则可被置换的根据本发明的给定氨基酸的位置可能改变。类似地,由于在突变蛋白或野生型人脂质运载蛋白25'-非翻译区(UTR)(包括启动子和/或任何其它调节序列或基因(包括外显子和内含子))的其它位置处的核苷酸缺失或添加,则可被置换的根据本发明的给定核苷酸的位置可能改变。

[0033] 因此,对于根据本发明的相应位置,优选地理解,核苷酸/氨基酸的位置在指定数字方面可以不同于类似的相邻核苷酸/氨基酸,但是所述一个或多个相应位置仍包含可被交换、缺失或添加的所述相邻核苷酸/氨基酸。

[0034] 此外,对于基于根据本发明的参考骨架的突变蛋白中的相应位置,优选地理解,核苷酸/氨基酸的位置在结构上对应于(突变蛋白或野生型)人脂质运载蛋白2中的其它位置,尽管这些位置在指定数字方面可能不同。

[0035] 如本文针对非天然靶标所用的术语“有机分子”或“小有机分子”表示包含至少两个碳原子的有机分子,但是优选地,它包含不超过7或12个可旋转碳键,具有100到2000道尔顿、优选地100到1000道尔顿的分子量范围,且任选地包含一个或两个金属原子。

[0036] 如本文所用的词“检测/可检测的”理解为在定量和定性水平上以及它们的组合。从而其包括目标分子的定量、半定量和定性测量。

[0037] “受试者”是脊椎动物,优选是哺乳动物,更优选是人。如本文所用,术语“哺乳动物”是指归类为哺乳动物的任何动物,包括但不限于人、家畜和农用动物以及动物园、运动或宠物动物,例如绵羊、狗、马、猫、牛、大鼠、猪、如食蟹猕猴(*cynomolgus monkey*)的猿等等,仅举几个示例性实例。优选地,本文所述哺乳动物是人。

[0038] “有效量”是足够实现有益或者所希望的结果的量。在一次或多次施用中可以施用有效量。

[0039] 将“样品”定义为从任何受试者采集的生物样品。生物样品包括但不限于血液、血清、尿液、粪便、精液或组织。

[0040] 根据本发明的术语“转移”是指在继发性肿瘤发展的患者中,癌性细胞从原发性肿瘤传播到别处的一个或多个部位。确定癌症是否已转移的手段是本领域已知的,包括骨扫描、胸部X射线、CAT扫描、MRI扫描和肿瘤标志物测试。术语“预防转移”是指预防、延迟或减少原发性肿瘤或癌症的转移,并因此预防、延迟或减少继发性肿瘤的发展。优选地,预防或减少肺的转移(即继发性肿瘤),这意味着预防或减少癌性细胞从原发性肿瘤向肺的转移性

传播。

[0041] 如本文所用的术语“癌症”是指增殖性疾病，比如淋巴瘤、淋巴细胞白血病、肺癌、非小细胞肺(NSCL)癌、支气管肺泡细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、结肠癌、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、何杰金氏病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、肝细胞癌、胆道癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、脊柱轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、许旺氏细胞瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤和尤文氏肉瘤，包括任意上述癌症的难治疗形式(refractory version)，或上述癌症中的一种或多种的组合。

[0042] 术语“血管疾病”包括癌症、炎性疾病、动脉粥样硬化、缺血、创伤、败血症、慢性阻塞性肺病(COPD)、哮喘、糖尿病、年龄相关性黄斑变性(AMD)、视网膜病变、中风、肥胖、急性肺损伤、出血、例如细胞因子诱导的血管渗漏、过敏、格雷夫斯(Graves')病、桥本氏(Hashimoto's)自身免疫性甲状腺炎、特发性血小板减少性紫癜、巨细胞性动脉炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、克罗恩(Crohn's)病、多发性硬化、溃疡性结肠炎、特别是实体瘤、眼内新生血管综合征(比如增生性视网膜病变或AMD)、类风湿性关节炎和牛皮癣(Folkman,J.,等,J.Biol.Chem.267(1992)10931-10934;Klagsbrun,M.,等,Annu.Rev.Physiol.53(1991)217-239;和Garner,A.,Vascular diseases,In:Pathobiology of ocular disease,A dynamic approach,Garner,A.,和Klintworth,G.K.(eds.),第二版,Marcel Dekker,New York(1994),pp 1625-1710)。

[0043] 如本文所用，术语“抗体”意指包含四条多肽链(通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链)的免疫球蛋白分子及其多聚体(如IgM)。每条重链包含重链可变区(本文简写为HCVR或V_H)和重链恒定区。所述重链恒定区包含三个结构域(CH1、CH2和CH3)。每条轻链包含轻链可变区(本文简写为LCVR或V_L)和轻链恒定区。所述轻链恒定区包含一个结构域(C_L1)。所述V_H和V_L区可进一步细分为高变区(称为互补决定区(CDR))，中间穿插着更保守的区(称为骨架区(FR))。每个V_H和V_L均由三个CDR和四个FR组成，从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施方案中，抗CGRP抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人种系序列相同，或者可以是天然或人工修饰的。可以基于两个或更多个CDR的并排分析来定义氨基酸共有序列。

[0044] 如本文所用，术语“抗体”还包括完整抗体分子的抗原结合片段。如本文所用，抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等术语包括特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程化的多肽或糖蛋白。抗体的抗原结合片段可以，例如使用任何合适的标准技术(例如蛋白水解消化或涉及编码抗体可变结构域和任选地恒定结构域的DNA的操作和表达的重组基因工程技术)从完整抗体分子得到。这种DNA是已知的和/或容易从例如商业来源、DNA文库(包括例如噬菌体-抗体文库)获得或可以合成。可以以化学方式或使用分子生物学技术对DNA进行测序和操作，从而，例如，将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列成合适的构型，或引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等。抗原结合片段的非限制性实例包括：(i) Fab片段；(ii) F(ab')₂片段；(iii) Fd片段；(iv) Fv片段；(v) 单链Fv(scFv)分子；(vi) dAb片段；和(vii) 由模拟抗体高

变区(例如分离的互补决定区(CDR))的氨基酸残基组成的最小识别单位。其它工程化分子，如双价抗体、三价抗体、四价抗体和微型抗体也涵盖在如本文所用的表述“抗原结合片段”内。抗体的抗原结合片段通常包含至少一个可变结构域。所述可变结构域可以是任何长度或氨基酸组成，并且通常将包含至少一个与一个或多个骨架序列相邻或与其同框的CDR。在具有与V_L结构域相连的V_H结构域的抗原结合片段中，V_H和V_L结构域可以以任何合适的排列相对于彼此定位。例如，可变区可以是二聚体的且包含V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚体。可选地，所述抗体的抗原结合片段可以包含单体V_H或V_L结构域。

附图说明

[0045] 图1:示出了在溶液结合竞争ELISA中测量的所选CGRP-特异性脂质运载蛋白突变蛋白(SEQ ID N0s:2至6)与人和与大鼠CGRP α 和 β 的结合。除分别对大鼠 α 和人 β CGRP具有较低亲和力的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:6外，突变蛋白均以低纳摩尔至两位数纳摩尔的EC50值结合全部四种CGRP种类。所得的EC50值汇总于实施例4的表1。

[0046] 图2:提供了通过SPR对脂质运载蛋白突变蛋白SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7至17和SEQ ID NO:19至28的结合-速率(on-rate)和解离-速率(off-rate)的典型测量。与人和大鼠CGPR种类(α 和 β)的结合速率(ka)、解离速率(kd)以及得到的解离常数(KD)分别汇总于实施例5的表2。

[0047] 图3:为所选CGRP特异性脂质运载蛋白突变蛋白的功能活性的图示。所述脂质运载蛋白突变蛋白与CGRP的结合导致了对于人和大鼠CGRP种类(α 和 β)，分别通过SK-N-MC细胞(人脑神经上皮瘤)或L6细胞(大鼠骨骼肌成肌细胞)的CGRP诱导的cAMP生成的减少。对全部四种CGRP种类的IC50值均处于亚纳摩尔至低纳摩尔范围并汇总于实施例6的表3。

[0048] 图4:示出了通过CGRP特异性突变蛋白的结合抑制了SK-N-MC细胞(人脑神经上皮瘤)的人 α 和 β CGRP诱导的cAMP生成，其中通过蛋白质工程化从所述突变蛋白中移除了天然存在的半胱氨酸桥。与具有半胱氨酸桥的相应亲本突变蛋白(SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:27)相比，不含半胱氨酸的突变蛋白(SEQ ID N0s:29至40)的IC50值不受影响，所述IC50值汇总于实施例7的表4。

[0049] 图5:提供了通过SPR对脂质运载蛋白突变蛋白(SEQ ID N0s:87至93)的结合-速率(on-rate)和解离-速率(off-rate)的典型测量。得到的与人 α CGPR的解离常数(KD)汇总于实施例9的表5。

具体实施方式

[0050] 本发明提供一种对CGRP具有结合特异性的多肽，其中，所述多肽包含以可检测的亲和力结合CGRP的hNGAL突变蛋白。

[0051] 在一些实施方案中，以可检测的亲和力结合CGRP的hNGAL突变蛋白可包含至少一个用另一个氨基酸(例如丝氨酸残基)置换天然半胱氨酸残基的氨基酸置换。在一些其它实施方案中，以可检测的亲和力结合CGRP的突变蛋白可包含置换野生型hNGAL的一个或多个氨基酸的一个或多个非天然半胱氨酸残基。在进一步特别的实施方案中，根据本发明的hNGAL突变蛋白包含至少两个用半胱氨酸残基置换天然氨基酸的氨基酸置换，从而形成一个或多个半胱氨酸桥。在一些实施方案中，所述半胱氨酸桥可以连接至少两个环区。根据

Flower(Flower, 1996, 上文; Flower等, 2000, 上文) 和Breustedt等(2005, 上文) 在本文中使用这些区的定义。

[0052] 如本文公开的对CGRP具有特异性的突变蛋白或其组合物可对CGRP的至少一种生物活性具有拮抗、或中和或阻断活性。

[0053] 一方面,本发明包含以至少可检测的亲和力结合CGRP的各种hNGAL突变蛋白。在此意义上,可认为CGRP是参考野生型hNGAL的非天然配体,其中“非天然配体”是指在生理条件下不结合野生型人脂质运载蛋白2的化合物。通过在某些序列位置处用一个或多个突变工程化野生型hNGAL,本发明的发明人已经证明对非天然配体即CGRP的高亲和力和高特异性是可能的。在一些实施方案中,在编码野生型1人脂质运载蛋白2上某些序列位置的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或甚至更多个核苷酸三联体处,可以通过用核苷酸三联体的亚集(subset)在这些位置处的置换来实施随机诱变。

[0054] 此外,本发明的突变蛋白可在对应于hNGAL线性多肽序列的某些序列位置的序列位置中的任意一个或多个处,包括至少任意1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个处具有突变的氨基酸残基,比如人NGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的序列位置8、9、28、36、38、40、41、42、44、46、47、49、52、54、62、65、66、68、70、71、72、73、75、76、77、79、80、81、83、87、96、97、98、100、103、105、106、108、111、112、114、123、125、126、127、129、132、134、135、136、145、146、175、176、177和178处。

[0055] 在突变的氨基酸序列位置之外,本发明的突变蛋白可包含“亲本”蛋白骨架(例如hNGAL)的野生型(天然)氨基酸序列。在一些实施方案中,根据本发明的hNGAL突变蛋白还可在一个或多个序列位置处携带一个或多个氨基酸突变,只要这种突变不妨碍或干扰、至少基本上不妨碍或干扰突变蛋白的结合活性和折叠。可以采用已建立的标准方法(Sambrook, J. 等(2001) Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) 在DNA水平上非常简单地完成这种突变。氨基酸序列改变的示例性实例是插入或缺失以及氨基酸置换。这种置换可以是保守的,即氨基酸残基被化学性质(特别是关于极性以及尺寸)相似的氨基酸残基替换。保守置换的实例是以下组的成员之间的替代:1) 丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸;2) 天冬氨酸和谷氨酸;3) 天冬酰胺和谷氨酰胺;4) 精氨酸和赖氨酸;5) 异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸;和6) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。另一方面,也可以将非-保守改变引入氨基酸序列。此外,代替替换单个氨基酸残基,还可以插入或缺失人脂质运载蛋白2的一级结构的一个或多个连续氨基酸,只要这些缺失或插入导致稳定的折叠/功能性的突变蛋白(例如,具有截短的N-和C-末端的hNGAL突变蛋白)。在这种突变蛋白中,例如,在多肽的N-或C-末端添加或缺失一个或多个氨基酸残基。一般而言,这种突变蛋白与成熟hNGAL的氨基酸序列具有约至少70% (包括至少约80%,比如至少约85%) 的氨基酸序列同一性。

[0056] 当比较与其它脂质运载蛋白的序列同一性时,本文公开的hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 具有高序列同一性。在该一般情况下,本发明的突变蛋白的氨基酸序列至少基本上类似于天然野生型hNGAL的氨基酸序列,前提是在比对中可能存在由氨基酸的添加或缺失导致的间隙(如下所定义)。在一些实施方案中,本发明的基本上类似于成熟hNGAL的序列的突变蛋白的相应序列与成熟hNGAL的序列具有至少70% 的同一性或序列同源性、至少75% 的同一性或序列同源性、至少80% 的同一性或序列同源性、至

少82%的同一性或序列同源性、至少85%的同一性或序列同源性、至少87%的同一性或序列同源性或者至少90%的同一性或序列同源性(包括至少95%的同一性或序列同源性),前提是保留改变的位置或序列并且一个或多个间隙是可能的。

[0057] 如本文所用,由于结合特异性不是绝对的,而是一种相对性质,因此,若本发明的突变蛋白能够区分靶标和一个或多个参考靶标,则其“特异性结合”这种靶标(例如,CGRP)。例如根据蛋白质印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-测试、FACS、IHC和肽扫描来测定“特异性结合”。

[0058] 在一个实施方案中,本发明的突变蛋白在其N-末端和/或其C-末端与融合配偶体融合,在一些特别的实施方案中,该融合配偶体是蛋白,或蛋白质结构域或肽。在一些实施方案中,所述蛋白质结构域可以延长所述突变蛋白的血清半衰期。在进一步特别的实施方案中,该蛋白结构域是免疫球蛋白的Fc部分、免疫球蛋白的CH3结构域、免疫球蛋白的CH4结构域、白蛋白结合肽或白蛋白结合蛋白。

[0059] 在另一个实施方案中,本发明的突变蛋白与延长所述突变蛋白血清半衰期的化合物缀合。更优选地,所述突变蛋白与选自以下的化合物缀合:聚亚烷基二醇分子、羟乙基淀粉、免疫球蛋白的Fc部分、免疫球蛋白的CH3结构域、免疫球蛋白的CH4结构域、白蛋白结合肽和白蛋白结合蛋白。

[0060] 在又一个实施方案中,本发明涉及一种包含编码本文公开的突变蛋白的核苷酸序列的核酸分子。

[0061] 在再一个实施方案中,本发明涉及一种包含所述核酸分子的表达载体。

[0062] 在另又一个实施方案中,本发明涵盖一种包含所述核酸分子的宿主细胞或转化细胞。

[0063] 在再又一个实施方案中,本发明涵盖一种用于采用包含所述核酸分子的宿主细胞或转化细胞生产本文公开的突变蛋白的方法。

[0064] 在另一个实施方案中,本发明涵盖一种包含本文公开的突变蛋白作为活性成分的药物组合物。

[0065] A. 对CGRP特异性的示例性突变蛋白

[0066] 一方面,本发明涉及一种新的、对CGRP特异性的特异性结合的人脂质运载蛋白2(人Lcn2或hNGAL)突变蛋白。

[0067] 本发明的一个实施方案涉及一种hNGAL突变蛋白,例如,当在基本上如实施例4所述的竞争ELISA分析中测量时,所述突变蛋白能够以可检测的亲和力,比如通过约200nM或更低(比如约150nM或更低)的 K_D 量度的亲和力结合人 α -CGRP (SEQ ID NO:80) 和人 β -CGRP (SEQ ID NO:81) 的至少之一。

[0068] 一方面,本发明提供一种hNGAL突变蛋白,例如,当在基本上如实施例5所述的基于SPR的分析中通过Biacore T200仪器测量时,所述突变蛋白可进一步能够以约5nM或更低,比如约2nM或更低的 K_D 结合CGRP。

[0069] 在一些其它实施方案中,在基本上如实施例6所述的基于SK-N-MC细胞的功能分析中,本发明的hNGAL突变蛋白可进一步能够以约5nM或更低,比如约1.7nM或更低的IC50值抑制或降低CGRP诱导的cAMP产生。

[0070] 在一些特别的实施方案中,例如,当在基本上如实施例4所述的竞争ELISA分析中

测量时,本发明的hNGAL突变蛋白可进一步能够以可检测的亲和力,比如通过约200nM或更低(比如约150nM或更低)的K_D量度的亲和力结合大鼠α-CGRP (SEQ ID NO:82) 和大鼠β-CGRP (SEQ ID NO:83) 的至少之一。

[0071] 另一方面,本发明提供一种hNGAL突变蛋白,例如,当通过基本上如实施例5所述的基于SPR的分析测量时,所述突变蛋白可进一步能够以约5nM或更低的K_D结合大鼠CGRP。

[0072] 在一些更进一步的实施方案中,在基本上如实施例6所述的基于L6细胞的功能分析中,本发明的hNGAL突变蛋白可进一步能够以约5nM或更低,比如约0.2nM或更低的IC50值抑制或降低大鼠CGRP诱导的cAMP产生。

[0073] 在一些实施方案中,本发明的hNGAL突变蛋白可进一步是与人CGRP和大鼠CGRP交叉反应性的。

[0074] 在一些其它实施方案中,本发明的hNGAL突变蛋白可进一步是与人α-CGRP和人β-CGRP交叉反应性的。

[0075] 在一些其它实施方案中,本发明的hNGAL突变蛋白可进一步是与大鼠α-CGRP和大鼠β-CGRP交叉反应性的。

[0076] 在这一方面,本发明涉及一种或多种hNGAL突变蛋白,其中,与成熟hNGAL的线性多肽序列相比,所述hNGAL突变蛋白可在对应于成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的序列位置8、9、28、36、38、40、41、42、44、46、47、49、52、54、62、65、66、68、70、71、72、73、75、76、77、79、80、81、83、87、96、97、98、100、103、105、106、108、111、112、114、123、125、126、127、129、132、134、135、136、145、146、175、176、177和178的一个或多个位置处进一步包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或甚至更多个突变的氨基酸残基,并且其中,所述hNGAL突变蛋白以可检测的亲和力结合CGRP。

[0077] 在一些实施方案中,本发明的hNGAL突变蛋白可在对应于成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的序列位置36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132和134的一个或多个位置处进一步包含突变的氨基酸残基。

[0078] 在一些实施方案中,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,本发明的hNGAL突变蛋白可进一步包含以下突变的氨基酸残基中的至少一个:Leu36→Ile、Phe、Trp、Arg或Glu; Ala 40→Met、Trp或Thr; Ile 41→Leu、Trp、Gly或Glu; Gln 49→Leu、Phe、Lys、Glu或Thr; Tyr 52→Ala、Gly、Glu或Gln; Ser 68→Trp、His或Asp; Leu 70→Met、Trp、Tyr、Gly或Gln; Arg72→Met、Ile、Trp、Glu或Ser; Lys 73→Ala、Glu、Thr或Gln; Asp 77→Ile或Asn; Trp 79→Val、Gly、His或Thr; Arg 81→Gly、His、Glu或Asn; Asn96→Ala、Gly或Thr; Tyr 100→Ile、Pro或Glu; Leu 103→Met、Glu、Thr或Gln; Tyr 106→Leu、Ile、Ala、His或Asn; Lys 125→Val、Phe、Gly或Glu; Ser 127→Phe、Trp或Arg; Tyr 132→Leu、Ile或Trp; 和Lys 134→Trp、His或Glu。

[0079] 在一些实施方案中,本发明的hNGAL突变蛋白可在所述成熟hNGAL的这些序列位置处进一步包含两个或更多个,比如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或甚至更多个或全部突变的氨基酸残基。

[0080] 另外,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,根据本发明的hNGAL突变蛋白还可包含以下置换:Gln 28→His和Cys 87→Ser。

[0081] 在一些另外的实施方案中,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,本发明的结合

CGRP的hNGAL突变蛋白可进一步包含以下氨基酸置换组之一：

[0082] (a) Gln 28→His; Leu 36→Glu; Ala 40→Trp; Ile 41→Gly; Gln 49→Lys; Tyr 52→Ala; Ser 68→Asp; Leu 70→Gln; Arg 72→Ile; Lys 73→Glu; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→Ala; Tyr 100→Glu; Leu 103→Gln; Tyr 106→Asn; Lys 125→Glu; Ser 127→Trp; Tyr 132→Leu; Lys 134→Trp;

[0083] (b) Gln 28→His; Leu 36→Phe; Ala 40→Met; Ile 41→Trp; Gln 49→Phe; Tyr 52→Gly; Ser 68→Trp; Leu 70→Trp; Arg 72→Glu; Lys 73→Ala; Trp 79→Gly; Arg 81→Asn; Cys 87→Ser; Asn 96→Gly; Tyr 100→Pro; Leu 103→Met; Tyr 106→His; Lys 125→Glu; Ser 127→Phe; Tyr 132→Trp; Lys 134→Trp;

[0084] (c) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Thr; Tyr 52→Gln; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ser; Lys 73→Glu; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu;

[0085] (d) Gln 28→His; Leu 36→Arg; Ile 41→Glu; Gln 49→Glu; Tyr 52→Glu; Ser 68→Asp; Leu 70→Gly; Arg 72→Trp; Lys 73→Gln; Asp 77→Ile; Trp 79→Val; Arg 81→His; Cys 87→Ser; Leu 103→Thr; Tyr 106→Ala; Lys 125→Val; Ser 127→Arg; Tyr 132→Trp; Lys 134→Glu; 或

[0086] (e) Gln 28→His; Leu 36→Ile; Ala 40→Trp; Ile 41→Trp; Gln 49→Leu; Ser 68→His; Leu 70→Met; Arg 72→Met; Lys 73→Thr; Trp 79→Thr; Cys 87→Ser; Tyr 100→Ile; Leu 103→Met; Tyr 106→Leu; Lys 125→Phe; Ser 127→Trp; Tyr 132→Trp; Lys 134→His。

[0087] 此外,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,根据本发明的hNGAL突变蛋白可进一步包含以下置换:Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Leu 42→Arg; Asp 47→Asn; Gln 49→Ile、Pro或Thr; Tyr 52→Gln; Thr 54→Met、Ile或Lys; Lys 62→Arg; Asn 65→Asp; Val 66→Ala; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Phe 71→Leu; Arg 72→Ala或Ser; Lys 73→Asp或Glu; Lys 75→Arg; Asp 77→Arg或Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Phe 83→Ser; Cys 87→Ser; Asn 96→Leu或Thr; Ile 97→Thr; Lys 98→Gln; Tyr 100→His; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Val 111→Met; Lys 125→Gly; Val 126→Met; Ser 127→Gly或Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Ile或Val; Thr 145→Ala和Ser 146→Asn。

[0088] 在一些特别的实施方案中,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,本发明的结合CGRP的hNGAL突变蛋白可进一步包含以下氨基酸置换组之一:

[0089] (a) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ser; Lys 73→Glu; Lys 75→Arg; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Phe 83→Ser; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu;

[0090] (b) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Leu 42→Arg; Asp 47→Asn; Gln 49→Thr; Tyr 52→Gln; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ser; Lys 73→Glu; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Phe 83→Ser; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr;

- Leu 103→Glu; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu;
- [0091] (c) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Asn 65→Asp; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Phe 71→Leu; Arg 72→Ser; Lys 73→Glu; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Phe 83→Ser; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Val 126→Met; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 145→Ala;
- [0092] (d) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Asp 47→Asn; Gln 49→Thr; Tyr 52→Gln; Val 66→Ala; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Phe 71→Leu; Arg 72→Ser; Lys 73→Glu; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Phe 83→Ser; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Ile 97→Thr; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu;
- [0093] (e) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Ile; Lys 62→Arg; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ser; Lys 73→Glu; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Ile; Ser 146→Asn;
- [0094] (f) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Pro; Tyr 52→Gln; Lys 62→Arg; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ser; Lys 73→Glu; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Phe 83→Ser; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Lys 98→Gln; Tyr 100→His; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Val 126→Met; Ser 127→Gly; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu;
- [0095] (g) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Lys; Lys 62→Arg; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ala; Lys 73→Asp; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Leu; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Ile; Ser 146→Asn;
- [0096] (h) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Lys; Lys 62→Arg; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ala; Lys 73→Glu; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Ile; Ser 146→Asn;
- [0097] (i) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Lys; Lys 62→Arg; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ala; Lys 73→Asp; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Ile; Ser 146→Asn;
- [0098] (j) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Lys; Lys 62→Arg; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ala; Lys 73→Asp; Asp 77→Arg; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Tyr 100→His;

Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Ile; Ser 146→Asn;

[0099] (k) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Met; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ala; Lys 73→Asp; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Val; Ser 146→Asn; 或

[0100] (l) Gln 28→His; Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Ile; Lys 62→Arg; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ser; Lys 73→Glu; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Val 111→Met; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Ile; Ser 146→Asn。

[0101] 另外,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,根据本发明的hNGAL突变蛋白还可包含以下置换:Cys 76→Leu、Met、Val、Ile、Phe、Arg、Lys或Asn和Cys 175→Leu、Val、Phe、Trp、Tyr、Asp或Glu。

[0102] 在一些特别的实施方案中,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,本发明的结合CGRP的hNGAL突变蛋白可进一步包含以下氨基酸置换组之一:

[0103] (a) Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Met; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ala; Lys 73→Asp; Cys 76→Arg; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Val; Ser 146→Asn; Cys 175→Phe;

[0104] (b) Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Met; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ala; Lys 73→Asp; Cys 76→Met; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Val; Ser 146→Asn; Cys 175→Tyr;

[0105] (c) Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Met; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ala; Lys 73→Asp; Cys 76→Leu; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Val; Ser 146→Asn; Cys 175→Trp;

[0106] (d) Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Met; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ala; Lys 73→Asp; Cys 76→Ile; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Val; Ser 146→Asn; Cys 175→Glu;

[0107] (e) Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Met; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ala; Lys 73→Asp; Cys 76→Val; Asp 77→

Asn;Trp 79→His;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Thr;Leu 103→Glu;Ser 105→Pro;Tyr 106→Ile;Lys 125→Gly;Ser 127→Asn;Tyr 132→Ile;Lys 134→Glu;Thr 136→Val;Ser 146→Asn;Cys 175→Tyr;

[0108] (f) Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Leu;Gln 49→Ile;Tyr 52→Gln;Thr 54→Met;Ser 68→Trp;Leu 70→Tyr;Arg 72→Ala;Lys 73→Asp;Cys 76→Arg;Asp 77→Asn;Trp 79→His;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Thr;Leu 103→Glu;Ser 105→Pro;Tyr 106→Ile;Lys 125→Gly;Ser 127→Asn;Tyr 132→Ile;Lys 134→Glu;Thr 136→Val;Ser 146→Asn;Cys 175→Trp;

[0109] (g) Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Leu;Gln 49→Ile;Tyr 52→Gln;Thr 54→Met;Ser 68→Trp;Leu 70→Tyr;Arg 72→Ala;Lys 73→Asp;Cys 76→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→His;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Thr;Leu 103→Glu;Ser 105→Pro;Tyr 106→Ile;Lys 125→Gly;Ser 127→Asn;Tyr 132→Ile;Lys 134→Glu;Thr 136→Val;Ser 146→Asn;Cys 175→Leu;

[0110] (h) Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Leu;Gln 49→Ile;Tyr 52→Gln;Thr 54→Met;Ser 68→Trp;Leu 70→Tyr;Arg 72→Ala;Lys 73→Asp;Cys 76→Arg;Asp 77→Asn;Trp 79→His;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Thr;Leu 103→Glu;Ser 105→Pro;Tyr 106→Ile;Lys 125→Gly;Ser 127→Asn;Tyr 132→Ile;Lys 134→Glu;Thr 136→Val;Ser 146→Asn;Cys 175→Val;

[0111] (i) Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Leu;Gln 49→Ile;Tyr 52→Gln;Thr 54→Met;Ser 68→Trp;Leu 70→Tyr;Arg 72→Ala;Lys 73→Asp;Cys 76→Lys;Asp 77→Asn;Trp 79→His;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Thr;Leu 103→Glu;Ser 105→Pro;Tyr 106→Ile;Lys 125→Gly;Ser 127→Asn;Tyr 132→Ile;Lys 134→Glu;Thr 136→Val;Ser 146→Asn;Cys 175→Asp;或

[0112] (j) Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Leu;Gln 49→Ile;Tyr 52→Gln;Thr 54→Met;Ser 68→Trp;Leu 70→Tyr;Arg 72→Ala;Lys 73→Asp;Cys 76→Phe;Asp 77→Asn;Trp 79→His;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Thr;Leu 103→Glu;Ser 105→Pro;Tyr 106→Ile;Lys 125→Gly;Ser 127→Asn;Tyr 132→Ile;Lys 134→Glu;Thr 136→Val;Ser 146→Asn;Cys 175→Asp。

[0113] 此外,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,根据本发明的hNGAL突变蛋白可进一步包含以下置换:Gln 28→His;Leu 36→Arg;Gly 38→Ala;Ala 40→Asp或Glu;Ile 41→Val、Thr、Ala、Arg或Glu;Glu 44→Lys或Asp;Lys 46→Asn;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Phe 71→Leu;Arg 72→Val或Ser;Lys 73→Arg、Glu或Gln;Lys 75→Arg;Asp 77→Met或Ile;Trp 79→Val;Ile 80→Val或Thr;Arg 81→His;Cys 87→Ser或Gly;Lys 98→Glu;Leu 103→Val或Thr;Tyr 106→Ala或Gly;Val 108→Ile;Ser 112→Asn;Asn 114→Asp;Phe 123→Val;Lys 125→Leu或Val;Ser 127→Gly、Arg或Lys;Asn 129→Ser;Tyr 132→Leu或Ser;Lys 134→Glu和Ile 135→Val。

[0114] 在一些特别的实施方案中,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,本发明的结合CGRP的hNGAL突变蛋白可进一步包含以下氨基酸置换组之一:

[0115] (a) Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Glu;Ile 41→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68

→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Asp 77→Ile;Trp 79→Val;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Lys 125→Val;Ser 127→Lys;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu;

[0116] (b) Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Asp;Ile 41→Ala;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Lys 125→Leu;Ser 127→Lys;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu;

[0117] (c) Gln 28→His;Leu 36→Arg;Gly 38→Ala;Ala 40→Asp;Ile 41→Arg;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Ser;Lys 73→Arg;Asp 77→Ile;Trp 79→Val;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gly;Lys 125→Val;Ser 127→Gly;Tyr 132→Ser;Lys 134→Glu;

[0118] (d) Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Asp;Ile 41→Glu;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Leu 103→Val;Tyr 106→Gly;Lys 125→Val;Ser 127→Arg;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu;

[0119] (e) Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Asp;Ile 41→Val;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Lys 75→Arg;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Ile 80→Thr;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Lys 98→Glu;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Asn 114→Asp;Phe 123→Val;Lys 125→Leu;Ser 127→Lys;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu;

[0120] (f) Gln 28→His;Leu 36→Arg;Gly 38→Ala;Ala 40→Asp;Ile 41→Val;Glu 44→Asp;Lys 46→Asn;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Ile 80→Val;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Lys 125→Leu;Ser 127→Lys;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu;Ile 135→Val;

[0121] (g) Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Asp;Ile 41→Thr;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Phe 71→Leu;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Phe 123→Val;Lys 125→Leu;Ser 127→Lys;Asn 129→Ser;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu;

[0122] (h) Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Asp;Ile 41→Thr;Glu 44→Lys;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Phe 123→Val;Lys 125→Leu;Ser 127→Lys;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu;

[0123] (i) Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Asp;Ile 41→Ala;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Val 108→Ile;Ser 112→Asn;Phe 123→Val;Lys 125→Leu;Ser 127→Lys;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu;或

[0124] (j) Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Asp;Ile 41→Ala;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Phe 71→Leu;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Asp 77→Met;

Trp 79→Val; Arg 81→His; Cys 87→Gly; Leu 103→Val; Tyr 106→Ala; Phe 123→Val; Lys 125→Leu; Ser 127→Lys; Tyr 132→Leu; Lys 134→Glu。

[0125] 另外,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,根据本发明的hNGAL突变蛋白还可包含以下置换:Cys 76→Leu或Tyr;Cys 175→Ile;Ile 176→Asp和Asp 177→Gly。

[0126] 在一些特别的实施方案中,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,本发明的结合CGRP的hNGAL突变蛋白可进一步包含以下氨基酸置换组之一:

[0127] (a) Leu 36→Arg; Ala 40→Asp; Ile 41→Val; Gln 49→Glu; Tyr 52→Glu; Ser 68→Asp; Leu 70→Gly; Arg 72→Val; Lys 73→Gln; Lys 75→Arg; Cys 76→Leu; Asp 77→Met; Trp 79→Val; Ile 80→Thr; Arg 81→His; Cys 87→Ser; Lys 98→Glu; Leu 103→Val; Tyr 106→Ala; Asn 114→Asp; Phe 123→Val; Lys 125→Leu; Ser 127→Lys; Tyr 132→Leu; Lys 134→Glu; Cys 175→Ile; Ile 176→Asp; Asp 177→Gly; 或

[0128] (b) Leu 36→Arg; Ala 40→Asp; Ile 41→Val; Gln 49→Glu; Tyr 52→Glu; Ser 68→Asp; Leu 70→Gly; Arg 72→Val; Lys 73→Gln; Lys 75→Arg; Cys 76→Tyr; Asp 77→Met; Trp 79→Val; Ile 80→Thr; Arg 81→His; Cys 87→Ser; Lys 98→Glu; Leu 103→Val; Tyr 106→Ala; Asn 114→Asp; Phe 123→Val; Lys 125→Leu; Ser 127→Lys; Tyr 132→Leu; Lys 134→Glu; Cys 175→Ile; Ile 176→Asp; Asp 177→Gly。

[0129] 此外,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,根据本发明的hNGAL突变蛋白可进一步包含以下置换和添加:Ile 8→Lys; Pro 9→His; Gln 28→His; Leu 36→Trp或Arg; Ala 40→Thr或Asp; Ile 41→Leu或Val; Gln 49→Ile或Glu; Tyr 52→Gln或Glu; Thr 54→Met; Asn 65→Gln; Ser 68→Trp或Asp; Leu 70→Tyr或Gly; Arg 72→Ala或Val; Lys 73→Asp或Gln; Lys 75→Arg; Cys 76→Ile; Asp 77→Asn或Met; Trp 79→His或Val; Ile 80→Thr; Arg 81→Glu或His; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Lys 98→Glu; Leu 103→Glu或Val; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile或Ala; Asn 114→Asp; Phe 123→Val; Lys 125→Gly或Leu; Ser 127→Asn或Lys; Tyr 132→Ile或Leu; Lys 134→Glu; Thr 136→Val; Ser 146→Asn; Cys 175→Glu; Gly 178→Asp和将Gly添加至N-末端氨基酸(Gln 1)。

[0130] 在一些特别的实施方案中,与所述成熟hNGAL的线性多肽序列相比,本发明的结合CGRP的hNGAL突变蛋白可进一步包含以下氨基酸置换组之一:

[0131] (a) Leu 36→Trp; Ala 40→Thr; Ile 41→Leu; Gln 49→Ile; Tyr 52→Gln; Thr 54→Met; Ser 68→Trp; Leu 70→Tyr; Arg 72→Ala; Lys 73→Asp; Cys 76→Ile; Asp 77→Asn; Trp 79→His; Arg 81→Glu; Cys 87→Ser; Asn 96→Thr; Leu 103→Glu; Ser 105→Pro; Tyr 106→Ile; Lys 125→Gly; Ser 127→Asn; Tyr 132→Ile; Lys 134→Glu; Thr 136→Val; Ser 146→Asn; Cys 175→Glu和将Gly添加至N-末端氨基酸(Gln 1) (SEQ ID NO: 87);

[0132] (b) Gln 28→His; Leu 36→Arg; Ala 40→Asp; Ile 41→Val; Gln 49→Glu; Tyr 52→Glu; Ser 68→Asp; Leu 70→Gly; Arg 72→Val; Lys 73→Gln; Lys 75→Arg; Asp 77→Met; Trp 79→Val; Ile 80→Thr; Arg 81→His; Cys 87→Ser; Lys 98→Glu; Leu 103→Val; Tyr 106→Ala; Asn 114→Asp; Phe 123→Val; Lys 125→Leu; Ser 127→Lys; Tyr 132→Leu; Lys 134→Glu和将Gly添加至N-末端氨基酸(Gln 1) (SEQ ID NO: 88);

[0133] (c) Gln 28→His; Leu 36→Arg; Ala 40→Asp; Ile 41→Val; Gln 49→Glu; Tyr 52

→Glu;Asn 65→Gln;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Lys 75→Arg;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Ile 80→Thr;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Lys 98→Glu;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Asn 114→Asp;Phe 123→Val;Lys 125→Leu;Ser 127→Lys;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu;Gly 178→Asp和将Gly添加至N-末端氨基酸(Gln 1) (SEQ ID NO:89) ;

[0134] (d) Ile 8→Lys;Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Asp;Ile 41→Val;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Lys 75→Arg;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Ile 80→Thr;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Lys 98→Glu;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Asn 114→Asp;Phe 123→Val;Lys 125→Leu;Ser 127→Lys;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu和将Gly添加至N-末端氨基酸(Gln 1) (SEQ ID NO:90) ;

[0135] (e) Pro 9→His;Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Asp;Ile 41→Val;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Lys 75→Arg;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Ile 80→Thr;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Lys 98→Glu;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Asn 114→Asp;Phe 123→Val;Lys 125→Leu;Ser 127→Lys;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu和将Gly添加至N-末端氨基酸(Gln 1) (SEQ ID NO:91) ;

[0136] (f) Ile 8→Lys;Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Asp;Ile 41→Val;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Asn 65→Gln;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Lys 75→Arg;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Ile 80→Thr;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Lys 98→Glu;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Asn 114→Asp;Phe 123→Val;Lys 125→Leu;Ser 127→Lys;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu;Gly 178→Asp和将Gly添加至N-末端氨基酸(Gln 1) (SEQ ID NO:92) ;或

[0137] (g) Pro 9→His;Gln 28→His;Leu 36→Arg;Ala 40→Asp;Ile 41→Val;Gln 49→Glu;Tyr 52→Glu;Asn 65→Gln;Ser 68→Asp;Leu 70→Gly;Arg 72→Val;Lys 73→Gln;Lys 75→Arg;Asp 77→Met;Trp 79→Val;Ile 80→Thr;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Lys 98→Glu;Leu 103→Val;Tyr 106→Ala;Asn 114→Asp;Phe 123→Val;Lys 125→Leu;Ser 127→Lys;Tyr 132→Leu;Lys 134→Glu;Gly 178→Asp和将Gly添加至N-末端氨基酸(Gln 1) (SEQ ID NO:93) 。

[0138] 在剩余区域,即与序列位置8、9、28、36、38、40、41、42、44、46、47、49、52、54、62、65、66、68、70、71、72、73、75、76、77、79、80、81、83、87、96、97、98、100、103、105、106、108、111、112、114、123、125、126、127、129、132、134、135、136、145、146、175、176、177和178不同的区域,在突变的氨基酸序列位置之外,本发明的hNGAL突变蛋白可包含野生型(天然)氨基酸序列。

[0139] 在进一步的特别的实施方案中,根据本发明的突变蛋白包含选自SEQ ID NOs:2-40、87-93的氨基酸序列或其功能片段或变体。在一些实施方案中,这种片段或变体是SEQ ID NOs:2-40、87-93中任一个限定的突变蛋白的结构同源物。

[0140] 本发明的hNGAL突变蛋白的氨基酸序列可与选自SEQ ID NOs:2-40、87-93的序列具有高序列同一性,比如至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少87%、至少90%的同一性,包括至少95%的同一性。

[0141] 在一些其它实施方案中,根据本发明的与人CGRP和/或大鼠CGRP交叉反应性或结

合的hNGAL突变蛋白包含选自SEQ ID NOS:2-40、87-93的氨基酸序列和其功能片段或变体。
[0142] 本发明还包含具有选自SEQ ID NOS:2-40、87-93的氨基酸序列的hNGAL突变蛋白的结构同源物，所述结构同源物与所述的hNGAL突变蛋白具有大于约60%，优选地大于65%、大于70%、大于75%、大于80%、大于85%、大于90%、大于92%和最优选地大于95%的氨基酸序列同源性或序列同一性，并结合CGRP。

[0143] 可以通过诱变天然存在形式的人脂质运载蛋白2获得根据本发明的hNGAL突变蛋白。在一些所述诱变的实施方案中，置换(或替换)是保守置换。然而，设想任何置换(包括非保守置换或来自下文的示例性置换中的一个或多个)，只要所述突变蛋白保留了其结合CGRP的能力，和/或其与之后被置换的序列具有同一性，即所述突变蛋白与成熟人脂质运载蛋白2(SWISS-PROT数据库登录号P80188, SEQ ID NO:1)的氨基酸序列具有至少60%，比如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或更高的同一性。

[0144] 本发明还涉及一种药物组合物，其包括至少一种本文公开的hNGAL突变蛋白，或如本文所述的其缀合物或融合蛋白，以及药学上可接受的赋形剂。

[0145] 因此，采用药学上可接受的成分以及已建立的制备方法(Gennaro和Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA)可以将本发明的hNGAL突变蛋白配制成组合物。为了制备所述药物组合物，可以使用药学上惰性的无机或有机赋形剂。

[0146] B. 对CGRP特异性的突变蛋白的应用

[0147] 最近，Arulmozhi及同事报道了关于偏头痛的各种理论(Vascular Pharmacology 43;176-187, 2005)。其中一项理论提出，目前未知的偏头痛触发物刺激支配头部组织的三叉神经和神经节，从而导致神经肽信使分子从脉管系统上的轴突释放。然后，所释放的这些神经肽会激活一系列事件，其结果是偏头痛。另外，这些神经肽的释放改变血管通透性，导致随后由受刺激的三叉神经纤维支配的组织中的血浆蛋白渗漏。这种渗漏导致神经源性炎症，其导致偏头痛。

[0148] 在这些神经肽中，据报道CGRP在偏头痛中起作用，因为CGRP在感觉神经刺激后释放并具有有力的血管舒张活性(Vascular Pharmacology 43;176-187, 2005)。此外，CGRP的释放使血管通透性和随后的由受刺激的三叉神经纤维支配的组织中的血浆蛋白渗漏(血浆蛋白渗出)增加(Vascular Pharmacology 43;176-187, 2005)。此外，研究报道，向患有偏头痛的患者输注CGRP导致偏头痛样症状(Cephalgia 22(1):54-61, 2002)。

[0149] 在过去，已经将5-羟色胺5-HT1B和5-HT1D受体的小分子激动剂用作偏头痛的治疗。这些所谓的曲坦类药物是有效的血管收缩剂，并且已显示在实验动物偏头痛模型中抑制由三叉神经纤维的刺激而导致的血浆蛋白渗出。此外，在相同的实验动物模型中，降低血浆蛋白渗出的曲坦类药物的剂量也减弱了CGRP水平(Br. J. Pharmacology 99;202-206, 1990; Neuropharmacology 30(11):1193-1200, 1991)。

[0150] 尽管已发现曲坦类药物有效，但许多对曲坦类药物治疗有响应的患者在治疗后数小时内患有复发性头痛。此外，由于曲坦类药物是有效的血管收缩剂，其在某些患者群中是禁忌的，比如患有高血压或患有缺血性心脏病的患者群。因此，需要治疗性化合物来预防和/或治疗偏头痛，而无不需要的副作用，例如心血管相关的作用。

[0151] 因此，本发明的对CGRP具有结合亲和力的突变蛋白的许多可能应用存在于医药

中,例如,偏头痛、颞下颌关节紊乱以及比如心力衰竭、高血压和败血症的大量其它疾病中。另一方面,本发明涉及本文所公开的这种突变蛋白在用于检测样品中CGRP以及相应的诊断方法中的用途。

[0152] 本发明还涉及如所述的一种或多种对CGRP具有结合亲和力的突变蛋白在用于与CGRP形成复合物中的用途。

[0153] 因此,本发明的又一方面,所公开的突变蛋白用于检测CGRP。这种用途可包括以下步骤:使一种或多种所述突变蛋白与怀疑含有CGRP的样品在合适条件下接触,由此允许在所述突变蛋白与CGRP之间形成复合物,并通过合适信号检测所述复合物。

[0154] 可检测信号可以通过如上文所述的标记引起,或通过由于结合(即复合物形成)本身而导致的物理特性的变化而引起。一个实例是SPR,其数值在结合配偶体结合期间发生改变,所述配偶体中的一者固定在表面上,例如金箔上。

[0155] 本文公开的突变蛋白还可用于分离CGRP。这种用途可包括以下步骤:使一种或多种所述突变蛋白与猜测含有CGRP的样品在合适条件下接触,由此允许在所述突变蛋白与CGRP之间形成复合物,并从所述样品中分离所述复合物。

[0156] 在所公开的突变蛋白用于检测CGRP以及分离CGRP的用途中,可以将所述突变蛋白和/或CGRP或者其结构域或片段固定在合适的固相上。

[0157] 因此,可以测定分子(比如CGRP),例如在样品中存在与否以及其浓度或水平。

[0158] 因此,本发明的突变蛋白可用于检测和/或测量样品中的CGRP,例如用于诊断目的。例如,所述突变蛋白可用于诊断以CGRP异常表达(例如,过表达、低表达、缺乏表达等)为特征的病症或疾病。CGRP的示例性诊断分析可以包含例如使从患者获得的样品与所述突变蛋白接触,其中,所述突变蛋白用可检测的标记或报告分子标记。可选地,未标记的突变蛋白可以与本身以可检测方式标记的二级分子组合用于诊断应用。所述可检测的标记或报告分子可以是放射性同位素(比如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S或¹²⁵I);荧光或化学发光部分(比如异硫氰酸荧光素或罗丹明);或酶(比如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或萤光素酶)。可用于检测或测量样品中CGRP的具体示例性分析包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫试验(RIA)和荧光激活细胞分选(FACS)。

[0159] 又一方面,本发明的特征在于一种诊断或分析试剂盒,其包含根据本发明的对CGRP具有结合亲和力的突变蛋白。

[0160] 再又一方面,本发明还涵盖所公开的hNGAL突变蛋白或包含本文所述的这种突变蛋白的组合在制备药物组合物中的用途。因此,所得的药物组合物可适用于降低游离CGRP的循环水平,其可用于预防或治疗受试者,优选地人中的偏头痛。所述药物组合物可用作单一疗法或用作组合疗法。因此,本发明还提供了hNGAL突变蛋白以治疗与失调的蛋白质血浆渗出相关的疾病或障碍。

[0161] 除了这些突变蛋白在诊断中的用途之外,在另一方面,本发明涵盖本发明的这种突变蛋白或包含这种突变蛋白的组合物或组合在用于结合受试者中CGRP和/或降低受试者中蛋白质渗出的量中的用途。在一些实施方案中,这种受试者可患有由神经肽释放引起的疾病或障碍,所述神经肽释放改变血管通透性,从而导致随后由受刺激的三叉神经纤维支配的组织中的血浆蛋白渗漏。

[0162] 在又一方面,本发明的特征在于一种结合受试者中CGRP的方法,所述方法包括向

所述受试者施用有效量的一种或多种对CGRP具有结合亲和力的突变蛋白或一种或多种包含这种突变蛋白的组合物或组合。

[0163] 在再一方面,本发明涉及一种用于抑制或降低受试者中偏头痛的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的一种或多种对CGRP或CGRP的片段具有结合亲和力的本发明的突变蛋白或一种或多种包含这种突变蛋白的组合物或组合。在一些实施方案中,这种受试者可患有与游离CGRP的失调水平相关的疾病或障碍。

[0164] 本发明的突变蛋白或包含这种突变蛋白的组合物或组合尤其可用于治疗、预防和/或改善与CGRP活性相关的任何疾病或障碍,包括与游离CGRP的失调水平相关的疾病或障碍。

[0165] 在再又一方面,本发明涉及一种用于抑制或降低受试者中血浆蛋白渗出的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的一种或多种对CGRP或CGRP的片段具有结合亲和力的本发明的突变蛋白或一种或多种包含这种突变蛋白的组合物或组合。

[0166] 例如,本发明的突变蛋白或包含这种突变蛋白的组合物或组合可用于降低游离CGRP的循环水平。

[0167] 在一些其它的实施方案中,本发明的突变蛋白或包含这种突变蛋白的组合物或组合还可用于治疗、预防和/或改善偏头痛。

[0168] 通过任何治疗有效的肠胃外或非肠胃外(例如肠内)途径施用根据本发明的hNGAL突变蛋白或包含这种突变蛋白的组合物或组合。治疗有效途径提供将药剂递送至所需的隔室、系统或位置。例如,治疗有效途径是这样一种途径:通过该途径可以施用药剂以在所需作用部位处提供足以实现有益或期望的临床结果的药剂量。

[0169] C. 本发明的突变蛋白

[0170] 当在本文的结合CGRP的本发明的突变蛋白的上下文中使用时,术语“对...特异性的(specific for)”包括该突变蛋白针对CGRP、结合CGRP或者与CGRP反应。因此,针对、结合或与其反应包括所述突变蛋白特异性结合CGRP。如本文所述,在上下文中术语“特异性地”是指,突变蛋白与CGRP反应,但基本上不与另一种靶标反应。如上定义的所述突变蛋白是否特异性反应可以很容易地进行测试,特别是通过比较本发明的hNGAL突变蛋白与CGRP的反应和所述突变蛋白与其它(另一种)靶标的反应。“特异性结合”也可以例如根据蛋白质印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA测试、FACS、IHC和肽扫描来测定。

[0171] 当比较与另一种脂质运载蛋白(也见上文)的序列同一性时,根据本发明的突变蛋白的氨基酸序列与人脂质运载蛋白2具有高序列同一性。在该一般情况下,根据本发明的组合的突变蛋白的氨基酸序列与相应脂质运载蛋白(野生型hNGAL)的氨基酸序列至少基本上相似。根据本发明的组合的突变蛋白的相应序列与成熟hNGAL的序列基本上相似,比如与成熟hNGAL的序列具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少87%、至少90%的同一性,包括至少95%的同一性。在这一方面,本发明的突变蛋白当然可包含如本文所述的比较置换,其使该突变蛋白能够结合CGRP。典型地,hNGAL的突变蛋白相对于天然序列的hNGAL包含在hNGAL的配体结合位点开放端处的四个环中的氨基酸的一个或多个突变。如上文所述,这些区域在决定突变蛋白对CGRP的结合特异性中至关重要。源自hNGAL或其同源物的突变蛋白在N-末端区域和/或 β -桶结构端部处排列的三个肽环BC、DE、和FG中的任何序列位置处可具有一个、两个、三个、四个或更多个突变的氨基酸残基,所述

β -桶结构端部位于天然结合口袋的对面。在一些特别的实施方案中,根据本发明的hNGAL突变蛋白包含SEQ ID NO:2-40、87-93之一的四个环,它们一起限定对CGRP的结合口袋。

[0172] 与相应的天然hNGAL相比,根据本发明的突变蛋白包含一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或甚至20个)置换,条件是这种突变蛋白应该能够结合CGRP。例如,突变蛋白可在对应于hNGAL的不同位置的位置处(即在对应位置处)具有置换。在一些实施方案中,根据本发明的组合的突变蛋白包含至少两个氨基酸置换,包括用精氨酸残基置换天然氨基酸的2、3、4、5或甚至更多个氨基酸置换。因此,以产生能够结合CGRP的突变蛋白为目标,对如本文所述的蛋白质‘参考’骨架的核酸进行诱变。

[0173] 并且,本发明的突变蛋白可在其N-或C-末端,优选地C-末端包含异源氨基酸序列(例如Strep-标签,例如Strep II标签)而不影响该突变蛋白的生物活性(结合其靶标,例如CGRP)。

[0174] 具体而言,为了确定与野生型hNGAL不同的突变蛋白的氨基酸序列的氨基酸残基是否对应于野生型hNGAL的氨基酸序列中的某一位置,技术人员可利用本领域熟知的手段和方法,例如手动地或通过使用计算机程序例如BLAST2.0(其代表基本局部比对搜索工具)或ClustalW或任何适用于产生序列比对的其它合适程序进行比对。因此,野生型hNGAL可作为“受试序列”或“参考序列”,而本文所述的与野生型hNGAL不同的突变蛋白的氨基酸序列作为“查询序列”。本文中术语“参考序列”和“野生型序列”可互换使用。

[0175] 在一些实施方案中,置换(或替代)是保守置换。然而,设想任何置换(包括非-保守置换或者来自下文列出的示例性置换中的一个或多个),只要所述突变蛋白保留了其结合CGRP的能力,和/或其与之后被置换的序列具有同一性,即所述突变蛋白与“原始”序列具有至少60%,比如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或更高的同一性。

[0176] 保守置换通常为以下置换,根据待突变的氨基酸列举,每一个待突变的氨基酸后面为一个或多个可作为保守替代:Ala→Gly、Ser、Val;Arg→Lys;Asn→Gln、His;Asp→Glu;Cys→Ser;Gln→Asn;Glu→Asp;Gly→Ala;His→Arg、Asn、Gln;Ile→Leu、Val;Leu→Ile、Val;Lys→Arg、Gln、Glu;Met→Leu、Tyr、Ile;Phe→Met、Leu、Tyr;Ser→Thr;Thr→Ser;Trp→Tyr;Tyr→Trp、Phe;Val→Ile、Leu。其它置换也是可能的并可凭经验或根据其它已知的保守或非-保守置换确定。作为另一取向(orientation),以下八组的每一组包含氨基酸,该氨基酸通常可用于定义另一种氨基酸的保守置换:

- [0177] a.丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly);
- [0178] b.天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu);
- [0179] c.天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln);
- [0180] d.精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys);
- [0181] e.异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、甲硫氨酸(Met)、缬氨酸(Val);
- [0182] f.苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp);
- [0183] g.丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr);和
- [0184] h.半胱氨酸(Cys)、甲硫氨酸(Met)。

[0185] 如果这种置换导致了生物活性的改变,则可引入更多实质性改变(如以下或如下文关于氨基酸分类进一步描述)并就所需特征筛选产物。这种更实质性改变的实例是:Ala→Leu、Ile;Arg→Gln;Asn→Asp、Lys、Arg、His;Asp→Asn;Cys→Ala;Gln→Glu;Glu→Gln;

His→Lys; Ile→Met、Ala、Phe; Leu→Ala、Met、正亮氨酸; Lys→Asn; Met→Phe; Phe→Val、Ile、Ala; Trp→Phe; Tyr→Thr、Ser; Val→Met、Phe、Ala。

[0186] hNGAL的生物性质中的实质性修饰通过选择它们在维持以下的效果上显著不同的置换完成: (a) 置换区域中多肽骨架的结构,例如片(sheet)或螺旋构象; (b) 靶标位点处分子的电荷或疏水性; 或 (c) 侧链的体积(bulk)。基于一般侧链性质,将天然存在的残基分为以下的组: (1) 疏水性: 正亮氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸; (2) 中性亲水性: 半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸; (3) 酸性: 天冬氨酸、谷氨酸; (4) 碱性: 天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸; (5) 影响链取向的残基: 甘氨酸、脯氨酸; 和 (6) 芳香族: 色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。

[0187] 非-保守置换需要将这些类别中一类的成员置换成另一类。通常还可用丝氨酸置换不参与维持hNGAL正确构象的任何半胱氨酸残基,以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可添加半胱氨酸键以提高其稳定性。

[0188] 采用已经建立的标准方法,可在核酸(例如DNA水平)上非常简单地完成任何突变,包括以上所讨论的插入。氨基酸序列改变的示例性实例是插入或缺失以及氨基酸置换。这种置换可以是保守的,即氨基酸残基被替代为化学性质(特别是关于极性以及尺寸)相似的氨基酸残基。保守置换的实例为以下组的成员之间的替代: 1) 丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸; 2) 天冬氨酸和谷氨酸; 3) 天冬酰胺和谷氨酰胺; 4) 精氨酸和赖氨酸; 5) 异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸; 和 6) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。另一方面,也可以将非-保守改变引入氨基酸序列。此外,代替替换单个氨基酸残基,还可以插入或缺失hNGAL的一级结构的一个或多个连续氨基酸,只要这些缺失或插入导致稳定的折叠/功能的突变蛋白。

[0189] 氨基酸序列的修饰包括单个氨基酸位置的定向诱变,以便通过引入某些限制性酶的切割位点来简化突变的hNGAL基因或其部分的亚克隆。此外,还可引入这些突变以进一步改善针对给定靶标(比如CGRP)的突变蛋白的亲和力。另外,如果需要,可以引入突变以便调节突变蛋白的某些特征,例如改善折叠稳定性、血清稳定性、蛋白质抗性或水溶解性或者降低聚集趋势。例如,可以将天然存在的半胱氨酸残基突变成其它氨基酸以防止二硫桥形成。还可以有意将其它氨基酸序列位置突变成半胱氨酸以便引入新的反应基团,例如用于与其它化合物如聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、生物素、肽或蛋白质缀合,或用于形成非天然存在的二硫化物连接(linkage)。所产生的硫醇部分可以用于使突变蛋白PEG化或HES化,例如,以便增加相应突变蛋白的血清半衰期。

[0190] 还可以将其它氨基酸序列位置突变成半胱氨酸以便引入新的反应基团,例如用于与其它化合物如聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、生物素、肽或蛋白质缀合,或用于形成非天然存在的二硫化物连接(linkage)。

[0191] 在一些实施方案中,若上述部分中的一个与本发明的突变蛋白缀合,则与氨基酸侧链的缀合可能是有利的。合适的氨基酸侧链可以天然存在于hNGAL的氨基酸序列中,或者可以通过诱变引入。若通过诱变引入了合适的结合位点,则一种可能性是用半胱氨酸残基替代在适当位置处的氨基酸。

[0192] 对于人脂质运载蛋白2的突变蛋白,这种将半胱氨酸残基引入脂质运载蛋白(包括人脂质运载蛋白2突变蛋白)的氨基酸序列中的突变的示例性可能性包括在对应于人NGAL野生型序列的序列位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146或158的序列位置中至少一

个处引入半胱氨酸(Cys)残基。在一些实施方案中,其中本发明的人脂质运载蛋白2突变蛋白具有这样一种序列,与SWISS-PROT/UniProt数据库登录号P80188的序列相比,在该序列中已经用另一种氨基酸残基替代半胱氨酸,相应的半胱氨酸可重新引入该序列。作为示例性实例,在这种情况下,可以通过还原为在SWISS-PROT登录号P80188的序列(SEQ ID NO:1)中原始存在的半胱氨酸来在氨基酸位置87处引入半胱氨酸残基。在氨基酸位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146和/或158中任何的侧面处产生的硫醇部分可以用于使突变蛋白PEG化或HES化,例如,以便增加相应人脂质运载蛋白2突变蛋白的血清半衰期。

[0193] 在另一个实施方案中,为了给将上述化合物中的一个缀合至根据本发明的突变蛋白提供合适的氨基酸侧链,可以通过诱变引入人工氨基酸。一般而言,这些人工氨基酸设计为更具反应性,从而促进与所需化合物缀合。这种可通过人工tRNA引入的人工氨基酸的一个实例是对乙酰基-苯丙氨酸。

[0194] 在一些实施方案中,本发明的突变蛋白可在其N-末端或其C-末端融合至蛋白质、蛋白质结构域或肽,例如信号序列和/或亲和标签。

[0195] 合适的融合配偶体的进一步实例是例如Strep-标签®或Strep-标签®II (Schmidt, T.GM. 等(1996) J.Mol.Biol. 255, 753-766)、myc-标签、FLAG-标签、His₆-标签或HA--标签的亲和标签或例如谷胱甘肽-S-转移酶的也允许容易检测和/或纯化重组蛋白的蛋白质。最后,具有生色或荧光性质的蛋白质(例如绿色荧光蛋白(GFP)或黄色荧光蛋白(YFP))也是本发明的突变蛋白的合适融合配偶体。

[0196] 一般而言,可以用任何合适的化学物质或酶标记本发明的突变蛋白,所述化学物质或酶直接或间接产生化学、物理、光学或酶反应中的可检测的化合物或信号。物理反应和同时光学反应/标记物的实例是照射时的荧光发射或当使用放射活性标记时的X-射线发射。碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶和β-半乳糖苷酶是催化显色反应产物形成的酶标记(同时是光学标记)的实例。一般而言,通常用于抗体的所有标记(除了那些专门与免疫球蛋白的Fc部分中的糖部分一起使用的)也可用于与本发明的突变蛋白缀合。本发明的突变蛋白还可与任何合适的治疗活性剂缀合,例如用于将这种试剂靶向递送至给定细胞、组织或器官或用于选择性靶向例如肿瘤细胞的细胞而不影响周围正常细胞。这种治疗活性剂的实例包括放射性核素、毒素、小有机分子和治疗性肽(例如作为细胞表面受体的激动剂/拮抗剂的肽或竞争给定细胞靶标上蛋白质结合位点的肽)。然而,本发明的突变蛋白还可与治疗活性核酸(例如反义核酸分子、小干扰RNA、微RNA或核酶)缀合。可以采用本领域熟知的方法产生这种缀合物。

[0197] 如上所述,在一些实施方案中,本发明的突变蛋白可与延长该突变蛋白血清半衰期的部分缀合(这方面还参见PCT公开文本WO 2006/56464,其中参考具有CTLA-4结合亲和力的人嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的突变蛋白描述了这种缀合策略)。所述延长血清半衰期的部分可以是聚亚烷基二醇分子、羟乙基淀粉、例如棕榈酸(Vajo&Duckworth 2000, Pharmacol.Rev. 52, 1-9)的脂肪酸、免疫球蛋白的Fc部分、免疫球蛋白的CH3结构域、免疫球蛋白的CH4结构域、白蛋白结合肽或白蛋白结合蛋白、转铁蛋白,仅举几个例子。白蛋白结合蛋白可以是细菌白蛋白结合蛋白、抗体、包括结构域抗体(例如,参见美国专利6,696,245)的抗体片段或对白蛋白具有结合活性的突变蛋白。因此,用于延长本发明的突变蛋白的半衰期的合适缀合配偶体包括白蛋白结合蛋白,例如,细菌白蛋白结合结构域,如链

球菌蛋白G (König, T., & Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83) 的一种。可用作缀合配偶体的白蛋白结合肽的其它实例是,例如如美国专利申请2003/0069395 (通过引用整体并入本文) 或Dennis等 (Dennis, M.S., Zhang, M., Meng, Y.G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L.A. (2002) J Biol Chem 277, 35035-35043) 所述,包含 Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys 共有序列的那些,其中 Xaa₁ 是 Asp、Asn、Ser、Thr 或 Trp; Xaa₂ 是 Asn、Gln、His、Ile、Leu 或 Lys; Xaa₃ 是 Ala、Asp、Phe、Trp 或 Tyr; 和 Xaa₄ 是 Asp、Gly、Leu、Phe、Ser 或 Thr。

[0198] 在其它实施方案中,白蛋白本身 (Osborn, B.L. 等, 2002, J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548) 或白蛋白的生物活性片段可用作本发明突变蛋白的缀合配偶体。术语“白蛋白”包括所有的哺乳动物白蛋白,例如人血清白蛋白或牛血清白蛋白或大鼠白蛋白。可以按照US专利No. 5,728,553或欧洲专利申请EP 0 330 451和EP 0 361 991 (通过引用整体并入本文) 中的描述重组产生所述白蛋白或其片段。可将重组的人白蛋白 (Recombumin®) Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK) 缀合或融合至本发明的突变蛋白,以便延长该突变蛋白的半衰期。

[0199] 若白蛋白结合蛋白是抗体片段,则其可以是结构域抗体。将结构域抗体 (dAb) 工程化以允许精确控制生物物理性质和体内半衰期,从而产生最佳安全性和有效性产品概况。结构域抗体例如可从 Domantis Ltd. (Cambridge, UK and MA, USA) 商购获得。

[0200] 将转铁蛋白用作延长本发明的突变蛋白血清半衰期的部分,可将该突变蛋白遗传地融合至非-糖基化转铁蛋白的N或C末端或者两者。非-糖基化转铁蛋白具有14-17天的半衰期,且转铁蛋白融合蛋白将类似地具有延长的半衰期。所述转铁蛋白载体还提供高生物利用度、生物分布和循环稳定性。这一技术可从 BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA) 商购获得。用于用作蛋白质稳定剂/半衰期延长配偶体的重组人转铁蛋白 (DeltaFerrin™) 也可从 Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK) 商购获得。

[0201] 若将免疫球蛋白的Fc部分用于延长本发明的突变蛋白的血清半衰期的目的,则可采用可从 Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, USA) 商购获得的 SynFusion™ 技术。这种Fc-融合技术的应用允许产生更长效的生物药物,并可以例如由两个拷贝的连接至抗体Fc区的所述突变蛋白组成以改善药物动力学、溶解度和生产效率。

[0202] 另一个延长本发明的突变蛋白半衰期的选择是将长的、非结构化的、柔性富含甘氨酸的序列 (例如具有约20至80个连续甘氨酸残基的聚甘氨酸) 与突变蛋白的N-或C-末端融合。W02007/038619中公开的这种方法,例如也称为“rPEG”(重组PEG)。

[0203] 若将聚亚烷基二醇用作缀合配偶体,则该聚亚烷基二醇可以是取代的、未取代的、线性的或支链的。其也可以是活化的聚亚烷基衍生物。合适的化合物的实例是如 WO 99/64016、美国专利6,177,074或美国专利6,403,564中关于干扰素所述的聚乙二醇 (PEG) 分子,或如对于其它蛋白质所述的聚乙二醇 (PEG) 分子,例如PEG修饰的天冬酰胺酶、PEG-腺苷脱氨酶 (PEG-ADA) 或PEG-超氧化物歧化酶 (参见,例如, Fuertges等 (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11, 139-148)。这种聚合物 (例如聚乙二醇) 的分子量可以从约300到约70,000道尔顿,包括,例如,具有约10,000、约20,000、约30,000或约40,000道尔顿的分子量的聚乙二醇。此外,如例如美

国专利6,500,930或6,620,413所述,为了延长血清半衰期的目的,可将例如淀粉或羟乙基淀粉(HES)的碳水化合物低聚-和聚合物与本发明的突变蛋白缀合。

[0204] 此外,本文公开的突变蛋白可与可赋予本发明的突变蛋白新特征(例如酶活性或对其它分子的结合亲和力)的部分融合。合适融合配偶体的实例是碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、谷胱甘肽-S-转移酶、蛋白G的白蛋白结合结构域、蛋白A、抗体片段、低聚结构域或毒素。

[0205] 特别地,可以将本文公开的突变蛋白与单独的酶活性位点融合,使得所得融合蛋白的两个“组分”一起作用于给定治疗靶标。可将突变蛋白的结合结构域附着至致病靶标,从而允许酶结构域消除该靶标的生物功能。

[0206] 本发明还涉及核酸分子(DNA和RNA),该核酸分子包含编码本发明的突变蛋白的核苷酸序列。由于遗传密码子的简并性允许指定相同氨基酸的其它密码子置换某些密码子,因此本发明不局限于编码如本文所述突变蛋白的特定核酸分子,而是涵盖包含编码功能性突变蛋白的核苷酸序列的全部核酸分子。在这一方面,本发明提供编码本发明的一些突变蛋白的核苷酸序列,如SEQ ID NOs:14-79、94-100所示。

[0207] 在本发明的一个实施方案中,所述方法包括使核酸分子在核苷酸三联体处经受诱变,该核苷酸三联体编码对应于人NGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的序列位置8、9、28、36、38、40、41、42、44、46、47、49、52、54、62、65、66、68、70、71、72、73、75、76、77、79、80、81、83、87、96、97、98、100、103、105、106、108、111、112、114、123、125、126、127、129、132、134、135、136、145、146、175、176、177和178的序列位置的至少一个,或甚至更多个氨基酸。

[0208] 本发明还包含编码本发明突变蛋白的核酸分子,其在实验诱变的指定序列位置之外包含另外的突变。这种突变通常是耐受的或甚至可证明是有利的,例如若这些突变有利于所述突变蛋白的改善的折叠效率、血清稳定性、热稳定性或配体结合亲和力。

[0209] 本申请公开的核酸分子可以“可操作地连接”至一个或多个调节序列以允许该核酸分子的表达。

[0210] 核酸分子,如DNA,如果它包括包含关于转录和/或翻译调节的信息的序列元件,并且这样的序列“可操作地连接”至编码多肽的核苷酸序列的话,其被称为“能够表达核酸分子”或能够“允许核苷酸序列的表达”。可操作的连接是这样的连接:在所述连接中,调节序列元件和待表达的序列以使基因能够表达的方式相连接。基因表达需要的调控区域的确切性质可能在种类间变化,但一般来说这些区域包括启动子,在原核生物中,所述启动子既包含启动子本身(即指导转录启动的DNA元件),又包括当转录成RNA时发出翻译启动信号的DNA元件。这种启动子区域通常包括参与转录和翻译启动的5'非编码序列,如-35/-10盒以及原核生物中的Shine-Dalgamo元件或者真核生物中的TATA盒、CAAT序列和5'-加帽元件。这些区域还可以包括增强子或阻遏元件以及用于将天然多肽靶向宿主细胞特定隔室的被翻译信号和前导序列。

[0211] 此外,3'非编码序列可以包含参与转录终止、聚腺苷酸化等的调节元件。然而,如果这些终止序列在特定的宿主细胞内没有令人满意的功能,那么它们可能被该细胞中有功能的信号置换。

[0212] 因此,本发明的核酸分子可以包括调节序列,如启动子序列。在一些实施方案中,本发明的核酸分子包括启动子序列和转录终止序列。合适的原核启动子是,例如,tet启动

子, lacUV5启动子或T7启动子。可用于在真核细胞中表达的启动子的实例有SV40启动子或CMV启动子。

[0213] 本发明的核酸分子也可以是载体的一部分或任何其它类型的克隆载体,如质粒、噬菌粒、噬菌体、杆状病毒、粘粒或人工染色体。

[0214] 在一个实施方案中,核酸分子包含在质粒中。质粒载体指编码融合至目的cDNA的温和噬菌体(如M13或f1)基因间区域或其功能部分的载体。用这样的噬菌粒载体和合适的辅助噬菌体(如M13K07、VCS-M13或R408)超感染细菌宿主细胞后,产生完整的噬菌体颗粒,由此使得可以将编码的异源cDNA物理偶联至在噬菌体表面上展示的其相应多肽(参见例如Lowman,H.B.(1997)Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.26,401-424,或Rodi,D.J.和Makowski,L.(1999)Curr.Opin.Biotechnol.10,87-93)。

[0215] 除上文描述的调节序列和编码如本文所述突变蛋白的核酸序列以外,这种克隆载体可以包括源自与用于表达的宿主细胞相容的物种的复制和控制序列,以及赋予转化或转染的细胞可选择表型的选择标记物。大量合适的克隆载体是本领域已知的,并可商购获得。

[0216] 可将编码如本文所述突变蛋白的DNA分子,特别是含有这种突变蛋白的编码序列的克隆载体,转化到能够表达该基因的宿主细胞中。可以使用标准技术进行转化。因此,本发明还涉及含有如本文公开的核酸分子的宿主细胞。

[0217] 在适于表达编码本发明融合蛋白的核苷酸序列的条件下培养转化的宿主细胞。合适的宿主细胞可以是原核细胞,如大肠杆菌(*E.coli*)或枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),或者是真核细胞,例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、SF9或High5昆虫细胞、永生化哺乳动物细胞系(例如HeLa细胞或CHO细胞)或原代哺乳动物细胞。

[0218] 本发明还涉及用于产生如本文所述的突变蛋白的方法,其中通过遗传工程方法,从编码该突变蛋白或多肽的核酸开始产生该突变蛋白或多肽、该突变蛋白的片段或该突变蛋白的融合蛋白。该方法可以在体内进行,所述突变蛋白或多肽可以例如在细菌或真核宿主生物体中产生,然后从该宿主生物体或其培养物中分离。还可以在体外产生蛋白质,例如使用体外翻译系统。

[0219] 当在体内产生突变蛋白时,通过重组DNA技术(如上文已概述)将编码该突变蛋白或多肽的核酸引入合适的细菌或真核宿主生物体中。为此,首先使用已建立的标准方法,用克隆载体转化该宿主细胞,所述克隆载体包含编码如本文所述突变蛋白的核酸分子。然后在允许表达该异源DNA并因而允许合成相应多肽的条件下培养该宿主细胞。之后,从细胞或培养基中回收该多肽。

[0220] 在一些实施方案中,本申请公开的核酸分子,如DNA,可以“可操作地连接”至本发明的另一核酸分子以允许本发明融合蛋白的表达。在这一方面,可操作的连接是这样的连接:在所述连接中,第一核酸分子的序列元件和第二核酸分子的序列元件以使融合蛋白能够表达为单一多肽的方式相连接。

[0221] 此外,在一些实施方案中,可在本发明的hNGAL突变蛋白中移除Cys76和Cys 175之间天然存在的二硫键。因此,这种突变蛋白可以在具有还原性氧化还原环境的细胞隔室中产生,例如,在革兰氏阴性细菌的细胞质中。

[0222] 在本发明突变蛋白包括分子内二硫键的情况下,可以优选的是,使用适合的信号

序列将新生多肽引导至具有氧化性氧化还原环境的细胞隔室。这种氧化性环境可以由革兰氏阴性细菌(例如大肠杆菌)的外周胞质、在革兰氏阳性细菌的细胞外环境中或在真核细胞的内质网腔中提供，并且这种氧化性环境通常有利于结构性二硫键的形成。

[0223] 然而，还可以在宿主细胞(优选大肠杆菌)的胞液中产生本发明的突变蛋白。在这种情况下，该突变蛋白或多肽可以以可溶和折叠状态直接获得，也可以以包涵体的形式回收，然后体外复性。其它选择为使用具有氧化性细胞内环境的特定宿主菌株，其可以因而允许在胞液中形成二硫键(Venturi等(2002)J.Mol.Biol.315,1-8.)。

[0224] 然而，如本文所述的突变蛋白或多肽可以不一定为仅通过利用基因工程生成或产生。而是，还可以通过化学合成或通过体外转录和翻译获得这种突变蛋白或多肽，所述化学合成例如Merrifield固相多肽合成。例如可行的是，使用分子建模鉴定有希望的突变，然后体外合成希望的(设计的)多肽，然后研究对CGRP的结合活性。用于固相和/或液相合成蛋白的方法是本领域熟知的(参见例如Bruckdorfer等(2004)Curr.Pharm.Biotechnol.5,29-43)。

[0225] 在另一个实施方案中，本发明的突变蛋白或多肽可以使用本领域技术人员已知的成熟方法通过体外转录/翻译产生。

[0226] 本领域技术人员将会理解用于制备本发明预期的、但其蛋白或核酸序列在本文中没有明确地披露的突变蛋白或其多肽的合适方法。作为一个概述，氨基酸序列的这种修饰包括，例如，通过引入某些限制性酶的切割位点对单个氨基酸位置进行定点诱变，以便简化突变的hNGAL基因或其部分的亚克隆。此外，也可以引入这些突变以进一步提高突变蛋白对其靶标(如CGRP)的亲和力。并且，如果必要，可以引入突变来调节突变蛋白的某些特征，如提高折叠稳定性、血清稳定性、蛋白抗性或水溶解性，或者减少聚集趋势。例如，天然存在的半胱氨酸残基可突变为其它氨基酸以防止形成二硫桥。

[0227] 本文公开的突变蛋白或其多肽以及它们的衍生物可以类似于抗体或其片段用在许多领域。例如，该突变蛋白可以用于以酶、抗体、放射活性物质或任何其它具有生物化学活性或确定的结合特征的基团进行标记。这样，它们各自的靶标或其缀合物或融合蛋白可以被检测或者与它们接触。此外，本发明的突变蛋白或其多肽可以用于通过已建立的分析方法(如ELISA或蛋白质印迹)或通过显微术或免疫传感器(immunosensorics)来检测化学结构。在这个方面，检测信号可以通过使用合适的突变蛋白缀合物或融合蛋白直接产生，或者通过经由抗体对结合的突变蛋白进行免疫化学检测而间接产生。

[0228] 对本领域技术人员而言，经审查以下的实施例及其附图(其并非意图用于限制)，本发明的另外的目的、优点和特征将变得显而易见。因此，应当理解的是，虽然本发明通过示例性实施方案以及任选的特征进行特定的公开，但本领域技术人员可以采取本文所公开于其中的公开内容的修饰及变化，且认为这样的修饰及变化在本发明的范围内。

[0229] 实施例

[0230] 实施例1：降钙素基因相关肽的肽合成和生物素化

[0231] 降钙素基因相关肽(CGRP)是神经活性肽。降钙素基因相关肽以两种不同的同种型存在， α 和 β CGRP，并且来自人和大鼠的两种同种型均通过肽合成产生(SEQ ID NOS:80至83)。将肽溶液等分到硅化的1.5-mL管(ThermoFisher, No.02-681-320)中，并通过速度真空浓缩系统在硅化的1.5-mL管(Thermo Fisher, No.02-681-320)中冻干。为了使所述肽重新

溶剂,加入0.5%AcOH,并通过轻敲(tapping)或抽吸彻底混合。

[0232] 为了选择和筛选目标突变蛋白,可将所述CGRP肽生物素化。在这一方面,在合成期间,生物素基团直接与所述肽的N-末端氨基酸的NH₂基团偶联。

[0233] 实施例2:采用噬菌体展示和高通量ELISA筛选选择并识别特异性结合CGRP的突变蛋白

[0234] 将通过成熟hNGAL的随机诱变产生的基于hNGAL的文库用于选择特异性结合不同CGRP靶标的突变蛋白。将四种生物素化的人和大鼠CGRP α 和 β 形式以在整个四轮选择中作为单一试剂或择一应用于独立噬菌体展示和选择过程。

[0235] 将来自这些文库的 2×10^{12} 个噬菌粒用200或500nM生物素化的靶标温育。将采用中性抗生物素蛋白(neutravidin)或链霉亲和素涂布的顺磁珠子用于捕获靶标/噬菌粒复合物,随后将其用磁体分离。通过用PBST或PBS洗涤珠子除去未结合的噬菌粒。首先,用300 μ l 70mM三乙胺洗脱结合的噬菌粒达10分钟,随后用100 μ l 1M Tris-C1 pH 6.0立即中和上清液。在一次中间洗涤循环后,用100mM甘氨酸pH 2.2洗脱剩余的噬菌粒达10分钟,随后用50 μ l 0.5M Tris-碱立即中和。将这两个洗脱级分合并,并且用于感染4ml大肠杆菌XL1-blue培养物(OD_{550} 0.45-0.6)以进行再扩增。在搅拌下温育30分钟后,以5000xg离心2分钟收集细菌,并将细菌重悬浮于1ml2xYT培养基中,并在三个大LB/Amp琼脂板(10g/1细菌用胰蛋白胨,5g/1酵母提取物,5g/1 NaCl, pH 7.5,15g/1琼脂,100 μ g/ml氨苄青霉素)上铺板。于32°C下将板温育过夜。使用50ml补充有100 μ g/ml氨苄青霉素的2xYT培养基(2xYT/Amp)从琼脂板刮下感染的细胞。用合适体积的细菌悬浮液接种50ml2xYT/Amp培养基以达到0.08的 OD_{550} 。于37°C下在振荡器(160rpm)上温育培养物,直到达到0.5的 OD_{550} ,然后通过于37°C下在温和搅拌的情况下温育15分钟,并且在振荡器上温育45分钟用辅助噬菌体(1.5×10^{11} pfu)感染。随后,添加卡那霉素至终浓度70 μ g/mL以选择被辅助噬菌体感染的细菌。最后,通过添加25ng/mL无水四环素诱导pIII-hNGAL突变蛋白的表达。

[0236] 在于24°C下温育15小时后,通过离心(5000xg达20分钟)使培养物的上清液澄清。随后,将20mL上清液通过具有0.22 μ m孔径的聚醚砜膜。对滤液添加5ml含有水中的20% (w/v) PEG-8000和15% (w/v) NaCl的溶液,并且轻轻混合。将所述溶液在冰上温育30分钟,之后于4°C下和5000xg离心20分钟。将含有噬菌粒的团粒在1mL含有200mM硼酸、160mM NaCl和1mM EDTA的缓冲液中溶解。通过离心(5000xg达5分钟)移除不溶性颗粒。将上清液转移到新鲜试管,并且与200 μ l含有水中的20% (w/v) PEG-8000和15% (w/v) NaCl的溶液混合。将所述溶液在冰上温育30分钟,随后通过离心(5000xg达5分钟)收集沉淀的噬菌粒。将噬菌粒重悬浮于补充有50mM苯甲脒的PBS中,并且用于下一轮噬菌粒选择。进行连续的4轮选择。

[0237] 由用第四个选择轮次的输出物感染的大肠杆菌细胞制备噬菌粒DNA,并且通过用BstX1消化DNA和随后使用标准方法(Sambrook等,(1989) Molecular cloning:a laboratory manual)经由琼脂糖凝胶电泳纯化分离hNGAL突变蛋白盒。将所述hNGAL突变蛋白盒插入同样切割的载体,该载体允许在四环素启动子的控制下的hNGAL突变蛋白的细菌产生。用连接混合物转化CaC12感受态TG1-F-细胞,并在LB/Amp板上铺板。

[0238] 为了优化CGRP特异性突变蛋白,采用基于所选位置的偏差(biased)随机化或易错聚合酶链反应(PCR)的方法产生基于突变蛋白SEQ ID N0s:4和5的文库。进行偏差(biased)设计,使得对于每一个所选位置,编码的氨基酸以50%-70%的概率对应于相应亲本克隆中

发现的氨基酸,而其可以是不同氨基酸的概率为50%-30%。设N为靶位置的数量和B为偏性(bias),则每个克隆最可能的交换数量为N×(1-B)。为了促进在真核细胞中表达,通过突变N65D将源自hNGAL的天然N-糖基化位点N65移除;并且对于其它潜在的N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr),通过在这些文库位置处设置偏性来降低发生的可能性。

[0239] 采用噬菌体展示来选择具有改善的热稳定性和结合亲和力的优化的突变蛋白。噬菌粒选择以与初始突变蛋白选择相比增加的严格性实施,并且涉及在升高的温度下和限制靶标浓度的预温育步骤。

[0240] 为了进一步优化CGRP特异性突变蛋白的结合亲和力,针对SEQ ID NO:14采用基于易错聚合酶链反应(PCR)的方法和针对SEQ ID NO:11采用所选位置的偏差(biased)随机化,产生基于突变蛋白SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:11的另外的文库。偏差设计完全按照前面描述的方式进行。

[0241] 采用噬菌体展示来选择具有改善的热稳定性和结合亲和力的优化的突变蛋白。噬菌粒选择以与初始突变蛋白选择相比增加的严格性实施,并且涉及在升高的温度下和限制靶标浓度的预温育步骤。

[0242] 为了促进在大肠杆菌中表达,移除内源性二硫键。采用通过利用TRIM寡核苷酸的位置半胱氨酸76和半胱氨酸175的偏差随机化,产生基于突变蛋白SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:27的文库。如所述实施突变蛋白的选择,但以增加的严格性实施。

[0243] 将通过上述每个选择过程获得的单个菌落用于接种2xYT/Amp培养基并生长过夜(14-18h)至稳定期。随后,自稳定期培养物接种50μl 2xYT/Amp,并在37°C下温育3h,然后转移至22°C直至达到0.6-0.8的OD₅₉₅。通过加入10μl补充有1.2μg/ml无水四环素的2xYT/Amp诱导突变蛋白的产生。将培养物在22°C下温育直到第二天。加入40μl在PBS/T中的5% (w/v) BSA和在25°C下温育1h之后,培养物准备用于筛选分析。当将20μl培养物直接施加至筛选ELISA板,剩余体积在65°C下温育1h。

[0244] 通过在微量滴定板上涂布中性抗生素蛋白和链霉亲和素(5μg/ml,在PBS中)的1:1混合物在4°C下过夜来测试分离的突变蛋白与CGRP的结合。用在PBST中的2%BSA封闭该板后,将生物素化的CGRP以在PBS/T中1μg/ml的浓度捕获在涂布的微量滴定板上。随后,将20μL BSA-封闭的培养物(有或没有之前的热温育)加入微量滴定板并在25°C下温育1h。用与辣根过氧化物酶缀合的抗-Streptag抗体检测结合的突变蛋白(1h温育;IBA, Boettingen)。为了定量,加入20μl QuantaBlu荧光过氧化物酶底物,并在330nm的激发波长和420nm的发射波长下测定荧光。

[0245] 此外,应用反向筛选形式,其中通过Streptag在涂布了抗-Streptag抗体的微量滴定板上捕获突变蛋白,并且加入不同浓度的生物素化的靶标并通过Extravidin-HRP(E2886;Sigma)检测。

[0246] 为了选择具有增加的亲和力和稳定性的突变蛋白,采用以下实施筛选:i)降低的抗原浓度,和/或ii)与未生物素化的靶标竞争,和/或iii)在加入至靶板之前,在65°C或70°C下温育筛选上清液,和/或iv)应用反向筛选形式,其中通过Streptag在涂布了抗-Streptag抗体的微量滴定板上捕获突变蛋白,并且加入不同浓度的生物素化的靶标并通过extravidin-HRP(Sigma Aldrich, St.Louis, MO)检测。

[0247] 之后对在上述ELISA筛选中显示阳性信号的克隆测序并选择突变蛋白用于进一步

表征。所选择的突变蛋白的氨基酸序列示于SEQ ID N0s:2-40。

[0248] 实施例3:突变蛋白的表达和纯化

[0249] 在2YT-Amp培养基中的大肠杆菌中表达自实施例2获得的突变蛋白(SEQ ID N0s:2-40) (编码其的核苷酸序列示于SEQ ID N0s:41-79),所述突变蛋白具有C-末端标签SAWSHPQFEK (SEQ ID N0:84);包括SA连接子和**Strep-tag® II**,WSHPQFEK (SEQ ID N0:85),以在表达后采用Streptactin亲和层析和制备型尺寸排阻色谱纯化所述突变蛋白。

[0250] 实施例4:在基于ELISA的设置中测定的突变蛋白对可溶性人和大鼠CGRP的亲和力

[0251] 采用竞争ELISA分析形式在体外测试脂质运载蛋白突变蛋白与来自人和大鼠的 α 和 β CGRP在溶液中的结合(图1)。在该实验中,将恒定浓度的非生物素化CGRP (0.5 μ M)与可变浓度的脂质运载蛋白突变蛋白SEQ ID N0:2、SEQ ID N0:3、SEQ ID N0:4、SEQ ID N0:5和SEQ ID N0:6一起温育1小时。在溶液中进行此预温育后,将所述脂质运载蛋白突变蛋白/CGRP混合物的等分试样转移到经由中性抗生物素蛋白捕获的人 α CGRP-bio涂布的ELISA板以测量未被非生物素化的人 α CGRP (SEQ ID N0:80)封闭的并因此仍能被固定化的人 α CGRP-bio结合的脂质运载蛋白突变蛋白的浓度(图1)。在另一相关CGRP种类(人 β CGRP (SEQ ID N0:81)、大鼠 α CGRP (SEQ ID N0:82)、大鼠 β CGRP (SEQ ID N0:83))上实施这一程序。所有的温育步骤均在以300rpm的振荡下实施,并且在每一温育步骤后,利用Biotek ELx405选择CW洗涤器用80 μ L PBS-T缓冲液(PBS,0.05%吐温20)洗涤板五次。在第一个步骤中,在4°C下用20 μ L的PBS中5 μ g/mL浓度的中性抗生物素蛋白涂布384孔ELISA板过夜。洗涤后,于室温下将该板用60 μ L PBS-T/BSA(含有0.05%吐温20的PBS中2%BSA)封闭1小时。

[0252] 为了允许检测并定量板结合的脂质运载蛋白突变蛋白,弃去残留的上清液,并且以PBS-T/BSA中的预先确定的最佳浓度添加20 μ l HRP标记的抗-hNGAL抗体,并于RT下温育1小时。已经通过用突变蛋白的混合物免疫兔获得抗-hNGAL抗体,随后使用试剂盒(EZ-link Plus Activated Peroxidase, Thermo Scientific)根据制造商的说明将抗-hNGAL抗体与HRP偶联以获得抗体-HRP缀合物。洗涤后,向每个孔中添加20 μ l荧光HRP底物(QuantaBlu, Thermo),并且允许反应进行15至60分钟。使用荧光微板读数器(Tecan或Molecular Devices)读出板上的每孔的荧光强度。为了评估数据,基于标准曲线结果计算游离的突变蛋白浓度c(突变蛋白)_{游离},并且相对于配体浓度c(配体)绘图。为了获得配体/突变蛋白复合物的形成被阻断50%时的配体浓度(IC50),通过采用单点结合模型的非线性回归根据c(突变蛋白)_{游离}=c(突变蛋白)_{tot}/(1+c(配体)/IC50)拟合曲线,其中总示踪剂浓度c(突变蛋白)_{tot}和IC50值为自由参数。使用GraphPad Prism 4软件进行曲线拟合。

[0253] 表1中汇总了所得的IC₅₀值。如图1所示出的,选择的突变蛋白结合相应CGRP种类的所有亚型。

[0254] 表1:竞争ELISA分析中的IC50值

SEQ ID NO	人 α CGRP IC50 [nM]	人 β CGRP IC50 [nM]	大鼠 α CGRP IC50 [nM]	大鼠 β CGRP IC50 [nM]
[0255]	SEQ ID NO: 2	55	46	35
	SEQ ID NO: 3	7.5	14	>1000
	SEQ ID NO: 4	2.1	1.8	2.6
	SEQ ID NO: 5	36	28	21
	SEQ ID NO: 6	3.1	>1000	0.77
				1.6

[0256] 实施例5:通过SPR测定的优化的突变蛋白结合CGRP的亲和力

[0257] 采用SPR测量本文公开的优化的脂质运载蛋白突变蛋白的结合动力学和亲和力。

[0258] 在37°C下,在采用HBS-EP+(1x;BR-1006-69;GE Healthcare)作为流动缓冲液的Biacore T200仪器(GE Healthcare)上实施hNGAL突变蛋白与人和大鼠CGRP α 和 β 的结合的SPR分析。

[0259] 生物素CAPture试剂盒(GE Healthcare)用于将生物素化的脂质运载蛋白突变蛋白固定到芯片表面。采用标准NHS化学法使突变蛋白生物素化。在具有预固定的互补ss-DNA寡核苷酸的传感器芯片CAP上捕获未稀释的生物素CAPture试剂(与ss-DNA寡核苷酸缀合的链霉亲和素)。此后,以5 μ L/min的流速施加1 μ g/mL的生物素化的突变蛋白达300秒。

[0260] 如图2所示,以30 μ L/min流速的30nM、3nM和0.3nM的三个浓度或以每循环25nM的单一浓度施加CGRP种类。注入稀释液,其中结合时间为180秒,解离时间为5400秒,以获得ka和kd信息。通过以10 μ L/min的流速注入6M胍盐-HCl+0.25M NaOH(120s)来实现芯片表面的再生。再生溶液注入后,用HBS-EP+(1x;BR-1006-69;GE Healthcare)流动缓冲液进行另外的洗涤步骤并稳定120秒。

[0261] 通过从结合响应中减去针对对照通道(仅加载Biotin CAPture试剂)测得的相应信号以及减去针对缓冲液注入测得的相应信号,对数据进行双重参照。使用Biacore T200评估软件V2.0进行数据处理和动力学拟合,测定结合反应的结合速率常数ka和解离速率常数kd。整体使用1:1结合模型拟合数据。

[0262] 表2中汇总了针对SEQ ID NO:4、SEQ ID NOs:7至17和SEQ ID NOs:19至28测定的ka、kd值以及所得到的平衡解离常数KD。对于人和大鼠 α 和 β CGRP,结果的图示分别示于图2A至2D。优化的CGRP特异性脂质运载蛋白突变蛋白以皮摩尔至低纳摩尔的亲和力结合人和大鼠CGRP的同种型,并且优化后亲和力提高多达120倍,而未检测到作为对照的hNGAL野生型(SEQ ID NO:1)的显著结合。

[0263] 表2:通过SPR测定的优化的突变蛋白对人和大鼠CGRP种类的亲和力、结合速率常数ka和解离速率常数kd。

[0264]		人 α CGRP	人 β CGRP	大鼠 α CGRP	大鼠 β CGRP
--------	--	-----------------	----------------	------------------	-----------------

SEQ ID NO:	ka [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	kd [s ⁻¹]	KD [nM]	ka [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	kd [s ⁻¹]	KD [nM]	ka [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	kd [s ⁻¹]	KD [nM]	ka [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	kd [s ⁻¹]	KD [nM]	
[0265]	4	1.66E+06	3.02E-03	1.82	5.24E+06	3.95E-03	0.753	1.24E+06	6.21E-03	5.00	1.66E+06	3.65E-03	2.19
	7	3.74E+06	2.49E-04	0.067	5.21E+06	1.88E-04	0.036	1.04E+06	3.13E-04	0.30	3.04E+06	2.76E-04	0.091
	8	2.07E+06	5.95E-04	0.288	3.70E+06	5.29E-04	0.143	7.34E+05	8.37E-04	1.14	1.82E+06	6.36E-04	0.349
	9	5.88E+06	2.57E-04	0.044	6.80E+06	1.81E-04	0.027	1.22E+06	3.18E-04	0.26	3.68E+06	2.75E-04	0.075
	10	1.26E+06	2.05E-04	0.163	2.14E+06	1.62E-04	0.076	5.59E+05	3.07E-04	0.55	1.08E+06	2.24E-04	0.206
	11	3.08E+06	4.55E-05	0.015	7.91E+06	5.63E-05	0.007	9.84E+05	7.60E-05	0.08	1.74E+06	7.30E-05	0.042
	12	1.08E+06	1.62E-04	0.15	1.10E+06	1.04E-04	0.095	6.61E+05	2.99E-04	0.45	1.17E+06	2.05E-04	0.176
	13	5.82E+06	4.36E-04	0.075	1.18E+07	3.66E-04	0.031	1.85E+06	5.25E-04	0.28	3.16E+06	3.50E-04	0.111
	14	2.56E+06	1.41E-04	0.055	4.56E+06	1.41E-04	0.031	1.19E+06	3.39E-04	0.29	1.69E+06	1.81E-04	0.107
	15	6.32E+06	2.38E-04	0.038	1.53E+07	2.73E-04	0.018	1.59E+06	2.74E-04	0.17	4.98E+06	1.93E-04	0.039
	16	5.02E+06	2.59E-04	0.052	1.01E+07	3.64E-04	0.036	1.41E+06	3.98E-04	0.28	2.37E+06	2.29E-04	0.097
	25	2.68E+06	1.65E-05	0.006	2.02E+06	1.01E-05	0.005	1.30E+06	2.12E-05	0.016	1.64E+06	1.33E-05	0.008
	24	1.60E+06	1.40E-05	0.009	2.52E+06	9.01E-06	0.004	1.43E+06	2.08E-05	0.015	1.69E+06	1.22E-05	0.007
	23	1.64E+06	1.84E-05	0.011	2.84E+06	4.11E-06	0.001	1.39E+06	1.30E-05	0.009	1.74E+06	1.34E-05	0.008
	26	1.50E+06	1.99E-05	0.013	2.44E+06	7.60E-06	0.003	1.31E+06	2.01E-05	0.015	1.56E+06	9.98E-06	0.006
	27	1.43E+06	2.59E-05	0.018	2.04E+06	2.26E-05	0.011	8.07E+05	3.10E-05	0.038	1.50E+06	2.64E-05	0.018
	28	1.59E+06	4.99E-05	0.031	2.52E+06	3.41E-05	0.014	1.41E+06	6.88E-05	0.049	1.72E+06	5.48E-05	0.032
	19	2.26E+06	1.07E-05	0.005	4.56E+06	6.67E-06	0.001	1.25E+06	3.02E-05	0.024	2.01E+06	1.21E-05	0.006
	22	1.76E+06	1.56E-05	0.009	2.70E+06	9.32E-06	0.003	9.31E+05	3.05E-05	0.033	1.60E+06	2.02E-05	0.013
	17	3.34E+06	3.66E-05	0.011	1.36E+07	1.44E-05	0.001	2.75E+06	8.44E-05	0.031	5.18E+06	5.99E-05	0.012
	20	1.45E+06	1.75E-05	0.012	2.18E+06	7.89E-06	0.004	8.67E+05	2.41E-05	0.028	1.38E+06	1.84E-05	0.013
	21	1.21E+06	1.71E-05	0.014	2.36E+06	8.74E-06	0.004	7.03E+05	3.70E-05	0.053	1.34E+06	2.36E-05	0.018

[0266] 实施例6:在cAMP分析中结合CGRP的突变蛋白的功能测试

[0267] 通过采用HitHunter®c-AMP XS+试剂盒(DiscoverX)测量响应于CGPR治疗分别在人SK-N-MC(人脑神经上皮瘤)和在大鼠L6(大鼠骨骼肌成肌细胞)中的cAMP(第二信使)产生,评估了SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NOs:17至20和SEQ ID NOs:23至27的脂质运载蛋白突变蛋白中和人和大鼠CGRP的生物活性的能力。

[0268] 在该实验中,将恒定浓度的人或大鼠CGRP与可变浓度的脂质运载蛋白突变蛋白一起温育90分钟。在溶液中进行此预温育后,将所述脂质运载蛋白突变蛋白/CGRP混合物的等分试样分别与SK-N-MC或L6细胞一起温育,从而测量残留的CGRP诱导的cAMP产生。

[0269] 将SK-N-MC细胞维持在补充10%胎牛血清的EMEM中并根据制造商的说明于标准条件下(ATCC,37℃、5%CO₂气氛)在细胞培养瓶中培养。

[0270] 将L6细胞维持在补充10%胎牛血清的DMEM中并根据制造商的说明于标准条件下(ATCC, 37°C、5%CO₂气氛)在细胞培养瓶中培养。

[0271] 以下描述设置分析的详细程序。

[0272] 固定浓度的人或大鼠CGRP在溶液中用可变浓度的SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NOs:17至20和SEQ ID NOs:23至27温育,其中采用合适起始浓度,该起始浓度在含有0.5mM IBMX和0.1%BSA(Working Buffer)的无血清培养基中以1:3的比率连续稀释至皮摩尔范围。在室温下温育90分钟后,将5μl反应混合物转移至白色384孔板,随后在加入细胞之前将其在37°C、5%CO₂下预热10分钟。

[0273] 将贴壁细胞(人SK-N-MC或大鼠L6细胞)用细胞消化液自其基底解离,并重悬于PBS中。随后,将细胞以300g离心5分钟,并在抗体工作溶液(2/3工作缓冲液,1/3HitHunter®抗体溶液)中根据制造商的说明将细胞数调节至3×10⁶个细胞/mL。

[0274] 以30.000个细胞/孔(10μl)加入板中并用透气性粘合密封件覆盖。

[0275] 然后在37°C、5%CO₂下使cAMP产生30分钟

[0276] 随后,将20μl ED/裂解/CL工作溶液(19份裂解缓冲液、1份Galacton Star、5份Emerald、25份cAMP xS+ED试剂)加入至板并在室温下避光温育1小时。

[0277] 向每个孔中的细胞中加入20μl EA试剂,并在1-18h后使用PheraStar测量发光。

[0278] 使用GraphPad Prism 4软件进行评估和曲线拟合。对于人和大鼠α和βCGRP,结果的图示分别示于图3A至3D。所得的IC50值汇总于下表3。

[0279] 表3:采用人和大鼠CGRP种类的功能性cAMP分析中的突变蛋白的IC50值。

[0280]

SEQ ID NO	人 α CGRP IC50 [nM]	人 β CGRP IC50 [nM]	大鼠 α CGRP IC50 [nM]	大鼠 β CGRP IC50 [nM]
11	0.11	0.22	0.08	0.06
27	0.1	0.12	—	—
25	0.15	0.19	0.06	0.16
24	0.12	0.19	0.07	0.16
23	0.18	0.2	0.07	0.17
26	0.16	0.26	0.05	0.16
14	0.15	1.5	0.12	0.09
19	0.14	0.21	0.07	0.17
20	0.14	0.17	0.08	0.11
18	0.19	0.29	0.06	0.14
17	0.11	0.23	0.06	0.11

[0281] 实施例7:对CGRP特异性的不含半胱氨酸的脂质运载蛋白突变蛋白的表征

[0282] 通过采用与实施例5中所述的相同的SPR方法,测定CDRP-特异性突变蛋白(SEQ ID

NO:17、SEQ ID NO:27和不含半胱氨酸的突变蛋白SEQ ID NOs:29至40)对人 α 和 β CGRP的Biacore亲和力。所得KD值列于表4。

[0283] 以与实施例6中所述相同的方式采用cAMP分析以测定CGRP-特异性突变蛋白SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:27和不含半胱氨酸的突变蛋白SEQ ID NO:29至40的功能性效力(参见图4A和4B)。得到的对人 α 和 β CGRP种类的IC50值汇总于表4。

[0284] 利用Mx3005P qPCR系统(Agilent Technologies),采用基于荧光的热变性分析(通常称为差示扫描荧光法的热移位分析)来测量CGRP-特异性突变蛋白(SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:27和不含半胱氨酸的突变蛋白SEQ ID NO:29至40)的热稳定性。

[0285] 因此,在磷酸盐缓冲盐水(PBS;pH 7.4;10010;Life Technologies)中将脂质运载蛋白突变蛋白溶液稀释至10 μ M的浓度,并制备荧光染料SYPRO Orange(DMSO中5000x浓缩物;S-6650;Life technologies)的PBS中的15倍储备液。在qPCR板(无裙边FrameStar 96;Cat No 4ti-0711;4titude)中将20 μ l的蛋白稀释液与5 μ l的SYPRO Orange储备液混合并用盖子(Flat Optically Clear Caps;Cat No 4Ti-0751;4titude)密封该板。使用Mx3005P qPCR系统,将板逐渐从25°C加热至100°C(45秒/步),同时在492nm的激发波长和610nm的发射波长下记录荧光信号。

[0286] 荧光增加表示蛋白质解折叠,因为SYPRO Orange非特异性结合疏水表面并且水强烈地淬灭Sypro Orange的荧光(James K.Kranz.Celine Schalk-Hihi (2011); "Protein thermal shifts to identify low molecular weight fragments"; Methods Enzymol.493:277-298;doi:10.1016/B978-0-12-381274-2.00011-X; PMID 21371595)。

[0287] 将Savitzky-golay平滑(5x savitzky golay滤波器)应用于原始数据(随着温度的荧光信号),并计算一阶导数。为了确定解链温度Tm,读出一阶导数的最大值(对应于荧光与温度曲线的拐点),并与相应的温度(=Tm)匹配。完整的评估在Microsoft Excel中进行。

[0288] 表4中汇编了在上述热移位分析中测定的脂质运载蛋白突变蛋白的解链温度(Tm)。

[0289] 表4:不含半胱氨酸的突变蛋白的SPR亲和力(KD)、功能性效力(IC50)以及解链温度(Tm)汇总于下表。

[0290]		SPR KD [nM]		cAMP 分析 IC50 [nM]		Tm [°C]
	SEQ ID NO:	h α CGRP	h β CGRP	h α CGRP	h β CGRP	
	17	0.020	0.003	0.09	0.13	75
	29	0.065	0.050	0.14	0.91	69

[0291]

30	0.109	0.075	0.22	1.32	69
27	0.038	0.007	0.1	0.12	80
31	0.033	0.043	0.19	1.64	73
32	0.034	0.021	0.17	0.26	76
33	0.034	0.018	0.14	0.24	76
34	0.041	0.025	0.12	0.29	79
35	0.045	0.017	0.15	0.27	77
36	0.046	0.022	0.25	0.81	73
37	0.055	0.023	0.16	0.77	72
38	0.059	0.026	0.21	3.16	74
39	0.062	0.034	0.21	1.03	76
40	0.070	0.023	0.18	0.42	78

[0292] 实施例8:无标签的脂质运载蛋白突变蛋白的制备

[0293] 参考脂质运载蛋白突变蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NOS:34和17),分别如SEQ ID NO:87和88所示设计无标签的脂质运载蛋白突变蛋白。附着N-末端Gly以便避免由Gln(最初是成熟hNGAL(SEQ ID NO:1)的N-末端氨基酸)形成焦谷氨酸。为了产生这些序列,将对应于无标签的脂质运载蛋白突变蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NOS:87和88)的核苷酸序列(SEQ ID NOS:94和95)亚克隆至大肠杆菌表达载体。此外,在所述核苷酸序列(SEQ ID NO:95)的基础上,通过基于PCR的定点诱变置换两个或更多个碱基。同样将得到的编码脂质运载蛋白突变蛋白(SEQ ID NOS:89-93)的核苷酸序列(SEQ ID NOS:96-100)亚克隆至大肠杆菌表达载体。

[0294] 利用如上所述的载体,采用培养基(MagicMedia™(Life Technologies))实施大肠杆菌的表达。为了促进纯化,表达N-末端氨基酸为Gly的脂质运载蛋白突变蛋白(SEQ ID NOS:87-93),其具有包括His₆-标签以及TEV蛋白酶识别基序部分的N-末端标签MRGSHHHHHHGSENLYFQ(SEQ ID NO:86),该TEV蛋白酶识别基序部分是一条由SEQ ID NO:86的E(Glu)13至Q(Gln)18组成的氨基酸序列,由此,每种表达产物均可被TEV蛋白酶切割,TEV蛋白酶的氨基酸序列和相应的核苷酸序列分别示于SEQ ID NOS:101和102。通过使用TALON CellThru Resin(Clontech)的固定金属亲和层析纯化表达产物,然后使用TEV蛋白酶移除

标签。TEV蛋白酶在Q(G1n) 和G(G1y) 之间切割,结果,纯化的无标签的脂质运载蛋白突变蛋白具有N-末端Gly (SEQ ID N0s:87-93)。通过利用HiTrap Q FF柱(GE Healthcare)的阴离子交换色谱和利用HiLoad 16/600Superdex 75pg柱(GE Healthcare)的尺寸排阻色谱法实施进一步的纯化。

[0295] 实施例9:无标签的脂质运载蛋白突变蛋白的表征

[0296] 在37℃下,在采用HBS-EP+作为流动缓冲液的Biacore T200仪器(GE Healthcare)上实施无标签的突变蛋白与人αCGRP结合的SPR分析。

[0297] 生物素CAPture试剂盒(GE Healthcare)用于将生物素化的脂质运载蛋白突变蛋白固定到芯片表面。采用标准MHS化学法使突变蛋白生物素化。在具有预固定的互补ss-DNA寡核苷酸的传感器芯片CAP上捕获稀释50倍的生物素CAPture试剂(与ss-DNA寡核苷酸缀合的链霉亲和素)。此后,以10μL/min的流速施加200nM的生物素化的突变蛋白达60秒。

[0298] 以30μL/min的流速0.0256nM至5nM的浓度范围施加人αCGRP。注入稀释液,其中结合时间为600秒,解离时间为1800秒。通过以10μL/min的流速注入6M胍盐-HCl+0.25M NaOH(120s),然后以10μL/min的流速注入30%乙腈+0.25M NaOH(120s)来实现芯片表面的再生。再生溶液注入后,用HBS-EP+流动缓冲液进行另外的洗涤步骤并稳定60秒。

[0299] 通过从结合响应中减去针对对照通道(仅加载Biotin CAPture试剂)测得的相应信号以及减去针对缓冲液注入测得的相应信号,对数据进行双重参照。使用Biacore T200评估软件1.0版本进行数据处理和动力学拟合,测定结合反应的结合速率常数ka和解离速率常数kd。整体使用1:1结合模型拟合数据。

[0300] 得到的无标签的突变蛋白(SEQ ID N0s:87-93)的KD值示于表5。结果的图示示于图5。

[0301] 为了测定无标签的突变蛋白SEQ ID N0s:87至93的功能性效力,以与实施例6中所述相同的方式采用cAMP分析,稍作如下修改:(1)向板中加入5,000个细胞/孔。(2)使用EnSpire (Perkin Elmer) 测量发光。

[0302] 得到的对人αCGRP的IC50值汇总于表5。

[0303] 表5:无标签的突变蛋白的SPR亲和力(KD)和功能性效力(IC50)。

[0304]	SEQ ID NO:	SPR KD[nM]	cAMP分析IC50[nM]
	87	0.081	0.66
	88	0.008	0.17
	89	0.006	0.17
	90	0.012	0.16
	91	0.010	0.16
	92	0.010	0.18
	93	0.011	0.13

[0305] 实施例10:脂质运载蛋白突变蛋白对由电刺激隐神经诱导的大鼠皮肤血管舒张的影响

[0306] 为了测试CGRP特异性脂质运载蛋白突变蛋白(SEQ ID N0s:11、17、18、23、25、27、87和89)的拮抗活性,采用具有如下修饰的大鼠模型(Br J Pharmacol.,1993,110 (2):772-6)测试了所述突变蛋白对由刺激大鼠隐神经诱导的皮肤血管舒张的影响。在实验前一天,

用硫酸胍乙啶 (20mg/kg, sc) 预处理Sprague Dawley大鼠以阻断交感神经活动。将大鼠用硫仲丁比妥钠盐 (100mg/kg, ip) 麻醉，并用0.5-1% 异氟烷维持。使后肢的隐神经通过外科手术暴露，向近端切开并置于铂双极电极上以进行刺激。在实验过程中，用在液体石蜡中浸渍的外科棉覆盖神经以防止其干燥。使用连接到激光多普勒流量计的皮肤探针在后爪的背中部侧 (mediodorsal side) 上测量皮肤血流量。在建立稳定的基线通量 (小于5% 变化) 后，在给药后125分钟，以30个脉冲电刺激隐神经的远端 (2Hz, 10V, 1ms, 持续15秒)。所有的突变蛋白和溶媒均皮下施用。

[0307] 使用图表软件 (LabChart 7, ADInstruments Pty.Ltd.) 记录所有数据。通过对电脉冲刺激的每个通量响应的通量-时间曲线下面积 (AUC) 估算皮肤血流量的累积变化。与溶媒对照组相比，计算突变蛋白对由电刺激导致的血流增加 (AUC) 的抑制作用，作为血流抑制。(如表6所示)

[0308] 表6: 大鼠皮肤血流分析

SEQ ID NO:	剂量 (mg/kg, sc)	给药后的时间 (min)	血流抑制 (溶媒的%)
[0309]	11	3	79.7
	17	3	81.9
	18	0.3	39.1
	23	0.3	49.9
	25	0.3	40
	27	3	81.6
	87	3	69.4
	89	2.5	64.4

[0310] 本文示例性所描述的实施方式可以适当地在本文中未具体公开的任何一种或多种要素、一种或多种限制不存在的情况下实施。因此，例如，术语“包含”、“包括”、“含有”等应被宽泛地解读且无限制。另外，本文所采用的术语和表达被用作描述的术语而非限制的术语，并且无意图在使用这些术语和表达时，排除掉显示和描述的特征的任何等同物或其部分，而是认可各种修饰可以在本发明请求保护的范围内。因此，应当理解的是，虽然这些实施方式已通过优选的实施方式和任选的特征而被具体公开，本领域技术人员可以寻求其修饰和变化，并且这样的修饰和变化被认为是在本发明的范围内。本文所述的所有专利、专利申请、教科书和同行评审的出版物均通过引用全文并入本文。此外，当在通过引用并入本文的参考文献中的定义或使用的术语与本文所提供该术语的定义不一致或相反时，适用本文所提供的该术语的定义，而不适用该参考文献中该术语的定义。每个较窄种类和亚属分组落入类属的公开范围内，也形成本发明的一部分。这包括本发明的一般描述，且具有从该种类中取出任何主题的条件或负面限制，而不管该去除的材料是否在本文中具体陈述。此外，当特征是以马库什组的形式描述时，本领域技术人员将认识到，本发明还由此以该马库什组中任何单独成员或成员亚组的形式描述。进一步的实施方式将由以下的权利要求书中

变得显而易见。

[0311] 等同物:本领域技术人员使用不超过常规实验就会认识到或者能够确定许多于此处描述的本发明的具体实施方式的等同物。以下的权利要求意欲涵盖这些等同物。在本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请在此完整引入本说明书中作为参考,就像每个单独的出版物、专利或专利申请具体地且分别指出引入本文作为参考一样。

序列表

<110> 皮里斯制药有限公司
<120> 对降钙素基因相关肽特异性的新型蛋白
<130> LC18310007P
<150> US 62/265,792
<151> 2015-12-10
<160> 102
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 178
<212> PRT
<213> 人
<400> 1

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0001] 20 25 30

Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Gln Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile
65 70 75 80

Arg Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Leu Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Ser Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 2

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 2

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0002] 20 25 30

Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Trp Gly Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Lys Lys Met Ala Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gln Phe Ile Glu Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile
65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Ala
85 90 95

Ile Lys Ser Glu Pro Gly Gln Thr Ser Asn Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Trp Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Leu Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 3

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 3

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0003] 20 25 30

Val Val Gly Phe Ala Gly Asn Met Trp Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Phe Lys Met Gly Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Trp Phe Glu Ala Lys Lys Cys Asp Tyr Gly Ile
65 70 75 80

Asn Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly
85 90 95

Ile Lys Ser Pro Pro Gly Met Thr Ser His Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 4

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 4

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 [0004] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

Thr Lys Met Gln Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ser Glu Lys Lys Cys Asn Tyr His Ile
 65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
 85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Ser Ile Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Ser Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 5

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 5

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0005] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Ala Glu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Trp Gln Lys Lys Cys Ile Tyr Val Ile
65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Val Val Arg Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 6

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 6

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0006] 20 25 30

Val Val Gly Ile Ala Gly Asn Trp Trp Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Leu Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr His Val Met Phe Met Thr Lys Lys Cys Asp Tyr Thr Ile
65 70 75 80

Arg Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Ile Pro Gly Met Thr Ser Leu Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Trp Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe His Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 7

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 7

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 [0007] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ser Glu Lys Arg Cys Asn Tyr His Ile
 65 70 75 80

Glu Thr Ser Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
 85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Ser Ile Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Ser Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 8

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 8

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 [0008] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Arg Arg Glu Asp Lys Asn Pro
 35 40 45

Thr Lys Met Gln Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ser Glu Lys Lys Cys Asn Tyr His Ile
 65 70 75 80

Glu Thr Ser Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
 85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Ser Ile Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Ser Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 9

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 9

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0009] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Trp Val Tyr Leu Ser Glu Lys Lys Cys Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Ser Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Ser Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Met Ser Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Ala Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 10

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 10

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0010] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asn Pro
35 40 45

Thr Lys Met Gln Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Ala Thr Trp Val Tyr Leu Ser Glu Lys Lys Cys Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Ser Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Thr Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Ser Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 11

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 11

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0011] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Ile Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Arg Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ser Glu Lys Lys Cys Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 12

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 12

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0012] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Pro Lys Met Gln Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Arg Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ser Glu Lys Lys Cys Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Ser Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Gln Ser His Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Met Gly Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 13

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 13

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asn Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0013] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Glu Glu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Gln Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Ser Glu Lys Lys Cys Ile Tyr Val Ile
65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Val Val Lys Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 14

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 14

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asn Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0014] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Ala Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Lys Cys Met Tyr Val Ile
65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Leu Val Lys Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 15

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 15

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asn Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0015] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Ala Asn Asp Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Ser Arg Lys Lys Cys Ile Tyr Val Ile
65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Thr Ser Gly Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Val Val Gly Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ser Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 16

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 16

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0016] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Glu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Lys Cys Met Tyr Val Ile
65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Gly Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Val Val Arg Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 17

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 17

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asn Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0017] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Val Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Arg Cys Met Tyr Val Thr
65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Glu Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asp Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 18

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 18

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0018] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Ala Asn Asp Val Leu Arg Asp Asp Asn Asp Pro
35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Lys Cys Met Tyr Val Val
65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Leu Val Lys Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Leu Phe Glu Val Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 19

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 19

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0019] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Thr Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Leu Val Gln Lys Lys Cys Met Tyr Val Ile
65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys Gln
115 120 125

Ser Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 20

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 20

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0020] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Thr Leu Arg Lys Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Lys Cys Met Tyr Val Ile
65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 21

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 21

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 [0021] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Ala Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Lys Cys Met Tyr Val Ile
 65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
 85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Ile Arg Val Val Asn
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 22

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 22

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0022] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Ala Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Leu Val Gln Lys Lys Cys Met Tyr Val Ile
65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Gly Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 23

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 23

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0023] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Lys Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Arg Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Cys Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Leu
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 24

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 24

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0024] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Lys Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Arg Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Glu Lys Lys Cys Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 25

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 25

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asn Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0025] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Lys Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Arg Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Cys Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 26

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 26

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 [0026] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Lys Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Arg Ser Tyr
 50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Cys Arg Tyr His Ile
 65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
 85 90 95

Ile Lys Ser His Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 27

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 27

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0027] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Cys Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 28

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 28

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
[0028] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Ile Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Arg Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ser Glu Lys Lys Cys Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Met Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 29

<211> 177

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 29

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
[0029] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Val Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Arg Leu Met Tyr Val Thr
65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Glu Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asp Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Ile Asp
 165 170 175

Gly

<210> 30

<211> 177

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 30

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
 [0030] 20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Val Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Arg Tyr Met Tyr Val Thr
 65 70 75 80

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
 85 90 95

Ile Glu Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asp Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Ile Asp
165 170 175

Gly

<210> 31

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 31

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
[0031] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Arg Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Phe Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 32

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 32

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
 [0032] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Met Asn Tyr His Ile
 65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
 85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Tyr Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 33

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 33

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
[0033] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Leu Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Trp Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 34

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 34

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
[0034] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Ile Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Glu Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 35

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 35

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asn Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
[0035] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Val Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Tyr Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 36

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 36

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
 [0036] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Arg Asn Tyr His Ile
 65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
 85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Trp Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 37

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 37

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asn Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
[0037] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Asn Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Leu Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 38

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 38

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
[0038] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Arg Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Val Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 39

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 39

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
[0039] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Asp Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 40

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 40

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
[0040] 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Phe Asn Tyr His Ile
65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Thr
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Asp Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 41

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 2 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 41

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
---	----

aacctccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtatgtcg tgggcgaggc cgaaaaattgg	120
---	-----

ggactgcgtg aggataagga tccgaaaaaaaa atggcagcga ccatttacga gttgaaagaa	180
---	-----

gataaatcat ataacgtcac cgacgtcaa tttatcgaga agaaatgcga ctactggatt	240
--	-----

[0041] ggaacctttg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcgcaat taaaagttag	300
---	-----

ccggggccaaa catcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
--	-----

gtgttcttca aggaggtgtg gcagaaccgc gagctgttt ggatcacact gtacggcgc	420
---	-----

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
---	-----

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534
---	-----

<210> 42

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 3 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 42

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
---	----

aacctccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtatgtcg tggcgttcgc cgaaaaatatg	120
---	-----

tggctgcgtg aggataagga tccgttcaa atgggagcga ccatttacga gttgaaagaa	180
--	-----

gataaatcat ataacgtcac ctgggtgtgg tttagggcaaa agaaatgcga ctacggatt	240
---	-----

aatacccttg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcggaat taaaagtcc	300
---	-----

ccgggcattga catcacactt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtttttca aggagggttt ccagaaccgc gagtggtttt ggatcacact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534
<210> 43	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 4 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 43	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggatgtcg tggctggc cgaaatacc	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgacccaa atgcaagcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac ctgggtgtac tttagcgaga agaaatgcaa ttaccacatt	240
gagacctttg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcaccat taaaagttac	300
[0042] ccggcggaga catcaatctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtttttca aggagggttt ccagaaccgc gagatcttg agatcacact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534
<210> 44	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 5 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 44	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggatgtcg tggccgtgc cgaaatgca	120
gagctgcgtg aggataagga tccggagaaa atggaggcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgacgtggaa tttggcaaa agaaatgcat ctacgttatt	240
cacacctttg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcaatat taaaagttac	300
ccgggcacca catcagcatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360

gtttcttca agtttgtcg tcagaaccgc gagtggttg agatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534
<210> 45	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 6 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 45	
caggactcca ctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggatgtcg tggcatcgc cggaaattgg	120
tggctgcgtg aggataagga tccgctgaaa atgtacgcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac ccacgtgatg tttatgacta agaaatgcga ctacaccatt	240
cgtaccttg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcaatat taaaagtatc	300
ccgggcatga catcaactgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
[0043] gtttcttca agtcgtgt gcagaaccgc gagtggttc acatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534
<210> 46	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 7 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 46	
caggactcca ctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggatgtcg tggctgggc cggaaatacc	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgatcaa atgcaagcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac ctgggtgtac tttagcgaga agagatgcaa ttaccacatt	240
gagacctctg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcaccat taaaagttac	300
ccgggcatgaga catcaatctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtttcttca agggagttag ccagaaccgc gagatcttg agatcacact gtacggcgc	420

acgaaaagaac	tgacaaggcga	gctgaaggaa	aatttatcc	gctttccaa	atctctggc	480	
ctccctgaaa	accacatcgt	cttccctgtc	ccaatcgacc	agtgtatcga	cggc	534	
<210>	47						
<211>	534						
<212>	DNA						
<213>	人工序列						
<220>							
<223>	SEQ ID NO:8 所示的突变蛋白的核苷酸序列						
<400>	47						
caggactcca	cctcagacct	gatcccagcc	ccacctctga	gcaaggtccc	tctgcagcag	60	
aacttcagg	acaaccaatt	ccatggaaa	tggtatgtcg	tggctggc	cggaaatacc	120	
ctgcggcgtg	aggataagaa	tccgaccaaa	atgcaaggcga	ccatttacga	gttcaaagaa	180	
gataaatcat	ataacgtcac	ctgggtgtac	tttagcgaga	agaaatgcaa	ttaccacatt	240	
gagacctctg	tgccggggag	ccagccggc	gagtttactt	taggcaccat	taaaagttac	300	
ccgggcgaga	catcaatctt	ggtccgcgtc	gtgagcacca	actacaacca	gcatgccatg	360	
gtgttcttca	agggagttag	ccagaaccgc	gagatcttg	agatcacact	gtacggcgc	420	
[0044]	acgaaaagaac	tgacaaggcga	gctgaaggaa	aatttatcc	gctttccaa	atctctggc	480
	ctccctgaaa	accacatcgt	cttccctgtc	ccaatcgacc	agtgtatcga	cggc	534
<210>	48						
<211>	534						
<212>	DNA						
<213>	人工序列						
<220>							
<223>	SEQ ID NO: 9 所示的突变蛋白的核苷酸序列						
<400>	48						
caggactcca	cctcagacct	gatcccagcc	ccacctctga	gcaaggtccc	tctgcagcag	60	
aacttcagg	acaaccaatt	ccatggaaa	tggtatgtcg	tggctggc	cggaaatacc	120	
ctgctgcgtg	aggataagga	tccgatcaaa	atgcaaggcga	ccatttacga	gttcaaagaa	180	
gataagtcat	atgacgtcac	ctgggtgtac	tttagcgaga	agaaatgcaa	ttaccacatt	240	
gagacctctg	tgccggggag	ccagccggc	gagtttactt	taggcaccat	taaaagttac	300	
ccgggcgaga	catcaatctt	ggtccgcgtc	gtgagcacca	actacaacca	gcatgccatg	360	
gtgttcttca	aggaaatgag	ccagaaccgc	gagatcttg	agatcacact	gtacggcgc	420	
	acgaaaagaac	tggcaaggcga	gctgaaggaa	aatttatcc	gctttccaa	atctctggc	480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgttatcga cggc	534
<210> 49	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 10 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 49	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtatgtcg tgggctggc cgaaataacc	120
ctgctgcgtg aggataagaa tccgacccaaa atgcaagcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgccac ctgggtgtac ctttagcgaga agaaatgcaa ttaccacatt	240
gagacctctg tgccggggag ccagccggc gagtttacct taggcaccac taaaagttac	300
ccgggcgaga caccaatcct ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agggagttag ccagaaccgc gagatcttg agatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gttgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
[0045] ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgttatcga cggc	534
<210> 50	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 11 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 50	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtatgtcg tgggctggc cgaaataacc	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgcaagcga tcatttacga gttgaaagaa	180
gatagatcat ataacgtcac ctgggtgtac tttagcgaaa agaaatgcaa ttaccacatt	240
gagacctttg tgccggggag ccagccggc gagtttacct taggcaccat taaaagttac	300
ccgggcgaga caccaatctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agggagttag ccagaaccgc gagatcttg agatcataact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgttatcga cggc	534

<210> 51
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SEQ ID NO: 12 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 51	
caggactcca cctcagacacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtatgtcg tgggctggc cgaaaaatacc	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgccccaaa atgcaagcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gatagatcgt ataacgtcac ctgggtgtac tttagcgaga agaaatgcaa ttaccacatt	240
gagacctctg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcaccat tcaaagtac	300
ccgggcgaga caccaatctt agtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca aggaaatggg ccagaaccgc gagatcttg agatcacact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cg	534

[0046]

<210> 52
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SEQ ID NO: 13 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 52	
caggactcca cctcagacacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtacgtgg tagggaggcgc cgaaaaatgag	120
gagctgcgtg aggataagga tccgcagaaa atggaggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggg tttcggaga agaaatgcat ttacgttatt	240
cataccttg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcaatat taaaagttat	300
ccgggcgtga catcagcggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca aggtggtaa gcagaaccgc gagttgtttg agatcacact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cg	534

<210> 53
<211> 534
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ ID NO: 14 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 53	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtacggtgg tagggaggc cgaaatgat	120
gcgcgtcggtg aggataagga tccggagaaa atggaggcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggg tttgtcaga agaaatgcat gtacgtgatt	240
cataccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcaatat taaaagttat	300
ccgggcgtga catcagctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agctggtaa gcagaaccgc gagtttttgc agatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534

[0047] <210> 54
<211> 534
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ ID NO: 15 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 54	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtacggtgg tagggaggc cgcaaatgat	120
aggctcggtg aggataagga tccggagaaa atggaggcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggg tttcgccga agaaatgcat ttacgttatt	240
cataccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcaatat taaaagttat	300
ccgggcacga catcagggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca aggtggtaa gcagaaccgc gagtcgtttgc agatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534

<210> 55
<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 16 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 55

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtgg tagggaggc cgaaatgat	120
gagctgcgtg aggataagga tccggagaaa atggaggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggt ttgtgcaga agaaatgcat gtacgttatt	240
cataccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcaatat taaaagttat	300
ccgggcgtga catcagggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca aggttgtgag gcagaaccgc gagttgtttg agatcacact gtacggcgc	420
acgaaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534

<210> 56

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 17 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 56

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtgg tagggaggc cgaaatgat	120
gtgctgcgtg aggataagga cccggagaaa atggaggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggg ttgtgcaga agagatgcat gtacgtgact	240
cataccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcaacat tgaaagttat	300
ccgggcgtga catcagctt ggtccgcgtc gtgagcaccg actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcgtca agctggtgaa gcagaaccgc gagttgtttg agatcacact gtacggcgc	420
acgaaaagagc tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534

<210> 57

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 18 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 57

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtgg tagggaggc tgcaaatgat	120
gtgctacgtg atgataatga tccggagaaa atggaggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggg tttgtcaga agaaatgcat gtatgtggtt	240
cataccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcaatat taaaagttat	300
ccgggcgtga catcagctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgctatg	360
gtgttctca agctggtgaa gcagaaccgc gagtttttgg aggtcacact gtacggcgc	420
acgaaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534

<210> 58

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

[0049] <220>

<223> SEQ ID NO: 19 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 58

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtgg tagggaggc cgaaaaatgat	120
acgctgcgtg aggataagga tccggagaaa atggaggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggg ctgtcaga agaaatgcat gtacgtgatt	240
cataccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcaatat taagagttat	300
ccgggcgtga catcagctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcgtca agctggtgaa gcagagccgc gagttttgg agatcacact gtacggcgc	420
acgaaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534

<210> 59

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 20 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400>	59	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag		60
aacctccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtgg tagggaggc cgaaatgat		120
acgctgcgtta aggataagga tccggagaag atggaggcga ccatatacga gttgaaagaa		180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggg tttgtcaga agaaatgcat gtacgtgatt		240
cataccttg taccggggag ccagccgggc gagttactt taggcaatat taaaagttat		300
ccggcgtaa catcagctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg		360
gtttcgtca agctggtaa gcagaaccgc gagttgttg agatcacact gtacggcgc		420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc		480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc		534

<210> 60

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0050] <223> SEQ ID NO: 21 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400>	60	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag		60
aacctccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtgg tagggaggc cgaaatgat		120
gcgcgtcggtg aggataagga tccggagaaa atggaggcga ccatatacga gttgaaagaa		180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggg tttgtcaga agaaatgcat gtacgtgatt		240
cataccttg tgccggggag ccagccgggc gagttactt taggcaatat taaaagttat		300
ccggcgtaa catcagctt gatccgcgtc gtgacacacca actacaacca gcatgccatg		360
gtttcgtca agctggtaa gcagaaccgc gagttgttg agatcacact gtacggcgc		420
acgaaagaac tgacgagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc		480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc		534

<210> 61

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 22 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 61
caggactcca cctcagaccc gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtgg tagggaggc cgaaatgat 120
gcgtcggtg aggataagga tccggagaaa atggaggcga ccattacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggg ctgtgcaga agaaatgcat gtacgtgatt 240
cataccttg tgccggggg ccagccggc gagttactt taggcaatat taaaagttat 300
ccgggcgtga catcagctct ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgttcgtca agctggtgaa gcagaaccgc gagtttttg agatcacact gtacggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc 480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc 534

<210> 62
<211> 534
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ ID NO: 23 所示的突变蛋白的核苷酸序列

[0051] <400> 62
caggactcca cctcagaccc gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtgg tagggaggc cgaaatgat 120
ctgtcggtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga agattacga gttgaaagaa 180
gataggtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgcggata agaaatgcaa ttaccatatt 240
gagaccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcttgat taaaagttat 300
ccgggcgaga caccgatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgttcttca agggggtgaa tcagaaccgc gagatttttg agatcattct gtacggcgc 420
acgaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc 480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc 534

<210> 63
<211> 534
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ ID NO: 24 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 63
caggactcca cctcagaccc gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagttg tcgggtggc cgaaatacg	120
cttctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga agatttacga gttgaaagaa	180
gataggtcat ataacgtcac ctgggttat ttgctgaga agaaatgcaa ttaccatatt	240
gagaccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcacgat taaaagttat	300
ccgggcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agggtgtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcattct gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534

<210> 64

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 25 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 64

caggactcca ctcagaccc tccatggccc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
--	----

[0052] aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagttg tcgggtggc cgaaatacg	120
cttctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga agatttacga gttgaaagaa	180
gataggtcat ataacgtcac ctgggttat ttgctgaga agaaatgcaa ttaccatatt	240
gagaccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcacgat taaaagttat	300
ccgggcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca aggggttgaa tcagaaccgc gagattttg agatcattct gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534

<210> 65

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 26 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 65

caggactcca ctcagaccc tccatggccc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
--	----

aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagttg tcgggtggc cgaaatacg	120
---	-----

cttctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga agatttacga gttgaaagaa	180
gataggtcat ataacgtcac ctgggtgtat tttgcggata agaaatgcag gtaccatatt	240
gagacctttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcacgat taaaagtcat	300
ccgggcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agggtgtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcattct gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534

<210> 66

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 27 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 66

caggactcca cctcagaccc gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
---	----

aacttccagg acaaccaatt ccatggggaa tggtagtgcg tcgggtggc cgaaaaatacg	120
---	-----

[0053] ctgctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga tgatttacga gttgaaagaa

gataagtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgcgtata agaaatgcaa ttaccatatt	240
--	-----

gagacctttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcacgat taaaagttat	300
---	-----

ccgggcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
---	-----

gtgttcttca aggggtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcgttct gtacggcgc	420
--	-----

acgaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
---	-----

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534
---	-----

<210> 67

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 28 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 67

caggactcca cctcagaccc gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
---	----

aacttccagg acaaccaatt ccatggggaa tggtagtgcg tgggtggc cgaaaaatacc	120
--	-----

ctgctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgcaagcga tcatTTacga gttgaaagaa	180
---	-----

gatacatataaacgtcac ctgggtgtac ttttagcgaaa agaaatgcaa ttaccacatt	240
gagaccttgc tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcaccat taaaagttac	300
ccggcgaga caccaatctt ggtccgcgtc atgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtttcttca agggagtgaa ccagaaccgc gagatcttg agatcatact gtacgggcgc	420
acgaaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534

<210> 68

<211> 531

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 29 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 68

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
---	----

aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggtaacgtgg tagggaggcgc cgaaatgat	120
--	-----

gtgctgcgtg aggataagga cccggagaaa atggaggcga ccattacga gttgaaagaa	180
--	-----

[0054] gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggg tttgtgcaga agagactgat gtacgtgact	240
--	-----

cataccttgc tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcacat tgaaagttat	300
--	-----

ccggcggtga catcagctt ggtccgcgtc gtgagcacccg actacaacca gcatgccatg	360
---	-----

gtttcgtca agctggtgaa gcagaaccgc gagtttttg agatcacact gtacgggcgc	420
---	-----

acgaaaagagc tgacaaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
--	-----

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agatcgacgg c	531
--	-----

<210> 69

<211> 531

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 30 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 69

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
---	----

aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggtaacgtgg tagggaggcgc cgaaatgat	120
--	-----

gtgctgcgtg aggataagga cccggagaaa atggaggcga ccattacga gttgaaagaa	180
--	-----

gataaatcat ataacgtcac cgatgtgggg tttgtgcaga agagatacat gtacgtgact	240
---	-----

cataccttg tgccggggag ccagccgggc gagttactt taggcaacat tgaaagttat	300
ccgggcgtga catcagctt ggtccgcgtc gtgagcaccc actacaacca gcatgccatg	360
gttgcgtca agctggtaa gcagaaccgc gagttttt agatcacact gtacggcgc	420
acgaaagagc tgacaaggcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agatcgacgg c	531

<210> 70
<211> 534
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ ID NO: 31 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 70	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttcagg acaaccaatt ccaaggaaa tggtagttt tcgggtggc cgaaatacg	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga tgatttacga gttgaaagaa	180
gataagtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgtgtata agaaacgtaa ttaccatatt	240
[0055] gagaccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcacgat taaaagttat	300
ccggcggaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtttttca agggggtaa tcagaaccgc gagatttt agatcggtt gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtttatcga cgcc	534

<210> 71
<211> 534
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ ID NO: 32 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 71	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttcagg acaaccaatt ccaaggaaa tggtagttt tcgggtggc cgaaatacg	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga tgatttacga gttgaaagaa	180
gataagtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgtgtata agaaaatgaa ttaccatatt	240
gagaccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcacgat taaaagttat	300

ccgggcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gttttctca aggggtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcggttct gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtatatcga cgcc	534
<210> 72	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 33 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 72	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccaaggaaa tggtaacgttgc tcgggtggc cgaaaaatacg	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga tgatttacga gttgaaagaa	180
gataagtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgtctgata agaaaactgaa ttaccatatt	240
gagacctttg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcacgat taaaagttat	300
[0056] cccggcggaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gttttctca aggggtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcggttct gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtggatcga cgcc	534
<210> 73	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 34 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 73	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccaaggaaa tggtaacgttgc tcgggtggc cgaaaaatacg	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga tgatttacga gttgaaagaa	180
gataagtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgtctgata agaaaatcaa ttaccatatt	240
gagacctttg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcacgat taaaagttat	300
ccgggcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360

gtgttcttca agggggtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcgttct gtacgggcgc	420
acgaaaagaac tgacaaaacga actgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc aggaaatcga cgcc	534
<210> 74	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 35 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 74	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccaaggaaa tggtagtttgc tcgggtggc cgaaatacg	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga tgatttacga gttgaaagaa	180
gataagtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgtgtata agaaagttaa ttaccatatt	240
gagacctttg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcacgat taaaagttat	300
ccggcgcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
[0057] gtgttcttca agggggtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcgttct gtacgggcgc	420
acgaaaagaac tgacaaaacga actgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtatatcga cgcc	534
<210> 75	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 36 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 75	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccaaggaaa tggtagtttgc tcgggtggc cgaaatacg	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga tgatttacga gttgaaagaa	180
gataagtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgtgtata agaaacgtaa ttaccatatt	240
gagacctttg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcacgat taaaagttat	300
ccggcgcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agggggtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcgttct gtacgggcgc	420

acgaaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtggatcga cggc 534

<210> 76

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 37 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 76

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttcagg acaaccaatt ccaagggaaa tggtagttg tcgggtggc cgaaaaatacg 120

ctgctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga tgatttacga gttgaaagaa 180

gataagtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgtgtata agaaaaacaa ttaccatatt 240

gagacctttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcacgtat taaaagttat 300

ccgggcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgttcttca aggggggtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcgttct gtacggcgc 420

[0058] acgaaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtggatcga cggc 534

<210> 77

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 38 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 77

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttcagg acaaccaatt ccaagggaaa tggtagttg tcgggtggc cgaaaaatacg 120

ctgctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga tgatttacga gttgaaagaa 180

gataagtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgtgtata agaaacgtaa ttaccatatt 240

gagacctttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcacgtat taaaagttat 300

ccgggcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgttcttca aggggggtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcgttct gtacggcgc 420

acgaaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctcccgtc ccaatcgacc aggttatcga cggc	534
<210> 78	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 39 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 78	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccaaggaaa tggtacgtt tcgggtggc cgaaatacg	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga tgatttacga gttgaaagaa	180
gataagtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgtctgata agaaaaaaaaa ttaccatatt	240
gagaccttg tgccgggag ccagccggc gagttactt taggcacgat taaaagttat	300
ccgggcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtttcttca aggggtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcggtct gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
[0059] ctccctgaaa accacatcgt ctcccgtc ccaatcgacc aggttatcga cggc	534
<210> 79	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 40 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 79	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccaaggaaa tggtacgtt tcgggtggc cgaaatacg	120
ctgctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgcaggcga tgatttacga gttgaaagaa	180
gataagtcat ataacgtcac ctgggtgtat ttgtctgata agaaattcaa ttaccatatt	240
gagaccttg tgccgggag ccagccggc gagttactt taggcacgat taaaagttat	300
ccgggcgaga cacctatttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtttcttca aggggtgaa tcagaaccgc gagattttg agatcggtct gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaaacga actgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctcccgtc ccaatcgacc aggttatcga cggc	534

<210> 80
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 80

Ala Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Lys Ala Phe
 35

<210> 81
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 81

Ala Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 [0060] 1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Met Val Lys Ser Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Lys Ala Phe
 35

<210> 82
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 82

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asp Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Glu Ala Phe
 35

<210> 83
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 83

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asp Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Lys Ala Phe
 35

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端标签

[0061] <400> 84

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5 10

<210> 85
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> strep 标签 II

<400> 85

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5

<210> 86
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> N-末端标签

<400> 86

Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Ser Glu Asn Leu Tyr
 1 5 10 15

Phe Gln

<210> 87
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 87

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

Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp
 20 25 30

Tyr Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp
 [0062] 35 40 45

Pro Ile Lys Met Gln Ala Met Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser
 50 55 60

Tyr Asn Val Thr Trp Val Tyr Phe Ala Asp Lys Lys Ile Asn Tyr His
 65 70 75 80

Ile Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly
 85 90 95

Thr Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Pro Ile Leu Val Arg Val Val
 100 105 110

Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Asn
 115 120 125

Gln Asn Arg Glu Ile Phe Glu Ile Val Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu
 130 135 140

Leu Thr Asn Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu
 145 150 155 160

Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Glu
165 170 175

Ile Asp Gly

<210> 88
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 88

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

Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp
20 25 30

Tyr Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Val Leu Arg Glu Asp Lys Asp
[0063] 35 40 45

Pro Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser
50 55 60

Tyr Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Arg Cys Met Tyr Val
65 70 75 80

Thr His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly
85 90 95

Ser Thr Asp Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys
 115 120 125

Gln Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu
 130 135 140

Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu
145 150 155 160

Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys
 165 170 175

Ile Asp Gly

<210> 89
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 89

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

Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp
20 25 30

Tyr Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Val Leu Arg Glu Asp Lys Asp
[0064] 35 40 45

Pro Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser
50 55 60

Tyr Gln Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Arg Cys Met Tyr Val
 65 70 75 80

Thr His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly
85 90 95

Asn Ile Glu Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val
100 105 110

Ser Thr Asp Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys
115 120 125

Gln Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu
130 135 140

Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu
 145 150 155 160

Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys
 165 170 175

Ile Asp Asp

<210> 90
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 90

Gly Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Lys Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys
1 5 10 15

Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp
20 25 30

Tyr Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Val Leu Arg Glu Asp Lys Asp
[0065] 35 40 45

Pro Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser
 50 55 60

Tyr Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Arg Cys Met Tyr Val
65 70 75 80

Thr His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly
85 90 95

Asn Ile Glu Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val
100 105 110

Ser Thr Asp Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys
 115 120 125

Gln Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu
 130 135 140

Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu
145 150 155 160

Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys
165 170 175

Ile Asp Gly

<210> 91
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 91

Gly Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile His Ala Pro Pro Leu Ser Lys
 1 5 10 15

Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp
20 25 30

Tyr Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Val Leu Arg Glu Asp Lys Asp
[0066] 35 40 45

Pro Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser
50 55 60

Tyr Asn Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Arg Cys Met Tyr Val
 65 70 75 80

Thr His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly
85 90 95

Asn Ile Glu Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val
100 105 110

Ser Thr Asp Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys
 115 120 125

Gln Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu
130 135 140

Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu
145 150 155 160

Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys
165 170 175

Ile Asp Gly

<210> 92
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 92

Gly Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Lys Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys
 1 5 10 15

Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp
20 25 30

Tyr Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Val Leu Arg Glu Asp Lys Asp
 [0067] 35 40 45

Pro Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser
50 55 60

Tyr Gln Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Arg Cys Met Tyr Val
65 70 75 80

Thr His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly
85 90 95

Asn	Ile	Glu	Ser	Tyr	Pro	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Leu	Val	Arg	Val	Val			
													100		105		110	

Ser Thr Asp Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys
 115 120 125

Gln Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu
 130 135 140

Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu
145 150 155 160

Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys
165 170 175

Ile Asp Asp

<210> 93
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 93

Gly Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile His Ala Pro Pro Leu Ser Lys
1 5 10 15

Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp
20 25 30

Tyr Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Asp Val Leu Arg Glu Asp Lys Asp
[0068] 35 40 45

Pro Glu Lys Met Glu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser
50 55 60

Tyr Gln Val Thr Asp Val Gly Phe Val Gln Lys Arg Cys Met Tyr Val
65 70 75 80

Thr His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly
85 90 95

Asn Ile Glu Ser Tyr Pro Gly Val Thr Ser Ala Leu Val Arg Val Val
100 105 110

Ser Thr Asp Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Val Lys Leu Val Lys
115 120 125

Gln Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu
130 135 140

Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu
145 150 155 160

Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys
 165 170 175

Ile Asp Asp

<210> 94
 <211> 537
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 87 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 94

ggtcaggata gcaccagcga tctgattccg gcaccgcctc tgagcaaagt tccgctgcag	60
cagaattttc aggataatca gtttcaggc aaatggtatg ttgttggttg ggcaggtaat	120
accctgctgc gtgaagataa agatccgatt aaaatgcagg ccatgatcta tgaactgaaa	180
gaggataaaaa gctacaacgt gacctgggtt tatttcggcg aaaaaaaaaat taactatcac	240
atcgaaacct ttgttccggg tagccagcct ggtgaattta ccctgggcac cattaaaagc	300
tatccgggtg aaaccccgat tctgggtcgt gttgttagca ccaattataa ccagcatgcc	360
[0069] atggtgtttt tcaaaggcgt taatcagaac cgcgaaatct ttgaaattgt gctgtatggt	420
cgtaccaaag aactgaccaa tgagctgaaa gaaaaacttta tccgctttag caaaaggctg	480
ggtctgcccgg aaaatcatat tgtgttccg gttccgattt atcaggaaat tggatgg	537

<210> 95
 <211> 537
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 88 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 95

ggtcaggata gcaccagcga tctgattccg gcaccgcctc tgagcaaagt tccgctgcag	60
cagaattttc aggataatca gtttcacggc aaatggtatg ttgttggtcg tgcaggtaat	120
gatgttctgc gtgaagataa agatccggaa aaaatggaag ccaccatcta tgaactgaaa	180
gaggataaaaa gctacaacgt taccgatgtt ggtttgttc agaaacgttg catgtatgt	240
accataacct ttgttccggg tagccagcct ggtgaattta ccctggtaa tattgaaagc	300
tatccgggtg ttaccagcgc actgggtcgt gttgttagca ccgattataa ccagcatgca	360
atggtttttg tgaaactggt gaaacagaat cgcgaaactgt ttgaaattac cctgtatggt	420

cgtaccaaag aactgaccag cgagctgaaa gaaaacttta ttcggttttag caaaagcctg	480
ggtctgccgg aaaatcatat tgtgttccg gttccgattg atcagtgtat tgatgtt	537
<210> 96	
<211> 537	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 89 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 96	
ggtcaggata gcaccagcga tctgattccg gcaccgcctc tgagcaaagt tccgctgcag	60
cagaattttc aggataatca gttcacggc aaatggtatg ttgttggtcg tgcaggtaat	120
gatgttctgc gtgaagataa agatccggaa aaaatggaag ccaccatcta tgaactgaaa	180
gaggataaaaa gctaccaggt taccgatgtt ggtttgttc agaaacgttg catgtatgt	240
acccataacct ttgttccggg tagccagcct ggtgaattta ccctggtaa tattgaaagc	300
tatccgggtg ttaccagcgc actgggtcgt gttgttagca ccgattataa ccagcatgca	360
atggttttt tgaaactggt gaaacagaat cgcgaaactgt ttgaaattac cctgtatggt	420
[0070] cgtaccaaag aactgaccag cgagctgaaa gaaaacttta ttcggttttag caaaagcctg	480
ggtctgccgg aaaatcatat tgtgttccg gttccgattg atcagtgtat tgatgtt	537
<210> 97	
<211> 537	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ ID NO: 90 所示的突变蛋白的核苷酸序列	
<400> 97	
ggtcaggata gcaccagcga tctgaaaccg gcaccgcctc tgagcaaagt tccgctgcag	60
cagaattttc aggataatca gttcacggc aaatggtatg ttgttggtcg tgcaggtaat	120
gatgttctgc gtgaagataa agatccggaa aaaatggaag ccaccatcta tgaactgaaa	180
gaggataaaaa gctacaacgt taccgatgtt ggtttgttc agaaacgttg catgtatgt	240
acccataacct ttgttccggg tagccagcct ggtgaattta ccctggtaa tattgaaagc	300
tatccgggtg ttaccagcgc actgggtcgt gttgttagca ccgattataa ccagcatgca	360
atggttttt tgaaactggt gaaacagaat cgcgaaactgt ttgaaattac cctgtatggt	420
cgtaccaaag aactgaccag cgagctgaaa gaaaacttta ttcggttttag caaaagcctg	480

ggtctgccgg	aaaatcatat	tgtgttccg	gttccgattg	atcagtgtat	tgatgg	537
<210>	98					
<211>	537					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	SEQ ID NO: 91 所示的突变蛋白的核苷酸序列					
<400>	98					
ggtcaggata	gcaccagcga	tctgattcat	gcacccgcctc	tgagcaaagt	tccgctgcag	60
cagaattttc	aggataatca	gtttcacggc	aaatggtatg	ttgttggtcg	tgcaggtaat	120
gatgttctgc	gtgaagataa	agatccggaa	aaaatggaag	ccaccatcta	tgaactgaaa	180
gaggataaaaa	gctacaacgt	taccgatgtt	ggttttgtc	agaaacgtt	catgtatgt	240
accataacct	ttgttccggg	tagccagcct	ggtgaattta	ccctggtaa	tattgaaagc	300
tatccgggtg	ttaccagcgc	actggttcgt	gtttagca	ccgattataa	ccagcatgca	360
atggttttt	tgaaactggt	gaaacagaat	cgcgaactgt	ttgaaattac	cctgtatggt	420
cgtaccaaag	aactgaccag	cgagctgaaa	gaaaacttta	ttcggttt	caaaagcctg	480
[0071]	ggtctgccgg	aaaatcatat	tgtgttccg	gttccgattg	atcagtgtat	tgatgg
						537
<210>	99					
<211>	537					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	SEQ ID NO: 92 所示的突变蛋白的核苷酸序列					
<400>	99					
ggtcaggata	gcaccagcga	tctgaaaccg	gcacccgcctc	tgagcaaagt	tccgctgcag	60
cagaattttc	aggataatca	gtttcacggc	aaatggtatg	ttgttggtcg	tgcaggtaat	120
gatgttctgc	gtgaagataa	agatccggaa	aaaatggaag	ccaccatcta	tgaactgaaa	180
gaggataaaaa	gctaccaggt	taccgatgtt	ggttttgtc	agaaacgtt	catgtatgt	240
accataacct	ttgttccggg	tagccagcct	ggtgaattta	ccctggtaa	tattgaaagc	300
tatccgggtg	ttaccagcgc	actggttcgt	gtttagca	ccgattataa	ccagcatgca	360
atggttttt	tgaaactggt	gaaacagaat	cgcgaactgt	ttgaaattac	cctgtatggt	420
cgtaccaaag	aactgaccag	cgagctgaaa	gaaaacttta	ttcggttt	caaaagcctg	480
ggtctgccgg	aaaatcatat	tgtgttccg	gttccgattg	atcagtgtat	tgatgt	537

<210> 100
 <211> 537
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SEQ ID NO: 93 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 100
 ggtcaggata gcaccagcga tctgattcat gcaccgcctc tgagcaaagt tccgctgcag 60
 cagaattttc aggataatca gttcacggc aaatggtatg ttgttggtcg tgcaggtaat 120
 gatgttctgc gtgaagataa agatccggaa aaaatggaag ccaccatcta tgaactgaaa 180
 gaggataaaaa gctaccaggt taccgatgtt ggtttgttc agaaacgtt catgtatgt 240
 acccataacct ttgttccggg tagccagcct ggtgaattta ccctggtaa tattgaaagc 300
 tatccgggtg ttaccagcgc actgggtcg tttgttagca ccgattataa ccagcatgca 360
 atggtttttg tgaaactggt gaaacagaat cgcgaaactgt ttgaaattac cctgtatggt 420
 cgtacccaaag aactgaccag cgagctgaaa gaaaacttta ttctgttttag caaaaaggctg 480
 ggtctgccgg aaaatcatat tgtgttccg gttccgattt atcagtgtat tgatgat 537

[0072]

<210> 101
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> TEV 蛋白酶变体

<400> 101

Gly	His	His	His	His	His	His	Gly	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Gly	Pro
1							5		10			15		

Arg	Asp	Tyr	Asn	Pro	Ile	Ser	Ser	Thr	Ile	Cys	His	Leu	Thr	Asn	Glu
				20				25				30			

Ser	Asp	Gly	His	Thr	Thr	Ser	Leu	Tyr	Gly	Ile	Gly	Phe	Gly	Pro	Phe
						35		40			45				

Ile	Ile	Thr	Asn	Lys	His	Leu	Phe	Arg	Arg	Asn	Asn	Gly	Thr	Leu	Leu
				50			55			60					

Val	Gln	Ser	Leu	His	Gly	Val	Phe	Lys	Val	Lys	Asn	Thr	Thr	Thr	Leu
				65		70		75			80				

Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro
85 90 95

Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln
100 105 110

Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser
115 120 125

Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser Ser Asp
130 135 140

Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly
145 150 155 160

Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser
165 170 175

Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys
180 185 190

[0073] Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser
195 200 205

Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val
210 215 220

Phe Met Val Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr
225 230 235 240

Gln Leu Met Asn Arg Arg Arg Arg Arg
245

<210> 102

<211> 747

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 101 所示的突变蛋白的核苷酸序列

<400> 102

ggtcatcatc atcatcatca tcatggagaa agcttgtta aggggccgct tgattacaac 60

ccgatatcga gcaccatttg tcatttgacg aatgaatctg atgggcacac aacatcgtt 120

	tatggtattg gatttgggcc cttcatcatt acaaacaagg acttgttag aagaataat	180
	ggaacactgt tggccaatc actacatggt gtattcaagg tcaagaacac cacgacttg	240
	caacaacacc tcattgatgg gagggacatg ataattattc gcatgcctaa ggatttccca	300
	ccatttcctc aaaagctgaa atttagagag ccacaaaggg aagagcgcatt atgtcttgt	360
	acaaccaact tccaaactaa gagcatgtct agcatggtgt cagacactag ttgcacattc	420
[0074]	ccttcatctg atggcatatt ctggaagcat tggattcaaa ccaaggatgg gcagtgtggc	480
	agtccattag tatcaactag agatgggttc attgttgta tacactcagc atcgaatttc	540
	accaacacaa acaattattt cacaagcgtg cgaaaaact tcatggatt gttgacaaat	600
	caggaggcgc agcagtgggt tagtggttgg cgattaaatg ctgactcagt attgtggggg	660
	ggccataaaag ttttcatggt gaaacctgaa gagcctttc agccagttaa ggaagcgcact	720
	caactcatga atcgctcgcc cgctcg	747

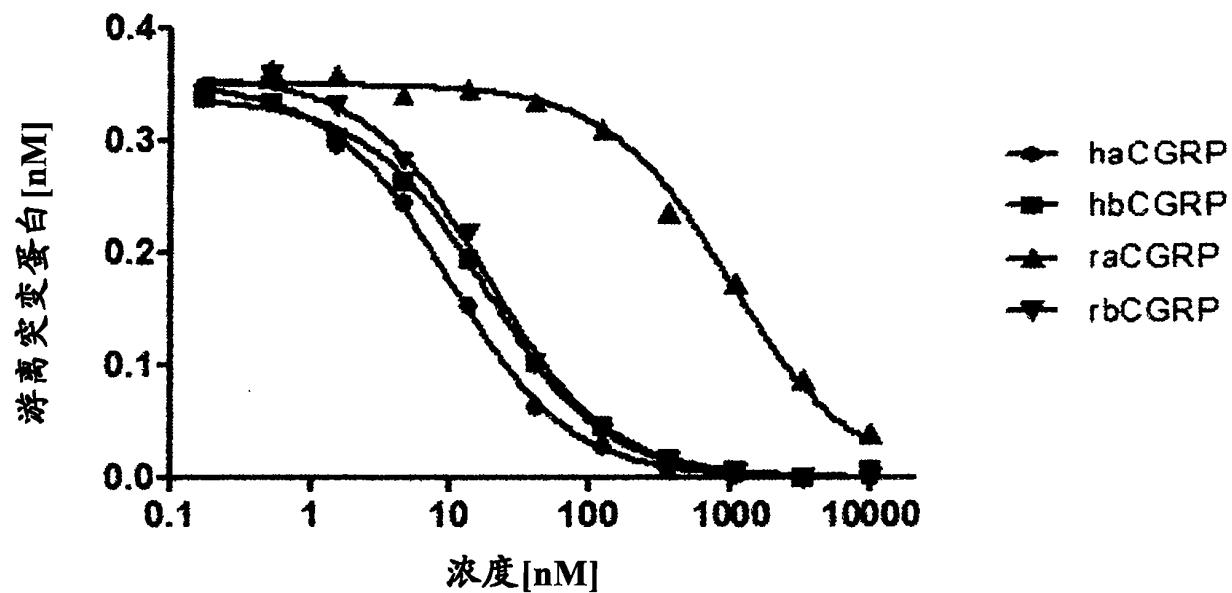
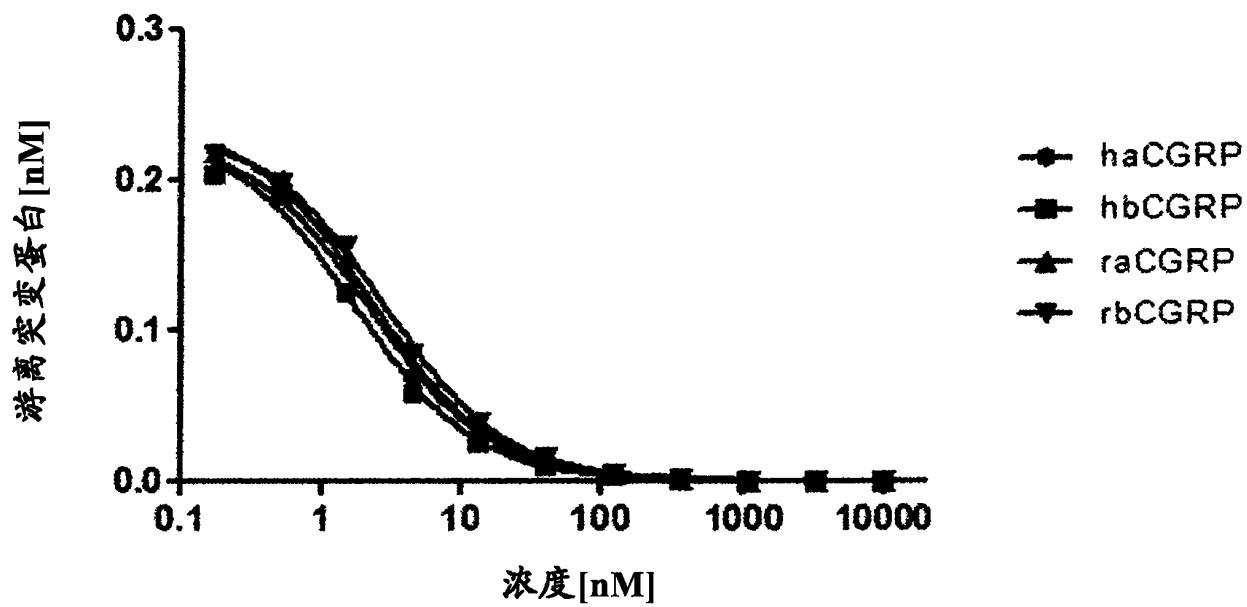
SEQ ID NO: 3**SEQ ID NO: 4**

图1

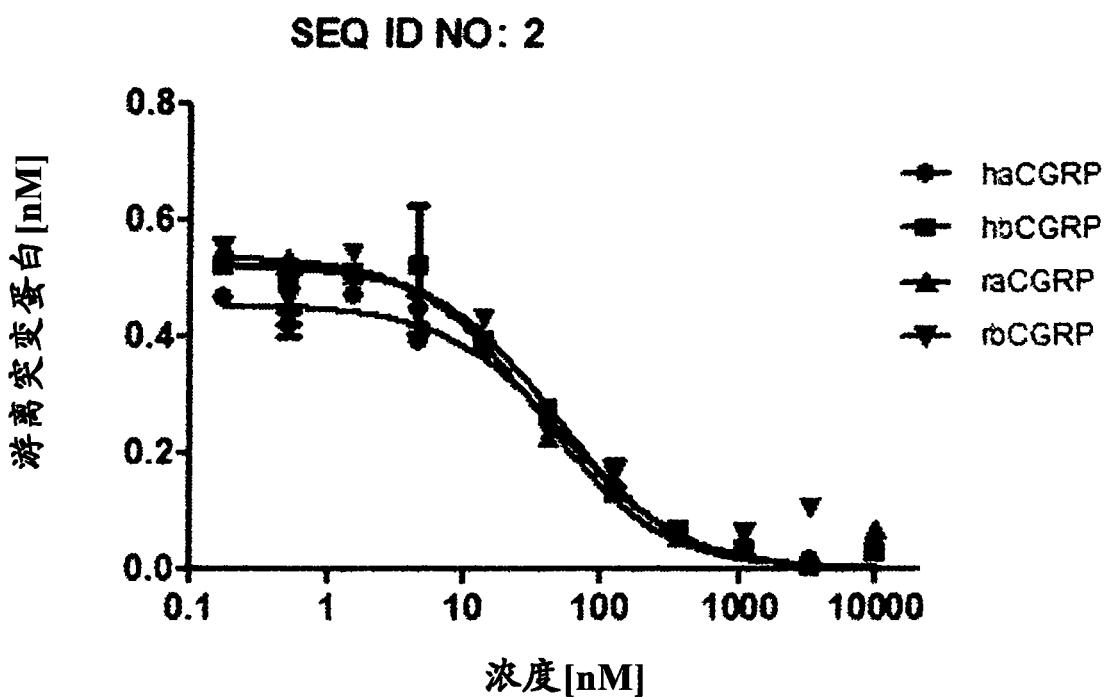
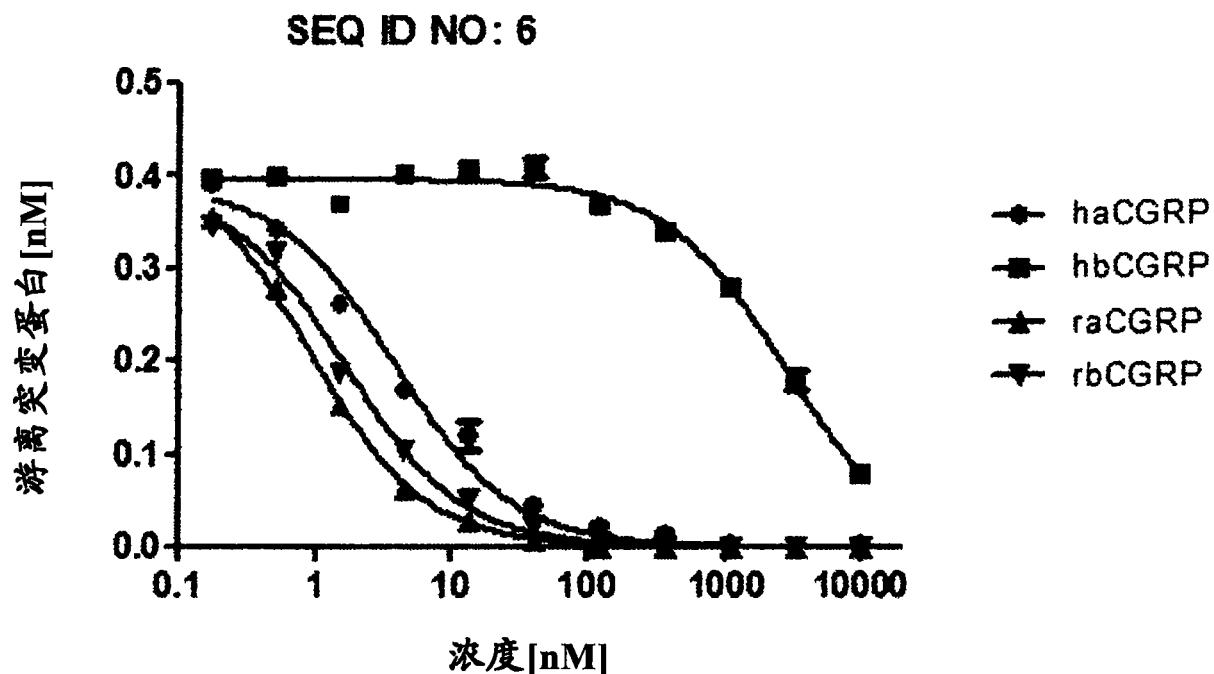


图1(续)

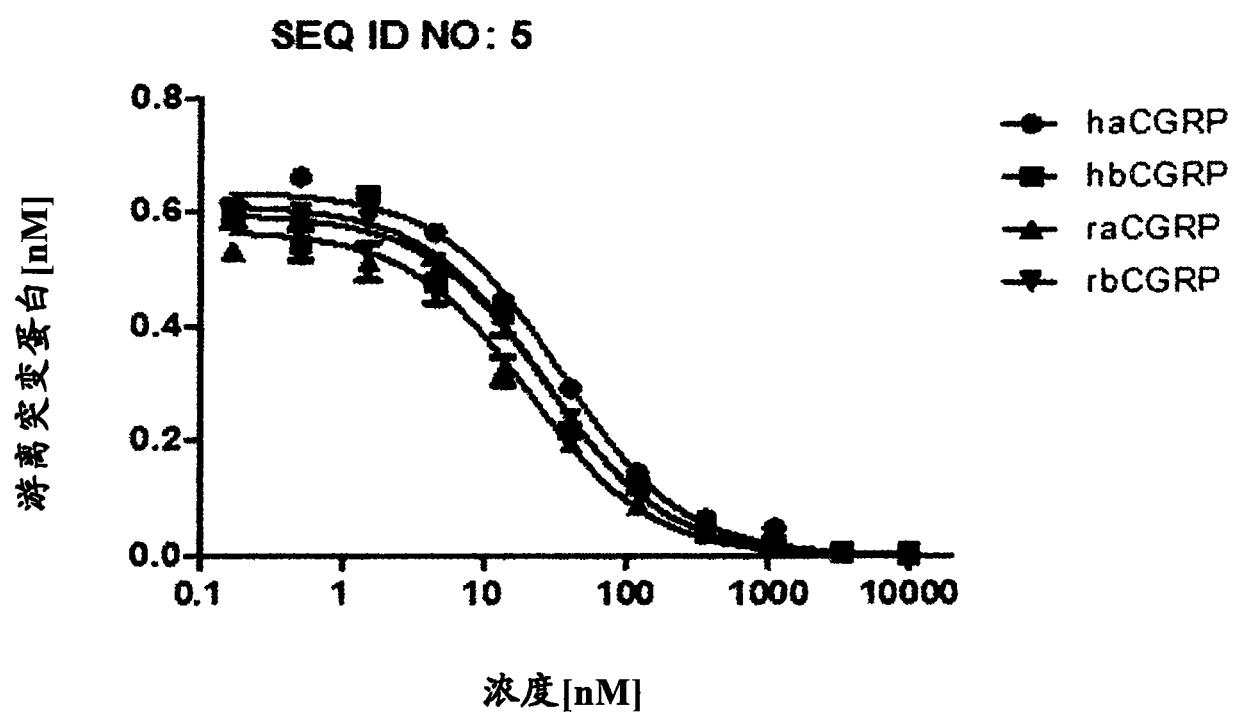


图1(续)

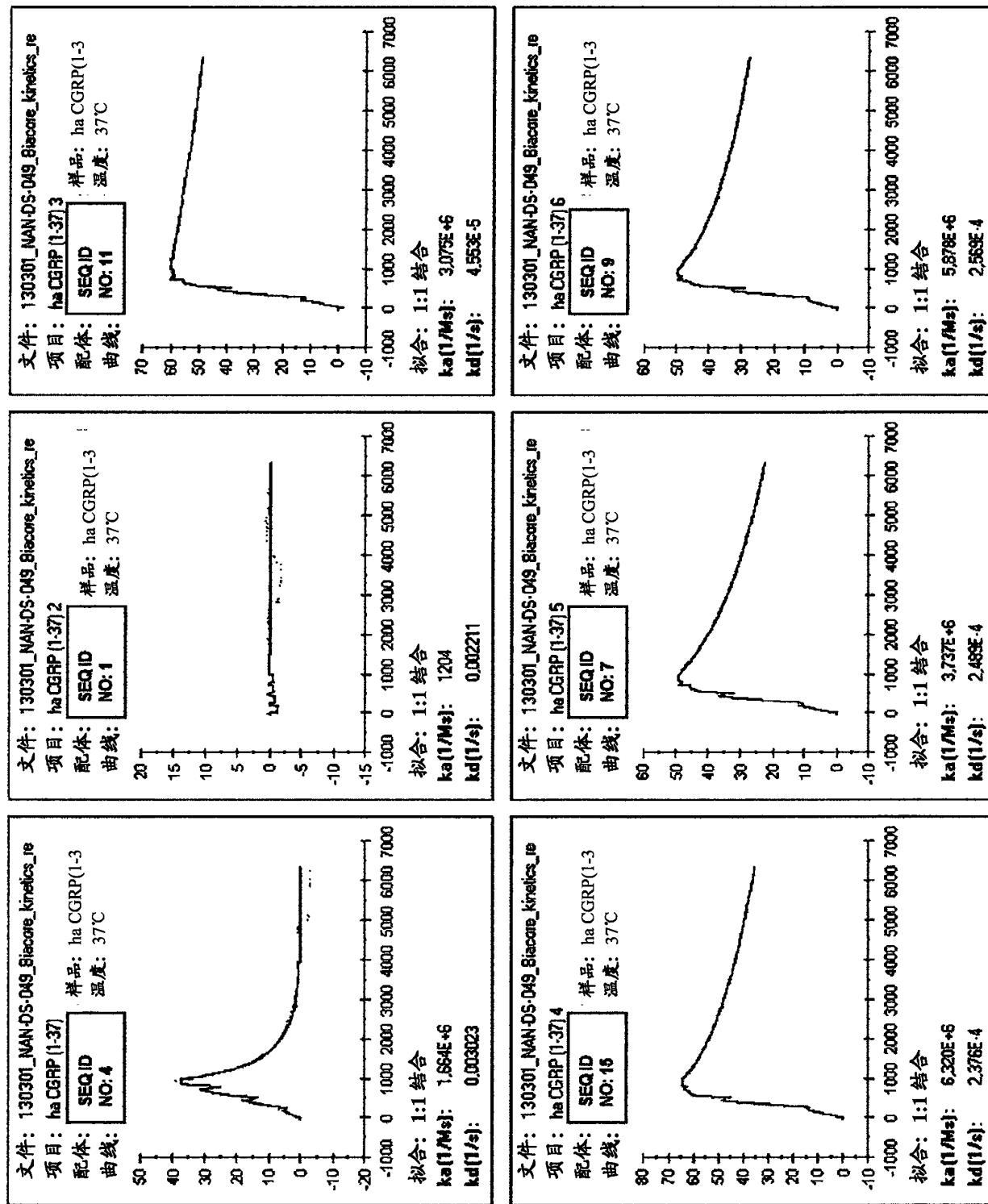


图2A人αCGRP

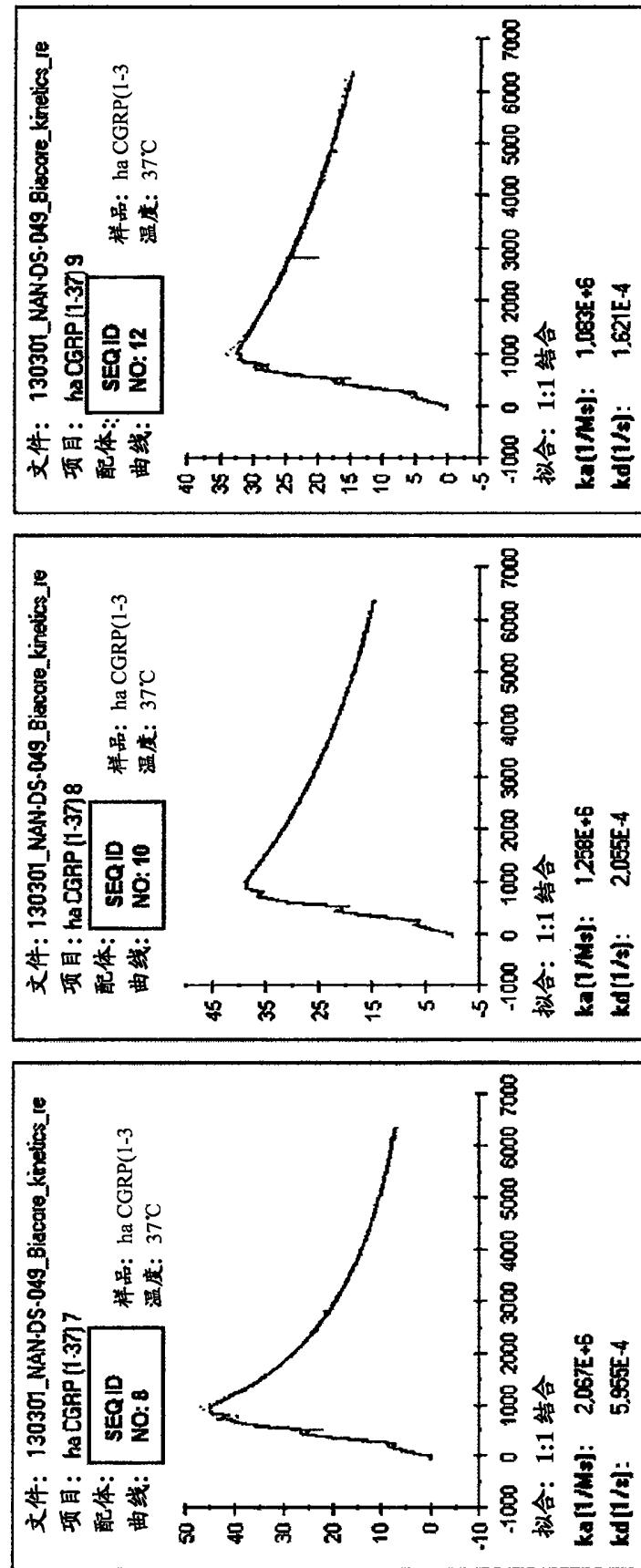


图2A (续)

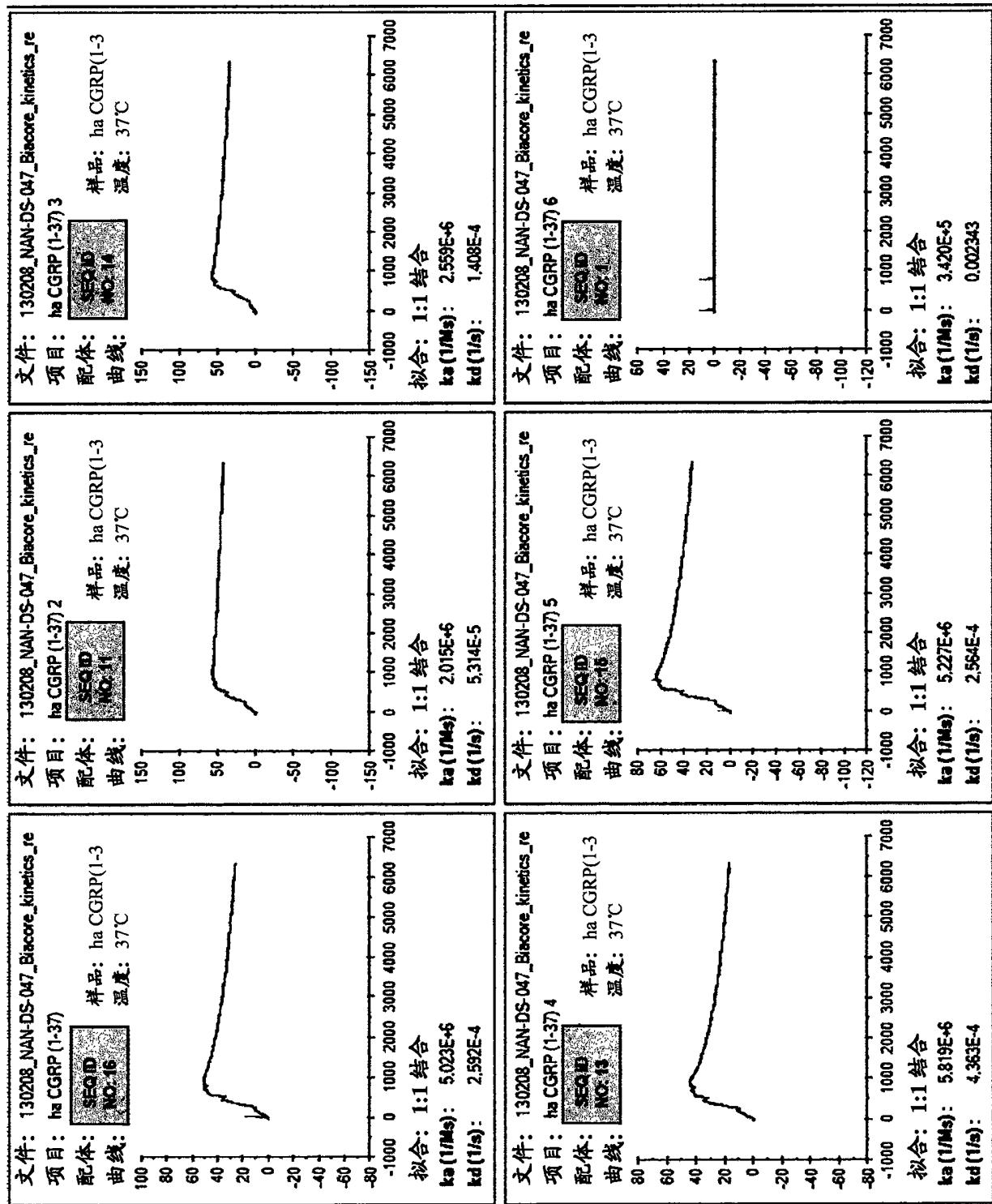


图2A (续)

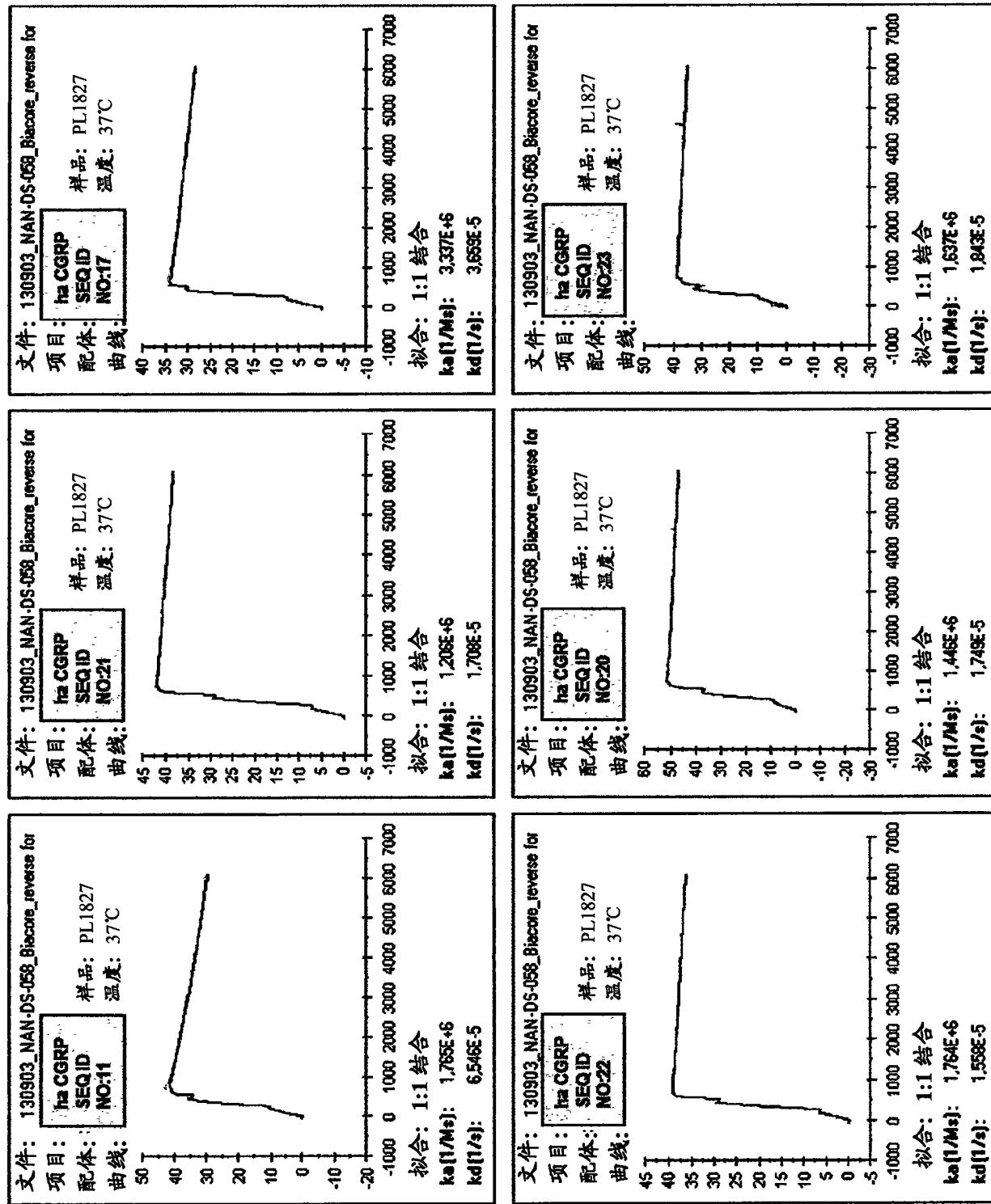


图 2A (续)

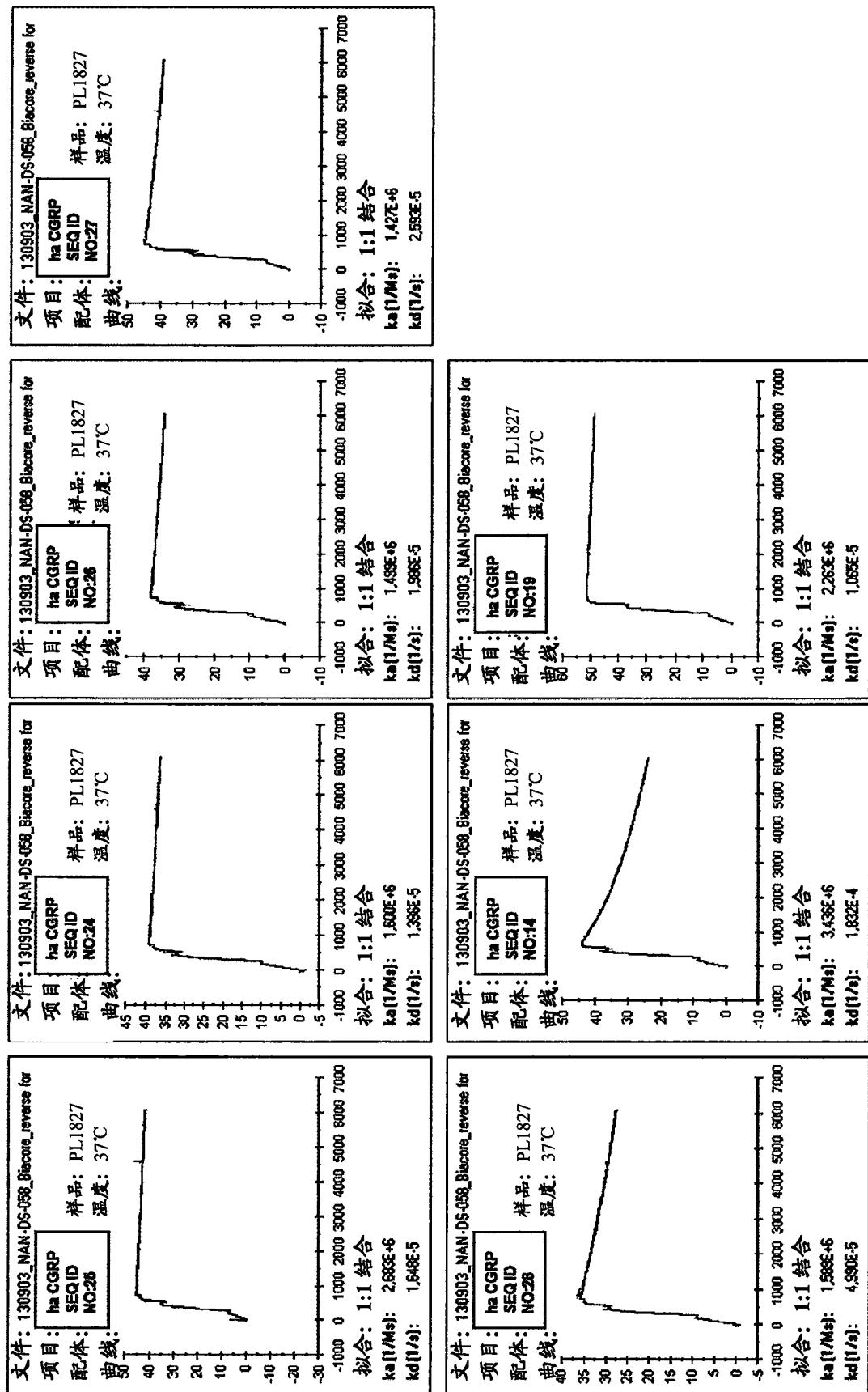


图2A (续)

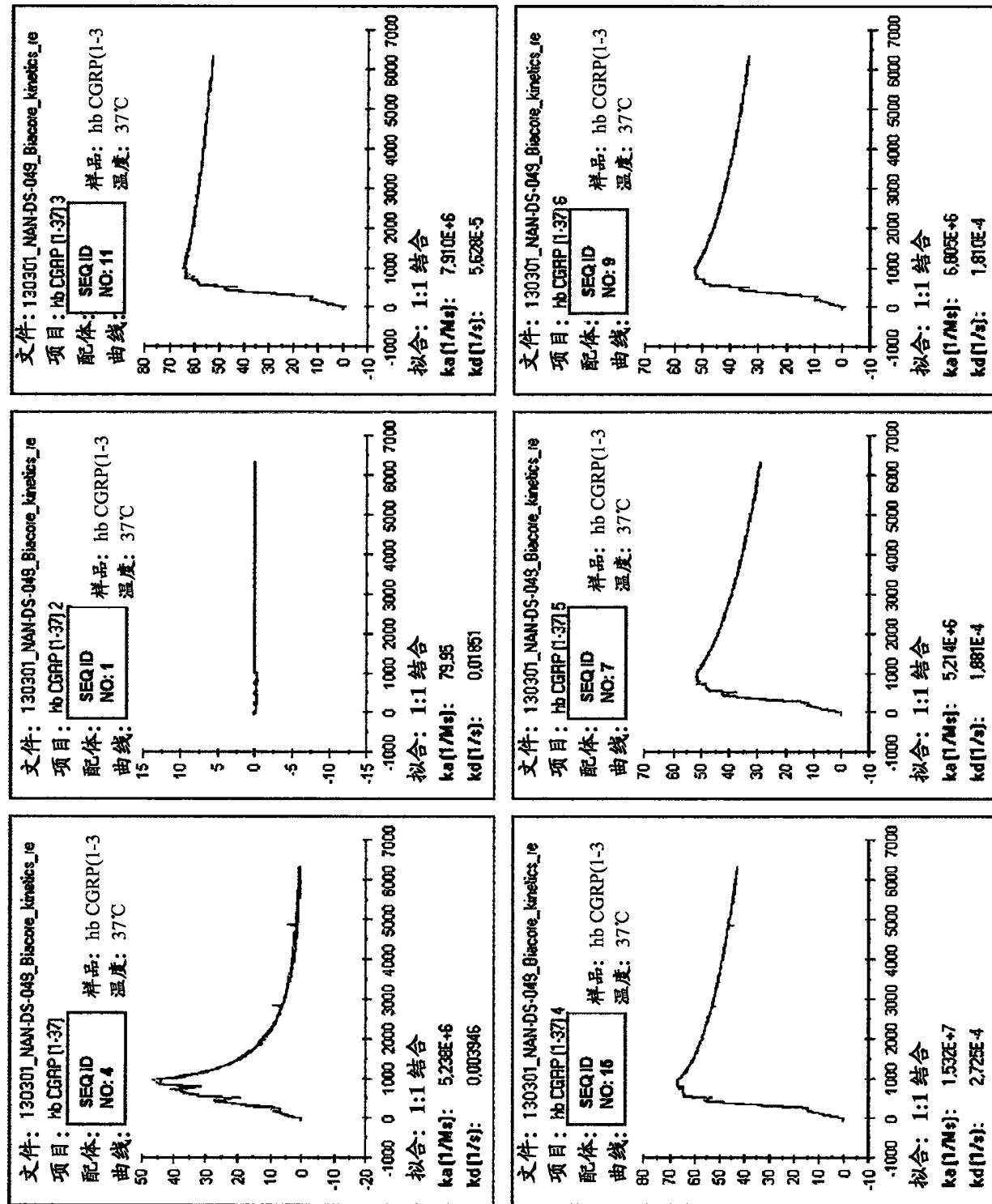


图2B人BCGRP

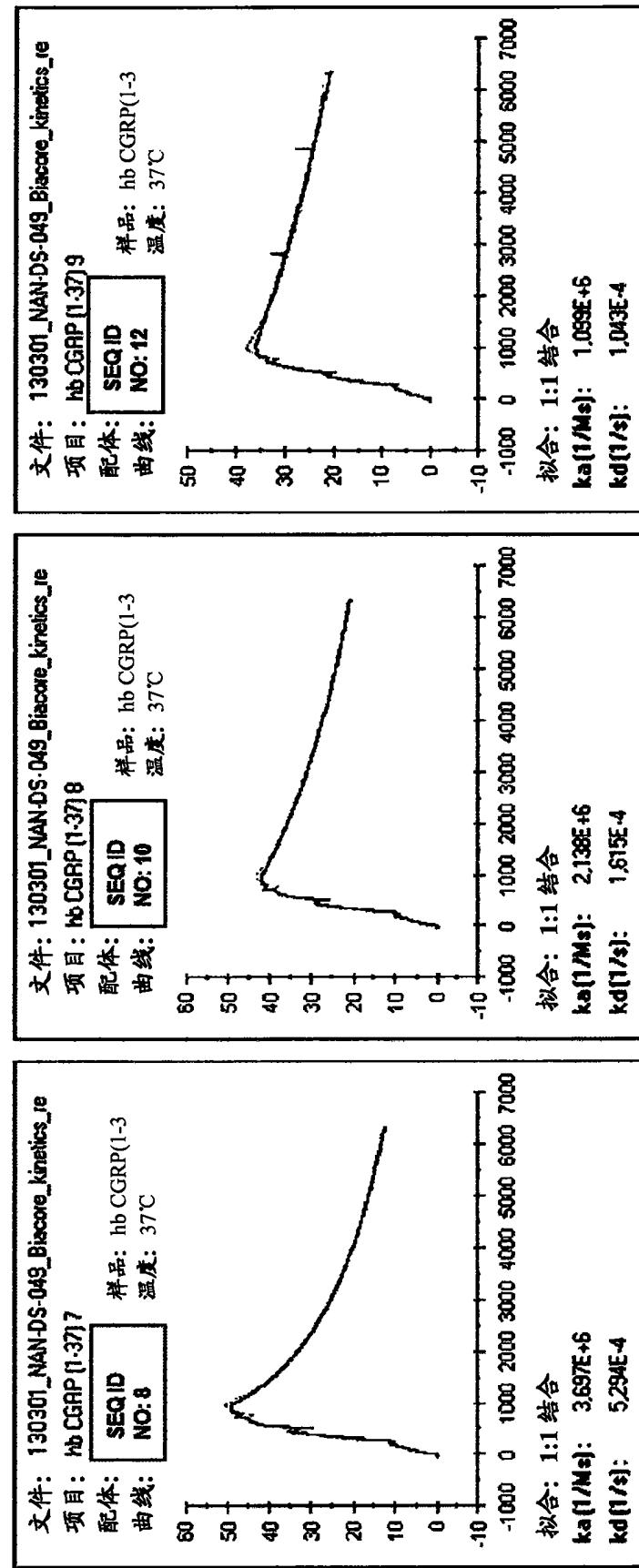


图2B(续)

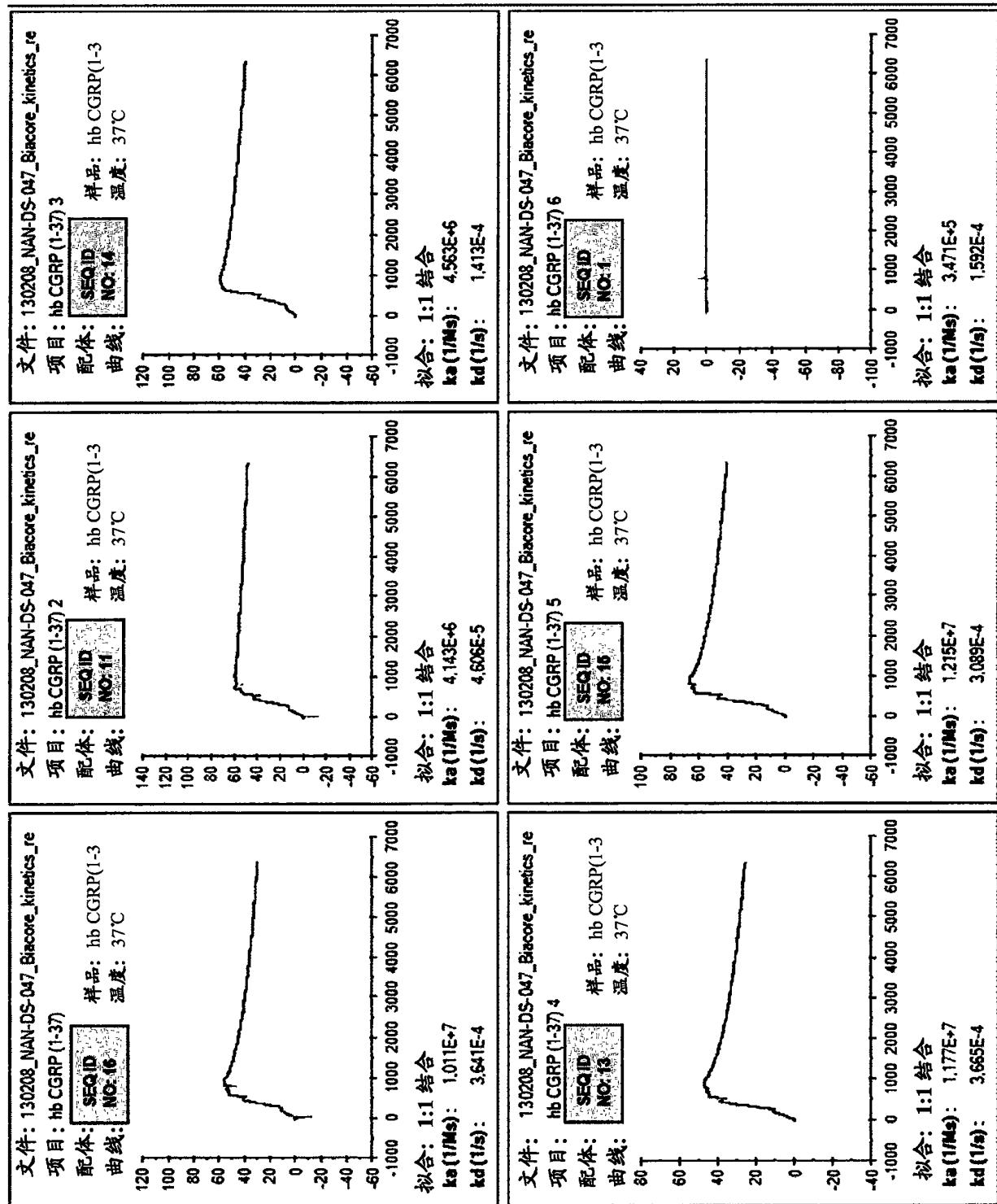


图2B(续)

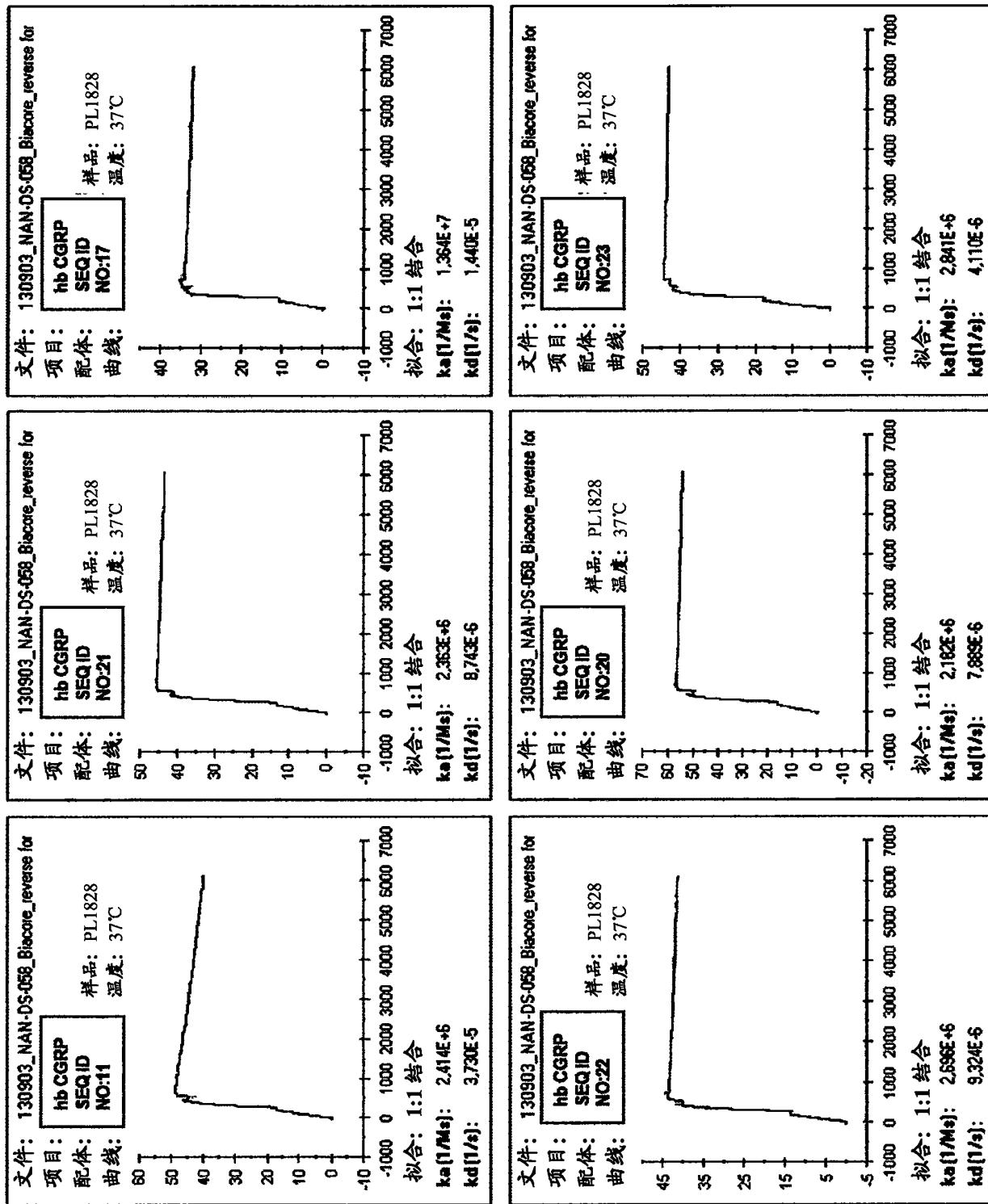


图2B(续)

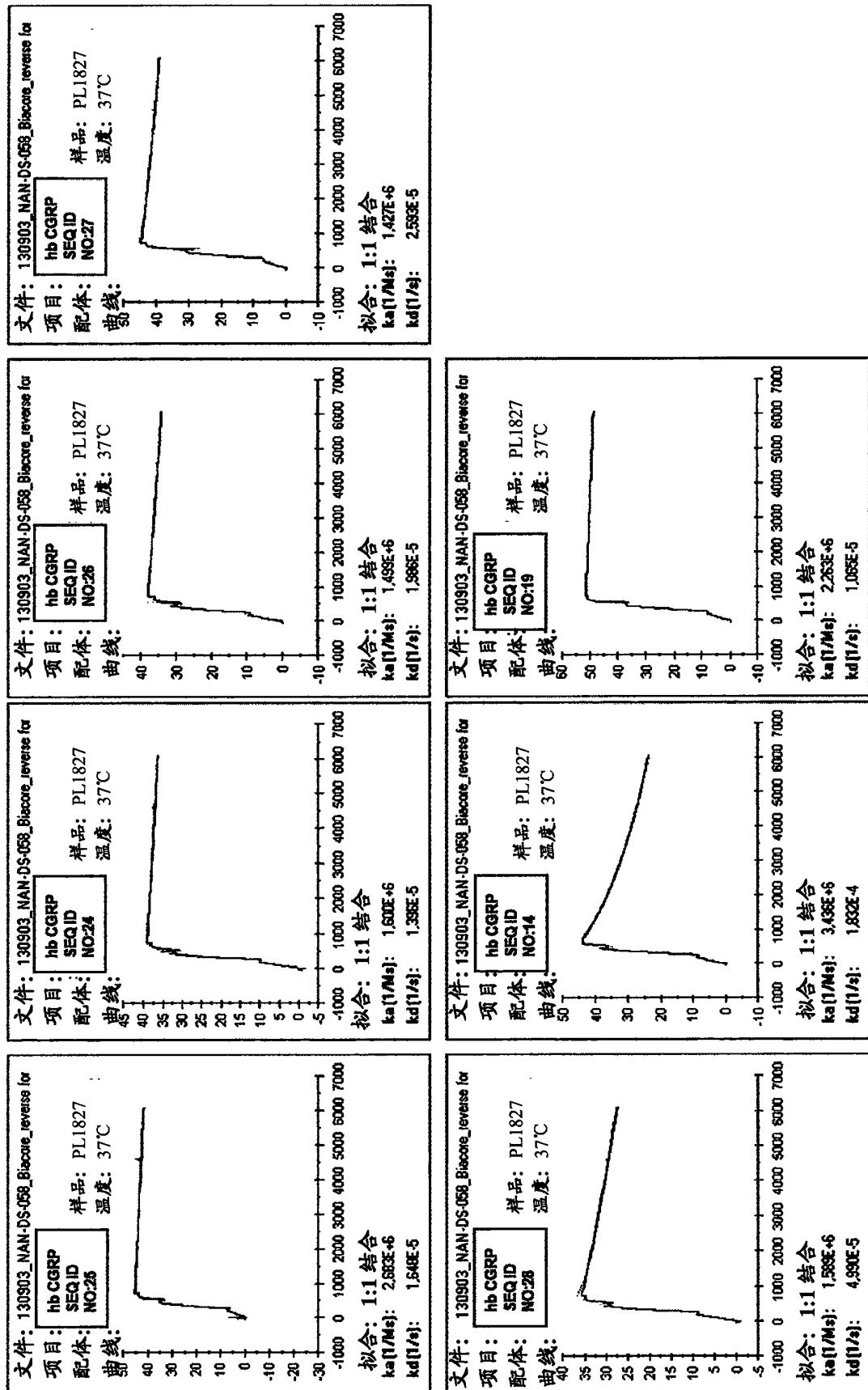


图2B(续)

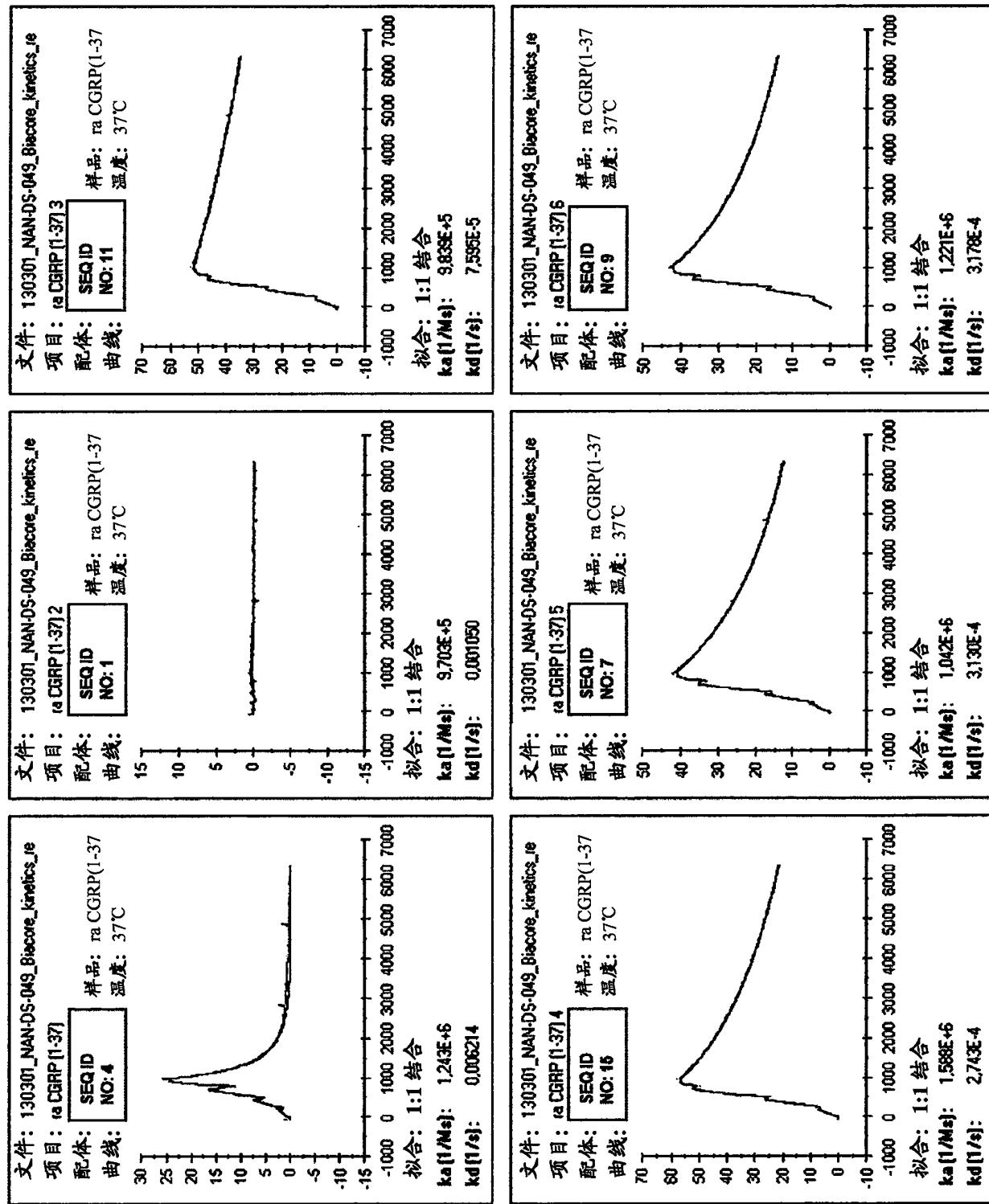


图2C大鼠αCGRP

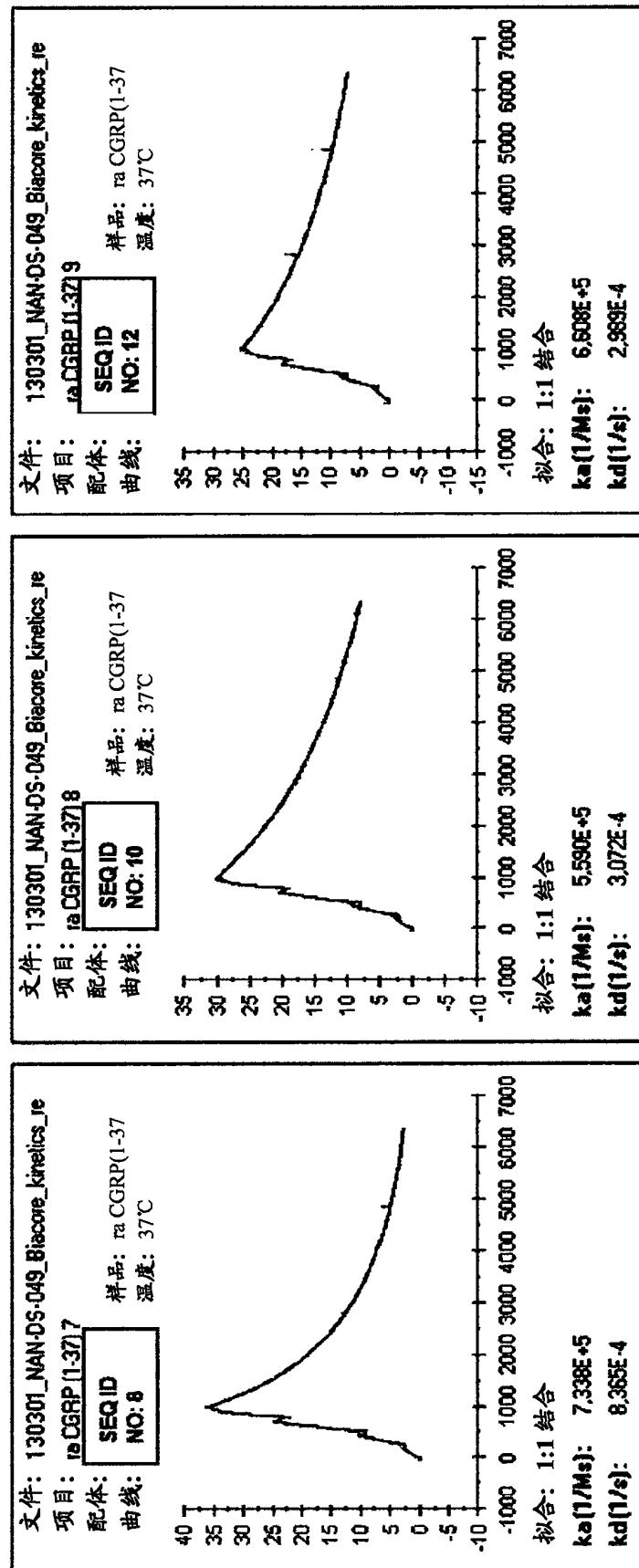


图2C (续)

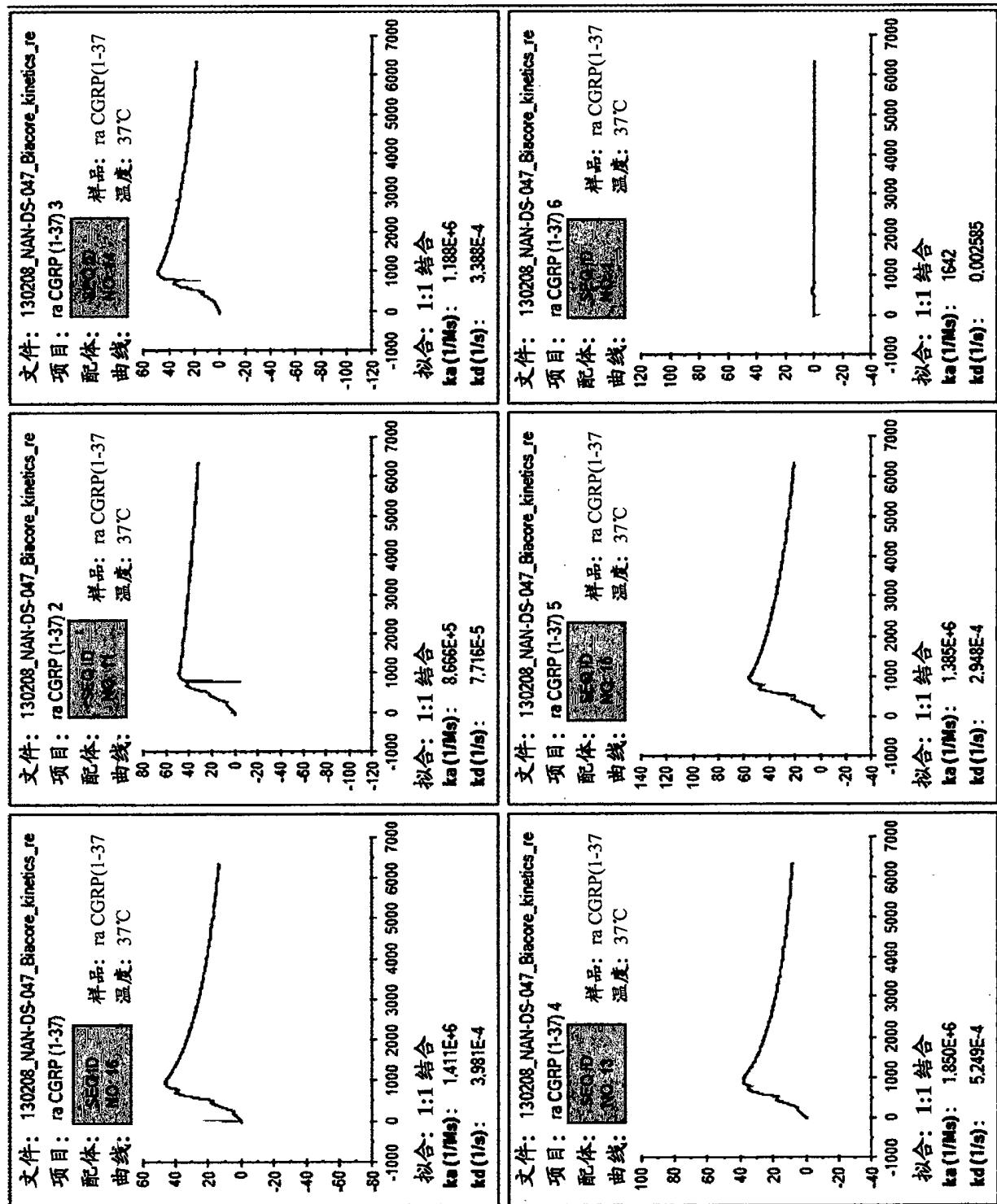


图2C (续)

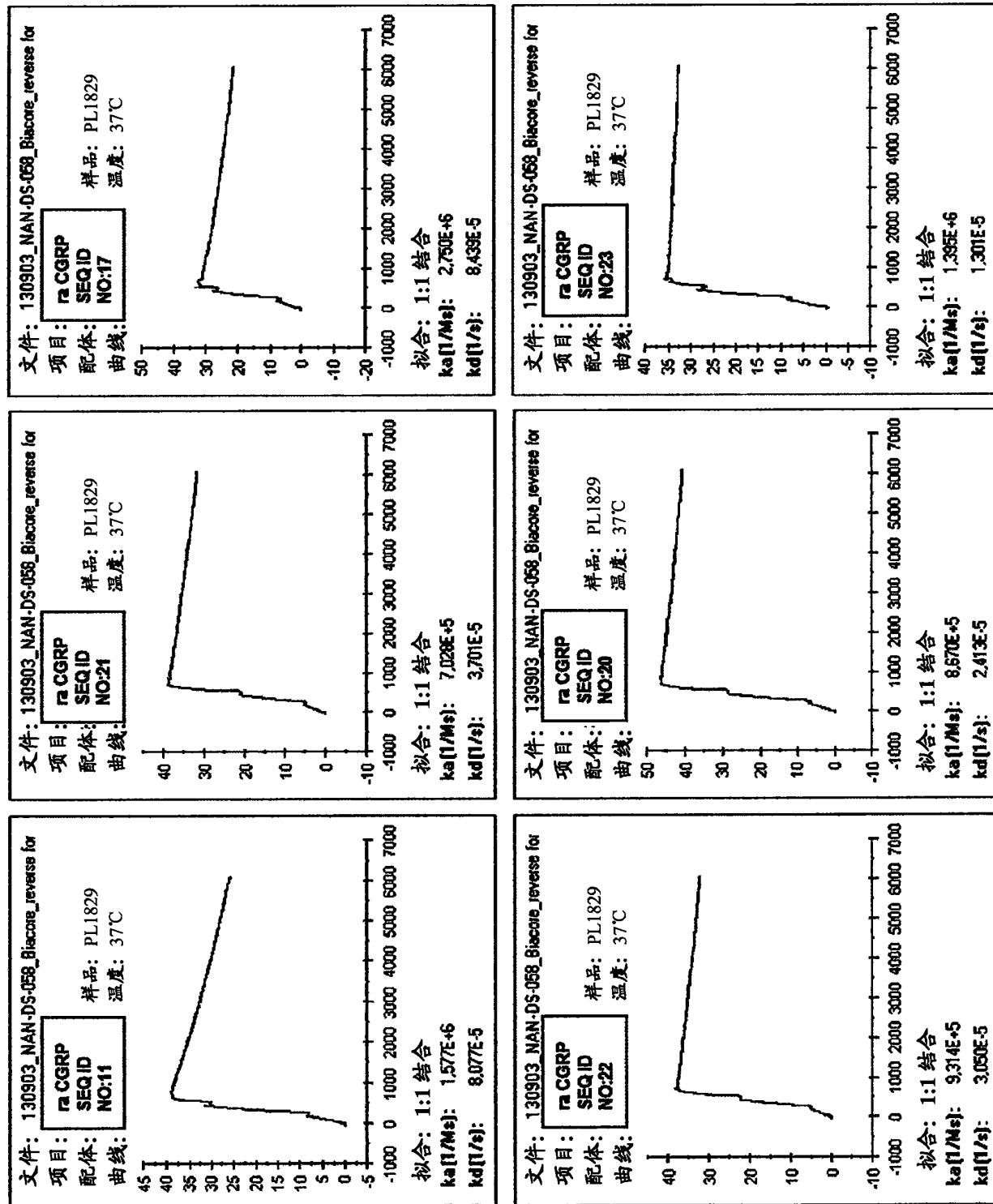


图2C (续)

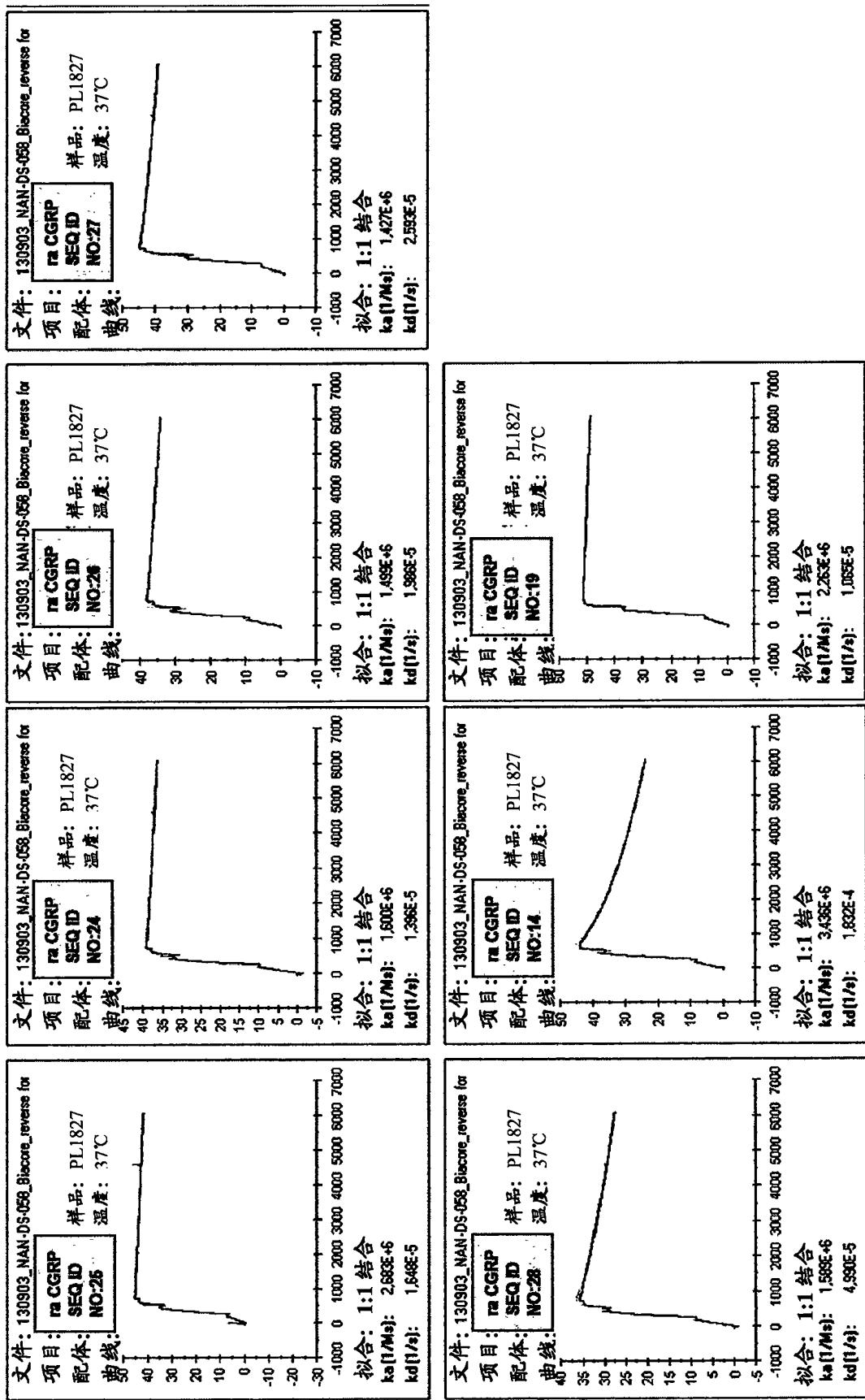


图2C(续)

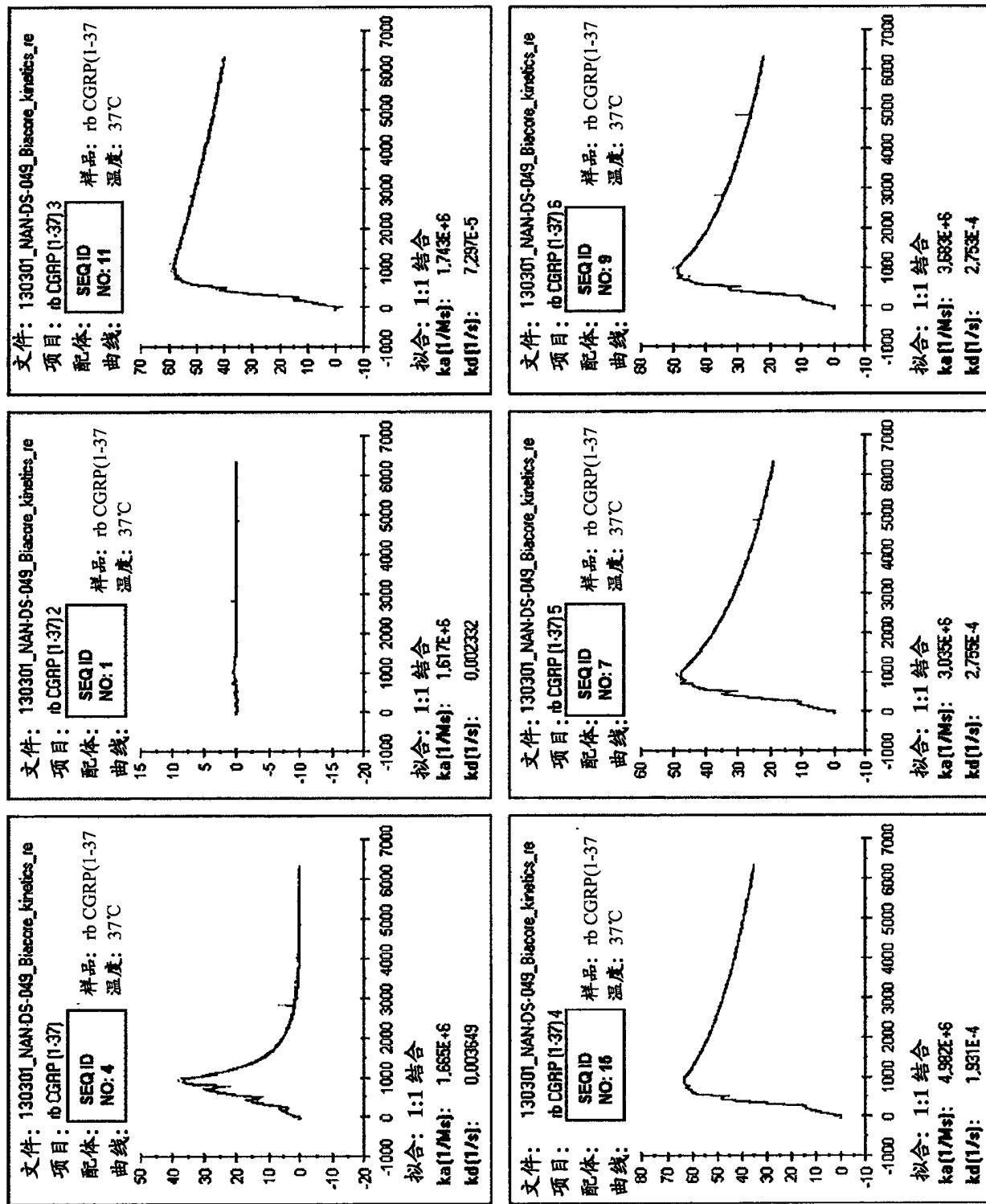


图2D大鼠βCGRP

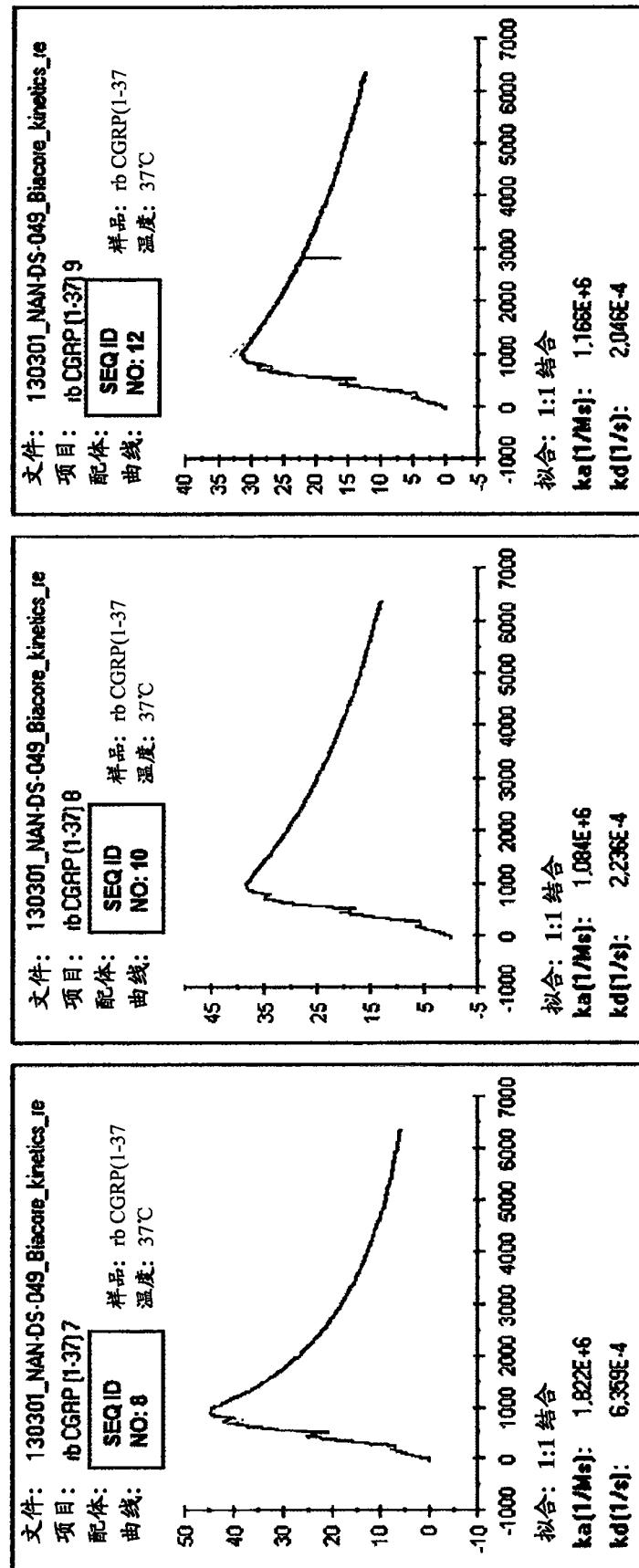


图2D (续)

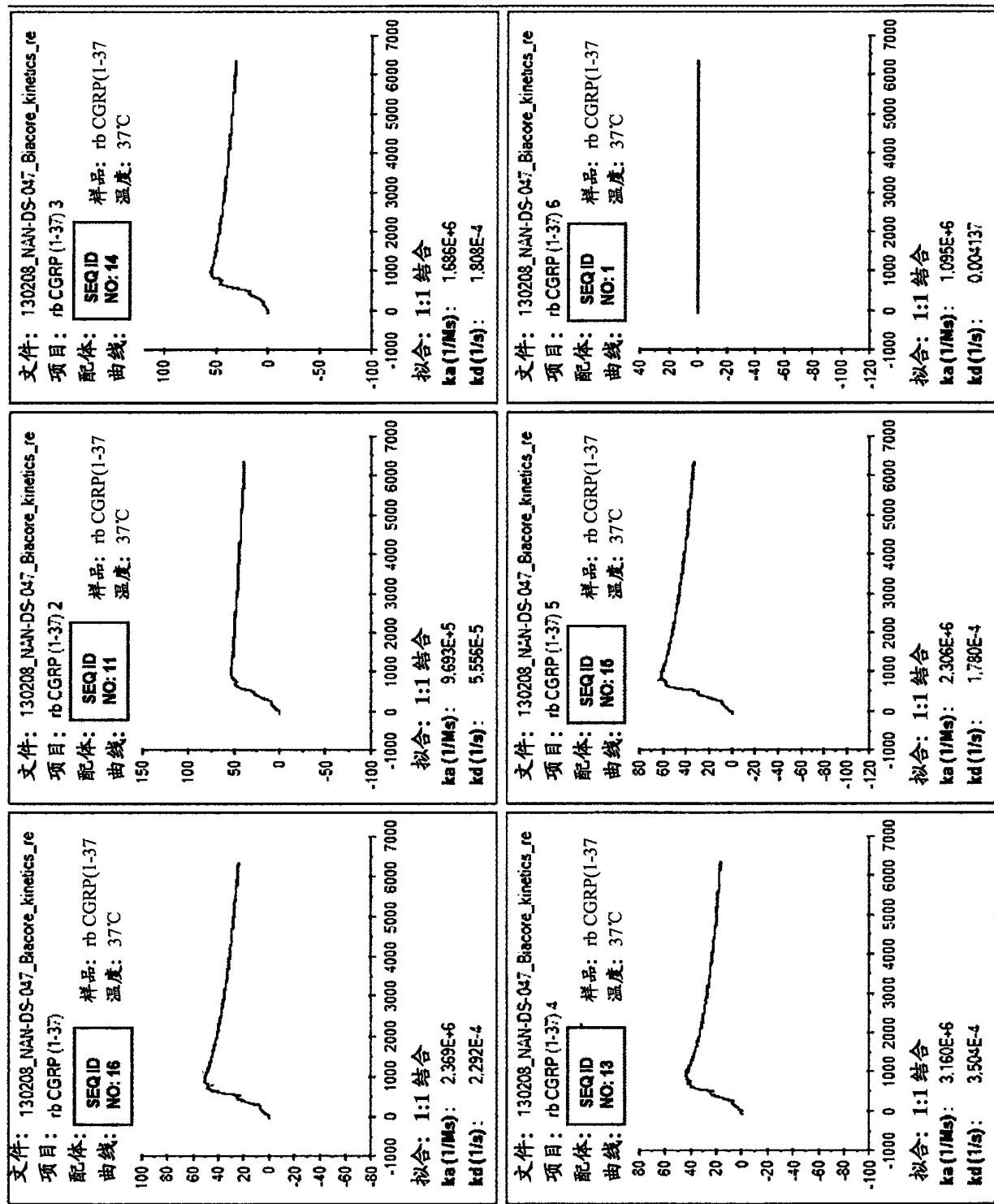


图2D (续)

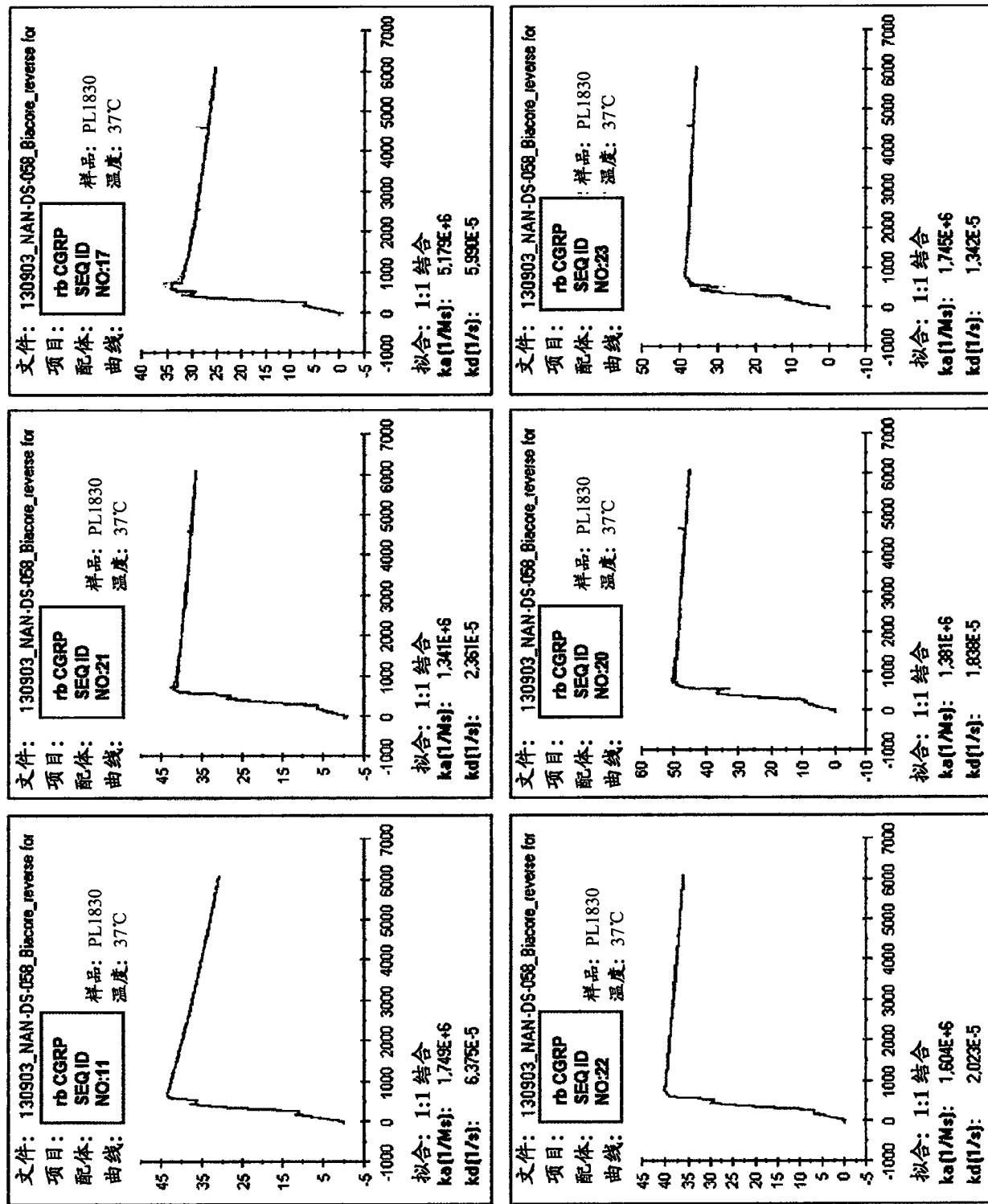


图2D(续)

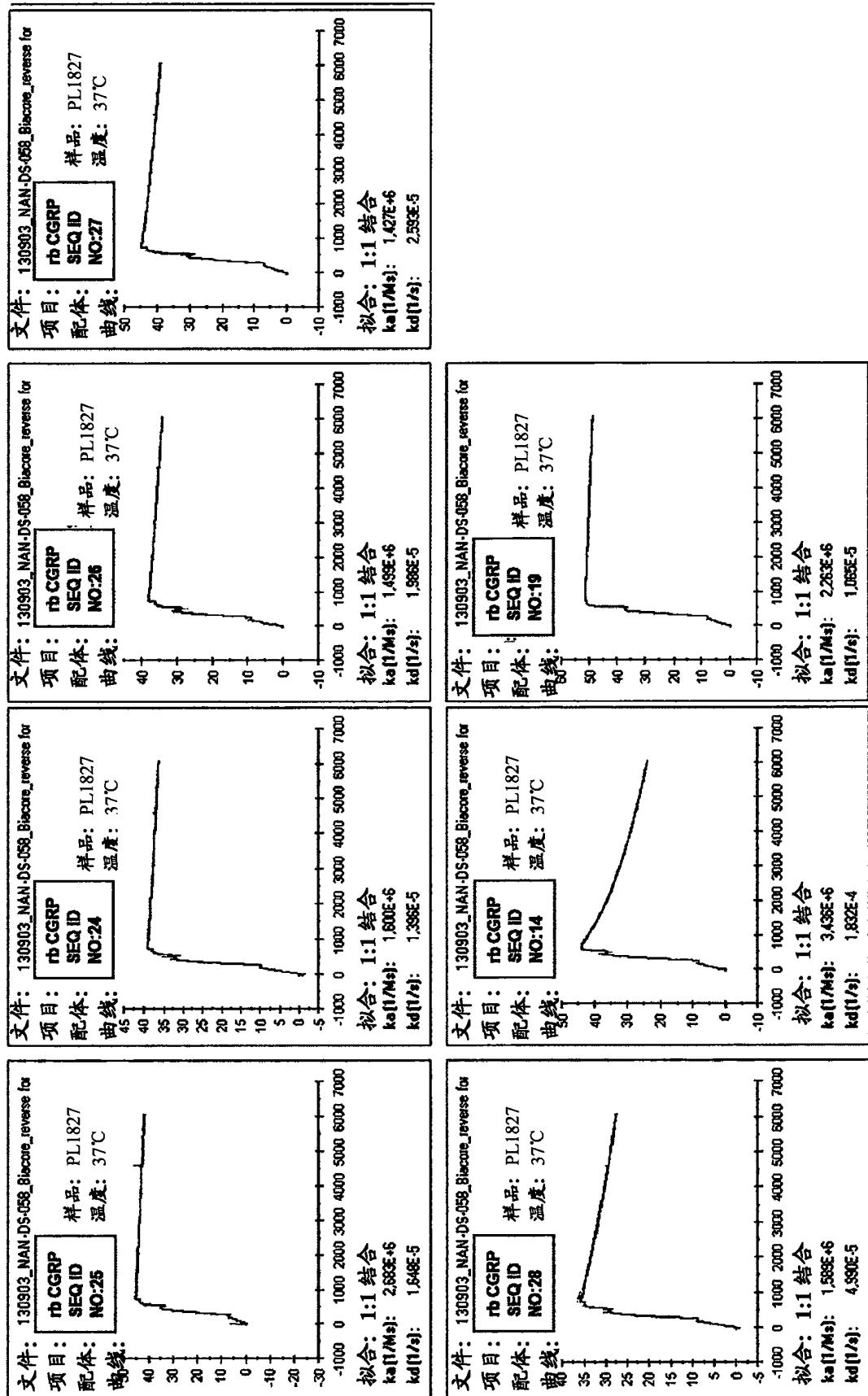
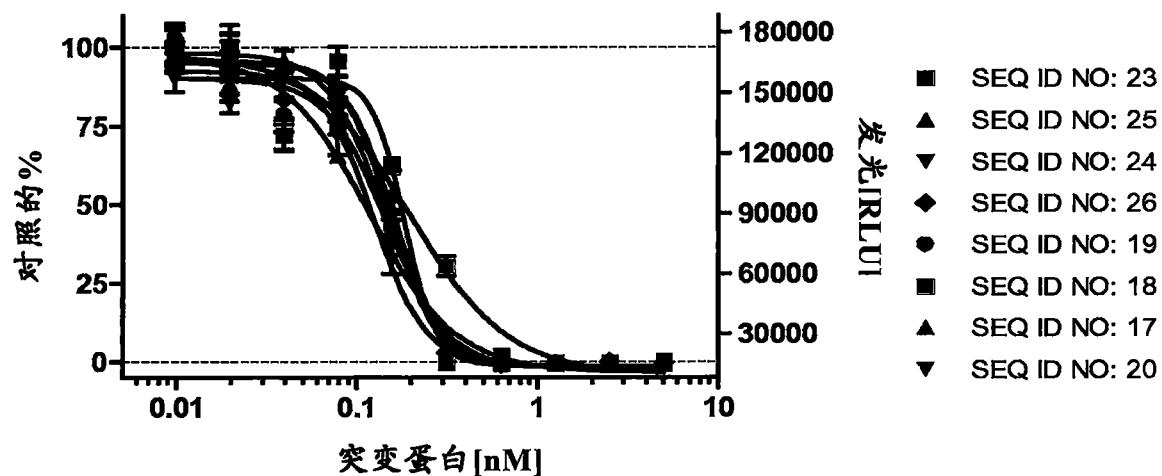
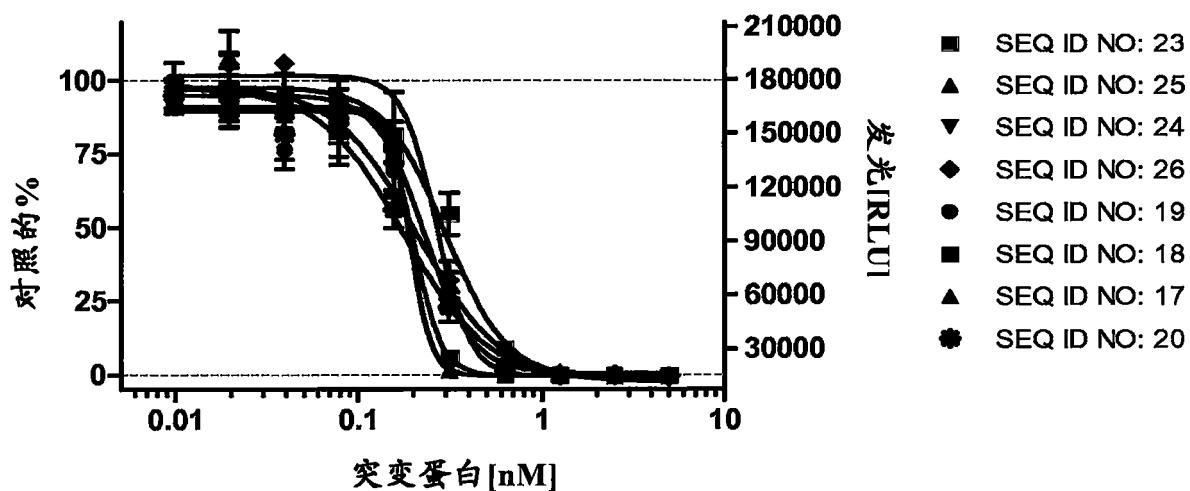


图2D(续)

图3A人 α CGRP图3B人 β CGRP

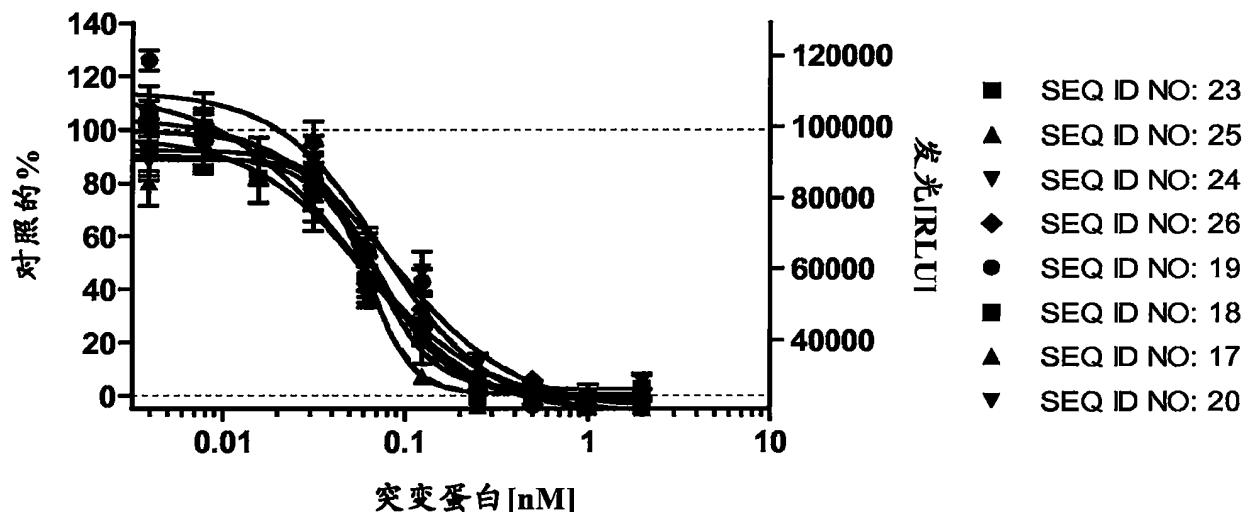


图3C大鼠αCGRP

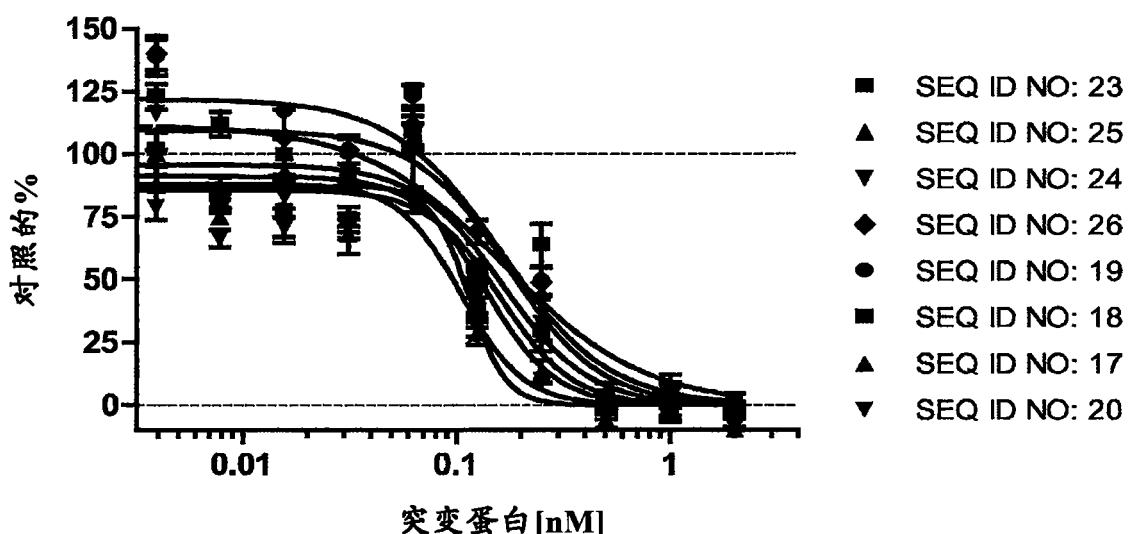
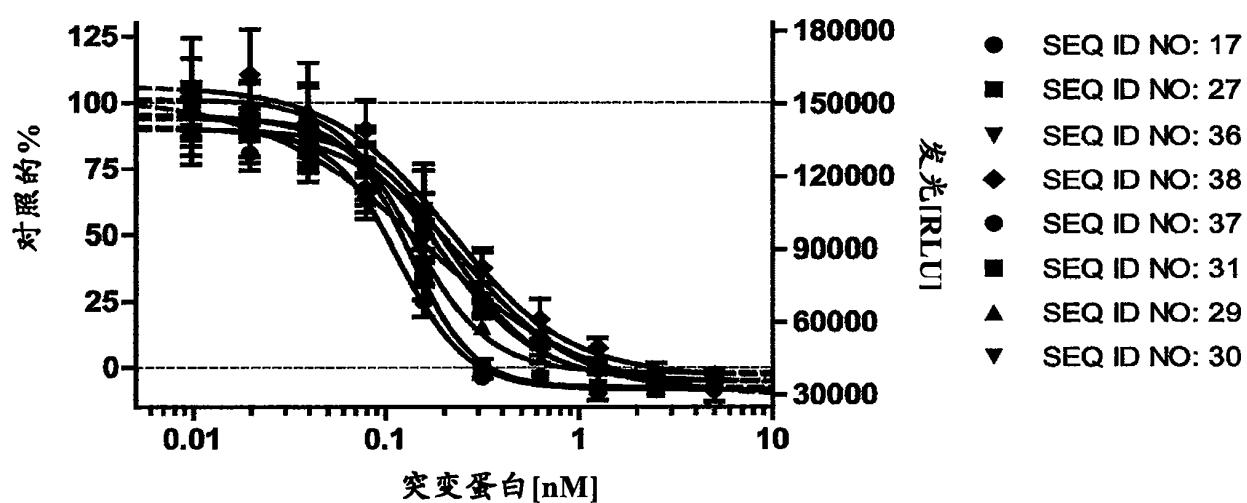
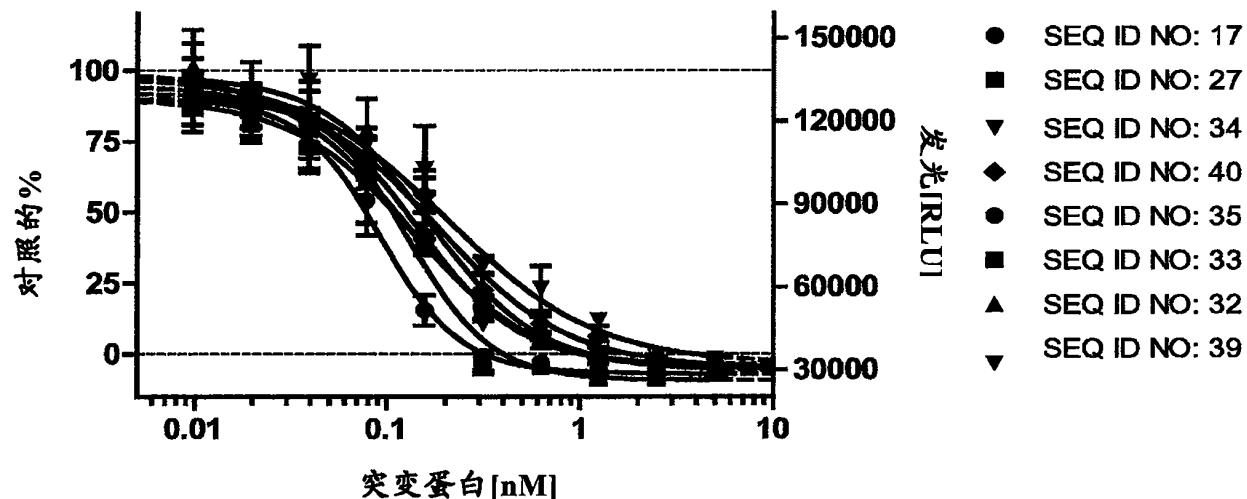


图3D大鼠βCGRP

图4A人 α CGRP

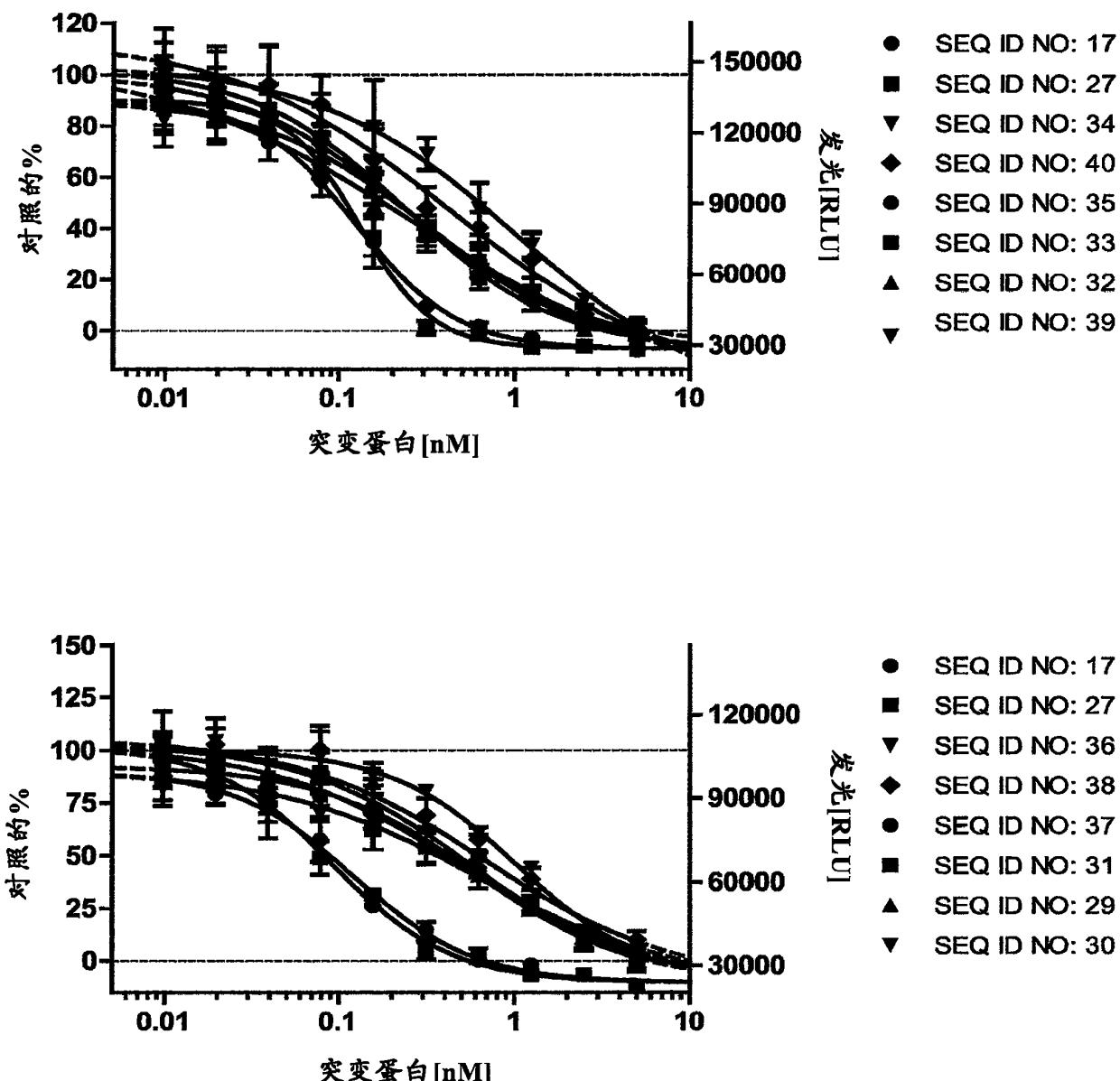


图4B人βCGRP

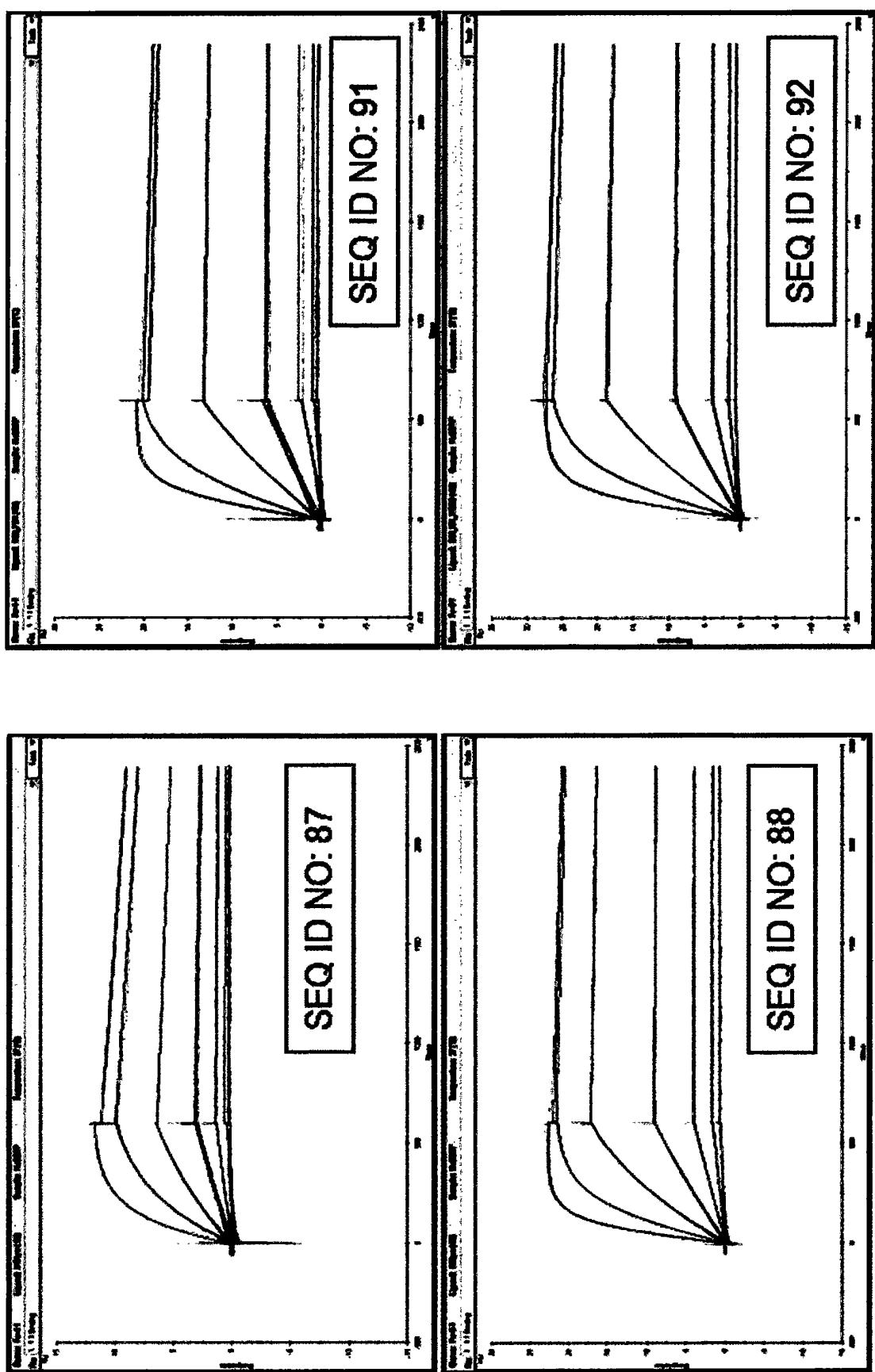


图5

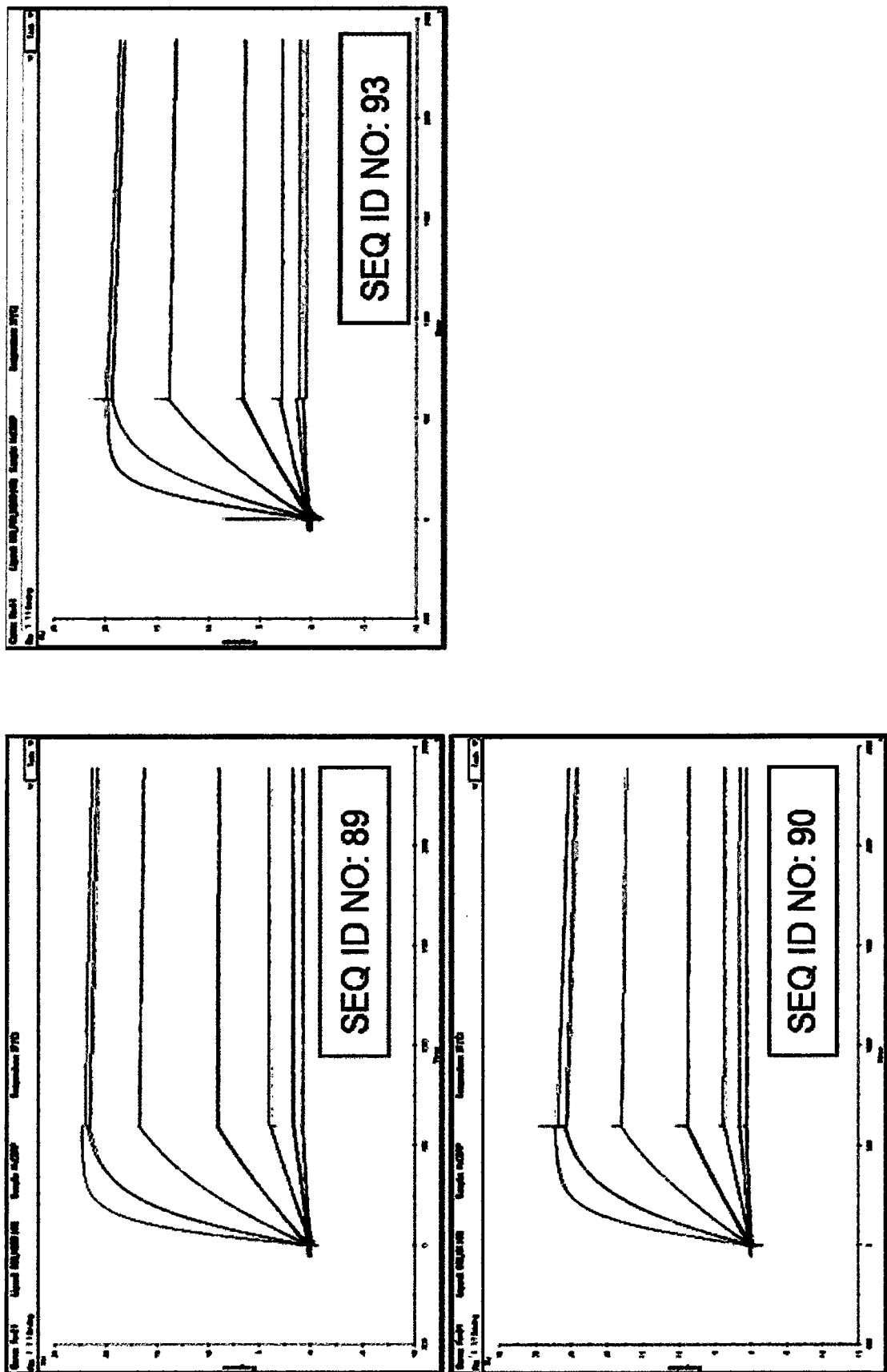


图5(续)