



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107787327 B

(45) 授权公告日 2022.02.08

(21) 申请号 201680028942.8

(22) 申请日 2016.05.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107787327 A

(43) 申请公布日 2018.03.09

(30) 优先权数据
15167922.2 2015.05.18 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.11.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/061058 2016.05.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/184875 EN 2016.11.24

(73) 专利权人 皮里斯制药有限公司
地址 德国弗赖辛-威赫史蒂芬

(72) 发明人 M·欣纳 A·艾乐斯道夫尔

R·S·贝莱巴 M·阿洛伊

A·维登曼 G·马茨钦格

M·修尔斯迈耶

(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

代理人 曹津燕 丁磊

(51) Int.Cl.
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2013174783 A1, 2013.11.28
W0 2012065978 A1, 2012.05.24
CN 1325644 C, 2007.07.11
CN 102770764 A, 2012.11.07

审查员 梁亚茹

权利要求书1页 说明书29页
序列表23页 附图1页

(54) 发明名称

对磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3) 具有亲和力的
人脂质运载蛋白2的突变蛋白

(57) 摘要

本发明涉及针对磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3) 的新型、特异性结合治疗性和/或诊断性蛋白, 该蛋白优选为脂质运载蛋白的突变蛋白, 更优选为脂质运载蛋白2 (Lcn2或NGAL) 的突变蛋白。本发明还涉及编码这种蛋白的核酸分子以及这种蛋白和核酸分子的产生方法和用途。因此, 本发明还涉及包含这种脂质运载蛋白的药学的和/或诊断性组合物, 包括这些蛋白的用途。

1. 一种脂质运载蛋白突变蛋白,其能够以1 nM或更低的 K_D 的亲合力结合磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3),其中,所述突变蛋白由选自SEQ ID NOs: 8-13和15-16中的一个氨基酸序列组成。
2. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白能够以1 nM或更低的 K_D 的亲合力结合小鼠磷脂酰肌醇聚糖-3。
3. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白以比SEQ ID NO: 3的突变蛋白更强的结合亲和力,即更低的 K_D 值结合磷脂酰肌醇聚糖-3。
4. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白由选自SEQ ID NOs: 8-10、12-13和15-16中的一个氨基酸序列组成。
5. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白由选自SEQ ID NOs: 8-13中的一个氨基酸序列组成。
6. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白由选自SEQ ID NOs: 8-10和12-13中的一个氨基酸序列组成。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的突变蛋白,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,所述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。
8. 根据权利要求1-6中任一项所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白与有机分子缀合。
9. 根据权利要求1-6中任一项所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白与酶标记、放射性标记、着色标记、显色标记或发光标记缀合。
10. 根据权利要求1-6中任一项所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白与荧光标记缀合。
11. 根据权利要求1-6中任一项所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白与半抗原、细胞生长抑制剂、毒素、金属络合物或金属缀合。
12. 根据权利要求1-6中任一项所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白与地高辛或生物素缀合。
13. 根据权利要求1-6中任一项所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白与胶体金缀合。
14. 一种核酸分子,其包含编码权利要求1-13中任一项所述的突变蛋白的核苷酸序列。
15. 一种宿主细胞,其含有权利要求14所述的核酸分子。
16. 一种生产权利要求1-13中任一项所述的突变蛋白的方法,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。
17. 一种权利要求1-13中任一项所述的突变蛋白在制备用于结合受试者中磷脂酰肌醇聚糖-3的组合物中的用途。
18. 一种权利要求1-13中任一项所述的突变蛋白在制备用于检测样品中磷脂酰肌醇聚糖-3的组合物中的用途。
19. 一种药物组合物,其包含一种或多种权利要求1-13中任一项所述的突变蛋白。
20. 权利要求1-13中任一项所述的突变蛋白或权利要求19所述的组合物在制备用于预防、改善或治疗与受试者中磷脂酰肌醇聚糖-3水平改变有关的疾病或障碍的组合物中的用途,其中所述疾病或障碍为癌症。

对磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3) 具有亲和力的人脂质运载蛋白2 的突变蛋白

背景技术

[0001] 磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3) 是一种属于糖基-磷脂酰肌醇-锚式硫酸肝素蛋白聚糖的磷脂酰肌醇聚糖家族的癌胚抗原。磷脂酰肌醇聚糖的特征是与称为硫酸肝素糖胺聚糖的复合多糖链共价连接。磷脂酰肌醇聚糖参与在细胞-细胞外基质界面处的细胞信号传导 (Sasisekharan等人, Nat. Rev. Cancer 2:521-528 (2002))。目前为止, 已经识别了人磷脂酰肌醇聚糖家族的六种不同的成员。细胞膜结合的GPC3由通过一个或多个二硫键连接的两个亚基组成。

[0002] GPC3在发育中的胎儿肝脏和胎盘中表达, 并在正常成人组织中下调或沉默。GPC3基因中的突变和消耗是人中胎儿生长过度 (Simpson-Golabi-Behmel) 或辛普森畸形综合征 (Simpson dysmorphia syndrome) 的原因。GPC3在各种癌症, 特别是肝细胞癌 (“HCC”)、黑色素瘤、Wilms’ 肿瘤和肝母细胞瘤中表达 (Jakubovic和Jothy, Ex. MoI. Path. 82:184-189 (2007); Nakatsura和Nishimura, Biodrugs 19 (2):71-77 (2005))。

[0003] HCC是全球癌症相关死亡的第三大原因。每年, HCC造成约100万死亡 (Nakatsura和Nishimura, Biodrugs 19 (2):71-77 (2005))。乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和导致肝硬化的慢性酗酒仍是HCC的最常见原因。在美国, HCC的发病率急剧增加, 部分原因是丙型肝炎病毒的传播。主要通过肝移植或肿瘤切除术治疗HCC。患者的预后依赖于潜在的肝功能和诊断出肿瘤的阶段 (Parikh和Hyman, Am J Med. 120 (3):194-202 (2007))。需要治疗HCC和其它表达GPC3的肿瘤的有效策略。因此, 期望拥有用于靶向GPC3, 优选地在肿瘤细胞上表达的GPC3的手段和方法。

[0004] 国际专利申请No. PCT/EP2011/070119公开了源自人脂质运载蛋白2 (也称为人嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (hNGAL)) 的脂质运载蛋白突变蛋白, 其能够结合GPC3。然而, 本发明提供另外的GPC3结合蛋白, 其具有伴随这些蛋白的先进特征。

附图说明

[0005] 图1: 示出了如在基于MSD的分析中测量的, 选择的优化的GPC3特异性脂质运载蛋白突变蛋白 (SEQ ID NOs: 7、9和10) 在用人GPC3转染的 SK-HEP-1细胞上的结合。优化的克隆以亚纳摩尔至低纳摩尔的EC50值结合GPC3阳性细胞, 而未检测到阴性对照脂质运载蛋白 (SEQ ID NO: 2) 的显著结合。用小鼠或猕猴GPC3转染的SK-HEP-1细胞观察到了类似的结合, 而脂质运载蛋白突变蛋白不结合对照细胞 (SK-HEP-1::载体)。

具体实施方式

[0006] 本发明的一个实施方案涉及一种脂质运载蛋白突变蛋白, 其能够以通过约1nM或更低的 K_D 量度的亲和力结合人GPC3。更优选地, 该突变蛋白可具有通过约1nM或约0.2nM或更低的 K_D 量度的亲和力。在另一个实施方案中, 在细胞结合分析中, 例如在基本上如实施例5所述的分析中, 该突变蛋白能够优选地以约25nM、10nM或3nM或更低的EC50值竞争结合人

GPC3。

[0007] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种脂质运载蛋白突变蛋白,其中所述突变蛋白在对应于hNGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的位置36、40、41、49、52、65、68、70、72、73、77、79、81、87、96、100、103、105、106、125、127、132、134、136和/或175的一个或多个位置处包含置换,优选地为本文所述的置换。

[0008] 在特别的实施方案中,本发明的突变蛋白在对应于成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的序列位置36、40、41、49、52、65、68、70、72、73、77、79、81、87、96、100、103、105、106、125、127、132、134、136和/或175的序列位置处包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20或甚至更多(比如21、22、23、24、25或26)个置换。

[0009] 在进一步特别的实施方案中,根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白包含选自SEQ ID NOs:5-16的氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述突变蛋白与成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 的序列具有至少70%的同一性。优选地,所述突变蛋白在成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的序列位置36、40、41、49、52、65、68、70、72、73、77、79、81、87、96、100、103、105、106、125、127、132、134、136和/或175处包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20或甚至更多(比如21、22、23、24、25或26)个突变的氨基酸残基。

[0010] 在一些另外的实施方案中,为了促进在真核细胞中的表达,在根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的相应序列位置处移除成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的位置65处的天然N-糖基化位点Asn,例如,通过位置65处的从Asn至Asp的突变。此外,优选地,根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白上不存在N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)。

[0011] 在一些其它的实施方案中,例如,为了进一步优化稳定性,根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白在对应于成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的序列位置28的序列位置处不包含突变。

[0012] 在另一个实施方案中,本发明的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、细胞生长抑制剂、毒素、金属络合物、金属和胶体金的化合物缀合。所述突变蛋白可在其N-末端和/或其C-末端与融合配偶体融合,该融合配偶体是蛋白、蛋白结构域或肽。

[0013] 在另一个实施方案中,所述突变蛋白与延长该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的化合物缀合。

[0014] 在另一个实施方案中,本发明的突变蛋白是GPC3的拮抗剂。

[0015] 在另一实施方案中,本发明涉及一种核酸分子,该核酸分子包含编码本发明的突变蛋白的核苷酸序列。

[0016] 在再另一个实施方案中,本发明涵盖一种宿主细胞,该宿主细胞含有所述核酸分子。

[0017] 本发明还包括一种治疗肿瘤,优选地治疗肝肿瘤或黑色素瘤的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用包含本文所述的突变蛋白的药物组合物。

[0018] 一方面,本发明涉及针对GPC3或GPC3特异性的新型特异性结合蛋白。本发明的蛋白可用于治疗性和/或诊断性目的。本发明的蛋白尤其包含本文所述的hNGAL突变蛋白。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,若本发明的蛋白能够区分靶标和一个或多个参照靶标,则其“特异性地结合”这种靶标(本文中为GPC3)。可以例如根据蛋白质印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-试验、FACS、IHC和肽扫描来测定“特异性结合”。

[0019] 同样地,另一方面,本发明涉及一种hNGAL突变蛋白,其中所述突变蛋白在对应于成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的位置36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132和/或134的一个或多个位置处包含置换,优选地为本文所述的置换。

[0020] 另一方面,本发明涉及一种包含hNGAL突变蛋白的多肽,其中所述 hNGAL突变蛋白在对应于成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的位置36、40、41、49、52、65、68、70、72、73、77、79、81、87、96、100、103、105、106、125、127、132、134、136和/或175的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20或甚至更多(比如21、22、23、24、25或26)个氨基酸位置处包含置换,优选地为本文所述的置换。

[0021] 类似地,本发明涉及一种源自hNGAL的脂质运载蛋白突变蛋白,其具有圆柱形 β 折叠片超二级结构区,所述结构区包含通过在一端的4个环逐对连接的8个 β 链,以由此限定结合口袋,其中所述4个环中的至少3个的每一个的至少一个氨基酸已经突变,并且其中所述脂质运载蛋白以可检测的亲合力有效结合GPC3,一种非天然靶标。有利地,所述脂质运载蛋白突变蛋白在对应于hNGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的氨基酸位置36、40、41、49、52、65、68、70、72、73、77、79、81、87、96、100、103、105、106、125、127、132、134、136和/或175的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸位置处包含置换,优选地为本文所述的置换。

[0022] 本发明还涉及编码这些蛋白的核酸。

[0023] 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。本文所用术语“对应”或“相应”还包括,位置不仅由之前的核苷酸/氨基酸的数量决定。因此,由于在(突变体或野生型)脂质运载蛋白中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脂质运载蛋白5'-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。

[0024] 因此,根据本发明的“对应/相应位置”,优选地理解,核苷酸/氨基酸在指定数字方面可以不同,但可仍有类似的相邻核苷酸/氨基酸。术语“对应/相应位置”还包含所述可被交换、缺失或添加的核苷酸/氨基酸。

[0025] 具体而言,为了确定与本发明的hNGAL脂质运载蛋白突变蛋白不同的脂质运载蛋白的氨基酸序列的核苷酸残基或氨基酸残基是否对应于所描述的hNGAL脂质运载蛋白突变蛋白的核苷酸序列或氨基酸序列(特别是SEQ ID NOs:5-16中任一个或在NGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列的位置36、40、41、49、52、65、68、70、72、73、77、79、81、87、96、100、103、105、106、125、127、132、134、136和/或175处具有一个或多个氨基酸置换的突变蛋白)中的某一位置,技术人员可利用本领域熟知的手段和方法,如手动地或通过使用计算机程序例如使用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,SEQ ID NOs:1-8中任一个的突变蛋白或在hNGAL (SEQ ID

NO:1)的线性多肽序列的位置36、40、41、49、52、65、68、70、72、73、77、79、81、87、96、100、103、105、106、125、127、132、134、136和/或175处具有一个或多个氨基酸置换的突变蛋白可作为“受试序列”，而与 hNGAL不同的脂质运载蛋白的氨基酸序列作为“查询序列”。

[0026] 鉴于以上，本领域技术人员因此容易确定本文描述的hNGAL中哪个突变的氨基酸位置对应于骨架中除hNGAL以外的氨基酸。具体地说，本领域技术人员可以将本文所述突变蛋白的氨基酸序列(特别是本发明的hNGAL 突变蛋白)与不同突变蛋白的氨基酸序列进行比对，以确定所述突变蛋白的哪个(哪些)氨基酸对应于所述不同脂质运载蛋白的氨基酸序列的相应氨基酸。更具体地说，本领域技术人员能够因此确定所述不同脂质运载蛋白的氨基酸序列的哪个氨基酸对应于在hNGAL (SEQ ID NO:1)的线性多肽序列的位置36、40、41、49、52、65、68、70、72、73、77、79、81、87、96、100、103、105、106、125、127、132、134、136和/或175处的氨基酸。

[0027] 本发明的针对GPC3或GPC3特异性的蛋白包含任意数目的基于所限定的蛋白骨架的特异性结合蛋白突变蛋白。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“参照”骨架相比，一个或多个核苷酸或氨基酸的交换、缺失或插入。优选地，分别被交换、缺失或插入的核苷酸或氨基酸的数目是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或甚至更多(比如21、22、23、24、25和26)个。然而，优选地，本发明的突变蛋白仍然能够结合GPC3。

[0028] 如本文所用，将“脂质运载蛋白”定义为重量为约18-20kDA的单体蛋白，其具有圆柱形 β 折叠片超二级结构区，所述结构区包含通过在一端的多个(优选为4个)环逐对连接的多个(优选为8个) β 链，以由此限定结合口袋。在脂质运载蛋白家族成员中，正是所述环在本应刚性的脂质运载蛋白骨架中的这种多样性产生多种不同的结合模式，每一种模式能够容纳不同大小、形状和化学特征的靶标(参见如Flower DR., The lipocalin protein family: structure and function, Biochem J. 318:1-14 (1996); Flower DR., 等人, The lipocalin protein family: structural and sequence overview. Biochim. Biophys. Acta 1482:9-24 (2000); Skerra, A. Biochim. Biophys. Acta 1482:337-350 (2000))。事实上，蛋白的脂质运载蛋白家族已经天然进化到结合范围广泛的配体，具有非常低水平的整体序列保守性(通常具有少于20%的序列同一性)，但保留高保守性的整体折叠模式。不同脂质运载蛋白的位置间的对应关系为本领域技术人员所熟知。例如，见，美国专利No. 7,250,297。

[0029] 在优选的实施方案中，本发明的蛋白是脂质运载蛋白2(Lcn 2,也称为人嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白、hNGAL或噬铁蛋白(siderocalin))的突变蛋白。术语“人嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白”、“hNGAL”、“成熟hNGAL”、“脂质运载蛋白2”、“人脂质运载蛋白2”、“成熟人脂质运载蛋白2”和“Lcn2”可互换使用并指具有 SWISS-PROT/UniProt数据库登录号P80188(同种型1)的成熟hNGAL。优选示于SWISS-PROT/UniProt数据库登录号P80188的氨基酸序列作为“参照序列”。

[0030] 最优选地，优选SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列作为“参照序列”。SEQ ID NO:1示出了成熟hNGAL。本文可互换使用术语“参照序列”和“野生型序列”。由于切除了氨基酸1-20(MPLGLLWLGL ALLGALHAQA)的信号肽，该蛋白的成熟形式具有完整序列的氨基酸21至198。该蛋白进一步具有在成熟蛋白的位置76和175处的氨基酸残基之间形成的二硫键。

[0031] 在突变的氨基酸序列位置之外,本发明的蛋白可包含“亲本”蛋白骨架(例如脂质运载蛋白)的野生型(天然)氨基酸序列;可选地,hNGAL 突变蛋白还可在经受诱变的序列位置之外含有不干扰突变蛋白的结合活性和折叠的氨基酸突变。可以采用已建立的标准方法(Sambrook,J.等人, Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY (2001))在DNA水平上完成这种突变。氨基酸序列的可能改变是插入或缺失以及氨基酸置换。

[0032] 这种置换可以是保守的,即氨基酸残基被化学性质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换: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-保守性改变引入氨基酸序列。此外,代替替换单一氨基酸残基,还可以使亲本蛋白骨架的一级结构插入或缺失一个或多个连续氨基酸,只要这些缺失或插入导致可被本领域技术人员容易测得稳定的折叠/功能的突变蛋白。

[0033] 本领域技术人员将理解可用于制备本发明考虑的但未在本文中明确公开其蛋白或核酸序列的蛋白突变蛋白的方法。作为概述,氨基酸序列的这种修饰包括如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脂质运载蛋白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脂质运载蛋白突变蛋白对给定靶标的亲和力。另外,如果需要,可以引入突变以调节突变蛋白的某些特征,例如以改善折叠稳定性、血清稳定性、蛋白质抗性或水溶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。

[0034] 因此,本发明还包括本文公开的蛋白的功能变体,其与参照蛋白有阈值序列同一性或序列同源性。“同一性”或“序列同一性”指的是衡量它们的相似性或关系的序列特性。本发明使用的术语“序列同一性”或“同一性”是指本发明多肽的序列与讨论的序列(同源性)比对之后,形成配对的相同残基相对于这两个序列中较长一个的残基数量的百分比。通过用相同残基的数量除以残基总数再使结果乘以100来测定同一性百分比。本文使用的术语“同源性”为其通常含义,包括相同的氨基酸以及在两个蛋白的线性氨基酸序列中的等效位置被认为是保守置换的氨基酸(例如,用天冬氨酸残基交换谷氨酸残基)。

[0035] 序列同源性或序列同一性百分比,比如,可以使用程序BLASTP blastp 2.2.5版(2002年11月16日;参见Altschul,S.F.等人Nucl.Acids Res.25, 3389-3402(1997))进行测定。在这个实施方案中,同源性百分比基于包括前肽序列的完整多肽序列的比对(矩阵:BLOSUM 62;间隙权重:11.1;截止值设定为 10^{-3}),优选地在配对比较中使用野生型蛋白骨架作为参照。其计算为,以BLASTP程序输出的结果表示的“阳性”(同源氨基酸)数除以程序选择用于比对的氨基酸总数的百分比。

[0036] 还可以特意地将其它氨基酸序列位置突变为半胱氨酸以便引入新的反应性基团,例如,用于缀合至其它化合物,如聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、生物素、肽或蛋白质,或用于形成非天然存在的二硫键。关于人脂质运载蛋白2的突变蛋白,将半胱氨酸残基引入到包括人脂质运载蛋白2突变蛋白的脂质运载蛋白的氨基酸序列中的这种突变的示例性可能性包括在对应于hNGAL的野生型序列的序列位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146或158的序列位置中的至少一个处引入半胱氨酸(Cys)。在一些实施方案中,相比于

SWISS-PROT/UniProt数据库登录号 P80188的序列,本发明的人脂质运载蛋白2突变蛋白的序列中的半胱氨酸已被另一个氨基酸残基替换,所述相应的半胱氨酸可以被重新引入所述序列。作为示例性实例,在这种情况下,通过恢复到最初存在于SWISS-PROT 登录号P80188的序列中的半胱氨酸,可以引入在氨基酸位置87处的半胱氨酸残基。在氨基酸位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146 和/或158中任一处的一侧生成的硫醇部分可用于PEG化或HES化突变蛋白,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。

[0037] 在一些优选的实施方案中,根据本发明的突变蛋白以约1nM或更低,包括0.5nM或更低、0.3nM或更低和0.2nM或更低的 K_D 结合人或小鼠 GPC3。本发明的突变蛋白可特异地结合GPC3的成熟、折叠生物活性形式的一个或多个连续、不连续或构象表位。

[0038] 可通过本领域技术人员已知的多种方法测量(并由此测定突变蛋白-配体复合物的 K_D 值)本发明的蛋白(例如脂质运载蛋白突变蛋白)与选定靶标(在本发明中为GPC3)的结合亲和力。这种方法包括但不限于,荧光滴定、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(BIAcore)。这样的方法在本领域中是公知的,并且其实例也在下文详述。

[0039] 本发明的突变蛋白的氨基酸序列可与成熟人脂质运载蛋白2具有高序列同一性。在本上下文中,本发明的蛋白可与选自SEQ ID NO:1的序列的蛋白具有至少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,例如选自SEQ ID NOs: 5-16的氨基酸序列的突变蛋白。

[0040] 本发明还包括选自SEQ ID NOs:5-16的序列的蛋白的结构同源物,所述结构同源物与所述蛋白具有大于约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%和最优地大于95%的序列同源性或序列同一性。

[0041] 术语“磷脂酰肌醇聚糖-3”、“磷脂酰肌醇聚糖蛋白聚糖3”、“GPC3”、“OTTHUMP00000062492”、“GTR2-2”、“SGB”、“DGSX”、“SDYS”、“SGBS”、“OCI-5”和“SGBSI”可互换使用,并包括人磷脂酰肌醇聚糖-3的变体、同种型和物种同系物。示例性人磷脂酰肌醇聚糖-3的完整氨基酸序列具有Genbank/NCBI登录号NM_004484。

[0042] 如上所述,本发明的突变蛋白优选地作为GPC3的拮抗剂。在一些实施方案中,本发明的突变蛋白可通过抑制GPC3分子结合其同源配体或与其同源配体相互作用的能力而作为GPC3的拮抗剂。

[0043] 另一方面,本发明包括特异地结合GPC3的人脂质运载蛋白2的突变蛋白。在这个意义上,GPC3可以看作野生型人脂质运载蛋白2的非天然配体,这里“非天然配体”指在生理条件下不结合人脂质运载蛋白2的化合物。通过工程化野生型脂质运载蛋白,如在某些位置处具有突变的人脂质运载蛋白2,本发明人证明了对非天然配体的高亲和力和高特异性是可能的。一方面,至少在编码成熟人脂质运载蛋白2(SEQ ID NO:1)的线性多肽序列的序列位置36、40、41、49、52、65、68、70、72、73、77、79、81、87、96、100、103、105、106、125、127、132、134、136和/或175 中任一个的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和/或20个核苷酸三联体处,可以通过允许用核苷酸三联体的子集在这些位置处进行置换来进行随机诱变。

[0044] 此外,所述脂质运载蛋白可用于产生突变蛋白,该突变蛋白在对应于成熟人脂质运载蛋白2(SEQ ID NO:1)的线性多肽序列的序列位置36、40、41、49、52、65、68、70、72、73、

77、79、81、87、96、100、103、105、106、125、127、132、134、136和/或175的序列位置处中任一个或多个（包括至少在任2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个）序列位置处具有突变的氨基酸残基。

[0045] 在序列位置36处的置换可以是例如置换Leu 36→Val或Arg。在序列位置40处的置换可以是例如置换Ala 40→Leu、Val或Gly。在序列位置41处的置换可以是例如置换Ile 41→Leu、Arg、Met、Gly或Ala。在序列位置49处的置换可以是例如置换Gln 49→Pro或Leu。在序列位置52处的置换可以是例如置换Tyr 52→Arg或Trp。在序列位置68处的置换可以是例如置换Asn 65→Asp。在序列位置68处的置换可以是例如置换Ser 68→Val、Gly、Asn或Ala。在序列位置70处的置换可以是例如置换Leu 70→Arg、Ser、Ala或Val。在序列位置72处的置换可以是例如置换Arg 72→Asp、Trp、Ala或Gly。在序列位置73处的置换可以是例如置换Lys 73→Gly、Arg、Asn、Glu或Ser。在序列位置76处的置换可以是例如置换Cys 76→Val或Ile。在序列位置77处的置换可以是例如置换Asp 77→His、Met、Val、Leu、Thr或Lys。在序列位置79处的置换可以是例如置换Trp 79→Lys、Ser或Thr。在序列位置81处的置换可以是例如置换Arg 81→Gly。在序列位置81处的置换可以是例如置换Cys 87→Ser。在序列位置96处的置换可以是例如置换Asn 96→Arg、Asp、Gln或Pro。在序列位置100处的置换可以是例如置换Tyr 100→Gly、Glu、Pro或Gln。在序列位置103处的置换可以是例如置换Leu 103→Glu、Gln、Asn、Gly、Ser或Tyr。在序列位置106处的置换可以是例如置换Ser 105→Ala。在序列位置106处的置换可以是例如置换Tyr 106→Asn、Ser或Thr。在序列位置125处的置换可以是例如置换Lys 125→Glu。在序列位置127处的置换可以是例如置换Ser 127→Arg或Tyr。在序列位置132处的置换可以是例如置换Tyr 132→Trp或Ile。在序列位置134处的置换可以是例如置换Lys 134→Ala或Phe。在序列位置134处的置换可以是例如置换Thr 136→Ile。在序列位置175处的置换可以是例如置换Cys 175→Ala。需注意，置换参照序列中相应氨基酸的任意氨基酸可被相应保守性氨基酸交换。特别地，保守置换是以下组的成员之间的替换：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。

[0046] 在一个实施方案中，本发明的结合GPC3的突变蛋白包括以下氨基酸替换：

[0047] (a) Leu 36→Val; Ile 41→Leu; Gln 49→Leu; Tyr 52→Arg; Asn 65→Asp; Ser 68→Val; Leu 70→Ser; Arg 72→Trp; Lys 73→Arg; Asp 77→His; Trp 79→Lys; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→Asp; Tyr 100→Gly; Leu 103→Gln; Tyr 106→Asn; Lys 125→Glu; Ser 127→Arg; Tyr 132→Trp; Lys 134→Ala;

[0048] (b) Leu 36→Val; Ala 40→Val; Ile 41→Arg; Gln 49→Pro; Tyr 52→Arg; Asn 65→Asp; Ser 68→Gly; Leu 70→Ser; Lys 73→Gly; Asp 77→His; Trp 79→Lys; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→Asp; Tyr 100→Gly; Leu 103→Glu; Tyr 106→Asn; Lys 125→Glu; Ser 127→Arg; Tyr 132→Trp; Lys 134→Phe;

[0049] (c) Leu 36→Val; Ala 40→Gly; Ile 41→Met; Gln 49→Leu; Tyr 52→Arg; Asn 65→Asp; Leu 70→Ala; Lys 73→Asn; Asp 77→His; Trp 79→Lys; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→Gln; Tyr 100→Gly; Leu 103→Glu; Tyr 106→Asn; Lys 125→Glu; Ser 127→Arg; Tyr 132→Trp; Lys 134→Phe;

[0050] (d) Leu 36→Arg; Ala 40→Val; Ile 41→Gly; Gln 49→Pro; Tyr 52→Trp; Asn 65→Asp; Ser 68→Asn; Leu 70→Arg; Arg 72→Ala; Lys 73→Arg; Asp 77→Leu; Trp 79→Ser; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→Gln; Tyr 100 →Glu; Leu 103→Asn; Ser 105→Ala; Tyr 106→Asn; Lys 125→Glu; Ser 127 →Tyr; Tyr 132→Ile; Lys 134→Phe; Thr 136→Ile;

[0051] (e) Leu 36→Arg; Ala 40→Val; Ile 41→Gly; Gln 49→Pro; Tyr 52→Trp; Asn 65→Asp; Ser 68→Asn; Leu 70→Arg; Arg 72→Ala; Lys 73→Arg; Asp 77→Thr; Trp 79→Ser; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→Gln; Tyr 100 →Glu; Leu 103→Gly; Ser 105→Ala; Tyr 106→Asn; Lys 125→Glu; Ser 127 →Tyr; Tyr 132→Ile; Lys 134→Phe; Thr 136→Ile;

[0052] (f) Leu 36→Arg; Ala 40→Gly; Ile 41→Ala; Gln 49→Pro; Tyr 52→Trp; Asn 65→Asp; Ser 68→Asn; Leu 70→Arg; Arg 72→Ala; Lys 73→Arg; Asp 77→Val; Trp 79→Ser; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→Pro; Tyr 100 →Glu; Leu 103→Asn; Ser 105→Ala; Tyr 106→Ser; Lys 125→Glu; Ser 127 →Tyr; Tyr 132→Ile; Lys 134→Phe; Thr 136→Ile;

[0053] (g) Leu 36→Arg; Ala 40→Val; Ile 41→Ala; Gln 49→Pro; Tyr 52→Arg; Asn 65→Asp; Ser 68→Ala; Leu 70→Arg; Arg 72→Ala; Lys 73→Arg; Asp 77→Leu; Trp 79→Ser; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→Arg; Tyr 100 →Glu; Leu 103→Tyr; Ser 105→Ala; Tyr 106→Asn; Lys 125→Glu; Ser 127 →Tyr; Tyr 132→Ile; Lys 134→Phe; Thr 136→Ile;

[0054] (h) Leu 36→Arg; Ala 40→Val; Ile 41→Ala; Gln 49→Pro; Tyr 52→Arg; Asn 65→Asp; Ser 68→Asn; Leu 70→Val; Arg 72→Ala; Lys 73→Gly; Asp 77→Lys; Trp 79→Ser; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→Arg; Tyr 100 →Pro; Leu 103→Asn; Ser 105→Ala; Tyr 106→Asn; Lys 125→Glu; Ser 127 →Tyr; Tyr 132→Ile; Lys 134→Phe; Thr 136→Ile;

[0055] (i) Leu 36→Arg; Ala 40→Leu; Ile 41→Gly; Gln 49→Pro; Tyr 52→Trp; Asn 65→Asp; Ser 68→Asn; Leu 70→Arg; Arg 72→Ala; Lys 73→Arg; Asp 77→Met; Trp 79→Ser; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→Gln; Tyr 100 →Glu; Leu 103→Ser; Ser 105→Ala; Tyr 106→Asn; Lys 125→Glu; Ser 127 →Tyr; Tyr 132→Ile; Lys 134→Phe;

[0056] (j) Leu 36→Arg; Ala 40→Val; Ile 41→Gly; Gln 49→Pro; Tyr 52→Trp; Asn 65→Asp; Ser 68→Asn; Leu 70→Arg; Arg 72→Ala; Lys 73→Gly; Cys 76→Val; Asp 77→Lys; Trp 79→Thr; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→ Gln; Tyr 100→Glu; Leu 103→Asn; Ser 105→Ala; Tyr 106→Thr; Lys 125 →Glu; Ser 127→Tyr; Tyr 132→Ile; Lys 134→Phe; Cys 175→Ala;

[0057] (k) Leu 36→Arg; Ala 40→Val; Ile 41→Gly; Gln 49→Pro; Tyr 52→Arg; Asn 65→Asp; Ser 68→Gly; Leu 70→Arg; Arg 72→Gly; Lys 73→Glu; Cys 76→Ile; Asp 77→Lys; Trp 79→Ser; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→ Gln; Tyr 100→Gln; Leu 103→Asp; Ser 105→Ala; Tyr 106→Thr; Lys 125 →Glu; Ser 127→Tyr; Tyr 132→Ile; Lys 134→Phe; Thr 136→Ile; Cys 175 →Ala;或

[0058] (1) Leu 36→Arg; Ala 40→Val; Ile 41→Gly; Gln 49→Pro; Tyr 52→Arg; Asn 65→Asp; Ser 68→Gly; Leu 70→Arg; Arg 72→Asp; Lys 73→Ser; Cys 76→Val; Asp 77→Thr; Trp 79→Ser; Arg 81→Gly; Cys 87→Ser; Asn 96→Gln; Tyr 100→Glu; Leu 103→Asn; Ser 105→Ala; Tyr 106→Thr; Lys 125→Glu; Ser 127→Tyr; Tyr 132→Ile; Lys 134→Phe; Thr 136→Ile; Cys 175→Ala。

[0059] 编号优选与成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 的线性多肽序列相关。因此, 根据本发明的教导, 本领域技术人员可容易地确定在优选的成熟hNGAL (SEQ ID NO:1) 的参照序列中哪些氨基酸对应于上述(a)至(1)中所述的那些; 从而突变参照序列中的所述氨基酸。

[0060] 在一些特别的实施方案中, 根据本发明的突变蛋白以比SEQ ID NO:3 的突变蛋白和/或SEQ ID NO:4的突变蛋白更强的结合亲和力结合人或小鼠 GPC3, 例如, 当通过基本上如实施例4所述的表面等离子体共振 (SPR) 分析测量时, 这种突变蛋白相比于SEQ ID NO:3 或4的突变蛋白具有更低的 K_D 值。

[0061] 在一些更进一步的实施方案中, 根据本发明的突变蛋白相比于SEQ ID NO:3的突变蛋白和/或SEQ ID NO:4的突变蛋白显示改善的EC50值, 例如, 当通过基本上如实施例5所述的基于用人、小鼠或猕猴GPC3转染的 SK-HEP-1细胞的分析测量时, 这种突变蛋白相比于SEQ ID NO:3或4的突变蛋白可具有更低的nM。

[0062] 在一些另外的实施方案中, 本发明的突变蛋白比SEQ ID NO:3的突变蛋白和/或SEQ ID NO:4的突变蛋白更具生物物理稳定性, 例如, 当通过基本上如实施例6所述的基于荧光的热变性分析测量时, 这种突变蛋白相比于SEQ ID NO:3或4的突变蛋白可具有增加的解链温度 (melting temperature)。

[0063] 还应注意, 各个突变蛋白与其配体之间的复合物形成受多种不同因素影响, 例如各自的结合配偶体的浓度、竞争剂的存在、使用的缓冲体系的pH 和离子强度以及用于测定解离常数 K_D 的实验方法 (例如荧光滴定法、竞争 ELISA或表面等离子共振, 仅列举几个) 或甚至用于评估实验数据的数学算法。

[0064] 因此, 本领域技术人员也十分清楚, 该 K_D 值 (在各个突变蛋白与其靶标/配体之间形成的复合物的解离常数) 可在一定实验范围内变化, 这取决于用于测定特定脂质运载蛋白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, 例如取决于通过表面等离子共振 (Biacore)、通过竞争 ELISA还是通过“直接ELISA”测定 K_D 值, 所测得的 K_D 值可能稍有偏差或者存在公差范围。

[0065] 在一个实施方案中, 本文公开的突变蛋白在N-或C-末端连接至融合配偶体, 所述融合配偶体优选地为蛋白或蛋白结构域或肽。融合配偶体的实例是亲和标签, 例如五组氨酸标签、六组氨酸标签或链霉亲和素标签 (如Streptag[®])。因而, 本申请还涵盖带有这种标签的所有明确和大致描述的突变蛋白。

[0066] 本发明结合特征脂质运载蛋白突变蛋白片段使用的术语“片段”涉及源自全长成熟Lcn2的蛋白或肽, 其在N-末端和/或C-末端截短, 即缺少至少一个N-末端和/或C-末端氨基酸。这种片段包括成熟Lcn2的一级序列的优选至少10个、更优选20个、最优选30个或更多个连续氨基酸, 并且通常可在成熟Lcn2的免疫测定中检测到。本文所用的词语“检测”理解为定量和定性水平两者, 以及它们的组合。因此, 其包括目标分子的定量、半定量和定性测量。因此, 可测定例如样品中分子 (如GPC3) 的存在或不存在及其浓度或水平。

[0067] 本发明范围内还包括上述突变蛋白,该突变蛋白在其免疫原性方面发生了改变,以降低任何通过采用本领域技术人员已知的方法检测的免疫原性。

[0068] 细胞毒性T细胞识别与I类主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原呈递细胞的细胞表面上的肽抗原。肽与MHC分子结合的能力是等位基因特异性的,并与其免疫原性相关。为了降低给定蛋白质的免疫原性,预测蛋白质中哪些肽具有与给定MHC分子结合的潜力的能力是十分有价值的。先前已经描述了利用计算机线程法(computational threading approach)识别潜在T细胞表位的方法来预测给定肽序列与I类MHC分子的结合(Altuvia等人,J.Mol.Biol.249:244-250(1995))。这样的方法还可以用于识别本发明突变蛋白中的潜在T细胞表位,并用于根据其预期用途而基于其预测的免疫原性来选择特定的突变蛋白。它还可以对预测含有T细胞表位的肽区域进行另外的诱变,以减少或消除这些T细胞表位,并因而使免疫原性最小化。从遗传工程化的抗体中除去两性表位(amphipathic epitope)已有描述(Mateo等人Hybridoma 19(6):463-471(2000)),并可以适于本发明的突变蛋白。由此获得的突变蛋白可具有最小化的免疫原性,这在其如下文所述的治疗和诊断应用中是期望的。

[0069] 对于一些应用,使用缀合形式的本发明的突变蛋白也是有用的。可以采用本领域已知的任何常规偶联方法进行缀合。

[0070] 本文针对非天然靶标使用的术语“有机分子”或“小有机分子”表示这样的有机分子:其包含至少两个碳原子,优选不超过7或12个可旋转碳键;具有在100到2000道尔顿、优选100到1000道尔顿的范围内的分子量;且任选地包含一个或两个金属原子。

[0071] 通常,可以用任何合适的化学物质或酶来标记本文所述的脂质运载蛋白突变蛋白,所述化学物质或酶在化学、物理、光学或酶促反应中直接或间接产生可检测的化合物或信号。物理反应并且同时光学反应/标记物的实例是在照射后发出荧光。碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或 β -半乳糖苷酶是催化形成生色反应产物的酶标记(同时也是光学标记)的实例。通常,常用于抗体的所有标记(除了仅用于免疫球蛋白Fc部分中的糖部分的那些标记以外)也均可用于与本发明的突变蛋白缀合。本发明的突变蛋白还可以缀合任何合适的治疗活性剂,例如用于将这样的活性剂靶向递送至给定细胞、组织或器官或者用于选择性靶向细胞(如肿瘤细胞)而不影响周围的正常细胞。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/拮抗剂的肽或者竞争给定细胞靶标上的蛋白质结合位点的肽)。合适的毒素的实例包括但不限于:百日咳毒素、白喉毒素、蓖麻毒素、肥皂草素、绿脓杆菌外毒素、加里刹毒素或其衍生物、紫杉烷、类美坦素、tubulysin或dolastatin类似物。该 dolastatin类似物可以是auristatin E、单甲基auristatin E、auristatin PYE和 auristatin PHE。细胞抑制剂的实例包括但不限于:顺铂、卡铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、泰索帝(多西他赛)、紫杉醇、蒽环霉素(多柔比星)、甲氨蝶呤、长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞宾、达卡巴嗪、环磷酰胺、依托泊苷、阿霉素、喜树碱、Combretastatin A-4相关化合物、磺胺、噻唑啉、苯并[b]噻吩合成螺缩酮吡喃、单四氢呋喃化合物、curacin和curacin 衍生物、甲氧基雌二醇衍生物和甲酰四氢叶酸。本发明的脂质运载蛋白突变蛋白还可缀合治疗活性核酸,如反义核酸分子、小干扰RNA、小RNA 或核酶。这种缀合物可通过本领域熟知的方法产生。

[0072] 在一个实施方案中,本发明的突变蛋白还可以与靶向特定机体部位的靶向部分偶

联,以便将本发明的突变蛋白递送至体内期望的部位或区域。可为理想的这种修饰的一个实例是穿过血脑屏障。为了穿过血脑屏障,本发明的突变蛋白可以与有利于主动转运穿过该屏障的部分偶联(Gaillard PJ等人, International Congress Series.127:185-198 (2005);Gaillard PJ等人,Expert Opin Drug Deliv.2(2):299-309(2005))。这样的化合物例如以商品名 2B-TransTM(to-BBB technologies BV,Leiden,NL)购得。本发明的突变蛋白可以偶联的其它示例性靶向分子包括对期望的靶标分子具有亲和力的抗体、抗体片段或脂质运载蛋白突变蛋白。靶向部分的靶标分子可以例如为细胞表面抗原。细胞表面抗原可以对于细胞或组织类型(例如癌症细胞)特异性的。这种细胞表面蛋白的示例性实例为HER-2或蛋白聚糖例如NEU-2。

[0073] 如上文所述,在一些实施方案中,本发明的突变蛋白可以与延长该突变蛋白的血清半衰期的化合物缀合(在这方面也参见PCT公开No. WO2006/56464,其中参考对CTLA-4具有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)。延长血清半衰期的化合物可以是聚亚烷基二醇分子,例如聚乙二醇(“PEG”)或其活化衍生物;羟乙基淀粉;脂肪酸分子,例如棕榈酸(Vajo & Duckworth,Pharmacol.Rev. 52,1-9(2000));免疫球蛋白的Fc部分、免疫球蛋白的C_H3结构域、免疫球蛋白的C_H4结构域;白蛋白或其片段、白蛋白结合肽、白蛋白结合蛋白;转铁蛋白;或标签Pro-Ala-Ser,仅几个例子。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(参见例如美国专利No.6,696,245)的抗体片段或者对白蛋白具有结合亲和力的脂质运载蛋白突变蛋白。因此,用于延长本发明脂质运载蛋白突变蛋白的半衰期的合适的缀合化合物包括白蛋白(Osborn等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.303:540-548(2002))或者白蛋白结合蛋白,例如细菌白蛋白结合结构域,例如链球菌G蛋白中的一种(König,T.和Skerra,A.,J.Immunol.Methods 218:73-83(1998))。可以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公开文本No. 2003/0069395或Dennis等人(Dennis等人J.Biol.Chem.277:35035-35043(2002))所述具有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。

[0074] 在其它实施方案中,白蛋白本身或白蛋白的生物活性片段可以用作延长本发明脂质运载蛋白突变蛋白的血清半衰期的突变蛋白的化合物。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。白蛋白或其片段可以如美国专利No.5,728,553或欧洲专利申请 No.EP 0 330 451和No.EP 0 361 991所述重组产生。用作蛋白稳定剂的重组人白蛋白(Recombunin[®])例如可从Novozymes Delta Ltd.(Nottingham,UK)得到。

[0075] 如果所述白蛋白结合蛋白是抗体片段,则它可以是结构域抗体。结构域抗体(dAb)被工程化为允许精确控制生理特性和体内半衰期,以产生最佳的安全性和效力产品特性。结构域抗体例如可从Domantis Ltd.(Cambridge,UK and MA,USA)商购得到。

[0076] 如果将转铁蛋白用作延长本发明突变蛋白的血清半衰期的部分,该突变蛋白可以基因操作方式融合至非糖基化的转铁蛋白的N-末端或C-末端,或者这两个末端。非糖基化的转铁蛋白具有14至17天的半衰期,并且转铁蛋白融合蛋白将相似地具有延长的半衰期。

转铁蛋白载体还提供高生物利用率、生物分布和循环稳定性。该技术可从BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA) 商购获得。用作蛋白稳定剂的重组人转铁蛋白 (DeltaFerrin™) 也可从Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK) 商购获得。

[0077] 如果将免疫球蛋白的Fc部分用于延长本发明突变蛋白的血清半衰期的目的, 则可以使用可从Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, USA) 商购获得的 SynFusion™技术。该Fc融合技术的使用允许产生作用更长的生物药物, 并可以例如包含与抗体的Fc区连接的两个拷贝的突变蛋白, 以改善药代动力学、溶解度和生产效率。

[0078] 延长本发明突变蛋白的半衰期的另一个替代方案是将本发明突变蛋白的N-末端或C-末端融合到富含甘氨酸的长的非结构化的柔性序列 (例如具有约20至80个连续甘氨酸残基的聚甘氨酸)。公开于例如PCT公开文本 No. W02007/038619的这种方法也称为“rPEG” (重组PEG)。

[0079] 如果将聚亚烷基二醇用作延长突变蛋白的半衰期的化合物, 则该聚亚烷基二醇可以是被取代的或未取代的。其还可以是活化的聚亚烷基衍生物。合适的化合物的实例为聚乙二醇 (PEG) 分子, 如W099/64016、美国专利No. 6,177,074或美国专利No. 6,403,564中关于干扰素所描述的, 或者如针对其它蛋白质所描述的, 所述其它蛋白质例如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等人, The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11,139-148 (1990))。这样的聚合物 (优选聚乙二醇) 的分子量可以为约300 至约70,000道尔顿的范围, 包括例如分子量为约10,000、约20,000、约30,000 或约40,000道尔顿的聚乙二醇。此外, 如美国专利No. 6,500,930或No. 6,620,413中所述, 可将碳水化合物寡聚物和聚合物 (如淀粉或羟乙基淀粉 (“HES”)) 缀合至本发明的突变蛋白, 用于延长血清半衰期的目的。

[0080] 在另一个实施方案中, 为了给将上文化合物中的一种缀合到本发明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。通常, 将这种人工氨基酸设计成更具反应性, 因而有利于缀合至期望部分。这种可以经由人工tRNA引入的人工氨基酸的一个实例是对乙酰基苯丙氨酸。

[0081] 对于本文公开的突变蛋白的若干应用而言, 以融合蛋白的形式使用它们可能是有利的。在一些实施方案中, 本发明的突变蛋白在其N-末端和/或其 C-末端融合至蛋白质、蛋白质结构域或肽 (如信号序列和/或亲和标签)。

[0082] 对于药物应用而言, 本发明的突变蛋白可以融合至延长该突变蛋白的体内血清半衰期的融合配偶体 (也参见PCT公开文本No. W02006/56464, 其中参考对CTLA-4具有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合适的融合配偶体)。类似于上文所述的缀合化合物, 所述融合配偶体可以是免疫球蛋白的Fc部分、免疫球蛋白的C_H3结构域、免疫球蛋白的C_H4结构域、白蛋白、白蛋白结合肽或白蛋白结合蛋白, 仅举几个例子。再次, 白蛋白结合蛋白可以是细菌白蛋白结合蛋白或者对白蛋白具有结合活性的脂质运载蛋白突变蛋白。因此, 用于延长本发明脂质运载蛋白突变蛋白的半衰期的合适的融合配偶体包括白蛋白 (Osborn, B.L. 等人, 上文J. Pharmacol. Exp. Ther. 303:540-548 (2002)) 或白蛋白结合蛋白, 例如细菌白蛋白结合结构域, 例如链球菌G蛋白 (König, T. 和 Skerra, A. 上文J. Immunol. Methods 218:73-83 (1998))。Dennis等人, 上文 (2002) 或美国

专利申请No.2003/0069395中描述的具有Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys共有序列的白蛋白结合肽也可以用作融合配偶体,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;Xaa₄是Asp、Gly、Leu、Phe、Ser或Thr。还可以使用白蛋白本身或白蛋白的生物活性片段作为本发明脂质运载蛋白突变蛋白的融合配偶体。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血清白蛋白。重组产生白蛋白或其片段是本领域熟知的,并例如描述于美国专利No.5,728,553、欧洲专利申请No.EP 0 330 451或No.EP 0 361 991。

[0083] 融合配偶体可以赋予本发明脂质运载蛋白突变蛋白新的特征,例如酶活性或对其他分子的结合亲和力。合适的融合蛋白的实例为碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、谷胱甘肽-S-转移酶、G蛋白的白蛋白结合结构域、A蛋白、抗体片段、寡聚化结构域、具有相同或不同结合特异性的脂质运载蛋白突变蛋白(导致形成“双运载蛋白”,参见Schlehuber, S. 和 Skerra, A., Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. (Biol.Chem.382,1335-1342 (2001))或毒素。

[0084] 特别地,可以将本发明的脂质运载蛋白突变蛋白与独立的酶活性位点融合,使得得到的融合蛋白的两个“组分”一起作用于给定治疗靶标。脂质运载蛋白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学功能。

[0085] 亲和标签例如 **Strep-tag[®]** 或 **Strep-tag[®] II** (Schmidt, T.G.M. 等人 J. Mol. Biol. 255:753-766 (1996))、myc-标签、FLAG-标签、His₆-标签或HA-标签,或者例如谷胱甘肽-S-转移酶的蛋白质也允许对重组蛋白容易地进行检测和/或纯化,是优选融合配偶体的进一步实例。最后,具有生色或荧光特性的蛋白质如绿色荧光蛋白(“GFP”)或黄色荧光蛋白(“YFP”)也是用于本发明脂质运载蛋白突变蛋白的合适的融合配偶体。

[0086] 本文所用术语“融合蛋白”还包括含有信号序列的根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白。多肽N-末端的信号序列将该多肽引导至特定的细胞区室,例如大肠杆菌的外周胞质或真核细胞的内质网。大量的信号序列是本领域已知的。用于将多肽分泌进入大肠杆菌外周胞质的优选信号序列是OmpA-信号序列。

[0087] 本发明还涉及包含编码本文所述突变蛋白的核苷酸序列的核酸分子(DNA和RNA)。由于遗传密码的简并性允许将某些密码子置换成指定相同氨基酸的其它密码子,因此本发明不限于编码本发明突变蛋白的特定核酸分子,而是包括包含编码功能性突变蛋白的核苷酸序列的所有核酸分子。

[0088] 本申请中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表达该核酸分子。

[0089] 如果核酸分子(如DNA)包含含有关于转录和/或翻译调节的信息的序列元件,并且这种序列“可操作地连接”至编码多肽的核苷酸序列,则称其“能够表达核酸分子”或能够“允许表达核苷酸序列”。可操作的连接是这样的连接:其中调节序列元件与待表达序列以使得基因能够表达的方式相连。基因表达所需调节区的确切性质在物种之间可能不同,但通常,这些区域包含启动子,其在原核生物中包含启动子本身(即指导转录起始的DNA元件)以及在转录成RNA时将发出翻译起始信号的DNA元件。这种启动子区通常包括参与转录和翻译起始的5'非编码序列,如原核生物中的-35/-10盒和 Shine-Dalgarno元件或真核生物中的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抑因子元件以及用于

将天然多肽靶向至宿主细胞特定区室的翻译的信号和前导序列。

[0090] 此外,3'非编码序列可以含有参与转录终止、多聚腺苷酸化等的调节元件。然而,如果这些终止序列在特定宿主细胞中的功能不令人满意,则可以将它们置换成在该细胞中有功能的信号。

[0091] 因此,本发明的核酸分子可以包含调节序列,优选启动子序列。在另一个优选的实施方案中,本发明的核酸分子包含启动子序列和转录终止序列。合适的原核启动子例如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为SV40启动子或CMV启动子。

[0092] 本发明的核酸分子还可以是载体或任何其它类型的克隆运载体(如质粒、噬菌粒、噬菌体、杆状病毒、粘粒或人工染色体(比如YAC或BAC))的一部分。

[0093] 编码本发明脂质运载蛋白突变蛋白的DNA分子,特别是含有这种脂质运载蛋白突变蛋白的编码序列的克隆载体,可以转化到能够表达该基因的宿主细胞中。可以使用标准技术(Sambrook,J.等人(2001),上文)进行转化。

[0094] 因此,本发明还涉及含有本文公开的核酸分子的宿主细胞。

[0095] 本发明还涉及用于产生本发明的突变蛋白的方法,其中通过遗传工程方法,从编码该突变蛋白的核酸开始产生该突变蛋白、该突变蛋白的片段或该突变蛋白与另一个多肽的融合蛋白。该方法可以在体内实施,突变蛋白可以在例如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富集、纯化或分离。还可以在体外产生蛋白质,例如通过使用体外翻译系统。术语“富集”表示,相比于在其所提取自的样品或溶液中,所述突变蛋白或其功能片段在目标样品或溶液中存在的总蛋白中所占的部分显著更高。例如富集可包括从细胞提取物中分离某一部分。这可以通过标准技术如离心获得。其它富集方式的实例为过滤或透析,例如其可以是针对去除某分子量以下的不期望分子,或使用有机溶剂或硫酸铵沉淀。例如,纯化可包括色谱技术,例如凝胶过滤、离子交换色谱、亲和纯化、疏水相互作用色谱或疏水电荷感应色谱法。纯化的另一个例子为电泳技术,如制备毛细管电泳。分离可包括类似方法的组合。文中使用的“基本上纯的”或“基本上纯化的”表示为存在的主要物质的化合物或物质(即,基于摩尔,它比组合物中任何其它个体物质更丰富)。在一些实施方案中,基本上纯的组合物是这样的组合物:在该组合物中,所述物质包括存在的全分子的或者全部大分子(如适用)的物质的至少约50%(基于摩尔)。在某些实施方案中,基本上纯的组合物将具有组合物中存在的全分子的或者全部大分子(如适用)的物质的超过约80%、约85%、约90%、约95%或约99%。

[0096] 在体内产生突变蛋白时,通过重组DNA技术(上文已概述)将编码本发明突变蛋白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(Sambrook,J.等人,Molecular cloning:a laboratory manual(1989))用克隆载体转化该宿主细胞,所述克隆载体包含编码本发明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。

[0097] 一方面,本发明涉及一种用于产生结合GPC3的突变蛋白的方法,该方法包括:

[0098] 使编码脂质运载蛋白的核酸分子进行诱变,从而得到一个或多个突变蛋白核酸分子。

[0099] 该方法可以进一步包括:

[0100] 在合适的表达系统中表达在 (a) 中获得的一个或多个突变蛋白核酸分子,

[0101] 使多个突变蛋白与GPC3的至少片段或成熟形式接触;以及

[0102] 通过选择和/或分离的手段富集对给定靶标具有可检测的结合亲和力的一个或多个突变蛋白。

[0103] 本文使用的术语“诱变”表示,选择实验条件,使得在脂质运载蛋白(包括hNGAL)的给定序列位置处的天然存在的氨基酸可以被替换为在相应天然多肽序列中此特定位置处不存在的至少一个氨基酸。术语“诱变”还包括通过缺失或插入一个或多个氨基酸进行的序列区段长度的(其它)修饰。因而,下述情况在本发明的范围内:例如,所选序列位置处的一个氨基酸被替换为3个随机突变的区段,从而相比于野生型蛋白的相应区段的长度插入两个氨基酸残基。这种插入或缺失可以彼此独立地引入到可以进行本发明的诱变的肽区段中的任一个。在本发明的一个示例性实施方案中,若干突变的插入可以引入到所选脂质运载蛋白骨架的环AB中(参见PCT公开文本No.WO2005/019256,其通过引用以其全文并入本文)。术语“随机诱变”表示,在某些序列位置处不存在预先确定的单个氨基酸(突变),但是在诱变期间,至少两个氨基酸可以以一定可能性被掺入于预定序列位置处。

[0104] 在一个非限制性方法中,将人脂质运载蛋白2的编码序列用作进行本发明中选择的肽区段的诱变的起点。为了进行所述氨基酸位置的诱变,本领域技术人员可以自行选择各种已建立的标准方法来进行定点诱变(Sambrook,J.等人(2001),上文)。通常使用的技术为使用合成的寡核苷酸的混合物,通过PCR(聚合酶链反应)手段引入突变,所述合成的寡核苷酸在期望序列位置处具有简并碱基组成。其它类似的技术是本领域技术人员熟知的。

[0105] 可以通过连接将上文限定的核酸分子与缺少的编码脂质运载蛋白多肽的核酸的5'及3'序列和/或载体连接在一起,并可以克隆到已知的宿主生物体中。多种已建立的方法可用于连接和克隆(Sambrook,J.等人(2001),上文)。例如,可以将也存在于克隆载体的序列中的限制性内切核酸酶的识别序列工程化到所述合成寡核苷酸的序列中。因而,在扩增各PCR产物和酶切割之后,所得的片段可以容易地使用相应的识别序列进行克隆。

[0106] 也可以经由已知方法,例如通过在提高的错误率的条件下使用聚合酶链反应、通过化学诱变或通过使用细菌增变菌株,使编码选择用于诱变的蛋白质的基因内较长的序列区段进行随机诱变。这些方法还可以用于进一步优化脂质运载蛋白突变蛋白的靶标亲和力或特异性。实验诱变区段以外可能发生的突变通常是容忍的,或者甚至可以证明是有利的,例如如果它们有助于改善脂质运载蛋白突变蛋白的折叠效率或折叠稳定性的话。

[0107] 在进一步的实施方案中,该方法包括在编码对应于脂质运载蛋白的线性多肽序列(特别是成熟hNGAL(SEQ ID NO:1)的线性多肽序列)的序列位置36、40、41、49、52、65、68、70、72、73、77、79、81、87、96、100、103、105、106、125、127、132、134、136和/或175的至少任1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或甚至更多个序列位置的核苷酸三联体处使核酸分子进行诱变。这种核酸可进行诱变并且通过采用重组DNA技术引入到合适的细菌或真核宿主生物体中。可以使用本领域已知的任何合适的技术获得脂质运载蛋白的核酸文库以用于产生具有抗体样特性的脂质运载蛋白突变蛋白,即与给定靶标具有亲和力的突变蛋白。这种组合方法的实例更详细地描述于例如PCT申请No.WO99/16873、No.WO00/75308、No.WO03/029471、No.WO03/029462、No.WO03/029463、No.WO2005/019254、No.WO2005/019255、No.WO2005/019256或No.WO2006/56464。这些专利申请中每一件的内

容都通过引用以其全文并入本文。在进行了诱变的核酸序列在适合的宿主中表达之后,可以从获得的文库中选择携带结合给定靶标的多种各脂质运载蛋白突变蛋白的遗传信息的克隆。可以利用熟知技术来选择这些克隆,例如噬菌体展示 (Adey, NB等人, Identification of calmodulin-binding peptide consensus sequences from a phage-displayed random peptide library, *Gene* 169:133-4 (1996) (1996); Lowman, H.B., Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 26:401-24 (1997); Rodi DJ等人, Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack *Curr Opin Biotechnol.* 10(1):87-93 (1999))、菌落筛选 (综述于 Pini, A.等人 *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 5:503-510 (2002))、核糖体展示 (综述于 Amstutz, P.等人, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:400-405 (2001))或如 Wilson, D.S. 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3750-3755 (2001) 中报道的 mRNA 展示或具体描述于 PCT 公开文本 No. W099/16873、No. W000/75308、No. W003/029471、No. W003/029462、No. W003/029463、No. W02005/019254、No. W02005/019255、No. W02005/019256 或 No. W02006/56464 中的方法。

[0108] 根据本公开内容,上述方法的另一个实施方案包括:

[0109] 提供例如 GPC3 的至少片段作为给定靶标/配体,

[0110] 将多个突变蛋白与所述靶标/配体接触,以便允许在所述配体与对所述靶标/配体具有结合亲和力的突变蛋白之间形成复合物,以及

[0111] 移除无结合亲和力或无实质结合亲和力的突变蛋白。

[0112] 在本发明方法的一个实施方案中,在竞争性条件下实施选择结合亲和力。本文使用的竞争性条件表示,突变蛋白的选择涵盖至少一个将突变蛋白与 GPC3 的片段在另外的配体存在下进行接触的步骤,该另外的配体与突变蛋白竞争结合靶标 GPC3。可选地,该另外的配体通过别构效应将与突变蛋白的结合位点不同的表位与靶标络合而竞争突变蛋白的结合。因此,任何 GPC3 的片段、前体或成熟形式均可用于产生本发明的突变蛋白。

[0113] 本发明方法的进一步实施方案涉及将编码本发明多个突变蛋白并由在 3' 末端诱变所得的核酸分子与编码 M13 家族丝状噬菌体衣壳蛋白 pIII 或该衣壳蛋白的片段的基因可操作地融合,以便选择至少一种用于结合给定配体的突变蛋白。

[0114] 该融合蛋白可以包含另外的组分,例如允许固定、检测和/或纯化该融合蛋白或其部分的亲和标签。此外,可以将终止密码子设置于编码脂质运载蛋白或其突变蛋白的序列区与噬菌体衣壳基因或其片段之间,其中该终止密码子 (优选为琥珀型终止密码子) 在合适的抑制菌株中进行翻译期间至少部分地翻译成氨基酸。

[0115] 可以使用两个 BstXI 限制性位点将本发明编码本发明突变蛋白的核酸分子插入载体中。连接之后,用所得的核酸混合物转化合适的宿主菌株,例如大肠杆菌 XL1-Blue,以获得大量独立的克隆。如果需要,可以产生用于制备超级噬菌粒文库的相应载体。

[0116] 一旦已经选择了与给定靶标具有亲和力的突变蛋白,还可以使这种突变蛋白进行另一诱变,以便随后选择具有甚至更高亲和力的变体,或者选择具有改善的特性 (例如更高的热稳定性;改善的血清稳定性;热力学稳定性;改善的溶解度;改善的单体行为;对热变性、化学变性、蛋白水解或去污剂等改善的抗性等) 的变体。这种进一步的诱变 (在目的为更高亲和力的情况下可认为是体外“亲和力成熟”) 可以通过基于推理性设计的位点特异性突

变或随机突变来实现。用于获得更高亲和力或改善的特性的另一种可行方法是使用易错PCR,该易错PCR导致在脂质运载蛋白突变蛋白的选定序列位置范围中产生点突变。易错PCR可以根据任何已知的规程来进行,例如Zaccolo等人J.Mol.Biol.255:589-603(1996)所述的规程。适用于这种目的的其他随机诱变方法包括如Murakami,H等人Nat.Biotechnol.20:76-81(2002)描述的随机插入/缺失(RID)诱变或者如Bittker等人,Nat.Biotechnol.20:1024-1029(2002)描述的非同源随机重组(NRR)。如果需要,还可以根据PCT公开文本No.WO 00/75308或Schlehuber等人,J.Mol.Biol.297:1105-1120(2000)中描述的程序进行亲和力成熟,其中获得了对地高辛具有高亲和力的后胆色素结合蛋白的突变蛋白。用于改进亲和力的其它方法为实施位置饱和诱变。在此方法中,可以创建“小”核酸文库,其中仅在四个环区段中任一个内的单个位置处引入氨基酸交换/突变。然后使这些文库直接进行选择步骤(亲和力筛选),而无需其它淘选轮次。此方法允许鉴定促成对期望靶标改善的结合的残基,并且允许鉴定对于结合来说重要的“热点”。

[0117] 在一个实施方案中,上述用于修饰突变蛋白的方法进一步包括在对应于人脂质运载蛋白2的野生型序列的序列位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146或158的任何序列位置中的至少一个处引入Cys残基,以及经由在对应于hNGAL的野生型序列的序列位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146或158的任何序列位置中的至少一个处引入的Cys残基的硫醇基团偶联能够改变所述突变蛋白的血清半衰期的部分。能够改变所述突变蛋白的血清半衰期的部分可以选自聚亚烷基二醇分子和羟乙基淀粉。

[0118] 当本发明的蛋白是本发明的人脂质运载蛋白2突变蛋白时,可将Cys 76与Cys 175之间的天然存在的二硫键移除。因此,这种突变蛋白(或不包括分子内二硫键的任何其它人脂质运载蛋白2突变蛋白)可以在具有还原性氧化还原环境(redox milieu)的细胞区室中产生,例如,在革兰氏阴性细菌的细胞质中。

[0119] 在本发明脂质运载蛋白突变蛋白包含分子内二硫键的情况下,可以优选的是,使用适合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区室。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中提供,并且这种氧化性环境通常有利于形成结构性二硫键。

[0120] 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等人,J.Mol.Biol.315:1-8(2002))。

[0121] 然而,本发明的突变蛋白可以不必定为仅通过利用基因工程生成或生产。而是,还可以通过化学合成或通过体外转录和翻译获得脂质运载蛋白突变蛋白,所述化学合成例如Merrifield固相多肽合成。例如可行的是,使用分子建模识别有希望的突变,然后体外合成希望的(设计的)多肽并研究对给定靶标的结合活性。用于固相和/或液相合成蛋白的方法是本领域熟知的(例如综述于Lloyd-Williams等人Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins.CRC Press,Boca Raton,Fields,GB,(1997); Colowick Solid-Phase Peptide Synthesis.Academic Press,San Diego (1997); Bruckdorfer等人Curr.Pharm.Biotechnol.5:29-43(2004))。

[0122] 在另一个实施方案中,本发明的突变蛋白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。

[0123] 本发明还涉及药物组合物,该药物组合物包含至少一种权利要求中所指的本发明突变蛋白或其融合蛋白或缀合物以及任选的药理学上可接受的赋形剂。

[0124] 根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可以经由对蛋白质药物而言治疗有效的任何肠胃外或非肠胃外(例如肠内)途径施用。肠胃外应用法包括例如皮内、皮下、肌肉或静脉内的注射和输注技术,例如注射液、输注液或酏剂以及气雾剂装置和吸入(例如气雾剂混合物)、喷雾剂或粉剂的形式。非肠胃外递送模式为例如经口(例如丸剂、片剂、胶囊剂、溶液剂或混悬剂的形式)或经直肠(例如栓剂的形式)。根据需要,本发明的突变蛋白可以在含有常规无毒药理学上可接受的赋形剂或载体、添加剂和运载体的制剂中全身或局部施周。

[0125] 在本发明的一个实施方案中,所述药物肠胃外施用于脊椎动物,包括哺乳动物,特别是人。相应的施用方法包括但不限于:例如皮内、皮下、肌肉或静脉内的注射和输注技术,例如注射液、输注液或酏剂以及气雾剂装置和吸入(例如气雾剂混合物的形式)、喷雾剂或粉剂的形式。静脉内和皮下输注和/或注射的组合对于血清半衰期相对较短的化合物而言可能是最方便的。所述药物组合物可以是水性溶液、水包油乳剂或油包水乳剂。

[0126] 就这一点而言,应该注意,如Meidan和Michniak *Am.J.Ther.* 11(4):312-316 (2004)所述的经皮递送技术(例如离子电渗、超声促渗或微针增强递送)也可以用于经皮递送本文所述的突变蛋白。非肠胃外递送模式为例如经口(例如以丸剂、片剂、胶囊剂、溶液剂或混悬剂的形式)或直肠施用(例如以栓剂的形式)。本发明的突变蛋白可在含有多种常规无毒药理学上可接受的赋形剂或载体、添加剂和运载体的制剂中全身或局部施用。

[0127] 所施用的突变蛋白的剂量可以在宽范围内变化,以实现期望的预防效果或治疗响应。例如,这将取决于该化合物对选定配体的亲和力以及该突变蛋白与该配体的复合物在体内的半衰期。此外,最佳剂量将取决于该突变蛋白或其融合蛋白或其缀合物的生物分布、施用模式、所治疾病/病症的严重程度以及患者的医学状况。例如,当在用于局部施用的膏剂中使用时,可以使用高浓度的本发明的蛋白。然而,如果需要,也可以在持续释放制剂中给予该蛋白,例如脂质体分散体或基于水凝胶的聚合物微球体,如 PolyActive™或 OctoDEX™(参见Bos等人,*Business Briefing:Pharmatech* 1-6(2003))。

[0128] 因此,可以使用药理学上可接受的成分以及已建立的制备方法将本发明的突变蛋白配制成组合物(参见如Gennaro和Gennaro,*Remington:The Science and Practice of Pharmacy*,20th Ed.,Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia,PA(2000))。为了制备药物组合物,可以使用药理学上惰性的无机或有机赋形剂。为了制备例如丸剂、粉剂、明胶胶囊剂或栓剂,可以使用例如乳糖、滑石、硬脂酸及其盐、脂肪、蜡、固体或液体多元醇、天然和硬化的油。用于产生溶液剂、悬浮剂、乳剂、气雾剂混合物或在使用前重建成溶液剂或气雾剂混合物的粉剂的合适的赋形剂包括水、醇、甘油、多元醇及其合适的混合物以及植物油。

[0129] 所述药物组合物还可以含有添加剂,例如填料、粘合剂、润湿剂、助流剂、稳定剂、防腐剂、乳化剂,以及其它溶剂或增溶剂或用于实现贮存效应的试剂。后者使得融合蛋白可以掺入缓慢或持续释放或靶向递送系统,如脂质体和微囊剂。

[0130] 可通过多种方法对制剂进行灭菌,包括通过截留细菌的滤器过滤,或通过以无菌固体组合物的形式掺入消毒剂,所述消毒剂可以在临用前溶于或分散于无菌水或其它无菌

介质中。

[0131] 本发明的突变蛋白或其融合蛋白或缀合物可以用于多种应用中。通常,这种突变蛋白可以用于所有使用抗体的应用,除了特异地依赖于Fc 部分的糖基化的那些以外。

[0132] 本文所述的突变蛋白可以施用于生物体(包括人患者本身),或在药物组合物中,其中该药物组合物可包含或混合有药学活性成分或合适的载体或赋形剂。相应脂质运载蛋白突变蛋白组合物的制备和施用技术类似于或相同于本领域已建立的低分子量化合物的那些技术。示例性途径包括但不限于:口服、经皮和肠胃外递送。脂质运载蛋白突变蛋白或相应的组合物可用于填充胶囊或管,或可以压缩的形式作为小丸提供。脂质运载蛋白突变蛋白或相应的组合物还可以注射或可喷雾形式,例如作为相应脂质运载蛋白突变蛋白的悬浮液使用。

[0133] 包含本发明脂质运载蛋白突变蛋白的组合物可例如用在皮肤上或伤口上。进一步合适的施用途径可例如包括长效(depot)、口服、直肠、经粘膜或肠内施用;肠胃外递送,包括肌内、皮下、静脉内、髓内注射,以及鞘内、直接心室内、腹膜内、鼻内或眼内注射。在一些实施方案中,可以局部而不是全身的方式施用脂质运载蛋白突变蛋白或各自的组合物,例如,通过注射。

[0134] 包含本发明脂质运载蛋白突变蛋白的药物组合物可以以本身已知的方式制备,例如,通过常规混合、溶解、造粒、糖衣制造、研磨、乳化、封装、包埋(entrap)或冻干过程的手段。根据本发明使用的药物组合物因此可以常规方式使用一种或多种生理上可接受的载体(包括有助于将水凝胶和/或肽/类肽处理成可在药学上使用的制剂的赋形剂和助剂)制备。适当的制剂取决于选择的给药途径。

[0135] 对于注射,脂质运载蛋白突变蛋白或各自的组合物可以在水性溶液中配制,例如在生理上相容的缓冲液例如汉克斯溶液、林格式溶液或生理盐水缓冲液中。对于经粘膜给药,将适合要渗透的屏障的渗透剂用于制剂。这种渗透剂是本领域常规已知的。

[0136] 对于口服给药,脂质运载蛋白突变蛋白或各自的组合物可以通过将它们与本领域熟知的药学上可接受的载体组合而容易地制得。这种载体使脂质运载蛋白突变蛋白或各自的组合物以及药学活性化合物(如果存在的话)能够配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等等,以使要治疗的患者口服摄入。口服使用的药物制剂可以通过添加固体赋形剂、任选地研磨得到的混合物、和处理颗粒的混合物(在添加适合的助剂后,如果需要的话)获得,以获得片剂或糖衣丸核。合适的赋形剂,特别是填料如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇、或山梨糖醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,可以添加崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、或海藻酸或其盐,如海藻酸钠。

[0137] 给糖衣丸核提供合适的包衣。为此,可以使用浓缩糖溶液,它可以可选地包含阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、羧乙烯聚合物凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。染料或色素可以添加至片剂或糖衣丸包衣,以识别或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0138] 可以口服使用的药物制剂包括由明胶制成的推入配合胶囊以及由明胶和增塑剂制成的软、密封的胶囊,所述增塑剂如甘油或山梨糖醇。所述推入配合胶囊可以包含活性成

分,所述活性成分混合填料如乳糖、粘结剂如淀粉、和/或润滑剂如滑石或硬脂酸镁,和任选的稳定剂。在软胶囊中,肽/类肽可以悬浮在合适的液体中,如脂肪油、液体石蜡、或液体聚乙二醇。此外,可以添加稳定剂。所有口服施用制剂应当有适合这种施用的剂量。对于口腔施用,该组合物可以采用以常规方式配制的片剂或锭剂形式。

[0139] 本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可以制成用于通过注射的肠胃外施用,例如,通过肌肉注射或快速浓注或连续输注。用于注射的制剂可以单位剂量的形式呈现,例如,在安瓿中或多剂量容器中,其中具有添加的防腐剂。相应的组合物可以采用如悬浮液、溶液或者在油性或水性溶媒中的乳剂的形式,并且可以包含配制试剂,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0140] 本发明的脂质运载蛋白突变蛋白还可以用于使化合物靶向至预先选择的部位。在一个这样的实施方案中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白用于使药学活性化合物靶向至生物体或组织中预先选择的部位,包括:

[0141] a) 将所述脂质运载蛋白突变蛋白与所述化合物缀合,以及

[0142] b) 将所述脂质运载蛋白突变蛋白/化合物复合物递送至该预先选择的部位。

[0143] 就这样的目的而言,使突变蛋白与目的化合物接触,以便允许形成复合物。然后将包含该突变蛋白和目的化合物的复合物递送至预先选择的部位。这可以例如通过使突变蛋白与靶向部分偶联而实现,所述靶向部分例如抗体、抗体片段、脂质运载蛋白突变蛋白或对该选择的靶标具有结合亲和力的脂质运载蛋白突变蛋白片段。

[0144] 该用途特别适用于、但不限于将药物(选择性地)递送至生物体中的预先选择的部位,例如旨在用该药物进行治疗的受到感染的机体部分、组织或器官。除了在突变蛋白与目的化合物之间形成复合物以外,突变蛋白还可以与给定化合物反应,以得到突变蛋白与化合物的缀合物。与上述复合物相似,这样的缀合物可以适用于将化合物递送至预先选择的靶部位。这样的突变蛋白与化合物的缀合物还可包括将突变蛋白和化合物彼此共价连接的接头。任选地,这样的接头在血流中稳定,但在细胞环境中可被切割。

[0145] 因而,本文公开的突变蛋白及其衍生物与抗体或其片段相似可用于多个领域。除了它们与支持物结合以允许固定或分离给定突变蛋白的靶标或者该靶标的缀合物或融合蛋白这种用途以外,该突变蛋白还可以用于用酶、抗体、放射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,它们各自的靶标或者其缀合物或融合蛋白可以被检测或者与它们接触。例如,本发明的突变蛋白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技术(immunosensorics)来检测化学结构。这里,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。

[0146] 医学领域中还存在本发明突变蛋白的众多可能的应用。除了它们在诊断和药物递送中的用途以外,可以产生结合例如组织或肿瘤特异性细胞表面分子的本发明的突变多肽。这样的突变蛋白例如可以以缀合形式或作为融合蛋白用于“肿瘤成像”或直接用于癌症治疗。

[0147] 另一方面,本发明还涵盖根据本发明的突变蛋白在制备药物组合物中的用途。因而获得的药物组合物可以适于治疗贫血。所述药物组合物可以用作单独治疗或组合治疗。因此,本发明还涉及上文限定的突变蛋白用于治疗与改变的(如增加的或降低的)GPC3水平

相关的疾病或障碍,如贫血。

[0148] 再一方面,本发明涉及根据本发明的突变蛋白在诊断中的用途。根据本发明的突变蛋白的用途通常是用于诊断与改变的GPC3水平相关的疾病或障碍以及相应的诊断方法。

[0149] 因此,本发明还涉及上文限定的突变蛋白用于诊断与改变的(如增加的或降低的)GPC3水平相关的疾病或障碍。在一些实施方案中,所述疾病是癌症,包括但不限于:肝癌或黑色素瘤。所述要诊断的癌症无特别限制,具体实例可包括肝癌、胰腺癌、胆管癌、肺癌、结肠癌、结肠直肠恶性肿瘤、神经纤维肉瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌(mammary cancer)、乳房癌(breast cancer)、卵巢癌、前列腺癌、白血病和淋巴瘤、Wilm's肿瘤,优选为肝癌或(原发性/早期)肝细胞癌(参见Sinnett D.,GPC3(glypican 3),Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.2002;6(3):206-208(2002))。

[0150] 此外,本发明还涉及一种治疗肿瘤或癌症的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用本文所述的包含本发明突变蛋白的药物组合物。同样,本发明涉及本发明的突变蛋白用于治疗肿瘤或癌症(的方法)中。类似地,本发明涉及本发明的突变蛋白用于制备治疗肿瘤或癌症的药物组合物的用途。所述要治疗的癌症或肿瘤无特别限制,其具体实例可包括肝癌、胰腺癌、胆管癌、肺癌、结肠癌、结肠直肠恶性肿瘤、神经纤维肉瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌(mammary cancer)、乳房癌(breast cancer)、卵巢癌、前列腺癌、白血病和淋巴瘤、Wilm's肿瘤,优选为肝癌或(原发性/早期)肝细胞癌(参见Sinnett D.,GPC3(glypican 3),Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.2002;6(3):206-208(2002))。

[0151] 又一方面,本发明的特征在于包含根据本发明的突变蛋白的诊断或分析试剂盒。

[0152] 需要这种治疗的受试者可以是哺乳动物,例如人、狗、小鼠、大鼠、猪、猿(例如猕猴),仅为几个示例性实例。

[0153] 再又一方面,本发明的特征在于用于在受试者中的体内成像的方法,该方法包括所述受试者施用本发明的突变蛋白或包含本发明的突变蛋白的药物组合物。受试者可以如上文进行限定。

[0154] 本发明的突变蛋白可以与选自有机分子、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、细胞生长抑制剂、毒素、金属络合物、金属和胶体金的化合物缀合。

[0155] 本发明的突变蛋白可在其N-末端和/或其C-末端与融合配偶体融合,该融合配偶体是蛋白、或蛋白结构域或肽。

[0156] 本发明的突变蛋白还可与延长该突变蛋白的血清半衰期的化合物缀合。在一些实施方案中,可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。在一些另外的实施方案中,所述聚亚烷基二醇是聚乙烯(PEG)或其活化衍生物。

[0157] 在一些其它的实施方案中,所述突变蛋白的融合配偶体是延长该突变蛋白的血清半衰期的蛋白结构域。

[0158] 在一些另外的实施方案中,所述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。

[0159] 本发明的突变蛋白可用于治疗或诊断(的方法)中;例如用于治疗肿瘤(的方法)或诊断肿瘤(的方法)中,所述肿瘤优选肝肿瘤;或用于抑制肿瘤生长(的方法)中;或用于治

疗或诊断肝肿瘤(的方法)中。

[0160] 本发明进一步提供包含编码本发明突变蛋白的核苷酸序列的核酸分子。在一些实施方案中,所述核酸分子可操作地连接至允许所述核酸分子表达的调节序列。在一些进一步的实施方案中,所述核酸分子包含在载体或噬菌粒载体中。

[0161] 本发明还公开了一种包含本发明的核酸分子的宿主细胞。

[0162] 此外,本发明向技术人员提供了一种生产本发明的突变蛋白的方法,其中通过遗传工程方法从编码该突变蛋白的核酸开始产生该突变蛋白、该突变蛋白的片段或该突变蛋白与另一个多肽的融合蛋白。在一些进一步的实施方案中,该突变蛋白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。

[0163] 本发明考虑一种包含本发明的突变蛋白和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0164] 本发明示例性说明了本发明的突变蛋白在结合/检测GPC3中的用途,包括:

[0165] (a) 将该突变蛋白与怀疑含有GPC3的测试样品接触,由此允许在该突变蛋白与GPC3之间形成复合物,和

[0166] (b) 通过合适的信号检测该突变蛋白与GPC3之间的复合物。

[0167] 本发明向技术人员揭示了一种治疗肿瘤的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用本发明的突变蛋白或其药物组合物。在一些进一步的实施方案中,所述肿瘤是肝癌、(原发性/早期)肝细胞癌、胰腺癌、胆管癌、肺癌、结肠癌、结肠直肠癌恶性肿瘤、神经纤维肉瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌(mammary cancer)、乳房癌(breast cancer)、卵巢癌、前列腺癌、白血病和淋巴瘤或Wilm's肿瘤。

[0168] 本发明传授了一种检测生物样品中GPC3的存在的方法,该方法包括:在允许本发明的突变蛋白与GPC3形成复合物的条件下使所述样品与该突变蛋白接触。在一些实施方案中,所述方法进一步包括检测该突变蛋白与GPC3的复合物。在一些进一步的实施方案中,自人中分离所述生物样品。在一些另外的实施方案中,所述样品包含体液。

[0169] 本发明公开了一种结合受试者中GPC3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。

[0170] 需要指出的是,除非上下文另有明确指示,本文所用单数形式“一(a)”、“一种(an)”和“所述/该(the)”包括所提及的复数。因此,例如,提及的“一种试剂”包括一种或多种这样不同的试剂,提及“所述方法”包括提及本领域普通技术人员已知的可修饰或置换本文所述的方法的等效步骤和方法。

[0171] 除非另有说明,一系列元素之前的术语“至少”将被理解是指该系列中的每一个元素。本领域技术人员将认识到或采用常规实验能够确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等价方案。本发明旨在涵盖这种等价方案。

[0172] 本说明书及随后的权利要求中,除非上下文有其它要求,词语“包括/包含(comprise)”以及变形词语诸如“包括/包含(comprises)”和“包括/包含(comprising)”将被理解为意指包括陈述的整数或步骤或者整数或步骤的集合,但并不排除任何其它的整数或步骤或者整数或步骤的集合。当本文使用时,术语“包括/包含(comprising)”能够用术语“含有(containing)”替代或有时在本文中使用时用术语“具有(having)”替代。

[0173] 当本文使用时,“由...组成”排除了未在权利要求元素中规定的任何元素、步骤或成分。当本文使用时,“基本上由...组成”并不排除实质上不影响权利要求的基本特征和新

特征的材料或步骤。在本文的每一个实例中，术语“包括/包含”、“本质上由...组成”和“由...组成”中任意一个可被其它两个术语中的任意一个替代。

[0174] 本说明书的全文中引用了若干文件。本文引用的每一个文件(包括所有的专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、指导书等)，无论在前还是在后，均以其全文并入本文。就通过引入并入的材料与本说明书矛盾或不一致来说，本说明书将优先于任何这样的材料。本文无任何内容将被解释为承认由于在先发明，本发明无权早于这样的公开内容。

[0175] 除非另有说明，采用已建立的重组基因技术的方法，例如，如Sambrook 等人(2001)，上文中所述。

[0176] 对于领域技术人员而言，通过审查以下实施例及其附图(其并非意图是限制性的)，本发明的其它目的、优点和特征将变得显而易见。因此，应当理解，虽然本发明通过示例性实施方案以及任选的特征进行了特定的公开，但本领域技术人员可以采取本文中实现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。

[0177] 实施例

[0178] 实施例1:成熟文库的产生和特异性结合GPC3的优化的突变蛋白的选择

[0179] 为了优化GPC3特异性突变蛋白，采用基于选择位置的偏差(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 NOs: 3和4的文库。进行偏差(biased)设计，使得对于每一个所选的位置，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 $N \times (1-B)$ 。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。通过设置在位置C76处缬氨酸作为主要氨基酸的50%偏性和通过C175A突变来完成所选文库中SS-桥的移除。

[0180] 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和限制性靶标浓度下的预温育步骤等等。

[0181] 实施例2:采用高通量ELISA筛选识别具有改善的GPC3结合和改善的热稳定性的突变蛋白

[0182] 将单个克隆用于接种2xYT/Amp培养基并生长过夜(14-18h)至稳定期。随后，接种50μL来自稳定期培养物的2xYT/Amp，并在37℃下温育3h，然后转移至22℃直至达到0.6-0.8的OD₅₉₅。通过加入10μL补充有1.2μg/ml 脱水四环素的2xYT/Amp诱导突变蛋白的产生。将培养物在22℃下温育直到第二天。加入40μL在PBS/T中的5% (w/v) BSA和在25℃下温育1h之后，培养物已经准备好用于筛选分析。将20μL的培养物直接施加至筛选 ELISA板，剩余的体积在65℃下温育1h。

[0183] 通过在微量滴定板上涂布中性抗生物素蛋白和链霉亲和素(5μg/ml，在 PBS溶液中的1:1混合物在4℃下过夜来测试分离的突变蛋白与GPC3的结合。用在PBST中的2%BSA封闭该板后，将生物素化的GPC3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℃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；2-

1509-001; IBA)。为了定量,加入20 μ L 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。

[0184] 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。

[0185] 基于筛选结果对克隆测序,并选择突变蛋白用于进一步表征。选择优化的脂质运载蛋白突变蛋白后,引入His 28 $\rightarrow$ Gln突变以进一步优化稳定性。

[0186] 实施例3:突变蛋白的表达

[0187] 在2YT-Amp培养基中的大肠杆菌中表达独特的突变蛋白,所述突变蛋白具有C-末端序列SAWSHPQFEK (SEQ ID NO:17) (包括SA连接子和**Strep-tag®** II, WSHPQFEK (SEQ ID NO:18)),以采用Streptactin亲和层析和制备型尺寸排阻色谱纯化表达后的突变蛋白。

[0188] 实施例4:通过表面等离子体共振测量对人和鼠GPC3的结合亲和力

[0189] 采用表面等离子体共振 (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。

[0190] 在25 $^{\circ}$ 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) 上实施优化的Lcn2突变蛋白与人和小鼠GPC3的结合的SPR分析。采用Biotin CAPture试剂盒 (GE Healthcare) 将生物素化的GPC3固定在芯片表面。采用标准NHS化学将人GPC3 (2119-GP; R&D systems) 和鼠GPC3 (6938-GP; R&D systems) 生物素化。将未稀释的Biotin CAPture试剂 (与ss-DNA寡核苷酸缀合的链霉亲和素) 捕获在具有预固定的互补ss-DNA寡核苷酸的传感器芯片CAP上。随后,以5 μ g/mL的流速施加1 μ g/mL的生物素化的人或鼠GPC3达300s。

[0191] 以30 μ L/min的流速,10nM、40nM和160nM的浓度施加Lcn2突变蛋白。注入稀释液,其中结合时间为180秒,解离时间为600秒,以获得 k_a 和 k_d 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H₂O进行另外的洗涤步骤并稳定120秒。

[0192] 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 k_a 和解离速率常数 k_d 。整体使用1:1结合模型拟合数据。

[0193] 表1中汇总了针对SEQ ID NOs:3和4以及优化的突变蛋白SEQ ID NOs: 5至16测定的 k_a 、 k_d 值以及所得到的平衡解离常数 (K_D)。优化的GPC3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以及鼠 GPC3,并且优化后亲和力提高30倍。

[0194] 表1:通过表面等离子体共振 (SPR) 测定的优化的突变蛋白对人和鼠 GPC3的亲和力、结合速率常数 k_a 和解离速率常数 k_d 。

SEQ ID NO:	人 GPC3			小鼠 GPC3		
	k_a [$M^{-1} \cdot s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [nM]	k_a [$M^{-1} \cdot s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [nM]
3	5.6E+05	2.2E-04	0.387	4.5E+05	3.0E-04	0.674
7	1.3E+06	1.3E-04	0.097	1.0E+06	1.5E-04	0.145
5	1.6E+06	2.0E-04	0.119	1.3E+06	2.6E-04	0.207
6	1.8E+06	3.3E-05	0.019	2.2E+06	4.2E-05	0.019
4	2.5E+06	2.2E-03	0.877	2.6E+06	2.8E-03	1.091
13	2.6E+06	1.8E-04	0.070	2.7E+06	2.4E-04	0.090
9	1.8E+06	9.8E-05	0.054	2.0E+06	1.5E-04	0.075
8	2.0E+06	1.3E-04	0.068	1.9E+06	1.8E-04	0.096
10	1.8E+06	1.2E-04	0.063	1.8E+06	1.7E-04	0.093
12	6.5E+06	2.4E-04	0.037	5.1E+06	3.0E-04	0.058
11	1.7E+06	4.6E-05	0.027	2.9E+06	3.2E-05	0.011
14	2.4E+06	2.0E-03	0.819	2.0E+06	3.1E-03	1.594
15	1.4E+06	4.9E-05	0.035	1.3E+06	9.1E-05	0.072
16	6.7E+05	1.1E-04	0.171	6.1E+05	1.9E-04	0.311

[0196] 实施例5:优化的脂质运载蛋白突变蛋白与人、猕猴和小鼠GPC3转染的SK-HEP-1细胞的结合

[0197] 用编码人、猕猴或小鼠GPC3的表达载体稳定转染来自DSMZ细胞库的 SK-HEP-1细胞,通过流式细胞术评估该细胞不表达可检测水平的内源 GPC3。还获得了空载体对照细胞并平行分析。

[0198] 采用ECL形式在SK-HEP-1细胞上测试与SEQ ID NOs:3和4相比,优化的突变蛋白SEQ ID NOs:5-16与人、猕猴和小鼠GPC3的结合(图1)。在这一实验中,在涂布了过表达人、猕猴或小鼠GPC3的SK-HEP-1细胞的 MSD板上温育脂质运载蛋白突变蛋白的稀释系列。

[0199] 全部温育步骤均在室温下进行,并且使用Biotek EL405选择CW洗涤器,在每个温育步骤后用80 μ L PBS缓冲液洗涤板两次。

[0200] 在第一步骤中,将384孔板用聚-D-赖氨酸预涂布5分钟,并用PBS洗涤两次。每孔接种10 000个SK-HEP-1细胞,并使其在37 $^{\circ}$ C下粘附过夜。洗涤后,用60 μ L PBS/酪蛋白(PBS中0.1%酪蛋白)封闭细胞涂布的孔。

[0201] 在PBS/酪蛋白中,将SEQ ID NOs:3、4、5、7、8、9、10、12、13、14、15和16(使用1000nM作为起始浓度)以1:3的比率连续稀释至皮摩尔范围。在室温下将20 μ L稀释系列转移到SK-HEP-1涂布的板上达1h。

[0202] 为了检测并定量结合的GPC3特异性脂质运载蛋白突变蛋白,弃去残留的上清液,并将20 μ L在PBS/酪蛋白中制备的兔抗-骨架抗体(2 μ g/ml)和 Sulfotag标记的抗-兔抗体(5 μ g/ml)的混合物加入到孔中,并在室温下温育1h。洗涤后,向每个孔中加入35 μ L无表面活性

剂的读数缓冲液,并使用MSD读数器读取每孔的ECL强度。

[0203] 使用GraphPad Prism4软件进行曲线拟合。

[0204] 与SEQ ID NOs:3和4相比,多数优化的GPC3特异性Lcn2突变蛋白以改善的EC50值结合人、小鼠或猕猴GPC3转染的SK-HEP-1细胞。图1 示出了示例性结合曲线并且表2中汇总了与SK-HEP-1::人GPC3、SK-HEP-1::小鼠GPC3和SK-HEP-1::猕猴GPC3的结合的EC50值。

[0205] 表2:分别在基于MSD的细胞结合分析中获得了与SEQ ID NOs:3和4 相比,优化的脂质运载蛋白突变蛋白与固定的人、鼠或猕猴GPC3转染的 SK-HEP-1细胞结合的EC50值。与SEQ ID NOs:3和4相比,大多数优化的突变蛋白显示较低的EC50值,这表明了与细胞上表达的GPC3的改善的结合。全部突变蛋白均显示与鼠和猕猴GPC3的交叉反应。

[0206]

SEQ ID NO:	EC50 [nM] SK-HEP-1:: 人 GPC3	EC50 [nM] SK-HEP-1:: 小鼠 GPC3	EC50 [nM] SK-HEP-1:: 猕猴 GPC3
3	24.3	29.8	29.9
7	2.5	4.8	2.8
5	24.1	25.6	33.9
4	10.2	7.1	5.7
13	0.9	2.9	0.6
9	1.1	4.1	1.9
8	1.4	5.3	2.3
10	0.8	3.8	0.8
12	2.0	5.3	1.7
14	9.5	6.7	15.4
15	1.6	4.8	1.6
16	2.2	4.4	2.5

[0207] 实施例6:通过基于荧光的热变性分析测量热稳定性

[0208] 采用Mx3005P qPCR System(Agilent Technologies),利用基于荧光的热变性分析(通常称为差示扫描荧光测定法的热移位分析)来测量人GPC3特异性Lcn2突变蛋白的热稳定性。

[0209] 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℃加热至100℃(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。

[0210] 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(参见Kranz J.和Schalk-Hihi,C., Protein thermal shifts to identify low molecular weight fragments,Methods Enzymol.493:277-298 (2011))。

[0211] 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(=T_m)匹配。完整的评估在Microsoft Excel中进行。

[0212] 表3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(T_m)。

[0213] 表3:通过采用SYPRO Orange染料的热移位分析测定的对GPC3特异性的优化的脂质运载蛋白突变蛋白的解链温度(T_m)。与未优化的突变蛋白相比,优化的脂质运载蛋白突变蛋白的解链温度的增加高达14℃。

[0214]

SEQ ID NO:	T _m [℃]
3	58
7	67
5	65
6	65
4	55
13	68
9	68
8	68
10	69
12	64
11	58
14	61
15	52
16	53

[0215] 实施例7:选择的优化的GPC3特异性脂质运载蛋白突变蛋白在缓冲液和血浆中的储存稳定性的评估

[0216] 为了评估示例性选择的突变蛋白(SEQ ID NOs:7、9和10)在非优化制剂(PBS pH 7.4)和人及鼠血浆中的储存稳定性,进行以下稳定性研究:

[0217] 为了研究在缓冲液中的储存稳定性,在PBS(磷酸盐缓冲盐水pH 7.4; 10010;Life Technologies)中将突变蛋白稀释至1mg/ml的浓度并将1等份试样在42℃下温育1周,而参照等份试样在-20℃下冷冻。在定量ELISA设置中测量活性突变蛋白。在分析型尺寸排阻色谱中测量单体蛋白。

[0218] 为了评估在血浆样品中的稳定性,制备浓度为0.5mg/ml的在PBS中 50%人或鼠血浆中的突变蛋白稀释液,并在37℃下温育1周(将制备的参照等份试样立即在-20℃下冷

冻)。通过qELISA评估活性突变蛋白的浓度。

[0219] 为了分析蛋白的活性,应用以下ELISA:用20 μ L在PBS中浓度为5 μ g/ml的GPC3 (2119-GP;R&D Systems)在4 $^{\circ}$ C下涂布384孔聚苯乙烯板 (Greiner FLUOTRACTM 600;黑色平底;高结合)过夜。洗涤后,用100 μ L 封闭缓冲液(在含有0.1%v/v吐温-20的PBS中的2%w/v BSA)封闭各孔。洗涤板,将20 μ L适当稀释的蛋白质标准品、未加压(unstressed)的参照样品(制备后在-20 $^{\circ}$ C下储存)或加压(stressed)样品转移到ELISA板中并温育。为了检测板结合的蛋白,洗涤ELISA板,弃去残留的上清液,并以在封闭缓冲液中预定的最佳浓度加入20 μ L HRP标记的抗-hNGAL抗体并温育。洗涤后,向各孔中加入20 μ L荧光HRP底物(QuantaBlu; Pierce),使反应进行5 分钟。使用荧光酶标仪(Tecan)读取板上每个孔的荧光强度。

[0220] 除非另有说明,否则所有温育步骤均在室温下进行1h,并且在每个温育步骤之后,使用Biotek ELx405选择CW洗涤器,用100 μ L PBS-T缓冲液(PBS;0.05%Tween 20)洗涤该板5次。

[0221] 对于上述ELISA,制备了通常在0.01-1000ng/mL范围内的包括11个突变蛋白稀释液的校准曲线,并且为每个样品准备了在校准曲线的线性范围内的三个不同的独立稀释液。使用任选补充了1%人或鼠血浆的封闭缓冲液用于稀释液。

[0222] 校准曲线使用4参数对数(4PL)非线性回归模型进行拟合,并用于计算测试样品的活性蛋白浓度。确定的活性蛋白浓度参照了相同浓度和在相同基质中的在-20 $^{\circ}$ C下储存的未加压参照样品。

[0223] 在具有两个在一行的Superdex 75 5/150 GL色谱柱(GE Healthcare)并用 PBS (10010;Life Technologies)以0.3mL/min的流速作为洗脱液的Agilent HPLC系统上,实施分析型尺寸排阻色谱。

[0224] 表4中汇总了在PBS pH7.4和人及鼠血浆中测试的储存稳定性的结果。

[0225] 表4:通过回收qELISA中的活性和分析型SEC中的单体含量来评估在非优化制剂(PBS;1周;42 $^{\circ}$ C)、人和鼠血浆(1周;37 $^{\circ}$ C)中的储存稳定性:在qELISA中稳定=100+/-15%(与非加压参照样品相比,突变蛋白活性回收);在aSEC中稳定=100+/-5%(与非加压参照样品相比,单体峰面积回收);对于包括参照样品的所有样品,检测100面积百分比的单体含量。

	人血浆:	小鼠血浆:	PBS:	
	37 $^{\circ}$ C 下1周	37 $^{\circ}$ C 下1周	42 $^{\circ}$ C 下1周	
SEQ ID NO:	突变蛋白活性回收[%]	突变蛋白活性回收[%]	突变蛋白活性回收[%]	单体峰面积回收[%]
7	98	105	93	103
9	92	101	96	105
10	105	95	101	98

[0227] 本文示例性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,且具有从该种类中去除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。

[0228] 等同物:本领域的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> 对磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3) 具有亲和力的人脂质运载蛋白 2 的突变蛋白
<130> LC17310011P

<150> EP15167922.2
<151> 2015-05-18

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 野生型 NGAL

<400> 1

[0001] 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
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 Lys Cys Asp Tyr Trp Ile
65 70 75 80

Arg Thr Phe Val Pro Gly Cys 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

<220>
<223> 野生型 NGAL98

<400> 2

[0002] 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
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 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> 3

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 - 亲本 NGAL (P019-Seq2 - S375.1 M1.1 A16)

<400> 3

[0003] 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
20 25 30

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

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

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

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

Ile Lys Ser Gly 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 Arg Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Ala 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

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 - 亲本 NGAL (P019-Seq 3 - S375.2 M1.1 M2)

<400> 4

[0004] 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
20 25 30

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

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

Asn Val Thr Asn Val Arg Phe Ala Met Lys Lys Cys Met Tyr Ser Ile
65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Glu Pro Gly Asn 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 Tyr Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Phe 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

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.05N06M1)

<400> 5

[0005] 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
20 25 30

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

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

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

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

Ile Lys Ser Gly 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 Arg Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Ala 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

<220>

<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.05K19M1)

<400> 6

[0006] 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
20 25 30

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

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

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

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

Ile Lys Ser Gly Pro Gly Glu 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 Arg Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Phe 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

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.05004M1)

<400> 7

[0007] 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
20 25 30

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

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

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

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

Ile Lys Ser Gly Pro Gly Glu 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 Arg Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Phe 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

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.02J22M1)

<400> 8

[0008] 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
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile 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

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.02B06M1)

<400> 9

[0009] 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
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile 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> 10
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.02L21M1)

<400> 10

[0010] 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
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile 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

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.02A11M1)

<400> 11

[0011] 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
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile 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> 12
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.09P24M1)

<400> 12

[0012] 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
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile 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

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.02N03M1)

<400> 13

[0013] 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
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Glu Ile Phe Phe 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

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.10I10M1)

<400> 14

[0014] 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
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Glu Ile Phe Phe 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 Ala Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 15
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.10D09M1)

<400> 15

[0015] 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
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile 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 Ala Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 16
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.04M18M2)

<400> 16

[0016] 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
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile 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 Ala Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> SA 连接子和 Strep-标签 II

<400> 17

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5 10

[0017]

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> Strep-标签 II

<400> 18

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

<210> 19
<211> 534
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.05N06M1)

<400> 19
caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttcagg acaaccaatt ccaagggaat tggtatgtcg tgggcgttgc cggaaatgct 120
ctgctgcgtg aggataagga tccgcttaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

	gataaatcat atgacgtcac cgttgtgtct ttttgaggga agaaatgcca ttacaagatt	240
	gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagtggg	300
	ccggggcaga catcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgtttttca aggaggtgag gcagaaccgc gagtggtttg ctatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534
	<210> 20	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.05K19M1)	
	<400> 20	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcgttgc cggaaatgtt	120
	cgtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
[0018]	gataaatcat atgacgtcac cgttgtgtct tttcggggga agaaatgcca ttacaagatt	240
	gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagtggg	300
	ccggggcaga catcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgtttttca aggaggtgag gcagaaccgc gagtggtttt ttatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534
	<210> 21	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.05004M1)	
	<400> 21	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcgttgc cggaaatgtt	120
	atgctgcgtg aggataagga tccgcttaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac cagtgtggct tttcgggaata agaaatgcca ttacaagatt	240

	gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtgg	300
	ccgggcgaga catcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca aggaggtgag gcagaaccgc gagtggtttt ttatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534
	<210> 22	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.02J22M1)	
	<400> 22	
	caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatgtg	120
	gggtctcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac caatgtgagg ttgctagga agaaatgctt gtactcgatt	240
[0019]	gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtga	300
	ccgggcaata cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatttttt ttatcatact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534
	<210> 23	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.02B06M1)	
	<400> 23	
	caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatgtg	120
	ggtctcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac caatgtgagg ttgctagga agaaatgcac gtactcgatt	240
	gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtga	300

	ccgggscggtc cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgtttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatTTTTT ttatcatact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534
	<210> 24	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.02L21M1)	
	<400> 24	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatgtcg tggcagggc cggaaatggg	120
	gctctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac caatgtgagg ttgctagga agaatgcgt gtactcgatt	240
	gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcccgat taaaagttag	300
[0020]	ccgggcaata cagcatcttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgtttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatTTTTT ttatcatact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534
	<210> 25	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.02A11M1)	
	<400> 25	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatgtcg tggcagggc cggaaatgtt	120
	gctctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac cgctgtgagg ttgctagga agaatgcct gtactcgatt	240
	gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcccgat taaaagttag	300
	ccgggctata cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360

	gtgtttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatTTTTT ttatcatact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534
	<210> 26	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.09P24M1)	
	<400> 26	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatgtg	120
	gctctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac caatgtggtg tttgctggga agaaatgcaa gtactcgatt	240
	gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccgat taaaagtccg	300
	ccgggcaata cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
[0021]	gtgtttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatTTTTT ttatcatact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534
	<210> 27	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.02N03M1)	
	<400> 27	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatctg	120
	ggtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac caatgtgagg tttgctagga agaaatgcat gtactctatt	240
	ggtacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtgag	300
	ccgggcagta cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgtttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatTTTTT ttatcacact gtacgggcgc	420

	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534
	<210> 28	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.10I10M1)	
	<400> 28	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatgtg	120
	ggtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac caatgtgagg tttgctggga agaaagttaa gtacacgatt	240
	gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagttag	300
	ccgggcaata cagcaacttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatTTTTT ttatcacact gtacgggcgc	420
[0022]	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc aggtatcga cggc	534
	<210> 29	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.10D09M1)	
	<400> 29	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatgtg	120
	ggtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac cgggtgtgagg tttggtgaga agaaaattaa gtactcgatt	240
	ggtacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtcag	300
	ccgggcgata cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatTTTTT ttatcatact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480

	ctccctgaaa accacatcgt cticcctgtc ccaatcgacc aggctatcga cggc	534
<210>	30	
<211>	534	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	脂质运载蛋白突变蛋白 (S0569.04M18M2)	
<400>	30	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
[0023]	aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtcg tgggccgggc cggaaatgtg	120
	ggtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac cgggtgtgagg ttigattcta agaaagtgac gtactctatt	240
	gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtgag	300
	ccgggcaata cagcgaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatTTTTT ttatcatact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cticcctgtc ccaatcgacc aggctatcga cggc	534

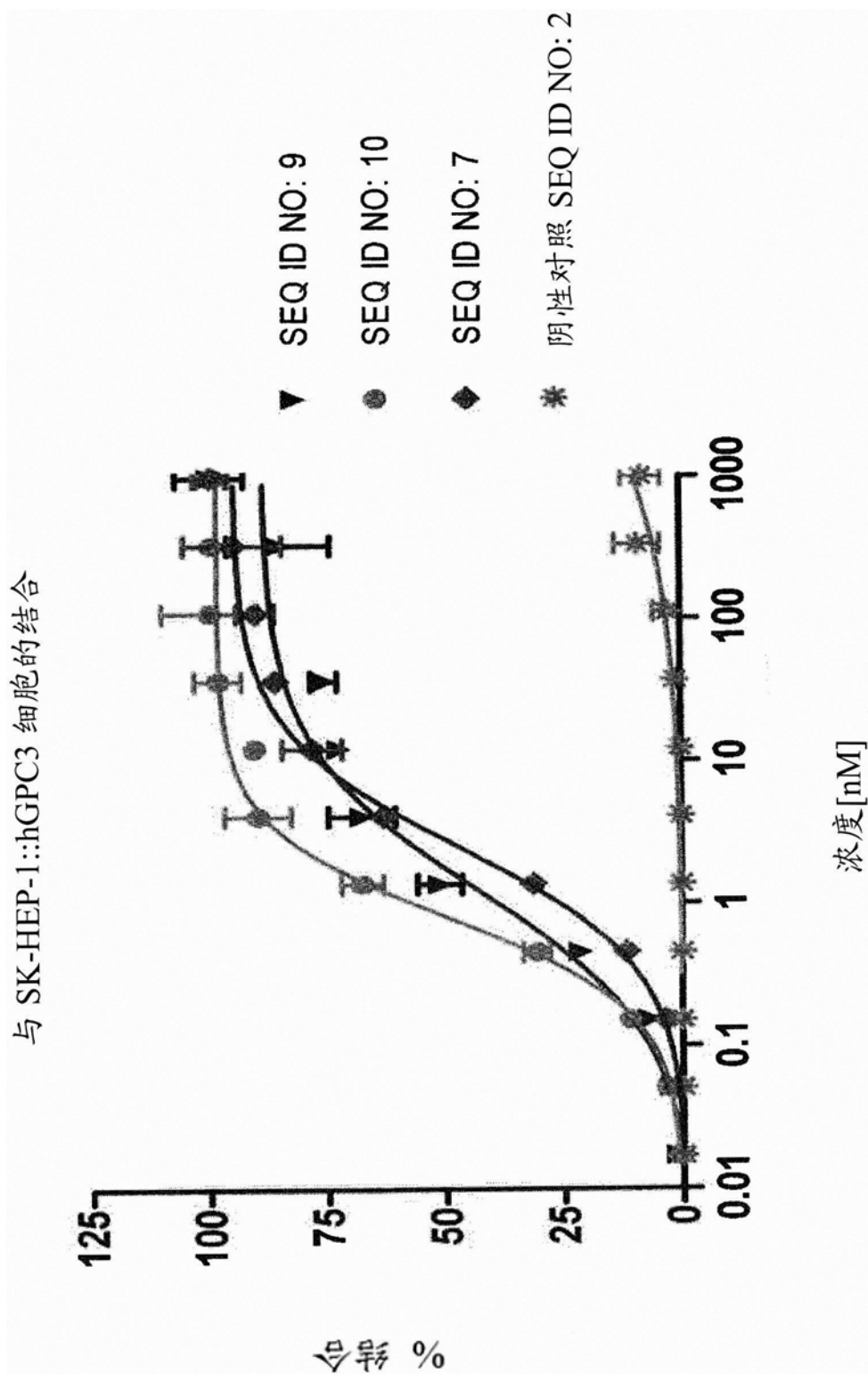


图1