



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102770764 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201080055370. 5

(22) 申请日 2010. 12. 07

(30) 优先权数据

61/267, 098 2009. 12. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 06. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/069028 2010. 12. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/069992 EN 2011. 06. 16

(73) 专利权人 皮里斯股份公司

地址 德国弗赖辛

(72) 发明人 A·斯克拉 M·格鲍尔 D·欣兹

S·劳特 G·马钦内尔

M·胡尔斯迈尔

(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 李渤

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2009156456 A1, 2009. 12. 30,

W0 9916873 A1, 1999. 04. 08,

CN 1871256 A, 2006. 11. 29,

CN 101516907 A, 2009. 08. 26,

Arne Skerra. Anticalins as alternative
binding proteins for therapeutic
use. 《CURRENT OPINION IN MOLECULAR
THERAPEUTICS》. 2007, 第9卷(第4期), 336-344.武婕 等. 脂质运载蛋白突变文库的应用及
研究现状. 《生命的化学》. 2007, 第27卷(第5
期), 第416-418页.Hyun Jin Kim et al.. High-Affinity nity
Recognition of Lanthanide(III) Chelate
Complexes by a Reprogrammed Human Lipocalin
2. 《J. AM. CHEM. SOC. 》. 2009, 第131卷(第
10期), 第3565-3576页.Arne Skerra. Alternative binding
proteins: Anticalins - harnessing the
structural plasticity of the lipocalin
ligand pocket to engineer novel binding
activities. 《the FEBS Journal》. 2008, 第275
卷(第11期), 第2677-2683页.

审查员 周洋

权利要求书4页 说明书42页

序列表40页 附图29页

(54) 发明名称

对给定靶标具有亲和力的人脂质运载蛋白2
(Lcn2, hNGAL) 的突变蛋白

(57) 摘要

本发明涉及用于产生突变蛋白的新文库和源自人脂质运载蛋白2 (Lcn2, hNGAL) 的新突变蛋白以及相关蛋白, 所述蛋白以可检测的亲和力结合给定靶标。本发明还涉及编码这样的突变蛋白的相应的核酸分子以及用于产生所述核酸分子的方法。本发明进一步涉及用于生产这样的突变蛋白的方法。例如, 这样的突变蛋白可以用于结合天然生物分子的致病形式, 例如阿尔茨海默氏病中的β淀粉样肽, 并使其耗尽, 或者可以与肿瘤新生血管相关的纤连蛋白额外结构域B为靶向。

Seq ID:	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Seq 1	ATG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Seq 2	ATG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Seq 3	ATG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Seq 4	ATG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Seq 5	ATG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Seq 6	ATG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Seq 7	ATG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Seq 8	ATG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Seq 9	ATG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Seq 10	ATG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG

1. 一种用于产生源自 hNGAL 的突变蛋白的方法,其中所述突变蛋白以 200nM 或更低的解离常数 (K_D) 结合给定非天然靶标,所述方法包括:

(a) 使编码 hNGAL 的核酸分子发生突变,所述突变发生在编码对应于 SEQ ID NO:44 中所示成熟 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 96、100 和 106 的任何序列位置中的至少一个的核苷酸三联体处;并且还至少发生在编码成熟 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、103、125、127、132 和 134 中任意的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或全部 17 个核苷酸三联体处,从而得到一种或多种突变蛋白核酸分子,并且

(b) 在合适的表达系统中表达在步骤 (a) 中获得的所述一种或多种突变蛋白核酸分子,以及

(c) 通过选择和 / 或分离富集对给定靶标具有可检测的结合亲和力的一种或多种突变蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中步骤 (a) 为:

(a) 使编码 hNGAL 的核酸分子发生突变,所述突变至少发生在编码对应于 SEQ ID NO:44 中所示成熟 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 96、100 和 106 的任何序列位置中的 2 个核苷酸三联体处,并且至少发生在编码成熟 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、103、125、127、132 和 134 中任意的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或全部 17 个核苷酸三联体处,从而得到一种或多种突变蛋白核酸分子。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中步骤 (a) 为:

(a) 使编码 hNGAL 的核酸分子发生突变,所述突变发生在编码对应于 SEQ ID NO:44 中所示成熟 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 96、100 和 106 的序列位置中的全部 3 个核苷酸三联体处,并且至少发生在编码成熟 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、103、125、127、132 和 134 中任意的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或全部 17 个核苷酸三联体处,从而得到一种或多种突变蛋白核酸分子。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其通过仅以核苷酸三联体组实现的替换,使至少在编码成熟 hNGAL 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 中任意的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个核苷酸三联体处发生随机突变。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中在突变期间,编码半胱氨酸的核苷酸三联体不用于替换。

6. 一种通过根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法可获得的源自 hNGAL 的突变蛋白,其中所述突变蛋白在对应于成熟 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 96、100 和 106 的序列位置中的任意处包含至少一个突变的氨基酸残基,其中所述突变蛋白进一步在对应于成熟 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、103、125、127、132 和 134 的序列位置中的任意处包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个突变的氨基酸残基,其中所述突变蛋白以 200nM 或更低的解离常数 (K_D) 结合给定非天然靶标。

7. 根据权利要求 6 所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白在成熟 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 96、100 和 106 处包含 2 或 3 个突变的氨基酸残基。

8. 根据权利要求7所述的突变蛋白,其在成熟hNGAL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中的任意处包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17个突变的氨基酸残基。

9. 根据权利要求8所述的突变蛋白,其在成熟hNGAL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中的任意处包含18、19或20个突变的氨基酸残基。

10. 根据权利要求6至9中任一项所述的突变蛋白,其中所述非天然靶标选自肽、蛋白、蛋白的结构域、和小有机分子,其中所述小有机分子是这样的有机分子:其包含至少两个碳原子,分子量范围为100至2000道尔顿。

11. 根据权利要求10所述的突变蛋白,其中所述小有机分子为显示免疫半抗原的特征的化合物。

12. 根据权利要求10所述的突变蛋白,其中所述肽具有2-45个氨基酸的长度。

13. 根据权利要求12所述的突变蛋白,其中所述肽为 β 淀粉样肽。

14. 根据权利要求13所述的突变蛋白,其中所述 β 淀粉样肽为A β 40肽或A β 42肽。

15. 根据权利要求13或14所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白相对成熟hNGAL氨基酸序列包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸替代,所述氨基酸替代选自Leu36 $\rightarrow$ Val或Cys;Ala40 $\rightarrow$ Tyr或Lys或Val;Ile41 $\rightarrow$ Thr或Ser或Leu;Gln49 $\rightarrow$ Leu或Trp;Leu70 $\rightarrow$ Gly;Arg72 $\rightarrow$ Gly或Asp;Lys73 $\rightarrow$ Leu或Thr或Asp;Asp77 $\rightarrow$ Asn或His或Leu;Trp79 $\rightarrow$ Lys;Asn96 $\rightarrow$ Ile或Arg;Tyr100 $\rightarrow$ Gln或Arg或Glu;Leu103 $\rightarrow$ Met或Arg或Gly;Tyr106 $\rightarrow$ Tyr或Ala或Trp;Lys125 $\rightarrow$ Thr或Val或Glu;Ser127 $\rightarrow$ Gly或Gln或Ala;Tyr132 $\rightarrow$ Met或Ser或Thr;以及Lys134 $\rightarrow$ Asn。

16. 根据权利要求15所述的突变蛋白,其由SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:43的序列编码。

17. 根据权利要求10所述的突变蛋白,其中所述蛋白为纤连蛋白或其结构域。

18. 根据权利要求17所述的突变蛋白,其中所述纤连蛋白结构域为额外结构域B。

19. 根据权利要求17或18所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白相对成熟hNGAL氨基酸序列包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸替代,所述氨基酸替代选自Leu36 $\rightarrow$ Lys或Glu或Arg或Ala;Ala40 $\rightarrow$ His或Met或Thr或Ser;Ile41 $\rightarrow$ Asp或Arg或Trp或Leu;Gln49 $\rightarrow$ Arg或Ala或Tyr;Leu70 $\rightarrow$ Leu或Arg或Met;Arg72 $\rightarrow$ Val或Arg或Gln或Met;Lys73 $\rightarrow$ His或Arg或Ser;Asp77 $\rightarrow$ Asn或His或Lys或Arg;Trp79 $\rightarrow$ Arg或Met或Leu;Asn96 $\rightarrow$ Lys或Ala或Ser;Tyr100 $\rightarrow$ Trp或Pro或Lys;Leu103 $\rightarrow$ His或Pro;Tyr106 $\rightarrow$ Phe或Trp或Thr;Lys125 $\rightarrow$ Arg或His或Thr;Ser127 $\rightarrow$ Tyr或Phe Ala;Tyr132 $\rightarrow$ Leu或Phe;Lys134 $\rightarrow$ Glu或His或Gly或Phe;以及Ser146 $\rightarrow$ Asn。

20. 根据权利要求19所述的突变蛋白,其由SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26的序列编码。

21. 根据权利要求6所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白相对成熟hNGAL氨基酸序列进一步包含选自Gln28 $\rightarrow$ His和Cys87 $\rightarrow$ Ser的氨基酸替代。

22. 根据权利要求6所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白在对应于成熟hNGAL线性多肽序列的序列位置137和145的序列位置中的任意处不包含突变的氨基酸残基。

23. 根据权利要求 6 所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白相对成熟 hNGAL 氨基酸序列包含选自 Tyr52 → Gln 或 Val ;Ser68 → Lys 或 Asn ;Arg81 → Trp 或 Asn 或 His 的氨基酸替代。

24. 根据权利要求 6 所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白与选自下述的化合物缀合:
(1) 有机分子,(2) 金属或金属络合物,(3) 酶标记、放射性标记、有色标记、生色标记、和发光标记,或 (4) 细胞抑制剂。

25. 根据权利要求 6 所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白与荧光标记缀合。

26. 根据权利要求 24 所述的突变蛋白,其中所述有机分子为半抗原或毒素 ;或者其中所述金属为胶体金。

27. 根据权利要求 24 所述的突变蛋白,其中所述有机分子为洋地黄毒苷或生物素。

28. 根据权利要求 6 所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白在其 N 端和 / 或其 C 端融合至融合配偶体,所述融合配偶体为蛋白、蛋白结构域或肽。

29. 根据权利要求 6 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。

30. 根据权利要求 29 所述的突变蛋白,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、白蛋白结合肽以及白蛋白结合蛋白。

31. 根据权利要求 30 所述的突变蛋白,其中所述聚亚烷基二醇为聚乙二醇 (PEG) 或其活化的衍生物。

32. 根据权利要求 28 所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白的融合配偶体为延长所述突变蛋白的血清半衰期的蛋白结构域。

33. 根据权利要求 32 所述的突变蛋白,其中所述蛋白结构域为免疫球蛋白的 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。

34. 根据权利要求 33 所述的突变蛋白,其中所述白蛋白结合蛋白为细菌白蛋白结合结构域或脂质运载蛋白突变蛋白。

35. 根据权利要求 34 所述的突变蛋白,其中所述细菌白蛋白结合结构域为链球菌 G 蛋白的白蛋白结合结构域。

36. 根据权利要求 33 所述的突变蛋白,其中所述白蛋白结合肽具有式 Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys,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。

37. 根据权利要求 6 所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白以 100nM 或更低的 KD 结合所述给定非天然靶标。

38. 根据权利要求 37 所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白以 50nM 或更低的 KD 结合所述给定非天然靶标。

39. 根据权利要求 37 所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白以 10nM 或更低的 KD 结合所述给定非天然靶标。

40. 根据权利要求 37 所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白以 1nM 或更低的 KD 结合所述给定非天然靶标。

41. 一种核酸分子,其包含编码根据权利要求 6 至 40 中任一项所述突变蛋白的核苷酸

序列。

42. 根据权利要求 41 所述的核酸分子,其中所述核酸分子可操作地连接至调节序列从而能够表达所述核酸分子。

43. 根据权利要求 41 或 42 所述的核酸分子,其包含在载体中。

44. 根据权利要求 41 或 42 所述的核酸分子,其包含在噬菌粒载体中。

45. 一种宿主细胞,其含有根据权利要求 41 至 44 中任一项所述的核酸分子。

46. 一种用于生产根据权利要求 6 至 40 中任一项所述的突变蛋白的方法,其中通过基因工程方法从编码所述突变蛋白的核酸开始生产所述突变蛋白或所述突变蛋白和另一多肽的融合蛋白。

47. 根据权利要求 46 所述的方法,其中在细菌或真核宿主生物体中生产所述突变蛋白并且从此宿主生物体或其培养物中分离所述突变蛋白。

48. 一种药物组合物,其包含至少一种根据权利要求 6 至 40 中任一项所述的突变蛋白。

49. 根据权利要求 6 至 40 中任一项所述的突变蛋白用于结合 / 检测给定靶标的用途,其包括:

(a) 使所述突变蛋白与推测含有所述靶标的测试样品接触,以及

(b) 通过合适的信号检测突变蛋白 / 靶标复合物。

50. 根据权利要求 6 至 40 中任一项所述的突变蛋白用于使化合物以预先选择的部位为靶向的用途,其包括:

(a) 使所述突变蛋白与所述化合物接触,以及

(b) 将突变蛋白 / 化合物复合物递送至所述预先选择的部位。

51. 根据权利要求 6 至 40 中任一项所述的突变蛋白用于与给定靶标形成复合物的用途。

52. 如权利要求 6 至 40 中任一项限定的突变蛋白用于制备药物组合物的用途。

53. 如权利要求 13 至 16 中任一项限定的突变蛋白用于制备药物组合物的用途,其中所述药物组合物用于治疗阿尔茨海默氏病。

54. 如权利要求 17 至 20 中任一项限定的突变蛋白用于制备药物组合物的用途,其中所述药物组合物用于癌症的治疗、纤维化的治疗、或涉及新血管形成的疾病的治疗。

55. 一种诊断或分析试剂盒,其包含如权利要求 6 至 40 中任一项限定的突变蛋白。

对给定靶标具有亲和力的人脂质运载蛋白 2 (Lcn2, hNGAL) 的突变蛋白

[0001] 概述

[0002] 本发明涉及用于产生突变蛋白的新文库和源自人脂质运载蛋白 2 (Lcn2, hNGAL) 的新突变蛋白以及相关蛋白, 所述蛋白以可检测的亲和力结合给定靶标。本发明还涉及编码这样的突变蛋白的相应的核酸分子以及用于产生所述核酸分子的方法。本发明进一步涉及用于生产这样的突变蛋白的方法。此外, 本发明涉及包含这样的脂质运载蛋白突变蛋白的药物组合物以及所述突变蛋白的多种用途。

[0003] 根据本发明的 Lcn2 突变蛋白显示出在数个疾病领域作为治疗和 / 或诊断试剂的潜力。例如, 它们可以用于结合天然生物分子的致病形式 (例如阿尔茨海默氏病中的 β 淀粉样肽) 并使其耗尽。在另一个实施例中, 它们可以用于将各种标记或毒素特异靶向至疾病相关的细胞表面标记物, 例如与肿瘤新生血管相关的纤连蛋白额外结构域 B。由于可以根据本发明的产生的 Lcn2 突变蛋白的特殊益处, 各种其它应用或实施例也是可以的。

背景技术

[0004] 阿尔茨海默氏病 (AD) 是老年人群中最为常见的痴呆形式。与 AD 相关的淀粉样前体蛋白的缺陷性进程产生具有潜在神经毒性的包含 40-42 个残基的 β 淀粉样肽 (A β)。A β 之后聚集成低聚物和长纤维, 这在该疾病的过程中具有关键作用, 从而聚集形成老年斑块 (Haass 和 Selkoe (2007) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 8, 101-112)。尽管 AD 越来越重要, 但对于预防、治疗或减缓所述痴呆的有效疗法的需求仍未得到满足。

[0005] 当前的抗淀粉样方法的目标为: (i) 预防 A β 形成, (ii) 阻断其聚集, (iii) 降低脑中可溶 A β 的水平, 以及 (iv) 分解存在的淀粉样斑块。迄今为止, 包括主动和被动免疫 AD 患者的免疫疗法在此领域最有希望 (Dodel 等人 (2003) Lancet Neurology 2, 215-220; Lichtlen 和 Mohajeri (2007) J. Neurochem. 104, 859-874; Brody 和 Holtzman (2008) Annu. Rev. Neurosci. 31, 175-193)。然而, 由于 6% 的患者发生了脑膜脑炎, 因此停止了主动免疫 AD 患者的近期临床试验。由于这些 Fc 介导的免疫功能的潜在不良反应, 非 Ig 结合试剂例如 Anticalin, 提供了替代方案。与 β 淀粉样蛋白具有特异性的亲和分子的识别是示出基因工程的非 Ig 结合蛋白的潜力的一个实例 (Grönwall 等人 (2007) J. Biotechnol. 128, 162-183; Hoyer 等人 (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 5099-5104)。

[0006] 然而, 亲和体的细菌来源可能在人患者中造成免疫原性的问题。

[0007] 纤连蛋白 (FN) 在细胞粘附、迁移、增殖和分化中起重要作用。FN 为大的模块化的二聚体糖蛋白, 其包含 I、II 和 III 型的多个结构域。FN 的可选剪切变体, 例如其额外结构域 B (ED-B, 在 FN^{III}7 和 FN^{III}8 结构域之间掺入) 表现为组织特异的和发育阶段依赖的行为 (Zardi 等人 (1987) EMBO J 6, 2337-2342)。

[0008] ED-B 不存在于正常成人组织中, 但在伤口愈合和肿瘤的血管形成期间例外。因此, 含有 ED-B 的纤连蛋白在吸引新血管形成和经历异常血管生成的多种不同肿瘤类型中大量

表达。尽管 ED-B 在血管生成中的实际生物学功能尚不清楚,其在 FN 中的加入起到肿瘤发生的良好标记物的作用。通常,区分恶性组织和健康器官是有利的治疗策略,原因在于,使药物直接选择性靶向到肿瘤组织使得药物局部浓度提高。

[0009] 为了特异性检测和靶向 ED-B,使用噬菌体展示抗体技术提供了重组抗体片段。分离的抗体片段中的一种为 L19 单链 Fv (Carnemolla 等人 (1996) *Int. J. Cancer* 68, 397-405;Ebbinghaus 等人 (2004) *Curr. Pharm. Des.* 10, 1537-1549)。目前通过 L19 组合有效的细胞毒性药剂来解决 ED-B 显示了癌症治疗和诊断的前景 (Schliemann 和 Neri (2007) *Biochim. Biophys. Acta* 1776, 175-192;Kaspar 等人 (2006) *Int. J. Cancer* 118, 1331-1339)。

[0010] 然而, L19 scFv 片段易于寡聚化。

[0011] 由于在治疗阿尔茨海默氏病和肿瘤的诊断或治疗中存在的上述问题,本发明的目的是提供可以用于治疗和肿瘤的诊断或治疗中的替代方法和化合物。

发明内容

[0012] 本发明人发现,源自脂质运载蛋白 2 的蛋白的特定突变蛋白由于其稳定性更好并且尺寸更小,因此是具有吸引力的化合物。本发明人鉴定了特定组的脂质运载蛋白 2 突变蛋白,其在特定位点具有突变,显示具有例如与 ED-B 的高亲和力和特异性。这种 Lcn2 突变蛋白以高灵敏性特异性地识别人细胞上的含 ED-B 的纤连蛋白,因而显示了作为用于诊断和治疗肿瘤疾病的治疗试剂的前景。

[0013] 本发明人还得以鉴定了与 A β 肽具有高亲和力和特异性的特定 Lcn2 突变蛋白。这种 Lcn2 突变蛋白还可以抑制 A β 聚集,并因而显示了在进一步改进和修饰后可以作为治疗 AD 的治疗试剂的前景。

[0014] 此外,本发明还描述了基于人 Lcn2 支架的新随机文库,所述文库允许有效产生通常与给定靶标具有高亲和力和特异性的突变蛋白,例如本发明的突变蛋白。这种文库或其部分的实例示于图 1 和 2。

[0015] 在一个方面,至少在编码 hLcn2 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 中任一个的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个核苷酸三联体处,通过此位置处以核苷酸三联体组实现的替换,进行随机突变。核苷酸三联体组可以是指、但不限于 (a) 少于由核苷酸 NNN 编码的 64 个可能的三联体 (如果 N = A、T、G、C,则表示 4x4x4=64 个可能的三联体), (b) 少于由核苷酸 NNK 或 NNS 编码的 32 个可能的三联体, (c) 少于编码全部 20 个天然蛋白氨基酸的必需三联体。在另一个实施方案中,在突变期间,编码半胱氨酸的核苷酸三联体不用于替换。这意味着突变不带来在原始未经突变的序列中不包含的携带新半胱氨酸的突变蛋白。因而,在这一方面规定了那些核苷酸三联体将被引入到如本段落所规定的待突变位置 (同样参见实施例 1 和图 2)。

[0016] 因而,在第一方面,本发明涉及一种产生源自人脂质运载蛋白 2 (Lcn2;也称为中性粒细胞明胶酶相关的脂质运载蛋白即 hNGAL 或称为 siderocalin)的突变蛋白的方法。以此方法获得的突变蛋白能够以可检测的亲和力结合非天然靶标。该方法包括:使编码人脂质运载蛋白 2 (Lcn2, hNGAL)的核酸分子发生突变,所述突变发生在对应于人脂质运载蛋

白 2 线性多肽序列的序列位置 96、100 和 106 的序列位置中的至少一个处,从而得到一种或多种突变蛋白核酸分子。

[0017] 根据上文,术语“人脂质运载蛋白 2”或“人中性粒细胞明胶酶相关的脂质运载蛋白 (hNGAL)”包括来自其它物种的已被鉴定或尚未分离的结构同源物,所述结构同源物具有大于约 60% 的氨基酸序列同源性或序列同一性。优选的是,上文描述的这些人脂质运载蛋白在对应于 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 33、36、40、41、42、43、44、46、47、48、49、50、51、52、54、55、59、65、68、70、72、73、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136 和 138 的序列位置中的任一个处包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个突变的氨基酸残基。本文使用的术语“同源性”以其通常的含义在本文中使使用,并且包括相同氨基酸以及认为是在两个互相比较的蛋白质线性氨基酸序列等价位置处的保守替换的氨基酸(例如天冬氨酸残基交换谷氨酸残基)。本发明所用的术语“序列同一性”或“同一性”表示本发明多肽序列与有关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。

[0018] 本文中,使用程序 BLASTP,blastp 2.2.5 版(2002 年 11 月 16 日;参见 Altschul, S. F. 等人 (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402)测定序列同源性或序列同一性百分比。同源性百分比基于包括前肽序列的完整多肽序列比对(matrix: BLOSUM 62; gap costs: 11.1; cutoff value set to 10^{-3}),在配对比较中使用人脂质运载蛋白 2 作为参考。其计算为,以 BLASTP 程序输出的结果表示的“阳性”(同源氨基酸)除以该程序选择用于比对的氨基酸总数的百分比。在这方面应注意,所选择的氨基酸的总数可以与人脂质运载蛋白 2 的长度不同。

[0019] 在不同于人脂质运载蛋白 2 的蛋白用于本发明的情况下,针对人脂质运载蛋白 2 给出的突变序列位置的定义可以在公开的序列比对或比对方法的帮助下指定给该其它脂质运载蛋白,所述公开的序列比对或比对方法是技术人员可获得的。可以例如如 WO 99/16873 (参见本文图 3)中所述,使用例如公开的比对(例如 Redl, B. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 241-248 的图 1 中的比对)进行序列比对。如果可获得脂质运载蛋白的三维结构,则可以将结构叠加用确定要进行本发明的突变的那些序列位置。结构分析的其它方法,例如多维核磁共振波谱法也可用于此目的。

[0020] 人脂质运载蛋白 2 的同源物也可以是人脂质运载蛋白 2 的突变蛋白本身,其中在不同于本发明中选择的位置的位置处引入氨基酸替换。例如,这种突变蛋白可以是这样的蛋白:相比于人脂质运载蛋白 2 的野生型序列,蛋白中的 β 桶的溶剂暴露表面处的位置被突变,以便提高蛋白的溶解性或稳定性。

[0021] 通常,术语“人脂质运载蛋白 2”包括与人脂质运载蛋白 2 的序列同源性或序列同一性大于 60%、70%、80%、85%、90% 或 95% 的所有蛋白。优选的是,上文描述的这些人脂质运载蛋白在对应于 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 33、36、40、41、42、43、44、46、47、48、49、50、51、52、54、55、59、65、68、70、72、73、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136 和 138 的序列位置中的任一个处包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个突变的氨基酸残基。

[0022] 因而,在另一方面,本发明提供了一种源自人脂质运载蛋白 2 的突变蛋白(即,人脂质运载蛋白突变蛋白或突变的人脂质运载蛋白,优选突变的成熟 hNGAL,其中所述成熟

hNGAL 具有 SWISS-PROT 数据库登记号 P80188,更优选所述成熟 hNGAL 具有 SEQ ID NO: 44 中所示的氨基酸序列)。此突变蛋白在对应于人 Lcn2 线性多肽序列的序列位置 96、100 和 106 的序列位置中的任一个处包含至少一个或两个突变的氨基酸残基,并且其中该突变蛋白以可检测的亲合力结合给定非天然靶标。

[0023] 本文使用的“突变蛋白”、“突变的”的实体(蛋白或核酸)或“突变体”是指,相比于天然存在的(野生型)核酸或蛋白“参照”支架,分别为一个或多个核苷酸或氨基酸的交换、缺失或插入。优选地,分别交换、缺失或插入的核苷酸或氨基酸的数量为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更多,例如 25、30、35、40、45 或 50。

[0024] 本文使用的术语“人中性粒细胞明胶酶相关的脂质运载蛋白”或“hNGAL”或“脂质运载蛋白 2”或“Lcn2”是指具有 SWISS-PROT 数据库登记号 P80188 的成熟 hNGAL (本文示例为 SEQ ID NO: 44)。

[0025] 在此上下文中,应注意本发明基于下述令人吃惊的发现:使人脂质运载蛋白 2、大鼠 α 2 微球蛋白相关蛋白 (A2m) 和小鼠 24p3/uterocalin (24p3) 在这些上文提及的 3 个序列位置中的一个或多个处进行突变,提供了具有结合预定靶标的足够亲和力的突变蛋白,所述预定靶标可以包括、但不限于肽、蛋白、蛋白的片段或结构域和小有机分子。

[0026] 给定靶标可以是任何期望的非天然靶标/配体。在一个实施方案中,术语“非天然配体”是指在生理条件下不结合天然的成熟 hNGAL 的化合物。

[0027] 本文针对非天然靶标使用的术语“有机分子”或“小有机分子”是指这样的有机分子:其包含至少两个碳原子,但是优选不大于 7 或 12 个可旋转碳键,分子量范围为 100 至 2000 道尔顿,优选 100 至 1000 道尔顿,并且任选地包含一个或两个金属原子。

[0028] 本文针对非天然靶标使用的术语“肽”是指具有 2 至 45 个氨基酸的二肽或寡肽。在一个实施方案中,该肽具有 2-40、2-35、2-30、2-25、2-20、2-15 或 2-10 个氨基酸残基。该肽可以是天然存在的肽或合成肽,并且除了 20 个天然存在的 L-氨基酸之外,还可以包括 D-氨基酸、非天然存在的氨基酸和氨基酸类似物。在一个实施方案中,该肽为 β 淀粉样肽 ($A\beta$ 或 $A\beta$)。在另一个实施方案中, β 淀粉样肽为 $A\beta$ 40 肽或 $A\beta$ 42 肽。

[0029] 在一个实施方案中,该小有机分子为显示具有免疫半抗原的特征的化合物。

[0030] 在一个实施方案中,非天然靶标是蛋白,且是纤连蛋白或其结构域,例如 EB- 结构域或 EB- 结构域的片段。

[0031] 本发明的人脂质运载蛋白 2 突变蛋白可以包含位于突变的氨基酸序列位置之外的野生型(天然)氨基酸序列。在其它方面,本文公开的脂质运载蛋白突变蛋白还可以含有进行突变的序列位置之外的氨基酸突变,只要这些突变不干扰突变蛋白的结合活性和折叠即可。使用已建立的标准方法(Sambrook, J. 等人 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) 可以非常容易地在 DNA 水平上实现此类突变。氨基酸序列的可能改变为插入或缺失以及氨基酸替换。此类替换可以是保守的,即氨基酸残基被化学上相似的氨基酸残基替代。保守替换的实例为以下组成员的替代: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,也可以在氨基酸序列中引入非保守改变。此外,除了替代单一的氨基酸残基,还可以插入或缺失人脂质运载蛋白 2 一级结构的一

个或多个连续的氨基酸,只要这些缺失或插入产生稳定的折叠 / 功能突变蛋白即可。

[0032] 总的来说,氨基酸序列的这种修饰包括单一氨基酸位置的定点突变,以便通过掺入特定限制性酶的切割位点而简化突变的脂质运载蛋白基因或其部分的亚克隆。此外,可掺入这些突变以进一步提高脂质运载蛋白突变蛋白与给定靶标的亲和力。并且,可以引入突变,以便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、蛋白质抗性或水溶解性,或者如果必要的话以降低聚集倾向。例如,天然存在的半胱氨酸残基可以突变成其它氨基酸,以防止二硫键的形成。然而,还可以有意地将其它氨基酸序列位置突变成半胱氨酸,以便引入新的反应性基团,例如用于缀合至其它化合物,例如聚乙二醇 (PEG)、羟乙基淀粉 (HES)、生物素、肽或蛋白质或者用于形成非天然的二硫键。将半胱氨酸残基引入人脂质运载蛋白 2 突变蛋白的氨基酸序列的这种突变的示例性可能包括,在对应于 hNGAL 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) 残基。产生的位于氨基酸位置 14、21、60、84、88、116、141、145、143、146 和 / 或 158 中的任一个一侧的硫醇部分可以用于对突变蛋白进行 PEG 化或 HES 化,例如以便提高相应的人脂质运载蛋白 2 突变蛋白的血清半衰期。

[0033] 在一个实施方案中,本发明的突变蛋白包含在对应于人脂质运载蛋白 2 线性多肽序列的序列位置 96、100 和 106 的序列位置中至少 2 个或全部 3 个处突变的氨基酸残基。

[0034] 在本发明的另一个实施方案中,该突变蛋白在对应于 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 33、36、40、41、42、43、44、46、47、48、49、50、51、52、54、55、59、65、68、70、72、73、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136 和 138 的序列位置中的任一个处包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个突变的氨基酸残基。在另一个实施方案中,该突变蛋白在 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 33、36、40、41、42、43、44、46、47、48、49、50、51、52、54、55、59、65、68、70、72、73、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136 和 138 中的任一个处包含至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 个突变的氨基酸残基。在另一个实施方案中,该突变蛋白在人脂质运载蛋白 2 线性多肽序列的序列位置 33、36、40、41、42、43、44、46、47、48、49、50、51、52、54、55、59、65、68、70、72、73、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136 和 138 中的任一个处包含 18、19 或 20 个突变的氨基酸残基。

[0035] 在本发明的一个实施方案中,该突变蛋白在上文列出的序列位置中的至少任意 10、14、15、20、22、24、26、28、29、30、31、32、33、35 或全部 45 个处包含突变的氨基酸残基。

[0036] 本发明的结合 β 淀粉样肽 (例如 A β 40 肽或 A β 42 肽) 的突变蛋白可以相对示例于图 17 的成熟人脂质运载蛋白 2 野生型氨基酸序列 (Lcn2) 包含至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个氨基酸替代,所述氨基酸替代包括、但不限于 Leu36 $\rightarrow$ Val 或 Cys ;Ala40 $\rightarrow$ Tyr 或 Lys 或 Val ;Ile41 $\rightarrow$ Thr 或 Ser 或 Leu ;Gln49 $\rightarrow$ Leu 或 Trp ;Leu70 $\rightarrow$ Gly ;Arg72 $\rightarrow$ Gly 或 Asp ;Lys73 $\rightarrow$ Leu 或 Thr 或 Asp ;Asp77 $\rightarrow$ Asn 或 His 或 Leu ;Trp79 $\rightarrow$ Lys ;Asn96 $\rightarrow$ Ile 或 Arg ;Tyr100 $\rightarrow$ Gln 或 Arg 或 Glu ;Leu103 $\rightarrow$ Met 或 Arg 或 Gly ;Tyr106 $\rightarrow$ Tyr 或 Ala 或 Trp ;Lys125 $\rightarrow$ Thr 或 Val 或 Glu ;Ser127 $\rightarrow$ Gly 或 Gln 或 Ala ;Tyr132 $\rightarrow$ Met 或 Ser 或 Thr ;以及 Lys134 $\rightarrow$ Asn。已发现,这种突变蛋白可以减少体外或体内 A β 聚集。优选的是,本文描述的突变蛋白结合 A β 且抑制 A β 聚集,所述 A β 优选 A β 40,更

优选在实施例 11 所指定的测定条件下(优选地包括突变蛋白 :A β 40 的比率为 1:10)。本发明还涉及如上文描述的突变蛋白,当与突变蛋白 US7 比较时,其具有可比较的生物学功能。“可比较的生物学功能”表示,这些突变蛋白能够结合和抑制 A β , 优选 A β 40,其中就 US7 的聚集抑制活性的差异不大于约 40%、30%、20%、15%、10%、5%、2、5%、2% 或 1%,例如在等同于实施例 11 中所列出的那些条件或与其相同的条件下(优选地,包括突变蛋白 :A β 40 的比率为 1:10)。本发明还涉及本文描述的突变蛋白,其用于治疗或预防神经退行性疾病,例如阿尔茨海默氏病。

[0037] 在一个实施方案中,本发明的结合 β 淀粉样肽(例如 A β 40 肽或 A β 42 肽)的突变蛋白包含下述氨基酸替代:Leu36 $\rightarrow$ Val ;Ala40 $\rightarrow$ Tyr ;Ile41 $\rightarrow$ Thr ;Gln49 $\rightarrow$ Leu ;Leu70 $\rightarrow$ Gly ;Lys73 $\rightarrow$ Leu ;Asp77 $\rightarrow$ Asn ;Trp79 $\rightarrow$ Lys ;Asn96 $\rightarrow$ Ile ;Tyr100 $\rightarrow$ Gln ;Leu103 $\rightarrow$ Met ;Lys125 $\rightarrow$ Thr ;Ser127 $\rightarrow$ Gly ;Tyr132 $\rightarrow$ Met ;以及 Lys134 $\rightarrow$ Asn。包含这种氨基酸替代的突变蛋白的实例为示例于图 17 的 S1-A4 (SEQ ID NO: 39)。

[0038] 在另一个实施方案中,本发明的结合 β 淀粉样肽(例如 A β 40 肽或 A β 42 肽)的突变蛋白包含下述氨基酸替代:Leu36 $\rightarrow$ Val ;Ala40 $\rightarrow$ Lys ;Ile41 $\rightarrow$ Ser ;Gln49 $\rightarrow$ Trp ;Leu70 $\rightarrow$ Gly ;Arg72 $\rightarrow$ Gly ;Lys73 $\rightarrow$ Thr ;Asp77 $\rightarrow$ His ;Trp79 $\rightarrow$ Lys ;Asn96 $\rightarrow$ Arg ;Tyr100 $\rightarrow$ Arg ;Leu103 $\rightarrow$ Arg ;Tyr106 $\rightarrow$ Ala ;Lys125 $\rightarrow$ Val ;Ser127 $\rightarrow$ Gln ;Tyr132 $\rightarrow$ Ser ;以及 Lys134 $\rightarrow$ Asn。包含这种氨基酸替代的突变蛋白的实例为示例于图 17 的 US-7 (SEQ ID NO: 41)。

[0039] 本发明还预见了突变的成熟 hNGAL 脂质运载蛋白(如保藏于 SWISS-PROT 数据库,登记号为 P80188,优选具有 SEQ ID NO: 40 中所示的氨基酸序列),其在对应于野生型 hNGAL 线性多肽序列的位置 36、40、41、49、70、72、73、77、79、96、100、103、106、125、127、132、134 的位置处包含一个或多个如本文描述的突变氨基酸。

[0040] 在另一个实施方案中,本发明的结合 β 淀粉样肽(例如 A β 40 肽或 A β 42 肽)的突变蛋白包含下述氨基酸替代:Leu36 $\rightarrow$ Cys ;Ala40 $\rightarrow$ Val ;Ile41 $\rightarrow$ Leu ;Gln49 $\rightarrow$ Leu ;Leu70 $\rightarrow$ Gly ;Arg72 $\rightarrow$ Asp ;Lys73 $\rightarrow$ Asp ;Asp77 $\rightarrow$ Leu ;Trp79 $\rightarrow$ Lys ;Asn96 $\rightarrow$ Arg ;Tyr100 $\rightarrow$ Glu ;Leu103 $\rightarrow$ Gly ;Tyr106 $\rightarrow$ Trp ;Lys125 $\rightarrow$ Glu ;Ser127 $\rightarrow$ Ala ;Tyr132 $\rightarrow$ Thr ;以及 Lys134 $\rightarrow$ Asn。包含这种氨基酸替代的突变蛋白的实例为示例于图 17 的 H1-G1 (SEQ ID NO: 43)。

[0041] 在另一个实施方案中,本发明的结合 β 淀粉样肽(例如 A β 40 肽或 A β 42 肽)的突变蛋白包含下述氨基酸替代:Leu36 $\rightarrow$ Ala ;Ala40 $\rightarrow$ Val ;Ile41 $\rightarrow$ Leu ;Gln49 $\rightarrow$ Leu ;Leu70 $\rightarrow$ Gly ;Arg72 $\rightarrow$ Asp ;Lys73 $\rightarrow$ Asp ;Asp77 $\rightarrow$ Leu ;Trp79 $\rightarrow$ Lys ;Asn96 $\rightarrow$ Arg ;Tyr100 $\rightarrow$ Glu ;Leu103 $\rightarrow$ Gly ;Tyr106 $\rightarrow$ Trp ;Lys125 $\rightarrow$ Glu ;Ser127 $\rightarrow$ Ala ;Tyr132 $\rightarrow$ Thr ;以及 Lys134 $\rightarrow$ Asn。包含这种氨基酸替代的突变蛋白的实例为示例为 SEQ ID NO: 50 的 H1GA。

[0042] 优选的是,本文上文描述的突变蛋白结合 A β 且抑制 A β 聚集,所述 A β 优选 A β 40,更优选在实施例 23 所指定的测定条件下(优选地, A β 40 :H1GA 的比率为 10:2)。本发明还涉及如上文描述的突变蛋白,当与突变蛋白 H1GA 比较时,其具有可比较的生物学功能。“可比较的生物学功能”表示,这些突变蛋白能够结合和抑制 A β , 优选 A β 40,其中就 H1GA 的聚集抑制活性的差异不大于约 40%、30%、20%、15%、10%、5%、2、5%、2% 或 1%,例如在等

同于实施例 23 中所列出的那些条件或与其相同的条件下(优选地, A β 40 :H1GA 的比率为 10:2)。本发明还涉及本文描述的突变蛋白,其用于治疗或预防神经退行性疾病,例如阿尔茨海默氏病。

[0043] 在另一个实施方案中,本发明的结合 β 淀粉样肽(例如 A β 40 肽或 A β 42 肽)的突变蛋白包含下述氨基酸替代:Leu36 $\rightarrow$ Val;Ala40 $\rightarrow$ Val;Ile41 $\rightarrow$ Leu;Gln49 $\rightarrow$ Leu;Leu70 $\rightarrow$ Gly;Arg72 $\rightarrow$ Asp;Lys73 $\rightarrow$ Asp;Asp77 $\rightarrow$ Leu;Trp79 $\rightarrow$ Lys;Asn96 $\rightarrow$ Arg;Tyr100 $\rightarrow$ Glu;Leu103 $\rightarrow$ Gly;Tyr106 $\rightarrow$ Trp;Lys125 $\rightarrow$ Glu;Ser127 $\rightarrow$ Ala;Tyr132 $\rightarrow$ Thr;以及 Lys134 $\rightarrow$ Asn。包含这种氨基酸替代的突变蛋白的实例为示例为 SEQ ID NO: 52 的 H1GV。

[0044] 优选的是,本文上文描述的突变蛋白在实施例 21 所指定的测定条件下结合 A β 40。本发明还涉及如上文描述的突变蛋白,当与突变蛋白 H1GV 比较时,其具有可比较的生物学功能。“可比较的生物学功能”表示,这些突变蛋白能够结合和抑制 A β , 优选 A β 40, 其中就 H1GV 的聚集抑制活性的差异不大于约 40%、30%、20%、15%、10%、5%、2.5%、2% 或 1%,例如在等同于实施例 21 中所列出的那些条件或与其相同的条件下。本发明还涉及本文描述的突变蛋白,其用于治疗或预防神经退行性疾病,例如阿尔茨海默氏病。

[0045] 在另一个实施方案中,本发明的结合额外结构域 B 或其片段的突变蛋白包含下述氨基酸替代:Leu36 $\rightarrow$ Lys;Ala40 $\rightarrow$ His;Ile41 $\rightarrow$ Asp;Gln49 $\rightarrow$ Arg;Tyr52 $\rightarrow$ Gln;Ser68 $\rightarrow$ Asn;Leu70 $\rightarrow$ Arg;Arg72 $\rightarrow$ Val;Lys73 $\rightarrow$ His;Asp77 $\rightarrow$ Asn;Trp79 $\rightarrow$ Arg;Arg81 $\rightarrow$ Trp;Tyr100 $\rightarrow$ Trp;Tyr106 $\rightarrow$ Trp;Lys125 $\rightarrow$ Arg;Ser127 $\rightarrow$ Tyr;Tyr132 $\rightarrow$ Leu;Lys134 $\rightarrow$ Glu 以及 Ser146 $\rightarrow$ Asn。包含这种氨基酸替代的突变蛋白的实例为示例于图 17 的 N7A (SEQ ID NO: 20)。

[0046] 在另一个实施方案中,本发明的结合额外结构域 B 或其片段的突变蛋白包含下述氨基酸替代:Leu36 $\rightarrow$ Arg;Ala40 $\rightarrow$ Met;Ile41 $\rightarrow$ Arg;Gln49 $\rightarrow$ Ala;Tyr52 $\rightarrow$ Val;Ser68 $\rightarrow$ Lys;Leu70 $\rightarrow$ Met;Arg72 $\rightarrow$ Gln;Lys73 $\rightarrow$ Arg;Asp77 $\rightarrow$ Lys;Trp79 $\rightarrow$ Met;Arg81 $\rightarrow$ Asn;Asn96 $\rightarrow$ Ala;Tyr100 $\rightarrow$ Pro;Leu103 $\rightarrow$ Pro;Tyr106 $\rightarrow$ Thr;Lys125 $\rightarrow$ His;Ser127 $\rightarrow$ Phe;以及 Lys134 $\rightarrow$ His。包含这种氨基酸替代的突变蛋白的实例为示例于图 17 的 N9B (SEQ ID NO: 24)。

[0047] 在另一个实施方案中,本发明的结合额外结构域 B 或其片段的突变蛋白包含下述氨基酸替代:Leu36 $\rightarrow$ Ala;Ala40 $\rightarrow$ Thr;Ile41 $\rightarrow$ Trp;Gln49 $\rightarrow$ Tyr;Tyr52 $\rightarrow$ Gln;Ser68 $\rightarrow$ Asn;Arg72 $\rightarrow$ Met;Lys73 $\rightarrow$ Ser;Asp77 $\rightarrow$ Arg;Trp79 $\rightarrow$ Met;Arg81 $\rightarrow$ His;Asn96 $\rightarrow$ Ser;Tyr100 $\rightarrow$ Trp;Tyr106 $\rightarrow$ Trp;Lys125 $\rightarrow$ Arg;Ser127 $\rightarrow$ Tyr;Tyr132 $\rightarrow$ Phe;以及 Lys134 $\rightarrow$ Gly。包含这种氨基酸替代的突变蛋白的实例为示例于图 17 的 N10D (SEQ ID NO: 26)。

[0048] 在另一个实施方案中,本发明的结合额外结构域 B 或其片段的突变蛋白包含下述氨基酸替代:Leu36 $\rightarrow$ Glu;Ala40 $\rightarrow$ Ser;Ile41 $\rightarrow$ Leu;Gln49 $\rightarrow$ Arg;Leu70 $\rightarrow$ Arg;Lys73 $\rightarrow$ Ser;Asp77 $\rightarrow$ His;Trp79 $\rightarrow$ Leu;Asn96 $\rightarrow$ Leu;Tyr100 $\rightarrow$ Lys;Leu103 $\rightarrow$ His;Tyr106 $\rightarrow$ Phe;Lys125 $\rightarrow$ Thr;Ser127 $\rightarrow$ Ala;以及 Lys134 $\rightarrow$ Phe。包含这种氨基酸替代的突变蛋白的实例为示例于图 17 的 N7E (SEQ ID NO: 22)。

[0049] 参考图 17 描述的上述突变蛋白可以包括其它氨基酸替代。该突变蛋白可以进一

步包括下述氨基酸替代：所述氨基酸替代可以包括、但不限于 Gln28 → His 或 Cys87 → Ser。其它可能的氨基酸替代包括、但不限于 Tyr52 → Gln 或 Val；Ser68 → Lys 或 Asn；或 Arg81 → Trp 或 Asn 或 His。

[0050] 本发明的脂质运载蛋白突变蛋白能够以可检测的亲合力、即以至少 200 nM 的解离常数 (K_D) 结合期望的非天然靶标。在另一个实施方案中，该突变蛋白以 1 μ M 或更低、100 μ M 或更低、1 μ M 或更低、500 nM、200 nM 或更低、100 nM 或更低、50 nM 或更低、10 nM 或更低、或者 1 nM 或更低的 K_D 结合给定非天然靶标。在另一个实施方案中，脂质运载蛋白突变蛋白以对于给定靶标的至少 100、20、1 nM 或甚至更低的解离常数结合期望的靶标。可以通过多种方法测量突变蛋白与期望靶标的结合亲合力，所述方法例如荧光滴定法、竞争 ELISA 或表面等离子共振 (BIAcore)。

[0051] 对本领域技术人员显而易见的是，与靶标形成复合体取决于多种因素，例如结合配偶体的浓度、竞争剂的存在、缓冲体系的离子强度等。选择和富集通常在允许分离脂质运载蛋白突变蛋白的条件下进行，所述脂质运载蛋白突变蛋白在与期望靶标复合时具有如上文所述的解离常数。然而，可以在多种严格程度下进行洗涤和洗脱步骤。例如，可以在这样的条件下进行选择：所述条件有利于与靶标显示缓慢解离（或换言之，低 K_{off} 速率）的突变蛋白与靶标形成复合体。或者，可以在这样的条件下进行选择：所述条件有利于快速（或换言之，高 K_{on} 速率）形成突变蛋白与靶标的复合体。

[0052] 本发明的突变蛋白通常作为单体蛋白存在。然而，本发明的脂质运载蛋白突变蛋白还可能能够自发地二聚化或寡聚化。尽管对一些应用而言可能优选使用形成稳定单体的脂质运载蛋白突变蛋白（例如由于更快的扩散和更好的组织透过性），但在其它情况下使用形成稳定的同型二聚体或多聚体的脂质运载蛋白突变蛋白可能是有利的，因为这种多聚体可以提供对给定靶标（进一步）提高的亲合力和 / 或亲合力。此外，寡聚体形式的脂质运载蛋白突变蛋白可具有更慢的解离速率或延长的血清半衰期。

[0053] 还应注意，各个突变蛋白及其配体之间的复合物形成受多种因素影响，例如各自的结合配偶体的浓度、竞争剂的存在、pH 和使用的缓冲体系的离子强度以及用于测定解离常数 K_D 的实验方法（例如例如荧光滴定法、竞争 ELISA 或表面等离子共振等）或甚至用于评估实验数据的数学算法。

[0054] 因此，本领域技术人员也十分清楚，该 K_D 值（各个突变蛋白与其配体形成的复合体的解离常数）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，取决于例如是通过表面等离子共振 (Biacore) 还是通过竞争 ELISA 测定 K_D 值，所测得的 K_D 值可能稍有变化或者是可接受的范围。

[0055] 在一个实施方案中，本文公开的突变蛋白在 N 或 C 端连接亲和标签，例如五组氨酸标签、六组氨酸标签或 Strep- 标签[®]。因而，本申请包括带有这种标签的所有明确和大致描述的突变蛋白。

[0056] 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 端和 / 或 C 端截短，即缺少至少一个 N 端和 / 或 C 端氨基酸。这种片段包括成熟 Lcn2 一级序列的优选至少 10 个、更优选 20 个、最优选 30 个或更多的连续氨基酸，并且通常可在成熟 Lcn2 的免疫测定中检测到。

[0057] 本发明范围内还包括在其免疫原性方面发生了改变的上述突变蛋白。

[0058] 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 分子结合的能力十分有价值。先前已经描述了利用计算机线程法 (computational threading approach) 鉴定潜在 T 细胞表位来预测给定肽序列与 I 类 MHC 分子的结合的方法 (Altuvia 等人 (1995) J. Mol. Biol. 249: 244-250)。

[0059] 这样的方法还可以用于鉴定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免疫原性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额外的突变, 以减少或消除这些 T 细胞表位, 因而使免疫原性最小化。从遗传改造的抗体中除去两性表位已有描述 (Mateo 等人 (2000) Hybridoma 19(6):463-471), 并可以适用于本发明的突变蛋白。

[0060] 这样获得的突变蛋白可以具有最小化的免疫原性, 这在其治疗和诊断应用中是期望的, 如下文所述。

[0061] 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。相应地, 本发明还涉及与这样的化合物缀合的脂质运载蛋白突变蛋白: 所述化合物包括、但不限于有机分子、酶标记、有色标记、细胞抑制剂、毒素、可以被光活化且适用于光动力治疗的标记、荧光标记、放射性标记、生色标记、发光标记、金属复合物、金属例如胶体金、半抗原、洋地黄毒苷、生物素、化疗金属等等。突变蛋白还可以缀合至有机药物分子。可以通过本领域已知的任何常规偶联方法进行缀合。

[0062] 通常, 可以以任何合适的化学物质或酶来标记 Lcn2 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。物理反应并且同时是光学反应 / 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 (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 部分的糖部分的那些标记以外) 也均可用于与本发明突变蛋白缀合。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。这些治疗活性剂的实例包括放射性核素、毒素、小有机分子和治疗肽 (例如作为细胞表面受体激动剂 / 拮抗剂的肽或者竞争给定细胞靶标上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。

[0063] 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(参见 Gaillard PJ 等人 (2005). International Congress Series. 1277, 185-198 或 Gaillard PJ 等人 (2005) Expert Opin Drug Deliv. 2(2), 299-309)。这样的化合物例如以商品名 2B-Trans™ (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与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 或蛋白多糖例如 NEU-2。

[0064] 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 WO 2006/56464,其中参考对 CTLA-4 具有结合亲和力的人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 2000, Pharmacol. Rev. 52, 1-9)、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、白蛋白或其片段、白蛋白结合肽或白蛋白结合蛋白、转铁蛋白等等。白蛋白结合蛋白可以是细菌白蛋白结合蛋白、抗体、抗体片段,包括结构域抗体(参见例如美国专利 6,696,245) 或者对白蛋白具有结合亲和力的脂质运载蛋白突变蛋白。相应地,用于延长本发明脂质运载蛋白突变蛋白半衰期的合适的缀合化合物包括白蛋白 (Osborn 等人 (2002) J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548) 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. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83)。可以用作缀合配偶体的白蛋白结合肽的其他实例例如具有 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; Xaa₄ 是 Asp、Gly、Leu、Phe、Ser 或 Thr,如美国专利申请 2003/0069395 或 Dennis 等人 (Dennis 等人 (2002) J. Biol. Chem. 277, 35035-35043) 所述。

[0065] 在其他实施方案中,白蛋白本身或白蛋白的生物活性片段可以用作本发明脂质运载蛋白突变蛋白的化合物,以延长该突变蛋白的血清半衰期。术语“白蛋白”包括所有哺乳动物白蛋白,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 5,728,553 或欧洲专利申请 EP 0 330 451 和 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。

[0066] 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) 被改造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。

[0067] 如果使用转铁蛋白作为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转铁蛋白的 N 端或 C 端,或者这两个末端。非糖基化的转铁蛋白具有 14-17 天的半衰期,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。

[0068] 如果使用免疫球蛋白的 Fc 部分来延长本发明突变蛋白的血清半衰期,则可以使用可从 Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, USA) 商购获得的 SynFusion™ 技术。使用该 Fc 融合技术允许产生作用更长的生物药物,并可以例如由与抗体的 Fc 区连接的两个拷贝的突变蛋白组成,以改进药代动力学、溶解度和产生效率。

[0069] 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 端或 C 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 W02007/038619 的这种方法也称为“rPEG”(重组 PEG)。

[0070] 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 W0 99/64016、美国专利 6,177,074 或美国专利 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 (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11, 139-148)。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,例如如美国专利 6,500,930 或 6,620,413 中所述,可将碳水化合物的寡聚物和多聚体(如淀粉或羟乙基淀粉 (HES)) 缀合至本发明的突变蛋白,以用于延长血清半衰期的目的。

[0071] 在另一实施方案中,为了提供用于将上文化合物中的一种缀合至本发明突变蛋白的合适的氨基酸侧链,可以通过突变引入人工氨基酸。通常,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。

[0072] 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 端和 / 或其 C 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)。

[0073] 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体内血清半衰期的融合配偶体(也参见 PCT 公开 W0 2006/56464,其中参考对 CTLA-4 具有结合亲和力的人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,融合配偶体可以是免疫球蛋白的 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、白蛋白结合肽或白蛋白结合蛋白等等。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。相应地,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 (2002) 同上 J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548) 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 蛋白中的一种 (König, T. 和 Skerra, A. (1998) 同上 J. Immunol. Methods 218, 73-83)。Dennis 等人,同上 (2002) 或美国专利申请 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 5,728,553、欧洲专利申请 EP 0 330 451 或 EP 0 361 991。

[0074] 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. (2001), Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. Biol. Chem. 382, 1335-1342)或毒素。

[0075] 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。

[0076] 亲和标签例如 Strep-tag® 或 Strep-tag® II (Schmidt, T.G.M. 等人 (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766)、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其它实例。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。

[0077] 本文使用的术语“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 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。

[0078] 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某些密码子替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。

[0079] 因此,本发明还包括编码根据本发明的突变蛋白的核酸序列,其包括至少在 Lcn2 线性多肽序列的氨基酸序列位置 96、100 和 106 中任一个的一个密码子处的突变。

[0080] 如本文公开的本发明还包括编码 Lcn2 突变蛋白的核酸分子,其包含在实验突变所指出序列位置之外的其它突变。这种突变经常是可以容忍的,或甚至可以证明是有利的,例如如果它们有助于提高该突变蛋白的折叠效率、血清稳定性、热稳定性或配体结合亲和力的话。

[0081] 本申请中公开的核酸分子可以“可操作地连接”至调节序列,从而能够表达该核酸分子。

[0082] 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

“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 -35/-10 盒），以及原核生物中的 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基因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。

[0083] 此外，3' 非编码序列可以含有参与转录终止、多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，则可以将它们替换成在该细胞中有功能的信号。

[0084] 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。

[0085] 本发明的核酸分子还可以是载体或其他类型克隆运载体（如质粒、噬菌粒、噬菌体、杆状病毒、粘粒或人工染色体）的一部分。

[0086] 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，从而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（综述于例如 Kay, B.K. 等人（1996）*Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual*, 第一版, Academic Press, New York NY; 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）。

[0087] 除了上文描述的调节序列和编码本发明脂质运载蛋白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，并可商购得到。

[0088] 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，可以转化进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（1989），同上）进行转化。

[0089] 因此，本发明还涉及含有本文公开的核酸分子的宿主细胞。

[0090] 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。

[0091] 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。该方法可以在体内进行,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分离。还可以在体外产生蛋白质,例如使用体外翻译系统。

[0092] 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,首先使用成熟的标准方法(Sambrook, J. 等人 (1989), 同上)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。

[0093] 在一个方面,本发明涉及一种产生本发明的突变蛋白的方法,该方法包括:

[0094] (a) 使编码人脂质运载蛋白 2 的核酸分子发生突变,所述突变发生在编码对应于 Lcn2 线性多肽序列的序列位置 96、100 和 106 的任何序列位置中的至少一个的核苷酸三联体处,从而得到一种或多种突变蛋白核酸分子。

[0095] 该方法可以进一步包括:

[0096] (b) 在合适的表达系统中表达在 (a) 中获得的一种或多种突变蛋白核酸分子,以及

[0097] (c) 通过选择和 / 或分离富集对给定靶标具有可检测的结合亲和力的一种或多种突变蛋白。

[0098] 本文使用的术语“突变”表示,选择该实验条件,使得 Lcn2 (hNGAL ;Swiss-Prot 数据库目录 P80188)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的此特定位置处不存在的至少一个氨基酸。术语“突变”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代为 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突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支架的环 AB 中(参见国际专利申请 WO 2005/019256,其通过引用以其全文并入本文)。术语“随机突变”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),但是在突变期间,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。

[0099] 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突变的起点。为了进行所述氨基酸位置的突变,本领域技术人员可以自行选择各种已建立的标准方法进行定点突变(Sambrook, J. 等人 (1989), 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(聚合酶链式反应)引入突变,所述合成的寡核苷酸具有期望序列位置处的简并碱基组成。例如,使用密码子 NNK 或 NNS(其中 N = 腺嘌呤、鸟嘌呤或胞嘧啶或胸腺嘧啶;K = 嘌呤或胸腺嘧啶;S = 腺嘌呤或胞嘧啶)允许在突变期间掺入全部 20 个氨基酸以及琥珀终止密码子,而密码子 VVS 将可以掺入的氨基酸的数量限制于 12 个,这是因为其排除了氨基酸 Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Val 被掺入多肽序列的所选择的位置;例如,使用密码子 NMS(其中 M = 腺嘌呤或胞嘧啶),将所选择的序列位置处可能的氨基酸的数量限制于 11 个,这是因为其排除了氨基酸 Arg、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Val 被掺入所选择的序列位置处。在这方面应注意,其它氨基酸(除了规则的 20 个天然存在的氨基酸,例如硒半胱氨酸或吡咯赖氨酸)的密码子可以掺入到突变蛋白的核酸中。还可以

的是,如 Wang, L., 等人 (2001) Science 292, 498-500 或 Wang, L., 和 Schultz, P.G. (2002) Chem. Comm. 1, 1-11 描述的,使用通常被识别为终止密码子的“人工”密码子,例如 UAG,以插入其它不常见的氨基酸,例如邻甲基-L-酪氨酸或对氨基苯丙氨酸。

[0100] 使用碱基对特异性降低的核苷酸构件,例如肌苷、8-氧-2'脱氧鸟苷或 6(2-脱氧-β-D-呋喃核糖苷)-3,4-二氢-8H-嘧啶并-1,2-噁嗪-7-酮(Zaccolo 等人 (1996) J. Mol. Biol. 255, 589-603),是用于将突变引入到所选序列区段的其它选择。

[0101] 其它可能是所谓的三联体突变。此方法使用不同核苷酸三联体的混合物,其中每一个均编码一个氨基酸,以掺入到编码序列中(Virnekäs B, Ge L, Plückthun A, Schneider KC, Wellenhofer G, Moroney SE. 1994 Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. Nucleic Acids Res 22, 5600-5607)。

[0102] 一种用于在相应多肽的所选择的区域中引入突变的可行策略基于使用四种寡核苷酸,其中每一个均部分源自要突变的相应的序列区段中的一个。当合成这些寡核苷酸时,本领域技术人员可以采用核酸构件的混合物,以合成那些对应于要突变的氨基酸位置的核苷酸三联体,以使得编码全部天然氨基酸的密码子随机出现,这样最后得以产生脂质运载蛋白文库。例如,第一个寡核苷酸在其序列中——除了突变位置——对应于脂质运载蛋白多肽最 N 端位置处要突变的肽区段的编码链。相应地,第二个寡核苷酸对应于该多肽序列后的第二个序列区段的非编码链。第三个寡核苷酸依次对应于相应的第三个序列区段的编码链。最后,第四个寡核苷酸对应于第四个序列区段的非编码链。可以用相应的第一个和第二个寡核苷酸进行聚合酶链式反应,如果需要,可以单独用相应的第三个和第四个寡核苷酸进行聚合酶链式反应。

[0103] 可以通过多种已知方法将这两个反应的扩增产物组合成包含从第一个至第四个序列区段的序列的单个核酸,其中已在选定的位置处引入突变。为此,可以使用侧翼寡核苷酸以及一种或多种中介体核酸分子(其贡献第二个与第三个序列区段之间的序列)将两种产物例如进行新的聚合酶链式反应。在选择寡核苷酸序列中用于突变的数目和排列时,本领域技术人员根据其需要有多种备选方案。

[0104] 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 (1989), 同上)。例如,可以将也存在于克隆载体中的限制性内切核酸酶的识别序列改造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。

[0105] 也可以经由已知方法将编码选择用于突变的蛋白质的基因内更长的序列区段进行随机突变,例如通过在提高错误率的条件下使用聚合酶链式反应、通过化学突变或通过使用细菌增变菌株。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。实验突变区段以外可能发生的突变通常是接受的,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。

[0106] 根据本发明的一个实施方案,上述方法包括使编码人脂质运载蛋白 2 蛋白的核酸分子发生突变,所述突变至少发生在编码人脂质运载蛋白 2 的上文所述的序列位置中的任一个的 2 或 3 个核苷酸三联体处。

[0107] 在另一个实施方案中,该方法进一步包括使核酸分子发生突变,所述突变发生在编码对应于 hNGAL 线性多肽序列的序列位置 33、36、40、41、42、43、44、46、47、48、49、50、51、52、54、55、59、65、68、70、72、73、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136 和 138 的任何序列位置中的至少一个核苷酸三联体处。

[0108] 在另一个实施方案中,该方法包括使核酸分子发生突变,所述突变发生在编码对应于人脂质运载蛋白 2 线性多肽序列的序列位置 33、36、40、41、42、43、44、46、47、48、49、50、51、52、54、55、59、65、68、70、72、73、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136 和 138 的序列位置中的至少任意 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个的核苷酸三联体处。

[0109] 根据本发明的方法,从编码 hNGAL 的核酸开始获得了突变蛋白。这种核酸进行突变并且通过重组 DNA 技术被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人脂质运载蛋白 2 的核酸文库以用于产生具有类似抗体的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国际专利申请 WO 99/16873、WO 00/75308、WO 03/029471、WO 03/029462、WO03/029463、WO 2005/019254、WO 2005/019255、WO 2005/019256 或 WO 2006/56464。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。在进行了突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结合给定靶标的克隆,所述克隆携带该多种各脂质运载蛋白突变蛋白的遗传信息。可以利用熟知技术来选择这些克隆,例如噬菌体展示(综述于 Kay, B. K. 等人 (1996) 上文;Lowman, H. B. (1997) 上文或 Rodi, D. J., 和 Makowski, L. (1999) 上文)、菌落筛选(综述于 Pini, A. 等人 (2002) Comb. Chem. High Throughput Screen. 5, 503-510)、核糖体展示(综述于 Amstutz, P. 等人 (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12, 400-405)或如 Wilson, D. S. 等人 (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3750-3755 中报道的 mRNA 展示或具体描述于 WO 99/16873、WO 00/75308、WO 03/029471、WO 03/029462、WO 03/029463、WO 2005/019254、WO 2005/019255、WO 2005/019256 或 WO 2006/56464 中的方法。

[0110] 根据本公开内容,在上述方法的另一实施方案中,步骤 (c) 还包括:

[0111] (i) 提供选自以下的化合物作为给定靶标 / 配体:例如游离或缀合形式的显示免疫半抗原特征的化合物、肽、蛋白质或其他大分子例如多糖、核酸分子(例如 DNA 或 RNA) 或完整的病毒颗粒或类病毒,

[0112] (ii) 将多种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体,以及

[0113] (iii) 去除无结合亲和力或无实质结合亲和力的突变蛋白。

[0114] 在本发明的具体实施方案中,该靶标 / 配体为非天然靶标,其包括、但不限于肽、蛋白、蛋白的片段或结构域、或小有机分子。在一个实施方案中,小有机分子为显示免疫半抗原的特征的化合物。在另一个实施方案中,肽为 β 淀粉样肽,例如 A β 40 肽或 A β 42 肽。在另一个实施方案中,给天然靶标为纤连蛋白或其结构域,例如 EB- 结构域或 EB- 结构域的片段。

[0115] 在本发明方法的一个实施方案中,步骤 (c) 中的选择在竞争性条件下进行。本文使用的“竞争性条件”表示,突变蛋白的选择包括至少一个其中将突变蛋白与人脂质运载蛋

白 2 (靶标) 的给定非天然配体在其他配体存在下进行接触的步骤, 该其他配体与突变蛋白竞争结合靶标。这种其他配体可以是靶标的生理配体、过量的靶标本身或者靶标的任何其他生理配体, 其至少结合与本发明突变蛋白所识别表位重叠的表位, 因而干扰该突变蛋白的靶标结合。或者, 该其他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与突变蛋白的结合。

[0116] 给出了使用温和 M13 噬菌体进行的噬菌体展示技术的实施方案(综述于 Kay, B. K. 等人 (1996), 同上; Lowman, H. B. (1997) 同上或者 Rodi, D. J. 和 Makowski, L. (1999), 同上) 作为可以在本发明中使用的选择方法的实例。可以用于选择本发明突变蛋白的噬菌体展示技术的另一个实施方案是如 Broders 等人 (Broders 等人 (2003) “Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display.” *Methods Mol. Biol.* 205:295-302) 所述的超级噬菌体 (hyperphage) 技术。其他温和噬菌体 (例如 f1) 或溶菌性噬菌体 (例如 T7) 也可以使用。就示例性选择方法而言, 产生了 M13 噬菌粒, 其允许将突变的脂质运载蛋白核酸序列表达为在 N 端与信号序列 (优选 OmpA 信号序列) 融合并在 C 端与噬菌体 M13 衣壳蛋白 pIII 或其能掺入噬菌体衣壳的片段融合的融合蛋白。优选使用包含野生型序列的氨基酸 217 至 406 的噬菌体衣壳蛋白的 C 端片段 Δ pIII 来产生融合蛋白。在一个实施方案中, 特别优选的是其中位置 201 处的半胱氨酸残基丢失或被另一个氨基酸替换的 pIII C 端片段。

[0117] 相应地, 本发明方法的另一个实施方案包括将编码多种人脂质运载蛋白 2 突变蛋白并由 3' 末端突变所得的核酸分子与编码 M13 家族丝状噬菌体衣壳蛋白 pIII 或该衣壳蛋白片段的基因可操作地融合, 以便选择至少一种与给定配体结合的突变蛋白。

[0118] 该融合蛋白可以包含额外的组分, 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) 在适当的抑制菌株中进行翻译期间至少部分地翻译成氨基酸。

[0119] 例如, 本文描述的质粒载体 pTLPC27 (现在也称为 pTlc27), 可以用于制备编码人脂质运载蛋白 2 突变蛋白的噬菌粒文库。使用两个 BstXI 限制性位点将本发明编码 hNGAL 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。

[0120] 接着, 使用适当的 M13 辅助噬菌体或超级噬菌体, 将所得的文库在液体培养物中进行超感染, 以便产生功能性噬菌粒。重组噬菌粒在其表面上以带有衣壳蛋白 pIII 或其片段的融合蛋白的形式展示脂质运载蛋白突变蛋白, 而该融合蛋白的 N 端信号序列通常被切掉。另一方面, 它还带有由辅助噬菌体提供的天然衣壳蛋白 pIII 的一个或多个拷贝, 因而能感染接受者, 所述接受者一般是带有 F 或 F' 质粒的细菌菌株。在超级噬菌体展示的情况下, 超级噬菌粒在其表面上以带有感染性衣壳蛋白 pIII 而不是天然衣壳蛋白的融合蛋白的形式展示脂质运载蛋白突变蛋白。在用辅助噬菌体或超级噬菌体感染期间或感染之后, 可以诱导脂质运载蛋白突变蛋白与衣壳蛋白 pIII 之间的融合蛋白的基因表达, 例如通过加入无水四环素来诱导。将诱导条件选择成使得所获得的噬菌粒的大部分在其表面上展示至少一个脂质运载蛋白突变蛋白。在超级噬菌体展示的情况下, 诱导条件产生带有 3 至 5 个

融合蛋白的超级噬菌粒群,所述融合蛋白由脂质运载蛋白突变蛋白和衣壳蛋白 pIII 组成。已知多种方法用于分离噬菌粒,例如用聚乙二醇进行沉淀。通常在 6-8 小时的孵育时间段后进行分离。

[0121] 然后通过与期望的靶标一起孵育来对所分离的噬菌粒进行选择,其中该靶标以允许将那些噬菌粒至少暂时固定的形式存在,所述噬菌粒在其衣壳中带有具有期望的结合活性的突变蛋白作为融合蛋白。在本领域技术人员已知的多个实施方案中,靶标可以例如与载体蛋白(如血清白蛋白)缀合,并经由该载体蛋白与蛋白质结合表面(例如聚苯乙烯)结合。适用于 ELISA 技术的微量滴定板或所谓的“免疫棒”可以优选地用于这样的靶标固定。或者,可以使用靶标与其他结合基团(例如生物素)的缀合物。接着可将靶标固定在选择性结合该基团的表面上,例如包被有链霉亲和素、中性亲和素(neutravidin)或亲和素的微量滴定板或顺磁性颗粒。如果靶标与免疫球蛋白的 Fc 部分融合,那么也可以固定在表面上,例如包被有 A 蛋白或 G 蛋白的微量滴定板或顺磁性颗粒。

[0122] 可以如 ELISA 方法中已知的那样,用封闭溶液饱和和表面上存在的非特异性噬菌粒结合位点。然后通常在生理缓冲液存在下使噬菌粒与固定在表面上的靶标接触。通过多次洗涤除去未结合的噬菌粒。然后洗脱表面上剩余的噬菌粒颗粒。对于洗脱而言,若干方法都是可行的。例如,可以通过加入蛋白酶或者在酸、碱、洗涤剂或离液盐存在下或在适度变性的条件下洗脱噬菌粒。优选方法是使用 pH 2.2 的缓冲液洗脱,其中接着中和洗脱液。或者,可以加入游离靶标的溶液以便与固定的靶标竞争结合噬菌粒,或者可以通过与特异性结合目的靶标的免疫球蛋白或天然配体蛋白竞争来洗脱靶标特异性噬菌粒。

[0123] 其后,用洗脱的噬菌粒感染大肠杆菌细胞。或者,可以从洗脱的噬菌粒中提取核酸并用于序列分析、扩增或以其他方式转化细胞。从以此方式获得的大肠杆菌克隆开始,根据上文所述的方法通过用 M13 辅助噬菌体或超级噬菌体进行超感染而再次产生新鲜的噬菌粒或超级噬菌粒,并且将以此方式扩增的噬菌粒再次以固定的靶标进行选择。经常需要多个选择循环才能以足够富集的形式获得带有本发明突变蛋白的噬菌粒。优选地,将选择循环数选择成使得在后续的功能分析中至少 0.1% 所研究的克隆产生与给定靶标具有可检测亲和力的突变蛋白。根据所使用文库的大小(即复杂性),通常需要 2 至 8 个循环来达到这一目的。

[0124] 对于选定突变蛋白的功能分析,用从选择循环获得的噬菌粒感染大肠杆菌菌株,并且分离相应的双链质粒 DNA。从该质粒 DNA 开始或者同样从提取自该噬菌粒的单链 DNA 开始,可以通过本领域已知的方法测定本发明选定突变蛋白的核酸序列,并且可由此推断氨基酸序列。可以在另一个表达载体中亚克隆完整 hNGAL 突变蛋白的突变区或序列,然后在合适的宿主生物体中表达。例如,可以使用载体 pTLPC26 (现在也称为 pTlc26)在大肠杆菌菌株(例如大肠杆菌 TG1)中表达。可以通过多种生物化学方法纯化由此产生的 hNGAL 突变蛋白。所产生的 hNGAL 突变蛋白(例如用 pTlc26 产生)在其 C 端带有亲和肽 Strep- 标签 II (Schmidt 等人,同上),因此优选地可以通过链霉亲和素亲和层析进行纯化。

[0125] 还可以通过其他方法进行选择。许多相应的实施方案是本领域技术人员已知的,或者已在文献中描述。此外,可以使用方法的组合。例如,可以使通过“噬菌体展示”选择或至少富集的克隆再进行“菌落筛选”。该方法具有以下优势:就产生对靶标具有可检测的结合亲和力的人脂质运载蛋白 2 突变蛋白这方面,可以直接分离各个克隆。

[0126] 除了使用大肠杆菌在“噬菌体展示”技术或“菌落筛选”方法中作为宿主生物体以外,其它细菌菌株、酵母或者昆虫细胞或哺乳动物细胞也可以用于此目的。除了从上文所述的随机文库中选择人脂质运载蛋白 2 突变蛋白以外,还可以使用进化方法(包括限制性突变),以使已对靶标具有一定结合活性的突变蛋白在对靶标的亲和力或特异性方面进行优化。

[0127] 一旦以及选择了与给定靶标具有亲和力的突变蛋白,还可以对使这种突变蛋白进行另一突变,以便随后选择具有甚至更高亲和力的变体,或者选择具有改进的特性(例如更高的热稳定性;提高的血清稳定性;热力学稳定性;提高的溶解度;改进的单体行为;对热变性、化学变性、蛋白水解或去污剂等提高的抗性等)的变体。这一其它突变(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。获得更高亲和力或改进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方案来进行,例如 Zaccolo 等人 (1996) *J. Mol. Biol.* 255, 589-603 所述的方案。适用于这种目的其它随机突变方法包括如 Murakami, H 等人 (2002) *Nat. Biotechnol.* 20, 76-81 描述的随机插入/缺失 (RID) 突变或者如 Bittker, J. A 等人 (2002) *Nat. Biotechnol.* 20, 1024-1029 描述的非同源随机重组 (NRR)。如果需要,还可以根据 WO 00/75308 或 Schlehuber, S. 等人 *J. Mol. Biol.* 297, 1105-1120 中描述的方法进行亲和力成熟,其中获得了对洋地黄毒苷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进行位置饱和突变。在此方法中,产生“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。此方法允许对促成对期望靶标改进的结合的残基进行鉴定,并且允许鉴定对于结合来说重要的“热点”。

[0128] 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 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 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。该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。

[0129] 在另一方面,本发明涉及对人脂质运载蛋白 2 的给定非天然配体具有可检测的结合亲和力的人脂质运载蛋白 2 突变蛋白,其能够通过本发明上文详述的方法获得或者通过本发明上文详述的方法获得。

[0130] 在本发明的一些人脂质运载蛋白 2 突变蛋白中,去除了 Cys 76 与 Cys 175 之间的天然存在的二硫键。相应地,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的细胞隔室中产生,例如,在革兰氏阴性细菌的细胞质中。

[0131] 在本发明脂质运载蛋白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。

[0132] 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 (2002) J. Mol. Biol. 315, 1-8.)。

[0133] 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,然后研究对于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 (1997) Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins. CRC Press, Boca Raton, Fields, GB, and Colowick (1997) Solid-Phase Peptide Synthesis. Academic Press, San Diego 或 Bruckdorfer 等人 (2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43)。

[0134] 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。

[0135] 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学上可接受的赋形剂。

[0136] 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有治疗效果的任何肠胃外或非肠胃外(肠内)途径给药。肠胃外施用法包括,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给药。

[0137] 在本发明的一个实施方案中,所述药物肠胃外施用至哺乳动物,特别是人。相应的给药方法包括、但不限于例如皮内、皮下、肌肉或静脉内的注射及输注技术,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溶液、水包油乳剂或油包水乳剂。

[0138] 就这一点而言,应该注意,如 Meidan 和 Michniak (2004) Am. J. Ther. 11(4), 312-316 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(例如丸剂、片剂、胶囊剂、溶液剂或混悬剂的形式)或直肠施用(例如栓剂的形式)。本发明的突变蛋白可在含有多种常规无毒药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给药。

[0139] 所施用的突变蛋白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体在体内的半衰期。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、给药模式、所治疾病 / 病症的严重程度以及患者的医学状况。例如,当在膏剂中用于局部施用时,可以使用高浓度的人脂质运载蛋白 2 突变蛋白。然而,如果需要,也可以在持续释放制剂中给予该突变蛋白,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 2003: 1-6)。

[0140] 相应地,可以使用药学上可接受的成分以及已建立的制备法将本发明的突变蛋白配制成组合物(Gennaro, A. L. 和 Gennaro, A. R. (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第二十版, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。为了制备药物组合物,可以使用药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、气雾剂混合物或粉剂(在使用前将粉剂重建成溶液剂或气雾剂混合物)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。

[0141] 所述药物组合物还可以含有添加剂,例如填料、粘合剂、湿润剂、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)。

[0142] 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他无菌介质中。

[0143] 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。

[0144] 因此,在本发明的另一方面,本发明的人脂质运载蛋白 2 突变蛋白用于结合和 / 或检测人脂质运载蛋白 2 的给定非天然配体。这样的用途可以包括以下步骤:在合适的条件下使该突变蛋白接触疑似含有给定配体的样品,由此允许在该突变蛋白与该给定配体之间形成复合物,以及通过合适的信号检测复合的突变蛋白。

[0145] 可检测信号可以通过如上文所述的标记产生,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产生。一个实例是等离子体表面共振,其数值在结合配偶体结合时发生改变,所述配偶体中的一者固定在表面上,例如金箔上。

[0146] 本文公开的人脂质运载蛋白 2 突变蛋白还可以用于分离人脂质运载蛋白 2 的给定非天然配体。这样的用途可以包括以下步骤:在合适的条件下使该突变蛋白接触推测含有所述配体的样品,由此允许在该突变蛋白与该给定配体之间形成复合物,以及从样品中分离突变蛋白 / 配体复合物。

[0147] 在突变蛋白用于检测给定非天然配体以及分离给定配体的两个用途中,突变蛋白和 / 或靶标均可以固定在合适的固相上。

[0148] 本发明的人脂质运载蛋白 2 突变蛋白还可以用于使化合物以预先选择的部位为靶向。在一个这样的实施方案中,人脂质运载蛋白 2 的突变蛋白用于使有药学活性的化合物以生物体或组织中预先选择的部位为靶向,包含:

[0149] a) 将突变蛋白与所述化合物缀合,以及

[0150] b) 将突变蛋白 / 化合物复合物递送至该预先选择的部位。

[0151] 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。

[0152] 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。

[0153] 因而,本文公开的突变蛋白及其衍生物可以用于与抗体或其片段相似的多个领域。除了与支持物结合以允许固定或分离给定突变蛋白的靶标或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以酶、抗体、放射性物质或任何其他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。例如,本发明的突变蛋白可以用于通过已建立的分析法(如 ELISA 或蛋白质印迹)或通过显微术或免疫传感器来检测化学结构。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。

[0154] 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。

[0155] 因此,本发明还涉及本发明的人脂质运载蛋白 2 突变蛋白用于与给定非天然配体或靶标形成复合物的用途。

[0156] 在另一方面,本发明还包括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退行性障碍,例如阿尔兹海默氏病。所述药物组合物还可以用于治疗癌症、治疗纤维化或治疗炎症。所述药物组合物可以用于单独治疗或组合治疗。

[0157] 在另一方面,本发明还涉及包含根据本发明的突变蛋白的诊断或分析试剂盒。

[0158] 本发明的另一方面涉及治疗患有神经退行性疾病、癌症、纤维化或炎症的受试者的方法,该方法包括有此需要的受试者施用本发明的各突变蛋白或包含本发明的突变蛋白的药物组合物。

[0159] 需要这种治疗的受试者可以哺乳动物,例如人、狗、小鼠、大鼠、猪、猿(例如猕猴),以上仅为几个示例性实例。

[0160] 在另一方面,本发明涉及用于受试者的体内成像的方法,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。

附图说明

[0161] 通过下述非限制性实例和附图进一步说明本发明,其中:

[0162] 图 1 示出了用于同时随机突变成成熟 Lcn2 氨基酸序列中的 20 个氨基酸位置 36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132 和 134 (下划线标出且编号的)的 PCR 组装策略。这 20 个位置分成四个序列组。为了随机化各组中的氨基酸,合成了寡脱氧核苷酸(SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4),其中在突变的密码子处利用核苷酸的 NNK 混合物。N 表示全部四个碱基 A、C、G 和 T 的混合物,而 K

表示仅两个碱基 G 和 T 的混合物,因此这样的三联体编码全部 20 种天然氨基酸以及琥珀型终止密码子 TAG,其在大肠杆菌 supE⁻ 菌株 XL1-blue (Bullock 等人, BioTechniques 5 (1987), 376-378) 或 TG1 (Sambrook 等人, Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Press) 中翻译成谷氨酰胺,所述菌株用于噬菌粒产生和基因表达。还在组装反应中使用四个其它的寡脱氧核苷酸(SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8),其具有对应于非编码链(在 DNA 双链序列下方以 3'-5' 方向写出)且填充上述寡脱氧核苷酸之间的间隙的固定核苷酸序列。额外添加的两个较短且带有生物素基团的侧翼寡脱氧核苷酸(SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10)用作所组装的整个合成基因片段的 PCR 扩增引物。两个侧翼引物各自包括 BstXI 限制性位点 (CCANNNNNNTGG),从而经酶消化产生相互不相容的突出。这种限制性位点的特殊排列使得合成的基因能够进行特别有效的连接和克隆。对初始 Lcn2 序列将氨基酸 Gln28 替换成 His 是必需的,从而引入第一 BstXI 位点,而第二个天然存在于 Lcn2 的 cDNA 中。此外,未配对残基 Cys87 在基因组组装期间被替代为 Ser。在一次罐式 PCR (pot PCR) 之后,将得到的基因片段插入到提供 Lcn2 结构基因的丢失部分的载体中。该图示还描述了两个短引物(SEQ ID NO: 45 和 SEQ ID NO: 46),分别在由该两个 BstXI 限制性位点侧翼的盒的上游和下游,已用于双链 DNA 测序。

[0163] 图 2 示出了合成的 Lcn2 基因文库的核苷酸序列(仅示出了如图 1 中由该两个 BstXI 限制性位点侧翼的中心盒)。此基因片段由 Sloning BioTechnology GmbH 制备。与图 1 中描述的 DNA 文库相比,存在两个不同。第一,只要可行,就对非突变的氨基酸位置进行了用于大肠杆菌表达的密码子优化。第二,在 20 个随机化位置处采用了各自编码不同氨基酸(除了 Cys)的 19 个不同三联体(GAC、TTC、CTG、CAC、AAT、AGC、ACC、GCA、ATG、CCT、GTT、TGG、GAG、CAA、ATC、GGA、CGT、GCA、TAC)的混合物,其与图 1 中所描述的那些相同。此处氨基酸的编号对应于 Sloning BioTechnology GmbH 采用的内部方案,由此 Gly no. 1 为直接位于第一个氨基酸密码子。

[0164] 图 3 示出了在大肠杆菌中表达后,重组 A β 融合蛋白 Trx-A β 28 (A) 和 MBP-A β 40 (B) 的 SEC 洗脱曲线。通过 SDS-PAGE 分析评估合成的 A β 40 和重组 A β 融合蛋白二者的纯度(C)。两种融合蛋白均在大肠杆菌 JM83 的细胞质中表达。在用弗氏压碎器破坏细胞之后,经由 His₆- 标签亲和色谱、然后进一步施用于 Superdex 75 HR 10/30 柱子(在 Trx-A β 28 的情况下)或施用于 Superdex 200 HR 10/30 柱子(在 MBP-A β 40 的情况下)纯化蛋白。在尺寸排阻色谱中两种蛋白均主要以单体洗脱,并且在纯化后为基本上匀质的。A β 40 获得 Keck Foundation,用 HFIP 处理,在 SpeedVac 中蒸发,最后溶解于蒸馏水中。15% 凝胶示出了 HFIP 处理后的 A β 40 以及 MAC 纯化和 SEC 之后的 Trx-A β 28 和 MBP-A β 40 样品。M 表示分子量标记物,其相应的谱带大小以 kDa 为单位示于凝胶的左侧。

[0165] 图 4 示出了 Lcn2 突变蛋白 H1-G1、S1-A4 和 US7 (A) 的 SEC 洗脱曲线的叠加和经由 15% SDS-PAGE (B) 进行的纯化蛋白分析结果。3 个 Lcn2 突变蛋白 H1-G1、S1-A4 和 US7 在大肠杆菌 JM83 或 TG1-F 的外周胞质中表达(如本文所示),并且经由 Strep⁻ 标签 II 亲和色谱纯化。全部 3 个突变蛋白从 Superdex 75 HR 10/30 柱子上主要以单体蛋白洗脱,保留体积为 10 至 11 ml。取决于具体突变蛋白的表达产量,峰值强度相异。(B) 示出了重组野生型 Lcn2 (泳道 1、5) 和突变蛋白 US7 (泳道 2、6)、H1-G1 (泳道 3、7) 和 Strep⁻ 标签 II 亲和纯化和 SEC 之后的 S1-A4 (泳道 4、8) 的 15% SDS-PAGE 分析结果。泳道 1-4 示出用 2- 巯

基乙醇还原的 Lcn2 突变蛋白,泳道 5-8 示出在非还原条件下的蛋白。M 表示分子量标记物,其相应的谱带大小以 kDa 为单位示于凝胶的左侧。

[0166] 图 5 示出了 Lcn2 突变蛋白 H1-G1、S1-A4 和 US7 在捕获 ELISA 中与不同生物素化的 A β 靶标的结合活性。将 10 μ g/ml 的 StrepMAB-Immo 固定在微量滴定板上,然后用于经由 Strep- 标签 II 捕获 1 μ M Lcn2 突变蛋白。在图 A 至 C 中,示出了 Lcn2 突变蛋白 S1-A4 和 US7 与 (A) 生物素化的 A β 40、(B) 生物素化的 Trx-A β 28 和 (C) 生物素化的 MBP-A β 40 的结合。通过用 ExtrAvidin/AP 孵育和之后用 pNPP 进行的显色反应检测结合。将卵白蛋白 (Ova)、硫氧还蛋白 (Trx) 和麦芽糖结合蛋白 (MBP) 用作阴性对照。此外,测试了野生型 (wt) 脂质运载蛋白的结合。将数据拟合成单价结合模型。图 D 示出了以 Lcn2 H1-G1 以及生物素化的 A β 40 和 Trx-A β 28 作为靶标进行的相同 ELISA 程序。针对 A β 40 测定的 K_D 值为:对于 S1-A4 为 2.7 nM,对于 US7 为 6.8 nM,对于 H1-G1 为 16.2 nM;针对 Trx-A β 28 测定的相应的值为:1.9 nM,2.4 nM,24.3 nM。与 MBP-A β 40 的结合示出的 K_D 值为:对于 S1-A4 为 4.7 nM,对于 US7 为 11.4 nM。相应地,针对 A β 16-27 的 K_D 值为 2.6 nM 和 2.1 nM。

[0167] 图 6 示出了 Lcn2 突变蛋白 S1-A4 和 US7 在直接 ELISA 中的结合活性。将 A β 靶标 Trx-A β 28 和 MBP-A β 40 以及对照蛋白麦芽糖结合蛋白 (MBP) 以 2 μ M 在 PBS 中固定过夜。经由它们的 Strep- 标签 II 使用链霉亲和素 /AP 然后用 pNPP 进行显色反应,检测结合的 Lcn2 突变蛋白。作为对照,测试了野生型 (wt) 脂质运载蛋白的结合。将数据拟合成单价结合模型。针对 Trx-A β 28 测定的 K_D 值为:对于 S1-A4 为 16.2 nM,对于 US7 为 9.6 nM;针对 MBP-A β 40 的相应的值为 149 nM 和 49.7 nM。

[0168] 图 7 示出了 Lcn2 突变蛋白 S1-A4 (A) 和 US7 (B) 在竞争 ELISA 中的结合活性。将 StrepMAB-Immo 以 10 μ g/ml 固定在微量滴定板上,然后用于经由 Strep- 标签 II 捕获 1 μ M Lcn2 突变蛋白。为进行竞争,将作为示踪物的恒定浓度的生物素化的 Trx-A β 28 与不同浓度的未标记的 Trx-A β 28 混合。之后,经由用 ExtrAvidin/AP 孵育然后通过用 pNPP 进行显色反应检测结合的生物素化的 Trx-A β 28。使用 sigmoidal 方程将数据进行拟合。针对 S1-A4 的 K_D 值为 21.7 nM,针对 US7 的值为 76.9 nM。

[0169] 图 8 示出了在 Biacore 仪器上以 10 μ l/min 的流量测量的 Lcn2 突变蛋白 S1-A4 (A) 和 US7 (B) 的动力学实时分析结果。经由胺化学将 MBP-A β 40 融合蛋白偶联在 CMD 200I 芯片 (RU = 1455) 上,每一种经纯化的 Lcn2 突变蛋白都以不同浓度的系列应用。在每种情况下,测得的信号示为灰色线条,而曲线拟合示为黑色线条。两种突变蛋白的 k_{on} 和 k_{off} 速率显著不同 (k_{on} (S1-A4) = $0.48 \cdot 10^5$ M⁻¹s⁻¹, k_{on} (US7) = $2.02 \cdot 10^5$ M⁻¹s⁻¹, k_{off} (S1-A4) = $8.36 \cdot 10^5$ s⁻¹, k_{off} (US7) = $25.2 \cdot 10^5$ s⁻¹)。然而,总体 K_D 值相当类似,其中 S1-A4 为 1.74 nM,US7 为 1.25 nM。

[0170] 图 9 示出了在 thioflavin T 聚集分析中测试的 Lcn2 突变蛋白 S1-A4 和 US7 的功能活性。用 10 μ M 的 US7、S1-A4、野生型 (wt) 脂质运载蛋白或用 PBS 在 37 °C 下不振摇孵育 100 μ M A β 40。在所示时间点,将 20 μ l 的各样品与 180 μ l 的 5 μ M thioflavin T 混合,然后用 450 nm 的激发波长和 482 nm 的发射波长测量荧光。在 1:10 (US7:A40) 的比率下,Lcn2 突变蛋白 US7 显示出聚集的强抑制。在此比率下,S1-A4 无法显著抑制聚集,但是在 1:2 (S1-A4:A β 40) 的比率下施加了明确抑制(未示出)。野生型 Lcn2 未对 A β 聚集显示出抑制性作用。

[0171] 图 10 示出了重组 ED-B (泳道 1)、FN7B8 (泳道 2) 和 FN789 (泳道 3) 在离子交换色谱之后的 SDS-PAGE 分析结果(用考马斯亮蓝染色之后的)。全部样品都用 2-巯基乙醇还原。M:分子量标记物 (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)。

[0172] 图 11 示出了 Lcn2 突变蛋白 s N7A (泳道 1)、N7E (泳道 2)、N9B (泳道 3) 和 N10D (泳道 4) 在 Strep-标签 II 亲和纯化之后的 SDS-PAGE 分析结果(用考马斯亮蓝染色之后的)。全部样品都用 2-巯基乙醇还原。M:分子量标记物 (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)。

[0173] 图 12 示出了在 ELISA 中的结合活性。用经纯化的蛋白 FN7B8 和 FN789 包被微量滴定板,用系列稀释的所选 Lcn2 突变蛋白孵育,然后用链霉亲和素-碱性磷酸酶缀合物和 pNPP 底物检测。重组 Lcn2 突变蛋白 N7A、N9B 和 N10D 在此分析中显示对 FN789 的可忽略信号,这缺乏 ED-B 并用作阴性对照。

[0174] 图 13 示出了在 Biacore 仪器上测量的 Lcn2 突变蛋白 N9B 的动力学实时分析结果。经由胺化学将 FN7B8 偶联到 CMD 200 m 传感器芯片 ($\Delta RU = 500$) 上,经纯化的 Lcn2 突变蛋白以不同浓度应用。在每种情况下,测得的信号示为灰色线条,而曲线拟合示为黑色线条。从该组曲线测得的动力学常数列于表 2 (实施例 17)。

[0175] 图 14 示出了在 Biacore 仪器上测量的 Lcn2 突变蛋白 N7E 的动力学实时分析结果。经由胺化学将 FN7B8 偶联到 CMD 200 m 传感器芯片 ($\Delta RU = 500$) 上,经纯化的 Lcn2 突变蛋白以不同浓度应用。在每种情况下,测得的信号示为灰色线条,而曲线拟合示为黑色线条。从该组曲线测得的动力学常数列于表 2 (实施例 17)。

[0176] 图 15 示出了在 Biacore 仪器上测量的 Lcn2 突变蛋白 N7A 的动力学实时分析结果。经由胺化学将 FN7B8 偶联到 CMD 200 m 传感器芯片 ($\Delta RU = 500$) 上,经纯化的 Lcn2 突变蛋白以不同浓度应用。在每种情况下,测得的信号示为灰色线条,而曲线拟合示为黑色线条。从该组曲线测得的动力学常数列于表 2 (实施例 17)。

[0177] 图 16 示出了在 Biacore 仪器上测量的 Lcn2 突变蛋白 N10D 的动力学实时分析结果。经由胺化学将 FN7B8 偶联到 CMD 200 m 传感器芯片 ($\Delta RU = 500$) 上,经纯化的 Lcn2 突变蛋白以不同浓度应用。在每种情况下,测得的信号示为灰色线条,而曲线拟合示为黑色线条。从该组曲线测得的动力学常数列于表 2 (实施例 17)。

[0178] 图 17 示出了命名为 S1-A4 (SEQ ID NO: 39)、US-7 (SEQ ID NO: 41)、H1-G1 (SEQ ID NO: 43)、N7A (SEQ ID NO: 20)、N7E (SEQ ID NO: 22)、N9B (SEQ ID NO: 24) 和 N10D (SEQ ID NO: 26) 的人 Lcn2 突变蛋白与 Lcn2 的序列比对结果。序列下方最后一行指示脂质运载蛋白的二级结构特征 (Schönfeld 等人 (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 8198-8203)。

[0179] 图 18 示出了 Lcn2 突变蛋白 H1GA 和 H1GV (A) 的 SEC 洗脱曲线的叠加和经由 15% SDS-PAGE (B) 进行的纯化蛋白分析结果。2 个 Lcn2 突变蛋白 H1GA 和 H1GV (A) 在大肠杆菌 JM83 的外周胞质中表达,并且经由 Strep-标签 II 亲和色谱纯化。2 个突变蛋白从 Superdex 75 HR 10/30 柱子上主要以单体蛋白洗脱,保留体积为 10 至 11 ml。取决于突变蛋白的表达产量,峰值强度相异。(B) 示出了重组 Lcn2 突变蛋白 H1-G1、H1GA 和 H1GV 在 Strep-标签 II 亲和纯化和 SEC 之后的 15% SDS-PAGE 分析结果。全部 3 个 Lcn2 突变蛋白在使用 2-巯基乙醇的还原条件下示出。M 表示分子量标记物。

[0180] 图 19 示出了 Lcn2 突变蛋白 H1GA、H1GV 和 H1-G1 在捕获 ELISA 中与生物素化的

A β 靶标 A β 40 (A) 和 Trx-A β 28 (B) 的结合活性。将 10 μ g/ml 的 StrepMAB-Immo 固定在微量滴定板上,然后用于经由 Strep- 标签 II 捕获 1 μ M Lcn2 突变蛋白。然后通过用 ExtrAvidin/AP 孵育和之后用 pNPP 进行的显色反应检测生物素化的靶标(以系列稀释应用)的结合。将生物素化的卵白蛋白 (Ova) 和硫氧还蛋白 (Trx) 用作阴性对照,该阴性对照不显示结合 Lcn2 突变蛋白(未示出)。将数据拟合成单价结合模型。针对 A β 40 测定的 K_D 值为:对于 H1GA 为 4.2 nM,对于 H1GV 为 4.9 nM,对于 H1-G1 为 21.5 nM;针对 Trx-A β 28 测定的相应的值分别为:3.8 nM、4.2 nM 和 24.4 nM。

[0181] 图 20 示出了在 Biacore 仪器上以 20 μ l/min 的流量测量的 Lcn2 突变蛋白 H1GA (A) 和 H1GV (B) 的动力学实时分析结果。经由胺化学将 MBP-A β 40 融合蛋白偶联在 CMD 200I 芯片 (RU = 1455) 上,每一种经纯化的 Lcn2 突变蛋白都以不同浓度的系列应用。在每种情况下,测得的信号示为灰色线条,而曲线拟合示为黑色线条。两种突变蛋白的 k_{on} 和 k_{off} 速率显著不同: $k_{on}(H1GA) = 5.77 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{on}(H1GV) = 6.84 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off}(H1GA) = 2.75 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $k_{off}(H1GV) = 7.26 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 。总体 K_D 值为:对于 H1GA 为 0.476 nM,对于 H1GV 为 1.06 nM。

[0182] 图 21 示出了在固定有 A β 40 的 Biacore 仪器上测量的 Lcn2 突变蛋白 H1GA 的动力学实时分析结果,其中对于以高浓度测量的轨迹使用延长的解离时间。经由胺化学将靶标肽 A β 40 偶联到 Biacore CM5 芯片 (Δ RU = 325) 上,经纯化的 Lcn2 突变蛋白 H1GA 以 30 μ l/min 的流量应用。为了准确测定低 k_{off} 速率,以测试的最高浓度进行解离 7200 s。使用系列稀释的 Lcn2 突变蛋白 H1GA 测定 k_{on} 速率,其中连接和解离时间均为 300 s。测得的 H1GA 的动力学值如下: $k_{on} = 1.25 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 1.18 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 0.095 \text{ nM}$ 。

[0183] 图 22 (A) 示出了在 thioflavin T 聚集分析中测试的 Lcn2 突变蛋白 H1GA 的功能活性。在不存在或存在不同摩尔比率的 Lcn2 突变蛋白 H1GA 的情况下,在 0.5 x PBS 中于 37 $^{\circ}$ C 下并搅拌,孵育 500 μ l 的 1 mg/ml 单体 A β 。一式三份地制备聚集反应。为了进行荧光测量,以周期性间隔取得的 20 μ l 样品各自与终浓度为 0.5 x PBS 中 50 μ M 的 180 μ l ThT 混合,然后以 450 nm 的激发波长和 482 nm 的发射波长分析。在等摩尔比率下,Lcn2 突变蛋白 H1GA 显示出聚集的强抑制。在此比率下, S1-A4 无法显著抑制聚集,但是在 1:2 (S1-A4: A β 40) 的比率下施加了明确抑制(未示出)。野生型 Lcn2 未对 A β 聚集显示出抑制性作用。在 10:2 (A β 40:H1GA) 的非等摩尔 (subequimolar) 比率下,聚集仍得到了显著减弱。(B) 相比之下,作为阴性对照的等摩尔量 BSA 或 Lcn2 均对 A β 40 的聚集无抑制性作用。

[0184] 图 23 总结了在不同 ELISA 程序中以及在表面等离子体共振测量中针对 Lcn2 突变蛋白 H1GA 和 H1GV 测定的 K_D 值。

[0185] 图 24 示出了 Lcn2 突变蛋白 S1-A4 (SEQ ID NO: 39)、US7 (SEQ ID NO: 41)、H1-G1 (SEQ ID NO: 43)、H1GA (SEQ ID NO: 50)、H1GV (SEQ ID NO: 52)、N7A (SEQ ID NO: 20)、N7E (SEQ ID NO: 22)、N9B (SEQ ID NO: 24) 和 N10D (SEQ ID NO: 26) 与 Lcn2 (SEQ ID NO: 44) 的序列比对结果。

[0186] 图 25 示出了突变蛋白 H1GA (SEQ ID NO: 50) 和 H1GV (SEQ ID NO: 52) 与它们的前体 H1-G1 (SEQ ID NO: 43) 和野生型 Lcn2 (SEQ ID NO: 44) 的相互序列比对结果。

[0187] 图 26 示出了 Lcn2 变体 N7E 在 ELISA 中对 FN7B8 的特异结合活性。用 FN7B8、FN789、BSA 或卵白蛋白包被微量滴定板,用系列稀释的 N7E 孵育,然后用链霉亲和素-碱性磷酸酶缀合物和 pNPP 底物检测。Lcn2 变体 N7E 在此分析中显示了对 FN789、BSA 和卵白蛋白的可忽略信号。

[0188] 图 27 示出了在 Biacore 仪器上测量的 Lcn2 变体 N7A (A)、N7E (B)、N9B (C) 和 N10D (D) 的动力学实时分析结果。经由胺化学将单个纤连蛋白结构域 ED-B 偶联在 CMD 200 m 传感器芯片 ($\Delta RU = 180$) 上,经纯化的 Lcn2 变体都以不同浓度应用。测得的信号示为与曲线拟合一起的轨迹。由这些感应谱的测定的动力学常数列于表 3 (实施例 24)。

[0189] 图 28 示出了 Lcn2 变体 N7A (A)、N10D (B)、N9B (C) 和 N7E (D) 的分析性尺寸排阻色谱。将经亲和纯化的蛋白施加到用 TBS 平衡的 Superdex S75 10/30 柱子。箭头指示了柱子的排斥体积 (6.7 ml)。分析性凝胶过滤得到该四种 Lcn2 变体中每一种的主峰蛋白的表观分子量为:N7A 为 21.0 kDa, N10D 为 21.3 kDa, N9B 为 21.7 kDa, N7E 为 21.7 kDa, 从而指示了仅单体物质不存在。

具体实施方式

[0190] 实施例 1:构建突变体 Lcn2 噬菌体展示文库

[0191] 在克隆的 cDNA 基础上产生了 Lcn2 变体的组合文库(Breustedt 等人 (2006) Biochim. Biophys. Acta 1764, 161-173),所述文库携带了氨基酸替换 Cys87Ser 以去除单个未配对的硫醇侧链(Goetz 等人 (2000) Biochemistry 39, 1935-1941)以及 Gln28His 以引入第二个 BstXI 限制性位点。基本上根据已公开的策略(Beste 等人 (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1898-1903; Skerra (2001) J. Biotechnol. 74, 257-275),进行了此区域的突变和聚合酶链式反应 (PCR) 组装,此时使用采用如示例于图 1 的寡脱氧核苷酸 (SEQ ID NO: 1-10) 的一罐式扩增反应。设计寡脱氧核苷酸,使得具有 SEQ ID NO: 1-4 的引物对应于编码链并且分别在氨基酸位置 36、40、41、49、52 或 68、70、72、73、77、79、81 或 96、100、103、106 或 125、127、132、134 处携带简并密码子,而具有 SEQ ID NO: 5-8 的引物对应于非编码链并且不携带简并密码子或反密码子。过量使用具有 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 的两个侧翼引物,并且用于扩增组装的随机化基因片段。如所述,使用 Go-Taq Hot Start DNA 聚合酶 (Promega, Mannheim, Germany) 进行全部 PCR 步骤(Schlehuber 等人 (2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120)。

[0192] HPLC 级的不携带简并密码子的寡脱氧核苷酸购自 Metabion (Munich, Germany)。脱盐的含 NNK 的寡脱氧核苷酸购自同一个供应商并且通过尿素 PAGE 进一步纯化。用 BstXI (Promega, Mannheim, Germany) 切割所得的 DNA 文库,然后在噬菌粒载体 phNGAL102 (SEQ ID NO: 11) 上克隆,所述噬菌粒载体 phNGAL102 基于通用表达载体 pASK111 (Vogt 和 Skerra (2001) J. Mol. Recognit. 14 (1), 79-86) 并编码由 OmpA 信号肽、经修饰的成熟 Lcn2、随后的琥珀密码子以及丝状噬菌体 M13 的基因 III 外壳蛋白 C 端片段组成的融合蛋白,即类似于之前针对后胆色素结合蛋白进行描述的(Beste 等人,上文;Skerra,上文)。在用 8,4 μ g 经消化的 PCR 产物和 94 μ g 经消化的质粒 DNA 的连接混合物电穿孔大肠杆菌 XL1-Blue (Bullock 等人 (1987) Biotechniques 5, 376-378) 之后,获得了 1×10^{10} 个转化子。

[0193] 或者,从 Sloning BioTechnology GmbH (Puchheim, Germany) 获得了描述于图 2 的克隆的合成 Lcn2 随机文库。使用适合的引物 (SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10) 经由 PCR 在 20 个循环中扩增由两个 BstXI 限制性位点侧翼的中心基因盒,然后在 pHNGAL108 (SEQ ID NO: 12) 上亚克隆,从而产生复杂度对应于 $1,7 \times 10^{10}$ 个独立转化子的文库。基于通用表达载体 pASK75 (Skerra (1994) Gene 151, 131-135) 的 pHNGAL108 编码由 OmpA 信号肽、经修饰的成熟 Lcn2、Strep- 标签、之后的琥珀型密码子以及丝状噬菌体 M13 的全长基因 III 外壳蛋白 (Vogt 和 Skerra (2004) ChemBioChem 5, 191-199) 组成的融合蛋白。

[0194] 对两个 Lcn2 文库相同地进行文库产生中的后续步骤。将 100 ml 的培养物转移到无菌 Erlenmeyer 烧瓶,然后在 37 ° C 下、以 160rpm 在 2YT 培养基(无抗生素选择压力)中孵育一个小时,其中所述培养物含有用质粒载体转化的细胞,所述质粒载体分别基于 pHNGAL102 或 pHNGAL108,从而编码作为噬菌体 pIII 融合蛋白的脂质运载蛋白突变蛋白的文库。在用 VCS-M13 辅助噬菌体感染之前,将培养物在 2YT 培养基中稀释到 OD550 为 0,1,其中加入了相应的抗生素并在相同条件下进一步生长直到达到 OD550 为 0,6。在用 VCS-M13 辅助噬菌体 (Agilent Technologies, La Jolla, USA) 以大约为 10 的感染复数感染之后,再在 37 ° C 下以 100 rpm 摇动培养物 30 分钟。然后将培养箱温度降低至 26 ° C,并将摇床速度再次升高至 160 rpm,10 分钟后加入卡那霉素 (70 µg/ml,之后经由加入 25 µg/l (在每升培养物中加入 125 µl 的在二甲基甲酰胺 DMF 中的 200 µg/ml 母液) 的无水四环素 (ACROS Organics, Geel, Belgium) 诱导基因表达。在 26 ° C 下以 160 rpm 再继续孵育 12-15 个小时。

[0195] 通过离心 (30 min, 18000 g, 4 ° C) 沉淀来自整个培养物的细胞。无菌过滤 (0.45 µm) 含有噬菌粒的上清液,与 1/4 体积的 20 % w/v PEG 8000、15 % w/v NaCl 混合,然后在冰上孵育至少 2 个小时。在离心 (30 min, 18000 g, 4 ° C) 之后,将来自 1 升培养物的沉淀的噬菌粒溶解于 30 ml 的冷 BBS/E (200 mM 硼酸钠, 160 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0) 中,所述 BBS/E 含有 50 mM 苯甲脒 (Sigma) 和 Pefabloc 1 µg/ml (Roth, Karlsruhe, Germany)。将溶液在冰上孵育 1 个小时。在离心 (10 min, 43000 g, 4 ° C) 未溶解的组分之后,将每个上清液转移到新的反应管。

[0196] 加入 1/4 体积的 20 % w/v PEG 8000、15 % w/v NaCl 和在冰上孵育 60 分钟使得再次沉淀噬菌粒,然后将噬菌粒等分并在 -80° C 下冷冻以进行保存。为了进行第一个选择循环,解冻噬菌粒并离心 (30 min, 34000 g, 4 ° C),去除上清液,然后溶解沉淀的噬菌粒并合并并在含有 50 mM 苯甲脒的总计 400 µl 的 PBS 中。在冰上孵育 30 min 之后,离心 (5 min, 18500 g, 4 ° C) 该溶液,以便去除参与的聚集体并将上清液直接用于噬菌体展示选择。

[0197] 实施例 2:制备不同形式的 Aβ 靶标

[0198] 购买了对应于成熟 β-淀粉样序列 (Dodel 等人 (2003) Lancet Neurology 2, 215-220) 的氨基酸 1 至 40 的 Aβ 40 肽 (SEQ ID NO: 29),该 Aβ 40 肽为合成的冻干的肽,具有经由赖氨酸间隔物连接的 C 端生物素基团 (Peptide Speciality Laboratory, Heidelberg, Germany) 或为未标记形式 (W. M. Keck Laboratory, New Haven, USA)。通过在室温下将多达 5 mg 的肽在 0.5 mL 的 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇 (HFIP; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 溶解至少 0.5 小时,获得了均一单体 Aβ 40。之后,在 SpeedVac 浓缩

仪中蒸发掉 HFIP, 并将 A β 40 溶解于合适体积的蒸馏水中, 随后在冷水中超声 (Bandelin, Sonorex, RK100, Germany) 15 分钟。用 0.22 μ m 过滤器 (Spin-X 离心管过滤器; Corning, USA) 过滤后, 通过在 280 nm 下使用计算的消光系数 1490 M⁻¹cm⁻¹ (Gasteiger 等人 (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 31, 3784-3788, <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 进行吸光度测量, 测定蛋白浓度。

[0199] 还从 Peptide Speciality Laboratory 购买了较短形式的 β -淀粉样肽, 例如 N-端的肽 A β 1-11 (SEQ ID NO: 30) 和中间的肽 A β 16-27 (SEQ ID NO: 31)。将这些较短形式的肽直接溶解于选择的缓冲液中, 未进行预先的 HFIP 处理。

[0200] 除了合成的肽, 构建了编码不同的重组 A β 融合蛋白的两个载体以进行细菌表达: 首先, 根据 Hortschansky 等人 ((2005) Protein Sci. 14, 1753-1759) 构建了具有麦芽糖结合蛋白 (MBP, pMBP-His, SEQ ID NO: 32) 的融合蛋白, 从而得到 pASK75-MBP-A β 40 (SEQ ID NO: 33)。第二, 根据 Moretto 等人 ((2007) J. Biol. Chem. 282, 11436-11445) 构建了 pASK75-TrxA β 28H6 (SEQ ID NO: 34), 在 pASK75-TrxA β 28H6 中, 将成熟淀粉样肽的氨基酸 1 至 28 插入到硫氧还蛋白 (Trx, pASK75-TrxH6, SEQ ID NO: 35) 的活性位点环中。

[0201] 顺序克隆在麦芽糖结合蛋白基因框架内携带延长的 N 端的人 A β 40, 产生了新的质粒 pASK75-MBP-A β 40, 这是载体 pASK75 的衍生物 (Skerra (1994) Gene 151, 131-135)。此载体编码这样的融合蛋白: 在麦芽糖结合蛋白之后为 His₆ 标签 (以便于蛋白纯化)、烟草蚀刻病毒 (TEV) 识别位点 (以用于切割该融合蛋白) 以及人 A β 40 的序列。所述载体处于四环素启动子 / 操纵子或系统的紧密控制下, 并且允许在大肠杆菌的细胞质中以高产率表达融合蛋白。

[0202] 经由硫氧还蛋白的活性环中的独特的 CpoI 位点 (核苷酸位置 99-105, 对应于氨基酸残基 34 和 35), 将编码成熟淀粉样肽的 (A β 28) 氨基酸 1 至 28 的序列插入到硫氧还蛋白环位点中, 从而产生载体 pASK75-Trx-A β 28H6。

[0203] 在大肠杆菌 JM83 (Yanisch-Perron 等人 (1985) Gene 33, 103-119) 中于 37 ° C 下表达两个 A β 融合蛋白 Trx-A β 28 和 MBP-A β 40 以及未融合的对照蛋白 Trx 和 MBP。通过加入溶解于无水二甲基甲酰胺 (DMF; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 中的 200 μ g/l 无水四环素 (aTc; Acros, Geel, Belgium)、然后继续搅拌孵育 3 小时, 以 0.5 的光密度 OD₅₅₀ 诱导蛋白表达。通过在 4 ° C 下以 4200 g 离心 20 分钟收集细胞。将来自 2 L 培养物的细胞重悬于 20 ml 裂解缓冲液 (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) 中, 然后通过使所得的悬浮液 3 次通过弗氏压碎器而匀质化。如果离心 (34500 g, 4 ° C, 20 min) 去除不溶物, 用 0.45 μ m 过滤器 (Filtropur S 0.45; Sarstedt, Nuembrecht, Germany) 过滤上清液并经由每种蛋白的 His₆ 标签进行亲和纯化。在固定化金属亲和色谱 (IMAC) 之后, 经由尺寸排阻色谱 (SEC) 进一步纯化该融合蛋白。

[0204] 通过在 280 nm 下使用下述计算的消光系数进行吸光度测量, 测定蛋白浓度: 对于 MBP (SEQ ID NO: 32) 为 66350 M⁻¹cm⁻¹, 对于 MBP-A β 40 (SEQ ID NO: 33) 为 69330 M⁻¹cm⁻¹, 对于 Trx-A β 28 (SEQ ID NO: 34) 为 15470 M⁻¹cm⁻¹, 对于 Trx (SEQ ID NO: 35) 为 13980 M⁻¹cm⁻¹ (Gasteiger 等人, 上文)。

[0205] 为了进行下述实验,将两种 A β 融合蛋白 Trx-A β 28 和 MBP-A β 40 以及用作对照蛋白的卵白蛋白 (Ova; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)、Trx 和 MBP,用生物素或洋地黄毒苷 (DIG) 以 2:1 的摩尔比率(标记试剂:靶蛋白)进行标记。

[0206] 为此,将溶解于无水二甲基甲酰胺 (DMF; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 或二甲基亚砜 (DMSO; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 中的 D-生物素- ϵ -氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 或洋地黄毒苷-3-O-甲基羰基- ϵ -氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 以 PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7.4) 中蛋白的 2 倍摩尔比率加入。将混合物在室温下旋转 1 小时。然后,加入 1 M Tris/HCl pH 8.0 至终浓度为 10 mM,并且孵育 10 分钟,从而浸透剩下的活性 NHS 酯基团,之后经由在 Superdex 75 HR 10/30 柱子 (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany) 上进行 SEC 纯化标记的蛋白。为了被用作噬菌体展示选择中的靶标,首先用洋地黄毒苷标记 Trx-A 28 1 小时,然后——为了封闭任何未配对的 Cys 残基——加入 50 倍的过量碘乙酰胺 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),然后孵育 1 小时。之后,用 1 M Tris/HCl pH 8.0 处理经修饰的蛋白并如上进行纯化。

[0207] 实施例 3:通过噬菌体展示选择对 A β 40 肽具有亲和力的 Lcn2 突变蛋白

[0208] 对于每个淘选循环,用 PBS/T (含有 0.1 % (v/v) Tween 20 [聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯; AppliChem, Darmstadt, Germany] 的 PBS) 中的 2 % (w/v) BSA 封闭 PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7.4) 中的约 10¹² 个重组噬菌粒 1 小时。用 PBS/T 分别洗涤 50 μ L 和 25 μ L 的多份链霉亲和素包被的磁珠悬浮液 (Dynabeads M-280 Streptavidin; Dynal Biotech, Invitrogen, Karlsruhe, Germany 和 Streptavidin Magnetic Particles; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany),然后用 PBS/T 中的 2 % (w/v) BSA 封闭 1 小时。将 25 μ L 经封闭的珠子用于预吸附经封闭的噬菌粒以去除对该柱子特异的噬菌粒,将 50 μ L 之后用于个选择循环。

[0209] 用 25 μ L 经洗涤且封闭的链霉亲和素包被的磁珠孵育经封闭的噬菌粒。然后用单管磁场 (Promega, Mannheim, Germany) 向下拉动珠子 2 分钟,用来自实施例 2 的 100 nM 生物素化的 A β 40,以 400 μ L 的总体积,将含有未结合至珠子的噬菌粒的上清液孵育 1-2 小时。用 50 μ L 经封闭的珠子孵育噬菌粒和肽靶标的混合物 0.5 小时,之后用单管磁场向下拉动 2 分钟。丢弃含有未结合的噬菌粒的上清液。用 400 μ L PBS/T 洗涤结合至磁珠的靶标/噬菌粒复合物 10 次,然后在旋转下用 350 μ L 0.1 M 甘氨酸/HCl, pH 2.2 洗脱结合的噬菌粒 10 分钟,然后立即用 55 μ L 0.5 M Tris 碱中和。或者,在用 PBS 中的 400 μ L 4 M 尿素的变性条件下进行洗脱 30 分钟,然后用 1 mL PBS 稀释。对于选择循环 1 和 2 应用用酸或尿素的变性条件下的洗脱,而对于循环 3 和 4,通过将 400 μ L 100 μ M 非生物素化的 A β 40 加入到结合的噬菌粒并旋转 1 小时,而在竞争条件下进行洗脱。总的来说,进行 4 个选择循环。

[0210] 为了扩增洗脱的噬菌粒,在 37 ° C 下感染指数生长的大肠杆菌 XL-1 Blue 30 分钟。通过将指数生长的大肠杆菌 XL-1 Blue 直接加入到珠子中,洗脱剩余的珠子结合的噬菌粒。在 4 ° C 下离心之后,将细菌沉淀重悬在合适体积的 2x YT 培养基 (16 g/L Bacto Tryptone, 10 g/L Bacto Yeast Extract, 5 g/L NaCl, pH 7.5) 中,涂布到 LB-Cam 板 (10

g/L Bacto Tryptone, 5 g/L Bacto Yeast Extract, 5 g/L NaCl, 15 g/L Bacto Agar, 35 mg/L 氯胺苯醇, pH 7.5) 上, 然后在 32 ° C 下孵育 14-16 小时。之后, 从板上刮下细胞并用于获得和扩增重组噬菌粒。

[0211] 在第四个淘选步骤之后, 通过筛选 ELISA (实施例 5) 进行富集的噬菌粒集合的筛选。

[0212] 实施例 4: 通过噬菌体展示选择对 Trx-A β 28 融合蛋白具有亲和力的 Lcn2 突变蛋白

[0213] 对于每个淘选循环, 首先用 PBS/T (含有 0.1 % (v/v) Tween 20 的 PBS) 中的 2 % (w/v) BSA 封闭 PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7.4) 中的约 10¹² 个重组噬菌粒 1 小时。来自进行的选择循环 3, 将 PBS/T 中的 2 % (w/v) 脱脂奶 (Sucofin, TSI, Zeven, Germany) 用作封闭试剂。用 PBS/T 洗涤 50 μ L 和 25 μ L 的抗 DIG-IgG 包被的磁珠悬浮液 (Europa Bioproducts Ltd, Cambridge, UK), 然后分别用 PBS/T 或脱脂奶中的 2 % (w/v) BSA 封闭 1 小时。

[0214] 用洗涤且经封闭的 25 μ L 抗 DIG-IgG 包被的磁珠孵育经封闭的噬菌粒 30 分钟。然后用单管磁场 (Promega, Mannheim, Germany) 向下拉动珠子 2 分钟, 用来自实施例 2 的 15 μ M 未标记的 Trx 将含有未结合至珠子的噬菌粒的上清液孵育 30 分钟, 以去除对 Trx 特异的噬菌粒。之后加入洋地黄毒苷化和羧甲基化的 Trx-A β 28 至终浓度为 100 nM, 以 400 μ L 的总体积孵育混合物 1-2 个小时。然后用从 50 μ L 份排出的经封闭的珠子孵育噬菌粒、Trx 和 Trx-A β 28 的混合物 0.5 小时。接着用单管磁场向下拉动珠子 2 分钟。丢弃含有未结合的噬菌粒的上清液。用 500 μ L PBS/T 洗涤具有结合的噬菌粒的磁珠 10 次。之后, 在 PBS 中的 400 μ L 4 M 尿素在旋转下洗脱结合的噬菌粒 30 分钟, 之后用 1 mL PBS 稀释。总的来说, 进行 6 个选择循环。

[0215] 为了扩增洗脱的噬菌粒, 在 37 ° C 下感染指数生长的大肠杆菌 XL-1 Blue 30 分钟。通过将指数生长期的大肠杆菌 XL-1 Blue 直接加入到珠子中, 洗脱剩余的珠子结合的噬菌粒。在 4 ° C 下离心之后, 将细菌沉淀重悬在合适体积的 2x YT 培养基 (16 g/L Bacto Tryptone, 10 g/L Bacto Yeast Extract, 5 g/L NaCl, pH 7.5) 中, 涂布到 LB-Cam 板 (10 g/L Bacto Tryptone, 5 g/L Bacto Yeast Extract, 5 g/L NaCl, 15 g/L Bacto Agar, 35 mg/L 氯胺苯醇, pH 7.5) 上, 然后在 32 ° C 下孵育 14-16 小时。之后, 从板上刮下细胞并用于获得和扩增重组噬菌粒。

[0216] 在第六个淘选步骤之后, 通过过滤器夹心的菌落筛选分析 (filter-sandwich colony screening synthesis) (实施例 6) 进行富集的噬菌粒集合的筛选。

[0217] 实施例 5: 经由筛选 ELISA 鉴定对 A β 特异的 Lcn2 突变蛋白

[0218] 在如实施例 3 所述用 A β 40 进行 4 个循环的噬菌粒选择之后, 将富集的 Lcn2 突变蛋白集合在 pHNGAL98 (SEQ ID NO: 27) 上进行亚克隆, 用于转化大肠杆菌 supE 菌株 TG1-F (大肠杆菌 K12 TG1 (Kim 等人 (2009) J. Am. Chem. Soc. 131, 3565-3576 的衍生物)), 然后进行筛选 ELISA。

[0219] 为此目的, 将来自富集的集合的单个菌落在 96 孔板 (圆底带盖的 Multiple Well Plate 96; Sarstedt, Nuembrecht, Germany) 中、在 100 μ L TB-Amp 培养基 (12 g/L Bacto Tryptone, 24 g/L Bacto 酵母提取物, 55 mM 甘油, 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄, 100

mg/L 氨苄西林)中于 37 ° C 下生长过夜。用过夜培养物接种具有 100 µL TB-Amp 培养基的新的培养板,然后在 22 ° C 或 37 ° C 下生长到指数期。用溶解于无水二甲基甲酰胺 (DMF; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 的 20 µL 0.2 µg/mL 无水四环素 (aTc; Acros, Geel, Belgium) 在 20 ° C 下诱导 Lcn2 突变蛋白的外周胞质表达 13-17 个小时。用包含 1 mg/mL 溶菌酶的 40 µL BBS(800 mM 硼酸钠, 640 mM NaCl, 8 mM EDTA, pH 8.0),通过在 4 ° C 下孵育 1 小时和以 750 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Germany) 搅拌,释放外周胞质蛋白。在用 PBS/T (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7.4,具有 0.05 % (v/v) Tween 20)中的 40 µL 10 % (w/v) BSA 于 4 ° C 和 750 rpm 下封闭 1 小时之后,在 4 ° C 和 3000 g 下离心培养板 10 分钟。将上清液用于 ELISA。

[0220] 为了选择性地捕获携带 C 端 Strep- 标签 II (Schmidt 和 Skerra (2007) Nat. Protoc. 2, 1528-1535) 的 Lcn2 突变蛋白,在 4 ° C 下用 PBS 中的 10 µg/mL StrepMAB-Immo (IBA, Göttingen, Germany) 包被 96 孔 MaxiSorp 聚苯乙烯微量滴定板 (Nunc, Langenselbold, Germany) 过夜,然后在室温下用 PBS/T(具有 0.1 % (v/v) Tween 20 的 PBS) 中的 3 % (w/v) BSA 封闭 1 个小时。用 PBS/T 的 3 次洗涤步骤之后,每孔应用来自上文的 120 µL 细胞提取物,然后以 300 rpm 孵育 1.5 小时。洗涤之后,加入来自实施例 2 的生物素化的 Aβ 40 至浓度为 0.5 µM,然后孵育 1 小时。作为对照,使用生物素化的 Ova,而非 Aβ 40。再次洗涤各孔,用 PBS/T 中 1:5000 稀释的 50 µL 的 ExtrAvidin/AP 缀合物 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 检测结合的生物素化的肽或蛋白,之后在 100 mM Tris/HCl, pH 8.8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂中的 100 µL 0.5 mg/mL 对硝基苯磷酸酯 (AppliChem, Darmstadt, Germany) 存在下进行信号显示长达 1 小时。在 SpectraMax 250 读板仪 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) 中测量 405 nm 下的吸光度。

[0221] 或者,将来自实施例 2 的 0.5 µM 非生物素化的 Aβ 40 直接固定在 96 孔 MaxiSorp 聚苯乙烯微量滴定板 (Nunc, Langenselbold, Germany) 上,然后进行封闭。在与来自上文的细胞提取物一起孵育并洗涤之后,经由 Strep- 标签 II、使用 1:1500 稀释的 Streptactin/AP 缀合物 (IBA, Göttingen, Germany) 检测结合的 Lcn2 突变蛋白。作为对照,将 0.5 µM Ova 固定到 ELISA 板上。

[0222] 实施例 6 :经由过滤器夹心的菌落筛选分析鉴定对 Trx-Aβ 28 特异的 Lcn2 突变蛋白

[0223] 在用如实施例 4 中描述的 Trx-Aβ 28 进行 6 个循环的噬菌粒选择之后,经由 BstXI (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) 在质粒 phNGAL124 (SEQ ID NO: 42) 上亚克隆经突变的 Lcn2 基因盒,所述质粒编码这样的融合蛋白 :OmpA 信号肽、具有 C 端 Strep- 标签 II (Schmidt and Skerra (2007) Nat. Protoc. 2, 1528-1535) 的 Lcn2 编码区、然后使琥珀型终止密码子以及用于来自链球菌 G 蛋白 (Schlehuber 等人 (2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120) 的白蛋白结合。结构域 (ABD) 的基因。

[0224] 然后进行过滤器夹心的菌落筛选分析,由此从涂在亲水滤膜 (PVDF 型 GVWP, 0.22 µm; Millipore, Schwalbach, Germany) 上的菌落释放 Lcn2-ABD 融合蛋白,然后功能性捕获在下面的第二个膜 (Immobilon-P 膜, 0.45 µm; Millipore, Schwalbach, Germany) 上,所述第二个膜包被了人血清白蛋白 (HSA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),之后进行由 Schlehuber 等人 ((2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120) 详细描述程序。用

来自实施例 2 的 PBS/T 中的 100 nM DIG 标记的 Trx-A β 28 探测该膜 1 个小时。用抗 DIG Fab/碱性磷酸酶 (AP) 缀合物 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 检测结合的靶标缀合物,之后用 5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯、4-甲苯胺蓝 (BCIP; AppliChem, Darmstadt, Germany) 和氮蓝四唑 (NBT; AppliChem, Darmstadt, Germany) 进行显色反应。在此膜上鉴定到具有强烈颜色信号的点之后,从第一过滤器上挑取相应菌落,然后经繁殖与第二个菌落筛选中进行并排比较。

[0225] 为此目的,将分离的细菌以及表达对照 Lcn2 突变蛋白(例如野生型脂质运载蛋白)的细菌点到新鲜的亲水膜上,然后使之生长直到小菌落可见。对 DIG 标记的 Trx-A β 28 以及 DIG 标记的对照蛋白 Trx 和 Ova 测试结合情况。将在第二个筛选中对 Trx-A β 28 靶标产生特异信号的 Lcn2 突变蛋白进一步繁殖以进行质粒分离和之后的序列分析。

[0226] 实施例 7:可溶产生和纯化对 A β 和 ED-B 特异的 Lcn2 突变蛋白

[0227] 通过在大肠杆菌 BL21 (Studier 和 Moffat (1986) J. Mol. Biol. 189, 113-130)、大肠杆菌 W3110 (Bachmann (1990) Microbiol. Rev. 54, 130-197)、大肠杆菌 JM83 (Yanisch-Perron 等人 (1985) Gene 33, 103-119) 或大肠杆菌 supE 菌株 TG1-F (大肠杆菌 K12 TG1 的一种衍生物 [Kim 等人 (2009) J. Am. Chem. Soc. 131, 3565-3576], 使用吡啶橙由其游离基因而加工而成)的外周胞质分泌,产生重组 Lcn2 及其突变蛋白,为了进行可溶蛋白表达,使用质粒 pHNGAL98 (SEQ ID NO: 27),其编码 OmpA 信号肽与成熟 Lcn2 蛋白 (SEQ ID NO: 28) 和 C 端 Strep- 标签 II 的融合蛋白,由此该质粒携带用于单向亚克隆该突变的基因盒的两个不相容的 BstXI 限制性位点。

[0228] 通过 Strep- 标签 II (Schmidt 和 Skerra (2007) Nat. Protoc. 2, 1528-1535)、然后通过使用 PBS 缓冲液在 Superdex 75 HR10/30 柱子 (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany) 上进行尺寸排阻色谱 (SEC),亲和纯化该可溶蛋白。通过 SDS-PAGE (Fling 和 Gregerson (1986) Anal. Biochem. 155, 83-88) 检测蛋白纯度。通过在 280 nm 下使用下述计算的消光系数进行吸光度测量,测定蛋白浓度:对于野生型 Lcn2 (SEQ ID NO: 44) 为 $31400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,对于 A β 特异突变蛋白 H1-G1 (SEQ ID NO: 43) 为 $26930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、对于 S1-A4 (SEQ ID NO: 38) 为 $24410 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,对于 US7 (SEQ ID NO: 41) 为 $26930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。ED-B 特异 Lcn2 突变蛋白的计算的消光系数为:对于突变蛋白 N7A (SEQ ID NO: 20) 为 $37930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,对于 N7E (SEQ ID NO: 22) 为 $22920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,对于 N9B (SEQ ID NO: 24) 为 $21430 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,对于 N10D (SEQ ID NO: 26) 为 $39420 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Gasteiger 等人,上文)。

[0229] 实施例 8:在 ELISA 实验中测量对不同 A β 靶标的结合活性

[0230] 为了选择性捕获携带 C 端 Strep- 标签 II (Schmidt 和 Skerra (2007) Nat. Protoc. 2, 1528-1535) 的 Lcn2 突变蛋白,在 4 $^{\circ}$ C 下用 PBS 中的 10 $\mu\text{g/mL}$ StrepMAB-Immo (IBA, Göttingen, Germany) 包被 96 孔 MaxiSorp 聚苯乙烯微量滴定板 (Nunc, Langenselbold, Germany) 过夜,然后在室温下用 PBS/T 中的 3 % (w/v) BSA 封闭 1 个小时。在用 PBS/T 的 3 次洗涤步骤之后,将 50 μL 来自实施例 7 的经纯化的 Lcn2 突变蛋白的 1 μM 溶液应用到全部孔中 1 个小时。洗涤之后,加入 50 μL 来自实施例 2 的系列稀释的生物素化的靶标 A β 40、MBP-A β 40 或 Trx-A β 28 并孵育 1 个小时,由此将来自实施例 2 的生物素化形式的 Ova、MBP 和 Trx 用作阴性对照蛋白。再次洗涤各孔,然后用 PBS/T 中 1:5000 稀释的 50 μL 的 ExtrAvidin/AP 缀合物 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 检测结合

的缀合物1个小时,之后在100 mM Tris/HCl, pH 8.8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂中的100 μ L 0.5 mg/mL 对硝基苯磷酸酯 (AppliChem, Darmstadt, Germany) 存在下进行信号显示。在 SpectraMax 250 读板仪 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) 中测量 405 nm 下吸光度 $\Delta A / \Delta t$ 的时间,然后用 KaleidaGraph 软件 (Synergy software, Reading, PA) 将数据拟合到方程

[0231] $\Delta A = \Delta A_{\max} \times [L]_{\text{tot}} / (K_D + [L]_{\text{tot}})$ 中,

[0232] 其中 $[L]_{\text{tot}}$ 表示应用的配体缀合物的浓度, K_D 为解离常数 (Voss 和 Skerra (1997) Protein Eng. 10, 975-982)。

[0233] 或者,为了进行“直接”ELISA,将 2 μ M 来自实施例 2 的未标记的 A β 40 靶标吸附到 96 孔 MaxiSorp 聚苯乙烯微量滴定板 (Nunc, Langenselbold, Germany) 上,然后用经纯化的 Lcn2 突变蛋白孵育,其经由 Strep- 标签 II、使用 1:1500 稀释的链霉亲和素 /AP 缀合物 (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) 进行检测。作为对照,将来自实施例 2 的 2 μ M MBP 吸附到 ELISA 板上。在 SpectraMax 250 读板仪 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) 中测量 405 nm 下的吸光度。

[0234] 或者,以与上文描述的“捕获”ELISA 相似的方式进行“竞争性”ELISA。再次地,在固定 StrepMAB-Immo 并洗涤之后,将 50 μ L 来自实施例 7 的经纯化的 Lcn2 突变蛋白的 1 μ M 溶液应用到全部孔中 1 个小时。洗涤之后,在不同浓度的游离未标记的靶标作为竞争物存在下,应用固定浓度为 5 nM (对于 S1-A4)或 40 nM (对于 US7)的来自实施例 2 的生物素化的靶标 Trx-A β 28。以 100 倍过量开始,在每个步骤中以 2 倍降低竞争物浓度。在这种情况下,将数据拟合为 sigmoidal 方程

[0235] $\Delta A = (\Delta A_{\max} - \Delta A_{\min}) / (1 + ([L]_{\text{tot}}^{\text{free}} / K_D)^p) + \Delta A_{\min}$

[0236] 其中将曲线斜率 p (Hill 系数) 作为其它参数。

[0237] 下表 1 总结了在不同 ELISA 程序中以及在表面等离子体共振 (参见实施例 9) 中测定的 K_D 值。

[0238] 表 1:

	K_D [nM]		
	S1-A4	US7	H1-G1
A 40 (捕获 ELISA, 参见图 5)	2.7 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 0.4	16.2 $\pm$ 1.9
Trx-A 28 (捕获 ELISA, 参见图 5)	1.9 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.2	24.3 $\pm$ 3.8
MBP-A 40 (捕获 ELISA, 参见图 5)	4.7 $\pm$ 0.1	11.4 $\pm$ 0.6	n.d.
[0239] A 16-27 (捕获 ELISA, 参见图 5)	2.6 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.1	n.d.
Trx-A 28 (直接 ELISA, 参见图 6)	16.2 $\pm$ 4.4	9.6 $\pm$ 1.7	290 $\pm$ 62
MBP-A 40 (直接 ELISA, 参见图 6)	149 $\pm$ 31	49.7 $\pm$ 8.1	n.d.
Trx-A 28 (竞争性 ELISA, 参见图 7)	21.7 $\pm$ 1.5	76.9 $\pm$ 4.5	n.d.
MBP-A 40 (SPR, 参见图 8, 实施例 9)	1.7	1.3	n.d.

[0240] 实施例 9:经由表面等离子体共振 (SPR) 测量对 A β 的结合活性

[0241] 在 Biacore X system (Biacore, Uppsala, Sweden) 上、使用 PBS/T (含有 0.005

% (v/v) Tween 20 的 PBS) 作为流动缓冲液, 进行 Lcn2 突变蛋白的实时分析。使用标准的胺偶联化学, 将来自实施例 2 的 MBP-A β 40 在 10 mM 乙酸钠, pH 4.5 中的 50 μ g/mL 溶液固定到 CMD 200I 芯片 (Xantec, Düsseldorf, Germany) 上, 从而得到 1455 共振单位 (RU) 的配体密度。以范围为 2 nM 至 125 nM 的浓度和 10 μ L/min 的流量应用来自实施例 7 的经纯化的 Lcn2 突变蛋白 S1-A4 和 US7。通过减去针对对照通道测得的相应信号, 校正感应谱, 所述对照通道已被活化且用乙醇胺封闭。通过用 BIAevaluation 软件 V 3.0 (Karlsson 等人 (1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240) 拟合, 进行动力学数据评估。在此步骤期间, 整体拟合 k_{on} 和 k_{off} 速率, 而对每条曲线局部地拟合最大响应差异 R_{max} 。

[0242] 实施例 10 : 经由 SPOT 膜上的表位作图确定 A β 表位

[0243] 在如 Frank ((2002) J. Immunol. Methods 262, 13-26) 描述的自动化程序中, 使用 MultiPep RS 仪器 (Intavis, Köln, Germany) 和来自同一供应商的活化氨基酸, 制备用于进行 Lcn2 突变蛋白 S1-A4 和 US7 的 A β 表位作图的 SPOT 膜 (Amino-PEG500-UC540 片, 100 x 150 mm, Intavis, Köln, Germany)。在膜上以连续的六聚体、十聚体和十五聚体合成 A β 40 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 29), 每一个均具有 1 个氨基酸的错位, 从而覆盖整个序列。这些肽的 C 端共价地连接到膜上, 而它们的 N 端被乙酰基化。固定的 Strep- 标签 II 用作该检测方法的阳性对照。

[0244] 用 95 % 三氟乙酸 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)、3 % 三异丙基硅烷 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 和 2 % 蒸馏水进行侧链脱保护 2 个小时。在用二氯甲烷 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 洗涤膜 4 次、用二甲基甲酰胺 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 洗涤两次和用乙醇洗涤两次之后, 风干该膜。

[0245] 在使用之前, 该膜用乙醇洗涤一次、用 PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7.4) 洗涤 3 次, 然后用 PBS/T (含有 0.1 % (v/v) Tween 20 的 PBS) 中的 3 % (w/v) BSA 封闭 1 个小时。在用 PBS/T 洗涤 3 次之后, 将膜用 PBS/T 中的 Lcn2 突变蛋白 S1-A4 (50 nM)、US7 (100 nM) 或野生型 Lcn2 (100 nM) 孵育 1 个小时, 然后用 PBS/T 洗涤 3 次。然后, 用 PBS/T 中的 1:1500 稀释的链霉亲和素 /AP 缀合物 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 孵育该膜 1 个小时, 以经由 Strep- 标签 II 进行蛋白检测。之后, 将该膜用 PBS/T 洗涤 3 次, 在 AP 缓冲液 (100 mM Tris/HCl, pH 8.8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) 中洗涤 1 次, 然后用 5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶基磷酸酯、4- 甲苯胺蓝 (BCIP; AppliChem, Darmstadt, Germany) 和氮蓝四唑 (NBT; AppliChem, Darmstadt, Germany) 在 AP 缓冲液进行显色反应, 如 Schlehuber 等人 ((2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120) 所述。

[0246] 比较分别用 S1-A4 和野生型 Lcn2 孵育的膜, 仅在用 S1-A4 孵育膜后产生了明显的点, 而在用野生型 Lcn2 孵育膜后没有产生。在十五聚体 A β 40 片段的情况下, 基序 LVFFAED 看起来对于 S1-A4 的结合是重要的。在较短的六聚体和十聚体肽序列的情况下, 检测到 S1-A4 结合到最小基序 VFFAED 和 FFAEDV。在此分析中, Lcn2 突变蛋白 US7 显示了类似的表位图谱。

[0247] 实施例 11 : 在 ThT 聚集分析进行与 A β 具有亲和力的 Lcn2 突变蛋白的功能分析

[0248] 在存在或不存在各种 Lcn2 突变蛋白的情况下, 使来自实施例 2 的固定和均匀单体的非生物素化的 A β 40 进行 thioflavin T 聚集分析。Thioflavin T (ThT; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 与富含 β -片层的淀粉样纤维和低聚前体特异地结合, 但是不与单

体 A β 肽结合,所述结合伴随着 ThT 荧光的增加(Khurana 等人 (2005) J. Struct. Biol. 151, 229-238)。

[0249] 为此,将 ThT 溶解于蒸馏水至浓度为 1 mM。通过用 5 mM 甘氨酸/NaOH, pH 8.5 将 1 mM 母液稀释到终浓度为 5 μ M 制备工作溶液。在 37 ° C 下无需搅拌,孵育 500 μ L 200 μ M A β 40 在蒸馏水中的 1:1 混合物(根据实施例 2 进行溶解)和 PBS 中的来自实施例 7 的 20 μ M Lcn2 突变蛋白。在不同时间点的每次荧光测量之前,短暂涡旋样品 10 次,将 20 μ L 的各样品与 180 μ L ThT 工作溶液混合。在荧光分光仪 (LS 50 B, Perkin Elmer, Waltham, USA) 中,用 450 nm 的激发波长和 482 nm 的发射波长测量荧光强度。

[0250] 如图 9 所示,Lcn2 突变蛋白 US7 显示了 1:10 的比率的 A β 40 聚集强抑制。

[0251] 实施例 12:制备含有额外结构域 B(ED-B) 的重组纤连蛋白片段

[0252] 将人纤连蛋白的 3 种不同重组片段用作选择的靶标:仅额外结构域 -B (命名为 ED-B; Zardi 等人 (1987) EMBO Journal, 6, 2337-2342);在其相邻结构域 7 和 8 中的相同结构域(称为 FN7B8);和包含常规结构域 7、8 和 9 的 FN789,因而缺少 ED-B (Carnemolla 等人 (1996), Int. J. 癌症, 68, 397-405;Leahy 等人 (1994) Proteins 19, 48-54)。

[0253] 将 FN7B8、FN789 和 ED-B 的编码序列克隆在载体 pASK75 (Skerra (1994) Gene 151, 131-135)或其衍生物 pASG-IBA-33 (IBA, Göttingen, Germany) 上,从而分别得到 pASK75-FN7B8 (SEQ ID NO: 13)、pASK75-FN789 (SEQ ID NO: 17) 和 pASG-IBA-33-EDB (SEQ ID NO: 15)。全部构建体在羧基端提供 His₆ 标签,以经由固定化金属亲和色谱 (IMAC) 进行纯化,在大肠杆菌 TG1/F [大肠杆菌 K12 TG1 的衍生物 (Gibson (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome, Cambridge University, England)] 或 BL21 (Studier 和 Moffatt (1986), 189, 113-130) 的细胞质产生了可溶蛋白。因此,在 37 ° C 下在含有 100 μ g/ml 氨苄西林的 LB 培养基中,使携带该表达质粒的大肠杆菌的 2L 培养物生长到对数期中期。加入 200 μ g/L 无水四环素 (Acros, Geel, Belgium) 之后,在 37 ° C 下继续生长 5 至 7 个小时。通过离心浓集细胞,重悬于 35 ml 冰冷的色谱缓冲液 (40 mM Hepes/NaOH, 1 M NaCl, pH 7.5) 中,然后通过超声 (S250D, Branson, Danbury CT, USA) 裂解。

[0254] 下文给出的纯化操作程序对于全部三种重组纤连蛋白片段而言是相同的。将经澄清的裂解液施加于 Zn²⁺/IDA-Sepharose 柱子 (GE Healthcare, Munich, Germany),所示柱子装有 10 mM ZnSO₄并用 40 mM Hepes/NaOH, 1 M NaCl, pH 7.5 平衡。用色谱缓冲液中的 0 至 300 mM 咪唑(用 HCl 调节 pH)之间的浅梯度洗脱结合的蛋白。通过混合了终浓度为 1 mM 的 EDTA 的 SDS-PAGE 鉴定含有重组蛋白的级分,然后针对 20 mM Hepes/NaOH, pH 7.4 透析过夜。之后,将蛋白装载于离子交换色谱柱子 (Resource Q, GE Healthcare, Munich, Germany) 上,所示柱子用 20 或 40 mM Hepes/NaOH, pH 7.4 平衡。为了洗脱结合的纤连蛋白片段,使用 0 至 300 mM NaCl 的梯度。

[0255] 最后,通过 SDS-PAGE 分析和尺寸排阻色谱确定蛋白的纯度。为了通过 280 nm 处的吸光度测量测定蛋白的浓度,使用下述计算的消光系数 (Gasteiger 等人 (2003) Nucleic Acids Res. 31, 3784-3788):对于 FN7B8 为 31,400 M⁻¹cm⁻¹,对于 FN789 为 28420 M⁻¹cm⁻¹,对于 ED-B 为 11460 M⁻¹cm⁻¹。通常,每 2L 摇瓶培养物获得约 10 至 20 mg 经纯化的蛋白。将经纯化的蛋白保存于 4 ° C 下,用于全部实验。

[0256] 根据供应商的手册,在室温下,以过量 (4:1 摩尔比率)的洋地黄毒苷 -3-O- 甲基羰

基-ε-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 进行 1 个小时的经纯化纤连蛋白片段的洋地黄毒苷标记。为了去除游离的洋地黄毒苷,将蛋白溶液施加于 PD-10 脱盐柱子 (GE Healthcare, Munich, Germany),所示柱子用 40 mM Tris/HCl, 115 mM NaCl 和 1 mM EDTA, pH 7.5 平衡。通过 SDS-PAGE、ESI 质谱或经由用抗洋地黄毒苷-AP、Fab 片段 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 染色的点印记检查洋地黄毒苷化成功与否和蛋白的完整性。

[0257] 实施例 13 :通过噬菌体展示选择与 ED-B 具有亲和力的 Lcn2 变体

[0258] 使用基于合成的基因集合的 Lcn2 随机噬菌粒文库进行一共 4 个噬菌粒展示选择循环,所示合成的基因集合最初由 Sloning BioTechnology GmbH 合成,如实施例 1 中所述。对于第一个选择循环,将约 5×10^{12} 个重组噬菌粒溶解于补充了 50 mM 苯甲脒的 300 L TBS/E (40 mM Tris/HCl, 115 mM NaCl and 1 mM EDTA, pH 7.4) 中,然后通过加入 TBS 中的 100 μL 8 % (w/v) BSA (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) 封闭 30 分钟,所述 TBS 含有 0.4 % (v/v) Tween 20 [聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯; AppliChem, Darmstadt, Germany]。然后用抗洋地黄毒苷 IgG 磁珠 (Europa Bioproducts, Cambridge, UK) 将此溶液孵育 1 个小时,所述磁珠已经用 TBS/T (含有 0.1 % (v/v) Tween 20 的 TBS) 中的 2 % (w/v) BSA 封闭了 1 个小时,并装载了 400 μl 的 0.1 μM 洋地黄毒苷标记的重组 FN7B89 (参见实施例 12)。

[0259] 在经由磁体收集珠子并丢弃上清液之后,用 TBS/T 进行 10 个洗涤步骤,然后首先用 400 μl 的 0.1 M 三乙基胺(未调节 pH)洗脱剩余结合的噬菌粒 6 分钟,然后用 350 μl 的 0.1 M 甘氨酸 /HCl pH 2.2 第二次洗脱 8 分钟。收集洗脱液,然后分别用适合量的 2 M 乙酸或 50 μl 0.5 M Tris 碱立刻中和,合并,并用于感染指数生长的大肠杆菌 XL1-Blue。滴定噬菌粒,然后在根据已公开的操作程序进行下一个淘洗步骤之前再次扩增 (Beste 等人 (1999) PNAS 96, 1898-903; Schlehuber 等人 (2000) J Mol Biol 297 1109-20)。

[0260] 对于第二轮选择,使用约 2×10^{12} 个扩增的噬菌粒,并通过与 400 μl 的 231 nmol/ml 游离重组 ED-B 竞争而洗脱结合的噬菌粒 75 分钟。

[0261] 在第三和第四个选择循环中,首先用 100 nM 洋地黄毒苷标记的 FN7B8 将约 2×10^{12} 个扩增的噬菌粒孵育 1 个小时。然后,在抗洋地黄毒苷 IgG 磁珠上捕获噬菌粒-抗原复合物 20 分钟。用 TBS/T 洗涤珠子 10 次之后,通过与 400 μl 的 140 至 231 nmol/ml 游离重组 ED-B 竞争而洗脱结合的噬菌粒 75 分钟。

[0262] 实施例 14 :通过筛选 ELISA 选择与 ED-B 具有亲和力的 Lcn2 变体

[0263] 通过筛选 ELISA 监测 Lcn2 突变蛋白的富集,所述 Lcn2 突变蛋白由实施例 13 中描述的噬菌体展示选择得到,特异性地结合靶标蛋白 ED-B。使用来自上一个淘洗步骤的合并的质粒制备物,经由 BstXI 将经突变的基因盒亚克隆到表达质粒 pHNGAL98 上,其编码用于在大肠杆菌中外周胞质产生的 OmpA 信号肽和具有 C 端 Strep- 标签 II (Schmidt and Skerra (2007) Nat. Protoc. 2, 1528-1535) 的 Lcn2 编码区的融合蛋白。如下进行在 96 孔板中可溶表达各 Lcn2 突变蛋白:用随机挑选的单个菌落接种含有 100 μg/ml 氨苄西林的 100 μl TB 培养基 (Tartof 和 Hobbs (1987) Bethesda Research Laboratory Focus 9, 12),然后在 37° C 下振摇 (500 至 800 rpm; Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg, Germany) 孵育 5 个小时。对于每个克隆,用 10 μl 该培养物接种 100 μl 的新鲜培养基,然

后在 37° C 下振摇孵育 1 至 2 个小时,然后将温度降低至 22° C。进一步孵育 2-4 小时之后,用 0.2 µg/ml 无水四环素 (Acros, Geel, Belgium) 在指数生长的细胞中表达 Lcn2 突变蛋白 12-14 个小时。在室温下并振摇,通过加入含有 1mg/ml 溶菌酶 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 的 40 µl 2xPBS(0.2 M 硼酸盐 /NaOH, 160 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 进行蛋白的外周胞质释放 1 个小时。用 TBS 中的 40 µl 10 % w/v BSA (Applchem, Darmstadt, Germany) 和 0.5 % Tween-20 封闭裂解液 1 个小时,然后通过离心 10 分钟,从粗提取物中去除细胞碎片。

[0264] 为了将 FN7B8 或 FN789 吸附在 96 孔 Nunc Maxisorp 板 (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Germany) 的表面上,每孔加入 50 µl 的 TBS 中的 100 µg/ml 蛋白溶液,然后在 4° C 下孵育过夜。在用 TBS/T 的三次洗涤步骤之后,在室温下,用 TBS/T 中的 2 % (w/v) BSA 封闭孔 3 个小时,并且在暴露于来自大肠杆菌的粗提取物之前重复洗涤。为了进行 ELISA,每孔施加 50 µl 的经澄清的裂解液,孵育 1 个小时,然后用 TBS/T 洗涤三次。用链霉亲和素 - 碱性磷酸酶缀合物 (TBS/T 中 1:1500; GE Healthcare, Munich, Germany),使用底物即 0.1 M Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 8.8 中的 4-硝基苯磷酸酯 (pNpp, 0.5 mg/ml; AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany),检测结合的 Lcn2 突变蛋白 (参见实施例 16)。

[0265] 在此筛选 ELISA 中鉴定了四个克隆。在后面的实验 (参见实施例 16-18) 中,发现这四个 Lcn2 突变蛋白还在 ED-B 阳性的人结肠癌细胞的 ELISA、SPR- 分析和免疫荧光显微术显示了对 FN7B8 的特异结合活性。将这些 Lcn2 突变蛋白命名为 N7A (SEQ ID NO: 20)、N7E (SEQ ID NO: 22)、N9B (SEQ ID NO: 24) 和 N10D (SEQ ID NO: 26)。

[0266] 实施例 15 :Lcn2 及其变体的可溶蛋白产生和纯化

[0267] 详见实施例 7。

[0268] 实施例 16 :在 ELISA 中测量对 ED-B 的结合活性

[0269] 为了将 FN7B8 或 FN789 吸附到 96 孔 Nunc Maxisorp 板 (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Germany) 的表面上,每孔加入 50 µl 的 TBS 中的 100 µg/ml 蛋白溶液,然后在室温下孵育 2 个小时。此外,为了包括对照蛋白,将空白孔暴露于 TBS/ET 中的 120 µl 2 % (w/v) BSA (AppliChem, Darmstadt, Germany)。在三次洗涤步骤之后,用 TBS/ET 中的 120 µl 2 % (w/v) BSA (AppliChem, Darmstadt, Germany) 封闭孔 2 个小时,并且重复洗涤,然后加入 50 µL 系列稀释的经纯化的 Lcn2 突变蛋白并孵育 1 个小时。再次洗涤各孔,然后用 TBS/T 中 1:1500 稀释的 50 µL 链霉亲和素 - 碱性磷酸酶缀合物 (GE Healthcare, Munich, Germany) 检测结合的 Lcn2 突变蛋白 1 个小时,之后在 100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 8.8 中的 50 µL 0.5 mg/mL 对硝基苯磷酸酯 (AppliChem, Darmstadt, Germany) 存在下进行信号显示。在 SpectraMax 250 读板仪 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 中测量 405 nm 下吸光度 $\Delta A / \Delta t$ 的时间,然后用 KaleidaGraph 软件 (Synergy software, Reading, PA) 将数据拟合到方程

$$[0270] \quad \Delta A = \Delta A_{\max} \times [L]_{\text{tot}} / (K_D + [L]_{\text{tot}})$$

[0271] 其中 $[L]_{\text{tot}}$ 表示应用的配体缀合物的浓度, K_D 为解离常数 (Voss 和 Skerra (1997) Protein Eng. 10, 975-982)。发现 Lcn2 变体 N7A、N9B 和 N10D 以 14.8 nM (N7A)、40.1 nM (N9B)、30.0 nM (N7E) 和 51.2 (N10D) 的 K_D 值特异性地结合 FN7B8, 但是不结合 FN789 或

BSA。

[0272] 实施例 17:经由表面等离子体共振 (SPR) 测量对重组纤连蛋白 FN7B8 的结合活性

[0273] 在 BIAcore X 系统 (BIAcore, Uppsala, Sweden) 上,使用 HBS/ET(20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 含有 0.005 % (v/v) Tween 20)作为流动缓冲液,进行 Lcn2 突变蛋白的实时分析。使用标准胺偶联化学 (Biacore, Uppsala, Sweden),将 10 mM 乙酸钠, pH 4.0 中的 200 $\mu\text{g/ml}$ 重组 FN7B8 溶液固定在 CMD 200 m 传感器芯片 (XanTec bioanalytics, Duesseldorf, Germany) 上,从而得到约 500 共振单位 (RU) 的配体密度。以 25 $\mu\text{l/min}$ 的流量、以 2.5 至 160 nM 的浓度应用经纯化的 Lcn2 突变蛋白。

[0274] 通过减去针对对照通道测得的相应信号,校正感应谱,所述对照通道已被活化且用乙醇胺封闭。通过用 BIAevaluation 软件 V 4.1 (Karlsson 等人 (1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240) 拟合,进行动力学数据评估。

[0275] 表 2. 通过表面等离子体共振测定所选择的 Lcn2 突变蛋白对 FN7B8 的动力学结合数据。

[0276]

Lcn2 变体	k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_{D} [M]
N7A	4.6×10^6	2.6×10^{-2}	5.8×10^{-9}
N7E	4.1×10^6	3.0×10^{-2}	7.2×10^{-9}
N9B	2.1×10^6	7.5×10^{-2}	3.6×10^{-8}
N10D	1.5×10^6	5.8×10^{-2}	3.8×10^{-8}

[0277] 实施例 18:免疫染色 ED-B 阳性的 CaCo2 细胞

[0278] 在 37° C 下和加湿气氛中,在 Nunc Lab-Tek™ II 室载玻片™系统(每个载玻片 4 个室; Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Germany)上、在 MEM 中,培养人结肠癌细胞(CaCo2 细胞由 H. Daniel, Technische Universität München, Germany 友情提供; Pujuguet 等人, Am. J. Pathol. 148, 579-592),所述 MEM 具有依格氏盐和 L- 谷氨酰胺,并补充了 10 % 胎牛血清、1x MEM 非必需氨基酸和 50 $\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素 (PAA Laboratories, Pasching, Austria),直到细胞汇合度为约 50 至 70 %。用 PBS (无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的杜氏; PAA Laboratories, Pasching, Austria)、然后用蒸馏水洗涤附着于载玻片的细胞单层,之后固定,用含有 5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (4',6- 二脒基 -2- 苯基吡啶; Sigma-Aldrich, Munich, Germany) 的冰冷甲醇复染 5 分钟。

[0279] 在暗处进行后续全部孵育。洗涤固定的细胞,然后用 500 μl 1 μM 野生型 Lcn2、Lcn2 突变蛋白、PBS 或 ED-B 特异抗体 scFv-L19 (Pini 等人 (1998) J. Biol. Chem. 273, 21769-21776) 孵育 1 小时。这些试剂全部纯化为 Strep- 标签 II 融合蛋白 (Schmidt 和 Skerra, 上文)。用 PBS 洗涤细胞,然后用未标记的抗体 StrepMABimmo (PBS 中 5 $\mu\text{g/ml}$; IBA, Göttingen, Germany) 孵育 1 小时,之后进行 2 个洗涤步骤。最后,使用 PBS 中 1:200 稀释的荧光标记的抗小鼠 IgG (H+L) F(ab')₂ 片段 DyLight-488 缀合物 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) 作为第二抗体,检测与 CaCo2 细胞的特异结合。

[0280] 当在Axiovert 40 CFL显微镜(Carl Zeiss, Göttingen, Germany)下观察时,全部Lcn2变体以及抗体scFv-L19显示了特异的细胞染色,而重组野生型Lcn2和PBS在此分析中显示了可忽略的信号。

[0281] 实施例 19:经由在位置 36 处的 H1-G1 中交换自由的半胱氨酸残基,产生 A β 特异的 Lcn2 突变蛋白 H1GA 和 H1GV

[0282] 提供定点突变将 Cys36 替代为 Ala 或 Val。为此,用简并寡脱氧核苷酸 DH-4 (SEQ ID NO: 45) 和第二寡脱氧核苷酸 J08rev (SEQ ID NO: 48) 以及编码 Lcn2 突变蛋白 H1-G1 的质粒 DNA 作为模板 (SEQ ID NO: 37),进行 PCR。经由 BstXI 将扩增的片段亚克隆在表达质粒 pHNGAL98 上并测序,从而鉴定各替换变体。取决于引入的氨基酸交换,将所得的 Lcn2 变体命名为 H1GA (SEQ ID NO: 49, 50) 和 H1GV (SEQ ID NO: 51, 52)。

[0283] 实施例 20:使用大肠杆菌培养物,以高光密度可溶产生和纯化新的 A β 特异的 Lcn2 突变蛋白 H1GA 和 H1GV

[0284] 通过在大肠杆菌 JM83 中外周胞质分泌产生重组 Lcn2 及其突变蛋白。为了进行可溶蛋白表达,使用了具有编码 H1GA (SEQ ID NO: 49) 或 H1GV (SEQ ID NO: 51) 的相应 BstXI 插入片段的质粒 pHNGAL98。在搅拌下于 22 ° C,在含有 100 mg/L 氨苄西林 (Amp) 的 2 L LB 培养基中使培养物生长。通过加入无水四环素 (aTc) 至终浓度为 0.2 mg/L,在 OD₅₅₀ = 2.5 的细胞密度时,诱导基因表达。在孵育 5 个小时之后,通过离心收集细胞,重悬于 40 mL 含有 0.1 mg/mL 溶菌酶的冰冷的的外周胞质分级缓冲液 (0.5 M 蔗糖, 1 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0) 中,然后在冰上孵育 30 分钟。通过重复离心沉淀所得的球形体,然后挥手含有可溶重组蛋白的上清液。

[0285] 通过 Strep- 标签 II 经亲和纯化可溶蛋白,然后在 Superdex 75 HR 10/30 柱子上使用 PBS 缓冲液 (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7.4) 进行尺寸排阻色谱 (SEC)。通过 SDS-PAGE 检查蛋白纯度。通过在 280 nm 下使用 A β 特异的突变蛋白 H1GA (SEQ ID NO: 50) 和 H1GV (SEQ ID NO: 52) 的计算的消光系数 27055 M⁻¹cm⁻¹ 进行吸光度测量,测定蛋白浓度。

[0286] 实施例 21:在 BiacoreX 仪器上经由表面等离子体共振测量对 MBP-A β 40 的结合活性

[0287] 在Biacore X系统上使用PBS/T (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7.4,含有 0.005 % (v/v) Tween 20) 作为流动缓冲液,进行 Lcn2 突变蛋白 H1GA 或 H1GV 与 MBP-A β 40 (SEQ ID NO: 33) 之间的相互作用的实时分析。使用标准胺偶联化学,将 10 mM 乙酸钠, pH 4.5 中的来自实施例 2 的 MBP-A β 40 的 15 μ g/mL 溶液固定到 CMD 200I 芯片 (Xantec, Düsseldorf, Germany) 上,从而得到 1316 共振单位 (RU) 的配体密度。以 4 nM 至 128 nM 范围的浓度、以 20 μ L/min 的流量应用来自实施例 20 的经纯化的 Lcn2 突变蛋白 H1GA 和 H1GV。通过减去针对对照通道 (已被活化且用乙醇胺封闭) 测得的相应信号,以及减去针对缓冲液注入的平均值测得的信号,对该数据进行双重参照。整体使用 BIAevaluation 软件 V 3.0 (Karlsson 等人 (1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240) 拟合动力学数据。

[0288] 实施例 22:在 Biacore T100 仪器上经由表面等离子体共振测量对 A β 40 的结合活性

[0289] 在Biacore T100系统(Biacore, Uppsala, Sweden)上使用PBS/T (4 mM KH_2PO_4 , 16 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl, pH 7.4, 含有0.005 % (v/v) Tween 20) 作为流动缓冲液, 进行Lcn2突变蛋白H1GA与A β 40 (SEQ ID NO: 29) 之间的相互作用的实时分析。使用标准胺偶联化学, 将10 mM 乙酸钠 pH 4.5 中的来自实施例2的A β 40的10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液固定到CMD芯片(Biacore, Uppsala, Sweden)上, 从而得到325 RU的配体密度。以1 nM至32 nM范围的浓度、以30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流量应用来自实施例20的经纯化的Lcn2突变蛋白H1GA。注入的系列稀释的H1GA的连接和解离时间均为300 s, 以获得 k_{on} 信息。为了准确测定低 k_{off} 速率, 使用7200 s的解离时间分析最高浓度。如实施例21中对数据进行双重参考。使用Biacore T100 Evaluation软件V2.0.3进行数据处理和动力学拟合, 从整个数据组测得了结合反应的 k_{on} 和 k_{off} 。整体使用1:1结合模型拟合数据。

[0290] 实施例23: 在ThT聚集分析中对Lcn2突变蛋白H1GA进行功能分析

[0291] 为了进行Thioflavin T (ThT) 聚集分析, 将合成的A β 肽 (SEQ ID NO: 29) 在1, 1, 1, 3, 3, 3-六氟-2-丙醇(HFIP; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 中溶解12个小时。在真空蒸发HFIP, 并将A β 溶解于合适体积的双蒸水中, 在4 ° C下超声15分钟, 然后过滤(Costar Spin-X离心管过滤器醋酸纤维素膜, 0.45 μm ; Corning Inc., Corning, NY)。然后立刻将溶解的单体A β 用于聚集分析。

[0292] 在不存在或存在不同摩尔比率的Lcn2突变蛋白或BSA的情况下, 在0.5 x PBS中于37 ° C下并搅拌, 孵育500 μl 的1 mg/ml A β 。一式三份地制备聚集反应。为了进行荧光测量, 将周期性取得的20 μl 样品与终浓度为0.5 x PBS中50 μM 的180 μl ThT混合, 然后使用FluoroMax-3荧光光度仪(HORIBA Jobin Yvon, Grasbrunn, Germany)以450 nm的激发波长和482 nm的发射波长分析。

[0293] 实施例24: 经由表面等离子体共振 (SPR) 测量对重组纤连蛋白单个结构域ED-B的结合活性

[0294] 在BIAcore X仪器上, 使用HBS/ET (20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 含有0.005 % (v/v) Tween 20) 作为流动缓冲液, 进行Lcn2突变蛋白的实时相互作用分析。使用标准胺偶联化学, 将10 mM 乙酸钠, pH 4.0中的重组ED-B的100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液固定在CMD 200 m传感器芯片上, 从而得到约180共振单位(RU)的配体密度。以2.5至160 nM的浓度、以25 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流量应用经纯化的Lcn2突变蛋白。通过减去针对对照通道测得的相应信号, 校正感应谱, 所述对照通道已被活化且用乙醇胺封闭。通过用BIAevaluation软件V 4.1 (Karlsson等人(1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240)整体拟合, 进行动力学数据评估。在此步骤期间, 整体拟合 k_{on} 和 k_{off} 速率, 而对每条曲线局部地拟合最大响应差异 R_{max} 。在N10D的情况下, 将异源分析物竞争性反应模型用于数据拟合, 从而得到两组动力学常数。

[0295] 表3. 通过表面等离子体共振测定的Lcn2突变蛋白对ED-B的动力学结合数据

[0296]

Lcn2 变体	$k_{on} [M^{-1}s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$
N7A	$1,8 \times 10^6$	0,138	$1,27 \times 10^{-7}$
N7E	$3,1 \times 10^6$	0,054	$1,73 \times 10^{-8}$
N9B	$1,45 \times 10^6$	$7,62 \times 10^{-3}$	$5,26 \times 10^{-9}$
N10D	$k_1 = 6,21 \times 10^5$ $k_2 = 2,94 \times 10^4$	$k_{-1} = 0,064$ $k_{-2} = 3,35 \times 10^{-3}$	

[0001]

- <110> 皮里斯股份公司
- <120> 对给定靶标具有亲和力的人脂质运载蛋白 2 (Lcn2, hNGAL) 的突变蛋白
- <130> LC12310005P
- <140> PCT/EP2010/069028
- <141> 2010-12-07
- <150> US 61/267,098
- <151> 2009-12-07
- <160> 52
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 88
- <212> DNA
- <213> 人工
- <220>
- <223> 对于位置 36、40、41、49、52 的 NNK 寡聚体
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (20)..(21)
- <223> n 为 a、c、g、或 t
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (22)..(22)
- <223> k 为 g 或 t
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (32)..(33)
- <223> n 为 a、c、g、或 t
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (34)..(34)
- <223> k 为 g 或 t
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (35)..(36)
- <223> n 为 a、c、g、或 t
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (37)..(37)
- <223> k 为 g 或 t

[0002]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (59)..(60)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(61)
 <223> k 为 g 或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (68)..(69)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (70)..(70)
 <223> k 为 g 或 t

<400> 1

gaagtggatat gtggtaggtt nkgcagggaa tnnknnkctc agagaagaca aagacccgnn 60

kaagatgnnk gccaccatct atgagctg 88

<210> 2
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 对于位置 68、70、72、73、77、79、81 的 NNK 寡聚体

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> k 为 g 或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> k 为 g 或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

<220>

[0003]

<221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> k 为 g 或 t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> k 为 g 或 t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (47)..(48)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(49)
 <223> k 为 g 或 t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (53)..(54)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (55)..(55)
 <223> k 为 g 或 t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (59)..(60)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(61)
 <223> k 为 g 或 t

 <400> 2

caagagctac aatgtcacen nkgtcnnktt tnnknkaag aagtgtnnkt acnnkatcnn 60

kacttttggtt ccaggttcc 79

<210> 3
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 对于位置 96、100、103、106 的 NNK 寡聚体

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)

[0004]

<223> n 为 a、c、g、或 t

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> k 为 g 或 t

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(32)

<223> n 为 a、c、g、或 t

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> k 为 g 或 t

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(41)

<223> n 为 a、c、g、或 t

<220>

<221> misc_feature

<222> (42)..(42)

<223> k 为 g 或 t

<220>

<221> misc_feature

<222> (49)..(50)

<223> n 为 a、c、g、或 t

<220>

<221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> k 为 g 或 t

<400> 3

ggcgagttca cgctgggcnn kattaagagt nnkcctggan nkacgagtnn kctcgtecca 60

gtggtgag 68

<210> 4

<211> 68

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 对于位置 125、127、132、134 的 NNK 寡聚体

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> n 为 a、c、g、或 t

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> k 为 g 或 t

[0005]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> k 为 g 或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(41)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (42)..(42)
 <223> k 为 g 或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n 为 a、c、g、或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (48)..(48)
 <223> k 为 g 或 t

<400> 4

gctatggtgt tcttcaagnn kgtnnkcaa aacagggagn nkttcnkat caccctctac 60
 gggagaac 68

<210> 5
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 具有对应于非编码链的固定核苷酸序列的 PCR 引物

<400> 5

ggtgacattg tagctcttgt cttctttcag ctcatagatg gtggc 45

<210> 6
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 具有对应于非编码链的固定核苷酸序列的 PCR 引物

<400> 6

gcccagcgtg aactcgcttg gctgggaacc tggaacaaaa gt 42

[0006]

<210>	7		
<211>	54		
<212>	DNA		
<213>	人工		
<220>			
<223>	具有对应于非编码链的固定核苷酸序列的 PCR 引物		
<400>	7		
	cttgaagaac accatagcat gctggttgta gttggtgctc accactcgga cgag		54
<210>	8		
<211>	64		
<212>	DNA		
<213>	人工		
<220>			
<223>	具有对应于非编码链的固定核苷酸序列的 PCR 引物		
<400>	8		
	ggagaagcgg atgaagttct cctttagttc cgaagtcagc tccttggttc tcccgtagag		60
	ggtg		64
<210>	9		
<211>	40		
<212>	DNA		
<213>	人工		
<220>			
<223>	5'侧翼的生物素化的 PCR 寡核苷酸		
<400>	9		
	ccaggacaac caattccatg ggaagtggta tgtggtaggt		40
<210>	10		
<211>	40		
<212>	DNA		
<213>	人工		
<220>			
<223>	3'侧翼的生物素化的 PCR 寡核苷酸		
<400>	10		
	ttcagggagg cccagagatt tggagaagcg gatgaagttc		40
<210>	11		
<211>	4746		
<212>	DNA		
<213>	人工		
<220>			
<223>	用作 NNK-文库主链的具有 CamR 的噬菌体展示载体 phNGAL102		

[0007]

<400> 11

ccataacgct	cggttgccgc	cgggcgtttt	ttattggcca	gatgattaat	tcctaatttt	60
tggtgacact	ctatcattgg	tagagttatt	ttaccactec	ctatcagtga	tagagaaaag	120
tgaaatgaat	agttcgacaa	aaatctagat	aacgagggca	aaaaatgaaa	aagacagcta	180
tcgcgattgc	agtggctctg	gctggettctg	ctaccgtage	gcaggcccag	gactccacct	240
cagacctgat	cccagcccca	cctctgagca	aggtcctctt	gcagcagaac	ttccaggaca	300
accaattcca	tgggaagtgg	tatgtggttag	gtctcgacag	gaatgcaatt	ctcagagaag	360
acaaagaccc	gcaaaagatg	tatgccacca	tctatgagct	gaaagaagac	aagagctaca	420
atgtcacctc	cgctcgtttt	aggaaaaaga	agtgtgacta	ctggatcagg	acttttgttc	480
caggttccca	gccaggcgag	ttcacgctgg	gcaacattaa	gagttaccct	ggattaacga	540
gttacctcgt	ccgagtgggtg	agcaccaact	acaaccagca	tgctatgggtg	ttcttcaaga	600
aagtttctca	aaacagggag	tacttcaaga	tcaccctcta	cgggagaacc	aaggagctga	660
cttcggaact	aaaggagaac	ttcatccgct	tctccaaatc	tctgggcctc	cctgaaaacc	720
acatcgtctt	ccctgtccca	atcgaccagt	gtatcgacgg	cagcgctgggt	ggggcctaga	780
ctggtgaaaag	ttgttttagca	aaaccccata	cagaaaattc	atttactaac	gtctggaaaag	840
acgacaaaac	tttagatcgt	tacgctaact	atgagggctg	tctgtggaat	gctacaggcg	900
ttgtagtttg	tactgggtgac	gaaactcagt	gttacggtac	atggggttctt	attgggcttg	960
ctatccctga	aaatgaggggt	gggtggctctg	agggtggcgg	ttctgaggggt	ggcggttctg	1020
agggtggcgg	tactaaacct	cctgagtacg	gtgatacacc	tattccgggc	tatacttata	1080
tcaaccctct	cgacggcact	tatccgcctg	gtactgagca	aaaccccgct	aatcctaata	1140
cttctcttga	ggagtctcag	cctcttaata	ctttcatggt	tcagaataat	aggttccgaa	1200
ataggcaggg	ggcattaact	gtttatacgg	gcactgttac	tcaaggcact	gaccccggtta	1260
aaacttatta	ccagtacact	cctgtatcat	caaaagccat	gtatgacgct	tactggaacg	1320
gtaaattcag	agactgcgct	ttccattctg	gctttaatga	ggatccattc	gtttgtgaat	1380
atcaaggcca	atcgtctgac	ctgcctcaac	ctcctgtcaa	tgctggcggc	ggctctgggtg	1440
gtggttctgg	tggcggctct	gaggggtgggtg	gctctgtggg	tggcggttct	gaggggtggcg	1500
gctctgaggg	aggcggttcc	gggtgggtggct	ctggttccgg	tgattttgat	tatgaaaaga	1560
tggcaaacgc	taataagggg	gctatgaccg	aaaatgccga	tgaaaacgcg	ctacagtctg	1620
acgctaaagg	caaacttgat	tctgtcgcta	ctgattacgg	tgctgctatc	gatgggtttca	1680
ttggtgacgt	ttccggcctt	gctaattgga	atggtgctac	tggtgatttt	gctggctcta	1740
attcccaaata	ggctcaagtc	ggtgacgggtg	ataattcacc	tttaataaat	aatttccgctc	1800
aatattttacc	ttccctccct	caatcggttg	aatgtcgccc	ttttgtcttt	ggcgtgggtta	1860

[0008]

aaccatatga	atcttctatt	gattgtgaca	aaataaactt	attccgtggt	gtctttgcgt	1920
ttcttttata	tgttgccacc	tttatgtatg	tatcttctac	gtttgctaac	atactgcgta	1980
ataaggagtc	ttaataagct	tgacctgtga	agtgaanaat	ggcgcacatt	gtgcgacatt	2040
ttttttgtct	gccgtttacc	gctactgcgt	cacggatctc	cacgcgccct	gtagcggcgc	2100
attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	cagcgtgacc	gctacacttg	ccagcgccct	2160
agcgccccgt	cctttcgctt	tcttcccttc	ctttctcgcc	acgttcgccg	gctttccccg	2220
tcaagctcta	aatcgggggc	tccctttagg	gttccgattt	agtgcctttac	ggcacctcga	2280
ccccaaaaaa	cttgattagg	gtgatggttc	acgtagtggg	ccatcgccct	gatagacggt	2340
ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacgtt	ctttaatagt	ggactcttgt	tccaaactgg	2400
aacaacactc	aaccctatct	cggctctattc	ttttgattta	taagggattt	tgccgatttc	2460
ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	acaaaaattt	aacgcgaatt	ttaacaaaat	2520
ttggcgaaaa	tgagacgttg	atcggcacgt	aagaggttcc	aactttcacc	ataatgaaat	2580
aagatcacta	ccgggcgtat	tttttgagtt	atcgagattt	tcaggagcta	aggaagctaa	2640
aatggagaaa	aaaatcactg	gatataccac	cgttgatata	tcccaatggc	atcgtaaaga	2700
acattttgag	gcatttcagt	cagttgctca	atgtacctat	aaccagaccg	ttcagctgga	2760
tattacggcc	tttttaaaga	ccgtaaagaa	aaataagcac	aagttttatc	cggcctttat	2820
tcacattctt	gcccgcctga	tgaatgctca	tccggaattc	cgtatggcaa	tgaagacggg	2880
tgagctggtg	atatgggata	gtgttcaccc	ttgttacacc	gttttccatg	agcaaactga	2940
aacgttttca	tcgctctgga	gtgaatacca	cgacgatttc	cggcagtttc	tacacatata	3000
ttcgcaagat	gtggcgtggt	acggtgaaaa	cctggcctat	ttccctaaag	ggtttattga	3060
gaatatgttt	ttcgtctcag	ccaatccctg	ggtgagtttc	accagttttg	atttaaactg	3120
ggccaatatg	gacaacttct	tcgccccctg	tttactatg	ggcaaataat	atacgcaagg	3180
cgacaagggtg	ctgatgccgc	tggcgattca	ggttcacat	gccgtttgtg	atggcttcca	3240
tgctggcaga	atgcttaatg	aattacaaca	gtactgcgat	gagtggcagg	gcggggcgta	3300
ataggaatta	atgatgtctc	gtttagataa	aagtaaagtg	attaacagcg	cattagagct	3360
gcttaatgag	gtcggaaatc	aaggtttaac	aaccgcgtaa	ctcgcccaga	agctaggtgt	3420
agagcagcct	acattgtatt	ggcatgtaaa	aaataagcgg	gctttgctcg	acgccttagc	3480
cattgagatg	ttagataggc	accatactca	cttttgccct	ttagaagggg	aaagctggca	3540
agatttttta	cgtaataacg	ctaaaagttt	tagatgtgct	ttactaagtc	atcgcgatgg	3600
agcaaaaagta	catttaggta	cacggcctac	agaaaaacag	tatgaaactc	tcgaaaatca	3660
attagccittt	ttatgccaac	aaggtttttc	actagagaat	gcattatatg	cactcagcgc	3720
agtggggcat	tttacttttag	gttgcgatatt	ggaagatcaa	gagcatcaag	tcgctaaaga	3780
agaaagggaa	acacctacta	ctgatagtat	gccgccatta	ttacgacaag	ctatcgaatt	3840

[0009]

atttgatcac	caaggtgcag	agccagcctt	cttattcggc	cttgaattga	tcatatgcgg	3900
attagaaaa	caacttaaat	gtgaaagtgg	gtcttaaaag	cagcataacc	tttttccgtg	3960
atggtaactt	cactagttta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	4020
caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	4080
aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaacc	4140
accgctacca	gcggtgggtt	gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	4200
aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgttctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	4260
ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	4320
agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	4380
accggataag	gcgcagcggg	cgggctgaac	gggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttgga	4440
gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	ctatgagaaa	gcgccacgct	4500
tcccgaaggg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	caggagagcg	4560
cacgagggag	cttccagggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgcca	4620
cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggcggagcc	tatggaaaaa	4680
cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttcct	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatgac	4740
ccgaca						4746

<210> 12
 <211> 4963
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 用于克隆文库的具有 AmpR 的噬菌体展示载体 phNGAL108

<400> 12

ccatcgaatg	gccagatgat	taattcctaa	tttttgttga	cactctatca	ttgatagagt	60
tattttacca	ctccctatca	gtgatagaga	aaagtgaat	gaatagtctg	acaaaaatct	120
agataacgag	ggcaaaaaat	gaaaaagaca	gctatcgca	ttgcagtggc	tctggctggc	180
ttcgctaccg	tagcgcaggc	ccaggactcc	acctcagacc	tgatcccagc	cccacctctg	240
agcaaggtcc	ctctgcagca	gaacttcag	gacaaccaat	tccatgggaa	gtggtatgtg	300
gtaggctctg	cagggaatgc	aattctcaga	gaagacaaag	acccgcaaaa	gatgtatgcc	360
accatctatg	agctgaaaga	agacaagagc	tacaatgtca	cctccgtcct	gtttaggaaa	420
aagaagtgtg	actactggat	caggactttt	gttccagggt	cccagccagg	cgagttcacg	480
ctgggcaaca	ttaagagtta	ccctggatta	acgagttacc	tcgtccgagt	ggtgagcacc	540
aactacaacc	agcatgctat	ggtgttcttc	aagaaagttt	ctcaaaacag	ggagtacttc	600
aagatcacc	tctacgggag	aaccaaggag	ctgacttcgg	aactaaagga	gaacttcac	660

[0010]

cgcttctcca	aatctctggg	cctccctgaa	aaccacatcg	tcttccctgt	cccaatcgac	720
cagtgtatcg	acggcagcgc	ttggcgtcac	ccgcagttcg	gtggggccta	gactgttgaa	780
agttgttttag	caaaacccca	tacagaaaat	tcatttacta	acgtctggaa	agacgacaaa	840
acttttagatc	gttacgctaa	ctatgagggc	tgtctgtgga	atgctacagg	cgttgtagtt	900
tgtactgggtg	acgaaactca	gtgttacggg	acatgggttc	ctattgggct	tgctatccct	960
gaaaatgagg	gtgggtggctc	tgaggggtggc	ggttctgagg	gtggcggttc	tgaggggtggc	1020
ggtactaaac	ctcctgagta	cggtgataca	cctattccgg	gctatactta	tatcaaccct	1080
ctcgacggca	cttatccgcc	tggtactgag	caaaaccccg	ctaataccta	tccttctctt	1140
gaggagtctc	agcctcttaa	tactttcatg	tttcagaata	ataggttccg	aaataggcag	1200
ggggcattaa	ctgtttatac	gggcactgtt	actcaaggca	ctgaccccg	taaaacttat	1260
taccagtaca	ctcctgtatc	atcaaaagcc	atgtatgacg	cttactggaa	cggtaaattc	1320
agagactgcg	ctttccattc	tggctttaat	gaggatccat	tcgtttgtga	atatcaaggc	1380
caatcgtctg	acctgcctca	acctcctgtc	aatgctggcg	gcggctctgg	tggtggttct	1440
ggtggcggct	ctgaggggtg	tggctctgag	ggtggcggtt	ctgaggggtg	cggctctgag	1500
ggaggcgggt	ccggtggtgg	ctctggttcc	ggtgattttg	attatgaaaa	gatggcaaac	1560
gctaataagg	gggctatgac	cgaaaatgcc	gatgaaaacg	cgctacagtc	tgacgctaaa	1620
ggcaaaacttg	attctgtcgc	tactgattac	ggtgctgcta	tcgatgggtt	cattggtgac	1680
gtttccggcc	ttgctaattg	taatggtgct	actggtgatt	ttgctggctc	taattcccaa	1740
atggctcaag	tcggtgacgg	tgataattca	cctttaatga	ataatttccg	tcaatatita	1800
ccttccctcc	ctcaatcggg	tgaatgtcgc	ccttttgtct	ttggcgctgg	taaaccatat	1860
gaattttcta	ttgattgtga	caaaataaac	ttattccgtg	gtgtctttgc	gtttctttta	1920
tatgttgcca	cctttatgta	tgtattttct	acgtttgcta	acatactgcg	taataaggag	1980
tcttaataag	cttgacctgt	gaagtgaaaa	atggcgcaca	ttgtgcgaca	ttttttttgt	2040
ctgccgttta	ccgctactgc	gtcacggatc	tccacgcgcc	ctgtagcggc	gcattaagcg	2100
cggcgggtgt	ggtggttacg	cgcagcgtga	ccgctacact	tgccagcgcc	ctagcggccg	2160
ctcctttcgc	tttcttccct	tcctttctcg	ccacgttcgc	cggctttccc	cgtcaagctc	2220
taaatcgggg	gtccctttta	gggttccgat	ttagtgtttt	acggcacctc	gaccccaaaa	2280
aacttgatta	gggtgatggt	tcacgtagtg	ggccatcgcc	ctgatagacg	gtttttcgcc	2340
ctttgacgtt	ggagtccacg	ttctttaata	gtggactctt	gttccaaact	ggaacaacac	2400
tcaaccctat	ctcggctctat	tcttttgatt	tataagggat	tttgccgatt	tcggcctatt	2460
ggttaaaaaa	tgagctgatt	taacaaaaat	ttaacgcgaa	ttttaacaaa	atattaacgc	2520
ttacaatttc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccctatt	tgttttatttt	2580
tctaaataca	ttcaaataatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	2640

[0011]

aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacattttccg	tgtcgccctt	attccctttt	2700
ttgcggcatt	ttgccttctt	gtttttgctc	accagaaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	2760
ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga	2820
tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagttctgc	2880
tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	2940
actatttctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	3000
gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgtcg	ccataaccat	gagtataaac	actgcggcca	3060
acttacttct	gacaacgacg	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	3120
gggatcatgt	aactcgcctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	3180
acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	3240
gcgaactact	tactctagct	tcccggcaac	aattgataga	ctggatggag	gcggataaag	3300
ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc	cggtctggctg	gtttattgct	gataaatctg	3360
gagccgggtga	gcgtggctct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	3420
cccgtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	3480
agatcgctga	gataggtgcc	tcactgatta	agcattggta	ggaattaatg	atgtctcggt	3540
tagataaaaag	taaagtgatt	aacagcgcac	tagagctgct	taatgaggtc	ggaatcgaag	3600
gtttaacaac	ccgtaaacct	gcccagaagc	taggtgtaga	gcagcctaca	ttgtattggc	3660
atgtaaaaaa	taagcgggct	ttgctcgacg	ccttagccat	tgagatgtta	gataggcacc	3720
atactcactt	ttgcccttta	gaaggggaaa	gctggcaaga	ttttttacgt	aataacgcta	3780
aaagtttttag	atgtgcttta	ctaagtcac	gcgatggagc	aaaagtacat	ttaggtagac	3840
ggcctacaga	aaaacagtat	gaaactctcg	aaaatcaatt	agccttttta	tgccaacaag	3900
gtttttcact	agagaatgca	ttatatgcac	tcagcgcagt	ggggcatttt	acttttaggt	3960
gcgtattgga	agatcaagag	catcaagtcg	ctaaagaaga	aagggaaaca	cctactactg	4020
atagtatgcc	gccattatta	cgacaagcta	tcgaattatt	tgatcaccaa	ggtgcagagc	4080
cagccttctt	attcggcctt	gaattgatca	tatgcggatt	agaaaaacaa	cttaaagtgtg	4140
aaagtgggtc	ttaaaagcag	cataaccttt	ttccgtgatg	gtaacttcac	tagtttaaaa	4200
ggatctaggt	gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	4260
cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	4320
ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttgtt	4380
tgccggatca	agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	4440
taccaaatac	tgtccttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	4500
caccgcctac	atacctcgct	ctgctaattc	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	4560
agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggctcg	4620

[0012]

```

gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 4680
gataacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 4740
ggatatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 4800
acgccttggtta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 4860
tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 4920
ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgaccgc aca 4963

```

<210> 13
 <211> 907
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> misc_feature
 <223> XbaI - HindIII 盒；起始-ATG：位置 43；FN7B8：
 重组 ED-B 结构域，由相邻 III 型 FN 同源重复序列侧翼，编码为克隆在 pASK75 上的盒

```

<400> 13
tctagaaata attttgttta actttaagaa ggagatatac atatgccatt gtctccacca 60
acaaacttgc atctggaggc aaaccctgac actggagtgc tcacagtctc ctgggagagg 120
agcaccaccc cagacattac tggttataga attaccacaa cccctacaaa cggccagcag 180
ggaaattctt tggaagaagt ggtccatgct gatcagagct cctgcacttt tgataacctg 240
agtcccggcc tggagtacaa tgtcagtgtt tacactgtca aggatgacaa ggaaagtgtc 300
cctatctctg ataccatcat cccagaagtt ccgcagctga cagatctgtc cttcgttgac 360
atcaccgaca gctccatcgg tctgcgttgg accccgctga attcctccac catcatcgg 420
tatcgtatca ccgttgttgc tgctggtgaa gggatcccgga tctttgaaga cttcgttgac 480
tcctccgttg gttactacac cgttaccggg ctggaacccg ggatcgacta cgacatctcc 540
gttatcacc cgtatcaacgg tggatgaatcc gctccgacca ccttaacca gcagaccgcg 600
gttcctcctc ccaactgacct gcgattcacc aacattgggtc cagacaccat gcgtgtcacc 660
tgggctccac ccccatccat tgatttaacc aacttctctg tgctgttact acctgtgaaa 720
aatgaggaag atgttgcaga gttgtcaatt tctccttcag acaatgcagt ggtcttaaca 780
aatctcctgc ctggtacaga atatgtagtg agtgtctcca gtgtctacga acaacatgag 840
agcacacctc ttagaggaag acagaaaaca ggtagcgcctc accatcacca tcaccattaa 900
taagctt 907

```

<210> 14
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> 智人

[0013]

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XbaI - HindIII 盒；起始-MET：位置 13；FN7B8：
 重组 ED-B 结构域，由相邻 III 型 FN 同源重复序列侧翼，编码为克隆在 pASK75 上的盒

<400> 14

Ser Arg Asn Asn Phe Val Leu Glu Gly Asp Ile His Met Pro Leu Ser
 1 5 10 15

Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn Pro Asp Thr Gly Val Leu
 20 25 30

Thr Val Ser Trp Glu Arg Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr Gly Tyr Arg
 35 40 45

Ile Thr Thr Thr Pro Thr Asn Gly Gln Gln Gly Asn Ser Leu Glu Glu
 50 55 60

Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser Cys Thr Phe Asp Asn Leu Ser Pro
 65 70 75 80

Gly Leu Glu Tyr Asn Val Ser Val Tyr Thr Val Lys Asp Asp Lys Glu
 85 90 95

Ser Val Pro Ile Ser Asp Thr Ile Ile Pro Glu Val Pro Gln Leu Thr
 100 105 110

Asp Leu Ser Phe Val Asp Ile Thr Asp Ser Ser Ile Gly Leu Arg Trp
 115 120 125

Thr Pro Leu Asn Ser Ser Thr Ile Ile Gly Tyr Arg Ile Thr Val Val
 130 135 140

Ala Ala Gly Glu Gly Ile Pro Ile Phe Glu Asp Phe Val Asp Ser Ser
 145 150 155 160

Val Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp
 165 170 175

Ile Ser Val Ile Thr Leu Ile Asn Gly Gly Glu Ser Ala Pro Thr Thr
 180 185 190

Leu Thr Gln Gln Thr Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr
 195 200 205

Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser
 210 215 220

Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu

[0014]

Ser Arg Asn Asn Phe Val Leu Glu Gly Asp Ile Gln Met Arg Gly Ser
1 5 10 15

61

Glu Val Pro Gln Leu Thr Asp Leu Ser Phe Val Asp Ile Thr Asp Ser
 20 25 30
 Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu Asn Ser Ser Thr Ile Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Arg Ile Thr Val Val Ala Ala Gly Glu Gly Ile Pro Ile Phe Glu
 50 55 60
 Asp Phe Val Asp Ser Ser Val Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val Ile Thr Leu Ile Asn Gly Gly
 85 90 95
 Glu Ser Ala Pro Thr Thr Leu Thr Gln Gln Thr Ala Gly Ser Ala His
 100 105 110
 His His His His His Gly Ser His Pro Gln Ala
 115 120

<210> 17
 <211> 904
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> misc_feature
 <223> XbaI - HindIII 盒; 起始-ATG: 位置 43; FN789:
 重组 III 型 FN 同源重复序列, 不具有 ED-B, 仅编码为克隆在 pASK75 上的盒
 5

<400> 17
 tctagaaata attttgttta actttaagaa ggagatatac atatgccatt gtctccacca 60
 acaaacttgc atctggaggc aaaccctgac actggagtgc tcacagtctc ctgggagagg 120
 agcaccaccc cagacattac tggttataga attaccacaa cccctacaaa cggccagcag 180
 ggaaattctt tggaagaagt ggtccatgct gatcagagct cctgcacttt tgataacctg 240
 agtccccggc tggagtacaa tgtcagtgtt tacactgtca aggatgacaa ggaaagtgtc 300
 cctatctctg ataccatcat cccagctgtt cctcctccca ctgacctgcg attcaccaac 360
 attggtccag acaccatgcg tgtcacctgg gctccacccc catccattga ttttaaccaac 420
 ttcctggtgc gttactcacc tgtgaaaaat gaggaagatg ttgcagagtt gtcaatttct 480
 ccttcagaca atgcagtggc ctttaacaaat ctctgcctg gtacagaata tgtagtgagt 540
 gtctccagtg tctacgaaca acatgagagc acacctctta gaggaagaca gaaaacaggt 600
 cttgattccc caactggcat tgacttttct gatattactg ccaactcttt tactgtgcac 660

[0016]

```

tggattgctc ctcgagccac catcactggc tacaggatcc gccatcatcc cgagcacttc      720
agtgggagac ctcgagaaga tcgggtgccc cactctcgga attccatcac cctcaccaac      780
ctcactccag gcacagagta tgtggtcagc atcgttgctc ttaatggcag agaggaaagt      840
cccttattga ttggccaaca atcaacagtt agcgctcacc atcaccatca ccattaataa      900
gctt                                904

```

<210> 18
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XbaI - HindIII 盒; 起始-MET: 位置 13; FN789:
 重组 III 型 FN 同源重复序列, 不具有 ED-B, 仅编码为克隆在 pASK75 上的盒
 <400> 18

Ser Arg Asn Asn Phe Val Leu Glu Gly Asp Ile His Met Pro Leu Ser
 1 5 10 15

Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn Pro Asp Thr Gly Val Leu
 20 25 30

Thr Val Ser Trp Glu Arg Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr Gly Tyr Arg
 35 40 45

Ile Thr Thr Thr Pro Thr Asn Gly Gln Gln Gly Asn Ser Leu Glu Glu
 50 55 60

Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser Cys Thr Phe Asp Asn Leu Ser Pro
 65 70 75 80

Gly Leu Glu Tyr Asn Val Ser Val Tyr Thr Val Lys Asp Asp Lys Glu
 85 90 95

Ser Val Pro Ile Ser Asp Thr Ile Ile Pro Ala Val Pro Pro Pro Thr
 100 105 110

Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp
 115 120 125

Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser
 130 135 140

Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val

[0017]

	165	170	175
Val Ser Val	Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr	Pro Leu Arg	
	180	185	190
Gly Arg Gln	Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser		
	195	200	205
Asp Ile Thr	Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala		
	210	215	220
Thr Ile Thr	Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly		
	225	230	235
Arg Pro Arg	Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu		
	245	250	255
Thr Asn Leu	Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu		
	260	265	270
Asn Gly Arg	Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val		
	275	280	285
Ser Ala His	His His His His His His Ala		
	290	295	

<210> 19
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> N7A: 克隆在 pHNGAL98 上的对纤连蛋白 ED-B 特异的 hNGAL 突变蛋白

<400> 19

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcaaagc cggaatcac	120
gacctgcgtg aggataagga tccgcgtaaa atgcaagcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac caatgtgcgt tttgttcaca agaaatgcaa ttaccgtatt	240
tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagttgg	300
ccgggcctga catcatggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agcgtgtgta ccagaaccgc gagctgtttg agatcacact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaaacga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 20

[0018]

<211> 178
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> N7A: 克隆在 phNGAL98 上的对纤连蛋白 ED-B 特异的 hNGAL 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
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Glu Leu Phe Glu Ile Thr 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> 21
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> N7E: 克隆在 phNGAL98 上的对纤连蛋白 ED-B 特异的 hNGAL 突变蛋白

[0019]

<400> 21
 caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgaggc cggaaatagc 120
 ctgctgcgtg aggataagga tccgcgtaaa atgtacgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cagcgtgcgt tttcgtagca agaaatgcc a ctacctgatt 240
 cgtacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcctgat taaaagtaaa 300
 ccggggccaca catcattctt ggtccgcgtt gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agaccgtggc acagaaccgc gagtactttt tcatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 22
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> N7E: 克隆在 pHNGAL98 上的对纤连蛋白 ED-B 特异的 hNGAL 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
 20 25 30
 Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Ser Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45
 Arg Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Val Thr Ser Val Arg Phe Arg Ser Lys Lys Cys His Tyr Leu Ile
 65 70 75 80
 Arg Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Leu
 85 90 95
 Ile Lys Ser Lys Pro Gly His Thr Ser Phe Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Thr Val Ala Gln
 115 120 125

[0020]

Asn Arg Glu Tyr 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> 23
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> N9B: 克隆在 pHNGAL98 上的对纤连蛋白 ED-B 特异的 hNGAL 突变蛋白

<400> 23

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tgggtatgtcg tgggccgtgc cggaatatg 120
 cgtctgcgtg aggataagga tccggcaaaa atggttgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac caaagtgtatg tttcaacgta agaaatgcaa atacatgatt 240
 aatacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgcaat taaaagtcct 300
 ccgggccccta catcaacctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agcacgtgtt ccagaaccgc gagtactttc acatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 24
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> N9B: 克隆在 pHNGAL98 上的对纤连蛋白 ED-B 特异的 hNGAL 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
 20 25 30

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

[0021]

Ala Lys Met Val Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Val Thr Lys Val Met Phe Gln Arg Lys Lys Cys Lys Tyr Met Ile
 65 70 75 80
 Asn Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Ala
 85 90 95
 Ile Lys Ser Pro Pro Gly Pro Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys His Val Phe Gln
 115 120 125
 Asn Arg Glu Tyr 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> 25
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> N10D: 克隆在 pHNGAL98 上的对纤连蛋白 ED-B 特异的 hNGAL 突变蛋白

<400> 25

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag      60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgcagc cggaataacc      120
tggctgcgtg aggataagga tccgtacaaa atgcaagcga ccatttacga gttgaaagaa      180
gataaatcat ataacgtcac caatgtgctg tttatgagca agaaatgccg ttacatgatt      240
cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcagcat taaaagttgg      300
ccgggcctga catcatggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg      360
gtgtttcttca agcgtgtgta ccagaaccgc gagttctttg gaatcacact gtacgggcgc      420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttttcaa atctctgggc      480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc          534
  
```

[0022]

<210> 26
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> N10D: 克隆在 phNGAL98 上的对纤连蛋白 ED-B 特异的 hNGAL 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
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Glu Phe Phe Gly 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> 27
 <211> 3745
 <212> DNA
 <213> 人工

[0023]

<220>

<223> 编码具有 C 端 Strep-标签 II 的野生型 Lcn2 的具有 AmpR 的表达载体 phNGAL98

<400> 27

```

ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt      60
tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaat gaatagtctg acaaaaatct      120
agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgca ttgcagtggc tctggctggc      180
ttcgctaccg tagcgcaggc ccaggactcc acctcagacc tgatcccagc cccacctctg      240
agcaagggtcc ctctgcagca gaacttcag gacaaccaat tccatgggaa gtggtatgtg      300
gtaggtctcg cagggaatgc aattctcaga gaagacaaag acccgcaaaa gatgtatgcc      360
accatctatg agctgaaaga agacaagagc tacaatgtca cctccgtcct gtttaggaaa      420
aagaagtgtg actactggat caggactttt gttccagggt cccagccagg cgagttcacg      480
ctgggcaaca ttaagagtta ccctggatta acgagttacc tcgtccgagt ggtgagcacc      540
aactacaacc agcatgctat ggtgttcttc aagaaagttt ctcaaaacag ggagtacttc      600
aagatcacc cttacgggag aaccaaggag ctgacttcgg aactaaagga gaacttcac      660
cgcttctcca aatctctggg cctccctgaa aaccacatcg tcttccctgt cccaatcgac      720
cagtgtatcg acggcagcgc ttggtctcac ccgcagttcg aaaaataata agcttgacct      780
gtgaagtga aaatggcgca cattgtgcga ctttttttt gtctgccgtt taccgctact      840
gcgtcacgga tctccacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta      900
cgcgacgcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgtctctttc gctttcttcc      960
cttcttttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt     1020
tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg     1080
gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca     1140
cgttctttta tagtgactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcgtctt     1200
attcttttga ttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga     1260

```

[0024]

tttaacaaaa	atttaacgcg	aattttaaca	aaatattaac	gtttacaatt	tcagggtggca	1320
cttttcgggg	aaatgtgcgc	ggaacccta	tttgtttatt	tttctaaata	cattcaaata	1380
tgtatccgct	catgagacaa	taaccctgat	aaatgcttca	ataatattga	aaaaggaaga	1440
gtatgagtat	tcaacatttc	cgtgtcgccc	ttattccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	1500
ctgtttttgc	tcaccagaa	acgctggtga	aagtaaaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	1560
cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	gaccttgag	agttttcgcc	1620
ccgaagaacg	ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagttct	gctatgtggc	gcggtattat	1680
cccgtattga	cgccgggcaa	gagcaactcg	gtcgccgcat	acactattct	cagaatgact	1740
tggttgagta	ctcaccagtc	acagaaaagc	atcttacgga	tggcatgaca	gtaagagaat	1800
tatgcagtgc	tgccataacc	atgagtgata	acactgcggc	caacttactt	ctgacaacga	1860
tcggaggacc	gaaggagcta	accgcttttt	tgcaacaacat	gggggatcat	gtaactcgcc	1920
ttgatcgttg	ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	cgacgagcgt	gacaccacga	1980
tgccctgtagc	aatggcaaca	acgttgcgca	aactattaac	tggcgaacta	cttactctag	2040
cttccccggca	acaattgata	gactggatgg	aggcggataa	agttgcagga	ccacttctgc	2100
gctcggccct	tccggctggc	tggtttattg	ctgataaatc	tggagccggt	gagcgtggct	2160
ctcgcggtat	cattgcagca	ctggggccag	atggtaagcc	ctcccgatc	gtagttatct	2220
acacgacggg	gagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	acagatcgct	gagataggtg	2280
cctcactgat	taagcattgg	taggaattaa	tgatgtctcg	tttagataaa	agtaaagtga	2340
ttaacagcgc	attagagctg	cttaatgagg	tcggaatcga	aggtttaaca	acccgtaaac	2400
tcgcccagaa	gctaggtgta	gagcagccta	cattgtattg	gcatgtaaaa	aataagcggg	2460
ctttgctcga	cgccttagcc	attgagatgt	tagataggca	ccatactcac	ttttgccctt	2520
tagaagggga	aagctggcaa	gattttttac	gtaataacgc	taaaagtttt	agatgtgctt	2580

[0025]

tactaagtca	tcgcgatgga	gcaaaagtac	atttaggtac	acggcctaca	gaaaaacagt	2640
atgaaactct	cgaaaatcaa	ttagcctttt	tatgccaaaca	aggtttttca	ctagagaatg	2700
cattatatgc	actcagcgca	gtggggcatt	ttacttttagg	ttgcgtattg	gaagatcaag	2760
agcatcaagt	cgctaaagaa	gaaagggaaa	cacctactac	tgatagtatg	ccgccattat	2820
tacgacaagc	tatcgaatta	tttgatcacc	aaggtgcaga	gccagccttc	ttattcggcc	2880
ttgaattgat	catatgcgga	ttagaaaaac	aacttaaattg	tgaaagtggg	tcttaaaagc	2940
agcataacct	ttttccgtga	tggttaacttc	actagtttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	3000
tttttgataa	tctcatgacc	aaaatccctt	aacgtgagtt	ttcgtttccac	tgagcgtcag	3060
accccgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	gagatccttt	ttttctgcgc	gtaatctgct	3120
gcttgcaaac	aaaaaaacca	ccgctaccag	cggtggtttg	tttgccggat	caagagctac	3180
caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	actgtccttc	3240
tagtgtagcc	gtagttaggc	caccacttca	agaactctgt	agcaccgcct	acatacctcg	3300
ctctgctaata	cctgtttacca	gtggctgctg	ccagtggcga	taagtcgtgt	cttaccgggt	3360
tggactcaag	acgatagtta	ccggataagg	cgcagcggtc	gggctgaacg	gggggttcgt	3420
gcacacagcc	cagcttggag	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	3480
tatgagaaaag	cgccacgctt	cccgaaggga	gaaaggcgga	caggtatccg	gtaagcggca	3540
gggtcgggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	3600
gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	3660
ggcggagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	cggccttttt	acggttcctg	gccttttgct	3720
ggcctttttgc	tcacatgacc	cgaca				3745

<210> 28
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 人工

[0026]

<220>

<223> 克隆在 phNGAL98 上不具有 OmpA 信号肽和 Strep-标签 II 的野生型 Lcn2

<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
 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> 29

<211> 40

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Aβ40 的肽序列

<400> 29

[0027]

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> A β 1-11 的肽序列

<400> 30

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
1 5 10

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> peptide sequence of A β 16-27

<400> 31

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn
1 5 10

<210> 32
<211> 1182
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> pMBP-His 的 XbaI HindIII DNA 限制性片段。阅读框在位置 27 处以 atg 开始

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> c can be t

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> t can be c

[0028]

<400> 32

```

tctagaacca acaaggacca tagcatatga aaactgaaga aggtaaactg gtaatctgga      60
ttaacggcga taaaggctat aacgggtctcg ctgaagtcgg taagaaattc gagaaagata     120
ccggaattaa agtcaccggt gagcatccgg ataaactgga agagaaattc ccacagggttg      180
cggcaactgg cgatggccct gacattatct tctgggcaca cgaccgcttt ggtggctacg      240
ctcaatctgg cctgttggct gaaatcacc cggacaaagc gttccaggac aagctgtatc      300
cgtttacctg ggatgccgta cgttacaacg gcaagctgat tgcttaccg atcgctgttg      360
aagcgttatt gctgatttat aacaaagatc tgctgccgaa cccgccaaaa acctgggaag      420
agatcccggc gctggataaa gaactgaaag cgaaaggtaa gagcgcgctg atgttcaacc      480
tgcaagaacc gtacttcacc tggccgctga ttgctgctga cgggggttat gcgttcaagt      540
atgaaaacgg caagtacgac attaaagacg tgggcgtgga taacgctggc gcgaaagcgg      600
gtctgacctt cctggttgac ctgattaaaa acaaacacat gaatgcagac accgattact      660
ccatcgcaga agctgccttt aataaaggcg aaacagcgat gaccatcaac ggcccgtggg      720
catggtccaa catcgacacc agcaaagtga attatggtgt aacggtactg ccgaccttca      780
aggggtcaacc atccaaaccg ttcgttggcg tgctgagcgc aggtattaac gccgccagtc      840
cgaacaaaga gctggcgaaa gagttcctcg aaaactatct gctgactgat gaaggctctgg      900
aagcgggttaa taaagacaaa ccgctgggtg ccgtagcgct gaagtcttac gaggaagagt      960
tggcgaaaga tccacgtatt gccgccacca tggaaaacgc ccagaaaggc gaaatcatgc     1020
cgaacatccc gcagatgtcc gctttctggt atgccgtgcg tactgcggtg atcaacgccg     1080
ccagcggctg tcagactgtc gatgaagccc tgaaagacgc gcagactcgt atcaccagg      1140
gatccctcga gatcaaacat caccaccatc accattaagc tt                          1182

```

<210> 33

<211> 1308

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> pASK75-MBP-Aβ40 的 XbaI HindIII DNA 限制性片段。阅读框在位置 27 处以 atg 开始

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> c can be t

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> t can be c

<400> 33

```

tctagaacca acaaggacca tagcatatga aaactgaaga aggtaaactg gtaatctgga      60

```

[0029]

ttaacggcga taaaggctat aacgggtctcg ctgaagtcgg taagaaattc gagaaagata	120
ccggaattaa agtcaccgtt gagcatccgg ataaactgga agagaaattc ccacaggttg	180
cggcaactgg cgatggccct gacattatct tctgggcaca cgaccgcttt ggtggctacg	240
ctcaatctgg cctgttggct gaaatcaccc cggacaaagc gttccaggac aagctgtatc	300
cgtttacctg ggatgccgta cgttacaacg gcaagctgat tgcttaccg atcgctgttg	360
aagcgttatc gctgatttat aacaaagatc tgctgccgaa cccgccaaaa acctgggaag	420
agatcccggc gctggataaa gaactgaaag cgaaaggtaa gagcgcgctg atgttcaacc	480
tgcaagaacc gtacttcacc tggccgctga ttgctgctga cgggggttat gcgttcaagt	540
atgaaaacgg caagtacgac attaaagacg tgggcgtgga taacgctggc gcgaaagcgg	600
gtctgacctt cctggttgac ctgattaaaa acaaacacat gaatgcagac accgattact	660
ccatcgcaga agctgccttt aataaaggcg aaacagcgat gaccatcaac ggcccgtggg	720
catggtccaa catcgacacc agcaaagtga attatggtgt aacggtactg ccgaccttca	780
aggggtcaacc atccaaaccg ttcgttggcg tgctgagcgc aggtattaac gccgccagtc	840
cgaacaaaga gctggcgaaa gagttcctcg aaaactatct gctgactgat gaaggctctgg	900
aagcggttaa taaagacaaa ccgctgggtg ccgtagcgct gaagtcttac gaggaagagt	960
tggcgaaaga tccacgtatt gccgccacca tggaaaacgc ccagaaagggt gaaatcatgc	1020
cgaacatccc gcagatgtcc gctttctggt atgccgtgcg tactgcggtg atcaacgccg	1080
ccagcggctg tcagactgtc gatgaagccc tgaaagacgc gcagactcgt atcaccagc	1140
gatcccatca ccaccatcat caccgagaact tgtacttcca ggacgctgaa ttccgtcacg	1200
actccggtta cgaagttcac caccagaagc tggttttctt cgctgaagac gttggttcca	1260
acaaagggtgc tatcatcggc ctgatgggtg gtggtgttgt ttaagctt	1308

<210> 34
 <211> 488
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> pASK75-TrxAβ28H6 的 XbaI HindIII DNA 限制性片段。阅读框在位置 23 处以 atg 开始

<400> 34

tctagatact gtggagttat atatgagcga taaaattatt cacctgactg acgacagttt	60
tgacacggat gtactcaaag cggacggggc gatcctcgtc gatttctggg cagagtgggtg	120
cgggtccgggt ggtggtgacg ctgaattccg tcacgactcc ggttacgaag ttaccacca	180
gaaactggtg ttcttcgctg aagacgttgg ttccaacaaa ggtggcggtc cgtgcaaaat	240
gatcgccccg attctggatg aaatcgctga cgaatatcag ggcaaaactga ccgttgcaaa	300

[0030]

actgaacatc gatcaaaacc ctggcactgc gccgaaatat ggcacccgtg gtatccccgac	360
tctgctgctg ttcaaaaacg gtgaagtggc ggcaacccaaa gtgggtgcac tgtctaaagg	420
tcagttgaaa gagttcctcg acgctaacct ggccagcgct caccatcacc atcaccatta	480
ataagctt	488

<210> 35
 <211> 383
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> pASK75-TrxH6 的 XbaI HindIII DNA 限制性片段。阅读框在位置 23 处以 atg 开始

<400> 35

tctagatact gtggagttat atatgagcga taaaattatt cacctgactg acgacagttt	60
tgacacggat gtactcaaag cggacggggc gatcctcgtc gatttctggg cagagtgggtg	120
cgggccgtgc aaaatgatcg ccccgattct ggatgaaatc gctgacgaat atcagggcaa	180
actgaccgtt gcaaaactga acatcgatca aaaccctggc actgcgccga aatatggcat	240
ccgtgggtatc ccgactctgc tgctgttcaa aaacggtgaa gtggcggcaa ccaaagtggg	300
tgcactgtct aaaggtcagt tgaaagagtt cctcgacgct aacctggcca gcgctcacca	360
tcaccatcac cattaataag ctt	383

<210> 36
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 不具有 Strep-标签 II 的成熟蛋白野生型 Lcn2 的 DNA 序列。阅读框以以下序列的第一个核苷酸开始

<400> 36

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaag tggatatgtg taggtctcgc agggaaatgca	120
attctcagag aagacaaaaga cccgcaaaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa	180
gacaagagct acaatgtcac ctccgtcctg tttaggaaaa agaagtgtga ctactggatc	240
aggacttttg ttccaggttc ccagccaggc gagttcacgc tgggcaacat taagagttac	300
cctggattaa cgagttacct cgcccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg	360
gtgttcttca agaaagtttc tcaaaacagg gagtacttca agatcaccct ctacgggaga	420
accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

[0031]

<210> 37
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 不具有 Strep-标签 II 的成熟蛋白 H1-G1 的 DNA 序列。阅读框以以下序列的第一个核苷酸开始

<400> 37

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag    60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaag tggatatgtg taggttgtgc agggaaatgtg    120
ttgctcagag aagacaaaga cccgcttaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa    180
gacaagagct acaatgtcac cagtgtcggg tttgatgata agaagtgttt gtacaagatc    240
cggacttttg ttccaggttc ccagccaggc gagttcacgc tgggcaggat taagagtgag    300
cctggaggta cgagttggct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg    360
gtgttcttca aggaggttgc gcaaaacagg gagacgttca atatcaccct ctacgggaga    420
accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc    480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc          534
```

<210> 38
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 不具有 Strep-标签 II 的成熟蛋白 S1-A4 的 DNA 序列。阅读框以以下序列的第一个核苷酸开始

<400> 38

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag    60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaag tggatatgtg taggtgttgc agggaaattat    120
acgctcagag aagacaaaga cccgctgaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa    180
gacaagagct acaatgtcac cagtgtcggg tttaggttga agaagtgtaa ttacaagatc    240
cggacttttg ttccaggttc ccagccaggc gagttcacgc tgggcattat taagagtcag    300
cctggaatga cgagttatct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg    360
gtgttcttca agacggttgg gcaaaacagg gagatgttca atatcaccct ctacgggaga    420
accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc    480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc          534
```

<210> 39
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 人工

[0032]

<220>

<223> S1-A4 (Aβ)

<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 His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Asn Arg Glu Met Phe Asn 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> 40

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 不具有 Strep-标签 II 的成熟蛋白 US7 的 DNA 序列。阅读框以以下序列的第一个核苷酸开始

<400> 40

[0033]

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag      60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaag tggatgtgg taggtgttgc aggggaataag      120
tctctcagag aagacaaaga cccgtggaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa      180
gacaagagct acaatgtcac ctcggtcggg ttggggacta agaagtgtca ttacaagatc      240
aggacttttg ttccagggttc ccagccaggc gagttcacgc tgggcaggat taagagtcgg      300
cctggaagga cgagtgtctt cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg      360
gtgttcttca aggtggttca gcaaaacagg gagtcgttca atatcaccct ctacgggaga      420
accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc      480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc          534

```

<210> 41
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> US7 (Aβ)

<400> 41

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 Lys Ser Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

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

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

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

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

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

[0034]

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> 42
<211> 805
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> pHNGAL124 的 XbaI/HindIII 限制性片段, 其编码克隆在 pASK75 上的野生型 Lcn2 与白蛋白结合结构域的融合蛋白。阅读框在位置 22 处以 atg 开始

<400> 42

```
tctagataac gagggcaaaa aatgaaaaag acagctatcg cgattgcagt ggctctggct      60
ggcttcgcta ccgtagcgca ggcccaggac tccacctcag acctgatccc agccccacct      120
ctgagcaagg tccctctgca gcagaacttc caggacaacc aattccatgg gaagtgggtat      180
gtggtagggtc tcgcagggaa tgcaattctc agagaagaca aagacccgca aaagatgtat      240
gccaccatct atgagctgaa agaagacaag agctacaatg tcacctccgt cctgtttagg      300
aaaaagaagt gtgactactg gatcaggact tttgttccag gttcccagcc aggcgagttc      360
acgctgggca acattaagag ttacctgga ttaacgagtt acctcgctccg agtgggtgagc      420
accaactaca accagcatgc tatggtgttc ttcaagaaaag tttctcaaaa caggaggtagc      480
ttcaagatca ccctctacgg gagaaccaag gagctgactt cggaactaaa ggagaacttc      540
atccgcttct ccaaattctt gggcctccct gaaaaccaca tcgtcttccc tgtcccaatc      600
gaccagtgtg tcgacggcag cgcttggtcc caccgcagct tcgaaaaata ggcccacctg      660
gctgaagcta aagttctggc taaccgtgaa ctggacaaat acggtgtttc cgactactac      720
aaaaacctca tcaacaacgc taaaaccgtt gaagggtgta aagctctgat cgacgaaatt      780
ctcgcagcac tgccgtaata agctt                                     805
```

<210> 43
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> H1-G1 (Aβ)

<400> 43

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

[0035]

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30
 Val Val Gly Cys Ala Gly Asn Val Leu 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 Ser Val Gly Phe Asp Asp Lys Lys Cys Leu Tyr Lys Ile
 65 70 75 80
 Arg Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Arg
 85 90 95
 Ile Lys Ser Glu Pro Gly Gly Thr Ser Trp Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Ala Gln
 115 120 125
 Asn Arg Glu Thr Phe Asn 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> 44
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> 野生型 Lcn2

<400> 44

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

[0036]

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> 45
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引物

<400> 45

cccaggactc cacctcagac c

21

<210> 46
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引物

<400> 46

actgcgggtg ggaccaagcg ctgccgt

27

[0037]

<210> 47
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 简并寡核苷酸 DH-4

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> y 为 c 或 t

<400> 47
 ggacaaccaa ttccatggga agtggtatgt ggtaggtgyt gcagggaatg tgttgctc 58

<210> 48
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引物 J08rev

<400> 48
 gctgccgtcg atacactg 18

<210> 49
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 不具有 Strep-标签 II 的成熟蛋白 H1GA 的 DNA 序列。阅读框以以下序列的第一个核苷酸开始

<400> 49
 caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaag tggatatgtg taggtgctgc agggaaatgtg 120
 ttgctcagag aagacaaaga cccgcttaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa 180
 gacaagagct acaatgtcac cagtgtcggg tttgatgata agaagtgttt gtacaagatc 240
 cggacttttg ttccaggttc ccagccaggc gagttcacgc tgggcaggat taagagttag 300
 cctggaggta cgagttggct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg 360
 gtgtttcttca aggaggttgc gcaaaacagg gagacgttca atatcaccct ctacgggaga 420
 accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

[0038]

<210> 50
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> H1GA (Aβ)

<400> 50

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

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

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

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

Asn Arg Glu Thr Phe Asn 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> 51
 <211> 534
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

[0039]

<223> 不具有 Strep-标签 II 的成熟蛋白 H1GA 的 DNA 序列。阅读框以以下序列的第一个核苷酸开始

```
<400> 51
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtecc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaag tggatatgtg taggtgttgc agggaatgtg 120
ttgctcagag aagacaaaga cccgcttaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa 180
gacaagagct acaatgtcac cagtgtcggg tttgatgata agaagtgttt gtacaagatc 240
cggacttttg ttccaggttc ccagccaggc gagttcacgc tgggcaggat taagagttag 300
cctggaggta cgagttggct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg 360
gtgtttcttca aggaggttgc gcaaaacagg gagacgttca atatcaccct ctacgggaga 420
accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtgc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 52
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> H1GV (A β)

```
<400> 52
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 Val Leu 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 Ser Val Gly Phe Asp Asp Lys Lys Cys Leu Tyr Lys Ile
65 70 75 80
Arg Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Arg
85 90 95
Ile Lys Ser Glu Pro Gly Gly Thr Ser Trp Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Ala Gln
115 120 125
```

[0040]

Asn Arg Glu Thr Phe Asn 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

[illegible]

图 1

```

1  CCAATTCCATGGGAAATGGTATGTCGTGGGCGnnnGCCGGAATnnnnnnCTCGTGAGGATAAGGATCCGnnnAAAATGnnnnCGACCAAT 90
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTTAAGGTACCCCTTACCATACAGCACCCGGACCGCCCTTACGGTAAGACGCACTCCTATTCCTAGGCGTCTTTTACATACGCTGGTA
GlnPheHisGlyLysTyrValValGlyXaaAlaGlyAsnXaaXaaLeuArgGluAspLysAspProXaaLysMetXaaAlaThrIle
      8      12 13      21      24
91  TTACGAGTTGAAAGAAGATAATCATATAACGTCAACCnnnnGTGnnnTTnnnnnnAAGAATGCnnnTACnnnATTnnnACCTTTGTGCC 180
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATGCTCAACTTCTTCTATTAGTATATTCAGTGGAGGCACAACAAGCGTTTTTCTTACGCTGATGACCTAAGCATGGAAACACGG
TyrGluLeuLysGluAspLysSerTyrAsnValThrXaaValXaaPheXaaXaaLysLysCysXaaTyrXaaIleXaaThrPheValPro
      40  42  44  45      49  51  53
181 GGGAGCCAGCCGGCCGAGTTTACTTTAGGCGnnnATTAAAGTnnnnCCGGCGnnnACATCannnTTGGTCCGCGTCGTGAGCACCAACTA 270
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCCTCGGTCGGCCCGCTCAAAATGAATCCGTTGTAATTTTCAATGGGCCCCGGACTGTAGTATGAACCCAGGCGCAGCACTCGTGGTTGAT
GlySerGlnProGlyGluPheThrLeuGlyXaaIleLysSerXaaProGlyXaaThrSerXaaLeuValArgValValSerThrAsnTyr
      68      72      75      78
271 CAACCAGCATGCCATGGTGTCTTCAAGnnnnGTGnnnCAGAACCGCGAGnnnTTnnnATCACACTGTACGGCGCGCACGAAAGAACTGAC 360
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTGGTCGTACGGTACCCACAAGAAGTCTTTTCACAGGGTCTTGGCGCTCATGAAATTCCTAGTGTGACATGCGCGCGTCTTCTTGTACTG
AsnGlnHisAlaMetValPhePheLysXaaValXaaGlnAsnArgGluXaaPheXaaIleThrLeuTyrGlyArgThrLysGluLeuThr
      97  99      104  106
361 AAGCGAGCTGAAGGAAATTTTATCCGCTTTTCCAAATCTCTGG 404
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGCTCGACTTCCTTTTAAATAGCGGAAAGGTTTAGAGACC
SerGluLeuLysGluAsnPheIleArgPheSerLysSerLeu

```

图 2

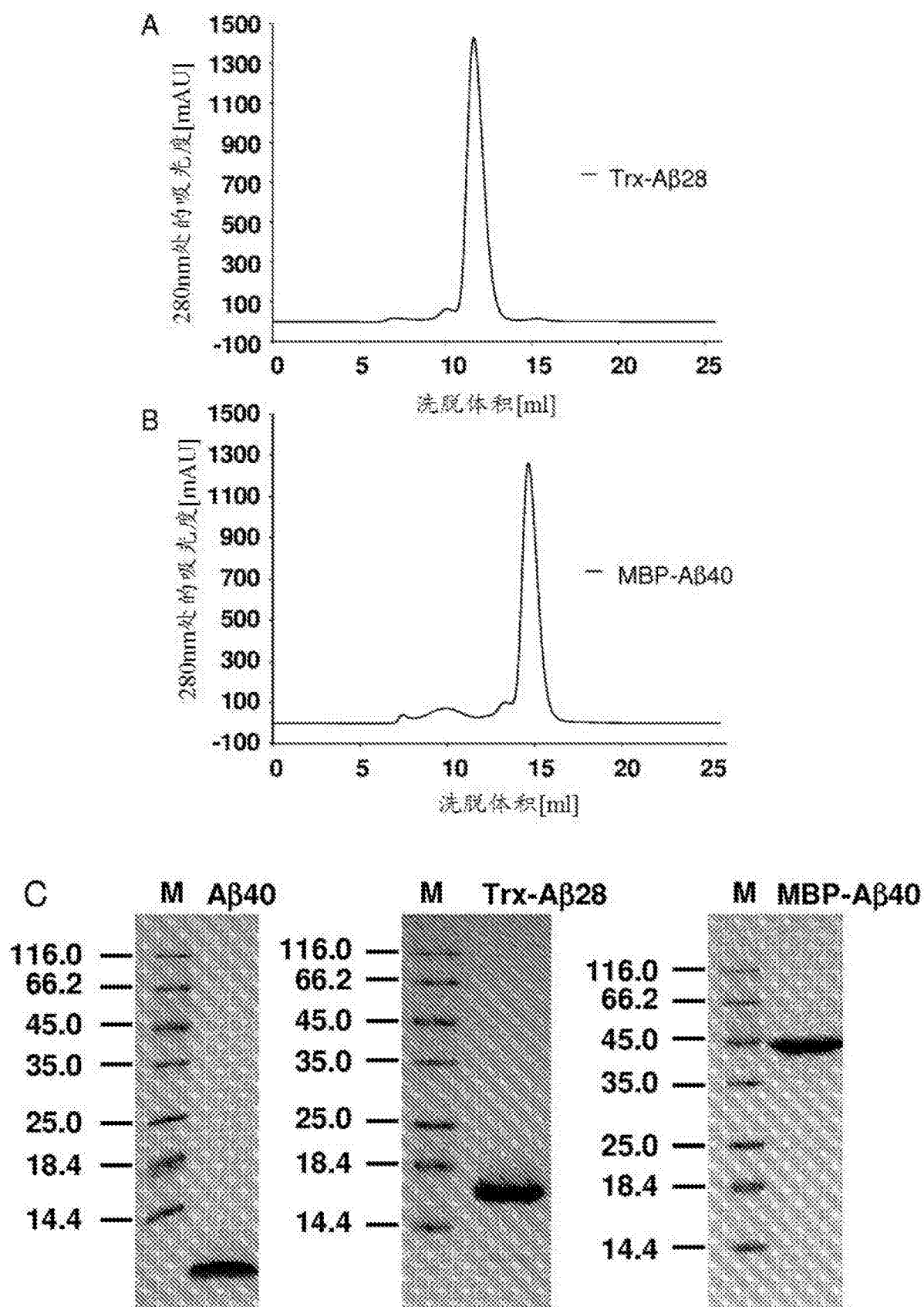


图 3

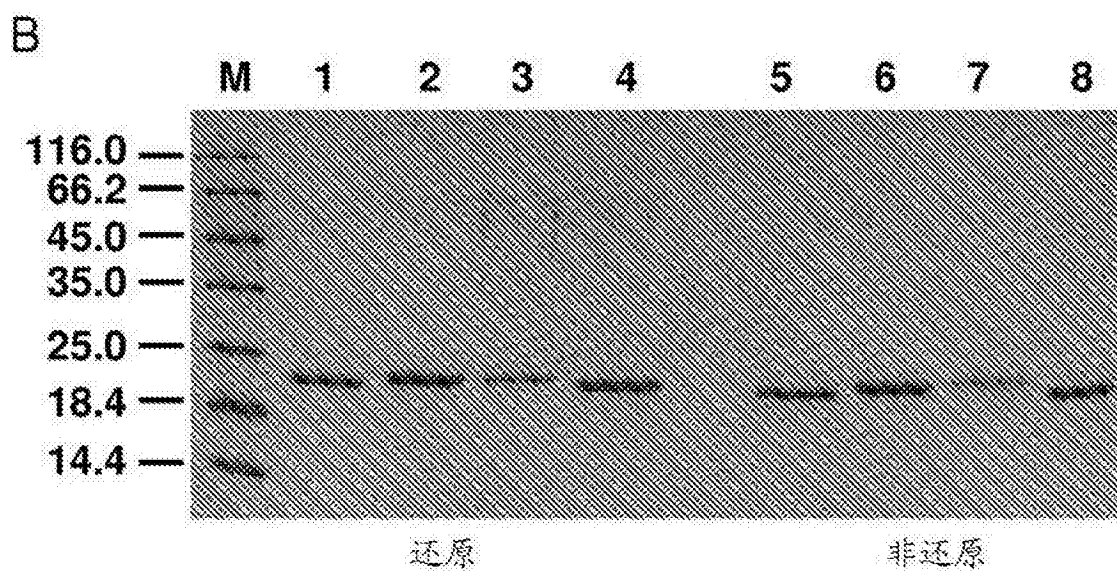
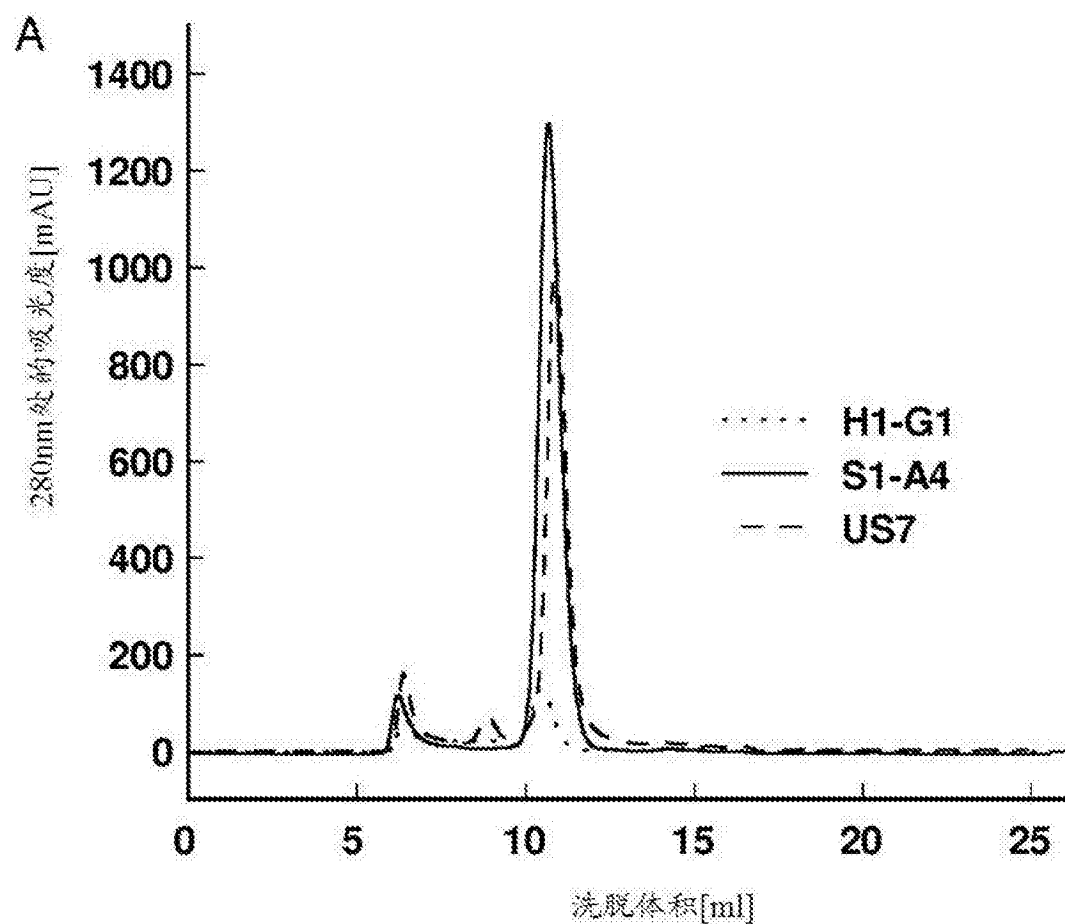


图 4

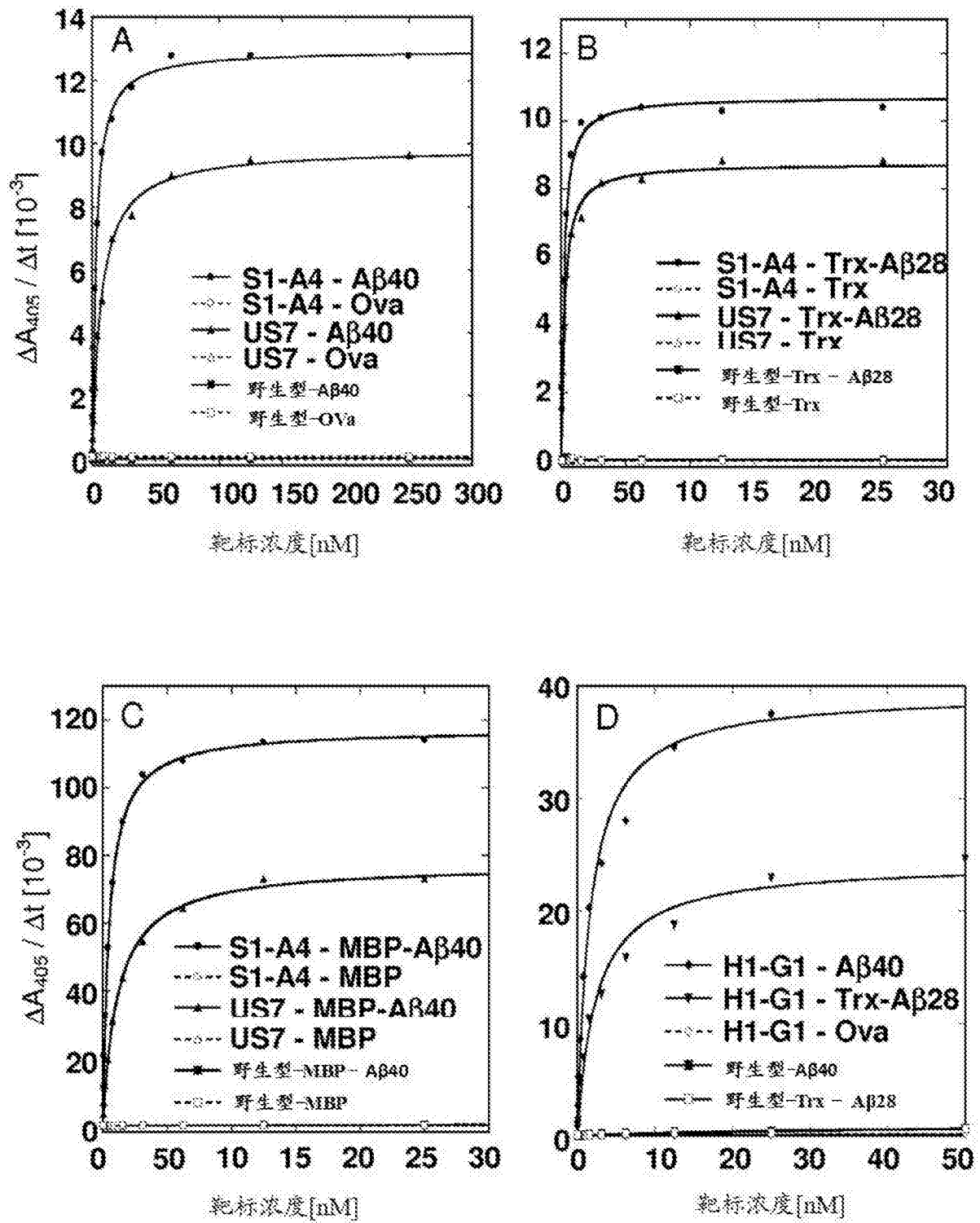


图 5

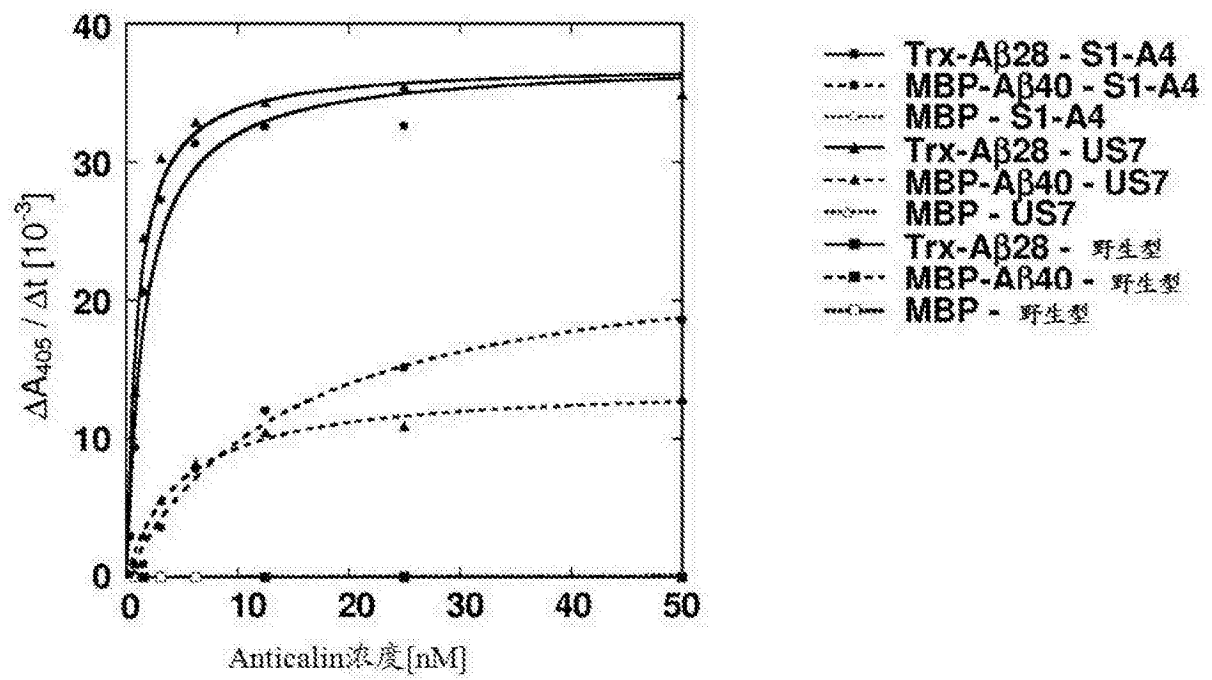


图 6

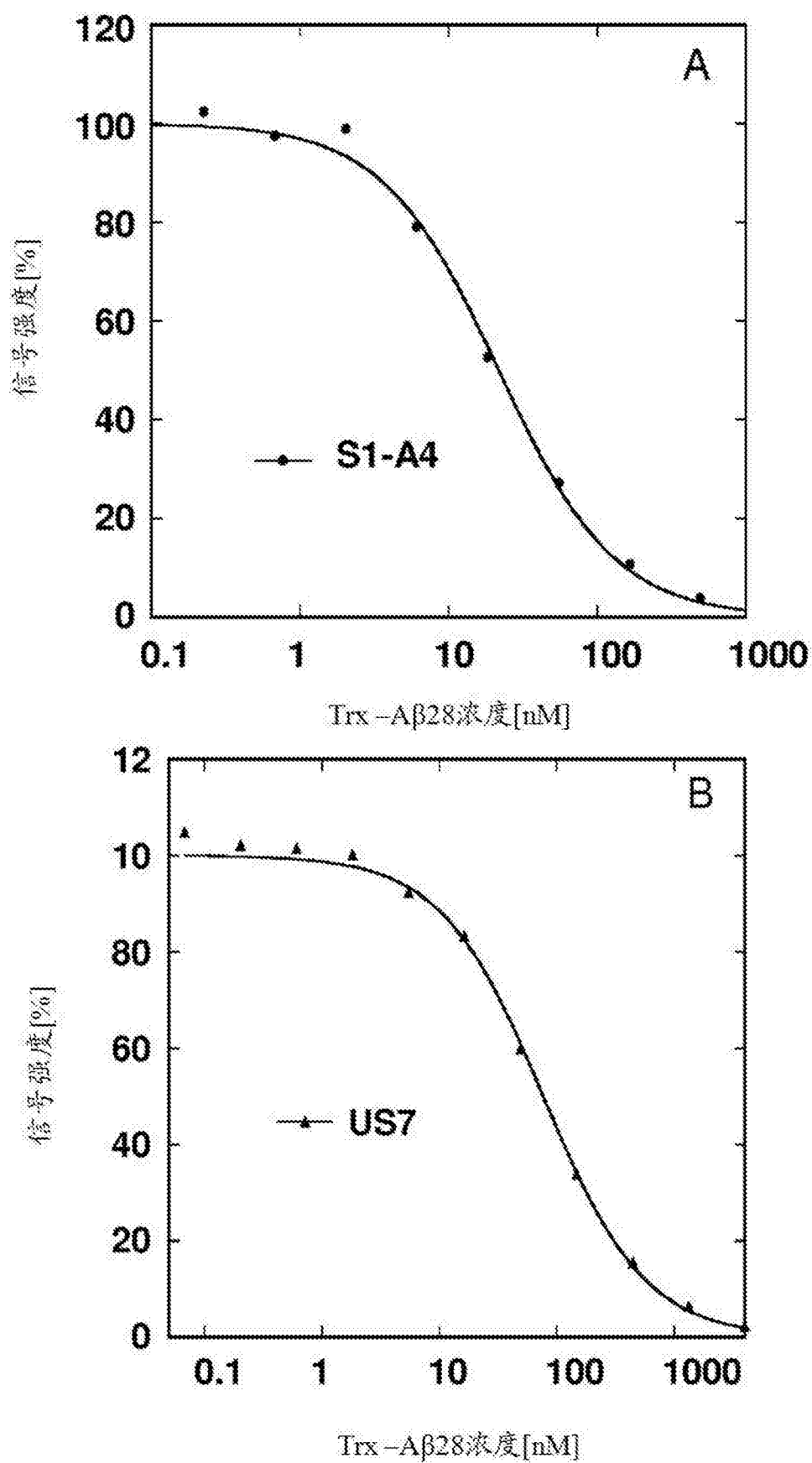


图 7

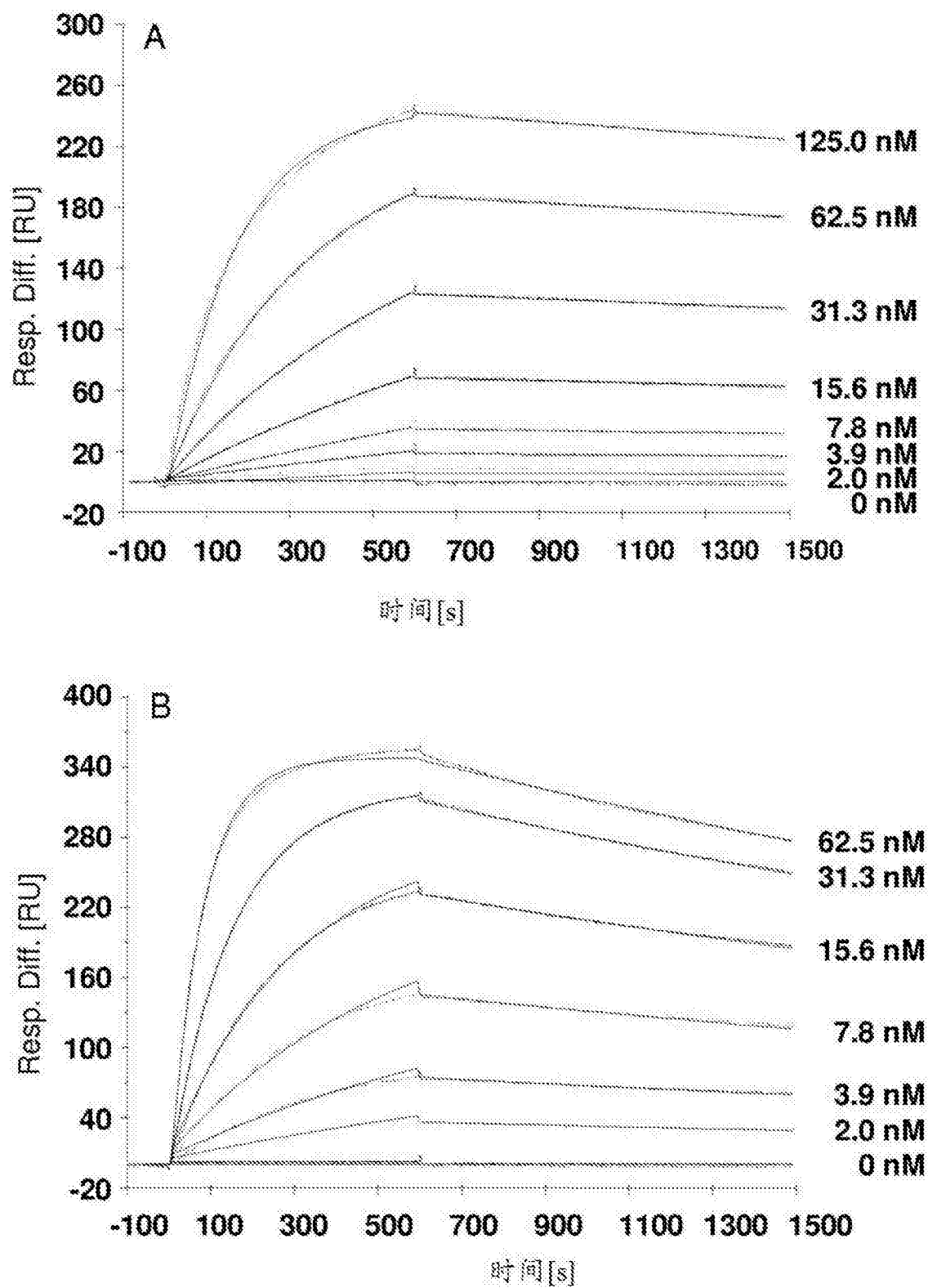


图 8

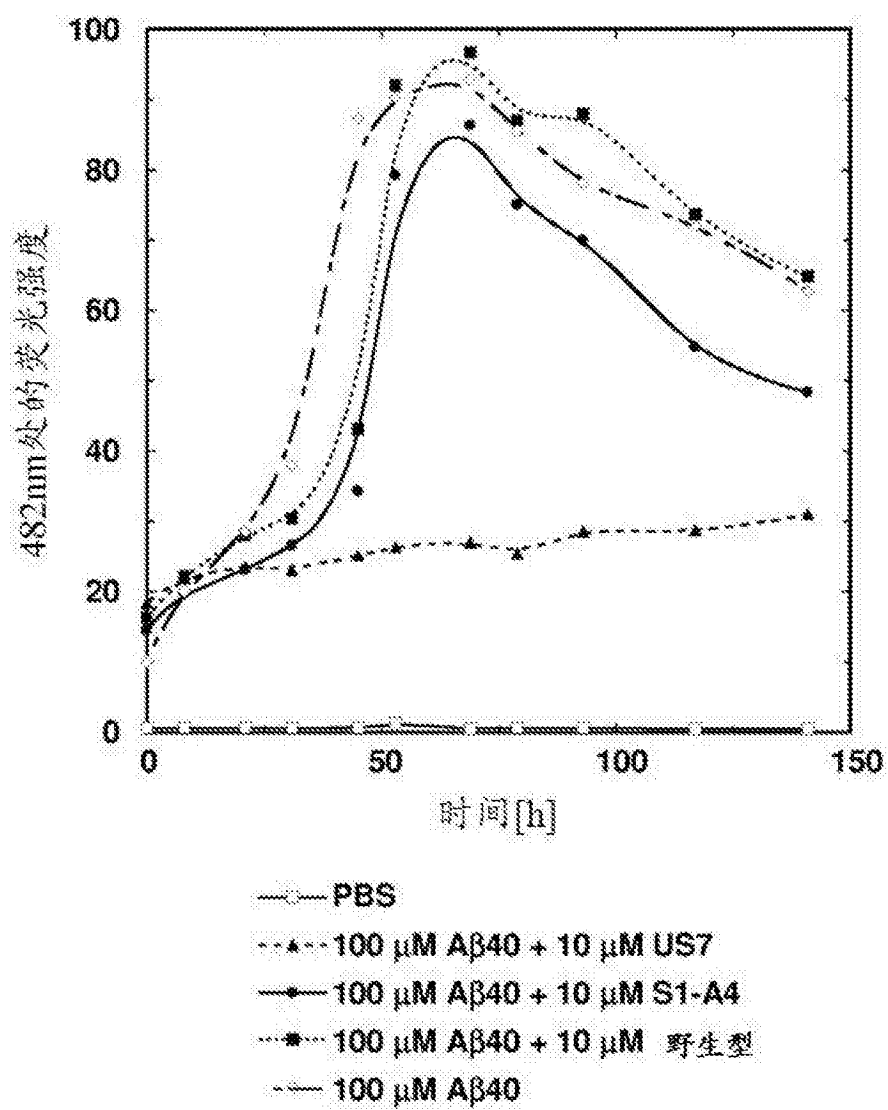


图 9

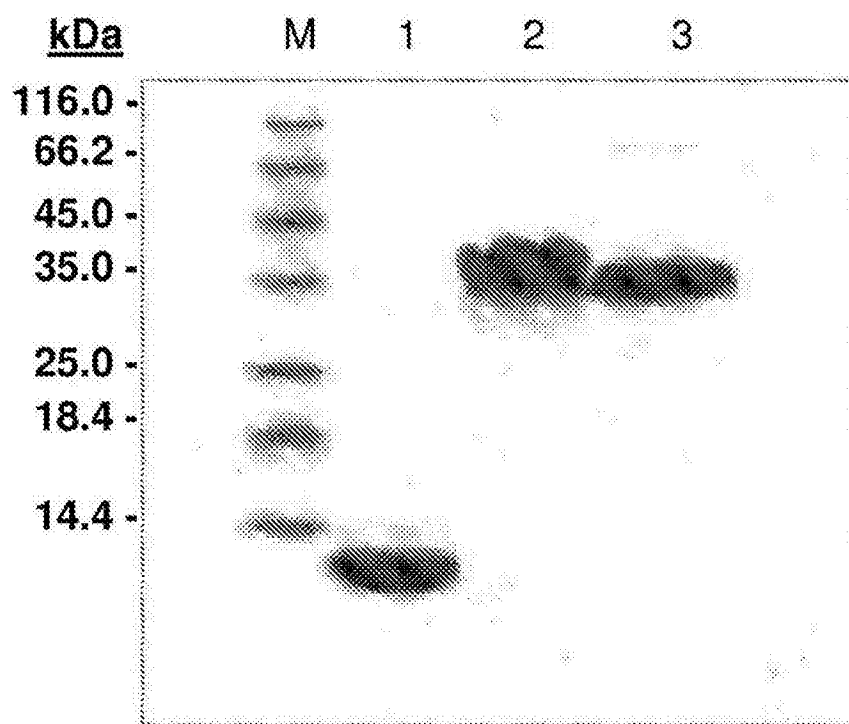


图 10

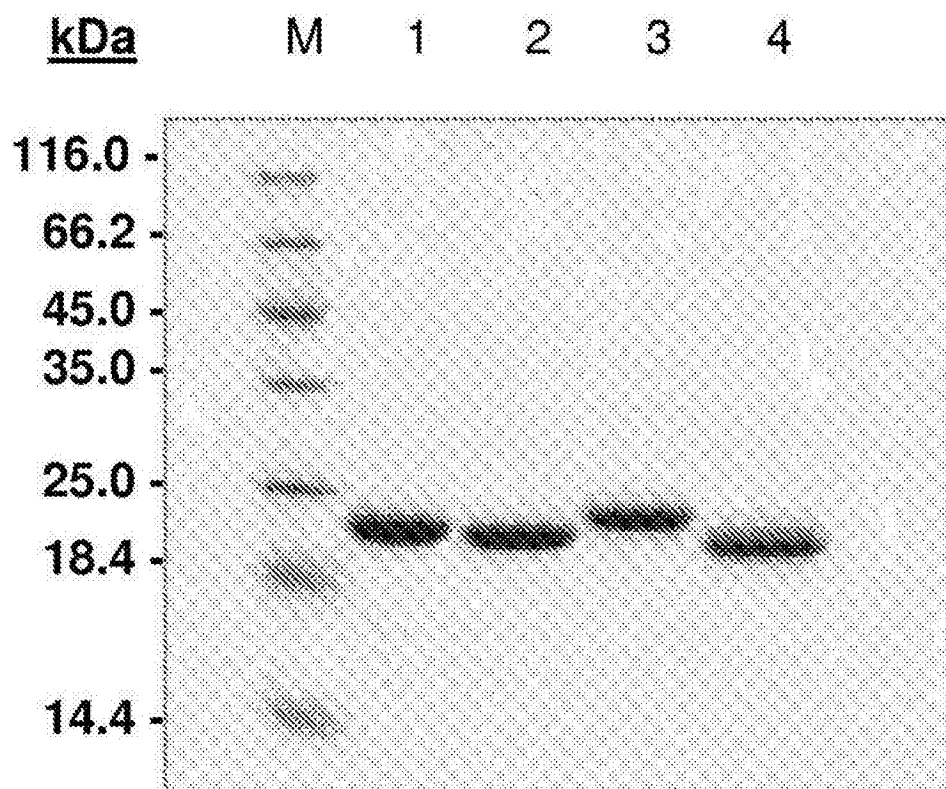


图 11

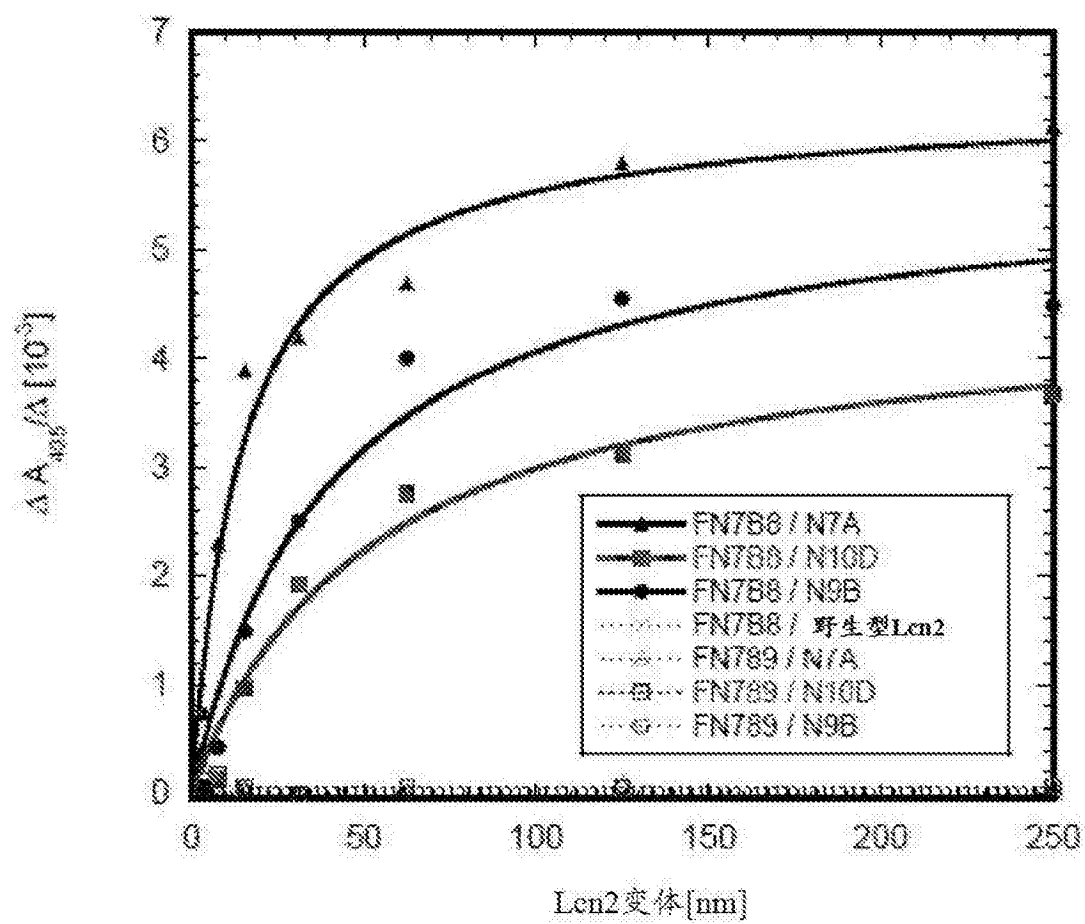


图 12

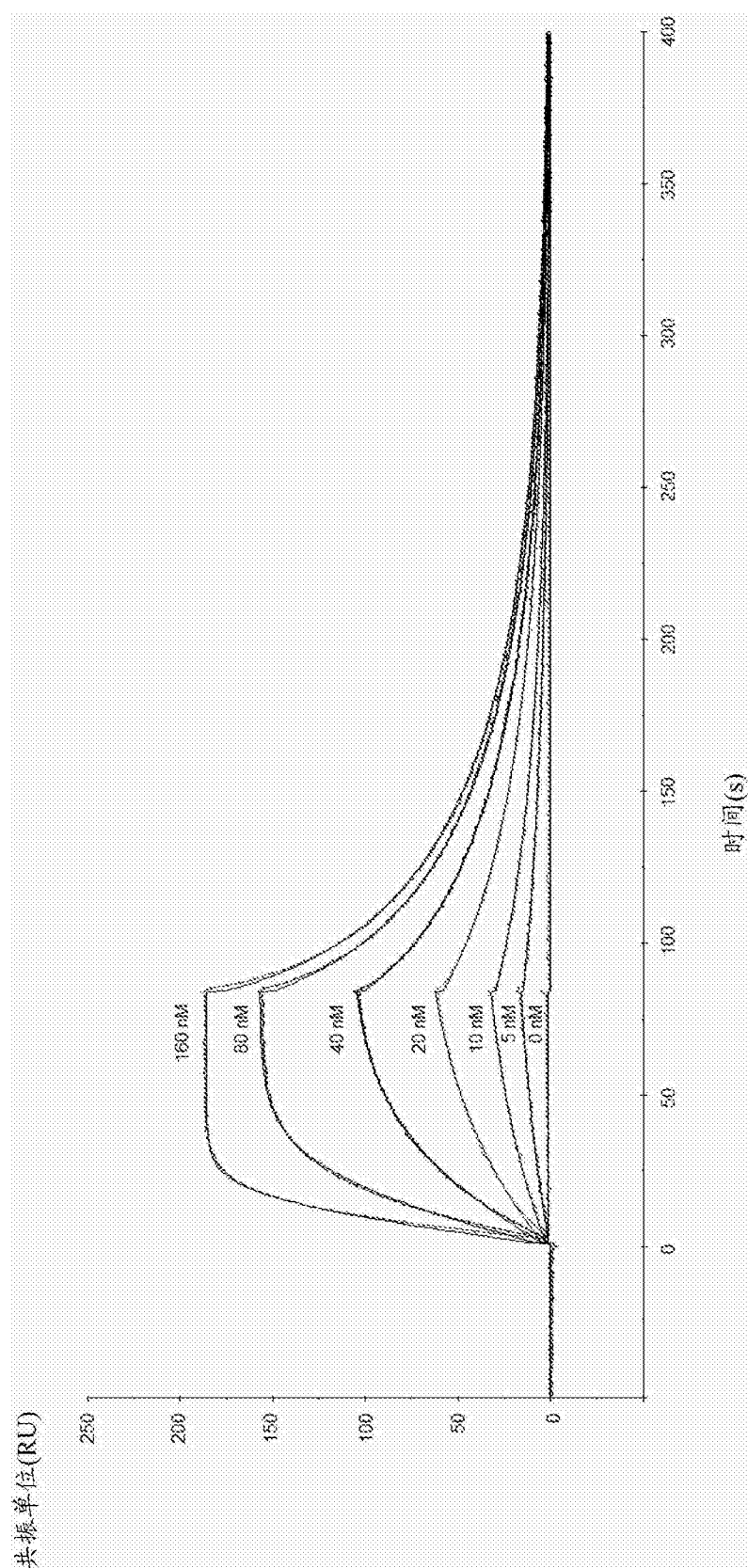


图 13

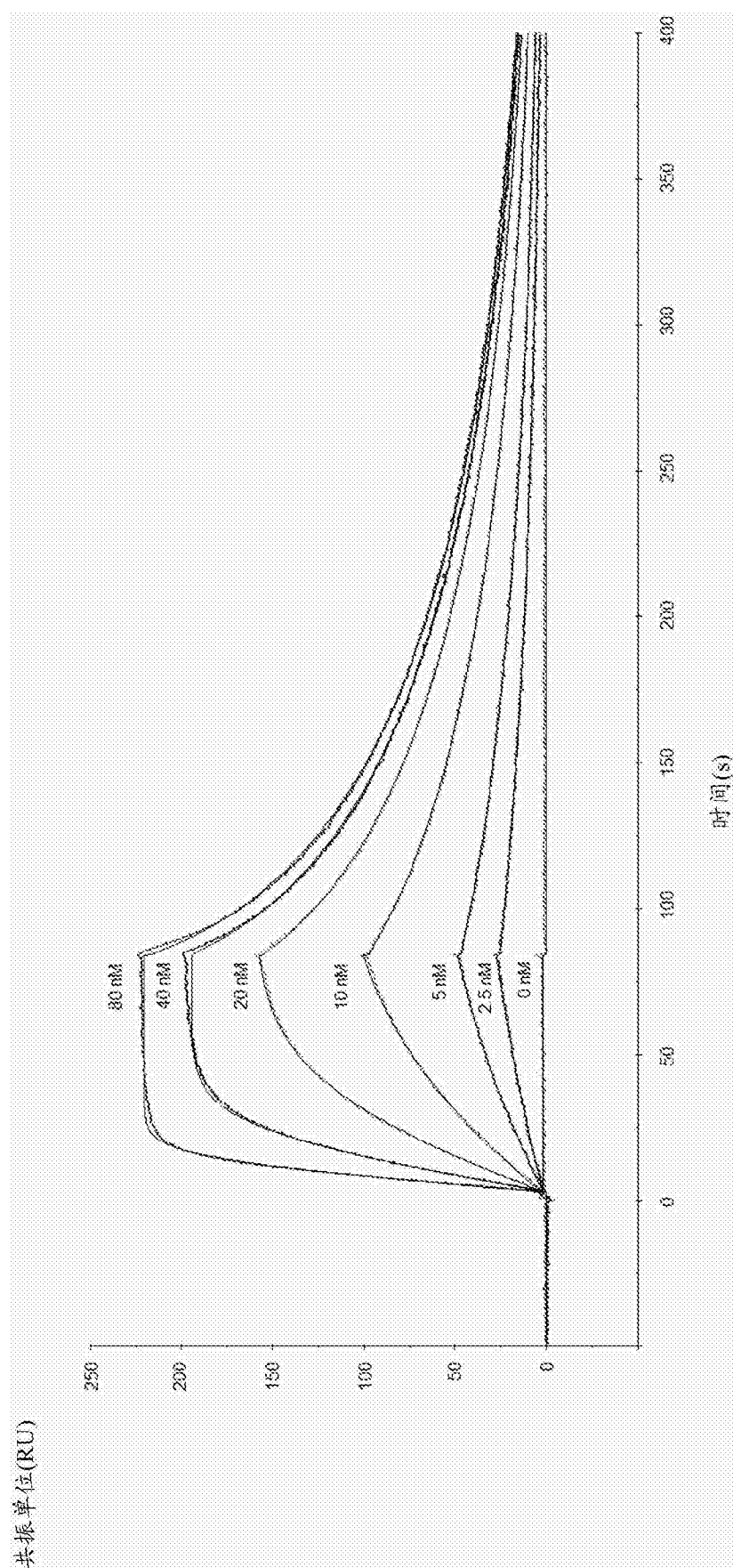


图 14

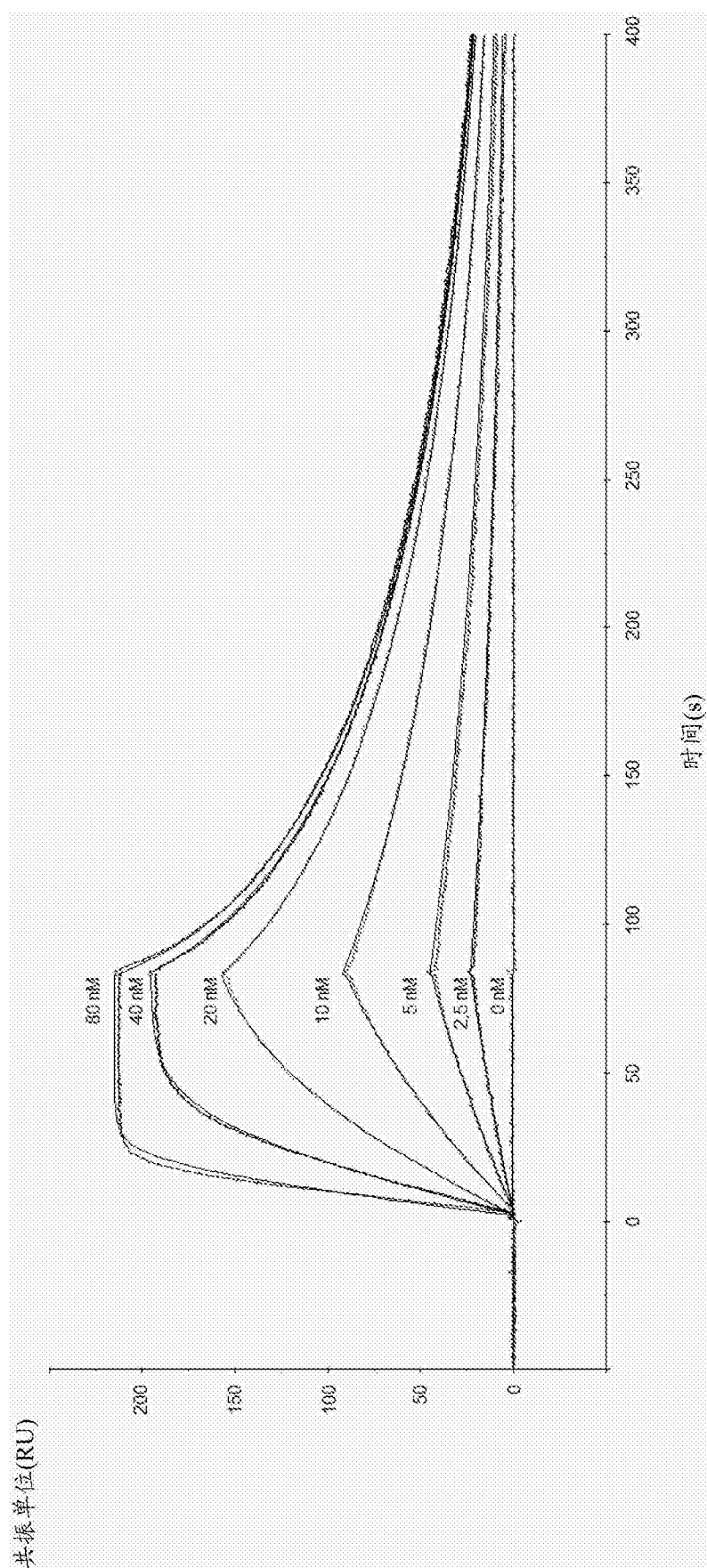


图 15

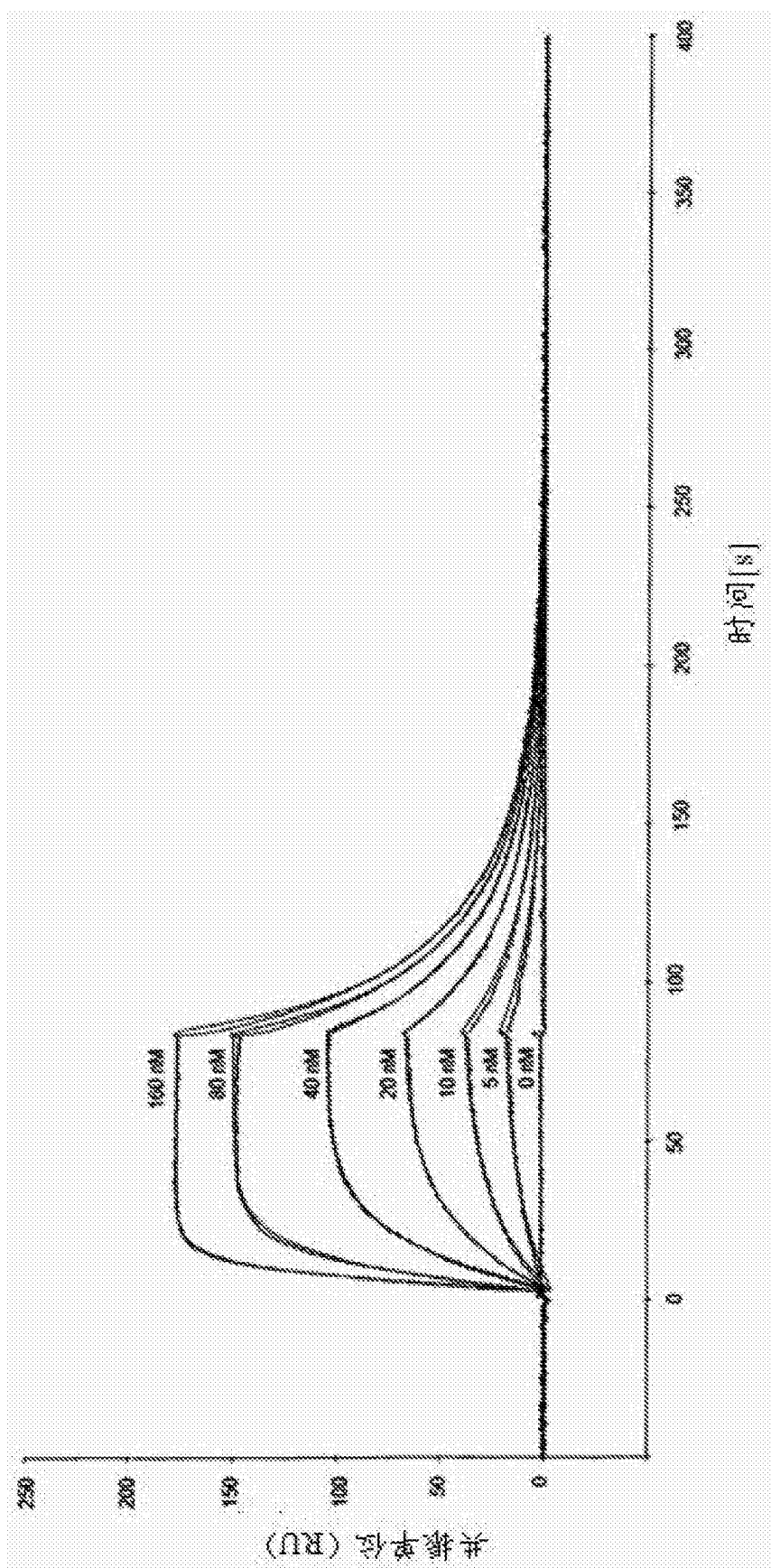


图 16

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Len2	QDSTDLIPAPL	SKVPELOQNFQ	QKQWVVL	AGNAIL	REDKDPQ	MIAT	YELKEDKSYN	TVSVLFRKKKCD	WIRTFVPGCQPG
Lib			h.....	x.....	xx.....	x.....	x.....	x.....	x.....
S1-A4 (Abeta)			h.....	V.....	YT.....	L.....	Y.....	S.....	G.....
US7 (Abeta)			h.....	V.....	KS.....	W.....	Y.....	S.....	G.....
H1-G1 (Abeta)			h.....	C.....	VL.....	L.....	Y.....	S.....	G.....
N7A (ED-B)			h.....	K.....	HD.....	R.....	Q.....	N.....	R.....
N7E (ED-B)			h.....	E.....	SL.....	R.....	Y.....	S.....	R.....
N9B (ED-B)			h.....	R.....	MR.....	A.....	V.....	K.....	M.....
N10D (ED-B)			h.....	A.....	TW.....	Y.....	Q.....	N.....	L.....
	=====A=====				-----#1-----				=====B=====
									=====C=====
									-----#2-----
									=====D=====
100	110	120	130	140	150	160	170		
Len2	EFTLGNKSY	PGLTSYLKRV	STVYNQH	AMVTFKKV	SONREYFK	ITLYGR	TKELTSEL	ENFIRFSK	SLGLPENHIVFPIDQIDG
Lib		x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....
S1-A4		I.....	Q.....	M.....	Y.....	T.....	G.....	M.....	N.....
US7		R.....	R.....	R.....	A.....	V.....	Q.....	S.....	N.....
H1-G1		R.....	E.....	G.....	W.....	E.....	A.....	T.....	N.....
N7A		N.....	W.....	L.....	W.....	R.....	Y.....	L.....	E.....
N7E		L.....	K.....	H.....	F.....	T.....	A.....	Y.....	F.....
N9B		A.....	P.....	P.....	T.....	H.....	F.....	Y.....	H.....
N10D		S.....	W.....	L.....	W.....	R.....	Y.....	F.....	G.....
	=====E=====				-----#3-----				=====F=====
									-----#4-----
									=====G=====
									-----#5-----

图 17

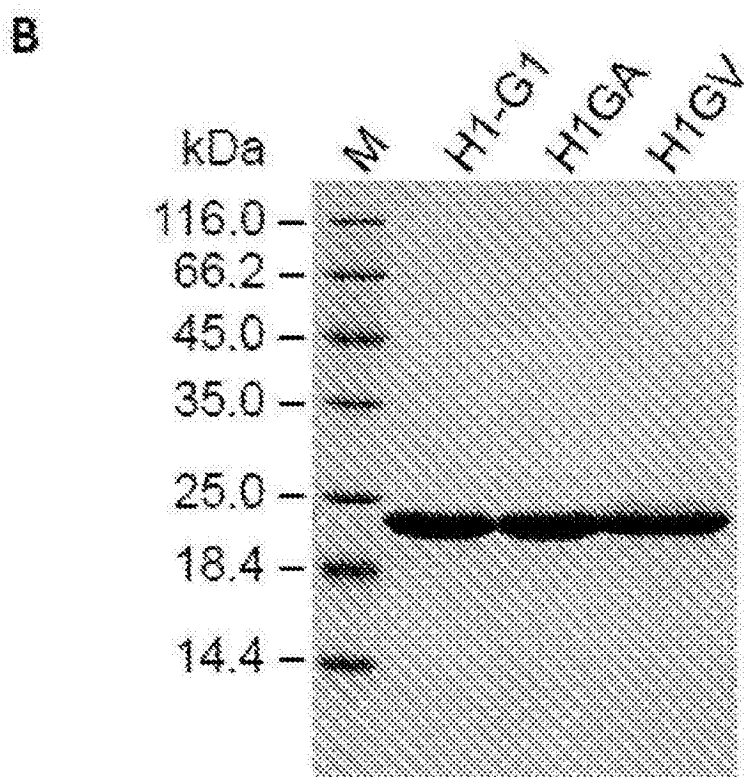
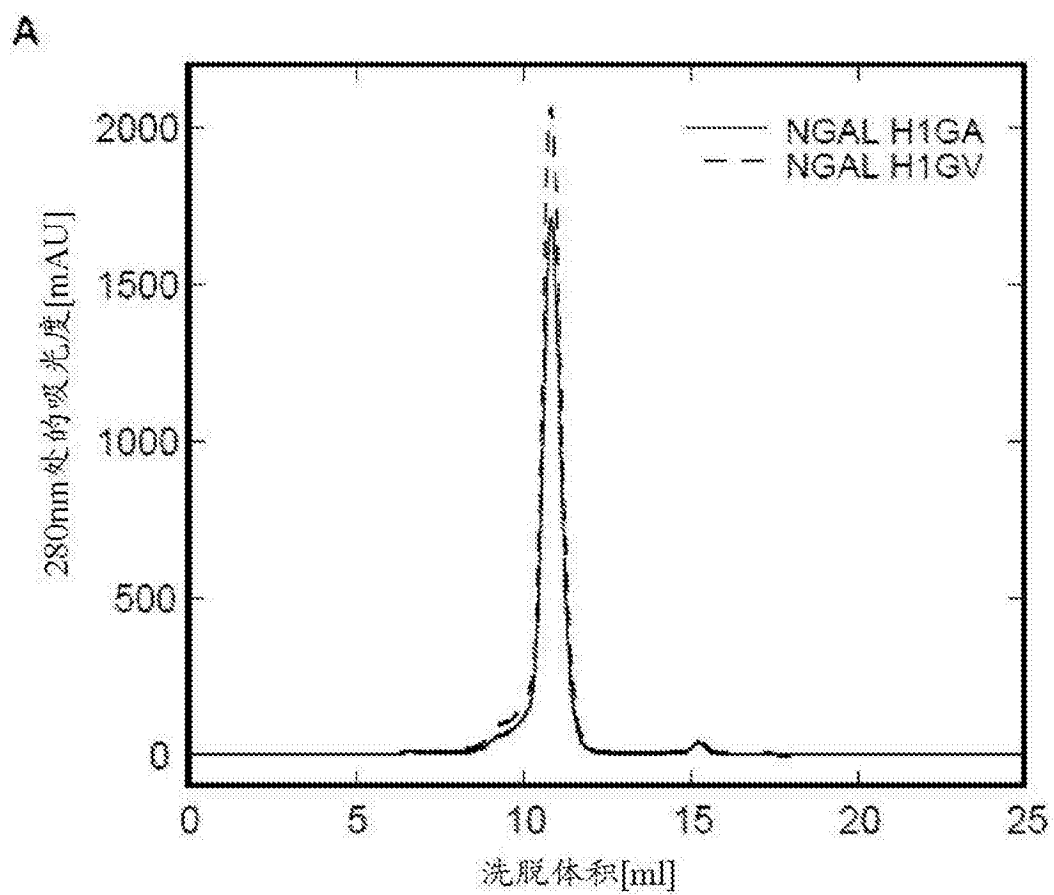


图 18

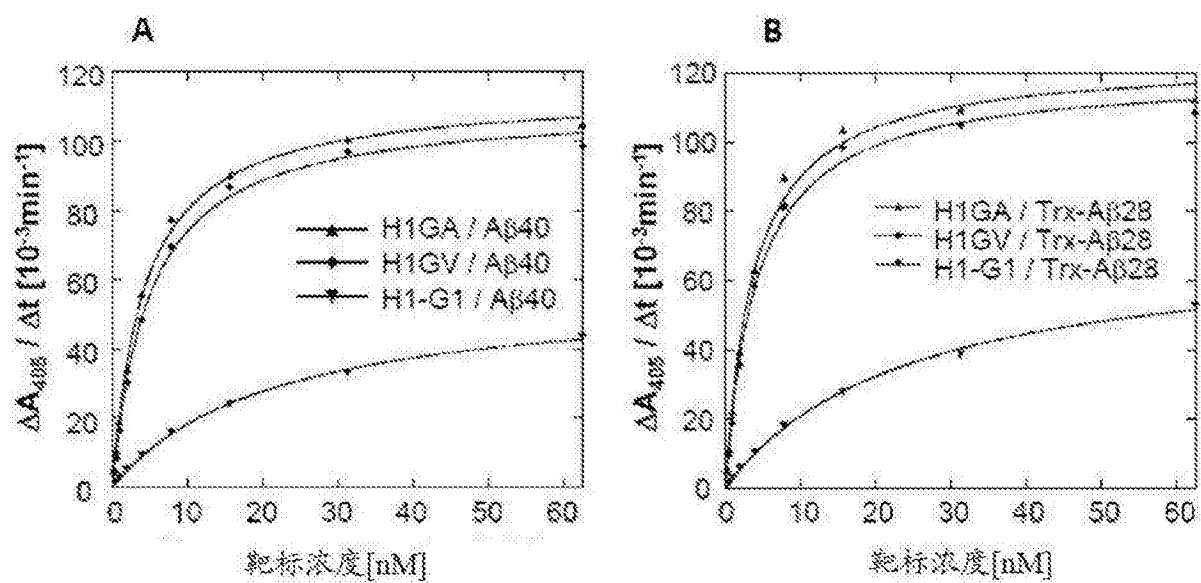


图 19

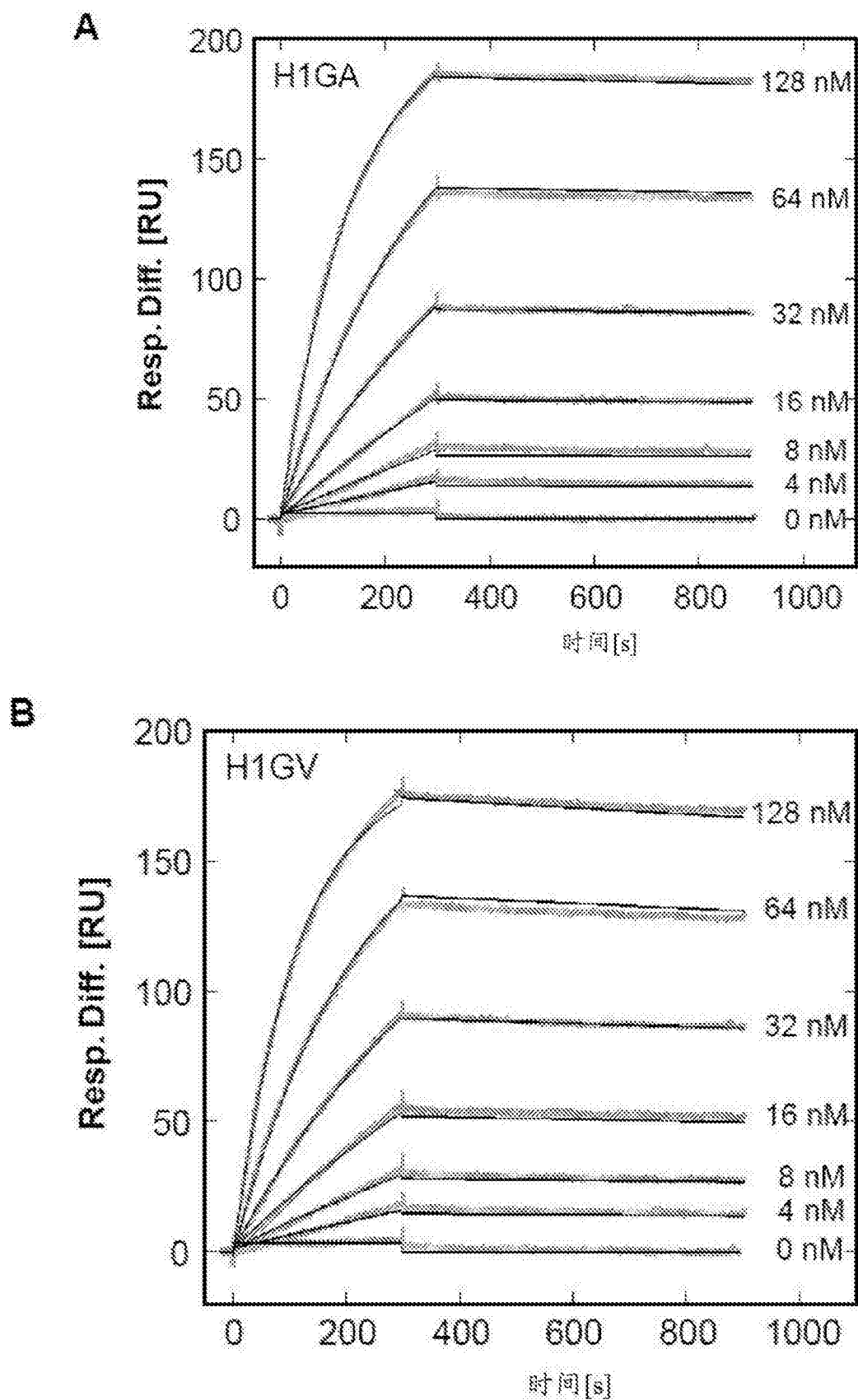


图 20

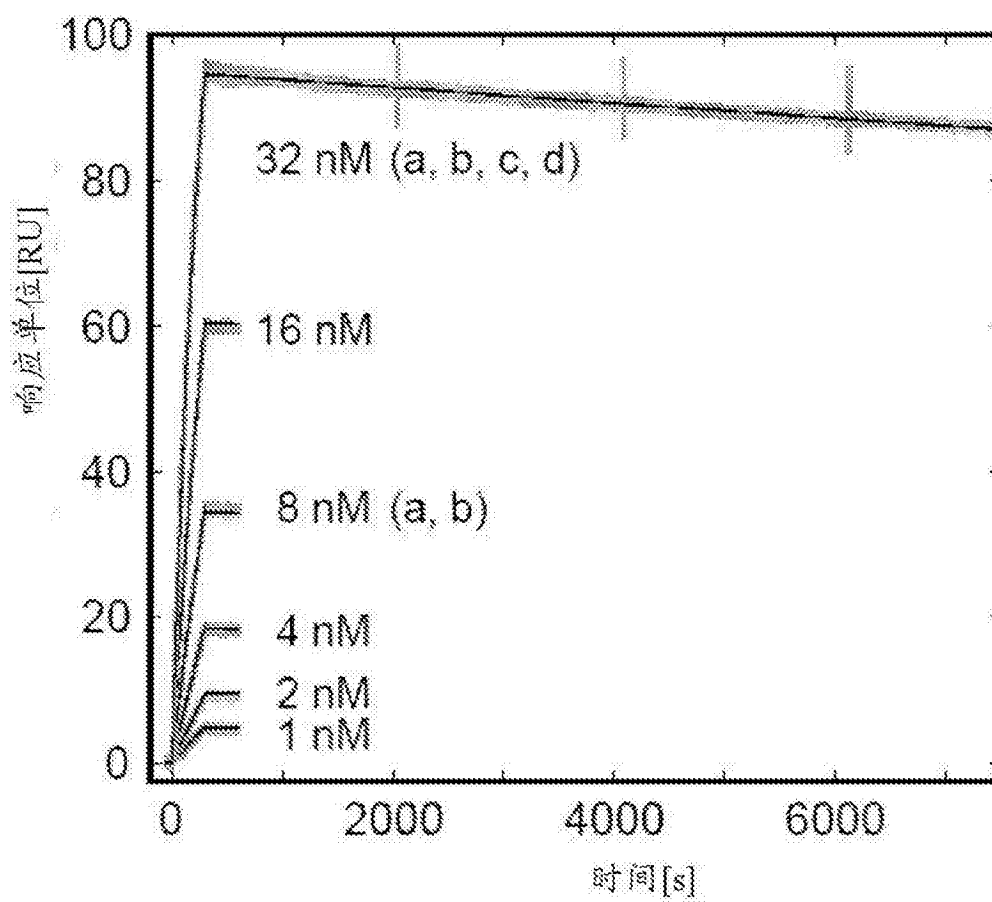


图 21

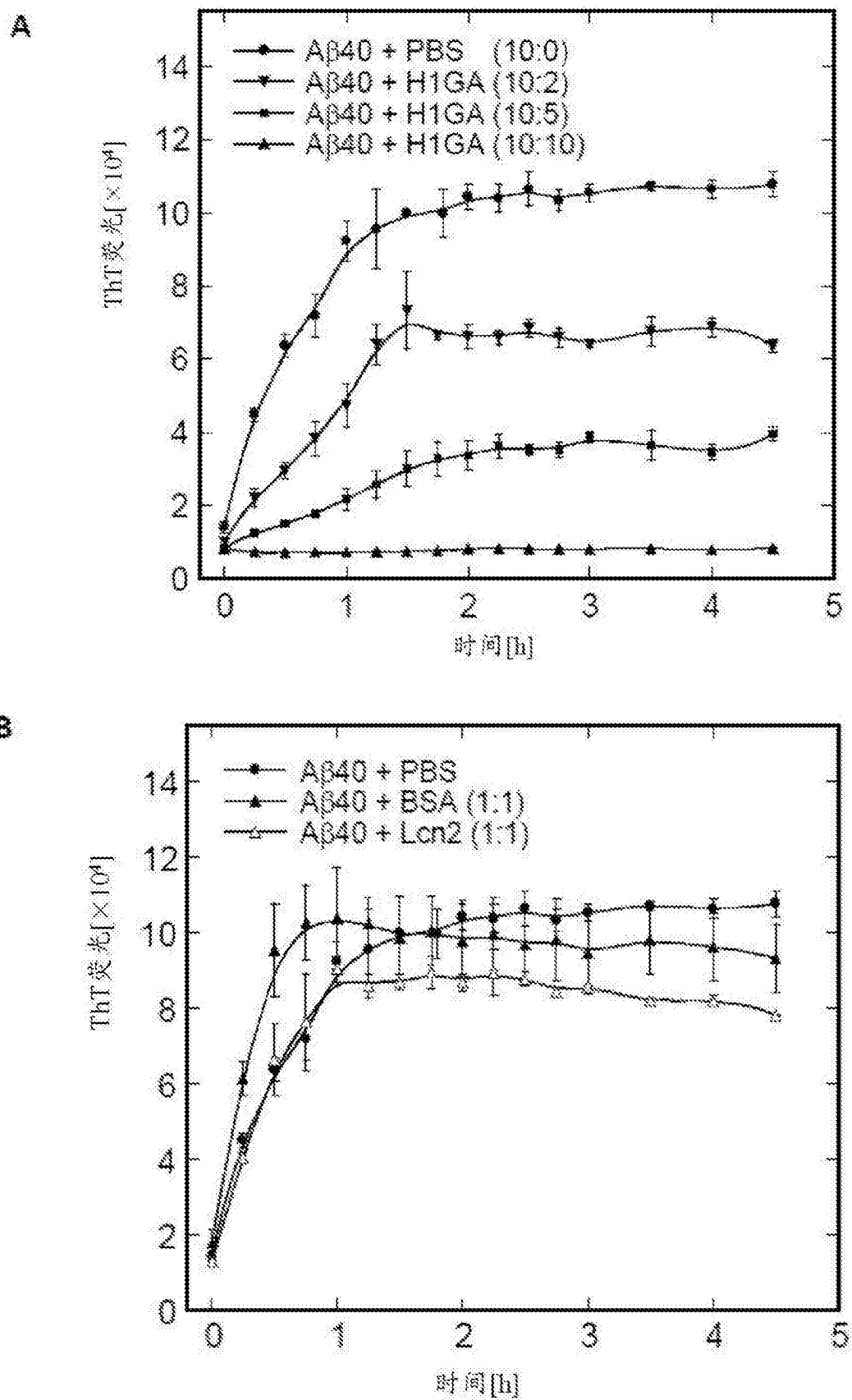


图 22

	K _D [nM]	
	H1GA	H1GV
Aβ40 (捕获ELISA, 图19)	4.2 ± 0.3	4.9 ± 0.3
Trx-Aβ28 (捕获ELISA, 图19)	3.8 ± 0.4	4.2 ± 0.4
MBP-Aβ40 (SPR, 图20) *	0.48	1.1
Aβ40 (SPR, 图21) **	0.095	-
*解离时间不够长		
**由于解离时间足够长, 所以数值更可靠		

图 23

	100	110	120	130	140	150	160	170	
1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1002	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
1102	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
1202	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
1302	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
1402	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
1502	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
1602	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
1702	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
1802	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
1902	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
2002	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
2102	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
2202	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
2302	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
2402	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
2502	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
2602	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
2702	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
2802	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
2902	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
3002	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
3102	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
3202	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
3302	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
3402	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
3502	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
3602	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
3702	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
3802	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
3902	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
4002	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
4102	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
4202	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
4302	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
4402	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
4502	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
4602	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
4702	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
4802	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
4902	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
5002	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
5102	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
5202	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
5302	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
5402	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
5502	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
5602	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
5702	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
5802	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
5902	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
6002	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
6102	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
6202	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
6302	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
6402	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
6502	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
6602	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
6702	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
6802	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
6902	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
7002	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
7102	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
7202	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
7302	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
7402	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
7502	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
7602	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
7702	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
7802	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
7902	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
8002	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
8102	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
8202	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
8302	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
8402	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
8502	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
8602	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
8702	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
8802	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
8902	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
9002	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
9102	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
9202	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
9302	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
9402	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
9502	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
9602	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
9702	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
9802	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
9902	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	
10002	CO	ST	LI	PA	PL	SK	VL	Q	

图 24

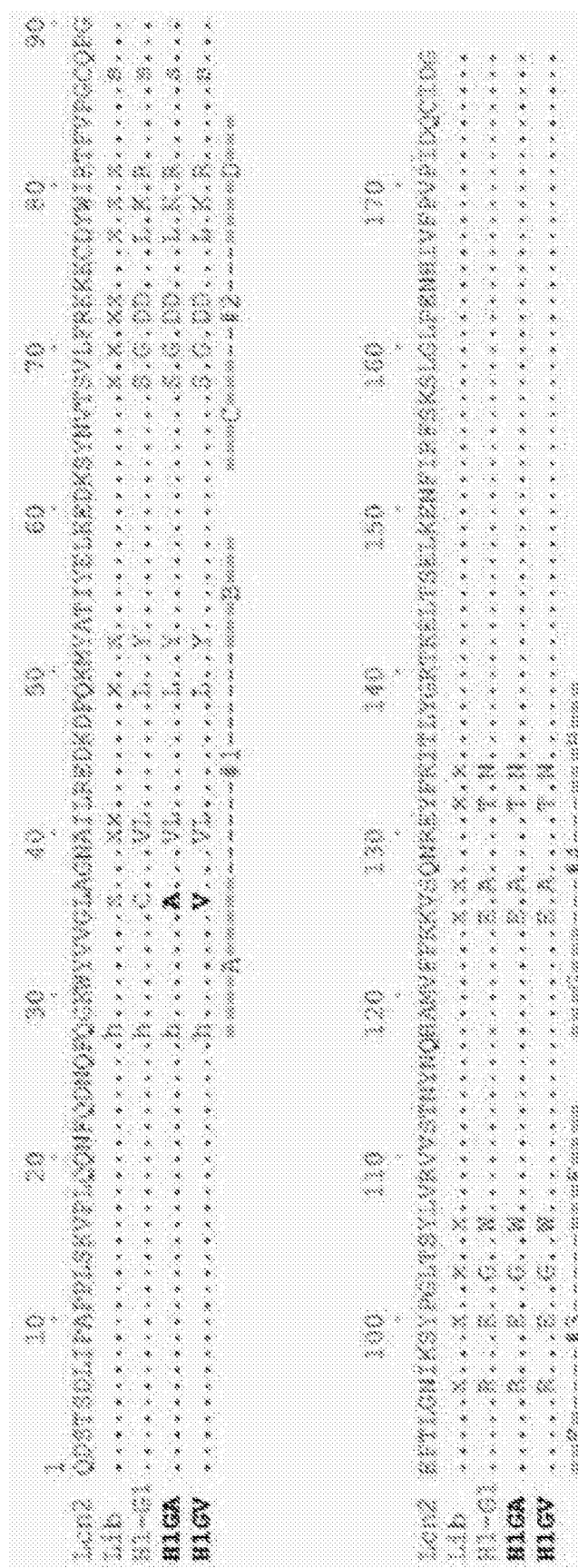


图 25

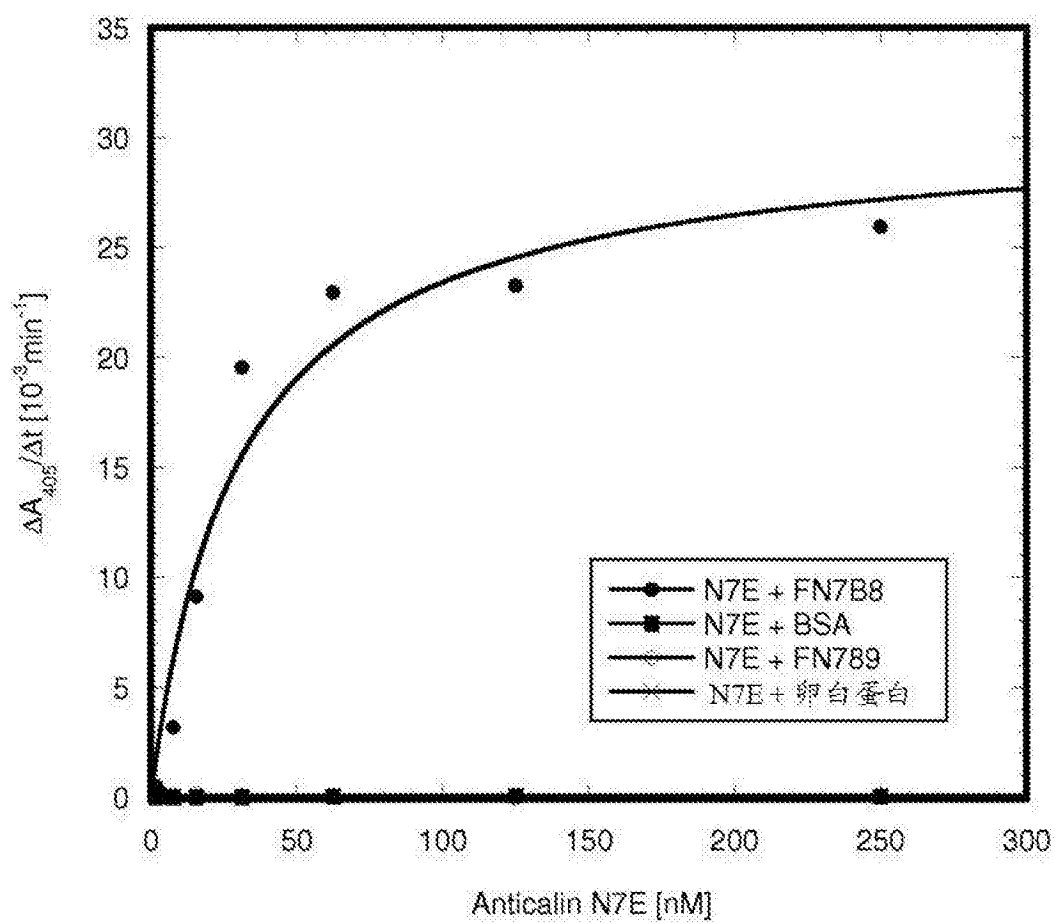
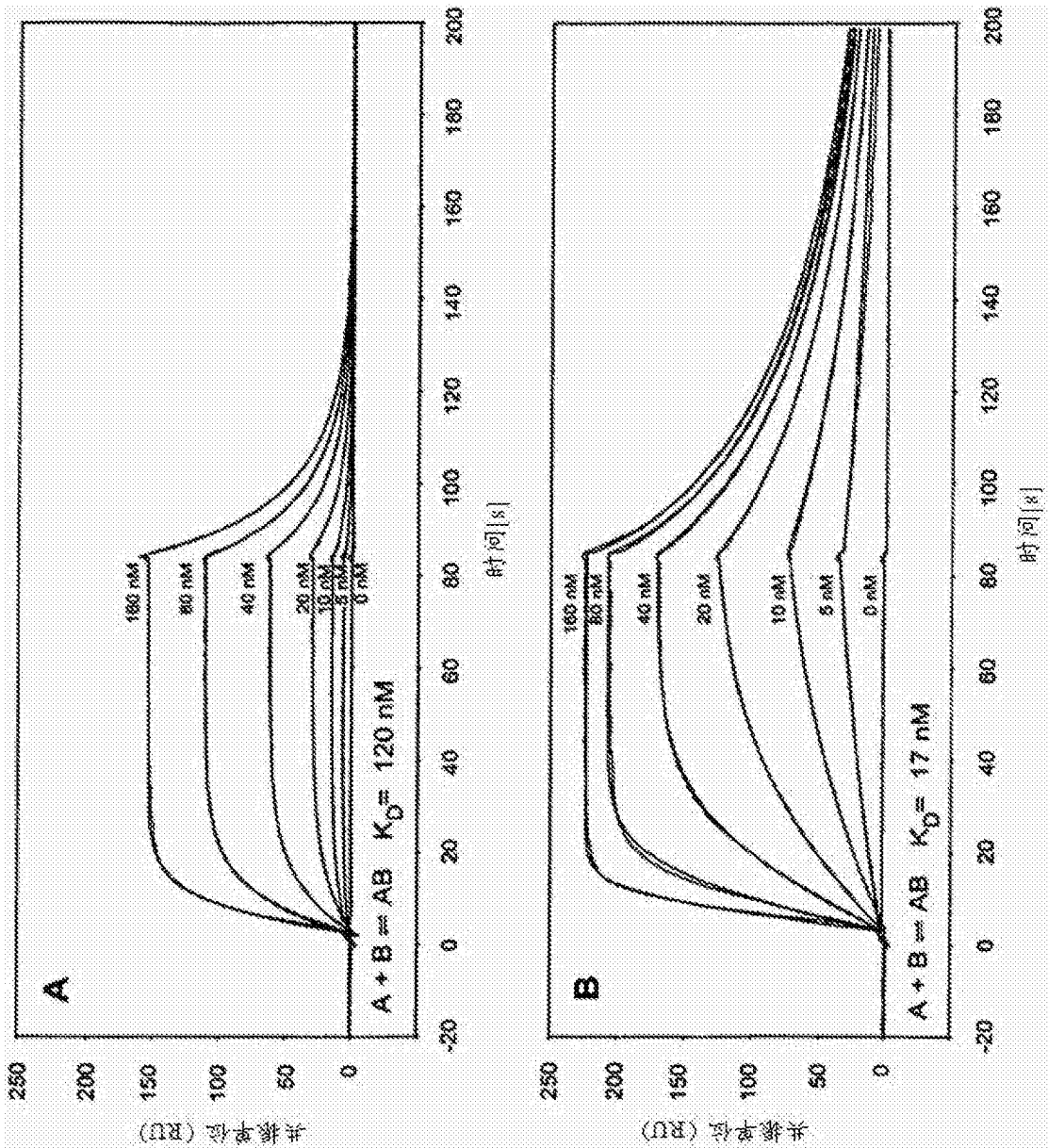


图 26



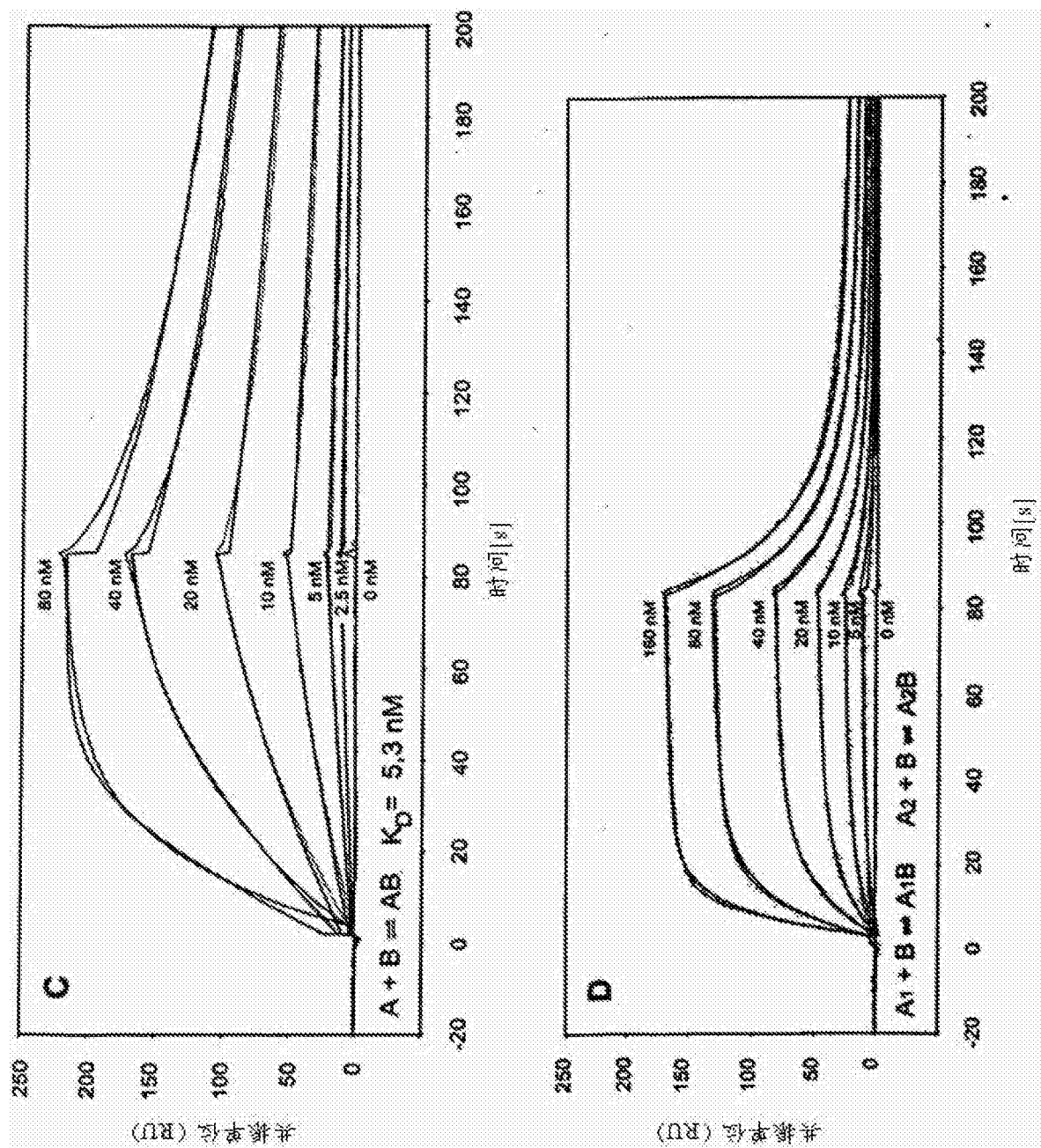
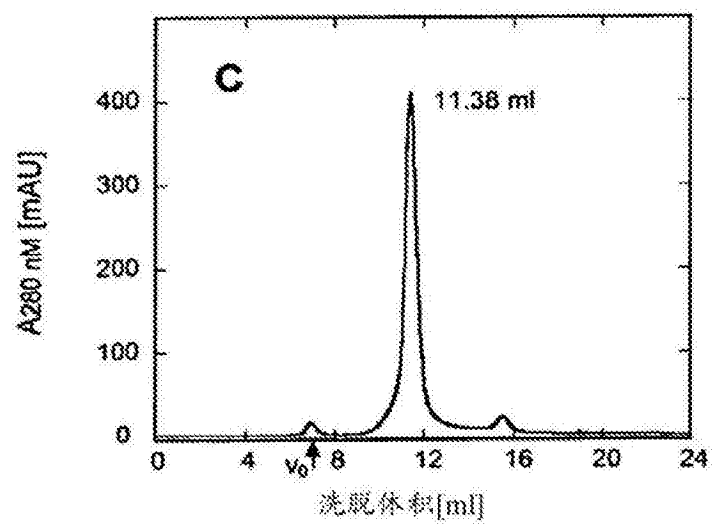
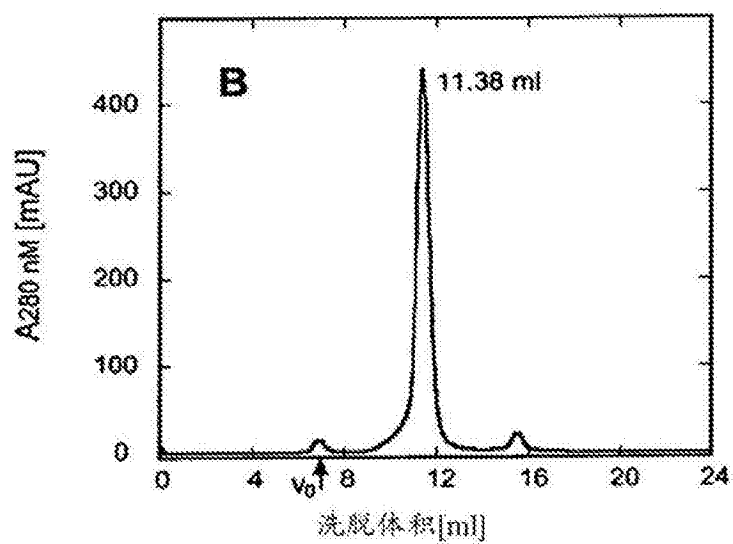
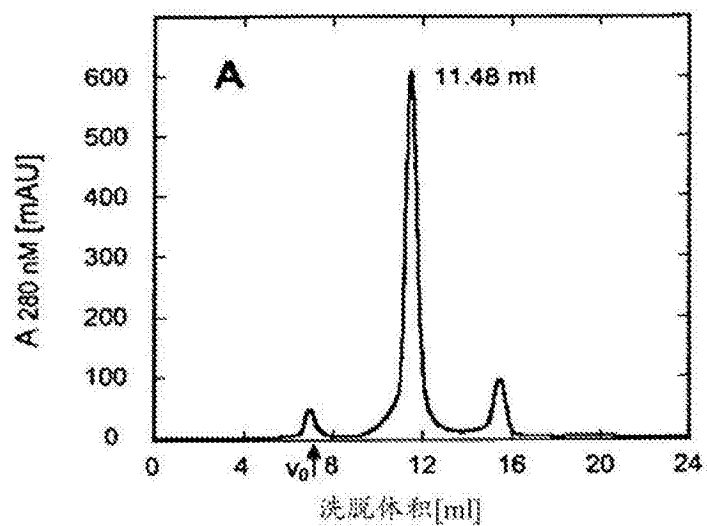


图 27



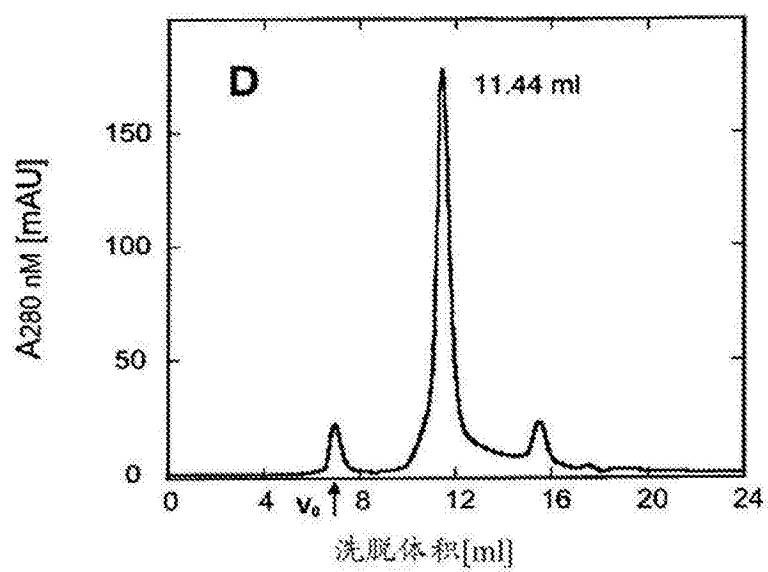


图 28