



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107969127 B

(45) 授权公告日 2022.09.06

(21) 申请号 201680051589.5

(22) 申请日 2016.09.06

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107969127 A

(43) 申请公布日 2018.04.27

(30) 优先权数据

62/215,256 2015.09.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.03.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/050405 2016.09.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/044424 EN 2017.03.16

(73) 专利权人 赛瑞品股份有限公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 M·S·海登-莱德贝特

J·A·莱德贝特 V·莫特斯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理人 封新琴

权利要求书4页 说明书56页

序列表62页 附图12页

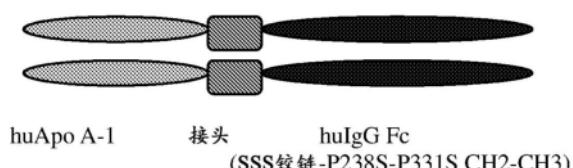
(54) 发明名称

APOA-1融合多肽及相关组合物和方法

(57) 摘要

公开了涉及ApoA-1融合多肽的组合物和方法。融合多肽包含对应于ApoA-1多肽或ApoA-1模拟物的第一多肽区段，并且还可以包含二聚化结构域，例如像Fc区，其通常经由柔性接头在羧基末端与所述第一多肽区段连接。在一些实施方案中，融合多肽进一步包含羧基末端位于第一多肽区段并赋予第二生物学活性的第二多肽区段（例如RNA酶、对氧磷酶、血小板活化因子乙酰水解酶、胆固醇酯转运蛋白、卵磷脂胆固醇酰基转移酶、或与β淀粉样蛋白特异性结合的多肽）。还公开了包含本文公开的第一和第二ApoA-1融合多肽的二聚体蛋白。融合多肽和二聚体蛋白可用在治疗方法中。

CN 107969127 B



1. 一种从氨基末端位置到羧基末端位置包含ApoA1-L1-D的融合多肽,其中:
ApoA1是由SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-267或25-267所示的氨基酸序列组成的第一多肽区段,其中,所述第一多肽区段具有胆固醇外流活性;
L1是由氨基酸序列DLS (GGGGS)_n TGL组成的第一多肽接头,其中n是2至6的正整数;并且D是免疫球蛋白Fc区。
 2. 权利要求1的融合多肽,其中,所述Fc区是人Fc区。
 3. 权利要求2的融合多肽,其中,所述Fc区是人 $\gamma 1$ Fc区或人 $\gamma 3$ Fc区。
 4. 权利要求2的融合多肽,其中,所述Fc区是其中由Eu编号获得的残基C220被丝氨酸替换的人 $\gamma 1$ Fc变体。
 5. 权利要求4的融合多肽,其中,由Eu编号获得的残基C226和C229各自被丝氨酸替换。
 6. 权利要求5的融合多肽,其中,由Eu编号获得的残基P238被丝氨酸替换。
 7. 权利要求3的融合多肽,其中,所述Fc区是其中由Eu编号获得的残基P331被丝氨酸替换的人 $\gamma 1$ Fc变体。
 8. 权利要求6的融合多肽,其中,由Eu编号获得的残基P331被丝氨酸替换。
 9. 权利要求1的融合多肽,其中所述Fc区是由Eu编号获得的残基N297被另一个氨基酸替换的Fc变体。
10. 权利要求1的融合多肽,其中,所述Fc区由以下所示的氨基酸序列组成:(i) SEQ ID NO:2的残基294-525或294-524,或(ii) SEQ ID NO:13的残基294-525或294-524。
11. 权利要求1的融合多肽,其中,所述融合多肽包含以下所示的氨基酸序列:
 - (i) SEQ ID NO:2的残基19-525、19-524、25-525或25-524,
 - (ii) SEQ ID NO:13的残基19-525、19-524、25-525或25-524,
 - (iii) SEQ ID NO:22的残基19-515、19-514、25-515或25-514,
 - (iv) SEQ ID NO:26的19-520、19-519、25-520或25-519,或者
 - (v) SEQ ID NO:24的残基19-535、19-534、25-535或25-534。
12. 权利要求1的融合多肽,进一步包含位于所述Fc区的羧基末端的第二多肽区段,其中,所述第二多肽区段选自下组:RNA酶和对氧磷酶,其中所述融合多肽从氨基末端位置至羧基末端位置包含ApoA1-L1-D-L2-P,其中:
ApoA1、L1和D如权利要求1所定义;
L2是由SEQ ID NO: 4的残基526-543中所示的氨基酸序列组成第二多肽接头;并且P是第二多肽区段。
13. 权利要求12的融合多肽,其中,所述Fc区是人Fc区。
14. 权利要求13的融合多肽,其中,所述Fc区是人 $\gamma 1$ Fc区或人 $\gamma 3$ Fc区。
15. 权利要求13的融合多肽,其中,所述Fc区是其中由Eu编号获得的残基C220被丝氨酸替换的人 $\gamma 1$ Fc变体。
16. 权利要求15的融合多肽,其中,由Eu编号获得的残基C226和C229各自被丝氨酸替换。
17. 权利要求16的融合多肽,其中,由Eu编号获得的残基P238被丝氨酸替换。
18. 权利要求14的融合多肽,其中,所述Fc区是其中由Eu编号获得的残基P331被丝氨酸替换的人 $\gamma 1$ Fc变体。

19. 权利要求17的融合多肽,其中,由Eu编号获得的残基P331被丝氨酸替换。
20. 权利要求12的融合多肽,其中所述Fc区是由Eu编号获得的残基N297被另一个氨基酸替换的Fc变体。
21. 权利要求12的融合多肽,其中,所述Fc区由SEQ ID NO:2的残基294-525或SEQ ID NO:13的残基294-525中所示的氨基酸序列组成。
22. 权利要求12的融合多肽,其中,所述第二多肽区段是RNA酶。
23. 权利要求22的融合多肽,其中,所述RNA酶由SEQ ID NO:4的残基544-675中所示的氨基酸序列组成。
24. 权利要求22的融合多肽,其中,所述融合多肽包含以下所示的氨基酸序列:
- (i) SEQ ID NO:4的残基19-675或25-675或
 - (ii) SEQ ID NO:14的残基19-675或25-675。
25. 权利要求12的融合多肽,其中,所述第二多肽区段是对氧磷酶。
26. 权利要求25的融合多肽,其中,所述对氧磷酶由SEQ ID NO:12的残基16-355、SEQ ID NO:42的残基16-355或SEQ ID NO:44的残基16-355中所示的氨基酸序列组成。
27. 权利要求25的融合多肽,其中,所述融合多肽包含以下所示的氨基酸序列:
- (i) SEQ ID NO:28的残基19-883或25-883,
 - (ii) SEQ ID NO:38的残基19-873或25-873,
 - (iii) SEQ ID NO:46的残基19-883或25-883,或者
 - (iv) SEQ ID NO:48的残基19-883或25-883。
28. 一种包含第一融合多肽和第二融合多肽的二聚体蛋白,其中,所述第一和第二融合多肽中的每一者都是如权利要求1-27中任一项所定义的融合多肽。
29. 一种编码权利要求1-27中任一项的融合多肽的多核苷酸。
30. 一种表达载体,所述表达载体包含以下可操作地连接的元件:
- 转录启动子;
- 编码权利要求1-27中任一项的融合多肽的DNA区段;以及
- 转录终止子。
31. 一种已经引入权利要求30的表达载体的培养细胞,其中,所述细胞表达了DNA区段。
32. 一种制备融合多肽的方法,所述方法包括:
- 对已经引入权利要求30的表达载体的细胞进行培养,其中,所述细胞表达所述DNA区段,并且产生了所述编码的融合多肽;并且
- 回收所述融合多肽。
33. 一种制备二聚体蛋白的方法,所述方法包括:
- 对已经引入权利要求30的表达载体的细胞进行培养,其中,所述细胞表达所述DNA区段,并且产生了所述编码的融合多肽而作为二聚体蛋白;并且
- 回收所述二聚体蛋白。
34. 一种组合物,所述组合物包括:
- 权利要求1-27中任一项的融合多肽;以及
- 药学上可接受的载体。
35. 一种组合物,所述组合物包括:

权利要求28的二聚体蛋白;以及
药学上可接受的载体。

36. 权利要求1-27中任一项的融合多肽或权利要求28的二聚体蛋白用于制备用于治疗以动脉粥样硬化为特征的心血管疾病的药物的用途。

37. 权利要求36的用途,其中,所述心血管疾病选自于由冠心病和中风组成的组。

38. 权利要求37的用途,其中,所述冠心病以急性冠脉综合征为特征。

39. 权利要求1-27中任一项的融合多肽或权利要求28的二聚体蛋白用于制备用于治疗神经退行性疾病的药物的用途,所述神经退行性疾病选自由阿尔茨海默病和多发性硬化症组成的组。

40. 权利要求25-27中任一项的融合多肽或由所述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白用于制备用于治疗神经退行性疾病的药物的用途,所述神经退行性疾病选自由阿尔茨海默病和多发性硬化症组成的组。

41. 权利要求1-27中任一项的融合多肽或权利要求28的二聚体蛋白用于制备用于治疗自身免疫性疾病的药物的用途,所述自身免疫性疾病选自于由类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症和1型糖尿病组成的组。

42. 权利要求1-27中任一项的融合多肽或权利要求28的二聚体蛋白用于制备用于治疗炎性疾病的药物的用途,所述炎性疾病选自下组:类风湿性关节炎,系统性红斑狼疮,多发性硬化症,2型糖尿病,和肥胖症。

43. 权利要求1-27中任一项的融合多肽或权利要求28的二聚体蛋白用于制备用于治疗炎症性肺部疾病的药物的用途,所述炎症性肺部疾病选自下组:哮喘和特发性肺纤维化。

44. 权利要求22-24任一项中的融合多肽或由所述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白用于制备用于治疗炎症性肺部疾病的药物的用途,所述炎症性肺部疾病选自下组:哮喘、特发性肺纤维化以及急性呼吸窘迫综合征。

45. 权利要求25-27任一项中的融合多肽或由所述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白用于制备用于治疗炎症性肺部疾病的药物的用途,所述炎症性肺部疾病选自下组:哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、支气管扩张和特发性肺纤维化。

46. 权利要求25-27任一项中的融合多肽或由所述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白用于制备用于治疗感染性疾病的药物的用途,所述感染性疾病以铜绿假单胞菌感染为特征。

47. 权利要求25-27中任一项的融合多肽或由所述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白用于制备用于处理暴露于硫芥子气或有机磷酸酯的药物的用途。

48. 权利要求1至27中任一项的融合多肽或权利要求28的二聚体蛋白用于制备用于治疗癌症的药物的用途,所述癌症选自下组:恶性黑素瘤、肺癌和卵巢癌。

49. 权利要求48的用途,其中,所述癌症治疗是组合疗法。

50. 权利要求49的方法,其中,所述组合疗法包含非ApoA1介导的免疫调节疗法。

51. 权利要求50的用途,其中,所述非ApoA1介导的免疫调节疗法包括抗PD-1/PD-L1疗法、抗-CTLA-4疗法或两者。

52. 权利要求49的用途,其中,所述组合疗法包括放射疗法。

53. 权利要求49的用途,其中,所述组合疗法包括化学疗法。

54. 权利要求49的用途,其中,所述组合疗法包括靶向疗法。

APOA-1融合多肽及相关组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年9月8日提交的美国临时专利申请号62/215,256的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表的引用

[0004] 本申请含有一份已经以ASCII格式经由EFS-Web提交的序列表,并且通过引用将其全部内容并入本文。创建于2016年8月31日的所述ASCII副本被命名为“TRP_0110PC_20160831_Seq_Listing_ST25”,并且大小为161,132字节。

背景技术

[0005] 载脂蛋白A-I (ApoA-1) 和高密度脂蛋白 (HDL)

[0006] 在许多国家中心血管疾病是死亡的主要原因,导致全世界每年约有1670万人死亡。心血管疾病最常见的后果是心肌梗塞和中风,这是动脉粥样硬化的常见的潜在病因。

[0007] 自二十世纪七十年代以来的流行病学研究表明,低水平的高密度脂蛋白 (HDL) 与心肌梗塞风险增加是有关联的。这导致了针对HDL的新疗法的多种方式(参见Kingwell等人,Nature Reviews Drug Discovery 13:445-64,2014),并达成共识认为胆固醇逆向转运(RCT)的过程是有益的HDL活动的中心,而不是简单地在没有RCT的情况下增加HDL。例如,在目前的临床试验中,通过用胆固醇酯转运蛋白 (CETP) 抑制剂抑制RCT来增加HDL的药物尚未有效。此外,近来已经认识到,HDL的测量水平不足以确定其在患者中的功能,因为HDL受到氧化和糖化的损伤,包括在化疗期间以及在患有神经退行性疾病的患者中。参见Keeney等人,Proteomics Clin Appl.7:109-122,2013。

[0008] 载脂蛋白A-1 (ApoA-1) 是HDL的主要蛋白组分。Phillips, Journal of Lipid Research 54:2034-2048,2013。人ApoA-1是一种243个氨基酸的蛋白质,具有跨越残基44-243的一组八个22聚体和两个11聚体两亲性 α -螺旋。Lund-Katz和Phillips, Subcell Biochem.51:183-227,2010。分子的氨基末端三分之二处的螺旋形成了螺旋束结构,而羧基末端区域形成了对于脂质结合很重要的单独的、相对无序的结构域。C末端片段与脂质的相互作用诱导ApoA-1结构的构象变化,从而增加分子的 α -螺旋含量并使得N末端螺旋束随后打开。参见,同前。ApoA-1的脂质亲和力赋予了类似洗涤剂的性质,并且其可以溶解磷脂以形成包含一段磷脂双分子层和两个ApoA-1分子的盘状HDL颗粒,这两个ApoA-1分子以反平行、双带构型排列在盘的边缘的周围。Phillips, 同上。构象适应性ApoA-1还赋予HDL颗粒(包括不同大小的盘状颗粒以及球形HDL颗粒)稳定性。参见,同前。这些特征使得ApoA-1能够与ABCA1配合,介导细胞磷脂和胆固醇的外流以及稳定的HDL颗粒的产生。参见Phillips, 同上;Lund-Katz和Phillips, 同上。

[0009] 由于其在HDL颗粒形成和功能中的重要作用,ApoA-1已经成为几种HDL靶向治疗策略的焦点。然而,包括了增加ApoA-1合成的烟酸和贝特类的药物也降低VLDL的浓度,并因此对HDL是特异性的。烟酸的临床试验由于缺乏效力而停止,而在荟萃分析(meta-analysis)中发现激活过氧化物增殖物激活受体 (PPAR) 的贝特类导致了主要心血管事件减少10% (p

<0.05),冠状动脉事件减少13% (p<0.0001)。参见Jun等人,Lancet 375:1875,2010。因为需要更有效的疗法,在临床前开发中还有其他几种口服活性药物可以增加ApoA-1。参见Kingwell等人,同上。

[0010] 增加ApoA-1的可替代的方法是直接注射纯化的蛋白质。参见例如Kingwell等人,Circulation 128:1112,2013。已经从人血浆(重构的HDL)中纯化了ApoA-1并在临床试验中进行了测试。重组ApoA-1也在细菌和哺乳动物表达系统中表达,并在临床试验中进行测试。这些研究已经表明,在小型(47-60名患者)临床试验之后,如通过血管内超声(IVUS)测量的,将用磷脂重构的ApoA-1注入到前 β -HDL中导致了斑块体积的减少和斑块形态的改善。虽然有希望,但使用天然或重组ApoA-1有一些局限性,包括由于较短的ApoA-1半衰期而需要每周给药以及较高的生产成本。

[0011] 高度活跃的ApoA-1突变体重组ApoA-1 Milano在细菌细胞中表达,并且在急性冠脉综合征患者的临床试验中进行测试(参见Nissen等人,JAMA 290:2292,2003),其中可见斑块体积减少。虽然这项研究被认为是对HDL的假设进行直接测试和确认的第一个研究,但由于低表达水平和高制造成本而对于在细菌系统中产生的ApoA-1尚未取得进展。在哺乳动物细胞中产生的重组ApoA-1在临床试验中取得了进一步的进展,包括最近完成的II期研究。由Cerenis Therapeutics开发的CER-001是由哺乳动物细胞产生并与特定脂质配制形成前 β 样HDL颗粒的重组ApoA-1。据Cerenis介绍,在MODE试验(NCT01412034)中,在家族性高胆固醇血症患者中,CER-001达到了通过MRI测量的颈动脉斑块体积减少的主要目的。在CHI-SQUARE试验(NCT01201837)中,Cerenis宣布在急性冠脉综合征患者中CER-001与基线水平相比减少了斑块体积,但是与安慰剂相比则这种减少并不显著。

[0012] 在另一项对恒河猴的研究中,每隔一天以相对较高的剂量(30、100和300mg/kg)给予用脂质(POPC)重构的ApoA-1 Milano,输注21次。Kempen等人,J.Lipid.Res.54:2341-2353,2013。药物输注迅速降低了内源性胆固醇酯化率,由于缺乏LCAT活化而使较大的ApoE富集颗粒的形成增加,并且由于持续刺激ABCA1介导的外流而引起游离胆固醇的大量增加。参见,同前。这些结果显示,在不能通过正常的代谢途径来进行处理的情况下,输注大量重构ApoA-1 Milano通过增强胆固醇外流而破坏HDL代谢。

[0013] 虽然HDL输注疗法的前景非常有希望,但是仍需要克服了目前方法的一些局限性的改进的重组ApoA-1分子。已经产生了几种重组ApoA-1融合蛋白,包括在具有His标签的细菌中产生的ApoA-1以简化纯化。参见例如Prieto等人,Protein J.31:681-688,2012;Ryan等人,Protein Expr.Purif.27:98-103,2003。在另一个实施例中,IFN α 通过3aa(Gly Ala Pro)接头连接到ApoA-1的氨基末端。参见Fioravanti等人,J.Immunol.188:3988-3992,2012。这种构建体中的接头是通过对限制性内切酶进行选择而形成的,并且通过腺病毒递送来测试融合蛋白以靶向肝脏并降低IFN α 疗法的毒性。ApoA-1也已经与Fc结构域(ApoA-1-Ig)融合,并且可以从Creative Biomart(cat.No.APOA-1-33H)和Life Technologies(Cat#10686-H02H-5)进行商购。然而,这种ApoA-1-Ig分子具有非常低的功能活性(见实施例1)。

[0014] 另外的重组ApoA-1融合蛋白包括抗CD20 scFv-ApoA-1(Crosby等人,Biochem.Cell Biol.10:1139/bcb,2015)、IL-15-ApoA-1(Ochoa等人,Cancer Res.73:139-149,2013)、以及通过添加人四连蛋白的三聚化结构域而制备的三聚体ApoA-1融合蛋白(Graversen等人,J.Cardiovascular Pharmacol.51:170-77,2008)。在这些实施例中,融合

是在ApoA-1的N末端。

[0015] 三聚体四连蛋白-ApoA-1 (TN-ApoA-1) 在逆向胆固醇外流方面是有效的,并且其在小鼠中的半衰期增加至12小时,相比于单体ApoA-1的三小时。参见Gaversen等人,同上。在侵袭性动脉粥样硬化模型(喂食高脂饮食的LDLR-/-小鼠)中,三聚体TN-ApoA-1减缓了主动脉根部病变的进展。参见,同前。然而,最近在非人类灵长类动物中的研究显示,脂化TN-ApoA-1的多次输注耐受性不好,并且导致高免疫原性和脂质积聚。参见Regeness-Lechner等人,Toxicological Sciences 150:378-89,2016。三聚体融合蛋白与磷脂复合,并且每四天一次以100mg/kg和400mg/kg的浓度注射三周,随后是六周的恢复期。多次输注脂化TN-ApoA-1之后,临床病症恶化,并且伴随有表明进行性炎症应答、细胞因子、C反应蛋白水平增加、以及多个组织中的血管/血管周围浸润的变化。在接受脂化TN-ApoA-1的所有动物中都发生了抗药物抗体的快速形成。参见,同前。三聚体TN-ApoA-1在治疗动物组织中的积聚类似于在N末端附近具有突变的患者体内的原纤维形成和ApoA-1沉积。参见Mizuguchi等人,J.Biol.Chem.290:20947-20959,2015;Das等人,J.Mol.Biol.2015.10.029;Obici等人,Amyloid 13:191-205,2006。

[0016] ApoA-1在临床开发中的当前形式需要在输注之前将特定的脂质配制成前β样HDL颗粒,因为在不存在脂质的情况下ApoA-1的半衰期非常短。参见Nanjee等人,Arterioscler Thromb Vasc Biol 16:1203-1214,1996(示出无脂质ApoA-1在推注或缓慢输注到人体中之后仅具有2-2.3小时的半衰期)。在脂质配制之后,半衰期增加至约48小时,所以仍然需要频繁(每周)施用。

[0017] ApoA-1疗法在改善胰岛素敏感度和葡萄糖摄取方面也显示出显著的益处(参见Drew等人,Nature Reviews Endocrinology 8:237,2012),并且可用于患有糖尿病和NASH(非酒精性脂肪性肝炎)的患者。另外,ApoA-1与β淀粉样蛋白结合,并且防止培养的海马神经元细胞中的神经毒性。参见Koldamova等人,Biochemistry 40:3553,2001;Paula-Lima等人,Int.J.Biochem.Cell Biol.41:1361,2009。此外,ApoA-1多态性与阿尔茨海默病的风险有关,并且发现ApoA-1在神经退行性障碍患者中的水平降低。参见Keeney等人,Proteomics Clin.Appl.109:122,2013。

[0018] ApoA-1疗法的功效已经在癌症动物模型中得到证实。一项研究检查了ApoA-1输注对小鼠肿瘤生长的影响。参见Zamanian-Daryoush等人,J.Biol.Chem.288:21237-21252,2013。Zamanian-Daryoush等人发现,ApoA-1在多种同基因肿瘤模型(包括B16F10L恶性黑素瘤和Lewis肺癌)中有效地抑制肿瘤生长和转移。ApoA-1的作用是由于免疫应答的调节。髓源性抑制细胞(MDSC)在肿瘤中的募集和扩增被抑制。还有对肿瘤血管生成和基质降解蛋白酶MMP-9的抑制。相反,ApoA-1疗法增加了CD11b巨噬细胞,并且增加了IFN γ 、IL-12b和CXCL10(Th1应答支持T细胞活化的标志物)的量。作者示出,T细胞是ApoA-1对肿瘤生长的有效抑制作用所需要的,并且ApoA-1疗法引起了肿瘤中的CD8 $^+$ T细胞的特异性增加。参见,同前。虽然Zamanian-Daryoush等人的结果是有希望的,但所述研究使用高剂量的无脂质ApoA-1来达到观察到的效果(每只小鼠每隔一天施用15mg),参见同上,这有可能是因为ApoA-1半衰期短而需要的。

[0019] 另一项癌症研究显示ApoA-1和模拟肽(L-4F,D-4F,L-5F)在卵巢癌的小鼠模型中抑制肿瘤发展。参见Su等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 107:19997-20002,2010。Su等人发

现,转基因小鼠中的ApoA-1过量表达或施用肽模拟物减少了刺激性磷脂,暗示了抑制肿瘤生长的另外的机制。参见,同前。

[0020] 研究还提示了ApoA-1在多发性硬化症(MS)的发病机制中的作用。特别是,与健康对照相比,MS患者的ApoA-1表达显示为较低,并且原发性进行性MS患者具有的血浆ApoA-1比患有其他形式的MS的患者更少。参见Meyers等人,J.Neuroimmunol.277:176-185,2014。使用实验性变应性脑脊髓炎(EAE)作为MS模型,与野生型动物相比,缺乏ApoA-1的小鼠表现出更差的临床病情和更多的神经退行性变。作者认为,增加ApoA-1水平的药物有可能是MS的治疗方法。参见,同前。另一项MS研究发现,ApoA-1启动子多态性A等位基因与ApoA-1水平升高相关,与MS患者认知表现改善相关;A等位基因携带者表现出总体上优越的认知表现并且具有整体风险降低三倍的认知障碍。参见Koutsis等人,Mult.Scler.15:174-179,2009。

[0021] 肽模拟物

[0022] ApoA-1模拟肽在许多动物疾病模型中显示出功效,并且具有使其作为有吸引力的潜在治疗剂的性质。参见例如Reddy等人,Curr.Opin.Lipidol.25:304-308,2014以及White等人,J.Lipid.Res.55:2007-2021,2014。肽4F已经在患有冠状动脉疾病的高风险患者中进行了测试。在过去几年中已经描述了抗氧化的几种ApoA-1模拟肽。虽然这些 α -螺旋肽在动物模型中显示出活性,但由于其半衰期短而需要每日给药。另外,在用肽治疗的动物中已经观察到毒性(包括肌肉毒性和高甘油三酯血症)(在用ApoA-1治疗的小鼠中已经看到了这些毒性)。描述了通过序列设计降低毒性并降低肽生产成本的进展。参见例如Bielicki,Curr.Opin.Lipidol.27:40-46,2016。另一种方法是合成D-肽,包括大量研究的D-4F肽。这些D-肽具有更长的半衰期并且可以口服给药,但是高制造成本和在组织中积聚D-肽可能会阻止这些肽通过最初的临床测试。

[0023] RNA酶

[0024] 已经研究了RNA酶作为癌症和自身免疫性疾病的疗法。对于癌症疗法,已经报道了天然的(豹蛙酶,青蛙RNA酶)以及耐受细胞质抑制剂的抑制的重组人RNA酶1(参见美国专利号8,569,457)。另外,已经报道了通过细胞毒性RNA酶(豹蛙酶)与抗肿瘤抗体的偶联而将RNA酶靶向肿瘤细胞。参见Lui等人,Mol.Cancer 13:1186,2014;Newton等人,Blood 97:528-535,2001。

[0025] 还在心血管疾病的小鼠模型中研究了RNA酶疗法。参见Simsekylmaz等,Circulation 129:598-606,2014。他们和其他人示出,细胞外RNA在血管损伤部位聚集,并且细胞外RNA导致了炎性细胞因子的产生。参见Fischer等人,Thromb.Haemost.108:730-741,2012。RNA酶疗法减少了加速心血管疾病的小鼠模型中的新内膜形成,降低了斑块巨噬细胞含量,并且在体内抑制了白细胞募集到受损的颈动脉。参见Simsekylmaz等人,同上。

[0026] 还在急性中风模型中对RNA酶疗法进行了研究,发现它可以减少梗塞面积。参见Walberer等人,Curr.Neurovasc.Res.6:12-19,2009。因此,用RNA酶1进行全身性治疗拯救了动脉血栓性闭塞的小鼠以限制脑水肿,并且在体内充当有效的抗炎治疗方案。在这些RNA酶疗法研究中,由于RNA酶1的半衰期非常短而通过使用皮下植入的渗透性微型泵连续输注来给予RNA酶。

[0027] 还在系统性红斑狼疮(SLE)的小鼠模型中对RNA酶疗法进行了研究。参见Sun等人,J.Immunol.190:2536-2543,2013。TLR7(RNA传感器)的过量表达会引起伴有自身抗体的狼

疮样疾病、肾脏疾病和早期死亡。将这些小鼠与过量表达RNA酶A作为转基因的小鼠进行杂交,导致了子代存活增加,减少了淋巴细胞活化,减少了IgG和C3的肾脏沉积,并且减少了肝脏炎症和坏死。

[0028] 细胞外单链病毒RNA在鞘内施用给小鼠后引起了广泛的神经退行性变,并且由TLR7介导神经元损伤。参见Lehmann等人,J. Immunol.189:1448-58,2012。

[0029] 将人RNA酶1与包含p238和p331突变的突变的人IgG1 Fc结构域融合的RNA酶-Ig(参见美国专利号8,937,157)由Resolve Therapeutics在患有系统性红斑狼疮(SLE)的患者中进行临床开发。

[0030] 对氧磷酶

[0031] 人对氧磷酶1(PON1)是具有高效酯酶活性并能够水解有机磷酸酯的脂肪内酯酶。PON1防止LDL和细胞膜氧化,并且被认为是具有动脉保护性的。PON1仅仅与HDL相关并有助于HDL的抗氧化功能。参见例如Mackness等人,Gene 567:12-21,2015。HDL-PON1活性的降低存在于多种炎性疾病中,其中PON1活性的丧失导致了可能促进炎症和动脉粥样硬化的功能障碍的HDL。参见例如Eren等人,Cholesterol.792090 doi 10.1155/2013/792090,2013。PON1活性在阿尔茨海默病和其他痴呆患者中也下降,提示PON1可能具有神经保护作用。参见Menini等人,Redox Rep.19:49-58,2014。

[0032] PON1在多种动物模型中显示出保护性活性。人类PON1的过量表达抑制了伴有瘦素和LDL受体缺陷的小鼠(一种代谢综合征模型)中的动脉粥样硬化的发展。参见Mackness等人,Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.26:1545-50,2006。

[0033] 在另一项研究中,在STZ诱导的糖尿病之前向小鼠注射重组PON1导致了糖尿病发病率降低和较高的血清胰岛素水平。与PON1同时添加HDL对胰岛素对于分泌具有累加效应。参见Koren-Gluser等人,Atherosclerosis 219:510-518,2011。

[0034] 在另一项研究中,使用含有蛋白转导结构域(PTD)的PON1融合蛋白将PON1转导到细胞和组织中。PON1转导在体外保护小胶质细胞免受氧化应激诱导的炎症反应,并且在帕金森病模型中防止多巴胺能神经元细胞死亡。参见Kim等人,Biomaterials 64:45-56,2015。

[0035] 在另一项研究中,将重组PON1施用于胆固醇质量显著降低和胆固醇生物合成速率受到抑制的小鼠,这可能导致动脉粥样硬化的减弱。参见Rosenblat等人,Biofactors 37:462-467,2011。

[0036] 在另一项研究中,给予小鼠重组腺病毒PON1或PON3,并且两者均显示出保护免于CC1(4)诱导的肝损伤。人PON1或人PON3的过量表达减少了肝脏氧化应激,并且增强了肝脏中的抗氧化能力。参见Peng等人,Toxicol.Lett.193:159-166,2010。

[0037] 在另一项研究中,PON1与Fc结构域的C末端融合,并且使用抗人胰岛素受体(HIR)的抗体而被表达为双特异性分子。这种被称为HIRMAb-PON1的分子在CHO细胞中表达后稳定,并且在恒河猴中显示出具有高血脑屏障渗透性但被肝脏迅速清除。参见Boado等人,Biotechnol.Bioeng.108:186-196,2011。

[0038] 血小板活化因子乙酰水解酶

[0039] 血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)是LDL和HDL相关酶,其水解磷脂的短链酰基(如血小板活化因子和氧化的磷脂)以降低其炎症特性。参见Watson等人,

J.Clin.Invest.95:774-782,1995;Stafforini,Cardiovasc.Drugs Ther.23:73-83,2009。已报道了采用PAF-AH通过腺病毒介导的基因递送的疗法,以缓解大鼠模型的蛋白尿和肾小球硬化症。参见Iso-O等人,Molecular Therapy 13:118-126,2006。PAF-AH还增强了大鼠的对乙酰氨基酚中毒后的肝脏恢复,并且PAF与高剂量对乙酰氨基酚的肝脏毒性相关。参见Grypioti等人,Dig.Dis.Sci.52:2580-2590,2007;Grypioti等人,Dig.Dis.Sci.53:1054-1062,2008。PAF-AH中的导致功能丧失的突变存在于4%的日本人中,并且发现PAF-AH是这些个体的心血管疾病和中风的独立危险因素。参见Blankenberg等人,J.Lipid Res.44:1381-1386,2003。在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者和脓毒症患者的III期临床试验中测试了重组PAF-AH。参见Karabina等人,Biochim.Biophys.Acta 1761:1351-1358,2006。

[0040] 胆固醇酯转移蛋白

[0041] 胆固醇酯转运蛋白(CETP)将胆固醇酯从高密度脂蛋白(HDL)转运至低密度和极低密度脂蛋白(LDL和VLDL)。已经在临床试验中开发和测试了许多CETP抑制剂。Torecetrapib是第一种进入后期临床试验的CETP抑制剂,并且显示出对血浆脂蛋白水平有显著影响,从而提高了抗动脉粥样硬化的HDL胆固醇水平,同时降低了促进动脉粥样硬化的LDL胆固醇水平。Torecetrapib深入地结合在CETP内,并且使疏水通道的N末端口袋中的结合的胆固醇酯移动并使磷脂从口袋中移位。参见Liu等人,J.Biol.Chem.287:37321-37329,2012。CETP抑制剂可用于心血管疾病治疗的最初希望尚未实现;四种抑制剂已达到后期临床试验,但是未能显示出减少心血管事件。参见Kosmas等人,Clinical Medical Insights:Cardiology 2016:10 37-42 doi:10.4137/CMC.S32667。

[0042] 出现了CETP抑制剂和心血管疾病的替代观点。参见例如Miller,F100 Research 3:124,2014。有越来越多的证据表明CETP的保护作用。例如,现在多项人体研究显示出心血管疾病与CETP水平呈负相关。另外,肝脏分泌减少的CETP等位基因与心肌梗塞的风险增加相关。参见Miller,同上。CETP抑制剂增加HDL胆固醇水平并因此有利于减少心血管疾病的最初想法可能是不正确的。高密度脂蛋白胆固醇因为其脂质转运功能而有可能是有益的,并且CETP介导的胆固醇酯从HDL转移到LDL和VLDL是这种功能的重要组成部分。

发明内容

[0043] 一方面,本发明提供了从氨基末端位置到羧基末端位置包含ApoA1-L1-D的融合多肽,其中ApoA1是具有胆固醇外流活性的第一多肽区段并且选自于(i)包含与SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-267、25-267或1-267具有至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列的多肽以及(ii)ApoA-1模拟物;L1是第一多肽接头;并且D是二聚化结构域。在某些实施方案中,L1包含至少两个氨基酸残基、至少三个氨基酸残基或至少16个氨基酸残基。例如,在具体变化中,L1由从2个至60个氨基酸残基、从3个至60个氨基酸残基、从5个至40个氨基酸残基、从15个至40个氨基酸残基或从16个至36个氨基酸残基组成。在更具体的变化中,L1由16个氨基酸残基、21个氨基酸残基、26个氨基酸残基、31个氨基酸残基或36个氨基酸残基组成;在一些此类实施方案中,L1具有以下各项中所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:22的残基268-283、SEQ ID NO:26的残基268-288、SEQ ID NO:2的残基268-293、SEQ ID NO:54、或SEQ ID NO:24的残基268-303。在某些实施方案中,第一多肽区段包含SEQ ID NO:2的残基19-267或25-267中所示的氨基酸序列。

[0044] 在上述的融合多肽的一些实施方案中,D是免疫球蛋白重链恒定区,例如像免疫球蛋白Fc区。在二聚化结构域是免疫球蛋白Fc区的某些实施方案中,Fc区是人Fc区,例如像相对于野生型人序列包含一个或多个氨基酸取代的人Fc变体。特别合适的Fc区包括人 γ 1和 γ 3Fc区。在一些变化中,Fc区是其中Eu残基C220被丝氨酸替换的人 γ 1Fc变体;在一些此类实施方案中,Eu残基C226和C229各自被丝氨酸替换,和/或Eu残基P238被丝氨酸替换。在包含上述Fc区的其他变化中,Fc区是其中Eu残基P331被丝氨酸替换的人 γ 1Fc变体。Fc变体可以包括相对于野生型人类序列降低了糖基化的氨基酸取代;在一些此类实施方案中,Eu残基N297被另一种氨基酸替换。在包含上述Fc区的其他变化中,Fc区是包含增加或降低与Fc受体的结合亲和力的氨基酸取代的Fc变体(例如增加了或降低了与Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII中的至少一个的结合亲和力的氨基酸取代)。在某些实施方案中,Fc变体包括增加或降低对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力的氨基酸取代。合适的Fc区包括:(i)包含SEQ ID NO:2的残基294-525或294-524中所示的氨基酸序列的Fc区,以及(ii)包含SEQ ID NO:13的残基294-525或294-524中所示的氨基酸序列的Fc区。

[0045] 在上述融合多肽的某些实施方案中,融合多肽包含与以下各项具有至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列:(i)SEQ ID NO:2的残基19-525、19-524、25-525或25-524,(ii)SEQ ID NO:13的残基19-525、19-524、25-525或25-524,(iii)SEQ ID NO:20的残基19-501、19-500、25-501或25-501,(iv)SEQ ID NO:22的残基19-515、19-514、25-515或25-514,(v)SEQ ID NO:26的残基19-520、19-519、25-520或25-519,或者(vi)SEQ ID NO:24的残基19-535、19-534、25-535或25-534。在更具体的变化中,融合多肽包含以下所示的氨基酸序列:(i)SEQ ID NO:2的残基19-525、19-524、25-525或25-524,(ii)SEQ ID NO:13的残基19-525、19-524、25-525或25-524,(iii)SEQ ID NO:20的残基19-501、19-500、25-501或25-501,(iv)SEQ ID NO:22的残基19-515、19-514、25-515或25-514,(v)SEQ ID NO:26的残基19-520、19-519、25-520或25-519,或者(vi)SEQ ID NO:24的残基19-535、19-534、25-535或25-534。

[0046] 在上述融合多肽的一些实施方案中,融合多肽进一步包含位于二聚化结构域的羧基末端的第二多肽区段。在具体的变化中,第二多肽区段是RNA酶、对氧磷酶、血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)、胆固醇酯转运蛋白(CETP)、卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)、或特异性结合 β 淀粉样蛋白($\text{A}\beta$)的多肽,例如像 $\text{A}\beta$ 特异性scFv。包含上述第二多肽区段的融合多肽可以由式ApoA1-L1-D-L2-P(从氨基末端位置到羧基末端位置)表示,其中ApoA1、L1和D各自定义如上所述,其中L2是第二多肽接头并可选地存在,并且其中P是第二多肽区段。在存在L2的融合多肽的一些实施方案中,L2具有SEQ ID NO:4的残基526-541中所示的氨基酸序列。

[0047] 另一方面,本发明提供了一种融合多肽,所述融合多肽包含具有胆固醇外流活性、并且选自于(i)包含与SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-267或25-267具有至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列的多肽和(ii)ApoA-1模拟物的第一多肽区段,以及位于第一多肽区段的羧基末端的第二多肽区段,其中所述第二多肽区段选自于RNA酶、对氧磷酶、血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)、胆固醇酯转运蛋白(CETP)、卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)以及与 β 淀粉样蛋白特异性结合的多肽(例如 $\text{A}\beta$ 特异性scFv)。在一些实施方案中,第一多肽区段具有SEQ ID NO:2的残基19-267或25-267中所示的氨基酸序列。在一些变化中,

融合多肽进一步包括位于第一多肽区段的羧基末端和第二多肽区段的氨基末端的接头多肽。在一些实施方案中,融合多肽进一步包含二聚化结构域。

[0048] 在包含RNA酶作为第二多肽区段的上述融合多肽的一些实施方案中,所述RNA酶是人RNA酶1或其功能变体或片段。在某些实施方案中,RNA酶与SEQ ID N0:4的氨基酸残基542-675具有至少90%或至少95%的同一性。在具体的变化中,RNA酶具有SEQ ID N0:4的残基542-675所示的氨基酸序列。在包含RNA酶并具有上述式ApoA1-L1-D-L2-P的融合多肽的具体实施方案中,融合多肽包含与以下各项具有至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列:(i) SEQ ID N0:4的残基19-675或25-675,或(ii) SEQ ID N0:14的残基19-675或25-675;在一些此类实施方案中,融合多肽包含以下所示的氨基酸序列:(i) SEQ ID N0:4的残基19-675或25-675,或(ii) SEQ ID N0:14的残基19-675或25-675。

[0049] 在包含对氧磷酶作为第二多肽区段的上述融合多肽的一些实施方案中,对氧磷酶是人对氧磷酶1(PON1)或其功能变体。在某些实施方案中,对氧磷酶与SEQ ID N0:12的氨基酸残基16-355、SEQ ID N0:42的氨基酸残基16-355、或SEQ ID N0:44的氨基酸残基16-355具有至少90%或至少95%的同一性。在特定的变化中,对氧磷酶包含SEQ ID N0:12的残基16-355、SEQ ID N0:42的残基16-355或SEQ ID N0:44的残基16-355中所示的氨基酸序列。在包含对氧磷酶并具有上述式ApoA1-L1-D-L2-P的融合多肽的具体实施方案中,所述融合多肽包含与以下各项具有至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列:(i) SEQ ID N0:28的残基19-883或25-883,(ii) SEQ ID N0:38的残基19-873或25-873,(iii) SEQ ID N0:46的残基19-883或25-883,或(iv) SEQ ID N0:48的残基19-883或25-883;在一些此类实施方案中,融合多肽包含以下所示的氨基酸序列:(i) SEQ ID N0:28的残基19-883或25-883,(ii) SEQ ID N0:38的残基19-873或25-873,(iii) SEQ ID N0:46的残基19-883或25-883,或(iv) SEQ ID N0:48的残基19-883或25-883。

[0050] 在上述包含血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)作为第二多肽区段的融合多肽的一些实施方案中,血小板活化因子乙酰水解酶是人PAF-AH或其功能变体。在某些实施方案中,血小板活化因子乙酰水解酶与SEQ ID N0:32的氨基酸残基22-441具有至少90%或至少95%的同一性。在特定的变化中,对氧磷酶包含SEQ ID N0:32的残基22-441中所示的氨基酸序列。在包含血小板活化因子乙酰水解酶并具有上述式ApoA1-L1-D-L2-P的融合多肽的具体实施方案中,所述融合多肽包含与SEQ ID N0:34的残基19-963或25-963具有至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列;在一些此类实施方案中,融合多肽包含SEQ ID N0:34的残基19-963或25-963中所示的氨基酸序列。

[0051] 在包含胆固醇酯转运蛋白(CETP)作为第二多肽区段的上述融合多肽的一些实施方案中,胆固醇酯转运蛋白是人CETP或其功能变体。在某些实施方案中,胆固醇酯转运蛋白与SEQ ID N0:30的氨基酸残基18-493具有至少90%或至少95%的同一性。在特定的变化中,胆固醇酯转运蛋白包含SEQ ID N0:30的残基18-493中所示的氨基酸序列。在包含血小板活化因子乙酰水解酶并具有上述式ApoA1-L1-D-L2-P的融合多肽的具体实施方案中,所述融合多肽包含与SEQ ID N0:40的残基19-1019或25-1019具有至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列;在一些此类实施方案中,融合多肽包含SEQ ID N0:40的残基19-1019或25-1019中所示的氨基酸序列。

[0052] 在如上所述的融合多肽的某些实施方案中,融合多肽与髓过氧化物酶(MPO)抑制

剂连接。

[0053] 另一方面,本发明提供了包含第一融合多肽和第二融合多肽的二聚体蛋白,其中所述第一和第二融合多肽中的每一个都是如上所述的包含二聚化结构域的融合多肽。

[0054] 另一方面,本发明提供了编码如上所述的融合多肽的多核苷酸。

[0055] 另一方面,本发明提供了包含以下可操作地连接的元件的表达载体:转录启动子(编码如上所述的融合多肽的DNA区段),以及转录终止子。还提供了一种已经引入了如上所述的表达载体的培养细胞,其中,所述细胞表达了DNA区段。

[0056] 另一方面,本发明提供了一种用于制备融合多肽的方法。所述方法通常包括对已经引入了如上所述的表达载体的细胞进行培养,其中所述细胞表达DNA区段并产生了编码的融合多肽,并且回收融合多肽。

[0057] 另一方面,本发明提供了一种制备二聚体蛋白的方法。所述方法通常包括对已经引入了如上所述表达载体的细胞进行培养,其中细胞表达DNA区段并且产生了编码的融合多肽而作为二聚体蛋白,并且回收二聚体蛋白。

[0058] 另一方面,本发明提供了包含如上所述的融合多肽和药学上可接受的载体的组合物。

[0059] 另一方面,本发明提供了包含如上所述的二聚体蛋白和药学上可接受的载体的组合物。

[0060] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗以动脉粥样硬化为特征的心血管疾病的方法。所述方法通常包括向患有心血管疾病的受试者施用有效量的如上所述的融合多肽或二聚体融合蛋白。在一些实施方案中,心血管疾病选自于由冠心病和中风组成的组。在某些变化中,冠心病的特征在于急性冠脉综合征。

[0061] 另一方面,本发明提供了用于治疗神经退行性疾病的方法。所述方法通常包括向患有神经退行性疾病的受试者施用有效量的如上所述的融合多肽或二聚体融合蛋白。在一些实施方案中,神经退行性疾病选自于由阿尔茨海默病和多发性硬化症组成的组。在某些实施方案中,神经退行性疾病的特征在于痴呆;在这样一些变化中,神经退行性疾病是阿尔茨海默病。

[0062] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗以淀粉样蛋白沉积为特征的疾病的方法。所述方法通常包括向患有以淀粉样蛋白沉积为特征的疾病的受试者施用有效量的如上所述的融合多肽或二聚体融合蛋白。在一些实施方案中,所述疾病是阿尔茨海默病。

[0063] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗自身免疫性疾病的方法。所述方法通常包括向患有自身免疫性疾病的受试者施用有效量的如上所述的融合多肽或二聚体融合蛋白。在一些实施方案中,自身免疫性疾病选自于由类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症和1型糖尿病组成的组。

[0064] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗炎性疾病的方法。所述方法通常包括向患有炎性疾病的受试者施用有效量的如上所述的融合多肽或二聚体融合蛋白。在一些实施方案中,炎性疾病选自下组:类风湿性关节炎,系统性红斑狼疮,多发性硬化症,1型糖尿病,2型糖尿病,肥胖症,非酒精性脂肪性肝炎,冠心病,以及中风。在其他实施方案中,炎性疾病是炎症性肺部疾病,例如像哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、支气管扩张症、特发性肺纤维化、高氧症、缺氧或急性呼吸窘迫综合征。

[0065] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗感染性疾病的方法。所述方法通常包括向患有感染性疾病的受试者施用有效量的如上所述的融合多肽或二聚体融合蛋白。在某些实施方案中,感染性疾病以细菌感染为特征;在一些此类实施方案中,细菌感染是铜绿假单胞菌感染。

[0066] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗肾病综合征(NS)的方法。所述方法通常包括向具有肾病综合征的受试者施用有效量的如上所述的融合多肽或二聚体融合蛋白。在具体变化中,受试者的肾病综合征与选自下组的疾病有关联:原发性肾病(例如微小病变肾病、局灶性肾小球硬化、膜性肾病或IgA肾病),淀粉样变性,系统性红斑狼疮,1型糖尿病,以及2型糖尿病。

[0067] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗暴露于硫芥子气或有机磷酸盐的方法。所述方法通常包括向暴露于硫芥子气或有机磷酸盐的受试者施用有效量的如上所述的融合多肽或二聚体融合蛋白。

[0068] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗癌症的方法。所述方法通常包括向患有癌症的受试者施用有效量的如上所述的融合多肽或二聚体融合蛋白。在一些实施方案中,癌症选自下组:恶性黑素瘤,肾细胞癌,非小细胞肺癌,膀胱癌,以及头颈癌。在某些变化中,癌症治疗是组合疗法。在一些组合疗法实施方案中,组合疗法包括非ApoA1介导的免疫调节疗法,例如像包含抗PD-1/PD-L1疗法、抗CTLA-4疗法或两者的免疫调节疗法。在其他组合疗法实施方案中,组合疗法包括放射疗法或化学疗法。在一些组合疗法实施方案中,组合疗法包括靶向疗法;在一些此类实施方案中,靶向疗法包括:(i)靶向特定细胞表面或细胞外抗原(例如VEGF、EGFR、CTLA-4、PD-1或PD-L1)的治疗性单克隆抗体,或(ii)靶向例如像胞内酶(例如蛋白酶体、酪氨酸激酶、细胞周期蛋白依赖激酶、丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶B-Raf(BRAF)或MEK激酶)的细胞内蛋白的小分子。

[0069] 参考下面对本发明的详细描述,本发明的这些和其他方面将变得明显。

[0070] 定义

[0071] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与所描述的方法和组合物相关的本领域普通技术人员通常所理解的相同意义。如本文所用的,除非另外指明,否则以下术语和短语具有归于它们的含义。

[0072] 术语“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”以及“所述(the)”包括复数指示物,除非上下文另外明确指明。

[0073] “多肽”是由肽键连接的氨基酸残基的聚合物,无论是天然产生的还是合成的。小于10个左右的氨基酸残基的多肽通常被称为“肽”。

[0074] “蛋白质”是包含一个或多个多肽链的大分子。蛋白质还可以包含非肽组分,如碳水化合物基团。碳水化合物和其他非肽取代基可以通过其中产生蛋白质的细胞而被添加到所述蛋白质中,并且将随着细胞的类型而变化。蛋白质在本文中根据其氨基酸主链结构来定义;取代基(如碳水化合物基团)通常没有被指定,但可以是存在的。

[0075] 术语“氨基末端”(或“N末端”)和“羧基末端”(或“C末端”)在本文中用于表示在多肽内的位置。在上下文允许的情况下,这些术语参照多肽的特定序列或部分来表示近似位置或相对位置。例如,位于多肽内的参考序列的羧基末端的特定序列位于参考序列的羧基末端附近,但不一定位于完整多肽的羧基末端。

[0076] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文中同义地使用，并且是指从5'端至3端读取的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基的单链或双链聚合物。多核苷酸包括RNA和DNA，并且可以从天然来源中分离，在体外合成，或者由天然和合成分子的组合来制备。多核苷酸的大小被表达为碱基对(缩写“bp”)、核苷酸(“nt”)或干碱基(“kb”)。在上下文允许的情况下，后两个术语可以描述是单链的或是双链的多核苷酸。本领域普通技术人员将认识到，双链多核苷酸的两条链的长度可以略有不同，并且其末端可以由于酶促裂解而交错；因而双链多核苷酸分子内的所有核苷酸都可以是不成对的。这种不成对的末端通常长度都不会超过20nt。

[0077] “区段”是具有特定属性的较大分子(例如多核苷酸或多肽)的一部分。例如，编码特定多肽的DNA区段是较长DNA分子的一部分，如从5'至3'方向读取时编码特定多肽的氨基酸序列的质粒或质粒片段。而且，在根据本发明的融合多肽的背景下，“具有胆固醇外流活性”和“包含与SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-267或25-267具有至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列”是较长的多肽融合分子的一部分，除了具有胆固醇外流活性的特定多肽区段之外，还包括本文所述的其他多肽区段(例如(多个)接头、二聚化结构域)。

[0078] 术语“表达载体”用于表示包含编码目的多肽的区段的线性或环状的DNA分子，其可操作地连接至提供其转录的附加区段。这些附加区段包括启动子和终止子序列，并且还可以包括一个或多个复制起点、一个或多个可选择标记、增强子、聚腺苷酸化信号等。表达载体通常来源于质粒或病毒DNA，或者可以含有两者的元件。

[0079] 术语“启动子”在本文中用于其本领域公认的含义，以表示基因的含有使RNA聚合酶结合和转录起始的DNA序列的部分。启动子序列通常但不总是在基因的5'非编码区中发现。

[0080] “分泌信号序列”是编码多肽(“分泌肽”)的DNA序列，其作为较大多肽的组分，指导较大的多肽通过细胞的合成所述多肽的分泌途径。较大的多肽通常在穿过分泌途径的过程中被切割以去除分泌肽。

[0081] “可操作地连接”是指两个或更多个实体连接在一起，使得它们按照其预期目的而协同工作。当提及DNA区段时，所述短语表示例如编码序列在正确的阅读框中连接，并且转录在启动子中起始并通过(多个)编码区段行进到终止子。当提及多肽时，“可操作地连接”包括共价(例如通过二硫键)和非共价(例如通过氢键键合、疏水作用或盐桥相互作用)连接的序列，其中序列的所需(多个)功能被保留。

[0082] 术语“重组”当用于指例如一种细胞、核酸、蛋白或载体时表明该细胞、核酸、蛋白或载体已经通过导入异源核酸或蛋白或者改变天然的核酸或蛋白进行修饰，或者表明该细胞衍生自这样修饰的细胞。因此，例如，这些重组细胞表达在细胞的天然形式(非重组体)中未发现的基因或表达以其他方式异常表达的、低表达的或根本不表达的天然基因。术语“重组核酸”在本文中是指通常通过使用例如以不常见于自然界的形式存在的聚合酶和内切核酸酶来操纵核酸而最初在体外形成的核酸。以这种方式，实现了不同序列的可操作连接。因此，线性形式的分离的核酸或通过使通常不连接的DNA分子连结而在体外形成的表达载体两者都被认为是为了本文公开的目的的重组体。可以理解的是，一旦制造重组核酸并将其重新引入到宿主细胞或生物体中，其将非重组地复制，即，使用宿主细胞的体内细胞机器而不是进行体外操纵；然而，这类核酸一旦重组产生，尽管随后进行了非重组复制，但为了本文所公开的目的仍被认为是重组的。类似地，“重组蛋白质”是使用重组技术制备的蛋白质，

即通过如上所述的重组核酸的表达。

[0083] 当结合核酸部分使用时,术语“异源的”表示核酸包括在自然界中彼此未发现相同关系的两个或更多个子序列。例如,该核酸通常是重组产生的,具有例如来自所排列的无关基因的两个或更多个序列,用于制备新的功能性核酸,例如来自一个来源的启动子和来自另一个来源的编码区。类似地,当与蛋白质的部分结合使用时,“异源的”表示蛋白质包含在自然界中彼此未发现相同关系的两个或更多个子序列(例如融合多肽的两个或多个区段)。

[0084] “免疫球蛋白”是在脊椎动物生物体中起抗体作用的血清蛋白质。已经在高等脊椎动物中识别了五类“免疫球蛋白”或抗体、蛋白质(IgG、IgA、IgM、IgD和IgE)。IgG包括主要类别;其通常作为血浆中发现的第二最丰富的蛋白质而存在。在人类中,IgG由四个亚类组成,分别命名为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgG类的重链恒定区用希腊文 γ 标识。例如,IgG1亚类的免疫球蛋白含有 γ 1重链恒定区。每个免疫球蛋白重链具有由恒定区蛋白结构域(CH1、铰链、CH2和CH3)组成的恒定区,所述恒定区对于物种中的给定的亚类是基本不变的。编码人和非人免疫球蛋白链的DNA序列是本领域已知的。参见例如Ellison等人,DNA 1:11-18,1981;Ellison等人,Nuc. Acids Res. 10:4071-4079,1982;Kenten等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6661-6665,1982;Seno等人,Nuc. Acids Res. 11:719-726,1983;Riechmann等人,Nature 332:323-327,1988;Amster等人,Nuc. Acids Res. 8:2055-2065,1980;Rusconi和Kohler,Nature 314:330-334,1985;Boss等人,Nuc. Acids Res. 12:3791-3806,1984;Bothwell等,Nature 298:380-382,1982;van der Loo等人,Immunogenetics 42:333-341,1995;Karlin等人,J. Mol. Evol. 22:195-208,1985;Kindsvogel等人,DNA 1:335-343,1982;Breiner等人,Gene 18:165-174,1982;Kondo等人,Eur. J. Immunol. 23:245-249,1993;以及GenBank登录号J00228。关于免疫球蛋白结构和功能的综述,参见Putnam,The Plasma Proteins,Vol V,Academic Press,Inc.,49-140,1987;以及Padlan,Mol. Immunol. 31:169-217,1994。

[0085] “免疫球蛋白铰链”是连接CH1和CH2结构域的免疫球蛋白重链的部分。人 γ 1的铰链区大致对应于Eu残基216-230。

[0086] 如本文所用的术语“Fc片段”、“Fc区”或“Fc结构域”是同义的,并且是指负责与细胞上的抗体受体和补体C1q组分结合的免疫球蛋白的一部分(在不存在任何氨基酸改变的情况下,相对于天然存在的序列,以去除这种结合活性)。Fc代表“片段结晶”,即易于形成蛋白质晶体的抗体片段。最初通过蛋白酶解消化所描述的不同的蛋白质片段可以定义免疫球蛋白蛋白质的总体通用结构。如文献中最初定义的,Fc片段由二硫键连接的重链铰链区、CH2和CH3结构域组成。如本文所用的,所述术语还指由CH3、CH2以及至少一部分足以与第二条链形成二硫键连接的二聚体的铰链所组成的单链。如本文所用的,术语Fc区进一步包括天然存在序列的变体,其中所述变体能够形成二聚体并且包括Fc受体结合或补体结合活性增加或降低的变体。

[0087] 如本文所用的,“二聚化结构域”是指对第二多肽具有亲和力的多肽,使得两种多肽在生理条件下缔合以形成二聚体。通常,第二多肽是相同的多肽,尽管在一些变化中第二多肽是不同的。多肽可以通过(多个)共价和/或非共价缔合而相互作用。二聚化结构域的实施例包括Fc区;铰链区;CH3结构域;CH4结构域;CH1或CL结构域;亮氨酸拉链结构域(例如jun/fos亮氨酸拉链结构域,参见例如Kostelney等人,J. Immunol. 148:1547-1553,1992;

或酵母GCN4亮氨酸拉链结构域)；异亮氨酸拉链结构域；二聚细胞表面受体(例如白细胞介素-8受体(IL-8R)；或整联蛋白异二聚体,如LFA-1或GPIIIb/IIIa)的二聚化区；分泌的二聚化配体(例如神经生长因子(NGF)、神经营养因子-3(NT-3)、白细胞介素-8(IL-8)、血管内皮生长因子(VEGF)或脑源性神经营养因子(BDNF)；参见例如Arakawa等人,J.Biol.Chem.269:27833-27839,1994以及Radziejewski等人,Biochem.32:1350,1993)的二聚化区；以及包含至少一个半胱氨酸残基(例如从1个、2个或3个左右至10个左右半胱氨酸残基)的多肽,使得可以在多肽与包含至少一个半胱氨酸残基的第二多肽(以下称为“合成铰链”)之间形成二硫键。根据本发明的优选的二聚化结构域是Fc区。

[0088] 如本文所用的,术语“二聚体”或“二聚体蛋白”是指经由二聚化结构域连接在一起的如本文所公开的两种(“第一”和“第二”)融合多肽的多聚体。除非上下文清楚地指出,否则“二聚体”或“二聚体蛋白”包括在可能在球形HDL颗粒(例如三聚体)中形成的更高阶的多聚体的情况下关于此类二聚化的第一和第二融合多肽,如通过使二聚化的第一和第二融合多肽与可能存在的另一种ApoA-1多肽相互作用(例如通过与天然存在的内源性ApoA-1蛋白相互作用)。所述术语还包括在更高阶的多聚体的情况下关于二聚化的第一和第二融合多肽,其可以通过在第一或第二融合多肽中包含额外的二聚化结构域(例如包含免疫球蛋白轻链的第一融合多肽和包含免疫球蛋白重链的第二融合多肽可以经由CH1和CL结构域之间的相互作用而进行异二聚化,并且两个此类异源二聚体可以经由免疫球蛋白重链的Fc区而进一步二聚化,由此形成四聚体)。

[0089] 术语“接头”或“多肽接头”在本文中用于指示通过(多个)肽键连接并使两个分立的、分开的多肽区域连接的两个或更多个氨基酸。通常将接头设计成允许单独的多肽区域执行其单独的功能(例如像在连接到其他多肽区域的二聚化结构域与另一个二聚化结构域相连而形成二聚体的情况下)。接头可以是天然序列、其变体或合成序列的一部分。在本文中还用缩写“L”来表示接头。在本文中使用具有“L”的下标(例如“1”或“2”)来区分多肽链内的多个接头,所述接头相对于氨基酸序列可以是相同的或不同的。

[0090] 除非上下文清楚地指出,否则在本文中提及的“ApoA-1”应理解为包括天然存在的ApoA-1多肽以及其功能变体、功能片段和模拟物。“ApoA1”、“Apo A-1”、“apoA-1”和“apo A-1”在本文中与“ApoA1”同义地使用。

[0091] 除非上下文清楚地指出,否则在本文中提及“RNA酶”(例如“RNA酶1”)、“对氧磷酶”(例如“PON1”)、“血小板活化因子乙酰水解酶”(“PAF-AH”)、胆固醇酯转运蛋白(“CETP”)或“卵磷脂胆固醇酰基转移酶”(“LCAT”)被理解为包括任何前述的天然存在的多肽以及其功能变体和功能片段。

[0092] 术语“等位基因变体”在本文中用于表示占据相同染色体位点的基因的两种或更多种替代形式中的任一种。等位基因变异通过突变而天然产生,并且可能导致种群体内表型多态性。基因突变可以是沉默的(在编码的多肽方面无变化)或可以编码具有改变的氨基酸序列的多肽。术语等位基因变体在本文中还用于表示由基因的等位基因变体编码的蛋白质。

[0093] 本公开的ApoA-1融合多肽在本文中被称为下式,例如像“ApoA1-L1-D”、“ApoA1-L1-D-L2-P”、“ApoA1-L1-[Fc区]”、“ApoA1-L1-D-L2-RNA酶”、“ApoA1-L1-[Fc区]-L2-RNA酶1”、“ApoA1-L1-D-L2-对氧磷酶”或“ApoA1-L1-[Fc区]-L2-PON1”。在每种这样的情况下,除

非上下文另有明确说明,否则涉及融合多肽的特定区段(例如“*ApoA1*”、“*D*”(用于二聚化结构域)、“*L1*”(用于第一多肽接头)、“*Fc区*”、“*RNA酶*”、“*对氧磷酶*”等)被理解为具有本文中归因于这样的术语的含义,并且包括如本文所述的各种实施方案。

[0094] 在通过向受试者施用本文所述的可溶性融合多肽或二聚体蛋白来治疗疾病的情况下,术语“有效量”是指足以抑制疾病的一种或多种症状的发生或改善所述疾病的一种或多种症状的此类分子的量。例如,在如本文所述的通过向受试者施用二聚体*ApoA1*融合蛋白而治疗自身免疫性疾病的特定情况下,术语“有效量”是指足以调节受试者的自身免疫应答以便抑制自身免疫疾病的发生或改善一种或多种症状的此类分子的量。根据本发明的方法以“有效方案”施用有效量的药剂。术语“有效方案”是指所施用药剂的量与给药频率的组合足以完成治疗或预防疾病。

[0095] 在治疗如本文所述的疾病或病症的情况下,术语“患者”或“受试者”包括哺乳动物,例如像人和其他灵长类动物。所述术语还包括家养动物,例如像牛、猪、羊、马、狗和猫。

[0096] 术语“组合疗法”是指涉及提供至少两种不同疗法以实现所指示的治疗效果的治疗方案。例如,联合治疗可以涉及施用两种或更多种化学活性不同的成分或药剂,例如根据本发明的可溶性*ApoA1*融合多肽或二聚体蛋白和另一种试剂例如另一种抗炎剂或免疫调节剂。可替代地,组合疗法可以涉及单独或与另一种药剂一起施用根据本发明的可溶性*ApoA1*融合多肽或二聚体蛋白,以及另一种疗法(例如放射疗法)的递送。构成组合疗法的不同疗法可以例如同时的、重叠的或顺序的给药方案进行递送。在施用两种或更多种化学上不同的药剂的情况下,应理解的是,活性成分可以作为相同组合物的一部分或作为不同组合物而施用。当作为单独的组合物施用时,包含不同活性成分的组合物可以在相同的或不同的时间,通过相同的或不同的途径,使用相同的或不同的给药方案来施用,所有这些都是由特定背景所要求并由主治医师决定的。

[0097] 在治疗癌症的情况下,术语“非*ApoA1*介导的免疫调节疗法”是指不特异性靶向*ApoA-1*或*ApoA-1*介导的信号传导途径的免疫调节疗法。

[0098] 在治疗癌症的情况下,术语“靶向疗法”是指使用治疗剂来识别和攻击特定类型的癌细胞的一种类型的治疗,通常对正常细胞的损害较小。在一些实施方案中,靶向疗法阻断了参与癌细胞生长和扩散的酶或其他分子的作用。在其他实施方案中,靶向疗法帮助免疫系统攻击癌细胞或者将毒性物质直接递送至癌细胞。在某些变化中,靶向疗法使用小分子药物或单克隆抗体作为治疗剂。

[0099] 如果两个氨基酸序列的氨基酸残基在最大对应性比对时是相同的,则这两个氨基酸序列具有“100%的氨基酸序列同一性”。可以使用例如包括在由DNASTAR (Madison, Wisconsin) 生产的LASERGENE生物信息学计算套件中的标准软件程序进行序列比较。通过确定最佳比对来比较氨基酸序列的其他方法是本领域普通技术人员熟知的。(参见例如Peruski和Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc.1997);吴等人(编辑)“*Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins*”, *Methods in Gene Biotechnology* 123-151 (CRC Press, Inc.1997);Bishop(编辑), *Guide to Human Genome Computing* (第2版, Academic Press, Inc.1998)。)如果两个序列相对于彼此具有至少80%、至少90%或至少95%的序列同一性,则认为这两个氨基酸序列具有“基本的序列同一性”。

[0100] 百分比序列同一性是通过常规方法来确定的。参见例如Altschul等人, Bull. Math. Bio. 48:603, 1986, 以及Henikoff和Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915, 1992。例如,可以对两个氨基酸序列进行比对,以使用空位开放罚分10、空位延伸罚分1和Henikoff和Henikoff的“blosum62”评分矩阵来优化所述比对分数,同上,如表1所示(氨基酸由标准单字母代码表示)。则百分比同一性被计算为:([相同匹配的总数]/[较长序列的长度加上为了对齐两个序列而引入到较长序列中的空位的数目]) (100)。

[0101] 表1:BLOSUM62评分矩阵

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4					
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-2	-1	1	5				
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	4	

[0103] 本领域普通技术人员认识到,存在许多建立的算法可用于比对两个氨基酸序列。Pearson和Lipman的“FASTA”相似性搜索算法是用于检查本文公开的氨基酸序列与第二氨基酸序列共享的同一性水平的合适的蛋白质比对方法。由Pearson和Lipman(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988)和Pearson(Meth. Enzymol. 183:63, 1990)描述了FASTA算法。简言之,通过识别由具有最高密度的一致性(如果ktup变量是1)或成对的一致性(如果ktup=2)的询问序列(例如SEQ ID No:2的残基19-267或25-267)和测试序列共享的区域,FastA首先表征序列相似性,而无需考虑保守氨基酸取代、插入或缺失。然后使用氨基酸取代矩阵通过比较所有配对的氨基酸的相似性来为具有最高密度的一致性的十个区域评分,并且将这些区域的末端“修整”成仅包括有助于最高分数的那些残基。如果存在若干个具有大于“截断”值(基于序列长度和ktup值通过预先确定的公式计算)的分数的区域,则对修整的初

始区域进行检查从而确定这些区域是否可以连接从而形成具有空位的近似比对。最后,使用Needleman-Wunsch-Sellers算法的修改将两个氨基酸序列的最高得分区进行比对(Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.48:444,1970;Sellers,SIAM J.Appl.Math.26:787,1974),其允许氨基酸插入和缺失。FASTA分析的说明性参数是:ktup=1,空位开放罚分=10,空位延伸罚分=1,以及替换矩阵=blosum62.通过修改评分矩阵文件(“SMATRIX”),如Pearson,Meth.Enzymol.附录2,183:63,1990中所解释的,可以将这些参数引入到FASTA程序中。

[0104] 当这样的值被表示为“约”X或“大致”X时,X的所述值将被理解为精确到±10%。

附图说明

[0105] 图1展示了BHK细胞培养物ApoA-1分子及其重组融合体中的胆固醇外流。与具有两个氨基酸的接头的ApoA-1-Fc融合蛋白(ApoA-1(2)Fc(Theripion))或不具有接头的ApoA-1-Fc融合蛋白(ApoA-1(0)Fc(Sino Biol))相比,在ApoA-1与Fc区(ApoA-1(26)Fc)之间含有26个氨基酸的接头的ApoA-1-Fc融合蛋白证实了胆固醇外流增加,并且具有与野生型人ApoA-1(对照ApoA-1)相似的活性。将ApoA-1分子与已诱导ABCA1表达的H3-胆固醇标记的BHK细胞一起温育2小时。预测Fc蛋白是二聚体;然而,所显示的浓度是基于每个分子的ApoA-1质量来计算和归一化的。

[0106] 图2A和2B示出了根据本公开的融合蛋白的某些实施方案的示意图,包括组分功能域。图2A描绘了在羧基末端经由接头连接到人IgG Fc区(在本文中也称为“THER融合蛋白”或“THER分子”)的人ApoA-1的图示。图2B描述了在羧基末端经由接头进一步连接至酶区的THER融合蛋白的图示(这些融合在本文中也被称为“双功能酶脂质转运”或“BELT”分子;BELT分子在本文中也可以通常被称为THER融合蛋白或分子)。存在于融合蛋白的羧基末端处的接头序列和结构域根据构建体而变化。

[0107] 图3示出了来自表达五种不同THER分子的瞬时转染的293T细胞的培养物上清液(无血清)的蛋白质印迹。如实施例3中所述进行转染和蛋白质印迹分析,如下。从左到右:MOCK-模拟转染阴性对照;CD40IgG-CD40IgG DNA转染阳性对照;THER0-接头为两个氨基酸的ApoA1-IgG融合蛋白;THER2-接头为16个氨基酸的ApoA1-IgG融合蛋白;THER4-接头为26个氨基酸的ApoA1-IgG融合蛋白;THER6-接头为36个氨基酸的ApoA1-IgG融合蛋白;THER4RNA-接头为36个氨基酸的ApoA1-IgG融合蛋白,经由第二个18氨基酸的接头进一步连接到人RNA酶1。

[0108] 图4A-4E示出了概括对表达THER0(图4A)、THER2(图4B)、THER4(图4C)、THER6(图4D)和THER4RNA2(图4E)的ApoA-1融合蛋白的稳定CHO克隆进行初始筛选、以及来自96孔培养物上清液的融合蛋白的相对表达水平的柱状图(参见实施例4,如下)。

[0109] 图5A-5C示出了在培养6天和10天之后对表达了更高的融合蛋白水平的THER克隆亚组的分析结果,从而评估其细胞生长模式(图5A)、相对细胞活力(图5B)和融合蛋白的表达(图5C)(参见实施例4,如下)。

[0110] 图6A和图6B示出了从CHO克隆消耗的培养物上清液中纯化的THER融合蛋白的非还原的(图6A)和还原的(图6B)SDS-PAGE分析(参见实施例4,如下)。

[0111] 图7示出了纯化的THER融合蛋白的天然PAGE凝胶分析。如在实施例4中所述的对样

品进行制备并对BLUE天然PAGE凝胶进行跑胶和染色。

[0112] 图8示出了对不同融合蛋白在夹心ELISA中的相对结合进行总结的图,使用抗-IgG捕获融合蛋白以及采用HRP-缀合的抗-ApoA-1抗体的检测步骤(参见实施例5,如下)。

[0113] 图9示出了动力学酶分析测量存在于纯化的ApoA1-IgG-RNA酶双特异性融合蛋白(THER4RNA2)的系列稀释样品中的RNA酶活性的结果。如实施例6中所述的进行RNA酶ALERTTM测定(IDT,Coralville,IA),如下,使用RNA酶A(“RNA酶”)作为阳性对照,并且使用ApoA-1-1nk26-hIgG(“THER4”)作为阴性对照。每个框显示在45分钟测定过程中观察到的相对荧光单位作为时间的函数,其中固定浓度的非荧光RNA底物在消化RNA时产生荧光信号。

[0114] 图10示出了图9中所示的数据的子集,从而比较了在4pmol/μl蛋白质稀释度下的RNA酶活性。

[0115] 图11示出了使用纯化的融合蛋白和分化的人单核细胞系THP-1的BODIPY-胆固醇外流测定的结果。如实施例7中所述的以96孔板格式进行测定,如下,并且数据被显示为从5次重复中观察到的平均外流量,从所有样品中减去基线外流量(单独的培养基)。

[0116] 图12示出了使用小鼠单核细胞-巨噬细胞系J774A.1(ATCC,Manassas,VA)的胆固醇外流测定的结果。如实施例7中所述的对基线和cAMP刺激的外流两者进行评估,如下。

发明内容

[0117] I. 概述

[0118] 本发明提供了涉及融合多肽的组合物和方法,所述融合多肽包含具有胆固醇外流活性的第一多肽区段,并且其是ApoA1多肽或其功能性变体或片段,或者可替代地是ApoA-1模拟物。在一些方面,融合多肽进一步包括在二聚化结构域的氨基末端与ApoA-1多肽、变体、片段或模拟物的羧基末端之间具有肽接头的二聚化结构域,由此允许融合多肽形成稳定的二聚体。在其他非互斥方面,融合多肽是双特异性构建体,所述双特异性构建体进一步包含ApoA-1多肽、变体、片段或模拟物的羧基末端的第二多肽区段并赋予第二生物学活性。示例性的第二多肽包括RNA酶、对氧磷酶、血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)、胆固醇酯转运蛋白(CETP)、卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)以及与β淀粉样蛋白特异性结合的多肽,其中任何一项可以是天然存在的蛋白质或其功能变体或片段。

[0119] 例如,可以使用本发明的融合分子来增加受试者的胆固醇逆向转运,并且在各种疾病的治疗中提供治疗益处。ApoA-1(HDL的主要蛋白)已经在患有急性冠脉综合征的患者的临床试验中显示出有益的活性。本发明的ApoA-1融合分子可以用于治疗冠心病、急性冠脉综合征、以及以动脉粥样硬化为特征的其他心血管疾病(例如像中风)。例如,用于治疗自身免疫性疾病(例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮)、炎性疾病、2型糖尿病、肥胖症和神经退行性疾病(例如阿尔茨海默病)的本发明的融合分子也是有用的。在一些实施方案中,使用本发明的融合蛋白来替换有缺陷的ApoA-1,例如在1型糖尿病和痴呆的治疗中。在某些变化中,本文所公开的融合蛋白被用于治疗多发性硬化症(MS)。已经显示出ApoA-1水平在MS患者中较低,并且已经显示出ApoA-1缺陷型小鼠在实验性变应性脑脊髓炎(EAE)(一种MS模型)中表现出比野生型动物更多的神经退行性变和更差的病情。参见Meyers等人,J.Neuroimmunol.277:176-185,2014。数据进一步提示,ApoA-1对中枢神经系统有积极的神经保护作用。参见Gardner等人,Frontiers in Pharmacology:2015年11月20日doi:

10.3389/fphar.2015.00278。

[0120] 几项研究支持使用ApoA-1治疗自身免疫性疾病。例如,患有系统性红斑狼疮(SLE)的患者具有低HDL胆固醇水平,并且存在的HDL经常受到髓过氧化物酶介导的甲硫氨酸氧化和ApoA-1的酪氨酸氯化的损伤,从而导致ABCA1依赖性胆固醇外流活性的丧失。参见Shao等人,J.Biol.Chem.281:9001-4,2006;Hewing等人,Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.34:779-89,2014。这促进了SLE患者丧失抗炎特性和产生促炎HDL。参见Skaggs等人,Clin.Immunol.137:147-156,2010;McMahon等人,Arthritis Rheum.60:2428-2437,2009。在许多SLE患者中存在ApoA-1自身抗体,并且通过SLEDAI评估的SLE疾病活性和通过SLICC/ACR损伤指数评估的SLE疾病相关器官损伤与抗ApoA-1抗体呈正相关。参见Batukla等人,Ann.NY Acad.Sci.1108:137-146,2007;Ahmed等人,EXCLI Journal 12:719-732,2013。此外,增加ApoA-1浓度减弱了狼疮倾向性SLE1、2、3小鼠的自身免疫和肾小球肾炎。参见Black等人,J.Immunol.195:4685-4698,2015。

[0121] 在具有高度疾病活性的类风湿性关节炎患者中HDL的胆固醇外流能力也受到损伤,并且与全身性炎症和HDL抗氧化活性丧失相关。参见Charles-Schoeman等人,Arthritis Rheum.60:2870-2879,2009;Charles-Schoeman等人,Ann.Rheum.Dis.71:1157-1162,2012。通过ApoA-1和重构HDL来对Lewis大鼠的关节炎进行治疗减轻了急性和慢性关节炎症,并且降低了巨噬细胞TLR2的表达和活化。参见Wu等人,Arterioscler.Thromb.Basc.Biol.34:543-551,2014。使用ApoA-1模拟肽D-4F联合普伐他汀治疗大鼠胶原诱导性关节炎的疗法显著降低了疾病活性。参见Charles-Schoeman等人,Clin.Immunol.127:234-244,2008。

[0122] 本发明的融合分子也可以用于治疗感染性疾病。在感染和内毒素血症期间,发生了脂质代谢和脂蛋白组成的显著改变,包括ApoA-1减少以及HDL组成和大小的变化。HDL可以结合并中和革兰氏阴性LPS和革兰氏阳性脂磷壁酸,从而促进这些炎症产物的清除。药理学研究支持重组ApoA-1在细菌感染期间的益处。参见例如Pirillo等人,Handb Exp Pharmacol.224:483-508,2015。

[0123] 含有对氧磷酶(例如PON1)的本发明的双功能ApoA-1融合分子对于感染铜绿假单胞菌(一种革兰氏阴性细菌)的患者的治疗特别有用。对于常见铜绿假单胞菌感染的免疫功能低下的患者,这一点尤其重要。铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)分泌毒力因子,并且在被称为群体感应(quorum sensing, QS)的浓度依赖性过程中响应于被称为酰基高丝氨酸内酯的小信号分子而形成生物膜。对氧磷酶1降解酰基高丝氨酸内酯,并且显示出在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (其中没有内源性PON同系物)的转基因体内模型中保护抵抗铜绿假单胞菌的致死性。参见Estin等人,Adv.Exp.Med.Biol.660:183-193,2010。

[0124] 本发明的融合分子也可以用于治疗炎性疾病。例如,如本文所述的ApoA-1融合多肽和二聚体蛋白可以改变嗜中性粒细胞、巨噬细胞和/或抗原呈递细胞的表型以减少促炎反应。本发明的分子引起由转运蛋白分子(例如像ABCA1)介导的胆固醇从细胞膜的外流。胆固醇从抗原呈递细胞(包括巨噬细胞和树突细胞)的外流可以抑制由这些细胞介导的促炎反应,从而导致了炎性细胞因子的产生的减少。研究支持ApoA-1介导抗炎作用的益处。例如,用ApoA-1进行治疗显示出通过改变脂膜筏的组成来抑制巨噬细胞在CD40刺激后的促炎信号传导。参见Yin等人,J.Atherosclerosis and Thrombosis 19:923-36,2012。还显示出ApoA-1引起TRAF-6向脂筏募集的减少、以及NF- κ B活化的减少。参见,同前。另一项研究表明

明,用ApoA-1或ApoA-1模拟物4F对人单核细胞和巨噬细胞进行处理改变了它们对LPS的应答,从而导致炎性细胞因子MCP-1、MIP-1、RANTES、IL-6和TNF α 的产生减少,但IL-10的产生增加。参见Smythies等人,Am.J.Physiol.Cell Physiol.298:C1538-48,2010.doi:1152/ajpcell.00467.2009。另一项研究表明,用ApoA-1进行治疗显著降低了LPS诱导的从THP-1细胞中释放MCP-1,并且抑制了CD11b和VCAM-1的表达。参见Wang等人,Cytokine 49:194-2000,2010。因此,ApoA-1抑制人单核细胞和巨噬细胞的活化和粘附,并且由于分化为抗炎表型而诱导显著的功能改变。

[0125] 如本文所述,炎症性肺部疾病属于可以使用ApoA-1融合分子进行治疗的炎性疾病。发现的在患有特异反应性和哮喘的患者中血清ApoA-1与FEV1呈正相关,而在没有哮喘的特应性和非特应性患者则无此结果。参见Barochia等人,Am.J.Respir.Crit.Care Med.191:990-1000,2015。在另一项研究中,与对照组相比,患有特发性肺纤维化的患者的细支气管灌洗液中ApoA-1水平较低($P < 0.01$)。参见Kim等人,Am.J.Respir.Crit.Care Med.182:633-642,2010。此外,在用博莱霉素治疗的小鼠中用ApoA-1进行鼻内治疗对于减少肺中的炎性细胞的数量和胶原沉积是非常有效的。参见,同前。

[0126] 根据本发明,肥胖是适合用ApoA-1融合分子进行治疗的另一种炎性疾病。证据支持使用ApoA-1和HDL来对抗肥胖症。参见例如Mineo等人,Circ.Res.111:1079-1090,2012。例如,在喂食高脂饮食的小鼠中,ApoA-1的过量表达或ApoA-1模拟肽D-4F的施用已经显示出降低了白色脂肪的质量和胰岛素抵抗性并增加了能量消耗。此外,在ob/ob小鼠中,显示出ApoA-1模拟物L-4F降低了肥胖和炎症并改善了葡萄糖耐量。同前。

[0127] 根据本发明可以使用ApoA-1融合分子进行治疗的另一种病症是肾病综合征(NS),其与患者的心血管疾病的较高风险相关。可滤性HDL(即HDL3)和贫脂apo A1的排尿损耗是肾病综合征患者的共同特征。这通常是由于这些分子通过肾近端小管中的cubulin/巨蛋白受体的再摄取减少。参见Barth等人,Trends Cardiovasc.Med.11:26-31,2001。如本文所述的包含Fc区的ApoA-1融合分子将以这种典型方式绕开对重摄取的需求,因为由于Fc结构域的存在而使分子经由FcRn再循环。

[0128] 如本文所述的融合分子也可以用于癌症患者的治疗。预期本发明的ApoA-1融合多肽和二聚体蛋白在减少促炎反应的同时增强CD8 $^+$ T细胞的活化和肿瘤浸润。研究支持ApoA-1疗法在癌症动物模型中的功效,并且已经显示出ApoA-1疗法可以引起肿瘤中CD8 $^+$ T细胞的特异性增加。参见例如Zamanian-Daryoush等人,J.Biol.Chem.288:21237-21252,2013。在一些方面,本发明的ApoA-1融合分子可用于与一种或多种其他抗癌疗法(例如像抗癌免疫疗法)联合。

[0129] 在某些方面,本发明提供了一种方式来稳定活性ApoA-1二聚体、同时还通过在二聚化结构域(例如Fc结构域)与ApoA-1多肽或其功能变体、片段或模拟物的C末端之间提供柔性接头来控制从前β颗粒成熟为盘状颗粒和球形颗粒。与野生型ApoA1相比,不包含接头的先前的ApoA-1-Ig分子在胆固醇外流测定中展现出较低的活性。相反,本发明的二聚化融合多肽在胆固醇外流测定中保留了ApoA-1活性,并且还允许进一步的改善,例如像RNA酶(例如RNA酶1)或其他多肽区段与二聚化结构的C末端的融合。在某些优选的实施方案中,使用Fc区作为二聚化结构域还使得二聚体的半衰期增加。

[0130] 尽管不旨在受到理论约束,但据信接头的长度控制稳定的ApoA-1二聚体的功能,

以在其摄取胆固醇时伸长。本发明提供了在ApoA-1多肽或其变体、片段或模拟物的C末端与二聚化结构域的N末端(例如像Fc结构域)之间含有柔性接头的ApoA-1融合分子。接头的长度足以使得ApoA-1或其功能变体、片段或其模拟物介导来自细胞的胆固醇外流(胆固醇逆向转运(RCT)中的初始关键步骤)。接头的长度通常在2个至60个氨基酸之间。据信具有替代性接头长度的ApoA-1融合分子通过约束ApoA-1的C末端来控制HDL颗粒的成熟而具有不同的功能特性。中等大小的HDL盘状颗粒可能具有改善的动脉保护性质,并且可能具有改善的CNS转运性质。本发明的分子可以在这些中间盘状阶段中改变HDL成熟的进程,从而相对于野生型ApoA-1蛋白改善了本发明的融合蛋白的功效。本发明的分子可能影响由三聚体ApoA-1颗粒组成的球形HDL颗粒的结构和组成(参见Silva等人,Acad.Sci.USA 105:12176-12181,2008)。本发明的分子有可能与天然ApoA-1相互作用而形成较大的球形HDL颗粒。

[0131] 在某些实施方案中,二聚化结构域是免疫球蛋白Fc区。本发明的ApoA-1-Fc融合分子延长了ApoA-1半衰期,同时保持ApoA-1逆向胆固醇外流并消除对大量脂质制剂的需求。另外,在抗体和Fc融合蛋白的制造中,Fc区的存在允许使用固定化蛋白A根据标准实践进行纯化。

[0132] ApoA-1的结构研究(参见例如Gogonea,Frontiers Pharmacol.6:318,2016)显示,ApoA-1在从无脂质单体向更高级形式成熟时呈现多重构象。最近的从小角度中子散射(SANS)得到的数据示出了在脂质核心周围处于开放构型的ApoA-1二聚体的低分辨率结构,被称为超双螺旋(DSH)模型。来自SANS研究的其他结构显示,处于不同开放构型的ApoA-1取决于脂质核心的组成;在这些结构中,ApoA-1单体的C末端相对于彼此处于不同的位置。类似地,并入第三ApoA-1单体的球形ApoA-1颗粒显示了与二聚体盘状ApoA-1中的位置相比处于不同位置的各单体的C末端。参见例如Gogonea,同上。本公开的柔性接头具有足够的长度以允许ApoA-1在没有构象约束的情况下呈现这些位置。

[0133] 在某些实施方案中,本发明的ApoA-1-[接头]-[二聚化结构域]分子包括与二聚化结构域的羧基末端融合的另外的多肽区段。这种变化允许形成具有ApoA-1功能活性和第二生物学活性的双特异性分子。

[0134] 在本发明的一些方面,提供双特异性融合分子,所述双特异性融合分子包含:(i)具有胆固醇逆向转运活性的第一多肽区段,其是ApoA1多肽或其功能变体或片段,或者可替代地是ApoA1模拟物,以及(ii)第一多肽区段的羧基末端的第二多肽区段,其中第二多肽区段选自于RNA酶、对氧磷酶、血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)、胆固醇酯转运蛋白(CETP)、卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)以及与 β 淀粉样蛋白(A)特异性结合的多肽(例如A特异性scFv)。此类第二多肽可以是天然存在的蛋白质或其功能性变体或片段。在一些实施方案中,如上所总结的,在第一和第二多肽之间包含接头和二聚化结构域。在替代性实施方案中,融合多肽缺少二聚化结构域。

[0135] 在缺乏Fc区的本发明的ApoA-1融合分子的一些实施方案中,融合分子可以与PEG缀合以提供延长的半衰期。这样的变化可以包括如本文所述的双特异性分子,例如像包含RNA酶、对氧磷酶、血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)、胆固醇酯转运蛋白(CETP)、卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)或与 β 淀粉样蛋白特异性结合的多肽的融合分子。

[0136] 在如上总结的双特异性分子的一些实施方案中,第二多肽区段是RNA酶。优选的RNA酶是人RNA酶1或其功能性变体或片段。在特定的变化中,RNA酶保留了其对细胞质抑制

剂的抑制的敏感性，并且对细胞具有非常低的毒性，但是在细胞外具有较高活性。RNA酶通过消化炎性细胞外RNA而具有抗炎特性，并且提供了另外的治疗益处用于治疗各种疾病，包括心血管疾病（例如冠状动脉疾病、中风）、自身免疫性疾病、炎性疾病、2型糖尿病、感染性疾病以及神经退行性疾病（例如阿尔茨海默病）。

[0137] 例如，如本文所述的包含RNA酶区段的双特异性ApoA-1融合分子可以例如用于治疗炎性疾病，例如像炎症性肺部疾病。一项研究显示，TLR3（一种RNA传感器）在没有病毒病原体的情况下在ARDS样病理学的进展中起主要作用。参见Murray等人，Am.J.Respir.Crit.Care Med.178:1227-1237,2008。氧疗法是ARDS的主要治疗性干预措施，但促成进一步的肺损伤和对病毒感染的易感性。氧疗法是培养的人上皮细胞中的TLR3的表达和活化增加的主要刺激，并且TLR3的缺失或阻断在暴露于高氧条件后保护小鼠免受肺损伤和炎症。参见Murray等人，同上。另一项研究显示，在急性缺氧的反应中发生了通过细胞外RNA来激活TLR3，并且采用RNA酶A的小鼠的治疗减少了急性缺氧后的肺部炎症。参见Biswas等人，Eur.J.Immunol.45:3158-3173,2015）。包含如本文所述的RNA酶区段的双特异性ApoA-1融合分子还可以用于例如治疗自身免疫性疾病，例如像系统性红斑狼疮（SLE）。研究显示了，例如，在SLE小鼠模型中的包含TLR7的RNA免疫复合物和RNA受体在SLE疾病发病机制中的作用以及对RNA酶过表达的保护作用。参见例如Sun等人，J.Immunol.190:2536-2543,2013。

[0138] 在如上总结的双特异性分子的其他实施方案中，第二多肽区段是对氧磷酶。优选的对氧磷酶是人对氧磷酶1（PON1）或其功能性变体或片段。对氧磷酶双特异性融合分子提供了用于使用ApoA-1介导的疗法可治疗的疾病的另外的治疗益处，包括例如通过其抗动脉粥样硬化、抗氧化、抗炎和/或神经保护性质。在一些替代性实施方案中，PON1可以通过其与ApoA-1的天然高亲和力结合而附接至本发明的ApoA-1融合分子，所述结合是由PON1的Tyr71介导的（参见Huang等人，J.Clin.Invest.123:3815-3828,2013）。在施用之前将ApoA-1融合分子与重组或天然PON1一起温育将足以将PON1“加载”到ApoA-1融合分子上。

[0139] 包含如本文所述的对氧磷酶片段的双特异性ApoA-1融合分子可以用于例如治疗自身免疫性疾病或炎性疾病。例如，研究支持使用对氧磷酶来治疗自身免疫性疾病，例如系统性红斑狼疮（SLE）。许多患有系统性红斑狼疮（SLE）的患者的自身抗体滴度与PON1的活性丧失相关（参见Batkukla等人，Ann.NY Acad.Sci.1108:137-146,2007），并且通过SLEDAI进行评估的SLE疾病活性以及通过SLICC/ACR损伤指数进行评估的SLE疾病相关的器官损伤与PON1活性呈负相关（参见Ahmed等人，EXCLI Journal 12:719-732,2013）。PON1活性在SLE患者中显著降低，并且是动脉粥样硬化的危险因素。参见Kiss等人，Ann.NY Acad.Sci.108:83-91,2007。另外，其他研究支持使用对氧磷酶来治疗炎性疾病，如炎症性肺部疾病。一项研究显示，在暴露于硫磺芥子气（SM）之后很久患有晚期肺部疾病（包括哮喘、慢性阻塞性肺病（COPD）和支气管扩张）的患者的细支气管灌洗液中的PON1水平显著降低（p<0.0001）。参见Golmanesh等人，Immunopharmacol.Immunotoxicol.35:419-425,2013。另一项研究显示，二十年前接触SM的伊朗老兵仍然具有显著较低水平的PON1活性，并且较低PON1与肺部疾病的严重程度相关。参见Taravati等人，Immunopharmacol.Immunotoxicol.34:706-713,2012。

[0140] 包含本文所述的RNA酶区段或对氧磷酶片段的双特异性ApoA-1融合分子还可以用

于例如治疗神经疾病。这种双特异性分子被转运到大脑,在此处它们递送保护性对氧磷酶或RNA酶。例如,PON1由于其抗氧化特性而在大脑中具有保护性,并且RNA酶通过消化细胞外RNA而具有保护性,所述细胞外RNA经由刺激TLR7和其他RNA受体而促进炎症。适用于使用本发明的ApoA-1/对氧磷酶或ApoA1/RNA酶双特异性分子的治疗的示例性神经疾病包括多发性硬化症、帕金森病和阿尔茨海默病。

[0141] 髓过氧化物酶 (MPO) 抑制剂与本发明的ApoA-1融合分子的附接作为保护ApoA-1免于因MPO介导的氧化而失活的方式是特别合乎需要的,并且还可以类似地保护对氧磷酶免于MPO介导的氧化和在包含对氧磷酶(如PON1)的双特异性融合多肽的条件下失活。ApoA-1的髓过氧化物酶介导的氧化促进ApoA-1的交联,并且可能暗示导致体内动脉粥样硬化斑块中的淀粉样蛋白沉积的机制。参见Chan等人,J.Biol.Chem.290:10958-71,2015。关于MPO抑制剂的综述,参见Malle等人,Br J Pharmacol.152:838-854,2007。MPO抑制剂与本发明分子的附接还可以定位MPO抑制以选择性保护ApoA-1免受氧化,同时保留在抗微生物活性中具有重要作用的MPO活性。

[0142] 在如上总结的双特异性分子的其他实施方案中,第二多肽区段选自于胆固醇酯转运蛋白 (CETP) 和卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (LCAT)。CETP参与了HDL颗粒在胆固醇逆向转运 (RCT) 过程中将胆固醇递送到肝脏的主要机制之一,具体地是通过卸出和转运胆固醇到LDL,然后经由LDL受体将胆固醇转运回到肝脏。这个卸出过程需要CETP。通过递送如本文提供的改良的ApoA-1分子来改良RCT途径的初始部分、然后添加其他RCT组分,可以提供有吸引力的且可能地协同的治疗方法。提供更多的含有ApoA-1的双特异性融合分子的形式的外源性CETP可以增强CETP活性和整体胆固醇逆向转运。

[0143] 含LCAT的双特异性融合蛋白可以提供增强内源性CETP的替代手段。卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 是一种与HDL相关并将游离胆固醇转化为胆甾醇酯的酶,其然后螯合到HDL颗粒中并允许形成球形。给予缺乏LCAT的小鼠的人重组LCAT显著增加了HDL-C水平,并且当给予人ApoA-1转基因小鼠时,HDL-C增加八倍,表明协同作用。参见Rousset等人,J Pharmacol Exp Ther.335:140-8,2010。已经报道了与Fc融合的重组人LCAT(参见Spahr等人,Protein Sci.22:1739-53,2013),并且含有ApoA-1和LCAT两者的双特异性分子也可以比单独的单特异性蛋白质更有效地改善RCT。

[0144] 在如上总结的双特异性分子的其他实施方案中,第二多肽区段是与 β 淀粉样蛋白 (A β) 特异性结合的多肽。在特定的变化中,第二多肽是A β -特异性单链抗体,例如像A β -特异性scFv。例如由Cattepoel等人 (PLoS One 6:e18296,2011) 描述了淀粉样蛋白 β 肽的特异性scFv。在这样的实施方案中,A β -结合多肽通常与ApoA-1的C末端融合,或者与二聚化结构域的C末端融合(如果存在)。这种双特异性融合分子具有改善的治疗阿尔茨海默病患者的特性。

[0145] II.融合多肽和二聚体蛋白

[0146] 因此,一方面,本发明提供了从氨基末端位置到羧基末端位置包含ApoA1-L1-D的融合多肽,其中ApoA1是具有胆固醇外流活性的第一多肽区段,并且其选自于(i)天然存在的ApoA-1多肽或其功能变体或片段和(ii)ApoA-1模拟物;L1是第一多肽接头;并且D是二聚化结构域。在一些实施方案中,融合多肽进一步包含位于二聚化结构域的羧基末端的第二多肽区段。在具体的变化中,第二多肽区段是:(a)天然存在的RNA酶、对氧磷酶、血小板活化

因子乙酰水解酶 (PAF-AH)、胆固醇酯转运蛋白 (CETP) 或卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (LCAT)；(b) 在 (a) 中指定的任何天然存在的蛋白质的功能变体或片段；或 (c) 与 β 淀粉样蛋白 (A β) 特异性结合的多肽 (例如像 A β -特异性 scFv)。包含上述第二多肽区段的此类融合多肽可以由式 ApoA1-L1-D-L2-P (从氨基末端位置到羧基末端位置) 表示，其中 ApoA1、L1 和 D 各自定义如前所述，其中 L2 是第二多肽接头并可选地存在，并且其中 P 是第二多肽区段。

[0147] 另一方面，本发明提供了一种融合多肽，所述融合多肽包含具有胆固醇外流活性、并且选自于 (i) 天然存在的 ApoA-1 多肽或其功能变体或片段和 (ii) ApoA-1 模拟物的第一多肽区段，以及位于第一多肽区段的羧基末端的第二多肽区段，其中第二多肽区段是：(a) 天然存在的 RNA 酶、对氧磷酶、血小板活化因子乙酰水解酶 (PAF-AH)、胆固醇酯转运蛋白 (CETP) 或卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (LCAT)；(b) 在 (a) 中指定的任何天然存在的蛋白质的功能变体或片段；或 (c) 与 β 淀粉样蛋白 (A β) 特异性结合的多肽 (例如像 A β -特异性 scFv)。在一些变化中，融合多肽进一步包括位于第一多肽区段的羧基末端和第二多肽区段的氨基末端的接头多肽。在一些实施方案中，融合多肽进一步包含二聚化结构域，其例如位于第一多肽区段的羧基末端和第二多肽区段的氨基末端。

[0148] 以上指定的具体的天然存在的蛋白质的功能变体可以使用常规测定法容易地加以识别，以评估变体对应于天然蛋白质的相关生物学或生物化学活性。例如，在 ApoA-1 的情况下，可以使用本文所述的已知胆固醇外流测定来测定变体诱导胆固醇外流的能力。参见例如 Tang 等人, J Lipid Res. 47:107-14, 2006。在 RNA 酶 (如人 RNA 酶 1) 的情况下，可以测定变体的消化单链或双链 RNA 的能力，是已知的用于评估 RNA 酶活性的测定。参见例如 Libonati 和 Sorrentino, Methods Enzymol. 341:234-248, 2001。可以使用对硝基苯酚磷酸酯 (对氧磷) 作为底物来测定对氧磷酶 1 (PON1) 变体的磷酸三酯酶活性，或使用乙酸苯酯作为底物来测定芳香基酯酶活性。参见例如 Graves 和 Scott, Curr Chem Genomics 2:51-61, 2008。评估相关 CETP 和 LCAT 活性的测定也是已知的。例如，用于测量 LCAT 和 CETP 酶活性的测定是可商购的，并且包括用于 LCAT 的例如 Cell Biolabs 目录 STA-615、Sigma-Aldrich 目录号 MAK107 和 Roar Biomedical 目录号 RB-LCAT，以及用于 CETP 的 Abcam 目录号 ab65383 和 Sigma-Aldrich 目录号 MAK106。

[0149] 在 A β -结合活性的情况下，可以使用各种已知测定法中的任一种来评估多肽 (例如像单链抗体) 的结合活性。例如，一种测定系统使用可商购的生物传感器仪器 (BIAcoreTM，Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ)，其中结合蛋白 (例如 A β -结合候选物，如抗体) 固定在传感器芯片的表面上，并且含有可溶性抗原 (例如 A β 肽) 的检测样品通过细胞。如果固定化蛋白质针对抗原具有亲和力，则其将与抗原结合，从而导致介质的折射率变化，其被检测为金膜的表面等离子体共振的变化。这种系统允许确定可以从其计算结合亲和力的结合速率和关闭速率，以及评估结合的化学计量。例如 Karlsson (J. Immunol. Methods 145:229-240, 1991) 和 Cunningham 和 Wells (J. Mol. Biol. 234:554-563, 1993) 公开了这种仪器的使用。A β -结合多肽也可以用于本领域已知的其他测定系统中。这样的系统包括用于测定结合亲和力的斯卡查德分析 (参见 Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949) 以及比色测定 (参见 Cunningham 等人, Science 253:545-548, 1991; Cunningham 等人, Science 254:821-825, 1991)。

[0150] 根据本发明使用的天然存在的多肽区段 (例如天然存在的 ApoA-1 多肽、RNA 酶、对

氧磷酶或血小板活化因子乙酰水解酶)包括天然存在的变体,例如像等位基因变体以及与本公开一致的种间同源物。

[0151] 特定参照多肽的功能变体(例如野生型人ApoA-1)通常被表征为相对于参照多肽具有一个或多个氨基酸取代、缺失或添加。这些改变优选地具有微小性质,即保守性氨基酸取代(参见例如表2,如下,其列举了一些示例性的保守性氨基酸取代)以及不显著影响蛋白质或多肽的折叠或活性的其他取代;通常为一个至30个左右的氨基酸的小缺失;以及小的氨基或羧基末端延伸部,如氨基末端甲硫氨酸残基、小连接肽、或促进纯化的小延伸部(亲和标签),如聚组氨酸段、蛋白A(Nilsson等人,EMBO J.4:1075,1985;Nilsson等人,Methods Enzymol.198:3,1991)、谷胱甘肽S转移酶(Smith和Johnson,Gene 67:31,1988)或其他抗原性表位或结合结构域。(总体上参见Ford等人,Protein Expression and Purification 2:95-107,1991。)编码亲和标签的DNA可从供应商(例如Pharmacia Biotech,Piscataway,NJ)获得。保守替换也可以从以下各项中选择:1)丙氨酸,甘氨酸;2)谷氨酸,天冬氨酸;3)天冬酰胺,谷氨酰胺;4)精氨酸,赖氨酸;5)异亮氨酸,亮氨酸,甲硫氨酸,缬氨酸;6)苯丙氨酸,酪氨酸,色氨酸;7)丝氨酸,苏氨酸;以及8)半胱氨酸,甲硫氨酸(参见例如Creighton,Proteins (1984))。

[0152] 表2:保守性氨基酸替换

	碱性	酸性	极性	疏水性	芳香族	小的
[0153]	精氨酸	谷氨酸	谷氨酰胺	亮氨酸	苯丙氨酸	甘氨酸
	赖氨酸	天冬氨酸	天冬酰胺	异亮氨酸	色氨酸	丙氨酸
[0154]	组氨酸			缬氨酸	酪氨酸	丝氨酸
				甲硫氨酸		苏氨酸
						甲硫氨酸

[0155] 可以根据本领域已知的程序(如定点诱变或丙氨酸扫描诱变)来识别天然存在的多肽中的必需氨基酸(Cunningham和Wells,Science 244:1081-1085,1989;Bass等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:4498-4502,1991)。在后一种技术中,将单个丙氨酸突变在分子中的每个残基处引入,并且对所产生的突变体分子测试生物学活性(例如ApoA-1变体的胆固醇外流)以识别对所述分子的活性至关重要的氨基酸残基。另外,通过由核磁共振、晶体学或光亲和标记等技术所确定的晶体结构的分析,可以确定相关蛋白质相互作用的位点。必需氨基酸的同一性还可以通过分析与相关蛋白的同源性(例如保持相同蛋白功能的物种直系同源物)来推断。

[0156] 可以使用已知的诱变和筛选方法来进行多个氨基酸取代并进行测试,如由Reidhaar-Olson和Sauer(Science 241:53-57,1988)或Bowie和Sauer(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:2152-2156,1989)所公开的。简言之,这些作者公开了用于同时使多肽中的两个或更多个位置随机化、选择功能性多肽、然后对诱变处理的多肽进行测序以确定在每个位置处的容许的取代的谱的方法。可以使用的另一种方法是区域定向诱变(Derbyshire等人,Gene 46:145,1986;Ner等人,DNA 7:127,1988)。

[0157] 变体核苷酸和多肽序列还可以通过DNA改组产生。(参见例如Stemmer,Nature 370:389,1994;Stemmer,Nat'l Acad.Sci.USA 91:10747,1994;国际公开号WO 97/20078。)

简言之,通过由亲本DNA的随机片段化进行体外同源重组、随后使用PCR进行重新组装而产生变体DNA分子,从而导致随机引入的点突变。可以通过使用亲本DNA分子家族(如来自不同物种的等位基因变体或DNA分子)来改进这种技术,以将另外的变异性引入所述过程。通过选择期望的突变而同时选择禁止有害变化,选择或筛选期望的活性、随后进行另外的诱变迭代和测定提供了序列的快速“进化”。

[0158] 如前所讨论的,根据本发明的多肽融合体可以包括对应于特定多肽的“功能片段”的多肽区段。可以进行核酸分子的常规缺失分析以获得编码给定多肽的核酸分子的功能片段。作为例证,可以用Ba131核酸酶来消化具有SEQ ID NO:1的残基70-816的核苷酸序列的ApoA-1编码的DNA分子,以获得一组嵌套缺失。然后将片段插入到适当的阅读框中的表达载体中,分离所表达的多肽并测试诱导胆固醇外流的能力。外切核酸酶消化的一种替代方法是使用寡核苷酸定点诱变作用来引入缺失或终止密码子以指定产生期望的片段。可替代地,可以使用聚合酶链式反应来合成编码多肽的基因的特定片段。

[0159] 因此,使用如以上讨论的方法,本领域普通技术人员可以制备多种多肽,所述多肽(i)与参照多肽(例如针对人野生型ApoA-1多肽的SEQ ID NO:2的残基19-267或25-267)基本上相同并且(ii)保留了参考多肽的期望的功能特性。

[0160] 在本发明内使用的多肽区段(例如对应于ApoA-1、RNA酶、对氧磷酶、血小板活化因子乙酰水解酶、二聚化结构域(例如像Fc片段)的多肽区段)可以从多种物种中获得。如果蛋白质要在人体内用于治疗,优选地使用人多肽序列。然而,可以使用非人序列,也可以使用变体序列。对于其他用途(包括体外诊断用途和兽医用途),可以使用来自人或非人动物的多肽序列,尽管来自与患者相同种类的序列可能优先地在体内用于兽医用途或在体外用于存在分子间反应的物种特异性的用途。因此,在本发明内使用的多肽区段可以是但不限于人类、非人类灵长类动物、啮齿类动物、犬科动物、猫科动物、马科动物、牛科动物、绵羊科动物、猪科动物、兔类动物和禽类的多肽及其变体。

[0161] 在某些实施方案中,第一多肽区段是人野生型ApoA-1多肽或其功能变体或片段。例如,在一些实施方案中,第一多肽区段包含与SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-267或25-267具有至少80%的同一性的氨基酸序列。在更具体的实施方案中,第一多肽区段包含与SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-267或25-267具有至少85%、至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列。在又其他实施方案中,第一多肽区段包含与SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-267或25-267具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。在特定变化中,对应于成熟的人野生型ApoA-1的156位氨基酸位置处的缬氨酸被赖氨酸替换,和/或对应于成熟的人野生型ApoA-1的173位的氨基酸位置处的精氨酸被半胱氨酸替换(在本文中还分别被称为V156K和R173C变体或突变)。成熟的人野生型ApoA-1的156位对应于SEQ ID NO:2的氨基酸位置180,成熟的人野生型ApoA-1的173位对应于SEQ ID NO:2的氨基酸位置197。与野生型ApoA-1相比,V156K和R173C突变在动脉粥样硬化小鼠中具有改善的活性和半衰期。参见Cho等人,Exp Mol Med 41:417,2009。

[0162] 在其他实施方案中,第一多肽区段是ApoA-1模拟物,例如像4F肽(参见Song等人,Int.J.Biol.Sci.5:637-646,2009)。ApoA-1模拟物通常在本领域中是已知的,并且在Reddy等人,Curr.Opin.Lipidol.304-308,2014中进行综述。

[0163] 在包含在第一多肽区段的羧基末端(例如二聚化结构域的羧基末端)的第二多肽

区段的某些实施方案中,第二多肽区段是RNA酶。在一些实施方案中, RNA酶是人RNA酶1或其功能变体或片段。例如,在一些实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:4的氨基酸残基542-675具有至少80%的同一性的氨基酸序列。在更具体的实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:4的氨基酸残基542-675具有至少85%、至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列。在又其他实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:4的氨基酸残基542-675具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0164] 在包含在第一多肽区段的羧基末端(例如二聚化结构域的羧基末端)的第二多肽区段的其他实施方案中,第二多肽区段是对氧磷酶。在一些实施方案中,对氧磷酶是人对氧磷酶1(PON1)或其功能变体或片段。例如,在一些实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:12的氨基酸残基16-355、SEQ ID NO:42的氨基酸残基16-355或SEQ ID NO:44的氨基酸残基16-355具有至少80%的同一性的氨基酸序列。在更具体的实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:12的氨基酸残基16-355、SEQ ID NO:42的氨基酸残基16-355或SEQ ID NO:44的氨基酸残基16-355具有至少85%、至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列。在又其他实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:12的氨基酸残基16-355、SEQ ID NO:42的氨基酸残基16-355或SEQ ID NO:44的氨基酸残基16-355具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0165] 在包含在第一多肽区段的羧基末端(例如二聚化结构域的羧基末端)的第二多肽区段的又其他实施方案中,第二多肽区段是血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)。在一些实施方案中,血小板活化因子乙酰水解酶是人PAF-AH或其功能变体或片段。例如,在一些实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:32的氨基酸残基22-441具有至少80%的同一性的氨基酸序列。在更具体的实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:32的氨基酸残基22-441具有至少85%、至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列。在又其他实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:32的氨基酸残基22-441具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0166] 在包含在第一多肽区段的羧基末端(例如二聚化结构域的羧基末端)的第二多肽区段的仍然其他实施方案中,第二多肽区段是胆固醇酯转运蛋白(CETP)。在一些实施方案中,胆固醇酯转运蛋白是人CETP或其功能变体或片段。例如,在一些实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:30的氨基酸残基18-493具有至少80%的同一性的氨基酸序列。在更具体的实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:30的氨基酸残基18-493具有至少85%、至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列。在又其他实施方案中,第二多肽区段包含与SEQ ID NO:30的氨基酸残基18-493具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0167] 根据本发明使用的多肽接头可以是天然存在的、合成的或两者的组合。接头连接两个独立的多肽区(例如二聚化结构域和ApoA-1多肽),并且维持所连接的多肽区为较长的多肽的独立的和分立的结构域。接头可以允许单独的、分立的结构域协作,但仍保持独立的性质(例如在Fc区二聚化结构域与ApoA-1多肽连接的情况下,Fc受体(例如FcRn)结合可以保持为Fc区,而ApoA-1多肽的功能特性(例如脂质结合)将保持)。对于使用天然存在的以及人工肽接头来连接异源多肽的实施例,参见例如Hallewell等人, J.Biol.Chem. 264, 5260-5268, 1989; Alftan等人, Protein Eng. 8, 725-731, 1995; Robinson和Sauer,

Biochemistry 35, 109-116, 1996; Khandekar等人, J. Biol. Chem. 272, 32190-32197, 1997; Fares等人, Endocrinology 139, 2459-2464, 1998; Smallshaw等人, Protein Eng. 12, 623-630, 1999; 美国专利号5,856,456。

[0168] 通常,接头多肽内的残基被选择以提供总体亲水性,并且是非免疫原性的和柔性的。如本文所用的,“柔性”接头是在溶液中缺乏基本稳定的高阶构象的接头,尽管局部稳定性的区域是容许的。通常,小的、极性的和亲水的残基是优选的,并且体积大的和疏水性的残基是不期望的。应避免局部电荷的区域;如果接头多肽包含带电荷的残基,则通常将其定位成在多肽的小区域内提供净中性电荷。因此,优选地将带电荷的残基与相反电荷的残基相邻地放置。通常,包含在接头多肽内的优选的残基包括Gly、Ser、Ala、Thr、Asn和Gln;更优选的残基包括Gly、Ser、Ala和Thr;最优选的残基是Gly和Ser。通常,避免Phe、Tyr、Trp、Pro、Leu、Ile、Lys和Arg残基(除非存在于接头的免疫球蛋白铰链区内),Pro残基是由于其疏水性和缺乏灵活性,Lys和Arg残基是由于潜在的免疫原性。接头的序列也将被设计成避免不需要的蛋白水解。

[0169] 在某些实施方案中,接头L1包含至少两个或至少三个氨基酸残基(例如至少五个、至少10个、至少16个、至少26个或至少36个氨基酸残基)。在具体变化中,L1由从2个至60个氨基酸残基、从3个至60个氨基酸残基、从5个至40个氨基酸残基或从15个至40个氨基酸残基组成。在其他变化中,L1由从2个至50个、从2个至40个、从2个至36个、从2个至35个、从2个至30个、从2个至26个、从3个至50个、从3个至40个、从3个至36个、从3个至35个、从3个至30个、从3个至26个、从5个至60个、从5个至50个、从5个至40个、从5个至36个、从5个至35个、从5个至30个、从5个至26个、从10个至60个、从10个至50个、从10个至40个、从10个至36个、从10个至35个、从10个至30个、从10个至26个、从15个至60个、从15个至50个、从15个至36个、从15个至35个、从15个至30或从15个至26氨基酸残基组成。在其他变化中,L1由从16个至60个、从16个至50个、从16个至40个或从16个至36个氨基酸残基组成。在又其他变化中,L1由从20个至60个、从20个至50个、从20个至40个、从20个至36个、从25个至60个、从25个至50个、从25个至40个或从25个至36个氨基酸残基组成。在仍然其他变化中,L1由从26个至60个、从26个至50个、从26个至40个或从26个至36个氨基酸残基组成。在更具体的变化中,L1由16个氨基酸残基、21个氨基酸残基、26个氨基酸残基、31个氨基酸残基或36个氨基酸残基组成。在一些实施方案中,L1包含或由以下各项中所示的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:2的残基268-293、SEQ ID NO:26的残基268-288、SEQ ID NO:22的残基268-283、SEQ ID NO:2的残基268-293、SEQ ID NO:54、或SEQ ID NO:24的残基268-303。

[0170] 示例性的L2接头包含至少三个氨基酸残基,并且通常地多达60个氨基酸残基。在某些变化中,L2接头具有如上所述的L1的一系列序列长度。在包含式ApoA1-L1-D-L2-P(其中存在L2且P为RNA酶)的多肽的特定实施方案中,L2包含或由SEQ ID NO:4的残基526-541中所示的氨基酸序列组成。

[0171] 在某些实施方案中,多肽接头包含多个甘氨酸残基。例如,在一些实施方案中,多肽接头(例如L1)包含多个甘氨酸残基以及可选的至少一个丝氨酸残基。在具体变化中,多肽接头(例如L1)包含序列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:15),例如像SEQ ID NO:15的氨基酸序列的两个或更多个串联重复序列。在一些实施方案中,接头包含序列[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n ([SEQ ID NO:15]_n),其中n是正整数,例如像从1至5、从2至5、从3至5、从1至

6、从2至6、从3至6或从4至6的整数。在包含式[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n的多肽接头的具体变异中,n是4。在包含式[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n的多肽接头的另一具体变异中,n是3。在包含式[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n的多肽接头的又一种具体变异中,n是5。在包含式[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n的多肽接头的又一种具体变异中,n是6。在某些实施方案中,多肽接头包含插入在多肽接头的两个其他序列(例如本文所述的任何多肽接头序列)之间的一组甘氨酸和丝氨酸残基(例如[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n,其中n是如上所定义的)。在其他实施方案中,多肽接头包含附接在多肽接头的另一个序列(例如本文所述的任何多肽接头序列)的一端或两端处的甘氨酸和丝氨酸残基(例如[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n,其中n是如上所定义的)。在一个实施方案中,多肽接头包含至少一部分上铰链区(例如源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4分子)、至少一部分中间铰链区(例如源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4分子)以及一组甘氨酸和丝氨酸氨基酸残基(例如[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n,其中n是如上所定义的)。

[0172] 在另一个实施方案中,多肽接头包含非天然存在的免疫球蛋白铰链区,例如不能在免疫球蛋白中天然发现的铰链区和/或已被改变而使其在氨基酸序列方面与天然存在的免疫球蛋白铰链区不同的铰链区。在一个实施方案中,可以对铰链区进行突变以制备多肽接头。在一个实施方案中,多肽接头包含铰链结构域,所述铰链结构域不包含天然存在的许多半胱氨酸,即多肽接头包含比天然存在的铰链分子数量更少的半胱氨酸或数量更多的半胱氨酸。

[0173] 各种二聚化结构域适合于根据如本文所述的融合多肽和二聚体融合蛋白而使用。在某些实施方案中,二聚化结构域是免疫球蛋白重链恒定区(如Fc区)。Fc区可以是天然序列Fc区或变体Fc区。在一些实施方案中,Fc区缺乏一种或多种效应子功能(例如ADCC和CDC效应子功能之一或两者)。

[0174] 在一些实施方案中,二聚化结构域是在CH2区中具有突变以使得所述分子不被糖基化的人抗体的Fc区,包括但不限于N297(用于人IgG重链恒定区的EU编号)(对应于SEQ ID NO:2的氨基酸位置375)。在另一个实施方案中,Fc区是铰链区(C220,C226,C229)的三个半胱氨酸各自变为丝氨酸、并且CH2结构域的238位的脯氨酸变为丝氨酸的人IgG1(γ1)。在另一个优选的实施方案中,Fc区是N297变为任何其他氨基酸的人γ1。在另一个实施方案中,Fc区是在Eu位置292和300之间具有一个或多个氨基酸取代的人γ1。在另一个实施方案中,Fc区是在残基292和300之间的任何位置处具有一个或多个氨基酸添加或缺失的人γ1。在另一个实施方案中,Fc区是具有SCC铰链(即,其中半胱氨酸C220变为丝氨酸,并且其中在Eu位置226和229处各具有半胱氨酸)或SSS铰链(即,Eu位置220、226和229处的三个半胱氨酸都变为丝氨酸)的人γ1。在进一步的实施方案中,Fc区是具有SCC铰链和P238突变的人γ1。在另一个实施方案中,Fc结构域是具有在不影响对半衰期很重要的FcRn结合的情况下改变Fcγ受体(I,II,III)结合的突变的人γ1。在进一步的实施方案中,Fc区是如以下所公开的:Ehrhardt和Cooper,Curr.Top.Microbiol.Immunol.2010年8月3日(Immunoregulatory Roles for Fc Receptor-Like Molecules);Davis等人,Ann.Rev.Immunol.25:525-60,2007(Fc Receptor-Like Molecules);或Swainson等人,J.Immunol.184:3639-47,2010。

[0175] 在包含Fc二聚化结构域的融合多肽的一些实施方案中,Fc区包含改变融合蛋白的抗原非依赖性效应子功能的氨基酸取代。在一些此类实施方案中,Fc区包括改变所得分子的循环半衰期的氨基酸取代。当与缺乏这些取代的抗体相比时,这类抗体衍生物展示出与

FcRn的结合增加或减少,并且因此分别使血清中的半衰期增加或减少。具有改善的与FcRn的亲和力的Fc变体预期具有更长的血清半衰期,并且此类抗体可应用于期望所施用的抗体的半衰期较长的治疗哺乳动物的方法中。相反,具有降低的FcRn结合亲和力的Fc变体预期具有更短的半衰期,并且此类抗体也可应用于例如施用给哺乳动物,其中缩短的循环时间可能是有利的,例如其中起始抗体在长期存在于循环中时具有毒性副作用。具有降低的FcRn结合亲和力的Fc变体还不太可能穿过胎盘,因此还可用于治疗孕妇的疾病或病症。另外,可能需要降低FcRn结合亲和力的其他应用包括其中局限于脑、肾脏和/或肝脏的应用。在一个示例性实施方案中,本发明的抗体展现出穿过肾小球的上皮细胞的从脉管系统的转运减少。在另一个实施方案中,本发明的融合蛋白展现出穿过血脑屏障(BBB)的从脑到血管间隙的转运减少。在一个实施方案中,具有改变的FcRn结合的融合蛋白包含了在Fc结构域的“FcRn结合环”内具有一个或多个氨基酸取代的Fc区。在国际PCT公开号W0 05/047327中公开了改变FcRn结合活性的示例性氨基酸取代,所述专利通过引用并入本文。

[0176] 在其他实施方案中,本发明的融合多肽包含Fc变体,所述Fc变体包含氨基酸取代,所述氨基酸取代例如与野生型Fc区相比改变了所述多肽的抗原依赖性效应子功能,特别是ADCC或补体激活。在示例性的实施方案中,此类融合多肽展现出改变的与Fc γ 受体(Fc γ R,例如CD16)的结合。当与野生型多肽相比时,这种融合多肽展现出与Fc γ R的结合增加或减少,并且因此分别介导增强的或减弱的效应子功能。具有改善的与Fc γ R的亲和力的Fc变体预期会增强效应子功能,并且此类融合蛋白可应用于需要破坏靶分子的治疗哺乳动物的方法中。相反,具有降低的Fc γ R结合亲和力的Fc变体预期会降低效应子功能,并且此类融合蛋白也可应用于例如不需要破坏靶细胞的病症的治疗,例如正常细胞可以表达靶分子的情况,或者长期施用抗体可能导致不想要的免疫系统激活的情况。在一个实施方案中,与包含野生型Fc区的多肽相比,包含Fc区的融合多肽展现出至少一种改变的抗原依赖性效应子功能,选自下组:调理素作用,吞噬作用,补体依赖性细胞毒性,抗原依赖性细胞毒性(ADCC)或效应细胞调节。

[0177] 在一个实施方案中,包含Fc区的融合多肽展现出改变的与活化Fc γ RR(例如Fc γ I、Fc γ IIa或Fc γ RIII)的结合。在另一个实施方案中,融合蛋白展现出改变的与抑制性Fc γ R(例如Fc γ RIIb)的结合亲和力。在国际PCT公开号W005/063815中公开了改变FcR或补体结合活性的示例性氨基酸取代,所述专利通过引用并入本文。

[0178] 包含Fc区的融合多肽还可以包含改变Fc区的糖基化的氨基酸取代。例如,融合蛋白的Fc结构域可以具有导致糖基化减少的突变(例如N-或O-联糖基化)或者可以包含野生型Fc结构域的改变的糖型(例如低岩藻糖或无岩藻糖的聚糖)。在另一个实施方案中,所述分子在糖基化基序附近或在糖基化基序内具有氨基酸取代,例如含有氨基酸序列NXT或NXS的N联糖基化基序。在国际PCT公开号W0 05/018572和美国专利申请公开号2007/0111281中公开了减少或改变糖基化的示例性氨基酸取代,所述专利通过引用并入本文。

[0179] 本领域普通技术人员将理解,除非上下文清楚地指出,否则本文所述的Fc变体的各种实施方式可以组合在本发明的融合多肽中。

[0180] 在一些实施方案中,二聚化结构域是包含与选自于(i) SEQ ID NO:2的残基294-525或294-524或(ii) SEQ ID NO:13的残基294-525或294-524中所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列的Fc区。在又其他实施方案中,Fc区

包含与选自于(i) SEQ ID NO:2的残基294-525或294-524或(ii) SEQ ID NO:13的残基294-525或294-524中所示的氨基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0181] 在如上所述的包含ApoA1-L1-D的融合多肽的一些实施方案中,融合多肽包含与以下各项中所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列: (i) SEQ ID NO:2的残基19-525、19-524、25-525或25-524, (ii) SEQ ID NO:13的残基19-525、19-524、25-525或25-524, (iii) SEQ ID NO:20的残基19-501、19-500、25-501或25-501, 或25-501, (iv) SEQ ID NO:22的残基19-515、19-514、25-515或25-514, (v) SEQ ID NO:26的残基19-520、19-519、25-520或25-519, 或(vi) SEQ ID NO:24的19-535、19-534、25-535或25-534。在仍其他实施方案中,融合多肽包含与以下各项所示的氨基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列: (i) SEQ ID NO:2的残基19-525、19-524、25-525或25-524, (ii) SEQ ID NO:13的残基19-525、19-524、25-525或25-524, (iii) SEQ ID NO:20的残基19-501、19-500、25-501或25-501, (iv) SEQ ID NO:22的残基19-515、19-514、25-515或25-514, (v) SEQ ID NO:26的残基19-520、19-519、25-520或25-519, 或者(vi) SEQ ID NO:24的残基19-535、19-534、25-535或25-534。

[0182] 在如上所述包含ApoA1-L1-D-L2-P并且其中P是RNA酶的融合多肽的一些实施方案中,融合多肽包含与以下各项所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列: (i) SEQ ID NO:4的残基19-675或25-675, 或(ii) SEQ ID NO:14的残基19-675或25-675。在其他实施方案中,融合多肽包含与以下各项所示的氨基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列: (i) SEQ ID NO:4的19-675或25-675, 或(ii) SEQ ID NO:14的残基19-675或25-675。

[0183] 在如上所述包含ApoA1-L1-D-L2-P并且其中P是对氧磷酶的融合多肽的一些实施方案中,融合多肽包含与以下各项所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列: (i) SEQ ID NO:28的残基19-883或25-883, (ii) SEQ ID NO:38的残基19-873或25-873, (iii) SEQ ID NO:46的残基19-883或25-883, 或(iv) SEQ ID NO:48的残基19-883或25-883。在其他实施方案中,融合多肽包含与以下各项所示的氨基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列: (i) SEQ ID NO:28的残基19-883或25-883, (ii) SEQ ID NO:38的残基19-873或25-873, (iii) SEQ ID NO:46的残基19-883或25-883, 或(iv) SEQ ID NO:48的残基19-883或25-883。

[0184] 在如上所述包含ApoA1-L1-D-L2-P并且其中P是血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)的融合多肽的一些实施方案中,融合多肽包含与SEQ ID NO:34的残基19-963或25-963所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的同一性。在其他实施方案中,融合多肽包含与SEQ ID NO:34的残基19-963或25-963所示的氨基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0185] 在如上所述包含ApoA1-L1-D-L2-P并且其中P是胆固醇酯转运蛋白(CETP)的一些实施方案中,融合多肽包含与SEQ ID NO:40的残基19-1019或25-1019所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的同一性的氨基酸序列。在其他实施方案中,融合多肽包含与SEQ ID NO:40的残基19-1019或25-1019所示的氨基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0186] 本发明还提供了包含如上所述的第一和第二多肽融合体的二聚体蛋白。因此,另一方面,本发明提供了一种二聚体蛋白,所述二聚体蛋白包含第一融合多肽和第二融合多肽,其中第一和第二多肽融合体中的每一个都从氨基末端位置到羧基末端位置包含ApoA1-L1-D,其中ApoA1是具有胆固醇外流活性的第一多肽区段,并且其选自于(i)天然存在的ApoA-1多肽或其功能变体或片段和(ii)ApoA-1模拟物;L1是第一多肽接头;并且D是二聚化结构域。在一些实施方案中,第一和第二融合多肽中的每一个进一步包含位于二聚化结构域的羧基末端的第二多肽区段。在具体的变化中,第二多肽区段是:(a)天然存在的RNA酶、对氧磷酶、血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)、胆固醇酯转运蛋白(CETP)或卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT);(b)在(a)中指定的任何天然存在的蛋白质的功能变体或片段;或(c)与 β 淀粉样蛋白(A β)特异性结合的多肽(例如像A β -特异性scFv)。包含上述第二多肽区段的此类融合多肽可以由式ApoA1-L1-D-L2-P(从氨基末端位置到羧基末端位置)表示,其中ApoA1、L1和D各自定义如前所述,其中L2是第二多肽接头并可选地存在,并且其中P是第二多肽区段。

[0187] 另一方面,本发明提供了一种二聚体蛋白,所述二聚体蛋白包含第一融合多肽和第二融合多肽,其中第一和第二融合多肽中的每一个都包含第一多肽区段、第二多肽区段和二聚化结构域,其中第一多肽区段具有胆固醇外流活性并选自于(i)天然存在的ApoA-1多肽或其功能变体或片段和(ii)ApoA-1模拟物,并且其中第二多肽区段位于第一多肽区段的羧基末端并且是:(a)天然存在的RNA酶、对氧磷酶、血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)、胆固醇酯转运蛋白(CETP)或卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT),(b)在(a)中指定的任何天然存在的蛋白质的功能变体或片段,或(c)与 β 淀粉样蛋白(A β)特异性结合的多肽(例如像A β -特异性scFv)。在一些实施方案中,二聚化结构域位于第一多肽区段的羧基末端和第二多肽区段的氨基末端。

[0188] 另一方面,本发明提供了:(a)包含与ApoA-1多肽或ApoA-1模拟物的羧基末端连接的免疫球蛋白重链的第一融合多肽,以及(b)包含与ApoA-1多肽或ApoA-1模拟物的羧基末端连接的免疫球蛋白轻链的第二融合多肽。可以共表达第一和第二融合多肽以形成由两条双带ApoA-1二聚体组成的稳定的四聚体,其中在ApoA-1与重链之间以及在ApoA-1与轻链之间的接头具有足够的长度以允许胆固醇外流和胆固醇逆向转运。

[0189] 包括二聚体融合蛋白的本发明的融合多肽可以进一步与效应器部分缀合。效应器部分可以是任何数量的分子,包括例如标记部分(如放射性标记或荧光标记)、TLR配体或结合结构域、酶或治疗部分。在具体的实施方案中,效应器部分是髓过氧化物酶(MPO)抑制剂。MPO抑制剂通常是已知的(参见例如Malle等人,Br J Pharmacol.152:838-854,2007),并且可以容易地与如本文所述的融合多肽缀合。示例性MPO抑制剂包括:基于3-烷基吲哚衍生物的抑制剂(参见Soubhye等人,J Med Chem 56:3943-58,2013;描述了3-烷基吲哚衍生物作为选择性的和高度有效的髓过氧化物酶抑制剂的研究,包括具有高度选择性MPO抑制($IC_{50}=18nM$)的化合物);基于3-(氨基烷基)-5-氟吲哚的抑制剂(参见Soubhye等人,J Med Chem 53:8747-8759,2010);基于2H-吲唑和1H-吲唑酮的抑制剂(参见Roth等人,Bioorg Med Chem 22:6422-6429,2014;描述了对2H-吲唑类和1H-吲唑酮类的评价以及对 IC_{50} 值<1 μM 的化合物的识别);以及含苯甲酸酰肼的化合物(参见Huang等人,Arch Biochem Biophys 570:14-22,2015;示出了含有苯甲酸酰肼的化合物使MPO失活,其中MPO的轻链亚

基通过酯键的裂解而从较大的重链中解离出来)。

[0190] 在另一个实施方案中,本发明的融合多肽(包括二聚体融合蛋白)被修饰以延长半衰期,例如像通过将至少一个分子附接至融合蛋白以延长血清半衰期。此类用于附接的分子可以包括例如聚乙二醇(PEG)基团、血清白蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白受体或其转铁蛋白结合部分或其组合。用于这种修饰的方法通常是本领域中熟知的。如本文中所用的,词语“附接”是指共价或非共价缀合的物质。可以通过基因工程或通过化学手段进行缀合。

[0191] III. 用于制备多肽融合体和二聚体蛋白的材料和方法

[0192] 本发明还提供了编码上述融合多肽的多核苷酸分子(包括DNA和RNA分子)。本发明的多核苷酸包括单链和双链分子。编码融合多肽的各种不同区段(例如二聚化结构域(如Fc片段)、ApoA1以及P多肽区段)的多核苷酸可以产生并使用已知的核酸重组操作方法而连接在一起以形成编码如本文所述的融合多肽的多核苷酸。

[0193] 编码ApoA-1、RNA酶(例如RNA酶1)、对氧磷酶(例如PON1)、血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)、胆固醇酯转运蛋白(CETP)和卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)的DNA序列分别是本领域中已知的。编码各种二聚化结构域的DNA序列(例如免疫球蛋白重链恒定区,如Fc片段)也是已知的。编码例如AB₁-结合抗体的可变区的多核苷酸(包括scFv)也可以使用本领域熟知的技术(如对重组抗体表达文库(例如噬菌体展示表达文库)进行筛选)容易地识别。编码任何这些多肽的附加的DNA序列可以由本领域普通技术人员基于遗传密码而容易地产生。通过用U替换T来产生配对的RNA序列。本领域普通技术人员将容易地认识到,鉴于遗传密码的简并性,在编码给定多肽的多核苷酸分子中可能存在相当大的序列变异。还可以使用已知的重组方法来获得编码此类多肽的功能变体和片段的DNA和RNA,以将变异引入到多核苷酸序列中,随后表达所编码的多肽并使用适当的筛选测定法来确定功能活性(例如胆固醇外流)。

[0194] 用于制备DNA和RNA的方法是本领域所熟知的。例如,可以由从产生大量的编码目的多肽的RNA的组织或细胞中分离的RNA来制备互补DNA(cDNA)克隆。可以使用盐酸胍提取、随后通过以CsCl梯度进行离心进行分离来制备总RNA(Chirgwin等人,Biochemistry 18: 52-94,1979)。使用Aviv和Leder的方法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69:1408-1412,1972)从总RNA制备Poly(A)⁺RNA。使用已知方法从Poly(A)⁺RNA制备互补DNA。在替代方案中,可以分离基因组DNA。用于识别和分离cDNA和基因组克隆的方法是本领域普通技术人员熟知的,并且包括使用用于探测或引发文库的本文公开的序列或其部分。通过例如杂交或聚合酶链式反应(“PCR”,Mullis,美国专利4,683,202)来识别和分离编码目的多肽的多核苷酸。可以用针对目的多肽、受体片段或其他特异性结合配偶体的抗体来探测表达文库。

[0195] 本发明的多核苷酸还可以通过自主合成来制备。短双链区段(60bp至80bp)的产生在技术上是简单的,并且可以通过合成互补链、然后退火来完成。较长的区段(通常>300bp)是由长度为从20个至100个核苷酸的单链片段以模块化形式进行组装的。多核苷酸的自主合成是在本领域普通技术人员的水平内的,并且合适的设备和试剂可从供应商处获得。通常参见Glick和Pasternak,Molecular Biotechnology,Principles&Applications of Recombinant DNA,ASM Press,Washington,D.C.,1994;Itakura等人,Ann.Rev.Biochem.53:323-356,1984;以及Climie等人,Proc.Natl.Acad.Sci.87:633-637,1990。

[0196] 另一方面,提供了用于生产本发明的多肽融合体(包括包含融合多肽的二聚体蛋白)的材料和方法。根据常规技术可以在基因工程宿主细胞中产生融合多肽。合适的宿主细胞是那些可以用外源DNA转化或转染并在培养物中生长的细胞类型,包括细菌、真菌细胞以及培养的高等真核细胞(包括多细胞生物体的培养细胞),特别是培养的哺乳动物细胞。由Sambrook等人(Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, NY,1989)和Ausubel等人(eds.,Current Protocols in Molecular Biology,Green和Wiley和Sons, NY,1993)公开了操纵克隆DNA分子和将外源DNA导入各种宿主细胞的技术。

[0197] 通常,编码融合多肽的DNA序列在表达载体内与其表达所需的其他遗传元件(通常包括转录启动子和终止子)可操作地连接。载体通常还含有一个或多个选择标记和一个或多个复制起点,尽管本领域普通技术人员将认识到在某些系统内可以在单独的载体上提供选择性标记、并且可以通过整合到宿主细胞基因组中来提供外源DNA的复制。启动子、终止子、选择性标记、载体和其他元件的选择是本领域普通技术人员的水平内的常规设计的问题。在文献中描述了许多此类元件,并且可通过供应商来获得。

[0198] 为了将ApoA-1融合多肽引导到宿主细胞的分泌途径中,在表达载体中提供分泌信号序列。分泌信号序列可以是天然ApoA-1多肽的分泌信号序列,或者可以来源于另一种分泌蛋白(例如t-PA;参见美国专利号5,641,655)或从头合成。工程化的切割位点可以包括在分泌肽与多肽融合体的其余部分之间的连接处以优化宿主细胞中的蛋白酶解加工。分泌信号序列与编码多肽融合体的DNA序列可操作地连接,即这两个序列以正确的阅读框连接并定位以引导新合成的多肽融合体进入宿主细胞的分泌途径。分泌信号序列通常位于编码目的多肽的DNA序列的5',尽管某些信号序列可以位于目的DNA序列中的其他位置(参见例如Welch等人,美国专利号5,037,743;Holland等人,美国专利号5,143,830)。根据本发明使用的分泌信号序列包括例如编码SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-18的多核苷酸。

[0199] 包含二聚化结构域的融合多肽的经由宿主细胞分泌途径的表达预期会导致产生二聚体蛋白。因此,另一方面,本发明提供了一种包含如上所述的第一和第二融合多肽的二聚体蛋白(例如包含第一融合多肽和第二融合多肽的二聚体蛋白,其中第一和第二融合多肽中的每一个都从氨基末端位置至羧基末端位置包含如本文所述的ApoA1-L1-D或ApoA1-L1-D-L2-P)。当在适当条件下温育组分多肽时,二聚体还可以在体外进行组装。通常,体外组装将包括在变性和还原条件下温育蛋白质混合物,然后对多肽进行重折叠和再氧化以形成二聚体。以下公开了在细菌细胞中表达的蛋白质的回收和组装。

[0200] 培养的哺乳动物细胞是用在本发明中的合适的宿主。将外源DNA导入哺乳动物宿主细胞的方法包括磷酸钙介导的转染(Wigler等人,Cell 14:725,1978;Corsaro和Pearson,Somatic Cell Genetics 7:603,1981;Graham和Van der Eb,Virology 52:456,1973)、电穿孔(Neumann等人,EMBO J.1:841-845,1982)、DEAE-葡聚糖介导的转染(Ausubel等人,同上)、以及脂质体介导的转染(Hawley-Nelson等人,Focus 15:73,1993;Ciccarone等人,Focus 15:80,1993)。由例如Levinson等人的美国专利号4,713,339、Hagen等人的美国专利号4,784,950、Palmiter等人的美国专利号4,579,821、以及Ringold的美国专利号4,656,134公开了在培养的哺乳动物细胞中产生重组多肽。合适的培养哺乳动物细胞包括COS-1(ATCC No.CRL 1650)、COS-7(ATCC No.CRL 1651)、BHK(ATCC No.CRL 1632)、BHK 570

(ATCC No.CRL 10314)、293 (ATCC No.CRL 1573; Graham等人, J.Gen.Viro1.36:59-72, 1977)、以及中国仓鼠卵巢(例如CHO-K1, ATCC No.CCL 61; CHO-DG44, Urlaub等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220, 1980) 细胞系。其他合适的细胞系是本领域已知的, 并且可从公共保藏机构(如American Type Culture Collection, Manassas, Virginia) 购得。可以使用强转录启动子, 如来自SV-40、巨细胞病毒或骨髓增殖性肉瘤病毒的启动子。参见例如美国专利号4,956,288和美国专利申请公开号20030103986。其他合适的启动子包括来自金属硫蛋白基因的启动子(美国专利号4,579,821和4,601,978) 和腺病毒主要晚期启动子。用在哺乳动物细胞中的表达载体包括已经分别以保藏号98669、98668和PTA-5266 保藏在American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA USA) 中的pZP-1、pZP-9和pZMP21, 以及这些载体的衍生物。

[0201] 通常使用药物选择来选择已经插入有外源DNA的培养的哺乳动物细胞。此类细胞通常被称为“转染子”。已经在存在选择剂的条件下培养并且能够将目的基因传递给其子代的细胞被称为“稳定转染子”。示例性的选择性标记是编码抗生素新霉素抗性的基因。在存在新霉素类药物(如G-418等)的条件下进行选择。选择系统还可以用于增加目的基因的表达水平, 这个过程被称为“扩增”。通过在存在低水平选择剂的条件下培养转染子、然后增加选择剂的量以选择产生高水平的导入基因产物的细胞来进行扩增。示例性的可扩增的选择性标记是二氢叶酸还原酶, 其赋予对甲氨蝶呤的抗性。还可以使用其他抗药基因(例如潮霉素抗性、多重抗药性、嘌呤霉素乙酰转移酶)。细胞表面标记和其他表型选择标记可以用于促进转染细胞的识别(例如通过荧光活化细胞分选法), 并且包括例如CD8、CD4、神经生长因子受体、绿色荧光蛋白等等。

[0202] 其他高等真核细胞也可以用作宿主, 包括昆虫细胞、植物细胞和禽类细胞。由Sinkar等人 (J.Biosci. (Bangalore) 11: 47-58, 1987) 对发根农杆菌(Agrobacterium rhizogenes) 作为用于在植物细胞中表达基因的载体的应用进行了综述。由Guarino等人的美国专利号5,162,222和WIPO公开WO 94/06463公开了昆虫细胞的转化和其中的外源多肽的产生。

[0203] 昆虫细胞可以用通常源自苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV) 的重组杆状病毒来感染。参见King和Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide; Chapman and Hall, London; O'Reilly等人, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford University Press, New York, 1994; 以及Richardson(编辑), Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, NJ, 1995。重组杆状病毒还可以通过使用由Luckow等人 (J.Viro1.67:4566-4579, 1993) 描述的基于转座子的系统来产生。这种利用转移载体的系统是以试剂盒形式(BAC-T0-BAC试剂盒; Life Technologies, Gaithersburg, MD) 可商购的。转移载体(例如PFASTBAC1; Life Technologies) 含有Tn7转座子, 以将编码目的蛋白的DNA移入保持在大肠杆菌中的作为被称为“杆粒”的大质粒的杆状病毒基因组中。参见Hill-Perkins和Possee, J.Gen.Viro1.71: 971-976, 1990; Bonning等人, J.Gen.Viro1.75: 1551-1556, 1994; 以及Chazenbalk和Rapoport, J.Biol.Chem. 270: 1543-1549, 1995。使用本领域已知的技术, 将编码多肽融合体的转移载体转化到大肠杆菌宿主细胞中, 并且对细胞进行筛选来筛选含有指示重组杆状病毒的间断lacZ基因的杆粒。含有重组杆状病毒基因组的杆粒DNA是使用常用技术进行分离

的，并且用于转染草地贪夜蛾细胞(如Sf9细胞)。随后产生表达多肽融合体的重组病毒。通过本领域常用的方法来制备重组病毒原液。

[0204] 为了产生蛋白质，使用重组病毒来感染宿主细胞，通常是源自秋夜蛾、草地贪夜蛾(例如Sf9或Sf21细胞)或粉纹夜蛾(例如HIGH FIVE细胞；Invitrogen, Carlsbad, CA)的细胞系。通常参见Glick和Pastemak,同上。还参见美国专利号5,300,435。使用无血清培养基来使细胞生长和维持。合适的培养基配方是本领域已知的并且可以从供应商获得。细胞从大约 $2-5 \times 10^5$ 个细胞的接种密度生长至 $1-2 \times 10^6$ 个细胞的密度，此时以0.1至10(更通常接近3)的感染复数(MOI)加入重组病毒原液。所用流程通常在提供的实验室手册中进行了描述(例如King和Possee,同上；O'Reilly等人,同上；Richardson,同上)。

[0205] 真菌细胞(包括酵母细胞)也可以用于本发明。就这一点而言特别感兴趣的酵母种类包括酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母和甲醇毕赤酵母。由例如Kawasaki的美国专利4,599,311、Kawasaki等人的美国专利号4,931,373、Brake的美国专利号4,870,008、Welch等人的美国专利号5,037,743以及Murray等人的美国专利号4,845,075公开了用外源DNA转化酿酒酵母细胞并从中产生重组多肽的方法。通过由选择性标记确定的表型、通常具有抗药性、或在不存在特定营养素(例如亮氨酸)的情况下生长的能力来对转化的细胞进行选择。用在酿酒酵母中的示例性载体系统是由Kawasaki等人(美国专利号4,931,373)公开的POT1载体系统，其允许通过在含有葡萄糖的培养基中生长来选择转化的细胞。用在酵母中的合适的启动子和终止子包括来自糖解酶基因(参见例如Kawasaki,美国专利号4,599,311；Kingsman等人,美国专利号4,615,974；以及Bitter,美国专利号4,977,092)和醇脱氢酶基因的启动子和终止子。还参见美国专利号4,990,446；5063154；5139936；和4,661,454。用于其他酵母(包括多形汉逊酵母、粟酒裂殖酵母、产乳糖酶酵母、脆壁克鲁维酵母、玉米黑粉菌、巴斯德毕赤酵母、甲醇毕赤酵母、赤酵母和麦芽糖假丝酵母)的转化系统是本领域已知的。参见例如Gleeson等人, J. Gen. Microbiol. 132:3459-3465, 1986; Cregg, 美国专利号4,882,279；以及Raymond等人, Yeast 14:11-23, 1998。曲霉菌细胞可以根据McKnight等人的美国专利号4,935,349的方法来使用。由Sumino等人在美国专利号5,162,228中公开了用于转化产黄孢子菌(Acremonium chrysogenum)的方法。由Lambowitz在美国专利号4,486,533中公开了用于转化脉孢菌属(Neurospora)的方法。在以下专利中公开了在甲醇毕赤酵母(Pichia methanolica)中生产重组蛋白：美国专利号5,716,808；5736383；5854039；以及5,888,768。

[0206] 原核宿主细胞(包括细菌大肠杆菌、芽孢杆菌属和其他属的菌株)也是本发明中有用的宿主细胞。用于转化这些宿主并表达克隆在其中的外源DNA序列的技术是本领域熟知的(参见例如Sambrook等人,同上)。当在细菌(如大肠杆菌)中表达融合多肽时，多肽可以通常作为不溶性颗粒而保留在细胞质中，或者可以通过细菌分泌序列而被引向周质间隙。在前一种情况下，细胞被溶解，并且使用例如盐酸胍或尿素将颗粒回收并变性。然后可以通过稀释变性剂(如通过在尿素与还原的和氧化的谷胱甘肽的组合的溶液中进行透析)、然后在缓冲盐溶液中进行透析来使变性的多肽重折叠和二聚化。在替代方案中，蛋白质可以以可溶形式从细胞质中回收，并且在不使用变性剂的情况下进行分离。在例如磷酸盐缓冲盐水中将蛋白质作为水提取物从细胞中回收。为了捕获目的蛋白，将提取物直接施加到色谱介质，如固定抗体或肝素-琼脂糖凝胶柱。通过破碎细胞(通过例如超声处理或渗透压震扰)并回收蛋白质，分泌的多肽可以以可溶性的和功能性的形式从周质间隙中回收，从而避免了变

性和重折叠的需求。参见例如Lu等人, *J. Immunol. Meth.* 267:213-226, 2002。

[0207] 根据常规流程将转化的或转染的宿主细胞在含有所选宿主细胞的生长所需的营养素和其他成分的培养基中进行培养。各种合适的培养基(包括确定成分培养基和复合培养基)是本领域已知的,并且通常包括碳源、氮源、必需氨基酸、维生素和矿物质。根据需要,培养基还可以含有生长因子或血清等成分。生长培养基通常通过例如药物选择或缺乏必需营养素来选择含有外源添加的DNA的细胞,所述必需营养素由表达载体上携带的选择性标记补充或共转染到宿主细胞中。

[0208] 通过常规的蛋白质纯化方法来纯化本发明的蛋白质,通常是通过色谱技术的组合。通常参见:*Affinity Chromatography: Principles&Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988; 以及 *Scopes, Protein Purification.: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York, 1994。包含免疫球蛋白重链多肽的蛋白质可以通过在固定化蛋白质A上的亲和层析来纯化。可以使用附加的纯化步骤(如凝胶过滤)来获得期望水平的纯度或提供脱盐、缓冲液交换等。

[0209] 例如,可以使用分级和/或常规纯化方法来获得从重组宿主细胞纯化而来的本发明的融合多肽和二聚体蛋白。通常,硫酸铵沉淀和酸或离液剂萃取可以用于样品的分级。示例性的纯化步骤可以包括羟磷灰石、尺寸排阻、FPLC和反相高效液相色谱。合适的色谱介质包括衍生葡聚糖、琼脂糖、纤维素、聚丙烯酰胺、特种二氧化硅等。PEI、DEAE、QAE和Q衍生物是合适的。示例性的色谱介质包括苯基、丁基或辛基衍生化的介质,如Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia)、Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA)、Octyl-Sepharose (Pharmacia) 等;或聚丙烯酸树脂,如Amberchrom CG 71 (Toso Haas) 等。合适的固体载体包括在其使用条件下不溶的玻璃珠、二氧化硅基树脂、纤维素树脂、琼脂糖珠、交联琼脂糖珠、聚苯乙烯珠、交联聚丙烯酰胺树脂等。这些支持物可以用允许通过氨基、羧基、巯基、羟基和/或碳水化合物部分使蛋白质附接的反应性基团进行修饰。

[0210] 偶联化学的实例包括溴化氰活化、N-羟基琥珀酰亚胺活化、环氧化物活化、巯基活化、酰肼活化、以及用于碳二亚胺偶联化学的羧基和氨基衍生物。这些和其他固体介质是公知的并且在本领域中被广泛使用,并且可以从供应商获得。选择用于多肽分离和纯化的特定方法是常规设计的问题,部分地由所选择的支持物的性质决定。参见例如:*Affinity Chromatography: Principles&Methods* (Pharmacia LKB Biotechnology 1988); 以及 *Doonan, Protein Purification Protocols* (The Humana Press 1996)。

[0211] 本领域普通技术人员可以设想蛋白质分离和纯化中的附加变化。例如,可以使用特异性结合如本文所述的融合多肽或二聚体蛋白的抗体(例如特异性结合对应于ApoA-1的多肽区段的抗体)通过免疫亲和纯化来分离大量蛋白质。

[0212] 本发明的蛋白质也可以通过利用特定的性质来分离。例如,可以使用固定化金属离子吸附(IMAC)色谱法来纯化富含组氨酸的蛋白质(包括那些包含聚组氨酸标签的蛋白质)。简言之,凝胶首先加入二价金属离子以形成螯合物(Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3:1, 1985)。富含组氨酸的蛋白质将根据所使用的金属离子而以不同的亲和力被吸附到这种基质上,并且将通过竞争洗脱、降低pH或使用强螯合剂来洗脱。其他纯化方法包括通过凝集素亲和层析和离子交换层析进行糖基化蛋白的纯化(参见例如M. Deutscher (编辑), *Enzymol.* 182:529, 1990)。在本发明的另外的实施方案中,可以构建目的多肽和亲和标

签(例如麦芽糖结合蛋白、免疫球蛋白结构域)的融合体以促进纯化。此外,可以利用融合多肽或其二聚体的受体或配体结合特性进行纯化。例如,可以通过使用亲和色谱法来分离包含A_β-结合多肽区段的融合多肽,其中β淀粉样蛋白(A_β)肽与柱结合,并且融合多肽与柱结合并随后使用标准色谱法洗脱。

[0213] 通常将本发明的多肽相对于污染性大分子(特别是其他蛋白质和核酸,并且不含传染性和致热剂)纯化到至少约80%纯度,更通常地到至少约90%纯度并优选地到至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的纯度。本发明的多肽也可以纯化至纯度大于99.9%的药学纯态。在某些制备中,纯化的多肽基本上不含其他多肽,特别是其他动物来源的多肽。

[0214] IV. 使用方法和药物组合物

[0215] 本发明的融合多肽和二聚体蛋白可以用于提供ApoA-1介导的疗法以治疗各种疾病或病症。在涉及进一步包含如本文所述的第二多肽区段(例如RNA酶、对氧磷酶、血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)、胆固醇酯转运蛋白(CETP)或卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT))的一些方面,融合多肽和二聚体蛋白可以进一步提供一种或多种用于这种治疗的附加生物学活性。

[0216] 在具体方面,本发明提供了用于治疗选自于以下各项的疾病或病症的方法:以动脉粥样硬化为特征的心血管疾病,神经退行性疾病,以淀粉样蛋白沉积为特征的疾病,自身免疫性疾病,炎性疾病,感染性疾病,肥胖症,代谢疾病综合征,肾病综合征,烧伤,暴露于硫芥子气,暴露于有机磷酸盐,以及癌症。所述方法通常包括向患有所述疾病或病症的受试者施用有效量的如本文所述的融合多肽或二聚体蛋白。

[0217] 根据本发明可以进行治疗的动脉粥样硬化性心血管疾病包括例如冠心病和中风。在冠心病治疗的一些变化中,冠心病是以急性冠脉综合征为特征。在一些实施方案中,动脉粥样硬化性心血管疾病选自于脑动脉疾病(例如额外脑动脉疾病、颅内脑动脉疾病)、动脉硬化性主动脉疾病、肾动脉疾病、肠系膜动脉疾病以及外周动脉疾病(例如主动脉闭塞性疾病)。

[0218] 根据本发明可进行治疗的神经退行性疾病包括例如以淀粉样蛋白沉积和/或痴呆为特征的神经退行性疾病。以淀粉样蛋白沉积为特征的示例性神经退行性疾病是阿尔茨海默病。以痴呆为特征的示例性神经退行性疾病包括阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病以及肌萎缩性侧索硬化症(ALS)。在一些实施方案中,神经退行性疾病是炎性疾病,例如像CNS的脱髓鞘性炎性疾病(例如多发性硬化症(MS),包括例如脊髓-眼MS、原发进行性MS(PPMS)、以及复发缓解型MS(RRMS))。

[0219] 在用于治疗神经退行性疾病(例如阿尔茨海默病或帕金森病)的方法的一些实施方案中,用于神经退行性疾病治疗的融合分子是具有ApoA1-L1-D-L2-RNA酶(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-RNA酶1)或ApoA1-L1-D-L2-对氧磷酶(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-PON1)结构的多肽,或者是通过任何前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白;在一些此类实施方案中,融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成:(i) SEQ ID NO:4的氨基酸残基19-675或25-675,(ii) SEQ ID NO:14的氨基酸残基19-657或25-675,(iii) SEQ ID NO:28的氨基酸残基19-883或25-883,(iv) SEQ ID NO:38的氨基酸残基19-873或25-873,(v) SEQ ID NO:46的氨基酸残基19-883或25-883,或(vi) SEQ

ID NO:48的氨基酸残基19-883或25-883。

[0220] 根据本发明可进行治疗的自身免疫性疾病包括例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症和1型糖尿病。在其他实施方案中,自身免疫性疾病选自:乳糜泻,神经炎,多肌炎,青少年类风湿性关节炎,牛皮癣,银屑病关节炎,白癜风,干燥综合征,自身免疫性胰腺炎,炎性肠病(例如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎),肝炎,肾小球肾炎,狼疮性肾炎,硬皮病,抗磷脂综合征,自身免疫性血管炎,结节病,自身免疫性甲状腺疾病,桥本氏甲状腺炎,格雷夫斯病,韦格纳肉芽肿病,重症肌无力,阿狄森氏病,自身免疫性葡萄膜视网膜炎,寻常性天疱疮,原发性胆汁性肝硬化,眼炎,葡萄膜炎,自身免疫性溶血性贫血,肺纤维化,慢性铍病以及特发性肺纤维化。在一些变型中,自身免疫性疾病选自:类风湿性关节炎,青少年类风湿性关节炎,银屑病关节炎,系统性红斑狼疮,狼疮肾炎,硬皮病,牛皮癣,干燥综合征,1型糖尿病,抗磷脂综合征和自身免疫性血管炎。

[0221] 在一些实施方案中,用于治疗自身免疫性疾病的融合分子是具有ApoA1-L1-D(例如ApoA1-L1-[Fc区])、ApoA1-L1-D-L2-RNA酶(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-RNA酶1)或ApoA1-L1-D-L2-对氧磷酶(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-PON1)结构的多肽,或者是通过任何前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白;在一些此类实施方案中,融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成:(i) SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524,(ii) SEQ ID NO:13的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524,(iii) SEQ ID NO:20的氨基酸残基19-501、19-500、25-501或25-501,(iv) SEQ ID NO:22的氨基酸残基19-515、19-514、25-515或25-514,(v) SEQ ID NO:24的氨基酸残基19-535、19-534、25-535或25-534,(vi) SEQ ID NO:4的氨基酸残基19-675或25-675,(vii) SEQ ID NO:14的氨基酸残基19-657或25-675,(viii) SEQ ID NO:28的氨基酸残基19-883或25-883,(ix) SEQ ID NO:38的氨基酸残基19-873或25-873,(x) SEQ ID NO:46的氨基酸残基19-883或25-883,或(xi) SEQ ID NO:48的氨基酸残基19-883或25-883。在用于治疗类风湿性关节炎(RA)的方法的一些具体变化中,用于RA治疗的融合分子是具有ApoA1-L1-D(例如ApoA1-L1-[Fc区])结构的多肽,或者是通过前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白;在一些此类实施方案中,所述融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成:(i) SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524,(ii) SEQ ID NO:13的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524,(iii) SEQ ID NO:20的氨基酸残基19-501、19-500、25-501或25-501,(iv) SEQ ID NO:22的氨基酸残基19-515、19-514、25-515或25-514,或(v) SEQ ID NO:24的氨基酸残基19-535、19-534、25-535或25-534。在用于治疗系统性红斑狼疮(SLE)的方法的一些具体变化中,用于SLE治疗的融合分子是具有ApoA1-L1-D-L2-RNA酶(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-RNA酶1)或ApoA1-L1-D-L2-对氧磷酶(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-PON1)结构的多肽,或者是通过任何前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白;在一些此类实施方案中,融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成:(i) SEQ ID NO:4的氨基酸残基19-675或25-675,(ii) SEQ ID NO:14的氨基酸残基19-657或25-675,(iii) SEQ ID NO:28的氨基酸残基19-883或25-883,(iv) SEQ ID NO:38的氨基酸残基19-873或25-873,(v) SEQ ID NO:46的氨基酸残基19-883或25-883,或(vi) SEQ ID NO:48的氨基酸残基19-883或25-883。在用于治疗多发性硬化症(MS)的方法的一些具体变化中,用于MS治疗的融合分子是具有

ApoA1-L1-D-L2-对氧磷酶(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-PON1)结构的多肽,或者是通过前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白;在一些此类实施方案中,融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成:(i) SEQ ID NO:28的氨基酸残基19-883或25-883,(ii) SEQ ID NO:38的氨基酸残基19-873或25-873,(iii) SEQ ID NO:46的氨基酸残基19-883或25-883,或(iv) SEQ ID NO:48的氨基酸残基19-883或25-883。

[0222] 根据本发明可以治疗的炎性疾病包括例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症、1型糖尿病、2型糖尿病和肥胖症。在一些实施方案中,炎性疾病是神经退行性炎性疾病,例如像多发性硬化症、阿尔茨海默病或帕金森病。在其他实施方案中,炎性疾病是动脉粥样硬化性疾病(例如冠心病或中风)。在其他变体中,炎性疾病选自:肝炎(例如非酒精性脂肪性肝炎),强直性脊柱炎,关节炎(例如骨关节炎、类风湿性关节炎(RA)、银屑病关节炎),克罗恩氏病,溃疡性结肠炎,皮炎,憩室炎,纤维肌痛,肠易激综合征(IBS)以及肾炎。在其他实施方案中,炎性疾病是炎症性肺部疾病;在一些此类实施方案中,炎症性肺部疾病选自:哮喘,慢性阻塞性肺病(COPD),支气管扩张症,特发性肺纤维化,高氧症,缺氧以及急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。在一些变化中,患有炎性肺部疾病的患者是暴露于硫芥子气(SM)的患者。在其他变化中,患有炎性肺部疾病的患者是暴露于有机磷酸酯(如杀虫剂)或其他神经毒素的患者。

[0223] 在一些实施方案中,用于治疗炎性疾病(例如炎性肺部疾病)的融合分子是具有ApoA1-L1-D(例如ApoA1-L1-[Fc区])、ApoA1-L1-D(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-RNA酶1)或ApoA1-L1-D-L2-对氧磷酶(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-PON1)结构的多肽,或者是通过前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白;在一些此类实施方案中,融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成:(i) SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524,(ii) SEQ ID NO:13的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524,(iii) SEQ ID NO:20的氨基酸残基19-501、19-500、25-501或25-501,(iv) SEQ ID NO:22的氨基酸残基19-515、19-514、25-515或25-514,(v) SEQ ID NO:24的氨基酸残基19-535、19-534、25-535或25-534,(vi) SEQ ID NO:4的氨基酸残基19-675或25-675,(vii) SEQ ID NO:14的氨基酸残基19-675或25-675,(viii) SEQ ID NO:28的氨基酸残基19-883或25-883,(ix) SEQ ID NO:38的氨基酸残基19-873或25-873,(x) SEQ ID NO:46的氨基酸残基19-883或25-883,或(xi) SEQ ID NO:48的氨基酸残基19-883或25-883。在治疗特发性肺纤维化的方法的一些具体变化中,用于特发性肺纤维化治疗的融合分子是具有ApoA1-L1-D(例如ApoA1-L1-[Fc区])结构的多肽,或者是通过前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白;在一些此类实施方案中,所述融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成:(i) SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524,(ii) SEQ ID NO:13的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524,(iii) SEQ ID NO:20的氨基酸残基19-501、19-500、25-501或25-501,(iv) SEQ ID NO:22的氨基酸残基19-515、19-514、25-515或25-514,或(v) SEQ ID NO:24的氨基酸残基19-535、19-534、25-535或25-534。在用于治疗暴露于硫芥子气(SM)或有机磷酸酯的患者的炎性肺部疾病的方法的一些具体变化中,用于治疗的融合分子是具有ApoA1-L1-D-L2(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-PON1)结构的多肽,或者是通过前述融合多肽的二聚化而形成的二聚

体蛋白；在一些此类实施方案中，融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成：(i) SEQ ID N0:28的氨基酸残基19-883或25-883，(ii) SEQ ID N0:38的氨基酸残基19-873或25-873，(iii) SEQ ID N0:46的氨基酸残基19-883或25-883，或(iv) SEQ ID N0:48的氨基酸残基19-883或25-883。在用于治疗急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、缺氧或高氧症的方法的一些具体变化中，用于治疗的融合分子是具有ApoA1-L1-D-L2-RNA酶(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-RNA酶1)结构的多肽，或者是通过前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白；在一些此类实施方案中，所述融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成：(i) SEQ ID N0:4的氨基酸残基19-675或25-675，或(ii) SEQ ID N0:14的氨基酸残基19-657或25-675。在某些实施方案中，此类ApoA1-L1-D-L2-RNA酶的变体用于治疗已经用氧气治疗了很长一段时间的早产儿。

[0224] 在一些实施方案中，用于治疗暴露于硫芥子气(SM)或暴露于有机磷酸酯的融合分子是具有ApoA1-L1-D-L2-对氧磷酶(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-PON1)结构的多肽，或者是通过前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白；在一些此类实施方案中，融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成：(i) SEQ ID N0:28的氨基酸残基19-883或25-883，(ii) SEQ ID N0:38的氨基酸残基19-873或25-873，(iii) SEQ ID N0:46的氨基酸残基19-883或25-883，或(iv) SEQ ID N0:48的氨基酸残基19-883或25-883。

[0225] 根据本发明可进行治疗的感染性疾病包括例如细菌感染和寄生虫感染。在一些实施方案中，寄生虫感染是布氏锥虫或利什曼原虫感染。在其他实施方案中，细菌感染是铜绿假单胞菌感染。

[0226] 在用于治疗铜绿假单胞菌感染的方法的一些实施方案中，用于铜绿假单胞菌感染治疗的融合分子是具有ApoA1-L1-D-L2-对氧磷酶(例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-PON1)结构的多肽，或者是通过前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白；在一些此类实施方案中，融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成：(i) SEQ ID N0:28的氨基酸残基19-883或25-883，(ii) SEQ ID N0:38的氨基酸残基19-873或25-873，(iii) SEQ ID N0:46的氨基酸残基19-883或25-883，或(iv) SEQ ID N0:48的氨基酸残基19-883或25-883。

[0227] 在一些实施方案中，用于治疗感染性疾病(例如炎性肺部疾病)的融合分子是具有ApoA1-L1-D(例如ApoA1-L1-[Fc区])结构的多肽，或者是通过前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白；在一些此类实施方案中，所述融合多肽包含或由与以下各项具有至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成：(i) SEQ ID N0:2的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524，(ii) SEQ ID N0:13的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524，(iii) SEQ ID N0:20的氨基酸残基19-501、19-500、25-501或25-501，(iv) SEQ ID N0:22的氨基酸残基19-515、19-514、25-515或25-514，或(v) SEQ ID N0:24的氨基酸残基19-535、19-534、25-535或25-534。

[0228] 根据本发明可进行治疗的癌症包括例如以下：头颈癌(例如口腔癌、口咽、鼻咽、下咽、鼻腔或鼻旁窦、喉、唇或唾液腺的癌症)；肺癌(例如非小细胞肺癌、小细胞癌或间皮瘤)；胃肠道癌(例如结肠直肠癌、胃癌、食管癌、或肛门癌)；胃肠道间质瘤(GIST)；胰腺癌；胰腺

腺泡细胞癌；小肠癌；肝脏或胆管癌（例如肝细胞腺瘤、肝细胞癌、血管肉瘤、肝外或肝内胆管肉瘤、壶腹癌、或胆囊癌）；乳腺癌（例如转移性乳腺癌或炎性乳腺癌）；妇科癌症（例如宫颈癌、卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌、阴道癌、外阴癌、妊娠滋养细胞肿瘤、或子宫癌，包括子宫内膜癌或子宫肉瘤）；泌尿道癌症（例如前列腺癌；膀胱癌；阴茎癌；尿道癌或肾癌，例如像肾细胞癌或移行细胞癌，包括肾盂和输尿管）；睾丸癌；中枢神经系统（CNS）癌症，如颅内肿瘤（例如星形细胞瘤、间变性星形细胞瘤、成胶质细胞瘤、少突胶质细胞瘤、间变性少突胶质细胞瘤、室管膜瘤、原发性CNS淋巴瘤、成神经管细胞瘤、生殖细胞瘤、松果体瘤、脑膜瘤、垂体瘤、神经鞘瘤（例如神经鞘瘤）、脊索瘤、颅咽管瘤、类丛神经肿瘤（例如脉络丛癌）；或神经元或神经胶质起源的其他颅内肿瘤）或脊髓肿瘤（例如神经鞘瘤、脑膜瘤）；内分泌肿瘤（例如甲状腺癌，例如像甲状腺癌、髓样癌、或甲状腺淋巴瘤；胰腺内分泌肿瘤，例如像胰岛瘤或胰高血糖素瘤；肾上腺癌、例如像嗜铬细胞瘤；类癌肿瘤；或甲状旁腺癌）；皮肤癌（例如鳞状细胞癌；基底细胞癌；卡波西肉瘤；或恶性黑素瘤，例如像眼内黑素瘤）；骨癌（例如骨肉瘤，例如像骨肉瘤、骨软骨瘤或尤文氏肉瘤）；多发性骨髓瘤；绿色瘤；软组织肉瘤（例如纤维肿瘤或纤维组织肉瘤）；平滑肌或骨骼肌的肿瘤；血管或淋巴管血管周肿瘤（例如卡波氏肉瘤）；滑膜肿瘤；间皮肿瘤；神经肿瘤；副神经节肿瘤；骨外软骨性或骨性肿瘤；以及多能间充质肿瘤。在一些此类实施方案中、将如本文所述的ApoA-1融合分子作为组合疗法的不同疗法之一施用给癌症患者，所述组合疗法例如像包含非ApoA1介导的免疫调节疗法（例如包含免疫检查点抑制剂的疗法）、放射疗法或化学疗法的组合疗法。

[0229] 在某些实施方案中，组合癌症疗法包含如本文所述的ApoA-1融合分子以及靶向疗法（例如靶向特定细胞表面或细胞外抗原的治疗性单克隆抗体、或靶向细胞内蛋白（例如细胞内酶）的小分子）。示例性的抗体靶向疗法包括抗VEGF（例如贝伐单抗）、抗EGFR（例如西妥昔单抗）、抗CTLA-4（例如伊匹木单抗）、抗PD-1（例如纳武单抗）以及抗PD-L1（例如派姆单抗）。示例性小分子靶向疗法包括：蛋白酶体抑制剂（例如硼替佐米）、酪氨酸激酶抑制剂（例如伊马替尼）、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂（例如塞利西利）；BRAF抑制剂（例如威罗菲尼或达拉菲尼）；以及MEK激酶抑制剂（例如曲美替尼）。

[0230] 在包含免疫检查点抑制剂的一些癌症组合疗法的变化中，组合疗法包括抗PD-1/PD-L1疗法、抗CTLA-4疗法或两者。在某些方面，如本文所述的ApoA-1融合分子可以增加针对抗CTLA-4或抗PD-1/PD-L1疗法的反应率、以及针对抗CTLA-4加抗PD-1/PD-L1疗法的反应率。本发明的融合分子还可用于降低与抗CTLA-4、抗PD-1/PD-L1或其组合相关的毒性。

[0231] 在某些变化中，根据本发明进行治疗的癌症选自于恶性黑素瘤、肾细胞癌、非小细胞肺癌、膀胱癌和头颈癌。这些癌症已显示出针对免疫检查点抑制剂抗PD-1/PD-L1和抗CTLA-4的反应。参见Grimaldi等人，*Expert Opin. Biol. Ther.* 16:433-41, 2016; Gunturi等人，*Curr. Treat. Options Oncol.* 15:137-46, 2014; Topalian等人，*Nat. Rev. Cancer* 16: 275-87, 2016。因此，在一些更具体的变化中，用本文所述的ApoA-1融合分子与抗PD-1/PD-L1疗法、抗CTLA-4疗法或两者联合对任何这些癌症进行治疗。

[0232] 在一些实施方案中，用于治疗癌症的融合分子是具有ApoA1-L1-D（例如ApoA1-L1-[Fc区]）、ApoA1-L1-D-L2-RNA酶（例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-RNA酶1）或ApoA1-L1-D-L2-对氧磷酶（例如ApoA1-L1-[Fc区]-L2-PON1）结构的多肽，或者是通过任何前述融合多肽的二聚化而形成的二聚体蛋白；在一些此类实施方案中，融合多肽包含或由与以下各项具有至

少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列组成: (i) SEQ ID NO:2的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524, (ii) SEQ ID NO:13的氨基酸残基19-525、19-524、25-525或25-524, (iii) SEQ ID NO:20的氨基酸残基19-501、19-500、25-501或25-501, (iv) SEQ ID NO:22的氨基酸残基19-515、19-514、25-515或25-514, (v) SEQ ID NO:24的氨基酸残基19-535、19-534、25-535或25-534, (vi) SEQ ID NO:4的氨基酸残基19-675或25-675, (vii) SEQ ID NO:14的氨基酸残基19-657或25-675, (viii) SEQ ID NO:28的氨基酸残基19-883或25-883, (ix) SEQ ID NO:38的氨基酸残基19-873或25-873, (x) SEQ ID NO:46的氨基酸残基19-883或25-883, 或 (xi) SEQ ID NO:48的氨基酸残基19-883或25-883。

[0233] 对于治疗用途,如本文所述的融合多肽或二聚体蛋白以与寻求治疗方法的疾病或病症的处理相关的常规方法一致的方式进行递送。根据本文的公开内容,将有效量的融合多肽或二聚体蛋白在足以预防或治疗疾病或病症的条件下施用于需要这种治疗方法的受试者一段时间。

[0234] 如本文所述的施用融合多肽或二聚体蛋白的受试者包括具有发展成特定疾病或病症的高风险的患者以及呈现现有疾病或病症的患者。在某些实施方案中,受试者已经被诊断为患有寻求治疗方法的疾病或病症。此外,可以在治疗过程中监测受试者疾病或病症的任何变化(例如疾病或病症的临床症状的增加或减少)。而且,在一些变化中,受试者不患有需要涉及施用ApoA-1蛋白的治疗的另一种疾病或病症。

[0235] 在预防性应用中,将药物组合物或药物以足以消除或降低风险或延迟疾病发作的量向易患或处于特定疾病风险的患者施用。在治疗应用中,将组合物或药物以足以治愈或至少部分阻止疾病及其并发症的症状的量施用于疑似或已经患有这种疾病的患者。足以实现这一点的量被称为治疗上或药学上有效的剂量或量。在预防性和治疗性方案中,通常以几种剂量施用药剂,直到已经实现了足够的反应(例如动脉粥样硬化消退或冠心病中已有的斑块的稳定)。通常,对反应进行监测,并且如果期望的反应开始减退则给予重复的剂量。

[0236] 为了对根据本发明的方法进行治疗的受试者进行识别,可以采用公认的筛选方法来确定与特定疾病相关的危险因素或确定受试者中已识别的现有疾病的状态。此类方法可以包括例如确定个体是否有亲属已被诊断为患有特定疾病。筛选方法还可以包括例如用于确定已知患有可遗传组分的特定疾病的家族状况的常规检查。为此,可以常规使用核苷酸探针来识别携带与特定目标疾病相关的遗传标记的个体。另外,本领域已知有多种免疫学方法可用于识别特定疾病的标志物。可以如已知的患者的症状学、年龄因素、相关危险因素等所指示的来实施筛选。这些方法允许临床医生常规地选择需要本文所述的方法进行治疗的患者。根据这些方法,使用本发明的融合多肽或二聚体蛋白的治疗可以作为独立的治疗计划或作为其他治疗的随访、辅助或协调治疗方案来实施。

[0237] 为了施用,根据本发明的融合多肽或二聚体蛋白被配制成药物组合物。包含如本文所述的融合多肽或二聚体蛋白的药物组合物可以根据已知方法进行配制以制备药学上可用的组合物,由此将治疗性分子与药学上可接受的载体组合成混合物。如果组合物的施用能够被接受患者所耐受,则称其为“药学上可接受的载体”。无菌磷酸盐缓冲盐水是药学上可接受的载体的一个实例。其他合适的载体是本领域普通技术人员熟知的。参见例如Gennaro(编辑),Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Company, 19th ed. 1995)。制剂可以进一步包含一种或多种赋形剂、防腐剂、增溶剂、缓冲剂、白蛋白,

以防止小瓶表面上的蛋白质损失等。

[0238] 包含本发明的融合多肽或二聚体蛋白的药物组合物以有效量施用给受试者。融合多肽或二聚体蛋白可以通过多种给药方式施用给受试者,包括例如通过肌内、皮下、静脉内、心房内、关节内、肠胃外、鼻内、肺内、透皮、胸膜内、鞘内、以及口服给药途径。为了预防和治疗的目的,融合多肽或二聚体蛋白可以在很长一段时间内通过连续递送(例如连续透皮递送)以单次团注方式、或以重复给药方案(例如基于每小时、每天或每周)施用给受试者。

[0239] 在这种情况下有效剂量的确定通常基于动物模型研究、随后是人类临床试验,并且通过确定显著降低模型对象中受试疾病或病症的发生或严重性的有效剂量和施用方案来进行指导。本发明的组合物的有效剂量取决于许多不同的因素,包括施用方式、靶位点、患者的生理状态、患者是人还是动物、施用的其他药物、是预防性还是治疗性的、以及组合物本身的具体活性及其在个体中引起所需反应的能力。通常,患者是人,但在某些疾病中,患者可以是非人类哺乳动物。典型地,调整给药方案以提供最佳治疗反应,即优化安全性和功效。因此,治疗或预防有效量也是有益效果超过任何不良副作用的量(例如在治疗动脉粥样硬化性心血管疾病的情况下,其中不良副作用都被有益效果超过,所述有益效果如HDL增加、动脉粥样硬化消退和/或斑块稳定化)。为了施用本发明的融合多肽或二聚体蛋白,剂量通常为约0.1 μ g至100mg/kg或1 μ g/kg至约50mg/kg,更通常地为10 μ g至5mg/kg受试者的体重。在更具体的实施方案中,所述药剂的有效量为约1 μ g/kg至约20mg/kg之间、约10 μ g/kg至约10mg/kg之间或约0.1mg/kg至约5mg/kg之间。在这个范围内的剂量可以通过单次或多次施用来实现,包括例如按天或每天多次给药、每周、每两周或每月施用。例如,在某些变化中,方案包括初始施用、然后以每周或每两周的间隔进行多次随后施用。另一种方案包括初始施用,然后以每月或每两个月的间隔进行多次随后施用。可替代地,如通过监测疾病或病症的临床症状和/或监测疾病生物标志物或其他疾病相关因素(例如在动脉粥样硬化性心血管疾病情况下的HDL水平)所指示的,施用可以是不规则的。

[0240] 用于评估本发明的ApoA-1组合物治疗动脉粥样硬化的功效的特别合适的动物模型包括例如已知的缺乏低密度脂蛋白受体(LDLR)或ApoE的小鼠模型。LDLR缺陷小鼠在服食高脂饮食12周后发生动脉粥样硬化斑块,并且人ApoA-1(用脂质重建)在所述模型中有效减少了斑块。ApoE缺陷小鼠还通常用于研究动脉粥样硬化,并且人ApoA-1(用脂质重建)在此模型中迅速起作用。肝脂酶转基因的兔子是用于测试ApoA-1组合物的另一种已知的动脉粥样硬化模型。

[0241] 阿尔茨海默病的一种模型在小鼠中使用突变淀粉样蛋白- β -前体蛋白(APP)和早老素1的过量表达。在这些小鼠中,人ApoA-1的过量表达防止了记忆和学习障碍。参见Lewis等人, *J Biol. Chem.* 285:36958-36968, 2010。

[0242] 类风湿性关节炎(RA)的胶原诱导性关节炎(CIA)模型也是已知的。CIA与RA具有相似的免疫学和病理学特征,使其成为评估ApoA-1组合物功效的理想模型。参见例如Charles-Schoeman等人, *Clin Immunol.* 127:234-44, 2008(描述了示出了ApoA-1模拟肽D-4F在CIA模型中的功效的研究)。另一种已知的RA模型是在雌性Lewis大鼠中的PG-多糖(PG-PS)诱导的关节炎。在这些小鼠中,施用ApoA-1蛋白或重构HDL减少了急性和慢性关节炎症。Wu等人, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:543-551, 2014。

[0243] 用于多发性硬化症 (MS) 的动物模型包括例如实验性变应性脑脊髓炎 (EAE) 模型, 所述模型依赖于通过用 CNS 抗原 (在 EAE 的背景下也被称为“致脑炎病原”) 进行免疫来诱导 CNS 中的自身免疫应答, 其导致炎症、脱髓鞘和虚弱。在这种模型中, ApoA-1 缺陷小鼠显示出比野生型动物表现出更多的神经退行性变和更差的病情。参见 Meyers 等人, *J. Neuroimmunol.* 277:176-185, 2014。

[0244] 可以评估本发明的融合分子在动物肿瘤模型中的抗肿瘤活性, 例如像 B16 黑素瘤 (一种免疫原性较差的肿瘤)。已经研究了多种肿瘤免疫治疗模型。参见 Ngioow 等人, *Adv. Immunol.* 130:1-24, 2016。已经用检查点抑制剂抗 CTLA-4、抗 PD-1 及其组合对 B16 黑素瘤模型进行了广泛研究。仅在与 GM-CSF 转导的肿瘤疫苗联合或与抗 PD-1 联合时, 抗 CTLA-4 单独在所述模型中具有有效的治疗效果。参见 Weber, *Semin. Oncol.* 37:430-439, 2010; Ai 等人, *Cancer Immunol. Immunother.* 64:885-92, 2015; Haanen 等人, *Prog. Tumor Res.* 42:55-66, 2015。例如通过向已经形成可触及的皮下肿瘤结节的 B16 黑素瘤小鼠给药后肿瘤生长减缓, 显示了 ApoA-1 融合分子用于治疗恶性黑素瘤的功效, ApoA-1 融合分子的功效可以在 B16 黑素瘤小鼠中单独地、或者与另一种抗癌疗法 (例如抗 CTLA-4, 有或没有肿瘤疫苗或有或没有抗 PD-1/PD-L1) 一起进行评估。例如, 在不存在肿瘤疫苗的情况下, 使用本文所述的 ApoA-1 融合分子与抗 CTLA-4 的组合的 B16 黑素瘤小鼠中的肿瘤排斥证明使用 ApoA-1 疗法使抗 CTLA-4 的反应增强。在用于评估包含人蛋白质序列的 ApoA-1 融合分子的示例性研究 (其在小鼠中具有功能活性, 但是预期在这些模型中具有免疫原性 (并且因此可能导致在 7-10 天后形成中和抗体)) 中, 在短时间内 (例如一周, 以例如间隔三天、两次约 40mg/kg 的剂量来给药) 给予小鼠本发明的融合分子, 然后监测肿瘤生长, 通常注射融合分子后持续两至三周。

[0245] 可以由主治临床医生改变药物组合物的剂量以维持目标部位处的所需浓度。例如, 如果选择静脉递送方式, 则靶组织处的血流中的局部药剂浓度可以在每升组合物约 1-50 纳摩尔之间, 有时在约 1.0 纳摩尔/升与 10、15 或 25 纳摩尔/升之间, 取决于受试者的状态和计划的实测反应。可以基于递送模式 (例如经表皮递送 vs 递送至粘膜表面) 来选择更高的或更低的浓度。还应该根据施用制剂 (例如鼻喷雾剂 vs 粉剂、缓释口服或注射颗粒、透皮制剂等) 的释放速率来调整剂量。为了达到相同的血清浓度水平, 例如释放速率为 5 纳摩尔 (在标准条件下) 的缓释颗粒将以释放速率为约 10 纳摩尔的颗粒的剂量的约两倍来施用。

[0246] 包含如本文所述的融合多肽或二聚体蛋白的药物组合物可以制成液体形式、气雾剂或固体形式。液体形式通过可注射溶液、气雾剂、滴剂、局部解剖学溶液以及口服混悬剂说明。示例性的固体形式包括胶囊剂、片剂、以及控释剂型。通过微渗透泵和植入物来展示后一种形式。参见例如 Bremer 等人, *Pharm. Biotechnol.* 10:239, 1997; Ranade, “Implants in Drug Delivery”, *Drug Delivery Systems* 95-123 (Ranade 和 Hollinger 编辑, CRC Press 1995); Bremer 等人, “Protein Delivery with Infusion Pumps”, *Protein Delivery: Physical Systems* 239-254 (Sanders 和 Hendren 编辑, Plenum Press 1997); Yewey 等人, “Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant”, *Protein Delivery: Physical Systems* 93-117 (Sanders 和 Hendren 编辑, Plenum Press 1997)。其他固体形式包括乳膏、糊剂、其他局部解剖学施用等。

[0247] 已经设计了可降解性聚合物微球来维持治疗性蛋白质的较高的全身水平。微球由

可降解聚合物制备,所述可降解聚合物如聚(丙交酯-共-乙交酯) (PLG)、聚酸酐类、聚(原酸酯)、不可生物降解的乙基乙酸乙烯酯聚合物,其中蛋白质被包埋在聚合物中。参见例如Gombotz和Pettit,Bioconjugate Chem.6:332,1995;Ranade,“Role of Polymers in Drug Delivery”,Drug Delivery Systems 51-93 (Ranade和Hollinger编辑,CRC Press 1995);Roskos和Maskiewicz,“Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery”,Protein Delivery:Physical Systems 45-92 (Sanders和Hendren编辑,Plenum Press 1997);Bartus等人,Science 281:1161,1998;Putney和Burke,Nature Biotechnology 16:153,1998;Putney,Curr.Opin.Chem.Biol.2548,1998。聚乙二醇(PEG)包被的纳米球也可以提供治疗性蛋白质的静脉内给药的载体。参见例如Gref等人,Pharm.Biotechnol.10167,1997。

[0248] 其他剂型可以是本领域普通技术人员设计的,如以下所示:例如,Ansel和Popovich,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (Lea和Febiger,第5版,1990);Gennaro(编辑),Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company,第19版,1995)以及Ranade和Hollinger,Drug Delivery Systems (CRC Press 1996)。

[0249] 如本文所述的药物组合物还可以用于组合疗法的情况下。术语“组合疗法”在本文中用于表示向受试者施用至少一种治疗有效剂量的如本文所述的融合多肽或二聚体蛋白和另一种治疗剂。

[0250] 药物组合物可以作为试剂盒来提供,所述试剂盒包含容器,所述容器包含如本文所述的融合多肽或二聚体蛋白。治疗性分子可以例如以单剂量或多剂量的可注射溶液的形式提供,或者作为将在注射前重构的无菌粉剂提供。可替代地,此类试剂盒可包含干粉分散器、液体气雾剂发生器、或用于给予治疗性蛋白质的喷雾器。此类试剂盒可进一步包含有关适应症的文字信息以及药物组合物的用法。

[0251] 下面通过非限制性实施例进一步说明本发明。

[0252] 实施例1

[0253] 分子设计和制备:设计、合成、并通过瞬时转染COS7细胞来表达两种ApoA-1-Fc cDNA构建体,然后通过蛋白质A层析来纯化所表达的蛋白质。一种构建体具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列并编码SEQ ID NO:2的融合多肽,并且在本文中也称为ApoA-1 (26) Fc或THER4。所述构建体含有编码人ApoA-1的C末端 (SEQ ID NO:2的残基1-267) 与人 γ 1Fc变体 (SEQ ID NO:2的残基294-525) 之间的26个氨基酸的接头 (SEQ ID NO:2的残基268-293) 的DNA区段。根据在哺乳动物细胞中的表达以及分泌信号肽(残基1-18)的切割和任何可能的前肽(残基19-24)的切割,这种融合多肽具有预测的对应于SEQ ID NO:2的残基19-525、19-524、25-525或25-524的氨基酸序列(已知Fc区的C末端赖氨酸在产生含有Fc的蛋白的过程中经常被切割)。另一构建体含有与ApoA-1 (26) Fc构建体相同的ApoA-1和Fc区,但是缺少人ApoA-1与Fc区之间的(gly4ser)接头;这种构建体在本文中也被称为ApoA-1 (2) Fc (Theripion)或THER0(无(gly4ser)重复单元)。由于在人IgG1的ApoA-1区与铰链区之间插入重叠的限制位点,这种构建体确实含有两个氨基酸的接头。

[0254] 胆固醇外流:使用体外测定来测量ApoA-I融合蛋白的胆固醇外流活性。参见Tang等人,J Lipid Res.47:107-14,2006。使用放射性标记的胆固醇和表达米非司酮可诱导的

人ABCA1的BHK细胞进行体外胆固醇外流测定。为了在处理前24小时标记细胞胆固醇,将H3-胆固醇加入到生长培养基中,并且使用10nM米非司酮来诱导ABCA1达16-20小时。通过在37°C下将具有或不具有融合蛋白的细胞温育2小时、在冰上冷却、并将培养基与细胞分离以测量放射性标记的胆固醇来测量胆固醇外流。使用野生型人ApoA-1蛋白作为阳性对照。直接与Fc连接而没有ApoA-1与Fc区之间的任何接头(APOA1重组人类蛋白,hIgG1-Fc标签;Sino Biological, Inc.)的可商购获得的ApoA-1-Fc蛋白也进行了测试,并且在本文中称为ApoA-1(0)Fc(Sine Biol)。这种测定的结果显示于图1中。与具有两个氨基酸的接头的ApoA-1-Fc(ApoA-1(2)Fc)或不含接头(ApoA-1(0)Fc(Sino Biol))的ApoA-1-Fc相比,在含有具有26个氨基酸的接头的ApoA-1-Fc(ApoA-1(26)Fc(Theripion))的培养物中胆固醇外流增加。ApoA-1(26)Fc还具有与野生型人ApoA-1(对照ApoA-1)相似的活性。

[0255] 实施例2:融合构建体的生成与序列验证

[0256] 设计附加的ApoA1融合构建体,并且将融合基因序列提交给Blue Heron (Bothell, WA) 用于基因合成。图2A和图2B显示了功能结构域位置的基本示意图,用于设计ApoA1融合蛋白。将融合基因构建体和编码融合基因的片段亚克隆到哺乳动物表达载体pDG中,所述融合基因被插入到通过限制酶消化而分离的基于pUC的载体中。简言之,使用HindIII+XbaI侧翼限制位点从载体中除去各表达基因,通过凝胶电泳分离亚片段,使用QIAquick纯化柱提取DNA,并且在30微升EB缓冲液中洗脱。将片段连接到indIII+XbaI消化的pDG载体中,并且将连接反应物转化到NEB 5- α 化学感受态细菌中。将克隆接种到含有100 μ g/ml氨苄青霉素的3ml LB肉汤中,在37°C下以200rpm振荡培养过夜,并且根据制造商的说明书使用QIAGEN旋转质粒小量制备试剂盒来制备质粒DNA。测序引物是从IDT Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) 获得的,并且包括以下各项:

- [0257] pdgF-2:5'-ggtttggcagtacatcaatgg-3' (SEQ ID NO:16) ;
- [0258] pdgR-2:5'-ctattgtcttcccaatcctccc-3' (SEQ ID NO:17) ;
- [0259] higgras:5'-acttgcacttgactcctt-3' (SEQ ID NO:18) 。

[0260] 将质粒DNA (800ng) 和测序引物 (25pmol或5 μ l的5pmol/ μ l原液) 混合,并且通过GENEWIZ (South Plainfield, NJ) 进行DNA测序。然后分析色谱图,将序列组装成重叠群,并且使用Vector Nti Advance 11.5软件 (Life Technologies, Grand Island, NY) 对序列进行验证。

[0261] 实施例3:融合蛋白在瞬时HEK 293T转染系统中的表达

[0262] 此实施例展示了在哺乳动物瞬时转染系统中的质粒构建体的转染和本文所述的融合蛋白的表达。将具有正确序列的Ig融合基因片段插入到哺乳动物表达载体pDG中,并且使用QIAGEN质粒制备试剂盒 (QIAGEN, Valencia, CA) 来扩增阳性克隆的DNA。生成了五种不同的构建体。它们各自包括人ApoA-1基因的天然编码序列 (SEQ ID NO:35所示的核苷酸序列,编码SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列)。每个序列包括野生型信号肽 (SEQ ID NO:35的核苷酸1-54,编码SEQ ID NO:36的氨基酸1-18) 以及载脂蛋白A-1的前肽序列 (SEQ ID NO:35的核苷酸55-72,编码SEQ ID NO:36的氨基酸19-24)。ApoA-1序列的C末端Q (Gln) 残基经由长度可变的接头区段与人IgG1铰链、CH2和CH3结构域连接以产生单链(ApoA-1)-1nk-人IgG1 Fc融合基因/蛋白质。人IgG1的铰链序列进行突变,使得三个半胱氨酸被丝氨酸残基取代,从而消除了在此区域中形成二硫键或可能危及融合蛋白正确折叠的不成对的半胱氨酸。

酸。CH2的P238和P331残基也突变为丝氨酸以消除效应子功能(如ADCC和补体结合)。每个构建体还包括插入在载脂蛋白A-1的羧基末端(以序列…TKKLNTQ(SEQ ID NO:35残基261-267)结束)与人Fc的铰链序列的起始(以基序…EPKSSDKT…(SEQ ID NO:2残基294-301)开始)之间的接头序列。所述接头序列的长度范围是从两个氨基酸(或在包含与侧翼结构域的重叠区的情况下是四个氨基酸)至36个氨基酸,取决于构建体。

[0263] 最短的接头仅包含两个重叠的限制位点(Bg1II和XhoI),其中接头长度为六个附加核苷酸或两个附加的非天然氨基酸。限制位点被整合到分子的编码序列中,使得只需要将两个附加氨基酸添加到氨基酸序列中。接头的Bg1II位点与ApoA-1的C末端谷氨酰胺的密码子重叠,并且编码XhoI位点的三个核苷酸形成铰链(E-谷氨酸)的第一个氨基酸的密码子。接头氨基酸序列(包括两个重叠的氨基酸)如SEQ ID NO:20的残基267-270中所示,其由SEQ ID NO:19的核苷酸816-825编码。此构建体的融合基因和蛋白被识别为THER0(因为不存在(gly4ser)重复单元)或apoA-1-1nk(2)hIgG。THER0的核苷酸和氨基酸序列被列为SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20。这些图使用THER0命名来指定此构建体。

[0264] 第二个构建体包括编码侧接限制位点(16个氨基酸的接头)的两个(gly4ser)序列的接头,并且此构建体的融合基因和蛋白质被识别为THER2(或apoA-1-1nk(16)-hIgG1或apoA-1-(g4s)2-hIgG1)。THER2的核苷酸和氨基酸序列分别被列为SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22。(gly4ser)2接头序列如SEQ ID NO:22的残基268-283中所示,(gly4ser)2接头的编码核苷酸序列如SEQ ID NO:21的残基817-864中所示。

[0265] 第三个构建体包括编码侧接限制位点(26个氨基酸的接头)的四个(gly4ser)序列的接头,并且此构建体的融合基因和蛋白质被识别为THER4(或apoA-1-(g4s)4-mthIgG或apoA-1-1nk(26)-mthIgG),其中“THER4”中的“4”是指(gly4ser)重复单元的数目,并且数字26是指在非天然的、引入的接头序列中编码的氨基酸的总数。THER4的核苷酸和氨基酸序列分别被列为SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2。(gly4ser)4接头序列如SEQ ID NO:50(SEQ ID NO:2的268-293位残基)中所示,(gly4ser)4接头的编码核苷酸序列如SEQ ID NO:49(残基SEQ ID NO:1的817-894)中所示。

[0266] 第四个构建体包括编码侧接限制位点(36个氨基酸的接头)的六个(gly4ser)序列的接头,并且此构建体的融合基因和蛋白质被识别为THER6(或apoA-1-(g4s)6-mthIgG或apoA-1-1nk(36)-mthIgG)。THER6的核苷酸和氨基酸序列分别被列为SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24。(gly4ser)6接头序列如SEQ ID NO:52(SEQ ID NO:24的268-303位残基)中所示,(gly4ser)6接头的编码核苷酸序列如SEQ ID NO:51(残基SEQ ID NO:23的817-924)中所示。

[0267] 第五个构建体包括编码侧接限制位点(36个氨基酸的接头)的四个(gly4ser)序列的接头,但是另外,构建体在IgG1结构域的羧基末端包含第二接头和酶序列。(gly4ser)4接头序列如上针对THER4(核苷酸和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50所示)所述。第二接头是18个氨基酸长的序列(VDGASSPVNVSSPSVQDI;SEQ ID NO:8的氨基酸残基1-18,由SEQ ID NO:7的核苷酸1-54编码),其包括N-联糖基化位点,接着是编码人RNA酶1酶活性的序列。接头序列被列为SEQ ID NO:7的前54个核苷酸,或SEQ ID NO:8的前18个氨基酸,随后是RNA酶序列。ApoA-1-1nk-hIgG1区段与NLG-RNA酶融合,并且此构建体被识别为THER4RNA2。核苷酸和氨基酸序列分别被识别为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4。

[0268] 制备五种构建体中的每种构建体的Miniprep DNA, 并且通过Nanodrop分析来对浓度进行检查。

[0269] 转染前一天, 将约 1.2×10^6 个293T细胞铺板于60mm培养皿中。使用QIAGEN POLYFECT®试剂(目录号301105/301107)并按照制造商的说明书来使用小质粒制剂(对于60mm板, 4.0 μ g的DNA)进行293T转染。转染后48-72小时收获培养物上清液。对于大多数转染, 转染后24小时将培养基更换为无血清培养基, 并且在收获之前将培养物再温育48小时。

[0270] 培养物上清液直接用于进一步的分析。将7 μ l来自瞬时转染细胞的各无血清培养物上清液加载到凝胶上, 将4X LDS样品缓冲液(Life Technologies, Grand Island, NY)的4倍稀释液加入到每各样品中以得到1X LDS上样缓冲液的终浓度。为了减少凝胶, 将样品还原剂加入至1/10的最终体积。将样品在72°C下加热10分钟并上样到NuPAGE®4-12% Bis-Tris凝胶(Life Technologies/ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY)上。将凝胶在1X NuPAGE®MOPS SDS-PAGE运行缓冲液(NP0001, Life Technologies/ThermoFisher)中在180伏电压下进行电泳1.5小时, 并且使用XCell II™ Blot Module(目录号EI002/EI9051, Life Technologies/ThermoFisher, Grand Island, NY)在30伏下将蛋白质转移至硝酸纤维素1小时。在含有5%脱脂牛奶的PBS中在4°C下过夜来封闭印迹。将印迹与辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人IgG的1:250000倍稀释液(Jackson Immunoresearch, 目录号109-036-098, 批号122301)一起温育。将印迹在PBS/0.05% Tween 20中洗涤三次, 每次30分钟, 并且在ThermoScientific ECL试剂(目录号32106)中显影1分钟。将印迹暴露于放射自显影胶片30秒至2分钟, 取决于印迹。图3示出了来自代表性293T瞬时转染的培养物上清液的蛋白质印迹分析。在每个转染系列中包括阳性和阴性对照(分别为CD40IgG和模拟转染/无DNA)。转染的样品如图3所示;泳道从左到右如下:泳道#1-模拟转染;泳道#2-CD40IgG;泳道#3-MW标志物;泳道#4-THER0;泳道#5-THER2;泳道#6-THER4;泳道#7-THER6;泳道#8-分子量标记;泳道#9-THER4RNA2。

[0271] THER0、THER2、THER4和THER6融合蛋白在50kDa分子量标记上方的位置处跑动。这些融合蛋白的预测分子量应分别为大约55、56、56.6和57kDa。通过每个融合蛋白的迁移率改变, 接头长度增加是显而易见的。预测THER4RNA2分子为大约73.2kDa, 而预测ApoA-1在28.6kDa处跑动。预期CD40IgG对照在约55kDa处跑动。

[0272] 实施例4: THERmthIgG和多亚基融合构建体和融合蛋白在稳定CHO细胞系中的表达

[0273] 这个实施例展示了本文所述的不同Ig融合基因在真核细胞系中的表达以及通过SDS-PAGE和IgG夹心ELISA对所表达的融合蛋白的表征。

[0274] 表达融合蛋白的稳定细胞系的转染和选择

[0275] 在CMV启动子的控制下, 通过含有THER-mthIgG cDNA(通过不同长度的接头而从人IgG1的铰链和Fc结构域中分离的人apo A-1的形式)的、可选择的、可扩增质粒(pDG)的电穿孔进入中国仓鼠卵巢(CHO) CHO DG44细胞中, 实现了Ig融合蛋白的稳定产生。

[0276] pDG载体是编码具有减毒启动子以增加质粒的选择压力的DHFR选择性标记的pcDNA3的修饰形式。使用QIAGEN HISPEED®maxiprep试剂盒来制备质粒DNA(200 μ g), 并且纯化的质粒在独特的AscI位点(New England Biolabs, Ipswich, MA目录号R0558)处进行线性化, 通过苯酚提取(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)进行纯化, 进行乙醇沉淀, 洗涤, 并在EX-CELL®302组织培养基(目录号14324, SAFC/Sigma Aldrich, St. Louis, MO)中进行重

悬浮。在苯酚提取和乙醇沉淀之前,加入鲑精DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 作为载体DNA。使质粒和载体DNA共沉淀,并且通过电穿孔将400 μ g用于转染 2×10^7 CHO DG44细胞。

[0277] 为了转染,CHO Dg44细胞在含有谷氨酰胺(4mM)、丙酮酸盐、重组胰岛素(1 μ g/ml)、青霉素-链霉素和含有谷氨酰胺(4mM)的EX-302培养基(目录号13424C, SAFC Biosciences, St. Louis, MO)、青霉素-链霉素和2倍DMEM非必需氨基酸(均来自Life Technologies, Grand Island, NY)的EX-CELL®302培养基(目录号13424C, SAFC Biosciences, St. Louis, MO)中生长,所述培养基在以下称为“EX-CELL 302完全”培养基。用于未转染细胞和待转染细胞的培养基还含有HT(从次黄嘌呤和胸昔的100倍溶液中稀释)(Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY)。使用具有电容增量剂的BioRad (Hercules, CA) GENEPULSER®电穿孔单元在280伏、950微法拉下进行电穿孔。在0.4cm间隙的无菌一次性比色皿中进行电穿孔。在将培养物转移到T75烧瓶中的非选择性EX-CELL 302完全培养基中之前,在电穿孔之后将电穿孔的细胞温育5分钟。

[0278] 以250个细胞/孔(2500个细胞/ml)至2000个细胞/孔(20,000个细胞/ml)范围内的不同连续稀释度在96孔平底板(Costar)中进行选择性铺板之前,使得转染细胞在非选择性培养基中恢复过夜。用于细胞克隆的培养基是含有50nM甲氨蝶呤的EX-CELL 302完全培养基。每隔五天用80 μ l新鲜培养基为转染平板补料。在第一批补料之后,移除培养基并用新鲜培养基替换。监测平板,并且对具有克隆的单个孔进行补料直到克隆突起而接近融合,之后将克隆扩增到含有1ml培养基的24孔平皿中。将细胞在24孔板中进行转移和扩增之前,将原来的96孔板的培养物上清液的等分试样采集到第二个96孔板中。冷冻此第二板直到进行ELISA分析以估计IgG浓度。

[0279] 筛选培养物上清液用于重组融合蛋白的生产水平

[0280] 一旦初始转染子的克隆突出足够,将来自主孔的培养物上清液的连续稀释液解冻,并且通过使用IgG夹心ELISA来对稀释物进行筛选而用于Ig融合蛋白的表达。简言之,将NUNC MAXISORP®板在4℃下用2 μ g/ml F(ab')2山羊抗人IgG (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA; 目录号109-006-098)在PBS中包被过夜。将板用PBS/3% BSA封闭,并且将连续稀释的培养物上清液在室温下温育2-3小时或在4℃下过夜。在PBS/0.05%吐温20中将平板洗涤三次,并且与辣根过氧化物酶缀合的F(ab')2山羊抗人IgG (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, 目录号109-036-098)在PBS/0.5% BSA中以1:7500-1:10000在室温下温育1-2小时。用PBS/0.05%吐温20将平板洗涤5次,用SUREBLUE RESERVE™ TMB底物(KPL Labs, Gaithersburg, MD; 目录号53-00-02)对结合进行检测。通过加入等体积的1N HCl来终止反应,并且在SYNERGY™ HT平板读数器(Biotek, Winooski, VT)上以450nM读取各平板上的每个孔的吸光度。通过将培养物上清液的稀释物的OD450与使用已知标准品(具有与THER克隆相同的Ig尾部的蛋白A纯化的人IgG融合蛋白)连续稀释液生成的标准曲线进行比较来估计浓度。使用GEN5™软件(Biotek, Winooski, VT)和Microsoft Office EXCEL®spreadsheet软件来收集和分析数据。

[0281] 在表3和图4A-4E和5A-5C中总结了CHO转染子的初始筛选结果。表3示出了筛选的克隆的数目、从最初的96孔培养物观察到的表达水平范围、以及从最初的T25和/或24孔消耗的培养物观察到的表达的总结。图4A-4E示出了代表从转染系列的每个CHO克隆获得的生产水平的一组柱状图。来自THER0、THER2、THER4、THER6和THER4RNA2转染的克隆在所示的五

个图中的每个图中均显示为一组。通过IgG夹心ELISA来筛选每个克隆至少一次以评估融合蛋白的表达水平。图5A-5C示出了三个图,显示了初始筛选后具有最高表达的CHO转染子的融合蛋白表达的6天和10天测定的结果。通过在T25烧瓶中以 1×10^5 个活细胞/ml (5 $\times 10^5$ 初始接种物) 设立5ml培养物来进行六天和十天测定。培养物生长六天后,取出1ml等分试样,并且计数活细胞和死细胞。然后离心细胞,并且保存培养物上清液用于通过IgG夹心ELISA和其他分析来进行进一步的分析。将剩余的培养物再温育四天,直到第10天,并且计数细胞的细胞数量、活力,并采集上清液样品用于IgG夹心ELISA。如第6天和第10天的细胞数量、活力和融合蛋白浓度的图示所示,对于每个克隆以柱状形式列出结果。

[0282] 表3:ApoA1-IgG融合蛋白在稳定转染的CHO DG44细胞中的表达

构建体	筛选的克隆	96孔上清液表达范围(μg/ml)	消耗的T25顶部产物(μg/ml)	顶部克隆的6/10天测定(μg/ml)
THER0	45	0-46.5	135	60/230
THER2	135	0-36	145	45/125
THER4	237	0-76	165	70/200
THER6	192	0-57	145	85/250
THER4RNA2	50	0-45	90	50/118

[0283] [0284] 将融合蛋白产量最高的克隆扩大到T25瓶中、然后到T75瓶中,以提供足够数量的细胞用于融合蛋白的冷冻和扩大生产。通过在含甲氨蝶呤的培养基中进行扩增,在四个最佳克隆的培养物中生产水平进一步增加。在细胞的每次连续传代中,EX-CELL 302完全培养基含有浓度增加的甲氨蝶呤,使得只有扩增DHFR质粒的细胞能够存活。在选择性扩增下转染的培养基含有不同水平的甲氨蝶呤(Sigma-Aldrich)作为选择剂,范围从50nM到1μM,取决于所达到的扩增程度。

[0285] 从培养物上清液中纯化融合蛋白

[0286] 从表达Apo A-1-1nk-mthIgG1构建体的消耗的CHO细胞培养物中收集上清液,通过0.2μm PES表达过滤器(Nalgene, Rochester, NY)进行过滤,并且在蛋白A-琼脂糖(IPA 300交联琼脂糖或IPA 400HC交联琼脂糖)柱(Repligen, Waltham, MA)上进行重力流动亲和层析。将柱用0.1M柠檬酸盐缓冲液(pH2.2)进行调节,然后用0.5M NHCO₃将上清液调节至pH 8.0,并且通过重力流进行上样以使融合蛋白结合。然后在洗脱之前用几个柱体积的柱洗涤缓冲液(90mM Tris-Base, 150mM NaCl, 0.05%叠氮化钠, pH8.7)或Dulbecco改良的PBS(pH7.4)来对柱进行洗涤。用0.1M柠檬酸盐缓冲液(pH 3.2)来洗脱结合的蛋白质。将馏分(0.8-0.9ml)收集到0.2ml 0.5M NaCO₃-NaHCO₃缓冲液中以中和每一馏分。使用Nanodrop(Wilmington De)显微分光光度计在280nm下测定来自每个馏分的等分试样(2μl)的蛋白质浓度,使用0.1M柠檬酸盐缓冲液(pH3.2)、0.5M NNaCO₃以10:1v:v比例进行空白测定。合并含有融合蛋白的馏分,并且通过使用Spectrum Laboratories G2(Ranch Dominguez, CA, 目录号G235057, Fisher Scientific目录号08-607-007) FLOAT-A-LYZER®单元(MWCO 20kDa)抗D-PBS(Hyclone, ThermoFisher Scientific, Dallas, TX) (pH7.4)进行透析来进行缓冲液更换。在无菌2.2升Coming转瓶中在4°C下过夜进行透析。

[0287] 在透析之后,使用0.2μM过滤器单元来过滤蛋白质,并且使用PYROTELL®LAL凝胶系统单项测试小瓶(STV)(目录号G2006,Associates,Cape Cod,East Falmouth,MA)来测试等分试样的内毒素污染。使用VECTORNTI®Version 11.5软件包(Informax,North Bethesda,MD)中的蛋白质分析工具以及在线ExPASy蛋白质分析工具的预测切割位点,确定THER4融合蛋白的1mg/ml溶液的预测OD 280为1.19(不含信号肽或6氨基酸前肽的成熟蛋白)或1.27(包括6氨基酸前肽)。尚不清楚相对于重组分子的前肽的完全切割,从CHO细胞分泌的融合蛋白是否是同质的。使用这些工具来校正每种纯化的融合蛋白的OD280。

[0288] apo A-1 Ig融合蛋白的还原和非还原SDS-PAGE分析

[0289] 通过在SDS-聚丙烯酰胺4-12% Bis-Tris NuPAGE®凝胶(Life Technologies, Grand Island,NY)上进行电泳来分析纯化的融合蛋白。在具有或不具有二硫键还原的情况下将融合蛋白样品在LDS样品缓冲液中在72°C下加热10分钟,然后施加到4-12% Bis-Tris凝胶(目录号NP0301,LIFE Technologies,Grand Island,NY)。将五微克的各纯化蛋白质上样到凝胶上。通过IMPERIAL™蛋白染色(Pierce Imperial Protein Stain Reagent,目录号24615,ThermoFisher Scientific/Pierce,Rockford,IL)进行电泳后,蛋白质被显现,并且在蒸馏水中脱色。在相同的凝胶(KALEIDOSCOPE™ Prestained Standards,目录号161-0324,Bio-Rad,Hercules,CA)上包括分子量标志物。代表性非还原凝胶和还原凝胶的结果分别显示在图6A和6B中。泳道从左至右依次为:泳道#1-KALEIDOSCOPE预染MW标记;泳道#2-THER0;泳道#3-THER2;泳道#4-THER4;泳道#5-THER6;泳道#6-THER4RNA2;泳道#7-KALEIDOSCOPE预染的MW标记。在图中标出了大致的分子量。

[0290] 再次,不同融合蛋白之间的接头长度差异在还原凝胶和非还原凝胶两者上都是明显的,其中THER0蛋白仅在50kDa以上跑动。当在还原或非还原条件下进行电泳时,通过每种蛋白质具有相似的迁移率而证明缺乏铰链二硫键。

[0291] apo A-1 IgG融合蛋白的非变性凝胶电泳

[0292] 使蛋白A纯化融合蛋白进行非变性PAGE分析。BLUE非变性PAGE凝胶使用4-16% Bis-Tris NativePAGE™凝胶(Life Technologies/ThermoFisher)来跑动,其中根据制造商的说明书来制备的阴极和阳极缓冲液。使用不加洗涤剂的4倍样品缓冲液在不加热的条件下制备样品(每种融合蛋白4.5μg)。凝胶在150伏下跑动30分钟,然后在180伏下跑动1小时,在220伏下跑动最后一小时。用蒸馏水洗涤凝胶并在IMPERIAL™蛋白质染色剂中温育两小时。将凝胶彻底脱色过夜,在蒸馏水中反复洗涤以除去用于使凝胶跑动的阴极缓冲液中存在的蓝色染料。图7示出了使用这些条件的代表性天然凝胶。分子量标志物是GE Healthcare高分子量校准标志物(六种大的多组分蛋白质的混合物),再悬浮于用于样品的上样缓冲液中,再次不加洗涤剂。将样品上样如下:泳道#1——ORENCIA®(abatacept; CTLA4hIgG);泳道#2——抗小鼠CD40单克隆抗体1C10;泳道#3——THER4RNA2;泳道#4——GE Healthcare高MW校准标志物;泳道#5——THER6;泳道#6——THER4;泳道#7——THER2;泳道#8——THER0;泳道#9——GE Healthcare高MW标志物;泳道#10——Athens ResearchApo A-1。

[0293] 天然ApoA1-IgG融合蛋白以大约140至233kDa标志物之间的分子量跑动,并且具有与ORENCIA®(abatacept)(具有相同的人IgG1Fc结构域的CTLA4Ig融合蛋白)相似的迁移率。THER4RNA酶双特异性融合蛋白可能由于RNA酶结构域的高度碱性组成而不能被

IMPERIAL染色染色,但似乎以更加分散的模式迁移,其中主要的可见带在233和440kDa标准之间迁移。

[0294] 实施例5:使用IgG/Apo A-1夹心ELISA来评估THER Apo A-1融合蛋白的结合

[0295] 进行抗原结合ELISA以评估由固定化的抗人IgG (Fc-特异性的) 捕获的Ig融合蛋白与人载脂蛋白A-1特异性的辣根过氧化物酶缀合的抗体结合并由其进行检测的能力。用1.5 μ g/ml山羊抗人IgG (Jackson Immunoresearch) 包被高蛋白结合96孔ELISA板 (NUNC MAXISORP® 平板, ThermoFisher Scientific)。用PBS/3% BSA将平板在4°C下封闭过夜。将每种THER融合蛋白的连续稀释液 (从5 μ g/ml开始) 在4°C下温育过夜。将平板洗涤三次,然后与1:1500稀释的辣根过氧化物酶缀合的抗人载脂蛋白A-1 (ThermoFisher Scientific, 目录号PAI-28965) 一起温育。将平板在室温下温育2小时。将平板洗涤四次,然后以80 μ l/孔将SUREBLUE RESERVE™ TMB底物 (目录号:53-00-02, KPL, Gaithersburg, MD) 加入到平板中。通过加入80 μ l/孔的1N HC1来终止显影。使用SYNERGY™ HT Bioteck平板读取器 (Bioteck Instruments, Winooski, VT) 在450nm下读取样品,并且使用GEN5™ 2.0软件来分析数据。

[0296] 图8示出了代表性Apo A-1结合ELISA的结果。绘制OD450对融合蛋白的浓度。所有0、2、4、6和THER4RNA2融合蛋白均展现出类似的剂量-反应曲线,表明可以通过结合Ig尾部来各自捕获分子并通过将Apo A-1结构域与靶向人Apo A-1的抗体结合来进行检测。人载脂蛋白A-1 (Athens Research&Technology, 产品目录号16-16-120101) 被包括作为对照,并且没有被抗人Fc特异性抗体捕获。在较高的浓度下,分子显示出靶向Apo A-1的抗体的弱结合,表明Apo A-1可能与塑料结合较弱而没有被抗Fc抗体捕获。

[0297] 实施例6:RNA酶双功能酶脂质转运融合分子的表达与检测

[0298] 对于Apo A-1 IgG RNA酶融合蛋白 (THER4RNA2), 测定RNA酶活性以确定所述酶与融合构建体的羧基末端的融合是否干扰分子消化RNA的能力。图9和图10示出了使用SYNERGY™ HT读板器的荧光和动力学测定功能进行的RNASEALERT™测定 (IDT, Coralville, IA) 的结果。RNASEALERT™底物是合成的RNA寡核苷酸,一端有荧光素 (R),并且另一端有黑色淬灭剂 (Q)。当完整时,底物几乎没有或没有荧光,但是当被RNA酶切割时,底物发出绿色荧光 (490nm激发, 520nm发射) 并且可以用适当配备的荧光读板器进行检测。此测定中的阳性信号显示由于(多个)样品中存在RNA酶对底物的切割而随时间增加的荧光信号。将微板与加入到96孔板的每个孔中的RNASEALERT底物 (固定浓度为20pmol/ μ l)、1X RNASEALERT缓冲液和融合蛋白或酶对照稀释液一起进行温育。对于每个样品以一式三份进行酶活性测定,并且使得动力学测定以每60秒连续读数进行45分钟。在图9中以RFU/孔的迹线作为时间的函数显示了每个孔在每个时间点的递增的荧光。酶/融合蛋白的连续稀释液包括20pmol/ μ l、13.4pmol/ μ l、8.9pmol/ μ l、6pmol/ μ l、4pmol/ μ l、2.7pmol/ μ l、1.8pmol/ μ l和不含酶。包括RNA酶A (Ambion/ThermoFisher, 目录号AM2270) 作为阳性对照,并且包含THER4 (apo A-1-nknk-hIgG) 作为阴性对照以与THER4RNA2融合蛋白进行比较。在图10中显示了使用4pmol/ μ l酶产生的迹线的重叠。显示了RNA酶A、THER4RNA2和THER4的两次重复。所有的酶都是4pmol/ μ l,并且存在底物20pmol/ μ l。

[0299] 实施例7:胆固醇外流到融合蛋白受体的测量

[0300] 使用两种单独的测定,评估THER0、THER2、THER4、THER6和THER4RNA2融合蛋白作为

受体分子从预加载的单核细胞/巨噬细胞哺乳动物细胞系进行胆固醇逆向转运的能力。第一种测定使用人单核/巨噬细胞系THP-1以及胆固醇、BODIPY-胆固醇或TOPFLUOR-胆固醇的荧光标记衍生物(荧光硼二吡咯亚甲基二氟化物与甾醇碳-24连接的的胆固醇化合物)(Avanti Polar Lipids,Alabaster,AL)。THP-1细胞在含有4mM谷氨酰胺、10%FBS的RPMI中生长,并且在铺板之前维持在对数生长中期。所述协议是从Sankaranarayanan等人(J.Lipid Res.52:2332-2340,2011)和Zhang等人(ASSAY and Drug Development Technologies:136-146,2011)概述的规程改编的。收获细胞并以 2×10^6 个细胞/ml或 2×10^5 个细胞/孔在含有33ng/ml PMA的100 μ lRPMI培养基中接种到96孔平底组织培养板中。将细胞在培养物中维持36-48小时以使得在测定之前进行分化。将培养基吸出,并且在1xPBS中洗涤平板。以体积100 μ l/孔加入由以下成分(含有培养基补充物的不含酚红的RPMI,含有2 μ g/ml的ACAT抑制剂、Sandoz 58-035(Sigma-Aldrich,St.Louis MO)、2.5 μ M的LXR激动剂T0-901317(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)、35ng/ml PMA(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)和1.25mM的甲基 β -环糊精(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)的0.2%FBS,50 μ M胆固醇(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO),以及25 μ M MTOPFLUOR胆固醇(Avanti Polar Lipids,Alabaster,AL))组成的标记培养基,并且在37°C、5%CO₂下温育10-12小时。将平衡培养基RPMI与10%FBS、33ng/ml PMA(100 μ l/孔)一起加入到每个孔中,并且在与受体温育之前温育8小时。从平板上吸出标记/平衡培养基,并且用200 μ l/孔PBS+0.15%BSA将平板洗涤两次。将外流受体试剂加入到外流缓冲液中的各个孔中,并且在测定前温育2小时。将受体加入到外流缓冲液中,浓度范围从100nM至500nM,取决于测定。外流缓冲液是含有生长添加剂和0.15%BSA的无酚红RPMI。样品以每个条件/受体6-12组跑动,并且进行最少5次重复用于统计分析。APO A-1跑动作为阳性对照,并且单独使用外流介质作为背景阴性对照(基线外流)。使得外流反应进行两个小时,在此之后将培养基采集到黑色平底96孔板中(培养基读数)。通过向外流平板的每个孔中添加100 μ l的0.1N NaOH并在4°C下在平板振荡器上温育15分钟来制备细胞裂解物。将细胞裂解物转移至黑色96孔板(裂解物读数),并且使用SYNERGY™ Ht读板器在485nm激发和528nm发射下测量培养基和裂解物样品的荧光。外流量被计算为荧光测量值的比率:(培养基/(培养基+裂解物)×100)。通过从每个测试受体的总外流/样品中减去没有受体存在的样品的基线读数来计算具体外流量。使用GraphPad Prism v 4.0软件(San Diego,CA)进行数据分析。测定结果显示于图11中。

[0301] 第二次测定使用小鼠巨噬细胞细胞系J774A.1(ATCC,Manassas,VA)以使用胆固醇的放射性衍生物([³H]-胆固醇)来评估胆固醇逆向转运(RCT),如Sankaranarayanan等人(J.Lipid Res.52:2332-2340,2011)和Yancey等人(J.Lipid Res.45:337-346,2004)所述。简言之,将J774细胞(在24孔板中,每孔 3.5×10^5)在补充有5%FBS、ACAT抑制剂Sandoz 58-035(2 μ g/ml)和4 μ Ci/ml [³H]-胆固醇的0.25ml RPMI培养基中进行温育。ACAT抑制剂在测定过程中始终存在。在与受体温育之前,将细胞在含有或不含有cAMP(0.3mM)的培养基中平衡16-24小时。cAMP的存在上调了ABCA1分子。在含有1%BSA的培养基中洗涤标记的细胞,然后在MEM-HEPES培养基中以50、100和200nM添加受体分子,并且在测量之前温育4小时。所有处理都是一式三份地进行。然后通过液体闪烁计数来测量100 μ l培养基中的[³H]-胆固醇。外流百分比是基于外流培养之前细胞中存在的总[³H]-胆固醇(t_0 样品)。为了测量细胞中存在的[³H]-胆固醇,通过在异丙醇中温育细胞单层过夜来提取细胞脂质。脂质提取后,通过液

体闪烁计数来测量脂质提取物中存在的总^{[3]H}-胆固醇。使用GraphPad Prism软件4.0 (San Diego, CA) 进行数据分析。测定结果显示于图12中。

[0302] 实施例8:PON1双功能酶脂质转运融合分子的构建

[0303] 除了上述apoA-1-IgG-RNA酶表达构建体之外,构建了将ApoA-1磷脂转运功能物理连接到其他酶结构域的活性位点的其他分子。这样一种分子含有对应于人PON1 (PON1) 的区段,分别具有如SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的核苷酸和编码的氨基酸序列。此芳香基酯酶存在于仅与高密度脂蛋白 (HDL) 相关的人血清中,并且抑制低密度脂蛋白分子的氧化。这种氧化保护还抑制了血管和冠状动脉病的发展。PON1的成熟蛋白形式是独特的,在于其在分泌之后保留其氨基末端信号肽 (SEQ ID NO:12的氨基酸残基1至15,由SEQ ID NO:11的核苷酸残基1至45编码)。具有可切割氨基末端的PON1的突变形式的表达表明,PON1通过其氨基末端通过与磷脂直接结合而不是首先与ApoA-1结合而与脂蛋白相关。参见Sorenson等人,Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 19:2214-2225, 1999。发现去除信号序列消除了PON1部分与磷脂、蛋白脂质体和血清脂蛋白的结合。另外,在不存在磷脂的情况下,野生型PON1不直接与ApoA-1结合。参见Sorenson等人,同上。这些PON1信号序列突变体显示了酶活性降低,可能是由于不能与最佳的磷脂底物结合。尽管如此,重组活性形式的人PON1已经在缺少此信号序列的细菌中表达。参见Stevens等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:12780-12784, 2008。ApoA-1的存在似乎稳定了酶的芳香基酯酶活性。

[0304] 去除PON1的氨基末端信号序列(并且由此去除磷脂结合部分)以及用人apoA-1-1nk-IgG取代此区域直接地将酶活性与ApoA-1的磷脂结合结构域连接,从而稳定了芳香基酯酶并同时提供与ApoA-1结构域结合的最佳底物。这样的分子仍然流通并且与ApoA-1结合的磷脂一起转运,并且由于用替代性的磷脂结合结构域替换了信号序列结构域而保留了酶活性。另外,融合了这两个结构域的双功能分子展现出改进的表达,并且通过apo A-1的活性结合而促进PON1活性靶向脉络丛。PON1已经在胰岛素受体靶向抗体的羧基末端表达(参见Boado等人,Mol. Pharm. 5:1037-1043, 2008;Boado等人,Biotechnology and Bioengineering 108:186-196, 2011);然而,在此融合蛋白中包含氨基末端信号肽。这里描述的融合基因和蛋白质提供了一种PON1融合蛋白表达的新方法,从而通过截短的酶与apo A-1结构域的直接物理偶联来消除对信号肽的需求,由此保留和稳定了PON1的结合功能和芳香酯酶活性两者。

[0305] 融合基因和蛋白的序列对于THER4PON1显示于SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28(分别为核苷酸和氨基酸序列),并且对于THER2PON1显示于SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38(分别为核苷酸和氨基酸序列)。相似的融合基因和蛋白含有与(多个)hIgG1-接头-PON1区段融合的ApoA-1的替代性接头形式。THER4PON1和THER2PON1分子内的PON1序列对应于人PON1的Q192等位基因。

[0306] PON1的替代形式还用于构建将PON1与Apo A-1连接的双功能融合分子。影响不同底物酶活性的序列多态性存在于PON1序列的192位。参见Steven等人,同上。在此位置的氨基酸可以是人体内的谷氨酰胺 (Q) 或精氨酸 (R),也可以是兔子中的赖氨酸 (K)。据报道192位的精氨酸等位基因在体外和在体内具有较高的催化活性。类似地,已经报道,兔的在192位具有赖氨酸的PON1形式在体外和在体内具有更稳定的催化活性(参见Steven等人,同上;

Richter等人,Circulation Cardiovascular Genetics 1:147-152,2008)。这些替代性PON1序列对PON1 Q192K形式显示于SEQ ID N0:41(核苷酸)和SEQ ID N0:42(氨基酸),并且对于PON1 Q192R形式显示于SEQ ID N0:43(核苷酸)和SEQ ID N0:44(氨基酸)。在这些交替的PON1形式与THER4序列(apoA-1(g4s)4hIgGNLG-...)之间的融合构建体被命名为THER4PON1 Q192K(核苷酸和氨基酸序列分别显示于SEQ ID N0:45和SEQ ID N0:46)或THER4PON1 Q192R(核苷酸和氨基酸序列分别显示于SEQ ID N0:47和SEQ ID N0:48),取决于在PON1序列的氨基酸192处(或在SEQ ID N0:46和SEQ ID N0:48所示的THER4PON1Q变体的氨基酸720处)的PON1序列中存在的多态性。类似地,融合基因/蛋白的THER2形式表示为THER2PON1Q192K或THER2PON1Q192R。对于所有这些融合构建体,去除PON1氨基末端信号序列(SEQ ID N0:12的氨基酸1-15)。

[0307] 使用无毒底物4-(氯甲基)苯基乙酸酯(CMPA)和乙酸苯酯来筛选包含PON1的双特异性酶脂蛋白转移蛋白的芳香基酯酶/PON1活性(参见Richter等人,同上)。这些底物对于筛选活性是优选的,因为底物和反应产物与有机磷酸酯杀虫剂相比是相对无毒的。将CMPA底物(Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO)与融合蛋白的连续稀释液一起温育,并且使用可透紫外线的96孔板(Costar, Cambridge, Mass)在25°C下以280nm测定CMPA水解速率4分钟。在20mM Tris-HCl(pH8.0)、1.0mM CaCl₂中,以固定的底物浓度为3mmol/L,使稀释液以一式三份或一式四份进行跑动。类似地,以乙酸苯酯作为底物进行芳香基酯酶测定。在高盐和低盐条件下,在270nm下测量PA水解速率4分钟。

[0308] 实施例9:PAFAH或CETP双功能酶脂质转运融合分子的构建

[0309] 除了上述apoA-1-IgG-RNA酶和apoA-1-IgG-PON1表达构建体之外,构建了将ApoA-1磷脂转运功能物理连接到其他酶结构域的活性位点的其他分子。

[0310] 一种这样的分子含有对应于人PAFAH(脂蛋白相关磷脂酶A2、人磷脂酶A2-VII、血小板活化因子乙酰水解酶)的区段,其中核苷酸和编码的氨基酸序列分别如SEQ ID N0:31和SEQ ID N0:32中所示(还参见GenBank登录号NM_005084(转录变体1))。PAFAH氨基酸序列由SEQ ID N0:31的核苷酸270至1592编码,其中终止密码子在核苷酸1593至1595处。融合基因和蛋白被设计成使人IgG的羧基末端的PAFAH编码序列与插入在两个分子之间的N联糖基化接头融合。THER4PAFAH核苷酸和编码的氨基酸序列分别显示为SEQ ID N0:33和SEQ ID N0:34。不含21个氨基酸信号肽的PAFAH序列(MVPPKLHVLFCCLCGCLAVVYP;SEQ ID N0:32的残基1-21)与SEQ ID N0:34的氨基酸位置544上的NLG接头融合。

[0311] 另一个这样的分子含有对应于人CETP或胆固醇酯转运蛋白(CETP)的区段、转录变体1,其中核苷酸和编码的氨基酸序列分别如SEQ ID N0:29和SEQ ID N0:30中所示(还可参见GenBank登录号NM_000078)。CETP蛋白由SEQ ID N0:29的核苷酸58至1537编码。融合基因和蛋白被设计成使人IgG的羧基末端的CETP编码序列与插入在两个分子之间的N联糖基化接头融合。THER4CETP(或人apoA-1-(g4s)4-hIgG-NLG-CETP)核苷酸和编码的氨基酸序列分别如SEQ ID N0:39和SEQ ID N0:40所示。编码信号肽(SEQ ID N0:30的氨基酸1-17)的核苷酸(SEQ ID N0:29的57-107)被去除以便产生NLG接头序列与CETP成熟肽之间的融合基因。这两个蛋白质结构域之间的融合连接位于SEQ ID N0:40的氨基酸544处。

[0312] 根据上文,应当理解,尽管本文出于解释说明的目的已经描述了本发明的具体实施例,但仍可以在不偏离本发明的精神和范围的条件下做出多种修改。因此,除了所附权利

要求书以外,本发明并受限。本文引用的所有公开物、专利和专利申请均出于所有目的通过引用整体并入本文。

- [0001] 序列表
[0002] <110> 赛瑞品股份有限公司
[0003] <120> APOA-1融合多肽及相关组合物和方法
[0004] <130> TRP-0110PC
[0005] <150> US 62/215,256
[0006] <151> 2015-09-08
[0007] <160> 54
[0008] <170> PatentIn version 3.5
[0009] <210> 1
[0010] <211> 1602
[0011] <212> DNA
[0012] <213> 人工
[0013] <220>
[0014] <223> hWTAP01- (g4s) 4-mthIgG DNA
[0015] <400> 1
[0016] gttaagcttg ccaccatgaa agctgcggtg ctgaccttgg ccgtgctctt cctgacgggg 60
[0017] agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg 120
[0018] aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctcaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc 180
[0019] cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agctccttga caactgggac 240
[0020] agcgtgacct ccaccccttag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc 300
[0021] tggataacc tggaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag 360
[0022] gaggtgaagg ccaaggtgca gcccttacctg gacgacttcc agaagaagtg gcaggaggag 420
[0023] atggagctct accgccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc 480
[0024] cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccactgg gcgaggagat ggcgcaccgc 540
[0025] ggcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cttacagcga cgagctgcgc 600
[0026] cagcgccttgg ccgcgcgcct tgaggctctc aaggagaacg gcggccgcag actggccgag 660
[0027] taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgtc 720
[0028] gaggacctcc gccaaggcct gctcccggt ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc 780
[0029] gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca 840
[0030] ggtggtggag gatctggagg aggtggaggt ggtggaggtg gtttaccgg tctcgagccc 900
[0031] aaatcttctg acaaaaactca cacatctcca ccgtcccccag cacctgaact cctgggagga 960
[0032] tcgtcagtct tccttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 1020
[0033] gaggtcacat gcgtgggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 1080
[0034] tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 1140
[0035] agcacgttacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1200
[0036] gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagcct ccatcgagaa aaccatctcc 1260
[0037] aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag 1320
[0038] ctgaccaaga accaggttcag cctgacctgc ctggtaaaag gtttctatcc cagcgacatc 1380
[0039] ggcgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg 1440
[0040] ctggactccg acggctcctt cttcccttac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1500
[0041] cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1560

[0042] cagaagagcc tctctctctc tccgggtaaa tgataatcta ga 1602
 [0043] <210> 2
 [0044] <211> 525
 [0045] <212> PRT
 [0046] <213> 人工
 [0047] <220>
 [0048] <223> hWTAP01- (g4s) 4-mthIgG
 [0049] <220>
 [0050] <221> 信号
 [0051] <222> (1) .. (18)
 [0052] <400> 2
 [0053] Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
 [0054] 1 5 10 15
 [0055] Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
 [0056] 20 25 30
 [0057] Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
 [0058] 35 40 45
 [0059] Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
 [0060] 50 55 60
 [0061] Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
 [0062] 65 70 75 80
 [0063] Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
 [0064] 85 90 95
 [0065] Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
 [0066] 100 105 110
 [0067] Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
 [0068] 115 120 125
 [0069] Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
 [0070] 130 135 140
 [0071] Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu
 [0072] 145 150 155 160
 [0073] Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala
 [0074] 165 170 175
 [0075] Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp
 [0076] 180 185 190
 [0077] Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn
 [0078] 195 200 205
 [0079] Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu
 [0080] 210 215 220
 [0081] Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln
 [0082] 225 230 235 240
 [0083] Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala

[0084]	245	250	255
[0085]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly		
[0086]	260	265	270
[0087]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[0088]	275	280	285
[0089]	Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser		
[0090]	290	295	300
[0091]	Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu		
[0092]	305	310	315
[0093]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
[0094]	325	330	335
[0095]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
[0096]	340	345	350
[0097]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[0098]	355	360	365
[0099]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
[0100]	370	375	380
[0101]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
[0102]	385	390	395
[0103]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
[0104]	405	410	415
[0105]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
[0106]	420	425	430
[0107]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
[0108]	435	440	445
[0109]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
[0110]	450	455	460
[0111]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
[0112]	465	470	475
[0113]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
[0114]	485	490	495
[0115]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
[0116]	500	505	510
[0117]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0118]	515	520	525
[0119]	<210> 3		
[0120]	<211> 2052		
[0121]	<212> DNA		
[0122]	<213> 人工		
[0123]	<220>		
[0124]	<223> hWTAP01- (g4s) 4-mthIgG-hRNase1 DNA		
[0125]	<400> 3		

[0126] gttaagctt ccaccatgaa agctgcggc ctgaccctgg ccgtgctctt cctgacgggg 60
 [0127] agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg 120
 [0128] aaggacctgg ccactgtgt a cgtggatgtg ctcaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc 180
 [0129] cagttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agctccttga caactggac 240
 [0130] agcgtgaccc ccacccctt tagtgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc 300
 [0131] tggataacc tggaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag 360
 [0132] gaggtgaagg ccaagggtgca gccttacctg gacgacttcc agaagaagtgc caggaggag 420
 [0133] atggagctct accggccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc 480
 [0134] cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccaactgg gcgaggagat ggcgcaccgc 540
 [0135] ggcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc 600
 [0136] cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggcttc aaggagaacg ggcgcgcag actggccgcag 660
 [0137] taccacgcca aggccaccga gcacatgcg acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgc 720
 [0138] gaggacctcc gccaaggcct gctgcgcgtg ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc 780
 [0139] gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca 840
 [0140] ggtggtggag gatctggagg aggtggaggt ggtggaggt gtttaccgg tctcgagccc 900
 [0141] aaatcttctg acaaaaactca cacatctcca cctgcgcgcgc cactgaaact cctgggagga 960
 [0142] tcgtcagtct tccttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcgtatctc ccggacccct 1020
 [0143] gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 1080
 [0144] tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 1140
 [0145] agcacgttacc gtgtggtcag cgtccctacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1200
 [0146] gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctccgcgcct ccatgagaa aaccatctcc 1260
 [0147] aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccattc cgggatgag 1320
 [0148] ctgaccaaga accaggctcag cctgacctgc ctggtaaa gtttctatcc cagcgacatc 1380
 [0149] gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgcgt 1440
 [0150] ctggactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca cctgtggacaa gagcagggtgg 1500
 [0151] cagcagggga acgttcttc atgtccgtg atgcacatc cttctgcacaa ccactacacg 1560
 [0152] cagaagagcc tctctcttc tccggtaaa gtcgacggag ctgcgcgcgc cgtgaacgtg 1620
 [0153] agcagccca gcgtgcagga tatccctcc ctggcaagg aatcccggc caagaaattc 1680
 [0154] cagcggcagc atatggactc agacagttcc cccagcagca gtcacacta ctgtaaacca 1740
 [0155] atgatgaggc gcccgaat gacacagggg cgggtcaaac cagtgaacac ctttgcac 1800
 [0156] gagccctgg tagatgtcca gaatgtctgt ttccaggaaa aggtcacctg caagaacggg 1860
 [0157] cagggcaact gctacaagag caactccagc atgcacatca cagactgcgc cctgacaaac 1920
 [0158] ggctccaggt accccaactg tgcataccgg accagccga aggagagaca catcattgtg 1980
 [0159] gcctgtgaag ggagccata tgtgccagtc cactttgatg cttctgtgga ggactctacc 2040
 [0160] taataatcta ga 2052
 [0161] <210> 4
 [0162] <211> 675
 [0163] <212> PRT
 [0164] <213> 人工
 [0165] <220>
 [0166] <223> hWTAP01- (g4s) 4-mthIgG-hRNase1
 [0167] <400> 4

[0168]	Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser		
[0169]	1	5	10
[0170]	Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp		15
[0171]		20	25
[0172]	Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp		30
[0173]		35	40
[0174]	Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys		45
[0175]		50	55
[0176]	Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr		60
[0177]		65	70
[0178]	Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp		75
[0179]		85	90
[0180]	Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys		95
[0181]		100	105
[0182]	Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe		110
[0183]		115	120
[0184]	Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu		125
[0185]		130	135
[0186]	Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu		140
[0187]		145	150
[0188]	Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala		155
[0189]		165	170
[0190]	Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp		175
[0191]		180	185
[0192]	Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn		190
[0193]		195	200
[0194]	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu		205
[0195]		210	215
[0196]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln		220
[0197]		225	230
[0198]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala		235
[0199]		245	250
[0200]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly		255
[0201]		260	265
[0202]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		270
[0203]		275	280
[0204]	Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser		285
[0205]		290	295
[0206]	Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu		300
[0207]		305	310
[0208]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		315
[0209]		325	330
			320
			335

[0210]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
[0211]	340	345	350
[0212]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[0213]	355	360	365
[0214]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
[0215]	370	375	380
[0216]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
[0217]	385	390	395
[0218]	400	405	410
[0219]	415		
[0220]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
[0221]	420	425	430
[0222]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
[0223]	435	440	445
[0224]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
[0225]	450	455	460
[0226]	460	465	470
[0227]	475	480	
[0228]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
[0229]	485	490	495
[0230]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
[0231]	500	505	510
[0232]	510	515	520
[0233]	525		
[0234]	Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Pro		
[0235]	530	535	540
[0236]	540	545	550
[0237]	555	560	
[0238]	Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln Met		
[0239]	565	570	575
[0240]	580	585	590
[0241]	590	595	
[0242]	600	605	
[0243]	610	615	620
[0244]	620	625	
[0245]	630	635	640
[0246]	640	645	
[0247]	650	655	
[0248]	660	665	670
[0249]	670		
[0250]	675	680	
[0251]	685		

- [0252] Asp Ser Thr
- [0253] 675
- [0254] <210> 5
- [0255] <211> 414
- [0256] <212> DNA
- [0257] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0258] <400> 5
- [0259] gatatccctt ccctggcaa ggaatccgg gccaaagaaat tccagcggca gcatatggac 60
- [0260] tcagacagtt cccccagcag cagctccacc tactgttaacc aaatgtatgag ggcgcggaaat 120
- [0261] atgacacagg ggcgggtgcaa accagtgaac acctttgtgc acgagccctt ggttagatgtc 180
- [0262] cagaatgtct gtttccagga aaaggtcacc tgcaagaacg ggcaggcggaaat ctgctacaag 240
- [0263] agcaactcca gcatgcacat cacagactgc cgcctgacaa acggctccag gtaccccaac 300
- [0264] tgtgcataacc ggaccagccc gaaggagaga cacatcattt tggcctgtga agggagccca 360
- [0265] tatgtgccag tccactttga tgcttctgtg gaggactcta cctaataatc taga 414
- [0266] <210> 6
- [0267] <211> 134
- [0268] <212> PRT
- [0269] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0270] <400> 6
- [0271] Asp Ile Pro Ser Leu Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg
- | | | | |
|--|-----|-----|----|
| [0272] 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0273] Gln His Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Thr Tyr Cys | | | |
| [0274] 20 | 25 | 30 | |
| [0275] Asn Gln Met Met Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro | | | |
| [0276] 35 | 40 | 45 | |
| [0277] Val Asn Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys | | | |
| [0278] 50 | 55 | 60 | |
| [0279] Phe Gln Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys | | | |
| [0280] 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0281] Ser Asn Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser | | | |
| [0282] 85 | 90 | 95 | |
| [0283] Arg Tyr Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile | | | |
| [0284] 100 | 105 | 110 | |
| [0285] Ile Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala | | | |
| [0286] 115 | 120 | 125 | |
| [0287] Ser Val Glu Asp Ser Thr | | | |
| [0288] 130 | | | |
| [0289] <210> 7 | | | |
| [0290] <211> 462 | | | |
| [0291] <212> DNA | | | |
| [0292] <213> 人工 | | | |
| [0293] <220> | | | |

- [0294] <223> 3-NLG-WThRNase1 DNA
- [0295] <400> 7
- [0296] gtcgacggag ctagcagccc cgtgaacgtg agcagccccca gcgtgcagga tatcccttcc 60
- [0297] ctgggcaagg aatcccgggc caagaaattc cagcggcagc atatggactc agacagttcc 120
- [0298] cccagcagca gctccaccta ctgtaaccaa atgatgaggc gccggaatat gacacagggg 180
- [0299] cggtgcaaac cagtgaacac ctttgtcac gagcccctgg tagatgtcca gaatgtctgt 240
- [0300] ttccaggaaa aggtcacctg caagaacggg cagggcaact gctacaagag caactccagc 300
- [0301] atgcacatca cagactgccc cctgacaaac ggctccaggt accccaactg tgcataaccgg 360
- [0302] accagcccga aggagagaca catcattgtg gcctgtgaag ggagcccata tgtgccagtc 420
- [0303] cactttgatg cttctgtgga ggactctacc taataatcta ga 462
- [0304] <210> 8
- [0305] <211> 150
- [0306] <212> PRT
- [0307] <213> 人工
- [0308] <220>
- [0309] <223> 3-NLG-WThRNase1
- [0310] <400> 8
- [0311] Val Asp Gly Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln
- [0312] 1 5 10 15
- [0313] Asp Ile Pro Ser Leu Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg
- [0314] 20 25 30
- [0315] Gln His Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Thr Tyr Cys
- [0316] 35 40 45
- [0317] Asn Gln Met Met Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro
- [0318] 50 55 60
- [0319] Val Asn Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys
- [0320] 65 70 75 80
- [0321] Phe Gln Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys
- [0322] 85 90 95
- [0323] Ser Asn Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser
- [0324] 100 105 110
- [0325] Arg Tyr Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile
- [0326] 115 120 125
- [0327] Ile Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala
- [0328] 130 135 140
- [0329] Ser Val Glu Asp Ser Thr
- [0330] 145 150
- [0331] <210> 9
- [0332] <211> 97
- [0333] <212> DNA
- [0334] <213> 人工
- [0335] <220>

- [0336] <223> (g4s) 5接头DNA
- [0337] <400> 9
- [0338] agatctctcc ggaggaggtg gctcaggtgg tggaggatct ggaggaggtg gctcaggtgg 60
- [0339] tggaggatct ggaggaggtg ggagtaccgg tctcgag 97
- [0340] <210> 10
- [0341] <211> 32
- [0342] <212> PRT
- [0343] <213> 人工
- [0344] <220>
- [0345] <223> (g4s) 5接头
- [0346] <400> 10
- [0347] Asp Leu Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
- [0348] 1 5 10 15
- [0349] Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Gly Leu Glu
- [0350] 20 25 30
- [0351] <210> 11
- [0352] <211> 1099
- [0353] <212> DNA
- [0354] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0355] <400> 11
- [0356] atggcgaagc tgattgcgct caccctcttg gggatggac tggcactctt caggaaccac 60
- [0357] cagtcttctt accaaacacg acttaatgct ctccgagagg tacaaccgt agaacttcct 120
- [0358] aactgttaatt tagttaaagg aatcgaaact ggctctgaag acttggagat actgcctaatt 180
- [0359] ggactggctt tcatttagctc tggattaaag tatcctggaa taaagagctt caaccccaac 240
- [0360] agtcctggaa aaatacttct gatggacctg aatgaagaag atccaacagt gttggaattt 300
- [0361] gggatcactg gaagtaaatt ttagtgcattt tcatttaacc ctcatggat tagcacattc 360
- [0362] acagatgaag ataatgccat gtacccctg gtggtaacc atccagatgc caagtccaca 420
- [0363] gtggagttgt ttaaatttca agaagaagaa aaatcgctt tgcatctaaa aaccatcaga 480
- [0364] cataaacttc tgcctaattt gaatgatatt gttgctgtgg gacctgagca cttttatggc 540
- [0365] acaaatgatc actatttct tgacccctac ttacaatcct gggagatgta tttgggttta 600
- [0366] gcgtggtcgt atgttgcata ctatagtcca agtgaagttc gagttggcaga agaaggattt 660
- [0367] gattttgcata atggaatcaa catttcaccc gatggcaagt atgtctatat agctgagttt 720
- [0368] ctggctcata agattcatgt gtatgaaaag catgctaatt ggactttaac tccattgaag 780
- [0369] tcccttgact ttaataccct cgtggataac atatctgtgg atcctgagac aggagacctt 840
- [0370] tgggttggat gccatccaa tggcatgaaa atcttcttct atgactcaga gaatcctcct 900
- [0371] gcatcagagg tgcttcgaat ccagaacatt ctaacagaag aacctaaagt gacacaggtt 960
- [0372] tatgcagaaa atggcacagt gttgcaaggc agtacagttg cctctgtgtt caaaggggaaa 1020
- [0373] ctgctgattt gcacagtgtt tcacaaagct cttaactgtt agctctaaca gaccgattt 1080
- [0374] cacccatgcc atagaaact 1099
- [0375] <210> 12
- [0376] <211> 355
- [0377] <212> PRT

[0378]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0379]	<220>			
[0380]	<221> 信号			
[0381]	<222> (1) .. (15)			
[0382]	<400> 12			
[0383]	Met Ala Lys Leu Ile Ala Leu Thr Leu Leu Gly Met Gly Leu Ala Leu			
[0384]	1	5	10	15
[0385]	Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr Arg Leu Asn Ala Leu Arg			
[0386]	20	25	30	
[0387]	Glu Val Gln Pro Val Glu Leu Pro Asn Cys Asn Leu Val Lys Gly Ile			
[0388]	35	40	45	
[0389]	Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile Leu Pro Asn Gly Leu Ala Phe			
[0390]	50	55	60	
[0391]	Ile Ser Ser Gly Leu Lys Tyr Pro Gly Ile Lys Ser Phe Asn Pro Asn			
[0392]	65	70	75	80
[0393]	Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu Asn Glu Glu Asp Pro Thr			
[0394]	85	90	95	
[0395]	Val Leu Glu Leu Gly Ile Thr Gly Ser Lys Phe Asp Val Ser Ser Phe			
[0396]	100	105	110	
[0397]	Asn Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp Glu Asp Asn Ala Met Tyr			
[0398]	115	120	125	
[0399]	Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys Ser Thr Val Glu Leu Phe			
[0400]	130	135	140	
[0401]	Lys Phe Gln Glu Glu Lys Ser Leu Leu His Leu Lys Thr Ile Arg			
[0402]	145	150	155	160
[0403]	His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile Val Ala Val Gly Pro Glu			
[0404]	165	170	175	
[0405]	His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Gln			
[0406]	180	185	190	
[0407]	Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr			
[0408]	195	200	205	
[0409]	Ser Pro Ser Glu Val Arg Val Ala Glu Gly Phe Asp Phe Ala Asn			
[0410]	210	215	220	
[0411]	Gly Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys Tyr Val Tyr Ile Ala Glu Leu			
[0412]	225	230	235	240
[0413]	Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala Asn Trp Thr Leu			
[0414]	245	250	255	
[0415]	Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser			
[0416]	260	265	270	
[0417]	Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly			
[0418]	275	280	285	
[0419]	Met Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu Asn Pro Pro Ala Ser Glu Val			

[0420]	290	295	300
[0421]	Leu Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu Pro Lys Val Thr Gln Val		
[0422]	305	310	315
[0423]	Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val		
[0424]	325	330	335
[0425]	Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr		
[0426]	340	345	350
[0427]	Cys Glu Leu		
[0428]	355		
[0429]	<210> 13		
[0430]	<211> 525		
[0431]	<212> PRT		
[0432]	<213> 人工		
[0433]	<220>		
[0434]	<223> 在Fc区的Eu位置331具有脯氨酸的hWTAP01- (g4s) 4-mthIgG		
[0435]	<400> 13		
[0436]	Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser		
[0437]	1 5 10 15		
[0438]	Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp		
[0439]	20 25 30		
[0440]	Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp		
[0441]	35 40 45		
[0442]	Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys		
[0443]	50 55 60		
[0444]	Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr		
[0445]	65 70 75 80		
[0446]	Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp		
[0447]	85 90 95		
[0448]	Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys		
[0449]	100 105 110		
[0450]	Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe		
[0451]	115 120 125		
[0452]	Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu		
[0453]	130 135 140		
[0454]	Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu		
[0455]	145 150 155		160
[0456]	Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala		
[0457]	165 170 175		
[0458]	Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp		
[0459]	180 185 190		
[0460]	Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn		
[0461]	195 200 205		

[0462]	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu		
[0463]	210	215	220
[0464]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln		
[0465]	225	230	235
[0466]	240		
[0467]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala		
[0468]	245	250	255
[0469]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly		
[0470]	260	265	270
[0471]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[0472]	275	280	285
[0473]	Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser		
[0474]	290	295	300
[0475]	Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu		
[0476]	305	310	315
[0477]	320		
[0478]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
[0479]	325	330	335
[0480]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
[0481]	340	345	350
[0482]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[0483]	355	360	365
[0484]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
[0485]	370	375	380
[0486]	385		
[0487]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
[0488]	390	395	400
[0489]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
[0490]	405	410	415
[0491]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
[0492]	420	425	430
[0493]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
[0494]	435	440	445
[0495]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
[0496]	450	455	460
[0497]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
[0498]	465	470	475
[0499]	480		
[0500]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
[0501]	485	490	495
[0502]	500	505	510
[0503]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	515	520	525
	<210> 14		
	<211> 675		

[0504]	<212> PRT			
[0505]	<213> 人工			
[0506]	<220>			
[0507]	<223> 在Fc区的Eu位置331具有脯氨酸的hWTAP01- (g4s) 4-mthIgG-hRNase1			
[0508]	<400> 14			
[0509]	Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser			
[0510]	1	5	10	15
[0511]	Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp			
[0512]	20	25	30	
[0513]	Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp			
[0514]	35	40	45	
[0515]	Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys			
[0516]	50	55	60	
[0517]	Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr			
[0518]	65	70	75	80
[0519]	Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp			
[0520]	85	90	95	
[0521]	Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys			
[0522]	100	105	110	
[0523]	Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe			
[0524]	115	120	125	
[0525]	Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu			
[0526]	130	135	140	
[0527]	Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu			
[0528]	145	150	155	160
[0529]	Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala			
[0530]	165	170	175	
[0531]	Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp			
[0532]	180	185	190	
[0533]	Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn			
[0534]	195	200	205	
[0535]	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu			
[0536]	210	215	220	
[0537]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln			
[0538]	225	230	235	240
[0539]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala			
[0540]	245	250	255	
[0541]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly			
[0542]	260	265	270	
[0543]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
[0544]	275	280	285	
[0545]	Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser			

[0546]	290	295	300
[0547]	Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu		
[0548]	305	310	315
[0549]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
[0550]	325	330	335
[0551]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
[0552]	340	345	350
[0553]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[0554]	355	360	365
[0555]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
[0556]	370	375	380
[0557]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
[0558]	385	390	395
[0559]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
[0560]	405	410	415
[0561]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
[0562]	420	425	430
[0563]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
[0564]	435	440	445
[0565]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
[0566]	450	455	460
[0567]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
[0568]	465	470	475
[0569]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
[0570]	485	490	495
[0571]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
[0572]	500	505	510
[0573]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly		
[0574]	515	520	525
[0575]	Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Pro		
[0576]	530	535	540
[0577]	Ser Leu Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met		
[0578]	545	550	555
[0579]	Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln Met		
[0580]	565	570	575
[0581]	Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr		
[0582]	580	585	590
[0583]	Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu		
[0584]	595	600	605
[0585]	Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser		
[0586]	610	615	620
[0587]	Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr Pro		

[0588]	625	630	635	640
[0589]	Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala			
[0590]		645	650	655
[0591]	Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val Glu			
[0592]		660	665	670
[0593]	Asp Ser Thr			
[0594]		675		
[0595]	<210> 15			
[0596]	<211> 5			
[0597]	<212> PRT			
[0598]	<213> 人工			
[0599]	<220>			
[0600]	<223> 接头			
[0601]	<400> 15			
[0602]	Gly Gly Gly Gly Ser			
[0603]	1	5		
[0604]	<210> 16			
[0605]	<211> 22			
[0606]	<212> DNA			
[0607]	<213> 人工			
[0608]	<220>			
[0609]	<223> 序列引物			
[0610]	<400> 16			
[0611]	ggtttggca gtacatcaat gg 22			
[0612]	<210> 17			
[0613]	<211> 22			
[0614]	<212> DNA			
[0615]	<213> 人工			
[0616]	<220>			
[0617]	<223> 序列引物			
[0618]	<400> 17			
[0619]	ctattgtctt cccaatcctc cc 22			
[0620]	<210> 18			
[0621]	<211> 20			
[0622]	<212> DNA			
[0623]	<213> 人工			
[0624]	<220>			
[0625]	<223> 序列引物			
[0626]	<400> 18			
[0627]	accttgcact tgtactcctt 20			
[0628]	<210> 19			
[0629]	<211> 1531			

- [0630] <212> DNA
[0631] <213> 人工
[0632] <220>
[0633] <223> THER0 DNA (apo A-1- (lnk2) -mthIgG; apo A-1-mthIgG)
[0634] <400> 19
[0635] gttaagctt ccaccatgaa agctgcggc ctgacccctt ccgtgcttt cctgacgggg 60
[0636] agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg 120
[0637] aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctcggaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc 180
[0638] cagttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agctccttga caactgggac 240
[0639] agcgtgaccc ccaccccttca gcaagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc 300
[0640] tggataacc tggaaaaggaa gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag 360
[0641] gaggtgaagg ccaagggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtg gcaggaggag 420
[0642] atggagctt accgcccggaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc 480
[0643] cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccaacttgg gcggaggagat gcgcgaccgc 540
[0644] gcgcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc 600
[0645] cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggctctc aaggagaacg gcggcgccag actggccgag 660
[0646] taccacgcca agggcaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgccctc 720
[0647] gaggacctcc gccaaggccct gctgcccgtg ctggagagct tcaaggctcg cttcctgagc 780
[0648] gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tcgagccaa atcttctgac 840
[0649] aaaactcaca catctccacc gtccccagca cctgaacttcc tgggaggatc gtcagtcctc 900
[0650] ctcttccccca caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 960
[0651] gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 1020
[0652] gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 1080
[0653] gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1140
[0654] aaggtctcca acaaagccct cccagctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaagg 1200
[0655] cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1260
[0656] caggtcagcc tgacccctc ggtcaaaggc ttctatccca gcgcacatgc cgtggagttg 1320
[0657] gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctccctgtgc ggactccgac 1380
[0658] ggctcccttccctc tacatcgacc caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaaac 1440
[0659] gtcttcat gctccgtat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgcga gaagagccctc 1500
[0660] tctctcttc cggtaaatg ataatctaga a 1531
[0661] <210> 20
[0662] <211> 501
[0663] <212> PRT
[0664] <213> 人工
[0665] <220>
[0666] <223> THER0多肽 (apo A-1- (lnk2) -mthIgG; apo A-1-mthIgG)
[0667] <400> 20
[0668] Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
[0669] 1 5 10 15
[0670] Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
[0671] 20 25 30

[0672]	Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp		
[0673]	35	40	45
[0674]	Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys		
[0675]	50	55	60
[0676]	Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr		
[0677]	65	70	75
[0678]	Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp		
[0679]	85	90	95
[0680]	Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys		
[0681]	100	105	110
[0682]	Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe		
[0683]	115	120	125
[0684]	Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu		
[0685]	130	135	140
[0686]	Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu		
[0687]	145	150	155
[0688]	Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala		
[0689]	165	170	175
[0690]	Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp		
[0691]	180	185	190
[0692]	Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn		
[0693]	195	200	205
[0694]	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu		
[0695]	210	215	220
[0696]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln		
[0697]	225	230	235
[0698]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala		
[0699]	245	250	255
[0700]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Glu Pro Lys		
[0701]	260	265	270
[0702]	Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu		
[0703]	275	280	285
[0704]	Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[0705]	290	295	300
[0706]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[0707]	305	310	315
[0708]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0709]	325	330	335
[0710]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
[0711]	340	345	350
[0712]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
[0713]	355	360	365

[0714] Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 [0715] 370 375 380
 [0716] Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 [0717] 385 390 395 400
 [0718] Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 [0719] 405 410 415
 [0720] Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 [0721] 420 425 430
 [0722] Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 [0723] 435 440 445
 [0724] Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 [0725] 450 455 460
 [0726] Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 [0727] 465 470 475 480
 [0728] Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 [0729] 485 490 495
 [0730] Leu Ser Pro Gly Lys
 [0731] 500
 [0732] <210> 21
 [0733] <211> 1573
 [0734] <212> DNA
 [0735] <213> 人工
 [0736] <220>
 [0737] <223> THER2 DNA (apo A-1- (1nk16) -mthIgG; apo A-1- (g4s) 2-mthIgG)
 [0738] <400> 21
 [0739] gtaagcttgcaccatgaa agctcggttgcacccttgg ccgtgctctt cctgacgggg 60
 [0740] agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg 120
 [0741] aaggacctgg ccactgtgttgc cgtggatgttgc ctcggaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc 180
 [0742] cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agctccttgc caactggac 240
 [0743] agcgtgacctt ccaccccttgcag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc 300
 [0744] tgggataacc tggaaaagga gacagaggc cttggaggcagg agatgagcaa ggatctggag 360
 [0745] gaggtgaagg ccaagggtgca gcccctacctg gacgacttcc agaagaagtgc cggaggagg 420
 [0746] atggagctct accggccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc 480
 [0747] cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccaactgg gcggaggat ggcgcaccgc 540
 [0748] ggcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc 600
 [0749] cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggctctc aaggagaacg gcggcgccag actggccgag 660
 [0750] taccacgcca aggccaccga gcacgttgc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgc 720
 [0751] gaggacctcc gccaaggcct gctgcccgtt ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc 780
 [0752] gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca 840
 [0753] ggaggaggtt ggagtaccgg tctcgagccaaatcttctg acaaaaactca cacatctcca 900
 [0754] ccgtccccag cacctgaact cctggggagga tcgtcagtttccccc cccaaaaccc 960
 [0755] aaggacaccc tcatgtatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggttggt ggacgtgagc 1020

[0756] cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1080
 [0757] aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1140
 [0758] gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1200
 [0759] ctcccagcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1260
 [0760] gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacactgc 1320
 [0761] ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg 1380
 [0762] gagaacaact acaagaccac gcctccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1440
 [0763] agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtttctc atgctccgtg 1500
 [0764] atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctctctc tccggtaaaa 1560
 [0765] tgataatcta gaa 1573
 [0766] <210> 22
 [0767] <211> 515
 [0768] <212> PRT
 [0769] <213> 人工
 [0770] <220>
 [0771] <223> THER2多肽 (apo A-1- (1nk16) -mthIgG; apo A-1- (g4s) 2-mthIgG)
 [0772] <400> 22
 [0773] Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
 [0774] 1 5 10 15
 [0775] Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
 [0776] 20 25 30
 [0777] Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
 [0778] 35 40 45
 [0779] Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
 [0780] 50 55 60
 [0781] Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
 [0782] 65 70 75 80
 [0783] Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
 [0784] 85 90 95
 [0785] Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
 [0786] 100 105 110
 [0787] Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
 [0788] 115 120 125
 [0789] Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
 [0790] 130 135 140
 [0791] Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu
 [0792] 145 150 155 160
 [0793] Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala
 [0794] 165 170 175
 [0795] Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp
 [0796] 180 185 190
 [0797] Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

[0798]	195	200	205
[0799]	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu		
[0800]	210	215	220
[0801]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln		
[0802]	225	230	235
[0803]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala		
[0804]	245	250	255
[0805]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly		
[0806]	260	265	270
[0807]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser		
[0808]	275	280	285
[0809]	Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
[0810]	290	295	300
[0811]	Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[0812]	305	310	315
[0813]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
[0814]	325	330	335
[0815]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[0816]	340	345	350
[0817]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
[0818]	355	360	365
[0819]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[0820]	370	375	380
[0821]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile		
[0822]	385	390	395
[0823]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0824]	405	410	415
[0825]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[0826]	420	425	430
[0827]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0828]	435	440	445
[0829]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0830]	450	455	460
[0831]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
[0832]	465	470	475
[0833]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[0834]	485	490	495
[0835]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[0836]	500	505	510
[0837]	Pro Gly Lys		
[0838]	515		
[0839]	<210> 23		

- [0840] <211> 1633
[0841] <212> DNA
[0842] <213> 人工
[0843] <220>
[0844] <223> THER6 DNA (apo A-1- (lnk36) -mthIgG; apo A-1- (g4s) 6-mthIgG)
[0845] <400> 23
[0846] gttaagtttccaccatgaa agctgcggc ctgaccttgg ccgtgctttt cctgacgggg 60
[0847] agccaggctc ggcatatctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagt 120
[0848] aaggacctgg ccactgttgc cgtggatgtc ctcaaaagaca gcggcagaga ctatgttcc 180
[0849] cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agctccttgc caactggac 240
[0850] agcgtgacccatccacccatcg caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc 300
[0851] tggataacc tggaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag 360
[0852] gaggtgaagg ccaaggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtgc gcaggaggag 420
[0853] atggagctct accgcccggaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgcgcgc 480
[0854] cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccacttgg gcgaggagat gcgcgaccgc 540
[0855] gcgcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc 600
[0856] cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggctctc aaggagaacg gcggcgccag actggccgag 660
[0857] taccacgcca agggcaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gccgcgcctc 720
[0858] gaggacctcc gccaaggcct gctgcccgtt ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc 780
[0859] gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca 840
[0860] ggtggtgag gatctggagg aggtggaggt ggtggagggt gttctggagg aggtggtagt 900
[0861] ggaggtggag gttctaccgg tctcgagccc aaatcttctg acaaaaactca cacatctcca 960
[0862] ccgtccccag caccctgaaact cctggggagga tcgtcagtct tcctcttccc cccaaaaacc 1020
[0863] aaggacacccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 1080
[0864] cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaacttgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1140
[0865] aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1200
[0866] gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc 1260
[0867] ctccccagcc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1320
[0868] gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1380
[0869] ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg 1440
[0870] gagaacaact acaagaccac gcctccctgt ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1500
[0871] agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggaa acgttcttc atgctccgtt 1560
[0872] atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctctcttc tccggtaaa 1620
[0873] tgataatcta gaa 1633
[0874] <210> 24
[0875] <211> 535
[0876] <212> PRT
[0877] <213> 人工
[0878] <220>
[0879] <223> THER6多肽 (apo A-1- (lnk36) -mthIgG; apo A-1- (g4s) 6-mthIgG)
[0880] <400> 24
[0881] Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Leu Phe Leu Thr Gly Ser

[0882]	1	5	10	15
[0883]	Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp			
[0884]	20	25	30	
[0885]	Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp			
[0886]	35	40	45	
[0887]	Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys			
[0888]	50	55	60	
[0889]	Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr			
[0890]	65	70	75	80
[0891]	Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp			
[0892]	85	90	95	
[0893]	Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys			
[0894]	100	105	110	
[0895]	Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe			
[0896]	115	120	125	
[0897]	Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu			
[0898]	130	135	140	
[0899]	Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu			
[0900]	145	150	155	160
[0901]	Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala			
[0902]	165	170	175	
[0903]	Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp			
[0904]	180	185	190	
[0905]	Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn			
[0906]	195	200	205	
[0907]	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu			
[0908]	210	215	220	
[0909]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln			
[0910]	225	230	235	240
[0911]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala			
[0912]	245	250	255	
[0913]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly			
[0914]	260	265	270	
[0915]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
[0916]	275	280	285	
[0917]	Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Gly Leu Glu			
[0918]	290	295	300	
[0919]	Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro			
[0920]	305	310	315	320
[0921]	Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
[0922]	325	330	335	
[0923]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			

[0966] cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggctctc aaggagaacg gcggcgccag actggccag 660
 [0967] taccacgcca aggccaccga gcacgtgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgctc 720
 [0968] gaggacctcc gccaaaggcct gctgcccgtg ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc 780
 [0969] gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctcagggtgg tggaggatct 840
 [0970] ggaggaggtg ggagtgggtgg aggtggttct accggctctg agcccaaatac ttctgacaaa 900
 [0971] actcacat ctccaccgtc cccagcacct gaactcctgg gaggatcgtc agtcttcctc 960
 [0972] ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 1020
 [0973] gtgggtggacg tgagccacga agacccttagt gtcaagttca actgttacgt ggacggcgtg 1080
 [0974] gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1140
 [0975] gtcagcgtcc tcaccgtctt gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag 1200
 [0976] gtctccaaca aagccctccc agcctccatc gagaaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1260
 [0977] ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccattccggg atgagctgac caagaaccag 1320
 [0978] gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatgcgtt ggagtggag 1380
 [0979] agcaatggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1440
 [0980] tccttcttcc tctacagcaa gctaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgta 1500
 [0981] ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctct 1560
 [0982] ctctctccgg gtaaatgata atctagaa 1588
 [0983] <210> 26
 [0984] <211> 520
 [0985] <212> PRT
 [0986] <213> 人工
 [0987] <220>
 [0988] <223> THER3多肽 (apo A-1- (1nk21) -mthIgG; apo A-1- (g4s) 3-mthIgG)
 [0989] <400> 26
 [0990] Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
 [0991] 1 5 10 15
 [0992] Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
 [0993] 20 25 30
 [0994] Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
 [0995] 35 40 45
 [0996] Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
 [0997] 50 55 60
 [0998] Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
 [0999] 65 70 75 80
 [1000] Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
 [1001] 85 90 95
 [1002] Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
 [1003] 100 105 110
 [1004] Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
 [1005] 115 120 125
 [1006] Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
 [1007] 130 135 140

[1008]	Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu			
[1009]	145	150	155	160
[1010]	Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala			
[1011]	165	170	175	
[1012]	Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp			
[1013]	180	185	190	
[1014]	Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn			
[1015]	195	200	205	
[1016]	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu			
[1017]	210	215	220	
[1018]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln			
[1019]	225	230	235	240
[1020]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala			
[1021]	245	250	255	
[1022]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly			
[1023]	260	265	270	
[1024]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Gly Leu			
[1025]	275	280	285	
[1026]	Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala			
[1027]	290	295	300	
[1028]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
[1029]	305	310	315	320
[1030]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
[1031]	325	330	335	
[1032]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
[1033]	340	345	350	
[1034]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
[1035]	355	360	365	
[1036]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
[1037]	370	375	380	
[1038]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
[1039]	385	390	395	400
[1040]	Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
[1041]	405	410	415	
[1042]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr			
[1043]	420	425	430	
[1044]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
[1045]	435	440	445	
[1046]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
[1047]	450	455	460	
[1048]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
[1049]	465	470	475	480

[1050] Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
[1051] 485 490 495
[1052] Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
[1053] 500 505 510
[1054] Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1055] 515 520
[1056] <210> 27
[1057] <211> 2677
[1058] <212> DNA
[1059] <213> 人工
[1060] <220>
[1061] <223> THER4PON1 DNA
[1062] <400> 27
[1063] gttaagttg ccaccatgaa agctgcggtg ctgaccttgg ccgtgctctt cctgacgggg 60
[1064] agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg 120
[1065] aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctcaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc 180
[1066] cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agtccttga caactggac 240
[1067] agcgtgaccc ccacccctcag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc 300
[1068] tgggataacc tgaaaaagga gacagagggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag 360
[1069] gaggtgaagg ccaaggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtg gcaggaggag 420
[1070] atggagctct accgcccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgcgcgc 480
[1071] cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccaactgg gcgaggagat ggcgcaccgc 540
[1072] gcgcgcgc 540
[1073] cagcgcttgg cccgcgcct tgaggctctc aaggagaacg gcggcgccag actggccgag 660
[1074] taccacgcca agggcaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgc 720
[1075] gaggacctcc gccaaggcct gctgcccgtg ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc 780
[1076] gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca 840
[1077] ggtggtgagg gatctggagg aggtggagg ggtggaggtg gttctaccgg tctcgagccc 900
[1078] aaatcttctg acaaaaactca cacatctcca ccgtccccag cacctgaact cctggaggaa 960
[1079] tcgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacccc tcatgatctc ccggaccct 1020
[1080] gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 1080
[1081] tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 1140
[1082] agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1200
[1083] gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagcct ccatcgagaa aaccatctcc 1260
[1084] aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacccc tgccccatc ccggatgag 1320
[1085] ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1380
[1086] gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg 1440
[1087] ctggactccg acggctcctt cttccctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1500
[1088] cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1560
[1089] cagaagagcc tctctctc tccggtaaa gtcgacggag ctagcagccc cgtgaacgtg 1620
[1090] agcagccccca gcgtgcagga tatcctctc aggaaccacc agtcttctt ccaaacacga 1680
[1091] cttaatgtc tccgagaggt acaacccgta gaacttccta actgttaattt agttaaagga 1740

[1092] atcgaaactg gctctgaaga cttggagata ctgcctaattg gactggcttt cattagctct 1800
 [1093] ggattaaagt atcctggaat aaagagcttc aaccccaaca gtcctggaaa aatacttctg 1860
 [1094] atggacctga atgaagaaga tccaacagtg ttgaaattgg ggatcactgg aagtaaattt 1920
 [1095] gatgtatctt catttaaacc tcatgggatt agcacattca cagatgaaga taatgccatg 1980
 [1096] tacctcctgg tggtaacca tccagatgcc aagtccacag tggagttgtt taaatttcaa 2040
 [1097] gaagaagaaa aatcgcttt gcatctaaaa accatcagac ataaacttct gcctaattt 2100
 [1098] aatgatattg ttgctgtggg acctgagcac ttttatggca caaatgatca ctatttctt 2160
 [1099] gaccctact tacaatcctg ggagatgtat ttgggtttag cgtggtcgtat gttgtctac 2220
 [1100] tatagtccaa gtgaagttcg agtggggca gaaggattt atttgctaa tggaatcaac 2280
 [1101] atttcacccg atggcaagta tgtctatata gctgagttgc tggctcataa gattcatgtg 2340
 [1102] tatgaaaagc atgctaattt gactttaact ccattgaagt cccttgactt taataccctc 2400
 [1103] gtggataaca tatctgtgga tcctgagaca ggagacctt gggttggatg ccatccaaat 2460
 [1104] ggcatgaaaa tcttcttcta tgactcagag aatcctcctg catcagaggt gcttcgaatc 2520
 [1105] cagaacattc taacagaaga acctaaagtg acacaggttt atgcagaaaa tggcacagtg 2580
 [1106] ttgcaaggca gtacagttgc ctctgtgtac aaaggaaac tgctgattgg cacagtgtt 2640
 [1107] cacaagctc tttactgtga gctctaataa tctagaa 2677
 [1108] <210> 28
 [1109] <211> 883
 [1110] <212> PRT
 [1111] <213> 人工
 [1112] <220>
 [1113] <223> THER4PON1多肽
 [1114] <400> 28
 [1115] Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
 [1116] 1 5 10 15
 [1117] Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
 [1118] 20 25 30
 [1119] Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
 [1120] 35 40 45
 [1121] Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
 [1122] 50 55 60
 [1123] Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
 [1124] 65 70 75 80
 [1125] Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
 [1126] 85 90 95
 [1127] Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
 [1128] 100 105 110
 [1129] Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
 [1130] 115 120 125
 [1131] Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
 [1132] 130 135 140
 [1133] Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

[1134]	145	150	155	160
[1135]	Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala			
[1136]	165	170	175	
[1137]	Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp			
[1138]	180	185	190	
[1139]	Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn			
[1140]	195	200	205	
[1141]	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu			
[1142]	210	215	220	
[1143]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln			
[1144]	225	230	235	240
[1145]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala			
[1146]	245	250	255	
[1147]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly			
[1148]	260	265	270	
[1149]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
[1150]	275	280	285	
[1151]	Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser			
[1152]	290	295	300	
[1153]	Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu			
[1154]	305	310	315	320
[1155]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
[1156]	325	330	335	
[1157]	Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys			
[1158]	340	345	350	
[1159]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
[1160]	355	360	365	
[1161]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
[1162]	370	375	380	
[1163]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
[1164]	385	390	395	400
[1165]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
[1166]	405	410	415	
[1167]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
[1168]	420	425	430	
[1169]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
[1170]	435	440	445	
[1171]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
[1172]	450	455	460	
[1173]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
[1174]	465	470	475	480
[1175]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			

[1176]	485	490	495
[1177]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
[1178]	500	505	510
[1179]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly		
[1180]	515	520	525
[1181]	Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Leu		
[1182]	530	535	540
[1183]	Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr Arg Leu Asn Ala Leu Arg		
[1184]	545	550	555
[1185]	Glu Val Gln Pro Val Glu Leu Pro Asn Cys Asn Leu Val Lys Gly Ile		
[1186]	565	570	575
[1187]	Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile Leu Pro Asn Gly Leu Ala Phe		
[1188]	580	585	590
[1189]	Ile Ser Ser Gly Leu Lys Tyr Pro Gly Ile Lys Ser Phe Asn Pro Asn		
[1190]	595	600	605
[1191]	Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu Asn Glu Glu Asp Pro Thr		
[1192]	610	615	620
[1193]	Val Leu Glu Leu Gly Ile Thr Gly Ser Lys Phe Asp Val Ser Ser Phe		
[1194]	625	630	635
[1195]	Asn Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp Glu Asp Asn Ala Met Tyr		
[1196]	645	650	655
[1197]	Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys Ser Thr Val Glu Leu Phe		
[1198]	660	665	670
[1199]	Lys Phe Gln Glu Glu Lys Ser Leu Leu His Leu Lys Thr Ile Arg		
[1200]	675	680	685
[1201]	His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile Val Ala Val Gly Pro Glu		
[1202]	690	695	700
[1203]	His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Gln		
[1204]	705	710	715
[1205]	Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr		
[1206]	725	730	735
[1207]	Ser Pro Ser Glu Val Arg Val Val Ala Glu Gly Phe Asp Phe Ala Asn		
[1208]	740	745	750
[1209]	Gly Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys Tyr Val Tyr Ile Ala Glu Leu		
[1210]	755	760	765
[1211]	Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala Asn Trp Thr Leu		
[1212]	770	775	780
[1213]	Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser		
[1214]	785	790	795
[1215]	Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly		
[1216]	805	810	815
[1217]	Met Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu Asn Pro Pro Ala Ser Glu Val		

[1218]	820	825	830
[1219]	Leu Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu Pro Lys Val Thr Gln Val		
[1220]	835	840	845
[1221]	Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val		
[1222]	850	855	860
[1223]	Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr		
[1224]	865	870	875
[1225]	Cys Glu Leu		
[1226]	<210> 29		
[1227]	<211> 1717		
[1228]	<212> DNA		
[1229]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[1230]	<400> 29		
[1231]	atatacgggc tccaggctga acggctcggt ccacttacac accactgcct gataaccatg 60		
[1232]	ctggctgccca cagtcctgac cctggccctg ctggcaatg cccatgcctg ctccaaaggc 120		
[1233]	acctcgcacg aggcaggcat cgtgtgccgc atcaccaagc ctgcctcct ggtgttgaac 180		
[1234]	cacgagactg ccaagggtgat ccagaccgccc ttccagcgag ccagctaccc agatatcacg 240		
[1235]	ggcgagaagg ccatgatgct cctggccaa gtcaagtatg ggtgcacaa catccagatc 300		
[1236]	agccacttgtt ccatcgccag cagccagggtg gagctggtgg aagccaagtc cattgatgtc 360		
[1237]	tccattcaga acgtgtctgt ggttcaag gggaccctga agtatggcta caccactgcc 420		
[1238]	tggggctgg gtattgatca gtccattgac ttcgagatcg actctgccat tgacctccag 480		
[1239]	atcaacacac agctgacctg tgactctggt agagtgcgga ccgatgcccc tgactgctac 540		
[1240]	ctgtcttcc ataagctgct cctgcatctc caaggggagc gagagcctgg gtggatcaag 600		
[1241]	cagctgttca caaatttcat ctccttcacc ctgaagctgg tcctgaaggg acagatctgc 660		
[1242]	aaagagatca acgtcatctc taacatcatg gccgattttg tccagacaag ggctgccagc 720		
[1243]	atcccttcag atggagacat tggggtgac atttccctga caggtgatcc cgtcatcaca 780		
[1244]	gcctcctacc tggagttccca tcacaagggt catttcatct acaagaatgt ctcagaggac 840		
[1245]	ctccccctcc ccaccttctc gcccacactg ctggggact cccgcatgct gtacttctgg 900		
[1246]	ttctctgagc gagtttcca ctgcgtggcc aaggtagctt tccaggatgg ccgcctcatg 960		
[1247]	ctcagcctga tggggagacga gttcaaggca gtgctggaga cctggggctt caacaccaac 1020		
[1248]	cagggaaatct tccaagaggt tgtcgccgc ttccccagcc aggcccaagt caccgtccac 1080		
[1249]	tgcctcaaga tgcccaagat ctcctgcca aacaaggggag tcgtgtcaat ttcttcagtg 1140		
[1250]	atggtaaat tcctcttcc acgcccagac cagcaacatt ctgttagctt cacatttcaa 1200		
[1251]	gaggatatcg tgactaccgt ccaggcctcc tattctaaga aaaagctttt cttaagcctc 1260		
[1252]	ttggatttcc agattacacc aaagactgtt tccaacttga ctgagagcag ctccgagtcc 1320		
[1253]	gtccagagct tcctgcagtc aatgatcacc gctgtggca tccctgaggt catgtctcg 1380		
[1254]	ctcgaggtag tgtttacagc ctcctatgaac agcaaaggcg tgagcctt cgcacatcatc 1440		
[1255]	aaccctgaga ttatcactcg agatggcttc ctgctgctgc agatggactt tggctccct 1500		
[1256]	gagcacctgc tggggattt ctcctcagagc ttgagctaga agtctccaag gaggtcgggaa 1560		
[1257]	tggggcttgc agcagaaggc aagcaccagg ctcacagctg gaaccctggt gtctccctca 1620		
[1258]	gcgtggtgaa agttgggtta ggagtacgga gatggagatt ggctcccaac tcctccctat 1680		
[1259]	cctaaaggcc cactggcatt aaagtgcgtt atccaag 1717		

[1260]	<210> 30		
[1261]	<211> 493		
[1262]	<212> PRT		
[1263]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[1264]	<400> 30		
[1265]	Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His		
[1266]	1	5	10
[1267]	Ala Cys Ser Lys Gly Thr Ser His Glu Ala Gly Ile Val Cys Arg Ile		
[1268]	20	25	30
[1269]	Thr Lys Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn His Glu Thr Ala Lys Val Ile		
[1270]	35	40	45
[1271]	Gln Thr Ala Phe Gln Arg Ala Ser Tyr Pro Asp Ile Thr Gly Glu Lys		
[1272]	50	55	60
[1273]	Ala Met Met Leu Leu Gly Gln Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Ile Gln		
[1274]	65	70	75
[1275]	Ile Ser His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ala		
[1276]	85	90	95
[1277]	Lys Ser Ile Asp Val Ser Ile Gln Asn Val Ser Val Val Phe Lys Gly		
[1278]	100	105	110
[1279]	Thr Leu Lys Tyr Gly Tyr Thr Thr Ala Trp Trp Leu Gly Ile Asp Gln		
[1280]	115	120	125
[1281]	Ser Ile Asp Phe Glu Ile Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr		
[1282]	130	135	140
[1283]	Gln Leu Thr Cys Asp Ser Gly Arg Val Arg Thr Asp Ala Pro Asp Cys		
[1284]	145	150	155
[1285]	Tyr Leu Ser Phe His Lys Leu Leu Leu His Leu Gln Gly Glu Arg Glu		
[1286]	165	170	175
[1287]	Pro Gly Trp Ile Lys Gln Leu Phe Thr Asn Phe Ile Ser Phe Thr Leu		
[1288]	180	185	190
[1289]	Lys Leu Val Leu Lys Gly Gln Ile Cys Lys Glu Ile Asn Val Ile Ser		
[1290]	195	200	205
[1291]	Asn Ile Met Ala Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser		
[1292]	210	215	220
[1293]	Asp Gly Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Leu Thr Gly Asp Pro Val Ile		
[1294]	225	230	235
[1295]	Thr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser His His Lys Gly His Phe Ile Tyr Lys		
[1296]	245	250	255
[1297]	Asn Val Ser Glu Asp Leu Pro Leu Pro Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu		
[1298]	260	265	270
[1299]	Gly Asp Ser Arg Met Leu Tyr Phe Trp Phe Ser Glu Arg Val Phe His		
[1300]	275	280	285
[1301]	Ser Leu Ala Lys Val Ala Phe Gln Asp Gly Arg Leu Met Leu Ser Leu		

[1302]	290	295	300															
[1303]	Met	Gly	Asp	Glu	Phe	Lys	Ala	Val	Leu	Glu	Thr	Trp	Gly	Phe	Asn	Thr		
[1304]	305			310			315			320								
[1305]	Asn	Gln	Glu	Ile	Phe	Gln	Glu	Val	Val	Gly	Gly	Phe	Pro	Ser	Gln	Ala		
[1306]				325				330			335							
[1307]	Gln	Val	Thr	Val	His	Cys	Leu	Lys	Met	Pro	Lys	Ile	Ser	Cys	Gln	Asn		
[1308]				340			345			350								
[1309]	Lys	Gly	Val	Val	Val	Asn	Ser	Ser	Val	Met	Val	Lys	Phe	Leu	Phe	Pro		
[1310]				355			360			365								
[1311]	Arg	Pro	Asp	Gln	Gln	His	Ser	Val	Ala	Tyr	Thr	Phe	Glu	Glu	Asp	Ile		
[1312]				370			375			380								
[1313]	Val	Thr	Thr	Val	Gln	Ala	Ser	Tyr	Ser	Lys	Lys	Lys	Leu	Phe	Leu	Ser		
[1314]	385			390				395			400							
[1315]	Leu	Leu	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Pro	Lys	Thr	Val	Ser	Asn	Leu	Thr	Glu		
[1316]				405				410			415							
[1317]	Ser	Ser	Ser	Glu	Ser	Val	Gln	Ser	Phe	Leu	Gln	Ser	Met	Ile	Thr	Ala		
[1318]				420			425			430								
[1319]	Val	Gly	Ile	Pro	Glu	Val	Met	Ser	Arg	Leu	Glu	Val	Val	Phe	Thr	Ala		
[1320]				435			440			445								
[1321]	Leu	Met	Asn	Ser	Lys	Gly	Val	Ser	Leu	Phe	Asp	Ile	Ile	Asn	Pro	Glu		
[1322]				450			455			460								
[1323]	Ile	Ile	Thr	Arg	Asp	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Gln	Met	Asp	Phe	Gly	Phe		
[1324]	465			470				475			480							
[1325]	Pro	Glu	His	Leu	Leu	Val	Asp	Phe	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser					
[1326]				485				490										
[1327]	<210>	31																
[1328]	<211>	1880																
[1329]	<212>	DNA																
[1330]	<213>	智人 (Homo sapiens)																
[1331]	<400>	31																
[1332]	gggtcggggc	cacaaggccg	cgctaggcgg	acccaggaca	cagccgcgc	gcagcccacc	60											
[1333]	cggccgcgc	ctgccagagc	tgctcgccc	gcagccaggg	ggacagcggc	ttgtcggagg	120											
[1334]	ctcgcagtgc	tgtcggcgag	aagcagtcgg	gtttggagcg	cttgggtcgc	gttgggtcgc	180											
[1335]	ggtggAACgc	gcccgaggac	cccagttccc	gcgcgcgcgc	ccgcgcgcgc	cctgagagac	240											
[1336]	taagctgaaa	ctgctgctca	gtccccaga	ttggtccacc	caaattgcat	gtgcgtttct	300											
[1337]	gcctctgcgg	ctgcctggct	gtggtttac	cttttgactg	gcaatacata	aatcctgttg	360											
[1338]	cccatatgaa	atcatcagca	tgggtcaaca	aaatacaga	actgatggct	gctgcaagct	420											
[1339]	ttggccaaac	taaaatcccc	cggggaaatg	ggccttattc	cgttgggtgt	acagacttaa	480											
[1340]	tgtttgatca	cactaataag	ggcaccttct	tgcgtttata	ttatccatcc	caagataatg	540											
[1341]	atcgccttga	cacccttgg	atcccaaata	aagaataattt	ttggggctt	agcaaatttc	600											
[1342]	ttggaacaca	ctggcttatg	ggcaacattt	tgaggttact	ctttgggtca	atgacaactc	660											
[1343]	ctgcaaactg	gaattccct	ctgaggcctg	gtgaaaaata	tccacttggtt	gttttttctc	720											

[1344] atggcttgg ggcattcagg acacttatt ctgctattgg cattgacctg gcatctcatg 780
 [1345] gtttatagt tgctgctgta gaacacagag atagatctgc atctgcaact tactattca 840
 [1346] aggaccaatc tgctgcagaa atagggaca agtcttggct ctacccataga accctgaaac 900
 [1347] aagaggagga gacacatata cgaatgagc aggtacggca aagagcaaaa gaatgttccc 960
 [1348] aagctctcag tctgattttt gacattgatc atggaaagcc agtgaagaat gcatttagatt 1020
 [1349] taaagttga tatggaacaa ctgaaggact ctattgatag ggaaaaaaa gcagtaattt 1080
 [1350] gacattctt tggggagca acggttattc agactcttag tgaagatcag agattcagat 1140
 [1351] gtggattgc cctggatgca tggatgttc cactgggtga tgaagtatat tccagaattc 1200
 [1352] ctcagccccct ctttttatac aactctgaat atttccaata tcctgctaattt atcataaaaa 1260
 [1353] tgaaaaaaatg ctactcacct gataaagaaa gaaagatgat tacaatcagg gttcagttcc 1320
 [1354] accagaattt tgctgacttc actttgcaa ctggcaaaat aattggacac atgctcaaat 1380
 [1355] taaagggaga catagattca aatgttagcta ttgatcttag caacaaagct tcattagcat 1440
 [1356] tcttacaaaaa gcatttagga cttcataaaag atttgtatca gtggactgc ttgattgaag 1500
 [1357] gagatgatga gaatcttattt ccagggacca acattaacac aaccaatcaa cacatcatgt 1560
 [1358] tacagaactc ttccatggata gagaatatac attaggatta aaataggttt tttaaaaagtc 1620
 [1359] ttgttcaaa actgtctaaa attatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgagag 1680
 [1360] agagagagag agagagagag agagagagag agaattttaa tgtatttcc caaaggactc 1740
 [1361] atattttaaa atgttaggcta tactgtatc gtgattgaag cttggactaa gaatttttc 1800
 [1362] ccttagatg taaagaaaga atacagtata caatattcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860
 [1363] aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1880
 [1364] <210> 32
 [1365] <211> 441
 [1366] <212> PRT
 [1367] <213> 智人(Homo sapiens)
 [1368] <400> 32
 [1369] Met Val Pro Pro Lys Leu His Val Leu Phe Cys Leu Cys Gly Cys Leu
 [1370] 1 5 10 15
 [1371] Ala Val Val Tyr Pro Phe Asp Trp Gln Tyr Ile Asn Pro Val Ala His
 [1372] 20 25 30
 [1373] Met Lys Ser Ser Ala Trp Val Asn Lys Ile Gln Val Leu Met Ala Ala
 [1374] 35 40 45
 [1375] Ala Ser Phe Gly Gln Thr Lys Ile Pro Arg Gly Asn Gly Pro Tyr Ser
 [1376] 50 55 60
 [1377] Val Gly Cys Thr Asp Leu Met Phe Asp His Thr Asn Lys Gly Thr Phe
 [1378] 65 70 75 80
 [1379] Leu Arg Leu Tyr Tyr Pro Ser Gln Asp Asn Asp Arg Leu Asp Thr Leu
 [1380] 85 90 95
 [1381] Trp Ile Pro Asn Lys Glu Tyr Phe Trp Gly Leu Ser Lys Phe Leu Gly
 [1382] 100 105 110
 [1383] Thr His Trp Leu Met Gly Asn Ile Leu Arg Leu Leu Phe Gly Ser Met
 [1384] 115 120 125
 [1385] Thr Thr Pro Ala Asn Trp Asn Ser Pro Leu Arg Pro Gly Glu Lys Tyr

[1386]	130	135	140
[1387]	Pro Leu Val Val Phe Ser His Gly Leu Gly Ala Phe Arg Thr Leu Tyr		
[1388]	145	150	155
[1389]	Ser Ala Ile Gly Ile Asp Leu Ala Ser His Gly Phe Ile Val Ala Ala		
[1390]	165	170	175
[1391]	Val Glu His Arg Asp Arg Ser Ala Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Lys Asp		
[1392]	180	185	190
[1393]	Gln Ser Ala Ala Glu Ile Gly Asp Lys Ser Trp Leu Tyr Leu Arg Thr		
[1394]	195	200	205
[1395]	Leu Lys Gln Glu Glu Glu Thr His Ile Arg Asn Glu Gln Val Arg Gln		
[1396]	210	215	220
[1397]	Arg Ala Lys Glu Cys Ser Gln Ala Leu Ser Leu Ile Leu Asp Ile Asp		
[1398]	225	230	235
[1399]	His Gly Lys Pro Val Lys Asn Ala Leu Asp Leu Lys Phe Asp Met Glu		
[1400]	245	250	255
[1401]	Gln Leu Lys Asp Ser Ile Asp Arg Glu Lys Ile Ala Val Ile Gly His		
[1402]	260	265	270
[1403]	Ser Phe Gly Gly Ala Thr Val Ile Gln Thr Leu Ser Glu Asp Gln Arg		
[1404]	275	280	285
[1405]	Phe Arg Cys Gly Ile Ala Leu Asp Ala Trp Met Phe Pro Leu Gly Asp		
[1406]	290	295	300
[1407]	Glu Val Tyr Ser Arg Ile Pro Gln Pro Leu Phe Phe Ile Asn Ser Glu		
[1408]	305	310	315
[1409]	Tyr Phe Gln Tyr Pro Ala Asn Ile Ile Lys Met Lys Lys Cys Tyr Ser		
[1410]	325	330	335
[1411]	Pro Asp Lys Glu Arg Lys Met Ile Thr Ile Arg Gly Ser Val His Gln		
[1412]	340	345	350
[1413]	Asn Phe Ala Asp Phe Thr Phe Ala Thr Gly Lys Ile Ile Gly His Met		
[1414]	355	360	365
[1415]	Leu Lys Leu Lys Gly Asp Ile Asp Ser Asn Val Ala Ile Asp Leu Ser		
[1416]	370	375	380
[1417]	Asn Lys Ala Ser Leu Ala Phe Leu Gln Lys His Leu Gly Leu His Lys		
[1418]	385	390	395
[1419]	Asp Phe Asp Gln Trp Asp Cys Leu Ile Glu Gly Asp Asp Glu Asn Leu		
[1420]	405	410	415
[1421]	Ile Pro Gly Thr Asn Ile Asn Thr Thr Asn Gln His Ile Met Leu Gln		
[1422]	420	425	430
[1423]	Asn Ser Ser Gly Ile Glu Lys Tyr Asn		
[1424]	435	440	
[1425]	<210> 33		
[1426]	<211> 2907		
[1427]	<212> DNA		

[1470] agtctgattc ttgacattga tcatggaaag ccagtgaaga atgcattaga tttaaagttt 2340
 [1471] gatatggAAC aactgaAGGA ctctattgat agggaaaaaa tagcagtaat tggacattct 2400
 [1472] tttgggtggag caacggttat tcagactctt agtgaagatc agagattcag atgtggatt 2460
 [1473] gccctggatg catggatgtt tccactgggt gatgaagttt attcagaat tcctcagccc 2520
 [1474] ctcttttta tcaactctga atatttccaa tattctgcta atatcataaa aatgaaaaaa 2580
 [1475] tgctactcac ctgataaaga aagaaagatg attacaatca ggggttcagt ccaccagaat 2640
 [1476] tttgctgact tcactttgc aactggcaaa ataattggac acatgctcaa attaaaggga 2700
 [1477] gacatagatt caaatgttagc tattgatctt agcaacaaag cttcattagc attcttacaa 2760
 [1478] aagcatttag gacttcataa agattttgat cagtggact gcttgattga aggagatgt 2820
 [1479] gagaatctta ttccagggac caacattaac acaaccaatc aacacatcat gttacagaac 2880
 [1480] tcttcaggaa tagagaaata caattag 2907
 [1481] <210> 34
 [1482] <211> 963
 [1483] <212> PRT
 [1484] <213> 人工
 [1485] <220>
 [1486] <223> THER4PAFAH多肽
 [1487] <400> 34
 [1488] Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
 [1489] 1 5 10 15
 [1490] Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
 [1491] 20 25 30
 [1492] Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
 [1493] 35 40 45
 [1494] Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
 [1495] 50 55 60
 [1496] Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
 [1497] 65 70 75 80
 [1498] Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
 [1499] 85 90 95
 [1500] Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
 [1501] 100 105 110
 [1502] Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
 [1503] 115 120 125
 [1504] Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
 [1505] 130 135 140
 [1506] Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu
 [1507] 145 150 155 160
 [1508] Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala
 [1509] 165 170 175
 [1510] Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp
 [1511] 180 185 190

[1512]	Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn		
[1513]	195	200	205
[1514]	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu		
[1515]	210	215	220
[1516]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln		
[1517]	225	230	235
[1518]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala		
[1519]	245	250	255
[1520]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly		
[1521]	260	265	270
[1522]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[1523]	275	280	285
[1524]	Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser		
[1525]	290	295	300
[1526]	Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu		
[1527]	305	310	315
[1528]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
[1529]	325	330	335
[1530]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
[1531]	340	345	350
[1532]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[1533]	355	360	365
[1534]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
[1535]	370	375	380
[1536]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
[1537]	385	390	395
[1538]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
[1539]	405	410	415
[1540]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
[1541]	420	425	430
[1542]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
[1543]	435	440	445
[1544]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
[1545]	450	455	460
[1546]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
[1547]	465	470	475
[1548]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
[1549]	485	490	495
[1550]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
[1551]	500	505	510
[1552]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly		
[1553]	515	520	525

[1554]	Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Phe		
[1555]	530	535	540
[1556]	Asp Trp Gln Tyr Ile Asn Pro Val Ala His Met Lys Ser Ser Ala Trp		
[1557]	545	550	555
[1558]	Val Asn Lys Ile Gln Val Leu Met Ala Ala Ser Phe Gly Gln Thr		
[1559]	565	570	575
[1560]	Lys Ile Pro Arg Gly Asn Gly Pro Tyr Ser Val Gly Cys Thr Asp Leu		
[1561]	580	585	590
[1562]	Met Phe Asp His Thr Asn Lys Gly Thr Phe Leu Arg Leu Tyr Tyr Pro		
[1563]	595	600	605
[1564]	Ser Gln Asp Asn Asp Arg Leu Asp Thr Leu Trp Ile Pro Asn Lys Glu		
[1565]	610	615	620
[1566]	Tyr Phe Trp Gly Leu Ser Lys Phe Leu Gly Thr His Trp Leu Met Gly		
[1567]	625	630	635
[1568]	640	645	650
[1569]	Asn Ile Leu Arg Leu Leu Phe Gly Ser Met Thr Thr Pro Ala Asn Trp		
[1570]	655	660	665
[1571]	Asn Ser Pro Leu Arg Pro Gly Glu Lys Tyr Pro Leu Val Val Phe Ser		
[1572]	670	675	680
[1573]	His Gly Leu Gly Ala Phe Arg Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Gly Ile Asp		
[1574]	685	690	695
[1575]	Leu Ala Ser His Gly Phe Ile Val Ala Ala Val Glu His Arg Asp Arg		
[1576]	700	705	710
[1577]	Ser Ala Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Lys Asp Gln Ser Ala Ala Glu Ile		
[1578]	720	725	730
[1579]	Gly Asp Lys Ser Trp Leu Tyr Leu Arg Thr Leu Lys Gln Glu Glu		
[1580]	735	740	745
[1581]	Thr His Ile Arg Asn Glu Gln Val Arg Gln Arg Ala Lys Glu Cys Ser		
[1582]	750	755	760
[1583]	Gln Ala Leu Ser Leu Ile Leu Asp Ile Asp His Gly Lys Pro Val Lys		
[1584]	765	770	775
[1585]	Asn Ala Leu Asp Leu Lys Phe Asp Met Glu Gln Leu Lys Asp Ser Ile		
[1586]	780	785	790
[1587]	Asp Arg Glu Lys Ile Ala Val Ile Gly His Ser Phe Gly Gly Ala Thr		
[1588]	800	795	805
[1589]	Val Ile Gln Thr Leu Ser Glu Asp Gln Arg Phe Arg Cys Gly Ile Ala		
[1590]	810	805	815
[1591]	Leu Asp Ala Trp Met Phe Pro Leu Gly Asp Glu Val Tyr Ser Arg Ile		
[1592]	820	825	830
[1593]	Pro Gln Pro Leu Phe Phe Ile Asn Ser Glu Tyr Phe Gln Tyr Pro Ala		
[1594]	840	835	845
[1595]	Asn Ile Ile Lys Met Lys Lys Cys Tyr Ser Pro Asp Lys Glu Arg Lys		
	850	855	860

[1596]	Met Ile Thr Ile Arg Gly Ser Val His Gln Asn Phe Ala Asp Phe Thr			
[1597]	865	870	875	880
[1598]	Phe Ala Thr Gly Lys Ile Ile Gly His Met Leu Lys Leu Lys Gly Asp			
[1599]	885	890	895	
[1600]	Ile Asp Ser Asn Val Ala Ile Asp Leu Ser Asn Lys Ala Ser Leu Ala			
[1601]	900	905	910	
[1602]	Phe Leu Gln Lys His Leu Gly Leu His Lys Asp Phe Asp Gln Trp Asp			
[1603]	915	920	925	
[1604]	Cys Leu Ile Glu Gly Asp Asp Glu Asn Leu Ile Pro Gly Thr Asn Ile			
[1605]	930	935	940	
[1606]	Asn Thr Thr Asn Gln His Ile Met Leu Gln Asn Ser Ser Gly Ile Glu			
[1607]	945	950	955	960
[1608]	Lys Tyr Asn			
[1609]	<210> 35			
[1610]	<211> 801			
[1611]	<212> DNA			
[1612]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[1613]	<400> 35			
[1614]	atgaaagctg cggtgctgac ctggccgtg ctttcctga cggggagcca ggctcgccat 60			
[1615]	ttctggcagc aagatgaacc ccccccagagc ccctgggatc gagtaagga cctggccact 120			
[1616]	gtgtacgtgg atgtgctcaa agacagcggc agagactatg tgtccagtt tgaaggctcc 180			
[1617]	gccttggaa aacagctaaa cctaaagctc cttgacaact gggacagcgt gacccctacc 240			
[1618]	ttcagcaagc tgcgcgaaca gctcggccct gtgacccagg agttctggaa taacctggaa 300			
[1619]	aaggagacag agggcctgag gcaggagatg agcaaggatc tggaggaggt gaaggccaag 360			
[1620]	gtgcagccct acctggacga cttccagaag aagtggcagg aggagatgga gctctaccgc 420			
[1621]	cagaagggtgg agccgctgctc cgccagagtc caagagggcg cgcccccagaa gctgcacgag 480			
[1622]	ctgcaagaga agctgagccc actggcgcag gagatgcgcg accgcgcgcg cgcccatgtg 540			
[1623]	gacgcgctgc gcacgcacatc ggccccctac agcgacgcgc tgcgccagcg cttggccgcg 600			
[1624]	cgcccttggagg ctctcaagga gaacggcggc gccagactgg ccgagttacca cgccaaggcc 660			
[1625]	accgagcatc tgagcacgct cagcgagaag gccaagcccg cgctcgagga cctccgcca 720			
[1626]	ggcctgctgc ccgtgctgga gagcttcaag gtcagttcc tgagcgctct cgaggagtag 780			
[1627]	actaagaagc tcaacaccca a 801			
[1628]	<210> 36			
[1629]	<211> 267			
[1630]	<212> PRT			
[1631]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[1632]	<400> 36			
[1633]	Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser			
[1634]	1 5 10 15			
[1635]	Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp			
[1636]	20 25 30			
[1637]	Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp			

[1638]	35	40	45
[1639]	Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys		
[1640]	50	55	60
[1641]	Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr		
[1642]	65	70	75
[1643]	Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp		
[1644]	85	90	95
[1645]	Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys		
[1646]	100	105	110
[1647]	Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe		
[1648]	115	120	125
[1649]	Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu		
[1650]	130	135	140
[1651]	Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu		
[1652]	145	150	155
[1653]	Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala		
[1654]	165	170	175
[1655]	Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp		
[1656]	180	185	190
[1657]	Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn		
[1658]	195	200	205
[1659]	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu		
[1660]	210	215	220
[1661]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln		
[1662]	225	230	235
[1663]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala		
[1664]	245	250	255
[1665]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln		
[1666]	260	265	
[1667]	<210> 37		
[1668]	<211> 2647		
[1669]	<212> DNA		
[1670]	<213> 人工		
[1671]	<220>		
[1672]	<223> THER2PON1 DNA		
[1673]	<400> 37		
[1674]	gttaagcttg ccaccatgaa agctgcggtg ctgaccttgg ccgtgctctt cctgacgggg 60		
[1675]	agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg 120		
[1676]	aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctcaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc 180		
[1677]	cagttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agctccttga caactggac 240		
[1678]	agcgtgacct ccaccttcag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc 300		
[1679]	tggataacc tggaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag 360		

[1680] gaggtgaagg ccaaggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtgcaggaggag 420
 [1681] atggagctct accgccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc 480
 [1682] cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccaactgg gcgaggagat gcgcgaccgc 540
 [1683] gcgcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc 600
 [1684] cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggctctc aaggagaacg gcggcgccag actggccgag 660
 [1685] taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgc 720
 [1686] gaggacctcc gccaaggcct gctgcccgtg ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc 780
 [1687] gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca 840
 [1688] ggaggaggtg ggagtaccgg tctcgagccc aaatcttctg acaaaaactca cacatctcca 900
 [1689] ccgtccccag cacctgaact cctgggagga tcgtcagttc tcctttccc cccaaaaccc 960
 [1690] aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc 1020
 [1691] cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1080
 [1692] aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1140
 [1693] gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1200
 [1694] ctcccagcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag 1260
 [1695] gtgtacaccc tgcccccattc ccggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1320
 [1696] ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg 1380
 [1697] gagaacaact acaagaccac gcctccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1440
 [1698] agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtttctc atgctccgtg 1500
 [1699] atgcattgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctctctc tccggtaaaa 1560
 [1700] gtcgacggag cttagcagccc cgtgaacgtg agcagccca gcgtgcagga tatcctcttc 1620
 [1701] aggaaccacc agtcttctta ccaaacacga cttaatgctc tccgagaggt acaaccgta 1680
 [1702] gaacttccta actgtatattt agttaaagga atcgaaactg gctctgaaga cttggagata 1740
 [1703] ctgcctaattg gactggctt cattagctct ggattaaagt atcctggaat aaagagcttc 1800
 [1704] aaccccaaca gtcctggaaa aatacttctg atggacctga atgaagaaga tccaaacagt 1860
 [1705] ttggatttgg ggttcactgg aagtaaattt gatgtatctt catttaaccc tcatggatt 1920
 [1706] agcacattca cagatgaaga taatgccatg tacctcctgg tggtaacca tccagatgcc 1980
 [1707] aagtccacag tggagttgtt taaatttcaa gaagaagaaaa aatcgctttt gcatctaaaa 2040
 [1708] accatcagac ataaacttct gcctaatttgc aatgatatttgg tgcgtgtggg acctgagcac 2100
 [1709] tttatggca caaatgatca ctatttctt gacccctact tacaatcctg ggagatgtat 2160
 [1710] ttgggtttag cgtggtcgtt tggatctac tatagtccaa gtgaagttcg agtgggtggca 2220
 [1711] gaaggatttgc attttgcataa tggatcaac atttcacccg atggcaagta tgtctatata 2280
 [1712] gctgagttgc tggctcataa gattcatgtg tatgaaaagc atgctaatttgc gactttaact 2340
 [1713] ccattgaagt cccttgactt taataccctc gtggataaca tatctgtggta tcctgagaca 2400
 [1714] ggagacctt ggggtggatg ccatccaaat ggcataaaaa tcttcttgc tgactcagag 2460
 [1715] aatcctcctg catcagaggt gcttcgaatc cagaacattc taacagaaga acctaaagtg 2520
 [1716] acacagggtt atgcagaaaaa tggcacagtg ttgcaaggca gtacagtgc ctctgtgtac 2580
 [1717] aaaggaaac tgctgattgg cacagtgttt cacaagctc tttactgtga gctctaataa 2640
 [1718] tcttagaa 2647
 [1719] <210> 38
 [1720] <211> 873
 [1721] <212> PRT

[1722]	<213> 人工															
[1723]	<220>															
[1724]	<223> THER2PON1多肽															
[1725]	<400> 38															
[1726]	Met	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Leu	Phe	Leu	Thr	Gly	Ser
[1727]	1				5					10					15	
[1728]	Gln	Ala	Arg	His	Phe	Trp	Gln	Gln	Asp	Glu	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro	Trp
[1729]						20				25					30	
[1730]	Asp	Arg	Val	Lys	Asp	Leu	Ala	Thr	Val	Tyr	Val	Asp	Val	Leu	Lys	Asp
[1731]						35				40					45	
[1732]	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Lys
[1733]						50				55					60	
[1734]	Gln	Leu	Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Thr
[1735]						65				70					75	
[1736]	Phe	Ser	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Phe	Trp
[1737]						85				90					95	
[1738]	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Gly	Leu	Arg	Gln	Glu	Met	Ser	Lys
[1739]						100				105					110	
[1740]	Asp	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Val	Gln	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asp	Phe
[1741]						115				120					125	
[1742]	Gln	Lys	Lys	Trp	Gln	Glu	Glu	Met	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gln	Lys	Val	Glu
[1743]						130				135					140	
[1744]	Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Leu	His	Glu
[1745]						145				150					155	
[1746]	Leu	Gln	Glu	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Gly	Glu	Glu	Met	Arg	Asp	Arg	Ala
[1747]						165				170					175	
[1748]	Arg	Ala	His	Val	Asp	Ala	Leu	Arg	Thr	His	Leu	Ala	Pro	Tyr	Ser	Asp
[1749]						180				185					190	
[1750]	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Asn
[1751]						195				200					205	
[1752]	Gly	Gly	Ala	Arg	Leu	Ala	Glu	Tyr	His	Ala	Lys	Ala	Thr	Glu	His	Leu
[1753]						210				215					220	
[1754]	Ser	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Gln
[1755]						225				230					235	
[1756]	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Glu	Ser	Phe	Lys	Val	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala
[1757]						245				250					255	
[1758]	Leu	Glu	Glu	Tyr	Thr	Lys	Lys	Leu	Asn	Thr	Gln	Asp	Leu	Ser	Gly	Gly
[1759]						260				265					270	
[1760]	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	
[1761]						275				280					285	
[1762]	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
[1763]						290				295					300	

[1764]	Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
[1765]	305	310	315	320
[1766]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
[1767]	325	330	335	
[1768]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
[1769]	340	345	350	
[1770]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
[1771]	355	360	365	
[1772]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
[1773]	370	375	380	
[1774]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile			
[1775]	385	390	395	400
[1776]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
[1777]	405	410	415	
[1778]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
[1779]	420	425	430	
[1780]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
[1781]	435	440	445	
[1782]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
[1783]	450	455	460	
[1784]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
[1785]	465	470	475	480
[1786]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
[1787]	485	490	495	
[1788]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
[1789]	500	505	510	
[1790]	Pro Gly Lys Val Asp Gly Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro			
[1791]	515	520	525	
[1792]	Ser Val Gln Asp Ile Leu Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr			
[1793]	530	535	540	
[1794]	Arg Leu Asn Ala Leu Arg Glu Val Gln Pro Val Glu Leu Pro Asn Cys			
[1795]	545	550	555	560
[1796]	Asn Leu Val Lys Gly Ile Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile Leu			
[1797]	565	570	575	
[1798]	Pro Asn Gly Leu Ala Phe Ile Ser Ser Gly Leu Lys Tyr Pro Gly Ile			
[1799]	580	585	590	
[1800]	Lys Ser Phe Asn Pro Asn Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu			
[1801]	595	600	605	
[1802]	Asn Glu Glu Asp Pro Thr Val Leu Glu Leu Gly Ile Thr Gly Ser Lys			
[1803]	610	615	620	
[1804]	Phe Asp Val Ser Ser Phe Asn Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp			
[1805]	625	630	635	640

[1806] Glu Asp Asn Ala Met Tyr Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys
 [1807] 645 650 655
 [1808] Ser Thr Val Glu Leu Phe Lys Phe Gln Glu Glu Glu Lys Ser Leu Leu
 [1809] 660 665 670
 [1810] His Leu Lys Thr Ile Arg His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile
 [1811] 675 680 685
 [1812] Val Ala Val Gly Pro Glu His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe
 [1813] 690 695 700
 [1814] Leu Asp Pro Tyr Leu Gln Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp
 [1815] 705 710 715 720
 [1816] Ser Tyr Val Val Tyr Tyr Ser Pro Ser Glu Val Arg Val Val Ala Glu
 [1817] 725 730 735
 [1818] Gly Phe Asp Phe Ala Asn Gly Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys Tyr
 [1819] 740 745 750
 [1820] Val Tyr Ile Ala Glu Leu Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys
 [1821] 755 760 765
 [1822] His Ala Asn Trp Thr Leu Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr
 [1823] 770 775 780
 [1824] Leu Val Asp Asn Ile Ser Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val
 [1825] 785 790 795 800
 [1826] Gly Cys His Pro Asn Gly Met Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu Asn
 [1827] 805 810 815
 [1828] Pro Pro Ala Ser Glu Val Leu Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu
 [1829] 820 825 830
 [1830] Pro Lys Val Thr Gln Val Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly
 [1831] 835 840 845
 [1832] Ser Thr Val Ala Ser Val Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val
 [1833] 850 855 860
 [1834] Phe His Lys Ala Leu Tyr Cys Glu Leu
 [1835] 865 870
 [1836] <210> 39
 [1837] <211> 3084
 [1838] <212> DNA
 [1839] <213> 人工
 [1840] <220>
 [1841] <223> THER4CETP DNA
 [1842] <400> 39
 [1843] gttaagctt ccaccatgaa agctcggtt ctgacccctt ccgtgtctt cctgacgggg 60
 [1844] agccaggctc ggcatttctt gcagcaagat gaacccccc agagccctt ggatcgagt 120
 [1845] aaggacctt ccactgttta cgtggatgtt ctcaaagaca gcggcagaga ctatgttcc 180
 [1846] cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agctccttga caactggac 240
 [1847] agcgtgaccc ccaccccttccag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc 300

[1848] tgggataacc tggaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa gnatctggag 360
 [1849] gaggtgaagg ccaagggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtgc caggaggag 420
 [1850] atggagctct accggccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc 480
 [1851] cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccaactgg gcgaggagat ggcgcaccgc 540
 [1852] ggcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc 600
 [1853] cagcgcctgg ccgcgcgcct tgaggcttc aaggagaacg gcggcgccag actggccgag 660
 [1854] taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgctc 720
 [1855] gaggacctcc gccaaggcct gctgcgcgtg ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc 780
 [1856] gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca 840
 [1857] ggtggtgag gatctggagg aggtggaggt ggtggaggtg gtttaccgg tctcgagccc 900
 [1858] aaatcttctg acaaactca cacatctcca cgtccccag cacctgaact cctggagga 960
 [1859] tcgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc cgggaccct 1020
 [1860] gaggtcacat gcgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 1080
 [1861] tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaagc cgcggagga gcagtacaac 1140
 [1862] agcacgttacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1200
 [1863] gagtacaagt gcaagggttc caacaaagcc ctcccagcct ccatcgagaa aaccatctcc 1260
 [1864] aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccattc cgggatgag 1320
 [1865] ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctggtaaa gtcgacggag ctgcgcacatc 1380
 [1866] gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg 1440
 [1867] ctggactccg acggctcctt ctccctctac agcaagctca cgtggacaa gaggcagggtgg 1500
 [1868] cagcagggga acgtttctc atgtccgtg atgcattgagg ctctgcacaa ccactacacg 1560
 [1869] cagaagagcc tctctcttc tccggtaaa gtcgacggag ctgcgcacatc cgtgaacgtg 1620
 [1870] agcagcccca gcgtgcagga tatctgctcc aaaggcacct cgcacgaggc aggcatcggt 1680
 [1871] tgccgcatac ccaaggctgc cttctggtg ttgaaccacg agactgcca ggtgatccag 1740
 [1872] accgcctcc agcgagccag ctacccagat atcacggcg agaaggccat gatgctcctt 1800
 [1873] ggccaagtca agtatgggtt gcacaacatc cagatcagcc acttgtccat cgccagcagc 1860
 [1874] caggtggagc tggtaaa gacgtccatt gatgtctcc ttcaaggtt gtcgtggc 1920
 [1875] ttcaagggga ccctgaagta tggctacacc actgccttgtt ggctgggtat tgatcagtcc 1980
 [1876] attgacttcg agatcgactc tgccattgac ctccagatca acacacagct gacctgtgac 2040
 [1877] tctggtagag tggcggaccga tgccctgtac tgctacctgt ctccatcaa gctgctcctg 2100
 [1878] catctccaag gggagcggaga gcctgggtgg atcaaggcagc tgccatcaa tttcatctcc 2160
 [1879] ttccacccgtaa agctggctt gaaggacagat atctgccaag agatcaacgt catctctaacc 2220
 [1880] atcatggccg atttgtcca gacaagggtt gccagcatcc tttcagatgg agacattggg 2280
 [1881] gtggacattt ccctgacagg tgatccgtc atcacagcct cttacctggaa gtcccatcac 2340
 [1882] aagggtcatt tcatctacaa gaatgtctca gaggacctcc ccctcccccac ctctcgccc 2400
 [1883] acactgctgg gggactcccg catgctgtac ttctgggtt ctgagcgtt cttccactcg 2460
 [1884] ctggccaagg tagtttcca ggatggccgc ctcatgctca gcctgtatggg agacgagttc 2520
 [1885] aaggcagtgc tggagacctg gggcttcaac accaaccagg aaatcttcca agaggttgc 2580
 [1886] ggcggcttcc ccagccaggc ccaagtcacc gtccactgcc tcaagatgcc caagatctcc 2640
 [1887] tgccaaaaca agggagtcgt ggtcaatttc tcaatgtatgg tgaaattccctt cttccacgc 2700
 [1888] ccagaccaggc aacattctgt agcttacaca tttgaagagg atatcgatcc taccgtccag 2760
 [1889] gcctcattt ctaagaaaaa gcttttta agcctttgg atttccagat tacaccaag 2820

[1890]	actgtttcca	acttgactga	gaggcagctcc	gagtcgcgtcc	agagttcct	gcagtcaatg	2880									
[1891]	atcaccgctg	tgggcatccc	tgaggtcatg	tctcggtctcg	aggttagtgtt	tacagccctc	2940									
[1892]	atgaacagca	aaggcgtgag	cctcttcgac	atcatcaacc	ctgagattat	cactcgagat	3000									
[1893]	ggttccctgc	tgctgcagat	ggactttggc	ttccctgagc	acctgctggt	ggatttcctc	3060									
[1894]	cagagcttga	gctaataatc	taga													
[1895]	<210>	40														
[1896]	<211>	1019														
[1897]	<212>	PRT														
[1898]	<213>	人工														
[1899]	<220>															
[1900]	<223>	THER4CETP多肽														
[1901]	<400>	40														
[1902]	Met	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Leu	Phe	Leu	Thr	Gly	Ser
[1903]	1				5				10						15	
[1904]	Gln	Ala	Arg	His	Phe	Trp	Gln	Gln	Asp	Glu	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro	Trp
[1905]							20			25					30	
[1906]	Asp	Arg	Val	Lys	Asp	Leu	Ala	Thr	Val	Tyr	Val	Asp	Val	Leu	Lys	Asp
[1907]							35			40					45	
[1908]	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Lys
[1909]							50			55					60	
[1910]	Gln	Leu	Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Thr
[1911]							65			70					75	
[1912]	Phe	Ser	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Phe	Trp
[1913]							85			90					95	
[1914]	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Gly	Leu	Arg	Gln	Glu	Met	Ser	Lys
[1915]							100			105					110	
[1916]	Asp	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Val	Gln	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asp	Phe
[1917]							115			120					125	
[1918]	Gln	Lys	Lys	Trp	Gln	Glu	Glu	Met	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gln	Lys	Val	Glu
[1919]							130			135					140	
[1920]	Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Leu	His	Glu
[1921]							145			150					155	
[1922]	Leu	Gln	Glu	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Gly	Glu	Glu	Met	Arg	Asp	Arg	Ala
[1923]							165			170					175	
[1924]	Arg	Ala	His	Val	Asp	Ala	Leu	Arg	Thr	His	Leu	Ala	Pro	Tyr	Ser	Asp
[1925]							180			185					190	
[1926]	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Asn
[1927]							195			200					205	
[1928]	Gly	Gly	Ala	Arg	Leu	Ala	Glu	Tyr	His	Ala	Lys	Ala	Thr	Glu	His	Leu
[1929]							210			215					220	
[1930]	Ser	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Gln
[1931]							225			230					235	
															240	

[1932]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala		
[1933]	245	250	255
[1934]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly		
[1935]	260	265	270
[1936]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[1937]	275	280	285
[1938]	Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser		
[1939]	290	295	300
[1940]	Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu		
[1941]	305	310	315
[1942]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
[1943]	325	330	335
[1944]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
[1945]	340	345	350
[1946]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[1947]	355	360	365
[1948]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
[1949]	370	375	380
[1950]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
[1951]	385	390	395
[1952]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
[1953]	405	410	415
[1954]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
[1955]	420	425	430
[1956]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
[1957]	435	440	445
[1958]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
[1959]	450	455	460
[1960]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
[1961]	465	470	475
[1962]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
[1963]	485	490	495
[1964]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
[1965]	500	505	510
[1966]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly		
[1967]	515	520	525
[1968]	Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Cys		
[1969]	530	535	540
[1970]	Ser Lys Gly Thr Ser His Glu Ala Gly Ile Val Cys Arg Ile Thr Lys		
[1971]	545	550	555
[1972]	Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn His Glu Thr Ala Lys Val Ile Gln Thr		
[1973]	565	570	575

[1974]	Ala Phe Gln Arg Ala Ser Tyr Pro Asp Ile Thr Gly Glu Lys Ala Met		
[1975]	580	585	590
[1976]	Met Leu Leu Gly Gln Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Ile Gln Ile Ser		
[1977]	595	600	605
[1978]	His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ala Lys Ser		
[1979]	610	615	620
[1980]	Ile Asp Val Ser Ile Gln Asn Val Ser Val Val Phe Lys Gly Thr Leu		
[1981]	625	630	635
[1982]	Lys Tyr Gly Tyr Thr Thr Ala Trp Trp Leu Gly Ile Asp Gln Ser Ile		
[1983]	645	650	655
[1984]	Asp Phe Glu Ile Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr Gln Leu		
[1985]	660	665	670
[1986]	Thr Cys Asp Ser Gly Arg Val Arg Thr Asp Ala Pro Asp Cys Tyr Leu		
[1987]	675	680	685
[1988]	Ser Phe His Lys Leu Leu Leu His Leu Gln Gly Glu Arg Glu Pro Gly		
[1989]	690	695	700
[1990]	Trp Ile Lys Gln Leu Phe Thr Asn Phe Ile Ser Phe Thr Leu Lys Leu		
[1991]	705	710	715
[1992]	Val Leu Lys Gly Gln Ile Cys Lys Glu Ile Asn Val Ile Ser Asn Ile		
[1993]	725	730	735
[1994]	Met Ala Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser Asp Gly		
[1995]	740	745	750
[1996]	Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Leu Thr Gly Asp Pro Val Ile Thr Ala		
[1997]	755	760	765
[1998]	Ser Tyr Leu Glu Ser His His Lys Gly His Phe Ile Tyr Lys Asn Val		
[1999]	770	775	780
[2000]	Ser Glu Asp Leu Pro Leu Pro Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Gly Asp		
[2001]	785	790	795
[2002]	Ser Arg Met Leu Tyr Phe Trp Phe Ser Glu Arg Val Phe His Ser Leu		
[2003]	805	810	815
[2004]	Ala Lys Val Ala Phe Gln Asp Gly Arg Leu Met Leu Ser Leu Met Gly		
[2005]	820	825	830
[2006]	Asp Glu Phe Lys Ala Val Leu Glu Thr Trp Gly Phe Asn Thr Asn Gln		
[2007]	835	840	845
[2008]	Glu Ile Phe Gln Glu Val Val Gly Gly Phe Pro Ser Gln Ala Gln Val		
[2009]	850	855	860
[2010]	Thr Val His Cys Leu Lys Met Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn Lys Gly		
[2011]	865	870	875
[2012]	Val Val Val Asn Ser Ser Val Met Val Lys Phe Leu Phe Pro Arg Pro		
[2013]	885	890	895
[2014]	Asp Gln Gln His Ser Val Ala Tyr Thr Phe Glu Glu Asp Ile Val Thr		
[2015]	900	905	910

[2016]	Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser Lys Lys Lys Leu Phe Leu Ser Leu Leu		
[2017]	915	920	925
[2018]	Asp Phe Gln Ile Thr Pro Lys Thr Val Ser Asn Leu Thr Glu Ser Ser		
[2019]	930	935	940
[2020]	Ser Glu Ser Val Gln Ser Phe Leu Gln Ser Met Ile Thr Ala Val Gly		
[2021]	945	950	955
[2022]	Ile Pro Glu Val Met Ser Arg Leu Glu Val Val Phe Thr Ala Leu Met		
[2023]	965	970	975
[2024]	Asn Ser Lys Gly Val Ser Leu Phe Asp Ile Ile Asn Pro Glu Ile Ile		
[2025]	980	985	990
[2026]	Thr Arg Asp Gly Phe Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe Pro Glu		
[2027]	995	1000	1005
[2028]	His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser		
[2029]	1010	1015	
[2030]	<210> 41		
[2031]	<211> 1068		
[2032]	<212> DNA		
[2033]	<213> 人工		
[2034]	<220>		
[2035]	<223> 人PON1 Q192K DNA		
[2036]	<400> 41		
[2037]	atggcgaagc tgattgcgct caccctttg gggatggac tggcacttt caggaaccac 60		
[2038]	cagtcttctt accaaacacg acttaatgct ctccgagagg tacaaccgt agaacttcct 120		
[2039]	aactgttaatt tagttaaagg aatcgaaact ggctctgaag acttggagat actgcctaatt 180		
[2040]	ggactggctt tcatttagctc tggattaaag tattctggaa taaagagctt caaccccaac 240		
[2041]	agtccctggaa aaatacttct gatggacctg aatgaagaag atccaaacagt gttggaaattt 300		
[2042]	gggatcactg gaagtaaatt ttagtgtatct tcatttaacc ctcatggat tagcacattc 360		
[2043]	acagatgaag ataatgccat gtaccccttg gtggtaacc atccagatgc caagtccaca 420		
[2044]	gtggagttgt ttaaatttca agaagaagaa aaatcgctt tgcattaaa aaccatcaga 480		
[2045]	cataaacttc tgcctaattt gaatgatatt gttgctgtgg gacctgagca cttttatggc 540		
[2046]	acaaatgatc actatttct tgaccctac ttaaaatcct gggagatgta tttgggttta 600		
[2047]	gcgtggcgt atgttgtcta ctatagtcca agtgaagttc gagttggcaga agaaggattt 660		
[2048]	gattttgcta atggaatcaa cattcaccc gatggcaagt atgtctatat agctgagttt 720		
[2049]	ctggctcata agattcatgt gtatgaaaag catgctaatt ggacttaac tccattgaag 780		
[2050]	tcccttgact ttaataccct cgtggataac atatctgtgg atcctgagac aggagacctt 840		
[2051]	tgggttggat gccatccaa tggcatgaaa atcttcttct atgactcaga gaatcctcct 900		
[2052]	gcatcagagg tgcttcaat ccagaacatt ctaacagaag aacctaaagt gacacaggtt 960		
[2053]	tatgcagaaa atggcacagt gttcaaggc agtacagttt cctctgtta caaaggaaa 1020		
[2054]	ctgctgattt gcacagtgtt tcacaaagct cttaactgtt agctctaa 1068		
[2055]	<210> 42		
[2056]	<211> 355		
[2057]	<212> PRT		

[2058]	<213> 人工															
[2059]	<220>															
[2060]	<223> 人PON1 Q192K多肽															
[2061]	<400> 42															
[2062]	Met	Ala	Lys	Leu	Ile	Ala	Leu	Thr	Leu	Leu	Gly	Met	Gly	Leu	Ala	Leu
[2063]	1			5				10								15
[2064]	Phe	Arg	Asn	His	Gln	Ser	Ser	Tyr	Gln	Thr	Arg	Leu	Asn	Ala	Leu	Arg
[2065]					20				25							30
[2066]	Glu	Val	Gln	Pro	Val	Glu	Leu	Pro	Asn	Cys	Asn	Leu	Val	Lys	Gly	Ile
[2067]					35				40							45
[2068]	Glu	Thr	Gly	Ser	Glu	Asp	Leu	Glu	Ile	Leu	Pro	Asn	Gly	Leu	Ala	Phe
[2069]					50				55							60
[2070]	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Lys	Tyr	Pro	Gly	Ile	Lys	Ser	Phe	Asn	Pro	Asn
[2071]					65				70							80
[2072]	Ser	Pro	Gly	Lys	Ile	Leu	Leu	Met	Asp	Leu	Asn	Glu	Glu	Asp	Pro	Thr
[2073]					85				90							95
[2074]	Val	Leu	Glu	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Ser	Lys	Phe	Asp	Val	Ser	Ser	Phe
[2075]					100				105							110
[2076]	Asn	Pro	His	Gly	Ile	Ser	Thr	Phe	Thr	Asp	Glu	Asp	Asn	Ala	Met	Tyr
[2077]					115				120							125
[2078]	Leu	Leu	Val	Val	Asn	His	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Glu	Leu	Phe
[2079]					130				135							140
[2080]	Lys	Phe	Gln	Glu	Glu	Glu	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Thr	Ile	Arg
[2081]					145				150							160
[2082]	His	Lys	Leu	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn	Asp	Ile	Val	Ala	Val	Gly	Pro	Glu
[2083]					165				170							175
[2084]	His	Phe	Tyr	Gly	Thr	Asn	Asp	His	Tyr	Phe	Leu	Asp	Pro	Tyr	Leu	Lys
[2085]					180				185							190
[2086]	Ser	Trp	Glu	Met	Tyr	Leu	Gly	Leu	Ala	Trp	Ser	Tyr	Val	Val	Tyr	Tyr
[2087]					195				200							205
[2088]	Ser	Pro	Ser	Glu	Val	Arg	Val	Val	Ala	Glu	Gly	Phe	Asp	Phe	Ala	Asn
[2089]					210				215							220
[2090]	Gly	Ile	Asn	Ile	Ser	Pro	Asp	Gly	Lys	Tyr	Val	Tyr	Ile	Ala	Glu	Leu
[2091]					225				230							240
[2092]	Leu	Ala	His	Lys	Ile	His	Val	Tyr	Glu	Lys	His	Ala	Asn	Trp	Thr	Leu
[2093]					245				250							255
[2094]	Thr	Pro	Leu	Lys	Ser	Leu	Asp	Phe	Asn	Thr	Leu	Val	Asp	Asn	Ile	Ser
[2095]					260				265							270
[2096]	Val	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Asp	Leu	Trp	Val	Gly	Cys	His	Pro	Asn	Gly
[2097]					275				280							285
[2098]	Met	Lys	Ile	Phe	Phe	Tyr	Asp	Ser	Glu	Asn	Pro	Pro	Ala	Ser	Glu	Val
[2099]					290				295							300

[2100]	Leu Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu Pro Lys Val Thr Gln Val			
[2101]	305	310	315	320
[2102]	Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val			
[2103]	325	330	335	
[2104]	Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr			
[2105]	340	345	350	
[2106]	Cys Glu Leu			
[2107]	355			
[2108]	<210> 43			
[2109]	<211> 1065			
[2110]	<212> DNA			
[2111]	<213> 智人 (Homo sapiens)			
[2112]	<400> 43			
[2113]	atggcgaagc tgattgcgct caccctctt gggatggac tggcactctt caggaaccac 60			
[2114]	cagtcttctt accaaacacg acttaatgct ctccgagagg tacaaccgt agaacttcct 120			
[2115]	aactgttaatt tagttaaagg aatcgaaact ggctctgaag acttggagat actgcctaatt 180			
[2116]	ggactggctt tcatttagctc tggattaaag tatcctggaa taaagagctt caaccccaac 240			
[2117]	agtcctggaa aaataacttct gatggacctg aatgaagaag atccaacagt gttggaattt 300			
[2118]	gggatcactg gaagtaaatt tgcgttatct tcatttaacc ctcattggat tagcacattc 360			
[2119]	acagatgaag ataatgccat gtaccccttg gtggtaacc atccagatgc caagtccaca 420			
[2120]	gtggagttgt ttaaatttca agaagaagaa aaatcgctt tgcattctaaa aaccatcaga 480			
[2121]	cataaacttc tgccttaattt gaatgatatt gttgctgtgg gacctgagca cttttatggc 540			
[2122]	acaaatgatc actatttct tgaccctac ttaagatcct gggagatgta tttgggttta 600			
[2123]	gcgtggcgt atgttgtcta ctatagtcca agtgaagttc gagtggtggc agaaggattt 660			
[2124]	gatttgctca atggaatcaa catttcaccc gatggcaagt atgtctatat agctgagttt 720			
[2125]	ctggctcata agattcatgt gtatgaaaag catgctaatt ggactttaac tccattgaag 780			
[2126]	tcccttgact ttaataccct cgtggataac atatctgtgg atccctgagac aggagacctt 840			
[2127]	tgggttggat gccatcccaa tggcatgaaa atcttcttct atgactcaga gaatcctctt 900			
[2128]	gcatcagagg tgcttcaat ccagaacatt ctaacagaag aacctaaagt gacacaggtt 960			
[2129]	tatgcagaaa atggcacagt gttcaaggc agtacagttt cctctgtgtt caaaggaa 1020			
[2130]	ctgctgattt gcacagtgtt tcacaaagct cttaactgtt agctc 1065			
[2131]	<210> 44			
[2132]	<211> 355			
[2133]	<212> PRT			
[2134]	<213> 智人 (Homo sapiens)			
[2135]	<400> 44			
[2136]	Met Ala Lys Leu Ile Ala Leu Thr Leu Leu Gly Met Gly Leu Ala Leu			
[2137]	1	5	10	15
[2138]	Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr Arg Leu Asn Ala Leu Arg			
[2139]	20	25	30	
[2140]	Glu Val Gln Pro Val Glu Leu Pro Asn Cys Asn Leu Val Lys Gly Ile			
[2141]	35	40	45	

[2142]	Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile Leu Pro Asn Gly Leu Ala Phe		
[2143]	50	55	60
[2144]	Ile Ser Ser Gly Leu Lys Tyr Pro Gly Ile Lys Ser Phe Asn Pro Asn		
[2145]	65	70	75
[2146]	80		
[2147]	Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu Asn Glu Glu Asp Pro Thr		
[2148]	85	90	95
[2149]	Val Leu Glu Leu Gly Ile Thr Gly Ser Lys Phe Asp Val Ser Ser Phe		
[2150]	100	105	110
[2151]	Asn Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp Glu Asp Asn Ala Met Tyr		
[2152]	115	120	125
[2153]	Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys Ser Thr Val Glu Leu Phe		
[2154]	130	135	140
[2155]	Lys Phe Gln Glu Glu Glu Lys Ser Leu Leu His Leu Lys Thr Ile Arg		
[2156]	145	150	155
[2157]	160		
[2158]	His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile Val Ala Val Gly Pro Glu		
[2159]	165	170	175
[2160]	His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Arg		
[2161]	180	185	190
[2162]	Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr		
[2163]	195	200	205
[2164]	Ser Pro Ser Glu Val Arg Val Val Ala Glu Gly Phe Asp Phe Ala Asn		
[2165]	210	215	220
[2166]	Gly Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys Tyr Val Tyr Ile Ala Glu Leu		
[2167]	225	230	235
[2168]	240		
[2169]	Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala Asn Trp Thr Leu		
[2170]	245	250	255
[2171]	Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser		
[2172]	260	265	270
[2173]	Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly		
[2174]	275	280	285
[2175]	Met Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu Asn Pro Pro Ala Ser Glu Val		
[2176]	290	295	300
[2177]	Leu Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu Pro Lys Val Thr Gln Val		
[2178]	305	310	315
[2179]	320		
[2180]	Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val		
[2181]	325	330	335
[2182]	Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr		
[2183]	340	345	350
[2184]	Cys Glu Leu		
[2185]	355		
[2186]	<210> 45		
[2187]	<211> 2677		

- [2184] <212> DNA
[2185] <213> 人工
[2186] <220>
[2187] <223> THER4PON1 Q192K DNA
[2188] <400> 45
[2189] gttaagctt ccaccatgaa agctgcggc ctgaccctgg ccgtgcttt cctgacgggg 60
[2190] agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagt 120
[2191] aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctcaaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc 180
[2192] cagttgaag gctccgcctt gggaaaacag cttaaacctaa agctccttga caactgggac 240
[2193] agcgtgacct ccaccccttca gcaagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc 300
[2194] tgggataacc tggaaaaggaa gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag 360
[2195] gaggtgaagg ccaagggtgca gcccttacctg gacgacttcc agaagaagtg gcaggaggag 420
[2196] atggagctt accgcccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc 480
[2197] cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccaacttgg gcgaggagat gcgcgaccgc 540
[2198] gcgcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cttacagcga cgagctgcgc 600
[2199] cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggctctc aaggagaacg gcggcgccag actggccgag 660
[2200] taccacgcca agggccaccga gcatctgagc acgctcagcgc agaaggccaa gcccgccctc 720
[2201] gaggacactcc gccaaggccct gctgcccgtg ctggagagct tcaagggtcag cttccctgagc 780
[2202] gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca 840
[2203] ggtgggtggag gatctggagg aggtgggagt ggtggaggtg gttctaccgg tctcgagccc 900
[2204] aaatcttctg acaaaaactca cacatctcca ccgtccccag caccctgaact cctgggagga 960
[2205] tcgtcagtct tccttttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 1020
[2206] gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 1080
[2207] tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaagac cgcgggagga gcagtacaac 1140
[2208] agcacgtacc gtgtggtcag cgtccctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1200
[2209] gagtacaagt gcaagggtc tc caacaagcc ctcccaagcc ccatcgagaa aaccatctcc 1260
[2210] aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag 1320
[2211] ctgaccaaga accaggtcag cctgaccctgc ctggtcaaag gttcttatcc cagcgacatc 1380
[2212] gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg 1440
[2213] ctggactccg acgctcctt cttccctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtgg 1500
[2214] cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1560
[2215] cagaagagcc tctctcttc tccggtaaa gtcgacggag ctagcagccc cgtgaacgtg 1620
[2216] agcagccccca gcgtgcagga tattctcttc aggaaccacc agtcttta ccaaacacga 1680
[2217] cttaatgctc tccgagaggt acaaccgtt gaaacttccctt actgttaattt agttaaaggaa 1740
[2218] atcgaaaactg gctctgaaga cttggagata ctgcctaatg gactggcttt cattagctct 1800
[2219] ggattaaagt atcctggaaat aaagagctc aaccccaaca gtcctggaaa aataacttctg 1860
[2220] atggacactga atgaagaaga tccaacagtg ttggaaattgg ggatcactgg aagtaaattt 1920
[2221] gatgtatctt catttaaccc tcatgggatt agcacattca cagatgaaga taatgccatg 1980
[2222] tacctcttgg tggtaacca tccagatgcc aagtccacag tggagttgtt taaatttcaa 2040
[2223] gaagaagaaa aatcgctttt gcatctaaaa accatcagac ataaacttct gcctaatttg 2100
[2224] aatgatattt ttgctgtggg acctgagcac ttttatggca caaatgatca ctatcttctt 2160
[2225] gaccctact taaaatcctg ggagatgtat ttgggttttag cgtggtcgtt tgggtctac 2220

[2226] tatagtccaa gtgaagttcg agtgggtggca gaaggatttg attttgctaa tggaatcaac 2280
 [2227] atttcacccg atggcaagta tgcttatata gctgagttgc tggctcataa gattcatgtg 2340
 [2228] tatgaaaagc atgctaattg gactttaact ccattgaagt cccttgactt taataccctc 2400
 [2229] gtggataaca tatctgtgga tcctgagaca ggagacctt gggttggatg ccatccaaat 2460
 [2230] ggcataaaaa tcttcttcta tgactcagag aatcctcctg catcagaggt gcttcgaatc 2520
 [2231] cagaacattc taacagaaga acctaaagtg acacaggttt atgcagaaaa tggcacagtg 2580
 [2232] ttgcaaggca gtacagttgc ctctgtgtac aaagggaaac tgctgattgg cacagtgtt 2640
 [2233] cacaaagctc tttactgtga gctctaataa tctagaa 2677
 [2234] <210> 46
 [2235] <211> 883
 [2236] <212> PRT
 [2237] <213> 人工
 [2238] <220>
 [2239] <223> THER4PON1 Q192K多肽
 [2240] <400> 46
 [2241] Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
 [2242] 1 5 10 15
 [2243] Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
 [2244] 20 25 30
 [2245] Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
 [2246] 35 40 45
 [2247] Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
 [2248] 50 55 60
 [2249] Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
 [2250] 65 70 75 80
 [2251] Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
 [2252] 85 90 95
 [2253] Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
 [2254] 100 105 110
 [2255] Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
 [2256] 115 120 125
 [2257] Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
 [2258] 130 135 140
 [2259] Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu
 [2260] 145 150 155 160
 [2261] Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala
 [2262] 165 170 175
 [2263] Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp
 [2264] 180 185 190
 [2265] Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn
 [2266] 195 200 205
 [2267] Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu

[2268]	210	215	220
[2269]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln		
[2270]	225	230	235
[2271]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala		
[2272]	245	250	255
[2273]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly		
[2274]	260	265	270
[2275]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[2276]	275	280	285
[2277]	Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser		
[2278]	290	295	300
[2279]	Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu		
[2280]	305	310	315
[2281]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
[2282]	325	330	335
[2283]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
[2284]	340	345	350
[2285]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[2286]	355	360	365
[2287]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
[2288]	370	375	380
[2289]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
[2290]	385	390	395
[2291]	400	405	410
[2292]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
[2293]	415		
[2294]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
[2295]	420	425	430
[2296]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
[2297]	435	440	445
[2298]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
[2299]	450	455	460
[2300]	460	465	475
[2301]	475	480	
[2302]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
[2303]	485	490	495
[2304]	500	505	510
[2305]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
[2306]	510	515	520
[2307]	520	525	
[2308]	Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Leu		
[2309]	530	535	540
[2309]	Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr Arg Leu Asn Ala Leu Arg		

[2310]	545	550	555	560
[2311]	Glu Val Gln Pro Val Glu Leu Pro Asn Cys Asn Leu Val Lys Gly Ile			
[2312]	565	570	575	
[2313]	Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile Leu Pro Asn Gly Leu Ala Phe			
[2314]	580	585	590	
[2315]	Ile Ser Ser Gly Leu Lys Tyr Pro Gly Ile Lys Ser Phe Asn Pro Asn			
[2316]	595	600	605	
[2317]	Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu Asn Glu Glu Asp Pro Thr			
[2318]	610	615	620	
[2319]	Val Leu Glu Leu Gly Ile Thr Gly Ser Lys Phe Asp Val Ser Ser Phe			
[2320]	625	630	635	640
[2321]	Asn Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp Glu Asp Asn Ala Met Tyr			
[2322]	645	650	655	
[2323]	Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys Ser Thr Val Glu Leu Phe			
[2324]	660	665	670	
[2325]	Lys Phe Gln Glu Glu Lys Ser Leu Leu His Leu Lys Thr Ile Arg			
[2326]	675	680	685	
[2327]	His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile Val Ala Val Gly Pro Glu			
[2328]	690	695	700	
[2329]	His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Lys			
[2330]	705	710	715	720
[2331]	Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr			
[2332]	725	730	735	
[2333]	Ser Pro Ser Glu Val Arg Val Val Ala Glu Gly Phe Asp Phe Ala Asn			
[2334]	740	745	750	
[2335]	Gly Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys Tyr Val Tyr Ile Ala Glu Leu			
[2336]	755	760	765	
[2337]	Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala Asn Trp Thr Leu			
[2338]	770	775	780	
[2339]	Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser			
[2340]	785	790	795	800
[2341]	Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly			
[2342]	805	810	815	
[2343]	Met Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu Asn Pro Pro Ala Ser Glu Val			
[2344]	820	825	830	
[2345]	Leu Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu Pro Lys Val Thr Gln Val			
[2346]	835	840	845	
[2347]	Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val			
[2348]	850	855	860	
[2349]	Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr			
[2350]	865	870	875	880
[2351]	Cys Glu Leu			

[2352] <210> 47
[2353] <211> 2677
[2354] <212> DNA
[2355] <213> 人工
[2356] <220>
[2357] <223> THER4PON1 Q192R DNA
[2358] <400> 47
[2359] gttaaaggctt ccaccatgaa agctgcgggt ctgaccccttgg ccgtgctctt cctgacgggg 60
[2360] agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg 120
[2361] aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctcaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc 180
[2362] cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agctcccttga caactgggac 240
[2363] agcgtgacct ccacccctttag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc 300
[2364] tgggataacc tggaaaagga gacagaggcctt ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag 360
[2365] gaggtgaagg ccaaggtgca gcccttacctg gacgacttcc agaagaagtgcagaggaggag 420
[2366] atggagctctt accggccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc 480
[2367] cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccaactgg gcgaggagat gcgcgaccgc 540
[2368] gcgcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cttacagcga cgagctgcgc 600
[2369] cagcgcttgg ccgcgcgcctt tgaggctctc aaggagaacg gcggccgcag actggccgag 660
[2370] taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgccctc 720
[2371] gaggacctcc gccaaggccctt gctgcgcgtt ctggagagct tcaaggtcag cttccctgagc 780
[2372] gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca 840
[2373] ggtgggtggag gatctggagg aggtggagg ggtggagggtt gtttaccggg tctcgagccc 900
[2374] aaatcttctg acaaactca cacatctcca ccgtcccccag cacctgaact cctgggagga 960
[2375] tcgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 1020
[2376] gaggtcacat gcgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 1080
[2377] tacgtggacg gcgtggagg gcataatgcc aagacaaagc cgcggaggaa gcagtacaac 1140
[2378] agcacgttacc gtgtggtcag cgtcccttacc gtcctgcacc aggactggctt gaatggcaag 1200
[2379] gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccaacttcc ccatcgagaa aaccatctcc 1260
[2380] aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccattt ccggatgag 1320
[2381] ctgaccaaga accaggttcag cctgacccctc ctggtaaaag gtttctatcc cagcgacatc 1380
[2382] gccgtggagg gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccctgt 1440
[2383] ctggactccg acggctccctt cttcccttac agcaagctca ccgtggacaa gaggcagggtgg 1500
[2384] cagcagggga acgtttctc atgctccgtt atgcattgg ctctgcacaa ccactacacg 1560
[2385] cagaagagcc tctctcttc tccggtaaa gtcgacggag ctgcaccc cgtgaacgtt 1620
[2386] agcagcccca gcgtgcagga tatcccttcc aggaaccacc agtcttcttta ccaaacacgca 1680
[2387] cttaatgctc tccgagaggatc acaaccgtttaa gaacttcataactttaatggaa 1740
[2388] atcgaaactg gctctgaaga ctggagata ctgcataatg gactggctt cattagctct 1800
[2389] ggattaaagt atcctggaaat aaagagcttcc aaccccaaca gtcctggaaa aataacttctg 1860
[2390] atggacctga atgaagaaga tccaaacatgtt ttggattttgg ggatcactgg aagtaaattt 1920
[2391] gatgtatctt catttaaccc tcatggattt acgcattca cagatgaaga taatgccatg 1980
[2392] tacctcctgg tggtaacca tccagatgcc aagtccacag tggagttgtt taaatttcaa 2040
[2393] gaagaagaaa aatcgctttt gcatctaaaa accatcagac ataaacttctt gcctaatttgc 2100

[2394] aatgatattg ttgctgtggg acctgagcac ttttatggca caaatgatca ctatttctt 2160
 [2395] gaccctact taagatcccg ggagatgtat ttgggttag cgtggcgta tgggtctac 2220
 [2396] tatagtccaa gtgaagttcg agtggcggca gaaggatttgc atttgctaa tggaatcaac 2280
 [2397] atttcaccccg atggcaagta tgtctatata gctgagttgc tggctataa gattcatgtg 2340
 [2398] tatgaaaagc atgctaatttgc gactttaact ccattgaagt cccttgactt taataccctc 2400
 [2399] gtggataaca tatctgtgga tcctgagaca ggagacctt gggttggatg ccatccaaat 2460
 [2400] ggcattgaaaaa tcttcttcta tgactcagag aatcctccctg catcagaggt gcttcgaatc 2520
 [2401] cagaacattc taacagaaga acctaaagtgc acacagggtt atgcagaaaaa tggcacagtg 2580
 [2402] ttgcaaggca gtacagttgc ctctgtgtac aaaggaaac tgctgattgg cacagtgtt 2640
 [2403] cacaaagctc tttactgtga gctctaataa tctagaa 2677
 [2404] <210> 48
 [2405] <211> 883
 [2406] <212> PRT
 [2407] <213> 人工
 [2408] <220>
 [2409] <223> THER4PON1 Q192R多肽
 [2410] <400> 48
 [2411] Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
 [2412] 1 5 10 15
 [2413] Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
 [2414] 20 25 30
 [2415] Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
 [2416] 35 40 45
 [2417] Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
 [2418] 50 55 60
 [2419] Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
 [2420] 65 70 75 80
 [2421] Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
 [2422] 85 90 95
 [2423] Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
 [2424] 100 105 110
 [2425] Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
 [2426] 115 120 125
 [2427] Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
 [2428] 130 135 140
 [2429] Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu
 [2430] 145 150 155 160
 [2431] Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala
 [2432] 165 170 175
 [2433] Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp
 [2434] 180 185 190
 [2435] Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

[2436]	195	200	205
[2437]	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu		
[2438]	210	215	220
[2439]	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln		
[2440]	225	230	235
[2441]	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala		
[2442]	245	250	255
[2443]	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly		
[2444]	260	265	270
[2445]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[2446]	275	280	285
[2447]	Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser		
[2448]	290	295	300
[2449]	Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu		
[2450]	305	310	315
[2451]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
[2452]	325	330	335
[2453]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
[2454]	340	345	350
[2455]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[2456]	355	360	365
[2457]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
[2458]	370	375	380
[2459]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
[2460]	385	390	395
[2461]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
[2462]	405	410	415
[2463]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
[2464]	420	425	430
[2465]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
[2466]	435	440	445
[2467]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
[2468]	450	455	460
[2469]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
[2470]	465	470	475
[2471]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
[2472]	485	490	495
[2473]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
[2474]	500	505	510
[2475]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly		
[2476]	515	520	525
[2477]	Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Leu		

[2478]	530	535	540
[2479]	Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr Arg Leu Asn Ala Leu Arg		
[2480]	545	550	555 560
[2481]	Glu Val Gln Pro Val Glu Leu Pro Asn Cys Asn Leu Val Lys Gly Ile		
[2482]	565	570	575
[2483]	Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile Leu Pro Asn Gly Leu Ala Phe		
[2484]	580	585	590
[2485]	Ile Ser Ser Gly Leu Lys Tyr Pro Gly Ile Lys Ser Phe Asn Pro Asn		
[2486]	595	600	605
[2487]	Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu Asn Glu Glu Asp Pro Thr		
[2488]	610	615	620
[2489]	Val Leu Glu Leu Gly Ile Thr Gly Ser Lys Phe Asp Val Ser Ser Phe		
[2490]	625	630	635 640
[2491]	Asn Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp Glu Asp Asn Ala Met Tyr		
[2492]	645	650	655
[2493]	Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys Ser Thr Val Glu Leu Phe		
[2494]	660	665	670
[2495]	Lys Phe Gln Glu Glu Lys Ser Leu Leu His Leu Lys Thr Ile Arg		
[2496]	675	680	685
[2497]	His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile Val Ala Val Gly Pro Glu		
[2498]	690	695	700
[2499]	His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Arg		
[2500]	705	710	715 720
[2501]	Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr		
[2502]	725	730	735
[2503]	Ser Pro Ser Glu Val Arg Val Val Ala Glu Gly Phe Asp Phe Ala Asn		
[2504]	740	745	750
[2505]	Gly Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys Tyr Val Tyr Ile Ala Glu Leu		
[2506]	755	760	765
[2507]	Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala Asn Trp Thr Leu		
[2508]	770	775	780
[2509]	Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser		
[2510]	785	790	795 800
[2511]	Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly		
[2512]	805	810	815
[2513]	Met Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu Asn Pro Pro Ala Ser Glu Val		
[2514]	820	825	830
[2515]	Leu Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu Pro Lys Val Thr Gln Val		
[2516]	835	840	845
[2517]	Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val		
[2518]	850	855	860
[2519]	Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr		

[2520]	865	870	875	880
[2521]	Cys Glu Leu			
[2522]	<210> 49			
[2523]	<211> 82			
[2524]	<212> DNA			
[2525]	<213> 人工			
[2526]	<220>			
[2527]	<223> (gly4ser) 4接头DNA			
[2528]	<400> 49			
[2529]	agatctctcc ggaggaggtg gctcaggtgg tggaggatct ggaggaggtg ggagtgggtgg 60			
[2530]	aggtgtttct accggctctcg ag 82			
[2531]	<210> 50			
[2532]	<211> 26			
[2533]	<212> PRT			
[2534]	<213> 人工			
[2535]	<220>			
[2536]	<223> (gly4ser) 4接头			
[2537]	<400> 50			
[2538]	Asp Leu Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
[2539]	1 5 10 15			
[2540]	Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Gly Leu			
[2541]	20 25			
[2542]	<210> 51			
[2543]	<211> 112			
[2544]	<212> DNA			
[2545]	<213> 人工			
[2546]	<220>			
[2547]	<223> (gly4ser) 6接头DNA			
[2548]	<400> 51			
[2549]	agatctctcc ggaggaggtg gctcaggtgg tggaggatct ggaggaggtg ggagtgggtgg 60			
[2550]	aggtgtttct ggaggaggtg gtagtggagg tggaggatct accggctctcg ag 112			
[2551]	<210> 52			
[2552]	<211> 36			
[2553]	<212> PRT			
[2554]	<213> 人工			
[2555]	<220>			
[2556]	<223> (gly4ser) 6接头			
[2557]	<400> 52			
[2558]	Asp Leu Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
[2559]	1 5 10 15			
[2560]	Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
[2561]	20 25 30			

- [2562] Ser Thr Gly Leu
- [2563] 35
- [2564] <210> 53
- [2565] <211> 93
- [2566] <212> DNA
- [2567] <213> 人工
- [2568] <220>
- [2569] <223> (gly4ser) 5接头DNA
- [2570] <400> 53
- [2571] gatctctccg gaggaggtgg ctcaggtggt ggaggatctg gaggaggtgg gagtggtgga 60
- [2572] ggtggttctg gaggaggtgg tagtaccggt ctc 93
- [2573] <210> 54
- [2574] <211> 31
- [2575] <212> PRT
- [2576] <213> 人工
- [2577] <220>
- [2578] <223> (gly4ser) 5接头
- [2579] <400> 54
- [2580] Asp Leu Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
- [2581] 1 5 10 15
- [2582] Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Gly Leu
- [2583] 20 25 30

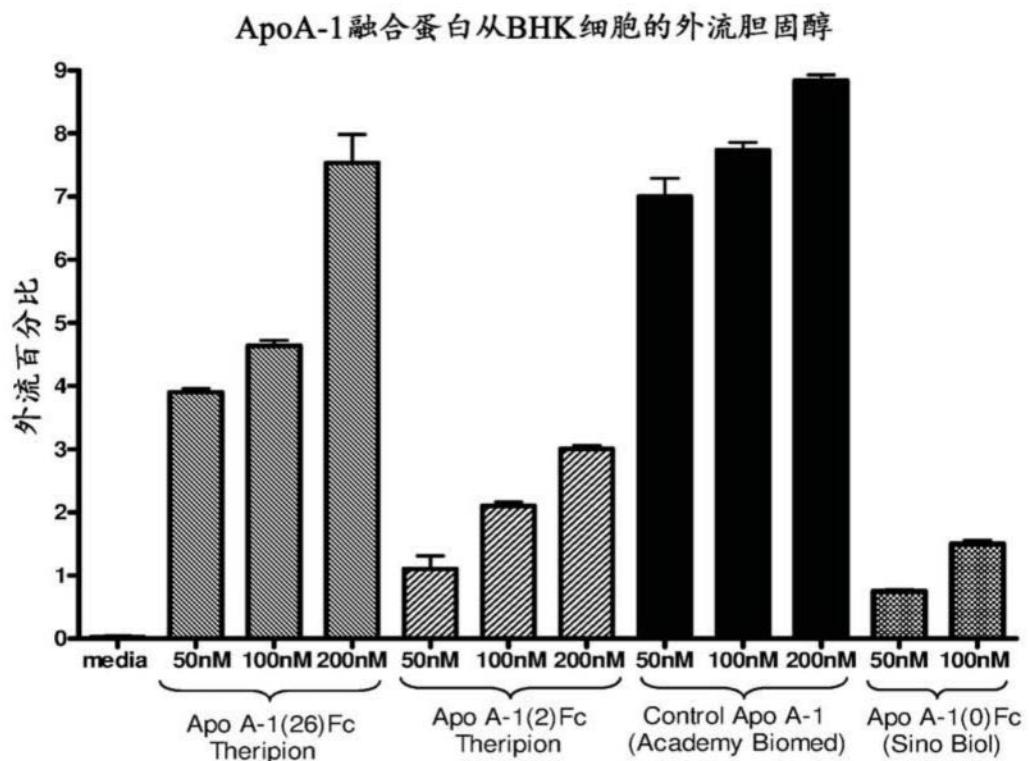


图1

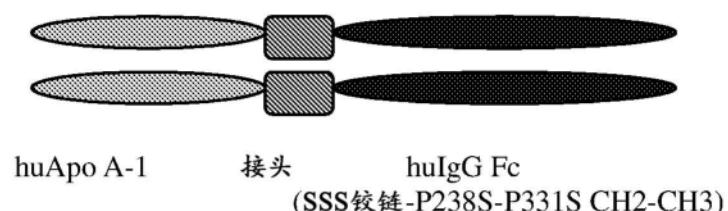


图2A

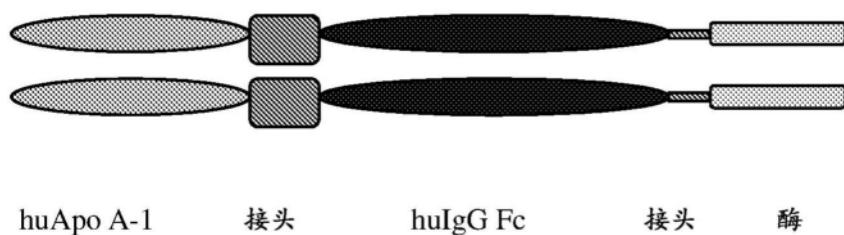


图2B

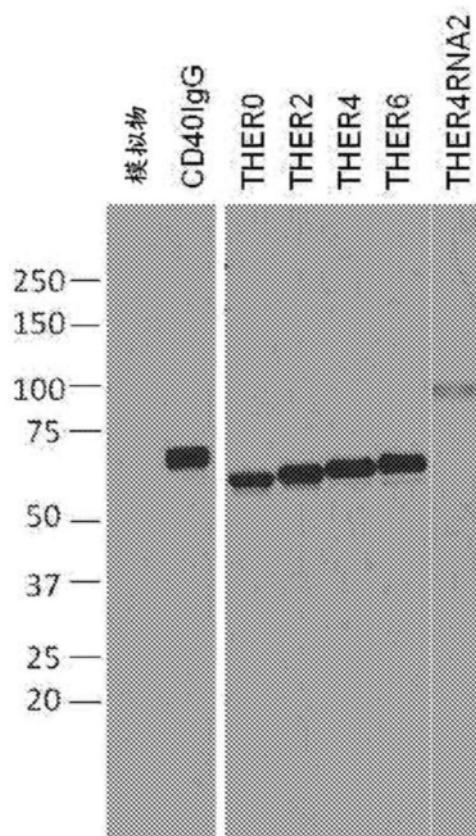


图3

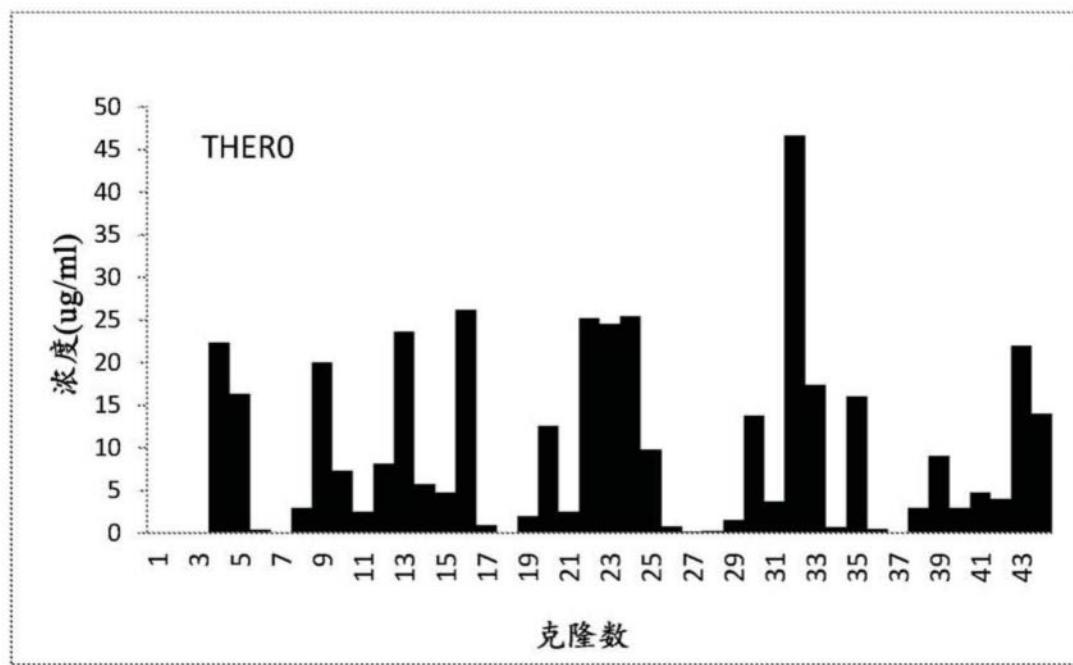


图4A

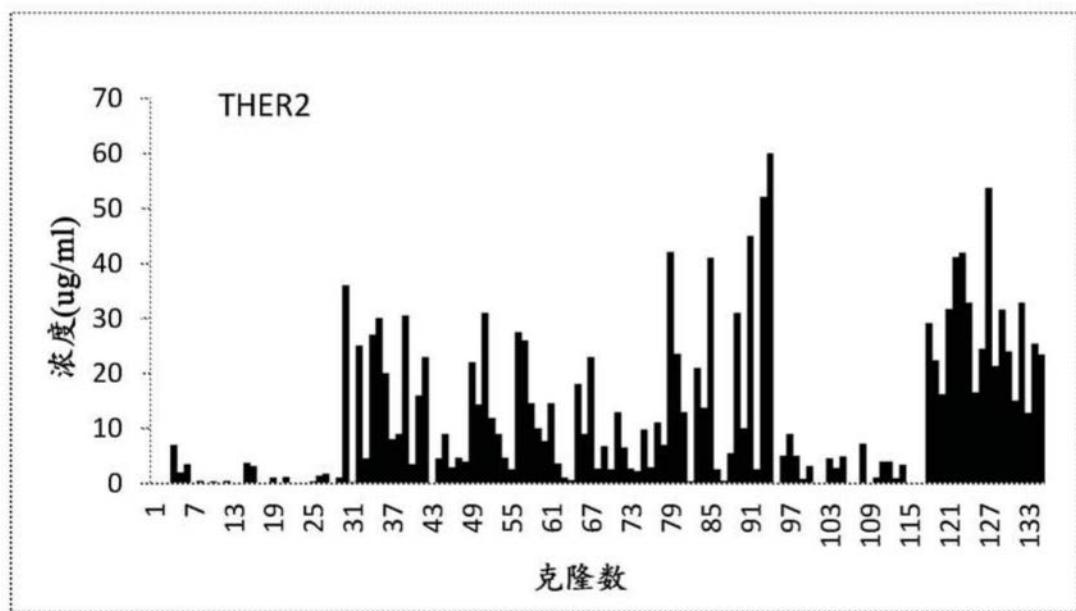


图4B

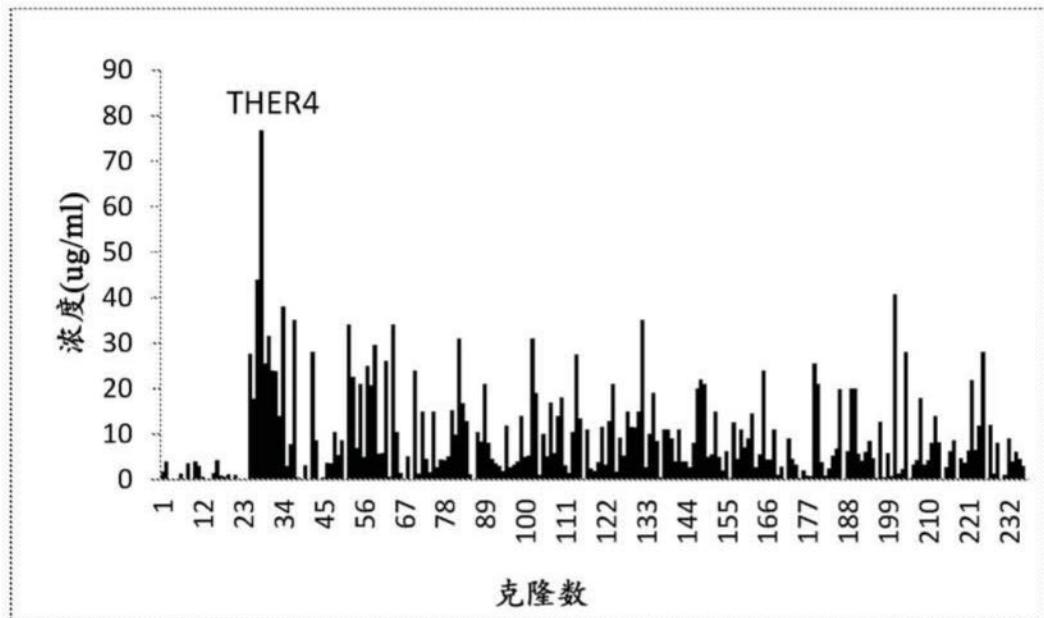


图4C

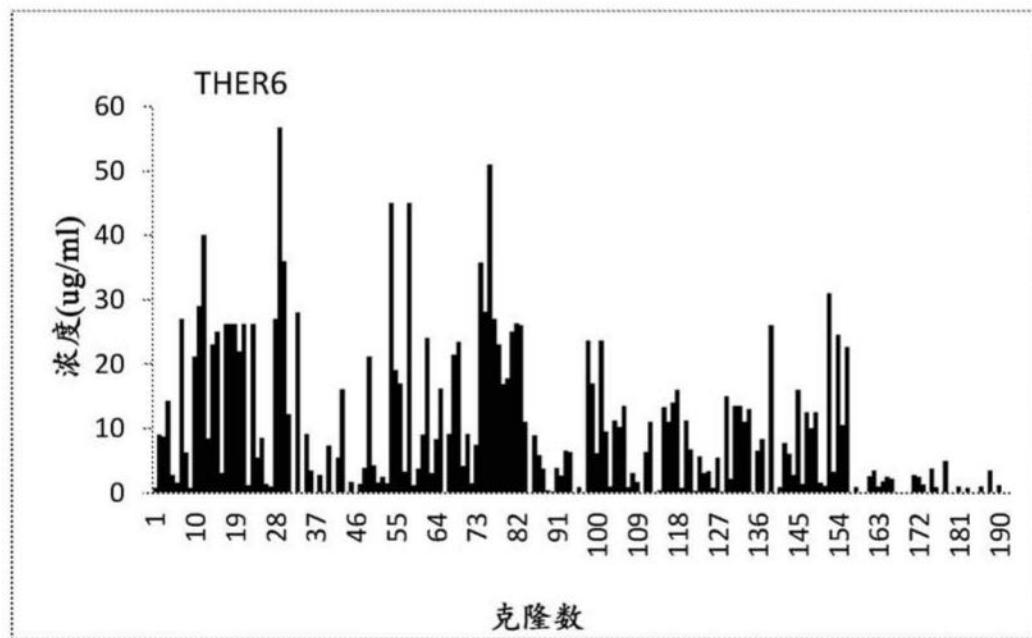


图4D

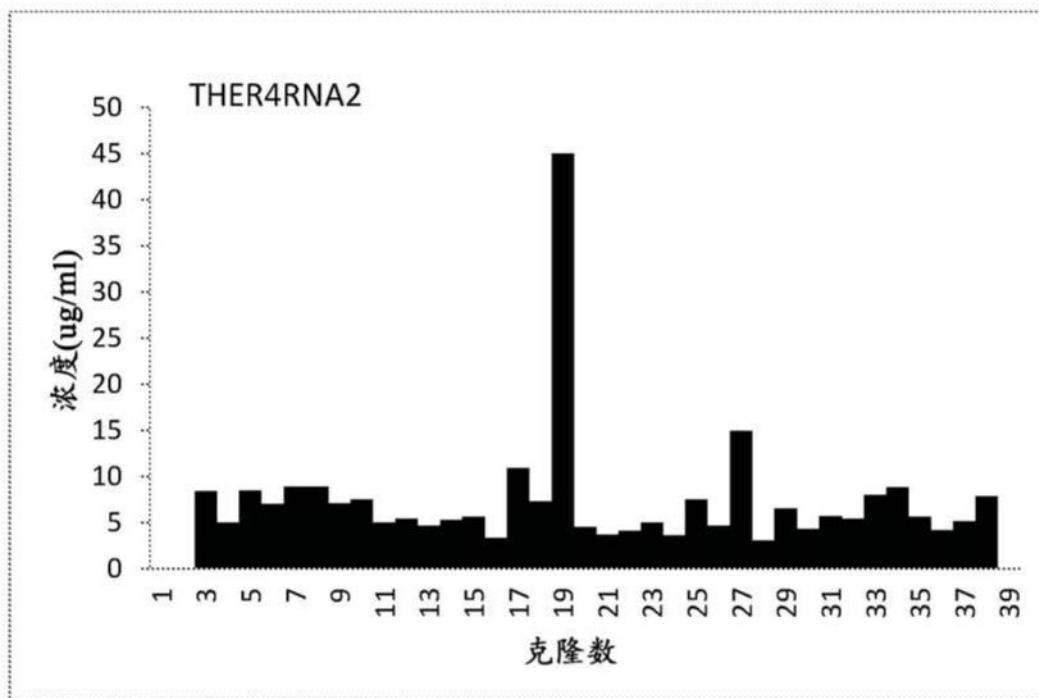


图4E

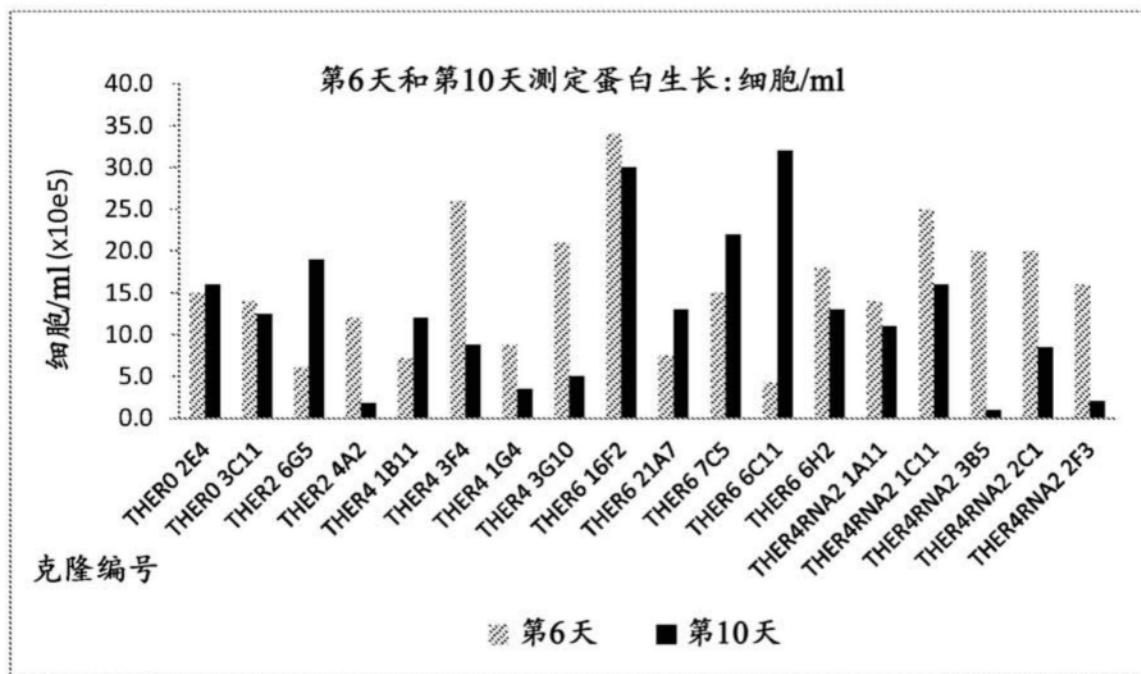


图5A

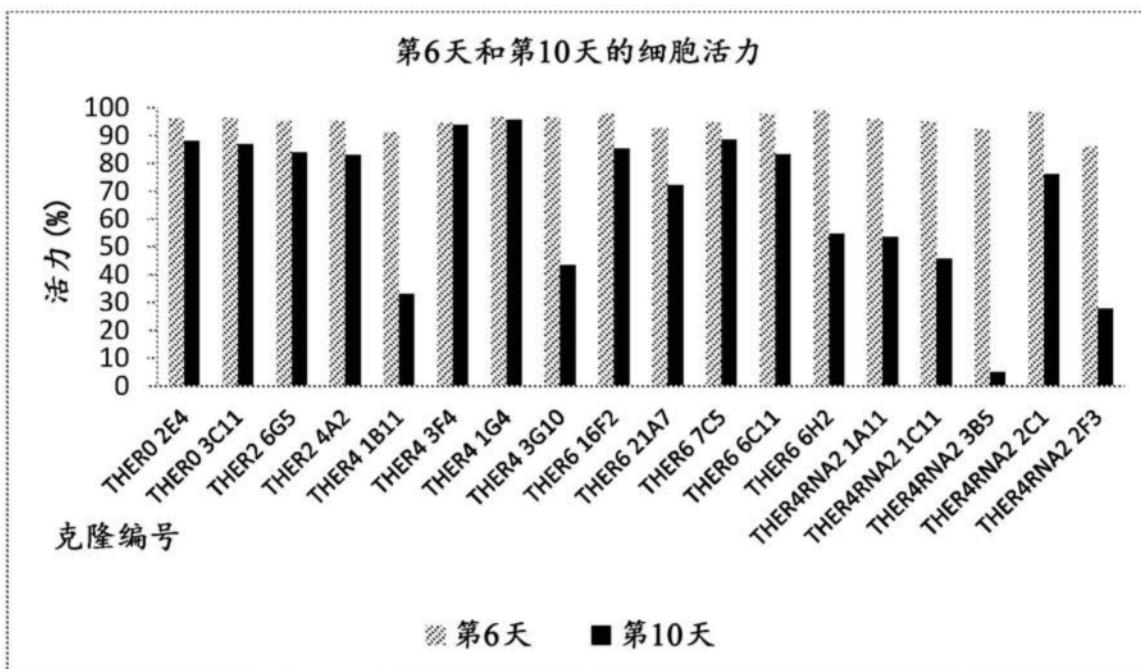


图5B

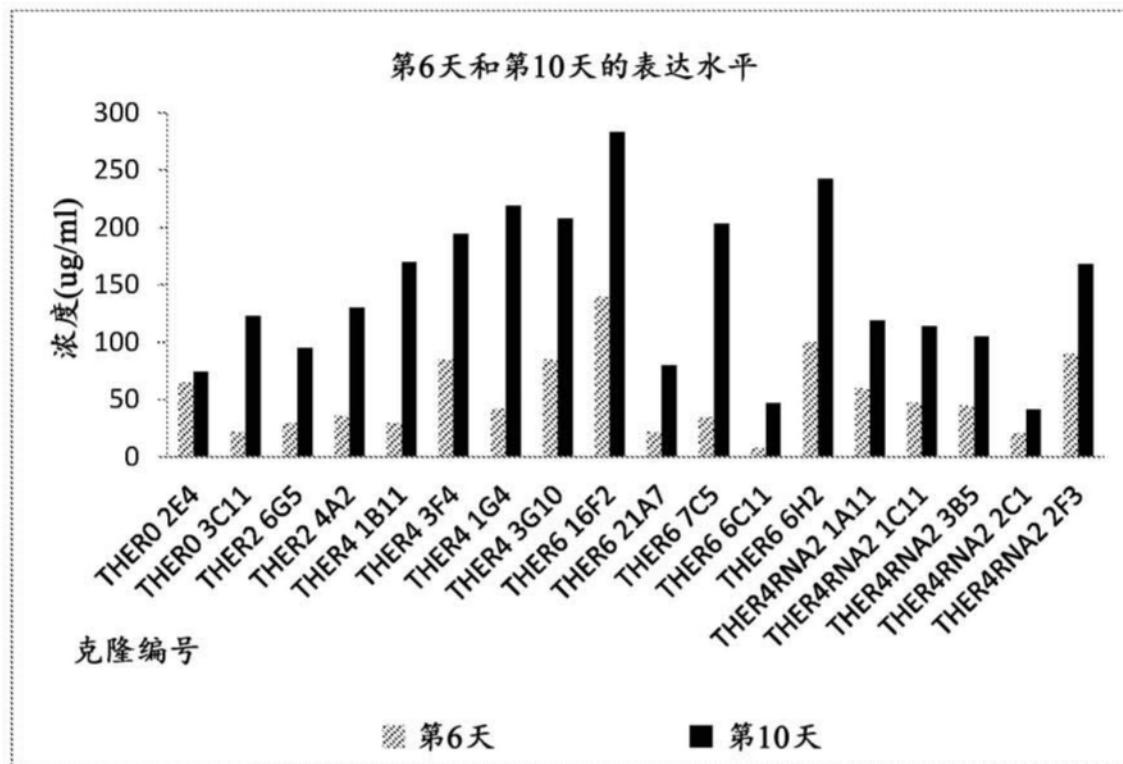


图5C

非还原

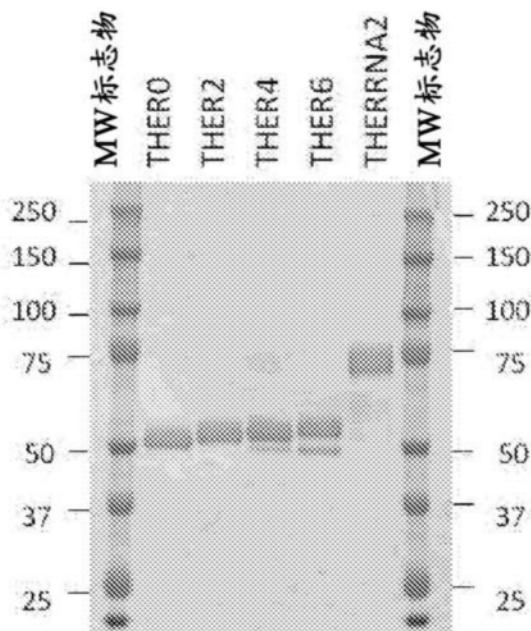


图6A

还原

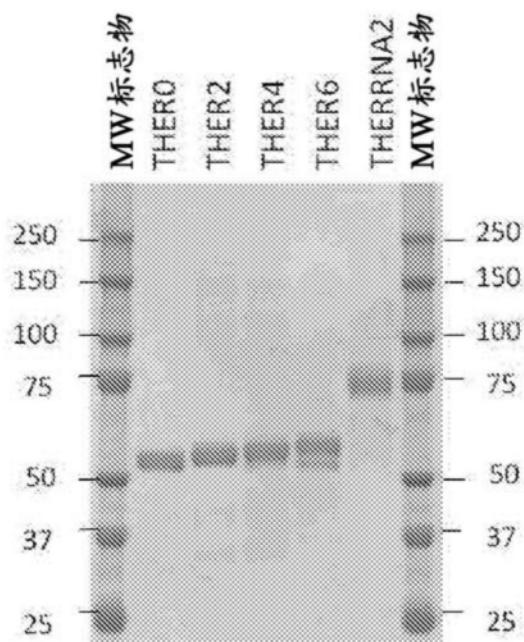


图6B

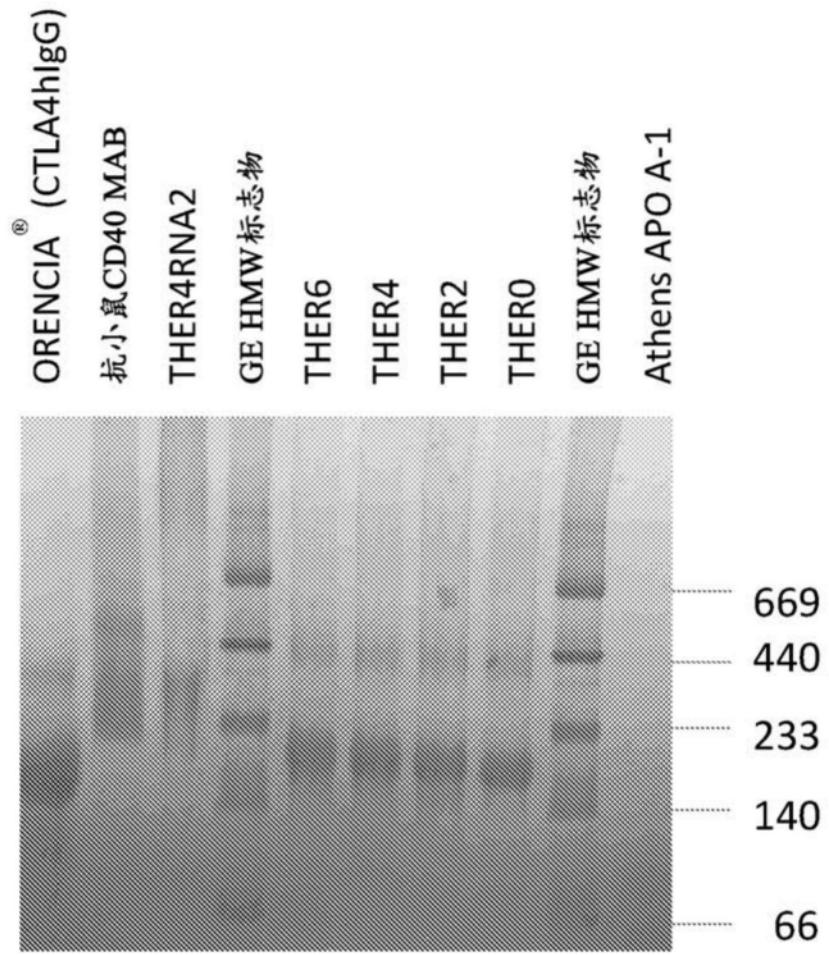


图7

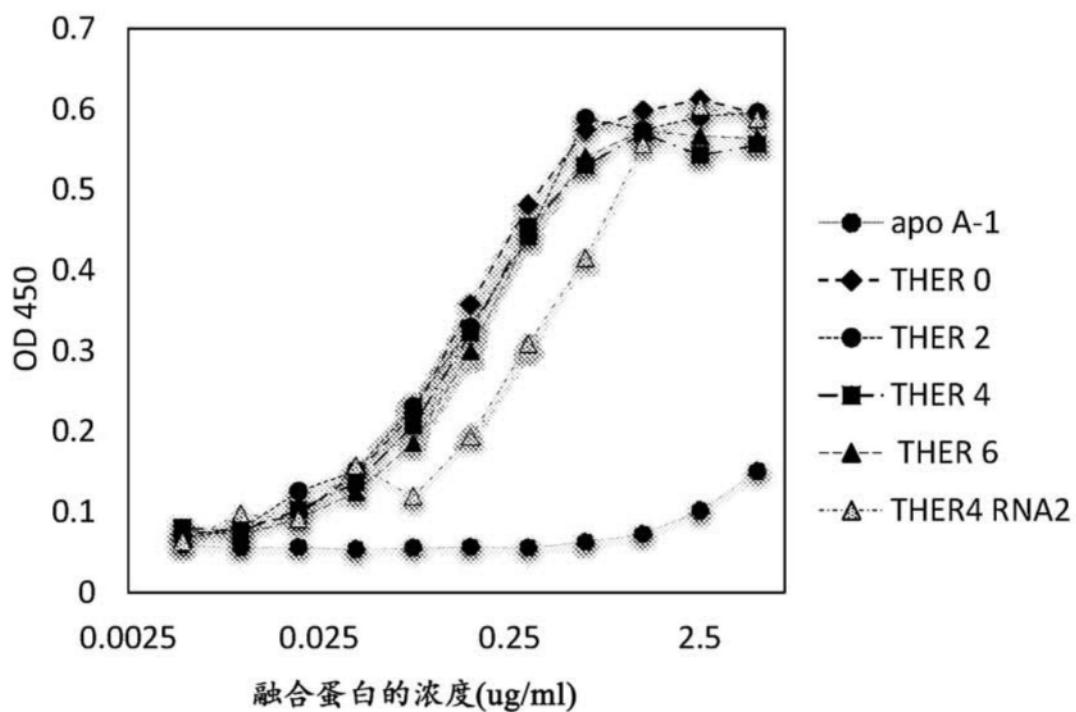


图8

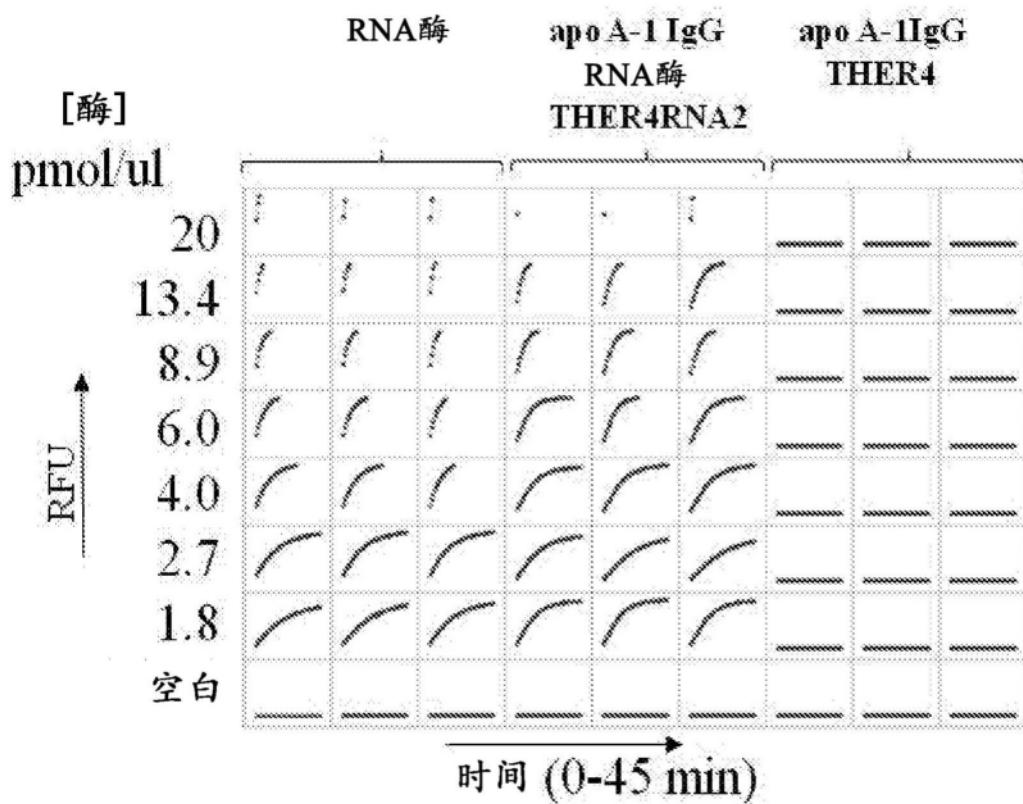


图9

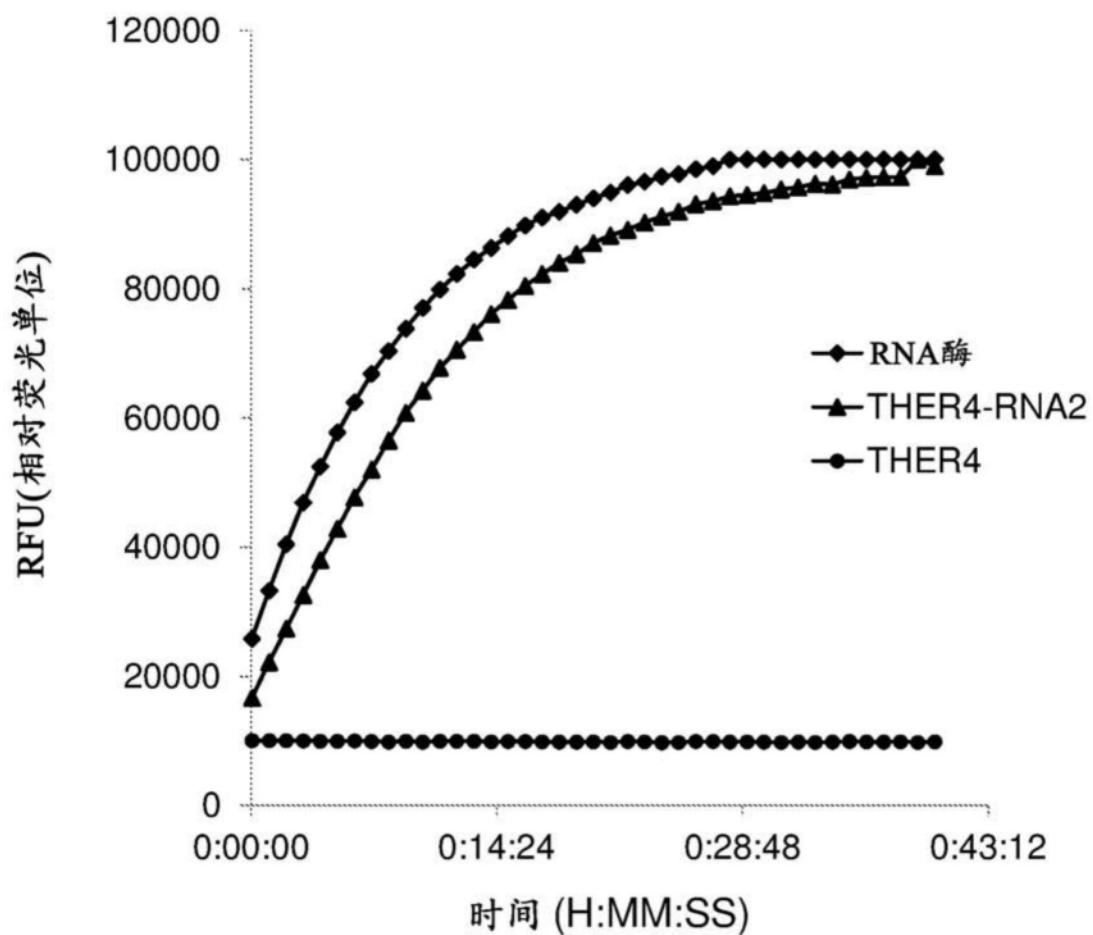


图10

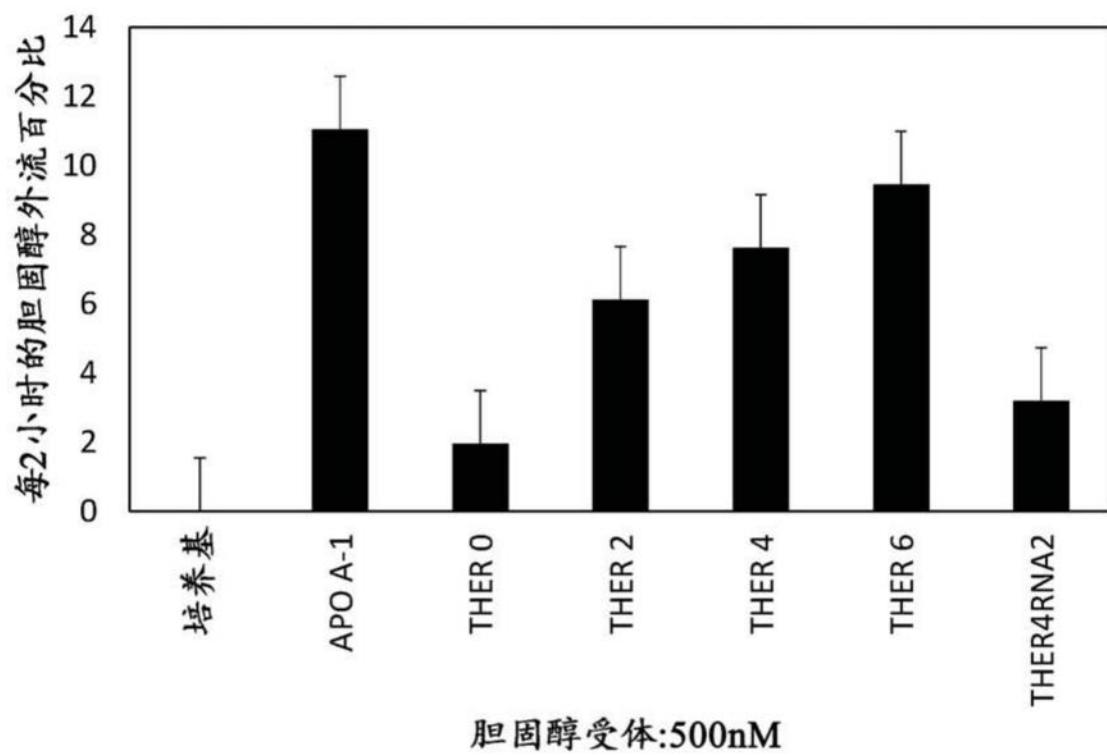


图11

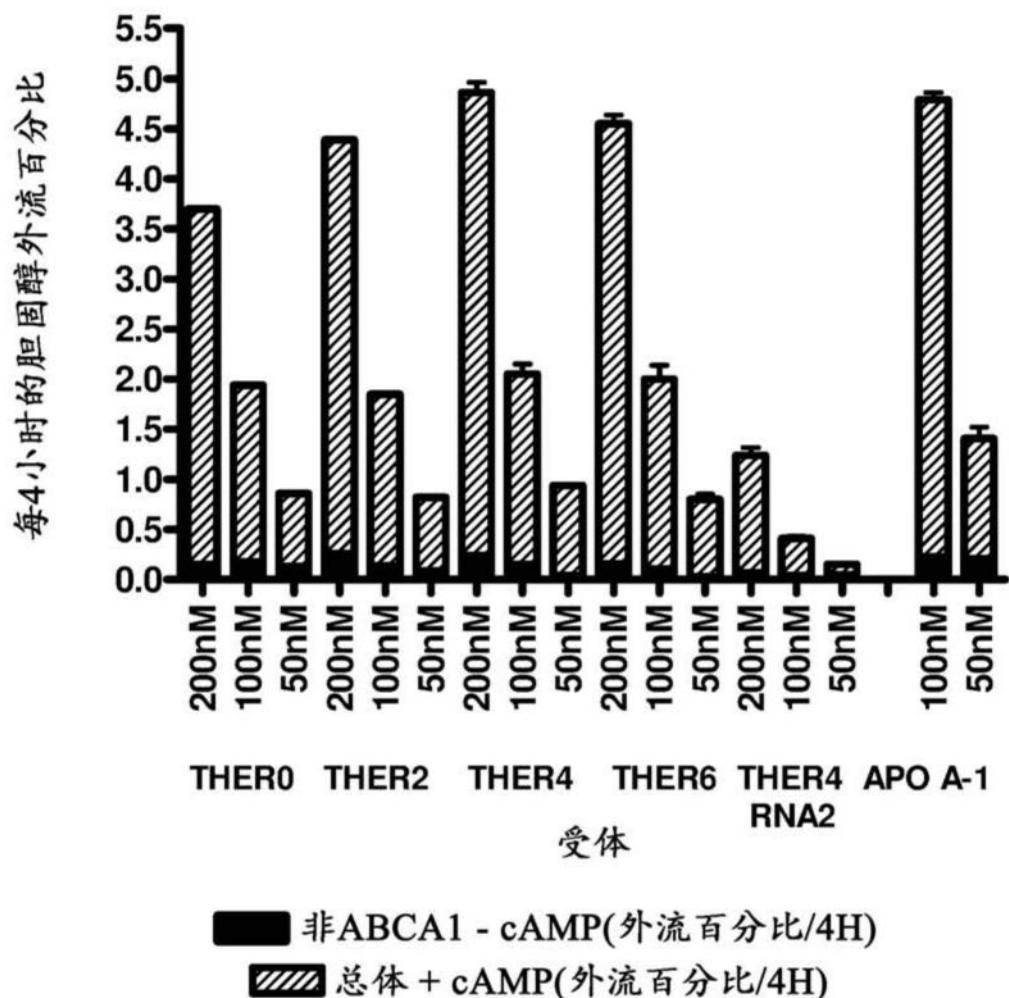


图12