



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105246503 A

(43) 申请公布日 2016.01.13

(21) 申请号 201480012827.2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014.03.13

A61K 39/00(2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 14/435(2006.01)

13175023.4 2013.07.04 EP

C07K 14/47(2006.01)

61/781,511 2013.03.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015.09.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/055013 2014.03.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/140210 EN 2014.09.18

(71) 申请人 第一三共株式会社

地址 日本东京中央区

(72) 发明人 G·马茨海纳 C·罗思

A·霍尔鲍姆 R·S·贝尔阿尔巴

M·海纳 A·阿勒斯多菲尔

B·伦德 A·维德曼 山口真司

油谷高秀 桥本隆治 高桥冬留

长崎知夏子 奈良太志 西沢友宏

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理

事务所(普通合伙) 11382

代理人 曹津燕 张伟

权利要求书6页 说明书43页

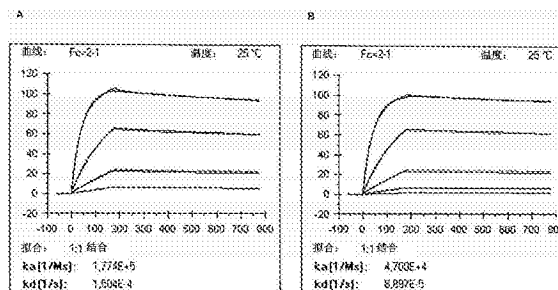
序列表86页 附图27页

(54) 发明名称

PCSK9 的新颖结合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及与 PCSK9 结合的新颖脂质运载蛋白突变蛋白。本发明还提供编码脂质运载蛋白突变蛋白的对应核酸分子和用于产生脂质运载蛋白突变蛋白的方法以及其编码核酸分子。



1. 一种人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白,其中所述突变蛋白包含:
 - (a) 在成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中的任一个或多个处的突变的氨基酸残基;和
 - (b) 在成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的序列位置 61、101、111、114 和 153 中的任一个或多个处的突变的氨基酸残基,并且其中所述突变蛋白与 PCSK9 特异性结合。
2. 一种脂质运载蛋白突变蛋白,其是 PCSK9 的拮抗剂。
3. 一种脂质运载蛋白突变蛋白,其竞争 LDL-R 与 PCSK9 的结合。
4. 一种脂质运载蛋白突变蛋白,其竞争包含 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:33 的单克隆抗体与 PCSK9 的结合。
5. 一种脂质运载蛋白突变蛋白,其能够完全或部分抑制 PCSK9 介导的 LDL-R 的下调。
6. 一种脂质运载蛋白突变蛋白,其能够在存在 PCSK9 的情况下恢复 LDL 摄取。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的脂质运载蛋白突变蛋白,其中所述突变蛋白与非人类灵长类动物 PCSK9 或其免疫原性片段结合,且解离常数 (K_D) 等于或小于 10nM。
8. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的脂质运载蛋白突变蛋白,其中所述突变蛋白与小鼠 PCSK9 或其免疫原性片段结合,且解离常数 (K_D) 等于或小于 10nM。
9. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的脂质运载蛋白突变蛋白,其中所述突变蛋白与人类 PCSK9 或其片段结合,且解离常数 (K_D) 等于或小于 10nM。
10. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的脂质运载蛋白突变蛋白,其中所述突变蛋白与人类 PCSK9 或其片段结合,且解离常数 (K_D) 等于或小于 1nM。
11. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的脂质运载蛋白突变蛋白,其中所述突变蛋白与人类 PCSK9 或其片段结合,且解离常数 (K_D) 等于或小于 0.1nM。
12. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的脂质运载蛋白突变蛋白,其中所述突变蛋白与人类 PCSK9 或其片段结合,且解离常数 (K_D) 等于或小于 1pM。
13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Arg 26 → Ser、Phe、Trp、His 或 Thr。
14. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Glu 34 → Asn、Thr、Arg 或 Gly, Leu 56 → Met、Ser、Gln、Phe、His 或 Asn。
15. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Ser 58 → Lys、Ala、Arg、Trp 或 Pro。
16. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Met 31 → Ala、Gly、His、Pro、Ser、Asp、Glu 或 Gln。
17. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Leu 33 → Tyr、Trp、Tyr、Phe、Pro 或 Ala。

18. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Ser 61 → Trp 或 Phe, Asp 80 → Ser、Met、Pro、Ile、Gln、Tyr、Ser、Val 或 Thr。

19. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Glu 104 → Leu、Pro、Ser、Ala、Asn、Thr、Lys 或 Asp。

20. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:His 106 → Pro、Gln、Gly、Arg、Val、Thr、Asn 或 Leu。

21. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Lys 108 → Gln、Ala、Trp、Tyr、Arg、Asp、Asn、Ser、Glu 或 Thr。

22. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Glu 27 → Arg、Ser、Gln、Thr、Phe、Lys、Ala 或 Arg。

23. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Pro 29 → Gly、Asp、Asn、Ile、Leu 或 Met。

24. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Asn 32 → Ile、Leu、Tyr、Met 或 Trp。

25. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Leu 105 → Cys、Tyr、Trp、Glu、Arg、Ser、His、Ala、Val、Asp、Pro、Gly 或 Lys。

26. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Phe 28 → Cys、Arg、Lys、Trp、Asp、Gly、His、Leu 或 Asn。

27. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Glu 30 → Arg、Asp、Thr、Ser、Gly、Ala 或 Asn。

28. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Ile 57 → Tyr、Trp、His、Gln、Thr 或 Arg。

29. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,所述突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Lys 83 → Arg、Ser、Gln、Thr 或 Glu。

30. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,其包含以下氨基酸置换的集合中的一个:

(a) Arg 26 → Phe ;Asn 32 → Ile ;Glu 34 → Thr ;Leu 56 → Met ;Ser 58 → Ala 和 Lys

83 → Ser,

(b) Arg 26 → Trp ; Asn 32 → Leu ; Glu 34 → Thr ; Leu 56 → Ser 和 Ser 58 → Ala,

(c) Arg 26 → His ; Asn 32 → Tyr ; Glu 34 → Thr ; Leu 56 → Ser ; Ser 58 → Arg 和 Lys 83 → Gln ;

(d) Arg 26 → Phe ; Asn 32 → Met ; Glu 34 → Thr ; Leu 56 → Gln ; Ser 58 → Ala 和 Lys 83 → Thr ;

(e) Asn 32 → Trp ; Glu 34 → Arg ; Leu 56 → Asn ; Ser 58 → Trp 和 Lys 83 → Ser,

(f) Arg 26 → Phe ; Asn 32 → Leu ; Glu 34 → Thr ; Leu 56 → Phe ; Ser 58 → Ala 和 Lys 83 → Arg,

(g) Arg 26 → Thr ; Asn 32 → Trp ; Glu 34 → Asn ; Leu 56 → His ; Ser 58 → Pro 和 Lys 83 → Ser,

(h) Asn 32 → Trp ; Glu 34 → Asn ; Leu 56 → Phe ; Ser 58 → Arg 和 Lys 83 → Glu,

(i) Arg 26 → Trp ; Asn 32 → Leu ; Glu 34 → Thr ; Leu 56 → Met ; Ser 58 → Ala 和 Lys 83 → Ser, 或

(j) Asn 32 → Trp ; Glu 34 → Gly ; Leu 56 → Gln ; Ser 58 → Ala 和 Lys 83 → Gln。

31. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白, 与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较, 其包含以下氨基酸置换的集合中的一个:

(a) Glu 27 → Ser ; Phe 28 → Arg ; Pro 29 → Gly ; Glu 30 → Asp ; Met 31 → Ala ; Leu 33 → Trp ; Ile 57 → Tyr ; Asp 80 → Met ; Glu 104 → Pro ; Leu 105 → Tyr ; His 106 → Gln ; Lys 108 → Ala,

(b) Glu 27 → Gln ; Phe 28 → Cys ; Pro 29 → Asp ; Glu 30 → Thr ; Met 31 → Gly ; Leu 33 → Trp ; Ile 57 → Tyr ; Leu 105 → Cys ; His 106 → Gly ; Lys 108 → Trp,

(c) Glu 27 → Glu ; Phe 28 → Trp ; Pro 29 → Asn ; Glu 30 → Gly ; Met 31 → His ; Leu 33 → Tyr ; Ile 57 → Tyr ; Asp 80 → Pro ; Glu 104 → Ser ; Leu 105 → Trp ; His 106 → Pro ; Lys 108 → Tyr,

(d) Glu 27 → Thr ; Phe 28 → Asp ; Pro 29 → Asn ; Glu 30 → Ser ; Met 31 → Pro ; Leu 33 → Phe ; Ile 57 → Tyr ; Asp 80 → Ile ; Glu 104 → Ala ; Leu 105 → Glu ; His 106 → Arg ; Lys 108 → Arg,

(e) Glu 27 → Phe ; Phe 28 → Lys ; Pro 29 → Ile ; Glu 30 → Ala ; Met 31 → Ser ; Leu 33 → Pro ; Ile 57 → Trp ; Asp 80 → Gln ; Glu 104 → Asn ; Leu 105 → Arg ; His 106 → Gln ; Lys 108 → Asp,

(f) Glu 27 → Lys ; Phe 28 → Gly ; Pro 29 → Pro ; Glu 30 → Thr ; Met 31 → Pro ; Leu 33 → Trp ; Ile 57 → His ; Asp 80 → Tyr ; Glu 104 → Ala ; Leu 105 → Ser ; His 106 → Val ; Lys 108 → Asn,

(g) Glu 27 → Glu ; Phe 28 → His ; Pro 29 → Leu ; Glu 30 → Ala ; Met 31 → Asp ; Leu 33 → Ala ; Ile 57 → Gln ; Asp 80 → Ile ; Glu 104 → Ala ; Leu 105 → Tyr ; His 106 → Pro ; Lys 108 → Ser,

(h) Glu 27 → Ala ; Phe 28 → Asp ; Pro 29 → Met ; Glu 30 → Gly ; Met 31 → Asp ; Leu 33 → Pro ; Ile 57 → Thr ; Asp 80 → Thr ; Glu 104 → Thr ; His 106 → Thr ; Lys 108 → Arg,

(i)Glu 27 → Arg ;Phe 28 → Leu ;Pro 29 → Asp ;Glu 30 → Asn ;Met 31 → Glu ;Leu 33 → Trp ;Ile 57 → Tyr ;Asp 80 → Gln ;Glu 104 → Pro ;Leu 105 → Arg ;His 106 → Asn ;Lys 108 → Ala,

(j)Glu 27 → Lys ;Phe 28 → Asn ;Pro 29 → Met ;Glu 30 → Gly ;Met 31 → Gln ;Leu 33 → Pro ;Ile 57 → Arg ;Asp 80 → Ile ;Glu 104 → Asp ;Leu 105 → Arg ;His 106 → Leu ;Lys 108 → Thr,或

(k)Glu 27 → Ser ;Phe 28 → Arg ;Pro 29 → Gly ;Glu 30 → Asp ;Met 31 → Ala ;Leu 33 → Trp ;Ile 57 → Tyr ;Asp 80 → Met ;Glu 104 → Pro ;Leu 105 → Gly ;His 106 → Gln ;Lys 108 → Ala。

32. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,其包含以下氨基酸置换的组合:Arg 26 → Phe ;Glu 27 → Ser ;Phe 28 → Arg ;Pro 29 → Gly ;Glu 30 → Asp ;Met 31 → Ala ;Asn 32 → Ile ;Leu 33 → Trp ;Glu 34 → Thr ;Leu 56 → Met ;Ile 57 → Tyr ;Ser 58 → Ala ;Lys 83 → Ser ;Glu 104 → Pro 和 Lys 108 → Thr。

33. 根据权利要求 32 所述的突变蛋白,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,其进一步包括以下氨基酸置换中的一个或多个:Thr 43 → Ile 或 Ala, Glu 45 → Gly, Asn 48 → Gly, Glu 63 → Gly, Ala 66 → Val, Glu 69 → Val, Lys 70 → Arg, Ala 79 → Thr、Met 或 Val, Asp 80 → Met 或 Ser, Gly 82 → Ser, His 84 → Gln, Val 85 → Gly, Tyr 87 → Ser, Ile 88 → Thr 或 Leu, His 92 → Pro, Leu 105 → His、Gly 或 Tyr 和 His 106 → Gln 或 Arg。

34. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,其包含以下氨基酸置换的组合:Glu 27 → Phe ;Phe 28 → Lys ;Pro 29 → Ile ;Asn 32 → Trp ;Leu 33 → Pro ;Glu 34 → Arg ;Leu 56 → Asn ;Ile 57 → Trp ;His 106 → Gln 和 Lys 108 → Glu。

35. 根据权利要求 34 所述的突变蛋白,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,其进一步包括以下氨基酸置换中的一个或多个:Glu 43 → Gly 或 Ala, Glu 45 → Gly, Ser 58 → Trp 或 Arg, Glu 63 → Asp, Glu 69 → Gly, Lys 70 → Arg, Asp 80 → Gln、Val 或 Thr, Gly 82 → Asp, Lys 83 → Ser 或 Arg, Ala 86 → Glu 或 Ser, Phe 99 → Leu, Glu 102 → Lys 或 Val, Glu 104 → Asn 或 Lys 和 Pro 106 → Thr。

36. 根据权利要求 1-35 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白在关于成熟人类泪液脂质运载蛋白的氨基酸序列的位置 28 或 105 处包含天然氨基酸由半胱氨酸残基置换的氨基酸置换。

37. 根据权利要求 1-36 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白与成熟人类泪液脂质运载蛋白的序列具有至少 75% 的同一性。

38. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白具有如 SEQ ID NOs:3-28、62-71 和 82 中任一个所示的氨基酸序列或其片段或变体。

39. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白具有如 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列或其片段或变体。

40. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白具有如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或其片段或变体。

41. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白具有如 SEQ ID

NO:20 所示的氨基酸序列或其片段或变体。

42. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白具有如 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列或其片段或变体。

43. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白与标记部分缀合。

44. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白与能够靶向受试者内的特定身体区域、生物体、组织、器官或细胞的部分缀合。

45. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白与能够延长所述突变蛋白的血清半衰期的部分缀合。

46. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白与聚乙二醇分子缀合。

47. 根据权利要求 46 所述的缀合的突变蛋白,其中所述缀合的突变蛋白包含如 SEQ ID NOs:30-32 中任一个所示的氨基酸序列。

48. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白与白蛋白结合蛋白缀合。

49. 根据权利要求 48 所述的缀合的突变蛋白,其中所述缀合的突变蛋白包含如 SEQ ID NOs:83-84 中任一个所示的氨基酸序列。

50. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的突变蛋白,其中所述突变蛋白与部分融合,所述部分能够给融合物赋予新特征。

51. 一种产生人类泪液脂质运载蛋白的一种或多种突变蛋白的方法,其中所述一种或多种突变蛋白与 PCSK9 结合,所述方法包括:

(a) 使编码人类泪液脂质运载蛋白的核酸分子在以下位置处经受突变:

(i) 成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的氨基酸序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中的任一个或多个,和

(ii) 成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的氨基酸序列位置 61、101、111、114 和 153 中的任一个或多个,

由此获得编码人类泪液脂质运载蛋白的一种或多种突变蛋白的一种或多种核酸分子,

(b) 在表达系统中表达在 (a) 中获得的所述一种或多种核酸分子,由此获得人类泪液脂质运载蛋白的一种或多种突变蛋白,和

(c) 进一步筛选在 (b) 中获得的所述一种或多种突变蛋白。

52. 根据权利要求 51 所述的方法,其中步骤 (c) 进一步包括:

(ci) 提供 PCSK9 或其免疫原性片段,

(cii) 使通过筛选获得的所述一种或多种突变蛋白与所述 PCSK9 或其免疫原性片段接触,由此允许在所述 PCSK9 或其免疫原性片段和对于其具有结合亲和力的突变蛋白之间形成复合物,和

(ciii) 去除不具有结合亲和力或不具有实质结合亲和力的一种或多种突变蛋白。

53. 根据权利要求 51 或 52 所述的方法,其中在步骤 (c) 中的筛选在竞争性条件下进行。

54. 根据权利要求 51-53 中任一项所述的方法,其中步骤 (a) 进一步包括:(a) (iii) 使

所述编码人类泪液脂质运载蛋白的核酸分子在成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的氨基酸序列位置 79、92 和 105 中的任一个或多个处经受突变。

55. 一种核酸分子,其包含编码权利要求 1-50 中任一项所述的突变蛋白的核苷酸序列。

56. 一种如 SEQ ID NOs:36-61、72-81 和 86-89 中任一个所示的核酸分子。

57. 一种含有权利要求 55 或 56 所述的核酸分子的宿主细胞。

58. 一种根据权利要求 1-50 中任一项所述的突变蛋白或包含所述突变蛋白的组合物在受试者中用于结合 PCSK9 的用途。

59. 根据权利要求 1-50 中任一项所述的突变蛋白或包含所述突变蛋白的组合物在受试者中用于抑制 PCSK9 与 LDL-R 的结合的用途。

60. 根据权利要求 1-50 中任一项所述的突变蛋白用于检测 PCSK9 的用途,所述检测包括:

(a) 在适当条件下使所述突变蛋白与疑似含有 PCSK9 的测试样品接触,由此允许在所述突变蛋白和 PCSK9 或其结构域或片段之间形成复合物,和

(b) 通过适当的信号检测所述复合物。

61. 根据权利要求 1-50 中任一项所述的突变蛋白用于分离 PCSK9 的用途,所述用途包括:

(a) 在适当条件下使所述突变蛋白与疑似含有 PCSK9 的样品接触,由此允许在所述突变蛋白和 PCSK9 或其结构域或片段之间形成复合物,和

(b) 从所述样品中分离所述复合物。

62. 根据权利要求 1-50 中任一项所述的突变蛋白用于将化合物靶向到预先选定的要用所述化合物处理的生物体、组织、器官或细胞的用途,所述用途包括以下步骤:

(a) 将所述突变蛋白与所述化合物缀合,和

(b) 将所述突变蛋白 / 化合物复合物递送到所述预先选定的生物体、组织、器官或细胞。

63. 一种包含根据权利要求 1-50 中任一项所述的突变蛋白的试剂盒。

PCSK9 的新颖结合蛋白

背景技术

[0001] 人类前蛋白转换酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 第9类 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 是一种主要表达于肾脏、肝脏和肠内的分泌蛋白。其具有三个结构域:抑制性前结构域(氨基酸1-152;包括位于氨基酸1-30的信号序列)、丝氨酸蛋白酶结构域(或催化结构域;位于氨基酸153-448)和长度为210个残基(位于氨基酸449-692)的C端结构域(或富含半胱氨酸/组氨酸的结构域),其富含半胱氨酸残基。合成PCSK9以作为在内质网内的前结构域和催化结构域之间经历自催化切割的酶原。该前结构域与切割后的成熟蛋白结合,且该复合物会被分泌。该富含半胱氨酸的结构域可扮演类似于其他Furin/kexin/枯草杆菌蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶的P-(加工)结构域,其似乎对于该活化的蛋白酶的折叠与调节而言是必需的。

[0002] PCSK9为丝氨酸蛋白酶的蛋白酶K分泌枯草杆菌蛋白酶样的亚家族的成员(Naureckiene等人., 2003 *Arc. Biochem. Biophys.* 420:55-67),且其作用为肝低密度脂蛋白受体(LDL-R)的强负调节剂。PCSK9在通过控制在血流中循环的低密度脂蛋白(LDL)颗粒水平的胆固醇代谢中起重要作用。PCSK9水平的上升已被证实在肝脏中降低LDL-R水平,从而导致在血浆中具有高水平的低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)且对冠状动脉疾病的感受性增加。(Peterson等人, *J Lipid Res.* 49(7):1595-9(2008))。

[0003] 低密度脂蛋白受体(LDL-R)通过清除在血流中的低密度脂蛋白(LDL)而预防动脉粥样硬化和高胆固醇血症。LDL-R在转译后的水平由PCSK9所调节。PCSK9基因剔除小鼠表现出在血浆LDL-c水平的约50%减少,且增加对他汀类药物在减少血浆LDL-c的敏感性(Rashid S等人(2005) *Proc Natl Acad Sci* 102:5374-5379)。人类的基因资料也支持PCSK9在体内恒定(homeostasis)的作用。PCSK9中的突变与血浆中LDL-c水平异常有关(Horton等人, 2006 *Trends. Biochem. Sci.* 32(2):71-77)。最近被鉴定出的两个突变据推测是PCSK9中“丧失功能”的突变。具有这些突变的个体在血浆中的LDL-c水平减少约40%,其换算后为减少约50-90%的冠状心脏疾病。

[0004] 因此,产生PCSK9的抑制剂将会是非常有利的,所述PCSK9的抑制剂拮抗PCSK9的活性且阻断或减少在各种病理状态中PCSK9所起的相关作用。

发明内容

[0005] 定义:

[0006] 下表定义整个说明书中使用的术语、用语和缩写。所有在本文中列出和定义的术语意在涵盖所有语法形式。

[0007] 如本文所用,术语“脂质运载蛋白”指由其超二级结构定义的多肽,所述超二级结构即圆柱状 β 折叠片超二级结构区域,所述区域包含通过在一端的四个环成对连接的八个 β 链,由此定义结合袋。脂质运载蛋白(Pervaiz和Brew, *FASEB J.* 1(1987), 209-214)为一个小的家族,通常为单体分泌蛋白,其已经从不同生物体中被分离出来(Flower, *Biochem. J.* 318(1996), 1-12)。脂质运载蛋白承受相对小的相对序列相似性,且首先通过X-射线结

构分析阐明它们属于同一蛋白结构家族 (Sawyer 等人, Nature 327 (1987), 659)。

[0008] 在这方面,如本文所讨论的“脂质运载蛋白突变蛋白”指这样的突变蛋白,其源自脂质运载蛋白且具有圆柱状 β 折叠片超二级结构区域,所述区域包含通过在一端的四个环成对连接的八个 β 链,由此定义结合袋,其中所述四个环中的至少三个的每一个的至少一个氨基酸已经突变(参见,例如, PCT 公开 W0 1999/16873)。在一些具体实施方式中,所述脂质运载蛋白突变蛋白可源自人类泪液脂质运载蛋白。然而,在一些其他具体实施方式中,所述脂质运载蛋白突变蛋白可源自人类泪液脂质运载蛋白以外的脂质运载蛋白。

[0009] 如本文所用,术语“受试者”包括任何脊椎动物,如,哺乳动物。哺乳动物包括、但不限于,家畜(如,乳牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(如,人类和非人类灵长类动物例如猴子)、兔和啮齿类动物(如,小鼠和大鼠)。在某些实施方式中,该个体或受试者为人类。

[0010] 如本文所用的“前蛋白转换酶枯草杆菌蛋白酶 kexin 第 9 类”(“PCSK9”,可与“NARC-1”互换使用)指来自任何脊椎动物来源的任何天然 PCSK9,所述任何脊椎动物来源包括哺乳动物例如灵长类动物(如人类)和啮齿类动物(如,小鼠和大鼠)除非另有说明。该术语涵盖“全长”未加工的 PCSK9,以及在细胞内加工所得到的任何形式的 PCSK9 或其任何片段。该术语也涵盖 PCSK9 的天然存在的变体,如剪接变体或等位基因变体。

[0011] 如本文所用的术语“载体”指能够增殖与其连接的其他核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及并入将其引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸序列的表达。这类载体在本文中称为“表达载体”。

附图说明

[0012] 图 1:提供了通过表面等离子体共振对于脂质运载蛋白突变蛋白 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:11 的结合速率和解离速率的典型测量。所得到的对人类 PCSK9 (“hPCSK9”) (SEQ ID NO:34) 的解离常数 (K_D)、结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off}) 总结于实施例 6 的表 1 中。

[0013] 图 2:证明脂质运载蛋白突变蛋白 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 能够阻断在 PCSK9 与其受体 LDL-R 之间的相互作用。生物素化的 hPCSK9 (图 2A) 或生物素化的 hPCSK9_D374Y 突变体 (图 2B) 与可变浓度的所述突变蛋白预先培养,且在 ELISA 板上用固定化的可溶 LDL-R 定量未中和的 PCSK9。负对照 SEQ ID NO:2 不具有竞争性效果。用单点结合模型拟合数据。所得的 IC₅₀ 值总结于实施例 7 的表 2 中。

[0014] 图 3:显示如在 ELISA 形式中测量的 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9 的脂质运载蛋白突变蛋白的交叉反应性概况。脂质运载蛋白突变蛋白对 hPCSK9_D374Y 突变体和对石蟹猕猴 PCSK9 的完整交叉反应性由几乎相同的 K_D 值所显现(参见表 3)。在测试的浓度范围内,对小鼠 PCSK9 也具有交叉反应性,但亲和力较低。负对照 (SEQ ID NO:2) 则未检测到结合反应。用单点结合模型拟合数据。

[0015] 图 4:示出了在以细胞为基础的分析中,SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 的脂质运载蛋白突变蛋白有效阻断 hPCSK9 与其受体 LDL-R 的结合。该分析基于在 HepG2 细胞上 PCSK9 诱导的 LDL-R 内化,从而导致荧光标记的 DiI-LDL 的胞内摄取减少。细胞与固定浓度 (100nM) 的 hPCSK9 培养,且用脂质运载蛋白突变蛋白进

行滴定。将使用 BMG PheraStar 读板器在 485/535nm 下测量的胞内 DiI-LDL 的标准化荧光信号针对脂质运载蛋白突变蛋白的浓度绘图。所得到的 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 的脂质运载蛋白突变蛋白的 IC₅₀ 值列于表 4 中。脂质运载蛋白突变蛋白对 PCSK9 的结合恢复了 DiI-LDL 摄取至细胞内的 PCSK9 介导的减少,而 SEQ ID NO:2 的负对照则无作用。通过 GraphPad Prism 4,使用非线性回归“S 形剂量-反应,可变斜率”模型进行曲线的拟合(5PL 拟合)。通过 PCSK9 刺激的和未刺激的细胞的值进行数据标准化。

[0016] 图 5:提供了如通过表面等离子体共振测量的 SEQ ID NO:13(图 5C)、SEQ ID NO:20(图 5A) 和 SEQ ID NO:21(图 5B) 的脂质运载蛋白突变蛋白对 hPCSK9 的结合与未结合的结合速率与解离速率的典型测量。所得到的 K_D总结于表 5 中(参见实施例 10)。

[0017] 图 6:提供了如通过表面等离子体共振测量的脂质运载蛋白突变蛋白(SEQ ID NO:20)对各种 PCSK9 种类的结合与未结合的结合速率与解离速率的典型测量。所得到的脂质运载蛋白突变蛋白 SEQ ID NO:20 和其他突变蛋白的 K_D总结于表 6 中(参见实施例 11)。

[0018] 图 7:证明了 SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:32 的 PEG 化形式的脂质运载蛋白突变蛋白能够与 hPCSK9 结合,IC₅₀ 分别为 0.19、0.53 和 0.37nM,与 SEQ ID NO:13 的未修饰的脂质运载蛋白突变蛋白类似,其 IC₅₀ 显示为 0.16nM。生物素化的 hPCSK9 与可变浓度的脂质转载蛋白突变蛋白预先培养,在固定了基准抗体(其轻链由 SEQ ID NO:29 表示,而其重链由 SEQ ID NO:33 表示)的 ELISA 板上定量未中和的 PCSK9,所述基准抗体用作正对照,以与脂质转载蛋白突变蛋白竞争与 hPCSK9 的结合。用单点结合模型拟合数据。

[0019] 图 8:证明在以细胞为基础的 LDL-R 耗尽分析中,SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:20 的脂质运载蛋白突变蛋白及其相应 PEG 化的 SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:32 的变体能够阻断 hPCSK9 的生物活性。在 LDL 匮乏的 HepG2 细胞上将连续稀释的测试脂质运载蛋白突变蛋白和 SEQ ID NO:2 的负对照与恒定浓度的 hPCSK9 一起培养。通过使用特定的山羊抗-hLDL-R 抗体(R&D CAT. No. AF2148)评价在该 HepG2 表面上的 LDL-R 含量。PCSK9 介导的最大 LDL-R 内化被设定为 100%。脂质运载蛋白突变蛋白的加入以剂量依赖方式阻断 PCSK9 的活性。就此而言,SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:20 的脂质运载蛋白突变蛋白的 IC₅₀ 值分别为 76nM、103nM 和 91nM。因此,PEG 化并不影响脂质运载蛋白突变蛋白的阻断能力,因为对于该 PEG 化的脂质运载蛋白突变蛋白(分别包含 SEQ ID NOs:30-32,其代表本发明的三个脂质运载蛋白突变蛋白的变体的氨基酸序列,但不包括该聚乙二醇(PEG)分子的序列)测量的 IC₅₀ 值与其各自未 PEG 化的形式(分别为 SEQ ID NOs:13、20 和 22)并无不同。SEQ ID NO:2 的负对照对 PCSK9 的活性则无影响。总之,该脂质运载蛋白突变蛋白抑制 PCSK9 的生物活性,因此恢复了在该细胞表面上的 LDL-R。用 S 形剂量-反应模型拟合数据。

[0020] 图 9:显示编码包含 OmpA 信号序列(OmpA)和人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白接着该 Strep-tag II 的融合蛋白的表达载体 pTLPC26(也称为 pTlc26)。标记了用于克隆该突变基因盒的 BstXI 限制酶切位点和位于结构基因侧翼的限制性位点。在四环霉素启动子/操纵子(tet^o)的控制下表达基因。转录终止于脂蛋白转录作用终止子(t_{lpp})。该载体进一步包含复制起点(ori)、丝状噬菌体 f1 的基因间区域(f1-IG)、氨苄青霉素抗性基因(amp))以及四环霉素抑制基因(tetR)。pTLPC26 的核酸序列的相关片段列于序列表中的

SEQ ID NO:35。该片段始于 XbaI 限制性位点,终于 HindIII 限制性位点。在该区域外的载体元件与载体 pASK75 相同,其完整的核苷酸序列示于德国专利公开 DE 4417598A1 中。

[0021] 图 10:描述某些以人类泪液脂质运载蛋白为基础的突变蛋白的氨基酸序列(列于 SEQ ID NOs:2-28)与成熟人类泪液脂质运载蛋白的多肽序列(SEQ ID NO:1)比较的比对。

[0022] 图 11:图 11A 提供实施例 3 中编码氨基酸的预期分布。注意,为了清楚起见,具有少于 1% 的频率的所有氨基酸均被省略;因为在噬菌体展示过程中使用密码子抑制因子菌株 TG1F,故琥珀终止密码子(TAG)被当作编码谷氨酰胺。此外,从成熟文库(图 11B 和图 11C)的测序获得的实验数据显示,预期与实验的分布之间具有良好的匹配,尽管丝氨酸的频率高出预期,反映出寡核苷酸合成或通过 PCR 的寡核苷酸组装的偏差。与此发现一致的是,实验获得的两个文库(图 11E 和图 11F)的突变分布频率与理论上预期的分布(图 11D)接近,但移向较低频率。

[0023] 图 12:描述代表脂质运载蛋白突变蛋白(SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NOs:63-65)的熔融曲线迭加的温谱图,其获自使用毛细管 nanoDSC 设备(Q2000, TA)的纳米差异化扫描热量计(“nanoDSC”)测量。与 SEQ ID NO:13 相比较,热稳定的衍生物(SEQ ID NOs:63-65)的熔融曲线显着地位移。

[0024] 图 13:提供了通过表面等离子体共振对于脂质运载蛋白突变蛋白(SEQ ID NOs:62-71)的结合速率与解离速率的典型测量。图 13A-图 13J 分别对应于 SEQ ID NOs:62-71。所得到的对人类 PCSK9(“hPCSK9”)(SEQ ID NO:34)的解离常数(KD)、结合速率(kon)和解离速率(koff)总结于实施例 17 的表 10 中。

[0025] 图 14:描述某些以人类泪液脂质运载蛋白为基础的突变蛋白的氨基酸序列(列为 SEQ ID NOs:13、22、62-71)与成熟人类泪液脂质运载蛋白的多肽序列(SEQ ID NO:1)相比较的比对。

具体实施方式

[0026] 在一方面,本发明提供与前蛋白转换酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 第 9 类或 PCSK9 结合的人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白。在一些实施方式中,该脂质运载蛋白突变蛋白对 PCSK9 具有高亲和力。作为本发明的突变蛋白的靶标的 PCSK9 一般而言为哺乳动物蛋白,例如,非人类灵长类动物蛋白或人类蛋白。全长人类 PCSK9 具有 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列。

[0027] 本发明的脂质运载蛋白突变蛋白也能够结合 PCSK9 的免疫原性片段。PCSK9 的免疫原性片段为具有一个或多个表位、模拟表位或其他抗原决定簇的片段,且因此能够诱导免疫反应或能够产生针对其的抗体。该免疫原性片段可包括单一表位或可具有多个表位。因为抗原呈递系统,如载体蛋白,可被用于提供被免疫系统识别所需的尺寸,因此没有具体的尺寸限制应用于该免疫原性片段。因此,该免疫原性片段也可作为“半抗原”,即本身不具有抗原性或可能具有低免疫原性的片段,具体而言因为该片段的小分子量和相对应的尺寸。一般而言,免疫原性片段可以单独或当在载体上呈现时,由免疫球蛋白结合。PCSK9 的免疫原性片段一般能够与 LDL-R 相互作用,由此调节在血流中循环的低密度脂蛋白(LDL)颗粒。在一些实施方式中,PCSK9 的免疫原性片段保留了全长配体被根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白识别和/或结合的能力。例如,该免疫原性片段可为 N 端和/或 C 端缩短

的蛋白或肽。

[0028] 在不同的实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白能够与非人类灵长类动物 PCSK9 (例如,石蟹猕猴 PCSK9 或黑猩猩 PCSK9) 或其具有可检测亲和力 (即具有至少 200nM 的解离常数 (K_D)) 的免疫原性片段结合。在一些实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可与非人类灵长类动物 PCSK9 或其具有等于或小于约 10nM、约 1nM 或约 0.3nM 的 K_D 的免疫原性片段结合。在不同的实施方式中,抗原结合部分与小鼠 PCSK9 或其具有等于或小于约 10nM、约 1nM 或约 0.5nM 的 K_D 的免疫原性片段结合。

[0029] 在不同的实施方式中,本发明的一种或多种脂质运载蛋白突变蛋白能够与人类 PCSK9 或其具有可检测亲和力 (即具有至少 200nM 的 K_D) 的免疫原性片段结合。在一些实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可与人类 PCSK9 或其具有等于或小于约 10nM、约 1nM、约 0.1nM、约 0.5nM、约 0.25nM、约 10pM 或甚至更少的 K_D 的免疫原性片段结合。

[0030] 在一些进一步的实施方式中,与人类 PCSK9 或其免疫原性片段结合的一种或多种脂质运载蛋白突变蛋白的结合亲和力已被发现具有 0.1nM 以下的 K_D ,且在一些实施方式中,具有等于或小于约 1 皮摩尔 (picomolar, pM) 的 K_D (参见图 7)。

[0031] 可以测量脂质运载蛋白突变蛋白与选定的靶标 (在本例中为 PCSK9) 的结合亲和力,由此通过本领域技术人员已知的多种方法测定突变蛋白-配体复合物的 K_D 值。这些方法包括、但不限于,荧光滴定、竞争 ELISA、量热法 (例如等温滴定量热法 (ITC)) 和表面等离子体共振 (BIAcore)。这些方法的实例详述如下 (参见,如,实施例 7)。

[0032] 在一个实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可作为 PCSK9 的拮抗剂。如本文所用,术语“PCSK9 的拮抗剂”指能够干扰 PCSK9 和 LDL-R 之间的结合的试剂。在一些情况下,PCSK9 的拮抗剂可由其完全或部分抑制 PCSK9 和 LDL-R 之间的结合的能力而被鉴别。

[0033] 此外,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可与 LDL-R 竞争与 PCSK9 的结合 (参见实施例 7)。

[0034] 此外,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可与包含 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:33 的单克隆抗体竞争与 PCSK9 的结合 (参见实施例 12)。

[0035] 在另一个实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白能够完全或部分抑制 PCSK9 介导的 LDL-R 的下调。与存在对照或缺乏脂质运载蛋白突变蛋白的情况下 PCSK9 介导的 LDL-R 的下调相比较,当暴露于本发明的脂质运载蛋白突变蛋白时,抑制发生,例如,其中 PCSK9 介导的 LDL-R 的下调为减少至少约 10%,例如减少至少约 25%、50%、75%,或完全地抑制。在一些进一步的实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白能够以剂量依赖的方式来抑制 PCSK9 介导的 LDL-R 的下调。在一些进一步的实施方式中,PCSK9 介导的 LDL-R 的下调的抑制可在基于 HEPG2 细胞的分析中被证实,如实施例 13 中实质地描述。

[0036] 在另一个实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白能够在存在 PCSK9 的情况下恢复 LDL 摄取。在一些进一步的实施方式中,在存在 PCSK9 的情况下 LDL 摄取的恢复可在基于 HEPG2 细胞的分析中被证实,如实施例 11 中实质地描述。在一些进一步的实施方式中,为了设定该分析,HEPG2 细胞可与固定浓度的 hPCSK9 (如 100nM) 一起培养,然后可与脂质运载蛋白突变蛋白进行滴定。

[0037] PCSK9 可用于定义人类泪液脂质运载蛋白的非天然配体。术语“非天然配体”指在

生理条件下不与成熟人类泪液脂质运载蛋白结合的化合物。如本文所使用,术语“人类泪液脂质运载蛋白”指对应于 SWISS-PROT 数据库登录号 P31025 的蛋白的成熟人类泪液脂质运载蛋白,然而该成熟人类泪液脂质运载蛋白 (SEQ ID NO:1) 并不包括含括在该 SWISS-PROT 登录号 P31025 的序列中的 N 端信号肽。

[0038] 本发明的突变蛋白的氨基酸序列与成熟人类泪液脂质运载蛋白 (SEQ ID NO:1) 具有高序列同一性。在此背景下,本发明的突变蛋白的氨基酸序列可基本上相似于成熟人类泪液脂质运载蛋白的氨基酸序列。本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的相应序列,与成熟人类泪液脂质运载蛋白的序列基本上相似,在不同的实施方式中,可与成熟人类泪液脂质运载蛋白的序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 82%、至少 85%、至少 87% 或至少 90% 同一性,包括至少 95% 同一性 (参见,例如,图 10 和图 14),条件是保留改变的位置或序列。

[0039] “同一性”指序列的属性,其量度序列的相似性或关系。通过将相同残基的数目除以残基总数再乘以 100 来计算同一性。如两个示例性实例所示,SEQ ID NO:3 的突变蛋白与成熟人类泪液脂质运载蛋白的氨基酸序列具有 82.28% 的序列同一性,且 SEQ ID NO:7 的突变蛋白与成熟人类泪液脂质运载蛋白具有 83.54% 的氨基酸序列同一性。

[0040] “间隔”为比对中的空隙,其是氨基酸添加或缺失的结果。因此,完全相同的序列的两个拷贝具有 100% 同一性,但不那么高度保守的序列和具有缺失、添加或替换的序列可具有较低程度的同一性。本领域技术人员将认识到,若干计算机程序可用于使用标准参数来测定序列同一性,例如 Blast (Altschul 等人 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402)、Blast2 (Altschul 等人 (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410), 和 Smith-Waterman (Smith 等人 (1981) *J. Mol. Biol.* 147, 195-197)。

[0041] 参照本发明的核酸或多肽的术语“突变的”或“突变蛋白”指与天然存在的核酸或多肽相比较,分别交换、缺失或插入一个或多个核苷酸或氨基酸。与对应的天然人类泪液脂质运载蛋白相比较,本发明的突变蛋白包括至少三个置换。

[0042] 在一些实施方式中,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白包括在成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列 (SEQ ID NO:1) 的序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中的任一个处的至少 2 个、包括 3、4、5、6、8、10、12、14、15、16、17 或 18 个突变的氨基酸残基。位置 26-34 包括在 AB 环中,位置 56-58 包括在 CD 环中。位置 80 位于 α 螺旋区中。位置 83 为在此 α 螺旋区和 β 折叠片 (βF) 之间的单一环定义氨基酸。位置 104-106 和 108 包括在泪液脂质运载蛋白的 β 桶结构的开放端处结合位置中的 GH 环中。本文所用的这些区域的定义根据 Flower (Flower, 1996 年,同上, Flower 等人, 2000 年,同上) 和 Breustedt 等人 (2005 年,同上)。

[0043] 在一些实施方式中,根据本发明的人类脂质运载蛋白突变蛋白可进一步包括将位置 61 和 / 或 153 处的天然半胱氨酸残基由丝氨酸残基进行氨基酸置换。在此背景下,值得注意的是,已发现将成熟人类泪液脂质运载蛋白的由半胱氨酸残基 61 和 153 形成的结构二硫键移除 (在对应天然核酸文库的程度上) (参照 Breustedt 等人, 2005 年,同上), 提供这样的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白,所述突变蛋白不仅稳定地折叠,而且还能够以高亲和力和力结合给定的非天然配体。不希望受到理论的束缚,据信消除结构二硫键提供进一步的优点,即允许非天然人工二硫键 (自发) 产生或故意引入本发明的突变蛋白中 (参见实施

例),例如由此增加该突变蛋白的稳定性。然而,结合 PCSK9 且在 Cys 61 与 Cys 153 之间具有形成的二硫键的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白亦为本发明的一部份。

[0044] 在一些实施方式中,本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换:Cys 61 → Ala、Phe、Lys、Arg、Thr、Asn、Tyr、Met、Ser、Pro 或 Trp 和 / 或 Cys 153 → Ser 或 Ala。

[0045] 在一些实施方式中,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括将位置 101 处的天然半胱氨酸残基由丝氨酸残基进行氨基酸置换。另外,在一些实施方式中,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括将位置 111 处的天然精氨酸残基由脯氨酸残基进行氨基酸置换。在一些实施方式中,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括将位置 114 处的天然赖氨酸残基由色氨酸残基进行氨基酸置换。

[0046] 在一些实施方式中,本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括至少一个氨基酸置换,其可为另外的氨基酸置换,其选自 Arg 111 → Pro 和 Lys 114 → Trp。本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白可进一步包括由另一个氨基酸置换在成熟人类泪液脂质运载蛋白的序列位置 101 处的半胱氨酸。这一置换可例如为突变 Cys 101 → Ser 或 Cys 101 → Pro。

[0047] 在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换中的一个或多个:Arg 26 → Ser、Phe、Trp、His 或 Thr, Glu 34 → Asn、Thr、Arg 或 Gly, Leu 56 → Met、Ser、Gln、Phe、His 或 Asn, 和 Ser 58 → Lys、Ala、Arg、Trp 或 Pro。

[0048] 在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Met31 → Ala、Gly、His、Pro、Ser、Asp、Glu 或 Gln, Leu 33 → Tyr、Trp、Tyr、Phe、Pro 或 Ala, Ser 61 → Trp 或 Phe, Asp 80 → Ser、Met、Pro、Ile、Gln、Tyr、Ser、Val 或 Thr, Glu 104 → Leu、Pro、Ser、Ala、Asn、Thr、Lys 或 Asp, His 106 → Pro、Gln、Gly、Arg、Val、Thr、Asn 或 Leu, 和 Lys 108 → Gln、Ala、Trp、Tyr、Arg、Asp、Asn、Ser、Glu 或 Thr。

[0049] 在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换中的一个或多个:Glu 27 → Arg、Ser、Gln、Thr、Phe、Lys、Ala 或 Arg, Pro 29 → Gly、Asp、Asn、Ile、Leu 或 Met, Asn 32 → Ile、Leu、Tyr、Met 或 Trp, 和 Leu 105 → Cys、Tyr、Trp、Glu、Arg、Ser、His、Ala、Val、Asp、Pro、Gly 或 Lys。

[0050] 在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包含以下氨基酸置换中的至少一个:Phe28 → Cys、Arg、Lys、Trp、Asp、Gly、His、Leu 或 Asn;Glu 30 → Arg、Asp、Thr、Ser、Gly、Ala 或 Asn, Ile 57 → Tyr、Trp、His、Gln、Thr 或 Arg, Lys 83 → Arg、Ser、Gln、Thr 或 Glu。

[0051] 在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合:Arg 26 → Phe;Asn 32 → Ile;Glu 34 → Thr;Leu 56 → Met;Ser 58 → Ala 和 Lys 83 → Ser。在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合:Arg 26 → Trp;Asn 32 → Leu;Glu 34 → Thr;Leu 56 → Ser 和 Ser 58 → Ala。

在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合:Arg 26 → His;Asn 32 → Tyr;Glu 34 → Thr;Leu 56 → Ser;Ser 58 → Arg 和 Lys 83 → Gln。在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合:Arg 26 → Phe;Asn 32 → Met;Glu 34 → Thr;Leu 56 → Gln;Ser 58 → Ala 和 Lys 83 → Thr。在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合:Asn 32 → Trp;Glu 34 → Arg;Leu 56 → Asn;Ser 58 → Trp 和 Lys 83 → Ser。在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合:Arg 26 → Phe;Asn 32 → Leu;Glu 34 → Thr;Leu 56 → Phe;Ser 58 → Ala 和 Lys 83 → Arg。在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合:Arg 26 → Thr;Asn 32 → Trp;Glu 34 → Asn;Leu 56 → His;Ser 58 → Pro 和 Lys 83 → Ser。在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合:Asn 32 → Trp;Glu 34 → Asn;Leu 56 → Phe;Ser 58 → Arg 和 Lys 83 → Glu。在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合:Arg 26 → Trp;Asn 32 → Leu;Glu 34 → Thr;Leu 56 → Met;Ser 58 → Ala 和 Lys 83 → Ser。在一些实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合:Asn 32 → Trp;Glu 34 → Gly;Leu 56 → Gln;Ser 58 → Ala 和 Lys 83 → Gln。

[0052] 在一些实施方式中,本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的集合中的一个:

[0053] (1)Glu 27 → Ser;Phe 28 → Arg;Pro 29 → Gly;Glu 30 → Asp;Met 31 → Ala;Leu 33 → Trp;Ile 57 → Tyr;Asp 80 → Met;Glu 104 → Pro;Leu 105 → Tyr;His 106 → Gln;Lys 108 → Ala,

[0054] (2)Glu 27 → Gln;Phe 28 → Cys;Pro 29 → Asp;Glu 30 → Thr;Met 31 → Gly;Leu 33 → Trp;Ile 57 → Tyr;Leu 105 → Cys;His 106 → Gly;Lys 108 → Trp,

[0055] (3)Glu 27 → Glu;Phe 28 → Trp;Pro 29 → Asn;Glu 30 → Gly;Met 31 → His;Leu 33 → Tyr;Ile 57 → Tyr;Asp 80 → Pro;Glu 104 → Ser;Leu 105 → Trp;His 106 → Pro;Lys 108 → Tyr,

[0056] (4)Glu 27 → Thr;Phe 28 → Asp;Pro 29 → Asn;Glu 30 → Ser;Met 31 → Pro;Leu 33 → Phe;Ile 57 → Tyr;Asp 80 → Ile;Glu 104 → Ala;Leu 105 → Glu;His 106 → Arg;Lys 108 → Arg,

[0057] (5)Glu 27 → Phe;Phe 28 → Lys;Pro 29 → Ile;Glu 30 → Ala;Met 31 → Ser;Leu 33 → Pro;Ile 57 → Trp;Asp 80 → Gln;Glu 104 → Asn;Leu 105 → Arg;His 106 → Gln;Lys 108 → Asp,

[0058] (6)Glu 27 → Lys;Phe 28 → Gly;Pro 29 → Pro;Glu 30 → Thr;Met 31 → Pro;Leu 33 → Trp;Ile 57 → His;Asp 80 → Tyr;Glu 104 → Ala;Leu 105 → Ser;His 106 → Val;Lys 108 → Asn,

[0059] (7)Glu 27 → Glu ;Phe 28 → His ;Pro 29 → Leu ;Glu 30 → Ala ;Met 31 → Asp ;
Leu 33 → Ala ;Ile 57 → Gln ;Asp 80 → Ile ;Glu 104 → Ala ;Leu 105 → Tyr ;His
106 → Pro ;Lys 108 → Ser,

[0060] (8)Glu 27 → Ala ;Phe 28 → Asp ;Pro 29 → Met ;Glu 30 → Gly ;Met 31 → Asp ;
Leu 33 → Pro ;Ile 57 → Thr ;Asp 80 → Thr ;Glu 104 → Thr ;His 106 → Thr ;Lys
108 → Arg,

[0061] (9)Glu 27 → Arg ;Phe 28 → Leu ;Pro 29 → Asp ;Glu 30 → Asn ;Met 31 → Glu ;
Leu 33 → Trp ;Ile 57 → Tyr ;Asp 80 → Gln ;Glu 104 → Pro ;Leu 105 → Arg ;His
106 → Asn ;Lys 108 → Ala,

[0062] (10)Glu 27 → Lys ;Phe 28 → Asn ;Pro 29 → Met ;Glu 30 → Gly ;Met 31 → Gln ;
Leu 33 → Pro ;Ile 57 → Arg ;Asp 80 → Ile ;Glu 104 → Asp ;Leu 105 → Arg ;His
106 → Leu ;Lys 108 → Thr,或

[0063] (11)Glu 27 → Ser ;Phe 28 → Arg ;Pro 29 → Gly ;Glu 30 → Asp ;Met 31 → Ala ;
Leu 33 → Trp ;Ile 57 → Tyr ;Asp 80 → Met ;Glu 104 → Pro ;Leu 105 → Gly ;His
106 → Gln ;Lys 108 → Ala。

[0064] 在一个具体实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合 :Arg 26 → Phe ;Glu 27 → Ser ;
Phe 28 → Arg ;Pro 29 → Gly ;Glu 30 → Asp ;Met 31 → Ala ;Asn 32 → Ile ;Leu 33 → Trp ;
Glu 34 → Thr ;Leu 56 → Met ;Ile 57 → Tyr ;Ser 58 → Ala ;Lys 83 → Ser ;Glu 104 → Pro
和 Lys 108 → Thr。在另一个实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,该人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换中的一个或多个 :Thr 43 → Ile 或 Ala,
Glu45 → Gly,Asn 48 → Gly,Glu 63 → Gly,Ala 66 → Val,Glu 69 → Val,Lys70 → Arg,Ala
79 → Thr、Met 或 Val,Asp 80 → Met 或 Ser,Gly 82 → Ser,His 84 → Gln,Val 85 → Gly,
Tyr 87 → Ser,Ile 88 → Thr 或 Leu,His 92 → Pro,Leu 105 → His、Gly 或 Tyr,和 His
106 → Gln 或 Arg。

[0065] 在另一个具体实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换的组合 :Glu27 → Phe ;Phe
28 → Lys ;Pro 29 → Ile ;Asn 32 → Trp ;Leu 33 → Pro ;Glu34 → Arg ;Leu 56 → Asn ;Ile
57 → Trp ;His 106 → Gln 和 Lys 108 → Glu。在又一个具体实施方式中,与成熟人类泪液脂质运载蛋白相比较,该人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括以下氨基酸置换中的一个或多个 :Glu 43 → Gly 或 Ala, Glu 45 → Gly, Ser 58 → Trp 或 Arg, Glu 63 → Asp, Glu
69 → Gly,Lys 70 → Arg,Asp 80 → Gln、Val 或 Thr,Gly 82 → Asp,Lys 83 → Ser 或 Arg,
Ala 86 → Glu 或 Ser,Phe 99 → Leu,Glu 102 → Lys 或 Val,Glu 104 → Asn 或 Lys,和 Pro
106 → Thr。

[0066] 在一些进一步的实施方式中,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白在成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的氨基酸序列位置 79、92 和 105 中的任一个处包含一个或多个突变的氨基酸残基。例如,本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白可包括以下氨基酸置换 :Ala 79 → Met、Thr 或 Val,His 92 → Pro 和 / 或 Leu 105 → Ala、Val、Asp、Pro、Arg、Gly、Lys 或 His。

[0067] 如上所定义,本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括至少一个氨基酸置换,其位于成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列 (SEQ ID NO:1) 的位置 26、27、28、30、31、33、34、57、61、80、83、104-106 和 108 的序列位置处。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白包括成熟人类泪液脂质运载蛋白的这些序列位置中的二个或更多个,例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 个氨基酸置换。在一个具体实施方式中,该突变蛋白在成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的序列位置 26、27、28、30、31、33、53、57、61、64、66、80、83、104-106 和 108 中的每一个处具有突变的氨基酸残基 (参见,例如,图 10 和图 14)。

[0068] 在一些实施方式中,关于成熟人类泪液脂质运载蛋白的氨基酸序列,本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白还可在成熟人类泪液脂质运载蛋白的环区域内的位置中任一个处包括一个或多个,包括至少二个、至少三个或至少四个天然氨基酸残基由半胱氨酸残基置换的氨基酸置换。在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白在关于成熟人类泪液脂质运载蛋白的氨基酸序列的位置 28 或 105 处包括天然氨基酸由半胱氨酸残基置换的氨基酸置换。

[0069] 在剩余区域中,即不同于 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 的区域中,本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白在突变的氨基酸序列位置以外可包括野生型 (天然的) 氨基酸序列。在一些实施方式中,根据本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白还可在一个序列位置 / 多个序列位置处携带一个或多个氨基酸突变,只要这样的突变至少实质上不会妨碍或干扰该突变蛋白的结合活性和折叠即可。这样的突变可以使用已建立的标准方法在 DNA 层次上及其容易地实现。改变氨基酸序列的示例性实例为插入或缺失以及氨基酸置换。这种置换可为保守性的,即用具有相似化学特性的氨基酸残基替换氨基酸残基,所述相似化学特性具体而言是关于极性以及尺寸。保守性置换的实例为以下组的成员之间的替换: 1) 丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸; 2) 天冬氨酸和谷氨酸; 3) 天冬酰胺和谷氨酰胺; 4) 精氨酸和赖氨酸; 5) 异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸; 和 6) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。另一方面,还可以在该氨基酸序列中引入非保守性的改变。此外,除了替换单一氨基酸残基以外,还可以插入或缺失一个或多个连续的泪液脂质运载蛋白的一级结构的氨基酸,只要这些缺失或插入造成稳定折叠的 / 功能性的突变蛋白 (参见,例如,产生具有截短的 N 端和 C 端的突变蛋白的实验部分)。

[0070] 该氨基酸序列的这种修饰包括单一氨基酸位置的直接突变,以便通过引入某些限制性酶的切割位点而简化该突变的脂质运载蛋白基因或其部分的亚克隆。此外,这些突变也可被并入以进一步改进脂质运载蛋白突变蛋白对给定靶标的亲和力。此外,如果需要,可引入突变以便调节该突变蛋白的某些特性,例如改善折叠稳定性、血清稳定性、蛋白质抗性或水溶性,或是减少聚集倾向。例如,天然存在的半胱氨酸残基可被突变为其他氨基酸以防止二硫键形成。还可以故意将其他氨基酸序列位置突变成为半胱氨酸以便引入新的反应基团,例如,为了与其他化合物缀合,例如聚乙二醇 (PEG)、羟乙基淀粉 (HES)、生物素、肽或蛋白质,或是为了形成非天然存在的二硫键。将半胱氨酸残基引入人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白的氨基酸序列的这样的突变的示例性可能性包括以下置换: Thr 40 → Cys, Glu 73 → Cys, Arg90 → Cys, Asp 95 → Cys, 和 Glu 131 → Cys。在氨基酸位置 40、73、90、95 和 / 或 131 中任一个的一侧处产生的巯基部分可被用来使突变蛋白聚二乙醇化 (PEGylate) 或

羟乙基淀粉化 (HESylate), 例如, 以便增加相应泪液脂质运载蛋白突变蛋白的血清半衰期。

[0071] 本发明还涵盖如上定义的突变蛋白, 其中成熟人类泪液脂质运载蛋白的序列的 N 端前四个氨基酸残基 (His-His-Leu-Leu; 位置 1-4) 和 / 或成熟人类泪液脂质运载蛋白的序列的 C 端最后两个氨基酸残基 (在位置 157 处的 Ser 和在位置 158 处的 Asp) 已被缺失 (参见图 10 和图 14)。该野生型序列的另一可能的突变是将序列位置 5 至 7 处的氨基酸序列 (Ala Ser Asp) 改变为 Gly Gly Asp, 如 PCT 公开 W0 2005/019256 所述。

[0072] 本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白可包括如 SEQ ID NOs: 3-28、62-71 和 82 所示的氨基酸序列中的任一个或其片段或变体, 由如 SEQ ID NOs: 3-28、62-71 和 82 所示的氨基酸序列中的任一个或其片段或变体组成, 或实质上由如 SEQ ID NOs: 3-28、62-71 和 82 所示的氨基酸序列中的任一个或其片段或变体组成。

[0073] 如本文与本发明的脂质运载蛋白突变蛋白有关所用的术语“片段”涉及源自其 N 端和 / 或 C 端缩短 (即缺少 N 端和 / 或 C 端氨基酸中的至少一个) 的全长成熟脂质运载蛋白的蛋白质或肽。这样的片段可包括该成熟脂质运载蛋白的一级序列的至少 10 个, 更多例如 20 或 30 个或更多个连续的氨基酸, 且通常在该成熟脂质运载蛋白的免疫分析中可检测到。

[0074] 如本发明所用的术语“变体”涉及本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的衍生物, 其包括氨基酸序列的修饰, 例如通过置换、缺失、插入或化学修饰。这样的修饰在一些实施方式中并不减少该突变蛋白的功能性。例如, 为了产生这样的变体, 本发明的突变蛋白的一个或多个氨基酸可被其各自的 D 立体异构物或被天然存在的 20 种氨基酸以外的氨基酸 (例如鸟氨酸、羟脯氨酸、瓜氨酸、高丝氨酸、羟基赖氨酸、正缬氨酸) 所替换。然而, 这样的置换也可能是保守性的, 即氨基酸残基由化学上相似的氨基酸残基所替换。保守性置换的实例为以下组的成员之间的替换: 1) 丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸; 2) 天冬氨酸和谷氨酸; 3) 天冬酰胺和谷氨酰胺; 4) 精氨酸和赖氨酸; 5) 异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、和缬氨酸; 和 6) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。

[0075] 本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可作为单体蛋白存在。在一些实施方式中, 根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白能够自发性地二聚化或寡聚化。使用形成稳定单体的脂质运载蛋白突变蛋白可在某些应用中具有优势, 例如因为较快的扩散和较佳的组织渗透性。在其他实施方式中, 使用自发地形成稳定同质二聚体或多聚体的脂质运载蛋白突变蛋白可具有优势, 因为这样的多聚体可提供对给定靶标的 (进一步) 增加的亲和力和 / 或亲合性。此外, 脂质运载蛋白突变蛋白的寡聚体的形式可具有较慢的解离速率或延长的血清半衰期。如果形成稳定的单体的突变蛋白的二聚化或多聚化是期望的, 这可以例如通过将各别寡聚结构域例如 jun-fos 结构域或亮氨酸拉链融合至本发明的突变蛋白或通过使用 “Duocalins” 来实现 (参见下文)。

[0076] 根据本发明的泪液脂质运载蛋白突变蛋白可通过人类泪液脂质运载蛋白的天然存在形式的突变而获得。如本文所用, 术语“突变”意为选择实验条件, 使得在人类泪液脂质运载蛋白 (Swiss-Prot 数据库条目 P31025) 的给定序列位置处天然存在的氨基酸可被至少一个不存在于该相应天然多肽序列中的此特定位置处的氨基酸所置换。术语“突变”还包括通过缺失或插入一个或多个氨基酸而另外修饰序列区段的长度。因此, 例如, 在选定序列位置处的一个氨基酸被整个三个随机的突变所替换, 从而造成与野生型蛋白的对应区段

的长度相比较,插入了两个氨基酸残基,这样的情况包含在本发明的范围内。这样的插入或缺失可被彼此独立地引入到本发明中可经受突变的肽区段的任一个中。在本发明的一个示例性实施方式中,若干突变的插入可被引入到所选定的脂质运载蛋白支架的 AB 环中(参见 PCT 公开 W02005/019256,其通过引用全文并入本文中)。术语“随机突变”意为在某个序列位置处不存在预定的单一氨基酸(突变),但在突变过程中以一定的机率有至少二个氨基酸可以被引入预定的序列位置处。

[0077] 人类泪液脂质运载蛋白的编码序列(Reidl, B. 等人(1992) J. Biol. Chem. 267, 20282-20287)被用作在本发明中选定的肽区段的突变的起始点。对于列举的氨基酸位置的突变,本领域技术人员可用各种已经建立的定点突变标准方法。常用的技术为通过 PCR(聚合酶链反应)引入突变,其中使用合成的寡核苷酸混合物,其在所需的序列位置处具有简并碱基组合物。例如,使用密码子 NNK 或 NNS(其中 N = 腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶;K = 鸟嘌呤或胸腺嘧啶;S = 腺嘌呤或胞嘧啶)允许在突变过程中并入所有 20 种氨基酸加上琥珀终止密码子,而密码子 VVS(其中 V = 腺嘌呤、鸟嘌呤或胞嘧啶)将可能并入的氨基酸数目限制为 12 个,因为其将氨基酸 Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Val 从并入该多肽序列所选的位置中排除;例如,使用密码子 NMS(其中 M = 腺嘌呤或胞嘧啶)将在所选的序列位置处可能的氨基酸数目限制为 11 个,因为其将氨基酸 Arg、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Val 从并入该所选的序列位置处排除。在这方面应该注意的是,其他氨基酸(非常规 20 种天然存在的氨基酸)的密码子,例如硒代半胱氨酸或吡咯赖氨酸也可被并入突变蛋白的核酸中。如 Wang, L. 等人(2001) Science 292, 498-500 或 Wang, L. 和 Schultz, P. G. (2002) Chem. Comm. 1, 1-11 所述,也可以使用“人工”密码子例如 UAG,其通常识别为终止密码子,以便插入其他不常见的氨基酸,例如,邻-甲基-L-酪氨酸或对-氨基苯丙氨酸。

[0078] 利用具有降低的碱基对特异性的核苷酸构筑块,例如肌苷、8-氧代-2'-脱氧鸟苷或 6(2'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3,4-二氢-8H-pyrimido-1,2-恶嗪-7-酮(Zaccolo 等人(1996) J. Mol. Biol. 255, 589-603),是另一种将突变引入所选定的序列区段的选择。

[0079] 另一种可能性是所谓的三联体-突变。此方法使用不同的核苷酸三联体的混合物,其中每一个编码一种氨基酸,用于并入编码序列中(Virnekäs B 等人(1994) Nucleic Acids Res 22, 5600-5607)。

[0080] 一种可能用于将突变引入各别多肽的选定区域的策略基于使用四个寡核苷酸,其中每一个部分源自要被突变的相应序列区段中的一个。当合成这些寡核苷酸时,本领域技术人员可以利用核酸构筑块的混合物来合成那些对应于要被突变的氨基酸位置的核苷酸三联体,使得随机出现编码所有天然的氨基酸密码子,其最后造成脂质运载蛋白肽文库的产生。例如,在其序列中的第一寡核苷酸对应于(除了突变的位置)在该脂质运载蛋白多肽的最 N 端位置处要被突变的肽区段的编码链。因此,第二寡核苷酸对应于在该多肽序列中后面的第二序列区段的非编码链。第三寡核苷酸依次对应于相应的第三序列区段的编码链。最后,第四寡核苷酸对应于第四序列区段的非编码链。聚合酶链反应可用相应的第一和第二寡核苷酸进行,如果需要,也可分别用相应的第三和第四寡核苷酸进行。

[0081] 这两种反应的扩增产物可以通过各种已知的方法组合为包括来自该第一至第四序列区段的序列的单一核酸,其中在选定的位置处已引入突变。为此,这两种产物均可例

如经受新的聚合酶链反应,其中使用侧翼的寡核苷酸以及一个或多个介体核酸分子,其贡献在第二和第三序列区段之间的序列。在选择用于突变的寡核苷酸序列内的数目和排列方面,本领域技术人员可使用多种替代方案。

[0082] 如上文定义的核酸分子可以通过连接与编码脂质运载蛋白多肽的核酸的缺失的 5'-和 3'-序列和 / 或载体连接,且可以被克隆到已知的宿主生物体重。有许多已建立的程序可用于连接和克隆。例如,也存在于该克隆载体的序列中的限制性内切酶的识别序列可被工程化到合成的寡核苷酸的序列中。因此,在相应的 PCR 产物扩增和酶促切割之后,所得到的片段可以使用相应的识别序列而容易地克隆。

[0083] 在编码选择用于突变的蛋白质的基因内较长的序列区段也可以经由已知方法来经受随机突变,例如,通过使用在增加误差率的条件下进行的聚合酶链反应、通过化学突变或通过使用细菌突变株。这样的方法也可以用于进一步优化脂质运载蛋白突变蛋白的靶标亲和力和特异性。在实验突变的区段以外可能发生的突变通常是被容忍的,或甚至可以证实是有利的,例如如果它们对该脂质运载蛋白突变蛋白的折叠效率或折叠稳定性具有贡献的话。

[0084] 在根据本发明的一个示例性方法中,使编码人类泪液脂质运载蛋白的核酸分子在成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中的一个或多个处经受突变。在一些实施方式中,该核酸分子进一步在该成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的氨基酸序列位置 61、101、111、114 和 153 中的一个或多个处经受突变。

[0085] 在本发明的一个实施方式中,用于产生人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白的方法包括,使成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的氨基酸序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中的任一个的密码子的至少 2、3、4、5、6、8、10、12、14、15、16、或 17 个突变。在一个实施方式中,使成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的氨基酸序列位置 26、27、28、29、30、31、32、33、34、56、57、58、80、83、104、105、106 和 108 的密码子的所有 18 个突变。

[0086] 在本发明的另一个实施方式中,根据本发明的方法包括编码在成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列 (SEQ ID NO:1) 中的位置 61 和 153 处的半胱氨酸的两个密码子的突变。在一个实施方式中,位置 61 被突变为编码丙氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、精氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、脯氨酸或色氨酸残基,仅举出几种可能性而已。在位置 153 被突变的实施方式中,氨基酸例如丝氨酸或丙氨酸可以被引入到位置 153 处。

[0087] 如本文所述,在本发明的另一个实施方式中,编码成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的氨基酸序列位置 111 和 / 或 114 的密码子被突变为编码例如在位置 111 处的精氨酸和在位置 114 处的色氨酸。

[0088] 本发明的方法的另一个实施方式包括编码在成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的位置 101 处的半胱氨酸的密码子的突变,使得该密码子编码任何其他氨基酸。在一个实施方式中,编码位置 101 的突变的密码子编码丝氨酸。因此,在一些实施方式中,在位置 61、101 和 153 处的半胱氨酸密码子中的二个或所有三个均被另一个氨基酸的密码子所替代。

[0089] 根据本发明的方法,脂质运载蛋白突变蛋白的获得开始于编码人类泪液脂质运载

蛋白的核酸分子。这样的核酸分子经受突变,且通过重组 DNA 技术被引入到适当的细菌或真核生物宿主生物体中。使用本领域已知的任何适当的技术可以获得脂质运载蛋白突变蛋白的核酸文库,以产生具有抗体样的特性的脂质运载蛋白突变蛋白,即对给定靶标具有亲和力的突变蛋白。这种组合方法的实例详述于例如, PCT 公开 WO 99/16873、WO 00/75308、WO 03/029471、WO 03/029462、WO 03/029463、WO 2005/019254、WO 2005/019255、WO 2005/019256、或 WO 2006/56464。这些专利申请中的每一个的内容均通过引用全文并入本文中。将经受突变的核酸序列在适当的宿主中表达之后,可以从获得的文库中筛选携带多个相应脂质运载蛋白突变蛋白的基因信息的克隆,所述突变蛋白结合给定靶标。熟知技术可用于筛选这些克隆,例如噬菌体展示(在 Kay, B. K. 等人(1996 年),同上;Lowman, H. B. (1997 年),同上或 Rodi, D. J. 和 Makowski, L. (1999 年),同上中的综述)、菌落筛选(在 Pini, A. 等人(2002) Comb. Chem. High Throughput Screen. 5, 503-510 中的综述)、核糖体展示(在 Amstutz, P. 等人(2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12, 400-405 中的综述)或在 Wilson, D. S. 等人(2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3750-3755 中所报告的 mRNA 展示,或在 WO 99/16873、WO 00/75308、WO 03/029471、WO 03/029462、WO 03/029463、WO 2005/019254、WO 2005/019255、WO 2005/019256、或 WO 2006/56464 中所具体描述的方法。

[0090] 所得到的编码一种或多种本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的核酸分子可使用任何适当的表达系统被表达。获得的一种脂质运载蛋白突变蛋白或多种脂质运载蛋白突变蛋白可以被进一步筛选。筛选可在例如竞争性条件下进行。如本文所用的竞争性条件意为脂质运载蛋白突变蛋白的筛选涵盖至少一个步骤,其中使该脂质运载蛋白突变蛋白和给定的野生型脂质运载蛋白的非天然配体在存在另外的配体的情况下接触,该另外的配体与该突变蛋白竞争与该非天然配体的结合。此另外的配体可为该靶标的生理配体、过量的该靶标本身或该靶标的任何其他非生理配体,其至少结合与本发明的突变蛋白识别的表位重叠的表位,因此干扰该突变蛋白的靶标结合。可替代地,通过将与该突变蛋白的结合位置不同的表位以变构效应复合到该靶标上,该另外的配体竞争该突变蛋白的结合。

[0091] 使用温和的 M13 噬菌体的噬菌体展示技术的一个实施方式(在 Kay, B. K. 等人(1996 年),同上;Lowman, H. B. (1997 年)同上或 Rodi, D. J. 和 Makowski, L. (1999 年)中综述)提供作为可用于本发明的筛选方法的实例。可用来筛选本发明突变蛋白的噬菌体展示技术的另一个实施方式为 Broders 等人所描述的超级噬菌体技术(Broders 等人,(2003) "Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display." Methods Mol. Biol. 205:295-302)。其他温和噬菌体例如 f1 或裂解性噬菌体例如 T7 也可被采用。针对示例性筛选方法,产生 M13 噬菌粒,其允许突变的脂质运载蛋白核酸序列表达为 N 端带有信号序列的融合蛋白,例如 OmpA- 信号序列,且带有该 M13 噬菌体的壳体蛋白 pIII 或其能够在 C 端被并入该噬菌体壳体蛋白的片段。包括野生型序列的氨基酸 217 至 406 的噬菌体壳体蛋白的 C 端片段 Δ pIII 可被用来产生融合蛋白。在一个实施方式中,使用 pIII 的 C 端片段,其中在位置 201 处的半胱氨酸残基丢失或被另一氨基酸所替换。

[0092] 据此,本发明的方法的一个进一步的实施方式包括可操作地融合编码一种或多种脂质运载蛋白突变蛋白的核酸分子,且由突变得到的在 3' 端具有编码 M13 家族的丝状噬菌体的壳体蛋白 pIII 或该壳体蛋白的片段的基因,以便筛选用于与给定配体结合的至少一个突变蛋白。

[0093] 该融合蛋白可包括另外的组分,例如亲和力标签,其允许该融合蛋白或其部分的固定、检测和/或纯化。此外,终止密码子可位于编码该脂质运载蛋白或其突变蛋白的序列区域和该噬菌体壳体基因或其片段之间,其中该终止密码子,例如琥珀终止密码子,在适当抑制株中的翻译过程中至少部分被翻译为氨基酸。

[0094] 例如,该噬菌粒载体 pTLPC27 (参见,例如,PCT 公开 W0 2008/015239 的图 20 和 SEQ ID NO:9),也称为 pTlc27,可被用于制备编码人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白的噬菌粒文库。本发明的编码该泪液脂质运载蛋白突变蛋白的核酸分子可使用二个 BstXI 限制性位点而被插入到该载体中。在连接之后,用所得的核酸混合物转化适当的宿主株例如 E. coli XL1-Blue 以得到大量的独立克隆。如果需要,可产生相应的载体用于制备超级噬菌体文库。

[0095] 所得到的文库接着在液体培养物中用适当的 M13- 辅助噬菌体或超级噬菌体进行超级感染,以便产生功能性噬菌粒。该重组噬菌粒在其表面上展示该脂质运载蛋白突变蛋白,作为与该壳体蛋白 pIII 或其片段的融合物,而该融合蛋白的 N 端信号序列被正常地切除。另一方面,其还带有一个或多个拷贝数的由该辅助噬菌体供应的天然壳体蛋白 pIII,因此能够感染接受者,一般而言为带有 F- 或 F' 质粒的菌株。在超级噬菌体展示的情况下,该超级噬菌体在其表面上展示该脂质运载蛋白突变蛋白,作为与感染性壳体蛋白 pIII 的融合物,但不具有天然的壳体蛋白。在感染辅助噬菌体或超级噬菌体的过程中或之后,可诱导该脂质运载蛋白突变蛋白和该壳体蛋白 pIII 之间的融合蛋白的基因表达,例如通过添加无水四环霉素。选择诱导条件使得获得的噬菌粒的主要部分在其表面上展示至少一个脂质运载蛋白突变蛋白。在超级噬菌体展示的情况下,诱导条件导致带有三至五条由该脂质运载蛋白突变蛋白和该壳体蛋白 pIII 组成的融合蛋白的超级噬菌粒的群。已知各种用于分离噬菌粒的方法,例如用聚乙二醇沉淀。分离通常在培养 6-8 小时之后进行。

[0096] 分离的噬菌粒接着可通过与所需靶标一起培养来经受筛选,其中该靶标以这样的形式呈现,所述形式允许至少暂时固定携带具有所需结合亲和力的突变蛋白作为在其壳体上的融合蛋白的那些噬菌粒。本领域技术人员已知的各种实施方式中,该靶标可例如与载体蛋白例如血清白蛋白缀合,且通过该载体蛋白与蛋白结合表面例如聚苯乙烯结合。适用于 ELISA 技术或所谓的“免疫粘附”的微量滴定板可用于例如固定该靶标。替代性地,也可使用该靶标与其他结合基团例如生物素的缀合物。该靶标接着可以被固定在选择性地结合该基团的表面上,例如微量滴定板或涂覆了链霉亲和素、中性亲和素或抗生物素蛋白的顺磁粒子。如果该靶标与免疫球蛋白的 Fc 部分融合,也可使用例如微量滴定板或涂覆了蛋白 A 或蛋白 G 的顺磁粒子的表面实现固定。

[0097] 呈现于表面上的非特异性噬菌粒结合位置可以用封闭溶液饱和,如已知用于 ELISA 的方法的封闭溶液。然后该噬菌粒一般在存在生理缓冲液的情况下与固定在表面上的靶标接触。未结合的噬菌粒通过多次清洗来移除。留在该表面上的噬菌粒粒子接着被洗脱。若干方法可用于洗脱。例如,该噬菌粒可以通过添加蛋白酶或在存在酸、碱、清洁剂或离液盐或者在适度变性的条件下进行洗脱。一种这样的方法为使用 pH 2.2 的缓冲液洗脱,其中该洗脱液随后被中和。替代性地,可添加不含靶标的溶液以便与该固定的靶标竞争与该噬菌粒的结合,或者靶标特异性的噬菌粒可通过与免疫球蛋白或与目标靶标特异性结合的天然配体蛋白竞争而被洗脱。

[0098] 之后,用洗脱的噬菌粒感染大肠杆菌细胞。替代性地,可从洗脱的噬菌粒中提取核

酸序列,用于序列分析、扩增或以另一种方式转化细胞。从由此方法获得的大肠杆菌克隆开始,新鲜的噬菌粒或超级噬菌粒再次根据上述方法通过用 M13 辅助噬菌体或超级噬菌体超级感染而产生,且以此方法扩增的噬菌粒再次地在固定的靶标上经受筛选。为了获得优化形式的带有本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的噬菌粒,多重筛选周期通常是必要的。在一些实施方式中,选择筛选周期的数目,使得在其后的功能分析中至少 0.1% 的被研究的克隆产生对于给定靶标具有可检测亲和力的突变蛋白。取决于尺寸,即所用的文库的复杂度,一般需要 2 至 8 个周期以达到此目的。

[0099] 针对所筛选的突变蛋白的功能性分析,以得自该筛选周期的噬菌粒感染大肠杆菌菌株,且分离相对应的双股噬菌粒 DNA。由此噬菌粒 DNA 开始,或也由从该噬菌粒提取的单股 DNA 开始,本发明所筛选的突变蛋白的核酸序列可以通过本领域已知的方法来测定,且氨基酸序列可由其推导。突变的区域或整个脂质运载蛋白突变蛋白的序列可被亚克隆到另一个表达载体上,且在适当的宿主生物体中表达。例如,载体 pTlPC26 (如图 9 中的描述所述),也称为 pTlc26,可被用于在大肠杆菌菌株例如 *E. coli* TG1 中表达。由此所产生的脂质运载蛋白突变蛋白可通过各种生物化学方法纯化。例如用 pTlc26 产生的脂质运载蛋白突变蛋白可携带亲和力肽,一种所谓的亲和力标签,例如在其 C 端,且因此可以通过亲和色谱法进行纯化。亲和力标签的实例包括、但不限于生物素、Strep-tag、Strep-tag II (Schmidt 等人,同上)、寡聚组氨酸、聚组氨酸、免疫球蛋白结构域、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 或钙调蛋白结合肽 (CBP)。

[0100] 一些亲和力标签为半抗原,例如但不限于,二硝基酚和地高辛。一些亲和力标签为表位标签,例如 FLAG®-肽 (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Gly)、T7 表位 (Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly)、麦芽糖结合蛋白 (MBP)、单纯疱疹病毒糖蛋白 D 的序列 Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp 的 HSV 表位、序列 Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala 的血凝素 (HA) 表位、水泡性口炎病毒糖蛋白的 VSV-G 表位 (Cys-Tyr-The-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Lys)、序列 Gly-Ala-Pro-Val-Pro-Tyr-Pro-Asp-Pro-Leu-Glu-Pro-Arg 的 E 表位标签、序列 Gly-Val-Ser-Ser-Thr-Ser-Ser-Asp-Phe-Arg-Asp-Arg 的 E2 表位标签、哺乳动物 MAPK/ERK 激酶的 C 端序列 Glu-Glu-Thr-Ala-Arg-Phe-Gln-Pro-Gly-Tyr-Arg-Ser 的 Tag-100 表位标签、序列 Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser 的 S-标签、转录因子 c-myc 的序列 Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu 的“myc”表位和猿猴病毒 5 的副粘病毒的 P 和 V 蛋白上存在的小 V5 表位 (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr)。此外,但一般不作为单一标签,可使用增加可溶性的标签例如 NusA、硫氧还原蛋白 (TRX)、小泛素样修饰剂 (SUMO) 和泛素 (Ub)。半抗原和表位标签可与对应抗体或抗体样的蛋白质性分子组合使用作为结合配偶体。序列 Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser 的 S-肽表位可被用作与相应抗体结合或与 S-蛋白组合的表位标签作为结合配偶体 (Hackbarth, JS, 等人, BioTechniques (2004) 37, 5, 835-839)。

[0101] 筛选也可以其他方式进行。许多相应的实施方式是本领域技术人员已知的,或描述于文献中。此外,可应用方法的组合。例如,筛选的或至少通过“噬菌体展示”富集的克隆可另外进行“菌落筛选”。此操作程序的优点为可以关于对于靶标具有可检测结合亲和力的突变蛋白的产生直接分离处的个别克隆。

[0102] 除了使用大肠杆菌作为在“噬菌体展示”技术或“菌落筛选”方法中的宿主生物体之外,其他细菌菌株、酵母或昆虫细胞或哺乳动物细胞也可被用于此目的。为了进一步从如上所述的随机文库中筛选脂质运载蛋白突变蛋白,还可应用包括限制突变的演进的方法,以便在重复筛选周期之后关于对于靶标的亲和力或特异性优化已经对于该靶标具有某些结合活性的突变蛋白。

[0103] 对技术人员而言很明显的是,复合物形成取决于许多因素,例如结合配偶体的浓度、竞争者的存在、缓冲系统的离子强度等。筛选和富集一般在允许分离脂质运载蛋白突变蛋白的条件下进行,所述脂质运载蛋白突变蛋白在与所需靶标复合的情况下,具有至少200nM的解离常数。然而,洗涤和洗脱步骤可在不同的严格度下进行。关于该动力学特性的筛选也是可能的。例如,筛选可在有利于该靶标与突变蛋白形成复合物的条件下进行,所述突变蛋白显示出从该靶标缓慢解离,或换句话说具有低 k_{off} 速率。可选地,筛选可在有利于突变蛋白与靶标之间复合物的快速形成或换句话说具有高 k_{on} 速率的条件下进行。作为进一步示例性的替代方法,筛选可在筛选突变蛋白的改进的热稳定性(与野生型脂质运载蛋白或已对预先筛选的靶标具有亲和力的突变蛋白相比较)的条件下进行。

[0104] 一旦已经筛选出对给定靶标具有亲和力的脂质运载蛋白突变蛋白,另外也可以使这样的突变蛋白进行另一次突变,以便随后筛选具有甚至更高亲和力的变体或具有改进特性的变体,例如更高的热稳定性、改进的血清稳定性、热力学稳定性、改进的溶解度、改进的单体行为、改进的热变性抗性、化学变性抗性、蛋白水解抗性 or 清洁剂抗性等。此进一步的突变,其中在目标为更高亲和力可被视为体外“亲和力成熟”的情况下,可通过基于合理设计的位置特异性突变或随机突变来实现。用于获得更高亲和力或改进的特性的另一可能方法为使用易错 PCR,其造成在脂质运载蛋白突变蛋白的序列位置的选定范围内的点突变。易错 PCR 可根据任何已知的实验方法来进行,例如由 Zacco 等人, (1996) J. Mol. Biol. 255, 589-603 中所描述的。适用于此目的的随机突变的其他方法包括如 Murakami, H. 等人 (2002) Nat. Biotechnol. 20, 76-81 所述的随机插入 / 缺失突变,或者如 Bittker, J. A. 等人 (2002) Nat. Biotechnol. 20, 1024-1029 所述的非同源随机重组 (NRR)。如果需要的话,亲和力突变还可根据 WO 00/75308 或 Schlehuber, S. 等人 (2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120 中所描述的操作程序进行,其中获得对地高辛具有高亲和力的胆色素结合蛋白的突变蛋白。

[0105] 在这方面,对技术人员而言很清楚的是,亲和力的 K_D 值(在各突变蛋白与其配体之间形成的复合物的解离常数)可在某个实验范围内变化,取决于用于测定特定脂质运载蛋白突变蛋白对于给定配体的亲和力的方法和实验设置。这表示,例如取决于该 K_D 值是通过表面等离子体共振 (Biacore) 还是通过竞争性 ELISA 测定,在测得的 K_D 值中可能有轻微的偏差或容忍范围。

[0106] 另外也包括在本发明的范围中的是上述突变蛋白的形式,其中个别突变蛋白关于其潜在的免疫性已被改变或修饰。

[0107] 细胞毒性 T- 细胞识别在与 I 类主要组织相容性复合物 (MHC) 分子相关的抗原呈递细胞的细胞表面上的肽抗原。该肽与 MHC 分子结合的能力是等位基因特异的,且与其免疫原性相关。为了减少给定蛋白质的免疫原性,预测在蛋白质中的哪些肽具有与给定的 MHC 分子结合的潜力的能力是很有价值的。采用计算线程方式以确认潜在的 T- 细胞表位的

方法在先前已被描述,以预测给定的肽序列与 MHC I 类分子的结合 (Altuvia 等人 (1995) J. Mol. Biol. 249, 244-250)。

[0108] 这种方法也可用于鉴别在本发明的突变蛋白中的潜在的 T 细胞表位,并取决于其预期用途,基于其预测的免疫原性利用特定突变蛋白的筛选。还可以进一步使已预测含有 T 细胞表位的肽区域经受另外的突变,以减少或消除这些 T 细胞表位,从而使免疫原性最小化。已描述了将双性表位从基因工程改造的抗体中移除 (Mateo 等人 (2000) Hybridoma 19, 6, 463-471), 且可适用于本发明的突变蛋白。

[0109] 由此获得的突变蛋白可具有最小化的免疫原性,这对于将它们用于例如下文所述的那些的治疗和诊断应用中是所期望的。

[0110] 对于本文所公开的脂质运载蛋白突变蛋白的若干应用,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可与部分例如在其 N 端或其 C 端融合,所述部分可为蛋白质、蛋白区域或肽,例如信号序列和 / 或亲和力标签。

[0111] 亲和力标签,如 Strep-tag[®] 或 Strep-tag[®] II (Schmidt, T. G. M. 等人 (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766)、myc- 标签、FLAG- 标签、His6- 标签或 HA- 标签或蛋白质例如谷胱甘肽-S- 转移酶,也允许容易地检测和 / 或纯化重组蛋白,是适合的融合配偶体的进一步实例。最后,具有生色或荧光特性的蛋白,如绿色荧光蛋白 (GFP) 或黄色荧光蛋白 (YFP) 也是适合于本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的融合配偶体。例如,当用于下文实施例中所述的实验时,本文所公开的脂质运载蛋白突变蛋白携带由 10 个氨基酸 (SAWSHPQFEK) 组成的 C 端 Strep-Tag[®] II 纯化标签 (IBA GmbH)。

[0112] 对于一些应用,以标记的形式采用本发明的突变蛋白也是有用的。相应地,本发明还涉及与选自下述的标记部分缀合的脂质运载蛋白突变蛋白:酶标记、放射性标记、有色标记、荧光标记、生色标记、发光标记、半抗原、地高辛、生物素、金属复合物、金属、胶体金。该突变蛋白还可与低分子量的有机化合物缀合。如本文所用,术语“低分子量的有机化合物”意指单体碳基化合物,其可具有脂肪族、脂环族和 / 或芳香族部分。在典型的实施方式中,该低分子量的有机化合物为具有至少二个碳原子的主链的有机化合物,且在一些实施方式中不超过 7 或 12 个可旋转的碳键。这样的化合物的分子量在约 100 至约 2000 道尔顿、例如约 100 至约 1000 道尔顿的范围内。其可任选地包括一个或二个金属原子。

[0113] 一般而言,可以用任何合适的化学物质或酶标记脂质运载蛋白突变蛋白,所述化学物质或酶以化学、物理、光学或酶促反应直接或间接产生可检测的化合物或信号。用于物理反应且同时用于光学反应 / 标记物的一个实例为经照射发射荧光,或当使用放射性标记时,发射 x- 射线。碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶和 β - 半乳糖苷酶为酶标记的实例 (且同时为光学标记),其催化生色反应产物的形成。一般而言,通常用于抗体的所有标记 (那些专门用于免疫球蛋白的 Fc 部分内的糖部分的除外),也可用于与本发明的突变蛋白缀合。本发明的突变蛋白也可以与任何合适的治疗活性剂缀合,例如,用于将这些试剂靶向性地递送到给定的细胞、组织、器官,或者用于选择性靶向细胞,例如,在不影响周围正常细胞的情况下靶向肿瘤细胞。这样的治疗活性剂的实例包括放射性核素、毒素、有机小分子和治疗性肽 (例如作为细胞表面受体的激动剂 / 拮抗剂的肽,或者竞争在给定靶标上的蛋白结合位点的肽)。然而,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白也可以与治疗活性核酸分子缀合,所述

核酸分子例如反义核酸分子、小干扰 RNA、微小 RNA 或核糖酶。这样的缀合物可通过本领域熟知的方法产生。

[0114] 在一个实施方式中,本发明的突变蛋白也可以被耦合到部分,所述部分可靶向受试者体内的特定身体区域、生物体、组织、器官或细胞,以便将本发明的突变蛋白递送到此受试者的所需身体区域、生物体、组织、器官或细胞中。其中可能需要这样的修改的一个实例是血脑屏障的穿越。为了穿越血脑屏障,本发明的突变蛋白可以耦合至有助于穿越此屏障的主动转运的部分(参见 Gaillard PJ 等人, *Diphtheria-toxin receptor-targeted brain drug delivery*. International Congress Series, 2005:1277, 185-198 或 Gaillard PJ 等人 *Targeted delivery across the blood-brain barrier*. Expert Opin Drug Deliv. 2005;2, 299-309)。这样的蛋白部分例如以商品名 2B-Trans™ 可得(至 BBB technologies BV, Leiden, NL)。

[0115] 如上所指出的,在一些实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可以与可延长该突变蛋白的血清半衰期的部分缀合(此方面也参见 PCT 公开 WO 2006/56464, 其中这样的缀合策略参考对于 CTLA-4 具有结合亲和力的人类嗜中性粒细胞明胶酶相关的脂质运载蛋白突变蛋白进行描述)。在本说明书中使用时,术语“缀合物”或“缀合”包括将部分通过化学试剂连接到脂质运载蛋白突变蛋白,所述化学试剂例如交联剂或是将部分耦合到氨基酸等的侧基团的试剂。此外,当用于本文时,该术语应理解为包括将部分通过形成共价键在任一端基因融合至脂质运载蛋白突变蛋白,例如通过翻译方式将可延长半衰期的部分融合至脂质运载蛋白突变蛋白。技术人员将从使用所述术语的上下文理解到,化学试剂是否用于缀合,或者翻译方式的融合是否意为通过遗传工程来实现。延长血清半衰期的部分可以是聚亚烷基二醇分子、羟乙基淀粉、脂肪酸分子例如棕榈酸 (Vajo 和 Duckworth (2000) *Pharmacol. Rev.* 52, 1-9)、免疫球蛋白的 Fc 部分、免疫球蛋白的 CH3 结构域、免疫球蛋白的 CH4 结构域、白蛋白或其片段、白蛋白结合肽或白蛋白结合蛋白、转铁蛋白,仅举几个例子而已。该白蛋白结合蛋白可为细菌白蛋白结合蛋白、白蛋白结合肽、工程化的白蛋白结合多肽、抗体、包括结构域抗体的抗体片段(参见例如美国专利 6,696,245)或对于白蛋白具有结合活性的脂质运载蛋白突变蛋白。相应地,用于延长本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的半衰期的适合的缀合配偶体包括白蛋白 (Osborn, BL 等人 (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 540-548), 或白蛋白结合蛋白,例如,细菌白蛋白结合结构域,如链球菌 G 蛋白的结构域 (König T. 和 Skerra A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-83)。可被用作缀合配偶体的白蛋白结合肽的实例为例如具有 Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys 共有序列的那些,其中 Xaa₁ 是 Asp、Asn、Ser、Thr、或 Trp; Xaa₂ 是 Asn、Gln、His、Ile、Leu、或 Lys; Xaa₃ 是 Ala、Asp、Phe、Trp、或 Tyr; Xaa₄ 是 Asp、Gly、Leu、Phe、Ser、或 Thr, 如美国专利申请 2003/0069395 或 Dennis 等人 (Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 35035-35043) 中所述。

[0116] 链球菌 G 蛋白 (SpG) 为存在于某些链球菌菌株表面上的双官能受体,能够与 IgG 和血清白蛋白二者结合 (Bjorck 等人, *Mol Immunol* 24:1113, 1987)。该结构以若干结构和功能上不同的结构域高度重复 (Guss 等人, *EMBO J* 5:1567, 1986), 更确切地说,是三个 Ig 结合结构域和三个血清白蛋白结合结构域 (Olsson 等人, *Eur J Biochem* 168:319, 1987)。在 SpG 中该三个血清白蛋白结合结构域之一的结构已被确定,显示三螺旋束折叠 (Kraulis

等人, FEBS Lett 378:190, 1996; Johansson 等人, J. Biol. Chem. 277:8114-20, 2002)。46 个氨基酸基序被定义为 ABD(白蛋白结合结构域), 随后也被命名为 G148-GA(GA 为 G 蛋白相关的白蛋白结合)。例如, 在 PCT 公开 W02009/016043 中公开了该 46 个氨基酸基序 ABD 的白蛋白结合变体。

[0117] 除了在 G 蛋白中的那些结构域之外, 其它细菌白蛋白结合结构域也已确定, 其中一些在结构上类似于 G 蛋白的那些结构域。含有这样的白蛋白结合结构域的蛋白质的实例为 PAB、PPL、MAG 和 ZAG 蛋白 (Rozak 等人, Biochemistry 45:3263-3271, 2006)。这样的白蛋白结合结构域的结构和功能的研究已经进行, 如由 Johansson 及其同事所报道 (Johansson 等人, J Mol Biol 266:859-865, 1997)。此外, Rozak 等人报道了 G148-GA3 的人工变体的创造, 其被筛选并关于不同的物种特异性和稳定性进行了研究 (Rozak 等人, Biochemistry 45:3263-3271, 2006), 而 Jonsson 等人开发了对于人类血清白蛋白具有非常大改进的亲力的 G148-GA3 人工变体 (Jonsson 等人, Prot Eng Des Sel 21:515-27, 2008)。对于一些变体而言, 实现更高的亲和力的代价是降低热稳定性。

[0118] 除了上述含有该三螺旋的蛋白质之外, 也有其他结合白蛋白的不相关的细菌蛋白质。

[0119] 最近, 在链球菌 G 蛋白菌株 148 (G148) 的白蛋白结合区域内实验性地鉴别出一些 T 和 B 细胞表位 (Goetsch 等人, Clin Diagn Lab Immunol 10:125-32, 2003)。该研究的作者将 G148 的 T 细胞表位用于疫苗中有兴趣, 即利用该白蛋白结合区域的固有的免疫刺激特性。Goetsch 等人还发现了 B 细胞表位, 即在免疫后在 G148 的序列中被抗体结合的区域。

[0120] 然而, 在用于人类施用的药物组合物中, 需要的是无免疫反应。因此, 该白蛋白结合结构域 G148 由于其上述免疫刺激特性而由此不适合用于此类组合物中。这些缺点和缺陷可由例如在 PCT 公开 W02012/004384 中公开的工程化的白蛋白结合多肽克服或减缓, 所述 PCT 公开通过引用全文并入本文。

[0121] 在这方面, 本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可与白蛋白结合蛋白缀合, 其经由一个或多个肽键连接物, 例如 GGG 与 KLGGGG 作为非限制实例, 与人类血清白蛋白 (“HAS”) 结合。在一些实施方式中, 该白蛋白结合蛋白可以是白蛋白结合结构域, 例如链球菌 G 蛋白菌株 148 (G148)。在一些其他实施方式中, 白蛋白结合蛋白可以是工程化的白蛋白结合多肽。例如, 该白蛋白结合多肽可以具有包含 SEQ ID NO:85 的氨基酸序列。SEQ ID NO:85 的白蛋白结合多肽在一些实施方式中可因此具有另外的氨基酸残基, 其附着在任一末端, 如三个氨基酸 KLN。在这方面, 本发明提供了示例性的缀合脂质运载蛋白突变蛋白, 其包含如 SEQ ID NO:83-84 中任一个所示的氨基酸序列。

[0122] 在其它实施方式中, 白蛋白本身或白蛋白的生物活性片段可以用作本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的结合配偶体。术语“白蛋白”包括所有哺乳动物白蛋白, 例如人类血清白蛋白 (“HAS”) 或牛血清白蛋白或大鼠白蛋白。白蛋白或其片段可以重组方式产生, 如美国专利 5,728,553 或欧洲专利申请 EP 0 330 451 和 EP 0 361 991 中所描述的。作为代表性的实例, 重组人类白蛋白 (**Recombunin®**) Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK) 可与脂质运载蛋白突变蛋白缀合或融合以延长该突变蛋白的半衰期。

[0123] 如果白蛋白结合蛋白是抗体片段, 其也可以是结构域抗体。工程化结构域抗体以允许精确地控制生物物理特性和体内半衰期, 从而建立最佳的安全性和有效性的产品概

况。结构域抗体例如从 Domantis Ltd (Cambridge, UK and MA, USA) 商购得到。

[0124] 使用转铁蛋白作为部分来延长本发明的突变蛋白的血清半衰期,该突变蛋白可以基因融合至非糖基化转铁蛋白的 N 或 C 端或两端。非糖基化转铁蛋白具有 14-17 天的半衰期,且转铁蛋白的融合蛋白也将类似地具有延长的半衰期。转铁蛋白载体也提供高生物利用度、生物分布和循环稳定性。此技术可从 BioRexis 商购得到 (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA)。作为蛋白质稳定剂 / 半衰期延长配偶体的重组人类转铁蛋白 (DeltaFerrin™) 也可从 Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK) 商购得到。

[0125] 如果免疫球蛋白的 Fc 部分被用于延长本发明的突变蛋白的血清半衰期的目的,则可使用可从 Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, USA) 商购得到的 SynFusion™ 技术。使用此 Fc 融合技术允许产生长效生物药物,且可例如由连接到抗体的 Fc 区的突变蛋白的两个拷贝组成,以提高药物动力学、溶解度和生产效率。

[0126] 然而,延长本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的半衰期的另一替代方案为将长的、非结构化的、柔性的富含甘氨酸的序列 (例如,具有约 20 至 80 个连续甘氨酸残基的聚甘氨酸) 融合至本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的 N 或 C 端。此方法公开于例如 W02007/038619 中,也称为术语“rPEG”(重组 PEG)。

[0127] 如果聚亚烷基二醇分子被用于延长本发明的突变蛋白的血清半衰期的目的,则聚亚烷基二醇可为被取代、未被取代、直链或支链的。它也可以是活化的聚亚烷基衍生物。合适的化合物的实例为聚乙二醇 (PEG) 分子或其活化的衍生物,如在 W0 99/64016、美国专利 6,177,074 或美国专利 6,403,564 中有关干扰素所描述的,或如对于例如经 PEG 修饰的天冬酰胺酶、PEG-腺苷脱氨酶 (PEG-ADA) 或 PEG-超氧化物歧化酶 (参见例如, Fuertges 等人 (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11, 139-148) 的蛋白质所描述的。这样的聚合物 (例如聚乙二醇) 的分子量可为约 300 至约 70000 道尔顿,包括例如,具有约 10,000、约 20,000、约 30,000 或约 40000 道尔顿的分子量的聚乙二醇。此外,由于例如在美国专利 6,500,930 或 6,620,413 中所述,碳水化合物寡聚物与聚合物,如淀粉或羟乙基淀粉 (HES),可与本发明的突变蛋白缀合以实现延长血清半衰期的目的。在一些进一步的实施方式中,为了延长本发明的突变蛋白的血清半衰期,建议使用 PEG30 或 PEG40,其在动物 / 人类可进行不同于较短的 PEG 的正常肾过滤,因为 PEG12 或 PEG20 的更快消除可限制本发明的 PEG 缀合的脂质运载蛋白突变蛋白 (聚乙二醇化) 的效力和持续时间。在这方面,本发明提供了示例性的可与 PEG 缀合的如 SEQ ID NO:30-32 所示的脂质运载蛋白突变蛋白。

[0128] 在另一个实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可与一个或多个部分融合,所述部分可给该融合物赋予新特性,例如酶促活性或对于其它分子的结合亲和力。这类合适的部分的实例为碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、谷胱甘肽-S-转移酶、G 蛋白的白蛋白结合结构域、蛋白 A、抗体片段、寡聚化结构域、具有相同或不同结合特异性的脂质运载蛋白突变蛋白 (其导致形成“Duocalins”,参见 Schlehuber S. 和 Skerra A. (2001 年), Duocalins,源自自脂质运载蛋白折叠的具有双特异性的工程化的配体结合蛋白, Biol. Chem. 382, 1335-1342) 或毒素。

[0129] 特别是,可将本发明的脂质运载蛋白突变蛋白与单独的酶活性位点融合,使得产生的融合物的两个“部件”可以一起作用于给定的治疗靶标上。例如,当融合在一起时,脂

质运载蛋白突变蛋白的结合结构域可附着于致病靶标上,由此允许该酶结构域消除该靶标的生物学功能。

[0130] 如果上述部分之一与本发明的人类泪液脂质运载蛋白突变蛋白缀合时,缀合至氨基酸侧链可以是有利的。合适的氨基酸侧链可以天然存在于人类泪液脂质运载蛋白的氨基酸序列中,或可通过突变将其引入。在合适的结合位置经由突变被引入的情况下,一种可能性是在适当的位置上将氨基酸替换为半胱氨酸残基。在一个实施方式中,这样的突变包括 Thr 40 → Cys、Glu 73 → Cys、Arg 90 → Cys、Asp 95 → Cys 或 Glu 131 → Cys 置换中的至少一个。在这些位置中任一个处的新产生的半胱氨酸残基可在以下被用于将突变蛋白与延长该突变蛋白的血清半衰期的部分缀合,所述部分例如 PEG 或其活化的衍生物。

[0131] 在另一个实施方式中,为了提供合适的氨基酸侧链以将上述部分之一与本发明的突变蛋白缀合,可以通过突变引入人工氨基酸。一般而言,这样的人工氨基酸被设计成更具反应性,从而有助于与所需的部分缀合。这种可经由人工 tRNA 引入的人工氨基酸的一个实例为对乙酰基-苯丙氨酸。

[0132] 在一些实施方式中,根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可包含信号序列。在多肽的 N 端的信号序列将这个多肽引导至特定的细胞腔室,例如大肠杆菌的周质或真核细胞的内质网。本领域已知大量信号序列。用于使多肽分泌到大肠杆菌的周质中的示例性信号序列为 OmpA- 信号序列。

[0133] 本发明还涉及包括编码如本文所述的突变蛋白的核苷酸序列的核酸分子 (DNA 和 RNA)。由于遗传密码子的简并性允许某些密码子被其他指定相同氨基酸的密码子所置换,本发明并不限于编码本发明的突变蛋白的特定核酸分子,而是涵盖包含编码功能性突变蛋白的核苷酸序列的所有核酸分子。在这方面,本发明提供编码本发明的某些脂质运载蛋白突变蛋白的核酸序列 (如 SEQ ID NO:36-61、72-81 和 86-89 所示)。

[0134] 因此,本发明包括编码根据本发明的突变蛋白的核酸序列,其具有在成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的氨基酸序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中的至少一个密码子处的突变,其中编码在该成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的序列位置 61 与 153 处的半胱氨酸残基的至少一个的密码子已被突变为编码任何其他氨基酸残基。在一些进一步的实施方式中,编码根据本发明的突变蛋白的核酸序列具有在该成熟人类泪液脂质运载蛋白的线性多肽序列的氨基酸序列位置 79、92 和 105 中的任一位置上的至少一个密码子处的突变。

[0135] 如本文所公开的内容也包括编码本发明的泪液脂质运载蛋白突变蛋白的核酸分子,其包括实验突变的所指示的序列位置之外的另外的突变。这种突变通常可被容忍,或者甚至被证明是有利的,例如,如果它们对于该突变蛋白的改进的折叠效率、血清稳定性、热稳定性或配体结合亲和力具有贡献的话。

[0136] 在本申请中所公开的核酸分子可被“可操作地连接”至一个或多个调控序列,以允许表达该核酸分子。

[0137] 如果核酸分子如 DNA 包括含有关于转录和 / 或翻译调控的序列元件,且这样的序列被“可操作地连接”至编码多肽的核苷酸序列,则该核酸分子被称为“能够表达核酸分子”或者能够“允许表达核酸分子”。可操作的连接为这样的连接,其中调节序列元件与要表达的序列以使基因能够表达的方式连接。基因表达所需的调节区域的确切性质在不同物种之

间可有所不同,但一般而言,这些区域包括启动子,其在原核生物中包含启动子本身,即指导转录启动的 DNA 分子;以及 DNA 元件,其当转录成 RNA 时,将发出翻译起始的信号。这样的启动子区域通常包括涉及转录和翻译起始的 5' 非编码序列,如 -35/-10 盒和在原核生物中的 Shine-Dalgarno 元件或在真核生物中的 TATA 盒、CAAT 序列以及 5' - 加帽元件。这些区域还可以包括增强子或抑制子元件,以及用于将天然多肽靶向到宿主细胞的特定腔室的翻译信号和前导序列。

[0138] 此外,3' 端非编码序列可以含有参与转录终止、聚腺苷酸化等等的调控元件。然而,如果这些终止序列不在特定宿主细胞中具有令人满意的功能,那么它们可以被替换为在该细胞中具有功能的信号。

[0139] 因此,本发明的核酸分子可以包括调节序列,如启动子序列。在一些实施方式中,本发明的核酸分子包括启动子序列和转录终止序列。合适的原核启动子为,例如,tet 启动子、lacUV5 启动子或 T7 启动子。在真核细胞中表达用的启动子的实例为 SV40 启动子或 CMV 启动子。

[0140] 本发明的核酸分子也可以是载体或任何其他类型的克隆载体如质粒、噬菌粒、噬菌体、杆状病毒、粘粒或人工染色体的一部分。

[0141] 在一个实施方式中,该核酸分子包含在噬菌粒中。噬菌粒载体是指编码温和噬菌体(如 M13 或 f1)或其与目标 cDNA 融合的功能部分的基因间区域的载体。在用这样的噬菌粒载体和适当的辅助噬菌体(例如 M13K07、VCS-M13 或 R408)超感染细菌宿主细胞之后,产生完整的噬菌体粒子,由此使编码的异源 cDNA 与其展示于该噬菌体表面上的相应多肽进行物理耦合(参见例如,Lowman, H. B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 401-424, 或 Rodi, D. J., 和 Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87-93)。

[0142] 除了上述的调控序列和编码本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的核酸序列之外,这样的克隆载体可包括源自与用于表达的宿主细胞相容的物种的复制和控制序列以及在转化或转染的细胞上赋予可选择表型的筛选标记物。大量合适的克隆载体是本领域已知的,并且可商购获得。

[0143] 编码本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的 DNA 分子,特别是含有这样的脂质运载蛋白突变蛋白的编码序列的克隆载体可被转化到能够表达该基因的宿主细胞中。转化可通过使用标准技术进行。因此,本发明还涉及包含如本文所公开的核酸分子的宿主细胞。

[0144] 转化的宿主细胞在适用于表达编码本发明的融合蛋白的核苷酸序列的条件下培养。合适的宿主细胞可以是原核细胞,如大肠杆菌 (*E. Coli*) 或枯草芽孢杆菌,或真核细胞,例如酿酒酵母、毕赤酵母、SF9 或 High5 昆虫细胞、永生化的哺乳动物细胞系(如 HeLa 细胞或 CHO 细胞)或初代哺乳动物细胞。

[0145] 本发明还涉及一种用于产生本发明的突变蛋白的方法,其中该突变蛋白、该突变蛋白的片段或该突变蛋白和另一个多肽的融合蛋白,通过遗传工程方法从编码该突变蛋白的核酸开始产生。该方法可以在体内进行,该突变蛋白可以例如在细菌或真核宿主生物体中产生,然后从该宿主生物体或其培养物中分离。还可以例如通过使用体外翻译系统而在体外产生蛋白。

[0146] 当在体内产生该突变蛋白时,编码本发明的突变蛋白的核酸通过重组 DNA 技术

(如上面已经概述的)被引入适合的细菌或真核宿主生物体中。为了这个目的,该宿主细胞首先使用已建立的标准方法,用含有编码本发明的突变蛋白的核酸分子的克隆载体进行转化。该宿主细胞接着在允许异源 DNA 表达的条件下培养,因此合成相应的多肽。随后,从细胞或从培养基中回收该多肽。

[0147] 在本发明的一些泪液脂质运载蛋白突变蛋白中,在 Cys 61 与 Cys 153 之间天然存在的二硫键被移除。相应地,这样的突变蛋白(或任何其它不包含分子内二硫键的泪液脂质运载蛋白突变蛋白)可以在具有还原氧化环境的细胞隔间中产生,例如,在革兰氏阴性菌的细胞质中。在本发明的脂质运载蛋白突变蛋白含有分子内二硫键的情况下,可期望使用适当的信号序列将新生的多肽引导到具有氧化还原环境的细胞隔间中。这种氧化环境可由革兰氏阴性菌如大肠杆菌的周质、在革兰氏阳性细菌的细胞外环境或在真核细胞的内质网的内腔中提供,并且通常有利于结构的二硫键的形成。然而,也可在宿主细胞例如大肠杆菌的细胞溶质中产生本发明的突变蛋白。在这种情况下,该多肽可以直接以可溶状态且折叠状态获得,或者以包涵体的形式回收,随后在体外复性。另一种选择是使用具有氧化细胞内环境的特定宿主菌株,其因此可在细胞溶质中形成二硫键(Venturi M 等人(2002) J. Mol. Biol. 315, 1-6)。

[0148] 然而,并不一定仅通过使用基因工程技术来产生或制造本发明的脂质运载蛋白突变蛋白。而是,脂质运载蛋白突变蛋白也可通过化学合成、如 Merrifield 固相多肽合成法或通过体外转录和翻译而获得。例如,可以使用分子建模来鉴别有希望的突变,然后在体外合成所要的(设计的)多肽,并调查其对于给定靶标的结合活性。蛋白质的固相和/或液相合成的方法是本领域熟知的(参见例如 Bruckdorfer T. 等人(2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43)。

[0149] 在另一个实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可使用本领域技术人员已知的充分建立的方法通过体外转录/翻译产生。

[0150] 由上面的公开显而易见的,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白或其融合蛋白或缀合物可以用于许多应用中。一般而言,本文所公开的突变蛋白及其衍生物可以因此类似于抗体或其片段用于许多领域中。因此,在医学中存在本发明的突变蛋白的众多可能的应用。

[0151] 例如,本发明涵盖本发明的一种或多种脂质运载蛋白突变蛋白或一种或多种包含这种突变蛋白的组合物用于在受试者中结合 PCSK9 和/或在受试者中抑制 PCSK9 与低密度脂蛋白受体(LDL-R)的结合的用途。在一些实施方式中,这种用途包括给该受试者施用有效量的本发明的一种或多种突变蛋白或一种或多种包含这种突变蛋白的组合物。在这方面,本申请还公开了结合 PCSK9 以及在受试者中抑制 PCSK9 与 LDL-R 的结合的方法,包括给该受试者施用有效量的本发明的一种或多种脂质运载蛋白突变蛋白或一种或多种包含这种突变蛋白的组合物。

[0152] 在本发明的另一方面,本发明涉及本发明的脂质运载蛋白突变蛋白用于与 PCSK9 形成复合物的用途。在这方面,还应该指出,各个突变蛋白和其配体之间的复合物的形成受到许多不同的因素影响,例如各自的结合配偶体的浓度、竞争者的存在、所用的缓冲系统的 pH 和离子强度和用于测定 K_D 的实验方法(例如荧光滴定、竞争性 ELISA 或表面等离子体共振,仅举几例),或者甚至是用于评估实验数据的数学算法。

[0153] 在一些实施方式中,本文所公开的本发明脂质运载蛋白突变蛋白可用于检测

PCSK9。这样的用途可包括下述步骤：在合适的条件下使该突变蛋白与疑似含有给定配体的样品接触，由此允许在该突变蛋白与该给定配体之间形成复合物，并且通过合适的信号检测复合的突变蛋白。

[0154] 该可检测的信号可通过标记而引起，如上所解释地，或通过由于结合、即该复合物形成本身而造成的物理性质的改变而引起。一个实例为表面等离子体共振，其值在结合配偶体的结合期间改变，其中一个固定在表面例如金箔上。

[0155] 另一方面，本发明提供了包含本发明的至少一种突变蛋白的试剂盒，该试剂盒还包含用于使用该试剂盒的一个或多个说明书。

[0156] 在一些实施方式中，该试剂盒进一步包括与其一体的或作为一个或多个单独文件的关于内容或该试剂盒和本发明的一种或多种突变蛋白的使用的信息。该试剂盒可包括本发明的一种或多种突变蛋白，其在稀释剂中配制以用于重构。这样的稀释剂，例如无菌稀释剂，也可包括在该试剂盒中，例如在容器内。

[0157] 本文所公开的脂质运载蛋白突变蛋白也可用于 PCSK9 的分离。这样的用途可包括下述步骤：在适合的条件下使该突变蛋白与应该含有所述配体的样品接触，由此允许在该突变蛋白与该配体之间形成复合物，并且从该样品分离该突变蛋白 / 配体复合物。

[0158] 在将本发明的突变蛋白用于检测 PCSK9 以及分离 PCSK9 的用途中，该突变蛋白和 / 或 PCSK9 可被固定在合适的固相上。

[0159] 在一些实施方式中，本发明的一种或多种脂质运载蛋白突变蛋白也可用于将化合物靶向至要用该化合物处理的预选的生物体、组织、器官或细胞，其中 PCSK9 存在于这样的生物体、组织、器官或细胞中。对于这样的目的，该突变蛋白与目标化合物接触以便允许复合物形成。然后，包括该突变蛋白和目标化合物的复合物被递送到该预选的生物体、组织、器官或细胞。这种使用特别合适于、但并不限于，将药物（选择性地）递送到预选的生物体、组织、器官或细胞，例如受感染的身体部位，其应该要用该药物治疗。除了在突变蛋白与目标化合物之间形成复合物之外，该突变蛋白还可以与给定化合物反应，以得到突变蛋白和化合物的缀合物。类似于上述复合物，这种缀合物可以适合于将该化合物递送至预选的生物体、组织、器官或细胞。这种突变蛋白和化合物的缀合物还可以包括将突变蛋白和化合物彼此共价连接的连接物。任选地，这样的连接物在血流中是稳定的，但在细胞环境中是可切割的。

[0160] 对本领域技术人员而言，经审查以下的实施例及其附图（其并非意图用于限制），本发明的另外的目的、优点和特征将变得显而易见。因此，应当理解的是，虽然本发明通过示例性实施方式以及任选的特征进行特定的公开，但本领域技术人员可以追求本文所公开于其中的公开内容的修改以及变化，且这样的修改及变化被认为是在本发明的范围内。

[0161] 实施例

[0162] 实施例 1：重组人类 PCSK9 和人类 PCSK9 突变体的产生和表征

[0163] 在转染的 HEK293F 细胞中表达包含 C 端 FLAG 标签的人类 PCSK9 (SEQ ID NO:34)。将 600ml 转染的细胞培养于 DMEM/TS/0.05% BSA 中 6 天，回收含有 hPCSK9 的上清液。hPCSK9 与 FLAG M2 树脂结合，用 50CV 洗涤缓冲液 (10mM Tris/HCL pH7.4, 150mM NaCl, 2mM CaCl₂, 10% 甘油) 洗涤，并用含有 100 μg/ml 3×FLAG 肽的 5CV 洗涤缓冲液洗脱。洗脱的蛋白经由使用 Superdex 20016/60 柱子 (GE Healthcare) 的凝胶过滤进一步纯化。使用 HepG2 细

胞用 LDL-R 细胞 ELISA 进行功能测试。

[0164] 为了目标脂质运载蛋白突变蛋白的选择与筛选, hPCSK9 可被生物素化。在室温下用 5 倍摩尔过量的 EZ-Link NHS- 显色生物素试剂 (Thermo Scientific 公司) 培养 hPCSK9 1 小时。去除过量的生物素, 通过超过滤浓缩被生物素化的蛋白质。Streptacin 下拉测定 (pull-down assay) 确定生物素化。

[0165] 以相同方法产生并表征获得的功能性 hPCSK9_D374Y 突变体、食蟹猕猴 PCSK9 和小鼠 PCSK9。

[0166] 实施例 2: 具有 2×10^{10} 个独立脂质运载蛋白突变蛋白的文库的产生和抗 PCSK9 的脂质运载蛋白突变蛋白的噬菌粒筛选

[0167] 通过成熟人类泪液脂质运载蛋白的随机突变产生具有高度多样性的 2×10^{10} 个脂质运载蛋白突变蛋白的随机文库 (参见例如, WO2007/107563)。为了筛选 PCSK9 特异性的脂质运载蛋白突变蛋白, 来自该文库的 2×10^{12} 个噬菌粒与 200nM 生物素化的人类和 / 或食蟹猕猴 PCSK9 一起培养。涂覆中性亲和素或链霉亲和素的顺磁性珠子用来捕获 PCSK9/ 噬菌粒复合物, 其随后用磁铁分离。通过用 1ml PBS/T 洗涤该磁珠 8 次去除未结合的噬菌粒。结合的噬菌粒先通过用三乙胺培养洗脱, 然后再用 0.1M 甘氨酸 pH2.2 洗脱。进行连续 4 轮的筛选。

[0168] 使用标准方法 (Sambrook 等人, (1989) Molecular cloning: a laboratory manual) 用 BstX1 进行 DNA 消化, 随后经由琼脂糖凝胶电泳纯化, 分离噬菌体展示筛选之后获得的噬菌粒制备物的突变的中心盒。将 DNA 插入到同样切割的载体 pT1c10 中, 其在四环霉素启动子的控制下允许细菌产生突变蛋白。CaCl₂ 胜任的 TG1-F' 细胞用连接混合物进行转化, 并在 LB/Amp 平板上涂板。使用单个菌落接种 2xYT/Amp 培养基并培养过夜 (14-18 小时) 至平台期。随后, 从平台期培养物中接种 50 μ l 2xYT/Amp 并于 37°C 下培养 3 小时, 然后转移到 22°C, 直到 OD₅₉₅ 达到 0.6-0.8。通过添加补充了 1.2 μ g/ml 无水四环霉素的 10 μ l 2xYT/Amp 诱导抗运载蛋白 (anticalin) 的产生。培养物在 22°C 下培养至第二天。在将 40 μ l 的 5% (w/v) BSA 加入 PBS/T 中, 并于 25°C 下培养 1 小时后, 培养物准备用于筛选测定。

[0169] 为了进行脂质运载蛋白突变蛋白的筛选, 将均携带 FLAG 标签的人类和石蟹猕猴 PCSK9 (PBS/T 中 1 μ g/ml) 通过抗 FLAG 标签抗体 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 在微量滴定板上捕获, 该抗体在前一天以在 PBS 中 5 μ g/ml 的终浓度被涂覆在微量滴定板上。将抗 Flag 标签抗体单独作为负对照。接着, 添加 20 μ l 的 BSA 封闭的培养物, 并于 25°C 下培养 1 小时。用在 PBS/T 中 1:10000 稀释的与辣根过氧化物酶缀合的抗 -T7 抗体 (“HRP”, Merck KgaA, Darmstadt) 检测结合的突变蛋白。针对定量, 加入 20 μ l QuantaBlu 荧光过氧化物酶底物, 并于 320nm 的激发波长和 430nm 的发射波长下测量。

[0170] 实施例 3: 用于 PCSK9 特异性的脂质运载蛋白突变蛋白的优化的偏差成熟文库的产生

[0171] 为了优化从上述实施例 2 中的脂质运载蛋白文库中鉴定的 PCSK9 特异性的突变蛋白, 基于脂质运载蛋白突变蛋白 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:7 (以下在此实施例中称为“母克隆”), 分别生成另外的文库。以得到仅所选位置的部分随机的方式产生所述文库。该设计被制成使得对于每一个所选择的位置, 所编码的氨基酸以 70% 的机率对应

于相应的母克隆中的氨基酸,而其可以以 30% 的机率为不同的氨基酸。在所靶向的位置的数目为 N 、 B 为偏差的情况下,每个克隆的交换的最大可能数目为 $N \times (1-B)$ 。例如,在母克隆的氨基酸具有 70% 偏差的情况下,如果有 20 个氨基酸位置被部分随机化,这将导致与母克隆相比较平均整体含有六个突变的突变体文库,但仅在靶标位置上而已。然而,并非所有的克隆都具有 6 个交换;每个克隆的突变频率将遵循二项式分布,如在图 11D 中所描绘。

[0172] 为了组装这样的文库,使用在聚合酶链反应 (“PCR”) (Stemmer 等人, (1995) *Gene* 164:49 - 53) 中的寡核苷酸的递归组装。通过标准亚磷酰胺化学产生寡核苷酸 (Beaucage 等人, (1981) *Tetrahedron Lett.* 22, 1859-62; McBride 等人, (1983) *Tetrahedron Lett.* 24, 245-8)。为了允许 70% 偏差的编码,我们为 20 种经典氨基酸中每一个的核苷酸三联体的每一个位置计算了优化的混合物。例如,通过核苷亚磷酰胺构建块:“abc”的混合物产生编码丝氨酸的混合物,其具有 70% 的偏差,并允许在剩余的 30% 中具有不同的氨基酸,其中 a 对应于 85% 的胸腺嘧啶核苷的混合物和各 5% 的亚氨基二甲胺 (guaninidine)、胞嘧啶和腺苷, b 对应于 85% 的胞嘧啶与各 5% 的其它核苷的混合物, c 对应于 50% 的胍与 50% 的胸腺嘧啶核苷的混合物 (参见图 11)。

[0173] 使用上述的技术,所述基于 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:7 的文库分别通过递归 PCR 产生。随后,将生成的脂质运载蛋白突变蛋白以高效率克隆到基本上如所描述的噬菌粒载体中 (参见例如, Kim 等人, (2009) *J Am Chem Soc* 131(10):3565-76)。该文库的大小为 7×10^9 至 11×10^9 个突变体。这些文库被用于随后的噬菌体筛选 (参见实施例 4)。

[0174] 实施例 4:优化的抗 PCSK9 脂质运载蛋白突变蛋白的噬菌粒筛选

[0175] 为了筛选优化的 PCSK9 特异性的脂质运载蛋白突变蛋白,使用来自实施例 3 中描述的文库的 2×10^{12} 个噬菌粒。噬菌粒被溶解在补充了 0.1% Tween-20 (v/v) 的 PBS (即 PBS/T)、50mM 胍脒和 1% (w/v) 酪蛋白中。为了筛选具有增加的亲和力的脂质运载蛋白突变蛋白,噬菌粒与降低浓度的范围为 0.01-10nM 的生物素化的 PCSK9 蛋白一同培养。在某些情况下,噬菌粒在 65°C 下培养 10 分钟以筛选具有增加的热耐受性的突变蛋白。封闭的噬菌粒与生物素化的 PCSK9 蛋白培养 40 分钟,之后加入 0.3mM 脱巯生物素到该溶液中以饱和游离的链霉亲和素结合位点,并继续培养 20 分钟。接着,加入封闭的 (PBS/T 中 1% (w/v) 酪蛋白) 且消耗的 (drained) 顺磁珠子达 20 分钟来捕获 PCSK9-噬菌粒复合物,所述顺磁珠子涂覆链霉亲和素或中性亲和素。通过使用 1ml PBS/T 洗涤珠子八次,彻底再悬浮,随后用磁铁收集珠子以去除未复合的噬菌粒。为了特异性地筛选具有降低的 k_{off} 率的突变蛋白,通过应用更严格的洗涤操作程序 (在第一轮后进行另外 5 次洗涤步骤,在第 2 轮后进行另外 10 次洗涤步骤,在第 3 轮后进行另外 15 次洗涤步骤,以及在第 4 轮后进行另外 20 次洗涤步骤),或者将突变蛋白-PCSK9 复合物与不同量 (10nM-5 μ M) 的纯化亲本突变蛋白 (如 SEQ ID NOs:3、4 或 7) 一起培养,使在优化的与亲本脂质运载蛋白突变蛋白之间竞争 PCSK9 结合。此外,应用这两种方法的组合。结合的噬菌粒首先用 300 μ l 70mM 三乙胺洗涤 10 分钟,随后立即用 100 μ l 1M Tris-Cl pH6.0 中和上清液。在一个中间洗涤循环之后,剩余的噬菌粒用 100mM 甘氨酸 pH 2.2 洗涤 10 分钟,随后立即用 50 μ l 0.5M Tris-base 中和。汇集洗脱级分,用于感染 4ml 对数期的大肠杆菌培养物 (OD_{550} 0.45-0.6) 以进行再扩增。在搅拌的条件下培养 30 分钟后,以 5000xg 离心 2 分钟收集细菌,再悬浮于 1ml 的 2 $\times$ YT 培养基

中,并在 3 个大的 LB/Amp 琼脂平板上涂板 (10g/1 细菌用胰蛋白胨,5g/1 酵母提取物,5g/1 氯化钠,pH 7.5,15g/1 琼脂,100 μ g/ml 氨苄青霉素)。平板于 32℃ 下培养整夜。感染的细胞使用补充了 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 50ml 2xYT 培养基 (2xYT/Amp) 从琼脂平板上刮下。将适当体积的细菌悬浮液接种于 50ml 2xYT/Amp 培养基,使 OD₅₅₀ 达到 0.08。该培养物在 37℃ 下于振荡器上 (160rpm) 培养直到 OD₅₅₀ 达到 0.5,然后通过温和搅拌培养 15 分钟且在 37℃ 下于振荡器上培养 45 分钟,用辅助噬菌体 (1.5x10¹¹ pfu) 感染。随后,加入卡那霉素至 70 μ g/ml 的终浓度以筛选感染辅助噬菌体的细菌。最后,通过加入 25ng/ml 无水四环霉素诱导 pIII- 脂质运载蛋白的表达。

[0176] 实施例 5:通过筛选进行 PCSK9 特异性的 T1c 突变蛋白的鉴定

[0177] 如实施例 4 中所述,使用标准方法 (Sambrook 等人,1989 年) 用 BstX1 进行 DNA 消化,随后经由琼脂糖凝胶电泳纯化,分离噬菌体展示筛选之后获得的噬菌粒制备物的突变的中心盒。将 DNA 插入到同样切割的载体中,其在四环霉素启动子的控制下允许细菌产生突变蛋白。CaCl₂ 胜任的 TG1-F' 细胞用连接混合物进行转化,并在 LB/Amp 平板上涂板。使用单个菌落接种 2xYT/Amp 培养基并培养过夜 (14-18 小时) 至平台期。随后,从平台期培养物中接种 50 μ l 2xYT/Amp 并于 37℃ 下培养 3 小时,然后转移到 22℃,直到 OD₅₉₅ 达到 0.6-0.8。通过添加补充了 1.2 μ g/ml 无水四环霉素的 10 μ l 2xYT/Amp 诱导脂质运载蛋白突变蛋白的产生。培养物在 22℃ 下培养至第二天。在将 40 μ l 的 5% (w/v) BSA 加入 PBS/T 中,并于 25℃ 下培养 1 小时后,培养物准备用于筛选测定。

[0178] 为了进行脂质运载蛋白突变蛋白的筛选,将均携带 FLAG 标签的人类和石蟹猕猴 PCSK9 (PBS/T 中 1 μ g/ml) 以及 hPCSK9-D374Y 突变体通过抗 FLAG 标签抗体 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 在微量滴定板上捕获,该抗体在前一天以在 PBS 中 5 μ g/ml 的终浓度被涂覆在平板上。接着,添加 20 μ l 的 BSA 封闭的培养物,并于 25℃ 下培养 1 小时。用在 PBS/T 中 1:10000 稀释的与 HRP 缀合的抗 -T7 抗体 (Merck KgaA, Darmstadt) 检测结合的脂质运载蛋白突变蛋白。针对定量,加入 20 μ l QuantaBlu 荧光过氧化物酶底物,并于 320nm 的激发波长和 430nm 的发射波长下测量。

[0179] 为了进行脂质运载蛋白突变蛋白的亲和力排名,将在 PBS 中的抗 Strep-tag 抗体 (IBA, Goettingen) 涂覆在微量滴定板上,并加入 20 μ l BSA 封闭的培养物,其允许脂质运载蛋白突变蛋白在该滴定板上被特异性捕获。加入不同浓度 (0.5-5nM) 的生物素化的 PCSK9 蛋白,并在充分洗涤后用 extravidin-HRP (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 检测特异性结合的 PCSK9 蛋白。针对定量,加入 20 μ l QuantaBlu,并于 320nm 的激发波长和 430nm 的发射波长下测量。

[0180] 通过在微量滴定板上涂覆抗 FLAG 标签 (在 PBS 中 5 μ g/ml),随后捕获 hPCSK9-D374Y 突变体 (在 PBS/T 中 1 μ g/ml),进行竞争性脂质运载蛋白突变蛋白的筛选。将封闭的培养物针对 30nM 纯化的 LDL 受体调整,且将其加入具有捕获的 hPCSK9-D374Y 突变体的滴定板中 72 小时。这使得该系统平衡和竞争性突变蛋白的可靠筛选。用 HRP 缀合的抗 - 组氨酸标签抗体 (在 PBS/T 中 1 μ g/ml ;Abcam, Cambridge, UK) 检测结合的受体。针对定量,加入 20 μ l QuantaBlu 荧光过氧化物酶底物,并于 320nm 的激发波长和 430nm 的发射波长下测量。

[0181] 实施例 6:代表性的脂质运载蛋白突变蛋白对 PCSK9 的亲和力

[0182] 为了测量代表性群体的脂质运载蛋白突变蛋白对生物素化的 PCSK9 的结合亲和力,使用以表面等离子体共振 (SPR) 为基础的分析,其中利用 Biacore T200 设备 (GE Healthcare)。针对 SPR 亲和力分析 (图 1),使用生物素捕获试剂盒 (GE Healthcare)。

[0183] 在每个测量周期中,将生物素捕获试剂 (GE Healthcare) 以 $2 \mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速施加到感应器芯片 CAP (GE Healthcare) 上的参考和测量通道持续 5 分钟。以 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度将生物素化的 PCSK9 以 $10 \mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速注射在该测量通道上持续 2 分钟。为了测定亲和力,三至四次稀释的 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 在 HBS-EP+ (0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M 氯化钠, 3mM EDTA, 0.005% 表面活性剂 P20) 缓冲液中制备,并施加到该芯片表面,其中对于 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 使用 500、125、31 和 8nM 的浓度,对于 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 使用 300、75、19 和 5nM 的浓度,对于 SEQ ID NO:7 使用 75、19 和 5nM 的浓度。结合分析以 3 分钟的接触时间、20 分钟的解离时间和施加 $30 \mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速进行。所有测量均在 25°C 下进行。通过注射 6M 的胍 - 盐酸与 0.25M 氢氧化钠 (2 分钟),接着用运行缓冲液进行另外的洗涤以及 2 分钟的稳定期,进行感应器芯片 CAP 表面的再生。在测量之前,进行了由三个连续的再生步骤组成的一个调整周期。数据用 Biacore T200 评估软件 (1.0 版) 进行评估。使用双重参照。使用 1:1 的结合模型以拟合原始数据。

[0184] 针对 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:11 所得到的拟合曲线分别如图 1(A-D) 所示。例如,该数据显示,SEQ ID NO:3 (图 1A) 以高亲和力与 PCSK9 结合 ($K_D = 0.85\text{nM}$)。结合速率常数 k_a 或 k_{on} 、解离速率常数 k_d 或 k_{off} 和为所有脂质运载蛋白突变蛋白得到的解离常数 K_D 总结于下文的表 1 中。

[0185] 表 1 :

[0186]

分子	$k_{on} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	$k_{off} [\text{s}^{-1}]$	$K_D [\text{nM}]$
SEQ ID NO:3	1.77E+05	1.50E-04	0.85
SEQ ID NO:4	4.79E+04	1.39E-04	2.89
SEQ ID NO:5	3.40E+04	1.63E-04	4.8
SEQ ID NO:6	5.66E+04	2.32E-04	4.1
SEQ ID NO:7	7.24E+05	4.84E-03	6.69
SEQ ID NO:8	1.54E+05	1.38E-03	8.96
SEQ ID NO:9	2.33E+05	4.80E-03	20.59
SEQ ID NO:10	5.70E+05	7.19E-03	12.61
SEQ ID NO:11	4.70E+04	8.90E-05	1.89

SEQ ID NO:12	2, 44E+04	1, 56E-04	6. 4
--------------	-----------	-----------	------

[0187] 实施例 7 :代表性的脂质运载蛋白突变蛋白对 PCSK9 作用的竞争性模式

[0188] 体外使用竞争性 ELISA 形式测试在实施例 6 公开的脂质运载蛋白突变蛋白是否以竞争性模式与 PCSK9 结合。在该实验中,恒定浓度的人类 PCSK9 (SEQ ID NO:34) 或人类 PCSK9_D374Y 突变体用不同浓度的脂质运载蛋白突变蛋白培养 1 小时。在溶液中此预培养中之后,将脂质运载蛋白突变蛋白 /PCSK9 混合物的等分试样转移至涂覆了人类 LDL-R 的 ELISA 平板上,以测量未被封闭而结合 hLDL-R 的 hPCSK9 的浓度。

[0189] 所有的培养步骤均在 300rpm 振荡下进行,并且在每个培养步骤后用 100 μ l PBS-T 缓冲液 (PBS (磷酸盐缓冲盐水), 0.05% Tween 20) 洗涤培养板 5 次,其中使用 Biotek ELx405 选择 CW 洗涤机。在第一步骤中,用 20 μ l 的重组人类 LDL-R (R&D Systems, Cat. No. 2148-LD/CF) 以在 PBS 中 5 μ g/ml 的浓度在 4 $^{\circ}$ C 下过夜涂覆 384 孔荧光板。洗涤后,将 LDL-R 涂覆的孔用 100 μ l PBS-T/BSA (在含有 0.05% Tween 20 的 PBS 中 2% BSA (牛血清白蛋白)) 在室温 (“RT”) 下封闭 1 小时。

[0190] 固定浓度的 25nM 人类 PCSK9 或 0.25nM 人类 PCSK9_D374Y 突变体在溶液中与下述一起培养:(i) 不同浓度的 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8,或 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:33 的基准抗体,或者 (ii) 作为负对照的 SEQ ID NO:2,其中采用 300nM 的起始浓度,在 PBS-T/BSA 缓冲液中以 1:3 的比例连续稀释至 5pM。在室温下培养 1 小时后,将 20 μ l 的反应混合物转移到 LDL-R 涂覆的 ELISA 板,在室温下 20 分钟以捕获未结合 (游离的) 或非竞争性结合的 PCSK9。为了将 ELISA 读出结果转化为游离的 hPCSK9 浓度 (参见下文),在 PBS-T/BSA 中制备含有不同浓度的 hPCSK9 或 hPCSK9_D374Y 突变体 (起始为 25/50nM (1:3 连续稀释 11 次)) 的标准曲线,且在 MSD (MesoScaleDiscovery) 板上培养 20 分钟。

[0191] 为了检测并定量结合的 PCSK9,移除残余的上清液,且将 20 μ l 小鼠抗 Flag M2-辣根过氧化物酶 (“HRP”) (Sigma-Aldrich) 以在 PBS-T/BSA 中 1:5000 稀释加入,并于室温下培养 1 小时。洗涤后,将 20 μ l QuantaBlu 荧光过氧化物酶底物加入到每个孔中,并在 15 分钟后使用 GENios Plus 读板器 (Tecan) 在 320nm 的激发波长和 430nm 的发射波长下测量荧光。

[0192] 评估如下进行:游离的 hPCSK9 或 hPCSK9_D374Y 突变体浓度 $c(\text{hPCSK9})$ 游离的 / $c(\text{hPCSK9_D374Y})$ 游离的从相对荧光信号计算,其中使用平行测定的标准曲线,并相对于脂质运载蛋白突变蛋白浓度 $c(\text{SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、或 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:33 的基准抗体})$ 绘图。为了获得在其下 PCSK9/ LDL-R 复合物形成被 50% 阻断时该脂质运载蛋白突变蛋白的浓度 (IC₅₀),根据 $c(\text{PCSK9})$ 游离的 = $c(\text{PCSK9})_{\text{tot}} / (1 + c(\text{脂质运载蛋白突变蛋白}) / \text{IC}_{50})$,通过用单点结合模型进行非线性回归,进行该曲线的拟合,其中总追踪物浓度 $c(\text{PCSK9})_{\text{tot}}$ 和上面获得的 IC₅₀ 值为自由参数。使用 GraphPad Prism4 软件进行曲线拟合。

[0193] 综上所述,负对照 SEQ ID NO:2 不与 PCSK9 结合;相反地,当竞争 hLDL-R 时,SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 表现出对 hPCSK9 和 hPCSK9_D374Y 突变体的强竞争性结合。拟合的 IC₅₀ 值如下表 2 以及图 2(A 和 B) 所示。针对野生

型和突变体 PCSK9 均显示出脂质运载蛋白突变蛋白 (SEQ ID NOs:3、4 和 6-9) 作用的竞争性模式。在竞争 ELISA 中使用 hPCSK9 的 IC₅₀ 值单独受到 25nM 的固定浓度影响。在竞争 ELISA 中使用 0.25nM hPCSK9_D374Y 突变体, IC₅₀ 值受到脂质运载蛋白突变蛋白的亲合力以及该固定突变体浓度的影响。

[0194] 表 2:

[0195]

分子	hPCSK9 野生型 IC ₅₀ [nM]	hPCSK9_D374Y IC ₅₀ [nM]
SEQ ID NO:3	13.8	0.13
SEQ ID NO:4	6.2	0.37
SEQ ID NO:6	10.1	0.21
SEQ ID NO:7	13.2	0.13
SEQ ID NO:8	10.7	0.32

[0196] 实施例 8:代表性的脂质运载蛋白突变蛋白对 PCSK9 的特异性和物种交叉反应性

[0197] 脂质运载蛋白突变蛋白的特异性和物种交叉反应性 (图 3(A-D)) 在结合 ELISA 中进行测定,其原理如下:生物素化的配体 (人类 PCSK9、人类 PCSK9_D374Y、小鼠 PCSK9 和食蟹猕猴 PCSK9) 被捕获于中性亲和素涂覆的 ELISA 板上,并且加入可变浓度的脂质运载蛋白突变蛋白。用兔抗 Streptag II 抗体 (GenScript, Cat. No. A00626) 和 HRP 标记的抗兔 IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 211-035-109) 检测结合的脂质运载蛋白突变蛋白。

[0198] 在下面详细的实验方案中,培养和洗涤步骤如上面实施例 7 中所述的竞争 ELISA 方案进行。用 20 μ l 的中性亲和素以在 PBS 中 5 μ g/ml 的浓度在 4℃ 下过夜涂覆适合用于荧光测量的 384 孔板 (Greiner FLUOTRAC™600, 黑色平底、高结合)。洗涤后,将中性亲和素涂覆的孔用 100 μ l 封闭缓冲液 (PBS-T/BSA) 室温下封闭 1 小时。再次洗涤后,20 μ l 生物素化的配体,人类 PCSK9、人类 PCSK9_D374Y、小鼠 PCSK9 或食蟹猕猴 PCSK9,以在 PBS-T/BSA 中 1 μ g/ml 的浓度在室温下加入 1 小时。过量的配体通过进一步的洗涤步骤去除。

[0199] 将脂质运载蛋白突变蛋白的浓度调整至 100nM,接着溶液在 PBS-T/BSA 缓冲液中以 1:3 的比例连续稀释至 2nM。将体积为 20 μ l 的稀释物转移到该 384 孔板,使其在室温下结合 1 小时。

[0200] 培养之后,移除残余的上清液,且加入 1:5,000 稀释于 PBS-T/BSA 中的 20 μ l 抗 StreptagII 抗体,并在室温下培养 1 小时。再次移除上清液。为了检测结合的抗 StreptagII 抗体,加入 20 μ l 的小鼠抗兔 IgG-HRP 抗体,并在室温下培养 1 小时。洗涤后,将 20 μ l 荧光 HRP 底物 (Quantablu, Pierce) 加入到每个孔中,并进行反应 15 分钟。使用 Safire 微量板读板器 (Tecan) 读取在该板上每个孔以相对荧光单位 (RFU) 计的荧光强度。为了获得在其下最大荧光信号达到 50% 的脂质运载蛋白突变蛋白浓度 (EC₅₀),根据 $RFU = RFU_{max} \cdot c / (EC_{50} + c)$ (脂质运载蛋白突变蛋白),通过用单点结合模型进行

非线性回归,进行该曲线的拟合,其中最大相对荧光 RFU_{max} 和 EC50 值为自由参数。使用 GraphPad Prism4 软件进行曲线拟合。

[0201] 综上所述,可检测到 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9 与人类 PCSK9、人类 PCSK9_D374Y 突变体、小鼠 PCSK9 和食蟹猕猴 PCSK9 的结合,而负对照 SEQ ID NO:2 则显示不与这些靶标中的任一个结合。拟合的 EC50 值如下文表 3 所示。对于人类 PCSK9 和食蟹猕猴 PCSK9 的 EC50 值相当,从而显示脂质运载蛋白突变蛋白与食蟹猕猴 PCSK9 完全交叉反应。对小鼠 PCSK9 的亲合力则相似或最多低 10 倍,而对于人类 PCSK9_D374Y 突变体的 EC50 值则与对于人类 PCSK9 获得的那些值相似。

[0202] 表 3:

[0203]

分子	hPCSK9 EC50 [nM]	hPCSK9 D374Y EC50 [nM]	mPCSK9 EC50 [nM]	cPCSK9 EC50 [nM]
SEQ ID NO: 3	1.6	1.2	4.4	1.8
SEQ ID NO: 4	2.4	1.6	21.8	2.9
SEQ ID NO: 5	5.1	2.9	30	5.7
SEQ ID NO: 6	3.1	2.1	20.1	3.7
SEQ ID NO: 7	2.8	0.8	16.3	3.8
SEQ ID NO: 8	4.4	1.4	10.1	6.1
SEQ ID NO: 9	5.6	1.1	16.2	8.4

[0204] 实施例 9:在以细胞为基础的分析中脂质运载蛋白突变蛋白介导的 DiI- 标记的 LDL 摄取的下调的恢复

[0205] 采用以细胞为基础的分析来证明结合 PCSK9 的脂质运载蛋白突变蛋白 (SEQ NO:3、SEQ NO:4、SEQ NO:6、SEQ NO:7 和 SEQ NO:8) 的下述能力:在 HepG2 细胞中,中和表面 LDL-R 分子的数量的 PCSK9 介导的减少,和因此恢复下调的 LDL 摄取。SEQ ID NO:2 作为负对照。

[0206] 在这方面,将 HepG2 细胞在 96 孔聚 -d- 赖氨酸涂覆的平板 (Greiner, 955946) 中以 60,000 细胞 / 孔的密度在含有 10% FCS (胎牛血清) 的 100 μ l / 孔 DMEM 培养基 (PAN P04-04510) 中涂板。24 小时后,将培养基转换为含 1% FCS 的 DMEM 培养基 (100 μ l / 孔)。18 小时后,除去培养基并换成 (无洗涤步骤) 含有 20 μ g/ml LDL- **Bodipy**[®] FL (Invitrogen, L3483) 但不含 FCS 的 50 μ l DMEM。以浓度为 4000nM 起始,进行脂质运载蛋白突变蛋白的 1:2 连续稀释。在含有 15 μ g/ml PCSK9 的 DMEM 进行一个稀释系列,另一个稀释系列是在纯 DMEM 中,作为对照。脂质运载蛋白突变蛋白和 PCSK9 预先在室温下培养

30 分钟,然后将 50 μ l 加入细胞中,使得 PCSK9 的最终浓度为 100nM。在平板上的总样本体积为 100 μ l,且所有样本以 5 倍重复测定。在不含 LDL 和 PCSK9 的 DMEM 中、在含 LDL 和 PCSK9 的 DMEM 中、和在含 LDL 但不含 PCSK9 的 DMEM 中的细胞用作对照。

[0207] 在细胞用 PBS 洗涤以前,将具有样本的平板在 37℃ 下培养 6 小时。用 100 μ l PBS 填充各孔,且使用 BMG PheraStar 读板器在 485/535nm 下读取细胞的荧光。

[0208] 为了测定 IC50 值,排除 5 个重复中最高值和最低值,计算每个剩余数据点的平均值和标准差。该曲线通过 GraphPad Prism 4 拟合,其中采用非线性回归“S 形计量 - 反应,可变斜率”模型 (5PL 拟合)。通过受刺激和未受刺激的细胞 (有 / 无 PCSK9 的细胞) 将数据标准化。拟合的曲线如图 4 所示,且计算的 IC50 值总结于下文的表 4 中。

[0209] 表 4:

[0210]

分子	IC50 [nM]
SEQ ID NO:3	71.8
SEQ ID NO:4	85.8
SEQ ID NO:6	44.5
SEQ ID NO:7	95.8
SEQ ID NO:8	81.2

[0211] 实施例 10:另外的脂质运载蛋白突变蛋白对 PCSK9 的亲合力

[0212] 为了测量另外的脂质运载蛋白突变蛋白对生物素化的人类 PCSK9 (hPCSK9-Bio) 的结合亲合力,进行以表面等离子体共振 (SPR) 为基础的分析,其中使用 Biacore T200 设备 (GE Healthcare)。针对 SPR 亲合力分析 (图 5(A-C)),使用生物素捕获试剂盒 (GE Healthcare)。

[0213] 在每个测量中,将周期生物素捕获试剂 (GE Healthcare) 以 2 μ l/ 分钟的流速施加到感应器芯片 CAP (GE Healthcare) 上的参考和测量通道持续 5 分钟。以 1 μ g/ml 的浓度将 hPCSK9-Bio 以 10 μ l/ 分钟的流速注射到该测量通道上持续 2 分钟。为了测定亲合力,三至四次稀释的 SEQ ID NOs:13-28 的脂质运载蛋白突变蛋白 (参见表 5) 在 HBS-EP+ 缓冲液中制备,并施加到该芯片表面,其中对于所述突变蛋白使用 128、32、8 和 2nM 的浓度。结合分析以 3 分钟的接触时间、15 分钟的解离时间和施加 30 μ l/ 分钟的流速进行。所有测量均在 25℃ 下进行。通过注射 6M 的胍 - 盐酸与 0.25M 氢氧化钠 (2 分钟),接着用运行缓冲液进行另外的洗涤以及 2 分钟的稳定期,进行感应器芯片 CAP 表面的再生。在测量之前,进行了由三个连续的再生步骤组成的一个调整周期。数据用 Biacore T200 评估软件 (1.0 版) 进行评估。使用双重参照。使用 1:1 的结合模型以拟合原始数据。

[0214] 针对一些脂质运载蛋白突变蛋白所得到的拟合曲线如图 5 所示。即 SEQ ID NO:13 (图 5C)、SEQ ID NO:20 (图 5A) 和 SEQ ID NO:22 (图 5B) 以高亲合力与人类 PCSK9 结合。结合速率常数 k_a 或 k_{on} 、解离速率常数 k_d 或 k_{off} 和为所有突变蛋白得到的解离常数 K_D

总结于下文的表 5 中。

[0215] 表 5：

[0216]

分子	$k_{on} [M^{-1} \cdot s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [nM]$
SEQ ID NO:13	2.75E+05	8.77E-05	0.32
SEQ ID NO:14	2.56E+05	1.05E-04	0.41
SEQ ID NO:15	2.78E+05	1.07E-04	0.38
SEQ ID NO:16	2.55E+05	1.29E-04	0.51
SEQ ID NO:17	2.49E+05	1.11E-04	0.45
SEQ ID NO:18	3.13E+05	1.11E-04	0.35
SEQ ID NO:19	2.47E+05	1.32E-04	0.53
SEQ ID NO:20	3.13E+05	9.73E-05	0.31
SEQ ID NO:21	2.45E+05	1.37E-04	0.56
SEQ ID NO:22	7.53E+05	2.63E-04	0.35
SEQ ID NO:23	8.36E+05	1.76E-04	0.21
SEQ ID NO:24	3.67E+05	1.15E-04	0.31
SEQ ID NO:25	4.36E+05	1.05E-04	0.24
SEQ ID NO:26	6.68E+05	2.30E-04	0.34
SEQ ID NO:27	7.34E+05	3.10E-04	0.42
SEQ ID NO:28	6.84E+05	1.98E-04	0.29

[0217] 实施例 11：另外的脂质运载蛋白突变蛋白对 PCSK9 的物种交叉反应性

[0218] 为了测量脂质运载蛋白突变蛋白 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:20 和 SEQ ID NO:22 对生物素化的人类、石蟹猕猴和小鼠 PCSK9 的结合亲和力，采取以表面等离子体共振 (SPR) 为基础的分析，其中使用 Biacore T200 设备 (GE Healthcare)。针对 SPR 亲和力分析 (图 6(A-C))，使用生物素捕获试剂盒 (GE Healthcare)。

[0219] 在下面的实验方案中，捕获、样本结合和再生步骤以及数据评估都如上文实施例 10 中所描述的进行。为了测定亲和力，四次稀释的所述突变蛋白在 HBS-EP+ 缓冲液中制备，并施加到芯片表面，其中分别使用 128、32、8 和 2nM 的浓度。

[0220] 对于 SEQ ID NO:20 所得到的拟合曲线如图 6 所示。数据显示 SEQ ID NO:20 以高

亲和力与人类 PCSK9 (图 6A) 和石蟹猕猴 PCSK9 (图 6B) 结合。与小鼠 PCSK9 (图 6C) 的亲和力较低。结合速率常数 k_a 或 k_{on} 、解离速率常数 k_d 或 k_{off} 和所得到的解离常数 K_D 总结于下文的表 6 中。

[0221] 表 6:

[0222]

配体	分子	k_{on}	k_{off}	K_D
		[M ⁻¹ s ⁻¹]	[s ⁻¹]	[nM]
人类 PCSK9	SEQ ID NO: 13	2.62E+05	8.31E-05	0.32
石蟹猕猴 PCSK9	SEQ ID NO: 13	2.16E+05	9.40E-05	0.44
小鼠 PCSK9	SEQ ID NO: 13	1.76E+05	3.12E-04	1.77
人类 PCSK9	SEQ ID NO: 20	2.49E+05	7.79E-05	0.31
石蟹猕猴 PCSK9	SEQ ID NO: 20	2.00E+05	1.03E-04	0.52
小鼠 PCSK9	SEQ ID NO: 20	1.77E+05	3.51E-04	1.98
人类 PCSK9	SEQ ID NO: 22	6.63E+05	2.58E-04	0.39
石蟹猕猴 PCSK9	SEQ ID NO: 22	3.86E+05	2.76E-04	0.71
小鼠 PCSK9	SEQ ID NO: 22	3.21E+05	6.38E-04	1.99

[0223] 实施例 12: 另外的脂质运载蛋白突变蛋白在溶液中与 PCSK9 的结合

[0224] 在体外使用竞争电化学发光 (ECL) 分析形式, 测试在溶液中脂质运载蛋白突变蛋白及其聚乙二醇化的变体 (此处具有支链 PEG40) 对生物素化的人类 PCSK9 (hPCSK9-Bio) 的结合 (图 7)。在该实验中, 恒定浓度的 hPCSK9-Bio 与可变浓度的脂质运载蛋白突变蛋白 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 22 以及聚乙二醇化的变体 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 32 培养 1 小时。在溶液中预培养之后, 将脂质运载蛋白突变蛋白 / PCSK9 混合物的等分试样转移至涂覆了单克隆抗体 (包含 SEQ ID NO: 29 的轻链和 SEQ ID NO: 33 的重链) 的 ECL 板, 以测量未被脂质运载蛋白突变蛋白 (聚乙二醇化以及非聚乙二醇化的形式) 封闭而因此能够被该抗体结合的 hPCSK9 的浓度 (图 7)。对于那些脂质运载蛋白突变蛋白作用的竞争性模式用 hPCSK9-Bio 显示。

[0225] 所有的培养步骤均在 300rpm 振荡下进行, 并且在每个培养步骤后用 80 μ l PBS-T 缓冲液 (PBS, 0.05% Tween 20) 洗涤培养板 5 次, 其中使用 Biotek ELx405 选择 CW 洗涤机。在第一步骤中, 用 20 μ l 的基准抗体以在 PBS 中 5 μ g/ml 的浓度在 4 $^{\circ}$ C 下过夜涂覆 384 孔 MSD 板。洗涤后, 将 LDL-R 涂覆的孔用 60 μ l PBS-T/BSA (在含有 0.05% Tween 20 的 PBS

中 2% BSA) 在室温下封闭 1 小时。

[0226] 固定浓度的 10pM hPCSK9-Bio 与不同浓度的所述突变蛋白培养于溶液中, 其中采用 100nM 的起始浓度, 在 PBS-T/BSA 缓冲液中以 1:3 的比例连续稀释至 1.7pM。在室温下培养 1 小时后, 将 20 μ l 的反应混合物转移到包覆抗体的 ELISA 板, 在室温下 20 分钟捕获未结合 (游离的) PCSK9。为了将 ELISA 读出结果转化为游离的 hPCSK9 浓度 (参见下文结合的 hPCSK9-Bio 的检测和定量), 在 PBS-T/BSA 中制备含有不同浓度的 hPCSK9-Bio (起始为 10nM(1:3 连续稀释 11 次)) 的标准曲线, 且在 MSD(MesoScaleDiscovery) 板上培养 20 分钟。

[0227] 为了检测并定量结合的 hPCSK9-Bio, 移除残余的上清液, 且将 20 μ l Sulfo- 标签 - 标记的链霉亲和素 (Meso Scale Discovery) 以在 PBS-T/BSA 中 1 μ g/ml 的浓度加入, 并于室温下培养 1 小时。洗涤后, 将 35 μ l 2 $\times$ MSD 读取缓冲液与表面活性剂 (Meso Scale Discovery) 加入到每个孔中, 并在 15 分钟内使用 SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery) 测量电化学发光 (ECL) 信号。

[0228] 评估如下进行: 游离的 PCSK9 浓度 $c(\text{PCSK9})_{\text{游离的}}$ 从 ECL 信号计算, 其中使平行测定的标准曲线, 并相对于脂质运载蛋白突变蛋白浓度 $c(\text{脂质运载蛋白突变蛋白})$ 绘图。为了获得在其下 PCSK9/ 基准抗体复合物形成被 50% 阻断时该脂质运载蛋白突变蛋白的浓度 (IC50), 根据 $c(\text{PCSK9})_{\text{游离的}} = c(\text{PCSK9})_{\text{tot}} / (1 + c(\text{脂质运载蛋白突变蛋白}) / \text{IC50})$, 通过用单点结合模型进行非线性回归, 进行该曲线的拟合, 其中总追踪物浓度 $c(\text{PCSK9})_{\text{tot}}$ 和 IC50 值作为自由参数。使用 GraphPad Prism4 软件进行曲线拟合。

[0229] 综上所述, 脂质运载蛋白突变蛋白 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:20 和 SEQ ID NO:22 以及聚乙二醇化的变体 SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:32 表现出强的与 hPCSK9-Bio 的竞争性结合, 当针对基准抗体竞争时 (包含 SEQ ID NOs:29 和 33)。拟合的 IC50 总结于下文的表 7 中。

[0230] 表 7:

[0231]

分子	IC50 [nM]
SEQ ID NO:13	0.16
SEQ ID NO:20	0.11
SEQ ID NO:22	0.09
SEQ ID NO:30	0.19
SEQ ID NO:31	0.53
SEQ ID NO:32	0.37

[0232] 实施例 13: 通过另外的脂质运载蛋白突变蛋白抑制 LDL-R 的 PCSK9 介导的下调

[0233] 人类 PCSK9 诱导 LDL-R 的内化, 因此诱导 LDL-R 从细胞表面耗尽。在此分析中, LDL-R 的表达在实施例 12 中所述的脂质运载蛋白突变蛋白 (聚乙二醇化的 (此处具有支链

PEG40) 以及非聚乙二醇化的形式) 的存在下进行评价,以确定脂质运载蛋白突变蛋白抑制 PCSK9 在介导 LDL-R 细胞表面耗尽的活性的潜力,而 SEQ ID NO:2 则用作负对照。

[0234] 使 HEPG2 细胞 (10,000 个细胞 / 孔) 在预先涂覆了 100 μ g/ml 聚 -d- 赖氨酸的 384 孔 MSD (Mesoscale Discovery) 中贴附 24 小时。接着将完全培养基 (含有 1mg/ml G418 和 10% FBS 的 DMEM 培养基) 转换为缺乏血清或含 10% 脂质运载蛋白 - 缺陷血清的 DMEM, 以使 LDL-R 在细胞表面上有最大表达。细胞接着用 PBS 洗涤,且在 100nM PCSK9 的存在下连续稀释的脂质运载蛋白突变蛋白在 37°C 下培养 6 小时。然后将混合物以轻轻敲击的方式移除,接着通过加入 Roti® -Histofix 在室温下进行细胞固定 20 分钟。细胞用 PBS 洗涤两次,且以封闭缓冲液 (PBS/FCS 4% /BSA 2%) 在 4°C 下过夜培养。轻轻地去除缓冲液,并将 1 μ g/ml 的山羊抗 hLDL-R (R&D systems, Cat. No. AF2148) 和 2 μ g/ml 的驴抗山羊 -Sulfolag (MSD, Cat. No. R32AG-1) 在封闭缓冲液中在室温下培养 1 小时。细胞接着用 PBS 轻轻地洗涤两次,并加入不含有表面活性剂的读取缓冲液 (MSD)。使用 SECTOR Imager 2400 (MSD) 测量 ECL 信号。评估如下进行:通过在缺乏竞争者 (此处为脂质运载蛋白突变蛋白) 的情况下对于 PCSK9 活性测量的信号设定为 100% PCSK9 活性,转换 ECL 信号。使用 GraphPad Prism 4 软件,用 S 形剂量 - 反应模型、采用共享斜率来拟合数据 (图 8)。得到的 IC50 值和 IC90 值总结于下文的表 8 中。

[0235] 表 8:

[0236]

分子	IC50 [nM]	IC90 [nM]
SEQ ID NO:13	103.3	216.1
SEQ ID NO:20	91.7	192.0
SEQ ID NO:22	76.9	160.9
SEQ ID NO:30	82.6	172.8
SEQ ID NO:31	82.6	172.8
SEQ ID NO:32	70.7	147.8

[0237] 实施例 14:通过位置饱和和突变产生热稳定的 PCSK9 特异性的脂质运载蛋白突变蛋白

[0238] 为了改进 PCSK9 特异性的突变蛋白的热稳定性,在 SEQ ID NO:13 的脂质运载蛋白突变蛋白的位置 79 和 105 上进行突变 (如图 14 所示)。产生 SEQ ID NO:13 的热稳定衍生物的文库,其方式导致上述位置的饱和随机化,要么是本身产生的,要么与使用在聚合酶链反应中的 NNK 寡核苷酸的递归组装 (参见例如 W02007/107563) 组合产生的。为了同样的目的,SEQ ID NO:22 的脂质运载蛋白突变蛋白在位置 92 处从组氨酸突变为脯氨酸 (如图 14 所示)。

[0239] 实施例 15:通过筛选鉴定热稳定的 PCSK9 特异性的突变蛋白

[0240] 将如实施例 14 所述在 PCR 组装后获得的文库制备物的突变的中心盒插入到载体

中,所述载体在四环霉素启动子的控制下允许细菌产生脂质运载蛋白突变蛋白(如实施例5所述)。

[0241] 为了进行优化的脂质运载蛋白突变蛋白的亲合力排名,将在PBS中稀释的抗Strep-tag抗体(IBA, Goettingen)涂覆在微量滴定板上,并加入20 μ l BSA封闭的培养物,其允许脂质运载蛋白突变蛋白在该滴定板上被特异性捕获。加入不同浓度(0.5–5nM)的生物素化的PCSK9蛋白,并在充分洗涤后用extravidin-HRP(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)检测特异性结合的PCSK9蛋白。针对定量,加入20 μ l QuantaBlu,并于320nm的激发波长和430nm的发射波长下测量。

[0242] 在如上文所述的相同方法中进行热稳定的脂质运载蛋白突变蛋白的筛选,差别仅在于在与PCSK9靶标培养之前,将含脂质运载蛋白突变蛋白的细菌提取物加热至65℃达30min。筛选出与未加热的样本相比较在加热步骤后显示未受影响的结合信号的那些突变蛋白,用于测序。

[0243] 实施例16:测量优化的PCSK9特异性的突变蛋白的熔融温度

[0244] 为了测定PCSK9特异性的突变蛋白的熔融温度,使用毛细管nanoDSC设备(Q2000, TA Instruments),以1C/分钟扫描(25–100℃)在PBS(Gibco)中蛋白质浓度为1mg/ml的样品。整合软件从所显示的温谱图计算该熔融温度(melting temperature, T_m)。

[0245] 对于两个脂质运载蛋白突变蛋白(SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:13)连同由其优化的衍生物(SEQ ID NOs:62–71)所得到的熔融温度一起总结于下文的表9中。例如,该数据显示,与SEQ ID NO:13相比较,SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:65的 T_m 显著更高,且熔融开始就被往上位移13℃(图12)。

[0246] 表9:

[0247]

SEQ ID	T_m [°C] nanoDSC	熔融开始[°C]
SEQ ID NO: 13	61	49
SEQ ID NO: 65	72,8	62
SEQ ID NO: 64	63,8	54

[0248]

SEQ ID NO: 66	69	53
SEQ ID NO: 67	67,8	53
SEQ ID NO: 68	65,1	55
SEQ ID NO: 63	68,3	57
SEQ ID NO: 69	63,7	55
SEQ ID NO: 70	59,1	54
SEQ ID NO: 71	65	56
SEQ ID NO: 22	56	52
SEQ ID NO: 62	59	53

[0249] 实施例 17 :优化的脂质运载蛋白衍生物对 PCSK9 的亲合力

[0250] 为了测量代表性群体的脂质运载蛋白突变蛋白对生物素化的人类 PCSK9 的结合亲合力,使用以表面等离子体共振 (SPR) 为基础的分析,其中利用 Biacore T200 设备 (GE Healthcare)。针对 SPR 亲合力分析,使用生物素捕获试剂盒 (GE Healthcare)。

[0251] 在每个测量周期中,将生物素捕获试剂 (GE Healthcare) 以 $2 \mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速施加到感应器芯片 CAP (GE Healthcare) 上的参考和测量通道持续 5 分钟。以 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度将生物素化的 PCSK9 以 $10 \mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速注射在该测量通道上持续 2 分钟。为了测定亲合力,三至四次稀释的 SEQ ID NOs:62-71 在 HBS-EP+(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M 氯化钠,3mM EDTA,0.005%表面活性剂 P20) 缓冲液中制备,并施加到该芯片表面,其中使用 128nM、32nM、8nM 和 4nM 的终浓度。结合分析以 3 分钟的接触时间、20 分钟的解离时间和施加 $30 \mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速进行。所有测量均在 25°C 下进行。通过注射 6M 的胍 - 盐酸与 0.25M 氢氧化钠 (2 分钟),接着用运行缓冲液进行另外的洗涤以及 2 分钟的稳定期,进行感应器芯片 CAP 表面的再生。在测量之前,进行了由三个连续的再生步骤组成的一个调整周期。数据用 Biacore T200 评估软件 (1.0 版) 进行评估。使用双重参照。使用 1:1 的结合模型以拟合原始数据。

[0252] 针对 SEQ ID NOs:62-71 的脂质运载蛋白突变蛋白所得到的拟合曲线分别如图 13(A-J) 所示。该数据显示,与 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:22 的脂质运载蛋白突变蛋白相比较,热稳定的脂质运载蛋白突变蛋白 (SEQ ID NOs:62-71) 的亲合力完全保留。结合速率常数 k_a 或 k_{on} ,而解离速率常数 k_d 或 k_{off} 。为所述脂质运载蛋白突变蛋白得到的解离常数 K_D 总结于下文的表 10 中。

[0253] 表 10 :

[0254]

SEQ ID	$k_{on}[\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	$k_{off}[\text{s}^{-1}]$	$K_D[\text{nM}]$
SEQ ID NO:13	2,81E+05	6,84E-05	0,24

SEQ ID NO:65	2, 39E+05	7, 61E-05	0, 32
SEQ ID NO:64	3, 23E+05	7, 25E-05	0, 22
SEQ ID NO:66	2, 51E+05	8, 17E-05	0, 33
SEQ ID NO:67	2, 49E+05	7, 60E-05	0, 31
SEQ ID NO:68	2, 63E+05	8, 03E-05	0, 31
SEQ ID NO:63	2, 35E+05	7, 84E-05	0, 33
SEQ ID NO:69	2, 63E+05	7, 66E-05	0, 29
SEQ ID NO:70	2, 23E+05	7, 39E-05	0, 33
SEQ ID NO:71	2, 72E+05	8, 81E-05	0, 32
SEQ ID NO:22	5, 91E+05	2, 19E-04	0, 37
SEQ ID NO:62	4, 98E+05	1, 65E-04	0, 33

[0255] 实施例 18 :在大肠杆菌中产生 PCSK9 特异性的 T1c 突变蛋白

[0256] 在大肠杆菌中表达 PCSK9- 特异性脂质运载蛋白突变蛋白 (SEQ ID NOs:62、82、83 和 84)。将编码每个脂质运载蛋白突变蛋白 (分别为 SEQ ID NOs:86、87、88 和 89) 的 DNA 插入到经过同样切割的载体中,其在 T5 启动子 (在 SEQ ID NOs:62、82 和 84 的情况下) 或 T7A3 启动子 (在 SEQ ID NO:83 的情况下) 的控制下允许细菌产生突变蛋白。通过使用阴离子交换柱、苯基琼脂糖柱、凝胶过滤柱和螯合柱 (在 SEQ ID NOs:82 和 84 的情况下) 的柱层析法的组合从细胞裂解液中纯化该突变蛋白。纯化的突变蛋白最后溶解于 PBS 中。

[0257] 实施例 19 :Biacore 分析

[0258] 所有操作程序均用 Biacore T200 (GE Healthcare) 在 25℃ 下进行。HBS-EP+ 缓冲液 (10mM HEPES, pH 7.4, 0.15M 氯化钠, 3mM EDTA, 和 0.05% 表面活性剂 P20) 作为运行缓冲液。使用标记试剂即 EZ-Link 磺基 -NHS-LC-LC- 生物素 (Thermo Scientific), 以一般方法进行 PCSK9 蛋白的生物素化, 且未反应的试剂通过去盐离心柱去除。生物素捕获试剂盒 (GE Healthcare) 用于将生物素化的 PCSK9 配体固定到传感器芯片。该 CAP 传感器芯片上的流动池 (预先固定了 ss-DNA 寡核苷酸) 与缀合了链霉亲和素的互补 ss-DNA 寡核苷酸进行杂交, 接着进行生物素化的配体注射。

[0259] 针对捕获实验, 将链霉亲和素 -DNA 缀合物注射到两个流动池中持续 20 秒, 且生物素化的 PCSK9 样本在运行缓冲液中稀释为 1ng/μl, 然后以 10 μl/ 分钟注射到一个流动池中持续 1 分钟, 而另一个流动池则留下来不具有捕获的样本以提供参考表面。设计捕获操作方案以产生配体样本的捕获水平, 得到的 R_{max} 值不超过 20RU。

[0260] 针对每个动力学实验, 制备范围为 0.03nM 至 100nM 的不同浓度的纯化的 PCSK9 特异性的脂质运载蛋白突变蛋白作为分析物, 并以 30 μl/ 分钟注射持续 300 秒, 随后解离 30

分钟。用 2 分钟脉冲的在 0.25M 氢氧化钠中 6M 盐酸胍进行捕获和参考表面的再生。

[0261] 解离常数 (KD) 使用 1:1Langmuir 结合模型进行计算。原始数据集使用 Biacore T200 评估软件 (1.0 版, GE Healthcare) 进行分析, 且参考流动池的传感图从样本捕获的流动池的传感图中减去。

[0262] 实施例 20 : 无细胞的 PCSK9-LDLR TR-FRET 分析

[0263] 分泌的 PCSK9 有利于肝 LDLR 的降解, 从而导致血清 LDL-C 含量的增加。因此, 干扰 PCSK9 与 LDLR 之间相互作用的 PCSK9 特异性的脂质运载蛋白突变蛋白造成 LDLR 循环至细胞质膜的增强, 其激活 LDL-C 的摄入, 且最终降低了循环的 LDL-C 含量。

[0264] 使用无细胞的 TR-FRET 分析来测定脂质运载蛋白突变蛋白 (SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83 和 SEQ ID NO:84) 对 PCSK9 与 LDLR 之间结合的抑制效果。通过与 5 倍摩尔过量的 EZ-Link NHSChromogenic 生物素试剂 (Thermo Scientific 公司) 在室温下培养 1 小时制备用于该分析中的生物素标记的 hPCSK9 (生物素 -hPCSK9), 并通过 illustra NAP 柱 (GE Healthcare Life Science) 去除过量的生物素。铕标记的 LDLR (Eu-LDLR) 如先前的报告中所描述的方法制备 (Fisher TS 等人, J. Biol. Chem. (2007) 282(28), 20502-20512)。

[0265] 以 384 孔形式进行无细胞的 PCSK9-LDLR TR-FRET 分析。在 34mg/ml 的人类血清白蛋白存在或缺乏的情况下, 将终浓度为 20nM 的生物素 -hPCSK9 与在结合缓冲液 (10mM HEPES, pH 7.4, 150mM 氯化钠, 0.1mM 氯化钙和 0.05% (w/v) BSA) 中若干浓度的测试脂质运载蛋白突变蛋白在室温下培养 2 小时。然后 10 μ l 的上述生物素 -hPCSK9- 脂质运载蛋白溶液和 10 μ l 的 Eu-LDLR/Alexa-SA 溶液 (1.0nM 的 Eu-LDLR, 80nM 的链霉亲和素 /Alexa Fluor647 缀合物 (Invitrogen), 10mM 的 HEPES, pH 7.4, 150mM 氯化钠, 0.1mM 氯化钙和 0.05% (w/v) BSA) 在孔中混合, 并在室温下黑暗中培养 2 小时, 接着在冰箱中培养过夜。使用 BMG Lab Systems Rubystar 读板器读取样本, 设定读取 20 次 / 孔, 50 μ s 整合延迟与 200 微秒整合时间, 总读取时间为 1100ms / 孔。以在 665/620nm 波长下的发射率测量 FRET。以下列方程式计算 TR-FRET 比例。

[0266] $\text{TR-FRET 比例} = (\text{在 } 665\text{nm 下的计数} / \text{在 } 620\text{nm 下的计数}) \times 10,000$

[0267] 为了获得在其下 PCSK9/LDL-R 复合物形成被 50% 阻断时该脂质运载蛋白突变蛋白的浓度 (IC₅₀), 该曲线係以非线性回归与单点结合模型进行拟合。使用 Kaleida Graph 4.1.1 版本软件进行曲线拟合 (Synergy Software 公司)。通过用单点结合模型进行非线性回归, 进行该曲线的拟合。使用 Kaleida Graph ver 4.1.1 软件 (Synergy Software) 进行曲线拟合。

[0268] 所得到的计算的 IC₅₀ 值总结于下文实施例 21 下面的表 11 中。

[0269] 实施例 21 : PCSK9 特异性的脂质运载蛋白突变蛋白的体内血浆半衰期

[0270] 脂质运载蛋白突变蛋白与可以靶向特定身体区域、生物体、组织、器官或细胞的部分的缀合可以延长脂质运载蛋白突变蛋白在体内的半衰期。例如, 人类血清白蛋白 (HAS) 的半衰期据报告为 ~ 19 天 (Biochimica et Biophysica Acta 1830 ;5526-5534, 2013), 因此将 PCSK9 特异性的脂质运载蛋白突变蛋白 (SEQ ID NO:62 和 SEQ ID NO:82) 与结合 HSA 的白蛋白结合蛋白 (如 G148 和 SEQ ID NO:85) 缀合, 因此可以在体内表现出脂质运载蛋白突变蛋白的长半衰期。

[0271] 为了观察与白蛋白结合蛋白缀合的效果, 以及测定 PCSK9 特异性的脂质运载蛋白

突变蛋白的血浆长半衰期,将若干测试脂质运载蛋白突变蛋白给正常大鼠进行静脉内给药,并使用夹心 ELISA 测量该脂质运载蛋白突变蛋白的血浆浓度。用来测定血浆半衰期的血液采样在不同时间点进行,接着进行测试脂质运载蛋白突变蛋白的给药。

[0272] 针对四个脂质运载蛋白突变蛋白所得到的血浆半衰期总结于下文的表 11 中。例如,该数据显示,与单独的脂质运载蛋白突变蛋白相比较,与可以结合 HSA 的部分缀合的脂质运载蛋白突变蛋白具有更长的半衰期。

[0273] 表 11:

[0274]

分子	Biacore_Anti PCSK9			Biacore_Anti HSA			LDLR 结合 (IC50, nM)		T1/2 (h)
	ka (1/Ms)	ka (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	ka (1/s)	KD (M)			
							无 HSA	有 HSA	
SEQ ID NO: 62	1.1 E+05	2.9 E-04	2.6 E-10	-	-	-	1.36	0.93	0.99
SEQ ID NO: 82	1.5 E+05	3.7 E-04	2.5 E-10	-	-	-	1.68	1.33	0.86
SEQ ID NO: 83	7.1 E+05	2.7 E-04	3.8 E-10	2.2 E+06	4.2 E-05	1.9 E-11	1.93	1.26	24
SEQ ID NO: 84	7.5 E+05	3.0 E-04	3.9 E-10	2.4 E+06	3.0 E-05	1.3 E-11	1.09	1.09	32

[0275] 本文示例性所描述的实施方式可以适当地在没有本文中未具体公开的任何一种或多种要素、一种或多种限制的情况下实施。因此,例如,术语“包含”、“包括”、“含有”等应被宽泛地解读且无限制。另外,本文所采用的术语和表达被用作为描述的术语而非限制,并且无意图在使用这些术语和表达时,排除掉显示和描述的特征的任何等同物或其部分,而是认可各种修改可以在本发明要求保护的范围内。因此,应当理解的是,虽然这些实施方式已通过优选的实施方式和任选的特征而被具体公开,本领域技术人员可以寻求其修改和变化,并且这样的修改和变化被认为是在本发明的范围内。本文所述的所有专利、专利申请、教科书和同行评审的出版物均通过引用全文并入本文。此外,当在通过引用并入本文的参考文献中的定义或使用的术语与本文所提供该术语的定义不一致或相反时,适用本文所提供的该术语的定义,而不适用该参考文献中该术语的定义。每个较窄种类和亚属分组落入一般性公开范围内,也形成本发明的一部分。这包括本发明的一般描述,且具有从该种类中取出任何主题的条件或负面限制,而不管该去除的材料是否在本文中具体陈述。此外,当特

征是以马库什组的形式描述时,本领域技术人员将认识到,本发明还由此以该马库什组中任何单独成员或亚组的形式描述。进一步的实施方式将由以下的权利要求书中变得显而易见。

[0001]

序列表

<110> 第一三共株式会社

<120> PCSK9 的新颖结合蛋白

<130> LC15310015P

<150> US 61/781,511

<151> 2013-03-14

<150> EP13175023.4

<151> 2013-07-04

<160> 89

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 158

<212> PRT

<213> 人类

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白

<400> 1

His His Leu Leu Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr
1 5 10 15

Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Phe Pro Glu Met Asn
20 25 30

Leu Glu Ser Val Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn
35 40 45

Leu Glu Ala Lys Val Thr Met Leu Ile Ser Gly Arg Cys Gln Glu Val

[0002]

50	55	60
Lys Ala Val Leu Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp		
65	70	75 80
Gly Gly Lys His Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His		
85	90	95
Tyr Ile Phe Tyr Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Lys Pro Val Arg Gly		
100	105	110
Val Lys Leu Val Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu		
115	120	125
Asp Phe Glu Lys Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile		
130	135	140
Leu Ile Pro Arg Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly Ser Asp		
145	150	155
<210> 2		
<211> 152		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白		
<400> 2		
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys		
1	5	10 15
Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Phe Pro Glu Met Asn Leu Glu Ser Val		
20	25	30

[0003]

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Leu Ile Ser Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Glu Leu His Gly Lys Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 3

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 3

[0004]

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Pro Tyr Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 4

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

[0005]

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 4

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Trp Gln Cys Asp Thr Gly Leu Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Ser Tyr Ala Gly Ala Phe Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Glu Cys Gly Gly Trp Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly

[0006]

145

150

<210> 5

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 5

Ala	Ser	Asp	Glu	Glu	Ile	Gln	Asp	Val	Ser	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Lys
1				5					10					15	

Ala	Met	Thr	Val	Asp	His	Glu	Trp	Asn	Gly	His	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Val
			20					25					30		

Thr	Pro	Met	Thr	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Gly	Gly	Asn	Leu	Glu	Ala	Lys
			35				40					45			

Val	Thr	Met	Ser	Tyr	Arg	Gly	Arg	Ser	Gln	Glu	Val	Lys	Ala	Val	Leu
	50					55				60					

Glu	Lys	Thr	Asp	Glu	Pro	Gly	Lys	Tyr	Thr	Ala	Pro	Gly	Gly	Gln	His
65					70					75				80	

Val	Ala	Tyr	Ile	Ile	Arg	Ser	His	Val	Lys	Asp	His	Tyr	Ile	Phe	Tyr
			85					90					95		

Ser	Glu	Gly	Ser	Trp	Pro	Gly	Tyr	Pro	Val	Pro	Gly	Val	Trp	Leu	Val
			100				105					110			

Gly	Arg	Asp	Pro	Lys	Asn	Asn	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Asp	Phe	Glu	Lys
			115				120					125			

[0007]

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 6
<211> 152
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 6

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Thr Asp Asn Ser Pro Met Phe Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Gln Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Thr His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Ala Glu Arg Gly Arg Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

[0008]

	100	105	110
Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys			
	115	120	125
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg			
	130	135	140
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly			
	145	150	
<210> 7			
<211> 152			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白			
<400> 7			
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys			
1	5	10	15
Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Ala Ser Trp Pro Arg Ser Val			
	20	25	30
Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys			
	35	40	45
Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu			
	50	55	60
Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Gly Ser His			
65	70	75	80

[0009]

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Asn Arg Gln Gly Asp Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 8

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 8

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Lys Gly Pro Thr Pro Leu Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Phe His Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu

[0010]

50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Tyr Gly Gly Arg His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Ala Ser Val Gly Asn Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 9
<211> 152
<212> PRT
<213> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 9

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Thr Glu His Leu Ala Asp Trp Ala Asn Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

[0011]

Val Thr Met His Gln Pro Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Ala Tyr Pro Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 10

<211> 152

<212> PRT

<213> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 10

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Ala Asp Met Gly Asp Trp Pro Asn Ser Val
20 25 30

[0012]

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Phe Thr Arg Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Thr Gly Gly Glu His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

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

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 11

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 11

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys

[0013]

1	5	10	15	
Ala Met Thr Val Asp Trp Arg Leu Asp Asn Glu Leu Trp Thr Ser Val	20	25	30	
Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys	35	40	45	
Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu	50	55	60	
Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Gly Ser His	65	70	75	80
Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr	85	90	95	
Ser Glu Gly Pro Arg Asn Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val	100	105	110	
Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys	115	120	125	
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg	130	135	140	
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly	145	150		
<210> 12				
<211> 152				
<212> PRT				
<213> 人工				

[0014]

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 12

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Leu Asp Trp Gln Cys Asp Thr Gly Leu Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Ser Tyr Ala Gly Ala Phe Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Glu Cys Gly Gly Trp Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

[0015]

<210> 13
<211> 152
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 13

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Thr Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Pro His Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg

[0016]

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 14
<211> 152
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 14

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Thr Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Pro His Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

[0017]

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
 115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
 130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
 145 150

<210> 15

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 15

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
 20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Ile Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Gly Val Lys Val Val Leu
 50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Met Gly Gly Ser Gln
 65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr

[0018]

	85	90	95
Pro Glu Gly Pro Tyr Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val			
100	105	110	
Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys			
115	120	125	
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg			
130	135	140	
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly			
145	150		
<210> 16			
<211> 152			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白			
<400> 16			
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys			
1	5	10	15
Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val			
20	25	30	
Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys			
35	40	45	
Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu			
50	55	60	

[0019]

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Thr Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Pro Tyr Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 17

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 17

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

[0020]

35	40	45
Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu		
50	55	60
Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Ser Gly Gly Ser His		
65	70	75
		80
Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr		
	85	90
		95
Ser Glu Gly Pro His Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val		
	100	105
		110
Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys		
	115	120
		125
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg		
	130	135
		140
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly		
145	150	
<210>	18	
<211>	152	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白	
<400>	18	
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys		
1	5	10
		15

[0021]

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Ala Leu Glu Gly Gly Gly Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Val Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Gly Ala Tyr Ile Thr Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

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

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 19

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

[0022]

<400> 19

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Met Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 20

[0023]

<211> 152

<212> PRT

<213> 人丁

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 20

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Val Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Ser Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Pro Glu Gly Pro Tyr Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

[0024]

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 21

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 21

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Leu Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Pro His Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

[0025]

115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 22
<211> 152
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 22

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Ala Ser Trp Pro Arg Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Asp Arg His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

[0026]

Ser Glu Gly Asn Leu Gln Gly Glu Thr Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 23

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 23

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Ala Ser Trp Pro Arg Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Gly Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Gly Ser His

[0027]

65	70	75	80
Val Glu His Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr			
85	90	95	
Ser Lys Gly Asn Leu Gln Gly Glu Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val			
100	105	110	
Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys			
115	120	125	
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg			
130	135	140	
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly			
145	150		
<210> 24			
<211> 152			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白			
<400> 24			
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys			
1	5	10	15
Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Ala Ser Trp Pro Arg Ser Val			
20	25	30	
Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys			
35	40	45	

[0028]

Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Glu Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Asn Leu Gln Gly Glu Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 25

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 25

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

[0029]

Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Ala Ser Trp Pro Arg Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Asp Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Gly Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Asp Ser His
65 70 75 80

Val Ser Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Leu Tyr
85 90 95

Ser Val Gly Asn Leu Gln Gly Glu Thr Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 26

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

[0030]

<400> 26

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Ala Ser Trp Pro Arg Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Val Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Lys Leu Gln Gly Glu Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 27

[0031]

<211> 152

<212> PRT

<213> 人丁

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 27

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Gly Ser Trp Pro Arg Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Asn Trp Arg Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Lys Leu Gln Gly Glu Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

[0032]

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 28

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 28

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Gly Ala Trp Pro Arg Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Thr Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Lys Leu Gln Gly Glu Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

[0033]

115	120	125
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg		
130	135	140
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly		
145	150	
<210>	29	
<211>	237	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	抗体 31H4 的轻链的氨基酸序列	
<220>		
<221>	信号	
<222>	(1)..(20)	
<400>	29	
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser		
1	5	10 15
Gly Ala Tyr Gly Glu Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly		
	20	25 30
Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn		
	35	40 45
Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr		
	50	55 60
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ser Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val		
65	70	75 80

[0034]

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala
85 90 95

Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser
100 105 110

Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 30

[0035]

<211> 152

<212> PRT

<213> 人丁

<220>

<223> SEQ ID NO: 22 所示的突变蛋白的变体

<400> 30

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Ala Ser Trp Pro Arg Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Asp Arg His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Asn Leu Gln Gly Glu Thr Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

[0036]

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 31

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 13 所示的突变蛋白的变体

<400> 31

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Thr Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Pro His Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

[0037]

115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 32
<211> 152
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> SEQ ID NO: 20 所示的突变蛋白的变体

<400> 32

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Val Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Ser Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

[0038]

Pro Glu Gly Pro Tyr Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 33

<211> 472

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体 31H4 的重链的氨基酸序列

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(19)

<400> 33

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

[0039]

Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Ser Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Tyr Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Tyr Asp Ala
115 120 125

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

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

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220

[0040]

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
225 230 235 240

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
245 250 255

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
260 265 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
275 280 285

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
305 310 315 320

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
325 330 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
340 345 350

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
355 360 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
385 390 395 400

[0041]

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 34
 <211> 692
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 根据 SWISS PROT 数据库登录号 Q8NBP7 的全长人类前蛋白转换酶枯草杆菌蛋白酶
 /kexin 第 9 类 (PCSK9)

<400> 34

Met Gly Thr Val Ser Ser Arg Arg Ser Trp Trp Pro Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ala Arg Ala Gln Glu
 20 25 30

Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala Leu Arg Ser Glu
 35 40 45

[0042]

Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr Thr Ala Thr Phe
50 55 60

His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr Val Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu Arg Thr Ala Arg
85 90 95

Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu Thr Lys Ile Leu
100 105 110

His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val Lys Met Ser Gly
115 120 125

Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Asp Tyr Ile Glu
130 135 140

Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg
145 150 155 160

Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp Gly
165 170 175

Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp
180 185 190

His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp Phe Glu Asn Val
195 200 205

Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp
210 215 220

[0043]

Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly
225 230 235 240

Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln
245 250 255

Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg
260 265 270

Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu Leu Pro
275 280 285

Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu
290 295 300

Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp
305 310 315 320

Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile Thr Val
325 330 335

Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr Leu Gly
340 345 350

Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Glu Asp Ile
355 360 365

Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val Ser Gln Ser Gly
370 375 380

Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala Ala Met Met Leu
385 390 395 400

[0044]

Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ile
405 410 415

His Phe Ser Ala Lys Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp
420 425 430

Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu Pro Pro Ser Thr
435 440 445

His Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val Trp Ser Ala His
450 455 460

Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala Ile Ala Arg Cys Ala Pro Asp
465 470 475 480

Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Lys Arg Arg
485 490 495

Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val Cys Arg Ala His
500 505 510

Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala Arg Cys Cys Leu
515 520 525

Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ala
530 535 540

Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln Gln Gly His Val Leu Thr
545 550 555 560

Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly Thr His Lys Pro
565 570 575

[0045]

Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys Val Gly His Arg
580 585 590

Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly Leu Glu Cys
595 600 605

Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu Gln Val Thr Val
610 615 620

Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Ala Leu Pro Gly
625 630 635 640

Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys Val Val
645 650 655

Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Glu Glu Ala Val
660 665 670

Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser
675 680 685

Gln Glu Leu Gln
690

<210> 35

<211> 580

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 质粒 pTLPC26 (XbaI-HindIII)

[0046]

<400> 35
 tctagataac gagggcaaaa aatgaaaaag acagctatcg cgattgcagt ggctctggct 60
 ggcttcgcta ccgtagcgea ggccgccica gacgaggaga ttcaggatgt gtcagggaac 120
 tggatctga aggccatgac ggtggacagg gagttccig agatgaatct ggaatcggtg 180
 acacceatga cctcacgac cctggaagg ggcaacctgg aagccaaggt caccatgetg 240
 ataagtggcc ggagccagga ggtgaaggcc gtcttgaga aaactgacga gccgggaaaa 300
 tacacggccg acgggggcaa gcacgtggca tacatcatca ggtcgcaegt gaaggaccac 360
 tacatctttt actctgagg cgagctccac gggaagccgg tcccaggggt gtgctctgtg 420
 ggcagagacc ccaagaacaa cctggaagcc ttggaggact ttgagaaagc cgcaggagcc 480
 cgcggactca gcacggagag catctcctc cccaggcaga gcgaaaccag ctctccaggg 540
 agegcttggc ctcaccgca gtctgaaaaa taataagctt 580

<210> 36
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> SEQ ID NO: 3 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 36
 gcctcagaac aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagc catgacgggtg 60
 gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgtaacac cgatgacct gactacactg 120
 gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccaggaagtc 180
 aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgatggg tggcagccat 240
 gtggcgtaga tcattcgtag ccatgtttaa gateactata tcttttatc cgaaggctcg 300
 tatcagggcg cgcgggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360
 gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcacc 420

[0047]

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 37

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 4 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 37

gccctcagacg aggagattca ggaatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gattggcaat gtgatactgg gctgtggact tctgttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atgtcttacg caggggcatt tcaggaggtg 180

aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cgcccgatgg cggtaaacaat 240

gttgccatata tcatttcagc ccaatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgaggcgag 300

tgtgggggggt ggcctgttcc aggggtgtgg ctcgtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagcccttg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 38

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 5 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 38

gccctcagacg aggagattca ggaatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gaccacgaat ggaacggcca ttactatacg agcgtaacac cgatgaccct gactacaactg 120

gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgtcttata gcggcgcag ccaggaagtc 180

[0048]

aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgccggg tggccaacat	240
gtggcgtaga tcattcgtag ccatgtttaa gatcactata tcttttattc cgaaggttct	300
tggccgggct atccggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggacttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 39
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> SEQ ID NO: 6 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 39	
gcctcagacg aggagattca ggaigtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg	60
gacttcaccg acaactctcc catgtttacg agcgtaacac cgaigaccct gactacactg	120
gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgcagtatg ccggccgcag ccaggaagtc	180
aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgatagg tggcaccat	240
gtggcgtaga tcattcgtag ccatgtttaa gatcactata tcttttattc cgaaggtgcc	300
gaacgcggcc gtccggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggacttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 40
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

[0049]

<223> SEQ ID NO: 7 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 40

```
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gaccgcttta aaatcgccag ctggccccgc agcgtaacac cgatgaccct gactacactg      120
gaggggcggca acctggagge gaaggtcacc atgaattggt ggggccgcag ccaggaagtc      180
aaagcggitt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgcaggg tggcagccat      240
gtggcgta ca tcttcgtag ccatgttaaa gatcactata tcttttattc cgaaggtaat      300
cgtcagggcg atccgggtgc aggggtgtgg ctctgtggga gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc      420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                456
```

<210> 41

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 8 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 41

```
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gacttcaagg gccccacgcc cctctggacg agcgtaacac cgatgaccct gactacactg      120
gaggggcggca acctggagge gaaggtcacc atgttccatg ccggccgcag ccaggaagtc      180
aaagcggitt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgtacgg tggccgcatc      240
gtggcgta ca tcttcgtag ccatgttaaa gatcactata tcttttattc cgaagggtgc      300
agcgtgggca acccggtgcc aggggtgtgg ctctgtggga gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc      420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                456
```

[0050]

<210> 42
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 9 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 42
 gcctcagacg aggagattca ggaatgtgtca gggacgtggt atctgaagge catgacggtg 60
 gacacggaac acttagccga ttgggcgaat agcgtaacac cgatgaccct gactacactg 120
 gagggcggca acctggagge gaaggtcacc atgcaccaac cgggccgcag ccaggaagtc 180
 aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgatagg tggcagccat 240
 gtggcgtaca tcattcgtag ccatgttaaa gatcactata tctttattc cgaagggtgc 300
 tatecgggca gcccggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360
 gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420
 ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 43
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 10 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 43
 gcctcagacg aggagattca ggaatgtgtca gggacgtggt atctgaagge catgacggtg 60
 gaccgcgcgg acatgggcga ttggcccaat agcgtaacac cgatgaccct gactacactg 120
 gagggcggca acctggagge gaaggtcacc atgttcaccc gcggccgcag ccaggaagtc 180
 aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgacggg tggcgaacat 240

[0051]

gtggcgtaca tcattcgtag ccatgttaaa gatcactata tcttttattc cgaaggtaacg	300
ttaacaggcc gtccgggtgcc aggggtgtgg ctctgtgggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 44
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 11 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 44

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagcc catgacgggtg	60
gactggcgtc tcgataatga actctggacg agcgtaacac cgatgaccct gactacactg	120
gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccaggaagtc	180
aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgcaggg tggcagccat	240
gtggcgtaca tcattcgtag ccatgttaaa gatcactata tcttttattc cgaagggtccg	300
cgtaatggcg cgccgggtgcc aggggtgtgg ctctgtgggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 45
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 12 所示的突变蛋白的 DNA 序列

[0052]

<400> 45
 gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgactttg 60
 gattggcaat gtgatactgg gctgtggact tctgttacgc caatgactct gactaccctt 120
 gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atgtettacg caggggcatt tcaggaggtg 180
 aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacat 240
 gttgcctata tcattcgcag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgag 300
 tgtggggggt ggctgttcc aggggtgtgg ctctgtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360
 gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420
 ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 46
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> SEQ ID NO: 13 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 46
 gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60
 gacttcagcc gcggggacgc gataatggacg agcgtaacac cgatgacctt gactacactg 120
 gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg cggccgcag ccaggaagtc 180
 aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccacgatggg tggcagccat 240
 gtggcgtaca tcatccgtag cctgttcaaa gatcactata tcttttattc cgaaggcccc 300
 catcagggcg cgccggtgcc aggggtgtgg ctctgtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360
 gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420
 ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

[0053]

<210> 47

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 14 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 47

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gacitcagec gcggggacgc gatatggacg agcgtaaacac cgatgaccct gactacactg 120

gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccaggaagtc 180

aaagcgggtct tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgatggg tggcagccat 240

giggcgtaca tcactcgtag ccatgttaaa gatcactata tcttttattc cgaagggtccg 300

catcagggcg cgcgggtgcc aggggtgtgg ctctgtgggc gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcaccacca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 48

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 15 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 48

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gacitcagec gcggggacgc gatatggact agcgtaaacac cgatgaccct gactatactg 120

gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccagggagtc 180

aaagtggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgatggg tggcagccaa 240

giggcgtaca tcactcgtag ccatgttaaa gatcactata tcttttattc cgaagggtccg 300

[0054]

tatcagggcg cgccggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360
gaagcccttg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcate 420
ctcatcecca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 49
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> SEQ ID NO: 16 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 49
gcctcagacg aggagattca ggaigtgtca gggacgtggt atctgaagc catgacggtg 60
gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgttacgc caatgactct gactaccctt 120
gaaggcggca atctggagcg taaggtcacc atgatgtatg ccgcccgcag ccaggaagtc 180
aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccacgatggg tggcagccat 240
gtggcgta ca tcttcgtag ccacgttaaa gatcactata tcttttatc cgaagcccg 300
tatcagggcg cgccggttcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360
gaagcccttg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcate 420
ctcatcecca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 50
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> SEQ ID NO: 17 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 50
gcctcagacg aggagattca ggaigtgtca gggacgtggt atctgaagc catgacggtg 60

[0055]

gacttttcga ggggggatgc gatttggacg agcgtaacac cgaagaccct gactacactg	120
gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ctggccggag ccaggaggtg	180
aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaatata cegccagtgg gggtctctcat	240
gtggcgtaca tcattcgtag ccatgttata gatcaactata tcttttattc cgaaggtcct	300
catcaggggg ctccggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcctcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 51
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 18 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 51	
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgttgt atctgaagge catgacggtg	60
gacttcagcc gcggggacgc gataatggacg agcgtaacac cgaagaccct gactgcactg	120
gagggcggcg gcctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccaggaagtc	180
aaagtggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaatata ccgcgatggg tggcagccat	240
ggggcgtaca tcactcgtag ccatgttata gatcaactata tcttttattc cgaaggtcct	300
tatcggggcg cgccggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcctcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 52
 <211> 456

[0056]

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 19 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 52

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggg atctgaaggc catgacgggtg 60

gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgtaaac cgaatgacct gactacactg 120

gagggcggca acatggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccgcccgcag ccaggaagtc 180

aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgatggg tggcagccat 240

gtggcgtaaa tcatctctag ccatgttaaa gatcactata tcttttattc cgaaggctctg 300

tatcagggcg cgcgggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaceccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcacc 420

ctcaccacca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 53

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 20 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 53

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggg atctgaaggc catgacgggtg 60

gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgtaaac cgaatgacct gactacactg 120

gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccgcccgcag ccaggaagtc 180

aaagcggttt tagaaaagac cgacgagccg ggcaaataca ccgtgatggg aggtagccat 240

gtggcgtaaa tcatctctag ccatgttaag gatcactata tcttttacct cgaaggctcg 300

tatcagggcg cgcgggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaceccaa gaacaacctg 360

[0057]

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 54

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 21 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 54

gcctcagacg aggagattca ggaatgtgtca gggacgttgt atctgaaggc catgacggtg 60

gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgtaacgc cgaigaccct gactacactg 120

gagggcggtg acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag tcaggaagtc 180

aaagcggttt tagaaaagac cgacgagccg ggcaaataca ccgcaatggg tggcagccat 240

gtggcgtaga tccttcgtag ccatgttaaa gatcactata tcttttatcc cgaaggtccg 300

catcagggcg cgccggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 55

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 22 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 55

gcctcagacg aggagattca ggaatgtgtca gggacgttgt atctgaaggc catgacggtg 60

gaccgcttta aaatcgccag ctggccccgc agcgtaactc cgatgaccct gactacactg 120

[0058]

gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgaattggt ggggccgcag ccaggaagtc	180
aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgcaggg tgaccgccat	240
gtggcgtaca tcattcgtag ccaigttaaa gatcaactata tcttttattc cgaagtaat	300
cttcagggcg aaacgggtccc aggggtgtgg ctctgtgggc gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactitga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 56
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> SEQ ID NO: 23 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 56	
gctcagacg aggagatca ggalgtgtca gggacgtggt atctgaagc catgacgglg	60
gaccgettta aaatgccag ctggcccegc agcgtaacac cgatgacct gactaactg	120
ggggcggca acctggagge gaaggtcacc atgaattggt ggggccgcag ccaggaagtc	180
aaagctgttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgcaggg tggtagccat	240
gtggagcata tcattcgtag ccatgttaaa gatcaactata tcttttattc caaagtaat	300
cttcagggcg aaccgggtccc aggggtgtgg ctctgtgggc gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactitga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 57
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工

[0059]

<220>

<223> SEQ ID NO: 24 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 57

gcctcagacg aggagattca ggaigtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gaccgcttta aaatcgccag ctggccccgc agcgtaacac cgatgaccct gactacactg 120

gagggcggca acctggagge gaaggtcacc atgaattggt ggggccgcag ccaggaagtc 180

aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgcaggg tggcagccat 240

gtggagtaca tcattcttag ccatgttaaa gatcactata tcttttattc cgaaggtaat 300

cttcagggcg aaccggctcc aggggtgtgg ctctgtgggc gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcadc 420

ctcaccacca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 58

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 25 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 58

gcctcagacg aggagattca ggaigtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gaccgcttta aaatcgccag ctggccccgc agcgtaacac cgatgaccct gacaacactg 120

gagggcggca acctggagge gaaggtcacc atgaattggt ggggccgcag ccaggatgac 180

aaagcggttt taggaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgcaggg tgacagccat 240

gtgtcgtaca tcattcttag ccatgttaaa gatcactata tcctttattc cgtaggtaat 300

cttcagggcg aaccggctcc aggggtgtgg ctctgtgggc gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcadc 420

[0060]

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 59

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 26 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 59

gccacagacg aggagattca ggaatgtgtc gggacgttgt atctgaaggc catgacggtg 60

gacagggtta agattgcttc gtggcctagg agcgtaacac cgatgaccct gactacactg 120

gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgaatttgt ggggccggag ccaggaggtg 180

aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgccgtggg gggctctcat 240

gtggcgtaca tcattcgtag ccaatgttaa gatcactata tcttttattc cgaaggtaag 300

ttgcaggggg agccgggtgc aggggtgttg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagcccttg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 60

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 27 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 60

gccacagacg aggagattca ggaatgtgtc gggacgttgt atctgaaggc catgacggtg 60

gacagggtta agattgggtc gtggcctagg agcgtaacac cgatgaccct gactacactg 120

gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgaatttgt ggggccggag ccaggaggtg 180

[0061]

```

aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcccaggg gggctctcat 240
gtggcgtaca tcattcgtag ccatgttaaa gactactata tcttttattc cgaaggtaag 300
ctgcaggggg agccggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

```

<210> 61

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 28 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 61

```

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggg atctgaaggc catgacggtg 60
gacaggttta agattgggtgc gtggccgagg agcgtaacac cgatgaacct gactacactg 120
gagggcggca acctggagge gaaggtcacc atgaattggg ggggccggag ccaggaggtg 180
aaagcggttt tagaaaagac cgacgaaccg ggcaaataca ccgccacggg gggctctcat 240
gtggcgtaca tcattcgtag ccatgttaaa gactactata tcttttattc cgaaggtaag 300
ttgcaggggg agccggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

```

<210> 62

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

[0062]

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 62

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Ala Ser Trp Pro Arg Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Asp Arg His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Asn Leu Gln Gly Glu Thr Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

[0063]

<210> 63

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 63

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Val Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Pro Gly Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg

[0064]

	130	135	140
	Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly		
	145	150	
<210>	64		
<211>	152		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白		
<400>	64		
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys			
1	5	10	15
Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val			
	20	25	30
Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys			
	35	40	45
Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu			
	50	55	60
Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Val Met Gly Gly Ser His			
65	70	75	80
Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr			
	85	90	95
Ser Glu Gly Pro Arg Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val			

[0065]

	100	105	110
Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys			
115	120	125	
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg			
130	135	140	
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly			
145	150		
<210>	65		
<211>	152		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白		
<400>	65		
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys			
1	5	10	15
Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val			
20	25	30	
Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys			
35	40	45	
Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu			
50	55	60	
Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Thr Met Gly Gly Ser His			

[0066]

35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Val Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Pro Asp Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 67
<211> 152
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 67

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys

[0068]

1	5	10	15
Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val			
20	25	30	
Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys			
35	40	45	
Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu			
50	55	60	
Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Met Met Gly Gly Ser His			
65	70	75	80
Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr			
85	90	95	
Ser Glu Gly Pro Val Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val			
100	105	110	
Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys			
115	120	125	
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg			
130	135	140	
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly			
145	150		

<210> 68

[0069]

<211> 152

<212> PRT

<213> 人丁

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 68

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Val Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Pro Pro Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

[0070]

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 69
<211> 152
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 69

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Val Met Gly Gly Ser His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Pro Lys Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

[0071]

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
 115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
 130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
 145 150

<210> 70

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 70

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
 20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
 50 55 60

Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Thr Met Gly Gly Ser His
 65 70 75 80

[0072]

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Pro Arg Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 71

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 71

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Ser Arg Gly Asp Ala Ile Trp Thr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Met Tyr Ala Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu

[0073]

50	55	60
Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Val Met Gly Gly Ser His		
65	70	75 80
Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr		
	85	90 95
Ser Glu Gly Pro Leu Gln Gly Ala Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val		
100	105	110
Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys		
115	120	125
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg		
130	135	140
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly		
145	150	

<210> 72
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 62 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 72

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacgggtg	60
gaccgcttta aaatcgccag ctgccccegc agcgtaacte cgatgaccct gactacactg	120
gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgaattggt ggggccgcag ccaggaagtc	180
aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccgcgcaggg tgaccgcat	240

[0074]

gtggcgtaca tcattcgtag cccggttaaa gatcactata tcttttattc cgaaggtaat	300
oitcagggcg aaacggtecc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagcettgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcate	420
ctcatcecca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 73

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 63 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 73

gcctcagacg aggagattca ggatgtgica gggacgtggc atctgaagcc catgacggcg	60
gacttcagcc ggggggacgc gatatggacg agcgtaacac cgatgacct gactacactg	120
gagggcgcca acctggagcg gaaggtcacc atgatgtatg ccggcccgag ccaggaagtc	180
aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccgttatggg tggcagccat	240
gtggcgtaca tcattcgtag cccgtgcaaa gatcactata tcttttattc cgaaggcccg	300
gggcagggcg cgcgggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagcettgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcate	420
ctcatcecca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 74

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

[0075]

<223> SEQ ID NO: 64 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 74

```
gcctcagacg aggagattca ggaigtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgtaacac cgatgaccct gactacactg      120
gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccaggaagtc      180
aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccgtgatggg tggcagccat      240
gtggcgtaca tcattccgtag cctgtcaaaa gatcactata tcttttatte cgaaggcccg      300
cgtcaggggc cgccgggtgcc aggggtgtgg ctctgtgggc gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc      420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                456
```

<210> 75

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 65 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 75

```
gcctcagacg aggagattca ggaigtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgtaacac cgatgaccct gactacactg      120
gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccaggaagtc      180
aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccgtgatggg tggcagccat      240
gtggcgtaca tcattccgtag cctgtcaaaa gatcactata tcttttatte cgaaggcccg      300
gctcaggggc cgccgggtgcc aggggtgtgg ctctgtgggc gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc      420
```

[0076]

ctcctcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 76
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 66 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 76
gcctcagacg aggagattca gcatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60
gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgtaacac cgatgaccct gactacactg 120
gagggcggca acctggagge gaaggtcacc atgatgtatg cggccgcag ccaggaagtc 180
aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccatgatggg tggcagccat 240
gtggcgtaca tcatccgtag cctgtcaaa gatcactata tcttttattc cgaaggeccg 300
gacagggcgc cgccggigcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420
ctcctcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 77
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 67 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 77
gcctcagacg aggagattca gcatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60
gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgtaacac cgatgaccct gactacactg 120

[0077]

gagggcggca accaggagge gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccaggaagtc	180
aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccatgatggg tggcagccat	240
gtggcgtaga tcatccgtag cctgtcaaa gatcaactata tcttttattc cgaaggeccg	300
gttcagggcg cgcgggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatt	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 78

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 68 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 78

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgttgt atctgaagge catgacgggtg	60
gacttcagcc gcggggagcg gatatggacg agegtaacac cgatgaccct gactaacctg	120
gagggcggca accaggagge gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccaggaagtc	180
aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccatgatggg tggcagccat	240
gtggcgtaga tcatccgtag cctgtcaaa gatcaactata tcttttattc cgaaggeccg	300
cgcagggcg cgcgggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatt	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 79

<211> 456

<212> DNA

[0078]

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 69 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 79

```
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacgggtg      60
gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgtaacac cgatgacctt gactacactg      120
gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccaggaagtc      180
aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccgttatggg tggcagccat      240
gtggcgtaaa tcattccgtg ccctgtcaaa gatcaactata tcttttattc cgaaggcccg      300
aagcagggcg cgccgggtgcc aggggtgtgg ctctgtggga gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatt      420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg      456
```

<210> 80

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 70 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 80

```
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacgggtg      60
gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgtaacac cgatgacctt gactacactg      120
gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccaggaagtc      180
aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccgtgatggg tggcagccat      240
gtggcgtaaa tcattccgtg ccctgtcaaa gatcaactata tcttttattc cgaaggcccg      300
aggcagggcg cgccgggtgcc aggggtgtgg ctctgtggga gagaccccaa gaacaacctg      360
```

[0079]

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcateccca ggcagagega aaccagctct ccaggg 456

<210> 81

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 71 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 81

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gacttcagcc gcggggacgc gatatggacg agcgtaacac cgatgaccct gactacactg 120

gagggcggca acctggaggc gaaggtcacc atgatgtatg ccggccgcag ccaggaagtc 180

aaagcggttt tagaaaggac cgacgaaccg ggcaaataca ccatgatggg tggcagccat 240

gtggcgtaca tcatccgtag ccctgtcaaa gatcactata tcttttattc cgaaggcccg 300

ctgcagggcg cgccggtgcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcateccca ggcagagega aaccagctct ccaggg 456

<210> 82

<211> 153

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 82

[0080]

Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu
1 5 10 15

Lys Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Ala Ser Trp Pro Arg Ser
20 25 30

Val Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala
35 40 45

Lys Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val
50 55 60

Leu Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Asp Arg
65 70 75 80

His Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe
85 90 95

Tyr Ser Glu Gly Asn Leu Gln Gly Glu Thr Val Pro Gly Val Trp Leu
100 105 110

Val Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu
115 120 125

Lys Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro
130 135 140

Arg Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 83

<211> 203

<212> PRT

<213> 人工

[0081]

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 83

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Ala Ser Trp Pro Arg Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Asp Arg His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Pro Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Asn Leu Gln Gly Glu Thr Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala
145 150 155 160

[0082]

Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly Val Ser Asp Phe
165 170 175

Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala
180 185 190

Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro Gly
195 200

<210> 84

<211> 210

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类泪液脂质运载蛋白的突变蛋白

<400> 84

Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu
1 5 10 15

Lys Ala Met Thr Val Asp Arg Phe Lys Ile Ala Ser Trp Pro Arg Ser
20 25 30

Val Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala
35 40 45

Lys Val Thr Met Asn Trp Trp Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val
50 55 60

Leu Glu Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Gln Gly Asp Arg
65 70 75 80

[0083]

His Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe
85 90 95

Tyr Ser Glu Gly Asn Leu Gln Gly Glu Thr Val Pro Gly Val Trp Leu
100 105 110

Val Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu
115 120 125

Lys Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro
130 135 140

Arg Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
165 170 175

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
180 185 190

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro Gly Lys
195 200 205

Leu Asn
210

<210> 85

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 白蛋白结合结构域 (ABD)

[0084]

<400> 85

Ser Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr
1 5 10 15

Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val
20 25 30

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

<210> 86

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 62 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 86

gcaagtgatg aagaaattea ggatgttagc ggcacctggc atctgaaage aatgaccgtt 60
gatcgcttta aaatcgcaag ctggcctcgt agcgttaccc cgatgaccct gaccaccctg 120
gaagggtgta atctggaagc aaaagttacc atgaattggt ggggtcgtag ccaagaagtt 180
aaagcagttc iggaacgtac cgatgaaccg ggtaaataca ccgcacaggg tgatcgteat 240
gttgcatata tcattcgtag ccctgtgaaa gaccactaca tcttttatag cgaagtaat 300
ctgcagggtg aaaccgttcc ggggtgttgg ctggttggtc gtgatccgaa aaataacctg 360
gaagcactgg aagatittga aaaagcagcc ggtgcacgtg gtctgagcac cgaaagcatt 420
ctgattccgc gtcagagcga aaccagcagt ccggga 456

<210> 87

<211> 459

<212> DNA

<213> 人工

[0085]

<220>

<223> SEQ ID NO: 82 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 87

```

ggtgcaagtg atgaagaaat tcaggatgtt agcggcacct ggtatctgaa ageaatgacc      60
gttgatcgct ttaaaatcgc aagctggcct cgtagcggtta ccccgatgac cctgaccacc      120
ctggaagggtg gtaatctgga agcaaaagtt accatgaatt ggtggggtcg tagccaagaa      180
gttaaagcag ttctggaacg taccgatgaa ccgggtaaat acaccgcaca gggtgatcgt      240
catgttgcat atatcattcg tagccatgtg aaagaccact acatctttta tagcgaaggt      300
aatctgcagg gtgaaaccgt tccgggtgtt tggtcggttg gtcgtgatcc gaaaaataac      360
ctggaagcac tggaagattt tgaaaaagca gccggtgcac gtggctctgag caccgaaagc      420
attctgattc cgcgtcagag cgaaaccagc agtcgggga                                459

```

<210> 88

<211> 609

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 83 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 88

```

gcgagcgatg aagagatcca agacgtcagc ggcacctggt acctgaaagc aatgactgtc      60
gaccgtttta agatcgcgag ctggcccggt agcgtttacgc caatgaccct gacgaccctg      120
gagggcggca acttggaagc gaaggtagcg atgaattggt ggggtcgcag ccaagaagtg      180
aaagccgttc tggagcgcac ggacgagccg ggtaagtata ccgcgcaggg tgatcgtcat      240
gtggcatata tcattcgcag cccggtgaag gaccactaca tttctactc tgagggtaat      300
ttgcagggtg aaaccgttcc tggcgtttgg ctggtcggtc gtgatccgaa aaacaatctg      360
gaagcactgg aggattttga gaaagctgcc ggtgcgcgtg gcctgtcgac cgagtctatt      420

```

[0086]

ctgattccgc gccagtcgga aacctccagc ccgggtggcg gtggtagcct ggcagaggcg	480
aaagaagcgg ctaacgctga gctggacagc tacggcgctga gcgatttcta taaacgtctg	540
atcgataagg ccaagaccgt cgagggtgtt gaagegciga aagacgcat cctggcggea	600
ttgccgggt	609

<210> 89

<211> 630

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 84 所示的突变蛋白的 DNA 序列

<400> 89

ggtgcaagtg atgaagaaat tcaggatgtt agcggcacct ggtatctgaa agcaatgacc	60
gttgatcgtt ttaaaatcgc aagctggcct cgtagcgta cccgatgac cctgaccacc	120
ctggaagggtg gtaatctgga agcaaaagtt accatgaatt ggtggggtcg tagccaagaa	180
gttaaagcag ttctggaacg taccgatgaa ccgggtaaat acaccgcaca gggatgatgt	240
catgttgcat atatcattcg tagccatgtg aaagaccact acatctttta tagcgaaggt	300
aatctgcagg gtgaaaccgt tccgggtgtt tggttggttg gtcgtgatcc gaaaaataac	360
ctggaagcac tggaagattt tgaaaaagca gccgggtcac gtggtctgag caccgaaagc	420
attctgattc cgcgtcagag cgaaaccagc agtccgggta agcttggagg tggcggaagc	480
ctggcagaag caaaagaagc agcaaacgca gaactggata gctatgggtg tagcgatttc	540
tataaacgcc tgatcgataa agccaaaacc gttgaaggtg ttgaagcaat gaaagatgca	600
attctggcag cactgccggg taagcttaat	630

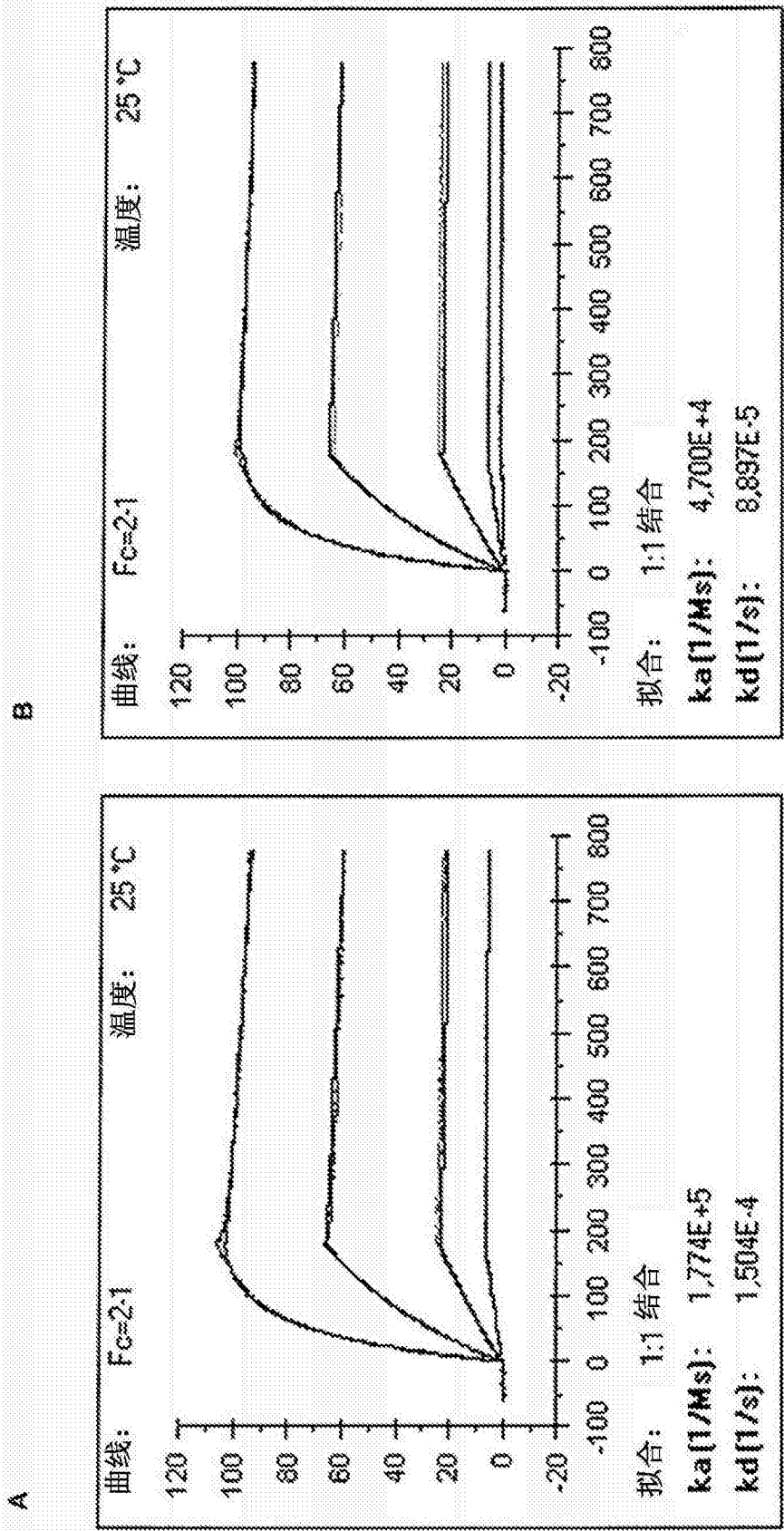


图 1

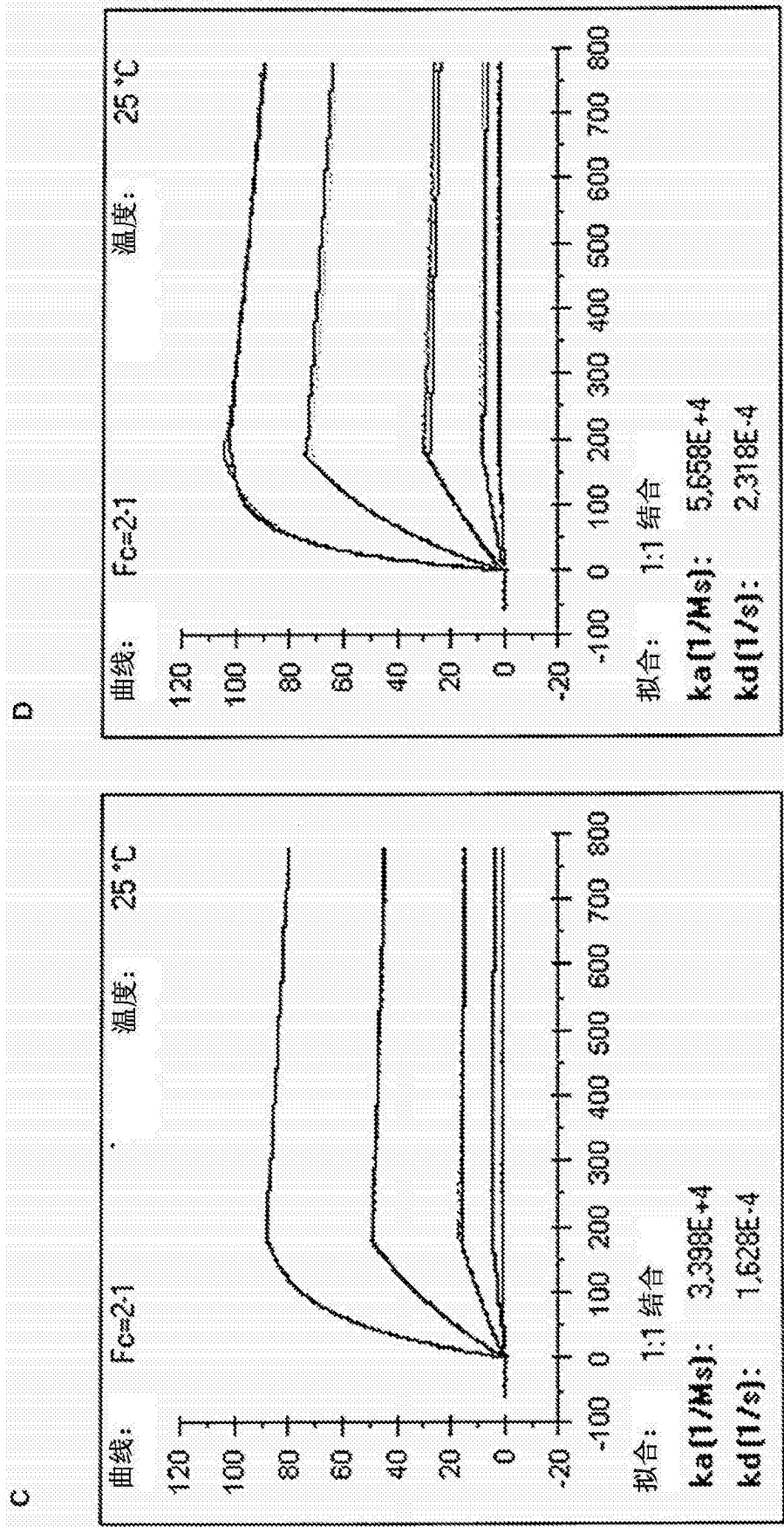
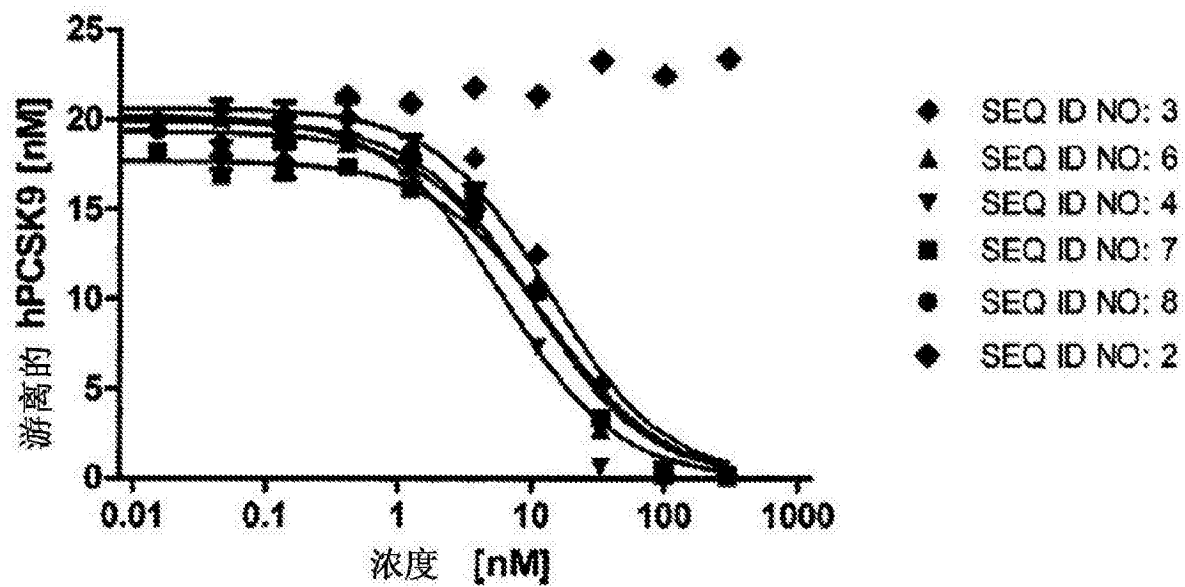


图 1(续)

A



B

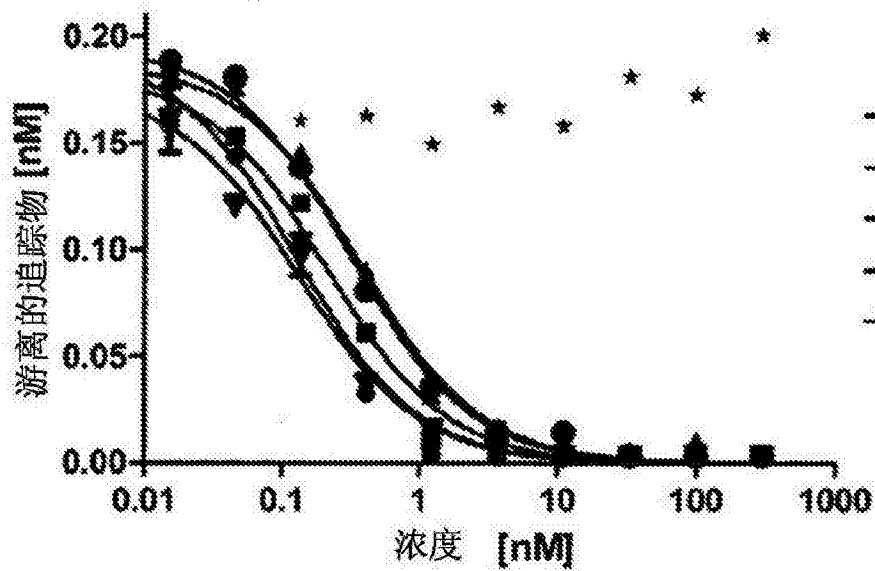
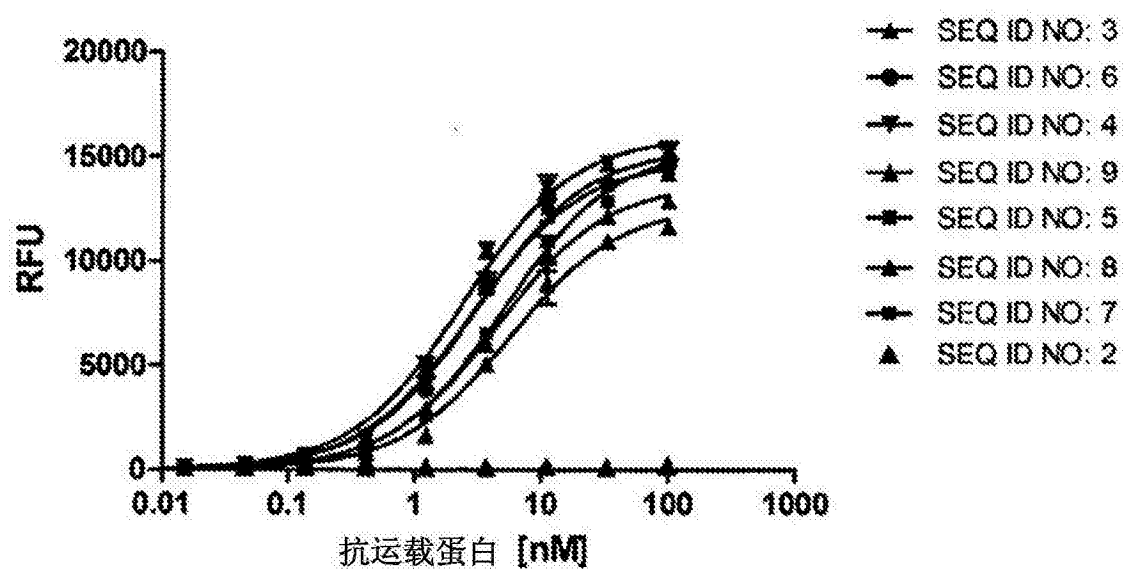


图 2

A



B

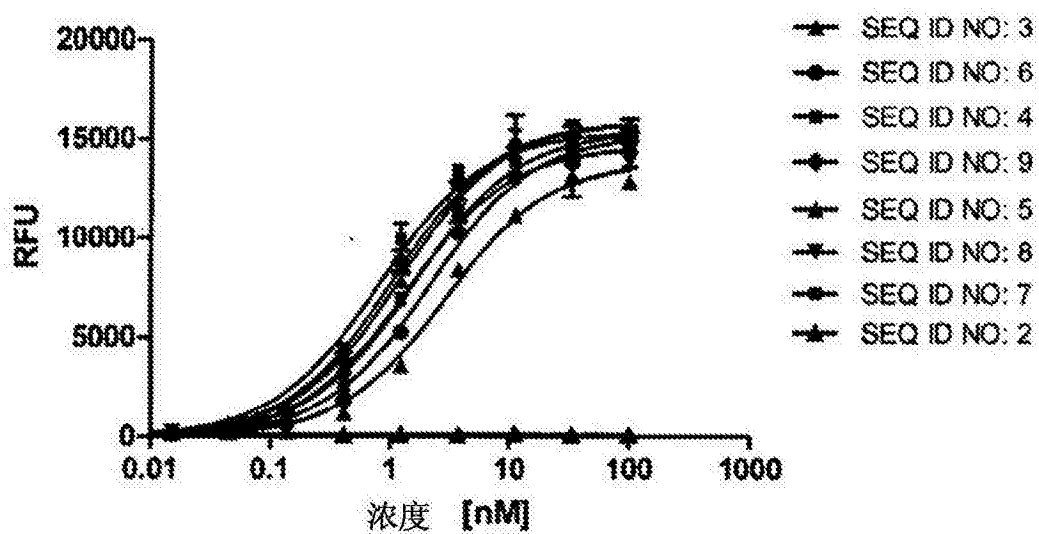
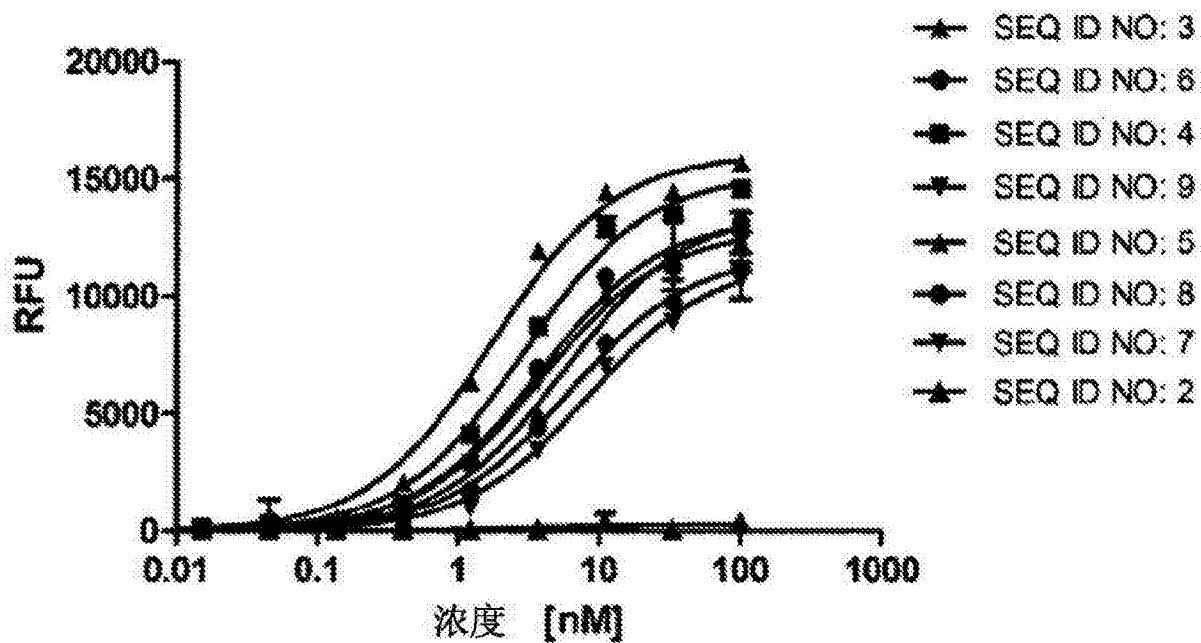


图 3

3C



3D

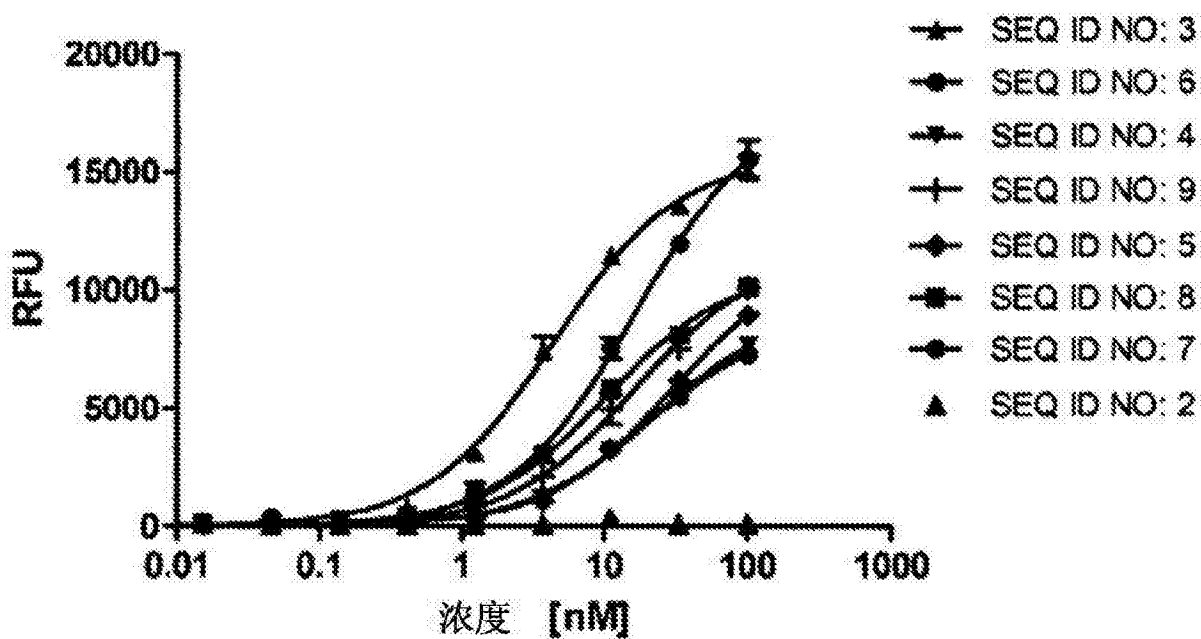


图3(续)

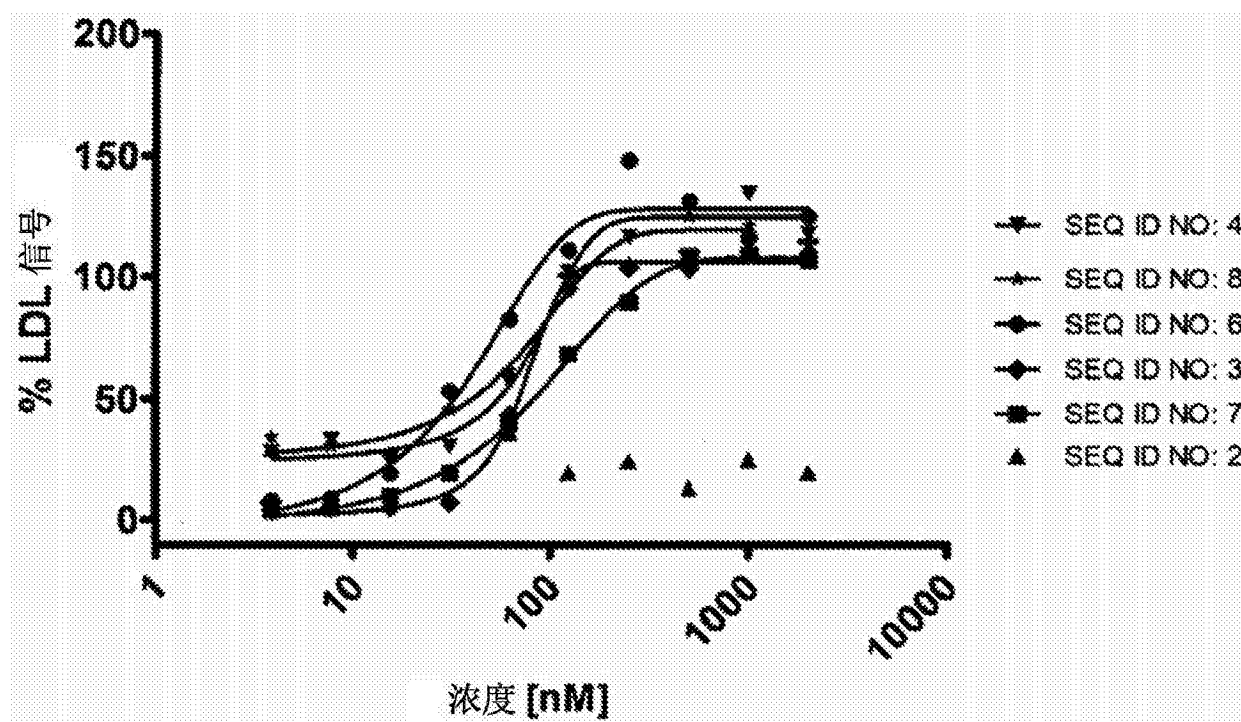


图 4

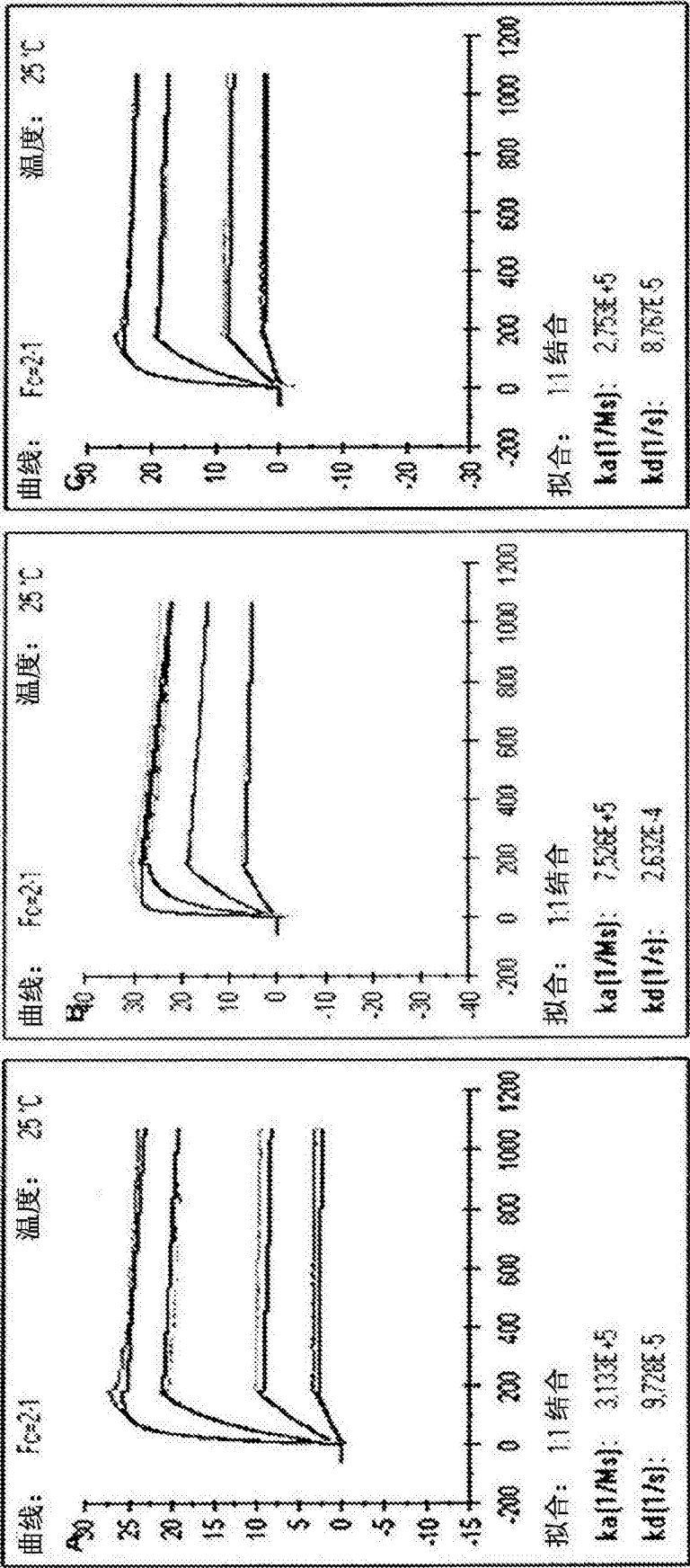


图 5

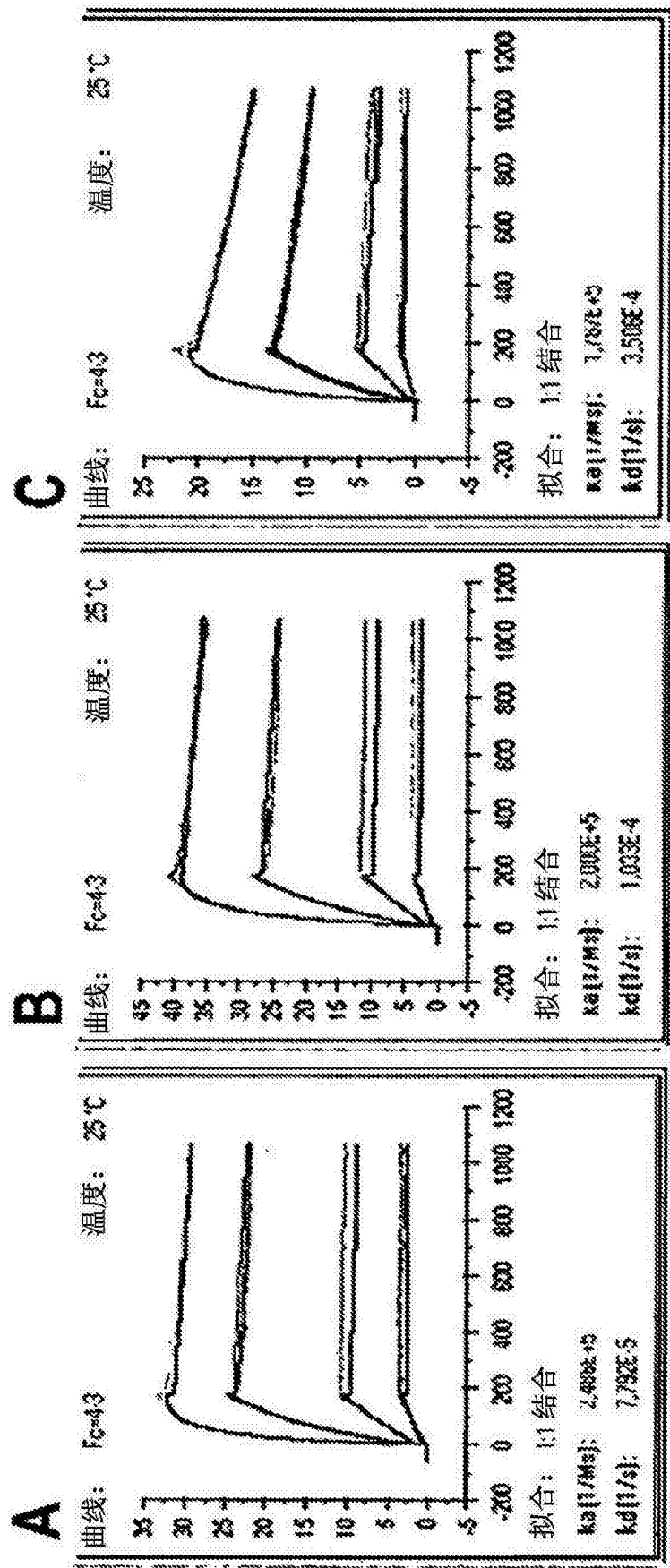


图 6

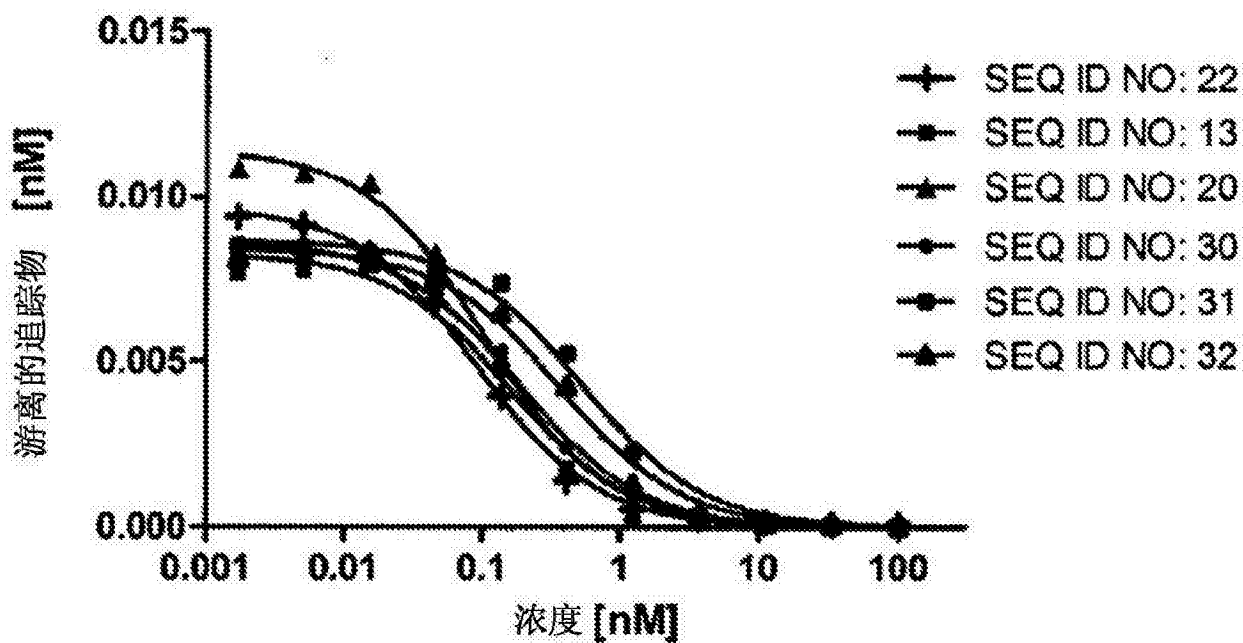


图 7

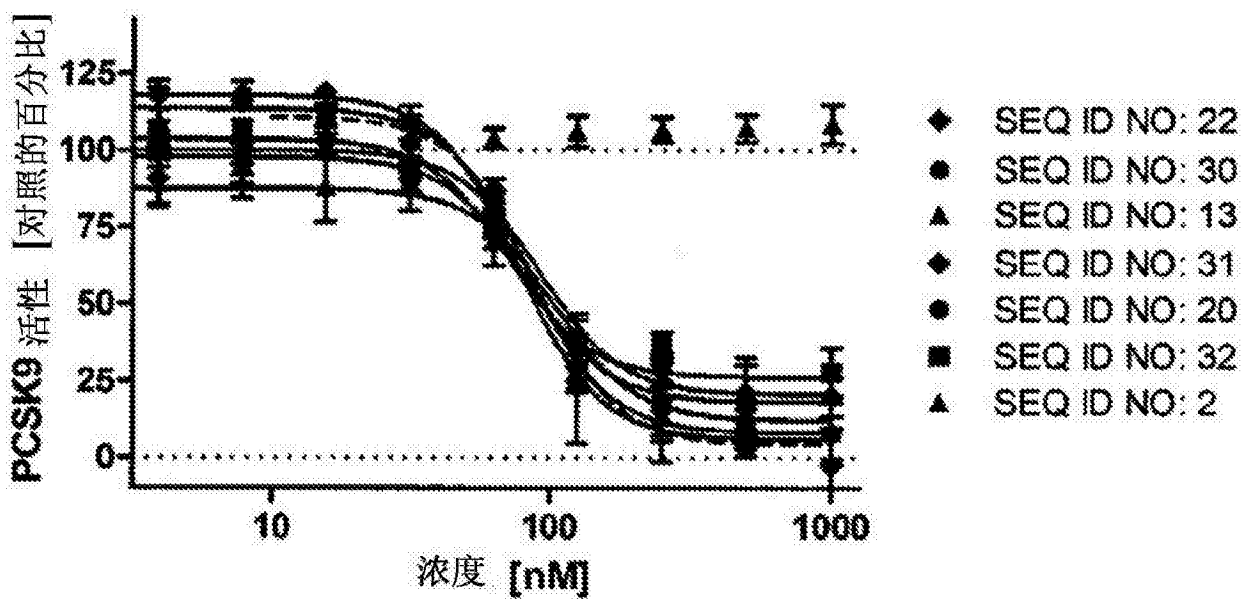


图 8

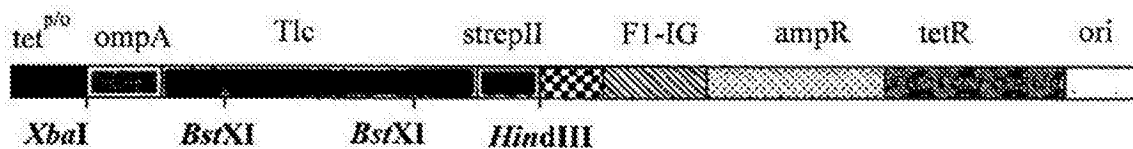


图 9

分子	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
SEQ ID NO: 1	H	H	L	L	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 2					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 3					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 4					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 5					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 6					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 7					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 8					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 9					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 10					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 11					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 12					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 13					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 14					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 15					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 16					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 17					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 18					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 19					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 20					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 21					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 22					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 23					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 24					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 25					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 26					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 27					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 28					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T

图 10

118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

图 10(续)

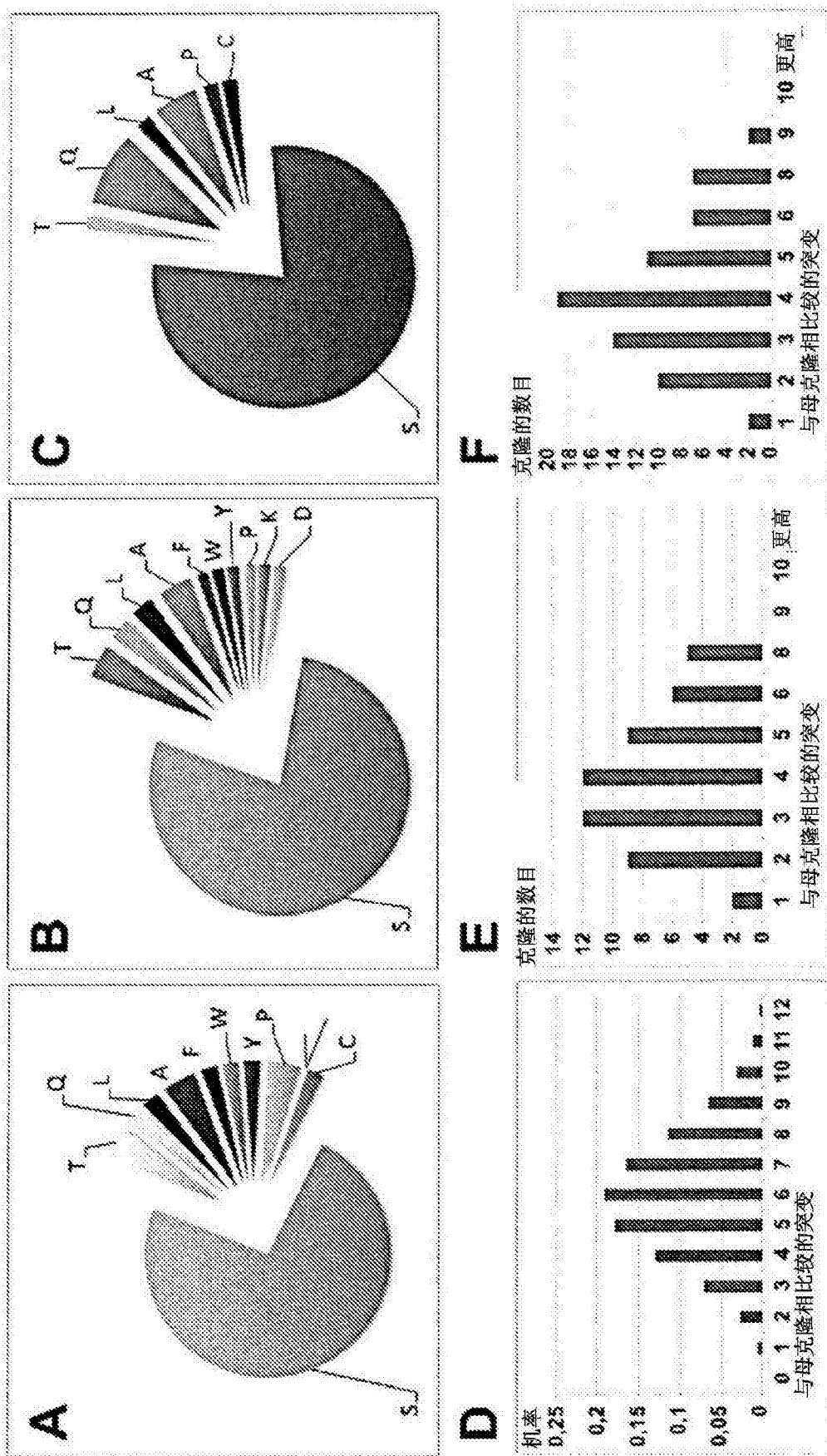


图 11

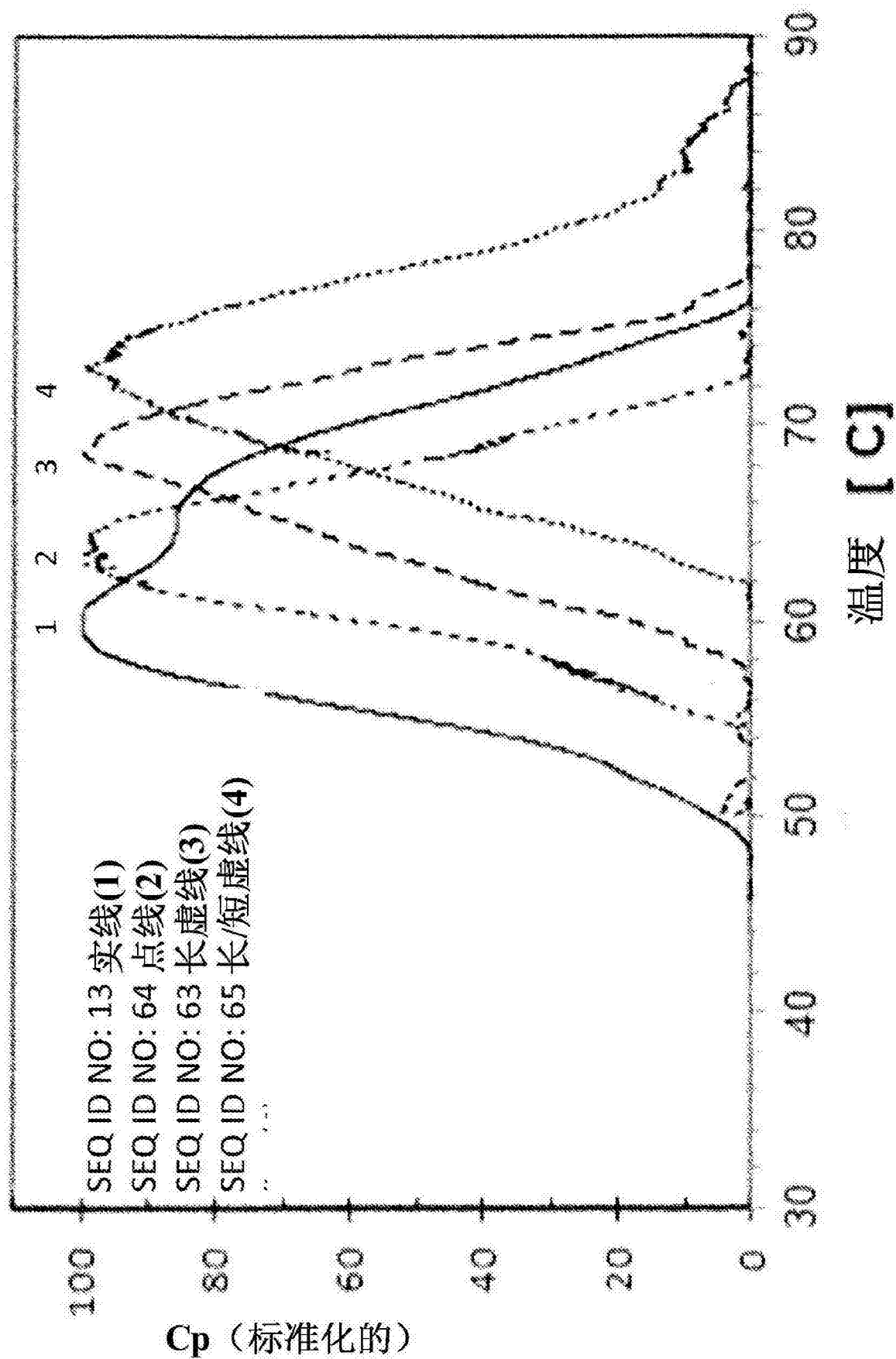


图 12

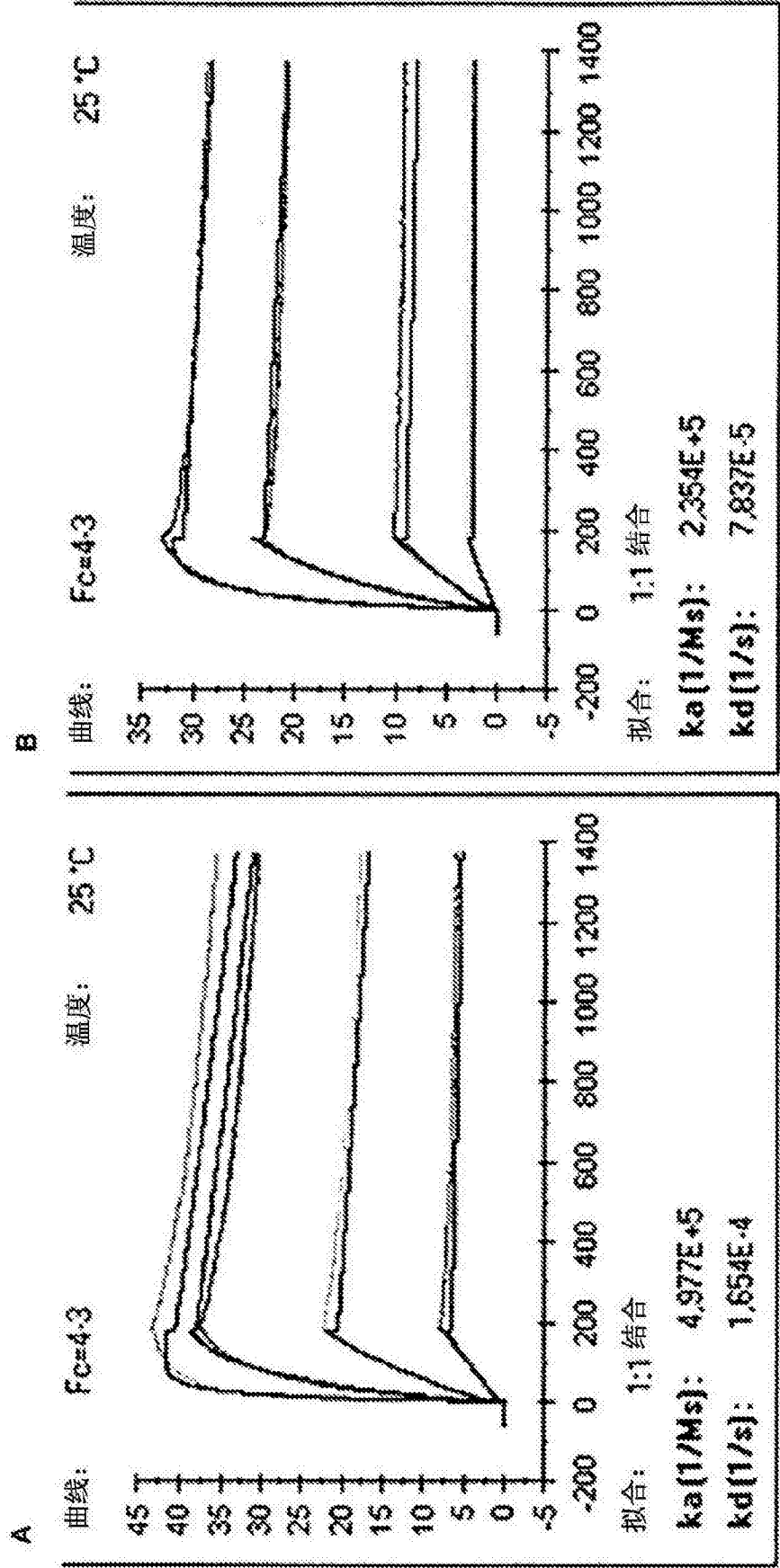


图 13

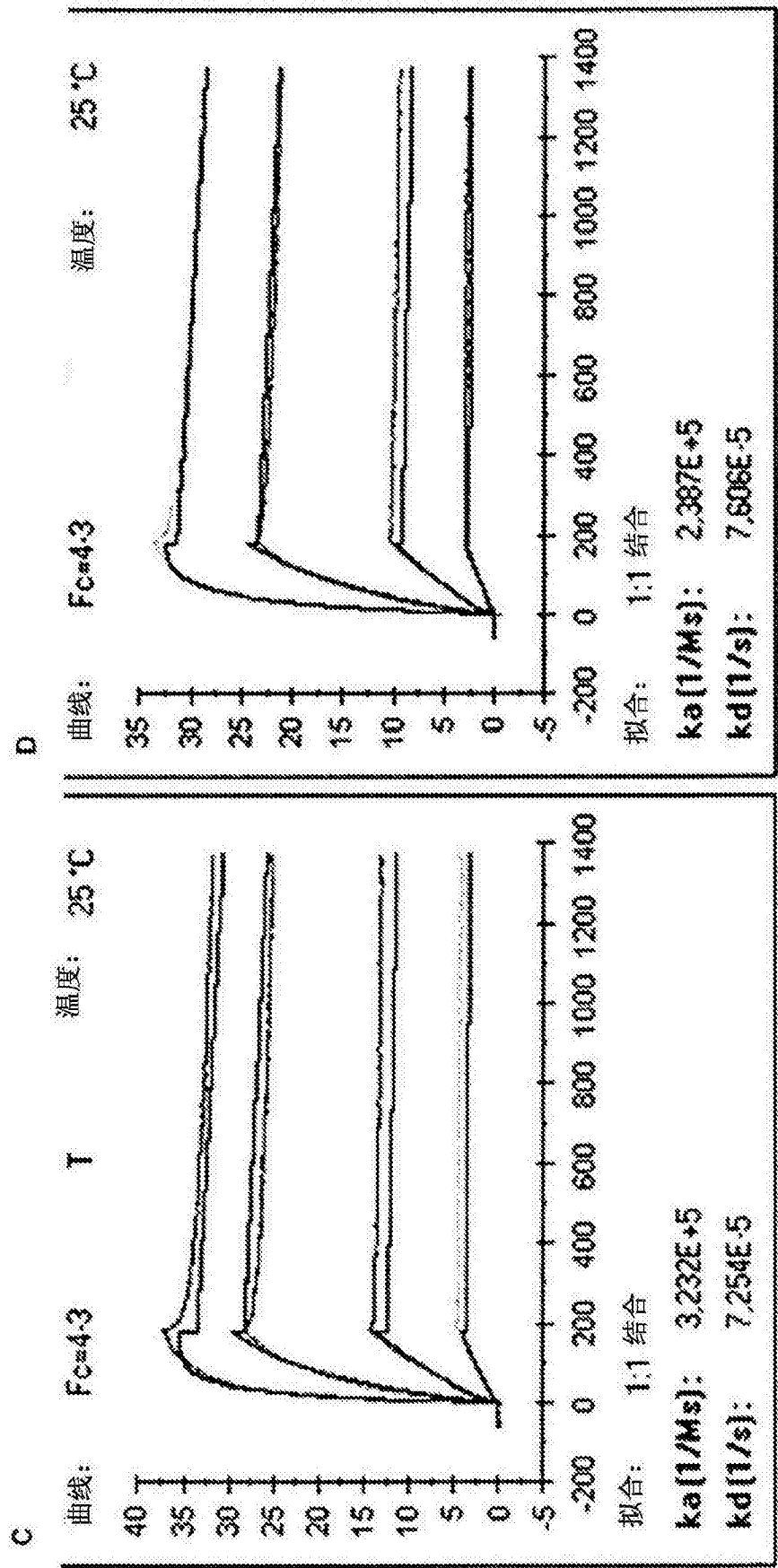


图 13(续)

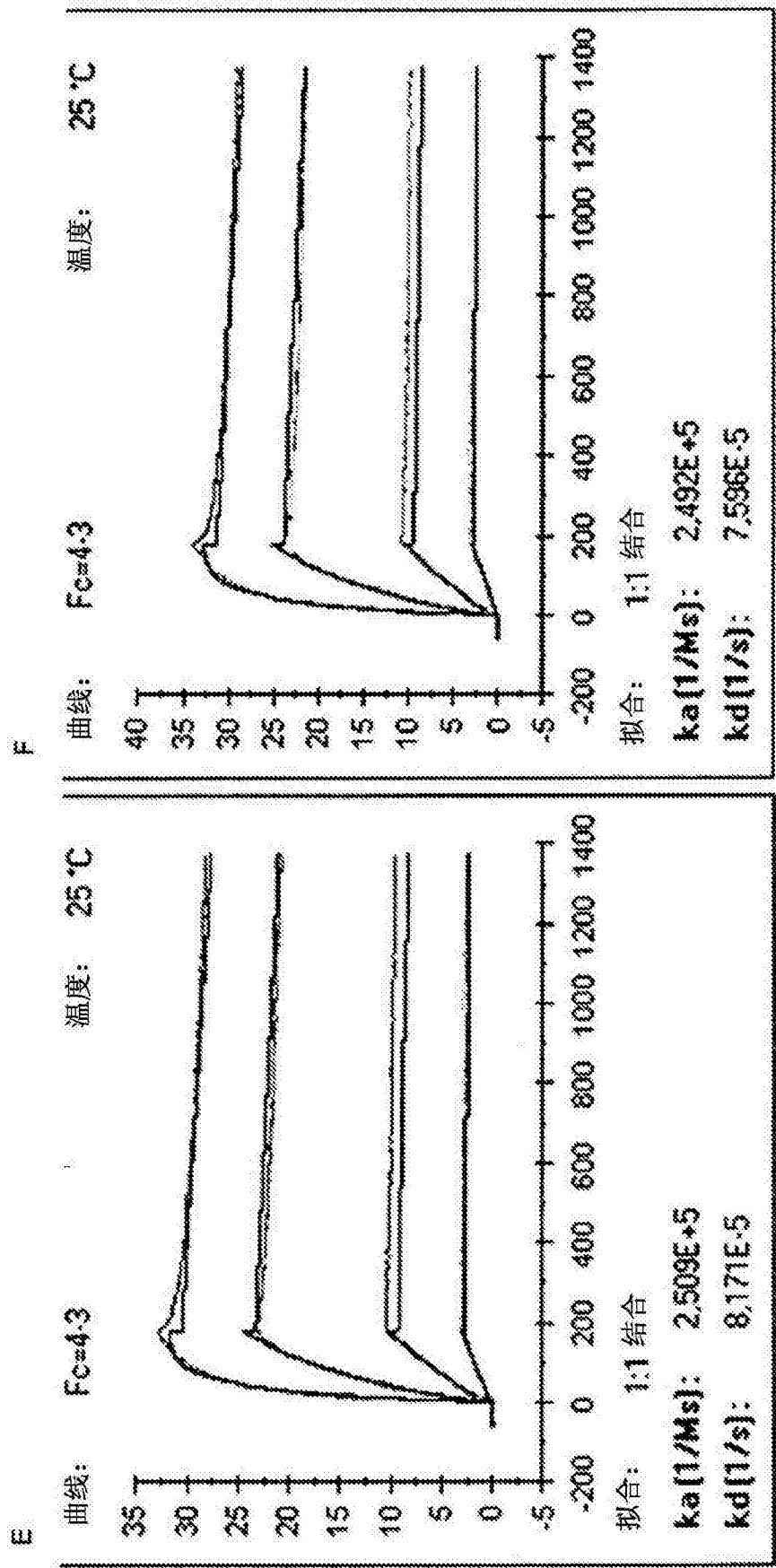


图 13(续)

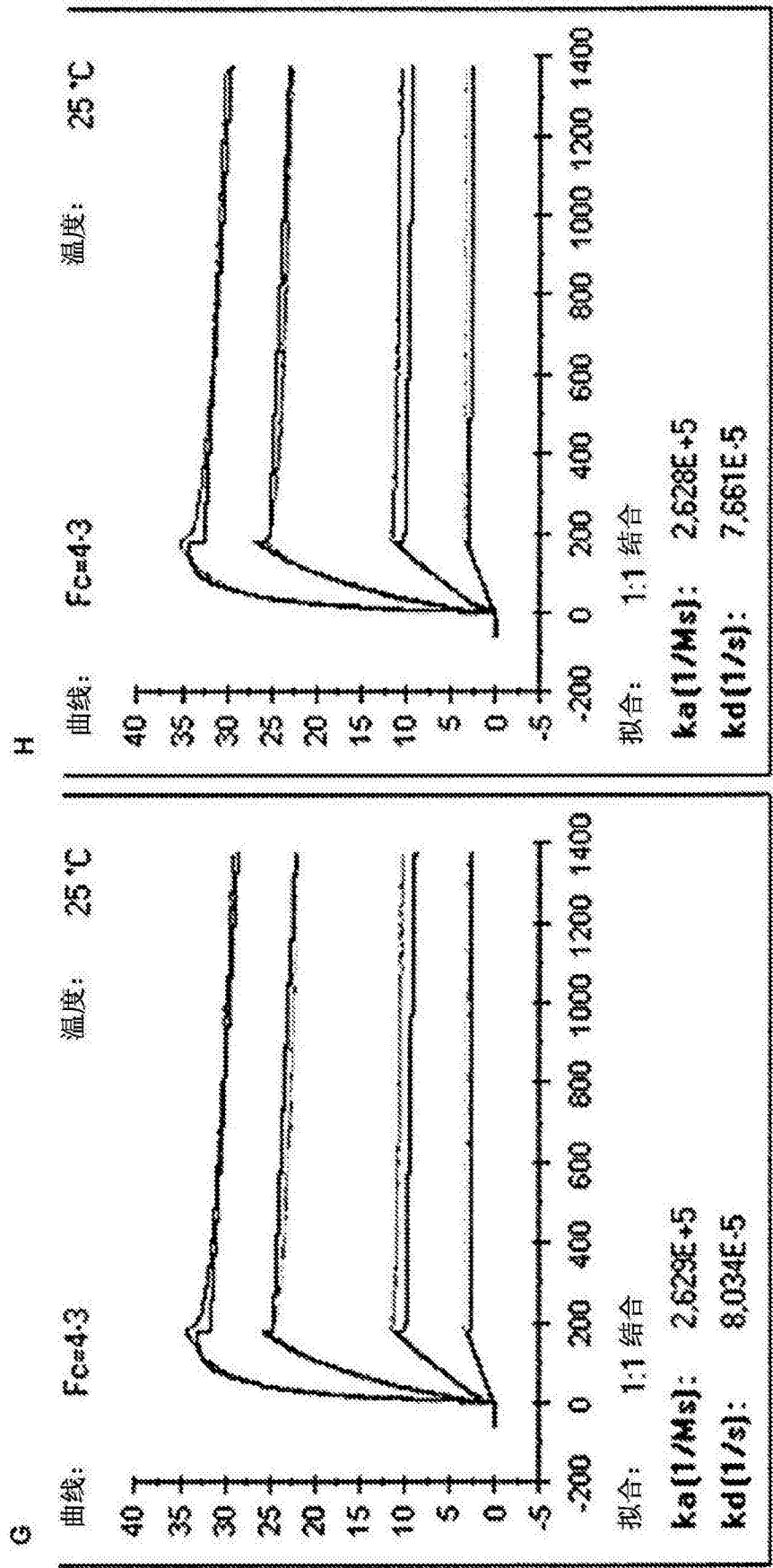


图 13(续)

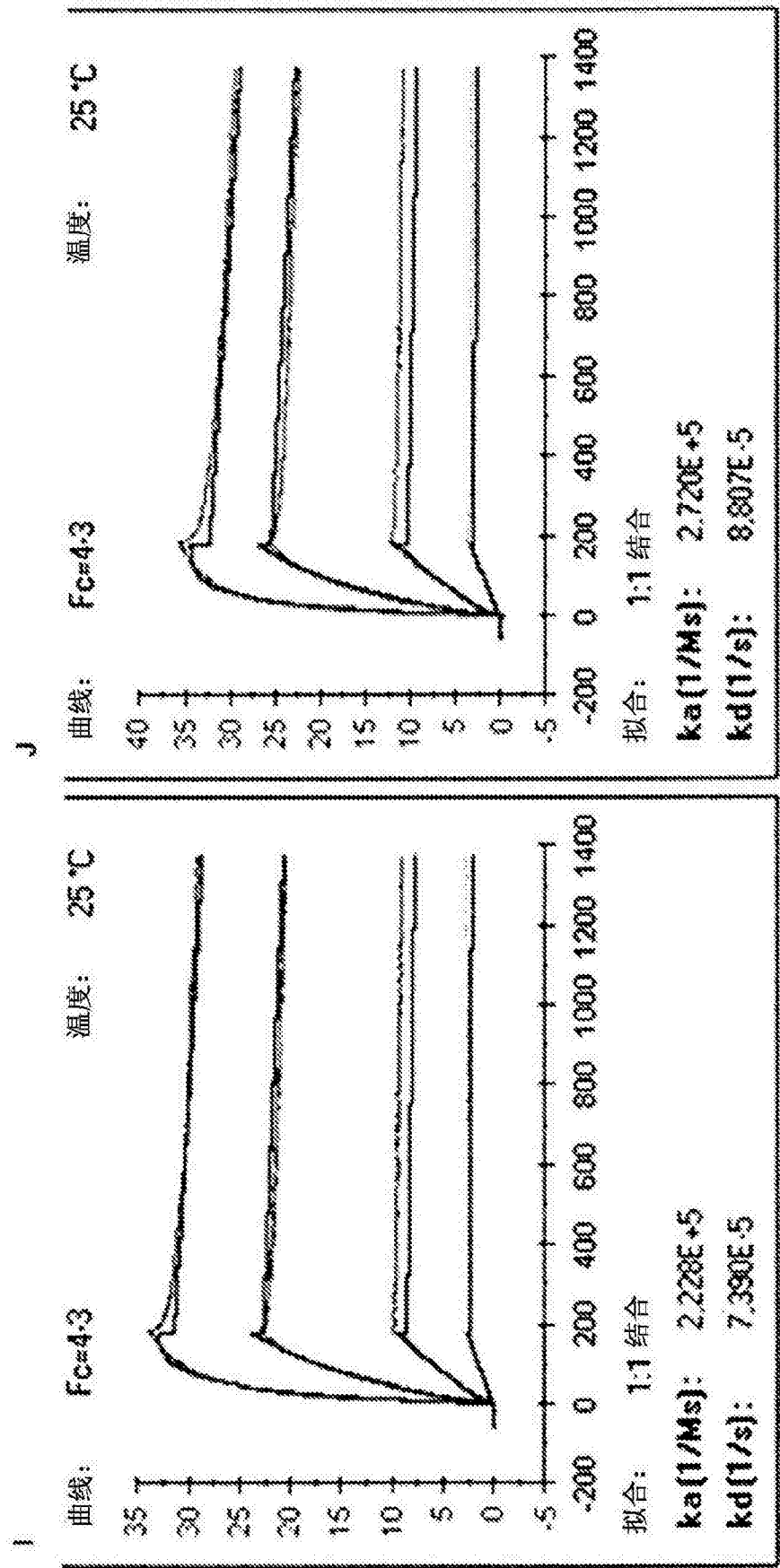


图 13(续)

分子

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
SEQ ID NO: 1	H	H	L	L	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 13					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 63					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 64					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 65					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 66					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 67					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 68					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 69					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 70					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 71					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 22					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T
SEQ ID NO: 62					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
V	D	R	E	S	F	P	E	M	N	L	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	F	S	R	G	G	D	A	I	W	T	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	F	S	R	G	G	D	A	I	W	T	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	F	S	R	G	G	D	A	I	W	T	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	F	S	R	G	G	D	A	I	W	T	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	F	S	R	G	G	D	A	I	W	T	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	F	S	R	G	G	D	A	I	W	T	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	F	S	R	G	G	D	A	I	W	T	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	F	S	R	G	G	D	A	I	W	T	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	F	S	R	G	G	D	A	I	W	T	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	F	S	R	G	G	D	A	I	W	T	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	R	F	K	I	A	S	W	P	R	R	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G
V	D	R	F	K	I	A	S	W	P	R	R	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G

图 14

48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
N	L	E	A	K	V	T	M	L	I	A	G	R	C	Q	E	V	K	A	V	L
N	L	E	A	K	V	T	M	M	Y	A	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L
N	L	E	A	K	V	T	M	M	Y	A	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L
N	L	E	A	K	V	T	M	M	Y	A	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L
N	L	E	A	K	V	T	M	M	Y	A	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L
N	L	E	A	K	V	T	M	M	Y	A	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L
N	L	E	A	K	V	T	M	M	Y	A	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L
N	L	E	A	K	V	T	M	M	Y	A	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L
N	L	E	A	K	V	T	M	M	Y	A	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L
N	L	E	A	K	V	T	M	M	Y	A	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L
N	L	E	A	K	V	T	M	N	W	W	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L
N	L	E	A	K	V	T	M	N	W	W	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L

69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	G	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V	K	D
E	R	T	D	E	P	G	K	Y	T	T	M	G	G	S	H	V	A	Y	I	I	R	S	P	V		

图 14(续)

96	H	Y	I	F	Y	C	E	G	E	L	G	G	P	A	P	V	R	G	V	K	L	V	G
97	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	H	G	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
98	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
99	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
100	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
101	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
102	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
103	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
104	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
105	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
106	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
107	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
108	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
109	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
110	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
111	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
112	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
113	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
114	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
115	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
116	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G
117	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	Q	G	A	A	P	V	P	G	V	W	L	V	G

[illegible]

图 14(续)

