



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116723869 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 08

(21) 申请号 202180080530.X

(22) 申请日 2021.12.08

(30) 优先权数据

63/122,886 2020.12.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/062389 2021.12.08

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/125653 EN 2022.06.16

(71) 申请人 修理生物科技公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 穆拉德·托珀斯 里森

吉列尔梅·切尔曼·佩尔迪冈·

德·奥利维拉

马克·里迪拉 戴维·麦肯齐-刘

加勒特·斯特劳

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限  
责任公司 11240

专利代理师 杜兆东

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书5页 说明书16页

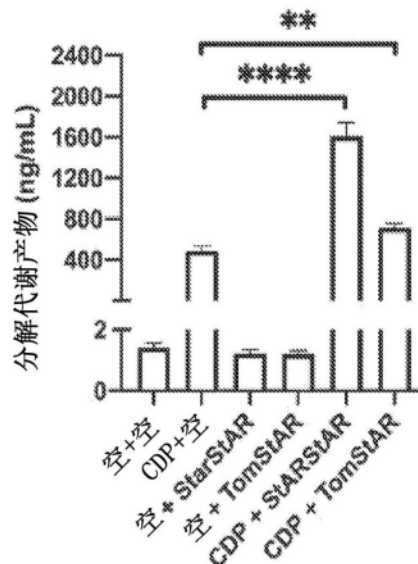
序列表22页 附图6页

(54) 发明名称

增强胆固醇的基于线粒体的流动和分解代谢

(57) 摘要

公开了用于增强细胞、组织或生物体中的胆固醇降解的组合物、方法和系统。在许多实施例中,本公开描述了一种或多种蛋白质或其编码序列用于增强胆固醇流入线粒体中的用途,其中胆固醇被包含细菌相关序列的一种或多种蛋白质降解。本文公开的组合物、方法和系统可用于预防或治疗与患者血液或细胞中高胆固醇水平相关的疾病、失调和病症。



1. 一种核酸组合物,包含:  
用于类固醇生成性急性调节(StAR)蛋白的编码序列;和  
用于胆固醇降解蛋白(CDP)的编码序列,所述胆固醇降解蛋白包括胆固醇脱氢酶(CholD)、3-酮类固醇 $\Delta$ 1-脱氢酶( $\Delta$ 1-KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶(KshAB)、3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶2(HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)中的一种或多种。
2. 根据权利要求1所述的核酸,其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63至188。
3. 根据权利要求1或2所述的核酸,其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63-188的重复。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的核酸,其中StAR蛋白包括TOMM20蛋白的至少一部分。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的核酸,其中所述CDP包括P450。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的核酸,其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的核酸,其中StAR蛋白和所述CDP包括至少一种线粒体信号传导蛋白。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的核酸,其中,所述核酸进一步包含细胞特异性启动子序列。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的核酸,其中,所述核酸包含在脂质纳米颗粒中。
10. 根据权利要求1至8中任一项所述的核酸,其中,所述核酸包含在病毒载体中。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的核酸,用于在治疗具有高胆固醇的受试者中使用。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的核酸,用于在转化哺乳动物细胞中使用。
13. 根据权利要求12所述的核酸,其中,所述哺乳动物细胞在体外转化。
14. 根据权利要求12所述的核酸,其中,所述哺乳动物细胞在体内转化。
15. 根据权利要求1至14中任一项所述的核酸,其中,所述核酸包含在脂质纳米颗粒中。
16. 根据权利要求1至15中任一项所述的核酸,其中,所述核酸包含在患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者的细胞中。
17. 根据权利要求1至16中任一项所述的核酸,用于在降低具有高胆固醇的受试者中的胆固醇中使用。
18. 一种哺乳动物细胞,包含:  
用于工程化的类固醇生成性急性调节(StAR)蛋白或其部分的编码序列;和  
用于胆固醇降解蛋白(CDP)的编码序列,所述胆固醇降解蛋白包括胆固醇脱氢酶(CholD)、3-酮类固醇 $\Delta$ 1-脱氢酶( $\Delta$ 1-KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶(KshAB)、3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶2(HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)中的一种或多种。
19. 根据权利要求18所述的哺乳动物细胞,其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63至188。
20. 根据权利要求18或19所述的核酸,其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63-188的

重复。

21. 根据权利要求18至20中任一项所述的哺乳动物细胞,其中StAR蛋白包括TOMM20蛋白序列的至少一部分。

22. 根据权利要求18至21中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述CDP包括P450。

23. 根据权利要求18至22中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。

24. 根据权利要求18至23中任一项所述的哺乳动物细胞,其中StAR蛋白和所述CDP包括至少一种线粒体信号传导蛋白。

25. 根据权利要求18至24中任一项所述的哺乳动物细胞,其中StAR或CDP的编码序列进一步包括细胞特异性启动子序列。

26. 根据权利要求18至25中任一项所述的哺乳动物细胞,其中StAR或CDP的编码序列整合到所述哺乳动物细胞的基因组中。

27. 根据权利要求18至25中任一项所述的哺乳动物细胞,其中StAR或CDP的编码序列未整合到所述哺乳动物细胞的基因组中。

28. 根据权利要求18至27中任一项所述的哺乳动物细胞,用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。

29. 根据权利要求18至28中任一项所述的哺乳动物细胞,用于在降低受试者中的胆固醇中使用。

30. 根据权利要求18至29中任一项所述的哺乳动物细胞,其中,所述哺乳动物细胞选自肝细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。

31. 一种哺乳动物细胞,包含:

工程化的类固醇生成性急性调节(StAR)蛋白或其部分;以及

胆固醇降解蛋白(CDP),所述胆固醇降解蛋白包括胆固醇脱氢酶(CholD)、3-酮类固醇 $\Delta 1$ -脱氢酶( $\Delta 1$ -KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶(KshAB)、3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶2(HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)中的一种或多种。

32. 根据权利要求31所述的哺乳动物细胞,其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63至188。

33. 根据权利要求31或32所述的哺乳动物细胞,其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63-188的重复。

34. 根据权利要求31至33中任一项所述的哺乳动物细胞,其中StAR蛋白包括TOMM20蛋白的至少一部分。

35. 根据权利要求31至34中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述CDP包括P450。

36. 根据权利要求31至35中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。

37. 根据权利要求31至36中任一项所述的哺乳动物细胞,其中StAR蛋白和所述CDP包括至少一种线粒体信号传导蛋白。

38. 根据权利要求31至37中任一项所述的哺乳动物细胞,其中,所述细胞中StAR蛋白和

CDP的总量的至少10%位于线粒体膜中。

39. 根据权利要求31至38中任一项所述的哺乳动物细胞,其中StAR蛋白或所述CDP由整合到所述哺乳动物细胞的基因组中的基因编码。

40. 根据权利要求31至39中任一项所述的哺乳动物细胞,其中StAR蛋白或所述CDP由基因组外基因编码。

41. 根据权利要求31至39中任一项所述的哺乳动物细胞,用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。

42. 根据权利要求31至40中任一项所述的哺乳动物细胞,用于在降低受试者中的胆固醇中使用。

43. 根据权利要求18至29中任一项所述的哺乳动物细胞,其中,所述细胞选自肝细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。

44. 一种增强哺乳动物细胞中胆固醇降解的方法,包括:

表达非天然的工程化的类固醇生成性急性调节(StAR)蛋白或其部分;以及

表达一种或多种胆固醇降解蛋白(CDP),所述胆固醇降解蛋白包括胆固醇脱氢酶(CholD)、3-酮类固醇 $\Delta$ 1-脱氢酶( $\Delta$ 1-KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶(KshAB)、3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶2(HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63至188。

46. 根据权利要求44或45所述的方法,其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63-188的重复。

47. 根据权利要求44至46中任一项所述的方法,其中StAR蛋白包括TOMM20蛋白的至少一部分。

48. 根据权利要求44至47中任一项所述的方法,其中所述CDP包括P450。

49. 根据权利要求44至48中任一项所述的方法,其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。

50. 根据权利要求44至49中任一项所述的方法,其中StAR蛋白和所述CDP包括至少一种线粒体信号传导蛋白。

51. 根据权利要求44至50中任一项所述的方法,其中StAR蛋白和CDP由细胞特异性启动子序列表达。

52. 根据权利要求44至51中任一项所述的方法,用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。

53. 根据权利要求44至52中任一项所述的方法,用于在降低具有高胆固醇的受试者中的胆固醇中使用。

54. 根据权利要求44至53中任一项所述的方法,其中所述细胞中StAR蛋白和CDP的总量的至少约10%位于线粒体膜中。

55. 根据权利要求44至54中任一项所述的方法,其中StAR蛋白或所述CDP由整合到所述哺乳动物细胞的基因组中的基因表达。

56. 根据权利要求44至54中任一项所述的方法,其中StAR蛋白或所述CDP来自基因组外

基因。

57. 根据权利要求44至56中任一项所述的方法,用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。

58. 根据权利要求44至57中任一项所述的方法,用于在降低受试者中的胆固醇中使用。

59. 根据权利要求44至58中任一项所述的方法,其中,所述细胞选自肝细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。

60. 根据权利要求44至59中任一项所述的方法,其中,所述胆固醇是LDL。

61. 根据权利要求44至59中任一项所述的方法,其中,所述胆固醇是7KC。

62. 一种治疗处于发展高胆固醇风险中或患有高胆固醇的患者的方法,包括:

给予所述患者至少一种修饰的细胞,所述修饰的细胞包括

非天然的工程化的类固醇生成性急性调节(StAR)蛋白或其部分;以及

一种或多种胆固醇降解蛋白(CDP),所述胆固醇降解蛋白包括胆固醇脱氢酶(CholD)、3-酮类固醇 $\Delta$ 1-脱氢酶( $\Delta$ 1-KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶(KshAB)、3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶2(HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63至188。

64. 根据权利要求62或63所述的方法,其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63-188的重复。

65. 根据权利要求62至64所述的方法,其中StAR蛋白包括TOMM20蛋白的至少一部分。

66. 根据权利要求62至65所述的方法,其中所述CDP包括P450。

67. 根据权利要求62至66所述的方法,其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。

68. 根据权利要求62至67所述的方法,其中StAR蛋白和所述CDP包括至少一种线粒体信号传导蛋白。

69. 根据权利要求62至68所述的方法,其中,StAR蛋白和CDP由细胞特异性启动子序列表达。

70. 根据权利要求62至76所述的方法,用于在降低具有高胆固醇的受试者中的胆固醇中使用。

71. 根据权利要求62至71所述的方法,其中,所述细胞中StAR蛋白和CDP的总量的至少约10%位于线粒体膜中。

72. 根据权利要求62至72所述的方法,其中,StAR蛋白或所述CDP由整合到哺乳动物细胞的基因组中的基因表达。

73. 根据权利要求62至72所述的方法,其中StAR蛋白或所述CDP来自基因组外基因。

74. 根据权利要求62至73所述的方法,其中所述患者具有大于200mg/dl的总胆固醇。

75. 根据权利要求62至74所述的方法,其中,所述患者患有非酒精性脂肪肝疾病。

76. 根据权利要求62至74所述的方法,其中所述患者患有非酒精性脂肪肝炎。

77. 根据权利要求62至76所述的方法,其中,所述修饰的细胞源自肝细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。

78. 根据权利要求62至77所述的方法,其中所述方法将所述患者血液中的总胆固醇浓

度降低大于5%。

79. 一种修饰哺乳动物线粒体的方法, 包括:

将至少一种非天然的工程化的类固醇生成性急性调节 (StAR) 蛋白或其部分插入哺乳动物线粒体外膜中; 和

其中所述线粒体包括一种或多种胆固醇降解蛋白 (CDP), 所述胆固醇降解蛋白包括胆固醇脱氢酶 (CholD)、3-酮类固醇  $\Delta 1$ -脱氢酶 ( $\Delta 1$ -KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶 (acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶 (KshAB)、3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶2 (HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白 (P450-FdxR-Fdx)。

80. 根据权利要求79所述的方法, 其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63至188。

81. 根据权利要求79或80所述的方法, 其中StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63-188的重复。

82. 根据权利要求79至81中任一项所述的方法, 其中, StAR蛋白包括TOMM20蛋白的至少一部分。

83. 根据权利要求79至82中任一项所述的方法, 其中, 所述CDP包括P450。

84. 根据权利要求79至83中任一项所述的方法, 其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白 (P450-FdxR-Fdx)。

85. 根据权利要求79至84中任一项所述的方法, 其中, StAR蛋白和所述CDP包括至少一种线粒体信号传导蛋白。

86. 根据权利要求79至85中任一项所述的方法, 其中, StAR蛋白和CDP由细胞特异性启动子序列表达。

87. 根据权利要求79至86中任一项所述的方法, 用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。

88. 根据权利要求79至87中任一项所述的方法, 用于在降低具有高胆固醇的受试者中的胆固醇中使用。

89. 根据权利要求79至88中任一项所述的方法, 其中, 细胞中StAR蛋白和CDP的总量的至少约10%位于线粒体膜中。

90. 根据权利要求79至90中任一项所述的方法, 其中, StAR蛋白或所述CDP由整合到哺乳动物细胞的基因组中的基因表达。

91. 根据权利要求79至89中任一项所述的方法, 其中, StAR蛋白或所述CDP来自基因组外基因。

92. 根据权利要求79至91中任一项所述的方法, 用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。

93. 根据权利要求79至92中任一项所述的方法, 用于在降低受试者中的胆固醇中使用。

94. 根据权利要求79至93中任一项所述的方法, 其中, 细胞选自肝细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。

## 增强胆固醇的基于线粒体的流动和分解代谢

### 技术领域

[0001] 所公开的过程、方法和系统是针对通过增强胆固醇穿梭进线粒体中和在线粒体内降解来治疗具有高水平胆固醇或处于其风险中的受试者。

[0002] 相关申请的引证

[0003] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2020年12月8日提交的名称为“增强胆固醇的基于线粒体的流动和分解代谢(Enhancing mitochondrial-based flow and catabolism of cholesterol)”的美国临时专利申请号63/122,886的优先权权益,在此将其通过引用全文并入本文。

[0004] 序列列表

[0005] 本申请包含序列列表,该序列列表已经以ASC II格式电子提交并且通过引用以其全文结合在此。在2021年12月7日创建的所述ASC II拷贝命名为P289347\_WO\_01\_SL.txt并且大小为52,905字节。

### 背景技术

[0006] 高胆固醇(或高胆固醇血症)是在血液中存在高水平的胆固醇,这可能是不良的饮食、生活方式、疾病(例如,糖尿病)或遗传学的结果。细胞内高浓度的胆固醇是多种疾病的特征,例如脂肪肝病、动脉粥样硬化等。

[0007] 动脉粥样硬化涉及动脉的狭窄,这是由于携带胆固醇的脂蛋白在动脉壁内聚集而产生的。通常,死亡的主要原因的先兆(precursor)包括心血管疾病(CVD)、心肌梗塞、中风和外周血管疾病。用于这些疾病的许多当前疗法集中于通过降低低密度脂蛋白(LDL)的循环水平和/或增加高密度脂蛋白(HDL)来预防次生事件(second event)(或高风险个体中的原发事件(primary event)),因为尽管哺乳动物细胞能够合成胆固醇,但是它们不能将其分解(将其分解代谢)。

[0008] 所需要的是用于降低患有过量脂质和胆固醇的受试者中的脂质和胆固醇水平的组合物和方法。

### 发明内容

[0009] 在此公开了用于增强胆固醇(包括各种修饰的胆固醇化合物)转运到修饰的哺乳动物线粒体中的组合物、方法和系统,其中该修饰使得该线粒体能够分解代谢胆固醇。在许多实施例中,可以对细胞进行工程化以增强胆固醇穿过线粒体膜的流动。细胞还可以包含一种或多种可以帮助胆固醇转运穿过线粒体膜的蛋白质。

[0010] 还公开了制造所公开的组合物的方法,以及使用所公开的组合物和方法来治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇的风险中的受试者的方法,并且可以帮助降低受试者中的胆固醇。在不同的实施例中,所公开的组合物可以被给予至需要治疗高胆固醇的受试者。在许多实施例中,表达所公开的蛋白质的核酸可以结合至哺乳动物细胞的基因组中,或可以是基因组外的。所公开的细胞可以选自肝细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、

上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。

[0011] 在此公开了用于修饰哺乳动物线粒体以增强胆固醇转运和降解的组合物、方法和系统。在许多实施例中,哺乳动物线粒体被工程化以包含一种或多种重组和/或非内源蛋白质,这些蛋白质可以帮助增强胆固醇穿过线粒体膜的流动。在许多实施例中,线粒体还可包括一种或多种可辅助胆固醇分解代谢的蛋白质。所公开的修饰的线粒体可用于降低细胞内胆固醇浓度,增加穿过线粒体膜的胆固醇运输,和/或降低处于发展高胆固醇或高胆固醇血症风险中或患有高胆固醇或高胆固醇血症的患者或受试者的血液中胆固醇的浓度。

[0012] 在另一方面,修饰哺乳动物线粒体的方法包括将至少一种非天然的工程化的类固醇生成性急性调节(StAR)蛋白或其部分插入哺乳动物线粒体外膜中,并且其中线粒体包括一种或多种胆固醇降解蛋白(CDP),包括胆固醇脱氢酶(CholD)、3-酮类固醇 $\Delta$ 1-脱氢酶( $\Delta$ 1-KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB)、3-酮类固醇 $9\alpha$ -羟化酶(KshAB)、 $3\beta$ -羟类固醇脱氢酶2(HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。

[0013] 在本文公开的方法和组合物的各个方面,StAR蛋白可以包含SEQ ID NO:7的残基63至188、其重复、或TOMM20蛋白的至少一部分。CDP可以包括P450或P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。StAR蛋白和CDP可以包含至少一种线粒体信号传导蛋白和/或从细胞特异性启动子序列表达,和/或从基因组整合的或从外部基因组基因表达,和/或细胞中StAR蛋白和CDP的总量的至少约10%可以位于线粒体膜中。所公开的方法和组合物可以用于治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇的风险中的受试者,如通过降低具有高胆固醇的受试者中的胆固醇。细胞可以选自肝细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。

## 附图说明

[0014] 图1描绘了在存在和不存在StAR-StAR或Tom-StAR的情况下表达CDP的细胞的培养基中的平均分解代谢产物浓度(n=3个独立实验)。

[0015] 图2是显示微管蛋白、CDP、StAR-StAR、和TomStAR在图1的细胞中的蛋白质表达水平的代表性蛋白质印迹(n=3个独立实验)。

[0016] 图3是显示胆固醇降解和随后的分解代谢产物的生产通过在表达CDP的小鼠RAW264.7细胞系中表达STAR而在体外显著增加的柱状图。

[0017] 图4是显示在图3中描述的细胞系中蛋白质的量的蛋白质印迹。

[0018] 图5是在此公开的不同蛋白质和核酸编码序列的序列。确切地说,p450-FdxR-Fdx(SEQ ID NO:1)的人蛋白序列用粗体的Flag标签描绘;示出了胆固醇脱氢酶CholD(SEQ ID NO:2);示出了 $3$ -酮基类固醇 $\Delta$ 1-脱氢酶, $\Delta$ 1-KstD(SEQ ID NO:3);示出了厌氧胆固醇代谢B酶,acmB(SEQ ID NO:4);示出了 $3$ -酮基类固醇 $9\alpha$ -羟化酶,KshAB(SEQ ID NO:5);显示了 $3\beta$ -羟类固醇脱氢酶2,HSD2(SEQ ID NO:6);显示了人StAR蛋白序列(SEQ ID NO:7);显示了人TOMM20蛋白序列(SEQ ID NO:8);显示了人Tom/Star融合蛋白序列(SEQ ID NO:9;Tom序列用粗体字母描述,接头序列用颜色和下划线描述);人StAR/StAR融合蛋白序列(接头序列用颜色和下划线描述(SEQ ID NO:10);StAR mRNA完整序列(SEQ ID NO:11;起始密码子显示为大写)用对应于SEQ ID NO 7的下划线的氨基酸63-285的编码序列描绘,以UPPERCASE字母描述;并且还显示了TOMM20 mRNA完整序列,CDS=123-560(SEQ ID NO:12;起始密码子

大写和终止显示为红色)。

### 具体实施方式

[0019] 在此公开了用于通过增强胆固醇向线粒体中的转运来减少受试者的细胞和/或血流中的胆固醇的组合物、方法和系统,在线粒体中,胆固醇被胆固醇分解代谢酶催化。

[0020] 在此公开了开发独特方法以用于帮助管理高胆固醇血症和与存在过量胆固醇相关的其他障碍。人类缺乏用于降解胆固醇的酶,并且许多哺乳动物细胞在没有正确存储或代谢胆固醇的方式的情况下摄取过量的胆固醇。在一些情况下,巨噬细胞在它们填充有胆固醇和胆固醇酯时发展成泡沫细胞。胆固醇的这种积累可导致动脉斑的形成,这可导致动脉粥样硬化。取决于它们的位置,斑块可能引起冠状动脉疾病、心绞痛(胸痛)、间歇性跛行(伴随运动的腿痛)或由于循环不良引起的慢性肾脏疾病。此外,许多斑块可能不稳定并且即使在它们对血流具有任何显著影响之前也易于破裂。这些结构典型地在临床上沉默,直到它们破裂(复杂的斑块)并且使下面的组织倾向于凝块,这些凝块可能突然阻塞受影响的血管。

[0021] 申请人在此显示人类细胞可以被工程化以帮助降低胆固醇。在许多实施例中,细胞可以是任何哺乳动物细胞。所公开的细胞可以被工程化以表达有助于胆固醇的转运和降解/分解代谢的不同蛋白质。如在此所使用,工程化细胞可以是具有一种或多种非天然和/或外源编码序列或蛋白质的细胞,例如工程化哺乳动物细胞可以包括一种或多种哺乳动物和/或细菌相关序列或蛋白质。如本文所用,非天然、外源或非内源可以指在大多数情况下通过重组方法引入细胞的序列或蛋白质。在大多数实施例中,细菌相关可以指与类似细菌序列具有大于约50%一致性的蛋白质或编码序列。在许多实施例中,所公开的蛋白质可以是融合蛋白和/或修饰的蛋白质,例如缺乏在天然蛋白质中发现的序列和/或在天然蛋白质中发现的重复序列的蛋白质。

[0022] 所公开的蛋白相对于内源基因和/或蛋白可以是过表达的。在一个实例中,内源基因或蛋白可以是哺乳动物p450 cc、StAR、或TOMM20蛋白。在大多数实施例中,与内源基因或蛋白质相比,在给定的样品中,基于重量或摩尔数,所公开的蛋白质的过表达可以导致2X、3X、4X、5X、10X、20X、100X、200X或更多所公开的基因或蛋白质。在大多数情况下,过表达是相对于内源蛋白质的非诱导表达。在一些情况下,过表达可以相对于内源蛋白质的诱导水平,其中表达可以相似或相同。在大多数实施例中,关于胆固醇降解的降解是指去除各种侧链和/或打开胆固醇的至少一个环。

[0023] 所公开的用于胆固醇降解的编码序列和蛋白质可以来源于细菌和/或哺乳动物。在许多实施例中,所公开的蛋白可以被称作胆固醇降解蛋白(CDP)并且可以选自以下各项中的一种或多种:胆固醇脱氢酶(CholD;SEQ ID NO:2)、3-酮基类固醇 $\Delta$ 1-脱氢酶( $\Delta$ 1-KstD;SEQ ID NO:3)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB;SEQ ID NO:4)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶(KshAB;SEQ ID NO:5)、3 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶2(HSD2;SEQ ID NO:6)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx;SEQ ID NO:1;uniprot编号P05108,P22570,P10109),和类固醇生成性急性调节蛋白(StAR;SEQ ID NO:7)。在许多实施例中,所公开的编码序列和蛋白质可以与在此公开的序列具有大于约80%的一致性。

[0024] 所公开的编码序列和蛋白可以在体内或体外递送至细胞,例如通过不同方法,包

括电穿孔、转染、病毒载体、纳米颗粒等。在一些实施例中，所公开的编码序列和蛋白质可以由细胞、载体或颗粒内的一个或多个核酸编码。在一些实施例中，该颗粒可以是脂质纳米颗粒(或脂纳米颗粒;LNP)。在一些实施例中，该载体可以是病毒载体，如腺病毒或慢病毒。在许多实施例中，编码序列可以包括一种或多种启动子和/或增强子序列，这些启动子和/或增强子序列可以帮助在特定细胞或组织中表达编码的蛋白质，或者可以帮助支持编码的蛋白质一般性地或在特定细胞或组织中的高表达。

[0025] 所公开的蛋白质(可以统称为或单独称为胆固醇降解蛋白(CDP))可以是针对哺乳动物的线粒体，例如外膜、内膜、膜间空间、或基质。

[0026] 术语“约”或“近似地”是指如由本领域的普通技术人员确定的特定值的可接受的误差，该误差部分地取决于该值是如何测量或确定的。在某些实施例中，术语“约”或“近似地”意指在1、2、3、或4个标准偏差内。在某些实施例中，术语“约”或“近似地”意指在给定的值或范围的30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、或0.05%内。无论何时术语“约”或“近似地”在一系列的两个或更多个数值中的第一数值之前，应理解术语“约”或“近似地”适用于该系列中的每一个数值。

[0027] 所公开的组合物、构建体、细胞、方法和系统的给予可以经由不同方法。在一个实施例中，给予可以是“静脉内”给予，是指将组合物、构建体、和/或细胞引入患者的静脉中，例如。通过输注(缓慢治疗性引入静脉)。在其他实施例中，给予可以是“皮下的”，其中引入是在患者的皮肤下方。“输注”或“输注的”是指为了治疗目的用溶液通过静脉引入身体。通常，这通过静脉注射(IV)袋，诸如可以容纳溶液的袋来实现。所公开的组合物、构建体、细胞、方法、和系统可以“共给予”患者，例如通过在相同给予期间静脉内给予至少第二治疗剂。在一些实施例中，共给予是同时的，在其他实施例中，共给予是连续的。

[0028] 如在此使用的术语“预防”是指通过向对其有需要的受试者给予根据本发明的组合物、构建体、方法、或系统，避免如在此指定的疾病、或与其相关联的至少一种症状的发生或再发生。

[0029] “患者”或“受试者”包括各种动物，包括人、猴、猫、狗、小鼠、大鼠、兔或豚鼠。动物可以是哺乳动物，如非灵长类动物和灵长类动物(例如，猴和人)。在一个实施例中，患者是人，例如人类婴儿、儿童、青少年或成人。

[0030] 术语“治疗(treat)”、“治疗了(treating)”和“治疗的(treatment)”是指暂时地或永久地、部分地或完全地消除、减少、压制、或改善在此公开的事件、疾病、障碍、或病症的至少一种症状、表现、或进展。如相关领域中公认的，用作治疗的方法、组合物和系统可以降低给定疾病状态的严重性，但不需要消除与其相关的每个症状(被认为是有用的)。类似地，预防性给予的治疗不需要完全有效地预防病症的发作以构成可行的预防性组合物、试剂、方法或系统。简单地降低疾病的影响(例如，如在此公开的，降低血液胆固醇浓度和/或降低相关症状的数目或严重性，或通过增加另一种治疗的有效性，或通过产生另一种有益效果)，或降低疾病在受试者中将发生或恶化的可能性，是足够的。

[0031] 术语“有效量”是指足以在疾病的治疗或预防中提供治疗或预防益处或延迟或最小化与疾病相关的症状的本发明的化合物或其他活性成分的量。此外，关于本发明的化合物的治疗有效量是指在疾病的治疗或预防中提供治疗益处的单独与其他疗法组合的治疗剂的量。结合本发明的化合物使用的，该术语可以涵盖改善总体治疗、减少或避免疾病的

症状或原因、或增强与另一种治疗剂的治疗功效或协同作用的量。

[0032] 短语“治疗有效量”是指本发明的组合物的量,该量(i)治疗具体疾病、病症、或失调,(ii)改善或消除该具体疾病、病症、或失调的一种或多种症状,或(iii)预防或延迟在此所述的具体疾病、病症、或失调的一种或多种症状的发作。在血液胆固醇过量的情况下,所公开的组物的治疗有效量可降低患者血液中胆固醇的浓度;降低细胞间胆固醇;抑制(即在一定程度上减缓且优选停止)胆固醇斑块生长和/或发育;抑制(即在一定程度上减缓并且优选地停止)肝脏中的脂质积累;降低肝脏中的脂质含量;和/或在一定程度上减轻与高浓度的血液胆固醇相关的一种或多种症状。

[0033] 如在此使用的术语“改善”是指通过向有需要的患者或受试者给予根据本公开的一种或多种治疗和/或组物,患者的疾病状态(例如高血胆固醇)的任何改善。这种改善可视为减缓或停止患者疾病的进展,和/或降低至少一种疾病症状的严重性,增加无疾病症状期的频率或持续时间,或预防由于疾病引起的损伤或失能。

[0034] 靶细胞

[0035] 用于表达CDP的各种组织和细胞类型可以用所公开的组物靶向。在各种实施方式中,细胞可以是所有器官和组织中的内皮和上皮细胞,包括但不限于平滑、骨骼和心肌细胞、神经元细胞、腺细胞、骨细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。在一些实施方式中,细胞可以是多能干细胞,例如诱导的多能干细胞。在许多实施例中,这些组织可以是癌性的或前癌性的,并且可以是皮肤和肠癌(鳞状上皮细胞)、腺癌(腺体起源的上皮细胞,胰腺)、胃肠类癌(神经内分泌细胞)、胰腺癌、小细胞癌(神经内分泌细胞)、平滑肌肉瘤(平滑肌细胞)以及淋巴瘤(在胃肠道的器官/壁中发现的淋巴细胞)中的一种或多种细胞。

[0036] 可以用所公开的组物和方法靶向各种细胞和组织。在许多实施例中,所公开的组物可以通过本领域技术人员已知的各种方法靶向特定细胞。在一些实施例中,LNP可以包括帮助靶向特异性细胞的一种或多种分子,例如对受体具有亲和力的蛋白质或靶细胞上的膜蛋白。

[0037] 胆固醇降解蛋白

[0038] 在此公开了多种胆固醇、以及胆固醇相关的基因和蛋白质。在一些实施例中,所公开的基因和蛋白质可以帮助胆固醇的转运和/或代谢。在大多数实施例中,所公开的基因和蛋白质可以在线粒体中表达和/或靶向线粒体。在许多实施例中,所公开的基因和蛋白可允许细胞降解和/或分解代谢胆固醇至开环,因此内源性蛋白和酶可进一步代谢分子。

[0039] 线粒体

[0040] 线粒体存在于大多数真核细胞和生物体中,并且由双膜组成。线粒体供给细胞的能量,并且在信号传导、细胞周期、细胞生长和分化、细胞凋亡和细胞死亡中发挥作用。具有高能量需求的细胞,如心脏、肌肉、脑和肝细胞,可以具有数千个线粒体。

[0041] 线粒体的双膜结构允许特定的隔室:外膜、膜间空间、内膜、以及脊(cristae)和基质。这些隔室允许专门的功能-如ATP合成。基质(matrix)容纳(home to)线粒体独立基因组。

[0042] 类固醇生成性急性调节蛋白(Steroidogenic Acute Regulatory Protein)(StAR)

[0043] 甾体(类固醇,Steroid)和甾体激素是由胆固醇合成的。类固醇生成的第一步是通

过P450scc切割胆固醇侧链，P450scc位于线粒体内膜(IMM)的基质侧。典型地，产生类固醇激素的细胞在任何一个时间储存并且仅具有少量的激素。因此，类固醇分泌的增加通过首先增加类固醇的合成来实现。然而，类固醇在细胞和生物体内具有广泛和强大的作用-因此类固醇生成细胞紧密地调节类固醇和前体的产生，以避免过量产生和与过量类固醇相关的病状。可以快速诱导并快速终止合成以避免过度生产。细胞实施这种控制(其可以在数分钟内增加合成10-100倍)的一种方式是通过调节胆固醇流入线粒体基质。胆固醇通过STAR蛋白转运穿过线粒体膜。

[0044] StAR蛋白被合成为包括线粒体靶向前导肽序列的37kDa蛋白。在插入线粒体膜时，前导肽被切割以产生位于线粒体内的30kDa蛋白质。StAR基因中的突变可以导致先天性类脂肾上腺增生(congenital lipoid adrenal hyperplasia)。患有肾上腺增生的受试者合成了非常少量的类固醇。

[0045] StAR可以与两种另外的蛋白质相互作用以支持胆固醇向线粒体中输入。TSP0, 转运体蛋白(Translocator Protein), 是一种帮助线粒体输入类固醇生成胆固醇的18kDa蛋白。研究已经显示, TSP0表达响应于巨噬细胞暴露于修饰的LDL而上调。此外, 普遍表达的PBR(外周型苯并二氮杂草受体)是一种涉及调节胆固醇转运的线粒体外膜蛋白。抑制PBR导致细胞类固醇生成能力的损失。

[0046] 从胆固醇产生大量类固醇的能力可以通过引入StAR而赋予非类固醇生成细胞(即通常不产生类固醇或产生非常低量的类固醇的细胞)。具体地, 用P450scc酶系统(即H<sub>2</sub>N-P450scc-肾上腺激素还原酶-肾上腺激素-COOH)转染的非类固醇生成细胞能够以非常低的水平代谢胆固醇。StAR的存在(即StAR和P450scc酶系统的共表达)将这些细胞中胆固醇的转化率增加了数倍。研究已经显示, 细胞的类固醇产生可以通过将STAR锚定在线粒体外膜(OMM)中, 或者通过与OMM蛋白融合(例如, 线粒体易位酶TOM基因易位酶, 外膜)或StAR结构域的复制(其可以有助于减缓StAR转运通过OMM)来进一步增强。StAR结构域的复制可以被称为StAR-StAR蛋白。StAR-StAR是将StAR的1-188个残基结合到StAR的63-285个残基, 从而使StAR的蛋白酶抗性结构域(残基63-188)二聚化的融合蛋白。

[0047] 用于与本发明的组合物和方法一起使用的StAR蛋白可以包括各种形式的StAR蛋白序列。在一些实施例中, 所公开的StAR蛋白可以包括一个或多个突变、截短、缺失、重复、融合等, 或所公开的蛋白可以是野生型或天然StAR蛋白。在一些实施例中, 可以修饰所公开的StAR蛋白以减少通过外膜的转运时间, 这可以帮助增强胆固醇的线粒体输入。

[0048] 如在此使用的, 术语胆固醇是指胆固醇(cholesterin)或胆固醇基醇(cholesteryl alcohol), 具有化学式C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O的甾醇(sterol), 具有IUPAC名称胆固醇-5-烯-3β-醇, 以及(3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-10, 13-二甲基-17-[(2R)-6-甲基庚烷-2-基]-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-十二氢-1H-环戊[a]菲-3-醇。如在此所使用, 术语胆固醇还可以指胆固醇的衍生物, 包括氧化胆固醇、C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>、氧胆固醇或5, 6-环氧胆固醇、7-酮基胆固醇(7KC)、胆甾烷-3β, 5α, 6β-三醇和7-α/β羟基胆固醇等。

[0049] 所公开的可以降解胆固醇的基因和蛋白可以选自胆固醇脱氢酶(CholD)、3-酮类固醇Δ<sup>1</sup>-脱氢酶(Δ<sup>1</sup>-KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB)、3-酮类固醇9α-羟化酶(KshAB)、3β-羟基类固醇脱氢酶2(HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)、及其组合。

[0050] 所公开的基因、蛋白质、和酶中的一种或多种可以包装到一个或多个载体、构建体、或盒中。在各种的实施例中,包括一种或多种胆固醇降解酶的盒可被称为胆固醇分解代谢盒(CCC)。在一些实施例中,该盒可以是构建体并且可以包括编码至少一种蛋白质的核酸序列,该蛋白质与在此公开的蛋白质或由所公开的基因中的任一种编码的蛋白质具有约80%或更高的一致性。在许多实施例中,与所公开的蛋白质或核苷酸序列的百分比一致性可以大于约79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%,并且小于约100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、和81%。对于蛋白质序列,可以计算序列一致性为大于约40aa(氨基酸残基)、50aa、60aa、70aa、80aa、90aa、100aa、110aa、120aa、130aa、140aa、150aa、160aa、170aa、180aa、190aa、200aa或更多且小于约300aa、200aa、190aa、180aa、170aa、160aa、150aa、140aa、130aa、120aa、110aa、100aa、90aa、80aa、70aa或60aa。在许多实施例中,在约80-150个氨基酸残基上计算序列一致性。在大多数情况下,与参照序列(即SEQ ID NO:1-10)相比,插入或缺失的氨基酸计为单个不一致的氨基酸。在一些实施例中,例如其中一种或多种组合物的递送是经由LNP,例如其中该组合物是一种或多种纳米质体或mRNA,该组合物可以包括一种或多种胆固醇降解蛋白,例如一种或多种酶和胆固醇转运蛋白,例如StAR蛋白或StAR变体。本领域技术人员能够从在此公开的蛋白质和核酸序列产生mRNA。在其中一种或多种组合物包含在可给予受试者的治疗细胞中的实施例中,该治疗细胞可以通过一种或多种载体、构建体和/或盒来给予,这些载体、构建体和/或盒包含编码胆固醇降解蛋白(例如酶和胆固醇转运蛋白)的核酸,例如StAR或StAR变体。在这些情况下,可以例如通过一种或多种病毒载体(在一个示例性慢病毒中)将这些核酸转导到细胞中,以帮助将编码序列整合或插入细胞的基因组序列或线粒体序列中。在一些实施例中,核酸可以不整合,并且所公开的蛋白质是从细胞核或线粒体中的基因组外序列表达的。

#### [0051] 胆固醇相关疾病和失调

[0052] 已经显示过量的天然LDL和增加的LDL:HDL比率在心血管疾病、动脉粥样硬化、中风和冠心病以及心脏病发作中发挥关键性作用。在一些实施例中,处于高胆固醇风险中或患有高胆固醇的受试者或患者可具有大于每分升血液约200mg胆固醇(即低密度脂蛋白+高密度脂蛋白)的总胆固醇浓度和/或大于约5.2mmol/L总胆固醇。在一些实施例中,处于高胆固醇风险中或患有高胆固醇的受试者或患者可以具有大于约100mg/dl的LDL浓度和/或大于约2.6mM LDL。在一些实施例中,处于高胆固醇风险中或患有高胆固醇的受试者或患者可以具有小于约50mg/dl的HDL浓度和/或小于约1.3mM HDL。在一些实施例中,处于高胆固醇风险中或患有高胆固醇的受试者或患者可具有大于约150mg/dl的甘油三酯浓度和/或大于约1.7mM甘油三酯。在一些实施例中,处于高胆固醇风险中或患有高胆固醇的受试者或患者可具有约4.0(即4比1)或大于4.0的LDL:HDL比率。

[0053] 乙酰化LDL是LDL的体外化学修饰形式并且在体内不存在。乙酰化LDL和氧化LDL两者都被巨噬细胞摄取,从而将那些细胞转化为泡沫细胞。在大多数情况下,LDL的所有组分都易于氧化,从而产生LDL的氧化形式(oxLDL)。由动脉巨噬细胞摄取oxLDL在噬斑(plaque)形成中是关键性的。与未修饰的LDL不同,oxLDL经由LDL清除剂受体以一种不受调节的方式被动脉壁巨噬细胞摄取。氧基甾醇比天然胆固醇的反应性高10-100X,其中最具毒性的是7-酮

基胆固醇(7KC),它在oxLDL中也是最丰富的。

[0054] 研究发现,更高水平的循环7KC与心血管事件的更大的未来风险和增加的总死亡率相关。7KC是一种通过破坏细胞膜和用于血管舒张反应的关键离子转运途径来改变内皮细胞功能的促炎性、促氧化剂、促凋亡和纤维生成分子。在一些实施例中,处于高胆固醇风险中或患有高胆固醇的受试者或患者可以具有高于约109.8nmol/L nmol/L的7KC浓度。

[0055] 患有高胆固醇或处于发展高胆固醇的风险的受试者或患者可以被称为高胆固醇血症。在一些实施方案中,高胆固醇血症可通过测量血浆氧甾醇的百分比,例如血浆氧甾醇中7-KC的百分比来评估。在高胆固醇血症患者中,7KC可占血浆氧甾醇的约57%。7KC之后是7- $\alpha/\beta$ 羟基胆固醇(血浆氧甾醇的21%),这是7KC代谢的直接产物。在动脉斑块中,55%的氧甾醇被报道为7KC,第二和第三丰度分别为13%和12%的胆甾烷-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -三醇和7- $\alpha/\beta$ 羟基胆固醇。

[0056] 如上所述,NASH(非酒精性脂肪性肝炎)是与过量胆固醇相关的另一种疾病。改变的胆固醇体内平衡和转运促成肝脏中游离胆固醇的累积,这进而经由对肝细胞的损害和非实质细胞的激活促成NAFLD(非酒精性脂肪肝病)。特别地,线粒体中和线粒体周围的游离胆固醇的过载诱导线粒体功能障碍并促进炎症、纤维化和肝细胞死亡。

[0057] 其他胆固醇相关疾病包括肺泡蛋白沉积症(PAP)、眼病、神经退行性疾病、C型尼曼匹克病(Niemann Pick Type C)(NPC)和溶酶体酸性脂肪酶(LAL)缺陷。因为胆固醇含量在调节表面活性物质流动性以及在有肺动物中的功能中发挥作用,并且流动性可以快速变化,尤其是在极端温度下,胆固醇清除的减少是驱动PAP发病机理的主要缺陷。在眼病的情况下,氧甾醇,特别是7KC引起视网膜细胞退化。因此,氧甾醇水平升高可在多种眼部疾病中起作用,包括黄斑变性(AMD)、脉络膜新血管形成(CNV)、青光眼和白内障。

[0058] 氧甾醇水平增加还可导致脑胆固醇代谢的改变。胆固醇代谢可以是多种脑障碍的组成部分,这些脑障碍包括阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、帕金森病、以及痴呆进展。已经在阿尔茨海默病患者的死后脑中鉴定出源自胆固醇自动氧化的各种氧甾醇,包括7KC。慢性癫痫还可共有许多这些病状。具体地,已经提出癫痫和动脉粥样硬化之间的关联。因此,治疗动脉粥样硬化,例如本发明公开的组合物、细胞和方法可减轻癫痫的影响。此外,7KC对神经元细胞是高度细胞毒性的,并且已经被怀疑涉及各种神经疾病的进展。令人惊奇的是,与胆固醇不同,氧甾醇可以穿过血脑屏障(BBB)并且在脑组织中积累,最终引起神经退化。

[0059] 多种其他疾病可以与增加的胆固醇水平相关联。例如,患有C型尼曼匹克病(Niemann Pick Type C)(NPC)的患者不能清除胆固醇,导致胆固醇和氧甾醇主要积累在肝脏、脾脏和脑中。已经报道了7KC谱(profile)与疾病的严重性之间的正相关。此外,具有溶酶体酸性脂肪酶(LAL)缺陷的患者在溶酶体中积累胆固醇酯和甘油三酯,并且可以与高胆固醇血症、高脂血症和/或动脉粥样硬化一起存在。这些患者在其血浆中也具有非常高水平的氧甾醇,包括7KC。氧甾醇形成的增加进一步增加氧化应激使病症恶化。

[0060] 所公开的组合物和方法可用于治疗与细胞、组织和器官中的过量胆固醇和/或脂肪沉积物相关联的疾病或病症。在一些实施例中,疾病或病症可以与过量胆固醇和/或存在一种或多种氧化胆固醇物质(例如7-酮基胆固醇)相关。在一些实施例中,该疾病或病症可以是脂肪肝病、动脉粥样硬化、心力衰竭、中风、局部缺血、冠心病、眼病、神经退行性疾病和

神经疾病、眼部疾病如黄斑退行性病、肺功能障碍等中的一种或多种。

[0061] 所公开的组合物、细胞、方法、以及疗法可以帮助治疗、减少、或逆转与过量胆固醇相关的各种疾病、失调、或病症。在一个实施例中，该疾病、失调或病症可以是早期II型损伤（即巨噬细胞泡沫细胞形成）、III型损伤或动脉粥样硬化瘤前期（即，具有小群体的细胞外脂质）、IV型损伤或动脉粥样硬化瘤（即具有胞外脂质的核心）、V型病变或纤维动脉粥样硬化瘤（即具有纤维增稠的动脉粥样硬化瘤）中的一种或多种。

[0062] 所公开的组合物、构建体、细胞、方法、疗法、和系统可以帮助降低患者血液中胆固醇的浓度。在一些实施例中，血液中胆固醇浓度的降低（例如以重量/体积计，如mg/dl，或以摩尔浓度计，如mmol/L）可以大于约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、或90%，并且小于约100%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、或2%。在许多实施例中，治疗后胆固醇水平的降低可反映为一种或多种胆固醇分解代谢产物的浓度或量的增加，例如相对于治疗之前的分解代谢产物的浓度，增加了大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、1.5x、2.0x、2.5x、3.0x、3.5x、4.0x、4.5x、5.0x、10x、20x、30x、40x、50x、60x、70x、80x、90x、100x、200x、300x、400x、500x、600x、700x、800x或更高，且小于约2000x、1500x、1000x、500x、400x、300x、200x、100x、90x、80x、70x、60x、50x、40x、30x、20x、10x、5x、4x、3x、2x、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、或10%。

[0063] 实施例

[0064] 实施例1-胆固醇降解酶和StAR蛋白的共表达

[0065] 进行体外实验以测试与STAR组合的胆固醇降解蛋白的胆固醇降解活性。在这些实验中，将人293T肾上皮细胞以 $3 \times 10^5$  293T细胞/孔接种在12孔板中的DMEM和10% FBS中。在75%汇合时，将细胞转染Lipofectamine 3000。接下来，将等摩尔量的CDP或空质粒以及StARStAR、TomStAR、或空质粒与P3000在50 $\mu$ L Opti-MEM中混合以具有以下条件：

[0066] 1. 空质粒+空质粒

[0067] 2. CDP质粒+空质粒

[0068] 3. StARStAR质粒+空质粒

[0069] 4. TomStAR质粒+空质粒

[0070] 5. CDP质粒+StARStAR质粒

[0071] 6. CDP质粒+TomStAR质粒

[0072] 将3X $\mu$ L的Lipofectamin试剂与50 $\mu$ L的Opti-MEM混合。接下来，将DNA/P3000管与Lipofectamine管结合，并且在室温下孵育15分钟。以逐滴方式将转染混合物添加至细胞并温育48小时。

[0073] 在孵育期结束时，测定细胞培养基的分解代谢产物浓度。使用RIPA缓冲液提取总细胞蛋白并且使用标准BCA试剂盒量化总蛋白浓度。

[0074] 结果：

[0075] 如所附的图1所示，在293T肾上皮细胞中CDP的表达导致培养基中分解代谢产物浓度从基线水平（仅表达空质粒的细胞的培养基，即无CDP）增加约300倍。与单独的CDP相比，这种融合蛋白与CDP的共表达增加了约4倍的分解代谢产物产生。Tom20具有嵌入在线粒体

外膜(OMM)中的50个N末端残基和在细胞质中的95个残基。StAR残基63-285融合至Tom20的羧基末端(即Tom-StAR)将StAR附着于OMM的细胞质侧,并且当与CDP共表达时,与仅表达CDP的细胞相比,分解代谢产物产量增加了约30%。仅表达StAR-StAR或TomStAR不影响分解代谢产物浓度。用StAR-StAR cDNA转染细胞导致通过SDS-PAGE和蛋白质印迹检测为约50kD条带的StAR-StAR蛋白的强表达,参见随附的图2。令人感兴趣的是,CDP(用抗FLAG抗体检测为FLAG标记的蛋白)与StAR-StAR的共表达导致稳态StAR-StAR蛋白水平的显著下调。不希望受理论束缚,这些数据表明持续的StAR-StAR-介导的CDP底物胆固醇转运到线粒体基质中导致StAR-StAR蛋白的去稳定化和降解/消耗。在共表达CDP的细胞中没有检测到Tom-StAR的下调,并且可能是由于(不希望被理论所束缚)在将胆固醇转运至线粒体基质中Tom-StAR的效率较低。相对于共表达CDP和StAR-StAR的细胞,CDP和Tom-StAR共表达细胞中CDP衍生的分解代谢产物的水平显著降低,证明了这种降低的效率(参见随附的图1)。与表达StAR-StAR和CDP的那些细胞相比,在仅表达StAR-StAR的细胞中StAR-StAR蛋白的水平更高,这表明在不存在CDP的情况下,StAR-StAR活性的水平及其随后发生的降解可能受到线粒体基质中胆固醇积累水平增加的限制。我们推测CDP继续将胆固醇转化成其分解代谢产物增加了沿线粒体内膜的胆固醇浓度梯度,从而进一步刺激StAR-StAR-介导的胆固醇转运到线粒体中。

[0076] 图1以柱状图的形式示出了来自该实验的结果。具体而言,图1示出在存在和不存在StAR-StAR或Tom-StAR( $n=3$ 个独立实验)的情况下表达CDP的细胞的培养基中的平均分解代谢产物浓度,如所附图所示。

[0077] 图2是代表性蛋白质印迹,显示了在存在和不存在StAR-StAR或Tom-StAR的情况下细胞中的CDP蛋白水平,其中微管蛋白作为对照( $n=3$ 个独立实验)。泳道如下:1,空质粒+空质粒;2,CDP质粒+空质粒;3,StARStAR质粒+空质粒;4, TomStAR质粒+空质粒;5, CDP质粒+StARStAR质粒;6, CDP质粒+TomStAR质粒。

[0078] 实施例2-胆固醇降解酶和StAR蛋白在小鼠细胞中的共表达

[0079] 如实施例2中所述进行体外实验。在这些实验中,将小鼠RAW264.7细胞以 $3 \times 10^5$  293T细胞/孔接种在12孔板中的DMEM和10% FBS中。在75%汇合时,将细胞转染Lipofectamine 3000。接下来,将等摩尔量的CDP或空质粒以及StARStAR或空质粒与P3000在50 $\mu$ L Opti-MEM中混合以具有以下条件:空质粒+空质粒;CDP质粒+空质粒;或CDP质粒+StARStAR质粒。

[0080] 胆固醇分解代谢在共表达CDP和StAR的细胞中大大增加。具体地,以pg/细胞计的分解代谢产物产生如下:空白+空白,2.83E-03;CDP+空白,1.26E-01;和CDP+StARStAR,1.07E+00。这些结果对应于在CDP存在下44.52倍的增加,和在StARStAR蛋白存在下另外的8.49倍的增加。

[0081] 权利要求1.一种核酸组合物,包含:

[0082] 用于类固醇生成性急性调节(StAR)蛋白的编码序列;和

[0083] 用于胆固醇降解蛋白(CDP)的编码序列,所述胆固醇降解蛋白包括胆固醇脱氢酶(CholD)、3-酮类固醇 $\Delta 1$ -脱氢酶( $\Delta 1$ -KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶(KshAB)、3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶2(HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)中的一种或多种。

- [0084] 权利要求2.根据权利要求1所述的核酸,其中所述StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63至188。
- [0085] 权利要求3.根据权利要求1或权利要求2所述的核酸,其中所述StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63-188的重复。
- [0086] 权利要求4.根据权利要求1至权利要求3中任一项所述的核酸,其中所述StAR蛋白包含所述TOMM20蛋白的至少一部分。
- [0087] 权利要求5.根据权利要求1至权利要求4中任一项所述的核酸,其中所述CDP包括P450。
- [0088] 权利要求6.根据权利要求1至权利要求5中任一项所述的核酸,其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。
- [0089] 权利要求7.根据权利要求1至权利要求6中任一项所述的核酸,其中所述StAR蛋白和所述CDP包含至少一种线粒体信号传导蛋白。
- [0090] 权利要求8.根据权利要求1至7中任一项所述的核酸,其中,所述核酸进一步包括细胞特异性启动子序列。
- [0091] 权利要求9.根据权利要求1至8中任一项所述的核酸,其中,所述核酸包含在脂质纳米颗粒中。
- [0092] 权利要求10.根据权利要求1至8中任一项所述的核酸,其中,所述核酸包含在病毒载体中。
- [0093] 权利要求11.根据权利要求1至10中任一项所述的核酸,用于在治疗患有高胆固醇的受试者中使用。
- [0094] 权利要求12.根据权利要求1-11中任一项所述的核酸,用于在转化哺乳动物细胞中使用。
- [0095] 权利要求13.根据权利要求12所述的核酸,其中,所述哺乳动物细胞在体外转化。
- [0096] 权利要求14.根据权利要求12所述的核酸,其中所述哺乳动物细胞在体内转化。
- [0097] 权利要求15.根据权利要求1至14中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含在脂质纳米颗粒中。
- [0098] 权利要求16.根据权利要求1至15中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含在患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者的细胞中。
- [0099] 权利要求17.根据权利要求1至16中任一项所述的核酸,用于在降低具有高胆固醇的受试者中的胆固醇中使用。
- [0100] 权利要求18.一种哺乳动物细胞,包含:
- [0101] 用于工程化的类固醇生成性急性调节(StAR)蛋白或其部分的编码序列;和
- [0102] 用于胆固醇降解蛋白(CDP)的编码序列,所述胆固醇降解蛋白包括胆固醇脱氢酶(CholD)、3-酮类固醇 $\Delta$ 1-脱氢酶( $\Delta$ 1-KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶(KshAB)、3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶2(HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)中的一种或多种。
- [0103] 权利要求19.根据权利要求18所述的哺乳动物细胞,其中所述StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63至188。
- [0104] 权利要求20.根据权利要求18或权利要求19所述的核酸,其中所述StAR蛋白包括

SEQ ID NO:7的残基63-188的重复。

[0105] 权利要求21.根据权利要求18-权利要求20中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述StAR蛋白包含TOMM20蛋白序列的至少一部分。

[0106] 权利要求22.根据权利要求18至21中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述CDP包括P450。

[0107] 权利要求23.根据权利要求18至22中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。

[0108] 权利要求24.根据权利要求18至23中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述StAR蛋白和所述CDP包含至少一种线粒体信号传导蛋白。

[0109] 权利要求25.根据权利要求18至24中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述StAR或CDP的所述编码序列进一步包括细胞特异性启动子序列。

[0110] 权利要求26.根据权利要求18至25中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述StAR或CDP的所述编码序列整合到所述哺乳动物细胞的基因组中。

[0111] 权利要求27.根据权利要求18至25中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述StAR或CDP的编码序列未整合到所述哺乳动物细胞的基因组中。

[0112] 权利要求28.根据权利要求18至27中任一项所述的哺乳动物细胞,用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。

[0113] 权利要求29.根据权利要求18至28中任一项所述的哺乳动物细胞,用于在减少受试者中的胆固醇中使用。

[0114] 权利要求30.根据权利要求18至29中任一项所述的哺乳动物细胞,其中,所述哺乳动物细胞选自肝细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。

[0115] 权利要求31.一种哺乳动物细胞,包含:

[0116] 工程化的类固醇生成性急性调节(StAR)蛋白或其部分;以及

[0117] 胆固醇降解蛋白(CDP),包含胆固醇脱氢酶(CholD)、3-酮类固醇 $\Delta$ 1-脱氢酶( $\Delta$ 1-KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶(KshAB)、3 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶2(HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)中的一种或多种。

[0118] 权利要求32.根据权利要求31所述的哺乳动物细胞,其中所述StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63至188。

[0119] 权利要求33.根据权利要求31或权利要求32所述的哺乳动物细胞,其中所述StAR蛋白包括SEQ ID NO:7的残基63-188的重复。

[0120] 权利要求34.根据权利要求31至权利要求33中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述StAR蛋白包括所述TOMM20蛋白的至少一部分。

[0121] 权利要求35.根据权利要求31至权利要求34中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述CDP包括P450。

[0122] 权利要求36.根据权利要求31至权利要求35中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。

[0123] 权利要求37.根据权利要求31至权利要求36中任一项所述的哺乳动物细胞,其中所述StAR蛋白和所述CDP包含至少一种线粒体信号传导蛋白。

- [0124] 权利要求38. 根据权利要求31至权利要求37中任一项所述的哺乳动物细胞, 其中所述细胞中StAR蛋白和CDP的总量的至少10%位于线粒体膜中。
- [0125] 权利要求39. 根据权利要求31至权利要求38中任一项所述的哺乳动物细胞, 其中所述StAR蛋白或所述CDP由整合到所述哺乳动物细胞的基因组中的基因编码。
- [0126] 权利要求40. 根据权利要求31至权利要求39中任一项所述的哺乳动物细胞, 其中所述StAR蛋白或所述CDP由基因组外基因编码。
- [0127] 权利要求41. 根据权利要求31至39中任一项所述的哺乳动物细胞, 用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。
- [0128] 权利要求42. 根据权利要求31至权利要求40中任一项所述的哺乳动物细胞, 用于在减少受试者中的胆固醇中使用。
- [0129] 权利要求43. 根据权利要求18至29中任一项所述的哺乳动物细胞, 其中, 所述细胞选自肝细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。
- [0130] 权利要求44. 一种增强哺乳动物细胞中胆固醇降解的方法, 包括:
- [0131] 表达非天然工程化的类固醇生成性急性调节 (StAR) 蛋白或其部分; 以及
- [0132] 表达一种或多种胆固醇降解蛋白 (CDP), 所述胆固醇降解蛋白包括胆固醇脱氢酶 (CholD)、3-酮类固醇  $\Delta 1$ -脱氢酶 ( $\Delta 1$ -KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶 (acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶 (KshAB)、3 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶2 (HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白 (P450-FdxR-Fdx)。
- [0133] 权利要求45. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述StAR蛋白包含SEQ ID NO:7的残基63至188。
- [0134] 权利要求46. 根据权利要求44或权利要求45所述的方法, 其中所述StAR蛋白包括SEQ ID NO:7的残基63-188的重复。
- [0135] 权利要求47. 根据权利要求44至权利要求46中任一项所述的方法, 其中所述StAR蛋白包括所述TOMM20蛋白的至少一部分。
- [0136] 权利要求48. 根据权利要求44至权利要求47中任一项所述的方法, 其中所述CDP包括P450。
- [0137] 权利要求49. 根据权利要求44至权利要求48中任一项所述的方法, 其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白 (P450-FdxR-Fdx)。
- [0138] 权利要求50. 根据权利要求44至权利要求49中任一项所述的方法, 其中所述StAR蛋白和所述CDP包含至少一种线粒体信号传导蛋白。
- [0139] 权利要求51. 根据权利要求44至权利要求50中任一项所述的方法, 其中由细胞特异性启动子序列表达所述StAR蛋白和CDP。
- [0140] 权利要求52. 根据权利要求44至权利要求51中任一项所述的方法, 用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。
- [0141] 权利要求53. 根据权利要求44至权利要求52中任一项所述的方法, 用于在降低具有高胆固醇的受试者中的胆固醇中使用。
- [0142] 权利要求54. 根据权利要求44至权利要求53中任一项所述的方法, 其中所述细胞中StAR蛋白和CDP的总量的至少约10%位于线粒体膜中。

[0143] 权利要求55. 根据权利要求44至权利要求54中任一项所述的方法, 其中所述StAR蛋白或所述CDP由整合到所述哺乳动物细胞的基因组中的基因表达。

[0144] 权利要求56. 根据权利要求44至权利要求54中任一项所述的方法, 其中所述StAR蛋白或所述CDP来自基因组外基因。

[0145] 权利要求57. 根据权利要求44至权利要求56中任一项所述的方法, 用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。

[0146] 权利要求58. 根据权利要求44至权利要求57中任一项所述的方法, 用于在降低受试者中的胆固醇中使用。

[0147] 权利要求59. 根据权利要求44至权利要求58中任一项所述的方法, 其中所述细胞选自肝细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。

[0148] 权利要求60. 根据权利要求44至权利要求59中任一项所述的方法, 其中所述胆固醇是LDL。

[0149] 权利要求61. 根据权利要求44至权利要求59中任一项所述的方法, 其中所述胆固醇是7KC。

[0150] 权利要求62. 一种治疗处于发展高胆固醇风险中或患有高胆固醇的患者的方法, 包括:

[0151] 向该患者给予至少一种修饰的细胞, 该修饰的细胞包括

[0152] 非天然的工程化的类固醇生成急性调节(StAR)蛋白或其部分; 以及

[0153] 一种或多种胆固醇降解蛋白(CDP), 所述胆固醇降解蛋白包括胆固醇脱氢酶(CholD)、3-酮类固醇 $\Delta$ 1-脱氢酶( $\Delta$ 1-KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶(acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶(KshAB)、3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶2(HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。

[0154] 权利要求63. 根据权利要求62所述的方法, 其中所述StAR蛋白包括SEQ ID NO:7的残基63至188。

[0155] 权利要求64. 根据权利要求62或权利要求63所述的方法, 其中所述StAR蛋白包括SEQ ID NO:7的残基63-188的重复。

[0156] 权利要求65. 根据权利要求62至权利要求64所述的方法, 其中所述StAR蛋白包括所述TOMM20蛋白的至少一部分。

[0157] 权利要求66. 根据权利要求62至权利要求65所述的方法, 其中所述CDP包括P450。

[0158] 权利要求67. 根据权利要求62至权利要求66所述的方法, 其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白(P450-FdxR-Fdx)。

[0159] 权利要求68. 根据权利要求62至权利要求67所述的方法, 其中所述StAR蛋白和所述CDP包含至少一种线粒体信号传导蛋白。

[0160] 权利要求69. 根据权利要求62至权利要求68所述的方法, 其中由细胞特异性启动子序列表达所述StAR蛋白和CDP。

[0161] 权利要求70. 根据权利要求62至权利要求76所述的方法, 用于在降低具有高胆固醇的受试者中的胆固醇中使用。

[0162] 权利要求71. 根据权利要求62至权利要求71所述的方法, 其中所述细胞中StAR蛋

白和CDP的总量的至少约10%位于线粒体膜中。

[0163] 权利要求72. 根据权利要求62至权利要求72所述的方法, 其中所述StAR蛋白或所述CDP由整合到所述哺乳动物细胞的基因组中的基因表达。

[0164] 权利要求73. 根据权利要求62至权利要求72所述的方法, 其中所述StAR蛋白或所述CDP来自基因组外基因。

[0165] 权利要求74. 根据权利要求62至权利要求73所述的方法, 其中所述患者具有大于200mg/dl的总胆固醇。

[0166] 权利要求75. 根据权利要求62至权利要求74所述的方法, 其中, 所述患者患有非酒精性脂肪肝疾病。

[0167] 权利要求76. 根据权利要求62至权利要求74所述的方法, 其中所述患者患有非酒精性脂肪肝炎。

[0168] 权利要求77. 根据权利要求62至权利要求76所述的方法, 其中, 所述修饰的细胞来源于肝脏细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。

[0169] 权利要求78. 根据权利要求62至权利要求77所述的方法, 其中所述方法将患者血液中的总胆固醇浓度降低大于5%。

[0170] 权利要求79. 一种修饰哺乳动物线粒体的方法, 包括:

[0171] 将至少一种非天然的工程化的类固醇生成性急性调节 (StAR) 蛋白或其部分插入哺乳动物线粒体外膜中; 和

[0172] 其中该线粒体包括一种或多种胆固醇降解蛋白 (CDP), 该胆固醇降解蛋白包括胆固醇脱氢酶 (CholD)、3-酮类固醇  $\Delta 1$ -脱氢酶 ( $\Delta 1$ -KstD)、厌氧胆固醇代谢B酶 (acmB)、3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶 (KshAB)、3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶2 (HSD2)、P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白 (P450-FdxR-Fdx)。

[0173] 权利要求80. 根据权利要求79所述的方法, 其中所述StAR蛋白包括SEQ ID NO:7的残基63至188。

[0174] 权利要求81. 根据权利要求79或80所述的方法, 其中所述StAR蛋白包括SEQ ID NO:7的残基63-188的重复。

[0175] 权利要求82. 根据权利要求79至权利要求81中任一项所述的方法, 其中, 所述StAR蛋白包括所述TOMM20蛋白的至少一部分。

[0176] 权利要求83. 根据权利要求79至权利要求82中任一项所述的方法, 其中, 所述CDP包括P450。

[0177] 权利要求84. 根据权利要求79至权利要求83中任一项所述的方法, 其中所述CDP包括P450-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白融合蛋白 (P450-FdxR-Fdx)。

[0178] 权利要求85. 根据权利要求79至权利要求84中任一项所述的方法, 其中, 所述StAR蛋白和所述CDP包含至少一种线粒体信号传导蛋白。

[0179] 权利要求86. 根据权利要求79至权利要求85中任一项所述的方法, 其中, 所述StAR蛋白和CDP由细胞特异性启动子序列表达。

[0180] 权利要求87. 根据权利要求79至权利要求86中任一项所述的方法, 用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。

[0181] 权利要求88.根据权利要求79至权利要求87中任一项所述的方法,用于在减少具有高胆固醇的受试者中的胆固醇中使用。

[0182] 权利要求89.根据权利要求79至权利要求88中任一项所述的方法,其中所述细胞中StAR蛋白和CDP的总量的至少约10%位于线粒体膜中。

[0183] 权利要求90.根据权利要求79至权利要求90中任一项所述的方法,其中所述StAR蛋白或所述CDP由整合到所述哺乳动物细胞的基因组中的基因表达。

[0184] 权利要求91.根据权利要求79至权利要求89中任一项所述的方法,其中所述StAR蛋白或所述CDP来自基因组外基因。

[0185] 权利要求92.根据权利要求79至权利要求91中任一项所述的方法,用于在治疗患有高胆固醇或处于发展高胆固醇风险中的受试者中使用。

[0186] 权利要求93.根据权利要求79至权利要求92中任一项所述的方法,用于在降低受试者中的胆固醇中使用。

[0187] 权利要求94.根据权利要求79至权利要求93中任一项所述的方法,其中,所述细胞选自肝细胞、神经元细胞、骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞、上皮细胞、免疫细胞、造血细胞和干细胞或其前体细胞。

[0188] 虽然公开了多个实施例,但是根据以下详细描述,本发明的其他实施例对于本领域技术人员将变得清楚。如将变得清楚的,本发明能够在各种显而易见的方面进行修改,所有修改都不背离本发明的精神和范围。因此,详细说明本质上被认为是说明性的而非限制性的。

[0189] 在此公开的所有参考文献(无论是专利还是非专利)都通过引用以其全文结合在此,如同各自以其引用被包括在内。在参考文献与说明书之间发生冲突的情况下,将以本说明书(包括定义)为准。

[0190] 虽然已经以某种具体程度对本公开进行了描述,但应理解的是,本公开已经通过举例的方式做出,并且可以在不脱离如所附权利要求书中限定的本公开的精神的情况下做出细节或结构的改变。

## 序列表

<110> 修理生物科技公司 (REPAIR BIOTECHNOLOGIES, INC.)

<120> 增强胆固醇的基于线粒体的流动和分解代谢

<130> P289347.W0.01

<140>

<141>

<150> 63/122,886

<151> 2020-12-08

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成多肽

<400> 1

```

Met Leu Ala Lys Gly Leu Pro Pro Arg Ser Val Leu Val Lys Gly Cys
1           5           10           15
Gln Thr Phe Leu Ser Ala Pro Arg Glu Gly Leu Gly Arg Leu Arg Val
           20           25           30
Pro Thr Gly Glu Gly Ala Gly Ile Ser Thr Arg Ser Pro Arg Pro Phe
           35           40           45
Asn Glu Ile Pro Ser Pro Gly Asp Asn Gly Trp Leu Asn Leu Tyr His
           50           55           60
Phe Trp Arg Glu Thr Gly Thr His Lys Val His Leu His His Val Gln
65           70           75           80
Asn Phe Gln Lys Tyr Gly Pro Ile Tyr Arg Glu Lys Leu Gly Asn Val
           85           90           95
Glu Ser Val Tyr Val Ile Asp Pro Glu Asp Val Ala Leu Leu Phe Lys
           100          105          110
Ser Glu Gly Pro Asn Pro Glu Arg Phe Leu Ile Pro Pro Trp Val Ala
           115          120          125
Tyr His Gln Tyr Tyr Gln Arg Pro Ile Gly Val Leu Leu Lys Lys Ser
           130          135          140
Ala Ala Trp Lys Lys Asp Arg Val Ala Leu Asn Gln Glu Val Met Ala
145          150          155          160
Pro Glu Ala Thr Lys Asn Phe Leu Pro Leu Leu Asp Ala Val Ser Arg

```

	165	170	175
Asp Phe Val Ser Val Leu His Arg Arg Ile Lys Lys Ala Gly Ser Gly			
	180	185	190
Asn Tyr Ser Gly Asp Ile Ser Asp Asp Leu Phe Arg Phe Ala Phe Glu			
	195	200	205
Ser Ile Thr Asn Val Ile Phe Gly Glu Arg Gln Gly Met Leu Glu Glu			
	210	215	220
Val Val Asn Pro Glu Ala Gln Arg Phe Ile Asp Ala Ile Tyr Gln Met			
225	230	235	240
Phe His Thr Ser Val Pro Met Leu Asn Leu Pro Pro Asp Leu Phe Arg			
	245	250	255
Leu Phe Arg Thr Lys Thr Trp Lys Asp His Val Ala Ala Trp Asp Val			
	260	265	270
Ile Phe Ser Lys Ala Asp Ile Tyr Thr Gln Asn Phe Tyr Trp Glu Leu			
	275	280	285
Arg Gln Lys Gly Ser Val His His Asp Tyr Arg Gly Ile Leu Tyr Arg			
	290	295	300
Leu Leu Gly Asp Ser Lys Met Ser Phe Glu Asp Ile Lys Ala Asn Val			
305	310	315	320
Thr Glu Met Leu Ala Gly Gly Val Asp Thr Thr Ser Met Thr Leu Gln			
	325	330	335
Trp His Leu Tyr Glu Met Ala Arg Asn Leu Lys Val Gln Asp Met Leu			
	340	345	350
Arg Ala Glu Val Leu Ala Ala Arg His Gln Ala Gln Gly Asp Met Ala			
	355	360	365
Thr Met Leu Gln Leu Val Pro Leu Leu Lys Ala Ser Ile Lys Glu Thr			
	370	375	380
Leu Arg Leu His Pro Ile Ser Val Thr Leu Gln Arg Tyr Leu Val Asn			
385	390	395	400
Asp Leu Val Leu Arg Asp Tyr Met Ile Pro Ala Lys Thr Leu Val Gln			
	405	410	415
Val Ala Ile Tyr Ala Leu Gly Arg Glu Pro Thr Phe Phe Phe Asp Pro			
	420	425	430
Glu Asn Phe Asp Pro Thr Arg Trp Leu Ser Lys Asp Lys Asn Ile Thr			
	435	440	445
Tyr Phe Arg Asn Leu Gly Phe Gly Trp Gly Val Arg Gln Cys Leu Gly			
	450	455	460
Arg Arg Ile Ala Glu Leu Glu Met Thr Ile Phe Leu Ile Asn Met Leu			
465	470	475	480

Glu Asn Phe Arg Val Glu Ile Gln His Leu Ser Asp Val Gly Thr Thr  
 485 490 495  
 Phe Asn Leu Ile Leu Met Pro Glu Lys Pro Ile Ser Phe Thr Phe Trp  
 500 505 510  
 Pro Phe Asn Gln Glu Ala Thr Gln Gln Thr Asp Gly Thr Ser Ser Thr  
 515 520 525  
 Gln Glu Lys Thr Pro Gln Ile Cys Val Val Gly Ser Gly Pro Ala Gly  
 530 535 540  
 Phe Tyr Thr Ala Gln His Leu Leu Lys His Pro Gln Ala His Val Asp  
 545 550 555 560  
 Ile Tyr Glu Lys Gln Pro Val Pro Phe Gly Leu Val Arg Phe Gly Val  
 565 570 575  
 Ala Pro Asp His Pro Glu Val Lys Asn Val Ile Asn Thr Phe Thr Gln  
 580 585 590  
 Thr Ala His Ser Gly Arg Cys Ala Phe Trp Gly Asn Val Glu Val Gly  
 595 600 605  
 Arg Asp Val Thr Val Pro Glu Leu Arg Glu Ala Tyr His Ala Val Val  
 610 615 620  
 Leu Ser Tyr Gly Ala Glu Asp His Arg Ala Leu Glu Ile Pro Gly Glu  
 625 630 635 640  
 Glu Leu Pro Gly Val Cys Ser Ala Arg Ala Phe Val Gly Trp Tyr Asn  
 645 650 655  
 Gly Leu Pro Glu Asn Gln Glu Leu Glu Pro Asp Leu Ser Cys Asp Thr  
 660 665 670  
 Ala Val Ile Leu Gly Gln Gly Asn Val Ala Leu Asp Val Ala Arg Ile  
 675 680 685  
 Leu Leu Thr Pro Pro Glu His Leu Glu Arg Thr Asp Ile Thr Lys Ala  
 690 695 700  
 Ala Leu Gly Val Leu Arg Gln Ser Arg Val Lys Thr Val Trp Leu Val  
 705 710 715 720  
 Gly Arg Arg Gly Pro Leu Gln Val Ala Phe Thr Ile Lys Glu Leu Arg  
 725 730 735  
 Glu Met Ile Gln Leu Pro Gly Ala Arg Pro Ile Leu Asp Pro Val Asp  
 740 745 750  
 Phe Leu Gly Leu Gln Asp Lys Ile Lys Glu Val Pro Arg Pro Arg Lys  
 755 760 765  
 Arg Leu Thr Glu Leu Leu Leu Arg Thr Ala Thr Glu Lys Pro Gly Pro  
 770 775 780  
 Ala Glu Ala Ala Arg Gln Ala Ser Ala Ser Arg Ala Trp Gly Leu Arg

785		790		795		800									
Phe	Phe	Arg	Ser	Pro	Gln	Gln	Val	Leu	Pro	Ser	Pro	Asp	Gly	Arg	Arg
				805				810							815
Ala	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	Ala	Val	Thr	Arg	Leu	Glu	Gly	Val	Asp	Glu
				820				825							830
Ala	Thr	Arg	Ala	Val	Pro	Thr	Gly	Asp	Met	Glu	Asp	Leu	Pro	Cys	Gly
				835				840							845
Leu	Val	Leu	Ser	Ser	Ile	Gly	Tyr	Lys	Ser	Arg	Pro	Val	Asp	Pro	Ser
				850				855							860
Val	Pro	Phe	Asp	Ser	Lys	Leu	Gly	Val	Ile	Pro	Asn	Val	Glu	Gly	Arg
865						870									880
Val	Met	Asp	Val	Pro	Gly	Leu	Tyr	Cys	Ser	Gly	Trp	Val	Lys	Arg	Gly
						885									895
Pro	Thr	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Thr	Met	Thr	Asp	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly
				900											910
Gln	Met	Leu	Leu	Gln	Asp	Leu	Lys	Ala	Gly	Leu	Leu	Pro	Ser	Gly	Pro
				915											925
Arg	Pro	Gly	Tyr	Ala	Ala	Ile	Gln	Ala	Leu	Leu	Ser	Ser	Arg	Gly	Val
				930											940
Arg	Pro	Val	Ser	Phe	Ser	Asp	Trp	Glu	Lys	Leu	Asp	Ala	Glu	Glu	Val
945						950									960
Ala	Arg	Gly	Gln	Gly	Thr	Gly	Lys	Pro	Arg	Glu	Lys	Leu	Val	Asp	Pro
						965									975
Gln	Glu	Met	Leu	Arg	Leu	Leu	Gly	His	Thr	Asp	Gly	Ala	Ser	Ser	Ser
				980											990
Ser	Glu	Asp	Lys	Ile	Thr	Val	His	Phe	Ile	Asn	Arg	Asp	Gly	Glu	Thr
				995											1005
Leu	Thr	Thr	Lys	Gly	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Leu	Leu	Asp	Val	Val	
				1010											1020
Val	Glu	Asn	Asn	Leu	Asp	Ile	Asp	Gly	Phe	Gly	Ala	Cys	Glu	Gly	
				1025											1035
Thr	Leu	Ala	Cys	Ser	Thr	Cys	His	Leu	Ile	Phe	Glu	Asp	His	Ile	
				1040											1050
Tyr	Glu	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Asp	Glu	Glu	Asn	Asp	Met	Leu	
				1055											1065
Asp	Leu	Ala	Tyr	Gly	Leu	Thr	Asp	Arg	Ser	Arg	Leu	Gly	Cys	Gln	
				1070											1080
Ile	Cys	Leu	Thr	Lys	Ser	Met	Asp	Asn	Met	Thr	Val	Arg	Val	Pro	
				1085											1095

Glu Thr Val Ala Asp Ala Arg Gln Ser Ile Asp Val Gly Lys Thr  
 1100 1105 1110  
 Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 1115 1120  
 <210> 2  
 <211> 427  
 <212> PRT  
 <213> 未知物  
 <220>  
 <223> 未知物的说明:胆固醇脱氢酶序列  
 <400> 2  
 Met Pro Thr Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Phe Gln Leu Gly Ser Leu Glu  
 1 5 10 15  
 Asn Leu Tyr Phe Gln Gly His His His His His His Gly Thr Met Ala  
 20 25 30  
 Gly Phe Leu Asn Cys Cys Pro Gly Cys Cys Met Glu Pro Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Leu Arg Arg Met Gly Asp Ala  
 50 55 60  
 Ser Leu Thr Thr Glu Leu Gly Arg Val Leu Val Thr Gly Gly Ala Gly  
 65 70 75 80  
 Phe Val Gly Ala Asn Leu Val Thr Thr Leu Leu Asp Arg Gly His Trp  
 85 90 95  
 Val Arg Ser Phe Asp Arg Ala Pro Ser Leu Leu Pro Ala His Pro Gln  
 100 105 110  
 Leu Glu Val Leu Gln Gly Asp Ile Thr Asp Ala Asp Val Cys Ala Ala  
 115 120 125  
 Ala Val Asp Gly Ile Asp Thr Ile Phe His Thr Ala Ala Ile Ile Glu  
 130 135 140  
 Leu Met Gly Gly Ala Ser Val Thr Asp Glu Tyr Arg Gln Arg Ser Phe  
 145 150 155 160  
 Ala Val Asn Val Gly Gly Thr Glu Asn Leu Leu His Ala Gly Gln Arg  
 165 170 175  
 Ala Gly Val Gln Arg Phe Val Tyr Thr Ser Ser Asn Ser Val Val Met  
 180 185 190  
 Gly Gly Gln Asn Ile Ala Gly Gly Asp Glu Thr Leu Pro Tyr Thr Asp  
 195 200 205  
 Arg Phe Asn Asp Leu Tyr Thr Glu Thr Lys Val Val Ala Glu Arg Phe  
 210 215 220



Ser Gly Ala Ser Ile Trp Leu Pro Gly Thr Gln Val Gln Glu Arg Ala  
 50 55 60  
 Gly Leu Pro Asp Ser Thr Glu Asn Ala Arg Thr Tyr Leu Arg Ala Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Gly Asp Ala Glu Ser Glu Arg Gln Asp Ala Tyr Val Glu Thr Ala  
 85 90 95  
 Pro Ala Val Val Ala Leu Leu Glu Gln Asn Pro Asn Ile Glu Phe Glu  
 100 105 110  
 Phe Arg Ala Phe Pro Asp Tyr Tyr Lys Ala Glu Gly Arg Met Asp Thr  
 115 120 125  
 Gly Arg Ser Ile Asn Pro Leu Asp Leu Asp Pro Ala Asp Ile Gly Asp  
 130 135 140  
 Leu Ala Gly Lys Val Arg Pro Glu Leu Asp Gln Asp Arg Thr Gly Gln  
 145 150 155 160  
 Asp His Ala Pro Gly Pro Met Ile Gly Gly Arg Ala Leu Ile Gly Arg  
 165 170 175  
 Leu Leu Ala Ala Val Gln Ser Thr Gly Lys Ala Glu Leu Arg Thr Glu  
 180 185 190  
 Ser Val Leu Thr Ser Leu Ile Val Glu Asp Gly Arg Val Val Gly Ala  
 195 200 205  
 Glu Val Glu Ser Gly Gly Glu Thr Gln Arg Ile Lys Ala Asn Arg Gly  
 210 215 220  
 Val Leu Met Ala Ala Gly Gly Ile Glu Gly Asn Ala Glu Met Arg Glu  
 225 230 235 240  
 Gln Ala Gly Thr Pro Gly Lys Ala Ile Trp Ser Met Gly Pro Phe Gly  
 245 250 255  
 Ala Asn Thr Gly Asp Ala Ile Ser Ala Gly Ile Ala Val Gly Gly Ala  
 260 265 270  
 Thr Ala Leu Leu Asp Gln Ala Trp Phe Cys Pro Gly Val Glu Gln Pro  
 275 280 285  
 Asp Gly Ser Ala Ala Phe Met Val Gly Val Arg Gly Gly Leu Val Val  
 290 295 300  
 Asp Ser Ala Gly Glu Arg Tyr Leu Asn Glu Ser Leu Pro Tyr Asp Gln  
 305 310 315 320  
 Phe Gly Arg Ala Met Asp Ala His Asp Asp Asn Gly Ser Ala Val Pro  
 325 330 335  
 Ser Phe Met Ile Phe Asp Ser Arg Glu Gly Gly Gly Leu Pro Ala Ile  
 340 345 350  
 Cys Ile Pro Asn Thr Ala Pro Ala Lys His Leu Glu Ala Gly Thr Trp

355	360	365
Val Gly Ala Asp Thr Leu Glu	Glu Leu Ala Ala Lys Thr Gly Leu Pro	
370	375	380
Ala Asp Ala Leu Arg Ser Thr Val Glu Lys Phe Asn Asp Ala Ala Lys		
385	390	395
Leu Gly Val Asp Glu Glu Phe His Arg Gly Glu Asp Pro Tyr Asp Ala		
405	410	415
Phe Phe Cys Pro Pro Asn Gly Gly Ala Asn Ala Ala Leu Thr Ala Ile		
420	425	430
Glu Asn Gly Pro Phe Tyr Ala Ala Arg Ile Val Leu Ser Asp Leu Gly		
435	440	445
Thr Lys Gly Gly Leu Val Thr Asp Val Asn Gly Arg Val Leu Arg Ala		
450	455	460
Asp Gly Ser Ala Ile Asp Gly Leu Tyr Ala Ala Gly Asn Thr Ser Ala		
465	470	475
Ser Leu Ser Gly Arg Phe Tyr Pro Gly Pro Gly Val Pro Leu Gly Thr		
485	490	495
Ala Met Val Phe Ser Tyr Arg Ala Ala Gln Asp Met Ala Lys		
500	505	510
<210> 4		
<211> 595		
<212> PRT		
<213> 未知物		
<220>		
<223> 未知物的说明: 厌氧胆固醇代谢B酶序列		
<400> 4		
Met Pro Thr Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Phe Gln Leu Gly Ser Gly Thr		
1	5	10
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Thr Met Ser Ile Glu Thr Asn Thr Tyr		
20	25	30
Asp Val Ile Val Val Gly Ser Gly Ala Gly Ala Met Leu Ala Ala Ala		
35	40	45
Arg Ala His Asp Leu Gly Leu Ser Val Leu Val Val Glu Lys Ser Asp		
50	55	60
Lys Tyr Gly Gly Thr Ser Ala Val Ser Gly Gly Ala Val Trp Ile Pro		
65	70	75
Asn Asn Ser Gln Met Gln Ile Lys Asp Ser Phe Asp Glu Ala Leu Thr		
85	90	95
Tyr Leu Lys Ala Ala Thr Gln Gly Leu Val Ala Glu Asp Arg Leu Leu		

	100		105		110
Ala Tyr Leu Glu Ser Ala Pro Gln Met Val Glu Tyr Ile Asn Ala Asn					
	115		120		125
Met Thr Leu Gln Tyr Phe Pro Cys His Arg Tyr Pro Asp Tyr Tyr Gln					
	130		135		140
His Leu Pro Gly Ala Lys Pro Gly Gly Arg Thr Met Glu Pro Met Leu					
145		150		155	160
Phe Asp Ala Ala Leu Leu Gly Asp Glu Phe Ala Asn Leu Arg Met Ala					
	165		170		175
Tyr Thr Gly Thr Leu Leu Met Gly Lys Ala Ser Met Thr Ala Thr Glu					
	180		185		190
Ala His Val Met Leu Ala Lys Glu Pro Gly Trp Met Leu Gln Val Ile					
	195		200		205
Lys Ser Leu Gly Arg Tyr Tyr Leu Asp Leu Pro Trp Arg Leu Lys Ser					
	210		215		220
Arg His Asp Arg Lys Arg Gly Leu Gly Asn Ala Met Ala Ala Gly Leu					
225		230		235	240
Arg His Ala Leu Leu Glu Arg Lys Val Pro Leu Trp Leu Asn Thr Pro					
	245		250		255
Phe Glu Ser Leu Ile Thr Glu Gly Ala Glu Asn Lys Arg Val Thr Gly					
	260		265		270
Ile Val Val Lys Arg Asn Gly Gln Thr Leu Gln Leu Thr Ala Arg Arg					
	275		280		285
Gly Val Val Leu Gly Ala Gly Gly Phe Glu Arg Asn Gln Gln Met Arg					
	290		295		300
Glu Gln Tyr Leu Pro Lys Pro Thr Asn Ala Ala Trp Ser Ala Thr Pro					
305		310		315	320
Pro His Asn Thr Gly Asp Thr Ile Arg Ala Ala Met Asp Ile Gly Ala					
	325		330		335
Arg Ala Glu Leu Met Asp Trp Ala Trp Trp Val Pro Ser Ile His Val					
	340		345		350
Pro Gly Glu Ala Ala Gln Thr Gly Leu Phe Ala Glu Arg Asn Leu Pro					
	355		360		365
Gly Cys Ile Val Val Asn Gly Lys Gly Gln Arg Phe Ile Asn Glu Ala					
	370		375		380
Ser Pro Tyr Leu Glu Phe Gly Ala Ala Met Tyr Glu Asn His Ala Arg					
385		390		395	400
Ser Gly Ser Ala Val Pro Ala Trp Leu Ile Phe Asp Gly Lys Phe Arg					
	405		410		415

Tyr Asn Tyr Pro Met Gly Pro Leu Met Pro Gly Gln Ile Gln Pro Asp  
 420 425 430  
 Arg Lys Ala Trp Leu Gly Lys Val Tyr Trp Arg Asp Asp Thr Leu Glu  
 435 440 445  
 Gly Leu Ala Lys Gln Ile Gly Val Asp Ala Ala Gly Leu Lys Gln Ser  
 450 455 460  
 Val Glu Leu Asn Asn Gln Tyr Ala Gln Asp Gly Lys Asp Arg Glu Phe  
 465 470 475 480  
 Asp Lys Gly Gly Asn Val Phe Asp Arg Tyr Tyr Gly Asp Tyr Asn Val  
 485 490 495  
 Lys Pro Asn Pro Cys Leu Ala Pro Ile Gly Lys Pro Pro Tyr Tyr Ala  
 500 505 510  
 Met Arg Val Asp Ala Gly Asp Ile Gly Thr Lys Gly Gly Leu Leu Thr  
 515 520 525  
 Asp Lys Asp Ala Arg Val Leu Asp Glu Ser Asp Arg Pro Ile Glu Gly  
 530 535 540  
 Leu Tyr Cys Ile Gly Asn Asn Ser Ala Ser Val Met Gly Lys Ala Tyr  
 545 550 555 560  
 Pro Gly Ala Gly Gly Thr Leu Gly Pro Ala Met Thr Phe Gly Phe Arg  
 565 570 575  
 Ala Ala Asn His Ile Ala Ala Ser Lys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp  
 580 585 590  
 Tyr Ala Gly  
 595  
 <210> 5  
 <211> 860  
 <212> PRT  
 <213> 未知物  
 <220>  
 <223> 未知物的说明:3-酮类固醇9 $\alpha$ -羟化酶序列  
 <400> 5  
 Met Ala Pro Tyr Ser Leu Leu Val Thr Arg Leu Gln Lys Ala Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Val Arg Gln Tyr His Val Ala Ser Val Leu Cys Gln Arg Ala Lys Val  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 35 40 45  
 Met Ser Ile Asp Thr Ala Arg Ser Gly Ser Asp Asp Asp Val Glu Ile  
 50 55 60

Arg	Glu	Ile	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Thr	Arg	Phe	Ala	Arg	Gly	Trp
65					70					75					80
His	Cys	Leu	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Phe	Gln	Asp	Gly	Lys	Pro	His	Ser
			85						90						95
Ile	Glu	Ala	Phe	Gly	Thr	Lys	Leu	Val	Val	Phe	Ala	Asp	Ser	Lys	Gly
			100					105						110	
Gln	Leu	Asn	Val	Leu	Asp	Ala	Tyr	Cys	Arg	His	Met	Gly	Gly	Asp	Leu
			115					120						125	
Ser	Arg	Gly	Glu	Val	Lys	Gly	Asp	Ser	Ile	Ala	Cys	Pro	Phe	His	Asp
			130					135						140	
Trp	Arg	Trp	Asn	Gly	Lys	Gly	Lys	Cys	Thr	Asp	Ile	Pro	Tyr	Ala	Arg
145								150						155	160
Arg	Val	Pro	Pro	Ile	Ala	Lys	Thr	Arg	Ala	Trp	Thr	Thr	Leu	Glu	Arg
								165						170	175
Asn	Gly	Gln	Leu	Tyr	Val	Trp	Asn	Asp	Pro	Gln	Gly	Asn	Pro	Pro	Pro
			180					185						190	
Glu	Asp	Val	Thr	Ile	Pro	Glu	Ile	Ala	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Glu	Trp
			195					200						205	
Thr	Asp	Trp	Ser	Trp	Lys	Ser	Leu	Arg	Ile	Lys	Gly	Ser	His	Cys	Arg
								210						215	220
Glu	Ile	Val	Asp	Asn	Val	Val	Asp	Met	Ala	His	Phe	Phe	Tyr	Ile	His
225								230						235	240
Tyr	Ser	Phe	Pro	Arg	Tyr	Phe	Lys	Asn	Val	Phe	Glu	Gly	His	Thr	Ala
								245						250	255
Thr	Gln	Tyr	Met	His	Ser	Thr	Gly	Arg	Glu	Asp	Val	Ile	Ser	Gly	Thr
								260						265	270
Asn	Tyr	Asp	Asp	Pro	Asn	Ala	Glu	Leu	Arg	Ser	Glu	Ala	Thr	Tyr	Phe
								275						280	285
Gly	Pro	Ser	Tyr	Met	Ile	Asp	Trp	Leu	Glu	Ser	Asp	Ala	Asn	Gly	Gln
								290						295	300
Thr	Ile	Glu	Thr	Ile	Leu	Ile	Asn	Cys	His	Tyr	Pro	Val	Ser	Asn	Asn
305								310						315	320
Glu	Phe	Val	Leu	Gln	Tyr	Gly	Ala	Ile	Val	Lys	Lys	Leu	Pro	Gly	Val
								325						330	335
Ser	Asp	Glu	Ile	Ala	Ala	Gly	Met	Ala	Glu	Gln	Phe	Ala	Glu	Gly	Val
								340						345	350
Gln	Leu	Gly	Phe	Glu	Gln	Asp	Val	Glu	Ile	Trp	Lys	Asn	Lys	Ala	Pro
								355						360	365
Ile	Asp	Asn	Pro	Leu	Leu	Ser	Glu	Glu	Asp	Gly	Pro	Val	Tyr	Gln	Leu

370	375	380
Arg Arg Trp Tyr Gln Gln Phe Tyr Val Asp Val Glu Asp Ile Thr Glu		
385	390	395
Asp Met Thr Lys Arg Phe Glu Phe Glu Ile Asp Thr Thr Arg Ala Val		
405	410	415
Ala Ser Trp Gln Lys Glu Val Ala Glu Asn Leu Ala Lys Gln Ala Glu		
420	425	430
Gly Ser Thr Ala Thr Pro Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu		
435	440	445
Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Pro Tyr		
450	455	460
Ser Leu Leu Val Thr Arg Leu Gln Lys Ala Leu Gly Val Arg Gln Tyr		
465	470	475
His Val Ala Ser Val Leu Cys Gln Arg Ala Lys Val Ala Met Ser Gly		
485	490	495
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly Gly Gly Ser Met Thr		
500	505	510
Ala Val Gln Ala Pro Val Thr Ser Arg Ala Thr Val Leu Thr Val Ser		
515	520	525
Ala Val Val Gln Glu Thr Ala Asp Ala Val Ser Leu Val Phe Asp Val		
530	535	540
Pro Asp Asp Arg Arg Glu Asp Phe Thr Tyr Arg Pro Gly Gln Phe Leu		
545	550	555
Thr Leu Arg Ile Pro Ser Asp Arg Thr Gly Ser Val Ala Arg Cys Tyr		
565	570	575
Ser Leu Ala Ser Ser Pro Phe Thr Gly Glu Pro Pro Lys Val Thr Val		
580	585	590
Lys Arg Thr Ala Gly Gly Tyr Gly Ser Asn Trp Leu Cys Asp Asn Ile		
595	600	605
Val Ala Gly Arg Ser Ile Glu Val Leu Pro Pro Ala Gly Val Phe Thr		
610	615	620
Pro Ala Asp Leu Thr Glu Lys Leu Val Leu Phe Ala Gly Gly Ser Gly		
625	630	635
Ile Thr Pro Val Met Ser Ile Leu Glu Ser Ala Leu His Ser Gly Asn		
645	650	655
Arg Asp Val Val Leu Ile Tyr Gly Asn Arg Asp Glu Lys Ser Val Ile		
660	665	670
Phe Ala Glu Lys Leu Arg Glu Leu Ala Ala Arg His Ala Gly Ala Leu		
675	680	685

Thr Val Val His Trp Leu Glu Ser Val Gln Gly Leu Pro Ser Pro Gln  
 690 695 700  
 Gln Leu Ala Thr Leu Ile Ser Pro Phe Ala Asp His Arg Ala Tyr Met  
 705 710 715 720  
 Cys Gly Pro Gly Pro Phe Met Asp Thr Val Arg Glu Gly Leu Leu Leu  
 725 730 735  
 Ala Gly Val Pro Lys Asp Arg Ile His Ala Glu Val Phe Thr Ser Leu  
 740 745 750  
 Ser Gly Asp Pro Phe Ala Asp Val Pro Leu Val Glu Ile Asp Glu Ser  
 755 760 765  
 Asp Ala Asp Ala Thr Ser Ala Thr Val Gln Leu Asp Gly Glu Glu His  
 770 775 780  
 Asp Leu Val Trp Pro Arg Ser Ala Thr Leu Val Asp Val Met Leu Ser  
 785 790 795 800  
 Lys Gly Leu Asp Val Pro Tyr Ser Cys Arg Glu Gly Glu Cys Gly Ser  
 805 810 815  
 Cys Ala Cys Thr Val Val Glu Gly Asp Val Asp Ser Leu Pro Ser Ala  
 820 825 830  
 Ile Leu Asp Glu Glu Asp Ile Ala Asn Gly Tyr Val Leu Ala Cys Gln  
 835 840 845  
 Ala Arg Pro Lys Ser Asp His Val Arg Ile Glu Phe  
 850 855 860  
 <210> 6  
 <211> 372  
 <212> PRT  
 <213> 未知物  
 <220>  
 <223> 未知物的说明:3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶序列  
 <400> 6  
 Met Gly Trp Ser Cys Leu Val Thr Gly Ala Gly Gly Leu Leu Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Arg Ile Val Arg Leu Leu Val Glu Glu Lys Glu Leu Lys Glu Ile Arg  
 20 25 30  
 Ala Leu Asp Lys Ala Phe Arg Pro Glu Leu Arg Glu Glu Phe Ser Lys  
 35 40 45  
 Leu Gln Asn Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Gly Asp Ile Leu Asp  
 50 55 60  
 Glu Pro Phe Leu Lys Arg Ala Cys Gln Asp Val Ser Val Val Ile His  
 65 70 75 80

Thr Ala Cys Ile Ile Asp Val Phe Gly Val Thr His Arg Glu Ser Ile			
	85	90	95
Met Asn Val Asn Val Lys Gly Thr Gln Leu Leu Leu Glu Ala Cys Val			
	100	105	110
Gln Ala Ser Val Pro Val Phe Ile Tyr Thr Ser Ser Ile Glu Val Ala			
	115	120	125
Gly Pro Asn Ser Tyr Lys Glu Ile Ile Gln Asn Gly His Glu Glu Glu			
	130	135	140
Pro Leu Glu Asn Thr Trp Pro Thr Pro Tyr Pro Tyr Ser Lys Lys Leu			
145	150	155	160
Ala Glu Lys Ala Val Leu Ala Ala Asn Gly Trp Asn Leu Lys Asn Gly			
	165	170	175
Asp Thr Leu Tyr Thr Cys Ala Leu Arg Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Glu			
	180	185	190
Gly Gly Pro Phe Leu Ser Ala Ser Ile Asn Glu Ala Leu Asn Asn Asn			
	195	200	205
Gly Ile Leu Ser Ser Val Gly Lys Phe Ser Thr Val Asn Pro Val Tyr			
	210	215	220
Val Gly Asn Val Ala Trp Ala His Ile Leu Ala Leu Arg Ala Leu Arg			
225	230	235	240
Asp Pro Lys Lys Ala Pro Ser Val Arg Gly Gln Phe Tyr Tyr Ile Ser			
	245	250	255
Asp Asp Thr Pro His Gln Ser Tyr Asp Asn Leu Asn Tyr Ile Leu Ser			
	260	265	270
Lys Glu Phe Gly Leu Arg Leu Asp Ser Arg Trp Ser Leu Pro Leu Thr			
	275	280	285
Leu Met Tyr Trp Ile Gly Phe Leu Leu Glu Val Val Ser Phe Leu Leu			
	290	295	300
Ser Pro Ile Tyr Ser Tyr Gln Pro Pro Phe Asn Arg His Thr Val Thr			
305	310	315	320
Leu Ser Asn Ser Val Phe Thr Phe Ser Tyr Lys Lys Ala Gln Arg Asp			
	325	330	335
Leu Ala Tyr Lys Pro Leu Tyr Ser Trp Glu Glu Ala Lys Gln Lys Thr			
	340	345	350
Val Glu Trp Val Gly Ser Leu Val Asp Arg His Lys Glu Thr Leu Lys			
	355	360	365
Ser Lys Thr Gln			
	370		
<210> 7			

<211> 285  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 7  
 Met Leu Leu Ala Thr Phe Lys Leu Cys Ala Gly Ser Ser Tyr Arg His  
 1                   5                   10                   15  
 Met Arg Asn Met Lys Gly Leu Arg Gln Gln Ala Val Met Ala Ile Ser  
                   20                   25                   30  
 Gln Glu Leu Asn Arg Arg Ala Leu Gly Gly Pro Thr Pro Ser Thr Trp  
                   35                   40                   45  
 Ile Asn Gln Val Arg Arg Arg Ser Ser Leu Leu Gly Ser Arg Leu Glu  
                   50                   55                   60  
 Glu Thr Leu Tyr Ser Asp Gln Glu Leu Ala Tyr Leu Gln Gln Gly Glu  
 65                   70                   75                   80  
 Glu Ala Met Gln Lys Ala Leu Gly Ile Leu Ser Asn Gln Glu Gly Trp  
                   85                   90                   95  
 Lys Lys Glu Ser Gln Gln Asp Asn Gly Asp Lys Val Met Ser Lys Val  
                   100                   105                   110  
 Val Pro Asp Val Gly Lys Val Phe Arg Leu Glu Val Val Val Asp Gln  
                   115                   120                   125  
 Pro Met Glu Arg Leu Tyr Glu Glu Leu Val Glu Arg Met Glu Ala Met  
                   130                   135                   140  
 Gly Glu Trp Asn Pro Asn Val Lys Glu Ile Lys Val Leu Gln Lys Ile  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Lys Asp Thr Phe Ile Thr His Glu Leu Ala Ala Glu Ala Ala Gly  
                   165                   170                   175  
 Asn Leu Val Gly Pro Arg Asp Phe Val Ser Val Arg Cys Ala Lys Arg  
                   180                   185                   190  
 Arg Gly Ser Thr Cys Val Leu Ala Gly Met Ala Thr Asp Phe Gly Asn  
                   195                   200                   205  
 Met Pro Glu Gln Lys Gly Val Ile Arg Ala Glu His Gly Pro Thr Cys  
                   210                   215                   220  
 Met Val Leu His Pro Leu Ala Gly Ser Pro Ser Lys Thr Lys Leu Thr  
 225                   230                   235                   240  
 Trp Leu Leu Ser Ile Asp Leu Lys Gly Trp Leu Pro Lys Ser Ile Ile  
                   245                   250                   255  
 Asn Gln Val Leu Ser Gln Thr Gln Val Asp Phe Ala Asn His Leu Arg  
                   260                   265                   270  
 Lys Arg Leu Glu Ser His Pro Ala Ser Glu Ala Arg Cys

	275	280	285
<210> 8			
<211> 145			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 8			
Met Val Gly Arg Asn Ser Ala Ile Ala Ala Gly Val Cys Gly Ala Leu			
1	5	10	15
Phe Ile Gly Tyr Cys Ile Tyr Phe Asp Arg Lys Arg Arg Ser Asp Pro			
	20	25	30
Asn Phe Lys Asn Arg Leu Arg Glu Arg Arg Lys Lys Gln Lys Leu Ala			
	35	40	45
Lys Glu Arg Ala Gly Leu Ser Lys Leu Pro Asp Leu Lys Asp Ala Glu			
	50	55	60
Ala Val Gln Lys Phe Phe Leu Glu Glu Ile Gln Leu Gly Glu Glu Leu			
65	70	75	80
Leu Ala Gln Gly Glu Tyr Glu Lys Gly Val Asp His Leu Thr Asn Ala			
	85	90	95
Ile Ala Val Cys Gly Gln Pro Gln Gln Leu Leu Gln Val Leu Gln Gln			
	100	105	110
Thr Leu Pro Pro Pro Val Phe Gln Met Leu Leu Thr Lys Leu Pro Thr			
	115	120	125
Ile Ser Gln Arg Ile Val Ser Ala Gln Ser Leu Ala Glu Asp Asp Val			
	130	135	140
Glu			
145			
<210> 9			
<211> 375			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的说明:合成多肽			
<400> 9			
Met Val Gly Arg Asn Ser Ala Ile Ala Ala Gly Val Cys Gly Ala Leu			
1	5	10	15
Phe Ile Gly Tyr Cys Ile Tyr Phe Asp Arg Lys Arg Arg Ser Asp Pro			
	20	25	30
Asn Phe Lys Asn Arg Leu Arg Glu Arg Arg Lys Lys Gln Lys Leu Ala			
	35	40	45

Lys Glu Arg Ala Gly Leu Ser Lys Leu Pro Asp Leu Lys Asp Ala Glu  
 50 55 60  
 Ala Val Gln Lys Phe Phe Leu Glu Glu Ile Gln Leu Gly Glu Glu Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Gln Gly Glu Tyr Glu Lys Gly Val Asp His Leu Thr Asn Ala  
 85 90 95  
 Ile Ala Val Cys Gly Gln Pro Gln Gln Leu Leu Gln Val Leu Gln Gln  
 100 105 110  
 Thr Leu Pro Pro Pro Val Phe Gln Met Leu Leu Thr Lys Leu Pro Thr  
 115 120 125  
 Ile Ser Gln Arg Ile Val Ser Ala Gln Ser Leu Ala Glu Asp Asp Val  
 130 135 140  
 Glu Gly Ser Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Ser Asp  
 145 150 155 160  
 Gln Glu Leu Ala Tyr Leu Gln Gln Gly Glu Glu Ala Met Gln Lys Ala  
 165 170 175  
 Leu Gly Ile Leu Ser Asn Gln Glu Gly Trp Lys Lys Glu Ser Gln Gln  
 180 185 190  
 Asp Asn Gly Asp Lys Val Met Ser Lys Val Val Pro Asp Val Gly Lys  
 195 200 205  
 Val Phe Arg Leu Glu Val Val Val Asp Gln Pro Met Glu Arg Leu Tyr  
 210 215 220  
 Glu Glu Leu Val Glu Arg Met Glu Ala Met Gly Glu Trp Asn Pro Asn  
 225 230 235 240  
 Val Lys Glu Ile Lys Val Leu Gln Lys Ile Gly Lys Asp Thr Phe Ile  
 245 250 255  
 Thr His Glu Leu Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asn Leu Val Gly Pro Arg  
 260 265 270  
 Asp Phe Val Ser Val Arg Cys Ala Lys Arg Arg Gly Ser Thr Cys Val  
 275 280 285  
 Leu Ala Gly Met Ala Thr Asp Phe Gly Asn Met Pro Glu Gln Lys Gly  
 290 295 300  
 Val Ile Arg Ala Glu His Gly Pro Thr Cys Met Val Leu His Pro Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Gly Ser Pro Ser Lys Thr Lys Leu Thr Trp Leu Leu Ser Ile Asp  
 325 330 335  
 Leu Lys Gly Trp Leu Pro Lys Ser Ile Ile Asn Gln Val Leu Ser Gln  
 340 345 350  
 Thr Gln Val Asp Phe Ala Asn His Leu Arg Lys Arg Leu Glu Ser His

355	360	365
Pro Ala Ser Glu Ala Arg Cys		
370	375	
<210> 10		
<211> 418		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的说明：合成多肽		
<400> 10		
Met Leu Leu Ala Thr Phe Lys Leu Cys Ala Gly Ser Ser Tyr Arg His		
1	5	10
Met Arg Asn Met Lys Gly Leu Arg Gln Gln Ala Val Met Ala Ile Ser		
	20	25
Gln Glu Leu Asn Arg Arg Ala Leu Gly Gly Pro Thr Pro Ser Thr Trp		
	35	40
Ile Asn Gln Val Arg Arg Arg Ser Ser Leu Leu Gly Ser Arg Leu Glu		
	50	55
Glu Thr Leu Tyr Ser Asp Gln Glu Leu Ala Tyr Leu Gln Gln Gly Glu		
65	70	75
Glu Ala Met Gln Lys Ala Leu Gly Ile Leu Ser Asn Gln Glu Gly Trp		
	85	90
Lys Lys Glu Ser Gln Gln Asp Asn Gly Asp Lys Val Met Ser Lys Val		
	100	105
Val Pro Asp Val Gly Lys Val Phe Arg Leu Glu Val Val Val Asp Gln		
	115	120
Pro Met Glu Arg Leu Tyr Glu Glu Leu Val Glu Arg Met Glu Ala Met		
	130	135
Gly Glu Trp Asn Pro Asn Val Lys Glu Ile Lys Val Leu Gln Lys Ile		
145	150	155
Gly Lys Asp Thr Phe Ile Thr His Glu Leu Ala Ala Glu Ala Ala Gly		
	165	170
Asn Leu Val Gly Pro Arg Asp Phe Val Ser Val Arg Gly Ser Asp Asp		
	180	185
Asp Asp Lys Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Ser Asp Gln Glu Leu Ala Tyr		
	195	200
Leu Gln Gln Gly Glu Glu Ala Met Gln Lys Ala Leu Gly Ile Leu Ser		
	210	215
Asn Gln Glu Gly Trp Lys Lys Glu Ser Gln Gln Asp Asn Gly Asp Lys		

225	230	235	240
Val Met Ser Lys Val Val Pro Asp Val Gly Lys Val Phe Arg Leu Glu			
	245	250	255
Val Val Val Asp Gln Pro Met Glu Arg Leu Tyr Glu Glu Leu Val Glu			
	260	265	270
Arg Met Glu Ala Met Gly Glu Trp Asn Pro Asn Val Lys Glu Ile Lys			
	275	280	285
Val Leu Gln Lys Ile Gly Lys Asp Thr Phe Ile Thr His Glu Leu Ala			
	290	295	300
Ala Glu Ala Ala Gly Asn Leu Val Gly Pro Arg Asp Phe Val Ser Val			
305	310	315	320
Arg Cys Ala Lys Arg Arg Gly Ser Thr Cys Val Leu Ala Gly Met Ala			
	325	330	335
Thr Asp Phe Gly Asn Met Pro Glu Gln Lys Gly Val Ile Arg Ala Glu			
	340	345	350
His Gly Pro Thr Cys Met Val Leu His Pro Leu Ala Gly Ser Pro Ser			
	355	360	365
Lys Thr Lys Leu Thr Trp Leu Leu Ser Ile Asp Leu Lys Gly Trp Leu			
	370	375	380
Pro Lys Ser Ile Ile Asn Gln Val Leu Ser Gln Thr Gln Val Asp Phe			
385	390	395	400
Ala Asn His Leu Arg Lys Arg Leu Glu Ser His Pro Ala Ser Glu Ala			
	405	410	415

Arg Cys

<210> 11

<211> 2565

<212> DNA

<213> 智人

<400> 11

gcagctgcgg gactcagagg cgaagcttga ggggctcagg aaggacgaag aaccaccctt	60
gagagaagag gcagcagcag cggcggcagc agcagcggca gcgacccac cactgccaca	120
tttgccagga aacaatgctg ctagegacat tcaagctgtg cgctgggagc tctacagac	180
acatgcgcaa catgaagggg ctgaggcaac aggctgtgat ggccatcagc caggagctga	240
accggagggc cctggggggc cccacccta gcacgtggat taaccagggtt cggcggcgga	300
gctctctact cggttctcgg ctggaagaga ctctctacag tgaccaggag ctggcctatc	360
tccagcaggg ggaggaggcc atgcagaagg ccttgggcat ccttagcaac caagagggt	420
ggaagaagga gagtcagcag gacaatgggg acaaagtgat gagtaaagtg gtcccagatg	480
tgggcaaggt gttccggctg gaggtcgtgg tggaccagcc catggagagg ctctatgaag	540
agctcgtgga gcgcatggaa gcaatggggg agtggaaacc caatgtcaag gagatcaagg	600

tctgcagaa gatcggaaaa gatacattca ttactcacga gctggctgcc gaggcagcag	660
gaaacctggt ggggccccgt gactttgtga gcgtgcgctg tgccaagcgc cgaggctcca	720
cctgtgtgct ggctggcatg gccacagact tcggaacat gcctgagcag aagggtgtca	780
tcagggcgga gcacggtdcc acttgcatgg tgcttcaccc gttggctgga agtccctcta	840
agaccaaact tacgtggcta ctgagcatcg acctcaaggg gtggctgccc aagagcatca	900
tcaaccagggt cctgtcccag acccagggtg attttgccaa ccacctgccc aagcgcctgg	960
agtcccaccc tgccctgtaa gccagggtgt gaagaccagc ctgctgttcc caactgtgcc	1020
cagctgcact ggtacacacg ctcatcagga gaatccctac tggaagcctg caagtctaag	1080
atctccatct ggtgacagtg ggatgggtgg ggttcgtgtt tagagtatga cactaggatt	1140
cagattggtg aaagttttta gtaccaagaa aacagggatg aggctcttgg attaaaaggt	1200
aacttcattc actgattagc tatgacatga gggttcaggc ccctaaaata attgtaaaac	1260
tttttttctg ggcccttatg taccaccta aaacctctt taaaatgcta gtggctgata	1320
tggtgtggg ggatgctaac cacaggcct gagaagtctt gctttatggg ctcaagaatg	1380
ccatgcgctg gcagtacatg tgcacaaagc agaatctcag aggtctctct gcagccctct	1440
gctcctccc gccgctgcac agcaacacca cagaacaagc agcaccacac agtgggtgcc	1500
ttccagaaat atagtccaag ctttctctgt ggaaaaagac aaaactcatt agtagacatg	1560
tttccctatt gctttcatag gcaccagtca gaataaagaa tcataattca cacaaacatc	1620
agtctttgtt ttaatattgt actgttaaaa aatctatgc agctgggtgc agtggctcac	1680
gcctgtaatc ccagcatttt gggaggctga ggtaggcgga tcacaaggtc aggagatcga	1740
gaccatcctg gccaacatgg tgaaacccc tctctactaa aatacaaaaa attagctggg	1800
tgtggtggcg caaacctgta gtcgtagcta cttgggaggc tgaggcaggg gaatcacttg	1860
aaccccgag gcggaggtg tagtgggccc agattgtgcc actgcgctcc agcgtgggcg	1920
acagagtgag actccatctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaat ctatgctagt agattacaac	1980
ttcacactag aggagtctg gacaaagctt ttaattagtc aactaaatt aaggctcatt	2040
aaaaggaaag gaactactgg gaaattatgc aattcaataa ttagactct gttaccagga	2100
tctttcataa aaatttaatt tccataatca taacctaaat gagttcttaa agaattctat	2160
aagcaatagc tgattaatgg gccctggaag atgaagatta taactgttta tttacctaat	2220
taaaaggaaa ggcagtgcc aatatgagag gataaacaat attagttaac atttctgtta	2280
tttatgatgc caattagtag taagataatt ccacagctgt caactttgtt tgggctggc	2340
aacttctctg cttaaacagg ctaaaagttt agtattctgg gagaagtggc tggaagaagg	2400
ggtaatatgg tgaaagcaaa ttcccttcc caggagtcaa gagaatttat gtgaggtggc	2460
tcccgcctgt aatctcagca ctttgggagg ccaaggcagg caatcacctg agggcaggag	2520
accagcctga ctaacatgga gaaacccat ctctactaaa aatac	2565
<210> 12	
<211> 3283	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 12	
ctttctgtgt tcttgcccc cggccgtcgg gtgtgagctg cgccgaccgc tctgagggtt	60

cgtggccac	cgctccttcg	cggtccctgc	cgccaccgtc	cacgctcagc	gttgtagaga	120
agatgggtggg	tcggaacagc	gccatcgccg	ccggtgtatg	cggggccctt	ttcattgggt	180
actgcatcta	cttcgaccgc	aaaagacgaa	gtgaccccaa	cttcaagaac	aggcttcgag	240
aacgaagaaa	gaaacagaag	cttgccaagg	agagagctgg	gctttccaag	ttacctgacc	300
ttaaagatgc	tgaagctggt	cagaagttct	tccttgaaga	aatacagctt	ggtgaagagt	360
tactagctca	aggtgaatat	gagaagggcg	tagaccatct	gacaaatgca	attgctgtgt	420
gtggacagcc	acagcagtta	ctgcaggtct	tacagcaaac	tcttcacca	ccagtgttcc	480
agatgcttct	gactaagctc	ccaacaatta	gtcagagaat	tgtaagtgct	cagagcttgg	540
ctgaagatga	tgtggaatga	gaaacaaatg	tcaacataat	aaaatctcag	ttaaaaatat	600
tttaaaaatt	cttggtagtt	gagcagctct	gggggaataa	gggcaaata	gcttgttatg	660
aactacactg	aaatctacca	aagttaatgt	ttactttgtg	tagatccatt	tgtctatttt	720
atztattttt	cccagtghaa	agtgtatttt	gatagagaac	ttttcattct	ataaatacac	780
tatgagttac	taaaatatca	tggattttgt	ttattcctga	aacatagtta	catagttaaa	840
ctgtacatat	gacatggctt	atgttaaaaa	taccagtgct	tcagttttga	aagataggca	900
aaaaaaaaaa	agtataggag	aaactgaaga	atgtacactt	ttttagaggg	cacattttgc	960
tgtaaactctg	gaaatttgat	agacttgact	gtgtttgtga	aaactgagca	ttaaaggttt	1020
tgattgatcc	tttctttcca	tttaatctct	gagacgtaaa	tatgtgaggt	gtgctgctgt	1080
gctgggttaa	cagcttcctt	ccctttctgt	gtagcagtct	tgaaatgttc	tgtttaaatc	1140
agtaggctta	atgtgttctg	ggtatztatc	tccttgtatt	ttaaataat	gtagttgcaa	1200
atagcaccag	gaattagatt	tctgtacacc	cctaacttag	ccttgtgagc	ttcgtagtt	1260
aatgtgtgct	cactttccct	ccatttgta	cgtagagaaa	tgcgtctgct	gatcactgaa	1320
gtgtcccttt	tagcttctga	ttcattgggt	tctgttgggc	atctttaaat	ccaccttaac	1380
ctgaggaatg	tatgtgggca	accaggccct	gcattttttt	atattctgaa	ttttgcatgc	1440
ttgcctgact	tagtatttct	gaattgatgt	tttttttaat	ggtataacta	tcttgatttt	1500
cactgaaatt	atatggttct	gtcactactc	tgtaaattaa	tccgaaactt	ttaaggtaac	1560
tgggatgatc	tgcttghaaa	aatgcttggt	gccttttgc	ttatcttcag	tgtacctcct	1620
taatcctgct	tcaacttgat	tatcttgtga	aacgatgaga	gtaagttgca	accttgtgac	1680
tgaaaacttg	aaaagagtgg	agcaggtggg	acctcttatt	ctcaaatagt	gacatattct	1740
ccgtagtcac	agtttcagaa	ctgagtaagg	atccttggtg	cttggtggca	tctgttgaa	1800
tgaggagcat	ttctcattgt	aaagattgcc	ttgttctgt	ctaaaagtct	ggagaaatcc	1860
caaagacttt	tcctatgtac	taggcatttt	atattgattg	acttacaac	tcttcttaat	1920
cattatcaat	ctcggttttt	ttgtggtgca	gtggaaggag	aaataggtct	agtttctgcc	1980
tctgattagc	cgcacagcct	tgaacaaatc	acatttcate	tttgaactta	cctctactgt	2040
tagactagc	gactcacatt	tgaggacttt	tctcgggtat	cttgagggtt	tgtgatcctg	2100
aacccttaaa	cagtgccttt	ttgttacaca	ggagggtttt	tttgggggga	tgaccagtac	2160
agacatgcca	gttagtttta	ctagtgggat	cccaaatcca	aagcagtgta	gtggtgattg	2220
gtcagtgact	aaccaggcag	ctaagaagtc	ttaggcagca	gcccagacat	gtatagaggg	2280
gcagttagag	ggagaacagg	ggtgggaaa	ggagcaaggg	gcagatagct	cagcaaggaa	2340
agaatgggct	cagaaaaagg	agggtctggct	ggaggagtga	ggggcagctt	aagtttgggg	2400

agggtagaaa	cgccgtttcc	ttgggaactg	gagtgcagta	tgagctgggt	gtcacttggc	2460
tctgaacata	ctggctttgc	tgtaatgctt	gaaaaggcgt	tggtatcttc	attttacagt	2520
tcattaaccc	aagtacgttt	tcttatttaa	atgacaactt	tggtgcttta	aaatgaggta	2580
ccacttttta	aagctagctg	tgtcgagtta	aagaaaaaat	cagcagtttt	ttctcccaga	2640
aatgtaattg	ccaaacacta	ttcatcccca	tcttaagttt	tacaaggaga	tgtaatcagc	2700
ttgtttagtg	gatgctggcc	aaatgggtgct	cagcaggtga	gaacaaaaaa	accccagatc	2760
tcagtgaact	aatacacagc	ttgagcgttt	ccatgtgcta	atgttgca	cttactaaaa	2820
aactttggaa	atggaaaata	atgtattagt	gcaacagttg	atgtgcttct	ttgggcaaag	2880
atatagtttt	gttccacaat	ttgtacttaa	aagcgaaaga	acattgaaaa	catagactta	2940
ctggctgtag	caatgctggc	ctgttaactg	ataactagaa	cttaggttca	cgtttatgta	3000
aagtgtgtaa	aacctagtag	agettgcata	gtcggcactc	agtaaagtgt	tggttccttt	3060
tgccccttgg	taagtttatt	ttaccatcct	cccactgcc	attctgactt	tattaaatca	3120
acatgtggac	cagagtgtta	atgagatggt	attgcagaag	agattgagaa	aattggtata	3180
tcatgcagat	aacatacaaa	atctttttgt	aacgtaaaaa	atgcagtttt	attattgctt	3240
gtgcctcaac	tgtttaagtg	aatattaaag	ggcttggaga	aaa		3283

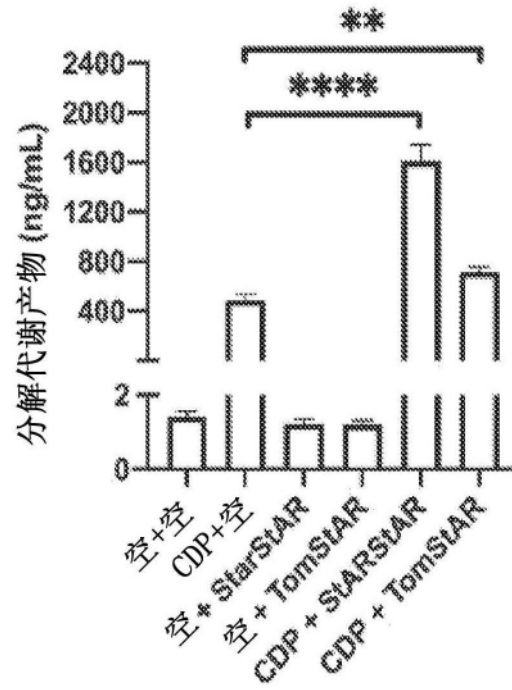


图1

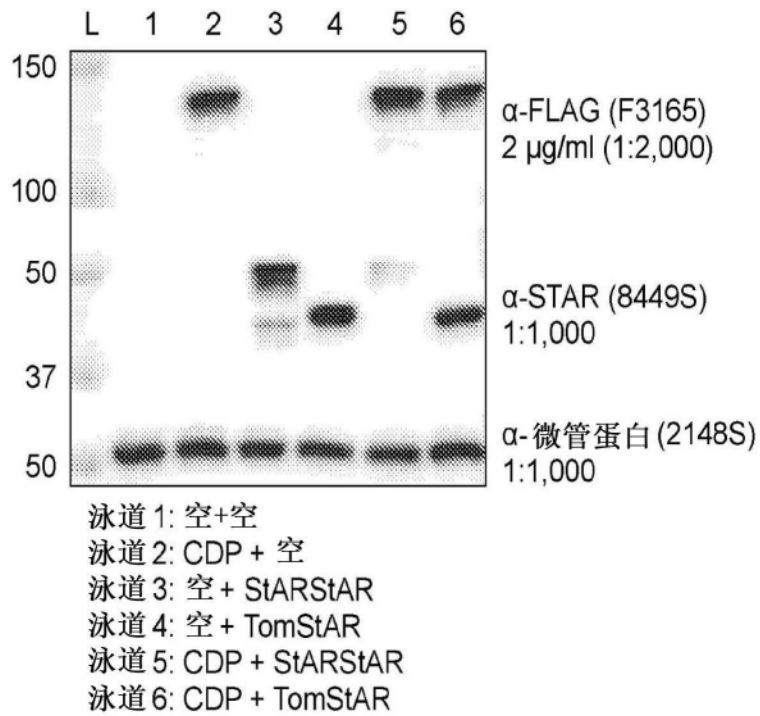


图2

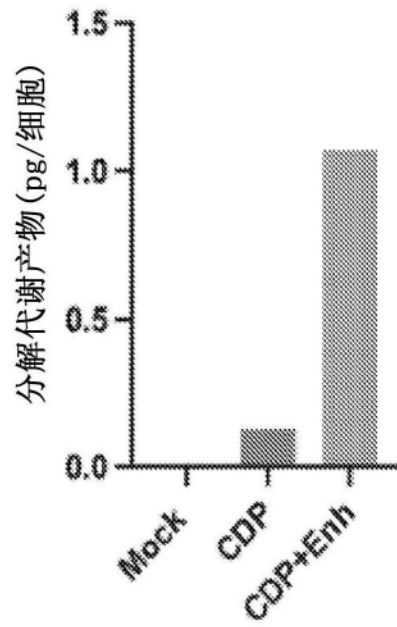


图3

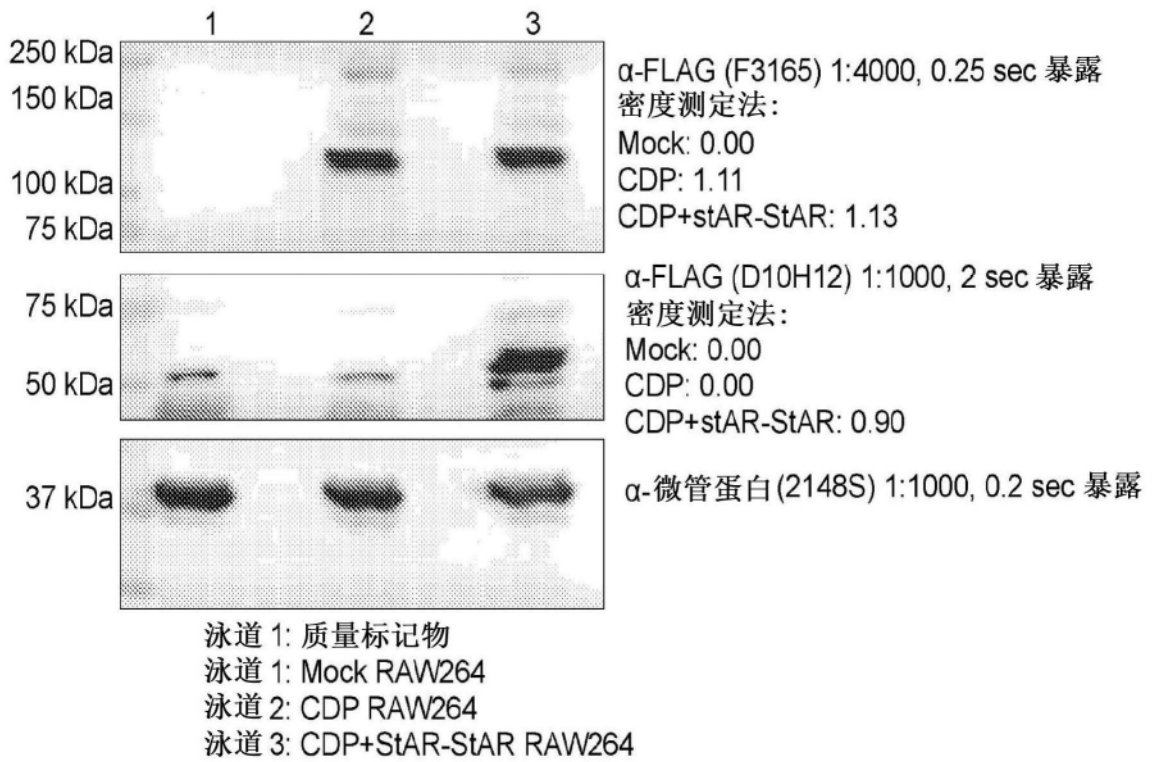


图4

p450-FdxR-Fdx的人蛋白序列 (w/Flag标签为粗体) SEQ ID NO:1

MLAKGLPPRSVLVKGCCQTFLSAPREGLGRLRVPTGEGAGISTRSPRPFNEIPSPGDNGWLNLYH  
 FWRETGTHKVLHHVQNFQKYGPIYREKLGNVESVYVIDPEDVALLFKSEGPNPERFLIPPWVAY  
 HQYYQRPIGVLLKKSAAWKKDRVALNQEVMAPKATKNFLPLLDVSRDFVSVLHRRRIKAGSGNY  
 SGGDISDDLFRFAFESITNVIFGERQGMLEEVNPEAQRFDIAYQMFHTSVPMNLNPPDLFRLFRFK  
 TWKDHVAAWVDFVFSKADIYTQNFYWELRQKGSVHHDYRGILYRLLGDSKMSFEDIKANVTEMLA  
 GGVDTTSMTLQWHLIEMARNLKVQDMLRAEVLAARHQAGQDMATMLQLVPLLKASIKETLRLHP  
 ISVTLQRYLVNDLVLVDYMIKATLVQVAIYALGREPTFFFDPENFDPTRWLSKDKNITYFRNLGFG  
 WGVQRQLGRRIAELEMTIFLINMLENFRVEIQHLSVGVTTFNLIIMPEKPISTFWPFNQEQATQQT  
 DGTSSSTQEKTPQICVVGSGPAGFYTAQHLLKHPQAHVDIYEKQPVVFGLVRFVAPDHPVEVKNVI  
 NTFTQTAHSGRCFAFWGNVEVGRDVTPELREAYHAVVLSYGAEDHRALEIPGEELPGVCSARAF  
 VGWYNGLPENQELEPDLSCDTAVILGQGNVALDVARILLTPPEHLERTDITKAALGVLRQSRVKT  
 WLVGRRGPLQVAFTIKELREMIQLPGARPILDVDFLGLQDKIKEVPRPRKRLTELLLRATEKPGP  
 AEAARQASASRAWGLRFFRSPQQVLPSPDGRRAAGVRLAVTRLEGVDEATRAVPTGDMEDLPC  
 GLVLSSIGYKSRPVDPSVPFDSKLGVIPNVEGRVMDVPGLYCSGWVWKRGPVGIATTMTDSFLTG  
 QMLLQDLKAGLLPSGPRPGYAAIQALLSSRGVPRVVSFSDWEKLDAAEEVARGQGTGKPREKLVDP  
 QEMLRLLGHTDGASSSEDKITVHFINDGETLTTKGVGDSLLDWWENNLDIDGFGACEGTLA  
 CSTCHLIFEDHIYEKLDAITDEENDMLDLAYGLTDRSRLGCQICLTKSMDNMTVRVPETVADARQS  
 IDVGKTSYKDDDDK

胆固醇脱氢酶, CholD SEQ ID NO:2

MPTLYKKAGFQLGSLNLYFQGHHHHHHGTMAAGFLNCCPGCCMEPGASDYKDDDDKMLRRMG  
 DASLTTTELGRVLTGGAGFVGANLVTLLDRGHVWRSFDRAPSLPAHPQLEVLQGDITDADVCA  
 AAVDGDITIFHTAAIIELMGGASVTDEYRQRSAFVNVGGTENLLHAGQRAGVQRFVYTSNSVWM  
 GGQNIAGGDETLPYTDRFNDLYTETKVVAERFVLAQNGVDGMLTCAIRPSGIWNGDQTMFRKL  
 FESVLKGVHVKLVGRKSARLDNSYVHNLHGFILAAHLVDPGTAPGQAYFINDAEPINMFEFARP  
 VLEACGQRWPKMRISGPAVRWVMTGWQRLHFRFGFPAPLLEPLAVERLYLDNYFSIAKARRDLG  
 YEPLFTTQQALTECLPYVSLFEQMKNEARAETAATVKPG

3-酮类固醇  $\Delta$ 1-脱氢酶,  $\Delta$ 1-KstD SEQ ID NO:3

MQDWTSECDVLVVGSGGGALTGAYTAAAGLTTIVLEKTDRFGGTSAYSASIWLPGTQVQERA  
 GLPDSTENARTYL RALLGDAESERQDAYVETAPAVALLEQNPNIEFEFFRAFPDYKAEGRMDTG  
 RSINPLDLDPADIGDLAGKVRPELDQDRTGQDHAPGPMIGGRALIGRLLAAVQSTGKAEIERTESVL  
 TSLIVEDGRVVGAEVESGGGETQRIKANRGLVMAAGGIEGNAEMREQAGTPGKAIWSMGPFGANT  
 GDAISAGIAVGGATALLDQAWFCPGVEQPDGSAAFMVGVRGGLVDSAGERYL NESLPYDQFG  
 RAMDAHDDNGSAVPSFMIFDSREGGGLPAICIPNTAPAKHLEAGTWVGADTLEELAAKTGLPADA  
 LRSTVEKFNDAAKLGVD EEFHRGEDPYDAFFCPPNGGANAALTAIENGPFYAARIVLSDLGKGG  
 LVTDVNGRVLRADGSAIDGLYAAGNTSASLSGRFYPGPGVPLGTAMVFSYRAAQDMAK

厌氧胆固醇代谢B酶, acmB SEQ ID NO:4

MPTLYKKAGFQLGSGTENLYFQGTMSIETNTYDVIVVVGSGAGAMLAARAHDLGLSVLVVEKSDK  
 YGGTSAVSGGAVWIPNNSQMCIKDSFDEALTYLKAATQGLVAEDRLLAYLESAPQMVEYINANMT  
 LQYFPCHRYPDYQHLP GAKPGGRTMEPMLFDAALLGDEFANLRMAYTGTLLMGKASMTATEA  
 HVMLAKEPGWMLQVIKSLGRYYLDLPWRLKSRHDRKRGLGNAMAAGLRHALLERKVPWLWNT  
 FESLITEGAENKRVTGIVVKRNGQTLQLTARRGVVLGAGGFERNQQMREQYLPKPTNAAWSATP  
 PHNTGDTIRAAMDIGARAELMDWAWWWWPSIHVPGEAAQTGLFAERNLPGCIVVNGKGRFINEA  
 SPYLEFGAAMYENHARSGSAVPAWLIFDGKFRYNYPMGPLMPGQIQPDRKAWLGKVYWRDDTL  
 EGLAKIQIGVDAAGLKQSVLNNQYAQDGKDFDKGGNVFDRYGYDYNVKNPCLAPIGKPPYY  
 AMRVDAGDIGTKGGLLTDKDARVLDES DRPIEGLYCIGNNSASVMGKAYPGAGGTLGPAMTFG  
 RAANHIAASKYPYDVPDYAG

图5



STAR1 mRNA完整序列，SEQ ID NO:11；SEQ ID NO:7的下划线氨基酸63-285对应于以下核苷酸序列的大写字母：

```

gcagctgctgggactcagaggcgaagctgaggggctcaggaaggacgaagaaccaccctgagagaagaggcagcagcagcggc
ggcagcagcagcggcagcgacccaccactgcccacattgcccaggaacaATGctgctagcgcattcaagctgtgcgtgggagc
tcciacagacacatgccaacatgaagggctgaggaacaggctgtgatggccatcagccaggagctgaaccggaggggccctggg
gggccccaccctagcagctggattaaccagggtcggcggcggagctctctactcgggtctcggCTGGAAGAGACTCTCTAC
AGTGACCAGGAGCTGGCCTATCTCCAGCAGGGGGAGGAGGCCATGCAGAAGGCCTTGGGC
ATCCTTAGCAACCAAGAGGGCTGGAAGAAGGAGAGTCAGCAGGACAATGGGGACAAAGTGA
TGAGTAAAGTGGTCCCAGATGTGGGCAAGGTGTTCCGGCTGGAGGTCGTGGTGGACCAGCC
CATGGAGAGGCTCTATGAAGAGCTCGTGGAGCGCATGGAAGCAATGGGGGAGTGGAAACC
CAATGTCAAGGAGATCAAGGTCCTGCAGAAGATCGGAAAAGATACATTCATTACTCACGAGC
TGGCTGCCGAGGCAGCAGGAAACCTGGTGGGGCCCCGTGACTTTGTGAGCGTGCCTGTG
CCAAGCGCCGAGGCTCCACCTGTGTGCTGGCTGGCATGGCCACAGACTTCGGGAACATGCC
TGAGCAGAAGGGTGTGCATCAGGGCGGAGCACGGTCCCACCTTGCATGGTGTTCACCCGTTG
GCTGGAAGTCCCTCTAAGACCAAACTTACGTGGCTACTCAGCATCGACCTCAAGGGGTGGCT
GCCAAGAGCATCATCAACCAGGTCCTGTCCCAGACCCAGGTGGATTTTGCCAACCACCTG
CGCAAGCGCCTGGAGTCCCACCCTGCCTCTGAAGCCAGGTGTTGAagaccagcctgctgttcccaactg
tgcccagctgcactggtacacacgctcatcaggagaatccctactggaagcctgcaagctcaagatccatctggtagcagtggtgg
gtggggtctgtttagagiatgacactaggtatcagatgggtgaaagtttttagtaccagaanaaacagggatgaggtcttggattaaaagg
taactcattcactgattagctatgacatgaggggtcaggccccataaataatgtaaaaactttttctgggccccttattgacccacctaaaacc
atcttaaaaagctagtgctgataatgggtgtgggggatglaaccacagggcctgagaagtctgtttatgggctcaagaaatgccatgog
ctggcagtaactgtgcacaaagcagaatctcagagggctcctgcagccctctctcccgccgctgcacagcaaccacacagaa
caagcagcacccccagtggtgctccagaaatagctccaagcttctctgtggaaaagacaaaactcattagtagacatgttccct
attgcttcatagggcaccagtcagaataaagaatcataatcacaacacacagctcttggtttaataattgtactgttaaaaaatctatgcag
ctgggtgtagtgctcagcctgtaatcccagcatttgggaggctgaggtaggoggatcacaaggtcaggagatcgagaccatccctgg
ccaacatggtgaaaacccctctctactaaaatacaaaaaattagctgggtgtgtggcgcaaacctgtagctagctacttgggaggctg
aggcagggggaalcactgaaaccccgaggcggagggtgtagtgggccgagattgtccactgctccagcgtggcgacagagtgga
gactccatctcaaaaaaaaaaaaaaaaaatctatgctagtagattacaacttcacactagaggagttctggacaagctttaaattagtc
aaactaaattaaggctcattaaaaggaaaggaactcctgggaaatattgcaaitcaataatttagactcgttacaggatcttccataaaaa
tttaattccataatcataacctaaatgagttcttaagaattctataagcaatagctgattaatgggcccctggaagatgaagattataactgtt
attacctaattaaaaggaaaggcagtgccaatatgagaggataaacaataatagtttaacattctgtattatgatgccaattagtagtaa
gataattccacagctgcaacttgggtggcctggcaactctctgctaaacaggctaaaagtttagtattctgggagaagtggtggaaga
aggggtaatatggtgaaagcaaatcccttcccaggagtcagagaattatgtgagggtggctcccgcctgtaatctcagcacttgggag
gccaaggcaggcaatccctgagggcaggagaccagcctgactaacatggagaaccccatctctactaaaaaac

```

图5续

TOMM20 mRNA完整序列, CDS = 123-560 SEQ ID NO:12

```

ctttctgtgttcctggcccgcggccgtcgggggtgagctgcgcgaccgctctgaggggtcgtggcccaccgctcctctcgggtccctgcgcg
caccgtccacgcctcagcgttgiagagaagATGgtgggtcggaaacagcgcgcacatcgcgccgggtgatgcggggcccttttcatt
gggtactgcactacttcgaccgcaaaagacgaagtgaccccaactcaagaacaggcttcgagaacgaagaagaagaaca
gaagcttgcgaaggagagagctggggcttccaagttacctgaccctaaagatgctgaagctgttcagaagttctccttgaaga
aatacagcttgggtgaagagtactagctcaaggtgaatafagaagggcgtagaccatctgacaaatgcaattgctgtgtgtgg
acagccacagcagttactgcaggtcttacagcaaacctctccaccaccagtgctcagatgcttctgactaagctcccaacaatt
agtcagagaattgtaagtgctcagagcttggctgaagatgatgtggaaTGAgaacaaatgtcaacataataaaatctcagttaa
aaaatatttaaaaatcttggtagttgagcagctcgggggaataagggcaataatgctgttaigaactacacigaaatclaccaaagttat
gtttactttgtgtagatccattgtctatttatttatttccagtgaaaagtgattttgatagagaacttttcattctataaatacactatgagttacta
aaataatcattggtatttatttctcgaacaatagttacatagttaaactgtacataigacatggcttaigttaaaaataaccagtgctcagittga
aagataggcaaaaaaaaaaaaagtataggagaaactgaagaatgtacacttttagaggggcacaatttgcgttaaatcggaaatttgata
gacttgactgtgtgtgaaaacagcagcatlaaaggttttgattgatcctttcttcatttaatctcagagaogtaaatatgtgggtgtgctgtgt
gctgggtaaacagctccttcccttctgtgtgagcagcttgaatgttctgtttaaactcagtaggcttaafgtgtcgggtatttctcctgtatttta
aataatgtagttgcaaatgacaccaggaaatagattctgtacaccocctaactcagcctgtgagctctgtagtlaatgtgtgtcacttccct
ccattgttacgtgagagaatggctctgctgacactgaagtgcccttttagctctgactcattgggtctgtggggcatcttaaatccaccttaa
cctgaggaatgtatgtggcaaccaggccctgcatttttatacttgaatttgcagcttgcctgacttagtattcigaattgatgttttttaag
gtataactatctgattttcacgaaattataatgttctgtcactactctgtaaaatcgcgaaacttttaaggtaactgggatgactgtgtgaaa
aatgtctgtcctttgtcttctcagigtactccttaactcctgtcaacttgattctctgtgaaacgatgagaglaagttgcaacctgtgac
tgaaaacttgaaaagagtgaggcagggtgggaccttattcctcaaatagtgacataattctcgtagtcacagttcagaactgagtaaggat
cctgtgactgtgggtcatctgtgaactgaggagcatttctcattgtaaagattgcttctgtctgtaaaaagtctgggagaaatcccaaggactt
ttcctatgtactaggcatttattttgattgacttacaactcttctaatcattatcaatctcgggtttttgtgggtcagtggaaggagaaataggctc
agttctgcctctgattagccgcacagccctgaacaaatcacatttcatcttgaactacctctacigttagactaggogactcacattgagga
ctttctcgggtatctgaggggtgtgatcctgaacccctaaacagtgctttttgttacacaggagggtttttggggggatgaccagtacaga
catgccagttagtttactagttggatoccaaaiaccaagcagtgtagtgggtattggctcagtgactaaccaggccagctlaagaagcttagg
cagcagcccagacatgtatagaggggagtttagaggggagaacaggggtgggaaagggagcaaggggcagatagctcagcaaggga
aagaatgggtcagaaaaaggagggctggctggaggagtgaggggcagctlaagttggggagggtagaaaacgccgttccctggga
actggagtgagatgagctgggtgtcacttggctcgaacatactggcttctgtlaatgctgaaaaggcgttggatcttcattttacagttc
attaacccaagtagtttctattttaaagacaaacttgggtctttaaagttaggtaccacttttaagctagctgtgtcagtttaagaaaaa
atcagcagtttttctccagaatgtaatlgccaaacactatcaccatctlaagttttacaagggtgatgtaacagctgtgtgtgtgtgtgt
ggccaaatgggtctcagcagggtgagaacaaaaaacccagatcicagtgaaactaatacacagctgagcgttccatgtgttaaitgtg
cacacttactaaaaacttggaaatggaaaataatgtattagtgcaacagttgatgtgtcttcttgggcaagatatagtttgttccacaattt
gtacttaaaagcgaagaacattgaaaacatagacttactggctgtagcaatgctggccgttaactgataactagaacttaggttcacgttt
atgtaaaagtgtaaaaacctagtagagctgtcatagtcggcactcagtaaatgttgggtcctttgcccctggtaagtttatttaccatcctcc
accigccattctgacttataaatacaatgtggaccagagtgtaaatgagatgtattgcagaagagatgagaaaatgggtatatacatgca
gataacatacaaaaatcttttgaacgttaaaaaatgcagtttattatfctgtgctcctcaactgttlaagtgaatattaagggtctggagaaaa

```

图5续