



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103038249 B

(45) 授权公告日 2016.04.13

(21) 申请号 201180028367.9

C12N 15/10(2006.01)

(22) 申请日 2011.06.08

C12N 9/16(2006.01)

(30) 优先权数据

61/352,461 2010.06.08 US

(56) 对比文件

WO 2005019256 A2, 2005.03.03,

CN 101516907 A, 2009.08.26,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.12.07

Koji Kawakami et al. Internalization property of interleukin-4 receptor alpha chain increases cytotoxic effect of interleukin-4 receptor targeted cytotoxin in cancer cells. 《Clinical cancer research》. 2002, 第8卷(第1期), 全文.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/059420 2011.06.08

Mitomu Kioi et al. Expression and targeting of interleukin-4 receptor for primary and advanced ovarian cancer therapy. 《Cancer research》. 2005, 第65卷(第18期), 全文.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/154420 EN 2011.12.15

F.L. Koller et al. Epithelial interleukin-4 receptor expression promotes colon tumor growth. 《Carcinogenesis》. 2010, 第31卷(第6期), 第1010-1017页.

(73) 专利权人 皮里斯股份公司

地址 德国弗赖辛

审查员 黎舒婷

(72) 发明人 A·霍尔鲍姆 A·贝尔赫

G·马钦内尔 S·特伦特曼

K·基尔弗莱德 H-J·克里斯蒂安

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11382

代理人 曹津燕 李渤

权利要求书1页 说明书29页

序列表28页 附图6页

(51) Int. Cl.

C07K 14/435(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

(54) 发明名称

结合 IL-4 受体  $\alpha$  的泪脂质运载蛋白突变蛋白

(57) 摘要

本申请涉及源自人泪脂质运载蛋白的新型突变蛋白,其与 IL-4 受体  $\alpha$  结合。所述突变蛋白的序列包含特定的氨基酸组合。特别地,在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的序列位置 27、28、30、31、33、53、57、61、64、66、80、83、104-106 和 108 中任一个或多个处存在突变的氨基酸残基。在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的序列位置 26、32、34、55、56、58 和 63 的任 2 个或更多个处也存在突变的氨基酸残基。本发明还提供编码这种突变蛋白的相应核酸分子以及用于产生这种突变蛋白和其编码核酸分子的方法。

1. 如 SEQ ID No:3-11 中任一项所示的人泪脂质运载蛋白突变蛋白。
2. 一种生成根据权利要求 1 所述的人泪脂质运载蛋白突变蛋白的方法, 其中所述突变蛋白结合至 IL-4 受体  $\alpha$ , 所述方法包括:
  - (a) 使编码人泪脂质运载蛋白的核酸分子在
    - (i) 成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置 27、28、30、31、33、53、57、61、64、66、80、83、104-106 和 108 中任一个或多个处, 和
    - (ii) 所述成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置 26、32、34、55、56、58 和 63 中任五个或更多个处诱变,从而获得一个或多个编码人泪脂质运载蛋白突变蛋白的核酸, 其中所述突变蛋白包含以下氨基酸集合中的一个:
    - (1) Ser 26 ; Tyr 32 ; Leu 55 ; Gln 56 ; Lys 58 ;
    - (2) Pro 26 ; Tyr 32 ; Ser 34 ; Ala 55 ; Gln 56 ; Lys 63 ;
    - (3) Leu 26 ; Phe 32 ; Trp 34 ; Ala 55 ; Ile 58 ; Ser 63 ;
    - (4) Ser 26 ; Tyr 32 ; Val 34 ; Ala 55 ; Ala 56 ; Ile 58 ; Ser 63 ;
    - (5) Ser 26 ; Val 32 ; Asn 34 ; Ala 55 ; Gln 56 ; Lys 58 ; Lys 63 ;
    - (6) Asn 26 ; Lys 32 ; Asp 34 ; Ala 55 ; His 56 ; Arg 58 ; Gln 63 ;
    - (7) Tyr 26 ; Tyr 32 ; His 34 ; Ala 55 ; His 56 ; Ala 58 ; Lys 63 ;
    - (8) Lys 26 ; Tyr 32 ; Arg 34 ; Ala 55 ; Lys 56 ; Asn 58 ; Pro 63 ; 和
    - (9) Glu 26 ; His 32 ; Gly 34 ; Ala 55 ; Met 56 ; Leu 58 ; Lys 63 ;
  - (b) 在表达系统中表达一个或多个在 (a) 中获得的突变蛋白核酸分子, 从而获得一个或多个突变蛋白, 以及
  - (c) 富集一个或多个在 (b) 中获得的突变蛋白并且筛选结合至 IL-4 受体  $\alpha$  的突变蛋白。
3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中步骤 (c) 进一步包括:
  - (ci) 提供 IL-4 受体  $\alpha$  或其免疫原性片段,
  - (cii) 使所述一个或多个突变蛋白与所述 IL-4 受体  $\alpha$  或其免疫原性片段接触, 从而允许在所述 IL-4 受体  $\alpha$  或其免疫原性片段和具有结合亲和力的突变蛋白之间形成络合物。
4. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法, 其中所述步骤 (c) 中的筛选在竞争性条件下进行。
5. 一种核酸分子, 其包含编码根据权利要求 1 所述的人泪脂质运载蛋白突变蛋白的核苷酸序列。
6. 一种宿主细胞, 其包含根据权利要求 5 所述的核酸分子。
7. 一种组合物, 其包含根据权利要求 1 所述的人泪脂质运载蛋白突变蛋白。

## 结合 IL-4 受体 $\alpha$ 的泪脂质运载蛋白突变蛋白

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求美国临时申请 61/61/352, 461 的优先权, 所述申请于 2010 年 6 月 8 日提交至 USPTO, 其全部内容通过引用全文并入本文。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及结合至 IL-4 受体  $\alpha$  的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白。本发明还涉及编码这种突变蛋白的相应核酸分子以及它们的生成方法。本发明进一步涉及用于产生这种突变蛋白的方法。最后, 本发明涉及包含这种脂质运载蛋白突变蛋白的药物组合物以及突变蛋白的各种用途。

### [0004] 背景

[0005] 通过非共价相互作用的方式选择性地结合至选定靶标的蛋白质一般在生物技术、医药、生物分析以及在生物和生命科学中作为试剂发挥了关键作用。抗体, 即免疫球蛋白, 是这类蛋白质的一个突出实例。尽管在配体 / 靶标的识别、结合和 / 或分离方面需要这种蛋白, 但目前使用的几乎都是免疫球蛋白。有明确配体结合特征的其他蛋白质的应用, 例如凝集素, 仍然局限于特殊情况。

[0006] 具有抗体类功能的其它蛋白质性的结合分子是脂质运载蛋白家族的成员, 它们已自然进化到结合配体。脂质运载蛋白产生于许多生物体中, 包括脊椎动物、昆虫、植物和细菌。脂质运载蛋白家族成员 (Pervaiz, S. 和 Brew, K. (1987) *FASEB J.* 1, 209-214) 通常为小的分泌蛋白, 并且具有单个多肽链。它们的特征在于一系列不同的分子识别特性: 它们结合多种分子 (主要是疏水分子, 例如类视色素、脂肪酸、胆固醇、前列腺素、胆绿素、信息素、促味剂和添味剂) 的能力、它们与特异细胞表面受体结合并形成大分子复合物。尽管过去将它们主要分类为转运蛋白, 但是现在明确了脂质运载蛋白完成多种生理功能。这些功能包括在视黄醇转运、嗅觉、信息素信号传导以及前列腺素生物合成中的作用。还表明脂质运载蛋白参与免疫应答的调节和细胞内环境稳定的介导 (例如 Flower, D. R. (1996) *Biochem. J.* 318, 1-14 和 Flower, D. R. 等人 (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 9-24 综述)。

[0007] 脂质运载蛋白之间的全序列保守性水平非常低, 经常具有低于 20% 的序列同一性。形成强烈对比的是, 其整体折叠模式高度保守。脂质运载蛋白结构的中心部分由单个八股反平行  $\beta$  折叠组成, 所述  $\beta$  折叠自身闭合形成连续的氢键  $\beta$  桶。该  $\beta$  桶形成中央腔体。桶的一个末端被穿过其底部的 N 端肽段以及连接  $\beta$  折叠股的三个肽环立体封闭。 $\beta$  桶的另一个末端对溶剂开放并包含由四个柔性肽环形成的靶标结合位点。正是所述环在本应刚性的脂质运载蛋白骨架中的这种多样性产生多种不同的结合模式, 每一种模式能容纳不同大小、形状和化学特征的靶标 (例如上文的 Flower, D. R. (1996); 上文的 Flower, D. R. 等人 (2000), 或 Skerra, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337-350 中的综述)。

[0008] 国际专利申请 WO 99/16873 公开了在四个肽环区域中具有突变氨基酸位置的脂质运载蛋白家族的多肽, 所述四个肽环排列于包围结合口袋的圆柱状  $\beta$  桶结构的末端, 并且与包含大菜粉蝶 (*Pieris brassicae*) 后胆色素结合蛋白的氨基酸位置 28 至 45、58 至

69、86 至 99、和 114 至 129 的线性多肽序列中的那些区段对应。已报道脂质运载蛋白家族成员被翻译后修饰,例如泪脂质运载蛋白的磷酸化和糖基化(例如 You, J., 等人 (2010) *Electrophoresis* 31, 1853-1861)。然而对于它们的分子识别特性不需要翻译后修饰。

[0009] 国际专利申请 WO 00/75308 公开了后胆色素结合蛋白的突变蛋白,其特异地结合地高辛,而国际专利申请 WO 03/029463 和 WO 03/029471 分别涉及人中性粒细胞明胶酶结合的脂质运载蛋白(hNGAL)和载脂蛋白 D 的突变蛋白。为进一步改善和优化脂质运载蛋白变体的配体亲和力、特异性以及折叠稳定性,已经提出了使用脂质运载蛋白家族的不同成员的多种方法(Skerra, A. (2001) *Rev. Mol. Biotechnol.* 74, 257-275 ;Schlehuber, S., 和 Skerra, A. (2002) *Biophys. Chem.* 96, 213-228),例如替换其它氨基酸残基。PCT 公开文件 WO 2006/56464 公开了人中性粒细胞明胶酶结合的脂质运载蛋白的突变蛋白,其对低纳摩尔范围的 CTLA-4 具有结合亲和力。

[0010] 国际专利申请 WO 2005/19256 公开了对不同或相同靶标配体具有至少一个结合位点的泪脂质运载蛋白的突变蛋白,并且提供了用于生成此类人泪脂质运载蛋白的突变蛋白的方法。根据该 PCT 专利申请,使泪脂质运载蛋白的一级序列中的某些氨基酸延伸序列(特别是包含成熟人泪脂质运载蛋白的氨基酸 7-14、24-36、41-49、53-66、69-77、79-84、87-98 和 103-110 的环区域)进行诱变,从而生成具有结合亲和力的突变蛋白。所得的突变蛋白对纳摩尔范围内,多数情况下 >100nM 的所选配体( $K_D$ )具有结合亲和力。国际专利申请 WO 2008/015239 公开了结合给定非天然配体的泪脂质运载蛋白的突变蛋白,所述给定非天然配体包括 IL-4 受体  $\alpha$ 。在表面等离子共振实验中,结合亲和力在纳摩尔范围内,低至近  $1 \times 10^{-10}$ M。

[0011] 人泪脂质运载蛋白(TLPC 或 T1c),也称为脂质运载蛋白 1,泪前白蛋白或埃布纳腺蛋白,最初被描述为人泪液的主要蛋白(大约总蛋白含量的三分之一),但也发现于其它几个分泌组织中,包括前列腺、肾上腺、胸腺、乳腺、睾丸、鼻粘膜和气管黏膜以及脑下垂体的促肾上腺皮质激素细胞。在猕猴、黑猩猩、大鼠、小鼠、猪、仓鼠、牛、狗和马体内发现了同源蛋白。泪脂质运载蛋白是不寻常的脂质运载蛋白成员,其原因在于相比于其它的脂质运载蛋白,它表现出一种不同寻常的广泛的配体特异性,以及其对于相对不溶的脂质的高混合性(参见 Redl, B. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 241 - 248)。泪脂质运载蛋白的这个特性归因于抑制角膜细菌和真菌的生长的蛋白质功能。具有不同化学分类的显著数量的亲脂性化合物如脂肪酸、脂肪醇、磷脂、糖脂和胆固醇是这种蛋白质的内源配体。有趣的是,与其它脂质运载蛋白相比,配体(靶标)结合强度与烷基酰胺和脂肪酸的碳氢尾的长度对应。因此,泪脂质运载蛋白最强烈地结合最不可溶的脂质(Glasgow, B. J. 等人 (1995) *Curr. Eye Res.* 14, 363-372 ;Gasymov, O. K. 等人 (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1433, 307-320)。泪脂质运载蛋白的 1.8-Å 晶体结构显示在其  $\beta$  桶内部有特别大的腔体(Breustedt, D. A. 等人 (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 1, 484-493)。

[0012] 尽管取得了进步,但是获得对 IL-4 受体  $\alpha$  具有改善的结合特性(尤其是更高结合亲和力)的人泪脂质运载蛋白突变蛋白仍然是令人期待的,简单的原因是,进一步改善人泪脂质运载蛋白突变蛋白在诊断和治疗应用中的适用性。

[0013] 发明概述

[0014] 因此,本发明的一个目的是提供一种对 IL-4 受体  $\alpha$  有高结合亲和力的改进的人

泪脂质运载蛋白突变蛋白。

[0015] 这个目的通过具有陈述于权利要求(尤其是权利要求 1)中的特征的人泪脂质运载蛋白突变蛋白实现。

[0016] 第一方面,本发明提供了一种人泪脂质运载蛋白的突变蛋白。所述突变蛋白与 IL-4 受体  $\alpha$  结合。所述突变蛋白在成熟人泪脂质运载蛋白的线性多肽序列的序列位置 27、28、30、31、33、53、57、61、64、66、80、83、104-106 和 108 中任一个或多个处具有突变的氨基酸残基。这种突变蛋白进一步在成熟人泪脂质运载蛋白的线性多肽序列的序列位置 26、32、34、55、56、58 和 63 中任两个或更多个处具有突变的氨基酸残基。人泪脂质运载蛋白突变蛋白的氨基酸序列包含以下氨基酸组合集合中的一个:(1)Ser 26、Glu 34、Leu 55、Lys 58,(2)Ser 26、Asn 34、Ala 55、Lys 58,(3)Ser 26、Val 34,(4)Pro 26、Ser 34,(5)Pro 26、Ala 55,(6)Leu 26、Trp 34、Ala 55,(7)Leu26、Trp 34、Ile 58,(8)Asn 26、Asp 34,(9)Asn 26、Ala 55,(10)Tyr 26、His 34、Ala 55,(11)Tyr 26、His 34、Ala 58,(12)Lys 26、Arg 34、Ala 55,(13)Lys 26、Arg 34、Asn 58,(14)Glu 26、Gly 34、Ala 55,和 (15)Glu 26、Gly 34、Leu 58。

[0017] 当根据本发明使用时,术语“位置”是指本文描述的氨基酸序列中的氨基酸的位置或本文描述的核酸序列中的核苷酸的位置。本文使用的术语“相应的”还包括不仅由前述核苷酸/氨基酸数量决定的位置。因此,可以被替换的根据本发明的给定氨基酸的位置可以由于缺失或添加(变体或野生型)脂质运载蛋白中别处的氨基酸而改变。类似地,可以被替换的根据本发明的给定核苷酸的位置可以由于缺失或添加突变蛋白中别处的核苷酸或包含启动子和/或任何其它调节序列或基因(包括外显子和内含子)的野生型脂质运载蛋白 5' - 非翻译区(UTR)而变化。

[0018] 因此,根据本发明在“相应的位置”下,优选地理解为核苷酸/氨基酸在所示的数字方面可以不同,但仍可以有类似的邻近核苷酸/氨基酸。可以交换、缺失或添加的所述核苷酸/氨基酸也被术语“相应的位置”所包含。

[0019] 特别地,为了确定不同于本发明 T1c 脂质运载蛋白突变蛋白的脂质运载蛋白氨基酸序列的核苷酸残基或氨基酸残基是否对合于所述 T1c 脂质运载蛋白突变蛋白的核苷酸序列或氨基酸序列(尤其是 SEQ ID NO:2-11 中任一个或在 Tc1 (SEQ ID NO:20)线性多肽序列的位置 27、28、30、31、33、53、57、61、64、66、80、83、104-106 和 108 处具有一个或多个氨基酸替换的序列)中的某个位置,技术人员可以利用本领域熟知的手段和方法,如比对图,手动地或通过使用计算机程序如 BLAST2.0,它代表基本局部比对搜索工具或 ClustalW 或任何其它适用于生成序列比对的合适程序。因此,具有 SEQ ID No:2-11 中任一个或在 Tc1 (SEQ ID NO:20)线性多肽序列的位置 27、28、30、31、33、53、57、61、64、66、80、83、104-106 和 108 处具有一个或多个氨基酸替换的序列的脂质运载蛋白突变蛋白可以作为“主体序列”,而不同于 T1c 的脂质运载蛋白的氨基酸序列作为“查询序列”。

[0020] 第二方面,本发明提供了一种产生人泪脂质运载蛋白突变蛋白的方法。这种突变蛋白与 IL-4 受体  $\alpha$  结合。该方法包括使编码人泪脂质运载蛋白的核酸分子在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置 27、28、30、31、33、53、57、61、64、66、80、83、104-106 和 108 中任一个或多个处发生诱变。进一步地,该方法包括使编码人泪脂质运载蛋白的核酸分子在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置 26、32、34、55、56、

58 和 63 中任两个或更多个处诱变。在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置 26、32、34、55、56、58 和 63 中两个或更多个处中的至少一个。结果得到一个或多个编码人泪脂质运载蛋白突变蛋白的核酸。编码的突变蛋白的氨基酸序列包含以下氨基酸组合集合中的一个：(1) Ser26、Glu 34、Leu 55、Lys5 8, (2) Ser 26、Asn 34、Ala 55、Lys 58, (3) Ser 26、Val 34, (4) Pro26, Ser 34, (5) Pro 26、Ala 55, (6) Leu 26、Trp 34、Ala 55, (7) Leu 26、Trp 34、Ile 58, (8) Asn 26、Asp 34, (9) Asn 26、Ala 55, (10) Tyr26、His 34、Ala 55, (11) Tyr 26、His 34、Ala 58, (12) Lys 26、Arg 34、Ala55, (13) Lys 26、Arg 34、Asn 58, (14) Glu 26、Gly 34、Ala 55, 和 (15) Glu26、Gly 34、Leu 58。该方法还包括在表达系统中表达一个或多个由此获得的编码突变蛋白的核酸分子。进一步地,该方法包括通过筛选和/或分离富集一个或多个由此获得的结合至 IL-4 受体  $\alpha$  的突变蛋白。

[0021] 第三方面,本发明提供了一种核酸分子。所述核酸分子包括编码根据第一方面的突变蛋白的核苷酸序列。

[0022] 第四方面,本发明提供一种宿主细胞。所述宿主细胞包含根据第三方面的核酸分子。

[0023] 第五方面,本发明提供一种药物组合物。所述药物组合物包含根据第一方面的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白。所述药物组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂。

[0024] 当结合非限制性实施例以及附图考虑时,参考详细描述能更好地理解本发明。

## 附图说明

[0025] 图 1 示出了 S191.4-B24 的多肽序列,它是一种对 IL-4 受体  $\alpha$  具有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白。

[0026] 图 2 示出了对 IL-4 受体  $\alpha$  (SEQ ID NO:2-11) 具有高亲和力的示例性突变蛋白的多肽序列。

[0027] 图 3 示出了在 IL-4 (A)和 IL-13 (B)存在下,增加量的本发明的突变蛋白对 TF-1 细胞增殖的抑制。

[0028] 图 4 示出了图 3 的  $IC_{50}$ 值和本发明人泪脂质运载蛋白突变蛋白与 IL-4 受体  $\alpha$  结合的 Biacore 测量数据,所述 IL-4 受体  $\alpha$  如人 IL-4 受体  $\alpha$ 。

## [0029] 详细描述

[0030] 本发明提供了一种对 IL-4 受体  $\alpha$  有特别高的亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白。作为本发明突变蛋白的靶标的 IL-4 受体  $\alpha$  是典型的哺乳类动物蛋白,如人蛋白。体内的 IL-4 受体  $\alpha$  可以结合白介素 4 和白介素 13 以调节 IgE 抗体在 B 细胞中的产生。

[0031] 根据本发明的突变蛋白的结合亲和力已经发现通常为  $K_D$  低于 0.1nM,在一些实施方式中为约 1 皮摩尔 (pM) (参见图 4)。本发明的脂质运载蛋白突变蛋白因此能够以可检测的亲和力结合 IL-4 受体  $\alpha$ ,即离解常数至少为 200nM。在一些实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白以对于 IL-4 受体  $\alpha$  为至少约 10nM、约 1nM、约 0.1nM、约 10pM 甚至更小的离解常数结合 IL-4 受体  $\alpha$ 。可以测量突变蛋白与选定靶标(在本发明中为 IL-4 受体  $\alpha$ )的结合亲和力,从而突变蛋白-配体复合物的  $K_D$  值可以通过本领域技术人员已知的多种方法来测定。这些方法包括、但不限于,荧光滴定法、竞争 ELISA、量热法,如等温滴定量热法 (ITC) 和表面等离子体共振 (BIAcore)。下面详细介绍这些方法的实例(例如参见实施例

2)。

[0032] 人白介素 4 受体  $\alpha$  链可以具有 SWISS PROT 数据库登记号 P24394(SEQ IDNO:18) 的氨基酸序列或其片段。人白介素 4 受体  $\alpha$  链片段的示例性实例包括 IL-4 受体  $\alpha$  的氨基酸 26 至 232。人 IL-13 受体  $\alpha 1$  的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:19。

[0033] 一般而言,本文相对于本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白的蛋白质配体使用的术语“片段”,涉及 N 端和 / 或 C 端缩短的蛋白或肽配体,其保留了由根据本发明的突变蛋白识别和 / 或结合的全长配体的能力。

[0034] 结合 IL-4 受体  $\alpha$  的人泪脂质运载蛋白突变蛋白可以用作 IL-4 拮抗剂和 / 或 IL-13 拮抗剂或用作反向 IL-4 激动剂和 / 或反向 IL-13 激动剂。反向激动剂与特定受体的激动剂的相同结合位点结合,并且逆转相应受体的组成型活性。到目前为止,IL-4 受体还没有被报道具有内源激酶活性,因此本发明的突变蛋白可以代表性地用作 IL-4 拮抗剂和 / 或 IL-13 拮抗剂。在一个实施方式中,人泪脂质运载蛋白突变蛋白用作人 IL-4 和 / 或人 IL-13 的拮抗剂。在一些实施方式中,突变蛋白与猕猴 IL-4IL-4 受体  $\alpha$  交叉反应,因此用作猕猴配体如 IL-4 和 / 或 IL-13 的拮抗剂。在一些实施方式中,突变蛋白与狨猴 IL-4IL-4 受体  $\alpha$  交叉反应,因此用作狨猴配体如 IL-4 和 / 或 IL-13 的拮抗剂。

[0035] IL-4 受体  $\alpha$  可以用来定义人泪脂质运载蛋白的非天然配体。术语“非天然的配体”是指一种化合物,它在生理条件下不与天然成熟人泪脂质运载蛋白结合。本文使用的术语“人泪脂质运载蛋白”指的是对应于 SWISS-PROT 数据库登记号 P31025 的蛋白的成熟人泪脂质运载蛋白。成熟人泪脂质运载蛋白不包含 SWISS-PROT 登记号 P31025 序列中包含的 N 末端信号肽(见图 2)。

[0036] 相比于与其它脂质运载蛋白(见上)的序列同一性,本发明突变蛋白的氨基酸序列与成熟人泪脂质运载蛋白具有高序列同一性。在此一般上下文中,本发明突变蛋白的氨基酸序列与成熟人泪脂质运载蛋白的氨基酸序列至少基本上相似。本发明突变蛋白的各自序列,与成熟人泪脂质运载蛋白的序列基本上相似,在一些实施方式中与成熟人泪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%、至少 90% 同一性,包括至少 95% 同一性,条件是保留突变位置或序列。

[0037] “同一性”指的是衡量它们的相似性或关联的序列特性。通过将相同残基的数量除以残基总数再使结果乘以 100 来量度同一性。作为两个示例性实施例,SEQ ID NO:3 的突变蛋白与成熟人泪脂质运载蛋白的氨基酸序列具有 83.3% 的序列同一性,SEQ ID NO:7 的突变蛋白与成熟人泪脂质运载蛋白具有 82.0% 的氨基酸序列同一性。

[0038] “间隙”是添加或缺失氨基酸所导致的比对中的空间。因此,两份完全相同的序列具有 100% 的同一性,但较不高度保守且具有添加、确实或替换的序列可能具有较低程度的同一性。本领域的技术人员将会认识到,可以得到数个计算机程序,用来使用标准参数测定序列同一性,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)。

[0039] 相比于天然存在的核酸或多肽,关于核酸或多肽的术语“突变的”或“突变体”是指分别地交换、缺失或插入一个或多个核苷酸或氨基酸。相比于相应的天然人泪脂质运载蛋白,本发明的突变蛋白包含至少三个替换。

[0040] 在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白包含至少两个氨基酸替换,包括 2、3、4、5 或更多个用精氨酸残基替换天然氨基酸的氨基酸替换。在一些实施方式中,替换的氨基酸可以位于相对于成熟人泪脂质运载蛋白的氨基酸序列的位置 27、30、57 和 83 的任一个处。

[0041] 在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白包含用丝氨酸残基替换在位置 61 和 / 或 153 处的天然半胱氨酸残基的氨基酸替换。在此上下文中指出,已经发现除去由半胱氨酸残基 61 和 153 (参见上文的 Breustedt 等人,2005) 形成的野生型泪脂质运载蛋白的结构性二硫键(在各自的天然核酸文库水平上) 提供了不仅稳定折叠此外还能以高亲和力结合给定非天然配体的泪脂质运载蛋白突变蛋白。不希望束缚于理论,还认为消除结构性二硫键提供了允许(自发的) 生成或特意引入非天然的人工二硫键到本发明的突变蛋白中(参见实施例) 的进一步优势,例如从而增加突变蛋白的稳定性。在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白包含用丝氨酸残基替换位置 101 处的天然半胱氨酸残基的氨基酸替换。进一步地,在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白包含用脯氨酸残基替换位置 111 处的天然精氨酸残基的氨基酸替换。在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白包含用色氨酸残基替换位置 114 处的天然赖氨酸残基的氨基酸替换。

[0042] 根据本发明的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白通常在对应于成熟人泪脂质运载蛋白氨基酸位置 26 的位置处具有天冬酰胺、谷氨酸、脯氨酸、亮氨酸、赖氨酸、丝氨酸和酪氨酸中的一个。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有下述序列:在所述序列中,相对于成熟人泪脂质运载蛋白,氨基酸位置 34 不变,并且突变蛋白的序列包含氨基酸替换 Arg 26 → Ser、Met 55 → Leu、Ser 58 → Lys。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Pro 和 Glu 34 → Ser 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Pro 和 Met 55 → Ala 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Ser 和 Glu 34 → Val 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Leu、Glu 34 → Trp 和 Met 55 → Ala 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Leu、Glu 34 → Trp 和 Ser 58 → Ile 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Ser、Glu 34 → Asn、Met 55 → Ala、和 Ser 58 → Lys 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Asn 和 Glu 34 → Asp 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Asn 和 Met 55 → Ala 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Tyr、Glu 34 → His 和 Met 55 → Ala 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Tyr、Glu 34 → His 和 Ser 58 → Ala 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Lys、Glu 34 → Arg 和 Met 55 → Ala 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Lys、Glu 34 → Arg 和 Ser 58 → Asn 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Glu、Glu 34 → Arg 和 Met 55 → Ala 的序列。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白具有包含氨基酸替换 Arg 26 → Glu、Glu 34 → Arg 和 Ser 58 → Leu 的序列。

[0043] 在一些实施方式中,相比于成熟人泪脂质运载蛋白的氨基酸序列,本发明结合 IL-4 受体  $\alpha$  的人泪脂质运载蛋白突变蛋白在序列位置 58 处或序列位置 63 处具有突变的

氨基酸残基。在一些实施方式中,相比于成熟人泪脂质运载蛋白的氨基酸序列,选择本发明的突变蛋白的序列,所述选择方式使得丝氨酸不同时存在于氨基酸位置 26 和 34 处。

[0044] 所述脂质运载蛋白突变蛋白可以相对于成熟人泪脂质运载蛋白氨基酸序列在天然成熟人泪脂质运载蛋白的位置 26-28、30-34、53、55-58、61、63、64、66、80、83、104-106 和 108 中任一个处进一步包含一个或多个(包括至少两个、至少三个或至少四个)用半胱氨酸残基替换天然氨基酸残基的氨基酸替换。在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白在相对于成熟人泪脂质运载蛋白氨基酸序列的位置 28 或 105 处包含用半胱氨酸残基替换天然氨基酸的氨基酸替换。在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白在相对于成熟人泪脂质运载蛋白氨基酸序列的位置 28 或 105 处包含用半胱氨酸残基替换天然氨基酸的氨基酸替换。

[0045] 在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的序列位置 26、32、34、55、56、58 和 63 的任意三个或更多个(包括 3、4、5、6 或 7 个)处具有突变的氨基酸残基。

[0046] 在一些实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白在位置 26 处具有突变的氨基酸残基,所述突变的氨基酸残基为天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸、亮氨酸、赖氨酸、丝氨酸和酪氨酸中的一个。在一些实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白在位置 32 处具有突变的氨基酸残基,所述突变的氨基酸残基为组氨酸、赖氨酸、酪氨酸和缬氨酸中的一个。在一些实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白在位置 34 处具有突变的氨基酸残基,所述突变的氨基酸残基为精氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、组氨酸、丝氨酸、色氨酸和缬氨酸中的一个。在一些实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白在位置 55 处具有突变的氨基酸残基,所述突变的氨基酸残基为丙氨酸和亮氨酸中的一个。在一些实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白在位置 56 处具有突变的氨基酸残基,所述突变的氨基酸残基为丙氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸和赖氨酸中的一个。在一些实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白在位置 58 处具有突变的氨基酸残基,所述突变的氨基酸残基为丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、组氨酸、异亮氨酸和赖氨酸中的一个。在一些实施方式中,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白在位置 63 处具有突变的氨基酸残基,所述突变的氨基酸残基为谷氨酰胺、赖氨酸、脯氨酸和丝氨酸中的一个。

[0047] 在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白包含替换 Met 31 → Ala、Leu33 → Tyr、Ser 61 → Trp、Asp 80 → Ser、Glu 104 → Leu、His 106 → Pro 和 Lys 108 → Gln 中的至少一个。在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白包含替换 Met 31 → Ala、Leu 33 → Tyr、Ser 61 → Trp、Asp 80 → Ser、Glu 104 → Leu、His 106 → Pro 和 Lys 108 → Gln 中的两个或更多个,例如 3、4、5、6 或全部。在一些实施方式中,根据本发明的突变蛋白包含替换 Val 53 → Ph 或 Val 53 → Leu。突变的氨基酸残基也可以包含替换 Val 64 → Tyr 或 Val 64 → Met。它还可以包含替换 Ala 66 → Leu 或 Ala 66 → Asp。

[0048] 在一些实施方式中,根据本发明的人泪脂质运载蛋白突变蛋白包含用另一个氨基酸替换存在于序列位置 61 和 153 中每一个处的至少一个或两个半胱氨酸残基的替换的氨基酸,以及在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的序列位置 26-28、30-34、53、55-58、63、64、66、80、83、104-106 和 108 中任一个处的至少三个氨基酸残基的突变。位置 26-28 和 30-34 包含于 AB 环中,位置 53 和 55 位于  $\beta$ -折叠最末端,接下来的位置 56-58 包含于 CD

环中。令人惊讶的是,位置 63、64 和 66 包含于  $\beta$ -折叠( $\beta D$ )内,位置 80 位于  $\alpha$ -螺旋区中。位置 83 是在此  $\alpha$ -螺旋区和  $\beta$ -折叠( $\beta F$ )之间的限定单环的氨基酸。位置 104-106 和 108 包含于泪脂质运载蛋白  $\beta$  桶结构开口末端处的结合位点中的 GH 环中。本文使用的这些区的定义根据 Flower (上文的 Flower, 1996, 上文的 Flower 等人, 2000) 和 Breustedt 等人(上文的 2005)。这种突变蛋白可以在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的序列位置 26-34、55-58、63、64、80、83、104-106 和 108 处包含至少 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。在一些实施方式中,突变蛋白包含氨基酸替换 Cys 61  $\rightarrow$  Ala、Phe、Lys、Arg、Thr、Asn、Tyr、Met、Ser、Pro 或 Trp 和 Cys 153  $\rightarrow$  Ser 或 Ala。这种替换证明了能有效防止连接有 Cys 61 和 Cys153 的天然存在的二硫键的形成,从而促进突变蛋白的处理。然而,结合 IL-4 受体  $\alpha$  且在 Cys 61 和 Cys153 之间形成二硫键的泪脂质运载蛋白突变蛋白也是本发明的一部分。

[0049] 在一些实施方式中,突变蛋白包含至少一个氨基酸替换,这可以是另外的氨基酸替换,选自 Arg 111  $\rightarrow$  Pro 和 Lys 114  $\rightarrow$  Trp。本发明的突变蛋白可以进一步包含在天然成熟人泪脂质运载蛋白序列的位置 101 处被另一个氨基酸替换的半胱氨酸。这个替换可以是,例如,突变 Cys 101  $\rightarrow$  Ser 或 Cys 101  $\rightarrow$  Thr。

[0050] 如上所述,本发明的突变蛋白包含至少一个氨基酸替换,其位于成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的位置 27、28、30、31、33、53、57、61、64、66、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含两个或更多个(例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 个)成熟人泪脂质运载蛋白的这些序列位置的氨基酸替换。在一个实施方式中,所述突变蛋白在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的序列位置 27、28、30、31、33、53、57、61、64、66、80、83、104-106 和 108 的每一个处具有突变的氨基酸残基。

[0051] 在一些实施方式中,在相对于成熟人泪脂质运载蛋白氨基酸序列的成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的序列位置 27、28、30、31、33、53、57、61、64、66、80、83、104-106 和 108 中任一个或多个处的突变的氨基酸残基包含替换 Met31  $\rightarrow$  Ala、Leu33  $\rightarrow$  Tyr、Ser 61  $\rightarrow$  Trp、Asp 80  $\rightarrow$  Ser、Glu 104  $\rightarrow$  Leu、His 106  $\rightarrow$  Pro 和 Lys 108  $\rightarrow$  Gln 中的一个或多个。在一些实施方式中,本发明的突变蛋白包含两个或更多个(例如 3、4、5、6 或 7 个)成熟人泪脂质运载蛋白的这些序列位置的氨基酸替换。

[0052] 在剩余区域即不同于序列位置 26-28、30-34、53、55-58、63、64、66、80、83、104-106 和 108 的区域中,在突变的氨基酸序列位置外,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可以包含野生型(天然的)氨基酸序列。在一些实施方式中,根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白也可以在一个或多个序列位置处进行一个或多个氨基酸突变,只要这样的突变确实、至少基本上不妨碍或不干扰结合活性和突变蛋白的折叠即可。使用确定的标准方法可以很轻易在 DNA 水平上完成这种突变。氨基酸序列改变的示例性实例为插入或缺失以及氨基酸替换。这样的替换可以是保守的,即氨基酸残基被替代为化学性质(尤其是关于极性以及大小)相似的氨基酸残基。保守替换的实例为以下组成员之间的替代:1) 丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸;2) 天冬氨酸和谷氨酸;3) 天冬酰胺和谷氨酰胺;4) 精氨酸和赖氨酸;5) 异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸;和6) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。另一方面,也可以在氨基酸序列中引入非保守改变。此外,除了替代单一的氨基酸残基,还可以插入或缺失泪脂质运载蛋白一级结构的一个或多个连续的氨基酸,只要这些缺失或插入产生稳定的折叠/功能突变蛋白即

可(例如参见,其中产生 N 和 C 端截短的突变蛋白的实验部分)。

[0053] 氨基酸序列的此类修饰包括单个氨基酸位置的定点诱变,以便通过掺入特定限制性酶的切割位点而简化突变的脂质运载蛋白基因或其部分的亚克隆。此外,可掺入这些突变以进一步改善脂质运载蛋白突变蛋白与给定靶标的亲和力。并且,可以引入突变,以便调节突变蛋白的某些特征,例如以改善折叠稳定性、血清稳定性、蛋白质抗性或水溶解性,或者如果必要的话以降低聚集倾向。例如,天然存在的半胱氨酸残基可以突变成其它氨基酸,以防止二硫键的形成。还可以有意地将其它氨基酸序列位置突变成半胱氨酸,以便引入新的反应性基团,例如用于缀合至其它化合物,例如聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、生物素、肽或蛋白质,或用于形成非天然存在的二硫键。将半胱氨酸残基引入到人泪脂质运载蛋白突变蛋白的氨基酸序列中的这种突变的示例性可能性包括替换 Thr 40 → Cys、Glu 73 → Cys、Arg90 → Cys、Asp 95 → Cys、和 Glu 13 → Cys。在氨基酸位置 40、73、90、95 和 / 或 131 的任一个一侧处生成的硫醇部分可以用于聚乙二醇化或羟乙基淀粉化突变蛋白,例如,用于增加各个泪脂质运载蛋白突变蛋白的血清半衰期。

[0054] 本发明还包括如上所述的突变蛋白,其中成熟人泪脂质运载蛋白序列的前四个 N 端氨基酸残基(His-His-Leu-Leu;位置 1-4)和 / 或成熟人泪脂质运载蛋白序列的最后两个 C 端氨基酸残基(Ser-Asp;位置 157-158)已被缺失(参见实施例和所附序列列表)。如 PCT 申请 WO 2005/019256 中所描述,另一个可行的野生型序列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。

[0055] 在一些实施方式中,相比于成熟人泪脂质运载蛋白,根据本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白具有一个或更多个(包括 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个)以下的氨基酸替换: Glu 27 → Arg、Phe 28 → Cys、Glu 30 → Arg、Met 31 → Ala、Leu 33 → Tyr、Ile 57 → Arg、Ser 61 → Trp、Asp 80 → Ser、Lys83 → Arg、Glu 104 → Leu、Leu 105 → Cys、His 106 → Pro、Lys 108 → Gln。在一些实施方式中,所述突变蛋白包含所有这些突变氨基酸替换。在一些实施方式中,所述突变蛋白进一步包含氨基酸替换 Val 53 → Phe、Val 64 → Tyr、Ala 66 → Leu 的集合。在其它实施方式中,所述突变蛋白进一步包含氨基酸替换 Val 53 → Leu、Val 64 → Met、Ala 66 → Asp 的集合。

[0056] 在一些实施方式中,相比于成熟人泪脂质运载蛋白,根据本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白包含氨基酸替换 Arg 26 → Ser、Asn 32 → Tyr、Met55 → Leu、Leu 56 → Gln、Ser 58 → Lys 的组合。在一些实施方式中,相比于成熟人泪脂质运载蛋白,根据本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白包含氨基酸替换 Arg 26 → Pro、Asn 32 → Tyr、Glu 34 → Ser、Met 55 → Ala、Leu 56 → Gln、Glu 63 → Lys 的组合。在一些实施方式中,相比于成熟人泪脂质运载蛋白,根据本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白包含氨基酸替换 Arg 26 → Leu、Asn32 → Phe、Glu 34 → Trp、Met 55 → Ala、Ser 58 → Ile、Glu 63 → Ser 的组合。在一些实施方式中,相比于成熟人泪脂质运载蛋白,根据本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白包含氨基酸替换 Arg 26 → Ser、Asn 32 → Tyr、Glu 34 → Val、Met55 → Ala、Leu 56 → Ala、Ser 58 → Ile、Glu 63 → Ser 的组合。在一些实施方式中,相比于成熟人泪脂质运载蛋白,根据本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白包含氨基酸替换 Arg 26 → Ser、Asn 32 → Val、Glu 34 → Asn、Met 55 → Ala、Leu56 → Gln、Ser 58 → Lys、Glu 63 → Lys 的组合。在一些实施方式中,相比于成熟人泪脂质运载蛋白,根据本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白包

含氨基酸替换 Arg 26 → Tyr、Asn32 → Tyr、Glu 34 → His、Met 55 → Ala、Leu 56 → His、Ser58 → Ala、Glu 63 → Lys 的组合。在一些实施方式中,相比于成熟人泪脂质运载蛋白,根据本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白包含氨基酸替换 Arg26 → Lys、Asn 32 → Tyr、Glu 34 → Arg、Met 55 → Ala、Leu 56 → Lys、Ser58 → Asn、Glu 63 → Pro 的组合。在一些实施方式中,相比于成熟人泪脂质运载蛋白,根据本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白包含氨基酸替换 Arg26 → Glu、Asn 32 → His、Glu 34 → Gly、Met 55 → Ala、Leu 56 → Met、Ser58 → Leu、Glu 63 → Lys 的组合。

[0057] 在一些实施方式中,本发明的突变蛋白相对于成熟人泪脂质运载蛋白氨基酸序列包含选自以下的至少 6、8、10、12、14 或 16 个氨基酸替换:Arg26 → Ser、Pro;Glu 27 → Arg;Phe 28 → Cys;Glu 30 → Arg;Met 31 → Ala;Asn32 → Tyr、His;Leu 33 → Tyr、Glu 34 → Gly、Ser、Ala、Asp、Lys、Asn、Thr、Arg;Leu 56 → Gln;Ile 57 → Arg;Ser 58 → Ile、Ala、Arg、Val、Thr、Asn、Lys、Tyr、Leu、Met;Asp 80 → Ser;Lys 83 → Arg;Glu 104 → Leu;Leu 105 → Cys;His 106 → Pro 和 Lys 108 → Gln。

[0058] 此外,这种突变蛋白可以进一步地包含选自以下的至少一个氨基酸替换:Met 39 → Val;Thr 42 → Met、Ala;Thr 43 → Ile、Pro、Ala;Glu 45 → Lys、Gly;Asn 48 → Asp、His、Ser、Thr;Val 53 → Leu、Phe、Ile、Ala、Gly、Ser;Thr 54 → Ala、Leu;Met 55 → Leu、Ala、Ile、Val、Phe、Gly、Thr、Tyr;Glu63 → Lys、Gln、Ala、Gly、Arg;Val 64 → Gly、Tyr、Met、Ser、Ala、Lys、Arg、Leu、Asn、His、Thr、Ile;Ala 66 → Ile、Leu、Val、Thr、Met;Glu 69 → Lys、Gly;Lys 70 → Arg、Gln、Glu;Thr 78 → Ala;Ile 89 → Val;Asp 95 → Asn、Ala、Gly;和 Tyr 100 → His。

[0059] 在一个实施方式中,结合 IL-4 受体 α 的人泪脂质运载蛋白突变蛋白包含氨基酸替换:Arg 26 → Ser、Glu 27 → Arg、Phe 28 → Cys、Glu 30 → Arg;Met31 → Ala、Leu 33 → Tyr、Leu 56 → Gln、Ile 57 → Arg、Asp80 → Ser、Lys 83 → Arg、Glu 104 → Leu、Leu 105 → Cys、His 106 → Pro、和 Lys108 → Gln。

[0060] 在一些实施方式中,结合 IL-4 受体 α 的人泪脂质运载蛋白突变蛋白包含以下氨基酸替换集合中的一个:

[0061] (1)Arg 26 → Ser、Glu 27 → Arg、Phe 28 → Cys、Glu 30 → Arg、Met 31 → Ala、Asn 32 → Tyr、Leu 33 → Tyr、Glu 34 → Gly、Leu 56 → Gln、Ile 57 → Arg、Ser58 → Ile、Asp 80 → Ser、Lys 83 → Arg、Glu 104 → Leu、Leu 105 → Cys、His106 → Pro、Lys 108 → Gln;

[0062] (2)Arg 26 → Ser、Glu 27 → Arg、Phe 28 → Cys、Glu 30 → Arg、Met 31 → Ala、Asn 32 → Tyr、Leu 33 → Tyr、Glu 34 → Lys、Leu 56 → Gln、Ile 57 → Arg、Ser58 → Asn、Asp 80 → Ser、Lys 83 → Arg、Glu 104 → Leu、Leu 105 → Cys、His106 → Pro、Lys 108 → Gln;

[0063] (3)Arg 26 → Ser、Glu 27 → Arg、Phe 28 → Cys、Glu 30 → Arg、Met 31 → Ala、Asn 32 → Tyr、Leu 33 → Tyr、Leu 56 → Gln、Ile 57 → Arg、Ser 58 → Arg、Asp80 → Ser、Lys 83 → Arg、Glu 104 → Leu、Leu 105 → Cys、His 106 → Pro、Lys108 → Gln;

[0064] (4)Arg 26 → Ser、Glu 27 → Arg、Phe 28 → Cys、Glu 30 → Arg、Met 31 → Ala、Asn 32 → Tyr、Leu 33 → Tyr、Glu 34 → Ser、Leu 56 → Gln、Ile 57 → Arg、Asp80 → Ser、Lys 83 → Arg、Glu 104 → Leu、Leu 105 → Cys、His 106 → Pro、Lys108 → Gln;

[0065] (5)Arg 26 → Ser、Glu 27 → Arg、Phe 28 → Cys、Glu 30 → Arg、Met 31 → Ala、Asn

32 → His、Leu 33 → Tyr、Glu 34 → Ser、Leu 56 → Gln、Ile 57 → Arg、Ser58 → Ala、Asp 80 → Ser、Lys 83 → Arg、Glu 104 → Leu、Leu 105 → Cys、His106 → Pro、Lys 108 → Gln ;  
[0066] (6) Arg 26 → Ser、Glu 27 → Arg、Phe 28 → Cys、Glu 30 → Arg、Met 31 → Ala、Asn 32 → Tyr、Leu 33 → Tyr、Glu 34 → Asp、Leu 56 → Gln、Ile 57 → Arg、Ser58 → Lys、Asp 80 → Ser、Lys 83 → Arg、Glu 104 → Leu、Leu 105 → Cys、His106 → Pro、Lys 108 → Gln ;  
和

[0067] (7) Arg 26 → Ser、Glu 27 → Arg、Phe 28 → Cys、Glu 30 → Arg、Met 31 → Ala、Asn 32 → Tyr、Leu 33 → Tyr、Glu 34 → Gly、Leu 56 → Gln、Ile 57 → Arg、Asp80 → Ser、Lys 83 → Arg、Glu 104 → Leu、Leu 105 → Cys、His 106 → Pro、Lys108 → Gln。

[0068] 本发明的人泪脂质运载蛋白突变蛋白可以包含 SEQ ID NO:3-11 中所示氨基酸序列中的任一个或其片段或变体,基本上由 SEQ ID NO:3-11 中所示氨基酸序列中的任一个或其片段或变体组成,或者由 SEQ ID NO:3-11 中所示氨基酸序列中的任一个或其片段或变体组成。本文中关于本发明突变蛋白使用的术语“片段”涉及源自全长成熟人泪脂质运载蛋白且为 N 端和 / 或 C 端截短的蛋白或肽,即缺少 N 端和 / 或 C 端氨基酸中的至少一个。这种片段可以包含成熟人泪脂质运载蛋白一级序列的至少 10 个、更多(例如 20 或 30 或更多个)连续的氨基酸,并且通常在成熟人泪脂质运载蛋白的免疫分析中可检测到。

[0069] 本发明中使用的术语“变体”涉及包含氨基酸序列修饰的蛋白质或肽的衍生物,所述氨基酸序列修饰例如通过替换、缺失、插入或化学修饰进行。在一些实施方式中,这种修饰确实不会降低蛋白质或肽的功能。这种变体包括蛋白质,其中一个或多个氨基酸被它们各自的 D 立体异构体或除天然存在的 20 个氨基酸外的氨基酸(比如,例如,鸟氨酸、羟脯氨酸、瓜氨酸,高丝氨酸,羟赖氨酸、戊氨酸)替代。然而,这样的替换也可以是保守的,即氨基酸残基被替代为化学性质相似的氨基酸残基。保守替换的实例为以下组成员之间的替代: 1) 丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸;2) 天冬氨酸和谷氨酸;3) 天冬酰胺和谷氨酰胺;4) 精氨酸和赖氨酸;5) 异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸;和 6) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。

[0070] 这种突变蛋白可以相对于成熟人泪脂质运载蛋白氨基酸序列包含选自以下的至少 6、8、10、12、14 或 16 个氨基酸替换: Arg 26 → Ser; Glu 27 → Ile; Glu 30 → Ser; Met 31 → Gly; Asn 32 → Arg; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Tyr; Leu56 → Lys、Glu、Ala、Met; Ile 57 → Phe; Ser 58 → Arg; Asp 80 → Ser、Pro; Lys 83 → Glu、Gly; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Ala; His 106 → Val; 和 Lys108 → Thr, 并且可以进一步地包含选自以下的至少一个氨基酸替换: Leu4 → Phe; Glu 63 → Lys; Val 64 → Met; Asp 72 → Gly; Lys 76 → Arg、Glu; Ile88 → Val、Thr; Ile 89 → Thr; Arg 90 → Lys; Asp 95 → Gly; Phe 99 → Leu; 和 Gly 107 → Arg、Lys、Glu。

[0071] 在一个具体实施方式中,这种突变蛋白包括氨基酸替换: Arg 26 → Ser、Glu 27 → Ile、Glu 30 → Ser、Met 31 → Gly、Asn 32 → Arg、Leu 33 → Ile、Glu34 → Tyr、Ile 57 → Phe、Ser 58 → Arg、Lys 83 → Glu、Glu 104 → Leu、Leu105 → Ala、His 106 → Val、和 Lys 108 → Thr。

[0072] 本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白可以以单体蛋白存在。在一些实施方式中,根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可以能够自发地二聚体化或寡聚体化。形成稳定单体的脂质运载蛋白突变蛋白的使用在一些应用中可能是有利的,例如:由于更快速的扩散和更

好的组织渗透。在其它实施方式中,自发形成同源二聚体或多聚体的脂质运载蛋白突变蛋白的使用可能是有利的,因为这样的多聚体可以提供对给定靶标(进一步)增加的亲和力和/或亲合力。此外,脂质运载蛋白突变蛋白的低聚物形式可以具有较低离解速率或延长的血清半衰期。如果形成稳定单体的突变蛋白的二聚作用或多聚作用是理想的,这可以例如通过将各自的低聚结构域如 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“Duocalin”实现(参见下面)。

[0073] 根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可以通过诱变天然存在形式的人泪脂质运载蛋白的方式获得。本文使用的术语“诱变”系指,选择实验条件,以使得在人泪脂质运载蛋白(Swiss-Prot 数据库条目 P31025)给定序列位置处天然存在的氨基酸可以被至少一个不存在于各天然多肽序列中的此特定位置处的氨基酸替换。术语“诱变”还包括通过缺失或插入一个或多个氨基酸进行的序列区段长度的(额外的)修饰。因此,以下情况在本发明的范围内:例如,一个在选定序列位置处的氨基酸被三个随机突变段替代,从而相比于野生型蛋白各区段的长度,导致两个氨基酸残基的插入。这样的删除或插入可以彼此独立地引入到在本发明中可以进行突变的任何肽区段中。在本发明的一个示例性实施方式中,几个突变的插入可以引入到选定的脂质运载蛋白支架的 AB 环中(参见以全文引用并入本文的国际专利申请 W02005/019256)。术语“随机诱变”指无预定的单个氨基酸(突变)存在于某个序列位置处,而是至少两个氨基酸可以在诱变期间以某概率掺入在预限定的序列位置处。

[0074] 人泪脂质运载蛋白的编码序列(Redl, B. 等人(1992) J. Biol. Chem. 267, 20282-20287)在本发明中用作用于诱变选择的肽区段的起始点。为了诱变所述氨基酸位置,本领域技术人员可以选择用各种已建立的标准方法来进行定点诱变。一个常用的技术是通过使用合成寡核苷酸混合物进行 PCR(聚合酶链反应)来引入突变,所述合成寡核苷酸在所需的序列位置处带有简并碱基组成。例如,在诱变期间使用密码子 NNK 或 NNS(其中 N= 腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤或胸腺嘧啶;K= 鸟嘌呤或胸腺嘧啶;S= 腺嘌呤或胞嘧啶)允许掺入所有 20 个氨基酸加上琥珀终止密码子,而密码子 VVS 将可以掺入的氨基酸的数量限制为 12 个,因为它将氨基酸 Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Val 排除于掺入多肽序列的选定位置处;使用密码子 NMS(其中 M= 腺嘌呤或胞嘧啶)例如将在选定序列位置处的可行氨基酸的数量限制为 11,因为它将氨基酸 Arg、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Val 排除于掺入选定序列位置处。在这方面指出,其它氨基酸的密码子(除了常规 20 种天然存在的氨基酸)如硒半胱氨酸或吡咯赖氨酸也可以掺入到突变蛋白的核酸中。也可以的是,如 Wang, L. 等人(2001) Science 292, 498-500 或 Wang, L. 和 Schultz, P. G. (2002) Chem. Comm. 1, 1-11 所描述的,使用“人工”密码子如 UAG,它通常被认为是终止密码子以便插入其它不寻常的氨基酸,例如邻甲基-L-酪氨酸或对氨基苯丙氨酸。

[0075] 使用具有降低的碱基对特异性的核苷酸构建块,例如肌苷,8-氧-2'-脱氧鸟苷或 6(2-脱氧-β-D-呋核亚硝脲)-3,4-二氢-8H-嘧啶并-1,2-噻-7 酮(Zaccolo 等人(1996) J. Mol. Biol. 255, 589-603),是将突变引入到选定序列区段中的另一选择。

[0076] 进一步的可能是所谓的三联体诱变。这种方法使用不同的核苷酸三联体的混合物,其每一个编码一个氨基酸,用以掺入到编码序列中(Virnekās B 等人,1994 Nucleic Acids Res 22, 5600-5607)。

[0077] 用于将突变引入到各肽选定区域中的一个可能策略是基于四个寡核苷酸的使用,

其每一个都部分源于要进行突变的相应序列区段之一。当合成这些寡核苷酸时,本领域技术人员可以使用核酸构建块的混合物,以合成对应于要进行突变的氨基酸位置的那些核苷酸三联体,以使得编码所有天然氨基酸的密码子随机出现,这最终导致脂质运载蛋白肽文库的产生。例如,第一个寡核苷酸在其序列中(除突变的位置外)对应于要进行突变的肽区段的编码链(在脂质运载蛋白多肽的最N端位置处)。因此,第二个寡核苷酸对应于多肽序列中后面的第二个序列区段的非编码链。第三个寡核苷酸依次对应于相应第三个序列区段的编码链。最后,第四个寡核苷酸对应于第四个序列区段的非编码链。聚合酶链反应可以使用各自的第一个和第二个寡核苷酸以及如果有必要分别使用各自的第三个和第四个寡核苷酸进行。

[0078] 这两种反应的扩增产物可以通过各种已知的方法合并成单个核酸,所述单个核酸包括从第一个到第四个序列区段的序列,其中突变已引入到选定的位置处。为此,两种产物例如可以使用侧翼寡核苷酸以及一个或多个中介核酸分子进行新的聚合酶链反应,所述中介核酸分子提供第二个和第三个序列区段之间的序列。在用于诱变的寡核苷酸序列内选择数目和排列时,本领域技术人员在他的处理中有许多替代选择。

[0079] 上面定义的核酸分子可以通过与编码脂质运载蛋白多肽和/或载体的核酸的缺失5'-和3'-序列连接来进行连接,并且可以被克隆到已知宿主生物体中。众多的已建立实验程序可供连接和克隆。例如,同样存在于克隆载体序列中用于限制性内切酶的识别序列可以被工程化成合成寡核苷酸的序列。因此,在扩增各自的PCR产物和酶切割之后,可以使用相应的识别序列容易地克隆所得片段。

[0080] 在编码选定用于诱变的蛋白的基因内的较长序列片段还可以通过已知方法进行随机诱变,例如通过利用在增加错误率的条件下的聚合酶链反应、通过化学诱变或通过使用细菌突变菌株。这些方法还可以用于进一步优化靶标亲和力或脂质运载蛋白突变蛋白的特异性。可能发生于实验性诱变片段之外的突变通常是可以接受的或者甚至可以证明是有利的,例如如果它们有助于改进折叠效率或脂质运载蛋白突变蛋白的折叠稳定性。

[0081] 在根据本发明的方法中,编码人泪脂质运载蛋白的核酸分子首先在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置27、28、30、31、33、53、57、61、64、66、80、83、104-106和108中一个或多个处进行诱变。其次,编码人泪脂质运载蛋白的核酸分子还可以在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置26、32、34、55、56、58和63中两个或更多个处进行诱变。在这些后面的氨基酸序列位置中,要进行突变的至少一个位置选自氨基酸序列位置58和氨基酸序列位置63。

[0082] 在本发明的一个实施方式中,用于产生人泪脂质运载蛋白突变蛋白的方法包括突变成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置26-28、30-34、53、55-58、63、64、66、80、83、104-106和108中任一个的密码子的至少2、3、4、5、6、8、10、12、14、15、16或17个。在一个实施方式中,突变成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置26、27、28、30、31、32、33、34、53、55、56、57、58、63、64、66、80、83、104、105、106和108的密码子的所有22个。

[0083] 在前述方法的一个实施方式中,另外突变成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置26-28、30-34、53、55-58、63、64、66、80、83、104-106和108中任一个的密码子的至少2、3、4、5、6、8、10、12、14或15个。

[0084] 在本发明进一步的实施方式中,根据本发明的方法包括编码成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列中位置 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 进行突变以编码丙氨酸、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,仅列举了几种可能性例子。在实施方式中,在位置 153 发生突变的情况下,氨基酸如丝氨酸或丙氨酸可以引入到位置 153 处。

[0085] 在如本文所描述的本发明的其它实施方式中,编码成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置 111 和 / 或 114 的密码子进行突变以编码例如在位置 111 处的精氨酸和在位置 114 处的色氨酸。

[0086] 本发明方法的另一个实施方式涉及诱变编码成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的位置 101 处的半胱氨酸的密码子,以使得此密码子编码其它任何氨基酸。在一个实施方式中,编码位置 102 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 处的两个或全部三个半胱氨酸密码子被其它氨基酸的密码子替代。

[0087] 根据本发明的方法,从编码人泪脂质运载蛋白的核酸开始,获得突变蛋白。这种核酸进行诱变,并且通过重组 DNA 技术手段引入到合适的细菌或真菌宿主生物体中。获得泪脂质运载蛋白的核酸文库可以使用本领域已知的用于产生具有抗体样性质(即与给定靶标有亲和力的突变蛋白)的任何适合的技术来进行。这种组合方法的实例在国际专利申请例如 WO 99/16873、W000/75308、WO 03/029471、WO 03/029462、WO 03/029463、WO 2005/019254、WO 2005/019255、WO 2005/019256 或 WO 2006/56464 中有详细描述。这些专利申请中的每一个的内容均以全文引用的方式并入本文。在适当宿主中表达进行诱变的氨基酸序列后,可以从获得的文库中选择运载多个各脂质运载蛋白突变蛋白的遗传信息的克隆,所述脂质运载蛋白突变蛋白结合给定靶标。可以使用熟知的技术来筛选这些克隆,比如噬菌体展示(上文的 Kay, B. K. 等人 (1996) 中的综述;上文的 Lowman, H. B. (1997) 或上文的 Rodi, D. J. 和 Makowski, L. (1999)), 菌落筛选(Pini, A. 等人 (2002) Comb. Chem. HighThroughput Screen. 5, 503-510 中的综述)、核糖体展示(Amstutz, P. 等人 (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12, 400-405 中的综述) 或如在 Wilson, D. S. 等人 (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3750-3755 中报道的 mRNA 展示,或在 W099/16873、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 中具体描述的方法。

[0088] 编码突变蛋白的核酸分子用任何适合的表达系统表达。获得的突变蛋白通过筛选或分离的方法富集。筛选可以例如在竞争性条件下进行。本文采用的竞争性条件是指突变蛋白的筛选包括以下至少一个步骤:在所述步骤中,突变蛋白和给定的人泪脂质运载蛋白的非天然配体(即 IL-4 受体  $\alpha$ ) 在额外的配体存在下进行接触,所述额外的配体与突变蛋白和 IL-4 受体  $\alpha$  的结合竞争。额外的配体可以是靶标(例如 IL-4)的生理配体、过量的靶标本身或靶标的任何其它非生理配体,所述配体结合至少一个重叠表位到由本发明的突变蛋白识别的表位,并且因而干涉突变蛋白的靶标结合。或者,额外的配体通过变构效应将不同于突变蛋白的结合位点的表位络合到靶标,从而与突变蛋白的结合竞争。

[0089] 提供使用温和 M13 噬菌体的噬菌体展示技术的实施方式(上文的 Kay, B. K. 等人 (1996) 中的综述;上文的 Lowman, H. B. (1997) 或 Rodi, D. J., & Makowski, L. (1999)) 作为可以用于本发明的筛选方法的实例。可以用来筛选本发明突变蛋白的噬菌体展示技术的另一

个实施方式是如 Broders 等人 (Broders 等人 (2003) “Hyperphage. Improving antibody presentation in phagedisplay.” *Methods Mol. Biol.* 205:295-302) 描述的超级噬菌体噬菌体技术。也可采用其它的温和噬菌体如 f1 或溶解性噬菌体如 T7。对于示例性的筛选方法而言, 产生 M13 噬菌粒, 其允许表达突变的脂质运载蛋白氨基酸序列作为融合蛋白, 所述融合蛋白在 N 端有信号序列 (如 OmpA 信号序列), 在 C 端具有噬菌体 M13 的衣壳蛋白 pIII 或其可以掺入噬菌体衣壳的片段。包括野生型序列的氨基酸 217 至 406 的噬菌体衣壳蛋白的 C 端片段  $\Delta$ pIII 可以用来产生融合蛋白。在一个实施方式中, 使用 pIII 的 C 端片段, 所述片段中位置 201 处的半胱氨酸残基缺失或者被其它氨基酸替代。

[0090] 因此, 本发明方法的进一步实施方式涉及可操作地融合编码一个或多个个人泪脂质运载蛋白突变蛋白的核酸, 并且由诱变得在 3' 端具有编码 M13 家族的纤维状噬菌体的外壳蛋白 pIII 或这种外壳蛋白的片段的基因, 以便筛选至少一种用来结合给定配体的突变蛋白。

[0091] 融合蛋白可以包括其它成分, 比如亲和和标签, 它允许融合蛋白或其部分的固定、检测和 / 或纯化。此外, 终止密码子可以位于编码脂质运载蛋白或其突变蛋白的序列区域和噬菌体衣壳基因或其片段之间, 其中所述终止密码子, 比如琥珀终止密码子, 至少部分地在合适的抑制菌株中在翻译过程中翻译成氨基酸。

[0092] 例如, 这里描述的噬菌粒载体 pTLPC27, 现在也称为 pTlc27, 可用于制备编码人泪脂质运载蛋白突变蛋白的噬菌粒文库。编码泪脂质运载蛋白突变蛋白的本发明的核酸分子用两个 BstXI 限制性位点插入到载体中。在连接后, 用所得的核酸混合物转化合适的宿主菌株, 如大肠杆菌 XL1-Blue, 以产生大量的独立克隆。如果需要, 可以产生各自的载体以用于制备超级噬菌粒 (hyperphagemid) 文库。

[0093] 随后在液体培养物中用适合的 M13 辅助噬菌体或超级噬菌体超感染得到的文库, 以便产生功能噬菌粒。重组噬菌粒在其表面上显示作为具有衣壳蛋白 pIII 或其片段的融合蛋白的脂质运载蛋白突变蛋白, 而融合蛋白的 N 端信号序列通常被切割掉。另一方面, 它还具有一个或多个由辅助噬菌体提供的天然衣壳蛋白 pIII 的拷贝, 因而能够感染受体, 所述受体一般来说为携带 F- 或 F' - 质粒的细菌菌株。在超级噬菌体展示的情况下, 所述超级噬菌粒在其表面上显示作为具有感染性衣壳蛋白 pIII 但没有天然衣壳蛋白的融合蛋白的脂质运载蛋白突变蛋白。用辅助噬菌体或超级噬菌体感染期间或之后, 可以诱导在脂质运载蛋白突变蛋白和衣壳蛋白 pIII 之间的融合蛋白的基因表达, 例如通过添加脱水四环素。选择诱导条件, 以使得大部分获得的噬菌粒在它们的表面上显示至少一种脂质运载蛋白突变蛋白。在超级噬菌体展示的情况下, 诱导情况产生携带三到五种由脂质运载蛋白突变蛋白和衣壳蛋白 pIII 组成的融合蛋白的超级噬菌粒群。已知用于分离噬菌粒的不同方法, 如用聚乙二醇沉淀。分离通常发生在 6-8 个小时的孵育期后。

[0094] 分离的噬菌粒然后通过用期望的靶标孵育来筛选, 其中所述靶标以允许至少临时固定这些噬菌粒的形式存在, 所述噬菌粒在它们的衣壳中携带具有如融合蛋白一样的期望的结合活性的突变蛋白。在本领域技术人员已知的不同实施方式中, 靶标可以例如与如血清白蛋白的载体蛋白缀合, 并且通过这种载体蛋白结合至蛋白结合表面, 例如聚苯乙烯。适合于 ELISA 技术的微量滴定板或所谓的“免疫棒”可以例如用于这样的靶标固定。或者, 可以使用靶标与其它结合基团的缀合物, 所述其它结合基团如生物素。靶标然后可以固

定在选择性结合此基团的表面上,例如涂有链霉亲和素、中和亲和素或亲和素的微量滴定板或顺磁性颗粒。如果靶标与免疫球蛋白的 Fc 部分融合,则用表面也可以实现固定,例如微量滴定板或顺磁性颗粒,它们涂有蛋白质 A 或蛋白质 G。

[0095] 存在于表面上的非特异性噬菌粒结合位点可以用封闭液饱和,如它们已知用于 ELISA 法一样。然后通常在生理缓冲液存在下,使噬菌粒与固定于表面上的靶标接触。未结合的噬菌粒通过多次洗涤去除。然后洗脱掉保留在表面上的噬菌粒粒子。对于洗脱,几个方法是可行的。例如,可以通过添加蛋白酶或在酸、碱、洗涤剂或离液盐的存在下或在适度变性条件下洗脱噬菌粒。这样的一种方法是使用 pH2.2 的缓冲液洗脱,其中随后中和洗脱液。或者,可以添加游离靶标的溶液,以和固定靶标竞争结合至噬菌粒或靶标特异性噬菌粒,所述噬菌粒或靶标特异性噬菌粒可以通过和免疫球蛋白或特异性结合至目标靶标的天然配体蛋白竞争而被洗脱。

[0096] 后来,用洗脱的噬菌粒感染大肠杆菌细胞。或者,可以从洗脱的噬菌粒提取核酸然后用于序列分析、扩增或以另一种方式转化细胞。从以这种方式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通过用 M13 辅助噬菌体或根据上述方法的超级噬菌体超感染而生成,然后用这种方式扩增的噬菌粒在固定的靶标上再一次进行筛选。多个筛选循环通常是必需的,以便以足够富集的形式获得具有本发明突变蛋白的噬菌粒。在一些实施方式中,选择筛选循环的次数以使得在随后的功能分析中,至少 0.1% 的所研究的克隆产生对于给靶标具有可检测亲和力的突变蛋白。根据大小,即所使用文库的复杂度,为此通常需要 2 到 8 个循环。

[0097] 对于选定的突变蛋白的功能分析,用从筛选循环中获得的噬菌粒感染大肠杆菌菌株,然后分离相应的双链质粒 DNA。从此噬菌粒 DNA 开始,或者也可以从提取自噬菌粒的单链 DNA 开始,本发明选定突变蛋白的氨基酸序列可以通过本领域已知方法测定,然后可以由其推导氨基酸序列。整个泪脂质运载蛋白突变蛋白的突变的区域或序列可以亚克隆到另一个表达载体上并且在合适的宿主生物体中表达。例如,载体 pTLPC26,现在也称为 pT1c26,可以用于在大肠杆菌菌株如大肠杆菌 TG1 中表达。这样产生的泪脂质运载蛋白突变蛋白可以通过不同的生化方法进行纯化。例如用 pT1c26 生成的泪脂质运载蛋白突变蛋白,可以携带亲和肽,即所谓的亲和标签,例如在其 C 端,因此可以通过亲和色谱法纯化。亲和标签的实例包括、但不限于生物素、Strep-tag、Strep-tag II (上文的 Schmidt 等人)、寡组氨酸、多组氨酸、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)。

[0098] 一些亲和标签是半抗原,例如但不限于,二硝基酚和地高辛。一些亲和标签是表位标签,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(Cys-Tyr-The-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Lys)的 VSV-G 表位、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、序列 Glu-Glu-Thr-Ala-Arg-Phe-Gln-Pro-Gly-Tyr-Arg-Ser 的哺乳类 MAPK/ERK 激酶 C 端的标签 -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、序列 Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu 的转录因子 c-myc 的“myc”表位以及存在于猿猴病毒 5 (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) 的副粘病毒的 P 和 V 蛋白上的小 V5 表位。此外,但是一般不作为单个标签,可以使用溶解度提高标签如 NusA、硫氧还蛋白(TRX)、小泛素样修饰蛋白(SUMO)、和泛素(Ub)。半抗原和表位标签可以与相应抗体或作为结合配偶体的抗体样蛋白质性分子结合使用。序列 Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser 的 S- 肽表位可以用作表位标签与各自的抗体相连接或与作为结合配偶体的 S- 蛋白相结合(Hackbarth, JS 等人., BioTechniques (2004) 37, 5, 835-839)。

[0099] 筛选也可以通过其它方法进行。很多相应实施方式为本领域技术人员已知或在文献中描述。此外,可以使用方法的组合。例如,通过“噬菌体展示”筛选或至少富集的克隆另外可以进行“菌落筛选”。这个过程的特点是单个克隆可以直接关于产生对靶标具有可检测亲和力的泪脂质运载蛋白突变蛋白进行分离。

[0100] 除了使用大肠杆菌在“噬菌体展示”技术或“菌落筛选”方法中作为宿主生物体外,其它细菌菌株、酵母或昆虫细胞或哺乳动物细胞也可以用于这一目的。除了如上所述从随机文库中筛选泪脂质运载蛋白突变蛋白,也可以应用进化方法,包括限制性诱变,以便在重复筛选循环后,关于对靶标的亲和力或特异性来优化对靶标已经具有一定结合活性的突变蛋白。

[0101] 对于技术人员显而易见的是,络合物形成取决于许多因素,如结合配偶体的浓度、竞争物的存在、缓冲体系的离子强度等。筛选和富集通常是在允许分离脂质运载蛋白突变蛋白的条件下进行,所述脂质运载蛋白突变蛋白在与期望靶标络合的情况下具有至少为 200nM 的离解常数。然而,洗涤和洗脱步骤可以在不同严格程度下进行。关于动力学特征的筛选也是可行的。例如,筛选可以在以下条件下进行:所述条件支持靶标和突变蛋白(显示出与靶标的缓慢离解)的络合物形成,或者换而言之,低  $K_{off}$  速率。或者,筛选可以在以下条件下进行:所述条件支持突变蛋白和靶标之间快速形成络合物,或者换而言之,高  $k_{on}$  速率。作为进一步的示例性选择,筛选可以在选择突变蛋白改善的热稳定性的条件下进行(相比于野生型泪脂质运载蛋白或对前面筛选的靶标已经有亲和力的突变蛋白)。

[0102] 一旦与给定靶标具有亲和力的突变蛋白被筛选出来,另外还可以使这种突变蛋白进行另一诱变,以便随后筛选具有甚至更高亲和力的变体或具有改善的特性的变体,如更高的热稳定性、改善的血清稳定性、热力学稳定性、改善的溶解度、改善的单体行为、对热变性、化学变性、蛋白质水解或洗涤剂的改善的抗性等等。此进一步诱变,在针对更高亲和力可视为体外“亲和力成熟”的情况下,可以通过基于合理设计或随机突变的位点特异性突变来获得。另一个可行的用于获得更高亲和力或改善的性质的方法是使用易错 PCR,它导致在脂质运载蛋白突变蛋白序列位置的所选范围内的点突变。易错 PCR 可以根据任何已知操作程序进行,如一个由 Zacco 等人 (1996) J. Mol. Biol. 255, 589-603 描述的操作程序。适合于这种目的其它随机诱变方法包括由 Murakami, H 等人 (2002) Nat. Biotechnol. 20, 76-81 描述的随机插入/缺失(RID)诱变,或由 Bittker, J. A 等人 (2002) Nat. Biotechnol. 20, 1024-1029 描述的非同源随机重组(NRR)。如果需要,也可以根据 WO 00/75308 或 Schlehuber, S. 等人 (2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120 中描述的过程进行亲和力成熟,在该文献中获得了地对地高辛具有高亲和力的后胆色素结合蛋白的突变蛋白。

[0103] 本发明的泪脂质运载蛋白突变蛋白可以用来与 IL-4 受体  $\alpha$  形成络合物。所述突变蛋白还能够结合 IL-4 受体  $\alpha$  的免疫原性片段。IL-4 受体  $\alpha$  的免疫原性片段是具有一个或多个表位、模拟表位或其它抗原决定簇的片段,并因此能够诱导免疫反应或者针对其可产生抗体。免疫原性片段可以包括单个表位或可以有多个表位。因为抗原呈递系统,如载体蛋白,可以用来提供由免疫系统识别的所需大小,没有特定的大小限制适用于免疫原性片段。因此,免疫原性片段也可以是“半抗原”,即片段,不需要本身是抗原性的或可以具有低免疫原性,特别是由于其小分子量和相应的大小。通常免疫原性片段单独或当呈递在载体上时,可以由免疫球蛋白结合,或者如果通过 MHC 分子呈递,则可以由 T 细胞受体 (TCR) 结合。一般免疫原性片段单独或当以抗原呈递系统的形式存在时,能够引起体液免疫反应和 / 或细胞免疫反应,从而例如使得 B- 和 / 或 T- 淋巴细胞激活。

[0104] 本发明突变蛋白的靶标是跨膜蛋白白介素 4 受体的  $\alpha$  链,它包含 207 个氨基酸的胞外域。胞外域的分泌形式存在 sIL-4 受体  $\alpha$ ,也被称为 CD124,能够阻断 IL-4 活性。本发明的突变蛋白可以结合 sIL-4 受体  $\alpha$  以及 IL 4 受体  $\alpha$  胞外域的任何部分。

[0105] 在这种情况下也指出,在各自的突变蛋白和其配体之间形成络合物受许多不同因素的影响,所述因素例如各自的结合配偶体的浓度、竞争物的存在、pH 和使用的缓冲体系的离子强度、以及用来确定离解常数  $K_D$  的试验方法(例如荧光滴定法、竞争 ELISA 或表面等离子体共振等等)或甚至用来评价实验数据的数学算法。

[0106] 因此,对于技术人员同样明显的是,这里给出的  $K_D$  值(各自的突变蛋白及其配体之间形成的络合物的离解常数)可以在某个实验范围内变化,这取决于方法和用于测定特定脂质运载蛋白突变蛋白对给定配体的亲和力的实验情况。这意味着,测量的  $K_D$  值可能会有轻微的偏差或耐受范围,这取决于例如, $K_D$  值是通过表面等离子体共振(Biacore)还是通过竞争 ELISA 法测定。

[0107] 上述突变蛋白的形式也包括于本发明的范围内,其中各自的突变蛋白关于其潜在免疫原性已经被改变或修饰。

[0108] 细胞毒性 T 细胞识别与 I 类主要组织相容性复合体(MHC)分子联合的抗原呈递细胞的细胞表面上的肽抗原。肽结合 MHC 分子的能力具有等位基因特异性并且和它们的免疫原性相关。为了减少给定蛋白的免疫原性,预测蛋白中的哪些肽具有潜力结合至给定的 MHC 分子的能力具有很大的价值。采用计算线程方法来识别潜在的 T 细胞表位的方法之前已经描述,以预测给定肽序列与 MHC I 类分子的结合(Altuvia 等人 (1995) J. Mol. Biol. 249, 244-250)。

[0109] 这种方法也可以用来识别在本发明突变蛋白中的潜在 T 细胞表位,以及取决于其预期用途,基于其预测的免疫原性进行特定突变蛋白的选择。进一步可能的是,使已经预测包含 T 细胞表位的肽区域进行另外的诱变,以减少或消除这些 T 细胞表位以及因此使免疫原性最小化。已经描述了从基因工程抗体中去除两性表位(Mateo 等人 (2000) Hybridoma 19, 6, 463-471),并且可以适于本发明的突变蛋白。

[0110] 由此获得的突变蛋白可以拥有最小化的免疫原性,这对于它们在治疗和诊断应用中的使用是理想的,所述应用比如下面描述的那些。

[0111] 对于某些应用,采用被标记形式的本发明突变蛋白也是有益的。因此,本发明还涉及与选自以下的标记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、显色标记、发光标记、半抗原、地高辛、生物素、金属络合物、金属和胶体金。突变蛋白也可以和低分子量有机化合物缀合。本文使用的术语“低分子量有机化合物”表示单体的碳基化合物,其可以具有脂肪族、脂环族和 / 或芳香族部分。在通常的实施方式中,低分子量有机化合物是具有至少两个碳原子的主链的有机化合物,而在一些实施方式中,具有不超过 7 或 12 个可旋转碳键。这种化合物具有的分子量范围为从 100 到大约 2000 道尔顿,比如从大约 100 到大约 1000 道尔顿。它可以任选地包含一个或两个金属原子。

[0112] 一般来说,可以用任何适当的化学物质或酶标记脂质运载蛋白突变蛋白,其直接或间接地生成在化学、物理、光学、或酶反应中可检测的化合物或信号。物理反应(同时为光学反应 / 标记物)的实例是照射时荧光的发射或在使用放射性标记时 X 射线的发射。碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或  $\beta$ -半乳糖苷酶是酶标记(同时为光学标记)的实例,其催化显色反应产物的形成。一般来说,通常用于抗体的所有标记(除了只能和免疫球蛋白 Fc 部分里的糖部分一起使用的那些)也可以用于缀合到本发明的突变蛋白。本发明的突变蛋白也可以和任何合适的治疗活性剂缀合,例如,用于将这种制剂靶向递送到给定细胞、组织或器官或用于细胞的选择性靶向,例如,肿瘤细胞而不影响周围的正常细胞。这种治疗活性剂的实例包括放射性核素、毒素、有机小分子和治疗肽(如作为细胞表面受体的激动剂 / 拮抗剂的肽或竞争给定细胞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和治疗活性核酸缀合,所述核酸如反义核酸分子、小干扰 RNA、微 RNA 或核酶。这样的缀合物可以通过本领域熟知的方法产生。

[0113] 在一个实施方式中,本发明的突变蛋白也可以耦合到靶向特定的人体区域的靶向部分,以便递送本发明的突变蛋白到体内期望区域或范围。其中可能需要这种修饰的一个实例为血脑屏障的穿过。为了穿过血脑屏障,本发明的突变蛋白可以耦合到促进主动转运通过这种屏障的部分(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。这种部分例如可以以商标 2B-Trans™ 获得(to-BBB technologies BV, Leiden, NL)。

[0114] 正如上文所说,本发明的突变蛋白在一些实施方式中可以缀合至延长所述突变蛋白血清半衰期的部分(这一点也参见 PCT 公开文件 W02006/56464, 其中参考对 CTLA-4 有结合亲和力的人嗜中性粒细胞明胶酶相关的脂质运载蛋白突变蛋白描述了这种缀合策略)。延长血清半衰期的部分可以是聚乙二醇分子、羟乙基淀粉、脂肪酸分子,如棕榈酸(Vajo & Duckworth 2000, Pharmacol. Rev. 52, 1-9)、免疫球蛋白的 Fc 部分、免疫球蛋白的 CH3 结构域、免疫球蛋白的 CH4 结构域、白蛋白或其片段、白蛋白结合肽或白蛋白结合蛋白质、转铁蛋白,仅列几个例子。白蛋白结合蛋白质可以是细菌白蛋白结合蛋白质、抗体、抗体片段(包括结构域抗体,例如参见美国专利 6,696,245)、或对白蛋白具有结合活性的脂质运载蛋白突变蛋白。相应地,用于延长本发明脂质运载蛋白突变蛋白的半衰期的适合的缀合配偶体包括白蛋白(Osborn, B. L. 等人, 2002, J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548), 或白蛋白结合蛋白质,例如细菌白蛋白结合结构域,例如一种链球菌蛋白 G (König, T. 和 Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83)。可以用作缀合配偶体的白蛋白结合肽的其它实例例如具有 Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cys 共有序列的那些,其中 Xaa<sub>1</sub>是 Asp、

Asn、Ser、Thr 或 Trp ;Xaa<sub>2</sub>是 Asn、Gln、His、Ile、Leu 或 Lys ;Xaa<sub>3</sub>是 Ala、Asp、Phe、Trp 或 Tyr ;Xaa<sub>4</sub>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., Kirchofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) J Biol Chem 277, 35035-35043) 所述。

[0115] 在其它实施方式中,可以将白蛋白自身或白蛋白的生物活性片段用作本发明的脂质运载蛋白突变蛋白的缀合配偶体。术语“白蛋白”包括所有的哺乳动物白蛋白,例如人血清白蛋白或牛血清白蛋白或大鼠白蛋白。可以以重组方式生成白蛋白或其片段,如美国专利 5,728,553 或欧洲专利申请 EP 0 330451 和 EP 0 361 991 中所述。可以将重组的人白蛋白(**Recombunin®**)Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK) 缀合或融合至脂质运载蛋白突变蛋白,从而延长突变蛋白的半衰期。

[0116] 如果白蛋白结合蛋白质是抗体片段,则其可以是结构域抗体。工程化结构域抗体(dAb)从而允许精确控制生物物理特性和体内半衰期,以获得最佳安全性和有效产物特征。结构域抗体例如可从 Domantis Ltd. (Cambridge, UK 和 MA, USA) 商购获得。

[0117] 将转铁蛋白用作延长本发明突变蛋白的血清半衰期的部分,可以以基因工程方式将所述突变蛋白融合至非糖基化的转铁蛋白的 N 或 C 端或二者。非糖基化的转铁蛋白的半衰期为 14-17 天,而转铁蛋白融合蛋白将类似地具有延长的半衰期。转铁蛋白载体还提供高的生物利用度、生物学分布和循环稳定性。此技术可从 BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA) 商购获得。用作蛋白质稳定剂/半衰期延长配偶体的重组人转铁蛋白(DeltaFerrin™)也可从 Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK) 商购获得。

[0118] 如果将免疫球蛋白的 Fc 部分用于延长本发明突变蛋白的血清半衰期的目的,可以使用可从 Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, USA) 商购获得的 SynFusion™ 技术。使用此 Fc- 融合技术允许产生更长效作用的生物药剂,并且可以例如由连接至抗体的 Fc 区域的两个拷贝的突变蛋白组成,以改善药代动力学、溶解性和生产效率。

[0119] 又一个延长本发明突变蛋白的半衰期的选择是将长的非结构化的柔性富甘氨酸序列(例如具有约 20 至 80 个连续甘氨酸残基的多甘氨酸)融合至本发明的突变蛋白的 N 或 C 端。此方法例如公开于 WO2007/038619, 还被称为“rPEG”(重组 PEG)。

[0120] 如果聚亚烷基二醇用作结合配偶体,则聚亚烷基二醇可以是取代的、未取代的、线性或分支的。它还可以是活化的聚亚烷基衍生物。适合的化合物的实例为聚乙二醇(PEG)分子,如描述于 WO 99/64016、美国专利 6,177,074 或涉及干扰素的美国专利 6,403,564 中,或者已针对其它蛋白质例如 PEG- 修饰的天冬酰胺酶、PEG- 腺苷脱氨酶(PEG-ADA) 或 PEG- 超氧化物歧化酶所描述的(例如参见 Fuertges 等人.(1990) The Clinical Efficacy of Poly(EthyleneGlycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11, 139-148)。这种聚合物的分子量,如聚乙二醇,可以在从大约 300 到大约 70000 道尔顿范围内变化,包括,例如,聚乙二醇分子量为约 10,000、为约 20,000, 为约 30,000 或为约 40,000 道尔顿。此外,例如在美国专利 6,500,930 或 6,620,413 中的描述,碳水化合物低聚糖和聚合物如淀粉或羟乙基淀粉(HES)可以缀合至本发明的突变蛋白,以延长血清半衰期。

[0121] 如果上述部分之一缀合至本发明人泪脂质运载蛋白突变蛋白,缀合到氨基酸侧链可以是有利的。适合的氨基酸侧链可以天然存在于人泪脂质运载蛋白的氨基酸序列中,或

者可以通过诱变引入。在经由诱变引入适合的结合位点的情况下,一种可行方法是在适当的位置处用半胱氨酸残基替代氨基酸。在一个实施方式中,该突变包括以下的至少一种: Thr 40 → Cys、Glu 73 → Cys、Arg 90 → Cys、Asp 95 → Cys 或 Glu 131 → Cys 替换。之后可以将在这些位置中任一个处新产生的半胱氨酸残基用于将突变蛋白缀合至延长所述突变蛋白的血清半衰期的部分上,所述部分例如 PEG 或其活化的衍生物。

[0122] 在另一个实施方式中,为了提供用于将上述部分之一缀合至本发明的突变蛋白的适合的氨基酸侧链,可以通过诱变引入人工氨基酸。通常,可以将此类人工氨基酸设计成更有反应性,因此促进与期望部分的缀合。可以经由人工 tRNA 引入的这样的人工氨基酸的一个实例是对乙酰基-苯丙氨酸。

[0123] 对于本文公开的突变蛋白的若干应用,使用它们的融合蛋白形式可能是有益的。在一些实施方式中,本发明的人泪脂质运载蛋白突变蛋白在其 N 端和其 C 端融合至蛋白、蛋白结构域或肽,例如信号序列和 / 或亲和标签。

[0124] 对于制药应用,本发明的突变蛋白可以融合至延长突变蛋白体内血清半衰期的融合配偶体(再次参见 PCT 申请 WO 2006/56464,其中参考对 CTLA-4 有结合亲和力的人嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白突变蛋白描述了合适的融合配偶体)。类似上面描述的缀合物,融合配偶体可以是免疫球蛋白的 Fc 部分、免疫球蛋白的 CH3 结构域、免疫球蛋白的 CH4 结构域、白蛋白、白蛋白结合肽或白蛋白结合蛋白质、转铁蛋白,仅列几个例子。再一次,白蛋白结合蛋白质可以是细菌白蛋白结合蛋白质或对白蛋白有结合活性的脂质运载蛋白突变蛋白。因此,用于延长本发明脂质运载蛋白突变蛋白半衰期的合适的融合配偶体包括白蛋白(上文的 Osborn, B. L. 等人 (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 540-548), 或白蛋白结合蛋白质,例如,细菌白蛋白结合结构域,例如一种链球菌蛋白 G (König, T., & Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-83)。描述于上文的 Dennis 等人 (2002) 或美国专利申请 2003/0069395 的白蛋白结合肽也可以用作融合配偶体,其具有 Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cys 共有序列,其中 Xaa<sub>1</sub> 是 Asp、Asn、Ser、Thr 或 Trp; Xaa<sub>2</sub> 是 Asn、Gln、His、Ile、Leu 或 Lys; Xaa<sub>3</sub> 是 Ala、Asp、Phe、Trp 或 Tyr; Xaa<sub>4</sub> 是 Asp、Gly、Leu、Phe、Ser 或 Thr。还可以使用白蛋白本身或白蛋白的生物活性片段作为本发明脂质运载蛋白突变蛋白的融合配偶体。术语“白蛋白”包括所有的哺乳动物白蛋白,例如人血清白蛋白或牛血清白蛋白或大鼠血清白蛋白。白蛋白或其片段的重组产生是本领域熟知的,例如描述于美国专利 5,728,553、欧洲专利申请 EP 0 330 451 和 EP 0 361 991 中。

[0125] 融合配偶体可以给本发明的脂质运载蛋白突变蛋白带来新的特性,如酶活性或其它分子的结合亲和力。合适的融合蛋白的实例有碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、谷胱甘肽-S-转移酶、蛋白质 G 的白蛋白结合结构域、蛋白质 A、抗体片段、寡聚结构域、结合特异性相同或不同的脂质运载蛋白突变蛋白(这造成“Duocalin”的形成,参见 Schlehuber, S. 和 Skerra, A. (2001), *Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. Biol. Chem.* 382, 1335-1342) 或毒素。

[0126] 特别地,可以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,以使得产生的融合蛋白的两个“部分”一起作用于给定治疗靶标。脂质运载蛋白突变蛋白的结合结构域连接到致病靶标,从而允许酶结构域阻止所述靶标的生物功能。

[0127] 亲和标签如 Strep-tag<sup>®</sup> 或 Strep-tag<sup>®</sup> II (Schmidt, T. G. M. 等人 (1996) *J. Mol.*

Biol. 255, 753-766)、myc- 标签、FLAG- 标签、His<sub>6</sub>- 标签或 HA- 标签或蛋白质如也允许易于检测和 / 或纯化重组蛋白的谷胱甘肽-S- 转移酶, 是合适的融合配偶体的其它实例。最后, 具有显色或荧光性质的蛋白质如绿色荧光蛋白(GFP) 或黄色荧光蛋白质(YFP) 也是本发明脂质运载蛋白突变蛋白的合适的融合配偶体。

[0128] 本文使用的术语“融合蛋白”还包括包含信号序列的根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白。多肽 N 端的信号序列将这种多肽导向到特定的细胞隔室, 例如大肠杆菌的周质或真核细胞的内质网。大量的信号序列是本领域已知的。用于将多肽分泌到大肠杆菌的周质的示例性信号序列为 OmpA- 信号序列。

[0129] 本发明还涉及核酸分子(DNA 和 RNA), 其包括本文所述编码突变蛋白的核苷酸序列。因为遗传密码的简并性允许指定相同氨基酸的其它密码子替换某些密码子, 因此本发明并不局限于编码本发明突变蛋白的特定核酸分子, 而是涵盖包括编码功能性突变蛋白的核苷酸序列的所有核酸分子。

[0130] 因此, 本发明还包括编码根据本发明的突变蛋白的核酸序列, 所述核酸序列在天然成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的氨基酸序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中任一个的至少一个密码子处具有突变, 其中编码在成熟人泪脂质运载蛋白线性多肽序列的序列位置 61 和 153 处的至少一个半胱氨酸残基的密码子已被突变以编码任何其它氨基酸残基。

[0131] 本文描述的本发明还包括编码泪脂质运载蛋白突变蛋白的核酸分子, 所述核酸分子包括在实验性诱变的所指明序列位置以外的其它突变。这种突变通常是可耐受的或甚至可能证明是有益的, 例如如果它们有助于改进突变蛋白的折叠效率、血清稳定性、热稳定性或配体结合亲和力。

[0132] 本申请中公开的核酸分子可以“可操作地连接”调节序列以允许该核酸分子的表达。

[0133] 核酸分子, 如 DNA, 如果它包括包含关于转录和 / 或翻译调节的信息的序列元件, 并且这样的序列“可操作地连接”编码多肽的核苷酸序列的话, 其被称为“能够表达核酸分子”或能够“允许核苷酸序列的表达”。可操作的连接是这样的连接: 在所述连接中, 调节序列元件和要表达的序列以使基因能够表达的方式相连接。基因表达需要的调控区域的确切性质可能在种类间变化, 但一般来说这些区域包括启动子, 在原核生物中, 所述启动子既包含启动子本身(即指导转录启动的 DNA 元件), 又包括当转录成 RNA 时发出翻译启动信号的 DNA 元件。这种启动子区域通常包括参与转录和翻译启动的 5' 非编码序列, 如 -35/-10 盒以及原核生物中的 Shine-Dalgarno 元件或 TATA 盒、CAAT 序列和真核生物中的 5' - 加帽元件。这些区域还可以包括增强子或阻遏元件以及翻译信号和用于将天然多肽靶向宿主细胞特定隔室的前导序列。

[0134] 此外, 3' 非编码序列可以包含参与转录终止、聚腺苷酸化等的调节元件。然而, 如果这些终止序列在特定的宿主细胞内没有令人满意的功能, 那么它们可能被该细胞中有功能的信号替换。

[0135] 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, 例如, tet 启动子, lacUV5 启动子或 T7 启动子。可用于在真核细胞中表达的启动子的实例有 SV40 启动子或

CMV 启动子。

[0136] 本发明的核酸分子也可以是载体的一部分或任何其它类型的克隆载体,如质粒、噬菌粒、噬菌体、杆状病毒、粘粒或人工染色体。

[0137] 在一个实施方式中,核酸分子被包含于噬菌粒中。噬菌粒载体代表编码温和噬菌体如 M13 或 f1 的基因间区域的载体,或者融合至目标 cDNA 的其功能部分。在用这种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后,生成完整的噬菌体粒子,从而使编码的异源 cDNA 物理耦合至显示在噬菌体表面上的其相应多肽(例如,参见 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)。

[0138] 除了上述调节序列和编码本发明脂质运载蛋白突变蛋白的核酸序列外,这种克隆载体可以包括源自与用于表达的宿主细胞相容的种类的复制和控制序列以及赋予被转化或被转染细胞可选择表型的选择标记物。大量的合适克隆载体是本领域已知的,且可商业购买。

[0139] 编码本发明脂质运载蛋白突变蛋白的 DNA 分子,特别是包含这种脂质运载蛋白突变蛋白编码序列的克隆载体,可以被转化到能够表达所述基因的宿主细胞中。转化可以使用标准的技术进行。因此,本发明也涉及包含本文公开的核酸分子的宿主细胞。

[0140] 在适合于编码本发明融合蛋白的核苷酸序列的条件下培养被转化的宿主细胞。合适的宿主细胞可以是原核的,如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌,或真核的,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)或原代哺乳动物细胞。

[0141] 本发明还涉及一种用于产生本发明突变蛋白的方法,其中该突变蛋白、突变蛋白的片段或突变蛋白与另一个多肽的融合蛋白通过基因工程方法的方式从编码所述突变蛋白的核酸开始而产生。该方法可在体内进行,例如突变蛋白可以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。也可以在体外产生蛋白质,例如通过使用体外翻译系统。

[0142] 当在体内产生突变蛋白时,编码本发明突变蛋白的核酸通过重组 DNA 技术引入合适的细菌和真核宿主生物体(如已经在上文列出的)。为了这个目的,首先用包括编码本发明突变蛋白的核酸分子的克隆载体以已建立的标准方法转化宿主细胞。宿主细胞然后在允许外源 DNA 表达然后合成相应多肽的条件下培养。随后,从细胞或从培养基中回收所述多肽。

[0143] 在本发明的一些泪脂质运载蛋白突变蛋白中,Cys 61 和 Cys 153 之间天然存在的二硫键被去除。因此,这种突变蛋白(或任何其它的不包括分子内二硫键的泪脂质运载蛋白突变蛋白)可以在氧化还原环境降低的细胞隔室中产生,所述细胞隔室例如革兰氏阴性细菌的细胞质。在本发明的脂质运载蛋白突变蛋白包括分子内二硫键的情况下,可能希望用适当的信号序列将原初多肽导向到具有氧化还原环境的细胞隔间。这种氧化环境可以由革兰氏阴性细菌如大肠杆菌的周质提供,在革兰氏阳性细菌的细胞外环境中或在真核细胞内质网的内腔中,并且通常有利于结构性二硫键的形成。然而,也可以在宿主细胞如大肠杆菌的胞溶胶中产生本发明的突变蛋白。在这种情况下,所述多肽可以以可溶性和折叠状态中直接获得或以包涵体的形式回收,然后在体外复性。其它选择是使用具有氧化的细胞

内环境的特定宿主菌株,其可以因此允许在胞溶胶中形成二硫键(Venturi M 等人 (2002) J. Mol. Biol. 315, 1-8)。

[0144] 然而,本发明的突变蛋白不一定仅通过使用基因工程生成或产生。相反,脂质运载蛋白突变蛋白也可以通过化学合成如梅利菲尔德固相多肽合成或通过体内转录和翻译获得。例如可行的是,有希望的突变是使用分子建模鉴定的,然后在体外合成想要的(设计的)多肽并且检测对给定靶标的结合亲和力。用于固相的方法和/或蛋白质液相合成是本领域熟知的(例如,参见 Bruckdorfer, T. 等人 (2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43)。

[0145] 在另一个实施方式中,本发明的突变蛋白可以通过采用本领域技术人员已知的已建立方法的体外转录/翻译产生。

[0146] 本发明还涉及到一种药物组合物,其包括至少一种本发明的人泪脂质运载蛋白突变蛋白或其融合蛋白或缀合物以及药学上可接受的赋形剂。

[0147] 可以经由对蛋白质性药物治疗上有效的肠胃外或非肠胃外(肠)途径施用根据本发明的脂质运载蛋白突变蛋白。以含有常规非毒性的药学上可接受的赋形剂或载体、如期望的添加剂和溶媒的制剂全身或局部地施用本发明的突变蛋白。

[0148] 在本发明的一个实施方式中,将药物非肠道施用给哺乳动物,尤其是人。药物组合物可以是水性溶液、水包油的乳液或油包水的乳液。

[0149] 在此方面,应注意如 Meidan VM 和 Michniak BB (2004) Am. J. Ther. 11, 4, 312-316 中描述的经皮递送技术,例如离子渗透、超声渗透或微针促进递送,也可用于经皮递送本文描述的突变蛋白。可以在含有多种常规非毒性的药学上可接受的赋形剂或载体、添加剂和溶媒的制剂中全身或局部地递送本发明的突变蛋白。

[0150] 施用的突变蛋白的剂量可在宽泛的限值内变化,以实现期望的预防作用或治疗反应。这将取决于例如化合物对所选配体的亲和力以及突变蛋白和配体之间的复合物的体内半衰期。此外,理想的剂量将取决于突变蛋白或其融合蛋白或其缀合物的生物学分布、施用模式、要治疗疾病/障碍的严重性以及患者的医疗状况。例如,当用于局部施用的膏剂时,可以使用高浓度的泪脂质运载蛋白突变蛋白。然而,如果需要,还可以在持续释放制剂中提供所述突变蛋白,所述持续释放制剂例如脂质体分散体或水凝胶基聚合物微球,如 PolyActive™或 OctoDEX™ (参见 Bos 等人, Business Briefing: Pharmatech 2003:1-6)。可得的其它持续释放制剂例如 PLGA 基聚合物 (PR pharmaceuticals)、PLA-PEG 基水凝胶 (Medincell) 和 PEA 基聚合物 (Medivas)。

[0151] 因此,本发明的突变蛋白可以使用药学上可接受的成分以及已建立的制备方法配制成组合物。所述药物组合物还可含有添加剂,例如填料、粘合剂、润湿剂、助流剂、稳定剂、防腐剂、乳化剂以及其它溶剂或助溶剂或用于获得持久药效的制剂。后者,融合蛋白可以并入慢的或缓释或靶向递送系统,如脂质体和微囊。

[0152] 可以通过多种方式对所述制剂进行灭菌,所述方式包括通过细菌阻留滤器的过滤或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂,所述无菌固体组合物可以在临使用之前溶解或分散于无菌水或其它无菌介质中。

[0153] 可以将本文描述的脂质运载蛋白突变蛋白施用给生物体,包括人患者本身,或在药学组合物中,后者可以包括或混有药学活性成分或适合的载体或赋形剂。各脂质运载蛋白突变蛋白组合物的制剂和施用技术类似于或同于本领域已建立的低分子量化合物的那

些技术。示范性途径包括、但不限于,口服、经皮和肠胃外递送。

[0154] 包括本发明脂质运载蛋白突变蛋白的组合物可以,例如应用到皮肤或敷在伤口上。在一些实施方式中,可以局部而不是全身的方式施用脂质运载蛋白突变蛋白或各自的组合物,例如,通过注射。

[0155] 包括本发明脂质运载蛋白突变蛋白的药学组合物可以本身已知的方式制造,例如,通过常规混合、溶解、造粒、糖衣制造、研磨、乳化、封装、固定或冻干过程的手段。根据本发明使用的药学组合物因此可以常规手段使用一种或多种生理上可接受的载体(包括有助于将水凝胶和 / 或肽 / 类肽处理成可作为药物使用的制剂的赋形剂和助剂)制备。适当的制剂取决于选择的给药途径。

[0156] 对于注射,脂质运载蛋白突变蛋白或各自的组合物可以在水性溶液中配制,例如在生理上相容的缓冲液中,例如汉克斯溶液、林格式溶液或生理盐水缓冲液。对于透粘膜给药,适合要渗透的障碍的渗透液用于制剂。这种渗透液是本领域常规已知的。

[0157] 对于口服给药,脂质运载蛋白突变蛋白或各自的组合物可以通过将它们与本领域熟知的药学上可接受的载体组合而容易地制得。这种载体使脂质运载蛋白突变蛋白或各自的组合物以及药学活性化合物(如果存在的话)能够配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等等,以使要治疗的患者口服摄入。口服使用的药物制剂可以通过添加固体赋形剂、任选地研磨得到的混合物、和处理颗粒的混合物(在添加适合的助剂后,如果需要的话)获得,以获得片剂或糖衣丸核。合适的赋形剂,特别是,填料如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇、或山梨糖醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、和 / 或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,可以添加崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、或海藻酸或其盐,如海藻酸钠等。

[0158] 给糖衣丸核提供合适的包衣。为此,可以使用浓缩糖溶液,它可以可选地包含阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、羧乙烯聚合物凝胶、聚乙二醇和 / 或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。染料或色素可以添加至片剂或糖衣丸包衣中,以识别或表示不同的活性复合剂组合。

[0159] 可以口服使用的药物制剂包括由明胶制成的推入配合胶囊以及由明胶和增塑剂制成的软、密封的胶囊,所述增塑剂如甘油或山梨糖醇。所述推入配合胶囊可以包含活性成分,所述活性成分混合填料如乳糖、粘结剂如淀粉、和 / 或润滑剂如滑石或硬脂酸镁,和任选的稳定剂。在软胶囊中,肽 / 类肽可以悬浮在合适的液体中,如脂肪油、液体石蜡、或液体聚乙二醇。此外,可以添加稳定剂。所有口服给药制剂应当有适合这种给药的剂量。

[0160] 脂质运载蛋白突变蛋白可以制成用于通过注射的肠胃外给药,例如,通过肌肉内注射或快速浓注或连续输注。注射制剂可以呈现在单位剂型中,例如,在安瓿中或多剂量容器中,其中具有添加的防腐剂。各自的组合物可以采用如悬浮液、溶液或者油性或水性溶媒中的乳剂的形式,并且可以包含配制试剂,如悬浮的、稳定的和 / 或分散的制剂。

[0161] 有此治疗需要的受试者可以是哺乳动物,如人、狗、小鼠、大鼠、猪、猿例如 cymologous, 仅列举了一些示范性例子。本发明的突变蛋白可以用于治疗涉及 I1-4 受体  $\alpha$  的任何疾病或障碍,所述 I1-4 受体  $\alpha$  在这种疾病或障碍的发展中可以显示到本发明核酸文库的表达产物或显示到另外获得的泪脂质运载蛋白突变蛋白。

[0162] 在本文中指出,多种肿瘤细胞比正常细胞表达多得高亲和力 IL-4 受体。这种细胞包括人类实体肿瘤,如黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、肾细胞癌、头部和颈部癌、艾滋病相关卡波济氏肉瘤=AIDS KS、激素依赖和独立的前列腺癌细胞、以及前列腺肿瘤的原代培养物(例如参见 Garland, L 等人 (2005) *Journal of Immunotherapy* 28, 4, 376-381, Rand, RW 等人 *Clinical Cancer Research*. (2000)6, 2157-2165 ;Husain SR 等人 (1999)*Nature Medicine* 5, 817-822 ;Puri RK 等人 *CancerResearch*(1996)56, 5631-5637 ;Debinski W 等人或 Husain SR 等人 .*CancerResearch*(1998)58, 3649-3653, Kawakami K 等人 (2000)*Cancer Research*, 60, 2981-2987 ;或 Strome SE 等人 .*Clinical Cancer Research*(2002)8, 281-286。记载 IL-4 受体超表达的细胞具体实例包括、但不限于, Burkitt 淋巴瘤细胞系 Jijoye (B 细胞淋巴瘤)、前列腺癌(LNCAp、DU145)、头部和颈部癌(SCC、KCCT873)、胰腺癌(PANC-1 细胞系)、SCC-25:13000 (+/-500)h 头部和颈部癌症细胞系(ATCC)。IL4 受体  $\alpha$  链在 IL4 内化中起着重要作用。因此,当融合或缀合到毒素时,结合 IL-4 受体  $\alpha$  链的泪脂质运载蛋白突变蛋白因此还可以用于治疗肿瘤(癌症)。合适的毒素的实例包括假单胞菌外毒素、百日咳毒素、白喉毒素、蓖麻毒素、皂草素、假单胞菌外毒素、卡里奇霉素或其衍生物、紫杉烷、美登素、tubulysin 和尾海兔素类似物。尾海兔素类似物的实例包括、但不限于, auristatin E、monomethylauristatin E、auristatin PYE 和 auristatin PHE。

[0163] 对于治疗癌症而言,也可以将结合 IL-4 受体  $\alpha$  链的突变蛋白缀合至细胞抑制剂。这种细胞抑制剂的实例包括顺铂、卡铂、奥沙利铂、五氟尿嘧啶、泰索帝(紫杉醇)、紫杉醇、葱环霉素(阿霉素)、甲氨蝶呤、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、达卡巴嗪、环磷酰胺、依托泊苷、阿霉素、Camptotecine、Combretastatin A-4 相关化合物、磺酰胺类、噁二唑啉类、苯并 [b] 噻吩合成螺缩酮吡喃、单四氢吡喃化合物、curacin 和 curacin 衍生物、甲氧雌二醇衍生物和亚叶酸。

[0164] 从上面的公开内容显而易见地,本发明的突变蛋白或融合蛋白或其缀合物可以在许多应用中使用。一般来说,这种突变蛋白可以用于所有用到抗体的应用中,除了特定地依赖 Fc 部分的糖基化的那些。

[0165] 因此,在本发明的另一方面,发明的人泪脂质运载蛋白突变蛋白用于检测人泪脂质运载蛋白的给定非天然配体。这种用途可以包括以下步骤:在合适条件下,使所述突变蛋白与疑似含有给定配体的样品接触,以及通过合适的信号检测络合的突变蛋白。

[0166] 可检测信号可以通过标记引起,正如前面所解释的,或由于结合本身(即络合物形成)而导致物理特性的改变。一个实例是表面等离子体共振,其值在结合配偶体的结合期间改变,结合配偶体中的一个被固定在表面比如金箔上。

[0167] 本文公开的人泪脂质运载蛋白突变蛋白也可以用于分离人泪脂质运载蛋白的给定非天然配体。这种用途可以包括以下步骤:在合适条件下,使所述突变蛋白与推测含有所述配体的样品接触,从而允许在突变蛋白和给定配体之间形成络合物,以及从样品中分离突变蛋白/配体络合物。

[0168] 在突变蛋白检测给定非天然配体以及分离给定配体的这两种用途中,突变蛋白和/或靶标可以固定在合适的固相上。

[0169] 本发明的人泪脂质运载蛋白突变蛋白还可以用于将化合物靶向至预选位点。对于

这样的目的,使突变蛋白和目标化合物接触,以允许络合物形成。然后包括所述突变蛋白和目标化合物的络合物被递送到预选位点。这种用途尤其适合、但不限于,将药物(选择性地)递送到生物体内的预选位点,例如认为要用所述药物治疗的被感染的身体部位、组织或器官。除了在突变蛋白和目标化合物之间形成络合物之外,所述突变蛋白还可以和给定的化合物反应,从而产生突变蛋白和化合物的缀合物。类似于上面的络合物,这种缀合物可以适合于将化合物递送到预选靶标位点。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,这种连接物在血流中是稳定的,但在细胞环境中是可切割的。

[0170] 本文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在许多领域。除了它们结合至支持物的用途(允许给定突变蛋白或缀合物的靶标或者这种靶标的融合蛋白固定或分离)外,突变蛋白可以和酶、抗体、放射性物质或具有生化活性或确定的结合特性的任何其它基团一起用于标记。通过这样做,它们各自的靶标或其缀合物或融合蛋白可以被检测出或与它们接触。例如,本发明的突变蛋白可以通过已建立的分析方法(如 ELISA 或蛋白质印迹)或者通过显微镜或免疫感知(immunosensorics)用来检测化学结构。在这里,检测信号可以通过使用合适的突变蛋白缀合物或融合蛋白直接生成或通过免疫化学检测经由抗体的结合突变蛋白间接地生成。

[0171] 本发明突变蛋白的众多可能的应用也存在于医药中。除了它们在诊断和药物递送中的用途,可以生成本发明的结合例如组织或肿瘤特异性表面分子的突变多肽。这种突变蛋白可以,例如,以缀合形式使用或用作用于“肿瘤成像”的融合蛋白或直接用于癌症治疗。因此,本发明提供了一种包含发明突变蛋白的诊断组合物和诊断用手段,例如赋形剂、缓冲液、标记(可以用于标记突变蛋白)。

[0172] 因此,本发明还涉及本发明的人泪脂质运载蛋白突变蛋白与给定非天然配体形成络合物的用途。

[0173] 本文描述的突变蛋白的另一个相关用途是靶标确认,即,分析假定涉及于疾病或障碍发展或过程中的多肽是否某种程度上实际诱发了这种疾病或障碍。这用于验证蛋白作为药理学药物靶标的用途利用了本发明的突变蛋白特异地识别天然构象蛋白质的表面区域的能力,例如结合至天然表位。在这方面,应注意,这种能力仅对于有限数量的重组抗体进行了报道。然而,发明的突变蛋白用于药物靶标的确认的用途不局限于作为靶标的蛋白质的检测,也包括蛋白质结构域、肽、核酸分子、有机分子或金属络合物的检测。

#### [0174] 本发明的示例性实施方式

[0175] 图 1 示出了前面公开的展示了对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白突变蛋白(S191.4-B24)的一级结构。前 21 个残基(带下划线的)构成信号序列,它在周质表达后被切割。N 端 T7- 标签(斜体)和 C 端 Streptag-II (粗体)是所表征蛋白的一部分。图 1 还示出了在该突变蛋白中缺失野生型泪脂质运载蛋白的 4 个 N 端氨基酸残基(His1 His2 Leu3 Ala4) 以及最后两个 C 端氨基酸残基(Ser157 和 Asp158)。

[0176] 图 2 示出了对 IL-4 受体  $\alpha$  (SEQ ID No:2-11) 有高亲和力的示例性突变蛋白的多肽序列。通过 ‘SwissProt P3 1025’ 表明的数字示出了 SwissProt 数据库条目的未加工前体序列的相应氨基酸位置编号。野生型 TLc26 实质上对应于载体 pTLc2 中的野生型泪脂质运载蛋白序列。然而,野生型 TLc26 不包括二硫键,因为成熟蛋白质位置 61 和 153 处的

半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代。同样,成熟蛋白质位置 101 处的丝氨酸残基被丝氨酸残基替代。此外,在成熟蛋白质位置 111 处,精氨酸残基被脯氨酸替代,以及在成熟蛋白质位置 114 处,赖氨酸残基被色氨酸替代。此外,包括在 SwissProt 条目 P31025 序列中的两个 C 端氨基酸不包括于序列中。AB4004 是在国际专利申请 W02008/015239 中公开的随机文库,其中所述突变位置用粗体表明。除了位置 53 和 55 外,随机化序列和 J14 相同。M3-B24 (PSM) 表示来自 PSM B24 的热点。

[0177] 图 3 示出了 TF-1 细胞增殖试验的结果。TF-1 细胞与系列稀释的所指示本发明突变蛋白(S276.2 K04、S308.5 F08、S308.5 N01、S308.5 L20、S308.5 L04、S308.5 N20、S308.3 010、S191.4 B24[SEQ ID No:2-11]) 在 37°C 下孵育 1 小时,然后添加 0.8ng/ml IL-4 (A) 或 12ng/ml IL-13 (B) 孵育 72h。用 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷酸掺入量测量增殖。

[0178] 图 4 描述了来自图 3 的 IC<sub>50</sub> 值和对 IL-4 受体 α 有亲和力的人泪脂质运载蛋白突变蛋白的 Biacore 测量结果。大约 400RU 的 IL-4 受体 α-Fc 被捕获到预先涂有抗人 Fc 单克隆抗体的 CM-5 芯片上。随后,25nM 单一浓度的突变蛋白穿过流动室,然后记录共振单位的变化。减去来自除了没有任何 IL-4 受体 α-Fc 外相同处理的流动室的基准信号,得到的数据使用 BIAevaluation 软件拟合成 1:1 的朗缪尔模型。由于缓慢离解,通过减去来自除了没有任何 IL-4 受体 α-Fc 外相同处理的流动室的信号,以及减去来自仅注射样品缓冲液的实验的信号,使用双引用的动力学。得到的数据使用 BIAevaluation 软件拟合成具有质量运输限制的 1:1 朗缪尔模型。

[0179] 除非另有说明,使用重组基因技术领域的已建立方法。

## 实施例

[0180] 实施例 1:使用定点随机方法的突变蛋白 S191.4-B24 的亲和力成熟

[0181] 通过位置 26、32、34、55、56、58 和 63 的随机化以允许在这些位置上的所有 20 个氨基酸,设计基于描述于 PCT 申请 W0 2008/015239 中的突变蛋白 S191.4-B24(SEQ ID NO:2) 的变体文库。文库的构建基本上如 W02008/015239 的实施例 1 所描述。

[0182] 噬菌粒的筛选如 W02008/015239 的实施例 2 中所描述进行,与抗 IL-4 受体 α 的竞争性单克隆抗体(MAB230, R&D 系统;1 小时洗涤)一起,各自地使用有限的靶标浓度(0.5nM 和 0.1nM 的 IL-4 受体 α, Peprotech) 联合有延长的洗涤时间,或短的孵育时间(10 分钟)。进行三或四轮筛选。

[0183] 进行 IL-4 受体 α 特异性突变蛋白的制备生产,使用了大肠杆菌 K12 菌株 JM83,其携带在表达载体 pTLPC10 (SEQ ID No:1) 上编码的相应突变蛋白,或者在需要更大量蛋白质的情况下,使用大肠杆菌菌株 W3110,其携带如 W02008/015239 中描述的相应表达载体。

[0184] 实施例 2:使用 Biacore 测定亲和力

[0185] 基本上如 W02006/56464 的实施例 9 中所描述进行亲和力测量,修改之处在于,固定大约 400RU 的 IL-4 受体 α-Fc(R&D Systems)(代替 W02006/56464 中用作靶标的 2000RU 人 CTLA-4 或鼠 CTLA-4-Fc),注射 100 μl 浓度为 25nM 的突变蛋白(代替用于 W02006/56464 中的 40 μl 浓度为 5-0.3 μM 的样品纯化脂质运载蛋白突变蛋白)。

[0186] 实施例 3:TF-1 细胞增殖试验

[0187] 基本上如 Lefort 等人(Lefort S. 等人 (1995) FEBS Lett. 366, 2-3, 122-126) 和

在 PCT 申请 WO 2008/015239 的实施例 10 中描述进行 IL-4 和 IL-13 刺激的 TF-1 细胞增殖试验。TF-1 细胞与系列稀释的所指示本发明突变蛋白(S276.2K04、S308.5 F08、S308.5 N01、S308.5 L20、S308.5 L04、S308.5 N20、S308.3010、S191.4 B24[SEQ ID No:3-11]) 在 37°C 下孵育 1 小时,然后添加 0.8ng/ml IL-4 (a)或 12ng/ml IL-13 (b)孵育 72h。用 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷酸掺入量测量增殖。来自 TF-1 增殖试验的结果在图中描述,并且示出了高亲和力和变体 S276.2 K04、S308.5 F08、S308.5 N01、S308.5 L20、S308.5 L04、S308.5 N20、和 S308.3010 是 IL-4 以及 IL-13 的诱发信号传导和扩散的强拮抗剂。

[0188] 本领域技术人员将会易于理解本发明能很好的适于进行主题并且获得提及的结果和优势,以及其中固有的那些。此外,可以对本文公开的发明进行不同的替换和修改,而不背离本发明的范围和精神,这对于本领域技术人员来说是显而易见的。本文所描述的组合物、方法、过程、处理、分子和具体化合物是目前示例性的某些实施方式中具有代表性的,并且不意图作为对本发明范围的限制。其中包含在本发明精神内发生于本领域技术人员的变化和其它用途,由权利要求的范围限定。在本说明书中先前出版的文件的列表或讨论不应一定理解为认可所述文件是本领域状态的一部分或者是公知常识。

[0189] 本文示例性描述的发明可以在任何未在本文具体公开的元素、限制不存在的情况下适当地进行实施。因此,例如术语“包含”、“包括”、“含有”等应该广泛理解而无限制。并且,本文采用的术语和表达方式用作描述的而非限制的术语,并且无意使用排除所示和所描述特征的任何等同方式或其部分的术语和表达方式,但是应理解,在本发明要求保护的范围内,多种修改方式是可行的。因此,应该理解,尽管本发明已经通过示例性实施方式和任选特征予以具体公开,但是本领域技术人员可以寻求本文在此公开的发明修改方式和改变,并且认为此类修改方式和改变在本发明的范围内。

[0190] 本文已经广泛和通用地描述了本发明。落在通用公开内容之内的每个较窄种类和亚类集合也形成本发明的一部分。这包括具有从该通类去除任何主题的先决或负面限制的本发明的通用描述,无论该排除的物质是否在本文具体描述。

[0191] 其它的实施方式在以下的权利要求范围内。并且,在本发明的特征或方面以马库什基团的方式进行描述的情况下,本领域技术人员将认识到,本发明还由此以任何单独的成员或马库什基团成员的子集进行了描述。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 皮里斯股份公司

<120> 结合 IL-4 受体  $\alpha$  的泪脂质运载蛋白突变蛋白

&lt;130&gt; ELC12310016P

&lt;150&gt; US 61/352 461

&lt;151&gt; 2010-06-08

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3700

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 表达载体 pTLPC10

&lt;400&gt; 1

```

ccatcgaatg gccagatgat taattectaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt    60
tattttacca ciccctatca gtgatagaga aaagtgaat gaatagtteg acaaaaaatct    120
agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgcga ttgcagtggc actggctggt    180
ttcgctaccg tagcgcagge egaecgatcg atgaccggtg gtcagcagat gggtgccctca    240
gaagaggaga ttcaggatgt gtragggacg tggtatctga aggccatgac ggtggacagg    300
gagttccctg agatgaatct ggaatcgggtg acacceatga cctcaccgac cctggaaggg    360
ggcaacctgg aagccaaggt caccatgctg ataagtggcc ggagccagga ggtgaaggcc    420
gtcctggaga aaactgacga gcgggaaaaa tacaaggccg acgggggcaa gcacgtggca    480
tacatcatca ggtcgcacgt gaaggaccac tacatctttt actctgaggg cgagctccac    540

```

[0002]

gggaagccgg tcccaggggt gtggctcgtg ggcagagacc ccaagaaaca cctggaagcc 600  
 ttgaggact ttgagaaage cgcaggagcc cgcggactca gcacggagag cactctcacc 660  
 cccaggeaga gcgaaaccag ctctccaggg agcgtttggt ctacccgca gttegaaaaa 720  
 taataagctt gacctgigaa gtgaaaaatg gcgcacattg tgcgacattt tttttgtctg 780  
 ccgtttaccg ctactgcgtc accgatctcc accgcctctg tagcggcgca ttaagcgcgg 840  
 cgggtgtggt ggtaacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcctca gcgccctc 900  
 ctctcctttt ctccctctcc ttctctgcca cgttcgcggg ctctccctct caagctctaa 960  
 atcgggggct ccctttaggg ttccgatitc gtgctttacc gcacctcgac cccaaaaaac 1020  
 ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc cactgcctct atagacgggt ttctgccttt 1080  
 tgacgttga gtcacgttc ttaaatagt gactcttgtt ccaaaactga acaaacctca 1140  
 accctatctc ggtctattct ttgatttat aagggatitc gcgatttcg gctatttgg 1200  
 taaaaaatga gctgatttaa caaaaattc accgcgaatt taacaaaata ttaacgctta 1260  
 caatttcagg tggcactttt cgggaaatg tgcgcggaac cctatttct tttttttct 1320  
 aaatacctc aaatatgtat ccgtctatg gacaataacc ctgataaatg ctcaataat 1380  
 attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt ccttttttg 1440  
 cggcattttg ccttctggt ttgtctacc cagaaacgt ggtgaaagta aaagatgctg 1500  
 aagatcagtt ggggtcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggttaagatc 1560  
 ttgagagttt tcgcccagaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaa gttctctat 1620  
 gtgcgctgtt attatccgt attgacgctg ggcaagagca actcggctgc cgcatacact 1680  
 attctcagaa tgacttgggt gactactcac cagtcacaga aaagcattt accgatgca 1740  
 tgacagtaag agaattatgc agtctgcca taacctagag tgataaacct gggccaact 1800  
 tacttctgae aacgatcgga ggaccgaagg agctaacgc tttttgcaac aacatggggg 1860

[0003]

atcatgtaac tcgectigat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg	1920
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaaacta ttaactggcg	1980
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat tgatagactg gatggaggcg gataaagtig	2040
caggaccaact tctgcgctcg gcccttcggg ctggetgggt tattgotgat aaatctggag	2100
coggtgagcg tggetctcgc ggtatcattg cagcaactgg gccagatggt aagcctctcc	2160
gtatcgtagt tatctaacg accggggagtc aggcaactat ggaigaacga aatagacaga	2220
tgcctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtagga attaatgatg tctcgtttag	2280
ataaaagtaa agtgattaac agcgcattag agctgcttaa tgaggtcggg atcgaaggtt	2340
taacaaccgg taaactcgcc cagaagctag ggttagagca gccacattg tattggcatg	2400
taaaaaataa gcgggctttg ctgcacgct tagccattga gatgtagat aggcaccata	2460
ctcacttttg cccttagaa ggggaaagct ggcaagattt tttacgtaat aacgctaaaa	2520
gttttagatg tgcttacta agtcatcggg atggagcaaa agtacattta ggtacacgce	2580
ctacagaaaa acagtatgaa acctctgaaa atcaattagc ctttttatgc caacaaggtt	2640
tttactaga gaatgcatta tatgcactca gcgcagtggg gcattttact ttaggttgcg	2700
tattggaaga tcaagagcat caagtcgcta aagaagaaag ggaaacacct actactgata	2760
gtatgcgccc attattacga caagctatcg aattatttga tcaaccaaggt gcagagcag	2820
ccttcctatt cggectigaa ttgatcatat gcggattaga aaaacaactt aaatgtgaaa	2880
glgggtctta aaagcagcat aaccttttcc cgtgatggta acttacttag tttaaaagga	2940
tctaggtgaa gatccctttt galaatctca tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt	3000
tcactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttcc	3060
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgttgc	3120
cggatcaaga gctacraact ctttttccga aggtaactgg ctfcagcaga gcgcagatac	3180

[0004]

caaatactgt ccttctagtg tagcctagtg taggccacca ctteaagaac tctgtagcac 3240  
 cgcctacata cctcgcctctg ctaatcctgt taccagtgge tgctgccagt ggcgataagt 3300  
 ogtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcagc cggtegggt 3360  
 gaacgggggg ttctgcaaca cagccagct tggagcgaac gacctacac gaaetgagat 3420  
 acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgettcacca agggagaaaag gcggacaggt 3480  
 atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg 3540  
 cctggtalet ttatagtcct gtcgggttcc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt 3600  
 gatgctcttc aggggggagg agcctatgga aaaacgcccag caacgcggcc tttttacgt 3660  
 tctggcctt ttctggcct tttgctcaca tgaccgaca 3700

<210> 2

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S191.4-B24

<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 Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Ser Ser Val  
                   20                    25                    30

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

Phe Thr Ala Gln Arg Ser Gly Arg Trp Gln Glu Tyr Lys Leu Val Leu

[0005]



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

Leu Thr Leu Gln Arg Lys Gly Arg Trp Gln Glu Met Lys Asp Val Leu  
 50 55 60

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

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

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln 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 Ser Ala  
 145 150

<210> 4

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S276.2-K04

<400> 4

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

[0007]



&lt;220&gt;

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S308.5-K12

&lt;400&gt; 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 Leu Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Trp Ser Val

20 25 30

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

35 40 45

Phe Thr Ala Leu Arg Ile Gly Arg Trp Gln Ser Tyr Lys Leu Val Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln 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 Ser Ala

145 150

[0009]



130

135

140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala

145

150

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 154

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S308.5-L4

&lt;400&gt; 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 Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Val Ser Val

20

25

30

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

35

40

45

Phe Thr Ala Ala Arg Ile Gly Arg Trp Gln Ser Tyr Lys Leu Val Leu

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100

105

110

[0011]

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 Ser Ala  
 145 150

<210> 8

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S308.5-L20

<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 Asn Arg Cys Pro Arg Ala Lys Tyr Asp Ser Val  
 20 25 30

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

Phe Thr Ala His Arg Arg Gly Arg Trp Gln Gln Tyr Lys Leu Val Leu  
 50 55 60

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

[0012]

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

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln 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 Ser Ala  
145 150

<210> 9

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S308.5-N1

<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 Tyr Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr His Ser Val  
20 25 30

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

Phe Thr Ala His Arg Ala Gly Arg Trp Gln Lys Tyr Lys Leu Val Leu  
50 55 60

[0013]

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

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

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln 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 Ser Ala  
145 150

<210> 10

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S308.3-010

<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 Lys Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Arg Ser Val  
20 25 30

[0014]

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

Phe Thr Ala Lys Arg Asn Gly Arg Trp Gln Pro Tyr Lys Leu Val Leu  
 50 55 60

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

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

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln 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 Ser Ala  
 145 150

<210> 11

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S308.5-N20

<400> 11

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

[0015]

Ala Met Thr Val Asp Glu Arg Cys Pro Arg Ala His Tyr Gly Ser Val  
 20 25 30

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

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

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

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

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln 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 Ser Ala  
 145 150

<210> 12

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

[0016]

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S276. 2-K04 的核苷酸序列

<400> 12

```
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagge catgacggtg      60
gaccccgct gcccggggc gtactacage tcggtagaac ccatgacct caccacctg      120
gaagggggca acctggaage caagttcacc gctcagcggg eggccggtg gcagaagtac      180
aagttgttcc tggagaaaac tgatgagcgg ggaanaataa ctgcctcgg ggcaggcac      240
gtagcaatac tcatcaggtc gcacgtgaag gaccactaca tctttcactc tgagggcctg      300
tgccccgggc agccggctcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggaatttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcacc      420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                     456
```

<210> 13

<211> 459

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S308. 5-F08 的核苷酸序列

<400> 13

```
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagge catgacggtg      60
gacagtcgct gcccggggc gggtacaat tcggtagaac ccatgacct caccacctg      120
gaagggggca acctggaage caagttcacc gctcagcggg agggccggtg gcagaagtac      180
aagttgttcc tggagaaaac tgatgagcgg ggaanaataa ctgcctcgg ggcaggcac      240
gtggcaatac tcatcaggtc gcacgtgaag gaccactaca tctttcactc tgagggcctg      300
tgccccgggc agccggctcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg      360
```

[0017]

gaagccttgg aggacttfga gaaagccgca ggagcccgeg gactcagcac ggagagcate 420

ctcaticceca ggcagagega aaccagctct ccagggagc 459

<210> 14

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S308.5-L4 的核苷酸序列

<400> 14

gctcagacg aggagattca ggatgtgtea gggacgtggt atctgaaggc catgaeggtg 60

gactcgcgct gcccgcgggc gtattacgtg teggtgacac ccatgacct cagcacctg 120

gaagggggca acctggaage caagttcacc gggcgcgga ttggccggtg gcagagttac 180

aagttggtec tggagaaaac tgatgagcgg gaaaataca ctgectcgg gggcaggcac 240

gtggcataca ttatcaggtc gcacgtgaag gaccactaca tcttctactc tgagggectg 300

tgccccgggc agccggtccc aggggtgtgg ctogtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggacttfga gaaagccgca ggagcccgeg gactcagcac ggagagcate 420

ctcaticceca ggcagagega aaccagctct ccagggagc 456

<210> 15

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S308.5-L20 的核苷酸序列

[0018]

<400> 15

```

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagge catgacggtg      60
gacaatcgct gccccggggc gaagtacgat tegtgtacac ccatgacct caccaccctg      120

gaagggggca acctggaage caagttcacc gcgcatcggc ggggcgggtg gcagcagtac      180

aagtgggtcc tggagaaaac tgatgagccg ggaaaataca ctgcctccgg gggcaggcac      240

gtggcataca tcaccaggtc gcacgtgaag gaccactaca tctttcactc tgaggccctg      300

tgccccgggc agccggctcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccctaa gaacaacctg      360

gaagccttgg aggacttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcacc      420

ctcaccctca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                     456

```

<210> 16

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 对IL-4受体 $\alpha$ 有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白S308.5-N1的核苷酸序列

<400> 16

```

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagge catgacggtg      60
gactatcgct gccccggggc gtattaccat tegtgtacac ccatgacct caccaccctg      120

gaagggggca acctggaage caagttcacc gctcaccggg ctggccgggtg gcagaagtac      180

aagtgggtcc tggagaaaac tgatgagccg ggaaaataca ctgcctccgg gggcaggcac      240

gtggcataca tcaccaggtc gcacgtgaag gaccactaca tctttcactc tgaggccctg      300

tgccccgggc agccggctcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccctaa gaacaacctg      360

gaagccttgg aggacttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcacc      420

ctcaccctca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                     456

```

[0019]

<210> 17

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4 受体  $\alpha$  有结合亲和力的人泪脂质运载蛋白的突变蛋白 S308.5-N20 的核苷酸序列

<400> 17

gectcagacg aggagattca ggatgigtca gggacgtggt atctgaagge catgacggtg 60

gacgagcgct gcccgcgggc gcattacggg tgggtgacac ccatgacct caccacctg 120

gaagggggca acctggaagc caagttcacc gctatgcggt tgggccggtg gcagaagtac 180

aagttggtcc tggagaaaac tgatgagccg ggaaaataca ctgcctcgg gggcaggcac 240

gtggcataca tcateaggtc gcacgtgaag gaccactaca tctttcactc tgagggcctg 300

tgccecgggc agccggctcc aggggigtgg ctctgtggga gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggacttga gaaagccga ggagcccgg gactcagcac ggagagcacc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 18

<211> 825

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人 IL-4 受体

<400> 18

Met Gly Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val

1

5

10

15

[0020]

Leu Leu Gln Val Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro  
 20 25 30

Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met  
 35 40 45

Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu  
 50 55 60

Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly  
 65 70 75 80

Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala  
 85 90 95

Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys  
 100 105 110

Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn  
 115 120 125

Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser  
 130 135 140

Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala  
 145 150 155 160

Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn  
 165 170 175

Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys  
 180 185 190

[0021]

Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr  
 195 200 205

Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser  
 210 215 220

Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln His Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Ser  
 225 230 235 240

Cys Ile Val Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Tyr Val Ser Ile Thr  
 245 250 255

Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser  
 260 265 270

Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Glu  
 275 280 285

Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn  
 290 295 300

Cys Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg  
 305 310 315 320

Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser  
 325 330 335

Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp  
 340 345 350

Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg Cys Val Glu Leu Phe Glu Ala Pro  
 355 360 365

[0022]

Val Glu Cys Glu Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe  
370 375 380

Cys Ala Ser Pro Glu Ser Ser Arg Asp Asp Phe Gln Glu Gly Arg Glu  
385 390 395 400

Gly Ile Val Ala Arg Leu Thr Glu Ser Leu Phe Leu Asp Leu Leu Gly  
405 410 415

Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu  
420 425 430

Leu Pro Pro Ser Gly Ser Thr Ser Ala His Met Pro Trp Asp Glu Phe  
435 440 445

Pro Ser Ala Gly Pro Lys Glu Ala Pro Pro Trp Gly Lys Glu Gln Pro  
450 455 460

Leu His Leu Glu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Glu Ser Pro Asp  
465 470 475 480

Asn Leu Thr Cys Thr Glu Thr Pro Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro Ala  
485 490 495

Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro Arg Glu  
500 505 510

Leu Gly Pro Asp Pro Leu Leu Ala Arg His Leu Glu Glu Val Glu Pro  
515 520 525

Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr Thr Val Pro Gln  
530 535 540

[0023]

Pro Glu Pro Glu Thr Trp Glu Gln Ile Leu Arg Arg Asn Val Leu Gln  
545 550 555 560

His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln  
565 570 575

Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val  
580 585 590

Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser  
595 600 605

Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala  
610 615 620

Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly  
625 630 635 640

Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly  
645 650 655

Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser  
660 665 670

Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp  
675 680 685

Met Pro Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val  
690 695 700

Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu  
705 710 715 720

[0024]

Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr  
 725 730 735

Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser  
 740 745 750

Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly  
 755 760 765

Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly  
 770 775 780

Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly  
 785 790 795 800

Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser  
 805 810 815

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser  
 820 825

<210> 19

<211> 427

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人 IL-13 受体  $\alpha$ 1

<400> 19

Met Glu Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys  
 1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln  
 20 25 30

[0025]

Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val  
 35 40 45

Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu  
 50 55 60

Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro  
 65 70 75 80

Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu  
 85 90 95

Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile  
 100 105 110

Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala  
 115 120 125

Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys  
 130 135 140

Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu  
 145 150 155 160

Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile  
 165 170 175

Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val  
 180 185 190

Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp  
 195 200 205

[0026]

Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser  
 210 215 220

Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn  
 225 230 235 240

Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg  
 245 250 255

Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His  
 260 265 270

Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu  
 275 280 285

Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro  
 290 295 300

Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys  
 305 310 315 320

Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile  
 325 330 335

Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val  
 340 345 350

Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu Lys  
 355 360 365

Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro Gly Lys Ile  
 370 375 380

[0027]

Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu His Trp Lys  
 385 390 395 400

Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys Glu Glu Thr Asp Ser Val  
 405 410 415

Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln  
 420 425

<210> 20

<211> 176

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人泪脂质运载蛋白(Tlc)

<400> 20

Met Lys Pro Leu Leu Leu Ala Val Ser Leu Gly Leu Ile Ala Ala Leu  
 1 5 10 15

Gln Ala His His Leu Leu Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser  
 20 25 30

Gly Thr Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Phe Pro Glu  
 35 40 45

Met Asn Leu Glu Ser Val Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly  
 50 55 60

Gly Asn Leu Glu Ala Lys Val Thr Met Leu Ile Ser Gly Arg Cys Gln  
 65 70 75 80

[0028]

Glu Val Lys Ala Val Leu Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr  
 85 90 95

Ala Asp Gly Gly Lys His Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys  
 100 105 110

Asp His Tyr Ile Phe Tyr Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Lys Pro Val  
 115 120 125

Arg Gly Val Lys Leu Val Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala  
 130 135 140

Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu  
 145 150 155 160

Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly Ser Asp  
 165 170 175

1

MKKTAAIAIV ALAGFATVAQ AASDEEIQDV SGTWYLKAMT VDSRCPRAYY  
 SSVTPMTLTT LEGGNLEAKF TAQRSGRWQE YKLVLEKTDE PGKYTASGGR  
 HVAYIIRSHV KDHYIFHSEG LCPGQPVPGV WLVGRDPKNN LEALEDPEKA  
 AGARGLSTES ILIPROSETS SPGSAWSHPQ FEK

图 1

<b>SwissProt P31025</b>	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
<b>AB4004</b>	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
野生型 TLc26	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
<b>M3-B24(PSM)</b>	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
S191.4-B24	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S351.5-M21	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S276.2-K04	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-K12	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-F08	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-L4	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-L20	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-N1	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.3-O10	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-N20	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L

<b>SwissProt P31025</b>	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
<b>AB4004</b>	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
野生型 TLc26	K	A	M	T	V	D	R	E	F	P	E	M	N	L	E
<b>M3-B24(PSM)</b>	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
S191.4-B24	K	A	M	T	V	D	S	R	C	P	R	A	Y	Y	S
S351.5-M21	K	A	M	T	V	D	S	R	C	P	R	A	Y	Y	E
S276.2-K04	K	A	M	T	V	D	P	R	C	P	R	A	Y	Y	S
S308.5-K12	K	A	M	T	V	D	L	R	C	P	R	A	F	Y	W
S308.5-F08	K	A	M	T	V	D	S	R	C	P	R	A	V	Y	N
S308.5-L4	K	A	M	T	V	D	S	R	C	P	R	A	Y	Y	V
S308.5-L20	K	A	M	T	V	D	N	R	C	P	R	A	K	Y	D
S308.5-N1	K	A	M	T	V	D	Y	R	C	P	R	A	Y	Y	H
S308.3-O10	K	A	M	T	V	D	K	R	C	P	R	A	Y	Y	R
S308.5-N20	K	A	M	T	V	D	E	R	C	P	R	A	H	Y	G

图 2(下一页续)

<b>SwissProt P31025</b>	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
<b>AB4004</b>	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
野生型 TLc26	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
<b>M3-B24(PSM)</b>	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
S191.4-B24	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S351.5-M21	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S276.2-K04	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-K12	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-F08	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-L4	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-L20	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-N1	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.3-O10	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-N20	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
<b>SwissProt P31025</b>	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
<b>AB4004</b>	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
野生型 TLc26	E	A	K	V	T	M	L	I	S	G	R	S	Q	E	V
<b>M3-B24(PSM)</b>	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
S191.4-B24	E	A	K	F	T	A	Q	R	S	G	R	W	Q	E	Y
S351.5-M21	E	A	K	L	T	L	Q	R	K	G	R	W	Q	E	M
S276.2-K04	E	A	K	F	T	A	Q	R	S	G	R	W	Q	K	Y
S308.5-K12	E	A	K	F	T	A	L	R	I	G	R	W	Q	S	Y
S308.5-F08	E	A	K	F	T	A	Q	R	K	G	R	W	Q	K	Y
S308.5-L4	E	A	K	F	T	A	A	R	I	G	R	W	Q	S	Y
S308.5-L20	E	A	K	F	T	A	H	R	R	G	R	W	Q	Q	Y
S308.5-N1	E	A	K	F	T	A	H	R	A	G	R	W	Q	K	Y
S308.3-O10	E	A	K	F	T	A	K	R	N	G	R	W	Q	P	Y
S308.5-N20	E	A	K	F	T	A	M	R	L	G	R	W	Q	K	Y
<b>SwissProt P31025</b>	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97
<b>AB4004</b>	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
野生型 TLc26	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
<b>M3-B24(PSM)</b>	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
S191.4-B24	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S351.5-M21	K	D	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S276.2-K04	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-K12	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-F08	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-L4	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-L20	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-N1	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.3-O10	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-N20	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A

图2(下一页续)

<b>SwissProt P31025</b>	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
<b>AB4004</b>	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
野生型 Tlc26	D	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
<b>M3-B24(PSM)</b>	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
S191.4-B24	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S351.5-M21	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S276.2-K04	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-K12	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-F08	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-L4	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-L20	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-N1	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.3-O10	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-N20	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K

<b>SwissProt P31025</b>	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127
<b>AB4004</b>	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
野生型 Tlc26	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	L	H	G	K	P
<b>M3-B24(PSM)</b>	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
S191.4-B24	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S351.5-M21	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S276.2-K04	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-K12	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-F08	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-L4	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-L20	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-N1	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.3-O10	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-N20	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P

<b>SwissProt P31025</b>	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142
<b>AB4004</b>	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124
野生型 Tlc26	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
<b>M3-B24(PSM)</b>	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124
S191.4-B24	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S351.5-M21	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S276.2-K04	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-K12	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-F08	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-L4	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-L20	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-N1	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.3-O10	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-N20	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L

图 2(下一页续)

<b>SwissProt P31025</b>	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157
<b>AB4004</b>	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
野生型 TLc26	E A L E D F E K A A G A R G L														
<b>M3-B24(PSM)</b>	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
S191.4-B24	E A L E D F E K A A G A R G L														
S351.5-M21	E A L E D F E K A A G A R G L														
S276.2-K04	E A L E D F E K A A G A R G L														
S308.5-K12	E A L E D F E K A A G A R G L														
S308.5-F08	E A L E D F E K A A G A R G L														
S308.5-L4	E A L E D F E K A A G A R G L														
S308.5-L20	E A L E D F E K A A G A R G L														
S308.5-N1	E A L E D F E K A A G A R G L														
S308.3-O10	E A L E D F E K A A G A R G L														
S308.5-N20	E A L E D F E K A A G A R G L														

<b>SwissProt P31025</b>	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172
<b>AB4004</b>	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
野生型 TLc26	S T E S I L I P R Q S E T S S														
<b>M3-B24(PSM)</b>	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
S191.4-B24	S T E S I L I P R Q S E T S S														
S351.5-M21	S T E S I L I P R Q S E T S S														
S276.2-K04	S T E S I L I P R Q S E T S S														
S308.5-K12	S T E S I L I P R Q S E T S S														
S308.5-F08	S T E S I L I P R Q S E T S S														
S308.5-L4	S T E S I L I P R Q S E T S S														
S308.5-L20	S T E S I L I P R Q S E T S S														
S308.5-N1	S T E S I L I P R Q S E T S S														
S308.3-O10	S T E S I L I P R Q S E T S S														
S308.5-N20	S T E S I L I P R Q S E T S S														

<b>SwissProt P31025</b>	173	174
<b>AB4004</b>	155	156
野生型 TLc26	P G	
<b>M3-B24(PSM)</b>	155	156
S191.4-B24	P G	
S351.5-M21	P G	
S276.2-K04	P G	
S308.5-K12	P G	
S308.5-F08	P G	
S308.5-L4	P G	
S308.5-L20	P G	
S308.5-N1	P G	
S308.3-O10	P G	
S308.5-N20	P G	

图 2

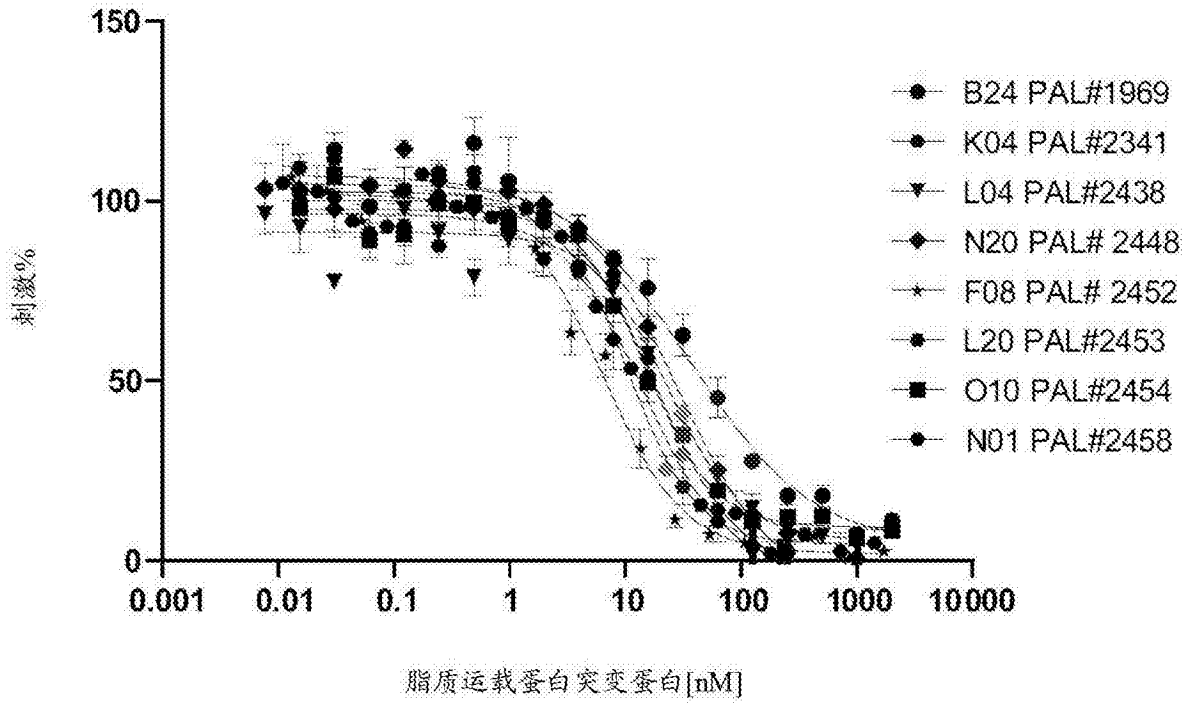


图 3A

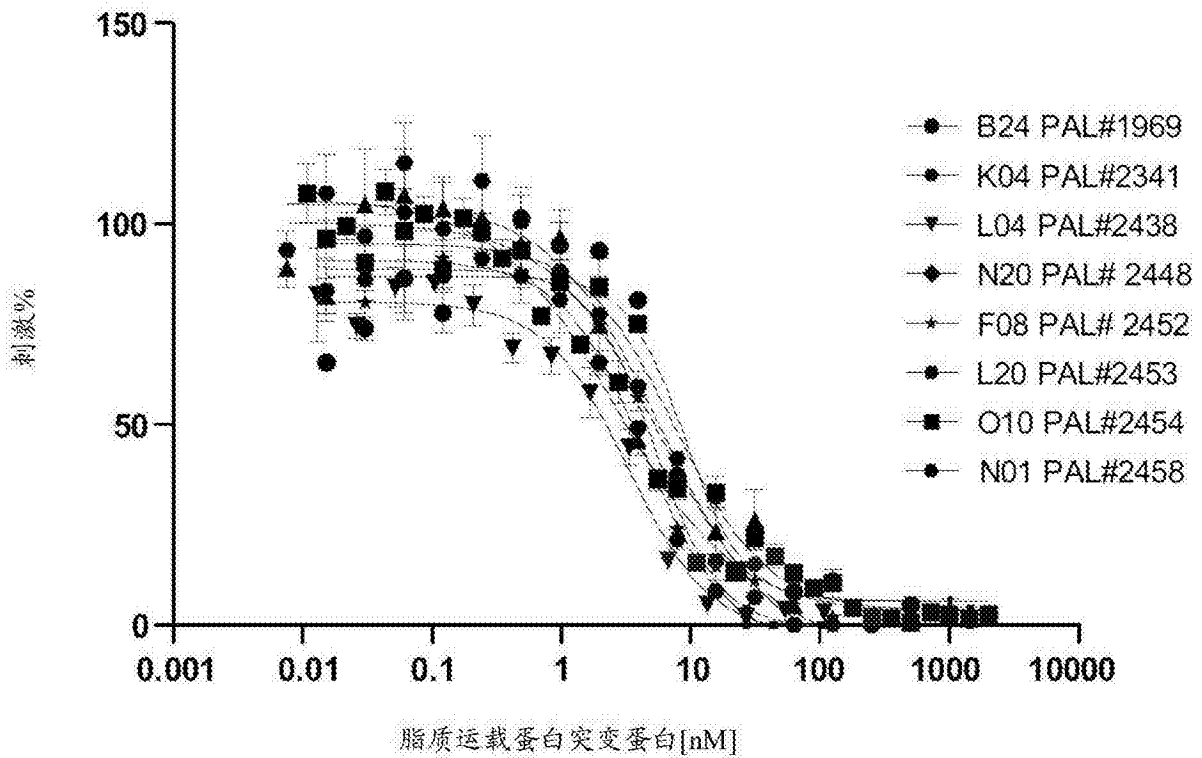


图 3B

图 3

	IC50TF1-增殖测定 IL-13(nM)	IC50TF1-增殖测定 IL-4(nM)	Biorec 亲和力 KDy (M)
S276.2 K04	14.8	3.6	2.30E-11
S308.5 F08	7.4	3.8	2.01E-11
S308.5 N01	17.7	4.4	2.41E-11
S308.5 L20	14.4	5.3	2.49E-11
S308.5 L04	22.9	5.7	7.24E-11
S308.5 N20	27.6	5.9	3.48E-11
S308.3 O10	15.1	7.5	1.32E-12
S191.4 B24	35.9	9.1	1.10E-10

图 4