



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105112477 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201510431417. 8

*C07K 14/47*(2006. 01)

(22) 申请日 2007. 08. 01

*G01N 33/53*(2006. 01)

*C12N 15/12*(2006. 01)

(30) 优先权数据

60/821, 073 2006. 08. 01 US

60/912, 013 2007. 04. 16 US

(62) 分案原申请数据

200780035208. 5 2007. 08. 01

(71) 申请人 皮里斯股份公司

地址 德国弗赖辛 - 威赫史蒂芬

(72) 发明人 K·詹森 M·许尔斯迈尔

S·施勒胡伯尔 A·霍尔鲍姆

A·斯克拉 E·布德罗 R·C·琼斯

I·金伯 R·迪尔曼

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理

事务所(普通合伙) 11382

代理人 曹津燕 张伟

(51) Int. Cl.

*C12P 21/02*(2006. 01)

*C12N 15/63*(2006. 01)

权利要求书3页 说明书53页

序列表82页 附图28页

(54) 发明名称

泪液脂质运载蛋白的突变蛋白及其获得方法

(57) 摘要

本发明涉及来自人泪液脂质运载蛋白的新的突变蛋白。本发明还涉及编码这样的突变蛋白的相应核酸分子及其产生方法。本发明还涉及产生这样的突变蛋白的方法。最后,本发明涉及包含这样的脂质运载蛋白突变蛋白的药物组合物以及该突变蛋白的多种用途。

1. 产生一种或多种人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的方法,其中所述一种或多种突变蛋白以可检测的结合亲和力与人泪液脂质运载蛋白的给定非天然配体结合,该方法包括:

(a) 将编码人泪液脂质运载蛋白的核酸分子在成熟人泪液脂质运载蛋白线性野生型氨基酸序列 (SEQ ID NO:71) 中氨基酸序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中任何位置的至少 12、14 或 16 个密码子处进行诱变,其中编码成熟人泪液脂质运载蛋白线性野生型氨基酸序列 (SEQ ID NO:71) 的序列位置 61 和 153 处半胱氨酸残基的至少一个密码子已经被突变成编码任何其他氨基酸残基,从而获得编码人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的多种核酸,

(b) 在表达系统中表达 (a) 中获得的核酸分子,从而获得一种或多种突变蛋白;其中所述表达系统包含细菌或分离的真核宿主细胞,或体外翻译系统,

(c) 将步骤 (b) 的一种或多种突变蛋白与人泪液脂质运载蛋白的非天然配体接触,以允许所述配体与对所述配体具有结合亲和力的一种或多种突变蛋白之间形成复合体,其中所述非天然配体选自以下的化合物:游离或缀合形式的显示免疫半抗原特征的化合物、肽、蛋白质或其他大分子,和

(d) 选择对所述非天然配体具有可检测结合亲和力的一种或多种突变蛋白。

2. 权利要求 1 的方法,其中突变了 SEQ ID NO:71 所示的成熟人泪液脂质运载蛋白线性野生型氨基酸序列的氨基酸序列位置 26、27、28、29、30、31、32、33、34、56、57、58、80、83、104、105、106 和 108 的所有 18 个密码子。

3. 权利要求 1 的方法,其中将编码 SEQ ID NO:71 所示的成熟人泪液脂质运载蛋白线性野生型氨基酸序列的氨基酸序列位置 61 和 153 的至少一个密码子突变成在 61 位编码丙氨酸、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,和 / 或在 153 位编码丝氨酸或丙氨酸。

4. 权利要求 1 的方法,其中将编码 SEQ ID NO:71 所示的成熟人泪液脂质运载蛋白线性野生型氨基酸序列的氨基酸序列位置 111 和 114 的密码子突变成在 111 位编码精氨酸和在 114 位编码色氨酸。

5. 权利要求 1 的方法,其中将编码 SEQ ID NO:71 所示的成熟人泪液脂质运载蛋白线性野生型氨基酸序列的 101 位半胱氨酸的密码子突变成编码任何其他氨基酸。

6. 权利要求 5 的方法,其中将编码成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列 101 位半胱氨酸的密码子突变成编码丝氨酸。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述配体是蛋白质或其片段。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述蛋白质或其片段选自:血管内皮生长因子 (VEGF)、血管内皮生长因子受体 2 (VEGF-R2) 和白介素 4 受体  $\alpha$  链 (IL-4 受体  $\alpha$ )。

9. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (d) 中的选择在竞争性条件下进行。

10. 权利要求 1 的方法,其中将编码多种人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的多种核酸的每一种在 3' 末端与编码 M13 家族丝状噬菌体衣壳蛋白 pIII 或编码该衣壳蛋白的片段的基因可操作地融合,以选择至少一种与给定配体结合的突变蛋白。

11. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (b) 中所述的表达系统是分离的细菌或真核宿主细胞。

12. 人泪液脂质运载蛋白突变蛋白,其对人泪液脂质运载蛋白的非天然配体具有可检

测结合亲和力,其中成熟人泪液脂质运载蛋白线性野生型氨基酸序列(SEQ ID NO:71)的序列位置 61 和 153 处至少一个半胱氨酸残基被其他氨基酸替换,以及其中在 SEQ ID NO:71 所示的成熟人泪液脂质运载蛋白线性野生型氨基酸序列的序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中任何位置处存在至少 12、14 或 16 个突变的氨基酸残基,以及其中所述人泪液脂质运载蛋白突变蛋白以 200nM 或更小的 KD 与所述非天然配体结合。

13. 权利要求 12 的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白,其中成熟人泪液脂质运载蛋白线性野生型氨基酸序列的序列位置 61 和 153 处的半胱氨酸残基被其他氨基酸替换,以及其中在成熟人泪液脂质运载蛋白线性野生型氨基酸序列的序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中任何位置处存在至少 12、14 或 16 个突变的氨基酸残基。

14. 权利要求 12 的突变蛋白,其中所述突变蛋白在序列位置 26、27、28、29、30、31、32、33、34、56、57、58、80、83、104、105、106 和 108 的所有 18 个位置处包含突变的氨基酸残基。

15. 权利要求 12 的突变蛋白,其中所述突变蛋白包含至少一个以下氨基酸替换:Cys 61 → Ala、Phe、Lys、Arg、Thr、Asn、Tyr、Met、Ser、Pro 或 Trp,以及 Cys 153 → Ser 或 Ala。

16. 权利要求 15 的突变蛋白,其中所述突变蛋白还包含成熟人泪液脂质运载蛋白线性野生型氨基酸序列的 101 位半胱氨酸残基的氨基酸替换。

17. 权利要求 16 的突变蛋白,其中所述突变蛋白包含突变 Cys 101 → Ser。

18. 权利要求 17 的突变蛋白,其中所述突变蛋白在其 N 端或 C 端与选自酶、蛋白质或蛋白质结构域、肽、信号序列和亲和标记的成员可操作地融合。

19. 权利要求 12 的突变蛋白,其中所述突变蛋白与延长突变蛋白血清半衰期的部分融合。

20. 权利要求 19 的突变蛋白,其中所述延长血清半衰期的部分选自: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、白蛋白或白蛋白片段、白蛋白结合肽、白蛋白结合蛋白和转铁蛋白。

21. 权利要求 20 的突变蛋白,其中所述白蛋白结合蛋白选自:细菌白蛋白结合蛋白、针对白蛋白的抗体、针对白蛋白的抗体片段和对白蛋白具有结合活性的脂质运载蛋白突变蛋白。

22. 权利要求 21 的突变蛋白,其中所述细菌白蛋白结合蛋白是链球菌 G 蛋白的白蛋白结合结构域。

23. 权利要求 12 的突变蛋白,其中所述突变蛋白与选自以下的标记缀合:有机分子、酶标记、放射性标记、荧光标记、生色标记、发光标记、半抗原、洋地黄毒苷、生物素、金属络合物、金属、胶体金和延长突变蛋白血清半衰期的部分。

24. 权利要求 23 的突变蛋白,其中所述延长血清半衰期的部分选自:聚亚烷基二醇分子、羟乙基淀粉、棕榈酸或其他脂肪酸分子、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、白蛋白或白蛋白片段、白蛋白结合肽、白蛋白结合蛋白和转铁蛋白。

25. 权利要求 24 的突变蛋白,其中所述白蛋白结合蛋白是细菌白蛋白结合蛋白或对白蛋白具有结合活性的脂质运载蛋白突变蛋白。

26. 权利要求 25 的突变蛋白,其中所述细菌白蛋白结合蛋白是链球菌 G 蛋白的白蛋白结合结构域。

27. 权利要求 24 的突变蛋白,其中所述聚亚烷基二醇分子是聚乙二醇 (PEG) 或其活化的衍生物。

28. 权利要求 12 的突变蛋白,其中所述非天然配体是蛋白质或其片段。

29. 权利要求 28 的突变蛋白,其中所述蛋白质或其片段选自:血管内皮生长因子 (VEGF)、血管内皮生长因子受体 2 (VEGF-R2) 和白介素 4 受体  $\alpha$  链 (IL-4 受体  $\alpha$ )。

30. 权利要求 29 的突变蛋白,其中所述蛋白质是 IL-4 受体  $\alpha$ 。

31. 权利要求 30 的突变蛋白,其中所述蛋白质是人 IL-4 受体  $\alpha$ 。

32. 权利要求 30 的突变蛋白,其中所述蛋白质是 IL-4 受体  $\alpha$  的胞外区域或结构域。

33. 权利要求 30 的突变蛋白,其中所述突变蛋白作为 IL-4 拮抗剂。

34. 权利要求 33 的突变蛋白,其中所述突变蛋白作为人 IL-4 拮抗剂。

35. 权利要求 30 至 34 中任一项的突变蛋白,其中所述突变蛋白作为 IL-13 拮抗剂。

36. 权利要求 35 的突变蛋白,其中所述突变蛋白作为人 IL-13 拮抗剂。

37. 权利要求 30 至 36 中任一项的突变蛋白,其中所述突变蛋白与猕猴 IL-4 受体  $\alpha$  具有交叉反应性。

38. 权利要求 12 的突变蛋白,其中所述突变蛋白包含相对于成熟人泪液脂质运载蛋白氨基酸序列而言在位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中任何位置处将天然氨基酸替换为半胱氨酸残基的至少两个氨基酸替换。

39. 核酸文库,其编码权利要求 12 的突变蛋白。

## 泪液脂质运载蛋白的突变蛋白及其获得方法

[0001] 本申请要求 2006 年 8 月 1 日提交的美国临时申请号 60/821,073 及 2007 年 4 月 16 日提交的美国临时申请号 60/912,013 的优先权,其内容就所有目的而言均整体并入本文作为参考。

[0002] 本发明涉及来自人泪液脂质运载蛋白 (tear lipocalin) 的新型突变蛋白,该突变蛋白以可检测的亲合力与给定的非天然配体结合。本发明还涉及编码这样的突变蛋白的相应核酸分子及其产生方法。本发明还涉及用于产生这样的突变蛋白的方法。最后,本发明涉及包含这样的脂质运载蛋白突变蛋白的药物组合物以及该突变蛋白的多种用途。

[0003] 脂质运载蛋白蛋白家族 (Pervaiz, S. 和 Brew, K. (1987)FASEB J. 1, 209-214) 的成员通常是小分泌蛋白,其通过一系列不同的分子识别特性来表征:其结合多种(注意为疏水的)分子(例如类视黄醇、脂肪酸、胆固醇、前列腺素、胆绿素、外激素、促味剂和芳香剂)的能力、其结合特异性细胞表面受体及其形成大分子复合体的能力。尽管过去它们主要归类为转运蛋白,但现在明白了脂质运载蛋白实现多种生理功能。这些生理功能包括在视黄醇转运、嗅觉、外激素信号转导和前列腺素合成中的作用。脂质运载蛋白还涉及免疫应答的调节和细胞内稳态的介导(综述于例如 Flower, D. R. (1996)Biochem. J. 318, 1-14 和 Flower, D. R. 等 (2000)Biochim. Biophys. Acta 1482, 9-24)。

[0004] 脂质运载蛋白通常共有低水平的总体序列保守性,序列同一性常低于 20%。与此截然相反的是,它们的总体折叠模式高度保守。脂质运载蛋白结构的中心部分由一个 8 条链的反向平行  $\beta$  折叠组成,该  $\beta$  折叠自身折回形成连续的氢键键合的  $\beta$  桶。该桶的一端被跨过其底部的 N 端肽区段以及连接该  $\beta$  链的三个肽环在空间上封闭。该  $\beta$  桶的另一端对溶剂开放,并包含由四个肽环形成的靶标结合位点。正是由于其他部分为刚性的脂质运载蛋白支架中的这种环多样性才产生了多种不同的结合模式,它们各自能够容纳不同大小、形状和化学特征的靶标(综述于例如 Flower, D. R. (1996), 见上文; Flower, D. R. 等 (2000), 见上文;或者 Skerra, A. (2000)Biochim. Biophys. Acta 1482, 337-350)。

[0005] 人泪液前清蛋白(现在称为泪液脂质运载蛋白, TLPC 或 T1c)最初描述为人泪液的主要蛋白质(约为总蛋白质含量的三分之一),但最近也已在若干其他分泌组织(包括前列腺、鼻粘膜和气管粘膜)中鉴定到。已经在大鼠、猪、狗和马中发现了同源蛋白。泪液脂质运载蛋白是一种不常见的脂质运载蛋白成员,因为它在相对不溶性脂质及结合特征方面高度混杂,这区别于该蛋白家族的其他成员(综述于 Redl, B. (2000)Biochim. Biophys. Acta 1482, 241-248)。大量不同化学类别的亲脂性化合物例如脂肪酸、脂肪醇、磷脂、糖脂和胆固醇等都是该蛋白的内源性配体。有意思的是,与其他脂质运载蛋白相反,对烷基酰胺和脂肪酸而言,配体(靶标)结合强度都与羟基尾相关。因此,泪液脂质运载蛋白与溶解性最低的脂质结合最强(Glasgow, B. J. 等 (1995)Curr. Eye Res. 14, 363-372; Gasymov, O. K. 等 (1999)Biochim. Biophys. Acta 1433, 307-320)。

[0006] 人泪液脂质运载蛋白的确切生物功能目前尚未完全阐明,并且仍然存在争论。在泪液中,它似乎通过将脂质从眼的粘膜表面移动到液相而对泪膜的完整性非常重要(综述于 Gasymov, O. K. 等 (1999), 同上)。然而,它在体外显示出在脂质运载蛋白中非常罕见的其

他活性,即抑制半胱氨酸蛋白酶以及非特异性的内切核酸酶活性 (van't Hof, W. 等 (1997) J. Biol. Chem. 272, 1837-1841 ;Yusifov, T. N. 等 (2000) Biochem. J. 347, 815-819)。最近已经证明,泪液脂质运载蛋白能够在体外结合多种脂质过氧化产物,从而产生了这一假说,即它可能作为对可能有有害的亲脂性分子的由生理氧化应激诱发的清除剂 (Lechner, M. 等 (2001) Biochem. J. 356, 129-135)。

[0007] 通过非共价相互作用结合其相应靶标的蛋白质总体而言作为试剂在生物技术、医学、生物分析学以及生物及生命科学中发挥重要的作用。抗体(即免疫球蛋白)是这类蛋白质的一个突出的例子。尽管在与配体/靶标的识别、结合和/或分离方面对这些蛋白质存在多方面的需求,但几乎仅有免疫球蛋白是目前使用的。对其他具有确定的配体结合特征的蛋白质(例如凝集素)的应用仍仅限于特殊的情况。

[0008] 近来,脂质运载蛋白家族的成员成为了关于具有确定配体结合特性的蛋白质的研究的主题。PCT 公开 W0 99/16873 公开了在四个肽环的区域中具有突变氨基酸位置的脂质运载蛋白家族多肽,这四个肽环排列在包含结合口袋的圆桶状  $\beta$ -桶结构的末端,并对应于包含甘蓝菜粉蝶 (*Pieris brassicae*) 后胆色素结合蛋白中 28 至 45、58 至 69、86 至 99 和 114 至 129 位氨基酸的线性多肽序列中的那些区段。

[0009] PCT 公开 W0 00/75308 公开了特异性结合洋地黄毒苷 (digoxigenin) 的后胆色素结合蛋白的突变蛋白,而国际专利申请 W0 03/029463 和 W0 03/029471 分别涉及人嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (hNGAL) 和载脂蛋白 D 的突变蛋白。为了进一步改善和细调脂质运载蛋白变体的配体亲和力、特异性和折叠稳定性,已经提出了使用不同脂质运载蛋白家族成员的多种方法 (Skerra, A. (2001) Rev. Mol. Biotechnol. 74, 257-275 ; Schlehner, S. 以及 Skerra, A. (2002) Biophys. Chem. 96, 213-228), 例如替换额外的氨基酸残基。PCT 公开 W0 2006/56464 公开了在低纳摩尔范围内对 CTLA-4 具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的突变蛋白。

[0010] PCT 公开 W0 2005/19256 公开了具有不同或相同靶配体的至少一个结合位点的泪液脂质运载蛋白突变蛋白,并提供了产生这样的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的方法。根据该 PCT 申请,对泪液脂质运载蛋白一级序列中的某些氨基酸串(特别是包含成熟人泪液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,以产生具有结合亲和力的突变蛋白。所得突变蛋白对选定的配体的结合亲和力 ( $K_D$ ) 在纳摩尔范围内,在多数情况下  $>100$ nM。

[0011] 尽管存在这一进步,但即便只是为了进一步改善人泪液脂质运载蛋白突变蛋白在诊断及治疗应用中的适用性,也仍期望能有益于产生对选定靶分子具有改善的结合特性(例如在皮摩尔范围内)的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的方法,

[0012] 因此,本发明的一个目的是提供对给定靶标具有高结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白。

[0013] 该目的通过产生具有独立权利要求中所述特征的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白来实现。

[0014] 在第一个方面中,本发明提供用于产生人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的方法,其中所述突变蛋白以可检测的结合亲和力与人泪液脂质运载蛋白的给定非天然配体结合,该方法包括:

[0015] (a) 将编码人泪液脂质运载蛋白的核酸分子在天然成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列的 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 位氨基酸序列中任何位置的至少一个密码子进行诱变, 其中将成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列中 61 和 153 位序列位的至少一个编码半胱氨酸残基的密码子突变成编码任一其他氨基酸残基, 从而获得多种编码人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的核酸,

[0016] (b) 在表达系统中表达 (a) 中得到的一种或多种突变蛋白核酸分子, 从而获得一种或多种突变蛋白, 和

[0017] (c) 通过选择和 / 或分离富集步骤 (b) 中获得的对人泪液脂质运载蛋白的给定非天然配体具有可检测的结合亲和力的一种或多种突变蛋白。

[0018] 在这种情况下, 应该注意, 本发明人出乎意料地发现, ( 在各个天然核酸文库水平上 ) 除去野生型泪液脂质运载蛋白中由半胱氨酸残基 61 与 153 形成的结构二硫键 ( 参阅 Breustedt, 等 (2005), The **1.8-Å** crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. J. Biol. Chem. 280, 484-493) 提供了这样的泪液脂质运载蛋白突变蛋白, 其不仅稳定折叠, 而且以低皮摩尔范围内的亲和力与给定的非天然配体结合。不希望被理论束缚, 还认为去除结构二硫键提供了额外的优点, 例如在本发明突变蛋白中 ( 自发 ) 产生或故意引入非天然人工二硫键, 从而提高突变蛋白稳定性 ( 参见实施例 )。

[0019] 本文使用的术语“诱变”指选择这样的实验条件, 其使得人泪液脂质运载蛋白 (Swiss-Prot 数据库条目 P31025) 中给定序列位置的天然氨基酸可被在各自天然多肽序列中不存在于该特定位置的至少一个氨基酸所替换。术语“诱变”还包括通过缺失或插入一个或多个氨基酸而对序列区段的长度进行 ( 进一步 ) 修饰。因此, 本发明范围内包括例如用一段三个随机突变替换选定序列位置的一个氨基酸, 使得与野生型蛋白质的各自区段的长度相比插入了两个氨基酸残基。这样的插入或缺失可彼此独立地在可进行本发明诱变的任何肽区段引入。在本发明的一个示例性实施方案中, 可以在选定的脂质运载蛋白骨架的环 AB 中引入多个突变的插入 ( 参阅国际专利申请 WO 2005/019256, 其整体并入本文作为参考 )。术语“随机诱变”指在诱变过程中不存在某序列位置处预定的单个氨基酸 ( 突变 ), 而是在预定的序列位置处可以一定的概率掺入至少两个氨基酸。

[0020] 使用人泪液脂质运载蛋白的编码序列 (Redl, B. 等 (1992) J. Biol. Chem. 267, 20282-20287) 作为本发明中选定的肽区段诱变的起点。对于所引用氨基酸位置的诱变, 本领域技术人员根据其需求可使用多种用于定点诱变的成熟的标准方法 (Sambrook, J. 等 (1989), 同上)。一种普遍使用的技术是通过 PCR ( 聚合酶链式反应 ) 引入突变, 其中使用在所需序列位置具有简并碱基组成的合成寡核苷酸混合物。例如, 使用密码子 NNK 或 NNS ( 其中 N = 腺嘌呤、鸟嘌呤或者胞嘧啶或胸腺嘧啶 ; K = 鸟嘌呤或胸腺嘧啶 ; S = 腺嘌呤或胞嘧啶 ) 允许在诱变过程中掺入所有 20 种氨基酸和琥珀型终止密码子, 而密码子 VVS 将可能掺入的氨基酸限制在 12 种, 因为不将氨基酸 Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Val 掺入多肽序列的选定位置 ; 例如, 使用密码子 NMS ( 其中 M = 腺嘌呤或胞嘧啶 ) 将选定序列位置处可能掺入的氨基酸数限制在 11 种, 因为它不将氨基酸 Arg、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Val 掺入选定的序列位置。就此而言, 应该注意, ( 除 20 种天然氨基酸以外的 ) 其他氨基酸如硒代半胱氨酸或吡咯赖氨酸的密码子也可掺入突变蛋白的核酸

中。如 Wang, L., 等 (2001) Science 292, 498-500 或 Wang, L. 和 Schultz, P. G. (2002) Chem. Comm. 1, 1-11 所述, 还有可能使用通常被识别为终止密码子的“人工”密码子如 UAG 来插入其他罕见氨基酸, 例如邻甲基-L-酪氨酸或对氨基苯丙氨酸。

[0021] 使用碱基对特异性降低的核苷酸构件 (例如肌苷、8-氧代-2'-脱氧尿苷或 6(2-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-3, 4-二氢-8H-嘧啶-1, 2-咪唑-7-酮 (Zaccolo 等 (1996) J. Mol. Biol. 255, 589-603) 是向选定的序列区段中引入突变的另一种选择。

[0022] 另一种可能性是所谓的三联体诱变。该方法使用不同核苷酸三联体的混合物 (各编码一种氨基酸) 掺入到编码序列中 (Virnekäs B, Ge L, Plückthun A, Schneider KC, Wellhofer G, Moroney SE. 1994 Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. Nucleic Acids Res 22, 5600-5607)。

[0023] 在各个多肽的选定区域中引入突变的一种可能的策略是基于使用四种寡核苷酸, 其中每种均部分来自相应待突变的序列区段之一。在合成这些寡核苷酸时, 本领域技术人员可利用核酸构件的混合物来合成对应于待突变氨基酸位置的那些核苷酸三联体, 从而随机产生编码所有天然氨基酸的密码子, 最终产生脂质运载蛋白的文库。例如, 第一种寡核苷酸的序列 (除了突变位置以外) 与脂质运载蛋白多肽 N 末端位置处的待突变肽区段的编码链对应。相应地, 第二种寡核苷酸与该多肽序列中之后的第二个序列区段的非编码链对应。第三种寡核苷酸继而与第三个序列区段的编码链对应。最后, 第四种寡核苷酸与第四个序列区段的非编码链对应。聚合酶链式反应可使用各自的第一种及第二种寡核苷酸进行, 必要时单独地使用各自的第三种和第四种寡核苷酸进行。

[0024] 可以使用多种已知方法将这两个反应的扩增产物组合成包含第一个至第四个序列区段的单个核酸, 其中突变已在选定的位置引入。为此, 可以使用侧翼寡核苷酸和一种或多种中介体核酸分子 (其贡献第二与第三个序列区段之间的序列) 将两种产物进行新的聚合酶链式反应。在选择寡核苷酸序列中用于诱变的数目和排列时, 本领域技术人员根据其需要有多种备选方案。

[0025] 可以通过连接将上述核酸分子与缺少的编码脂质运载蛋白多肽的核酸的 5' 及 3' 序列和 / 或载体连接在一起, 并可克隆到已知的宿主生物中。有多种成熟的方法可用于连接和克隆 (Sambrook, J. 等 (1989), 同上)。例如, 可将也存在于克隆载体中的限制性内切核酸酶识别序列改造到所述合成寡核苷酸序列中。这样, 在扩增各个 PCR 产物和酶切割后, 所得的片段可以容易地使用相应的识别序列进行克隆。

[0026] 也可以通过已知方法将编码选择用于诱变的蛋白质的基因中更长的序列区段进行随机诱变, 例如通过在提高错误率的条件下使用聚合酶链式反应、化学诱变或使用细菌增变菌株。这些方法还可用于进一步优化脂质运载蛋白突变蛋白的靶标亲和力或特异性。实验诱变区段以外可能发生的突变通常是可以接受的, 甚至已证明是有利的, 例如在它们有助于改善脂质运载蛋白突变蛋白的折叠效率或折叠稳定性时。

[0027] 本文使用的术语“人泪液脂质运载蛋白”指 SWISS-PROT 数据库登记号 P31025 的成熟人泪液脂质运载蛋白。

[0028] 术语“非天然配体”指在生理条件下不与天然成熟人泪液脂质运载蛋白结合的化

合物。该靶标（配体）可以是游离或缀合形式的显示免疫半抗原特征的任何化合物、激素如甾类激素，或其任何生物聚合物或片段，例如蛋白质或蛋白质结构域、肽、寡聚脱氧核糖核苷酸、核酸、寡糖或多糖或其缀合物、脂质或另一大分子。

[0029] 在本发明的一个实施方案中，用于产生人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的方法包括对成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列中 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 位氨基酸序列中任何位置的至少 2、3、4、5、6、8、10、12、14、15、16 或 17 个密码子进行突变。在另一实施方案中，对成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列中 26、27、28、29、30、31、32、33、34、56、57、58、80、83、104、105、106 和 108 位氨基酸序列的全部 18 个密码子进行突变。

[0030] 在另一个方面中，本发明包括用于产生人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的方法，其中所述突变蛋白以可检测的结合亲和力结合人泪液脂质运载蛋白的给定的非天然配体，该方法包括：

[0031] (a) 将编码人泪液脂质运载蛋白的核酸分子在天然成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列的 30、80 和 104 位氨基酸序列中任何位置的至少一个密码子进行诱变，从而获得多种编码人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的核酸，

[0032] (b) 在表达系统中表达 (a) 中得到的一种或多种突变蛋白核酸分子，从而获得一种或多种突变蛋白，和

[0033] (c) 通过选择和 / 或分离富集步骤 (b) 中获得的对人泪液脂质运载蛋白的给定非天然配体具有可检测的结合亲和力的一种或多种突变蛋白。

[0034] 在上述方法的一个实施方案中，另外还对天然成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列的 26-33、56-58、83、105-106 和 108 位氨基酸序列中任何位置的至少 2、3、4、5、6、8、10、12、14 或 15 个密码子进行突变。

[0035] 在本发明的另一实施方案中，本发明的方法包括对天然成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列的 61 和 153 位编码半胱氨酸的两个密码子同时进行突变。在一个实施方案中，将 61 位突变成编码丙氨酸、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，这只是其中的几种可能性。在突变 153 位的实施方案中，可以在 153 位引入诸如丝氨酸或丙氨酸的氨基酸。

[0036] 在本文所述的本发明一个实施方案中，对编码天然成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列中氨基酸序列位置 111 和 / 或 114 的密码子进行突变，例如突变成 111 位编码精氨酸，114 位编码色氨酸。。

[0037] 本发明方法的另一实施方案涉及对编码成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列中 101 位半胱氨酸的密码子进行诱变，以使该密码子编码任何其他氨基酸。在一个实施方案中，所述突变的 101 位密码子编码丝氨酸。因此，在一些实施方案中，用另一氨基酸的密码子替换 61、101 和 153 位半胱氨酸密码子中的两个或全部三个。

[0038] 根据本发明的方法，从编码人泪液脂质运载蛋白的核酸开始获得了突变蛋白。对这样的核酸进行诱变并通过重组 DNA 技术将其引入合适的细菌或真核宿主生物中。可以使用任何本领域已知的合适技术来产生泪液脂质运载蛋白的核酸文库，以产生具有抗体样特性的脂质运载蛋白突变蛋白，即对给定靶标具有亲和力的突变蛋白。这些组合方法的实例详细描述于例如国际专利申请 WO 99/16873、WO 00/75308、WO 03/029471、WO 03/029462、WO 03/029463、WO 2005/019254、WO 2005/019255、WO 2005/019256 或 WO 2006/56464。这

些专利申请中每篇内容均整体并入本文作为参考。在合适的宿主中表达进行了诱变的核酸序列之后,可以从所得文库中选择出带有与给定靶标结合的各个脂质运载蛋白突变蛋白的遗传信息的克隆。可以使用熟知的技术来选择这些克隆,例如噬菌体展示(综述于 Kay, B. K. 等(1996)同上;Lowman, H. B. (1997) 同上,或者 Rodi, D. J. 和 Makowski, L. (1999) 同上)、菌落筛选(综述于 Pini, A. 等(2002) *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 5, 503-510)、核糖体展示(综述于 Amstutz, P. 等(2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 400-405) 或如 Wilson, D. S. 等(2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3750-3755 报道的 mRNA 展示或者具体描述于 WO 99/16873、WO 00/75308、WO 03/029471、WO 03/029462、WO 03/029463、WO 2005/019254、WO 2005/019255、WO 2005/019256 或 WO 2006/56464 的方法。

[0039] 根据本文的公开内容,在上述方法的另一实施方案中,步骤(c)还包括:

[0040] (i) 提供选自以下的化合物作为给定的配体:例如游离或缀合形式的显示免疫半抗原特征的化合物、肽、蛋白质或其他大分子如多糖、核酸分子(例如 DNA 或 RNA) 或完整的病毒颗粒或类病毒,

[0041] (ii) 将多种突变蛋白与所述配体接触,以允许所述配体与对所述配体具有结合亲和力的突变蛋白之间形成复合体,和

[0042] (iii) 除去无结合亲和力或无实质结合亲和力的突变蛋白。

[0043] 在本发明的一些实施方案中,所述配体可以是蛋白质或其片段。在一个实施方案中,排除与 T 细胞共同受体 CD4 结合的突变蛋白。

[0044] 在本发明方法的一个实施方案中,步骤(c)中的选择在竞争性条件下进行。本文使用的“竞争性条件”指突变蛋白的选择包括至少一个将突变蛋白与人泪液脂质运载蛋白(靶标)的给定的非天然配体在其他配体存在下进行接触的步骤,所述其他配体与突变蛋白竞争结合靶标。这种其他配体可以是靶标的生理配体,过量的靶标本身或者靶标的任何其他生理配体,其至少与本发明突变蛋白所识别表位重叠的表位结合,因此干扰该突变蛋白的靶标结合。或者,所述其他配体通过别构效应将与突变蛋白的结合位点不同的表位与靶标络合而竞争突变蛋白的结合。

[0045] 给出了使用温和噬菌体 M13 进行的噬菌体展示技术实施方案(综述于 Kay, B. K. 等(1996), 同上;Lowman, H. B. (1997) 同上,或者 Rodi, D. J. 和 Makowski, L. (1999), 同上)作为本发明可以使用的选择方法的实例。可用于选择本发明突变蛋白的噬菌体展示技术的另一实施方案是如 Broders 等(Broders 等(2003)“*Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display.*” *Methods Mol. Biol.* 205:295-302)所述的超级噬菌体(hyperphage)技术。其他温和噬菌体(如 f1)或溶菌性噬菌体(如 T7)也可以使用。就示例性选择方法而言,产生了 M13 噬菌粒,其允许将突变的脂质运载蛋白核酸序列表达为在 N 端与信号序列(优选 OmpA 信号序列)融合并在 C 端与噬菌体 M13 衣壳蛋白 pIII 或其能掺入噬菌体衣壳的片段融合的融合蛋白。优选使用包含野生型序列的氨基酸 217 至 406 的噬菌体衣壳蛋白的 C 端片段  $\Delta$ pIII 来产生融合蛋白。在一个实施方案中,特别优选的是其中 201 位半胱氨酸残基缺失或被另一氨基酸替换的 pIII C 端片段。

[0046] 因此,本发明方法的另一实施方案中包括将编码多种人泪液脂质运载蛋白突变蛋白并由 3' 末端诱变所导致的核酸分子与编码 M13 家族丝状噬菌体衣壳蛋白 pIII 或该衣壳蛋白片段的基因有效融合,以选择至少一种与给定配体结合的突变蛋白。

[0047] 该融合蛋白可包含额外的组分,例如允许固定、检测和 / 或纯化该融合蛋白或其部分的亲和标记。此外,可将终止密码子置于编码脂质运载蛋白或其突变蛋白的序列区与噬菌体衣壳基因或其片段之间,其中该终止密码子(优选为琥珀型终止密码子)在适当的抑制菌株中翻译时至少部分翻译成氨基酸。

[0048] 例如,本文描述的质粒载体 pTLPC27(现在也称为 pTlc27),可用于制备编码人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的噬菌粒文库。使用两个 BstXI 限制性位点将本发明编码泪液脂质运载蛋白突变蛋白的核酸分子插入载体中。连接之后,用所得的核酸混合物转化合适的宿主菌株,例如大肠杆菌 XL1-Blue,以获得大量独立的克隆。需要时,可产生用于制备超级噬菌粒文库的相应载体。

[0049] 接着,使用适当的 M13 辅助噬菌体或超级噬菌体,将所得文库在液体培养物中进行超感染(superinfect),以产生功能性噬菌粒。重组噬菌粒在其表面上以带有衣壳蛋白 pIII 或其片段的融合蛋白形式展示泪液脂质运载蛋白突变蛋白,而该融合蛋白的 N 端信号序列通常被切掉。另一方面,它还带有由辅助噬菌体提供的天然衣壳蛋白 pIII 的一个或多个拷贝,因此它能感染受者,所述受者一般是带有 F 或 F' 质粒的细菌菌株。对于超级噬菌体展示的情况,超级噬菌粒在其表面上以带有感染性衣壳蛋白 pIII 而不是天然衣壳蛋白的融合蛋白形式展示脂质运载蛋白突变蛋白。在用辅助噬菌体或超级噬菌体感染过程中或感染之后,可以诱导基因表达脂质运载蛋白突变蛋白与衣壳蛋白 pIII 的融合蛋白,例如通过加入无水四环素来诱导。将诱导条件选择成使得所得噬菌粒中的大部分在其表面上展示至少一个脂质运载蛋白突变蛋白。对于超级噬菌体展示的情况,诱导条件产生带有 3 至 5 个融合蛋白的超级噬菌粒群,所述融合蛋白由脂质运载蛋白突变蛋白和衣壳蛋白 pIII 组成。已知有多种方法来分离噬菌粒,例如用聚乙二醇进行沉淀。一般在 6-8 小时的孵育期后进行分离。

[0050] 接着通过与期望的靶标一起孵育来对所分离的噬菌粒进行选择,其中所述靶标以允许将噬菌粒至少暂时固定的形式存在,所述噬菌粒在衣壳中带有具有期望的结合活性的突变蛋白作为融合蛋白。在本领域技术人员已知的多个实施方案中,靶标可以例如与载体蛋白(如血清白蛋白)缀合,并通过该载体蛋白与蛋白质结合表面(例如聚苯乙烯)结合。适用于 ELISA 技术的微量滴定板或所谓的“免疫棒(immuno-stick)”可优选地用于这样的靶标固定。或者,可以使用靶标与其他结合基团(如生物素)的缀合物。接着可将靶标固定在选择性结合该基团的表面上,例如包被有链霉亲和素、中性亲和素(neutravidin)或亲和素的微量滴定板或顺磁性颗粒。如果靶标与免疫球蛋白的 Fc 部分融合,那么也可以固定在表面上,例如包被有 A 蛋白或 G 蛋白的微量滴定板或顺磁性颗粒。

[0051] 可以像 ELISA 方法中已知的那样,用封闭液饱和表面上存在的非特异性噬菌粒结合位点。接着一般在生理缓冲液存在下使噬菌粒与固定在表面上的靶标接触。多次洗涤除去未结合的噬菌粒。接着洗脱表面上剩余的噬菌粒颗粒。例如,可通过加入蛋白酶或者在酸、碱、洗涤剂或离液盐存在下或在适度变性的条件下洗脱噬菌粒。一个优选方法是使用 pH 2.2 的缓冲液洗脱,其中接着中和洗脱液。或者,可以加入游离靶标的溶液以与固定靶标竞争结合噬菌粒,或者可通过与特异性结合目的靶标的免疫球蛋白或中性配体蛋白竞争来洗脱靶标特异性噬菌粒。

[0052] 其后,用洗脱的噬菌粒感染大肠杆菌细胞。或者,可以从洗脱的噬菌粒中提取核酸

并用于后续的分析、扩增或以其他方式转化细胞。从这样获得的大肠杆菌克隆开始,根据上述方法通过用 M13 辅助噬菌体或超级噬菌体进行超感染而再次产生新的噬菌粒或超级噬菌粒,并将这样扩增的噬菌粒再次以固定的靶标进行选择。经常需要多个选择循环才能以足够丰富的形式获得带有本发明突变蛋白的噬菌粒。优选地,将选择循环数选择成使得在后续的功能分析中至少 0.1% 所研究的克隆产生对给定靶标具有可检测亲和力的突变蛋白。根据所使用文库的大小(即复杂性),一般需要 2 至 8 个循环来达到这一目的。

[0053] 对于选定突变蛋白的功能分析,用从选择循环中获得的噬菌粒感染大肠杆菌菌株,并分离相应的双链噬菌粒 DNA。从该噬菌粒 DNA 开始或者从提取自该噬菌粒的单链 DNA 开始,可通过本领域已知的方法测定本发明选定突变蛋白的核酸序列,并可由此推断出氨基酸序列。可以在另一表达载体中亚克隆完整泪液脂质运载蛋白突变蛋白的突变区或序列,并在合适的宿主生物中表达。例如,可以使用载体 pTLPC26(现在也称为 pTlc26)在大肠杆菌菌株(如大肠杆菌 TG1)中表达。可通过多种生物化学方法纯化这样产生的泪液脂质运载蛋白突变蛋白。所产生(例如用 pTlc26 产生)的泪液脂质运载蛋白突变蛋白在其 C 端带有亲和肽 Strep-tag II(Schmidt 等,同上),因此优选地可通过链霉亲和素亲和层析来纯化。

[0054] 还可以通过其他方法进行选择。许多相应的实施方案是本领域技术人员已知的,或者已在文献中描述。此外,可以使用方法的组合。例如,可以对通过“噬菌体展示”选择或至少富集的克隆再进行“菌落筛选”。该方法在产生对靶标具有可检测的结合亲和力的泪液脂质运载蛋白突变蛋白这方面具有这样的优点,即可以直接分离各个克隆。

[0055] 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以外,其他细菌菌株、酵母或者昆虫细胞或哺乳动物细胞也可用于该目的。除了从上述随机文库中选择泪液脂质运载蛋白突变蛋白以外,还可以使用进化方法(包括限制性诱变),以在重复筛选循环后对已对靶标具有一定结合活性的突变蛋白在亲和力或特异性方面进行优化。

[0056] 一旦选择了对给定靶标具有亲和力的突变蛋白,还可以对这样的突变蛋白进行另一诱变,以随后选择具有更高亲和力的变体,或者选择具有改进的特性(如更高的热稳定性;提高的血清稳定性、热力学稳定性;提高的溶解度;改进的单体行为;对热变性、化学变性、蛋白水解或去污剂提高的抗性等)。这一其他诱变(在目的为更高亲和力的情况下可认为是体外“亲和力成熟”)可通过基于推理性设计的位点特异性突变或随机突变来实现。获得更高亲和力或改进特性的另一种可能的方法是使用易错 PCR,这导致在脂质运载蛋白突变蛋白的选定序列位置范围中产生点突变。易错 PCR 可根据任何已知的方案来进行,例如 Zacco 等(1996) *J. Mol. Biol.* 255, 589-603 所述的方案。适用于这些目的的其他随机诱变方法包括如 Murakami, H 等(2002) *Nat. Biotechnol.* 20, 76-81 所述的随机插入/缺失(RID)诱变或者如 Bittker, J. A 等(2002) *Nat. Biotechnol.* 20, 1024-1029 所述的非同源随机重组(NRR)。需要时,还可以根据 WO 00/75308 或 Schlehuber, S. 等,(2000) *J. Mol. Biol.* 297, 1105-1120 中公开的方法进行亲和力成熟,在该方法中获得了对于洋地黄毒苷具有高亲和力的后胆色素结合蛋白的突变蛋白。

[0057] 在另一个方面中,本发明涉及对给定的人泪液脂质运载蛋白非天然配体具有可检测结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白,该突变蛋白可通过本发明上述方法获得,或者通过本发明上述方法获得。

[0058] 在一个实施方案中,根据上述方法获得的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白包括:成熟人泪液脂质运载蛋白中序列位置 61 和 153 的半胱氨酸残基中的至少一个或两个被其他氨基酸替换,以及序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中任何位置的至少一个氨基酸残基的突变。在泪液脂质运载蛋白  $\beta$ -桶结构开口端的结合位点中,24-36 位包含在 AB 环中,53-66 位包含在 CD 环中,69-77 位包含在 EF 环中,103-110 位包含在 GH 环中。本文中这四个环的定义与 Flower (Flower, D. R. (1996), 同上,以及 Flower, D. R. 等 (2000), 同上) 一致。通常,这样的突变蛋白在成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列的序列位置 26-34、56-58、80、83、104-106 和 108 中包含至少 2、3、4、5、6、8、10、12、14、15、16、17 或 18 个突变的氨基酸残基。在一个具体的实施方案中,上述突变蛋白包含以下氨基酸替换:Cys 61  $\rightarrow$  Ala、Phe、Lys、Arg、Thr、Asn、Tyr、Met、Ser、Pro 或 Trp,以及 Cys 153  $\rightarrow$  Ser 或 Ala。这样的替换已证明可用于防止形成连接 Cys 61 与 Cys 153 的天然二硫键,因此有利于操作该突变蛋白。

[0059] 在另一实施方案中,所述突变蛋白包含选自 Arg 111  $\rightarrow$  Pro 和 Lys 114  $\rightarrow$  Trp 的至少一个额外的氨基酸替换。本发明的突变蛋白还可包含用其他氨基酸替换天然成熟人泪液脂质运载蛋白序列中 101 位的半胱氨酸。例如,该替换可以是突变 Cys 101  $\rightarrow$  Ser 或 Cys 101  $\rightarrow$  Thr。

[0060] 该突变蛋白所结合的非天然配体可以是蛋白质或其片段,前提为在一些实施方案中可以排除人 T 细胞共同受体 CD4 作为非天然靶标。

[0061] 本发明的泪液脂质运载蛋白突变蛋白可在突变的氨基酸序列位置以外包含野生型(天然)氨基酸序列。另一方面,本文公开的泪液脂质运载蛋白突变蛋白还可在进行诱变的序列位置以外也包含氨基酸突变,只要这些突变不干扰该突变蛋白的结合活性和折叠即可。可以使用成熟的标准方法 (Sambrook, J. 等 (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) 非常容易地在 DNA 水平实现这些突变。可能的氨基酸序列改变是插入或缺失以及氨基酸替换。这样的替换可以是保守性的,即氨基酸残基被化学上相似的氨基酸残基替换。保守性替换的实例是以下组中成员之间的替换:1) 丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸;2) 天冬氨酸和谷氨酸;3) 天冬酰胺和谷氨酰胺;4) 精氨酸和赖氨酸;5) 异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸;以及6) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。另一方面,还可以在氨基酸序列中引入非保守性改变。此外,作为替换单个氨基酸残基的替代,还可以插入或缺失泪液脂质运载蛋白一级结构中的一个或多个连续氨基酸,只要这些缺失或插入产生稳定折叠/功能性的突变蛋白即可(例如,参阅其中产生具有截短的 N 端和 C 端的突变蛋白的实验章节)。

[0062] 这样的氨基酸序列修饰包括定向诱变单个氨基酸位置,以通过引入某些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,还可掺入这些突变以进一步改善脂质运载蛋白突变蛋白对给定靶标的亲和力。另外,必要时可以引入突变以调节突变蛋白的某些特征,例如提高折叠稳定性、血清稳定性、蛋白抗性 or 水溶性,或者降低聚集倾向。例如,可将天然半胱氨酸残基突变成其他氨基酸,以防止形成二硫键。然而,也可以故意将其他氨基酸序列位置突变成半胱氨酸,以引入新的反应基团,例如用于缀合到其他化合物(例如聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、生物素、肽或其他蛋白质)或者形成非天然的二硫键。向人泪液脂质运载蛋白突变蛋白氨基酸序列中引入半胱氨酸残基的

此类突变的示例可能性包括以下替换: Thr 40 → Cys、Glu 73 → Cys、Arg 90 → Cys、Asp 95 → Cys 和 Glu 131 → Cys。例如,在氨基酸位置 40、73、90、95 和 / 或 131 中任何位置侧面产生的巯基部分可用于对突变蛋白进行 PEG 化或 HES 化,以提高各自泪液脂质运载蛋白突变蛋白的血清半衰期。在任一这些序列位置引入半胱氨酸的突变蛋白 S236.1-A22(见实施例 46)是这些本发明突变蛋白的一个说明性实例。

[0063] 本发明还涵盖上述突变蛋白,其中成熟人泪液脂质运载蛋白序列的前四个 N 端氨基酸残基 (His-His-Leu-Leu;1-4 位) 和 / 或成熟人泪液脂质运载蛋白序列的 C 端最后两个氨基酸残基 (Ser-Asp;157-158 位) 被缺失(还参见实施例及所附序列列表)。

[0064] 本发明的脂质运载蛋白突变蛋白能以可检测的亲合力(即解离常数至少为 200nM)与期望的靶标结合。在一些实施方案中,优选为以对给定靶标至少为 100、20、1nM 或更低的解离常数与期望靶标结合的脂质运载蛋白突变蛋白。突变蛋白与期望靶标的结合亲和力可通过多种方法测量,例如荧光滴定、竞争 ELISA 或表面等离子共振 (BIAcore)。

[0065] 对本领域技术人员显而易见的是,复合体的形成取决于许多因素,例如结合配偶体的浓度、竞争剂的存在、缓冲体系的离子强度等。选择和富集通常在允许分离脂质运载蛋白的条件下进行,所述脂质运载蛋白在与期望靶标复合时解离常数至少为 200nM。然而,可以在多种严格度条件下进行洗涤和洗脱步骤。还可以在动力学特征方面进行选择。例如,可以在这样的条件下进行选择,该条件有利于与靶标显示缓慢解离(即低  $K_{off}$  速率)的突变蛋白与靶标形成复合体。或者,可以在这样的条件下进行选择,所述条件有利于快速形成突变蛋白与靶标的复合体,换句话说,高  $K_{on}$  速率。作为另一示例性替代方案,筛选可以在选择突变蛋白提高的热稳定性(与野生型泪液脂质运载蛋白或对预定靶标已具有亲和力的突变蛋白相比)的条件下进行。

[0066] 本发明的泪液脂质运载蛋白突变蛋白作为单体蛋白存在。然而本发明的脂质运载蛋白突变蛋白有可能能够自发二聚化或寡聚化。尽管对一些应用而言可能优选使用形成稳定单体的脂质运载蛋白突变蛋白(例如由于更快的扩散和更好的组织透过性),但在另一些情况下使用自发形成稳定同型二聚体或多聚体的脂质运载蛋白突变蛋白可能是有利的,因为这些多聚体可提供对给定靶标(进一步)提高的亲合力和 / 或亲合力。此外,寡聚体形式的脂质运载蛋白突变蛋白可具有更慢的解离速率或延长的血清半衰期。如果期望使形成稳定单体的突变蛋白二聚化或多聚化,这可通过例如将各自寡聚化结构域(如 jun-fos 结构域或亮氨酸拉链)与本发明突变蛋白融合或通过使用“双运载蛋白 (Duocalin)”(见下文)来实现。

[0067] 本发明的泪液脂质运载蛋白突变蛋白可用于与给定靶标形成复合体。所述靶标可以是非天然靶标 / 配体。所述靶标(配体)可以是任何显示免疫半抗原特征的游离或缀合形式的化合物、激素例如甾类激素或其生物聚合体或片段,例如蛋白质或蛋白质结构域、肽、寡聚脱氧核糖核苷酸、核酸、寡糖或多糖或其缀合物。在本发明的一个实施方案中,靶标是蛋白质,其前提为排除人 T 细胞共同受体 CD4。该蛋白质可以是任何球形可溶性蛋白质或受体蛋白,例如参与细胞信号转导的跨膜蛋白、免疫系统的组分如 MHC 分子或指示特定疾病的细胞表面受体。所述突变蛋白还可以仅与蛋白质片段结合。例如,突变蛋白可与细胞表面受体的结构域结合(当它是锚着在细胞膜上的受体部分时)以及与溶液中的相同结构域结合(如果该结构域可产生为可溶性蛋白)。然而,本发明决不仅限于仅结合这些大分子

靶标的突变蛋白。而是也可以通过诱变获得泪液脂质运载蛋白突变蛋白,其对(较)低分子量配体(如生物素、荧光素或洋地黄毒苷)显示特异性结合亲和力。

[0068] 在本发明的一个实施方案中,被泪液脂质运载蛋白突变蛋白结合的配体是蛋白质或其片段,其选自血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体2(VEGF-R2)和白介素4受体 $\alpha$ 链(IL-4受体 $\alpha$ ),或其片段。配体还包括VEGF-R2或IL-4受体 $\alpha$ 的胞外区域或结构域。这些配体一般为哺乳动物来源。在一些实施方案中,这些配体为人来源,但它们也可以为小鼠、大鼠、猪、马、狗、猫或牛或猕猴来源,以上仅为少数示例性实例。

[0069] 人VEGF可选自VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C和VEGF-D,并可具有SWISS PROT数据库登记号P15692、P49765、P49767和O43915(SEQ ID No.:22-25)所示氨基酸序列或其片段。一个这样的示例性片段由VEGF-A的氨基酸8至109组成。人血管内皮生长因子受体2(VEGF-R2)可具有SWISS PROT数据库登记号P35968(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列或其片段。这些片段的示例性实例包括VEGF-R2的胞外Ig样C2型结构域1至7,分别包含氨基酸46至110、141至207、224至320、328至414、421至548、551至660以及667至753。人白介素4受体 $\alpha$ 可具有SWISS PROT数据库登记号P24394(SEQ ID NO:20)的氨基酸序列或其片段。人白介素4受体 $\alpha$ 链的片段的示例性实例包括IL-4受体 $\alpha$ 的氨基酸26至232。

[0070] 一般而言,就本发明泪液脂质运载蛋白突变蛋白的蛋白质配体而言,本文使用的术语“片段”涉及N端和/或C端缩短的蛋白质或肽配体,其保持全长配体被本发明突变蛋白识别和/或结合的能力。

[0071] 因此,本发明的另一个方面涉及人泪液脂质运载蛋白突变蛋白,其在成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列的序列位置24-36、53-66、79-84和103-110中两个或更多个位置处包含至少一个突变氨基酸残基,并结合IL-4受体 $\alpha$ 、VEGF-R2或VEGF。

[0072] 结合IL-4受体 $\alpha$ 的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白可作为IL-4拮抗剂和/或IL-13拮抗剂。在一个实施方案中,所述人泪液脂质运载蛋白突变蛋白作为人IL-4和/或IL-13的拮抗剂。在另一实施方案中,所述突变蛋白与猕猴配体如IL-4和/或IL-13交叉反应,并因此作为猕猴IL-4受体 $\alpha$ 的拮抗剂。

[0073] 相对于成熟人泪液脂质运载蛋白氨基酸序列而言,结合IL-4受体 $\alpha$ 的本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白可包含天然成熟人泪液脂质运载蛋白的26-34、56-58、80、83、104-106和108中任何位置上用半胱氨酸残基替换天然氨基酸残基的至少两个氨基酸替换。一般而言,这样的突变蛋白以200nM或更低、100nM或更低、20nM或更低或者1nM的 $K_D$ 或甚至在皮摩尔范围内的 $K_D$ 与IL-4受体 $\alpha$ 的胞外区或结构域结合。因此,本发明还涵盖以900pM或更低、600pM或更低、500pM或更低、250pM、100pM或更低、60pM或更低或者40pM或更低的 $K_D$ 与IL-4受体结合的泪液脂质运载蛋白突变蛋白。测定突变蛋白-配体复合体的 $K_D$ 值的合适方法为本领域技术人员已知,并且包括荧光滴定、竞争ELISA、量热法如等温滴定量热法(ITC)以及表面等离子共振。这些方法的实例在下文中详细描述(参见如实施例6、8、14、16、22、24和27)。

[0074] 在这种情况下,还应注意,各个突变蛋白与其配体之间复合体的形成受到多种不同因素的影响,例如各结合配偶体的浓度、竞争剂的存在、所用缓冲体系的pH和离子强度,以及用于测定解离常数 $K_D$ 的实验方法(例如荧光滴定、竞争ELISA或表面等离子共振,

以上仅为几个实例)或甚至用于评价实验数据的数学算法。

[0075] 因此,本领域技术人员也十分清楚,本文给出的 $K_0$ 值(各个突变蛋白与其配体形成的复合体的解离常数)可在一定实验范围内变化,这取决于用于测定特定脂质运载蛋白突变蛋白对给定配体的亲和力的方法和实验设置。这意味着,取决于例如是通过表面等离子共振(Biacore)还是通过竞争ELISA测定 $K_0$ 值,所测得的 $K_0$ 值可能稍有变化或者是可接受的范围。

[0076] 在本发明一个具体的实施方案中,这样的突变蛋白相对于成熟人泪液脂质运载蛋白的氨基酸序列而言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、Pro;Glu 27 → Arg;Phe 28 → Cys;Glu 30 → Arg;Met 31 → Ala;Asn 32 → 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;以及Lys 108 → Gln。

[0077] 此外,这样的突变蛋白还可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;Glu 63 → 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;以及Tyr 100 → His。

[0078] 在一个实施方案中,与IL-4受体 $\alpha$ 结合的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白包含以下氨基酸替换:Arg 26 → Ser、Glu 27 → Arg、Phe 28 → Cys、Glu 30 → Arg;Met 31 → Ala、Leu 33 → Tyr、Leu 56 → Gln、Ile 57 → Arg、Asp 80 → Ser、Lys 83 → Arg、Glu 104 → Leu、Leu 105 → Cys、His 106 → Pro和Lys 108 → Gln。

[0079] 在另一实施方案中,与IL-4受体 $\alpha$ 结合的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白包含以下氨基酸替换组之一:

[0080] (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;Ser 58 → Ile;Asp 80 → Ser;Lys 83 → Arg;Glu 104 → Leu;Leu 105 → Cys;His 106 → Pro;Lys 108 → Gln;

[0081] (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;Ser 58 → Asn;Asp 80 → Ser;Lys 83 → Arg;Glu 104 → Leu;Leu 105 → Cys;His 106 → Pro;Lys 108 → Gln;

[0082] (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;Asp 80 → Ser;Lys 83 → Arg;Glu 104 → Leu;Leu 105 → Cys;His 106 → Pro;Lys 108 → Gln;

[0083] (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;Asp 80 → Ser;Lys 83 → Arg;Glu 104 → Leu;Leu 105 → Cys;His 106 → Pro;Lys 108 → Gln;

[0084] (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 ;Ser 58 → Ala ;Asp 80 → Ser ;Lys 83 → Arg ;Glu 104 → Leu ;Leu 105 → Cys ;His 106 → Pro ;Lys 108 → Gln ;

[0085] (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 ;Ser 58 → Lys ;Asp 80 → Ser ;Lys 83 → Arg ;Glu 104 → Leu ;Leu 105 → Cys ;His 106 → Pro ;Lys 108 → Gln ;and

[0086] (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 ;Asp 80 → Ser ;Lys 83 → Arg ;Glu 104 → Leu ;Leu 105 → Cys ;His 106 → Pro ;Lys 108 → Gln。

[0087] 与 IL-4 受体  $\alpha$  结合的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白可包含、基本组成为或组成为 :SEQ ID NO:2-8 所示氨基酸序列任一个或其片段或变体。在一个实施方案中,本发明的突变蛋白包含、基本组成为或组成为 :SEQ ID NO:5 或 6 所示氨基酸序列或其片段或变体。

[0088] 涉及本发明的突变蛋白时,本发明使用的术语“片段”指的来自全长成熟人泪液脂质运载蛋白的 N 端和 / 或 C 端缩短 (即缺少至少一个 N 端和 / 或 C 端氨基酸) 的蛋白质或肽。这样的片段优选地包含成熟人泪液脂质运载蛋白一级序列的至少 10 个、更优选 20 个、最优选 30 个或更多连续氨基酸,并且通常可在成熟人泪液脂质运载蛋白的免疫测定中检测到。

[0089] 本发明所使用的术语“变体”指蛋白质或肽的衍生物,其包含氨基酸序列的修饰,例如替换、缺失、插入或化学修饰。优选地,这样的修饰不降低该蛋白质或肽的功能性。这样的变体包括蛋白质,其中一个或多个氨基酸被其相应的 D- 立体异构体取代或 20 种天然氨基酸以外的氨基酸 (例如鸟氨酸、羟脯氨酸、瓜氨酸、高丝氨酸、羟赖氨酸、正缬氨酸) 取代。然而,这样的替换也可以是保守性的,即氨基酸残基被化学性质相似的氨基酸残基取代。保守性替换的实例是以下组的成员之间的替换 :1) 丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸 ;2) 天冬氨酸和谷氨酸 ;3) 天冬酰胺和谷氨酰胺 ;4) 精氨酸和赖氨酸 ;5) 异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸 ;以及 6) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。

[0090] 在另一个方面中,本发明涉及与血管内皮生长因子受体 2 (VEGF-R2) 或其胞外区或结构域结合的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白。通常,这样的突变蛋白作为 VEGF 拮抗剂,并以 200nM 或更低、100nM 或更低、20nM 或更低、15nM 或更低、10nM 或更低或甚至 1nM 或更低的  $K_D$  与 VEGF-R2 的胞外区或结构域结合。

[0091] 相对于成熟人泪液脂质运载蛋白而言,这样的突变蛋白可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 ;Leu 56 → 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 ;以及 Lys 108 → Thr, 并且还可包含选自以下的至少一个氨基酸替换 :Leu 41 → Phe ;Glu 63 → Lys ;Val 64 → Met ;Asp 72 → Gly ;Lys 76 → Arg、Glu ;Ile 88 → Val、Thr ;Ile 89 → Thr ;Arg 90 → Lys ;Asp 95 → Gly ;Phe 99 → Leu ;以及 Gly 107 → Arg、Lys、Glu。

[0092] 在一个具体的实施方案中,这样的突变蛋白包含以下氨基酸替换:Arg 26 → Ser, Glu 27 → Ile, Glu 30 → Ser, Met 31 → Gly, Asn 32 → Arg, Leu 33 → Ile, Glu 34 → Tyr, Ile 57 → Phe, Ser 58 → Arg, Lys 83 → Glu, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Ala, His 106 → Val, 和 Lys 108 → Thr。

[0093] 以可检测的亲合力与 VEGF-R2 胞外区或结构域结合的本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白可包含以下氨基酸替换组之一:

[0094] (1) Arg 26 → Ser, Glu 27 → Ile, Glu 30 → Ser, Met 31 → Gly, Asn 32 → Arg, Leu 33 → Ile, Glu 34 → Tyr, Leu 56 → Lys, Ile 57 → Phe, Ser 58 → Arg, Asp 80 → Ser, Lys 83 → Glu, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Ala, His 106 → Val, Lys 108 → Thr;

[0095] (2) Arg 26 → Ser, Glu 27 → Ile, Glu 30 → Ser, Met 31 → Gly, Asn 32 → Arg, Leu 33 → Ile, Glu 34 → Tyr, Leu 56 → Glu, Ile 57 → Phe, Ser 58 → Arg, Asp 80 → Ser, Lys 83 → Glu, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Ala, His 106 → Val, Lys 108 → Thr;

[0096] (3) Arg 26 → Ser, Glu 27 → Ile, Glu 30 → Ser, Met 31 → Gly, Asn 32 → Arg, Leu 33 → Ile, Glu 34 → Tyr, Leu 56 → Ala, Ile 57 → Phe, Ser 58 → Arg, Asp 80 → Ser, Lys 83 → Glu, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Ala, His 106 → Val, Lys 108 → Thr; 和

[0097] (4) Arg 26 → Ser, Glu 27 → Ile, Glu 30 → Ser, Met 31 → Gly, Asn 32 → Arg, Leu 33 → Ile, Glu 34 → Tyr, Leu 56 → Glu, Ile 57 → Phe, Ser 58 → Arg, Asp 80 → Pro, Lys 83 → Glu, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Ala, His 106 → Val, Lys 108 → Thr。

[0098] 在本发明的一个实施方案中,与 VEGF-R2 结合的突变蛋白包含、基本组成为或组成为:SEQ ID No:34-39 所示任一氨基酸序列。

[0099] 在另一实施方案中,本发明涉及与血管内皮生长因子(VEGF)结合的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白。通常,这样的突变蛋白通过抑制 VEGF 与 VEGF 受体结合而作为 VEGF 拮抗剂,并以 200nM 或更低、100nM 或更低、20nM、5nM 或更低或甚至 1nM 或更低的  $K_D$  与 VEGF 结合。

[0100] 相对于成熟人泪液脂质运载蛋白而言,可通过本发明方法获得的这样的突变蛋白可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、Pro、Val、Leu、Ile; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His、Arg、Tyr、Gln; Ile 57 → Val、Thr、Leu; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile、Val; Glu 104 → Cys; His 106 → Asn、Ser、Asp; 以及 Lys 108 → Ala、Val, 并且还可包含选自以下的至少一个氨基酸替换:Val 36 → Met; Thr 37 → Ala; Met 39 → Thr; Thr 40 → Ala、Ser; Asn 48 → Asp; Ala 51 → Val; Lys 52 → Arg; Thr 54 → Val; Met 55 → Val; Ser 61 → Pro; Lys 65 → Arg; Ala 66 → Val; Val 67 → Ile; Glu 69 → Gly、Ser、Thr; Lys 76 → Arg、Ile、Ala、Met、Pro; Tyr 87 → Arg、His、Lys、Gln; Ile 89 → Thr、Val、Gly、His、Met、Lys; Arg 90 → Gly; Ile 98 → Val 和 Gly 107 → Glu。

[0101] 在一个实施方案中,这样的与 VEGF 结合的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白包含以下氨基酸替换:Glu 27 → Gly, Phe 28 → Ala, Pro 29 → Leu, Glu 30 → Arg, Met 31 → Cys, Asn 32 → Leu, Leu 33 → Ala, Glu 34 → Gly, Asp 80 → Ile, Lys 83 → Ile, Glu 104 → Cys, 和 Lys 108 → Val。

[0102] 在另一具体的实施方案中,与 VEGF 结合的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白可包含选自以下的氨基酸替换组之一:

[0103] (1) Arg 26 → Ser ;Glu 27 → Gly ;Phe 28 → Ala ;Pro 29 → Leu ;Glu 30 → Arg ;Met 31 → Cys ;Asn 32 → Leu ;Leu 33 → Ala ;Glu 34 → Gly ;Leu 56 → His ;Ser 58 → Lys ;Asp 80 → Ile ;Lys 83 → Ile ;Glu 104 → Cys ;His 106 → Asn ;Lys 108 → Val ;

[0104] (2) Arg 26 → Pro ;Glu 27 → Gly ;Phe 28 → Ala ;Pro 29 → Leu ;Glu 30 → Arg ;Met 31 → Cys ;Asn 32 → Leu ;Leu 33 → Ala ;Glu 34 → Gly ;Leu 56 → His ;Ser 58 → Glu ;Asp 80 → Ile ;Lys 83 → Ile ;Glu 104 → Cys ;His 106 → Ser ;Lys 108 → Val ;

[0105] (3) Arg 26 → Pro ;Glu 27 → Gly ;Phe 28 → Ala ;Pro 29 → Leu ;Glu 30 → Arg ;Met 31 → Cys ;Asn 32 → Leu ;Leu 33 → Ala ;Glu 34 → Gly ;Leu 56 → His ;Ser 58 → Lys ;Asp 80 → Ile ;Lys 83 → Ile ;Glu 104 → Cys ;His 106 → Asn ;Lys 108 → Val ;

[0106] (4) Arg 26 → Pro ;Glu 27 → Gly ;Phe 28 → Ala ;Pro 29 → Leu ;Glu 30 → Arg ;Met 31 → Cys ;Asn 32 → Leu ;Leu 33 → Ala ;Glu 34 → Gly ;Leu 56 → Arg ;Ser 58 → Lys ;Asp 80 → Ile ;Lys 83 → Ile ;Glu 104 → Cys ;His 106 → Ser ;Lys 108 → Val ;

[0107] (5) Arg 26 → Pro ;Glu 27 → Gly ;Phe 28 → Ala ;Pro 29 → Leu ;Glu 30 → Arg ;Met 31 → Cys ;Asn 32 → Leu ;Leu 33 → Ala ;Glu 34 → Gly ;Leu 56 → His ;Ser 58 → Lys ;Asp 80 → Ile ;Lys 83 → Ile ;Glu 104 → Cys ;His 106 → Ser ;Lys 108 → Val ;

[0108] (6) Arg 26 → Ser ;Glu 27 → Gly ;Phe 28 → Ala ;Pro 29 → Leu ;Glu 30 → Arg ;Met 31 → Cys ;Asn 32 → Leu ;Leu 33 → Ala ;Glu 34 → Gly ;Leu 56 → His ;Ser 58 → Lys ;Asp 80 → Ile ;Lys 83 → Ile ;Glu 104 → Cys ;His 106 → Ser ;Lys 108 → Val ;

[0109] (7) Arg 26 → Val ;Glu 27 → Gly ;Phe 28 → Ala ;Pro 29 → Leu ;Glu 30 → Arg ;Met 31 → Cys ;Asn 32 → Leu ;Leu 33 → Ala ;Glu 34 → Gly ;Leu 56 → His ;Ser 58 → Lys ;Asp 80 → Ile ;Lys 83 → Ile ;Glu 104 → Cys ;His 106 → Ser ;Lys 108 → Val ;

[0110] (8) Arg 26 → Leu ;Glu 27 → Gly ;Phe 28 → Ala ;Pro 29 → Leu ;Glu 30 → Arg ;Met 31 → Cys ;Asn 32 → Leu ;Leu 33 → Ala ;Glu 34 → Gly ;Leu 56 → His ;Ser 58 → Lys ;Asp 80 → Ile ;Lys 83 → Ile ;Glu 104 → Cys ;His 106 → Ser ;Lys 108 → Val ;和

[0111] (9) Arg 26 → Ile ;Glu 27 → Gly ;Phe 28 → Ala ;Pro 29 → Leu ;Glu 30 → Arg ;Met 31 → Cys ;Asn 32 → Leu ;Leu 33 → Ala ;Glu 34 → Gly ;Leu 56 → His ;Ser 58 → Lys ;Asp 80 → Ile ;Lys 83 → Ile ;Glu 104 → Cys ;His 106 → Ser ;Lys 108 → Val。

[0112] 在本发明的一个实施方案中,与 VEGF 结合的突变蛋白包含、基本组成为或组成为 SEQ ID No:26-33 或 SEQ ID No:44-47 中任一氨基酸序列。

[0113] 本发明范围内还包括在潜在免疫原性方面发生了改变的上述突变蛋白。

[0114] 细胞毒性 T 细胞识别与 I 类主要组织相容性复合体 (MHC) 分子结合的抗原呈递细胞表面上的肽抗原。肽与 MHC 分子结合的能力是等位基因特异性的,并与其免疫原性相关。为了降低给定蛋白质的免疫原性,预测蛋白质中哪些肽具有与给定 MHC 分子结合的能力是十分有价值的。先前已经描述了利用计算机线程法 (computational threading approach) 鉴定潜在 T 细胞表位来预测给定肽序列与 I 类 MHC 分子的结合的方法 (Altuvia 等 (1995) J. Mol. Biol. 249:244-250)。

[0115] 这样的方法还可用于鉴定本发明突变蛋白中的潜在 T 细胞表位,并用于根据其预

期用途而基于其预计免疫原性选择特定的突变蛋白。它还可以对预计含有 T 细胞表位的肽区域进行额外的诱变,以减少或消除这些 T 细胞表位,从而使免疫原性最小化。从遗传改造的抗体中除去两性表位已有描述 (Mateo 等 (2000) *Hybridoma* 19(6):463-471),并可适用于本发明的突变蛋白。

[0116] 这样获得的突变蛋白可具有尽可能小的免疫原性,这在其治疗或诊断应用中是期望的,如下文所述。

[0117] 对于一些应用,使用标记形式的本发明突变蛋白也可能是有用的。因此,本发明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、生色标记、发光标记、半抗原、洋地黄毒苷、生物素、金属络合物、金属以及胶体金。突变蛋白也可以缀合到有机分子。本文使用的术语“有机分子”优选指这样的有机分子:其包含至少两个碳原子,但优选不超过 7 或 12 个可旋转的碳键,分子量为 100 至 2000 道尔顿,优选 100 至 1000 道尔顿,并任选地包含一个或两个金属原子。

[0118] 一般而言,可以以任何合适的化学物质或酶来标记脂质运载蛋白突变蛋白,所述化学物质或酶在化学、物理、光学或酶促反应中直接或间接产生可检测的化合物或信号。物理反应并且同时是光学反应/标记物的实例是在照射后发出荧光或在使用放射性标记时发射 X 射线。碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或  $\beta$ -半乳糖苷酶是催化形成生色反应产物的酶标记(也是光学标记)实例。一般而言,通常用于抗体的所有标记(除了仅用于免疫球蛋白 Fc 部分的糖部分的标记以外)均可用于与本发明突变蛋白缀合。本发明的突变蛋白还可缀合任何合适的治疗活性剂,例如用于将这样的活性剂定向递送至给定细胞、组织或器官或者用于选择性靶定细胞(如肿瘤细胞)而不影响周围的正常细胞。这些治疗活性剂的实例包括放射性核素、毒素、小有机分子和治疗肽(例如作为细胞表面受体激动剂/拮抗剂的肽或者竞争给定细胞靶标上蛋白质结合位点的肽)。然而,本发明的脂质运载蛋白突变蛋白还可缀合治疗活性核酸,如反义核酸分子、小干扰 RNA、小 RNA 或核酶。这些缀合物可通过本领域熟知的方法产生。

[0119] 在一个实施方案中,本发明的突变蛋白还可与靶向特定机体部位的靶向部分偶联,以将本发明突变蛋白递送至体内期望的部位或区域。可能期望这样的修饰的一个实例是穿过血脑屏障。为了穿过血脑屏障,本发明的突变蛋白可与有利于主动转运穿过该屏障的部分偶联(参阅 Gaillard PJ 等. *Diphtheria-toxin receptor-targeted brain drug delivery. International Congress Series.* 2005 1277:185-198 或者 Gaillard PJ 等 *Targeted delivery across the blood-brain barrier. Expert Opin Drug Deliv.* 2005 2(2):299-309)。这样的部分可以例如商品名 2B-Trans™(BBB technologies BV, Leiden, NL) 购得。

[0120] 如上述,在一些实施方案中,本发明的突变蛋白可与延长该突变蛋白的血清半衰期的部分缀合(这方面可参阅 PCT 公开 WO 2006/56464,其中参考对 CTLA-4 具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的突变蛋白描述了这样的缀合策略)。延长血清半衰期的部分可以是聚(亚烷基)二醇分子、羟乙基淀粉、脂肪酸分子如棕榈酸 (Vajo&Duckworth 2000, *Pharmacol. Rev.* 52, 1-9)、免疫球蛋白的 Fc 部分、免疫球蛋白的 CH3 结构域、免疫球蛋白的 CH4 结构域、白蛋白或其片段、白蛋白结合肽或白蛋白结合蛋白、转铁蛋白,以上仅为少数实例。白蛋白结合蛋白可以是细菌白蛋白结合蛋白、抗体、抗

体片段,包括结构域抗体(参阅如美国专利 6,696,245)或者对白蛋白有结合亲和力的脂质运载蛋白。相应地,延长本发明脂质运载蛋白突变蛋白半衰期的合适的缀合配偶体包括白蛋白(Osborn, B. L. 等(2002)Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548)或者白蛋白结合蛋白,例如细菌白蛋白结合结构域,例如链球菌 G 蛋白之一(König, T. 和 Skerra, A. (1998)Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. J. Immunol. Methods 218, 73-83)。可用作缀合配偶体的白蛋白结合肽的其他实例为例如具有 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(Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Amico, L. A. (2002)., Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins.” J Biol Chem 277, 35035-35043) 所述。

[0121] 在其他实施方案中,白蛋白本身或白蛋白的生物活性片段可用作本发明脂质运载蛋白突变蛋白的缀合配偶体。术语“白蛋白”包括所有哺乳动物白蛋白,例如人血清白蛋白或牛血清白蛋白或大鼠白蛋白。白蛋白或其片段可如美国专利 5,728,553 或欧洲专利申请 EP 0 330 451 和 EP 0 361 991 所述重组产生。重组人白蛋白(**Recombunin®**) Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK) 可与脂质运载蛋白突变蛋白缀合或融合,以延长该突变蛋白的半衰期。

[0122] 如果所述白蛋白结合蛋白是抗体片段,则它可以是结构域抗体。结构域抗体(dAb)被改造成允许精确控制生理特性和体内半衰期,以产生最佳的安全性及效力产品特性。结构域抗体例如可购自 Domantis Ltd. (Cambridge, UK and MA, USA)。

[0123] 使用转铁蛋白作为延长本发明突变蛋白血清半衰期的部分,该突变蛋白可遗传融合至非糖基化转铁蛋白的 N 段或 C 端,或者这两个末端。非糖基化的转铁蛋白具有 14-17 天的半衰期,转铁蛋白融合蛋白将相似地具有延长的半衰期。转铁蛋白载体还提供高生物利用率、生物分布和循环稳定性。该技术可购自 BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA)。用作蛋白稳定剂/半衰期延长配偶体的重组人转铁蛋白(DeltaFerrin™)也可购自 Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK)。

[0124] 如果使用免疫球蛋白的 Fc 部分来延长本发明突变蛋白的血清半衰期,则可使用可购自 Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, USA) 的 SynFusion™ 技术。使用该 Fc 融合技术允许产生作用更长久生物药物,并可由例如两拷贝的突变蛋白与抗体 Fc 区连接组成,以改进药代动力学、溶解度和生产效率。

[0125] 延长本发明突变蛋白半衰期的另一替代方案是向本发明突变蛋白的 N 端或 C 端融合富含甘氨酸的长的非结构化的柔性序列(例如具有约 20 至 80 个连续甘氨酸残基的聚甘氨酸)。公开于例如 W02007/038619 的这种方法也称为“rPEG”(重组 PEG)。

[0126] 如果使用聚(亚烷基)二醇作为缀合配偶体,则所述聚(亚烷基)二醇可以是被取代的、未取代的,直链的或分支的。还可以是活化的聚亚烷基衍生物。合适的化合物的实例

为聚乙二醇 (PEG) 分子,如 WO 99/64016、美国专利 6,177,074 或美国专利 6,403,564 中涉及干扰素的描述,或者如针对其他蛋白质的描述,如 PEG 修饰的天冬酰胺酶、PEG-腺苷脱氨酶 (PEG-ADA) 或 PEG-超氧化物歧化酶 (参阅如 Fuertges 等 (1990) *The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins* J. Control. Release 11, 139-148)。这样的聚合物 (优选聚乙二醇) 的分子量为约 300 至约 70000 道尔顿,包括如分子量约 10000、约 20000、约 30000 或约 40000 道尔顿的聚乙二醇。此外,如美国专利 6,500,930 或 6,620,413 所述,可将碳水化合物的寡聚物和多聚体 (如淀粉或羟乙基淀粉 (HES)) 与本发明的突变蛋白缀合,以用于延长血清半衰期的目的。

[0127] 如果将上述部分之一与本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白缀合,则缀合至氨基酸侧链可能是有利的。合适的氨基酸侧链可天然存在于人泪液脂质运载蛋白的氨基酸序列中,或者可通过诱变引入。对于通过诱变引入适当的结合位点的情况,一种可能性是用半胱氨酸残基替换适当位置的氨基酸。在一个实施方案中,这样的突变包括 Thr 40 → Cys、Glu 73 → Cys、Arg 90 → Cys、Asp 95 → Cys 或 Glu 131 → Cys 替换中至少一个。任何这些位置处新产生的半胱氨酸残基其后均可用于将该突变蛋白与延长该突变蛋白血清半衰期的部分 (如 PEG 或其活化衍生物) 缀合。

[0128] 在另一实施方案中,为了提供用于将本发明突变蛋白与上述部分之一缀合的合适的氨基酸侧链,可通过诱变引入人工氨基酸。一般而言,这样的人工氨基酸设计成更具反应性,因此有利于缀合期望的部分。这些可通过人工 tRNA 引入的人工氨基酸的一个实例是对乙酰苯丙氨酸。

[0129] 对于本文公开的突变蛋白的一些应用而言,以融合蛋白的形式使用它们可能是有利的。在一些实施方案中,本发明的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白在其 N 端或其 C 端与蛋白质、蛋白质结构域或肽 (如信号序列和 / 或亲和标记) 融合。

[0130] 对于药物应用而言,本发明突变蛋白可与延长该突变蛋白体内血清半衰期的融合配偶体融合 (也参阅 PCT 公开 WO 2006/56464,其中参考对 CTLA-4 具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的突变蛋白描述了合适的融合配偶体)。与上述缀合相似,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,以上仅为少数实例。再次,白蛋白结合蛋白可以是细菌白蛋白结合蛋白或者对白蛋白具有结合活性的脂质运载蛋白突变蛋白。相应地,用于延长本发明脂质运载蛋白突变蛋白半衰期的合适的融合配偶体包括白蛋白 (Osborn, B. L. 等 (2002) 同上 J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548) 或白蛋白结合蛋白,例如细菌白蛋白结合结构域,如链球菌 G 蛋白之一 (König, T. 和 Skerra, A. (1998) 同上 J. Immunol. Methods 218, 73-83)。Dennis 等, 同上 (2002) 或美国专利申请 2003/0069395 中描述的具有 Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cys 共有序列的白蛋白结合肽也可用作融合配偶体,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。重组产生白蛋白或其片段为本领域所熟知,并描述于例如美国专利 5,728,553、欧洲专利申请 EP 0 330 451 或 EP 0 361 991。

[0131] 融合配偶体可赋予本发明脂质运载蛋白突变蛋白新的特征,例如酶活性或对其他分子的结合亲和力。合适的融合蛋白的实例为碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、谷胱甘肽-S-转移酶、G蛋白的白蛋白结合结构域、A蛋白、抗体片段、寡聚化结构域、具有相同或不同结合特异性的脂质运载蛋白突变蛋白(导致形成“双运载蛋白”,参阅 Schlehner, 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。

[0132] 特别地,可以将本发明的脂质运载蛋白突变蛋白与独立的酶活性位点融合,使得所得融合蛋白的两个“组分”都作用于给定的治疗性靶标。上述脂质运载蛋白突变蛋白的结合结构域附着至致病靶标,使得酶结构域能够消除靶标的生物功能。

[0133] 亲和标记如 **Strep-tag®** 或 **Strep-tag® II** (Schmidt, T. G. M. 等 (1996) *J. Mol. Biol.* 255, 753-766)、myc- 标记、FLAG- 标记、His6- 标记或 HA- 标记或者蛋白质如谷胱甘肽-S-转移酶也允许对重组蛋白容易地进行检测和 / 或纯化,并且也是优选的融合配偶体实例。最后,具有生色或发光特性的蛋白质如绿色荧光蛋白 (GFP) 或黄色荧光蛋白 (YFP) 也是用于本发明脂质运载蛋白突变蛋白的合适的融合配偶体。

[0134] 本文使用的术语“融合蛋白”还包括含有信号序列的本发明脂质运载蛋白突变蛋白。多肽 N 端的信号序列将该多肽引导至特定的细胞区室,例如大肠杆菌的周质或真核细胞的内质网。大量的信号序列为本领域已知。用于将多肽分泌进大肠杆菌周质的一种优选信号序列是 OmpA- 信号序列。

[0135] 本发明还涉及包含编码本文所述突变蛋白的核苷酸序列的核酸分子 (DNA 和 RNA)。由于遗传密码的简并性将某些密码子替换成代表同一氨基酸的其他密码子,因此本发明不局限于编码本发明突变蛋白的特定核酸分子,而是包括包含编码功能性突变蛋白的核苷酸序列的所有核酸分子。

[0136] 因此,本发明还包括编码本发明突变蛋白的核酸序列,其包含天然成熟人泪液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 中任何位置上的至少一个密码子突变,其中编码成熟人泪液脂质运载蛋白线性多肽序列中序列位置 61 和 153 的半胱氨酸残基中至少一个的密码子被突变成编码任一其他氨基酸残基。

[0137] 如本文公开的本发明还包括编码泪液脂质运载蛋白突变蛋白的核酸分子,其包含实验诱变所指出序列位置以外的其他突变。这样的突变经常是可以容忍的,或者甚至证明可提供优点,例如如果它们有助于提高该突变蛋白的折叠效率、血清稳定性、热稳定性或配体结合亲和力的话。

[0138] 本申请所述核酸分子可以与调节序列“有效连接”,以允许表达该核酸分子。

[0139] 如果核酸分子(如 DNA) 包含含有转录和 / 或翻译调节相关信息的序列元件,并且这些序列与编码多肽的核苷酸序列“有效连接”,则称其“能够表达核酸分子”或能“允许表达核苷酸序列”。有效连接是其中调节性序列元件与待表达序列以允许基因表达的方式相连的连接。基因表达所需调节区的确切性质在物种之间可能有所不同,但一般而言,这些区域包含启动子,其在原核生物中包含启动子本身(即指导转录起始的 DNA 元件)以及在转录成 RNA 后发出翻译起始信号的 DNA 元件。这样的启动子区通常包括参与转录及翻译起始的 5' 非编码序列(如 -35/-10 盒),以及原核生物中的 Shine-Dalgarno 元件或真核生物中的 TATA 盒、CAAT 序列和 5' 加帽元件。这些区域还可包括增强子或阻抑基因元件以及用于

将天然多肽靶向至宿主细胞特定区室的翻译的信号和前导序列。

[0140] 此外,3'非编码序列可包含参与转录终止、多腺苷酸化等的调节元件。然而,如果这些终止序列在特定宿主细胞中的功能不令人满意,则可将其替换成在该细胞中有功能的信号。

[0141] 因此,本发明的核酸分子可包含调节序列,优选为启动子序列。在另一优选的实施方案中,本发明的核酸分子包含启动子序列和转录终止序列。合适的原核启动子为例如 tet 启动子、lacUV5 启动子或 T7 启动子。可用于真核细胞表达的启动子实例为 SV40 启动子或 CMV 启动子。

[0142] 本发明的核酸分子还可以是载体或其他类型克隆运载体(如质粒、噬菌粒、噬菌体、杆状病毒、粘粒或人工染色体)的一部分。

[0143] 在一个实施方案中,所述核酸分子包含在质粒中。噬粒载体指编码与目的 cDNA 融合的温和噬菌体(如 M13 或 f1)基因间区域或其功能部分的载体。用这样的噬菌粒和合适的辅助噬菌体(如 M13K07、VCS-M13 或 R408)超感染细菌宿主细胞后,产生完整的噬菌体颗粒,从而使得可以将所编码的异源 cDNA 与噬菌体表面所展示的其相应多肽物理偶联(综述于例如 Kay, B. K. 等(1996)Phage Display of Peptides and Proteins—A Laboratory Manual, 第一版, Academic Press, New York NY; Lowman, H. B. (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26, 401 - 424, 或者 Rodi, D. J. 和 Makowski, L. (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10, 87 - 93)。

[0144] 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以外,这些克隆载体可包括来自与表达所使用的宿主细胞相容的物种的复制及控制序列,以及赋予转化或转染细胞可选择表型的选择标记。大量合适的克隆载体为本领域已知,并可购得。

[0145] 编码本发明脂质运载蛋白突变蛋白的 DNA 分子(特别是含有此类脂质运载蛋白突变蛋白的编码序列的克隆载体)可转化进能表达该基因的宿主细胞中。转化可使用标准技术进行(Sambrook, J. 等(1989), 同上),因此,本发明还涉及含有本文所述核酸分子的宿主细胞。

[0146] 在适于表达编码本发明融合蛋白的核酸序列的条件下培养转化的宿主细胞。合适的宿主细胞可以是原核细胞,如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),或者是真核的,例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、SF9 或 High5 昆虫细胞、永生化哺乳动物细胞系(如 HeLa 细胞或 CHO 细胞)或原代哺乳动物细胞。

[0147] 本发明还涉及用于产生本发明突变蛋白的方法,其中通过遗传工程方法,从编码该突变蛋白的核酸开始产生该突变蛋白、该突变蛋白的片段或该突变蛋白与另一多肽的融合蛋白。该方法还可在体内进行,上述突变蛋白可以在例如细菌或真核宿主生物中产生,接着从该宿主生物或其培养物中分离。还可以在体外产生蛋白质,例如使用体外翻译系统。

[0148] 在体内产生突变蛋白时,通过重组 DNA 技术(上文已概述)将编码本发明突变蛋白的核酸引入合适的细菌或真核宿主生物中。为此,首先使用成熟的标准方法(Sambrook, J. 等(1989), 同上)用克隆载体转化该宿主细胞,所述克隆载体包含编码本发明突变蛋白的核酸分子。接着在允许表达该异源 DNA 并因此允许合成相应多肽的条件下培养该宿主细胞。其后,从细胞或培养基中回收该多肽。

[0149] 在本发明的一些泪液脂质运载蛋白突变蛋白中, Cys 61 与 Cys 153 之间天然存在的二硫键被除去。因此, 这样的突变蛋白 (或不包含分子内二硫键的任何其他泪液脂质运载蛋白突变蛋白) 可在具有还原性氧还环境的细胞区室 (例如革兰氏阴性菌的胞质) 中产生。对于本发明脂质运载蛋白突变蛋白包含分子内二硫键的情况, 使用适当的信号序列将新生多肽引导至具有氧化性氧还环境的细胞区室中可能是优选的。这样的氧化性环境可由革兰氏阴性菌 (如大肠杆菌) 的周质、革兰氏阳性菌的胞外环境或真核细胞的内质网腔来提供, 并通常有利于形成结构性二硫键。然而, 也可以在宿主细胞 (优选大肠杆菌) 的胞质溶胶中产生本发明的突变蛋白。在这种情况下, 该多肽可以可溶并已折叠的状态直接获得, 或者以包含体形式回收, 其后体外复性。另一种选择是使用具有氧化性胞内环境并因此允许在胞质溶胶中形成二硫键的特定宿主菌株 (Venturi M, Seifert C, Hunte C. (2002) "High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm." *J. Mol. Biol.* 315, 1-8.)。

[0150] 然而, 本发明的突变蛋白不一定仅使用遗传工程产生或生产。相反, 脂质运载蛋白突变蛋白也可通过化学合成 (如 Merrifield 固相多肽合成) 或者体外转录和翻译获得。例如, 可以使用分子建模鉴定有希望的突变, 接着在体外合成需要 (设计) 的多肽并研究对给定靶标的结合活性。固相和 / 或溶液相合成蛋白质的方法为本领域所熟知 (综述于例如 Lloyd-Williams, P. 等 (1997) *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*. CRC Press, Boca Raton, Fields, G. B., 以及 Colowick, S. P. (1997) *Solid-Phase Peptide Synthesis*. Academic Press, San Diego, 或者 Bruckdorfer, T. 等 (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 29-43)。

[0151] 在另一实施方案中, 本发明的突变蛋白可使用本领域技术人员已知的成熟方法通过体外转录 / 翻译产生。

[0152] 本发明还涉及包含至少一种本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白或其融合蛋白或缀合物以及可药用赋形剂的药物组合物。

[0153] 本发明的脂质运载蛋白突变蛋白可通过对蛋白质药物而言有疗效的任何肠胃外或非肠胃外 (肠内) 途径给药。肠胃外施用法包括如皮内、皮下、肌内、气管内、鼻内、玻璃体内或静脉内的注射及输注技术, 例如注射液、输注液或酞剂以及气雾剂装置和吸入 (例如气雾剂混合物)、喷雾剂或粉剂的形式。肺部药物递送 (即通过吸入气雾剂 (也可用于鼻内给药) 或气管内滴注) 的概述由例如 J. S. Patton 等 *The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery*. *Proc. Amer. Thoracic Soc.* 2004 Vol. 1 338-344 页给出。非肠胃外递送模式为例如经口 (例如丸剂、片剂、胶囊剂、溶液剂或混悬剂形式) 或直肠 (如栓剂形式)。根据需要, 本发明的突变蛋白可在含有常规无毒可药用赋形剂或载体、添加剂和运载体的制剂中全身或局部给药。

[0154] 在本发明的一个实施方案中, 所述药物肠胃外施用至哺乳动物 (特别是人)。相应的给药方法包括但不限于例如皮内、皮下、肌内、气管内或静脉内的注射及输注技术, 例如注射液、输注液或酞剂以及气雾剂装置和吸入 (例如气雾剂混合物)、喷雾剂或粉剂的形式。静脉内及皮下输注和 / 或注射的组合对于血清半衰期相对短的化合物可能是最方便的。所述药物组合物可以是水溶液、水包油乳剂或油包水乳剂。

[0155] 就这一点而言, 应该注意, 如 Meidan VM 和 Michniak BB 2004

Am. J. Ther. 11(4):312-316 所述的经皮递送技术(如离子电渗、超声促渗或纤维针增强递送)也可用于经皮递送本文所述突变蛋白。非肠胃外递送模式为例如经口(例如丸剂、片剂、胶囊剂、溶液剂或混悬剂形式)或直肠施用(如栓剂形式)。本发明的突变蛋白可在含有常规无毒可药用赋形剂或载体、添加剂和运载体的制剂中全身或局部给药。

[0156] 所施用的突变蛋白剂量可在宽范围内变化,以实现期望的预防效果或治疗应答。例如,这将取决于该化合物对选定配体的亲和力以及该突变蛋白与该配体的复合体在体内的半衰期。此外,最佳剂量将取决于该突变蛋白或其融合蛋白或其缀合物的生物分布、给药模式、受治疾病/病症的严重程度以及患者的医学状况。例如,当在软膏剂中用于局部施用时,可以使用高浓度的泪液脂质运载蛋白突变蛋白。然而,如果需要的话,也可在持续释放制剂中给予该突变蛋白,例如脂质体分散体或基于水凝胶的聚合物微球体,如PolyActive™或OctoDEX™(参阅Bos等,Business Briefing:Pharmatech 2003:1-6)。其他可用的持续释放制剂为例如基于PLGA的聚合物(PR pharmaceuticals)、基于PLA-PEG的水凝胶(Medincell)以及基于PEA的聚合物(Medivas)。

[0157] 因此,可使用可药用成分和成熟的制备法将本发明的突变蛋白配制成组合物(Gennaro, A. L. 和 Gennaro, A. R. (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第二十版, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA)。为了制备药物组合物,可以使用药学惰性的无机或有机赋形剂。为了制备如丸剂、粉剂、明胶胶囊剂或栓剂,可以使用例如乳糖、滑石、硬脂酸及其盐、脂肪、蜡、固体或液体多元醇、天然及硬化的油。用于产生溶液剂、混悬剂、乳剂、气雾剂混合物或粉剂(在使用前将粉剂重建成溶液剂或气雾剂混合物)的合适赋形剂包括水、醇、甘油、多元醇及其合适的混合物以及植物油。

[0158] 所述药物组合物还可包含添加剂,例如填充剂、粘合剂、湿润剂、助流剂、稳定剂、防腐剂、乳化剂,以及溶剂或增溶剂或用于实现贮存效应的试剂。后者是融合蛋白可掺入缓慢或持续释放或靶向递送系统(如脂质体和微囊剂)。

[0159] 可通过多种方法对制剂进行灭菌,包括通过截留细菌的滤器过滤,或通过以无菌固体组合物的形式掺入消毒剂,所述消毒剂可在临用前溶于或分散于无菌水或其他无菌介质中。

[0160] 本发明的另一方面涉及治疗疾病或病症的方法,包括对有此需要的受试者施用包含上述突变蛋白的药物组合物。

[0161] 需要这些治疗的受试者可以是哺乳动物,例如人、狗、小鼠、大鼠、猪、猿(如猕猴),以上仅为几个示例性实例。

[0162] 待根据本发明治疗的疾病和病症的确切性质取决于所使用突变蛋白预期结合的配体。因此,本发明的突变蛋白可用于治疗任何疾病,只要已知参与该疾病或病症的发生的靶分子可展示为本发明核酸文库的表达产物或展示为以其他方式获得的泪液脂质运载蛋白突变蛋白即可。

[0163] 上述以高亲和力结合IL-4受体 $\alpha$ 的突变蛋白或含有它们的药物组合物可用于治疗与Th2免疫应答提高相关的疾病或病症的方法。例如,这样的疾病或病症可以是变态反应或变应性炎症。上述变应性炎症又可与变应性哮喘、鼻炎、结膜炎或皮炎相关(参阅Hage等,Crystal Structure of the Interleukin-4 Receptor alpha chain complex reveals a mosaic binding interface, Cell, Vol. 97, 271-281, April 16, 1999

或者 Mueller 等, Structure, binding and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system, *Biochemica et Biophysica Acta*(2002), 237-250)。

[0164] 在这种情况下, 应该注意, 多种肿瘤细胞表达比正常细胞更多数量的高亲和力 IL-4 受体。这些细胞包括例如人实体瘤如黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、间皮瘤、成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、肾细胞癌、头颈癌、AIDS 相关的卡波西肉瘤 = AIDS KS、激素依赖性 & 非依赖性前列腺癌细胞以及来自前列腺瘤的原代培养物 (参阅 Garland L, Gitlitz B, 等, *Journal of Immunotherapy*. 28:376-381, No. 4, Jul-Aug 2005; Rand RW, Kreitman RJ, 等 *Clinical Cancer Research*. 6:2157-2165, Jun 2000; Husain SR, Kreitman RJ, 等 *Nature Medicine*. 5:817-822, Jul 1999; Puri RK, Hoon DS, 等 *Cancer Research*. 56:5631-5637, 15 Dec 1996, 10. Debinski W, Puri R 等, 或 Husain SR, Behari N, 等 *Cancer Research*. 58:3649-3653, 15 Aug 1998, Kawakami K, Leland P, 等 *Cancer Research*. 60:2981-2987, 1 Jun 2000; 或者 Strome SE, Kawakami K, 等 *Clinical Cancer Research*. 8:281-286, Jan 2002)。例如, 已证实过表达 IL-4 受体的细胞的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)、头颈癌 (SCC、KCCT873)、胰腺癌 (PANC-1 细胞系)、SCC-25:13.000 (+/-500)h 头颈癌细胞系 (ATCC)。IL4R $\alpha$  链在 IL4 内化中发挥重要作用。因此, 当与毒素融合或缀合时, 与 IL-4 受体  $\alpha$  链结合的泪液脂质运载蛋白突变蛋白还可用于治疗肿瘤 (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、蓖麻毒蛋白、肥皂草毒蛋白、假单胞菌外毒素、刺孢霉素或其衍生物、紫杉烷、maytansinoid、tubulysin 和多拉司他汀类似物。多拉司他汀类似物的实例包括但不限于 auristatin E、monomethylauristatin E、auristatin PYE 和 auristatin PHE。

[0165] 就癌症治疗而言, 还可以将结合 IL-4 受体  $\alpha$  链的突变蛋白与细胞抑制剂缀合。这些细胞抑制剂的实例包括顺铂、卡铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、泰索帝 (多西他赛)、紫杉醇、蒽环类抗生素 (多柔比星)、氨甲喋呤、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春烯碱、达卡巴嗪、环磷酰胺、依托泊苷、阿霉素、喜树碱、考布他汀 A-4 相关化合物、氨磺酰类、噻二唑啉类、苯并 [b] 噻吩合成螺酮缩醇吡喃、单四氢呋喃化合物、curacin 和 curacin 衍生物、甲氧基雌二醇衍生物和亚叶酸。

[0166] 就这方面而言, 还应该指出, 本发明泪液脂质运载蛋白突变蛋白与毒素或细胞抑制剂的融合物或缀合物当然不仅限于对 IL-4 受体  $\alpha$  链有亲和力的突变蛋白。相反, 对于本领域技术人员显而易见的是, 与癌细胞表面表达的受体结合的任何泪液脂质运载蛋白突变蛋白都可以融合蛋白或缀合物的形式用于治疗癌症。

[0167] 以高亲和力与 VEGF-R2 或 VEGF 结合的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白或包含它们的药物组合物可用于治疗与血管化作用提高的疾病或病症, 例如癌症、新血管湿性年龄相关性黄斑变性 (AMD)、糖尿病性视网膜病变或黄斑水肿、早产儿视网膜病变或视网膜静脉闭塞。这样的癌症可选自胃肠道、直肠、结肠、前列腺、卵巢、胰腺、乳腺、膀胱、肾、子宫内膜和肺的癌症、白血病和黑素瘤, 以上仅为少数实例。

[0168] 从上文的公开内容中很明显的是, 本发明的突变蛋白或其融合蛋白或缀合物可用于许多应用中。一般而言, 这样的突变蛋白可用于所有使用抗体的应用, 除了特别依赖于 Fc 部分的糖基化的以外。

[0169] 因此,在本发明的另一个方面中,本发明的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白用于检测人泪液脂质运载蛋白的给定的非天然配体。这一用途可包括以下步骤:在适当条件下使该突变蛋白接触怀疑含有给定配体的样品,以允许该突变蛋白与该给定配体形成复合体,并通过适当的信号检测复合的突变蛋白。

[0170] 可检测信号可通过如上述的标记产生,或通过由于结合(即复合物形成)本身而导致的物理特性的变化而产生。一个实例是等离振子表面共振,其数值在结合配偶体结合时发生改变,所述配偶体之一固定在表面上,例如金箔上。

[0171] 本文所述人泪液脂质运载蛋白突变蛋白还可用于分离人泪液脂质运载蛋白的给定非天然配体。这样的用途可包括以下步骤:在适当条件下使该突变蛋白接触推测含有给定配体的样品,以允许该突变蛋白与该给定配体形成复合体,并从样品中分离突变蛋白/配体复合体。

[0172] 在突变蛋白用于检测给定非天然配体和分离给定配体的用途中,突变蛋白和/或靶标均可固定在合适的固相上。

[0173] 本发明的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白还可用于将化合物靶向至预选的部位。就这样的目的而言,将突变蛋白与目的化合物接触,以允许形成复合体。接着将该突变蛋白与目的化合物的复合体递送至预选部位。该用途特别适用于(但不仅限于)将药物(选择性)递送至生物体中的预选部位,例如旨在用该药物进行治疗的受到感染的机体部分、组织或器官。除了在突变蛋白与目的化合物之间形成复合体以外,突变蛋白还可以与给定的化合物反应,以得到突变蛋白与化合物的缀合物。与上述复合体相似,这样的缀合物可适用于将化合物递送至预定的靶部位。这样的突变蛋白与化合物的缀合物还可包括将突变蛋白和化合物彼此共价连接的接头。任选地,这样的接头在血流中稳定,但在细胞环境中可被切割。

[0174] 因此,本文所述突变蛋白及其衍生物可以与抗体或其片段相似地用于许多领域。除了与支持物结合以允许固定或分离给定突变蛋白的靶标或该靶标的缀合物或融合蛋白以外,该突变蛋白还可用于以酶、抗体、放射性物质或任何其他具有生物化学活性或确定的结合特征的基团进行标记。这样,它们各自的靶标或其缀合物或融合蛋白可以被检测或者与它们接触。例如,本发明的突变蛋白可用于通过成熟的分析法(如ELISA或Western印迹)或通过显微术或免疫传感器来检测化学结构。这里,检测信号可使用合适的突变蛋白缀合物或融合蛋白直接产生,或者通过以抗体对结合的突变蛋白进行免疫化学检测而间接产生。

[0175] 医学领域中还存在本发明突变蛋白的众多可能的应用。除了在诊断和药物递送中的用途以外,可以产生与例如组织或肿瘤特异性细胞表面分子结合的本发明突变多肽。这样的突变蛋白例如可以缀合形式或作为融合蛋白用于“肿瘤成像”或直接用于癌症治疗。

[0176] 因此,本发明还涉及本发明的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白用于与给定非天然配体形成复合体的用途。

[0177] 本文所述突变蛋白的另一相关并优选的用途是靶标确认,即分析推测参与疾病或病症的发生或发展的多肽是否确实以某种方式导致该疾病或病症。这种确认蛋白质作为药理学药物靶标的用途利用本发明突变蛋白特异性识别天然构象蛋白质的表面区(即结合天然表位)的能力。在这方面,应该注意,该能力仅在少数重组抗体中有过报道。然而,本

发明突变蛋白用于确认药物靶标的用途不仅限于检测蛋白质作为靶标,而且还包括检测蛋白质结构域、肽、核酸分子、有机分子或金属络合物。

[0178] 通过以下非限制性实例和附图进一步说明本发明,其中:

[0179] 图 1 显示表达载体 pTLPC10(SEQ ID NO:1) 的图。

[0180] 图 2 显示 S148.3 J14 的多肽序列, S148.3 J14 是一种对 IL-4 受体  $\alpha$  具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白。

[0181] 图 3 显示通过 ELISA 进行的亲和力筛选方法,以及对 IL-4 受体  $\alpha$  具有亲和力的突变蛋白得到的结果。

[0182] 图 4 显示对 IL-4 受体  $\alpha$  具有最高亲和力的突变蛋白的多肽序列 (SEQ ID No:3-8)。

[0183] 图 5 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S148.3 J14 ;SEQ ID NO:2) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的 BIAcore 测量。

[0184] 图 6 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S191.5 K12 ;SEQ ID NO:3) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的 BIAcore 测量。

[0185] 图 7 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S148.3 J14AM2C2 ;SEQ ID NO:4) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的 BIAcore 测量。

[0186] 图 8 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S191.4 B24 ;SEQ ID NO:5) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的 BIAcore 测量。

[0187] 图 9 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S191.4 K19 ;SEQ ID NO:6) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的 BIAcore 测量。

[0188] 图 10 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S191.5 H16 ;SEQ ID NO:7) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的 BIAcore 测量。

[0189] 图 11 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S197.8 D22 ;SEQ ID NO:8) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的 BIAcore 测量。

[0190] 图 12 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S148.3 J14 ;SEQ ID NO:2) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的竞争性 ELISA 测量。

[0191] 图 13 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S191.5 K12 ;SEQ ID NO:3) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的竞争性 ELISA 测量。

[0192] 图 14 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S148.3 J14AM2C2 ;SEQ ID NO:4) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的竞争性 ELISA 测量。

[0193] 图 15 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S191.4 B24 ;SEQ ID NO:5) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的竞争性 ELISA 测量。

[0194] 图 16 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S191.4 K19 ;SEQ ID NO:6) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的竞争性 ELISA 测量。

[0195] 图 17 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白竞争性 (S191.5 H16 ;SEQ ID NO:7) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的竞争性 ELISA 测量。

[0196] 图 18 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S197.8 D22 ;SEQ ID NO:8) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的竞争性 ELISA 测量。

[0197] 图 19 显示 IL-4 或 IL-13 及本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S191.5 K12、

S148.3 J14AM2C2、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16 和 S197.8 D22[SEQ ID No:3-8]) 存在下的 TF-1 细胞增殖测定。

[0198] 图 20 显示表达载体 pTLPC27(SEQ ID NO:9) 的图。

[0199] 图 21 显示在人 VEGF165 及本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S209.2 C23、S209.2 D16、S209.2 N9、S209.6 H7、S209.6 H10、S209.2 M17、S209.2 O10[SEQ ID NOs:27-33])、野生型泪液脂质运载蛋白 (pTLPC10 的基因产物, 对照) 或 **Avastin**<sup>®</sup> (Roche ;对照) 存在下由人脐静脉 (HUVEC) 培养的内皮细胞的增殖测定。

[0200] 图 22 显示 PEG 化的本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S148.3 J14 ;SEQ ID NO:2) 与 IL-4 受体  $\alpha$  的结合的 BIAcore 测量。

[0201] 图 23 显示本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S236.1-A22、SEQ ID NO:44) 与固定的 VEGF<sub>8-109</sub> 的结合的 BIAcore 测量。

[0202] 图 24 显示 hVEGF<sub>8-109</sub>、hVEGF<sub>121</sub>、剪接形式 hVEGF<sub>165</sub> 及相应小鼠直向同源物 mVEGF<sub>164</sub> 与人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22(SEQ ID NO:44) 结合的 BIAcore 测量。

[0203] 图 25 显示人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22(SEQ ID NO:44) 在人血浆和玻璃体液中稳定性测试的结果 (图 25A), 以及突变蛋白 S236.1-A22 与白蛋白结合结构域 (ABD) 的融合蛋白 (SEQ ID NO:51) 的稳定性测试结果 (图 25B)。

[0204] 图 26 显示表达载体 pTLPC51, 其编码包含以下的融合蛋白: OmpA 信号序列 (OmpA)、与白蛋白结合结构域 (abd) 融合的突变人泪液脂质运载蛋白 (T1c), 其后为 Strep-tag II。

[0205] 图 27 显示泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22(SEQ ID NO:44) 和突变蛋白 S236.1-A22 与 ABD 的融合蛋白 (SEQ ID NO:51) 与重组 VEGF 结合的 BIAcore 测量。

[0206] 图 28 显示在人血清白蛋白 (HAS) 不存在或存在下用 S236.1-A22 与 ABD 的融合蛋白 (SEQ ID NO:51) 抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 增殖。

[0207] 图 29 显示与 **Avastin**<sup>®</sup> 和野生型泪液脂质运载蛋白所实现的抑制相比, 脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22(SEQ ID NO:44) 对培养自人脐静脉 (HUVEC) 的内皮细胞的 VEGF 诱导的增殖的抑制。

[0208] 图 30 显示与 **Avastin**<sup>®</sup> 所实现的抑制相比, 脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22(SEQ ID NO:44) 对 HUVEC 中 VEGF 介导的 MAP 激酶激活的抑制。

[0209] 图 31 显示与 **Avastin**<sup>®</sup> 和野生型泪液脂质运载蛋白相比, 局部施用泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S209.2\_010(SEQ ID NO:33) 的血管通透性测定的结果。

[0210] 图 32 显示比较泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S209.2\_010(SEQ ID NO:33) 与 **Avastin**<sup>®</sup> 和野生型泪液脂质运载蛋白的中值血管发生指数的 CAM 测定结果。

[0211] 图 33 显示泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22(SEQ ID NO:44) 和突变蛋白 S236.1-A22 与 ABD 的融合蛋白 (SEQ ID NO:51) 的 NMRI 小鼠血浆中的脂质运载蛋白浓度。

[0212] 图 34 显示与野生型泪液脂质运载蛋白、PBS 缓冲液和 **Avastin**<sup>®</sup> 相比, 全身施用泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22 与 ABD 的融合蛋白 (SEQ ID NO:51) 后血管通透性测定的结果。

[0213] 图 35 显示与野生型泪液脂质运载蛋白、PBS 缓冲液和 **Avastin®** 相比,腹膜内施用泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22 与 ABD 的融合蛋白 (SEQ ID NO:51) 的肿瘤异种移植模型 (Swiss 裸鼠) 的结果。

[0214] 图 36 显示在存在和不存在浓度逐渐提高的 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 (SEQ ID NO:4) 的情况下用 IL-4 或 IL-13 刺激的 A549 细胞进行的嗜酸性粒细胞活化趋化因子 (Eotaxin)-3 分泌测定的结果。

[0215] 图 37 显示在存在和不存在浓度逐渐提高的 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 (SEQ ID NO:4) 时,经刺激的外周血单核细胞 (PBMC) 中 IL-4/IL-13 诱导的 CD23 表达。

[0216] 图 38 显示 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 (SEQ ID NO:4) 的 Schild 分析结果。

[0217] 图 39 显示 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 (SEQ ID NO:4) 对人原代 B 细胞的亲和力评估的结果。

[0218] 图 40 显示 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 在静脉内、皮下或气管内给药后的生物利用率测试的结果。

[0219] 图 41 显示 VEGF 刺激的 HUVEC 增殖测定中以 PEG20、PEG30 或 PEG40 PEG 化或未 PEG 化的突变蛋白 S236.1-A22 (SEQ ID NO:44) 的体外功效评估。

[0220] 图 1 显示了表达载体 pTLPC10,其编码包含 OmpA 信号序列 (OmpA)、T7 亲和标记和突变人泪液脂质运载蛋白 (Tlc)、其后为 Strep-tagII 的融合蛋白。用于克隆突变基因表达盒的 BstXI 限制性位点和结构基因侧翼的限制性位点均已标记。基因表达在四环素启动子 / 操纵基因 ( $tet^{p/o}$ ) 控制之下。转录在脂蛋白转录终止子 ( $t_{1pp}$ ) 处终止。该载体还包含复制起点 (ori)、丝状噬菌体 f1 的基因间区域 (f1-IG)、氨苄青霉素抗性基因 (amp) 和四环素抑制基因 (tetR)。将 pTLPC10 核酸序列的相关区段与序列表中 SEQ ID NO:1 所编码氨基酸序列一起复制。该区段从 XbaI 限制性位点开始,以 HindIII 限制性位点结束。该区域以外的载体元件与载体 pASK75 相同,其完整核苷酸序列在德国专利公开 DE 44 17 598 A1 中给出。

[0221] 图 2 显示对 IL-4 受体  $\alpha$  显示结合亲和力的本发明人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (S148.3J14) 的一级结构。前 21 个残基 (下划线) 构成在周质表达后被切割的信号序列。N 端 T7- 标记 (斜体) 和 C 端 Streptag-II (粗体) 是所表征蛋白质的一部分。图 2 还显示在这一发明的示例性突变蛋白中 4 个 N 端氨基酸残基 (H1 H2 L3 A4) 和最后两个 C 端氨基酸残基 (S157 和 D158) 已缺失。

[0222] 图 3 显示亲和力筛选实验的结果。将单克隆抗 StrepTag 抗体 (Qiagen) 包被至 ELISA 平板上,以捕获所表达的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白,使用辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 的 Fc 结构域的多克隆抗体来检测 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc (R&D Systems; 3nM 和 0.75nM) 与所捕获突变蛋白的结合。亲和力提高的克隆给出更高的信号 (左)。将 IL-4 包被至 ELISA 平板上,并将 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc (3nM) 与所表达的突变蛋白一起孵育。使用针对 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 的 Fc 结构域的辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合多克隆抗体来检测具有未占据的 IL-4 结合位点的 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 的结合。拮抗性亲和力提高的克隆给出更低的信号 (右)。用箭头标出了对应于本发明突变蛋白 S148.3 J14 (SEQ ID NO:2) 的信号,并用菱形标出了来自各个克隆的信号。

[0223] 图 4 显示通过 SEQ ID NO:2(S148.3J14) 的亲合力成熟获得的对 IL-4 受体  $\alpha$  具有最高结合亲和力的六种人泪液脂质运载蛋白突变蛋白(S191.5 K12、S148.3 J14AM2C2、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16 和 S197.8 D22[SEQ ID No:3-8]) 的多肽序列。所示一级结构的前 21 个残基(下划线)构成在周质表达后被切割的信号序列。C 端 Streptag-II(粗体)是所表征蛋白质的一部分。图 4 还显示在本发明泪液脂质运载蛋白突变蛋白中,例如可缺失前 4 个 N 端氨基酸残基(HHLA)以及最后两个 C 端氨基酸残基(SD)而不影响该蛋白质的生物功能。

[0224] 图 5-11 显示显示对 IL-4 受体  $\alpha$  具有亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白(S148.3 J14、S191.5 K12、S148.3 J14AM2C2、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16 和 S197.8 D22[SEQ ID No:2-8]) 的 Biacore 测量。约 400RU 的 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 被捕获在之前以抗人 Fc 单克隆抗体包被的 CM-5 芯片上。其后,使不同浓度(图 5:20nM;40nM;80nM;160nM;320nM)或单个浓度 25nM(图 6-11)的突变蛋白经过流动池,记录共振单位的变化。减去来自经同样处理但无任何 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 的流动池的参比信号,使用 BIAevaluation 软件将所得数据以 1:1 Langmuir 模型进行拟合。由于图 6-11 所示实验中相互作用的慢解离动力学情况,通过减去来自同样处理但无任何 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 并减去来自仅注射样品缓冲液的实验的信号来使用双参照。使用 BIAevaluation 软件用质量转运限制模式将所得数据以 1:1 Langmuir 模型进行拟合。在图 6-11 中,显示了五个实验中的一个代表的结果。

[0225] 图 12 显示对 IL-4 受体  $\alpha$  具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白(S148.3 J14;SEQ ID NO:2) 的竞争 ELISA 测量。将 IL-4(20  $\mu$ g/ml)包被至 ELISA 平板上,并将 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc(15nM)与多种浓度的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白或 IL-4 受体特异性单克隆抗体(MAB230,R&D Systems)在室温下一起孵育 1 小时。对 IL-4 包被的平板在室温下给予 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 和突变蛋白混合物 30 分钟。用山羊抗人 Fc-HRP 缀合抗体检测结合的 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc。将数据对以下表达式进行拟合: $0.5 * (-m_0 + m_2 - m_1 + \sqrt{(-m_0 + m_2 - m_1)^2 + 4 * m_1 * m_2})$ 。通过变量  $m_1$  给出  $K_i$ 。显示了三个实验中一个代表的结果。

[0226] 图 13-18 显示对 IL-4 受体  $\alpha$  具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白及作为对照的野生型泪液脂质运载蛋白(TLPC10;pTLPC10 的基因产物)的竞争 ELISA 测量。将针对 IL-4 受体的 IL-4 受体  $\alpha$  特异性单克隆抗体 MAB230(R&D Systems)包被至 ELISA 平板上,并将生物素化的 IL-4 受体  $\alpha$ (IL-4R alpha-bio;0.5nM)与多种浓度的本发明突变蛋白或 TLPC10 在室温下一起孵育 1 小时。将 IL-4R alpha-bio 和突变蛋白混合物在室温下在 MAB230 包被的平板中孵育 30 分钟。用 Extravidin-HRP 检测结合的 IL-4R alpha-bio。将数据以以下表达式进行拟合: $0.5 * (-m_0 + m_2 - m_1 + \sqrt{(-m_0 + m_2 - m_1)^2 + 4 * m_1 * m_2})$ 。通过变量  $m_1$  给出  $K_D$ 。显示了三个实验中的一个代表的结果。

[0227] 图 19 显示了 TF-1 细胞增殖测定的结果。将 TF-1 细胞与连续稀释的所示突变蛋白、IL-4 受体  $\alpha$  特异性单克隆抗体或 IgG2a 抗体同种型对照在 37°C 下孵育 1 小时,之后加入 0.8ng/ml IL-4(a,b)或 12ng/ml IL-13(c,d)72 小时。通过  $^3\text{H}$ -胸苷掺入来测量增殖。

[0228] 图 20 显示噬粒载体 pTLPC27,其编码包含 OmpA 信号序列(OmpA)、T1c、其后为 Strep-tag II 的融合蛋白以及包含氨基酸 217 至 406 的截短形式的 M13 衣壳蛋白 pIII(pIII)的融合蛋白。在 SupE 琥珀抑制基因宿主菌种中部分翻译成 Gln 的琥珀型终止密码子位于 T1c 编码区(包括 Strep-tag II)与截短的噬菌体衣壳蛋白 pIII 的编码区之间,

从而允许在使用非阻抑基因大肠杆菌菌种时可以可溶性表达无 M13 衣壳蛋白 pIII 的 T1c 突变蛋白。用于克隆突变基因表达盒的 BstXI 限制性位点和结构基因侧翼的限制性位点均已标记。基因表达在四环素启动子 / 操纵基因 ( $tet^{p/o}$ ) 控制之下。转录在脂蛋白转录终止子 ( $t_{1pp}$ ) 处终止。该载体还包含复制起点 (ori)、丝状噬菌体 f1 的基因间区域 (f1-IG)、编码氯霉素乙酰转移酶的氨苄青霉素抗性基因 (amp) 和四环素抑制基因 (tetR)。将 pTLPC27 核酸序列的相关区段与序列表中 SEQ ID NO:9 所编码氨基酸序列一起复制。

[0229] 图 21 显示利用对人 VEGF 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白、野生型泪液脂质运载蛋白 (TLPC10) 或 VEGF 特异性治疗性抗体 **Avastin**<sup>®</sup> 进行的增殖测定的结果。将约 1400 个 HUVEC 细胞接种到完全培养基中并以 37°C 过夜孵育, 洗涤细胞并加入含有 0.5% FCS、氢化可的松和庆大霉素 / 两性霉素的基本培养基。以标明的浓度一式三份向孔中加入 VEGF 特异性突变蛋白 S209. 2-C23, S209. 2-D16, S209. 2-N9, S209. 6-H7, S209. 6-H10, S209. 2-M17, S209. 2-O10 (SEQ ID NO:27-33)、野生型泪液脂质运载蛋白 (pTLPC10 的基因产物, 作为对照) 或治疗性 VEGF 特异性单克隆抗体 **Avastin**<sup>®</sup> (Roche; 作为对照)。30 分钟后, 加入人 VEGF165 或人 FGF-2 (作为未受 VEGF 诱导增殖的对照 (未显示)), 6 天后以 CellTiter 96 Aqueous One 生色测定 (chromogenic assay) (Promega) 评估细胞生存力。

[0230] 图 22 显示对 IL-4 受体  $\alpha$  具有亲和力的人泪液脂质运载蛋白的 PEG 化突变蛋白 S148. 3 J14 (SEQ ID NO:2) 的 Biacore 测量。将约 400RU IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 捕获在之前以抗人 Fc 单克隆抗体包被的 CM-5 芯片上。其后, 使不同浓度 (200nM; 67nM; 22nM) 的突变蛋白通过流动池并记录共振单位的改变。减去来自同样处理但无任何 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 的流动池的参照信号, 并使用 BIAevaluation 软件将所得数据以 1:1 Langmuir 模型进行拟合。

[0231] 图 23 显示人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236. 1-A22 (SEQ ID NO:44) 与固定的 VEGF<sub>8-109</sub> 的结合的示例性 Biacore 测量。使用标准胺化学反应将 VEGF<sub>8-109</sub> 固定在 CM5 芯片上。在 500nM 至 16nM 的六种不同浓度下以 30  $\mu$ l / 分钟的流速应用脂质运载蛋白突变蛋白 S236. 1-A22。用 BIA T100 软件进行传感图评估, 以测定该突变蛋白的  $k_{on}$ 、 $k_{off}$  和  $K_D$ 。

[0232] 图 24 显示固定在传感芯片上的突变蛋白 S236. 1-A22 (SEQ ID NO:44) 与不同形式 VEGF 的亲和力测量。基本如 WO 2006/56464 的实施例 9 所述进行亲和力测量, 改动是突变蛋白被固定, 并以 250nM 的浓度注入含有不同 VEGF 变体的 70  $\mu$ l 样品。结果的定性比较显示, 截短形式 hVEGF<sub>8-109</sub> 和 hVEGF<sub>121</sub> 显示基本相同的传感图, 表明对泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236. 1-A22 (SEQ ID NO:44) 相似的亲和力。剪接形式 hVEGF<sub>165</sub> 也显示与泪液脂质运载蛋白突变蛋白的强烈结合, 而相应的小鼠直向同源物 mVEGF<sub>164</sub> 的亲和力稍低。

[0233] 图 25 显示 VEGF- 结合突变蛋白 S236. 1-A22 在 37°C 下在 PBS 和人血清中的稳定性测试, 该测试基本如国际专利申请 WO2006/056464 的实施例 15 所述进行, 只是所使用的浓度为 1mg/ml。通过 HPLC-SEC 判断, 在 7 天的温育期间未检测到该突变蛋白的改变 (数据未显示)。在人血清中孵育该泪液脂质运载蛋白突变蛋白导致亲和力在 7 天后下降至参照的约 70% (图 25a)。还如上述在人血清中测试了 S236. 1-A22 的 ABD 融合蛋白 (SEQ ID NO:51) 的稳定性。在 7 天的孵育期中未检测到活性的损失 (图 25b)。

[0234] 图 26 显示表达载体 pTLPC51, 其编码包含 OmpA 信号序列 (OmpA)、与白蛋白结合结构域 (abd) 融合的突变人泪液脂质运载蛋白 (T1c)、其后为 Strep-tag II 的融合蛋白。用

于克隆突变基因表达盒的 BstXI 限制性位点和结构基因侧翼的限制性位点均已标记。基因表达在四环素启动子 / 操纵基因 ( $tet^{p/o}$ ) 控制之下。转录在脂蛋白转录终止子 ( $t_{1pp}$ ) 处终止。该载体还包含复制起点 (ori)、丝状噬菌体 f1 的基因间区域 (f1-IG)、氨苄青霉素抗性基因 (amp) 和四环素抑制基因 (tetR)。将 pTLPC51 核酸序列的相关区段与序列表中 SEQ ID NO:48 和 49 所编码氨基酸序列一起复制。该区段从 XbaI 限制性位点开始,以 HindIII 限制性位点结束。该区域以外的载体元件与载体 pASK75 相同,其完整核苷酸序列在德国专利公开 DE 44 17 598 A1 中给出。

[0235] 图 27 显示使用表面等离子共振 (Biacore) 对泪液脂质运载蛋白突变蛋白的 ABD 融合物 S236.1-A22 (A22-ABD) (SEQ ID NO:51) (200pM) 与重组 VEGF<sub>8-109</sub> 的亲合力测量。亲合力测量基本如 WO 2006/56464 的实施例 9 所述进行,改动为使用标准胺化学反应将约 250RU 的重组 VEGF<sub>8-109</sub> 与传感芯片直接偶联。以 400nM 的浓度注入 40  $\mu$ l 突变蛋白。发现亲合力基本无改变,测得为 260pM。

[0236] 图 28 显示泪液脂质运载蛋白突变蛋白 A22-ABD (ABD-S236.1-A22 融合物) 在人血清白蛋白存在下的功能性测试,这通过评估其抑制 VEGF 所诱导的 HUVEC 增殖来进行。在明胶包被的平皿中培养 HUVEC (Promocell),并在 P2 至 P8 代之间使用。在第 1 天,以 1400 个细胞 / 孔接种到 96 孔板的完全培养基中。第 2 天,洗涤细胞并加入含有 0.5% FCS、氢化可的松和庆大霉素 / 两性霉素的 100  $\mu$ l 基本培养基。用 20ng/ml VEGF<sub>165</sub> 或 10ng/ml FGF-2 刺激增殖,将它们与脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22-ABD (SEQ ID NO:51) 混合,孵育 30 分钟并加入孔中。在第 6 天测定生存力,将结果表示为抑制百分比。在标明的情况下加入了人血清白蛋白 (HSA, 5  $\mu$ M)。在 5  $\mu$ M HAS 下, >99.8% 的 A22-ABD 在任何给定时间均与 HAS 相关联。

[0237] 图 29 显示本发明突变蛋白对 VEGF 诱导的 HUVEC 增殖的抑制。在明胶包被的平皿中增殖 HUVEC (Promocell),并在 P2 到 P8 代之间使用。在第 1 天,以 1400 个细胞 / 孔接种到 96 孔板的完全培养基中。第 2 天,洗涤细胞并加入含有 0.5% FCS、氢化可的松和庆大霉素 / 两性霉素的 100  $\mu$ l 基本培养基。用 20ng/ml VEGF<sub>165</sub> 或 10ng/ml FGF-2 刺激增殖,将它们与脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22 (SEQ ID NO:44) 混合,孵育 30 分钟并加入孔中。在第 6 天测定生存力,将结果表示为抑制百分比。

[0238] 图 30 显示本发明突变蛋白对 HUVEC 中 VEGF 介导的 MAP 激酶活化的抑制。以 1400 个细胞 / 孔将 HUVEC 接种到 96 孔板的标准培养基 (Promocell, Heidelberg) 中。第 2 天,将 FCS 减少至 0.5%,并继续培养 16 小时。在基本培养基中的 0.5% BSA 中使细胞饥饿 5 小时。在浓度逐渐提高的泪液脂质运载蛋白突变蛋白 A22 或 Avastin (贝伐单抗, Genentech/Roche) 存在下用 VEGF<sub>165</sub> (Reliatech, Braunschweig) 刺激 HUVEC 10 分钟,以获得剂量应答曲线。根据生产商的说明书 (Active Motif, Rixensart, Belgium),使用 ELISA 定量 MAP 激酶 ERK1 和 ERK2 的磷酸化。IC<sub>50</sub> 值测定为:突变蛋白 A22 (SEQ ID NO:44) 为 4.5nM, **Avastin®** 为 13nM。

[0239] 图 31 显示局部施用泪液脂质运载蛋白突变蛋白的血管通透性测定。将体重 350  $\pm$  50g 的 Duncan-Hartley 豚鼠在肩和背部剃毛。该动物通过耳静脉接受静脉注射 1ml 1% Evan's 蓝色染料。30 分钟后,将 20ng VEGF<sub>165</sub> (Calbiochem) 以 10 倍摩尔过量与测试物质或对照物混合,并在 3 $\times$ 4 的方格中皮内注射。30 分钟后,通过 CO<sub>2</sub> 窒息对动物实施安

乐死。注射 VEGF 后 1 小时,取下含有方格图案的皮肤并清除结缔组织。使用图像分析仪 (Image Pro Plus 1.3, Media Cybernetics) 对染料外渗面积进行定量。

[0240] 图 32 显示鸡尿囊绒膜 (CAM) 测定。将含有 FGF-2(500ng)、VEGF(150ng) 以及泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (1.35  $\mu$ g) 或 Avastin(10  $\mu$ g) 的胶原种植体 (onplant) 置于 10 日鸡胚的 CAM 上 (4 个 / 动物, 10 只动物 / 组)。在 24 小时以相同剂量对该种植体再次应用泪液脂质运载蛋白突变蛋白或 Avastin。72 小时后,收集种植体并捕捉图像。通过不知情观察者确定含有至少一个血管的阳性方格的百分比。对 VEGF 拮抗剂 S209.2-010 (SEQ ID NO:33) 和 **Avastin**<sup>®</sup> 以及野生型泪液脂质运载蛋白对照将中值血管发生指数报告为阳性方格的分数。

[0241] 图 33 显示测定 A22 和 A22-ABD 在小鼠中的药代动力学 (PK) 参数。在 NMRI 小鼠中测定静脉内注射泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1 A22 (SEQ ID NO:44) (4mg/kg) 后及静脉或腹膜内快速输注突变蛋白 S236.1 A22 与 ABD 的融合蛋白 (SEQ ID NO:51) (5.4mg/kg) 后的药代动力学 (PK) 参数 (半衰期血浆浓度、生物利用率)。从在预定时间点收集的末端血样中制备血浆,并通过 ELISA 测定脂质运载蛋白突变蛋白的浓度。使用 WinNonlin 软件 (Pharsight Corp., Mountain View, USA) 分析结果。 $T_{1/2}$ A22 静脉内注射:0.42 小时; $T_{1/2}$ A22-ABD 静脉内注射:18.32 小时; $T_{1/2}$ A22-ABD 腹膜内注射:20.82 小时。腹膜内注射施用 A22-ABD 融合蛋白后的生物利用率为 82.5%。

[0242] 图 34 显示全身施用泪液脂质运载蛋白突变蛋白的血管通透性测定。实验前 12 小时,将测试物质或对照静脉内注射到每组三只动物中。第 1 组:PBS 载体;第 2 组:Avastin, 10mg/kg;第 3 组:突变蛋白 S236.1 A22-ABD, 6.1mg/kg;第 4 组:TLPC51:6.1mg/kg。在时间=0 时注射 Evan's Blue。30 分钟后,在 3 $\times$ 4 方格中一式三份皮内注射 4 种剂量的 VEGF (5、10、20 或 40ng)。注射 VEGF 后 30 分钟,处死动物并使用图像分析仪 (Image Pro Plus 1.3, Media Cybernetics) 对染料外渗进行定量。

[0243] 图 35 显示本发明突变蛋白在肿瘤异种移植模型中的作用。将基质胶中的  $1 \times 10^7$  个 A673 横纹肌肉瘤细胞 (ATTC) 皮下接种至经照射 (2.5Gy, Co<sup>60</sup>) 的 Swiss 裸鼠的右侧腹 (n = 12 只 / 组)。腹膜内施用处理,在照射开始的同一天开始并持续 21 天。第 1 组:PBS 载体,每天一次;第 2 组:Avastin (贝伐单抗, Genentech/Roche), 5mg/kg, 每 3 天一次;第 3 组:脂质运载蛋白突变蛋白 A22-ABD (SEQ ID NO:51), 每天一次, 3.1mg/kg;第 4 组:TLPC51, 每天一次, 3.1mg/kg。将脂质运载蛋白突变蛋白 A22-ABD 的剂量选择成实现恒定存在等摩尔数的突变蛋白及 Avastin 的 VEGF 结合位点,这是基于 A22-ABD PK 数据和抗体在小鼠中的估计血清半衰期。用测径器每周两次测量肿瘤大小,并根据式 (长度  $\times$  宽度<sup>2</sup>)/2 来估计肿瘤体积。当肿瘤体积超过 2,000mm<sup>3</sup>时处死小鼠。

[0244] 图 36 显示用 A549 细胞进行的嗜酸性粒细胞活化趋化因子分泌测定的结果。在存在和不存在浓度逐渐提高的 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 (SEQ ID NO:4) 的情况下分别用 0.7nM IL-4 或 0.83nM IL-13 刺激 A549 细胞。在 72 小时后通过使用市售试剂盒测量细胞培养上清液中的嗜酸性粒细胞活化趋化因子 3 浓度来评估嗜酸性粒细胞活化趋化因子 3 的分泌。

[0245] 图 37 显示在不存在和存在浓度逐渐提高的 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 (SEQ ID NO:4) 的情况下经刺激的外周血单核细胞 (PBMC) 中 IL-4/IL-13 诱导的 CD23

表达。从暗黄覆盖区中分离总人 PBMC。加入浓度逐渐提高的 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24, 并分别以终浓度 1.0nM 或 2.5nM 的 IL-4 或 IL-13 刺激细胞。48 小时后, 通过流式细胞术对表达 CD23 的 CD14<sup>+</sup> 单核细胞进行定量。

[0246] 图 38 显示 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 (SEQ ID NO:4) 的 Schild 分析的结果。在不存在或存在若干固定浓度 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 的情况下评估 TF-1 细胞的 IL-4 剂量依赖性增殖 (图 38A)。所得结果的 Schild 分析 (图 38B) 获得的  $K_d$  为 192pM (线性回归) 和 116pM (非线性回归)。

[0247] 图 39 显示结合 IL-4 受体  $\alpha$  的突变蛋白 S191.4 B24 (SEQ ID NO:4) 对人原代 B 细胞的亲和力评估的结果。从人血液中分离 PBMC, 并与不同浓度的结合 IL-4 受体  $\alpha$  的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S191.4 B24 或野生型人泪液脂质运载蛋白 (TLPC26) 一起孵育。接着用抗 CD20-FITC 单克隆抗体和生物素化的抗脂质运载蛋白抗血清、其后用链霉亲和素-PE 染色细胞。野生型脂质运载蛋白和结合 IL-4 受体  $\alpha$  的脂质运载蛋白突变蛋白 S191.4 B24 的结果分别示于图 39A 和 B。将所测定的 PE 阳性 B 细胞百分比对脂质运载蛋白浓度进行拟合 (图 39C), 并从所得曲线中计算  $EC_{50}$ 。IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 (SEQ ID NO:4) 的  $EC_{50}$  计算为 105pM。

[0248] 图 40 显示静脉内、皮下或气管内施用后结合 IL-4 受体  $\alpha$  的突变蛋白 S191.4 B24 的生物利用率测试的结果。通过所示途径, 以 4mg/kg 对 Sprague-Dawley 大鼠给予单剂量的突变蛋白 S191.4 B24。使用微型喷雾给药装置 (PennCentury, USA) 进行气管内施用。在预定时间点获得血浆样品并进行夹层 ELISA 分析, 以测定具有功能活性的突变蛋白的剩余浓度。通过非房室 PK 分析来分析浓度。生物利用率在皮下给药后为 100%, 在气管内递送后为 13.8%。

[0249] 图 41 显示与人泪液脂质运载蛋白野生型相比, 未 PEG 化或以 PEG20、PEG30 或 PEG40PEG 化的突变蛋白 S236.1-A22 (SEQ ID NO:44) 的体外效力评估。通过在 VEGF 刺激的 HUVEC 增殖测定中滴定各自的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白并测定增殖抑制来测定  $IC_{50}$ 。

## 实施例

[0250] 除非另外指明, 否则均使用成熟的重组基因技术方法, 例如 Sambrook 等 (同上) 所述。

[0251] 实施例 1: 产生具有  $2 \times 10^9$  种独立的 T1c 突变蛋白的文库

[0252] 通过协同诱变成熟野生型人泪液脂质运载蛋白中 18 个选定的氨基酸位置 26、27、28、29、30、31、32、33、34、56、57、58、80、83、104、105、106 和 108 来制备高复杂性的泪液脂质运载蛋白 (T1c) 随机文库。为此, 在根据前述策略的两个步骤中, 使用简并性引物寡脱氧核苷酸通过聚合酶链式反应 (PCR) 装配以靶向方式将相应密码子随机化的基因盒, (Skerra, A. (2001) "Anticalins": a new class of engineered-ligand-binding proteins with antibody-like properties. *J. Biotechnol.* 74, 257-275)。在该文库设计中, 泪液脂质运载蛋白野生型序列中的前 4 个 N 端氨基酸残基 (HHLA) 和最后两个 C 端氨基酸残基 (SD) 被缺失 (为此, 所附序列中所有的泪液脂质运载蛋白突变蛋白均含有野生型序列的 Ala5 作为 N 末端残基, Gly156 作为 C 末端残基 (后者任选地与例如亲和标记融合))。

[0253] 在产生随机文库的第一个步骤中, 使用引物 TL46 (SEQ ID NO:10) 和 TL47 (SEQ

ID NO:11) 为 T1c 第一个和第二个暴露环制备带有随机化密码子的 PCR 片段,使用引物 TL48(SEQ ID NO:12) 和 TL49(SEQ ID NO:13) 平行地为 T1c 第三个和第四个暴露环制备带有随机化密码子的另一 PCR 片段。在第二个步骤中,使用连接寡脱氧核苷酸将这两个 PCR 片段合并,并在使用引物 AN-14(SEQ ID NO:14)、TL50bio(SEQ ID NO:15) 和 TL51 bio(SEQ ID NO:16) 的 PCR 反应中作为模板,以获得装配好的随机化基因盒。

[0254] 第一步中的两个 PCR 反应 (1a 和 1b) 各在 100  $\mu$ l 体积中进行,每个反应分别使用作为模板的 10ng pTLPC10 质粒 DNA(图 1) 以及 50pmol 的每对引物(分别为 TL46 和 TL47,或者 TL48 和 TL49),它们根据常规的亚磷酸法合成。此外,反应混合物含有 10  $\mu$ l 10 $\times$ Taq 反应缓冲液(100mM Tris/HCl pH 9.0, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1% v/v Triton X-100) 和 2  $\mu$ l dNTP-Mix(10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)。用水补足体积后,加入 5u Taq DNA 聚合酶(5u/l, Promega),在带热盖的可编程热循环仪(Eppendorf) 中进行 94 $^{\circ}$ C 1 分钟、58 $^{\circ}$ C 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 1.5 分钟的 20 个循环,其后 60 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟完成反应。使用 GTQ 琼脂糖(Roth) 和 Wizard DNA 提取试剂盒(Promega),通过制备型琼脂糖凝胶电泳分离具有分别为 135bp 和 133bp 的期望大小的扩增产物。

[0255] 在第二个 PCR 步骤中,制备 1000  $\mu$ l 混合物,其中在 500pmol 每种侧翼引物 TL50bio(SEQ ID NO:15) 和 TL51bio(SEQ ID NO:16) 以及 10pmol 中介体引物 AN-14(SEQ ID NO:14) 存在下,使用约 500fmol 来自 PCR 反应 1a 和 1b 的片段作为模板。两种侧翼引物均在其 5' 末端带有生物素基团,因此允许在 BstXI 切割后通过包被有链霉亲和素的顺磁性珠从不完全消化的产物中分离 PCR 产物。此外,该反应混合物含有 100  $\mu$ l 10 $\times$ Taq 缓冲液、20  $\mu$ l dNTP 混合物(10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、50u Taq DNA 聚合酶(5u/l, Promega),并用水将终体积补足至 1000  $\mu$ l 终体积。将混合物分成 100  $\mu$ l 等分试样并以 94 $^{\circ}$ C 1 分钟、57 $^{\circ}$ C 1 分钟、72 $^{\circ}$ C 1.5 分钟的 20 个循环进行 PCR,随后最终以 60 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟。使用 E. Z. N. A. Cycle-Pure Kit(PeqLab) 纯化 PCR 产物。

[0256] 就后续的克隆而言,首先根据生产商的说明,用限制性酶 BstXI(Promega) 切下代表核酸形式 T1c 突变蛋白文库中心部分的这一片段,接着如上述通过制备型琼脂糖凝胶电泳进行纯化,产生大小为 301 个碱基对的双链 DNA 片段。

[0257] 使用以链霉亲和素包被的顺磁性珠(Merck),通过其 5' - 生物素标签除去未消化或未完全消化的 DNA 片段。为此,用 100  $\mu$ l TE 缓冲液(10mM Tris/HCl pH 8.0, 1mM EDTA) 将 150  $\mu$ l 市售的链霉亲和素包被的顺磁性颗粒的悬浮液(10mg/ml 的浓度) 洗涤三次。接着借助磁体将颗粒排干水分并与 100  $\mu$ l TE 缓冲液中的 70pmol 经消化 DNA 片段在室温下混合 15 分钟。接着借助磁体收集 Eppendor 容器壁上的顺磁性颗粒,回收完全消化的 DNA 片段用于后续的连接反应中。

[0258] 根据生产商的说明,用限制性酶 BstXI(Promega) 切割载体 pTLPC27(图 20),如上述通过制备型琼脂糖凝胶电泳纯化获得的大载体片段,产生代表载体骨架的大小为 3772 个碱基对的双链 DNA 片段。

[0259] 就连接反应而言,在总体积 10.76ml(50mM Tris/HCl pH 7.8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM ATP, 50  $\mu$ g/ml BSA) 中,在 1074Weiss 单位 T4DNA 连接酶(Promega) 存在下将 40pmol PCR 片段和 40pmol 载体片段(pTLPC27) 以 16 $^{\circ}$ C 孵育 48 小时。接着通过加入 267  $\mu$ l 酵母 tRNA(水中 10mg/ml 溶液(Roche))、10.76ml 5M 乙酸铵和 42.7ml 乙醇将连接混合物

中的 DNA 沉淀 1.5 小时。沉淀后,用 70% EtOH 洗涤 DNA 沉淀并干燥。最后,将 DNA 在总体积 538  $\mu$ l 水中溶解至终浓度 200  $\mu$ g/ml。

[0260] 根据 Tung 和 Chow(Trends Genet.11(1995),128-129) 以及 Hengen(Trends Biochem. Sci. 21(1996),75-76) 所述方法进行细胞大肠杆菌菌株 XL1-Blue 的电感受态细菌(Bullock 等,同上)的制备。通过加入 XL1-Blue 的过夜培养物并在 2 升锥形瓶中以 140rpm 和 26 $^{\circ}$ C 孵育而将 1 升 LB 培养基(10g/L Bacto Tryptone,5g/L 细菌用酵母提取物,5g/L NaCl,pH 7.5)调整成 600nm 处的吸光度  $OD_{600}=0.08$ 。达到  $OD_{600}=0.6$  后,将培养物在冰上冷却 30 分钟,其后以 4000g 和 4 $^{\circ}$ C 离心 15 分钟。将细胞用 500ml 冰预冷的 10% w/v 甘油洗涤两次,最后重悬于 2ml 冰预冷的 GYT 培养基(10% w/v 甘油、0.125% w/v 酵母提取物、0.25% w/v 胰蛋白胍)中。接着将细胞分成等分试样(200  $\mu$ l),在液氮中速冻并保存于 -80 $^{\circ}$ C。

[0261] 在 4 $^{\circ}$ C 下使用 Micro Pulser 系统(BioRad)结合来自同一销售商的穿孔杯(电极距离 2mm)进行电穿孔。将 10  $\mu$ l 等分试样的连接后的 DNA 溶液(含有 1  $\mu$ g DNA)与 100  $\mu$ l 细胞悬液混合,首先在冰上孵育 1 分钟,接着转移到预冷的穿孔杯中。使用 5ms 和 12.5kV/cm 场强的参数进行电穿孔,其后立即将悬液在 2ml 冰预冷的 SOC 培养基(20g/L Bacto Tryptone,5g/L 细菌用酵母提取物,10mM NaCl,2.5mM KCl,pH 7.5,高压灭菌,在电穿孔前加入 10ml/L 1M  $MgCl_2$ 和 1M  $MgSO_4$ 以及 20ml/L 20%葡萄糖)中稀释,随后以 37 $^{\circ}$ C 和 140rpm 孵育 60 分钟。其后,将培养物在含有 100  $\mu$ g/ml 氯霉素(2YT/Cam)的 2L 2 $\times$ YT 培养基(16g/L Bacto Tryptone,10g/L 细菌用酵母提取物,5g/L NaCl,pH 7.5)中稀释,得到 0.26 的  $OD_{550}$ 。将培养物在 37 $^{\circ}$ C 下孵育,直至  $OD_{550}$ 再提高 0.6 单位。

[0262] 通过在 54 次电穿孔中使用总计 107.6  $\mu$ g 已连接的 DNA,获得了总计约  $2.0 \times 10^9$  个转化体。将转化体进一步用于制备编码作为融合蛋白的 T1c 突变蛋白文库的噬菌粒。

[0263] 就噬菌粒文库的制备而言,用  $1.3 \times 10^{12}$ pfu VCS-M13 辅助噬菌体(Stratagene)感染 41 上述培养物。37 $^{\circ}$ C 搅拌 45 分钟后,将孵育温度降至 26 $^{\circ}$ C。温度平衡 10 分钟后,加入 25  $\mu$ g/l 无水四环素,以诱导基因表达 T1c 突变蛋白与噬菌体衣壳蛋白之间的融合蛋白。允许在 26 $^{\circ}$ C 产生噬菌粒 11 小时。通过离心除去细菌后,用 20% (w/v) 聚乙二醇 8000(Fluka)、15% (w/v)NaCl 从培养物上清液沉淀噬菌粒两次,最后溶于 PBS(4mM  $KH_2PO_4$ ,16mM  $Na_2HPO_4$ ,115mM NaCl)中。

[0264] 实施例 2: 噬菌粒呈递以及选择对 IL-4 受体  $\alpha$  具有亲和力的 T1c 突变蛋白

[0265] 利用实施例 1 所得的噬菌粒进行噬菌粒展示和选择,基本如 WO 2006/56464 的实施例 2 所述的进行,有以下修改:以 200nM 的浓度使用靶蛋白(IL-4 受体  $\alpha$ ,Peprrotech),并作为生物素化蛋白呈递给文库,随后使用链霉亲和素珠(Dynal)捕获噬菌体-靶标复合体。或者,以 200nM 浓度 Fc-融合蛋白(IL-4 受体  $\alpha$ -Fc,R&D System)的形式使用靶蛋白,其后根据生产商的说明,使用 G 蛋白珠(Dynal)并通过将 Fc-融合蛋白固定在以抗人 Fc 捕获抗体(Jackson Immuno Research)包被的免疫棒(Nunc)上来捕获噬菌体-靶标复合体。进行三轮或四轮选择。

[0266] 实施例 3: 使用高通量 ELISA 筛选来鉴定 IL-4 受体  $\alpha$  特异性突变蛋白

[0267] 基本如 WO 2006/56464 的实施例 3 所述对根据实施例 2 选择的突变蛋白进行筛选,有以下修改:表达载体为 pTLPC10(图 1)。所使用的靶蛋白为 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc(R&D

Systems) 和 IL-4 受体  $\alpha$  (Peprotech), 均为  $2 \mu\text{g/ml}$ 。

[0268] 筛选了如实施例 2 所述选择的 5632 个克隆, 鉴定了指示从文库中成功分离突变蛋白的 2294 个原始命中。使用该方法鉴定了克隆 S148.3J14 (SEQ ID NO:2)。S148.3J14 的序列也示于图 2。

[0269] 实施例 4: 使用易错 PCR 对突变蛋白 S148.3J14 进行亲和力成熟

[0270] 使用寡核苷酸 TL50 bio (SEQ ID NO:15) 和 TL51 bio (SEQ ID NO:16), 基本如 WO 2006/56464 实施例 5 所述产生基于突变蛋白 S148.3 J14 (SEQ ID NO:2) 的变体文库, 得到每个结构基因平均带有 3 个替换的文库。

[0271] 如实施例 2 所述进行噬菌粒选择, 但使用有限的靶标浓度 (2nM、0.5nM 和 0.1nM 的 IL-4 受体  $\alpha$ , Peprotech Ltd)、延长的洗涤时间以及针对 IL-4 受体  $\alpha$  的拮抗性单克隆抗体 (MAB230, R&D Systems ;1 小时洗涤时间和 2 小时洗涤时间) 或短孵育时间 (30 秒、1 分钟和 5 分钟)。进行三轮或四轮选择。

[0272] 实施例 5: 使用定点随机法对突变蛋白 S148.3 J14 进行亲和力成熟

[0273] 通过将位置 34、53、55、58、61、64 和 66 随机化成在这些位置上允许全部 20 种氨基酸来设计基于突变蛋白 S148.3 J14 (SEQ ID NO:2) 的变体文库。基本如实施例 1 所述构建文库, 改动为分别使用脱氧核苷酸 TL70 (SEQ ID NO:17)、TL71 (SEQ ID NO:18) 和 TL72 (SEQ ID NO:19) 代替 TL46、TL47 和 AN-14。

[0274] 分别使用有限的靶标浓度 (0.5nM 和 0.1nM IL-4 受体  $\alpha$ , Peprotech) 与延长的洗涤时间及针对 IL-4 受体  $\alpha$  的竞争性单克隆抗体 (MAB230, R&D Systems ;1 小时洗涤) 或短孵育时间 (10 分钟) 组合, 如实施例 2 所述进行噬菌粒选择。进行三轮或四轮选择。

[0275] 实施例 6: 使用高通量 ELISA 筛选对 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白进行亲和力筛选

[0276] 如实施例 3 所述进行筛选, 改动为使用 3nM 浓度的 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc (R&D Systems), 并加入了 i) 将单克隆抗 -Strep 标签抗体 (Qiagen) 包被在 ELISA 平板上, 以捕获产生的突变蛋白, 并使用针对 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 的 Fc 结构域的 HRP (辣根过氧化物酶) 缀合的多克隆抗体检测 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc (R&D Systems, 3nM 和 0.75nM) 与所捕获的泪液脂质运载蛋白突变蛋白的结合。另外, 在备选的筛选设置中 ii) 将 IL-4 包被在 ELISA 平板上, 将 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc (R&D Systems, 3nM) 与所表达的突变蛋白一起孵育, 使用针对 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 的 Fc 结构域的 HRP (辣根过氧化物酶) 缀合的多克隆抗体检测 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc 与未占据的 IL-4 结合位点的结合。

[0277] 这样的筛选的结果示于图 3。与作为亲和力成熟基础的突变蛋白 S148.3 J14 (SEQ ID NO:2) 相比, 如实施例 4 和 5 所述选择的大量突变蛋白被鉴定为对 IL-4 受体  $\alpha$  具有提高的亲和力。使用该方法鉴定了突变蛋白 S191.5 K12、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、S197.8 D22 和 S148.3 J14AM2C2 (SEQ ID NO:3-8)。S191.5 K12、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、S197.8 D22 和 S148.3 J14AM2C2 的序列也示于图 4。

[0278] 实施例 7: 产生 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白

[0279] 为制备性产生 IL-4 受体  $\alpha$  特异性突变蛋白, 根据 Schlehuber, S. 等 (J. Mol. Biol. (2000), 297, 1105-1120) 所述方案, 将带有表达载体 pTLPC10 (图 1) 上所编码各个突变蛋白的大肠杆菌 K12 菌株 JM83 以 2L 摇瓶培养在 LB- 氨苄青霉素培养基中培养。在需要大量蛋白质时, 基于 Schiweck, W. 和 Skerra, A. Proteins (1995) 23, 561-565) 所述方案, 在

11 或 101 容器中,使用带有各自表达载体的大肠杆菌 W3110 通过台式发酵罐培养进行周质生产。

[0280] 根据 Skerra, A. & Schmidt, T. G. M. (2000) (Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 326A, 271-304) 所述方法,使用适当柱床体积的柱通过链霉亲和素亲和层析在单个步骤中从周质级分中纯化突变蛋白。为了获得更高的纯度以及除去任何聚集的重组蛋白,最后在 PBS 缓冲液存在下在 Superdex 75HR 10/30 柱 (24-ml 柱床体积, Amersham Pharmacia Biotech) 上最后进行突变蛋白的凝胶过滤。合并单体蛋白级分,通过 SDS-PAGE 检查纯度,并用于进一步生化表征。

[0281] 实施例 8: 使用 Biacore 进行亲和力测量

[0282] 基本如 WO 2006/56464 实施例 9 所述进行亲和力测量,改动是固定约 400RU IL-4 受体  $\alpha$ -Fc (R&D Systems) (而不是 WO 2006/56464 中用作靶标的 2000RU 人 CTLA-4 或小鼠 CTLA-4-Fc),并注射 25mM 浓度的 100  $\mu$ l 突变蛋白 (而不是 WO 2006/56464 中使用浓度 5 - 0.3  $\mu$ M 的纯化脂质运载蛋白突变蛋白的 40  $\mu$ l 样品)。

[0283] 使用 S148.3 J14、S191.5 K12、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、S197.8 D22 和 S148.3 J14AM2C2 进行的亲和力测量的结果示于图 5-11,并总结于表 I

[0284]

克隆	亲和力 Biacore (pM)	$k_{on}$ (1/Ms $\times 10^5$ )	$k_{off}$ (1/s $\times 10^{-5}$ )
----	------------------	--------------------------------	-----------------------------------

[0285]

<b>S148.3 J14</b>	<b>37500</b>	<b>1.4</b>	<b>517</b>
<b>S191.5 K12</b>	<b>13.5 (2.9)</b>	<b>58 (27)</b>	<b>7.7 (3.3)</b>
<b>S148.3 AM2C2</b>	<b>17.9 (2.7)</b>	<b>23 (1.7)</b>	<b>4.2 (0.7)</b>
<b>S191.4 B24</b>	<b>19.3 (3.3)</b>	<b>26 (6.7)</b>	<b>4.9 (1.0)</b>
<b>S191.4 K19</b>	<b>20.1 (14)</b>	<b>17 (2.7)</b>	<b>3.6 (2.8)</b>
<b>S191.5 H16</b>	<b>24.3 (12)</b>	<b>17 (1.8)</b>	<b>4.1 (1.6)</b>
<b>S197.8 D22</b>	<b>55.8 (4.2)</b>	<b>11 (1.3)</b>	<b>6.3 (1.0)</b>

[0286] 表 I. 通过 Biacore 测定的本发明选定的突变蛋白对 IL-4 受体  $\alpha$  的亲和力。显示了五个实验的平均值 (标准差)。

[0287] 实施例 9: 使用抑制 ELISA 鉴定 IL-4 的拮抗剂

[0288] 在抑制 ELISA 中评估所选突变蛋白对 IL-4 与 IL-4 受体  $\alpha$  之间相互作用的抑制。因此,将恒定浓度的 IL-4 受体  $\alpha$  (0.5nM 生物素化的 IL-4 受体  $\alpha$ , Peprotech, 或 15nM IL-4 受体  $\alpha$ -Fc, R&D Systems) 与泪液脂质运载蛋白突变蛋白的连续稀释液一起孵育,在 ELISA 中定量具有未占据的 IL-4 结合位点的 IL-4 受体  $\alpha$  的量,在所述 ELISA 中用 IL-4 或拮抗性抗 IL-4 受体  $\alpha$  单克隆抗体包被平板。使用 HRP 缀合的 Extravidin (Sigma) 检测已结合的生物素化 IL-4 受体  $\alpha$ , 并与确定量生物素化 IL-4 受体  $\alpha$  的标准曲线进行比较。使用突变蛋白 S148.3 J14、S191.5 K12、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、S197.8 D22 和

S148.3 J14AM2C2 测量的结果示于图 12-18,并总结于表 II。

[0289]

克隆	亲和力竞争 ELISA (pM)
<b>S148.3 J14</b>	<b>17300</b>
<b>S191.5 K12</b>	<b>25.3 (9.9)</b>
<b>S148.3 AM2C2</b>	<b>40.7 (14.8)</b>
<b>S191.4 B24</b>	<b>49.2 (14)</b>
<b>S191.4 K19</b>	<b>120 (32)</b>
<b>S191.5 H16</b>	<b>61.7 (11.4)</b>

[0290]

<b>S197.8 D22</b>	<b>140 (37)</b>
-------------------	-----------------

[0291] 表 II. 通过竞争 ELISA 测定的所选本发明泪液脂质运载蛋白突变蛋白对 IL-4 受体  $\alpha$  的拮抗能力和亲和力。显示了三个实验的平均值 (标准差)。

[0292] 实施例 10: 使用 TF-1 增殖测定鉴定 IL-4 及 IL-13 信号转导的拮抗剂

[0293] 基本如 Lefort 等 (Lefort S., Vita N., Reeb R., Caput D., Ferrara P. (1995) FEBS Lett. 366(2-3), 122-126) 所述进行以 IL-4 和 IL-13 刺激的 TF-1 细胞增殖测定。来自 TF-1 增殖测定的结果示于图 19, 其显示高亲和力变体 S191.5 K12、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、S197.8 D22 和 S148.3 J14AM2C2 是 IL-4 和 IL-13 所诱导信号转导及增殖的强力拮抗剂。

[0294] 实施例 11: 抗 IL-4 受体  $\alpha$  人泪液脂质运载蛋白突变蛋白抑制 STAT6 介导的途径

[0295] 在含有 10% 热灭活胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、100 单位/ml 青霉素、100g/ml 氯霉素的 RPMI1640 中培养 TF-1 细胞, 并补充 2ng/ml 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。将细胞以  $5 \times 10^4$  个细胞/ml 接种至 100mm 直径组织培养皿中的总体积 20 ml 培养基中, 每 2 至 3 天将其分开并以此浓度再接种, 在 5% CO<sub>2</sub> 的加湿气氛中在 37°C 下培养。

[0296] 通过 1200 rpm 离心 5 分钟来收获 TF-1 细胞, 并通过在含有 1% 热灭活胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、100 单位/ml 青霉素、100g/ml 链霉素的 RPMI1640 (RPMI-1% FCS) 中 1200rpm 离心 5 分钟来洗涤两次。以  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 将细胞重悬于 RPMI-1% FCS 中, 以 1ml 接种到 24 孔板中并培养过夜。第二天, 将 TF-1 细胞与 20g/ml IL-4 受体  $\alpha$  特异性突变蛋白或阴性对照突变蛋白一起培养。将细胞的其他等分试样在空气中 5% CO<sub>2</sub> 的加湿气氛中在 37°C 下仅用培养基培养 1 小时。其后, 分别以终浓度 0.8ng/ml 或 12ng/ml 加入人重组 IL-4 或 IL-13, 在空气中 5% CO<sub>2</sub> 的加湿气氛中在 37°C 下将培养物孵育 10 分钟。

[0297] 通过加入 42  $\mu$ l 37% 甲醛 (1.5% 终浓度) 在室温 (RT) 下将细胞固定 10 分钟, 并转移至 5ml 圆底聚苯乙烯管 (BD Falcon) 中。用含有 1% FCS 的 2ml PBS (PBS-FCS) 洗涤细胞, 1200rpm 离心 5 分钟进行沉淀, 弃去上清液。通过加入 500  $\mu$ l 冰预冷的甲醇并剧烈涡旋来透化细胞。4°C 孵育 10 分钟后, 通过以 2ml PBS-FCS 以 1200rpm 离心 5 分钟洗涤两次。将细胞重悬于 100  $\mu$ l PBS-FCS 中, 并用 20  $\mu$ l 抗磷酸化 STAT-6 藻红蛋白 (PE)- 标记的抗

体 (克隆 Y641 ;BD Biosciences) 在室温下避光染色 30 分钟。最后,通过 1200rpm 离心 5 分钟而用 2ml PBS-FCS 洗涤细胞两次并重悬浮在 500  $\mu$ l PBS-FCS 中。使用 FACScalibur 流式细胞仪 (BD Biosciences),通过流式细胞术分析细胞。从至少 10000 个门控细胞收集数据。

[0298] 通过流式细胞术测量 IL-4 受体  $\alpha$  特异性突变蛋白 S191.4 B24 (SEQ ID NO:5) 和 S191.4K19 (SEQ ID NO:6) 抑制 TF-1 细胞中 IL-4 和 IL-13 介导的 STAT-6 磷酸化的能力。基于细胞大小 (前向散射, FSC) 和细胞粒度 (侧向散射, SSC) 使用对照 TF-1 细胞 (未刺激的和未染色的), 对完整细胞设置门控, 以基于 FL2 值 (通道 2 荧光 ;PE 强度) 排除 99% 的对照未染色群体。用抗磷酸化 STAT-6PE 标记抗体对未刺激细胞的其他等分试样进行染色。

[0299] STAT-6 磷酸化测定的结果清楚地显示, IL-4 受体  $\alpha$  特异性突变蛋白 S191.4 B24 和 S191.4K19 显著抑制 TF-1 细胞中 IL-4 和 IL-13 诱导的 STAT-6 磷酸化 (数据总结于表 III)。

[0300]

处理	%阳性	MFI
未染色	1	3.8
染色的未刺激的	6	5.8
IL-4	75	15.8
IL-13	77	16.4
pTLPC10+IL-4 (阴性对照)	72	13.1
pTLPC10+IL-13 (阴性对照)	84	18.6
S191.4 K19+IL-4	6	4.9

[0301]

S191.4 K19+IL-13	8	5.0
S191.4 B24+IL-4	6	4.8
S191.4 B24+IL-13	11	5.5

[0302] 表 III. 通过流式细胞术测量 S191.4 B24 和 S191.4 K19 (SEQ ID NO:5 和 6) 抑制 TF 细胞中 IL-4 和 IL-13 诱导的 STAT-6 磷酸化的能力。显示了 STAT-6 磷酸化阳性染色的门控细胞百分比以及所有门控细胞的中值荧光强度 (MFI)。

[0303] 实施例 12: 抗人 IL-4 受体  $\alpha$  突变蛋白与猕猴外周血淋巴细胞交叉反应

[0304] 由 Astra Zeneca (Macclesfield, UK) 的临床药理学单位 (CPU) 将健康人志愿者的全血收集到 9ml 肝素锂管中。从 Harlan Sera-Lab (Bicester, UK) 或者 B and K Universal Ltd (Hull, UK) 获得来自猕猴的肝素化全血样品 (合并自至少两只动物)。

[0305] 将人和猕猴全血以红细胞裂解缓冲液 (0.15M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.0mM  $\text{KHC}\text{O}_3$ , 0.1mM EDTA, pH 7.2-7.4) 以 1:5 稀释,接着在室温下倒置孵育 10 分钟。将细胞以 1200rpm 离心 5 分钟,除去上清液。将细胞重悬于裂解缓冲液中并重复操作,直至上清液中不再含有血红蛋白。将细胞重悬于与血液原始体积相同体积的冷冻介质 (1:10, 二甲亚砜:胎牛血清) 中并转移至冻存管。每管含有来自 1ml 血的细胞。将细胞在  $-80^\circ\text{C}$  下冷冻过夜,并转移至液氮中保存。

[0306] 将冷冻的外周血细胞在  $37^\circ\text{C}$  下迅速解冻并用 FACS 缓冲液 (FBS/1% FCS) 洗涤。将细胞沉淀重悬于 FACS 缓冲液中 (1ml 缓冲液/管)。将 100  $\mu\text{l}$  等分试样置于 96 孔圆底平板中,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  FACS 缓冲液,将平板在  $4^\circ\text{C}$  下以 1200rpm 离心 5 分钟,弃去上清液。其后,通过低速涡旋而重悬细胞,加入 100  $\mu\text{l}$  稀释的第一抗体 (抗 CD124 或 IgG1 同种型对照, eBioscience, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) 或抗 IL-受体  $\alpha$  突变蛋白 (10  $\mu\text{g/ml}$ ), 并将细胞在冰上孵育 30 分钟。通过加入 100  $\mu\text{l}$  FACS 缓冲液并在  $4^\circ\text{C}$  下 1200rpm 离心 5 分钟而将细胞洗涤一次,弃去上清液,低速涡旋使细胞重悬。使用 200  $\mu\text{l}$  FACS 缓冲液重复两次以洗涤细胞。最后一次离心后,将细胞沉淀重悬于 5  $\mu\text{g/ml}$  的 100  $\mu\text{l}$  适当的第二抗体 (生物素化的抗人脂质运载蛋白-1 抗体 (R&D Systems) 或生物素化的大鼠抗小鼠 IgG (Insight Biotechnology Ltd)) 中并将细胞在冰上孵育 30 分钟。通过在  $4^\circ\text{C}$  下 1200rpm 离心 5 分钟而在 100  $\mu\text{l}$  FACS 缓冲液中洗涤细胞,弃去上清液并通过低速涡旋而重悬细胞。使用 200  $\mu\text{l}$  FACS 缓冲液和  $4^\circ\text{C}$  1200rpm 离心 5 分钟再洗涤两次。最后一次离心后,将细胞沉淀重悬于 100  $\mu\text{l}$  检测试剂 (藻红蛋白 [PE] 标记的链霉亲和素 (eBioscience); 1.25  $\mu\text{g/ml}$ ) 中并在冰上避光孵育 30 分钟。如前述再进行三次洗涤后,将细胞置于 200  $\mu\text{l}$  FACS 缓冲液中,转移至  $40\times 6\text{mm}$  试管中并使用 FACScalibur 流式细胞仪通过流式细胞术进行分析。对照细胞未染色。使用未染色的对照细胞,并对细胞大小 (前向散射, FSC) 和细胞粒度 (侧向散射, SSC) 设置完整淋巴细胞门控 (Chrest, F. J. 等 (1993). Identification and quantification of apoptotic cells following anti-CD3 activation of murine G0T cells. Cytometry 14:883-90)。该区域在同一天分析的样品之间没有改变。基于对照未染色群体的 FL2 (通道 2 荧光, PE 强度) 值做出标记以区分 IL-4 受体  $\alpha^+$  和 IL-4 受体  $\alpha^-$  的群体,基于排除 99% 的未染色群体而设置标记 1 (M1) IL-4R  $\alpha^+$  细胞。对每个样品,获得来自至少  $1\times 10^4$  个细胞的数据。

[0307] 突变蛋白 S191.5 K12、S. 148.3 J14-AM2C2、S. 191.4 B24、S. 191.4 K19 和 S. 197.8 D22 (SEQ ID NO: 3-6 和 8) 对猕猴淋巴细胞显示高水平结合, IL-4 受体  $\alpha^+$  细胞为 61% 至 80% 不等, MFI 值为 6.0 至 9.2 不等 (表 2)。变体 S. 191.5 H16 (SEQ ID NO: 7) 也特异性结合猕猴淋巴细胞,但与剩余突变蛋白相比亲和力降低 (41% IL-4 受体  $\alpha^+$  细胞; MFI 值 4.1)。

[0308] 平行地,还通过流式细胞术分析了这些 IL-4 受体  $\alpha$  特异性突变蛋白与来自一名人供体的外周血淋巴细胞结合的能力。所有的抗 IL-4 受体  $\alpha$  突变蛋白均显示出与 pTLPC10 阴性对照所观察到的相比对人细胞显著更高水平的结合。IL-4 受体  $\alpha^+$  细胞为 60% 至 76% 不等, MFI 值为 7.4 至 9.7 不等。用 pTLPC10 阴性对照染色的细胞显示低水平的非特异性结合, 9% 的细胞记录为 IL-4 受体  $\alpha^+$ , MFI 值为 3.2。突变蛋白 S191.5 K12、S. 191.4 B24 和 S. 191.4 K19 (SEQ ID NO: 3、5 和 6) 对第二名人供体的外周血淋巴细胞显示相似的结合亲和力 (数据未显示)。

[0309]

处理	人外周血细胞		猕猴外周血细胞	
	%阳性	MFI	%阳性	MFI
未染色	1	2.4	1	1.7
pTLPC10 (阴性对照)	9	3.2	5	1.9
S.191.4 K19	72	8.9	65	6.6
S.191.5 K12	74	9.7	78	9.0
S.191.4 B24	74	9.3	80	9.2
S.148.3 J14-AM2C2	76	9.6	68	6.8
S.191.5 H16	72	9.0	42	4.1
S.197.8 D22	72	9.3	70	7.1

[0310] 表 IV. 通过流式细胞术分析了 IL-4 受体  $\alpha$  特异性突变蛋白结合人及猕猴外周血淋巴细胞的能力。显示了 IL-4 受体  $\alpha$  阳性染色的门控细胞百分比以及所有门控细胞的中值荧光强度 (MFI)。

[0311] 实施例 13: 噬菌粒呈递和以对人 VEGF 的亲合力选择 T1c 突变蛋白

[0312] 基本如实施例 2 所述利用得自实施例 1 的噬菌粒进行噬菌粒展示和选择, 进行了以下改动: 靶蛋白 (即重组人 VEGF-A 片段 (VEGF<sub>8-109</sub>, 成熟多肽链的氨基酸 8-109) 以 200nM 浓度使用, 并作为生物素化蛋白呈递于噬菌粒文库, 其后根据生产商的说明使用链霉亲和素珠 (Dyna1) 捕获噬菌体-靶标复合物。进行四轮选择。

[0313] 通过将编码人 VEGF A (SWISS PROT 数据库登记号 P15692) 的成熟多肽链的氨基酸 8 至 109 的核酸引入表达载体 pET11c (Novagen) 中而获得靶蛋白。因此, BamHI 和 NdeI 限制性位点分别引入了人 VEGF 片段 cDNA 的 3' 和 5' 末端, 并用于亚克隆 VEGF 基因片段。

[0314] 用所得表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 在 37°C 下在含有氨苄青霉素的 LB 培养基中以 IPTG 诱导表达培养 3 小时后实现 VEGF<sub>8-109</sub> 的胞质产生。5000g 离心 20 分钟后, 将细胞沉淀重悬于每 21 培养液 200ml 的 PBS 中, 5000g 再离心 10 分钟, 然后 -20°C 孵育过夜。将得自 500ml 培养液的每份细胞沉淀重悬于 20ml 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM EDTA 中并在冰上超声处理, 4 次, 10 秒钟。4°C 下 10000g 离心 10 分钟后, 将包含体溶于 15ml 预冷的 IB 缓冲液 (2M 尿素、20mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5M NaCl) 中, 如上述进行超声处理和离心。其后, 将细胞沉淀溶于 20ml IB 缓冲液并如上述再次离心, 之后溶于 25ml 溶解缓冲液中 (7.5M 尿素、20mM Tris-HCl (pH 7.5)、4mM DTT)。将细胞悬液在室温下搅拌 2 小时, 4°C 下 40000g 离心 15 分钟, 过滤含有重组 VEGF 的上清液 (0.45  $\mu$ m)。如下进行重折叠: 室温下对 51 缓冲液 1 (20mM Tris-HCl (pH 8.4), 400mM NaCl, 1mM 半胱氨酸) 透析过夜, 其后再对 51 缓冲液 2 (20mM Tris-HCl (pH 8.4), 1mM 半胱氨酸) 透析, 并以 51 缓冲液 3 (20mM Tris-HCl (pH 8.4)) 透析两次。离心 (40000g, 20min, 4°C) 和浓缩后, 根据标准方法通过离子交换层析 (Q-Sepharose) 和大小排阻层析 (Superdex 75) 纯化重组的 VEGF 片段。

[0315] 实施例 14: 使用高通量 ELISA 筛选来鉴定 VEGF 结合突变蛋白

[0316] 基本如实施例 3 所述对实施例 13 所得 T1c 突变蛋白进行筛选, 进行了以下改动:

得自实施例 11 的重组靶蛋白 VEGF<sub>8109</sub> 以 5 μg/ml 使用, 并直接包被至微量滴定板。筛选了共 2124 个克隆, 鉴定了 972 个指示从文库中成功分离了突变蛋白的初步命中。使用该方法鉴定出了 T1c 突变蛋白 S168. 4-L01 (SEQ ID NO:26)。

[0317] 实施例 15: 使用易错 PCR 对 T1c 突变蛋白 S168. 4-L01 进行亲和力成熟

[0318] 基本如实施例 4 所述使用寡核苷酸 TL50bio (SEQ ID NO:15) 和 TL51bio (SEQ ID NO:16) 产生基于突变蛋白 S168. 4-L01 的变体文库, 得到平均每个结构基因含有 5 个替换的文库。

[0319] 如实施例 13 所述进行噬菌粒选择, 使用有限的靶标浓度 (10nM、1nM 和 0. 2nM VEGF<sub>8109</sub>) 或短孵育时间 (1 和 5 分钟) 并使用或不使用有限的靶标浓度 (10nM、100nM)。进行四轮选择。

[0320] 实施例 16: 使用高通量 ELISA 筛选对 VEGF 结合突变蛋白的亲和力筛选

[0321] 如实施例 14 所述对实施例 15 中选择的突变蛋白进行筛选, 改动为将单克隆抗 T7 标签抗体 (Novagen) 包被至 ELISA 平板上以捕获产生的突变蛋白, 并使用 HRP 缀合的 Extravidin 检测生物素化 VEGF<sub>8109</sub> (500nM 和 50nM) 与所捕获 T1c 突变蛋白的结合。

[0322] 鉴定了与作为亲和力成熟基础的突变蛋白 S168. 4-L01 相比具有提高的亲和力的大量克隆。使用该方法鉴定出了克隆 S209. 2-C23、S209. 2-D16、S209. 2-N9、S209. 6-H7、S209. 6-H10、S209. 2-M17、S209. 2-O10 (SEQ ID NO:27-33)。

[0323] 实施例 17: 产生 VEGF 结合突变蛋白

[0324] 基本如实施例 7 所述进行产生。

[0325] 实施例 18: 使用 Biacore 进行 VEGF 特异性突变蛋白的亲和力测定

[0326] 基本如实施例 8 所述进行亲和力测量, 改动是使用标准胺化学反应将约 250RU 的重组 VEGF 与传感器芯片直接偶联。以 400nM 浓度注入 40 μl 得自实施例 15 的 T1c 突变蛋白。

[0327] 突变蛋白 S209. 2-C23、S209. 2-D16、S209. 2-N9、S209. 6-H7、S209. 6-H10、S209. 2-M17 和 S209. 2-O10 (SEQ ID NO:27-33) 的亲和力测定结果总结于表 V。

[0328]

克隆	k <sub>on</sub>	k <sub>off</sub>	亲和力
	[10 <sup>4</sup> 1/Ms]	[10 <sup>5</sup> 1/s]	[nM]
S209. 2-C23	3. 6	1. 3	0. 37
S209. 2-D16	3. 8	3	0. 79
S209. 2-N9	5. 9	7. 1	1. 2
S209. 6-H7	6. 4	4. 4	0. 68
S209. 6-H10	4. 6	4. 4	0. 97
S209. 2-M17	2. 8	2. 0	0. 72

S209.2-010	3.2	0.67	0.21
------------	-----	------	------

[0329] 表 V. 在 25°C 下通过 Biacore 测量测定了选定的本发明突变蛋白对 VEGF 的亲合力。

[0330] 实施例 19: 使用抑制 ELISA 鉴定 VEGF 的拮抗剂

[0331] 在抑制 ELISA 中评估对 VEGF 与 VEGF 受体 2 (VEGF-R2) 之间相互作用的抑制。为此, 将恒定浓度的生物素化 VEGF<sub>8-109</sub> (1nM) 与连续稀释的各个 T1c 突变蛋白一起孵育, 并在 ELISA 中测定带有未占据的 VEGF-R2 结合位点的 VEGF 的量, 所述 ELISA 中包被了干扰 VEGF/VEGF-R2 相互作用的抗 VEGF 抗体 (MAB293, R&D Systems)。使用 HRP 缀合的 Extravidin (Sigma) 检测结合的 VEGF 并与确定量 VEGF 的标准曲线进行比较。使用突变蛋白 S209.2-C23、S209.2-D16、S209.2-N9、S209.6-H7、S209.6-H10、S209.2-M17 和 S209.2-010 (SEQ ID NO:27-33) 的测定结果总结于表 VI。

[0332]

克隆	亲和力竞争 ELISA
	Ki [nM]
S209.2-C23	2.3

[0333]

S209.2-D16	3.9
S209.2-N9	2.8
S209.6-H7	2.4
S209.6-H10	1.3
S209.2-M17	2.0
S209.2-010	0.83

[0334] 表 VI. 通过竞争 ELISA 测定的选定的本发明泪液脂质运载蛋白突变蛋白的拮抗能力以及对 VEGF 的亲合力。

[0335] 实施例 20: 使用 HUVEC 增殖测定来鉴定 VEGF 拮抗剂

[0336] 基本如前述 (Korherr C., Gille H, Schafer R., Koenig-Hoffmann K., Dixelius J., Eglund K. A., Pastan I. & Brinkmann U. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 103(11) 4240-4245) 评估对 VEGF 和 FGF-2 刺激的 HUVEC 细胞增殖的抑制, 进行了以下改动: 根据生产商的推荐培养 HUVEC 细胞 (PromoCell) 并在第 2 代至第 6 代之间使用。第 1 天, 将 1400 个细胞接种至完全培养基 (PromoCell)。第二天, 洗涤细胞并加入含 0.5% FCS、氢化可的松和庆大霉素 / 两性霉素但无其他补充剂的基本培养基 (PromoCell)。向一式三份的孔中加入以标明的浓度连续稀释的 VEGF 特异性突变蛋白 S209.2-C23、S209.2-D16、S209.2-N9、S209.6-H7、S209.6-H10、S209.2-M17、S209.2-010 (SEQ ID

NO:27-33)、野生型泪液脂质运载蛋白 (pTLPC10 的基因产物;作为对照) 或 VEGF 特异性治疗性单克隆抗体 **Avastin**<sup>®</sup> (Roche;作为对照),30 分钟后加入人 VEGF165(R&D Systems) 或人 FGF-2(Reliatech)。6 天后,根据生产商的说明,使用 CellTiter 96 Aqueous One (Promega) 评估细胞生存力。

[0337] 使用突变蛋白 S209.2-C23、S209.2-D16、S209.2-N9、S209.6-H7、S209.6-H10、S209.2-M17 和 S209.2-O10 (SEQ ID NO:27-33) 的测量结果示于图 21。所有本发明突变蛋白均显示显著抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞增殖,与 **Avastin**<sup>®</sup> 诱导的抑制相当或更好,而野生型泪液脂质运载蛋白不抑制 VEGF 诱导的细胞增殖。FGF-2 诱导的细胞增殖不受 VEGF 特异性突变蛋白、TLPC10 或 **Avastin**<sup>®</sup> 中任何一种的影响(未显示)。

[0338] 实施例 21: 针对 VEGF-R2 的 T1c 突变蛋白的噬菌粒呈递和选择

[0339] 基本如实施例 2 所述用得自实施例 1 的噬菌粒进行噬菌粒展示和选择,进行了以下修改:靶蛋白 VEGF-R2-Fc(R&D Systems) 以 200nM 浓度使用,并作为 Fc 融合蛋白呈递至文库,其后根据生产商的说明使用 G 蛋白珠 (Dyna1) 捕获噬菌体-靶标复合体。进行四轮选择。

[0340] 实施例 22: 使用高通量 ELISA 筛选来鉴定 VEGF-R2 结合突变蛋白

[0341] 基本如实施例 3 所述进行筛选,改动为靶蛋白 VEGF-R2-Fc(R&D Systems) 以 2.5  $\mu$ g/ml 的浓度使用。

[0342] 筛选了得自实施例 21 所述方法的 1416 个克隆,鉴定出指示从本发明文库中成功分离了突变蛋白的 593 个原始命中。使用该方法鉴定出了突变蛋白 S175.4 H11 (SEQ ID NO:34)。

[0343] 实施例 23: 使用易错 PCR 对 VEGF-R2 特异性突变蛋白 S175.4 H11 进行亲和力成熟

[0344] 基本如实施例 4 所述使用寡聚脱氧核苷酸 TL50bio (SEQ ID NO:15) 和 TL51bio (SEQ ID NO:16) 产生基于突变蛋白 S175.4 H11 的变体文库,产生了平均每个结构基因含有 2 个替换的文库。

[0345] 如实施例 21 所述进行噬菌粒选择,使用有限的靶标浓度 (5nM、1nM 和 0.2nM 的 VEGF-R2-Fc)、在竞争重组 VEGF<sub>8-109</sub> (100nM) 存在下延长的洗涤时间 (1 小时) 或短孵育时间 (2 和 5 分钟) 并使用或不使用有限的靶标浓度 (10nM、100nM)。进行四轮选择。

[0346] 实施例 24: 使用高通量 ELISA 筛选对 VEGF-R2 结合突变蛋白进行亲和力筛选

[0347] 如实施例 3 所述进行筛选,改动为将单克隆抗 T7 标记抗体 (Novagen) 包被至 ELISA 平板以捕获产生的 T1c 突变蛋白,并使用针对 VEGF-R2-Fc 中 Fc 结构域的 HRP 缀合抗体检测 VEGF-R2-Fc (R&D Systems, 3nM 和 1nM) 与所捕获突变蛋白的结合。

[0348] 鉴定了与作为亲和力成熟基础的突变蛋白 S175.4 H11 相比具有提高的亲和力的大量克隆。使用该方法鉴定出了克隆 S197.7-N1、S197.2-I18、S197.2-L22、S197.7-B6 和 S197.2-N24 (SEQ ID NO:35-39)。

[0349] 实施例 25: 产生 VEGF-R2 结合突变蛋白

[0350] 如实施例 7 所述进行产生。

[0351] 实施例 26: 使用 Biacore 对 VEGF-R2 特异性突变蛋白进行亲和力测定

[0352] 基本如实施例 8 所述进行亲和力测量,改动为捕获了约 500RU 的 VEGF-R2-Fc (R&D Systems) 并以 1.5  $\mu$ M 浓度注入 80  $\mu$ l 突变蛋白。

[0353] 使用 S175.4-H11、S197.7-N1、S197.2-I18、S197.2-L22、S197.7-B6 和 S197.2-N24 (SEQ ID NOs:35-39) 的测定结果总结于表 VII。

[0354]

克隆	$k_{on}$	$k_{off}$	亲和力
	[ $10^4$ 1/Ms]	[ $10^5$ 1/s]	[nM]
S175.4-H11	0.9	36	35
S197.7-N1	2.1	11	5.5
S197.2-I18	2.7	8.3	3.1
S197.2-L22	1.2	2.4	3.3
S197.7-B6	2.3	13	6
S197.2-N24	2.4	6.4	2.7

[0355] 表 VII. 通过 Biacore 测量测定了选定的本发明突变蛋白对 VEGF-R2 的亲和力。

[0356] 实施例 27: 使用抑制 ELISA 鉴定 VEGF 拮抗剂

[0357] 在抑制 ELISA 中评估 VEGF-R2 特异性突变蛋白对 VEGF 与 VEGF 受体 2 (VEGF-R2) 之间相互作用的抑制。为此,将恒定浓度的 VEGF-R2 (4nM VEGF-R2-Fc, R&D Systems) 与连续稀释的各个突变蛋白一起孵育,并在 ELISA 中测定带有未占据的 VEGF 结合位点的 VEGF-R2 的量,所述 ELISA 中包被了 VEGF<sub>8109</sub>。使用 HRP 缀合的抗人 Fc 抗体 (Dianova) 检测结合的 VEGF-R2 并与确定量 VEGF-R2-Fc 的标准曲线进行比较。使用突变蛋白 S175.4-H11、S197.7-N1、S197.2-I18、S197.2-L22、S197.7-B6 和 S197.2-N24 (SEQ ID NO:35-39) 的测定结果总结于表 VIII。

[0358]

克隆	亲和力竞争 ELISA
	Ki [nM]
S175.4-H11	12.9
S197.7-N1	12
S197.2-I18	5.5
S197.2-L22	3.5
S197.7-B6	3.8

S197.2-N24	2.3
------------	-----

[0359] 表 VIII. 通过竞争 ELISA 测定了选定的本发明泪液脂质运载蛋白突变蛋白的拮抗能力和对 VEGF-R2 的亲合力。

[0360] 实施例 28: 用聚乙二醇 (PEG) 对 IL-4 受体  $\alpha$  特异性突变蛋白进行位点特异性修饰

[0361] 通过点突变在 IL-4 受体  $\alpha$  特异性突变蛋白 S148.3 J14 (SEQ ID NO:2) 中引入未配对的半胱氨酸残基来代替 131 位氨基酸 Glu, 以便提供用于与活化 PEG 的偶联的反应基。其后如实施例 7 所述在大肠杆菌中产生带有该游离 Cys 残基的重组突变蛋白。

[0362] 就突变蛋白 S148.3 J14 与 PEG 的偶联而言, 将 5.1mg 聚乙二醇马来酰亚胺 (平均分子量 20kDa, 线性碳链, NOF) 与 3mg 蛋白质在 PBS 中混合, 并室温搅拌 3 小时。加入  $\beta$ -巯基乙醇至 85  $\mu$ M 终浓度以终止反应。对 10mM Tris HCl (pH 7.4) 透析后, 将反应混合物应用至 HiTrap Q-XL 琼脂糖柱 (Amersham), 弃去流出液。应用 0mM 至 100mM NaCl 梯度洗脱并从未反应的蛋白质中分离 PEG 化的突变蛋白。

[0363] 实施例 29: 使用 Biacore 对 PEG 化突变蛋白 S148.3 J14 进行亲和力测量

[0364] 基本如实施例 8 所述进行亲和力测量, 改动为固定约 500RU 的 IL-4 受体  $\alpha$ -Fc (R&D Systems), 并以 200nM、67nM 和 22nM 浓度注入 80  $\mu$ l 纯化的 PEG 化突变蛋白。该测定的结果示于图 22 并总结于表 IX。与未 PEG 化突变蛋白 (约 37nM, 见实施例 8) 相比, PEG 化形式的突变蛋白 S148.3J14 的亲合力 (约 30nM) 几乎没有变化。

[0365]

克隆	$k_{on}$	$k_{off}$	亲和力
	[ $10^5$ 1/Ms]	[ $10^{-3}$ 1/s]	[nM]
S148.3J14-PEG	1.64	4.93	30

[0366] 表 IX. 通过 Biacore 测定的 PEG 化的本发明突变蛋白 S148.3J14 对 IL-4 受体  $\alpha$  的亲合力。

[0367] 实施例 30: 使用定点随机方法对突变蛋白 S209.6-H10 进行亲和力成熟

[0368] 通过将残基位置 26、69、76、87、89 和 106 随机化成在这些位置上允许全部 20 种氨基酸来设计基于突变蛋白 S209.6-H10 (SEQ ID NO:30) 的变体文库。基本如实施例 1 所述构建文库, 改动为分别使用脱氧核苷酸 TL107 (覆盖位置 26)、TL109 (覆盖位置 87 和 89)、TL110 (覆盖位置 106) 和 TL111 (覆盖位置 69 和 76) 来代替 TL46、TL47、TL48 和 TL49。基本如实施例 13 所述进行噬菌粒选择, 使用有限的靶标浓度 (10pM 和 2pM 以及 0.5pM 的 VEGF<sub>8-109</sub>) 或与针对 VEGF 的竞争性单克隆抗体 (**Avastin®**) 组合。进行四轮选择。

[0369] TL107 (SEQ ID NO:40)

[0370] GAAGGCCATGACGGTGGACNNSGGCGCGCTGAGGTGCCTC

[0371] TL109 (SEQ ID NO:41)

[0372] GGCCATCGGGGCATCCACGTGGCANNATCNSAGGTCGCACGTGAAGGAC

[0373] TL110 (SEQ ID NO:42)

[0374] CACCCCTGGGACCGGGACCCCSNNCAAGCAGCCCTCAGAG

[0375] TL111 (SEQ ID NO:43)

[0376] CCCCCGATGGCCGTGTASNCCCCGGCTCATCAGTTTTSNNCAGGACGGCCCTCACCTC

[0377] 实施例 31: 使用高通量 ELISA 筛选对 VEGE 结合突变蛋白进行亲和力筛选

[0378] 如实施例 14 所述进行筛选, 改动为使用  $1 \mu\text{g/ml}$  浓度的 VEGF, 并且此外

[0379] i) 将单克隆抗 T7 标签抗体 (Novagen) 包被到 ELISA 平板上以捕获产生的突变蛋白, 并使用 HRP (辣根过氧化物酶) 缀合的 extravidin 检测生物素化 VEGF (3nM 和 1nM) 与所捕获的泪液脂质运载蛋白突变蛋白的结合。此外, 在备选筛选设置中

[0380] ii) 不使用人 VEGF<sub>8109</sub>, 而是将小鼠 VEGF<sub>164</sub> (R&D Systems) 直接包被到微量滴定板上 ( $1 \mu\text{g/ml}$ )。

[0381] iii) 将含有 VEGF 结合突变蛋白的提取物在  $60^\circ\text{C}$  加热 1 小时。

[0382] iv) 将 mAB293 (R&D Systems,  $5 \mu\text{g/ml}$ ) 包被到 ELISA 平板上, 并用生物素化 VEGF<sub>8109</sub> 与所表达的突变蛋白预孵育。使用 HRP (辣根过氧化物酶) 缀合的 extravidin 检测 VEGF<sub>8109</sub> 与 mAB293 的结合。

[0383] 鉴定到了与作为亲和力成熟基础的突变蛋白 S209.6-H10 相比具有提高的亲和力的大量克隆。使用该方法鉴定出了克隆 S236.1-A22、S236.1-J20、S236.1-M11 和 S236.1-L03 (SEQ ID NO:44-47)。

[0384] 在这种情况下, 应该注意, 由于本发明突变蛋白中缺失了泪液脂质运载蛋白的前 4 个氨基酸, 因此氨基酸序列从所保藏的野生型泪液脂质运载蛋白序列的序列位置 5 (丙氨酸) 开始显示, 从而 Ala5 显示为 N 端氨基酸。此外, 野生型泪液脂质运载蛋白的 C 端氨基酸 Asp158 被丙氨酸残基取代 (SEQ ID NO:44-47 中的残基 154, 还参见本发明其他突变蛋白如 SEQ ID NO:26-40)。此外, 用于构建实施例 1 天然文库的突变蛋白 S236.1-A22、S236.1-J20、S236.1-M11 和 S236.1-L03 以及与泪液脂质运载蛋白 C 端融合的 **STREP-TAG® II** 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:52 (S236.1-A22-strep)、SEQ ID NO:53 (S236.1-J20-strep)、SEQ ID NO:54 (S236.1-M11-strep) 和 SEQ ID NO:55 (S236.1-L03-step)。还显示了本发明泪液脂质运载蛋白突变蛋白偏离所标明的突变位置 / 突变的变异性, 这些突变位置 / 突变是为各自突变蛋白提供特异性结合给定靶标 (如 VEGF 或 VEGF-R2 或白介素 4 受体  $\alpha$  链 (IL-4 受体  $\alpha$ )) 的能力所必需的。

[0385] 实施例 32: 产生 VEGF 结合突变蛋白

[0386] 基本如实施例 7 所述进行产生。

[0387] 实施例 33: 使用 Biacore 对 VEGF 特异性突变蛋白进行亲和力测定

[0388] 基本如实施例 18 所述进行亲和力测量。(含参阅图 23, 其中展示了人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22 (SEQ ID NO:44) 与固定的 VEGF<sub>8109</sub> 的 Biacore 测量)。简言之, 使用标准胺化学反应将 VEGF<sub>8109</sub> 固定在 CM5 芯片上。在 500nM 至 16nM 的六种浓度下以  $30 \mu\text{l/分钟}$  的流速应用脂质运载蛋白突变蛋白。用 BIA T100 软件评估传感器图, 以测定各个突变蛋白的  $K_{on}$ 、 $K_{off}$  和 KD。

[0389]

突变蛋白	$k_{on}$	$k_{off}$	亲和力

	[10 <sup>4</sup> 1/Ms]	[10 <sup>5</sup> 1/s]	[nM]
S236.1-A22	8.8	2.2	0.25
S236.1-J20	7.9	2.2	0.28
S236.1-L03	6.8	4.4	0.64
S236.1-M11	7.3	2.3	0.31

[0390] 表 X. 在 25°C 下通过 Biacore 测定的选定的本发明突变蛋白对 VEGF 的亲合力。

[0391] 实施例 34: 使用抑制 ELISA 鉴定 VEGF 的拮抗剂

[0392] 基本如实施例 19 所述在抑制 ELISA 中评估对 VEGF 与 VEGF 受体 2 (VEGF-R2) 之间相互作用的抑制, 改动为将 1 小时的孵育时间缩短至 10 分钟。抑制常数总结于下表中:

[0393]

突变蛋白	亲和力竞争 ELISA
	Ki [nM]
S236.1-A22	5.8
S236.1-J20	6.3
S236.1-L03	9.4
S236.1-M11	6.4

[0394] 表 XI. 通过竞争 ELISA 测定的选定的本发明泪液脂质运载蛋白突变蛋白的拮抗能力和对 VEGF 的亲合力。

[0395] 实施例 35: 使用 Biacore 测定 VEGF 特异性突变蛋白 S236.1-A22 的交叉反应性

[0396] 基本如实施例 18 所述进行亲和力测量, 改动是将突变蛋白 S236.1-A22 (SEQ ID NO:44) 固定在传感器芯片上。以 250 nM 浓度注入 70  $\mu$ l 样品。

[0397] 图 24 所示的结果的定性比较显示, 截短形式的 hVEGF<sub>8-109</sub> 和 hVEGF<sub>121</sub> 显示基本相同的传感器图, 表明与泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22 (SEQ ID NO:44) 相似的亲和力。剪接形式 hVEGF<sub>165</sub> 也显示与脂质运载蛋白突变蛋白强结合, 而各自小鼠直向同源物 mVEGF164 具有稍低的亲和力。同种型 VEGF-B、VEGF-C 和 VEGF-D 及相关蛋白 PlGF 在该实验中不显示结合 (数据未显示)。

[0398] 实施例 36: 使用 CD 光谱术测定 VEGF 结合突变蛋白的热变性

[0399] 基本如国际专利申请 W02006/056464 的实施例 14 所述进行圆二色性测量, 改动是使用的波长为 228nm。例如, 泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22 (SEQ ID NO:44) 的解链温度 T<sub>m</sub> 测定为 75°C。

[0400] 实施例 37: S236.1-A22 的稳定性测试

[0401] 基本如国际专利申请 W02006/056464 的实施例 15 所述测试 VEGF 结合突变蛋白在

37°C下在PBS和人血清中的稳定性,只是使用的浓度为1mg/ml。通过HPLC-SEC判断,在PBS中孵育的7天中未检测到突变蛋白的改变(数据未显示)。将脂质运载蛋白突变蛋白在人血清中孵育导致亲和力与参考相比在7天后下降约70%(还参见图25a)。

[0402] 实施例 38: 将抗 VEGF 突变蛋白与白蛋白结合结构域融合

[0403] 为了延长血清半衰期,将抗 VEGF 突变蛋白在 C 端与白蛋白结合结构域 (ABD) 融合。用于表达的遗传构建体称为 pTLPC51\_S236.1-A22 (SEQ ID NO:50) (见图 26)。

[0404] 基本如实施例 7 所述进行 VEGF 特异性突变蛋白-ABD 融合物或 T1c-ABD (作为对照) 的制备性产生。

[0405] 基本如实施例 18 所述使用表面等离子共振 (Biacore) 进行亲和力测量。发现泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22 的 ABD 融合物 (A22-ABD) (SEQ ID NO:51) (200pM) 对重组 VEGF 的亲和力基本未改变,测定为 260pM (见图 27)。

[0406] 此外,通过如实施例 8 所述的相同方法测试 ABD 结构域的完整性,改动是使用标准胺化学反应将约 850RU 的人血清白蛋白直接与传感器芯片偶联。以 500nM 浓度注入 60 μl 突变蛋白-ABD 融合物 (A22-ABD (SEQ ID NO:51) 或野生型 T1c-ABD (SEQ ID NO:49))。测得其亲和力为约 20nM。

[0407] 基本如实施例 37 所述测试 S236.1-A22 的 ABD 融合物 (SEQ ID NO:51) 在人血清中的稳定性。在 7 天的孵育期中未检测到活性丧失 (见图 25b)。

[0408] 通过其抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 增殖的能力测试脂质运载蛋白突变蛋白 A22-ABD (S236.1-A22 的 ABD 融合物) 在人血清白蛋白存在下的功能性。该测定基本如实施例 39 所述进行,只是在标明处加入了人血清白蛋白 (HSA, 5 μM)。在 5 μM HAS 下,由于 A22-ABD 对 HAS 的纳摩尔亲和力,>99.8% 的 A22-ABD 在任何给定时间均与 HAS 结合 (见图 28)。测得 IC<sub>50</sub> 值如下:

[0409] S236.1-A22-ABD IC<sub>50</sub>:760pM

[0410] S236.1-A22-ABD(+HSA) IC<sub>50</sub>:470pM。

[0411] 实施例 39: 抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 增殖

[0412] 在明胶包被的平皿上增殖 HUVEC (Promocell), 并在 P2 代到 P8 代之间使用。第一天,在 96 孔平板中每孔的完全培养基中接种 1400 个细胞。第二天,洗涤细胞并加入含有 0.5% FCS、氢化可的松和庆大霉素/两性霉素的 100 μl 基本培养基。用 20ng/ml VEGF165 或 10ng/ml FGF-2 刺激增殖,将它们与脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1-A22 (SEQ ID NO:44) 混合,孵育 30 分钟并加入孔中。在第 6 天测定生存力,结果表示为%抑制。测得 IC<sub>50</sub> 值如下 (还参见图 29)。

[0413] S236.1-A22 IC<sub>50</sub>:0.51nM

[0414] Avastin IC<sub>50</sub>:0.56nM

[0415] FGF-2 介导的刺激不受 VEGF 拮抗剂影响 (数据未显示)。

[0416] 实施例 40: 抑制 HUVEC 中 VEGF 介导的 MAP 激酶活化

[0417] 以 1400 个细胞/孔将 HUVEC 细胞接种至 96 孔板的标准培养基 (Promocell, Heidelberg) 中。第二天,将 FCS 减少到 0.5% 并继续培养 16 小时。接着在基本培养基中的 0.5% BSA 中使细胞饥饿 5 小时。在浓度逐渐提高的泪液脂质运载蛋白突变蛋白 A22 或 Avastin (贝伐单抗, Genentech/Roche) 存在下用

VEGF<sub>165</sub> (Reliatech, Braunschweig) 刺激 HUVEC 10 分钟, 以获得剂量反应曲线。根据生产商的手册 (Active Motif, Rixensart, Belgium) 使用 ELISA 定量 MAP 激酶 ERK1 和 ERK2 的磷酸化。IC<sub>50</sub> 值测得为: 突变蛋白 A22 (SEQ ID NO:44) 为 4.5nM, **Avastin**<sup>®</sup> (参见图 30) 为 13nM。

[0418] 实施例 41: 使用局部施用泪液脂质运载蛋白突变蛋白的血管通透性测定

[0419] 将体重 350±50g 的 Duncan-Hartley 豚鼠在肩和背部剃毛。该动物通过耳静脉接受静脉内注射 1ml 1% Evan's 蓝染料。30 分钟后, 将 20ng VEGF<sub>165</sub> (Calbiochem) 与 10 倍摩尔过量的测试物质或对照物混合, 并在 3×4 的方格上皮内注射。30 分钟后, 通过 CO<sub>2</sub> 窒息处死动物。注射 VEGF 后 1 小时, 取下含有方格图案的皮肤并清除结缔组织。使用图像分析仪 (Image Pro Plus 1.3, Media Cybernetics) 对染料外渗面积进行定量 (见图 31)。

[0420] 实施例 42: CAM (鸡尿囊绒膜) 测定

[0421] 如标示将含有 FGF-2 (500ng)、VEGF (150ng) 和泪液脂质运载蛋白突变蛋白 (1.35 μg) 或 Avastin (10 μg) 的胶原种植体置于 10 日鸡胚的 CAM 上 (4 个/动物, 10 只动物/组)。在 24 小时以相同剂量对该种植体再次局部应用泪液脂质运载蛋白突变蛋白或 Avastin。72 小时后, 收集种植体并捕捉图像。通过不知情观察者确定含有至少一个血管的阳性方格的百分比。对 VEGF 拮抗剂 S209.2-010 (SEQ ID NO:33) 和 **Avastin**<sup>®</sup> 以及野生型泪液脂质运载蛋白对照将中值血管发生指数报告为阳性方格的分数 (见图 32)。

[0422] 实施例 43: 测定 A22 和 A22-ABD 在小鼠中的药代动力学 (PK) 参数

[0423] 在 NMRI 小鼠中测定静脉内注射泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S236.1 A22 (SEQ ID NO:44) (4mg/kg) 后及静脉内或腹膜内单次快速浓注施用突变蛋白 S236.1A22 与 ABD 的融合蛋白 (SEQ ID NO:51) (5.4mg/kg) 后的药代动力学 (PK) 参数 (半衰期血浆浓度、生物利用率)。从在预定时间点收集的末端血样制备血浆, 并通过 ELISA 测定脂质运载蛋白突变蛋白的浓度。使用 WinNonlin 软件 (Pharsight Corp., Mountain View, USA) 分析结果。T<sub>1/2</sub>A22 静脉内注射: 0.42 小时; T<sub>1/2</sub>A22-ABD 静脉内注射: 18.32 小时; T<sub>1/2</sub>A22-ABD 腹膜内注射: 20.82 小时。腹膜内注射施用融合蛋白 A22-ABD 后的生物利用率为 82.5% (见图 33)。

[0424] 实施例 44: 全身施用泪液脂质运载蛋白突变蛋白的血管通透性测定

[0425] 实验前 12 小时, 将测试物质或对照静脉内注射到每组三只动物中。第 1 组: PBS 载体; 第 2 组: Avastin, 10mg/kg; 第 3 组: 突变蛋白 S236.1 A22-ABD, 6.1mg/kg; 第 4 组: TLPC51: 6.1mg/kg。在时间 = 0 时注射 Evan's Blue。30 分钟后, 在 3×4 方格中一式三份皮内注射 4 种剂量的 VEGF (5、10、20 或 40ng)。注射 VEGF 后 30 分钟, 处死动物并如上对染料外渗进行定量 (见图 34)。

[0426] 实施例 45: 肿瘤异种移植物模型

[0427] 将基质胶中的 1×10<sup>7</sup> 个 A673 横纹肌肉瘤细胞 (ATTC) 接种至经照射 (2.5Gy, Co<sup>60</sup>) 的 Swiss 裸鼠的右侧腹 (n = 12 只/组)。腹膜内施用处理, 在照射开始的同一天开始并持续 21 天。第 1 组: PBS 载体, 每天一次; 第 2 组: Avastin (贝伐单抗, Genentech/Roche), 5mg/kg, 每 3 天一次; 第 3 组: 突变蛋白 A22-ABD (SEQ ID NO:51), 每天一次, 3.1mg/kg; 第 4 组: TLPC51, 每天一次, 3.1mg/kg。将脂质运载蛋白 A22-ABD 的剂量选择成实现恒定存在等摩尔数的突变蛋白及 Avastin 的 VEGF 结合位点, 这是基于 A22-ABD PK 数据和抗体在小鼠中的估计的血清半衰期。用测径器每周两次测量肿瘤大小, 并根据式 (长度 × 宽度<sup>2</sup>)/2 来

估计肿瘤体积。当肿瘤体积超过 2,000mm<sup>3</sup>时处死小鼠（见图 35）。

**[0428] 实施例 46: 筛选脂质运载蛋白突变蛋白 -Cys 变体**

[0429] 为了提供用于偶联例如活化的 PEG 的反应基, 通过定点诱变引入未配对的半胱氨酸残基。其后如实施例 7 所述在大肠杆菌中产生带有游离 Cys 残基的重组突变蛋白, 如实施例 14 所述测定表达产物并通过 ELISA 测量亲和力。

[0430] 下表中给出了 VEGF 特异性突变蛋白 S236. 1-A22 (SEQ ID NO:44) 的 Cys 筛选的示例性结果。使用以下寡核苷酸引入半胱氨酸来代替氨基酸 Thr 40、Glu 73、Asp 95、Arg 90 和 Glu 131:

[0431] A22\_D95C 正向: GAGGTCGCACGTGAAGTGCCACTACATCTTTTACTCTGAGG (SEQ ID NO:56),

[0432] A22\_D95C 反向: CCTCAGAGTAAAAGATGTAGTGGCACTTCACGTGCGACCTC (SEQ ID NO:57),

[0433] A22\_T40C 正向: GGGTCGGTGATACCCACGTGCCTCACGACCCTGGAAGGG (SEQ ID NO:58),

[0434] A22\_T40C 反向: CCCTTCCAGGGTCGTGAGGCACGTGGGTATCACCGACCC, (SEQ ID NO:59),

[0435] A22\_E73C 正向: CCGTCCTGAGCAAACTGATTGCCCGGGGATCTACACGG (SEQ ID NO:60),

[0436] A22\_E73C 反向: CCGTGTAGATCCCCGGGCAATCAGTTTTGCTCAGGACGG (SEQ ID NO:61),

[0437] A22\_E131C 正向: GCCTTGAGGACTTTTGTAAGCCGCAGGAG (SEQ ID NO:62),

[0438] A22\_E131C 反向: CTCCTGCGGCTTTACAAAAGTCCTCCAAGGC (SEQ ID NO:63),

[0439] A22\_R90C 正向: CGTGGCAAAGATCGGGTGCTCGCACGTGAAGGACC (SEQ ID NO:64), 和

[0440] A22\_R90C 反向: GGTCCCTTCACGTGCGAGCACCCGATCTTTGCCACG (SEQ ID NO:65).

[0441]

克隆	产率	亲和力
	[ $\mu$ g/L]	[nM]
S236. 1-A22	1000	10
S236. 1-A22 T40C	420	14
S236. 1-A22 E73C	300	13
S236. 1-A22 D95C	750	10
S236. 1-A22 R90C	470	10
S236. 1-A22 E131C	150	>100

[0442] 表 XII. 通过 ELISA 测定的突变蛋白 S236. 1-A22 及其 Thr 40  $\rightarrow$  Cys (SEQ ID NO:66)、Glu 73  $\rightarrow$  Cys (SEQ ID NO:67)、Asp 95  $\rightarrow$  Cys (SEQ ID NO:68)、Arg 90  $\rightarrow$  Cys (SEQ ID NO:69) 和 Glu 131  $\rightarrow$  Cys (SEQ ID NO:70) 突变体对 VEGF 的亲和力。

**[0443] 实施例 47: 嗜酸性粒细胞活化趋化因子 3 分泌测定**

[0444] 在 72 小时中对 A549 细胞进行嗜酸性粒细胞活化趋化因子 3 分泌测定。肺上皮细胞（如 A549 细胞）在 IL-4/IL-13 刺激后分泌嗜酸性粒细胞活化趋化因子 3。因此, 用浓度逐渐提高的结合 IL-4 受体  $\alpha$  的突变蛋白 S191. 4 B24 (SEQ ID NO:4) 处理细胞, 并分别

用 0.7nM IL-4 或 0.83nM IL-13 进行刺激。在 72 小时后通过使用市售的夹层 ELISA (R&D Systems) 评估嗜酸性粒细胞活化趋化因子 3 的分泌。结果 (图 36) 证明, 结合 IL-4 受体  $\alpha$  的突变蛋白 S191.4 B24 分别以 32 和 5.1nM 的  $IC_{50}$  值抑制 A549 细胞中 IL-4 和 IL-13 介导的嗜酸性粒细胞活化趋化因子 3 分泌 (表 XIII)。

[0445]

	$IC_{50}$ (nM)
IL-4	32
IL-13	5.1

[0446] 表 XIII. S191.4 B24 对 A549 细胞中 IL-4 和 IL-13 所介导的嗜酸性粒细胞活化趋化因子 3 分泌的  $IC_{50}$  值。

[0447] 实施例 48: IL-4/IL-13 介导的外周血单核细胞上 CD23 的诱导

[0448] 从暗黄覆盖区中分离总人 PBMC。用浓度逐渐提高的 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 处理 PBMC, 并分别加入终浓度 1.0nM 和 2.5nM 的 IL-4 或 IL-13。将 PBMC 在含有 10% FCS 的 RPMI 培养基中培养 48 小时。用抗 CD14-FITC 和抗 CD23-PE 抗体染色细胞并通过流式细胞术分析。对于每个点, 测定双阳性细胞在全部 CD14 阳性单核细胞中的百分比, 并作为突变蛋白浓度的函数作图。

[0449] 从获得的结果中计算突变蛋白 S191.4 B24 抑制 IL-4 和 IL-13 介导的单核细胞上 CD23 表达的  $IC_{50}$  值 (表 XIV)。

[0450]

	$IC_{50}$ (nM)
IL-4	905
IL-13	72

[0451] 表 XIV. S191.4 B24 对 IL-4 和 IL-13 介导的 PBMC 中 CD23 表达的  $IC_{50}$  值。

[0452] 实施例 49: IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 的 Schild 分析

[0453] 进行了 Schild 分析来证实假想的突变蛋白竞争性结合机制并测定对细胞的  $K_d$ 。用固定浓度的 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 (0.4.1、12.3、37、111.1、333.3 或 1000nM) 处理 TF-1 细胞并用 IL-4 滴定, 在 4 天后评估细胞生存力 (图 38A)。通过非线性回归测定  $EC_{50}$  值。所得结果的常规 Schild 分析 (图 38B) 得到  $K_d$  为 192pM (线性回归), 更准确的非线性回归得到 116pM。1.084 的 Schild 斜率表明竞争性抑制, 即突变蛋白与 IL-4 竞争 IL-4 受体  $\alpha$  结合。

[0454] 实施例 50: 突变蛋白 S191.4 B24 与原代 B 细胞的皮摩尔结合

[0455] 从人血液中分离 PBMC, 并与不同浓度的 IL-4 受体  $\alpha$  结合人泪液脂质运载蛋白突变蛋白 S191.4 B24 或野生型人泪液脂质运载蛋白 (TLPC26) 一起孵育。接着用抗 CD20-FITC 单克隆抗体和生物素化的抗脂质运载蛋白抗血清、其后用链霉亲和素-PE 染色细胞。野生型脂质运载蛋白和 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 的结果分别示于图 39A 和 B。将

所测定的 PE 阳性 B 细胞百分比对脂质运载蛋白浓度进行拟合 (图 39C), 并从所得曲线中计算  $EC_{50}$ 。IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 (SEQ ID NO:4) 结合原代 B 细胞的  $EC_{50}$  计算为 105pM。

[0456] **实施例 51: 突变蛋白在皮下及气管内给药后的生物利用率**

[0457] 测定了静脉内、皮下或气管内给药后 IL-4 受体  $\alpha$  结合突变蛋白 S191.4 B24 的生物利用率, 这通过在大鼠中 4mg/kg 快速推注突变蛋白 S191.4 B24 后监测血浆浓度 4 小时来进行。气管内给药使用市售的气管内给药装置 (**MicroSprayer®**, Penn-Century Inc, Philadelphia, PA, USA) 来进行, 该装置从连接在注射器上的细长管的尖端产生气溶胶。气溶胶大小约为 20  $\mu$ m。非房室药代动力学 (PK) 分析的结果证实了皮下注射后 100% 的生物利用率, 并且与抗体相反, 人泪液脂质运载蛋白突变蛋白的经肺递送看来是可行的。所得结果示于表 XV。

[0458]

	静脉内	皮下	气管内
$t_{1/2}$ [h]	0.78	1.6	2.36
生物利用率 ( $AUC_{last}$ )	n/a	97.2%	10%
生物利用率 ( $AUC_{inf}$ )	n/a	119%	13.8%

[0459] 表 XV. 静脉内、皮下和气管内给药后 S191.4 B24 的半衰期和生物利用率。

[0460] **实施例 52: 使用 HUVEC 增殖测定 PEG 化 VEGF 拮抗剂的体外效力**

[0461] 基本如实施例 20 所述评估对 VEGF 刺激的 HUVEC 细胞增殖的抑制, 进行以下修改: 如实施例 28 所述将 VEGF 特异性突变蛋白 S236.1-A22 (SEQ ID NO:44) 在 95C 位置与 PEG20、PEG30 或 PEG40 偶联。向 VEGF165 中加入突变蛋白、其 PEG 化衍生物和野生型脂质运载蛋白 (pTLP26 的基因产物, 作为对照) 的连续稀释液, 并在室温下孵育 30 分钟。将混合物加入一式三份孔中的 HUVEC 细胞中, 获得 20ng/ml VEGF 的终浓度以及标出的 0.003nM 至 2.000nM 的浓度。6 天后根据生产商的说明用 CellTiter-Glo (Promega) 评估细胞生存力。

[0462] 使用上述突变蛋白的测量结果示于图 41。S236.1-A22 (SEQ ID NO:44) 及其 PEG 化衍生物显示随着附着的 PEG 部分分子量的下降而显著抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞增殖, 而野生型泪液脂质运载蛋白不抑制 VEGF 诱导的细胞增殖 (表 XVI)。

[0463]

	$IC_{50}$ (nM)
S236.1-A22	0.4
S236.1-A22-PEG20	0.53
S236.1-A22-PEG30	2.13
S236.1-A22-PEG40	3.27

[0464] 表 XVI. S236. 1-A22 (SEQ ID NO:44) 及其用 PEG20、PEG30 或 PEG40 PEG 化的衍生物对 HUVEC 细胞增殖抑制的  $IC_{50}$  值。

[0465] 本文所述发明适于在缺少本文具体公开的任何要素、限制的情况下实施。因此,例如术语“包含”、“包括”、“含有”等应理解为开放性的并且没有限制。此外,本文使用的术语和表述处于描述和表达目的使用,这些术语和表述的使用不排除所显示及描述特征或其部分的任何等同方式,而是应该理解,在要求保护的发明范围内可以有多种改变。因此,应该理解,尽管本发明通过优选实施方案和任选特征进行了描述,但本领域技术人员可进行本文所述发明的修改和改变,并且这样的修改和改变被认为是在本发明范围内。本文广义和一般性地描述了本发明。落入一般公开内容之内的每种更窄的种类和亚类也构成本发明的一部分。这包括本发明的一般描述,而不限从类中除去任何主题,无论是否所除去的材料是否在本文中具体指出。此外,当本发明的特征或方面以马库什组方式描述时,本领域技术人员会理解,本发明也就该马库什组的任何个体成员或成员亚组进行了描述。本发明的其他实施方案根据以下权利要求将是显而易见的。

[0001]

## 序列表

- <110> 皮里斯股份公司
- <120> 泪液脂质运载蛋白的突变蛋白及其获得方法
- <130> LC15310012
- <140> PCT/EP2007/057971
- <141> 2007-8-1
- <160> 70
- <170> PatentIn 版本 3.3
- <210> 1
- <211> 3700
- <212> DNA
- <213> 人工的
- <220>
- <223> 表达载体 pTLPC10
- <400> 1
- ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt 60
- tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaat gaatagttcg acaaaaaatct 120
- agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgca ttgcagtgge actggetggt 180
- ttegtaccg tagcgcagge cgacgcctcg atgaccggtg gtcagcagat ggggtgcctca 240
- gacgaggaga ttcaggatgt gtcagggacg tggtatctga aggccatgac ggtggacagg 300
- gagttccctg agatgaatct ggaatcggtg acaccatga cctcaagac cctggaaggg 360
- ggcaacctgg aagccaaggt caccatgctg ataagtggcc ggagccagga ggtgaagccc 420
- gtcctggaga aaactgacga gccgggaaaa tacacggccg acgggggcaa gcacgtggca 480
- tacatcatea ggtcgcactg gaaggaccac tacatctttt actctgaggg cgagctccac 540
- gggaagccgg tcccaggggt gtggctcgtg ggcagagacc ccaagaacaa cctggaagcc 600

[0002]

ttggaggact ttgagaaagc cgcaggagcc cgcggactca gcacggagag catcctcacc	660
cccaggcaga gcgaaaccag ctctccaggg agcgccttggc ctaccccgca gttcgaaaaa	720
taataagctt gacctgtgaa gtgaaaaatg gcgcacattg tgcgacattt tttttgtctg	780
cggtttaccg ctactgcgfc acggatctcc acgcgcccctg tagcggcgca ttaagcggg	840
cgggtgtggt ggttacgcgc agegtgaccg ctacaactgc cagcgceeta gcgcccctc	900
ctttcgtttt ctcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttcccgt caagetctaa	960
atcgggggct cccttaggg ttccgattta gtgccttacg gcacctcgac cccaaaaaac	1020
ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc catcgcccctg atagacggtt tttcgccctt	1080
tgacgttggg gtccacgttc tttaatagtg gactcttggt ccaaactgga acaacactca	1140
accctatctc ggtctattct ttgatttat aagggatctt gccgatttcg gcctattggt	1200
taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgetta	1260
caatttcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac cctattttgt ttattttct	1320
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg ctcaataat	1380
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt ccctttttg	1440
cggcattttg ccttctgtt ttgtctacc cagaaacgct ggtgaaagia aaagatgctg	1500
aagatcagtt ggggtcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc	1560
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat	1620
giggcgcggt attatcccg tttgacgccc ggcaagagca actcggctgc cgcatacact	1680
attctcagaa tgacttgggt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca	1740
tgacagtaag agaattatgc agtctgcca taacctgag tgataaacct ggggccaact	1800
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg	1860
atcatgtaac tcgcttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg	1920

[0003]

agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg 1980  
 aactacttac tctagcttcc cggcaacaat tgatagactg gatggaggcg gataaagttg 2040  
 caggaccact tetgcgctcg gcccttcagg ctggetggtt tattgctgat aaatctggag 2100  
 cgggtgagcg tggctctcgc ggtatcattg cagcaactggg gccagatggi aagcctccc 2160  
 gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 2220  
 tcgctgagat aggtgcctca ctgattaage atiggtagga attaataatg tctcgtttag 2280  
 ataaaagtaa agtgattaac agcgcattag agctgcttaa tgaggtegga atcgaaggtt 2340  
 taacaaccgg taaactcgcc cagaagctag gtgtagagca gccacattg tattggcatg 2400  
 taaaaaataa gcgggctttg ctgcagcctc tagccattga gatgtagat aggcaccata 2460  
 ctacactttg ccctttagaa ggggaaagct ggcaagattt ttacgtaat aacgctaaaa 2520  
 gttttagatg tgccttaact agtcatcgcg atggagcaaa agtacattta ggtacacggc 2580  
 ctacagaaaa acagtaigaa actctcgaaa atcaattagc ctttttatgc caacaaggtt 2640  
 tttcactaga gaatgcatta tatgcactca gcgcagtggg gcattttact ttaggttgcg 2700  
 tattggaaga tcaagagcat caagtcgcta aagaagaaag ggaaacacct actactgata 2760  
 gtatgccgcc attattacga caagctatcg aattatttga tcaccaaggt gcagagccag 2820  
 ccttcattat cggccttgaa ttgatcata gcggattaga aaaacaactt aatgtgaaa 2880  
 gtgggtctta aaagcagcat aaccttttct cgtgatggta acttcactag tttaaaagga 2940  
 tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaactg gagttttcgt 3000  
 tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttct 3060  
 tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc 3120  
 cggatcaaga gctaccaact ctttttcgca aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac 3180  
 caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca ctccaagaac tctgtagcac 3240

[0004]

cgcctacata cctcgetctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 3300  
 cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggegcag cggtcgggct 3360  
 gaacgggggg ttcgtgcaca cageccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 3420  
 acetacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga agggagaaag gcggacaggt 3480  
 atccggtaaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg 3540  
 cctggfctct tlatagtcct gtcgggttcc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 3600  
 gatgctcgtc agggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacggggcc tttttacggt 3660  
 tcttggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgacccgaca 3700

<210> 2

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4R $\alpha$  具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 2

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

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr 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

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

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

[0005]

65	70	75	80
Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr			
	85	90	95
Ser Glu Gly Leu 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> 3			
<211> 154			
<212> PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 对 IL-4R $\alpha$ 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白			
<400> 3			
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 Lys Ser Val			
	20	25	30
Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys			
	35	40	45

[0006]

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

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Ala 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 Tyr  
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-4R $\alpha$  具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 4

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

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Glu Ser Val

[0007]

	20		25		30										
Thr	Pro	Met	Thr	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Gly	Gly	Asn	Leu	Glu	Ala	Lys
		35					40					45			
Phe	Thr	Leu	Gln	Arg	Arg	Gly	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	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	Tyr
			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>	5														
<211>	154														
<212>	PRT														
<213>	人工的														
<220>															
<223>	对 IL-4R $\alpha$ 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白														
<400>	5														

[0008]



<213> 人工的

<220>

<223> 对 IL-4R $\alpha$  具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 6

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

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala His 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

Leu Thr Leu Gln Arg Ala Gly Arg Trp Gln Glu Gly Lys Ile 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 Tyr  
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

[0010]



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-4R $\alpha$  具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 8

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

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr 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

Leu Thr Leu Gln Arg Ser Gly Arg Trp Gln Glu Ser Lys Val 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 Tyr  
 85 90 95

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

[0012]

	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

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 4041

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 噬菌粒载体 pTlc27

&lt;400&gt; 9

```

ccataacgct cggttgcgc cgggcgtttt ttattggcca gatgattaat tcctaatttt      60
tgttgacaact ctatcattga tagagttatt ttaccaactcc ctatcagtga tagagaaaag      120
tgaaatgaat agttcgacaa aaatctagat aacgagggca aaaaatgaaa aagacagcta      180
tcgcgattgc agtggcactg gctggtttcg ctaccgtage gcaggccgcc tcagacgagg      240
agattcagga tgtgtcaggg acgtggtaic tgaaggccat gacggtggac agggagtcc      300
ctgagaigaa tetggaateg gtagacacca tgacctcac gacctggaa gggggcaacc      360
tggaagccaa ggtcaccatg ctgataagtg gccggagcca ggaggagaag gccgtcctgg      420
agaaaactga cgagccggga aaatacacgg ccgacggggg caagcacgtg gcatacatca      480
tcaggtcgca cgtgaaggac cactacatct tttactctga gggcgagctc cacgggaago      540
cggteccagg ggtgtggctc gtgggcagag accccaagaa caacctggaa gccttgagg      600

```

[0013]

actttgagaa agccgcagga gcccgcgga cagcagcga gagcatcctc atccccaggc	660
agagcgaaac cagctctcca gggagcgett ggtctcacc gcagttcgaa aaataggctg	720
gcgccggctc tgggtggtgt tctggcggcg gctctgaggg tgggtgctct gagggtgccg	780
gtcttgaggg tggcgctct gagggagcgg gttccgggtg tgctctggt tccggtgatt	840
ttgattatga aaagatggca aacgctaata agggggctat gaccgaaaat gccgatgaaa	900
acgcctaca gictgacgt aaagcacaac ttgattctgt cgtactgat tacggctctg	960
ctatcgatgg tttcattggt gacgtttccg gccttgcata tggtaatggt gctactggtg	1020
atlttgctgg ctctaattcc caaatggctc aagtcgggta cggtgataat tcacctttaa	1080
tgaataattt ccgtcaatat ttaccttccc tccctcaatc ggttgaatgt cgcccttttg	1140
tctttggcgc tggtaaacca tatgaatttt ctattgatgg tgacaaaata aacttattcc	1200
gtgggtgtct tgcgtttctt ttatattgtg ccacctttat gtatgtattt tctacgtttg	1260
ctaacatact gcgtaataag gaggcttaat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc	1320
acattgtgeg acattttttt tctctgccc ttaccgctac tgcgtcacgg atctccacgc	1380
gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac	1440
acttgcagc gccctagegc ccgctctttt cgtttcttc ccttctttc tgcceacgtt	1500
cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggtccct ttaggttcc gatttagtgc	1560
ttacggcac ctgacccca aaaaacttga ttaggtgat ggttcacgta gtggccatc	1620
gccctgatag acggtttttt gcccttgac gttggagtc agttcttla atagtggacl	1680
ctgttccaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg attataag	1740
gattttgccc atttggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc	1800
gaattttaac aaaatttggc gaaaatgaga cgttgatcgg cagtaagag gttccaactt	1860
tcaccataat gaaaatagat cactaccggg cgtatttttt gagttatcga gattttcagg	1920

[0014]

agctaaggaa gctaaaatgg agaaaaaaat cactggatat accacegttg atatatccca	1980
atggcatcgt aaagaacatt ttgaggcatt tcagtcagtt gctcaatgta ectataacca	2040
gaccgttcag ctggatatta cggecttttt aaagaccgta aagaaaaata agcacaagtt	2100
ttatccggcc ttatctaca ttcttgcctg cctgatgaat gctcctcgg aattcctgat	2160
ggcaatgaaa gacggtgagc tggtgatatg ggatagtgtt cacccttgtt acaccgtttt	2220
ccatgagcaa actgaaacgt ttctatcgtc ctggagttaa taccacgacg atttccggca	2280
gtttctaac atatatctgc aagatgtgce gigtctcgtt gaaaacctgg cctatttccc	2340
taaagggttt attgagaata tgtttttcgt ctacagcaat ccttgggtga gtttcaccag	2400
ttttgattta aacgtggcca atatggacaa cttcttcgcc cccgttttca ctatgggcaa	2460
atattatacg caaggcgaca aggtgctgat gccctctggc attcagttc atcatgccgt	2520
ttgtgatggc ttccatgtcg gcagaatgct taatgaatta caacagtact gcgatgagtg	2580
gcagggcggg gcgtaatagg aattaatgat gtctcgttta gataaaagta aagtgattaa	2640
cagcgcatta gagctgetta atgaggtcgg aatcgaaggt ttaacaacce gtaaactcgc	2700
ccagaageta ggtgtagagc agcctacatt gtattggcat gtaaaaaata agcgggcttt	2760
gctcgcgccc ttagccattg agatgttaga taggcacct actcacittt gccctttaga	2820
aggggaaage tggcaagatt ttttactgaa taacgctaaa agtttttagat gtgccttact	2880
aagtcctcgc gatggagcaa aagtacattt aggtacacgg cctacagaaa aacagtatga	2940
aactctcgaa aatcaattag cctttttatg ccaacaaggt ttctcactag agaatgcatt	3000
atatgcactc agcgcagtgg ggcattttac tttaggttgc gtattggaag atcaagagca	3060
tcaagtctgt aaagaagaaa gggaaacacc tactactgat agtatgccgc cattattacg	3120
acaagctatc gaattatttg atcaccaagg tgcagagcca gccttcttat tcggccttga	3180
atgatcata tgcggattag aaaaacaact taaatgtgaa agtgggtctt aaaagcagca	3240

[0015]

```

taaccttttt cegtgatgt aacttcacta gtttaaaagg atctaggtga agatectttt 3300

tgataatctc atgaccaaaa tccettaacg tgagttttcg ttcactgag cgteagacce 3360

egtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tctttttttt ctgctgctaa tetgetgctt 3420

gcaaacaaaa aaacceccgc taccagcggg ggtttgtttg ceggatcaag agctaccaac 3480

tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tcttctagt 3540

gfagccgtag itagccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctaat acctcgctct 3600

gctaactctg itaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tegtgtctta cegggttggg 3660

ctcaagaega tagttaccgg ataaggcga gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac 3720

acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga taacctacagc gtgagctatg 3780

agaaagegcc accttcccg aaggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt 3840

cggaacagga gagegcacga gggagcttc agggggaaac gcctggctac tttatagtec 3900

tgtcgggttt ccccacctt gacttgagcg tctgttttg tgatgctct caggggggeg 3960

gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcgc ctttttacgg ttcctggcct ttigetggcc 4020

ttttgctcac atgacccgac a 4041

```

<210> 10

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物 TL46 (环 1/2 正向)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (19)..(20)

<223> n 为 a、c、g 或 t

<220>

[0016]

<221> misc_feature	
<222> (22).. (23)	
<223> n 为 a、c、g 或 t	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (25).. (26)	
<223> n 为 a、c、g 或 t	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (28).. (29)	
<223> n 为 a、c、g 或 t	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (31).. (32)	
<223> n 为 a、c、g 或 t	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (34).. (35)	
<223> n 为 a、c、g 或 t	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (37).. (38)	
<223> n 为 a、c、g 或 t	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (40).. (41)	
<223> n 为 a、c、g 或 t	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (43).. (44)	
<223> n 为 a、c、g 或 t	
<400> 10	
aaggccatga cgggtggacnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnstcggg gacaccatg	60
acc	63

[0017]

- <210> 11  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 寡核苷酸引物 TL47 (环 1/2 反向)  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20).. (21)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (23).. (24)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (26).. (27)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t  
  
 <400> 11  
 caacctctgg gaccggccsn nsnnsnncat ggtgaccttg gcttc 45  
  
 <210> 12  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 寡核苷酸引物 TL48 (环 3/4 正向)  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25).. (26)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t  
  
 <220>

[0018]

- <221> misc\_feature  
 <222> (34)..(35)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t
- <400> 12  
 gacgagccgg gaaaatacac ggcennsggg ggcennscacg tggcatacat cate 54
- <210> 13  
 <211> 56  
 <212> DNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223> 寡核苷酸引物 TL49 (环 3/4 反向)
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (24)..(25)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (30)..(31)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(34)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (36)..(37)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t
- <400> 13  
 cgagccacac ccctgggacc ggsnnccesn nsnnsngcc ctcagagtaa aagatg 56
- <210> 14  
 <211> 56  
 <212> DNA

[0019]

- <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 寡核苷酸引物 AN-14  
 <400> 14  
 gtattttccc ggetcatcag ttttctcag gacgaccttc acctcctggg accggc 56
- <210> 15  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 寡核苷酸引物 TL50bio (装配 5')  
 <400> 15  
 tatctgaagg ccatgacggt ggac 24
- <210> 16  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 寡核苷酸引物 TL51bio (装配 3')  
 <400> 16  
 tgecccagag ccacaccct ggga 24
- <210> 17  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 寡核苷酸引物 TL70 随机引物, 环 1  
 <220>  
 <221> misc\_feature

[0020]

- <222> (44)..(45)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t
- <400> 17  
 gaaggccatg acggtggact cccgctgccc gcgggcgtac taennstegg tgacacccat 60  
 gacc 64
- <210> 18  
 <211> 78  
 <212> DNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223> 寡核苷酸引物 TL71 随机引物, 环 2
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(22)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (27)..(28)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (36)..(37)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (45)..(46)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (54)..(55)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t
- <220>

[0021]

<221> misc\_feature  
 <222> (60).. (61)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t

<400> 18  
 catcagtttt ctccaggacs nctttsnct cctgsnnrcg gccsnccgc tgsnnggtsn 60  
 ncttgcttc caggttgc 78

<210> 19  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 寡核苷酸引物 TL72 装配引物

<400> 19  
 tectggagaa aactgatgag ceggg 25

<210> 20  
 <211> 825  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 20  
 Met Gly Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val  
 1 5 10 15  
 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

[0022]

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

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

[0023]

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

Val Glu Cys Glu 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

[0024]

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 Gln 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

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

[0025]

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

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

[0026]

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> 21

<211> 1356

<212> PRT

<213> 人

<400> 21

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu  
 1 5 10 15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro  
 20 25 30

Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr  
 35 40 45

Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro  
 50 55 60

Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser  
 65 70 75 80

[0027]

Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn  
 85 90 95

Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser  
 100 105 110

Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser  
 115 120 125

Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys  
 130 135 140

Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser  
 145 150 155 160

Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg  
 165 170 175

Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile  
 180 185 190

Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser  
 195 200 205

Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr  
 210 215 220

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu  
 225 230 235 240

Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile  
 245 250 255

[0028]

Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu  
 260 265 270

Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe  
 275 280 285

Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu  
 290 295 300

Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr  
 305 310 315 320

Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met  
 325 330 335

Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala  
 340 345 350

Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly  
 355 360 365

Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr  
 370 375 380

Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu  
 385 390 395 400

Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val  
 405 410 415

Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val  
 420 425 430

[0029]

Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr  
 435 440 445

Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu  
 450 455 460

Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr  
 465 470 475 480

Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys  
 485 490 495

Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys  
 500 505 510

Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr  
 515 520 525

Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser  
 530 535 540

Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln  
 545 550 555 560

Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser  
 565 570 575

Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro  
 580 585 590

Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr  
 595 600 605

[0030]

Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile  
610 615 620

Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr  
625 630 635 640

Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val  
645 650 655

Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn  
660 665 670

Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys  
675 680 685

Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn  
690 695 700

Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg  
705 710 715 720

Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr  
725 730 735

Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe  
740 745 750

Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu  
755 760 765

Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile  
770 775 780

[0031]

Ile Leu Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Gly Gly Glu Leu Lys Thr Gly  
785 790 795 800

Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu His  
805 810 815

Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp  
820 825 830

Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val  
835 840 845

Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Arg Thr  
850 855 860

Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg  
865 870 875 880

Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu  
885 890 895

Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu  
900 905 910

Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu  
915 920 925

Arg Ser Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Thr Lys Gly Ala Arg  
930 935 940

Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys  
945 950 955 960

[0032]

Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly  
 965 970 975

Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro  
 980 985 990

Glu Asp Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr  
 995 1000 1005

Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys  
 1010 1015 1020

Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu  
 1025 1030 1035

Lys Asn Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile  
 1040 1045 1050

Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro  
 1055 1060 1065

Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr  
 1070 1075 1080

Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile  
 1085 1090 1095

Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu  
 1100 1105 1110

Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro  
 1115 1120 1125

[0033]

Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp  
 1130 1135 1140

His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Ser Glu Leu Val Glu  
 1145 1150 1155

His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala Gln Gln Asp Gly Lys  
 1160 1165 1170

Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu Ser Met Glu Glu  
 1175 1180 1185

Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser Cys Met Glu  
 1190 1195 1200

Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn Thr Ala  
 1205 1210 1215

Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg Pro  
 1220 1225 1230

Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu  
 1235 1240 1245

Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val  
 1250 1255 1260

Leu Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu  
 1265 1270 1275

Ser Pro Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser  
 1280 1285 1290

[0034]

Val Ala Ser Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly  
1295 1300 1305

Tyr His Ser Asp Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu  
1310 1315 1320

Ala Glu Leu Leu Lys Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser  
1325 1330 1335

Thr Ala Gln Ile Leu Gln Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser  
1340 1345 1350

Pro Pro Val  
1355

<210> 22

<211> 232

<212> PRT

<213> 人

<400> 22

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly  
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln  
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu  
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu

[0035]

65	70	75	80
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro			
	85	90	95
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His			
	100	105	110
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys			
	115	120	125
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val			
	130	135	140
Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr			
	145	150	155
Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp			
	165	170	175
Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys			
	180	185	190
His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn			
	195	200	205
Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr			
	210	215	220
Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg			
	225	230	

<210> 23

[0036]

&lt;211&gt; 207

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 23

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu  
 1                    5                    10                    15

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln  
                   20                    25                    30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln  
                   35                    40                    45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val  
                   50                    55                    60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly  
 65                    70                    75                    80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln  
                   85                    90                    95

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

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys  
                   115                    120                    125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg  
                   130                    135                    140

Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro  
 145                    150                    155                    160

[0037]

Ser Pro Ala Asp Ile Thr His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser Ala  
 165 170 175

His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala  
 180 185 190

Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala  
 195 200 205

<210> 24

<211> 419

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

Met His Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu Leu Ala Ala  
 1 5 10 15

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

Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu Ala  
 35 40 45

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

Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met  
 65 70 75 80

Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln  
 85 90 95

[0038]

Ala Asn Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala  
 100 105 110

His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys  
 115 120 125

Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe  
 130 135 140

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr  
 145 150 155 160

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr  
 165 170 175

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

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser  
 195 200 205

Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile  
 210 215 220

Ile Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn  
 225 230 235 240

Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys  
 245 250 255

Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser  
 260 265 270

[0039]

Thr Asp Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu  
 275 280 285

Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys  
 290 295 300

Gly Pro His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys  
 305 310 315 320

Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu  
 325 330 335

Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro  
 340 345 350

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

Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr  
 370 375 380

Arg Arg Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser  
 385 390 395 400

Tyr Ser Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro  
 405 410 415

Gln Met Ser

<210> 25

<211> 354

<212> PRT

[0040]

<213> 人

<400> 25

Met Tyr Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val  
1 5 10 15

Gln Leu Val Gln Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser  
20 25 30

Ser Gln Ser Thr Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser  
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu  
50 55 60

Trp Arg Cys Arg Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg  
65 70 75 80

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

Glu Thr Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser  
100 105 110

Pro Arg Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr  
115 120 125

Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly  
130 135 140

Cys Cys Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr  
145 150 155 160

[0041]

Ile Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro  
 165 170 175

Glu Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu  
 180 185 190

Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln  
 195 200 205

Ile Pro Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile  
 210 215 220

Asp Met Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu  
 225 230 235 240

Asn Pro Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala  
 245 250 255

Leu Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val  
 260 265 270

Cys Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys  
 275 280 285

Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His  
 290 295 300

Lys Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe  
 305 310 315 320

His Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys  
 325 330 335

[0042]

Arg Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys  
 340 345 350

Asn Pro

<210> 26

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGF 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 26

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

Ala Met Thr Val Asp Ser Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala 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

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

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

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

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

[0043]

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> 27

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGF 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 27

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

Ala Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val  
 20 25 30

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

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

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

[0044]

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

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val 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> 28

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGF 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 28

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

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

Thr Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Val Lys  
35 40 45

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

[0045]

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

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

Ser Glu Gly Cys Leu Asn Gly Val 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> 29

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGF 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 29

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 Pro Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Ala  
20 25 30

[0046]

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

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

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

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

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val 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> 30

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGF 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 30

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

[0047]

Ala Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val  
 20 25 30

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

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

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

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

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val 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> 31

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

[0048]



<210> 32

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGF 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 32

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

Ala Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala 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

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

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

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

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Glu Val 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

[0050]

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala  
145 150

<210> 33

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGF 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 33

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 Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val  
20 25 30

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

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

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

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

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

[0051]

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> 34

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGFR2 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 34

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 Ile Phe Pro Ser Gly Arg Ile Tyr Ser Val  
 20 25 30

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

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

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

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

[0052]

Ser Glu Gly Leu Ala Val Gly Thr 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> 35

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGFR2 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 35

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 Ile Phe Pro Ser Gly Arg Ile Tyr Ser Val  
 20 25 30

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

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

[0053]

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

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

Ser Glu Gly Leu Ala Val Arg Thr 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> 36

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGFR2 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 36

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 Ile Phe Pro Ser Gly Arg Ile Tyr Ser Val  
20 25 30

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

[0054]

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

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

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

Ser Glu Gly Leu Ala Val Gly Thr 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> 37

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGFR2 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 37

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

[0055]

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

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

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

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

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

Ser Glu Gly Leu Ala Val Gly Thr 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> 38

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGFR2 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

[0056]

&lt;400&gt; 38

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 Ile Phe Pro Ser Gly Arg Ile Tyr Ser Val  
 20 25 30

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

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

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

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

Ser Glu Gly Leu Ala Val Lys Thr 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

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 154

[0057]

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 对 VEGFR2 具有结合亲和力的人泪液脂质运载蛋白突变蛋白

<400> 39

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 Ile Phe Pro Ser Gly Arg Ile Tyr Ser Val  
                  20                   25                   30

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

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

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

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

Ser Glu Gly Leu Ala Val Glu Thr 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

[0058]

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala  
145 150

<210> 40

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物 TL 107

<220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> n 为 a、c、g 或 t

<400> 40

gaaggccatg acggtggacn nsggcgcgct gaggtgcctc

40

<210> 41

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物 TL 109

<220>

<221> misc\_feature

<222> (26)..(27)

<223> n 为 a、c、g 或 t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (32)..(33)

<223> n 为 a、c、g 或 t

<400> 41

ggccatcggg ggcattccacg tggcannsac ennsaggtcg cacgtgaagg ac

52

[0059]

- <210> 42  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 寡核苷酸引物 TL 110  
  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (23).. (24)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t  
  
 <400> 42  
 cacccctggg accgggaccc csnncaagca gcctcagag 40  
  
  
 <210> 43  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 寡核苷酸引物 TL 111  
  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19).. (20)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (40).. (41)  
 <223> n 为 a、c、g 或 t  
  
 <400> 43  
 cccccgatgg ccgtgtasnn ccccgctca tcagttttsn ncaggacggc cctcacctc 59  
  
  
 <210> 44  
 <211> 154

[0060]

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> S236.1-A22

<400> 44

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 Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val  
                  20                   25                   30

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

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

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

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

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val 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

[0061]

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala  
145 150

<210> 45

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> S236. 1-J20

<400> 45

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 Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val  
20 25 30

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

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

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

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

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

[0062]

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> 46

<211> 162

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> S236. I-M11

<400> 46

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 Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val  
 20 25 30

Ile Pro Thr Ser Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asp Leu Glu Ala Lys  
 35 40 45

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

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

[0063]

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

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val 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 Trp Ser His Pro Gln Phe  
 145 150 155 160

Glu Lys

<210> 47

<211> 162

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> S236.1-L03

<400> 47

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 Ile Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val  
 20 25 30

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

[0064]



tctagataac gagggcaaaa aatgaaaaag acagctatcg cgattgcagt ggcactggct 60  
 ggtttcgcta ccgtagegca ggccgcctca gacgaggaga ttcaggatgt gtcagggacg 120  
 tggtatctga aggccatgac ggtggacagg gagttccctg agatgaatct ggaatcggtg 180  
 acacccatga ccctcagac cctggaaggg ggcaacctgg aagccaaggt caccatgctg 240  
 ataagtggcc ggagccagga ggtgaaggcc gtcctggaga aaactgacga gccgggaaaa 300  
 tacacggccg acgggggcaa gcacgtggca tacatcatca ggtcgcacgt gaaggaccac 360  
 tacatctttt actctgaggg cgagctccac gggaagccgg tcccaggggt gtggctcgtg 420  
 ggcagagacc ccaagaacaa cctggaagcc ttggaggact ttgagaaagc cgcaggagcc 480  
 cgcggactca gcacggagag catctcctc cccaggcaga gcgaaaccag ctctccaggg 540  
 agcgcctggg cgcctgacgc taactctctg gctgaagcta aagttctggc taaccgtgaa 600  
 ctggacaaat acggtgtttc cgactactac aaaaacctca tcaacaacgc taaaaccgtt 660  
 gaaggigtta aagetctgat cgacgaaatt ctctcagcac tgcgagcgc ttggtctcac 720  
 ccgcagttcg aaaaataata agctt 745

<210> 49

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 融合蛋白 OmpA 信号序列 - 人泪液脂质运载蛋白 -  
 白蛋白结合结构域 (abd) - Strep-Tag II

<400> 49

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala  
 1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly  
 20 25 30

[0066]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg  
180 185 190

Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn  
195 200 205

[0067]

Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu  
 210 215 220

Ala Ala Leu Pro Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
 225 230 235

<210> 50

<211> 745

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> pTLPC51\_S236.1-A22 118-862 XbaI/HindIII (编码融合蛋白 ompA、人泪液脂质运载蛋白 S236.1-A22、

abd 和 Strep-Tag II 的 nt 序列)

<400> 50

tctagataac gagggcaaaa aatgaaaag acagctatcg cgattgcagt ggcactgget 60

ggtttcgcta ccgtagegca ggccgcctca gaegaggaga ttcaggatgt gtcagggagc 120

tggtatctga aggccatgac ggtggacgtg ggcgcctga ggtgcctcgc ggggtcggtg 180

ataccacga ccctcacgac cctggaaggg ggcaacctgg aagccaaggt caccatgcat 240

ateaagggcc ggtcccagga ggtgaaggcc gtctgagca aaactgatga gccggggatc 300

tacacggcca tegggggcat ccactggca aagatcgga ggtcgcacgt gaaggaccac 360

tacatctttt actctgaggg ctgcttgagc ggggtcccgg tcccaggggt gtggtcgtg 420

ggcagagacc ccaagaacaa cctggaagcc ttggaggact ttgagaaagc cgcaggagcc 480

cgcgactca gcacggagag catctcctc ccaggcaga gegaaceag ctctccaggg 540

agcgtggtg ccgtcgacgc taactctctg gctgaagcta aagttctggc taacctgaa 600

ctggacaaat acggtgttcc cgactactac aaaaacctca tcaacaacgc taaaaccggt 660

gaaggtgta aagctctgat cgacgaaatt ctgcagcac tgccgagcgc ttggtctcac 720

[0068]

ccgcagttcg aaaaataata agctt

745

<210> 51

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> ompA、人泪液脂质运载蛋白 S236.1-A22、白蛋白结合结构域 (abd) 和 Strep-Tag II 的融合蛋白

<400> 51

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala  
1                    5                    10                    15

Thr Val Ala Gln Ala Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly  
                  20                    25                    30

Thr Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys  
                  35                    40                    45

Leu Ala Gly Ser Val Ile Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly  
                  50                    55                    60

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

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

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

His Tyr Ile Phe Tyr Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro

[0069]

	115		120		125
Gly Val Trp Leu Val Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu					
130		135		140	
Glu Asp Phe Glu Lys Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser					
145	150		155		160
Ile Leu Ile Pro Arg Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala Gly					
	165		170		175
Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg					
	180		185		190
Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn					
	195		200		205
Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu					
	210		215		220
Ala Ala Leu Pro Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys					
225		230		235	
<210> 52					
<211> 162					
<212> PRT					
<213> 人工的					
<220>					
<223> S236.1-A22-strep					
<400> 52					
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys					
1		5		10	
					15

[0070]

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

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

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

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

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

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val 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 Trp Ser His Pro Gln Phe  
 145 150 155 160

Glu Lys

<210> 53

<211> 162

<212> PRT

<213> 人工的

[0071]





	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 Trp Ser His Pro Gln Phe					
145	150		155		160
Glu Lys					
<210> 55					
<211> 162					
<212> PRT					
<213> 人工的					
<220>					
<223> S236.1-L03					
<400> 55					
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 Ile Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala 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		
Val Val Val His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Arg Ala Val Leu					
50	55	60			
Ser Lys Thr Asp Glu Pro Gly Pro Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His					
65	70	75	80		

[0074]

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

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val 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 Trp Ser His Pro Gln Phe  
 145 150 155 160

Glu Lys

<210> 56

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物 A22\_D95C 正向

<400> 56

gaggtegcac gtgaagtgcc actacatcct ttactctgag g 41

<210> 57

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸引物 A22\_D95C 反向

<400> 57

cctcagagta aaagatgtag tggeacttca cgtgcacct c 41

[0075]

<210>	58	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物 A22_T40C 正向	
<400>	58	
	gggtcgggtga taccacacgtg cctcaccgacc ctggaaggg	39
<210>	59	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物 A22_T40C 反向	
<400>	59	
	cccttcagg gtcgtgagge acgtgggtat caccgaccc	39
<210>	60	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物 A22_E73C 正向	
<400>	60	
	ccgtcctgag caaaactgat tgcccgggga tctacacgg	39
<210>	61	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物 A22_E73C 反向	
<400>	61	
	ccgtgtagat ccccgggcaa tcagttttgc tcaggacgg	39

[0076]

<210>	62	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物 A22_E131C 正向	
<400>	62	
	gccttgagg acttttgtaa agccgcagga g	31
<210>	63	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物 A22_E131C 反向	
<400>	63	
	ctcctgcggc ttacaaaag tcctccaagg c	31
<210>	64	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物 A22_R90C 正向	
<400>	64	
	cgtggcaaag atcgggtgct cgcacgtgaa ggacc	35
<210>	65	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物 A22_R90C 反向	
<400>	65	
	ggtccttcac gtgcgagcac ccgatcttg ccacg	35

[0077]



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> 67  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> S236.1-A22 Glu73-Cys

<400> 67

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 Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val  
 20 25 30

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

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

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

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

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

[0079]

	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> 68			
<211> 154			
<212> PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> S236. I-A22 Asp95-Cys			
<400> 68			
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys			
1	5	10	15
Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val			
	20	25	30
Ile Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys			
	35	40	45
Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu			
	50	55	60
Ser Lys Thr Asp Glu Pro Gly Ile Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His			
65	70	75	80

[0080]

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

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val 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> 69

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> S236.1-A22 Arg90-Cys

<400> 69

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

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

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

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

[0081]



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

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

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

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

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val 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 Cys 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

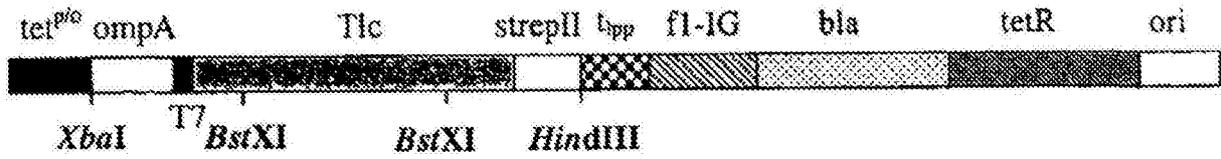


图 1

```

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ ADASMTGGQQ MGASDEEIQD VSGTWYLKAM
TVDSRCPRAY YGSVTPMTLT TLEGGNLEAK VTMQRIGRSQ EVKAVLEKTD
EPGKYTAGGG RHVAYIIRSH VKDHYIFYSE GLCPGQPVPG VWLVGRDPKN
NLEALEDFEK AAGARGLSTE SILIPRQSET SSPGSAWSHP QFEK
    
```

图 2

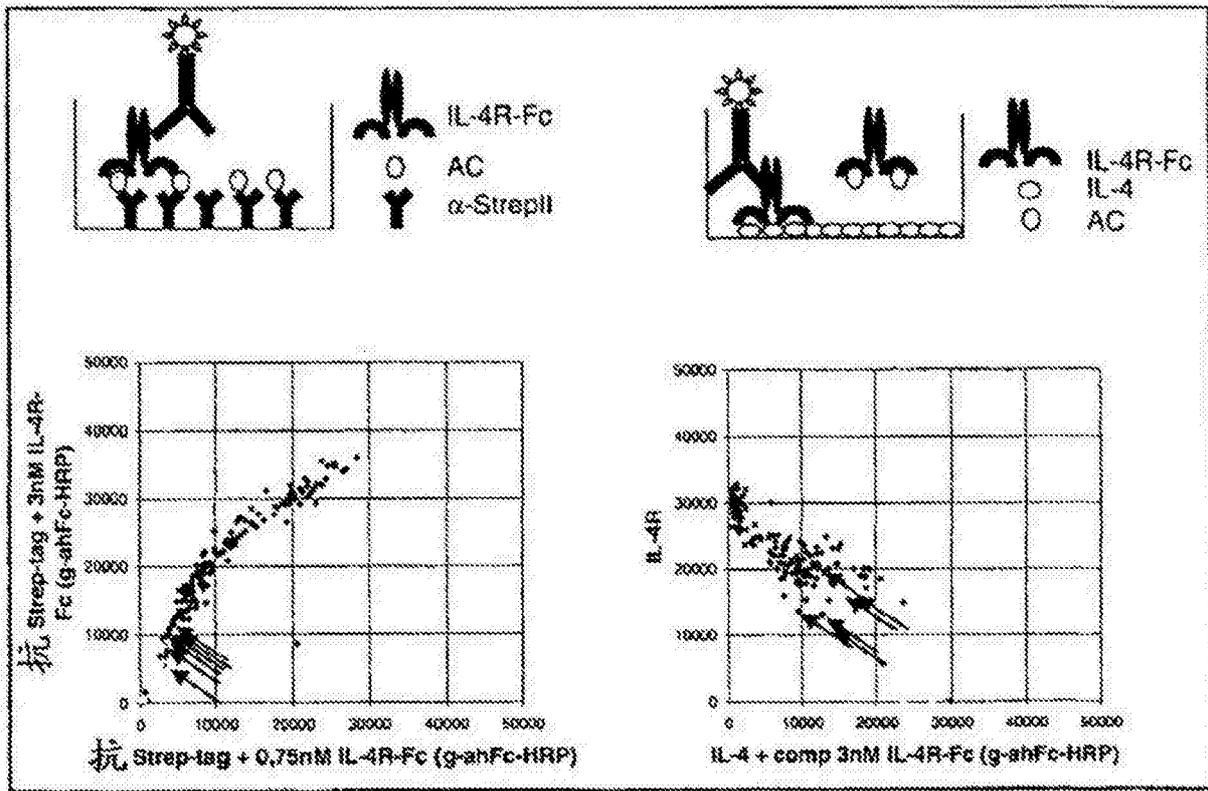


图 3

S191.5 K12:

MKKTAI A I A V A L A G F A T V A Q A A S D E E I Q D V S G T W Y L K A M T V D S R C P R A Y Y K S V T P M T L T T L E G G N L E A K F T A Q  
R N G R W Q E L K L V L E K T D E P G K Y A A S G G R H V A Y I I R S H V K D H Y I F Y S E G L C P G Q P V P G V W L V G R D P K N N L E A L E D  
F E K A A G A R G L S T E S I L I P R Q S E T S S P G S A W S H P Q F E K

S148.3 J14AM2C2:

MKKTAI A I A V A L A G F A T V A Q A A S D E E I Q D V S G T W Y L K A M T V D S R C P R A Y Y E S V T P M T L T T L E G G N L E A K F T L Q  
R R G R W Q E G K L V L E K T D E P G K Y T A S G G R H V A Y I I R S H V K D H Y I F Y S E G L C P G Q P V P G V W L V G R D P K N N L E A L E D  
F E K A A G A R G L S T E S I L I P R Q S E T S S P G S A W S H P Q F E K

S191.4 B24:

MKKTAI A I A V A L A G F A T V A Q A A S D E E I Q D V S G T W Y L K A M T V D S R C P R A Y Y S S V T P M T L T T L E G G N L E A K F T A Q  
R S G R W Q E Y K L V L E K T D E P G K Y T A S G G R H V A Y I I R S H V K D H Y I F H S E G L C P G Q P V P G V W L V G R D P K N N L E A L E D  
F E K A A G A R G L S T E S I L I P R Q S E T S S P G S A W S H P Q F E K

S191.4 K19:

MKKTAI A I A V A L A G F A T V A Q A A S D E E I Q D V S G T W Y L K A M T V D S R C P R A H Y S S V T P M T L T T L E G G N L E A K L T L Q  
R A G R W Q E G K I V L E K T D E P G K Y T A S G G R H V A Y I I R S H V K D H Y I F Y S E G L C P G Q P V P G V W L V G R D P K N N L E A L E D  
F E K A A G A R G L S T E S I L I P R Q S E T S S P G S A W S H P Q F E K

S191.5 H16:

MKKTAI A I A V A L A G F A T V A Q A A S D E E I Q D V S G T W Y L K A M T V D S R C P R A Y Y D E S V T P M T L T T L E G G N L E A K G T L Q  
R K G R P Q E N K L V L E K T D E P G K Y T A S G G R H V A Y I I R S H V K D H Y I F Y S E G L C P G Q P V P G V W L V G R D P K N N L E A L E D  
F E K A A G A R G L S T E S I L I P R Q S E T S S P G S A W S H P Q F E K

S197.8 D22:

MKKTAI A I A V A L A G F A T V A Q A A S D E E I Q D V S G T W Y L K A M T V D S R C P R A Y Y G S V T P M T L T T L E G G N L E A K L T L Q  
R S G R W Q E S K V L E K T D E P G K Y T A S G G R H V A Y I I R S H V K D H Y I F Y S E G L C P G Q P V P G V W L V G R D P K N N L E A L E D  
F E K A A G A R G L S T E S I L I P R Q S E T S S P G S A W S H P Q F E K

图 4

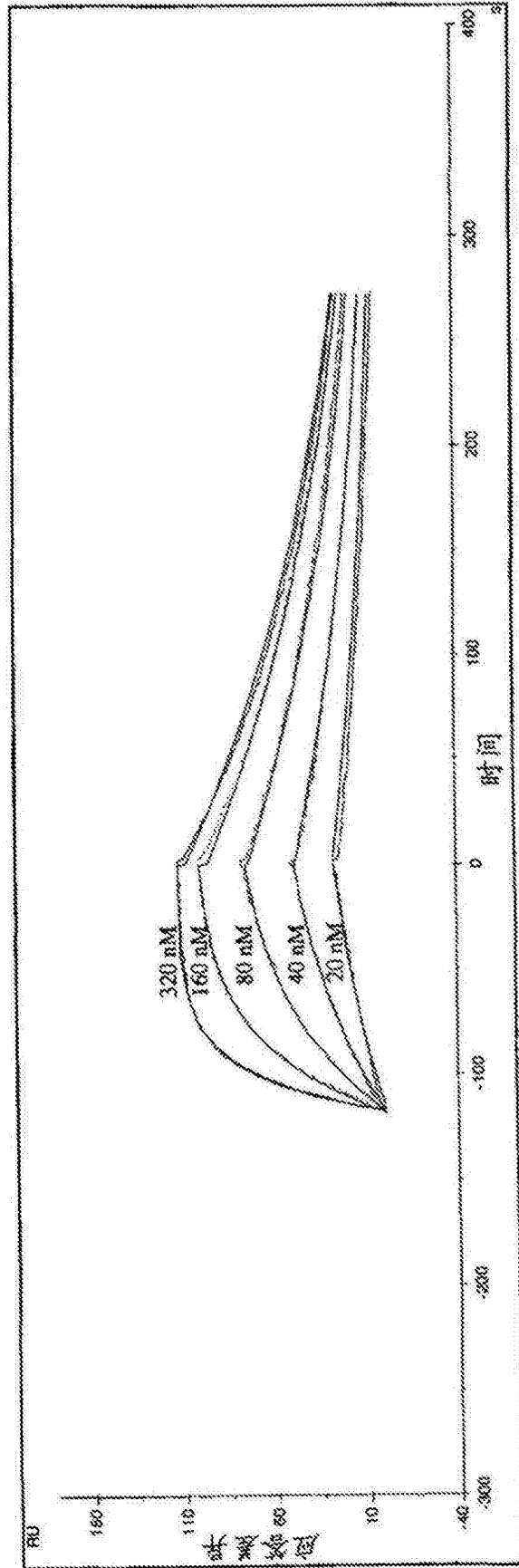


图 5

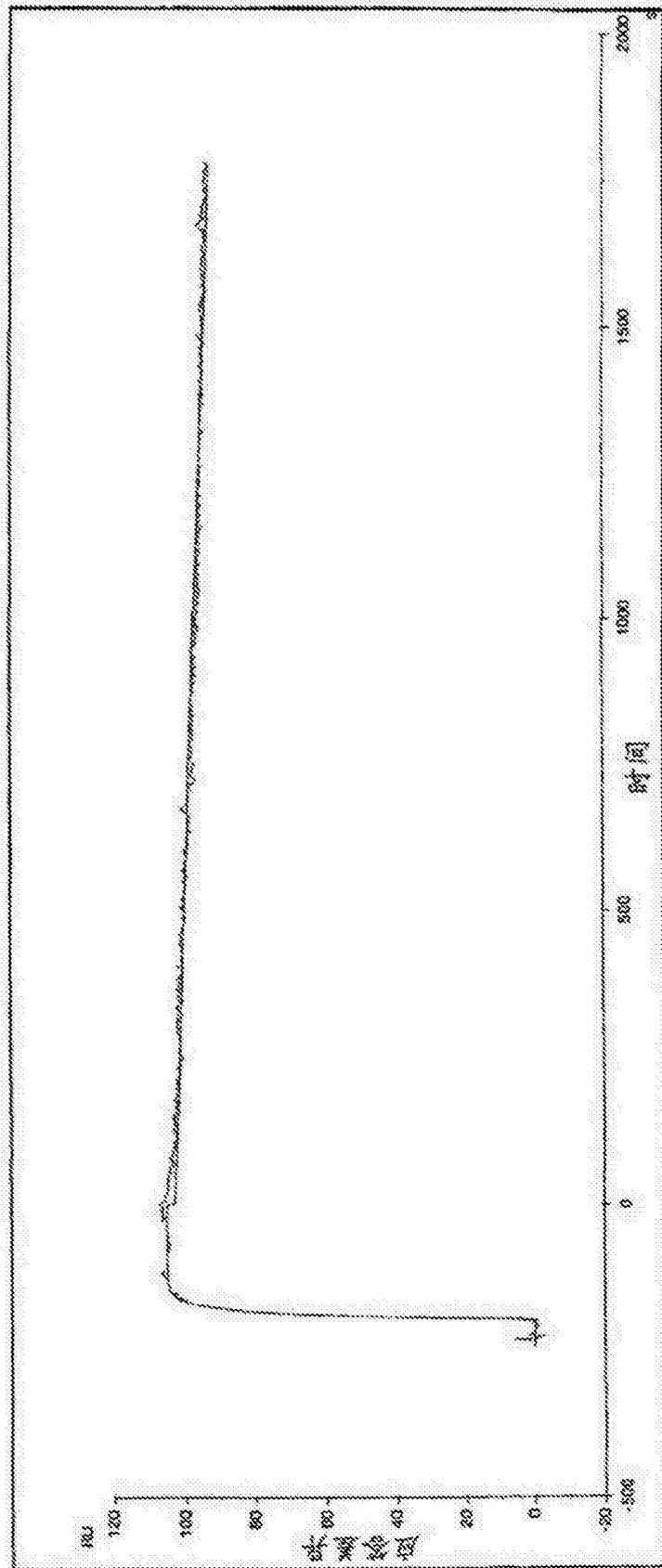


图 6

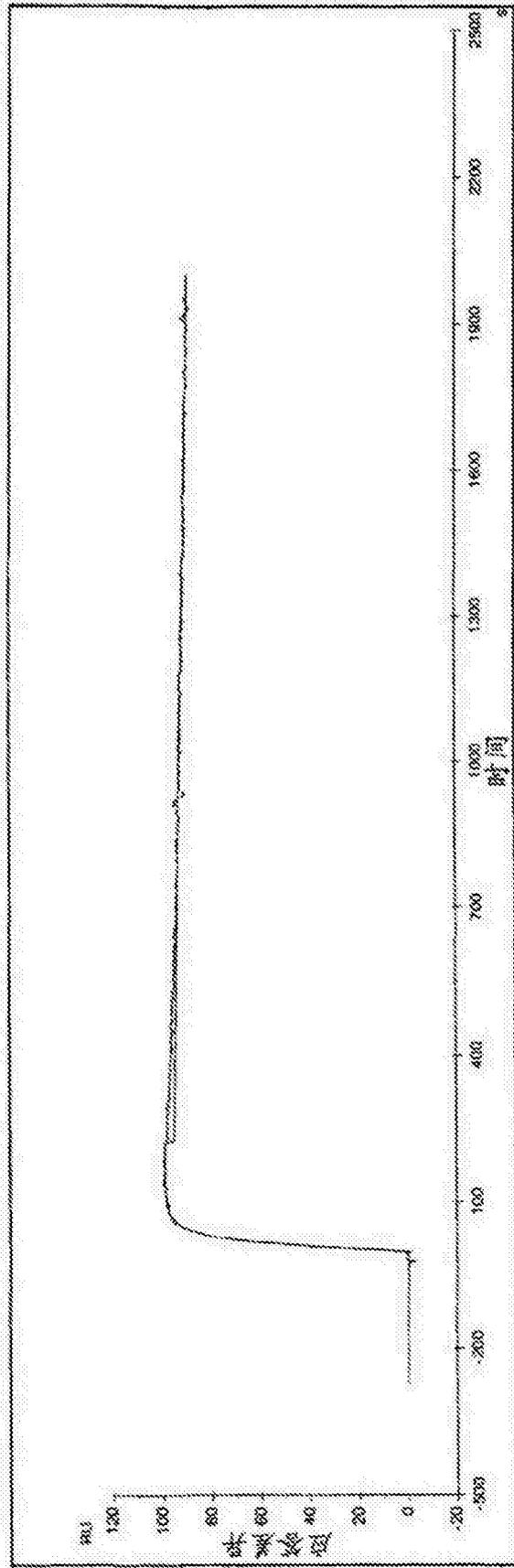


图 7

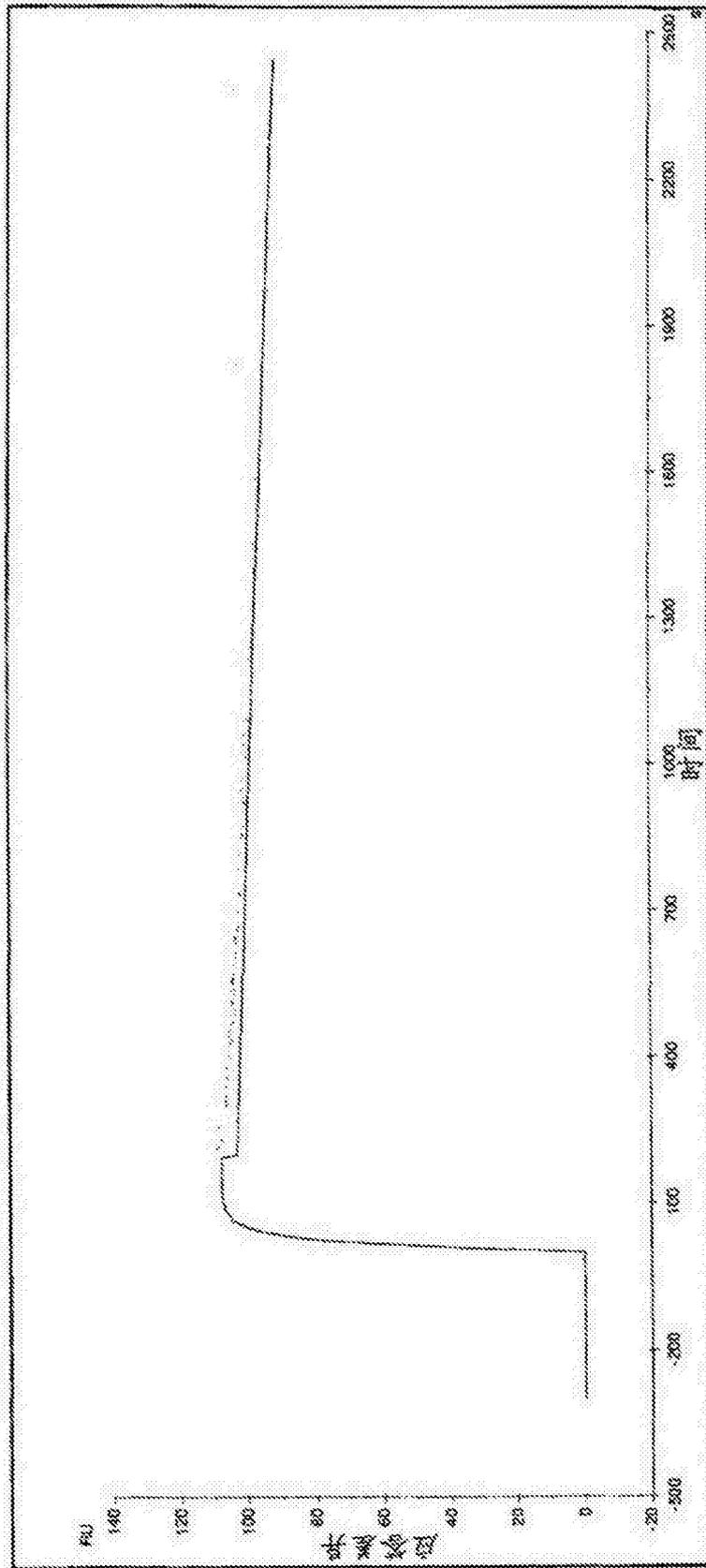


图 8

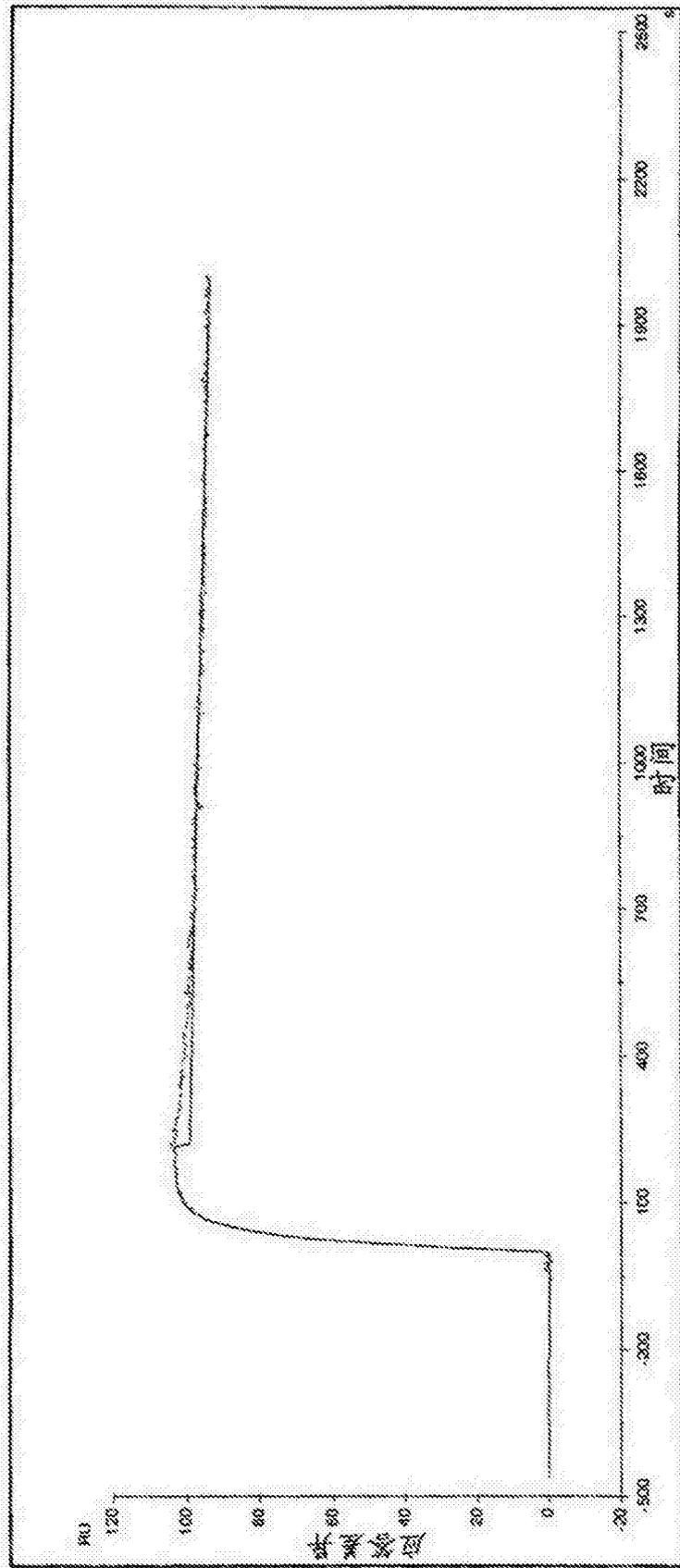


图 9

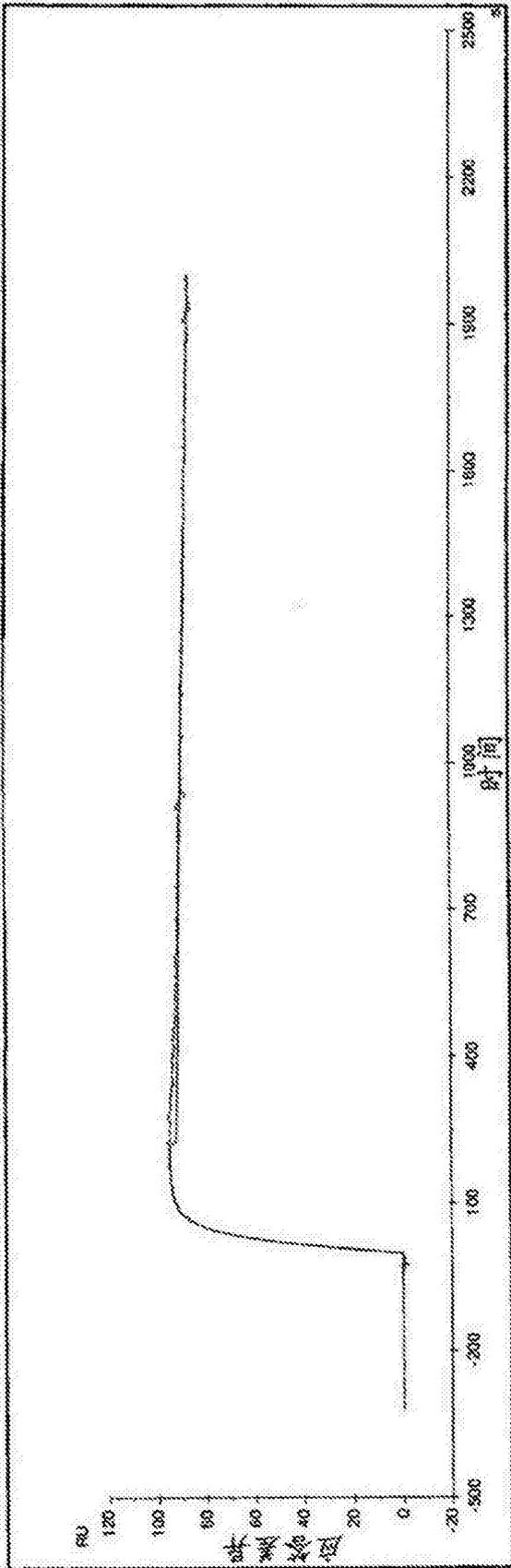


图 10

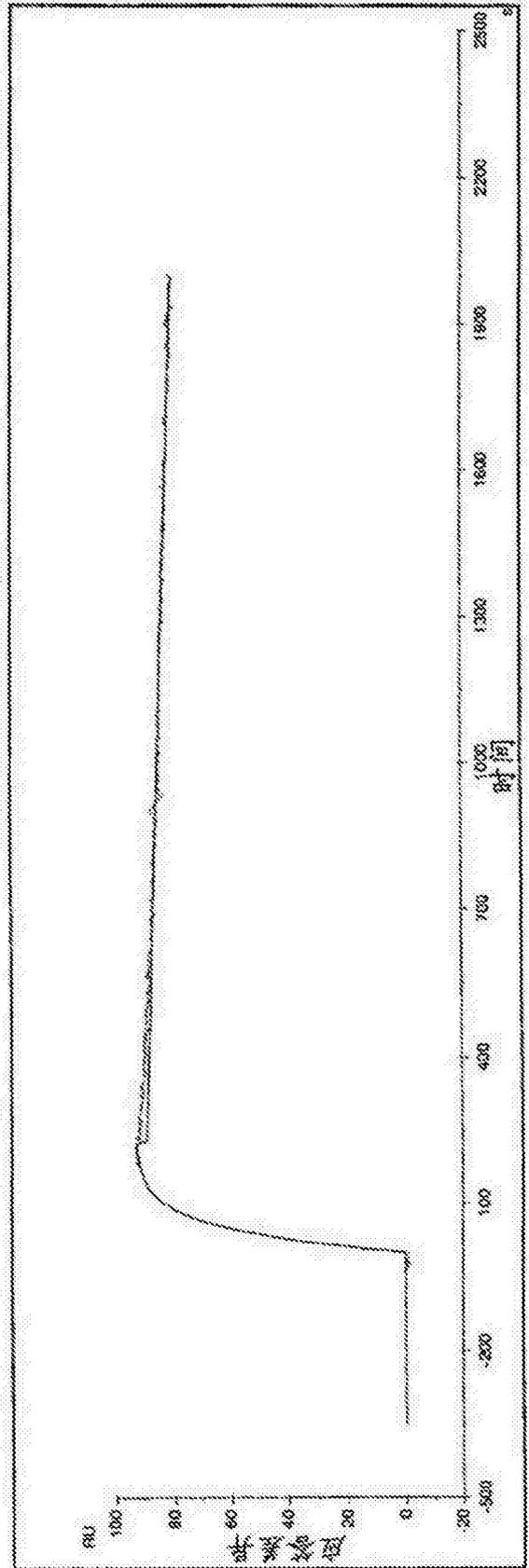


图 11

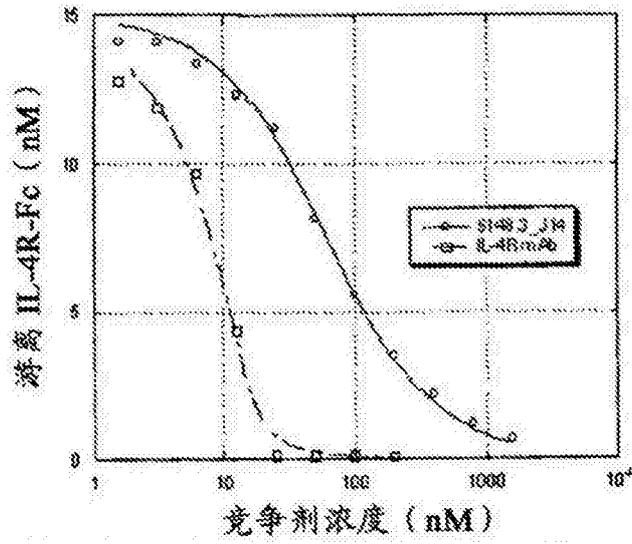


图 12

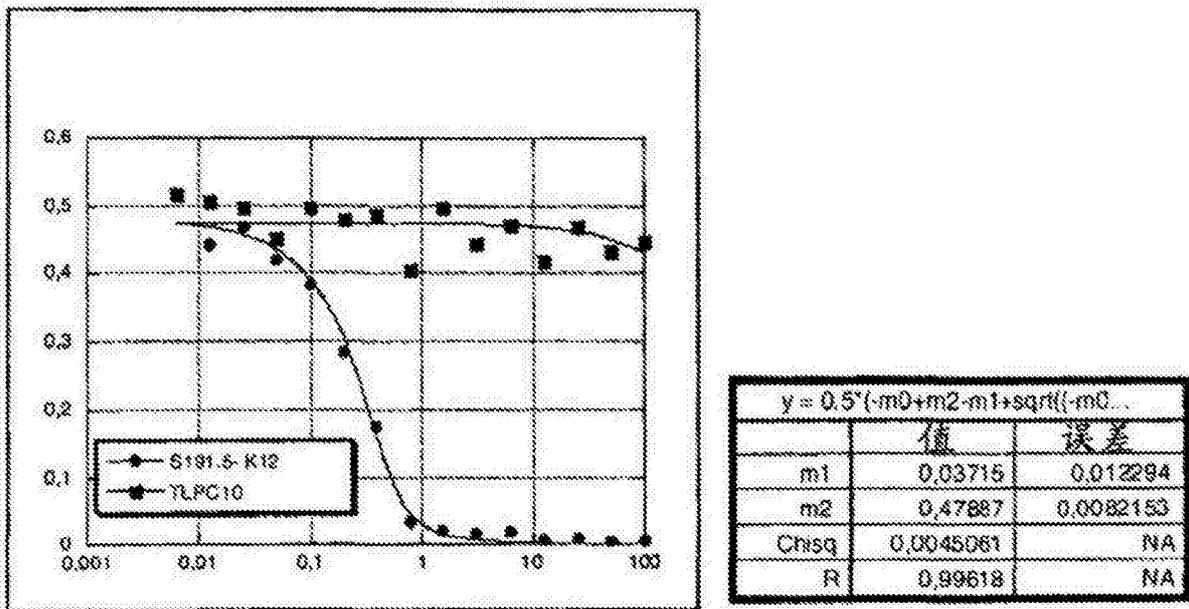


图 13

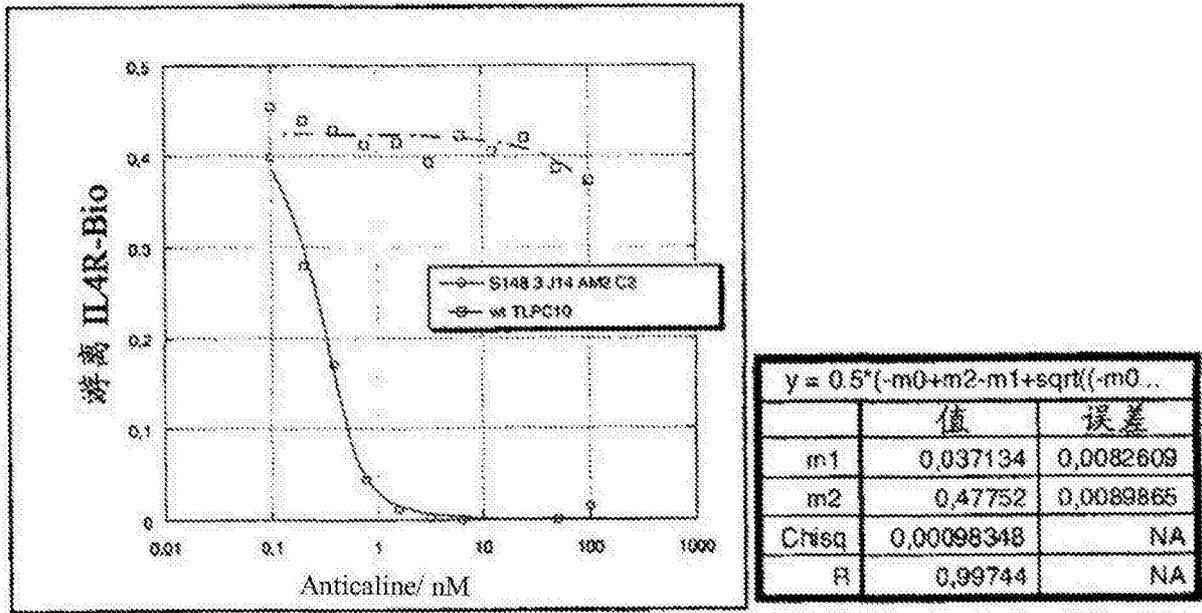


图 14

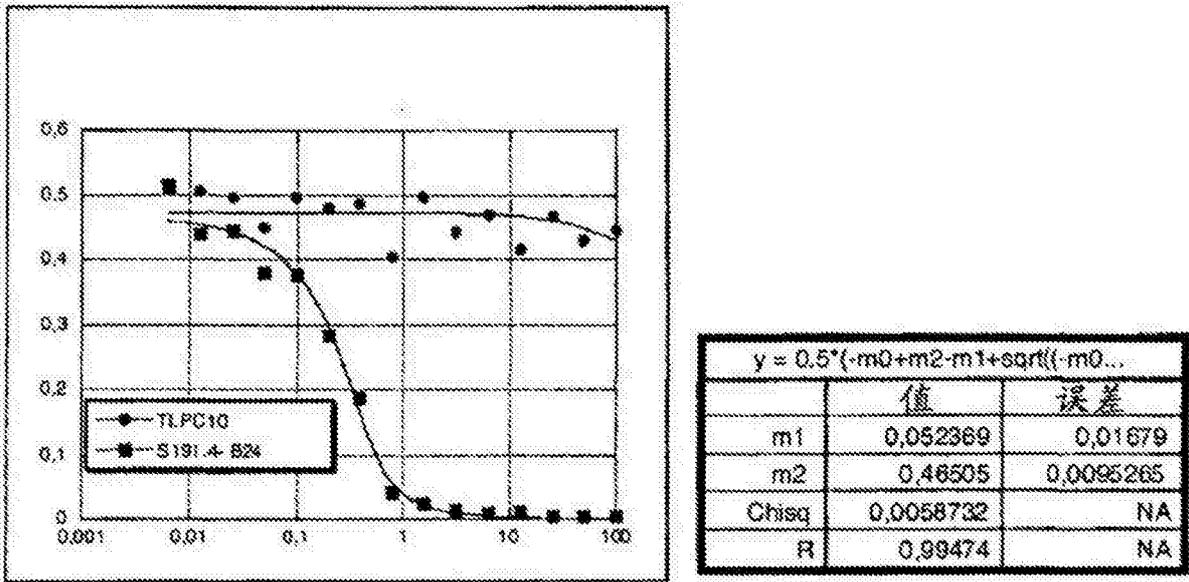


图 15

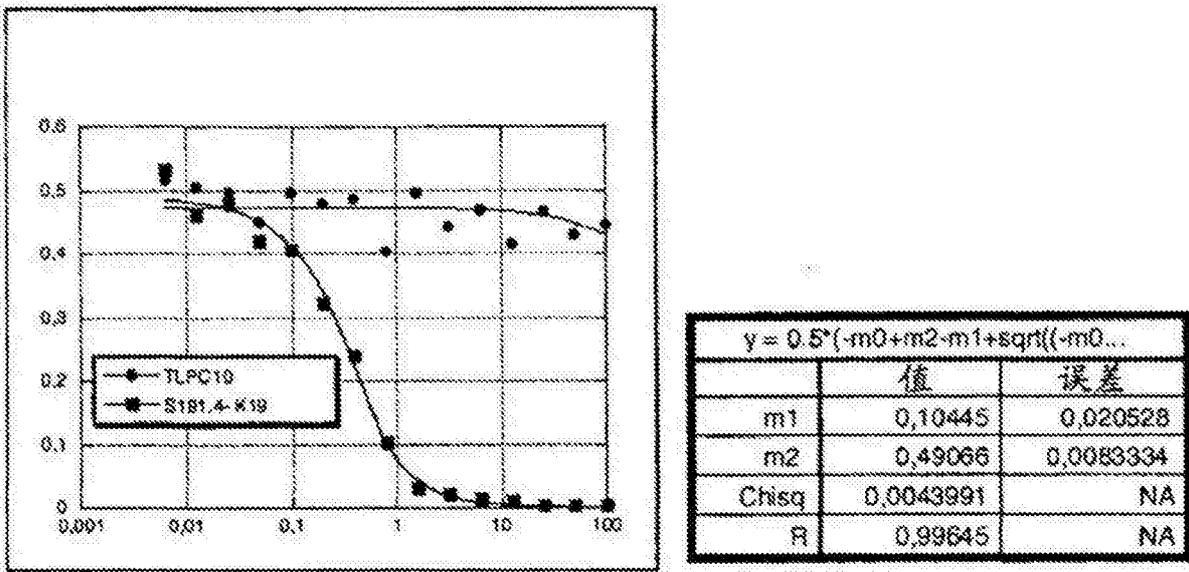


图 16

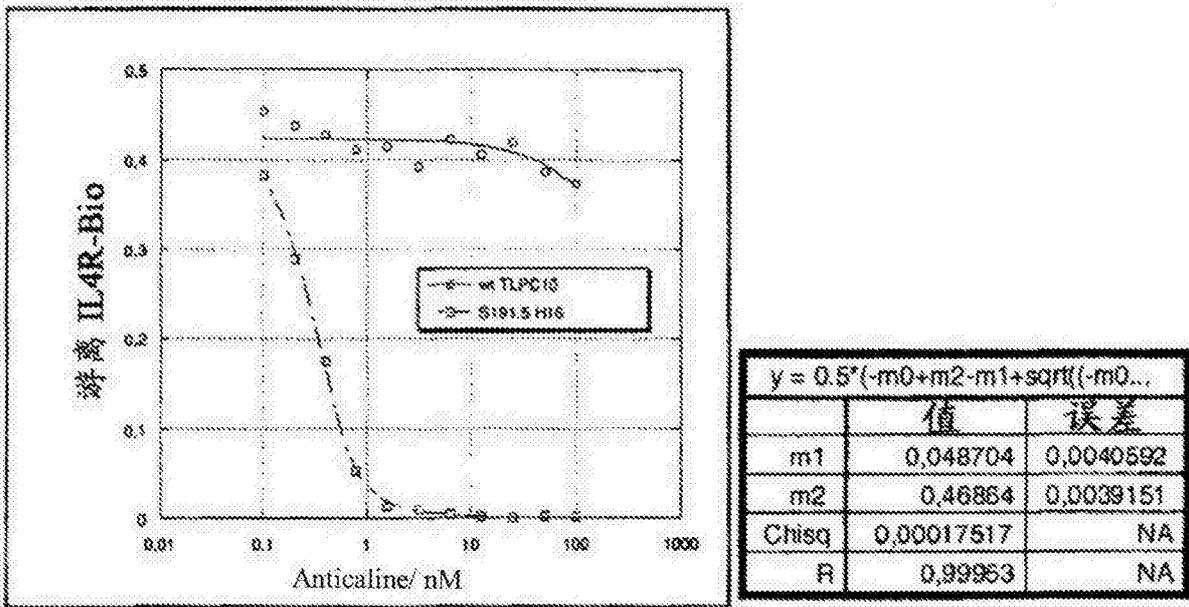


图 17

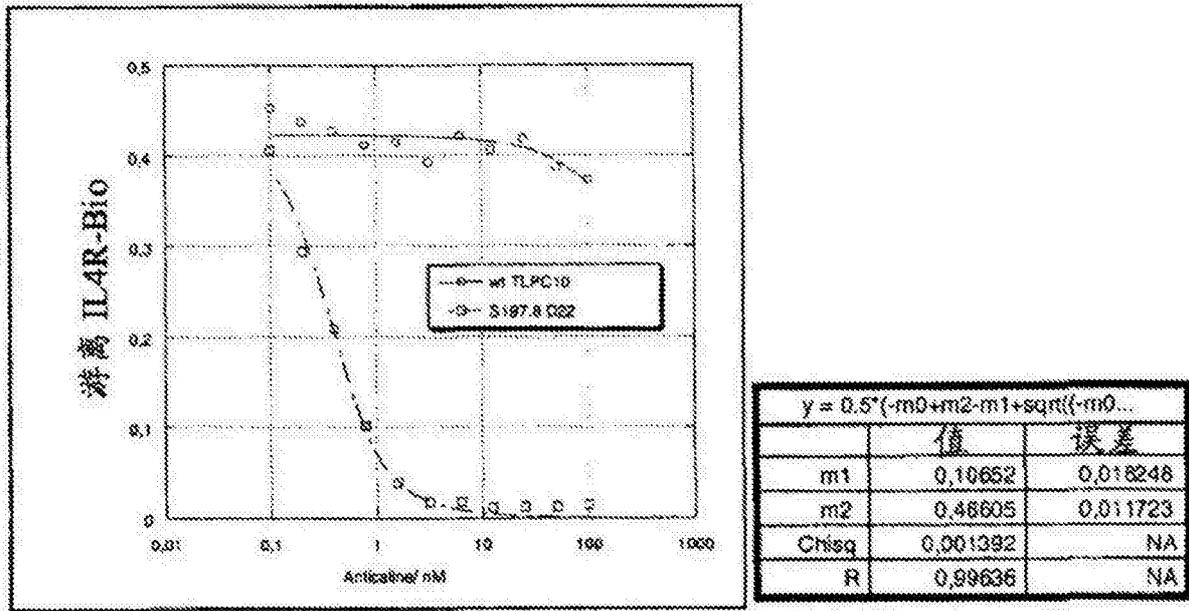
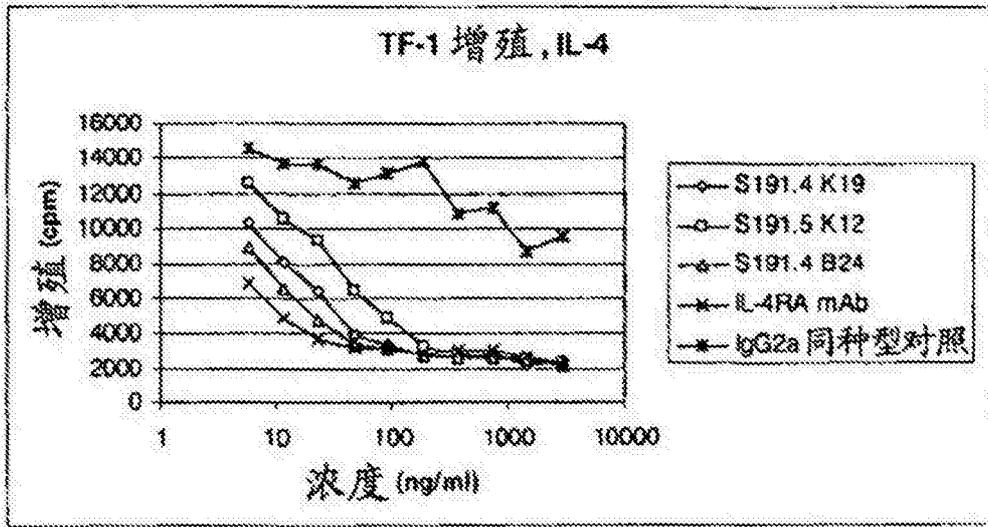
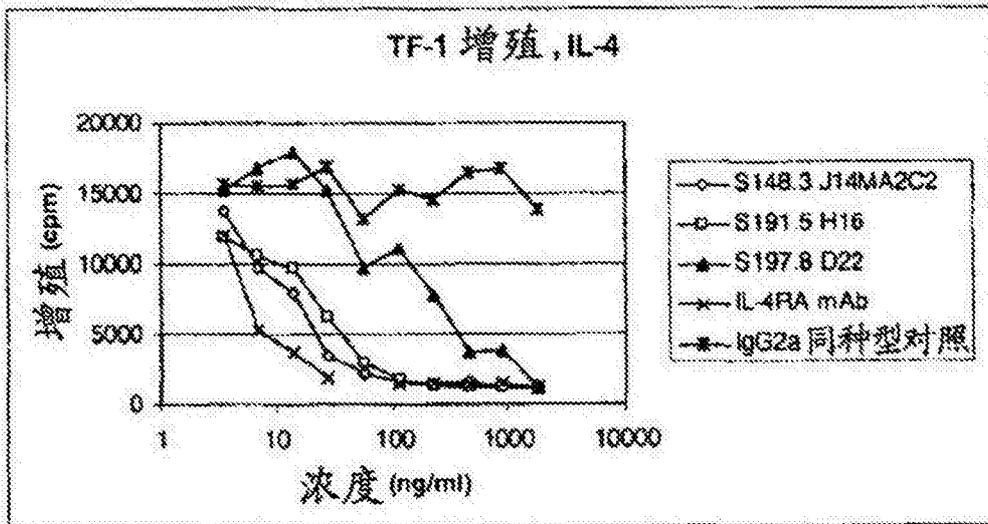


图 18

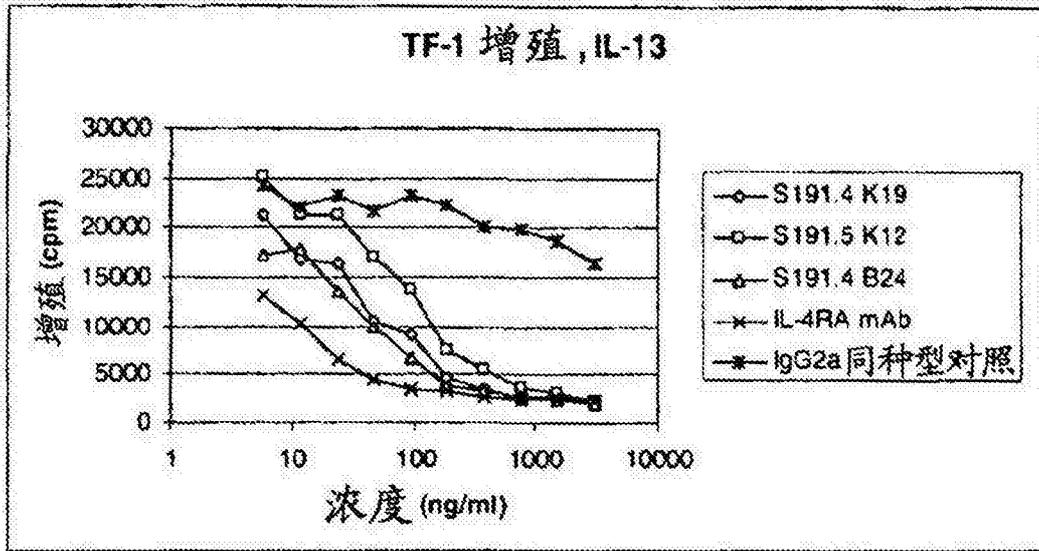
a)



b)



c)



d)

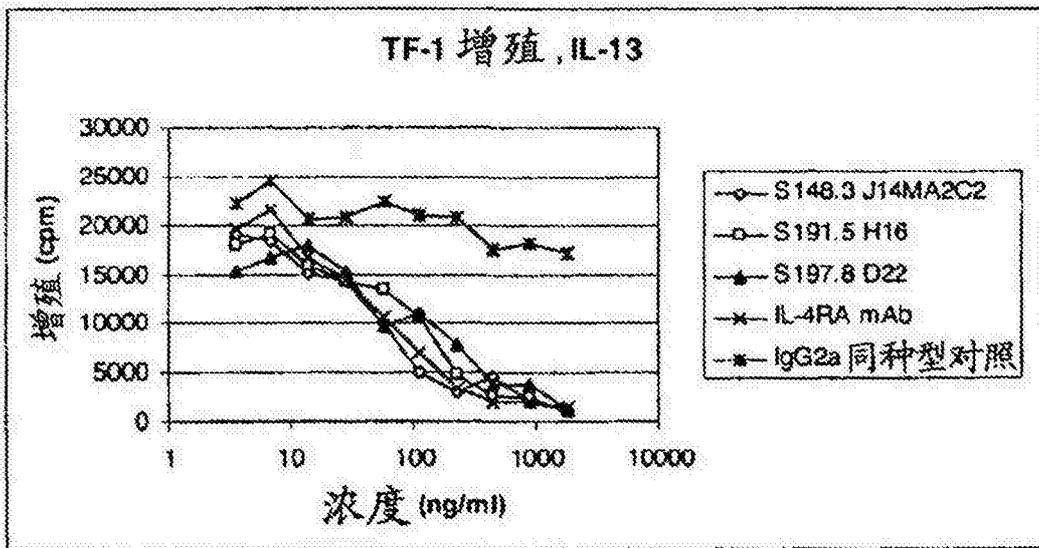


图 19

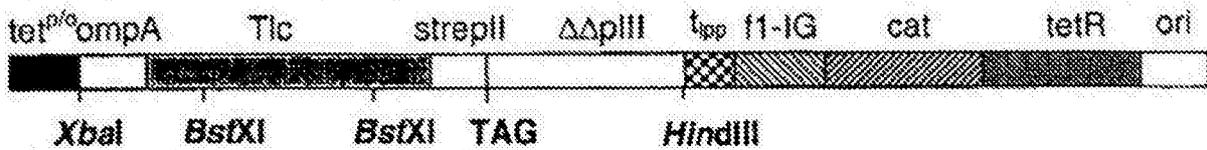


图 20

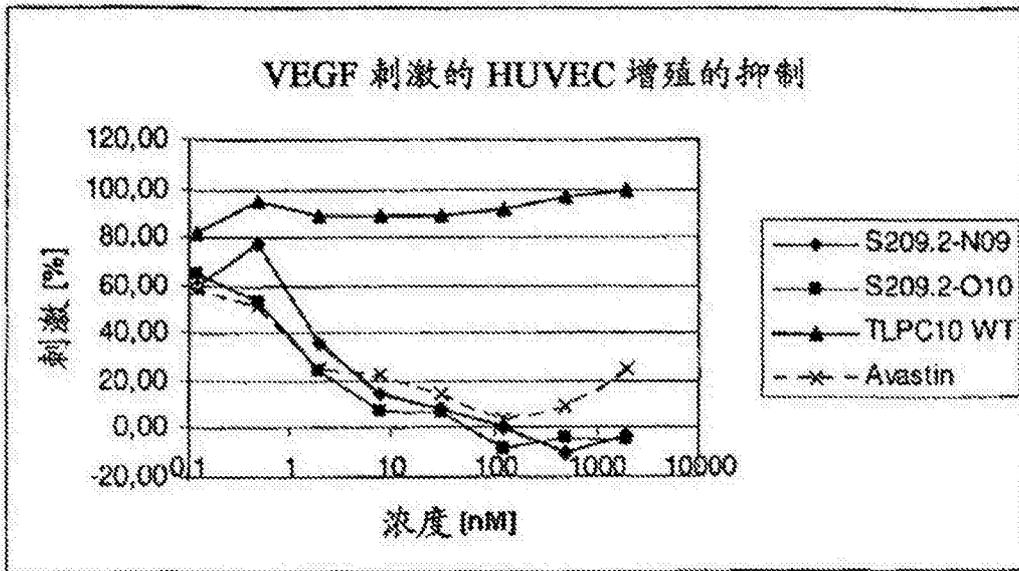


图 21a

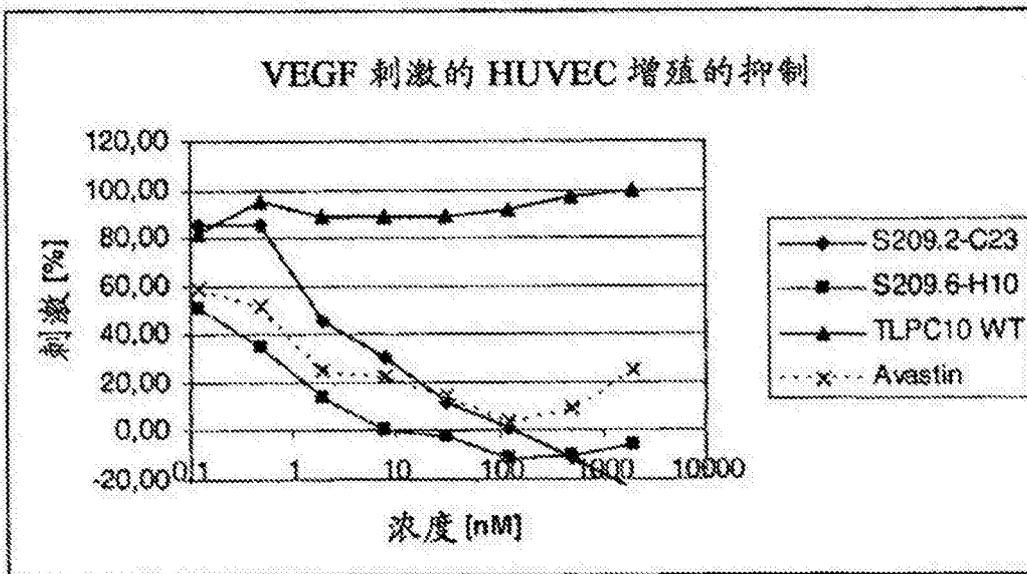


图 21b

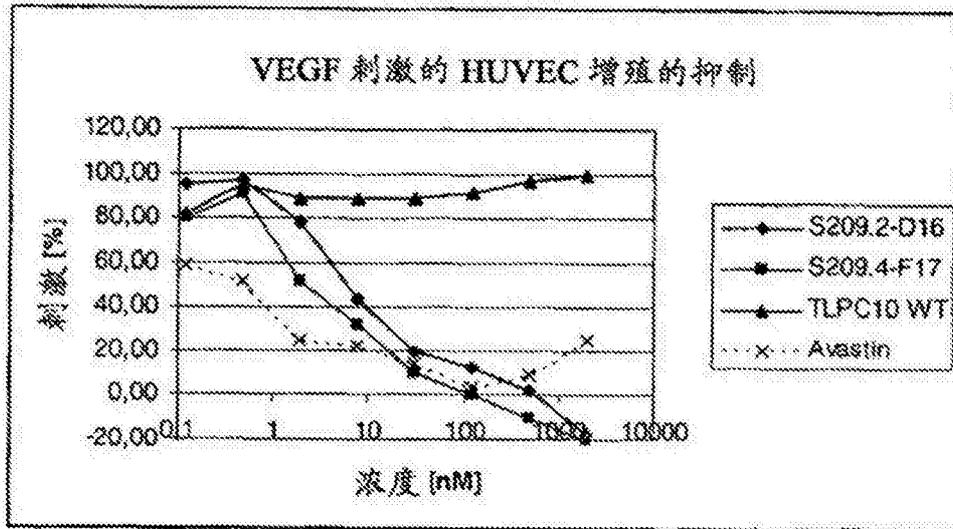


图 21c

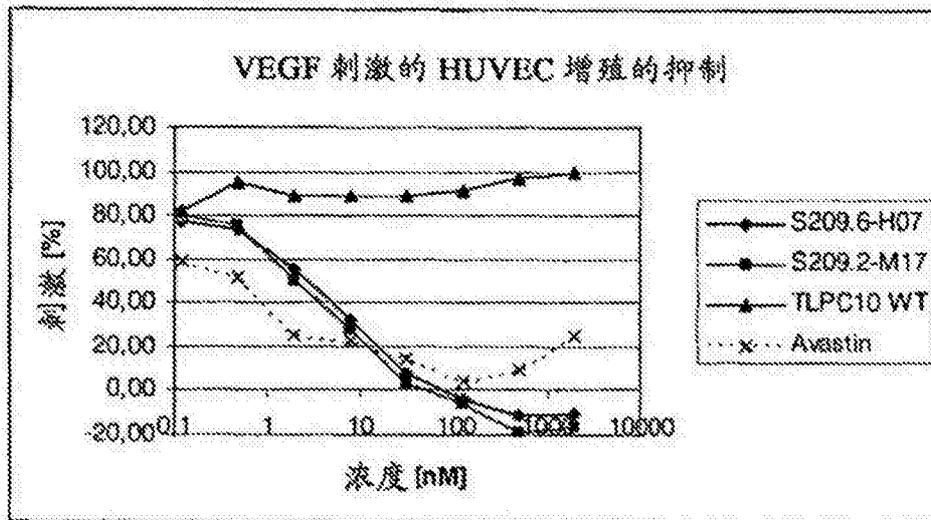


图 21d

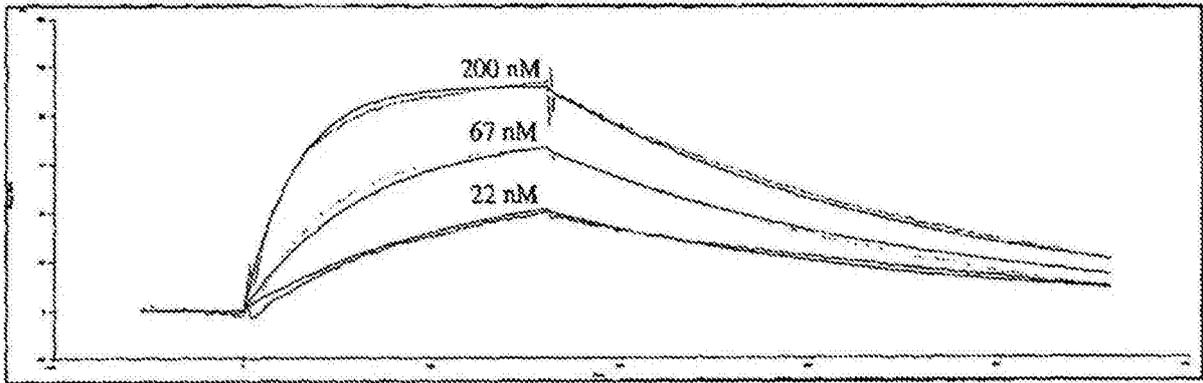


图 22

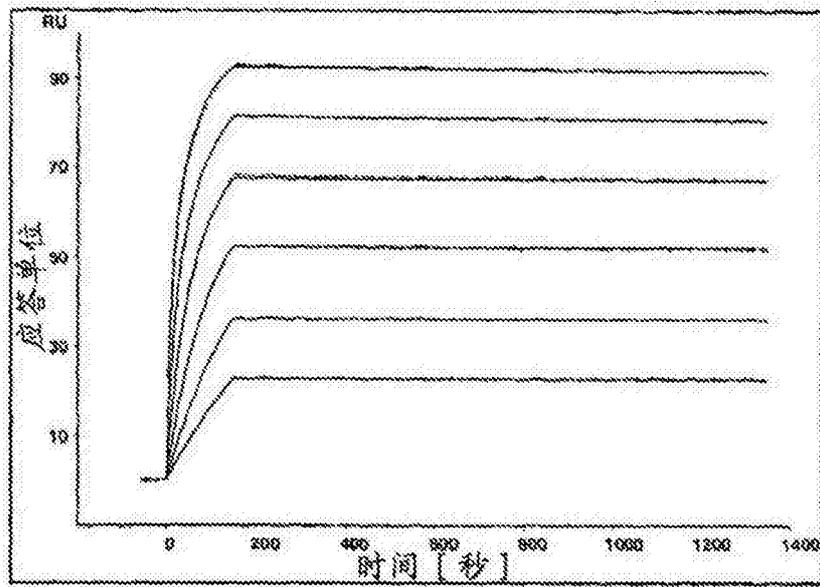


图 23

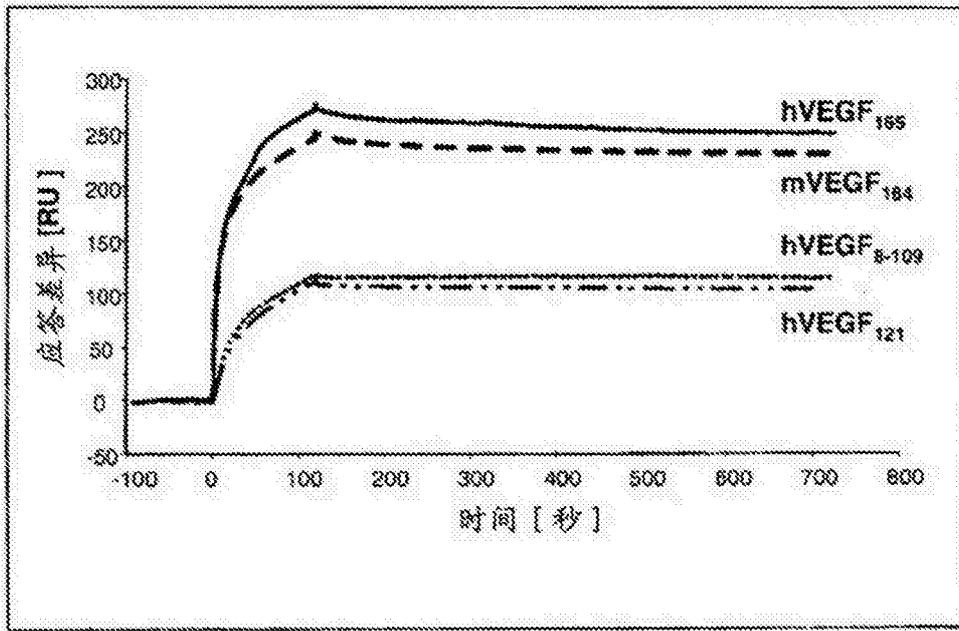
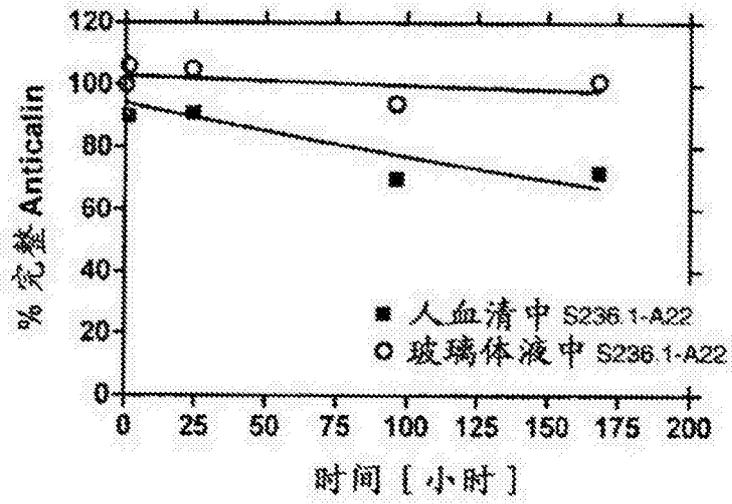


图 24

a)



b)

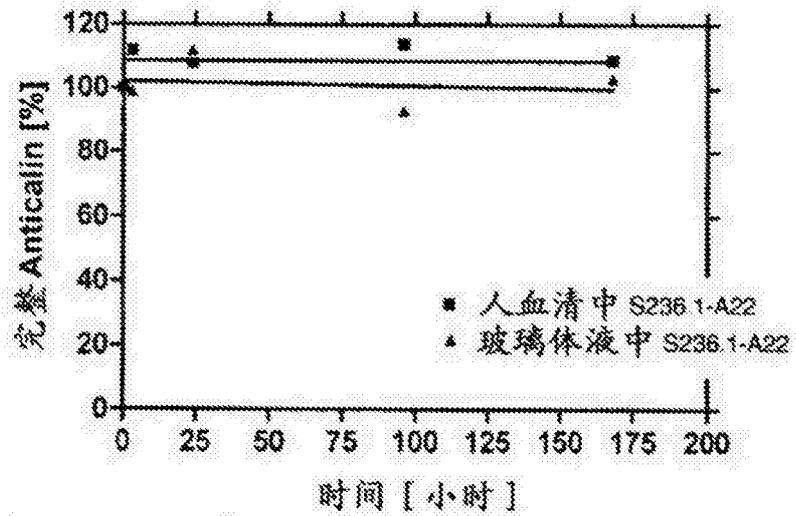


图 25

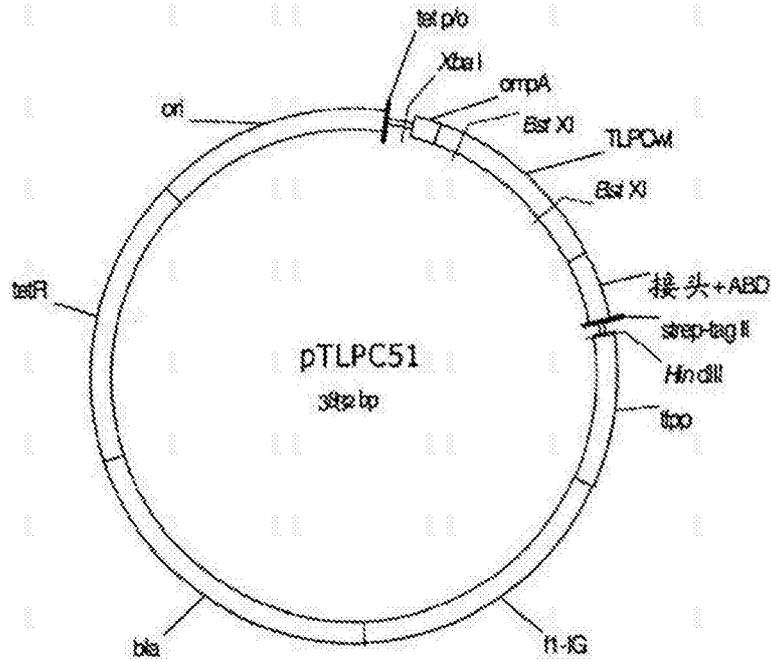
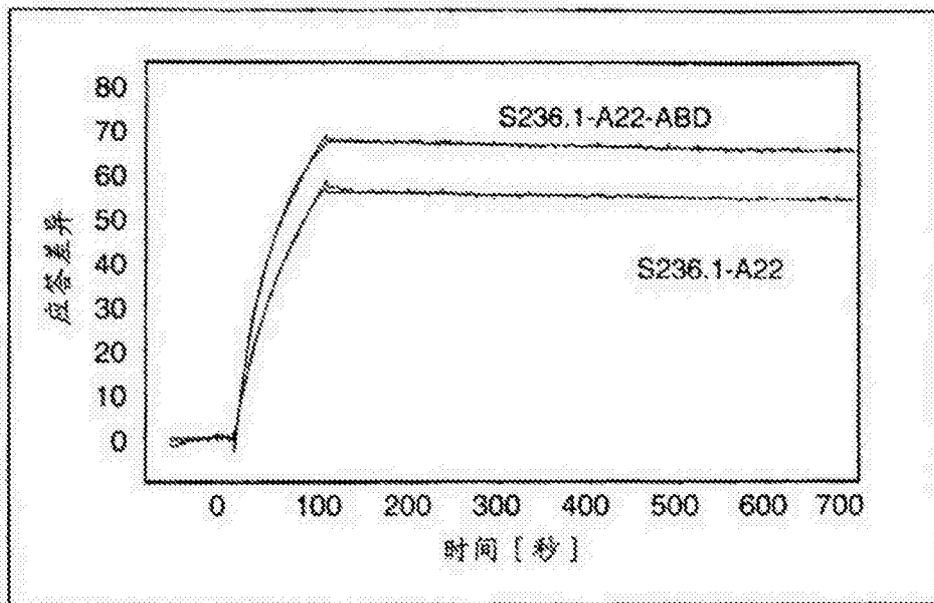


图 26



**Biacore-测量**

S236.1-A22 (泪液脂质运载蛋白突变蛋白) KD: 200pM

S236.1-A22-ABD (泪液脂质运载蛋白突变蛋白-ABD) KD: 260pM

图 27

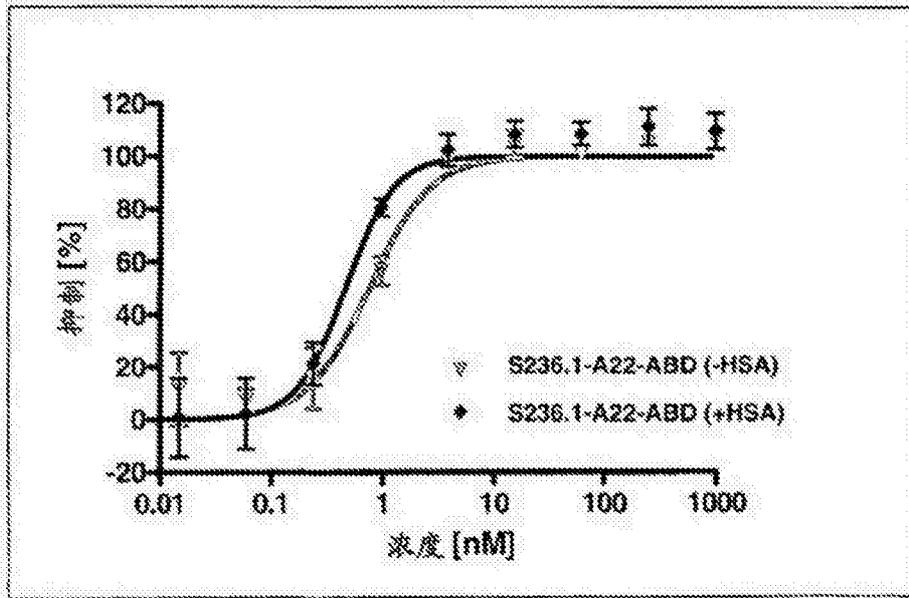
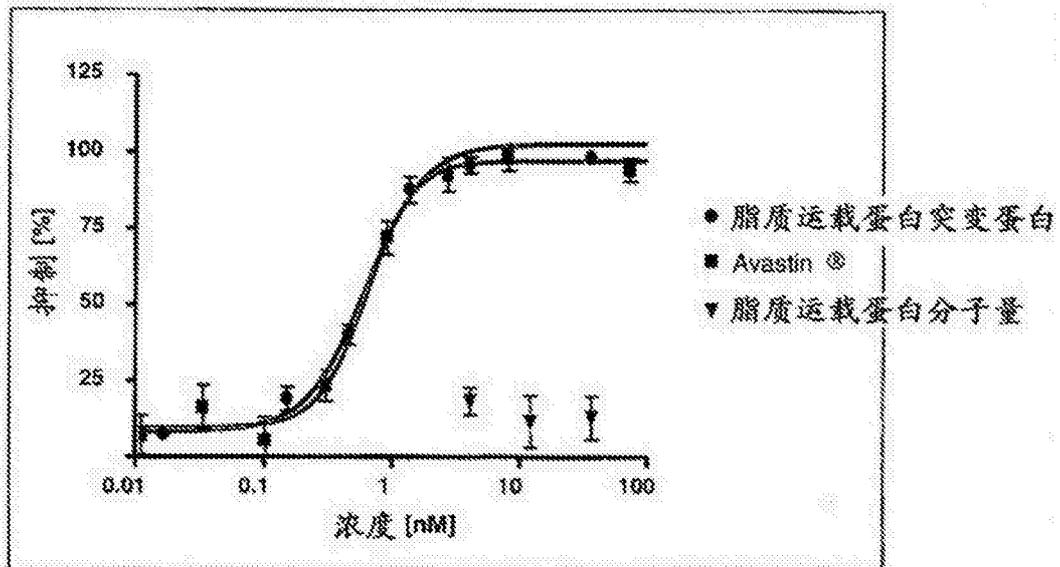
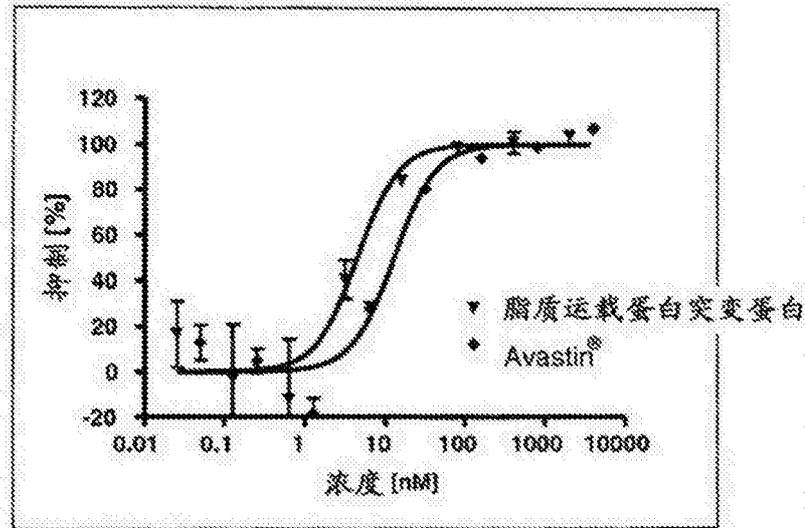


图 28



化合物	IC50 [nM]
S236.1-A22 (脂质运载蛋白突变蛋白)	0.51
Avastin	0.56

图 29



化合物	IC50 [nM]
S236.1-A22 (脂质运载蛋白突变蛋白)	4.5
Avastin	13

图 30

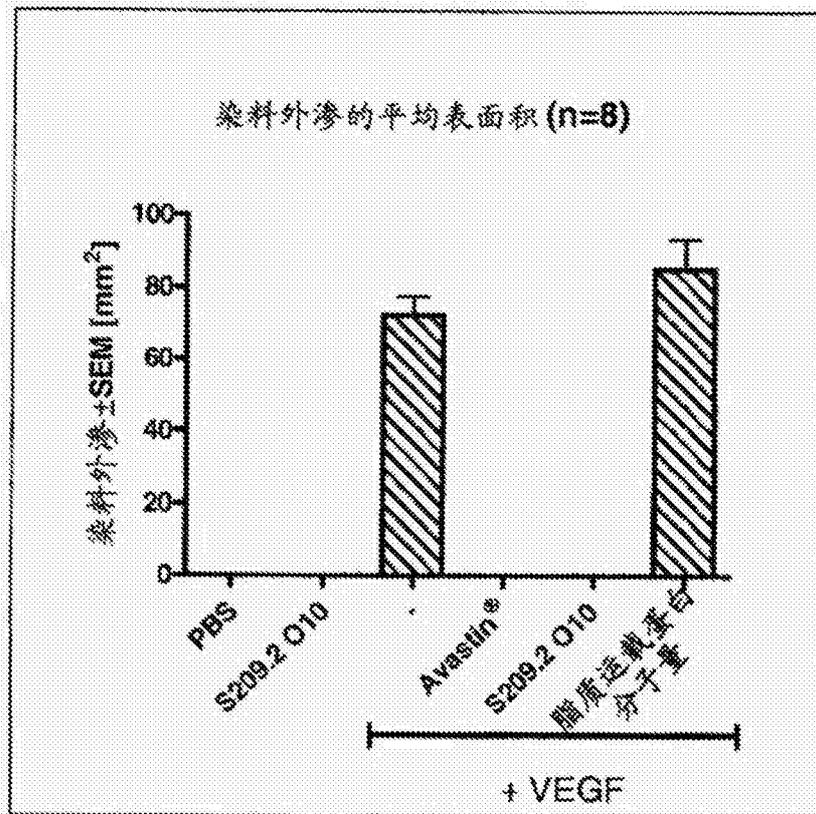


图 31

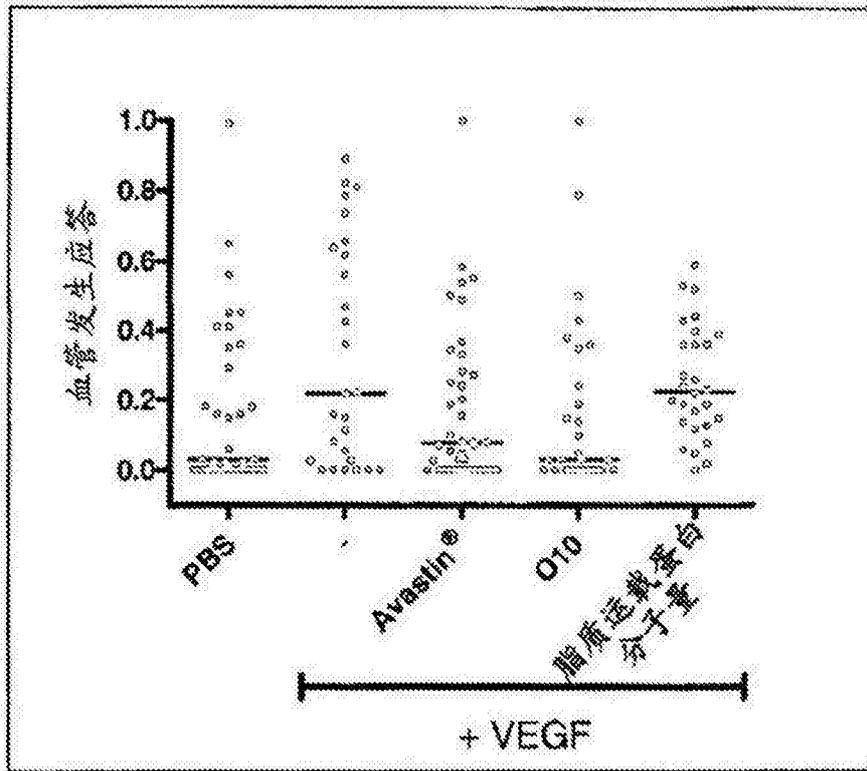


图 32

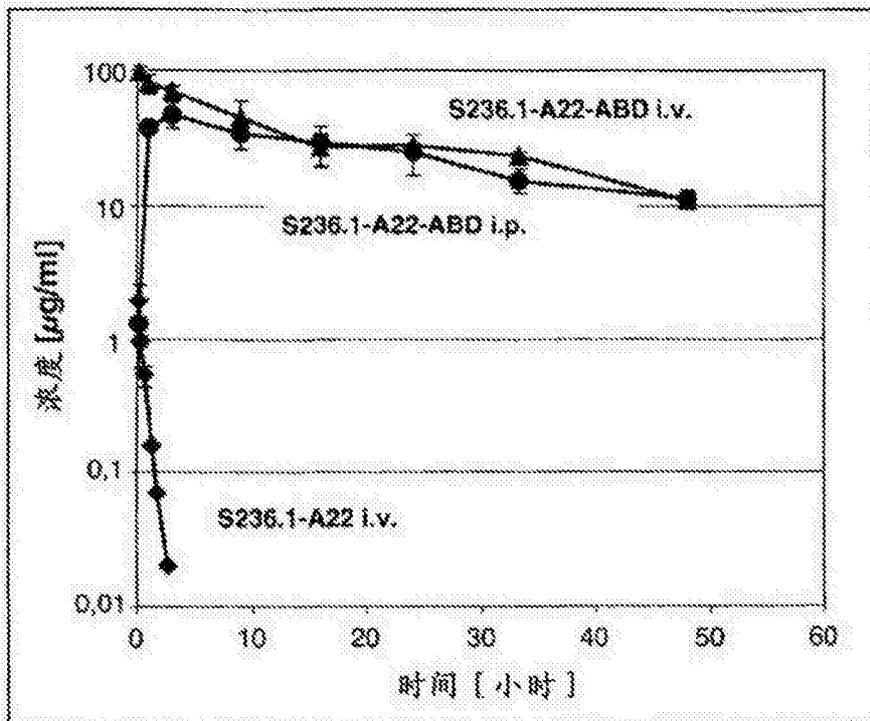


图 33

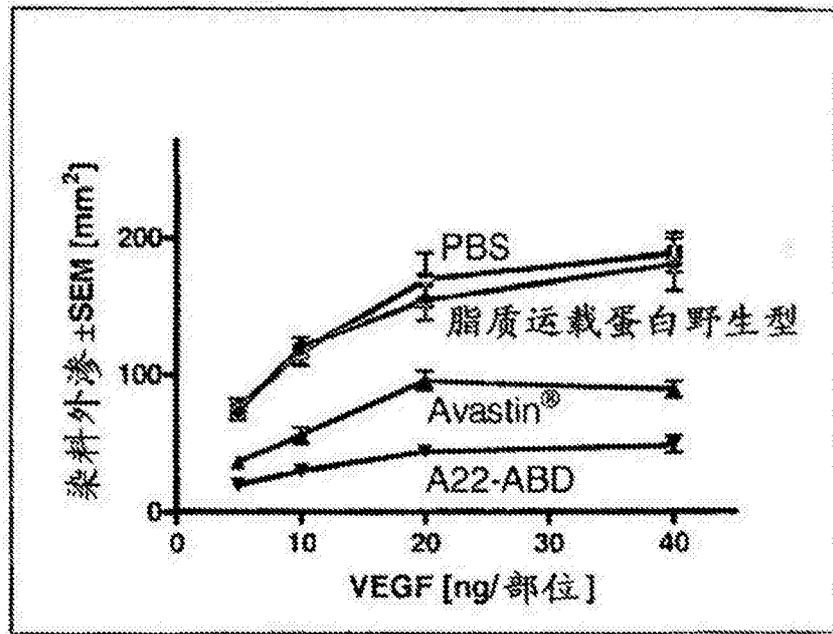


图 34

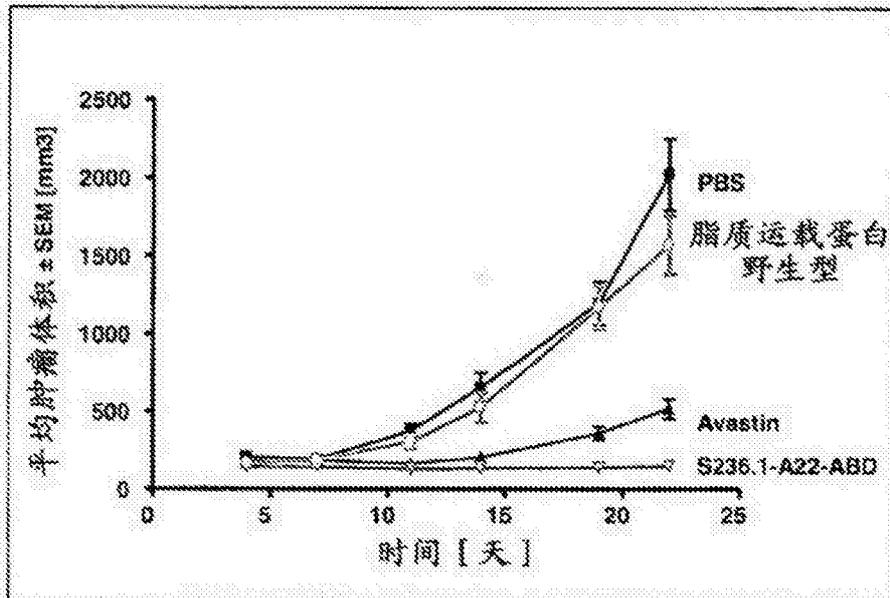


图 35

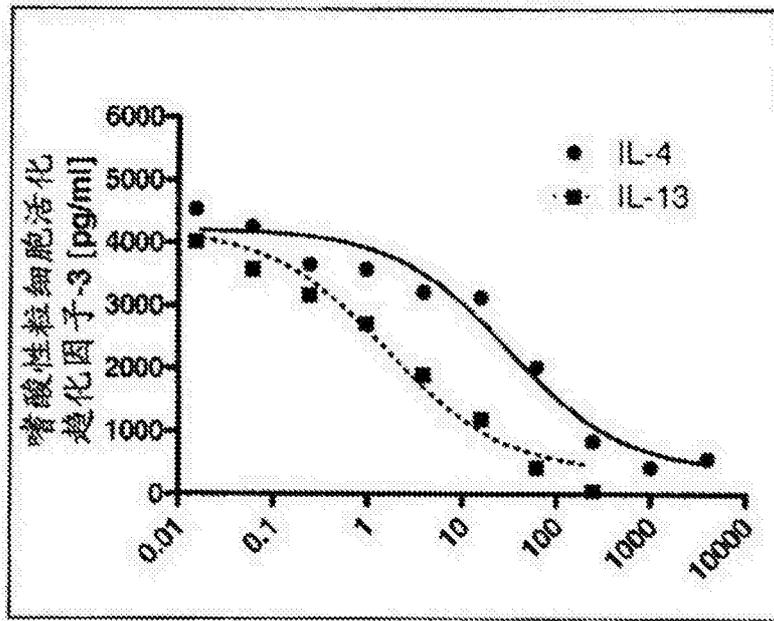


图 36

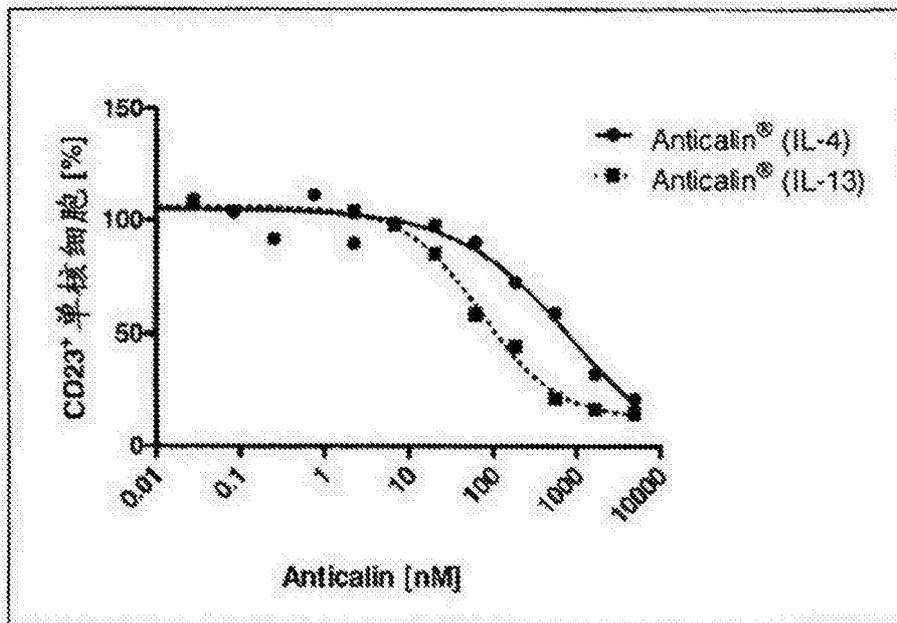


图 37

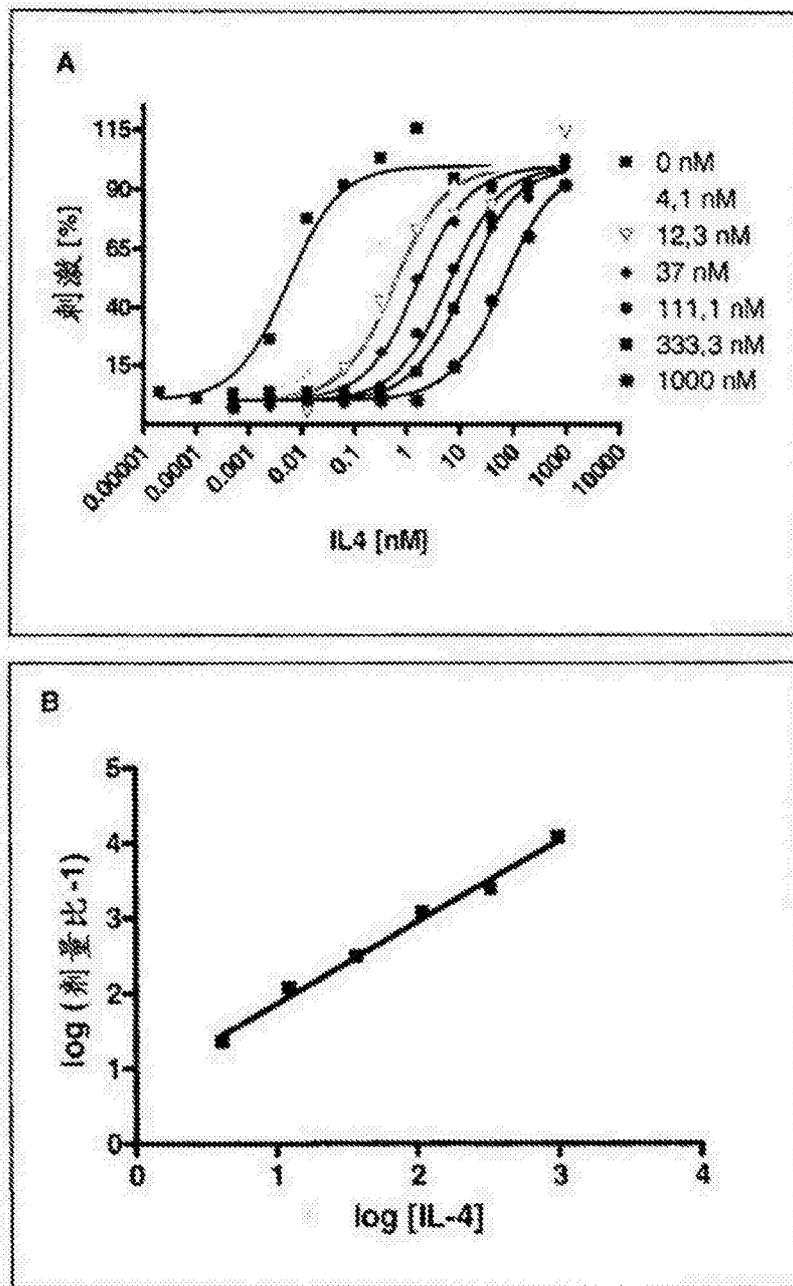


图 38

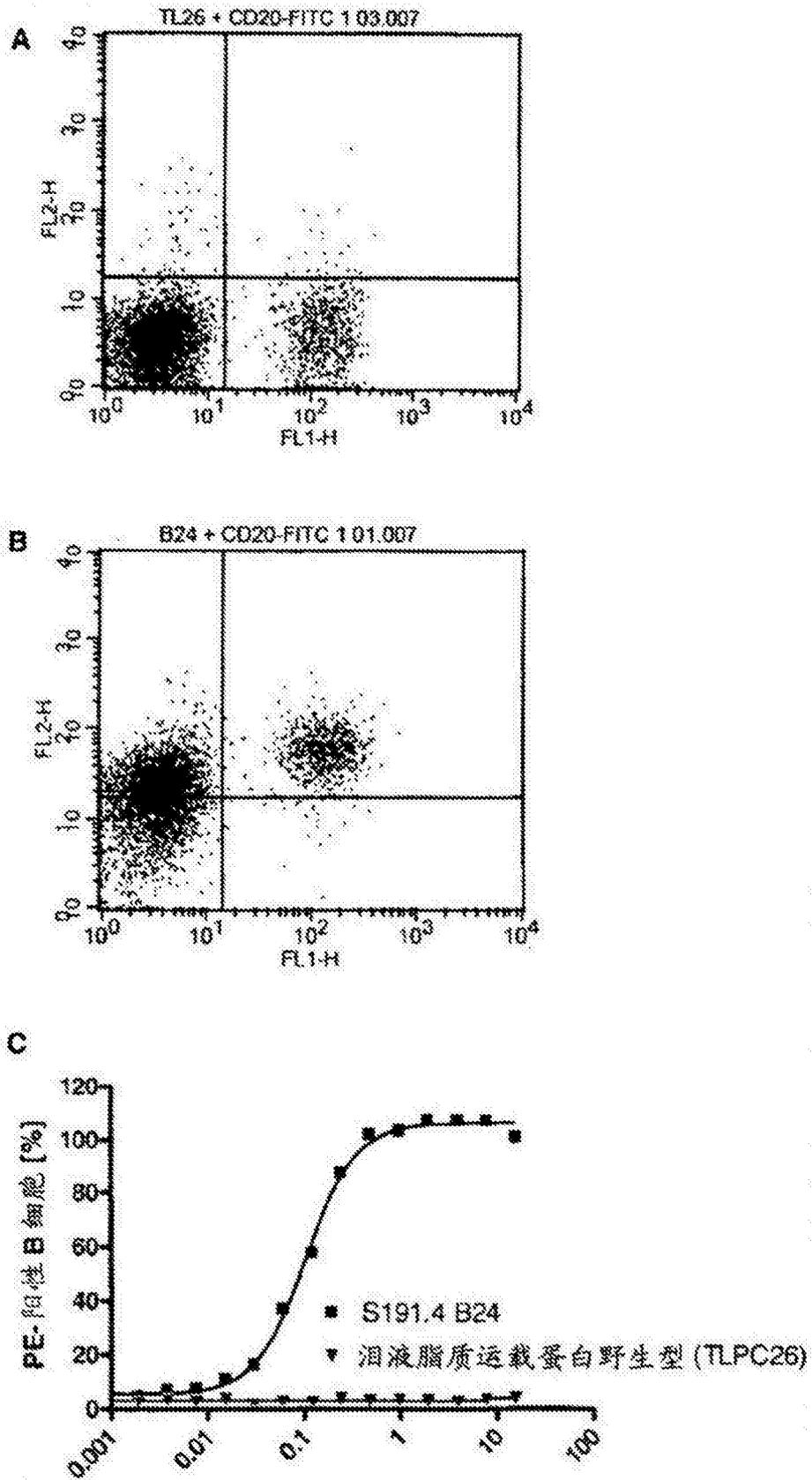


图 39

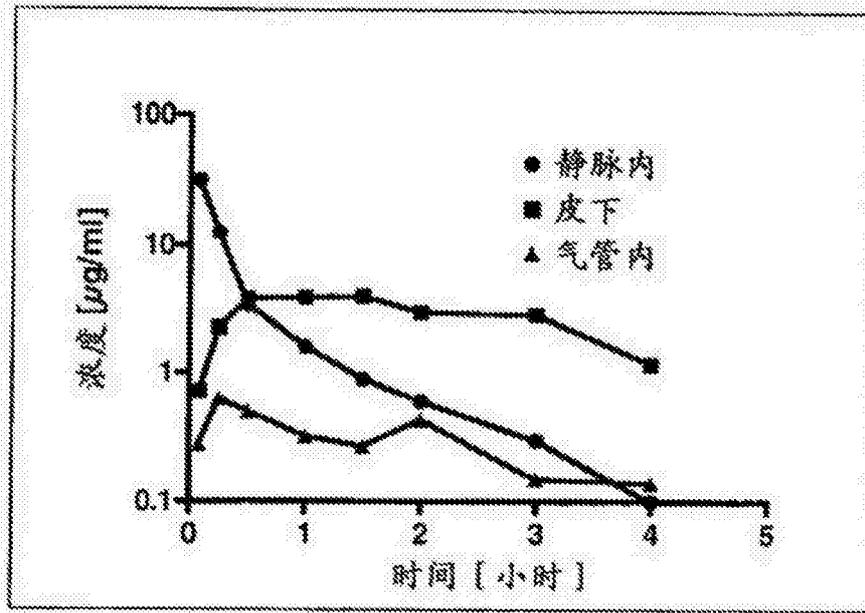


图 40

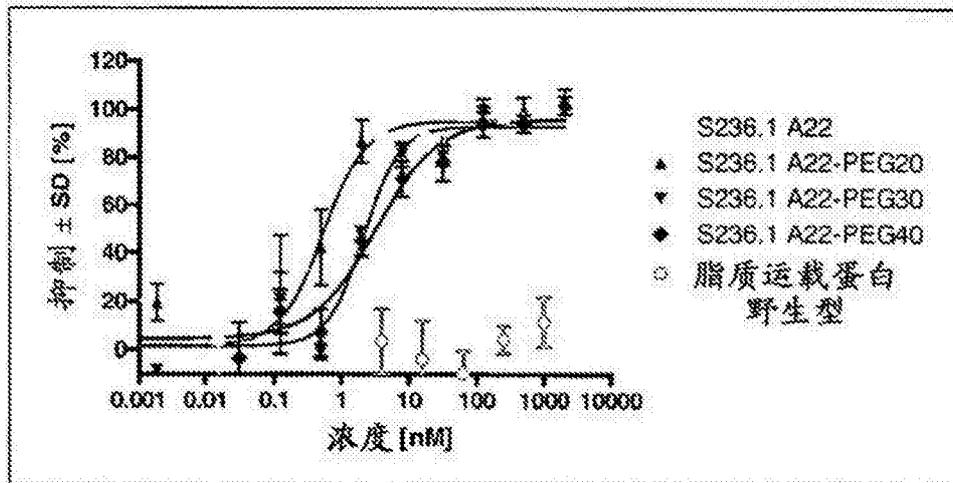


图 41

专利名称(译)	泪液脂质运载蛋白的突变蛋白及其获得方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105112477A</a>	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN201510431417.8	申请日	2007-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	皮里斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	皮里斯股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	皮里斯股份公司		
[标]发明人	K詹森 M许尔斯迈尔 S施勒胡伯尔 A霍尔鲍姆 A斯科拉 E布德罗 RC琼斯 I金伯 R迪尔曼		
发明人	K·詹森 M·许尔斯迈尔 S·施勒胡伯尔 A·霍尔鲍姆 A·斯科拉 E·布德罗 R·C·琼斯 I·金伯 R·迪尔曼		
IPC分类号	C12P21/02 C12N15/63 C07K14/47 G01N33/53 C12N15/12		
CPC分类号	C07K14/47 C07K14/435 C07K14/705 C12N5/10 G01N33/57407 G01N33/57492 G01N2333/70521 A61K38/00 A61K38/1709 A61K38/38 A61P7/10 A61P9/00 A61P9/08 A61P9/10 A61P11/06 A61P27/00 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 A61K47 /60		
代理人(译)	张伟		
优先权	60/821073 2006-08-01 US 60/912013 2007-04-16 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及来自人泪液脂质运载蛋白的新的突变蛋白。本发明还涉及编码这样的突变蛋白的相应核酸分子及其产生方法。本发明还涉及产生这样的突变蛋白的方法。最后，本发明涉及包含这样的脂质运载蛋白突变蛋白的药物组合物以及该突变蛋白的多种用途。

