

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03802072.6

[51] Int. Cl.

*C12N 15/49 (2006.01)*

*C12N 5/10 (2006.01)*

*C07K 14/16 (2006.01)*

*C07K 16/10 (2006.01)*

*A61K 39/21 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2006年12月27日

[11] 授权公告号 CN 1292069C

[51] Int. Cl. (续)

*G01N 33/566 (2006.01)*

[22] 申请日 2003.1.9 [21] 申请号 03802072.6

[30] 优先权

[32] 2002. 1. 11 [33] FR [31] 02/00319

[86] 国际申请 PCT/FR2003/000051 2003. 1. 9

[87] 国际公布 WO2003/057885 法 2003. 7. 17

[85] 进入国家阶段日期 2004. 7. 9

[73] 专利权人 拜奥默里克斯股份有限公司

地址 法国玛西 - 勒托勒

[72] 发明人 C·吉隆 A·彻达尔 - 博努

B·沃里尔 B·曼德兰德

审查员 韩世炜

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 程泳

权利要求书7页 说明书103页 附图8页

[54] 发明名称

HIV - 1 病毒 TAT - 蛋白突变体

[57] 摘要

本发明涉及用于制备野生型 HIV - 1 病毒 Tat 蛋白的解毒免疫原性突变体的蛋白质突变方法的用途。本发明还涉及制备野生型 HIV - 1 病毒 Tat 蛋白的解毒免疫原性突变体的方法，包括第一步制备野生型 Tat 蛋白质突变体、第二步筛选没有跨细胞活性但是核定位被改变的解毒突变体、以及第三步筛选能诱导同时针对所述突变体和野生 Tat 蛋白的抗体的免疫原性突变体。步骤二和三可以调换。

1. HIV-1 病毒 Tat 蛋白的解毒免疫原性突变体，其特征在于它在野生型 Tat 蛋白的结构域 4 含有至少一个突变，在结构域 4 和/或 5 中至少含有其它突变，且其中，当突变处于结构域 4 时它位于从氨基酸位置 49 至氨基酸位置 57 这部分中，且其中，当突变处于结构域 5 中时，它或者位于 RGD 基元中或者在 88-92 区中，突变是由一个氨基酸被另一氨基酸置换形成的突变。

2. 根据权利要求 1 的突变体，其特征在于当所述突变在结构域 5 的 88-92 区中时，它在位置 89 和/或 92。

3. 根据权利要求 1 或 2 的突变体，其特征在于结构域 4 和/或 5 中的突变能带来以下特征中的至少一种：

- 废除野生型 Tat 蛋白的跨细胞效应，
- 改变野生型 Tat 蛋白的核定位。

4. 根据权利要求 1 或 2 的突变体，其特征在于它含有能够使野生型 Tat 蛋白反式激活活性丧失的附加突变。

5. 根据权利要求 1 或 2 的突变体，其特征在于它在野生型 Tat 蛋白结构域 4 的 N-末端区域从氨基酸位置 49 至氨基酸位置 55 这部分中含有突变。

6. 根据权利要求 1 或 2 的突变体，其特征在于它在野生型 Tat 蛋白结构域 2 中包含突变。

7. 根据权利要求 6 的突变体，其特征在于在野生型 Tat 蛋白结构域 2 中的突变是对任一半胱氨酸的置换。

8. 根据权利要求 6 的突变体，其特征在于在野生型 Tat 蛋白结构域 2 中的突变是任一半胱氨酸被丝氨酸的置换。

9. 根据权利要求 1 或 2 的突变体，其特征在于它含有以下至少一种突变：

- 第 27 位的半胱氨酸被丝氨酸取代，
- 第 51 位的赖氨酸被苏氨酸取代，

- 第 52 位的精氨酸被亮氨酸取代,
- 第 55 位的精氨酸被亮氨酸取代,
- 第 57 位的精氨酸被亮氨酸取代,
- 第 79 位的甘氨酸被丙氨酸取代,
- 第 89 位的赖氨酸被亮氨酸取代,
- 第 92 位的谷氨酸被谷氨酰胺取代。

10. 根据权利要求 1 或 2 的突变体, 其特征在于它选自下述具有两种突变的突变体, 各突变用三联体表示: 字母-数字-字母, 其中的数字表示突变氨基酸的位置, 数字前的字母对应突变所涉及的氨基酸, 数字后的字母表示用于置换数字前氨基酸的氨基酸:

- K51T-R52L (SEQ ID NO: 2)
- K51T-R55L (SEQ ID NO: 3)
- K51T-R57L (SEQ ID NO: 4)
- K51T-G79A (SEQ ID NO: 5)
- K51T-K89L (SEQ ID NO: 6)
- K51T-E92Q (SEQ ID NO: 7)
- R52L-R55L (SEQ ID NO: 8)
- R52L-R57L (SEQ ID NO: 9)
- R52L-G79A (SEQ ID NO: 10)
- R52L-K89L (SEQ ID NO: 11)
- R52L-E92Q (SEQ ID NO: 12)
- R55L-R57L (SEQ ID NO: 13)
- R55L-G79A (SEQ ID NO: 14)
- R55L-K89L (SEQ ID NO: 15)
- R55L-E92Q (SEQ ID NO: 16)
- R57L-G79A (SEQ ID NO: 17)
- R57L-K89L (SEQ ID NO: 18)
- R57L-E92Q (SEQ ID NO: 19)。

11. 根据权利要求 10 的突变体, 其特征在于它选自下列突变体:

**K51T-R55L (SEQ ID NO : 3)**  
**R52L-R55L (SEQ ID NO : 8)**  
**R52L-G79A (SEQ ID NO : 10)**  
**R55L-R57L (SEQ ID NO : 13).**

12. 根据权利要求 1 或 2 的突变体, 其特征在于它选自下述具有三种突变的突变体, 各突变用三联体表示: 字母-数字-字母, 其中的数字表示突变氨基酸的位置, 数字前的字母对应突变所涉及的氨基酸, 数字后的字母表示用于置换数字前氨基酸的氨基酸:

**C27S-K51T-R52L (SEQ ID NO : 23)**  
**C27S-K51T-R55L (SEQ ID NO : 24)**  
**C27S-K51T-R57L (SEQ ID NO : 25)**  
**C27S-K51T-G79A (SEQ ID NO : 26)**  
**C27S-K51T-K89L (SEQ ID NO : 27)**  
**C27S-K51T-E92Q (SEQ ID NO : 28)**  
**C27S-R52L-R55L (SEQ ID NO : 29)**  
**C27S-R52L-R57L (SEQ ID NO : 30)**  
**C27S-R52L-G79A (SEQ ID NO : 31)**  
**C27S-R52L-K89L (SEQ ID NO : 32)**  
**C27S-R52L-E92Q (SEQ ID NO : 33)**  
**C27S-R55L-R57L (SEQ ID NO : 34)**  
**C27S-R55L-G79A (SEQ ID NO : 35)**  
**C27S-R55L-K89L (SEQ ID NO : 36)**  
**C27S-R55L-E92Q (SEQ ID NO : 37)**  
**C27S-R57L-G79A (SEQ ID NO : 38)**  
**C27S-R57L-K89L (SEQ ID NO : 39)**  
**C27S-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 40).**

13. 根据权利要求 12 的突变体, 其特征在于它选自下列突变体:

**C27S-K51T-R55L (SEQ ID NO : 24)**  
**C27S-R52L-R55L (SEQ ID NO : 29)**

**C27S-R52L-G79A (SEQ ID NO : 31)。**

14. 根据权利要求 1 或 2 的突变体, 其特征在于它选自下述具有四种突变的突变体, 各突变用三联体表示: 字母-数字-字母, 其中的数字表示突变氨基酸的位置, 数字前的字母对应突变所涉及的氨基酸, 数字后的字母表示用于置换数字前氨基酸的氨基酸:

**C27S-K51T-R52L-G79A (SEQ ID NO : 44)**

**C27S-K51T-R52L-K89L (SEQ ID NO : 45)**

**C27S-K51T-R52L-E92Q (SEQ ID NO : 46)**

**C27S-K51T-R55L-G79A (SEQ ID NO : 47)**

**C27S-K51T-R55L-K89L (SEQ ID NO : 48)**

**C27S-K51T-R55L-E92Q (SEQ ID NO : 49)**

**C27S-K51T-R57L-G79A (SEQ ID NO : 50)**

**C27S-K51T-R57L-K89L (SEQ ID NO : 51)**

**C27S-K51T-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 52)**

**C27S-K51T-G79A-K89L (SEQ ID NO : 53)**

**C27S-K51T-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 54)**

**C27S-K51T-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 55)**

**C27S-R52L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 56)**

**C27S-R52L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 57)**

**C27S-R52L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 58)**

**C27S-R52L-R55L-G79A (SEQ ID NO : 59)**

**C27S-R52L-R55L-K89L (SEQ ID NO : 60)**

**C27S-R52L-R55L-E92Q (SEQ ID NO : 61)**

**C27S-R52L-R57L-G79A (SEQ ID NO : 62)**

**C27S-R52L-R57L-K89L (SEQ ID NO : 63)**

**C27S-R52L-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 64)**

**C27S-R55L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 65)**

**C27S-R55L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 66)**

**C27S-R55L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 67)**

C27S-R55L-R57L-G79A (SEQ ID NO : 68)  
C27S-R55L-R57L-K89L (SEQ ID NO : 69)  
C27S-R55L-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 70)  
C27S-R57L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 71)  
C27S-R57L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 72)  
C27S-R57L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 73)。

15. 根据权利要求 14 的突变体, 其特征在于它选自下列突变体:

C27S-K51T-R55L-G79A (SEQ ID NO : 47)  
C27S-K51T-R55L-K89L (SEQ ID NO : 48)  
C27S-K51T-R55L-E92Q (SEQ ID NO : 49)  
C27S-R52L-R55L-G79A (SEQ ID NO : 59)。

16. 根据权利要求 1 或 2 的突变体, 其特征在于它选自下述具有五种突变的突变体, 各突变用三联体表示: 字母-数字-字母, 其中的数字表示突变氨基酸的位置, 数字前的字母对应突变所涉及的氨基酸, 数字后的字母表示用于置换数字前氨基酸的氨基酸:

C27S-K51T-G79A-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 75)  
C27S-K51T-R52L-R55L-G79A (SEQ ID NO : 76)  
C27S-K51T-R52L-R55L-K89L (SEQ ID NO : 77)  
C27S-K51T-R52L-R55L-E92Q (SEQ ID NO : 78)  
C27S-K51T-R52L-R57L-G79A (SEQ ID NO : 79)  
C27S-K51T-R52L-R57L-K89L (SEQ ID NO : 80)  
C27S-K51T-R52L-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 81)  
C27S-K51T-R52L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 82)  
C27S-K51T-R52L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 83)  
C27S-K51T-R52L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 84)  
C27S-K51T-R55L-R57L-G79A (SEQ ID NO : 85)  
C27S-K51T-R55L-R57L-K89L (SEQ ID NO : 86)  
C27S-K51T-R55L-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 87)  
C27S-K51T-R55L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 88)

- C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 89)  
C27S-K51T-R55L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 90)  
C27S-K51T-R57L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 91)  
C27S-K51T-R57L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 92)  
C27S-K51T-R57L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 93)  
C27S-R52L-R55L-R57L-G79A (SEQ ID NO : 94)  
C27S-R52L-R55L-R57L-K89L (SEQ ID NO : 95)  
C27S-R52L-R55L-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 96)  
C27S-R52L-R55L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 97)  
C27S-R52L-R55L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 98)  
C27S-R52L-R55L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 99)  
C27S-R52L-R57L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 100)  
C27S-R52L-R57L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 101)  
C27S-R52L-R57L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 102)  
C27S-R52L-G79A-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 103)  
C27S-R55L-R57L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 104)  
C27S-R55L-R57L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 105)  
C27S-R55L-R57L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 106)  
C27S-R55L-G79A-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 107)  
C27S-R57L-G79A-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 108)。

17. 根据权利要求 16 的突变体, 其特征在于它选自下列突变体:

- C27S-K51T-R55L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 88)  
C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 89)。

18. 编码根据权利要求 1 至 17 任一项的突变体之一的核苷酸序列。

19. 用根据权利要求 18 的核苷酸序列转染的细胞系。

20. 针对根据权利要求 1 至 17 任一项的突变体之一的抗体, 其不识别野生型蛋白质结构域 1。

21. 根据权利要求 20 的抗体, 其识别野生型蛋白质。

22. 根据权利要求 20 的抗体，其不识别野生型蛋白质。

23. 药物组合物，它包含作为活性成分的至少一种根据权利要求 1 至 17 任一项的突变体或至少一种根据权利要求 18 的核苷酸序列或至少一种根据权利要求 20-22 任一项的抗体以及药学适宜载体，其中的核苷酸序列位于权利要求 1-17 任一项的突变体之一的组成型表达所必需的元件控制之下。

24. 根据权利要求 23 的药物组合物，其是疫苗。

25. 含有至少一种如权利要求 1 至 17 任一项中所定义的突变体、或至少一种根据权利要求 20 至 22 任一项的抗体的检测和/或定量 HIV-1 病毒的诊断组合物。

26. 检测和/或定量取自能被 HIV-1 感染的个体的生物样品中 HIV-1 病毒的方法，其特征在于该方法包括下列阶段：

- 在预定条件下将所述生物样品与含有如权利要求 1 至 17 任一项所定义的突变体或如权利要求 20 至 22 任一项所定义的抗体的诊断组合物接触，其中该预定条件允许上述定义的突变体与针对野生型 Tat 蛋白的抗体之间、或上述定义的抗体与野生型 Tat 蛋白之间形成抗体/抗原复合物，和

- 用适当的手段检测和/或定量所述复合物的形成。

27. 根据权利要求 26 的方法，其中所述生物样品选自血浆、血清或组织。

28. 至少一种如权利要求 1 至 17 任一项所定义的突变体或至少一种根据权利要求 20 至 22 任一项的抗体在体外检测生物样本或样品中 HIV-1 病毒中的用途。

29. 至少一种如权利要求 1 至 17 任一项所定义的突变体或至少一种根据权利要求 20 至 22 任一项的抗体在制备疫苗组合物中的用途。

## HIV-1 病毒 TAT-蛋白突变体

本发明的一个主题是 HIV-1 病毒 Tat-蛋白突变体, 以及包含至少一种所述突变体的药物组合物, 特别是包含至少一种所述突变体的疫苗。

HIV 病毒是产生 AIDS 的病因物质。HIV 属于人反转录病毒科 (Retroviridae) 慢病毒亚科。在两种 HIV 类型 (HIV-1 和 HIV-2) 中, HIV-1 更具细胞病变能力且在全球尤其是西方国家中占主导地位。HIV-1 感染伴随有被感染个体免疫系统早期功能障碍。

与其它反转录病毒一样, HIV-1 具有编码病毒结构蛋白的基因。*gag* 基因编码形成病毒粒子核心的蛋白质, 包括 p24 抗原。*pol* 基因编码负责反转录 (反转录酶) 及整合 (整合酶) 的酶。*env* 基因编码外壳糖蛋白。然而 HIV-1 比其它反转录病毒更复杂, 它包含其它六个涉及病毒基因表达调控的蛋白质的编码基因 (*tat*、*rev*、*nef*、*vif*、*vpr* 和 *vpu*)。HIV-1 基因组中还含有包括参与病毒基因表达的调控元件的 5' 和 3'LTRs (长末端重复)。

在体内, Tat 是 HIV-1 复制所必需的蛋白质。人们对 Tat 在转录中的功能已作了大量研究, 现在非常清楚的是, Tat 的主要作用之一是调控从 5' LTR 的转录。Tat 是一种通过与其它细胞因子同时结合到 TAR 序列上来反式激活 5' LTR 的转录激活因子, 从而导致病毒转录和延长的增加。LTR 被 Tat 蛋白的反式激活对基因表达和病毒复制都是重要的。病毒启动子被 Tat 蛋白反式激活 (17、18) 使病毒信使 RNAs 得以大规模生产, 这些信使 RNA 向细胞质的转移依赖于另一调控蛋白, Rev 蛋白。Tat 和 Rev 调控 HIV-1 的表达 (7)。Tat 蛋白由被 HIV-1 感染的细胞分泌。一旦达到细胞外, 它就能被相邻的感染或未感染细胞内化 (9、14), 从而能诱导对未感染 T 淋巴细胞激活状态的修饰。因此它直接涉及 AIDS 的发展以及可能涉及与 AIDS 有关的病理症状,

例如卡波西肉瘤 (Kaposi's sarcoma)。

完整的 Tat 蛋白由 101 个氨基酸组成, 残基 1-72 由第一个外显子编码, 残基 73-101 由第二个外显子编码。Tat 蛋白高度保守。在一些经传代培养得到的实验株系中存在一种不同于天然形式的具有 86 个氨基酸的截断形式。该截断形式是由在传代培养过程中向 87 位导入了一个终止密码子而产生的, 但是在所研究的 Tat 蛋白中超过 90% 都保持 101 个氨基酸的构型。尽管氨基酸 87-101 不能大大促进离体 (*ex vivo*) 增殖, 但是它们在能复制的 HIV-1 天然分离物中的保守性却是它们生物学重要性的指征。具有 101 个氨基酸的 HIV-1 天然 Tat 蛋白由五个物理结构域组成, 但是其作用分子机制还未得到完全阐明。简言之, 这五个结构域描述于 Jeang, K. T 等人 (18) 的出版物。在该出版物中, 结构域 1 对应于酸性氨基酸富集的氨基酸 1-20, 结构域 2 对应于半胱氨酸残基富集 (7 个半胱氨酸残基, 其中 6 个极度保守) 的氨基酸 21-40, 结构域 3 对应于氨基酸 41-48 且包含 HIV-1、HIV-2 和 SIV 共有的 RKGLGI 基元, 结构域 4 对应于氨基酸 49-72 且包含一个碱性 RKKRRQRRR 基元, 以及结构域 5 对应于氨基酸 73-101 且包含一个 RGD 基元。没有解释结构域 1 的作用。只显示出, 该结构域中一个氨基酸的改变可以被良好耐受且不改变 Tat 蛋白的功能。所提出的一种假说是, 结构域 1 可能涉及反式激活。改变结构域 2 的七个半胱氨酸中的六个抑制了 Tat 蛋白的功能。该结构域对于反式激活很重要。没有阐述结构域 3 的作用。结构域 4 赋予 Tat 结合 TAR RNA 的特性, 而且它对于核定位以及 Tat 蛋白的跨细胞运输是重要的。结构域 5 也涉及 Tat 蛋白的跨细胞运输。

在后面的发明详述中, 本发明人从 ACH320.2A.2.1 株的序列出发 (NCBI accession no. U34604), 细化了 Jeang, K.T 等人的出版物 (18) 中给出的有关结构域的观点。因此, 对于这一特定株系, 本发明中的结构域 1 对应于氨基酸 1-21 (作用未阐明), 结构域 2 对应于氨基酸 22-37 (涉及反式激活), 结构域 3 对应于氨基酸 38-48 (作用未知) 以及结构域 5 对应于氨基酸 73-101 (跨细胞运输)。在对应于氨基酸

49-72 的结构域 4 中，对结合 TAR RNA、核定位以及 Tat 跨细胞运输来说重要的是肽 49-57 (18)。

全世界都在等待 HIV-1 疫苗的开发。在被 HIV-1 感染的病人中，只在未发展成 AIDS 的个体中检测到对 Tat 和 Rev 的免疫反应 (26)。几项用 Tat 和/或 Rev 对 SIV 动物模型进行的接种研究显示出部分或完全预防感染保护 (4-6, 21)。然而，将这些方案直接应用于人类是不可能的。尤其已有显示，Tat 在体外具有毒性效应 (19、22)。这些毒性效应包括 (i) 对涉及凋亡的细胞信号失调 (28、30)，(ii) 免疫系统中部分基因表达的失调，例如编码白细胞介素-2 的基因 (29)，或编码 I 型主要组织相容性复合物 (MHC) 的基因 (16)，和/或 (iii) 诱导血管形成 (1、2、20)。因此 Tat 蛋白在用作疫苗抗原之前必须先解毒。一个小组选择通过化学灭活使 Tat 蛋白解毒 (10)。然而，这样的灭活只能在以重组蛋白为抗原时实施。为了能够利用活或非活重组载体中核酸形式的 Tat 蛋白，只能设想采用遗传解毒作用。因此本发明人选择开发经定向诱变这一 Tat 蛋白解毒途径以使其用作疫苗蛋白亚单位和/或接种载体的一部分。

本发明涉及制备解毒免疫原性野生型 Tat-蛋白突变体的蛋白质突变方法的用途。

野生型 Tat 蛋白“突变体”意指通过一个或多个氨基酸的取代或置换获得的突变体。

“解毒野生型 Tat-蛋白突变体”意指不再具有以下毒性效应的 Tat 蛋白：

- 当它由被感染细胞分泌时，由于具有通过与表面受体结合而诱导细胞信号传递、以及被未感染细胞内化并运输至靶细胞核的能力，因而对于未被 HIV-1 感染的细胞来说其具有外源形式的毒性；

- Tat 蛋白以外源和内源形式定位于靶细胞核中并诱导对能够参与 Tat 蛋白反式激活特性或结构域 5 的细胞基因的表达调控。

“免疫原性野生型 Tat-蛋白突变体”意指注射入模型动物后能够诱导抗体产生的突变体，这些抗体既能与 Tat-蛋白突变体也能与野生型 Tat 蛋白反应。

本发明还涉及制备解毒免疫原性野生型 Tat-蛋白突变体的方法，其特征在于它包括：

- 制备野生型 Tat-蛋白突变体的阶段，特别是通过使编码野生型 Tat 蛋白的核酸产生突变，
  - 筛选解毒突变体的阶段，该解毒突变体的特征在于无跨细胞活性且核定位发生改变、以及可选地无反式激活活性，和
  - 筛选免疫原性突变体的阶段，该免疫原性突变体的特征在于它们能诱导产生同时针对所述突变体和野生型 Tat 蛋白的抗体，
- 最后两个阶段的顺序可以调换。

无跨细胞活性也意味着无跨细胞运输，在已建立的细胞系中可通过 LTR-报告基因结构中病毒启动子的未被激活进行检测，例如氯霉素乙酰基转移酶（CAT）的病毒启动子，氯霉素乙酰基转移酶的表达依赖于已建立的细胞系中的病毒启动子（LTR）（31），并且在这之前将细胞与以外源方式产生的 Tat-蛋白突变体接触，例如由不同于包含病毒 LTR 依赖性报告基因的细胞系的细胞系（32）产生的 Tat-蛋白突变体。

核定位的改变可以定义为用编码野生型 Tat-蛋白突变体的核酸转染的细胞其细胞质区室中 Tat 蛋白的存在，例如在转染后 72 小时内，可以在用编码 Tat-蛋白突变体的核酸转染细胞系后通过这些基因产物的免疫标记技术用光学显微镜进行检测，也可以在转染后通过检测包含与自发荧光蛋白例如 EGFP 蛋白的编码基因融合的 Tat 突变体编码基因的核酸的翻译产物而进行检测（33，34）。

无反式激活活性对应于病毒启动子的未被激活，且用编码野生型 Tat-蛋白突变体的核酸转染已建立的细胞系后可以通过报告基因的未表达来进行检测，报告基因例如其在该细胞系中的表达依赖于病毒启动子（LTR）的氯霉素乙酰基转移酶（CAT）（31）。

本发明还涉及 HIV-1 病毒的解毒免疫原性 Tat 蛋白突变体，其特征在于它在野生型 Tat 蛋白的区域 4 和/或 5 中至少含有两个突变，且其中，当突变处于结构域 4 区域时它位于从氨基酸位置 49 至氨基酸位置 57 这部分中，且其中，当突变处于结构域 5 中时它或者位于 RGD 基元中或者在 88-92 区中，优选在位置 89 和/或 92，突变是由一个氨基酸被另一氨基酸置换形成的突变。

一种根据本发明的有利突变体是如上述所定义的突变体，其特征在于它在区域 4 中至少含有一个突变。

本发明还涉及如上述所定义的突变体，其特征在于结构域 4 和/或 5 中的突变能带来以下特征中的至少一种：

- 废除野生型 Tat 蛋白的跨细胞效应，
- 改变野生型 Tat 蛋白的核定位。

本发明涉及如上述所定义的突变体，其特征在于它含有能够使野生型 Tat 蛋白反式激活活性丧失的附加突变。

因此可用作免疫接种抗原的 Tat 蛋白将满足下列大部分标准：

- 废除 Tat 的跨细胞效应（结构域 4 和/或 5）
- 改变 Tat 的核定位（结构域 4）
- 丧失反式激活活性（结构域 2）
- 保持蛋白质的抗原性（至多 4 或 5 个突变，尽可能少的改变 CTL 表位）

根据一种有利实施方式，本发明涉及如上述所定义的突变体，其特征在于它在野生型 Tat 蛋白结构域 4 的 N-末端区域中，特别是在从氨基酸位置 49 至氨基酸位置 57 这部分中，含有突变。

一种根据本发明的有利突变体是如上述所定义的突变体，其特征在于它在野生型 Tat 蛋白结构域 4 的 N-末端区域从氨基酸位置 49 至氨基酸位置 55 这部分中含有突变。

一种根据本发明的有利突变体是如上述所定义的突变体，其特征在于它在野生型 Tat 蛋白结构域 5 中的下列至少一个区域内含有突变：

- RGD 基元，

- 区域 88-92, 优选在位置 89 和/或 92。

一种根据本发明的有利突变体是如上述所定义的突变体, 其特征在于它在野生型 Tat 蛋白结构域 2 中包含突变, 特别是对任一半胱氨酸的置换, 有利地是被丝氨酸置换。

本发明还涉及如上述所定义的突变体, 其特征在于它含有以下至少一种突变:

- 第 27 位的半胱氨酸被丝氨酸取代,
- 第 51 位的赖氨酸被苏氨酸取代,
- 第 52 位的精氨酸被亮氨酸取代,
- 第 55 位的精氨酸被亮氨酸取代,
- 第 57 位的精氨酸被亮氨酸取代,
- 第 79 位的甘氨酸被丙氨酸取代,
- 第 89 位的赖氨酸被亮氨酸取代,
- 第 92 位的谷氨酸被谷氨酰胺取代。

本发明还涉及如上述所定义的突变体, 其特征在于它选自具有下述两种突变的突变体, 各突变用三联体表示: 字母-数字-字母, 其中的数字表示突变氨基酸的位置, 数字前的字母对应突变所涉及的氨基酸, 数字后的字母表示用于置换数字前氨基酸的氨基酸:

K51T-R52L	(SEQ ID NO : 2)
K51T-R55L	(SEQ ID NO : 3)
K51T-R57L	(SEQ ID NO : 4)
K51T-G79A	(SEQ ID NO : 5)
K51T-K89L	(SEQ ID NO : 6)
K51T-E92Q	(SEQ ID NO : 7)
R52L-R55L	(SEQ ID NO : 8)
R52L-R57L	(SEQ ID NO : 9)
R52L-G79A	(SEQ ID NO : 10)
R52L-K89L	(SEQ ID NO : 11)
R52L-E92Q	(SEQ ID NO : 12)

R55L-R57L	( SEQ ID NO : 13 )
R55L-G79A	( SEQ ID NO : 14 )
R55L-K89L	( SEQ ID NO : 15 )
R55L-E92Q	( SEQ ID NO : 16 )
R57L-G79A	( SEQ ID NO : 17 )
R57L-K89L	( SEQ ID NO : 18 )
R57L-E92Q	( SEQ ID NO : 19 )
G79A-K89L	( SEQ ID NO : 20 )
G79A-E92Q	( SEQ ID NO : 21 )
K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 22 )

一种根据本发明的有利突变体是如上述所定义的突变体，其特征在于它选自下列突变体：

K51T-R55L	( SEQ ID NO : 3 )
R52L-R55L	( SEQ ID NO : 8 )
R52L-G79A	( SEQ ID NO : 10 )
R55L-R57L	( SEQ ID NO : 13 )
G79A-K89L	( SEQ ID NO : 20 )

本发明还涉及如上述所定义的突变体，其特征在于它选自具有下述三种突变的突变体，各突变用三联体表示：字母-数字-字母，其中的数字表示突变氨基酸的位置，数字前的字母对应突变所涉及的氨基酸，数字后的字母表示用于置换数字前氨基酸的氨基酸：

C27S-K51T-R52L	( SEQ ID NO : 23 )
C27S-K51T-R55L	( SEQ ID NO : 24 )
C27S-K51T-R57L	( SEQ ID NO : 25 )
C27S-K51T-G79A	( SEQ ID NO : 26 )
C27S-K51T-K89L	( SEQ ID NO : 27 )
C27S-K51T-E92Q	( SEQ ID NO : 28 )
C27S-R52L-R55L	( SEQ ID NO : 29 )
C27S-R52L-R57L	( SEQ ID NO : 30 )

<b>C27S-R52L-G79A</b>	<b>( SEQ ID NO : 31 )</b>
<b>C27S-R52L-K89L</b>	<b>( SEQ ID NO : 32 )</b>
<b>C27S-R52L-E92Q</b>	<b>( SEQ ID NO : 33 )</b>
<b>C27S-R55L-R57L</b>	<b>( SEQ ID NO : 34 )</b>
<b>C27S-R55L-G79A</b>	<b>( SEQ ID NO : 35 )</b>
<b>C27S-R55L-K89L</b>	<b>( SEQ ID NO : 36 )</b>
<b>C27S-R55L-E92Q</b>	<b>( SEQ ID NO : 37 )</b>
<b>C27S-R57L-G79A</b>	<b>( SEQ ID NO : 38 )</b>
<b>C27S-R57L-K89L</b>	<b>( SEQ ID NO : 39 )</b>
<b>C27S-R57L-E92Q</b>	<b>( SEQ ID NO : 40 )</b>
<b>C27S-G79A-K89L</b>	<b>( SEQ ID NO : 41 )</b>
<b>C27S-G79A-E92Q</b>	<b>( SEQ ID NO : 42 )</b>
<b>C27S-K89L-E92Q</b>	<b>( SEQ ID NO : 43 )</b>

本发明还涉及如上述所定义的突变体，其特征在于它选自下列突变体：

<b>C27S-K51T-R55L</b>	<b>( SEQ ID NO : 24 )</b>
<b>C27S-R52L-R55L</b>	<b>( SEQ ID NO : 29 )</b>
<b>C27S-R52L-G79A</b>	<b>( SEQ ID NO : 31 )</b>

本发明还涉及如上述所定义的突变体，其特征在于它选自具有下述四种突变的突变体，各突变用三联体表示：字母-数字-字母，其中的数字表示突变氨基酸的位置，数字前的字母对应突变所涉及的氨基酸，数字后的字母表示用于置换数字前氨基酸的氨基酸：

<b>C27S-K51T-R52L-G79A</b>	<b>( SEQ ID NO : 44 )</b>
<b>C27S-K51T-R52L-K89L</b>	<b>( SEQ ID NO : 45 )</b>
<b>C27S-K51T-R52L-E92Q</b>	<b>( SEQ ID NO : 46 )</b>
<b>C27S-K51T-R55L-G79A</b>	<b>( SEQ ID NO : 47 )</b>
<b>C27S-K51T-R55L-K89L</b>	<b>( SEQ ID NO : 48 )</b>
<b>C27S-K51T-R55L-E92Q</b>	<b>( SEQ ID NO : 49 )</b>
<b>C27S-K51T-R57L-G79A</b>	<b>( SEQ ID NO : 50 )</b>

C27S-K51T-R57L-K89L	( SEQ ID NO : 51 )
C27S-K51T-R57L-E92Q	( SEQ ID NO : 52 )
C27S-K51T-G79A-K89L	( SEQ ID NO : 53 )
C27S-K51T-G79A-E92Q	( SEQ ID NO : 54 )
C27S-K51T-K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 55 )
C27S-R52L-G79A-K89L	( SEQ ID NO : 56 )
C27S-R52L-G79A-E92Q	( SEQ ID NO : 57 )
C27S-R52L-K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 58 )
C27S-R52L-R55L-G79A	( SEQ ID NO : 59 )
C27S-R52L-R55L-K89L	( SEQ ID NO : 60 )
C27S-R52L-R55L-E92Q	( SEQ ID NO : 61 )
C27S-R52L-R57L-G79A	( SEQ ID NO : 62 )
C27S-R52L-R57L-K89L	( SEQ ID NO : 63 )
C27S-R52L-R57L-E92Q	( SEQ ID NO : 64 )
C27S-R55L-G79A-K89L	( SEQ ID NO : 65 )
C27S-R55L-G79A-E92Q	( SEQ ID NO : 66 )
C27S-R55L-K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 67 )
C27S-R55L-R57L-G79A	( SEQ ID NO : 68 )
C27S-R55L-R57L-K89L	( SEQ ID NO : 69 )
C27S-R55L-R57L-E92Q	( SEQ ID NO : 70 )
C27S-R57L-G79A-K89L	( SEQ ID NO : 71 )
C27S-R57L-G79A-E92Q	( SEQ ID NO : 72 )
C27S-R57L-K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 73 )
C27S-G79A-K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 74 )

一种根据本发明的有利突变体是如上述所定义的突变体，其特征在于它选自下列突变体：

C27S-K51T-R55L-G79A	( SEQ ID NO : 47 )
C27S-K51T-R55L-K89L	( SEQ ID NO : 48 )
C27S-K51T-R55L-E92Q	( SEQ ID NO : 49 )

**C27S-R52L-R55L-G79A (SEQ ID NO : 59)**

本发明还涉及如上述所定义的突变体，其特征在于它选自具有下述五种突变的突变体，各突变用三联体表示：字母-数字-字母，其中的数字表示突变氨基酸的位置，数字前的字母对应突变所涉及的氨基酸，数字后的字母表示用于置换数字前氨基酸的氨基酸：

- C27S-K51T-G79A-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 75)**
- C27S-K51T-R52L-R55L-G79A (SEQ ID NO : 76)**
- C27S-K51T-R52L-R55L-K89L (SEQ ID NO : 77)**
- C27S-K51T-R52L-R55L-E92Q (SEQ ID NO : 78)**
- C27S-K51T-R52L-R57L-G79A (SEQ ID NO : 79)**
- C27S-K51T-R52L-R57L-K89L (SEQ ID NO : 80)**
- C27S-K51T-R52L-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 81)**
- C27S-K51T-R52L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 82)**
- C27S-K51T-R52L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 83)**
- C27S-K51T-R52L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 84)**
- C27S-K51T-R55L-R57L-G79A (SEQ ID NO : 85)**
- C27S-K51T-R55L-R57L-K89L (SEQ ID NO : 86)**
- C27S-K51T-R55L-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 87)**
- C27S-K51T-R55L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 88)**
- C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 89)**
- C27S-K51T-R55L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 90)**
- C27S-K51T-R57L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 91)**
- C27S-K51T-R57L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 92)**
- C27S-K51T-R57L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 93)**
- C27S-R52L-R55L-R57L-G79A (SEQ ID NO : 94)**
- C27S-R52L-R55L-R57L-K89L (SEQ ID NO : 95)**
- C27S-R52L-R55L-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 96)**
- C27S-R52L-R55L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 97)**
- C27S-R52L-R55L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 98)**

C27S-R52L-R55L-K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 99 )
C27S-R52L-R57L-G79A-K89L	( SEQ ID NO : 100 )
C27S-R52L-R57L-G79A-E92Q	( SEQ ID NO : 101 )
C27S-R52L-R57L-K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 102 )
C27S-R52L-G79A-K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 103 )
C27S-R55L-R57L-G79A-K89L	( SEQ ID NO : 104 )
C27S-R55L-R57L-G79A-E92Q	( SEQ ID NO : 105 )
C27S-R55L-R57L-K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 106 )
C27S-R55L-G79A-K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 107 )
C27S-R57L-G79A-K89L-E92Q	( SEQ ID NO : 108 )

一种根据本发明的有利突变体是如上述所定义的突变体，其特征在于它选自下列突变体：

C27S-K51T-R55L-G79A-K89L	( SEQ ID NO : 88 )
C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q	( SEQ ID NO : 89 )

本发明还涉及编码如上述所定义突变体之一的核苷酸序列。

本发明还涉及用本发明的核苷酸序列转染的细胞系。

本发明还涉及针对如上述所定义突变体的抗体，其不识别野生型蛋白质结构域 D1。

这样的抗体通过，例如在 Elisa 检测中检测并除去与对应于 Tat 结构域 D1 的肽有亲和力的抗体而进行选择，其中该肽至少包含序列 EPVDPKLEPWKHPGS（残基 2-16）。

根据本发明的抗体识别或不识别野生型蛋白质。

一种根据本发明的有利抗体类别包括识别野生型蛋白质的如上述所定义的抗体。

根据本发明的抗体是多克隆或单克隆抗体。

上述多克隆抗体通过用至少一种根据本发明的突变体免疫动物获得，之后通过取所述动物的血清样品、从血清中的其它成分中分离出所述抗体，特别是通过过柱亲和层析，回收纯化形式的抗体，其中柱中固定有被抗体特异识别的抗原，特别是根据本发明的突变体。

根据本发明的单克隆抗体可以通过杂交瘤技术获得，下文重述了其原理。

第一阶段中，用根据本发明的突变体免疫接种动物，通常为小鼠（或在免疫接种框架中体外培养的细胞），之后其 B 淋巴细胞就能够产生针对所述突变体的抗体。之后将这些产抗体淋巴细胞与“永生”骨髓瘤细胞（实施例 1 中为鼠科）融合以产生杂交瘤。之后从如此获得的异源细胞混合物中选择能够产生特定抗体并无限增殖的细胞。各杂交瘤以克隆形式增殖，各自导致单克隆抗体的产生，这些单克隆抗体对本发明突变体的识别特性可以用例如 ELISA、一或二维的免疫转移、免疫荧光、或用 biocaptor 进行检测。随后纯化如此选择的单克隆抗体，特别是根据上述亲和层析技术。

本发明还涉及药物组合物，特别是疫苗，它包含作为活性成分的至少一种如上述所定义的突变体或至少一种如上述所定义的核苷酸序列或至少一种如上述所定义抗体以及药学适宜载体，其中核酸位于如上述所定义突变体之一的组成型表达所必需的元件控制之下。

当然，本领域技术人员易于决定用作药物组合物功能组分的突变体的量。

本发明还涉及含有至少一种如上述所定义突变体、或至少一种如上述所定义抗体的检测和/或定量 HIV-1 病毒的诊断组合物。

当然，本领域技术人员易于决定用作诊断技术所用功能的突变体的量。

本发明还涉及检测和定量取自能被 HIV-1 感染的个体的生物样品中 HIV-1 病毒的方法，例如血浆、血清或组织，其特征在于它包括下列阶段：

— 在预定条件下将所述生物样品与含有如上述所定义突变体或如上述所定义抗体的诊断组合物接触，如果需要的话该预定条件允许上述定义的突变体与针对野生型 Tat 蛋白的抗体之间、或上述定义的抗体与野生型 Tat 蛋白之间形成抗体/抗原复合物，和

— 用任何适当的方法检测和/或定量所述复合物的形成。

检测和/或定量病毒的方法用本领域技术人员熟知的标准技术完成，例如印迹法，所谓的三明治技术和竞争技术。

本发明还涉及至少一种如上述所定义的突变体或至少一种如上述所定义的抗体的用途，用于体外诊断生物样本或样品中 HIV-1 病毒。

本发明还涉及至少一种如上述所定义的突变体或至少一种如上述所定义的抗体的用途，用于制备疫苗组合物。

发明人因此指出，为上述用途必须在 Tat 蛋白结构域 4 产生至少一个突变和/或在 Tat 蛋白结构域 5 产生至少一个突变。他们通过定向诱变得到了 Tat-蛋白突变体，之后根据这些突变体的特性进行选择。保留的突变体选自具有以下至少一个突变的突变体：K51T（结构域 4 中第 51 位的赖氨酸被苏氨酸取代），R52L（结构域 4 中第 52 位的精氨酸被亮氨酸取代），R55L（结构域 4 中第 55 位的精氨酸被亮氨酸取代），R57L（结构域 4 中第 57 位的精氨酸被亮氨酸取代），G79A（结构域 5 中第 79 位的甘氨酸被丙氨酸取代），K89L（结构域 5 中第 89 位的赖氨酸被亮氨酸取代）和 E92Q（结构域 5 中第 92 位的谷氨酸被谷氨酰胺取代）。上述及后述所有氨基酸位置根据 ACH320.2A.2.1 株的 101 个氨基酸完整序列给出。本发明的一个主题是上述突变体。但是本发明还涉及在 Tat 蛋白结构域 4 中具有两个突变的突变体。这些“双重”突变体选自突变体 K51T-R55L、R52L-R55L、R52L-G79A、R55L-R57L 和 G79A-K89L。发明人之后显示，通过将结构域 4 中的这些双重突变与结构域 2 中的附加突变 C27S（用丝氨酸取代半胱氨酸）组合，他们获得了令人非常满意的结果。因此，本发明还包括选自“三重”突变体 C27S-K51T-R55L、C27S-R52L-R55L 和 C27S-R52L-G79A 的突变体。优选所选突变体为突变体 C27S-K51T-R55L。最后，他们证实组合有结构域 2 中至少一个突变、结构域 4 中至少两个突变以及结构域 5 中至少一个突变的“四重”突变体对获得非毒性 Tat 蛋白具有极端良好的表现。该“四重”突变体选自突变体 C27S-K51T-R55L-G79A，C27S-K51T-R55L-K89L，C27S-K51T-R55L-E92Q 和 C27S-R52L-R55L-G79A。优选所选突变体

为突变体 C27S-K51T-R55L-G79A。

### 附图说明

图 1 是 PCR 定点诱变技术的图形表示。

图 2 示出毒株 ACH320.2A.2.1 Tat 蛋白的蛋白质序列 (SEQ ID NO: 1) 与本发明突变 Tat 蛋白的蛋白质序列的比较。

图 3a 和 3b 是表示 ACH320.2A.2.1 或其突变体反式激活能力的图表。各构建体的结果是两个独立试验的平均值。图 3a 中, NT (未转染) 柱表示 LTR-CAT 构建体的基线活性。

y-轴表示反式激活的倍增因子。

图 4a 和 4b 表示 ACH320.2A.2.1 构建体或其突变体的细胞内定位。

图 5 表示 ACH320.2A.2.1 构建体或其突变体的转导能力。所示数值为两个独立试验的平均值。测定 pEGFP 的反式激活百分数, 通过计算该百分数的平均值+3SD (标准差) 来确定分隔线。

白柱对应 293T/HL3T1 共培养, 黑柱对应 HL3T1 细胞转染。

y-轴对应相对于野生型 ACH320.2A.2.1 的反式激活百分数。

图 6 表示另一种筛选表达本发明突变体的细胞系的方法 (描述于实施例 5)。

表 1 代表用于 Tat PCR 定向诱变的寡核苷酸。

实施例 1: 构建编码突变 Tat 蛋白的突变 DNA。

用商业试剂盒 (Clontech) 和表 1 中所述的核苷酸引物使一段含有 306 个碱基对的 cDNA 片段产生突变, 该 cDNA 片段对应于分离的 HIV-1 ACH320.2A.2.1 野生型 Tat 基因的两个外显子。PCR 定点诱变的原理描述于图 1。

如图 1 所示, 从野生型 Tat 基因的 cDNA 出发, 用一个位于末端 (E5' 或 E3') 的末端引物和一个位于基因内部且带有所需突变的引物 (分别为 M3' 和 M5') 进行两次独立的 PCR (第一个 PCR 循环)。然后以等摩尔混合两个 PCR 产物, 并用 5' 端包含 EcoRI 限制位点和 3'

端包含 SaII 限制位点的末端引物进行第二个 PCR 循环。由此获得了在所需位点产生突变的 cDNA。

该操作原理用于所有突变体，除了 K89L 和 E92Q。对于后者，所要突变的核苷酸几乎位于 cDNA 的一个末端，这样可以直接进行半巢式 PCR 定向诱变，在第一个 PCR 循环中分别用以下引物对：E5'/K89L (M3') 和 E5'/E92Q (M5')。

用下列引物进行包含两个突变的单次诱变以产生双重突变体 R52L-R55L：

R52L-R55L (M5')

5'-GGCAGGAAGCTTAGACAGCTGCGAAGATC-3'

R52L-R55L (M3')

5'-GATCTTCGCAGCTGTCTAAGCTTCTTCCTGCC-3'

以突变体 G79A 的 cDNA 为模板(matrix)、R52L (M5')/R52L (M3') 为引物对进行 PCR 定向诱变得到双重突变体 R52L-G79A。

以突变体 G79A 的 cDNA 为模板、E5'/K89L (M3') 为第一个 PCR 循环的引物对进行半巢式 PCR 产生双重突变体 G79A-K89L。

以双重突变体 K51T-R55L 的 cDNA 为模板、C27S (M5') /C27S (M3') 为引物对进行 PCR 定向诱变得到三重突变体 C27S-K51T-R55L (STL)。

以突变体 R52L-G79A 的 cDNA 为模板、C27S (M5') / C27S (M3') 为引物对进行 PCR 定向诱变得到三重突变体 C27S-R52L-G79A。

用 STL 的 cDNA 作为模板以及引物 G79A (M5') / G79A (M3') 进行诱变产生四重突变体 C27S-K51T-R55L-G79A (STLA)。

所有的第一个 PCR 循环都用 0.5 μg 质粒和 0.29 ng/ml 各自引物在下列条件下进行：1×94°C 5' 1×[94°C 2' 50°C 2' 72°C 4'] 25×[94°C 1' 50°C 1' 72°C 4'] 1×72°C 5'。

引物对 EcoRI/SaII 用于所有 PCR 定向诱变的第二个循环，除了突变体 R52L、R55L 和双突变体 R52L-R55L，对它们用引物 E6854 替换引物 SaII 3'。在所有例子中第二个循环都用与第一个循环相同的

条件进行, 其中使用 0.5  $\mu$ l 第一个循环的 5'和 3' PCR 产物 (图 1)。形成一个 323 碱基对的条带, 之后根据生产者的说明将其结合于 pCR2, 1-Topo (Invitrogen, K4500-40) 质粒以产生 pCR-TEX 构建体。

用 DyeTerminator (商标) 测序混合物在 377X 自动测序仪 (Applied Biosystems) 上自动测序后选择阳性克隆。用 MacVector 7.0 软件 (Oxford Molecular) 分析序列。在所有测序的构建体中, 全都仅含所需突变, 除了一个衍生自 PCR-R55L 产物的克隆, 其在位置 51 表现出一个附加突变 K $\rightarrow$ T。因此保存该双重突变体 K51T-R55L 作另外的分析, 并用引物 K51T(M5') 和 K51T(M3') 产生单突变体 K51T。

将 pCR-TEX 构建体的 EcoRI-SalI 或 EcoRI-EcoRI 片段亚克隆进真核载体 pEGFP-C2 (Clontech), 其中 Tat 突变体在 C 末端与 EGFP (增强的绿色荧光蛋白) 融合。以前显示, EGFP 与 Tat 融合既不改变 Tat 的反式激活能力, 也不改变其细胞定位 (25)。根据标准的分子生物学技术 (23) 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. Coli*) DH5 $\alpha$  中完成克隆。通过对阳性克隆自动测序筛选并获得 pEGFP-TEX 构建体, 其中融合蛋白的表达受巨细胞病毒 (CMV) 启动子的控制。所选择的阳性克隆的氨基酸序列示于图 2。扩增这些克隆的 DNA, 并按照生产者的说明用 Nucléobond AX 试剂盒 (商标) (Macherey-Nagel) 纯化。

#### 实施例 2: Tat 突变体的反式激活能力。

为了研究 EGFP-Tat 融合蛋白的反式激活能力, 使用了细胞系 HL3T1。该细胞系是 HeLa 细胞的一个用氯霉素乙酰基转移酶 (CAT) 基因稳定转染的衍生物, 该氯霉素乙酰基转移酶依赖于病毒 HIV-1 启动子 (LTR) (8)。在 6 孔板中接种  $2.5 \times 10^5$  HL3T1 细胞一天后, 用 2  $\mu$ g pEGFP-TEX 构建体按照生产者推荐的程序用 Exgen 500 试剂盒 (由 Euromedex 销售) 转染细胞。培养 48 至 72 小时后, 用胰蛋白酶消化细胞并借助荧光显微镜估测被转染细胞的量。在 100  $\mu$ l Tris 0.01M-EDTA 1nM-NaCl 150mM (TEN) 中酶解  $1.5 \times 10^3$  的荧光细胞,

并将其经过一个冻/融阶段后于 65°C 下处理 20 分钟。之后根据前人的描述 (24) 在相提取测试中测定 CAT 活性。简言之, 37°C 下将 70  $\mu$ l 裂解物与 130  $\mu$ l CAT 反应混合物 (Tris-HCl pH=7.5 150mM, EDTA 0.2nM, NaCl 30mM, 丁酰辅酶 A 0.3 mg/ml, 丙三醇 3%, D-苏-[二氯乙酰- $^{14}$ C]氯霉素 0.08  $\mu$ Ci) 孵育 2 小时。之后用 400  $\mu$ l 体积/体积比为 2:1 的朴日斯烷 (2, 6, 10, 14-四甲基十五烷) 与二甲苯的混合物抽提反应混合物。用闪烁计数器测定 300  $\mu$ l 所得有机相的放射活性。

图 3a 和 3b 显示, 没有一个单突变能够单独完全破坏 ACH320.2A.2.1 Tat 蛋白的反式激活活性, 除了突变体 C27S。突变体 R55L 并不非常显著地改变 ACH320.2A.2.1 Tat 的反式激活活性。但是该突变与突变 K51T 或 R52L 之一组合则显示出对 Tat 反式激活活性非常显著的抑制。该抑制是三重和四重突变体 STL 和 STLA 的总和。

### 实施例 3: Tat-EGFP 融合蛋白的细胞内定位。

碱性 Tat 结构域负责 Tat 的核定位。确信所构建的某些突变影响该碱性结构域。同样, 发明人想要鉴定影响 Tat 细胞内定位的突变。在显微镜玻片上接种  $2.5 \times 10^5$  HL3T1 细胞后, 用 2  $\mu$ g 各 pEGFP-TEX 构建体按照生产者推荐的程序用 Exgen 500 试剂盒 (由 Euromedex 销售) 转染细胞。1、2 或 3 天后回收玻片, 并在用 Axioplan 2 (商标) 荧光显微镜 (Zeiss) 观察前用 4% 多聚甲醛将其固定。如图 4a 或 b (A 和 B) 中所述以及已有的描述 (25), 野生型 Tat-EGFP 融合蛋白在培养 3 天后显示核定位。单一 Tat 突变不影响该定位 (图 4a, C 至 H), 双重突变 R52L-R55L (图 4a, I)、R52L-G79A (图 4b, C)、G79A-K89L (图 4b, D)、和三重突变体 C27S-R52L-G79A (图 4b, E) 也不影响。然而, K51T-R55L 组合或包含它的多重突变体 (STL, STLA) 在第三天显示 Tat 蛋白-EGFP 的核定位和细胞质定位 (图 4a, J to L), 而在转染后第一和第二天信号严格限制于核。因此, 看来 Tat 的核定位信号似乎是不连续的且至少包含残基 K51 和 R55, 但是不含

## R52.

### 实施例 4: Tat 突变体的跨细胞活性。

不同的研究显示,碱性 Tat 结构域中的碱性残基总数对由被感染细胞分泌而存在于胞外介质中的 Tat 被未感染细胞内化的能力(这一现象也称作转导)起作用。发明人评估了在碱性结构域中含有突变的构建体的转导能力。用生产细胞和效应细胞进行了共培养试验。采用磷酸钙技术(23)以 3  $\mu\text{g}$  pEGFP-TEX 构建体转染 293T 细胞。转染后 24 小时,将转染的 293T 细胞用胰蛋白酶消化,并在 100  $\mu\text{M}$  氯喹存在下与  $2.5 \times 10^5$  HL3T1 细胞再共培养 48 小时。之后根据前人所述,收集细胞并在评估 CAT 活性前于 TEN 中裂解。由于该系统同时依赖于转导效果和反式激活活性,因此发明人着手于这样一个前提,也就是,与标准化阳性对照相比,直接转染后测定的活性与共培养后测定的活性之间的显著差异反映了转导能力的急剧变化。这就是为什么所有数据都以分离的 ACH320.2A.2.1 的野生型蛋白的反式激活活性百分数表示的原因,以及为什么比较各构建体获自 HL3T1 细胞转染和 293T/HL3T1 细胞共培养的数据的原因。如图 5 所示,R55L 突变并不显著改变蛋白质的转导能力。突变 R52L 显著降低蛋白质的转导能力(用该构建体转染的 HL3T1 细胞和与表达 pEGFP-TEX-R52L 的 293T 细胞共培养的 HL3T1 细胞间的 CAT 活性降低 5 倍)。正如共培养后测定的 CAT 活性背景噪音所示,双重突变体 R52L-R55L 显示转导能力的完全丢失。用 R52L 和 R52L-R55L 突变体获得的结果都暗示,Tat 的转导能力与碱性结构域中精氨酸残基的数量有关(27)。看来对于 Tat 的转导能力残基 R55 似乎不及残基 R52 重要。因此,精氨酸残基的定位可能也在整个转导机制中起作用。

### 实施例 5: 克隆用本发明核苷酸序列转染的细胞系。

许多有关 HIV-1 Tat 蛋白对细胞基因调控的功能试验涉及使用组成型表达该蛋白质的细胞系。因此发明人建立了表达不同 Tat-蛋白突

变体的细胞系。为此,将 HeLa 细胞以  $2.5 \times 10^5$  细胞每孔接种于 6 孔板,之后于第二天以 2  $\mu\text{g}$  编码各种 Tat 突变体的 DNA 用试剂 Exgen 500 (由 Euromedex 销售) 转染。为对这些转染细胞进行生物克隆,细胞转染 3 天后用胰蛋白酶消化并计数,之后以 3 至 30 个细胞每孔的浓度、每次转染 3 至 5 个 96 孔板的比率(每次转染的总数为 288 至 480 孔)接种于平底 96 孔板。之后在 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  geneticin (Geneticin 硫酸盐, Gibco-BRL) 存在下于 96-孔板中培养 15 天。15 天后,将细胞仍然存活并显著增殖的孔视为阳性。在标准方法中,当来自相同转染的各 96 孔板中含有少于 10 个阳性孔每板,则认为该生物克隆是成功的。之后在 geneticin 存在下将每次转染的 3 至 15 个阳性孔增殖六代以获得充足的用于冷冻的细胞量。第六代时,用免疫转移(蛋白质印迹)验证各克隆的 Tat 的表达。

用免疫转移证实了如此产生的细胞系中的 Tat 表达之后,发明人使用了含有依赖于病毒 HIV 启动子(LTR-CAT 构建体)的 CAT 基因的质粒构建体,以转染由此获得的不同的细胞系克隆。从而有可能显示,该细胞系中 Tat 突变体的稳定表达不改变它们的反式激活活性(图 6)。

#### 实施例 6: 位置 58 的突变体

以 ACH.320.2A.2.1 株野生型 Tat 基因的 cDNA 为模板、S58A (M5') / S58A (M3') 为引物对获得单突变体 S58A。然而,存在其它的在位置 58 天然带有丙氨酸且具有功能性(核定位、反式激活等) Tat 所有特性的其它 HIV-1 株,例如 HXB2 株。ACH320.2A.2.1 株上这样的突变 S58A 不改变蛋白质的行为且不可能实现 Tat 解毒。

末端引物, 第一个循环	序列
E5'	5'- GAA TTC ATG GAG CCA GTA GAT C- 3'
E3'	5'- AGA TCT CTA ATC GAC CGG ATC- 3'
末端引物, 第二个循环	
EcoR I	5'- AAA GAA TTC ATG GAG CCA GTA GAT CC- 3'
E6854	5'- AAA GAT CTC TAA TCG ACC GGA TCT GTC TCT GTC TC- 3'
Sal I	5'- AAG TCG ACC TAA TCG ACC GGA TCT GTC TCT GTC TC- 3'
中间引物	
W11F (M5')	5'- CCA GTA GAT CCT AAA CTA GAG CCC TTC AAG CAT CCA G-3'
C27S (M5')	5'- ACA ATT GCT ATT CGA AAA AGT G- 3'
C27S (M3')	5'- CAC TTT TTC GAA TAG CAA TTG T- 3'
K50R (M5')	5'- ATC TCA TAT GGC AGG CGG AAG -3'
K50R (M3')	5'- CTT CCG CCT GCC ATA TGA GAT -3'
K51T (M5')	5'- GGC AGG AAG ACC CGG AGA CAG C- 3'
K51T (M3')	5'- GCT GTC TCC GGG TCT TCC TGC C- 3'
R52L (M5')	5'- GGC AGG AAG AAG CTT AGA CAG CGA CGA AGA TC -3'
R52L (M3')	5'- GAT CTT CGT CGC TGT CTA AGC TTC TTC CTG CC- 3'
R55L (M5')	5'- GGC AGG AAG AAG CGG AGA CAG CTG CGA AGA TC- 3'
R55L (M3')	5'- GAT CTT CGC AGC TGT CTC CGC TTC TTC CTG CC- 3'
R57L (M5')	5'- GAC AGC GAC GAC TAT CTC CTC AAG AC -3'

R57L (M3')	5'- GTC TTG AGG AGA TAG TCG TCG CTG TC- 3'
G79A (M5')	5'- CAG CCC CGA GCG GAT CCG ACA GG- 3'
G79A (M3')	5'- CCT GTC GGA TCC GCT CGG GGC TG- 3'
K89L (M3')	5'- CTG TCT CTG TCT CTC TCT CCA CCT TAA GCT TCG ATT CC- 3'
E92Q (M3')	5'- CTG TCT CTG TCT CTC TTT GCA CCT TCT TCT TCG AAT CC- 3'
R52L-R55L (M5')	5'- GGC AGG AAG AAG CTT AGA CAG CTG CGA AGA TC - 3'
R52L-R55L (M3')	5'- GAT CTT CGC AGC TGT CTA AGC TTC TTC CTG CC - 3'
R55L-R57L (M5')	5'- GAA GCG GAG ACA GCT GCG ACT ATC TCC TCA AGA C -3'
R55L-R57L (M3')	5'- GTC TTG AGG AGA TAG TCG CAG CTG TCT CCG CTT C -3'
S58A (M5')	5'- GAC AGC GAC GAA GAG CAC CTC AAG ACA GT -3'
S58A (M3')	5'- ACT GTC TTG AGG TGC TCT TCG TCG CTG TC -3'

表 1

## 参考文献

1. Albini, A., G. Barillari, R. Benelli, R. C. Gallo, and B. Ensoli. 1995. Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:4838-4842.
2. Albini, A., R. Soldi, D. Giunciuglio, E. Giraud, R. Benelli, L. Primo, D. Noonan, M. Salio, G. Camussi, W. Rockl, and F. Bussolino. 1996. The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk- 1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med*. 2:1371-5.
3. Bartz, S. R., and M. Emerman. 1999. Human Immunodeficiency Virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/Caspase-8. *J Virol*. 73:1956-1963.
4. Cafaro, A., A. Caputo, C. Fracasso, M. T. Maggiorella, D. Goletti, S. Baroncelli, M. Pace, L. Sernicola, M. L. Koanga-Mogtomo, M. Beti, A. Borsetti, R. Belli, L. Akerblom, F. Corrias, S. Butto, J. Heeney, P. Verani, F. Titti, and B. Ensoli. 1999. Control of SHIV-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine. *Nat Med*. 5:643-650.
5. Cafaro, A., A. Caputo, M. T. Maggiorella, S. Baroncelli, C. Fracasso, M. Pace, A. Borsetti, L. Sernicola, D. R. Negri, P. Ten Haaft, M. Betti, Z. Michelini, I. Macchia, E. Fanales-Belasio, R. Belli, F. Corrias, S. Butto, P. Verani, F. Titti, and B. Ensoli. 2000. SHIV89.6P pathogenicity in cynomolgus monkeys and control of viral replication

and disease onset by human immunodeficiency virus type 1 Tat vaccine. *J Med Primatol.* 29:193-208.

6. Cafaro, A., F. Titti, C. Fracasso, M. T. Maggiorella, S. Baroncelli, A. Caputo, D. Goletti, A. Borsetti, M. Pace, E. Fanales-Belasio, B. Ridolfi, D. R. Negri, L. Sernicola, R. Belli, F. Corrias, I. Macchia, P. Leone, Z. Michelini, P. ten Haft, S. Butto, P. Verani, and B. Ensoli. 2001. Vaccination with DNA containing tat coding sequences and unmethylated CpG motifs protects cynomolgus monkeys upon infection with simian/human immunodeficiency virus (SHIV89.6P). *Vaccine.* 19:2862-77.

7. Cullen, B. R. 1992. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol Rev.* 56:375-394.

8. Felber, B. K., and G. N. Pavlakis. 1988. A quantitative bioassay for HIV-1 based on transactivation. *Science.* 239:184-187.

9. Frankel, A. D., and C. O. Pabo. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* 55:1189-1193.

10. Gringeri, A., E. Santagostino, M. Muca-Perja, H. The Buanec, B. Bizzini, A. Lachgar, J. F. Zagury, J. Rappaport, A. Burny, R. C. Gallo, and D. Zagury. 1999. Tat toxoid as a component of a preventive vaccine in seronegative subjects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum Retrovirol.* 20:371-375.

11. Groenink, M., A. C. Andeweg, R. A. Fouchier, S. Broersen, R. C. van der Jagt, H. Schuitemaker, R. E. of Goede, M. L. Bosch, H. G.

Huisman, and M. Tersmette. 1992. Phenotype-associated env gene variation among eight related human immunodeficiency virus type 1 clones: evidence for in vivo recombination and determinants of cytotropism outside the V3 domain. *J Virol.* 66:6175-6180.

12. Guillon, C., F. Bedin, R. A. M. Fouchier, H. Schuitemaker, and R. A. Gruters. 1995. Completion of nucleotide sequences of non-syncytium-inducing and syncytium-inducing HIV type 1 variants isolated from the same patient. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 11:1537-1538.

13. Hauber, J., M. H. Malim, and B. R. Cullen. 1989. Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus Tat protein. *J Virol.* 63:1181-1187.

14. Helland, D. E., J. L. Welles, A. Caputo, and W. A. Haseltine. 1991. Transcellular transactivation by the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *J Virol.* 65:4547-4549.

15. Higuchi, R. 1990. Recombinant PCR, p. 177-183. *In* M. A. Innis, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications.* Academic Press, Inc., San Diego, CA.

16. Howcroft, T. K., K. Strebel, M. A. Martin, and D. S. Sinder. 1993. Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science.* 260:1320-1322.

17. Jeang, K.-T. 1996. HIV-1 Tat: structure and function, p. 3-18. *In* G. Myers and B. Foley and J. W. Mellors and B. Korber and K. T. Jeang and S. Wain-Hobson (ed.), *Human retroviruses and AIDS 1996: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos.
18. Jeang, K. T., H. Xiao, and E. A. Rich. 1999. Multifaceted activities of HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem*. 274:28837-28840.
19. Meyaard, L., S. A. Otto, H. Schuitemaker, and F. Miedema. 1992. Effects of HIV-1 Tat protein on human T-cell proliferation. *Eur J Immunol*. 22:2729-2732.
20. Mitola, S., R. Soldi, I. Zanon, L. Barra, M. I. Gutierrez, B. Berkhout, M. Giacca, and F. Bussolino. 2000. Identification of specific molecular structures of human immunodeficiency virus type 1 Tat relevant for its biological effects on vascular endothelial cells. *J Virol*. 74:344-53.
21. Osterhaus, A. D. M. E., C. A. van Baalen, R. A. Gruters, M. Schutten, C. H. Siebelink, E. G. Hulskotte, E. J. Tijhaar, R. E. Randall, G. van Amerongen, A. Fleuchaus, V. Erfle, and G. Sutter. 1999. Vaccination with Rev and Tat against AIDS. *Vaccine*. 17:2713-2714.
22. Ott, M., S. Emiliani, C. Van Lint, G. Herbein, J. Lovett, N. Chirmule, T. McCloskey, S. Pahwa, and E. Verdin. 1997. Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science*. 275:1481-1485.

23. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning. A laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

24. Seed, B., and J. Sheen. 1988. A simple phase extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity. *Gene*. 67:271-277.

25. Stauber, R. H., and G. N. Pavlakis. 1998. Intracellular trafficking and interactions of HIV-1 Tat protein. *Virology*. 252:126-136.

26. van Baalen, C. A., O. Pontesilli, R. C. Huisman, A. M. Geretti, M. R. Klein, F. of Wolf, F. Miedema, R. A. Gruters, and A. D. M. E. Osterhaus. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol*. 78:1913-1918.

27. Wender, P. A., D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, and J. B. Rothbard. 2000. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:13003-13008.

28. Westendorp, M. O., R. Frank, C. Oschenbauer, K. Stricker, J. Dhein, H. Walczak, K. M. Debatin, and P. H. Krammer. 1995. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*. 375:497-500.

- 
29. Westendorp, M. O., M. Li-Weber, R. W. Frank, and P. H. Krammer. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells. *J. Virol.* 68:4177-4185.
30. Zauli, G., D. Gibellini, D. Milani, M. Mazzoni, P. Borgatti, M. La Placa, and S. Capitani. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein protects lymphoid, epithelial, and neuronal cell lines from death by apoptosis. *Cancer Res.* 53:4481-4485.
31. Mayhood T, Kaushik N, Pandey PK, Kashanchi F, Deng L, Pandey VN. 2000. Inhibition of Tat-mediated transactivation of HIV-1 LTR transcription by polyamide nucleic acid targeted to TAR hairpin element. *Biochemistry*, 39, 11532-11539.
32. Tyagi M., Rusnati M., Presta M., Giacca M. 2001. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 276, 3254-3261.
33. Stauber RH, Pavlakis GN. 1998. Intracellular trafficking and interactions of HIV-1 Tat protein. *Virology*, 252, 126-136.
34. Endo S., Kubota S., Siomi H., Adachi A., Oroszlan S., Maki M., Hatanaka M. 1989. A region of basic amino-acid cluster in HIV-1 Tat protein is essential for trans-acting activity and nucleolar localization. *Virus Genes*, 3, 99-110.

## 序列表

&lt;110&gt; BIOMERIEUX SA

&lt;120&gt; HIV-1 病毒 TAT 蛋白突变体

&lt;130&gt; IFB 01 CE BIO MTAT

&lt;140&gt; PCT/FR03/00051

&lt;141&gt; 2003-01-09

&lt;150&gt; FR 02/00319

&lt;151&gt; 2002-01-11

&lt;160&gt; 108

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; HIV-1 病毒

&lt;400&gt; 1

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
 100

<210> 2  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Tat 蛋白突变体 K51T-R52L

<400> 2  
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15  
  
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
           20                   25                   30  
  
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45  
  
 Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
       50                   55                   60  
  
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65                   70                   75                   80  
  
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
           85                   90                   95  
  
 Thr Asp Pro Val Asp  
           100

<210> 3  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Tat 蛋白突变体 K51T-R55L

<400> 3  
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 4  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Tat 蛋白突变体 K51T-R57L

<400> 4  
Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp 65  
75 80

70

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu



&lt;400&gt; 6

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                    5                    10                    15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                    25                    30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                   35                    40                    45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
                   50                    55                    60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65                    70                    75                    80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                   85                    90                    95

Thr Asp Pro Val Asp  
                   100

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 K51T-E92Q

&lt;400&gt; 7

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                    5                    10                    15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                    25                    30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                   35                    40                    45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr



<211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 R52L-R57L

<400> 9

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
       50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                   85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
           100

<210> 10  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 R52L-G79A

<400> 10

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe



Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 12  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 R52L-E92Q

<400> 12

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                  35                   40                   45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
                  50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 13  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 R55L-R57L

&lt;400&gt; 13

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
 100

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 R55L-G79A

&lt;400&gt; 14

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60



<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 R55L-E92Q

<400> 16

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
          50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
          100

<210> 17

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 R57L-G79A

<400> 17

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
          20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 18

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 R57L-K89L

<400> 18

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 19  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 R57L-E92Q

<400> 19

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
          50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 20  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 G79A-K89L

<400> 20

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 21

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 G79A-E92Q

<400> 21

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R52L

&lt;400&gt; 23

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                   35                   40                   45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
           50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                   85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
                   100

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R55L

&lt;400&gt; 24

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                   35                   40                   45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 25

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R57L

<400> 25

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 26

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-G79A

<400> 26

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 27

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-K89L

<400> 27

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 28

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-E92Q

<400> 28

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp

100

<210> 29  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R55L

&lt;400&gt; 29

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
       50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                   85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
           100

<210> 30  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R57L

&lt;400&gt; 30

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
 100

<210> 31

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-G79A

<400> 31

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu

85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 32  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-K89L

<400> 32  
Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15  
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30  
His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45  
Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60  
His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80  
Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 33  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-E92Q

&lt;400&gt; 33

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
       50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
                   85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
           100

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-R55L-R57L

&lt;400&gt; 34

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr       50  
 55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-R55L-K89L

&lt;400&gt; 36

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser

1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe

20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly

35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr

50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp

65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu

85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp

100

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-R55L-E92Q

&lt;400&gt; 37

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser

1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe

20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly

35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
 100

<210> 38  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Tat 蛋白突变体 C27S-R57L-G79A

<400> 38  
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
 100

<210> 39  
 <211> 101

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R57L-K89L

<400> 39  
Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15  
  
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30  
  
His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                  35                   40                   45  
  
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
                  50                   55                   60  
  
His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65                   70                   75                   80  
  
Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95  
  
Thr Asp Pro Val Asp  
                  100

<210> 40  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R57L-E92Q

<400> 40  
Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15  
  
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30  
  
His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly



<210> 42  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Tat 蛋白突变体 C27S-G79A-E92Q

<400> 42  
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30  
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                   35                   40                   45  
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
                   50                   55                   60  
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65                   70                   75                   80  
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
                   85                   90                   95  
 Thr Asp Pro Val Asp  
                   100

<210> 43  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Tat 蛋白突变体 C27S-K89L-E92Q

<400> 43  
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65 70 75 80

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

Thr Asp Pro Val Asp  
 100

<210> 44

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R52L-G79A

<400> 44

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 45  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R52L-K89L

<400> 45  
Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 46  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R52L-E92Q

<400> 46

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 47  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R55L-G79A

<400> 47  
Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R55L-E92Q

&lt;400&gt; 49

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                  35                   40                   45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
                  50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
                  100

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R57L-G79A

&lt;400&gt; 50

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                  35                   40                   45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr



<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R57L-E92Q

<400> 52

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 53

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-G79A-K89L

<400> 53

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 54

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-G79A-E92Q

<400> 54

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 55  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-K89L-E92Q

<400> 55  
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
           20                   25                   30  
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45  
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
           50                   55                   60  
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65                   70                   75                   80  
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
           85                   90                   95  
 Thr Asp Pro Val Asp  
           100

<210> 56  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-G79A-K89L

<400> 56  
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
 100

<210> 57

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-G79A-E92Q

<400> 57

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu



&lt;400&gt; 59

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
       50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                   85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
           100

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R55L-K89L

&lt;400&gt; 60

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
       50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R57L-G79A

&lt;400&gt; 62

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
       50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                   85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
           100

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R57L-K89L

&lt;400&gt; 63

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 64

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R57L-E92Q

<400> 64

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 65

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R55L-G79A-K89L

<400> 65

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                  35                   40                   45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
                  50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
                  100

<210> 66

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R55L-G79A-E92Q

<400> 66

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly



<210> 68  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R55L-R57L-G79A

<400> 68

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
       50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                   85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
           100

<210> 69  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R55L-R57L-K89L

<400> 69

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
 100

<210> 70

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R55L-R57L-E92Q

<400> 70

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 71  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R57L-G79A-K89L

<400> 71

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
          50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 72  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R57L-G79A-E92Q

<400> 72

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 73

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R57L-K89L-E92Q

<400> 73

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-G79A-K89L-E92Q

&lt;400&gt; 75

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65 70 75 80

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

Thr Asp Pro Val Asp 100

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R52L-R55L-G79A

&lt;400&gt; 76

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60



<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R52L-R55L-E92Q

<400> 78

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
      50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
          100

<210> 79

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R52L-R57L-G79A

<400> 79

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
          20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly



<210> 81  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R52L-R57L-E92Q

<400> 81

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
       50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
                   85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
           100

<210> 82  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R52L-G79A-K89L

<400> 82

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe



Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 84  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R52L-K89L-E92Q

<400> 84

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
      50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65                   70                   75                   80

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

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 85  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R55L-R57L-G79A

<400> 85

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
      50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
          100

<210> 86

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R55L-R57L-K89L

<400> 86

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
      50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                                   85                                  90                                  95

Thr Asp Pro Val Asp  
                                   100

<210> 87

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R55L-R57L-E92Q

<400> 87

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                                  5                                  10                                  15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                                   20                                  25                                  30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                                   35                                  40                                  45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
                                   50                                  55                                  60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65                                  70                                  75                                  80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
                                   85                                  90                                  95

Thr Asp Pro Val Asp  
                                   100

<210> 88

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R55L-G79A-K89L

<400> 88

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
      50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
          100

<210> 89

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q

<400> 89

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
      50                   55                   60



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R57L-G79A-K89L

&lt;400&gt; 91

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser

1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe

20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly

35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr

50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp 65

75 80 70

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu

85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp

100

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R57L-G79A-E92Q

&lt;400&gt; 92

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser

1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe

20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly

35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 93  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Tat 蛋白突变体 C27S-K51T-R57L-K89L-E92Q

<400> 93  
Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

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

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 94  
<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R55L-R57L-G79A

<400> 94

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
      50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
          100

<210> 95

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R55L-R57L-K89L

<400> 95

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
          20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
 100

<210> 96

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R55L-R57L-E92Q

<400> 96

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
 100

<210> 97  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R55L-G79A-K89L

<400> 97

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                   20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
           35                   40                   45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
       50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                   85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
           100

<210> 98  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R55L-G79A-E92Q

<400> 98

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
 100

<210> 99

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R55L-K89L-E92Q

<400> 99

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu



Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp  
100

<210> 102

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-R57L-K89L-E92Q

<400> 102

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

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

Thr Asp Pro Val Asp  
                                   100

<210> 103

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R52L-G79A-K89L-E92Q

<400> 103

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1                                  5                                  10                                  15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                                   20                                  25                                  30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                                   35                                  40                                  45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
                                   50                                  55                                  60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
 65                                  70                                  75                                  80

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

Thr Asp Pro Val Asp  
                                   100

<210> 104

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

## &lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-R55L-R57L-G79A-K89L

&lt;400&gt; 104

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
      50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65                   70                   75                   80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
                  85                   90                   95

Thr Asp Pro Val Asp  
          100

&lt;210&gt; 105

&lt;211&gt; 101

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

## &lt;223&gt; Tat 蛋白突变体 C27S-R55L-R57L-G79A-E92Q

&lt;400&gt; 105

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr



<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R55L-G79A-K89L-E92Q

<400> 107

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
      50                   55                   60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65                   70                   75                   80

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

Thr Asp Pro Val Asp  
          100

<210> 108

<211> 101<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tat 蛋白突变体 C27S-R57L-G79A-K89L-E92Q

<400> 108

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
          35                   40                   45

---

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp  
65 70 75 80

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

Thr Asp Pro Val Asp  
100

76

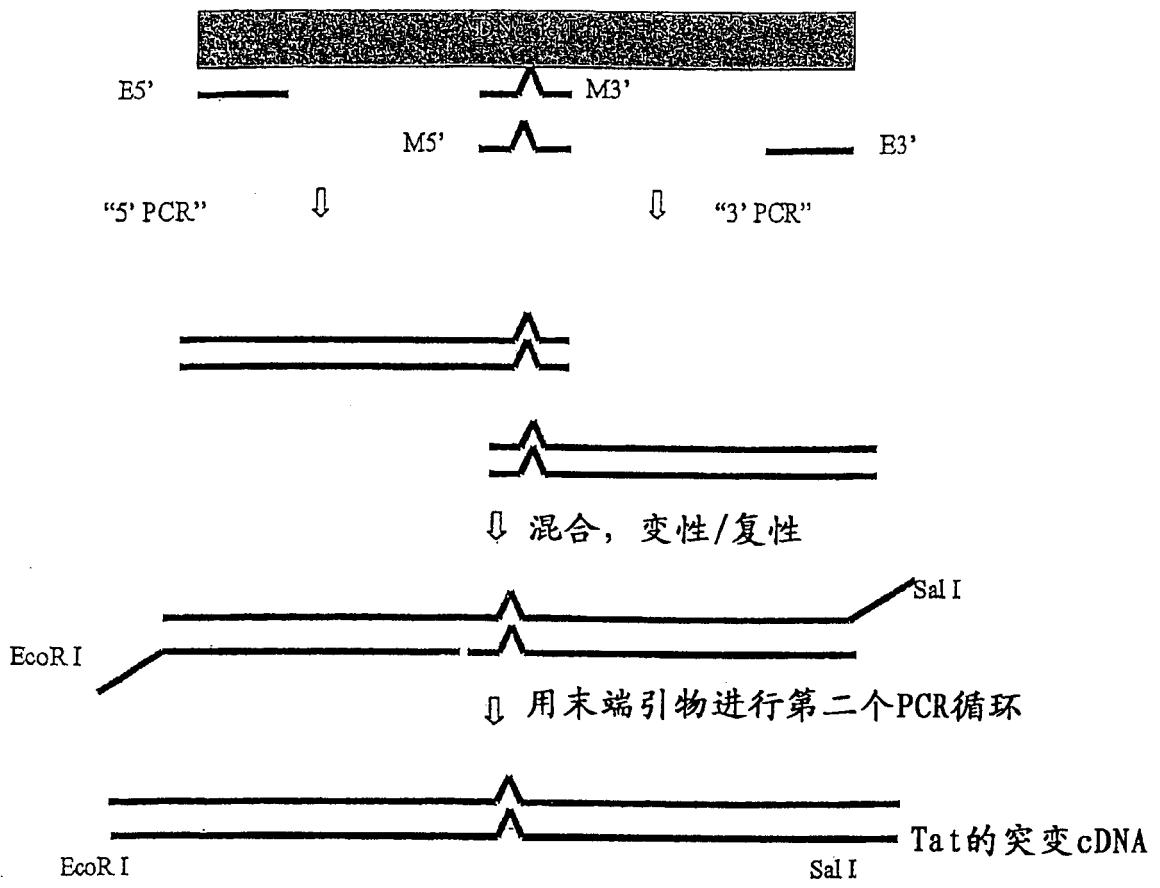


图1

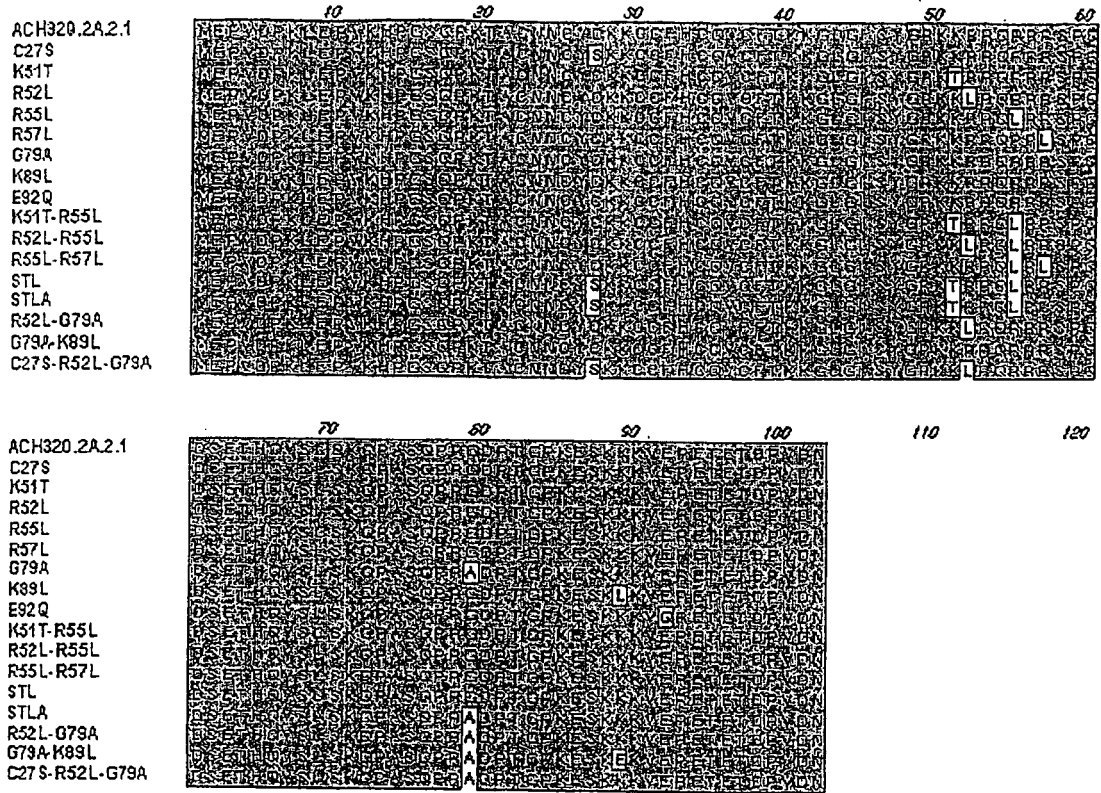


图2

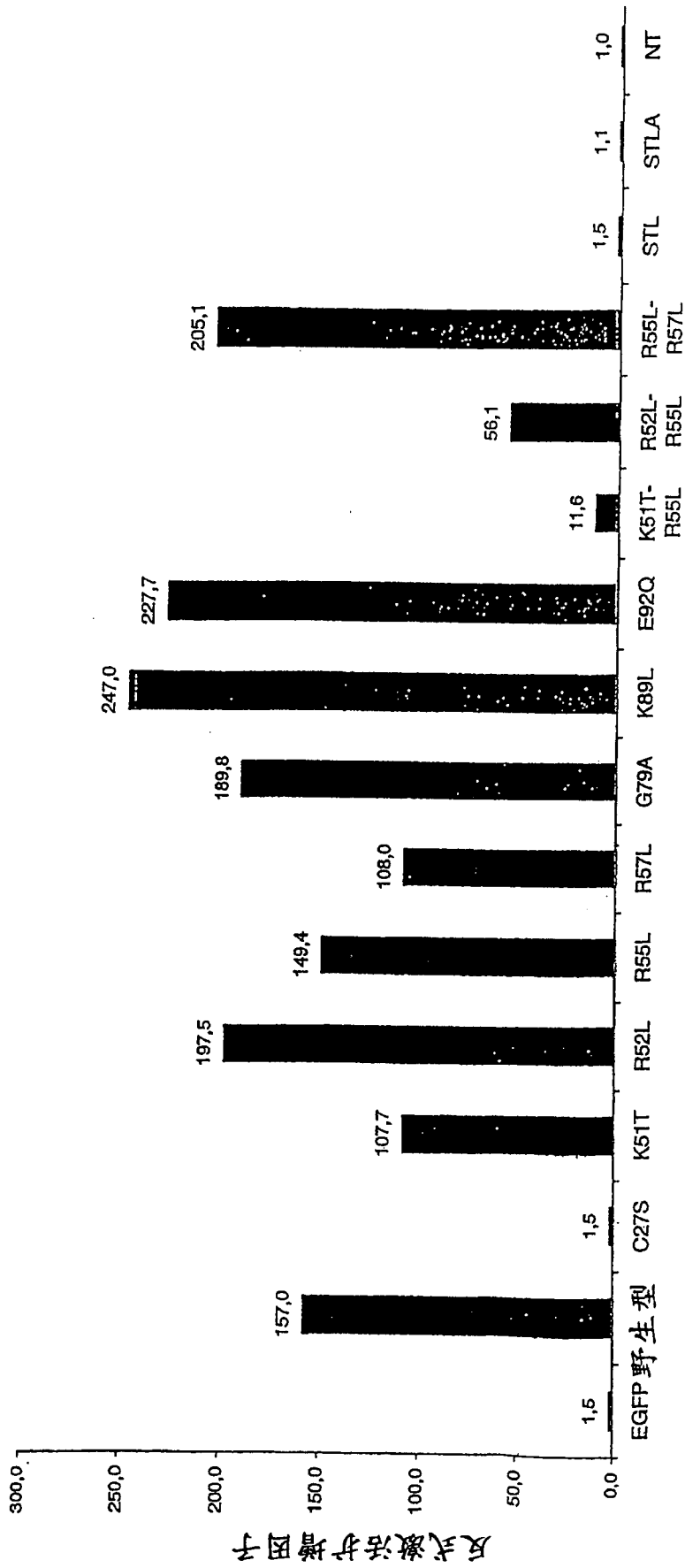


图 3a

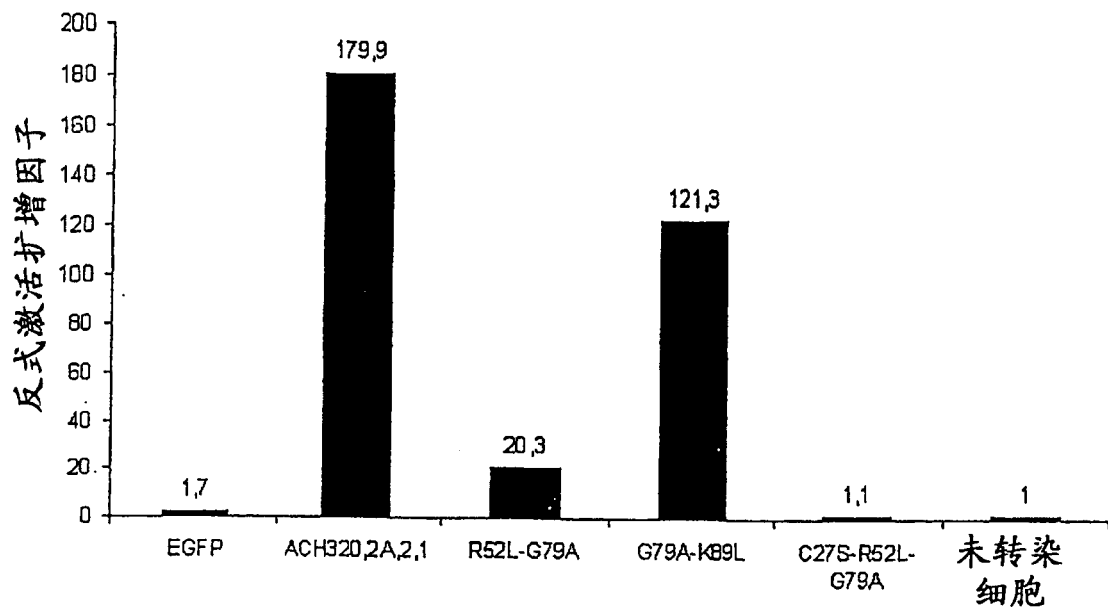


图 3b

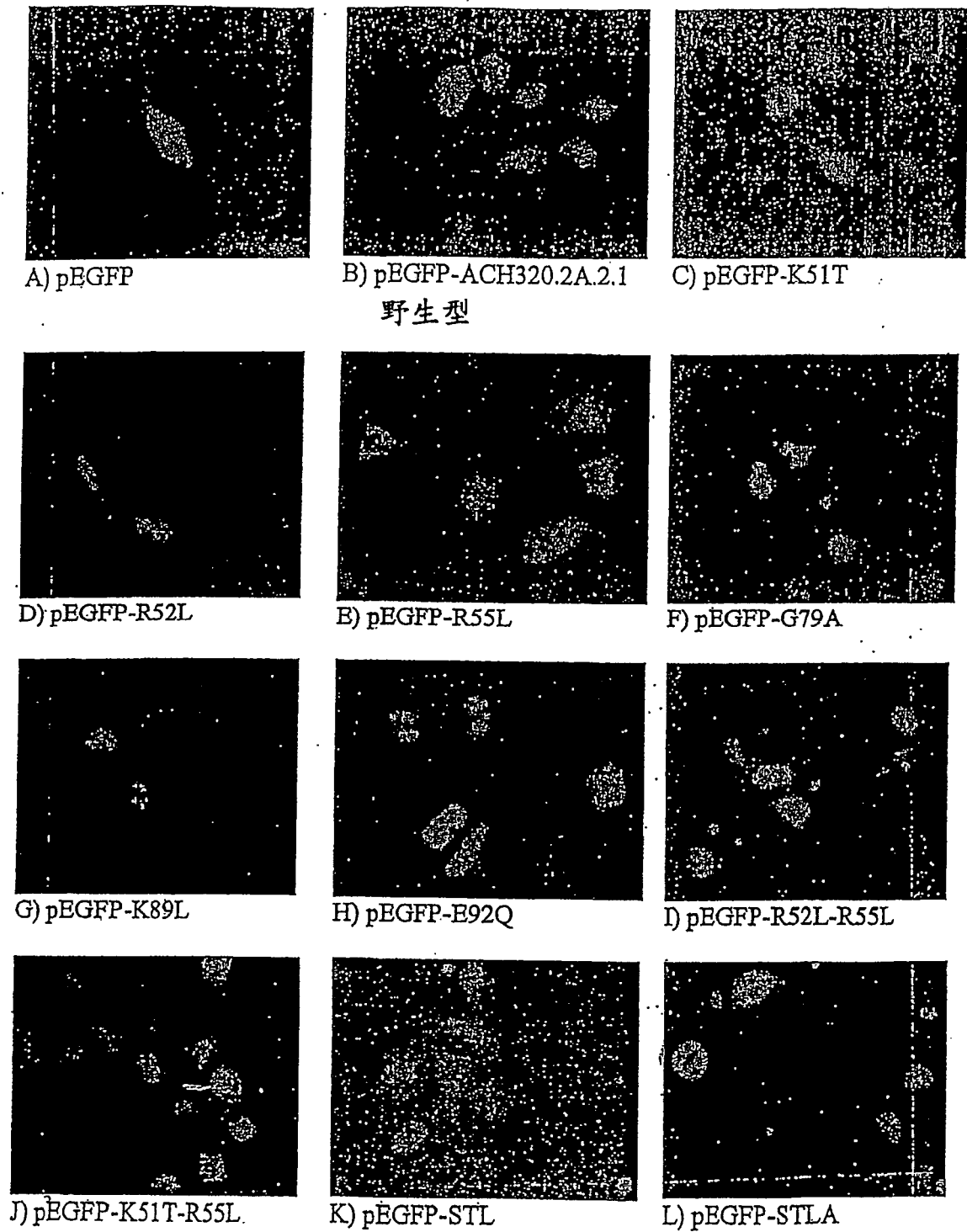


图 4a

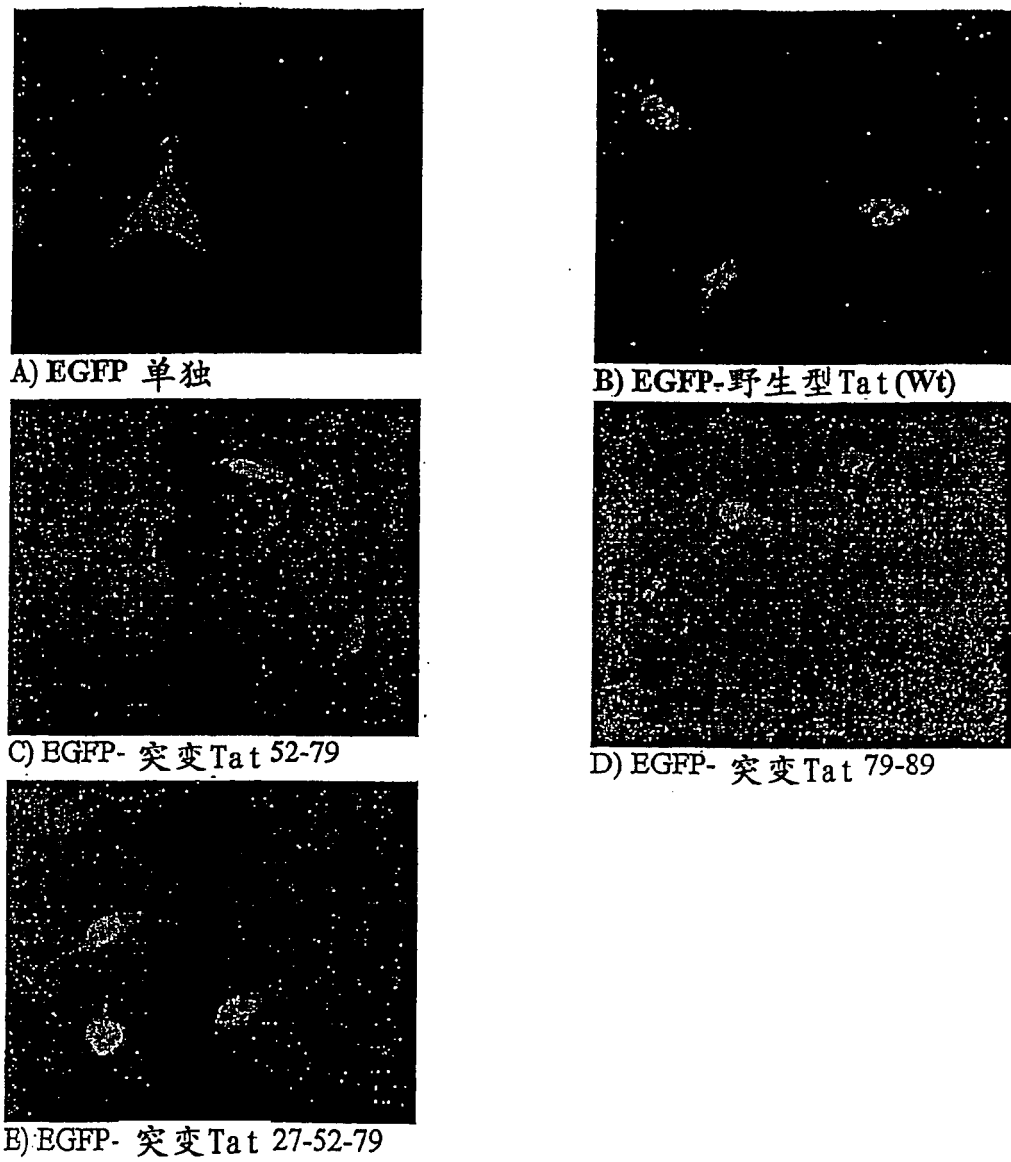


图 4b

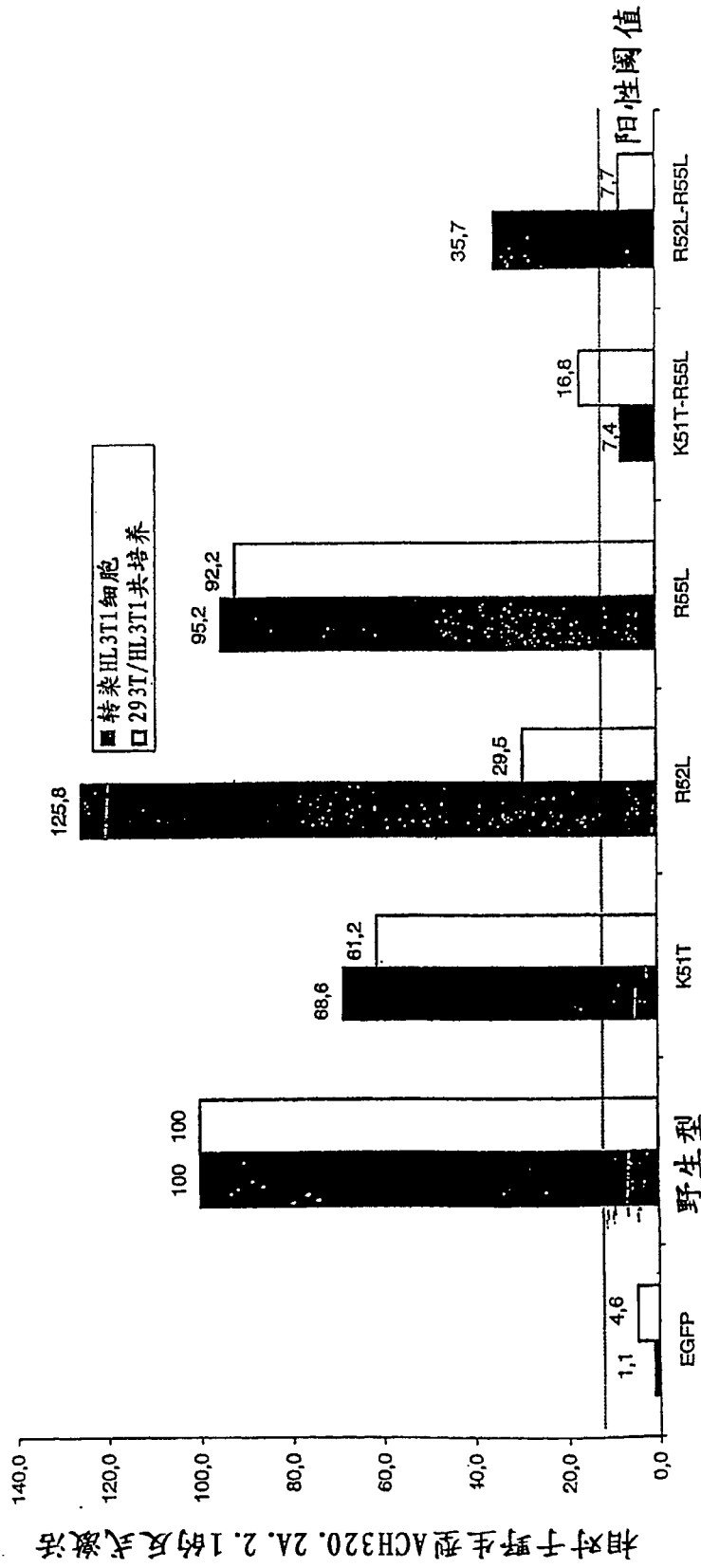


图5

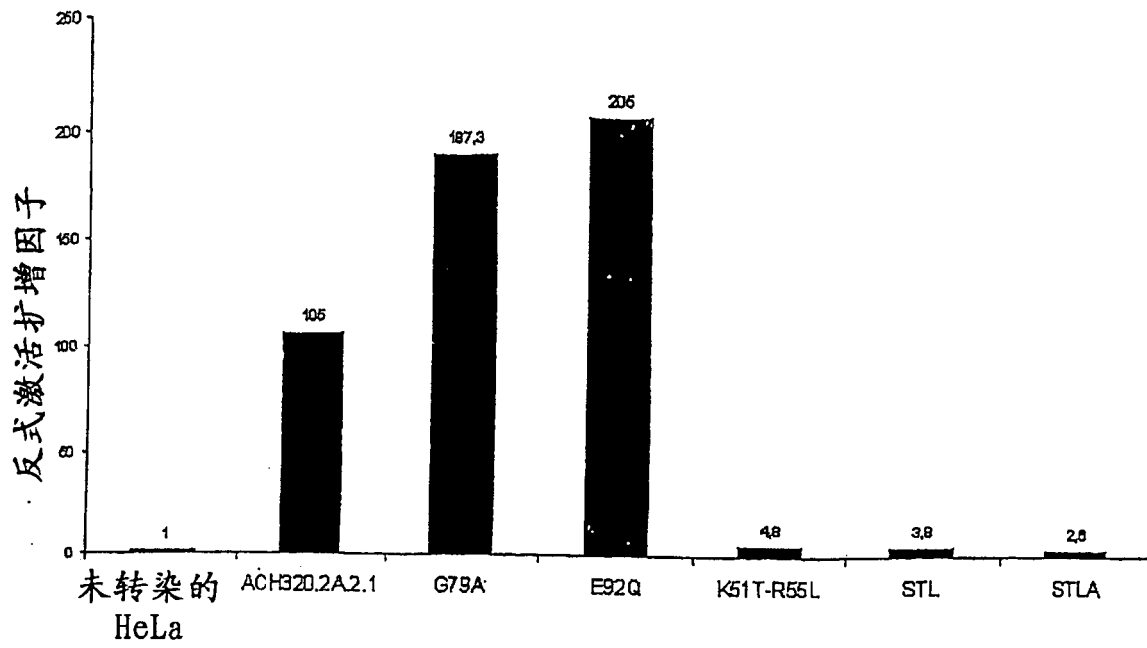


图6

专利名称(译)	HIV - 1病毒TAT - 蛋白突变体		
公开(公告)号	<a href="#">CN1292069C</a>	公开(公告)日	2006-12-27
申请号	CN03802072.6	申请日	2003-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	拜奥默里克斯股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜奥默里克斯股份有限公司		
[标]发明人	C吉隆 B沃里尔 B曼德兰德		
发明人	C·吉隆 A·彻达尔-博努 B·沃里尔 B·曼德兰德		
IPC分类号	C12N15/49 C12N5/10 C07K14/16 C07K16/10 A61K39/21 G01N33/53 G01N33/566 A61P31/18 C12N15/48		
CPC分类号	C12N2740/16322 A61K2039/53 C07K14/005 A61K39/21 C12N2740/16334 A61K39/12 A61P31/18		
代理人(译)	程泳		
优先权	2002000319 2002-01-11 FR		
其他公开文献	CN1615364A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于制备野生型HIV-1病毒Tat蛋白的解毒免疫原性突变体的蛋白质突变方法的用途。本发明还涉及制备野生型HIV-1病毒Tat蛋白的解毒免疫原性突变体的方法，包括第一步制备野生型Tat蛋白质突变体、第二步筛选没有跨细胞活性但是核定位被改变的解毒突变体、以及第三步筛选能诱导同时针对所述突变体和野生Tat蛋白的抗体的免疫原性突变体。步骤二和三可以调换。

