



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103476791 A

(43) 申请公布日 2013.12.25

(21) 申请号 201280009650.1

C07K 19/00 (2006.01)

(22) 申请日 2012.01.11

C12N 15/12 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/62 (2006.01)

61/431,701 2011.01.11 US

C12N 15/63 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61K 38/17 (2006.01)

2013. 08. 20

A61P 21/00 (2006.01)

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2012/020984 2012.01.11

(87) PCT申请的公布数据

W02012/097093 EN 2012.07.19

(71) 申请人 菲特治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 李彤 莫妮卡·黑赫斯特·班尼特

迈克尔·J·菲奇 彼得·弗林

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C07K 14/705(2006.01)

权利要求书3页 说明书34页

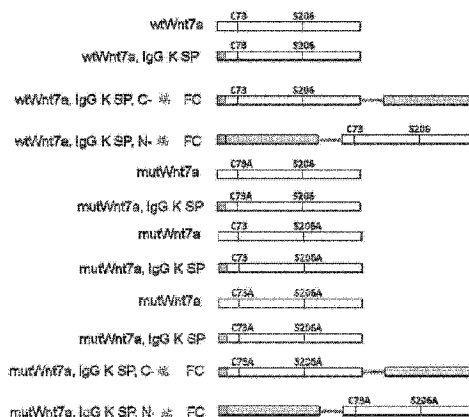
序列表60页 附图15页

(54) 发明名称

新型 WNT 组合物和该组合物的治疗用途

(57) 摘要

本发明提供了具有提高溶解性和改善类生物药物性能的新型 Wnt 多肽, 以及编码本发明的 Wnt 多肽的多聚核苷酸。本发明的 Wnt 多肽在治疗方面可用在如例如预防或治疗肌肉损失和 / 或促进肌肉肥大和生长的方法中。



1. 修饰的 Wnt 多肽,其包含降低所述 Wnt 多肽脂化的一个或多个氨基酸。
2. Wnt 多肽,其包含降低所述 Wnt 多肽脂化的一个或多个氨基酸缺失、插入或取代。
3. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的 Wnt 多肽,其中所述 Wnt 多肽激活非经典 Wnt 信号转导通路。
4. 如权利要求 3 所述的 Wnt 多肽,其中所述 Wnt 多肽选自:Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b 和 Wnt11。
5. 如权利要求 3 所述的 Wnt 多肽,其中 Wnt 多肽是 Wnt7a 或 Wnt5a 多肽
6. 修饰的 Wnt7a 多肽,其相对于对应 SEQ ID NOs:2 和 6-11 中任一个 Wnt7a 多肽的脂化具有降低的脂化。
7. 如权利要求 6 所述的修饰的 Wnt7a 多肽,其中所述多肽在相应于 SEQ ID NOs:2 和 6-11 中任一个的第 73 位的氨基酸位置处包含氨基酸的缺失、插入或取代。
8. 如权利要求 6 所述的修饰的 Wnt7a 多肽,其中所述多肽在相应于 SEQ ID NOs:2 和 6-11 中任一个的第 206 位的氨基酸位置处包含氨基酸的缺失、插入或取代。
9. 如权利要求 6 所述的修饰的 Wnt7a 多肽,其中所述多肽在相应于 SEQ ID NOs:2 和 6-11 中任一个的第 73 位和第 206 位的氨基酸位置处包含氨基酸的缺失、插入或取代。
10. 如权利要求 6 所述的修饰的 Wnt7a 多肽,其中所述多肽在相应于 SEQ ID NOs:2 和 6-11 中任一个的第 73 位或第 206 位的氨基酸位置处包含丙氨酸。
11. 如权利要求 6 所述的修饰的 Wnt7a 多肽,其中所述多肽在相应于 SEQ ID NOs:2 和 6-11 中任一个的第 73 位和第 206 位的氨基酸位置处包含丙氨酸。
12. 修饰的 Wnt5a 多肽,其相对于对应 SEQ ID NOs:15 和 19-23 中任一个的 Wnt5a 多肽的脂化具有降低的脂化。
13. 如权利要求 12 所述的修饰的 Wnt5a 多肽,其中所述多肽在相应于 SEQ ID NOs:15 和 19-23 中任一个的第 104 位的氨基酸位置处包含氨基酸的缺失、插入或取代。
14. 如权利要求 12 所述的修饰的 Wnt5a 多肽,其中所述多肽在相应于 SEQ ID NOs:15 和 19-23 中任一个的第 244 位的氨基酸位置处包含氨基酸的缺失、插入或取代。
15. 如权利要求 12 所述的修饰的 Wnt5a 多肽,其中所述多肽在相应于 SEQ ID NOs:15 和 19-23 中任一个的第 104 位和第 244 位的氨基酸位置处包含氨基酸的缺失、插入或取代。
16. 如权利要求 12 所述的修饰的 Wnt5a 多肽,其中所述多肽在相应于 SEQ ID NOs:15 和 19-23 中任一个的第 104 位或第 244 位的氨基酸位置处包含丙氨酸。
17. 如权利要求 12 所述的修饰的 Wnt5a 多肽,其中所述多肽在相应于 SEQ ID NOs:15 和 19-23 中任一个的第 104 位和第 244 位的氨基酸位置处包含丙氨酸。
18. Wnt 多肽,其包含 SEQ ID NOs:3-5、12-13 和 16-18 中任一个所示的氨基酸序列。
19. 融合多肽,其包含权利要求 18 所述的 Wnt 多肽。
20. 如权利要求 19 所述的融合多肽,其包含天然信号肽、异源信号肽、或天然和异源信号肽的杂合体。
21. 如权利要求 20 所述的融合多肽,其中所述异源信号肽选自:CD33 信号肽、免疫球蛋白信号肽、生长激素信号肽、红细胞生成素信号肽、白蛋白信号肽、分泌型碱性磷酸酶信号肽和病毒性信号肽。
22. 如权利要求 20 所述的融合多肽,其中所述异源信号肽为 CD33 信号肽、IgG κ 信号

肽或 IgG μ 信号肽。

23. 如权利要求 19-22 中任一项所述的融合多肽,其包含异源蛋白酶切割位点。

24. 如权利要求 23 所述的融合多肽,其中所述异源蛋白酶切割位点选自:烟草蚀纹病毒(TEV)蛋白酶切割位点、肝素切割位点、凝血酶切割位点、肠激酶切割位点和因子 Xa 切割位点。

25. 如权利要求 19-24 中任一项所述的融合多肽,其包含选自以下的表位标签:His6 表位、MYC 表位、FLAG 表位、V5 表位、VSV-G 表位和 HA 表位。

26. 如权利要求 19-24 中任一项所述的融合多肽,其中所述融合多肽包含 SEQ ID NOs:3-5 和 12-13 中任一个所示的氨基酸序列,相较于 SEQ ID NOs:2 和 6-11 中所示的对应的天然 Wnt 多肽,其具有增加的产量、分泌或溶解性。

27. 如权利要求 19-24 中任一项所述的融合多肽,其中所述融合多肽包含 SEQ ID NOs:16-18 中任一个所示的氨基酸序列,相较于 SEQ ID NOs:15 和 19-23 中所示的对应的天然 Wnt 多肽,其具有增加的产量、分泌或溶解性。

28. 编码权利要求 1-27 中任一项所述的多肽的多聚核苷酸。

29. 包含权利要求 28 所述的多聚核苷酸的载体。

30. 包含权利要求 29 所述的载体的宿主细胞。

31. 权利要求 30 所述的宿主细胞产生的多肽。

32. 组合物,其包含权利要求 1-27 中任一项所述的多肽;编码权利要求 1-27 中任一项所述的多肽的多聚核苷酸;或包含编码权利要求 1-27 中任一项所述的多肽的多聚核苷酸的载体。

33. 如权利要求 32 所述的组合物,其包含药学可接受的盐、载体或赋形剂。

34. 如权利要求 32 所述的组合物,其中所述组合物在水溶液中可溶。

35. 如权利要求 32 所述的组合物,其中所述组合物配制为用于注射。

36. 如权利要求 32 所述的组合物,其中所述组合物无需去垢剂配制。

37. 如权利要求 32 所述的组合物,其中所述组合物配制为用于静脉注射、心内注射、皮下注射、腹腔内注射或肌肉内直接注射中的一种或多种。

38. 如权利要求 32 所述的组合物,其中所述组合物促进组织形成、再生、维持或修复。

39. 如权利要求 38 所述的组合物,其中所述组织为肌肉。

40. 如权利要求 38 所述的组合物,其中所述肌肉为骨骼肌、心肌或平滑肌。

41. 如权利要求 32 所述的组合物,其中所述组合物促进干细胞扩增。

42. 如权利要求 41 所述的组合物,其中所述干细胞是成体干细胞。

43. 如权利要求 42 所述的组合物,其中所述成体干细胞是卫星干细胞。

44. 如权利要求 32 所述的组合物,其中所述组合物促进肌肉肥大或预防萎缩。

45. 治疗或预防肌肉损失的方法,其包括给予个体权利要求 32 所述的组合物。

46. 如权利要求 45 所述的方法,其中所述组合物包含药学可接受的盐、载体、或赋形剂。

47. 如权利要求 45 所述的方法,其中所述组合物在水溶液中可溶。

48. 如权利要求 45 所述的方法,其中所述组合物不在去垢剂中配制。

49. 如权利要求 45 所述的方法,其中所述组合物配制为用于注射。

50. 如权利要求 45 所述的方法,其中所述组合物配制为用于静脉注射、心内注射、皮下注射、腹腔内注射或肌肉内直接注射中的一种或多种。

51. 如权利要求 45 所述的方法,其中所述个体患有或有风险患有影响肌肉的疾病或病症。

52. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述疾病是退行性疾病。

53. 如权利要求 52 所述的方法,其中所述退行性疾病是肌营养不良。

54. 如权利要求 53 所述的方法,其中所述肌营养不良选自:杜兴氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良(BMD)、埃默里—德赖富斯肌营养不良、兰迪二氏肌营养不良、面肩肱型肌营养不良(FSH)、肢带型肌营养不良、von Graefe-Fuchs 型肌营养不良、眼咽型肌营养不良(OPMD)、肌强直性营养不良(斯太纳特病)和先天性肌营养不良。

55. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述影响肌肉的疾病或病症是消耗病、肌肉衰减、肌肉萎缩、ICU 诱发性虚弱、持续废用、手术诱发性虚弱或肌肉退行性疾病。

56. 如权利要求 55 所述的方法,其中所述病症为与肌肉废用、固定、手术诱发性虚弱或损伤相关的肌肉萎缩。

57. 如权利要求 45 所述的方法,其中给予所述组合物促进肌肉肥大。

58. 如权利要求 57 所述的方法,其中所述肌肉是骨骼肌或心肌。

59. 如权利要求 45 所述的方法,其中给予所述组合物促进卫星细胞扩增。

新型 WNT 组合物和该组合物的治疗用途

[0001] 关于序列表的声明

[0002] 提供以文本格式替代纸质副本的本申请的序列表, 据此通过引用并入说明书。包含序列表的文本文件的名称为 FATE_095_00W0_ST25. txt。文本文件的大小为 124KB, 创建于 2011 年 1 月 11 日并通过 EFS-Web 系统电子提交。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请根据 35U. S. C. § 119(e) 的规定, 要求 2012 年 1 月 11 日提交的美国临时专利申请第 61/431, 701 号的权益, 通过引用将其整体并入本文。

[0005] 背景

技术领域

[0006] 本发明大体涉及新型 Wnt 组合物及利用所述新型 Wnt 组合物的治疗方法。本发明的 Wnt 多肽及其组合物在治疗方面可用于, 例如通过促进干细胞扩增和肌肉肥大促进肌肉再生。

[0007] 相关领域的描述

[0008] Wnt 基因家族编码二十多种富含半胱氨酸的分泌型 Wnt 信号糖蛋白, 这些蛋白通过结合靶细胞上的佛力子(Fzd)受体而起作用。佛力子受体是 G- 蛋白偶联受体蛋白家族。Wnt 家族的不同成员与 Fzd 家族某些成员的结合可通过数条不同通路之一启动信号转导。在“经典通路”中, 信号分子散乱蛋白(Disheveled)的激活导致糖原合成酶激酶-3(GSK-3 β)的失活, 所述糖原合成酶激酶-3 是一种胞质丝氨酸-苏氨酸激酶。GSK-3 β 的靶标 β - 连环蛋白进而被稳定并易位至细胞核, 在细胞核中, β - 连环蛋白激活特定启动子的 TCF (T- 细胞因子) 依赖型转录 (Wodarz, 1998, Dierick, 1999)。“非经典”Wnt 通路激活包括 Wnt 和 Fzd 间的一组相互作用, 其可激活 Ca²⁺ 通路信号转导和可能的 PI3K 信号转导、Rho 通路信号转导以及平面细胞极性(PCP)通路信号转导。

[0009] Wnt 是分泌型糖蛋白, 其作为在多种原始细胞类型中有活性的旁分泌或自分泌信号而起作用。虽然 Wnt 蛋白从细胞中分泌, 但是发现它们是疏水的, 并且通过在保守的半胱氨酸残基和保守的丝氨酸残基处添加脂质部分进行翻译后修饰。这些脂质修饰对 Wnt 蛋白的生物活性和分泌的重要性被广泛接受。然而, 去垢剂脂化和脂化 Wnt 的低溶解性与配制过程中没有使用去垢剂时的低产率有关, 从而出现了 Wnt 临床规模生产的独特挑战。因此, 尽管 Wnt 在多种临床环境的治疗应用中具有巨大潜力, 但 Wnt 的治疗潜力由于 Wnt 的不溶性以及相应的不足以作为纯化的、生物活性制剂生产而未被充分了解。

[0010] 因此, 该领域需要保留 Wnt 生物活性的可溶的、新型 Wnt 多肽, 产生临床规模的新型 Wnt 的方法以及使用新型 Wnt 促进组织形成、再生、维持和修复的方法。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供修饰的 Wnt 多肽, 其包含降低 Wnt 多肽脂化的一个或多个氨基酸。在具体实施方式中, 所述 Wnt 多肽包含降低 Wnt 多肽脂化的一个或多个氨基酸的缺失、插入或取代。

[0013] 在一个实施方式中,多肽为激活非经典 Wnt 信号转导通路的 Wnt 多肽。

[0014] 在具体实施方式中,激活非经典 Wnt 信号转导通路的 Wnt 多肽选自:Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、和 Wnt11。

[0015] 在本发明的一些实施方式中,多肽是 Wnt7a 或 Wnt5a 多肽。

[0016] 在具体实施方式中,本发明提供了修饰的 Wnt7a 多肽,其相对于对应 SEQ ID NO:2 和 6-11 中任一个的 Wnt7a 多肽的脂化具有降低的脂化。在其他实施方式中,本发明提供的修饰的 Wnt7a 多肽在相应于 SEQ ID NO:2 和 6-11 中任一个的第 73 位的氨基酸位置处包含氨基酸缺失、插入、或取代。在一些实施方式中,本发明提供的 Wnt7a 多肽在相应于 SEQ ID NO:2 和 6-11 中任一个的第 206 位的氨基酸位置处包含氨基酸缺失、插入、或取代。在具体实施方式中,本发明提供的 Wnt7a 多肽在相应于 SEQ ID NO:2 和 6-11 中任一个的第 73 位和第 206 位的氨基酸位置处包含氨基酸缺失、插入、或取代。

[0017] 在一些实施方式中,本发明提供的 Wnt7a 多肽在相应于 SEQ ID NO:2 和 6-11 中任一个的第 73 位或第 206 位的氨基酸位置处包含丙氨酸。在其他实施方式中,本发明提供的 Wnt7a 多肽在相应于 SEQ ID NO:2 和 6-11 中任一个的第 73 位和第 206 位的氨基酸位置处包含丙氨酸。本发明还提供了包含本文中任一实施方式的组合物,其中所述 Wnt7a 多肽是人或小鼠 Wnt7a 多肽。

[0018] 在具体实施方式中,本发明提供了修饰的 Wnt5a 多肽,其相对于对应 SEQ ID NO:15 和 19-23 中任一个的 Wnt5a 多肽的脂化具有降低的脂化。在其他实施方式中,本发明提供的修饰的 Wnt5a 多肽在相应于 SEQ ID NO:15 和 19-23 中任一个的第 104 位的氨基酸位置处包含氨基酸缺失、插入、或取代。在一些实施方式中,本发明提供的 Wnt5a 多肽在相应于 SEQ ID NO:15 和 19-23 中任一个的第 244 位的氨基酸位置处包含氨基酸缺失、插入、或取代。在具体实施方式中,本发明提供的 Wnt5a 多肽在相应于 SEQ ID NO:15 和 19-23 中任一个的位置 104 和 244 的氨基酸位置处包含氨基酸缺失、插入、或取代。

[0019] 在一些实施方式中,本发明提供的 Wnt5a 多肽在相应于 SEQ ID NO:15 和 19-23 中任一个的第 104 位或第 244 位的氨基酸位置处包含丙氨酸。在其他实施方式中,本发明提供的 Wnt5a 多肽在相应于 SEQ ID NO:15 和 19-23 中任一个的第 104 位和第 244 位的氨基酸位置处包含丙氨酸。本发明还提供了包含本文中任一实施方式的组合物,其中所述 Wnt5a 多肽是人或小鼠 Wnt5a 多肽。

[0020] 在一些实施方式中,本发明提供的 Wnt 多肽包含 SEQ ID NO:3-5、12-13 和 16-18 中任一个所示的氨基酸序列。

[0021] 在多个实施方式中,本发明部分地关注包含 Wnt 多肽的融合多肽,所述 Wnt 多肽包含 SEQ ID NO:3-5、12-13 和 16-18 中任一个所示的氨基酸序列。

[0022] 在一个实施方式中,融合多肽包含天然信号肽、异源信号肽、或天然和异源信号肽的杂交体。

[0023] 在具体实施方式中,异源信号肽选自:CD33 信号肽、免疫球蛋白信号肽、生长激素信号肽、红细胞生成素信号肽、白蛋白信号肽、分泌型碱性磷酸酶信号肽、和病毒性信号肽。

[0024] 在某些实施方式中,异源信号肽为 CD33 信号肽、IgG κ 信号肽、或 IgG μ 信号肽。

[0025] 在其他实施方式中,融合多肽包含异源蛋白酶切割位点。

[0026] 在一个实施方式中,异源蛋白酶切割位点选自:烟草蚀纹病毒 (TEV) 蛋白酶切割

位点、肝素切割位点、凝血酶切割位点、肠激酶切割位点和因子 Xa 切割位点。

[0027] 在进一步的实施方式中,融合多肽包含选自以下的表位标签: HIS6 表位、MYC 表位、FLAG 表位、V5 表位、VSV-G 表位、和 HA 表位。

[0028] 在具体实施方式中,融合多肽包含 SEQ ID NO:3-5 和 12-13 中任一个所示的氨基酸序列,相较于 SEQ ID NO:2 和 6-11 所示的相应的天然 Wnt 多肽,其具有增加的产量、分泌、或溶解性。

[0029] 在某些实施方式中,融合多肽包含 SEQ ID NO:16-18 中任一个所示的氨基酸序列,相较于 SEQ ID NO:15 和 19-23 所示的相应的天然 Wnt 多肽,其具有增加的产量、分泌、或溶解性。

[0030] 本发明还提供编码 Wnt 多肽的多聚核苷酸,所述 Wnt 多肽具有降低 Wnt 多肽脂化的一个或多个氨基酸。本发明的一些实施方式提供了包含编码 Wnt 多肽的多聚核苷酸的载体,所述 Wnt 多肽具有降低 Wnt 多肽脂化的一个或多个氨基酸。本发明还提供了包括此类载体的宿主细胞,和所述宿主细胞产生的 Wnt 多肽。

[0031] 本发明还提供了包含本发明的 Wnt 多肽、多聚核苷酸和载体的组合物。在一些实施方式中,所述组合物包含药学可接受的盐、载体、或赋形剂,并且在一些实施方式中,所述组合物在水溶液中可溶。在本发明的具体实施方式中,所述组合物配制为用于注射。在某些实施方式中,配制所述组合物无需去垢剂。在相关实施方式中,所述组合物的配制基本上不存在去垢剂。在另一个相关实施方式中,配制的组合物基本上不含去垢剂。在更具体的实施方式中,所述组合物配制为用于静脉注射、心内注射、皮下注射、腹腔内注射、或肌肉内直接注射中的一种或多种。

[0032] 在本发明的一些实施方式中,所述组合物促进组织形成、再生、维持或修复。在具体实施方式中,所述组织为肌肉,并且在更具体的实施方式中,所述肌肉为骨骼肌、心肌、或平滑肌。

[0033] 在其他实施方式中,本发明的组合物促进干细胞扩增。在一些实施方式中,干细胞是成体干细胞,并且在具体实施方式中,成体干细胞是卫星干细胞。

[0034] 在一些实施方式中,本发明的组合物促进肌肉肥大或防止萎缩。

[0035] 本发明还提供了治疗或预防肌肉损失的方法,其包括给予个体具有 Wnt 多肽的组合物,所述 Wnt 多肽包含降低 Wnt 多肽脂化的一个或多个氨基酸。在一些实施方式中,所述组合物包含药学可接受的盐、载体、或赋形剂,并且在具体实施方式中,所述组合物在水溶液中可溶。在其他具体实施方式中,所述组合物配制为用于注射,并且在更具体的实施方式中,所述组合物配制为用于静脉注射、心内注射、皮下注射、腹腔内注射、或肌肉内直接注射中的一种或多种。

[0036] 在某些实施方式中,配制所述组合物无需去垢剂。在相关实施方式中,所述组合物的配制基本上不存在去垢剂。在另一个相关实施方式中,配制的组合物基本上不含去垢剂。

[0037] 在本发明方法的一些实施方式中,所述个体患有影响肌肉的疾病或病症或有患影响肌肉的疾病或病症的风险。在具体实施方式中,所述疾病是退行性疾病,并且在更具体的实施方式中,退行性疾病是肌营养不良。在更加具体的实施方式中,所述肌营养不良选自: 杜兴氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良(BMD)、埃默里—德赖富斯肌营养不良、兰迪二氏肌营养不良、面肩肱型肌营养不良(FSH)、肢带型肌营养不良、von Graefe-Fuchs 型肌营

营养不良、眼咽型肌营养不良 (OPMD)、肌强直性营养不良 (斯太纳特病) 和先天性肌营养不良。

[0038] 在所述方法的其他实施方式中, 所述影响肌肉的疾病或病症是消耗病、肌肉衰减、肌肉萎缩、ICU 诱发性虚弱、持续废用、手术诱发性虚弱、或肌肉退行性疾病。在更具体的实施方式中, 所述病症为伴随肌肉废用、固定、手术诱发性虚弱、或损伤的肌肉萎缩。

[0039] 在一些实施方式中, 给予所述组合物促进肌肉萎缩。在具体实施方式中, 所述肌肉是骨骼肌或心肌。

[0040] 在本发明方法的其他实施方式中, 给予所述组合物促进卫星细胞扩增。

附图说明

[0041] 图 1 显示的是全部 19 种人 Wnt 多肽序列的 ClustalW 比对。保守的可能的翻译后脂化位点用灰色阴影标出并与人 Wnt7a 的半胱氨酸 73 和丝氨酸 206 比对。被认为是糖基化位点的天冬酰胺残基用下划线示出。

[0042] 图 2 显示的是来自多种物种的保守 Wnt7a 多肽序列的 ClustalW 比对。

[0043] 图 3 显示的是用非经典 Wnt 刺激下的成肌细胞肥大。图 3a 显示的是非经典 Wnt 处理 (Wnt7a) 刺激的体外成肌细胞肥大的代表图。图 3b 显示的是某些 Wnt 处理诱发的体外成肌细胞纤维肥大的数据。每个处理组的 3 个生物重复中的每个当中计数 100 条纤维并显示微米下的个体计数和重复的中位数。

[0044] 图 4 显示的是多种构建 Wnt7a 变体的示意图。白色显示的是野生型人 Wnt7a 序列, 如图所示, 导致氨基酸变化的特定点突变的变体用带有氨基酸变化的白色显示。灰色阴影指示的是天然存在 Wnt7a 的分泌信号肽用人 IgG κ 链信号肽替换。如图所示, 免疫球蛋白 Fc 区的氨基或羧基端融合体用接头区构建。

[0045] 图 5 显示的是哺乳动物组织培养的 HEK293 细胞表达和分泌的 Wnt7a 的 SDS-PAGE、Western 印迹。具有 CD33 或 IgG κ 链的外源分泌信号肽的 Wnt 多肽增加的表达和随后的分泌可清楚地从具有天然信号肽的 Wnt 多肽上看出。

[0046] 图 6 显示的是高效液相色谱法 (HPLC) 追踪检测溶液中的去垢剂 CHAPS。图 6a 显示的是在磷酸盐缓冲液中校正系统的 CHAPS 标准曲线。图 6b 显示的是与来自 R&D 系统的商购蛋白 (商业蛋白包含引起第二大峰的载体蛋白) 相比, 在 1%CHAPS 中配制的修饰的 Wnt 多肽制品。图 6c 显示的是, 如图所示, 透析 4 和 20 小时从 Wnt 多肽制剂中有效去除 CHAPS。

[0047] 图 7 显示的是成肌细胞肥大测定, 其展示了在存在或不存在去垢剂的情况下配制的 Wnt7a 变体的活性。Wnt 蛋白由 IgG κ 分泌信号肽构建而成。蛋白在 HEK293 哺乳动物培养系统中产生并亲和纯化。蛋白在具有 1%CHAPS 去垢剂的 PBS 中配制而成。每种蛋白变体的等分试样通过透析去除去垢剂来重新配制。蛋白具有等摩尔浓度并应用于 C2C12 肥大测定。

[0048] 图 8 显示的是测定用编码本文其他地方所述的修饰的人 Wnt7a 多肽、野生型人 Wnt7a 或 LacZ 对照的表达质粒电穿孔的小鼠胫骨前肌 (TA) 肌肉平均纤维直径的实验结果。

[0049] 图 9 显示的是测定用编码本文其他地方所述的修饰的人 Wnt7a 多肽的表达质粒或盐水对照电穿孔小鼠胫骨前肌 (TA) 肌肉重量的实验结果。

[0050] 图 10 显示的是测定用编码本文其他地方所述的修饰的人 Wnt7a 多肽、野生型人 Wnt7a 或 LacZ 对照的表达质粒电穿孔小鼠胫骨前肌 (TA) 肌肉中 Pax7⁺ 卫星干细胞数量的

实验结果。

[0051] 图 11 是免疫球蛋白 Fc 融合蛋白。图 11a 显示用免疫球蛋白 κ 中的信号肽取代其天然分泌信号肽并构建为免疫球蛋白 Fc 结构域融合蛋白的 Wnt7a 蛋白的 Western 印迹。图 11a 中显示与单独的 Fc 结构域对照相比的哺乳动物培养系统的分泌。图 11b 显示利用抗-Wnt7a 检测抗体通过 SDS-PAGE Western 印迹得到的 Wnt7a 和 Wnt7a-Fc 融合蛋白间的相对分子量差异。

[0052] 序列表简要说明

[0053] SEQ ID NO:1 示出了人 Wnt7a 的 cDNA 序列。

[0054] SEQ ID NO:2 示出了由 SEQ ID NO:1 编码的人 Wnt7a 多肽的氨基酸序列。

[0055] SEQ ID NO:3 示出了 SEQ ID NO:2 的人 Wnt7a 多肽的氨基酸序列,其在氨基酸第 73 位具有丙氨酸突变。

[0056] SEQ ID NO:4 示出了 SEQ ID NO:2 的人 Wnt7a 多肽的氨基酸序列,其在氨基酸第 206 位具有丙氨酸突变。

[0057] SEQ ID NO:5 示出了 SEQ ID NO:2 的人 Wnt7a 多肽的氨基酸序列,其在氨基酸第 73 位和第 206 位具有丙氨酸突变。

[0058] SEQ ID NO:6 示出了小鼠 Wnt7a 多肽的氨基酸序列。

[0059] SEQ ID NO:7 示出了大鼠 Wnt7a 多肽的氨基酸序列。

[0060] SEQ ID NO:8 示出了鸡 Wnt7a 多肽的氨基酸序列。

[0061] SEQ ID NO:9 示出了斑马鱼 Wnt7a 多肽的氨基酸序列。

[0062] SEQ ID NO:10 示出了猪 Wnt7a 多肽的氨基酸序列。

[0063] SEQ ID NO:11 示出了牛 Wnt7a 多肽的氨基酸序列。

[0064] SEQ ID NO:12 示出了人免疫球蛋白 κ 链的信号肽取代天然分泌信号肽的人 Wnt7a 多肽的氨基酸序列。

[0065] SEQ ID NO:13 示出了在氨基酸第 73 位和第 206 位处具有丙氨酸突变的、并用人免疫球蛋白 κ 链的信号肽取代天然分泌信号肽的人 Wnt7a 多肽的氨基酸序列。

[0066] SEQ ID NO:14 示出了人 Wnt5a 的 cDNA 序列。

[0067] SEQ ID NO:15 示出了由 SEQ ID NO:14 编码的人 Wnt5a 多肽的氨基酸序列。

[0068] SEQ ID NO:16 示出了 SEQ ID NO:15 的人 Wnt5a 多肽的氨基酸序列,其在氨基酸第 104 位具有丙氨酸突变。

[0069] SEQ ID NO:17 示出了 SEQ ID NO:15 的人 Wnt5a 多肽的氨基酸序列,其在氨基酸第 244 位具有丙氨酸突变。

[0070] SEQ ID NO:18 示出了 SEQ ID NO:15 的人 Wnt5a 多肽的氨基酸序列,其在氨基酸第 104 位和第 244 位具有丙氨酸突变。

[0071] SEQ ID NO:19 示出了小鼠 Wnt5a 多肽的氨基酸序列。

[0072] SEQ ID NO:20 示出了大鼠 Wnt5a 多肽的氨基酸序列。

[0073] SEQ ID NO:21 示出了鸡 Wnt5a 多肽的氨基酸序列。

[0074] SEQ ID NO:22 示出了斑马鱼 Wnt5a 多肽的氨基酸序列。

[0075] SEQ ID NO:23 示出了牛 Wnt5a 多肽的氨基酸序列。

[0076] SEQ ID NO:24 示出了人 Wnt1 多肽的氨基酸序列。

- [0077] SEQ ID NO:25 示出了人 Wnt2 多肽的氨基酸序列。
- [0078] SEQ ID NO:26 示出了人 Wnt2b 多肽的氨基酸序列。
- [0079] SEQ ID NO:27 示出了人 Wnt3 多肽的氨基酸序列。
- [0080] SEQ ID NO:28 示出了人 Wnt3a 多肽的氨基酸序列。
- [0081] SEQ ID NO:29 示出了人 Wnt4 多肽的氨基酸序列。
- [0082] SEQ ID NO:30 示出了人 Wnt5b 多肽的氨基酸序列。
- [0083] SEQ ID NO:31 示出了人 Wnt6 多肽的氨基酸序列。
- [0084] SEQ ID NO:32 示出了人 Wnt7b 多肽的氨基酸序列。
- [0085] SEQ ID NO:33 示出了人 Wnt8a 多肽的氨基酸序列。
- [0086] SEQ ID NO:34 示出了人 Wnt8b 多肽的氨基酸序列。
- [0087] SEQ ID NO:35 示出了人 Wnt9a 多肽的氨基酸序列。
- [0088] SEQ ID NO:36 示出了人 Wnt9b 多肽的氨基酸序列。
- [0089] SEQ ID NO:37 示出了人 Wnt10a 多肽的氨基酸序列。
- [0090] SEQ ID NO:38 示出了人 Wnt10b 多肽的氨基酸序列。
- [0091] SEQ ID NO:39 示出了人 Wnt11 多肽的氨基酸序列。
- [0092] SEQ ID NO:40 示出了人 Wnt16 多肽的氨基酸序列。
- [0093] SEQ ID NO:41-46 示出了寡聚核苷酸序列。

[0094] 详细描述

[0095] A. 概述

[0096] 虽然 Wnt 的翻译后脂化被认为是生物活性和蛋白分泌的需要,本发明提供新型 Wnt 多肽,其脂化氨基酸位点被改变使得不发生翻译后脂化。本发明的蛋白保留 Wnt 生物活性,并且本发明因此提供了具有改善的类生物药物性能,如增大的溶解性、产量和配方的修饰的 Wnt 组合物,以及该 Wnt 组合物的治疗用途。本发明提供了对由 Wnt 多肽的不溶性引起的问题的新的解决方案,并进一步地提供了适用于临床规模生产和治疗应用的包括融合多肽在内的创新的 Wnt 多肽。本发明的 Wnt 组合物的治疗用途包括,例如,促进组织形成、再生、修复和维持。

[0097] 除非有明确的相反指示,在本发明的实施采用化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、DNA 重组技术、遗传学、免疫学、细胞学的领域内常规方法,为了说明的目的,其中有许多在下面描述。这些技术在文献中有全面的解释。参见,例如, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, 2008 年 7 月修正); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); 和 Harlow and Lane, Antibodies, (Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1998).

[0098] 在此引用的所有的出版物、专利和专利申请据此通过引用将其整体并入本文。

[0099] B. 定义

[0100] 除另有定义, 本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域内普通技术人员所公知的相同含义。

[0101] 虽然本发明的实施和测试中可使用任何与本文中所描述的相似或等同的方法和材料, 但方法和材料的优选实施方式在本文中描述。为了本发明的目的, 下述术语做出如下定义。

[0102] 本文使用的冠词“一 (a)”和“一个 (an)”和“所述 (the)”指该冠词的语法对象为一个或多个 (即至少一个)。例如, “一元件 (an element)”指一个元件或多个元件。

[0103] 如本文所用, 术语“约”或“大约”指与参考的量、水平、值、数、频率、百分比、尺度、尺寸、数额、重量或长度相差多达 30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1% 的量、水平、值、数、频率、百分比、尺度、尺寸、数额、重量或长度。在具体实施方案中, 术语“约”或“大约”在数值前时是指该数值加或减 15%、10%、5% 或 1% 的范围。

[0104] 如本文所用, 术语“基本上”是指是参考值 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的量、水平、浓度、值、数、频率、百分比、尺度、尺寸、数额、重量或长度。例如, 基本上不含一种物质 (如去垢剂) 的组合物是 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 不含该指定物质, 或用常规方法无法测出该物质。类似的含义可应用于术语“不存在”, 其指不存在特定物质或组合物的组分。

[0105] 如本文所用, 术语“干细胞”是指这样的细胞: 该细胞是未分化的细胞, 其能够 (1) 长期自我更新, 或能够产生原始细胞的至少一个相同的拷贝, (2) 在单细胞水平上分化成多种, 并在某些情况下, 仅分化成一种特化的细胞类型, 以及 (3) 在体内功能性再生组织。干细胞根据其发育潜能被细分为全能性 (totipotent)、多潜能性 (pluripotent)、多能性 (multipotent) 和寡能性 / 单能性 (oligo/unipotent)。

[0106] 如本文所用, 术语“成体干细胞”是指在成熟有机体内发现的干细胞。成体干细胞包括, 但不限于, 外胚层干细胞、内胚层干细胞、中胚层干细胞、神经干细胞、造血干细胞、肌肉干细胞等。肌肉干细胞是传统上被认为时单能性的干细胞的例子, 仅产生肌肉细胞。

[0107] 如本文所用, 术语“卫星干细胞”是指一种产生如成肌细胞和肌细胞的肌源性谱系细胞的成体干细胞类型。

[0108] 如本文所用, 术语“祖细胞”是指具有自我更新和分化成更多成熟细胞的能力、但定向于某个谱系的细胞 (例如, 造血祖细胞定向于血液谱系), 而干细胞不必有这样的限制。成肌细胞是祖细胞的一个实例, 其可仅分化为一种类型的细胞, 但其本身不是完全成熟或完全分化的。成肌细胞可分化为肌细胞。

[0109] 如本文所用, 术语“肌细胞”或“肌纤维”是指肌肉中发现的一种分化的细胞类型。每个肌细胞包含肌原纤维, 所述肌原纤维是长链的肌小节, 而肌小节是肌肉细胞收缩单位。多种特化型肌细胞: 心肌细胞、骨骼肌细胞和平滑肌细胞, 具有本领域中已知的多种特性。

[0110] 如本文所用, 术语“自我更新”是指细胞具有产生没有改变的子细胞并产生特化的细胞类型的独特能力 (潜能)。自我更新可以通过两种方式实现。非对称细胞分裂产生一个与亲本细胞相同的子细胞和一个不同于亲本细胞并且是祖细胞或分化的细胞的子细胞。因此非对称细胞分裂并不增加与亲本细胞相同的子细胞的数量, 而是维持亲本细胞类型的

细胞数量。相比之下,对称细胞分裂产生两个均与亲本细胞相同的子细胞。因此对称细胞分裂增加与亲本细胞相同的细胞的数量,扩增亲本细胞群。在具体实施方式中,对称细胞分裂与“细胞扩增”互换使用。

[0111] 如本文所用,术语“分化”是指细胞由此特化为一种特定功能的发育过程,例如,细胞获得不同于原始细胞类型的一种或多种形态特征和 / 或功能。术语“分化”包括谱系定向和终末分化过程。例如,通过用免疫组织化学或本领域技术人员所知的其他方法评估或监测生物标记物的存在与否可评估未分化或分化状态。

[0112] 如本文所用,术语“谱系定向”是指干细胞定向形成特定受限范围的分化细胞类型的过程。谱系定向发生在,例如,干细胞在非对称细胞分裂过程中产生祖细胞时。定向祖细胞通常可自我更新或细胞分裂。

[0113] 如本文所用,术语“终末分化”是指细胞最终分化成为成熟、完全分化的细胞。通常地,终末分化伴随细胞周期的取消和增值停止。

[0114] 如本文所用,术语“肌肉肥大”是指肌肉尺寸的增加,以及可包括个体纤维体积的增加和 / 或肌纤维的横截面积的增加,而且还可包括每根肌纤维细胞核数量的增加。肌肉肥大还可包括整个肌肉体积和量的增加;然而,肌肉肥大可以与肌肉增生(其是肌纤维数量的增加)区别开。在一个实施方式中,肌肉肥大是指肌动蛋白和肌球蛋白收缩蛋白数量的增加。

[0115] 如本文所用,术语“促进”、“增强”、“刺激”或“增加”一般是指与由媒介物或对照分子 / 组合物引起的反应相比,本发明的 Wnt 组合物产生或引起更强生理反应(即,可测量的下游效应)的能力。一种此类可测量的生理反应包括,但不限于,与非对称细胞分裂相比对称干细胞分裂的增加,例如,与正常、未处理的、或对照处理的肌肉细胞相比卫星干细胞的增加、和 / 或增加的肌肉肥大。例如,生理反应可增加至少 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200% 或更高。在另一个非限制性的例子中,与正常、未处理的、或对照处理的肌肉相比,响应给予本发明的 Wnt 组合物的肌肉肥大可增加至少 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200% 或更高。“增加的”或“增强的”反应通常是“统计学上显著的”反应,并可以包括为由媒介物(不存在试剂)或对照组合物所产生反应的 1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30 倍或更多倍(如,500 倍、1000 倍)(包括两者之间和大于 1 的所有整数和小数、例如 1.5、1.6、1.7、1.8 等)的增加。

[0116] 如本文所用,术语“保留(retaining)”或“维持(maintaining)”,或“保留(retain)”或“维持(maintain)”一般是指本发明的 Wnt 组合物(即,修饰的 Wnt 组合物)产生或引起与天然存在 Wnt 氨基酸或核酸序列的 Wnt 组合物引起的反应性质相似的生理反应(即,可测量的下游效应)的能力。例如,本发明的 Wnt 组合物表现出 Wnt 生物活性,并因此保留 Wnt 活性。本发明的组合物还产生与天然存在 Wnt 多肽引起的反应性质相似的生理反应如肌肉肥大。引发相似生理反应的本发明的 Wnt 组合物可以引发这样的生理反应,该生理反应是包含天然存在 Wnt 氨基酸和核酸序列的组合物引发的生理反应水平的至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或约 100%。

[0117] 保留“天然存在 Wnt7a 活性”的修饰或改造的本发明的 Wnt7a 多肽是指具有降低

蛋白脂化的一个或多个氨基酸突变、添加、缺失和 / 或取代的修饰的 Wnt7a 多肽, 其中该多肽产生的生理反应是对应的天然存在 Wnt7a 多肽产生的生理反应的至少 100%、至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%、或至少 5% 生理反应。

[0118] 保留“天然存在 Wnt5a 活性”的修饰或改造的本发明的 Wnt5a 多肽是指具有降低蛋白脂化的一个或多个氨基酸突变、添加、缺失、和 / 或取代的修饰的 Wnt5a 多肽, 其中该多肽产生的生理反应是对应的天然存在 Wnt5a 多肽产生的生理反应的至少 100%、至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%、或至少 5% 生理反应。

[0119] 如本文所用, 术语“减少”或“减低”, 或“减轻”或“降低”或“减弱”通常是指与由媒介物或对照分子 / 组合物引起的反应相比, 本发明的 Wnt 组合物产生或引起更小的生理反应 (即下游的效应) 的能力, 例如减少细胞凋亡。在一实施方式中, 减少可以是通常与细胞活力降低相关的基因表达的降低或细胞信号转导的减少。“减少的”或“降低的”反应通常是“统计学上显著的”反应, 并可以包括为由媒介物 (不存在试剂) 或对照组合物产生的反应的 1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30 倍或更多倍 (例如, 500 倍, 1000 倍) (包括两者之间和大于 1 的所有整数和小数, 例如 1.5、1.6、1.7、1.8 等) 的降低。

[0120] C. Wnt 信号转导通路

[0121] Wnt 信号转导通路是古老的、进化的保守通路, 其在发育和整个成年时期中调节细胞命运决定、细胞迁移、细胞极性、神经模式和器官形成的重要方面。已鉴定的 Fz 受体下游的 Wnt 信号转导通路包括经典通路或 Wnt/ β -连环蛋白依赖型通路以及非经典通路或 β -连环蛋白非依赖型通路, 并可进一步划分为平面细胞极性、Wnt/ Ca^{2+} 通路和其他通路。

[0122] Wnt 蛋白结合佛力子 (Fz) 受体家族的细胞外半胱氨酸富集区 N 端, 在人类当中有十种 Fz。Fz 蛋白是与 G-蛋白偶联受体具有拓扑同源性的七次跨膜蛋白。此外, 对于 Wnt 和 Fz 间的相互作用, 还需要辅助受体来介导 Wnt 信号转导。例如, 需要低密度脂蛋白相关蛋白 5/6 (LRP5/6) 介导经典 Wnt 信号, 而可以需要受体酪氨酸激酶 RYK 介导非经典功能。Wnt 信号转导的另一调节水平出现在存在不同数量的分泌型 Wnt 拮抗剂的细胞外环境内。Wnt 结合受体复合物之后, 信号转导至细胞质磷蛋白散乱蛋白 (Dsh/Dvl)。Dsh 可直接与 Fz 相互作用。在 Dsh 水平上, Wnt 信号分为至少三个主要级联, 经典 (β -连环蛋白), 平面细胞极性和 Wnt/ Ca^{2+} 。进一步地, G-蛋白偶联受体信号转导还可刺激生长和存活通路, 如 PI3K。

[0123] 1. 经典 Wnt 信号转导通路

[0124] 经典 Wnt 信号转导通路最初在果蝇的遗传筛选中鉴定并描绘出, 并且在苍蝇、蠕虫、青蛙、鱼和小鼠中的深入研究已引起基本分子信号转导框架的鉴定。经典 Wnt 通路的特点是黏合连接相关蛋白 β -连环蛋白累积并易位至细胞核。缺乏 Wnt 信号转导时, 细胞质 β -连环蛋白被 β -连环蛋白降解复合物降解, 所述复合物包括 Axin、腺瘤性结肠息肉 (APC)、蛋白磷酸酶 2A (PP2A)、糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β) 和酪蛋白激酶 1 α (CK1 α)。 β -连环蛋白被该复合物内的 CK1 α 和 GSK3 β 磷酸化, 导致其被泛素化以及随后由蛋白酶体机制蛋白水解破坏。Wnt 与其由 Fz 和 LRP5/6 组成的受体复合物的结合诱导 CK1 和 GSK3- β 对 LRP6 的双重磷酸化, 并且这容许包含 Axin 的蛋白复合物从细胞溶质易位至质膜。Dsh 也补充至质膜并结合 Fz, 并且 Axin 结合磷酸化的 LRP5/6。在 Fz/LRP5/6 的质膜处

形成的该复合物通过 Axin 的隔离和 / 或降解诱导 β -连环蛋白的稳定化。 β -连环蛋白易位至细胞核,在这里其与 Lef/Tcf 家族成员复合以介导靶基因的转录诱导。

[0125] 经典 Wnt 信号转导影响前头结构和神经外胚层模式的形成、尾部模式和尾巴形成,还影响多种器官系统包括心脏、肺、肾脏、皮肤以及骨骼的形成。

[0126] 可通过经典 Wnt 信号转导通路信号转导的 Wnt 包括但不限于:Wnt1、Wnt2、Wnt2b/13、Wnt3、Wnt3a、Wnt8、Wnt8a、Wnt8b、Wnt10a、Wnt10b、和 Wnt16。

[0127] 2. 非经典 Wnt 信号转导通路

[0128] 非经典通路通常被称为 β -连环蛋白非依赖型通路。该通路可进一步划分为至少两个不同分支,平面细胞极性通路(或 PCP 通路)和 Wnt/Ca²⁺ 通路,其中本文仅进一步详细通论 PCP。PCP 通路出自果蝇的遗传研究,其中包括佛力子和散乱蛋白的 Wnt 信号转导组分中的突变被发现使包括角质毛发(cuticle hair)和感觉鬃的上皮结构的定位随机化。已知上皮中的细胞拥有确定的顶端-基底外侧极性,但是,另外,其还沿着上皮层表面极化。这种严格的组织性支配包括毛囊、感觉鬃和眼睛内小眼的六角形排列在内的结构的定向。在脊椎动物里,这种组织性已被证明引起肌肉细胞、内耳感觉上皮内的立体纤毛的组建和定向、毛囊的组建、和经历原肠胚形成的背部中胚层细胞的形态和迁移行为。

[0129] Wnt 信号转导通过不依赖于 Fz 的 LRP5/6 转导,导致 Dsh 激活。Dsh 通过 Daam1 介导 Rho 的激活,Rho 依次激活 Rho 激酶(ROCK)。Daam1 还通过肌动蛋白结合蛋白抑制蛋白(Profilin)介导肌动蛋白聚合。Dsh 还介导 Rac 激活,Rac 依次激活 JNK。来自 Rock、JNK 和抑制蛋白中的信号转导整合在一起,用于原肠胚形成过程中细胞极性和运动的细胞骨架变动。

[0130] 可通过非经典 Wnt 信号转导通路信号转导的 Wnt 包括但不限于:Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b 和 Wnt11。

[0131] 3. 肌肉细胞发育中的 Wnt 信号转导

[0132] 卫星干细胞是产生肌肉细胞的成体干细胞。成体骨骼肌内的卫星细胞位于其宿主肌细胞的肌纤维膜和基膜间的小凹陷中。损伤,如,物理创伤、重复锻炼、或患病时,卫星细胞变为激活的、增殖的并产生表达成肌调节因子(MRF) MyoD 和 Myf5 的成肌前体细胞(成肌细胞)群。在再生过程期间,成肌细胞在定向至终末分化、融合宿主纤维或产生新肌纤维以重建损伤组织前经历多轮分裂(Charge and Rudnicki, 2004)。骨骼肌再生期间,卫星细胞群由干细胞亚群体维持,由此允许个体寿命期间的组织平衡和多轮再生(Kuang et al., 2008)。卫星干细胞(Pax7+/Myf5-)占成体卫星细胞库的约 10%,并通过不对称的顶-底细胞分裂产生子卫星成肌细胞(Pax7+/Myf5+)。

[0133] Wnt 信号转导在调节胚胎发育期间的发育程序、以及调节成体组织的干细胞功能中扮演重要角色(Clevers, 2006)。Wnt 在轴旁中胚层的胚胎成肌诱导中是必需的(Borello et al., 2006; Chen et al., 2005; Tajbakhsh et al., 1998),在肌纤维发育过程的分化控制中也是必需的(Anakwe et al., 2003)。近年来,Wnt 平面细胞极性(PCP)通路已涉及调节发育肌节中肌细胞生长的方向(Gros et al., 2009)。在成人中,Wnt 信号转导被认为是急性损伤后肌肉组织中的成体干细胞的成肌定向所必需的(Polesskaya et al., 2003; Torrente et al., 2004)。其他的研究表明 Wnt/ β -连环蛋白信号转导通过储存成肌细胞的激活和补充调节成肌分化(Rochat et al., 2004)。此外,成体肌肉中卫星细胞内的 Wnt/ β -连环蛋

白信号转导似乎通过限制 Notch 信号转导并由此促进分化来控制成肌谱系的进展 (Brack et al., 2008)。

[0134] 近年来,确定了 Wnt 受体 Fzd7 在休眠卫星干细胞中明显地上调。另外,进一步的研究显示出 Wnt7a 在肌肉再生中表达并通过其受体 Fzd7 和 Vangl2 (平面细胞极性 (PCP) 通路的组分) 起作用,从而诱导对称卫星干细胞扩增并显著增强细胞再生。

[0135] PCP 通路中受体或效应分子,例如 Fzd7 或 Vangl2 的抑制,被认为是在卫星干细胞上取消 Wnt7a 的效应 (Le Grand et al., 2009)。进一步证实,给予脂化的 Wnt7a 多肽、或编码 Wnt7a 多肽的多聚核苷酸 (其随后通过脂化进行翻译后修饰),在体外和体内显著增加卫星干细胞数量,并促进体内组织形成,导致受伤的和患病的肌肉组织中增强的修复和再生 (Le Grand et al., 2009)。

[0136] 不希望受任何具体的理论限制,可以考虑到,导致受伤的和患病的肌肉组织中增强的修复和再生的 Wnt7a 作用机制有两条路:Wnt7a 通过 PCP 通路可以刺激肌肉卫星(干)细胞的对称扩增,导致可随后分化为成肌细胞的更大的细胞库;以及,第二,经 G 蛋白偶联受体 (Frizzled) 的 Wnt7a 信号转导可刺激成肌细胞和肌纤维中磷脂酰肌醇 3- 激酶 / Akt (蛋白激酶 B) / 哺乳动物类雷帕霉素靶标 (PI3K/Akt/mTOR) 通路信号转导,并显示为刺激肥大 (Bodine et al., Nature Cell Biology. 2001;vol. 3;pp. 1014-1017;Glass et al., Nature Cell Biology. 2003;vol. 5;pp. 87-90;Ciciliot and Schiaffino, Current Pharmaceutical Design. 2010;16(8);pp. 906-914)。Wnt7a 可通过 G- 蛋白偶联受体 Frizzled7 信号转导,并且该 Wnt/Frz 相互作用可有助于两种生物效应。

[0137] 在多种实施方式中,本发明某种程度上涉及使用包含一种或多种修饰的 Wnt 的 Wnt 组合物来修复和再生受伤肌肉组织,所述 Wnt 通过非经典 Wnt 信号转导通路信号转导。在具体实施方式中,本发明的组合物包含选自以下的修饰的、非经典 Wnt :Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b 和 Wnt11。在优选实施方式中,本发明的组合物包含修饰的 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽。在另一优选实施方式中,本发明的组合物包含缺少一个或多个脂化位点的修饰的 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽。

[0138] 在某些实施方式中,本发明的组合物包括融合多肽,该融合多肽包含天然的、异源的、或杂合的信号肽和非经典 Wnt 多肽 (任选缺乏一个或多个脂化位点)。

[0139] 虽然已描述了 PI3K/Akt/mTOR 通路对肌肉细胞肥大的重要性,但在肌肉细胞中特异地刺激该通路的治疗挑战成为在受伤的和患病的肌肉组织中增强修复和再生的显著障碍。如 IGF-1 的有效 PI3- 激酶激活剂的早期研究产生体外肥大,但存在“脱靶”代谢效应的可能 (即, IGF-1 和 PI3K 是管家代谢、存活和代谢过程的关键调节剂)。因此,非经典 Wnt 通路的肌肉特异性刺激的潜力,如, PI3K/Akt/mTOR 通路的 Wnt7a-Fzd7 刺激,会表现出重要且独特的治疗突破。

[0140] 如下进一步描述的,本发明部分涉及创造性的 Wnt 组合物,其为 Wnt 组合物增强受伤的和患病的肌肉组织中的修复和再生的治疗用途的这一技术困难和其它障碍提供意想不到的方案。

[0141] D. 多肽

[0142] Wnt 信号转导通路是细胞信号转导网络的关键组分。人 Wnt 基因家族由 19 个成员构成,编码具有 22 或 24 个 Cys 残基和数个保守 Asn 和 Ser 残基的进化保守的糖蛋白。示

例性人 Wnt 蛋白包括 Wnt1、Wnt2、Wnt2b/13、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11 和 Wnt16。

[0143] Wnt 是分泌型糖蛋白,在转运前被高度修饰并释放如细胞外环境。信号序列切割并易位至内质网(ER)中后,Wnt 通过内膜系统转运至细胞表面并经历多次修饰。Wnt 经历 N-连接糖基化(Burrus and McMahon 1995;Kadowaki et al.,1996;Komekado et al.,2007;Kurayoshi et al.,2007;Mason et al.,1992;Smolich et al.,1993;Tanaka et al.2002)。许多 Wnt 还在第一保守半胱氨酸处棕榈酰化,例如,Wnt1 中的 C93、Wnt3a 中的 C77、和 Wnt5a 中的 C104(Galli et al.,2007;Kadowaki et al.,1996;Komekado et al.,2007;Willert et al.2003)。此外,Wnt3a 在保守丝氨酸处(S209)用棕榈油酸修饰,这还被 Wnt1(S224)Wnt5a 保留(Takada et al.,2006)。而且,这些保守半胱氨酸和丝氨酸残基存在于很多 Wnt 中,例如,Wnt1、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt6、Wnt7a、Wnt9a、wnt10a 和 Wnt11 等(Takada et al.,2006;还参见图 1)。

[0144] 普遍认为 Wnt 酰化造成分泌型 Wnt 的普遍疏水的特性(Willert et al.,2003)。另外,哺乳动物类 Wnt 的翻译后脂化被认为是对功能至关重要。Wnt1、Wnt3a、或 Wnt5a 的保守 N-端半胱氨酸的突变阻止了细胞培养物中的棕榈酰化。这些突变 Wnt 是分泌的但显示出很少或无信号转导活性(Galli et al.,2007;Komekado et al.,2007;Kurayoshi et al.,2007;Willert et al.,2003),并且未棕榈酰化的 Wnt 被认为不可结合 Fz 受体(Komekado et al.,2007;Kurayoshi et al.2007)。突变 Wnt3a 中心部分保守的丝氨酸阻止了棕榈油酸添加并阻塞分泌和因此的活性(Takada et al.,2006)。果蝇 Wg 的研究确认了酰化的重要性(Franch-Marro et al.,2008a;Nusse2003;van den Heuvel et al.,1993)。

[0145] 进一步地,这些数据通过显示 Wg 信号转导强损失的果蝇刺猬(porc)表型得以支持(van den Heuvel et al.,1993)。Porc 是 Wg 棕榈酰化(Zhai et al.,2004)和 Wg ER 输出(Tanaka et al.,2002)所需的 ER-定位的整合膜 O-酰基转移酶(Kadowaki et al.,1996)。脊椎动物 Porc 还提升 Wnt 脂化并且是 Wnt 信号转导和 Wnt 生物活性所需的(Galli et al.,2007)。

[0146] 这些研究建立了这样的模型,其中棕榈油酸修饰是分泌和棕榈酸酯结合 Fz 所需的。因此,缺少一个或者全部这些脂质修饰的 Wnt 多肽预期将缺乏生物活性。

[0147] 在多种实施方式中,本发明部分涉及被修饰或改造以降低或移除经典脂化位点但出乎意料地保留 Wnt 生物活性的 Wnt 多肽。在具体实施方式中,本发明的 Wnt 多肽促进细胞扩增和肌肉肥大,并促进组织形成、再生、维持和修复。如本文所用,结合氨基酸序列使用的术语“经典”是指天然存在多肽中存在的一个氨基酸或一组氨基酸。在一些情况下,在指示天然存在多肽中存在的氨基酸时,“经典”与“天然”可互换使用。

[0148] 在某些实施方式中,修饰或改造 Wnt 多肽使之缺少用于 Wnt 多肽脂化的一个或多个天然氨基酸。在某些具体实施方式中,修饰或改造 Wnt 多肽使之缺少用于 Wnt 多肽脂化的所有天然氨基酸。在一些实施方案中,Wnt 多肽是非经典 Wnt 多肽,即一种通过非经典 Wnt 信号转导通路信号转导的 Wnt 多肽。在具体实施方式中,非经典 Wnt 选自:Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b 和 Wnt11。在优选实施方式中,Wnt 多肽是本文所述的缺少经典或天然脂化位点但保持或具有增加的经典和/或非经典 Wnt 信号转导活性的修饰或改造的 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽。

[0149] 如上所述,在一些实施方式中,本发明使用本领域已知的和可用的技术提供组合物,其包含改造的 Wnt 多肽或编码该改造的 Wnt 多肽的多聚核苷酸。在具体实施方案中,Wnt 多肽改造为移除一个或多个、或所有脂化位点。

[0150] 如本文所用,除有相反的说明外,术语“多肽”、“肽”和“蛋白”可互换使用,并且根据常规含义,即为,肽键或修饰肽键连接的氨基酸的序列。在具体实施方式中,术语“多肽”包括融合多肽。多肽不限于特定长度,如其可包括全长蛋白序列或全长蛋白的片段,并且可包括多肽的翻译后修饰,例如,糖基化、酰基化、磷酸化等,也包括本领域公知的、天然存在和非天然存在的其他修饰。本发明的多肽可通过多种公知的重组和 / 或合成技术制备,例证将在下面进一步讨论。然而,在具体实施方式中,本发明的 Wnt 多肽被改造,使得它们具有移除或消除 Wnt 多肽上的一个、两个或更多个或全部脂化位点的一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、或突变。在某些实施方式中,Wnt 多肽是非经典 Wnt 多肽,即,通过非经典 Wnt 信号转导通路信号转导的 Wnt 多肽。

[0151] 在多种实施方式中,Wnt 多肽选自:Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b 和 Wnt11,其中 Wnt 多肽通过如氨基酸取代、缺失或突变缺少一个或更多个或全部脂化位点。在优选实施方式中,Wnt 多肽是通过如氨基酸取代、缺失、或突变缺少一个或更多个或全部脂化位点的 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽。

[0152] 如本文所用,术语“非经典 Wnt 多肽”是指通常或主要通过非经典 Wnt 信号转导通路信号转导的 Wnt 多肽。示例性非经典 Wnt 多肽包括但不限于:Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b 和 Wnt11。在一些实施方式中,术语“非经典 Wnt 多肽”是指具有这样序列的修饰或改造的非经典 Wnt 多肽,该序列与天然存在的非经典 Wnt 多肽序列至少约 70%、更优选约 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或约 100% 一致。可在超过至少约 10、25、50、100、200、300 或更多个连续氨基酸上评估一致性,或者可在序列全长上评估一致性。确定一致性 % 或同源性 % 的方法是本领域公知的并可被用于该目的的任何适当的方法。非经典 Wnt 多肽的示例在 SEQ ID Nos:2-13 和 15-23、29-32 和 39 中示出。

[0153] 如本文所用,术语“Wnt7a 多肽”是指具有相应于野生型 Wnt7a 序列的多肽序列的 Wnt7a 蛋白。在一些实施方式中,术语“Wnt7a 多肽”是指具有的序列与天然存在的 Wnt7a 序列至少约 70%、更优选约 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或约 100% 一致的修饰或改造的 Wnt7a 多肽。可在超过至少约 10、25、50、100、200、300 或更多个连续氨基酸上评估一致性,或者可在序列全长上评估一致性。Wnt7a 多肽的示例在 SEQ ID Nos:2-13 中示出。

[0154] 如本文所用,术语“Wnt5a 多肽”是指具有相应于野生型 Wnt5a 序列的多肽序列的 Wnt5a 蛋白。在一些实施方式中,术语“Wnt5a 多肽”是指具有的序列与天然存在的 Wnt5a 序列至少约 70%、更优选约 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或约 100% 一致的修饰或改造的 Wnt5a 多肽。可在超过至少约 10、25、50、100、200、300 或更多个连续氨基酸上评估一致性,或者可在序列全长上评估一致性。Wnt7a 多肽的示例在 SEQ ID Nos:15-23 中示出。

[0155] 如本文所用,术语“修饰的 Wnt 多肽”、“修饰或改造的 Wnt 多肽”和“改造的 Wnt 多肽”可交换使用,是指包含一个或多个氨基酸突变、增加、缺失或取代的 Wnt 多肽、其生物活性片段或变体、或其同源物、旁系同源物或直系同源物。在本发明的具体实施方式中,为了

防止 Wnt 多肽脂化但还得到保持 Wnt 生物活性的 Wnt 多肽,修饰的 Wnt 多肽包含保守脂化位点的一个或多个氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代。在具体实施方式中,修饰的 Wnt 多肽缺少一个或多个或所有脂化位点但保持 Wnt 活性。优选地,本发明的修饰的 Wnt 多肽保持至少 100%、至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%、或至少 5% 的天然存在 Wnt 的活性。

[0156] 如本文所用,术语“修饰的非经典 Wnt 多肽”、“修饰或改造的非经典 Wnt 多肽”和“改造的非经典 Wnt 多肽”可交换使用,是指包含一个或多个氨基酸突变、增加、缺失或取代的非经典 Wnt 多肽、其生物活性片段或变体、或其同源物、旁系同源物或直系同源物。在本发明的具体实施方式中,为了防止非经典 Wnt 多肽脂化但还得到保持非经典 Wnt 生物活性的非经典 Wnt 多肽,例如通过非经典 Wnt 通路信号转导,修饰的非经典 Wnt 多肽包含保守脂化位点的一个或多个氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代,。在具体实施方式中,修饰的非经典 Wnt 多肽缺少一个或多个或所有脂化位点但保持非经典 Wnt 活性。优选地,本发明的修饰的非经典 Wnt 多肽保持至少 100%、至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%、或至少 5% 的天然存在非经典 Wnt 的活性。

[0157] 如本文所用,术语“修饰的 Wnt7a 多肽”、“修饰或改造的 Wnt7a 多肽”和“改造的 Wnt7a 多肽”可交换使用,是指包含一个或多个氨基酸突变、增加、缺失或取代的 Wnt7a 多肽、其生物活性片段或变体、或其同源物、旁系同源物或直系同源物。在本发明的具体实施方式中,为了防止 Wnt7a 多肽脂化但还得到保持或增加 Wnt7a 生物活性的 Wnt7a 多肽,修饰的 Wnt7a 多肽包含保守脂化位点的一个或多个氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代。在具体实施方式中,修饰的 Wnt7a 多肽缺少一个或多个或所有脂化位点但保持 Wnt 生物活性。优选地,本发明的 Wnt7a 多肽变体保持至少 100%、至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%、或至少 5% 的天然存在 Wnt7a 的活性。修饰的 Wnt7a 多肽的示例在 SEQ ID No:3-5 和 12-13 中示出。

[0158] 如本文所用,术语“修饰的 Wnt5a 多肽”、“修饰或改造的 Wnt5a 多肽”和“改造的 Wnt5a 多肽”可交换使用,是指包含一个或多个氨基酸突变、增加、缺失或取代的 Wnt5a 多肽、其生物活性片段或变体、或其同源物、旁系同源物或直系同源物。在具体实施方式中,为了防止 Wnt5a 多肽脂化但还得到保持或增加 Wnt5a 生物活性的 Wnt5a 多肽,本发明的修饰的 Wnt5a 多肽包含保守脂化位点的一个或多个氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代。在具体实施方式中,修饰的 Wnt5a 多肽缺少一个或多个或所有脂化位点但保持 Wnt 生物活性。优选地,本发明的 Wnt5a 多肽变体保持至少 100%、至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%、或至少 5% 的天然存在 Wnt5a 的活性。修饰的 Wnt5a 多肽的示例在 SEQ ID No:16-18 中示出。

[0159] 在具体实施方式中,本发明的修饰的 Wnt 多肽包含减少或阻止多肽脂化的氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代,但该多肽具有 Wnt 生物活性。在具体实施方式中, Wnt 多肽是在表 1 中确定的一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代的经典 Wnt 多肽,其中氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代防止确定位置的脂化,并且其中经典 Wnt 多肽保持或增加经典 Wnt 生物活性水平。

[0160] 表 1

[0161]

Wnt	AA 位置	Ref. SEQ ID
Wnt1	93;224	24
Wnt2	76;212	25
Wnt2b	88;224	26
Wnt3	80;212	27
Wnt3a	77;209	28
Wnt8a	54;186	33
Wnt8b	54;186	34
Wnt9a	93;221	35
Wnt9b	89;216	36
Wnt10a	96;268	37
Wnt10b	83;253	38
Wnt16	81;227	40

[0162] 在具体实施方式中, Wnt 多肽是在表 2 中确定的一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代的非经典 Wnt 多肽, 其中氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代防止确定位置的脂化, 并且其中非经典 Wnt 多肽保持或增加非经典 Wnt 生物活性水平。

[0163] 表 2

[0164]

Wnt	AA 位置	Ref. SEQ ID
Wnt4	78;212	29
Wnt5a	104;244	15
Wnt5b	83;223	30
Wnt6	76;228	31
Wnt7a	73;206	2
Wnt7b	73;206	32
Wnt11	80;215	39

[0165] 在具体实施方式中,Wnt 多肽是在氨基酸 73 和 / 或 206 处包含防止在该位置发生脂化的氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代的 Wnt7a 多肽,其中该 Wnt7a 多肽保持或增加 Wnt7a 生物活性水平。在一个实施方式中,多肽是在氨基酸第 73 位包含防止在该位置发生脂化的氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代的 Wnt7a 多肽,其中该 Wnt7a 多肽保持或增加 Wnt7a 生物活性水平。在一些实施方式中,本发明的 Wnt 多肽是在氨基酸第 206 位包含防止在该位置发生 Wnt7a 脂化的氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代的 Wnt7a 多肽,其中该 Wnt7a 多肽保持或增加 Wnt7a 生物活性水平。在一些实施方式中,多肽是在氨基酸第 73 位和第 206 位包含氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代的 Wnt7a 多肽,其中该 Wnt7a 多肽缺乏翻译后脂化并具有 Wnt 生物活性。

[0166] 在某些实施方式中,Wnt7a 多肽的 C73 和 / 或 S206 是 Ala 或另一氨基酸取代的以防止这些残基脂化。在其他实施方式中,突变或缺失 C73 和 / 或 S206 以防止这些残基的脂化,例如,SEQ ID Nos:3-5。在一些实施方式中,C73 和 S206 被 Ala 取代,并且本发明的 Wnt7a 多肽缺少脂化位点并保持一些 Wnt 生物活性水平,如,SEQ ID NO:5。

[0167] 在具体实施方式中,Wnt 多肽是在氨基酸 104 和 / 或 244 处包含防止在该位置发生脂化的氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代的 Wnt5a 多肽,其中该 Wnt5a 多肽保持或增加 Wnt5a 生物活性水平。在一个实施方式中,多肽是在氨基酸第 104 位包含防止在该位置发生脂化的氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代的 Wnt5a 多肽,其中该 Wnt5a 多肽保持或增加 Wnt5a 生物活性水平。在一些实施方式中,本发明的 Wnt 多肽是在氨基酸第 244 位包含防止在该位置发生 Wnt5a 脂化的氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代的 Wnt5a 多肽,其中该 Wnt5a 多肽保持或增加 Wnt5a 生物活性水平。在一些实施方式中,多肽是在氨基酸第 104 位和第 244 位包含氨基酸突变、增加、缺失、和 / 或取代的 Wnt5a 多肽,其中该 Wnt5a 多肽缺乏翻译后脂化并具有 Wnt 生物活性。

[0168] 在某些实施方式中,Wnt5a 多肽的 C104 和 / 或 S244 是 Ala 或另一氨基酸取代的以防止这些残基脂化。在其他实施方式中,突变或缺失 C104 和 / 或 S244 以防止这些残基的脂化,例如,SEQ ID Nos:16-18。在一些实施方式中,C104 和 S244 被 Ala 取代,并且本发明的 Wnt5a 多肽缺少脂化位点并保持一些 Wnt 生物活性水平,如,SEQ ID NO:18。

[0169] 如本文所用,术语“天然存在”是指在自然界中可以找到的多肽或多聚核苷酸序列。例如,天然存在多肽或多聚核苷酸序列是有机体中存在的,并且可以从有机体中分离的,并且没有在实验室中被人为有意修饰的。术语“野生型”通常与术语“天然存在”可互换使用。

[0170] 在本发明的上下文中,多肽、其生物活性片段或变体、或其同源物、旁系同源物或直系同源物在表现出约 10%、20%、30%、40% 或 50% 的野生型蛋白活性,优选至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、或至少 80% 的野生型蛋白活性时,认为其与野生型蛋白具有至少大体上相同的活性。在具体实施方式中,多肽、其生物活性片段或变体、或其同源物、旁系同源物或直系同源物表现出至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、或至少 100% 的野生型蛋白活性。在某些实施方式中,可获得大于野生型活性的活性。如 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽的非经典 Wnt 多肽、其生物活性片段或变体、或其同源物、旁系同源物或直系同源物的活性,例如,可通过如刺激 Wnt 信号转导通路,如促进对称干细胞扩增或细胞生长以测量其模拟野生型 Wnt 生物活性的能力,并与野生型蛋白活性的能力对比来确定。测量

和表征干细胞分裂（如卫星干细胞分裂）和细胞生长（如肌肉肥大）的方法是本领域内已知的。

[0171] 如本文所用，应用于参考多聚核苷酸或多肽序列的片段的术语“生物活性片段”是指具有至少约 5、10、15、20、25、30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100、110、120、150、200、300、400、500、600、700、800、900、或 1000% 或更多的 Wnt 参考序列的生物活性（如刺激其 Wnt 信号转导通路的生物活性）的修饰的 Wnt 多肽的片段。本发明的某些实施方式部分涉及长度为至少约 20、50、100、150、200、250、或 300 个（包括其间所有整数）连续氨基酸残基的修饰的 Wnt 多肽的生物活性片段或编码这些片段的多聚核苷酸序列，其包括或编码具有参考 Wnt 多肽（如天然存在的 Wnt 多肽）的生物活性的多肽。

[0172] 修饰的多肽包括多肽变体。本文所用的术语“变体”是指如本文他处所述和本领域所知的，通过修饰、增加、缺失、或取代至少一个氨基酸残基而区别于参考多肽的多肽。在某些实施方式中，多肽变体是通过一个或多个氨基酸取代（例如，1、2、3、4、5 或更多取代）而区别于参考多肽，所述取代可以是保守的或非保守的。例如，在多种实施方式中，可在靶向于天然存在 Wnt 多肽脂化的任何氨基酸残基中进行一个或多个保守或非保守取代。

[0173] 在其他具体实施方式中，与天然存在的 Wnt 多肽相比，为了防止脂化、增加 Wnt 通路信号转导活性、和 / 或增加修饰的 Wnt 多肽的稳定性，Wnt 多肽变体包含一个或多个氨基酸的增加、缺失、或取代。

[0174] 在其他具体实施方式中，与天然存在的非经典多肽相比，为了防止脂化、增加 Wnt 通路信号转导活性、和 / 或增加修饰的 Wnt 多肽的稳定性，非经典 Wnt 多肽变体包含一个或多个氨基酸的增加、缺失或取代。

[0175] 在其他具体实施方式中，与天然存在的 Wnt7a 多肽相比，为了防止脂化、增加 Wnt 通路信号转导活性、和 / 或增加修饰的 Wnt 多肽的稳定性，Wnt7a 多肽变体包含一个或多个氨基酸的增加、缺失或取代。

[0176] 在其他具体实施方式中，与天然存在的 Wnt5a 多肽相比，为了防止脂化、增加 Wnt 通路信号转导活性、和 / 或增加修饰的 Wnt 多肽的稳定性，Wnt5a 多肽变体包含一个或多个氨基酸的增加、缺失或取代。

[0177] 为了产生此类变体，例如，本领域技术人员可根据如表 3 改变一个或多个编码 DNA 序列的密码子。

[0178] 表 3 氨基酸密码子

[0179]

氨基酸	密码子					
丙氨酸	GCA	GCC	GCG	GCU		
半胱氨酸	UGC	UGU				
天冬氨酸	GAC	GAU				
谷氨酸	GAA	GAG				
苯基丙氨酸	UUC	UUU				
甘氨酸	GGA	GGC	GGG	GGU		
组氨酸	CAC	CAU				
异亮氨酸	AUA	AUC	AUU			
赖氨酸	AAA	AAG				
亮氨酸	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
蛋氨酸	AUG					
天冬酰胺	AAC	AAU				
脯氨酸	CCA	CCC	CCG	CCU		
谷氨酰胺	CAA	CAG				
精氨酸	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
丝氨酸	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
苏氨酸	ACA	ACC	ACG	ACU		
缬氨酸	GUA	GUC	GUG	GUU		
色氨酸	UGG					
酪氨酸	UAC	UAU				

[0180] 决定可取代、插入、或缺失哪些氨基酸残基而不去除生物或免疫活性的指导可利用本领域公知的计算机程序获得,例如 DNASTAR™ 软件。若需要,可进行氨基酸取代,以从多肽中改变和 / 或移除功能基团。或者,本文所述的蛋白变体中氨基酸的改变可以为保守氨基酸改变,即带相似电荷的氨基酸或或不带电荷的氨基酸的取代。保守氨基酸的改变涉及与其侧链相关的氨基酸家族之一的取代。天然存在的氨基酸大体上分为四个家族:酸性(天冬氨酸、谷氨酸)、碱性(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、非极性(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯基丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)和无电荷极性(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)氨基酸。苯基丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时共同分类为芳香族氨基酸。详见表 4。

[0181] 表 4 保守氨基酸取代基

[0182]

原残基	保守取代
Ala(A)	Gly;Ser

Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln;His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala;Pro
His (H)	Asn;Gln
Ile (I)	Leu;Val
Leu (L)	Ile;Val
Lys (K)	Arg;Gln;Glu
Met (M)	Leu;Tyr;Ile
Phe (F)	Met;Leu;Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe
Val (V)	Ile;Leu

[0183] 其他取代也是可允许的,并且可根据经验或根据其他已知保守(或非保守)取代确定。

[0184] 在做出这些改变时,可能需要考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指数在赋予蛋白相互作用生物功能中的重要性被本领域普遍认可 (Kyte and Doolittle, 1982, 在此通过引用并入本文)。本领域公知的是,某些氨基酸可被具有相似亲水指数或分数的其他氨基酸取代,并仍得到带有相似生物活性的蛋白,即,仍获得生物功能等同的蛋白。在做出该改变时,取代的氨基酸的亲水指数优选是 ± 2 以内,更优选的是 ± 1 以内,并更优选的是 ± 0.5 以内。本领域还公知,相似氨基酸的取代可根据亲水性有效实施。

[0185] 本发明的多肽的变体包括糖基化形式、与其他分子的聚合偶联物、和与无关化学部分(如,聚乙二醇化分子)的共价偶联物。如本领域公知,共价变体可通过将官能团与氨基酸链或 N-端或 C-端残基所见的基团连接来制备。变体还包括等位基因变体、物种变体、和

突变蛋白。不影响蛋白功能活性的区域截短或缺失也是变体。

[0186] 本发明多肽中功能必要的氨基酸可通过本领域公知的方法鉴别,例如,位点定向诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham and Wells, Science244:1081-1085, 1989)。对配体受体结合至关重要的位点也可通过如结晶、核磁共振或光亲和标记的结构分析确定 (Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992 and de Vos et al. Science255:306-312, 1992)。

[0187] 某些改变并不显著影响蛋白的折叠或活性。本领域技术人员将进行的氨基酸取代的数量取决于很多因素,包括上述的那些因素。一般而言,任何给定多肽的取代数量不会超过 50、40、30、25、20、15、10、5 或 3。

[0188] 此外,多肽和 / 或突变蛋白的聚乙二醇化预计提供改进的性能,如,增加的半衰期、溶解性、和蛋白酶抗性。聚乙二醇化是本领域公知的。

[0189] E. 融合多肽

[0190] 在多种实施方式中,本发明部分涉及融合多肽、和编码融合多肽的多聚核苷酸。在一个实施方式中,融合多肽包含修饰的 Wnt 多肽、生物活性 Wnt 多肽片段、和 / 或进一步包含本文他处记载的一个或多个氨基酸突变、取代、和 / 或增加的此类肽。在具体实施方式中,融合多肽包含选自以下的非经典 Wnt 多肽:Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b 和 Wnt11。在优选实施方式中,Wnt 多肽是本文所述的缺乏经典或天然脂化位点但保持或增加 Wnt 信号转导活性的修饰的或改造的 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽。

[0191] 融合多肽可在蛋白 N 端包含信号肽,其在翻译的同时和翻译后指导 Wnt 多肽的转移。融合多肽还可包含接头或间隔区、一个或多个蛋白酶切割位点、一个或多个表位标签或便于多肽合成、纯化或产生的其他序列。

[0192] 融合多肽和融合蛋白是指直接或通过氨基酸接头被共价连接至一个或多个异源多肽序列(融合伴侣)的本发明的多肽。形成融合蛋白的多肽通常是 C- 端与 N- 端连接的,尽管其也可也是 C- 端与 C- 端、N- 端与 N- 端、或 N- 端与 C- 端连接的。融合蛋白的多肽可以为任何顺序。

[0193] 只要融合伴侣不会不利影响所需的多肽活性,可设计和包括基本上用于期望的任何目的的融合伴侣。例如,在一个实施方式中,可选出融合伴侣以便增加蛋白的溶解性或稳定性、促进 Wnt 多肽的制备和 / 或纯化、和 / 或促进 Wnt 的系统递送和 / 或组织摄入。融合多肽可通过化学合成方法或通过两个部分间的化学键合产生,或者可通常用其他标准技术制备。在一个实施方式中,Wnt 融合蛋白包含以下的一个或多个、或全部:信号肽、Wnt 多肽,如,为 Wnt5a 或 Wnt7a 的非经典 Wnt、或其生物活性片段、蛋白酶切割位点、和表位标签。

[0194] 如本文所用,术语“信号肽”是指确保进入分泌通路的前导序列。为了分泌蛋白的工业生产,产生的蛋白需要从宿主细胞或宿主体中有效分泌。信号肽可以是,如待产生的蛋白的天然信号肽、异源信号肽、或天然和异源信号肽的杂合体。很多信号肽用于制备分泌蛋白。

[0195] 因此,在多种实施方式中,本发明涉及促进 Wnt 多肽(包括如 Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b 和 Wnt11 的非经典 Wnt 多肽)产生和分泌的方法,其包括在如哺乳动物、昆虫、或细菌的细胞内表达具有信号肽和如本文所述的被修饰或改造而缺少经典或天然脂化位点的非经典 Wnt 多肽(其中该多肽保持或增加经典和 / 或非经典 Wnt 信号转导活性)的融合多肽。在优选实施方式中,促进 Wnt5a 或 Wnt7a 的产生和分泌的方法包括,在细胞内

表达融合多肽,其具有信号肽和如本文所述的被修饰或改造而缺少经典或天然脂化位点但却保持或增加经典和 / 或非经典 Wnt 信号转导活性的 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽。

[0196] 用于本发明的融合多肽中的信号肽的示例包括但不限于:CD33 信号肽;如 IgG κ 信号肽或 IgG μ 信号肽的免疫球蛋白信号肽;生长激素信号肽;红细胞生成素信号肽;白蛋白信号肽;分泌型碱性磷酸酶信号肽、和如轮状病毒 VP7 糖蛋白信号肽的病毒信号肽。

[0197] 在具体实施方式中,本发明的融合多肽包含蛋白酶切割位点和促进如 Wnt5a 和 Wnt7a 的非经典 Wnt 多肽的纯化和产生的表位标签。蛋白酶切割位点的位置通常在 Wnt 多肽的 C-端和表位标签间以在将 Wnt 递送至细胞或组织前帮助异源序列的移除。

[0198] 本发明的融合蛋白中可用的异源蛋白酶切割位点的示例包括但不限于:烟草蚀纹病毒 (TEV) 蛋白酶切割位点、肝素切割位点、凝血酶切割位点、肠激酶切割位点和 Xa 因子切割位点。

[0199] 本发明的融合蛋白中可用的表位标签的示例包括但不限于:His6 表位、MYC 表位、FLAG 表位、V5 表位、VSV-G 表位和 HA 表位。

[0200] 若需要,还可以利用肽接头序列将融合多肽的组分间隔足以确保每条多肽折叠成其二级和三级结构的距离。这样的肽接头序列利用本领域公知的标准技术并入融合蛋白。某些肽接头序列可基于以下因素进行选择:(1) 其采用弹性延伸构造的能力;(2) 其无法采用能够与第一和第二多肽上的功能表位相互作用的二级结构的能力;(3) 缺乏可能与多肽功能表位反应的疏水性或带电荷的残基。优选的肽接头序列包含 Gly、Asn 和 Ser 残基。其他接近中性的氨基酸,如 Thr 和 Ala 也可用在接头序列中。可用作接头的氨基酸序列包括在 Maratea et al., Gene40:3946(1985);Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA83:82588262(1986);美国专利第 4,935,233 号和美国专利第 4,751,180 号中公开的那些接头。接头序列的长度可大体上是 1 至大约 50 个氨基酸。当第一和第二多肽具有可用于分离功能结构域并防止空间干扰的非必要 N-端氨基酸区时,不需要接头序列。两条编码序列可无需任何接头或通过使用由五聚物 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 重复 1 至 3 次的弹性多聚接头而直接融合。该接头已通过插入 VH 和 VL 之间用于构建单链抗体 (scFv) (Bird et al., 1988, Science242:423-426;Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:5979-5883)。接头被设计成可使形成单链抗体的可变区的两个 β -折叠间恰当相互作用。其他可使用的接头包括 Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp (Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:1066-1070) 和 Lys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp (Bird et al., 1988, Science242:423-426)。

[0201] 在一个实施方式中,本发明的融合多肽包含抗体的一部分(如免疫球蛋白“Fc 区”),和例如本文所述的被修饰或改造以缺少经典或天然脂化位点但保持或增加经典和 / 或非经典 Wnt 信号转导活性的修饰的 Wnt 多肽如 Wnt5a 或 Wnt7a。抗体的 Fc 区由两条重链组成,该重链依赖抗体种类形成两个或三个恒定区。Fc 区可从如 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE 的任何免疫球蛋白种类中获得。在一些实施方案中,Fc 区是野生型 Fc 区。在一些实施方式中,Fc 区是突变 Fc 区。在一些实施方式中,Fc 区在 N-端被截短了 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸(例如,在铰链结构域中)。包含 Fc 区的本发明的 Wnt 融合多肽可具有提升

的产生和 / 或纯化效率。

[0202] 在一个实施方式中,本发明的 Wnt 融合多肽包含被修饰以缺少天然脂化位点但保持非经典 Wnt 信号转导活性的 Wnt7a 多肽,和人 IgG Fc 区。在具体实施方式中,Wnt7a 多肽包含在相应于 SEQ ID NO:2 第 73 位或第 206 位的氨基酸位置处的氨基酸缺失、插入或取代,和人 IgG Fc 区。在具体实施方式中,Wnt7a 多肽包含在相应于 SEQ ID NO:2 第 73 位和第 206 位的氨基酸位置处的氨基酸缺失、插入或取代,和人 IgG Fc 区。在具体实施方式中,Wnt7a 多肽包含在相应于 SEQ ID NO:2 第 73 位或第 206 位的氨基酸位置处的丙氨酸,和人 IgG Fc 区。在一个实施方式中,Wnt7a 多肽包含在相应于 SEQ ID NO:2 第 73 位和第 206 位的氨基酸位置处的丙氨酸,和人 IgG Fc 区

[0203] 包含 Fc 区和修饰的非经典 Wnt 多肽 (如 Wnt5a 或 Wnt7a) 的融合多肽可进一步包含天然或异源信号肽、蛋白酶切割位点和表位标签中的一个或多个、或所有。

[0204] 在优选实施方式中,改善修饰的 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽的半衰期、药物动力学性质、溶解性、和产生效率的方法包括在细胞中表达融合多肽,该融合多肽具有 Fc 区和 / 或信号肽和如本文所述的被修饰或改造以缺少经典或天然脂化位点但保持或增加经典和 / 或非经典 Wnt 信号转导活性的 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽。

[0205] 例如,融合至免疫球蛋白 Fc 区的修饰的 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽具有增加的系统半衰期、改善的药物动力学性质、溶解性和产生效率。在一个实施方式中,将 Wnt 多肽融合至抗体 Fc 部分优化融合多肽的药物动力学和药效性质。例如,多肽的 Fc 部分可使多肽免于降解、使多肽循环更久。通常,多肽、融合多肽 (及其编码多聚核苷酸) 和细胞是分离的。“分离”的多肽或多聚核苷酸是从其原始环境移出的多肽或多聚核苷酸。例如,本文所用的“分离的肽”或“分离的多肽”等是指肽或多肽分子从细胞环境中、和从与细胞其他组分的结合中体外分离和 / 或纯化,即其明显不与体内物质结合。相似地,本文所用的“分离的多聚核苷酸”是指已从在天然存在的状态下位于其侧翼的序列中纯化的多聚核苷酸,如从通常临近 DNA 片段的序列中移除的 DNA 片段。例如如果多聚核苷酸被克隆进不是天然环境的一部分的载体,则其被认为是分离的。“分离的细胞”是指从体内组织或器官中获得的并大体上不含细胞外基质的细胞。优选地,如果多肽、多聚核苷酸或细胞是至少约 60% 纯的、至少约 70% 纯的、至少约 80% 纯的、至少约 90% 纯的、更优选至少约 95% 纯的和最优选至少约 100% 纯的,则该多肽、多聚核苷酸、或细胞是分离的。

[0206] 如本文所用,术语“从…中获得”意味着例如,如多聚核苷酸或多肽的样品分离自或获自如重组宿主细胞的特定来源中。在另一实施方式中,术语“从…中获得”是指细胞分离自或获自如体内组织或器官的来源。

[0207] F. 多聚核苷酸

[0208] 本发明还提供了编码本发明的 Wnt 多肽的分离的多聚核苷酸。在多种实施方式中,本发明部分涉及编码缺少经典脂化位点但保持 Wnt 生物活性、并在一些实施方式中增加 Wnt 信号转导活性的多肽的 Wnt 多聚核苷酸。在具体实施方式中,本发明的 Wnt 多聚核苷酸编码促进干细胞扩增并促进组织形成、再生、维持和修复的 Wnt 多肽。

[0209] 本发明的 Wnt 多聚核苷酸适用于 Wnt 多肽临床规模生产,并且适用于增强人体中损伤的和患病的肌肉组织的修复和再生的方法。在某些实施方式中,Wnt 多聚核苷酸编码缺少 Wnt 多肽的脂化用的一个或多个天然氨基酸的 Wnt 多肽。在某些具体实施方式中,Wnt 多

聚核苷酸编码缺少 Wnt 多肽的脂化用的所有天然氨基酸的 Wnt 多肽。在优选实施方式中, Wnt 多聚核苷酸编码缺少非经典脂化位置但保持或增加 Wnt 生物活性的非经典 Wnt 多肽。在其他优选实施方式中, Wnt 多聚核苷酸编码缺少经典脂化位置但保持或增加 Wnt 生物活性(如非经典 Wnt 信号转导活性)的 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽。

[0210] 核酸可用记载在如下文献中本领域已知的方案合成:Caruthers et al., 1992, *Methods in Enzymology* 211, 3-19; Thompson et al., 国际 PCT 公开号 W099/54459; Wincott et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677-2684; Wincott et al., 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59-68; Brennan et al., 1998, *Biotechnol Bioeng.*, 61, 33-45; 以及 Brennan, U. S. Pat. No. 6, 001, 311)。

[0211] 所用“核苷酸”指的是与磷酸化糖通过 N-糖苷键连接的杂环氮碱基。核苷酸在本领域中公认地包括天然碱基(标准)和本领域公知的修饰碱基。此类碱基一般位于核苷酸糖部分的 1' 位。核苷酸一般包含碱基、糖和磷酸基。核苷酸可在糖、磷酸基和 / 或碱基部分未修饰或修饰, 还可互换的称作核苷酸类似物、修饰的核苷酸、非天然核苷酸、非标准核苷酸等(详见例证: Usman and McSwiggen, 同上; Eckstein et al., 国际 PCT 公开号 W092/07065; Usman et al., 国际 PCT 公开号 W093/15187; Uhlman & Peyman, 同上)。Limbach 等人(1994, *Nucleic Acids Res.* 22, 2183-2196)总结了一些本领域公知的修饰的核酸碱基的例子。

[0212] 如本文所用, 术语“DNA”和“多聚核苷酸”和“核酸”是指从无特定物种的总基因组 DNA 分离的 DNA 分子。因此, 编码多肽的 DNA 节段是指包含一个或多个编码序列但实质上从获得该 DNA 节段的物种的总基因组 DNA 分离出或纯化出的 DNA 节段。包含在术语“DNA 节段”和“多聚核苷酸”内的是 DNA 节段和该节段的小片段, 以及包括如质粒、粘粒、噬菌粒、噬菌体、病毒等的重组载体。

[0213] 如本领域技术人员所知的, 本发明的多聚核苷酸序列可包括表达、或可适于表达蛋白、多肽、肽等的基因组序列、基因组外序列和质粒编码序列和更小的改造的基因节段。此类节段可以是天然分离、重组、或人为修饰合成的。

[0214] 如本领域技术人员公知的, 多聚核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链的, 并且可以是 DNA(基因组、cDNA 或合成的)或 RNA 分子。其他编码或非编码序列可以但不必须存在于本发明的多聚核苷酸内, 并且多聚核苷酸可以但不必须连接其他分子和 / 或支撑材料。

[0215] 多聚核苷酸可以包括天然序列(即, 编码本发明的多肽或者其一部分的内源序列)或可包括变体、或与其生物功能等同的序列。多聚核苷酸变体可含有一个或多个如本文所述取代、增加、缺失和 / 或插入, 优选地以使变体编码缺少经典脂化位点但保持并在一些实施方式中增加生物活性(如通路信号转导活性)的多肽。

[0216] 还包括的是与编码本发明的多肽的多聚核苷酸杂交的多聚核苷酸。在“严紧条件”下杂交描述的是彼此至少 60% 相同的核苷酸序列保持杂交的杂交方案。高严紧杂交条件是使探针、引物或寡聚核苷酸仅与其靶序列杂交的条件。严紧条件是依赖序列的并且各不相同。中等严紧条件是使用洗涤液的条件和比高严紧条件的严紧性低(Sambrook, 1989)的杂交条件, 以使多聚核苷酸与本发明的核酸的整体、片段、衍生物或类似物杂交。中等严紧条件在(Ausubel et al., 1987; Kriegler, 1990)中记载。低严紧条件是使用洗涤液并且

比中等严谨条件 (Sambrook, 1989) 严谨性低的杂交条件, 以使多聚核苷酸与本发明的核酸的整体、片段、衍生物或类似物杂交。如那些跨种杂交的低等严谨条件记载在 (Ausubel et al., 1987; Kriegler, 1990; Shilo and Weinberg, 1981) 中。

[0217] 在其他实施方式中, 本发明提供分离的多聚核苷酸, 其包含与本文所述的编码多肽的多聚核苷酸相同或互补的序列的不同长度的连续区段。例如, 本发明提供的多聚核苷酸编码本发明多肽的至少约 50、100、150、200、250、300、或约 350 或更多个以及所有中间长度的连续氨基酸残基。很容易理解本文中的“中间长度”指的是所记载的数值之间的任意长度, 如 56、57、58、59 等; 101、102、103 等; 151、152、153 等; 201、202、203 等。

[0218] 本领域技术人员应当理解的是, 由于遗传密码简并性的结果, 有很多编码本文所述的多肽的核苷酸序列, 包括为人和 / 或灵长类密码子筛选优化的多聚核苷酸。进一步地, 还可使用包含本文提供的多聚核苷酸序列的基因的等位基因。

[0219] 本发明的多聚核苷酸组合物可使用多种已知技术中的任一种鉴别、制备和 / 或操作 (详见 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989 等类似文献)。

[0220] 多种表达载体 / 宿主系统是已知的, 并可用于包含和表达多聚核苷酸序列。这些包括但不限于: 微生物, 如用重组噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌; 用酵母表达载体转化的酵母菌; 用病毒表达载体 (如, 杆状病毒) 感染的昆虫细胞系统; 用病毒表达载体 (如, 花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV) 或用细菌表达载体 (如, Ti 或 pBR322 质粒) 转化的植物细胞系统; 或动物细胞系统。

[0221] 如本文所用, 术语“调控元件”或“调节序列”是指存在于表达载体中是载体非翻译区的序列 (如, 增强子、启动子、5' 和 3' 非翻译区), 并且与宿主细胞蛋白相互作用以实施转录和翻译。此类元件可在其强度和特异性上变化。根据所用的载体系统和宿主, 可使用任何数量的适宜的转录和翻译元件, 包括组成型和诱导型启动子。例如, 在细菌系统中克隆时, 可使用诱导型启动子, 如 PBLUESCRIPT 噬菌粒 (Stratagene, La Jolla, Calif.) 或 PSPORT1 质粒 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.)、pET 质粒 (Novagen) 等的杂合 lacZ 启动子。载体组分通常包括但不限于一个或多个以下组分: 信号序列、复制起点、一个或多个标志基因、增强子元件、宿主机体识别的启动子、和转录终止序列。特定启动信号还可用于更有效完成编码目的多肽的序列翻译。

[0222] 在酿酒酵母中, 可使用包含组成型或诱导型启动子 (如 α 因子、醇氧化酶、和 PGH) 的载体, 还包括 *Pichia pandoris* 表达系统 (详见如 Li et al., *Nature Biotechnology*. 24, 210-215, 2006; 以及 Hamilton et al., *Science*, 301:1244, 2003)。

[0223] 在使用植物表达载体的情况下, 如 CaMV 的 35S 和 19S 启动子的病毒启动子可单独或与 TMV 的 Ω 前导序列 (Takamatsu, *EMBO J.* 6:307-311 (1987)) 结合使用。可通过直接 DNA 转化或病原体介导的转染将这些构建体引入植物细胞。

[0224] 昆虫系统还可用于表达目的多肽。示例性杆状病毒表达系统包括但不限于: 使用 SF9、SF21 和 Tni 细胞的系统 (详见如 Murphy and Piwnica-Worms, *Curr Protoc Protein Sci.* Chapter5:Unit5.4, 2001)。

[0225] 在哺乳动物宿主细胞中, 一般可用一些基于病毒的表达系统。此外, 如 Rous 肉瘤病毒 (RSV) 增强子的转录增强子可用于增加哺乳动物宿主细胞中的表达。有用哺乳动物宿

主细胞系的实例包括 COS-7 细胞、293 或 293T 细胞、BHK 细胞、VERO-76 细胞、HELA 细胞、和 CHO 细胞（包括 DHFR-CHO 细胞）。哺乳动物表达系统可利用贴壁细胞系（例如，T 烧瓶、滚瓶、或细胞工厂中的贴壁细胞系）或悬浮培养，如 1L 和 5L 转瓶、5L、14L、40L、100L 和 200L 搅拌槽生物反应器、或 20/50L 和 100/200L WAVE 生物反应器、以及现有技术中其他已知反应器中悬浮培养。

[0226] 还包括蛋白的无细胞表达。这些和相关实施方式通常使用纯化 RNA 聚合酶、核糖体、tRNA 和核糖核苷酸。这些试剂可通过从细胞或基于细胞表达系统提取制备。

[0227] 在具体实施方式中，本发明的多肽从细菌中表达和纯化。示例性细菌表达载体包括 BLUESCRIPT(Stratagene);pIN 载体 (Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264:55035509 (1989)); 和可用于表达如带有谷胱甘肽 s- 转移酶的融合蛋白的外来多肽的 pGEX 载体 (Promega, Madison, Wis.)。某些实施方式可采用基于 E. coli 的表达系统。

[0228] 在具体实施方式中，蛋白表达可通过 T7 RNA 聚合酶(如 pET 载体系列)控制。这些和相关的实施方式可利用表达宿主株 BL21 (DE3)、支持 T7 介导的表达并缺乏促进靶蛋白稳定性的 lon 和 omp T 蛋白酶的 BL21 的 λ DE3 溶源体。还包括的是携带编码很少用于 E. coli 中的 tRNA 的质粒的表达宿主株，例如，Rosetta™(DE3) 和 Rosetta2 (DE3) 菌株。细胞裂解和样品处理还可利用如 Benzonase®核酸酶和 BugBuster®蛋白提取剂的试剂完善。为了细胞培养，自动诱导培养基可提升很多表达系统的效率，包括高产能表达系统。这种类型的培养基(如，Overnight Express™自动诱导培养基)逐渐通过不加入如 IPTG 的人造诱导剂的代谢性迁移引起蛋白表达。某些实施方式可采用冷激诱导 E. coli 高产率生产系统，因为低温下大肠杆菌中蛋白的过表达提高其溶解性和稳定性(详见如 Qing et al., Nature Biotechnology. 22:877-882, 2004)。

[0229] 通过重组细胞产生的蛋白可以根据多种技术纯化和表征。实施蛋白纯化和分析蛋白纯度的示例性系统包括快速蛋白液相层析 (FPLC) (如 KTA 和 Bio-Rad FPLC 系统)、高压液相层析 (HPLC) (如 Beckman 和 Waters HPLC)。示例性纯化化学包括离子交换层析(如，Q, S)、粒径排阻层析、盐梯度、亲和纯化(如，Ni、Co、FLAG、麦芽糖、谷胱甘肽、蛋白 A/G)、凝胶过滤、反相法、陶瓷 HyperD®离子交换层析、和疏水作用柱(HIC)、以及其他本领域已知的方法。还包括如，SDS-PAGE (如，考马斯染色法、银染色法)、免疫印迹、Bradford、和 ELISA 的分析方法，可用在产生或纯化过程的任何步骤中，通常用于测量蛋白组合物的纯度。

[0230] 在某些实施方式中，临床规模蛋白可从 E. coli 包涵体中分离。在具体实施方式中，本发明涉及制备适用于本文他处所述的治疗用途的重组 Wnt 多肽的方法。

[0231] 在一个实施方式中，制备重组 Wnt 多肽的方法包括以下的一个或多个步骤：i) 在宿主中表达 Wnt 多聚核苷酸；ii) 培养宿主细胞以表达作为包涵体的 Wnt 多肽；iii) 洗涤包涵体的一个或多个步骤；iv) 溶解多肽；v) 重折叠多肽；vi) 纯化多肽；和 vii) 在所需缓冲液中透析多肽。

[0232] 在某些实施方式中，密码子优化 Wnt 多聚核苷酸序列用于在细菌宿主中表达。

[0233] 除了重组制备方法，本发明的多肽及其片段可使用固相技术通过直接肽合成制备 (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963))。蛋白合成可使用手动技术或自动操作进行。例如可以利用 Applied Biosystems 431A 肽合成仪 (Perkin Elmer) 实现自动合

成。或者,多个片段可分别化学合成并使用化学方法连接以产生全长分子。

[0234] G. 组合物

[0235] 在多种实施方式中,本发明部分涉及 Wnt 多肽及其编码多聚核苷酸的新型组合物。如本文他处讨论的,Wnt 的治疗用途主要限制和障碍之一是其低溶解性,使其在临床规模上的产生行不通。发明人改造的新型 Wnt 多肽具有增加的溶解性、稳定性、并与天然存在 Wnt 相比保持或具有增加的 Wnt 生物活性。在具体实施方式中,本发明提供可溶 Wnt 多肽的水性制剂,以促进干细胞扩增和肌肉肥大,并促进组织形成、再生、维持和修复。在某些实施方式中,本发明提供了可溶 Wnt 多肽的水性制剂,以促进干细胞扩增和肌肉肥大,并促进组织形成、再生、维持和修复,其中制剂中基本上不存在去垢剂。

[0236] 本发明的组合物可包含如本文所述的一种或多种多肽、多聚核苷酸、包含多聚核苷酸的载体等,以及用于单独或与一种或者多种其他治疗形式相结合给予细胞或动物的一种或多种药学可接受的盐或载体和 / 或生理学可接受的溶液。还应理解的是,若需要,本发明的组合物也可结合其他制剂给予,例如,其他蛋白、多肽、小分子或多种药物活性试剂。事实上,对还可以包含在组合物中的其他组分没有限制,只需其它试剂对 Wnt 组合物的治疗潜力(例如组合物促进肌肉肥大和促进组织形成、再生、维持和修复的能力)没有不利影响即可。

[0237] 药学可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白的游离氨基形成)和与例如如盐酸或磷酸的无机酸、或如醋酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等这样的有机酸形成的盐。与游离羧基形成的盐还可来源于例如如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、或氢氧化铁的无机碱,以及如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等这样的有机碱。

[0238] 在某些情况下,可取的是,将本文所述的组合物经肠道外、经血管(如经静脉或经动脉)、经肌肉、甚至经腹腔递送,例如如美国专利第 5,543,158 号、美国专利第 5,641,515 号和美国专利第 5,399,363 号所述的(每篇文献均明确通过引用整体并入本文)。

[0239] 如本文所用,“载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介、涂层、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和延迟吸收剂、缓冲剂、载体溶液、混悬剂、胶体等。此类介质和试剂对药物活性物质的用途是本领域公知的。除了任何与活性成分不相容的常规介质或试剂,涉及其在治疗组合物中的用途。补充活性成分也可并入组合物。

[0240] 词组“药学可接受的”是指当给予人体时不产生过敏或类似不良反应的分子实体和组合物。包含作为活性成分的蛋白的水性组合物的制备是本领域公知的。通常,此类组合物被制备成血管注射剂,为液体溶液或悬浮液。还可制备成适于在注射前溶解、或悬浮在液体中的固体形式。

[0241] 在某些实施方式中,组合物可通过鼻内喷雾、吸入、和 / 或其他气溶胶递送媒介给药。美国专利第 5,756,353 号和美国专利第 5,804,212 号已记载了通过鼻气溶胶喷雾直接递送基因、多聚核苷酸、和肽组合物进入肺的方法(每篇文献均明确通过引用整体并入本文)。同样地,利用鼻内微粒树脂(Takenaga et al., 1998)和溶血磷脂酰甘油化合物(美国专利第 5,725,871 号,在此明确通过引用整体并入本文)也是制药领域公知的。同样地,聚四氟乙烯支持基质形式的经粘膜药物递送在美国专利第 5,780,045 号中描述(明确通过引用整体并入本文)。本发明的具体实施方式可包括其他制剂,如制药领域公知的制剂,并且描述于例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition.

Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000 中。

[0242] H. 递送方法

[0243] 在一个实施方式中, 将细胞(例如, 如卫星干细胞的干细胞)与包含一种或多种本发明的 Wnt 多肽和/或多聚核苷酸的组合物接触。可考虑到, 本发明的细胞可在体外、离体、或体内接触。在其他实施方式中, 将本发明的 Wnt 组合物给予个体。

[0244] 本发明的组合物可直接给予个体(如蛋白/多肽, 或用于基因治疗的表达载体的情况下)或离体递送至来源于个体的细胞(例如, 如离体基因治疗中)。直接体内递送组合物一般会通过肠道外注射完成, 如, 皮下、腹腔、静脉、心肌、瘤内、瘤周或组织胞间隙。其他给药方式包括口服和肺内给药、栓剂、和透皮给药、针、和基因枪或无针注射器。

[0245] 本发明的组合物还可通过直接注射至如肌肉的组织给药。在本发明的一些实施方式中, 本发明的组合物通过直接向肌肉组织注射组合物给药, 以预防注射肌肉中的肌肉损失或促进注射肌肉的再生或修复, 例如, 通过促进注射肌肉的肌肉细胞扩增或肥大。

[0246] 一般地, 用于离体和体外应用的核酸递送可通过本领域公知的如葡聚糖介导转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导转染、原生质体融合、电穿孔、脂质体对多聚核苷酸的封装、的直接将 DNA 显微注射入核内、和如腺病毒(和腺相关病毒)或甲病毒的病毒介导来实现。

[0247] 在某些实施方式中, 优选地利用病毒载体或其他体内多聚核苷酸递送技术递送一种或多种修饰的 Wnt。在优选实施方式中, 病毒载体是非整合载体或基于转座子的载体。可利用多种公知方法中的任何一种来完成递送, 如包括腺病毒、转录酶病毒、慢病毒、腺相关病毒(AAV)载体的载体, 或如表达构建体的其他病毒载体的利用(包括但不限于牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒和疱疹病毒)。

[0248] 非病毒方法也可用于给予本发明的多聚核苷酸。在一个实施方式中, 多聚核苷酸可直接通过显微注射给予细胞或通过注射给予组织, 例如通过利用 Dubensky et al., (1984) 或 Benvenisty & Reshef (1986) 中记载的技术。可以期望的是, 编码目的基因的 DNA 还可在体内以类似方法转移并表达基因产品。

[0249] 转移裸 DNA 表达构建体进入细胞的本发明的另一实施方式可涉及粒子轰击。该方法依赖加速包被 DNA 的微弹至高速, 从而允许其刺穿细胞膜并进入细胞而不杀死细胞的能力(Klein et al., 1987)。在另一实施方式中, 通过电穿孔向细胞给予多聚核苷酸。

[0250] I. 治疗方法

[0251] 本发明的修饰的 Wnt 多肽和组合物用于多种治疗应用。例如, 本文所述的组合物和方法用于促进有需要的个体中的组织形成、再生、修复或维持。

[0252] 本发明的 Wnt 组合物的一些相关治疗应用包括需要通过增加肌肉尺寸、体积或强度而防止肌肉损失或再生损失或损害肌肉组织的情况。这样的情况包括, 例如, 化学疗法或放射疗法之后、肌肉损伤之后、或者影响肌肉的疾病或病症的治疗或操作中。在某些实施方式中, 影响肌肉的疾病或病症可包括消耗病(如, 恶病质, 其可以与如癌症或 AIDS 的疾病相关)、肌肉衰减或萎缩、或肌肉退行性疾病。肌肉衰减或萎缩可与以下相关: 如肌肉衰减症(包括增龄相关的肌肉衰减症)、ICU 诱发性虚弱、肌肉废用(例如, 由于昏迷、瘫痪、损伤、或固定引起的肌肉废用)、手术诱发性虚弱(如, 髌或膝盖置换之后)、或肌肉退行性疾病(如, 肌营养不良症)。该列举并未详尽。

[0253] 在某些实施方式中, 本发明的多肽和组合物可用于刺激肌肉卫星细胞的对称扩

增,由此增加肌肉组织中常驻卫星细胞、或定向前体细胞的比例。多肽和组合物还可用于通过如增加个体肌肉纤维的尺寸促进肌肉肥大。因此,本发明的多肽和组合物可增加肌肉细胞的数量和肌肉细胞的尺寸,并由此可用于例如,替换受伤或缺陷组织、或防止肌肉萎缩或肌肉量损失,尤其是如肌营养不良、神经肌肉性疾病和神经退行性疾病,肌肉消耗病和病症、萎缩、心血管疾病、中风、心力衰竭、心肌梗塞、癌症、HIV 感染、AIDS 等影响肌肉的疾病和病症。

[0254] 在其他实施方式中,组合物和方法用于,例如在患有肌肉退行性疾病的个体中修复或再生机能障碍骨骼肌。该个体可疑似患有或有风险患有骨骼肌损伤、退化或萎缩。骨骼肌损伤可以是疾病相关的或非疾病相关的。人类个体可患有或有风险患有肌肉退化或肌肉消耗。肌肉退化或肌肉消耗可整体或部分由疾病,例如 AIDS、癌症、肌肉退行性疾病或以上的组合引起。

[0255] 肌肉萎缩症的示例包括但不限于:杜兴氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良(BMD)、肌强直性营养不良(也称斯太纳特病)、肢带型肌营养不良、面肩肱型肌营养不良(FSH)、先天性肌营养不良、眼咽型肌营养不良(OPMD)、末梢型肌营养不良和埃默里—德赖富斯肌营养不良。详见如 Hoffman et al., N. Engl. J. Med., 318: 1363-1368 (1988); Bonnemant, C. G. et al., Curr. Opin. Ped., 8: 569-582 (1996); Worton, R., Science, 270: 755-756 (1995); Funakoshi, M. et al., Neuromuscul. Disord., 9 (2): 108-114 (1999); Lim, L. E. and Campbell, K. P., Cure. Opin. Neurol., 11 (5): 443-452 (1998); Voit, T., Brain Dev., 20 (2): 65-74 (1998); Brown, R. H., Annu. Rev. Med., 48: 457-466 (1997); Fisher, J. and Upadhyaya, M., Neuromuscul. Disord., 7 (1): 55-62 (1997)。

[0256] 在某些实施方式中,在此提供本文所述的组合物在制备用于促进有需要的个体中肌肉形成、维持、修复或肌肉再生的药物中的用途。在具体实施方式中,提供制备用于促进有需要的个体中肌肉形成、维持、修复或肌肉再生的药物的本文所述的组合物。Wnt 多肽可用于通过如增加肌纤维的尺寸或数量来预防或治疗肌肉萎缩。

[0257] 可以以有效量如治疗有效量给予组合物。对于人和非人类个体的体内治疗,个体通常被给予包含有效量的一种或多中本发明的修饰的 Wnt 多肽的组合物。“有效量”是指在给药并持续必要的时间时有效实现预期的治疗或预防结果的量。

[0258] 本发明的 Wnt 多肽、或包含本发明 Wnt 多肽的组合物的“治疗有效量”可根据如下因素而不同:如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及 Wnt 多肽在个体中引起期望应答的能力。治疗有效量还是这样的情况,即治疗有益效果超过 Wnt 多肽的任何有毒或有害效果。术语“治疗有效量”是指有效“治疗”哺乳动物(如,患者)的疾病或病症的 Wnt 多肽或包含 Wnt 多肽的组合物的量。

[0259] “预防有效量”是指在给药并持续必要的时间时有效实现预期的预防结果的量。由于预防剂量在发病之前或疾病的早期阶段在个体中使用,因此预防有效量通常少于治疗有效量,但并非必然如此。

[0260] 在多种实施方式中,本发明提供增加如卫星干细胞的成人干细胞对称分裂(与未处理的干细胞群相比)的方法。本文公开的方法能够进一步促进对称干细胞分裂,而不改变干细胞分裂的速率,并可以促进干细胞群的存活。该方法可在体外、离体或体内实施。

[0261] 在具体实施方式中,包含一种或多种修饰的 Wnt 多肽和 / 或多聚核苷酸的组合物

在有需要的个体体内给药。如本文所用,术语“个体”包括但不限于:哺乳动物,包括如人、非人灵长类(如,狒狒、猩猩、猴子)、小鼠、猪、牛、山羊、狗、猫、兔、大鼠、豚鼠、仓鼠、马、猴子、绵羊、或其他非人哺乳动物;非哺乳动物,包括如非哺乳类脊椎动物,例如鸟(如,鸡或鸭)或鱼;以及非哺乳无脊椎动物。在优选实施方式中,个体是人。需要治疗疾病或病症的个体包括表现出该疾病或病症的症状的个体,如患有疾病或病症的个体,以及具有患有疾病或病症风险的个体。

[0262] 在具体实施方式中,体内、离体或体外扩增卫星干细胞群的方法包括:将干细胞与有效量的包含修饰的非经典 Wnt 多肽或编码该修饰的非经典 Wnt 多肽的多聚核苷酸的组合物接触。在具体实施方式中,非经典 Wnt 选自:Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b 和 Wnt11。在优选实施方式中,Wnt 多肽是能结合 Wnt 受体并激活 Wnt 受体的 Wnt5a 或 Wnt7a 多肽或其活性片段或变体、或其旁系同源物、直系同源物或同源物。

[0263] 不结合任何特定理论,认为增加组织内卫星细胞的数量提供了增强的组织再生潜力。

[0264] 在具体实施方式中,分离或维持干细胞,并离体或体外扩增,并随后给予有需要的个体。例如,干细胞可被离体或体外培养并扩增,并与有效量的本发明的 Wnt 多肽接触,然后根据技术人员已知的方法作为治疗干细胞组合物给予患者。在某些实施方式中,扩增的干细胞群与治疗 Wnt 组合物结合给予患者。

[0265] 促进干细胞扩增的方法可用于刺激干细胞的离体或体外扩增,并从而提供适于向有需要的个体移植或给药的细胞群。

[0266] 在一些控尿形式中,功能障碍肌肉可用本发明的组合物或方法通过如将蛋白直接注射入肌肉治疗。因此,在一个实施方式中,该方法用于治疗尿失禁。

[0267] 在进一步的实施方式中,受损的或功能障碍的肌肉组织可以是心肌。例如,受损肌肉组织可以通过如心肌梗塞、或心力衰竭的心血管事件受损的心肌,其中靶干细胞是心脏干细胞。依照本发明的另一方面,提供了促进哺乳动物中心脏干细胞扩增或心肌肥大的方法,包括给予哺乳动物有效量的本文所述的组合物。

[0268] 进一步地,除了在移植中使用干细胞,干细胞或包含干细胞的组合物可用作研究工具和/或诊断试验或试剂盒的一部分。不希望受到限制,试剂盒可包含肌肉干细胞、一种或多种修饰的 Wnt 多肽、细胞培养或生长培养基、细胞低温贮藏培养基、一种或多种药学可接受的递送介质、一种或多种修饰的 Wnt 多聚核苷酸序列或基因构建体、一种或多种向需要的个体移植或递送细胞的装置、使用、递送、移植、培养、低温贮藏或本文所述的细胞或以上的任何组合的说明书。

[0269] 细胞扩增和/或肌肉肥大的指示物可定性或定量地监测,并包括如总体形态学、总细胞数量、组织学、组织化学或免疫组织化学的改变、或特定细胞标记物的存在、不存在或相对水平。细胞标记物的存在、不存在或相对水平可通过如组织化学技术、免疫学技术、电泳、Western 印迹分析、FACS 分析、流式细胞术等分析。可选择地,编码细胞标记蛋白的基因表达的 mRNA 的存在可利用如 PCR 技术、Northern 印迹分析、使用合适的寡聚核苷酸探针等方法探测。

[0270] 所用出版物、专利申请、和本说明书中引用的授权专利在此通过引用并入本文,同明确并分别指出将每一篇单独的出版物、专利申请或授权专利通过引用并入一样。

[0271] 尽管为清楚理解的目的,上述发明已通过阐释和举例的方式进行详细描述,在本发明的教导下,本领域普通技术人员可显而易见地对其作出某些改变和修改而不脱离随附权利要求书的精神或范围。下面的实施例仅通过阐释的方式,而非限制的方式提供。本领域的技术人员容易地认识到可改变或修改的多种非关键的参数并得到基本类似的结果。

实施例

[0272] 实施例 1

[0273] Wnt 多肽具有翻译后修饰的保守位点

[0274] Wnt 蛋白是参与细胞存活、增殖、分裂和迁移的分泌型信号转导蛋白。Wnt 是胚胎形成和成体组织再生过程中有效的组织模式形成所必需的。某些 Wnt 蛋白通过刺激卫星干细胞对称扩增和肌肉纤维肥大而驱动骨骼肌再生。

[0275] 以鉴别出 19 种人 Wnt,并根据不连续的同源区分类。Wnt 蛋白具有包括糖基化和脂化的复杂的翻译后修饰。蛋白糖基化是有效蛋白折叠和分泌所必需的。图 1 是所有 19 种人 Wnt 多肽的比对。糖基化或脂化修饰的氨基酸残基具有较好的保守性(参见阴影残基)。进一步地,这些相同残基在种间是保守的,这可从图 2 和图 11 中 Wnt7a 多肽的比对中看出。以往脂化被认为是通过固定成熟分泌蛋白至质膜、有效定位 Wnt 至其佛力子受体的有效活性所必需的。为此,Wnt 被认为是自分泌或局部旁分泌信号转导分子而不是完全的系统生长因子/细胞因子。

[0276] 如本文他处所述,蛋白质脂化不是所有 Wnt 多肽活性必需的。选择突变野生型 Wnt(wtWnt) 序列(Wnt7a,SEQ ID NO:2) 中脂化的半胱氨酸或丝氨酸残基,用非脂化的丙氨酸残基替换。在 Wnt7a 的具体实例中,第 73 位的半胱氨酸残基和/或第 206 位的丝氨酸残基突变为丙氨酸残基。这导致包含 SEQ ID No:3-5 中列出的序列的蛋白,其缺乏在突变残基处的翻译后脂化。

[0277] 实施例 2

[0278] 非经典 WNT 诱导成肌细胞肥大

[0279] Wnt 多肽通过佛力子受体和共受体信号转导以刺激数条细胞内通路。Wnt 通常被分为“经典”或“非经典”信号转导分子,其中经典信号转导导致蛋白 β -连环蛋白的核定位和随后的靶基因表达。非经典信号转导一般包括 Wnt 的细胞功能,并不直接涉及 β -连环蛋白的核定位,如平面细胞极性(PCP)或钙/PLC/PKC 通路的激活。经典和非经典通路激活的受体和共受体是不同的;经典信号转导通路显示对共受体 LRP 的依赖性。Wnt7a 是非经典信号转导分子并已显示通过 PCP 通路的激活驱动肌肉卫星干细胞的对称扩增(Le Grand et al.,Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells.Cell Stem Cell 4,535-547,2009)。最近,Wnt7a 显示出可能通过 PI3-激酶/mTOR 通路的 G 蛋白依赖型激活驱动培养的成肌细胞肥大(Julia von Maltzahn,C.Florian Bentzinger and Michael A.Rudnicki,Nature Cell Biology,Dec. 11,2011;epub)。

[0280] 测试了数种 Wnt 多肽诱导成肌细胞肥大的能力。最初测试的 Wnt 多肽从 R&D 系统中获得并代表经典(Wnt3a)和非经典(Wnt5a 和 Wnt7a)信号转导多肽。如图 3 所示,尽管缓冲液对照或经典 Wnt 多肽 Wnt3a 不具有成肌细胞肥大效果,但两个非经典 Wnt 多肽(Wnt5a

和 Wnt7a) 在体外产生明显的成肌细胞肥大效果。

[0281] 方法

[0282] C2C12 小鼠成肌细胞从 ATCC(#CRL-1772) 获得, 并生长在补充 10% 50FBS 的 DMEM(MediaTech#10-017-CV) 的明胶包被的组织培养板上。整个实验中细胞保持少于 20% 的汇合度。96 孔组织培养板在室温下(RT) 用 0.1% 明胶包被至少 15 分钟, 并且 2000 个细胞(在 0.2mL 生长培养基中) 接种在 96-孔板的各孔中。随后将平板在 37℃ 孵育 24 小时。第二天, 抽出培养基, 并用 0.2mL 具有补充 2% 马血清(Fisher, Hyclone SH30074) 的 DMEM(MediaTech#10-017-CV) 的分化培养基取代。分化 3 天之后, 将 Wnt 多肽(rhWnt7a#3008-WN/CF、rhWnt3a#5036-WN/CF 或 rhWnt5a#645-WN/CF(来自 R&D 系统) 加入细胞培养物中并再培养 2 天。

[0283] 对细胞进行固定、洗涤、透化、并用肌球蛋白慢和快肌球蛋白抗体染色(Sigma # M4276-.2ML、Sigma # M8421-.2ML)。观察细胞; 肌纤维直径以每次实验 100 根纤维计算; 并且收集 3 个独立生物重复的数据, 每个处理组总共 300 个数据点。图 3 中显示每个生物重复组的中位数纤维直径。每组三个生物重复的中位数的平均值对单独的培养基为 17.5 μm、18.8 μm (Wnt3a)、27 μm (Wnt7a)、24.6 μm (Wnt5a)、和 25.8 μm (胰岛素生长因子(IGF))。与培养基对照或 Wnt3a 处理相比, 用 Wnt7a、Wnt5a 和 IGF 处理的细胞肥大的增加是统计上显著的。

[0284] 实施例 3

[0285] 修饰的 WNT7A 多肽的构建和表达

[0286] 非经典 Wnt 诱导肌肉卫星干细胞扩增和肌肉肥大。两个过程的诱导在治疗上对恶病质、肌肉萎缩、和肌营养不良的治疗大有益处。Wnt 作为治疗剂的应用要求有效的规模生产和提纯以及适用于治疗用途并保持特异的 Wnt 活性和受体特异性的配方。Wnt 多肽的翻译后脂化是这些生产要求的潜在难题。Wnt 一般被认为为了有效活性需要脂化, 脂化的蛋白在高浓度下纯化是困难的, 并且为了溶解性和稳定性需要使用去垢剂配方。

[0287] 为了解决这些挑战, 构建了几种 Wnt7a 的变体。具体而言, 靶向翻译后脂化的氨基酸残基(Wnt7a 中的 Cys73 和 Ser206) 利用下述分子生物学技术突变为丙氨酸残基。野生型人 Wnt7a 通过正向引物 5'-GCATGGATCCACCATGAACCGAAAGCGCGG-3' (SEQ ID NO:41) 和反向引物 5'-GCATGCGCCGCTCACTTGACGTGTACATCTCC-3' (SEQ ID NO:42) 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物插入 pcDNA3.1(+) 载体的 BamHI 和 Not I 位点间。修饰的 Wnt7a 构建体使用 QuikChange® 位点定向诱变法制备。人 Wnt7a C73A 构建体(氨基酸 73 的半胱氨酸用丙氨酸取代)以人野生型 Wnt7a 为模板, 用正向引物 5'-ATGGGCCTGGACGAGGCCAGTTTCAGTTCCGC-3' (SEQ ID NO:43) 和反向引物 5'-GCGGAAGTAACTGGGCCTCGTCCAGGCCCAT-3' (SEQ ID NO:44) 制备。人 Wnt7a S206A 构建体(氨基酸 206 的丝氨酸用丙氨酸取代)以人野生型 Wnt7a 为模板, 用正向引物 5'-GTGCCACGGCGTGGCAGGCTCGTGACCC-3' (SEQ ID NO:45) 和反向引物 5'-GTGTCACGAGCCTGCCACGCCGTGGCAC-3' (SEQ ID NO:46) 制备。人 Wnt7a C73A/S206A 构建体使用单独 C73A 和 S206A 构建体的试剂制备。最终的载体 DNA 用 Qiagen Endo-free 纯化试剂盒制备。pcDNA3 载体中的 Wnt cDNA 在 HEK293 细胞中表达 48-72 小时。随后从 HEK293 培养基中使用对产生的 Wnt7a 的所有变体特异的抗体(抗体: Santa Cruz K15#26361) 通过亲和层析纯化 Wnt 多肽。纯化的修饰的 Wnt 多肽的活性用随后的实施例所述的体外肥大

试验测试。构建的所有 Wnt7a 构建体的示意图在图 4 中显示。(还参见 SEQ ID NOs:1、2、3、4、5、12 和 13)。

[0288] 实施例 4

[0289] 异源信号肽促进 WNT 分泌和产生

[0290] 为了提高显示出分泌不良(大部分表达蛋白残留在细胞内)的 Wnt 蛋白从哺乳动物 HEK293 细胞培养物中的产生、分泌、和溶解性,构建了 Wnt 融合多肽,其中内源性 Wnt 分泌信号肽由人免疫球蛋白 G κ 链(IgGK)的信号肽或人 CD33 蛋白的信号肽取代。包含异源信号肽的 Wnt7a 融合蛋白的示意图如图 4 中显示(还参见 SEQ ID NO:12 和 13)。

[0291] 如图 5 中所示,比较在 HEK293 培养物中的表达和分泌时,具有异源信号肽的 Wnt 融合蛋白表现得显著地优于包含天然信号肽的 Wnt 多肽。

[0292] 实施例 5

[0293] 修饰的 WNT 多肽可在不存在去垢剂下配制并保持稳定性和活性

[0294] Wnt 蛋白的产生和配制传统上依赖于在去垢剂中配制,以保持这些脂化蛋白的溶解性。Wnt 多肽的有效治疗递送要求在不存在去垢剂的情况下配制。不具有脂化位点的 Wnt 多肽如实施例 3 中记载的方法构建、在哺乳动物培养系统中表达、从培养基中纯化、并在 1%CHAPS 去垢剂中配制。配置基于 HPLC 的测定以有效测定 Wnt 多肽制剂中的 CHAPS 去垢剂。

[0295] 如图 6a 中所示,溶液中 CHAPS 去垢剂的滴定允许测定的有效校准。测试纯 Wnt 多肽的多种制剂,并且最终制剂显示为 PBS 中 $\sim$ 1%CHAPS 溶液(图 6b)。随后 Wnt 多肽溶液针对单独的 PBS 的透析将去垢剂有效去除至检测水平以下(图 6c)。然后,透析后的多肽在存在或不存在 CHAPS 去垢剂的情况下测试稳定性和活性。

[0296] 蛋白制剂在 4 $^{\circ}$ C 或 37 $^{\circ}$ C 孵育超过 7 天显示,具有天然脂化位点的 Wnt 在去垢剂中配制时相对稳定,但在不存在去垢剂的情况下配制时不稳定。相反地,与天然、脂化的蛋白相比,在不存在去垢剂的情况下,移除脂化位点并用丙氨酸取代(C73A, S206A)的修饰的 Wnt 显示出提高的稳定性。

[0297] 然后将用或不用去垢剂配制的 Wnt 变体如实施例 2 中描述的在 C2C12 肥大测定中测试活性。Wnt 多肽在 HEK293 哺乳动物培养系统中产生并亲和纯化。Wnt 多肽在具有 1% CHAPS 去垢剂的 PBS 中配制。每种 Wnt 多肽变体的等分试样通过透析去除去垢剂而重新配制。Wnt 蛋白具有等摩尔浓度并应用于 C2C12 肥大测定。

[0298] 与阳性对照、天然 Wnt 序列相比,使用异源信号肽在 HEK293 培养系统中产生的 Wnt 多肽保持其活性(图 7)。进一步地, Wnt7a C73A 和 S206A 突变体保持特异的肥大活性(图 7)。在去垢剂中配制时,所有修饰的 Wnt 保持活性。

[0299] 在不存在去垢剂下重新配制 Wnt 时,只有包含丙氨酸取代脂化位点的修饰的 Wnt 保持活性,而天然 Wnt 失去了成肌细胞肥大活性(图 7)。因此,在保守脂化位点特定地改变的 Wnt 保持生物活性。在不存在去垢剂下配制时,修饰的 Wnt 仍保持活性。由此,本发明的修饰的 Wnt 多肽代表天然蛋白的有用治疗版本。

[0300] 实施例 6

[0301] 修饰的 WNT7A 增加肌肉肥大和卫星干细胞扩增

[0302] 为了证实去脂化的 Wnt(如去除一个或多个脂化位点的 Wnt)在体内刺激肌肉再生

的能力,修饰的 Wnt7a 通过将 CMV-Wnt7a 表达质粒电穿孔进入 3 月龄小鼠的 TA 肌肉来过表达。

[0303] 1. 体内电穿孔

[0304] 编码 LacZ、野生型 Wnt7a、Wnt7a C73A、Wnt7a S206A 和 Wnt7a C73A/S206A 的质粒构建体在体内电穿孔进入小鼠。将 40 μ g 在 0.9%NaCl 中的各质粒 DNA 或 0.9%NaCl (生理盐水) 直接注射入左 TA 肌肉内,该 TA 肌肉已通过麻醉小鼠皮肤的切口暴露。紧随注射之后,使用 5 毫米的针形电极(BTX),以固定 20ms 的持续时间和 200ms 的间隔,通过 100-150 伏的脉冲发生器 (ECM830, BTX) 脉冲 6 次,直接向 TA 施加电刺激,。分离实验和对侧的 TA 肌肉,嵌入 OCT-15% 蔗糖 (Tissue-Tek) 中,并用冷氮冷却的异戊烷冷冻。

[0305] 2. 组织学和定量

[0306] 实验和对侧肌肉的横切切片 (8 μ m) 用低温恒温器 (Leica CM1850) 切割。为了在连续切片(从每块 TA 肌肉获得约 400 个切片)的相同水平处对实验肌肉和对侧肌肉进行比较,对整个 TA 肌肉进行切片。对于 LacZ 反应,冰冻切片用 0.1% 戊二醛固定,并暴露于 X-gal 溶液。对于 H&E 和免疫染色,切片用 4% 多聚甲醛固定。对于纤维计数,组合层粘连蛋白染色的冰冻切片图片,并在 Adobe Photoshop CS2 上计数。肌纤维口径的量化用 ImageJ 实现。在 Photoshop 上,在所有纤维都具有位于中心的细胞核的再生区中采集的 Pax7 和层粘连蛋白共免疫染色的冰冻切片上进行卫星细胞计数。“Pax-7+ 细胞百分数”代表相对于每一纤维数和对侧腿标准化的亚层 Pax7+ve 卫星细胞的数量。

[0307] 3. 统计分析

[0308] 对所提供的实验进行最低 2 个重复和高达 5 个重复。数据表示为平均值的标准误差。结果使用学生 T 检验 (Microsoft Excel) 进行统计显著性评估,并且 $P < 0.05$ 水平时认为差异是统计学显著的。

[0309] 4. 结果

[0310] 与 LacZ 对照质粒相比,WT Wnt7a、Wnt7a C73A、Wnt7a S206A 和 Wnt7a C73A/S206A 构建体的电穿孔在小鼠 TM 肌肉的平均纤维直径上产生统计学显著的增加。而且,Wnt7a C73A、Wnt7a S206A 和 Wnt7a C73A/S206A 构建体保持野生型 Wnt 构建体的 Wnt 生物活性,因为 Wnt7a C73A、Wnt7a S206A 和 Wnt7a C73A/S206A 构建体产生的 TA 肌肉的平均纤维直径的增加与野生型 Wnt 构建体产生的 TA 肌肉的平均纤维直径的增加相当。这些结果显示在图 1 中。

[0311] 值得注意的是,图 2 表明,用 Wnt7a S206A 和 Wnt7a C73A/S206A 构建体电穿孔的 TA 肌肉还表现出与用野生型 Wnt 构建体电穿孔的 TA 肌肉相当的 TA 肌肉量的增加。

[0312] 为了评估 Wnt7a C73A、Wnt7a S206A 和 Wnt7a C73A/S206A 是否相似地刺激体内卫星干细胞的扩增,在用修饰的 Wnt7a 表达质粒电穿孔之后,评估再生肌肉中卫星细胞和卫星干细胞的数量。在电穿孔后 3 个星期时的切片上,Wnt7a C73A、Wnt7a S206A 和 Wnt7a C73A/S206A 的过表达导致每根肌纤维 Pax7+ 卫星细胞数量的统计学显著增加 (Wnt7a C73A, $p=0.001$, $n=4$; Wnt7a S206A, $p=0.01$, $n=2$; Wnt7a C73A/S206A, $p=0.05$, $n=2$)。由 Wnt7a C73A、Wnt7a S206A 和 Wnt7a C73A/S206A 的过表达诱导的 Pax7 卫星细胞数量的增加与野生型 Wnt7a 诱导的增加相当。这些结果显示在图 3 中。

[0313] 总的来说,图 1-3 中显示的这些结果表明,Wnt7a C73A、Wnt7a S206A 和 Wnt7a

C73A/S206A 的过表达明显增强了肌肉再生,如存在以下情况所证明的:较大纤维数量的增加和肌肉量的增加以及进一步的体内卫星干细胞数量的增加。此外,这些结果表明,Wnt7a C73A、Wnt7a S206A 和 Wnt7a C73A/S206A 产生的效果与野生型 Wnt7a 产生的效果是相当的。

[0314] 一般而言,在下述权利要求中,使用的术语不应解释为将权利要求限制至本说明书和权利要求中公开的具体实施方案,而应解释为包括所有可能的实施方案连同这类权利要求所给予的等同物的所有范围。因此,权利要求不受本公开的限制。

[0315] 实施例 7

[0316] WNT 蛋白可表达为免疫球蛋白 FU 融合体

[0317] 免疫球蛋白融合蛋白和 / 或多肽已用于改善 Wnt 多肽的药物学性能,如其体内循环半衰期。如图 4 中示意性表示的,本发明的 Wnt 蛋白与氨基端或羧基端的 Fc 融合域在哺乳动物表达载体(pcDNA3+)中构建。将天然人 Wnt7a 或具有 C73A 和 / 或 S206A 突变的人 Wnt7a 的氨基酸残基 31-349 与作为 N- 或 C- 端融合体的 IgG κ 分泌信号肽和人 IgG1e3-Fc1 结构域符合读框地亚克隆。该 Fc 结构域包含与天然 IgG1 序列不同的氨基酸改变 (E233P/L234V/L235A/ Δ G236+A327G/A330S/P331S),以降低抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖的细胞毒性(CDC)的影响。17 个氨基酸的接头(GT (GGGGS) 3) 加入 Wnt 蛋白序列和 Fc 融合序列之间,以降低空间位阻并防止 Wnt 特异活性的降低。将这些载体转染入 HEK293 细胞并且蛋白表达持续 48 小时。蛋白表达和分泌通过 Western 印迹监测,并可参见图 11a 和 11b。当用抗 Wnt7a 抗体或抗 Fc 检测免疫检测时,见到预期分子量的完整融合蛋白。观察融合蛋白的有效分泌。分泌的蛋白随后通过蛋白 A 或蛋白 G 亲和层析纯化。

[0001]

序列表

<110> 菲特治疗公司
李彤
莫妮卡·黑赫斯特·班尼特
迈克尔·J·菲奇
彼得·弗林

<120> 新型WNT组合物和该组合物的治疗用途

<130> FATE-095/01W0

<150> US 61/431,701

<151> 2011-01-11

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1732

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

gaggggcggg ggctggagge agcagcgccc ccgcactccc cgcgtctcgc acacttgcac      60
cggtcgctcg cgcgcagccc ggctcgccc caegccgcgc tcgtctctcc ctccctcctc      120
ccgctccgtg gctcccgtgc tcttgccgag gctcaggcgc ggagcgcgcg gacggggcga      180
ccgacagacg gcccggggga cgcctcggt cgcgcctccc ggccgggcta tgttgattgc      240
cccgcggggg ccggcccgcg ggatcagcac agcccgccc ggcccccgg ccgccaatcg      300
ggactatgaa ccggaagcg cgccgctgcc tgggccacct cttctcagc ctgggcatgg      360
tctacctccg gatcggtggc ttctctcag tggtagctct ggccgcaagc atcatctgta      420
acaagatccc aggcctggct ccagacagc ggccgactcg ccagagccgg ccgacgcca      480
tcctcgtcat aggagaagcg tcacaaatgg gccctggaag gtgtcagttt cagtcccgca      540
atggccgctg gaactgctct gcactgggag agccgacgct ctccgggaag gagctcaaaag      600
tggggagccg ggaggtcgcg ttacctaag ccactattgc ccgcccgtg gcccacgcca      660
tcacagctgc ctgtaccag ggcaacctga gcgactgtgg ctgcgacaaa gagaagcaag      720
gccagtacca ccgggacgag ggctggaagt ggggtggctg ctctgccgac atccgctacg      780
gcctcgcttt ccgaaggte ttgttgatg ccggggagat caagcagaat gcccggaact      840
tcctgaactt gcacaacaac gaggcaggcc gaaagatcct ggaggagaa atgaagctgg      900
aatgtaagtg ccacggcgct tcaggtcgtg gcaccaccaa gacgtgctgg accacactgc      960
cacagtttcg ggagctgggc taegtgtctc aggacaagta caacaggccc gttcacgtgg      1020
agcctgtcgc tgccagccgc aacaagcgcc ccaccttctt gaagatcaag aagccactgt      1080
cgtaccgcaa gcccatggac acggacctgg tgtaacatga gaagtcgccc aactactgag      1140
aggaggaccc ggtgaccgga agtgtgggca ccaggggcgc cgcctgcaac aagacggctc      1200
cccaggccag cggtgtgac ctcatgtgct gtgggcgtgg ctacaacacc caccagtacg      1260

```

[0002]

```

ccgcgctgtg gcagtgcaac tgtaagttcc actggtgctg ctatgtcaag tgcaacacgt      1320
gcagcgagcg caccgagatg tacacgtgca agtgagcccc gtgtgcacac caccctcccg      1380
ctgcaagtca gatttctggg aggactggac cgtttccaag ctgegggtct cctggcagga      1440
tgctgagctt gtcctttctg ctgaggaggg tacttttctt gggtttcttg caggcatccg      1500
tgggggaaaa aaaatctctc agagccctca actattctgt tccacaccea atgtgtctcc      1560
accctccccc agacacagcc caggtccctc cggggtgga gcaagcctt ctgcagcagg      1620
aacctctggac cctgggcct catcacagca atatttaaca atttattctg ataaaaataa      1680
tattaattta ttaattaaa aagaattctt ccacaaaaaa aaaaaaaaaa aa      1732

```

<210> 2
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

```

Met Asn Arg Lys Ala Arg Arg Cys Leu Gly His Leu Phe Leu Ser Leu
1           5           10           15

```

```

Gly Met Val Tyr Leu Arg Ile Gly Gly Phe Ser Ser Val Val Ala Leu
20          25          30

```

```

Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln
35          40          45

```

```

Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly Glu
50          55          60

```

```

Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn Gly
65          70          75          80

```

```

Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys Glu
85          90          95

```

```

Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile Ala
100         105         110

```

```

Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn Leu
115         120         125

```

```

Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg Asp
130         135         140

```

```

Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly Ile
145         150         155         160

```

```

Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn Ala
165         170         175

```

[0003]

Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile Leu
 180 185 190
 Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser
 195 200 205
 Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu Leu
 210 215 220
 Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys Lys
 245 250 255
 Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile Glu
 260 265 270
 Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val Gly
 275 280 285
 Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly Cys
 290 295 300
 Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala Arg
 305 310 315 320
 Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys
 325 330 335
 Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
 340 345
 <210> 3
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 改造突变的人Wnt-7A多肽
 <400> 3
 Met Asn Arg Lys Ala Arg Arg Cys Leu Gly His Leu Phe Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Met Val Tyr Leu Arg Ile Gly Gly Phe Ser Ser Val Val Ala Leu
 20 25 30
 Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln
 35 40 45
 Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly Glu
 50 55 60

[0004]

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

[0005]

Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
340 345

<210> 4
<211> 349
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 改造突变的人Wnt-7A多肽

<400> 4

Met Asn Arg Lys Ala Arg Arg Cys Leu Gly His Leu Phe Leu Ser Leu
1 5 10 15

Gly Met Val Tyr Leu Arg Ile Gly Gly Phe Ser Ser Val Val Ala Leu
20 25 30

Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln
35 40 45

Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly Glu
50 55 60

Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn Gly
65 70 75 80

Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys Glu
85 90 95

Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile Ala
100 105 110

Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn Leu
115 120 125

Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg Asp
130 135 140

Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly Ile
145 150 155 160

Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn Ala
165 170 175

Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile Leu
180 185 190

Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ala Gly Ser
195 200 205

[0006]

Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu Leu
 210 215 220
 Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys Lys
 245 250 255
 Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile Glu
 260 265 270
 Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val Gly
 275 280 285
 Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly Cys
 290 295 300
 Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala Arg
 305 310 315 320
 Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys
 325 330 335
 Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
 340 345
 <210> 5
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 改造突变的人Wnt-7A多肽
 <400> 5
 Met Asn Arg Lys Ala Arg Arg Cys Leu Gly His Leu Phe Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Met Val Tyr Leu Arg Ile Gly Gly Phe Ser Ser Val Val Ala Leu
 20 25 30
 Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln
 35 40 45
 Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly Glu
 50 55 60
 Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Ala Gln Phe Gln Phe Arg Asn Gly
 65 70 75 80
 Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys Glu
 85 90 95

[0007]

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

<210> 6

<211> 349

[0008]

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 6

Met Thr Arg Lys Ala Arg Arg Cys Leu Gly His Leu Phe Leu Ser Leu
1 5 10 15

Gly Ile Val Tyr Leu Arg Ile Gly Gly Phe Ser Ser Val Val Ala Leu
20 25 30

Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln
35 40 45

Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly Glu
50 55 60

Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn Gly
65 70 75 80

Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys Glu
85 90 95

Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile Ala
100 105 110

Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn Leu
115 120 125

Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg Asp
130 135 140

Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly Ile
145 150 155 160

Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn Ala
165 170 175

Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile Leu
180 185 190

Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser
195 200 205

Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu Leu
210 215 220

Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu Pro
225 230 235 240

Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys Lys
245 250 255

[0009]

Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile Glu
 260 265 270
 Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val Gly
 275 280 285
 Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly Cys
 290 295 300
 Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala Arg
 305 310 315 320
 Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys
 325 330 335
 Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
 340 345
 <210> 7
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> 大家鼠(Rattus norvegicus)
 <400> 7
 Met Thr Arg Lys Ala Arg Arg Cys Leu Gly His Leu Phe Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Ile Val Tyr Leu Arg Ile Gly Asp Phe Ser Ser Val Val Ala Leu
 20 25 30
 Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln
 35 40 45
 Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly Glu
 50 55 60
 Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn Gly
 65 70 75 80
 Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys Glu
 85 90 95
 Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile Ala
 100 105 110
 Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn Leu
 115 120 125
 Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg Asp
 130 135 140

[0010]

Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly Ile
 145 150 155 160
 Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn Ala
 165 170 175
 Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile Leu
 180 185 190
 Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser
 195 200 205
 Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu Leu
 210 215 220
 Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys Lys
 245 250 255
 Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile Glu
 260 265 270
 Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val Gly
 275 280 285
 Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly Cys
 290 295 300
 Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala Arg
 305 310 315 320
 Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys
 325 330 335
 Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
 340 345
 <210> 8
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> 原鸡(Gallus gallus)
 <400> 8
 Met Asn Arg Lys Thr Arg Arg Trp Ile Phe His Ile Phe Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Ile Val Tyr Ile Lys Ile Gly Gly Phe Ser Ser Val Val Ala Leu
 20 25 30
 Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln

[0011]

35	40	45
Arg Ala Ile Cys Gln Ser	Arg Pro Asp Ala Ile	Ile Val Ile Gly Glu
50	55	60
Gly Ser Gln Met Gly Ile	Asn Glu Cys Gln Phe	Gln Phe Arg Asn Gly
65	70	75
80		
Arg Trp Asn Cys Ser Ala	Leu Gly Glu Arg Thr	Val Phe Gly Lys Glu
85	90	95
100		
Leu Lys Val Gly Ser Arg	Glu Ala Ala Phe Thr	Tyr Ala Ile Ile Ala
105		110
115		
Ala Gly Val Ala His Ala	Ile Thr Ala Ala Cys	Thr Gln Gly Asn Leu
120		125
130		
Ser Asp Cys Gly Cys Asp	Lys Glu Lys Gln Gly	Gln Tyr His Lys Glu
135		140
145		
Glu Gly Trp Lys Trp Gly	Gly Cys Ser Ala Asp	Ile Arg Tyr Gly Ile
150		155
160		
Gly Phe Ala Lys Val Phe	Val Asp Ala Arg Glu	Ile Lys Gln Asn Ala
165		170
175		
Arg Thr Leu Met Asn Leu	His Asn Asn Glu Ala	Gly Arg Lys Ile Leu
180		185
190		
Glu Glu Asn Met Lys Leu	Glu Cys Lys Cys His	Gly Val Ser Gly Ser
195		200
205		
Cys Thr Thr Lys Thr Cys	Trp Thr Thr Leu Pro	Lys Phe Arg Glu Leu
210		215
220		
Gly Tyr Ile Leu Lys Asp	Lys Tyr Asn Glu Ala	Val Gln Val Glu Pro
225		230
235		
240		
Val Arg Ala Ser Arg Asn	Lys Arg Pro Thr Phe	Leu Lys Ile Lys Lys
245		250
255		
Pro Leu Ser Tyr Arg Lys	Pro Met Asp Thr Asp	Leu Val Tyr Ile Glu
260		265
270		
Lys Ser Pro Asn Tyr Cys	Glu Glu Asp Pro Val	Thr Gly Ser Val Gly
275		280
285		
Thr Gln Gly Arg Met Cys	Asn Lys Thr Ala Gln	Gln Ser Asn Gly Cys
290		295
300		
Asp Leu Met Cys Cys Gly	Arg Gly Tyr Asn Thr	His Gln Tyr Ser Arg

[0012]

305		310		315		320
Val Trp Gln Cys	Asn Cys Lys Phe His	Trp Cys Cys Tyr	Val Lys Cys			
	325		330		335	
Asn Thr Cys Ser	Glu Arg Thr Glu	Val Tyr Thr Cys Lys				
	340	345				
<210>	9					
<211>	349					
<212>	PRT					
<213>	斑马鱼					
<400>	9					
Met Ser Arg Lys	Thr Arg Arg Trp	Ile Phe His	Ile Phe Leu Cys Leu			
1	5	10	15			
Gly Ile Ile Tyr	Leu Lys Ile Gly	Gly Phe Ser Ser	Val Val Ala Leu			
	20	25	30			
Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys	Ile Pro Gly Leu	Ala Pro Arg Gln			
	35	40	45			
Arg Thr Ile Cys	Gln Ser Arg Pro	Asp Ala Ile Ile	Val Ile Gly Glu			
	50	55	60			
Gly Ala Gln Met	Gly Ile Asn Glu	Cys Gln Phe Gln	Phe Lys Asn Gly			
65	70	75	80			
Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly	Glu Arg Thr Val	Phe Gly Lys Glu			
	85	90	95			
Leu Lys Val Gly	Ser Lys Glu Ala	Ala Phe Thr Tyr	Ala Ile Ile Ala			
	100	105	110			
Ala Gly Val Ala	His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr	Gln Gly Thr Leu			
	115	120	125			
Ser Gly Cys Gly	Cys Asp Lys Glu	Lys Gln Gly Phe	Tyr Asn Gln Glu			
	130	135	140			
Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys	Ser Ala Asp Ile	Arg Tyr Gly Leu			
	145	150	155			160
Ser Phe Ser Lys	Val Phe Leu Asp	Ala Arg Glu Ile	Lys Gln Asn Ala			
	165	170	175			
Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn	Asn Glu Val Gly	Arg Lys Ile Leu			
	180	185	190			
Glu Lys Asn Met	Arg Leu Glu Cys	Lys Cys His Gly	Val Ser Gly Ser			
	195	200	205			

[0013]

Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Lys Phe Arg Gln Leu
210 215 220

Gly Tyr Ile Leu Lys Glu Arg Tyr Asn His Ala Val His Val Glu Pro
225 230 235 240

Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Ala Phe Leu Lys Val Lys Lys
245 250 255

Pro Tyr Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile Glu
260 265 270

Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Ala Asp Pro Val Thr Gly Ser Met Gly
275 280 285

Thr Gln Gly Arg Ile Cys Asn Lys Thr Ala Gln His Thr Asn Gly Cys
290 295 300

Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ser Arg
305 310 315 320

Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe Leu Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys
325 330 335

Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Val Tyr Thr Cys Lys
340 345

<210> 10
<211> 349
<212> PRT
<213> 野猪 (Sus scrofa)

<400> 10

Met Asn Arg Lys Ala Arg Arg Cys Leu Gly His Leu Phe Leu Ser Leu
1 5 10 15

Gly Leu Val Tyr Leu Arg Ile Gly Gly Phe Ser Ser Val Val Ala Leu
20 25 30

Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln
35 40 45

Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly Glu
50 55 60

Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn Gly
65 70 75 80

Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys Glu
85 90 95

[0014]

Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile Ala
 100 105 110

Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn Leu
 115 120 125

Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg Asp
 130 135 140

Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly Ile
 145 150 155 160

Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn Ala
 165 170 175

Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile Leu
 180 185 190

Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser
 195 200 205

Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu Leu
 210 215 220

Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu Pro
 225 230 235 240

Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys Lys
 245 250 255

Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile Glu
 260 265 270

Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val Gly
 275 280 285

Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly Cys
 290 295 300

Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala Arg
 305 310 315 320

Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys
 325 330 335

Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Val Tyr Thr Cys Lys
 340 345

<210> 11
 <211> 349
 <212> PRT

[0015]

<213> 牛

<400> 11

Met Asn Arg Lys Ala Arg Arg Cys Leu Gly His Leu Phe Leu Ser Leu
1 5 10 15

Gly Met Val Tyr Leu Arg Ile Gly Gly Phe Ser Ser Val Val Ala Leu
20 25 30

Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln
35 40 45

Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly Glu
50 55 60

Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn Gly
65 70 75 80

Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys Glu
85 90 95

Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile Ala
100 105 110

Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn Leu
115 120 125

Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg Asp
130 135 140

Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly Ile
145 150 155 160

Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn Ala
165 170 175

Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile Leu
180 185 190

Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser
195 200 205

Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu Leu
210 215 220

Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu Pro
225 230 235 240

Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Ala Phe Leu Lys Ile Lys Lys
245 250 255

[0016]

Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Glu Leu Val Tyr Ile Glu
 260 265 270
 Lys Ser Pro Ser Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Ala Thr Gly Ser Val Gly
 275 280 285
 Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly Cys
 290 295 300
 Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala Arg
 305 310 315 320
 Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys
 325 330 335
 Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Val Tyr Thr Cys Lys
 340 345
 <210> 12
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 带有人免疫球蛋白 κ 链信号肽的人Wnt7a多肽
 <400> 12
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30
 Lys Leu Ala Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu
 35 40 45
 Ala Pro Arg Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile
 50 55 60
 Val Ile Gly Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln
 65 70 75 80
 Phe Arg Asn Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val
 85 90 95
 Phe Gly Lys Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr
 100 105 110
 Ala Ile Ile Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr
 115 120 125
 Gln Gly Asn Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln
 130 135 140

[0017]

Tyr His Arg Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile
145 150 155 160

Arg Tyr Gly Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile
165 170 175

Lys Gln Asn Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly
180 185 190

Arg Lys Ile Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly
195 200 205

Val Ser Gly Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln
210 215 220

Phe Arg Glu Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val
225 230 235 240

His Val Glu Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu
245 250 255

Lys Ile Lys Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu
260 265 270

Val Tyr Ile Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr
275 280 285

Gly Ser Val Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln
290 295 300

Ala Ser Gly Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His
305 310 315 320

Gln Tyr Ala Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys
325 330 335

Tyr Val Lys Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys
340 345 350

Lys

<210> 13
<211> 353
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 带有人免疫球蛋白 κ 链信号肽的人Wnt7a多肽
<400> 13

[0018]

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1           5           10           15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
20           25           30

Lys Leu Ala Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu
35           40           45

Ala Pro Arg Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile
50           55           60

Val Ile Gly Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Ala Gln Phe Gln
65           70           75           80

Phe Arg Asn Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val
85           90           95

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

Ala Ile Ile Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr
115          120          125

Gln Gly Asn Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln
130          135          140

Tyr His Arg Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile
145          150          155          160

Arg Tyr Gly Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile
165          170          175

Lys Gln Asn Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly
180          185          190

Arg Lys Ile Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly
195          200          205

Val Ala Gly Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln
210          215          220

Phe Arg Glu Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val
225          230          235          240

His Val Glu Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu
245          250          255

Lys Ile Lys Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu
260          265          270

```

[0019]

Val Tyr Ile Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr
 275 280 285

Gly Ser Val Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln
 290 295 300

Ala Ser Gly Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His
 305 310 315 320

Gln Tyr Ala Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys
 325 330 335

Tyr Val Lys Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys
 340 345 350

Lys

<210> 14
 <211> 1143
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 14
 atgaagaagt ccattggaat attaagccca ggagttgctt tggggatggo tggaagtgca 60
 atgttctcca agttcttctt agtggtcttg gccatatitt tctctctcgc ccaggttgta 120
 attgaagcca attcttggtg gtcgctaggt atgaataacc ctgttcagat gtcagaagta 180
 tatattatag gaggacagcc tctctgcagc caactggcag gactttctca aggacagaag 240
 aaactgtgcc acttgatcca ggaccacatg cagtacatcg gagaaggcgc gaagacaggo 300
 atcaagaagt gccagatcca attccgacat cgaagggtga actgcagcac tgttgataac 360
 acctctgttt ttggcagggt gatgcagata ggcagccgcg agacggcctt cacatacgcg 420
 gtgagcgcag cagggtgtgt gaacgccatg agccgggcgt gccgcgaggg cgagctgtcc 480
 acctgcggtt gcagccgcgc cgcgcgcgcc aaggacctgc cgcgggaactg gctctggggo 540
 ggctgcggcg acaacatcga ctatggctac cgttttgcca aggagtctgt ggacgcgcgc 600
 gagcgggagc gcatccagcc caagggtctc taagagagtg ctgcctctct catgaacctg 660
 cacaacaacg aggcgggcgc caggacggtg tacaacctgg ctgatgtggo ctgcaagtgc 720
 catgggtgtt cgggtctatg tagctgaag acatgctggo tgcagctggo agacttccgc 780
 aaggtgggtg atgccctgaa ggagaagtac gacagcgcgc cggccatgcg gctcaacagc 840
 cggggcaagt tgggtacaggt caacagccgc ttcaactcgc ccaccacaca agacctggtc 900
 tacatcgacc ccagccctga ctactgcgtg cgcaatgaga gcaccggctc gctgggcacg 960
 cagggcgcgc tgtgcaacaa gaactcggag ggcatggaat gctgcgagct catgtgctgc 1020
 ggccgtgggt acgaccagtt caagaccgtg cagacggagc gctgccactg caagttccac 1080
 tgggtgtgct acgtcaagtg caagaagtgc acggagatcg tggaccagtt tgtgtgcaag 1140

[0020]

tag 1143

<210> 15
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15

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

Ala Gly Ser Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val Ala Leu Ala Ile
 20 25 30

Phe Phe Ser Phe Ala Gln Val Val Ile Glu Ala Asn Ser Trp Trp Ser
 35 40 45

Leu Gly Met Asn Asn Pro Val Gln Met Ser Glu Val Tyr Ile Ile Gly
 50 55 60

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

Lys Leu Cys His Leu Tyr Gln Asp His Met Gln Tyr Ile Gly Glu Gly
 85 90 95

Ala Lys Thr Gly Ile Lys Glu Cys Gln Tyr Gln Phe Arg His Arg Arg
 100 105 110

Trp Asn Cys Ser Thr Val Asp Asn Thr Ser Val Phe Gly Arg Val Met
 115 120 125

Gln Ile Gly Ser Arg Glu Thr Ala Phe Thr Tyr Ala Val Ser Ala Ala
 130 135 140

Gly Val Val Asn Ala Met Ser Arg Ala Cys Arg Glu Gly Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Thr Cys Gly Cys Ser Arg Ala Ala Arg Pro Lys Asp Leu Pro Arg Asp
 165 170 175

Trp Leu Trp Gly Gly Cys Gly Asp Asn Ile Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe
 180 185 190

Ala Lys Glu Phe Val Asp Ala Arg Glu Arg Glu Arg Ile His Ala Lys
 195 200 205

Gly Ser Tyr Glu Ser Ala Arg Ile Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu
 210 215 220

Ala Gly Arg Arg Thr Val Tyr Asn Leu Ala Asp Val Ala Cys Lys Cys
 225 230 235 240

[0021]

His Gly Val Ser Gly Ser Cys Ser Leu Lys Thr Cys Trp Leu Gln Leu
245 250 255

Ala Asp Phe Arg Lys Val Gly Asp Ala Leu Lys Glu Lys Tyr Asp Ser
260 265 270

Ala Ala Ala Met Arg Leu Asn Ser Arg Gly Lys Leu Val Gln Val Asn
275 280 285

Ser Arg Phe Asn Ser Pro Thr Thr Gln Asp Leu Val Tyr Ile Asp Pro
290 295 300

Ser Pro Asp Tyr Cys Val Arg Asn Glu Ser Thr Gly Ser Leu Gly Thr
305 310 315 320

Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu
325 330 335

Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp Gln Phe Lys Thr Val Gln Thr
340 345 350

Glu Arg Cys His Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys Lys
355 360 365

Lys Cys Thr Glu Ile Val Asp Gln Phe Val Cys Lys
370 375 380

<210> 16

<211> 380

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人Wnt5a多肽

<400> 16

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

Ala Gly Ser Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val Ala Leu Ala Ile
20 25 30

Phe Phe Ser Phe Ala Gln Val Val Ile Glu Ala Asn Ser Trp Trp Ser
35 40 45

Leu Gly Met Asn Asn Pro Val Gln Met Ser Glu Val Tyr Ile Ile Gly
50 55 60

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

[0022]

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

[0023]

Glu Arg Cys His Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys Lys
 355 360 365

Lys Cys Thr Glu Ile Val Asp Gln Phe Val Cys Lys
 370 375 380

<210> 17
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的人Wnt5a多肽

<400> 17

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

Ala Gly Ser Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val Ala Leu Ala Ile
 20 25 30

Phe Phe Ser Phe Ala Gln Val Val Ile Glu Ala Asn Ser Trp Trp Ser
 35 40 45

Leu Gly Met Asn Asn Pro Val Gln Met Ser Glu Val Tyr Ile Ile Gly
 50 55 60

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

Lys Leu Cys His Leu Tyr Gln Asp His Met Gln Tyr Ile Gly Glu Gly
 85 90 95

Ala Lys Thr Gly Ile Lys Glu Cys Gln Tyr Gln Phe Arg His Arg Arg
 100 105 110

Trp Asn Cys Ser Thr Val Asp Asn Thr Ser Val Phe Gly Arg Val Met
 115 120 125

Gln Ile Gly Ser Arg Glu Thr Ala Phe Thr Tyr Ala Val Ser Ala Ala
 130 135 140

Gly Val Val Asn Ala Met Ser Arg Ala Cys Arg Glu Gly Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Thr Cys Gly Cys Ser Arg Ala Ala Arg Pro Lys Asp Leu Pro Arg Asp
 165 170 175

Trp Leu Trp Gly Gly Cys Gly Asp Asn Ile Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe
 180 185 190

Ala Lys Glu Phe Val Asp Ala Arg Glu Arg Glu Arg Ile His Ala Lys
 195 200 205

[0024]

Gly Ser Tyr Glu Ser Ala Arg Ile Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu
210 215 220

Ala Gly Arg Arg Thr Val Tyr Asn Leu Ala Asp Val Ala Cys Lys Cys
225 230 235 240

His Gly Val Ala Gly Ser Cys Ser Leu Lys Thr Cys Trp Leu Gln Leu
245 250 255

Ala Asp Phe Arg Lys Val Gly Asp Ala Leu Lys Glu Lys Tyr Asp Ser
260 265 270

Ala Ala Ala Met Arg Leu Asn Ser Arg Gly Lys Leu Val Gln Val Asn
275 280 285

Ser Arg Phe Asn Ser Pro Thr Thr Gln Asp Leu Val Tyr Ile Asp Pro
290 295 300

Ser Pro Asp Tyr Cys Val Arg Asn Glu Ser Thr Gly Ser Leu Gly Thr
305 310 315 320

Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu
325 330 335

Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp Gln Phe Lys Thr Val Gln Thr
340 345 350

Glu Arg Cys His Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys Lys
355 360 365

Lys Cys Thr Glu Ile Val Asp Gln Phe Val Cys Lys
370 375 380

<210> 18
<211> 380
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变的人Wnt5a多肽

<400> 18

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

Ala Gly Ser Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val Ala Leu Ala Ile
20 25 30

Phe Phe Ser Phe Ala Gln Val Val Ile Glu Ala Asn Ser Trp Trp Ser
35 40 45

[0025]

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

[0026]

Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu
 325 330 335
 Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp Gln Phe Lys Thr Val Gln Thr
 340 345 350
 Glu Arg Cys His Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys Lys
 355 360 365
 Lys Cys Thr Glu Ile Val Asp Gln Phe Val Cys Lys
 370 375 380
 <210> 19
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 19
 Met Lys Lys Pro Ile Gly Ile Leu Ser Pro Gly Val Ala Leu Gly Thr
 1 5 10 15
 Ala Gly Gly Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Met Ala Leu Ala Thr
 20 25 30
 Phe Phe Ser Phe Ala Gln Val Val Ile Glu Ala Asn Ser Trp Trp Ser
 35 40 45
 Leu Gly Met Asn Asn Pro Val Gln Met Ser Glu Val Tyr Ile Ile Gly
 50 55 60
 Ala Gln Pro Leu Cys Ser Gln Leu Ala Gly Leu Ser Gln Gly Gln Lys
 65 70 75 80
 Lys Leu Cys His Leu Tyr Gln Asp His Met Gln Tyr Ile Gly Glu Gly
 85 90 95
 Ala Lys Thr Gly Ile Lys Glu Cys Gln Tyr Gln Phe Arg His Arg Arg
 100 105 110
 Trp Asn Cys Ser Thr Val Asp Asn Thr Ser Val Phe Gly Arg Val Met
 115 120 125
 Gln Ile Gly Ser Arg Glu Thr Ala Phe Thr Tyr Ala Val Ser Ala Ala
 130 135 140
 Gly Val Val Asn Ala Met Ser Arg Ala Cys Arg Glu Gly Glu Leu Ser
 145 150 155 160
 Thr Cys Gly Cys Ser Arg Ala Ala Arg Pro Lys Asp Leu Pro Arg Asp
 165 170 175
 Trp Leu Trp Gly Gly Cys Gly Asp Asn Ile Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe

[0027]

180	185	190
Ala Lys Glu Phe Val Asp Ala Arg Glu Arg Glu Arg Ile His Ala Lys 195 200 205		
Gly Ser Tyr Glu Ser Ala Arg Ile Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu 210 215 220		
Ala Gly Arg Arg Thr Val Tyr Asn Leu Ala Asp Val Ala Cys Lys Cys 225 230 235 240		
His Gly Val Ser Gly Ser Cys Ser Leu Lys Thr Cys Trp Leu Gln Leu 245 250 255		
Ala Asp Phe Arg Lys Val Gly Asp Ala Leu Lys Glu Lys Tyr Asp Ser 260 265 270		
Ala Ala Ala Met Arg Leu Asn Ser Arg Gly Lys Leu Val Gln Val Asn 275 280 285		
Ser Arg Phe Asn Ser Pro Thr Thr Gln Asp Leu Val Tyr Ile Asp Pro 290 295 300		
Ser Pro Asp Tyr Cys Val Arg Asn Glu Ser Thr Gly Ser Leu Gly Thr 305 310 315 320		
Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu 325 330 335		
Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp Gln Phe Lys Thr Val Gln Thr 340 345 350		
Glu Arg Cys His Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys Lys 355 360 365		
Lys Cys Thr Glu Ile Val Asp Gln Phe Val Cys Lys 370 375 380		
<210> 20		
<211> 379		
<212> PRT		
<213> 大家鼠		
<400> 20		
Met Lys Lys Pro Ile Gly Ile Leu Ser Pro Gly Val Ala Leu Gly Thr 1 5 10 15		
Ala Gly Gly Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Met Ala Leu Ala Thr 20 25 30		
Phe Phe Ser Phe Ala Gln Val Val Ile Lys Ala Asn Ser Trp Trp Ser 35 40 45		

[0028]

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

[0029]

Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
325 330 335

Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp Gln Phe Lys Thr Val Gln Thr Glu
340 345 350

Arg Cys His Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys Lys Lys
355 360 365

Cys Thr Glu Ile Val Asp Gln Phe Val Cys Lys
370 375

<210> 21
<211> 385
<212> PRT
<213> 原鸡

<400> 21

Met Glu Lys Ser Thr Ala Val Leu Ile Gln Gly Gly Ala Leu Gly Thr
1 5 10 15

Leu Gly Ser Thr Met Ala Ser Gln Tyr Leu Val Val Ala Leu Ala Ile
20 25 30

Phe Ser Ser Cys Thr Gln Val Val Ile Glu Ala Ser Ser Trp Trp Ser
35 40 45

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

Val Tyr Ile Ile Gly Ala Gln Pro Leu Cys Ser Gln Leu Ala Gly Leu
65 70 75 80

Ser Gln Gly Gln Lys Lys Leu Cys Gln Leu Tyr Gln Asp His Met Gln
85 90 95

Phe Ile Gly Glu Gly Ala Lys Thr Gly Ile Lys Glu Cys Gln Tyr Gln
100 105 110

Phe Arg His Arg Arg Trp Asn Cys Ser Thr Val Asp Asn Asn Ser Val
115 120 125

Phe Gly Arg Val Met Gln Ile Gly Ser Arg Glu Thr Ala Phe Thr Tyr
130 135 140

Ala Val Ser Ala Ala Gly Val Val Asn Ala Met Ser Arg Ala Cys Arg
145 150 155 160

Glu Gly Glu Leu Ser Ser Cys Gly Cys Ser Arg Ala Ala Arg Pro Lys
165 170 175

[0030]

Asp Leu Pro Arg Asp Trp Leu Trp Gly Gly Cys Gly Asp Asn Ile Glu
180 185 190

Tyr Gly Tyr Arg Phe Ala Lys Glu Phe Val Asp Ala Arg Glu Arg Glu
195 200 205

Arg Val Tyr Gln Arg Gly Ser Tyr Glu Ser Ala Arg Ile Met Met Asn
210 215 220

Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Arg Thr Val Tyr Asn Leu Ala Asp
225 230 235 240

Val Ala Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser Cys Ser Leu Lys Thr
245 250 255

Cys Trp Leu Gln Leu Ala Asp Phe Arg Lys Val Gly Asp Ala Leu Lys
260 265 270

Glu Lys Tyr Asp Ser Ala Ala Ala Met Lys Leu Asn Ser Arg Gly Lys
275 280 285

Leu Val Gln Met Asn Ser Arg Phe Asn Ala Pro Thr Ile His Asp Leu
290 295 300

Ile Tyr Ile Asp Pro Ser Pro Asp Tyr Cys Met Arg Asn Glu Ser Thr
305 310 315 320

Gly Ser Leu Gly Thr Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly
325 330 335

Met Asp Gly Cys Glu Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp Gln Phe
340 345 350

Lys Thr Val Gln Arg Glu Arg Cys His Cys Lys Phe His Trp Cys Cys
355 360 365

Tyr Val Lys Cys Lys Leu Cys Thr Glu Ile Val Asp Gln Phe Val Cys
370 375 380

Lys
385

<210> 22
<211> 374
<212> PRT
<213> 斑马鱼

<400> 22

Met Met Leu Leu Lys Leu Lys Trp Thr Ser Ser Gly Val Lys Asp Thr
1 5 10 15

[0031]

Pro His Thr	Leu Leu Ser Ile Ile Ile Thr Phe Cys Val Phe Phe Met
20	25 30
Leu Glu Ile Val Asp Ala Asn Ser Trp Trp Ser Leu Ala Met Asn Pro	
35	40 45
Leu Leu Ile Pro Glu Val Tyr Val Ile Gly Gly Gln Pro Leu Cys Ser	
50	55 60
Gln Leu Ser Gly Leu Ser Lys Gly Gln Lys Lys Leu Cys Gln Leu Tyr	
65	70 75 80
Gln Asp His Met Gln Tyr Ile Gly Glu Gly Ala Lys Thr Gly Ile Arg	
	85 90 95
Glu Cys Gln His Gln Phe Arg His Arg Arg Trp Asn Cys Ser Thr Val	
	100 105 110
Asp Asn Ser Thr Val Leu Gly Arg Val Met His Ile Gly Ser Arg Glu	
	115 120 125
Ser Ala Phe Ala Phe Ala Ile Ser Ala Ala Gly Val Leu His Ala Val	
	130 135 140
Ser Arg Ala Cys Arg Glu Gly Ala Leu Ser Ser Cys Gly Cys Ser Arg	
	145 150 155 160
Ala Ser Arg Pro Lys Asp Leu Pro Arg Asp Trp Leu Trp Gly Gly Cys	
	165 170 175
Gly Asp Asn Leu Asn Tyr Gly Tyr Arg Phe Ser Arg Glu Phe Val Asp	
	180 185 190
Ala Arg Glu Arg Glu Lys Thr Phe Ser Lys Gly Ser Ala Glu Ser Ala	
	195 200 205
Arg Gln Met Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Arg Ile Val	
	210 215 220
Ser Asp Leu Ala Asp Val Ser Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser	
	225 230 235 240
Cys Ser Leu Lys Thr Cys Trp Leu Gln Leu Ala Asp Phe Arg Lys Val	
	245 250 255
Gly Asp Val Leu Lys Glu Lys Tyr Asp Ser Ala Ala Ala Met Arg Met	
	260 265 270
Asn Gly Arg Gly Lys Leu Val Gln Met His Ser Lys Phe Ser Pro Pro	
	275 280 285

[0032]

Ser Gly Gln Asp Leu Leu Tyr Leu Gln Pro Ser Pro Asp Tyr Cys Ile
 290 295 300
 Arg Asn Ser Ser Ser Gly Ser Leu Gly Thr Gln Gly Arg Leu Cys Asn
 305 310 315 320
 Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Ala Leu Met Cys Cys Gly Arg
 325 330 335
 Gly Tyr Asp Gln Tyr Lys Ala Glu Leu Val Glu Arg Cys His Cys Lys
 340 345 350
 Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Arg Cys Lys Arg Cys Ser Ser Ile Val
 355 360 365
 Asp Gln Tyr Val Cys Lys
 370
 <210> 23
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 牛
 <400> 23
 Met Lys Lys Ser Ile Gly Ile Leu Ser Pro Gly Val Ala Trp Gly Thr
 1 5 10 15
 Ala Gly Arg Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Met Ala Leu Ala Ile
 20 25 30
 Phe Leu Ser Phe Ala Gln Val Val Ile Glu Ala Asn Ser Trp Trp Ser
 35 40 45
 Leu Gly Met Asn Asn Pro Val Gln Met Ser Glu Val Tyr Ile Ile Gly
 50 55 60
 Ala Gln Pro Leu Cys Ser Gln Leu Ala Gly Leu Ser Gln Gly Gln Lys
 65 70 75 80
 Lys Leu Cys His Leu Tyr Gln Asp His Met Gln Tyr Ile Gly Glu Gly
 85 90 95
 Ala Lys Thr Gly Ile Lys Glu Cys Gln Tyr Gln Phe Arg His Arg Arg
 100 105 110
 Trp Asn Cys Ser Thr Val Asp Asn Thr Ser Val Phe Gly Arg Val Met
 115 120 125
 Gln Ile Gly Ser Arg Glu Thr Ala Phe Thr Tyr Ala Val Ser Ala Ala
 130 135 140
 Gly Val Val Asn Ala Met Ser Arg Ala Cys Arg Glu Gly Glu Leu Ser

[0033]

145	150	155	160
Thr Cys Gly Cys Ser Arg Ala Ala Arg Pro Lys Asp Leu Pro Arg Asp	165	170	175
Trp Leu Trp Gly Gly Cys Gly Asp Asn Ile Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe	180	185	190
Ala Lys Glu Phe Val Asp Ala Arg Glu Arg Glu Arg Ile His Ala Lys	195	200	205
Gly Ser Tyr Glu Ser Ala Arg Ile Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu	210	215	220
Ala Gly Arg Arg Thr Val Tyr Ser Leu Ala Asp Val Ala Cys Lys Cys	225	230	235
His Gly Val Ser Gly Ser Cys Ser Leu Lys Thr Cys Trp Leu Gln Leu	245	250	255
Ala Asp Phe Arg Lys Val Gly Asp Ala Leu Lys Glu Lys Tyr Asp Ser	260	265	270
Ala Ala Ala Met Arg Leu Asn Ser Arg Gly Lys Leu Val Gln Val Asn	275	280	285
Ser Arg Phe Asn Ser Pro Thr Thr Gln Asp Leu Val Tyr Ile Asp Pro	290	295	300
Ser Pro Asp Tyr Cys Val Arg Asn Glu Ser Thr Gly Ser Leu Gly Thr	305	310	315
Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu	325	330	335
Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp Gln Phe Lys Thr Val Gln Thr	340	345	350
Glu Arg Cys His Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys Lys	355	360	365
Lys Cys Thr Glu Ile Val Asp Gln Phe Val Cys Lys	370	375	380
<210> 24			
<211> 370			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 24			
Met Gly Leu Trp Ala Leu Leu Pro Gly Trp Val Ser Ala Thr Leu Leu	1	5	10
			15

[0034]

Leu Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ala Ala Leu Ala Ala Asn Ser Ser Gly
 20 25 30
 Arg Trp Trp Gly Ile Val Asn Val Ala Ser Ser Thr Asn Leu Leu Thr
 35 40 45
 Asp Ser Lys Ser Leu Gln Leu Val Leu Glu Pro Ser Leu Gln Leu Leu
 50 55 60
 Ser Arg Lys Gln Arg Arg Leu Ile Arg Gln Asn Pro Gly Ile Leu His
 65 70 75 80
 Ser Val Ser Gly Gly Leu Gln Ser Ala Val Arg Glu Cys Lys Trp Gln
 85 90 95
 Phe Arg Asn Arg Arg Trp Asn Cys Pro Thr Ala Pro Gly Pro His Leu
 100 105 110
 Phe Gly Lys Ile Val Asn Arg Gly Cys Arg Glu Thr Ala Phe Ile Phe
 115 120 125
 Ala Ile Thr Ser Ala Gly Val Thr His Ser Val Ala Arg Ser Cys Ser
 130 135 140
 Glu Gly Ser Ile Glu Ser Cys Thr Cys Asp Tyr Arg Arg Arg Gly Pro
 145 150 155 160
 Gly Gly Pro Asp Trp His Trp Gly Gly Cys Ser Asp Asn Ile Asp Phe
 165 170 175
 Gly Arg Leu Phe Gly Arg Glu Phe Val Asp Ser Gly Glu Lys Gly Arg
 180 185 190
 Asp Leu Arg Phe Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Thr
 195 200 205
 Thr Val Phe Ser Glu Met Arg Gln Glu Cys Lys Cys His Gly Met Ser
 210 215 220
 Gly Ser Cys Thr Val Arg Thr Cys Trp Met Arg Leu Pro Thr Leu Arg
 225 230 235 240
 Ala Val Gly Asp Val Leu Arg Asp Arg Phe Asp Gly Ala Ser Arg Val
 245 250 255
 Leu Tyr Gly Asn Arg Gly Ser Asn Arg Ala Ser Arg Ala Glu Leu Leu
 260 265 270
 Arg Leu Glu Pro Glu Asp Pro Ala His Lys Pro Pro Ser Pro His Asp
 275 280 285

[0035]

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

Leu Gly Thr Ala Gly Thr Ala Gly Arg Ala Cys Asn Ser Ser Ser Pro
305 310 315 320

Ala Leu Asp Gly Cys Glu Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Arg Thr
325 330 335

Arg Thr Gln Arg Val Thr Glu Arg Cys Asn Cys Thr Phe His Trp Cys
340 345 350

Cys His Val Ser Cys Arg Asn Cys Thr His Thr Arg Val Leu His Glu
355 360 365

Cys Leu
370

<210> 25
<211> 360
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Met Asn Ala Pro Leu Gly Gly Ile Trp Leu Trp Leu Pro Leu Leu Leu
1 5 10 15

Thr Trp Leu Thr Pro Glu Val Asn Ser Ser Trp Trp Tyr Met Arg Ala
20 25 30

Thr Gly Gly Ser Ser Arg Val Met Cys Asp Asn Val Pro Gly Leu Val
35 40 45

Ser Ser Gln Arg Gln Leu Cys His Arg His Pro Asp Val Met Arg Ala
50 55 60

Ile Ser Gln Gly Val Ala Glu Trp Thr Ala Glu Cys Gln His Gln Phe
65 70 75 80

Arg Gln His Arg Trp Asn Cys Asn Thr Leu Asp Arg Asp His Ser Leu
85 90 95

Phe Gly Arg Val Leu Leu Arg Ser Ser Arg Glu Ser Ala Phe Val Tyr
100 105 110

Ala Ile Ser Ser Ala Gly Val Val Phe Ala Ile Thr Arg Ala Cys Ser
115 120 125

Gln Gly Glu Val Lys Ser Cys Ser Cys Asp Pro Lys Lys Met Gly Ser
130 135 140

[0036]

Ala Lys Asp Ser Lys Gly Ile Phe Asp Trp Gly Gly Cys Ser Asp Asn
 145 150 155 160
 Ile Asp Tyr Gly Ile Lys Phe Ala Arg Ala Phe Val Asp Ala Lys Glu
 165 170 175
 Arg Lys Gly Lys Asp Ala Arg Ala Leu Met Asn Leu His Asn Asn Arg
 180 185 190
 Ala Gly Arg Lys Ala Val Lys Arg Phe Leu Lys Gln Glu Cys Lys Cys
 195 200 205
 His Gly Val Ser Gly Ser Cys Thr Leu Arg Thr Cys Trp Leu Ala Met
 210 215 220
 Ala Asp Phe Arg Lys Thr Gly Asp Tyr Leu Trp Arg Lys Tyr Asn Gly
 225 230 235 240
 Ala Ile Gln Val Val Met Asn Gln Asp Gly Thr Gly Phe Thr Val Ala
 245 250 255
 Asn Glu Arg Phe Lys Lys Pro Thr Lys Asn Asp Leu Val Tyr Phe Glu
 260 265 270
 Asn Ser Pro Asp Tyr Cys Ile Arg Asp Arg Glu Ala Gly Ser Leu Gly
 275 280 285
 Thr Ala Gly Arg Val Cys Asn Leu Thr Ser Arg Gly Met Asp Ser Cys
 290 295 300
 Glu Val Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp Thr Ser His Val Thr Arg
 305 310 315 320
 Met Thr Lys Cys Gly Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Ala Val Arg Cys
 325 330 335
 Gln Asp Cys Leu Glu Ala Leu Asp Val His Thr Cys Lys Ala Pro Lys
 340 345 350
 Asn Ala Asp Trp Thr Thr Ala Thr
 355 360
 <210> 26
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 26
 Met Leu Asp Gly Leu Gly Val Val Ala Ile Ser Ile Phe Gly Ile Gln
 1 5 10 15

[0037]

Leu Lys Thr Glu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Val Pro Gly Ile Pro Thr
 20 25 30
 Gln Ser Ala Phe Asn Lys Cys Leu Gln Arg Tyr Ile Gly Ala Leu Gly
 35 40 45
 Ala Arg Val Ile Cys Asp Asn Ile Pro Gly Leu Val Ser Arg Gln Arg
 50 55 60
 Gln Leu Cys Gln Arg Tyr Pro Asp Ile Met Arg Ser Val Gly Glu Gly
 65 70 75 80
 Ala Arg Glu Trp Ile Arg Glu Cys Gln His Gln Phe Arg His His Arg
 85 90 95
 Trp Asn Cys Thr Thr Leu Asp Arg Asp His Thr Val Phe Gly Arg Val
 100 105 110
 Met Leu Arg Ser Ser Arg Glu Ala Ala Phe Val Tyr Ala Ile Ser Ser
 115 120 125
 Ala Gly Val Val His Ala Ile Thr Arg Ala Cys Ser Gln Gly Glu Leu
 130 135 140
 Ser Val Cys Ser Cys Asp Pro Tyr Thr Arg Gly Arg His His Asp Gln
 145 150 155 160
 Arg Gly Asp Phe Asp Trp Gly Gly Cys Ser Asp Asn Ile His Tyr Gly
 165 170 175
 Val Arg Phe Ala Lys Ala Phe Val Asp Ala Lys Glu Lys Arg Leu Lys
 180 185 190
 Asp Ala Arg Ala Leu Met Asn Leu His Asn Asn Arg Cys Gly Arg Thr
 195 200 205
 Ala Val Arg Arg Phe Leu Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser
 210 215 220
 Gly Ser Cys Thr Leu Arg Thr Cys Trp Arg Ala Leu Ser Asp Phe Arg
 225 230 235 240
 Arg Thr Gly Asp Tyr Leu Arg Arg Arg Tyr Asp Gly Ala Val Gln Val
 245 250 255
 Met Ala Thr Gln Asp Gly Ala Asn Phe Thr Ala Ala Arg Gln Gly Tyr
 260 265 270
 Arg Arg Ala Thr Arg Thr Asp Leu Val Tyr Phe Asp Asn Ser Pro Asp
 275 280 285

[0038]

Tyr Cys Val Leu Asp Lys Ala Ala Gly Ser Leu Gly Thr Ala Gly Arg
 290 295 300
 Val Cys Ser Lys Thr Ser Lys Gly Thr Asp Gly Cys Glu Ile Met Cys
 305 310 315 320
 Cys Gly Arg Gly Tyr Asp Thr Thr Arg Val Thr Arg Val Thr Gln Cys
 325 330 335
 Glu Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Ala Val Arg Cys Lys Glu Cys Arg
 340 345 350
 Asn Thr Val Asp Val His Thr Cys Lys Ala Pro Lys Lys Ala Glu Trp
 355 360 365
 Leu Asp Gln Thr
 370
 <210> 27
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 27
 Met Glu Pro His Leu Leu Gly Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Arg Val Leu Ala Gly Tyr Pro Ile Trp Trp Ser Leu Ala Leu Gly
 20 25 30
 Gln Gln Tyr Thr Ser Leu Gly Ser Gln Pro Leu Leu Cys Gly Ser Ile
 35 40 45
 Pro Gly Leu Val Pro Lys Gln Leu Arg Phe Cys Arg Asn Tyr Ile Glu
 50 55 60
 Ile Met Pro Ser Val Ala Glu Gly Val Lys Leu Gly Ile Gln Glu Cys
 65 70 75 80
 Gln His Gln Phe Arg Gly Arg Arg Trp Asn Cys Thr Thr Ile Asp Asp
 85 90 95
 Ser Leu Ala Ile Phe Gly Pro Val Leu Asp Lys Ala Thr Arg Glu Ser
 100 105 110
 Ala Phe Val His Ala Ile Ala Ser Ala Gly Val Ala Phe Ala Val Thr
 115 120 125
 Arg Ser Cys Ala Glu Gly Thr Ser Thr Ile Cys Gly Cys Asp Ser His
 130 135 140
 His Lys Gly Pro Pro Gly Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Glu

[0039]

145	150	155	160
Asp Ala Asp Phe Gly Val Leu Val Ser Arg Glu Phe Ala Asp Ala Arg	165	170	175
Glu Asn Arg Pro Asp Ala Arg Ser Ala Met Asn Lys His Asn Asn Glu	180	185	190
Ala Gly Arg Thr Thr Ile Leu Asp His Met His Leu Lys Cys Lys Cys	195	200	205
His Gly Leu Ser Gly Ser Cys Glu Val Lys Thr Cys Trp Trp Ala Gln	210	215	220
Pro Asp Phe Arg Ala Ile Gly Asp Phe Leu Lys Asp Lys Tyr Asp Ser	225	230	235
Ala Ser Glu Met Val Val Glu Lys His Arg Glu Ser Arg Gly Trp Val	245	250	255
Glu Thr Leu Arg Ala Lys Tyr Ser Leu Phe Lys Pro Pro Thr Glu Arg	260	265	270
Asp Leu Val Tyr Tyr Glu Asn Ser Pro Asn Phe Cys Glu Pro Asn Pro	275	280	285
Glu Thr Gly Ser Phe Gly Thr Arg Asp Arg Thr Cys Asn Val Thr Ser	290	295	300
His Gly Ile Asp Gly Cys Asp Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Asn	305	310	315
Thr Arg Thr Glu Lys Arg Lys Glu Lys Cys His Cys Ile Phe His Trp	325	330	335
Cys Cys Tyr Val Ser Cys Gln Glu Cys Ile Arg Ile Tyr Asp Val His	340	345	350
Thr Cys Lys	355		
<210> 28			
<211> 352			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 28			
Met Ala Pro Leu Gly Tyr Phe Leu Leu Leu Cys Ser Leu Lys Gln Ala	1	5	10
Leu Gly Ser Tyr Pro Ile Trp Trp Ser Leu Ala Val Gly Pro Gln Tyr	20	25	30

[0040]

Ser Ser Leu Gly Ser Gln Pro Ile Leu Cys Ala Ser Ile Pro Gly Leu
 35 40 45
 Val Pro Lys Gln Leu Arg Phe Cys Arg Asn Tyr Val Glu Ile Met Pro
 50 55 60
 Ser Val Ala Glu Gly Ile Lys Ile Gly Ile Gln Glu Cys Gln His Gln
 65 70 75 80
 Phe Arg Gly Arg Arg Trp Asn Cys Thr Thr Val His Asp Ser Leu Ala
 85 90 95
 Ile Phe Gly Pro Val Leu Asp Lys Ala Thr Arg Glu Ser Ala Phe Val
 100 105 110
 His Ala Ile Ala Ser Ala Gly Val Ala Phe Ala Val Thr Arg Ser Cys
 115 120 125
 Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ile Cys Gly Cys Ser Ser Arg His Gln Gly
 130 135 140
 Ser Pro Gly Lys Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Glu Asp Ile Glu
 145 150 155 160
 Phe Gly Gly Met Val Ser Arg Glu Phe Ala Asp Ala Arg Glu Asn Arg
 165 170 175
 Pro Asp Ala Arg Ser Ala Met Asn Arg His Asn Asn Glu Ala Gly Arg
 180 185 190
 Gln Ala Ile Ala Ser His Met His Leu Lys Cys Lys Cys His Gly Leu
 195 200 205
 Ser Gly Ser Cys Glu Val Lys Thr Cys Trp Trp Ser Gln Pro Asp Phe
 210 215 220
 Arg Ala Ile Gly Asp Phe Leu Lys Asp Lys Tyr Asp Ser Ala Ser Glu
 225 230 235 240
 Met Val Val Glu Lys His Arg Glu Ser Arg Gly Trp Val Glu Thr Leu
 245 250 255
 Arg Pro Arg Tyr Thr Tyr Phe Lys Val Pro Thr Glu Arg Asp Leu Val
 260 265 270
 Tyr Tyr Glu Ala Ser Pro Asn Phe Cys Glu Pro Asn Pro Glu Thr Gly
 275 280 285
 Ser Phe Gly Thr Arg Asp Arg Thr Cys Asn Val Ser Ser His Gly Ile
 290 295 300

[0041]

Asp Gly Cys Asp Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Asn Ala Arg Ala
305 310 315 320

Glu Arg Arg Arg Glu Lys Cys Arg Cys Val Phe His Trp Cys Cys Tyr
325 330 335

Val Ser Cys Gln Glu Cys Thr Arg Val Tyr Asp Val His Thr Cys Lys
340 345 350

<210> 29
<211> 351
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Met Ser Pro Arg Ser Cys Leu Arg Ser Leu Arg Leu Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Val Phe Ser Ala Ala Ala Ser Asn Trp Leu Tyr Leu Ala Lys Leu Ser
20 25 30

Ser Val Gly Ser Ile Ser Glu Glu Glu Thr Cys Glu Lys Leu Lys Gly
35 40 45

Leu Ile Gln Arg Gln Val Gln Met Cys Lys Arg Asn Leu Glu Val Met
50 55 60

Asp Ser Val Arg Arg Gly Ala Gln Leu Ala Ile Glu Glu Cys Gln Tyr
65 70 75 80

Gln Phe Arg Asn Arg Arg Trp Asn Cys Ser Thr Leu Asp Ser Leu Pro
85 90 95

Val Phe Gly Lys Val Val Thr Gln Gly Thr Arg Glu Ala Ala Phe Val
100 105 110

Tyr Ala Ile Ser Ser Ala Gly Val Ala Phe Ala Val Thr Arg Ala Cys
115 120 125

Ser Ser Gly Glu Leu Glu Lys Cys Gly Cys Asp Arg Thr Val His Gly
130 135 140

Val Ser Pro Gln Gly Phe Gln Trp Ser Gly Cys Ser Asp Asn Ile Ala
145 150 155 160

Tyr Gly Val Ala Phe Ser Gln Ser Phe Val Asp Val Arg Glu Arg Ser
165 170 175

Lys Gly Ala Ser Ser Ser Arg Ala Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu
180 185 190

[0042]

Ala Gly Arg Lys Ala Ile Leu Thr His Met Arg Val Glu Cys Lys Cys
 195 200 205
 His Gly Val Ser Gly Ser Cys Glu Val Lys Thr Cys Trp Arg Ala Val
 210 215 220
 Pro Pro Phe Arg Gln Val Gly His Ala Leu Lys Glu Lys Phe Asp Gly
 225 230 235 240
 Ala Thr Glu Val Glu Pro Arg Arg Val Gly Ser Ser Arg Ala Leu Val
 245 250 255
 Pro Arg Asn Ala Gln Phe Lys Pro His Thr Asp Glu Asp Leu Val Tyr
 260 265 270
 Leu Glu Pro Ser Pro Asp Phe Cys Glu Gln Asp Met Arg Ser Gly Val
 275 280 285
 Leu Gly Thr Arg Gly Arg Thr Cys Asn Lys Thr Ser Lys Ala Ile Asp
 290 295 300
 Gly Cys Glu Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly Phe His Thr Ala Gln Val
 305 310 315 320
 Glu Leu Ala Glu Arg Cys Ser Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Phe Val
 325 330 335
 Lys Cys Arg Gln Cys Gln Arg Leu Val Glu Leu His Thr Cys Arg
 340 345 350
 <210> 30
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 30
 Met Pro Ser Leu Leu Leu Phe Thr Ala Ala Leu Leu Ser Ser Trp
 1 5 10 15
 Ala Gln Leu Leu Thr Asp Ala Asn Ser Trp Trp Ser Leu Ala Leu Asn
 20 25 30
 Pro Val Gln Arg Pro Glu Met Phe Ile Ile Gly Ala Gln Pro Val Cys
 35 40 45
 Ser Gln Leu Pro Gly Leu Ser Pro Gly Gln Arg Lys Leu Cys Gln Leu
 50 55 60
 Tyr Gln Glu His Met Ala Tyr Ile Gly Glu Gly Ala Lys Thr Gly Ile
 65 70 75 80

[0043]

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

[0044]

Val Asp Gln Tyr Ile Cys Lys
355

<210> 31
<211> 365
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Met Leu Pro Pro Leu Pro Ser Arg Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Cys Pro Ala His Val Gly Gly Leu Trp Trp Ala Val Gly Ser Pro
20 25 30

Leu Val Met Asp Pro Thr Ser Ile Cys Arg Lys Ala Arg Arg Leu Ala
35 40 45

Gly Arg Gln Ala Glu Leu Cys Gln Ala Glu Pro Glu Val Val Ala Glu
50 55 60

Leu Ala Arg Gly Ala Arg Leu Gly Val Arg Glu Cys Gln Phe Gln Phe
65 70 75 80

Arg Phe Arg Arg Trp Asn Cys Ser Ser His Ser Lys Ala Phe Gly Arg
85 90 95

Ile Leu Gln Gln Asp Ile Arg Glu Thr Ala Phe Val Phe Ala Ile Thr
100 105 110

Ala Ala Gly Ala Ser His Ala Val Thr Gln Ala Cys Ser Met Gly Glu
115 120 125

Leu Leu Gln Cys Gly Cys Gln Ala Pro Arg Gly Arg Ala Pro Pro Arg
130 135 140

Pro Ser Gly Leu Pro Gly Thr Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ser
145 150 155 160

Pro Glu Gly Ser Ala Ala Trp Glu Trp Gly Gly Cys Gly Asp Asp Val
165 170 175

Asp Phe Gly Asp Glu Lys Ser Arg Leu Phe Met Asp Ala Arg His Lys
180 185 190

Arg Gly Arg Gly Asp Ile Arg Ala Leu Val Gln Leu His Asn Asn Glu
195 200 205

Ala Gly Arg Leu Ala Val Arg Ser His Thr Arg Thr Glu Cys Lys Cys
210 215 220

His Gly Leu Ser Gly Ser Cys Ala Leu Arg Thr Cys Trp Gln Lys Leu

[0045]

225	230	235	240
Pro Pro Phe Arg Glu Val Gly Ala Arg Leu Leu Glu Arg Phe His Gly	245	250	255
Ala Ser Arg Val Met Gly Thr Asn Asp Gly Lys Ala Leu Leu Pro Ala	260	265	270
Val Arg Thr Leu Lys Pro Pro Gly Arg Ala Asp Leu Leu Tyr Ala Ala	275	280	285
Asp Ser Pro Asp Phe Cys Ala Pro Asn Arg Arg Thr Gly Ser Pro Gly	290	295	300
Thr Arg Gly Arg Ala Cys Asn Ser Ser Ala Pro Asp Leu Ser Gly Cys	305	310	315
Asp Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Arg Gln Glu Ser Val Gln Leu	325	330	335
Glu Glu Asn Cys Leu Cys Arg Phe His Trp Cys Cys Val Val Gln Cys	340	345	350
His Arg Cys Arg Val Arg Lys Glu Leu Ser Leu Cys Leu	355	360	365
<210> 32			
<211> 349			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 32			
Met His Arg Asn Phe Arg Lys Trp Ile Phe Tyr Val Phe Leu Cys Phe	1	5	10
Gly Val Leu Tyr Val Lys Leu Gly Ala Leu Ser Ser Val Val Ala Leu	20	25	30
Gly Ala Asn Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln	35	40	45
Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly Glu	50	55	60
Gly Ala Gln Met Gly Ile Asn Glu Cys Gln Tyr Gln Phe Arg Phe Gly	65	70	75
Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Lys Thr Val Phe Gly Gln Glu	85	90	95
Leu Arg Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Thr Ala	100	105	110

[0046]

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

<210> 33
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 33

[0047]

```

Met Gly Asn Leu Phe Met Leu Trp Ala Ala Leu Gly Ile Cys Cys Ala
1           5           10           15

Ala Phe Ser Ala Ser Ala Trp Ser Val Asn Asn Phe Leu Ile Thr Gly
20           25           30

Pro Lys Ala Tyr Leu Thr Tyr Thr Thr Ser Val Ala Leu Gly Ala Gln
35           40           45

Ser Gly Ile Glu Glu Cys Lys Phe Gln Phe Ala Trp Glu Arg Trp Asn
50           55           60

Cys Pro Glu Asn Ala Leu Gln Leu Ser Thr His Asn Arg Leu Arg Ser
65           70           75           80

Ala Thr Arg Glu Thr Ser Phe Ile His Ala Ile Ser Ser Ala Gly Val
85           90           95

Met Tyr Ile Ile Thr Lys Asn Cys Ser Met Gly Asp Phe Glu Asn Cys
100          105          110

Gly Cys Asp Gly Ser Asn Asn Gly Lys Thr Gly Gly His Gly Trp Ile
115          120          125

Trp Gly Gly Cys Ser Asp Asn Val Glu Phe Gly Glu Arg Ile Ser Lys
130          135          140

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

Asn Leu His Asn Asn Arg Ala Gly Arg Leu Ala Val Arg Ala Thr Met
165          170          175

Lys Arg Thr Cys Lys Cys His Gly Ile Ser Gly Ser Cys Ser Ile Gln
180          185          190

Thr Cys Trp Leu Gln Leu Ala Glu Phe Arg Glu Met Gly Asp Tyr Leu
195          200          205

Lys Ala Lys Tyr Asp Gln Ala Leu Lys Ile Glu Met Asp Lys Arg Gln
210          215          220

Leu Arg Ala Gly Asn Ser Ala Glu Gly His Trp Val Pro Ala Glu Ala
225          230          235          240

Phe Leu Pro Ser Ala Glu Ala Glu Leu Ile Phe Leu Glu Glu Ser Pro
245          250          255

Asp Tyr Cys Thr Cys Asn Ser Ser Leu Gly Ile Tyr Gly Thr Glu Gly
260          265          270

```

[0048]

Arg Glu Cys Leu Gln Asn Ser His Asn Thr Ser Arg Trp Glu Arg Arg
275 280 285

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

Lys Thr Glu Val Ile Ser Ser Cys Asn Cys Lys Phe Gln Trp Cys Cys
305 310 315 320

Thr Val Lys Cys Asp Gln Cys Arg His Val Val Ser Lys Tyr Tyr Cys
325 330 335

Ala Arg Ser Pro Gly Ser Ala Gln Ser Leu Gly Lys Gly Ser Ala
340 345 350

<210> 34
<211> 351
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Met Phe Leu Ser Lys Pro Ser Val Tyr Ile Cys Leu Phe Thr Cys Val
1 5 10 15

Leu Gln Leu Ser His Ser Trp Ser Val Asn Asn Phe Leu Met Thr Gly
20 25 30

Pro Lys Ala Tyr Leu Ile Tyr Ser Ser Ser Val Ala Ala Gly Ala Gln
35 40 45

Ser Gly Ile Glu Glu Cys Lys Tyr Gln Phe Ala Trp Asp Arg Trp Asn
50 55 60

Cys Pro Glu Arg Ala Leu Gln Leu Ser Ser His Gly Gly Leu Arg Ser
65 70 75 80

Ala Asn Arg Glu Thr Ala Phe Val His Ala Ile Ser Ser Ala Gly Val
85 90 95

Met Tyr Thr Leu Thr Arg Asn Cys Ser Leu Gly Asp Phe Asp Asn Cys
100 105 110

Gly Cys Asp Asp Ser Arg Asn Gly Gln Leu Gly Gly Gln Gly Trp Leu
115 120 125

Trp Gly Gly Cys Ser Asp Asn Val Gly Phe Gly Glu Ala Ile Ser Lys
130 135 140

Gln Phe Val Asp Ala Leu Glu Thr Gly Gln Asp Ala Arg Ala Ala Met
145 150 155 160

[0049]

Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ala Val Lys Gly Thr Met
 165 170 175
 Lys Arg Thr Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser Cys Thr Thr Gln
 180 185 190
 Thr Cys Trp Leu Gln Leu Pro Glu Phe Arg Glu Val Gly Ala His Leu
 195 200 205
 Lys Glu Lys Tyr His Ala Ala Leu Lys Val Asp Leu Leu Gln Gly Ala
 210 215 220
 Gly Asn Ser Ala Ala Gly Arg Gly Ala Ile Ala Asp Thr Phe Arg Ser
 225 230 235 240
 Ile Ser Thr Arg Glu Leu Val His Leu Glu Asp Ser Pro Asp Tyr Cys
 245 250 255
 Leu Glu Asn Lys Thr Leu Gly Leu Leu Gly Thr Glu Gly Arg Glu Cys
 260 265 270
 Leu Arg Arg Gly Arg Ala Leu Gly Arg Trp Glu Arg Arg Ser Cys Arg
 275 280 285
 Arg Leu Cys Gly Asp Cys Gly Leu Ala Val Glu Glu Arg Arg Ala Glu
 290 295 300
 Thr Val Ser Ser Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Ala Val Arg
 305 310 315 320
 Cys Glu Gln Cys Arg Arg Arg Val Thr Lys Tyr Phe Cys Ser Arg Ala
 325 330 335
 Glu Arg Pro Arg Gly Gly Ala Ala His Lys Pro Gly Arg Lys Pro
 340 345 350
 <210> 35
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 35
 Met Leu Asp Gly Ser Pro Leu Ala Arg Trp Leu Ala Ala Ala Phe Gly
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala Leu Arg Pro Ser Ala Ala Tyr Phe Gly
 20 25 30
 Leu Thr Gly Ser Glu Pro Leu Thr Ile Leu Pro Leu Thr Leu Glu Pro
 35 40 45
 Glu Ala Ala Ala Gln Ala His Tyr Lys Ala Cys Asp Arg Leu Lys Leu

[0050]

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

[0051]

	325	330	335
Arg Pro Cys Gln Cys Gln Val Arg Trp Cys Cys Tyr Val Glu Cys Arg	340	345	350
Gln Cys Thr Gln Arg Glu Glu Val Tyr Thr Cys Lys Gly	355	360	365
<210> 36			
<211> 357			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 36			
Met Arg Pro Pro Pro Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Cys Leu Leu Ala	1	5	10 15
Leu Pro Ala Ala Ala Ala Ser Tyr Phe Gly Leu Thr Gly Arg Glu Val	20	25	30
Leu Thr Pro Phe Pro Gly Leu Gly Thr Ala Ala Ala Pro Ala Gln Gly	35	40	45
Gly Ala His Leu Lys Gln Cys Asp Leu Leu Lys Leu Ser Arg Arg Gln	50	55	60
Lys Gln Leu Cys Arg Arg Glu Pro Gly Leu Ala Glu Thr Leu Arg Asp	65	70	75 80
Ala Ala His Leu Gly Leu Leu Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg His Glu	85	90	95
Arg Trp Asn Cys Ser Leu Glu Gly Arg Met Gly Leu Leu Lys Arg Gly	100	105	110
Phe Lys Glu Thr Ala Phe Leu Tyr Ala Val Ser Ser Ala Ala Leu Thr	115	120	125
His Thr Leu Ala Arg Ala Cys Ser Ala Gly Arg Met Glu Arg Cys Thr	130	135	140
Cys Asp Asp Ser Pro Gly Leu Glu Ser Arg Gln Ala Trp Gln Trp Gly	145	150	155 160
Val Cys Gly Asp Asn Leu Lys Tyr Ser Thr Lys Phe Leu Ser Asn Phe	165	170	175
Leu Gly Ser Lys Arg Gly Asn Lys Asp Leu Arg Ala Arg Ala Asp Ala	180	185	190
His Asn Thr His Val Gly Ile Lys Ala Val Lys Ser Gly Leu Arg Thr	195	200	205

[0052]

Thr Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser Cys Ala Val Arg Thr Cys
210 215 220

Trp Lys Gln Leu Ser Pro Phe Arg Glu Thr Gly Gln Val Leu Lys Leu
225 230 235 240

Arg Tyr Asp Ser Ala Val Lys Val Ser Ser Ala Thr Asn Glu Ala Leu
245 250 255

Gly Arg Leu Glu Leu Trp Ala Pro Ala Arg Gln Gly Ser Leu Thr Lys
260 265 270

Gly Leu Ala Pro Arg Ser Gly Asp Leu Val Tyr Met Glu Asp Ser Pro
275 280 285

Ser Phe Cys Arg Pro Ser Lys Tyr Ser Pro Gly Thr Ala Gly Arg Val
290 295 300

Cys Ser Arg Glu Ala Ser Cys Ser Ser Leu Cys Cys Gly Arg Gly Tyr
305 310 315 320

Asp Thr Gln Ser Arg Leu Val Ala Phe Ser Cys His Cys Gln Val Gln
325 330 335

Trp Cys Cys Tyr Val Glu Cys Gln Gln Cys Val Gln Glu Glu Leu Val
340 345 350

Tyr Thr Cys Lys His
355

<210> 37
<211> 417
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Met Gly Ser Ala His Pro Arg Pro Trp Leu Arg Leu Arg Pro Gln Pro
1 5 10 15

Gln Pro Arg Pro Ala Leu Trp Val Leu Leu Phe Phe Leu Leu Leu
20 25 30

Ala Ala Ala Met Pro Arg Ser Ala Pro Asn Asp Ile Leu Asp Leu Arg
35 40 45

Leu Pro Pro Glu Pro Val Leu Asn Ala Asn Thr Val Cys Leu Thr Leu
50 55 60

Pro Gly Leu Ser Arg Arg Gln Met Glu Val Cys Val Arg His Pro Asp
65 70 75 80

[0053]

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

[0054]

Asp Ser Ala Gly Thr Val Gly Arg Leu Cys Asn Lys Ser Ser Ala Gly
355 360 365

Ser Asp Gly Cys Gly Ser Met Cys Cys Gly Arg Gly His Asn Ile Leu
370 375 380

Arg Gln Thr Arg Ser Glu Arg Cys His Cys Arg Phe His Trp Cys Cys
385 390 395 400

Phe Val Val Cys Glu Glu Cys Arg Ile Thr Glu Trp Val Ser Val Cys
405 410 415

Lys

<210> 38
<211> 389
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Met Leu Glu Glu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro Ser Gly Leu Ala Gly
1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Ala Leu Cys Ser Arg Ala Leu Ser Asn Glu Ile Leu
20 25 30

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

Leu Thr Leu Ser Gly Leu Ser Lys Arg Gln Leu Gly Leu Cys Leu Arg
50 55 60

Asn Pro Asp Val Thr Ala Ser Ala Leu Gln Gly Leu His Ile Ala Val
65 70 75 80

His Glu Cys Gln His Gln Leu Arg Asp Gln Arg Trp Asn Cys Ser Ala
85 90 95

Leu Glu Gly Gly Gly Arg Leu Pro His His Ser Ala Ile Leu Lys Arg
100 105 110

Gly Phe Arg Glu Ser Ala Phe Ser Phe Ser Met Leu Ala Ala Gly Val
115 120 125

Met His Ala Val Ala Thr Ala Cys Ser Leu Gly Lys Leu Val Ser Cys
130 135 140

Gly Cys Gly Trp Lys Gly Ser Gly Glu Gln Asp Arg Leu Arg Ala Lys
145 150 155 160

[0055]

Leu Leu Gln Leu Gln Ala Leu Ser Arg Gly Lys Ser Phe Pro His Ser
165 170 175

Leu Pro Ser Pro Gly Pro Gly Ser Ser Pro Ser Pro Gly Pro Gln Asp
180 185 190

Thr Trp Glu Trp Gly Gly Cys Asn His Asp Met Asp Phe Gly Glu Lys
195 200 205

Phe Ser Arg Asp Phe Leu Asp Ser Arg Glu Ala Pro Arg Asp Ile Gln
210 215 220

Ala Arg Met Arg Ile His Asn Asn Arg Val Gly Arg Gln Val Val Thr
225 230 235 240

Glu Asn Leu Lys Arg Lys Cys Lys Cys His Gly Thr Ser Gly Ser Cys
245 250 255

Gln Phe Lys Thr Cys Trp Arg Ala Ala Pro Glu Phe Arg Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Leu Arg Glu Arg Leu Gly Arg Ala Ile Phe Ile Asp Thr His
275 280 285

Asn Arg Asn Ser Gly Ala Phe Gln Pro Arg Leu Arg Pro Arg Arg Leu
290 295 300

Ser Gly Glu Leu Val Tyr Phe Glu Lys Ser Pro Asp Phe Cys Glu Arg
305 310 315 320

Asp Pro Thr Met Gly Ser Pro Gly Thr Arg Gly Arg Ala Cys Asn Lys
325 330 335

Thr Ser Arg Leu Leu Asp Gly Cys Gly Ser Leu Cys Cys Gly Arg Gly
340 345 350

His Asn Val Leu Arg Gln Thr Arg Val Glu Arg Cys His Cys Arg Phe
355 360 365

His Trp Cys Cys Tyr Val Leu Cys Asp Glu Cys Lys Val Thr Glu Trp
370 375 380

Val Asn Val Cys Lys
385

<210> 39
<211> 354
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Met Arg Ala Arg Pro Gln Val Cys Glu Ala Leu Leu Phe Ala Leu Ala

[0056]

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

[0057]

	275		280		285	
Val Gly Ser His Gly Thr Gln Asp Arg Gln Cys Asn Lys Thr Ser Asn						
290			295		300	
Gly Ser Asp Ser Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Pro						
305		310		315		320
Tyr Thr Asp Arg Val Val Glu Arg Cys His Cys Lys Tyr His Trp Cys						
	325		330			335
Cys Tyr Val Thr Cys Arg Arg Cys Glu Arg Thr Val Glu Arg Tyr Val						
	340		345		350	
Cys Lys						
<210> 40						
<211> 365						
<212> PRT						
<213> 智人						
<400> 40						
Met Asp Arg Ala Ala Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Cys Ala Leu Trp						
1	5		10		15	
Ala Ala Leu Leu Val Leu Phe Pro Tyr Gly Ala Gln Gly Asn Trp Met						
	20		25		30	
Trp Leu Gly Ile Ala Ser Phe Gly Val Pro Glu Lys Leu Gly Cys Ala						
	35		40		45	
Asn Leu Pro Leu Asn Ser Arg Gln Lys Glu Leu Cys Lys Arg Lys Pro						
50		55		60		
Tyr Leu Leu Pro Ser Ile Arg Glu Gly Ala Arg Leu Gly Ile Gln Glu						
65	70		75		80	
Cys Gly Ser Gln Phe Arg His Glu Arg Trp Asn Cys Met Ile Thr Ala						
	85		90		95	
Ala Ala Thr Thr Ala Pro Met Gly Ala Ser Pro Leu Phe Gly Tyr Glu						
	100		105		110	
Leu Ser Ser Gly Thr Lys Glu Thr Ala Phe Ile Tyr Ala Val Met Ala						
	115		120		125	
Ala Gly Leu Val His Ser Val Thr Arg Ser Cys Ser Ala Gly Asn Met						
	130		135		140	
Thr Glu Cys Ser Cys Asp Thr Thr Leu Gln Asn Gly Gly Ser Ala Ser						
145	150		155		160	

[0058]

Glu Gly Trp His Trp Gly Gly Cys Ser Asp Asp Val Gln Tyr Gly Met
 165 170 175
 Trp Phe Ser Arg Lys Phe Leu Asp Phe Pro Ile Gly Asn Thr Thr Gly
 180 185 190
 Lys Glu Asn Lys Val Leu Leu Ala Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala
 195 200 205
 Gly Arg Gln Ala Val Ala Lys Leu Met Ser Val Asp Cys Arg Cys His
 210 215 220
 Gly Val Ser Gly Ser Cys Ala Val Lys Thr Cys Trp Lys Thr Met Ser
 225 230 235 240
 Ser Phe Glu Lys Ile Gly His Leu Leu Lys Asp Lys Tyr Glu Asn Ser
 245 250 255
 Ile Gln Ile Ser Asp Lys Thr Lys Arg Lys Met Arg Arg Arg Glu Lys
 260 265 270
 Asp Gln Arg Lys Ile Pro Ile His Lys Asp Asp Leu Leu Tyr Val Asn
 275 280 285
 Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Val Glu Asp Lys Lys Leu Gly Ile Pro Gly
 290 295 300
 Thr Gln Gly Arg Glu Cys Asn Arg Thr Ser Glu Gly Ala Asp Gly Cys
 305 310 315 320
 Asn Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Val Val Arg His
 325 330 335
 Val Glu Arg Cys Glu Cys Lys Phe Ile Trp Cys Cys Tyr Val Arg Cys
 340 345 350
 Arg Arg Cys Glu Ser Met Thr Asp Val His Thr Cys Lys
 355 360 365

<210> 41
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(31)
 <223> 正向引物

<400> 41
 gcgatgatcc accatgaacc ggaaagegcg g

31

[0059]

<210>	42	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(34)	
<223>	反向引物	
<400>	42	
	gcattgcggcc gctcacttgc acgtgtacat ctcc	34
<210>	43	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(33)	
<223>	正向引物	
<400>	43	
	atgggccttg acgaggccca gtttcagttc cgc	33
<210>	44	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(33)	
<223>	反向引物	
<400>	44	
	gcggaactga aactgggcct cgtccaggcc cat	33
<210>	45	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(28)	
<223>	正向引物	
<400>	45	
	gtgccacggc gtggcaggct cgtgcacc	28
<210>	46	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(28)	

[0060]

<223> 反向引物

<400> 46

ggtgcacgag cctgccacgc cgtggcac

28

Wnt-1	-----MGLWALLPGW-----VSATLLLLAALPAALA	27
Wnt-2	-----MNAPLG-----GIWLWLPLLLLTWLTP	21
Wnt-2b	-----MLDGLGVV-----AISIFGIQLKTEGSLRTAVP	28
Wnt-3	-----MEPH-----LLGLLLGLLLGGTRVLA	21
Wnt-3a	-----MAP-----LGYFL-LLCSLKQALG	18
Wnt-4	-----MSPR-----SCLRSLRLLVFAVFSAA	21
Wnt-5a	-----MKKSIGILSPGVALGMAGSAMSSKFFLVALAIFFSFAQVVI	41
Wnt-5b	-----MPSLLLLLFTAALLSSWAQLLIT	21
Wnt-6	-----MLPPLPSRLGLLLLLLL	16
Wnt-7a	-----MNRKARRC-----LGHLFLSLG--MVYLRI	23
Wnt-7b	-----MHRNFRKW-----IFYVFLCFG--VLYVKL	23
Wnt-8a	-----MGNLFMLWAALGIC---C	15
Wnt-8	-----MFLSKPSVYICLFTC	15
Wnt-9a	-----MLDGSPLARWLAAAFGLTLLLA	22
Wnt-9b	-----MR--PPPALALAGLC---LLA	16
Wnt-10a	MGSAHPRP-----WLRLRPQPQPRPALWVLLFFLL	30
Wnt-10b	-----MLEEPRPRPPPSGLAGLLFLA	21
Wnt-11	-----MRARPQVCEALLFAL	15
Wnt-16	-----MDRAALLG-----LARLCAALWAALLVLFY	25
Wnt-1	ANSSGRWWGIVNVASSTNLLTD-----SKSLQLVLEPSLQLLSRKQRR	70
Wnt-2	EVNSSWWY-----MRATGGS-----SRVMCDNVPGLVSSQRQ	53
Wnt-2b	GIPTQSAFNKC---LQRYIGAL-----G---ARVICDNIPGLVSRQRQ	65
Wnt-3	GYP--IWWSLALCQQYTSLSGS-----QPLLCSIPGLVPKQLR	57
Wnt-3a	SYP--IWWSLAVGPQYSSLGS-----QPILCASIPGLVPKQLR	54
Wnt-4	ASN---WLYLAKLSSVGSISE-----EETCEKLGKLIQRQVQ	55
Wnt-5a	EANSWWSLGMNPNVQMSEVYII-----G---AQPLCSQLAGLSQGQKK	81
Wnt-5b	DANSWWSLALN-PVQRPMEFII-----G---AQPVCSQLPGLSPGQRK	60
Wnt-6	LCPAHVGG-----LWWAVGSP-----LVMDPTSICRKARRLAGRAE	53
Wnt-7a	GGFSSVVA-----LGAS-----IICNKIPGLAPRQRA	50
Wnt-7b	GALSSVVA-----LGAN-----IICNKIPGLAPRQRA	50
Wnt-8a	AAFSASAWS-----VNNFLIT	31
Wnt-8	VLQLSHSWS-----VNNFLMT	31
Wnt-9a	ALRPSAAYFGLTGSEPLTILP--LTLEPEAAAQAHYKACDRLKLERKQRR	70
Wnt-9b	LPAAAASYFGLTGREVLTFFPGLGTAAAPAQGGAHKQCDLLKLSRRQKQ	66
Wnt-10a	LLAAAMPERSAPNDILDLRLPPE-----PVLNANTVCLTLPGLSRRQME	73
Wnt-10b	LCSRALS---NEILGLKLPGE-----PPLTANTVCLTSLGSKRQLG	60
Wnt-11	ALQTGVVCYGIKWALSKTPSAL-----ALN-QTQHKQLEGLVSAQVQ	57
Wnt-16	GAQGNWMW-----LGIASFGV-----P---EKLGCANLP-LNSRQKE	58
Wnt-1	LIRQNPGLILHSVSGGLQSAVRECKWQFRNRRWNCP-----TAPG-PHL	112
Wnt-2	LCHRHDPVMR AISQGVAEWTAECQHQFRQHRWNCN-----TLDRDHSL	96
Wnt-2b	LCQRYFPDIMRSVGE GAREWIRECQHQFRHHRWNCT-----TLDRDHTV	108
Wnt-3	FCRNYIEIMPSVAEGVKLG IQECQHQFRGRRWNCT-----TIDDSLAI	100
Wnt-3a	FCRNYVEIMPSVAEGIKIGIQECQHQFRGRRWNCT-----TVHDSLAI	97
Wnt-4	MCKRNLEVMDSVRRGAQLAIEECQYQFRNRRWNCS-----TLDS-LPV	97
Wnt-5a	LCHLYQDHMQYIGEGAKTGIKECQYQFRHRRWNCS-----TVD-NTSV	123
Wnt-5b	LCQLYQEHMAYIGEGAKTGIKECQHQFRQRRWNCS-----TAD-NASV	102
Wnt-6	LCQAEPEVVAELARGARLG VRECQYQFRFRRWNCS-----SHS-----KA	93

图 1

Wnt-7a	ICQSRPDAlIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNCs-----ALGERTV	92
Wnt-7b	ICQSRPDAlIIVIGEGAQMGINECQYQFRFGRWNCs-----ALGEKTV	92
Wnt-8a	GPKAYLTYTTSVALGAQSGIEECKYQFAWERWNCp-----ENALQLS	73
Wnt-8	GPKAYLIYSSSVAAGAQSGIEECKYQFAWDRWNCp-----ERALQLS	73
Wnt-9a	MCRDPGVAETLVEAVSMSALECQFQFRFERWNCt-----LEGry	110
Wnt-9b	LCRREPGLAETLRDAAHGLLECQFQFRHERWNCs-----LEG--	104
Wnt-10a	VCVRHPDVAASAIQGIQIAIHECQHQRDQRWNCs-----SLETRNKIPY	118
Wnt-10b	LCLRNPDVTASALQGLHIAVHECQHQLRDQRWNCs-----ALEGGRLPH	105
Wnt-11	LCRSNLELMHTVVHAAREVMKACRRAFADMRWNCs-----SIELAPN	99
Wnt-16	LCKRKPYLLPSIREGARLGIQECGSQFRHERWNCMITAAATTAPMGASPL	108
Wnt-1	FGKIVNRGCRETAFIFAITsAGVTHSvARsCSEGSIESCTCDYRRRGPG-	161
Wnt-2	FGRVLLRSSRESAFVYAISSAGVVFAITRACSQGEVKSCSDPKKMGSAK	146
Wnt-2b	FGRVMLRSSREAAfVYAISSAGVVHAI TRACSQGElsVCSCDPYTRGRHH	158
Wnt-3	FGPVLDKATRESAFVHAIASAGVAFVTRSCAEGTSTICGCDShHKGP-	149
Wnt-3a	FGPVLDKATRESAFVHAIASAGVAFVTRSCAEGTAAICGCSsRHQGS-	146
Wnt-4	FGKVVTQGTREAAfVYAISSAGVAFVTRACSSGELEKCGCDRTVHGVS-	146
Wnt-5a	FGRVMQIGSRETAFtyAVSAAGVVNAMSrACREGELSTCGCS--RAARPK	171
Wnt-5b	FGRVMQIGSRETAFthAVSAAGVVNAISRACREGELSTCGCS--RTARPK	150
Wnt-6	FGRILQQDI RETAFVFAITAAGASHAVTQACSMGELLQCGCQAPRG----	139
Wnt-7a	FGKELKVGsSREAAfTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYH	142
Wnt-7b	FGQELRVGSREAAfTYAITAAGVAHAVTAACsQGNLSNCGCDREKQGYYN	142
Wnt-8a	THNRLRSATRETSFIHAISSAGVMYIITKNCsMGDFENCgCDGSNNGKTG	123
Wnt-8	SHGGLRSANRETAFVHAISSAGVMYTLTRNCsLGDFDNCgCDDSRNGQLG	123
Wnt-9a	RASLLKRGfKETAFlyAIISSAGLTHALAKACSAGRMErCTCDEAPDLENR	160
Wnt-9b	RMGLLKRGfKETAFlyAVSSAALThTLARACSAGRMErCTCDDSPGLESR	154
Wnt-10a	ESPIFSRGfRESAFAYAlAAAGVVHAVSNACALGKLKACGCDASRRGDEE	168
Wnt-10b	HSAILKRGfRESAFsFsmLAAGVMHAVATACSLGKLvSCGCGWKGSGEQD	155
Wnt-11	YLLDLERGtRESAFVYALSAAAIshAIARACTSGDLPGCSCGPVPGEP-	148
Wnt-16	FGYELSSGTKETAFIYAVMAAGLVHsvTRSCsAGNMTECsCDTTLQNGGS	158
Wnt-1	-----GPDWHWGGCSDNI	174
Wnt-2	D-----SKGIFDWGGCSDNI	161
Wnt-2b	D-----QRGDFDWGGCSDNI	173
Wnt-3	-----GEGWKWGGCsEDA	162
Wnt-3a	-----GKGWKWGGCsEDI	159
Wnt-4	-----PQGFQWSGCSDNI	159
Wnt-5a	D-----LPRDWLWGGCGDNI	186
Wnt-5b	D-----LPRDWLWGGCGDNV	165
Wnt-6	-----RAPPRPSGLP-GTPGP-PGPAGSPEGsAAWEGGCGDDV	176
Wnt-7a	R-----DEG-WKWGGCsADI	156
Wnt-7b	Q-----AEG-WKWGGCsADV	156
Wnt-8a	-----GHGWIWGGCsDNV	136
Wnt-8	-----GQGWLWGGCsDNV	136
Wnt-9a	E-----AWQWGGCGDNL	172
Wnt-9b	Q-----AWQWGVCGDNL	166
Wnt-10a	AFRRKLHRLQLDALQRGKGLSHGVPEHPALPTASPLQDSWEWGGCSPDM	218
Wnt-10b	RLRAKL--LQLQALSRGKSfPHSLPSPGPGSSPSPGPQDTWEWGGCNHDM	203
Wnt-11	-----GPGNRWGGCADNL	161
Wnt-16	A-----SEG-WHWGGCsDDV	172
Wnt-1	DFGRLFGREFVDSGEKGR-----DLRFLMNLHNNEAGRTTVFSEMRO	216

图1(续)

Wnt-2	DYGIKFARAFVDAKERKG-----KDARALMNLHNNRAGRKAVKRFLKQ	204
Wnt-2b	HYGVRFAKAFVDAKEKRL-----KDARALMNLHNNRCGR TAVRRFLKL	216
Wnt-3	DFGVLSREFADARENRP-----DARSAMNKHNNNEAGR TTILDHMHL	204
Wnt-3a	EFGGMVSREFADARENRP-----DARSAMNRHNNNEAGR QAIASHMHL	201
Wnt-4	AYGVAFSQSFVDVRERSKG-----ASSSRALMNLHNNNEAGR KAILTHMRV	204
Wnt-5a	DYGYRFAKEFVDARERERIHA KGSYESARILMNLHNNNEAGR RTVYNLADV	236
Wnt-5b	EYGYRFAKEFVDAREREKNFA KGSSEEQGRVLMNLQNNNEAGR RAVYKMADV	215
Wnt-6	DFGDEKSRLFMDARHKRG-----RGDIRALVQLHNNNEAGR LAVRSHTRT	220
Wnt-7a	RYGIGFAKVFDAREIKQN---ART-----LMNLHNNNEAGR KILEENMKL	198
Wnt-7b	RYGIDFSRRFVDAREIKKN---ARR-----LMNLHNNNEAGR KVLEDRMQL	198
Wnt-8a	EFGERISKLFVDSLEKGD-----ARALMNLHNNRAGR LAVRATMKR	178
Wnt-8	GFGEAISKQFVDALETGQD-----ARAAMNLHNNNEAGR KAVKGTMKR	178
Wnt-9a	KYSSKFVKEFLG-RRSSKD-----LRARVDFHNNLVGVKVIKAGVET	213
Wnt-9b	KYSTKFLSNFLGSKRGNKD-----LRARADAHNTHVGIKAVKSGLRT	208
Wnt-10a	GFGERFSKDFLDSREP-----HRDIHARMRLHNNRVGRQAVMENMRR	260
Wnt-10b	DFGEKFSRDFLDSREA-----PRDIQARMRIHNNRVGRQVVTENLKR	245
Wnt-11	SYGLLMGAKFSDAPMKVKKTG----SQANKLMRLHNNSEVGRQALRASLEM	207
Wnt-16	QYGMWFSRKFLDFPIGNTT---GKENKVLLAMNLHNNNEAGRQAVAKLMSV	219
Wnt-1	ECKCHGMSGSCSCTVRTCWMRLPTLRAVGDVLRDRFDGASRVLYGNRGSNRA	266
Wnt-2	ECKCHGVSGSCTLRCTCWLAMADFRKTGDYLWRKYNGAIQVVMNQ---DGT	251
Wnt-2b	ECKCHGVSGSCTLRCTCWRALSDFRRTGDYLRRRYDGAVQVMATQ---DGA	263
Wnt-3	KCKCHGLSGSCEVKTCCWAAQPDFRAIGDFLKD KYDSASEMVVEK---HRE	251
Wnt-3a	KCKCHGLSGSCEVKTCCWWSQPDFRAIGDFLKD KYDSASEMVVEK---HRE	248
Wnt-4	ECKCHGVSGSCEVKTCCWRAPPPFRQVGHALKEKFDGATEVEPRR---VGS	251
Wnt-5a	ACKCHGVSGSCSLKTCWLQ LADFRKVG DALKEKYDSAAAMRLNS---RGK	283
Wnt-5b	ACKCHGVSGSCSLKTCWLQ LAEFRKVG DRLKEKYDSAAAMRVTR---KGR	262
Wnt-6	ECKCHGLSGSCALRTCWQKLPPFREV GARLLERFH GASRVMTGN---DGK	267
Wnt-7a	ECKCHGVSGSCTTKTCWTTL PQFRELGYVLKDYNEAVHVEPVR---ASR	245
Wnt-7b	ECKCHGVSGSCTTKTCWTTL PKFREVGHLLKEKYNAAVQVEVVR---ASR	245
Wnt-8a	TCKCHGISGSCSIQTCWLQ LAEFREM GDY LKAKYDQALKIEMDKRQ--LR	226
Wnt-8	TCKCHGVSGSCTTQTCWLQ LPEFREVGAHLKEKYHAALKVDLLQ-----	223
Wnt-9a	TCKCHGVSGSCTVRTCWRQLAPFHEV GKHLKH KYETALKV GSTTNEAAGE	263
Wnt-9b	TCKCHGVSGSCAVRTCWKQLSPFRETQV LKLR YDSAVKVSSATNEALGR	258
Wnt-10a	KCKCHGTSGSCQLKTCWQVTPEFRTV GALLRS RFHRATLIRPHNR--NGG	308
Wnt-10b	KCKCHGTSGSCQFKTCWRAPAEFRAVGAALRERLGRAIFIDTHNR--NSG	293
Wnt-11	KCKCHGVSGSCSIRTCWKGLQELQDVAADLKTRYLSATKVVHRP---MGT	254
Wnt-16	DCRCHGVSGSCAVKTCWKTMSSFEKIGHLLKDKYENSIQISDKT---KRK	266
Wnt-1	SRAELLR-----LEPEDPAHKPPSPHDLVYFEKSPNFCTYSGR LGTAGTA	311
Wnt-2	GFTVAN-----ERFKKPTKNDLVYFENS PDYCI RDREAGSLGTA	290
Wnt-2b	NFTAAR-----QGYRRATRTDLVYFDNSPDYCVLDKAAGSLGTA	302
Wnt-3	SRGWVET-----LRKYSLFKPPTERDLVYYENSPNFCEPNPETGSFGTR	296
Wnt-3a	SRGWVET-----LRPRYTYFKVPTERDLVYYEASPNFCEPNPETGSFGTR	293
Wnt-4	SR-----A-----LVPRNAQFKPHTDEDLVYLEPSPDFCEQDMRSGVLGTR	292
Wnt-5a	-LVQVN-----SRFNSPTTQDLVYIDPSPDYCVRNES TGSLGTQ	321
Wnt-5b	-LELVN-----SRFTQPTPEDLVYVDPSPDYCLRNES TGSLGTQ	300
Wnt-6	ALLPAVR-----TLKPPGRADLLYAADSPDFCAPNRR TGSPGTR	306
Wnt-7a	NKRPTFL-----KIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVTG SVGTQ	290
Wnt-7b	LRQPTFL-----RIKQLRSYQKPMETDLVYIEKSPNYCEEDAATG SVGTQ	290
Wnt-8a	AGNSAEG-----HWVPAEAF LPSAEAE LIFLEESPDYCTCNSSLGIYGTE	271
Wnt-8	AGNSAAG-----RGAIADTFRSISTREL VHLEDSPDYCLENKTLGLLGTE	268

图1(续)

Wnt-9a	AGAISFPRGR--ASGAGGSDPLFRTPELVHLDSPSPFCLAGR--FSPGTA	309
Wnt-9b	LELWAPAR-----QGS ¹ LT ² KG ³ LAP ⁴ RS ⁵ GD ⁶ LV ⁷ ME ⁸ DS ⁹ SP ¹⁰ FC ¹¹ R ¹² PS ¹³ K--YSPGTA	301
Wnt-10a	QLEFGPAGAFSPAPGAPGFRRRASPADLVYFEKSPDFCEREPR ¹ LDSAGTV	358
Wnt-10b	AFQ ¹ PRLR-----PRRLSG--ELVYFEKSPDFCERDPTMGSPGTR	330
Wnt-11	RKHLVPK-----DLDIRPVK ¹ DS ² ELVYLQSSP ³ DFC ⁴ M ⁵ NEK ⁶ VGS ⁷ HGTQ	295
Wnt-16	MRR-----REKDQ ¹ RKIPI ² HKD-DLLYVNKSPNYC ³ VEDKKLGIPGTQ	306
Wnt-1	GRACN ¹ SSPALDGCCELLCCGRGHRT ² RTQ ³ RVTER-----CNCTFWHCC ⁴ H	354
Wnt-2	GRVCN ¹ LTSRGMDSC ² EV ³ MCCGRGYDT ⁴ SHVTRMTK-----CGCKFWHCC ⁵ A	333
Wnt-2b	GRVCSK ¹ TSKGT ² DGC ³ EIMCCGRGYDT ⁴ TRVTRVTQ-----CECKFWHCC ⁵ A	345
Wnt-3	DRTC ¹ NVTSHGIDGCDLLCCGRGHNT ² TEKRKEK-----CHCIFHWCC ³ Y	339
Wnt-3a	DRTC ¹ NVSSHGIDGCDLLCCGRGHNARA ² ERRREK-----CRCVFWHCC ³ Y	336
Wnt-4	GRTCN ¹ KTSKAIDGCCELLCCGRGFHTA ² QVELAER-----CSC ³ KFWHCC ⁴ F	335
Wnt-5a	GRLCN ¹ KTSEGMDGC ² ELMCCGRGYDQ ³ FKTVQTER-----CHCKFWHCC ⁴ Y	364
Wnt-5b	GRLCN ¹ KTSEGMDGC ² ELMCCGRGYNQ ³ FKSVQVER-----CHCKFWHCC ⁴ F	343
Wnt-6	GRACN ¹ SSAPDL ² SGCDLLCCGRGHRQ ³ ESVQLEEN-----CLCRFWHCC ⁴ V	349
Wnt-7a	GRACN ¹ KTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQ ² YARVWQ-----CNCKFWHCC ³ Y	333
Wnt-7b	GRLCN ¹ RTPGADGCDT ² MCCGRGYNTHQ ³ YTKVWQ-----CNCKFWHCC ⁴ F	333
Wnt-8a	GRECL ¹ QNSHNTSRWERRSC ² GR ³ LCTECGLQVEERKTEVISSCNCKFQWCCT	321
Wnt-8	GRECL ¹ RRGRALGRWERRSC ² RRLCGDCGLAVEERRAETVSSCNCKFWHCC ³ A	318
Wnt-9a	GRRCHREK----NCESICCGRGHNTQ ¹ SRVVTRP-----CQCQVRWCC ² Y	348
Wnt-9b	GRVCSREA----SCSSLCCGRGYDTQ ¹ SRLVAFS-----CHCQVQWCC ² Y	340
Wnt-10a	GRLCN ¹ KSSAGSDGCGSMCCGRGHNL ² RQTRSER-----CHCRFWHCC ³ F	401
Wnt-10b	GRACN ¹ KTSRLLDGCGSLCCGRGHNV ² LQTRVER-----CHCRFWHCC ³ Y	373
Wnt-11	DRQC ¹ NKTSNGSDSCDLMCCGRGYNPYTDRVVER-----CHCKYHWCC ² Y	338
Wnt-16	GRECN ¹ RTEGADGCNLLCCGRGYNTHVVRHVER-----CECKFIWCC ² Y	349
Wnt-1	VSCRNCTHTRVLHECL-----	370
Wnt-2	VRCQDCLEALDVHTCKAPKNADWTTAT-----	360
Wnt-2b	VRCKECRNTVDVHTCKAPKKAEWLDQT-----	372
Wnt-3	VSCQECIRIYDVHTCK-----	355
Wnt-3a	VSCQECTRVYDVHTCK-----	352
Wnt-4	VKCRQCQRLVELHTCR-----	351
Wnt-5a	VKCKKCTEIVDQFVCK-----	380
Wnt-5b	VRCKKCTEIVDQYICK-----	359
Wnt-6	VQCHRCRVRKELSLCL-----	365
Wnt-7a	VKCNTCSERTEMYTCK-----	349
Wnt-7b	VKCNTCSERTEVFTCK-----	349
Wnt-8a	VKCDQCRHVVS ¹ KYYCARSP----GSAQSLGK ² GSA	351
Wnt-8	VRCEQCRRRVTKYFCSRAERPRGGA ¹ HKPGRKP-	351
Wnt-9a	VECRQCTQREEVYTCKG-----	365
Wnt-9b	VECQQC ¹ VQEELVYTCKH-----	357
Wnt-10a	VVCEECRIT ¹ EWVS ² VCK-----	417
Wnt-10b	VLCDECKVTEWVNVCK-----	389
Wnt-11	VTCCRRCERTVERYVCK-----	354
Wnt-16	VRCRRCESMTDVHTCK-----	365

图1(续)

Wnt-7A 比对

10	20	30	40	50	60	70	80	
1	MNRKARRCLGHLFSLGLMVYLRIGGFSSVVALGASII	CNKIPGLAPRQRAICQSRPD	AI	IVIGEGSQMGLDECQFQFRNG	Wnt7A	人		
1	MTRKARRCLGHLFSLGLIVYLRIGGFSSVVALGASII	CNKIPGLAPRQRAICQSRPD	AI	IVIGEGSQMGLDECQFQFRNG	Wnt7A	小鼠		
1	MTRKARRCLGHLFSLGLIVYLRIGGFSSVVALGASII	CNKIPGLAPRQRAICQSRPD	AI	IVIGEGSQMGLDECQFQFRNG	Wnt7A	大鼠		
1	MNRKTRRWIFHIFLSLGIYIKIGGFSSVVALGASII	CNKIPGLAPRQRAICQSRPD	AI	IVIGEGSQMGINECQFQFRNG	Wnt7A	鸡		
1	MSRKTRRWIFHIFLSLGIYIKIGGFSSVVALGASII	CNKIPGLAPRQRTICQSRPD	AI	IVIGEGSQMGINECQFQFRNG	Wnt7A	斑马鱼		
1	MNRKARRCLGHLFSLGLVYLRIGGFSSVVALGASII	CNKIPGLAPRQRAICQSRPD	AI	IVIGEGSQMGLDECQFQFRNG	Wnt7A	猪		
1	MNRKARRCLGHLFSLGLMVYLRIGGFSSVVALGASII	CNKIPGLAPRQRAICQSRPD	AI	IVIGEGSQMGLDECQFQFRNG	Wnt7A	牛		
90	100	110	120	130	140	150	160	
81	RWNC	SALGERTVFGKELKVGSR	EAAFTYAI	IAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGYH	RD	EGWKWGGCSADIRYGI	Wnt7A	小鼠
81	RWNC	SALGERTVFGKELKVGSR	EAAFTYAI	IAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGYH	RD	EGWKWGGCSADIRYGI	Wnt7A	大鼠
81	RWNC	SALGERTVFGKELKVGSR	EAAFTYAI	IAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGYH	RD	EGWKWGGCSADIRYGI	Wnt7A	鸡
81	RWNC	SALGERTVFGKELKVGSR	EAAFTYAI	IAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGYH	RD	EGWKWGGCSADIRYGI	Wnt7A	斑马鱼
81	RWNC	SALGERTVFGKELKVGSR	EAAFTYAI	IAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGYH	RD	EGWKWGGCSADIRYGI	Wnt7A	猪
81	RWNC	SALGERTVFGKELKVGSR	EAAFTYAI	IAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGYH	RD	EGWKWGGCSADIRYGI	Wnt7A	牛
170	180	190	200	210	220	230	240	
161	GFAKVFVDAREIKQ	NARTILMNLHNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQFRELGYVLKDKYNEAVHVEP	Wnt7A	人				
161	GFAKVFVDAREIKQ	NARTILMNLHNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQFRELGYVLKDKYNEAVHVEP	Wnt7A	小鼠				
161	GFAKVFVDAREIKQ	NARTILMNLHNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQFRELGYVLKDKYNEAVHVEP	Wnt7A	大鼠				
161	GFAKVFVDAREIKQ	NARTILMNLHNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPKFRQLGYILKERYNHAVHVEP	Wnt7A	鸡				
161	GFAKVFVDAREIKQ	NARTILMNLHNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPKFRQLGYILKERYNHAVHVEP	Wnt7A	斑马鱼				
161	GFAKVFVDAREIKQ	NARTILMNLHNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQFRELGYVLKDKYNEAVHVEP	Wnt7A	猪				
161	GFAKVFVDAREIKQ	NARTILMNLHNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQFRELGYVLKDKYNEAVHVEP	Wnt7A	牛				
250	260	270	280	290	300	310	320	
241	VRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM	TDLVYIEKSPNYCEDPVTG	SVGTQGRACNKTA	PQASGCDLMCCGRGYNTHQYAR	Wnt7A	人		
241	VRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM	TDLVYIEKSPNYCEDPVTG	SVGTQGRACNKTA	PQASGCDLMCCGRGYNTHQYAR	Wnt7A	小鼠		
241	VRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM	TDLVYIEKSPNYCEDPVTG	SVGTQGRACNKTA	PQASGCDLMCCGRGYNTHQYAR	Wnt7A	大鼠		
241	VRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM	TDLVYIEKSPNYCEDPVTG	SVGTQGRMCNKTA	QSQNGCDLMCCGRGYNTHQYSR	Wnt7A	鸡		
241	VRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM	TDLVYIEKSPNYCEDPVTG	SMGTQGRICNKTA	QHTNGCDLMCCGRGYNTHQYSR	Wnt7A	斑马鱼		
241	VRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM	TDLVYIEKSPNYCEDPVTG	SVGTQGRACNKTA	PQASGCDLMCCGRGYNTHQYAR	Wnt7A	猪		
241	VRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM	TDLVYIEKSPNYCEDPVTG	SVGTQGRACNKTA	PQASGCDLMCCGRGYNTHQYAR	Wnt7A	牛		
330	340							
321	VWQCNCKFHWCCYVK	CNTCSERTEMYTCK	Wnt7A	人				
321	VWQCNCKFHWCCYVK	CNTCSERTEMYTCK	Wnt7A	小鼠				
321	VWQCNCKFHWCCYVK	CNTCSERTEMYTCK	Wnt7A	大鼠				
321	VWQCNCKFHWCCYVK	CNTCSERTEVYTCK	Wnt7A	鸡				
321	VWQCNCKFHWCCYVK	CNTCSERTEVYTCK	Wnt7A	斑马鱼				
321	VWQCNCKFHWCCYVK	CNTCSERTEVYTCK	Wnt7A	猪				
321	VWQCNCKFHWCCYVK	CNTCSERTEVYTCK	Wnt7A	牛				

图 2

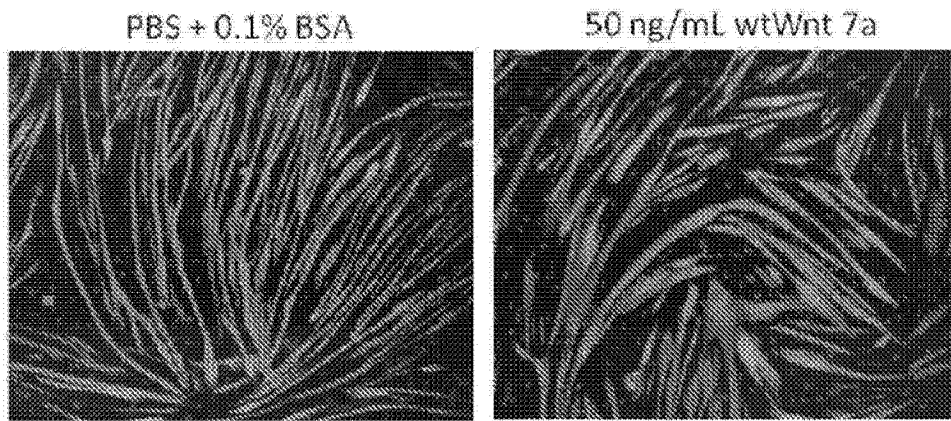


图 3A

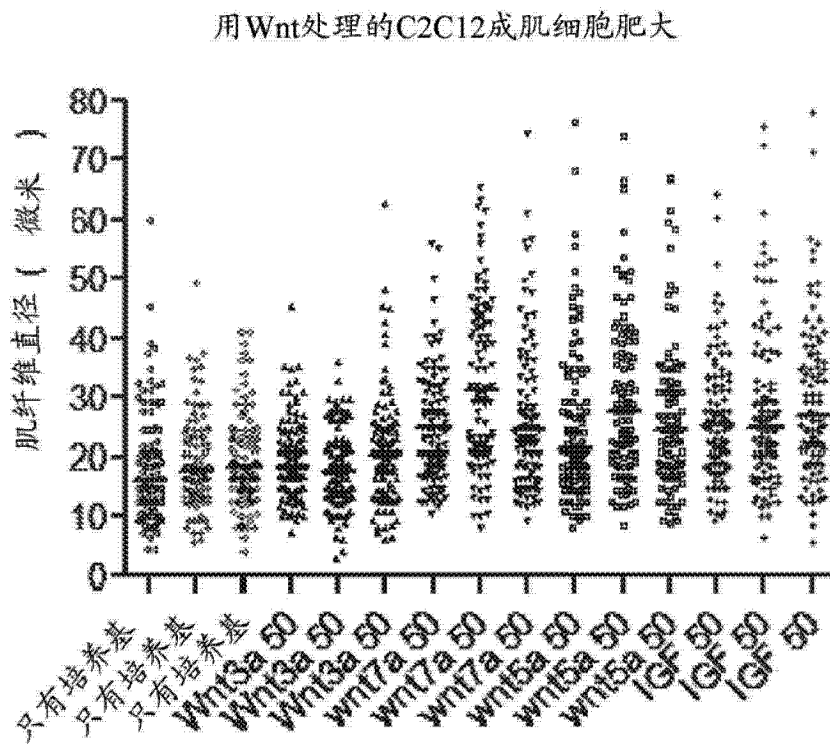


图 3B

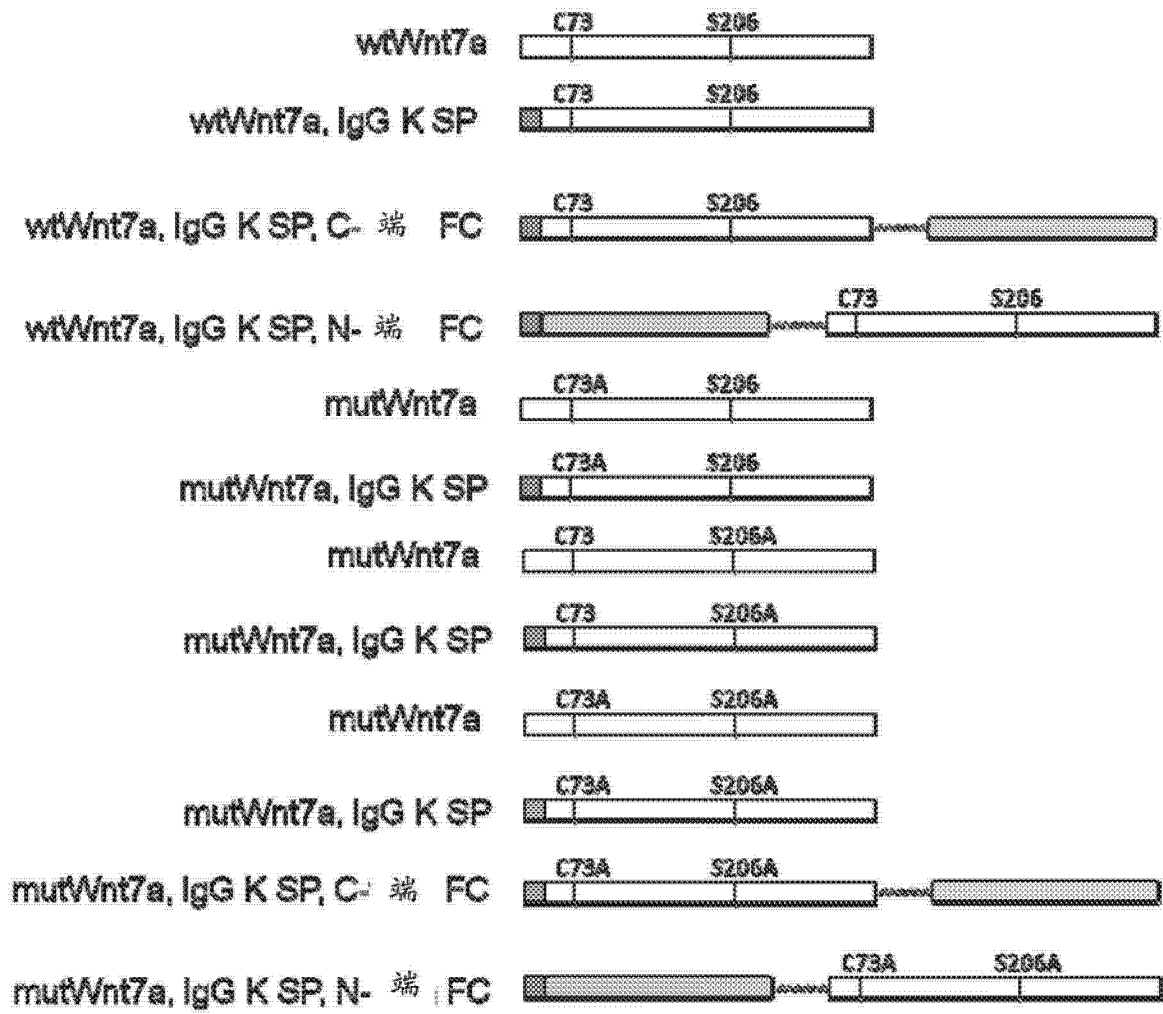


图 4

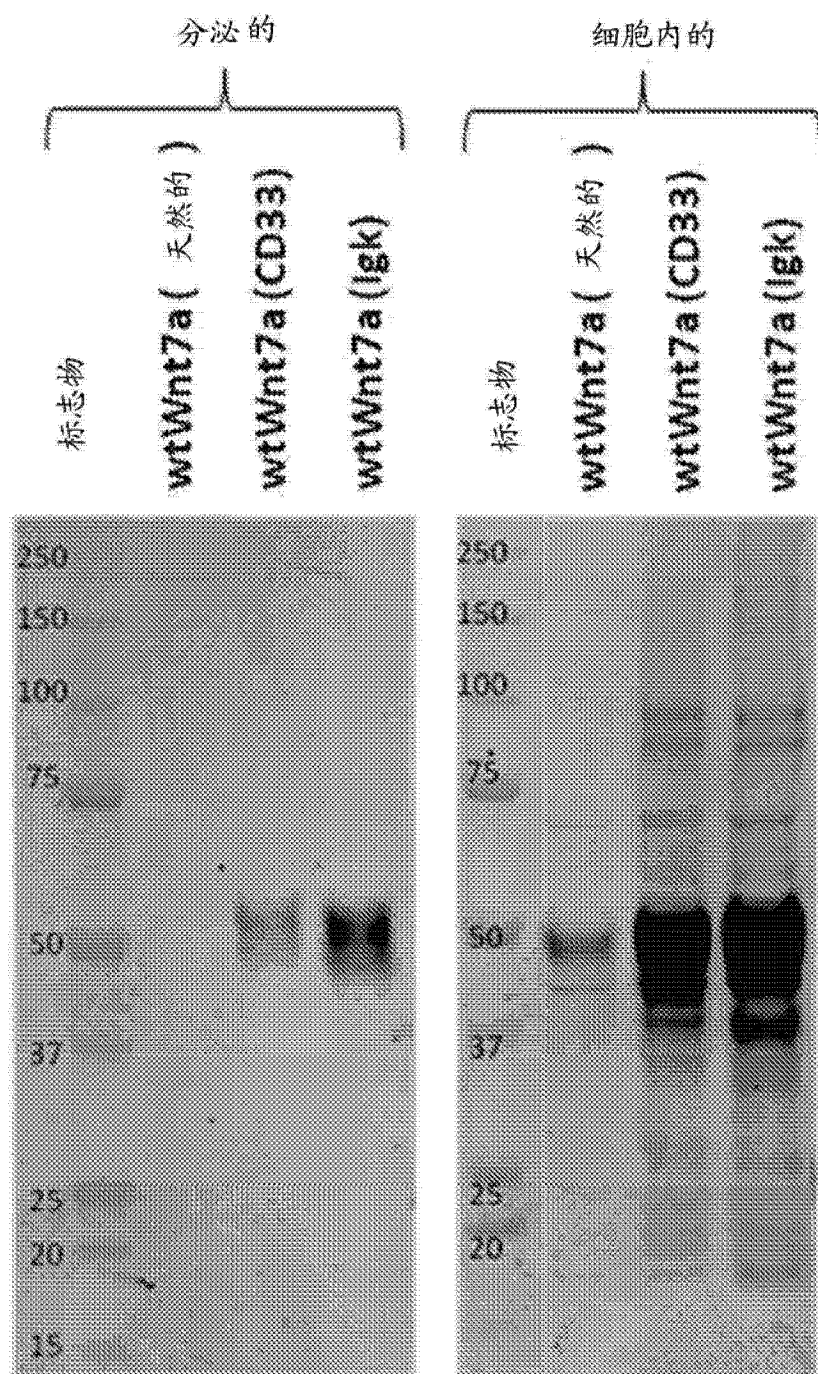


图 5

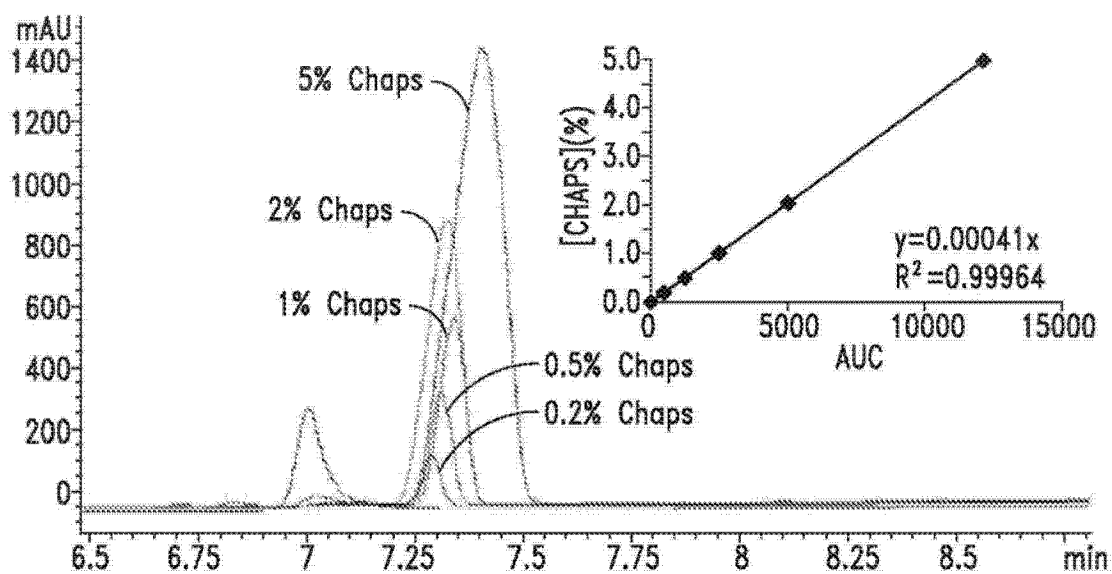


图 6A

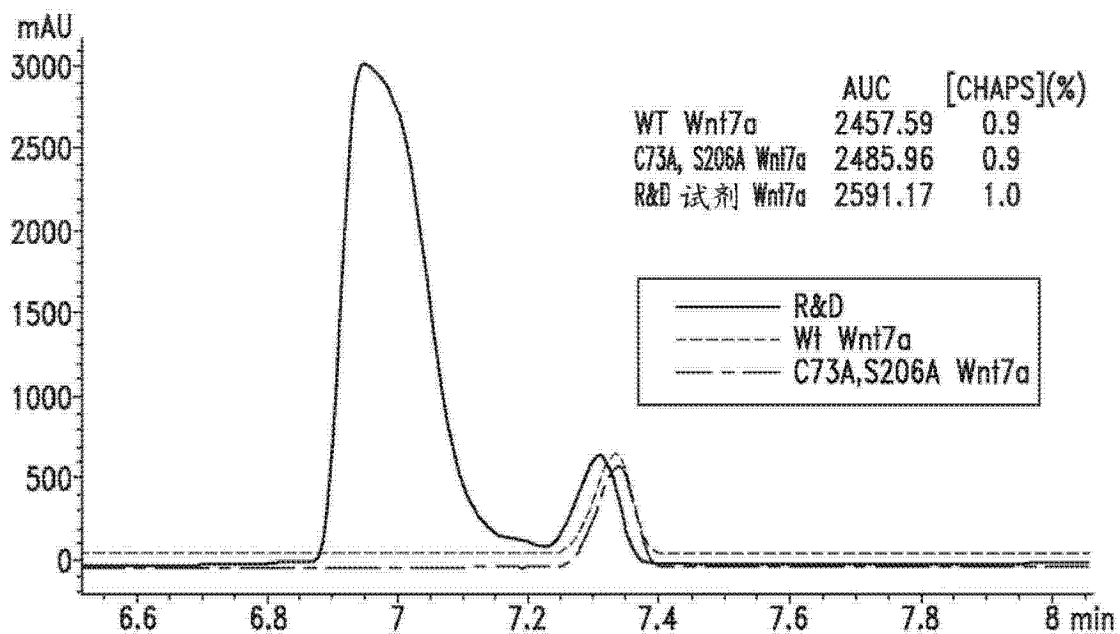


图 6B

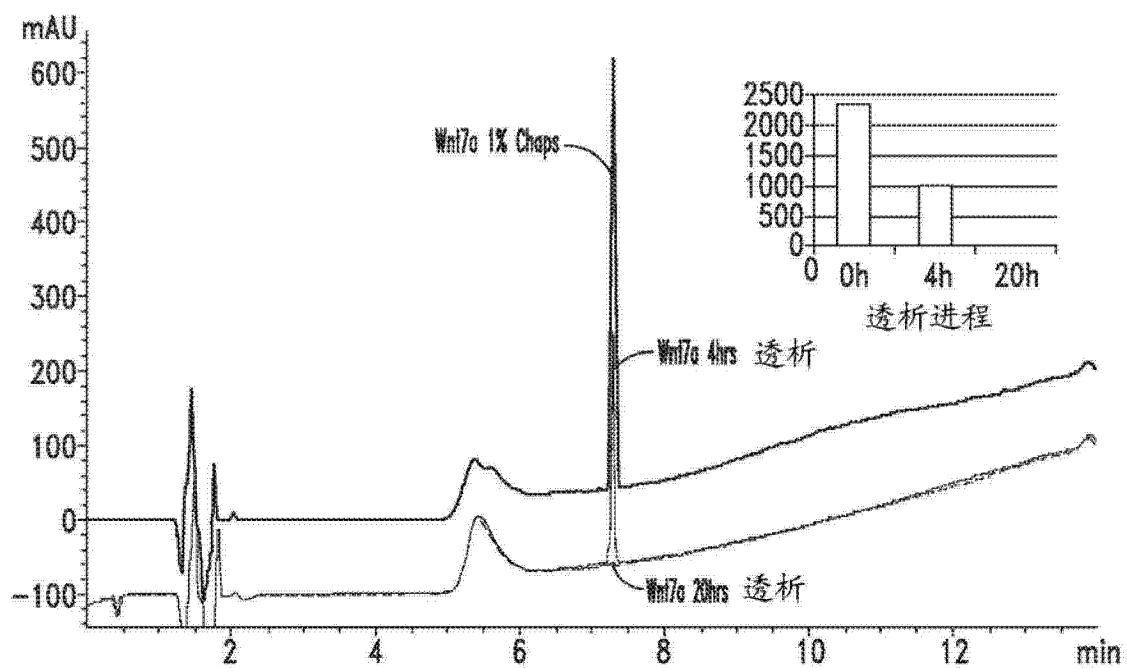


图 6c

在存在或不存去垢剂下配制的Wnt 7a变体的活性

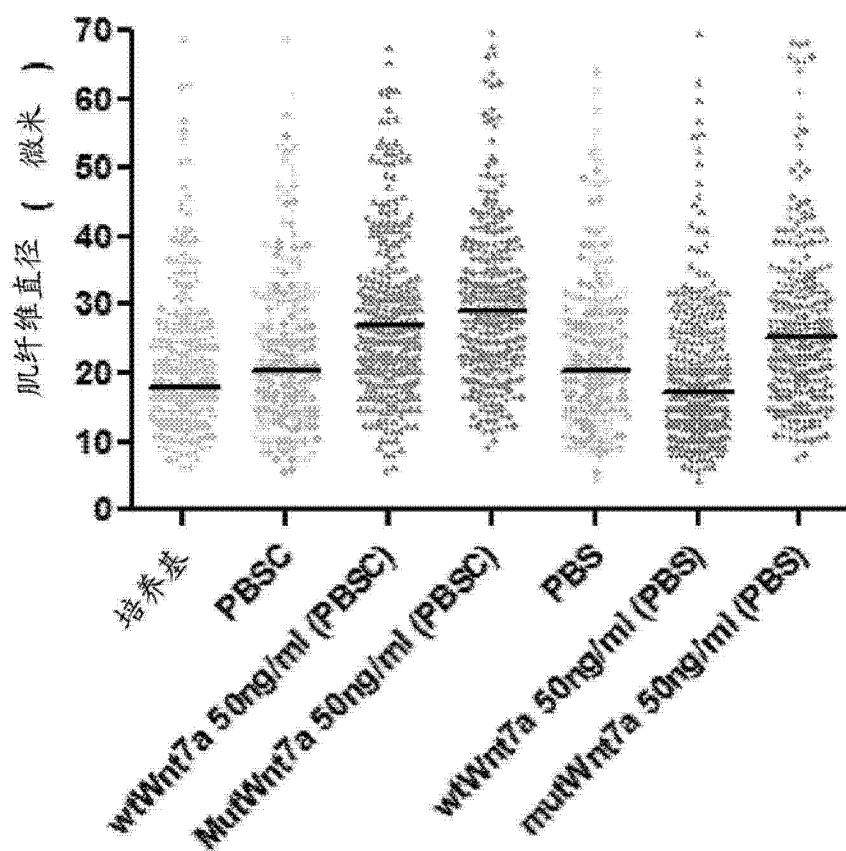


图 7

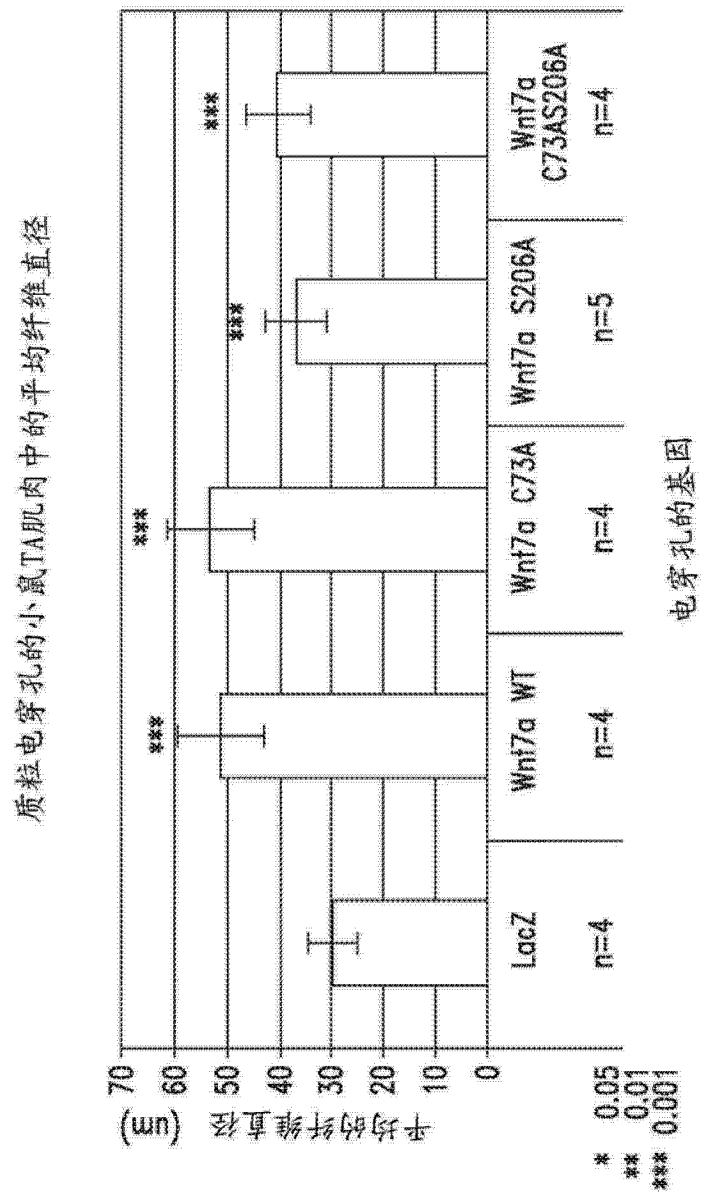


图 8

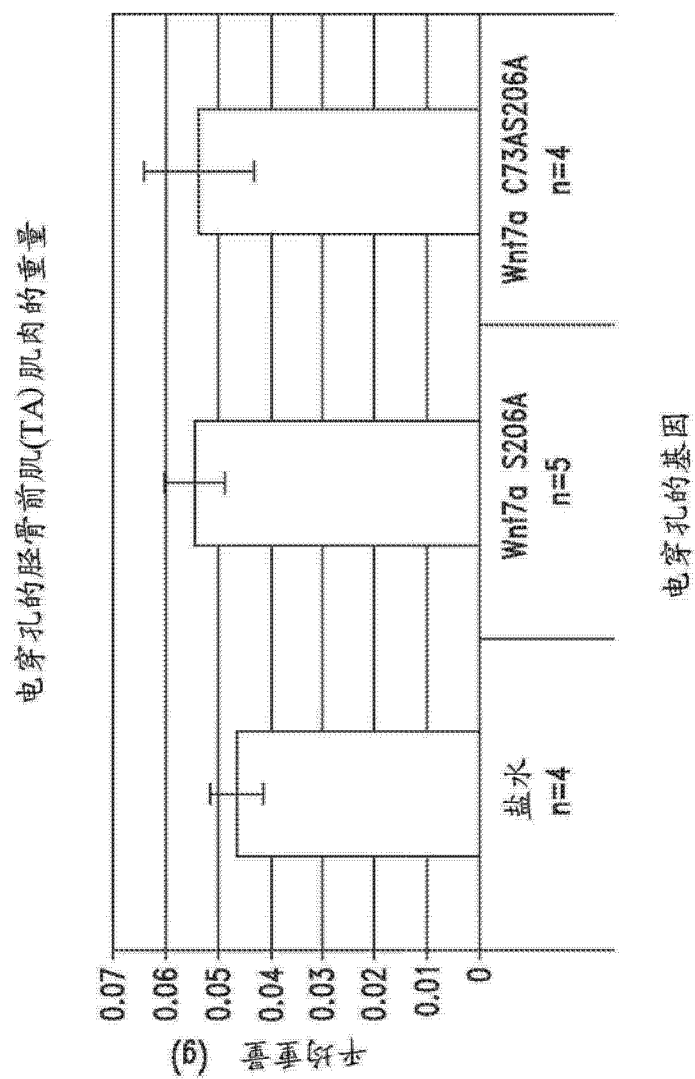


图 9

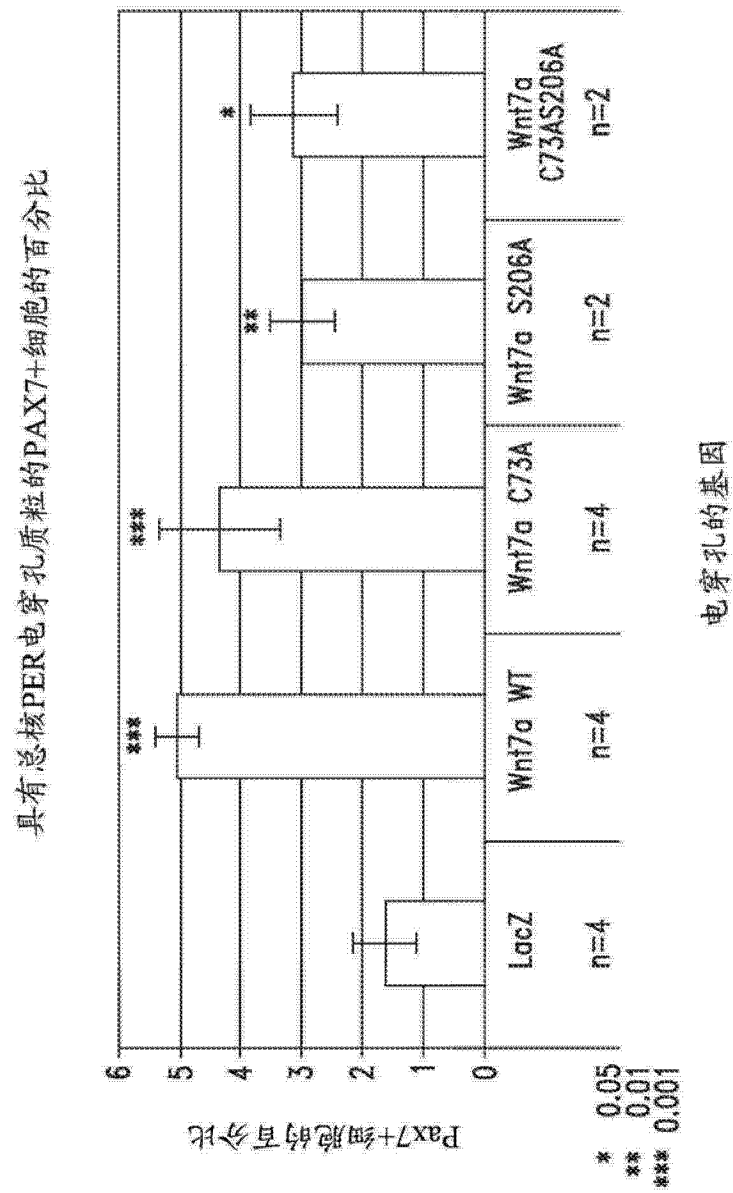


图 10

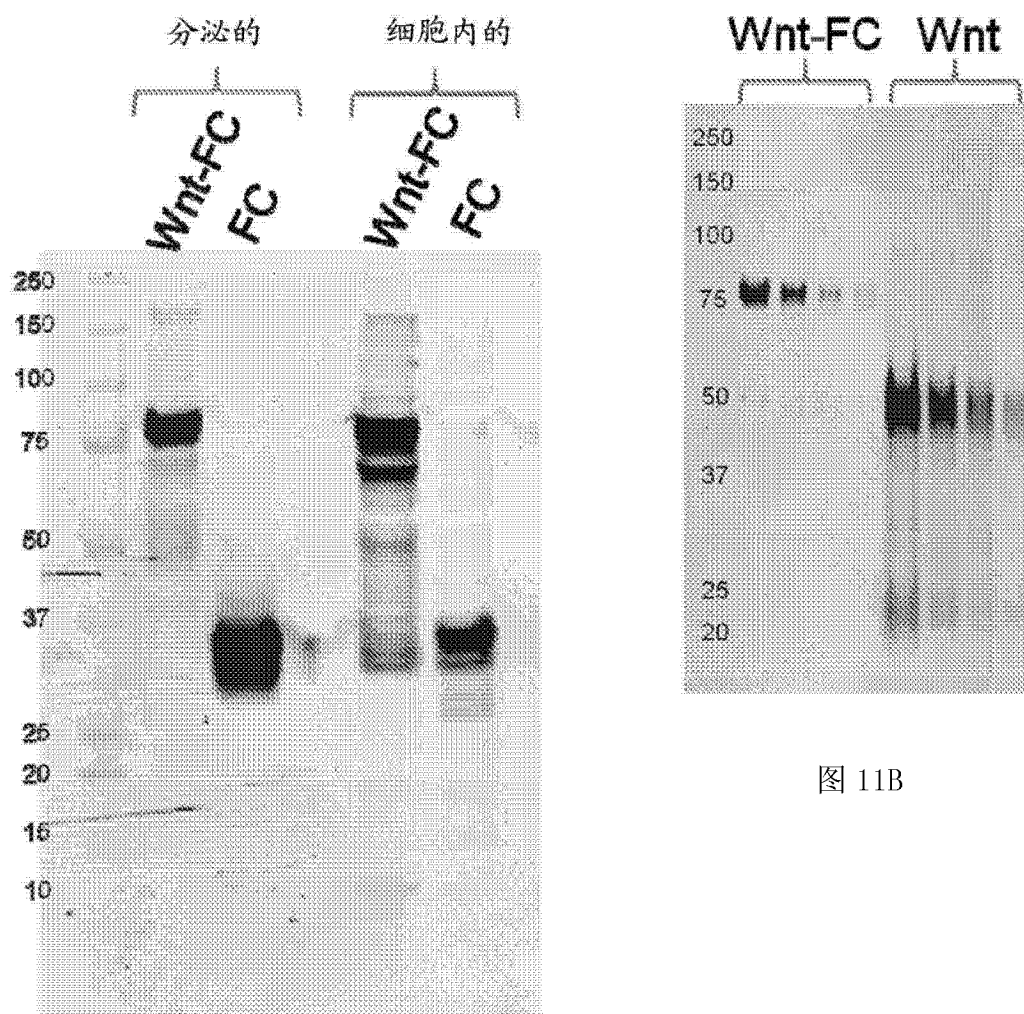


图 11B

图 11A