



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114805533 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 29

(21) 申请号 202210088433.1

T·P·赖利 R·C·克里斯汀

(22) 申请日 2015.10.23

D·利波夫斯基 R·坎普豪森

J·克鲁平斯基

(30) 优先权数据

62/068,523 2014.10.24 US

62/068,514 2014.10.24 US

62/068,526 2014.10.24 US

62/068,534 2014.10.24 US

62/068,296 2014.10.24 US

62/141,337 2015.04.01 US

62/141,383 2015.04.01 US

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

专利代理师 左路 区斌

(51) Int.Cl.

C07K 14/50 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201580070276.X 2015.10.23

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西

(72) 发明人 P·E·莫林 D·科恩 R·慕克吉

权利要求书1页 说明书152页

序列表280页 附图97页

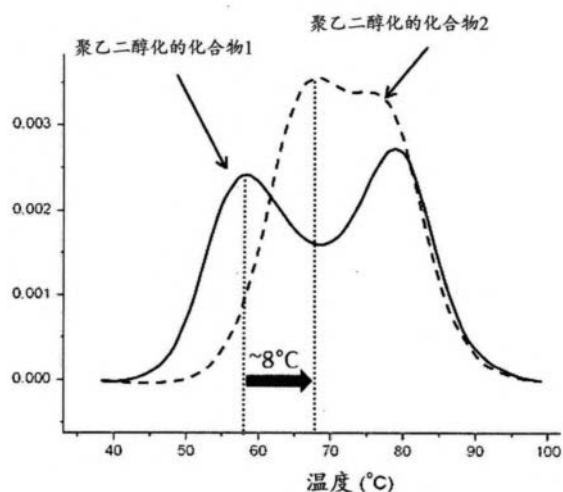
(54) 发明名称

修饰的FGF-21多肽及其用途

(57) 摘要

提供了修饰的FGF-21多肽及其用途,例如用于治疗纤维化相关疾病。公开了含有内部缺失及任选的置换肽的修饰的FGF-21多肽,其任选地经至少一个非天然编码的氨基酸修饰和/或任选地融合至融合配偶体。

差示扫描量热法 (DSC)



1. 一种修饰的FGF-21多肽,其包含(a) 无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:102或(b) SEQ ID NO:102,或由(a) 或(b) 组成。

修饰的FGF-21多肽及其用途

[0001] 本申请是申请日为2015年10月23日的第201580070276.X号发明名称为“修饰的FGF-21多肽及其用途”的中国专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及含有内部缺失的任选地经肽置换的修饰的FGF-21多肽及其用于治疗或预防疾病和病症的用途。

[0003] 发明背景

[0004] 成纤维细胞生长因子是广泛表达于发育和成熟组织中的多肽(Baird等,Cancer Cells,3:239-243,1991),其在多个生理功能中起关键作用(McKeehan等,Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.59:135-176,1998;Burgess,W.H.等,Annu.Rev.Biochem.58:575-606(1989)。根据文献,FGF家族由至少二十二个成员组成(Reuss等,Cell Tissue Res.313:139-157(2003))。

[0005] 成纤维细胞生长因子21(FGF-21)已描述于文献中(Nishimura等,Biochimica et Biophysica Acta,1492:203-206(2000);WO 01/36640;和WO 01/18172及美国专利公开No.20040259780,其各自通过提述以其整体并入本文)。不同于其他FGF,已报导FGF-21不具有增殖及致瘤效应(Ornitz和Itoh,Genome Biology 2001,2(3):评述3005.1-3005.12)。

[0006] 一些FGF-21多肽及其用途描述于美国专利公开No.20010012628、美国专利No.6,716,626,U.S.、美国专利公开No.2004/0259780、WO 03/011213、Kharitononkov等J Clin Invest.2005年6月;115(6):1627-35;WO 03/059270;美国专利公开No.2005/0176631,WO 2005/091944;WO 2007/0293430;美国专利公开No.2007/0293430;WO/2008/121563;美国专利No.4,904,584;WO 99/67291;WO 99/03887;WO 00/26354及美国专利No.5,218,092中,其各自通过提述以其整体并入本文。

[0007] 已报导人FGF-21在体内倾向于经历蛋白水解,在体外形成聚集体,经历脱酰胺(Gimeno和Moller,Trends Endocrinol Metab.2014 Jun;25(6):303-11;美国专利No.8,361,963;Hecht等,PLoS One.2012;7(11):e49345;美国专利公开No.2007/0293430;WO 2006/0065582),有可能限制含有FGF-21的药物组合物的储存期限。聚集体及脱酰胺形式的治疗性多肽可潜在地增加免疫原性(参见美国卫生及公共服务部(U.S.Department of Health and Human Services),“Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products”,2014年8月;Subramanyam(编),“Therapeutic Protein Immunogenicity Focus Group Newsletter”,American Association of Pharmaceutical Scientists,第1卷,第3期(2011年12月))。

[0008] 以WO 2008/121563和美国专利公开No.2008/0255045公开的先前工作指示,经修饰以在特定位置含有连接至聚(乙二醇)的非天然编码的氨基酸的一些人FGF-21多肽展现出增加的体内半衰期和/或保留的生物活性。然而,例示的人FGF-21多肽不包括本文所述的序列缺失或取代。

[0009] 纤维化是在器官或组织中过量纤维结缔组织的形成。纤维组织的过量沉积与可导

致器官或组织功能损伤的病理性条件相关。受影响器官可包括肺(肺纤维化(lung/pulmonary fibrosis))、肝脏(肝纤维化(liver/hepatic fibrosis))、肾脏(肾纤维化(kidney/renal fibrosis))及心脏(心脏纤维化)。纤维化还可影响其他组织及器官,包括关节、皮肤、肠、骨髓及其他组织及器官。例示性纤维化病况或疾病包括但不限于非酒精性脂肪性肝炎(NASH),其影响肝脏;糖尿病性肾脏疾病及糖尿病性肾病变,其影响肾脏;及代谢性心脏衰竭,其影响心脏。例如,NASH的特征在于食用极少或不食用酒精的人的肝脏中的脂肪、炎症和损伤且可导致肝硬化。NASH倾向于在通常具有升高的血脂水平和患糖尿病或前驱糖尿病的超重或肥胖中年人中诊断出来。

[0010] 本发明的实施方案此外还阐述了与FGF-21多肽的活性和生产相关的问题,具有改进的生物学或药理学特性(如改进的治疗性半衰期)的FGF-21多肽的生产,和治疗或预防疾病和病症的方法。

发明内容

[0011] 本文提供修饰的FGF-21多肽,其包含具有选自SEQ ID NO:1-7的氨基酸序列的多肽,只是其中所述氨基酸序列包含:(i) 2至19个氨基酸(如5至19个氨基酸)的内部缺失,其中所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸116至134对应的区域内,其中所述内部缺失由长度为0至12个氨基酸的置换肽置换;和(ii) 9个或少于9个额外氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0012] 本文还提供包含本文所述的修饰的FGF-21多肽的任一种和药学上可接受的载剂或赋形剂的组合物。

[0013] 本文提供修饰的FGF-21多肽,其包含具有选自SEQ ID NO:1-7的氨基酸序列的多肽,只是其中所述氨基酸序列包含:(i) 2至19个氨基酸(如5至19个氨基酸)的内部缺失,其中所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸116至134对应的区域内,其中所述内部缺失由长度为0至12个氨基酸的置换肽置换;和(ii) 9个或少于9个额外氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0014] 本文还提供在对其有需要的患者中调节葡萄糖及脂质稳态、葡萄糖摄入、GLUT 1表达和/或葡萄糖、甘油三酯、胰岛素或胰高血糖素血清浓度的至少一项的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽。

[0015] 本文还提供在对其有需要的患者中或所述患者的血液、血清样品或另外的样品中增加胰岛素敏感性、增加脂联素水平、降低血糖水平、降低胰高血糖素水平、降低甘油三酯水平、降低果糖胺水平、降低低密度胆固醇水平或降低C反应性蛋白水平的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽。

[0016] 本文还提供在对其有需要的患者中治疗选自如下的病况或病症的方法:肥胖、糖尿病、胰腺炎、胰岛素抗性、高胰岛素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代谢综合征、葡萄糖耐量受损、葡萄糖清除不足、高血糖、A型胰岛素抗性、C型胰岛素抗性(AKA HAIR-AN综合征)、罗伯森-门登荷综合征(Rabson-Mendenhall Syndrome)、多诺霍氏综合征(Donohue's Syndrome)或矮怪病(Leprechaunism)、雄激素过多症、多毛症或黑棘皮病、和普拉德-威利综合征(Prader-Willi syndrome),其包括向患者施用治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽。

[0017] 本文还提供在对其有需要的患者中治疗1型糖尿病、2型糖尿病或肥胖的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽。

[0018] 本文还提供治疗纤维化相关疾病的方法,其包括向对其有需要的患者施用有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽。

[0019] 本文还提供治疗纤维化相关疾病的方法,其包括向对其有需要的患者施用有效量的包含本文所述的修饰的FGF-21多肽和药学上可接受的载剂或赋形剂的组合物。

[0020] 本文还提供在对其有需要的患者中治疗肝纤维化或肝硬化的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽。

[0021] 本文还提供在对其有需要的患者中治疗或预防NASH的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽。

[0022] 本文还提供治疗NASH和/或肝纤维化的方法,其包括向对其有需要的患者施用有效量的包含本文所述的修饰的FGF-21多肽和药学上可接受的载剂或赋形剂的组合物。

[0023] 本文还提供在对其有需要的患者中降低肝脂肪分数的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽,其中所述患者任选地处于患上NASH的风险或已诊断患有NASH。

[0024] 本文还提供在对其有需要的患者中增加脂联素水平(如血浆总脂联素和/或高分子量脂联素)的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽,其中所述患者任选地处于患上NASH的风险或已诊断患有NASH。

[0025] 本文还提供在对其有需要的患者中治疗心脏衰竭或心脏纤维化的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽。

[0026] 本文还提供在对其有需要的患者中治疗肾脏或肾纤维化的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽。

[0027] 本文还提供在对其有需要的患者中治疗肺纤维化的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽。

[0028] 本文还提供在对其有需要的患者中治疗纤维化相关疾病的方法,其包括向患者施用有效量的包含一个或多个非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21多肽,其中所述修饰的FGF-21多肽与具有选自SEQ ID NO:1-7和201的氨基酸序列的人FGF-21多肽具有至少90%同一性,其中所述纤维化相关疾病选自NASH、肝纤维化、糖尿病性肾脏疾病、慢性肾病、肾纤维化、肺纤维化、心脏纤维化、心脏衰竭及代谢性心脏衰竭。

[0029] 附图简述

[0030] 图1A至B. 例示性的修饰的FGF-21多肽序列。指示的坐标相对于SEQ ID NO:1的野生型FGF-21多肽。完整多肽各包含N末端序列MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIRE DGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY,然后是位置108处的指示氨基酸,然后是标记为“氨基酸109-149”的区域的指示序列,然后是序列PGILAPQPPDVGSDDLPLSM,然后是标记为“氨基酸169-181”的区域的指示序列。修饰的FGF-21多肽的完整氨基酸序列还示于下文实施例4中。

[0031] 图2. 聚乙二醇化的化合物1及聚乙二醇化的化合物2的体外FGF-21活性的例示性剂量反应曲线(在基于细胞的测定法中通过胞外信号调节激酶(ERK) 1/2的FGF21依赖性磷酸化测量)。

[0032] 图3.用于评估修饰的FGF-21多肽的热稳定性进行的差示扫描量热法(DSC)的代表性结果。在此实例中,显示了聚乙二醇化的化合物2具有高出聚乙二醇化的化合物1约8℃的转变中点(“Tm”)温度。热可逆性>95%(未显示)。

[0033] 图4.用于评估修饰的FGF-21多肽的热稳定性进行的热扫描荧光分析(TSF)的代表性结果。在此图中,显示了化合物10具有高出化合物1(具有野生型FGF-21序列,但其中包括N末端甲硫氨酸以在大肠杆菌(E.coli)中表达)约8℃的转变中点(“Tm”)温度。

[0034] 图5.左小图:25℃聚乙二醇化的化合物1及聚乙二醇化的化合物2随时间的脱酰胺化的测量(通过电荷异质性表示)。聚乙二醇化的化合物2表现出减少的电荷异质性形成,指示脱酰胺化大幅减慢。右小图:40℃各自处于pH 7.0和7.5mg/ml的蛋白质浓度的蔗糖/组氨酸缓冲液中的聚乙二醇化的化合物1及聚乙二醇化的化合物2随时间的聚集体形成的测量(通过大小排阻色谱测量)。聚乙二醇化的化合物2表现出减少的聚集体形成。总之,这些结果能够预测相对于聚乙二醇化的化合物1,聚乙二醇化的化合物2具有更佳的储存稳定性和配制至较高浓度的能力。

[0035] 图6.在pH 6.5处于蔗糖/组氨酸缓冲液中(上方小图)、在pH 7.0处于蔗糖/组氨酸缓冲液中(中间小图)及在pH 8.3处于蔗糖/TRIS缓冲液中(下方小图)修饰的FGF-21多肽随时间的高分子量(HMW)聚集体形成的测量。相比于pH 8.3处,在pH 6.5及pH 7.0处的HMW聚集体形成更为明显。大多数FGF-21变体表现出相对于聚乙二醇化的化合物1减少的HMW聚集体形成,但对于少数化合物,HMW聚集体形成与化合物1类似或更高。

[0036] 图7.在pH 6.5处于蔗糖/组氨酸缓冲液中(上方小图)、在pH 7.0于蔗糖/组氨酸缓冲液中(中间小图)及在pH 8.3于蔗糖/TRIS缓冲液中(下方小图)修饰的FGF-21多肽的脱酰胺化倾向的测量(通过随时间的酸性变体的形成表示)。与聚乙二醇化的化合物1相比,所有所示化合物都表现出减少的电荷酸性变体形成,指示降低的脱酰胺化。

[0037] 图8.修饰的FGF-21多肽的溶解度的测量。给定多肽浓度处相对较低的高分子量聚集体形成指示较大溶解度,由此使得能够配制为较大浓度。测试化合物的蛋白质浓度相对于高分子量(HMW)种类的百分比的观察结果经由pH 7.2处的PBS缓冲液中的活塞流过滤测定法(plug flow filtration assay)来确定。线性拟合至这些观察结果中的每一项的线性斜率用于估计蛋白质聚集倾向。

[0038] 图9.在7天蛋白和外周血液单核细胞(PBMC)温育之后具有CD4+T细胞增殖响应的供体的百分比。对照蛋白是具有已知T细胞活化特性的大肠杆菌表达的蛋白。比较非聚乙二醇化经修饰的FGF-21化合物与化合物1(具有野生型FGF-21序列,但其中包括N末端甲硫氨酸以在大肠杆菌中表达)。“ConA”是伴刀豆球蛋白A(一种已知免疫原性蛋白)的缩写。

[0039] 图10.在向ob/ob小鼠单次S.C.施用0.05mg/kg之后聚乙二醇化的化合物1及聚乙二醇化的化合物2的药代动力学分析。修饰的FGF-21化合物的水平以总计与C-末端完整(活性)多肽二者测量。与聚乙二醇化的化合物1相比,聚乙二醇化的化合物2表现出对于C-末端完整形式大得多的总AUC,指示聚乙二醇化的化合物2的体内蛋白水解大幅降低。结果图示于上方小图中且药代动力学参数列表于左下方小图(聚乙二醇化的化合物1)及右下方小图(聚乙二醇化的化合物2)中。

[0040] 图11A至B.向食蟹猴(cynomolgus monkeys)施用后的聚乙二醇化的化合物1和聚乙二醇化的化合物2的药代动力学分析。修饰的FGF-21化合物的水平以(A)总计和(B)C-末

端完整(活性)多肽测量。与聚乙二醇化的化合物1相比,聚乙二醇化的化合物2表现出对于C-末端完整形式大得多的总AUC,指示聚乙二醇化的化合物2的体内蛋白水解大幅降低。

[0041] 图12.ob/ob小鼠中重复给药研究的第21天的相对于介质的糖化血红蛋白(HbA1c)变化。

[0042] 图13.ob/ob小鼠中重复给药研究的21天的体重。

[0043] 图14.ob/ob小鼠中重复给药研究的21天的体重百分比变化。

[0044] 图15.ob/ob小鼠中21天重复给药研究期间的血浆胰岛素浓度。

[0045] 图16.ob/ob小鼠中21天重复给药研究期间的血浆葡萄糖浓度。

[0046] 图17.ob/ob小鼠中21天重复给药研究期间的AUC血浆葡萄糖浓度变化,表示为与介质处理对照的百分比差异。

[0047] 图18.ob/ob小鼠中21天重复给药研究期间的血浆甘油三酯浓度。

[0048] 图19.Stelic NASH小鼠研究中的体重变化。

[0049] 图20.Stelic NASH小鼠研究中的总食品消耗。

[0050] 图21.Stelic NASH小鼠研究中的体重。

[0051] 图22.Stelic NASH小鼠研究中的肝脏重量。

[0052] 图23.Stelic NASH小鼠研究中的肝-体重比。

[0053] 图24.Stelic NASH小鼠研究中的全血葡萄糖。

[0054] 图25.Stelic NASH小鼠研究中的血浆ALT。

[0055] 图26.Stelic NASH小鼠研究中的血浆甘油三酯。

[0056] 图27.Stelic NASH小鼠研究中的总血浆胆固醇。

[0057] 图28.Stelic NASH小鼠研究中的肝脏甘油三酯。

[0058] 图29.Stelic NASH小鼠研究中的肝脏胆固醇。

[0059] 图30A至B.Stelic NASH小鼠研究中HE染色肝脏切片的代表性显微照片。

[0060] 图31.Stelic NASH小鼠研究中的NAFLD活性评分。

[0061] 图32A.Stelic NASH小鼠研究中的脂肪变性评分。

[0062] 图32B.Stelic NASH小鼠研究中的小叶炎症评分。

[0063] 图32C.Stelic NASH小鼠研究中的肝细胞鼓起评分。

[0064] 图33A至B.Stelic NASH小鼠研究中的天狼星红染色肝脏切片的代表性显微照片。

[0065] 图34.Stelic NASH小鼠研究中的纤维化区域。

[0066] 图35A至B.Stelic NASH小鼠研究中的F4/80免疫染色肝脏切片的代表性显微照片。

[0067] 图36.Stelic NASH小鼠研究中的炎症区域。

[0068] 图37A至B.Stelic NASH小鼠研究中油红染色肝脏切片的代表性显微照片。

[0069] 图38.Stelic NASH小鼠研究中的脂肪沉积区域。

[0070] 图39A至D.Stelic NASH小鼠研究中的相对基因表达。(A) α -SMA、(B) TIMP-1、(C) 1型胶原和(D) TGF- β 的表达结果。

[0071] 图40A至D.融合至Fc域、PKE Adnectin或人血清白蛋白多肽的例示性修饰的FGF-21多肽序列。“融合排列”描述了融合蛋白的由N至C末端的通常取向,其意在说明(但不限于)对应多肽序列。HuSA (C34A):具有氨基酸序列SEQ ID NO:321的修饰的人血清白蛋白;

HuSA (C34A;des Leu-585):具有氨基酸序列SEQ ID NO:322的修饰的人血清白蛋白;PKE (1):具有氨基酸序列SEQ ID NO:319的PKE Adnectin;PKE (2):具有氨基酸序列SEQ ID NO:320的PKE Adnectin。后面有数字的L表示接头;FGF-21 (Cmp.2) 表示含有内部缺失及置换肽的FGF-21序列(具体而言为化合物2)且FGF-21 (Cmp.1) 表示缺乏所述缺失及置换肽的FGF-21序列(具体而言为化合物1)。FGF-21 (Cmp.1) 和FGF-21 (Cmp.2) 可包括或缺乏化合物1及中所含有的N末端甲硫氨酸。Fc多肽序列的变体形式以圆括号标识,例如Fc (hIgG1a_191)。标记FGF-21-1aa (Cmp.2) 和FGF-21-3aa (Cmp.2) 是指通过自其C末端缺失所述数量的氨基酸(分别为1或3)而修饰的化合物2序列。

[0072] 图41.融合至Adnectin融合配偶体的修饰的FGF-21多肽的溶解度的测量。给定多肽浓度处相对较少的高分子量聚集体形成指示较大溶解度,由此使得能够配制为较大浓度。测试化合物的蛋白质浓度相对于高分子量(HMW)种类的百分比的观察结果经由pH为7.2的PBS缓冲液中的活塞流过滤测定法来确定。线性拟合至这些观察结果中的每一项的线性斜率用于估计蛋白质聚集倾向。

[0073] 图42A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的体重。A.用介质或PEG-化合物(“PEG-Cmpd”)1处理9至12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。

[0074] 图43A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的肝脏重量。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。经9-15周处理的小鼠的肝脏重量显著降低($p<0.001$)。

[0075] 图44A至B.Stelic NASH小鼠研究中的处理组的肝-体重比。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。经9-12周或9-15周处理的小鼠的肝-体重比显著降低(分别为 $p<0.01$ 及 $p<0.001$)。

[0076] 图45A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的右肾重量。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。

[0077] 图46A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的左肾重量。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。

[0078] 图47A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的全血葡萄糖。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。经9-15周处理的小鼠的全血葡萄糖显著降低($p<0.05$)。

[0079] 图48A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的血浆ALT。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。经9-15周处理的小鼠的血浆ALT显著降低($p<0.01$)。

[0080] 图49A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的血浆甘油三酯。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。

[0081] 图50A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的血浆总胆固醇。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。

[0082] 图51A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的肝脏甘油三酯。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。经9-12周或9-15周处理的小鼠的肝脏甘油三酯显著降低(分别为 $p<0.01$ 及 $p<0.001$)。

[0083] 图52A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的肝脏胆固醇。A.用介质或PEG-化合物

1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。经9-12周或9-15周处理的小鼠的肝脏胆固醇显著降低(分别为 $p<0.01$ 及 $p<0.001$)。

[0084] 图53A至H.用介质(A-B)或PEG-化合物1(C-D)处理9-12周和用介质(E-F)或PEG-化合物1(G-H)处理9-15周的小鼠的HE染色肝脏切片的代表性显微照片。

[0085] 图54A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的NAFLD活性评分。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。经9-12周或9-15周处理的小鼠的NAFLD活性评分显著降低(分别为 $p<0.01$ 及 $p<0.001$)。

[0086] 图55A至H.用介质(A-B)或PEG-化合物1(C-D)处理9-12周及用介质(E-F)或PEG-化合物1(G-H)处理9-15周的小鼠的天狼星红染色肝脏切片的代表性显微照片。

[0087] 图56A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的肝纤维化区域的概述。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。用PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的纤维化区域显著降低($p<0.05$)。

[0088] 图57A至H.用介质(A-B)或PEG-化合物1(C-D)处理9-12周及用介质(E-F)或PEG-化合物1(G-H)处理9-15周的小鼠的F4/80免疫染色肝脏的代表性显微照片。

[0089] 图58A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的炎症区域的概述。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。

[0090] 图59A至H.用介质(A-B)或PEG-化合物1(C-D)处理9-12周和用介质(E-F)或PEG-化合物1(G-H)处理9-15周的小鼠的油红染色肝脏切片的代表性显微照片。

[0091] 图60A至B.Stelic NASH小鼠研究中处理组的脂肪沉积区域的概述。A.用介质或PEG-化合物1处理9-12周的小鼠的比较。B.用介质或PEG-化合物1处理9-15周的小鼠的比较。经9-12周或9-15周处理的小鼠的脂肪沉积区域显著降低(均为 $p<0.001$)。

[0092] 图61.Stelic NASH小鼠研究中的血清总脂联素测量。在来自处理5-9周或7-9周之间的小鼠的末端血浆样品中,与介质处理的小鼠相比,用3.0mg/kg的PEG-化合物1处理的小鼠中血清总脂联素显著增加($p<0.001$,Dunnett's T检验)。

[0093] 图62.Stelic NASH小鼠研究中的血清总脂联素测量。在来自第12或15周的小鼠的末端血浆样品中,与介质处理的小鼠相比,用3.0mg/kg的PEG-化合物1处理的小鼠中血清总脂联素显著增加($p<0.05$,Dunnett's T检验)。

[0094] 图63.三种FGF21变体的浓度-响应曲线:5h Elk1-荧光素酶测定法中的N末端His标记的化合物1(His-Cmpd 1)、PEG-化合物1(PEG-Cmpd 1)和PEG-化合物2(PEG-Cmpd 2)。值来自6个独立实验,每个实验重复3或4次。 Z' 值在0.6-0.9变化指示可接受的测定质量($Z'>0.5$)。

[0095] 图64.基于细胞的Elk1-荧光素酶测定法中测量的FGF-21变体的效力。各数据点指示个体重复且水平棒表示均值。值表示为以摩尔计的测量的 EC_{50} 值的以10为底的对数。

[0096] 图65.C57BL/6J小鼠中单次急性剂量的PEG-化合物2对百分比体重变化的影响。用介质(250mM蔗糖/20mM Tris,pH 8.3)或0.03、0.1、0.3或1.0mg/kg的PEG-化合物2处理C57BL/6J小鼠, $n=10$ /组。确定基线(0)、SC给药后24、48、72和144h时C57BL/6J小鼠的百分比体重变化。所有值为均值 $\pm$ SEM* $P<0.05$ 、*** $P<0.001$ 、**** $P<0.0001$ 相对于介质,(单因素ANOVA,随后为Dunnett's检验)。

[0097] 图66A.C57BL/6J小鼠中单次急性剂量的PEG-化合物2对血浆总脂联素的影响。确

定基线(0)、SC给药后24、48、72和144h时的血浆总脂联素浓度。用介质(250mM蔗糖/20mM Tris, pH 8.3)或0.03、0.1、0.3或1.0mg/kg的PEG-化合物2处理非空腹C57BL/6J小鼠, n=10/组。所有值为均值±SEM**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001相对于介质,(单因素ANOVA,随后为Dunnett's检验)。

[0098] 图66B.C57BL/6J小鼠中单次急性剂量的PEG-化合物2对血浆总脂联素的百分比变化的影响。用介质(250mM蔗糖/20mM Tris, pH 8.3)或0.03、0.1、0.3或1.0mg/kg的PEG-化合物2处理C57BL/6J小鼠, n=10/组。确定基线、SC给药后24、48、72及144h时的血浆总脂联素浓度,并确定相对于基线的百分比变化。所有值为平均值±SEM**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001相对于介质,(单因素ANOVA,随后为Dunnett's检验)。

[0099] 图67A.C57BL/6J小鼠中FGF-21变体对血浆总脂联素的影响。0.3与1mpk剂量的PEG-化合物2与PEG-化合物20处理在给药后6天导致总血浆脂联素显著增加(*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001)。

[0100] 图67B.C57BL/6J小鼠中FGF-21变体对血浆总脂联素的影响。在第3和6天,与介质处理的对照中总脂联素的百分比变化相比,54.3nmol/kg剂量的PEG-化合物2、化合物105和化合物112使总脂联素的百分比变化显著增加。

[0101] 图67C.C57BL/6J小鼠中FGF-21变体对血浆总脂联素的影响。在第3和6天,18.1与54.3nmol/kg剂量的化合物182使血浆总脂联素的百分比变化显著增加(与介质对照中观察到的百分比变化相比)。

[0102] 图67D.C57BL/6J小鼠中FGF-21变体对血浆总脂联素的影响。在给药后第3和6天,与介质处理的对照相比,化合物171与化合物181使血浆总脂联素自基线的百分比变化以剂量依赖性方式显著增加。

[0103] 图67E.C57BL/6J小鼠中FGF-21变体对血浆总脂联素的影响。在第3和6天以18.1nmol/kg和54.3nmol/kg的化合物170使血浆总脂联素自基线的百分比变化(与介质相比)显著增加。

[0104] 图67F.C57BL/6J小鼠中FGF-21变体对血浆总脂联素的影响。在第3和6天,与介质处理的对照相比,10mg/kg剂量的PEG-化合物1使血浆总脂联素自基线的百分比变化显著增加。

[0105] 图68.PEG-化合物2对白蛋白尿(尿液ACR)的影响。#P<0.05,疾病(unix db/db, n=9-10)相对于正常(db/m瘦, n=10-12)。*P<0.05, PEG-化合物2(n=13-14)相对于介质。各个时间点各对的ANOVA与Dunnett's事后检验。数据以均值±S.E.M形式表示。

[0106] 图69.显示了用异丙肾上腺素和PEG-化合物2处理的第3周时的心脏羟脯氨酸(HP)含量。各数据点表示标准化至蛋白质的个体小鼠全心脏HP含量。*:P<0.05,相对于Sham+介质,**:P<0.05,相对于Iso+介质(单因素ANOVA,随后为Bonferroni's检验)。

[0107] 图70A-C.Stelic NASH小鼠研究中FGF-21变体对血清总脂联素(图70A)、血清高分子量(HMW)脂联素(图70B)和HMW脂联素与总脂联素的比率(图70C)的影响。所有值为均值±SEM。

[0108] 图71A至B.NASH动物模型中的肝脏重量(图71A)及肝脏重量与体重(BW)的比率(图71B)。

[0109] 图72.NASH动物模型中FGF-21变体的作用。在用聚乙二醇化的化合物1(“PEG-Cmpd

1”)、聚乙二醇化的化合物2 (“PEG-Cmpd 2”)或化合物170 (“Cmpd 170”)处理之后,评估动物的体重(图72A)、肝脏重量(图72B)、肝脏与体重的比率(图72C)、肝脏甘油三酯(图72D)、血浆ALT(图72E)、肝脏胆固醇(图72F)和血浆甘油三酯(图72G)。与介质处理对照的统计学显著差异如所示。n.s.:未检测到统计显著差异(即 $P \geq 0.05$)。

[0110] 发明详述

[0111] 定义

[0112] 如本文及随附权利要求书中所用的,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一(a/an)”及“所述”包括复数个指代物。因此,例如,提及“FGF-21”、“FGF-21多肽”或“修饰的FGF-21多肽”是指一个或多个此类蛋白且包括本领域普通技术人员已知的其等同物等。

[0113] 除非另有定义,否则本文中所用的所有技术及科学术语具有与本领域普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0114] 血糖浓度正常:在本发明中,术语血糖浓度正常或血糖正常是指具有正常血糖浓度的状态。例示性正常人血糖浓度空腹成人中为70mg/dl至99mg/dl,且在餐后成人中为70mg/dl至140mg/dl。持续血糖浓度正常是指例如在用本发明的修饰的FGF-21多肽持续处理期间维持血糖浓度正常相当长时段,例如至少一天、至少两天、至少一周、至少两周、至少一个月或更长。

[0115] 术语“半衰期延长部分”(在本文中也称为“HLEM”)是指任选地经由非天然编码的氨基酸直接或经由接头与本文所述的修饰的FGF-21多肽共价连接(“缀合”或“融合”)的药学上可接受的部分、域或分子,与如未缀合形式的修饰的FGF-21多肽或野生型FGF-21多肽的比较剂相比,其会阻止或减缓修饰的FGF-21多肽的体内蛋白降解或其他活性降低的化学修饰,增加半衰期和/或改进或改变其他药代动力学或生物物理学特性,包括但不限于增加吸收速率、降低毒性、改进溶解度、减少蛋白质聚集、增加生物活性和/或修饰的FGF-21多肽的靶标选择性、增加工艺性和/或降低修饰的FGF-21多肽的免疫原性。术语“半衰期延长部分”包括非蛋白质半衰期延长部分,如水溶性聚合物,如聚乙二醇(PEG)或离散PEG、羟乙基淀粉(HES)、脂质、支链或无支链酰基、支链或无支链C8-C30酰基、支链或无支链烷基及支链或无支链C8-C30烷基;及蛋白质半衰期延长部分,如血清白蛋白、转铁蛋白、Adnectin(例如白蛋白结合的或药代动力学扩展(PKE)的Adnectin)、Fc域和非结构化多肽,如XTEN和PAS多肽(例如由氨基酸Pro、Ala和/或Ser构成的构象无序的多肽序列),及前述任一项的片段。FGF-21或FGF家族成员的晶体结构及其与FGF受体的相互作用的研究可指示某些氨基酸残基具有可完全或部分接近溶剂的侧链。这些位置的非天然编码的氨基酸的侧链可指向远离蛋白质表面且进入溶剂中,从而连接至例如水溶性聚合物。

[0116] 如本文所用,术语“白蛋白结合部分”是指能够结合至白蛋白的任何化学基团,即具有白蛋白结合亲和力,例如白蛋白结合或PKE Adnectin。

[0117] “白蛋白结合亲和力”可通过本领域已知的若干方法来确定。在一种方法中,待量测的化合物用例如¹²⁵I或³H放射性标记且与固定化白蛋白温育(Kurtzhals等, Biochem.J., 312, 725-731 (1995))。计算相对于标准物的化合物的结合。在另一方法中,相关化合物经放射性标记且其与固定于例如SPA珠上的白蛋白(闪烁逼近测定法珠粒, PerkinElmer目录号RPNQ0001)的结合通过一系列稀释度的待测量的化合物竞争。竞争的EC50值是化合物亲和力的量度。在第三种方法中,在不同浓度的白蛋白处测量化合物的受

体亲和力或效力,且化合物的相对亲和力或效力的改变作为白蛋白浓度的函数反映其对白蛋白的亲和力。

[0118] 术语“热稳定性”是指多肽加热时抵抗解折叠的能力。一般地,分子的热稳定性越高,多肽解折叠所需的温度越高。确定多肽的热稳定性的例示性方法是在本文实施例6中所述的差示扫描量热法(DSC)和热扫描荧光方法。热稳定性可相对于比较剂化合物来确定,例如用以鉴定热稳定性增加的多肽。

[0119] 术语“聚集”是指多肽与其他分子(如同一多肽的其他分子)形成非共价连接复合物,由此形成高分子量复合物的倾向。测量聚集体形成的例示性方法包括如本文实施例7中所述的分析型大小排阻色谱。可确定相对于比较剂化合物的相对聚集量,例如用以鉴定具有降低的聚集的多肽。

[0120] 术语“脱酰胺化”是指多肽内的氨基酸残基自发经历脱酰胺化反应,由此改变氨基酸的化学结构且可能影响多肽功能的倾向。测量脱酰胺化的例示性方法包括如本文实施例7中所述的成像毛细管等电聚焦(icIEF)。可相对于比较剂化合物来确定脱酰胺化的相对量,例如用以鉴定具有降低的脱酰胺化的多肽。

[0121] 术语“体内蛋白水解”是指多肽在引入至活系统中时(例如注射至生物体中时)的裂解,其可由该生物体中存在的蛋白酶导致。蛋白水解可影响多肽的生物活性或半衰期。例如,野生型FGF-21可经历C末端裂解,产生截短的非活性多肽。测量FGF-21体内蛋白水解的例示性方法是本文实施例10中所述的基于中型探索(Meso Scale Discovery, MSD)的电化学发光免疫吸附测定法(ECLIA)。可相对于比较剂化合物来确定体内蛋白水解的相对量,例如用以鉴定具有降低的体内蛋白水解的多肽。

[0122] 术语“溶解度”是指可溶解于另一物质中的物质的量,例如可溶解于水溶液中的未修饰的或修饰的FGF-21多肽的量。测量未修饰的或修饰的FGF-21多肽的溶解度的例示性方法是描述于本文实施例8中的活塞流溶解度测试。可相对于比较剂化合物来确定相对溶解度,例如用以鉴定具有增加的溶解度的多肽。

[0123] 术语“生物活性”是指分子影响与生物体(包括但不限于病毒、细菌、噬菌体、转座子、朊病毒、昆虫、真菌、植物、动物和人)相关的生物系统的任何物理或生物化学特性、通路、分子或相互作用的能力。例如,在未修饰的或修饰的FGF-21的情况下,生物活性包括通过如本文所述的FGF-21进行的功能的任一种。确定分子是否具有野生型FGF-21(如SEQ ID NO:1的野生型FGF-21多肽)的至少一种生物活性的例示性方法可包括实施例5中所述的体外测定或实施例17中所述的体外测定。可相对于比较剂化合物来确定相对生物活性水平,例如用以鉴定对于预期治疗用途具有生物活性或具有足够高的生物活性的多肽,例如具有为比较剂的EC50的少于5倍、10倍、少于20倍、少于50倍或少于100倍的EC50。

[0124] 本文所述比较剂化合物可为缺乏修饰的(如本文所述的修饰)另一序列。例如,比较剂化合物可以是无内部缺失、无置换肽或无融合配偶体的相同的修饰的FGF-21多肽序列。例示性比较剂化合物包括但不限于SEQ ID NO:1的野生型FGF-21多肽、SEQ ID NO:201的修饰的FGF-21多肽或另外的比较剂化合物。在一些实施方案中,比较剂化合物可含有至少一个非天然编码的氨基酸,其可连接至接头、聚合物、生物活性分子、肽、多肽或本文所述的半衰期延长部分(例如PEG)。在一些实施方案中,比较剂化合物可含有至少一个非天然编码的氨基酸,其可以不连接至接头、聚合物、生物活性分子、肽、多肽或本文所述的半衰期延

长部分(例如PEG)。在一些实施方案中,比较剂化合物可含有额外氨基酸取代、缺失和/或插入。在一些实施方案中,比较剂可用聚乙二醇化或非聚乙二醇化形式的多肽进行;在前者的情况下,比较剂可用包含或不包含非天然编码的氨基酸的多肽进行。在一些实施方案中,比较剂化合物可含有任选地通过肽置换的内部缺失(例如与比较剂比较的化合物中的相同内部缺失和置换肽),但无融合配偶体。

[0125] 术语“Fc”、“Fc域”或“Fc区”是指Fc域或其片段。Fc可为氨基酸序列与自然界中所见的Fc区的氨基酸序列一致的天然Fc区,或氨基酸序列与天然Fc区的氨基酸序列至少有一个氨基酸不同的变异Fc区。在一些实施方案中,相比于天然Fc区或相比于亲本多肽的Fc区,Fc区具有至少一个氨基酸取代,例如在天然Fc区或亲本多肽的Fc区中具有约一至约二十个,约一至约十个或约一至约五个氨基酸取代、缺失或插入。在本文中,Fc区与天然Fc区和/或与亲本多肽的Fc区可具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在一些实施方案中,Fc区与天然Fc区和/或亲本多肽的Fc区可具有至少约90%的序列同一性。在一些实施方案中,Fc区与天然Fc区和/或亲本多肽的Fc区可具有至少约95%的序列同一性。Fc区的例示性氨基酸序列包括SEQ ID NO:302和323-335。Fc区的例示性域或片段包括SEQ ID NO:303-309的多肽。

[0126] 如本文所用,“功能性Fc区”是指保持结合FcRn的能力的Fc域或其片段。

[0127] 术语“对应”是指通过与参考序列比较而鉴定的多肽或多核苷酸序列内的位置(“位置对应”或“对应的位置”)或区域(“区域对应”或“对应的区域”)。参考序列可为野生型或未经修饰的序列,如SEQ ID NO:1的野生型FGF-21多肽。对应的位置或区域可通过序列与参考序列的比对鉴定。例如,序列中“与SEQ ID NO:1中的氨基酸108对应的位置”是指当序列与SEQ ID NO:1比对时序列中与SEQ ID NO:1中的氨基酸108处于相同比对标的位置。在比对中,氨基酸或核苷酸可以匹配或可以不匹配参考序列中的对应位置中的氨基酸或核苷酸。当提及对应区域的缺失时,除非缺失区域已经被可能与缺失区域的一部分比对的置换肽置换,否则比对可在与缺失区域内的各位置对应的比对标中含有缺口。因此,对于经置换肽置换的缺失,在进行比对时可从序列省略置换肽,以使得比对应在整个缺失区中应当含有缺口。或者,在鉴定对应区域时可忽略置换肽(若存在的话)。

[0128] 可使用常规比对算法来获得用于鉴定对应位置或对应区域的比对,所述比对算法如Blast(Altschul等,J Mol Biol.1990年10月5日;215(3):403-10)、Smith-Waterman(Smith和Waterman,J Mol Biol.1981年3月25日;147(1):195-7)或Needleman-Wunsch(Needleman和Wunsch,J Mol Biol.1970年3月;48(3):443-53)。可使用Needleman-Wunsch法以获得最高评分的全局比对(即含有两个序列中的每一残基的比对,但比对可以缺口开始和/或结束)。不论使用Blast法、Smith-Waterman法或Needleman-Wunsch,可使用“默认”参数鉴定最高评分比对,如使用BLOSUM62评分矩阵、11的缺口开放罚分和1的缺口扩展罚分和(当使用Blast进行成对比对时)3的字长。

[0129] “区域”是指多肽或多核苷酸序列的连续部分。区域可通过多肽或多核苷酸内的两个位置鉴定,其指定序列内的区域的开始和末端位置。除非另有说明,否则区域包括限定参考序列内的区域的位置,即包括给定的开始及末端位置。例如,SEQ ID NO:1的区域119-130是指在氨基酸119处起始及在氨基酸130处结束的SEQ ID NO:1的部分,包括氨基酸119及130,其具有序列PGNKSPHRDPAP(SEQ ID NO:73)。

[0130] 术语“缺失”是指从多肽或多核苷酸移除一个或多个(或指定数量的)连续氨基酸或核苷酸。“内部缺失”是指不包括多肽的N或C末端或多核苷酸的5'或3'端的缺失。缺失或内部缺失可通过相对于参考序列指定缺失的开始和末端位置来鉴定。相对于修饰的FGF-21多肽,提及内部缺失一般指定相对于参考FGF-21多肽的区域缺失,如与SEQ ID NO:1的野生型FGF-21多肽的位置对应的区域的缺失,例如SEQ ID NO:1中的氨基酸位置119-130(即PGNKSPHRDPAP(SEQ ID NO:73))。

[0131] “置换肽”是指插入以替代内部缺失或多肽内的其他缺失的氨基酸。置换肽的长度可以不同于内部缺失的长度。例示性置换肽可包含一个或多个甘氨酸、丝氨酸及组氨酸残基,且在一些情况下,包含额外氨基酸残基,如赖氨酸和脯氨酸。然而,应了解,置换肽不限于含有这些特定氨基酸的序列,而是可包括天然氨基酸或非天然编码的氨基酸。置换肽可具有任何长度,例如单个氨基酸(即具有1个氨基酸的长度)、两个或两个以上氨基酸或三个或三个以上氨基酸。长度为零个氨基酸的置换肽表示置换肽并不存在。在一些实施方案中,置换多肽的长度可为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸。在一些实施方案中,置换多肽的长度可为1-10、1-7、1-5或1-3个氨基酸。在一些实施方案中,置换多肽长度可为2-7、2-5或2-3个氨基酸。在一些实施方案中,置换多肽的长度可为3个氨基酸。例示性置换肽包括序列G、GG、SG、GSG、GGH、SGG、GSGH(SEQ ID NO:343)、HSG、HHS(SG ID NO:344)、HSGH(SEQ ID NO:345)、GSGP(SEQ ID NO:346)、HGG、HSGG(SEQ ID NO:347)和HGSG(SEQ ID NO:348)。额外的例示性置换肽包括序列K、DKS、HKS、D、Q、KDS和KDSQ(SEQ ID NO:349)。

[0132] “融合配偶体”是指融合至本文所述的修饰的FGF-21多肽的肽或多肽。融合配偶体可融合至N和/或C末端上的修饰的FGF-21多肽。例示性融合配偶体包括但不限于白蛋白、转铁蛋白、Adnectin(例如白蛋白结合或药代动力学扩展(PKE) Adnectin)、Fc域、和非结构化多肽,如XTEN及PAS多肽(例如由氨基酸Pro、Ala和/或Ser构成的构象无序的多肽序列),及前述任一项的片段。融合配偶体可融合至修饰的FGF-21多肽以供任何目的,包括但不限于纯化、工艺性、半衰期延伸、增强的生物物理学特性(例如溶解度或稳定性)、降低的免疫原性或毒性等。

[0133] “连接肽”是指其N与C末端均融合至其他肽或多肽的氨基酸序列。连接肽可存在于例如末端融合(以任何顺序)至修饰的FGF-21多肽及融合配偶体的融合蛋白中。例示性连接肽可包含0个氨基酸(即无连接肽存在)至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60或100或大于100个氨基酸。在一些实施方案中,连接肽可包含1至40个、1至30个、1至20个、1至10个、1至5个、2至40个、2至30个、2至20个、2至10个、5至40个、5至30个、5至20个或5至10个氨基酸。在一些实施方案中,连接肽可包含5至20个氨基酸。在一些实施方案中,连接肽可包含10至20个氨基酸。本文所述的某些例示性连接肽可富含于丝氨酸和甘氨酸残基中,然而应了解连接肽不限于此类序列。例示性连接肽包括如下序列:GAGGGGSG(SEQ ID NO:74)、EPKSSD(SEQ ID NO:75)、D,ESPKAQASSVPTAQPAEGLA(SEQ ID NO:76)、ELQLEESAAEAQDGELD(SEQ ID NO:77)、GQPDEPGGS(SEQ ID NO:78)、GGSGSGSGSGSGS(SEQ ID NO:79)、ELQLEESAAEAQEGELE(SEQ ID NO:80)、GSGSG(SEQ ID NO:81)、GSGC(SEQ ID NO:82)、AGGGGSG(SEQ ID NO:83)、GSGS(SEQ ID NO:84)、QPDEPGGS(SEQ ID NO:85)、GSGSGS(SEQ ID NO:86)、TVAAPS(SEQ ID NO:87)、KAGGGGSG(SEQ ID NO:88)、KSGSGSGSGSGS(SEQ ID NO:89)、KQPDEPGGS(SEQ ID NO:90)、KELQLEESAAEAQDGELD(SEQ ID

NO:91)、KTVAAPS (SEQ ID NO:92)、KAGGGGSGG (SEQ ID NO:93)、KSGSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO:94)、KQPDEPGGSG (SEQ ID NO:95)、KELQLEESAAEAQDGELDG (SEQ ID NO:96)、KTVAAPSG AGGGGSGG (SEQ ID NO:97)、AGGGGSG (SEQ ID NO:98)、GSGSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO:99)、QPDEPGGSG (SEQ ID NO:100)、TVAAPSG (SEQ ID NO:301)、GGGGSGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO:350)、PSPEPPTPEPPSPEP (SEQ ID NO:351)、ELQLEESAAEAQEGELE (SEQ ID NO:352)、SSGGGGSGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:353)、GS (SEQ ID NO:354)、GGGGS (SEQ ID NO:355)、EEEEDEEEED (SEQ ID NO:356)、PSPEPPTPEP (SEQ ID NO:357)、GSHHHHHHHHGS (SEQ ID NO:358)、GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:359)、GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:360)、GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:361)、PSTPPTPSPSTPPTPSPS (SEQ ID NO:362)、RGGEEKKKKEKEKEEQEERETKTP (SEQ ID NO:363)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:364)、PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO:365)、PSTPPTPSPSTPPTPSPSPSTPPTPSPSTPPTPSPS (SEQ ID NO:366)、PSPEP (SEQ ID NO:367)、PSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO:368)、PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO:369)、PTPEPPSPEPPTPEPPSPEP (SEQ ID NO:370)、PSPEPGGGSPTPEP (SEQ ID NO:371)、PSPEPEEEDPTPEP (SEQ ID NO:372)、PSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEP (SEQ ID NO:373)、PTPEPPSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEPPSPEP (SEQ ID NO:374)、PTPEPPSPEPPTPEPGGGGSPSPEPPTPEPPSPEP (SEQ ID NO:375)、PSPEPTPEPSPEPPTPEPSPEPTPEP (SEQ ID NO:376)、GETGS (SEQ ID NO:377)、GGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:378)、GETGSSGEGT (SEQ ID NO:379)、GETGSSGEGTGSTGS (SEQ ID NO:380)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:381)、GETGSSGEGTGSTGSGAGES (SEQ ID NO:382)、和GETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGS (SEQ ID NO:383),即SEQ ID NO:74-100、301、和350-383。

[0134] 术语“纤维化相关疾病”包括其中已观察到纤维化发生或已知或认为纤维化与疾病病因、进展或症状相关或促进疾病病因、进展或症状,或已知或认为随疾病进展而发生纤维化的疾病、病症及病况。纤维化可影响器官或组织,如胰腺、肺、心脏、肾脏、肝脏、眼、神经系统、骨髓、淋巴结、心内膜心肌或腹膜后腔。与纤维化相关的例示性疾病包括但不限于非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、肝纤维化、前肝硬化、肝硬化、弥散性实质性肺病、囊肿性纤维化、肺或肺纤维化、进行性大规模纤维化、特发性肺纤维化、注射性纤维化、肾脏或肾纤维化、慢性肾病、糖尿病性肾病、局灶性节段性肾小球硬化、膜性肾病、IgA肾病、骨髓纤维化、心脏衰竭、代谢性心脏衰竭、心脏纤维化、白内障纤维化、白内障、眼部结疤、胰腺纤维化、皮肤纤维化、肠纤维化、肠狭窄、心内膜心肌纤维化、心房纤维化、纵隔纤维化、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、腹膜后纤维化、瘢痕疙瘩、肾源性全身纤维化、硬皮病、全身性硬化症、关节纤维化、Peyronie's 综合征、杜普伊特伦氏挛缩 (Dupuytren's contracture)、糖尿病神经病变、黏连性囊炎、酒精性肝病、肝性脂肪变性、病毒性肝炎、胆汁疾病、原发性血红蛋白沉着病、药物相关的肝硬化、隐源性肝硬化、威尔逊氏病 (Wilson's disease)、及 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、间质性肺病 (ILD)、人纤维化肺病、黄斑变性、视网膜病变、玻璃体视网膜病变、心肌纤维化、格雷弗氏眼病 (Grave's ophthalmopathy)、药物诱导的麦角中毒、心血管疾病、动脉粥样硬化/再狭窄、增生性疤痕、原发性或特发性骨髓纤维化和炎症性肠病 (包括但不限于胶原性结肠炎)。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可包括肝纤维化、肾脏或肾纤维化、肺或肺纤维化和心脏或心脏性纤维化。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可为肝

纤维化。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可为NASH。

[0135] 词组“医学上并发的肥胖”(有时也称为“病态肥胖”)一般是指一个亚类的肥胖个体的病况,所述个体还具有肥胖相关的或导致的健康并发症。肥胖可通过确定身体质量指数(以千克计的重量除以以米计的高度的平方)来判定,其中身体质量指数为 $30\text{m}/\text{kg}^2$ 或大于 $30\text{m}/\text{kg}^2$ 指示肥胖。医学上并发的肥胖中所存在的例示性健康并发症可包括如下一项或多项:2型糖尿病、高血压、阻塞性睡眠呼吸暂停、冠状动脉疾病及其他心血管疾病(包括冠状动脉疾病、中风及充血性心脏衰竭)及血脂异常。其他可存在的健康并发症包括非酒精性脂肪肝病(如脂肪变性、脂肪变性肝炎或肝硬化)、呼吸疾病、阻塞性睡眠呼吸暂停、肥胖换气不足综合征、哮喘、限制性肺病、癌症、骨关节炎、胆石病、胃食道逆流病、妇科异常、不孕症、月经异常、静脉停滞、皮肤问题、擦烂(intertrigo)、蜂窝组织炎、手术或怀孕期间的并发症风险增加、尿失禁及特发性颅内压增高。医学上并发的肥胖还可与普拉德-威利综合征相关。

[0136] 术语“基本上纯的”是指可基本上或实质上不含通常与天然存在的环境(即天然细胞)或宿主细胞(在以重组方式生产的未修饰的或修饰的FGF-21多肽的情况下)中所见的蛋白质相伴或与其相互作用的组分的未修饰的或修饰的FGF-21多肽。可基本上不含细胞物质的未修饰的或修饰的FGF-21多肽包括小于约30%、小于约25%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%或小于约1%(以干重计)的污染蛋白质的蛋白制剂。当未修饰的或修饰的FGF-21多肽或其变体通过宿主细胞重组生产时,蛋白质的含量可为细胞干重的约30%、约25%、约20%、约15%、约10%、约5%、约4%、约3%、约2%或约1%或更低。当未修饰的或修饰的FGF-21多肽或其变体通过宿主细胞重组生产时,培养基中的蛋白质含量可为细胞干重的约5g/L、约4g/L、约3g/L、约2g/L、约1g/L、约750mg/L、约500mg/L、约250mg/L、约100mg/L、约50mg/L、约10mg/L或约1mg/L以下。因此,如通过本发明的方法生产的“基本上纯的”的未修饰的或修饰的FGF-21多肽可具有至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%的纯度水平,具体地至少约75%、80%、85%的纯度水平,且更具体地至少约90%的纯度水平、至少约95%的纯度水平、至少约99%或更大的纯度水平,如通过适当方法(如SDS/PAGE分析、RP-HPLC、SEC及毛细管电泳)所确定的。

[0137] “重组宿主细胞”或“宿主细胞”是指包括外源性多核苷酸的细胞,与用于插入的方法(例如直接摄取、转导、f-配对(f-mating)或其他本领域已知用于产生重组宿主细胞的方法)无关。外源性多核苷酸可维持为非并入载体,例如质粒,或者可以并入至宿主基因组中。

[0138] 如本文所用,术语“培养基(medium/media)”包括任何培养基、溶液、固体、半固体或刚性支持物,其可负载或含有任何宿主细胞(包括细菌宿主细胞、酵母菌宿主细胞、昆虫宿主细胞、植物宿主细胞、真核宿主细胞、哺乳动物宿主细胞、CHO细胞、原核宿主细胞、大肠杆菌或假单胞菌属(Pseudomonas)宿主细胞)及细胞内含物。因此,该术语可涵盖宿主细胞已生长于其中的培养基,例如未修饰的或修饰的FGF-21多肽已分泌于其中的培养基,包括增殖步骤之前或之后的培养基。术语还可涵盖含有宿主细胞裂解液的缓冲剂或试剂,如在细胞内生产未修饰的或修饰的FGF-21多肽且将宿主细胞裂解或破坏以释放未修饰的或修饰的FGF-21多肽的情况中。

[0139] 术语“抗糖尿病剂”应意指适用于治疗、预防任何葡萄糖代谢病症或其任何并发症

(包括本文所述的病况、疾病或并发症的任一种)或以其他方式降低其严重程度的任何药物。抗糖尿病剂包括胰岛素、噻唑烷二酮类、磺酰脲类、苯甲酸衍生物、 α -葡萄糖苷酶抑制剂等等。本发明的抗糖尿病组合能够将HbA1c水平自基线降低至少10%或至少50%的变化。抗糖尿病剂包括胰岛素增强剂,如,包括但不限于小分子胰岛素增强剂、牛磺酸、 α 硫辛酸、桑椹提取物、铬、谷氨酰胺、*Enicostemma littorale* Blume、野甘草(*Scoparia dulcis*)、龙蒿(*Tarragon*)提取物、穿心莲(*Andrographis paniculata*)、异麦芽糖、海藻糖或D-甘露糖,其可进一步加强胰岛素的分泌或活性。

[0140] 如本文所用,“修饰的FGF-21多肽”、“修饰的成纤维细胞生长因子21”或“修饰的FGF-21”及其未加连字符的形式可互换使用,且应包括那些多肽和蛋白质,所述多肽和蛋白质不同于野生型FGF-21(例如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:5的野生型人FGF-21)且通常具有至少一种成纤维细胞生长因子21的生物活性,以及FGF-21类似物、FGF-21同种型、FGF-21模拟物、FGF-21片段、杂交FGF-21蛋白、其融合蛋白、寡聚物和多聚物、同系物、糖基化模式变体、变体、剪接变体及突变蛋白(muteins),而无论其生物活性。术语“修饰的FGF-21多肽”和“修饰的FGF-21”涵盖包含一个或多个氨基酸取代、添加或缺失的FGF-21多肽。例如,本发明的修饰的FGF-21多肽包含内部缺失,包括图1中所示的那些内部缺失及本文所述的其他内部缺失。

[0141] 术语“修饰的FGF-21多肽”还涵盖多态性(例如天然存在的FGF-21序列变体)。例如,“P型”的FGF-21在位置174含有脯氨酸(P)(SEQ ID NO:1的成熟多肽中的位置146),而“L型”在位置174含有亮氨酸(L)(SEQ ID NO:5的成熟多肽中的位置146)。例示性的P型FGF-21多肽序列含于SEQ ID NO:1-4中,而例示性L型FGF-21多肽序列含于SEQ ID NO:5-7中。

[0142] 已描述了天然存在的FGF-21中的多种氨基酸位置中的取代。取代包括但不限于调节溶解度或稳定性、增加激动剂活性、增加体内或体外半衰期、增加蛋白酶抗性、使多肽转化为拮抗剂、降低免疫原性或毒性、有助于纯化或工艺性等的那些,且涵盖于术语“修饰的FGF-21多肽”或“经修饰的FGF-21”中。在一些情况下,在修饰的FGF-21多肽内,非天然编码的氨基酸取代可与其他添加、取代或缺失组合以相对于另一FGF-21多肽(例如SEQ ID NO:1的野生型FGF-21多肽、SEQ ID NO:201的修饰的FGF-21多肽或另外的FGF-21多肽,如无该添加、取代或缺失的相同FGF-21多肽,或另外的未修饰的或修饰的FGF-21未修饰的或修饰的多肽)影响修饰的FGF-21多肽的其他生物性状。在一些情况下,其他添加、取代或缺失可增加修饰的FGF-21多肽的稳定性(包括但不限于对蛋白水解降解的抗性)或增加修饰的FGF-21多肽对其受体的亲和力。在一些情况下,其他添加、取代或缺失可增加修饰的FGF-21多肽的药学稳定性。在一些情况下,其他添加、取代或缺失可增加修饰的FGF-21多肽的溶解度(包括但不限于当在大肠杆菌或其他宿主细胞中表达时)。在一些实施方案中,添加、取代或缺失可增加多肽在大肠杆菌或其他重组宿主细胞中表达后的溶解度。在一些实施方案中,除用于并入在大肠杆菌或其他重组宿主细胞中表达后导致增加多肽溶解度的非天然氨基酸的另一位点以外,还选择位点用于以天然编码或非天然氨基酸取代。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含另一添加、取代或缺失,其调节针对FGF-21多肽受体、结合蛋白或相关配体的亲和力,调节与FGF-21受体结合后的信号转导,调节循环半衰期,调节释放或生物利用度,促进纯化,或改进或改变具体施用途。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含增加修饰的FGF-21对其受体亲和力的添加、取代或缺失。类似地,修饰的FGF-21多肽可包

含化学或酶裂解序列、蛋白酶裂解序列、反应性基团、抗体-结合域(包括但不限于FLAG或多聚His)或其它基于亲和力的序列(包括但不限于FLAG、多聚His、GST等)或连接分子(包括但不限于生物素),其改进检测(包括但不限于GFP)、纯化、运输通过组织或细胞膜、前药释放或活化、修饰的FGF-21尺寸缩减或多肽的其他性状。

[0143] 对于缺乏前导序列的FGF-21的序列,在本文中参见SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:5。对于具有前导序列的FGF-21的序列,在本文中参见SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7。在一些实施方案中,本发明的FGF-21多肽与SEQ ID NO:1-7或FGF-21多肽序列任何其他序列实质上相同。已鉴定FGF-21的多种多态性。在美国专利公开No.20010012628和美国专利No.6,716,626中已在相同位置描述了亮氨酸或脯氨酸。相差1个氨基酸(亮氨酸)的N末端前导或信号序列示于美国专利No.6,716,626和美国专利公开No.20040259780中。FGF-21多肽变体或突变体包括但不限于如下文献中所公开的那些变体或突变体:美国专利No.6,716,626;美国专利公开No.2005/0176631、2005/0037457、2004/0185494、2004/0259780、2002/0164713和2001/0012628;WO 01/36640;WO 03/011213;WO 03/059270;WO 04/110472;WO 05/061712;WO 05/072769;WO 05/091944;WO 05/113606;WO 06/028595;WO 06/028714;WO 06/050247;WO 06/065582;WO 06/078463;WO01/018172;WO09/149171;WO10/042747;WO12/066075;WO11/154349;WO13/052311;WO13/188181,其通过提述以其整体并入本文。

[0144] 术语“修饰的FGF-21多肽”还包括天然存在的FGF-21的生物活性片段、生物活性变体和立体异构体以及天然存在的FGF-21的激动剂、模拟物和拮抗剂变体及其多肽融合物。在氨基端、羧基端或二者处包含额外氨基酸的融合物涵盖于术语“修饰的FGF-21多肽”中。例示性融合物包括但不限于例如甲硫氨酰基FGF-21,其中甲硫氨酸连接至由缺乏前导或信号肽或其部分的成熟形式的FGF-21重组表达产生的FGF-21的N末端(甲硫氨酸连接至由例如大肠杆菌中的重组表达产生的FGF-21的N末端)、用于纯化目的融合物(包括但不限于多聚组氨酸或亲和力表位)、与血清白蛋白结合肽(如PKE Adnectin)的融合物或与血清蛋白(如血清白蛋白)的融合物,以及包含FGF-21及一个或多个其他分子(“融合配偶体”)的融合蛋白,所述其他分子包括但不限于血清白蛋白、Fc域、免疫球蛋白恒定区、非结构化多肽和Adnectin及其片段。任何此类片段均可通过标准生物化学方法或通过表达编码片段的多核苷酸由蛋白质来制备。

[0145] 除原本所示的情况外,如本文所用的术语“FGF-21多肽”、“成纤维细胞生长因子21”和“FGF-21”一般涵盖未经修饰(即野生型)的FGF-21及修饰的FGF-21多肽。

[0146] 术语“修饰的FGF-21多肽”包括缀合至如PEG的聚合物的多肽,且可任选地包含半胱氨酸、赖氨酸或其他残基的一个或多个其他衍生化。另外,修饰的FGF-21多肽可包含接头或聚合物,其中所述接头或聚合物所结合的氨基酸可为本发明的非天然氨基酸,或可利用本领域已知的技术结合至天然编码的氨基酸,如与赖氨酸或半胱氨酸偶联。

[0147] 术语“修饰的FGF-21多肽”还包括糖基化的修饰的FGF-21,例如但不限于在任何氨基酸位置糖基化的多肽、多肽的N-连接或O-连接糖基化形式。含有单一核苷酸变化的变体也视为FGF-21多肽的生物活性变体。此外,还包括剪接变体。术语“修饰的FGF-21多肽”还包括任何一个或多个未修饰的或修饰的FGF-21多肽或任何其他多肽、蛋白质、糖类、聚合物、小分子、接头、配体或任何类型的其他生物活性分子的FGF-21多肽异二聚体、同二聚体、异

多聚体或同多聚体(通过化学手段连接或表达为融合蛋白),以及含有例如特定缺失或其他修饰然而保持生物活性的多肽类似物。

[0148] 除非另外说明(即当说明比较是基于SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7或其他FGF-21序列时),否则所有提及本文所述的未经修饰或经修饰的FGF-21中的氨基酸位置均基于SEQ ID NO:1中的对应位置。例如,SEQ ID NO:1位置77处的氨基酸是精氨酸且对应精氨酸位于SEQ ID NO:2位置87处。本领域技术人员会了解与SEQ ID NO:1中的位置对应的氨基酸位置可在如SEQ ID NO:2、3、4、5、6和7的任何其他FGF-21分子中容易地加以鉴定。本领域技术人员会了解,与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7或任何其他FGF-21序列中的位置对应的氨基酸位置可在如FGF-21融合物、变体、片段等的任何其他FGF-21分子中容易地加以鉴定。例如,可使用如BLAST的序列比对程序来比对并鉴定蛋白质中对应于SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7或其他FGF-21序列中的位置的具体位置。本文中关于SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7或其他FGF-21序列所述的氨基酸的取代、缺失或添加也是指在本文所述或本领域中已知的FGF-21融合物、变体、片段等中的对应位置中的取代、缺失或添加并且明确地涵盖于本发明内。

[0149] 术语“修饰的FGF-21多肽”或“修饰的FGF-21”涵盖包含一个或多个氨基酸取代、插入或缺失的FGF-21多肽。例如,本发明的修饰的FGF-21多肽可包含一个或多个天然氨基酸的修饰,任选地连同—个或多个非天然氨基酸修饰。FGF-21多肽(包括本文所述的那些和其他的)中的各种氨基酸位置中的例示性取代、插入或缺失包括但不限于调节药理学稳定性的取代,其调节FGF-21多肽的生物活性的一项或多项,例如但不限于增加激动剂活性、增加多肽的溶解度、降低蛋白酶易感性、降低脱酰胺化、使多肽转化为拮抗剂、降低免疫原性或毒性、有助于纯化或工艺性等且涵盖于术语“修饰的FGF-21多肽”中。

[0150] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽进一步包含调节修饰的FGF-21多肽的生物活性的额外插入、取代或缺失。例如,添加、取代或缺失可以调节修饰的FGF-21的一种或多种特性或活性。例如,添加、取代或缺失可调节FGF-21多肽受体的亲和力。调节循环半衰期,调节治疗性半衰期,调节多肽的稳定性,调节由蛋白酶产生的裂解,调节剂量,调节释放或生物利用度,有助于纯化,降低脱酰胺化,改进储存期限或改进或改变具体施用途径。类似地,修饰的FGF-21多肽可包含蛋白酶裂解序列、反应性基团、抗体结合域(包括但不限于FLAG或多聚His)或改进多肽的检测(包括但不限于GFP)、纯化或其他特性的其他基于亲和力的序列(包括但不限于FLAG、多聚His、GST等)或连接分子(包括但不限于生物素)。

[0151] 术语“修饰的FGF-21多肽”还涵盖经由如Fc域的融合配偶体形成或得以连接的同二聚体、异二聚体、同多聚体及异多聚体,包括但不限于经由非天然编码的氨基酸侧链直接连接,连接至相同或不同的非天然编码的氨基酸侧链、连接至天然编码的氨基酸侧链或经由接头间接连接的那些。例示性接头包括但不限于小有机化合物、多种长度的水溶性聚合物(如聚(乙二醇)或聚右旋糖酐)或各种长度的多肽。

[0152] “非天然编码的氨基酸”是指并非20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸或硒代半胱氨酸之一的氨基酸。可与术语“非天然编码的氨基酸”同义使用的其他术语为“非天然氨基酸(non-natural amino acid/unnatural amino acid)”、“非天然存在的氨基酸”及其各种加连字符及不加连字符的形式。术语“非天然编码的氨基酸”还包括但不限于通过天然编码的氨基酸(包括但不限于20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸及硒代半胱氨酸)的修饰(例如翻译后修饰)产生但本身并不会通过翻译复合体天然并入生长的多肽链中的氨基酸。此类非天然

编码的氨基酸的实例包括但不限于N-乙酰基葡萄糖氨基-L-丝氨酸、N-乙酰基葡萄糖氨基-L-苏氨酸和O-磷酸酪氨酸。

[0153] “氨基端修饰基团”是指可与多肽的氨基端连接的任何分子。类似地，“羧基端修饰基团”是指可与多肽的羧基端连接的任何分子。末端修饰基团包括但不限于各种水溶性聚合物、肽或蛋白质，如血清白蛋白、Fc域、免疫球蛋白恒定区、非结构化多肽、Adnectin或其片段，或增加肽的血清（体内）半衰期的其他部分。

[0154] 本领域及本文中使用的术语“官能团”、“活性部分”、“活化基团”、“离去基团”、“反应性位点”、“化学反应性基团”和“化学反应性部分”是指分子的不同可定义部分或单元。此类术语在某种程度上与化学领域中的含义同义，并且在本文中用以表示分子中执行一些功能或活性并与其他分子反应的部分。

[0155] 术语“连接基/键(linkage)”或“接头”在本文中用以指通常由化学反应形成且通常为共价连接的基团或键。水解稳定连接基意指，该连接基在水中基本稳定，且在适用的pH值处，包括但不限于在生理条件下，可在一段较长时间内（可能甚至无限期地）不与水反应。水解不稳定或可降解连接基意指该连接基可在水或水溶液（包括例如血液）中降解。酶促不稳定或可降解连接基意指该连接基可由一种或多种酶降解。如本领域中所理解的，PEG及相关聚合物可包括在聚合物主链中或在聚合物主链与聚合分子的一个或多个末端官能团之间的连接基团中的可降解连接基。例如，由PEG羧酸或活化PEG羧酸与生物活性剂上的醇基团的反应形成的酯键一般在生理条件下水解以释放药剂。其他水解可降解连接基包括但不限于：碳酸酯键；由胺与醛反应产生的亚胺键；通过醇与磷酸酯基反应形成的磷酸酯键；作为酰肼与醛的反应产物的腙键；作为醛与醇的反应产物的缩醛键；作为甲酸与醇的反应产物的原酸酯键；通过包括但不限于聚合物（如PEG）末端的氨基与肽的羧基形成的肽键；和由包括但不限于聚合物末端的氨基磷酸酯基与寡核苷酸的5'羟基形成的寡核苷酸键。

[0156] 术语“生物活性分子”、“生物活性部分”或“生物活性剂”在本文中使用时意指可影响与活生物体相关的生物系统、通路、分子或相互作用的任何物理或生物化学特性的任何物质。具体而言，如本文所用，生物活性分子包括但不限于意欲用于诊断、治愈、缓解、治疗或预防人或动物的疾病，或以其他方式增强人或动物的身体或精神良好状态的任何物质。生物活性分子的实例包括但不限于自病毒、细菌、昆虫、动物或任何其他细胞或细胞类型、脂质体、微粒及微胶束获得或衍生的肽、蛋白质、酶、小分子药物、糖类、无机原子或分子、染料、脂质、核苷、放射性核素、寡核苷酸、类毒素、毒素、多糖、核酸、肽、多肽、蛋白质及其部分。

[0157] 术语“取代基”包括但不限于“非干扰取代基”。“非干扰取代基”是产生稳定化合物的那些基团。适合的非干扰取代基或基团包括但不限于卤素、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、 C_1-C_{10} 烷氧基、 C_1-C_{12} 芳烷基、 C_1-C_{12} 烷芳基、 C_3-C_{12} 环烷基、 C_3-C_{12} 环烯基、苯基、取代的苯基、甲苯酰基、二甲苯基、联苯基、 C_2-C_{12} 烷氧基烷基、 C_2-C_{12} 烷氧基芳基、 C_7-C_{12} 芳氧基烷基、 C_7-C_{12} 氧基芳基、 C_1-C_6 烷基亚磺酰基、 C_1-C_{10} 烷基磺酰基、 $--(CH_2)_m--O--(C_1-C_{10})$ 烷基，其中m为1至8、芳基、取代的芳基、取代的烷氧基、氟烷基、杂环基、取代的杂环基、硝基烷基、 $--NO_2$ 、 $--CN$ 、 $--NRC(O)--(C_1-C_{10})$ 烷基、 $--C(O)--(C_1-C_{10})$ 烷基、 C_2-C_{10} 烷基硫代烷基、 $--C(O)O--(C_1-C_{10})$ 烷基、 $--OH$ 、 $--SO_2$ 、 $=S$ 、 $--COOH$ 、 $--NR_2$ 、羰基、 $--C(O)-(C_1-C_{10})$ 烷基、 $--CF_3$ 、 $--C(O)CF_3$ 、 $--C(O)NR_2$ 、 $--(C_1-C_{10})$ 芳基、 $--S--(C_6-C_{10})$ 芳基、 $--C(O)--(C_1-C_{10})$ 芳基、 $--(CH_2)_m--$

$O--(--(CH_2)_m--O--(C_1-C_{10} \text{烷基}))$, 其中各 m 为1至8、 $--C(O)NR_2$ 、 $--C(S)NR_2$ 、 $--SO_2NR_2$ 、 $--NRC(O)NR_2$ 、 $--NRC(S)NR_2$ 、其盐等等。如本文所用的各 R 为 H 、烷基或取代的烷基、芳基或取代的芳基、芳烷基或烷芳基。

[0158] 如本文所用,术语“水溶性聚合物”是指在水性溶剂中可溶的任何聚合物。水溶性聚合物与修饰的FGF-21多肽的键可产生如下改变,包括但不限于相对于未经修饰的形式增加或调节的血清(体内)半衰期或增加或调节的治疗半衰期、调节的免疫原性或毒性、调节的物理缔合特征(如聚集及多聚体形成)、改变的受体结合、改变的与一个或多个结合配偶体的结合及改变的受体二聚化或多聚化。水溶性聚合物可具有或可不具有其自身生物活性,且可用作连接经修饰的FGF-21与其他物质的接头,所述其他物质包括但不限于一种或多种未修饰的或修饰的FGF-21多肽或一种或多种生物活性分子。适合的聚合物包括但不限于聚乙二醇、聚乙二醇丙醛、其单 C_1-C_{10} 烷氧基或芳氧基衍生物(描述于美国专利No.5,252,714中,其通过提述并入本文)、单甲氧基-聚乙二醇、离散PEG、聚乙烯吡咯啉酮、聚乙烯醇、聚氨基酸、二乙烯醚顺丁烯二酸酐、 $N-(2\text{-羟丙基})$ -甲基丙烯酰胺、右旋糖、右旋糖衍生物(包括硫酸右旋糖)、聚丙二醇、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、寡糖、聚糖、纤维素及纤维素衍生物(包括但不限于甲基纤维素和羧甲基纤维素)、淀粉及淀粉衍生物、多肽、聚烷撑二醇(polyalkylene glycol)及其衍生物、聚烷撑二醇及其衍生物的共聚物、聚乙烯乙醚及 α - β -聚 $[(2\text{-羟乙基})-DL\text{-天冬酰胺}]$ 等,或其混合物。此类水溶性聚合物的实例包括但不限于聚乙二醇和血清白蛋白。

[0159] 如本文所用,术语“聚烷撑二醇”(PEG)或“聚(烯烴二醇)”是指聚乙二醇(聚(乙二醇))、聚丙二醇、聚丁二醇及其衍生物。术语“聚烷撑二醇”涵盖直链与支链聚合物及0.1kDa至100kDa的平均分子量。其他例示性实施例列于例如商业供货商目录中,如Shearwater公司的目录“Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications”(2001)。

[0160] 如本文所用,术语“经调节的血清半衰期”或“经调节的体内半衰期”及类似术语是指经修饰的FGF-21相对于如其非修饰形式的比较剂的循环半衰期的正或负变化。血清半衰期通过如下方法测量:在施用经修饰的FGF-21后的不同时间点处获取血液样品,且确定各样品中该分子的浓度。血清浓度与时间的相关性允许计算血清半衰期。增加的血清(体内)半衰期理想地可为至少约两倍,但较小增加可为有用的,例如在实现令人满意的给药方案或避免毒性作用的情况下。在一些实施方案中,增加可为至少约三倍、至少约五倍或至少约十倍。

[0161] 如本文所用,术语“经调节的治疗性半衰期”意指治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽相对于如其非修饰形式或野生型FGF-21的比较剂的血清或体内半衰期的正或负变化。治疗性半衰期通过在施用后的不同时间点处测量分子的药代动力学和/或药效学特性来测量。增加的治疗半衰期理想地实现特别有益的给药方案,特别有益的总剂量,或避免不良作用。在一些实施方案中,增加的治疗半衰期由以下产生:增加的效力、修饰的分子与其靶物的增加或降低的结合、分子通过酶(如蛋白酶)的增加或降低的分解、或未修饰的分子的作用机制或另一参数的增加或降低或分子的受体介导的清除的增加或降低。

[0162] 术语“分离的”在用于核酸或蛋白质时表示核酸或蛋白质不含其在天然状态下相关的细胞组分中的至少一些,或所述核酸或蛋白质已浓缩至大于其在体内或体外生产的浓

度的水平。其可呈均质状态。分离的物质可呈干燥或半干燥状态；或呈溶液形式，包括但不限于水溶液。其可为包含额外的药学上可接受的载剂和/或赋形剂的药物组合物的组分。纯度及均质性通常使用如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱的分析化学技术来确定。在制备物中占主导种类的蛋白质是基本上纯的。具体地，分离的基因分离自位于该基因侧翼的开放阅读框且编码除目的基因之外的蛋白。术语“纯化”表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中实质上产生一个条带。具体地，其可意指核酸或蛋白质是至少85%纯的、至少90%纯的、至少95%纯的、至少99%纯的或大于99%纯的。

[0163] 术语“核酸”是指脱氧核糖核苷酸、脱氧核糖核苷、核糖核苷或核糖核苷酸及其单或双链形式的聚合物。除有具体限定外，该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸，所述已知类似物具有与参考核酸类似的结合特性且以与天然存在的核苷酸类似的方式代谢。除有具体限定外，该术语也指寡核苷酸类似物，包括PNA（肽核酸）、用于反义技术的DNA的类似物（硫代磷酸酯（phosphorothioates）、磷酰氨酸（phosphoroamidates）及其类似物）。除非另有指明，否则具体核酸序列还隐含地涵盖其经保守修饰的变体（包括但不限于简并密码子取代）及互补序列以及明确指明的序列。

[0164] 术语“多肽”、“肽”及“蛋白”在本文中可互换使用，且是指氨基酸残基的聚合物。即针对多肽的描述同样适用于肽的描述和蛋白的描述，反之亦然。所述术语适用于天然存在的氨基酸聚合物以及其中一个或多个氨基酸残基是非天然编码的氨基酸的氨基酸聚合物。如本文所用，所述术语涵盖任何长度的氨基酸链，包括全长蛋白，其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0165] “保守修饰的变体”是指含有保守取代的氨基酸序列。例示性保守修饰的变体包括核酸、肽、多肽或蛋白序列的取代、缺失或插入，其会改变、添加或删除多肽序列或编码的多肽序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸，例如多至1、2、3、4或5个氨基酸，或多肽序列或编码的多肽序列的氨基酸的至多0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%或3.5%，其任选地可为或可包括用化学上类似的氨基酸的氨基酸取代。提供功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域普通技术人员已知的。此类保守修饰的变体是附加的且不排除本发明的修饰的FGF-21多肽的多态变体、种间同系物和等位基因。

[0166] 提供功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域普通技术人员已知的。如下八个组各自含有彼此互为保守取代的氨基酸：

[0167] 1) 丙氨酸(A)，甘氨酸(G)；

[0168] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；

[0169] 3) 天冬酰胺(N)，谷氨酰胺(Q)；

[0170] 4) 精氨酸(R)，赖氨酸(K)；

[0171] 5) 异亮氨酸(I)，亮氨酸(L)，甲硫氨酸(M)，缬氨酸(V)；

[0172] 6) 苯丙氨酸(F)，酪氨酸(Y)，色氨酸(W)；

[0173] 7) 丝氨酸(S)，苏氨酸(T)；和

[0174] 8) 半胱氨酸(C)，甲硫氨酸(M)

[0175] (参见例如Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman&Co.; 第2版(1993年12月))。

[0176] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情况下，术语“相同”或百分比“同一性”是指相

同的两个或更多个序列或亚序列。当在比较窗或标示区上比较和比对用于最大对应时,如使用如下序列比较算法(或本领域普通技术人员可获得的其他算法)之一或通过手动比对及目测所测量的,若序列具有一定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即在指定区域上约60%同一性,约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%同一性),则所述序列“基本上相同”。同一性可存在于长度为至少约50个氨基酸或核苷酸的区域或比较窗上,或长度为75-100个氨基酸或核苷酸的区域上,或在未指定的情况下跨越整个多核苷酸或多肽序列。如本文所用的,“比较窗”包括指选自下组的任一数目的连续位置的区段:20至600、通常约50至约200,更通常约100至约150,其中在两个序列为最佳比对之后,可将一个序列与相同数目的连续位置的参考序列相比。可适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的实例为BLAST及BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等(1997)Nuc. Acids Res. 25:3389-3402和Altschul等(1990)J. Mol. Biol. 215:403-410中,以及Smith-Waterman (Smith和Waterman, J Mol Biol. 1981Mar 25;147(1):195-7)或Needleman-Wunsch (Needleman和Wunsch, J Mol Biol. 1970Mar;48(3):443-53)算法,其可用默认参数运行,例如如各自公开中描述的那样。

[0177] 如本文所用的术语“受试者”是指动物,在一些实施方案中为哺乳动物,且在其他实施方案中为人,其是治疗、观察或实验的对象。动物可为宠物(例如狗、猫等)、农场动物(例如牛、羊、猪、马等)或实验室动物(例如大鼠、小鼠、豚鼠等)。

[0178] 如本文所用,术语“有效量”是指可在一定程度上减轻正在治疗的疾病、病况或病症的一个或多个症状的施用的化合物(例如本文所述的修饰的FGF-21多肽)的量。可施用含有本文所述的修饰的FGF-21多肽的组合物以进行预防性、增强和/或治疗性处理。

[0179] 术语“增强(enhance或enhancing)”意指增加或延长所需效果的效力或持续时间。因此,关于增强治疗剂的效果,术语“增强”是指增加或延长其他治疗剂对系统的效果的效力或持续时间的能力。

[0180] 如本文所用,术语“修饰的”是指给定多肽的任何变化,如多肽的长度、多肽的氨基酸序列、化学结构、共翻译修饰或翻译后修饰的变化。形式“(修饰的)”术语意指所论述的多肽是任选地经修饰的,即论述的多肽可为修饰的或未修饰的。

[0181] 术语“翻译后修饰的”是指天然或非天然氨基酸在已并入至多肽链中之后发生的该氨基酸的任何修饰。该术语涵盖例如共翻译体内修饰、共翻译体外修饰(如在无细胞翻译系统中)、翻译后体内修饰及翻译后体外修饰。

[0182] 在预防性应用中,向易患特定疾病、病症或病况或是处于特定疾病、病症或病况风险的患者施用含有修饰的FGF-21多肽的组合物。此类量定义为“预防有效量”。

[0183] 在治疗性应用中,向已患有疾病、病况或病症的患者施用足以治愈或至少部分遏制或缓解疾病、病症或病况的症状的量的包含经修饰的非天然氨基酸多肽的组合物。此类量定义为“治疗有效量”,且可根据疾病、病症或病况的严重程度和病程、先前治疗、患者的健康状况及对药物的响应和治疗医师的判断而定。认为技术人员能够通过常规实验(例如剂量递增临床试验)确定此类治疗有效量。

[0184] 术语“治疗”用以指预防性和/或治疗性处理。

[0185] 本文中呈现的非天然编码的氨基酸多肽可包括同位素标记的化合物,其中一个或多个原子由原子质量或质量数不同于自然界中通常发现的原子质量或质量数的原子置换。

[0186] 将包括但不限于非对映异构体、对映异构体及其混合物的所有异构体视为本文所述的组合物的一部分。在额外或进一步的实施方案中,非天然编码的氨基酸多肽在施用于所需生物体时发生代谢以产生代谢物,然后用于产生所需效果,包括所需治疗性效果。在进一步的或额外实施方案中,是非天然编码的氨基酸多肽的活性代谢物。

[0187] I. 综述

[0188] 本发明提供包含内部缺失且任选地包含至少一个非天然氨基酸的修饰的FGF-21分子。证明包含内部缺失的修饰的FGF-21多肽的例示性实施方案显示出至少一个有利特性,包括但不限于增加的热稳定性、改进的溶解度、降低的脱酰胺作用、改进的工艺性、全长生物活性形式的改进的体内半衰期,同时保持生物活性的水平与无内部缺失的FGF-21多肽相当。

[0189] 在含有缺失区且任选地经肽替换的修饰的FGF-21多肽中脱酰胺化得以减缓且储存期限和纯度得以改进(参见图1)。例示性的修饰的序列显示出减缓可在分子存储期间发生的脱酰胺化作用。除脱酰胺化减缓以外,该修饰还增加呈溶液状态的蛋白质的热稳定性和/或溶解度,且相对于缺乏此缺失的野生型FGF-21或FGF-21多肽使蛋白质聚集倾向进一步降至最低。降低的脱酰胺化、增加的热稳定性、增加的溶解度和/或减少聚集指示优良的配制特征,如较长储存期限及较大纯度,以及较大浓度的配制物。另外,脱酰胺化的倾向减缓允许有较大范围的配制选择;否则,需要选择配制条件以降低脱酰胺化,其会潜在产生其他不合需要的配制特征。此外,不可预测且出人意料的是,包含5至19个连续氨基酸的内部缺失及置换肽的修饰的FGF-21多肽可保留FGF-21的生物功能且具有降低的脱酰胺化、增加的热稳定性、增加的溶解度和减少聚集的至少一项。

[0190] 进一步的例示性修饰会减缓自蛋白的体内蛋白水解剪切十个C末端氨基酸。此修饰延长完整、活性分子的血液半衰期,这导致降低总剂量和更低的给药频率。减缓蛋白水解剪切的例示性修饰是点突变,G170E,但还可利用其他修饰。

[0191] 在一些实施方案中,本发明提供修饰的FGF-21多肽,其包含具有选自SEQ ID NO: 1-7的氨基酸序列的多肽,只是其中所述氨基酸序列可包含:(i) 2至19个氨基酸(如5至19个氨基酸)的内部缺失,其中所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸116至134对应的区域内,其中所述内部缺失经长度为0至12个氨基酸的置换肽置换;及(ii) 9或少于9个额外氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0192] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含多肽,所述多肽具有含有至少一个非天然编码的氨基酸的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1的氨基酸72、77、86、87、91、108、110、126、131或146对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1的氨基酸77、91、108或131对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸108对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸72对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸77对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸86对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸87对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1中的氨基

酸91对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸110对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸126对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸131对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸146对应的位置。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸是苯丙氨酸衍生物。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸可为经对位取代、经邻位取代或经间位取代的苯丙氨酸衍生物。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸是对-乙酰基-L-苯丙氨酸。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸是对-乙酰基-L-苯丙氨酸,其并入与SEQ ID NO:1中的氨基酸108对应的位置处。

[0193] 在一些实施方案中,本发明提供修饰的FGF-21多肽,其包含具有选自SEQ ID NO:1-7的氨基酸序列的多肽,只是其中所述氨基酸序列可包含:(i) 2至19个氨基酸(如5至19个氨基酸)的内部缺失,其中所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸116至134对应的区域内,其中所述内部缺失经长度为0至12个氨基酸的置换肽置换;及(ii) 9个或少于9个额外氨基酸取代、缺失和/或插入;(iii) 与SEQ ID NO:1的氨基酸108对应的位置处的非天然编码的氨基酸,其可包含经对位取代、经邻位取代或经间位取代的苯丙氨酸衍生物,如对-乙酰基-L-苯丙氨酸。

[0194] 在一些实施方案中,所述修饰的FGF-21多肽可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸170对应的位置处用谷氨酸对甘氨酸的取代。

[0195] 在一些实施方案中,所述内部缺失可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸119-130对应的区域或由其组成。在一些实施方案中,所述修饰的FGF-21多肽可连接至聚合物、水溶性聚合物或聚(乙二醇),如平均分子量是约30kDa的聚(乙二醇)。在一些实施方案中,所述置换肽具有序列G、GG、SG、GSG、GGH或SGG。在一些实施方案中,所述置换肽具有序列GSG。

[0196] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1个或更少的额外氨基酸取代、缺失和/或插入的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有的8个或更少个额外氨基酸取代、缺失和/或插入的氨基酸序列。本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有的7个或更少个额外氨基酸取代、缺失和/或插入的氨基酸序列。本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有的6个或更少个额外氨基酸取代、缺失和/或插入的氨基酸序列。本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有的5个或更少个额外氨基酸取代、缺失和/或插入的氨基酸序列。本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有的4个或更少个额外氨基酸取代、缺失和/或插入的氨基酸序列。本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有的3个或更少个额外氨基酸取代、缺失和/或插入的氨基酸序列。本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有的2个或更少个额外氨基酸取代、缺失和/或插入的氨基酸序列。本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有的1个或更少个额外氨基酸取代、缺失和/或插入的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有与SEQ ID NO:1的氨基酸G170对

应的氨基酸的取代或缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有在与SEQ ID NO:1的氨基酸170对应的位置用谷氨酸取代甘氨酸的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可不含额外氨基酸取代、缺失和/或插入的氨基酸序列。

[0197] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有氨基酸序列,所述氨基酸序列含有4至19个、4至18个、4至17个、4至16个、4至15个、4至14个、4至13个、4至12个、4至11个、4至10个、4至9个、4至8个、4至7个或4至6个氨基酸的内部缺失。在一些实施方案中,所述内部缺失可为4至14个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为4至12个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为4至10个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为4至8个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为4至6个氨基酸。

[0198] 在一些实施方案中,所述内部缺失可为5至19个、5至18个、5至17个、5至16个、5至15个、5至14个、5至13个、5至12个、5至11个、5至10个、5至9个、5至8个、5至7个或5至6个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为5至14个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为5至12个氨基酸。

[0199] 在一些实施方案中,所述内部缺失可为6至19个、6至18个、6至17个、6至16个、6至15个、6至14个、6至13个、6至12个、6至11个、6至10个、6至9个、6至8个或6至7个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为6至14个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为6至12个氨基酸。

[0200] 在一些实施方案中,所述内部缺失可为7至19个、7至18个、7至17个、7至16个、7至15个、7至14个、7至13个、7至12个、7至11个、7至10个、7至9个或7至8个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为7至14个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为7至12个氨基酸。

[0201] 在一些实施方案中,所述内部缺失可为8至19个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为8至14个氨基酸。在一些实施方案中,所述内部缺失可为8至12个氨基酸。

[0202] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含多肽,所述多肽具有可含有12个氨基酸的内部缺失的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含多肽,所述多肽具有可含有13个氨基酸的内部缺失的氨基酸序列。

[0203] 在一些实施方案中,本文所述的内部缺失可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸121对应的位置。

[0204] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含内部缺失的氨基酸序列,其中:

[0205] i) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸116至氨基酸121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0206] ii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸117至氨基酸121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0207] iii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸118至氨基酸121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0208] iv) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸119至氨基酸121、122、123、124、125、

126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0209] v) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸120至氨基酸121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；或

[0210] vi) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸121至氨基酸122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成。

[0211] 在一些实施方案中，本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽，所述多肽具有可含有内部缺失的氨基酸序列，其中：

[0212] i) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸122至氨基酸126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0213] ii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸123至氨基酸127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0214] iii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸124至氨基酸128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0215] iv) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸125至氨基酸129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0216] v) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸126至氨基酸130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0217] vi) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸127至氨基酸131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0218] vii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸128至氨基酸132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0219] viii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸129至氨基酸133或134对应的区域内或由其组成；或

[0220] ix) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸130至氨基酸134对应的区域内或由其组成。

[0221] 在一些实施方案中，本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽，所述多肽具有可含有内部缺失的氨基酸序列，其中：

[0222] i) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸116至氨基酸117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0223] ii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸117至氨基酸118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0224] iii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸118至氨基酸119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0225] iv) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸119至氨基酸120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0226] v) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸120至氨基酸121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0227] vi) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸121至氨基酸122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成；

[0228] vii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸122至氨基酸123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0229] viii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸123至氨基酸124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0230] ix) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸124至氨基酸125、126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0231] x) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸125至氨基酸126、127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0232] xi) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸126至氨基酸127、128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0233] xii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸127至氨基酸128、129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0234] xiii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸128至氨基酸129、130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0235] xiv) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸129至氨基酸130、131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0236] xv) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸130至氨基酸131、132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0237] xvi) 该内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸131至氨基酸132、133或134对应的区域内或由其组成;

[0238] xvii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸132至氨基酸133或134对应的区域内或由其组成;或

[0239] xviii) 所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸133至氨基酸134对应的区域内或由其组成。

[0240] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有内部缺失的氨基酸序列,其中所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸119-130对应的区域内。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有内部缺失的氨基酸序列,其中所述内部缺失包含与SEQ ID NO:1的氨基酸119-130对应的区域或由其组成。

[0241] 在一些实施方案中,本发明提供修饰的FGF-21多肽,其包含具有选自SEQ ID NO:1-7的氨基酸序列的多肽,只是其中所述氨基酸序列可包含:(i) 与SEQ ID NO:1的氨基酸119-130对应的区域的内部缺失,其中所述内部缺失经长度为0至12个氨基酸的置换肽置换;及(ii) 9个或少于9个额外氨基酸取代、缺失和/或插入;和(iii) 与SEQ ID NO:1的氨基酸108对应的位置的非天然编码的氨基酸,其可包含经对位取代、经邻位取代或经间位取代的苯丙氨酸衍生物,如对-乙酰基-L-苯丙氨酸。所述修饰的FGF-21多肽可包含在与SEQ ID NO:1的氨基酸170对应的位置处用谷氨酸对甘氨酸的取代。所述修饰的FGF-21多肽可连接至聚合物、水溶性聚合物或聚(乙二醇),如平均分子量为约30kDa的聚(乙二醇)。在一些实施方案中,所述置换肽具有序列G、GG、SG、GSG、GGH或SGG。在一些实施方案中,所述置换肽具有序列GSG。

[0242] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可包含置换多肽的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述置换肽的长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸。在一些实施方案中,所述置换肽的长度为2-8个氨基酸。在一些实施方案中,所述置换肽的长度为2-5个氨基酸。在一些实施方案中,所述置换肽的长度为3个氨基酸。在一些实施方案中,所述置换肽包含丝氨酸、组氨酸和/或甘氨酸残基。在一些实施方案中,所述置换肽包含丝氨酸和/或甘氨酸残基。在一些实施方案中,所述置换肽具有序列G、GG、SG、GSG、GGH或SGG。在一些实施方案中,所述置换肽具有序列GSG。

[0243] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸119-130对应的区域内的内部缺失及具有序列GSG的置换肽的氨基酸序列。

[0244] 在一些实施方案中,本发明提供修饰的FGF-21多肽,其包含具有选自SEQ ID NO:1-7的氨基酸序列的多肽,只是其中所述氨基酸序列可包含:(i) 2至19个氨基酸(如5至19个氨基酸)的内部缺失,其中所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸116至134对应的区域内,其中所述内部缺失经具有序列G、GG、SG、GSG、GGH或SGG的置换肽置换;(ii) 9个或少于9个额外氨基酸取代、缺失和/或插入;(iii) 与SEQ ID NO:1的氨基酸108对应的位置的非天然编码的氨基酸,其可包含经对位取代、经邻位取代或经间位取代的苯丙氨酸衍生物,如对-乙酰基-L-苯丙氨酸。所述修饰的FGF-21多肽可包含在与SEQ ID NO:1的氨基酸170对应的位置用谷氨酸取代甘氨酸。所述内部缺失可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸119-130对应的区域或由其组成。所述修饰的FGF-21多肽可连接至聚合物、水溶性聚合物或聚(乙二醇),如平均分子量是约30kDa的聚(乙二醇)。在一些实施方案中,所述置换肽具有序列GSG。

[0245] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有包含与SEQ ID NO:1的氨基酸119-130对应的区域的内部缺失、具有序列GSG的置换肽、在与SEQ ID NO:1的氨基酸170对应的位置用谷氨酸取代甘氨酸、和任选的与SEQ ID NO:1的氨基酸108对应的位置处的非天然编码的氨基酸的氨基酸序列,所述非天然编码的氨基酸可包含经对位取代、经邻位取代或经间位取代的苯丙氨酸衍生物,如对-乙酰基-L-苯丙氨酸。

[0246] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有氨基酸序列,所述氨基酸序列可与有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:202的多肽具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可与有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:202的多肽具有至少95%同一性。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可与有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:202的多肽具有至少97%同一性。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可与有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:202的多肽具有至少98%同一性。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可与有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:202的多肽具有至少99%同一性。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可包含有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:202的多肽或由其组成。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可包含SEQ ID NO:202的多肽或由其组成。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可包含无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:202的多肽或由其组成。

[0247] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有氨基酸序列,所述氨基酸序列可与有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:102的多肽具有

至少90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可与有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:102的多肽具有至少95%同一性。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可与有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:102的多肽具有至少97%同一性。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可与有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:102的多肽具有至少98%同一性。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可与有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:102的多肽具有至少99%同一性。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可包含有或无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:102的多肽或由其组成。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可包含SEQ ID NO:102的多肽或由其组成。在一些实施方案中,所述氨基酸序列可包含无N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:102的多肽或由其组成。

[0248] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可进一步包含融合配偶体。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可在所述氨基酸序列与融合配偶体之间包含长度为0-50个氨基酸的连接肽。在一些实施方案中,连接肽可具有选自SEQ ID NO:74-100、301和350-383的氨基酸序列。在一些实施方案中,连接肽可具有氨基酸序列GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:360)。

[0249] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可进一步包含连接所述氨基酸序列与所述融合配偶体的连接肽。在一些实施方案中,连接肽的长度可为0至100个、2至80个、2至60个、2至50个、2至40个、2至30个、2至20个、2至10个、2至8个、2至6个或2至4个氨基酸。在一些实施方案中,连接肽可包含选自SEQ ID NO:74-100、301和350-383的氨基酸序列或由其组成。

[0250] 在一些实施方案中,连接肽可包含氨基酸序列GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:360) 或由其组成。

[0251] 在一些实施方案中,融合配偶体选自血清白蛋白、Fc域、免疫球蛋白恒定区、非结构化多肽和Adnectin及其片段。在一些实施方案中,融合配偶体包含免疫球蛋白恒定区或修饰的免疫球蛋白恒定区。在一些实施方案中,融合配偶体可包含非结构化多肽,其中所述非结构化多肽包括XTEN或PAS多肽。在一些实施方案中,PAS多肽可具有选自SEQ ID NO:310-316的氨基酸序列或与其至少70%、75%、80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列。

[0252] 在一些实施方案中,融合配偶体包含Fc域或其片段。在一些实施方案中,Fc域可具有与选自SEQ ID NO:302和323-335的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,或其片段,如选自SEQ ID NO:303-309的多肽。在一些实施方案中,融合配偶体可包含具有选自SEQ ID NO:302和323-335的氨基酸序列的Fc域或Fc片段。在一些实施方案中,Fc域可具有与选自SEQ ID NO:302和323-335的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列或其片段。在一些实施方案中,Fc域可具有与SEQ ID NO:302至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc域可具有与SEQ ID NO:302至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc域可包含氨基酸序列SEQ ID NO:302。

[0253] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包含与选自SEQ ID NO:475-487的多肽至少90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的多肽或由其组成。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含与SEQ ID NO:475至少90%相同的多肽或由其组成。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含与SEQ ID NO:475至少95%相同的多肽或由其组成。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含与SEQ ID NO:475至少96%相同的多肽或由其组成。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含与SEQ ID NO:475至少97%相同的多肽或由其组成。在一

些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含与SEQ ID NO:475至少98%相同的多肽或由其组成。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含与SEQ ID NO:475至少99%相同的多肽或由其组成。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含SEQ ID NO:475的多肽或由其组成。

[0254] 在一些实施方案中,融合配偶体可包含Adnectin。在一些实施方案中,融合配偶体可包含白蛋白结合或PKE Adnectin。在一些实施方案中,PKE Adnectin可包含与SEQ ID NO:320至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽。在一些实施方案中,PKE Adnectin可包含与SEQ ID NO:320至少90%相同的多肽。在一些实施方案中,PKE Adnectin可包含SEQ ID NO:320的多肽。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包含与选自SEQ ID NO:401-423的多肽至少90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的多肽或由其组成。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包含与选自SEQ ID NO:401-423的多肽至少95%相同的多肽或由其组成。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包含选自SEQ ID NO:401-423的多肽或由其组成。

[0255] 在一些实施方案中,PKE Adnectin可包含与SEQ ID NO:319至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽。在一些实施方案中,PKE Adnectin可包含与SEQ ID NO:319至少90%相同的多肽。在一些实施方案中,PKE Adnectin可包含SEQ ID NO:319的多肽。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包含与选自SEQ ID NO:452-474的多肽至少90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的多肽或由其组成。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包含与选自SEQ ID NO:452-474的多肽至少95%相同的多肽或由其组成。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包含选自SEQ ID NO:452-474的多肽或由其组成。

[0256] 在一些实施方案中,融合配偶体包含血清白蛋白或其片段。在一些实施方案中,融合配偶体包含人血清白蛋白或其片段。在一些实施方案中,融合配偶体可包含与SEQ ID NO:321或322至少90%相同的多肽。在一些实施方案中,融合配偶体可包含SEQ ID NO:321或322的多肽。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包含与选自SEQ ID NO:424-432、434-437、440-443和446-451的多肽至少90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的多肽。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包含与选自SEQ ID NO:424-432、434-437、440-443和446-451的多肽至少95%相同的多肽。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包含选自SEQ ID NO:424-432、434-437、440-443和446-451的多肽。

[0257] 在一些实施方案中,本发明提供修饰的FGF-21多肽,其包含具有选自SEQ ID NO:1-7的氨基酸序列的多肽,只是其中所述氨基酸序列可包含:(i) 2至19个氨基酸(如5至19个氨基酸)的内部缺失,其中所述内部缺失在与SEQ ID NO:1的氨基酸116至134对应的区域内,其中所述内部缺失经长度为0至12个氨基酸的置换肽置换;及(ii) 9个或少于9个额外氨基酸取代、缺失和/或插入;其中所述修饰的FGF-21多肽进一步包含融合配偶体。所述融合配偶体可包含Fc域或其片段。所述修饰的FGF-21多肽可包含在与SEQ ID NO:1的氨基酸170对应的位置用谷氨酸对甘氨酸的取代。所述内部缺失可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸119-130对应的区域或由其组成。在一些实施方案中,所述置换肽具有序列G、GG、SG、GSG、GGH或SGG。在一些实施方案中,所述置换肽具有序列GSG。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽在该氨基酸序列与融合配偶体之间包含连接肽,其中所述连接肽包含氨基酸序列GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:360) 或由其组成。

[0258] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽

具有可含有非天然编码的氨基酸的氨基酸序列,所述非天然编码的氨基酸可连接至接头、聚合物、生物活性分子、肽、多肽或半衰期延长部分。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有非天然编码的氨基酸(其可连接至半衰期延长部分)的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述半衰期延长部分包括水溶性聚合物。在一些实施方案中,所述半衰期延长部分选自聚(乙二醇)(PEG)、单甲氧基PEG(mPEG)、非结构化多肽、Adnectin、血清白蛋白、人血清白蛋白、Fc域、免疫球蛋白恒定区、前述任一项的片段、脂质、支链或无支链酰基、支链或无支链C8-C30酰基、支链或无支链烷基及支链或无支链C8-C30烷基。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有可含有非天然编码的氨基酸的氨基酸序列,所述非天然编码的氨基酸可连接至选自XTEN或PAS多肽的非结构化多肽。在一些实施方案中,所述半衰期延长部分包含聚(乙二醇)(PEG)或单甲氧基PEG(mPEG)聚合物。在一些实施方案中,所述半衰期延长部分包含支链或多臂聚(乙二醇)(PEG)或其他支链或多臂水溶性聚合物。在一些实施方案中,所述半衰期延长部分包含平均分子量为约0.1kDa至约100kDa的聚(乙二醇)(PEG)或单甲氧基PEG(mPEG)部分。在一些实施方案中,所述半衰期延长部分包含平均分子量如下的聚(乙二醇)或单甲氧基PEG(mPEG)部分:

[0259] i) 约0.1kDa至约100kDa;

[0260] ii) 约1kDa至50kDa;

[0261] iii) 约10kDa至40kDa;

[0262] iv) 约20kDa至30kDa;

[0263] v) 约0.050kDa至约100kDa;或

[0264] vi) 为约100kDa、95kDa、90kDa、85kDa、80kDa、75kDa、70kDa、65kDa、60kDa、55kDa、50kDa、45kDa、40kDa、35kDa、30kDa、25kDa、20kDa、15kDa、10kDa、9kDa、8kDa、7kDa、6kDa、5kDa、4kDa、3kDa、2kDa、1kDa、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da或100Da。

[0265] 在一些实施方案中,所述半衰期延长部分包含平均分子量为约30kDa的聚(乙二醇)。在一些实施方案中,所述半衰期延长部分包含非聚(乙二醇)水溶性聚合物或寡糖。

[0266] 在一些实施方案中,本文所述的非天然编码的氨基酸可包含羰基、氨基氧基、酰肼基、肼基、氨基脒基、叠氮基或炔基。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸包含羰基部分且连接至包含氨基氧基、肼、酰肼或氨基脒部分的接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸包含经由酰胺键的连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分的氨基氧基、肼、酰肼或氨基脒部分。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸包含经由叠氮部分连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分的炔基部分。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸包含叠氮部分,其连接至包含炔基部分的接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸包含叠氮或炔基部分,其经由酰胺键连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸经由肼键连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸经由肼键连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分,其中所述肼键具有由羰基与氨基氧基

反应产生的结构。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸经由肽键连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分,其中所述肽键具有由所述非天然编码的氨基酸中所含的羰基与所述接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分中所含的氨基氧基反应产生的结构。

[0267] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽具有具氨基酸序列SEQ ID NO:1的野生型人FGF-21多肽的至少一种生物活性。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽具有如下至少一项:与无所述内部缺失的FGF-21多肽或包含氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:201的FGF-21多肽相比,或与无所述内部缺失及置换肽的相同修饰的FGF-21多肽相比,增加的热稳定性、减少的聚集、降低的体内蛋白水解、降低的脱酰胺化和增加的溶解度。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽具有如下至少一项:与无所述内部缺失的聚乙二醇化FGF-21多肽、无所述内部缺失的非聚乙二醇化FGF-21多肽、包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的FGF-21多肽、包含氨基酸序列SEQ ID NO:201的非聚乙二醇化FGF-21多肽、聚乙二醇化SEQ ID NO:201相比或与无所述内部缺失及置换肽的相同修饰的FGF-21多肽相比,增加的热稳定性、减少的聚集、降低的体内蛋白水解、降低的脱酰胺化及增加的溶解度。

[0268] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可与无所述内部缺失的聚乙二醇化FGF-21多肽相比。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可与无所述内部缺失的非聚乙二醇化FGF-21多肽相比。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可与包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的FGF-21多肽相比。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可与SEQ ID NO:201相比。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可与聚乙二醇化SEQ ID NO:201相比。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可与无所述内部缺失及置换肽的相同修饰的FGF-21多肽相比。

[0269] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽与包含氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:201的未修饰的FGF-21多肽或无所述内部缺失的FGF-21多肽相比表现出2℃至12℃、2℃至10℃、2℃至8℃、4℃至8℃、4℃至10℃、4℃至12℃或6℃至8℃的转变中点(熔解温度,T_m)增加。

[0270] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、202、205、206、210、211、212、219、220、221、222或223的多肽具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、202、205、206、210、211、212、219、220、221、222或223的多肽具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、202、205、206、210、211、212、219、220、221、222或223的多肽具有至少98%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:202的多肽具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%

同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:202的多肽具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含这样的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:202的多肽具有至少98%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:202的多肽。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:202的多肽,其中SEQ ID NO:202中的pAF可连接至聚(乙二醇)。在一些实施方案中,聚(乙二醇)的平均分子量是约30kDa。

[0271] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含具有N末端甲硫氨酸(其可在一些如大肠杆菌的系统中表达之后存在)的多肽。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含不具有N末端甲硫氨酸的多肽,例如由于加工以去除含有N末端甲硫氨酸的信号肽(例如在基于哺乳动物细胞的表达系统中)。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包括本文公开的序列或其变体的任一种但删去N末端甲硫氨酸,例如本文所述的SEQ ID NO:101-132、201-202、205-206、210-212、219-223的任一种或其变体、修饰或融合形式的任一种,其中N末端甲硫氨酸被删去或不存在。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可包括任何本文公开的序列或其变体,例如本文所述的SEQ ID NO:401-487的任一种或其变体、修饰或融合形式的任一种,其中添加有或存在有N末端甲硫氨酸。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含无N末端甲硫氨酸的具有氨基酸序列SEQ ID NO:202的多肽。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:202(任选地无N末端甲硫氨酸)的多肽,其中SEQ ID NO:202中的pAF连接至平均分子量为约30kDa的聚(乙二醇)。

[0272] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:102的多肽。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含具有无N末端甲硫氨酸的氨基酸序列SEQ ID NO:102的多肽。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含具有无N末端甲硫氨酸的氨基酸序列SEQ ID NO:102以及Fc域或其片段的多肽。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:102及Fc域或其片段的多肽。在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含SEQ ID NO:475。

[0273] 在一些实施方案中,本发明提供编码本文所述的修饰的FGF-21多肽的分离的核酸。在一些实施方案中,本文提供表达载体,其包含编码本文所述的修饰的FGF-21多肽的分离核酸。在一些实施方案中,本文提供包含表达载体的宿主细胞,所述表达载体包含编码本文所述的修饰的FGF-21多肽的分离核酸。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞,如CHO或HEK。在一些实施方案中,宿主细胞是细菌,如大肠杆菌。在一些实施方案中,宿主细胞是酵母,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。在一些实施方案中,本发明提供一种生产修饰的FGF-21多肽的方法,包括培养本文所述的宿主细胞及分离所述修饰的FGF-21多肽。在一些实施方案中,本发明提供一种生产包含非天然编码氨基酸的修饰的FGF-21多肽的方法。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸由选择密码子编码。在一些实施方案中,该方法包括培养本文所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞包含识别所述选择密码子且将所述非天然编码的氨基酸引入至所述修饰的FGF-21多肽中的正交tRNA;和分离所述修饰的

FGF-21多肽。

[0274] 在一些实施方案中,本发明提供一种组合物,其包含本文所述的修饰的FGF-21多肽和药学上可接受的载剂或赋形剂。在一些实施方案中,本发明提供一种组合物,其包含修饰的FGF-21多肽,所述修饰的FGF-21多肽包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:202的多肽,其中SEQ ID NO:202中的pAF可连接至聚(乙二醇);和药学上可接受的载剂或赋形剂。在一些实施方案中,聚(乙二醇)可以具有约30kDa的平均分子量。

[0275] 在一些实施方案中,本发明提供一种组合物,其包含修饰的FGF-21多肽,所述修饰的FGF-21多肽具有无N末端甲硫氨酸的氨基酸序列SEQ ID NO:102,其融合至Fc域或其片段;和药学上可接受的载剂或赋形剂。在一些实施方案中,本发明提供一种组合物,其包含修饰的FGF-21多肽,所述经修饰的FGF-21包含SEQ ID NO:475;和药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0276] 在一些实施方案中,本发明提供一种组合物,其包含本文所述的修饰的FGF-21多肽和药学上可接受的载剂或赋形剂以及至少一种其他活性剂。在一些实施方案中,所述至少一种其他活性剂是抗糖尿病剂、胆固醇控制剂、抗炎剂、抗肥胖剂、抗高血压药剂或抗纤维化剂。在一些实施方案中,所述至少一种其他活性剂是GLP-1激动剂或胰岛素。在一些实施方案中,所述至少一种其他活性剂为速效、短效、长效、中效或长效胰岛素、优泌乐(Humalog)、赖脯胰岛素(Lispro)、诺和乐(Novolog)、艾倍得(Apidra)、优泌林(Humulin)、门冬胰岛素(Aspart)、人胰岛素、NPH、Lente、Ultralente、兰德仕(Lantus)、甘精胰岛素(Glargine)、诺和平(Levemir)、地特胰岛素(Detemir);艾塞那肽(exenatide) (Byetta/Bydureon)、利拉鲁肽(liraglutide) (Victoza)、利西拉来(lixisenatide) (Lyxumia)、阿必鲁肽(albiglutide) (Tanzeum)、长效释放艾塞那肽(LAR)、他司鲁肽(taspoglutide)、阿必鲁肽(albiglutide)、LY2189265(度拉糖肽(Dulaglutide));奥利司他(orlistat) (Xenical)、胰脂肪酶抑制剂、纳曲酮(naltrexone)、苯丁胺(phentermine)、托吡酯(topiramate) (Qsymia)、氯卡色林(lorcaserin) (Belviq)、纳曲酮和安非他酮(bupropion) (Contravene)、利莫那班(rimonabant) (Acomplia)、类大麻酚受体拮抗剂、西布曲明(sibutramine) (Meridia)、氯卡色林、利莫那班、普兰林肽(pramlintide)、苯丁胺、托吡酯、安非他酮或葡甘露聚糖。

[0277] 在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中调节如下至少一项的方法:葡萄糖及脂质稳态、葡萄糖摄取、GLUT 1表达和/或葡萄糖、甘油三酯、胰岛素或胰高血糖素的血清浓度,其包括向患者施用治疗有效量的本文公开的修饰的FGF-21多肽或本文公开的组合物。在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中增加胰岛素敏感性、增加脂联素水平、降低血糖水平、降低胰高血糖素水平、降低甘油三酯水平、降低果糖胺水平、降低低密度胆固醇水平或降低C反应性蛋白水平的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文公开的修饰的FGF-21多肽或本文公开的组合物。在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中治疗选自如下的病况或病症的方法:肥胖、糖尿病、胰腺炎、胰岛素抗性、高胰岛素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代谢综合征、葡萄糖耐量受损、葡萄糖清除不足、高血糖及普拉德-威利综合征,其包括向患者施用治疗有效量的本文公开的修饰的FGF-21多肽或本文公开的组合物。在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中治疗选自如下的胰岛素相关病况或病症的方法:A型胰岛素抗性、C型胰岛素抗性

(AKA HAIR-AN综合征)、罗伯森-门登荷综合征、多诺霍氏综合征或矮怪病、雄激素过多症、多毛症或黑棘皮病,其包括向患者施用治疗有效量的本文公开的修饰的FGF-21多肽或本文公开的组合物。在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中治疗1型糖尿病或2型糖尿病的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文公开的修饰的FGF-21多肽或本文公开的组合物。在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中治疗肥胖的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本文公开的修饰的FGF-21多肽或本文公开的组合物。

[0278] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗纤维化相关疾病的方法,其包括向对其有需要的患者施用有效量的修饰的FGF-21多肽或包含如本文所述的修饰的FGF-21多肽的组合物。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可影响器官或组织,如胰脏、肺、心脏、肾脏、肝脏、眼、神经系统、骨髓、淋巴结、心内膜心肌和/或腹膜后腔。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可为肝纤维化或肝硬化前期(pre-cirrhosis)。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可选自:非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬化、弥散性实质性肺病、囊肿性纤维化、肺纤维化、进行性大规模纤维化、特发性肺纤维化、注射性纤维化、肾纤维化、慢性肾病、糖尿病性肾病、局灶性节段性肾小球硬化、膜性肾病、IgA肾病、骨髓纤维化、心脏衰竭、代谢性心脏衰竭、心脏纤维化、白内障纤维化、白内障、眼部结疤、胰脏纤维化、皮肤纤维化、肠纤维化、肠狭窄、心内膜心肌纤维化、心房纤维化、纵隔纤维化、克罗恩氏病、腹膜后纤维化、瘢痕疙瘩、肾源性全身纤维化、硬皮病、全身性硬化症、关节纤维化、Peyronie's综合征、杜普伊特伦氏挛缩、糖尿病神经病变、黏连性囊炎、酒精性肝病、肝性脂肪变性、病毒性肝炎、胆汁疾病、原发性血色沉着病、药物相关的肝硬化、隐源性肝硬化、威尔逊氏病及 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺乏症、间质性肺病(ILD)、人纤维化肺病、肝纤维化、黄斑变性、视网膜病、玻璃体视网膜病、心肌纤维化、格雷弗氏眼病、药物诱导的麦角中毒、心血管疾病、动脉粥样硬化/再狭窄、增生性疤痕、原发性或特发性骨髓纤维化和炎症性肠病(包括但不限于胶原性结肠炎)。在一些实施方案中,纤维化相关疾病由肺病、肺癌、药物治疗、化学疗法或放射疗法的一项或多项导致。在一些实施方案中,纤维化相关疾病由衰老、心脏病发作、中风、心肌损伤或左心室功能障碍的一项或多项导致。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可以选自肾纤维化、肾小球肾炎、慢性肾病、慢性肾衰竭和与全身性狼疮、癌症、实质障碍、毒素、代谢疾病、免疫疾病或糖尿病性肾病相关的肾炎。在一些实施方案中,纤维化相关疾病由创伤、脊椎损伤、感染、手术、缺血性损伤、心脏病发作、烧伤、环境污染物暴露、肺炎、肺结核或急性呼吸窘迫综合征的一项或多项造成。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可选自肺纤维化、间质性肺病、人纤维化肺疾病、特发性肺纤维化、肝纤维化、心脏纤维化、心肌纤维化、黄斑变性、视网膜病、玻璃体视网膜病、格雷弗氏眼病、药物诱导的麦角中毒、心血管疾病、动脉粥样硬化/再狭窄、瘢痕疙瘩及增生性疤痕、原发性或特发性骨髓纤维化、炎症性肠病、胶原性结肠炎、眼部结疤及白内障纤维化。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可选自NASH、肝纤维化和肝硬化。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可为NASH。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可选自糖尿病性肾脏疾病、慢性肾病和肾纤维化。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可选自代谢性心脏衰竭及心脏纤维化。在一些实施方案中,纤维化相关疾病可为肺纤维化。

[0279] 在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中治疗肝纤维化或肝硬化的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽或本文所述的组合

物。在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中治疗或预防NASH的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽或本文所述的组合物。

[0280] 在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中降低肝脂肪分数的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽或本文所述的组合物,其中所述患者任选地处于患上NASH的风险或已诊断患有NASH。在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中降低肝脏硬度、降低体脂肪百分比、降低体重、降低肝-体重比率、降低肝脏脂质含量、减小肝纤维化区域、降低空腹血糖水平、空腹甘油三酯、降低LDL胆固醇、降低ApoB、降低ApoC和/或增加HDL胆固醇的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽或本文所述的组合物,其中所述患者任选地处于患上NASH的风险或已诊断患有NASH。在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中提高脂联素水平的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽或本文所述的组合物,其中所述患者任选地处于患上NASH的风险或已诊断患有NASH。在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中治疗一种或多种与NASH相关的症状的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽或本文所述的组合物。

[0281] 本文提供在对其有需要的患者中治疗或预防NASH的方法,其包括向患者施用治疗有效量的修饰的FGF-21多肽,所述修饰的FGF-21多肽包含具有与SEQ ID NO:202至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含具有与SEQ ID NO:202至少95%相同的氨基酸序列的多肽。本文还提供在对其有需要的患者中治疗或预防NASH的方法,其包括向患者施用治疗有效量的包含SEQ ID NO:202的修饰的FGF-21多肽,其中其pAF残基连接至聚(乙二醇)部分。在一些实施方案中,所述聚(乙二醇)的分子量是约0.1kDa至100kDa或约20kDa至约40kDa或是约30kDa。在一些实施方案中,所述聚(乙二醇)分子量是约30kDa。

[0282] 本文提供在对其有需要的患者中治疗或预防NASH的方法,其包括向患者施用治疗有效量的修饰的FGF-21多肽,所述修饰的FGF-21多肽包含这样的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:102至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含这样的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:102至少95%相同的氨基酸序列。本文还提供在对其有需要的患者中治疗或预防NASH的方法,其包括向患者施用治疗有效量的修饰的FGF-21多肽,所述修饰的FGF-21多肽包含(a)无N末端Met的SEQ ID NO:102,或(b)SEQ ID NO:102。

[0283] 本文提供在对其有需要的患者中治疗或预防NASH的方法,其包括向患者施用治疗有效量的修饰的FGF-21多肽,所述修饰的FGF-21多肽包含这样的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:475至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含具有与SEQ ID NO:475至少95%相同的氨基酸序列的多肽。本文提供在对其有需要的患者中治疗或预防NASH的方法,其包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的包含SEQ ID NO:475的修饰的FGF-21多肽。

[0284] 在一些实施方案中,患者可表现出NASH CRN纤维化1-3期,其任选地通过肝脏活组织检查确定。在一些实施方案中,在治疗之前,患者可表现出至少约60的脂肪肝指数。在一些实施方案中,在治疗之前,患者可表现出至少10%的肝脂肪分数百分比,其任选地通过磁共振成像确定。

[0285] 在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中治疗心脏衰竭或心脏纤维化的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽或本文所述的组合物。在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中治疗肾脏或肾纤维化的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽或本文所述的组合物。在一些实施方案中,本发明提供一种在对其有需要的患者中治疗肺纤维化的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽或本文所述的组合物。

[0286] 在一些实施方案中,本发明提供在对其有需要的患者中治疗纤维化相关疾病的方法,其包括向患者施用有效量的包含一个或多个非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21多肽,其中所述修饰的FGF-21多肽与具有选自SEQ ID NO:1-7和201的氨基酸序列的人FGF-21多肽具有至少90%或95%同一性,其中所述纤维化相关疾病选自NASH、肝纤维化、糖尿病性肾脏疾病、慢性肾病、肾纤维化、肺纤维化、心脏纤维化、心脏衰竭和代谢性心脏衰竭。

[0287] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽与具有选自SEQ ID NO:1-7和201的氨基酸序列的人FGF-21多肽具有至少96%、97%、98%或99%同一性。

[0288] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗纤维化相关疾病的方法,其包括向对其有需要的患者施用有效量的SEQ ID NO:201的修饰的FGF-21多肽,其任选地连接至可包含聚(乙二醇)的聚合物或水溶性聚合物,后者的分子量任选地为1至100kDa或约30kDa,其中所述纤维化相关疾病可选自NASH、肝纤维化、糖尿病性肾脏疾病、慢性肾病及代谢性心脏衰竭。

[0289] 在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸可位于与SEQ ID NO:1的氨基酸72、77、86、87、91、108、110、126、131或146对应的位置。在一些实施方案中,至少一个非天然编码的氨基酸可位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸108对应的位置。在一些实施方案中,至少一个非天然编码的氨基酸可位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸77、91或131对应的位置。

[0290] 在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸可包含苯丙氨酸类似物或衍生物。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸包含对-乙酰基-L-苯丙氨酸。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸可包含对-乙酰基-L-苯丙氨酸且可位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸108对应的位置。

[0291] 在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸可连接至平均分子量为约0.1kDa至约100kDa的聚(乙二醇)(PEG)或单甲氧基PEG(mPEG)部分。在一些实施方案中,至少一个非天然编码的氨基酸可连接至具有如下平均分子量的聚(乙二醇)或单甲氧基PEG(mPEG)部分:i)约0.1kDa至约100kDa;ii)约1kDa至50kDa;iii)约10kDa至40kDa;iv)约20kDa至30kDa;v)约0.050kDa至约100kDa;或vi)约100kDa、95kDa、90kDa、85kDa、80kDa、75kDa、70kDa、65kDa、60kDa、55kDa、50kDa、45kDa、40kDa、35kDa、30kDa、25kDa、20kDa、15kDa、10kDa、9kDa、8kDa、7kDa、6kDa、5kDa、4kDa、3kDa、2kDa、1kDa、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da或100Da。在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸可连接至平均分子量为约30kDa的聚(乙二醇)。

[0292] 在一些实施方案中,所述至少一个非天然编码的氨基酸可经由肽键连接至接头、聚合物、生物活性分子或半衰期延长部分。在一些实施方案中,肽键具有由羰基与氨基氧基的反应产生的结构。

[0293] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可具有具氨基酸序列SEQ ID NO:1的野生型人FGF-21多肽或另一FGF-21多肽的至少一种生物活性。

[0294] 在一些实施方案中,该方法可进一步包括向所述患者施用至少一种其他活性剂,其中所述额外活性剂可含于与所述修饰的FGF-21多肽相同的组合物中或可分别施用。在一些实施方案中,所述至少一种其他活性剂可选自抗纤维化剂、N-钙粘素拮抗剂、抗N钙粘素抗体、小分子N-钙粘素拮抗剂、拮抗性N-钙粘素片段、抗炎剂、抑制肾素-血管紧张素(RAS)系统的肝保护剂、益生菌(probiotics)及多不饱和脂肪酸(PUFA)。在一些实施方案中,抗纤维化剂可选自尼达尼布(nintedanib)、吡非尼酮(Pirfenidone)、LPA1拮抗剂、LPA1受体拮抗剂、GLP1类似物、tralokinumab(IL-13,AstraZeneca)、维莫德吉(vismodegib)(刺猬拮抗剂,Roche)、PRM-151(正五聚素蛋白-2,TGF β -1,Promedior)、SAR-156597(双特异性Mab IL-4&IL-13,Sanofi)、simtuzumab(抗赖氨酸氧化酶样2(抗LOXL2)抗体,Gilead)、CKD-942、PTL-202(PDE inh./己酮可可碱/NAC口服控制释放,Pacific Ther.)、omipalisib(口服PI3K/mTOR抑制剂,GSK)、IW-001(V型牛胶原型口服液,ImmuneWorks)、STX-100(并入素 α V/ β -6ant,Stromedix/Biogen)、Actimmune(IFN γ)、PC-SOD(中度歧化酶(midismase);吸入,LTT Bio-Pharma/CKD Pharm)、lebrikizumab(抗IL-13SC人源化,Roche)、AQX-1125(SHIP1活化剂,Aquinox)、CC-539(JNK抑制剂,Celgene)、FG-3019(FibroGen)和SAR-100842(Sanofi)。在一些实施方案中,肝保护剂可为熊脱氧胆酸(UDCA)或奥贝胆酸(obeticholic acid)(OCA或INT-747,Intercept)。

[0295] 在一些实施方案中,本发明提供一种组合物,其包含经调适用于治疗如本文所述的纤维化相关疾病的方法的修饰的FGF-21多肽和药学上可接受的载剂或赋形剂。在一些实施方案中,组合物可进一步包含至少一种其他活性剂。在一些实施方案中,至少一种其他活性剂可选自抗纤维化剂、吡非尼酮、N-钙粘素拮抗剂、抗N钙粘素抗体、小分子N-钙粘素拮抗剂、拮抗性N-钙粘素片段、抗炎剂、肝保护剂(如熊脱氧胆酸(UDCA)、奥贝胆酸(obeticholic acid)(OCA或INT-747,Intercept)、抑制肾素-血管紧张素系统(RAS)的系统)、益生菌和多不饱和脂肪酸(PUFA)。

[0296] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗医学上并发的肥胖的方法,其包括向对其有需要的患者施用有效量的如本文所述的修饰的FGF-21多肽或包含如本文所述的修饰的FGF-21多肽的组合物。在一些实施方案中,医学上并发的肥胖可与普拉德-威利综合征相关。

[0297] 在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽或包含本文公开的修饰的FGF-21多肽和药学上可接受的载剂或赋形剂的组合物可口服、局部或经由注射施用。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽或组合物可经由皮下注射、IV注射、腹膜内注射、肌肉注射施用。

[0298] 在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽或组合物以约每天一次的频率或低于约每天一次的频率施用。在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽或组合物以约每周两次的频率或低于约每周两次的频率施用。在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽或组合物以约每周一次的频率或低于约每周两次/一次的频率施用。在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽或组合物以约每两周一次的频率或低于约每周两次/每两周一次的频率施用。在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽或组合

物以约每三周一的频率或低于约每周两次/每三周一的频率施用。在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽或组合物以约每月一次的频率或低于约每月一次的频率施用。在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽或组合物以每四周一次的频率施用。在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽或组合物以约每天一次的频率施用。在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽或组合物以约每周一次的频率施用。

[0299] 在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽可以如下量施用:每剂约0.01mg至约500mg、每剂约0.1mg至约200mg、每剂约0.2mg至约100mg、每剂约0.5mg至约80mg、每剂约1mg至约60mg、每剂约5mg至约40mg、每剂约10mg至约30mg、每剂约10mg至约20mg、每剂约0.2mg至约1mg、每剂约1mg至约2mg、每剂约2mg至约4mg、每剂约4mg至约6mg、每剂约6mg至约10mg、每剂约10mg至约20mg、每剂约20mg至约40mg、每剂约40mg至约60mg、每剂约60mg至约80mg、每剂约80mg至约100mg、每剂约100mg至约120mg、每剂约120mg至约140mg、每剂约140mg至约160mg、每剂约160mg至约180mg、每剂约180mg至约200mg、或每剂约200mg至约240mg。

[0300] 在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽可以选自如下的量施用:每剂约0.2mg、约0.6mg、约1mg、约2mg、约4mg、约6mg、约8mg、约10mg、约20mg、约40mg、约60mg、约80mg、约100mg、约120mg、约140mg、约160mg、约180mg、和约200mg。在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽可以选自如下的量施用:每剂量约0.2mg、约0.6mg、约2mg、约6mg、约20mg、约40mg和约60mg。

[0301] 在一些实施方案中,本文公开的修饰的FGF-21多肽或包含修饰的FGF-21多肽和药学上可接受的载剂或赋形剂的组合物可与至少一种其他活性剂共同施用或分别施用(同时或序贯)。在一些实施方案中,所述至少一种其他活性剂选自抗糖尿病剂、抗肥胖剂、胆固醇控制剂、抗炎剂及抗高血压剂。

[0302] 在一些实施方案中,所述至少一种其他活性剂选自他汀类、GLP-1激动剂和胰岛素。在一些实施方案中,至少一种其他活性剂选自糊精、糊精类似物、 α -葡糖苷酶抑制剂(如米格列醇、阿卡波糖、伏格列波糖)、二甲双胍、双胍、格列酮类(glitazone)(如罗格列酮、吡格列酮、曲格列酮)、促分泌素(如艾塞那肽、利拉鲁肽、他司鲁肽或利西拉来)、糖尿抑制剂(glycosuric)、二肽基肽酶-4抑制剂、胰岛素、速效、短效、长效、中效或长效胰岛素、优泌乐、赖脯胰岛素、诺和乐、艾倍得、优泌林、门冬胰岛素、人胰岛素、NPH、Lente、Ultralente、兰德仕、甘精胰岛素、诺和平、地特胰岛素、阿托伐他汀(Atorvastatin)、西立伐他汀(Cerivastatin)、氟伐他汀(Fluvastatin)、洛伐他汀(Lovastatin)、美伐他汀(Mevastatin)、匹伐他汀(Pitavastatin)、普伐他汀(Pravastatin)、瑞舒伐他汀(Rosuvastatin)、辛伐他汀(Simvastatin Vytarin)、Advicor、苯磺酸酯Caduet(Besylate Caduet)、Simcor、奥利司他(Xenical)、胰脂酶抑制剂、纳曲酮、苯丁胺及托吡酯(Qsymia)、氯卡色林(Belviq)、纳曲酮、安非他酮(Contravene)、利莫那班(Acomplia)、类大麻酚受体拮抗剂、西布曲明(Meridia)、氯卡色林、利莫那班、艾塞那肽、普兰林肽、苯丁胺、托吡酯、情绪稳定剂、安非他酮、葡甘露聚糖、瓜尔胶、右旋苯丙胺(Dexedrine)、地高辛、厌食药、抗肥胖药、艾塞那肽(Byetta/Bydureon)、利拉鲁肽(Victoza)、利西拉来(Lyxumia)、阿必鲁肽(Tanzeum)、艾塞那肽长效释放(LAR)、他司鲁肽、阿必鲁肽和LY2189265(度拉糖肽)。

[0303] 有利地,本文所述的修饰的FGF-21化合物可通过如下来增加功效:允许需要较少

剂量情况下较长的循环半衰期、增加对需要此类治疗的个体的便利性和个体依从给药要求的可能性二者。

[0304] 通常在表现出如下症状的至少三种的患者中诊断出代谢综合征：腹部脂肪一大多数男性中，腰为40英寸或更大；空腹血糖高一至少110毫克/分升 (mg/dL)；血流中的甘油三酯高一至少150mg/dL；低HDL一小于40mg/dL；和血压为130/85或更高。

[0305] 本发明方法可有效治疗或延缓对其有需要的患者的II型糖尿病和/或肥胖的发作。所述患者可经诊断患有前驱糖尿病或可表现出一个或多个患上II型糖尿病的风险因素，如II型糖尿病的家族病史；先前诊断患有II型糖尿病的一个或多个父母或兄弟姐妹；血脂异常；总血液甘油三酯水平为至少200mg/dL；血液高密度脂蛋白水平小于35mg/dL；肥胖；身体质量指数大于 25kg/m^2 ；妊娠糖尿病病史；先前生产出生重量大于9磅的婴儿；高血压；收缩血压为至少140mmHg；舒张血压为至少90mmHg；先前测量的空腹血糖为至少99mg/dL；血管疾病；多囊卵巢综合征；或黑棘皮病。

[0306] 患者可表现出一种或多种前驱糖尿病的症状，如空腹血糖水平在100mg/dL至125mg/dL；在摄入75克葡萄糖溶液或每千克体重1.75克葡萄糖的葡萄糖溶液（最大剂量达75克）之后两小时，血糖水平在140mg/dL至199mg/dL；和/或糖化血红蛋白在5.7%至6.4%。

[0307] 患者可表现出一种或多种糖尿病症状，如空腹血糖水平大于125mg/dL；在摄入75克葡萄糖溶液或每千克体重1.75克葡萄糖的葡萄糖溶液（最大剂量达75克）之后两小时血糖水平为至少200mg/dL；和/或糖化血红蛋白为至少6.5%。

[0308] 患者可为诊断为患有II型糖尿病的。

[0309] 患者可为对于用至少一种选自下组的化合物治疗难治的：GLP-1、艾塞那肽-1、毒蜥外泌肽 (exendin)、毒蜥外泌肽类似物、毒蜥外泌肽激动剂、利拉鲁肽、利西拉来、阿必鲁肽、艾塞那肽LAR、DPP-4抑制剂、GLP-1受体激动剂、和另一GLP-1激动剂；或可禁止将此类化合物施用于患者。

[0310] 该方法可进一步包括在所述修饰的FGF-21多肽之外还向所述患者施用抗糖尿病剂或抗肥胖剂。所述抗糖尿病剂或抗肥胖剂可包括如下项或多项：糊精、糊精激动剂、磺酰脲类、降钙素、胰高血糖素、PPAR- γ 激动剂、GPL-1受体激动剂、二肽基肽酶IV抑制剂、糊精类似物、双胍类、多巴胺D2受体激动剂、美格列脲 (meglitinide)、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、抗脂质异常性胆酸螯合剂、毒蜥外泌肽、毒蜥外泌肽类似物、毒蜥外泌肽激动剂、胃抑制肽 (GIP)、肠降血糖素肽、胰岛素、SGLT2抑制剂、葡萄糖重吸收抑制剂、非诺贝特 (fenofibrate)、贝特类 (fibrate)、抗胃饥饿素 (ghrelin) 抗体或抗体片段、成纤维细胞生长因子受体 (FGFR)-1 (IIIb)、FGFR-1 (IIIc)、抗体或抗体片段、和/或FGFR-4 (IIIc)、抗CD38抗体或抗体片段、抗MIC-1抗体或MIC-1结合片段、二甲双胍或前述任一项的组合。

[0311] 在一例示性实施例中，所述抗糖尿病剂可为二甲双胍、甘精胰岛素 (如兰德仕 (Sanofi))、西他列汀 (如捷诺维 (Januvia))、门冬胰岛素 (如诺和乐及诺和锐 (NovoRapid) (Novo Nordisk))、赖脯胰岛素 (如优泌乐 (Eli Lilly))、利拉鲁肽 (如维康特 (Victoza) (Novo Nordisk))、地特胰岛素 (如诺和平 (Novo Nordisk))、西他列汀与二甲双胍的组合 (如捷诺达 (Janumet) (Merck))、比率为30/70的可溶性门冬胰岛素和鱼精蛋白结晶的门冬胰岛素 (如Novo Mix 30 (Novo Nordisk) 或吡格列酮 (如艾可拓 (Actos) (Takeda)))。

[0312] 该方法可有效引起体重减轻。

[0313] 与本发明的修饰的FGF-21多肽组合使用的抗糖尿病剂包括但不限于胰岛素促分泌素或胰岛素敏化剂、MGAT2抑制剂或其他抗糖尿病剂。这些药剂包括但不限于二肽基肽酶IV (DP4) 抑制剂(例如西他列汀、沙格列汀(saxagliptin)、阿格列汀(alogliptin)、维格列汀(vildagliptin)等等)、双胍类(例如二甲双胍、苯乙双胍等等)、磺酰脲类(例如格列本脲(glyburide)、格列美脲(glimepiride)、格列吡嗪(glipizide)等等)、葡糖苷酶抑制剂(例如阿卡波糖、米格列醇(miglitol)等等)、PPAR γ 激动剂(如噻唑烷二酮类(例如罗格列酮、吡格列酮等等))、PPAR α/γ 双重激动剂(例如莫格列扎(muraglitazar)、替格列扎(tesaglitazar)、阿格列扎(aeglitalazar)等等)、葡糖激酶活化剂(如Fyfe, M.C.T.等, *Drugs of the Future*, 34 (8) :641-653 (2009) 中所述且通过提述并入本文)、GPR40受体调节剂、GPR119受体调节剂(MBX-2952、PSN821、APD597等等)、SGLT2抑制剂(例如达格列净(dapagliflozin)、卡格列净(canagliflozin)、瑞格列净(remagliflozin)等等)、糊精类似物(如普兰林肽)、和/或胰岛素。本发明的修饰的FGF-21多肽还可任选地与治疗糖尿病并发症的药剂组合使用。这些药剂包括PKC抑制剂和/或AGE抑制剂。

[0314] 本发明的修饰的FGF-21多肽还可任选地与一种或多种降食欲剂(hypophagic agent)组合使用,所述降食欲剂如二乙胺苯丙酮(diethylpropion)、苯二甲吗啉、苯丁胺、奥利司他、西布曲明、氯卡色林、普兰林肽、托吡酯、MCHR1受体拮抗剂、胃酸调节素、纳曲酮、糊精肽、NPY Y5受体调节剂、NPY Y2受体调节剂、NPY Y4受体调节剂、西替利司他(cetilistat)、5HT_{2c}受体调节剂等。修饰的FGF-21多肽还可与胰高血糖素样肽-1受体(GLP-1R)的激动剂组合使用,所述胰高血糖素样肽-1受体(GLP-1R)的激动剂如艾塞那肽、利拉鲁肽、GPR-1 (1-36) 酰胺、GLP-1 (7-36) 酰胺、GLP-1 (7-37) (如Habener的美国专利No.5, 614, 492中所公开,其公开内容通过提述并入本文),其可经由注射剂、鼻内或通过经皮或含服(buccal)装置施用。

[0315] 本发明的修饰的FGF-21多肽还可任选地与一种或多种其他类型的治疗剂组合使用,所述治疗剂如DGAT抑制剂、降LDL药(如他汀类(HMG CoA还原酶抑制剂)或胆固醇吸收抑制剂)、PCSK9调节剂、增加HDL的药物(如CETP抑制剂)。

[0316] 在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸可以连接至水溶性聚合物。在一些实施方案中,水溶性聚合物包含聚(乙二醇)部分。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸由接头连接至水溶性聚合物或键合至水溶性聚合物。在一些实施方案中,聚(乙二醇)分子是双官能聚合物。在一些实施方案中,双官能聚合物连接至第二多肽。在一些实施方案中,第二多肽是未修饰的或修饰的FGF-21多肽。

[0317] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含连接至包含聚(乙二醇)部分的水溶性聚合物的至少两个非天然编码的氨基酸。在一些实施方案中,一个或多个非天然编码的氨基酸并入修饰的FGF-21中如下位置的一项或多项中:在位置1之前(即在N末端)、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、

143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182 (即在蛋白质的羧基端) (与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7中的对应氨基酸)。在一些实施方案中,一个或多个非天然编码的氨基酸并入修饰的FGF-21中如下位置的一项或多项中:10、52、117、126、131、162、87、77、83、72、69、79、91、96、108及110 (与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一些实施方案中,一个或多个非天然编码的氨基酸并入修饰的FGF-21中如下位置的一项或多项中:10、52、77、117、126、131、162 (与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一些实施方案中,一个或多个非天然编码的氨基酸并入修饰的FGF-21中如下位置的一项或多项中:87、77、83、72 (与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一些实施方案中,一个或多个非天然编码的氨基酸并入修饰的FGF-21中如下位置的一项或多项中:69、79、91、96、108及110 (与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一些实施方案中,一个或多个非天然氨基酸并入SEQ ID NO:3、4、6、7或其他未修饰的或修饰的FGF-21序列的前导或信号序列中。在一些实施方案中,前导序列可选自SEQ ID NO:39、40、41、42、43或44。在一些实施方案中,将修饰的FGF-21分泌构建体克隆至pVK7ara (Nde/Eco) 中,其前导序列选自SEQ ID NO:39、40、41、42、43或44。

[0318] 在一些实施方案中,这些位置的一项或多项处的非天然存在的氨基酸连接至水溶性聚合物,所述位置包括但不限于如下位置:在位置1之前 (即在N末端)、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182 (即在蛋白质的羧基端) (与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7中的对应氨基酸)。在一些实施方案中,从SEQ ID NO:34-36中的位置1之前 (即在N末端) 至C末端的一个或多个位置处的非天然存在的氨基酸连接至水溶性聚合物。在一些实施方案中,这些位置的一项或多项处的非天然存在的氨基酸连接至水溶性聚合物,所述位置包括但不限于如下位置:10、52、117、126、131、162、87、77、83、72、69、79、91、96、108和110 (与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一些实施方案中,这些位置的一项或多项处的非天然存在的氨基酸连接至水溶性聚合物,所述位置包括但不限于如下位置:10、52、77、117、126、131、162 (与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一些实施方案中,这些位置的一项或多项处的非天然存在的氨基酸连接至水溶性聚合物,所述位置为:87、77、83、72 (与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一些实施方案中,这些位置的一项或多项处的非天然存在的氨基酸连接至水溶性聚合物,所述位置为:69、79、91、96、108和110 (与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一些实施方案中,SEQ ID NO:3、4、6、7、39、40、41、42、43、44或其

他修饰的FGF-21序列的前导或信号序列中的一个或多个非天然存在的氨基酸连接至水溶性聚合物。在一些实施方案中,SEQ ID NO:3、4、6、7或其他修饰的FGF-21序列的前导或信号序列中的一个或多个非天然存在的氨基酸连接至水溶性聚合物。

[0319] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含调节修饰的FGF-21多肽对FGF-21多肽受体或结合配偶体(包括但不限于蛋白质、多肽、小分子或核酸)的亲力的至少一个取代、添加或缺失。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含增加修饰的FGF-21多肽的稳定性的至少一个取代、添加或缺失,当与无所述至少一个取代、添加或缺失的对应FGF-21的稳定性相比时或当与如SEQ ID NO:1、201的FGF-21多肽或另一未修饰的或修饰的FGF-21多肽的比较剂化合物相比时。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含降低修饰的FGF-21多肽的免疫原性的至少一个取代、添加或缺失,当与无所述至少一个取代、添加或缺失的对应FGF-21的免疫原性相比时或与如SEQ ID NO:1、201的FGF-21多肽或另一未修饰的或修饰的FGF-21多肽的比较剂化合物相比时。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含增加修饰的FGF-21多肽的血清半衰期或循环时间的至少一个取代、添加或缺失,当与无所述至少一个取代、添加或缺失的对应FGF-21的血清半衰期或循环时间相比时或与如SEQ ID NO:1、201的FGF-21多肽或另一未修饰的或修饰的FGF-21多肽的比较剂化合物相比时。

[0320] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含降低修饰的FGF-21多肽的脱酰胺化的至少一个取代、添加或缺失,当与无所述至少一个取代、添加或缺失的对应FGF-21的脱酰胺化相比时或与如SEQ ID NO:1、201的FGF-21多肽或另一未修饰的或修饰的FGF-21多肽的比较剂化合物相比时。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含增加修饰的FGF-21多肽的水溶性的至少一个取代、添加或缺失,当与无所述至少一个取代、添加或缺失的对应FGF-21的水溶性相比时或与如SEQ ID NO:1、201的FGF-21多肽或另一未修饰的或修饰的FGF-21多肽的比较剂化合物相比时。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含增加宿主细胞中产生的修饰的FGF-21多肽的溶解度的至少一个取代、添加或缺失,当与无所述至少一个取代、添加或缺失的对应FGF-21的溶解度相比时或与如SEQ ID NO:1、201的FGF-21多肽或另一未修饰的或修饰的FGF-21多肽的比较剂化合物相比时。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含增加修饰的FGF-21多肽在宿主细胞中的表达或增加体外合成的至少一个取代、添加或缺失,当与无所述至少一个取代、添加或缺失的对应FGF-21的表达或合成相比时或与如SEQ ID NO:1、201的FGF-21多肽或另一未修饰的或修饰的FGF-21多肽的比较剂化合物相比时。包含此取代的修饰的FGF-21多可保持激动剂活性且保持或改进在宿主细胞中的表达水平。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含增加修饰的FGF-21多肽的蛋白酶抗性或减少蛋白酶裂解(如C末端氨基酸裂解)的至少一个取代、添加或缺失,当与无所述至少一个取代、添加或缺失的对应FGF-21的蛋白酶抗性相比时或与如SEQ ID NO:1、201的FGF-21多肽或另一未修饰的或修饰的FGF-21多肽的比较剂化合物相比时。美国专利No.6,716,626指示可被取代以改变蛋白酶裂解的潜在位点包括但不限于脯氨酸的2个残基内的单碱基位点。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含调节修饰的FGF-21受体的信号转导活性的至少一个取代、添加或缺失,当与无所述至少一个取代、添加或缺失的对应FGF-21多肽相互作用时的受体活性相比时或与如SEQ ID NO:1、201的FGF-21多肽或另一未修饰的或修饰的FGF-21多肽的比较剂化合物相比时。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含调节其与另一分子(如受体)的结合的至少一个取代、添加或缺失,当与无所述至少一个取代、添加或缺失

的对应FGF-21多肽的结合相比时或与如SEQ ID NO:1、201的FGF-21多肽或另一未修饰的或修饰的FGF-21多肽的比较剂化合物相比时。

[0321] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含增加修饰的FGF-21多肽与制药防腐剂(例如间甲酚、苯酚、苯甲醇)的相容性的至少一个取代、添加或缺失,当与无所述至少一个取代、添加或缺失的对应FGF-21多肽的相容性相比时或与如SEQ ID NO:1、201的FGF-21多肽或另一未修饰的或修饰的FGF-21多肽的比较剂化合物相比时。此增加的相容性能够制备在存储期间维持蛋白质的生物化学特性及生物活性的储存药物配制物。通过提述以其整体并入本文的W0 2005/091944论述了具有增强的药理学稳定性的FGF-21突变蛋白的如下实例:用带电和/或极性但不带电的氨基酸取代如下之一:W0 05/091944的SEQ ID NO:1的甘氨酸42、谷氨酰胺54、精氨酸77、丙氨酸81、亮氨酸86、苯丙氨酸88、赖氨酸122、组氨酸125、精氨酸126、脯氨酸130、精氨酸131、亮氨酸139、丙氨酸145、亮氨酸146、异亮氨酸152、丙氨酸154、谷氨酰胺156、甘氨酸161、丝氨酸163、甘氨酸170或丝氨酸172。本发明的修饰的FGF-21多肽可包括在多肽中的对应位置处的这些取代的至少一项和/或可包括一个或多个其他取代、添加或缺失。在一些实施方案中,如下位置的一项或多项处的一个或多个非天然氨基酸被取代:甘氨酸42、谷氨酰胺54、精氨酸77、丙氨酸81、亮氨酸86、苯丙氨酸88、赖氨酸122、组氨酸125、精氨酸126、脯氨酸130、精氨酸131、亮氨酸139、丙氨酸145、脯氨酸/亮氨酸146、异亮氨酸152、丙氨酸154、谷氨酰胺156、甘氨酸161、丝氨酸163、甘氨酸170、丝氨酸172(与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7中的对应氨基酸)。在一些实施方案中,如下位置的一项或多项处的一个或多个非天然氨基酸被取代:谷氨酸91、精氨酸131、谷氨酰胺108、精氨酸77、精氨酸72、组氨酸87、亮氨酸86、精氨酸126、谷氨酸110、酪氨酸83、脯氨酸146、精氨酸135、精氨酸96、精氨酸36(与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7中的对应氨基酸)。

[0322] W0 05/091944描述了具有增强的药理学稳定性的FGF-21的额外突变蛋白质。此类突变蛋白质包括FGF-21中如下二项或更多项的半胱氨酸的取代(参见W0 05/091944的SEQ ID NO:1):精氨酸19、酪氨酸20、亮氨酸21、酪氨酸22、苏氨酸23、天冬氨酸24、天冬氨酸25、丙氨酸26、谷氨酰胺27、谷氨酰胺28、丙氨酸31、亮氨酸33、异亮氨酸35、亮氨酸37、缬氨酸41、甘氨酸42、甘氨酸43、谷氨酸50、谷氨酰胺54、亮氨酸58、缬氨酸62、亮氨酸66、甘氨酸67、赖氨酸69、精氨酸72、苯丙氨酸73、谷氨酰胺76、精氨酸77、天冬氨酸79、甘氨酸80、丙氨酸81、亮氨酸82、甘氨酸84、丝氨酸85、脯氨酸90、丙氨酸92、丝氨酸94、苯丙氨酸95、亮氨酸100、天冬氨酸盐102、酪氨酸104、酪氨酸107、丝氨酸109、谷氨酸酯110、脯氨酸115、组氨酸117、亮氨酸118、脯氨酸119、天冬酰胺121、赖氨酸122、丝氨酸123、脯氨酸124、组氨酸125、精氨酸126、天冬氨酸127、丙氨酸129、脯氨酸130、甘氨酸132、丙氨酸134、精氨酸135、亮氨酸137、脯氨酸138或亮氨酸139。本发明的修饰的FGF-21多肽可包括在多肽中的对应位置的这些取代的至少一项和/或可包括一个或多个其他取代、添加或缺失。

[0323] W0 05/091944进一步描述,除Cys75-Cys93处天然存在的突变蛋白质以外,具有工程化的二硫键(用半胱氨酸取代的氨基酸)的FGF-21的特异性突变蛋白质为如下:Gln76Cys-Ser109Cys、Cys75-Ser85Cys、Cys75-Ala92Cys、Phe73Cys-Cys93、Ser123Cys-His125Cys、Asp102Cys-Tyr104Cys、Asp127Cys-Gly132Cys、Ser94Cys-Glu110Cys、Pro115Cys-His117Cys、Asn121Cys-Asp127Cys、Leu100Cys-Asp102Cys、Phe95Cys-

Tyr107Cys、Arg19CysPro138Cys、Tyr20Cys-Leu139Cys、Tyr22Cys-Leu137Cys、Arg77Cys-Asp79Cys、Pro90Cys-Ala92Cys、Glu50Cys-Lys69Cys、Thr23Cys-Asp25Cys、Ala31Cys-Gly43Cys、Gln28Cys-Gly43Cys、Thr23Cys-Gln28Cys、Val41Cys-Leu82Cys、Leu58Cys-Val62Cys、Gln54Cys-Leu66Cys、Ile35Cys-Gly67Cys、Gly67Cys-Arg72Cys、Ile35Cys-Gly84Cys、Arg72Cys-Gly84Cys、或Arg77Cys-Ala81Cys，其中编号基于W0 05/091944的SEQ ID NO:1。具有工程化的二硫键的其他突变蛋白质为Tyr22Cys-Leu139Cys；Asp24Cys-Arg135Cys；Leu118Cys-Gly132Cys；His117Cys-Pro130Cys；His117Cys-Ala129Cys；Leu82Cys-Pro119Cys；Gly80Cys-Ala129Cys；Gly43Cys-Pro124Cys；Gly42Cys-Arg126Cys；Gly42Cys-Pro124Cys；Gln28Cys-Pro124Cys；Gln27Cys-Ser123Cys；Ala26Cys-Lys122Cys；或Asp25Cys-Lys122Cys，其中编号基于W0 05/091944的SEQ ID NO:1。具有工程化的二硫键的其他突变蛋白质为Leu118Cys-Ala134Cys；Leu21Cys-Leu33Cys；Ala26Cys-Lys122Cys；Leu21Cys-Leu33Cys/Leu118Cys-Ala134Cys，其中编号基于W0 05/091944的SEQ ID NO:1。本发明的修饰的FGF-21多肽可包括在多肽中的对应位置的这些取代的一项或多项和/或可包括一个或多个其他取代、添加或缺失。

[0324] W0 05/091944描述了聚乙二醇化的FGF-21的额外突变蛋白质。这些突变蛋白质具有如下取代之一：D25C、D38C、L58C、K59C、P60C、K69C、D79C、H87C、E91C、E101C、D102C、L114C、L116C、K122C、R126C、P130C、P133C、P140C。W0 05/091944描述了如下位置处的半胱氨酸取代：19、21、26、28、29、30、36、39、42、50、56、61、64、65、68、70、71、77、81、85、86、90、92、94、98、107、108、112、113、123和124。W0 05/091944指示了如下位置处的半胱氨酸取代：24、27、37、40、44、46、49、57、88、89、106、110、111、115、120和139。W0 05/091944还描述了如下位置处的半胱氨酸取代：18、45、47、48、78、83、99、103、125、128、131、132和138。W0 05/091944还描述了如下位置处的半胱氨酸取代：25、38、58、59、60、69、79、87、91、101、102、114、116、122、126、130、133和140。

[0325] 本发明的修饰的FGF-21多肽可包括前述在多肽中的对应位置的取代的一项或多项和/或可包括一个或多个其他取代、添加或缺失。本文还提供包含经调配用于本文所描述的方法的修饰的FGF-21多肽和药学上可接受的载剂或赋形剂的组合物。

[0326] 在本发明的一些实施方案中，具有至少一个非天然氨基酸的修饰的FGF-21多肽包括至少一个翻译后修饰。在一些实施方案中，翻译后修饰在体外完成。在一些实施方案中，翻译后修饰在真核细胞中或在非真核细胞中在体内完成。

[0327] 在一些实施方案中，蛋白包括至少一个由一个宿主细胞体内完成的翻译后修饰，其中所述翻译后修饰通常不由另一个宿主细胞类型完成。在一些实施方案中，蛋白包括至少一个由真核细胞体内完成的翻译后修饰，其中所述翻译后修饰通常不由非真核细胞完成。翻译后修饰的实例包括但不限于糖基化、乙酰化、酰化、脂质修饰、棕榈酰化、棕榈酸酯基添加、磷酸化、糖脂键修饰等等。在一些实施方案中，本发明的蛋白或多肽可包含分泌或定位序列、表位标签、FLAG标签、多聚组氨酸标签、GST融合等等。

[0328] 本发明还提供PEG衍生物的水溶性和水解稳定性衍生物以及具有一个或多个乙炔或叠氮部分的相关亲水性聚合物。含有乙炔部分的PEG聚合物衍生物对与已响应于选择密码子以选择性方式引入至蛋白质中的叠氮部分偶联具有高选择性。类似地，含有叠氮部分的PEG聚合物衍生物对与已响应于选择密码子以选择性方式引入至蛋白质中的乙炔部分偶

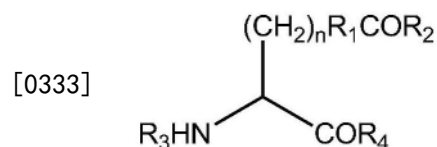
联具有高选择性。

[0329] 更具体而言,叠氮部分包括但不限于烷基叠氮化物、芳基叠氮化物和这些叠氮化物的衍生物。烷基和芳基叠氮化物的衍生物可包括其他取代基,只要维持乙炔特异性反应性即可。乙炔部分包含烷基和芳基乙炔及各自的衍生物。烷基及芳基乙炔的衍生物可包括其他取代基,只要维持叠氮特异性反应性即可。

[0330] 本发明提供具有多种官能团、取代基或部分的物质与其他物质的缀合物,所述其他物质包括但不限于标记;染料;聚合物;水溶性聚合物;聚乙二醇的衍生物;光交联剂;放射性核素;细胞毒性化合物;药物;亲和力标记;光亲和力标记;反应性化合物;树脂;第二蛋白或多肽或多肽类似物;抗体或抗体片段;金属螯合剂;辅因子;脂肪酸;糖类;多核苷酸;DNA;RNA;反义多核苷酸;糖;水溶性树状聚合物;环糊精;抑制性核糖核酸;生物材料;纳米粒子;自旋标记;荧光团;含金属的部分;放射性部分;新的官能团;与其他分子共价或非共价相互作用的基团;光笼化(photocaged)部分;光化辐射可激发的部分;可光致异构化部分;生物素;生物素衍生物;生物素类似物;并入重原子的部分;可化学裂解的基团;可光裂解的基团;延长的侧链;碳连接的糖;氧化还原活性剂;氨基硫代酸;毒性部分;经同位素标记的部分;生物物理探针;磷光基团;化学发光基团;电子致密基团;磁性基团;插入基团;发色团;能量转移剂;生物活性剂;可检测标记;小分子;量子点;纳米传递剂(nanotransmitter);放射性核苷酸;放射性传递剂(radiotransmitter);中子捕获剂;或上述物质的任何组合,或任何其他所需化合物或物质。本发明还包括具有叠氮或乙炔部分的物质与具有相应乙炔或叠氮部分的PEG聚合物衍生物的缀合物。例如,含有叠氮部分的PEG聚合物可与生物活性分子在含有带有乙炔官能团的非遗传编码氨基酸的蛋白中的位置处偶联。偶联PEG和生物活性分子的键包括但不限于Huisgen[3+2]环加成产物。

[0331] 在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸包含羰基、乙酰基、氨基氧基、胍基、酰胍基、氨基脒基、叠氮基或炔基。

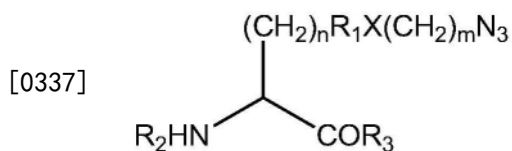
[0332] 在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸包含羰基。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸具有如下结构:



[0334] 其中n为0-10;R₁为烷基、芳基、取代的烷基或取代的芳基;R₂为H、烷基、芳基、取代的烷基和取代的芳基;且R₃为H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,且R₄为H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。

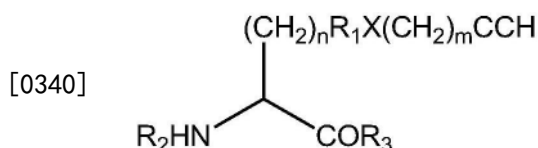
[0335] 在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸包含氨基氧基。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸包含酰胍基。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸包含胍基。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸包含氨基脒基。

[0336] 在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸残基包含叠氮基。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸具有如下结构:



[0338] 其中n为0-10;R₁为烷基、芳基、取代的烷基、取代的芳基或不存在;X为O、N、S或不存在;m为0-10;R₂为H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,且R₃为H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。

[0339] 在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸包含炔基。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸具有如下结构:



[0341] 其中n为0-10;R₁为烷基、芳基、取代的烷基或取代的芳基;X为O、N、S或不存在;m为0-10;R₂为H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,且R₃为H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。

[0342] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可以是激动剂、部分激动剂、拮抗剂、部分拮抗剂或反向激动剂。在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽包含连接至水溶性聚合物的非天然编码的氨基酸。在一些实施方案中,水溶性聚合物包含聚(乙二醇)部分。

[0343] 本发明还提供包含在严格条件下与SEQ ID NO:8-14杂交的多核苷酸的分离核酸。本发明还提供包含在严格条件下与SEQ ID NO:8-14杂交的多核苷酸的分离核酸,其中所述多核苷酸包含至少一个选择密码子。本发明还提供包含编码如SEQ ID NO:1-7所示多肽或本文所述的修饰的FGF-21多肽的多核苷酸的分离核酸。在一些实施方案中,本文所述的分离的多核苷酸包含至少一个选择密码子,例如编码所述修饰的FGF-21多肽中所含的非天然编码的氨基酸的选择密码子。

[0344] 在一些实施方案中,选择密码子选自下组:琥珀密码子(amber codon)、赭石密码子(ochre codon)、乳白密码子(opal codon)、独特密码子、稀有密码子、五碱基密码子和四碱基密码子。

[0345] 本发明还提供制备与水溶性聚合物连接的修饰的FGF-21多肽的方法。在一些实施方案中,该方法包括使包含非天然编码的氨基酸的分离的修饰的FGF-21多肽与包含与非天然编码的氨基酸反应的部分的水溶性聚合物接触。在一些实施方案中,并入至修饰的FGF-21多肽中的非天然编码的氨基酸对水溶性聚合物具有反应性,所述水溶性聚合物则对20种常见氨基酸的任一种均不具反应性。在一些实施方案中,并入至修饰的FGF-21多肽中的非天然编码的氨基酸对接头、聚合物或生物活性分子具有反应性,所述接头、聚合物或生物活性分子则对20种常见氨基酸的任一种均不具反应性。

[0346] 在一些实施方案中,连接至水溶性聚合物的修饰的FGF-21多肽通过使包含含羰基的氨基酸的经修饰的FGF-21多肽与包含氨基氧基、肼基、酰肼基或氨基脒基的接头、聚合物(如聚(乙二醇)分子)或生物活性分子反应制得。在一些实施方案中,氨基氧基、肼基、酰肼基或氨基脒基经由酰胺键连接至聚(乙二醇)分子。

[0347] 在一些实施方案中,连接至水溶性聚合物的修饰的FGF-21多肽通过使包含羰基的聚(乙二醇)分子与包含含氨基氧基、肼基、酰肼基或氨基脒基的非天然编码的氨基酸的多

肽反应制得。

[0348] 在一些实施方案中,连接至水溶性聚合物的修饰的FGF-21多肽通过使包含含炔烃的氨基酸的经修饰的FGF-21多肽与包含叠氮部分的聚(乙二醇)分子反应而制得。在一些实施方案中,叠氮基或炔基经由酰胺键连接至聚(乙二醇)分子。

[0349] 在一些实施方案中,连接至水溶性聚合物的修饰的FGF-21多肽通过使包含含叠氮的氨基酸的修饰的FGF-21多肽与包含炔烃部分的聚(乙二醇)分子反应制得。在一些实施方案中,叠氮基或炔基经由酰胺键连接至聚(乙二醇)分子。

[0350] 在一些实施方案中,连接至修饰的FGF-21多肽的水溶性聚合物包含聚烷撑二醇部分。在一些实施方案中,并入至修饰的FGF-21多肽中的非天然编码的氨基酸残基包含羰基、氨基氧基、酰肼基、肼、氨基脒基、叠氮基或炔基。在一些实施方案中,并入至修饰的FGF-21多肽中的非天然编码的氨基酸残基包含羰基部分,且水溶性聚合物包含氨基氧基、酰肼、肼或氨基脒部分。在一些实施方案中,并入至修饰的FGF-21多肽中的非天然编码的氨基酸残基包含炔烃部分且水溶性聚合物包含叠氮部分。在一些实施方案中,并入至修饰的FGF-21多肽中的非天然编码的氨基酸残基包含叠氮部分且水溶性聚合物包含炔烃部分。

[0351] 本发明还提供多核苷酸的细胞,所述多核苷酸编码包含选择密码子的修饰的FGF-21多肽。在一些实施方案中,所述细胞包含正交RNA合成酶和/或正交tRNA,用于将非天然编码的氨基酸取代至修饰的FGF-21多肽中。

[0352] 本发明还提供制备包含非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21多肽的方法。在一些实施方案中,该方法包括在允许修饰的FGF-21多肽表达的条件下培养包含编码修饰的FGF-21多肽的多核苷酸、正交RNA合成酶和/或正交tRNA的细胞;并且从所述细胞和/或培养基纯化修饰的FGF-21多肽。

[0353] 本发明范围内包括与修饰的FGF-21编码区接合(joined to)的FGF-21前导或信号序列,以及与修饰的FGF-21编码区接合的异源信号序列。所选的异源前导或信号序列应当是被识别并由例如宿主细胞分泌系统处理以分泌并可能由宿主细胞通过信号肽酶裂解的前导或信号序列。本发明的前导序列可选自如下:来自SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:6的三个亮氨酸前导子(氨基酸位置1-28)、来自SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:7的两个亮氨酸前导子(氨基酸位置1-27)、来自SEQ ID NO:2的His标签(氨基酸位置1-10)、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44。一种用本发明的修饰的FGF-21治疗病况或病症的方法意在暗示用有或无信号肽或前导肽的修饰的FGF-21多肽治疗。

[0354] 本发明还提供诱导脂肪细胞中的葡萄糖摄取增加的方法,该方法包括向所述细胞施用有效诱导葡萄糖摄取增加的量的修饰的FGF-21。所述葡萄糖摄取增加可通过更快且更有效的葡萄糖利用引起能量消耗增加。

[0355] II. 用于本发明的修饰的FGF-21多肽的通用重组核酸和方法

[0356] 在本发明的许多实施方案中,可分离、克隆且通常使用重组方法改变所编码感兴趣的修饰的FGF-21多肽的核酸。此类实施方案可用于包括但不限于蛋白表达或在变体、衍生物、表达盒或衍生自修饰的FGF-21多肽的其他序列的产生过程中。在一些实施方案中,编码本发明的修饰的FGF-21多肽的序列可操作性地连接至异源启动子。在一些实施方案中,使用本领域中熟知的技术,可针对大肠杆菌或哺乳动物细胞(例如CHO)表达来优化编码修

饰的FGF-21多肽的多核苷酸序列中的DNA密码子使用。

[0357] 编码无前导序列的P型FGF-21的例示性cDNA示于SEQ ID NO:8。此多肽示于SEQ ID NO:1。

[0358] 编码无前导序列的His标记的P型FGF-21的例示性cDNA示于SEQ ID NO:9。此多肽示于SEQ ID NO:2。

[0359] 编码含有总计3个亮氨酸的有前导序列的P型FGF-21的例示性cDNA示于SEQ ID NO:10。此多肽示于SEQ ID NO:3。

[0360] 编码含有总计2个亮氨酸的有前导序列的P型FGF-21的例示性cDNA示于SEQ ID NO:11。此多肽示于SEQ ID NO:4。

[0361] 编码无前导序列的L型FGF-21的例示性cDNA示于SEQ ID NO:12。此多肽示于SEQ ID NO:5。

[0362] 编码含有总计3个亮氨酸的有前导序列的L型FGF-21的例示性cDNA示于SEQ ID NO:13。此多肽示于SEQ ID NO:6。

[0363] 编码含有总计2个亮氨酸的有前导序列的L型FGF-21的例示性cDNA示于SEQ ID NO:14。此多肽示于SEQ ID NO:7。

[0364] 编码本文所述的修饰的FGF-21多肽的核苷酸序列可基于亲本多肽的氨基酸序列合成,包括但不限于具有SEQ ID NO:1-7中所示的氨基酸序列,然后改变核苷酸序列以实现相关氨基酸残基的引入(即并入或取代)或移除(即缺失或取代)。核苷酸序列可方便地根据常规方法通过定点诱变来修饰。或者,核苷酸序列可通过化学合成来制备,包括但不限于通过使用寡核苷酸合成仪,其中寡核苷酸基于所需多肽的氨基酸序列来设计,并优选为选择在生产重组多肽的宿主细胞中有利的那些密码子。例如,若干编码所需多肽的一部分的小寡核苷酸可通过PCR、连接或连接链式反应合成并组装。参见例如Barany等, Proc.Natl.Acad.Sci.88:189-193(1991);美国专利6,521,427,其通过提述并入本文。

[0365] 本发明还涉及用于经由正交tRNA/RS对在体内并入非天然氨基酸的真核宿主细胞、非真核宿主细胞和生物体。宿主细胞用本发明的多核苷酸或包括本发明的多核苷酸的构建体进行遗传工程化(包括但不限于转化、转导或转染),其包括但不限于本发明的载体,其可以是例如克隆载体或表达载体。例如,正交tRNA、正交tRNA合成酶和待衍生化的蛋白的编码区可操作性地连接至在所需宿主细胞中发挥功能的基因表达控制元件。载体可以是例如呈质粒、粘粒、噬菌体、细菌、病毒、裸多核苷酸或缀合多核苷酸的形式。可通过标准方法将载体引入至细胞和/或微生物中。

[0366] 选择密码子(Selectorcodons)

[0367] 本发明的选择密码子扩大了蛋白质生物合成机器的遗传密码子框架。例如,选择密码子包括但不限于独特的三碱基密码子、无义密码子(如终止密码子,包括但不限于琥珀密码子(UAG)、赭石密码子或乳白密码子(UGA))、非天然密码子、四个或四个以上碱基密码子、稀有密码子,等等。本领域普通技术人员显而易见,有广泛数量的选择密码子可引入至所需基因或多核苷酸中,包括但不限于单个多核苷酸中的一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、4、5、6、7、8、9、10或更多个,其编码修饰的FGF-21多肽的至少一部分。

[0368] 在一个实施方案中,该方法涉及使用选择密码子,其是用于体内并入一个或多个非天然(即非天然编码的)氨基酸的终止密码子。例如,生产识别终止密码子(包括但不限于

UAG)的O-tRNA,并通过具有所需非天然氨基酸的O-RS将其氨基酰化。此O-tRNA不被天然存在的宿主的氨基酰基-tRNA合成酶识别。常规定点突变诱导可用于在感兴趣的多肽中的感兴趣的位点处引入终止密码子,包括但不限于TAG。参见例如Sayers,J.R.等,(1988),5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis.Nucleic Acids Res.,16:791-802。当O-RS、O-tRNA和编码感兴趣的多肽的核酸在体内组合时,非天然氨基酸响应于UAG密码子而并入,从而得到在指定位置含有非天然氨基酸的多肽。

[0369] 可在不显著干扰真核宿主细胞的情况下于体内并入非天然氨基酸。例如,因为UAG密码子的抑制效率取决于O-tRNA(包括但不限于琥珀抑制子tRNA)与真核释放因子(包括但不限于eRF)(其与终止密码子结合且起始生长肽从核糖体释放)之间的竞争,抑制效率可通过包括但不限于增加O-tRNA和/或抑制子tRNA的表达水平来调节。

[0370] 还可使用稀有密码子编码非天然氨基酸。例如,当体外蛋白质合成反应中的精氨酸浓度降低时,已证实稀有精氨酸密码子AGG可通过用丙氨酸酰化的合成tRNA来有效插入Ala。参见例如Ma等,Biochemistry,32:7939(1993)。在此情况下,合成tRNA与天然存在的tRNA^{Arg}竞争,后者作为次要物种存在于大肠杆菌中。一些生物体并不使用所有的三联体密码子。嗜黄微球菌(*Micrococcus luteus*)中的未指定密码子AGA已用于体外转录/翻译提取物中的氨基酸插入。参见例如Kowal及Oliver,Nucl. Acid. Res.,25:4685(1997)。可生产本发明的组分以体内使用这些稀有密码子。

[0371] 选择密码子还包含延长密码子,包括但不限于四个或更多个碱基的密码子,如四个、五个、六个或六个以上碱基的密码子。四碱密码子的实例包括但不限于AGGA、CUAG、UAGA、CCCU等。五碱密码子的实例包括但不限于AGGAC、CCCCU、CCCUC、CUAGA、CUACU、UAGGC等。本发明的特征包括使用基于移码抑制的延长的密码子。四个或更多个碱基的密码子可将(包括但不限于)一个或多个非天然氨基酸插入至同一蛋白中。例如,在存在突变O-tRNA(包括但不限于具有反密码子环,例如具有至少8-10nt反密码子环的特定移码抑制子tRNA)的情况下,将四个或更多个碱基的密码子读为单个氨基酸。在其他实施方案中,反密码子环可解码(包括但不限于)至少一个四碱基密码子、至少一个五碱基密码子或至少一个六碱基密码子或更多。因为存在256个可能的四碱基密码子,故可以在同一细胞中使用四个或更多个碱基的密码子编码多个非天然氨基酸。

[0372] 在一个实施方案中,可在本发明中使用基于稀有密码子或无义密码子的延长密码子,其可以减少其他不合需要的位点处的错义连读和移码抑制。

[0373] 对于给定系统,选择密码子还可包括天然的三碱基密码子之一,其中内源系统不使用(或很少使用)天然碱基密码子。例如,其包括缺乏识别天然三碱基密码子的tRNA的系统和/或三碱基密码子是稀有密码子的系统。

[0374] 选择密码子任选地包括非天然碱基对。这些非天然碱基对进一步扩充现有遗传密码代号。一个额外碱基对使三联体密码子的数量从64增加至125。第三碱基对的特性包括稳定和选择性碱基配对、通过聚合酶在高保真度下有效酶促并入至DNA中及在新生非天然碱基对的合成后的有效持续引物延伸。可适用于方法及组合物的非天然碱基对的描述包括例如Hirao等,(2002),Nature Biotechnology,20:177-182。还参见Wu,Y等,(2002)J. Am. Chem. Soc.124:14626-14630。

[0375] 可使用本领域普通技术人员已知及本文所述的方法诱变编码感兴趣的蛋白或多肽(如修饰的FGF-21多肽)的基因以使其包括例如一个或多个用于并入非天然氨基酸的选择密码子。例如,诱变感兴趣的蛋白的核酸以使其包括一个或多个选择密码子,从而并入一个或多个非天然氨基酸。本发明包括任何此类变体,包括但不限于任何蛋白的突变体型式,例如包括至少一个非天然氨基酸。

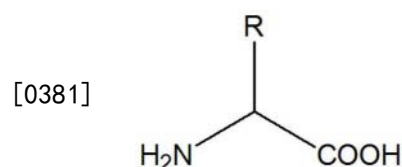
[0376] 编码感兴趣的蛋白(如修饰的FGF-21多肽)的核酸分子可容易地突变以在该多肽的任何所需位置引入半胱氨酸。半胱氨酸广泛用以将反应性分子、水溶性聚合物、蛋白或多种其他分子引入至感兴趣的蛋白上。

[0377] III. 非天然编码的氨基酸

[0378] 多种非天然编码的氨基酸适用于本发明。可将任何数量的非天然编码的氨基酸引入至修饰的FGF-21多肽中。一般地,引入的非天然编码的氨基酸对20种常见的遗传编码的氨基酸(即丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)基本上呈化学惰性。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸包含侧链官能团,其与20种常见氨基酸中没有的官能团(包括但不限于叠氮基、酮基、醛基和氨基氧基)有效和选择性地反应以形成稳定缀合物。例如,包含含有叠氮基官能团的非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21多肽可与聚合物(包括但不限于聚(乙二醇)或者含有炔基部分的第二多肽)反应以形成稳定缀合物,由叠氮基与炔基官能团的选择性反应以形成Huisgen[3+2]环加成产物得到。

[0379] α -氨基酸的通用结构如下(式I)所示:

[0380] I

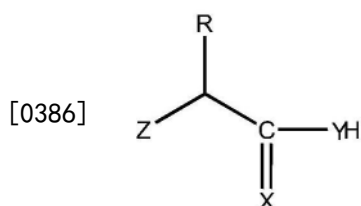


[0382] 非天然编码的氨基酸通常是具有以上所列举的式的任何结构,其中R基团是除用于二十个天然氨基酸中的取代基外的任何取代基,且可适用于本发明的修饰的FGF-21多肽中。因为本发明的非天然编码的氨基酸与天然氨基酸的不同于通常仅在于侧链结构,所以非天然编码的氨基酸与其他氨基酸(包括但不限于天然或非天然编码的氨基酸)形成酰胺键,其形成的方式与它们在天然存在的多肽中形成的方式相同。然而,非天然编码的氨基酸的侧链基团将其与天然氨基酸区分开来。例如,R任选地包括烷基-、芳基-、酰基-、酮基-、叠氮基-、羟基-、胍、氰基-、卤素-、酰肼、烯基、炔基、醚、硫醇、硒-、磺酰-、硼酸酯基(borate)、硼酸酯基(boronate)、磷酸基、膦酰基、膦化氢(phosphine)、杂环、烯酮(enone)、亚胺、醛、酯、硫代酸、羟胺、氨基等等或其任何组合。

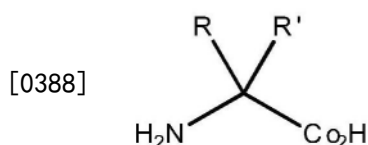
[0383] 可适用于本发明且适用于与水溶性聚合物反应的例示性非天然编码的氨基酸包括但不限于具有羰基、氨基氧基、胍、酰肼、氨基脒、叠氮和炔基反应性基团的那些氨基酸。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸含糖部分。此类氨基酸的实例包括N-乙酰基-L-葡萄糖氨基-L-丝氨酸、N-乙酰基-L-半乳糖氨基-L-丝氨酸、N-乙酰基-L-葡萄糖氨基-L-苏氨酸、N-乙酰基-L-葡萄糖氨基-L-天冬酰胺和O-甘露糖氨基-L-丝氨酸。

[0384] 多种本文提供的非天然编码的氨基酸可购自例如Sigma-Aldrich (St.Louis,MO, USA)、Novabiochem (EMD Biosciences的分公司, Darmstadt, Germany) 或Peptech (Burlington, MA, USA)。不能从商业上获得的那些氨基酸任选地如本文提供的或使用本领域普通技术人员已知的标准方法合成。对于有机合成技术, 参见例如Fessendon和Fessendon的Organic Chemistry (1982, 第二版, Willard Grant Press, Boston Mass.); March的Advanced Organic Chemistry (第三版, 1985, Wiley and Sons, New York); 和Carey和Sundberg的Advanced Organic Chemistry (第三版, A和B部分, 1990, Plenum Press, New York)。还参见美国专利No. 7,045,337和7,083,970, 其通过提述并入本文。除含有新的侧链的非天然氨基酸以外, 可适用于本发明的非天然氨基酸还任选地包含修饰的主链结构, 包括但不限于如式II和式III的结构所示的主链结构:

[0385] II



[0387] III



[0389] 其中Z通常包含OH、NH₂、SH、NH-R'或S-R'; X和Y, 其可为相同或不同的, 通常包含S或O, 且R和R', 其任选地是相同或不同的, 通常选自上文针对具有式I的非天然氨基酸所述的R基团的相同的组分列表, 以及氢。例如, 本发明的非天然氨基酸任选地包含如式II和III所示的氨基或羧基中的取代。此类型的非天然氨基酸包括但不限于α-羟基酸、α-硫代酸、α-氨基硫代羧酸, 包括但不限于具有与常见二十种天然氨基酸对应的侧链或非天然侧链的氨基酸。此外, 在α-碳处的取代任选地包括但不限于L、D或α-α-二取代氨基酸, 如D-谷氨酸、D-丙氨酸、D-甲基-0-酪氨酸、氨基丁酸等。其他结构性替代物包括环状氨基酸, 如脯氨酸类似物以及3、4、6、7、8及9元环脯氨酸类似物、β和γ氨基酸, 如取代的β-丙氨酸和γ-氨基丁酸。

[0390] 多种非天然氨基酸基于天然氨基酸, 如酪氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸等等, 且适用于本发明。酪氨酸类似物包括但不限于对位取代的酪氨酸、邻位取代的酪氨酸及间位取代的酪氨酸, 其中取代的酪氨酸包含 (包括但不限于) 酮基 (包括但不限于乙酰基)、苯甲酰基、氨基、肼、羟基胺、硫醇基、羧基、异丙基、甲基、C₆-C₂₀直链或支链烃、饱和或不饱和烃、0-甲基、聚醚基、硝基、炔基等等。此外, 还涵盖经多次取代的芳基环。可适用于本发明的谷氨酰胺类似物包括但不限于α-羟基衍生物、γ-取代的衍生物、环状衍生物及酰胺取代的谷氨酰胺衍生物。可适用于本发明的实例苯丙氨酸类似物包括但不限于对位取代的苯丙氨酸、邻位取代的苯丙氨酸和间位取代的苯丙氨酸, 其中所述取代基包含 (包括但不限于) 羟基、甲氧基、甲基、烯丙基、醛、叠氮基、碘基、溴基、酮基 (包括但不限于乙酰基)、苯甲酰基、炔基等。可适用于本发明的非天然氨基酸的具体实例包括但不限于对乙酰基-L-苯丙氨酸、0-甲基-L-酪氨酸、L-3-(2-萘基) 丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、0-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-

酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAc β -丝氨酸、L-Dopa、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对叠氨基-L-苯丙氨酸、对酰基-L-苯丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、L-磷酸丝氨酸、膦酰基丝氨酸、膦酰基酪氨酸、对碘-苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸和对炔丙氧基-苯丙氨酸等。

[0391] 在一个实施方案中,提供包含非天然氨基酸(如对(炔丙氧基)-苯丙氨酸)修饰的FGF-21多肽的组合物。还提供包含对(炔丙氧基)-苯丙氨酸及(包括但不限于)蛋白和/或细胞的各种组合物。在一个方面,包括对(炔丙氧基)-苯丙氨酸非天然氨基酸的组合物进一步包括正交tRNA。非天然氨基酸可结合(包括但不限于共价)至正交tRNA,包括但不限于经由氨基-酰基键共价结合至正交tRNA、共价结合至正交tRNA的末端核糖的3'OH或2'OH等。

[0392] 本文所述的修饰的FGF-21多肽可包含美国专利No.8,012,931中所述的非天然编码的氨基酸,其通过提述以其整体并入本文。

[0393] 非天然氨基酸的结构和合成:羰基、羰基样、掩蔽羰基(MASKED CARBONYL)、受保护的羰基和羟胺基团

[0394] 在一些实施方案中,本发明提供通过脲键连接至水溶性聚合物(例如PEG)的修饰的FGF-21。多种类型的非天然编码的氨基酸适用于形成脲键。这些氨基酸包括但不限于含有羰基、二羰基、羰基样、掩蔽羰基、受保护的羰基或羟胺基团的非天然编码的氨基酸。此类氨基酸、其结构及合成描述于美国专利No.8,012,931中,其通过提述以其整体并入本文。

[0395] IV. 非天然氨基酸的结构和合成:含羟胺的氨基酸

[0396] 美国临时专利申请No.60/638,418通过提述以其整体并入本文。因此,美国临时专利申请No.60/638,418中第V节(名称为“Non-natural Amino Acids Amino Acids”),B部分(名称为“Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids:Hydroxylamine-Containing Amino Acids”)中提供的公开内容完全适用于生产、纯化、表征及使用本文所述的非天然氨基酸、非天然氨基酸多肽和修饰的非天然氨基酸多肽的方法、组合物、技术及策略,其适用程度如同这些公开内容完全存在于本文中一般。美国专利公开No.2006/0194256、2006/0217532及2006/0217289和名称为“Compositions containing,methods involving,and uses of non-natural amino acids and polypeptides”的W02006/069246也通过提述以其整体并入本文。

[0397] 非天然氨基酸的化学合成

[0398] 许多适用于本发明的非天然氨基酸可购自例如Sigma(USA)或Aldrich(Milwaukee,WI,USA)。商业上不可获得的那些氨基酸任选地如本文中所提供的或如各种出版物中所提供的或使用本领域普通技术人员已知的标准方法来合成。对于有机合成技术,参见例如Fessendon和Fessendon的Organic Chemistry(1982,第二版,Willard Grant Press,Boston Mass.);March的Advanced Organic Chemistry(第三版,1985,Wiley and Sons,New York);和Carey和Sundberg的Advanced Organic Chemistry(第三版,部分A和B,1990,Plenum Press,New York)。描述非天然氨基酸合成的其他出版物包括例如名称为“In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids”的W0 2002/085923;Matsoukas等,(1995) J.Med.Chem.,38,4660-4669;King,F.E.和Kidd,D.A.A.(1949) A New Synthesis of Glutamine and of γ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J.Chem.Soc.,3315-3319;Friedman,O.M.和Chatterrji,R.(1959)

Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3750-3752; Craig, J. C. 等 (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4[[4- (diethylamino) -1-methylbutyl]amino]quinolone (Chloroquine). *J. Org. Chem.* 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmon, M. 和 Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, *Eur. J. Med. Chem.* 26, 201-5; Koskinen, A. M. P. 和 Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. *J. Org. Chem.* 54, 1859-1866; Christie, B. D. 和 Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. *J. Org. Chem.* 50:1239-1246; Barton 等, (1987) Synthesis of Novel α -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- α -Amino-Adipic Acids, L- α -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. *Tetrahedron* 43:4297-4308; 和 Subasinghe 等, (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. *J. Med. Chem.* 35:4602-7. 还参见名为“Protein Arrays”的美国专利公开 No. U.S. 2004/0198637, 其通过提述并入本文。

[0399] A. 羰基反应性基团

[0400] 具有羰基反应性基团的氨基酸允许多种反应以经由亲核加成或醇醛缩合反应 (除其他之外) 连接分子 (包括但不限于 PEG 或其他水溶性分子)。

[0401] 对乙酰基- (+/-) - 苯丙氨酸和间乙酰基- (+/-) - 苯丙氨酸的合成描述于 Zhang, Z. 等, *Biochemistry* 42:6735-6746 (2003) 中, 其通过提述并入本文。其他含羰基的氨基酸可由本领域普通技术人员类似地制备。

[0402] 在一些实施方案中, 包含非天然编码的氨基酸的修饰的 FGF-21 多肽可经化学修饰产生反应性羰基官能团。例如, 可由具有相邻氨基及羟基的官能团产生适用于结合反应的醛官能团。例如, 当生物活性分子是多肽时, 可使用 N 末端丝氨酸或苏氨酸 (其可正常存在或可经由化学或酶促消化而暴露) 在使用过碘酸盐的温和氧化裂解条件下产生醛官能团。参见例如 Gaertner 等, *Bioconjug. Chem.* 3:262-268 (1992); Geoghegan, K. 和 Stroth, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner 等, *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994)。然而, 本领域中已知的方法局限于肽或蛋白的 N 末端处氨基酸。

[0403] 在本发明中, 带有相邻羟基和氨基的非天然编码的氨基酸可并入至多肽中作为“掩蔽”醛官能团。例如, 5-羟基赖氨酸在邻近 ϵ 胺处带有羟基。用于产生醛的反应条件通常涉及在温和条件下添加摩尔浓度过量的偏过碘酸钠, 以避免在多肽内的其他位点发生氧化。氧化反应的 pH 值通常是约 7.0。典型反应涉及将约 1.5 摩尔浓度过量的偏过碘酸钠添加至多肽缓冲溶液中, 随后在暗处温育约 10 分钟。参见例如美国专利 No. 6,423,685, 其通过提述并入本文。

[0404] 羰基官能团可在水溶液中在温和条件下以选择性方式与含有肼、酰肼、羟胺或氨基脲的试剂反应, 以分别形成在生理条件下稳定的相应腙、肟或缩氨基脲键。参见例如 Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. 和 Tam, J. P.,

J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)。此外,羰基的独特反应性允许在存在其他氨基酸侧链的情况下进行选择修饰。参见例如Cornish, V.W.等, J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K.F. 和 Stroh, J.G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal, L.K. 等, Science 276:1125-1128 (1997)。

[0405] B. 肼、酰肼或氨基脒反应性基团

[0406] 含有亲核基团(如肼、酰肼或氨基脒)的非天然编码的氨基酸可与多种亲电子基团反应以形成缀合物(包括但不限于与PEG或其他水溶性聚合物)。

[0407] 含酰肼、含肼和含氨基脒的氨基酸可购自商业来源。例如, L-谷氨酸- γ -酰肼可购自Sigma Chemical (St. Louis, MO)。其他商业上不可获得的氨基酸可由本领域普通技术人员制备。参见例如美国专利No. 6,281,211,其通过提述并入本文。

[0408] 含有带有酰肼、肼或氨基脒官能团的非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21多肽可与含有醛或具有类似化学反应性的其他官能团的多种分子有效和选择性地反应。参见例如Shao, J. 和 Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)。酰肼、肼和氨基脒官能团的独特反应性使其对醛、酮及其他亲电子基团的反应性显著大于20种常见氨基酸上存在的亲核基团(包括但不限于丝氨酸或苏氨酸的羟基或赖氨酸的氨基及N末端)。

[0409] C. 含氨基氧基的氨基酸

[0410] 含有氨基氧基(也称为羟胺)的非天然编码的氨基酸允许其与多种亲电子基团反应以形成缀合物(包括但不限于与PEG或其他水溶性聚合物)。与肼、酰肼和氨基脒相似地,氨基氧基的增强的亲核性允许其与多种含有醛或具有类似化学反应性的其他官能团的分子有效和选择性地反应。参见例如Shao, J. 和 Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995); H. Hang 和 C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34:727-736 (2001)。鉴于与肼基团反应的结果是对应的脎,然而,脎一般由氨基氧基与含羰基的基团(如酮)的反应产生。

[0411] 可由容易获得的氨基酸前体(高丝氨酸、丝氨酸和苏氨酸)制备含氨基氧基的氨基酸。参见例如M. Carrasco 和 R. Brown, J. Org. Chem. 68:8853-8858 (2003)。已从天然来源中分离出一些含氨基氧基的氨基酸,如L-2-氨基-4-(氨基氧基)丁酸(Rosenthal, G., Life Sci. 60:1635-1641 (1997))。其他含氨基氧基的氨基酸可由本领域普通技术人员制备。

[0412] D. 叠氮和炔烃反应性基团

[0413] 叠氮和炔烃官能团的独特反应性使得其极其适用于多肽及其他生物分子的选择性修饰。有机叠氮化物,具体而言脂肪族叠氮化物,和炔烃通常对常见化学反应条件是稳定的。具体而言,叠氮和炔烃官能团对见于天然存在的多肽中的20种常见氨基酸的侧链(即R基团)是惰性的。然而,当使叠氮和炔基团紧密靠近时,表现出二者的“弹簧承载(spring-loaded)”性质且其通过Huisgen[3+2]环加成反应以选择性地且有效地反应以产生对应的三唑。参见例如Chin J.,等, Science 301:964-7 (2003); Wang, Q.,等, J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Chin, J.W.,等, J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002)。

[0414] 因为Huisgen环加成反应涉及选择性环加成反应(参见例如Padwa, A., COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS, 第4期, (Trost, B.M. 编, 1991), 第1069-1109页; Huisgen, R. 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY, (Padwa, A. 编, 1984), 第1-176页)而非亲核取代,带有含叠氮及炔烃侧链的非天然编码的氨基酸的并入使所得多肽在非天然编码的氨基酸的位置处被选择性修饰。涉及含叠氮或炔烃的修饰的FGF-21多肽的环加成反应

可在室温于水溶液条件下以催化量的使Cu(II)原位还原为Cu(I)的还原剂存在下通过添加Cu(II)(包括但不限于催化量的CuSO₄形式)进行。参见例如Wang, Q., 等, J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornøe, C. W., 等, J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, 等, Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002)。例示性的还原剂包括(包括但不限于)抗坏血酸盐、金属铜、奎宁、对苯二酚、维生素K、谷胱甘肽、半胱氨酸、Fe²⁺、Co²⁺和所施加的电势。

[0415] 在一些情况下,在需要叠氮与炔烃之间的Huisgen[3+2]环加成反应的情况下,修饰的FGF-21多肽可包含含炔烃部分的非天然编码的氨基酸,且待附接至氨基酸的水溶性聚合物可包含叠氮部分。或者,还可进行逆反应(即与氨基酸上的叠氮部分和存在于水溶性聚合物上的炔烃部分)。

[0416] 叠氮官能团还可选择性地与含有芳基酯的水溶性聚合物反应且由芳基酯部分适当官能化以产生酰胺键。芳基酯基团原位还原叠氮基且所得的胺接着与临近的酯键有效反应以产生对应的酰胺。参见例如E. Saxon和C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000)。含叠氮化物的氨基酸可为烷基叠氮化物(包括但不限于2-氨基-6-叠氮基-1-己酸)或芳基叠氮化物(对叠氮基-苯丙氨酸)。

[0417] 叠氮官能团还可选择性地与含有硫酯的水溶性聚合物反应且由芳基酯部分适当官能化以产生酰胺键。芳基酯基团原位还原叠氮基且所得的胺接着与硫酯键有效反应以产生对应的酰胺。

[0418] 含炔烃的氨基酸是商业上可获得的。例如,炔丙基甘氨酸可购自Peptech (Burlington, MA)。或者,含炔烃的氨基酸可根据标准方法制备。例如,对炔丙基氧基苯丙氨酸可按照例如Deiters, A., 等, J. Am. Chem. Soc. 125:11782-11783 (2003)中所述合成且4-炔基-L-苯丙氨酸可如Kayser, B., 等, Tetrahedron 53 (7):2475-2484 (1997)中所述合成。其他含炔烃氨基酸可由本领域普通技术人员制备。

[0419] 含叠氮基氨基酸可购自商业来源。例如,4-叠氮基苯丙氨酸可获自Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL)。对于商业上不可获得的那些含叠氮基氨基酸,叠氮基可使用本领域普通技术人员已知的标准方法相对容易地制备,包括但不限于经由合适的离去基团(包括但不限于卤化物、甲磺酸酯基、甲苯磺酸酯基)的移位(displacement)或经由打开受适当保护的内酯。参见例如March的Advanced Organic Chemistry (第三版, 1985, Wiley and Sons, New York)。

[0420] 可经由[3+2]环加成添加的本发明蛋白中的分子包括具有叠氮或炔基衍生物的几乎任何分子。分子包括但不限于染料、荧光团、交联剂、糖衍生物、聚合物(包括但不限于包含聚乙二醇的聚合物)、光交联剂、细胞毒性化合物、亲和标签、生物素衍生物、树脂、珠粒、第二蛋白或多肽(或更多)、多核苷酸(包括但不限于DNA、RNA等)、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、糖类等。可将这些分子添加至分别具有炔基(包括但不限于对炔丙基氧基苯丙氨酸)或叠氮基(包括但不限于对叠氮基-苯丙氨酸)的非天然氨基酸中。

[0421] E. 氨基硫醇反应性基团

[0422] β-取代的氨基硫醇官能团的独特反应性使其极其适用于通过形成噻唑烷而选择性修饰含有醛基的多肽和其他生物分子。参见例如J. Shao和J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899。在一些实施方案中,可以将β-取代的氨基硫醇氨基酸并入修饰的FGF-

21多肽中,接着与包含醛官能团的水溶性聚合物反应。在一些实施方案中,水溶性聚合物、药物缀合物或其他有效负载物(payload)可通过形成噻唑烷与包含 β 取代的氨基硫醇氨基酸的修饰的FGF-21多肽偶联。

[0423] F. 额外反应性基团

[0424] 可并入至本发明的修饰的FGF-21多肽中的额外反应性基团及非天然编码的氨基酸描述于如下专利申请中,其全部通过提述以其整体并入本文:美国专利公开No.2006/0194256、美国专利公开No.2006/0217532、美国专利公开No.2006/0217289、美国临时专利No.60/755,338;美国临时专利No.60/755,711;美国临时专利No.60/755,018;国际专利申请No.PCT/US06/49397;WO 2006/069246;美国临时专利No.60/743,041;美国临时专利No.60/743,040;国际专利申请No.PCT/US06/47822;美国临时专利No.60/882,819;美国临时专利No.60/882,500;和美国临时专利No.60/870,594。

[0425] 非天然氨基酸的细胞摄取

[0426] 细胞的非天然氨基酸摄取是在设计并选择非天然氨基酸(包括但不限于用于并入蛋白)时通常考虑的一个问题。例如, α -氨基酸的高电荷密度指示这些化合物不太可能是可穿透细胞的。天然氨基酸通过一系列基于蛋白的转运系统吸收至真核细胞中。可进行快速筛选来评估哪些非天然氨基酸(若存在的话)被细胞吸收。参见例如名称为“蛋白阵列(Protein Arrays)”的美国专利公开No.U.S.2004/0198637中的毒性测定法,其通过提述并入本文;及Liu,D.R.和Schultz,P.G.(1999)Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code.PNAS United States 96:4780-4785。尽管由各种测定能容易地分析摄取,但设计适用于细胞摄取途径的非天然氨基酸的替代方案是提供生物合成途径以在体内产生氨基酸。

[0427] 非天然氨基酸的生物合成

[0428] 细胞中已存在多种用于产生氨基酸及其他化合物的生物合成途径。尽管自然界中(包括但不限于细胞中)可能不存在特定的非天然氨基酸的生物合成方法,但本发明提供此类方法。例如,可以通过添加新酶或修饰现有的宿主细胞途径而任选地在宿主细胞中产生用于非天然氨基酸的生物合成途径。额外的新酶任选地是天然存在的酶或人工形成的酶。例如,对氨基苯丙氨酸的生物合成(如名称为“非天然氨基酸的体内并入(In vivo incorporation of unnatural amino acids)”的WO 2002/085923中的实例所示)依赖于添加来自其他生物体的已知酶组合。可通过用包含基因的质粒转化细胞将这些酶的基因引入至真核细胞中。当基因在细胞中表达时,其提供一种合成所需化合物的酶促途径。如下实施例中提供了任选地添加的酶的类型实例。额外的酶序列见于例如GenBank中。同样任选地以相同方式将人工形成的酶添加至细胞中。以此方式,操控细胞机制和细胞资源以生产非天然氨基酸。

[0429] 多种用于产生用于生物合成途径或用于现有途径的演化的新酶的方法是可获得的。例如,递归重组(包括但不限于由Maxygen,Inc.开发的(可在万维网(World Wide Web)上于maxygen.com获得))可任选地用于开发新的酶和途径。参见例如Stemmer(1994),Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling,Nature 370(4):389-391;和Stemmer,(1994),DNA shuffling by random fragmentation and reassembly:In vitro recombination for molecular evolution,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,91:10747-10751。

类似地,由Genencor开发的DesignPath™(可在万维网上于genencor.com获得)可用于进行代谢途径工程化,包括但不限于工程改造出在细胞中产生O-甲基-L-酪氨酸的途径。此技术使用新基因(包括但不限于经由功能性基因组学及分子进化和设计所鉴定的那些基因)的组合在宿主生物体中改造现存途径。Diversa Corporation(可在万维网上于diversa.com获得)还提供快速筛选基因文库及基因途径(包括但不限于产生新途径)的技术。

[0430] 通常,产生用本发明的工程化的生物合成途径产生的非天然氨基酸,其处于对于有效蛋白生物合成足够的浓度(包括但不限于天然细胞量),但未达到影响其他氨基酸的浓度或耗尽细胞资源的程度。以此方式体内产生的典型浓度是约10mM至约0.05mM。在用包含用于产生特异性途径所需的酶的基因的质粒转化细胞并且产生非天然氨基酸之后,任选地使用体内选择以针对核糖体蛋白合成与细胞生长二者进一步优化非天然氨基酸的生产。

[0431] V. 体内产生包含非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21

[0432] 本发明的修饰的FGF-21多肽可使用修饰的tRNA和tRNA合成酶添加至或取代天然存在的系统中不编码的氨基酸来体内产生。此类方法描述于美国专利No.8,012,931中,其通过提述以其整体并入本文。

[0433] 使用天然存在的系统中不编码的氨基酸产生tRNA及tRNA合成酶的方法描述于例如美国专利No.7,045,337和第7,083,970,通过提述并入本文。这些方法涉及产生一种翻译机制,该翻译机制不依赖于翻译系统内源性合成酶及tRNA而起作用(且因此有时称为“正交”)。通常,翻译系统包含正交tRNA(O-tRNA)及正交氨酰基tRNA合成酶(O-RS)。O-RS通常优选地使翻译系统中具有至少一个非天然存在的氨基酸的O-tRNA氨酰化,且O-tRNA识别至少一个并非经该系统中的其他tRNA识别的选择密码子。翻译系统因此响应于编码的选择密码子将非天然编码的氨基酸插入至系统中生产的蛋白中,由此将氨基酸“取代”至编码的多肽中的位置。

[0434] O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶的使用涉及编码非天然编码的氨基酸的特异性密码子的选择。尽管可使用任何密码子,但通常需要选择极少或从未用于表达O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶的细胞中的密码子。例如,例示性密码子包括无义密码子,如终止密码子(琥珀、赭石及乳白)、四个或更多个碱基的密码子及其他极少或未使用的天然三碱基密码子。

[0435] 可使用本领域中已知的诱变方法(包括但不限于定点诱变、盒式诱变、限制选择诱变等)将特异性选择密码子引入至修饰的FGF-21多核苷酸编码序列中的适当位置。

[0436] VI. 修饰的FGF-21多肽中非天然编码的氨基酸的位置

[0437] 本发明涵盖将一个或多个非天然编码的氨基酸并入至修饰的FGF-21多肽中。一个或多个非天然编码的氨基酸可并入不破坏多肽活性的特定位置。此作用可通过进行“保守”取代来实现,包括但不限于用疏水性氨基酸取代疏水性氨基酸、用大型氨基酸取代大型氨基酸、用亲水性氨基酸取代亲水性氨基酸和/或将非天然存在的氨基酸插入非活性所需的位置。

[0438] 在一些实施方案中,本发明的修饰的FGF-21多肽包含一个或多个位于不破坏多肽结构的蛋白的区域中的非天然存在的氨基酸。

[0439] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽中的氨基酸序列可包含至少一个非天然编码的氨基酸。所示至少一个非天然编码的氨基酸可并入氨基酸序列中的任何位置中,包括对应与SEQ ID NO:1的氨基酸1-181对应的位置或其中位置1之前(即在N末端)或

位置182(即在蛋白的羧基端),或SEQ ID NO:2-7或本发明的另一修饰的FGF-21多肽中的对应氨基酸。在一些实施方案中,所示至少一个非天然编码的氨基酸可位于与SEQ ID NO:1的氨基酸10、36、52、117、126、131、135、146、162、87、77、83、72、69、79、91、96、108或110对应的位置。在一些实施方案中,所示至少一个非天然编码的氨基酸可位于与SEQ ID NO:1的氨基酸72、77、86、87、91、108、110、126、131或146对应的位置。在一些实施方案中,所示至少一个非天然存在的氨基酸可位于与SEQ ID NO:1中的氨基酸108对应的位置。在一些实施方案中,所示至少一个非天然编码的氨基酸可为苯丙氨酸衍生物。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:1的氨基酸108对应的位置可为苯丙氨酸衍生物。在一些实施方案中,所示至少一个非天然编码的氨基酸可为对乙酰基-L-苯丙氨酸。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:1的氨基酸108对应的位置可为对乙酰基-L-苯丙氨酸衍生物。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的91位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的131位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的108位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的77位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的72位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的87位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的86位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的126位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的110位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的83位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的146位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的135位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的96位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。在一个实施方案中,非天然存在的氨基酸位于FGF-21中的36位置(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。

[0440] 在另一个实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽中的氨基酸序列可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸108对应的位置处的非天然编码的氨基酸,及至少一个如下位置处的其他非天然编码的氨基酸:与来自SEQ ID NO:1的氨基酸1-181中的任何另一项对应的位置或与其中位置1之前(即在N末端)或位置182(即在蛋白的羧基端)对应的位置,或SEQ ID NO:2-7或本发明的另一修饰的FGF-21多肽中的对应氨基酸。在另一个实施方案中,至少一个其他非天然编码的氨基酸可位于与SEQ ID NO:1的氨基酸10、36、52、117、126、131、135、146、162、87、77、83、72、69、79、91、96、108或110对应的位置。在另一个实施方案中,至少一个其他非天然编码的氨基酸可位于与SEQ ID NO:1的氨基酸91或131对应的位置。

[0441] 在另一个实施方案中,在91处存在一个非天然存在的氨基酸且在如下位置的一项或多项处存在一个或多个其他非天然存在的氨基酸:与来自SEQ ID NO:1的氨基酸1-181中的任何另一项对应的位置或与其中位置1之前(即在N末端)或位置182(即在蛋白的羧基端)

对应的位置,或SEQ ID NO:2-7或本发明的另一修饰的FGF-21多肽中的对应氨基酸。在另一个实施方案中,在91处存在一个非天然存在的氨基酸且在如下位置的一项或多项处存在一个或多个其他非天然存在的氨基酸:131、108、77、72、87、86、126、110、83、146、135、96和36(与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。

[0442] 在另一个实施方案中,在131处存在一个非天然存在的氨基酸且在如下位置的一项或多项处存在一个或多个其他非天然存在的氨基酸:与来自SEQ ID NO:1的氨基酸1-181中的任何另一项对应的位置或与其中位置1之前(即在N末端)或位置182(即在蛋白的羧基端)对应的位置,或SEQ ID NO:2-7或本发明的另一修饰的FGF-21多肽中的对应氨基酸。在另一个实施方案中,在131处存在一个非天然存在的氨基酸且在如下位置的一项或多项处存在一个或多个其他非天然存在的氨基酸:131、108、77、72、87、86、126、110、83、146、135、96和36(与SEQ ID NO:1对应的氨基酸位置或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。

[0443] 在另一个实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽中的氨基酸序列可包含与SEQ ID NO:1的残基对应的位置108处的非天然编码的氨基酸和至少两个位于与SEQ ID NO:1的如下氨基酸的至少两项对应的位置处的其他非天然编码的氨基酸:与来自SEQ ID NO:1氨基酸1-181中的任何另一项对应的位置或与其中位置1之前(即在N末端)或位置182(即在蛋白的羧基端)对应的位置,或SEQ ID NO:2-7或本发明的另一修饰的FGF-21多肽中的对应氨基酸。在另一个实施方案中,本文所述的修饰的FGF-21多肽中的氨基酸序列可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸108对应的位置处的非天然编码的氨基酸及至少两个位于与SEQ ID NO:1的如下氨基酸的至少两项对应的位置处的其他非天然存在的氨基酸:SEQ ID NO:1的10、36、52、117、126、131、135、146、162、87、77、83、72、69、79、91、96、108或110。

[0444] 在另一个实施方案中,在77处存在一个非天然存在的氨基酸且在如下位置的一项或多项处存在一个其他非天然存在的氨基酸:与来自SEQ ID NO:1的氨基酸1-181中的任何另一项对应的位置或与其中位置1之前(即在N末端)或位置182(即在蛋白的羧基端)对应的位置,或SEQ ID NO:2-7或本发明的另一修饰的FGF-21多肽中的对应氨基酸。在另一个实施方案中,在77处存在一个非天然存在的氨基酸且在如下位置的一项或多项处存在一个或多个其他非天然存在的氨基酸:131、108、77、72、87、86、126、110、83、146、135、96和36(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2-7的对应氨基酸)。

[0445] VII. 非真核生物和真核生物中的表达

[0446] I. 表达系统、培养及分离

[0447] 未修饰的或修饰的FGF-21多肽可在许多适合表达系统中表达,包括例如酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞和细菌。下文中提供例示性表达系统的描述。

[0448] 酵母:如本文所用,术语“酵母”包括能够表达编码修饰的FGF-21多肽的基因的各种酵母中的任一种。

[0449] 特别感兴趣的用于本发明的是毕赤酵母属(*Pichia*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、酵母属(*Saccharomyces*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、球拟酵母属(*Torulopsis*)和念珠菌属(*Candida*)中的物种,包括但不限于巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*)、季也蒙毕赤酵母(*P.guilliermondii*)、酿酒酵母(*S.cerevisiae*)、卡尔酵母(*S.carlsbergensis*)、糖化酵母(*S.diastaticus*)、道格拉氏酵母(*S.douglasii*)、克鲁弗酵母(*S.kluyveri*)、诺地酵母(*S.norbensis*)、卵形酵母

(*S.oviformis*)、乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*)、白色念珠菌(*C.albicans*)、麦芽糖念珠菌(*C.maltosa*)和多形汉逊酵母(*H.polymorpha*)。WO 2005/091944(其通过提述并入本文)描述了FGF-21在酵母中的表达。

[0450] 感染杆状病毒的昆虫细胞:术语“昆虫宿主”或“昆虫宿主细胞”是指可用作或已用作重组载体或其他转运DNA的受体的昆虫。该术语包括已转染的原始昆虫宿主细胞的子代。应了解,单一亲本细胞的子代在形态上或基因组或总DNA互补物上与原始亲本可不一定完全相同,这是由于偶然或故意突变所致。与亲本充分类似且特征在于相关特性(如存在编码修饰的FGF-21多肽的核苷酸序列)的亲本细胞的子代包括于此定义涵盖的子代中。

[0451] 大肠杆菌、假单胞菌物种及其他原核生物:

[0452] 术语“细菌宿主”或“细菌宿主细胞”是指可用作或已用作重组载体或其他转运DNA的受体的细菌。该术语包括已经转染的原始细菌宿主细胞的子代。应了解,单一亲本细胞的子代在形态上或基因组或总DNA互补物上与原始亲本可不一定完全相同,这是由于偶然或故意突变所致。与亲本充分类似且特征在于相关特性(如存在编码未修饰的或修饰的FGF-21多肽的核苷酸序列)的亲本细胞的子代包括于此定义涵盖的子代中。

[0453] 在选择用于表达的细菌宿主时,合适的宿主可包括显示具有尤其良好的包涵体形成能力、低蛋白水解活性及整体稳健性的宿主。工业/制药发酵通常使用衍生自K菌株(例如W3110)或来自衍生自B菌株(例如BL21)的细菌的细菌。适合大肠杆菌宿主的其他实例包括但不限于BL21、DH10B或其衍生物的菌株。在本发明方法的另一个实施方案中,大肠杆菌宿主是缺乏蛋白酶的菌株(protease minus strain),包括但不限于OMP-和LON-。宿主细胞菌株可为假单胞菌菌种,包括但不限于荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。已知称为菌株MB101的荧光假单胞菌生物变种1(*Pseudomonas fluorescens* biovar 1)适用于重组产生且可用于治疗性蛋白生产方法。

[0454] 在形成重组宿主细胞菌株后(即将表达构建体引入至宿主细胞中并分离具有适当表达构建体的宿主细胞),在适于产生修饰的FGF-21多肽的条件下培养重组宿主细胞菌株。

[0455] 重组宿主细胞可以分批或连续模式培养,其中细胞收获(在其中修饰的FGF-21多肽积聚于细胞内的情况下)或收获培养物上清液是分批或连续模式的。

[0456] 在细菌宿主细胞中产生的修饰的FGF-21多肽可为难溶的或不溶的(呈包涵体形式)。在本发明的一个实施方案中,在出于增加重组生产的蛋白的溶解度的目的而选择的修饰的FGF-21多肽中可容易进行氨基酸取代。修饰的FGF-21多肽可例如用尿素或盐酸胍溶解。

[0457] 在可溶性修饰的FGF-21的情况下,FGF-21可分泌至周质间隙或培养基中。例如,通过如下使修饰的FGF-21分泌至W3110-B2细胞的周质间隙中:使用包括八个不同前导序列(包括SEQ ID NO:39-44中所列举的那些前导序列)的编码构建体的质粒,和使这些质粒转化至W3110-B2细胞中,所述W3110-B2细胞接着在37℃生长直至OD达到约0.8,此时用0.01%阿拉伯糖诱导表达。五小时后可从培养物制得周质释放样品。此外,可溶性修饰的FGF-21可存在于宿主细胞的细胞质中。可能需要在进行纯化步骤之前浓缩可溶性修饰的FGF-21。

[0458] 当FGF-21多肽作为融合蛋白产生时,可去除融合序列。融合序列的去除可通过酶促或化学裂解实现。融合序列的酶促去除可使用本领域普通技术人员已知的方法来完成。

用于去除融合序列的酶的选择可通过融合的性质确定,且如本领域普通技术人员所知的,反应条件可通过酶的选择而指定。化学裂解可使用本领域普通技术人员已知的试剂来实现,包括但不限于溴化氰、TEV蛋白酶及其他试剂。裂解的修饰的FGF-21多肽可通过本领域普通技术人员已知的方法从裂解的融合序列纯化而得。

[0459] 一般地,偶尔需要对表达的多肽进行变性和还原,然后致使多肽再折叠成优选的构象。例如,可将胍、脲、DTT、DTE和/或伴侣蛋白添加至感兴趣的翻译产物中。蛋白可在含有(包括但不限于)氧化谷胱甘肽和L-精氨酸的氧化还原缓冲液中再折叠。再折叠试剂可流动或是移动以与一种或多种多肽或其他表达产物接触,反之亦然。

[0460] 在修饰的FGF-21多肽的原核生产的情况下,由此产生的修饰的FGF-21多肽可以是错误折叠的,从而缺乏生物活性或生物活性降低。蛋白的生物活性可通过“再折叠”恢复。一般地,错误折叠的未修饰的或修饰的FGF-21多肽通过使用例如一种或多种离液剂(例如脲和/或胍)和能够还原二硫键的还原剂(例如二硫苏糖醇、DTT或2-巯基乙醇,2-ME)溶解(其中修饰的FGF-21多肽也是不可溶的)、解折叠和还原多肽链而得以再折叠。在中等浓度的离液剂下,接着添加氧化剂(例如氧、胱氨酸或胱胺),其允许再形成二硫键。修饰的FGF-21多肽可使用本领域中已知的标准方法再折叠,如美国专利No.4,511,502、4,511,503和4,512,922中所述的那些标准方法,其通过提述并入本文。修饰的FGF-21多肽还可与其他蛋白共折叠以形成异二聚体或异多聚体。

[0461] 在再折叠之后,可进一步纯化修饰的FGF-21。修饰的FGF-21的纯化可使用本领域普通技术人员已知的多种技术实现,包括疏水相互作用色谱、大小排阻色谱、离子交换色谱、逆相高效液相色谱、亲和色谱及等等或其任何组合。其他纯化还可包括干燥或沉淀纯化蛋白的步骤。

[0462] 在纯化之后,可将修饰的FGF-21交换至不同缓冲剂中和/或通过多种本领域已知的方法的任一种浓缩,包括但不限于透滤和渗析。以单一纯化蛋白的形式提供的修饰的FGF-21可经历聚集和沉淀。

[0463] 纯化的修饰的FGF-21可以是至少90%纯的(如通过逆相高效液相色谱、RP-HPLC或十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,SDS-PAGE所测量的)或至少95%纯的、或至少98%纯的、或至少99%纯的或更纯的。无论修饰的FGF-21的纯度的精确数值如何,修饰的FGF-21的纯度足以用作药物产品或用于进一步加工,如与水溶性聚合物(如PEG)缀合。

[0464] 在不存在其他活性成分或蛋白(除赋形剂、载剂及稳定剂、血清白蛋白等以外)的情况下,一些修饰的FGF-21分子可用作治疗剂,或其可与另一蛋白或聚合物复合。

[0465] 在本发明的一些实施方案中,在各纯化步骤之后修饰的FGF-21的产率可为用于各纯化步骤的起始物质中的未经修饰或修饰的FGF-21的至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、至少约99.9%、或至少约99.99%。

[0466] VIII. 替代系统中的表达

[0467] 本发明的修饰的FGF-21多肽可使用无细胞(例如体外)翻译系统来表达。翻译系统可以是细胞的或无细胞且可以是原核或真核的。细胞翻译系统包括但不限于全细胞制备

物,如经透化细胞(permeabilized cell)或细胞培养物,其中所需核酸序列可转录为mRNA并翻译mRNA。无细胞翻译系统是商业上可获得的且多种不同类型和系统是熟知的。无细胞系统的实例包括但不限于原核裂解液,如大肠杆菌裂解液,及真核裂解液,如小麦胚芽提取物、昆虫细胞裂解液、兔网织红细胞裂解液、兔卵母细胞裂解液和人细胞裂解液。还可获得膜性提取物,如含有微粒体膜的犬胰脏提取物,其可用于翻译分泌性蛋白。

[0468] IX. 与修饰的FGF-21多肽偶联的大分子聚合物

[0469] 可使用本文所述的组合物、方法、技术及策略对本文所述的非天然氨基酸多肽进行各种修饰。这些修饰包括将其他官能团并入至多肽的非天然氨基酸组分上,所述其他官能团包括但不限于标记;染料;聚合物;水溶性聚合物;聚乙二醇的衍生物;光交联剂;放射性核素;细胞毒性化合物;药物;亲和力标记;光亲和力标记;反应性化合物;树脂;第二蛋白或多肽或多肽类似物;抗体或抗体片段;金属螯合剂;辅因子;脂肪酸;糖类;多核苷酸;DNA;RNA;反义多核苷酸;糖;水溶性树状聚合物;环糊精;抑制性核糖核酸;生物材料;纳米粒子;自旋标记;荧光团;含金属的部分;放射性部分;新官能团;与其他分子共价或非共价相互作用的基团;光笼化部分;光化辐射可激发的部分;可光致异构化部分;生物素;生物素衍生物;生物素类似物;并入有重原子的部分;可化学裂解的基团;可光裂解的基团;延长的侧链;碳连接的糖;氧化还原活性剂;氨基硫代酸;毒性部分;经同位素标记的部分;生物物理探针;磷光基团;化学发光基团;电子致密基团;磁性基团;插入基团;发色团;能量转移剂;生物活性剂;可检测标记;小分子;量子点;纳米传递素;放射性核苷酸;放射性传递素;中子收获剂;或上述物质的任何组合,或任何其他所需的化合物或物质。作为本文所述的组合物、方法、技术及策略的一个说明性非限制性实例,如下描述将集中于将大分子聚合物添加(adding)至非天然氨基酸多肽上,同时理解其描述的组合物、方法、技术及策略(必要时具有适当修改且本领域普通技术人员可用本文公开内容进行所述修改)还可适用于添加其他官能团,包括但不限于上文所列的那些官能团。

[0470] 多种大分子聚合物及其他分子可连接至本发明的修饰的FGF-21多肽以调节修饰的FGF-21多肽的生物特性和/或为修饰的FGF-21分子提供新的生物特性。这些大分子聚合物可经由天然编码的氨基酸、经由非天然编码的氨基酸或天然或非天然氨基酸的任何官能取代基或添加至天然或非天然氨基酸中的任何取代基或官能团连接至修饰的FGF-21多肽。聚合物分子量可在包括但不限于约100Da至约100,000Da或更大的广泛范围。聚合物的分子量可为约100Da至约100,000Da,包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da和100Da。在一些实施方案中,聚合物的分子量是约100Da至约50,000Da。在一些实施方案中,聚合物的分子量是约100Da至约40,000Da。在一些实施方案中,聚合物的分子量是约1,000Da至约40,000Da。在一些实施方案中,聚合物的分子量是约5,000Da至约40,000Da。在一些实施方案中,聚合物的分子量是约10,000Da至约40,000Da。

[0471] 所选聚合物可为水溶性的,以使得其附接的蛋白在水性环境(如生理环境)中不沉淀。聚合物可为分支或无分支的。对于成品制备物的治疗用途而言,聚合物可为药学上可接

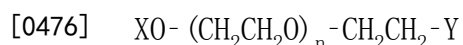
受的。

[0472] 聚合物的实例包括但不限于聚烷基醚及其烷氧基封端类似物(例如聚氧乙烯二醇、聚氧乙烯/丙二醇及其甲氧基或乙氧基封端类似物,尤其是聚氧乙烯二醇,后者也称为聚乙二醇或PEG);离散PEG(dPEG);聚乙烯吡咯啉酮;聚烷基烷基醚;聚恶唑啉、聚烷基恶唑啉及聚羟烷基恶唑啉;聚丙烯酰胺、聚烷基丙烯酸酰胺及聚羟烷基丙烯酸酰胺(例如聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺及其衍生物);聚羟烷基丙烯酸酯;聚唾液酸及其类似物;亲水性肽序列;多糖及其衍生物,包括右旋糖酐及右旋糖酐衍生物,例如羧基甲基右旋糖酐、硫酸右旋糖酐、氨基右旋糖酐;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素、羟烷基纤维素;甲壳素及其衍生物,例如壳聚糖、琥珀酰壳聚糖、羧甲基甲壳素、羧甲基壳聚糖;透明质酸及其衍生物;淀粉;海藻酸盐;硫酸软骨素;白蛋白;支链淀粉(pullulan)及羧甲基支链淀粉;聚氨基酸及其衍生物,例如聚谷氨酸、聚赖氨酸、聚天冬氨酸、聚天冬酰胺;顺丁烯二酸酐共聚物,如:苯乙烯顺丁烯二酸酐共聚物、二乙烯基乙基醚顺丁烯二酸酐共聚物;聚乙烯醇;其共聚物;其三元共聚物;其混合物;及前述各项的衍生物。

[0473] 如本文所用且在考虑PEG:修饰的FGF-21多肽缀合物时,术语“治疗有效量”是指向患者提供所需益处的量。量可在个体之间变化且可依赖于多种因素,所述因素包括患者总体身体状况和要治疗的病况的基本病因。用于治疗的修饰的FGF-21多肽的量提供可接受的变化率且使所需反应维持在有利程度。

[0474] 水溶性聚合物可以是任何结构形式,包括但不限于线性、叉状或分支形。通常,水溶性聚合物是聚(烷撑二醇),如聚(乙二醇)(PEG),但还可使用其他水溶性聚合物。例如,用PEG来描述本发明的一些实施方案。

[0475] 术语“PEG”广泛用于涵盖任何聚乙二醇分子,而不考虑PEG的大小或末端的修饰,且在连接至修饰的FGF-21多肽时可由下式表示:



[0477] 其中n是2至10,000,且X是H或末端修饰,包括但不限于C₁₋₄烷基、保护基团或末端官能团。

[0478] 在一些情况下用于本发明多肽的PEG在一个末端终止于羟基或甲氧基,即X为H或CH₃(“甲氧基PEG”)。或者,PEG可终止于反应性基团,由此形成双功能聚合物。典型的反应性基团可包括常用于和见于20种常见氨基酸中的官能团(包括但不限于马来酰亚胺基团、活化的碳酸酯(包括但不限于对硝基苯酯)、活化的酯类(包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺、对硝基苯酯)和醛)以及对所述20种常见氨基酸呈惰性但与存在于非天然编码的氨基酸中的互补官能团特异性反应的官能团(包括但不限于叠氮基、炔基)反应的那些反应性基团。应注意,上式中由Y所示的PEG的另一末端可经由天然存在或非天然编码的氨基酸直接或间接连接至修饰的FGF-21多肽。例如,Y可为与多肽的胺基(包括但不限于赖氨酸的ε胺或N端)相连的酰胺、氨基甲酸酯或脲连接基。或者,Y可为与硫醇基(包括但不限于半胱氨酸的硫醇基)的马来酰亚胺连接基。或者,Y可为与通常不可经由20种常见氨基酸获得的残基的连接基。例如,PEG上的叠氮基可与修饰的FGF-21多肽上的炔基反应以形成Huisgen[3+2]环加成产物。或者,PEG上的炔基可与非天然编码的氨基酸中存在的叠氮基反应以形成类似产物。在一些实施方案中,强亲核试剂(包括但不限于肼、酰肼、羟胺、氨基脲)可与非天然编码的氨基酸中存在的醛或酮基反应以形成腙、肟或缩氨基脲,(若适用的话)其在一些情况下可

通过用适当还原剂处理而进一步还原。或者,强亲核试剂可经由非天然编码的氨基酸并入至修饰的FGF-21多肽中,并优选地用于与水溶性聚合物中存在的酮或醛基反应。

[0479] 可视实际需要使使用任何分子量的PEG,包括但不限于约100道尔顿(Da)至100,000Da,或视需要更大(包括但不限于,有时为0.1-50kDa或10-40kDa)。PEG的分子量可在包括但不限于约100Da至约100,000Da或更大的广泛范围。PEG可为约100Da至约100,000Da,包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、和100Da。还可使用分支PEG,包括但不限于各链的MW范围为1-100kDa(包括但不限于1-50kDa或5-20kDa)的PEG分子。分支PEG的各链的分子量可为包括但不限于约1,000Da至约100,000Da或更大。分支PEG的各链的分子量可为约1,000Da至约100,000Da,包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da和1,000Da。一般地,PEG分子的至少一端可用于与非天然编码的氨基酸反应。例如,用于与氨基酸侧链反应的带有炔烃和叠氮部分PEG衍生物可用于将PEG与如本文所述的非天然编码的氨基酸连接。如果非天然编码的氨基酸包含叠氮部分,则PEG通常可含有炔烃部分以形成[3+2]环加成产物,或含磷基团的活化的PEG物质(即酯、碳酸酯)以形成酰胺键。或者,如果非天然编码的氨基酸包含炔烃,则PEG通常可含有叠氮部分以形成[3+2]Huisgen环加成产物。如果非天然编码的氨基酸包含羰基,则PEG通常可分别包含强效亲核试剂(包括但不限于酰肼、肼、羟胺或氨基脲官能团)以形成对应的脎、肟和缩氨基脲连接基。在其他替代方案中,可使用上述反应性基团的反向取向,即非天然编码的氨基酸中的叠氮部分可与含有炔烃的PEG衍生物反应。

[0480] 在一些实施方案中,具有PEG衍生物的修饰的FGF-21多肽含有化学官能团,所述化学官能团是与非天然编码的氨基酸侧链上存在的化学官能团的反应性。

[0481] 在一些实施方案中,本发明提供含叠氮和含乙炔的聚合物衍生物,其包含平均分子量为约800Da至约100,000Da的水溶性聚合物主链。水溶性聚合物的聚合物主链可为聚(乙二醇)。然而,应了解,多种水溶性聚合物(包括但不限于聚(乙烯)乙二醇)及其他相关聚合物,包括聚(聚右旋糖酐)和聚(丙二醇),也适用于本发明公开的多肽,且使用术语PEG或聚(乙二醇)意在涵盖且包括所有此类分子。

[0482] 聚合物主链可为直链或分支的。分支聚合物主链通常是本领域已知的。通常,分支聚合物具有中心分支核心部分和多个连接至该中心分支核心的直链聚合物链。分支PEG还可表现为由PEG(-YCH₂)_n表示的分叉PEG形式,其中Y是连接基基团且Z是由限定长度的原子链连接至CH的活化末端基团。另一分支形式,悬垂PEG(pendant PEG),沿PEG主链而非在PEG链末端具有反应性基团,如羧基。

[0483] 多种其他聚合物也适用于本发明的多肽。适合的聚合物的实例包括但不限于其他聚(烷撑二醇),如聚(丙二醇)、“PPG”、其共聚物(包括但不限于乙二醇和丙二醇的共聚物)、其三元共聚物、其混合物及其类似物。尽管聚合物主链的各链的分子量可有变化,但其

通常范围为约800Da至约100,000Da,通常为约6,000Da至约80,000Da。聚合物主链的各链的分子量可为约100Da至约100,000Da,包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da和100Da。

[0484] 水溶性聚合物可与本发明的修饰的FGF-21多肽连接。水溶性聚合物可经由并入修饰的FGF-21多肽中的非天然编码的氨基酸、或非天然编码或天然编码的氨基酸的任何官能团或取代基,或添加至非天然编码或天然编码的氨基酸中任何官能团或取代基而连接。或者,水溶性聚合物经由天然存在的氨基酸(包括但不限于半胱氨酸、赖氨酸或N末端残基的氨基)连接至包含非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21多肽。在一些情况下,本发明的修饰的FGF-21多肽包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个非天然氨基酸,其中一个或多个非天然编码的氨基酸连接至水溶性聚合物(包括但不限于PEG和/或寡糖)。在一些情况下,本发明的修饰的FGF-21多肽进一步包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个连接至水溶性聚合物的天然编码的氨基酸。在一些情况下,本发明修饰的FGF-21多肽包含一个或多个连接至水溶性聚合物的非天然编码的氨基酸和一个或多个连接至水溶性聚合物的天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,相对于比较剂化合物,如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:201的FGF-21多肽、无所述水溶性聚合物的相同FGF-21多肽或本文中其他地方所述的另一比较剂化合物,用于本发明的水溶性聚合物增强修饰的FGF-21多肽的血清半衰期。

[0485] 可调节连接至本发明的修饰的FGF-21多肽的水溶性聚合物的数量(即聚乙二醇化或糖基化程度)以提供改变(包括但不限于增加或降低)的药理学、药代动力学或药效学特征如体内半衰期。在一些实施方案中,相对于未修饰的多肽,修饰的FGF-21的半衰期增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、50倍或至少约100倍。

[0486] 含有强亲核基团(即酰肼、肼、羟胺或氨基脒)的PEG衍生物

[0487] 在本发明的一个实施方案中,包含含羰基的非天然编码的氨基酸的本发明修饰的FGF-21多肽可由含有直接连接至PEG主链的末端肼、羟胺、酰肼或氨基脒部分的PEG衍生物修饰。

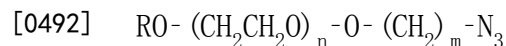
[0488] 水溶性聚合物连接至修饰的FGF-21多肽的程度和位点可调节修饰的FGF-21多肽与FGF-21多肽受体的结合。在一些实施方案中,如由平衡结合测定(如Spencer等, J.Biol.Chem., 263:7862-7867 (1988) 中关于修饰的FGF-21所述的测定)所测量的,可排列连接基以使得修饰的FGF-21多肽与FGF-21多肽受体结合的 K_d 为约400nM或更低, K_d 为150nM或更低,且在一些情况下, K_d 为100nM或更低。

[0489] 用于活化聚合物以及用于缀合肽的方法及化学作用描述于文献中且是本领域已知的。常用于活化聚合物的方法包括但不限于用溴化氰、过碘酸盐、戊二醛、二环氧化物、表氯醇、二乙烯砜、碳化二亚胺、磺酰卤、三氯三嗪等活化官能团。含有非天然编码的氨基酸(如对叠氮基-L-苯丙氨酸)的修饰的FGF-21多肽的聚乙二醇化(即添加任何水溶性聚合物)可通过任何适合的方法进行,如美国专利No.8,012,931中所述的那些方法,其通过提述并

入本文。连接至本发明的修饰的FGF-21多肽的氨基酸的水溶性聚合物可不受限地进一步加以衍生化或取代。

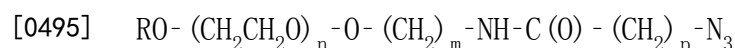
[0490] 在本发明的另一个实施方案中,修饰的FGF-21多肽可由含有叠氮部分的PEG衍生物修饰,所述叠氮部分可与非天然编码的氨基酸的侧链上存在的炔烃部分反应。一般地,PEG衍生物的平均分子量范围可为1-100kDa,且在一些实施方案中,为10-40kDa。

[0491] 在一些实施方案中,叠氮端PEG衍生物可具有如下结构:



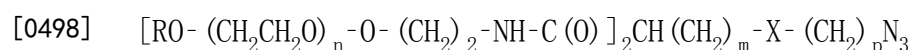
[0493] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10且n是100-1,000(即平均分子量为5-40kDa)。

[0494] 在另一个实施方案中,叠氮端PEG衍生物可具有如下结构:



[0496] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10,p是2-10且n是100-1,000(即平均分子量为5-40kDa)。

[0497] 在本发明的另一个实施方案中,包含含炔烃氨基酸的修饰的FGF-21多肽可由含有叠氮末端部分的分支PEG衍生物进一步修饰,其中所述分支PEG的各链的MW范围为10-40kDa且可为5-20kDa。例如,在一些实施方案中,叠氮末端PEG衍生物可具有如下结构:

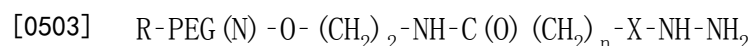


[0499] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10,p是2-10且n是100-1,000且X任选地是O、N、S或羰基(C=O),在各情况下其可存在或不存在。

[0500] 在本发明的另一个实施方案中,修饰的FGF-21多肽可由含有炔烃部分的PEG衍生物修饰,该炔烃部分可与非天然编码的氨基酸的侧链上存在的叠氮部分反应。

[0501] 在本发明的另一个实施方案中,修饰的FGF-21多肽可由含有进一步包含芳基膦基团的活化官能团(包括但不限于酯、碳酸酯)的PEG衍生物进行修饰,该芳基膦基团可与非天然编码的氨基酸的侧链上存在的叠氮部分反应。

[0502] 修饰的FGF-21多肽可通过如下例示性方法缀合至含酰肼PEG。并入含羰基氨基酸(如pAcF)的修饰的FGF-21多肽可根据上述程序制备。一经修饰,具有如下结构的含酰肼的PEG即可缀合至修饰的FGF-21多肽:

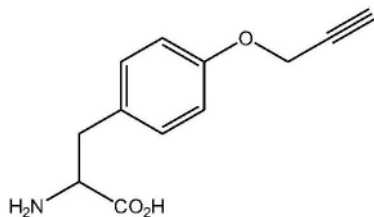


[0504] 其中例如R=甲基,n=2且N=10,000MW,且X是羰基(C=O)基团。将纯化的含有对-乙酰基-苯丙氨酸的修饰的FGF-21以0.1-10mg/mL溶解于25mM MES(Sigma Chemical, St.Louis,MO) pH 6.0、25mM Hepes(Sigma Chemical, St.Louis,MO) pH 7.0或10mM乙酸钠(Sigma Chemical, St.Louis,MO) pH 4.5中,与1至100倍过量的含酰肼PEG反应,并通过添加溶解于H₂O中至最终浓度10-50mM的储液1M NaCNBH₃(Sigma Chemical, St.Louis,MO)来原位还原对应的腙。反应在黑暗中于4℃至室温进行18-24小时。通过添加约pH 7.6的1M Tris(Sigma Chemical, St.Louis,MO)至50mM的最终Tris浓度来终止反应,或稀释至适当缓冲液中用于立即纯化。

[0505] 将含炔烃的氨基酸引入至修饰的FGF-21多肽中并用Mpeg-叠氮基的衍生化

[0506] 可生产含有含炔烃氨基酸的修饰的FGF-21多肽且可通过如下例示性方法用mPEG-叠氮基将其衍生化。所选位置可由如下非天然编码的氨基酸取代:

[0507]



[0508] 用于将对炔丙基-酪氨酸位点特异性并入至修饰的FGF-21中的序列可为上述的SEQ ID NO:1 (FGF-21)、SEQ ID NO:16或17 (muttRNA, 詹氏甲烷球菌 (*M. jannaschii*) mtRNA^{Tyr}_{CUA})、22、23或24。含有炔丙基酪氨酸的修饰的FGF-21多肽可在大肠杆菌中表达并用上述用于纯化含有含羰基氨基酸的修饰的FGF-21多肽的条件来纯化。

[0509] 纯化的含有炔丙基-酪氨酸的修饰的FGF-21以0.1-10mg/mL溶解于PB缓冲液(100mM磷酸钠、0.15M NaCl, pH=8)中并将10至1000倍过量的含叠氮PEG添加至反应混合物中。然后将催化量的CuSO₄和Cu丝(wire)添加至反应混合物中。在温育混合物(包括但不限于在室温或37℃约4小时,或在4℃过夜)之后,添加H₂O且经由透析膜过滤混合物。可分析样品以确定产率。

[0510] X. 含有修饰的FGF-21多肽的融合蛋白

[0511] 本发明还提供修饰的FGF-21多肽或其片段,其包含修饰的FGF-21多肽序列和融合配偶体。融合配偶体可赋予功能特性,包括但不限于半衰期延长、促进蛋白纯化和/或生产、增强的生物物理特性(如增加溶解度或稳定性)及降低的免疫原性或毒性,或任何其他目的。例如,融合蛋白可表现出延长的体内半衰期,由此有助于治疗方案中的较不频繁给药(如每周给药两次、每周一次或每隔一周一次等)。例示性的融合蛋白包含融合至融合配偶体的修饰的FGF-21,所述融合配偶体如白蛋白(例如人血清白蛋白)、PK延伸(PKE) Adnectin、XTEN、Fc域或前述任一项的片段,或前述任何项的组合。融合蛋白可通过表达编码修饰的FGF-21多肽序列和相同阅读框架中的融合配偶体序列的核酸来生产,任选地通过编码连接肽的序列来分离。融合蛋白可以任何顺序包含修饰的FGF-21多肽和融合配偶体,例如一种或多种连接至修饰的FGF-21多肽序列的N末端和/或C末端的融合配偶体,或一种或多种连接至N末端和C末端两者的融合配偶体。

[0512] 融合可通过使融合配偶体附接至修饰的FGF-21多肽的任一末端(即N末端或C末端)而形成,即融合配偶体-修饰的FGF-21或修饰的FGF-21-融合配偶体排列。另外,修饰的FGF-21多肽可在两个末端融合至一种或多种任选地在任一末端或两个末端具有连接肽的融合配偶体。在一些实施方案中,融合配偶体和修饰的FGF-21经由连接肽融合。例示性的连接肽可包含选自SEQ ID NO:74-100、301和350-383或前述(例如前述序列中的两项、三项或更多项)的组合的序列或由其组成。例示性连接肽的长度可为0(即无连接肽存在)至100个更多个氨基酸,如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个和多至60、50、40、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12或11个氨基酸。例示性的非限制性长度的连接肽包括长度为1至100个氨基酸、1至40个氨基酸、1至20个氨基酸、1至10个氨基酸或3至5个氨基酸。

[0513] 修饰的FGF-21多肽或其片段可作为包含人血清白蛋白(HSA)或其部分的融合蛋白生产。此类融合构建体可适用于增强修饰的FGF-21或其片段在真核宿主细胞(如CHO)中或在细菌(如大肠杆菌)中的表达。例示性的HSA部分包括N末端多肽(氨基酸1-369、1-419和从

氨基酸1起始的中等长度),如美国专利No.5,766,883和PCT公开W0 97/24445中公开的那样,其通过提述并入本文。在一些实施方案中,融合蛋白可包含HSA蛋白以及修饰的FGF-21或其片段,其连接至HSA的C末端和N末端中的每一个。例示性的HSA构建体公开于美国专利No.5,876,969中,其通过提述并入本文。FGF-21的哺乳动物细胞表达的例示性方法描述于W0 2005/091944中,其通过提述并入本文。

[0514] 修饰的FGF-21多肽可融合XTEN分子。XTEN分子也称为非结构化重组聚合物、非结构化重组多肽(URP),且一般描述于Schellenberger等,Nat Biotechnol.,2009Dec;27(12):1186-90;美国公开No.2012/0220011;美国专利No.7,846,445及W0/2012/162542中,其各自通过提述以其整体并入本文。修饰的FGF-21多肽的半衰期可通过改变XTEN分子的构造(例如通过改变其尺寸)而变化。例如,可选择XTEN分子以获得所需半衰期,如范围为1至50小时,如至少1、2、5、10、12、15、20或25小时或更长。

[0515] 例示性的XTEN分子包括包含至少40个连续氨基酸的URP,其中:(a)URP包含至少三个不同类型的选自下组的氨基酸:甘氨酸(G)、天冬氨酸(D)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)残基,其中URP中所含的组的氨基酸的总和占URP的总氨基酸的约80%以上,且其中所述URP包含一个以上的脯氨酸残基,且其中相对于缺乏所述一个以上脯氨酸残基的对应URP,所述URP具有降低的蛋白水解降解敏感性;(b)如由Chou-Fasman算法所确定的,所述URP的至少50%的氨基酸无二级结构;且(c)所述URP的Tepitope评分小于-5。额外的例示性XTEN分子包含非结构化重组聚合物(URP),其含有至少约40个连续氨基酸,且其中(a)URP中所含的甘氨酸(G)、天冬氨酸(D)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)残基的总和占URP的总氨基酸的至少80%,且其余部分(若存在的话)由精氨酸或赖氨酸组成,且其余部分不含甲硫氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺,其中所述URP包含至少三个不同类型的选自如下的氨基酸:甘氨酸(G)、天冬氨酸(D)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P);(b)如通过Chou-Fasman算法所确定的,所述URP中的至少40个连续氨基酸中的至少50%无二级结构;且(c)其中URP的Tepitope评分小于-4。

[0516] 额外的例示性XTEN分子包括rPEG分子。在一些实施方案中,rPEG分子可以不包括疏水性残基(例如F、I、L、M、V、W或Y)、含侧链酰胺的残基(例如N或Q)或带正电的侧链残基(例如H、K或R)。在一些实施方案中,增强部分可包括A、E、G、P、S或T。在一些实施方案中,rPEG可包括10-20%、20-30%、30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80%、80-90%、90-99%的甘氨酸或甚至100%的甘氨酸。

[0517] 所述XTEN分子可进一步连接至聚乙二醇。

[0518] 术语“PAS”和/或“PAS化”是指感兴趣的生物药物蛋白(如修饰的FGF-21多肽)与由氨基酸Pro、Ala和Ser构成的构象无序的多肽序列的遗传融合(因此为术语“PAS多肽”及“PAS化”)。PAS化可增加血清半衰期、增加溶解度、稳定性和/或对蛋白酶的抗性和/或降低感兴趣的蛋白(例如融合蛋白)的免疫原性(参考文献可见W02008155134 A1和US20140073563,其通过提述并入本文)。PAS序列可经由基因融合连接至修饰的FGF-21多肽的氨基酸序列的N末端、C末端或两个末端。在一些实施方案中,PAS多肽可包含至少两个域,所述域包含由至少约100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000或更多个氨基酸残基组成的氨基酸序列,其形成无规卷曲构象,且其中所述第二域包含丙氨

酸、丝氨酸和脯氨酸残基,由此所述无规卷曲构象介导融合有PAS多肽的生物药物蛋白的体内和/或体外稳定性增加。在一些实施方案中,包含丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸残基的第二域可选自ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO:310);AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO:311);APSSPSPASPPSPASPSS (SEQ ID NO:312),SAPSSPSPASPPSPASPS (SEQ ID NO:313),SSPSAPSPSPASPSSPA (SEQ ID NO:314),AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO:315)和ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO:316)。PAS多肽可含有一个或多个用于共价修饰的位点。

[0519] 在例示性实施方案中,修饰的FGF-21融合至Adnectin,例如白蛋白结合或PKE Adnectin。例示性的Adnectin公开于美国公开No.2011/0305663中,其通过提述以其整体并入本文。所述Adnectin可基于第十纤连蛋白III型结构域并可结合至血清白蛋白。所述Adnectin可包含如下一项或多项:包含SEQ ID NO:45所示氨基酸序列的BC环、包含SEQ ID NO:46所示氨基酸序列的DE环和包含SEQ ID NO:47所示氨基酸序列的FG环,或包含选自SEQ ID NO:48、49、50、51和52-72的多肽,或包含与SEQ ID NO:48、49、50、51或52-72至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同的多肽,其分别对应于与美国公开No.2011/0305663的SEQ ID NO 5、6、7、8、12、16、20和24-44。

[0520] 在一些实施方案中,修饰的FGF-21多肽可融合至免疫球蛋白Fc域(“Fc域”)或其片段或变体,如功能性Fc区。功能性Fc区结合至FcRn,但不具有效应物功能。Fc区或其片段结合FcRn的能力可通过本领域中已知的标准结合测定法来确定。例示性的“效应物功能”包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等。此类效应物功能可使用本领域中已知用于评估此类抗体效应物功能的各种测定法来评估。

[0521] 在一个例示性实施方案中,Fc域来源于IgG1亚类,然而还可使用其他亚类(例如IgG2、IgG3及IgG4)。下文显示了人IgG1免疫球蛋白Fc域的例示性序列:

[0522] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:302)

[0523] 在一些实施方案中,用于融合蛋白中的Fc区可包含Fc分子的铰链区。例示性的铰链区包含跨越上文所提供的例示性人IgG1免疫球蛋白Fc域序列的位置1-16的核心铰链残基(即DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO:303))。在一些实施方案中,融合蛋白可采用多聚体结构(例如二聚体),这部分是由于上文所提供的例示性人IgG1免疫球蛋白Fc域序列的铰链区内的位置6和9的半胱氨酸残基。在其他实施方案中,如本文所用的铰链区可进一步包括衍生自上文所提供的例示性人IgG1免疫球蛋白Fc域序列的核心铰链序列侧翼的CH1和CH2区的残基。在其他实施方案中,铰链序列可包含GSTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO:304)或由其组成。

[0524] 在一些实施方案中,铰链序列可包括一个或多个赋予所需药代动力学、生物物理学和/或生物学特性的取代。一些例示性的铰链序列包括EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO:305)、EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO:306)、EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO:307)、DKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO:308)、和DKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ

ID NO:309)。在一个实施方案中,上文提供的例示性人IgG1免疫球蛋白Fc域序列的位置18处的残基P可用S替换以除去Fc效应物功能;此置换例示于具有序列EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO:306)、EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO:307)、和DKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO:309)的铰链中。在另一个实施方案中,上文提供的例示性人IgG1免疫球蛋白Fc域序列的位置1-2的残基DK可用GS替换以去除可能的剪切位点;此置换例示于序列EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO:307)中。在另一个实施方案中,人IgG1的重链恒定区(即域CH₁--CH₃)的位置103处的C可用S替换以防止在不存在轻链的情况下形成不正确的半胱氨酸键;此置换例示于序列EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO:305)、EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO:306)、和EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO:307)中。

[0525] 额外的例示性Fc序列包括如下:

[0526] hIgG1a_191[A亚型]

[0527] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0528] (SEQ ID NO:323)

[0529] hIgG1a_189[hIgG1a_191C末端无“GK”;A亚型]

[0530] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SP

[0531] (SEQ ID NO:324)

[0532] hIgG1a_191b[A/F亚型]

[0533] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:325)

[0534] hIgG1f_1.1_191[含有5个用于改变ADCC功能的点突变,F亚型]

[0535] DKTHTCPPCPAEPAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0536] (SEQ ID NO:326)

[0537] hIgG1f_1.1_186[含有5个用于改变ADCC功能的点突变和C225S (Edlemen编号);F
亚型]

[0538] EPKSSDKTHTCPPCPAEPAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNH

YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:327)

[0539] hIgG1a_(N297G)_191 [A亚型]

[0540] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:328)

[0541] hIgG1a_190[hIgG1a_190C末端无“K”;A亚型]

[0542] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPG (SEQ ID NO:329)

[0543] hIgG1a_(N297Q)_191 [A亚型]

[0544] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:330)

[0545] hIgG1a_(N297S)_191 [A亚型]

[0546] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:331)

[0547] hIgG1a_(N297A)_191 [A亚型]

[0548] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:332)

[0549] hIgG1a_(N297H)_191 [A亚型]

[0550] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYHSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:333)

[0551] hIgG4

[0552] DKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN
HYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:334)

[0553] hIgG4_(S241P)

[0554] DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM

TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN
HYTQKSLSLGK (SEQ ID NO:335)

[0555] 在一些实施方案中,Fc域包含选自SEQ ID NO:302和323-335的氨基酸序列。应了解Fc域的C末端赖氨酸是包含Fc域的融合蛋白的任选组分。在一些实施方案中,Fc域包含选自SEQ ID NO:302和323-335的氨基酸序列,但其C末端赖氨酸是删去的。在一些实施方案中,Fc域包含SEQ ID NO:302的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc域包含SEQ ID NO:302的氨基酸序列,但其C末端赖氨酸是删去的。

[0556] 在一些实施方案中,制得包含白蛋白结合序列的修饰的FGF-21多肽。例示性的白蛋白结合序列包括但不限于来自链球菌蛋白G的白蛋白结合域(参见例如Makrides等,J.Pharmacol.Exp.Ther.277:534-542(1996)和Sjolander等,J.Immunol.Methods 201:115-123(1997))或如描述于例如Dennis等,J.Biol.Chem.277:35035-35043(2002)中的那些的白蛋白结合肽。

[0557] 在一些实施方案中,用脂肪酸酰化本发明的修饰的FGF-21多肽。在一些情况下,脂肪酸有助于结合至血清白蛋白。参见例如Kurtzhals等,Biochem.J.312:725-731(1995)。

[0558] 在一些实施方案中,本发明的修饰的FGF-21多肽直接与血清白蛋白(包括但不限于人血清白蛋白)融合。本领域技术人员会认识到多种其他分子也可与本发明的修饰的FGF-21连接以调节与血清白蛋白或其他血清组分的结合。

[0559] XI.修饰的和未修饰的FGF-21多肽的糖基化

[0560] 本发明包括包含一个或多个带有糖残基的非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21多肽。糖残基可为天然的(包括但不限于N-乙酰基葡萄糖胺)或非天然的(包括但不限于3-氟半乳糖)。糖可通过N-或O-连接的糖苷键(包括但不限于N-乙酰基半乳糖-L-丝氨酸)或非天然键(包括但不限于脲或对应C-或S-连接的糖苷)连接至非天然编码的氨基酸。

[0561] 可将糖(包括但不限于糖基)部分体内或体外添加至修饰的FGF-21多肽中。在本发明的一些实施方案中,包含含羰基的非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21多肽可由用氨基氧基衍生化的糖修饰以产生经由脲键连接的对应糖基化多肽。一旦连接至非天然编码的氨基酸后,可进一步通过用糖基转移酶和其他酶处理来加工糖,以产生结合至修饰的FGF-21多肽的寡糖。参见例如H.Liu等,J.Am.Chem.Soc.125:1702-1703(2003)。

[0562] 在本发明的一些实施方案中,包含含羰基的非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21多肽可用聚糖直接修饰,所述聚糖具有限定的结构,制备为氨基氧基衍生物。其他官能团,包括叠氮基、炔基、酰肼、肼和氨基脲,可用于将糖连接至非天然编码的氨基酸。

[0563] 在本发明的一些实施方案中,包含含叠氮基或炔基的非天然编码氨基酸的修饰的FGF-21多肽可随后通过分别与(包括但不限于)炔基或叠氮基衍生物进行(包括但不限于)Huisgen[3+2]环加成反应来修饰。

[0564] XII.FGF-21二聚体和多聚物

[0565] 本发明还提供FGF-21和修饰的FGF-21组合,如同二聚体、异二聚体、同多聚体或异多聚体(即三聚体、四聚体等),其中含有一个或多个非天然编码氨基酸的修饰的FGF-21结合至另一个FGF-21或修饰的FGF-21或其变体或非FGF-21或修饰的FGF-21或其变体的任何其他多肽,直接结合至多肽主链或经由接头结合。由于其与单体相比增加的分子量,FGF-21二聚体或多聚体缀合物可相对于单体FGF-21表现出新的或所需的特性,包括但不限于不同

药理学、药代动力学、药效学、调节的治疗半衰期或调节的血浆半衰期。在一些实施方案中，本发明的修饰的FGF-21二聚体可调节FGF-21受体的信号转导。在其他实施方案中，本发明的修饰的FGF-21二聚体或多聚体可充当FGF-21受体拮抗剂、激动剂或调节剂。

[0566] XIII. 测量FGF-21多肽活性和FGF-21多肽对FGF-21多肽受体的亲和力

[0567] 已显示在3T3-L1脂肪细胞中FGF-21会刺激葡萄糖摄取并增强胰岛素敏感性，3T3-L1脂肪细胞是一种如美国专利公开No. 20040259780的实施例3中所示的用于研究脂肪组织代谢的体外模型，该文献通过提述以其整体并入本文。2型糖尿病的特征为包括脂肪组织的各种组织类型中葡萄糖摄取缺乏。因此，修饰的FGF-21可适用于通过降低血糖水平来治疗2型糖尿病。此外，修饰的FGF-21可适用于通过更快且更有效的葡萄糖使用增加能量消耗来治疗肥胖。另外，已显示FGF-21在3T3-L1脂肪细胞中以非胰岛素依赖性方式刺激葡萄糖摄取，从而指示其也可用于治疗1型糖尿病。参见美国专利公开No. 20040259780。在美国专利公开No. 20040259780中，FGF-21显示出在3T3-L1脂肪细胞中在次佳胰岛素浓度(5nM)处和在不存在胰岛素情况下以浓度依赖性方式刺激葡萄糖摄取。另外，在离体组织模型中，FGF-21诱导葡萄糖摄取，如美国专利公开No. 20040259780中所述。

[0568] 可对修饰的FGF-21多肽进行生物活性测定。一般地，生物活性测试应对所需结果提供分析，所述结果如与未修饰的FGF-21或如本文其他地方所述的另一比较剂化合物相比，生物活性增加或减少、生物活性不同、受体或结合配偶体亲和力分析、修饰的FGF-21自身或其受体的构象或结构变化、或血清半衰期分析。

[0569] 使3T3-L1分化为脂肪细胞和葡萄糖摄取测定的例示性方法描述于美国专利No. 8, 012, 931中，其通过提述以其整体并入本文。

[0570] XIV. 测量效力、功能性体内半衰期和药代动力学参数

[0571] 本发明的一个方面是延长的生物半衰期，其可通过构建修饰的FGF-21多肽获得，所述修饰的FGF-21多肽可缀合至水溶性聚合物部分或融合至融合配偶体。FGF-21多肽血清浓度在施用后的快速降低已使其对评估对使用修饰的FGF-21多肽治疗的生物学响应具有治疗显著性。本发明的修饰的FGF-21多肽也还经由(例如皮下或静脉内施用)施用之后可具有延长的血清半衰期，从而使其能通过例如ELISA法或通过初步筛选测定来测量。如本文所述进行体内生物半衰期的测量。

[0572] 包含内部缺失和/或非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21多肽的效力及功能性体内半衰期可根据本领域普通技术人员已知且如本文所述的方案来确定。

[0573] 在例示性的测定中，本文所述的未修饰的或修饰的FGF-21多肽的药代动力学参数可在正常Sprague-Dawley雄性大鼠(N=5只动物/处理组)中评估。动物可接受静脉内25μg/大鼠或皮下50μg/大鼠的单次剂量，且根据预定时间程获取约5-7个血液样品，一般而言对未与水溶性聚合物缀合的包含非天然编码的氨基酸的修饰的FGF-21多肽覆盖约6小时，并对包含非天然编码的氨基酸且与水溶性聚合物缀合的修饰的FGF-21多肽约4天。修饰的FGF-21的药代动力学数据可与比较剂化合物相比，所述比较剂化合物如SEQ ID NO:1的野生型FGF-21多肽、SEQ ID NO:201的修饰的FGF-21多肽、缺乏内部缺失的相同修饰的FGF-21多肽或本文所述其他比较剂化合物。

[0574] 药代动力学参数还可在灵长类动物(如食蟹猴)中进行评估。通常，皮下或静脉内施用单次注射，并随时间监测血清FGF-21含量。

[0575] 本发明的多肽可用于治疗患有非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM:2型)、胰岛素依赖性糖尿病(1型)以及肥胖、葡萄糖清除不足、高血糖症、高胰岛素血症等的哺乳动物。如美国专利公开No.20040259780中所示,FGF-21对于糖尿病和肥胖的动物模型有效,该文献通过提述以其整体并入本文。由于各种肥胖和糖尿病的动物模型中的代谢特征不同,因此分析了多种模型以分离高胰岛素血症、高血糖症和肥胖的效果。糖尿病(db/db)和肥胖(ob/ob)小鼠的特征在于非常肥胖、暴食、可变的高血糖症、胰岛素抗性、高胰岛素血症及生热受损(Coleman,Diabetes 31:1,1982;E.Shafrir,in Diabetes Mellitus;H.Rifkin和D.Porte,Jr.编(Elsevier Science Publishing Co.,Inc.,New York,第4版,1990),pp.299-340)。然而,在db/db模型中糖尿病更为严重(Coleman,Diabetes 31:1,1982;E.Shafrir,in Diabetes Mellitus;H.Rifkin和D.Porte,Jr.编(Elsevier Science Publishing Co.,Inc.,New York,第4版,1990),pp.299-340)。Zucker(fa/fa)大鼠患严重肥胖、高胰岛素血症性及胰岛素抗性(Coleman,Diabetes 31:1,1982;E.Shafrir,in Diabetes Mellitus;H.Rifkin和D.Porte,Jr.编(Elsevier Science Publishing Co.,Inc.,New York,第4版,1990),pp.299-340),且fa/fa突变可为鼠类db突变的大鼠等效物(Friedman等,Cell 69:217-220,1992;Truett等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7806,1991)。Tubby(tub/tub)小鼠的特征在于肥胖、中度胰岛素抗性、高胰岛素血症,而无显著高血糖症(Coleman等,J.Heredit 81:424,1990)。

[0576] 还可检查化学诱导的肥胖的谷氨酸单钠(MSG)模型(Olney,Science 164:719,1969;Cameron等,Cli.Exp.Pharmacol.Physiol.5:41,1978),其中与遗传模型中相比其肥胖较不严重且未发展为暴食、高胰岛素血症及胰岛素抗性。最终,可测试化学诱导的糖尿病的链脲霉素(STZ)模型以检查在不存在肥胖情况下高血糖症的影响。STZ处理的动物缺乏胰岛素且具有严重高血糖(Coleman,Diabetes 31:1,1982;E.Shafrir,in Diabetes Mellitus;H.Rifkin和D.Porte,Jr.编(Elsevier Science Publishing Co.,Inc.,New York,第4版,1990),pp.299-340)。

[0577] 可在ob/ob小鼠中的体内败血性休克模型中评价本发明的修饰的FGF-21多肽。参见美国专利公开No.20050176631,其通过提述以其整体并入本文。

[0578] 用于分析FGF-21诱导的ERK1/2磷酸化的方法

[0579] FGF-21(野生型或修饰的FGF-21多肽,包括连接至PEG或其他接头、聚合物或生物活性分子的那些)诱导的ERK1/2磷酸化可通过如下例示性方法进行:

[0580] 在以聚赖氨酸涂布的平板中用人Kltho β 以100,000个细胞/孔(DMEM+10%FBS)稳定转染的种细胞(seed)293。第二天,细胞100%汇合,抽出培养基并用新鲜培养基替换并温育过夜。24小时之后,用所选的未修饰或修饰的FGF-21或FGF-21类似物用作标准FGF21WT刺激细胞。各个化合物通过用PBS/1%BSA稀释来制备。在37℃于培养箱中重复三次处理细胞10min。10min温育后,自各孔小心抽出培养基并将40 μ l含有蛋白酶/磷酸酶抑制剂(PI混合物,Na3VN4和PMSF)的冷的1 $\times$ Cell Signaling裂解缓冲液添加至各孔中以产生细胞裂解液。将96孔/板置于冰上20分钟,然后以4000rpm减慢旋转10min。将细胞裂解液冷冻于-80℃。随后将各样品复苏且将10 μ l细胞裂解液被添加至涂布有捕获非磷酸化与磷酸化形式的ERK1/2的抗体的MSD处理的平板中。与一抗一起温育2小时,然后用特异性缓冲液洗涤平板数次,然后添加二抗。1小时之后,再洗涤温育平板数次。将用于读取的缓冲液添加至各孔。

将平板转移至MSD读取器中。产生的曲线基于抗磷酸化ERK1/2读取单元且使用Sigma图(Sigma Plot)计算EC50。通过将测试化合物的EC50除以WT的EC50计算活性的倍数减少。

[0581] 确定大鼠中修饰的FGF-21多肽的药代动力学特性

[0582] 这些例示性方法可用于测量插入导管的大鼠中的天然和修饰的FGF-21化合物的药代动力学特性。通过对人FGF-21特异性的ELISA测定来自给药后的特定时间点获得的血清样品的测试制品的药代动力学。

[0583] 在研究开始时十二(12)只称重约250-275克的雄性Sprague-Dawley (SD) 大鼠可具有以手术方式设置的颈静脉导管。动物处于良好状态且可在研究开始之前适应研究场所至少3天。可在施用测试制品当天称重大鼠。可将动物豢养于具有任取额食品及水的标准无病原体条件中。

[0584] 化合物例如以0.25mg/kg皮下施用。

[0585] 在施用测试制品之前称重动物。配制化合物从而按1X BW以 μ L计来施用。将皮下施用的测试制品注射至背侧肩胛部位中。动物可接受测试制品的单次注射(时间=0)。在所选时间点,可自动物抽取全血,收集至SST微量采血收集管中。在离心之前可使血清凝结30分钟。可将血清转移至聚丙烯滴定管中,用微带线密封且储存于-80℃直至通过ELISA分析以确定未修饰的或修饰的FGF-21血清浓度。

[0586] 各动物均可用于完全PK时程。可自颈静脉导管抽取约0.25mL全血。在血液收集之后立即可用0.1mL生理盐水冲洗导管。接收测试制品材料的动物的以下收集时间点需要加以选择,但可基于测试制品的预期药代动力学概况加以修饰:

[0587] 预先放血、给药后1、2、4、8、24、32、48、56、72及96小时。确定各测试化合物的药代动力学参数,其可包括 λ_z 、 λ_z 下限、 λ_z 上限、HL λ_z 、Tmax、Cmax、C0、AUCINF_obs、Vz_obs、Cl_obs、MRTINF_obs和/或Vss_obs。

[0588] ZDF大鼠中的修饰的FGF-21的体内研究

[0589] 向小鼠或大鼠施用修饰的FGF-21、未修饰的FGF-21和缓冲溶液。结果显示与未修饰的FGF-21相比,本发明的修饰的FGF-21多肽的活性及半衰期。

[0590] WO 2005/091944描述了可用如本发明化合物的FGF-21化合物来进行的药代动力学研究。本发明的修饰的FGF-21多肽通过静脉内或皮下途径向小鼠施用。在给药前及给药后的时间点对动物抽血。自各样品收集血浆并通过放射免疫分析来分析。可计算并比较包含内部缺失和/或非天然编码的氨基酸或融合配偶体的修饰的FGF-21多肽与野生型FGF-21或本发明的各种形式的FGF-21多肽之间的排除半衰期。类似地,可向食蟹猴施用本发明的修饰的FGF-21多肽。在给药前及给药后的时间点对动物抽血。从各样品收集血浆且通过放射免疫测定来分析。

[0591] 可向ZDF雄性大鼠施用本发明的多肽(糖尿病性肥胖大鼠;在研究开始时8周龄,Charles River-GMI)。对大鼠任意饲喂Purina 5008饲料。设定如下测试组:盐水;胰岛素4U/天;未修饰的或修饰的FGF-21,500 μ g/天快速(快速给药组为给药一次且在给药后T=0、2、4、8及24小时时抽血);未修饰的或修饰的FGF-21,100 μ g/天;未修饰的或修饰的FGF-21,250 μ g/天;未修饰的或修饰的FGF-21,500 μ g/天;未修饰的或修饰的FGF-21(一次/天),500 μ g/ml;瘦(Lean)盐水;瘦胰岛素4U/天;瘦未修饰的或修饰的FGF-21,500 μ g/天。瘦组表示非糖尿病性瘦ZDF大鼠。

[0592] 皮下注入化合物(每天2次),第二500 μ g/天组除外,其每天接受一次注射维持研究持续时间(7天)。向对照大鼠注射介质(PBS;0.1ml)。给药7天之后,对动物进行口服葡萄糖耐量测试。通过无麻醉剂切尾取血收集用于葡萄糖和甘油三酯的血液。修饰的FGF-21多肽可以剂量依赖性方式降低血浆葡萄糖含量。与给药胰岛素的大鼠相比时,瘦ZDF大鼠在暴露于本发明的修饰的FGF-21多肽之后也可以不是低血糖的。

[0593] ob/ob肥胖模型中修饰的FGF-21的体内研究

[0594] ob/ob小鼠模型是高血糖症、胰岛素抗性和肥胖的动物模型。与介质和胰岛素对照组相比,可测量ob/ob小鼠中用未修饰的或修饰的FGF-21多肽处理后的血浆葡萄糖含量。在此肥胖模型中,雄性ob/ob小鼠的测试组(7周龄)用介质单独(PBS)、胰岛素(4U/天)或未修饰的或修饰的FGF-21多肽(5 μ g/天和25 μ g/天)皮下注射(0.1ml,每天两次)持续七天。在第1、3及7天、在第一化合物注射之后一小时通过切尾取血收集血液,并使用标准方案测量血浆葡萄糖含量。本发明的修饰的FGF-21多肽刺激葡萄糖摄取,但当与培养基对照组相比时其降低血浆葡萄糖含量。可在用本发明的修饰的FGF-21多肽处理后将甘油三酯水平与其他分子相比。可通过多剂、连续输注或单剂等向小鼠施用多肽。

[0595] 修饰的FGF21多肽的药代动力学评估:

[0596] 在大鼠中评估具有不同的PEG缀合位点的修饰的FGF-21的药代动力学特性。研究的其他参数是PEG MW以及所施用的化合物的剂量。确定百分比生物利用度。

[0597] 所有动物实验均在实验动物关怀及使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)批准的协议下进行。雄性(175-300g)Sprague-Dawley大鼠获取自Charles River Laboratories。将大鼠独立豢养于12h光/暗循环下的房间中的笼中,并在实验之前适应饲养室至少3天。使动物任意取食经认证的Purina啮齿动物饲料5001和水。

[0598] 将导管以手术方式安装至颈静脉中用于血液收集。在成功地使导管通畅之后,在给药前将动物分配至处理组。以1mL/kg的给药体积静脉内或皮下施用单次剂量的化合物。化合物剂量浓度通过使用如释放证书(Certificate of Release)中所指定的储备液浓度的PBS稀释而得到。经由留置导管在不同时间点收集血液样品并将血液样品置于SST微量离心管中。在离心之后收集血清,并将其储存于-80 $^{\circ}$ C直至进行分析。

[0599] 如下进行定量Sprague-Dawley大鼠血清中修饰的FGF-21的分析。以用作捕获试剂的山羊抗人FGF-21IgG多克隆抗体(PAb;RnD系统,克隆AF2539)来涂布微板孔。通过将未修饰的或修饰的FGF-21掺入100%Sprague Dawley大鼠血清中制得标准(STD)与质量控制(QC)样品,并在用I-封闭缓冲液1:100预处理之后将研究样品加载于孔中。通过固定的PAb捕获STD、QC和研究样品中的未修饰的或修饰的FGF-21。通过洗涤孔去除未结合材料。将生物素山羊抗人FGF-21IgG PAb(RnD系统,克隆BAF2539)添加至孔中,然后是洗涤步骤,并添加链霉亲和素辣根过氧化物酶(SA-HRP;RnD系统,目录号DY998)用于检测捕获的未修饰的或修饰的FGF-21。在再一次洗涤步骤之后,将四甲基联苯胺(TMB,Kirkegaard Perry Laboratories)基质溶液添加至孔中。TMB与过氧化物在HRP存在下反应并产生与由最初步骤中的捕获试剂结合的FGF-21(野生型或修饰的FGF-21)的那些成正比的比色信号。通过添加2N硫酸终止显色并测量450nm处的颜色的强度(光密度,OD)。用于研究样品和QC的OD单位向浓度的转换通过相同平板上的标准曲线的计算机软件介导的比较来实现,该曲线根据5参数逻辑回归模型使用SOFTmax Pro v5数据简化包进行回归。结果以ng/mL浓度单位报告。

[0600] 浓度还可通过双抗体夹心测定或本领域技术人员已知的其他方法来测量。使用产生自对应给药化合物的标准曲线来计算浓度。使用建模程序WinNonlin (Pharsight, 4.1版)来估算药代动力学参数。使用线性-上/对数-下梯形积分下的受试者动物数据的非区室分析,且浓度数据均一地加权。

[0601] XV. 施用及药物组合物

[0602] 本文还提供包含治疗有效量的本文所述的修饰的FGF-21多肽和药学上可接受的载剂或赋形剂的组合物。此类载剂或赋形剂包括但不限于生理盐水、缓冲生理盐水、右旋糖、水、丙三醇、乙醇和/或其组合。制备使得配制物适合于施用模式。一般地,施用蛋白的方法是本领域普通技术人员已知的且可用于施用本发明的多肽。

[0603] 例如,可向患者施用浓度为约0.1至100mg/每千克接受患者体重的本文所述的修饰的FGF-21多肽。在一个实施方案中,可向患者施用浓度为约0.5-5mg/每千克接受患者体重的本文所述的修饰的FGF-21多肽。在另一个实施方案中,可以按每天一次至每两周一次的频率,如约每周一次或两次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次或每六天一次的频率向接受患者施用本文所述的修饰的FGF-21多肽。

[0604] 应了解,向给定患者施用的修饰的FGF-21多肽的浓度可高于或低于上述例示性施用浓度。

[0605] 根据本发明中提供的信息,本领域技术人员能够例如通过本文中的公开内容及如下文献的教导的指导通过常规实验确定有效施用剂量及频率:Goodman, L.S., Gilman, A., Brunton, L.L., Lazo, J.S., & Parker, K.L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; Howland, R.D., Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C., & Mycek, M.J. (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 和 Golan, D.E. (2008). Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia, Pa., (等): Lippincott Williams & Wilkins。

[0606] 可改变修饰的FGF-21的平均量,并具体而言应当基于有资质的医师的建议和处方。修饰的FGF-21的确切量优选地涉及如要治疗的病况的确切类型、要治疗的患者的病况以及组合物中的其他成分的因素。本发明还提供施用治疗有效量的另一活性剂。给定量可容易地由本领域普通技术人员确定。

[0607] “药物组合物”是指适于向哺乳动物施用的化学或生物组合物。此类组合物可经具体配制用于经由一种或多种途径施用,所述途径包括但不限于经口、上表皮、硬膜外、吸入、动脉内、心内、脑室内、皮内、肌肉内、鼻内、眼内、腹膜内、脊柱内、鞘内、静脉内、口服、胃肠外、经由灌肠剂或栓剂的经直肠、皮下、真皮下、舌下、透皮和经黏膜。此外,可通过注射剂、粉剂、液体、凝胶、滴剂或其他施用手段进行施用。

[0608] 如本文所用的“药学上可接受的载剂”或“赋形剂”包括生理学上相容的任何及所有溶剂、分散培养基、涂层、抗菌剂及抗真菌剂、等张剂及吸收延迟剂。在一个实施方案中,载剂适用于胃肠外施用。或者,载剂可适用于静脉内、腹膜内、肌肉内或舌下施用。药学上可接受的载剂包括无菌水溶液或分散液及用于即时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉剂。

[0609] 在一些实施方案中,药物组合物可以冻干形式存在。组合物可配制为溶液、微乳

液、脂质体或适合于高药物浓度的其他有序结构。载剂可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙二醇及液态聚乙二醇)的溶剂或分散介质及其适合混合物。本发明进一步涵盖在药物组合物中包含稳定剂。可例如通过维持所需的粒度(在分散液的情况下)及通过使用表面活性剂来维持适当流动性。

[0610] 在许多情况下,在组合物中可优选地包括等张剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨糖醇)或氯化钠。通过包括如单硬脂酸盐和明胶的药剂,可延长可注射组合物的吸收。此外,多肽可以延时释放配制物形式(例如以包括缓释聚合物的组合物形式)配制。活性化合物可用载剂制备,所述载剂保护化合物以免快速释放,如控制释放型制剂,包括移植物及微胶囊化递送系统。可使用生物可降解、生物相容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚乳酸和聚乳酸、聚乙醇酸共聚物(PLG)。制备此类配制物的多种方法是本领域技术人员已知的。

[0611] 本发明的修饰的FGF-21多肽及组合物可通过适用于蛋白或肽任何常规途径施用,所述途径包括但不限于胃肠外、例如注射剂(包括但不限于皮下或静脉内)或任何其他形式的注射剂或输注。多肽组合物可通过多种途径施用,包括但不限于口服、静脉内、腹膜内、肌肉内、经皮、皮下、局部、舌下或经直肠的方法。还可经由脂质体施用包含修饰的FGF-21的组合物。修饰的FGF-21多肽可单独与其他适合组分(药物载剂)组合使用。修饰的FGF-21多肽可与其他药剂(包括但不限于口服抗糖尿病剂)组合使用。

[0612] 术语“抗糖尿病剂”应意指可用于治疗、预防任何葡萄糖代谢病症或其任何并发症(包括本文所述的病况、疾病或并发症的任一种)或以其他方式降低其严重程度的任何药物。抗糖尿病剂包括胰岛素、噻唑烷二酮类、磺酰脲类、苯甲酸衍生物、 α -葡萄糖苷酶抑制剂等等。

[0613] 本领域中熟知的用于处理糖尿病及其前驱综合征(如胰岛素抗性)的当前药物或抗糖尿病剂包括五类化合物:双胍类,例如二甲双胍;噻唑烷二酮类,例如曲格列酮;磺酰脲类,例如甲苯磺丁脲及格列本脲;苯甲酸衍生物,例如瑞格列奈;和葡萄糖苷酶抑制剂。除这些药剂以外,多种其他疗法可与本发明FGF-21多肽组合使用以改进葡萄糖控制,包括但不限于DPP-4抑制剂。临床试验中测试的前导DPP-4化合物包括维格列汀(Galvus)(LAF237)、西他列汀(Januvia)、沙格列汀及阿格列汀、诺华(Novartis)化合物1-[[[2-[5-氰基吡啶-2-基]氨基]乙基]氨基]乙酰基]-2-氰基-(S)-吡咯烷(NVP DPP728)。

[0614] 另一类抗糖尿病剂是肉毒碱棕榈酰基-转移酶I(CPT-I)的抑制剂,如乙莫克舍(etomoxir)。

[0615] 其他已知抗糖尿病剂包括胰岛素制剂(例如从牛和猪的人胰脏提取的动物胰岛素制剂;使用大肠杆菌、酵母遗传合成的人胰岛素制备物;锌胰岛素;鱼精蛋白锌胰岛素;胰岛素的片段或衍生物(例如INS-1)、口服胰岛素制备物)胰岛素敏化剂(例如吡格列酮或其盐(优选为盐酸盐)、罗格列酮或其盐(优选为顺丁烯二酸盐)、萘格列酮(Netoglitazone)、来格列酮(Rivoglitazone)(CS-011)、FK-614(W001/38325中所述的化合物)、替格列扎(AZ-242)、拉格列扎(Ragaglitazar)(N,N-622)、莫格列扎(Muraglitazar)(BMS-298585)、依格列酮(Edaglitazone)(BM-13-1258)、美格列森(Metaglidasen)(MBX-102)、那格列扎(Naveglitazar)(LY-519818)、MX-6054、LY-510929、AMG-131(T-131)、THR-0921)、 α -葡萄糖苷酶抑制剂(例如伏格列波糖、阿卡波糖、米格列醇、乙格列酯等)、双胍(例如苯乙双胍、二甲

双胍、丁双胍或其盐(例如盐酸盐、反丁烯二酸盐、丁二酸酯))、胰岛素促分泌物[磺酰脲类(例如甲苯磺丁脲、格列本脲、格列齐特(gliclazide)、氯磺丙脲(chlorpropamide)、甲磺氮草脲(tolazamide)、醋磺环己脲(acetohexamide)、格列吡脲(glyclopamide)、格列美脲(glimepiride)、格列吡嗪(glipizide)、格列丁唑(glybuzole))、瑞格列奈(repaglinide)、那格列奈(nateglinide)、米格列奈(mitiglinide)或其钙盐水合物]、二肽基肽酶IV抑制剂(例如维达列汀(Vidagliptin) (LAF237)、P32/98、西他列汀(Sitagliptin) (MK-431)、P93/01、PT-100、沙格列汀(Saxagliptin) (BMS-477118)、T-6666、TS-021)、 β 3激动剂(例如AJ-9677)、GPR40激动剂、类胰高血糖素多肽(I) (glpI)、(glp2)或其他致糖尿病肽激素、GLP-1受体激动剂[例如GLP-1、GLP-1MR药剂、N,N-2211、AC-2993(毒蜥外泌肽-4)、BIM-51077、Aib(8,35)hGLP-1(7,37)NH₂、CJC-[131]、糊精激动剂(例如普兰林肽)、磷酸酪氨酸磷酸酶抑制剂(例如钒酸钠)、葡糖新生抑制剂(例如肝糖磷酸化酶抑制剂、葡萄糖-6-磷酸酶抑制剂、胰高血糖素拮抗剂)、SGLT2(钠-葡萄糖共转运蛋白)抑制剂(例如T-1095)、11 β -羟基类固醇去氢酶抑制剂(例如BVT-3498)、脂联素或其激动剂、IKK抑制剂(例如AS-2868)、瘦素抗性改进药、生长抑素受体激动剂(W001/25228、W003/42204、W098/44921、W098/45285、W099/2273.5等中所述的化合物)、葡糖激酶活化剂(例如Ro-28-1675)、GIP(葡萄糖依赖性促胰岛素肽)等是可提及的。

[0616] 还可将修饰的FGF-21制成用于经吸入施用的气雾剂配制物(即可将其“雾化”)。可将气雾剂配制物置于可接受加压的推进剂中,如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。

[0617] 适用于胃肠外施用,如通过关节内(关节中)、静脉内、肌内、皮内、腹膜内及皮下途径施用的配制物包括可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使配制物与预期接受者的血液等张的溶质的水性及非水性等张无菌注射溶液,及可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂在一起的水性及非水性无菌注射液。修饰的FGF-21的配制物可以单位剂量或多剂量密封容器(如安瓿和小瓶)的形式存在。

[0618] 在本发明的上下文中,向患者施用的剂量足以在患者中随时间具有有益治疗响应或取决于应用而具有其他适当活性。剂量通过配制物的功效及所用的修饰的FGF-21多肽的活性、稳定性或血清半衰期和患者的健康状况以及待治疗的患者的体重或体表面积来确定。

[0619] 向例如70千克患者施用的剂量通常范围为等于目前所用治疗蛋白的剂量,其经调节以改变相关组合物的活性或血清半衰期。

[0620] 对于施用,本发明的配制物以由相关配制物的LD-50或ED-50和/或各种浓度的修饰的FGF-21多肽的任何副作用的观察结果(包括但不限于应用于患者的质量及总体健康状况时)确定的速率施用。施用可经由单次或分次剂量来实现。

[0621] 可向哺乳动物受试者直接施用本发明的修饰的FGF-21多肽。施用通过常用于向受试者引入FGF-21多肽的任何途径进行。本发明的修饰的FGF-21多肽可以单位剂量可注射形式与药学上可接受的载剂一起制备成混合物(包括但不限于溶液、悬浮液或乳剂)。本发明的修饰的FGF-21多肽还可通过连续输注(使用(包括但不限于)微型泵,如渗透泵)、单次推注或缓慢释放的储藏式配制物施用。

[0622] 适用于施用的配制物包括水溶液和非水溶液、等张无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使配制物与预期接受者血液等渗的溶质;以及可包括悬浮剂、增稠

剂、增稠剂、稳定剂及防腐剂的水性和非水性无菌悬浮液。可从前述种类的无菌粉剂、颗粒剂和片剂制备溶液及悬浮液。

[0623] 本发明的药物组合物和配制物可包含药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂。

[0624] 适合的载剂包括但不限于：含有琥珀酸盐、磷酸盐、硼酸盐、HEPES、柠檬酸盐、组氨酸、咪唑、乙酸盐、碳酸氢盐及其他有机酸的缓冲剂；抗氧化剂，包括但不限于抗坏血酸；低分子量多肽，包括但不限于小于约10个残基的那些；蛋白质，包括但不限于血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，包括但不限于聚乙烯吡咯酮；氨基酸，包括但不限于甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸、组氨酸组氨酸或组氨酸衍生物、甲硫氨酸、谷氨酸或赖氨酸；单糖、双糖及其他糖类，包括但不限于海藻糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，包括但不限于EDTA和乙二酸四乙酸钠；二价金属离子，包括但不限于锌、钴或铜；糖醇，包括但不限于甘露糖醇或山梨糖醇；成盐抗衡离子，包括但不限于钠和氯化钠；和/或非离子型表面活性剂，包括但不限于TweensTM（包括但不限于Tween 80（聚山梨醇酯80）和Tween 20（聚山梨醇酯20））、PluronicTM和其他普朗尼克酸（包括但不限于普朗尼克酸F68（泊洛沙姆188））或PEG。适合的表面活性剂包括例如但不限于基于聚（氧化乙烯）-聚（氧化丙烯）-聚（氧化乙烯），即（PEO-PP0-PEO）或聚（氧化丙烯）-聚（氧化乙烯）-聚（氧化丙烯），即（PP0-PEO-PP0）或其组合的聚醚。PEO-PP0-PEO及PP0-PEO-PP0可以商品名PluronicTM、R-PluronicTM、TetronicTM和R-TetronicTM（BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.）购得且进一步描述于美国专利No. 4,820,352中，该文献通过提述以其整体并入本文。其他乙烯/聚丙烯嵌段聚合物可为适合的表面活性剂。表面活性剂或表面活性剂的组合可用于稳定聚乙二醇化的修饰的FGF-21以抵抗一种或多种应力，包括但不限于由搅动产生的应力。上文中的一些可称为“膨胀剂”。一些还可称为“张力调节剂”。还可应用抗微生物防腐剂以提供产品稳定性和抗微生物有效性；适合的防腐剂包括但不限于苯甲醇、苯扎氯铵、间甲酚、对羟基苯甲酸甲/丙酯、甲酚和苯酚、或其组合。

[0625] 本发明的修饰的FGF-21多肽（包括与水溶性聚合物（如PEG）连接的那些多肽）还可通过持续释放系统或作为其一部分施用。持续释放组合物包括（包括但不限于）呈成型制品形式（包括但不限于膜或微胶囊）的半渗透聚合物基质。持续释放基质包括生物相容性物质，如聚（2-甲基丙烯酸羟基乙酯）、乙烯乙酸乙烯酯（或聚-D-（-）-3-羟基丁酸）、聚丙交酯（聚乳酸）、聚乙交酯（乙醇酸的聚合物）、聚丙交酯共乙交酯（乳酸及乙醇酸的共聚物）、聚酸酐、L-谷氨酸及γ-乙基-L-谷氨酸的共聚物、聚（邻）酯、多肽、透明质酸、胶原、软骨素硫酸酯、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、氨基酸（如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸）、多核苷酸、聚乙烯丙烯、聚乙烯吡咯烷酮和硅酮（silicone）。持续释放组合物还包括由脂质体包埋的化合物。含有化合物的脂质体通过已知方法来制备。

[0626] 在本发明的上下文中，施用患者的剂量应足以随时间在受试者体内实现有益响应。一般地，每剂量的胃肠外施用的本发明的修饰的FGF-21多肽的总体药理学有效量范围为0.01μg/kg/天至约100μg/kg，或约0.05mg/kg至约1mg/kg的患者体重，但此量要经治疗性判断。

[0627] 在一些实施方案中，本发明的修饰的FGF-21多肽调节抗糖尿病剂的效果。在本发明的另一个实施方案中，修饰的FGF-21多肽可与抗糖尿病剂一起施用。在本发明的另一个实施方案中，可在用抗糖尿病剂治疗之前施用修饰的FGF-21多肽。在本发明的另一个实施

方案中,可在用抗糖尿病剂治疗之后施用修饰的FGF-21多肽。在本发明的另一个实施方案中,修饰的FGF-21多肽与二甲双胍一起施用。在一些实施方案中,本发明的修饰的FGF-21多肽与Klotho β 一起施用。在一些实施方案中,本发明的修饰的FGF-21多肽与包括一个或多个非天然编码的氨基酸的Klotho β 一起施用。在一些实施方案中,本发明的修饰的FGF-21多肽与Klotho β 及抗糖尿病剂一起施用。在一些实施方案中,本发明的修饰的FGF-21多肽与抗糖尿病剂一起施用。在一些实施方案中,本发明的修饰的FGF-21多肽与如下一项或多项组合使用:牛磺酸、 α 硫辛酸、桑椹提取物、铬、谷氨酰胺、Enicostemma littorale Blume、野甘草(Scoparia dulcis)、龙蒿提取物及穿心莲。在一些实施方案中,本发明的修饰的FGF-21多肽与如下一项或多项组合使用:胰岛素制剂(例如从牛和猪的胰脏提取的动物胰岛素制剂;使用大肠杆菌、酵母基因合成的人胰岛素制剂;锌胰岛素;鱼精蛋白锌胰岛素;胰岛素的片段或衍生物(例如INS-1)、口服胰岛素制剂)、胰岛素敏化剂(例如吡格列酮或其盐(优选地为盐酸盐)、罗格列酮或其盐(优选地为顺丁烯二酸盐)、萘格列酮利格列酮(CS-011)、FK-614、W001/38325中所述的化合物、替格列扎(AZ-242)、拉格列扎(N,N-622)、莫格列扎(BMS-298585)、依格列酮(BM-13-1258)、美格列森(MBX-102)、那格列扎(LY-519818)、MX-6054、LY-510929、AMG-131(T-131)、THR-0921)、 α -葡萄糖苷酶抑制剂(例如伏格列波糖、阿卡波糖、米格列醇、乙格列酯等)、双胍(例如苯乙双胍、二甲双胍、丁双胍或其盐(例如盐酸盐、反丁烯二酸盐、琥珀酸酯))、胰岛素促分泌物[磺酰脲类(例如甲苯磺丁脲、格列本脲、格列齐特、氯磺丙脲、甲磺氮卓脲、醋磺环己脲、格列吡脲、格列美脲、格列吡嗪、格列丁唑)、瑞格列奈、那格列奈、米格列奈或其钙盐水合物]、二肽基肽酶IV抑制剂(例如维达列汀(LAF237)、P32/98、西他列汀(MK-431)、P93/01、PT-100、沙格列汀(BMS-477118)、T-6666、TS-021)、 β 3激动剂(例如AJ-9677)、GPR40激动剂、类胰高血糖素多肽(I)(glp I)、(glp2)或其他致糖尿病肽激素、GLP-1受体激动剂[例如GLP-1、GLP-1MR剂、N,N-2211、AC-2993(毒蜥外泌肽-4)、BIM-51077、Aib(8,35)hGLP-1(7,37)NH₂、CJC-[131]、糊精激动剂(例如普兰林肽)、磷酸酪氨酸磷酸酶抑制剂(例如钒酸钠)、葡萄糖新生抑制剂(例如肝糖磷酸化酶抑制剂、葡萄糖-6-磷酸酶抑制剂、胰高血糖素拮抗剂)、SGLUT(钠-葡萄糖共转运蛋白)抑制剂(例如T-1095)、11 β -羟基类固醇去氢酶抑制剂(例如BVT-3498)、脂联素或其激动剂、IKK抑制剂(例如AS-2868)、瘦素抗性改进药、生长抑素受体激动剂(W001/25228、W003/42204、W098/44921、W098/45285、W099/22735等所述的化合物)、葡萄糖激酶活化剂(例如Ro-28-1675)、GIP(葡萄糖依赖性促胰岛素肽)。

[0628] 可确定多肽的治疗功效和组合疗法(包括本发明的多肽)的一种方式患者HbA1c含量降低。在一个实施方案中,本发明的多肽使HbA1c含量比用修饰的FGF-21多肽开始治疗之前两个月、用修饰的FGF-21多肽开始治疗之前三个月的HbA1c水平降低至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或至少50%的变化,或自基线的百分比变化。在另一个实施方案中,向还在用抗糖尿病剂治疗的患者施用本发明的多肽能调节抗糖尿病剂降低血糖的能力。

[0629] 在另一个实施方案中,本发明的修饰的FGF-21多肽调节曲格列酮降低胰岛素需求的能力。在本发明的一些实施方案中,与本发明的多肽组合使用的曲格列酮可用于延缓或预防2型糖尿病。

[0630] 在本发明的一个实施方案中,修饰的FGF-21多肽与磺酰脲类一起施用或在用磺酰脲类治疗之前或之后施用。在本发明的一些实施方案中,用治疗性剂量的修饰的FGF-21多肽治疗能调节血清葡萄糖。在另一个实施方案中,本发明的修饰的FGF-21多肽与Klotho β 一起施用,由此调节多肽对血糖的作用。在另一个实施方案中,本发明的修饰的FGF-21多肽与Klotho β 一起施用,由此比单独使用修饰的FGF-21多肽更能降低血糖。

[0631] XVI. 本发明的修饰的FGF-21多肽的治疗用途

[0632] 本发明的修饰的FGF-21多肽可用于治疗患有非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM:2型)、胰岛素依赖性糖尿病(1型)以及肥胖、葡萄糖清除不足、高血糖症、高胰岛素血症及任何可由FGF-21介导的其他疾病或病况的哺乳动物。

[0633] 普拉德-威利综合征(P.W.S.或PWS)是一种罕见遗传病症,其中染色体15(q 11-13)上的七个基因(或其一些子集)在父系染色体上是缺失的或不表达(染色体15q部分缺失)。PWS的特征为肌肉张力低、身高矮、性发育不完整、认知障碍、问题行为和可导致饮食过量并危及生命的肥胖的持续饥饿感。

[0634] 本发明提供一种治疗表现出如下一项或多项的哺乳动物的方法:1型糖尿病、2型糖尿病、肥胖、胰岛素抗性、高胰岛素血症、葡萄糖不耐症或高血糖症,其包括向所述需要此类治疗的哺乳动物施用治疗有效量的本发明的修饰的FGF-21多肽。

[0635] 治疗方法可足以在所述哺乳动物中实现如下修饰的至少一项:体脂肪储存降低、胰岛素抗性减轻、高胰岛素血症减轻、葡萄糖耐受增加和高血糖症减轻。

[0636] 本发明还涵盖一种降低患有与感染性损害相关的全身炎症反应综合征(SIRS)的危重患者死亡率及发病率的方法,所述全身炎症反应综合征如败血症、胰腺炎、局部缺血、多处创伤及组织损伤、出血性休克、免疫介导性的器官损伤、呼吸窘迫、休克、肾衰竭及多器官功能障碍综合征(MODS)以及非感染性病理性病因,该方法包括向危重患者施用治疗有效量的修饰的FGF-21。

[0637] 在一个实施方案中,本发明提供将本文公开的修饰的FGF-21多肽与另一药剂组合的组合物和方法,其用于治疗葡萄糖代谢受损(如胰岛素抗性、胰岛素分泌受损或高血糖症)。此类其他药剂包括例如如下一项或多项:磺酰脲类、PPAR- γ 激动剂、GPL-1受体激动剂、二肽基肽酶IV抑制剂、糊精类似物、双胍、多巴胺D2受体激动剂、美格替耐、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、抗脂质异常性胆酸螯合剂、胰岛素、细胞激素疗法、基因疗法和抗体疗法。在一些实施方案中,可向经施用如下另一治疗而未实现血糖浓度正常的患者施用本文公开的修饰的FGF-21多肽:例如用二甲双胍、吡格列酮、磺酰脲类、格列奈、口服噻唑烷二酮类(TZD)(如吡格列酮)、类胰高血糖素肽1(GLP-1)受体激动剂(如艾塞那肽)、DPP4抑制剂(如西他列汀、维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀(linagliptin)或替格列汀(teneligliptin))或组合疗法(如二甲双胍及吡格列酮、二甲双胍及磺酰脲类、二甲双胍及格列奈、二甲双胍和TZD、二甲双胍及吡格列酮、二甲双胍及GLP-1受体激动剂、二甲双胍和艾塞那肽、西他列汀及二甲双胍、西他列汀及辛伐他汀、维格列汀和二甲双胍、沙格列汀及二甲双胍、阿格列汀及吡格列酮、或利拉利汀和二甲双胍)或SGLT2抑制剂)如达格列净、卡格列净、依帕列净(empagliflozin)、伊格列净(ipragliflozin)或托格列净(tofogliflozin)治疗。

[0638] 在一些实施方案中,可施用本文公开的修饰的FGF-21多肽以预防或治疗肥胖(例如身体质量指数为至少25)。所述修饰的FGF-21多肽可与抗肥胖剂组合施用,所述抗肥胖剂

如奥利司他、利莫那班、西布曲明、肽YY (PYY,降低食欲的36个氨基酸的肽)、PYY类似物、CB-1拮抗剂、利莫那班、瘦素、瘦素类似物或苯丁胺。

[0639] 在一些实施方案中,可施用本文公开的修饰的FGF-21多肽以预防或治疗普拉德-威利综合征。

[0640] 应了解,本文所述的实施例和实施方案仅出于说明的目的,且本领域普通技术人员会想到根据其的各种修改或变化并包括在本申请案的主旨及范围以及所附权利要求书的范围内。也应了解,本文所用的术语仅出于描述例示性实施方案的目的而并不意欲限制本发明的范畴,本发明的范畴仅由所附的权利要求书限定。本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和/或其他文献均出于所有目的通过提述以其整体并入本文,其引用的程度就如同个体地指示将各单独的出版物、专利、专利申请案和/或其他文献通过提述并入以用于所有目的一样。

实施例

[0641] 提供如下实施例以进行说明,而非限制本发明。

[0642] 实施例1

[0643] FGF-21在大肠杆菌中的表达和纯化

[0644] 含有未修饰的或修饰的FGF-21表达构建体(其处于T7启动子控制下)的质粒转化至大肠杆菌菌株(如大肠杆菌的W3110 B2菌株)中,在该菌株中T7聚合酶的表达在阿拉伯糖诱导型启动子控制下进行。可将过夜细菌培养物1:100稀释至含有2X YT培养基的摇瓶中并在37℃生长至OD⁶⁰⁰为~0.8。蛋白表达可通过添加阿拉伯糖(最终为0.2%)和对-乙酰基-苯丙氨酸(pAcF)至4mM的终浓度来诱导。可将培养物温育适合的持续时间和温度,例如在37℃温育4小时。可使细胞沉淀并重悬于B-PER裂解缓冲液(Pierce) 100μl/OD/ml+10μg/ml DNA酶中并在37℃温育30min。可通过离心去除细胞物质且可去除上清液。可将沉淀重悬于等量的SDS-PAGE蛋白加载缓冲液中。可将样品加载于具有MES和DTT的4-12%PAGE凝胶上。纯化FGF-21的方法是本领域普通技术人员已知的且纯化可通过SDS-PAGE、Western印迹分析、电喷雾-电离离子阱质谱分析等来确定。

[0645] 通过混合为最终10%固体将细胞浆重悬于4℃包涵体(IB)缓冲液I(50mM Tris pH 8.0;100mM NaCl;1mM EDTA;1%Triton X-100;4℃)中。通过使重悬的物质流经过微流化床装置总计两次来裂解细胞,然后将其离心(10,000g;15min;4℃)并倾析上清液。通过重悬于另一体积的IB缓冲液I(50mM Tris pH 8.0;100mM NaCl;1mM EDTA;1%Triton X-100;4℃)中来洗涤IB沉淀并使重悬的物质经过微流化床装置总计两次,然后离心(10,000g;15min;4℃)并倾析上清液。使IB沉淀重悬于一个体积的缓冲液II(50mM Tris pH 8.0;100mM NaCl;1mM EDTA;4℃)中,然后离心(10,000g;15min;4℃)并倾析上清液。然后将IB球粒重悬于1/2体积的缓冲液II(50mM Tris pH 8.0;100mM NaCl;1mM EDTA;4℃)中。将IB等分至适当容器中,然后离心(10,000g;15min;4℃)并倾析上清液。溶解包涵体(在这一点可将其以其他方式储存于-80℃直至进一步使用)。

[0646] 将包涵体溶解于溶解缓冲液(20mM Tris,pH 8.0;8M脲;10mMβ-ME)中至10至15mg/mL的终浓度并在室温在持续混合下将溶解的IB温育1小时。通过过滤(0.45μm PES过滤器)去除不可溶物质并通过用额外溶解缓冲液稀释来调节蛋白浓度(未必总是需要)(当蛋白浓

度高时)。

[0647] 再折叠可通过在20mM Tris,pH 8.0;4℃中稀释至0.5mg/mL的最终蛋白浓度来实现。允许在4℃再折叠18至24小时。

[0648] 对于纯化,可使过滤的再折叠的反应物经过0.45μM PES过滤器。物质加载于用缓冲液A(20mM Tris,pH 7.5)平衡的Q HP柱(GE Healthcare)上。在20CV中以线性梯度至100%缓冲液B(20mMTris,pH 7.5;250mM NaCl)洗脱未修饰的或修饰的FGF-21。由此可由合并的洗脱级分产生单体FGF 21。获取Q HP合并物并缓冲液交换至20mM Tris,pH 8.0;2M尿素;1mM EDTA中。用50%冰醋酸使pH值降至4.0。将样品浓缩至约4.0±1.0mg/mL。向样品中添加12:1摩尔过量的PEG和终浓度为1%的乙酰肼,pH 4.0。在28℃温育样品48-72小时。然后向PEG反应物添加最终的50mM Tris碱,并用RO水稀释10倍。证实电导率<1mS/cm且pH值在8.0-9.0。将物质加载于用缓冲液A(20mM Tris,pH 8.0)平衡的Source 30Q柱(GE Healthcare)上。在超过20CV中用线性梯度至100%B(20mM Tris,pH 8.0;100mM NaCl)洗脱PEG-FGF-21。合并PEG-FGF-21并缓冲液交换至20mM Tris,pH 7.4;150mM NaCl中。将PEG物质浓缩至1-2mg/mL并用0.22μm PES过滤器过滤灭菌。将物质储存于4℃。为延长存储,急骤冷冻且存储于-80℃。

[0649] 实施例2

[0650] 产生包含非天然编码氨基酸的修饰的FGF-21多肽的方法

[0651] 引入的包含正交tRNA(O-tRNA)和正交氨酰tRNA合成酶(O-RS)的翻译系统可用于表达含有非天然编码氨基酸的修饰的FGF-21。O-RS优先氨酰化具有非天然编码的氨基酸的O-tRNA。然后翻译系统响应于编码的选择密码子将非天然编码的氨基酸插入至FGF-21中。适合的O-RS和O-tRNA序列描述于名称为“Compositions of Aminoacyl-tRNASynthetase and Uses Thereof”的WO 2006/068802(E9;SEQ ID NO:15)和名称为“Compositions of tRNA and Uses Thereof”的WO 2007/021297(F13;SEQ ID NO:16)中,其通过提述以其整体并入本文。例示性的O-RS和O-tRNA序列包括于下表2中。

[0652] 表2:例示性的正交tRNA(O-tRNA)和正交氨酰tRNA合成酶(O-RS)多肽及多核苷酸序列的序列标识

[0653]

SEQ ID NO: 17	詹氏甲烷球菌(<i>M. jannaschii</i>) mtRNA ^{Tyr} _{CUA}	tRNA
SEQ ID NO: 18	HLAD03; 一种优化的琥珀抑制子tRNA	tRNA
SEQ ID NO: 19	HL325A; 一种优化的AGGA 移码抑制子tRNA	tRNA
SEQ ID NO: 20	用于并入对-叠氮基-L-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 <i>p-Az-PheRS</i> (6)	RS
SEQ ID NO: 21	用于并入对-苯甲酰基-L-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 <i>p-BpaRS</i> (1)	RS
SEQ ID NO: 22	用于并入炔丙基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 炔丙基- <i>PheRS</i>	RS
SEQ ID NO: 23	用于并入炔丙基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 炔丙基- <i>PheRS</i>	RS
SEQ ID NO: 24	用于并入炔丙基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 炔丙基- <i>PheRS</i>	RS
SEQ ID NO: 25	用于并入对-叠氮基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 <i>p-Az-PheRS</i> (1)	RS
SEQ ID NO: 26	用于并入对-叠氮基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 <i>p-Az-PheRS</i> (3)	RS
SEQ ID NO: 27	用于并入对-叠氮基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 <i>p-Az-PheRS</i> (4)	RS

[0654]

SEQ ID NO: 28	用于并入对-叠氮基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 <i>p-Az-PheRS</i> (2)	RS
SEQ ID NO: 29	用于并入对-乙酰基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 (<i>LW1</i>)	RS
SEQ ID NO: 30	用于并入对-乙酰基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 (<i>LW5</i>)	RS
SEQ ID NO: 31	用于并入对-乙酰基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 (<i>LW6</i>)	RS
SEQ ID NO: 32	用于并入对-叠氮基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 (<i>AzPheRS</i> -5)	RS
SEQ ID NO: 33	用于并入对-叠氮基-苯丙氨酸的氨酰tRNA合成酶 (<i>AzPheRS</i> -6)	RS

[0655] 表3. 例示性的FGF-21、正交tRNA (O-tRNA) 和正交氨酰基tRNA合成酶 (O-RS) 多肽和多核苷酸序列

[0656]

SEQ ID #	序列名称
1	没有前导子的FGF-21的氨基酸序列 (P型) HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPE SLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLE DGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAPPEPPGI LAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
2	没有前导子的FGF-21的氨基酸序列 (P型)—带有His标签 MHHHHHSHSGGHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFD PEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLP GLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
3	具有前导子的FGF-21的氨基酸序列 (P型)— 具有3个亮氨酸的前导子(“209个 氨基酸的P型”或“P型”) MDSDETGFESGLWVSVLAGLLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYL YTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTS RFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNV YQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPP DVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
4	具有前导子的FGF-21的氨基酸序列 (P型)— 具有2个亮氨酸的前导子 MDSDETGFESGLWVSVLAGLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLY TDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSR FLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNK SPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQG RSPSYAS
5	没有前导子的FGF-21的氨基酸序列(L型) His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr

[0657]

	Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
6	具有前导子的FGF-21的氨基酸序列(L型) — 具有3个亮氨酸的前导子(209个氨基酸的L型) Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
7	具有前导子的 FGF-21的氨基酸序列(L型) —具有2个亮氨酸的前导子(208个氨基酸的L型) Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
8	没有前导子的FGF-21的核苷酸序列(P型) CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTC CGGCAGCGGTACCTCTACACAGATGATGCCAGCAGACAGAAGCCCA CCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGA

[0658]

	GCCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTC AAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATG GGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCC GGGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATAACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCC ACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGAC CCTGCACCCCCGAGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCC CCCGCACCCCCGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGAT GTGGGCTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGA AGCCCCAGCTACGCTTCCTGA
9	没有前导子的FGF-21的核苷酸序列 (P型)—带His标签 ATGCATCATCATCATCATAGCGGCGGCCACCCCATCCCTGACTCC AGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTAC ACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCACCTGGAGATCAGGGAGGA TGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCCTGC AGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAG ACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCG CTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTGAG GACGGATAACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGGCCTCCCGCTGCAC CTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCCGAGGACC AGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACCCCCGGAGCC ACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGACCC TCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCTTC CTGA
10	具有前导子的FGF-21的核苷酸序列(P型)— 具有3个亮氨酸的前导子 ATGGACTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGACTGTGGGTTTCT GTGCTGGCTGGTCTTCTGCTGGGAGCCTGCCAGGCACCCCCATCCCT GACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTAC CTCTACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCACCTGGAGATCAG GGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTC TCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAG TCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATG GATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTC TTGAGGACGGATAACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGGCCTCCCGC TGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCGA GGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACCCCCG GAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCG GACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTAC GCTTCCTGA
11	具有前导子的FGF-21的核苷酸序列 (P型)— 具有2个亮氨酸的前导子

[0659]

	ATGGA CTCTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGACTGTGGGTTTCT GTGCTGGCTGGTCTTCTGGGAGCCTGCCAGGCACACCCCATCCCTGAC TCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTC TACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCACCTGGAGATCAGGGA GGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCC TGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCA AGACATCCAGGTTCCCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGAT CGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTG AGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGGCCTCCCGCTGC ACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCGAGGA CCAGCTCGCTTCCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACCCCGGAG CCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGAC CCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCT TCCTGA
12	没有前导子的FGF-21的核苷酸序列 (L型) CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGCCAAGTCC GGCAGCGGTACCTCTACACAGATGATGCCAGCAGACAGAAGCCCAC CTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAG CCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCA AATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCCCTGTGCCAGCGGCCAGATGG GGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCG GGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCA CGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCC TGCACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCC CGCACTCCCGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGT GGGCTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAG CCCAGCTACGCTTCCTGA
13	具有前导子的FGF-21的核苷酸序列 (L型) - 具有3个亮氨酸的前导子 ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG CTG GGA GCC TGC CAG GCA CAC CCC ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC CAA GTC CGG CAG CGG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG ACA GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG GGC GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA GCC TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA TCC AGG TTC CTG TGC CAG CGG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CGG GAG CTG CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CGG

[0660]

	GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA GGC CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC CCC CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA
14	具有前导子的FGF-21的核苷酸序列 (L型) - 具有2个亮氨酸的前导子 ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG GGA GCC TGC CAG GCA CAC CCC ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC CAA GTC CGG CAG CGG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG ACA GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG GGC GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA GCC TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA TCC AGG TTC CTG TGC CAG CGG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CGG GAG CTG CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CGG GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA GGC CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC CCC CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA
34	FGF-21的氨基酸序列 (褐家鼠(<i>Rattus norvegicus</i>) - ref NP_570108.1 [18543365]) Met Asp Trp Met Lys Ser Arg Val Gly Ala Pro Gly Leu Trp Val Cys Leu Leu Leu Pro Val Phe Leu Leu Gly Val Cys Glu Ala Tyr Pro Ile Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Thr Ala His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Thr Leu Tyr Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Lys Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Gln Asp Pro Ala Thr Arg Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Pro His Glu Pro Gln Glu Gln Pro Gly Val Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
35	FGF-21的氨基酸序列 (小鼠(<i>Mus musculus</i>) - ref NP_064397.1 [9910218]) Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Ala Ala His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys

[0661]

	Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala Thr Ser Trp Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Leu His Glu Pro Gln Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
36	FGF-21的氨基酸序列 (斑马鱼(Danio rerio) - ref NP_001038789.1 [113671792]) Met Leu Phe Ala Cys Phe Phe Ile Phe Phe Ala Leu Phe Pro His Leu Arg Trp Cys Met Tyr Val Pro Ala Gln Asn Val Leu Leu Gln Phe Gly Thr Gln Val Arg Glu Arg Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Leu Phe Leu Glu Met Asn Pro Asp Gly Ser Val Lys Gly Ser Pro Glu Lys Asn Leu Asn Cys Val Leu Glu Leu Arg Ser Val Lys Ala Gly Glu Thr Val Ile Gln Ser Ala Ala Thr Ser Leu Tyr Leu Cys Val Asp Asp Gln Asp Lys Leu Lys Gly Gln His His Tyr Ser Ala Leu Asp Cys Thr Phe Gln Glu Leu Leu Leu Asp Gly Tyr Ser Phe Phe Leu Ser Pro His Thr Asn Leu Pro Val Ser Leu Leu Ser Lys Arg Gln Lys His Gly Asn Pro Leu Ser Arg Phe Leu Pro Val Ser Arg Ala Glu Asp Ser Arg Thr Gln Glu Val Lys Gln Tyr Ile Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ser Asp Asp Pro Leu Gly Met Gly His Arg Ser His Leu Gln Thr Val Phe Ser Pro Ser Leu His Thr Lys Lys
37	Klotho β 的氨基酸序列 (人(Homo sapiens) - ref NP_783864.1 [28376633]) MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVT GFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFKNFFWIGITGALQVEGSWK KDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSI SWPRLFPDGIPTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEIVTLYHWDLPLALQE KYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHPYLVAWHGYGTG MHAPGEKGNLAAVYTVGHNLKAHASKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLG SHWIEPNRSENTMDIFKCQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL NWKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYY KQIIRENGFSLKESTPDVQGGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHL YVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYR FALDWASVLPTGNLSAVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPHTA HLGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRL SDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHAD WAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDPAAAMREYIASKH RRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSD RDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRLKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQ ALEDDRRLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYAFKLAEKSKPRFGFF TSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPL

[0662]

	IFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS
38	Klotho β 的氨基酸序列 (小鼠 - refNP_112457.1 GI:13626032) MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSVLSAFVLLRA VTGFSGDGKAIWDDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEG SWKTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSF YQFSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYRALLDSLVLNRNIEPIVTLYHWDL PLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHPYLVAV HGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLKAHSKVWHNYDKNFRPHQKG WLSITLGSHWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSVVLGWFANPIHGDGDYPEF MKTGAMIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLN LRQVLNWIKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQ AIKFDEIRVFGYTAWTLLDGFQWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSS AHYYKQIIQDNGFPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFT DPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKV THYQFALDWTSLPTGNLSKVNQRQVLRYYRCVVSEGLKLGVPMTLYH PTHSHLGLPLLLSSGGWLNMTAKAFQDYAELCFRELGDVLKLVITINE PNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGAVSLS LHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYI ASKNQRLSSSVLPRFTAKESRLVKGTVDYFALNHFTTRFVIHKQLNTNR SVADRQVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGVRLKLLAWIRNRYRDRDIYITAN GIDDLALEDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYYAFKLTEESKP RFGFTSDFRAKSSVQFYSKLISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFLV EKKPLIFFGCCFISTLAVLLSITVFHHQKRRKFQKARNLQ NIPLKKGHSRVFS
39	OmpA核苷酸前导序列 atgaaaaaaactgctatcgcatcgctgtagctctggctggttcgcgaccgtagctaacgct
40	OmpA氨基酸前导序列 M K K T A I A I A V A L A G F A T V A N A
41	MalE核苷酸前导序列 atgaaaataaaaacaggtgcacgcattcctcgattatccgcattaacgacgatgatgtttccgcctcgctctcgcc
42	MalE氨基酸前导序列 M K I K T G A R I L A L S A L T T M M F S A S A L A
43	StII核苷酸前导序列 atgaaaaagaatcgcatttcttctgcattctatgttcgtttttctattgctacaaatgcctatgca
44	StII氨基酸前导序列 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A

[0663] 用含有修饰的FGF-21基因和正交氨酰tRNA合成酶/tRNA对(特异性针对所需的非天然编码的氨基酸)的质粒转化大肠杆菌允许非天然编码的氨基酸位点特异性并入修饰的FGF-21多肽中。

[0664] 野生型成熟FGF-21可通过PCR由cDNA合成反应扩增,例如使用标准方案来源于健康人肝脏多聚A+mRNA (Biochain) 并克隆至如pET30的载体中(例如利用NcoI-BamHI裂解位

点)。在任选进行的序列确认之后,可对FGF-21(其可包括纯化标签,如N末端HHHHHSGG序列)进行亚克隆。例如,可将FGF-21亚克隆至含有来自詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*) (Mj tRNA^{Tyr/CUA})的琥珀抑制子酪氨酰基tRNA^{Tyr/CUA}的抑制载体中,并连接至适合启动子,例如在衍生自大肠杆菌脂蛋白启动子序列的合成启动子的组成性控制下(Miller, J.H., *Gene*, 1986),以及在大肠杆菌GlnRS启动子控件下的正交酪氨酰基-tRNA-合成酶(MjTyrRS)。未修饰的或修饰的FGF-21多肽的表达在T7启动子的控制下。可使用标准快速变化突变方案引入琥珀突变(Stratagene; La Jolla, California)。可对构建体进行序列验证。

[0665] 可通过在核酸内的两个不同位点引入选择密码子将两个不同的非天然编码氨基酸引入修饰的FGF-21多肽中。

[0666] 用对-乙酰基-苯丙氨酸(pAcF)抑制

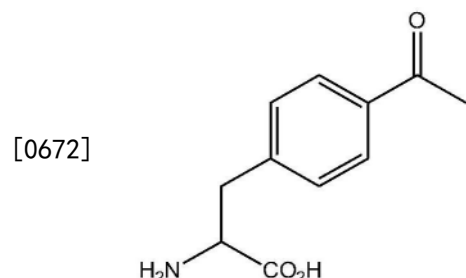
[0667] 可将含有修饰的FGF-21表达构建体和O-tRNA及O-RS表达构建体的质粒(其可处于相同或不同的质粒中或稳定转染至菌株中)转化至大肠杆菌的W3110 B2菌株中,其中T7聚合酶的表达在阿拉伯糖诱导性启动子的控制下。可将过夜细菌培养物1:100稀释至含有2×YT培养基的摇瓶中且在37℃生长至~0.8的OD₆₀₀。蛋白表达可通过添加阿拉伯糖(最终为0.2%)和对-乙酰基-苯丙氨酸(pAcF)至4mM的终浓度来诱导。可将培养物温育适合的持续时间和温度,例如在37℃温育4小时。可将细胞沉淀并重悬于B-PER溶解缓冲液(Pierce) 100 μl/OD/ml+10 μg/ml DNA酶中并在37℃温育30min。可通过离心去除细胞物质并可去除上清液。可使沉淀重悬于等量SDS-PAGE蛋白加载缓冲液中。可将样品加载于具有MES和DTT的4-12%PAGE凝胶上。纯化FGF-21的方法是本领域普通技术人员已知的且纯化可通过SDS-PAGE、Western印迹分析、电喷雾-电离离子阱质谱分析等来确定。

[0668] His标记或非His标记的突变体FGF-21蛋白可用本领域普通技术人员已知的方法来纯化。例如,ProBond镍-螯合树脂(Invitrogen, Carlsbad, CA)可通过制造商提供的标准His标记蛋白纯化程序来使用。

[0669] 实施例3

[0670] 将含羰基的氨基酸引入至修饰的FGF-21多肽中以及随后与含氨基氧基的PEG反应

[0671] 如下的例示性方法可用于产生连接至半衰期延长部分的修饰的FGF-21多肽。该方法并入了含酮的非天然编码氨基酸,其随后与半衰期延长部分(如具有约30,000Da的分子量的含氨基氧基的PEG)反应。所选的FGF-21残基用具有如下结构的非天然编码的氨基酸取代:



[0673] 用于将对-乙酰基-苯丙氨酸位点特异性并入至FGF-21中的序列可为SEQ ID NO:1 (FGF-21)、SEQ ID NO:16或17 (muttRNA, 詹氏甲烷球菌 (*M. jannaschii*) mtRNA^{Tyr_{CUA}})、15、29、30或31 (TyrRS LW1、5或6) 或本文所述的任何修饰的FGF-21多肽。

[0674] 一经修饰,包含含羰基氨基酸的FGF-21多肽即与下式的含氨基氧基PEG衍生物反应:

[0675] $R\text{-PEG(N)}\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-O-NH}_2$

[0676] 其中R是甲基,n是3且N为所选分子量,例如约30,000Da。

[0677] 或者,含酮的非天然编码氨基酸可连接至具有如下结构的PEG试剂:

[0678] $R\text{-PEG(N)}\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{-O-NH}_2$

[0679] 其中R=甲基,n=4且N为所选分子量,例如约30,000Da。

[0680] 使以10mg/mL溶解于25mM MES(Sigma Chemical,St.Louis,MO) pH 6.0、25mM Hepes(Sigma Chemical,St.Louis,MO) pH 7.0或10mM乙酸钠(Sigma Chemical,St.Louis,MO) pH 4.5中的纯化的含对-乙酰基-苯丙氨酸的修饰的FGF-21与10至100倍过量的含氨基氧基的PEG反应,然后在室温搅拌10-16小时(Jencks,W.J.Am.Chem.Soc.1959,81,pp 475)。然后将PEG-FGF-21稀释于适当缓冲液中用于立即纯化及分析。

[0681] 实施例4

[0682] 修饰的FGF-21多肽的生产

[0683] 生产了编码如图1A-B所示的各个修饰的FGF-21多肽的多核苷酸。使用本领域已知的标准方法将多核苷酸序列中的DNA密码子使用针对大肠杆菌表达进行优化(SEQ ID NO: 317和318分别为编码化合物2和聚乙二醇化的化合物2的例示性多核苷酸序列)。若存在连接肽,则其编码序列基于如下的标准遗传密码加以选择:例如对于甘氨酸而言是GGU、GGC、GGA或GGG、对于丝氨酸而言是UCU、UCC、UCA、UCG、AGU或AGC、对于组氨酸而言是CAU或CAC等。在大肠杆菌中表达修饰的FGF-21多肽并加以纯化(本文中描述了例示性方法)。生产了含有非天然编码氨基酸对-乙酰基-苯丙氨酸(缩写为pACF或pAF)的修饰的FGF-21多肽(实施例2中提供了例示性方法)。简言之,进一步修饰编码多核苷酸以在多核苷酸序列中的对应位置并入有选择密码子以编码pACF,并在经工程化以表达正交tRNA(O-tRNA)和正交氨酰tRNA合成酶(O-RS)的细胞中表达,从而使选择密码子在所选位置处指向包括pACF。然后使pACF连接至平均分子量为约30kDa的聚(乙二醇)(PEG)(实施例3中所提供了例示性方法)。

[0684] 化合物2编码序列(SEQ ID NO:317)

M H P I P D S S P L L Q F G G Q V R Q R
1 ATG CAT CCT ATT CCT GAT TCT TCT CCT CTG CTG CAA TTT GGG GGT CAG GTG CGC CAA CGT
Y L Y T D D A Q Q T E A H L E I R E D G
61 TAC CTG TAC ACC GAC GAT GCG CAA CAG ACT GAG GCT CAC CTG GAG ATC CGT GAG GAC GGG
T V G G A A D Q S P E S L L Q L K A L K
121 ACT GTC GGA GGG GCT GCC GAT CAA TCC CCA GAG TCA CTG CTG CAA CTG AAA GCC CTG AAG
P G V I Q I L G V K T S R F L C Q R P D
[0685] 181 CCT GGG GTC ATT CAG ATC CTG GGC GTA AAG ACG AGT CGT TTC CTG TGC CAA CGT CCT GAC
G A L Y G S L H F D P E A C S F R E L L
241 GGG GCA CTG TAT GGC TCG CTG CAT TTT GAT CCT GAG GCT TGT AGT TTT CGC GAA CTG CTG
L E D G Y N V Y Q S E A H G L P L H L G
301 CTG GAA GAT GGT TAC AAT GTG TAT CAG AGT GAA GCA CAC GGT CTG CCT CTG CAC CTG GGT
S G R G P A R F L P L P G L P P A P P E
361 TCT GGT CGT GGT CCG GCG CGT TTT CTG CCA CTG CCT GGC CTG CCT CCA GCA CCA CCT GAA
P P G I L A P Q P P D V G S S D P L S M
421 CCA CCG GGT ATT CTG GCT CCG CAA CCT CCA GAC GTC GGG AGT TCA GAT CCT CTG TCG ATG
[0686] V E P S Q G R S P S Y A S
481 GTA GAA CCG TCA CAA GGT CGC TCT CCT AGT TAC GCG TCA
[0687] 聚乙二醇化的化合物2编码序列 (SEQ ID NO:318)

M H P I P D S S P L L Q F G G Q V R Q R
 1 ATG CAT CCT ATT CCT GAT TCT TCT CCT CTG CTG CAA TTT GGG GGT CAG GTG CGC CAA CGT
 Y L Y T D D A Q Q T E A H L E I R E D G
 61 TAC CTG TAC ACC GAC GAT GCG CAA CAG ACT GAG GCT CAC CTG GAG ATC CGT GAG GAC GGG
 T V G G A A D Q S P E S L L Q L K A L K
 121 ACT GTC GGA GGG GCT GCC GAT CAA TCC CCA GAG TCA CTG CTG CAA CTG AAA GCC CTG AAG
 P G V I Q I L G V K T S R F L C Q R P D
 181 CCT GGG GTC ATT CAG ATC CTG GGC GTA AAG ACG AGT CGT TTC CTG TGC CAA CGT CCT GAC
 G A L Y G S L H F D P E A C S F R E L L
 [0688] 241 GGG GCA CTG TAT GGC TCG CTG CAT TTT GAT CCT GAG GCT TGT AGT TTT CGC GAA CTG CTG
 L E D G Y N V Y pAF S E A H G L P L H L G
 301 CTG GAA GAT GGT TAC AAT GTG TAT TAG AGT GAA GCA CAC GGT CTG CCT CTG CAT CTG GGC
 S G R G P A R F L P L P G L P P A P P E
 361 TCC GGC CGC GGT CCG GCC CGT TTT CTG CCA CTG CCT GGC CTG CCT CCA GCA CCA CCT GAA
 P P G I L A P Q P P D V G S S D P L S M
 421 CCA CCG GGT ATT CTG GCT CCG CAA CCT CCA GAC GTC GGG AGT TCA GAT CCT CTG TCG ATG
 V E P S Q G R S P S Y A S
 481 GTA GAA CCG TCA CAA GGT CGC TCT CCT AGT TAC GCG TCA

[0689] 如下文实施例中所详述的,进一步表征修饰的FGF-21多肽,包括测试糖尿病模型中的体外生物活性、稳定性、脱酰胺化及聚集体形成的倾向、对体内蛋白水解的抗性、免疫原性、药代动力学和体内生物活性。

[0690] 生产的修饰的FGF-21多肽的完整多肽序列(其部分序列示于图1A-B中)如下:

[0691] 化合物1

[0692] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:101)

[0693] 化合物2

[0694] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARGFLPLPGLPPAPPEPPGI LAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:102)

[0695] 化合物3

[0696] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:103)

[0697] 化合物4

[0698] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP GKKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP
PAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:104)

[0699] 化合物5

[0700] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP GDKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPA
PPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:105)

[0701] 化合物6

[0702] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP GHKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPA
PPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:106)

[0703] 化合物7

[0704] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP GDKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP
PAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:107)

[0705] 化合物8

[0706] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGARFLPLPGLPPAPPEPPGILAP
QPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:108)

[0707] 化合物9

[0708] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP GQKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP
PAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:109)

[0709] 化合物10

[0710] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGGPARFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:110)

[0711] 化合物11

[0712] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGHRDPAPRGPARFLPLPGLPPA
PEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:111)

[0713] 化合物12

[0714] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPHHSGRDPAPRGPARFLPLPGLPPA
PPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:112)

[0715] 化合物13

[0716] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGKDSQDPAPRGPARFLPLPGLPPA

PPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:113)

[0717] 化合物14

[0718] MHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP GHKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPA
PPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:114)

[0719] 化合物15

[0720] MHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP GHKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPA
PPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGREPSYAS (SEQ ID NO:115)

[0721] 化合物16

[0722] MHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP GHKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPA
PPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:116)

[0723] 化合物17

[0724] MHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP GHKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPA
PPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:117)

[0725] 化合物18

[0726] MHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP
PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEP (SEQ ID NO:118)

[0727] 化合物19

[0728] MHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPA
PPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:119)

[0729] 化合物20

[0730] MHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGGHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPP
EPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:120)

[0731] 化合物21

[0732] MHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPP
EPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:121)

[0733] 化合物22

[0734] MHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLSGGPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP
PGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:122)

[0735] 化合物23

[0736] MHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG

VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGGGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILA
PQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:123)

[0737] 化合物24

[0738] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGGGRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQ
PPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:124)

[0739] 化合物25

[0740] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPSSGGRFLPLPGLPPAPPEPPGILAP
QPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:125)

[0741] 化合物26

[0742] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHSGGPAPRGPAPFLPLPGLPPAPPEPP
GILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:126)

[0743] 化合物27

[0744] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHSGGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILA
PQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:127)

[0745] 化合物28

[0746] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPHGGRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPD
VGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:128)

[0747] 化合物29

[0748] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPHSGGRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPP
DVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:129)

[0749] 化合物30

[0750] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPHGSGRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPP
DVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:130)

[0751] 化合物31

[0752] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGGPARFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDVGSSDPLSMVTPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:131)

[0753] 化合物32

[0754] MHHHHHHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGV
IQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPFLP
LPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:132)

[0755] 聚乙二醇化的化合物1

[0756] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPL PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:201)

[0757] 聚乙二醇化的化合物2

[0758] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGSGRGPAPRFLPLPGLPPAPPE PPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:202)

[0759] 聚乙二醇化的化合物5

[0760] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPGDKSRDPAPRGPAPRFLPLPG LPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:205)

[0761] 聚乙二醇化的化合物6

[0762] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPAPRFLPLPG LPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:206)

[0763] 聚乙二醇化的化合物10

[0764] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGSGGPAPRFLPLPGLPPAPPEP PGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:210)

[0765] 聚乙二醇化的化合物11

[0766] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGSGHRDPAPRGPAPRFLPLPGL PPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:211)

[0767] 聚乙二醇化的化合物12

[0768] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPHHSGRDPAPRGPAPRFLPLPG LPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:212)

[0769] 聚乙二醇化的化合物19

[0770] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGSGPHRDPAPRGPAPRFLPLPG LPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:219)

[0771] 聚乙二醇化的化合物20

[0772] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGGHRDPAPRGPAPRFLPLPGLP PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:220)

[0773] 聚乙二醇化的化合物21

[0774] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGSGRDPAPRGPAPRFLPLPGLP PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:221)

[0775] 聚乙二醇化的化合物22

[0776] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLSGGPAPRGPAPFLPLPGLPPA PPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:222)

[0777] 聚乙二醇化的化合物23

[0778] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGGGPAPFLPLPGLPPAPPEPP GILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:223)

[0779] 其他修饰的FGF-21多肽生产成融合蛋白。一些修饰的FGF-21多肽含有化合物2 (有或无N末端甲硫氨酸) 的序列 (SEQ ID NO:102), 其融合至一种或多种融合配偶体 (如Fc域或其片段、PKE Adnectin (“PKE”)、或修饰的或未修饰的人血清白蛋白 (“HSA”) 序列和任选的连接肽)。其他修饰的FGF-21多肽基于化合物1的野生型序列 (有或无N末端甲硫氨酸)。包括不同PKE Adnectin序列形式。这些形式称为“PKE (1)”或“PKEI”和“PKE (2)”或PKEII。

[0780] PKE (1) 的氨基酸序列为

[0781] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD YTITVYAVYGS KYYYPI SINYRTEIEKPSQ (SEQ ID NO:319)。PKE (2) 的氨基酸序列为

[0782] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP (SEQ ID NO:320)。当在融合蛋白的N末端包括PKE (1) 或PKE (2) 时, 表达于大肠杆菌中的序列包括N末端甲硫氨酸, 预期其在表达于大肠杆菌中时被met外肽酶裂解, 产生无N末端甲硫氨酸的成熟序列; 如下列表中显示了预期的无N末端甲硫氨酸的PKE融合蛋白的成熟形式。

[0783] 一些融合蛋白中含有的人血清白蛋白序列为HuSA (C34A)。其氨基酸序列为:

[0784] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLS QRFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO:321)。

[0785] 一些融合蛋白中含有的另一人血清白蛋白序列为HAS (C34A, des Leu-585)。其氨基酸序列为:

[0786] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLS QRFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK

KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG (SEQ ID NO:322)。

[0787] G4S_x3是指序列GGGS重复3次,即GGGS₃GGGS₃GGGS₃。

[0788] 例示性的融合蛋白含有多于一个的修饰的FGF-21多肽,例如化合物141-146。

[0789] 融合蛋白化合物的序列显示如下,且这些融合蛋白的特征概述于图40A-C中。

[0790] 化合物101:PKE (2) -L1-FGF21 (化合物2)

[0791] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTPGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG
TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLP
LHLGSGRGPARGFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:401)

[0792] 化合物102:PKE (2) -L2-FGF21 (化合物2)

[0793] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTPGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR
EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPARGFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:402)

[0794] 化合物103:PKE (2) -L3-FGF21 (化合物2)

[0795] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTPEEEEDEEEEDHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEA
HLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY
QSEAHGLPLHLGSGRGPARGFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:
403)

[0796] 化合物104:PKE (2) -L4-FGF21 (化合物2)

[0797] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTPPSPEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEA
HLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY
QSEAHGLPLHLGSGRGPARGFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:
404)

[0798] 化合物105:PKE (2) -L5-FGF21 (化合物2)

[0799] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTPGSHHHHHHHGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT
EAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYN
VYQSEAHGLPLHLGSGRGPARGFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID
NO:405)

[0800] 化合物106:PKE (2) -L6-FGF21 (化合物2)

[0801] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTPGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDA
QQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLED
GYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARGFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID
NO:406)

[0802] 化合物107:PKE (2) -L7-FGF21 (化合物2)

[0803] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPGGGGSGGGSGGGSGSHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDA
QQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLED
GYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID
NO:407)

[0804] 化合物108:PKE (2) -L8-FGF21 (化合物2)

[0805] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPGSGSGSGSGSGSGSGSHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDD
AQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLE
DGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ
ID NO:408)

[0806] 化合物109:PKE (2) -L9-FGF21 (化合物2)

[0807] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSTPPTPSPSTPPTPSPSHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYT
DDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELL
LEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ
ID NO:409)

[0808] 化合物110:PKE (2) -L10-FGF21 (化合物2)

[0809] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPHPIDSSPLLQFGGQVRQ
RYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACS
FRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSY
AS (SEQ ID NO:410)

[0810] 化合物111:PKE (2) -L11-FGF21 (化合物2)

[0811] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGSHPIPDSPLLQFGGQV
RQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEA
CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSP
SYAS (SEQ ID NO:411)

[0812] 化合物112:PKE (2) -L12-FGF21 (化合物2)

[0813] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPHPIPDSPLLQ
FGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLH
FDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPS
QGRSPSYAS (SEQ ID NO:412)

[0814] 化合物113:PKE (2) -L13-FGF21 (化合物2)

[0815] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSTPPTPSPSTPPTPSPSTPPTPSPSTPPTPSPSHPIP
SSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA

LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:413)

[0816] 化合物114:PKE (2) -L14-FGF21 (化合物2)

[0817] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:414)

[0818] 化合物115:PKE (2) -L15-FGF21 (化合物2)

[0819] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:415)

[0820] 化合物116:PKE (2) -L16-FGF21 (化合物2)

[0821] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:416)

[0822] 化合物117:PKE (2) -L17-FGF21 (化合物2)

[0823] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:417)

[0824] 化合物118:PKE (2) -L18-FGF21 (化合物2)

[0825] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPGGSPTPEPHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:418)

[0826] 化合物119:PKE (2) -L19-FGF21 (化合物2)

[0827] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPEEEDPTPEPHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:419)

[0828] 化合物120:PKE (2) -L20-FGF21 (化合物2)

[0829] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS

GLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEPHPIPDSPLLQFGGQVR
QRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGS LHFDP
EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSP
S YAS (SEQ ID NO:420)

[0830] 化合物121:PKE (2) -L21-FGF21 (化合物2)

[0831] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPTPEPPSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEPPSPEPHPIPDS
PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLY
GS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSM
VEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:421)

[0832] 化合物122:PKE (2) -L22-FGF21 (化合物2)

[0833] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPTPEPPSPEPPTPEPGGGGSPSEPPTPEPPSPEPHPIPDS
SPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGL
YGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:422)

[0834] 化合物123:PKE (2) -L23-FGF21 (化合物2)

[0835] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPTPEPSPEPPTPEPSPEPTPEPHPIPDSPLLQFGGQ
VRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGS LHFDP
EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRS
PSYAS (SEQ ID NO:423)

[0836] 化合物124:HuSA (C34A) -L201-FGF21 (化合物2)

[0837] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF LGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNL IKQNCELFEQLGEYKFQNAL LVRYYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMP
C AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETVVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKADDKETCF AEKGKLVAAASQAALGLGSHPIPDSSPLLQFG
GQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGS LHFDP
EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQ
GRSPSYAS (SEQ ID NO:424)

[0838] 化合物125:HuSA (C34A) -L202-FGF21 (化合物2)

[0839] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVEND

EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLGGGSGHPIPDSSPLL
QFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS
LHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEP
SQERSPSYAS (SEQ ID NO:425)

[0840] 化合物126:HuSA (C34A) -L203-FGF21 (化合物2)

[0841] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLGETGSHPIPDSSPLL
QFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS
LHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEP
SQERSPSYAS (SEQ ID NO:426)

[0842] 化合物127:HuSA (C34A) -L204-FGF21 (化合物2)

[0843] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLGGGSGGGGSHPIPD
SSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPL
SMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:427)

[0844] 化合物128:HuSA (C34A) -L205-FGF21 (化合物2)

[0845] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK

KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLGETGSSGEGTHPIPD
SSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPL
SMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:428)

[0846] 化合物129:HuSA (C34A) -L206-FGF21 (化合物2)

[0847] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNL IKQNCELFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLGGGSGGGGSGGGGS
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQ
RPD GALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVG
SSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:429)

[0848] 化合物130:HuSA (C34A) -L207-FGF21 (化合物2)

[0849] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNL IKQNCELFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLGETGSSGEGTGSTGS
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQ
RPD GALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVG
SSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:430)

[0850] 化合物131:HuSA (C34A) -L208-FGF21 (化合物2)

[0851] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNL IKQNCELFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLGGGSGGGGSGGGGS
GGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTS
RFLCQRPD GALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQ

PPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:431)

[0852] 化合物132:HuSA (C34A) -L209-FGF21 (化合物2)

[0853] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIA
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLGETGSSGEGTGSTGS
GAGESHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTS
RFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQ
PPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:432)

[0854] 化合物133:HuSA (C34A, des Leu-585) -L211-FGF21 (化合物2)

[0855] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIA
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGGGGSGGGSGGGGSH
PIPSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQR
PDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVG
SDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:434)

[0856] 化合物134:HuSA (C34A, des Leu-585) -L207-FGF21 (化合物2)

[0857] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIA
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGGETGSSGEGTGSTGSH
PIPSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQR
PDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVG
SDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:435)

[0858] 化合物135:HuSA (C34A, des Leu-585) -L211-FGF21 (化合物1)

[0859] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHT

LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELF EQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGGGGSGGGSGGGGSH
PIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQR
PDGALYGLSHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 436)

[0860] 化合物136:HuSA (C34A, des Leu-585) -L207-FGF21 (化合物1)

[0861] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELF EQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGGETGSSGEGTGSTGSH
PIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQR
PDGALYGLSHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 437)

[0862] 化合物137:FGF21 (化合物2) -L205-HuSA (C34A) -

[0863] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGALYGLSHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPRFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFED
HVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLPR
LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGK
ASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CE
NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYS
VVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELF EQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQV
STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD
ETYPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAE
EGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO: 440)

[0864] 化合物138:FGF21 (化合物2) -L209-HuSA (C34A) -

[0865] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGALYGLSHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPRFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFA
QYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQ

HKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP
KLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADD
RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY
EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELF EQLGEYKFQNALL
VRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNR
RPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKK
ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO:441)

[0866] 化合物139:FGF21 (化合物2) -L210-HuSA (C34A) -

[0867] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALPGVILGV
KTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDV GSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGSDAHKSEVAHRFKDLGEEN
FKALVLI AFAQYLQQAPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
EPERNECFLQHKKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQ
AADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECC
HGD LLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA
KDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELF EQL
GEYKFQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT
KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
FAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO:442)

[0868] 化合物140:FGF21 (化合物1) -L209-HuSA (C34A) -

[0869] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALPGVILGV
KTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGP ARFLPLPGLPP
APPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENF
KALVLI AFAQYLQQAPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE
PERNECFLQHKKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA
ADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCH
GDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAK
DVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELF EQLG
EYKFQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT
CCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDF
AAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO:443)

[0870] 化合物141:FGF21 (化合物2) -L209-HuSA (C34A) -G4Sx3-FGF21 (化合物2)

[0871] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALPGVILGV
KTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDV GSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFA
QYLQQAPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQ
HKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP
KLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADD
RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY

EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALL
VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNR
RPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK
ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR
EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:446)

[0872] 化合物142:FGF21 (化合物1) -L209-HuSA (C34A) -G4Sx3-FGF21 (化合物1)

[0873] HPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPFLPLPGLPP
APPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENF
KALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE
PERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA
ADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCH
GDLLECADD RADLAKY ICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAK
DVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLG
EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTK
CCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDF
AAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ
QTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYSLHFDPEACSFRELLEDG
YNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSY
AS (SEQ ID NO:447)

[0874] 化合物143:FGF21 (化合物2) -L209-HuSA (C34A,des Leu-585) -G4Sx3-FGF21 (化合
物2)

[0875] HPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFA
QYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQ
HKDDNP NLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLP
KLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD
RADLAKY ICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY
EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALL
VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNR
RPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK
ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRE
DGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHG
LPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:448)

[0876] 化合物144:FGF21 (化合物1) -L209-HuSA (C34A,des Leu-585) -G4Sx3-FGF21 (化合
物1)

[0877] HPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV

KTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPP
APPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENF
KALVLI AFAQYLQQAPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE
PERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT ECCQA
ADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECC
GDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAK
DVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELF EQLG
EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTK
CCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDF
AAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ
TEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALPGV I QILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
(SEQ ID NO:449)

[0878] 化合物145:FGF21 (化合物2) -L210-HuSA (C34A) -G4Sx3-FGF21 (化合物2)

[0879] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALPGV I QILGV
KTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARGPARFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDV GSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGSDAHKSEVAHRFKDLGEEN
FKALVLI AFAQYLQQAPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
EPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT ECCQ
AADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECC
HGDLECA DD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA
KDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELF EQL
GEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTK
KCCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
FAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDA
QQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALPGV I QILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLED
GYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID
NO:450)

[0880] 化合物146:FGF21 (化合物1) -L210-HuSA (C34A) -G4Sx3-FGF21 (化合物1)

[0881] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALPGV I QILGV
KTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPP
APPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGSDAHKSEVAH
RFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRY
KAAFT ECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTD
LTKVHTECCGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK
DVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IK
QNC ELF EQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE
KTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATK

EQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVR
QRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EAC
SFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMV
GPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:451)

[0882] 化合物147:PKE (1) -L1-FGF21 (化合物2)

[0883] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGS KYYYYPISINYRTEIEKPSQGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA
ADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGS
GRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:452)

[0884] 化合物148:PKE (1) -L2-FGF21 (化合物2)

[0885] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGS KYYYYPISINYRTEIEKPSQGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTV
GGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLH
LGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:453)

[0886] 化合物149:PKE (1) -L3-FGF21 (化合物2)

[0887] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGS KYYYYPISINYRTEIEKPSQEEEEDEEEDHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR
EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:454)

[0888] 化合物150:PKE (1) -L4-FGF21 (化合物2)

[0889] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGS KYYYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR
EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:455)

[0890] 化合物151:PKE (1) -L5-FGF21 (化合物2)

[0891] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGS KYYYYPISINYRTEIEKPSQGGSHHHHHHHHSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLE
IREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:456)

[0892] 化合物152:PKE (1) -L6-FGF21 (化合物2)

[0893] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGS KYYYYPISINYRTEIEKPSQGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEA
HLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVY
QSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:
457)

[0894] 化合物153:PKE (1) -L7-FGF21 (化合物2)

[0895] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGS KYYYYPISINYRTEIEKPSQGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEA
HLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVY

QSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 458)

[0896] 化合物154:PKE (1) -L8-FGF21 (化合物2)

[0897] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQSGSGSGSGSGSGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT
AHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNV
YQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:
459)

[0898] 化合物155:PKE (1) -L9-FGF21 (化合物2)

[0899] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSTPPTSPSTPPTSPSPSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ
TEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGY
NVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID
NO: 460)

[0900] 化合物156:PKE (1) -L10-FGF21 (化合物2)

[0901] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYT
DDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELL
LEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ
ID NO: 461)

[0902] 化合物157:PKE (1) -L11-FGF21 (化合物2)

[0903] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYL
YTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRE
LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS
(SEQ ID NO: 462)

[0904] 化合物158:PKE (1) -L12-FGF21 (化合物2)

[0905] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQV
RQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEA
CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSP
SYAS (SEQ ID NO: 463)

[0906] 化合物159:PKE (1) -L13-FGF21 (化合物2)

[0907] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSTPPTSPSTPPTSPSPSTPPTSPSTPPTSPSPSHPIPDSSPLL
QFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGL
HFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEP
SQRSPSYAS (SEQ ID NO: 464)

[0908] 化合物160:PKE (1) -L14-FGF21 (化合物2)

[0909] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYIEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPHPIPDSPLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTV
GGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLH
LGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:465)

[0910] 化合物161:PKE (1) -L15-FGF21 (化合物2)

[0911] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYIEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPTPEPPSPEPTPEPHPIPDSPLQFGGQVRQRYLYTDDA
QQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLED
GYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID
NO:466)

[0912] 化合物162:PKE (1) -L16-FGF21 (化合物2)

[0913] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYIEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPTPEPPSPEPTPEPPSPEPTPEPPSPEPTPEPHPIPDS
SPLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAL
YGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:467)

[0914] 化合物163:PKE (1) -L17-FGF21 (化合物2)

[0915] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYIEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPTPEPPSPEPTPEPPSPEPHPIPDSPLQFGGQVRQRYLYTDDA
QQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLED
GYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID
NO:468)

[0916] 化合物164:PKE (1) -L18-FGF21 (化合物2)

[0917] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYIEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPGGSPTPEPHPIPDSPLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAH
LEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQ
SEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:
469)

[0918] 化合物165:PKE (1) -L19-FGF21 (化合物2)

[0919] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYIEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPEEDPTPEPHPIPDSPLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAH
LEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQ
SEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:
470)

[0920] 化合物166:PKE (1) -L20-FGF21 (化合物2)

[0921] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYIEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPTPEPEEDPSPEPTPEPHPIPDSPLQFGGQVRQRYLY
TDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFREL
LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS

(SEQ ID NO:471)

[0922] 化合物167:PKE (1) -L21-FGF21 (化合物2)

[0923] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPTPEPPSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEPPSPEPHPIPDSPLQF
GGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHF
DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQ
GRSPSYAS (SEQ ID NO:472)

[0924] 化合物168:PKE (1) -L22-FGF21 (化合物2)

[0925] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPTPEPPSPEPPTPEPGGGSPSPEPPTPEPPSPEPHPIPDSPLQF
FGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHF
FDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPS
QGRSPSYAS (SEQ ID NO:473)

[0926] 化合物169:PKE (1) -L23-FGF21 (化合物2)

[0927] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVD
YTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPTPEPSPEPPTPEPSPEPTPEPHPIPDSPLQF GGGQVRQRY
LYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHF DPEACSF
RELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS
(SEQ ID NO:474)

[0928] 化合物170[Fc (hIgG1a₁₉₁) -L7-FGF21 (化合物2)]

[0929] DKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSPLQF GGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHF DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:475)

[0930] 化合物171[Fc (hIgG1a₁₉₁) -L250-FGF21 (化合物2)]

[0931] DKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSPLQF GGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGT
VGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHF DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLH
LGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:476)

[0932] 化合物172[Fc (hIgG1a₁₉₁) -L12-FGF21 (化合物2)]

[0933] DKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKS
LSLSPGKPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPHPIPDSPLQF GGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG
TVGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHF DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLP

LHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:477)

[0934] 化合物173[Fc (hIgG1a₁₉₁) -L251-FGF21 (化合物2)]

[0935] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKPSPEPTPEPPSPPEHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:478)

[0936] 化合物174[Fc (hIgG1a₁₉₁) -L5-FGF21 (化合物2)]

[0937] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGSHHHHHHHHSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKA
LKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGL
PPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:479)

[0938] 化合物175[Fc (hIgG1a₁₉₁) -L252-FGF21 (化合物2)]

[0939] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKELQLEESAAEAQEGELEHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESL
LQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:480)

[0940] 化合物176[Fc (hIgG1a₁₉₀) -L253-FGF21 (化合物2)]

[0941] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGSSGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESLL
QLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLP
LPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:481)

[0942] 化合物177[Fc (hIgG1a₁₉₁) -L6-FGF21 (化合物2)]

[0943] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:482)

[0944] 化合物178[Fc (hIgG1a₁₈₉) -L6-FGF21 (化合物2)]

[0945] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS

LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGGGGSGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKA
LKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGL
PPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:483)

[0946] 化合物179[Fc (hIgG1a_191) -L7-FGF21-1aa (C末端氨基酸被删除的化合物2)]

[0947] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGGGSGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYA (SEQ ID NO:484)

[0948] 化合物180[Fc (hIgG1a_191) -L7-FGF21-3aa (3个C末端氨基酸被删除的化合物2)]

[0949] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGGGSGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPS (SEQ ID NO:485)

[0950] 化合物181[Fc (hIgG1f_1.1_186) -L7-FGF21 (化合物2)]

[0951] EPKSSDKHTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSP
ESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGA
RFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:486)

[0952] 化合物182[Fc (hIgG1a_191b) -L7-FGF21 (化合物2)]

[0953] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGGGSGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:487)

[0954] 实施例5

[0955] FGF-21缺失分子的体外效力

[0956] 在本实施例中,在基于细胞的体外受体活化测定中测试了数种修饰的FGF-21多肽的效力并与聚乙二醇化的化合物1的效力相比。据显示,数种修饰的FGF-21多肽(包括聚乙二醇化的化合物2)具有与聚乙二醇化的化合物1相当的效力。

[0957] 方法

[0958] 产生了稳定表达人 β -klotho的克隆人胚肾(HEK)293细胞系以在初级体外测定中

表征FGF21变体。通过遵循制造商关于Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 转染试剂的方案并使用编码具有C末端FLAG标签 (N-DYKDDDDK-C, 以一字母氨基酸代码) 的人 β -klotho线性化质粒 (其处于在巨细胞病毒启动子控制下) 转染HEK-293细胞。在选择培养基 [于具有4.5g/l的含L-谷氨酰胺的D-葡萄糖、Hepes (Invitrogen) 和10%胎牛血清 (FBS) 的Dulbecco's修饰的Eagle's培养基 (DMEM) 中的600 μ g/mL遗传霉素 (Invitrogen)] 中生长14天后分离阳性克隆。

[0959] 初级测定测量了稳定表达人 β -klotho的克隆HEK-293细胞系中胞外信号调节的激酶1/2 (pERK1/2) 的FGF21变体依赖性磷酸化。为进行测定, 将细胞于200 μ L选择培养基中以每孔40,000个细胞接种于96孔组织培养平板 (Falcon) 中并维持于37 $^{\circ}$ C潮湿的5%CO₂氛围中。48小时后, 用无血清培养基 (具有4.5g/lD-葡萄糖及0.1%无脂肪酸牛血清白蛋白的DMEM) 替换全选择培养基, 并将细胞维持在37 $^{\circ}$ C潮湿的5%CO₂氛围中6小时。用无血清培养基连续稀释待测试的化合物。测定通过用稀释的化合物替换细胞上的无血清培养基开始, 允许温育在室温进行7分钟, 并通过去除化合物和将100 μ L裂解缓冲液 (Perkin Elmer AlphaScreen试剂盒) 添加至各孔中以终止反应。在 $\sim$ 80rpm于室温振荡平板约10分钟并于-80 $^{\circ}$ C冷冻储存。根据制造商关于Surefire AlphaScreen pERK1/2试剂盒和AlphaScreen IgG检测试剂盒, 蛋白A (Perkin Elmer) 的方案, 使用384孔白色Proxiplates (Perkin Elmer) 分析来自各孔的复苏的细胞裂解液的等分试样 (4 μ L) 的pERK1/2。在室温于黑暗中温育平板两小时, 然后在Envision 2103Multiplate读取器 (Perkin Elmer) 上使用AlphaScreen方案读取。使用GraphPad Prism 5软件通过非线性回归将数据拟合为4参数对数 (激动剂) 对响应的方程。

[0960] 结果

[0961] 通过测量人胚肾 (HEK) 293细胞系中胞外信号调节的激酶 (ERK) 1/2的FGF21-依赖性磷酸化来确定体外效力, 其中已稳定引入人 β -Klotho以与内源性表达的FGFR剪接变体充当共同受体。通过确定各测试化合物的平均EC₅₀或pEC₅₀ (以摩尔/公升表示的EC₅₀浓度的以10为底的负对数) 值评估效力。聚乙二醇化的化合物1和聚乙二醇化的化合物2的例示性剂量-响应曲线示于图2中。其他测试化合物的结果示于表4和5中。

[0962] 表4. pERK测定中修饰的FGF-21的体外活性的EC50值

[0963]

化合物名称	pERK EC50 (nM) n=3
聚乙二醇化的化合物 1	6.7
化合物 2	4.6
化合物 3	28
化合物 5	69.2
化合物 6	39.1
化合物 7	28.4
化合物 10	21.9
化合物 11	28.2
化合物 12	31.9

[0964]	化合物 19	5.1
	化合物 20	3.9
	化合物 22	4.1
	化合物 23	30

[0965] 表5.pERK测定中修饰的FGF-21的体外活性的EC50值

[0966]	化合物名称	EC50 (nM)
	聚乙二醇化的化合物1	14
	聚乙二醇化的化合物2	28
	聚乙二醇化的化合物5	24
	聚乙二醇化的化合物6	20
	聚乙二醇化的化合物10	28
	聚乙二醇化的化合物11	30
	聚乙二醇化的化合物12	39
	聚乙二醇化的化合物19	30
	聚乙二醇化的化合物20	42
	聚乙二醇化的化合物21	30
	聚乙二醇化的化合物22	36
	化合物32 (非聚乙二醇化对照)	8

[0967] 实施例6

[0968] 修饰的FGF-21多肽的热稳定性测试

[0969] 在本实施例中,使用热扫描荧光 (TSF) 和差示扫描量热法 (DSC) 测量修饰的FGF-21多肽的热稳定性。文献中认定热稳定性对于确定形成聚集体倾向具有预测价值 (参见例如 Webster, “Predicting Long-Term Storage Stability of Therapeutic Proteins”, Pharmaceutical Technology, 第37卷, 第11期, 第42-48页, 2013年11月2日)。

[0970] 方法

[0971] 在MicroCal (Malvern Instruments) 自动VP-DSC中通过差示扫描量热法测量热变性中点。对于DSC分析,以每小时90℃的扫描速率以约2mg/mL用250mM蔗糖、20mm组氨酸pH 7.0配制蛋白样品。用相同的无蛋白缓冲液填充参考细胞 (cell)。从热分析图迹线 (箭头) 中所见的最大峰确定在溶液条件和所应用的扫描速率下折叠与热解折叠的蛋白结构域之间的相变的转变中点 (T_m)。

[0972] 对于热扫描荧光 (TSF),将蛋白在目的缓冲液中稀释至0.2mg/mL并添加少量荧光团苯氨基萘磺酸 (ANS)。将样品置于96孔PCR薄壁平板中并在外来荧光团的存在下使蛋白样品的温度增加,同时在Bio-Rad CT1000-RT PCR仪上监测样品的荧光。在蛋白与热变性蛋白的新暴露的疏水性核心相互作用时,通过监测探针的荧光信号增加来确定蛋白的蛋白热解折叠的中点。在测验的缓冲液及扫描速率条件下解折叠中点 (T_m) 的温度定义为荧光信号升高曲线的温度拐点 (inflection point)。

[0973] 结果

[0974] 代表性的DSC扫描结果示于图3中。观察到聚乙二醇化的化合物2的转变中点

(“T_m”)温度比聚乙二醇化的化合物1高约8℃。热可逆性>95% (数据未显示)。

[0975] 图4显示了TSF的代表性结果。化合物10表现出相对于化合物1 (具有野生型FGF-21序列,但其包括N末端甲硫氨酸以在大肠杆菌中表达) T_m增加约8℃。其他化合物的结果示于下表6中。

[0976] 总之,这些结果说明可合理预期例示性化合物会降低形成聚集体的倾向,例如化合物2、10和16。预期降低的形成聚集体的倾向会赋予更长的储存期限和/或配制为较大浓度的能力。

[0977] 表6.通过热扫描荧光确定修饰的FGF-21多肽相比于化合物1的热稳定性结果。对于一些化合物观察到了多至约7-8℃的热稳定性增加。

化合物	T _m (摄氏度)	与化合物1的差异
化合物1	46.63	0
化合物2	53.2	6.57
化合物3	46.92	0.29
化合物5	47.46	0.83
化合物6	43.2	-3.43
化合物7	42.78	-3.85
化合物10	54.5	7.87
化合物11	43.9	-2.73
化合物12	45.4	-1.23
化合物14	42.97	-3.66
化合物16	50.8	4.17
化合物18	47.96	1.33

[0979] 实施例7

[0980] 脱酰胺化和聚集体形成

[0981] 本实施例描述了对修饰的FGF-21多肽的脱酰胺化和聚集体形成的评估。

[0982] 方法

[0983] 热应力测试:

[0984] 在测试缓冲液 (250mM蔗糖, 20mM组氨酸, pH 6.5和pH 7或20mM TRIS pH 7.5) 中以7.5mg蛋白/mL的浓度制备目的蛋白样品。通过分析型大小排阻色谱 (aSEC) 和时间=0时的成像毛细管等电聚焦 (icIEF) 的电荷变体分析来测验样品。然后将样品置于25℃培养箱中1周然后在40℃5周来测试样品的应力。取出等分试样并通过icIEF和aSEC在各个时间点进行检查,在接下来的4至5周取出并进一步通过aSEC和icIEF进行检查以监测稳定性。

[0985] aSEC

[0986] 使用Agilent 1100HPLC系统 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA) 在Zenix-C 300SEC柱 (Sepax Technologies, Newark, DE USA) 上用300×4.6mm的尺寸进行大小排阻色谱 (aSEC)。所用的流动相是200mM磷酸钾和150mM氯化钠,其调节至pH 6.9,流动速率为0.35mL/min。对于各分析注射约20μg样品。在UV 280nm处监测分离。在与各物质对应的保留时间处通过曲线下面积的积分来进行单体对HMW物种的定量。

[0987] icIEF

[0988] 通过成像毛细管等电点聚焦(icIEF)进行的电荷变体分析(脱酰胺化会增加蛋白的净负电荷和酸性变体的形成)检测脱酰胺化,其在iCE280仪器(ProteinSimple, Santa Clara, CA USA)上使用经碳氟化合物涂布的毛细管(100 μ m $\times$ 50mm)进行。使用含有0.35%甲基纤维素、4%pH 3-10Pharmalytes、4M尿素和2%pI标志物的溶液将样品稀释至0.3mg/mL。阳极电解液和阴极电解液分别为0.08M磷酸和0.1M氢氧化钠。通过应用1.5kV 2min然后3.0kV 11min来达到聚焦。由对应的曲线下面积的积分,相对于亲本物质,来定量(-)电荷的修饰的物种。

[0989] 结果

[0990] 聚乙二醇化的化合物2的生物物理学特性表现出相对于聚乙二醇化的化合物1的优越性。在2-8 $^{\circ}$ C经5周均未观察到降解,伴随着在40 $^{\circ}$ C在加速条件下观察到相对于聚乙二醇化的化合物1的低速降解(图5)。八周加速研究指示,在测试配制物(组氨酸/蔗糖pH 7.0)中聚乙二醇化的化合物2优于聚乙二醇化的化合物1。在这些赋形剂条件下,脱酰胺化消除且聚乙二醇化的化合物2降低了形成可溶性高分子量(HMW)聚集体的倾向。这些结果提示,相对于聚乙二醇化的化合物1,聚乙二醇化的化合物2具有降低的聚集倾向,具有可供配制选择的较宽pH范围。

[0991] 还分析了HMW聚集体形成。在给定浓度处HMW聚集体形成较少表示溶解度较大,由此使得能够配制为较高浓度。图6说明了数种修饰的FGF-21多肽和化合物1的HMW聚集体形成。对于大多数测试化合物,相对于聚乙二醇化的化合物1的聚集体形成降低(例如聚乙二醇化的化合物2和聚乙二醇化的化合物10)。对于少数化合物,HMW聚集体形成类似于或高于聚乙二醇化的化合物1。

[0992] 还分析了脱酰胺化。图7说明数种修饰的FGF-21多肽和聚乙二醇化的化合物1所检测的脱酰胺化水平(由随时间的酸性变体的形成指示)。对于所有显示的修饰的FGF-21多肽,检测到的脱酰胺化水平是相对于聚乙二醇化的化合物1降低的。

[0993] 实施例8

[0994] 修饰的FGF-21多肽的溶解度评估

[0995] 本实施例描述了修饰的FGF-21多肽的相对溶解度的测量。结果显示化合物能够配制成相对高的浓度,其允许更便利地施用有效剂量。

[0996] 方法

[0997] 相对溶解度评估通过序贯活塞流浓缩循环,然后是大小排阻色谱分析来进行。将于PBS pH 7.2中以类似但不相同的起始浓度配制的样品吸入至3kDa分子量截留离心浓缩器中并在4 $^{\circ}$ C以4,750RPM旋转10分钟、15分钟和30分钟的循环。在旋转循环之间,自浓缩装置移出等分试样并进行分析型大小排阻色谱分析(aSEC)(在用PBS pH 7.2缓冲液平衡的GE Healthcare Superdex S-75 10/300 GL柱上)以确定溶液中HMW及单体物种的浓度。

[0998] 用NanoDrop分光光度计通过280nm处的吸光度来确定总浓度。相对于SEC色谱图迹线中的单体峰,通过高分子量峰的曲线下面积计算来确定高分子量百分比。绘制所得数据点以将观察测试条件下从最难溶构建体至最可溶的排列顺序可视化,由数据点产生的斜率越低,测试条件下的蛋白变体越稳定。

[0999] 结果

[1000] 修饰的FGF-21多肽的相对溶解度通过测量高分子量(HMW)聚集体的形成作为蛋白

浓度的函数来确定。在给定浓度下较低的HMW聚集体形成指示较大的溶解度,由此使得能够配制至较高浓度。

[1001] 测试化合物的活塞流溶解度曲线的斜率示于下表7中 (较低值表示较少聚集体形成且因此能够配制为较高浓度)。对于其中数种化合物 (例如化合物2和化合物10) 观察到相对低的聚集体形成水平,指示较低的聚集体形成和较大的溶解度 (图8和表7)。观察到化合物1的活塞流溶解度斜率最高。

[1002] 表7. 修饰的FGF-21多肽的活塞流溶解度结果

[1003]

化合物	活塞流溶解度斜率
化合物1	1.863
化合物2	0.3171
化合物3	1.2219
化合物5	0.8548
化合物6	1.1353
化合物7	1.4318
化合物10	0.3647
化合物11	1.1156
化合物12	1.0317
化合物19	0.9743
化合物20	1.1545
化合物22	0.1997
化合物23	0.771

[1004] 实施例9

[1005] FGF-21缺失分子的免疫原性测试

[1006] 进行T细胞活化响应研究,并指示大多数化合物中所用的蛋白序列与聚乙二醇化的化合物1中所用的蛋白序列表现出等同响应。

[1007] 方法

[1008] 通过CD4+T细胞增殖测定评估免疫原性。使用Ficoll梯度自不同组的人血液供体分离外周血单核细胞 (PBMC)。对供体进行HLA分型以确保覆盖人群体中存在的II类MHC等位基因的变化。在标记之后,具有羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 的PBMC以每孔200,000个细胞在测试化合物存在于标准细胞培养基中平板接种于96孔格式中7天。通过用抗CD4抗体标记和流式细胞术分析CD4+T细胞的增殖。抗原性蛋白的百分比计算为相对于介质对照表现出显著CD4+T细胞增殖响应的供体的百分比。

[1009] 结果

[1010] 在利用人T细胞增殖测定的体外免疫原性风险评估中,与40个供体中的15个显示出来自化合物1 (具有野生型FGF-21序列,但其包括N末端甲硫氨酸以在大肠杆菌中表达) 阳性信号相比,在暴露于化合物2经7天之后,40个供体中的13个 (32.5%) 显示出CD4+增殖响应 (图9)。尽管此基于细胞的实验不能替代实际世界的人免疫响应观察结果,但此分析指示与野生型FGF21相比,化合物2的人免疫原性风险没有增加。

[1011] 在相对于化合物1的CD4+增殖测定中测试了进一步修饰的FGF-21多肽 (图9)。免疫

原性一般与对照FGF21序列(化合物1)观察到的免疫原性类似,但其中例外为化合物10,其表现出相对较更高的免疫响应,指示若向人患者施用,则该化合物可能具有不合意的免疫原性。

[1012] 实施例10

[1013] C末端完整(活性)的修饰的FGF-21多肽的体内稳定性

[1014] 本研究评估了体内C末端完整(即活性)的修饰的FGF-21多肽的水平。与聚乙二醇化的化合物1相比,聚乙二醇化的化合物2表现出大大增加的C末端完整的活性多肽的比例,包括更长的体内活性的持续时间。

[1015] 方法

[1016] 在食蟹猴中在分别皮下(SC)给药0.25mg/Kg和0.225mg/kg之后评估聚乙二醇化的化合物2和聚乙二醇化的化合物1的药代动力学。在药物施用之后0、0.25、0.5、1、3、7、24、48、72、96、120、144、168小时收集血液样品(0.2mL)并储存于-80℃直至进行生物分析。

[1017] 总计和C末端完整的聚乙二醇化的化合物1及聚乙二醇化的化合物2的PK参数通过血清或血浆浓度相对于时间数据的非分区分析(non-compartmental analysis)获得(Phoenix™ WinNonlin®, 6.3, Pharsight Corporation, St. Louis, MO)。使用线性和对数梯形求和的组合计算时间零点至无穷大[AUC(tot)]的曲线下面积。可以定量浓度使用3个时间点的最小值估计AUC和半衰期($t_{1/2}$)。

[1018] 使用未验证的基于中型探索(MSD)的电化学发光免疫吸附剂分析(ECLIA)测量了单次剂量PK研究中总聚乙二醇化的化合物1的浓度。使用PEG特异性单克隆抗体(mAb)捕获聚乙二醇化的化合物1,随后使用兔抗FGF21多克隆抗体(pAb)检测总聚乙二醇化的化合物1。

[1019] 还在雄性Ob/Ob小鼠中评估了聚乙二醇化的化合物2和聚乙二醇化的化合物1的皮下(SC)药代动力学(PK)。向小鼠($n=3$ /时间点/途径)以单次皮下0.1mg/kg注射施用聚乙二醇化的化合物2。施用0.05mg/kg呈单次皮下剂量形式的聚乙二醇化的化合物1。在药物施用后的各个时间点收集血液样品并基本上如对于食蟹猴所述进行处理。

[1020] 经由电化学发光读出,以相对光度单位(RLU)表示,其与通过捕获和检测试剂结合的总聚乙二醇化的化合物1的量成比例。标准曲线在0.2与154ng/mL之间。使用4参数对数(logistic)拟合回归模型用1/Y的权重因子定量测试样品。使用相同的测定来测量ZDF大鼠和食蟹猴血清中C末端完整的聚乙二醇化的化合物1的浓度,只是使用特异性针对聚乙二醇化的化合物1的C末端的兔抗FGF21 pAb进行检测。标准曲线在0.2与154ng/mL之间。使用4参数对数拟合回归模型用1/Y的加权因子定量测试样品。

[1021] 结果

[1022] 聚乙二醇化的化合物1经历体内蛋白水解,以使得随时间大多数化合物变为截短的非活化形式。在ob/ob小鼠(图10)和食蟹猴(图11)中直接比较聚乙二醇化的化合物1和2的体内蛋白水解稳定性。这些结果显示了与聚乙二醇化的化合物1相比,含有缺失的修饰的FGF-21化合物(聚乙二醇化的化合物2)的活性C末端完整形式的AUC增加7至8倍,指示聚乙二醇化的化合物2的体内蛋白水解稳定性增加。

[1023] 实施例11

[1024] 修饰的FGF-21多肽的药代动力学研究

[1025] 本实施例显示了在小鼠、大鼠及食蟹猴中使用修饰的FGF-21多肽进行的药代动力学研究的结果(参见下表8)。

[1026] 简言之,在小鼠、大鼠和猴中聚乙二醇化的化合物2的清除率低(范围:0.94-2.6mL/h/kg)。约0.04-0.05L/kg的分布体积(V_{ss})接近血浆体积且指示血管外间隙中的最少分布。在小鼠(40%)和猴(58%)中的皮下(SC)生物利用度是可接受的,而在大鼠(16%)中其相对低。此低皮下生物利用度可为特异性针对大鼠的,因为已观察到其他聚乙二醇化分子具有类似现象(在大鼠中具有低SC生物利用度,在小鼠、猴和人中具有良好生物利用度)。更重要的是,这些物种(包括大鼠)中聚乙二醇化的化合物2的SC生物利用度比聚乙二醇化的化合物1高2-3.4倍。

[1027] 在向小鼠、大鼠及猴皮下施用聚乙二醇化的化合物2之后,相对于聚乙二醇化的化合物1,完整蛋白的剂量校正的暴露(AUC)一致(7-8倍)增加。在所有三种物种中,相对于聚乙二醇化的化合物1,在皮下施用之后完整聚乙二醇化的化合物2的暴露增加可归因于较低的全身清除率(2-5倍)以及皮下生物利用度改进(2-3.4倍)。

[1028] 由蛋白水解片段和完整聚乙二醇化的化合物2的混合物构成的总聚乙二醇化的化合物2也以这些药代动力学研究测量。在小鼠和大鼠中,在静脉内施用之后完整的聚乙二醇化的化合物2相对于总聚乙二醇化的化合物2的AUC比率接近1,从而指示系统性蛋白水解最少。然而,在这些物种中,在皮下施用之后该比率为0.6-0.86,指示了在SC部位的一些蛋白水解。在猴中注意到了类似趋势,其中与静脉内施用相比,在SC施用之后完整聚乙二醇化的化合物2相对于总聚乙二醇化的化合物2的AUC比率有少量降低(在SC给药之后为0.7对比在IV给药之后为0.8)。

[1029] 总体而言,聚乙二醇化的化合物2表现出有利的体外及体内药代动力学特性,包括增加的生物利用度、降低的清除率及增加的AUC(血浆浓度-时间曲线下面积)。

[1030] 表8. 小鼠、大鼠和猴中完整的修饰的FGF-21蛋白的IV和SC药代动力学

物种	小鼠		大鼠		猴	
	聚乙二醇化的化合物1	聚乙二醇化的化合物2	聚乙二醇化的化合物1	聚乙二醇化的化合物2	聚乙二醇化的化合物1	聚乙二醇化的化合物2
CL (mL/h/kg)	6.1	2.5	6.2 ± 0.7	2.6 ± 0.4	4.4 ± 1	0.94 ± 0.05
V_{ss} (L/kg)	0.043	0.044	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.005	0.04 ± 0.003
半衰期 (h)	47	26	35 ± 1	24 ± 3.9	13 ± 2	57 ± 4.2
MRT (h)	7.1	20	8.4 ± 0.3	20 ± 1.3	16 ± 2.5	47 ± 1.5
SC BA (%)	15	40	4.8	16.3	30	58
SC AUC (μg/mL*h)	1.2	8.1	0.39 ± 0.07	3.1 ± 0.2	20 ± 2.2	154 ± 63

[1032] 缩写:CL:血浆的表观总身体药物清除率; V_{ss} :稳定状态下的表观分布体积;MRT:平均保留时间;SC BA:皮下生物利用度;SC AUC:皮下血浆浓度-时间曲线下面积。

[1033] 实施例12

[1034] 糖尿病小鼠模型中修饰的FGF-21多肽的体内重复给药研究

[1035] 在21天重复给药研究中直接(head-to-head)评估聚乙二醇化的化合物2和聚乙二

醇化的化合物1。结果指示尽管两种化合物对于改善代谢症状都有效,但较长的活性聚乙二醇化的化合物2的体内半衰期会产生更大的治疗作用,在比较每周给药的影响时尤其如此。

[1036] 方法

[1037] 在本研究开始时雄性ob/ob小鼠 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) 为8周龄。基于体重和葡萄糖水平将小鼠随机分入处理组。所有组通过皮下 (s.c.) 施用1ml/kg 给药溶液处理。处理组如下: 1) 介质 (250mM蔗糖/20mM Tris, pH 8.3), 每周两次 (BIW), 2) 聚乙二醇化的化合物1, 0.15mg/kg BIW, 3) 聚乙二醇化的化合物2, 0.15mg/kg BIW, 4) 聚乙二醇化的化合物1, 0.3mg/kg, 每周一次 (QW), 或5) 聚乙二醇化的化合物2, 0.3mg/kg QW。每周仅施用一次化合物的小鼠在BIW组施用其每周第二次化合物注射剂之日时施用介质。确定饲养状态下整个21天给药期中的体重、血浆葡萄糖、甘油三酯 (Olympus临床化学分析仪, AU680) 和胰岛素 (ELISA, Mercodia Inc.)。在研究开始和终止时也用Olympus分析仪确定全血中的糖化血红蛋白 (HbA1c)。

[1038] 结果

[1039] 皮下施用0.15mg/kg的剂量每周两次 (BIW) 和0.3mg/kg QW施用聚乙二醇化的化合物1与聚乙二醇化的化合物2。第21天在最低处测量的血浆浓度显示总 (完整和蛋白水解的) FGF21的暴露对于两种变体相似, 但在QW或BIW施用之后, 活性C末端完整聚乙二醇化的化合物2的暴露分别比聚乙二醇化的化合物1高12至25倍 (表9)。

[1040] 表9: 在ob/ob小鼠中在重复给药21天之后最低处的C末端完整的聚乙二醇化的化合物1和聚乙二醇化的化合物2的暴露 (平均值 $\pm$ s.e.m.)

参数	聚乙二醇化的 化合物 2 BIW (0.15 mg/kg)	聚乙二醇化的 化合物 1 BIW (0.15 mg/kg)	聚乙二醇化的 化合物 2 QW (0.3 mg/kg)	聚乙二醇化的 化合物 1 QW (0.3 mg/kg)
	最低处的浓度	最低处的浓度	最低处的浓度	最低处的浓度
[1041] (ng/mL)	175 $\pm$ 43	7 $\pm$ 0.7	38 $\pm$ 3	3 $\pm$ 0.1
预测的 C _{max}	1064	313	2149	633
[1042] (ng/mL)*				
预测的 AUC	107	18	107	18
(μ g/mL*h)*				

[1043] *基于ob/ob小鼠中的单剂量药代动力学数据预测

[1044] 从将葡萄糖无酶催化添加至此蛋白内的特异性氨基酸中体内产生糖化血红蛋白 (HbA1c), 且测量的HbA1c百分比与循环红细胞的寿命上并入的平均血糖对应。大于6.5%的HbA1c值是糖尿病的诊断准则。图12中显示出重复给药研究的第21天的介质校正的HbA1c变化。BIW施用0.15mg/kg的任一FGF21多肽在施用21天之后将HbA1c校正至小于5%的值。然而, 与以QW施用0.3mg/kg介质相比, 仅聚乙二醇化的化合物2在统计上显著降低 Δ HbA1c, 这与对于活性C末端完整蛋白的功能性暴露显著增加是一致的。这些结果表面维持目标最低浓度 (C_{最低处}) 对于功效可为足够的 (表9)。

[1045] 与降低的HbA1c结果一致, 在整个研究中血浆葡萄糖水平也显著降低 (第2至21天, 相对于介质的所有组 $p < 0.01$, 第14天的QW剂量除外, 其聚乙二醇化的化合物2达到统计学显著性 ($p < 0.05$) 且聚乙二醇化的化合物1不显著) (图16)。总体而言, 在研究过程中通过所有

处理的葡萄糖AUC变化(相对于介质的百分比差异)显著降低($p<0.001$ 相对于介质)(图17)。

[1046] 另外,在第2和4天对于BIW组($p<0.01$)和在第2、4和10和17天对于QW组($p<0.01$),以及在第2和17天对于聚乙二醇化的化合物1QW组($p<0.05$),相对于介质,在聚乙二醇化的化合物2组中血浆甘油三酯水平显著降低(图18)。

[1047] 在ob/ob小鼠中,在整个21天研究过程中,相对于介质或聚乙二醇化的化合物1,聚乙二醇化的化合物2显著降低体重增加百分比(图13和图14)。当在最低处测量体重时,在第7、14和21天QW施用0.3mg/kg聚乙二醇化的化合物2表现出降低的功效,再次说明维持目标最低浓度($C_{最低}$)对于功效可为足够的。

[1048] 在ob/ob小鼠中,在整个21天重复给药研究中,BIW施用0.15mg/kg聚乙二醇化的化合物2统计学显著地降低血浆胰岛素水平(图15);在第10天之后BIW聚乙二醇化的化合物1未能显著降低血浆胰岛素。QW施用0.3mg/kg聚乙二醇化的化合物2产生表现“锯-齿形”曲线,其中当在化合物最低处测量胰岛素时在第14和21天趋势为超出介质组中的值。此图指示在长期给药下聚乙二醇化的化合物2可保持胰脏中的胰岛素含量。

[1049] 这些结果显示,0.15mg/kg BIW组中维持聚乙二醇化的化合物2为175ng/ml的最低浓度(表9)导致血糖和体重变化的测量中的显著改进。

[1050] 相对于聚乙二醇化的化合物1,ob/ob小鼠模型中对于活性C末端完整的聚乙二醇化的化合物2的暴露增加使得QW施用的对基于剂量和延长的作用持续时间的体内效力增强,从而导致HbA1c、重量增加和血浆胰岛素的优良的降低。

[1051] 实施例13

[1052] 脂肪肝至非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的进展最终可产生肝纤维化。本实施例描述了FGF-21多肽的使用,在纤维化模型中包含经修饰以含有在位置108处用谷氨酰胺取代对-乙酰基-L-苯丙氨酸并连接至30kDa聚(乙二醇)的人FGF-21多肽,(聚乙二醇化的化合物1或“PEG-化合物1”,SEQ ID NO:201)。具体而言,在NASH的Stelic Institute的2命中模型中测试了PEG-化合物1,其中C57BL6小鼠在出生之后不久用链脲霉素处理以诱导糖尿病,然后在4周龄时饲以高脂肪膳食。在可再现时程中这些小鼠患上脂肪肝(5周)、NASH(7周)、肝纤维化(9周)和终末期肝细胞癌(16周)。当从5至9周龄(预防性模型)或7至9周龄(治疗性模型)对小鼠进行处理时,PEG-化合物1预防或有效逆转Stelic模型中的NASH发展。在此研究中在9周时间点处,PEG-化合物1还降低肝纤维化。

[1053] PEG-化合物1的序列如下:

[1054] MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:201),其中pAF连接至30kDa PEG。

[1055] 材料和方法

[1056] C57BL/6小鼠(怀孕15天的雌性)获取自Charles River Laboratories Japan, Inc. (Kanagawa, Japan)。豢养用于研究的所有动物并根据关于动物使用的日本药理学学会指南(Japanese Pharmacological Society Guidelines)看护。

[1057] 将动物维持于SPF设备中处于受控的温度($23\pm2^{\circ}\text{C}$)、湿度($45\pm10\%$)、照明(12小时人工光和暗循环;8:00至20:00有光照)及空气交换的条件下。实验房间维持高压($20\pm$

4Pa) 以预防设备污染。将动物豢养于聚碳酸酯笼KN-600 (Natsume Seisakusho, Japan) 中, 每笼最多4只小鼠。使用灭菌的PULMAS μ (Material Research Center, Japan) 铺垫且每周替换一次。

[1058] 提供任意可取的灭菌的固体高脂肪膳食 (HFD), 置于笼顶的金属盖中。从装备有橡胶塞何吸管的水瓶任意提供纯水。水瓶一周替换一次, 清洁并在高压釜中灭菌且重复使用。

[1059] 在40只雄性小鼠中通过在出生之后单次皮下注射200 μ g链脲霉素 (STZ, Sigma-Aldrich Co. LLC., USA) 溶液2天和在4周龄之后饲喂高脂肪膳食 (HFD, 57kcal%脂肪, 目录号: HFD32, CLEA Japan, Inc., Japan) 诱导NASH (“STAM小鼠”)。在治疗时段期间每周每日测量食品消耗。

[1060] 通过皮下途径以1mL/kg的体积施用PEG-化合物1和介质 (20mM Tris/250mM蔗糖, pH 8.3)。每周两次施用剂量为1和3mg/kg的PEG-化合物1。

[1061] 使用LIFE CHECK (EIDIA Co. Ltd., Japan) 在全血中测量非空腹血糖。对于血浆生物化学分析, 将血液收集于具有抗凝血剂的聚丙烯管 (Novo-Heparin, Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Japan) 中并在4 $^{\circ}$ C以1,000xg离心15分钟。收集上清液并储存于-80 $^{\circ}$ C直至使用。通过FUJI DRI-CHEM 7000 (Fujifilm Corporation, Japan) 测量血浆丙氨酸转氨酶 (ALT)、甘油三酯及总胆固醇水平。

[1062] 通过Folch's法获得肝脏总脂质提取物 (Folch J. 等, J. Biol. Chem. 1957; 226: 497)。使肝脏样品在氯仿-甲醇 (2:1, v/v) 中均质化并在室温温育过夜。在用氯仿-甲醇-水 (8:4:3, v/v/v) 洗涤之后, 使提取物蒸发至干燥并溶解于异丙醇中。分别通过甘油三酯E-测试和胆固醇E-测试测量肝脏甘油三酯和胆固醇水平 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)。

[1063] 对于苏木素及伊红 (HE) 染色, 从用Bouin's溶液预固定的肝脏组织石蜡块切片并用Lillie-Mayer's苏木素 (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Japan) 和伊红 (Wako Pure Chemical Industries) 染色。根据Kleiner的标准计算非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 活性评分 (NAS) (Kleiner DE. 等, Hepatology, 2005; 41: 1313)。为观察大泡和小泡脂肪, 从用10%中性缓冲福尔马林预固定、包埋于Tissue-Tek O.C.T. 化合物 (Sakura Finetek Japan Co. Ltd., Japan) 中的冷冻肝脏组织进行冷冻切片并用油红O (Sigma-Aldrich) 染色。对于免疫组化, 从包埋于Tissue-Tek O.C.T. 化合物中并用丙酮固定的冷冻肝脏组织进行切片。使用0.03% H₂O₂封闭内源性过氧化酶活性5分钟, 然后与Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd., Japan) 一起温育10分钟。在室温用抗-F4/80抗体 (BMA Biomedicals, Switzerland) 的200倍稀释液温育切片过夜。在与二抗 (HRP-山羊抗大鼠抗体, Invitrogen, USA) 一起温育之后, 使用3,3'-二氨基联苯胺/H₂O₂溶液 (Nichirei Bioscience Inc., Japan) 进行酶-底物反应。

[1064] 为定量分析纤维化、脂肪沉积和炎症区域, 使用数码相机 (DFC280; Leica, Germany) 在200倍放大倍数下捕获中心静脉周围天狼星红染色、油红染色及F4/80免疫染色切片的明视野图像, 并使用ImageJ软件 (美国国立卫生研究院 (National Institute of Health), USA) 测量5个视野/切片中的阳性区域。

[1065] 对于定量PCR, 使用RNAiso (Takara Bio Inc., Japan) 根据制造商的说明书自肝脏样品提取总RNA。使用最终体积为20 μ L的含有4.4mM MgCl₂ (F. Hoffmann-La Roche Ltd.,

Switzerland)、40U RNA酶抑制剂(Toyobo Co.,Ltd.,Japan)、0.5mM dNTP(Promega Corporation,USA)、6.28μM随机六聚体(Promega Corporation)、5×第一链缓冲液(Promega)、10mM二硫苏糖醇(Invitrogen)及200U MMLV-RT(Invitrogen)的反应混合物逆转录1μg RNA。在37℃进行反应1小时,随后在99℃5分钟。使用实时PCR DICE和SYBR预混物Taq(Takara Bio)进行实时PCR。为计算相对mRNA表达水平,各基因的表达相对于参考基因36B4的表达进行校正(基因符号:Rplp0)。PCR-引物序列如下:36B4:正向5'-TTCCAGGCTTTGGGCATCA-3';反向5'-ATGTTTCAGCATGTTTCAGCAGTGTG-3';α-SMA:正向5'-AAGAGCATCCGACACTGCTGAC-3';反向5'-AGCACAGCCTGAATAGCCACATAC-3';TIMP-1:正向5'-TGAGCCCTGCTCAGCAAAGA-3';反向5'-GAGGACCTGATCCGTCCACAA-3';胶原1型:正向5'-CCAACAAGCATGTCTGGTTAGGAG-3';反向5'-GCAATGCTGTTCTTGCA GTGGTA-3';TGF-β:MA030397正向5'-GTGTGGAGCAACATGTGGA ACTCTA-3';反向5'-TTGGTTCAGCCACTGCCGTA-3'。基因标识符如下:36B4:核糖体蛋白,大型,P0,α-SMA:肌肉肌动蛋白,α2,平滑肌,主动脉(Acta2),Timp-1:金属蛋白酶1的肌肉组织抑制剂(Timp1),转录变体1,胶原1型:肌肉胶原,I型,α2(Coll1a2),TGF-β:转化生长因子β。

[1066] 对于治疗期5-9周,使用Bonferroni多重比较测试使用GraphPad Prism 4(GraphPad Software Inc.,USA)进行统计学分析。对于治疗期7-9周,使用Student's t检验使用GraphPad Prism 4进行t统计学分析。P值<0.05视为统计显著。当单尾t检验返回的P值<0.10时鉴定有朝向统计学显著的趋势或倾向。结果表示为均值±标准偏差(SD)。

[1067] 各研究组含有8只用体积为1mL/kg的介质或PEG-化合物1皮下每周两次处理的STAM小鼠。在9周时将动物处死。研究组如下:

[1068] 第1组:介质。八只5至9周龄的NASH小鼠每周两次皮下施用体积为1mL/kg的介质。

[1069] 第2组:低剂量PEG-化合物1。八只5至9周龄的NASH小鼠每周两次皮下施用剂量为1mg/kg的补充有PEG-化合物1的介质。

[1070] 第3组:高剂量PEG-化合物1。八只5至9周龄的NASH小鼠每周两次皮下施用剂量为3mg/kg的补充有PEG-化合物1的介质。

[1071] 第4组:介质。八只7至9周龄的NASH小鼠每周两次皮下施用体积为1mL/kg的介质。

[1072] 第5组:高剂量PEG-化合物1。八只7至9周龄的NASH小鼠每周两次皮下施用剂量为3mg/kg的补充有PEG-化合物1的介质。

[1073] 每日监测存活力、临床症状和行为。在处理之前记录体重。在各次施用之后约60分钟观察到小鼠毒性、濒死及死亡的显著临床症状。在研究结束时,通过在乙醚麻醉(Wako Pure Chemical Industries)下直接心脏穿刺通过放血将动物处死。

[1074] 结果

[1075] 体重变化示于图19。

[1076] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),在治疗期期间体重逐渐增加。在第11、13、15、16、18、19、20天和第22天至第28天低PEG-化合物1组的平均体重显著低于介质组。第10天至第28天高PEG-化合物1组的平均体重显著低于介质组。无动物显示出一般健康状况恶化。

[1077] 对于治疗期7-9周(第4和5组),在治疗期期间体重逐渐增加。在第5、6、9天及第11天至第14天高PEG-化合物1组的平均体重显著低于介质组。无动物显示一般健康状况恶化。

[1078] 总食品消耗示于图20。

[1079] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),介质组与PEG-化合物1处理组之间的总食品消耗无显著差异(介质:130±4g/小鼠,低PEG-化合物1:130±3g/小鼠,高PEG-化合物1:131±3g/小鼠)。

[1080] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组的总食品消耗倾向于增加(介质:62±3g/小鼠,高PEG-化合物1:68±2g/小鼠)。

[1081] 处死时的体重示于图21和表10中。

[1082] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),在处死时,与介质组相比PEG-化合物1处理组显示平均体重显著降低(介质:21.7±1.4g,低PEG-化合物1:19.5±1.4g,高PEG-化合物1:18.9±1.6g)。

[1083] 对于治疗期7-9周(第4和5组),在处死时,与介质组相比,高PEG-化合物1组显示平均体重显著降低(介质:21.5±1.4g,高PEG-化合物1:19.8±1.0g)。

[1084] 肝脏重量及肝-体重比示于图22及图23及表10中。

[1085] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),与介质组相比,PEG-化合物1处理组显示出平均肝脏重量显著降低(介质:1511±66mg,低PEG-化合物1:1163±117mg,高PEG-化合物1:970±237mg)。与介质组相比PEG-化合物1处理组显示出平均肝-体重比显著降低(介质:7.0±0.4%,低PEG-化合物1:6.0±0.5%,高PEG-化合物1:5.1±0.9%)。

[1086] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组显示出平均肝脏重量显著降低(介质:1364±126mg,高PEG-化合物1:1008±135mg)。与介质组相比高PEG-化合物1组显示出平均肝-体重比显著降低(介质:6.4±0.5%,高PEG-化合物1:5.1±0.8%)。

[1087] 表10. 体重和肝重量

参数 (均值 ± SD)	介质 (5-9周处理) (n=8)	低PEG-化合物1 (5-9周处理) (n=8)	高PEG-化合物1 (5-9周处理) (n=8)	介质 (7-9周处理) (n=8)	高PEG-化合物1 (7-9周处理) (n=8)
体重(g)	21.7 ± 1.4	19.5 ± 1.4	18.9 ± 1.6	21.5 ± 1.4	19.8 ± 1.0
肝重量(mg)	1511 ± 66	1163 ± 117	970 ± 237	1364 ± 126	1008 ± 135
肝-体重比(%)	7.0 ± 0.4	6.0 ± 0.5	5.1 ± 0.9	6.4 ± 0.5	5.1 ± 0.8

[1089] 全血葡萄糖示于图24和表11中。

[1090] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),与介质组相比高PEG-化合物1组显示出平均全血葡萄糖显著降低。与介质组相比,在低PEG-化合物1组中血糖水平倾向于降低(介质:691±114mg/dL,低PEG-化合物1:566±119mg/dL,高PEG-化合物1:493±136mg/dL)。

[1091] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组显示全血葡萄糖显著降低(介质:656±85mg/dL,高PEG-化合物1:454±104mg/dL)。

[1092] 血浆ALT示于图25和表11中。

[1093] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),在介质组与PEG-化合物1处理组之间血浆ALT含量无显著差异(介质:82±66U/L,低PEG-化合物1:64±36U/L,高PEG-化合物1:108±78U/L)。

[1094] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组的血浆ALT含量倾向于降低(介质:229±285U/L,高PEG-化合物1:36±8U/L)。

[1095] 血浆甘油三酯水平示于图26及表11中。

[1096] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),与介质组相比PEG-化合物1处理组显示出血浆甘油三酯水平显著降低(介质:322±341mg/dL,低PEG-化合物1:75±39mg/dL,高PEG-化合物1:64±22mg/dL)。

[1097] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组显示出血浆甘油三酯水平显著降低(介质:139±39mg/dL,高PEG-化合物1:59±51mg/dL)。

[1098] 总血浆胆固醇水平示于图27和表11中。

[1099] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),与介质组相比高PEG-化合物1组中的血浆总胆固醇水平倾向于降低。在介质组与低PEG-化合物1组之间血浆总胆固醇水平无显著差异(介质:121±20mg/dL,低PEG-化合物1:114±19mg/dL,高PEG-化合物1:98±31mg/dL)。

[1100] 对于治疗期7-9周(第4和5组),介质组与高PEG-化合物1组之间血浆总胆固醇水平无显著差异(介质:121±19mg/dL,高PEG-化合物1:115±29mg/dL)。

[1101] 肝脏甘油三酯水平示于图28和表11中。

[1102] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),与介质组相比PEG-化合物1处理组显示出血浆甘油三酯含量显著降低(介质:54±13mg/g肝脏,低PEG-化合物1:25±7mg/g肝脏,高PEG-化合物1:22±9mg/g肝脏)。

[1103] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组显示肝脏甘油三酯水平显著降低(介质:53±11mg/g肝脏,高PEG-化合物1:17±6mg/g肝脏)。

[1104] 肝脏胆固醇水平示于图29和表11中。

[1105] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),介质组与PEG-化合物1处理组之间的肝脏胆固醇含量无显著差异(介质:2.9±0.7mg/g肝脏,低PEG-化合物1:2.9±0.6mg/g肝脏,高PEG-化合物1:3.1±0.4mg/g肝脏)。

[1106] 对于治疗期7-9周(第4和5组),介质组与PEG-化合物1处理组之间的肝脏胆固醇含量无显著差异(介质:3.1±0.8mg/g肝脏,高PEG-化合物1:3.6±1.5mg/g肝脏)。

[1107] 表11. 血液及肝脏生物化学

参数 (均值±SD)	介质 (5-9周处理) (n=8)	低PEG-化合物 1 (5-9周处理) (n=8)	高PEG-化合物 1 (5-9周处理) (n=8)	介质 (7-9周处理) (n=8)	高PEG-化合物 1 (7-9周处理) (n=8)
全血葡萄糖 (mg/dL)	691 ± 114	566 ± 119	493 ± 136	656 ± 85	454 ± 104
血浆ALT (U/L)	82 ± 66	64 ± 36	108 ± 78	229 ± 285	36 ± 8
[1108] 血浆甘油三酯 (mg/dL)	322 ± 341	75 ± 39	64 ± 22	139 ± 39	59 ± 51
血浆总胆固醇 (mg/dL)	121 ± 20	114 ± 19	98 ± 31	121 ± 19	115 ± 29
肝脏甘油三酯 (mg/g肝脏)	54 ± 13	25 ± 7	22 ± 9	53 ± 11	17 ± 6
肝 脏 胆 固 醇 (mg/g肝脏)	2.9 ± 0.7	2.9 ± 0.6	3.1 ± 0.4	3.1 ± 0.8	3.6 ± 1.5

[1109] 组织学分析:HE染色和NAFLD活性评分

[1110] HE染色切片的代表性显微照片示于图30A-B中,NAFLD活性评分的结果示于图31、

图32A-C和表12中。(NALFD活性评分(图31)为脂肪变性、肝细胞膨胀和小叶炎症评分)。表12中所示的结果基于表13中所示的评分标准。

[1111] 表12.NAFLD活性评分

[1112]

组	n	评分											NAS (均值 ± SD)
		脂肪变性				小叶炎症				肝细胞膨胀			
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	
介质 (5-9周处理)	8	-	6	2	-	-	-	5	3	-	-	8	5.6 ± 0.7
低PEG-化合物1 (5-9周处理)	8	3	5	-	-	-	4	4	-	-	1	7	4.0 ± 1.2
高PEG-化合物1 (5-9周处理)	8	4	4	-	-	-	5	3	-	2	4	2	2.9 ± 1.2
介质	8	-	5	3	-	-	-	6	2	-	-	8	5.6 ± 0.7

[1113]

(7-9周处理)													
高PEG-化合物1 (7-9周处理)	8	5	3	-	-	-	6	2	-	3	4	1	2.4 ± 1.3

[1114] 表13.NAS化合物的定义

项目	分数	程度
脂肪变性	0	<5%
	1	5-33%
	2	>33-66%
	3	>66%
肝细胞膨胀	0	无
	1	少量膨胀细胞
	2	许多细胞/显著膨胀
小叶炎症	0	无病灶
	1	<2病灶/200x
	2	2-4病灶/200x
	3	>4病灶/200x

[1116] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),来自介质组的肝脏切片表现出严重小泡和大泡脂肪沉积、肝细胞膨胀和炎症性细胞浸润。与介质组相比PEG-化合物1处理组显示出脂肪沉积、肝细胞膨胀和炎症性细胞浸润的显著改善(降低),NAFLD活性评分(NAS)显著降低(介质:5.6 $\pm$ 0.7,低PEG-化合物1:4.0 $\pm$ 1.2,高PEG-化合物1:2.9 $\pm$ 1.2)。

[1117] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组显示出脂肪沉积、肝细胞膨胀和炎症性细胞浸润显著改善(降低)及NAS显著降低(介质:5.6 $\pm$ 0.7,高PEG-化合物1:2.4 $\pm$ 1.3)。

[1118] 组织学分析:天狼星红染色

[1119] 天狼星红染色的结果示于图33A-B、图34(显示出代表性染色)和表14中。

[1120] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),来自介质组的肝脏切片表现出肝脏小叶的中心周围区域中的胶原沉积。与介质组相比PEG-化合物1处理组中纤维化区域(天狼星红阳性面

积)显著减小(介质:1.10±0.24%,低PEG-化合物1:0.71±0.17%,高PEG-化合物1:0.71±0.19%)。

[1121] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组中的纤维化区域显著减小(介质:1.25±0.29%,高PEG-化合物1:0.75±0.21%)。

[1122] 组织学分析:F4/80免疫组化分析

[1123] F4/80免疫组化分析的结果示于图35A-B、图36(显示出代表性染色)和表14中。

[1124] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),来自介质组的肝脏切片的F4/80免疫染色表现出肝脏小叶中的F4/80+细胞积聚。介质组与PEG-化合物1处理组之间的F4/80+细胞的数量和大小以及炎症区域(F4/80-阳性区域)的百分比无显著差异(介质:6.9±0.9%,低PEG-化合物1:7.6±1.5%,高PEG-化合物1:7.1±0.7%)。

[1125] 对于治疗期7-9周(第4和5组),介质组与高PEG-化合物1组之间的F4/80+细胞的数量和大小以及炎症区域的百分比无显著差异(介质:7.1±0.7%,高PEG-化合物1:6.3±1.1%)。

[1126] 组织学分析:油红染色

[1127] 油红染色的结果示于图37A-B(显示出代表性染色)、图38和表14中。

[1128] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),来自介质组的肝脏切片表现出肝细胞的小泡和大泡脂肪沉积。与介质组相比PEG-化合物1处理组脂肪沉积区域(油红阳性区域)的百分比显著减小(介质:30.4±4.8%,低PEG-化合物1:20.5±8.8%,高PEG-化合物1:16.2±6.1%)。

[1129] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组的脂肪沉积区域的百分比显著减小(介质:30.7±5.6%,高PEG-化合物1:13.9±7.7%)。

[1130] 表14.组织学分析

参数 (均值 ± SD)	介质 (5-9周处理) (n=8)	低PEG-化合物 1(5-9周处理) (n=8)	高PEG-化合物 1 (5-9周处理) (n=8)	介质 (7-9周处理) (n=8)	高PEG-化合物 1 (7-9周处理) (n=8)
天狼星红阳性区域(%)	1.10 ± 0.24	0.71 ± 0.17	0.71 ± 0.19	1.25 ± 0.29	0.75 ± 0.21
F4/80阳性区域(%)	6.9 ± 0.9	7.6 ± 1.5	7.1 ± 0.7	7.1 ± 0.7	6.3 ± 1.1
油红阳性区域(%)	30.4 ± 4.8	20.5 ± 8.8	16.2 ± 6.1	30.7 ± 5.6	13.9 ± 7.7

[1132] 基因表达分析

[1133] α-SMA、TIMP-1、胶原1型和TGF-β的基因表达分析的结果示于图39A-D和表15中。

[1134] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),与介质组相比高PEG-化合物1组中的α-SMA mRNA表达水平倾向于下调。介质组与低PEG-化合物1组之间的α-SMAmRNA表达水平无显著差异(介质:1.00±1.14,低PEG-化合物1:0.52±0.60,高PEG-化合物1:0.39±0.30)。

[1135] 对于治疗期7-9周(第4和5组),介质组与高PEG-化合物1组之间的α-SMA mRNA表达水平无显著差异(介质:1.00±0.88,高PEG-化合物1:1.14±1.01)。

[1136] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),与介质组相比低PEG-化合物1组中的TIMP-1mRNA表达水平倾向于下调。介质组与高PEG-化合物1组之间的TIMP-1mRNA表达水平无显著差异(介质:1.00±0.39,低PEG-化合物1:0.73±0.28,高PEG-化合物1:0.88±0.31)。

[1137] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组中的TIMP-1mRNA表

达水平倾向于下调(介质:1.00±0.57,高PEG-化合物1:0.65±0.34)。

[1138] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),介质组与PEG-化合物1处理组之间的胶原1型mRNA表达水平无显著差异(介质:1.00±0.22,低PEG-化合物1:0.88±0.24,高PEG-化合物1:0.89±0.34)。

[1139] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组中的胶原1型mRNA表达显著降低(介质:1.00±0.29,高PEG-化合物1:0.69±0.20)。

[1140] 对于治疗期5-9周(第1、2和3组),与介质组相比低PEG-化合物1组中的TGF-βmRNA表达水平倾向于下调。介质组与高PEG-化合物1组之间的TGF-βmRNA表达水平无显著差异(介质:1.00±0.24,低PEG-化合物1:1.07±0.60,高PEG-化合物1:0.90±0.26)。

[1141] 对于治疗期7-9周(第4和5组),与介质组相比高PEG-化合物1组中的TGF-βmRNA表达水平倾向于下调(介质:1.00±0.45,高PEG-化合物1:0.77±0.22)。

[1142] 表15.基因表达分析

参数 (均值±SD)	介质 (5-9周处理) (n=8)	低PEG-化合物1 (5-9周处理) (n=8)	高PEG-化合物1 (5-9周处理) (n=8)	介质 (7-9周处理) (n=8)	高PEG-化合物1 (7-9周处理) (n=8)
[1143] α-SMA	1.00 ± 1.14	0.52 ± 0.60	0.39 ± 0.30	1.00 ± 0.88	1.14 ± 1.01
TIMP-1	1.00 ± 0.39	0.73 ± 0.28	0.88 ± 0.31	1.00 ± 0.57	0.65 ± 0.34
胶原1型	1.00 ± 0.22	0.88 ± 0.24	0.89 ± 0.34	1.00 ± 0.29	0.69 ± 0.20
TGF-β	1.00 ± 0.24	1.07 ± 0.60	0.90 ± 0.26	1.00 ± 0.45	0.77 ± 0.22

[1144] 如上文所指出的,通过测量肝甘油三酯水平的生物化学测定和用苏木素和伊红或油红O染色肝脏切片后的组织学分析所评估的,PEG-化合物1降低肝脂肪积聚。文献中已报导天然FGF21的此种抗脂肪肝活性取决于小鼠中的脂联素而定(参见Lin等,Cell Metab.17:779-789(2013);Holland等,Cell Metab 17:790-797(2013),其各自通过提述以其整体并入本文)。因此,在从处理小鼠制备的末端血清样品中测量总脂联素的浓度。遵循制造商的方案使用市售ELISA试剂盒(Alpco目录号47-ADPMS-E01)测量血清脂联素。

[1145] 在所有测试的末端时间点,与对应介质组相比,每周两次施用3mg/kg PEG-化合物1统计学显著地增加血清总脂联素(图61)。此结果与脂联素有助于PEG-化合物1于Stellic NASH模型中的功效的假设一致。

[1146] 讨论

[1147] 本实施例显示了测试PEG-化合物1在预防性与治疗性NASH模型中的功效的实验的结果。在预防性模型中,在此模型中在脂肪肝明显时起始处理(自第5周起始,即第5-9周组)。在治疗性模型中,在此模型中NASH明显时起始治疗(自第7周起始,即第7-9周组)。因此,预防性与治疗性模型中证明了PEG-化合物1的治疗性功效。

[1148] 在两种处理模型中用PEG-化合物1处理显著减小纤维化区域(通过天狼星红染色检测),证明PEG-化合物1的抗纤维化作用。PEG-化合物1处理也降低α-SMA、TIMP-1和胶原1型的mRNA表达水平,进一步支持PEG-化合物1的抗纤维化特性。用PEG-化合物1处理还导致体重及肝脏重量、肝-体重比、血糖、血浆及肝脏甘油三酯、NAFLD活性评分、脂肪沉积区域

(通过油红染色检测) 统计学显著地降低。

[1149] 所有PEG-化合物1处理组显示出NAS显著降低, 其是评估NASH活性的一个临床终点 (Sanyal AJ. 等, Hepatology, 2011; 54: 344)。

[1150] 此外, 如全血葡萄糖含量、血浆甘油三酯水平和肝脏甘油三酯含量降低所证明的, 用PEG-化合物1处理改善脂质及葡萄糖代谢。

[1151] 总之, 在本发明研究中PEG-化合物1显示出与改善的脂质及葡萄糖代谢相关的抗NASH、抗纤维化作用。

[1152] 实施例14

[1153] 包含融合配偶体的修饰的FGF-21多肽的溶解度评估

[1154] 本实施例描述了包含融合配偶体的修饰的FGF-21多肽的相对溶解度的测量。结果指示化合物能够配制至相对较高的浓度, 由此允许更便利地施用有效剂量。

[1155] 方法

[1156] 相对溶解度通过序贯活塞流浓缩循环进行, 随后大小排阻色谱分析来评估。将于20mM组氨酸缓冲液pH 7.0中以类似但不相同起始浓度配制的样品移液至3kDa分子量截留离心浓缩器中并在4℃在4,750RPM旋转15分钟、15分钟和30分钟的循环。在旋转循环之间, 自浓缩装置移出等分试样并进行分析型大小排阻色谱分析 (aSEC) (在用PBS pH 7.2缓冲液平衡的GE Healthcare Superdex S-75 10/300GL柱上) 以确定溶液中HMW和单体物种的浓度。

[1157] 用NanoDrop分光光度计通过280nm处的吸光度确定总浓度。相对于SEC色谱图迹线中的单体峰, 通过高分子量峰的曲线下面积计算来确定高分子量百分比。绘制所得数据点以将观察测试条件下从最难溶构建体至最可溶的排列顺序可视化, 由数据点产生的斜率越低, 测试条件下的蛋白变体越稳定。

[1158] 结果

[1159] 包含融合配偶体的修饰的FGF-21多肽的相对溶解度通过测量高分子量 (HMW) 聚集体的形成与蛋白浓度的函数来确定。在给定浓度下较低的HMW聚集体形成指示较大的溶解度, 由此使得能够配制至较高浓度。

[1160] 结果图示于图41中。测试化合物的活塞流溶解度曲线的斜率示于下表16中 (较低值表示较少聚集体形成且因此能够配制为较高浓度)。

[1161] 表16. 包含融合配偶体的修饰的FGF-21多肽的活塞流溶解度结果

[1162]	FGF21- PKE Adnectin(2) 融合化合物	活塞流溶解度曲线 斜率
	化合物101	2.72
	化合物102	0.31
	化合物103	n.d.
	化合物104	0.36
	化合物105	0.88
	化合物106	0.83
	化合物107	0.37
	化合物108	0.68
	化合物109	0.76
	化合物110	0.25
	化合物111	0.65
	化合物112	0.05
	化合物113	0.47

[1163] 实施例15:评估PEG-化合物1在患有非酒精性脂肪性肝炎的成人中的安全性、药代动力学和药效学效果的随机、双盲、安慰剂对照、平行组、多重剂量研究

[1164] 在美国,NASH是成人中肝硬化的主要原因之一;至多20%的患有NASH的成人患上肝硬化。NASH的组织学研究结果包括肝脏中不同细胞外纤维化量的脂肪变性、炎症及膨胀变性,并在不存在显著醇使用情况下出现。NASH患者表现出自心脏血管、肝脏及癌症相关的死亡增加的死亡率。不可获得特定的药物治疗选项。

[1165] 此实施例描述了评估患有NASH的成人中PEG-化合物1 (SEQ ID NO:201的多肽,其中pAF连接至30kDa PEG)的安全性、药代动力学及药效学效果的随机、双盲和安慰剂对照的人临床试验,包括通过MRI以肝脂肪分数(%)评估安全性、耐受性和变化。

[1166] 研究群体:约90个符合所有如下标准的21至75岁的男性及女性个体入选:在筛选1年内进行的肝脏活检,以NASH CRN纤维化分期1-3或使用不同评分系统获得的等效结果记录NASH的结果;BMI ≥ 30 (重量(kg)/[高度(m)]²);脂肪肝指数 ≥ 60 ;通过在筛选时段期间进行MRI得到肝脂肪分数(%) $\geq 10\%$ 。受试者经历筛选评估以在随机分组之前42天内确定合格性。

[1167] 若有证明并发疾病包括长期肝病(除NASH之外)、肝硬化、失代偿性肝病、不受控制的糖尿病及一些其他医学病况或病史,则从研究排除个体。

[1168] 在第1天给药活性药物或安慰剂之前约14至35天进行基线扫描,包括通过磁共振成像(MRI)得到的肝脂肪含量、通过磁共振弹性成像(MRE)得到的肝硬度和通过双能X射线吸光测定法(DXA)得到的身体组成。额外基线患者评估包括确定体重、BMI和腰围。

[1169] 治疗方案:向患有NASH的成人每日或每周施用PEG-化合物1持续16周。在适当使用具有安慰剂的注射器进行7天患者训练之后,皮下自我使用治疗。在第1天将约90个符合条件的个体随机分至三个处理组之一(每组30个),然后对其进行如下治疗(在第1天起始):治疗A:10mg PEG-化合物1,每天;处理B:20mg PEG-化合物1,每周;处理C:安慰剂,每天。使用

基于当前美国糖尿病协会标准 (American Diabetes Association criteria) 的2型糖尿病诊断 (是或否) 将个体分级。

[1170] 所有个体每天一次自我施用PEG-化合物1或安慰剂。PEG-化合物1以10mg/mL溶液的形式提供。对于治疗B (20mg/周) 组, 在第1天 (D 1) 和第2-7天各同时给予2个1mL的注射剂, 注射剂为安慰剂。为保持为盲化, 其他两组也具有两个第1天注射, 其中之一或两者含有安慰剂。在第2-7天, 注射为1mL的PEG-化合物1 (治疗A组) 或1mL安慰剂 (治疗C组)。持续治疗直至第112天 (D 112) (即16周)。

[1171] 患者评估: 在D-7 (仅安慰剂引入开始时)、D 1、D 15、D 29、D 43、D 57、D 86和D 112实施患者评估。进行体检、生命征象测量、12导联心电图 (ECG)、临床实验室评估和MRI、MRE和DXA扫描。在第112 (+/-1周) 天进行MRI、MRE和DXA治疗末期扫描。在约D 142和D 292实施随访, 在最后给药之后6个月 (+/-2周) 实施DXA后续扫描。收集血液以进行药代动力学 (PK) 和药效学 (PD) 分析。通过经验证分析测量PEG-化合物1的血清浓度 (总计及C末端完整)。通过开发的群体PK模型评估研究中所收集的所有PK数据以评估基于模型的参数, 如CL/F、Vc/F、Ka等。此外, 个体暴露参数 (如稳定状态下的Cavg、Cmin、Cmax和AUC) 的评估源自基于模型的参数。密切监测整个研究中个体的不良事件。

[1172] 主要终点: 主要目的为通过MRI评估患有活检证实的NASH的患者中每天或每周剂量的PEG-化合物1对安全性、耐受性及肝脂肪分数 (%) 的效果。这通过由质子密度脂肪级分肝MRI确定的基线至第16周的肝脂肪分数百分比变化 (%) 的主要终点评估。基线定义为所有终点的最后非缺失给药前测量。预测与安慰剂相比, 向患有NASH的患者每天或每周施用PEG-化合物1维持16周会较大程度降低肝脂肪分数 (%)。主要终点还包括安全性终点, 包括AE、严重AE及特别感兴趣的事件 (包括注射部位评估、导致中断的AE和死亡) 的发生以及临床实验室测试、生命体征测量、ECG、体检和在特定时间点通过DXA扫描收集的骨矿物质密度 (BMD) 中的显著异常。

[1173] 次要终点: 次要终点包括药代动力学终点和免疫原性终点。药代动力学终点将通过PEG-化合物1 (总计和C末端完整) 血清浓度的基于模型的药代动力学参数来评估: 由所选时间点实施的测量确定的Cavg、Cmin、Cmax和AUC (TAU)。免疫原性终点通过抗PEG-化合物1抗体和抗-FGF21抗体的患者含量评估。确定PEG-化合物1 (总计和C末端完整) 血清浓度的基于模型的药代动力学参数。主要PK参数包括: CL/F (静脉外施用后的表观清除率); V/F (静脉外施用后的表观分布体积); 和Ka (注射部位至血液循环的吸收速率常数)。自主要PK参数得到次要PK参数, 包括Cmax (最大计算血清浓度); T1/2 (清除半衰期); AUC (TAU) (一个给药时间间隔中的浓度-时间曲线下面积); Cmin (给药时间间隔内的最小浓度); 及Cavg (给药时间间隔内的平均浓度)。

[1174] 分析: 使用轴向重复测量分析来分析实施基线和至少一种基线后测量的治疗群体在第16周相对于基线的肝脂肪分数变化 (%)。模型包括处理组、作为主要效果的周和周-治疗相互作用和作为协变量的基线肝脂肪分数 (%) 和基线糖尿病状态。非结构化协变量矩阵用以表示各个体内重复测量的相关性。模型提供点治疗内及治疗之间相对于基线的平均变化的评估、标准误和双边90%置信区间。计算P值以比较两个PEG-化合物1处理组 (每天10mg及每周20mg) 中的每一项中的治疗效果与安慰剂处理组第16周的治疗效果。各处理组比较在单边0.05显著性水平下进行。不针对多重性进行调节。

[1175] 研究PEG-化合物1(总计和C末端完整)暴露与其他生物标记或终点之间的关系以表现出剂量反应关系。还分析了这些测量以显示其与肝脂肪分数变化的关系,和这些生物标记如何预测或涉及该变化。这些终点和生物标记包括通过MRE得到的肝脏硬度变化、体重、BMI、腰围、通过DXA得到的身体组成、葡萄糖稳态、胰岛素敏感性、空腹脂质、骨骼稳态、ALT和AST以及与疾病进展和并发症的风险相关的生物标志物。NASH通常与降低的脂联素水平(低脂联素血症)相关和降低的水平与更大规模的坏死性炎症相关。据信脂联素通过增强脂肪氧化和降低肝脂质存储而增加胰岛素敏感性。预期血清总脂联素水平通过PEG-化合物1治疗增加。还预期在NASH患者中PEG-化合物1治疗降低空腹甘油三酯、LDL、ApoB、ApoC3且增加HDL。

[1176] 使用如上文所述的非结构化协变量矩阵实施研究结果的分析表现出与安慰剂对照相比用PEG-化合物1(在每天与每周施用研究组中)治疗的患者中肝脂肪分数统计显著($p < 0.05$)降低。

[1177] 实施例16

[1178] 本实施例进一步探索了非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的STAM模型中PEG-化合物1的功效。在9至12周龄或至15周龄之间处理小鼠。

[1179] 方法

[1180] 提供PEG-化合物1和介质(20mM Tris/250mM蔗糖,pH 8.3)。为制备给药溶液,通过用提供的介质适当稀释制备PEG-化合物1溶液。

[1181] C57BL/6小鼠(怀孕15天的雌性)获自Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan)。将用于研究的所有动物豢养且根据动物使用的日本药理学标准看护。在60个雄性小鼠中通过在出生之后单次皮下注射200 μ g链脲霉素(STZ, Sigma-Aldrich, USA)溶液2天和在4周龄之后用高脂肪膳食(HFD, 57kcal%脂肪, 目录号:HFD32, CLEA Japan, Inc., Japan)饲喂来诱导NASH。

[1182] PEG-化合物1和介质通过以3mg/kg的剂量按1mL/kg的体积每周两次皮下途径施用。使动物维持于SPF设备中处于受控的温度($23 \pm 2^\circ\text{C}$)、湿度($45 \pm 10\%$)、照明(12小时人工光和暗循环;8:00至20:00有光照)及空气交换的条件下。实验房间维持高压($20 \pm 4\text{Pa}$)以预防设备污染。将动物豢养于聚碳酸酯笼KN-600(Natsume Seisakusho, Japan)中,每笼最多4只小鼠。使用灭菌的Paper-Clean(Japan SLC)铺垫且一周替换一次。提供任意可取的灭菌固体HFD,置于笼顶的金属盖中。从装备有橡胶塞和吸管的水瓶任意提供纯水。水瓶一周替换一次,清洁并在高压釜中灭菌且重复使用。通过耳环上雕刻的数字识别小鼠。用特定识别代码标记各笼。

[1183] 使用LIFE CHECK(EIDIA Co.Ltd., Japan)在全血中测量非空腹血糖。对于血浆生物化学分析,将血液收集于具有抗凝血剂的聚丙烯管(Novo-Heparin, Mochida Pharmaceutical Co.Ltd., Japan)中并在 4°C 以1,000 $\times g$ 离心15分钟。收集上清液并储存于 -80°C 直至使用。通过FUJI DRI-CHEM 7000(Fujifilm Corporation, Japan)测量血浆ALT、甘油三酯和总胆固醇水平。

[1184] 通过Folch's法获得肝脏总脂质提取物(Folch J.等, J.Biol.Chem.1957;226:497)。使肝脏样品在氯仿-甲醇(2:1, v/v)中均质化并在室温温育过夜。在用氯仿-甲醇-水(8:4:3, v/v/v)洗涤之后,使提取物蒸发至干燥并溶解于异丙醇中。分别通过甘油三酯E-测

试和胆固醇E-测试测量肝脏甘油三酯和胆固醇含量(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)。

[1185] 对于HE染色,从用Bouin's溶液预固定的肝脏组织石蜡块切片并用Lillie-Mayer's苏木素(Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Japan)和伊红(Wako Pure Chemical Industries)染色。根据Kleiner的标准计算非酒精性脂肪肝病(NAFLD)活性评分(NAS)(Kleiner DE.等, Hepatology, 2005; 41:1313)。为观察胶原沉积,用苦天狼星红溶液(Waldeck, Germany)染色Bouin's固定的肝脏切片。为观察大泡和小泡脂肪,从用10%中性缓冲福尔马林预固定、包埋于Tissue-Tek O.C.T.化合物(Sakura Finetek Japan Co. Ltd., Japan)中的冷冻肝脏组织进行冷冻切片并用油红O(Sigma-Aldrich)染色。对于免疫组化,从包埋于Tissue-Tek O.C.T.化合物中并用丙酮固定的冷冻肝脏组织进行切片。使用0.03% H₂O₂封闭内源性过氧化酶活性5分钟,然后与Block Ace(Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd., Japan)一起温育10分钟。在4℃用抗-F4/80(BMA Biomedicals, Switzerland)抗体的200倍稀释液温育切片过夜。在与二抗(HRP-山羊抗大鼠抗体, Invitrogen, USA)一起温育之后,使用3,3'-二氨基联苯胺/H₂O₂溶液(Nichirei Bioscience Inc., Japan)进行酶-底物反应。

[1186] 用布安氏溶液(Bouin's solution)固定肾脏。使用通过0.5%过碘酸氧化并用Schiff's试剂染色(两者皆来自Wako Pure Chemical Industries)的PAS染色切片观察肾小球结构。为观察胶原沉积,用苦天狼星红溶液(Waldeck)染色肾脏切片。

[1187] 为定量分析纤维化、脂肪沉积和炎症区域,使用数码相机(DFC280; Leica, Germany)在200倍放大倍数下捕获肝脏中心静脉周围或肾间质性区域的天狼星红染色、油红染色和F4/80免疫染色切片的明视野图像,并使用ImageJ软件(美国国立卫生研究院, USA)测量5个视野/切片中的阳性区域。

[1188] 使用Bonferroni多重比较测试经GraphPad Prism 4(GraphPad Software Inc., USA)进行统计学分析。P值<0.05视为统计显著。当单尾t检验返回的P值<0.05时假定有该趋势或倾向。结果以平均值±SD表示。

[1189] 结果

[1190] 研究组如下(概述于下表17中)。

[1191] 第1组:介质。对二十只在9至12周龄或至15周龄的NASH小鼠每周两次皮下施用体积为1mL/kg的介质。

[1192] 第2组:PEG-化合物1。对二十只在9至12周龄或至15周龄的NASH小鼠每周两次皮下施用剂量为3mg/kg的补充有PEG-化合物1的介质。

[1193] 表17. 治疗概述。

[1194]

组	小鼠编号	小鼠	测试物质	剂量 (mg/kg)	体积 (mL/kg)	疗法	处死 (周)
1	20	STAM	介质	-	1	SC, 每周两次, 9 周-12 周或 15 周	12, 15
2	20	STAM	PEG-化 合物 1	3	1	SC, 每周两次, 9 周-12 周或 15 周	12, 15

[1195] 每天监测存活力、临床症状和行为。在处理之前记录体重。在各次施用之后约60分

钟观察到小鼠毒性、濒死和死亡的显著临床症状。通过在乙醚麻醉(Wako Pure Chemical Industries)下直接心脏穿刺通过放血将动物处死。在12周龄将所有组中的六只动物处死以进行如下分析,并将剩余动物保留直至15周龄处死那天。

[1196] 在治疗期期间所有组中的体重无明显变化。介质组与PEG-化合物1组之间的平均体重无显著差异。

[1197] 在治疗期期间,如下小鼠在达到第40天之前死亡:在介质组中20只小鼠中的八只死亡。在PEG-化合物1组中未发现动物死亡。死亡原因尚不明确且可为介质组中相关的疾病进展。个体小鼠死亡的天数为第7、17(两只小鼠)、20(两只小鼠)、34、38及40天。在介质组中5只小鼠死亡之后,决定改变原始研究方案并将每组在第6周处死的小鼠数量由8只降至6只,以试图确保各组中至少6只小鼠存活至第15周。

[1198] 在第9周与第12周之间处理的动物中,处死当天介质组和PEG-化合物1组之间的平均体重无显著差异(图42A)。同样地,在第9周与第15周之间处理的动物中,处死当天介质组和PEG-化合物1组之间的平均体重无显著差异(图42B)。

[1199] 器官重量和肝-体重比示于图43-46并概述于表18中。

[1200] 在第9周与第12周之间处理的动物中,与介质组相比PEG-化合物1组显示出平均肝脏重量的降低趋势(图43A)。与介质组相比PEG-化合物1组中平均肝-体重比显著降低($p < 0.01$)(图44A)。介质组与PEG-化合物1组之间的平均右肾脏重量无显著差异(图45A)。与介质组(图46A)相比在PEG-化合物1组中平均左肾脏重量倾向于降低。

[1201] 在第9周-15周之间处理的动物中,与介质组相比PEG-化合物1组显著降低平均肝脏重量($p < 0.001$)(图43B)和平均肝-体重比($p < 0.001$)(图44B)。在介质组与PEG-化合物1组之间平均右肾脏重量(图45B)和平均左肾重量(图46B)无显著差异。

[1202] 表18. 体重和器官重量结果

[1203]	参数 (均值 $\pm$ SD)	12 周介质(n=6)	12 周 PEG-化合物 1 (n=6)
	体重(g)	18.0 $\pm$ 4.7	16.0 $\pm$ 3.9
	肝重量(mg)	1389 $\pm$ 374	973 $\pm$ 226
	肝-体重比(%)	7.7 $\pm$ 1.1	6.1 $\pm$ 0.7
[1204]	右肾重量(mg)	143 $\pm$ 40	110 $\pm$ 25
	左肾重量(mg)	148 $\pm$ 37	98 $\pm$ 26
	参数 (均值 $\pm$ SD)	15 周介质(n=6)	15 周 PEG-化合物 1 (n=14)
	体重(g)	16.5 $\pm$ 4.8	15.2 $\pm$ 2.5
	肝重量(mg)	1341 $\pm$ 374	746 $\pm$ 161
	肝-体重比(%)	8.2 $\pm$ 1.5	5.0 $\pm$ 1.1
	右肾重量(mg)	111 $\pm$ 26	97 $\pm$ 24
	左肾重量(mg)	101 $\pm$ 22	90 $\pm$ 20

[1205] 生物化学测量结果示于图47-52中并概述于下表19中。

[1206] 在第9周至第12周处理的动物中,介质组与PEG-化合物1组之间的全血葡萄糖水平无显著差异(图47A)。

[1207] 在第9周至第15周处理的动物中,与介质组相比PEG-化合物1组中全血葡萄糖水平显著降低($p < 0.05$)(图47B)。

[1208] 在第9周至第12周处理的动物中,介质组与PEG-化合物1组之间的血浆ALT水平无显著差异(图48A)。

[1209] 在第9周至第15周处理的动物中,与介质组相比PEG-化合物1组中血浆ALT水平显著降低($p<0.01$) (图48B)。

[1210] 在第9周至第12周处理的动物中,与介质组相比PEG-化合物1组显示出血浆甘油三酯水平降低的倾向(图49A)。

[1211] 在第9周至第15周处理的动物中,介质组与PEG-化合物1组之间的血浆甘油三酯水平无显著差异(图49B)。

[1212] 在第9周至第12周处理的动物中,介质组与PEG-化合物1组之间的血浆总胆固醇无显著差异(图50A)。

[1213] 在第9周至第15周处理的动物中,介质组与PEG-化合物1组之间的血浆总胆固醇无显著差异(图50B)。

[1214] 在第9周至第12周处理的动物中,与介质组相比PEG-化合物1组中肝脏甘油三酯含量显著降低($p<0.01$) (图51A)。

[1215] 在第9周至第15周处理的动物中,与介质组相比PEG-化合物1组中肝脏甘油三酯含量显著降低($p<0.001$) (图51B)。

[1216] 在第9周至第12周处理的动物中,与介质组相比PEG-化合物1组中肝脏胆固醇含量显著降低($p<0.01$) (图52A)。

[1217] 在第9周至第15周处理的动物中,与介质组相比PEG-化合物1组中肝脏胆固醇含量显著降低($p<0.001$) (图52B)。

[1218] 表19.生化测试结果

[1219]	参数(均值±SD)	12周介质(n=6)	12周PEG-化合物1(n=6)
	全血葡萄糖(mg/dL)	628±268	505±231
	血浆ALT(U/L)	55±30	39±21
	血浆甘油三酯(mg/dL)	498±368	167±214
	血浆总胆固醇(mg/dL)	195±115	162±62
	肝甘油三酯(mg/g肝脏)	98±38	42±13
	肝胆固醇(mg/g肝脏)	36±15	18±4
	参数(均值±SD)	15周介质(n=6)	15周PEG-化合物1(n=14)
	全血葡萄糖(mg/dL)	594±182	350±174
	血浆ALT(U/L)	48±15	23±15
	血浆甘油三酯(mg/dL)	117±24	102±57
	血浆总胆固醇(mg/dL)	176±72	141±45
	肝甘油三酯(mg/g肝脏)	98±31	49±19
	肝胆固醇(mg/g肝脏)	39±10	19±9

[1220] 显示肝脏样品的组织学分析的代表性显微照片示于图53、55、57和59中。组织学结果的概述图示于图54、56、58和60中,并列于下表22中。

[1221] 在第9周至第12周处理的动物中,来自介质组的HE染色肝脏切片表现出严重小泡和大泡脂肪沉积、肝细胞膨胀和炎症性细胞浸润(图53A-B)。与介质组相比,PEG-化合物1组

显示脂肪沉积、肝细胞膨胀和炎症性细胞浸润的显著改进及NAS显著降低(图53C-D)。

[1222] 在第9周至第15周处理的动物中,与介质组相比,PEG-化合物1组显示脂肪沉积、肝细胞膨胀和炎症性细胞浸润的显著改进(图53E-F)及NAS显著降低(图53G-H)。

[1223] 分别对于第9周至第12周和第9周至第13周处理的动物,NALFD活性评分结果图示于图54A-B中,并概述于表20中。两个处理组中的NALFD活性评分显著降低($p<0.01$ 和 $p<0.001$,分别对于第9周至第12周和第9周至第15周处理的动物)。

[1224] 表20.NALFD活性评分结果概述。评分组分如下表21所示。

组	N	脂肪变性				小叶炎症				肝细胞膨胀			NAS (均值±SD)
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	
[1225] 12周介质	6	1	4	-	1	-	2	4	-	-	-	6	4.8±1.2
12周PEG-	6	6	-	-	-	1	2	2	1	2	4	-	2.2±0.8
化合物1													
[1226] 15周介质	6	1	3	1	1	-	1	5	-	-	-	6	5.2±1.2
15周PEG-化合物1	14	11	3	-	-	6	6	2	-	7	5	2	1.6±1.2

[1227] 表21.NALFD活性评分组分

项目	评分	程度
脂肪变性	0	<5%
	1	5-33%
	2	>33-66%
	3	>66%
肝细胞膨胀	0	无
	1	少数膨胀细胞
	2	许多细胞/显著膨胀
小叶炎症	0	无病灶
	1	<2 病灶/200x
	2	2-4 病灶/200x
	3	>4 病灶/200x

[1229] 在第9周至第12周处理的动物中,来自介质组的天狼星红染色肝脏切片表现出肝脏小叶的中心周围区域中的胶原沉积(图55A-B)。如图56A中所概述的,介质组与PEG-化合物1组之间的纤维化区域无显著差异(图55C-D)。

[1230] 如图56B中所概述,在第9周至第15周处理的动物中,与介质组(图55G-H)相比,PEG-化合物1组(图55E-F)中的纤维化区域显著减少($p<0.05$)。

[1231] F4/80免疫染色切片的代表性显微照片示于图57中。

[1232] 在第9周至第12周处理的动物中,来自介质组的F4/80免疫染色肝脏切片表现出肝脏小叶中F4/80+细胞的积聚(图57A-B)。如图58A中所概述,介质组(图57C-D)与PEG-化合物1组之间的F4/80+细胞数量和大小无显著差异。

[1233] 如图58B中所概述,在第9周至第15周处理的动物中,介质组(图57E-F)与PEG-化合物1组(图57G-H)之间的F4/80+细胞数量和大小无显著差异。

[1234] 油红染色切片的代表性显微照片示于图59A-H中。

[1235] 在第9周至第12周处理的动物中,来自介质组的油红染色肝脏切片表现出肝细胞中的小泡及大泡脂肪沉积(图59A-B)。如图60A中所概述的,与介质组相比,PEG-化合物1组的脂肪沉积区域(油红阳性区域)的百分比显著降低(图59C-D) ($p<0.001$)。

[1236] 如图60B中所概述的,在第9周至第15周处理的动物中,与介质组(图59G-H)相比,PEG-化合物1组(图59E-F)的脂肪沉积区域百分比显著降低。

[1237] 图22.组织学发现概述

[1238]	参数(均值 $\pm$ SD)	12周介质(n=6)	12周PEG-化合物1(n=6)
	肝纤维化区域(%)	1.17 $\pm$ 0.33	0.97 $\pm$ 0.51
	炎症区域(%)	3.38 $\pm$ 0.70	3.47 $\pm$ 1.40
	脂肪沉积区域(%)	40.1 $\pm$ 4.8	16.2 $\pm$ 7.9
	肾纤维化区域(%)	1.70 $\pm$ 0.49	1.67 $\pm$ 0.92
	参数(介质 $\pm$ SD)	15周介质(n=6)	15周PEG-化合物1(n=14)
	肝纤维化区域(%)	2.18 $\pm$ 0.14	1.44 $\pm$ 0.53
	炎症区域(%)	3.983 $\pm$ 1.966	4.511 $\pm$ 1.597
	脂肪沉积区域(%)	32.0 $\pm$ 9.6	12.5 $\pm$ 10.1
	肾纤维化区域(%)	1.58 $\pm$ 0.41	1.77 $\pm$ 0.69

[1239] 如上文所指出,如测量肝甘油三酯含量的生物化学测定和用苏木素及伊红或油红O染色肝脏切片后的组织学分析所评估的,PEG-化合物1降低肝脂肪积聚。文献中已报导天然FGF21的这种抗脂肪肝活性依赖于小鼠中的脂联素而定(参见Lin等,Cell Metab.17:779-789(2013);Holland等,Cell Metab 17:790-797(2013),其各自通过提述以其整体并入本文)。因此,在制备自经处理小鼠的末端血清样品中测量总脂联素的浓度。遵循制造商的方案使用市售ELISA试剂盒(Alpco目录号47-ADPMS-E01)测量血清脂联素。

[1240] 在所有测试末端时间点,与对应介质组相比,每周两次施用3mg/kg PEG-化合物1统计学显著地增加血清总脂联素(图62)。此结果与Stelic NASH模型中脂联素有助于PEG-化合物1的功效的假设一致。

[1241] 总之,用PEG-化合物1处理三周显著降低了肝-体重比、肝脏脂质含量(甘油三酯和胆固醇)、脂肪沉积区域和NAS。除这些效果外,用PEG-化合物1处理6周还显著降低全血葡萄糖、血浆ALT和纤维化区域。此外,与介质组相比,PEG-化合物1处理改善了存活率。

[1242] 总之,PEG-化合物1显示了抗NASH及抗纤维化效果,包括改善的脂质和葡萄糖代谢。

[1243] 实施例17

[1244] 聚乙二醇化的化合物2在稳定表达 β -Klotho的人胚肾细胞中的体外特征。

[1245] FGF21利用 β -klotho以及FGF受体作为共同受体用于其组织特异性信号传输活性(参见例如Kurosu等,2007,J.Biol.Chem.282:26687-26695;Ogawa等,2007,Proc.Natl.Acad.of Sci.,USA 104:7432-7437,其各自通过提述以其整体并入本文)。FGF21首先结合至 β -klotho且复合物可随后活化FGF受体以起始细胞内信号级联,其在几分钟的过程中快速活化胞外信号调节的激酶1/2(ERK1/2)。在更长的时间,活化的磷酸化ERK(pERK)可转送至细胞核并磷酸化和活化多种转录调节因子,包括称为E二十六(ETS)样蛋白

1 (Elk1) 的三元复合因子。活化Elk1与结合至某些DNA序列的血清反应因子形成复合物以调节某些基因的表达。

[1246] 稳定共表达人 β -klotho的细胞系和Elk1-荧光素酶反式报告基因构建体的产生

[1247] Elk1-荧光素酶反式报告基因细胞系利用Agilent Technologies' PathDetect Elk1反式报告基因系统由HEK293细胞产生。该系统具有表达来自酵母转录激活因子蛋白Gal4的DNA结合域的融合蛋白的反式激活因子融合质粒,然后是Elk1的激活域。当转录激活因子Elk1在通过FGF21刺激时通过胞外信号调节的激酶(ERK)磷酸化并活化时,融合活化剂蛋白以二聚体形式结合至GAL4上游激活序列并激活荧光素酶报告酶的转录。来自报告质粒的荧光素酶表达说明融合反式激活因子蛋白的活化,且因此存在内源性蛋白激酶。相应地,荧光素酶活性反映活化细胞中ERK和对应信号转导通路的激活,在此情况下激活Elk1。

[1248] HEK293细胞与融合反式激活子质粒、报告体质粒和编码人 β -klotho的质粒共转染。转染的细胞经G-418 (500 μ g/ml) 和杀稻瘟菌素 (10 μ g/ml) 进行选择。通过用FGF21构建体刺激并按照Elk1-荧光素酶活性来分析双重抗生素选择后存活的克隆。选择HEK Luc克隆2作为将来所有测定的细胞系。

[1249] 基于细胞的Elk1-荧光素酶分析

[1250] 将HEK293 Luc克隆2细胞以每孔25,000个细胞的密度接种于96孔平板中。在组织培养恒温箱中于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂温育平板两天。在测定当天,用补充有1 $\times$ L-谷氨酰胺、10mM Hepes, pH 7.2-7.5和10%FBS的无酚红DMEM培养基制备3倍连续稀释的FGF21蛋白。去除旧的细胞培养生长培养基。为起始治疗,将50 μ l具有测试化合物的无酚红DMEM培养基添加至各孔中并将平板放置回细胞培养物培养箱中。在5小时温育结束时,向各孔中添加等体积荧光素酶底物试剂混合物。将平板覆盖并置于600rpm的定轨振荡器中3min。经Perkin Elmer's Envision 2103多重平板读取器测量发光。

[1251] 数据分析

[1252] 用GraphPad Prism 5软件(GraphPad Software Inc., CA) 使用非线性回归分析来分析所有个体重复数据点的原始数据。使用具有4个参数的对数(激动剂)对响应等式拟合数据:底部(最小值)、顶部(最大值)、log EC50(效力的量度)及可变Hill斜率。效力(EC50)定义为响应中产生高于基线的半最大增加的浓度且通过曲线拟合程序计算。

[1253] 结果

[1254] 三种FGF21变体(N末端His标记的化合物1(His-化合物1)、PEG-化合物1和PEG-化合物2)的代表性浓度P响应曲线和5小时Elk1-荧光素酶测定中计算的效力和功效值示于图63和表23中。在5小时Elk1-荧光素酶测定中三种变体的效力是相似的(表23)。

[1255] 表23.5小时Elk1荧光素酶测定中FGF21变体的效力和功效

化合物	效力		功效	
	pEC50 ^a (log M)	EC50 ^b (nM)	E _{max} ^a (RLU)	%对照 ^c
[1256] His-化合物 1	8.99 $\pm$ 0.10	1.0 (0.8 - 1.3)	1.90E06 $\pm$ 3.9E05	100
PEG-化合物 1	8.44 $\pm$ 0.05 ^d	3.6 (3.2 - 4.1) ^d	1.60E06 $\pm$ 3.7E05	84.5 $\pm$ 19.8
PEG-化合物 2	8.27 $\pm$ 0.16 ^d	5.4 (3.7 - 8.0) ^d	1.66E06 $\pm$ 4.5E05	87.8 $\pm$ 23.9

[1257] ^a均值 $\pm$ S.D.

[1258] ^b几何均值(95%置信区间)

[1259] ^c对照定义为His-化合物1

[1260] ^d $P < 0.05$, 与His-化合物1相比, 具有Tukey-Kramer事后检验的ANOVA。

[1261] 在基于细胞的Elk1-荧光素酶测定中比较了各种Fc-FGF-21融合分子。除化合物180和化合物175外的所有分子都表现出单数位nM效力或更低且与所测量的PEG-化合物2的效力相当或更低(图64和下表24)。

[1262] 表24. 具有95%置信区间的几何均值EC50

[1263]

	化合物 170	化合物 171	化合物 172	化合物 173	化合物 174	化合物 175	化合物 176	化合物 177	化合物 178	化合物 179	化合物 180	化合物 181	PEG·化合 物2
几何均值(nM)	3.8	1.7	1.5	1.5	3.3	14.6	1.2	1.8	1.3	2.5	164.8	0.8	5.9
均值的95%CI 下限	2.8	1.0	0.6	1.2	1.3	6.1	1.0	1.4	1.0	1.2	92.9	0.6	4.9
均值的95%CI 上限	5.2	2.9	3.6	1.7	8.4	34.8	1.5	2.4	1.6	5.0	291.7	1.1	7.1

[1264] 实施例18: FGF-21变体化合物对C57BL/6J小鼠中脂联素水平的影响

[1265] FGF21刺激从脂肪细胞分泌脂联素, 并且脂联素受体的宽分布提供了可使FGF21效果延伸至其他组织的潜在途径。已报告小鼠中的天然FGF21的许多代谢效果(包括其抗脂肪肝活性)都需要脂联素(Lin, Z.等, Cell Metab. 17:779-789 (2013); Holland等, Cell Metab 17:790-797 (2013), 其各自通过提述以其整体并入本文)。本实施例报道了在正常非糖尿病C57BL/6J小鼠中单剂量增加的PEG-化合物2对FGF21活性的所选药效学标志物的影响。

[1266] 将8周龄雄性C57BL/6J小鼠随机分至以下处理组(样本量 $n = 10$ /组): 1) 介质; 2) PEG-化合物2, 0.03mg/kg; 3) PEG-化合物2, 0.1mg/kg; 4) PEG-化合物2, 0.3mg/kg; 或5) PEG-化合物2, 1.0mg/kg, 和以5ml/kg皮下给药其各自处理。在非空腹状态下给药之后, 将血液样品离心并将20 μ l血浆等分以定量确定总计和高分子量(HMW)脂联素(Alpco Diagnostics, Salem, NH, 目录号47-ADPMS-E01)。小鼠在非空腹状态下在单次急性给药之后24、48、72和144小时再次抽血以进行血浆葡萄糖和脂联素分析, 并在各次抽血之前测量体重。

[1267] 遵循用于小鼠总计和HMW ELISA试剂盒(Alpco Diagnostics, Salem, NH)的制造商的方案测量总计和高分子量(HMW)脂联素的血浆浓度。通过ELISA确定PEG-化合物2的血浆暴露。使用单因素ANOVA然后是Dunnett's t 检验并用介质组作为对照(JMP来自SAS, Cary, NC)进行所有数据的统计学分析。统计学显著性确定为概率(P) < 0.05 。

[1268] 在基线(0)、处理后24、48、72和144小时确定体重。当转化为自基线(第0天)的体重百分比变化时, 观察到响应于单次皮下给药PEG-化合物2的显著剂量依赖性降低(图65)。响应于1.0mg/kg剂量的PEG-化合物2, 在给药后72小时体重减轻效果百分比最大且在第6天开始返回至基线值, 与介质组中相比显著降低。与介质处理组相比, 0.3mg/kg处理组在72小时($P < 0.001$)和1.0mg/kg处理组在48小时($P < 0.05$)、72小时($P < 0.0001$)和144小时($P < 0.001$)体重显著降低。

[1269] 在给药后72和144小时(图66A), 相对于介质, 通过用0.1、0.3和1.0mg/kg剂量的PEG-化合物2处理, 血浆总脂联素浓度显著增加。与介质相比, 0.03mg/kg剂量的所测试PEG-化合物2在任何测量点均不显著增加总脂联素效果。在0.1mg/kg处理组中, 在72小时($P < 0.001$)和144小时($P < 0.01$), 在0.3mg/kg处理组中在72小时($P < 0.01$)及144小时($P < 0.01$)和在1mg/kg处理组中在72小时($P < 0.0001$)和144小时($P < 0.0001$)血浆总脂联素显著增加。

[1270] 当表示为自基线的百分比变化时, 与介质相比, 通过用所有剂量的PEG-化合物2处

理在一些时间点处理使血浆总脂联素浓度显著增加(图66B)。与介质相比,用任何剂量的PEG-化合物2处理后24小时相对于基线总脂联素的百分比变化无显著差异,且与介质相比,在给药后72小时,所有剂量的PEG-化合物2均产生统计学显著的增加。给药1mg/kg PEG-化合物2后144小时,观察到的最大变化是自基线脂联素的变化增加75%。在0.03mg/kg处理组中,在72小时($P<0.01$),在0.1mg/kg处理组中在48小时($P<0.01$)、72小时($P<0.0001$)和144小时($P<0.001$),在0.3mg/kg处理组中在72小时($P<0.0001$)和144小时($P<0.0001$)和在1.0mg/kg处理组中在48小时($P<0.01$)、72小时($P<0.0001$)和144小时($P<0.0001$)处的血浆总脂联素的百分比变化是显著增加的。

[1271] 与介质相比,通过用0.1和1.0mg/kg剂量的PEG-化合物2处理,血浆HMW脂联素浓度显著增加,而与介质相比,0.03和0.3mg/kg剂量的PEG-化合物2在任何测量点均不显著增加HMW脂联素(数据未示出)。

[1272] 在处理144小时的研究结束处测量时,对于活性羧基(C)末端完整和总计(完整的和蛋白水解的)形式的分子,PEG-化合物2的血浆浓度以剂量依赖性方式增加,表25。

[1273] 表25. 单次SC剂量后总计和C末端完整PEG-化合物2的血浆浓度

PEG-化合物2的形式	剂量 (mg/kg)			
	0.03	0.1	0.3	1.0
[1274] 总计(ng/ml)	1.5 ± 0.21	12 ± 0.89	39 ± 3.2	222 ± 15
C-末端完整的(ng/ml)	0.40 ± 0.11	5.2 ± 0.38	19 ± 1.4	135 ± 8.6

[1275] SC给药后144小时C57BL/6J小鼠血浆中的总计和C末端完整PEG-化合物2。

[1276] 所有值为均值±S.E.M。

[1277] 用9-11周龄C58BL/6J小鼠,以分子PEG-化合物20、化合物105、化合物112、化合物182、化合物171、化合物170、化合物181和PEG-化合物1遵循类似方案,但其中总脂联素改为仅在基线处、给药后3天(72小时)和6天(144小时)测量。除化合物181外,化合物在大肠杆菌中表达,该化合物181在HEK细胞中表达。与介质相比,在某些测试剂量处的所有化合物在第3天和/或第6天显著增加血浆总脂联素(参见图67A-E)。

[1278] 在0.3mg/kg和1mg/kg的剂量处,PEG-化合物2和PEG-化合物20在给药后6天各自导致血浆总脂联素显著增加($P<0.001$,对于1mg/kg的任一化合物; $P<0.01$,对于0.3mg/kg PEG-化合物2;和 $P<0.05$,对于0.3mg/kg PEG-化合物20)(图67A)。

[1279] 在54.3nmol/kg的剂量处,通过PEG-化合物2、化合物105和化合物112在第3和6天使得自基线的血浆总脂联素百分比变化显著增加(与培养基处理的对照相比)($P<0.001$,对于所有数据点,PEG-化合物2除外,在第3天, $P<0.05$)(图67B)。另外,与介质处理的对照相比,5.43nmol/kg剂量的化合物112仅在第3天显著增加血浆总脂联素的百分比变化($P<0.05$)(图67B)。

[1280] 通过在18.1nmol/kg($P<0.01$,第3与6天)和54.3nmol/kg剂量($P<0.001$ 和 $P<0.05$,分别第3和6天)的化合物182使得自基线的血浆总脂联素百分比变化显著增加(图67C)。5.43nmol/kg剂量的化合物182的血浆总脂联素的百分比变化的增加仅在第6天显著($P<0.05$)。另外,PEG-化合物2(54.3nmol/kg剂量)在第3天和第6天显著增加血浆总脂联素的百分比变化($P<0.001$,在该两天)(图67C)。

[1281] 与介质处理的对照相比,通过化合物171与化合物181二者,在第3天与第6天使得自基线的血浆总脂联素百分比变化以剂量依赖性方式显著增加(对于所有数据点 $P<0.001$,只有对于5.43nmol/kg剂量的化合物181在第6天除外,其 $P<0.01$) (图67D)。另外,PEG-化合物2 (54.3nmol/kg剂量) 在第3天与第6天显著增加血浆总脂联素的百分比变化($P<0.001$,在该两天) (图67D)。

[1282] 在第3和6天通过18.1nmol/kg ($P<0.01$,该两天) 和54.3nmol/kg (第3天 $P<0.05$,和第6天 $P<0.001$) 的化合物170使得自基线的血浆总脂联素百分比变化显著增加;对于5.43nmol/kg剂量,血浆总脂联素的百分比变化的增加仅在第6天显著($P<0.05$) (图67E)。另外,PEG-化合物2 (54.3nmol/kg剂量) 在第3天和第6天显著增加血浆总脂联素的百分比变化($P<0.001$,在该两天) (图67E)。

[1283] 通过剂量为10mg/kg的化合物1在第3和6天使得自基线的血浆总脂联素百分比变化显著增加($P<0.001$,在该两天)。另外,PEG-化合物2 (1mg/kg) 在第6天显著增加血浆总脂联素的百分比变化($P<0.001$) (图67F)。

[1284] 实施例19:对db/db小鼠中糖尿病性肾病的影响

[1285] 单侧肾切除的(unix) db/db小鼠是糖尿病性肾脏疾病(DKD)的啮齿动物模型,其中手术去除一个肾脏会加重且加快由2型糖尿病造成的肾损伤和功能障碍(Ninichuk等, Eur J Med Res 12:351-355 (2007),其通过提述以其整体并入本文)。

[1286] 4周研究

[1287] 在此研究中,8周龄的Db/db小鼠在用5%异氟醚麻醉下经历左肾切除以加速患上糖尿病性肾病。在单侧肾切除后三周,基于以尿白蛋白-肌酐比(uACR)、血糖和体重以该顺序随机分组,将14只单侧肾切除小鼠的组分布至PEG-化合物2或介质处理。db/m瘦小鼠组($n=12$)指定为非糖尿病正常对照。在单侧肾切除db/db小鼠中在手术后三周开始用PEG-化合物2或介质处理。每周两次(BIW)通过皮下(SC)注射施用0.15mg/kg PEG-化合物2,其处于含有250mM蔗糖、20mM Tris, pH 8.3的介质中。在用5%异氟醚麻醉下经由眶后放血收集基线血液样品。在基线和处理2、3和4周之后从各小鼠获得用于测量尿液葡萄糖、白蛋白和肌酐的多个三小时点尿收集物。

[1288] 在处理四周之后在异氟醚麻醉下处死小鼠。除非另有说明,否则使用单因素方差分析(ANOVA),然后是Dunnett's检验进行数据的统计学分析(JMP统计学分析软件,SAS, Cary, NC)。统计学显著性确定为概率($P<0.05$)。unix db/db介质组中的四只小鼠被排除在数据分析外(除食品及水消耗以外),因为其表现出严重肾盂肾炎。

[1289] PEG-化合物2和介质组表现出处理之前基线的类似血浆葡萄糖水平(765 ± 42 对比 815 ± 46 , $P>0.05$)。在处理四周之后在研究结束时,PEG-化合物2组中的血浆葡萄糖低于介质组23% (485 ± 39 对比 629 ± 43 , $P<0.05$) (参见表26)。

[1290] 表26. PEG-化合物1处理降低血液葡萄糖(mg/dL)^a

组	基线血液葡萄糖	末端血液葡萄糖
瘦	194.9 ± 6.4	181.0 ± 19.5
Unix db/db, 介质	814.8 ± 45.6^b	628.6 ± 39.0^b
Unix db/db, PEG-化合物2	628.6 ± 39.0^b	485.2 ± 42.5^c

[1292] a. 数据表示为均值 $\pm$ S.E.M。

[1293] b. $P < 0.05$, 疾病 (unix db/db, 介质, $n=9$) 对比正常 (db/m瘦, $n=10$)。

[1294] c. $P < 0.05$, PEG-化合物2 ($n=14$) 对比介质 ($n=9$)。

[1295] 在用PEG-化合物2处理开始之后, 尿液葡萄糖水平逐渐降低。当与介质组相比时, PEG-化合物2组的尿液葡萄糖水平显示出在处理2、3和4周分别71%、73%及84%的显著降低 (所有 $P < 0.05$; 表5)。

[1296] 表27. PEG化合物2降低尿液葡萄糖 (mg/dL) ^a

组	2周给药	3周给药	4周给药
瘦	17 ± 3	12 ± 1	40 ± 5
Unix db/db, 介质	8719 ± 694 ^b	8550 ± 204 ^b	9796 ± 378 ^b
Unix db/db, PEG-化合物2	2537 ± 818 ^c	2284 ± 715 ^c	1565 ± 410 ^c
%降低	71%	73%	84%

[1298] a数据表示为均值 ± S.E.M。

[1299] b $P < 0.05$, 疾病 (unix db/db, 介质, $n=9-10$) 对比正常 (db/m瘦, $n=10-12$)。

[1300] c $P < 0.05$, PEG-化合物2 ($n=13-14$) 对比介质 ($n=9-10$)。

[1301] 文献中已报告了微量白蛋白尿 (尿液白蛋白-肌酐比 (uACR) $> 30 \mu\text{g}/\text{mg}$) 是糖尿病性患者中最敏感性和特异性的早期肾病指标之一 (参见Chae等, J Korean Med Sci. 2012; 27: 784-787, 其通过提述以其整体并入本文)。自3小时点尿收集物测量微量白蛋白并将值校正至尿液肌酐。在研究过程期间非糖尿病db/m瘦小鼠的平均uACR值范围为21至37 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (图68和表28)。

[1302] 在研究期间, 与非糖尿病性瘦db/m小鼠相比, unix db/db小鼠中的uACR由23显著增加至62倍 (所有 $P < 0.05$) (图68和表28)。介质处理组的uACR自基线的838 ± 159 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 至4周后的1341 ± 284 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (表28), 这与进行性肾损伤一致。

[1303] 与介质组相比, PEG-化合物2处理的unix db/db小鼠分别对于处理2、3和4周显示出uACR值分别显著降低49%、53%和66% (所有 $P < 0.05$; 图68)。在PEG-化合物2处理后的uACR值低于预处理基线处测量的那些 (表28)。

[1304] 表28. PEG化合物2降低uACR ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ^a

组	基线	2周给药	3周给药	4周给药
瘦	36.7 ± 2.6	26.3 ± 4.3	21.4 ± 2.7	30.1 ± 2.8
Unix db/db, 介质	838.2 ± 159.4 ^b	1060.2 ± 256.9 ^b	1319.9 ± 282.3 ^b	1341.3 ± 283.5 ^b
Unix db/db, PEG-化合物2	865.8 ± 170.8	538.5 ± 107.5 ^c	616.1 ± 145.2 ^c	460.6 ± 92.7 ^c

[1306] 肾脏湿重反映了由于糖尿病中的超滤的肾肥大的状态。与非糖尿病性瘦小鼠相比, 在unix db/db小鼠中平均肾脏重量显著较大, 用介质处理的unix db/db小鼠的肾脏重量增加59%。用PEG-化合物2处理四周显著抑制糖尿病小鼠中的肾脏重量增加 (286 ± 6.3 对比 253 ± 7.4, 介质对比PEG-化合物2, $P < 0.05$)。

[1307] 8周研究

[1308] 在8周龄时, db/db小鼠在氧气中在3%异氟醚下经历左肾切除以加速患上糖尿病性肾病。在单侧肾切除后三周, 基于尿液白蛋白-肌酐比 (uACR)、血糖和体重以该顺序, 将14只单侧肾切除小鼠的组阻断 (blocked)、随机分组并分布至0.15mg/kg或0.015mg/kg的PEG-化合物2或介质处理。db/m瘦小鼠组 ($n=11$) 指定为非糖尿病正常对照。在unix db/db小鼠

中,在手术后三周开始用0.15或0.015mg/kg的PEG-化合物2或介质每周两次皮下处理。在处理八周后在3%异氟醚下于氧气中然后是颈椎脱位术处死小鼠。将肾切除、解封装并称重。

[1309] 0.015mg/kg剂量组未显示任何显著的血糖降低或肾参数改善。与介质处理的小鼠相比,0.15mg/kg剂量的PEG-化合物2显著降低血液和尿液葡萄糖水平且将白蛋白尿降低~50% (所有 $P<0.05$)。相对于瘦小鼠,单侧肾切除db/db小鼠的肾中一组炎症性和纤维化基因显著上调,且用0.15mg/kg的PEG-化合物2处理使这些基因的表达显著降低至瘦db/m对照小鼠中所见的水平。与瘦小鼠相比,在单侧肾切除db/db小鼠中平均肾脏湿重也显著更高,与介质相比,用0.15mg/kg的PEG-化合物2处理57天显著降低平均肾脏湿重。

[1310] 用苏木素和伊红染色来自肾脏的中间1/3的切片用于组织学分析。肾脏病损根据表29的注释中限定的标准进行分级。所有unix db/db小鼠表现出肾小球膜肾小球病变,其是此模型的预期表型(表29)。用0.15mg/kg而非0.015mg/kg的PEG-化合物2处理看起来降低肾小球膜肾小球病变的严重程度。少数unix db/db小鼠表现出继发于肾小球病变的小管-间质病损,其与该模型的潜在发病机制一致。

[1311] 这些观察结果证明在慢性2型糖尿病的情况下0.15mg/kg的PEG-化合物2是肾脏保护性的。

[1312] 表29.PEG-化合物2:肾脏病损的发生率和等级

	治疗 (mg/kg)	0 (介质对照)	0.015	0.15
	小鼠编号	9	8	9
部位	等级			
肾小球^a		9	8	9
	1	1	1	6
	2	5	2	3
	3	3	5	-
肾小管/间质^b		3	3	4
	1	2	2	4
	2	1	1	-
骨盆^c		2	1	2
	1	2	-	1
	2	-	1	1

[1315] a肾小球膜扩张是局部或弥散性的,且部分或总体的。2级是基于>50%的具有膜扩张的肾小球评估和/或至少1个肾小球中的额外肾小球膜、毛细管、上皮或荚膜病损;3级是基于这些额外肾小球病损的多于一项。

[1316] b小管病损包括膨胀、萎缩和/或增生;间质病损通常与肾小球病损相关且其特征为最小炎症或局部管周纤维化。1级为局部;2级为具有2至4个病灶的多灶性的。

[1317] c化脓性炎症;1级基于限于骨盆上皮的炎症;2级基于延伸至髓质或骨盆周围皮层。

[1318] 实施例20.对异丙肾上腺素灌注的Balb/C小鼠中的心脏肥大和心脏纤维化的影响

[1319] 异丙肾上腺素(Iso)灌注的Balb/c小鼠是心脏纤维化和肥大的啮齿动物模型。

[1320] 将10至12周的雄性Balb/c小鼠基于药物施用前的体重随机化。经由渗透微泵皮下施用Iso或介质(于盐水中的0.02%抗坏血酸)3周。小鼠经3周的过程每周两次(BIW)同时给

药0.5mg/kg PEG化合物2或培养基。然后使动物安乐死并在大血管处移出心脏并轻吸以去除心室中的任何血液,然后称重。自各组中的剩余24只小鼠,将整个心脏于干冰上冷冻并储存于 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 以进行羟脯氨酸(HP)分析。

[1321] 使用总胶原测定试剂盒根据制造商的说明书(Quickzyme Biosciences, Netherlands)进行心脏HP含量(心脏纤维化终点)分析。

[1322] 在3周生命期结束时,测量整个心脏HP含量。与假拟物+介质组($9.96 \pm 0.38 \mu\text{g}/\text{mg}$)相比,在Iso+介质组($21.35 \pm 0.81 \mu\text{g}/\text{mg}$)中,经校正的HP含量增加114% ($P < 0.05$)。这说明在Balb/c小鼠中响应于Iso输注形成心脏纤维化。接收Iso+PEG-化合物2(0.5mg/kg)的小鼠中的心脏HP含量($15.91 \pm 0.49 \mu\text{g}/\text{mg}$)显著低于Iso+介质动物中(图69和表30)。因此,当以预防性模式施用,PEG-化合物2(0.5mg/kg)降低了心脏肥大和纤维化的程度。

[1323] 表30.用异丙肾上腺素和PEG-化合物2处理第3周的心脏HP含量.数据代表校准至蛋白的全心脏HP含量。所有值为均值 $\pm$ S.E.M.*: $P < 0.05$,对比假拟物+介质,**: $P < 0.05$,对比Iso+介质(单因素ANOVA,然后是Bonferroni's检验)。

[1324]		假拟物+介质 (n)	Iso+介质 (n)	Iso+PEG-化合物2 (n)
	羟脯氨酸/蛋白 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	9.96 ± 0.38 (20)	21.35 ± 0.81 (19) *	15.91 ± 0.49 (20) **

[1325] 进行介入研究以确定0.5mg/kg PEG-化合物2是否能在用PEG-FGF21变体处理3周开始前已经用Iso灌注1周的Balb/c小鼠中延缓进展或逆转之前形成的心脏肥大和纤维化。PEG-化合物2(0.5mg/kg)介入使得左心室(LV)质量降低24%(通过超声心动图评估的心脏肥大终点)。此观察与显著的14%体重减轻和23%脂联素循环水平升高相关。在Iso+介质与Iso+PEG-化合物2组之间在心脏纤维化(HP含量)或收缩心脏功能中未观察到显著差异(通过超声心动图测量)。

[1326] 实施例21:评估健康受试者中PEG-化合物2的安全性、耐受性、药代动力学及药效学的随机、安慰剂对照、单次和多次递增剂量研究

[1327] 该研究由三部分组成:A部分:单次递增剂量(SAD);B部分:多次递增剂量(MAD);和C部分:日本受试者中的多次递增剂量(J-MAD)。PEG-化合物2或安慰剂以盲法处理通过皮下注射施用。A部分中的受试者接受单剂的盲法处理且B和C部分中的受试者接受多剂的盲法处理。

[1328] 选择起始剂量为0.6mg的PEG-化合物2。还选择了SAD中60mg的最高剂量和对于MAD每周给药60mg以探究预计有效的剂量范围上限。在SAD组中受试者可接受剂量为0.6mg、2mg、6mg、20mg、40mg或多至60mg的PEG-化合物2。在MAD组中,个体可接受2mg、6mg、20mg、40mg或60mg的每周剂量(QW或BIW)。

[1329] 可包括BMI为30-40(A和B部分)或20-35(C部分)的年龄21-55岁的健康男性和女性受试者。

[1330] 主要终点:

[1331] 目的(评估健康受试者中单次和多次皮下给药PEG-化合物2的安全性和耐受性)通过如下安全性终点来测量:AE、严重AE和特别关注事件(包括注射部位评估、导致中断的AE和死亡)的发生以及在研究药物的最后一次给药之后多至30天出现的临床实验室测试、生命体征测量、ECG、体检的显著异常。

[1332] 次要终点:

[1333] A部分:在单次给药处理当天和在单次给药之后多至4周清除时来源于C末端完整PEG-化合物2血清浓度对比时间数据的单次给药药代动力学参数(C_{max} 、 T_{max} 、 $AUC(0-T)$ 、 $AUC(INF)$ 、 $T-HALF$ 和 CLT/F)。

[1334] B和C部分:在第一次给药和最后一次给药之后来源于PEG-化合物2血清浓度对比时间数据的多次剂量药代动力学参数(C_{max} 、 T_{max} 、 $AUC(TAU)$ 和积聚指数(AI))。仅计算最后一次给药的 $T-HALF$ 。在22天处理过程期间和最后一次给药之后至多4周的选择之日获得PEG-化合物2最低血清浓度(C最低处)。

[1335] 实施例22.NASH小鼠模型中PEG-化合物1、PEG-化合物2和化合物170的评估

[1336] 如上文实施例13中所述,在NASH的Stellic Institute的2命中模型中测试了三种FGF 21变体、PEG-化合物1、PEG-化合物2和化合物170。在40只雄性小鼠中通过在出生之后单次皮下注射200 μ g链脲霉素溶液2天和在4周龄之后饲喂高脂肪膳食(HFD;以千卡计57%脂肪)诱导NASH(“STAM小鼠”)。对于小鼠通过皮下途径每周两次从7至9周龄施用3mg/kg PEG-化合物1($n=8$)、0.5mg/kg PEG-化合物2($n=8$)、2.5mg/kg化合物170($n=8$)或介质(20mM Tris/250mM蔗糖,pH 8.3)($n=8$)。将这些小鼠在9周龄处死以进行各种分析。另一组八只小鼠充当基线对照并在7周龄时处死。

[1337] 使用市售的ELISA试剂盒(Alpco目录号47-ADPMS-E01)遵循制造商的方案测量制备自小鼠的最终血清样品中的总计和高分子量(HMW)脂联素浓度。与介质组相比,所有3种FGF21变体都显著增加血清总脂联素(图70A)($p<0.0001$,对于PEG-化合物1、PEG-化合物2和化合物170)、血清HMW脂联素(图70B)($p<0.005$,PEG-化合物1;和 $p<0.0001$,PEG-化合物2和化合物170)及HMW/总脂联素的比率(图70C)($p<0.05$,PEG-化合物1;和 $p<0.01$,PEG-化合物2和化合物170)。

[1338] 确定体重、肝脏重量、肝脏甘油三酯、肝脏胆固醇和血浆葡萄糖、甘油三酯及ALT水平。所有三种FGF21变体均显著降低的体重(图72A)、肝脏重量(图72B)、肝-体重比(图72C)、肝脏甘油三酯(图72D)和血浆ALT(图72E)。PEG-化合物2和化合物170显著降低肝脏胆固醇(图72F),且PEG-化合物2显著降低血浆甘油三酯(图72G)。在此研究中没有化合物显著降低血浆胆固醇或葡萄糖(数据未示出)。

[1339] 实施例23.在ob/ob小鼠中3周BIW给药期间的PEG-化合物2和化合物170的评估

[1340] 在21天重复给药研究中评估聚乙二醇化的化合物2和化合物170。结果指示与介质相比两种化合物均导致肝脏重量降低和肝脏左外叶中肝细胞脂肪变性的剂量依赖性降低。

[1341] 如实施例12中所述将8周龄的雄性ob/ob小鼠(Jackson Laboratories,Bar Harbor,ME)随机分成5组。对小鼠如下每周两次(BIW)皮下施用介质、聚乙二醇化的化合物2和化合物170($n=12$,对于各组):1)介质(250mM蔗糖/20mM Tris,pH 8.3);2)聚乙二醇化的化合物2,8.14nmol/kg(0.15mg/kg);3)化合物170,8.14nmol/kg;4)聚乙二醇化的化合物2,81.45nmol/kg(1.5mg/kg);和5)化合物170,81.45nmol/kg。确定饲喂状态下整个21天给药时期中的体重、血浆葡萄糖、甘油三酯、胰岛素、非酯化脂肪酸(NEFA)、 β -OH-丁酸盐、总脂联素和高分子量(HMW)脂联素。在研究开始和终止时确定全血中的糖化血红蛋白(HbA1c)。在研究终止时确定肝脏重量及肝脏甘油三酯。对肝脏左外叶进行肝脏组织学分析以评估肝细胞脂肪变性。用10%缓冲福尔马林固定组织且进行处理以用于组织学分析。使用标准方法用苏木素和伊红染色石蜡包埋的组织切片。评估各处理组中的前6只小鼠(总计=30只小

鼠)。肝细胞脂肪变性(小泡和大泡脂肪变化)主要限于对照小鼠中的II/III区;此脂肪变性程度任意属于2级(评分)。以盲法方式对其他样品分级(0级属于观察到的脂肪变性程度最低)。此外,在用PEG-化合物2或化合物170而非介质处理的小鼠中观察到载有脂质的窦周细胞,大概为星形(Ito)的细胞,在介质处理的小鼠中Ito细胞通过肝细胞脂肪变性掩蔽。以盲法方式评估Ito细胞的丰度(而不计数),并将各样品任意分级以提供半定量评估(评分3指示最高丰度)。

[1342] 两种剂量的两种化合物将饲喂的葡萄糖显著降低至血糖量正常水平(数据未示出),且显著降低血浆胰岛素和HbA1c(数据未示出)。第8天至第21天观察到以剂量相关性趋势相对于介质的高分子量(HMW)脂联素显著增加,而血浆总脂联素显示一些小的、但相对于介质的不一致的增加(数据未示出)。相对于介质(数据未示出)用两种化合物(尤其高剂量)增加的血浆NEFA和 β -OH-丁酸酯两者,指示脂肪酸氧化增加。在所有处理组中在21天观察到绝对肝脏重量与针对体重校正的肝脏重量显著降低(图71A和71B)。具体地,在所有四个用FGF-21变体处理的组中,相对于介质对照绝对肝脏重量显著降低($p < 0.0001$),且相对于降低剂量的化合物,较高剂量的PEG-化合物2显著降低绝对肝脏重量($p < 0.05$) (图71A)。另外,在所有四个用FGF-21变体处理的组中,相对于介质对照肝脏重量与体重的比率显著降低($p < 0.0001$) (图71B)。与介质相比,在用PEG-化合物2或化合物170处理的小鼠中观察到肝细胞脂肪变性的严重程度的剂量依赖性降低(表31)。在来自PEG-化合物2和化合物170处理的小鼠的切片中观察到载有脂质的窦周细胞(想必为Ito或肝星形细胞)(表32),但在来自介质处理的小鼠的切片中因来自肝细胞脂肪变性的干扰而不可观测到。在来自用PEG-化合物2或化合物170处理的小鼠的切片中观察到Ito细胞突出的严重程度的剂量依赖性降低。

[1343] 表31.ob/ob小鼠中的肝细胞脂肪变性(脂肪变化)发生率和组织学评分

[1344]	评分	No.	介质	PEG- 化合物 2 (8.14 nmol/kg)	化合物 170 (8.14 nmol/kg)	PEG- 化合物 2 (81.45 nmol/kg)	化合物 170 (81.45 nmol/kg)
			6	6	6	6	6
	0		-	-	1	6	6
	1		-	6	5	-	-
	2		6	-	-	-	-

[1345] 表32.ob/ob小鼠中的窦周载有脂质的细胞发生率和组织学评分

[1346]	评分	No.	介质	PEG- 化合物 2 (8.14 nmol/kg)	化合物 170 (8.14 nmol/kg)	PEG- 化合物 2 (81.45 nmol/kg)	化合物 170 (81.45 nmol/kg)
			6	6	6	6	6
	0		ND	-	-	1	-
	1		ND	-	1	4	1
	2		ND	-	-	1	5
	3		ND	6	5	-	-

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His		
100	105	110
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro		
115	120	125
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro		
130	135	140
Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val		
145	150	155
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser		
165	170	175
Pro Ser Tyr Ala Ser		
180		
<210> 2		
<211> 191		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 2		
Met His His His His His His Ser Gly Gly His Pro Ile Pro Asp Ser		
1	5	10
Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr		
20	25	30
Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp		
35	40	45
Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln		
50	55	60
Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr		
65	70	75
Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu		
85	90	95
His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp		
100	105	110
Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu		
115	120	125
Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala		
130	135	140
Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro		
145	150	155
Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu		
165	170	175

Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180 185 190
 <210> 3
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
 20 25 30
 Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
 35 40 45
 Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
 50 55 60
 Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
 85 90 95
 Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
 115 120 125
 Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
 130 135 140
 His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
 145 150 155 160
 Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
 165 170 175
 Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
 180 185 190
 Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
 195 200 205
 Ser
 <210> 4
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Met	Asp	Ser	Asp	Glu	Thr	Gly	Phe	Glu	His	Ser	Gly	Leu	Trp	Val	Ser
1				5				10						15	
Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Gln	Ala	His	Pro	Ile	Pro	Asp
			20					25					30		
Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu
		35					40					45			
Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu
	50					55					60				
Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu
65				70					75					80	
Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys
			85					90					95		
Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser
			100					105					110		
Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu
		115					120					125			
Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His
	130					135					140				
Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Pro
145				150					155					160	
Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro
			165					170					175		
Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro
		180					185					190			
Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser
	195					200					205				
<210>	5														
<211>	181														
<212>	PRT														
<213>	Homo sapiens														
<400>	5														
His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val
1				5				10						15	
Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His
			20					25					30		
Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln
	50					55					60				

Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly
65					70				75					80	
Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg
			85						90					95	
Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His
			100						105					110	
Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro
			115						120					125	
Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro
			130						135					140	
Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val
145						150					155				160
Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser
			165						170					175	

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 6

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
 145 150 155 160
 Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu
 165 170 175
 Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
 180 185 190
 Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
 195 200 205

Ser

<210> 7

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp
 20 25 30
 Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu
 35 40 45
 Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu
 50 55 60
 Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu
 65 70 75 80
 Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys
 85 90 95
 Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser
 100 105 110
 Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu
 115 120 125
 Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His
 130 135 140
 Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro
 145 150 155 160
 Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro
 165 170 175
 Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro
 180 185 190
 Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

	195	200	205	
<210>	8			
<211>	546			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<400>	8			
	caccccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag			60
	ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gcccacctgg agatcaggga ggatgggacg			120
	gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg			180
	ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg			240
	gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt			300
	gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg			360
	aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctcgcttcct gccactacca			420
	ggcctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg			480
	ggctcctcgg accctctgag catggtggga ctttcccagg gccgaagccc cagctacgct			540
	tctga			546
<210>	9			
<211>	576			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<400>	9			
	atgcatcatc atcatcatca tagcggcggc caccccatcc ctgactccag tcctctcctg			60
	caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag ctctacacag atgatgccca gcagacagaa			120
	gcccacctgg agatcaggga ggatgggacg gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa			180
	agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca			240
	tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct			300
	gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa			360
	gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc			420
	cgaggaccag ctcgcttcct gccactacca ggcctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc			480
	ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg ggctcctcgg accctctgag catggtggga			540
	cttcccagg gccgaagccc cagctacgct tctga			576
<210>	10			
<211>	630			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<400>	10			
	atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt			60
	cttctgctgg gagcctgcca ggcacacccc atccctgact ccagtctctt cctgcaattc			120
	gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg cccagcagac agaagcccac			180

ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc	240
ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt attcaaattct tgggagtcaa gacatccagg	300
ttcctgtgcc agcggccaga tggggccctg tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc	360
tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac	420
ggcctcccgc tgcacctgcc agggaacaag tccccacacc gggaccctgc accccgagga	480
ccagctcgct tcctgccact accaggcctg cccccgcac ccccgagcc acccggaatc	540
ctggcccccc agccccccga tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggg gggaccttcc	600
cagggccgaa gccccagcta cgcttctga	630
<210> 11	
<211> 627	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 11	
atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt	60
cttctgggag cctgccaggc acaccccatc cctgactcca gtctctctct gcaattcggg	120
ggccaagtcc ggcagcggta cctctacaca gatgatgccc agcagacaga agcccacctg	180
gagatcaggg aggatgggac ggtggggggc gctgctgacc agagccccga aagtctctctg	240
cagctgaaag ccttgaagcc gggagttatt caaatcttgg gagtcaagac atccaggttc	300
ctgtgccagc ggccagatgg ggccctgtat ggatcgctcc actttgacct tgaggcctgc	360
agcttccggg agctgcttct tgaggacgga tacaatgttt accagtccga agcccacggc	420
ctcccgtgc acctgccagg gaacaagtcc ccacaccggg accctgcacc ccgaggacca	480
gctcgcttcc tgccactacc aggcctgccc cccgcacccc cggagccacc cggaatcctg	540
gccccccagc ccccgatgt gggctcctcg gacctctga gcatggtggg accttcccag	600
ggccgaagcc ccagctacgc ttcctga	627
<210> 12	
<211> 545	
<212> DNA	
<213> homo sapiens	
<400> 12	
caccccatcc ctgactccag tcctctctctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag	60
ctctacacag atgatgccc gacagacagaa gcccacctgg agatcaggga ggatgggacg	120
gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctctctgc agctgaaagc cttgaagccg	180
ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg	240
gccctgtatg gatcgctcca ctttgacctt gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt	300
gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg	360
aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctgccttctt gccactacca	420
ggcctgcccc ccgcactccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg	480
ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc agctacgctt	540
cctga	545

<210>	13	
<211>	630	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	13	
atggactcgg	acgagaccgg	gttcgagcac
cttctgctgg	gagcctgcca	ggcacacccc
gggggccaag	tccggcagcg	gtacctctac
ctggagatca	gggaggatgg	gacgggtggg
ctgcagctga	aagccttgaa	gccgggagtt
ttcctgtgcc	agcggccaga	tggggccctg
tgcagcttcc	gggagctgct	tcttgaggac
ggcctcccgc	tgcacctgcc	agggaacaag
ccagctcgct	tccctgccact	accaggcctg
ctggcccccc	agccccccga	tgtgggctcc
cagggccgaa	gccccagcta	cgcttcctga
		60
		120
		180
		240
		300
		360
		420
		480
		540
		600
		630
<210>	14	
<211>	627	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	14	
atggactcgg	acgagaccgg	gttcgagcac
cttctgggag	cctgccaggc	acaccccata
ggccaagtcc	ggcagcggta	cctctacaca
gagatcaggg	aggatgggac	ggtggggggc
cagctgaaag	ccttgaagcc	gggagttatt
ctgtgccagc	ggccagatgg	ggccctgtat
agcttccggg	agctgcttct	tgaggacgga
ctcccgtgc	acctgccagg	gaacaagtcc
gctcgcttcc	tgccactacc	aggcctgccc
gccccccagc	cccccgatgt	gggctcctcg
ggccgaagcc	ccagctacgc	ttcctga
		60
		120
		180
		240
		300
		360
		420
		480
		540
		600
		627
<210>	15	
<211>	77	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Mutant tRNA derived from Methanococcus jannaschii tRNA	
<400>	15	

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa	60
tccagcccg cggacca	77
<210> 16	
<211> 306	
<212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Mutant synthetase derived from Methanococcus jannaschii synthetase	
<400> 16	
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser	
1 5 10 15	
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val	
20 25 30	
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln	
35 40 45	
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile	
50 55 60	
Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp	
65 70 75 80	
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met	
85 90 95	
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys	
100 105 110	
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys	
115 120 125	
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro	
130 135 140	
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His	
145 150 155 160	
Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile	
165 170 175	
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His	
180 185 190	
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser	
195 200 205	
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala	
210 215 220	
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro	

225	230	235	240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys			
	245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu			
	260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys			
	275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys			
	290	295	300
Arg Leu			
305			
<210> 17			
<211> 77			
<212> DNA			
<213> Methanococcus jannaschii			
<400> 17			
ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa			60
tccggccccgc cggacca			77
<210> 18			
<211> 88			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> An optimized amber supressor tRNA			
<400> 18			
cccagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc			60
gagggttcga atcccttccc tgggacca			88
<210> 19			
<211> 89			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> An optimized AGGA frameshift supressor tRNA			
<400> 19			
gcgagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttctt aatccgttct ctaggagtt			60
cgagggttcg aatccctccc ctgcacca			89
<210> 20			
<211> 306			
<212> PRT			

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-azido-L-phenylalanine

<400> 20

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

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 21
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 p-benzoyl-L-phenylalanine
 <400> 21
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His
 145 150 155 160
 Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195	200	205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala		
210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro		
225	230	235
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys		
245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		
260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys		
275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		
290	295	300
Arg Leu		
305		
<210> 22		
<211> 305		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of propargyl-phenylalanine		
<400> 22		
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser		
1	5	10
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala		
20	25	30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln		
35	40	45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile		
50	55	60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp		
65	70	75
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met		
85	90	95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys		
100	105	110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys		
115	120	125

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

Leu

305

<210> 23

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
propargyl-phenylalanine

<400> 23

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

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

Leu

305

<210> 24

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

propargyl-phenylalanine

<400> 24

```

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1           5           10           15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20           25           30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35           40           45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50           55           60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65           70           75           80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85           90           95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys
100          105          110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115          120          125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130          135          140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
145          150          155          160
Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
165          170          175
Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
180          185          190
Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
195          200          205
Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
210          215          220
Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
225          230          235          240
Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
245          250          255
Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
260          265          270
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
275          280          285
Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg

```

290	295	300
Leu		
305		
<210> 25		
<211> 306		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of		
p-azido-phenylalanine		
<400> 25		
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser		
1 5 10 15		
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr		
20 25 30		
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln		
35 40 45		
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile		
50 55 60		
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp		
65 70 75 80		
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met		
85 90 95		
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys		
100 105 110		
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys		
115 120 125		
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro		
130 135 140		
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His		
145 150 155 160		
Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile		
165 170 175		
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His		
180 185 190		
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser		
195 200 205		
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala		
210 215 220		

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 26
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 p-azido-phenylalanine
 <400> 26
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His

145	150	155	160
Tyr Gln Gly Val Asp	Val Ala Val Gly Gly	Met Glu Gln Arg Lys	Ile
	165	170	175
His Met Leu Ala Arg	Glu Leu Leu Pro Lys Lys	Val Val Cys Ile	His
	180	185	190
Asn Pro Val Leu Thr	Gly Leu Asp Gly Glu Gly	Lys Met Ser Ser	Ser
	195	200	205
Lys Gly Asn Phe Ile	Ala Val Asp Asp Ser Pro	Glu Glu Ile Arg	Ala
	210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala	Tyr Cys Pro Ala Gly	Val Val Glu Gly	Asn Pro
225	230	235	240
Ile Met Glu Ile Ala	Lys Tyr Phe Leu Glu	Tyr Pro Leu Thr	Ile Lys
	245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe	Gly Gly Asp Leu Thr	Val Asn Ser Tyr	Glu Glu
	260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe	Lys Asn Lys Glu Leu	His Pro Met Asp	Leu Lys
	275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu	Glu Leu Ile Lys Ile	Leu Glu Pro Ile	Arg Lys
290	295	300	
Arg Leu			
305			
<210>	27		
<211>	306		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of p-azido-phenylalanine		
<400>	27		
Met Asp Glu Phe Glu	Met Ile Lys Arg Asn Thr	Ser Glu Ile Ile	Ser
1	5	10	15
Glu Glu Glu Leu Arg	Glu Val Leu Lys Lys	Asp Glu Lys Ser	Ala Leu
	20	25	30
Ile Gly Phe Glu Pro	Ser Gly Lys Ile His	Leu Gly His Tyr	Leu Gln
	35	40	45
Ile Lys Lys Met Ile	Asp Leu Gln Asn Ala	Gly Phe Asp Ile	Ile Ile
	50	55	60
Leu Leu Ala Asp Leu	His Ala Tyr Leu Asn	Gln Lys Gly Glu	Leu Asp
65	70	75	80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met		
85	90	95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys		
100	105	110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys		
115	120	125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro		
130	135	140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Val His		
145	150	155
Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile		
165	170	175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His		
180	185	190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser		
195	200	205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala		
210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro		
225	230	235
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys		
245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		
260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys		
275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		
290	295	300
Arg Leu		
305		
<210>	28	
<211>	306	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of p-azido-phenylalanine	
<400>	28	
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser		

1	5	10	15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr			
20	25	30	
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln			
35	40	45	
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile			
50	55	60	
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp			
65	70	75	80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met			
85	90	95	
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys			
100	105	110	
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys			
115	120	125	
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro			
130	135	140	
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His			
145	150	155	160
Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile			
165	170	175	
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His			
180	185	190	
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser			
195	200	205	
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala			
210	215	220	
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro			
225	230	235	240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys			
245	250	255	
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu			
260	265	270	
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys			
275	280	285	
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys			
290	295	300	
Arg Leu			
305			

<210> 29
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 p-acetyl-phenylalanine
 <400> 29
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His
 145 150 155 160
 Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

					245					250					255	
Arg	Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Tyr	Glu	Glu	
			260					265					270			
Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Met	Asp	Leu	Lys	
		275					280					285				
Asn	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	Pro	Ile	Arg	Lys	
	290					295					300					
Arg	Leu															
305																
<210>	30															
<211>	306															
<212>	PRT															
<213>	Artificial															
<220>																
<223>	Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of p-acetyl-phenylalanine															
<400>	30															
Met	Asp	Glu	Phe	Glu	Met	Ile	Lys	Arg	Asn	Thr	Ser	Glu	Ile	Ile	Ser	
1				5				10						15		
Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Ser	Ala	Leu	
			20					25					30			
Ile	Gly	Phe	Glu	Pro	Ser	Gly	Lys	Ile	His	Leu	Gly	His	Tyr	Leu	Gln	
		35					40					45				
Ile	Lys	Lys	Met	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Phe	Asp	Ile	Ile	Ile	
	50					55					60					
Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	His	Ala	Tyr	Leu	Asn	Gln	Lys	Gly	Glu	Leu	Asp	
65					70					75					80	
Glu	Ile	Arg	Lys	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asn	Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Ala	Met	
			85						90					95		
Gly	Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Val	Tyr	Gly	Ser	Glu	Phe	Gln	Leu	Asp	Lys	
			100					105					110			
Asp	Tyr	Thr	Leu	Asn	Val	Tyr	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys	
		115					120					125				
Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Met	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro	
	130					135					140					
Lys	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Tyr	Pro	Ile	Met	Gln	Val	Asn	Gly	Thr	His	
145					150					155					160	
Tyr	Arg	Gly	Val	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	Ile	
			165						170						175	

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 31
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 p-acetyl-phenylalanine
 <400> 31
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys

	100		105		110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys					
115		120		125	
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro					
130		135		140	
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His					
145		150		155	160
Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile					
165		170		175	
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His					
180		185		190	
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser					
195		200		205	
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala					
210		215		220	
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro					
225		230		235	240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys					
245		250		255	
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu					
260		265		270	
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys					
275		280		285	
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys					
290		295		300	
Arg Leu					
305					
<210>	32				
<211>	306				
<212>	PRT				
<213>	Artificial				
<220>					
<223>	Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of p-azido-phenylalanine				
<400>	32				
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser					
1	5		10		15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala					
20		25		30	

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln		
35	40	45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile		
50	55	60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp		
65	70	75
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met		
85	90	95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys		
100	105	110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys		
115	120	125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro		
130	135	140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His		
145	150	155
Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile		
165	170	175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His		
180	185	190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser		
195	200	205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala		
210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro		
225	230	235
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys		
245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		
260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys		
275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		
290	295	300
Arg Leu		
305		
<210>	33	
<211>	306	
<212>	PRT	

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-azido-phenylalanine

<400> 33

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

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 34
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 34
 Met Asp Trp Met Lys Ser Arg Val Gly Ala Pro Gly Leu Trp Val Cys
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Pro Val Phe Leu Leu Gly Val Cys Glu Ala Tyr Pro Ile
 20 25 30
 Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg
 35 40 45
 Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile
 50 55 60
 Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Thr Ala His Arg Ser Pro Glu Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly
 85 90 95
 Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Thr Leu Tyr
 100 105 110
 Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu
 115 120 125
 Leu Lys Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro
 130 135 140
 Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Gln Asp Pro Ala Thr Arg Gly Pro
 145 150 155 160
 Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Pro His Glu Pro Gln Glu Gln
 165 170 175
 Pro Gly Val Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro
 180 185 190
 Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 195 200 205
 <210> 35
 <211> 210

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile
 20 25 30

Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg
 35 40 45

Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile
 50 55 60

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

Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly
 85 90 95

Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Ala Leu Tyr
 100 105 110

Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu
 115 120 125

Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro
 130 135 140

Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala Thr Ser Trp
 145 150 155 160

Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Leu His Glu Pro Gln
 165 170 175

Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser
 180 185 190

Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr
 195 200 205

Ala Ser

210

<210> 36

<211> 194

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 36

Met Leu Phe Ala Cys Phe Phe Ile Phe Phe Ala Leu Phe Pro His Leu
 1 5 10 15

Arg Trp Cys Met Tyr Val Pro Ala Gln Asn Val Leu Leu Gln Phe Gly

Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln Val
85 90 95

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

				405					410					415			
Gly	Trp	Phe	Thr	Asp	Ser	Arg	Val	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Thr	Ala	Ile		
				420					425					430			
Tyr	Met	Met	Lys	Asn	Phe	Leu	Ser	Gln	Val	Leu	Gln	Ala	Ile	Arg	Leu		
				435					440					445			
Asp	Glu	Ile	Arg	Val	Phe	Gly	Tyr	Thr	Ala	Trp	Ser	Leu	Leu	Asp	Gly		
				450					455					460			
Phe	Glu	Trp	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Ile	Arg	Arg	Gly	Leu	Phe	Tyr	Val		
465									470					475			480
Asp	Phe	Asn	Ser	Lys	Gln	Lys	Glu	Arg	Lys	Pro	Lys	Ser	Ser	Ala	His		
				485					490					495			
Tyr	Tyr	Lys	Gln	Ile	Ile	Arg	Glu	Asn	Gly	Phe	Ser	Leu	Lys	Glu	Ser		
				500					505					510			
Thr	Pro	Asp	Val	Gln	Gly	Gln	Phe	Pro	Cys	Asp	Phe	Ser	Trp	Gly	Val		
				515					520					525			
Thr	Glu	Ser	Val	Leu	Lys	Pro	Glu	Ser	Val	Ala	Ser	Ser	Pro	Gln	Phe		
				530					535					540			
Ser	Asp	Pro	His	Leu	Tyr	Val	Trp	Asn	Ala	Thr	Gly	Asn	Arg	Leu	Leu		
545									550					555			560
His	Arg	Val	Glu	Gly	Val	Arg	Leu	Lys	Thr	Arg	Pro	Ala	Gln	Cys	Thr		
				565					570					575			
Asp	Phe	Val	Asn	Ile	Lys	Lys	Gln	Leu	Glu	Met	Leu	Ala	Arg	Met	Lys		
				580					585					590			
Val	Thr	His	Tyr	Arg	Phe	Ala	Leu	Asp	Trp	Ala	Ser	Val	Leu	Pro	Thr		
				595					600					605			
Gly	Asn	Leu	Ser	Ala	Val	Asn	Arg	Gln	Ala	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Cys		
				610					615					620			
Val	Val	Ser	Glu	Gly	Leu	Lys	Leu	Gly	Ile	Ser	Ala	Met	Val	Thr	Leu		
625									630					635			640
Tyr	Tyr	Pro	Thr	His	Ala	His	Leu	Gly	Leu	Pro	Glu	Pro	Leu	Leu	His		
				645					650					655			
Ala	Asp	Gly	Trp	Leu	Asn	Pro	Ser	Thr	Ala	Glu	Ala	Phe	Gln	Ala	Tyr		
				660					665					670			
Ala	Gly	Leu	Cys	Phe	Gln	Glu	Leu	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Leu	Trp	Ile		
				675					680					685			
Thr	Ile	Asn	Glu	Pro	Asn	Arg	Leu	Ser	Asp	Ile	Tyr	Asn	Arg	Ser	Gly		
				690					695					700			
Asn	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Ala	His	Asn	Leu	Leu	Val	Ala	His	Ala	Leu		
705									710					715			720

Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Arg Gln Phe Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala		
725	730	735
Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr		
740	745	750
Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile		
755	760	765
Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala		
770	775	780
Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser		
785	790	795
Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr		
805	810	815
Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Met His		
820	825	830
Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe		
835	840	845
Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile		
850	855	860
Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly		
865	870	875
Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu		
885	890	895
Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln Glu		
900	905	910
Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr		
915	920	925
Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe		
930	935	940
Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys Val		
945	950	955
Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser Ser Arg Cys Ser		
965	970	975
Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu Phe Leu Val Gln		
980	985	990
Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe Ser Thr Leu Val		
995	1000	1005
Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln Lys Arg Arg Lys		
1010	1015	1020
Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro Leu Lys Lys Gly		

1025	1030	1035
Lys Arg Val Val Ser		
1040		
<210> 38		
<211> 1043		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400> 38		
Met Lys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe		
1 5 10 15		
Phe Ser Ser Asp Glu Arg Asn Thr Arg Ser Arg Lys Thr Met Ser Asn		
20 25 30		
Arg Ala Leu Gln Arg Ser Ala Val Leu Ser Ala Phe Val Leu Leu Arg		
35 40 45		
Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Lys Ala Ile Trp Asp Lys Lys		
50 55 60		
Gln Tyr Val Ser Pro Val Asn Pro Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr		
65 70 75 80		
Phe Pro Lys Asn Phe Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Ala Phe Gln Val		
85 90 95		
Glu Gly Ser Trp Lys Thr Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile Trp Asp Arg		
100 105 110		
Tyr Val Tyr Ser His Leu Arg Gly Val Asn Gly Thr Asp Arg Ser Thr		
115 120 125		
Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Phe Leu		
130 135 140		
Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro		
145 150 155 160		
Asn Gly Thr Val Ala Ala Val Asn Ala Gln Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg		
165 170 175		
Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr		
180 185 190		
Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Thr Leu Gln Glu Glu Tyr Gly Gly		
195 200 205		
Trp Lys Asn Ala Thr Met Ile Asp Leu Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr		
210 215 220		
Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His		
225 230 235 240		
Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Phe Gly Thr Gly Met His Ala		

	245		250		255
Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn					
	260		265		270
Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asp Lys Asn Phe					
	275		280		285
Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp					
	290		295		300
Ile Glu Pro Asn Arg Thr Asp Asn Met Glu Asp Val Ile Asn Cys Gln					
305		310		315	320
His Ser Met Ser Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly					
	325		330		335
Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Phe Met Lys Thr Gly Ala Met Ile Pro Glu					
	340		345		350
Phe Ser Glu Ala Glu Lys Glu Glu Val Arg Gly Thr Ala Asp Phe Phe					
	355		360		365
Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Arg Pro Ser Asn Thr Val Val					
	370		375		380
Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Gln Val Leu Asn Trp					
385		390		395	400
Ile Lys Leu Glu Tyr Asp Asp Pro Gln Ile Leu Ile Ser Glu Asn Gly					
	405		410		415
Trp Phe Thr Asp Ser Tyr Ile Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile Tyr					
	420		425		430
Met Met Lys Asn Phe Leu Asn Gln Val Leu Gln Ala Ile Lys Phe Asp					
	435		440		445
Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Thr Leu Leu Asp Gly Phe					
	450		455		460
Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Thr Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp					
465		470		475	480
Phe Asn Ser Glu Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr					
	485		490		495
Tyr Lys Gln Ile Ile Gln Asp Asn Gly Phe Pro Leu Lys Glu Ser Thr					
	500		505		510
Pro Asp Met Lys Gly Arg Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val Thr					
	515		520		525
Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Phe Thr Val Ser Ser Pro Gln Phe Thr					
	530		535		540
Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Val Thr Gly Asn Arg Leu Leu Tyr					
545		550		555	560

Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ser Gln Cys Thr Asp		
	565	570 575
Tyr Val Ser Ile Lys Lys Arg Val Glu Met Leu Ala Lys Met Lys Val		
	580	585 590
Thr His Tyr Gln Phe Ala Leu Asp Trp Thr Ser Ile Leu Pro Thr Gly		
	595	600 605
Asn Leu Ser Lys Val Asn Arg Gln Val Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val		
	610	615 620
Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Val Phe Pro Met Val Thr Leu Tyr		
	625	630 635 640
His Pro Thr His Ser His Leu Gly Leu Pro Leu Pro Leu Leu Ser Ser		
	645	650 655
Gly Gly Trp Leu Asn Met Asn Thr Ala Lys Ala Phe Gln Asp Tyr Ala		
	660	665 670
Glu Leu Cys Phe Arg Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr		
	675	680 685
Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Met Tyr Asn Arg Thr Ser Asn		
	690	695 700
Asp Thr Tyr Arg Ala Ala His Asn Leu Met Ile Ala His Ala Gln Val		
	705	710 715 720
Trp His Leu Tyr Asp Arg Gln Tyr Arg Pro Val Gln His Gly Ala Val		
	725	730 735
Ser Leu Ser Leu His Cys Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Phe Val		
	740	745 750
Asp Ser His Trp Lys Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala		
	755	760 765
Trp Phe Ala Asp Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ser Val Met		
	770	775 780
Lys Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Asn Gln Arg Gly Leu Ser Ser Ser Val		
	785	790 795 800
Leu Pro Arg Phe Thr Ala Lys Glu Ser Arg Leu Val Lys Gly Thr Val		
	805	810 815
Asp Phe Tyr Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Ile His Lys		
	820	825 830
Gln Leu Asn Thr Asn Arg Ser Val Ala Asp Arg Asp Val Gln Phe Leu		
	835	840 845
Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Ser Arg Leu Ala Val Thr Pro		
	850	855 860
Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Ala Trp Ile Arg Arg Asn Tyr Arg Asp		

865	870	875	880
Arg Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Asn Gly Ile Asp Asp Leu Ala Leu Glu			
	885	890	895
Asp Asp Gln Ile Arg Lys Tyr Tyr Leu Glu Lys Tyr Val Gln Glu Ala			
	900	905	910
Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala			
	915	920	925
Phe Lys Leu Thr Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr			
	930	935	940
Ser Asp Phe Arg Ala Lys Ser Ser Val Gln Phe Tyr Ser Lys Leu Ile			
945	950	955	960
Ser Ser Ser Gly Leu Pro Ala Glu Asn Arg Ser Pro Ala Cys Gly Gln			
	965	970	975
Pro Ala Glu Asp Thr Asp Cys Thr Ile Cys Ser Phe Leu Val Glu Lys			
	980	985	990
Lys Pro Leu Ile Phe Phe Gly Cys Cys Phe Ile Ser Thr Leu Ala Val			
	995	1000	1005
Leu Leu Ser Ile Thr Val Phe His His Gln Lys Arg Arg Lys Phe			
	1010	1015	1020
Gln Lys Ala Arg Asn Leu Gln Asn Ile Pro Leu Lys Lys Gly His			
	1025	1030	1035
Ser Arg Val Phe Ser			
1040			
<210>	39		
<211>	63		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)		
<400>	39		
atgaaaaaaa ctgctatcgc gatcgcgtgta gctctggctg gtttcgcgac cgtagctaac			60
gct			63
<210>	40		
<211>	21		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)		
<400>	40		

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Asn Ala
20
<210> 41
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)
<400> 41
atgaaaataa aaacaggtgc acgcatactc gcattatccg cattaacgac gatgatgttt 60
tccgcctcgg ctctcgcc 78
<210> 42
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)
<400> 42
Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15
Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala
20 25
<210> 43
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)
<400> 43
atgaaaaaga atatcgcat tcttcttgca tctatgttcg ttttttctat tgctacaaat 60
gcctatgca 69
<210> 44
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 44

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser

1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala

20

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 45

His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser

1 5

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 46

Tyr Ser Gln Thr

1

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 47

Tyr Gly Ser Lys Tyr Tyr Tyr

1 5

<210> 48

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 48

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

<210> 49

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 49

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asn
 1 5 10 15
 Asp Gly Pro Gly Leu Ser Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ser Ser Gln Thr Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 50 55 60
 Tyr Ala Val Ser Tyr Tyr Thr Lys Lys Ala Tyr Ser Ala Gly Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85

<210> 50

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 50

Glu Met Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Asp

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

<210> 51

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 51

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

<210> 52

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 52

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Met			
1	5	10	15

Asp Glu Tyr Asp Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Asn Tyr Tyr Asn Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Arg Ile Lys Ala Asn Asn Tyr Met Tyr Gly Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85

<210> 53

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 53

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

<210> 54

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 54

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly His
 1 5 10 15
 Tyr Arg Arg Ser Gly His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

35	40	45
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val		
50	55	60
Tyr Ala Val Tyr Ser Ala Lys Ser Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr		
65	70	75
80		
Arg Thr		
<210> 57		
<211> 86		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic polypeptide		
<400> 57		
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Lys		
1	5	10
15		
Tyr Ser Lys His Gly His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly		
20	25	30
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ser Gly Asn Ala Thr		
35	40	45
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val		
50	55	60
Tyr Ala Val Glu Asp Thr Asn Asp Tyr Pro His Thr His Arg Pro Ile		
65	70	75
80		
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr		
85		
<210> 58		
<211> 84		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic polypeptide		
<400> 58		
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Gly		
1	5	10
15		
Glu Pro Asp Gln Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly		
20	25	30
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Pro Tyr Arg Arg Thr		
35	40	45
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val		

50	55	60
Tyr Ala Val Thr Ser Gly Tyr Thr Gly His Tyr Gln Pro Ile Ser Ile		
65	70	75
Asn Tyr Arg Thr		80
<210> 59		
<211> 86		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic polypeptide		
<400> 59		
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Lys		
1	5	10
Tyr Ser Lys His Gly His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly		15
	20	25
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Asp Pro Ser Ser Tyr Thr		30
	35	40
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val		45
	50	55
Tyr Ala Val Ser Lys Asp Asp Tyr Tyr Pro His Glu His Arg Pro Ile		60
65	70	75
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr		80
	85	
<210> 60		
<211> 82		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic polypeptide		
<400> 60		
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Glu		
1	5	10
Pro Tyr Thr Pro Ile His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly		15
	20	25
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Gly Thr		30
	35	40
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val		45
	50	55
Tyr Ala Val Tyr Gly Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr		60

65	70	75	80
Arg Thr			
<210> 61			
<211> 86			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic polypeptide			
<400> 61			
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Lys			
1 5 10 15			
Tyr Ser Lys His Gly His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly			
20 25 30			
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ser Gly Asn Ala Thr			
35 40 45			
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val			
50 55 60			
Tyr Ala Val Ser Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr His Gln His Arg Pro Ile			
65 70 75 80			
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr			
85			
<210> 62			
<211> 86			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic polypeptide			
<400> 62			
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly His			
1 5 10 15			
Tyr Arg Arg Ser Gly His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly			
20 25 30			
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Asp Pro Ser Ser Tyr Thr			
35 40 45			
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val			
50 55 60			
Tyr Ala Val Ser Lys Asp Asp Tyr Tyr Pro His Glu His Arg Pro Ile			
65 70 75 80			
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr			

85

<210> 63

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 63

Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Ser	Lys
1				5					10					15	
Tyr	Ser	Lys	His	Gly	His	Tyr	Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly
			20					25					30		
Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Ser	Gly	Asn	Ala	Thr
			35				40					45			
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val
			50			55				60					
Tyr	Ala	Val	Glu	Asp	Thr	Asn	Asp	Tyr	Pro	His	Thr	His	Arg	Pro	Ile
65					70				75					80	
Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr										

85

<210> 64

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 64

Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Tyr	Glu
1				5					10					15	
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Tyr	Tyr	Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly
			20					25					30		
Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Ser	Tyr	Tyr	His	Thr
			35				40					45			
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val
			50			55				60					
Tyr	Ala	Val	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Glu	Tyr	Glu	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr
65					70				75					80	
Arg	Thr														

<210> 65

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 65

Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Gln	Ser
1				5					10					15	
Tyr	Tyr	Ala	His	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly
			20					25					30		
Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Tyr	Pro	Pro	Gln	Thr
			35				40					45			
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val
			50			55				60					
Tyr	Ala	Val	Tyr	Ala	Gly	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr
65					70					75					80
Arg	Thr														

<210> 66

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 66

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

<210> 67

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 67

Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Pro	Glu
1				5					10				15		
Pro	Gly	Thr	Pro	Val	Tyr	Tyr	Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly
				20				25					30		
Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Thr
				35				40					45		
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val
				50				55					60		
Tyr	Ala	Val	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Ser	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr
65						70				75					80
Arg	Thr														

<210> 68

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 68

Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Tyr	Arg
1				5					10				15		
Tyr	Glu	Lys	Thr	Gln	His	Tyr	Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly
				20				25					30		
Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Pro	Glu	Ser	Gly	Thr
				35				40					45		
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val
				50				55					60		
Tyr	Ala	Val	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Glu	Tyr	Pro	His	Thr	His	Arg	Pro	Ile
65						70				75					80
Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr										

<210> 69

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 69

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

<210> 70

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 70

Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Tyr	Asp
1				5					10					15	
Pro	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly
			20					25					30		
Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Gly	Pro	Tyr	Thr	Thr	Thr
			35					40					45		
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val
			50				55					60			
Tyr	Ala	Val	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Gln	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr
65					70					75					80
Arg	Thr														

<210> 71

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 71

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asn
 1 5 10 15
 Asp Gly Pro Gly Leu Ser Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ser Ser Gln Thr Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 50 55 60
 Tyr Ala Val Ser Tyr Tyr Thr Lys Lys Ala Tyr Ser Ala Gly Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85

<210> 72

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 72

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Asp
 1 5 10 15
 Pro Tyr Tyr Lys Pro Asp Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Arg Asp Tyr Thr Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 50 55 60
 Tyr Ala Val Tyr Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
 65 70 75 80
 Arg Thr

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 73

Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro
 1 5 10

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 74

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 75

Glu Pro Lys Ser Ser Asp

1 5

<210> 76

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 76

Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala Gln Pro Gln

1 5 10 15

Ala Glu Gly Leu Ala

20

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 77

Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu

1 5 10 15

Asp

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 78

Gly Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser

1 5

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 79

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 80

Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Glu Gly Glu Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 81

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 82

<211> 4

<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 82
Gly Ser Gly Cys
1
<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 83
Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5
<210> 84
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 84
Gly Ser Gly Ser
1
<210> 85
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 85
Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser
1 5
<210> 86
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 86

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 87

Thr Val Ala Ala Pro Ser

1 5

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 88

Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 89

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 89

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 90

Lys Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser

1 5
<210> 91
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 91
Lys Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu
1 5 10 15
Leu Asp
<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 92
Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser
1 5
<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 93
Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
<210> 94
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 94
Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10
<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 95

Lys Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 96

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 96

Lys Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu

1 5 10 15

Leu Asp Gly

<210> 97

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 97

Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 98

Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 99

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 99

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 100

Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 101

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 101

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln

1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala

20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln

35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala

100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp

115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro

130	135	140
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp		
145	150	155
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg		
	165	170
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		175
	180	
<210>	102	
<211>	173	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	102	
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln		
1	5	10
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala		
	20	25
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln		
	35	40
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile		
	50	55
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp		
65	70	75
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe		
	85	90
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala		
	100	105
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe		
	115	120
Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile		
	130	135
Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met		
145	150	155
Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
	165	170
<210>	103	
<211>	182	
<212>	PRT	

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 103

```

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1           5           10           15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
           20           25           30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
           35           40           45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
           50           55           60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65           70           75           80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
           85           90           95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
           100          105          110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
           115          120          125
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
           130          135          140
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145          150          155          160
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg
           165          170          175
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
           180

```

<210> 104

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 104

```

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1           5           10           15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
           20           25           30

```

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Lys Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175
 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 105

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 105

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

Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	
100					105					110						
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Asp	Lys	Ser	Arg	Asp	Pro	Ala	
115					120					125						
Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	
130					135					140						
Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	
145					150					155					160	
Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	
165					170					175						
Ser	Tyr	Ala	Ser													
180																
<210>				106												
<211>				180												
<212>				PRT												
<213>				Artificial												
<220>																
<223>				Synthetic sequence												
<400>				106												
Met	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	
1				5				10				15				
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	
20					25					30						
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	
35					40					45						
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	
50					55					60						
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	
65					70					75					80	
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	
85					90					95						
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	
100					105					110						
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	His	Lys	Ser	Arg	Asp	Pro	Ala	
115					120					125						
Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	
130					135					140						
Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	
145					150					155					160	

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 107

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 107

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 108

<211> 170

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 108

```

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1           5           10           15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
           20           25           30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
           35           40           45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
           50           55           60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65           70           75           80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
           85           90           95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
           100          105          110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Ala Arg Phe Leu Pro Leu
           115          120          125
Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro
           130          135          140
Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro
145          150          155          160
Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
           165          170

```

<210> 109

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 109

```

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1           5           10           15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
           20           25           30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
           35           40           45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile

```

50	55	60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp		
65	70	75
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe		
85	90	95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala		
100	105	110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp		
115	120	125
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro		
130	135	140
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp		
145	150	155
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg		
165	170	175
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
180		
<210>	110	
<211>	172	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	110	
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln		
1	5	10
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala		
20	25	30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln		
35	40	45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile		
50	55	60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp		
65	70	75
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe		
85	90	95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala		
100	105	110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Gly Pro Ala Arg Phe Leu		

115	120	125
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu		
130	135	140
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val		
145	150	155
Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
165	170	
<210> 111		
<211> 179		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 111		
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln		
1	5	10
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala		
20	25	30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln		
35	40	45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile		
50	55	60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp		
65	70	75
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe		
85	90	95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala		
100	105	110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly His Arg Asp Pro Ala Pro		
115	120	125
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro		
130	135	140
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser		
145	150	155
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser		
165	170	175
Tyr Ala Ser		
<210> 112		
<211> 180		

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 112
 Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro His His Ser Gly Arg Asp Pro Ala
 115 120 125
 Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
 130 135 140
 Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
 165 170 175
 Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 113
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 113

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala

			20					25					30			
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	
		35					40					45				
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	
	50					55					60					
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	
65					70					75					80	
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	
			85					90					95			
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	
		100					105					110				
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Lys	Asp	Ser	Gln	Asp	Pro	Ala	
	115					120					125					
Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	
	130					135					140					
Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	
145					150					155					160	
Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	
			165					170					175			
Ser	Tyr	Ala	Ser													
		180														
<210>	114															
<211>	181															
<212>	PRT															
<213>	Artificial															
<220>																
<223>	Synthetic sequence															
<400>	114															
Met	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	
1			5					10					15			
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	
		20					25					30				
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	
	35					40					45					
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	
	50					55					60					
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	
65					70					75					80	
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	

	85							90							95						
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala						
	100							105							110						
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	His	His	Lys	Ser	Arg	Asp	Pro						
	115							120							125						
Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro						
	130							135							140						
Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val						
145						150				155					160						
Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser						
	165							170							175						
Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser																	
	180																				
<210>	115																				
<211>	181																				
<212>	PRT																				
<213>	Artificial																				
<220>																					
<223>	Synthetic sequence																				
<400>	115																				
Met	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln						
1				5				10					15								
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala						
	20							25							30						
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln						
	35							40							45						
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile						
	50							55							60						
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp						
65					70				75						80						
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe						
	85							90							95						
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala						
	100							105							110						
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	His	His	Lys	Ser	Arg	Asp	Pro						
	115							120							125						
Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro						
	130							135							140						
Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val						

145	150	155	160
Gly Ser Ser Asp Pro	Leu Ser Met Val	Glu Pro Ser Gln Gly	Arg Glu
	165	170	175
Pro Ser Tyr Ala Ser			
	180		
<210>	116		
<211>	180		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	116		
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln			
1	5	10	15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala			
	20	25	30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln			
	35	40	45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile			
	50	55	60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp			
65	70	75	80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe			
	85	90	95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala			
	100	105	110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly His His Lys Ser Arg Asp Pro			
	115	120	125
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro			
	130	135	140
Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val			
145	150	155	160
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro			
	165	170	175
Ser Tyr Ala Ser			
	180		
<210>	117		
<211>	180		
<212>	PRT		

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 117

```

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1           5           10           15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
           20           25           30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
           35           40           45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
           50           55           60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65           70           75           80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
           85           90           95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
           100          105          110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly His His Lys Ser Arg Asp Pro
           115          120          125
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
           130          135          140
Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145           150          155          160
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Ser Gln Gly Arg Ser Pro
           165          170          175
Ser Tyr Ala Ser
           180

```

<210> 118

<211> 172

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 118

```

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1           5           10           15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
           20           25           30

```

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro
 165 170

<210> 119

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 119

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Pro His Arg Asp Pro Ala
 115 120 125
 Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
 130 135 140
 Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
 165 170 175
 Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 120

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 120

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Gly His Arg Asp Pro Ala Pro Arg
 115 120 125
 Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro
 130 135 140
 Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser
 145 150 155 160
 Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr
 165 170 175

Ala Ser

<210> 121

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 121

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln

1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala

20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln

35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala

100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Asp Pro Ala Pro Arg

115 120 125

Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro

130 135 140

Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser

145 150 155 160

Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr

165 170 175

Ala Ser

<210> 122

<211> 176

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 122

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln

1	5	10	15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala			
20	25	30	
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln			
35	40	45	
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile			
50	55	60	
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp			
65	70	75	80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe			
85	90	95	
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala			
100	105	110	
His Gly Leu Pro Leu His Leu Ser Gly Gly Pro Ala Pro Arg Gly Pro			
115	120	125	
Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro			
130	135	140	
Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro			
145	150	155	160
Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
165	170	175	

<210> 123

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 123

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln			
1	5	10	15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala			
20	25	30	
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln			
35	40	45	
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile			
50	55	60	
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp			
65	70	75	80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe			

	85							90					95				
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala		
	100							105					110				
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Gly	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro		
	115							120					125				
Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala		
	130							135					140				
Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu		
145	150							155					160				
Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser							
	165							170									
<210>	124																
<211>	169																
<212>	PRT																
<213>	Artificial																
<220>																	
<223>	Synthetic sequence																
<400>	124																
Met	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln		
1	5							10					15				
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala		
	20							25					30				
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln		
	35							40					45				
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile		
	50							55					60				
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp		
65	70							75					80				
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe		
	85							90					95				
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala		
	100							105					110				
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Gly	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro		
	115							120					125				
Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln		
	130							135					140				
Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser		
145	150							155					160				
Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser									

165

<210> 125

<211> 170

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 125

```

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1           5           10           15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
           20           25           30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
           35           40           45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
           50           55           60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65           70           75           80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
           85           90           95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
           100          105          110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Ser Gly Gly Arg Phe Leu Pro Leu
           115          120          125
Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro
           130          135          140
Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro
145          150          155          160
Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
           165          170

```

<210> 126

<211> 175

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 126

```

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1           5           10           15

```

Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp
65															
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Ser	Gly	Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Ala
Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro
130															
Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu
145															
Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser	

<210> 127

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 127

Met	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln
1															
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp
65															
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro Leu His Gly Ser Gly Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro
 115 120 125
 Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala
 130 135 140
 Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu
 145 150 155 160
 Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 165 170

<210> 128

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 128

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro His Gly Gly Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 130 135 140
 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg
 145 150 155 160
 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 165

<210> 129

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 129

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln

1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala

20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln

35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala

100 105 110

His Gly Leu Pro His Ser Gly Gly Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu

115 120 125

Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro

130 135 140

Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly

145 150 155 160

Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

165

<210> 130

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 130

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln

1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala

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

	100		105		110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Gly Pro Ala Arg Phe Leu					
115		120		125	
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu					
130		135		140	
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val					
145		150		155	160
Thr Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser					
	165		170		
<210>	132				
<211>	187				
<212>	PRT				
<213>	Artificial				
<220>					
<223>	Synthetic sequence				
<400>	132				
Met His His His His His His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu					
1	5		10		15
Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala					
20		25		30	
Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly					
35		40		45	
Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu					
50		55		60	
Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu					
65		70		75	80
Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro					
85		90		95	
Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val					
100		105		110	
Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys					
115		120		125	
Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro					
130		135		140	
Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala					
145		150		155	160
Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly					
165		170		175	
Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser					

180
185
 $\langle 210 \rangle$ 133
 $\langle 400 \rangle$ 133
000
 $\langle 210 \rangle$ 134
 $\langle 400 \rangle$ 134
000
 $\langle 210 \rangle$ 135
 $\langle 400 \rangle$ 135
000
 $\langle 210 \rangle$ 136
 $\langle 400 \rangle$ 136
000
 $\langle 210 \rangle$ 137
 $\langle 400 \rangle$ 137
000
 $\langle 210 \rangle$ 138
 $\langle 400 \rangle$ 138
000
 $\langle 210 \rangle$ 139
 $\langle 400 \rangle$ 139
000
 $\langle 210 \rangle$ 140
 $\langle 400 \rangle$ 140
000
 $\langle 210 \rangle$ 141
 $\langle 400 \rangle$ 141
000
 $\langle 210 \rangle$ 142
 $\langle 400 \rangle$ 142
000
 $\langle 210 \rangle$ 143
 $\langle 400 \rangle$ 143
000
 $\langle 210 \rangle$ 144
 $\langle 400 \rangle$ 144
000
 $\langle 210 \rangle$ 145
 $\langle 400 \rangle$ 145

000
<210> 146
<400> 146
000
<210> 147
<400> 147
000
<210> 148
<400> 148
000
<210> 149
<400> 149
000
<210> 150
<400> 150
000
<210> 151
<400> 151
000
<210> 152
<400> 152
000
<210> 153
<400> 153
000
<210> 154
<400> 154
000
<210> 155
<400> 155
000
<210> 156
<400> 156
000
<210> 157
<400> 157
000
<210> 158
<400> 158

000
<210> 159
<400> 159
000
<210> 160
<400> 160
000
<210> 161
<400> 161
000
<210> 162
<400> 162
000
<210> 163
<400> 163
000
<210> 164
<400> 164
000
<210> 165
<400> 165
000
<210> 166
<400> 166
000
<210> 167
<400> 167
000
<210> 168
<400> 168
000
<210> 169
<400> 169
000
<210> 170
<400> 170
000
<210> 171
<400> 171

000
<210> 172
<400> 172
000
<210> 173
<400> 173
000
<210> 174
<400> 174
000
<210> 175
<400> 175
000
<210> 176
<400> 176
000
<210> 177
<400> 177
000
<210> 178
<400> 178
000
<210> 179
<400> 179
000
<210> 180
<400> 180
000
<210> 181
<400> 181
000
<210> 182
<400> 182
000
<210> 183
<400> 183
000
<210> 184
<400> 184

000
<210> 185
<400> 185
000
<210> 186
<400> 186
000
<210> 187
<400> 187
000
<210> 188
<400> 188
000
<210> 189
<400> 189
000
<210> 190
<400> 190
000
<210> 191
<400> 191
000
<210> 192
<400> 192
000
<210> 193
<400> 193
000
<210> 194
<400> 194
000
<210> 195
<400> 195
000
<210> 196
<400> 196
000
<210> 197
<400> 197

000
<210> 198
<400> 198
000
<210> 199
<400> 199
000
<210> 200
<400> 200
000
<210> 201
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (109) .. (109)
<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
poly(ethylene glycol)
<400> 201
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala
100 105 110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro

130	135	140
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp		
145	150	155
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg		
	165	170
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		175
	180	
<210>	202	
<211>	173	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(109) .. (109)	
<223>	Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa poly(ethylene glycol)	
<400>	202	
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln		
1	5	10
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala		15
	20	25
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln		30
	35	40
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile		45
	50	55
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp		60
65	70	75
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe		80
	85	90
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala		95
	100	105
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe		110
	115	120
Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile		125
	130	135
Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met		140
145	150	155
		160

Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 165 170

<210> 203

<400> 203

000

<210> 204

<400> 204

000

<210> 205

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (109) .. (109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
 poly(ethylene glycol)

<400> 205

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala
 100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Arg Asp Pro Ala
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
 130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

145	150	155	160
Ser Ser Asp Pro Leu	Ser Met Val Glu Pro	Ser Gln Gly Arg Ser	Pro
	165	170	175
Ser Tyr Ala Ser			
	180		
<210>	206		
<211>	180		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(109) .. (109)		
<223>	Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa poly(ethylene glycol)		
<400>	206		
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln			
1	5	10	15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala			
	20	25	30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln			
	35	40	45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile			
	50	55	60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp			
65	70	75	80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe			
	85	90	95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala			
	100	105	110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly His Lys Ser Arg Asp Pro Ala			
	115	120	125
Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala			
	130	135	140
Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly			
145	150	155	160
Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro			
	165	170	175

Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 207

<400> 207

000

<210> 208

<400> 208

000

<210> 209

<400> 209

000

<210> 210

<211> 172

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (109) .. (109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
poly(ethylene glycol)

<400> 210

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln

1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala

20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln

35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala

100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Gly Pro Ala Arg Phe Leu

115 120 125

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu
 130 135 140
 Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val
 145 150 155 160
 Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 165 170
 <210> 211
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (109) .. (109)
 <223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
 poly(ethylene glycol)
 <400> 211
 Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly His Arg Asp Pro Ala Pro
 115 120 125
 Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro
 130 135 140
 Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
 145 150 155 160
 Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser

	165	170	175
Tyr Ala Ser			
<210> 212			
<211> 180			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Synthetic sequence			
<220>			
<221> misc_feature			
<222> (109) .. (109)			
<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa poly(ethylene glycol)			
<400> 212			
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln			
1 5 10 15			
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala			
20 25 30			
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln			
35 40 45			
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile			
50 55 60			
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp			
65 70 75 80			
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe			
85 90 95			
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala			
100 105 110			
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro His His Ser Gly Arg Asp Pro Ala			
115 120 125			
Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala			
130 135 140			
Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly			
145 150 155 160			
Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro			
165 170 175			
Ser Tyr Ala Ser			
180			
<210> 213			

<400> 213
 000
 <210> 214
 <400> 214
 000
 <210> 215
 <400> 215
 000
 <210> 216
 <400> 216
 000
 <210> 217
 <400> 217
 000
 <210> 218
 <400> 218
 000
 <210> 219
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (109)..(109)
 <223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
 poly(ethylene glycol)
 <400> 219
 Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Pro His Arg Asp Pro Ala
 115 120 125
 Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
 130 135 140
 Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
 165 170 175
 Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 220

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (109) .. (109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
poly(ethylene glycol)

<400> 220

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

	100		105		110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Gly His Arg Asp Pro Ala Pro Arg					
115		120		125	
Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro					
130		135		140	
Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser					
145		150		155	160
Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr					
	165		170		175
Ala Ser					
<210>	221				
<211>	178				
<212>	PRT				
<213>	Artificial				
<220>					
<223>	Synthetic sequence				
<220>					
<221>	misc_feature				
<222>	(109) .. (109)				
<223>	Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa poly(ethylene glycol)				
<400>	221				
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln					
1	5		10		15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala					
	20		25		30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln					
	35		40		45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile					
	50		55		60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp					
65		70		75	80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe					
	85		90		95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala					
	100		105		110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Asp Pro Ala Pro Arg					
	115		120		125
Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro					

130	135	140
Glu Pro Pro Gly Ile Leu	Ala Pro Gln Pro Pro	Asp Val Gly Ser Ser
145	150	155
Asp Pro Leu Ser Met Val	Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser	Pro Ser Tyr
165	170	175
Ala Ser		
<210>	222	
<211>	176	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(109) .. (109)	
<223>	Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa poly(ethylene glycol)	
<400>	222	
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln		
1	5	10
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala		
20	25	30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln		
35	40	45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile		
50	55	60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp		
65	70	75
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe		
85	90	95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala		
100	105	110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Ser Gly Gly Pro Ala Pro Arg Gly Pro		
115	120	125
Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro		
130	135	140
Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro		
145	150	155
Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		

	165	170	175
<210>	223		
<211>	171		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(109) .. (109)		
<223>	Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa poly(ethylene glycol)		
<400>	223		
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln			
1	5	10	15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala			
	20	25	30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln			
	35	40	45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile			
	50	55	60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp			
65	70	75	80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe			
	85	90	95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala			
	100	105	110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Gly Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro			
	115	120	125
Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala			
	130	135	140
Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu			
145	150	155	160
Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
	165	170	
<210>	224		
<400>	224		
000			
<210>	225		

<400> 225
000
<210> 226
<400> 226
000
<210> 227
<400> 227
000
<210> 228
<400> 228
000
<210> 229
<400> 229
000
<210> 230
<400> 230
000
<210> 231
<400> 231
000
<210> 232
<400> 232
000
<210> 233
<400> 233
000
<210> 234
<400> 234
000
<210> 235
<400> 235
000
<210> 236
<400> 236
000
<210> 237
<400> 237
000
<210> 238

<400> 238
000
<210> 239
<400> 239
000
<210> 240
<400> 240
000
<210> 241
<400> 241
000
<210> 242
<400> 242
000
<210> 243
<400> 243
000
<210> 244
<400> 244
000
<210> 245
<400> 245
000
<210> 246
<400> 246
000
<210> 247
<400> 247
000
<210> 248
<400> 248
000
<210> 249
<400> 249
000
<210> 250
<400> 250
000
<210> 251

<400> 251
000
<210> 252
<400> 252
000
<210> 253
<400> 253
000
<210> 254
<400> 254
000
<210> 255
<400> 255
000
<210> 256
<400> 256
000
<210> 257
<400> 257
000
<210> 258
<400> 258
000
<210> 259
<400> 259
000
<210> 260
<400> 260
000
<210> 261
<400> 261
000
<210> 262
<400> 262
000
<210> 263
<400> 263
000
<210> 264

<400> 264
000
<210> 265
<400> 265
000
<210> 266
<400> 266
000
<210> 267
<400> 267
000
<210> 268
<400> 268
000
<210> 269
<400> 269
000
<210> 270
<400> 270
000
<210> 271
<400> 271
000
<210> 272
<400> 272
000
<210> 273
<400> 273
000
<210> 274
<400> 274
000
<210> 275
<400> 275
000
<210> 276
<400> 276
000
<210> 277

<400> 277
000
<210> 278
<400> 278
000
<210> 279
<400> 279
000
<210> 280
<400> 280
000
<210> 281
<400> 281
000
<210> 282
<400> 282
000
<210> 283
<400> 283
000
<210> 284
<400> 284
000
<210> 285
<400> 285
000
<210> 286
<400> 286
000
<210> 287
<400> 287
000
<210> 288
<400> 288
000
<210> 289
<400> 289
000
<210> 290

<400> 290
000
<210> 291
<400> 291
000
<210> 292
<400> 292
000
<210> 293
<400> 293
000
<210> 294
<400> 294
000
<210> 295
<400> 295
000
<210> 296
<400> 296
000
<210> 297
<400> 297
000
<210> 298
<400> 298
000
<210> 299
<400> 299
000
<210> 300
<400> 300
000
<210> 301
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 301

Thr Val Ala Ala Pro Ser Gly

1 5

<210> 302

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 302

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 303
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 303
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
<210> 304
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 304
Gly Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
<210> 305
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 305
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
20
<210> 306
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 306
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser

20

<210> 307

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 307

Glu Pro Lys Ser Ser Gly Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1

5

10

15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser

20

<210> 308

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 308

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1

5

10

15

Gly Pro Ser

<210> 309

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 309

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1

5

10

15

Gly Ser Ser

<210> 310

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 310

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15
Ser Ala Pro Ala
 20
<210> 311
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 311
Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15
Ala Ala Pro Ser
 20
<210> 312
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 312
Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala
1 5 10 15
Ser Pro Ser Ser
 20
<210> 313
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 313
Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro
1 5 10 15
Ala Ser Pro Ser
 20
<210> 314
<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 314

Ser Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro

1 5 10 15

Ser Ser Pro Ala

20

<210> 315

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 315

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala

20

<210> 316

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 316

Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala

20

<210> 317

<211> 519

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 317

atgcaccta ttctgattc ttctcctctg ctgcaatttg ggggtcaggt gcgccaacgt

60

<400> 319

50 55 60

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

355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu		
385	390	395
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro		400
405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		
500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu		
580	585	
<210> 322		
<211> 584		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 322		
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu		
1	5	10
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln		15

20	25	30
Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu		
35	40	45
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys		
50	55	60
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu		
65	70	75
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro		
85	90	95
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu		
100	105	110
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His		
115	120	125
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg		
130	135	140
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg		
145	150	155
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala		
165	170	175
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser		
180	185	190
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu		
195	200	205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro		
210	215	220
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys		
225	230	235
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp		
245	250	255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser		
260	265	270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His		
275	280	285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		
290	295	300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
325	330	335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr			
340	345	350	
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu			
355	360	365	
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro			
370	375	380	
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu			
385	390	395	400
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro			
405	410	415	
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys			
420	425	430	
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys			
435	440	445	
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His			
450	455	460	
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser			
465	470	475	480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr			
485	490	495	
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp			
500	505	510	
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala			
515	520	525	
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu			
530	535	540	
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys			
545	550	555	560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val			
565	570	575	
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly			
580			
<210>	323		
<211>	227		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	323		

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20					25					30		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		35					40					45			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	50					55					60				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	130					135					140				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150					155					160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				165					170					175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			180					185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	210					215					220				
Pro	Gly	Lys													
225															
<210>	324														
<211>	225														
<212>	PRT														
<213>	Artificial														
<220>															
<223>	Synthetic sequence														
<400>	324														
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
1				5					10					15	

Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20					25					30		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		35					40					45			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	50					55					60				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75				80	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	130					135						140			
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150					155				160	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				165					170					175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			180					185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	210					215					220				
Pro															
225															
<210>	325														
<211>	227														
<212>	PRT														
<213>	Artificial														
<220>															
<223>	Synthetic sequence														
<400>	325														
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
1				5				10					15		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20					25					30		

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
35	40	45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
50	55	60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
65	70	75
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
85	90	95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
100	105	110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
130	135	140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
145	150	155
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
210	215	220
Pro Gly Lys		
225		
<210>	326	
<211>	227	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	326	
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly		
1	5	10
Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
20	25	30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
35	40	45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
50	55	60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
65	70	75
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	85	90
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile		
	100	105
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	115	120
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	130	135
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
145	150	155
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
	165	170
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
	180	185
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	195	200
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	210	215
Pro Gly Lys		220
225		
<210>	327	
<211>	232	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	327	
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
1	5	10
Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
	20	25
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
	35	40
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
	50	55
		60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
65	70	75	80
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
	85	90	95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
	100	105	110
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
	115	120	125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr			
	130	135	140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
145	150	155	160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
	165	170	175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
	180	185	190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe			
	195	200	205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
	210	215	220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
225	230		
<210>	328		
<211>	227		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	328		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
1	5	10	15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	20	25	30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
	35	40	45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
	50	55	60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr			
65	70	75	80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	85	90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
	100	105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	115	120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	130	135 140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
145	150	155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
	165	170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
	180	185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	195	200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	210	215 220
Pro Gly Lys		
225		
<210>	329	
<211>	226	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	329	
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
1	5	10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	20	25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	35	40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	50	55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
65	70	75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	85	90 95

Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile		
100						105						110					
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val		
115						120						125					
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser		
130						135						140					
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu		
145						150						155				160	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro		
165						170						175					
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val		
180						185						190					
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met		
195						200						205					
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser		
210						215						220					
Pro Gly																	
225																	
<210> 330																	
<211> 227																	
<212> PRT																	
<213> Artificial																	
<220>																	
<223> Synthetic sequence																	
<400> 330																	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly		
1				5				10				15					
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met		
20						25						30					
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His		
35						40						45					
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val		
50						55						60					
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr		
65						70						75				80	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly		
85						90						95					
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile		
100						105						110					

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
130	135	140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
145	150	155
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
	165	170
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
	180	185
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	195	200
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	210	215
Pro Gly Lys		220
225		
<210>	331	
<211>	227	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	331	
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
1	5	10
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	20	25
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	35	40
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	50	55
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Thr Tyr		
65	70	75
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	85	90
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
	100	105
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	115	120

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
130	135	140	
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220
Pro Gly Lys			
225			
<210>	332		
<211>	227		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	332		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
1	5	10	15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	20	25	30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
	35	40	45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
	50	55	60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr			
65	70	75	80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
	85	90	95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	100	105	110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	130	135	140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220
Pro Gly Lys			
225			
<210>	333		
<211>	227		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	333		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
1	5	10	15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	20	25	30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
	35	40	45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
	50	55	60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr His Ser Thr Tyr			
65	70	75	80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
	85	90	95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	100	105	110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	130	135	140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
145	150	155	160

Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				165				170				175			
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
				180				185				190			
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
				195				200				205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
				210				215				220			
Pro Gly Lys															
225															
<210> 334															
<211> 233															
<212> PRT															
<213> Artificial															
<220>															
<223> Synthetic sequence															
<400> 334															
Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro
1				5				10				15			
Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
				20				25				30			
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
				35				40				45			
Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr
50				55				60							
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
65				70				75				80			
Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
				85				90				95			
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
				100				105				110			
Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
				115				120				125			
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met
130				135				140							
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
145				150				155				160			
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
				165				170				175			

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 180 185 190
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 195 200 205
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 210 215 220
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 225 230
 <210> 335
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 335
 Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 20 25 30
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 35 40 45
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 50 55 60
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 65 70 75 80
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 85 90 95
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 100 105 110
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 115 120 125
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 130 135 140
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 165 170 175
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 180 185 190

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
195 200 205
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
225 230
<210> 336
<400> 336
000
<210> 337
<400> 337
000
<210> 338
<400> 338
000
<210> 339
<400> 339
000
<210> 340
<400> 340
000
<210> 341
<400> 341
000
<210> 342
<400> 342
000
<210> 343
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 343
Gly Ser Gly His
1
<210> 344
<211> 4
<212> PRT

<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 344
His His Ser Gly
1
<210> 345
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 345
His Gly Ser His
1
<210> 346
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 346
Gly Ser Gly Pro
1
<210> 347
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence
<400> 347
His Ser Gly Gly
1
<210> 348
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic sequence

<400> 348

His Gly Ser Gly

1

<210> 349

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 349

Lys Asp Ser Gln

1

<210> 350

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 350

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

20

25

<210> 351

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 351

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro

1

5

10

15

<210> 352

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 352

Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Glu Gly Glu Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 353

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 353

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser

<210> 354

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 354

Gly Ser

1

<210> 355

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 355

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 356

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 356

Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp

1	5	10
<210>	357	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	357	
Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro		
1	5	10
<210>	358	
<211>	12	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	358	
Gly Ser His His His His His His His His Gly Ser		
1	5	10
<210>	359	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	359	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
1	5	10 15
<210>	360	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	360	
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
1	5	10 15
<210>	361	
<211>	16	

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 361

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10 15

<210> 362

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 362

Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser

1 5 10 15

Pro Ser

<210> 363

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 363

Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu

1 5 10 15

Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro

20

<210> 364

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 364

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20

25

<210> 365

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 365

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro

1 5 10 15

Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro

20 25 30

<210> 366

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 366

Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser

1 5 10 15

Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr

20 25 30

Pro Ser Pro Ser

35

<210> 367

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 367

Pro Ser Pro Glu Pro

1 5

<210> 368

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 368

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro

1 5 10 15

Thr Pro Glu Pro

20

<210> 369

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 369

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro

1 5 10 15

Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser

20 25 30

Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro

35 40

<210> 370

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 370

Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro

1 5 10 15

Ser Pro Glu Pro

20

<210> 371

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 371

Pro Ser Pro Glu Pro Gly Gly Gly Ser Pro Thr Pro Glu Pro

1 5 10

<210> 372

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 372

Pro Ser Pro Glu Pro Glu Glu Glu Asp Pro Thr Pro Glu Pro

1 5 10

<210> 373

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 373

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Glu Glu Glu Asp Pro Ser

1 5 10 15

Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro

20

<210> 374

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 374

Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Glu

1 5 10 15

Glu Glu Asp Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro

20 25 30

Glu Pro

<210> 375

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 375

Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Gly

1	5	10	15
Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser			
	20	25	30

Pro Glu Pro

35

<210> 376

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 376

Pro Ser Pro Glu Pro Thr Pro Glu Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro

1	5	10	15

Glu Pro Ser Pro Glu Pro Thr Pro Glu Pro

20

25

<210> 377

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 377

Gly Glu Thr Gly Ser

1	5

<210> 378

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 378

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1	5	10

<210> 379

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 379

Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr

1 5 10

<210> 380

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 380

Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser

1 5 10 15

<210> 381

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 381

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 382

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 382

Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly

1 5 10 15

Ala Gly Glu Ser

20

<210> 383

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 383

Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly

1 5 10 15

Ala Gly Glu Ser Gly Thr Gly Glu Ser Gly Glu Gly Gly Ser

20 25 30

<210> 384

<400> 384

000

<210> 385

<400> 385

000

<210> 386

<400> 386

000

<210> 387

<400> 387

000

<210> 388

<400> 388

000

<210> 389

<400> 389

000

<210> 390

<400> 390

000

<210> 391

<400> 391

000

<210> 392

<400> 392

000

<210> 393

<400> 393

000

<210> 394

<400> 394

000

<210> 395

<400> 395

000

<210> 396

<400> 396

000

<210> 397

<400> 397

000

<210> 398

<400> 398

000

<210> 399

<400> 399

000

<210> 400

<400> 400

000

<210> 401

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 401

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly

35 40 45

Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr

50 55 60

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val

65 70 75 80

Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile

85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser

100	105	110
Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr		
115	120	125
Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly		
130	135	140
Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu		
145	150	155
Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser		
165	170	175
Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His		
180	185	190
Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly		
195	200	205
Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly		
210	215	220
Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro		
225	230	235
Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val		
245	250	255
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser		
260	265	270
Pro Ser Tyr Ala Ser		
275		
<210> 402		
<211> 280		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 402		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro		
1 5 10 15		
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr		
20 25 30		
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly		
35 40 45		
Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr		
50 55 60		
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val		

65	70	75	80
Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile			
	85	90	95
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro			
	100	105	110
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr			
	115	120	125
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg			
	130	135	140
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu			
145	150	155	160
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val			
	165	170	175
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly			
	180	185	190
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu			
	195	200	205
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu			
210	215	220	
His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly			
225	230	235	240
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro			
	245	250	255
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln			
	260	265	270
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
	275	280	
<210>	403		
<211>	285		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	403		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro			
1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr			
	20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly			

	35					40					45							
Pro	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr			
	50					55					60							
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val			
65					70					75						80		
Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Gly	Glu	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile			
				85					90						95			
Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu			
			100					105					110					
Asp	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln			
	115					120					125							
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala			
	130					135					140							
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln			
145					150					155						160		
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile			
				165					170					175				
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp			
	180					185					190							
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe			
	195					200					205							
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala			
	210					215					220							
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe			
225					230					235						240		
Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile			
				245					250					255				
Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met			
	260					265					270							
Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser						
	275					280					285							
<210>	404																	
<211>	285																	
<212>	PRT																	
<213>	Artificial																	
<220>																		
<223>	Synthetic sequence																	
<400>	404																	
Gly	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro			

1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr			
20	25	30	
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly			
35	40	45	
Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr			
50	55	60	
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val			
65	70	75	80
Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile			
85	90	95	
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu			
100	105	110	
Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln			
115	120	125	
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala			
130	135	140	
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln			
145	150	155	160
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile			
165	170	175	
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp			
180	185	190	
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe			
195	200	205	
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala			
210	215	220	
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe			
225	230	235	240
Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile			
245	250	255	
Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met			
260	265	270	
Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
275	280	285	
<210>	405		
<211>	287		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 405

Gly	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro
1				5					10					15	
Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr
			20					25						30	
Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Arg	Glu	Val	Gln	Lys	Tyr	Ser	Asp	Leu	Gly
		35					40					45			
Pro	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr
	50					55					60				
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val
65					70					75					80
Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Gly	Glu	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile
				85					90						95
Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Pro	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	His
			100					105						110	
His	Gly	Ser	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly
		115						120					125		
Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr
		130					135					140			
Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala
145					150					155					160
Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly
				165						170					175
Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg
			180						185					190	
Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys
		195					200					205			
Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser
		210					215					220			
Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala
225					230					235					240
Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro
				245						250				255	
Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu
			260					265					270		
Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser	
		275						280					285		

<210> 406
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 406
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
 35 40 45
 Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
 50 55 60
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
 85 90 95
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu
 115 120 125
 Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala
 130 135 140
 Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu
 180 185 190
 Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro
 195 200 205
 Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val
 210 215 220
 Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg
 225 230 235 240
 Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro
 245 250 255

Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser
			260					265					270		
Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr
		275					280					285			
Ala	Ser														
	290														
<210>	407														
<211>	290														
<212>	PRT														
<213>	Artificial														
<220>															
<223>	Synthetic sequence														
<400>	407														
Gly	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro
1			5					10					15		
Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr
		20					25					30			
Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Arg	Glu	Val	Gln	Lys	Tyr	Ser	Asp	Leu	Gly
	35					40					45				
Pro	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr
	50				55					60					
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val
65			70					75					80		
Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Gly	Glu	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile
		85						90					95		
Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
	100					105						110			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu
	115					120					125				
Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala
	130					135					140				
Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly
145					150				155					160	
Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu
			165					170					175		
Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu
		180						185					190		
Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro
	195						200						205		

Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val
 210 215 220
 Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg
 225 230 235 240
 Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro
 245 250 255
 Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser
 260 265 270
 Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr
 275 280 285
 Ala Ser
 290
 <210> 408
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 408
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
 35 40 45
 Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
 50 55 60
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
 85 90 95
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 100 105 110
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu
 115 120 125
 Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp
 130 135 140
 Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val
 145 150 155 160

Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala		
	165	170 175
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe		
	180	185 190
Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp		
	195	200 205
Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn		
	210	215 220
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly		
225	230	235 240
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro		
	245	250 255
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser		
	260	265 270
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser		
	275	280 285
Tyr Ala Ser		
290		
<210>	409	
<211>	293	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	409	
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro		
1	5	10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr		
	20	25 30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly		
	35	40 45
Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr		
	50	55 60
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val		
65	70	75 80
Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile		
	85	90 95
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro		
	100	105 110

Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser
 115 120 125
 Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr
 130 135 140
 Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly
 145 150 155 160
 Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu
 165 170 175
 Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser
 180 185 190
 Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His
 195 200 205
 Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly
 210 215 220
 Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 245 250 255
 Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 260 265 270
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser
 275 280 285
 Pro Ser Tyr Ala Ser
 290
 <210> 410
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 410
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
 35 40 45
 Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
 50 55 60

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val			
65	70	75	80
Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile			
	85	90	95
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu			
	100	105	110
Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro His Pro			
	115	120	125
Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln			
	130	135	140
Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu			
145	150	155	160
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu			
	165	170	175
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu			
	180	185	190
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu			
	195	200	205
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu			
	210	215	220
Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu			
225	230	235	240
Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu			
	245	250	255
Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro			
	260	265	270
Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro			
	275	280	285
Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
	290	295	
<210>	411		
<211>	300		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	411		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro			
1	5	10	15

Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr
20				25				30							
Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Arg	Glu	Val	Gln	Lys	Tyr	Ser	Asp	Leu	Gly
35				40				45							
Pro	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr
50				55				60							
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val
65				70				75				80			
Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Gly	Glu	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile
85				90				95							
Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
100				105				110							
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
115				120				125							
His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val
130				135				140							
Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His
145				150				155				160			
Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser
165				170				175							
Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln
180				185				190							
Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly
195				200				205							
Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg
210				215				220							
Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His
225				230				235				240			
Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu
245				250				255							
Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu
260				265				270							
Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val
275				280				285							
Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser				
290				295				300							

<210> 412
 <211> 305
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 412

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

275	280	285
Pro Leu Ser Met Val Glu	Pro Ser Gln Gly Arg Ser	Pro Ser Tyr Ala
290	295	300
Ser		
305		
<210> 413		
<211> 311		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 413		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro		
1 5 10 15		
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr		
20 25 30		
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly		
35 40 45		
Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr		
50 55 60		
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val		
65 70 75 80		
Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile		
85 90 95		
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro		
100 105 110		
Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro		
115 120 125		
Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser His Pro Ile Pro Asp		
130 135 140		
Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu		
145 150 155 160		
Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu		
165 170 175		
Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu		
180 185 190		
Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys		
195 200 205		
Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser		

210	215	220
Leu His Phe Asp Pro Glu	Ala Cys Ser Phe Arg Glu	Leu Leu Leu Glu
225	230	235
Asp Gly Tyr Asn Val Tyr	Gln Ser Glu Ala His Gly	Leu Pro Leu His
245	250	255
Leu Gly Ser Gly Arg Gly	Pro Ala Arg Phe Leu Pro	Leu Pro Gly Leu
260	265	270
Pro Pro Ala Pro Pro Glu	Pro Pro Gly Ile Leu Ala	Pro Gln Pro Pro
275	280	285
Asp Val Gly Ser Ser Asp	Pro Leu Ser Met Val Glu	Pro Ser Gln Gly
290	295	300
Arg Ser Pro Ser Tyr Ala	Ser	
305	310	
<210>	414	
<211>	280	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	414	
Gly Val Ser Asp Val Pro	Arg Asp Leu Glu Val Val	Ala Ala Thr Pro
1	5	10
Thr Ser Leu Leu Ile Ser	Trp Asp Ala Pro Ala Val	Thr Val Arg Tyr
20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly	Arg Glu Val Gln Lys Tyr	Ser Asp Leu Gly
35	40	45
Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln	Glu Phe Thr Val Pro Gly	Ser Lys Ser Thr
50	55	60
Ala Thr Ile Ser Gly Leu	Lys Pro Gly Val Asp Tyr	Thr Ile Thr Val
65	70	75
Tyr Ala Val Thr Gly Ser	Gly Glu Ser Pro Ala Ser	Ser Lys Pro Ile
85	90	95
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr	Pro Pro Ser Pro Glu Pro	His Pro Ile Pro
100	105	110
Asp Ser Ser Pro Leu Leu	Gln Phe Gly Gly Gln Val	Arg Gln Arg Tyr
115	120	125
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala	Gln Gln Thr Glu Ala His	Leu Glu Ile Arg
130	135	140
Glu Asp Gly Thr Val Gly	Gly Ala Ala Asp Gln Ser	Pro Glu Ser Leu

145	150	155	160
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val			
	165	170	175
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly			
	180	185	190
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu			
	195	200	205
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu			
	210	215	220
His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly			
225	230	235	240
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro			
	245	250	255
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln			
	260	265	270
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
	275	280	
<210>	415		
<211>	295		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	415		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro			
1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr			
	20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly			
	35	40	45
Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr			
	50	55	60
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val			
65	70	75	80
Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile			
	85	90	95
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu			
	100	105	110
Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp			

115	120	125
Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu		
130	135	140
Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu		
145	150	155
Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu		
165	170	175
Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys		
180	185	190
Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser		
195	200	205
Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu		
210	215	220
Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His		
225	230	235
Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu		
245	250	255
Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro		
260	265	270
Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly		
275	280	285
Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
290	295	
<210>	416	
<211>	315	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	416	
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro		
1	5	10
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr		
20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly		
35	40	45
Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr		
50	55	60
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val		

65	70	75	80
Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile			
	85	90	95
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu			
	100	105	110
Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro			
	115	120	125
Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro His			
	130	135	140
Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg			
145	150	155	160
Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu			
	165	170	175
Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro			
	180	185	190
Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile			
	195	200	205
Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala			
	210	215	220
Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu			
225	230	235	240
Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly			
	245	250	255
Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro			
	260	265	270
Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala			
	275	280	285
Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu			
	290	295	300
Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
305	310	315	
<210>	417		
<211>	295		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	417		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro			

1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr			
20	25	30	
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly			
35	40	45	
Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr			
50	55	60	
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val			
65	70	75	80
Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile			
85	90	95	
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu			
100	105	110	
Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp			
115	120	125	
Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu			
130	135	140	
Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu			
145	150	155	160
Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu			
165	170	175	
Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys			
180	185	190	
Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser			
195	200	205	
Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu			
210	215	220	
Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His			
225	230	235	240
Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu			
245	250	255	
Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro			
260	265	270	
Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly			
275	280	285	
Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
290	295		
<210>	418		
<211>	289		

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 418
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
 35 40 45
 Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
 50 55 60
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
 85 90 95
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Pro Glu Pro Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln
 115 120 125
 Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln
 130 135 140
 Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly
 145 150 155 160
 Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys
 165 170 175
 Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys
 180 185 190
 Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu
 195 200 205
 Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
 210 215 220
 Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly
 225 230 235 240
 Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
 245 250 255
 Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
 260 265 270

Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
 275 280 285
 Ser
 <210> 419
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 419
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
 35 40 45
 Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
 50 55 60
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
 85 90 95
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Pro Glu Pro Glu Glu Glu Asp
 100 105 110
 Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln
 115 120 125
 Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln
 130 135 140
 Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly
 145 150 155 160
 Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys
 165 170 175
 Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys
 180 185 190
 Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu
 195 200 205
 Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
 210 215 220
 Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly

225	230	235	240
Pro Ala Arg Phe Leu	Pro Leu Pro Gly Leu	Pro Pro Ala Pro	Pro Pro Glu
245	250	255	
Pro Pro Gly Ile Leu	Ala Pro Gln Pro Pro	Asp Val Gly Ser Ser	Asp
260	265	270	
Pro Leu Ser Met Val	Glu Pro Ser Gln Gly Arg	Ser Pro Ser Tyr	Ala
275	280	285	
Ser			
<210>	420		
<211>	299		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	420		
Gly Val Ser Asp Val	Pro Arg Asp Leu Glu	Val Val Ala Ala	Thr Pro
1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile	Ser Trp Asp Ala Pro	Ala Val Thr Val	Arg Tyr
20	25	30	
Tyr Arg Ile Thr Tyr	Gly Arg Glu Val Gln	Lys Tyr Ser Asp	Leu Gly
35	40	45	
Pro Leu Tyr Ile Tyr	Gln Glu Phe Thr Val	Pro Gly Ser Lys	Ser Thr
50	55	60	
Ala Thr Ile Ser Gly	Leu Lys Pro Gly Val	Asp Tyr Thr Ile	Thr Val
65	70	75	80
Tyr Ala Val Thr Gly	Ser Gly Glu Ser Pro	Ala Ser Ser Lys	Pro Ile
85	90	95	
Ser Ile Asn Tyr Arg	Thr Pro Pro Ser Pro	Glu Pro Pro Thr	Pro Glu
100	105	110	
Pro Glu Glu Glu Asp	Pro Ser Pro Glu Pro	Pro Thr Pro Glu	Pro His
115	120	125	
Pro Ile Pro Asp Ser	Ser Pro Leu Leu Gln	Phe Gly Gly Gln	Val Arg
130	135	140	
Gln Arg Tyr Leu Tyr	Thr Asp Asp Ala Gln	Gln Thr Glu Ala	His Leu
145	150	155	160
Glu Ile Arg Glu Asp	Gly Thr Val Gly Gly	Ala Ala Asp Gln	Ser Pro
165	170	175	
Glu Ser Leu Leu Gln	Leu Lys Ala Leu Lys	Pro Gly Val Ile	Gln Ile
180	185	190	

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
 195 200 205
 Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
 210 215 220
 Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
 225 230 235 240
 Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro
 245 250 255
 Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala
 260 265 270
 Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu
 275 280 285
 Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 290 295
 <210> 421
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 421
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
 35 40 45
 Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
 50 55 60
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
 85 90 95
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu
 100 105 110
 Pro Pro Thr Pro Glu Pro Glu Glu Glu Asp Pro Ser Pro Glu Pro Pro
 115 120 125
 Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser
 130 135 140

Gly	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro
1				5					10					15	
Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr
			20					25						30	
Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Arg	Glu	Val	Gln	Lys	Tyr	Ser	Asp	Leu	Gly
		35					40					45			
Pro	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr
	50					55					60				
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val
65					70					75					80

Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Gly	Glu	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile
				85				90					95		
Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Pro	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Ser	Pro	Glu
			100					105					110		
Pro	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro
			115					120					125		
Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser
			130					135					140		
Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr
145					150					155					160
Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp
				165						170				175	
Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln
			180					185					190		
Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr
			195					200					205		
Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu
			210					215					220		
His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp
225					230					235					240
Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu
			245							250				255	
Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro
			260					265					270		
Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp
			275					280					285		
Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg
			290					295					300		
Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser										
305					310										
<210>	423														
<211>	301														
<212>	PRT														
<213>	Artificial														
<220>															
<223>	Synthetic sequence														
<400>	423														
Gly	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro
1				5					10					15	

Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr
20				25				30							
Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Arg	Glu	Val	Gln	Lys	Tyr	Ser	Asp	Leu	Gly
35				40				45							
Pro	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr
50				55				60							
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val
65				70				75				80			
Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Gly	Glu	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile
85				90				95							
Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Pro	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro
100				105				110							
Ser	Pro	Glu	Pro	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	Thr	Pro	Glu
115				120				125							
Pro	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln
130				135				140							
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala
145				150				155				160			
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln
165				170				175							
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile
180				185				190							
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp
195				200				205							
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe
210				215				220							
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala
225				230				235				240			
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe
245				250				255							
Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile
260				265				270							
Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met
275				280				285							
Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser			
290				295				300							

<210> 424
 <211> 759
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 424

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

275	280	285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		
290	295	300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
325	330	335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr		
340	345	350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu		
355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu		
385	390	395
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro		
405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		
500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Ser His Pro Ile Pro Asp		
580	585	590

Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu
 595 600 605
 Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu
 610 615 620
 Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu
 625 630 635 640
 Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys
 645 650 655
 Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser
 660 665 670
 Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu
 675 680 685
 Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His
 690 695 700
 Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu
 705 710 715 720
 Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro
 725 730 735
 Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu
 740 745 750
 Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 755
 <210> 425
 <211> 762
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 425
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80

Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	
				85					90					95		
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	
				100					105					110		
Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	
				115					120					125		
Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	
				130					135					140		
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	
145					150					155					160	
Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	
				165					170					175		
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	
				180					185					190		
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	
				195					200					205		
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	
				210					215					220		
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	
225					230					235					240	
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	
				245					250					255		
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	
				260					265					270		
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	
				275					280					285		
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	
				290					295					300		
Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	
305					310					315					320	
Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	
				325					330					335		
Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	
				340					345					350		
Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	
				355					360					365		
Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	
				370					375					380		
Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	

385	390	395	400
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro			
	405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys			
	420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys			
	435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His			
	450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser			
465	470	475	480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr			
	485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp			
	500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala			
	515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu			
	530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys			
545	550	555	560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val			
	565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser His Pro			
	580	585	590
Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln			
	595	600	605
Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu			
	610	615	620
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu			
625	630	635	640
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu			
	645	650	655
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu			
	660	665	670
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu			
	675	680	685
Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu			
	690	695	700

Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu
 705 710 715 720
 Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro
 725 730 735
 Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro
 740 745 750
 Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 755 760
 <210> 426
 <211> 762
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 426
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu		
195	200	205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro		
210	215	220
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys		
225	230	235
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp		
	245	250
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser		
	260	265
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His		
	275	280
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		
290	295	300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
	325	330
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr		
	340	345
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu		
	355	360
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu		
385	390	395
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro		
	405	410
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
	420	425
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
	435	440
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
	485	490
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		

500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Glu Thr Gly Ser His Pro		
580	585	590
Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln		
595	600	605
Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu		
610	615	620
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu		
625	630	635
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu		
645	650	655
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu		
660	665	670
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu		
675	680	685
Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu		
690	695	700
Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu		
705	710	715
Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro		
725	730	735
Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro		
740	745	750
Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
755	760	
<210> 427		
<211> 767		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		

<400> 427

Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu
1				5					10					15	
Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln
			20					25					30		
Gln	Ala	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu
		35					40					45			
Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys
	50					55					60				
Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu
65				70					75					80	
Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro
			85					90					95		
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu
		100					105					110			
Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His
	115					120					125				
Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg
	130					135					140				
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg
145				150					155					160	
Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala
			165					170					175		
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser
		180				185					190				
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu
	195					200					205				
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro
	210				215					220					
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys
225				230					235					240	
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp
			245					250					255		
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser
		260					265						270		
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His
	275					280						285			
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser
	290					295					300				

Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala
305						310					315				320
Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg
				325					330					335	
Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr
			340					345					350		
Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu
		355					360					365			
Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro
	370					375					380				
Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu
385					390					395					400
Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro
			405						410					415	
Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys
			420					425					430		
Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys
		435					440					445			
Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His
	450					455					460				
Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser
465					470					475					480
Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr
			485						490					495	
Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp
		500						505					510		
Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala
		515					520						525		
Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu
	530					535					540				
Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys
545					550					555					560
Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val
			565						570					575	
Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
		580						585					590		
Gly	Gly	Ser	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly
		595					600					605			
Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr

610	615	620
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala		
625	630	635
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly		640
	645	650
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg		655
	660	665
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys		670
	675	680
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser		685
690	695	700
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala		
705	710	715
Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro		720
	725	730
Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu		735
	740	745
Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		750
755	760	765
<210> 428		
<211> 767		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 428		
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu		
1	5	10
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln		15
	20	25
Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu		30
	35	40
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys		45
50	55	60
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu		
65	70	75
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro		80
	85	90
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu		95

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

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		
500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly		
580	585	590
Glu Gly Thr His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly		
595	600	605
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr		
610	615	620
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala		
625	630	635
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly		
645	650	655
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg		
660	665	670
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys		
675	680	685
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser		
690	695	700
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala		
705	710	715
Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro		

	725		730		735
Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu					
	740		745		750
Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser					
	755		760		765
<210>	429				
<211>	772				
<212>	PRT				
<213>	Artificial				
<220>					
<223>	Synthetic sequence				
<400>	429				
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu					
1	5		10		15
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln					
	20		25		30
Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu					
	35		40		45
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys					
	50		55		60
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu					
65	70		75		80
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro					
	85		90		95
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu					
	100		105		110
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His					
	115		120		125
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg					
	130		135		140
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg					
145	150		155		160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala					
	165		170		175
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser					
	180		185		190
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu					
	195		200		205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro					

210	215	220
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys		
225	230	235
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp		240
245	250	255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser		
260	265	270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His		
275	280	285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		
290	295	300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
325	330	335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr		
340	345	350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu		
355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu		
385	390	395
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro		
405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		
500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
515	520	525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu			
530	535	540	
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys			
545	550	555	560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val			
	565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
	580	585	590
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro			
	595	600	605
Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp			
	610	615	620
Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr			
625	630	635	640
Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys			
	645	650	655
Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg			
	660	665	670
Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe			
	675	680	685
Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr			
	690	695	700
Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser			
705	710	715	720
Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala			
	725	730	735
Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly			
	740	745	750
Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro			
	755	760	765
Ser Tyr Ala Ser			
770			
<210>	430		
<211>	772		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	430		

Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu
1			5						10					15	
Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln
			20						25					30	
Gln	Ala	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu
			35						40					45	
Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys
			50						55					60	
Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu
65									70					75	
Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro
									85					90	
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu
									100					105	
Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His
									115					120	
Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg
									130					135	
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg
145									150					155	
Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala
									165					170	
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser
									180					185	
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu
									195					200	
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro
									210					215	
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys
225									230					235	
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp
									245					250	
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser
									260					265	
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His
									275					280	
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser
									290					295	
Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala
									300						

305	310	315	320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg			
	325	330	335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr			
	340	345	350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu			
	355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro			
	370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu			
385	390	395	400
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro			
	405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys			
	420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys			
	435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His			
	450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser			
465	470	475	480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr			
	485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp			
	500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala			
	515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu			
	530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys			
545	550	555	560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val			
	565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly			
	580	585	590
Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro			
	595	600	605
Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp			
	610	615	620

Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr
 625 630 635 640
 Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys
 645 650 655
 Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg
 660 665 670
 Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe
 675 680 685
 Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr
 690 695 700
 Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser
 705 710 715 720
 Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
 725 730 735
 Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
 740 745 750
 Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro
 755 760 765
 Ser Tyr Ala Ser
 770

<210> 431

<211> 777

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 431

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

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

				405						410					415		
Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys		
				420						425					430		
Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys		
				435						440					445		
Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His		
				450						455					460		
Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser		
465						470				475					480		
Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr		
				485						490					495		
Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp		
				500						505					510		
Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala		
				515						520					525		
Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu		
				530						535					540		
Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys		
545						550				555					560		
Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val		
				565						570					575		
Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly		
				580						585					590		
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	His	Pro	Ile		
				595						600					605		
Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg		
				610						615					620		
Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile		
625						630				635					640		
Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser		
				645						650					655		
Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly		
				660						665					670		
Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr		
				675						680					685		
Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu		
				690						695					700		
Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro		
705						710				715					720		

Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro
 725 730 735
 Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln
 740 745 750
 Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser
 755 760 765
 Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 770 775
 <210> 432
 <211> 777
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 432
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu		
195	200	205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro		
210	215	220
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys		
225	230	235
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp		
	245	250
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser		
	260	265
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His		
	275	280
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		
290	295	300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
	325	330
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr		
	340	345
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu		
	355	360
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu		
385	390	395
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro		
	405	410
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
	420	425
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
	435	440
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
	485	490
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		

500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly		
580	585	590
Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser His Pro Ile		
595	600	605
Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg		
610	615	620
Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile		
625	630	635
Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser		
645	650	655
Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly		
660	665	670
Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr		
675	680	685
Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu		
690	695	700
Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro		
705	710	715
Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro		
725	730	735
Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln		
740	745	750
Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser		
755	760	765
Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
770	775	
<210> 433		
<400> 433		
000		
<210> 434		

<211> 771
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 434
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser

260	265	270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His		
275	280	285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		
290	295	300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
325	330	335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr		
340	345	350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu		
355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu		
385	390	395
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro		
405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		
500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
565	570	575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
580	585	590
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu		
595	600	605
Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp		
610	615	620
Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val		
625	630	635
Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala		
645	650	655
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe		
660	665	670
Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp		
675	680	685
Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn		
690	695	700
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly		
705	710	715
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro		
725	730	735
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser		
740	745	750
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser		
755	760	765
Tyr Ala Ser		
770		
<210> 435		
<211> 771		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 435		
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu		
1	5	10
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln		
20	25	30
Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu		
35	40	45

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

355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp	Glu Phe Lys Pro Leu Val	Glu Glu Pro
370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys	Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu	
385	390	395
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val	Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro	
405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val	Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys	
420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His	Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys	
435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val	Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His	
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg	Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser	
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe	Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr	
485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala	Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp	
500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu	Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala	
515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys	Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu	
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala	Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys	
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe	Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val	
565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly	Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu	
580	585	590
Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser His	Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu	
595	600	605
Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg	Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp	
610	615	620
Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu	Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val	
625	630	635
Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro	Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala	
645	650	655
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile	Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe	
660	665	670

Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp		
675	680	685
Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn		
690	695	700
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly		
705	710	715
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro		
	725	730
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser		
	740	745
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser		
	755	760
Tyr Ala Ser		
770		
<210>	436	
<211>	780	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	
<400>	436	
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu		
1	5	10
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln		
	20	25
Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu		
	35	40
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys		
	50	55
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu		
65	70	75
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro		
	85	90
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu		
	100	105
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His		
	115	120
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg		
	130	135
		140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg			
145	150	155	160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala			
	165	170	175
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser			
	180	185	190
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu			
	195	200	205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro			
	210	215	220
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys			
225	230	235	240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp			
	245	250	255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser			
	260	265	270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His			
	275	280	285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser			
	290	295	300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala			
305	310	315	320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg			
	325	330	335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr			
	340	345	350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu			
	355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro			
	370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu			
385	390	395	400
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro			
	405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys			
	420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys			
	435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His			

450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		480
	485	490
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		495
	500	505
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		510
	515	520
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		525
	530	535
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		540
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		560
	565	570
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		575
	580	585
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu		590
	595	600
Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp		605
	610	615
Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val		620
625	630	635
Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala		640
	645	650
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe		655
	660	665
Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp		670
	675	680
Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn		685
	690	695
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn		700
705	710	715
Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu		720
	725	730
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu		735
	740	745
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val		750
	755	760
		765

Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 770 775 780
 <210> 437
 <211> 780
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 437
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp		
245	250	255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser		
260	265	270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His		
275	280	285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		
290	295	300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
325	330	335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr		
340	345	350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu		
355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu		
385	390	395
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro		
405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		
500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		

545	550	555	560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val			
	565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu			
	580	585	590
Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu			
	595	600	605
Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp			
	610	615	620
Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val			
625	630	635	640
Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala			
	645	650	655
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe			
	660	665	670
Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp			
	675	680	685
Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn			
	690	695	700
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn			
705	710	715	720
Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu			
	725	730	735
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu			
	740	745	750
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val			
	755	760	765
Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
	770	775	780
<210> 438			
<400> 438			
000			
<210> 439			
<400> 439			
000			
<210> 440			
<211> 767			
<212> PRT			
<213> Artificial			

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 440

His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val
1				5					10					15	
Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His
			20					25					30		
Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser
		35					40				45				
Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln
	50					55				60					
Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly
65				70					75					80	
Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg
			85					90					95		
Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His
			100					105					110		
Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu
	115						120				125				
Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu
	130					135				140					
Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val
145				150						155				160	
Glu	Pro	Ser	Gln	Glu	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser	Gly	Glu	Thr	Gly
			165						170				175		
Ser	Ser	Gly	Glu	Gly	Thr	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg
		180					185					190			
Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala
	195						200					205			
Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Ala	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu
	210					215				220					
Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser
225				230						235				240	
Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu
			245						250				255		
Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys
		260						265				270			
Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys
	275						280					285			

Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val
290						295					300				
Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr
305					310					315					320
Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu
				325						330				335	
Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln
			340					345					350		
Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg
		355					360					365			
Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser
370						375					380				
Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg
385					390					395					400
Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu
			405						410					415	
Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu
		420						425					430		
Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu
		435					440					445			
Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro
450						455					460				
Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met
465					470					475					480
Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp
			485						490				495		
Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe
		500						505				510			
Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu
		515					520					525			
Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala
		530				535				540					
Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys
545					550					555					560
Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu
			565					570					575		
Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg
		580					585					590			
Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val

595	600	605
Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu		
610	615	620
Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn		
625	630	635
Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr		
645	650	655
Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala		
660	665	670
Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr		
675	680	685
Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln		
690	695	700
Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys		
705	710	715
Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe		
725	730	735
Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu		
740	745	750
Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu		
755	760	765
<210> 441		
<211> 777		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 441		
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val		
1	5	10
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His		
20	25	30
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser		
35	40	45
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln		
50	55	60
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly		
65	70	75
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg		

	85		90		95
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His					
100		105		110	
Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu					
115		120		125	
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu					
130		135		140	
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val					
145		150		155	
Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Glu Thr Gly					
165		170		175	
Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser					
180		185		190	
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu					
195		200		205	
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln					
210		215		220	
Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu					
225		230		235	
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys					
245		250		255	
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu					
260		265		270	
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro					
275		280		285	
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu					
290		295		300	
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His					
305		310		315	
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg					
325		330		335	
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg					
340		345		350	
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala					
355		360		365	
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser					
370		375		380	
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu					
385		390		395	
				400	

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro		
405	410	415
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys		
420	425	430
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp		
435	440	445
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser		
450	455	460
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His		
465	470	475
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		
485	490	495
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
500	505	510
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
515	520	525
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr		
530	535	540
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu		
545	550	555
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
565	570	575
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu		
580	585	590
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro		
595	600	605
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
610	615	620
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
625	630	635
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
645	650	655
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
660	665	670
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
675	680	685
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		
690	695	700
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		

705	710	715	720
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu			
	725	730	735
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys			
	740	745	750
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val			
	755	760	765
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu			
	770	775	
<210>	442		
<211>	787		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	442		
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val			
1	5	10	15
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His			
	20	25	30
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser			
	35	40	45
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln			
	50	55	60
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly			
65	70	75	80
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg			
	85	90	95
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His			
	100	105	110
Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu			
	115	120	125
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu			
	130	135	140
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val			
145	150	155	160
Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Glu Thr Gly			
	165	170	175
Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser			

			180						185					190			
Gly	Thr	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	Gly	Gly	Ser	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu		
			195						200					205			
Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu		
			210						215					220			
Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Ala	Pro	Phe	Glu	Asp		
225						230					235				240		
His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val		
				245						250					255		
Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe		
			260							265					270		
Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu		
			275						280					285			
Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe		
			290				295							300			
Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro		
305					310						315				320		
Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe		
				325						330					335		
Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr		
			340						345						350		
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr		
			355						360						365		
Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu		
			370						375						380		
Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu		
385					390						395				400		
Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp		
				405						410					415		
Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu		
			420							425					430		
Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys		
			435						440						445		
His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys		
			450				455								460		
Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys		
465					470						475				480		
Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu		
				485						490					495		

Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val		
500	505	510
Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe		
515	520	525
Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser		
530	535	540
Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu		
545	550	555
Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe		
565	570	575
Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln		
580	585	590
Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala		
595	600	605
Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr		
610	615	620
Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys		
625	630	635
Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser		
645	650	655
Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser		
660	665	670
Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro		
675	680	685
Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe		
690	695	700
Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu		
705	710	715
Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys		
725	730	735
His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp		
740	745	750
Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr		
755	760	765
Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala		
770	775	780
Leu Gly Leu		
785		
<210> 443		

<211> 786
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 443
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60
 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
 Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
 115 120 125
 Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140
 Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
 165 170 175
 Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly
 180 185 190
 Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val
 195 200 205
 Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val
 210 215 220
 Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ala Pro Phe Glu Asp His
 225 230 235 240
 Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala
 245 250 255
 Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly

260	265	270
Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr	Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met	
275	280	285
Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu		
290	295	300
Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu		
305	310	315
Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu		
325	330	335
Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala		
340	345	350
Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu		
355	360	365
Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp		
370	375	380
Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys		
385	390	395
Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala		
405	410	415
Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val		
420	425	430
Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His		
435	440	445
Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr		
450	455	460
Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys		
465	470	475
Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn		
485	490	495
Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu		
500	505	510
Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu		
515	520	525
Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val		
530	535	540
Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys		
545	550	555
Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp		
565	570	575

Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn		
580	585	590
Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu		
595	600	605
Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu		
610	615	620
Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys		
625	630	635
His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val		
645	650	655
Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp		
660	665	670
Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys		
675	680	685
Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn		
690	695	700
Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys		
705	710	715
Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His		
725	730	735
Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe		
740	745	750
Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys		
755	760	765
Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu		
770	775	780
Gly Leu		
785		
<210> 444		
<400> 444		
000		
<210> 445		
<400> 445		
000		
<210> 446		
<211> 964		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		

<223> Synthetic sequence

<400> 446

His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val
1			5					10					15		
Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His
		20					25					30			
Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser
		35				40					45				
Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln
	50				55					60					
Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly
65				70					75					80	
Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg
				85				90						95	
Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His
			100					105					110		
Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu
		115				120						125			
Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu
	130					135				140					
Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val
145					150					155				160	
Glu	Pro	Ser	Gln	Glu	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser	Gly	Glu	Thr	Gly
				165					170					175	
Ser	Ser	Gly	Glu	Gly	Thr	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Glu	Ser
		180					185					190			
Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu
		195				200						205			
Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln
	210					215					220				
Gln	Ala	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu
225					230				235					240	
Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys
				245					250					255	
Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu
			260					265					270		
Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro
		275					280						285		
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu

290	295	300
Pro Arg Leu Val Arg	Pro Glu Val Asp Val	Met Cys Thr Ala Phe His
305	310	315
Asp Asn Glu Glu Thr	Phe Leu Lys Lys Tyr	Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
325	330	335
Arg His Pro Tyr Phe	Tyr Ala Pro Glu Leu	Leu Phe Phe Ala Lys Arg
340	345	350
Tyr Lys Ala Ala Phe	Thr Glu Cys Cys Gln	Ala Ala Asp Lys Ala Ala
355	360	365
Cys Leu Leu Pro Lys	Leu Asp Glu Leu Arg	Asp Glu Gly Lys Ala Ser
370	375	380
Ser Ala Lys Gln Arg	Leu Lys Cys Ala Ser	Leu Gln Lys Phe Gly Glu
385	390	395
Arg Ala Phe Lys Ala	Trp Ala Val Ala Arg	Leu Ser Gln Arg Phe Pro
405	410	415
Lys Ala Glu Phe Ala	Glu Val Ser Lys Leu	Val Thr Asp Leu Thr Lys
420	425	430
Val His Thr Glu Cys	Cys His Gly Asp Leu	Leu Glu Cys Ala Asp Asp
435	440	445
Arg Ala Asp Leu Ala	Lys Tyr Ile Cys Glu	Asn Gln Asp Ser Ile Ser
450	455	460
Ser Lys Leu Lys Glu	Cys Cys Glu Lys Pro	Leu Leu Glu Lys Ser His
465	470	475
Cys Ile Ala Glu Val	Glu Asn Asp Glu Met	Pro Ala Asp Leu Pro Ser
485	490	495
Leu Ala Ala Asp Phe	Val Glu Ser Lys Asp	Val Cys Lys Asn Tyr Ala
500	505	510
Glu Ala Lys Asp Val	Phe Leu Gly Met Phe	Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
515	520	525
Arg His Pro Asp Tyr	Ser Val Val Leu Leu	Leu Arg Leu Ala Lys Thr
530	535	540
Tyr Glu Thr Thr Leu	Glu Lys Cys Cys Ala	Ala Ala Asp Pro His Glu
545	550	555
Cys Tyr Ala Lys Val	Phe Asp Glu Phe Lys	Pro Leu Val Glu Glu Pro
565	570	575
Gln Asn Leu Ile Lys	Gln Asn Cys Glu Leu	Phe Glu Gln Leu Gly Glu
580	585	590
Tyr Lys Phe Gln Asn	Ala Leu Leu Val Arg	Tyr Thr Lys Lys Val Pro
595	600	605

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys			
610	615	620	
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys			
625	630	635	640
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His			
	645	650	655
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser			
	660	665	670
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr			
	675	680	685
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp			
690	695	700	
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala			
705	710	715	720
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu			
	725	730	735
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys			
	740	745	750
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val			
	755	760	765
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
770	775	780	
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro			
785	790	795	800
Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp			
	805	810	815
Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr			
	820	825	830
Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys			
	835	840	845
Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg			
850	855	860	
Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe			
865	870	875	880
Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr			
	885	890	895
Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser			
	900	905	910
Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala			

915	920	925
Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly		
930	935	940
Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro		
945	950	955
Ser Tyr Ala Ser		
<210> 447		
<211> 982		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 447		
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val		
1 5 10 15		
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His		
20 25 30		
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser		
35 40 45		
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln		
50 55 60		
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly		
65 70 75 80		
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg		
85 90 95		
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His		
100 105 110		
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro		
115 120 125		
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro		
130 135 140		
Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val		
145 150 155 160		
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser		
165 170 175		
Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly		
180 185 190		
Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val		
195 200 205		

Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val		
210	215	220
Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ala Pro Phe Glu Asp His		
225	230	235 240
Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala		
	245	250 255
Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly		
	260	265 270
Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met		
	275	280 285
Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu		
	290	295 300
Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu		
305	310	315 320
Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu		
	325	330 335
Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala		
	340	345 350
Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu		
	355	360 365
Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp		
	370	375 380
Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys		
385	390	395 400
Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala		
	405	410 415
Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val		
	420	425 430
Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His		
	435	440 445
Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr		
	450	455 460
Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys		
465	470	475 480
Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn		
	485	490 495
Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu		
	500	505 510
Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu		

515	520	525
Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val		
530	535	540
Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys		
545	550	555
Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp		
565	570	575
Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn		
580	585	590
Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu		
595	600	605
Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu		
610	615	620
Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys		
625	630	635
His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val		
645	650	655
Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp		
660	665	670
Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys		
675	680	685
Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn		
690	695	700
Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys		
705	710	715
Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His		
725	730	735
Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe		
740	745	750
Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys		
755	760	765
Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu		
770	775	780
Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
785	790	795
Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln		
805	810	815
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala		
820	825	830

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 835 840 845
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 850 855 860
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 865 870 875 880
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 885 890 895
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 900 905 910
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
 915 920 925
 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 930 935 940
 Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 945 950 955 960
 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 965 970 975
 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 980
 <210> 448
 <211> 963
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 448
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60
 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95

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

				405				410				415			
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys
				420				425				430			
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp
				435				440				445			
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser
				450				455				460			
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His
465				470				475				480			
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser
				485				490				495			
Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala
				500				505				510			
Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg
				515				520				525			
Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr
				530				535				540			
Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu
545				550				555				560			
Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro
				565				570				575			
Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu
				580				585				590			
Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro
				595				600				605			
Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys
				610				615				620			
Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys
625				630				635				640			
Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His
				645				650				655			
Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser
				660				665				670			
Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr
				675				680				685			
Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp
690				695				700							
Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala
705				710				715				720			

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
725	730	735
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
740	745	750
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
755	760	765
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
770	775	780
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu		
785	790	800
Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp		
805	810	815
Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val		
820	825	830
Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala		
835	840	845
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe		
850	855	860
Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp		
865	870	880
Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn		
885	890	895
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly		
900	905	910
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro		
915	920	925
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser		
930	935	940
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser		
945	950	960
Tyr Ala Ser		
<210> 449		
<211> 981		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 449		
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val		

1	5	10	15
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His			
20	25	30	
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser			
35	40	45	
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln			
50	55	60	
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly			
65	70	75	80
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg			
85	90	95	
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His			
100	105	110	
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro			
115	120	125	
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro			
130	135	140	
Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val			
145	150	155	160
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser			
165	170	175	
Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly			
180	185	190	
Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val			
195	200	205	
Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val			
210	215	220	
Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ala Pro Phe Glu Asp His			
225	230	235	240
Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala			
245	250	255	
Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly			
260	265	270	
Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met			
275	280	285	
Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu			
290	295	300	
Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu			
305	310	315	320

Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu
				325					330					335	
Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala
			340					345					350		
Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu
			355				360					365			
Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp
			370				375					380			
Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys
385					390					395					400
Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala
				405					410					415	
Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val
			420						425					430	
Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His
			435				440					445			
Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr
	450					455					460				
Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys
465					470					475					480
Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn
				485					490					495	
Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu
			500					505					510		
Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu
			515				520					525			
Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val
	530					535					540				
Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys
545					550					555					560
Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp
				565					570					575	
Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn
			580					585					590		
Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu
			595				600					605			
Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu
	610					615					620				
Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys

625	630	635	640
His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val			
	645	650	655
Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp			
	660	665	670
Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys			
	675	680	685
Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn			
	690	695	700
Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys			
705	710	715	720
Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His			
	725	730	735
Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe			
	740	745	750
Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys			
	755	760	765
Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu			
	770	775	780
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
785	790	795	800
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val			
	805	810	815
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His			
	820	825	830
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser			
	835	840	845
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln			
	850	855	860
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly			
865	870	875	880
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg			
	885	890	895
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His			
	900	905	910
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro			
	915	920	925
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro			
	930	935	940

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 945 950 955 960
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
 965 970 975
 Pro Ser Tyr Ala Ser
 980
 <210> 450
 <211> 974
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 450
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60
 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
 Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu
 115 120 125
 Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu
 130 135 140
 Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val
 145 150 155 160
 Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Glu Thr Gly
 165 170 175
 Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser
 180 185 190
 Gly Thr Gly Glu Ser Gly Glu Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu
 195 200 205

Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu
210						215					220				
Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Ala	Pro	Phe	Glu	Asp
225					230				235					240	
His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val
			245					250						255	
Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe
		260						265					270		
Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu
	275						280					285			
Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe
290						295					300				
Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro
305					310					315				320	
Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe
			325					330						335	
Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr
		340						345					350		
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr
	355						360					365			
Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu
370						375					380				
Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu
385					390					395				400	
Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp
			405					410					415		
Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu
		420						425					430		
Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys
	435						440					445			
His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys
	450					455					460				
Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys
465					470					475				480	
Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu
			485					490					495		
Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val
		500						505					510		
Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe

515	520	525
Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser		
530	535	540
Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu		
545	550	555
Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe		
565	570	575
Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln		
580	585	590
Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala		
595	600	605
Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr		
610	615	620
Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys		
625	630	635
Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser		
645	650	655
Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser		
660	665	670
Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro		
675	680	685
Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe		
690	695	700
Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu		
705	710	715
Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys		
725	730	735
His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp		
740	745	750
Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr		
755	760	765
Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala		
770	775	780
Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
785	790	795
Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly		
805	810	815
Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu		
820	825	830

Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp
835 840 845
Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val
850 855 860
Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro
865 870 875 880
Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser
885 890 895
Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu
900 905 910
Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg
915 920 925
Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly
930 935 940
Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser
945 950 955 960
Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
965 970

<210> 451

<211> 992

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 451

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

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

	420		425		430
Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe	Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp				
435		440		445	
Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys					
450		455		460	
Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp					
465		470		475	480
Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu					
	485		490		495
Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp					
500		505		510	
Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys					
515		520		525	
Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu					
530		535		540	
Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu					
545		550		555	560
Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp					
	565		570		575
Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val					
580		585		590	
Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln					
595		600		605	
Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys					
610		615		620	
Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn					
625		630		635	640
Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg					
	645		650		655
Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys					
660		665		670	
Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys					
675		680		685	
Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val					
690		695		700	
Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe					
705		710		715	720
His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys					
	725		730		735

Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys		
740	745	750
Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys		
755	760	765
Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys		
770	775	780
Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly		
785	790	795
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp		
805	810	815
Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu		
820	825	830
Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu		
835	840	845
Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu		
850	855	860
Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys		
865	870	875
Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser		
885	890	895
Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu		
900	905	910
Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His		
915	920	925
Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro		
930	935	940
Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro		
945	950	955
Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro		
965	970	975
Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
980	985	990

<210> 452

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 452

Gly	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro
1				5					10					15	
Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	His	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Gln	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu
		35					40					45			
Phe	Thr	Val	Pro	Tyr	Ser	Gln	Thr	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys
	50					55					60				
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Tyr	Gly	Ser	Lys
65					70					75					80
Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Glu	Ile	Glu	Lys	Pro
				85					90					95	
Ser	Gln	Gly	Ser	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe
			100					105						110	
Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln
		115					120					125			
Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala
	130						135					140			
Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro
145					150					155					160
Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln
			165					170						175	
Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala
			180					185					190		
Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln
		195					200					205			
Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro
	210					215					220				
Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro
225					230					235					240
Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro
			245						250					255	
Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser
			260					265						270	
<210>	453														
<211>	275														
<212>	PRT														
<213>	Artificial														
<220>															

<223> Synthetic sequence

<400> 453

Gly	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro
1				5				10						15	
Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	His	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Gln	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu
		35					40					45			
Phe	Thr	Val	Pro	Tyr	Ser	Gln	Thr	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys
	50					55					60				
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Tyr	Gly	Ser	Lys
65					70					75					80
Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Glu	Ile	Glu	Lys	Pro
				85				90						95	
Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu
			100					105						110	
Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp
		115					120							125	
Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val
		130				135						140			
Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala
145					150					155					160
Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe
				165					170					175	
Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp
			180					185						190	
Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn
		195					200					205			
Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly
		210				215						220			
Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro
225					230					235					240
Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser
				245					250					255	
Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser
			260					265						270	
Tyr	Ala	Ser													
		275													

<210> 454

<211> 280
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 454
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro
 85 90 95
 Ser Gln Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp His Pro Ile Pro
 100 105 110
 Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
 115 120 125
 Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
 130 135 140
 Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
 145 150 155 160
 Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
 165 170 175
 Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
 180 185 190
 Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
 195 200 205
 Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
 210 215 220
 His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
 225 230 235 240
 Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
 245 250 255
 Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln

	260		265		270
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser					
	275		280		
<210>	455				
<211>	280				
<212>	PRT				
<213>	Artificial				
<220>					
<223>	Synthetic sequence				
<400>	455				
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro					
1	5		10		15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr					
	20		25		30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu					
	35		40		45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys					
	50		55		60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys					
65	70		75		80
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro					
	85		90		95
Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro					
	100		105		110
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr					
	115		120		125
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg					
	130		135		140
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu					
145	150		155		160
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val					
	165		170		175
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly					
	180		185		190
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu					
	195		200		205
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu					
	210		215		220
His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly					

225	230	235	240
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro			
	245	250	255
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln			
	260	265	270
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
	275	280	
<210> 456			
<211> 282			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Synthetic sequence			
<400> 456			
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro			
1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr			
	20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu			
	35	40	45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
	50	55	60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys			
65	70	75	80
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro			
	85	90	95
Ser Gln Gly Ser His His His His His His His Gly Ser His Pro			
	100	105	110
Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln			
	115	120	125
Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu			
	130	135	140
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu			
145	150	155	160
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu			
	165	170	175
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu			
	180	185	190
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu			

195	200	205
Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu		
210	215	220
Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu		
225	230	235
Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro		
245	250	255
Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro		
260	265	270
Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
275	280	
<210> 457		
<211> 285		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 457		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro		
1	5	10
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr		
20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu		
35	40	45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
50	55	60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys		
65	70	75
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro		
85	90	95
Ser Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
100	105	110
Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln		
115	120	125
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala		
130	135	140
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln		
145	150	155
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile		

	165		170		175
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp					
	180		185		190
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe					
	195		200		205
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala					
	210		215		220
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe					
225		230		235	240
Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile					
	245		250		255
Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met					
	260		265		270
Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser					
	275		280		285
<210>	458				
<211>	285				
<212>	PRT				
<213>	Artificial				
<220>					
<223>	Synthetic sequence				
<400>	458				
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro					
1	5		10		15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr					
	20		25		30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu					
	35		40		45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys					
	50		55		60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys					
65		70		75	80
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro					
	85		90		95
Ser Gln Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly					
	100		105		110
Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln					
	115		120		125
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala					

130	135	140
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln		
145	150	155
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile		
165	170	175
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp		
180	185	190
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe		
195	200	205
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala		
210	215	220
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe		
225	230	235
Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile		
245	250	255
Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met		
260	265	270
Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
275	280	285
<210> 459		
<211> 286		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 459		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro		
1	5	10
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr		
20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu		
35	40	45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
50	55	60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys		
65	70	75
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro		
85	90	95
Ser Gln Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser		

100	105	110
Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly		
115	120	125
Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu		
130	135	140
Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp		
145	150	155
Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val		
165	170	175
Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro		
180	185	190
Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser		
195	200	205
Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu		
210	215	220
Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg		
225	230	235
Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly		
245	250	255
Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser		
260	265	270
Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
275	280	285
<210> 460		
<211> 288		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 460		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro		
1	5	10
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr		
20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu		
35	40	45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
50	55	60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys		

65	70	75	80
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro			
	85	90	95
Ser Gln Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr			
	100	105	110
Pro Ser Pro Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe			
	115	120	125
Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln			
	130	135	140
Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala			
145	150	155	160
Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro			
	165	170	175
Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln			
	180	185	190
Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala			
	195	200	205
Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln			
	210	215	220
Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro			
225	230	235	240
Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro			
	245	250	255
Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro			
	260	265	270
Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
	275	280	285
<210>	461		
<211>	293		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	461		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro			
1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr			
	20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu			

35	40	45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
50	55	60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys		
65	70	75
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro		
85	90	95
Ser Gln Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu		
100	105	110
Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser		
115	120	125
Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr		
130	135	140
Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly		
145	150	155
Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu		
165	170	175
Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser		
180	185	190
Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His		
195	200	205
Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly		
210	215	220
Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly		
225	230	235
Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro		
245	250	255
Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val		
260	265	270
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser		
275	280	285
Pro Ser Tyr Ala Ser		
290		
<210>	462	
<211>	295	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	

<400> 462

Gly	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro
1				5				10						15	
Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	His	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Gln	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu
		35					40					45			
Phe	Thr	Val	Pro	Tyr	Ser	Gln	Thr	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys
	50					55					60				
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Tyr	Gly	Ser	Lys
65					70				75					80	
Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Glu	Ile	Glu	Lys	Pro
			85					90					95		
Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		100						105					110		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	His	Pro	Ile	Pro	Asp
	115							120				125			
Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu
	130					135					140				
Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu
145					150				155					160	
Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu
			165					170					175		
Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys
		180						185					190		
Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser
	195					200					205				
Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu
	210					215				220					
Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His
225				230					235					240	
Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu
			245					250					255		
Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro
		260						265					270		
Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly
	275						280					285			
Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser									
	290					295									

<210> 463
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 463
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro
 85 90 95
 Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu
 100 105 110
 Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro
 115 120 125
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 130 135 140
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 145 150 155 160
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 165 170 175
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 180 185 190
 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 195 200 205
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 210 215 220
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 225 230 235 240
 Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu
 245 250 255

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu
 260 265 270
 Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val
 275 280 285
 Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 290 295 300
 <210> 464
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 464
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro
 85 90 95
 Ser Gln Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr
 100 105 110
 Pro Ser Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro
 115 120 125
 Pro Thr Pro Ser Pro Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu
 130 135 140
 Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala
 145 150 155 160
 Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly
 165 170 175
 Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu
 180 185 190
 Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu
 195 200 205

Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro
 210 215 220
 Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val
 225 230 235 240
 Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg
 245 250 255
 Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro
 260 265 270
 Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser
 275 280 285
 Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr
 290 295 300
 Ala Ser
 305
 <210> 465
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 465
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro
 85 90 95
 Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu
 100 105 110
 Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp
 115 120 125
 Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val
 130 135 140

Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala
 145 150 155 160
 Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe
 165 170 175
 Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp
 180 185 190
 Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn
 195 200 205
 Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly
 210 215 220
 Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
 245 250 255
 Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser
 260 265 270

Tyr Ala Ser
 275

<210> 466

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 466

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro
 85 90 95
 Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu
 100 105 110

Pro	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu
115				120				125							
Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala
130				135				140							
Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly
145				150				155				160			
Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu
165				170				175							
Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu
180				185				190							
Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro
195				200				205							
Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val
210				215				220							
Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg
225				230				235				240			
Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro
245				250				255							
Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser
260				265				270							
Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr
275				280				285							
Ala Ser															
290															
<210> 467															
<211> 310															
<212> PRT															
<213> Artificial															
<220>															
<223> Synthetic sequence															
<400> 467															
Gly	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro
1				5				10				15			
Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	His	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Gln	Asn	Ser	Tyr
20				25				30							
Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu
35				40				45							
Phe	Thr	Val	Pro	Tyr	Ser	Gln	Thr	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys
50				55				60							

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys			
65	70	75	80
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro			
	85	90	95
Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu			
	100	105	110
Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro			
	115	120	125
Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser			
	130	135	140
Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr			
145	150	155	160
Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp			
	165	170	175
Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln			
	180	185	190
Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr			
	195	200	205
Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu			
	210	215	220
His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp			
225	230	235	240
Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu			
	245	250	255
Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro			
	260	265	270
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp			
	275	280	285
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg			
	290	295	300
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
305	310		
<210>	468		
<211>	290		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	468		

Gly	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro
1				5					10					15	
Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	His	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Gln	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu
		35					40					45			
Phe	Thr	Val	Pro	Tyr	Ser	Gln	Thr	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys
	50					55					60				
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Tyr	Gly	Ser	Lys
65					70					75				80	
Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Glu	Ile	Glu	Lys	Pro
				85				90					95		
Ser	Gln	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	Pro	Thr	Pro	Glu
			100					105					110		
Pro	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu
		115					120					125			
Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala
	130					135					140				
Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly
145					150					155				160	
Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu
				165				170					175		
Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu
			180					185					190		
Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro
		195					200					205			
Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val
	210					215				220					
Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg
225					230					235				240	
Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro
				245					250				255		
Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser
			260					265				270			
Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr
		275						280				285			
Ala	Ser														
	290														
<210>	469														

<211> 284
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 469
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro
 85 90 95
 Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Gly Gly Gly Ser Pro Thr Pro Glu Pro
 100 105 110
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 115 120 125
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 130 135 140
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 145 150 155 160
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 165 170 175
 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 180 185 190
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 195 200 205
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 210 215 220
 Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu
 225 230 235 240
 Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu
 245 250 255
 Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val

	260		265		270
Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser					
	275		280		
<210>	470				
<211>	284				
<212>	PRT				
<213>	Artificial				
<220>					
<223>	Synthetic sequence				
<400>	470				
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro					
1	5		10		15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr					
	20		25		30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu					
	35		40		45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys					
	50		55		60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys					
65	70		75		80
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro					
	85		90		95
Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Glu Glu Glu Asp Pro Thr Pro Glu Pro					
	100		105		110
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val					
	115		120		125
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His					
	130		135		140
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser					
145	150		155		160
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln					
	165		170		175
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly					
	180		185		190
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg					
	195		200		205
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His					
	210		215		220
Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu					

225	230	235	240
Pro Leu Pro Gly Leu	Pro Pro Ala Pro	Pro Glu Pro Pro	Gly Ile Leu
	245	250	255
Ala Pro Gln Pro Pro	Asp Val Gly Ser	Ser Asp Pro Leu	Ser Met Val
	260	265	270
Glu Pro Ser Gln Gly	Arg Ser Pro Ser	Tyr Ala Ser	
	275	280	
<210>	471		
<211>	294		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	471		
Gly Val Ser Asp Val	Pro Arg Asp Leu	Glu Val Val Ala	Ala Thr Pro
1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile	Ser Trp His Ser	Tyr Tyr Glu Gln	Asn Ser Tyr
	20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr	Gly Glu Thr Gly	Gly Asn Ser Pro	Val Gln Glu
	35	40	45
Phe Thr Val Pro Tyr	Ser Gln Thr Thr	Ala Thr Ile Ser	Gly Leu Lys
	50	55	60
Pro Gly Val Asp Tyr	Thr Ile Thr Val	Tyr Ala Val Tyr	Gly Ser Lys
65	70	75	80
Tyr Tyr Tyr Pro Ile	Ser Ile Asn Tyr	Arg Thr Glu Ile	Glu Lys Pro
	85	90	95
Ser Gln Pro Ser Pro	Glu Pro Pro Thr	Pro Glu Pro Glu	Glu Glu Asp
	100	105	110
Pro Ser Pro Glu Pro	Pro Thr Pro Glu	Pro His Pro Ile	Pro Asp Ser
	115	120	125
Ser Pro Leu Leu Gln	Phe Gly Gly Gln	Val Arg Gln Arg	Tyr Leu Tyr
	130	135	140
Thr Asp Asp Ala Gln	Gln Thr Glu Ala	His Leu Glu Ile	Arg Glu Asp
145	150	155	160
Gly Thr Val Gly Gly	Ala Ala Asp Gln	Ser Pro Glu Ser	Leu Leu Gln
	165	170	175
Leu Lys Ala Leu Lys	Pro Gly Val Ile	Gln Ile Leu Gly	Val Lys Thr
	180	185	190
Ser Arg Phe Leu Cys	Gln Arg Pro Asp	Gly Ala Leu Tyr	Gly Ser Leu

195	200	205
His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp		
210	215	220
Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu		
225	230	235
Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro		
245	250	255
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp		
260	265	270
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg		
275	280	285
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
290		
<210> 472		
<211> 304		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 472		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro		
1	5	10
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr		
20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu		
35	40	45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
50	55	60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys		
65	70	75
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro		
85	90	95
Ser Gln Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu		
100	105	110
Pro Glu Glu Glu Asp Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro		
115	120	125
Ser Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe		
130	135	140
Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln		

145	150	155	160
Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala			
	165	170	175
Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro			
	180	185	190
Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln			
	195	200	205
Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala			
	210	215	220
Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln			
225	230	235	240
Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro			
	245	250	255
Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro			
	260	265	270
Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro			
	275	280	285
Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
	290	295	300
<210>	473		
<211>	305		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	473		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro			
1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr			
	20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu			
	35	40	45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
	50	55	60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys			
65	70	75	80
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro			
	85	90	95
Ser Gln Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu			

100	105	110
Pro Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro		
115	120	125
Pro Ser Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln		
130	135	140
Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln		
145	150	155
Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly		
165	170	175
Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys		
180	185	190
Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys		
195	200	205
Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu		
210	215	220
Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr		
225	230	235
Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly		
245	250	255
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu		
260	265	270
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp		
275	280	285
Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala		
290	295	300
Ser		
305		
<210> 474		
<211> 296		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 474		
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro		
1	5	10
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr		
20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu		

35	40	45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
50	55	60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys		
65	70	75
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro		
85	90	95
Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Thr Pro Glu Pro Ser Pro Glu Pro Pro		
100	105	110
Thr Pro Glu Pro Ser Pro Glu Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro		
115	120	125
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr		
130	135	140
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg		
145	150	155
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu		
165	170	175
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val		
180	185	190
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly		
195	200	205
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu		
210	215	220
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu		
225	230	235
His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly		
245	250	255
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro		
260	265	270
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln		
275	280	285
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
290	295	
<210>	475	
<211>	414	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic sequence	

<400> 475

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20					25					30		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			35					40					45		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
			50				55					60			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100						105				110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			115					120					125		
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
			130				135						140		
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150					155					160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				165						170				175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			180					185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
			195				200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
			210				215				220				
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
225					230					235					240
Gly	Ser	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly
				245					250					255	
Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu
			260					265					270		
Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp
			275				280					285			
Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val
			290				295					300			

Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro
305						310				315					320
Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser
						325				330					335
Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu
						340				345					350
Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg
						355									365
Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly
						370									380
Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser
385						390									400
Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser		
						405									410

<210> 476

<211> 427

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 476

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
225	230	235	240
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser His			
	245	250	255
Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg			
	260	265	270
Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu			
	275	280	285
Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro			
	290	295	300
Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile			
305	310	315	320
Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala			
	325	330	335
Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu			
	340	345	350
Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly			
	355	360	365
Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro			
	370	375	380
Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala			
385	390	395	400
Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu			
	405	410	415
Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
	420	425	
<210>	477		
<211>	429		
<212>	PRT		

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 477

```

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

```

275	280	285
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln		
290	295	300
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile		
305	310	315
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp		
325	330	335
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe		
340	345	350
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala		
355	360	365
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe		
370	375	380
Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile		
385	390	395
Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met		
405	410	415
Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
420	425	
<210> 478		
<211> 414		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic sequence		
<400> 478		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
1	5	10
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
20	25	30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
35	40	45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
50	55	60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
65	70	75
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
85	90	95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		

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

<210> 479
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 479
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys Gly Ser His His His His His His His Gly Ser His
 225 230 235 240
 Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
 245 250 255

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu																			
260																			
Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro																			
275																			
Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile																			
290																			
Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala																			
305																			
Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu																			
Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly																			
Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro																			
Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala																			
Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu																			
Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser																			
<210>	480																		
<211>	416																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial																		
<220>																			
<223>	Synthetic sequence																		
<400>	480																		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly																			
1																			
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met																			
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His																			
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val																			
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr																			
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly																			

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

	405	410	415
<210>	481		
<211>	415		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	481		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
1	5	10	15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	20	25	30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
	35	40	45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
	50	55	60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
65	70	75	80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
	85	90	95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	100	105	110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	130	135	140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220
Pro Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
225	230	235	240
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly			

			245				250				255					
Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	
			260				265				270					
Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	
			275				280				285					
Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	
			290				295				300					
Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	
305					310				315				320			
Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	
			325				330				335					
Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	
			340				345				350					
Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala	
			355				360				365					
Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	
			370				375				380					
Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	
385					390				395				400			
Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser		
			405				410				415					
<210>	482															
<211>	414															
<212>	PRT															
<213>	Artificial															
<220>																
<223>	Synthetic sequence															
<400>	482															
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
1				5			10						15			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
			20				25				30					
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
			35			40			45							
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
			50			55			60							
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
65					70				75				80			
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	

				85						90					95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
				100						105					110	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
				115						120					125	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
				130						135					140	
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
145						150					155				160	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
				165						170					175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
				180						185					190	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
				195						200					205	
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
				210						215					220	
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
225						230					235				240	
Gly	Ser	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	
				245						250					255	
Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	
				260						265					270	
Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	
				275						280					285	
Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	
				290						295					300	
Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	
305						310					315				320	
Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	
				325						330					335	
Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	
				340						345					350	
Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	
				355						360					365	
Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	
				370						375					380	
Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	
385						390					395				400	

Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 405 410

<210> 483
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 483

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

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

<210> 484

<211> 413

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 484

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
	85	90	95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	100	105	110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	130	135	140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
225	230	235	240
Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly			
	245	250	255
Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu			
	260	265	270
Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp			
	275	280	285
Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val			
	290	295	300
Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro			
305	310	315	320
Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser			
	325	330	335
Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu			
	340	345	350
Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg			
	355	360	365
Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly			
	370	375	380
Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser			

385	390	395	400
Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala			
	405	410	
<210> 485			
<211> 411			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Synthetic sequence			
<400> 485			
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
1	5	10	15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	20	25	30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
	35	40	45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
	50	55	60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
65	70	75	80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
	85	90	95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	100	105	110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	130	135	140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			

225	230	235	240
Gly Ser His Pro Ile	Pro Asp Ser Ser	Pro Leu Leu Gln Phe	Gly Gly
245	250	255	
Gln Val Arg Gln Arg	Tyr Leu Tyr Thr	Asp Asp Ala Gln Gln	Thr Glu
260	265	270	
Ala His Leu Glu Ile	Arg Glu Asp Gly	Thr Val Gly Gly	Ala Ala Asp
275	280	285	
Gln Ser Pro Glu Ser	Leu Leu Gln Leu	Lys Ala Leu Lys	Pro Gly Val
290	295	300	
Ile Gln Ile Leu Gly	Val Lys Thr Ser	Arg Phe Leu Cys	Gln Arg Pro
305	310	315	320
Asp Gly Ala Leu Tyr	Gly Ser Leu His	Phe Asp Pro Glu	Ala Cys Ser
325	330	335	
Phe Arg Glu Leu Leu	Leu Glu Asp Gly	Tyr Asn Val Tyr	Gln Ser Glu
340	345	350	
Ala His Gly Leu Pro	Leu His Leu Gly	Ser Gly Arg Gly	Pro Ala Arg
355	360	365	
Phe Leu Pro Leu Pro	Gly Leu Pro Pro	Ala Pro Pro Glu	Pro Pro Gly
370	375	380	
Ile Leu Ala Pro Gln	Pro Pro Asp Val	Gly Ser Ser Asp	Pro Leu Ser
385	390	395	400
Met Val Glu Pro Ser	Gln Gly Arg Ser	Pro Ser	
405	410		
<210>	486		
<211>	419		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	Synthetic sequence		
<400>	486		
Glu Pro Lys Ser Ser	Asp Lys Thr His	Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala
1	5	10	15
Pro Glu Ala Glu Gly	Ala Pro Ser Val	Phe Leu Phe Pro	Pro Lys Pro
20	25	30	
Lys Asp Thr Leu Met	Ile Ser Arg Thr	Pro Glu Val Thr	Cys Val Val
35	40	45	
Val Asp Val Ser His	Glu Asp Pro Glu	Val Lys Phe Asn	Trp Tyr Val
50	55	60	
Asp Gly Val Glu Val	His Asn Ala Lys	Thr Lys Pro Arg	Glu Glu Gln

65					70					75					80
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
					85					90					95
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
					100					105					110
Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
					115					120					125
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr
					130					135					140
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
145					150					155					160
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
					165					170					175
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
					180					185					190
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe
					195					200					205
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
					210					215					220
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
225					230					235					240
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu
					245					250					255
Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp
					260					265					270
Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val
					275					280					285
Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala
					290					295					300
Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe
305					310					315					320
Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp
					325					330					335
Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn
					340					345					350
Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly
					355					360					365
Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro
					370					375					380

Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
 385 390 395 400
 Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser
 405 410 415
 Tyr Ala Ser
 <210> 487
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic sequence
 <400> 487
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210	215	220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
225	230	235
Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly		240
	245	250
Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu		255
	260	265
Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp		270
	275	280
Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val		285
	290	295
Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro		300
305	310	315
Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser		320
	325	330
Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu		335
	340	345
Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg		350
	355	360
Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly		365
	370	375
Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser		380
385	390	395
Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		400
	405	410

化合物名称	SEQ ID NO:	氨基酸 108	PEG 分子量	氨基酸 109-149	氨基酸 169-181
化合物1	101	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGNKS ^{PHRDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP}	VGPSQGRSPSYAS
化合物2	102	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG-----RGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物3	103	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGNKS ^{PHRDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP}	VEPSQGRSPSYAS
化合物4	104	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGKKS ^{PHRDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP}	VEPSQGRSPSYAS
化合物5	105	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGDKS---RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物6	106	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物7	107	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGDKS ^{PHRDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP}	VEPSQGRSPSYAS
化合物8	108	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG-----ARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物9	109	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGQKS ^{PHRDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP}	VEPSQGRSPSYAS
化合物10	110	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG-----GPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物11	111	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHSG---RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物12	112	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHSG---RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物13	113	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGKDS---QDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物14	114	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS---RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VGPSQGRSPSYAS
化合物15	115	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS---RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGREPSYAS
化合物16	116	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS---RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	V-PSQGRSPSYAS
化合物17	117	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS---RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VG-SQGRSPSYAS
化合物18	118	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGNKS ^{PHRDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP}	VEP-----
化合物19	119	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSGP-HRDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物20	120	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GGH---RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物21	121	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG---RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物22	122	Q	n/a	SEAHGLPLHLGG-----PAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物23	123	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GG-----GPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS

图1A

化合物名称	SEQ ID NO:	氨基酸 108	PEG 分子量	氨基酸 109-149	氨基酸 169-181
化合物24	124	Q	n/a	SEAHGLPLHLPG-----G--RFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物25	125	Q	n/a	SEAHGLPLHLPG-SG-----G--RFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物26	126	Q	n/a	SEAHGLPLH-SGG-----PAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物27	127	Q	n/a	SEAHGLPLH-SGG-----GPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物28	128	Q	n/a	SEAHGLP-H-SGG-----RFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物29	129	Q	n/a	SEAHGLP-H-SGG-----RFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物30	130	Q	n/a	SEAHGLP-H-SGG-----RFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物31	131	Q	n/a	SEAHGLPLHL-SGG-----GPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
化合物32	132	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGNKSHPHDPAPRGPARFLPLGLPPALPEP	VGPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物1	201	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHLPGNKSHPHDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VGPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物2	202	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHL-SGG-----RGPAREFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物5	205	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHLPGDKS--RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物6	206	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物10	210	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHL-SGG-----GPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物11	211	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHL-SGSH--RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物12	212	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHLPHHSG--RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物19	219	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHL-SGGP-HRDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物20	220	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHL-SGGH--RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物21	221	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHL-SGG-----RDPAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物22	222	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHL-SGG-----PAPRGPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
聚乙二醇化的化合物23	223	pAF	30 kDa	SEAHGLPLHL-SGG-----GPARFLPLGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS

图1B

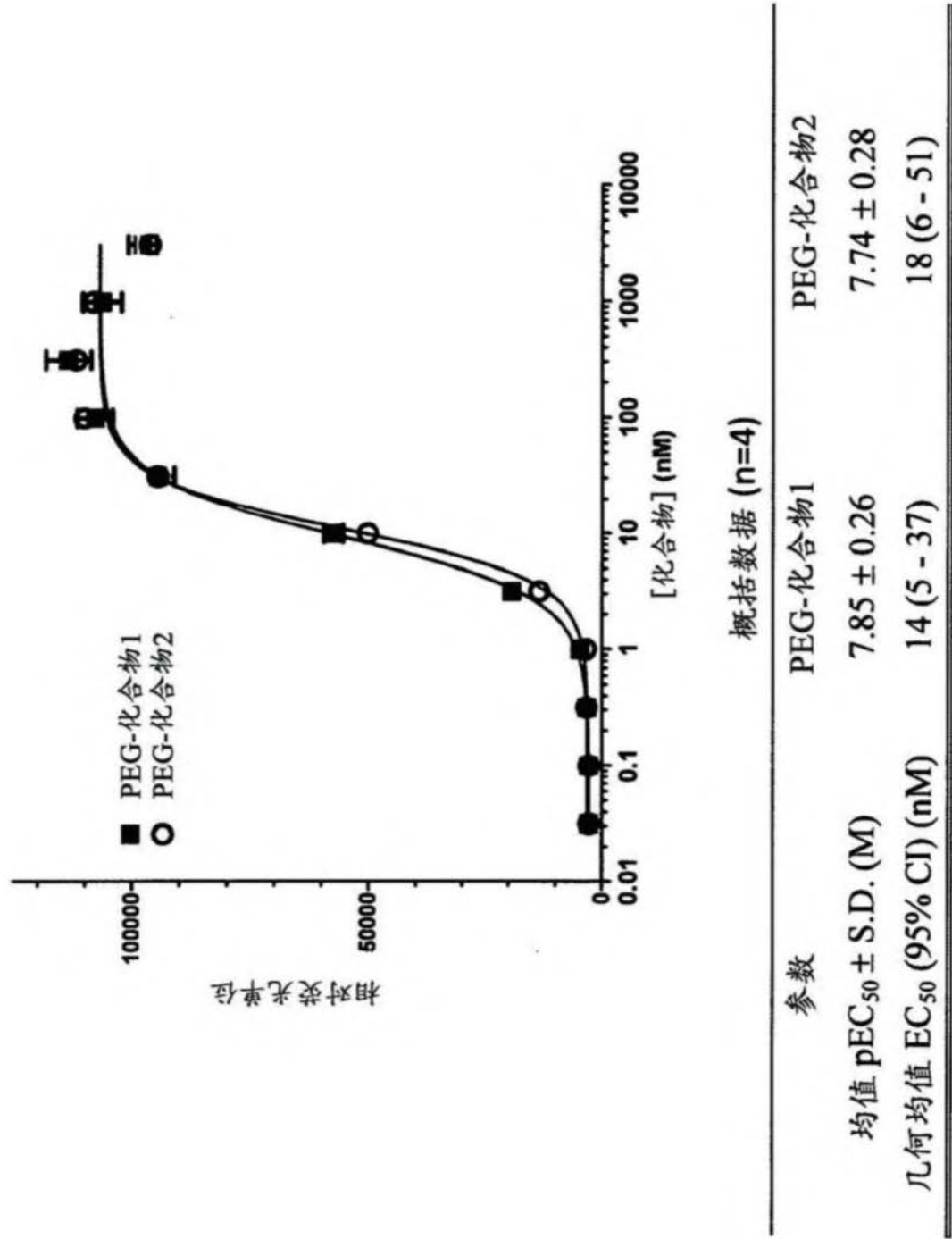


图2

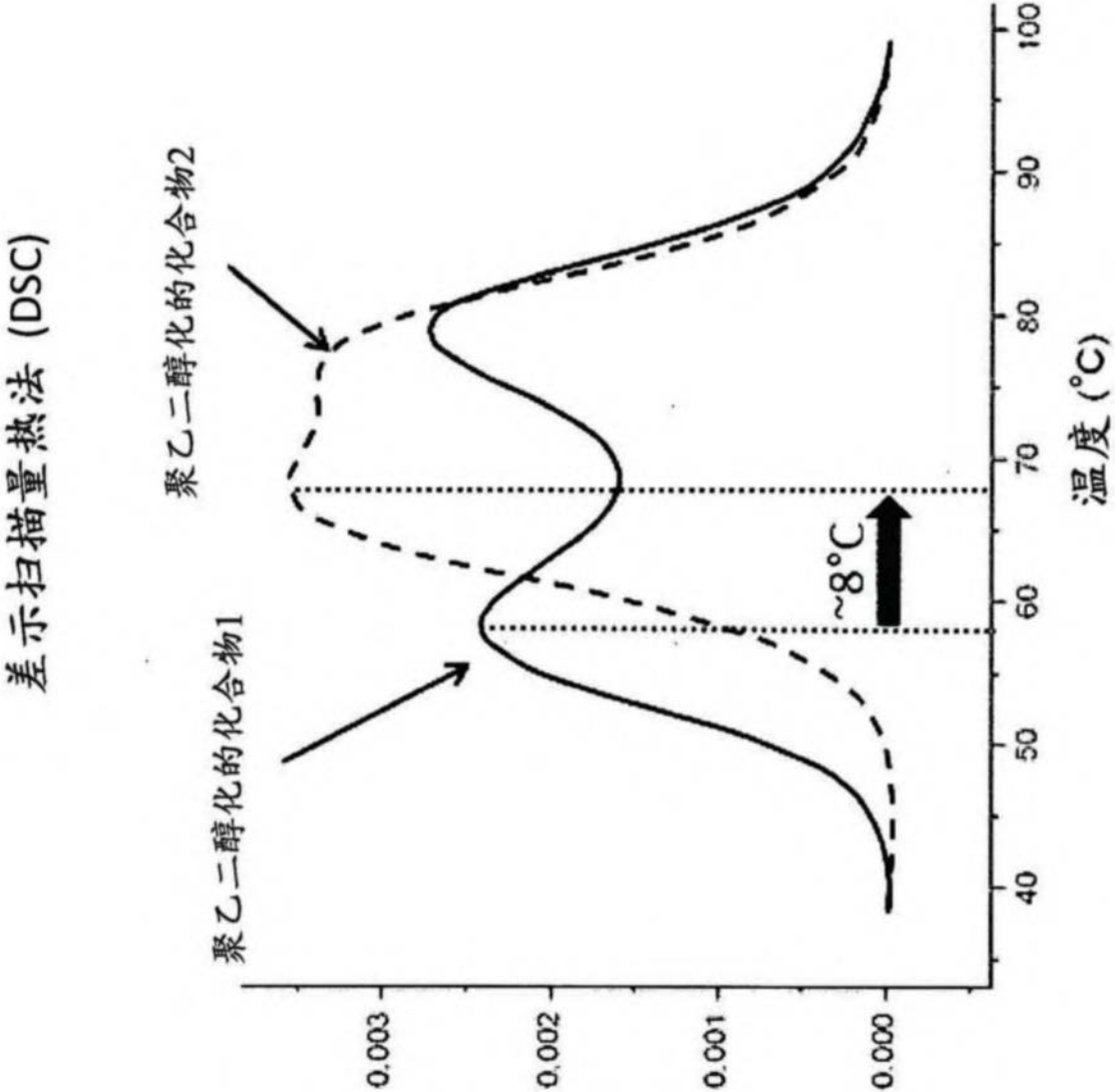


图3

通过热扫描荧光得到的热稳定性(TSF)

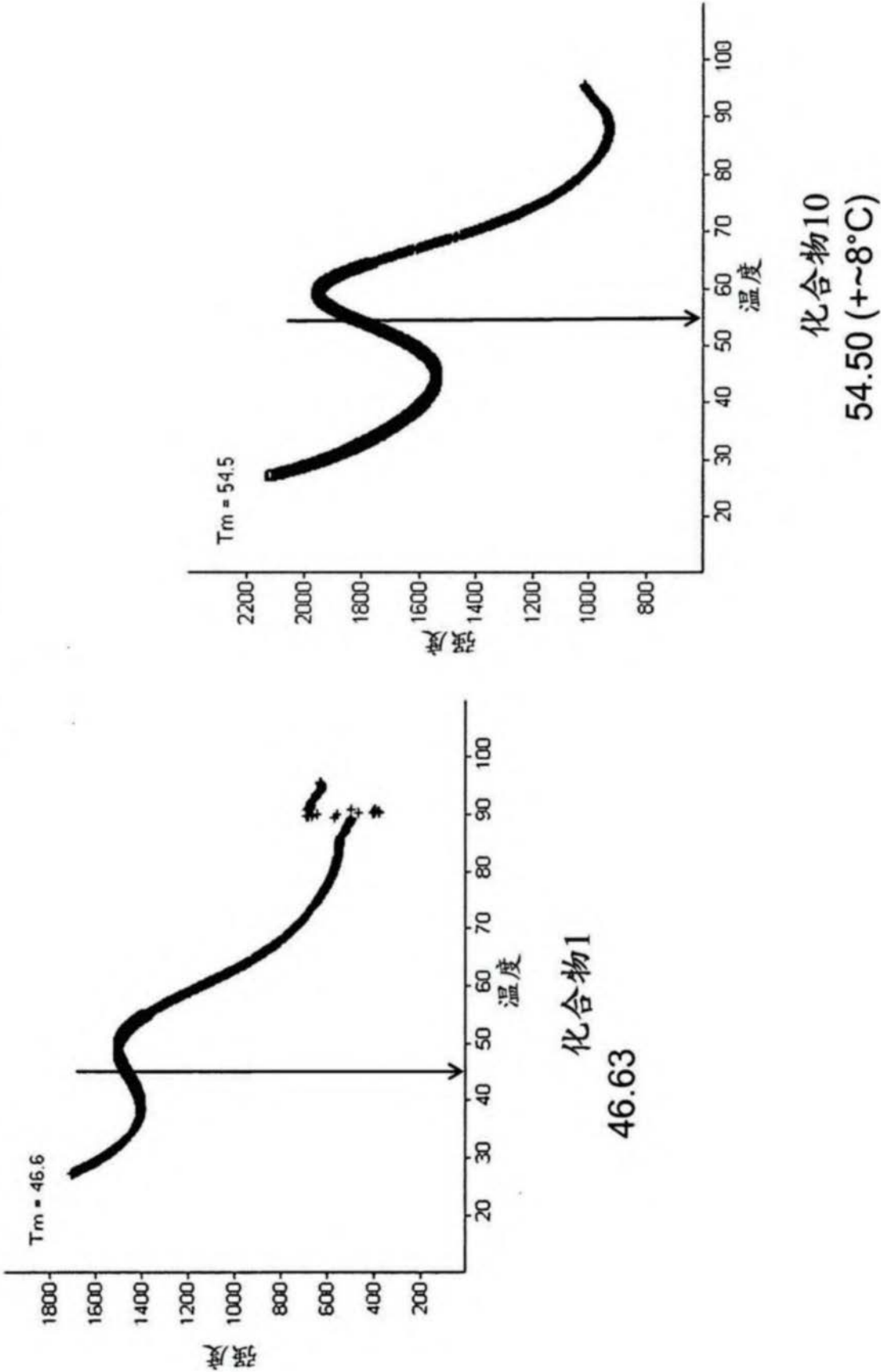


图4

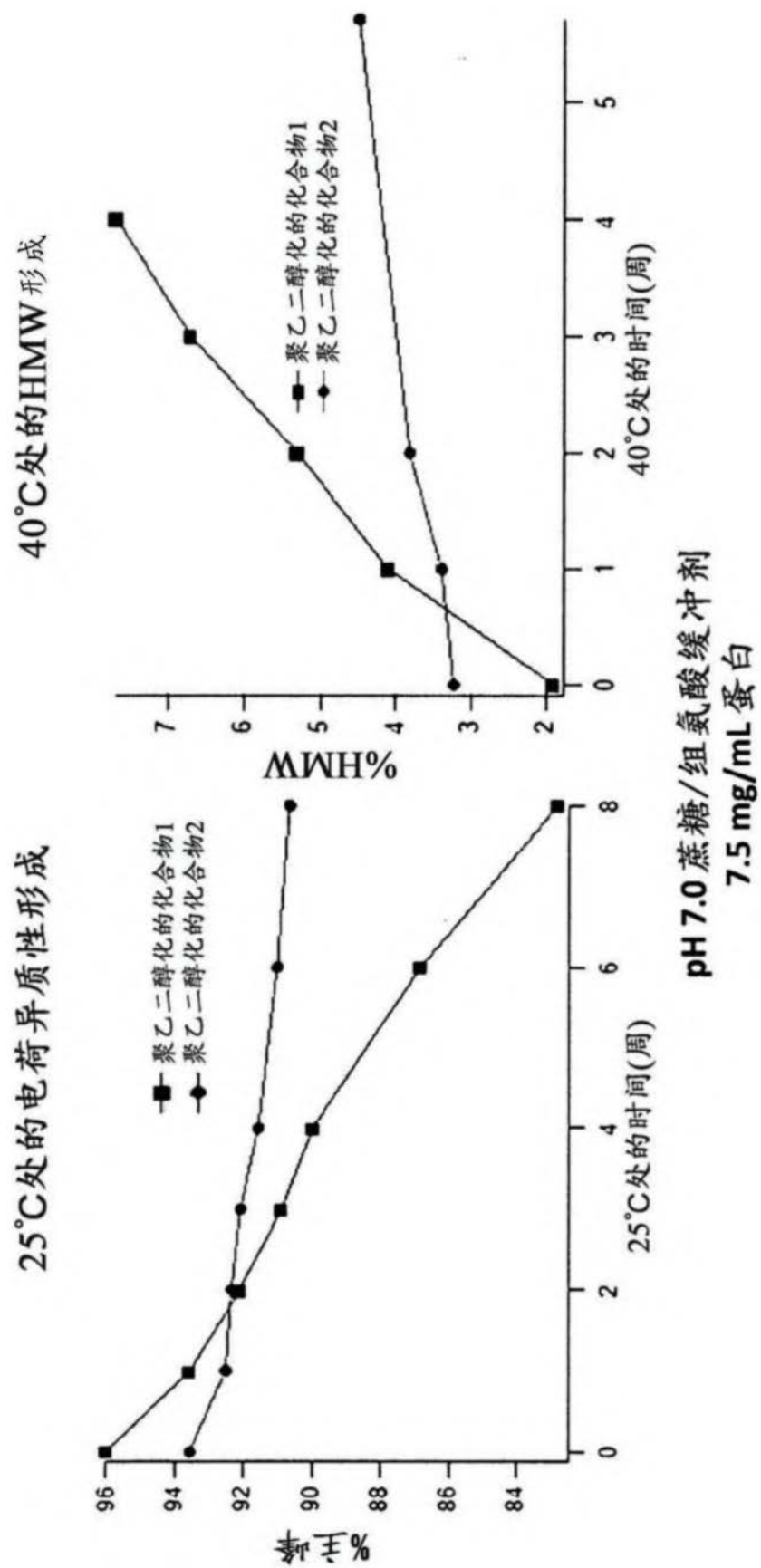


图5

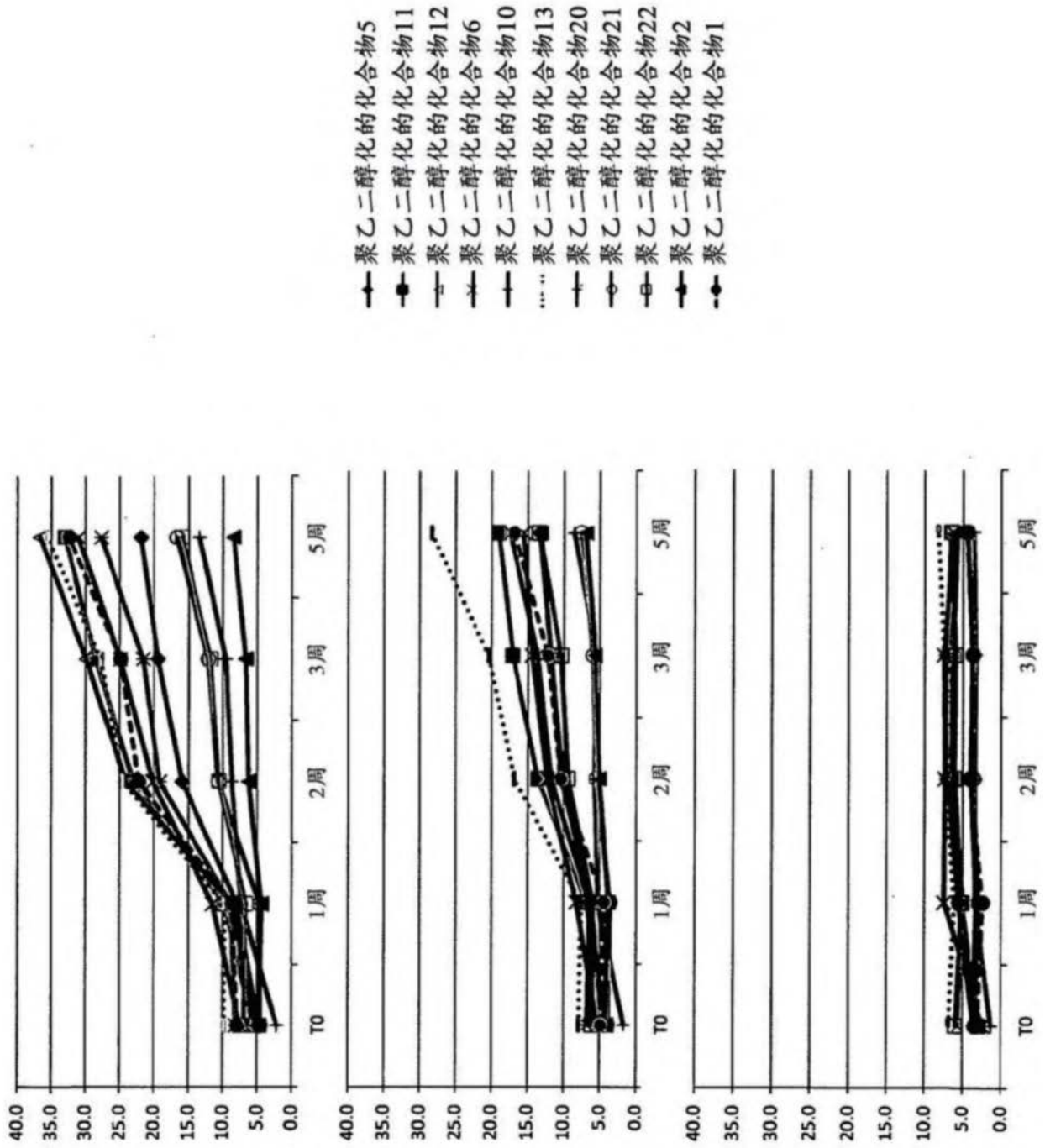


图6

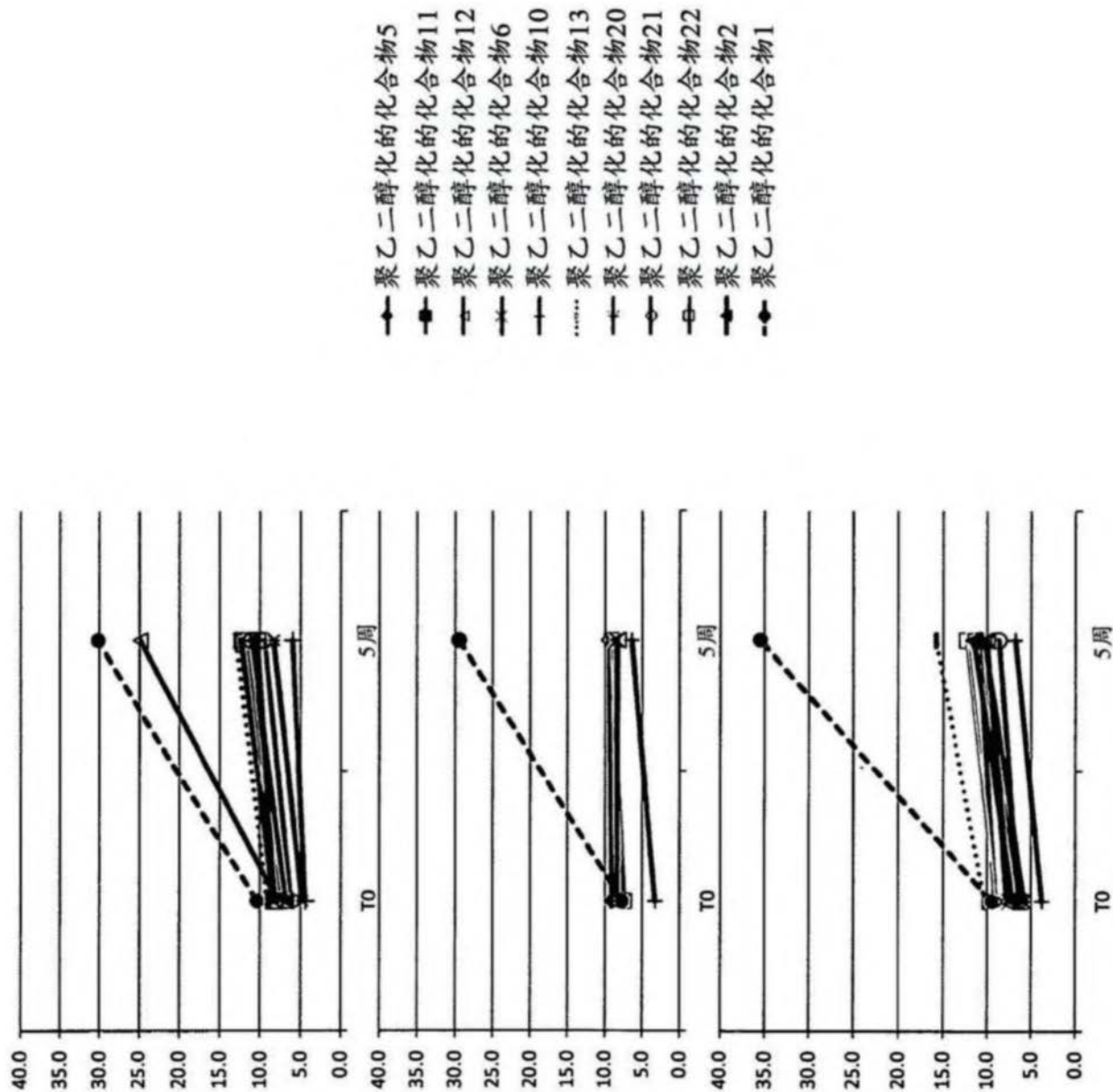


图7

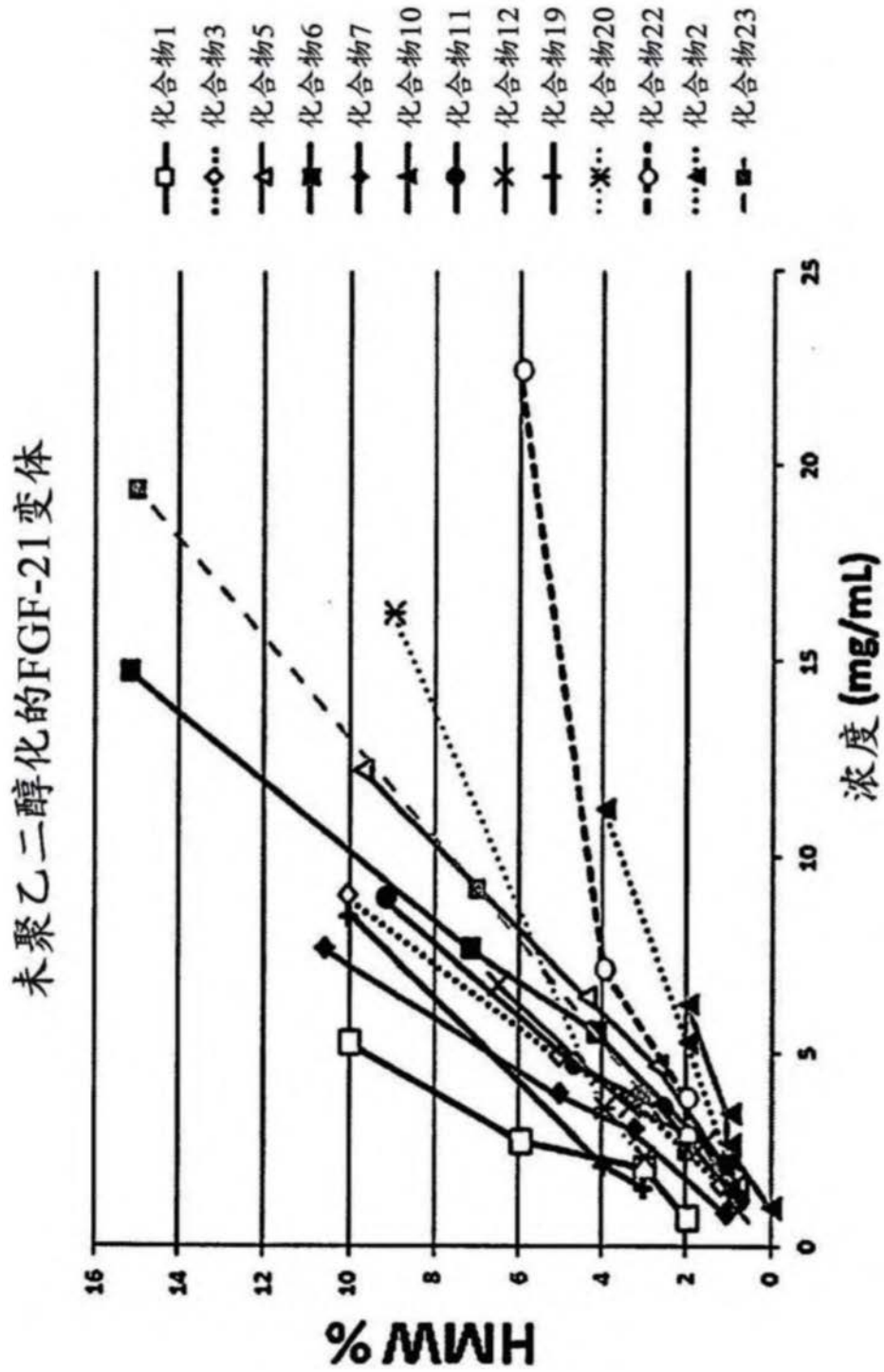


图8

(未聚乙二醇化的)修饰的FGF-21
多肽的CD4+增殖测定结果

由供体切分的百分比抗原性

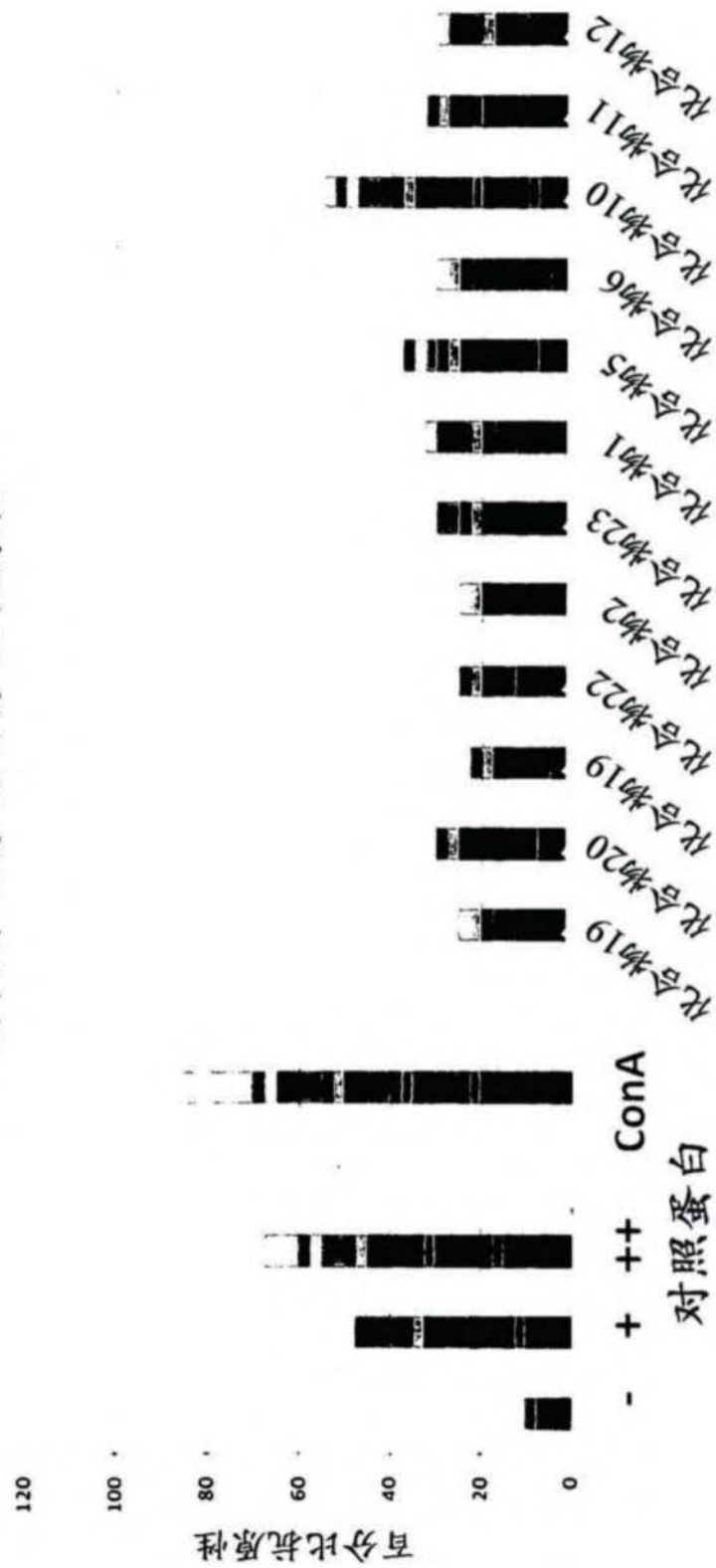
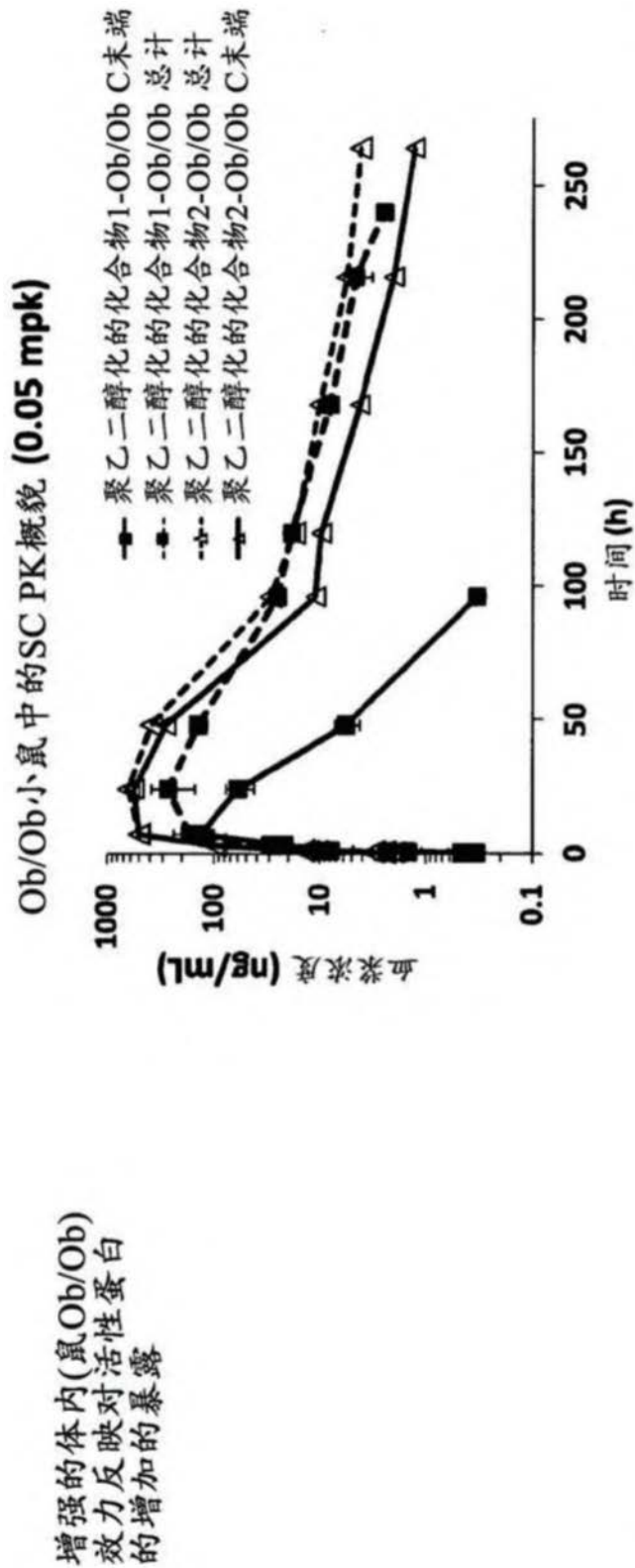


图9



聚乙二醇化的化合物1 SCPK 参数ob/ob小鼠				
PK 参数	单位	C末端 (活性)	总计	
Cmax	ng/mL	133	267.9	
Tmax	h	7	24	
AUCtot	µg/mL·h	2.6	13.8	
AUC比	活性/总计	0.18		

聚乙二醇化的化合物2 SCPK 参数ob/ob小鼠				
PK 参数	单位	C末端 (活性)	总计	
Cmax	ng/mL	560.5	629	
Tmax	h	24	24	
AUCtot	µg/mL·h	24.9	31.8	
thalf	h	46.1	51.7	
AUC比	活性/总计	0.78		

图10

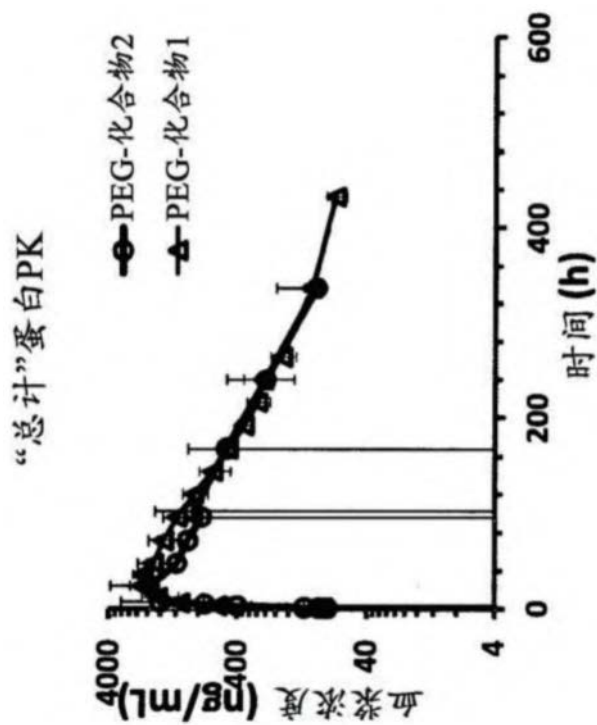


图11A

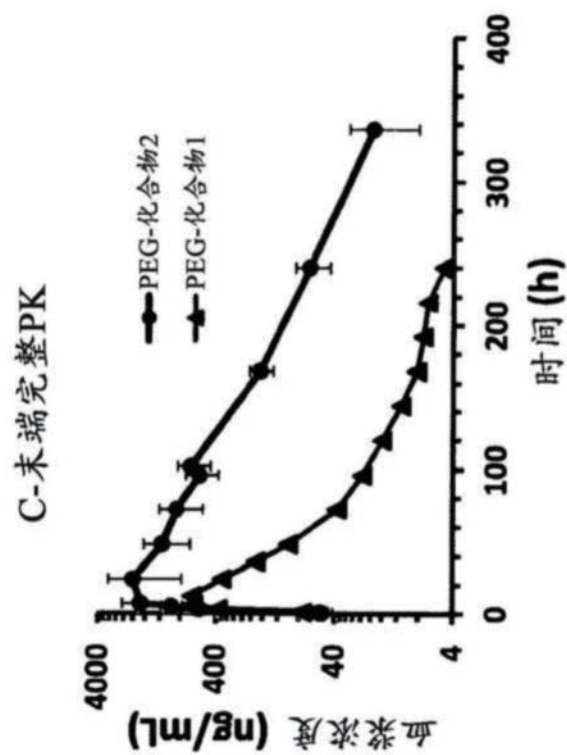


图11B

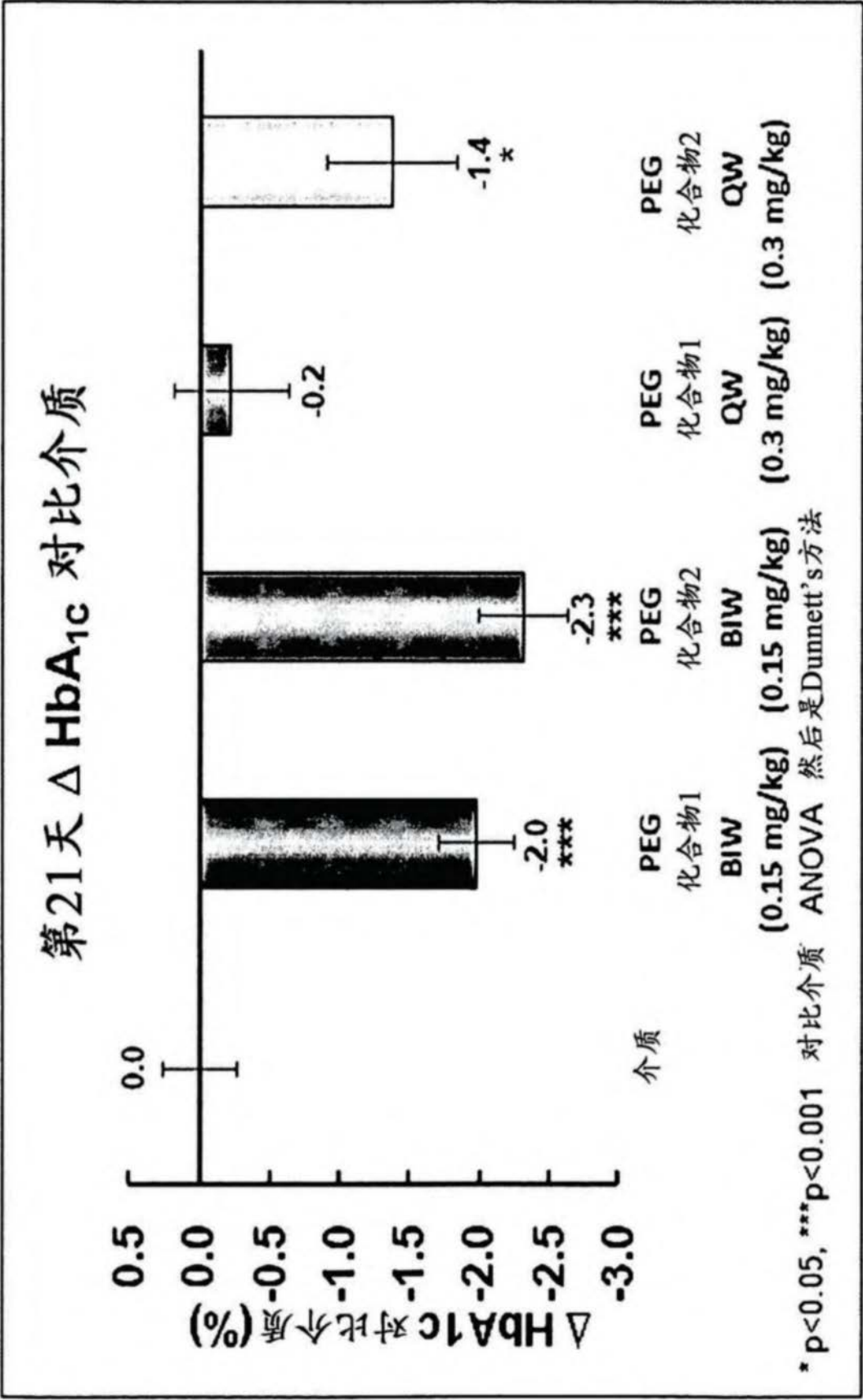


图12

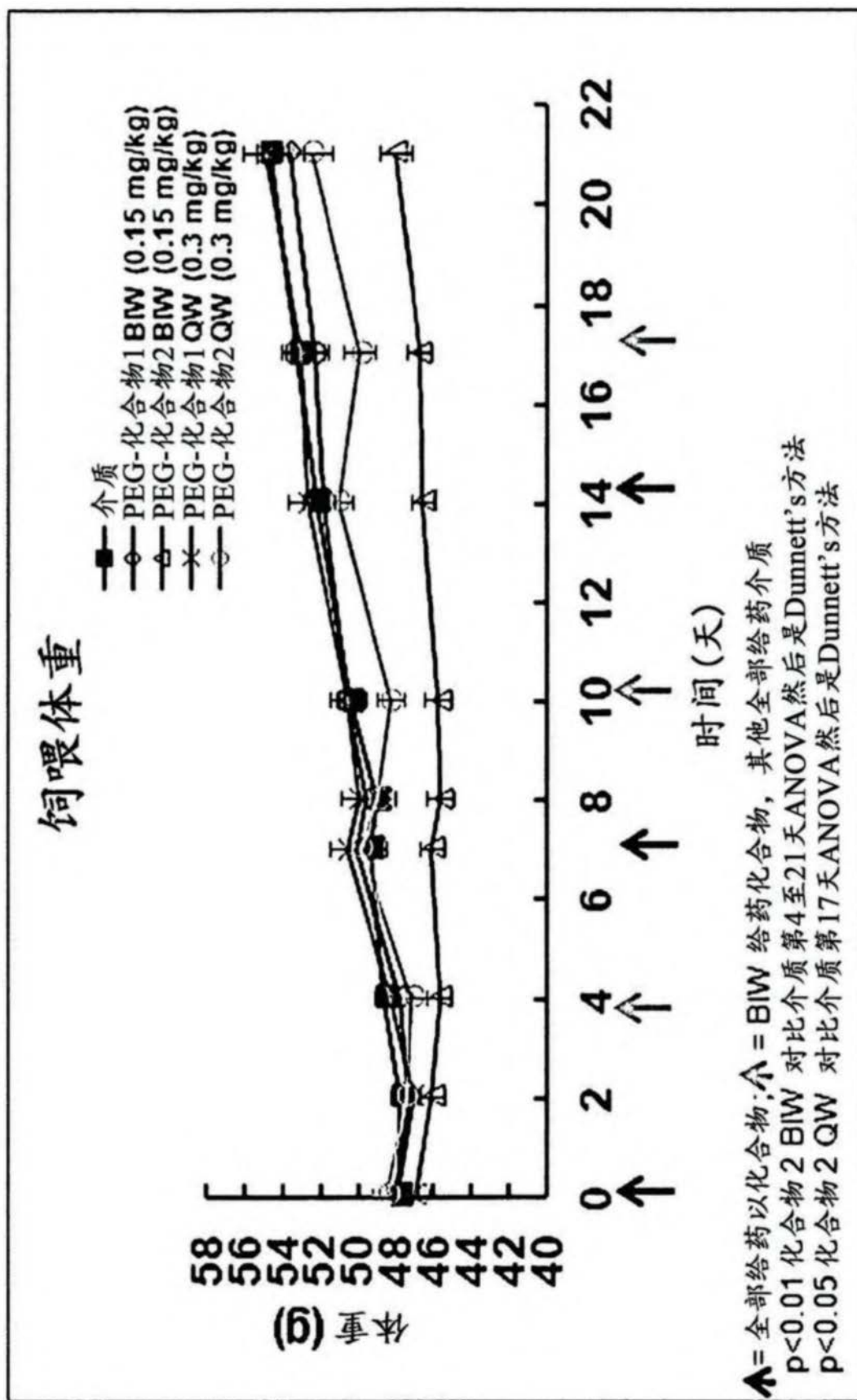


图13

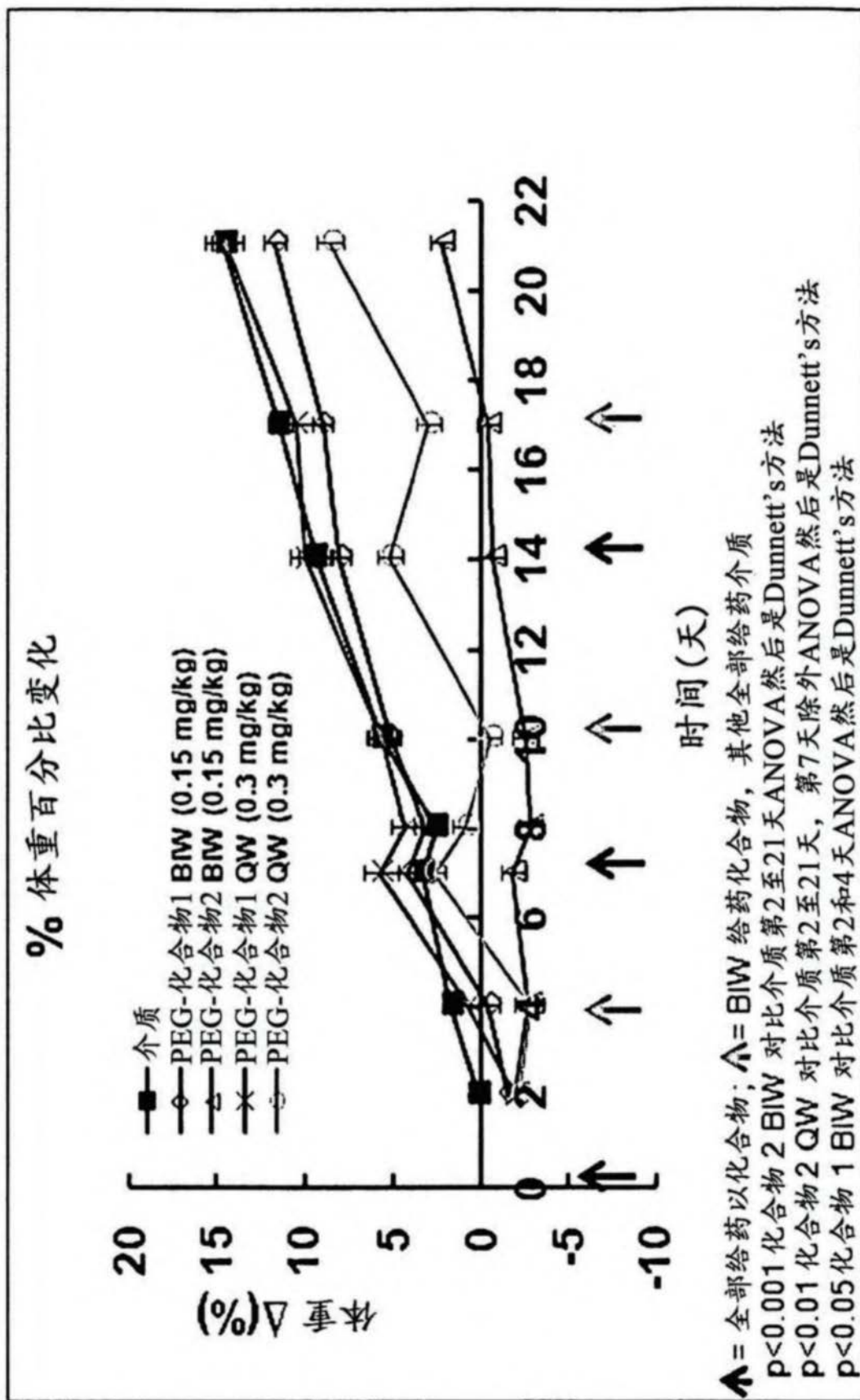


图14

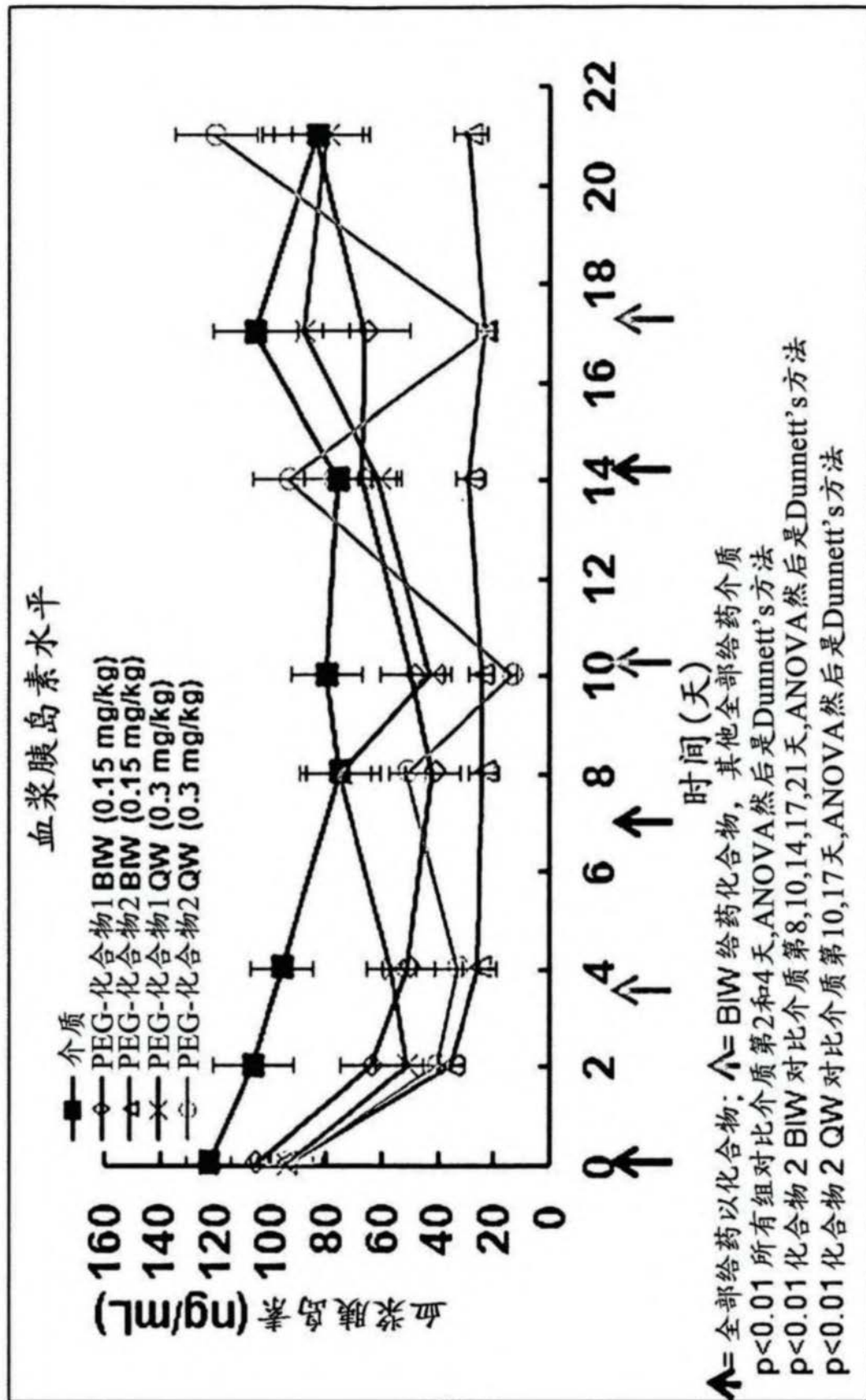


图15

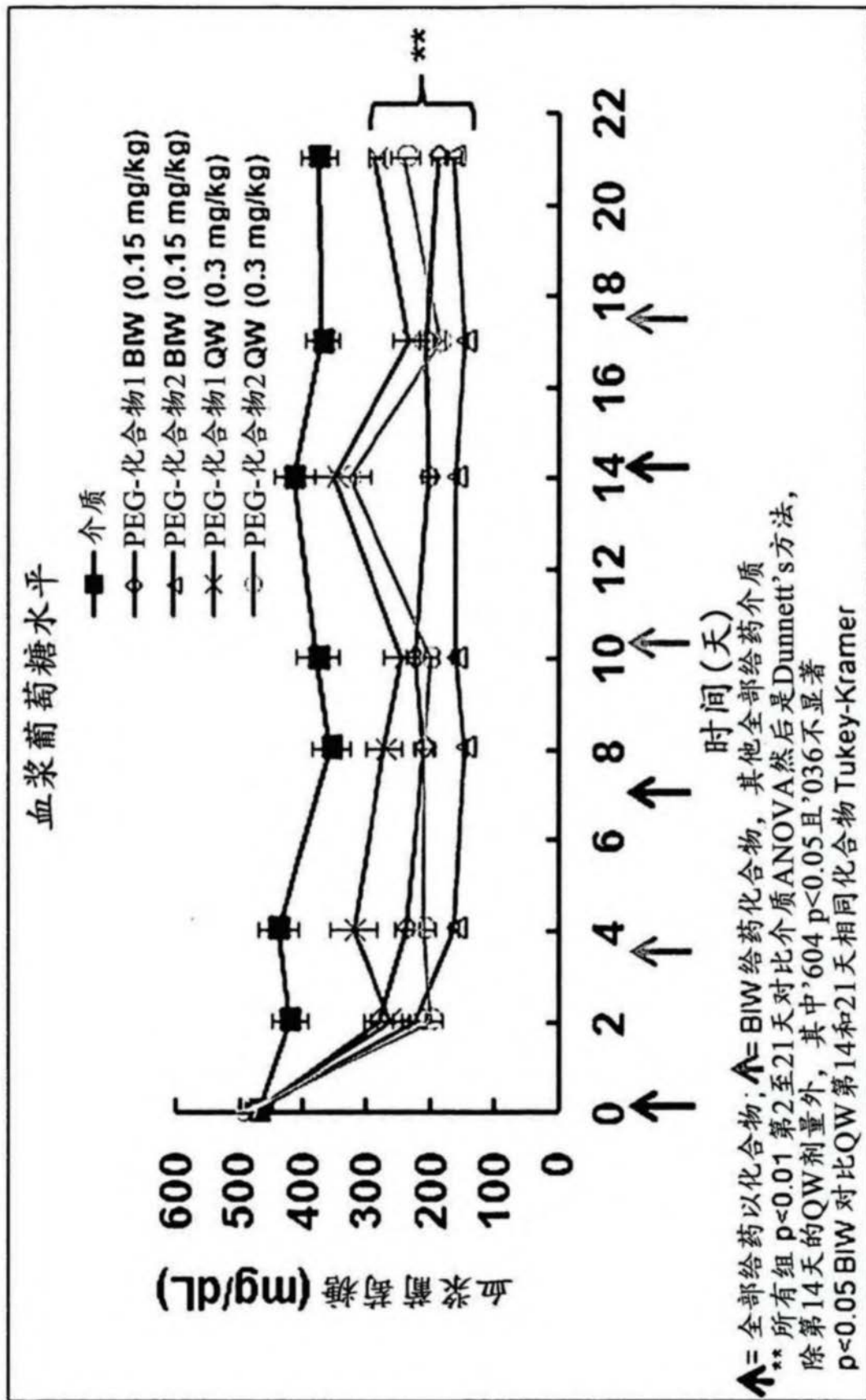


图16

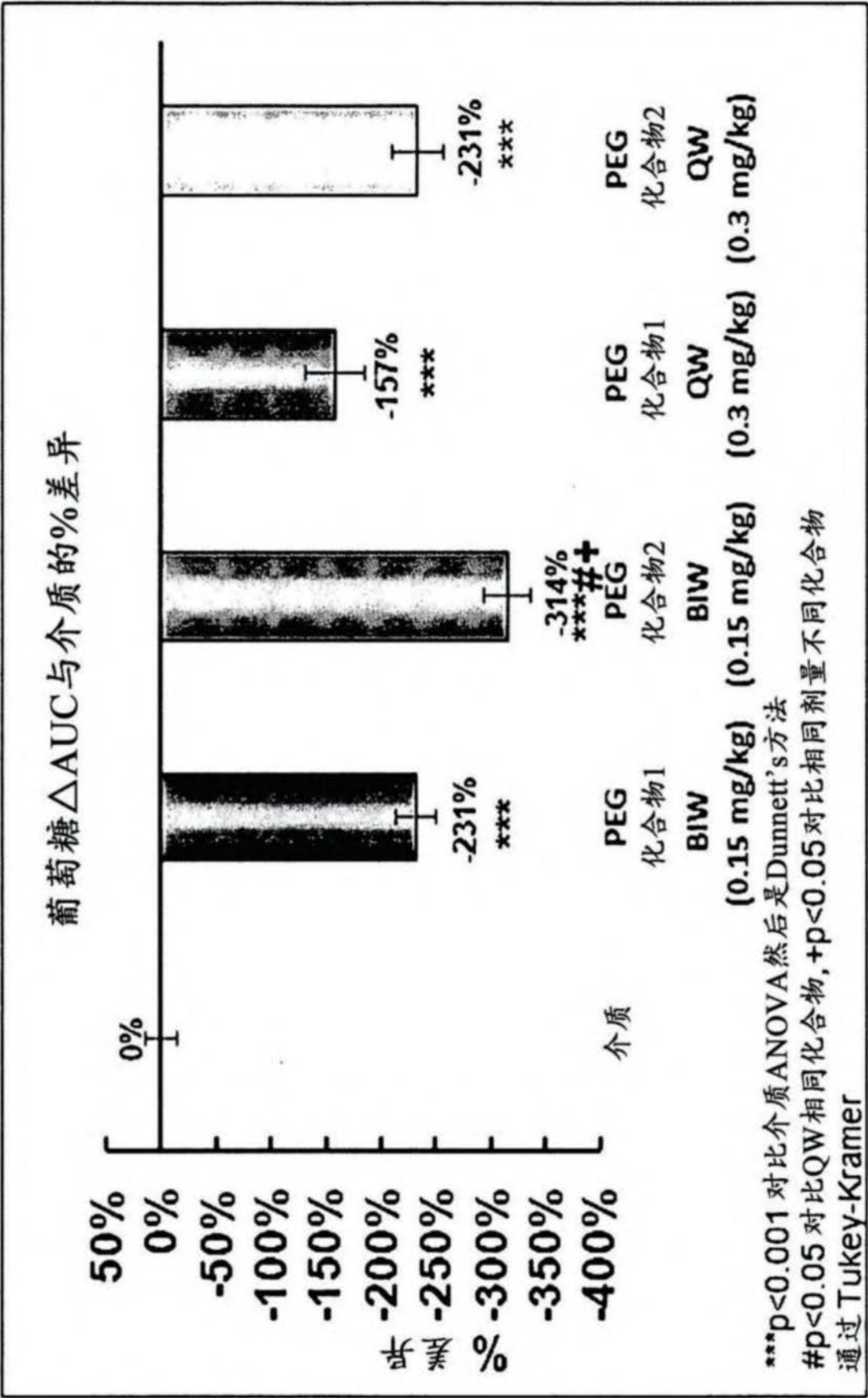


图17

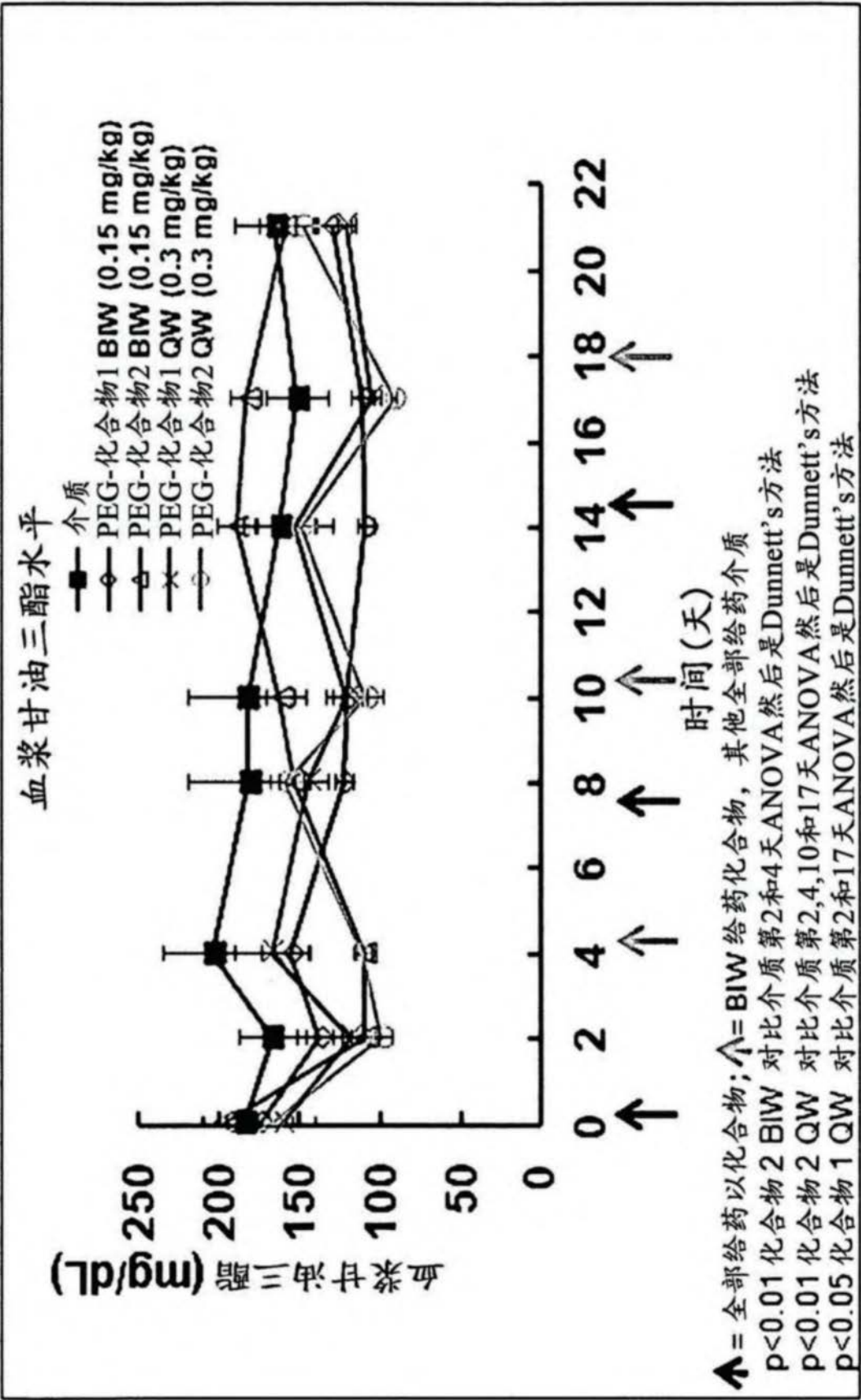


图18

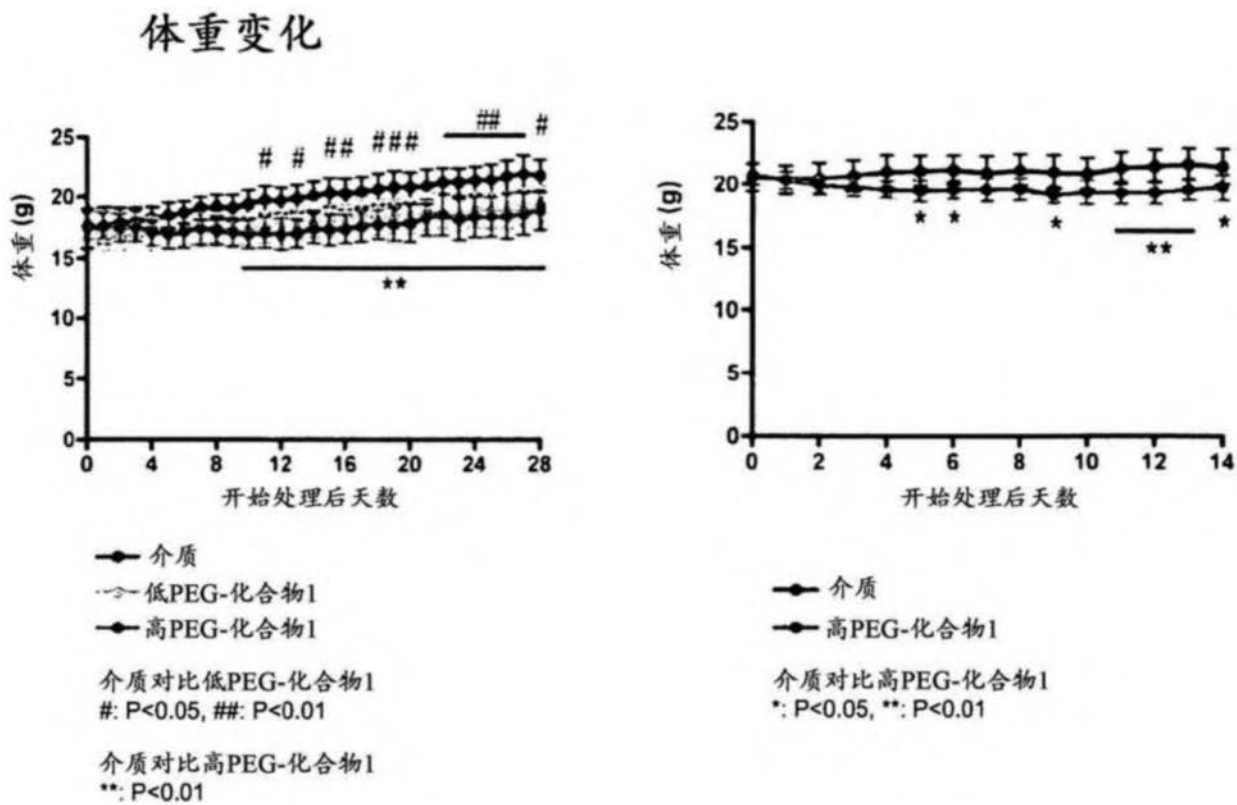


图19

总食物消耗

图20

体重

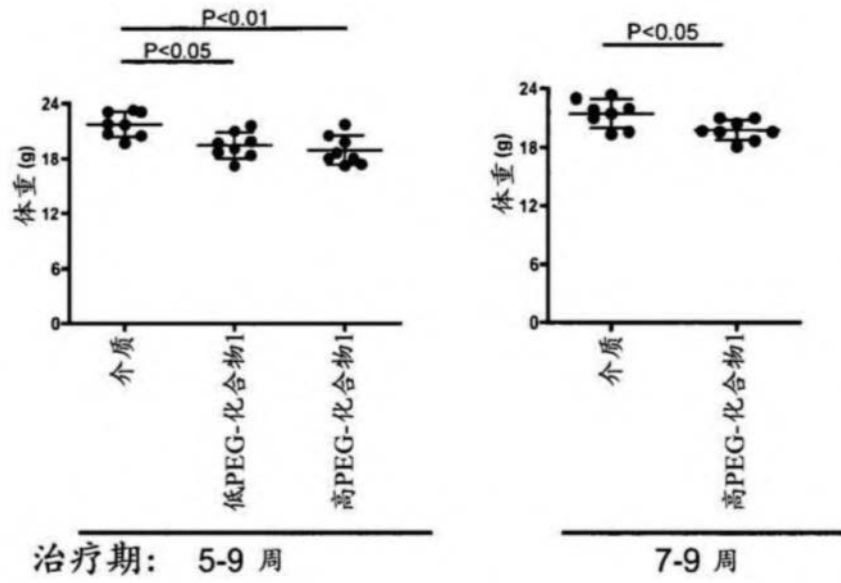


图21

肝重量

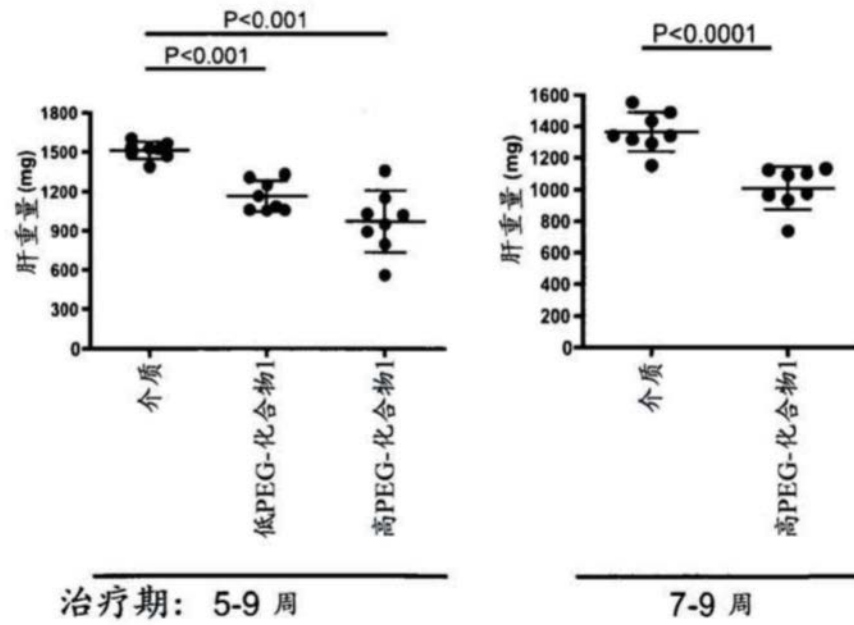


图22

肝-体重比

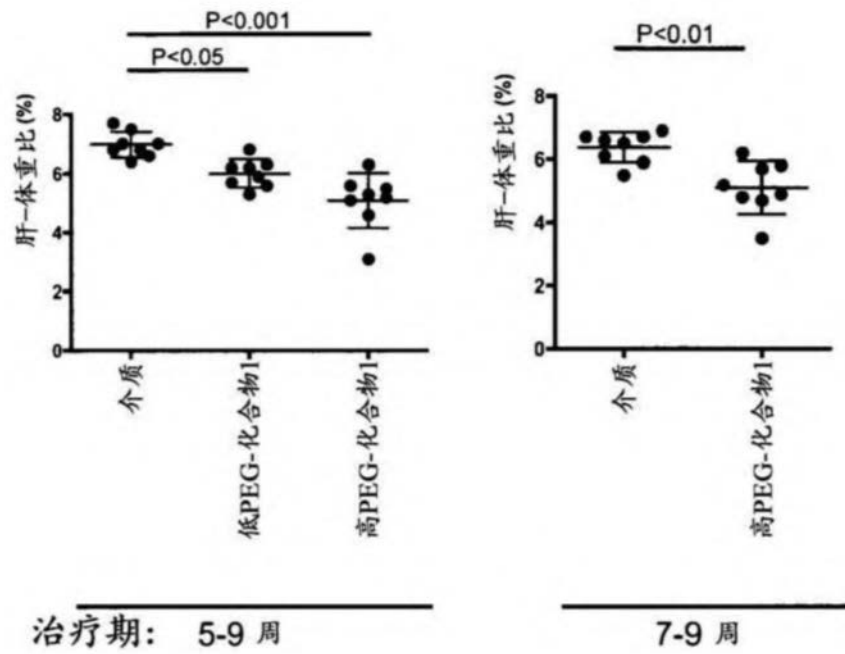


图23

全血葡萄糖

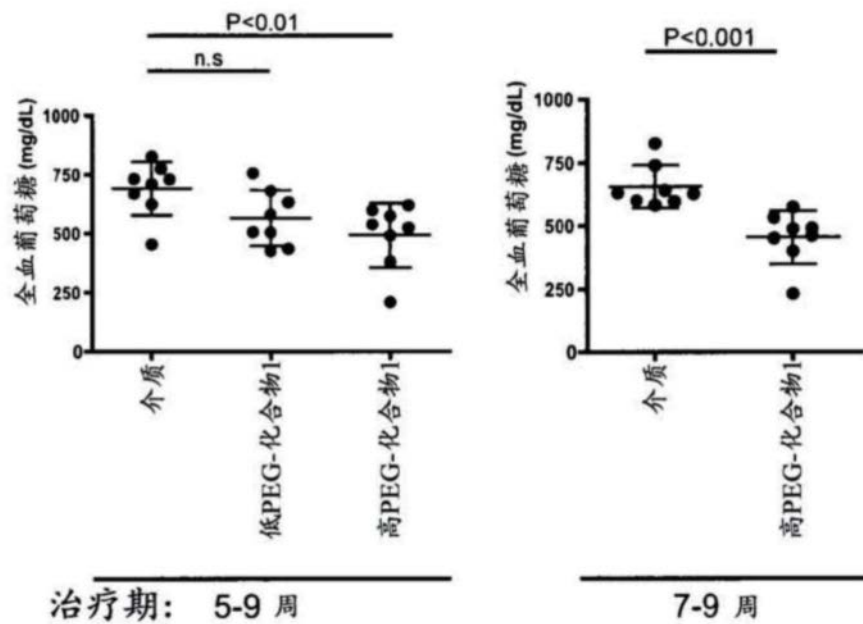


图24

血浆ALT

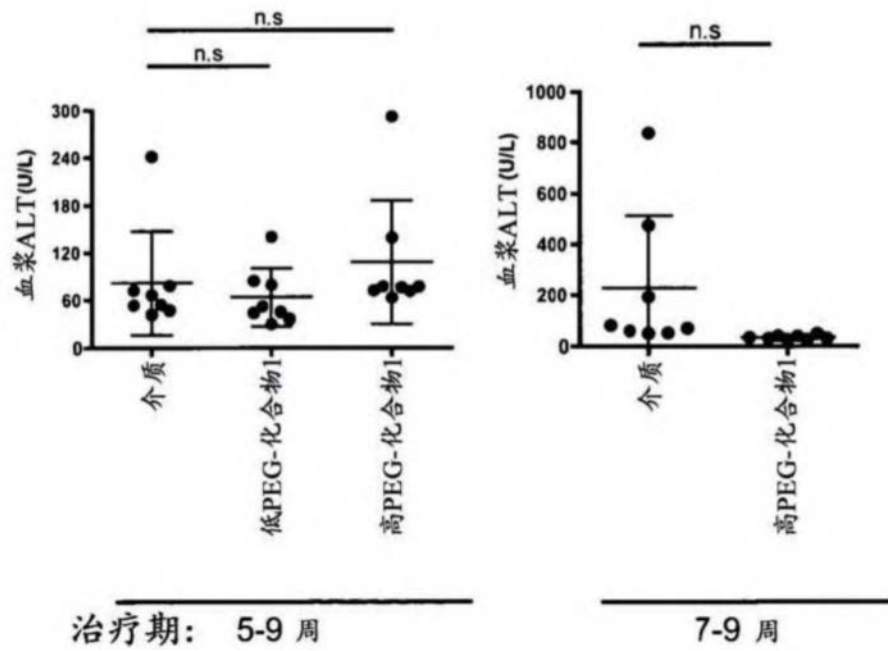


图25

血浆甘油三酯

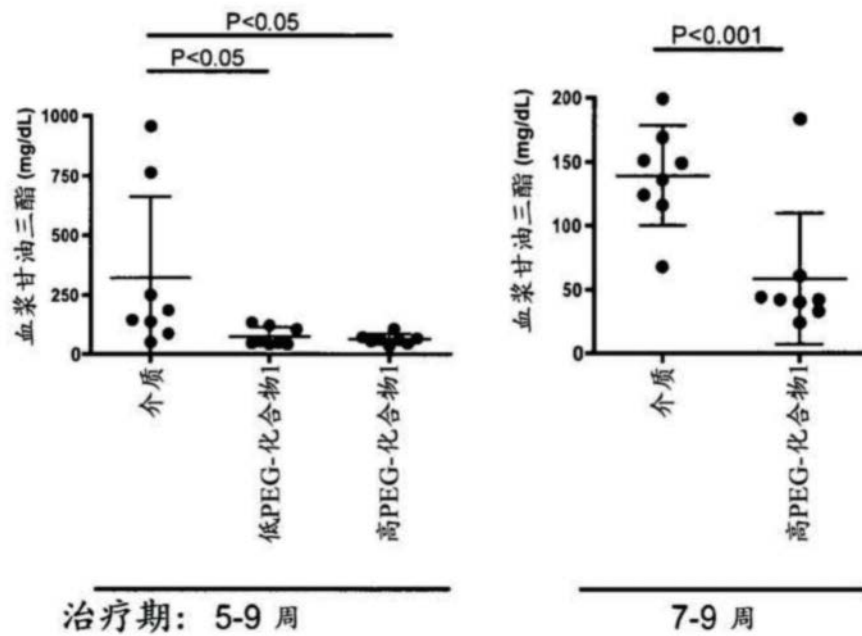


图26

血浆总胆固醇

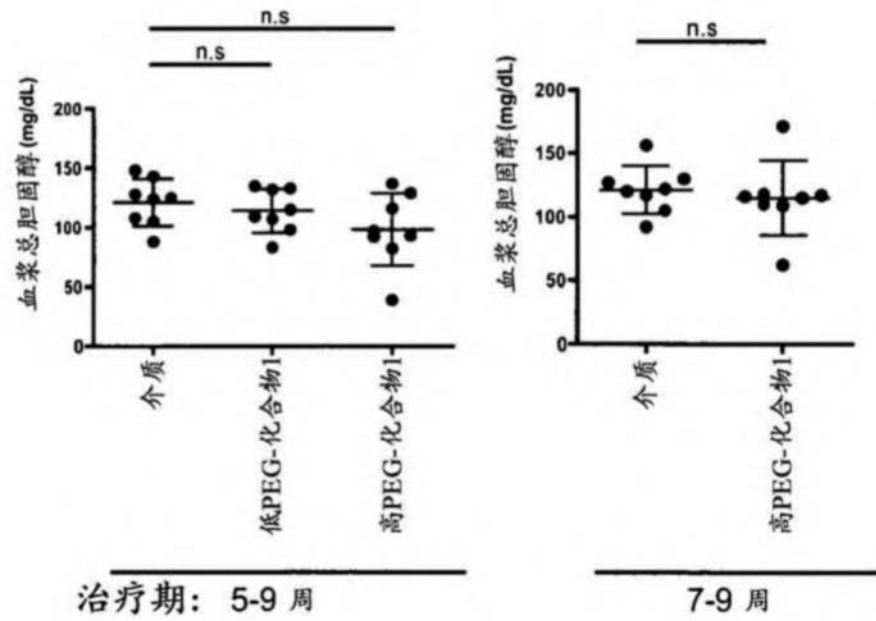


图27

肝甘油三酯

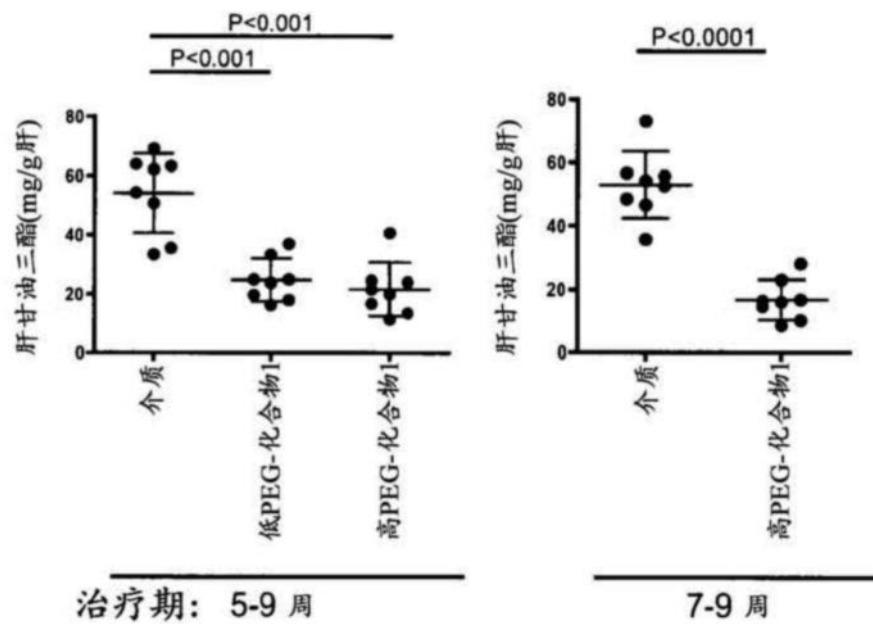


图28

肝胆固醇

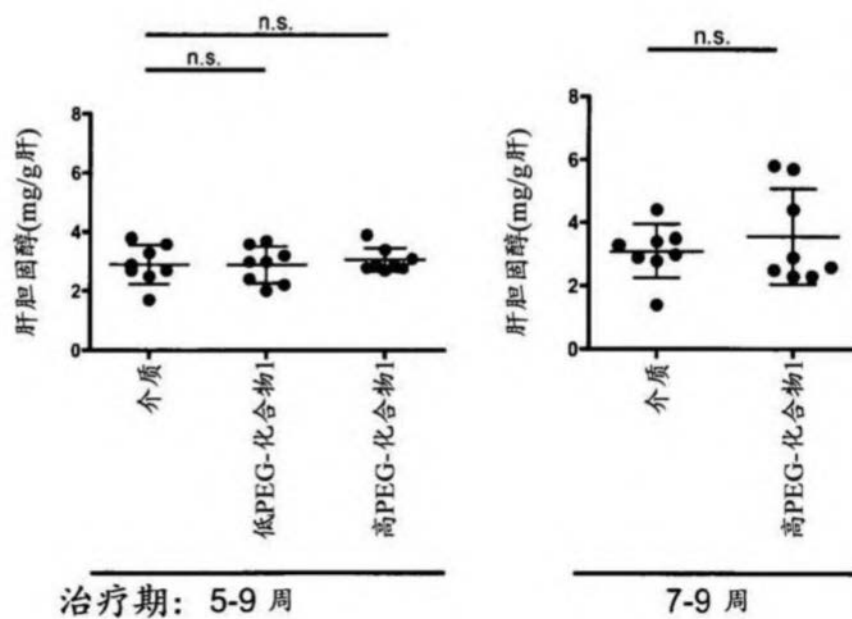


图29

HE染色肝切片的代表性的显微照片

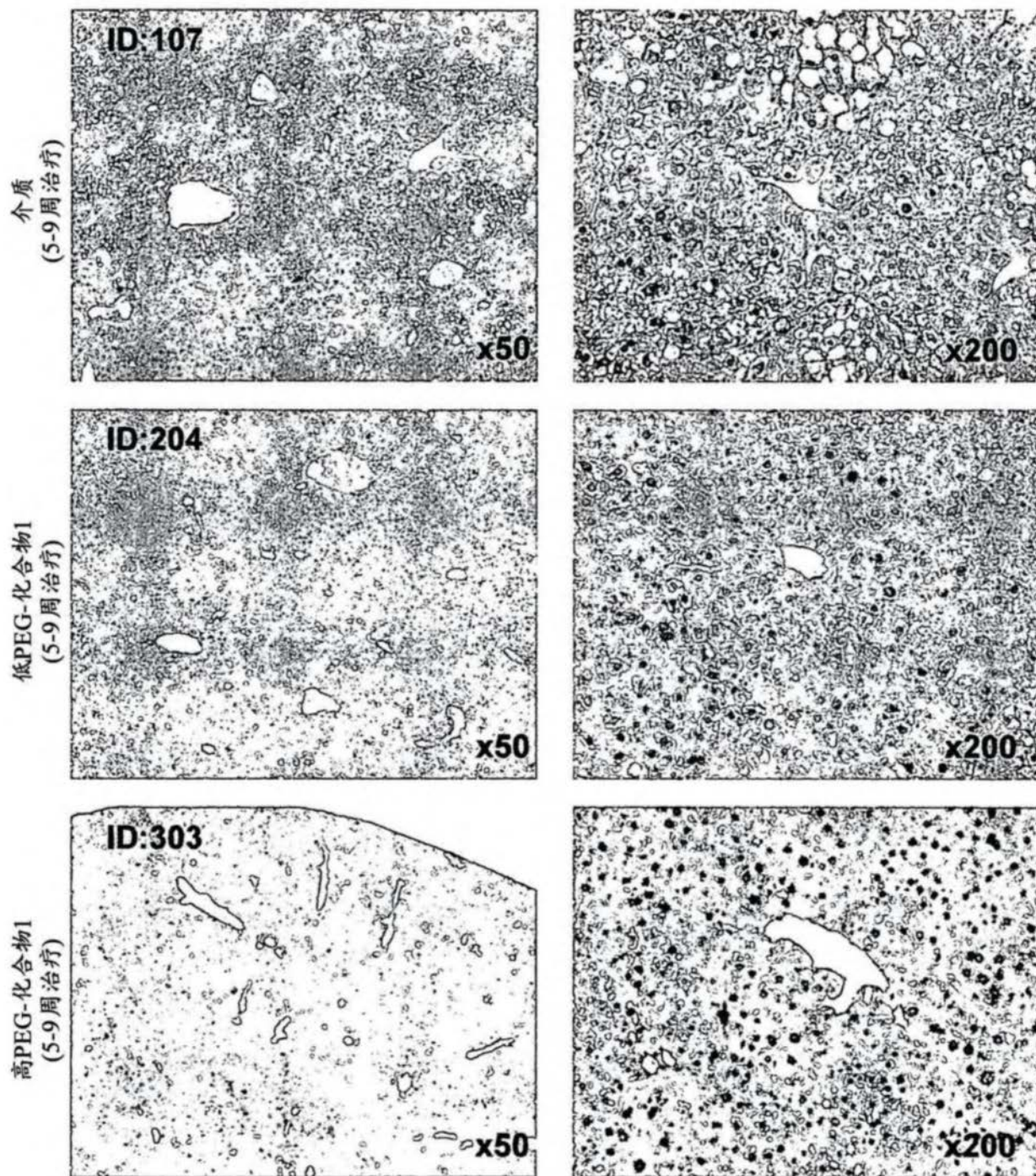


图30A

HE染色肝切片的代表性的显微照片(续)

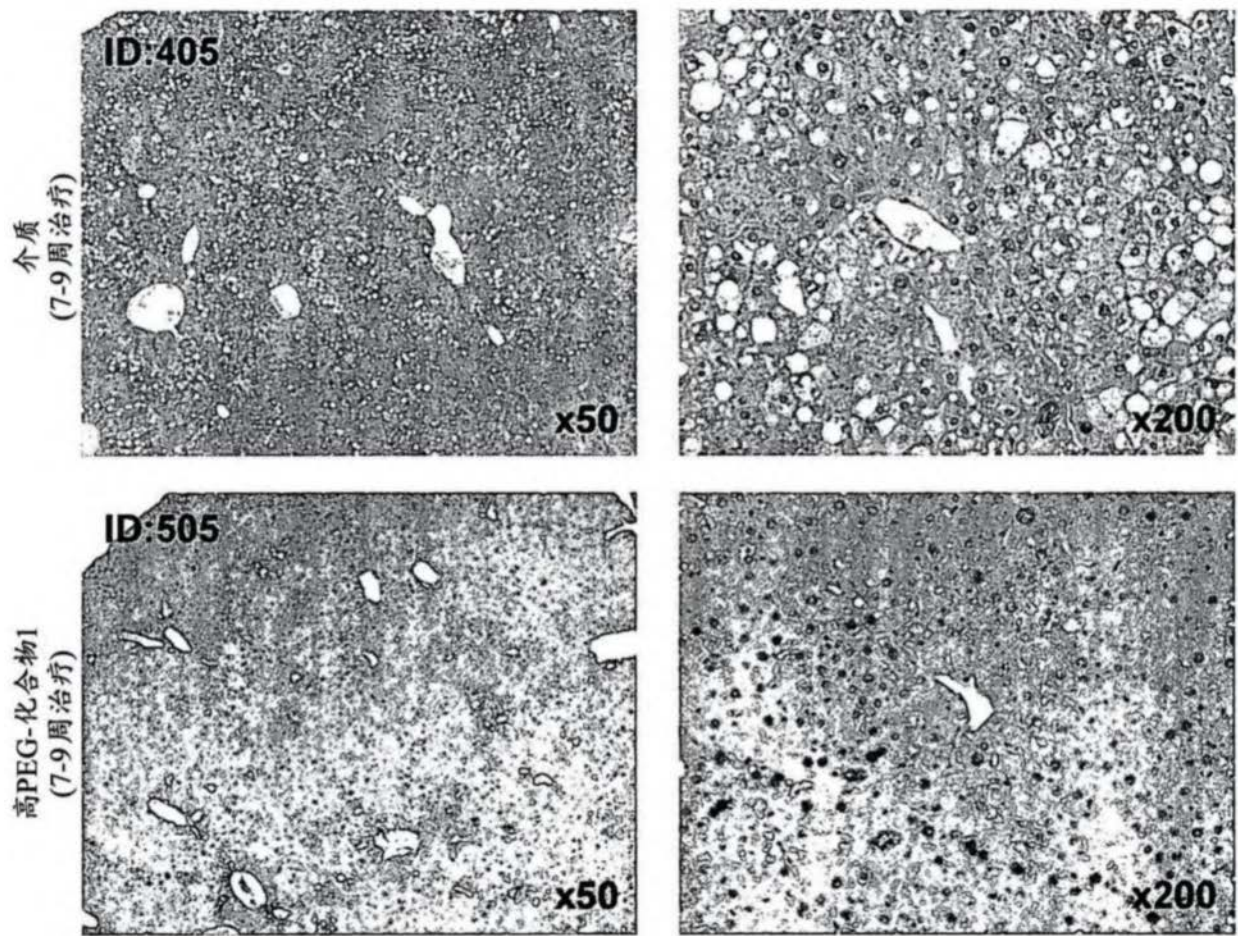


图30B

脂肪变性评分

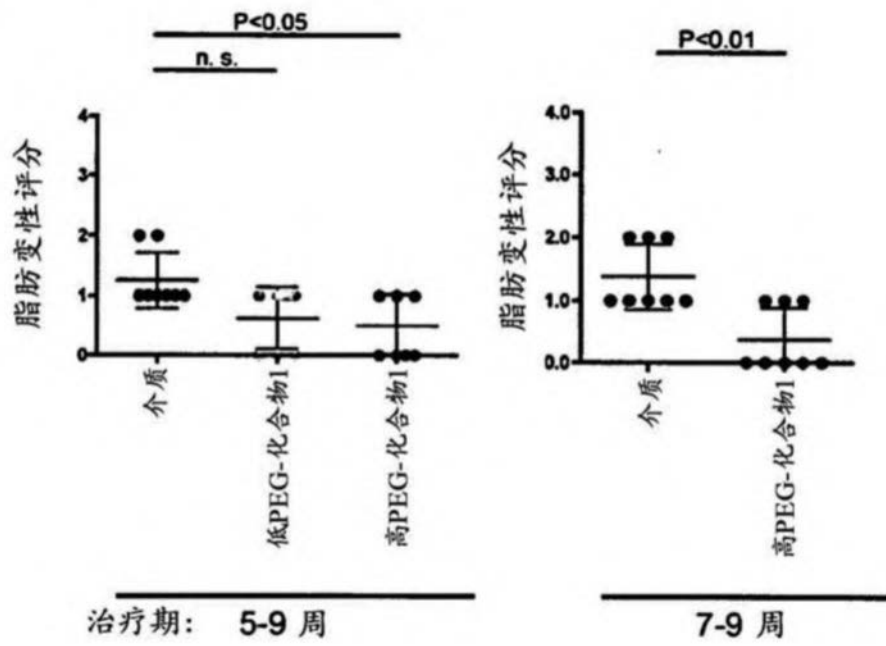


图32A

小叶炎症评分

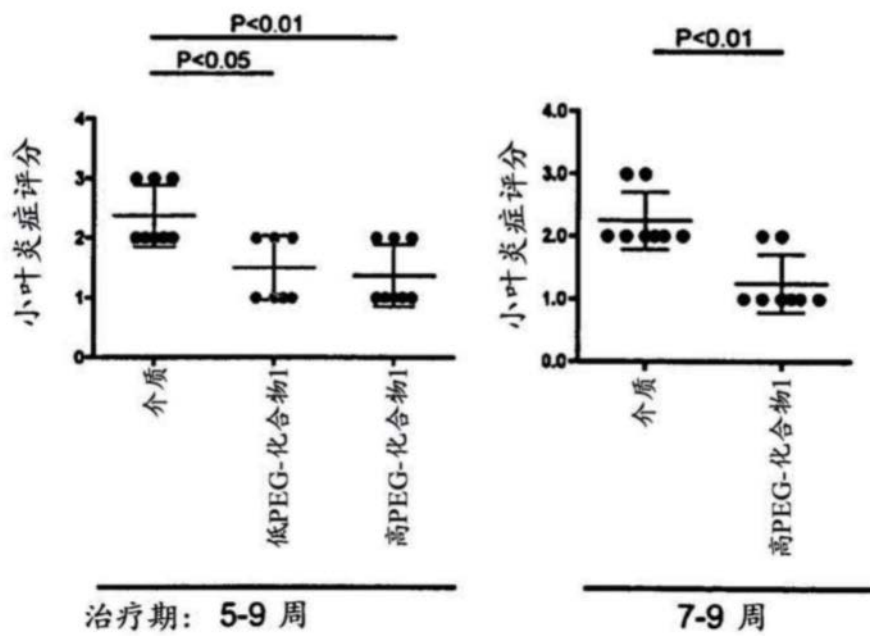


图32B

肝细胞膨胀评分

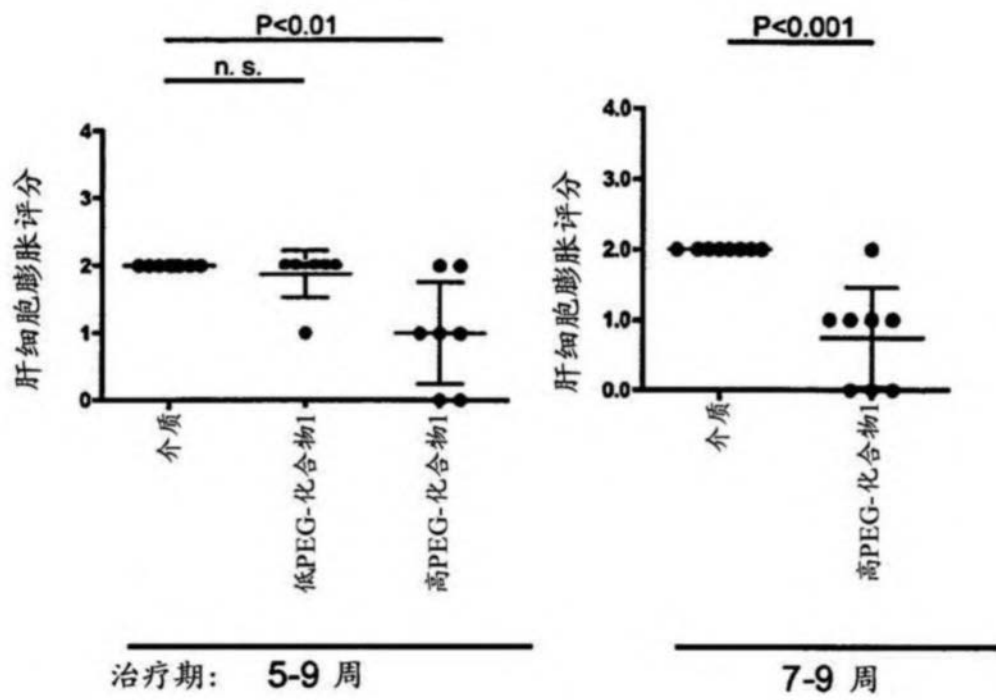


图32C

天狼星红染色肝切片的代表性的显微照片

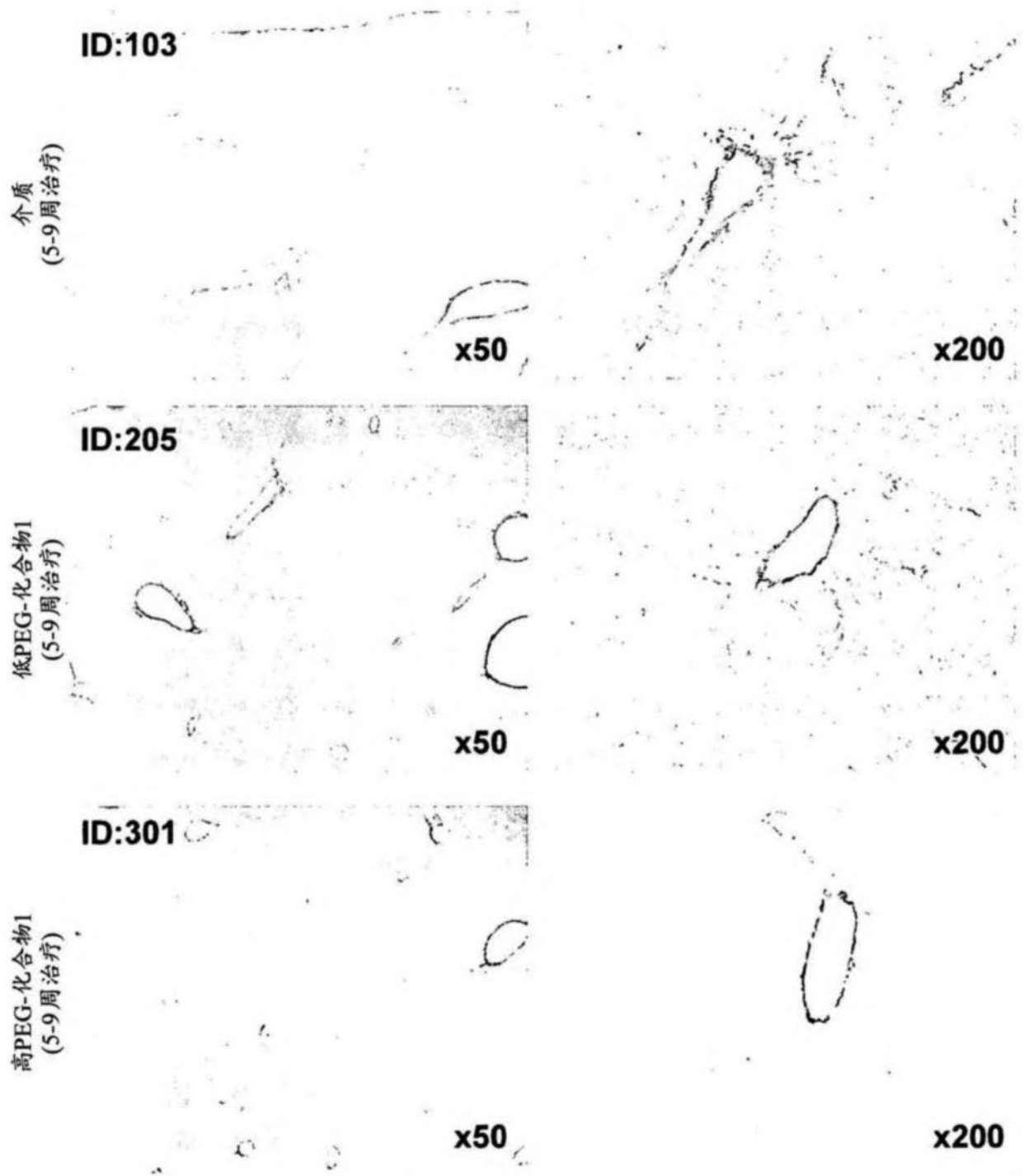


图33A

天狼星红染色肝切片的代表性的显微照片(续)

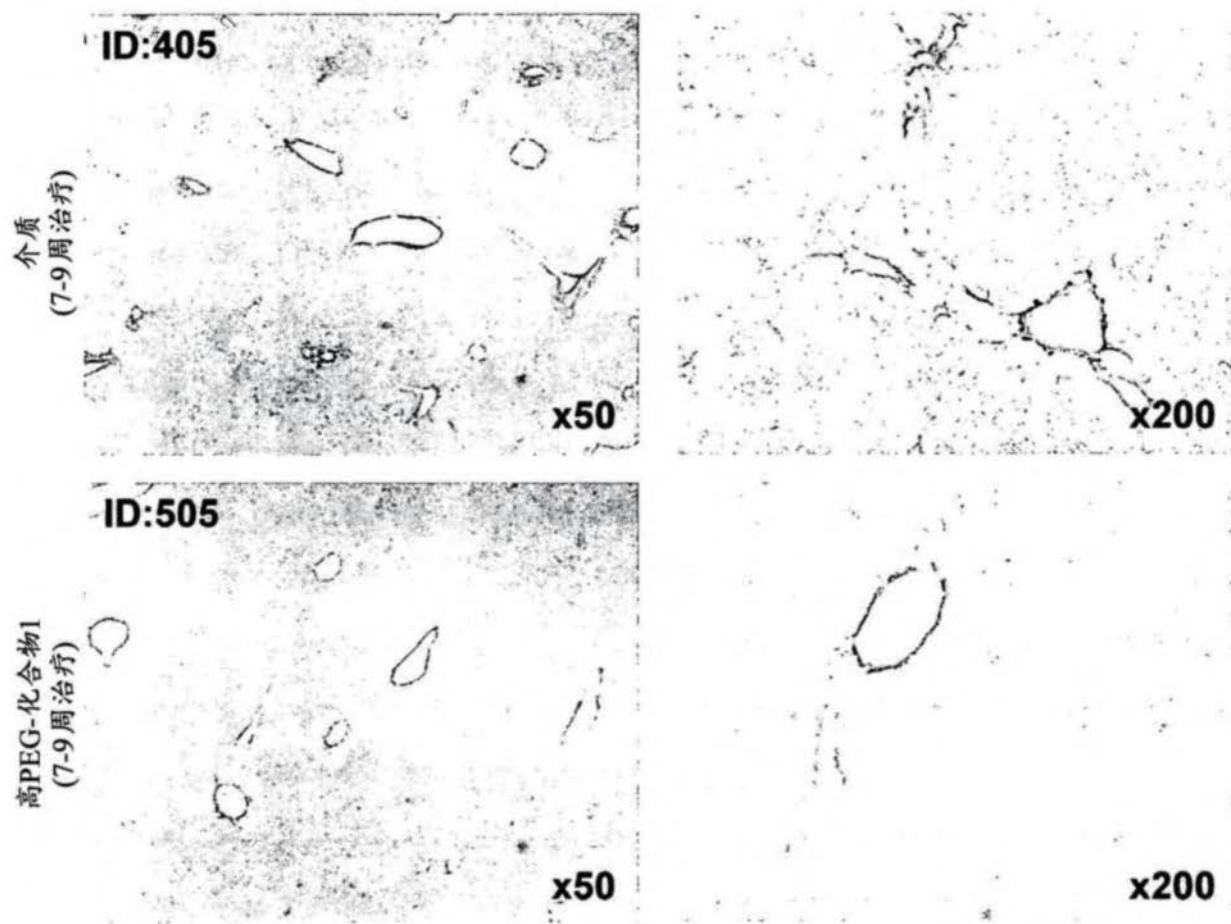


图33B

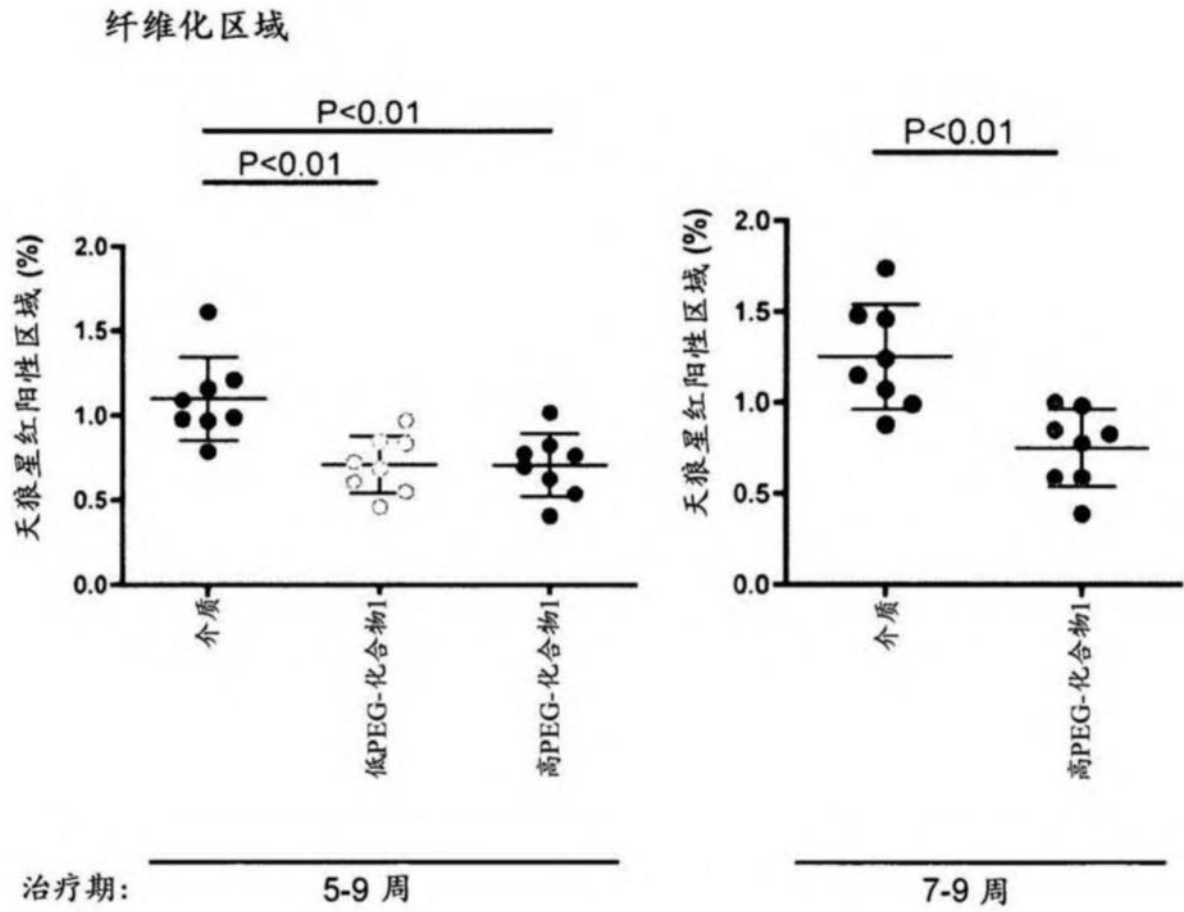


图34

F4/80免疫染色肝切片的代表性的显微照片

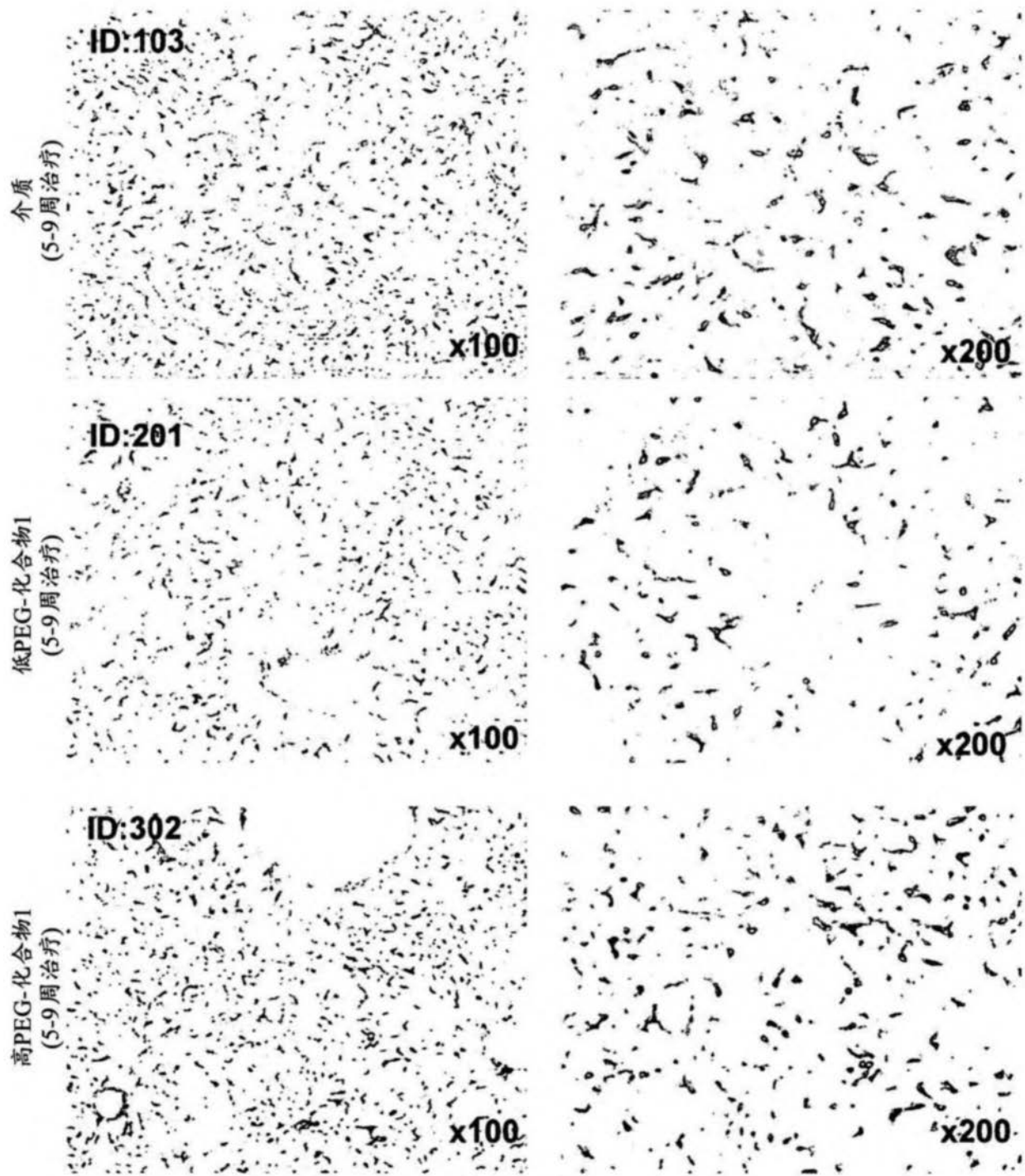


图35A

F4/80免疫染色肝切片的代表性的显微照片(续)

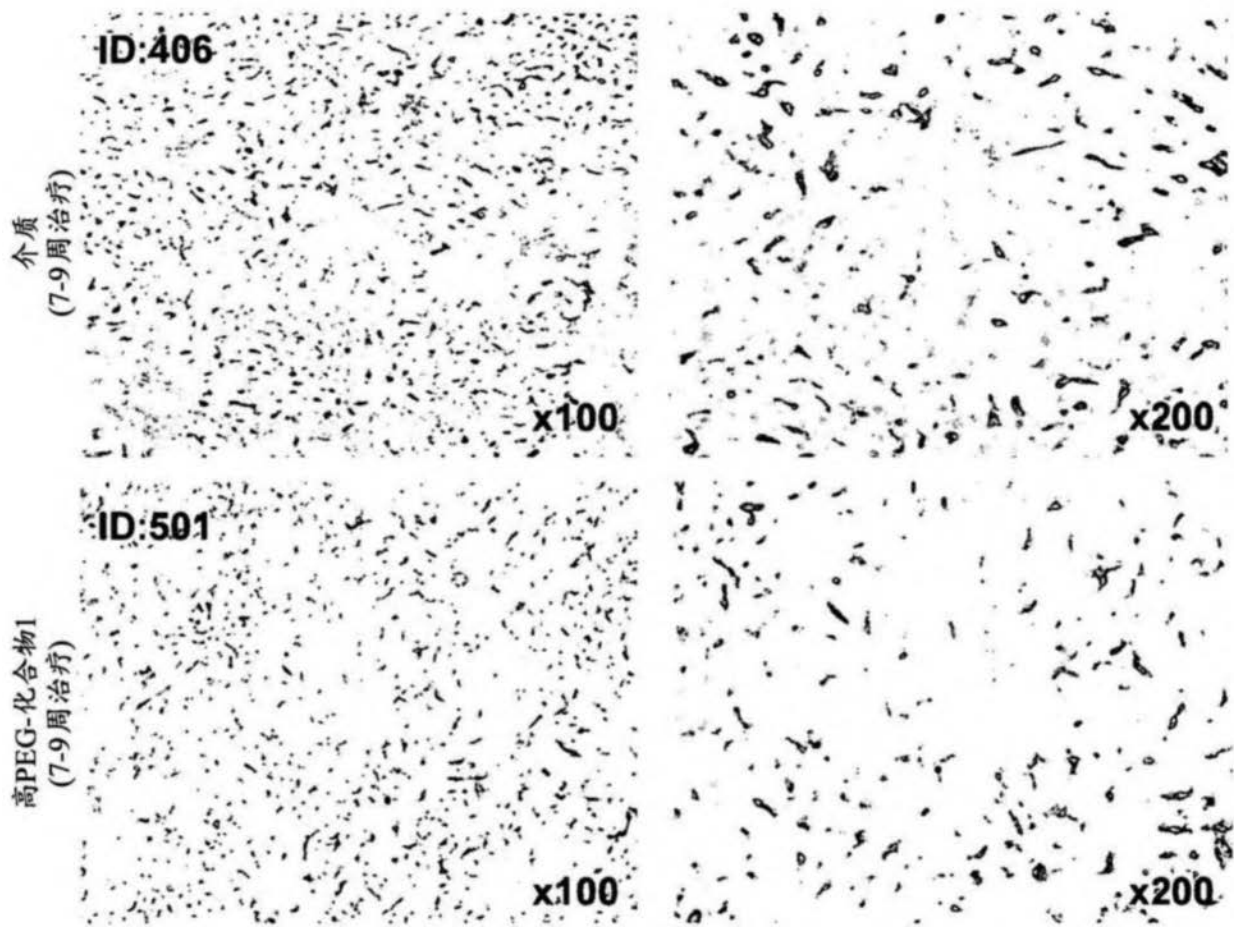


图35B

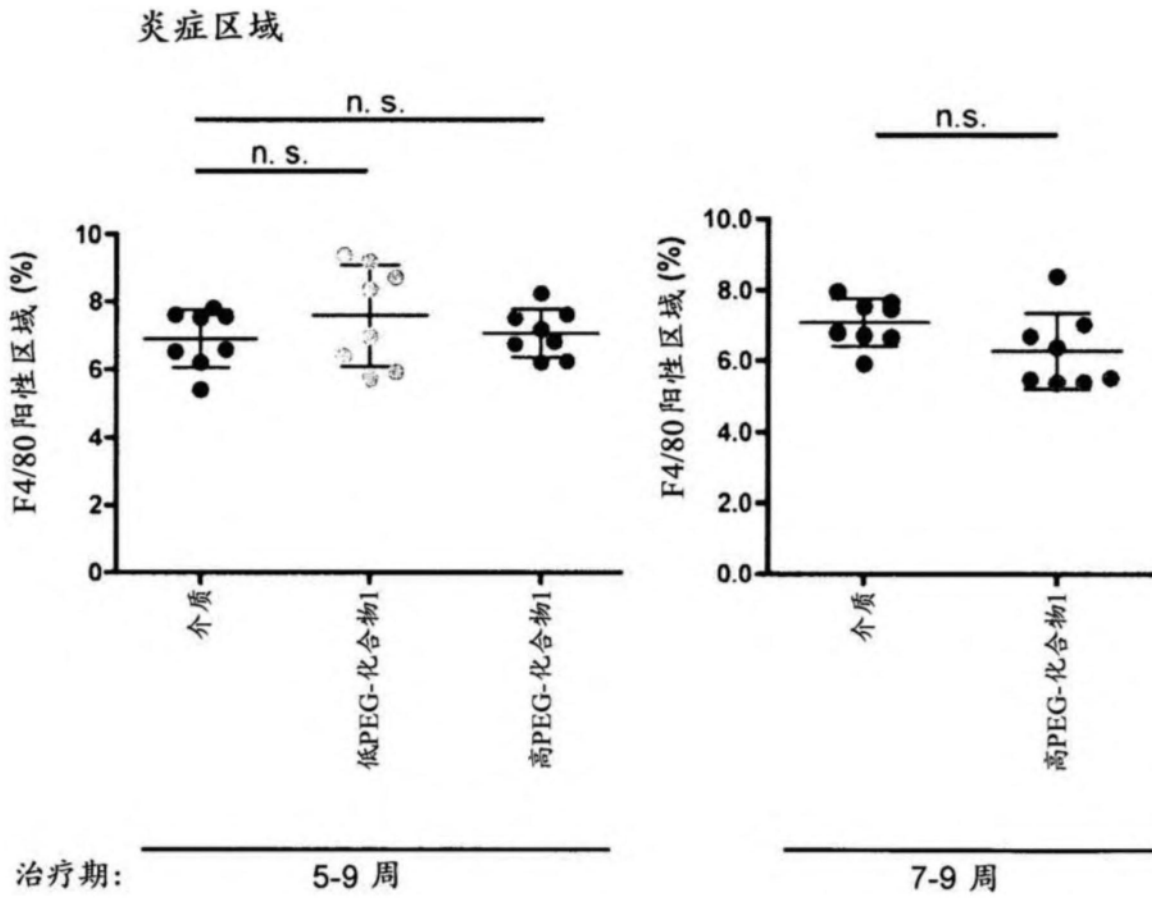


图36

油红染色肝切片的代表性的显微照片

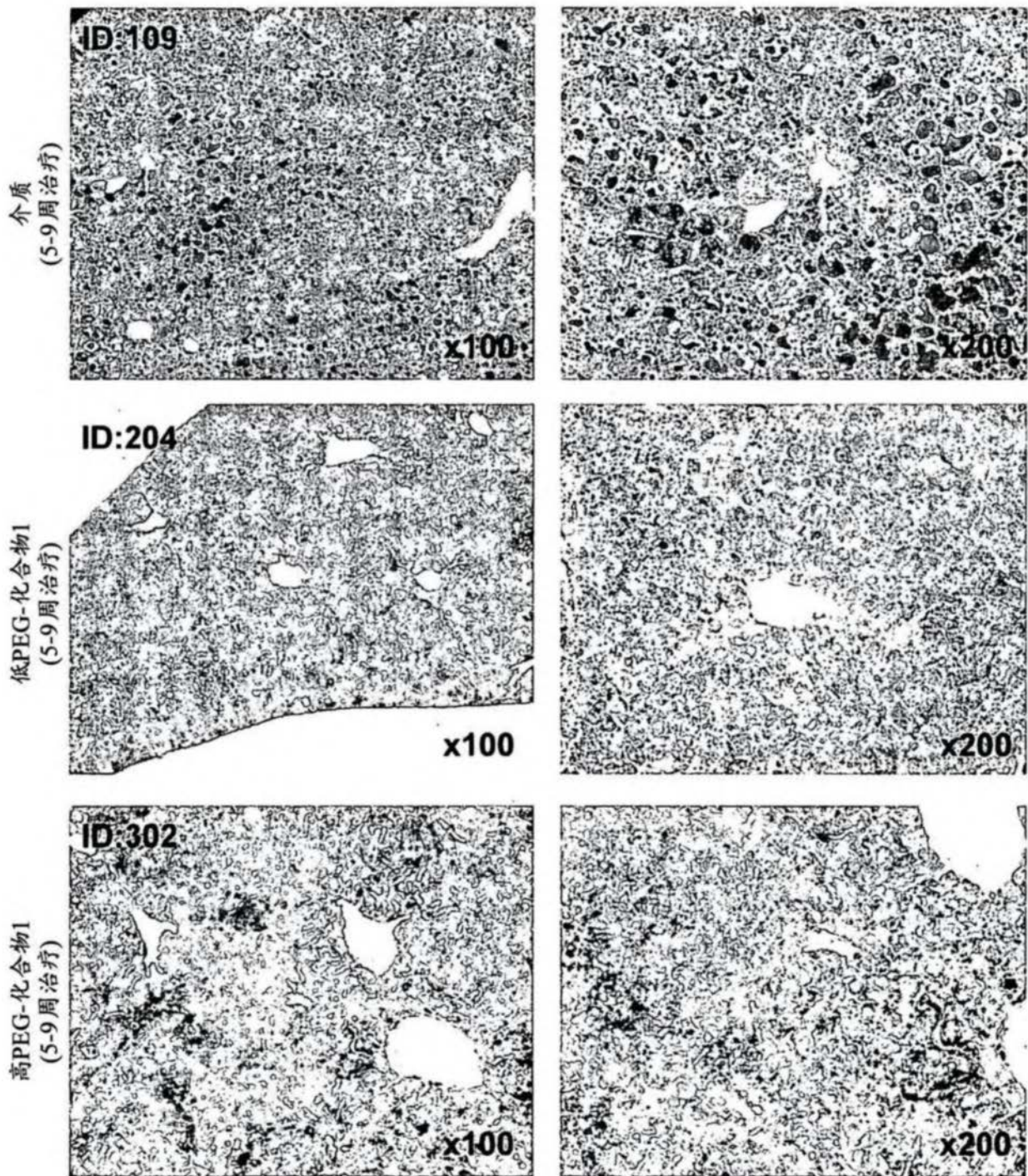


图37A

油红染色肝切片的代表性的显微照片(续)

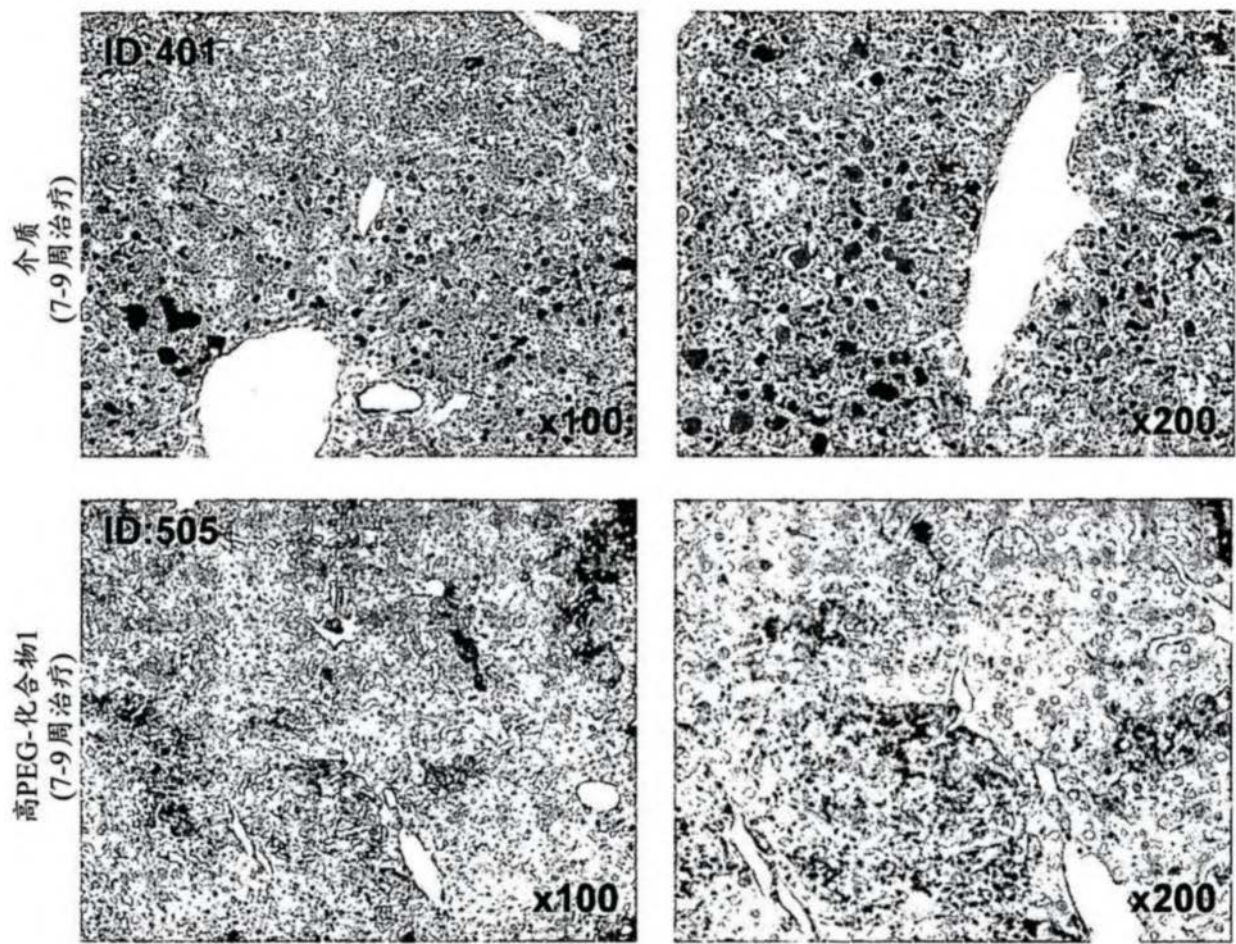


图37B

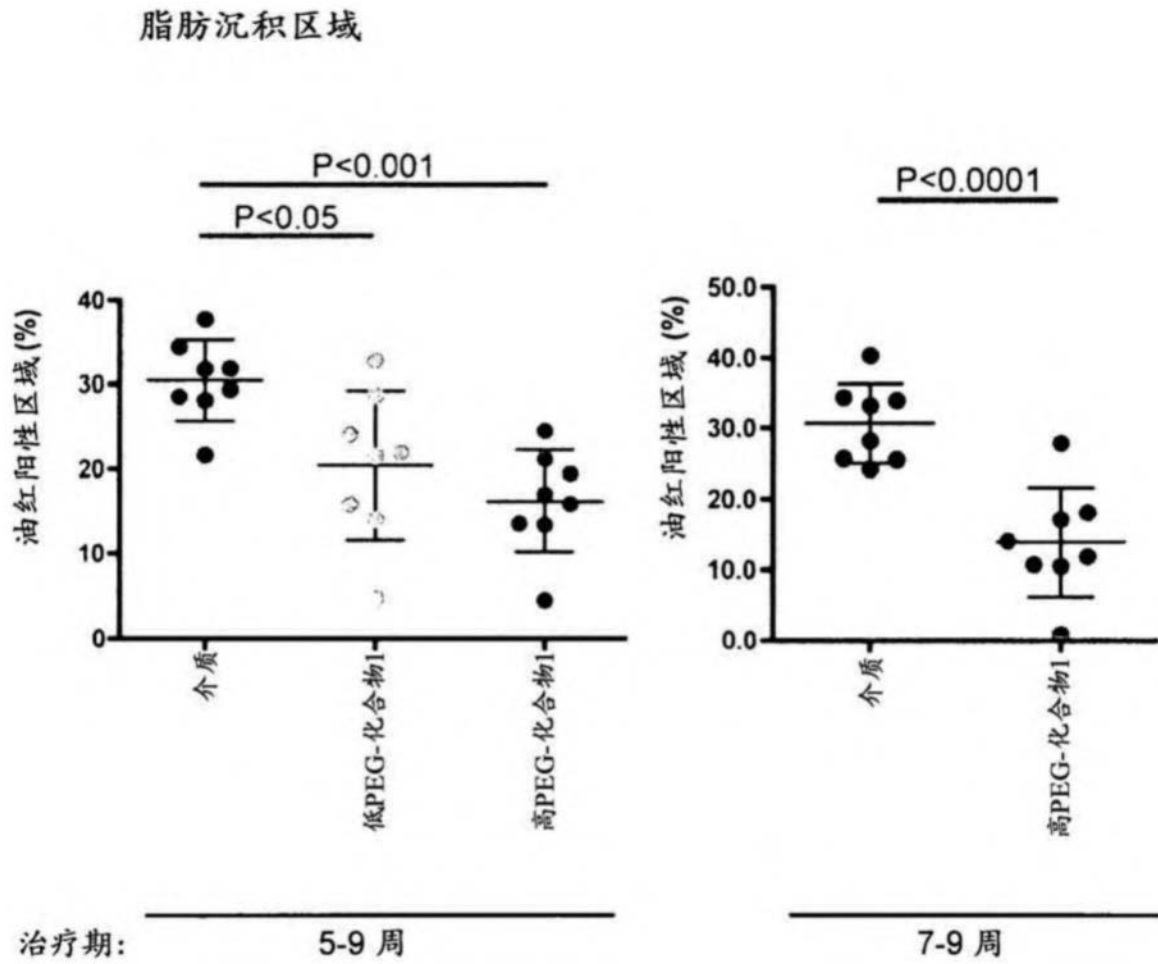


图38

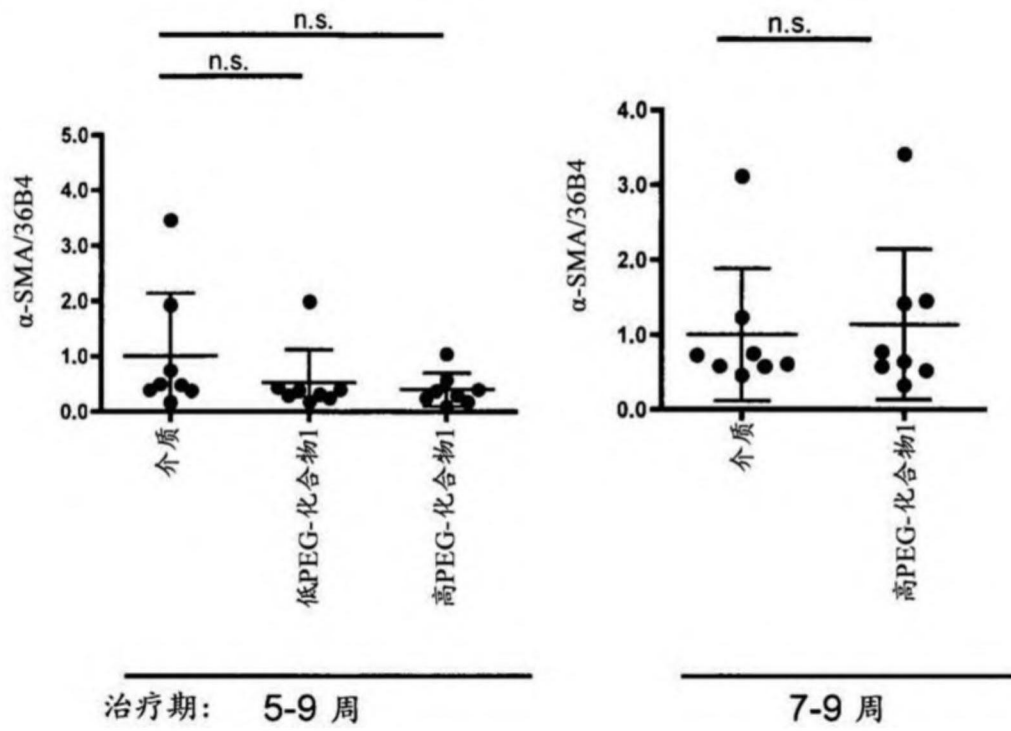
α -SMA

图39A

TIMP-1

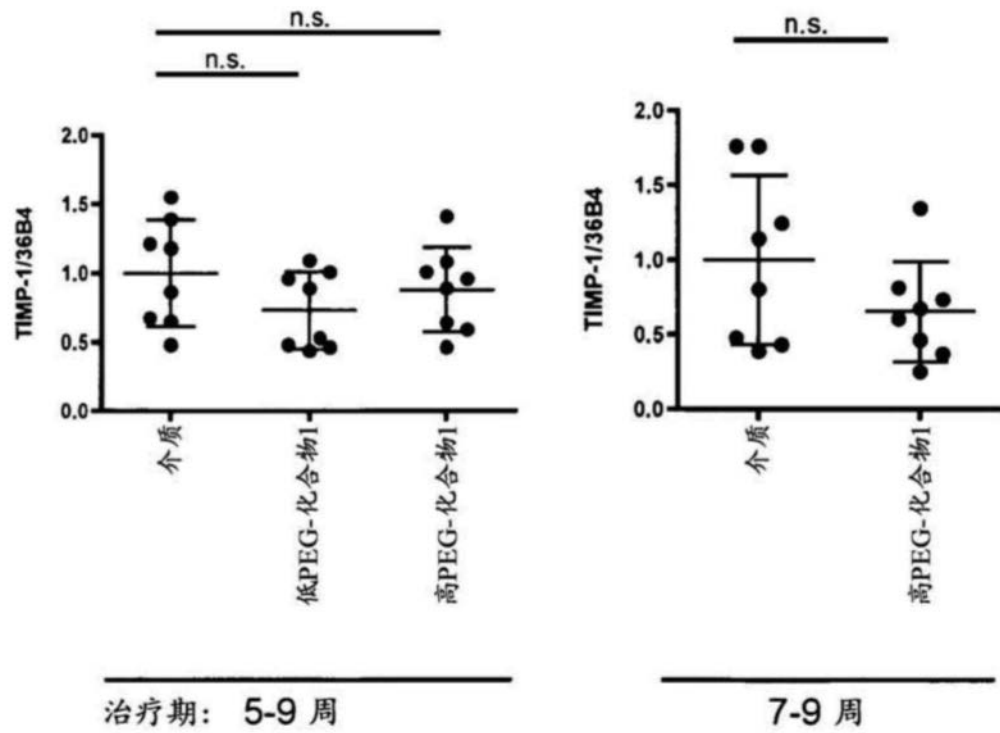


图39B

1型胶原

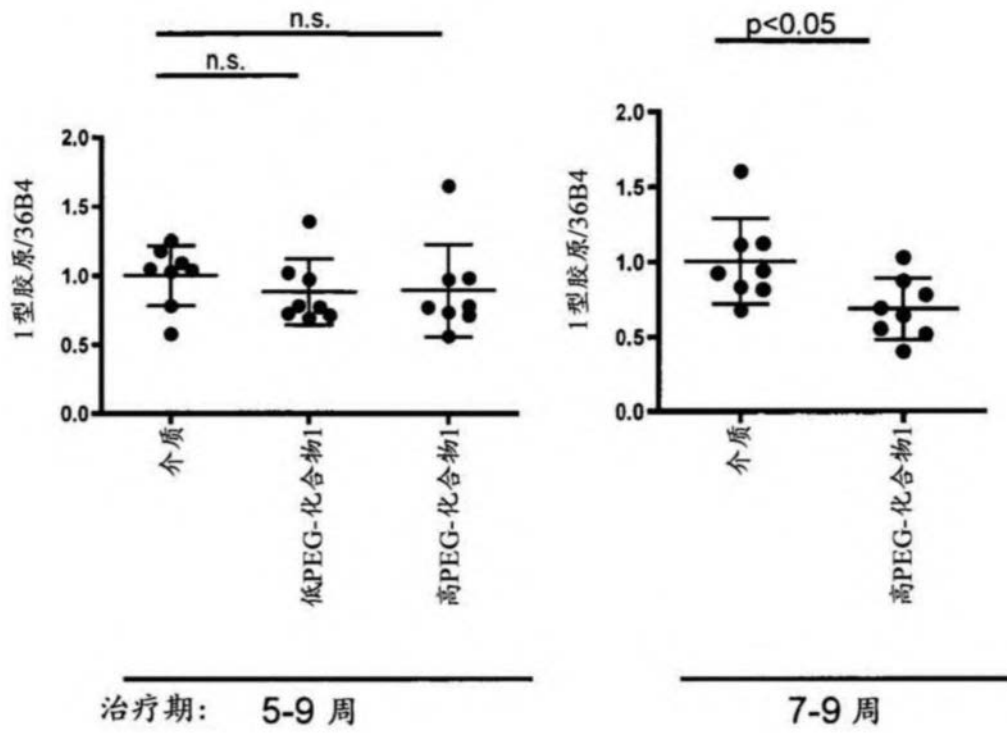


图39C

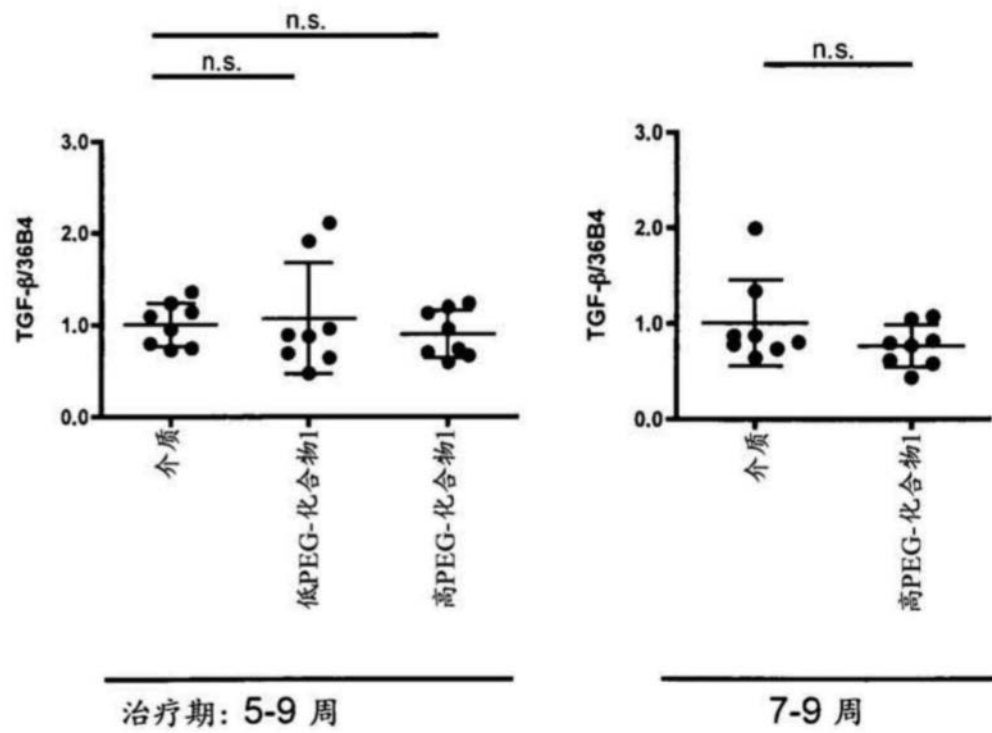
TGF- β 

图39D

修饰的FGF-21多肽融合蛋白

化合物名称	SEQ ID NO:	融合物排列	连接肽	SEQ ID NO:
化合物 101	401	PKE(2)-L1-FGF21(Cmp. 2)	GS	354
化合物 102	402	PKE(2)-L2-FGF21(Cmp. 2)	GGGS	355
化合物 103	403	PKE(2)-L3-FGF21(Cmp. 2)	EEEEDEEED	356
化合物 104	404	PKE(2)-L4-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEP	357
化合物 105	405	PKE(2)-L5-FGF21(Cmp. 2)	GSHHHHHHGS	358
化合物 106	406	PKE(2)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGGS	359
化合物 107	407	PKE(2)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGGS	360
化合物 108	408	PKE(2)-L8-FGF21(Cmp. 2)	GSGSGSGSGSGSGS	361
化合物 109	409	PKE(2)-L9-FGF21(Cmp. 2)	PSTPTPSPSTPTSPS	362
化合物 110	410	PKE(2)-L10-FGF21(Cmp. 2)	RGGEKKKEKEEERETKP	363
化合物 111	411	PKE(2)-L11-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGSGGGGS	364
化合物 112	412	PKE(2)-L12-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPSPPEPTPEP	365
化合物 113	413	PKE(2)-L13-FGF21(Cmp. 2)	PSTPTPSPSTPTPSPSTPTPSPSTPTPSPS	366
化合物 114	414	PKE(2)-L14-FGF21(Cmp. 2)	PSPEP	367
化合物 115	415	PKE(2)-L15-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPSPPEPTPEP	368
化合物 116	416	PKE(2)-L16-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPSPPEPTPEPSPPEPTPEP	369
化合物 117	417	PKE(2)-L17-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPSPPEPTPEPSPPEP	370
化合物 118	418	PKE(2)-L18-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPGGGSPTPEP	371
化合物 119	419	PKE(2)-L19-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPEEDPTPEP	372
化合物 120	420	PKE(2)-L20-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPEEEDPSPEPTPEP	373
化合物 121	421	PKE(2)-L21-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPSPPEPTPEPEEEDPSPEPTPEPSPPEP	374
化合物 122	422	PKE(2)-L22-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPSPPEPTPEPGGGSPPEPTPEPSPPEP	375
化合物 123	423	PKE(2)-L23-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPSPPEPTPEPSPPEPTPEP	376

图40A

化合物名称	SEQ ID NO:	融合物排列	连接肽	SEQ ID NO:
化合物 124	424	HuSA(C34A)-L201-FGF21(Cmp. 2)	GS	354
化合物 125	425	HuSA(C34A)-L202-FGF21(Cmp. 2)	GGGS	355
化合物 126	426	HuSA(C34A)-L203-FGF21(Cmp. 2)	GETGS	377
化合物 127	427	HuSA(C34A)-L204-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGGS	378
化合物 128	428	HuSA(C34A)-L205-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGT	379
化合物 129	429	HuSA(C34A)-L206-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGGS	359
化合物 130	430	HuSA(C34A)-L207-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTGS	380
化合物 131	431	HuSA(C34A)-L208-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGSGGGGS	381
化合物 132	432	HuSA(C34A)-L209-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTSGAGES	382
化合物 133	434	HuSA(C34A, des Leu-585)-L211-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGSGGGGS	359
化合物 134	435	HuSA(C34A, des Leu-585)-L207-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTGS	380
化合物 135	436	HuSA(C34A, des Leu-585)-L211-FGF21(Cmp. 1)	GGGSGGGSGGGSGGGGS	359
化合物 136	437	HuSA(C34A, des Leu-585)-L207-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEGTGSTGS	380
化合物 137	440	FGF21(Cmp. 2)-L205-HuSA(C34A)	GETGSSGEGT	379
化合物 138	441	FGF21(Cmp. 2)-L209-HuSA(C34A)	GETGSSGEGTGSTSGAGES	382
化合物 139	442	FGF21(Cmp. 2)-L210-HuSA(C34A)	GETGSSGEGTGSTSGAGES	383
化合物 140	443	FGF21(Cmp. 1)-L209-HuSA(C34A)	GETGSSGEGTGSTSGAGES	382
化合物 141	446	FGF21(Cmp. 2)-L209-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTSGAGES	382
化合物 142	447	FGF21(Cmp. 1)-L209-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEGTGSTSGAGES	382
化合物 143	448	FGF21(Cmp. 2)-L209-HuSA(C34A, des Leu-585)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTSGAGES	382
化合物 144	449	FGF21(Cmp. 1)-L209-HuSA(C34A, des Leu-585)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEGTGSTSGAGES	382
化合物 145	450	FGF21(Cmp. 2)-L210-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTSGAGES	383
化合物 146	451	FGF21(Cmp. 1)-L210-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEGTGSTSGAGES	383

图40B

化合物名称	SEQ ID NO:	融合物排列	连接肽	SEQ ID NO:
化合物 147	452	PKE(1)-L1-FGF21(Cmp. 2)	GS	354
化合物 148	453	PKE(1)-L2-FGF21(Cmp. 2)	GGGS	355
化合物 149	454	PKE(1)-L3-FGF21(Cmp. 2)	EEEEEEEEED	356
化合物 150	455	PKE(1)-L4-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEP	357
化合物 151	456	PKE(1)-L5-FGF21(Cmp. 2)	GSHHHHHHHGS	358
化合物 152	457	PKE(1)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGGS	359
化合物 153	458	PKE(1)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGGS	360
化合物 154	459	PKE(1)-L8-FGF21(Cmp. 2)	GSGSGSGSGSGGS	361
化合物 155	460	PKE(1)-L9-FGF21(Cmp. 2)	PSTPTSPSTPTSPS	362
化合物 156	461	PKE(1)-L10-FGF21(Cmp. 2)	RGGEKKKEKEEQEERETKP	363
化合物 157	462	PKE(1)-L11-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGSGGGGS	364
化合物 158	463	PKE(1)-L12-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPPSPPEPTPEP	365
化合物 159	464	PKE(1)-L13-FGF21(Cmp. 2)	PSTPTSPSTPTSPSTPTSPSTPTSPSTPTSPS	366
化合物 160	465	PKE(1)-L14-FGF21(Cmp. 2)	PSPEP	367
化合物 161	466	PKE(1)-L15-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPPSPPEPTPEP	368
化合物 162	467	PKE(1)-L16-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPPSPPEPTPEPPSPPEPTPEP	369
化合物 163	468	PKE(1)-L17-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPPEPTPEPPSPPEP	370
化合物 164	469	PKE(1)-L18-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPGGGSPTPEP	371
化合物 165	470	PKE(1)-L19-FGF21(Cmp. 2)	PSPEEEDPTPEP	372
化合物 166	471	PKE(1)-L20-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEEEDPSPEPTPEP	373
化合物 167	472	PKE(1)-L21-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPPEPTPEEEDPSPEPTPEPPSPPEP	374
化合物 168	473	PKE(1)-L22-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPPEPTPEPGGGSPEPTPEPPSPPEP	375
化合物 169	474	PKE(1)-L23-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPPSPPEPTPEPPSPPEPTPEP	376

图40C

化合物名称	SEQ ID NO:	融合物排列	连接肽	SEQ ID NO:
化合物 170	475	Fc(hlgG1a_191)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGGS	360
化合物 171	476	Fc(hlgG1a_191)-L250-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	350
化合物 172	477	Fc(hlgG1a_191)-L12-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPPSPPEPTPEPPSPPTPEP	365
化合物 173	478	Fc(hlgG1a_191)-L251-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPPSPPEP	351
化合物 174	479	Fc(hlgG1a_191)-L5-FGF21(Cmp. 2)	GSHHHHHHHHGS	358
化合物 175	480	Fc(hlgG1a_191)-L252-FGF21(Cmp. 2)	ELQLEESAAEAQEGELE	352
化合物 176	481	Fc(hlgG1a_190)-L253-FGF21(Cmp. 2)	SSGGSGGGSGGGSGGGGS	353
化合物 177	482	Fc(hlgG1a_191)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGGS	359
化合物 178	483	Fc(hlgG1a_189)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGGS	359
化合物 179	484	Fc(hlgG1a_191)-L7-FGF21-1aa(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGGS	360
化合物 180	485	Fc(hlgG1a_191)-L7-FGF21-3aa(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGGS	360
化合物 181	486	Fc(hlgG1f_1.1_186)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGGS	360
化合物 182	487	Fc(hlgG1a_191b)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGGS	360

图40D

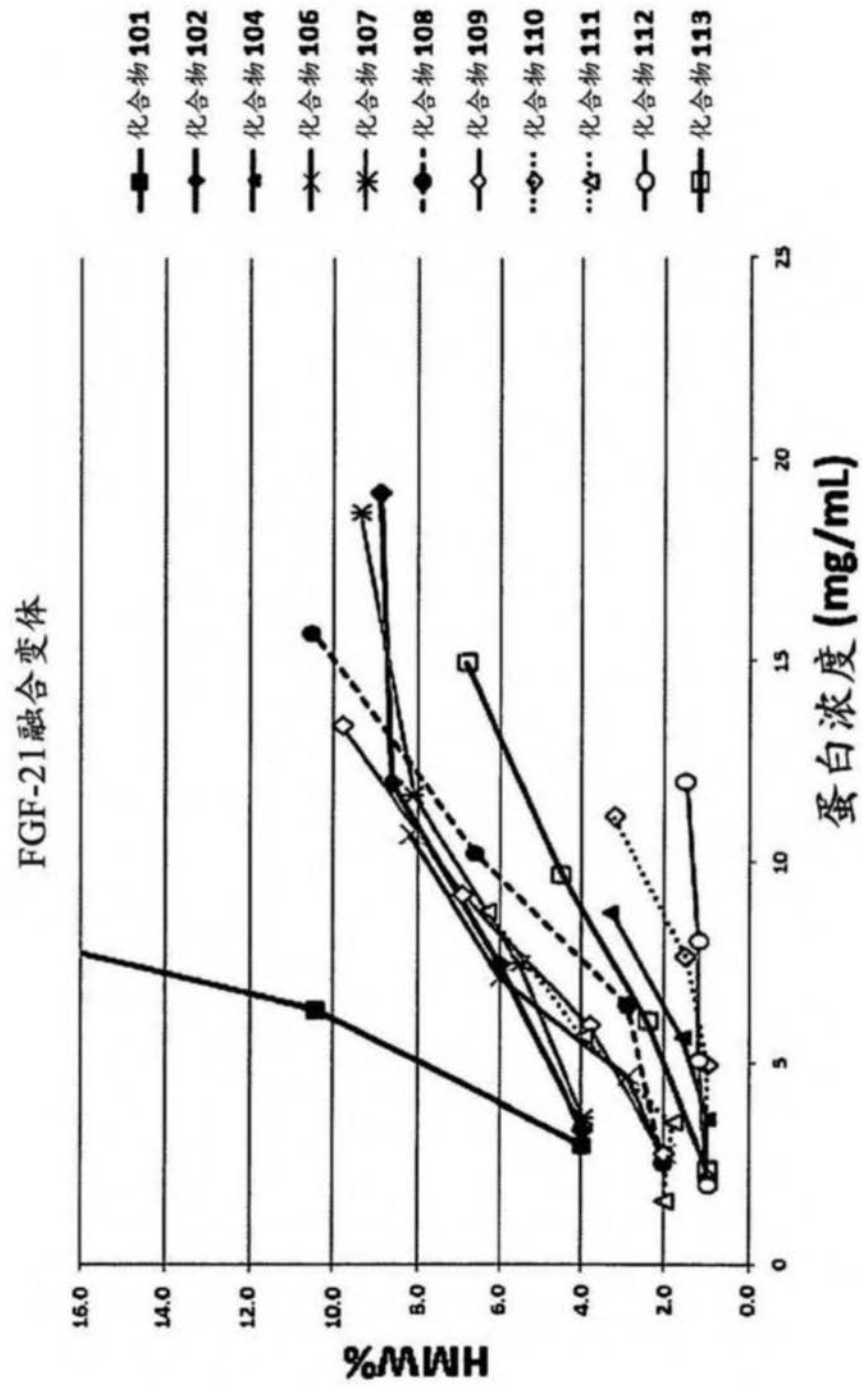


图41

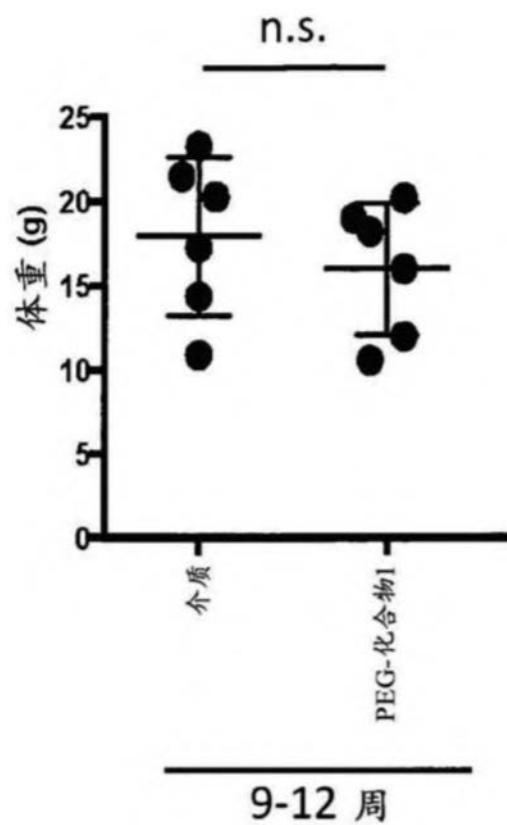


图42A

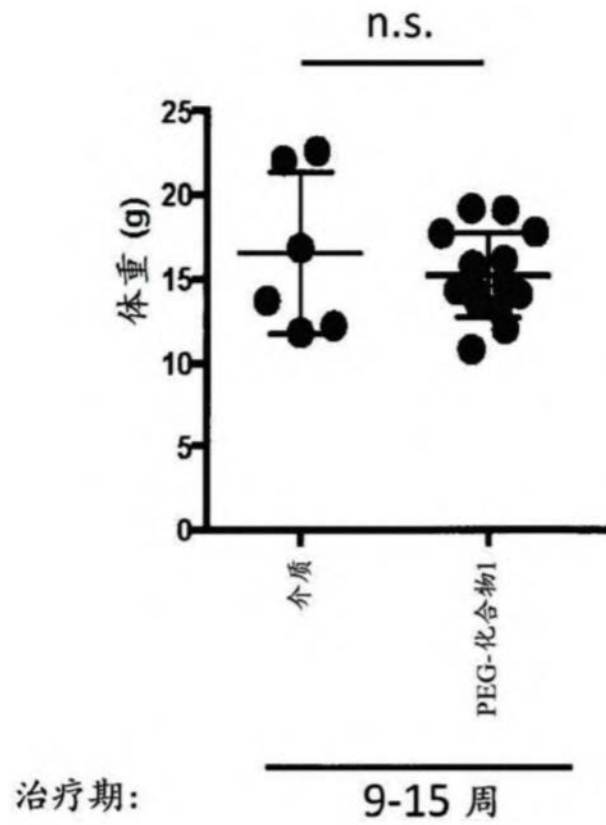


图42B

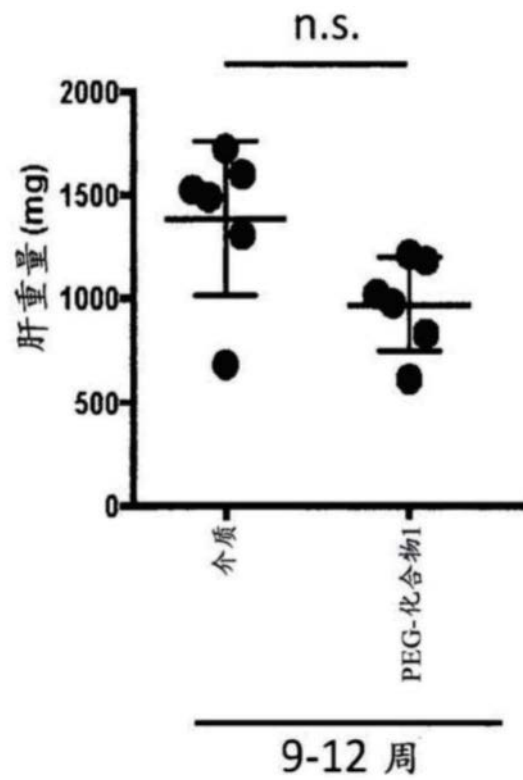


图43A

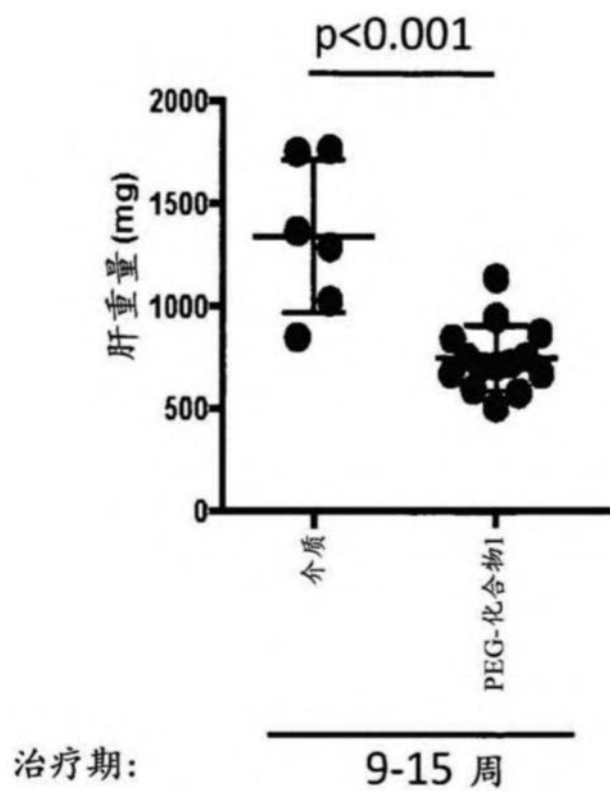


图43B

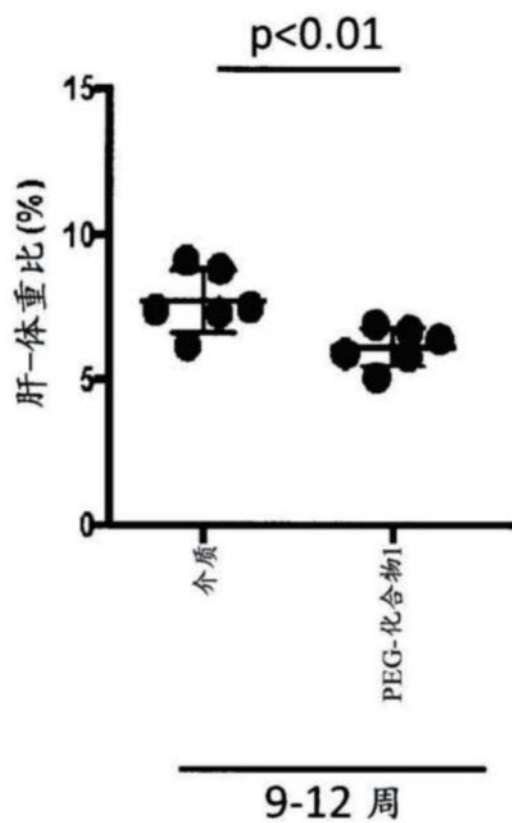


图44A

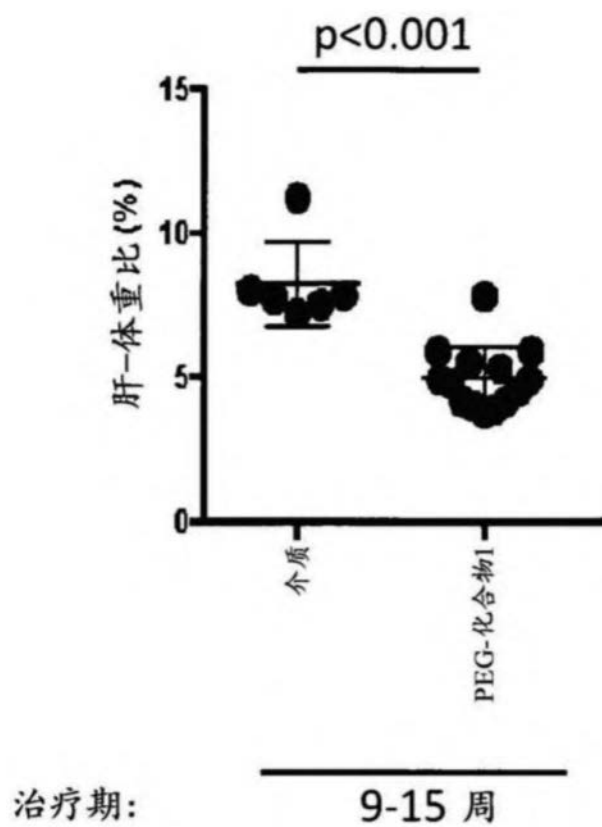


图44B

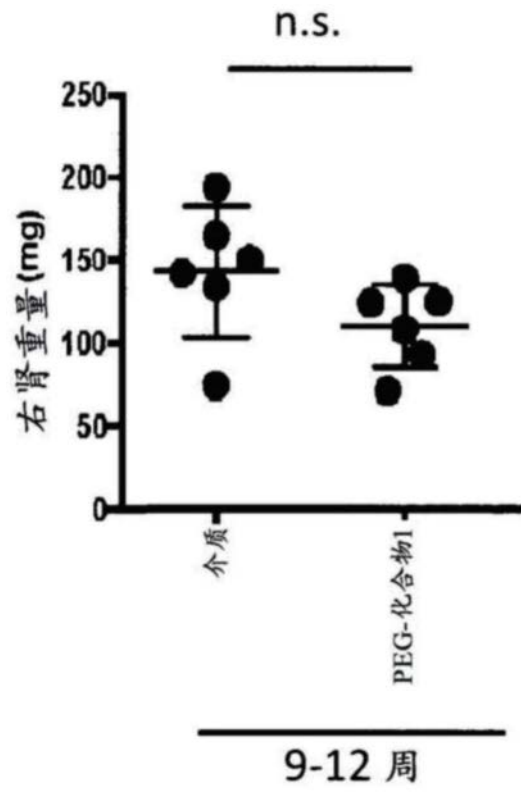


图45A

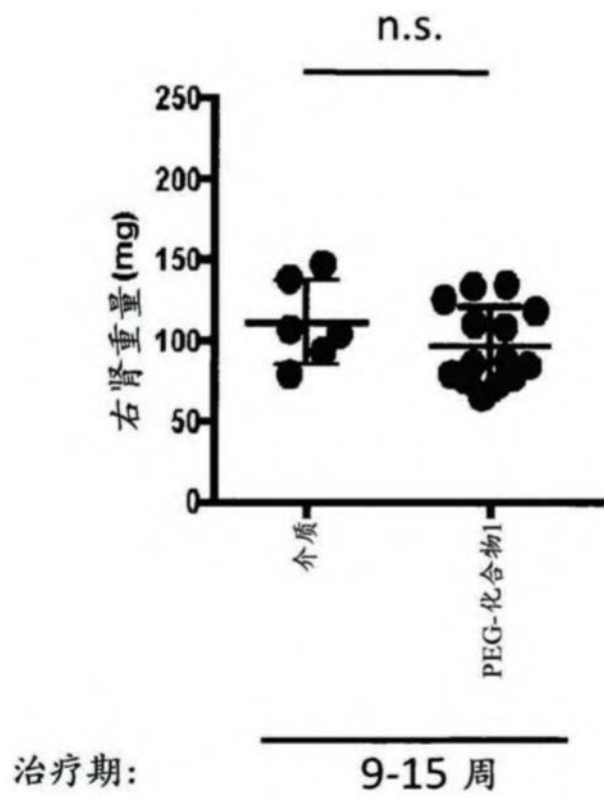


图45B

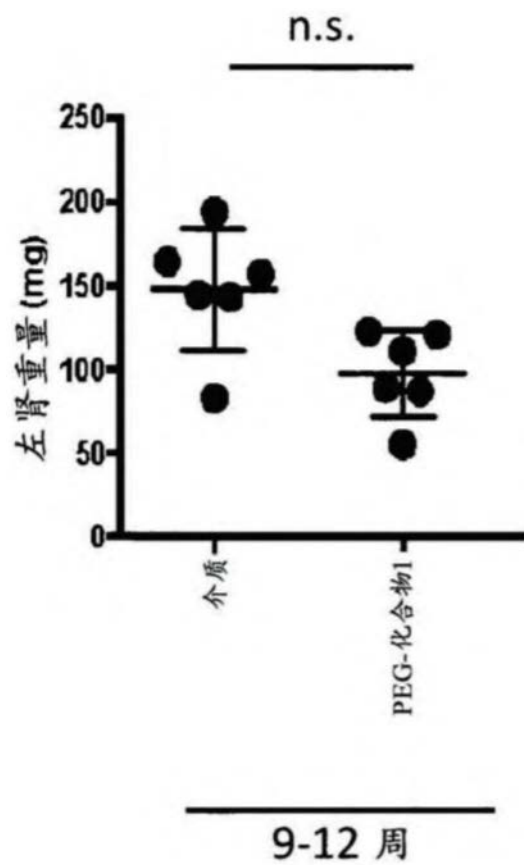


图46A

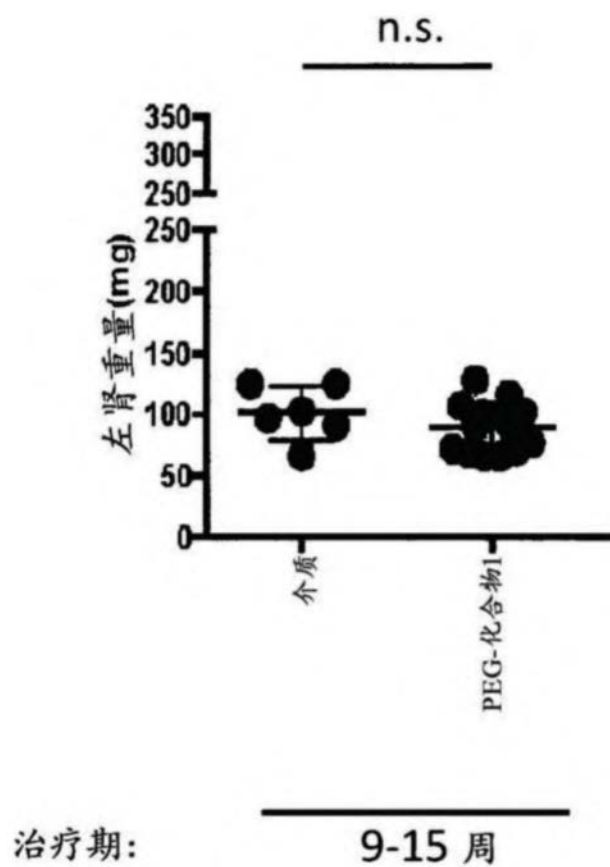


图46B

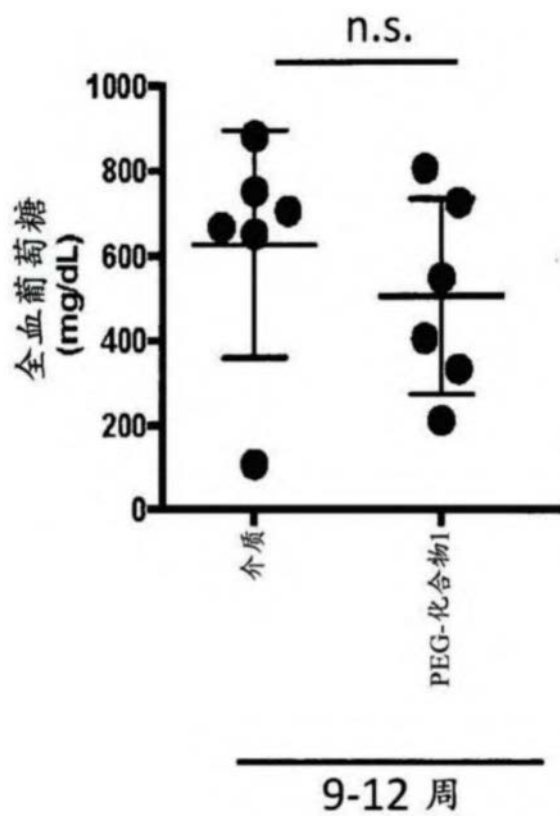


图47A

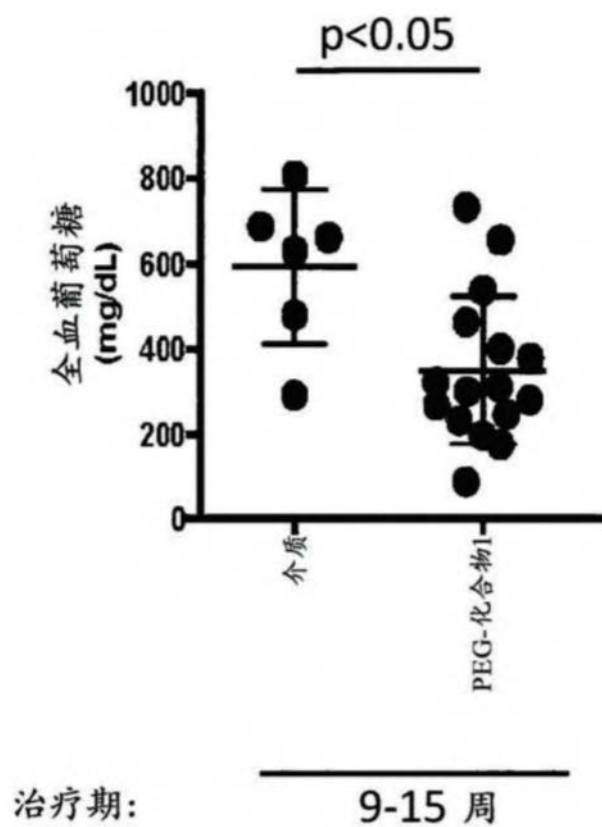


图47B

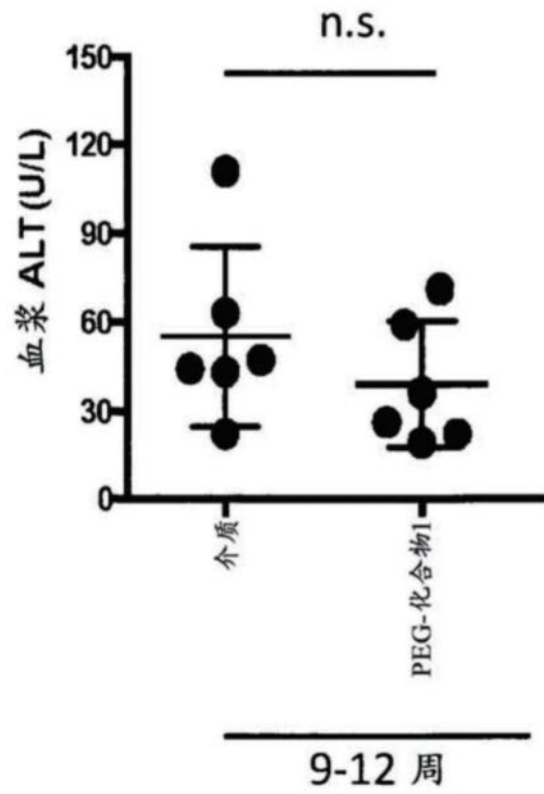


图48A

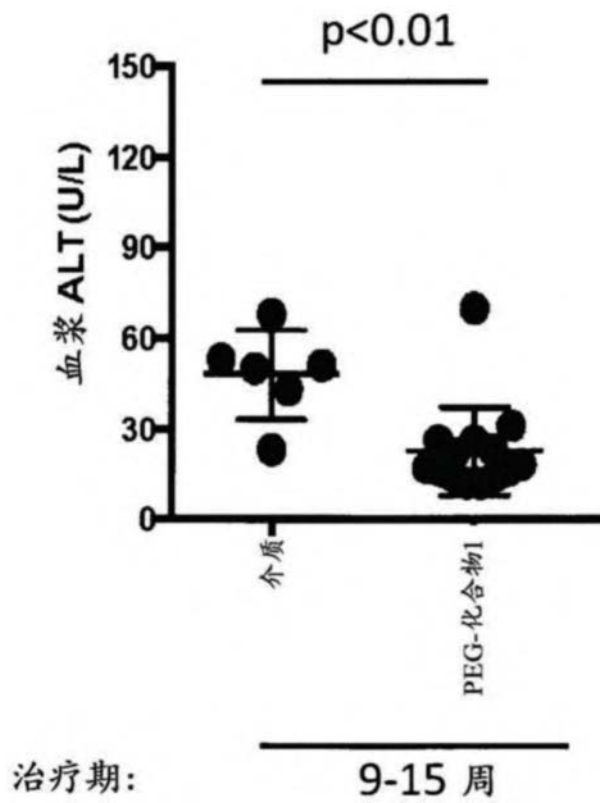


图48B

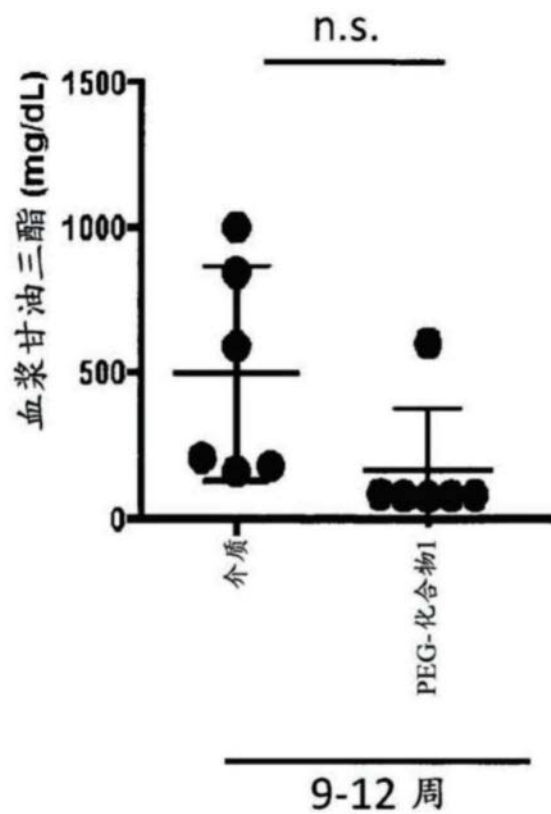


图49A

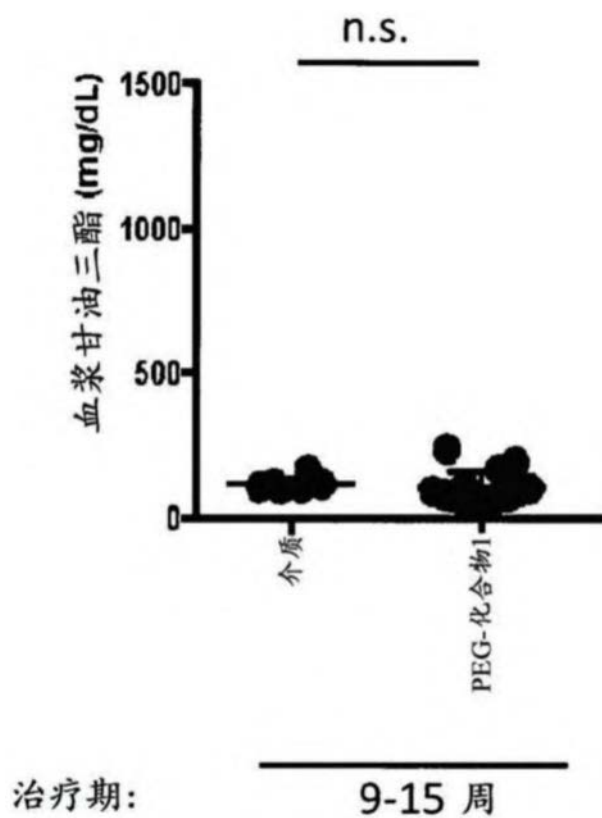


图49B

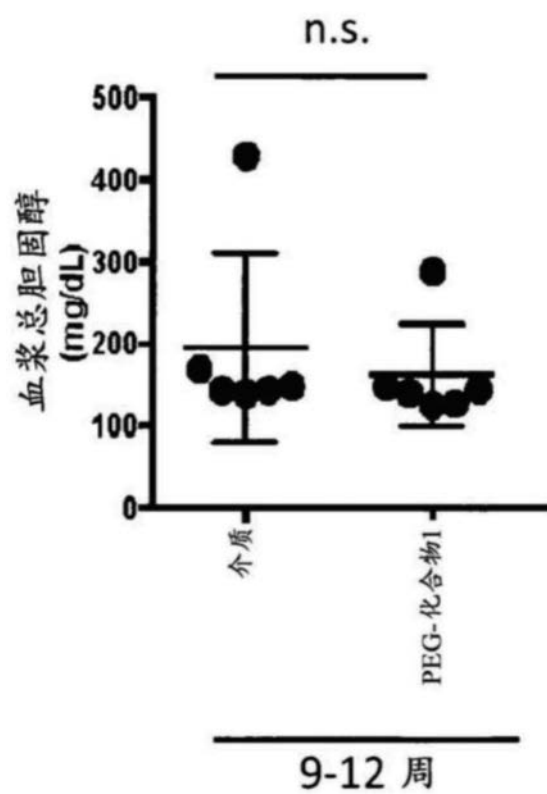


图50A

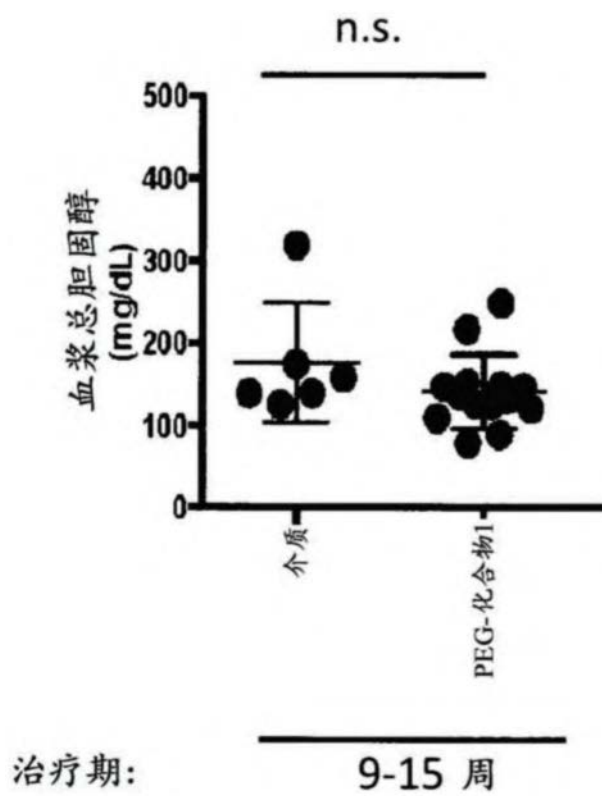


图50B

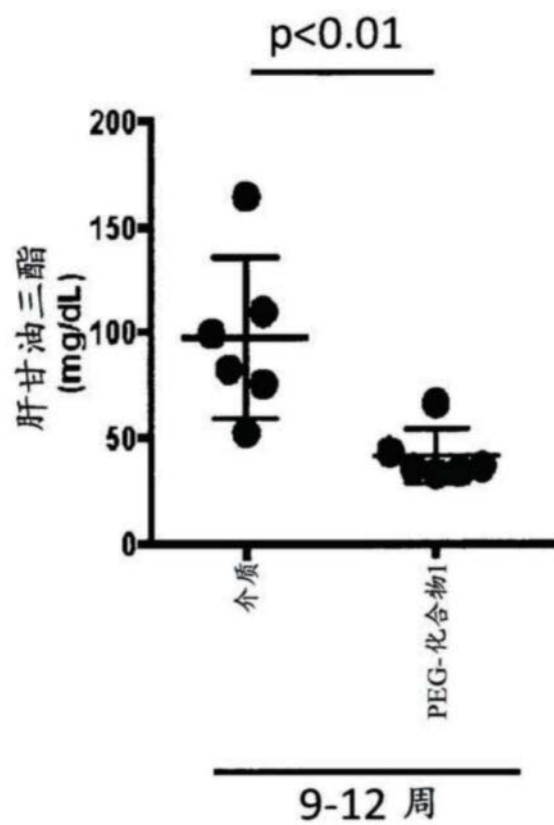


图51A

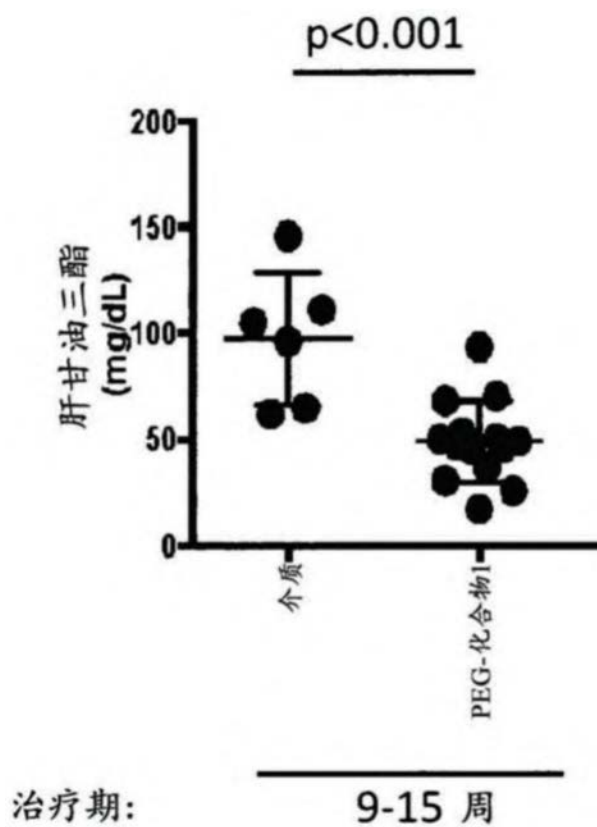


图51B

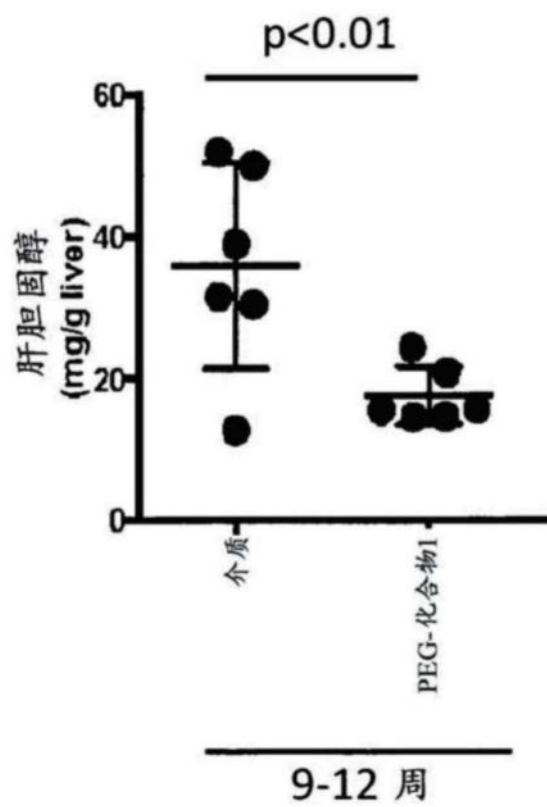


图52A

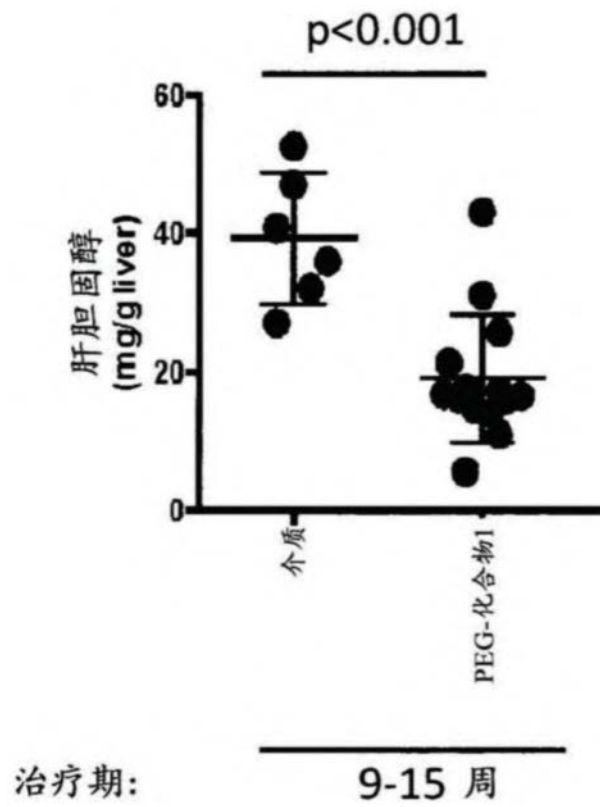


图52B

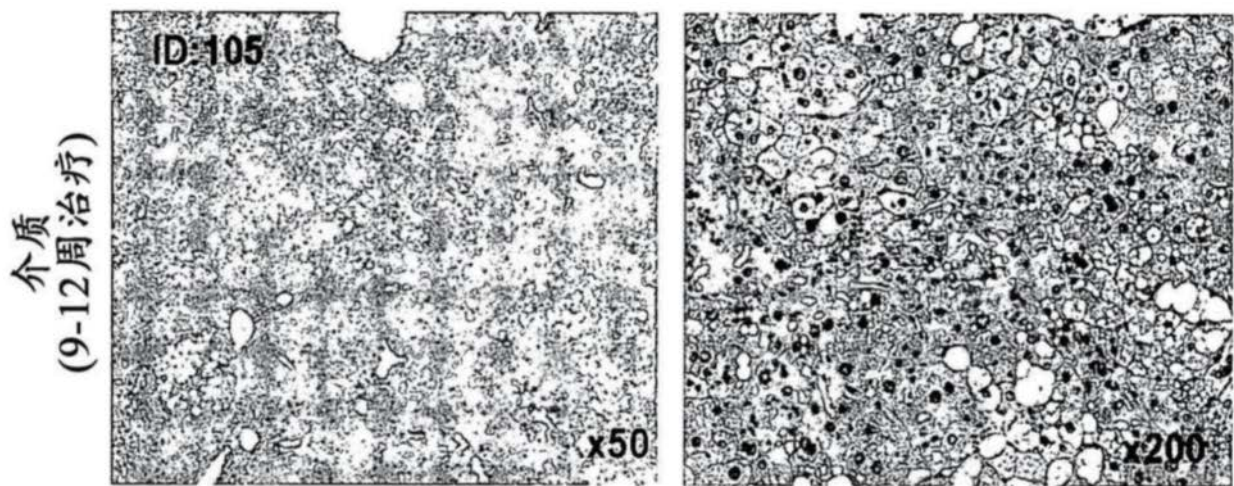


图53A

图53B

PEG-化合物I
(9-12周治疗)

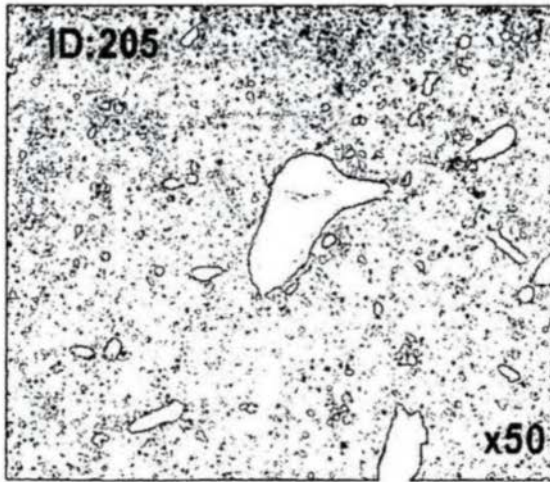


图53C

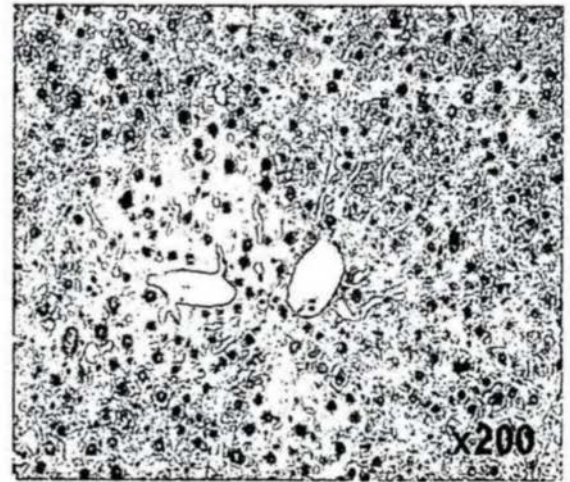


图53D

介质
(9-15周治疗)

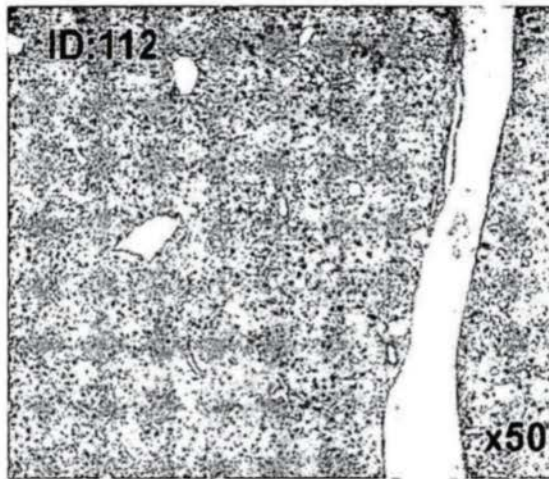


图53E

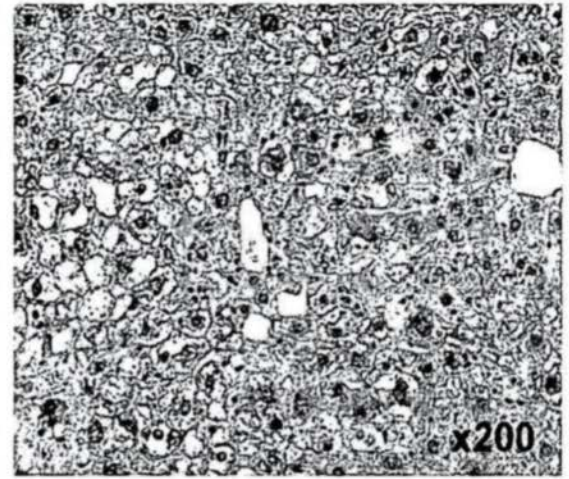


图53F

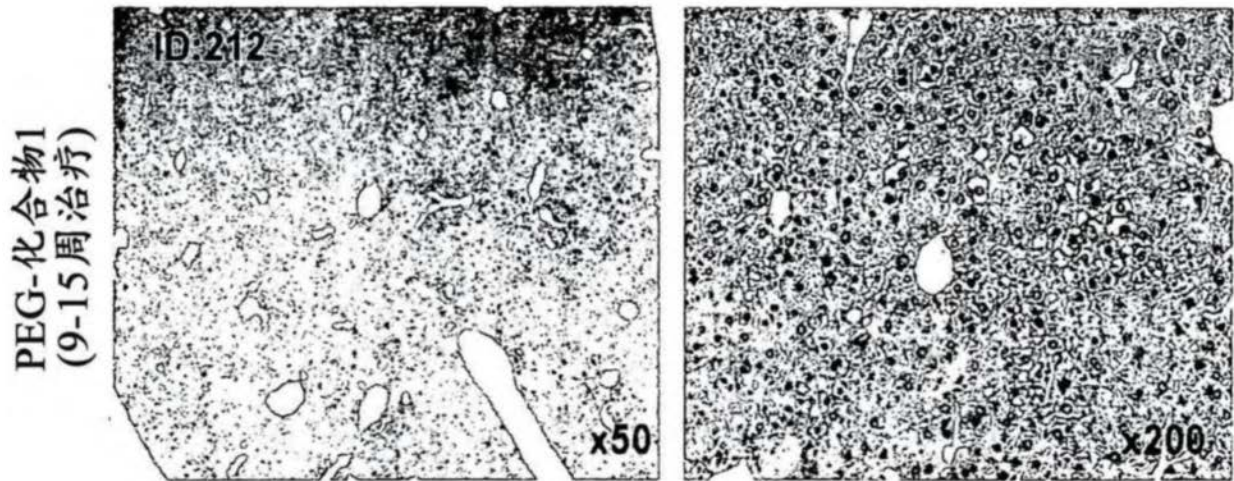


图53G

图53H

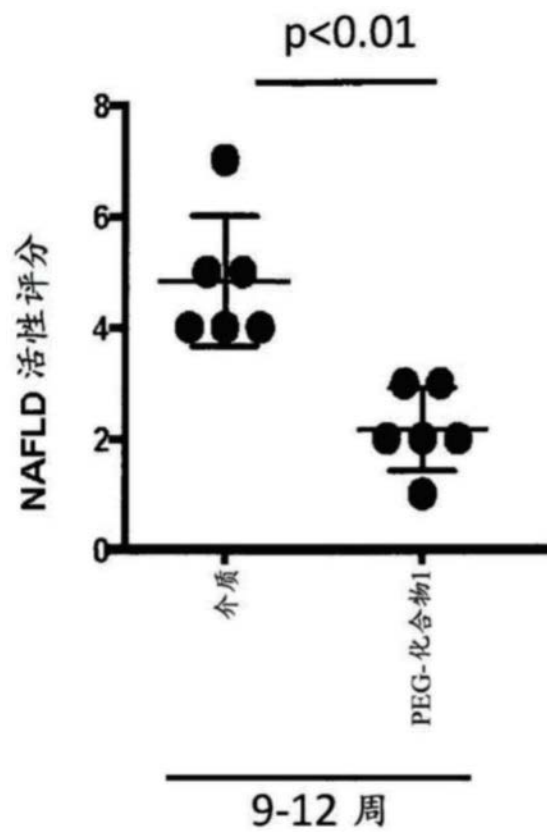


图54A

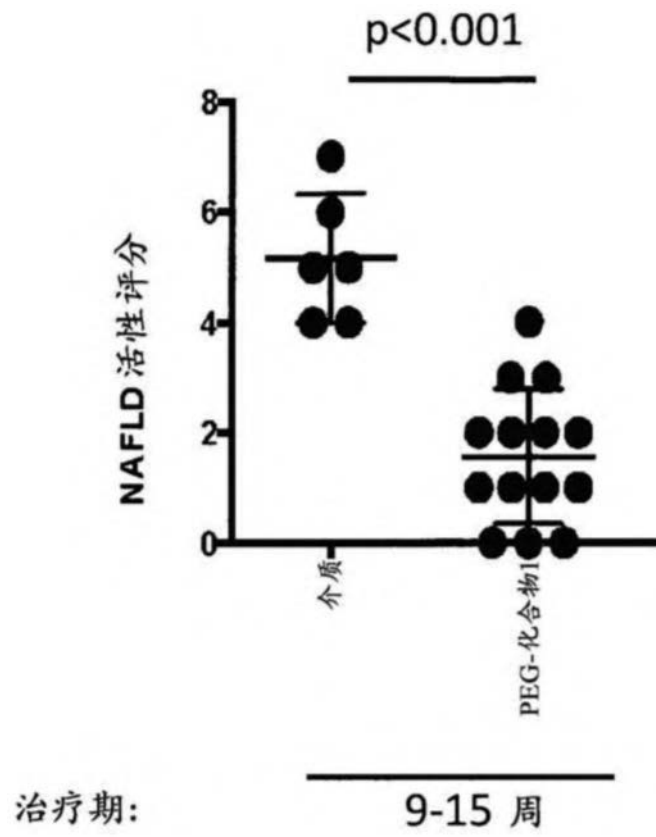


图54B

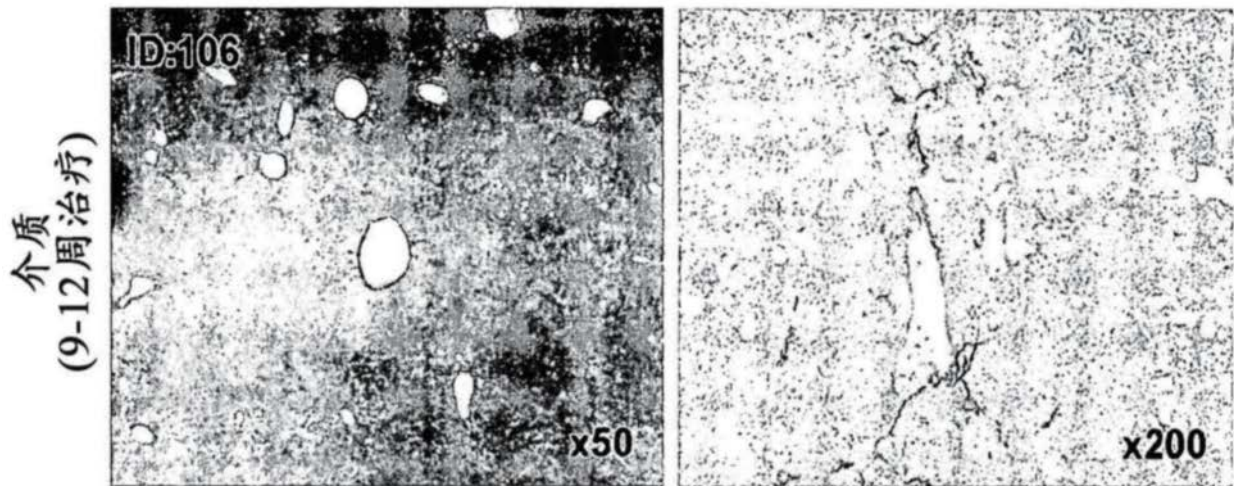


图55A

图55B

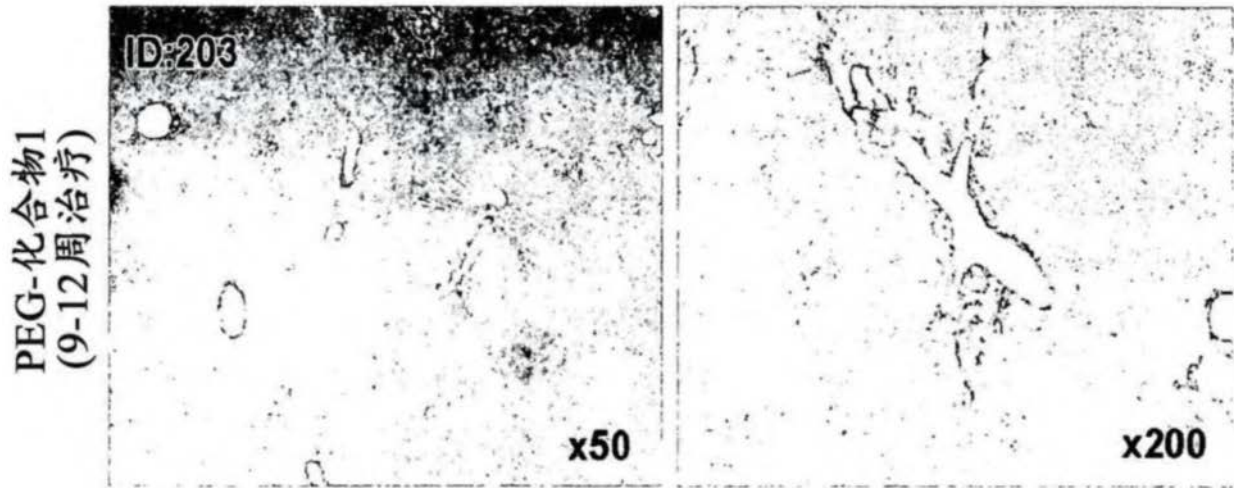


图55C

图55D

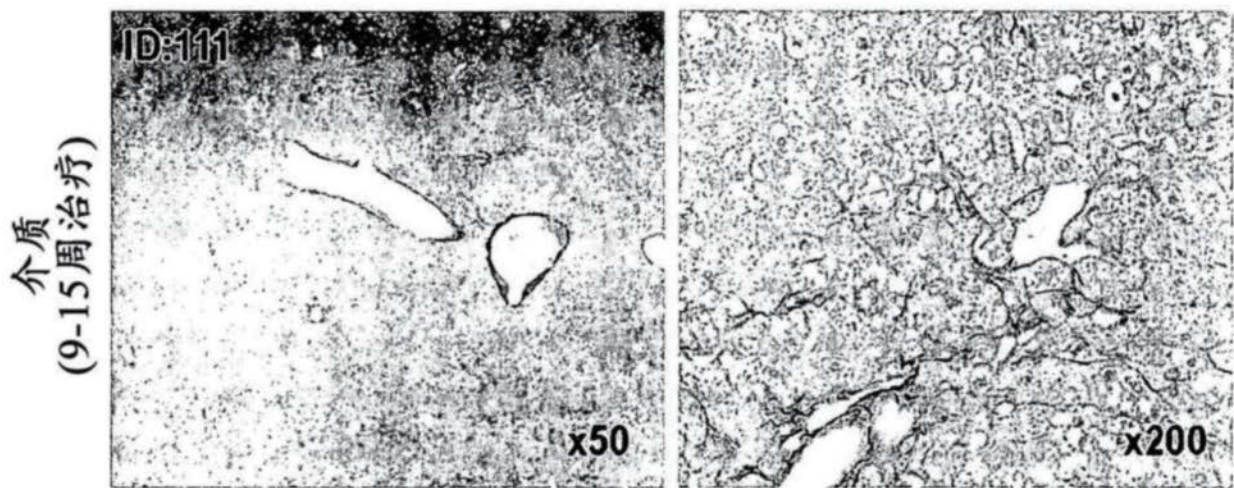


图55E

图55F

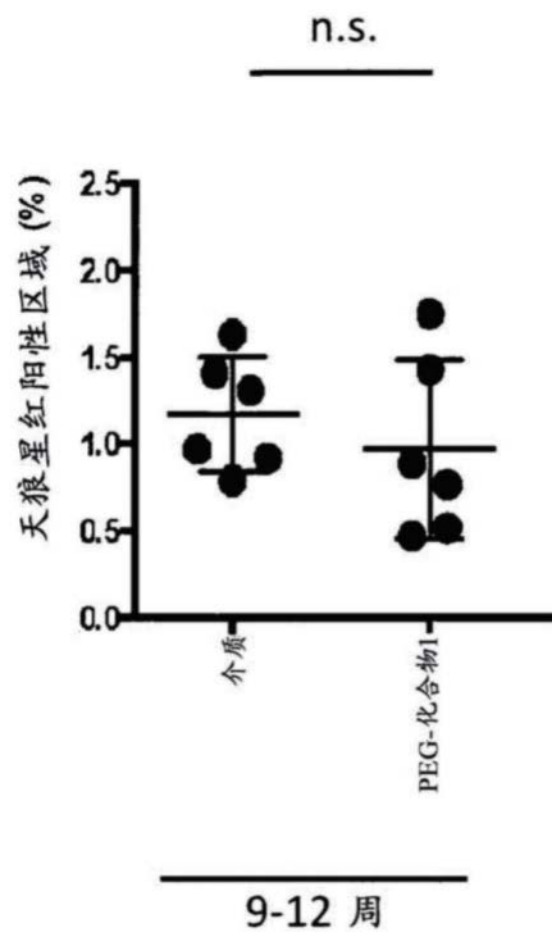
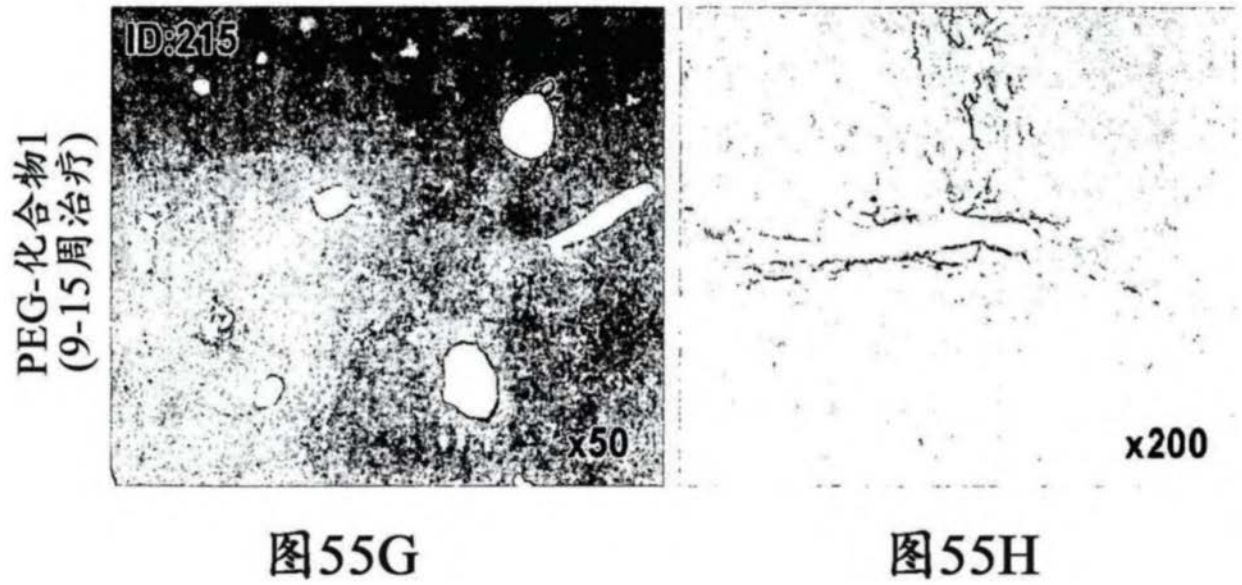


图56A

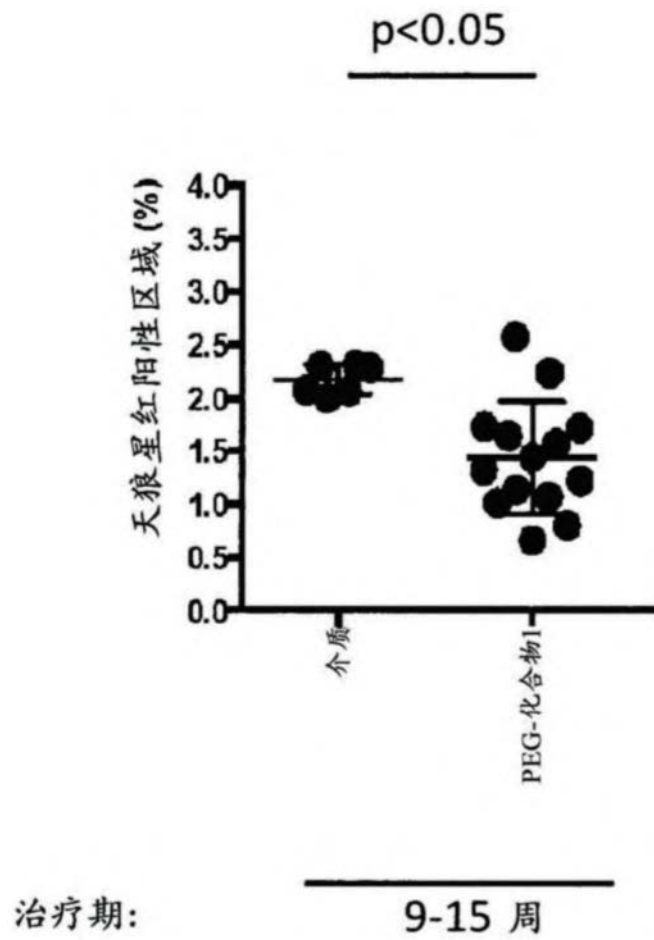


图56B

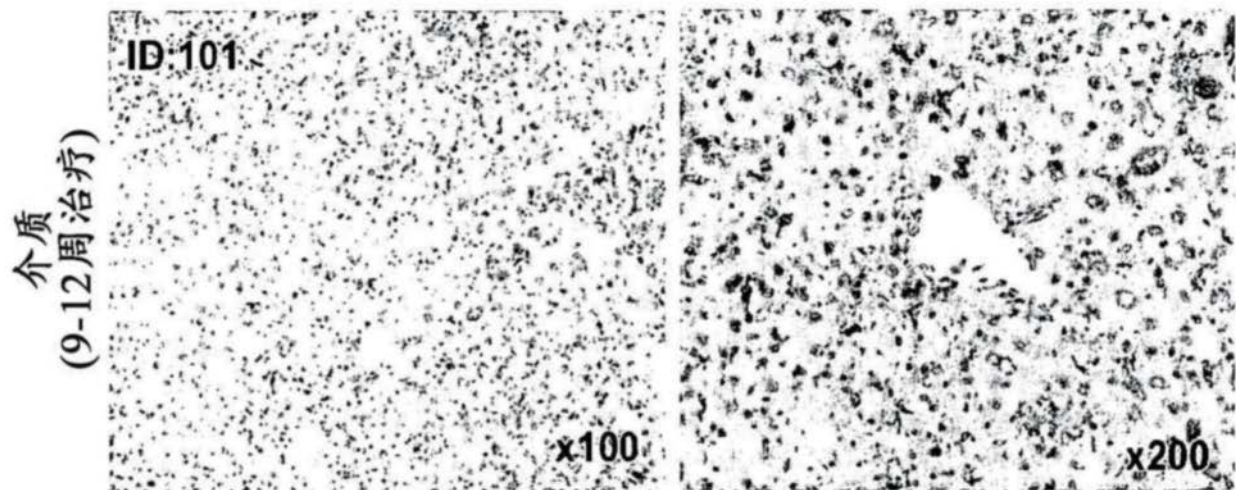
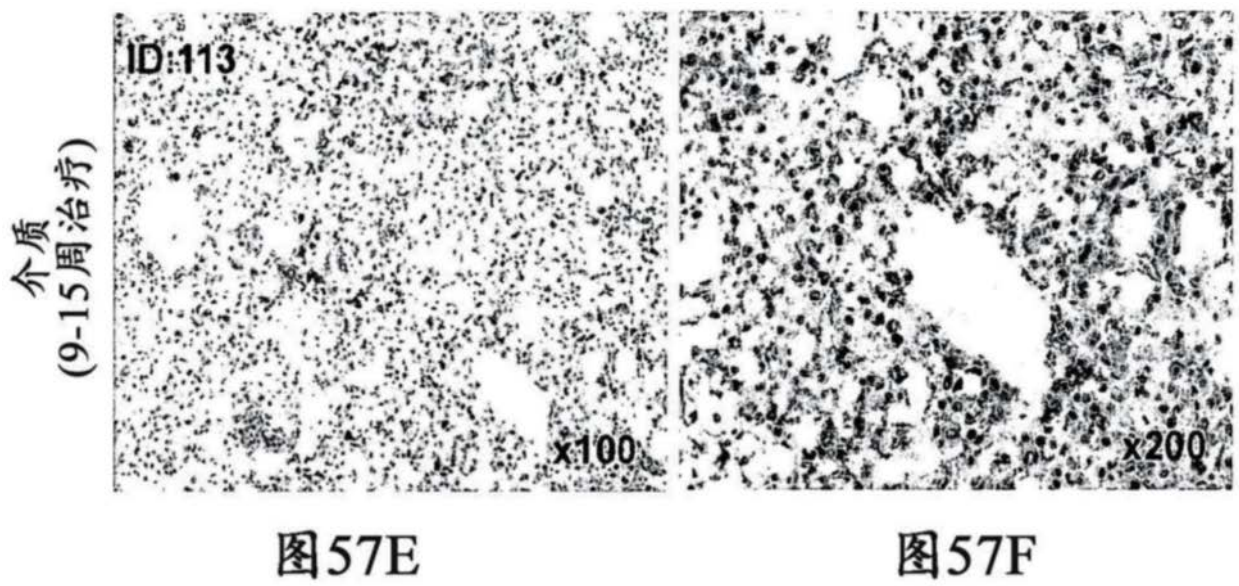
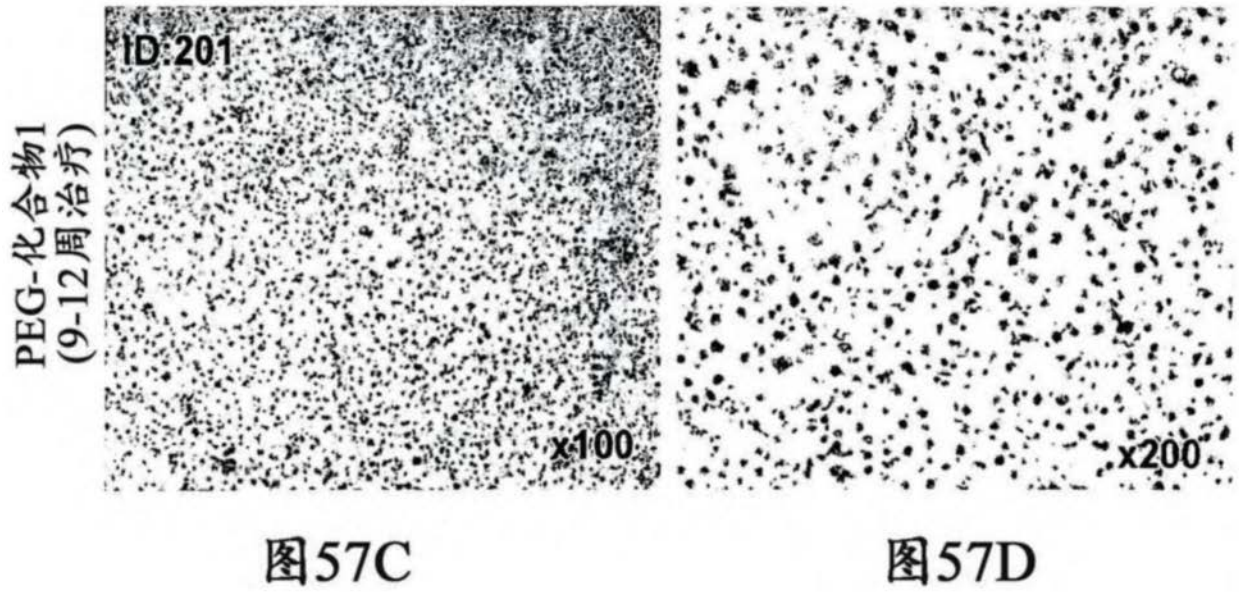


图57A

图57B



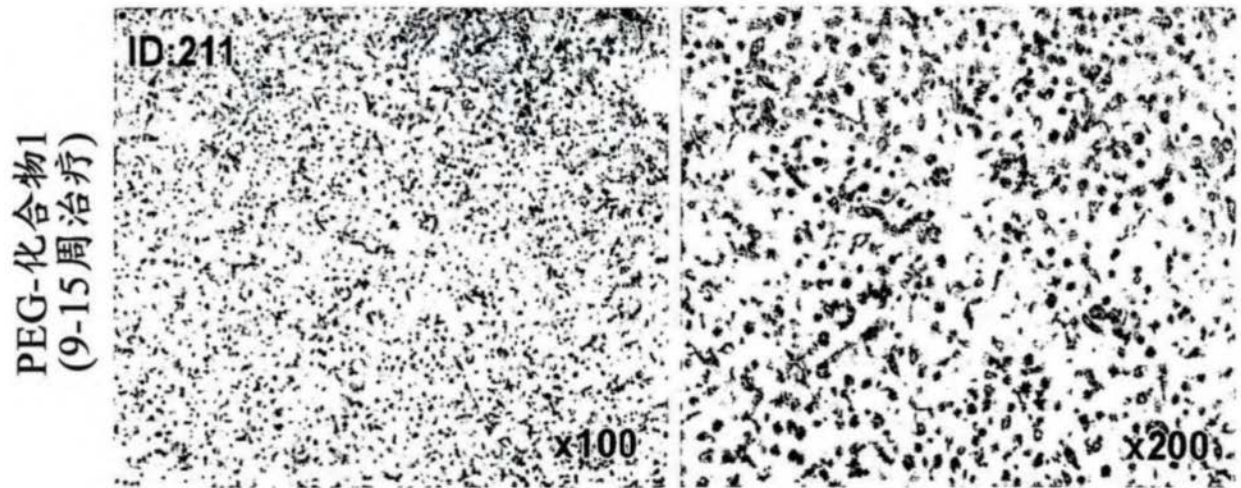


图57G

图57H

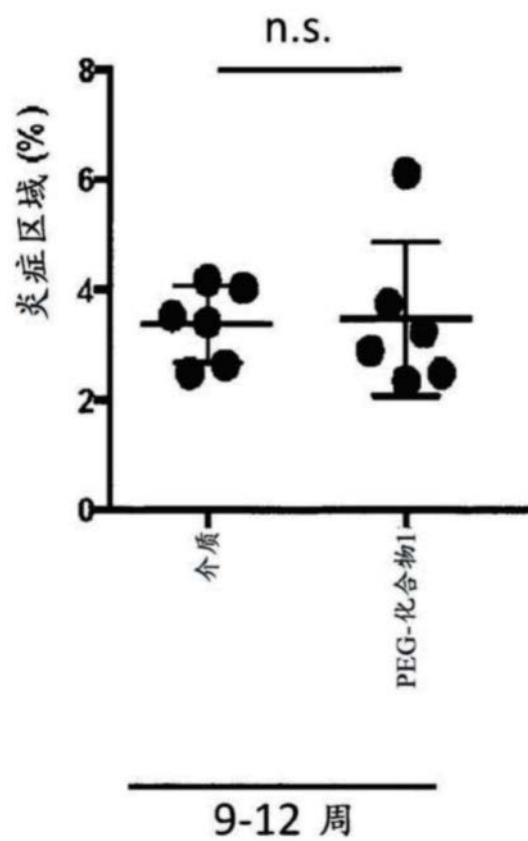


图58A

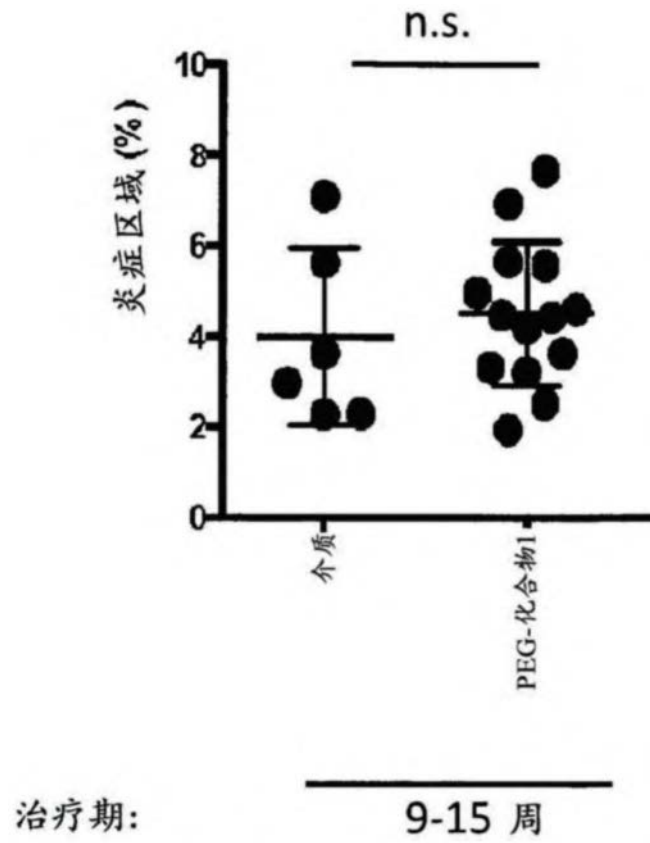


图58B

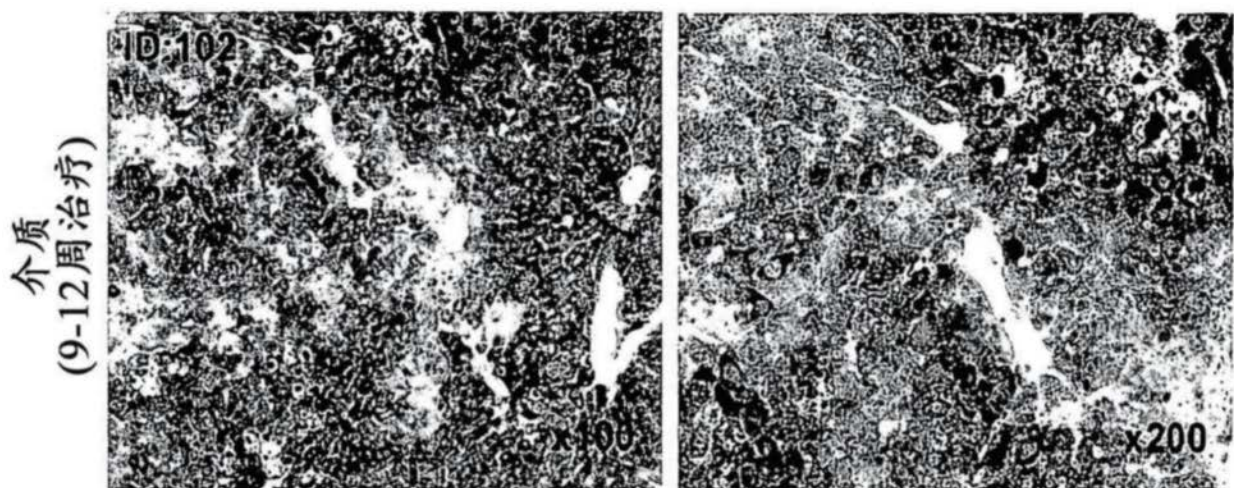


图59A

图59B

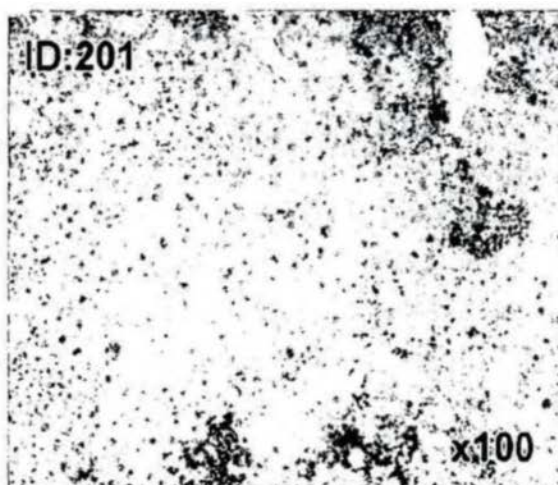
PEG-化合物1
(9-12周治疗)

图59C

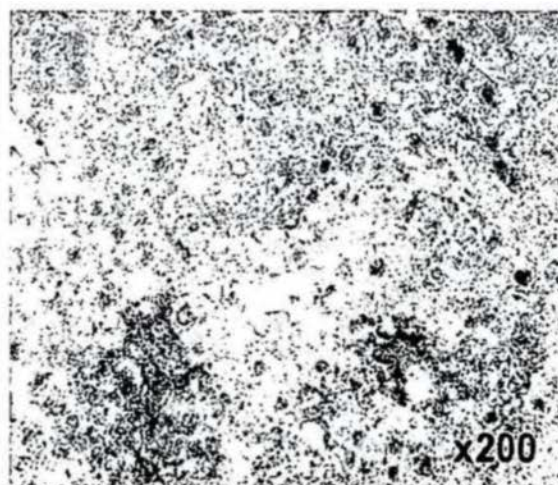


图59D

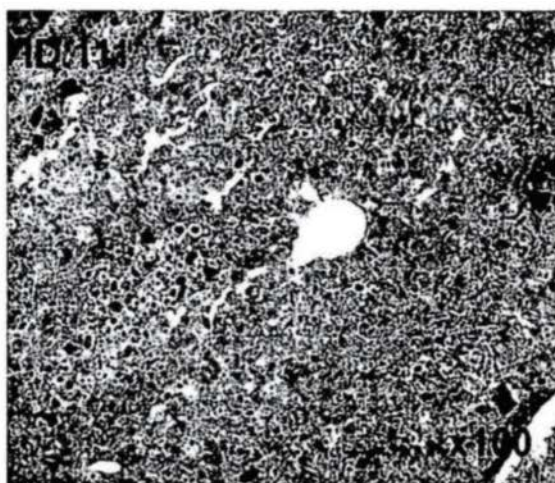
介质
(9-15周治疗)

图59E

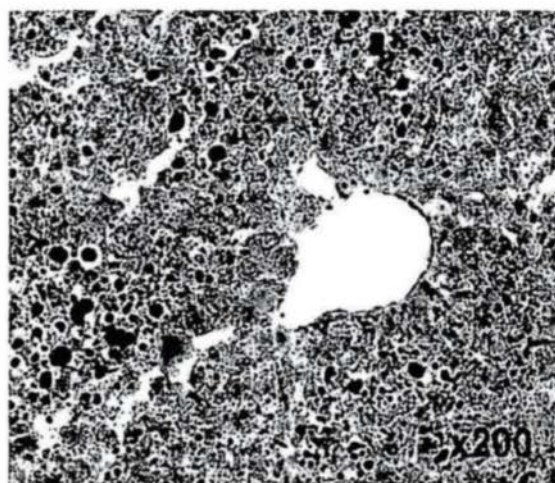


图59F

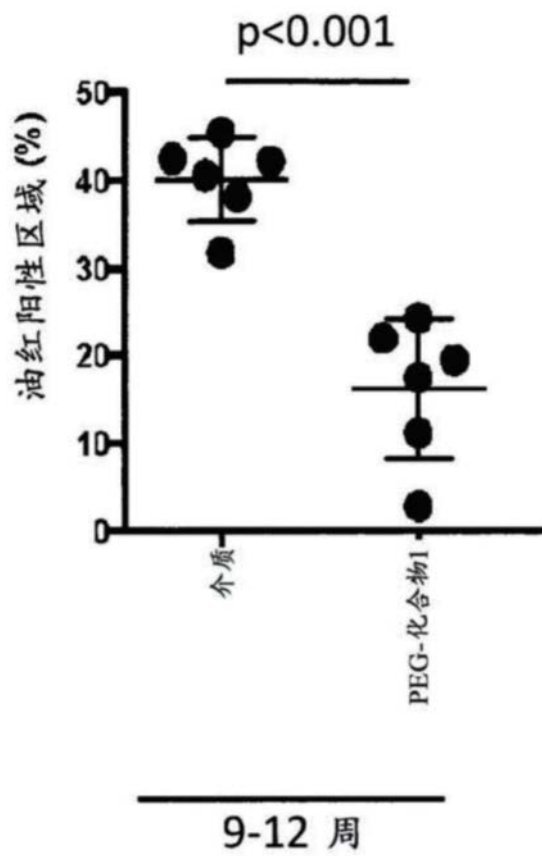
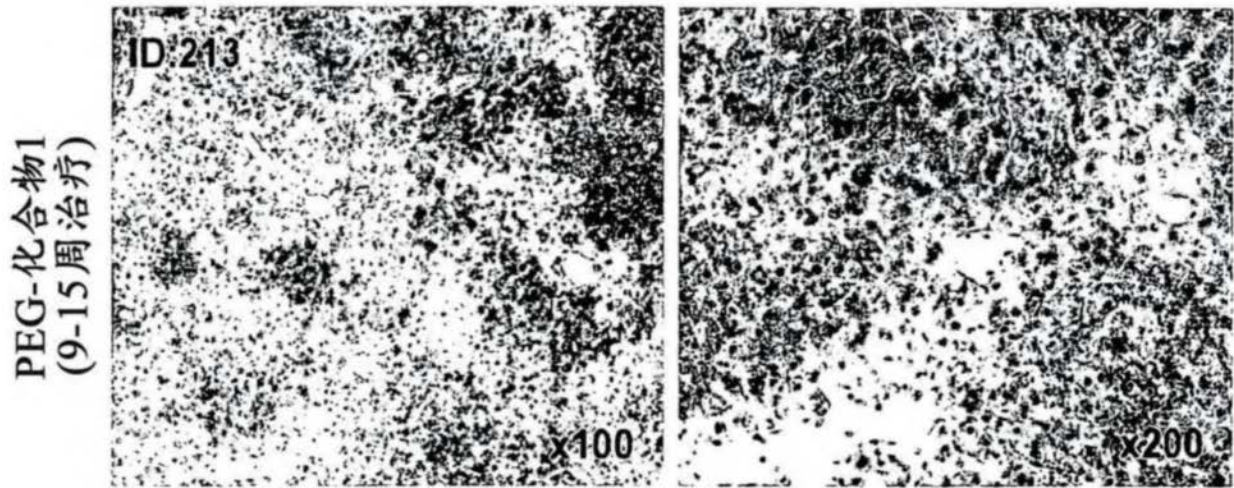


图60A

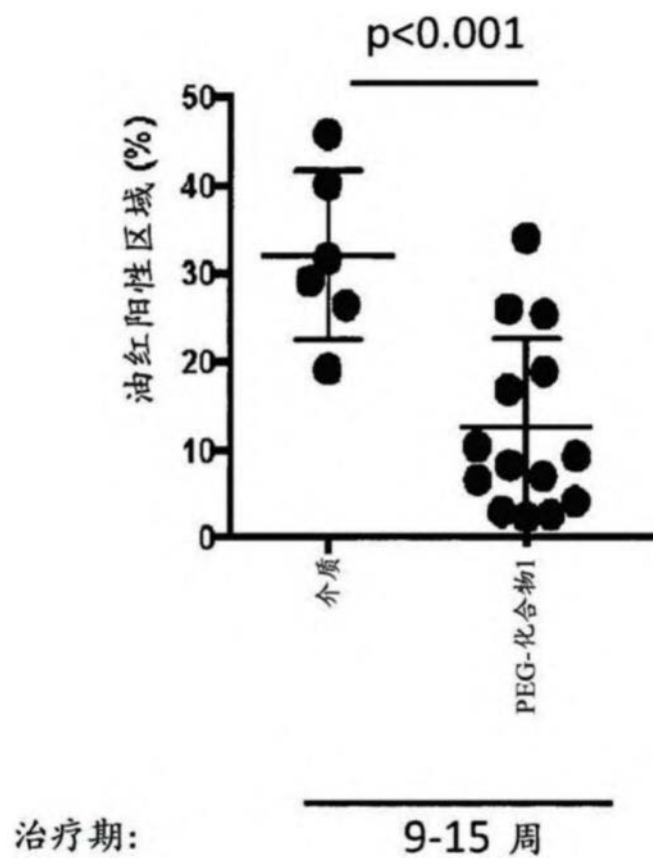


图60B

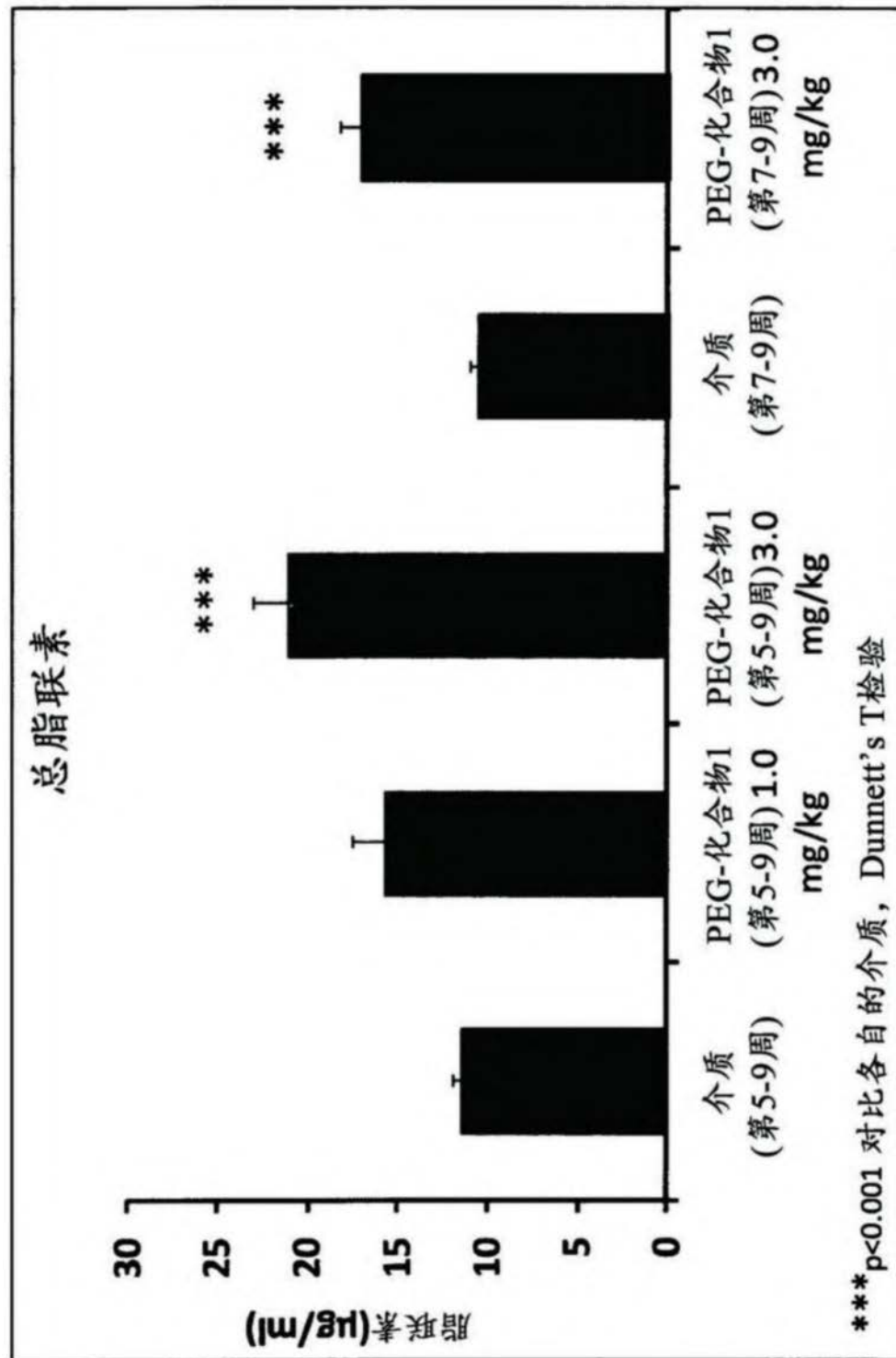


图61

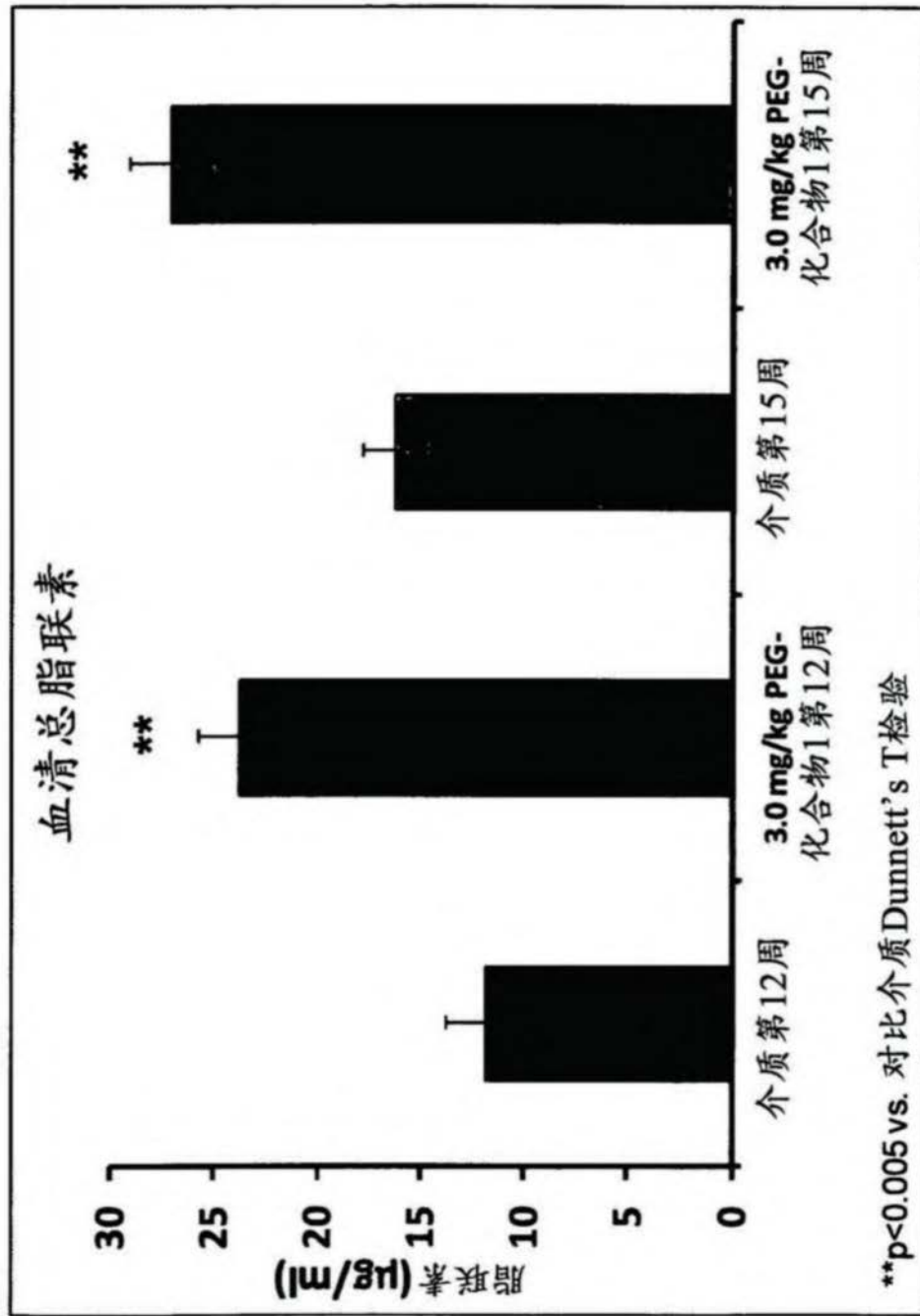


图62

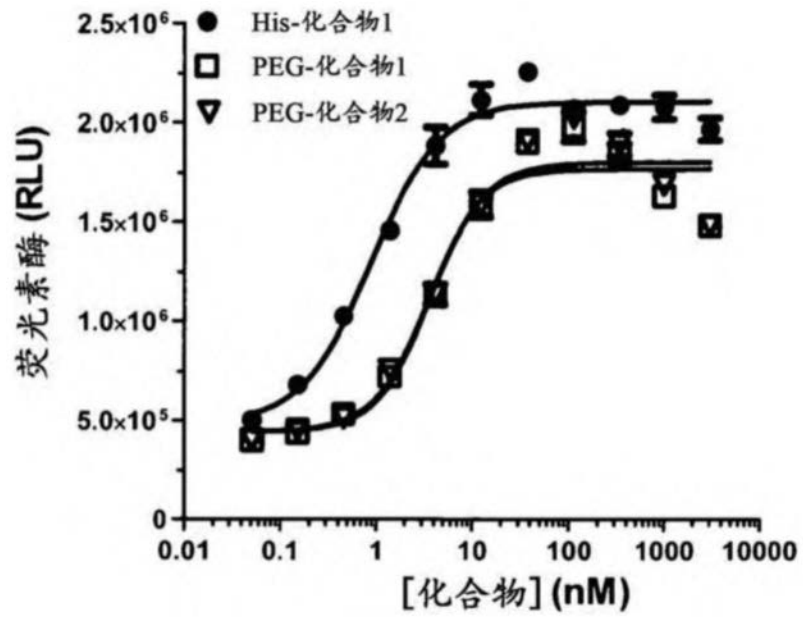


图63

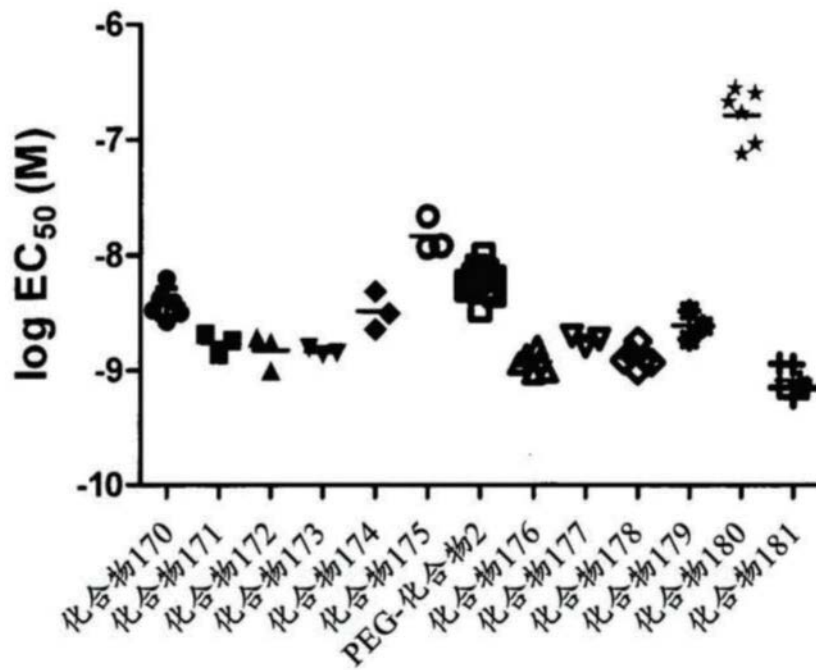


图64

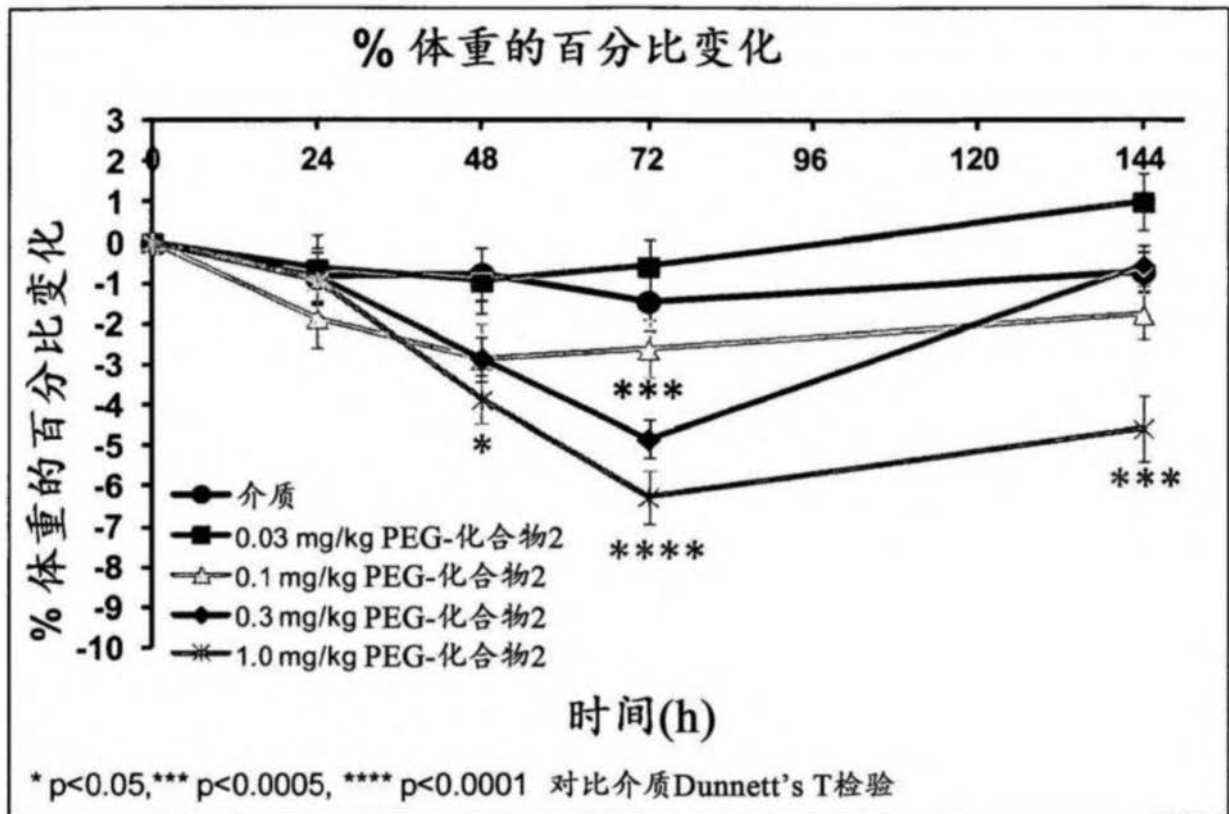


图65

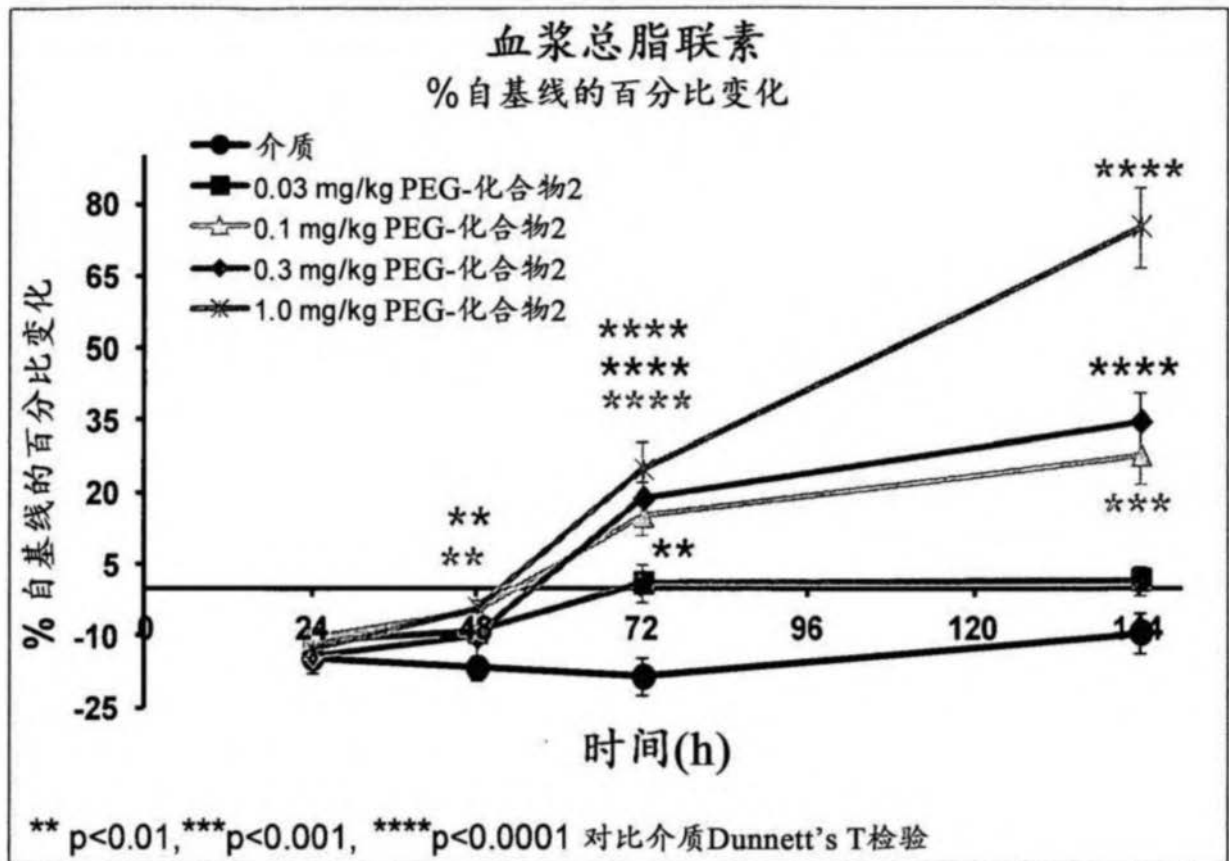


图66B

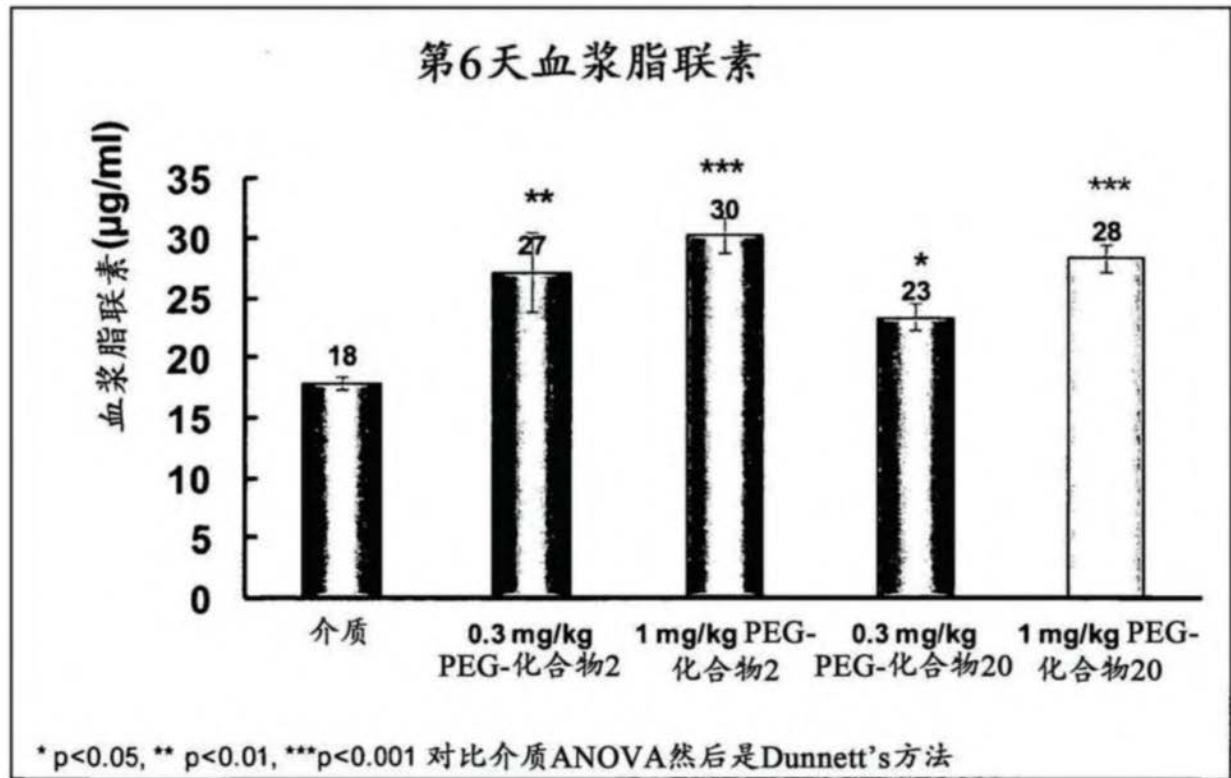


图67A

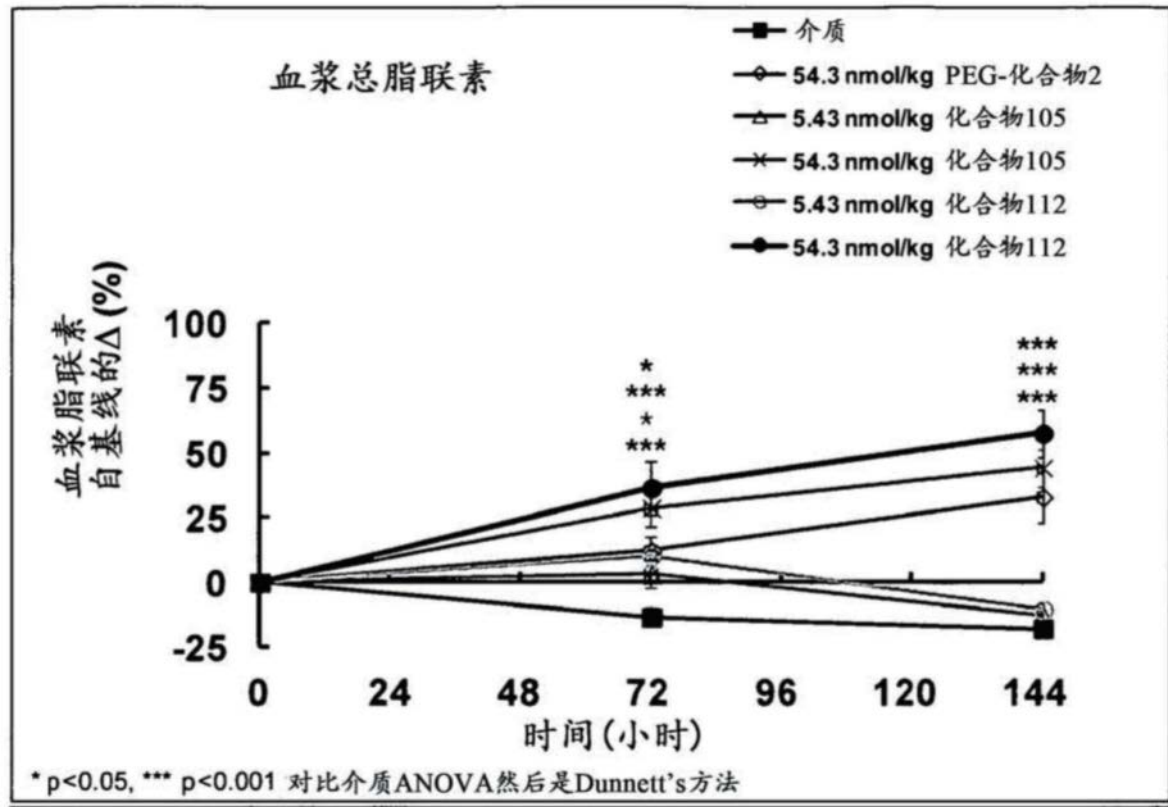


图67B

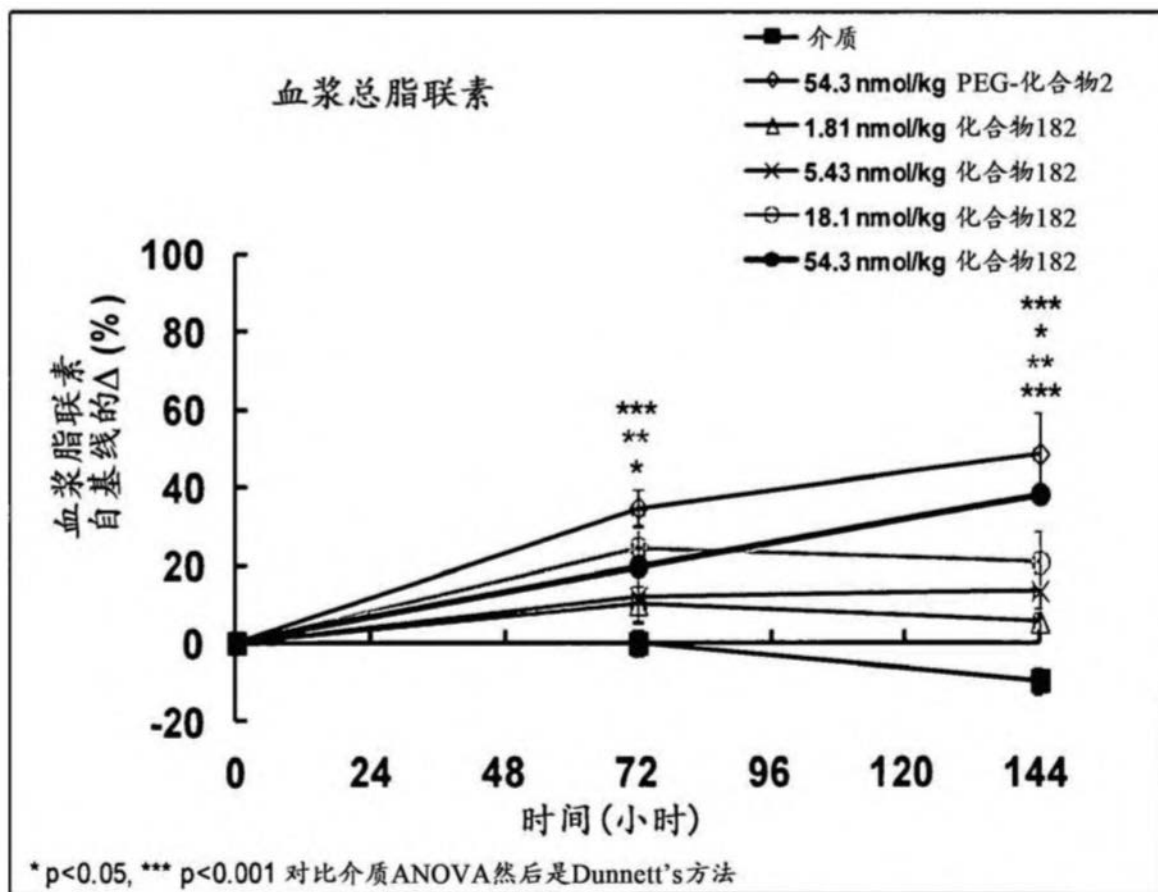


图67C

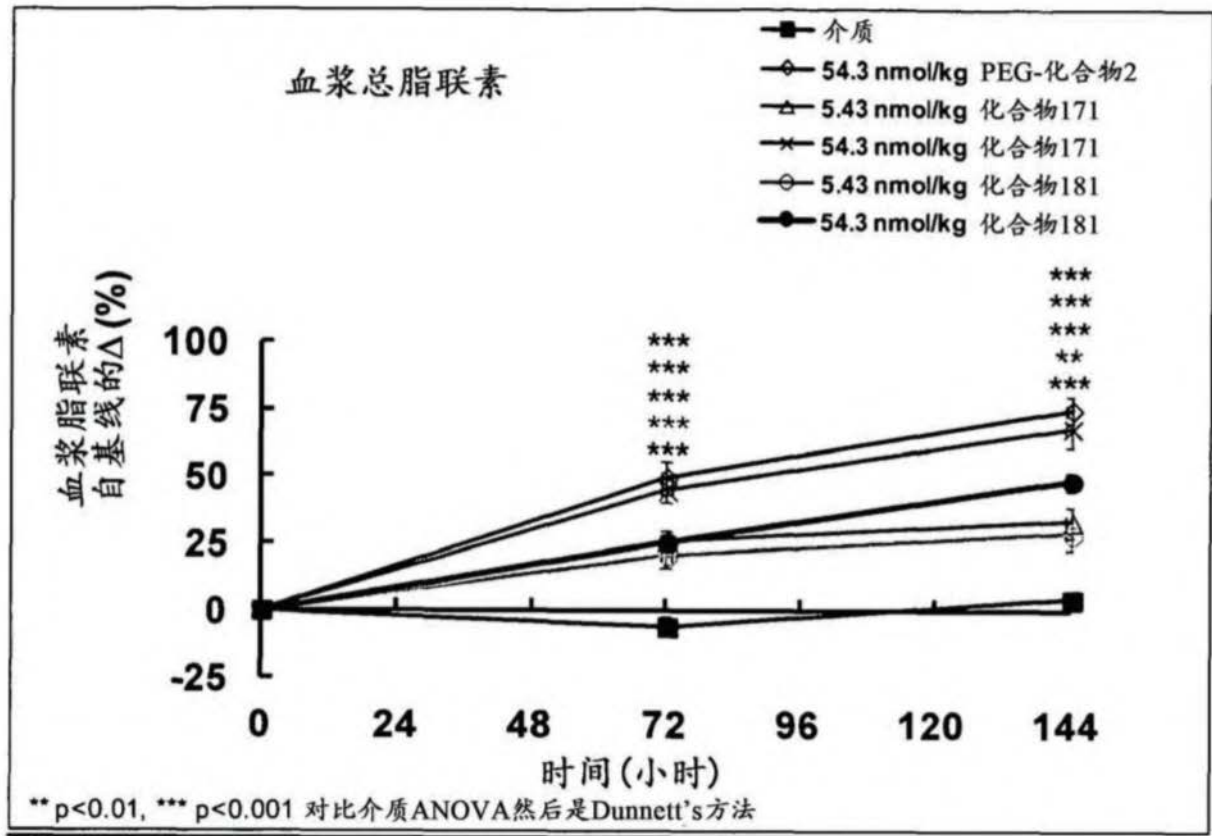


图67D

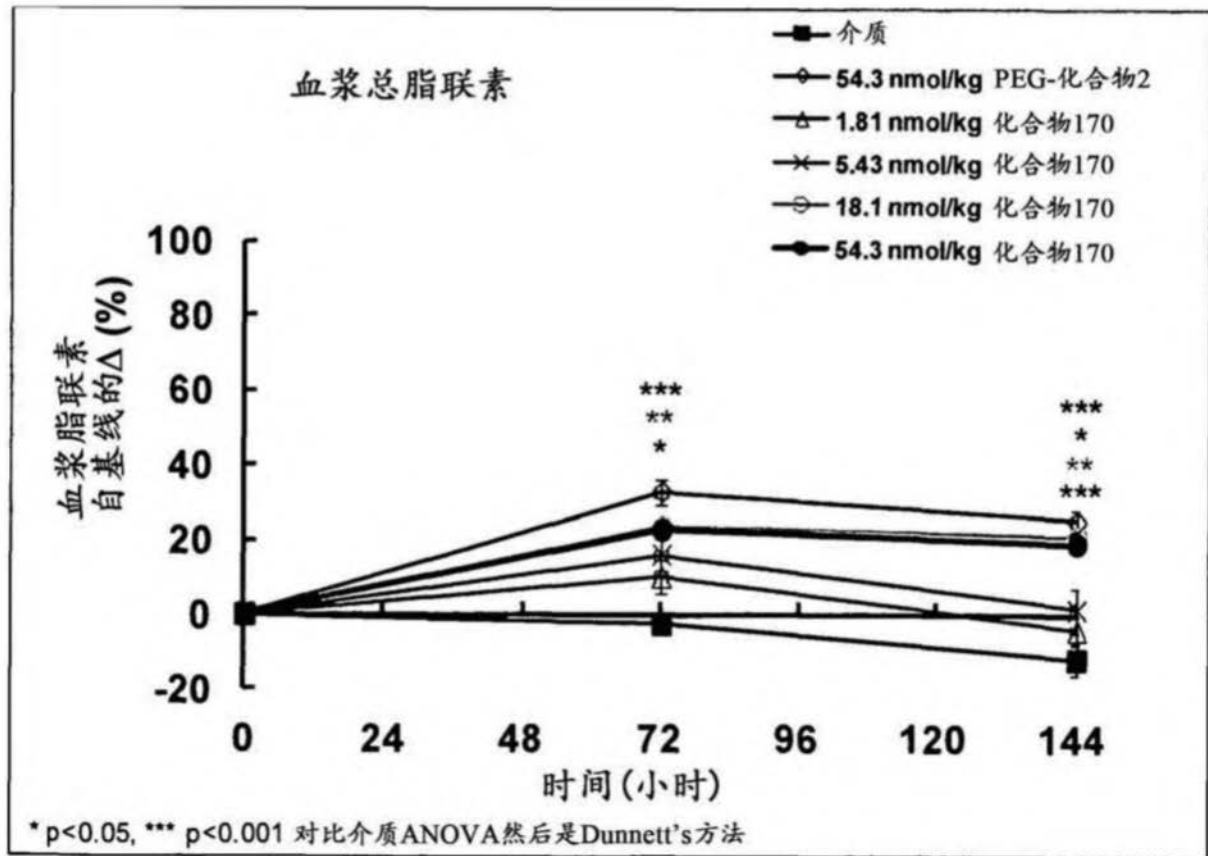


图67E

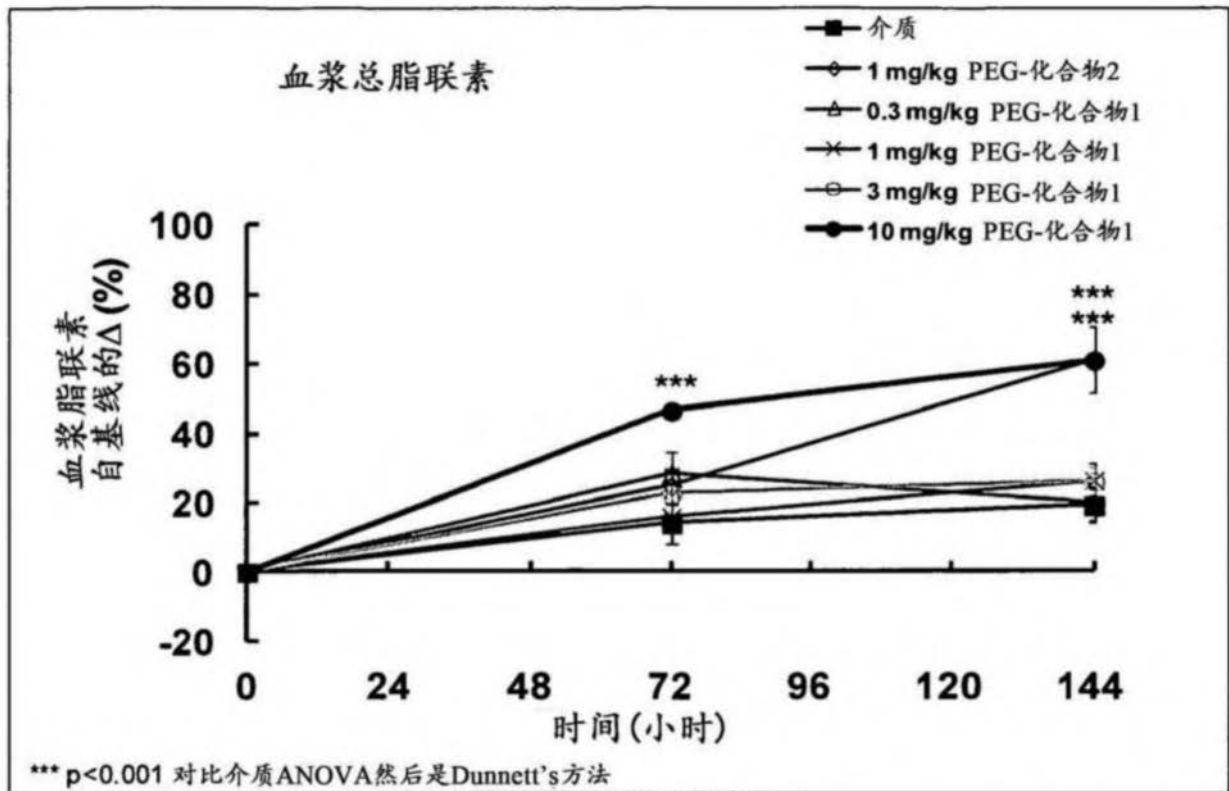


图67F

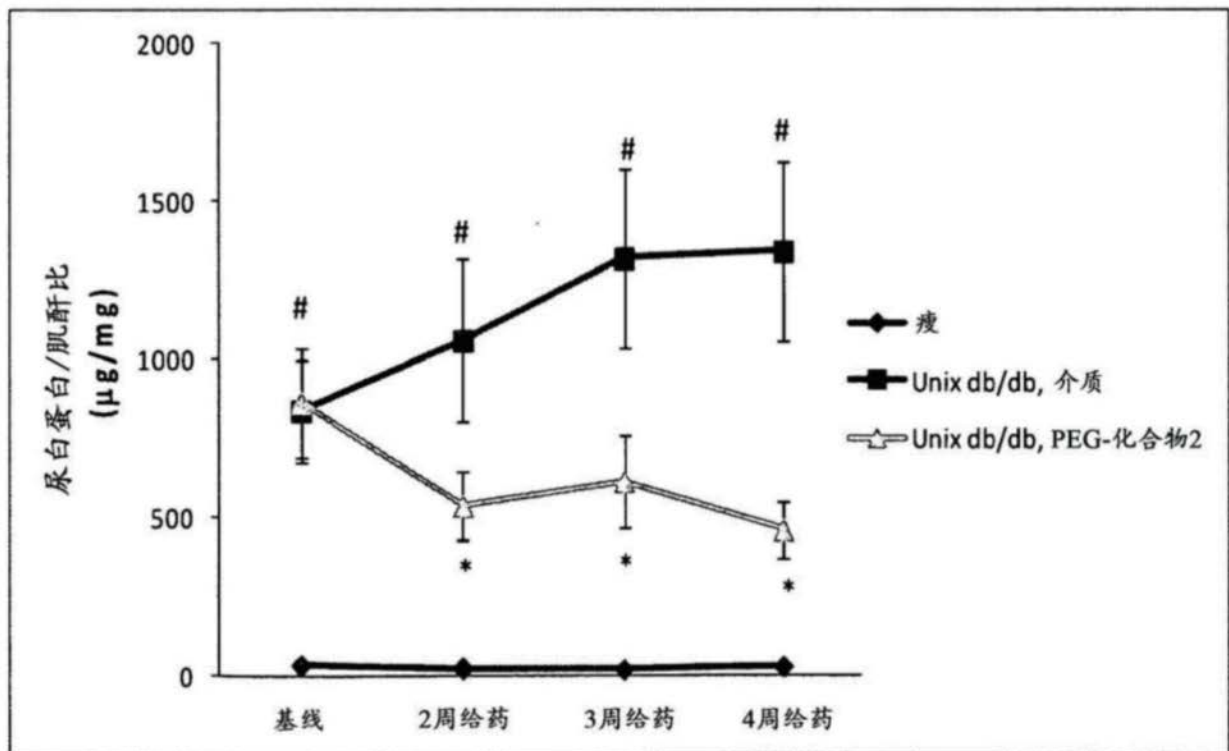


图68

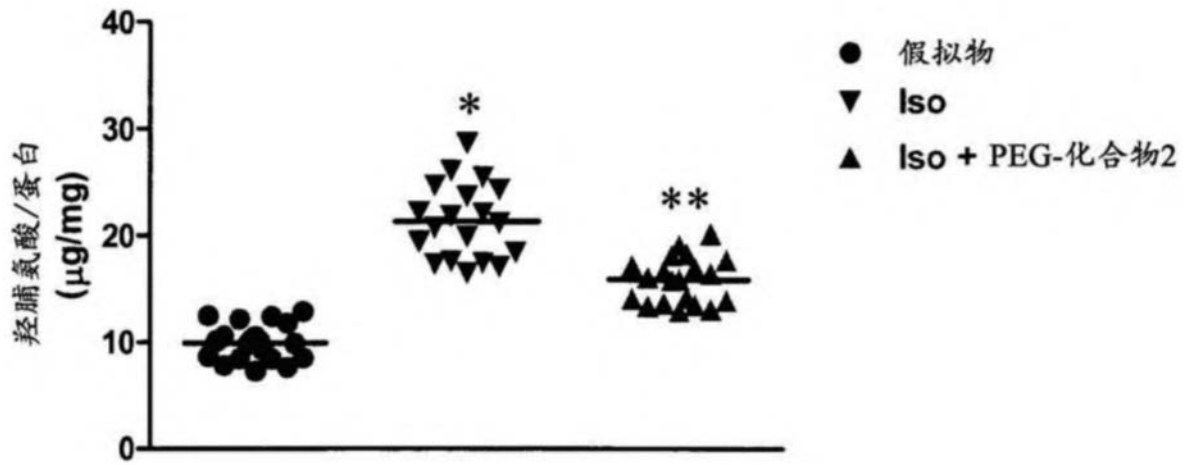


图69

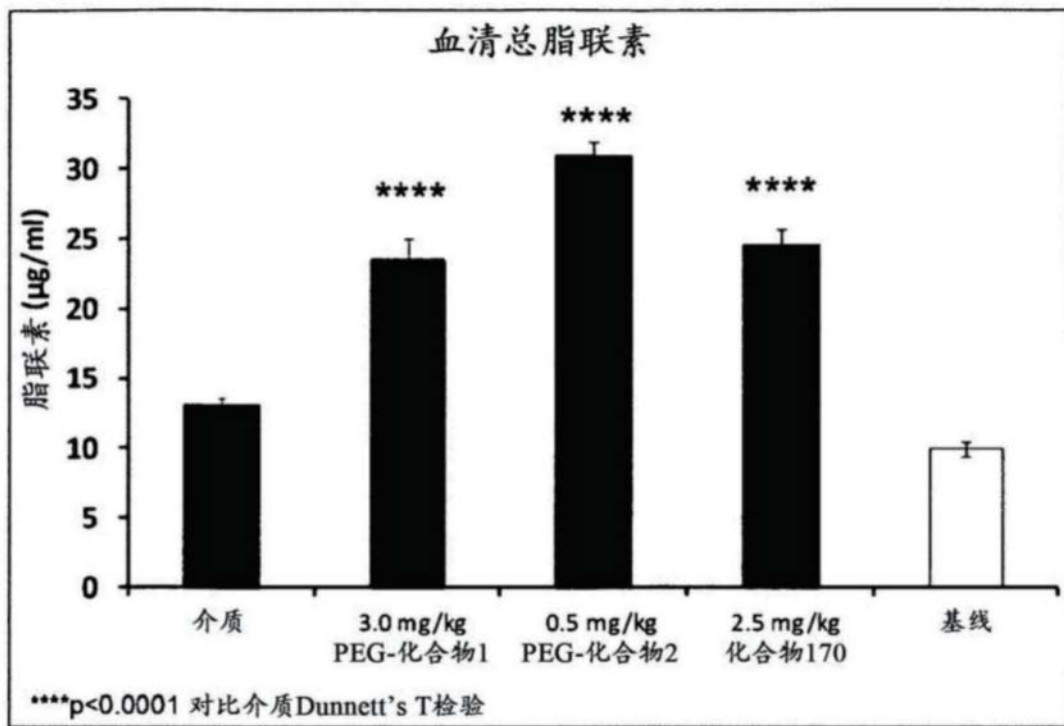


图70A

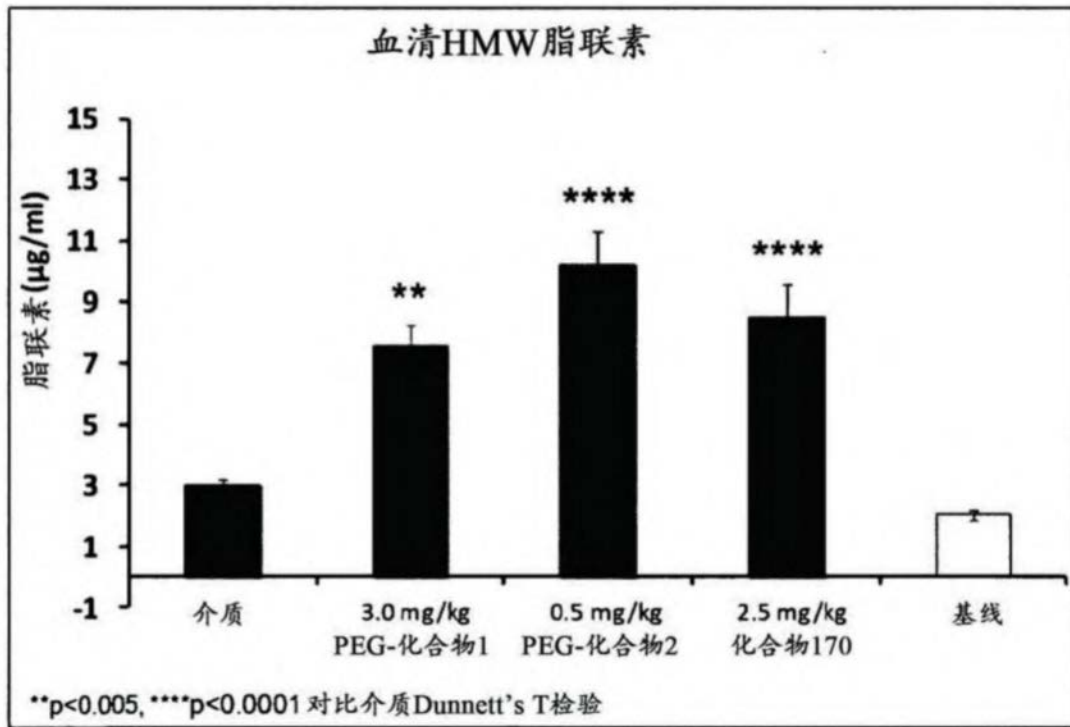


图70B

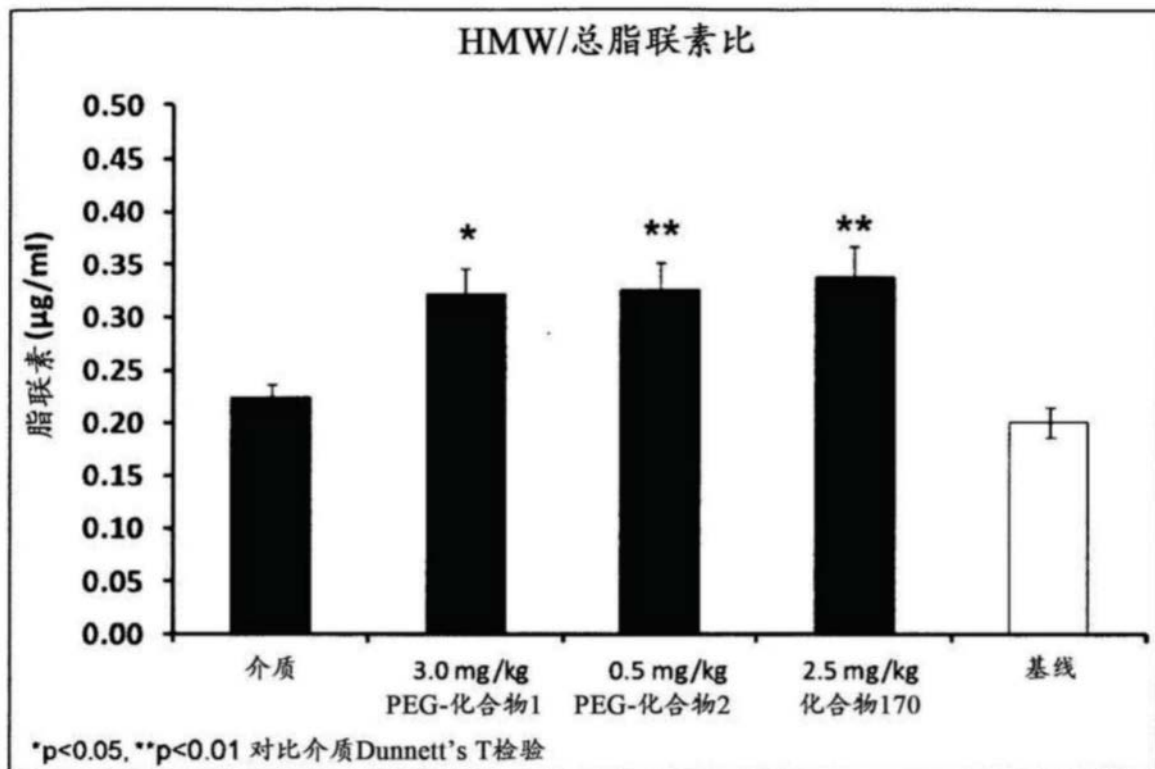


图70C

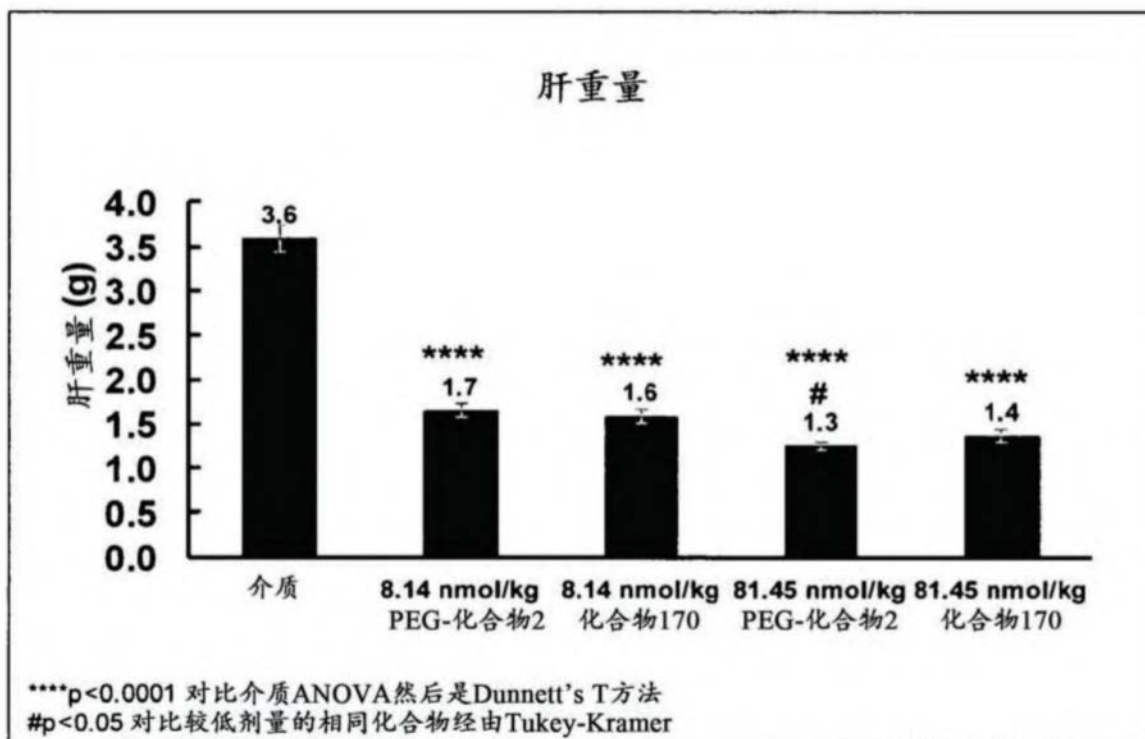


图71A

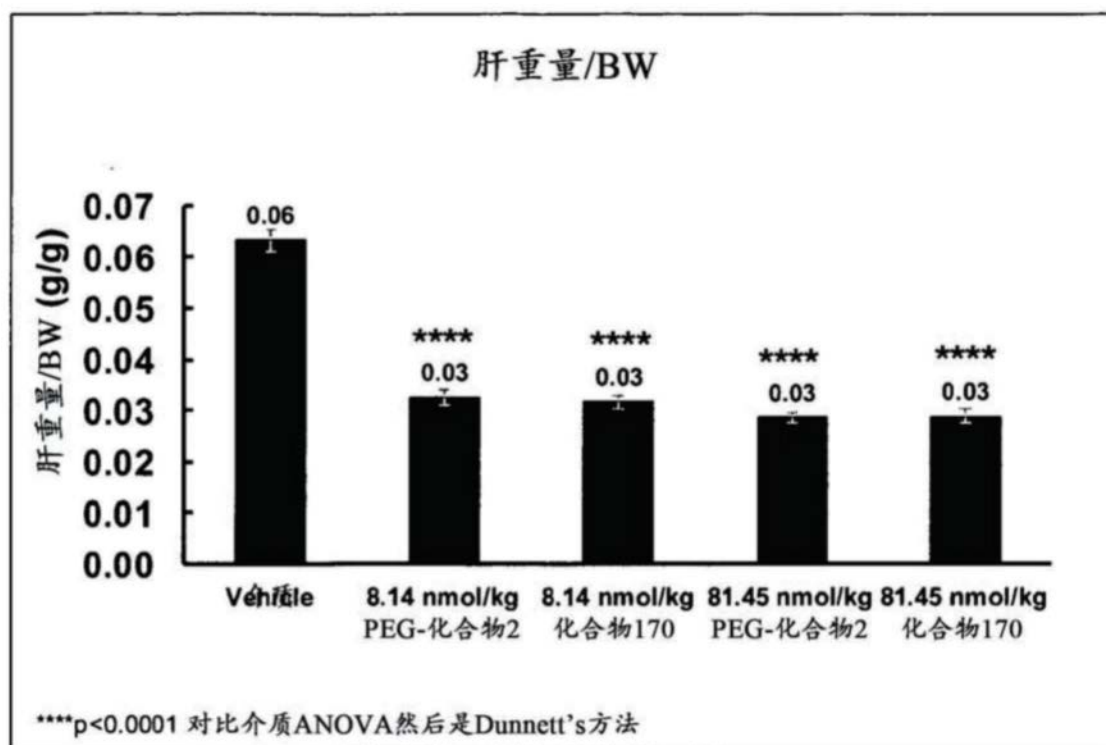


图71B

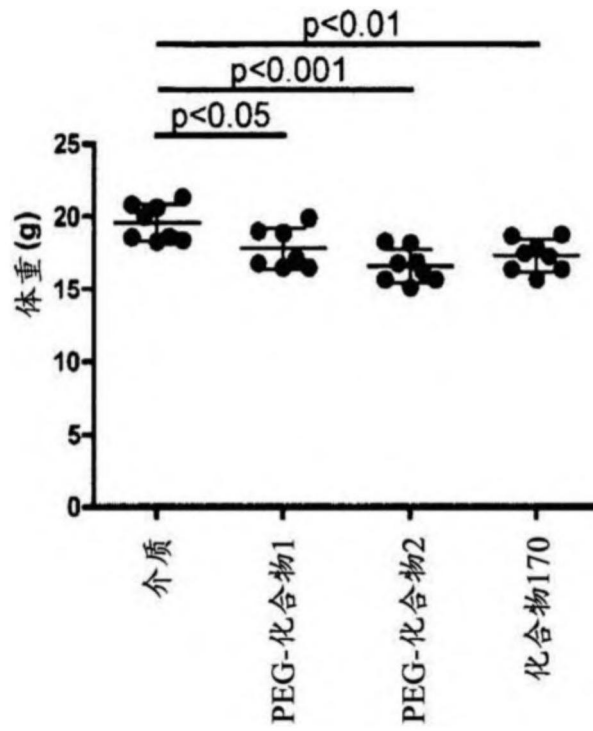


图72A

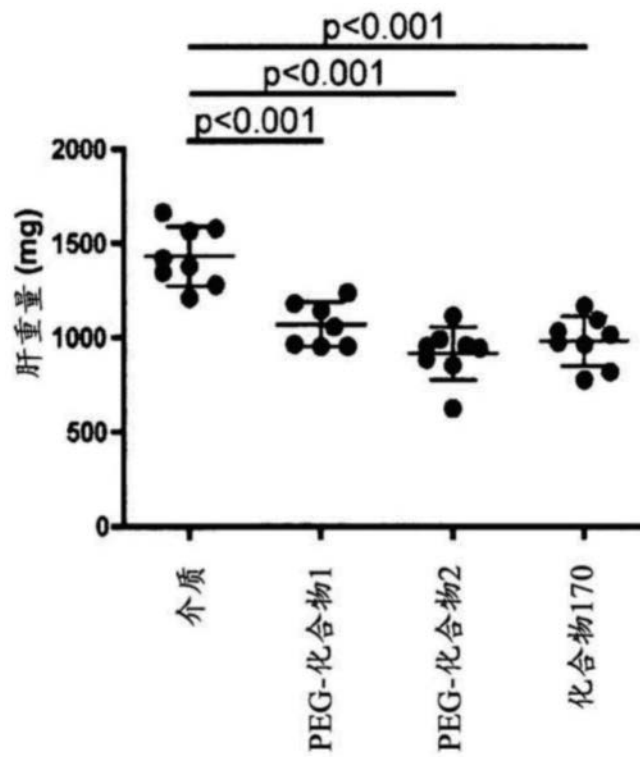


图72B

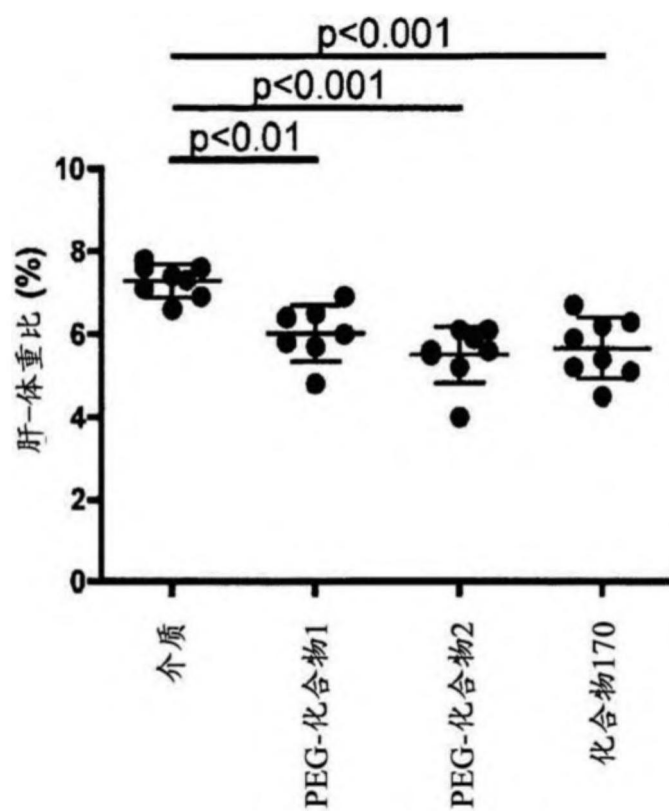


图72C

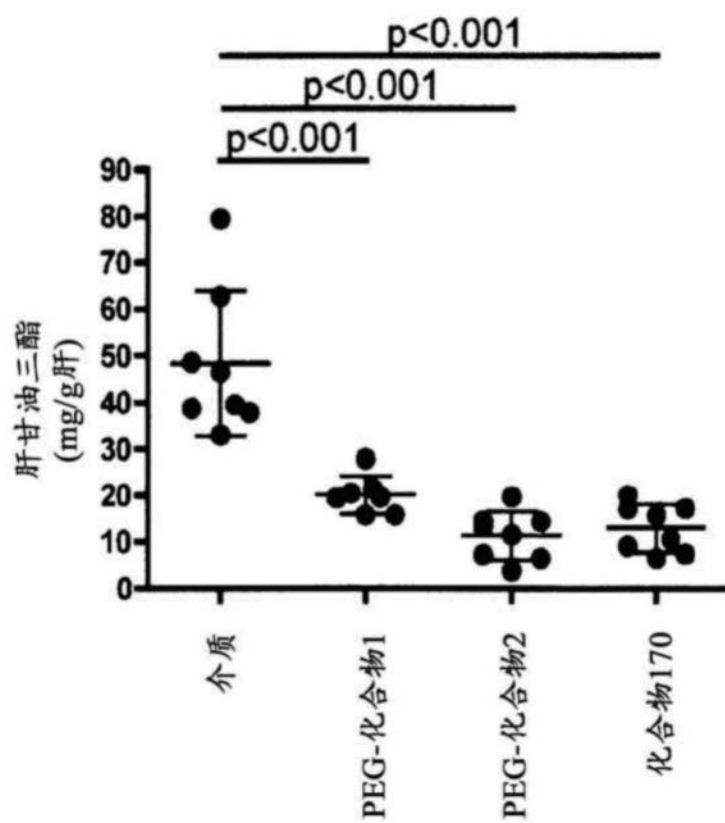


图72D

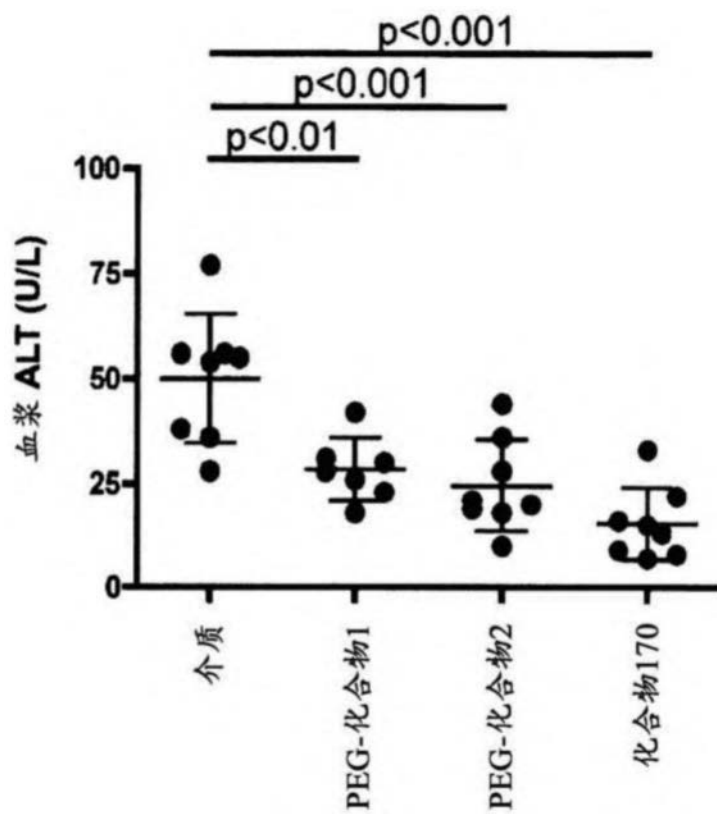


图72E

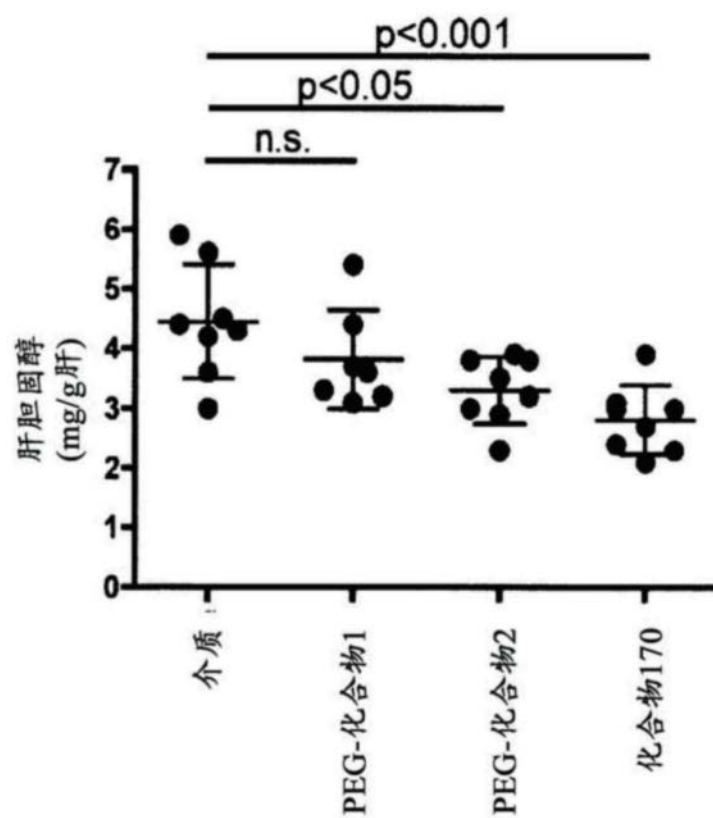


图72F

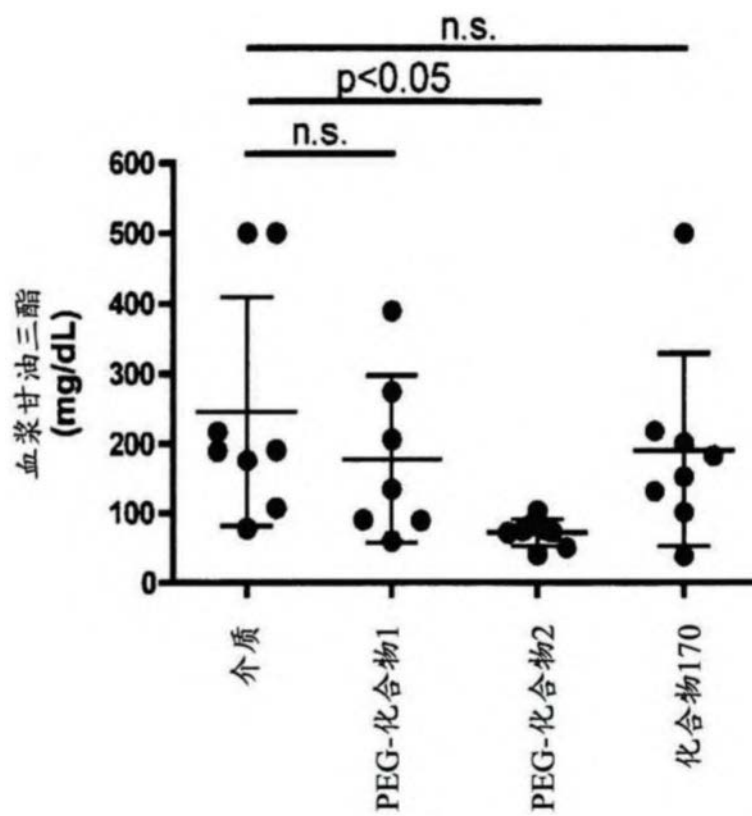


图72G