



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113082194 B

(45) 授权公告日 2025.03.18

(21) 申请号 202110417494.3

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2010.08.13

专利代理人 黄希贵

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113082194 A

(51) Int.Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.07.09

A61K 38/16 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 38/17 (2006.01)

PCT/US2009/004659 2009.08.13 US

A61K 38/19 (2006.01)

12/583177 2009.08.13 US

A61K 39/395 (2006.01)

61/305901 2010.02.18 US

A61P 7/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 3/00 (2006.01)

201080045618.X 2010.08.13

A61P 7/06 (2006.01)

(73) 专利权人 阿塞勒隆制药公司

(56) 对比文件

地址 美国麻萨诸塞州

WO 2008073292 A2, 2008.06.19

(72) 发明人 J·西拉 R·S·皮尔萨尔

WO 2008076437 A2, 2008.06.26

R·库马

审查员 陈城

权利要求书1页 说明书49页

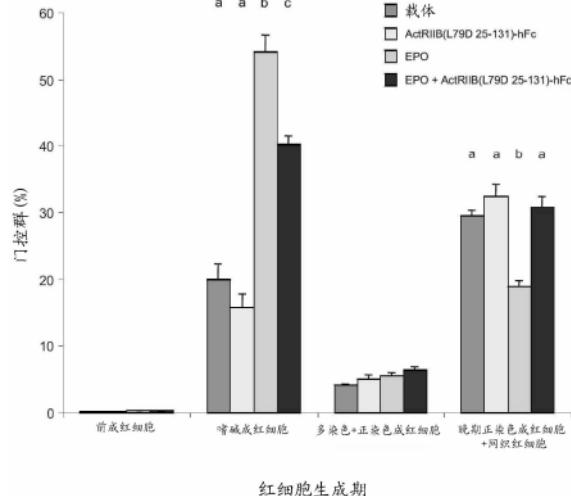
序列表31页 附图18页

(54) 发明名称

GDF捕获物和促红细胞生成素受体激活剂联合应用以增加红细胞水平

(57) 摘要

提供了用于提高红细胞水平或治疗贫血的组合物，其包括促红细胞生成素受体激活剂和变体激活素RIIB(ActRIIB)多肽，所述多肽具有被酸性氨基酸残基替换的亮氨酸残基，其中所述变体ActRIIB多肽对激活素B具有降低的亲和力并且可称为GDF捕获物。提供了应用这些组合物的方法。



1. ActRII融合蛋白在制备用于治疗有需要的患者中的骨髓异常增生综合症的药物中的用途,包括向患者施用有效量的ActRII融合蛋白,所述融合蛋白包括:

(i) ActRII蛋白,其由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成;

(ii) 免疫球蛋白Fc结构域;和

(iii) 位于ActRII蛋白和免疫球蛋白Fc结构域之间的接头结构域,所述接头结构域包括选自由GGG、SEQ ID NO:13,或SEQ ID NO:14组成的组的氨基酸序列;

其中所述ActRII融合蛋白中对应于SEQ ID NO:1的位置79的位置是天冬氨酸,并且

其中与SEQ ID NO:1的位置79是亮氨酸的ActRII融合蛋白相比,所述ActRII融合蛋白表现出与激活素A和激活素B的结合丧失,但保留与GDF11的结合。

2. 权利要求1的用途,其中所述免疫球蛋白Fc结构域衍生自IgG重链。

3. 权利要求2的用途,其中所述融合蛋白形成同二聚体。

4. 权利要求3的用途,其中所述融合蛋白通过皮下注射施用。

5. 权利要求4的用途,其中所述融合蛋白以至多30mg/kg的剂量施用于患者。

6. 权利要求5的用途,其中所述融合蛋白以至多10mg/kg的剂量施用于患者。

7. 权利要求6的用途,其中所述融合蛋白以至多3mg/kg的剂量施用于患者。

GDF捕获物和促红细胞生成素受体激活剂联合应用以增加红细胞水平

[0001] 本申请是申请日为2010年8月13日,申请号为201510979291.8的、发明名称和本发明相同的发明专利申请的分案申请。

发明背景

[0002] 成熟的红细胞或红血球负责脊椎动物循环系统中的氧运输。红细胞包含高浓度的血红蛋白,血红蛋白是一种蛋白,其在相对高的氧分压(pO_2)下在肺中与氧结合,并将氧递至具有相对低 pO_2 的身体区域。

[0003] 成熟的红细胞在称为红细胞生成的过程中由多能造血干细胞产生。出生后红细胞生成主要在骨髓和脾的红髓中进行。各种信号转导途径的协同作用控制细胞增殖、分化、存活和死亡的平衡。在正常条件下,红细胞以维持体内恒定的红细胞量的速率生成,且响应于各种刺激(包括上升或下降的氧张力或组织需求)可增加或减少其生成。红细胞生成的过程开始于谱系定向的前体细胞的形成,并通过一系列的不同前体细胞类型进行。红细胞生成的最终阶段出现为网织红细胞,其释放进入血流,并失去它们的线粒体和核糖体,同时呈现成熟红细胞的形态。在血液中网织红细胞的上升水平或者网织红细胞:红细胞的上升比例提示红细胞产生速率上升。

[0004] 促红细胞生成素(EPO)被广泛认为是脊椎动物中出生后红细胞生成的最重要的正调节剂。EPO调节对减少的组织氧张力(低氧)和低红细胞水平或低血红蛋白水平的代偿性红细胞生成反应。在人体内,上升的EPO水平通过刺激骨髓和脾中红细胞祖先的生成而促进红细胞形成。在小鼠中,EPO主要增加脾中的红细胞生成。

[0005] EPO的效果由属于细胞因子受体超家族的细胞表面受体介导。人EPO受体基因编码483个氨基酸的跨膜蛋白质,而活性EPO受体被认为作为多聚复合物存在,即使在不存在配体下(参见美国专利号6,319,499)。哺乳动物细胞中表达的克隆的全长EPO受体以与天然受体在红细胞祖细胞上的亲和力类似的亲和力与EPO结合。EPO与其受体的结合引起构象变化,导致受体激活和生物学效果,包括不成熟成红细胞的增加的增殖、不成熟成红细胞的增加的分化和红细胞祖细胞中降低的凋亡(Liboi等人, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury等人, 1990, Science 248:378-381)。

[0006] 医生们在各种临床情况下采用各种形式的重组EPO来增加红细胞水平,特别用于贫血的治疗。贫血是一种宽泛限定的状况,其特征在于血液中的血红蛋白或红细胞低于正常水平。在一些情况下中,贫血是由红细胞的生成或存活中的原发性病症所引起的。更通常地,贫血继发于其它系统的疾病(Weatherall & Provan (2000) Lancet 355,1169-1175)。贫血可由红细胞生成速率下降或破坏速率上升导致,或者由因出血引起的红细胞丢失导致。贫血可由多种病症引起,所述病症包括,例如,慢性肾功能衰竭、化学疗法治疗、骨髓异常增生综合征、类风湿关节炎以及骨髓移植。

[0007] 以EPO治疗通常导致健康人在一周中血红蛋白上升约1-3 g/dL。当施用至贫血个体时,该治疗方案通常提供血红蛋白和红细胞水平的实质上升,并使得生活质量改善和存

活延长。EPO并非一律有效,许多个体甚至在高剂量下是难治的(Horl等人 (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50)。50%以上的癌症患者对EPO的反应不足,大约10%的末期肾疾病患者具有低反应性(Glaspy等人 (1997) J Clin Oncol 15, 1218-1234; Demetri等人 (1998) J Clin Oncol 16, 3412-3425),以及不到10%的骨髓异常增生综合征患者有利地反应(Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67)。一些因素,包括炎症、铁和维生素缺乏、透析不充分、铝毒性以及甲状旁腺功能亢进可预测较差的治疗反应。对EPO抵抗的分子机制仍然不清楚。近来的证据提出,较高剂量的EPO可与心血管发病率的增加风险、肿瘤生长和某些患者群中的死亡率有关(Krapf等人, 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4:470-480; Glaspy, 2009, Annu Rev Med 60:181-192)。因此已建议,基于EPO的治疗化合物(促红细胞生成素-刺激剂,ESAs)以足以避免对红细胞输注的需求的最低剂量施用(Jelkmann等人, 2008, Crit Rev Oncol. Hematol 67:39-61)。

[0008] 因此,本公开内容的一个目的是提供提高患者红细胞水平的替代性方法,其将允许应用降低剂量的促红细胞生成素受体激活剂。

发明概述

[0009] 本公开内容部分地说明,GDF捕获物(GDF Traps)可与EPO受体激活剂联合施用(例如,在相同时间或不同时间施用,但通常以实现重叠药物效果的方式)以在需要的患者中增加红细胞水平(红细胞生成)或治疗贫血。本公开内容部分地说明,GDF捕获物可与EPO受体激活剂联合施用,以协同增加患者中的红细胞形成。因此,该联合治疗的效果可以显著高于GDF捕获物和EPO受体激活剂以其各自量单独施用时的效果总和。在某些实施方案中,该协同作用可为有利的,因为其能够以较低剂量的EPO受体激活剂获得红细胞靶水平,由此避免潜在的副作用或与较高水平的EPO受体激活相关的其它问题。

[0010] EPO受体激活剂可通过直接接触和激活EPO受体刺激红细胞生成。在某些实施方案中,EPO受体激活剂是基于天然EPO的165个氨基酸序列的一类化合物中的一个,并且通常称为红细胞生成-刺激剂(ESAs),其例子是依伯汀 α 、依伯汀 β 、依伯汀 δ 和依伯汀 ω 。在其它实施方案中,ESAs包括合成EPO蛋白质(SEPs)和EPO衍生物,其具有赋予期望的药动学特性(延长的循环半衰期)的非肽修饰,其例子是达贝泊汀 α (darbepoetin alfa)和甲氧基-聚乙二醇依伯汀 β 。在某些实施方案中,EPO受体激活剂可为不结合EPO多肽骨架或通常不归类为ESA的EPO受体激动剂。这种EPO受体激动剂可包括但不限于EPO的肽和非肽模拟物、靶向EPO受体的激动抗体、包含EPO模拟结构域的融合蛋白质、和促红细胞生成素受体延长期限制激动剂(erythropoietin receptor extended-duration limited agonists, EREDLA)。

[0011] 在某些实施方案中,EPO受体激活剂可通过增强内源性EPO产生间接刺激红细胞生成,不接触EPO受体本身。例如,低氧诱导的转录因子(HIFs)是EPO基因表达的内源性刺激剂,所述表达在常氧条件下通过细胞调节机制而抑制(去稳定)。本公开内容通过应用GDF捕获物和具有HIF稳定特性的间接EPO受体激活剂如脯氨酰羟化酶抑制剂联合治疗部分地提供患者中增加的红细胞生成。

[0012] 相对于其它ActRIIB配体如GDF11和/或筒箭毒碱具有对激活素(例如,激活素A和/或激活素B)显著降低的亲和力的变体ActRIIB多肽被称为GDF捕获物。本文描述的ActRIIB变体是GDF捕获物,除非另外指定。特别地,本公开内容说明为在SEQ ID NO:1的位置79具有

酸性残基的可溶形式ActRIIB多肽的GDF捕获物在体内施用时增加血中红细胞水平。因此，在某些实施方案中，本公开内容提供应用GDF捕获物增加患者中红细胞和血红蛋白水平和治疗与需要的患者中低红细胞或血红蛋白水平有关的病症的方法。如并入本文作为参考的美国专利申请号12/012,652所述，GDF捕获物可以用于增加肌肉量和降低脂肪量。

[0013] 在某些方面，本公开内容提供为变体ActRIIB多肽的GDF捕获物，包括具有氨基和羧基端截短和序列变化的ActRIIB多肽。任选地，本发明的GDF捕获物可设计为优先拮抗ActRIIB受体的一个或多个配体，如GDF8（也称为筒箭毒碱）、GDF11、Nodal和BMP7（也称为OP-1）。GDF捕获物的例子包括衍生自ActRIIB的一组变体，其具有大大减少的对激活素的亲和力。这些变体展示对红细胞的期望的效果，同时降低对其它组织的效果。这种变体的例子包括在相当于SEQ ID NO.1的位置79的位置具有酸性氨基酸（例如，天冬氨酸D或谷氨酸E）的那些。在某些实施方案中，GDF捕获物多肽包含下列氨基酸序列，其包含SEQ ID NO:7、26、28、29、32、37或38的氨基酸序列和与前述任一具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%同一性的多肽，由SEQ ID NO:7、26、28、29、32、37或38的氨基酸序列和与前述任一具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%同一性的多肽组成，或基本上由SEQ ID NO:7、26、28、29、32、37或38的氨基酸序列和与前述任一具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%同一性的多肽组成。

[0014] 在某些方面，本公开内容提供药物制剂，其包含与ActRIIB配体如GDF8、GDF11、激活素（例如激活素B）、BMP7或nodal结合的GDF捕获物，和药学上可接受的载体。任选地，GDF捕获物与ActRIIB配体以低于10微摩尔、低于1微摩尔、低于100纳摩尔、低于10纳摩尔或低于1纳摩尔的Kd结合。任选地，GDF捕获物抑制ActRIIB信号传导，如ActRIIB配体触发的细胞内信号转导事件。用于这种制剂的GDF捕获物可为本文公开的那些中的任一，包括例如，具有选自SEQ ID NOS:2、3、7、11、26、28、29、32、37、38或40的氨基酸序列的GDF捕获物，或具有与选自SEQ ID NOS:2、3、7、11、26、28、29、32、37、38或40的氨基酸序列有至少80%、85%、90%、95%、97%或99%同一性的氨基酸序列的GDF捕获物，或具有与选自SEQ ID NOS:2、3、7、11、26、28、29、32、37、38或40的氨基酸序列有至少80%、85%、90%、95%、97%或99%同一性的氨基酸序列的GDF捕获物，其中相当于SEQ ID NO:1中L79的位置是酸性氨基酸。用于这种制剂的优选的GDF捕获物由SEQ ID NO:26的氨基酸序列组成或基本上由SEQ ID NO:26的氨基酸序列组成。GDF捕获物可包含天然ActRIIB多肽的功能片段，如包含选自SEQ ID NOS: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38或40的序列的至少10、20或30个氨基酸的那种，或SEQ ID NO: 2的序列，缺乏C-末端1、2、3、4、5或10至15个氨基酸和缺乏N-末端的1、2、3、4或5个氨基酸。优选的多肽将包含相对于SEQ ID NO: 2或40的N-末端2至5个氨基酸和C-末端不超过3个氨基酸的截短。GDF捕获物可包括相对于天然发生的ActRIIB多肽在ActRIIB多肽的氨基酸序列中的一个或多个变化（例如，在配体结合结构域中）。氨基酸序列中的改变可以例如，当在哺乳动物、昆虫或其它真核细胞中产生时改变多肽的糖基化，或者相对于天然存在的ActRIIB多肽改变多肽的蛋白酶剪切。

[0015] GDF捕获物可以是融合蛋白，其具有作为一个结构域的ActRIIB多肽（例如，带有一个或多个序列变异的ActRIIB的配体结合结构域）和提供理想特性（例如改善的药代动力学、更容易的纯化、对特定组织的靶向等）的一个或多个其它结构域。例如，融合蛋白的结构域可增强以下一项或多项：体内稳定性、体内半衰期、摄取/施用、组织定位或分布、蛋白复

合物的形成、融合蛋白的多聚化和/或纯化。GDF捕获物融合蛋白可包含免疫球蛋白Fc结构域(野生型或突变体)或血清白蛋白。在一些实施方式中,GDF捕获物融合体包含位于Fc结构域和胞外ActRIIB结构域之间的相对非结构化的接头。该非结构化的接头可相当于ActRIIB胞外域C-末端(“尾”)处的大致15个氨基酸的非结构区,或其可以是相对不含二级结构的3至5、15、20、30、50或更多氨基酸的人工序列。接头可富含甘氨酸和脯氨酸残基,并可以例如含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的重复序列(例如,TG₄(SEQ ID NO:13)或SG₄(SEQ ID NO:14)单序列或重复序列)或一连串3个甘氨酸。融合蛋白可包含纯化子序列,例如表位标记、FLAG标记、聚组氨酸序列和GST融合体。在某些实施方案中,GDF捕获物融合体包含前导序列。前导序列可为天然ActRIIB前导序列或异源性前导序列。在某些实施方案中,前导序列是组织纤溶酶原激活剂(TPA)前导序列。在一个实施方案中,GDF捕获物融合蛋白包含如式A-B-C中列出的氨基酸序列。B部分是N-和C-末端截短的ActRIIB多肽,其由相当于SEQ ID NO:2或40的氨基酸25-131的氨基酸序列组成。A和C部分可独立为不存在、一个或多于一个氨基酸,并且A和C部分都是与B异源的。A和/或C部分可与B部分经接头序列连接。

[0016] 任选地,GDF捕获物包含具有选自如下的一种或多种修饰的氨基酸残基的变体ActRIIB多肽:糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸以及与有机衍生剂缀合的氨基酸。药物制剂还可包含一种或多种额外化合物,例如用于治疗ActRIIB-相关病症的化合物。优选地,药物制剂基本不含致热原。一般而言,优选在哺乳动物细胞系中表达GDF捕获物,这合适地介导GDF捕获物的天然糖基化,从而减少患者中的不利免疫应答的可能性。人和CHO细胞系已被成功使用,且预期其它常见的哺乳动物表达载体将是有用的。

[0017] 在某些方面,本公开内容提供包装药物,其包含本文描述的药物制剂和用于增加人中红细胞水平的标签。

[0018] 在某些方面,本公开内容提供GDF捕获物,其为包含改变的配体-结合(例如,GDF8-结合)结构域的可溶性ActRIIB多肽。具有改变的配体-结合结构域的GDF捕获物可包括例如,在人ActRIIB氨基酸残基如E37、E39、R40、K55、R56、Y60、A64、K74、W78、L79、D80、F82和F101的一个或多个突变(编号相对于SEQ ID NO:1)。任选地,改变的配体-结合结构域相对于ActRIIB受体的野生型配体-结合结构域可以具有对配体如GDF8/GDF11增加的选择性。为了举例说明,本文说明这些突变增加改变的配体-结合结构域相比于激活素对GDF11(并且因此,推测地,GDF8)的选择性:K74Y、K74F、K74I、L79D、L79E和D80I。下列突变具有相反效果,增加激活素结合相比于GDF11的比例:D54A、K55A、L79A和F82A。总体(GDF11和激活素)结合活性可以通过包含“尾部”区域或推测地非结构化的接头区域,以及也通过应用K74A突变而增加。引起配体结合亲和力的总体降低的其它突变包括:R40A、E37A、R56A、W78A、D80K、D80R、D80A、D80G、D80F、D80M和D80N。突变可组合以实现期望的效果。例如,影响GDF11:激活素结合比的许多突变对配体结合具有总体负面效果,并且因此,它们可与一般增加配体结合的突变组合以产生具有配体选择性的改进的结合蛋白质。在示范性实施方案中,GDF捕获物是包含L79D或L79E突变的ActRIIB多肽,任选地联合额外的氨基酸取代、添加或缺失。

[0019] 任选地,包含改变的配体-结合结构域的GDF捕获物具有的用于激活素结合的K_d与用于GDF8结合的K_d的比相对于野生型配体-结合结构域的比为至少2、5、10或甚至100倍高。任选地,包含改变的配体-结合结构域的GDF捕获物具有的用于抑制激活素的IC₅₀与用于抑

制GDF8/GDF11的IC₅₀的比相对于野生型ActRIIB配体-结合结构域为至少2、5、10或甚至100倍高。任选地，包含改变的配体-结合结构域的GDF捕获物以与用于抑制激活素的IC₅₀相比至少2、5、10或甚至100倍低的IC₅₀抑制GDF8/GDF11。这些GDF捕获物可以是包括免疫球蛋白Fc结构域(野生型或突变体)的融合蛋白。在某些情况下，主题可溶性GDF捕获物是GDF8和/或GDF11的拮抗剂(抑制剂)。

[0020] 其它GDF捕获物如下考虑。包含衍生自SEQ ID NO: 1或39的ActRIIB序列的部分和第二多肽部分的GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸21-29中的任一(任选地起始于SEQ ID NO: 1或39的22-25)和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸109-134中的任一的序列，并且其中在基于细胞的分析中GDF捕获物融合蛋白抑制通过激活素、简箭毒碱和/或GDF11的信号传导。上述GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸20-29中的任一(任选地起始于SEQ ID NO: 1或39的22-25)和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸109-133中的任一的序列。上述GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸20-24中的任一(任选地起始于SEQ ID NO: 1或39的22-25)和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸109-133中的任一的序列。上述GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸21-24中的任一和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸109-134中的任一的序列。上述GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸20-24中的任一和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸118-133中的任一的序列。上述GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸21-24中的任一和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸118-134中的任一的序列。上述GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸20-24中的任一和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸128-133中的任一的序列。上述GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸20-24中的任一和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸128-133中的任一的序列。上述GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸21-29中的任一和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸118-134中的任一的序列。上述GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸20-29中的任一和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸118-133中的任一的序列。上述GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸21-29中的任一和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸128-134中的任一的序列。上述GDF捕获物融合蛋白，其中衍生自ActRIIB的部分相应于起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸20-29中的任一和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸128-133中的任一的序列。令人惊讶地，起始于SEQ ID NO: 1或39的22-25的构建体具有大于具有人ActRIIB全部胞外域的蛋白质的活性水平。在一个优选的实施方案中，GDF捕获物融合蛋白包含起始于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸位置25和终止于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸位置131的氨基酸序列、基本上由该氨基酸序列组成或由该氨基酸序列组成。在另一个优选实施方案中，GDF捕获物多肽由SEQ ID NO: 7、26、28、29、32、37或38的氨基酸序列组成或基本上由该氨基酸序列组成。上述GDF捕获物融合蛋白中的任一可作为同二聚体产生。上述GDF捕获物融合蛋白中的任一可具有包含来自IgG重链的恒定区如Fc结

构域的异源性部分。上述GDF捕获物融合蛋白中的任一可包含在相应于SEQ ID NO: 1的位置79的位置的酸性氨基酸,任选地联合相对于SEQ ID NO: 1的一个或多个额外的氨基酸取代、缺失或插入。

[0021] 其它GDF捕获物蛋白质如下考虑。包含与SEQ ID NO: 1或39的氨基酸29-109的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的GDF捕获物蛋白质,其中相应于SEQ ID NO: 1的64的位置是R或K,并且其中GDF捕获物蛋白质在基于细胞的分析中抑制通过激活素、筒箭毒碱和/或GDF11的信号传导。上述GDF捕获物蛋白质,其中相对于SEQ ID NO: 1或39的序列的至少一个变化位于配体结合口袋之外。上述GDF捕获物蛋白质,其中相对于SEQ ID NO: 1或39的序列的至少一个变化是位于配体结合口袋内的保守的变化。上述GDF捕获物蛋白质,其中相对于SEQ ID NO: 1或39的序列的至少一个变化是在选自下列的一个或多个位置的变化:K74、R40、Q53、K55、F82和L79。上述GDF捕获物蛋白质,其中蛋白质在不同于ActRIIB的内源性N-X-S/T序列的位置、以及在配体结合口袋之外的位置包含至少一个N-X-S/T序列。

[0022] 其它GDF捕获物如下考虑。包含与SEQ ID NO: 1或39的氨基酸29-109的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的GDF捕获物蛋白质,并且其中该蛋白质在不同于ActRIIB的内源性N-X-S/T序列的位置、以及在配体结合口袋之外的位置包含至少一个N-X-S/T序列。上述GDF捕获物,其中GDF捕获物蛋白质在相应于SEQ ID NO: 1或39的位置24的位置包含N,并且在相应于SEQ ID NO: 1或39的位置26的位置包含S或T,并且其中GDF捕获物在基于细胞的分析中抑制通过激活素、筒箭毒碱和/或GDF11的信号传导。上述GDF捕获物,其中GDF捕获物蛋白质在相应于SEQ ID NO: 1或39的位置64的位置包含R或K。上述GDF捕获物,其中ActRIIB蛋白质在相应于SEQ ID NO: 1或39的位置79的位置包含D或E,并且其中GDF捕获物在基于细胞的分析中抑制通过激活素、筒箭毒碱和/或GDF11的信号传导。上述GDF捕获物,其中相对于SEQ ID NO: 1或39的序列的至少一个变化是位于配体结合口袋内的保守的变化。上述GDF捕获物,其中相对于SEQ ID NO: 1或39的序列的至少一个变化是在选自下列的一个或多个位置的变化:K74、R40、Q53、K55、F82和L79。上述GDF捕获物,其中蛋白质是进一步包含异源性部分的融合蛋白。上述GDF捕获物融合蛋白的任一可作为同二聚体产生。上述GDF捕获物融合蛋白的任一可具有包含来自IgG重链的恒定区如Fc结构域的异源性部分。

[0023] 在某些方面,本公开内容提供编码GDF捕获物多肽的核酸。分离的多核苷酸可包含例如上文所述的可溶性GDF捕获物多肽的编码序列。例如,分离的核酸可包含编码GDF捕获物的序列,所述GDF捕获物包含具有一个或多个序列变异的序列的ActRIIB多肽的胞外域(例如,配体-结合结构域),以及编码ActRIIB多肽的部分或全部跨膜结构域和/或胞质域的序列,除了定位在跨膜结构域或胞质域中或定位在胞外域与跨膜结构域或胞质域之间的终止密码子。例如,编码GDF捕获物的分离的多核苷酸可包含全长ActRIIB多核苷酸序列,例如,具有一个或多个变异的SEQ ID NO: 4或部分截短形式,所述分离的多核苷酸进一步包含在3'-末端之前至少六百个核苷酸处或其它位置的转录终止密码子,从而使多核苷酸的翻译产生任选地融合至全长ActRIIB的截短部分的胞外域。本文公开的核酸可以可操作地连接至启动子进行表达,且本公开内容提供用此类重组多核苷酸转化的细胞。所述细胞优选为哺乳动物细胞,例如CHO细胞。

[0024] 在某些方面,本公开内容提供用于制备GDF捕获物多肽的方法。这一方法可包括在合适的细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达本文公开的任意核酸(例如,SEQ ID NO:

5、25、27、30或31)。此类方法可包括:a)在适于表达GDF捕获物多肽的条件下培养细胞,其中用GDF捕获物表达构建体转化所述细胞;和b)回收如此表达的GDF捕获物多肽。GDF捕获物多肽可作为粗制的、部分纯化的或高度纯化的级分应用用于从细胞培养物获得蛋白质的任何公知技术回收。

[0025] 在某些方面,本文公开的GDF捕获物多肽可用于在受试者中促进红细胞产生或提高红细胞水平的方法中。在某些实施方式中,本公开内容提供了在有需要的患者中治疗与低红细胞计数或低血红蛋白水平相关的病症(例如,贫血)或促进红细胞生成的方法。方法可包括给有需要的受试者施用有效量的GDF捕获物多肽。在某些方面,所述公开内容提供了GDF捕获物多肽在制备用于治疗本文描述的病症或状况的药物中的用途。

[0026] 在某些方面,本公开内容提供用于向患者施用GDF捕获物多肽的方法。部分地,本公开内容说明GDF捕获物多肽可以用于增加红细胞和血红蛋白水平。GDF捕获物多肽也可用于治疗或预防其它治疗应用,如促进肌肉生长。在某些情况下,当施用GDF捕获物多肽用于促进肌肉生长时,可期望在施用GDF捕获物多肽期间监测对红细胞的作用、或确定或调节GDF捕获物多肽的给药,以便降低对红细胞的不期望的效果。例如,红细胞水平、血红蛋白水平或血细胞比容水平的增加可引起血压的增加。

附图简述

[0027] 本专利或申请文件包含至少一副彩色描绘的附图。带彩图的这一专利或专利申请公开的副本将由专利局在请求和支付必要费用后提供。

[0028] 图1示出人ActRIIA (SEQ ID NO: 15) 和人 ActRIIB (SEQ ID NO: 2) 的胞外域的比对,其具有用框表明的本文推论的残基,所述残基基于多个ActRIIB和ActRIIA晶体结构的复合分析直接接触配体(配体结合口袋)。

[0029] 图2示出各种脊椎动物ActRIIB蛋白质和人ActRIIA (SEQ ID NOs: 16-23) 的多重序列比对。

[0030] 图3示出GDF捕获物ActRIIB (L79D 20-134) -hFc的全部氨基酸序列 (SEQ ID NO: 11),包括TPA前导序列(双下划线)、ActRIIB胞外域(SEQ ID NO: 1中的残基20-134;下划线)和hFc结构域。在天然序列位置79取代的天冬氨酸是双下划线和突出显示的,如通过对成熟融合蛋白中N-末端残基测序显示的甘氨酸。

[0031] 图4示出编码ActRIIB (L79D 20-134) -hFc的核苷酸序列。SEQ ID NO: 25相应于有义链,并且SEQ ID NO: 33相应于反义链。TPA前导序列(核苷酸1-66)是双下划线的,并且ActRIIB胞外域(核苷酸76-420)是下划线的。

[0032] 图5示出截短的GDF捕获物ActRIIB (L79D 25-131) -hFc (SEQ ID NO: 26) 的全部氨基酸序列,包括TPA前导序列(双下划线)、截短的ActRIIB胞外域(SEQ ID NO: 1中的残基25-131;下划线)和hFc结构域。在天然序列位置79取代的天冬氨酸是双下划线和突出显示的,如通过对成熟融合蛋白中N-末端残基测序显示的谷氨酸。

[0033] 图6示出编码ActRIIB (L79D 25-131) -hFc的核苷酸序列。SEQ ID NO: 27相应于有义链,并且SEQ ID NO: 34相应于反义链。TPA前导序列(核苷酸1-66)是双下划线的,并且截短的ActRIIB胞外域(核苷酸76-396)是下划线的。也示出ActRIIB胞外域的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1中的残基25-131)。

[0034] 图7示出无前导序列的截短的GDF捕获物ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 28)。截短的ActRIIB胞外域(SEQ ID NO: 1中的残基25-131)是下划线的。在天然序列位置79取代的天冬氨酸是双下划线和突出显示的,如通过对成熟融合蛋白中N-末端残基测序显示的谷氨酸。

[0035] 图8示出无前导序列、hFc结构域和接头的截短的GDF捕获物ActRIIB(L79D 25-131)的氨基酸序列(SEQ ID NO: 29)。在天然序列位置79取代的天冬氨酸是双下划线和突出显示的,如通过对成熟融合蛋白中N-末端残基测序显示的谷氨酸。

[0036] 图9示出编码ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的可选核苷酸序列。SEQ ID NO: 30相应于有义链,并且SEQ ID NO: 35相应于反义链。TPA前导序列(核苷酸1-66)是双下划线的,截短的ActRIIB胞外域(核苷酸76-396)是下划线的,并且胞外域野生型核苷酸序列中的取代是双下划线和突出显示的(与SEQ ID NO: 27比较,图6)。也示出ActRIIB胞外域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1中的残基25-131)。

[0037] 图10示出图9中示出的可选核苷酸序列(SEQ ID NO: 30)的核苷酸76-396(SEQ ID NO: 31)。图9中表明的相同核苷酸取代也在此下划线和突出显示。SEQ ID NO: 31仅编码截短的ActRIIB胞外域(对应于SEQ ID NO: 1中的残基25-131),带有L79D取代,例如ActRIIB(L79D 25-131)。

[0038] 图11示出ActRIIB(L79D 25-131)-hFc对化学治疗-诱导的贫血的小鼠模型中血红蛋白浓度的作用。数据为均值±SEM。**,P<0.01,相对于紫杉醇,在相同时间点。该GDF捕获物抵消紫杉醇治疗诱导的贫血。

[0039] 图12示出ActRIIB(L79D 25-131)-hFc对慢性肾脏疾病单侧肾切除(NEPHX)小鼠模型中红细胞(RBC)水平的作用。数据为均值±SEM。***,P<0.001,相对于基线。该GDF捕获物逆转对照小鼠中观察的肾切除术诱导的贫血。

[0040] 图13示出ActRIIB(L79D 25-131)-hFc对慢性肾脏疾病单侧肾切除(NEPHX)小鼠模型中红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)和血细胞比容(HCT)水平的作用。数据是4周期间从基线的平均变化(±SEM)。*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001,相对于NEPHX对照。该GDF捕获物防止肾切除术相关的这些红细胞参数的降低,增加各自至与肾脏完整(假手术)小鼠中类似的量级。

[0041] 图14示出ActRIIB(L79D 25-131)-hFc对急性失血诱导的贫血的大鼠模型中红细胞(RBC)水平的作用。血液移取在第-1天发生,给药在第0和3天。数据为均值±SEM。**,P<0.01;***,P<0.001,相对于载体在相同时间点。该GDF捕获物改进从失血诱导的贫血恢复的速度和程度。

[0042] 图15示出用ActRIIB(L79D 20-134)-hFc(灰色)或ActRIIB(L79D 25-131)-hFc(黑色)治疗对食蟹猴中红细胞浓度从基线的绝对变化的作用。VEH=载体。数据为均值±SEM。n=4-8每组。

[0043] 图16示出用ActRIIB(L79D 20-134)-hFc(灰色)或ActRIIB(L79D 25-131)-hFc(黑色)治疗对食蟹猴中血细胞比容从基线的绝对变化的作用。VEH=载体。数据为均值±SEM。n=4-8每组。

[0044] 图17示出用ActRIIB(L79D 20-134)-hFc(灰色)或ActRIIB(L79D 25-131)-hFc(黑色)治疗对食蟹猴中血红蛋白浓度从基线的绝对变化的作用。VEH=载体。数据为均值±SEM。n

=4-8每组。

[0045] 图18示出用ActRIIB(L79D 20-134)-hFc(灰色)或ActRIIB(L79D 25-131)-hFc(黑色)治疗对食蟹猴中循环网织红细胞浓度从基线的绝对变化的作用。VEH=载体。数据为均值±SEM。n=4-8每组。

[0046] 图19示出用促红细胞生成素(EPO)和ActRIIB(L79D 25-131)-hFc联合治疗72小时对小鼠中血细胞比容的作用。数据为均值±SEM(n=4每组),并且彼此显著不同的均值(p<0.05,不配对t检验)由不同字母指定。与载体相比,联合治疗增加血细胞比容23%,这是大于EPO和ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的单独效果的总和的协同增加。

[0047] 图20示出用EPO和ActRIIB(L79D 25-131)-hFc联合治疗72小时对小鼠中血红蛋白浓度的作用。数据为均值±SEM(n=4每组),并且彼此显著不同的均值(p<0.05)由不同字母指定。与载体相比,联合治疗增加血红蛋白浓度23%,其也是协同效果。

[0048] 图21示出用EPO和ActRIIB(L79D 25-131)-hFc联合治疗72小时对小鼠中红细胞浓度的作用。数据为均值±SEM(n=4每组),并且彼此显著不同的均值(p<0.05)由不同字母指定。与载体相比,联合治疗增加血红蛋白浓度20%,其也是协同效果。

[0049] 图22示出用EPO和ActRIIB(L79D 25-131)-hFc联合治疗72小时对小鼠脾中红细胞生成前体细胞的数目的作用。数据为均值±SEM(n=4每组),并且彼此显著不同的均值(p<0.01)由不同字母指定。尽管单独的EPO以晚期前体成熟的代价显著增加嗜碱成红细胞(BasoE)数目,联合治疗增加BosoE数目至较少但仍然显著的程度,同时支持晚期前体不降低的成熟。

发明详述

[0050] 1. 综述

[0051] EPO是牵涉在红细胞祖细胞生长和成熟为红细胞的糖蛋白激素。EPO在胎儿生命期间由肝脏产生,并且在成人中由肾脏产生。通常在成人中作为肾脏衰竭后果发生的EPO的降低产生引起贫血。EPO已基于蛋白质从用EPO基因转染的宿主细胞的表达和分泌通过遗传工程技术产生。这种重组EPO的施用在贫血的治疗中是有效的。例如,Eschbach等人(1987, N Engl J Med 316:73)描述了应用EPO纠正慢性肾脏衰竭引起的贫血。

[0052] EPO的效果通过其结合、和激活属于细胞因子受体超家族并指定为EPO受体的细胞表面受体而介导。人和鼠科动物EPO受体已得到克隆和表达(D'Andrea等人, 1989, Cell 57:277; Jones等人, 1990, Blood 76:31; Winkelman等人, 1990, Blood 76:24; WO 90/08822/美国专利号5,278,065)。人EPO受体基因编码483个氨基酸的跨膜蛋白质,其包含大约224个氨基酸的胞外域并展示与鼠科动物EPO受体大约82%的氨基酸序列同一性(参见美国专利号6,319,499)。哺乳动物细胞中表达的克隆的全长EPO受体(66-72 kDa)以类似于天然受体在红细胞祖细胞上的亲和力的亲和力($K_D=100-300$ nM)结合EPO。因此,认为这一形式包含主要EPO结合决定簇并且称为EPO受体。通过与其它密切相关的细胞因子受体类比,认为EPO受体在激动剂结合后二聚化。然而,可为多聚复合体的EPO受体的详细结构及其具体激活机制不完全明了(美国专利号6,319,499)。

[0053] EPO受体激活引起几个生物学效果。这些包括不成熟成红细胞的增加的增殖、不成熟成红细胞的增加的分化、和红细胞祖细胞的降低的凋亡(Liboi等人, 1993, Proc Natl

Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury等人, 1990, Science 248:378-381)。介导增殖和分化的EPO受体信号转导途径似乎不同(Noguchi等人, 1988, Mol Cell Biol 8:2604; Patel等人, 1992, J Biol Chem 1992, 267:21300; Liboi等人, ibid)。一些结果暗示附属蛋白质可能对于分化信号的介导是需要的(Chiba等人, 1993, Nature 362:646; Chiba等人, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11593);但是,关于附属蛋白质在分化中的作用存在争论,因为组成型活化形式的受体可以刺激增殖和分化二者(Pharr等人, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:938)。

[0054] EPO受体激活剂包括小分子红细胞生成-刺激剂(ESAs)以及基于EPO的化合物。前者的例子是与聚乙二醇共价连接的基于二聚肽的激动剂(专有名称Hematide),其已示出在健康志愿者和具有慢性肾脏疾病和内源性抗-EPO抗体的患者中的红细胞生成-刺激特性(Stead等人, 2006, Blood 108:1830-1834; Macdougall等人, 2009, N Engl J Med 361:1848-1855)。其它例子包括基于非肽的ESAs(Qureshi等人, 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:12156-12161)。

[0055] EPO受体激活剂也包括不接触EPO受体本身、通过增强内源性EPO产生间接刺激红细胞生成的化合物。例如,低氧诱导的转录因子(HIFs)是EPO基因表达的内源性刺激物,其在常氧条件下被细胞调节机制抑制(去稳定)。因此,HIF脯氨酰羟化酶抑制剂正研究用于体内EPO-诱导活性。EPO受体的其它间接激活剂包括GATA-2转录因子抑制剂(Nakano等人, 2004, Blood 104:4300-4307),其增强地抑制EPO基因表达,和造血细胞磷酸酶(HCP或SHP-1)抑制剂,其作为EPO受体信号转导的负调节剂起作用(Klingmuller等人, 1995, Cell 80:729-738)。

[0056] 转化生长因子- β (TGF- β)超家族包含多种生长因子,它们具有共同的序列元件和结构基序。已知这些蛋白在脊椎动物和无脊椎动物中对多种细胞类型施加生物作用。该超家族的成员在胚胎发育过程中在模式形成和组织特化方面行使重要功能,并且能够影响多种分化过程,包括脂肪生成、肌发生、软骨发生、心脏生成、血细胞生成、神经发生和上皮细胞分化。该家族分成两大分支:BMP/GDF和TGF- β /激活素/BMP10分支,其成员具有多样的、通常互补的作用。通过操纵TGF- β 家族成员的活性,通常可以导致生物中的显著生理学改变。例如,皮埃蒙特和比利时蓝牛品种携带GDF8(也称作筒箭毒碱)基因中的功能丧失突变,其导致肌肉量的显著增加.Grobet等人, Nat Genet. 1997, 17(1):71-4。此外,在人类中,GDF8的无活性等位基因与增加的肌肉量相关,并且,据报道,与优越的强度相关.Schuelke等人, N Engl J Med 2004, 350:2682-8。

[0057] TGF- β 信号由在配体刺激后磷酸化并激活下游Smad蛋白质的I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异聚复合体介导(Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178)。这些I型和II型受体是跨膜蛋白质,由带有富含半胱氨酸区域的配体-结合胞外域、跨膜结构域、和带有预测丝氨酸/苏氨酸特异性的胞质域组成。I型受体是信号传导必须的。II型受体是结合配体和I型受体表达所需的。I型和II型激活素受体在配体结合后形成稳定的复合体,导致I型受体被II型受体磷酸化。

[0058] 两个相关II型受体(ActRII)ActRIIA和ActRIIB已鉴定为用于激活素的II型受体(Mathews和Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano等人, 1992, Cell 68: 97-108)。除激活素外,ActRIIA和ActRIIB可以与几个其它TGF- β 家族蛋白质生物化学地相互作用,包

括BMP7、Nodal、GDF8和GDF11(Yamashita等人, 1995, *J. Cell Biol.* 130:217-226; Lee和McPherron, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:9306-9311; Yeo和Whitman, 2001, *Mol. Cell* 7: 949-957; Oh等人, 2002, *Genes Dev.* 16:2749-54)。ALK4是对于激活素、特别是对于激活素A的主要I型受体,并且ALK-7也可充当对于激活素、特别是对于激活素B的受体。在某些实施方案中,本发明涉及用主题GDF捕获物多肽拮抗ActRIIB受体的配体(也称为ActRIIB配体)。ActRIIB受体的示范性配体包括一些TGF- β 家族成员,如激活素、Nodal、GDF8、GDF11和BMP7。

[0059] 激活素是二聚多肽生长因子,其属于TGF- β 超家族。存在三种主要的激活素形式(A,B和AB),其为两种密切相关的 β 亚基的同/异二聚体(分别为 $\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ 和 $\beta_A\beta_B$)。人基因组还编码激活素C和激活素E,它们主要在肝中表达,同样已知包括 β_C 或 β_E 的异二聚体形式。在TGF- β 超家族中,激活素是独特的和多功能的因子,它能刺激卵巢和胎盘细胞中的激素生成,支持神经元细胞存活,根据细胞类型正面或负面影响细胞周期进程,并至少在两栖动物胚胎中诱导中胚层的分化(DePaolo等人, 1991, *Proc Soc Ep Biol Med.* 198:500-512; Dyson等人, 1997, *Curr Biol.* 7:81-84; Woodruff, 1998, *Biochem Pharmacol.* 55:953-963)。此外,已发现从刺激后的人单核细胞白血病细胞中分离的红细胞分化因子(EDF)与激活素A相同(Murata等人, 1988, *PNAS*, 85:2434)。已表明激活素A促进骨髓中的红细胞生成。在一些组织中,激活素信号传导被它的相关异二聚体,即抑制素所拮抗。例如,在从脑垂体释放促卵泡激素(FSH)的过程中,激活素促进FSH分泌和合成,而抑制素阻止FSH的分泌和合成。其它可调节激活素生物活性和/或结合激活素的蛋白包括促滤泡素抑制素(FS)、促滤泡素抑制素相关蛋白(FSRP)和 α_2 -巨球蛋白。

[0060] Nodal蛋白质在早期胚胎发生中在中胚层和内胚层诱导和形成以及随后的轴结构如心脏和胃的组织化中具有功能。已说明发育中脊椎动物胚胎中的脊背组织主要促成脊索和脊索前板的轴结构,同时其募集周围细胞以形成非轴胚胎结构。Nodal看来通过I型和II型受体二者和称为Smad蛋白质的细胞内效应器发信号。近来的研究支持ActRIIA和ActRIIB起Nodal的II型受体作用的观点(Sakuma等人, *Genes Cell.* 2002, 7:401-12)。建议的是, Nodal配体与它们的辅因子(例如cripto)相互作用以激活激活素I型和II型受体,其磷酸化Smad2。Nodal蛋白质牵涉在对早期脊椎动物胚胎重要的许多事件中,包括中胚层形成、前部模式化(anterior patterning)和左右轴规格(left-right axis specification)。实验证据已说明Nodal信号传导激活pAR3-Lux,其为之前示出对激活素和TGF- β 特异性应答的萤光素酶报道分子。但是,Nodal不能诱导pT1x2-Lux,其为对骨形态发生蛋白特异性反应的报道分子。近来的结果提供直接生物化学证据,即Nodal信号传导通过激活素-TGF- β 途径Smads、Smad2和Smad3介导。其它证据已示出胞外cripto蛋白质是Nodal信号传导所需的,使其不同于激活素或TGF- β 信号传导。

[0061] 生长和分化因子-8(GDF8)也称为筒箭毒碱。GDF8是骨骼肌量的负调节物。GDF8在发育中和成人骨骼肌中高度表达。转基因小鼠中的GDF8无效突变的特征在于骨骼肌的显著肥大和增生(McPherron等人, *Nature*, 1997, 387:83-90)。骨骼肌量的类似增加在牛中GDF8的天然发生的突变(Ashmore等人, 1974, *Growth*, 38:501-507; Swatland和Kieffer, *J. Anim. Sci.*, 1994, 38:752-757; McPherron和Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12457-12461; 和Kambadur等人, *Genome Res.*, 1997, 7:910-915)

中是明显的，并且在人中是引人注目的 (Schuelke等人， N Engl J Med 2004;350:2682-8)。研究也已示出与人中HIV-感染相关的肌肉萎缩伴随GDF8蛋白质表达增加 (Gonzalez-Cadavid等人， PNAS, 1998, 95:14938-43)。此外，GDF8可以调节肌肉-特异性酶(例如，肌酸激酶)的产生和调节成肌细胞细胞增殖 (W000/43781)。GDF8前肽可以非共价结合于成熟GDF8结构域二聚体，灭活其生物学活性 (Miyazono等人 (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield等人 (1988) J. Biol. Chem., 263; 7646-7654; 和Brown等人 (1990) Growth Factors, 3: 35-43)。结合GDF8或结构上相关蛋白质和抑制它们的生物学活性的其它蛋白质包括滤泡抑素，以及潜在地滤泡抑素相关蛋白质 (Gamer等人 (1999) Dev. Biol., 208: 222-232)。

[0062] 生长和分化因子-11 (GDF11) 也称为BMP11，为分泌蛋白质 (McPherron等人， 1999, Nat. Genet. 22: 260-264)。GDF11在小鼠发育期间在尾芽、肢芽、上颌骨和下颌弓和背根神经节中表达 (Nakashima等人， 1999, Mech. Dev. 80: 185-189)。GDF11在模式化 (patterning) 中胚层和神经组织中起独特作用 (Gamer等人， 1999, Dev Biol., 208:222-32)。示出GDF11是发育中鸡肢体中的软骨形成和肌生成的负调节物 (Gamer等人， 2001, Dev Biol. 229:407-20)。GDF11在肌肉中的表达也表明其在以类似于GDF8的方式调节肌肉生长中的作用。此外，GDF11在脑中的表达表明GDF11可也拥有涉及神经组织功能的活性。有趣的是，发现GDF11抑制嗅上皮中的神经发生 (Wu等人， 2003, Neuron. 37:197-207)。因此，GDF11在疾病如肌肉疾病和神经变性疾病 (例如肌萎缩侧索硬化) 的治疗中可具有体外和体内用途。

[0063] 骨形态发生蛋白 (BMP7) 也称为成骨蛋白质-1 (OP-1)，公知其诱导软骨和骨形成。此外，BMP7调节广泛的生理过程。例如，BMP7可为负责上皮骨发生现象的骨诱导因子。也发现BMP7在钙调节和骨稳态中起作用。类似于激活素，BMP7结合II型受体ActRIIA和ActRIIB。但是，BMP7和激活素募集不同的I型受体到异聚受体复合体中。观察到的主要BMP7 I型受体是ALK2，而激活素唯一地结合于ALK4 (ActRIIB)。BMP7和激活素引发不同的生物反应并激活不同的Smad途径 (Macias-Silva等人， 1998, J Biol Chem. 273:25628-36)。

[0064] 如本文说明的，为变体ActRIIB多肽 (ActRIIB) 的GDF捕获物多肽与野生型可溶性ActRIIB多肽相比更有效增加体内红细胞水平并且在各种贫血模型中具有有益效果。另外地，示出GDF捕获物多肽联合EP0受体激活剂的应用引起红细胞形成的大量增加。应当指出，血细胞生成是复杂的过程，由多种因素调节，包括促红细胞生成素、G-CSF和铁稳态。术语“增加的红细胞水平”和“促进红细胞形成”指临幊上可观察的量度，如血细胞比容、红细胞计数和血红蛋白测量，并且意图关于通过其发生这种变化的机制是中立的。

[0065] 除了刺激红细胞水平外，GDF捕获物多肽对于多种治疗意图有用，包括例如，促进肌肉生长 (参见PCT公开号W0 2006/012627和W0 2008/097541，其整体并入本文作为参考)。在某些情况下，当施用GDF捕获物多肽用于增加肌肉目的时，可期望降低或最小化对红细胞的效果。通过监测用GDF捕获物多肽治疗中的患者或用GDF捕获物多肽治疗的候选者中的各种血液学参数，适当的给药 (包括施用量和频率) 可基于个别患者的需求、基线血液学参数和治疗目的确定。而且，治疗进展和随时间对一个或多个血液学参数的效果可用于管理给予GDF捕获物多肽的患者，这通过促进患者护理、确定适当的维持剂量 (量和频率) 等进行。

[0066] 在本发明的上下文中以及在使用每个术语的特定的上下文中，在本说明书中所用

的术语通常具有其在本领域中的普通含义。在下文以及说明书的其它部分讨论了某些术语,以在描述本发明的组合物和方法以及如何制造和使用它们的方面为从业者提供额外的指导。术语的任何使用范围或含义将从使用该术语的特定上下文显而易见。

[0067] “约”和“大约”一般应表示考虑到测量法的性质和精确性,测得的量的可接受误差程度。典型地,示例性误差程度为在给定的数值或数值范围的20%以内,优选在10%以内,更优选在5%以内。

[0068] 或者,特别是在生物系统中,术语“约”和“大约”可表示在一定数量级内,优选在给定值的5倍以内,更优选在2倍以内的值。除非另有说明,本文给出的数量为近似值,表示在未明确指出时,可推出术语“约”或“大约”。

[0069] 本发明的方法可包括对序列彼此比较的步骤,包括将野生型序列与一种或多种突变体(序列变体)进行比较。此类比较通常包括聚合物序列的比对,例如,采用本领域熟知的序列比对程序和/或算法(例如,稍加举例,BLAST、FASTA和MEGALIGN)进行。本领域技术人员可容易地理解:在此类比对中,当突变包含残基插入或缺失时,该序列比对将在不包含该插入或缺失的残基的聚合物序列中引入“空位”(通常由破折号或“*A*”表示)。

[0070] 以其所有的语法形式和拼写变化表示的“同源性”均指具有“共同进化起源”的两种蛋白(包括来自相同生物物种的超家族的蛋白,以及来自不同生物物种的同源性蛋白)之间的关系。此类蛋白(及其编码核酸)具有序列同源性,这反映在它们的序列相似性,不管是在同一性百分比方面还是在特定残基或基序以及保守位置的存在方面。

[0071] 以其所有的语法形式表示的术语“序列相似性”指可共有或可不共有共同进化起源的核酸或氨基酸序列之间的同一性或对应性程度。

[0072] 然而在通常的使用以及在本申请中,当术语“同源性”被副词例如“高度”修饰时,可表示序列相似性,并可涉及或可不涉及共同进化起源。

[0073] 2.GDF捕获物多肽

[0074] 在某些方面,本发明涉及GDF捕获物多肽,例如可溶性变体ActRIIB多肽,包括例如,ActRIIB多肽的片段、功能变体和修饰形式。在某些实施方案中,GDF捕获物多肽具有至少一种与相应野生型ActRIIB多肽相似或相同的生物活性。例如,本发明的GDF捕获物多肽可结合和抑制ActRIIB配体(例如,激活素A、激活素AB、激活素B、Nodal、GDF8、GDF11或BMP7)的功能。任选地,GDF捕获物多肽增加红细胞水平。GDF捕获物多肽的实例包括具有一个或多个序列变化的人ActRIIB前体多肽(SEQ ID NO: 1或39),和具有一个或多个序列变化的可溶性人ActRIIB多肽(例如,SEQ ID NOs: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40和41)。GDF捕获物指相对于其它ActRIIB配体,包括例如GDF11和/或简箭毒碱对激活素具有降低的亲和力的ActRIIB多肽。

[0075] 本文所用的术语“ActRIIB”指来自任意物种的IIb型激活素受体(ActRIIB)蛋白以及通过诱变或其它修饰从所述ActRIIB蛋白衍生的变体的家族。本文提及ActRIIB应理解为提及目前鉴定的形式中的任意一种。ActRIIB家族的成员通常为跨膜蛋白,由具有富含半胱氨酸的区域的配体结合胞外域、跨膜结构域以及具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的胞质域组成。人ActRIIA可溶性胞外域(提供用于比较)和ActRIIB可溶性胞外域的氨基酸序列在图1中图解。

[0076] 术语“ActRIIB多肽”包括包含ActRIIB家族成员的任何天然存在的多肽及其保留

了有用活性的任意变体(包括突变体、片段、融合体以及肽模拟(peptide模拟物)形式)的多肽。参见,例如WO/2006/012627。例如,ActRIIB多肽包括由任意已知ActRIIB的序列所衍生的、具有与ActRIIB多肽的序列有至少约80%同一性、任选至少85%、90%、95%、97%、99%或更高同一性的序列的多肽。例如,ActRIIB多肽可结合ActRIIB蛋白和/或激活素并抑制其功能。可针对在体内促进红细胞形成的活性选择为GDF捕获物的ActRIIB多肽。ActRIIB多肽的实例包括人ActRIIB前体多肽(SEQ ID NO: 1和39)和可溶性人ActRIIB多肽(例如,SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40和41)。对于本文描述的所有ActRIIB-相关多肽的氨基酸编号基于SEQ ID NO:1的编号,除非另外具体指明。

[0077] 人ActRIIB前体蛋白序列如下:

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETREC**IYYNANWE**LERT****NQSGLERC**
EGEQDKRLHCYASWRN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSEREIFSTPGMKHENLL
[0078] **QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETM**
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
VRFEPGKPPGDTHQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK
DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 1)

[0079] 信号肽以单下划线表示;胞外域以粗体表示,而潜在的N-联糖基化位点在框中。

[0080] 在位置64带有丙氨酸的形式也在文献中报告,如下:

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETREC**IYYNANWE**LERT****NQSGLERC**
EGEQDKRLHCYASWAN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSEREIFSTPGMKHENLL
[0081] **QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETM**
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
VRFEPGKPPGDTHQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK
DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 39)

[0082] 人ActRIIB可溶性(细胞外)、加工的多肽序列如下:

GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG

[0083] TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTVYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 2)

[0084] 具有A64的可选形式如下：

GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG

[0085] TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTVYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 40)

[0086] 在一些条件下,蛋白质可在N-末端带有“SGR...”序列产生。胞外域的C-末端“尾”以下划线表示。去除“尾”的序列(Δ15序列)如下所示:

GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG

[0087] TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EA (SEQ ID NO: 3)

[0088] 带有A64的可选形式如下：

GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG

[0089] TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EA (SEQ ID NO: 41)

[0090] 在一些条件下,蛋白质可在N-末端带有“SGR...”序列产生。编码人ActRIIB前体蛋白质的核酸序列如下:(Genbank条目NM_001106的核苷酸5-1543)(示出的序列提供位置64的丙氨酸,并且可经修饰以替代地提供精氨酸)

ATGACGGCGCCCTGGGTGCCCTGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC

CCGGCTCTGGCGTGGGAGGCTGAGACACGGGAGTCATCTACTACAA

CGCCAACCTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC

GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCCTGGCCAACA

[0091] GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
 CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
 GTGTACTTCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
 ATTTGCCAGAGGCTGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGGCCACCCCCGAC
 AGCCCCCACCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCATCGGG

GGCCTTCCCTCATCGCCTGCTGGCTTTGGATGTACCGGCATCGCA
 AGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCTGGGCCTCCACC
 ACCATCCCCTCTGGTGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
 GCTCGGGGCGCTTGGCTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
 TTGTAGCTGTCAAGATCTCCCACCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
 TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
 CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
 GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
 GGGGAACATCATCACATGGAACGAACGTGTGATGTAGCAGAGACGATG
 TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCG
 AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
 [0092] ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
 GTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGACACCCACGGACAGGTAG
 GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGTTGGTG
 CCAGAGAGATGCCCTCGCGATTGACATGTATGCCATGGGTTGGTG
 CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
 AGTACATGCTGCCCTTGAGGAAGAGATTGCCAGCACCCCTCGTTGGA
 GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGCCAGCACCCATTAAA
 GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCAGCTTGTGTGACCATCG
 AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT
 GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTGGAGGTGGTCAACGGCACTACCTCG
 GACTGTCTCGTTCCCTGGTACCTCTGTACCAATGTGGACCTGCC
 CTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEQ ID NO: 4)

[0093] 编码人ActRIIB可溶性(细胞外)多肽的核酸序列如下(示出的序列提供位置64的丙氨酸,并且可经修饰以替代地提供精氨酸) :

GGCGTGGGAGGCTGAGACACGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACT
 GGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGA
 GCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCCTGGCCAACAGCTCTGGC
 ACCATCGAGCTCGTAAGAAGGGCTGCTGGTAGATGACTTCAACTGCT
 [0094] ACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTT
 CTGCTGCTGTGAAGGCAACTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTGCCA
 GAGGCTGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGGCCACCCCCGACAGCCCCA
 CC (SEQ ID NO: 5)

[0095] 在特定实施方案中,本发明涉及为变体形式的可溶性ActRIIB多肽的GDF捕获物多

肽。本文所述的术语“可溶性ActRIIB多肽”通常指包含ActRIIB蛋白的胞外域的多肽。本文所用的术语“可溶性ActRIIB多肽”包括任何天然存在的ActRIIB蛋白的胞外域及保持有用活性的其任何变体(包括突变体、片段以及肽模拟形式)。例如,ActRIIB蛋白的胞外域与配体结合,并通常是可溶性的。可溶性的ActRIIB多肽的实例包括ActRIIB可溶性多肽(例如,SEQ ID N0s: 22、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40和41)。可溶性的ActRIIB多肽的其它实例除ActRIIB蛋白质的胞外域外还包含信号序列,参见实施例1。信号序列可以是ActRIIB的天然信号序列,或来自其它蛋白质的信号序列,如组织纤溶酶原激活剂(TPA)。信号序列或蜜蜂蜂毒素(HBM)信号序列。

[0096] 本公开内容识别ActRIIB的功能活性部分和变体。申请人已确定,在相应于SEQ ID NO: 1的氨基酸64的位置具有丙氨酸(A64)的具有Hilden等人公开的序列的Fc融合蛋白(Blood. 1994 Apr 15;83(8):2163-70)具有相对低的对激活素和GDF-11的亲和力。与之相比,在位置64带有精氨酸(R64)的相同Fc融合蛋白在低纳摩尔至高皮摩尔范围对激活素和GDF-11具有亲和力。因此,在本公开中,带有R64的序列用作对于人ActRIIB的野生型参考序列。

[0097] Attisano等人(Cell. 1992 Jan 10;68(1):97-108)显示,在ActRIIB的胞外域的C-末端脯氨酸结的缺失降低受体对激活素的亲和力。含有SEQ ID NO: 1的氨基酸20-119的ActRIIB-Fc融合蛋白“ActRIIB(20-119)-Fc”对GDF-11和激活素具有降低的结合,所述降低是相对于ActRIIB(20-134)-Fc,其包括脯氨酸结区域和完全近膜结构域。但是,ActRIIB(20-129)-Fc蛋白质相对于野生型保持类似但有些降低的活性,即使脯氨酸结区域破坏。因此,在氨基酸134、133、132、131、130和129停止的ActRIIB胞外域均期望是活性的,但在134或133停止的构建体可最具活性。类似地,在残基129-134的任一的突变不期望改变配体结合亲和力至大的界限。对其支持的是,P129和P130的突变基本上不降低配体结合。因此,为ActRIIB-Fc融合蛋白的GDF捕获物多肽可在早至氨基酸109终止(最后的半胱氨酸),但是终止于109和119或在109和119之间的形式期望具有降低的配体结合。氨基酸119是保守性差的并因此容易改变或截短的。终止于128或更后的形式保持配体结合活性。终止于119和127或119和127之间的形式将具有中等结合能力。这些形式中的任一可取决于临床或实验情况而期望应用。

[0098] 在ActRIIB的N-末端,期望起始于氨基酸29或之前的蛋白质将保持配体结合活性。氨基酸29代表初始半胱氨酸。在位置24的丙氨酸至天冬酰胺突变引入N-联糖基化序列,基本上不影响配体结合。这证实相应于氨基酸20-29的在信号切割肽和半胱氨酸交联区域之间的区域中的突变被充分耐受。特别地,起始于位置20、21、22、23和24的构建体将保持活性,并且起始于位置25、26、27、28和29的构建体也期望保持活性。实施例中示出的数据说明,令人惊讶地,起始于22、23、24或25的构建体将具有最大活性。

[0099] 总之,ActRIIB的活性部分包含SEQ ID NO: 1的氨基酸29-109,并且GDF捕获物构建体可例如包含起始于相应于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸 20-29的残基和终止于相应于SEQ ID NO: 1或39的氨基酸 109-134的位置的ActRIIB部分。其它实例包括构建体,其起始于SEQ ID NO: 1或39的20-29或21-29的位置和终止于SEQ ID NO: 1或39的119-134、119-133、129-134或129-133的位置。其它实例包括构建体,其起始于SEQ ID NO: 1或39的20-24(或21-24或22-25)的位置和终止于SEQ ID NO: 1或39的109-134(或109-133)、119-134(或

119-133)或129-134(或129-133)的位置。也考虑这些范围内的变体,尤其是与SEQ ID NO: 1或39的相应部分具有至少80%、85%、90%、95%或99%同一性的那些。在某些实施方案中,GDF捕获物多肽包含与SEQ ID NO: 1或39的氨基酸残基25-131具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的多肽,基本上由该多肽组成,或由该多肽组成。在某些实施方案中,GDF捕获物多肽包含与SEQ ID NOs: 7、26、28、29、32、37或38具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的多肽,基本上由该多肽组成,或由该多肽组成。在优选的实施方案中,GDF捕获物多肽由SEQ ID NOs: 7、26、28、29、32、37或38的氨基酸序列组成,或基本上由其组成。

[0100] 本公开内容包括复合ActRIIB结构的分析结果,其在图1中示出,表明配体结合口袋由残基Y31、N33、N35、L38至T41、E47、E50、Q53至K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78至N83、Y85、R87、A92和E94至F101限定。在这些位置,期望保守的突变会被耐受(tolerated),尽管K74A突变被充分耐受,如R40A、K55A、F82A和位置L79的突变。R40在爪蟾属中是K,指示这一位置处的碱性氨基酸会被耐受。Q53在牛ActRIIB中是R和在爪蟾属ActRIIB中是K,并且因此包括R、K、Q、N和H的氨基酸会在这一位置被耐受。因此,用于GDF捕获物蛋白的通式是包含SEQ ID No. 1或39的氨基酸29-109的那种,但任选在范围是20-24或22-25的位置开始,并在范围是129-134的位置终止,并且在配体结合口袋中包含不超过1、2、5、10或15个保守氨基酸改变,和在配体结合口袋中的位置40、53、55、74、79和/或82包含0、1或更多个非保守改变。这样的蛋白可以与SEQ ID NO: 1或39的氨基酸29-109的序列保持大于80%、90%、95%或99%的序列同一性。结合口袋外的位点(在该处可变性可特别充分耐受)包括胞外域的氨基和羧基末端(如上述),和位置42-46和65-73。在位置65的天冬酰胺至丙氨酸变化(N65A)实际上改进在A64背景中的配体结合,并且因此期望对A64背景中的配体结合不具有有害效果。这一变化有可能消除A64背景中N65处的糖基化,因此表明这一区域中的显著变化可能被耐受。虽然R64A变化耐受差,R64K被充分耐受,并且因此其它碱性残基如H可在位置64被耐受。

[0101] ActRIIB在几乎所有脊椎动物中是充分保守的,具有完全保守的大的胞外域伸展。结合ActRIIB的许多配体也是高度保守的。相应地,来自各种脊椎动物生物体的ActRIIB序列的比较提供可改变的残基的洞察。因此,用作GDF捕获物的活性人ActRIIB变体多肽可包括在与另一脊椎动物ActRIIB的序列相应的位置的一个或多个氨基酸,或可包括类似于人或其它脊椎动物序列中的残基。下列实例说明确定活性ActRIIB变体的这一方法。L46在爪蟾属ActRIIB中是缬氨酸,并且因此这一位置可改变和任选地可改变为另一疏水残基如V、I或F,或非极性残基如A。E52在爪蟾属中是K,指示这一位点可耐受多种变化,包括极性残基如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y和可能地A。T93在爪蟾属中是K,指示宽泛的结构变异在这一位置被耐受,极性残基是有利的,如S、K、R、E、D、H、G、P、G和Y。F108在爪蟾属中是Y,并且因此Y或其它疏水性基团如I、V或L应当耐受。E111在爪蟾属中是K,指示带电残基会在这一位置耐受,包括D、R、K和H,以及Q和N。R112在爪蟾属中是K,指示碱性残基在这一位置耐受,包括R和H。位置119的A是相对保守性差的,并且在啮齿动物中表现为P和在爪蟾属中表现为V,因此基本上任何氨基酸应当在这一位置耐受。

[0102] 本公开内容说明另外N-联糖基化位点(N-X-S/T)的添加相对于ActRIIB(R64)-Fc形式增加ActRIIB-Fc融合蛋白的血清半衰期。通过在位置24引入天冬酰胺(A24N构建体),

产生赋予较长半衰期的NXT序列。其它NX(T/S)序列在42-44(NQS)和65-67(NSS)发现,尽管后者可不以位置64的R有效糖基化。N-X-S/T序列可通常在图1中限定的配体结合口袋外的位置引入。用于引入非内源性N-X-S/T序列的特别合适的位点包括氨基酸20-29、20-24、22-25、109-134、120-134或129-134。N-X-S/T序列可也引入ActRIIB序列和Fc或其它融合体组分间的接头。这种位点可以最小努力引入,通过在相对于预先存在的S或T的正确位置引入N,或通过在相应于预先存在的N的位置引入S或T。因此,会产生N-联糖基化位点的期望的变化是:A24N、R64N、S67N(可能与N65A变化组合)、E106N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112S和R112T。预测糖基化的任何S可改变为T,而不产生免疫原性位点,这是因为糖基化提供的保护。同样,预测糖基化的任何T可改变为S。因此,变化S67T和S44T被考虑。同样,在A24N变体中,S26T变化可应用。相应地,GDF捕获物可为具有一个或多个额外的非内源性N-联糖基化共有序列的ActRIIB变体。

[0103] ActRIIB的位置L79可改变以赋予改变的激活素-筒箭毒碱(GDF-11)结合特性。L79A或L79P降低GDF-11结合至比激活素结合大的程度。L79E或L79D保持GDF-11结合。显著地,L79E和L79D变体具有大大降低的激活素结合。体内实验表明这些非激活素受体保持增加红细胞的显著能力,但对其它组织显示降低效果。这些数据说明用于获得对激活素具有降低效果的多肽的期望性和可行性。在示范性实施方案中,本文描述的方法利用为变体ActRIIB多肽的GDF捕获物多肽,其在相应于SEQ ID NO: 1或39的位置79的位置包含酸性氨基酸(例如D或E),任选地联合一个或多个额外的氨基酸取代、添加或缺失。

[0104] 描述的变异可以各种方式联合。另外地,本文描述的诱变程序的结果表明在ActRIIB中存在通常有益于保守的氨基酸序列。这些包括位置64(碱性氨基酸)、位置80(酸性或疏水性氨基酸)、位置78(疏水性,并且尤其是色氨酸)、位置37(酸性,并且尤其是天冬氨酸或谷氨酸)、位置56(碱性氨基酸)、位置60(疏水性氨基酸,尤其是苯丙氨酸或酪氨酸)。因此,在本文公开的每一变体中,本公开内容提供可为保守的氨基酸的框架。可期望保守的其它位置如下:位置52(酸性氨基酸)、位置55(碱性氨基酸)、位置81(酸性)、98(极性或带电的,尤其是E、D、R或K)。

[0105] 在某些实施方案中,ActRIIB多肽的分离片段可通过筛选从编码ActRIIB多肽的核酸(例如,SEQ ID NOs: 4和5)的相应片段重组产生的多肽获得。此外,可采用本领域已知技术(如常规的Merrifield固相f-Moc或t-Boc化学)来化学合成片段。可(通过重组或化学合成)产生片段并进行测试,以鉴定能够充当例如ActRIIB蛋白或ActRIIB配体的拮抗剂(抑制剂)或激动剂(激活剂)的那些肽基片段。

[0106] 在某些实施方案中,GDF捕获物多肽是具有与选自SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40或41的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列的变体ActRIIB多肽。在某些情况下,该GDF捕获物具有与选自SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40或41的氨基酸序列有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,GDF捕获物包含与选自SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40或41的氨基酸序列有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由该氨基酸序列组成,或由该氨基酸序列组成,其中相应于SEQ ID NO: 1的L79的位置是酸性氨基酸(例如D或E氨基酸残基)。

[0107] 在某些实施方案中,本发明考虑通过修饰GDF捕获物多肽的结构来制备功能变体,

目的是增强疗效或稳定性(例如,离体保质期以及对体内蛋白水解降解的抗性)。GDF捕获物多肽还可通过氨基酸取代、去除或添加来产生。例如,可以合理预期单独以异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸、以谷氨酸取代天冬氨酸、以丝氨酸取代苏氨酸或以结构相关氨基酸进行的类似氨基酸取代(例如,保守突变)将不对所得分子的生物活性产生较大的影响。保守取代是发生在侧链相关的氨基酸家族内的那些取代。在GDF捕获物多肽的氨基酸序列中的改变是否产生功能性变体可通过评估GDF捕获物多肽相对于未修饰的GDF捕获物多肽或野生型ActRIIB多肽在细胞中产生应答或与未修饰的GDF捕获物多肽或野生型ActRIIB多肽比较结合一个或多个配体如激活素、GDF-11或筒箭毒碱的能力容易地测定。

[0108] 在某些特定实施方案中,本发明考虑在ActRIIB多肽的胞外域(也称为配体-结合结构域)中做出突变,以使ActRIIB多肽具有改变的配体-结合活性(例如,结合亲和力或结合特异性)。在某些情况下,这种GDF捕获物多肽具有对特定配体的改变的(提高的或降低的)结合亲和力。在其它情况下,GDF捕获物多肽对ActRIIB配体具有改变的结合特异性。

[0109] 例如,本公开内容提供相对于激活素优先结合GDF8/GDF11的GDF捕获物多肽。本公开内容进一步确立这种多肽减低脱靶效果的期望性,尽管这种选择变体对于治疗严重疾病可为较不期望的,在该严重疾病中,非常大的红细胞水平增长对于治疗效果是可需要的并且其中一些水平的脱靶效果是可接受的。例如,ActRIIB蛋白质的氨基酸残基如E39、K55、Y60、K74、W78、D80和F101在配体-结合口袋中并介导与其配体如激活素和GDF8结合。因此,本发明提供包含ActRIIB受体的改变的配体-结合结构域(例如,GDF8-结合结构域)的GDF捕获物,其包含在这些氨基酸残基处的一个或多个突变。任选地,相对于ActRIIB受体的野生型配体-结合结构域,改变的配体-结合结构域对配体如GDF8可以具有增加的选择性。为了举例说明,这些突变增加改变的配体-结合结构域相对于激活素对GDF8的选择性。任选地,改变的配体-结合结构域具有的用于激活素结合的 K_d 与用于GDF8结合的 K_d 的比相对于野生型配体-结合结构域的比为至少2、5、10或甚至100倍高。任选地,改变的配体-结合结构域具有的用于抑制激活素的 IC_{50} 与用于抑制GDF8的 IC_{50} 的比相对于野生型配体-结合结构域为至少2、5、10或甚至100倍高。任选地,改变的配体-结合结构域以与用于抑制激活素的 IC_{50} 相比至少2、5、10或甚至100倍低的 IC_{50} 抑制GDF8。

[0110] 作为一个具体实例,ActRIIB的配体-结合结构域的带正电氨基酸残基Asp(D80)可以突变为不同氨基酸残基,以产生优先结合GDF8而不是激活素的GDF捕获物多肽。优选地,D80残基变化为选自下列的氨基酸残基:不带电氨基酸残基,负电氨基酸残基和疏水性氨基酸残基。作为一个进一步具体实例,疏水性残基L79可以改变为酸性氨基酸天冬氨酸或谷氨酸,以大大降低激活素结合同时保持GDF11结合。如本领域技术人员知晓的,大多数描述的突变、变体或修饰可在核酸水平或在一些情况下通过翻译后修饰或化学合成作出。这种技术是本领域公知的。

[0111] 在某些实施方案中,本发明考虑在ActRIIB中具有特定突变的GDF捕获物多肽,从而改变ActRIIB多肽的糖基化。GDF捕获物多肽中的示范性糖基化位点在图1中举例说明(例如,下划线NX(S/T)位点)。可对此类突变进行选择,以便引入或消除一个或多个糖基化位点,例如O-联或N-联糖基化位点。天冬酰胺-联的糖基化识别位点通常包含三肽序列,即天冬酰胺-X-苏氨酸(其中“X”为任意氨基酸),其被适当的细胞糖基化酶特异性识别。还可通过对野生型ActRIIB多肽序列进行一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基的添加或取代(对于O-

联糖基化位点)来进行改变。在糖基化识别位点的第一或第三氨基酸位置之一或两者进行的多种氨基酸取代或去除(和/或在第二位的氨基酸去除)导致在修饰的三肽序列处的非糖基化。增加GDF捕获物多肽上的碳水化合物部分的数量的另一种方式是通过将糖苷化学或酶促偶联至GDF捕获物多肽。根据所用的偶联模式,糖可被连接至(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离羧基基团;(c)游离巯基基团,例如半胱氨酸的那些;(d)游离羟基基团,例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的那些;(e)芳族残基,例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些;或者(f)谷氨酰胺中的酰胺基团。这些方法描述在WO 87/05330和Aplin和Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306中,其并入本文作为参考。可化学和/或酶促实现将存在于GDF捕获物多肽上的一个或多个碳水化合物部分去除。化学去糖基化可涉及,例如,将GDF捕获物多肽暴露至化合物三氟甲磺酸或等同的化合物。该处理导致除了连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)以外大部分或全部糖的裂解,同时保持氨基酸序列完整。化学去糖基化进一步由Hakimuddin等人(1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52和Edge等人(1981) Anal. Biochem. 118:131描述。GDF捕获物多肽上的碳水化合物部分的酶促裂解可通过采用Thotakura等人(1987) Meth. Enzymol. 138:350所述的多种内切和外切糖苷酶来实现。适当时,GDF捕获物多肽的序列可根据所用表达系统的类型进行调整,因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞均可导入可受到肽的氨基酸序列影响的不同的糖基化模式。一般而言,虽然其它的哺乳动物表达细胞系也预期有用,但是用于人类的GDF捕获物多肽会在提供适当糖基化的哺乳动物细胞系(例如HEK293或CHO细胞系)中表达。

[0112] 本公开内容进一步考虑生成变体的方法,特别是生成GDF捕获物多肽的组合变体组、包含任选地截短变体的方法;组合突变体集合对于鉴定GDF捕获物序列特别有用。筛选此类组合文库的目的可以是生成例如具有改变的特性,如改变的药动学或改变的配体结合的GDF捕获物多肽变体。下文提供了多种筛选测定,此类测定可用于评估变体。例如,可针对结合ActRIIB多肽、防止ActRIIB配体与ActRIIB多肽结合或者干扰ActRIIB配体引起信号传导的能力筛选GDF捕获物多肽变体。

[0113] GDF捕获物多肽或其变体的活性也可在基于细胞的测定或体内测定中进行测试。例如,可以评估GDF捕获物多肽变体对参与血细胞生成的基因的表达的作用。根据需要,这可以在一种或多种重组ActRIIB配体蛋白(例如激活素)的存在下进行,且可转染细胞以产生GDF捕获物多肽和/或其变体,以及任选地ActRIIB配体。同样地,可给小鼠或其它动物施用GDF捕获物多肽,并可应用本领域公知方法评估一种或多种血液测量值,例如RBC计数、血红蛋白水平、血细胞比容水平、铁储存或网织红细胞计数。

[0114] 可生成相对于参考GDF捕获物多肽具有选择性效力的组合衍生的变体。这种变体蛋白质当从重组DNA构建体表达时可以应用在基因治疗方案中。同样地,诱变可以产生变体,该变体的胞内半衰期明显不同于相应的未修饰的GDF捕获物多肽。例如,改变的蛋白可变得对于蛋白水解降解或导致未修饰的GDF捕获物多肽破坏或以其它方式灭活的其它过程更加稳定或更加不稳定。这些变体以及编码它们的基因可用于通过调节GDF捕获物多肽的半衰期来改变GDF捕获物多肽水平。例如,短的半衰期可以产生更为短暂的生物效应,并且,对于可诱导的表达系统的部分,可允许对细胞中重组GDF捕获物多肽水平的更紧密控制。在Fc融合蛋白中,可在接头(如有)和/Fc部分进行突变以改变该蛋白的半衰期。

[0115] 在某些实施方案中,除ActRIIB多肽中天然存在的任意修饰之外,本发明的GDF捕

获物多肽可进一步包括翻译后修饰。这些修饰包括,但不限于,乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。其结果是,GDF捕获物多肽可包含非氨基酸元件,例如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸酯。该种非氨基酸元件对GDF捕获物多肽功能性的作用可按照本文针对其它GDF捕获物多肽变体描述地进行测试。当GDF捕获物多肽通过裂解GDF捕获物多肽的新生形式在细胞中产生时,翻译后加工也可能对蛋白正确的折叠和/或功能是重要的。不同的细胞(例如CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)对这种翻译后活性具有特异性的细胞结构和特征机制,并可以进行选择以确保GDF捕获物多肽的正确修饰和加工。

[0116] 在某些方面,GDF捕获物多肽包括具有ActRIIB多肽的至少一部分和一个或多个融合结构域的融合蛋白。熟知的这种融合结构域的实例包括,但不限于,聚组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白A、蛋白G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。可选择融合结构域来赋予所需的特性。例如,有些融合结构域对于通过亲和层析分离该融合蛋白特别有用。针对亲和纯化的目的,使用亲和层析的相关基质,例如谷胱甘肽-、淀粉酶-、以及镍-或钴-缀合的树脂。该类基质中许多可以“试剂盒”形式获得,例如可与(HIS)₆融合配偶体一起使用的Pharmacia GST纯化系统和QIA表达TM系统(Qiagen)。作为另一实例,可选择融合结构域以促进GDF捕获物多肽的检测。该种检测结构域的实例包括各种荧光蛋白(例如,GFP)以及“表位标记”,其通常为能够获得特异性抗体的短肽序列。可容易地获得特异性单克隆抗体的熟知表位标记包括FLAG、流感病毒血细胞凝集素(HA)和c-myc标记。在一些情况下,融合结构域具有蛋白酶切割位点,例如对于Xa因子或凝血酶,其允许相关的蛋白酶部分消化该融合蛋白,从而由其释放重组蛋白。该释放的蛋白可随后通过后续的层析分离从该融合结构域分离出来。在某些优选实施方案中,GDF捕获物多肽与在体内稳定GDF捕获物多肽的结构域(“稳定剂”结构域)相融合。“稳定”表示增加血清半衰期的任意情况,而不论它是由破坏减少、肾清除率降低或其它药代动力学作用所引起。与免疫球蛋白的Fc部分的融合体已知能对多种蛋白赋予所需药代动力学特性。同样地,与人血清白蛋白的融合体可赋予期望的特性。可供选择的其它融合结构域类型包括多聚化(例如,二聚化、四聚化)结构域和功能性结构域(其赋予附加的生物功能,如进一步增加红细胞水平)。

[0117] 作为一个特定实例,本发明提供了GDF捕获物,其为ActRIIB-Fc融合蛋白,包含与Fc结构域融合的(例如配体-结合)ActRIIB多肽的胞外域。示范性Fc结构域的序列如下所示(SEQ ID NO: 6)。

[0118]

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPIEKTIISKAK
GQPREPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

[0119] 任选地,Fc结构域在诸如Asp-265、赖氨酸322和Asn-434的残基具有一个或多个突变。在某些情况下,具有一个或多个所述突变(例如Asp-265突变)的突变体Fc结构域与Fc γ 受体的结合能力相对于野生型Fc结构域有所下降。在其它情况下,具有一个或多个所述突变(例如Asn-434突变)的突变体Fc结构域与I类MHC相关的Fc受体(FcRN)的结合能力相对于野生型Fc结构域有所上升。

[0120] 可以理解该融合蛋白的不同元件可以与所需功能性一致的任意方式排列。例如,

GDF捕获物多肽可置于异源结构域的C-末端,或者替代地,异源结构域可置于GDF捕获物多肽的C-末端。该GDF捕获物多肽结构域和该异源结构域无需在融合蛋白中彼此相邻,并且在任一结构域的C-或N-末端或者在结构域之间可包含另外的结构域或氨基酸序列。

[0121] 在某些实施方案中,GDF捕获物融合蛋白包含式A-B-C示出的氨基酸序列。B部分是N-和C-末端截短的ActRIIB多肽,由相当于SEQ ID NO: 26的氨基酸26-132的氨基酸序列组成。A和C部分可独立为0、1个或多于1个氨基酸,并且A和C部分在存在时对B都是异源的。A和/或C部分可通过接头序列与B部分连接。示范性接头包括短多肽接头如2-10、2-5、2-4、2-3个甘氨酸残基,例如,Gly-Gly-Gly接头。其它适当的接头在本文上述。在某些实施方案中,GDF捕获物融合蛋白包含式A-B-C中列出的氨基酸序列,其中A是前导序列,B由SEQ ID NO: 26的氨基酸26-132组成并且C是增强体内稳定性、体内半衰期、摄取/施用、组织定位或分布、蛋白质复合体形成和/或纯化中的一个或多个的多肽部分。在某些实施方案中,GDF捕获物融合蛋白包含式A-B-C中列出的氨基酸序列,其中A是TPA前导序列,B由SEQ ID NO: 26的氨基酸26-132组成,并且C是免疫球蛋白Fc结构域。优选的GDF捕获物融合蛋白包含SEQ ID NO: 26中列出的氨基酸序列。

[0122] 在某些实施方案中,本发明的GDF捕获物多肽包含能够稳定该GDF捕获物多肽的一种或多种修饰。例如,这些修饰提高GDF捕获物多肽的体外半衰期,提高GDF捕获物多肽的循环半衰期或减少GDF捕获物多肽的蛋白水解降解。这些稳定化修饰包括,但不限于,融合蛋白(包括,例如,包含GDF捕获物多肽和稳定剂结构域的融合蛋白)、糖基化位点的修饰(包括,例如,向GDF捕获物多肽添加糖基化位点)以及碳水化合物部分的修饰(包括,例如,从GDF捕获物多肽除去碳水化合物部分)。在融合蛋白的情况下,GDF捕获物多肽融合于稳定剂结构域如IgG分子(例如Fc结构域)。本文所用的术语“稳定剂结构域”不仅指融合蛋白情况下的融合结构域(例如Fc),还包括非蛋白质修饰,例如碳水化合物部分,或非蛋白质聚合物,例如聚乙二醇。

[0123] 在某些实施方案中,本文使得可以获得GDF捕获物多肽的分离和/或纯化形式,其分离自其它蛋白,或者另外地基本不含其它蛋白。

[0124] 在某些实施方案中,本发明的GDF捕获物多肽(未修饰的或修饰的)可以通过各种公知技术产生。例如,这种GDF捕获物多肽可以应用标准蛋白质化学技术合成,如在Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) 和Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992) 中描述的那些。此外,自动肽合成仪是可商购的(例如, Advanced ChemTech Model396; Milligen/Bioscience 9600)。可选地,GDF捕获物多肽、其片段或变体可应用本领域公知的各种表达系统重组产生(例如,大肠杆菌、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、COS细胞、杆状病毒)。在又一实施方案中,修饰的或未修饰的GDF捕获物多肽可通过应用例如蛋白酶,例如胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶或配对碱性氨基酸转换酶(PAGE)消化重组产生的全长GDF捕获物多肽产生。计算机分析(应用可购得的软件,例如MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.)可以用于识别蛋白水解切割位点。可选地,这种GDF捕获物多肽可从重组产生的全长GDF捕获物多肽产生,如本领域已知的标准技术,如通过化学裂解(例如,溴化氰、羟胺)。

[0125] 3. 编码 GDF捕获物多肽的核酸

[0126] 在某些方面,本发明提供了编码本文公开的任意GDF捕获物多肽的分离和/或重组核酸。SEQ ID NO: 4编码天然存在的ActRIIB前体多肽,而SEQ ID NO: 5编码可溶性ActRIIB多肽,和SEQ ID NOs: 25、27、30和31编码可溶性GDF捕获物。所述主题核酸可以是单链的或是双链的。这样的核酸可以是DNA或RNA分子。这些核酸可以在,例如,制备GDF捕获物多肽的方法中使用,或者作为直接的治疗剂(例如在基因治疗方法中)使用。

[0127] 在某些方面,编码GDF捕获物多肽的主题核酸应进一步理解为包括作为SEQ ID NOs: 5、25、27、30和31的变体的核酸。变体核苷酸序列包括变化一个或多个核苷酸取代、添加或缺失的序列,如等位基因变体;并将因此包括不同于在SEQ ID NOs: 5、25、27、30和31中指定的编码序列的核苷酸序列的编码序列。

[0128] 在某些实施方案中,本发明提供了与SEQ ID NO: 5、25、27、30或31具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的分离或重组核酸序列。本领域普通技术人员将能理解:与SEQ ID NO: 5、25、27、30或31互补的核酸序列,以及SEQ ID NO: 5、25、27、30或31的变体同样在本发明的范围之内。在进一步的实施方案中,本发明的核酸序列可以是分离的、重组的和/或与异源核苷酸序列融合,或者在DNA文库中。

[0129] 在其它实施方案中,本发明的核酸还包括在高度严格的条件下与SEQ ID NO: 5、25、27、30或31所示的核苷酸序列,SEQ ID NO: 5、25、27、30或31的互补序列或其片段杂交的核苷酸序列。如上文所讨论的,本领域普通技术人员将容易理解,促进DNA杂交的合适的严格条件是可以改变的。例如,可在6.0 x 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)、约45°C下杂交,然后在2.0 x SSC、50°C下洗涤。例如,洗涤步骤中的盐浓度可从低严格性的约2.0 x SSC、50°C至高严格性的约0.2 x SSC、50°C中选择。此外,洗涤步骤中的温度可从低严格性条件的室温,即约22°C上升至高严格条件的约65°C。温度和盐可都改变,或者可将温度或盐浓度保持恒定,而改变另一变量。在一种实施方案中,本发明提供以下核酸:其在6 x SSC、室温的低严格条件下杂交,然后在2 x SSC、室温下洗涤。

[0130] 由于遗传密码的简并性而不同于SEQ ID NO: 5、25、27、30或31所示核酸的分离的核酸也在本发明的范围内。例如,许多氨基酸由一个以上的三联体密码所指定。指定相同氨基酸的密码子,或称同义密码子(例如,CAU和CAC为组氨酸的同义密码子)可导致不影响蛋白氨基酸序列的“沉默”突变。在某些实施方案中,GDF捕获物多肽将由替代核苷酸序列编码。替代核苷酸序列相对于天然GDF捕获物核酸序列产生,但仍编码相同融合蛋白。在某些实施方案中,具有SEQ ID NO: 26的GDF捕获物由包含SEQ ID NO: 30的替代核酸序列编码。然而,预期在哺乳动物细胞中存在确实导致主题蛋白的氨基酸序列改变的DNA序列多态性。本领域技术人员将能理解:在编码特定蛋白的核酸中一个或多个核苷酸(最多约3-5%的核苷酸)的这些变异可能由于天然等位基因变异而在特定物种的个体中存在。任一和全部这些核苷酸变异以及由此产生的氨基酸多态性均在本发明的范围之内。

[0131] 在某些实施方案中,本发明的重组核酸可以在表达构建体中可操作地连接至一种或多种调节性核苷酸序列。调节性核苷酸序列通常适合用于表达的宿主细胞。本领域已知用于多种宿主细胞的多种类型的合适的表达载体以及合适的调节序列。所述一种或多种调节性核苷酸序列通常可包括,但不限于,启动子序列、前导或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或激活子序列。本发明也考虑本领域已知的组成型或诱导型启动子。所述启动子可以是天然存在的启动子,或者是合并了一个

以上启动子的元件的杂合启动子。表达构建体可存在于细胞中的附加体(例如质粒)上,或者表达构建体可插入染色体中。在优选的实施方案中,表达载体包含选择标记基因,从而允许选择转化的宿主细胞。选择标记基因已为本领域熟知,并将随所用的宿主细胞而改变。

[0132] 在本发明的某些方面,在表达载体中提供主题核酸,所述表达载体包含编码GDF捕获物多肽并可操作地连接于至少一种调节序列的核苷酸序列。调节序列已为本领域所了解,并选择用于指导GDF捕获物多肽的表达。因此,术语调节序列包括启动子、增强子以及其它表达控制元件。示范性的调节序列描述于Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)。例如,在与DNA序列可操作地连接时控制该DNA序列表达的多种表达控制序列中的任意一种可用于这些载体中,以表达编码GDF捕获物多肽的DNA序列。这些有用的表达控制序列包括,例如,SV40的早期和晚期启动子、tet启动子、腺病毒和巨细胞病毒立即早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、由T7 RNA聚合酶指导表达的T7启动子、噬菌体λ的主要操纵子和启动子区、fd外壳蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子,例如Pho5、酵母α-交配因子的启动子、杆状病毒系统的多角体启动子以及已知控制原核或真核细胞或其病毒的基因表达的其它序列,及其各种组合。应当理解,表达载体的设计可取决于诸如待转化宿主细胞的选择和/或需要表达的蛋白类型等因素。此外,还应考虑载体的拷贝数、控制拷贝数的能力以及由该载体编码的任何其它蛋白(例如抗生素标记)的表达。

[0133] 本发明的重组核酸可通过将克隆的基因或其部分连接至适于在原核细胞、真核细胞(酵母、禽类、昆虫或哺乳动物)或两者中表达的载体中而产生。生产重组GDF捕获物多肽的表达载体包括质粒和其它载体。例如,合适的载体包括如下类型的质粒:用于在原核细胞(例如大肠杆菌)中表达的pBR322-衍生的质粒、pEMBL-衍生的质粒、pEX -衍生的质粒、pBTac -衍生的质粒以及pUC -衍生的质粒。

[0134] 一些哺乳动物表达载体同时包含促进载体在细菌中繁殖的原核序列和一种或多种在真核细胞中表达的真核转录单位。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg衍生的载体是适于真核细胞转染的哺乳动物细胞表达载体的实例。这些载体中的一些用来自细菌质粒(如pBR322)的序列进行修饰,以促进在原核和真核细胞这两者中的复制和药物抗性选择。或者,病毒的衍生物如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或EB病毒(pHEBo、pREP-衍生的和p205)可用于真核细胞中蛋白的瞬时表达。其它病毒(包括逆转录病毒)表达系统的实例可在下文有关基因治疗送递系统的描述中找到。用于制备质粒和转化宿主生物的各种方法为本领域熟知。其它合适的原核和真核细胞表达系统以及一般的重组程序参见Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. Sambrook, Fritsch和Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Chapters 16和17。在某些情况下,可能需要采用杆状病毒表达系统来表达重组多肽。这些杆状病毒表达系统的实例包括pVL-衍生的载体(例如pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW-衍生的载体(例如pAcUW1)以及pBlueBac-衍生的载体(例如含β-gal的pBlueBac III)。

[0135] 在优选的实施方案中,将设计用于在CHO细胞中产生主题GDF捕获物多肽的载体,例如Pcmv-Script载体(Stratagene, La Jolla, Calif)、pcDNA4载体(Invitrogen,

Carlsbad, Calif.) 和 pCI-neo 载体 (Promega, Madison, Wisc)。显而易见地, 该主题基因构建体可用于引起该主题 GDF 捕获物多肽在培养物中繁殖的细胞中表达, 例如, 以产生蛋白, 包括融合蛋白或变体蛋白, 用于纯化。

[0136] 本发明内容还涉及用包含一种或多种主题 GDF 捕获物多肽的编码序列 (例如, SEQ ID NO: 4、5、25、27、30 或 31) 的重组基因转染的宿主细胞。所述宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如, 本发明的 GDF 捕获物多肽可在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞 (例如采用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达。其它合适的宿主细胞已为本领域技术人员所熟知。

[0137] 因此, 本发明进一步涉及生产主题 GDF 捕获物多肽的方法。例如, 用编码 GDF 捕获物多肽的表达载体转染的宿主细胞可在适当条件下培养, 以允许发生该 GDF 捕获物多肽的表达。所述 GDF 捕获物多肽可被分泌并从细胞和含有该 GDF 捕获物多肽的培养基的混合物中分离。或者, GDF 捕获物多肽可保留在细胞质内或者在膜级份中, 收获、裂解该细胞并分离蛋白。细胞培养物包含宿主细胞、培养基和其它副产物。细胞培养的合适培养基为本领域熟知。该主题 GDF 捕获物多肽可从细胞培养基、宿主细胞或两者中采用本领域已知的用于纯化蛋白的技术分离, 该技术包括离子交换层析、凝胶过滤层析、超滤、电泳、用 GDF 捕获物多肽的特定表位的特异性抗体进行免疫亲和纯化。在优选的实施方案中, GDF 捕获物多肽是包含促进其纯化的结构域的融合蛋白。

[0138] 在另一实施方案中, 编码纯化前导序列 (例如在重组 GDF 捕获物多肽的所需部分的 N 末端的聚组氨酸/肠激酶切割位点序列) 的融合基因, 可允许通过采用 Ni^{2+} 金属树脂的亲和层析来纯化表达的融合蛋白。然后该纯化前导序列可通过肠激酶处理而去除, 以提供纯化的 GDF 捕获物多肽 (例如, 参见 Hochuli 等人, (1987) *J. Chromatography* 411: 177; 和 Janknecht 等人, *PNAS USA* 88:8972)。

[0139] 制备融合基因的技术已经熟知。本质上, 采用平端或交错端的用于连接的末端, 根据常规技术连接编码不同多肽序列的各种 DNA 片段, 限制酶消化以提供合适的末端, 根据需要补平粘端, 碱性磷酸酶处理以避免不期望的连接, 并且酶促连接。在另一实施方案中, 融合基因可通过包括自动化 DNA 合成仪的常规技术合成。或者, 可使用在两个连续基因片段之间产生互补突出端的锚定引物进行基因片段的 PCR 扩增, 此两个连续基因片段随后可退火形成嵌合基因序列 (例如, 参见 *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel 等人, John Wiley & Sons: 1992)。

[0140] 4. 筛选测定

[0141] 在某些方面, 本发明涉及主题 GDF 捕获物多肽 (例如, 可溶性变体 ActRIIB 多肽) 用于鉴定作为 ActRIIB 多肽的激动剂或拮抗剂的化合物 (药剂) 的应用。可测试通过该筛选所鉴定的化合物, 以评估它们在体内或体外调节红细胞、血红蛋白和/或网织红细胞水平的能力。这些化合物可以在, 例如, 动物模型中测试。

[0142] 有多种方法筛选通过靶向 ActRIIB 信号传导来提高红细胞或血红蛋白水平的治疗剂。在某些实施方式中, 可进行化合物的高通量筛选, 从而鉴定在选定的细胞系上干扰 ActRIIB-介导的作用的药剂。在某些实施方式中, 实施该测定以筛选并鉴定特异性抑制或减少 ActRIIB 多肽与其结合配偶体, 如 ActRIIB 配体 (例如, 激活素、Nodal、GDF8、GDF11 或 BMP7) 的结合的化合物。或者, 该测定可用于鉴定增加 ActRIIB 多肽与其结合配偶体如

ActRIIB配体的结合的化合物。在进一步的实施方式中,化合物可通过其与ActRIIB多肽相互作用的能力来鉴定。

[0143] 多种测定形式可满足需要,且根据本公开内容,未在本文明确描述的测定可被本领域普通技术人员所理解。如本文所述,本发明的测试化合物(药剂)可通过任意组合的化学方法生成。或者,该主题化合物可以是在体内或体外合成的天然存在的生物分子。用于测试其作为组织生长调节剂的能力的待测试化合物(药剂)可通过,例如,细菌、酵母、植物或其它生物产生(例如,天然产物),通过化学方法产生(例如,小分子,包括肽模拟物)或重组产生。本发明考虑的测试化合物包括非肽基有机分子、肽、多肽、肽模拟物、糖、激素和核酸分子。在特定实施方式中,该测试药剂是分子量小于约2000道尔顿的小有机分子。

[0144] 本发明的测试化合物可以作为单独的、分散的实体提供,或者在更复杂的文库中提供,例如通过组合化学制备。这些文库可包含,例如,醇、卤代烷、胺、酰胺、酯、醛、醚和其他有机化合物类别。测试化合物可以分离形式或化合物的混合物展示于测试系统(特别是在初始筛选步骤中)。任选地,化合物任选可用其它化合物衍生,并具有促进该化合物分离的衍生基团。衍生基团的非限制性实例包括,生物素、荧光素、洋地黄毒苷、绿色荧光蛋白、同位素、聚组氨酸、磁珠、谷胱甘肽S转移酶(GST)、可光活化的交联剂或其任意组合。

[0145] 在许多对化合物和天然提取物文库进行测试的药物筛选程序中均期望使用高通量测定,从而使给定时间范围内所考察的化合物数量达到最大化。在无细胞系统中进行的测定(如可以用纯化或半纯化蛋白衍生)常被优选为“初级”筛选,因为可以产生它们,从而允许快速开发和相对容易检测由测试化合物介导的分子靶中的改变。此外,测试化合物的细胞毒性或生物利用度通常在体外系统中可被忽略,使测定替代地主要集中在药物对分子靶的作用,其可通过ActRIIB多肽与其结合配偶体(例如,ActRIIB配体)之间的结合亲和力的改变所显示。

[0146] 仅为阐述目的,在本发明的示例性筛选测定中,感兴趣的化合物与分离和纯化的ActRIIB多肽(其通常能够结合ActRIIB配体,如适用于分析目的)相接触。然后向化合物与ActRIIB多肽的混合物中添加含有ActRIIB配体的组合物。对ActRIIB/ActRIIB配体复合物的检测和定量为测定化合物抑制(或加强)ActRIIB多肽和其结合蛋白质之间复合物形成的效力提供了手段。该化合物的效力可通过由不同浓度的测试化合物所得的数据生成剂量反应曲线而进行评估。此外,还可进行对照测定以提供用于比较的基线。例如,在对照测定中,向含有ActRIIB多肽的组合物中添加分离和纯化的ActRIIB配体,并在缺乏测试化合物的情况下对ActRIIB/ActRIIB配体复合物的形成进行定量。应当理解,一般而言混合反应物的顺序可以变化,并且可以同时混合。此外,细胞提取物和裂解物可取代纯化蛋白,用于产生合适的无细胞测定系统。

[0147] ActRIIB多肽和其结合蛋白之间的复合物形成可通过多种技术检测。例如,可采用,例如,可检测地标记的蛋白如放射性标记的(例如,³²P、³⁵S、¹⁴C或³H)、荧光标记的(例如, FITC)或酶标记的ActRIIB多肽或其结合蛋白,通过免疫测定或通过色谱检测对复合物形成的调节进行定量。

[0148] 在某些实施方式中,本发明考虑使用荧光极化测定和荧光共振能量转移(FRET)测定来直接或间接测量ActRIIB多肽和它的结合蛋白之间的相互作用程度。此外,其它检测模式,例如基于光波导(PCT公开WO 96/26432和美国专利号5,677,196)、表面等离子共振

(SPR)、表面电荷传感器和表面力传感器的那些,可适用于本发明的多种实施方式。

[0149] 此外,本发明考虑使用相互作用捕获测定(也称为“双杂交测定”)来鉴定破坏或加强ActRIIB多肽及其结合配偶体之间的相互作用的药剂。例如,参见,美国专利号5,283,317;Zervos等人(1993) Cell 72:223-232;Madura等人(1993) J Biol Chem 268:12046-12054;Bartel等人(1993) Biotechniques 14:920-924;以及Iwabuchi等人(1993) Oncogene 8:1693-1696)。在特定实施方式中,本发明考虑使用逆向双杂交系统来鉴定使ActRIIB多肽及其结合蛋白之间的相互作用解离的化合物(例如,小分子或肽)。例如,参见Vidal和Legrain,(1999) Nucleic acids Res 27:919-29;Vidal和Legrain,(1999) Trends Biotechnol 17:374-81;以及美国专利号5,525,490;5,955,280;和5,965,368。

[0150] 在某些实施方式中,可通过与ActRIIB多肽相互作用的能力来鉴定主题化合物。化合物与ActRIIB多肽之间的相互作用可以是共价或非共价的。例如,这种相互作用可应用体外生物化学方法在蛋白水平上鉴定,所述生物化学方法包括光交联、放射性标记的配体结合以及亲和层析(Jakoby WB等人,1974,Methods in Enzymology 46: 1)。在某些情况下,可在基于机理的测定(例如检测结合ActRIIB多肽的化合物的测定)中筛选化合物。这可包括固相或液相结合事件。或者,编码ActRIIB多肽的基因可用报道系统(例如,β-半乳糖苷酶、萤光素酶或绿色荧光蛋白)转染进入细胞,并优选通过高通量筛选对文库进行筛选或用文库的各个成员进行筛选。可使用其它的基于机理的结合测定,例如,检测自由能变化的结合测定。可在靶被固定至孔、珠或芯片或者被固定化抗体捕获或者被毛细管电泳分辨的情况下实施结合测定。结合化合物通常可采用比色或荧光或表面等离子共振进行检测。

[0151] 5.示例性治疗用途

[0152] 在某些实施方式中,本发明的GDF捕获物多肽可用于在哺乳动物(如啮齿动物和灵长类动物,特别是在人类患者)中提高红细胞水平。另外地,如本文示出,GDF捕获物多肽可联合EPO受体激活剂应用以在较低剂量范围实现红细胞增加。这可在减低已知脱靶效果和与高剂量EPO受体激活剂相关的风险中有益。在某些实施方式中,本发明提供了通过给个体施用治疗有效量的GDF捕获物多肽或GDF捕获物多肽和EPO受体激活剂的联合(或联合治疗)而治疗或预防有需要的个体的贫血的方法。这些方法可用于哺乳动物(特别是人)的治疗性或预防性治疗。

[0153] GDF捕获物多肽可联合EPO受体激活剂应用以降低对EPO副作用易感的患者中这些激活剂的需要剂量。EPO的主要副作用是血细胞比容或血红蛋白水平的过度增加和红细胞增多症。提高的血细胞比容水平可以引起高血压(更尤其是高血压恶化)和血管血栓。已报告的EPO的其它副作用,涉及高血压的其中一些是头痛、流感样综合征、旁路阻塞、归于血栓症的心肌梗塞和脑惊厥、高血压脑病和红细胞aplasia(Singibarti, (1994) J. Clin Investig 72(suppl 6), S36-S43; Horl等人(2000) Nephrol Dial Transplant 15(suppl 4), 51-56; Delanty等人(1997) Neurology 49, 686-689; Bunn (2002) N Engl J Med 346(7), 522-523)。

[0154] 本文公开的GDF捕获物多肽对红细胞水平的快速效果表明这些制剂通过与EPO不同的机制起作用。相应地,这些拮抗剂可用于增加对EPO不充分应答的患者中的红细胞和血红蛋白水平。例如,GDF捕获物多肽可有益于其中施用正常至增加(>300 IU/kg/周)剂量的

EPO不导致血红蛋白水平增加直至靶水平的患者。具有不充分EPO应答的患者发现于所有类型的贫血,但较高数目的非应答者已在患有癌症的患者和患有末期肾脏疾病的患者中特别频繁地观察到。对EPO的不充分应答可以是组成性的(即在用EPO初次治疗后观察到)或获得性的(例如在用EPO反复治疗后观察到)。

[0155] 本文所用的“预防”病症或状况的治疗剂指在统计样本中相对未治疗的对照样本减少治疗样本中的病症或状况的发生,或者相对未治疗的对照样本延迟病症或状况的一种或多种症状的发作或减少其严重性的化合物。本文所用的术语“治疗”包括预防指定的状况或者在其形成后改善或消除该状况。在任一情况下,预防或治疗可在医师或其他健康护理提供者所提供的诊断和该治疗剂的施用的预期结果中得到辨别。

[0156] 如本文所示,任选地与EPO受体激活剂联合的本文公开的GDF捕获物多肽可用于提高健康个体的红细胞、血红蛋白或网织红细胞水平,且这些GDF捕获物多肽可用于选定的患者群体。合适的患者群体的实例包括具有不希望的低红细胞或血红蛋白水平的患者,例如患有贫血的患者,以及具有发展不希望的低红细胞或血红蛋白水平的风险的患者,例如正要进行可能导致大量失血的大手术或其它过程的患者。在一个实施方式中,采用GDF捕获物多肽治疗具有足够红细胞水平的患者以提高红细胞水平,然后抽出血液并保存,供以后输血使用。

[0157] 任选地与EPO受体激活剂联合的本文公开的GDF捕获物多肽可用于提高患有贫血的患者中的红细胞水平。当在人类中观察血红蛋白水平时,尽管考虑个体变异,低于适当的年龄和性别分类的正常值的水平可表示贫血。例如,12 g/dl的血红蛋白水平通常认为是一般成年群体中的正常值的下限。潜在的原因包括失血、营养缺乏、药物反应、与骨髓和多种疾病有关的各种问题。更具体而言,贫血与多种病症相关,其包括,例如,慢性肾功能衰竭、骨髓异常增生综合征、类风湿关节炎、骨髓移植。贫血还可与如下状况相关:实体瘤(如乳腺癌、肺癌、结肠癌);淋巴系统的肿瘤(如慢性淋巴细胞白血病,非何杰金淋巴瘤和何杰金淋巴瘤);造血系统的肿瘤(如白血病、骨髓异常增生综合征、多发性骨髓瘤);放疗;化疗(如含铂的方案);炎性和自身免疫疾病,包括但不限于类风湿关节炎、其它炎性关节炎疹、系统性红斑狼疮(SLE)、急性或慢性皮肤疾病(例如,牛皮癣)、炎性肠病(例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎);急性或慢性肾疾病或衰竭,包括特发性或先天性状况;急性或慢性肝疾病;急性或慢性出血;由于患者的异体或自体抗体和/或由于宗教原因(例如,某些耶和华证人)而不能输注红细胞的情况;感染(例如,疟疾,骨髓炎);血红蛋白病,包括,例如,镰状细胞疾病、地中海贫血;药物使用或滥用,例如,酒精滥用;由于任何避免输血的原因导致的贫血的儿科患者;以及由于担心循环负荷而不能接受输血的患贫血的年长患者或基础心肺疾病患者。

[0158] 任选地与EPO受体激活剂联合的GDF捕获物多肽对于治疗低增殖性骨髓的贫血(其典型地与红细胞(RBC)形态的很少改变相关)是合适的。低增殖性贫血包括:1)慢性疾病的贫血,2)肾疾病的贫血,和3)与低代谢状态相关的贫血。在这些类型的每一种中,内源性促红细胞生成素水平对于观察到的贫血程度是不适当低的。其它低增殖性贫血包括:4)早期缺铁性贫血,和5)由骨髓损伤导致的贫血。在这些类型中,内源性促红细胞生成素水平对于观察到的贫血程度是合适地升高的。

[0159] 最常见的类型是慢性疾病的贫血,所述慢性疾病包括炎症、感染、组织损伤和诸如癌的状况,并且通过低促红细胞生成素水平和骨髓中对促红细胞生成素的反应不足这两者

来区分(Adamson, 2008, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634)。很多因素会导致癌相关的贫血。一些与疾病过程本身和炎性细胞因子如白介素-1、干扰素- γ 和肿瘤坏死因子的产生相关(Bron 等人, 2001, *Semin Oncol* 28 (Suppl 8):1-6)。在其效果中,炎症诱导关键的铁调节肽铁调素(hepcidin),从而抑制铁从巨噬细胞运出,并且通常限制用于红细胞生成的铁利用度(Ganz, 2007, *J Am Soc Nephrol* 18:394-400)。经各种途径的失血也会导致癌相关的贫血。由于癌进展导致的贫血的普遍程度随癌类型而不同,从前列腺癌中的5%直至多发性骨髓瘤中的95%。癌相关的贫血对患者具有明显后果,包括疲乏和生活质量下降、疗效降低和死亡率上升。

[0160] 慢性肾疾病与低增殖性贫血相关,所述贫血的严重程度随肾损害的程度改变。所述贫血主要是由于促红细胞生成素的产生不足和红细胞存活减少。慢性肾疾病通常在数年或数十年的时间中逐渐进展到末期(5期)疾病,此时需要进行透析或肾移植来使患者存活。贫血通常在此过程的早期发生,并且随疾病进展恶化。已充分记载了肾疾病的贫血的临床后果,包括发展左心室肥厚、认知功能受损、生活质量下降和免疫功能改变(Levin 等人, 1999, *Am J Kidney Dis* 27:347-354; Nissenson, 1992, *Am J Kidney Dis* 20 (Suppl 1):21-24; Revicki 等人, 1995, *Am J Kidney Dis* 25:548-554; Gafter 等人, 1994, *Kidney Int* 45:224-231)。如申请人在慢性肾疾病的小鼠模型中所证明的(参见下文实施例),任选地与EPO受体激活剂联合的GDF捕获物多肽可以用于治疗肾疾病的贫血。

[0161] 很多导致低代谢速率的状况会产生轻到中度低增殖性贫血。在所述状况中包括内分泌缺陷状况。例如,在阿狄森病、甲状腺机能减退、甲状旁腺功能亢进或去势或用雌激素治疗的男性中会发生贫血。轻到中度贫血也可以随蛋白的饮食摄取减少(在老年人中特别普遍的一种状况)而发生。最后,具有由几乎任何原因导致的慢性肝病的患者中也会发展贫血(Adamson, 2008, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634)。

[0162] 大量急性失血如外伤或产后出血引起的贫血称为急性出血后贫血。急性失血最初引起血容量不足,没有贫血,因为存在RBC连同其它血液成分的按比例耗竭。但是,血容量不足会快速地触发将流体从血管外转移到血管腔隙的生理机制,这导致血液稀释和贫血。如果是慢性的,则失血逐渐耗竭机体铁储存和最终导致铁缺乏。如申请人在小鼠模型中说明的(参见下文实施例),任选地与EPO受体激活剂联合的GDF捕获物多肽可以用于从急性失血的贫血快速恢复。

[0163] 缺铁性贫血是不断增加的铁缺乏的分级进展(其包括作为中间阶段的铁的负平衡和缺铁性红细胞生成)中的最终阶段。铁缺乏可以由增加的铁需求、减少的铁摄取或增加的铁丢失导致,其在以下状况中示例:诸如妊娠、饮食不足、肠吸收不良、急性或慢性炎症,以及急性或慢性失血。伴随这种类型的轻到中度贫血,骨髓保持低增殖性,并且RBC形态大致正常;但是,即使轻度贫血也会导致一些小红细胞低血色素的RBC,并且,向严重缺铁性贫血的转变伴随骨髓的高增殖和越来越普遍存在的小红细胞和低血色素的RBC(Adamson, 2008, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634)。缺铁性贫血的适当治疗取决于其原因和严重程度,口服铁制剂、肠胃外铁制剂和RBC输注是主要的常规选择。任选地与EPO受体激活剂联合的GDF捕获物多肽可

以单独或与常规治疗方法联合用于治疗慢性缺铁性贫血,特别是用于治疗多因素来源的贫血。

[0164] 低增殖性贫血可以由骨髓的原发功能障碍或衰竭(而不是继发于炎症、感染或癌进展的功能障碍)导致。突出的实例是由癌化疗药物或癌放疗导致的骨髓抑制。广泛的临床试验综述发现100%的化疗后患者中会发生轻度贫血,而在多至80%的这些患者中会发生更严重的贫血(Groopman等人,1999,J Natl Cancer Inst 91:1616-1634)。骨髓抑制药物包括:1) 烷化剂,如氮芥(如美法仑)和亚硝基脲(如链脲霉素);2) 抗代谢药,如叶酸拮抗剂(如氨甲喋呤)、嘌呤类似物(如硫鸟嘌呤)和嘧啶类似物(如吉西他滨);3) 细胞毒性抗生素如蒽环类抗生素(如阿霉素);4) 激酶抑制剂(如吉非替尼);5) 有丝分裂抑制剂如紫杉烷类(如紫杉醇)和长春花生物碱(如长春瑞滨);6) 单克隆抗体(如利妥昔单抗);和7) 拓扑异构酶抑制剂(如托泊替康和依托泊苷)。如在化疗诱导的贫血的小鼠模型中所证明的(参见下文实施例),任选地与EPO受体激活剂联合的GDF捕获物多肽可以用于治疗化疗剂和/或放疗导致的贫血。

[0165] 任选地与EPO受体激活剂联合的GDF捕获物多肽也适合于治疗RBC成熟紊乱的贫血,其特征部分在于尺寸不足(小红细胞)、尺寸过大(巨红细胞)、奇形怪状或异常颜色的(低血色素的)RBC。

[0166] 尽管较低的目标水平可引起较少的心血管副作用,可采用目的在于将患者恢复至目标血红蛋白水平的给药方案来治疗患者,该目标血红蛋白水平通常在约10 g/dl和约12.5 g/dl之间,典型地约为11.0 g/dl(也参见Jacobs等人(2000) Nephrol Dial Transplant 15,15-19)。或者,血细胞比容水平(细胞占血样体积的百分比)可用作对红细胞状况的测量值。对于健康个体的血细胞比容水平,成年男性的范围为41-51%,成年女性的范围为35-45%。目标血细胞比容水平通常约为30-33%。此外,血红蛋白/血细胞比容水平随个体而变化。因此,最佳情况下,该目标血红蛋白/血细胞比容水平可针对每位患者进行个体化。

[0167] 在某些实施方案中,本发明提供通过测量患者中一个或多个血液学参数用于管理已用GDF捕获物多肽治疗或是GDF捕获物多肽治疗候选者的患者的方法。血液学参数可用于评价对于是GDF捕获物多肽治疗候选者的患者的适当给药、监测在用GDF捕获物多肽治疗期间的血液学参数、评价是否在用GDF捕获物多肽治疗期间调节剂量、和/或评价GDF捕获物多肽的适当的维持剂量。如果血液学参数中的一个或多个在正常水平外,用GDF捕获物多肽给药可降低、延迟或停止。

[0168] 可根据本文提供的方法测量的血液学参数包括例如,红细胞水平、血压、铁储存和与增加的红细胞水平相关的体液中发现的其它药剂,其应用本领域公知方法。这种参数可应用来自患者的血样确定。红细胞水平、血红蛋白水平和/或血细胞比容水平的增加可引起血压的增加。

[0169] 在一个实施方案中,如果一个或多个血液学参数在正常范围之外或在正常高侧,则在为GDF捕获物多肽治疗候选者的患者中,GDF捕获物多肽的开始施用可延迟,直至血液学参数已自然地或经治疗干预回复到正常或可接受的水平。例如,如果候选患者是高血压或高血压前期,则患者可用降压药治疗以便降低患者的血压。适用于个别患者的状况的任何降压药都可应用,包括例如,利尿药、肾上腺素能抑制剂(包括 α 受体阻滞剂和 β 受体阻滞

剂)、血管扩张剂、钙通道阻滞剂、血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂或血管紧张素II受体阻滞剂。血压可可选地应用饮食和锻炼方案治疗。类似地,如果候选患者具有低于正常或正常低侧的铁储存,则患者可用适当的饮食和/或铁补充方案治疗,直至患者的铁储存回复到正常或可接受的水平。对于具有高于正常红细胞水平和/或血红蛋白水平的患者,则施用GDF捕获物多肽可延迟,直至水平回复到正常或可接受的水平。

[0170] 在某些实施方案中,如果一个或多个血液学参数在正常范围外,或在正常高侧,则在为GDF捕获物多肽治疗候选者的患者中,开始施用可延迟。但是,GDF捕获物多肽的剂量或给药频率可设置为会降低施用GDF捕获物多肽时增加的血液学参数中的不可接受增加的风险的量。可选地,治疗方案可针对组合GDF捕获物多肽和解决不期望水平的血液学参数的治疗剂的患者开发。例如,如果患者具有提高的血压,则可设计牵涉施用GDF捕获物多肽和降压药的治疗方案。对于具有低于期望的铁储存的患者,可开发GDF捕获物多肽和铁补充的治疗方案。

[0171] 在一个实施方案中,可对为GDF捕获物多肽治疗候选者的患者确立对于一个或多个血液学参数的基线参数,并且基于基线值对该患者确立适当的给药方案。可选地,基于患者的医疗史确立的基线参数可用于告知对患者的适当的GDF捕获物多肽给药方案。例如,如果健康患者具有高于限定正常范围的确立的基线血压读数,在GDF捕获物多肽治疗前可不必使患者的血压成为对一般群体考虑为正常的范围。在GDF捕获物多肽治疗前患者的一个或多个血液学参数的基线值也可用作相关比较值来监测GDF捕获物多肽治疗期间血液学参数的任何变化。

[0172] 在某些实施方案中,一个或多个血液学参数在GDF捕获物多肽治疗的患者中测量。该血液学参数可用于在治疗期间监测患者并允许调整或停止GDF捕获物多肽给药或另一治疗剂的额外给药。例如,如果施用GDF捕获物多肽导致血压、红细胞水平或血红蛋白水平增加,或铁储存降低,则GDF捕获物多肽的剂量可在量或频率方面降低,以便降低GDF捕获物多肽对一个或多个血液学参数的作用。如果施用GDF捕获物多肽导致不利于患者的一个或多个血液学参数变化,则GDF捕获物多肽的给药可临时地、直至血液学参数回复到可接受的水平、或永久地停止。类似地,如果一个或多个血液学参数在减低施用GDF捕获物多肽的剂量或频率后不在可接受的范围内,则给药可停止。作为减低或停止GDF捕获物多肽给药的替代或附加,患者可给予解决血液学参数的不期望水平的额外治疗剂,例如,降压药或铁补充剂。例如,如果用GDF捕获物多肽治疗的患者具有提高的血压,则GDF捕获物多肽给药可在相同水平持续,并且将降压药加入治疗方案,GDF捕获物多肽给药可降低(例如,量和/或频率)并且将降压药加入治疗方案,或GDF捕获物多肽给药可停止并且患者可用降压药治疗。

[0173] 在某些实施方案中,正用GDF捕获物多肽治疗的患者或要用GDF捕获物多肽治疗的候选患者是需要肌肉生长的患者,如患有神经肌肉障碍或肌肉产生障碍的患者、或处于发生神经肌肉障碍或肌肉产生障碍的风险中的患者。例如,患者或候选患者可患有下列病症或处于发生下列病症的风险中:Lou Gehrig病(ALS)、癌症厌食症-恶病质综合征、肌营养不良症、肌肉萎缩、充血阻塞性肺疾病(和与COPD相关的肌肉萎缩)、肌肉萎缩综合征、少肌症或恶病质。肌营养不良症指一组退行性肌肉疾病,特征是骨骼肌以及有时心肌和呼吸肌的逐渐变弱和劣化。可用包括主题GDF捕获物多肽的方案治疗的示范性肌营养不良包括:杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良(BMD)、埃-德二氏肌营养不良(EDMD)、肢带肌营养不良

(LGMD)、面肩肱型肌营养不良 (FSH或FSHD) (也称为 Landouzy-Dejerine)、营养不良性肌强直(MMD) (也称为斯坦纳特病)、眼咽肌营养不良 (OPMD)、远侧肌营养不良 (DD)、先天性肌营养不良 (CMD)。

[0174] 6. 药物组合物

[0175] 在某些实施方案中,本发明的化合物(例如,GDF捕获物多肽)与药学可接受的载体一起配制。例如,GDF捕获物多肽可单独施用或作为药物制剂(治疗组合物)的组分施用。可以配制所述主题化合物,从而以任何方便的方式施用,用于人或兽医中。

[0176] 在某些实施方式中,本发明的治疗方法包括作为移植物或装置全身或局部施用组合物。在施用时,用于本发明的治疗组合物当然地呈无致热原、生理学可接受的形式。除了GDF捕获物多肽以外的、也可任选包含在上述组合物中的治疗有用的药剂可在本发明的方法中与主题化合物(例如,GDF捕获物多肽)同时或序贯施用。

[0177] 典型地,将肠胃外施用化合物。适合肠胃外施用的药物组合物可包含一种或多种GDF捕获物多肽,其与以下组分组合:一种或多种药学可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散液、混悬液或乳状液;或者可在即将使用之前重配成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期的接受者的血液等渗的溶质、或者悬浮剂或增稠剂。可在本发明药物组合物中采用的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物;植物油,如橄榄油;以及可注射的有机酯,如油酸乙酯。例如,可通过使用包覆材料如卵磷脂,在分散液的情况下通过维持所需要的粒度,以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0178] 此外,可以用于递送到靶组织部位(如骨髓)的形式将组合物包封或注射。在某些实施方案中,本文所述的组合物可包含能够将一种或多种治疗化合物(如GDF捕获物多肽)递送到靶组织部位(如骨髓)的基质,为发育中组织提供结构且最优能够被再吸收进入体内。例如,所述基质可提供GDF捕获物多肽的缓慢释放。此类基质可由当前用于其它植入医疗应用中的材料形成。

[0179] 基质材料的选择基于生物相容性、生物可降解性、机械性质、美学外观和界面性质。主题组合物的具体应用将限定合适的制剂。用于组合物的可能的基质可以是生物可降解的和在化学上定义的硫酸钙、磷酸三钙、羟磷灰石、聚乳酸和聚碳酸。其它可能的材料是生物可降解的且在生物学上充分定义的,例如骨或真皮胶原。进一步的基质包括纯蛋白或细胞外基质组分。其它可能的基质是不可生物降解且经化学定义的,例如烧结的羟磷灰石、生物玻璃、铝酸盐或其它陶瓷。基质可包含任意上述类型的材料的组合,例如聚乳酸与羟磷灰石或者胶原蛋白与磷酸三钙的组合。可以在组成上(如钙-铝酸盐-磷酸盐)改变生物陶瓷,并进行加工,以改变孔径、粒度、粒子形状和生物可降解性。

[0180] 在某些实施方案中,本发明的方法可以口服施用,例如为以下的形式:胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、糖锭(使用矫味的基料(*flavored basis*),通常是蔗糖和阿拉伯树胶或西黄耆胶)、粉剂、颗粒或作为在水性或非水性液体中的溶液或混悬液、或者作为水包油或油包水的液体乳状液、或作为酏剂或糖浆、或作为锭剂(采用惰性基质,如明胶和甘油或者蔗糖和阿拉伯树胶)和/或作为漱口剂等等,每种形式含有预定量的药剂作为有效成分。药剂也可以以大丸剂、药糖剂(*electuary*)或糊剂的形式给予。

[0181] 在用于口服施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣剂、粉剂、颗粒等等)中,一种

或多种本发明的治疗化合物可与一种或多种药学可接受的载体(例如柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或任意以下物质混合:(1)填充剂或增量剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘结剂,诸如,例如羟甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/阿拉伯树胶;(3)保湿剂如甘油;(4)崩解剂,如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐以及碳酸钠;(5)溶液阻滞剂,如石蜡;(6)吸收促进剂,如季铵化合物;(7)湿润剂,如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(8)吸附剂,如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物;以及(10)着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可以包含缓冲剂。相似类型的固体组合物也可以在软和硬填充明胶胶囊中用作填充剂,所述胶囊使用诸如以下的赋形剂:乳糖或奶糖,以及高分子量聚乙二醇等等。

[0182] 用于口服施用的液体剂型包括药学可接受的乳状液、微乳状液、溶液、混悬液、糖浆和酏剂。除了活性成分之外,液体剂型可包含本领域通常使用的惰性稀释剂,如水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇,油(尤其是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油),甘油,四氢糠醇,聚乙二醇和失水山梨糖醇的脂肪酸酯,及其混合物。除了惰性稀释剂,口服组合物也可以包含佐剂,如湿润剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、香料和防腐剂。

[0183] 除了活性化合物,混悬液可包含悬浮剂,如乙氧基化异十八醇、聚氧乙烯山梨醇、失水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂-琼脂和西黄耆胶,及其混合物。

[0184] 本发明的组合物也可以含有佐剂,如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过引入各种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等)来保证防止微生物的作用。也可希望将等渗剂(如糖、氯化钠等)包含入组合物中。此外,可通过包含延迟吸收的试剂(如单硬脂酸铝和明胶)来延长可注射药物形式的吸收。

[0185] 可以理解剂量方案可由主治医师考虑改变本发明主题化合物(例如,GDF捕获物多肽)的作用的各种因素来确定。所述各种因素包括,但不限于,患者的红细胞计数,血红蛋白水平或其它诊断评估,所需的目标红细胞计数,患者的年龄、性别和饮食,可导致红细胞水平降低的任意疾病的严重性、施用时间以及其它临床因素。向最终组合物中添加其它已知的生长因子也可能影响剂量。可通过周期性评估红细胞和血红蛋白水平,以及评估网织红细胞水平和其它的造血过程指示剂来监测进展。

[0186] 在某些实施方式中,本发明还提供了用于体内生成GDF捕获物多肽的基因治疗。该种治疗可通过将GDF捕获物多核苷酸序列导入具有上述列举的病症的细胞或组织实现其疗效。可采用重组表达载体(例如嵌合病毒或胶体分散系统)实现GDF捕获物多核苷酸序列的送递。优选使用靶向的脂质体进行GDF捕获物多核苷酸序列的治疗性送递。

[0187] 本文教导的可用于基因治疗的各种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、痘苗病毒或RNA病毒如逆转录病毒。该逆转录病毒载体可以是鼠或禽类逆转录病毒的衍生物。可插入单个外源基因的逆转录病毒载体的实例包括,但不限于:莫洛尼鼠氏白血病毒(MoMuLV)、Harvey鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)以及劳斯肉瘤病毒(RSV)。许多其它的逆转录病毒载体可掺入多种基因。所有这些载体可转移或掺入选择标记基因,从而可鉴别和生成转导的细胞。逆转录病毒载体可通过连接例如糖、糖脂或蛋白而具有靶特异性。优选通过使用抗体实现靶向作用。本领域技术人员将认识到,特定的多核苷酸序列可被插入

逆转录病毒基因组或连接至病毒包膜,以允许包含GDF捕获物多核苷酸的逆转录病毒载体的靶特异性送递。

[0188] 或者,可采用编码逆转录病毒结构基因gag、pol和env的质粒通过传统的磷酸钙转染直接转染组织培养细胞。然后用含有感兴趣的基因的载体质粒转染这些细胞。所得的细胞将逆转录病毒载体释放进入培养基。

[0189] GDF捕获物多核苷酸的另一靶向送递系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠以及基于脂质的系统(包括水包油乳状液、胶束、混合胶束以及脂质体)。本发明优选的胶体系统为脂质体。脂质体是可在体外和体内用作送递载体的人工膜泡。RNA、DNA和完整的病毒体可被包封在水相内部,并以生物活性形式送递至细胞(例如,参见Fraley等人,Trends Biochem. Sci.,6:77,1981)。使用脂质体载体有效转移基因的方法已为本领域所知,例如,参见Mannino等人,Biotechniques,6:682,1988。脂质体的组成通常为磷脂的组合,并常与类固醇、特别是胆固醇联用。也可使用其它的磷脂或其它的脂质。脂质体的物理特征依赖于pH、离子强度以及二价阳离子的存在。

[0190] 用于产生脂质体的脂质的例子包括磷脂酰基化合物,如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂以及神经节苷脂。例示性的磷脂包括卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。脂质体的靶向也可能基于,例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性,并且在本领域内是已知的。

实施例

[0191] 以上对本发明进行了一般描述,参考以下的实施例将更容易理解本发明,实施例仅仅是为了举例说明本发明的某些实施方案和实施方案,并不意欲限制本发明。

[0192] 实施例1: GDF捕获物的产生

[0193] 申请人如下构建 GDF捕获物。将具有修饰的ActRIIB胞外域(其具有相对于GDF11和/或筒箭毒碱大大降低的激活素A结合(作为SEQ ID NO: 1中位置 79的亮氨酸-至-天冬氨酸取代的后果))的多肽与人或小鼠Fc结构域融合,其间带有最小接头(3个甘氨酸氨基酸)。该构建体分别称为 ActRIIB(L79D 20-134) -hFc 和ActRIIB(L79D 20-134) -mFc。类似地实施在位置 79带有谷氨酸而不是天冬氨酸的可选形式(L79E)。也产生相对于下文的SEQ ID NO: 7在位置226带有丙氨酸而不是缬氨酸的可选形式并在测试的各方面等价实施。位置79(相对于 SEQ ID NO: 1,或相对于SEQ ID NO: 7的位置60)的天冬氨酸在下文以灰色突出显示。相对于 SEQ ID NO: 7在位置226的缬氨酸也在下文以灰色突出显示。

[0194] GDF捕获物ActRIIB (L79D 20-134) -hFc在下文显示为从CHO细胞系纯化 (SEQ ID NO: 7)。

- GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCW~~DDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPT~~
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
- [0195] FNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
LSPGK
- [0196] GDF捕获物的ActRIIB-衍生的部分具有下文示出的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 32) , 并且该部分会用作单体,或用作单体、二聚体或更高级复合体的非-Fc融合蛋白。
- GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE
- [0197] LVKKGCW~~DDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYE~~
PPPTAPT (SEQ ID NO: 32)
- [0198] GDF捕获物蛋白质在CHO细胞系中表达。考虑3个不同的前导序列:
- [0199] (i) 蜜蜂蜂毒素 (HBML) : **MKFLVNVALVFMVVYISIYA** (SEQ ID NO: 8)
- [0200] (ii) 组织纤溶酶原激活剂 (TPA) :
MDAMKRLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)
- [0201] (iii) 天然的: **MTAPWVALALLWGSLCAGS** (SEQ ID NO: 10)。
- [0202] 选择的形式利用TPA前导序列并具有下列未加工氨基酸序列:
- MDAMKRLCCVLLCGAVFVSPGASGRGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
 GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCW~~DDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE~~
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
- [0203] TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)
- [0204] 该多肽由下列核酸序列 (SEQ ID NO:12) 编码:

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT
 CGCCCGGC CGC CTCTGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA
 ACTGGGAGCT GGAGCGCAC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
 AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA
 AGGGCTGCTG GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACCTC
 ATTTGCCAGA GGCTGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCCGACA GCCCCCACCG
 GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG
 TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
 ACGCGTGGT GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCCGGGG GGAGCAGTAC AACAGCACGT
 ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA
 AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCAGGAG GAGATGACCA
 AGAACCGAGT CAGCCTGACC TGCCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAAC AACTACAAGAC CACGCCCTCC GTGCTGGACT
 CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

[0205] 纯化可通过一系列柱色谱步骤,包括例如下列中的3个或更多以任何顺序实现:蛋白质A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可以用病毒过滤和缓冲液交换完成。在纯化方案的一个实例中,使细胞培养基通过蛋白质A柱,在150 mM Tris/NaCl (pH 8.0)中洗涤,然后在50 mM Tris/NaCl (pH 8.0)中洗涤并用0.1 M甘氨酸pH 3.0洗脱。将低pH洗脱物保持在室温30分钟,作为病毒清除步骤。然后使洗脱物中和并通过Q琼脂糖离子交换柱并在50 mM Tris pH 8.0、50 mM NaCl中洗涤,并在50 mM Tris pH 8.0(带有150 mM至300 mM的NaCl浓度)中洗脱。然后将洗脱物变更到50 mM Tris pH 8.0、1.1 M硫酸铵中并通过苯基琼脂糖柱、洗涤并在50 mM Tris pH 8.0(带有150 mM至300 mM的硫酸铵)中洗脱。将洗脱物透析并过滤进行应用。

[0206] 额外的GDF捕获物(修饰的ActRIIB-Fc融合蛋白从而降低激活素A结合相对于筒箭毒碱或GDF11的比)描述于PCT/US2008/001506和WO 2006/012627中,其并入本文作为参考。

[0207] 实施例 2.对于GDF-11和激活素-介导的信号传导的生物分析。

[0208] 应用A-204报道基因分析来评价ActRIIB-Fc 蛋白质和GDF捕获物对通过GDF-11和激活素A的信号传导的作用。细胞系:人横纹肌肉瘤(衍生自肌肉)。报道载体:pGL3(CAGA)12(描述于Dennler等人, 1998, EMBO 17: 3091-3100)。CAGA12基序存在于TGF- B 反应性基因(PAI-1基因)中,因此这一载体通常用于通过Smad2和3发信号的因子。

[0209] 第1日:将A-204细胞分到48-孔板中。

[0210] 第2日:将A-204细胞用10 ug pGL3(CAGA)12或pGL3(CAGA)12(10 ug)+ pRLCMV (1 ug)和Fugene转染。

[0211] 第3日:加入因子(稀释到培养基+ 0.1 % BSA中)。抑制剂需要在加入细胞前与因子预温育1小时。6小时后,将细胞用PBS漂洗并裂解细胞。

[0212] 随后进行萤光素酶分析。在不存在任何抑制剂的情况下,激活素A显示报道基因表达的10倍刺激和ED₅₀ ~ 2 ng/ml。GDF-11:16倍刺激,ED₅₀:~ 1.5 ng/ml。

[0213] ActRIIB(20-134)是该分析中激活素、GDF-8和GDF-11活性的有效抑制剂。也在该分析中测试变体。

[0214] 实施例 3.通过N-末端和C-末端截短的GDF-11抑制

[0216] 产生带有N-末端和/或C-末端截短的ActRIIB(20-134)-hFc变体并测试其作为GDF-11和激活素的抑制剂的活性。活性在下文示出(如在条件培养基中测量的)：

[0217] C-末端ActRIIB-hFc截短：

	IC50 (ng/mL)	
	GDF-11	激活素
ActRIIB(20-134)-hFc	45	22
ActRIIB(20-132)-hFc	87	32
ActRIIB(20-131)-hFc	120	44
ActRIIB(20-128)-hFc	130	158

[0219] 可见,C-末端3个(以…PPT终止)、6个(以…YEP终止)或更多个氨基酸的截短引起分子活性3倍或更高的降低。ActRIIB部分的最后15个氨基酸的截短引起活性的更多丢失(参见WO2006/012627)。

[0220] 氨基末端截短在ActRIIB(20-131)-hFc蛋白质的背景下作出。活性在下文示出(如在条件培养基中测量的)：

[0221] N-末端ActRIIB-hFc截短：

	IC50 (ng/mL)	
	GDF-11	激活素
ActRIIB(20-131)-hFc (GRG...)	183	201
ActRIIB(21-131)-hFc (RGE...)	121	325
ActRIIB(22-131)-hFc (GEA...)	71	100
ActRIIB(23-131)-hFc (EAE...)	60	43
ActRIIB(24-131)-hFc (AET...)	69	105

[0223] 相应地,2个、3个或4个氨基酸从N-末端的截短引起比带有全长胞外域的形式更具活性蛋白质的产生。另外的实验显示,5个氨基酸的截短ActRIIB(25-131)-hFc与未截短形式具有等价的活性,并且在N-末端的额外缺失持续降低蛋白质的活性。因此,最佳的构建体会具有在SEQ ID NO: 1的氨基酸133-134之间终止的C-末端和在SEQ ID NO: 1的氨基酸22-24起始的N-末端。相应于氨基酸21或25的N-末端会产生类似于ActRIIB(20-134)-hFc构建体的活性。这些截短可也在GDF捕获物的上下文中应用,如L79D或L79E变体。

[0224] 实施例 4 .ActRIIB-Fc变体,基于细胞的活性。

[0225] 在基于细胞的分析中测试ActRIIB-Fc蛋白质和GDF捕获物的活性,如上述。结果在下表中概述。一些变体在不同的C-末端截短构建体中进行测试。如上文论述,5或15个氨基酸的截短引起活性降低。GDF捕获物(L79D和L79E 变体)显示激活素结合的实质丢失,同时保持几乎GDF-11的野生型抑制。

[0226] 与GDF11和激活素A的可溶性ActRIIB-Fc结合:

ActRIIB-Fc 变异	ActRIIB 部分 (相当于 SEQ ID NO: 1 的氨基酸)	GDF11 抑制活性	激活素抑制活性
R64	20-134	+++ (大致 10^{-8} M K _I)	+++ (大致 10^{-8} M K _I)
A64	20-134	+ (大致 10^{-6} M K _I)	+ (大致 10^{-6} M K _I)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+

[0227] [0228] + 活性差 (大致 1×10^{-6} K_I)

[0229] ++ 中等活性 (大致 1×10^{-7} K_I)

[0230] +++ (野生型) 活性良好 (大致 1×10^{-8} K_I)

[0231] +++++ 高于野生型活性。

[0232] 已评估几种变体在大鼠中的血清半衰期。ActRIIB(20-134)-Fc具有大约70小时的血清半衰期。ActRIIB(A24N 20-134)-Fc具有大约100-150小时的血清半衰期。A24N变体在基于细胞的分析(上述)和体内分析(下文)中具有等价于野生型分子的活性。结合较长半衰期,这意味着随着时间的过去A24N变体将产生比野生型分子更大的每单位蛋白质的作用。A24N变体和上文测试的任何其它变体可与GDF捕获物分子结合,如L79D或L79E变体。

[0233] 实施例 5.GDF-11和激活素A结合。

[0234] 在BiaCoreTM分析中测试某些ActRIIB-Fc蛋白质和GDF捕获物与配体的结合。

[0235] 应用抗-hFc抗体将ActRIIB-Fc变体或野生型蛋白质捕获在系统中。将配体注射和流动在捕获的受体蛋白质上。结果在下文的表中概述。

[0236] 配体结合特异性IIB变体。

GDF11			
蛋白质	K 结合 (1/Ms)	K 解离 (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	1.34e-6	1.13e-4	8.42e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1.21e-6	6.35e-5	5.19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6.7e-5	4.39e-4	6.55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.8e-5	2.74e-4	7.16e-10
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.77e-5	2.41e-5	3.56e-11
GDF8			
蛋白质	K 结合 (1/Ms)	K 解离 (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	3.69e-5	3.45e-5	9.35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3.85e-5	8.3e-4	2.15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.74e-5	9e-4	2.41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2.25e-5	4.71e-5	2.1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9.74e-4	2.09e-4	2.15e-9
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1.08e-5	1.8e-4	1.67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2.8e-5	2.03e-5	7.18e-11
激活素 A			
蛋白质	K 结合 (1/Ms)	K 解离 (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	5.94e6	1.59e-4	2.68e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3.34e6	3.46e-4	1.04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc			低结合
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc			低结合
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.82e6	3.25e-4	4.76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7.46e6	6.28e-4	8.41e-11
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5.02e6	4.17e-4	8.31e-11

[0237] [0238] 这些数据证明基于细胞分析数据表明, A24N变体保持类似于ActRIIB (20-134) - hFc分子的配体-结合活性, 并且L79D或L79E分子保持筒箭毒碱和GDF11结合但显示明显降低(不可计量)的与激活素A的结合。

[0239] 已产生和测试其它变体, 如W02006/012627(整体并入本文作为参考)中报告的, 参见例如第59-60页, 其应用偶联于该装置的配体和在偶联配体上的流动受体。显著地, K74Y、K74F、K74I (和大概在K74的其它疏水性取代, 如 K74L) 和D80I引起激活素A结合与GDF11结合的比相对于野生型K74分子降低。关于这些变体的数据表在下文重现:

[0240] 对GDF11和激活素A的可溶性ActRIIB-Fc变体结合(BiaCore分析)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1.8e-7M (+)	KD= 2.6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8.6e-8M (+++)
+15 尾	KD ~2.6 e-8M (+++)	KD= 1.9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4.35e-9 M +++++	KD=5.3e-9M +++++
K74Y	*	--
K74F	*	--
K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

[0241] [0242] *没有观察的结合

[0243] -- < 1/5 WT 结合

[0244] - ~ 1/2 WT 结合

[0245] + WT

[0246] ++ < 2×增加的结合

[0247] +++ ~5×增加的结合

[0248] ++++ ~10×增加的结合

[0249] +++++ ~ 40×增加的结合。

[0250] 实施例 6. ActRIIB-hFc刺激非人灵长动物中的红细胞生成

[0251] 将ActRIIB(20-134) -hFc (IgG1) 对雄性和雌性食蟹猴通过皮下注射每周1次施用1个月。将48只食蟹猴(24/性别) 指定到4个治疗组中的1个中(6只动物/性别/组) 并皮下注射施用载体或3、10或30 mg/kg的ActRIIB-hFc, 每周1次, 进行4周(总共5个剂量)。评价的参数包括一般临床病理学(血液学、临床化学、凝血和验尿)。至15天, ActRIIB-hFc在治疗动物中引起统计学显著提高的平均绝对网织红细胞值。至36天, ActRIIB-hFc引起几种血液学变化, 包括提高的平均绝对网织红细胞和红细胞分布宽度值和较低的平均微粒血红蛋白浓度。所有治疗组和两种性别都受影响。这些效果与ActRIIB-hFc对不成熟网织红细胞从骨髓

释放的正面作用一致。这一效果在药物从治疗动物洗出后逆转(至研究第56天)。相应地,我们推断ActRIIB-hFc刺激红细胞生成。

[0252] 实施例 7. ActRIIB-mFc通过刺激脾红细胞生成活性促进小鼠中的红细胞生成方面

[0253] 在本研究中,分析体内施用ActRIIB(20-134)-mFc对骨髓和脾中造血祖先的频率的作用。一组C57BL/6小鼠注射以PBS作为对照并且第二组小鼠施用两个剂量的10 mg/kg的ActRIIB-mFc,并且两组都在8天后处死。应用外周血进行全血计数,并应用股骨和脾进行体外产克隆分析来评价每一器官中的淋巴、红细胞和骨髓祖细胞含量。在本研究的短时间框架中,没有见到治疗小鼠中红细胞、血红蛋白或白细胞水平的显著变化。在股骨中,在对照和治疗组之间没有有核细胞数目或祖先含量的差异。在脾中,化合物治疗组经历成熟红细胞祖先(CFU-E)集落数目/皿、频率和总祖先数目/脾的统计学显著增加。此外,在骨髓数目(CFU-GM)、不成熟红细胞(BFU-E)和总祖先数目/脾中见到增加。

[0254] 动物:

[0255] 将16只6-8周龄的C57BL/6雌性小鼠用于研究中。以10 mg/kg的剂量在第1和3天给8只小鼠皮下注射测试化合物ActRIIB-mFc,并且以每只小鼠100 μL的体积给8只小鼠皮下注射载体对照磷酸缓冲盐水(PBS)。第一次注射后8天根据相关动物管理指南处死所有小鼠。通过心脏穿刺收集来自个体动物的外周血(PB)样品,并且将其用于全血计数和分类计数(CBC/Diff)。从每只小鼠收获股骨和脾。

[0256] 进行的测试:

[0257] CBC/Diff计数

[0258] 通过心脏穿刺收集来自每只小鼠的PB,并且放置在合适的微量采血管(microtainer)中。将样品送到CLV,用于在CellDyn 3500计数器上进行分析。

[0259] 产克隆测定

[0260] 用下文描述的体外基于甲基纤维素的培养基系统评估骨髓、红细胞和淋巴系的产克隆祖先。

[0261] 成熟的红细胞祖先

[0262] 在MethoCult™ 3334,即一种含有重组人(rh)促红细胞生成素(3 U/mL)的基于甲基纤维素的培养基中培养成熟的红细胞(CFU-E)系的产克隆祖先。

[0263] 淋巴祖先

[0264] 在MethoCult® 3630,即一种含rh白介素7(10 ng/mL)的基于甲基纤维素的培养基中培养淋巴(CFU-pre-B)系的产克隆祖先。

[0265] 骨髓和未成熟红细胞祖先

[0266] 在MethoCult™ 3434,即一种含重组鼠(rm)干细胞因子(50 ng/mL)、rh白介素6(10 ng/mL)、rm白介素3(10 ng/mL)和rh促红细胞生成素(3 U/mL)的基于甲基纤维素的培养基中培养粒细胞-单核细胞(CFU-GM)、红细胞(BFU-E)和多能细胞(CFU-GEMM)系的产克隆祖先。

[0267] 方法:

[0268] 通过标准方案处理小鼠股骨和脾。简言之,通过使用21号针头和1 cc注射器,用含2%胎牛血清(IMDM 2% FBS)的Iscove改良的Dulbecco培养基冲洗股骨腔,获得骨髓。通过70

μM 过滤器挤压脾并用IMDM 2% FBS冲洗过滤器,获得脾细胞。然后用Neubauer计数室在单细胞悬浮液上进行3%冰醋酸中的有核细胞计数,从而可以计算每个器官的总细胞。为了除去污染红细胞,随后用3倍体积的氯化铵裂解缓冲液稀释总脾细胞,并在冰上温育10分钟。然后洗涤细胞并且将其重悬于IMDM 2% FBS中,进行第二次细胞计数,以确定裂解后的细胞的细胞浓度。

[0269] 制备细胞原液,并添加到每个基于甲基纤维素的培养基制剂中,以获得每个培养基制剂中每种组织的最优铺板浓度。将骨髓细胞以每个培养皿 1×10^5 个细胞铺板到MethoCult™ 3334中,以评估成熟的红细胞祖先,以每个培养皿 2×10^5 个细胞铺板到MethoCult™ 3630中,以评估淋巴祖先,并且以每个培养皿 3×10^4 个细胞铺板到MethoCult™ 3434中,以评估未成熟的红细胞和骨髓祖先。将脾细胞以每个培养皿 4×10^5 个细胞铺板到MethoCult™ 3334中,以评估成熟的红细胞祖先,以每个培养皿 4×10^5 个细胞铺板到MethoCult™ 3630中,以评估淋巴细胞祖先,并且以每个培养皿 2×10^5 个细胞铺板到MethoCult™ 3434中,以评估未成熟的红细胞和骨髓祖先。铺板到三个重复培养皿的培养物在 37°C 、5% CO_2 中温育,直到由受过训练的人进行集落计数和评价。将成熟的红细胞祖先培养2天,将淋巴祖先培养7天,并将成熟的红细胞和骨髓祖先培养12天。

[0270] 分析

[0271] 对于产克隆测定的三次重复培养物,并且对于对照和治疗组对所有数据集计算平均值+/-1个标准差。

[0272] 如下计算每个组织中的集落形成细胞(CFC)的频率:

[0273] 每个培养皿铺板的细胞

[0274] 每个培养皿评分的平均CFC

[0275] 每个股骨或脾的总CFC如下计算:

[0276] 评分的总CFC×每个股骨或脾的有核细胞计数(RBC裂解后)

[0277] 培养的有核细胞数

[0278] 进行标准t检验,用于评估在PBC对照小鼠和化合物治疗小鼠之间细胞或造血祖先的平均数是否有差异。由于集落计数可能具有主观性,小于0.01的p值认为是显著的。每组的平均值(+/- SD)示于下表。

[0279] 表:血液学参数

治疗组	白细胞 ($\times 10^9/\text{L}$)	红细胞 ($\times 10^9/\text{L}$)	血红蛋白 (g/L)	血细胞比容 (L/L)
[0280]	PBS (n=8)	9.53 +/- 1.44	10.5 +/- 1.1	160.9 +/- 13.3
	ActRIIB-mFc (n=8)	9.77 +/- 1.19	10.8 +/- 0.3	162.1 +/- 4.1

[0281] 表:来自股骨和脾的CFC

治疗组	总 CFC/股骨	总 CFC/脾	总 CFU-E/股骨	总 CFU-E/脾
[0282]	PBS (n=8)	88 +/- 10	54 +/- 14	156 +/- 27
	ActRIIB-mFc (n=8)	85 +/- 9	79 +/- 6*	164 +/- 23

[0283] *初步分析表明p < 0.005。

[0284] 用ActRIIB(20-134)-mFc治疗小鼠在本研究的短时间框架内不导致红细胞或血红蛋白含量的显著增加。但是,对祖细胞含量的作用是显著的。在股骨中,在对照和治疗组之间有核细胞数目或祖细胞含量方面没有差异。在脾中,化合物治疗组在红细胞裂解前的有核细胞数目和每个培养皿的成熟红细胞祖先(CFU-E)集落数目、每个脾的频率和总祖先数方面经历了统计学显著的增加。此外,在每个脾的骨髓祖先(CFU-GM)、不成熟红细胞祖先(BFU-E)和总祖先数目方面观察到了增加。相应地,期望经过更长时期,ActRIIB(20-134)-mFc治疗可导致提高的红细胞和血红蛋白含量。

[0285] 实施例8:GDF捕获物在体内增加红细胞水平

[0286] 将12周大的雄性C57BL/6NTac小鼠指定到2个治疗组中的1个中(N=10)。通过皮下注射(SC)以10 mg/kg对小鼠给予载体或变体ActRIIB多肽(“GDF捕获物”) [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc],每周2次,进行4周。在研究停止时,通过心脏穿刺收集全血到含EDTA管中并应用HM2血液学分析仪(Abaxis, Inc)分析细胞分布。

[0287] 组指定

	组	N	小鼠	注射	剂量 (mg/kg)	途径	频率
[0288]	1	10	C57BL/6	PBS	0	SC	2 次/周
	2	10	C57BL/6	GDF 捕获物 [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc]	10	SC	2 次/周

[0289] 与载体对照相比,用GDF捕获物治疗对白细胞(WBC)数目不具有统计学显著效果。与对照相比,红细胞(RBC)数目在治疗组中增加(参见下表)。血红蛋白含量(HGB)和血细胞比容(HCT)也都由于额外的红细胞而增加。红细胞的平均宽度(RDWc)在治疗动物中较高,表明 不成熟红细胞群增加。因此,用GDF捕获物治疗导致红细胞增加,没有对白细胞群的可识别效果。

[0290] 血液学结果

	RBC $10^{12}/L$	HGB (g/dL)	HCT (%)	RDWc (%)
[0291]	PBS	10.7 ± 0.1	14.8 ± 0.6	44.8 ± 0.4
	GDF 捕获物	$12.4 \pm 0.4^{**}$	$17.0 \pm 0.7^*$	$48.8 \pm 1.8^*$

[0292] *=p<0.05, **= p<0.01。

[0293] 实施例9:GDF捕获物对于体内增加红细胞水平优于ActRIIB-Fc

[0294] 将19周龄的雄性 C57BL/6NTac小鼠随机指定到3个组中的一个中。小鼠通过皮下注射给予载体(10 mM Tris缓冲盐水,TBS)、野生型ActRIIB(20-134)-mFc或GDF捕获物ActRIIB(L79D 20-134)-hFc,每周2次,进行3周。在基线和给药3周后颊部放血收集血液并应用血液学分析仪(HM2, Abaxis, Inc.)分析细胞分布。

[0295] 与载体对照相比,用ActRIIB-Fc或GDF捕获物治疗不具有对白细胞(WBC)数目的显著效果。与对照或野生型构建体相比,红细胞计数(RBC)、血细胞比容(HCT)和血红蛋白水平在GDF捕获物治疗小鼠中都提高(参见下表)。因此,在直接比较中,GDF捕获物促进红细胞增加至比野生型ActRIIB-Fc蛋白质显著更高的程度。事实上,在本实验中,野生型ActRIIB-Fc蛋白质不引起红细胞的统计学显著增加,表明较长或较高剂量对于展现该效果是需要的。

[0296] 3周给药后的血液学结果

	RBC ($10^{12}/\text{ml}$)	HCT %	HGB g/dL
[0297]	TBS	11.06 ± 0.46	46.78 ± 1.9
	ActRIIB-mFc	11.64 ± 0.09	49.03 ± 0.3
	GDF 捕获物	$13.19 \pm 0.2^{**}$	$53.04 \pm 0.8^{**}$

[0298] $^{**}=p<0.01$ 。

[0299] 实施例 10. 带有截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物的产生

[0300] 如实施例1中描述的,称为ActRIIB(L79D 20-134)-hFc的GDF捕获物这样产生:通过TPA前导序列与含有亮氨酸-至-天冬氨酸取代(在SEQ ID NO: 1中的残基 79)的ActRIIB 胞外域(SEQ ID NO: 1中的残基 20-134)的N-末端融合以及人Fc结构域与最小接头(3个甘氨酸残基)的C-末端融合(图 3)。相应于该融合蛋白的核苷酸序列在图4中示出。

[0301] 称为ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的带有截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物这样产生:通过TPA前导序列与含有亮氨酸-至-天冬氨酸取代(在 SEQ ID NO: 1中残基 79)的截短的胞外域(SEQ ID NO: 1中的残基25-131)的N-末端融合以及人Fc结构域与最小接头(3个甘氨酸残基)的C-末端融合(图5)。相应于该融合蛋白的核苷酸序列在图6中示出。

[0302] 实施例 11. 通过带有双截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物的选择性配体结合

[0303] 用Biacore™ 仪器在体外评价GDF捕获物和其它ActRIIB-hFc蛋白质对几种配体的亲和力。结果在下面的表中概述。Kd值通过归于复合体的非常快的缔合和解离的稳态亲和力拟合获得,其防止 $k_{\text{结合}}$ 和 $k_{\text{解离}}$ 的准确确定。

[0304] ActRIIB-hFc变体的配体选择性:

	融合构建体	激活素 A (Kd e-11)	激活素 B (Kd e-11)	GDF11 (Kd e-11)
[0305]	ActRIIB(L79 20-134)-hFc	1.6	1.2	3.6
	ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	1350.0	78.8	12.3
	ActRIIB(L79 25-131)-hFc	1.8	1.2	3.1
	ActRIIB(L79D 25-131)-hFc	2290.0	62.1	7.4

[0306] 与缺乏L79D取代的ActRIIB-hFc配对物相比,带有截短的胞外域的GDF捕获物ActRIIB(L79D 25-131)-hFc等于或胜过更长变体ActRIIB(L79D 20-134)-hFc展示的配体选择性,激活素A和激活素B结合明显丢失并且几乎完全保留GDF11结合。注意单独的截短(没有L79D取代)不改变此处展示的配体间的选择性[比较ActRIIB(L79 25-131)-hFc与ActRIIB(L79 20-134)-hFc]。

[0307] 实施例 12. 带有替代核苷酸序列的ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的产生

[0308] 为了产生ActRIIB(L79D 25-131)-hFc,将在天然位置79 (SEQ ID NO: 1) 带有天冬氨酸取代和带有N-末端和C-末端截短(SEQ ID NO: 1中的残基25-131)的人ActRIIB 胞外域在N-末端与TPA前导序列而不是天然ActRIIB前导序列和在C-末端与人Fc结构域通过最小接头(3个甘氨酸的残基)融合(图5)。编码该融合蛋白的一个核苷酸序列在图6中示出(SEQ ID NO: 27),并且编码完全相同融合蛋白的可选核苷酸序列在图9中示出(SEQ ID NO: 30)。该蛋白质应用实施例1中描述的方法学表达和纯化。

[0309] 实施例 13. 带有截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物增加小鼠中红细胞祖先的增殖

[0310] 评价ActRIIB(L79D 25-131)-hFc来确定其对红细胞祖先增殖的效果。将雄性C57BL/6小鼠(8周龄)用ActRIIB(L79D 25-131)-hFc(10 mg/kg,皮下;n = 6)或载体(TBS;n = 6)在第1和4天治疗,然后在第8天安乐死,以收集脾、胫骨、股骨和血液。分离脾和骨髓的细胞,在含有5%胎牛血清的Iscove改良的Dulbecco培养基中稀释,在专门的甲基纤维素基培养基中悬浮,并培养2或12天以评估在集落形成单位-红细胞(CFU-E)和爆发形成单位-红细胞(BFU-E)期分别产克隆祖先的水平。用于BFU-E确定的甲基纤维素基培养基(MethoCult M3434, Stem Cell Technologies)包括重组鼠干细胞因子、白介素-3和白介素-6,其在用于CFU-E确定的甲基纤维素培养基中不存在(MethoCult M3334, Stem Cell Technologies),同时两种培养基都含有促红细胞生成素等其它成分。对于BFU-E和CFU-E二者,克隆数目在衍生自各组织样品的两个培养板中确定,并且结果的统计学分析基于小鼠数目/治疗组。

[0311] 来自用ActRIIB(L79D 25-131)-hFc治疗的小鼠的脾-衍生的培养物具有的CFU-E克隆数目是来自对照小鼠的相应培养物的2倍($P < 0.05$),而BFU-E克隆数目不显著不同于体内治疗。来自骨髓培养物的CFU-E或BFU-E克隆数目也不显著不同于治疗。如期望的,相比对照,在用ActRIIB(L79D 25-131)-hFc治疗的小鼠中,在安乐死下,在脾-衍生的培养物中增加的CFU-E克隆数目伴随红细胞水平(11.6%增加)、血红蛋白浓度(12%增加)和血细胞比容水平(11.6%增加)的显著($P < 0.001$)变化。这些结果表明,体内施用带有截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物可以刺激红细胞祖先增殖,作为其增加红细胞水平的总体效果的一部分。

[0312] 实施例 14. 带有截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物抵消小鼠中化学治疗-诱导的贫血

[0313] 申请人研究了在基于紫杉醇的化学治疗-诱导的小鼠模型贫血中ActRIIB(L79D 25-131)-hFc对红细胞生成参数的作用,其通过阻断微管聚合抑制细胞分裂。将雄性C57BL/6小鼠(8周龄)指定到4个治疗中的1个中:

[0314] 1) 紫杉醇(25 mg/kg,腹膜内)

[0315] 2) ActRIIB(L79D 25-131)-hFc(10 mg/kg,腹膜内)

[0316] 3) 紫杉醇 + ActRIIB(L79D 25-131)-hFc

[0317] 4) 载体(TBS)。

[0318] 紫杉醇在第0天施用,而ActRIIB(L79D 25-131)-hFc或载体在第0和3天施用。从单独的群在第1、3和5天收集血样进行CBC分析,对于治疗组1-3的结果(上述)表示为在给定时间点与载体的差异百分数。归于紫杉醇毒性的损耗是仅紫杉醇组在第3天(其中n = 1)的问题,否则n = 3-5/治疗/时间点。与载体相比,单独的紫杉醇在第5天降低血红蛋白浓度几乎13%,而添加ActRIIB(L79D 25-131)-hFc防止这一紫杉醇-诱导的下降(图11)。类似的效果对于血细胞比容和RBC水平见到。在紫杉醇不存在的情况下,与载体相比在第3和5天ActRIIB(L79D 25-131)-hFc增加血红蛋白浓度10%(图11)。因此,带有截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物可以增加红细胞水平,其足以抵消化学治疗-诱导的贫血。

[0319] 实施例 15. 带有截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物逆转小鼠中肾切除术诱导的贫血

[0320] 申请人研究了慢性肾疾病的肾切除小鼠模型中ActRIIB(L79D 25-131)-hFc对贫

血的作用。雄性C57BL/6小鼠(11周龄)经历假手术或单侧肾切除术以降低促红细胞生成素产生的能力。使小鼠进行1周术后恢复,并然后用ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, 腹膜内; n = 15/状况)或载体(TBS; n = 15/状况)每周治疗2次周,总共4周。给药开始前和治疗4周后收集血样。尽管载体处理的肾切除术小鼠经过4-周治疗期展示红细胞数目的显著下降,用ActRIIB(L79D 25-131)-hFc治疗不仅防止该下降,而且增加红细胞水平高于基线17% (P < 0.001) (图12),尽管肾脏促红细胞生成素产生能力降低。在肾切除的小鼠中,ActRIIB(L79D 25-131)-hFc也产生血红蛋白浓度和血细胞比容水平从基线的显著增加,并且在肾切除状况下显著刺激这些红细胞生成参数的每一个至与假手术状况大约相同的程度(图 13)。因此,带有截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物可以增加红细胞水平,其足以逆转慢性肾脏疾病模型中的贫血。

[0321] 实施例 16. 带有截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物改进大鼠中从失血诱导的贫血的恢复

[0322] 申请人研究了在急性失血诱导的大鼠贫血(急性出血后贫血)模型中ActRIIB(L79D 25-131)-hFc对红细胞生成参数的作用。雄性Sprague-Dawley大鼠(大约300 g)在卖主(Harlan)处接受长期颈导管(jugular catheter)。在第-1天,经过5-分钟时期通过导管在异氟烷麻醉下将20%的总血液容量从每一大鼠抽出。去除的血量基于根据下列关联计算的总血量的值,所述关联来自Lee和同事(J Nucl Med 25:72-76, 1985),用于体重大于120 g的大鼠:

[0323] 总血量(ml) = 0.062 × 体重(g) + 0.0012。

[0324] 在取血时间通过导管置换等量的磷酸缓冲盐水。大鼠用ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, 皮下; n = 5)或载体(TBS; n = 5)在第0和3天治疗。用于CBC分析的血样通过导管在第-1(基线)、0、2、4和6天去除。

[0325] 对照大鼠响应于20%失血,红细胞水平至第0天下降将近15%。这些水平在第2和4天保持显著低于基线,并且至第6天未完全恢复(图14)。尽管用ActRIIB(L79D 25-131)-hFc治疗的大鼠在20%失血后显示几乎相同的红细胞水平降低,这些大鼠然后至第2天展示这些水平的完全恢复,随后在第4和6天进一步提高,这代表在相应时间点相对于对照水平高度显著的改进(图14)。类似的结果对于血红蛋白浓度获得。这些发现说明,带有截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物可以产生红细胞水平从急性出血引起的贫血的较快恢复。

[0326] 实施例 17. 带有截短的ActRIIB细胞外域的GDF捕获物增加非人灵长动物中的红细胞水平

[0327] 评价在食蟹猴中两个GDF捕获物ActRIIB(L79D 20-134)-hFc和ActRIIB(L79D 25-131)-hFc刺激红细胞产生的能力。猴用GDF捕获物(10 mg/kg; n = 4雄性/4雌性)或载体(n = 2 雄性/2雌性)在第1和8天皮下治疗。在第1(治疗前基线)、3、8、15、29和44天收集血样,并分析红细胞水平(图15)、血细胞比容(图16)、血红蛋白水平(图17)和网织红细胞水平(图18)。载体治疗猴在所有治疗后时间点显示降低水平的红细胞、血细胞比容和血红蛋白,重复采血的期望效果。与之相比,用ActRIIB(L79D 20-134)-hFc或ActRIIB(L79D 25-131)-hFc治疗至第一治疗后时间点(第3天)增加这些参数并在研究持续时间将其维持在实质上提高的水平(图15-17)。重要的是,与载体相比,用ActRIIB(L79D 20-134)-hFc或ActRIIB(L79D 25-131)-hFc治疗的猴中的网织红细胞水平在第8、15和29天实质上增加(图18)。这

一结果说明,GDF捕获物治疗增加红细胞前体产生,导致提高的红细胞水平。

[0328] 总之,这些数据说明截短的GDF捕获物以及全长变体可以用作GDF11的选择性拮抗剂和潜在相关的配体以增加体内红细胞形成。

[0329] 实施例 18.衍生自ActRIIB5的GDF捕获物

[0330] 其它人报告了替代的可溶形式的ActRIIB(指定为ActRIIB5),其中外显子4,包括ActRIIB跨膜结构域,已由不同的C-末端序列替换(WO2007/053775)。

[0331] 不含其前导序列的天然人ActRIIB5的序列如下:

GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

KGCW~~I~~DDFN CYDRQECVATEENPQVY FCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

[0332] TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLLEGPAHE

(SEQ ID NO: 36)

[0333] 亮氨酸-至-天冬氨酸取代或其它酸性取代可在所述天然位置79进行(下划线和以灰色突出显示)以构建变体ActRIIB5(L79D),其具有下列序列:

GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

KGCW~~I~~DDDFN CYDRQECVATEENPQVY FCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

[0334] TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLLEGPAHE

(SEQ ID NO: 37)

[0335] 该变体可用TGGG接头与人Fc连接以产生具有下列序列的人ActRIIB5(L79D)-hFc融合蛋白:

GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

KGCW~~I~~DDDFN CYDRQECVATEENPQVY FCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLLEGPAHE~~TGGG~~THTCPPCPAPELLGGPSVFL

[0336] FPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLR

PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY

SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)

[0337] 该构建体可在CHO细胞中表达。

[0338] 实施例 19.用EPO和带有截短的ActRIIB胞外域的GDF捕获物的联合治疗在小鼠中的作用

[0339] EPO通过增加红细胞前体增殖诱导红细胞形成,而GDF捕获物可以补充或增强 EPO的效果的方式潜在地影响红细胞形成。因此,申请人研究用EPO和ActRIIB(L79D 25-131)-hFc联合治疗对红细胞生成参数的作用。雄性C57BL/6小鼠(9周龄)给予单次腹膜内注射单独的重组人EPO(依伯汀 α ,1800单位/kg)、单独的ActRIIB(L79D 25-131)-hFc(10 mg/kg)、EPO和ActRIIB(L79D 25-131)-hFc、或载体(Tris-缓冲盐水)。给药后72 h对小鼠安乐死来收集血液、脾和股骨。

[0340] 处理脾和股骨以获得红细胞前体细胞进行流式细胞术分析,去除后,将脾在含有

5%胎牛血清的Iscove改良的Dulbecco培养基中切碎并通过用来自无菌1-mL注射器的活塞挤过70- μm 细胞滤网机械离解。对股骨清除任何残留肌肉或结缔组织并修剪末端,以允许通过经与3-mL注射器连接的21号针用含有5%胎牛血清的Iscove改良的Dulbecco培养基冲洗残留的骨干收集骨髓。将细胞悬液离心(2000 rpm, 10 min)并将细胞团块重悬浮在含有5%胎牛血清的PBS中。将来自个组织的细胞(10^6)用抗-小鼠 IgG温育以封闭非特异性结合,然后用针对小鼠细胞表面标记CD71(转铁蛋白受体)和Ter119(与细胞表面血型糖蛋白A结合的抗原)的荧光标记抗体温育、洗涤、和通过流式细胞术分析。通过用碘化丙啶复染将样品中的死细胞从分析排除。通过在分化过程中降低的CD71标记程度和在起始于前成红细胞期的末端红细胞分化期间增加的Ter119标记程度评估脾或骨髓中的红细胞分化(Socolovsky等人, 2001, Blood 98:3261-3273; Ying等人, 2006, Blood 108:123-133)。因此,应用流式细胞术确定前成红细胞(CD71^高Ter119^低)、嗜碱成红细胞(CD71^高Ter119^高)、多染色性+正染色成红细胞(CD71^中Ter119^高)和晚期正染色成红细胞 + 网织红细胞(CD71^低Ter119^高)的数目,如所述的。

[0341] 用EPO和ActRIIB(L79D 25-131)-hFc联合治疗引起红细胞令人惊讶地剧烈增加。在这一实验的72-h时间框架中,单独EPO和ActRIIB(L79D 25-131)-hFc与载体相比都不显著增加血细胞比容,而用两种药剂联合治疗引起血细胞比容几乎25%增加,这是意料不到地协同的,即,大于它们单独效果的总和(图19)。这一类型的协同作用通常考虑为证明个别药剂通过不同细胞机制起作用。类似结果也对血红蛋白浓度(图20)和红细胞浓度(图21)观察到,其各自也通过联合治疗协同增加。

[0342] 红细胞前体水平的分析显示更复杂的方式。在小鼠中,认为脾是负责诱导性(“应激”)红细胞生成的主要的器官。脾组织在72 h 的流式细胞计数分析显示 EPO与载体相比显著改变红细胞生成前体概况,增加嗜碱成红细胞数目超过170%,代价是晚期前体(晚期正染色成红细胞 + 网织红细胞),其降低超过三分之一(图 22)。重要的是,联合治疗与载体相比显著增加嗜碱成红细胞,但比单独EPO的程度低,同时支持晚期前体的不减少的成熟(图22)。因此,用 EPO和ActRIIB(L79D 25-131)-hFc联合治疗通过前体增殖和成熟的平衡增强增加红细胞生成。与脾相对,联合治疗后骨髓中的前体细胞概况不略微不同于单独EPO之后的那种。申请人根据脾前体概况预测联合治疗会引起增加的网织红细胞水平并会伴有成熟红细胞水平的持续提高,如果实验延长超过72 h。

[0343] 总之,这些发现说明带有截短的ActR IIB胞外域的GDF捕获物可以与EPO联合施用以协同地增加红细胞体内形成。通过补充但未限定机制的作用,GDF捕获物可以减缓单独EPO受体激活剂的强增殖效果,并仍然允许以较低剂量的EPO受体激活剂获得红细胞的靶水平,由此避免与较高水平的EPO受体激活相关的潜在的副作用或其它问题。

[0344] 通过引用并入

[0345] 本文所提及的所有公开文献和专利均通过全文引用并入本文,如同每一个单独的公开文献和专利均被特别地和单独地通过引用并入。

[0346] 尽管已经讨论了主题的特定实施方式,以上的说明书仅作阐述之用,而不具有限制性。在阅读本说明书和以下权利要求书后,本发明的许多变化形式对于本领域技术人员而言将是显而易见的。本发明的完整范围应当参照权利要求书及其所有的等同范围以及说明书及各种变化形式得以确定。

- [0001] <110> 阿塞勒隆制药公司
[0002] <120> GDF捕获物和促红细胞生成素受体激活剂联合应用以增加红细胞水平
[0003] <130> PHPH-040-102
[0004] <140> 12/856,420
[0005] <141> 2010-08-13
[0006] <150> PCT/US09/004659
[0007] <151> 2009-08-13
[0008] <150> 12/583,177
[0009] <151> 2009-08-13
[0010] <150> 61/305,901
[0011] <151> 2010-02-18
[0012] <160> 44
[0013] <170> PatentIn version 3.5
[0014] <210> 1
[0015] <211> 512
[0016] <212> PRT
[0017] <213> 智人
[0018] <400> 1
[0019] Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp
[0020] 1 5 10 15
[0021] Pro Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
[0022] 20 25 30
[0023] Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
[0024] 35 40 45
[0025] Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
[0026] 50 55 60
[0027] Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
[0028] 65 70 75 80
[0029] Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
[0030] 85 90 95
[0031] Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
[0032] 100 105 110
[0033] Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
[0034] 115 120 125
[0035] Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
[0036] 130 135 140
[0037] Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
[0038] 145 150 155 160
[0039] Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
[0040] 165 170 175
[0041] Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu

[0042]	180	185	190
[0043]	Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln		
[0044]	195	200	205
[0045]	Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys		
[0046]	210	215	220
[0047]	Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys		
[0048]	225	230	235
[0049]	His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn		
[0050]	245	250	255
[0051]	Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser		
[0052]	260	265	270
[0053]	Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys		
[0054]	275	280	285
[0055]	His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp		
[0056]	290	295	300
[0057]	Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg		
[0058]	305	310	315
[0059]	Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val		
[0060]	325	330	335
[0061]	Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro		
[0062]	340	345	350
[0063]	Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu		
[0064]	355	360	365
[0065]	Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile		
[0066]	370	375	380
[0067]	Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys		
[0068]	385	390	395
[0069]	Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu		
[0070]	405	410	415
[0071]	Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val		
[0072]	420	425	430
[0073]	His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro		
[0074]	435	440	445
[0075]	Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp		
[0076]	450	455	460
[0077]	Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu		
[0078]	465	470	475
[0079]	Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu		
[0080]	485	490	495
[0081]	Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile		
[0082]	500	505	510
[0083]	<210> 2		

[0084]	<211> 115			
[0085]	<212> PRT			
[0086]	<213> 智人			
[0087]	<400> 2			
[0088]	Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn			
[0089]	1	5	10	15
[0090]	Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly			
[0091]	20	25	30	
[0092]	Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser			
[0093]	35	40	45	
[0094]	Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn			
[0095]	50	55	60	
[0096]	Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val			
[0097]	65	70	75	80
[0098]	Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His			
[0099]	85	90	95	
[0100]	Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr			
[0101]	100	105	110	
[0102]	Ala Pro Thr			
[0103]	115			
[0104]	<210> 3			
[0105]	<211> 100			
[0106]	<212> PRT			
[0107]	<213> 智人			
[0108]	<400> 3			
[0109]	Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn			
[0110]	1	5	10	15
[0111]	Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly			
[0112]	20	25	30	
[0113]	Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser			
[0114]	35	40	45	
[0115]	Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn			
[0116]	50	55	60	
[0117]	Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val			
[0118]	65	70	75	80
[0119]	Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His			
[0120]	85	90	95	
[0121]	Leu Pro Glu Ala			
[0122]	100			
[0123]	<210> 4			
[0124]	<211> 1539			
[0125]	<212> DNA			

[0126]	<213> 智人	
[0127]	<400> 4	
[0128]	atgacggcgc cctgggtggc cctgcgcctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg 60	
[0129]	cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcata tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120	
[0130]	accaaccaga gcggcctgga gcgcgtcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac 180	
[0131]	gcctcctggg ccaacagctc tggaccatc gagctcgta agaaggctg ctggcttagat 240	
[0132]	gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccaggtgtac 300	
[0133]	ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatttgcc agaggctggg 360	
[0134]	ggcccggaag tcacgtacga gccacccccc acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc 420	
[0135]	tactcaactgc tgcccattcg gggccttcc ctcattcgatc tgctggcctt ttggatgtac 480	
[0136]	cggcatcgca agcccccta cggcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540	
[0137]	ccatccccctc tgggtggcct gaagccactg cagctgtgg agatcaaggc tcggggcgc 600	
[0138]	tttggctgtg tctgaaaggc ccagctcatg aatgacttt tagctgtcaa gatctccca 660	
[0139]	ctccaggaca agcagtcgt gcagagtcaa cggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720	
[0140]	cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcggag gctccaacct cgaagttagag 780	
[0141]	ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac 840	
[0142]	atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgtc gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac 900	
[0143]	ctgcatgagg atgtgccctg gtggcgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg 960	
[0144]	gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgaccta cagccgtgct ggctgacttt 1020	
[0145]	ggcttggctg ttgcatttga gccaggaaa cctccagggg acaccacgg acaggttaggc 1080	
[0146]	acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140	
[0147]	ttcctgcgc tttgacatgtc tggcatgggg ttgggtctgt gggagctgt gtctcgctgc 1200	
[0148]	aaggctgcag acggacccgt ggatgagttc atgctccctt ttgaggaaga gattggccag 1260	
[0149]	cacccttcgt tggaggagct gcaggagggtg gtggcgcaca agaagatgag gccaccatt 1320	
[0150]	aaagatcaact ggttgaaaaca cccggccctg gcccagctt gtgtgaccat cgaggagtgc 1380	
[0151]	tgggaccatg atgcagaggc tcgcattgtcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440	
[0152]	attcggaggt cggtaaacgg cactacctcg gactgtctcg tttcccttgtt gacctctgtc 1500	
[0153]	accaatgtgg acctgccccca taaagagtca agcatctaa 1539	
[0154]	<210> 5	
[0155]	<211> 345	
[0156]	<212> DNA	
[0157]	<213> 智人	
[0158]	<400> 5	
[0159]	ggcgtgggg aggctgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag 60	
[0160]	cgcaccaacc agagcggcct ggagcgctgc gaaggcggagc aggacaagcg gctgcactgc 120	
[0161]	tacgcctcct gggcaacag ctctggcacc atcgagctcg tgaagaagg ctgctggcta 180	
[0162]	gatgacttca actgctacga taggcaggag tgggtggcca ctgaggagaa cccccagggt 240	
[0163]	tacttctgtc gctgtgaagg caacttctgc aacgagcgt tcactcattt gccagaggct 300	
[0164]	ggggcccgaa aagtcacgta cgagccaccc ccgacagcccc ccacc 345	
[0165]	<210> 6	
[0166]	<211> 225	
[0167]	<212> PRT	

[0168]	<213> 人工序列		
[0169]	<220>		
[0170]	<223> 人工序列描述：合成多肽		
[0171]	<220>		
[0172]	<221> MOD_RES		
[0173]	<222> (43) .. (43)		
[0174]	<223> Asp或Ala		
[0175]	<220>		
[0176]	<221> MOD_RES		
[0177]	<222> (100) .. (100)		
[0178]	<223> Lys或Ala		
[0179]	<220>		
[0180]	<221> MOD_RES		
[0181]	<222> (212) .. (212)		
[0182]	<223> Asn或Ala		
[0183]	<400> 6		
[0184]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
[0185]	1	5	10
[0186]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
[0187]	20	25	30
[0188]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp		
[0189]	35	40	45
[0190]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
[0191]	50	55	60
[0192]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
[0193]	65	70	75
[0194]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
[0195]	85	90	95
[0196]	Tyr Lys Cys Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys		
[0197]	100	105	110
[0198]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
[0199]	115	120	125
[0200]	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
[0201]	130	135	140
[0202]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
[0203]	145	150	155
[0204]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
[0205]	165	170	175
[0206]	Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
[0207]	180	185	190
[0208]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[0209]	195	200	205

[0210]	Ala Leu His Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0211]	210	215	220
[0212]	Lys		
[0213]	225		
[0214]	<210> 7		
[0215]	<211> 343		
[0216]	<212> PRT		
[0217]	<213> 人工序列		
[0218]	<220>		
[0219]	<223> 人工序列描述：合成多肽		
[0220]	<400> 7		
[0221]	Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn		
[0222]	1 5 10 15		
[0223]	Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly		
[0224]	20 25 30		
[0225]	Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser		
[0226]	35 40 45		
[0227]	Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn		
[0228]	50 55 60		
[0229]	Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val		
[0230]	65 70 75 80		
[0231]	Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His		
[0232]	85 90 95		
[0233]	Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr		
[0234]	100 105 110		
[0235]	Ala Pro Thr Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
[0236]	115 120 125		
[0237]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
[0238]	130 135 140		
[0239]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
[0240]	145 150 155 160		
[0241]	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
[0242]	165 170 175		
[0243]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
[0244]	180 185 190		
[0245]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
[0246]	195 200 205		
[0247]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
[0248]	210 215 220		
[0249]	Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
[0250]	225 230 235 240		
[0251]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		

[0252]	245	250	255
[0253]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
[0254]	260	265	270
[0255]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
[0256]	275	280	285
[0257]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
[0258]	290	295	300
[0259]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
[0260]	305	310	315
[0261]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
[0262]	325	330	335
[0263]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0264]	340		
[0265]	<210> 8		
[0266]	<211> 21		
[0267]	<212> PRT		
[0268]	<213> 意大利蜂(Apis mellifera)		
[0269]	<400> 8		
[0270]	Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile		
[0271]	1 5	10	15
[0272]	Ser Tyr Ile Tyr Ala		
[0273]	20		
[0274]	<210> 9		
[0275]	<211> 22		
[0276]	<212> PRT		
[0277]	<213> 未知		
[0278]	<220>		
[0279]	<223> 未知描述：组织纤溶酶原激活剂		
[0280]	<400> 9		
[0281]	Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly		
[0282]	1 5	10	15
[0283]	Ala Val Phe Val Ser Pro		
[0284]	20		
[0285]	<210> 10		
[0286]	<211> 19		
[0287]	<212> PRT		
[0288]	<213> 未知		
[0289]	<220>		
[0290]	<223> 未知描述：天然肽		
[0291]	<400> 10		
[0292]	Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys		
[0293]	1 5	10	15

[0294]	Ala Gly Ser
[0295]	<210> 11
[0296]	<211> 368
[0297]	<212> PRT
[0298]	<213> 人工序列
[0299]	<220>
[0300]	<223> 人工序列描述：合成多肽
[0301]	<400> 11
[0302]	Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Cys Gly
[0303]	1 5 10 15
[0304]	Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
[0305]	20 25 30
[0306]	Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn
[0307]	35 40 45
[0308]	Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His
[0309]	50 55 60
[0310]	Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys
[0311]	65 70 75 80
[0312]	Lys Gly Cys Trp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys
[0313]	85 90 95
[0314]	Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
[0315]	100 105 110
[0316]	Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro
[0317]	115 120 125
[0318]	Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr
[0319]	130 135 140
[0320]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
[0321]	145 150 155 160
[0322]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[0323]	165 170 175
[0324]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[0325]	180 185 190
[0326]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0327]	195 200 205
[0328]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[0329]	210 215 220
[0330]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[0331]	225 230 235 240
[0332]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr
[0333]	245 250 255
[0334]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0335]	260 265 270

[0336]	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[0337]	275	280	285
[0338]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[0339]	290	295	300
[0340]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[0341]	305	310	315
[0342]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[0343]	325	330	335
[0344]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[0345]	340	345	350
[0346]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0347]	355	360	365
[0348]	<210> 12		
[0349]	<211> 1107		
[0350]	<212> DNA		
[0351]	<213> 人工序列		
[0352]	<220>		
[0353]	<223> 人工序列描述：合成多核苷酸		
[0354]	<400> 12		
[0355]	atggatcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60		
[0356]	tgcggccgcg cctctggcg tggggaggct gagacacggg agtgcatacta ctacaacgcc 120		
[0357]	aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac 180		
[0358]	aaggcgctgc actgctacgc ctccctggcgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240		
[0359]	aagggtcgct gggacgatga cttaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300		
[0360]	gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact 360		
[0361]	catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc caccccccac agccccccacc 420		
[0362]	ggtgtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480		
[0363]	gtttccctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc 540		
[0364]	acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagtg 600		
[0365]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660		
[0366]	taccgtgtgg tcagcgtctt caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag 720		
[0367]	aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gtccccatcg agaaaaaccat ctccaaagcc 780		
[0368]	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccggga ggagatgacc 840		
[0369]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catgccgtg 900		
[0370]	gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960		
[0371]	tccgacggct ccttcttctt ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020		
[0372]	ggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1080		
[0373]	agcctctccc tgtctccggg taaatga		1107
[0374]	<210> 13		
[0375]	<211> 5		
[0376]	<212> PRT		
[0377]	<213> 人工序列		

- [0378] <220>
- [0379] <223> 人工序列描述: 合成肽
- [0380] <400> 13
- [0381] Thr Gly Gly Gly Gly
- [0382] 1 5
- [0383] <210> 14
- [0384] <211> 5
- [0385] <212> PRT
- [0386] <213> 人工序列
- [0387] <220>
- [0388] <223> 人工序列描述: 合成肽
- [0389] <400> 14
- [0390] Ser Gly Gly Gly Gly
- [0391] 1 5
- [0392] <210> 15
- [0393] <211> 116
- [0394] <212> PRT
- [0395] <213> 智人
- [0396] <400> 15
- [0397] Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
- [0398] 1 5 10 15
- [0399] Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
- [0400] 20 25 30
- [0401] Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
- [0402] 35 40 45
- [0403] Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
- [0404] 50 55 60
- [0405] Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
- [0406] 65 70 75 80
- [0407] Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
- [0408] 85 90 95
- [0409] Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
- [0410] 100 105 110
- [0411] Lys Pro Pro Thr
- [0412] 115
- [0413] <210> 16
- [0414] <211> 150
- [0415] <212> PRT
- [0416] <213> 家鼠属物种(Rattus sp.)
- [0417] <400> 16
- [0418] Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
- [0419] 1 5 10 15

[0420]	Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr		
[0421]	20	25	30
[0422]	Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg		
[0423]	35	40	45
[0424]	Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Pro		
[0425]	50	55	60
[0426]	Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp		
[0427]	65	70	75
[0428]	Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn		
[0429]	85	90	95
[0430]	Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg		
[0431]	100	105	110
[0432]	Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro		
[0433]	115	120	125
[0434]	Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu		
[0435]	130	135	140
[0436]	Pro Ile Gly Gly Leu Ser		
[0437]	145	150	
[0438]	<210> 17		
[0439]	<211> 150		
[0440]	<212> PRT		
[0441]	<213> 猪属物种(Sus sp.)		
[0442]	<400> 17		
[0443]	Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys		
[0444]	1	5	10
[0445]	Val Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr		
[0446]	20	25	30
[0447]	Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg		
[0448]	35	40	45
[0449]	Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg		
[0450]	50	55	60
[0451]	Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp		
[0452]	65	70	75
[0453]	Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn		
[0454]	85	90	95
[0455]	Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg		
[0456]	100	105	110
[0457]	Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro		
[0458]	115	120	125
[0459]	Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu		
[0460]	130	135	140
[0461]	Pro Ile Gly Gly Leu Ser		

[0462]	145	150
[0463]	<210> 18	
[0464]	<211> 150	
[0465]	<212> PRT	
[0466]	<213> 小鼠属物种 (Mus sp.)	
[0467]	<400> 18	
[0468]	Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys	
[0469]	1 5 10 15	
[0470]	Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr	
[0471]	20 25 30	
[0472]	Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg	
[0473]	35 40 45	
[0474]	Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg	
[0475]	50 55 60	
[0476]	Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp	
[0477]	65 70 75 80	
[0478]	Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn	
[0479]	85 90 95	
[0480]	Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg	
[0481]	100 105 110	
[0482]	Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro	
[0483]	115 120 125	
[0484]	Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu	
[0485]	130 135 140	
[0486]	Pro Ile Gly Gly Leu Ser	
[0487]	145 150	
[0488]	<210> 19	
[0489]	<211> 150	
[0490]	<212> PRT	
[0491]	<213> 智人	
[0492]	<400> 19	
[0493]	Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys	
[0494]	1 5 10 15	
[0495]	Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr	
[0496]	20 25 30	
[0497]	Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg	
[0498]	35 40 45	
[0499]	Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg	
[0500]	50 55 60	
[0501]	Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp	
[0502]	65 70 75 80	
[0503]	Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn	

[0504]	85	90	95
[0505]	Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg		
[0506]	100	105	110
[0507]	Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro		
[0508]	115	120	125
[0509]	Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu		
[0510]	130	135	140
[0511]	Pro Ile Gly Gly Leu Ser		
[0512]	145	150	
[0513]	<210> 20		
[0514]	<211> 150		
[0515]	<212> PRT		
[0516]	<213> 牛属物种(Bos sp.)		
[0517]	<400> 20		
[0518]	Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys		
[0519]	1 5 10 15		
[0520]	Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr		
[0521]	20 25 30		
[0522]	Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg		
[0523]	35 40 45		
[0524]	Cys Glu Gly Glu Arg Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg		
[0525]	50 55 60		
[0526]	Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp		
[0527]	65 70 75 80		
[0528]	Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn		
[0529]	85 90 95		
[0530]	Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg		
[0531]	100 105 110		
[0532]	Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro		
[0533]	115 120 125		
[0534]	Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu		
[0535]	130 135 140		
[0536]	Pro Val Gly Gly Leu Ser		
[0537]	145 150		
[0538]	<210> 21		
[0539]	<211> 150		
[0540]	<212> PRT		
[0541]	<213> 爪蟾属物种(Xenopus sp.)		
[0542]	<400> 21		
[0543]	Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Ala Thr Phe		
[0544]	1 5 10 15		
[0545]	Arg Ala Gly Ser Gly His Asp Glu Val Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr		

[0546]	20	25	30
[0547]	Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu		
[0548]	35	40	45
[0549]	Arg Leu Val Glu Gly Lys Lys Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser		
[0550]	50	55	60
[0551]	Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp		
[0552]	65	70	75
[0553]	Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Ile Ala Lys Glu		
[0554]	85	90	95
[0555]	Glu Asn Pro Gln Val Phe Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Tyr Cys Asn		
[0556]	100	105	110
[0557]	Lys Lys Phe Thr His Leu Pro Glu Val Glu Thr Phe Asp Pro Lys Pro		
[0558]	115	120	125
[0559]	Gln Pro Ser Ala Ser Val Leu Asn Ile Leu Ile Tyr Ser Leu Leu Pro		
[0560]	130	135	140
[0561]	Ile Val Gly Leu Ser Met		
[0562]	145	150	
[0563]	<210> 22		
[0564]	<211> 150		
[0565]	<212> PRT		
[0566]	<213> 智人		
[0567]	<400> 22		
[0568]	Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys		
[0569]	1 5 10 15		
[0570]	Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe		
[0571]	20 25 30		
[0572]	Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu		
[0573]	35 40 45		
[0574]	Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp		
[0575]	50 55 60		
[0576]	Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu		
[0577]	65 70 75 80		
[0578]	Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp		
[0579]	85 90 95		
[0580]	Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu		
[0581]	100 105 110		
[0582]	Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn		
[0583]	115 120 125		
[0584]	Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu		
[0585]	130 135 140		
[0586]	Val Pro Leu Met Leu Ile		
[0587]	145 150		

- [0588] <210> 23
 [0589] <211> 154
 [0590] <212> PRT
 [0591] <213> 人工序列
 [0592] <220>
 [0593] <223> 人工序列描述：合成共有多肽
 [0594] <220>
 [0595] <221> MOD_RES
 [0596] <222> (8) .. (8)
 [0597] <223> Thr或Ala
 [0598] <220>
 [0599] <221> MOD_RES
 [0600] <222> (121) .. (121)
 [0601] <223> Pro, Ala, Val或Met
 [0602] <400> 23
 [0603] Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Xaa Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu
 [0604] 1 5 10 15
 [0605] Cys Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
 [0606] 20 25 30
 [0607] Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu
 [0608] 35 40 45
 [0609] Arg Leu Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser
 [0610] 50 55 60
 [0611] Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Leu Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
 [0612] 65 70 75 80
 [0613] Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu
 [0614] 85 90 95
 [0615] Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn
 [0616] 100 105 110
 [0617] Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Xaa Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr
 [0618] 115 120 125
 [0619] Glu Pro Lys Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr
 [0620] 130 135 140
 [0621] Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Met
 [0622] 145 150
 [0623] <210> 24
 [0624] <211> 6
 [0625] <212> PRT
 [0626] <213> 人工序列
 [0627] <220>
 [0628] <223> 人工序列描述：合成6xHis标签
 [0629] <400> 24

[0630]	His His His His His His				
[0631]	1 5				
[0632]	<210> 25				
[0633]	<211> 1107				
[0634]	<212> DNA				
[0635]	<213> 人工序列				
[0636]	<220>				
[0637]	<223> 人工序列描述：合成多核苷酸				
[0638]	<400> 25				
[0639]	atggatcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60				
[0640]	tcgcccggcg cctctggcg tggggaggct gagacacggg agtgcatactta ctacaacgcc 120				
[0641]	aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac 180				
[0642]	aagcggctgc actgctacgc ctcctggcg aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240				
[0643]	aagggctgct gggatgatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300				
[0644]	gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact 360				
[0645]	catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc caccccccac agccccccacc 420				
[0646]	ggtgtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480				
[0647]	gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc 540				
[0648]	acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600				
[0649]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660				
[0650]	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720				
[0651]	aagtgcagg tctccaacaa agccctccc gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 780				
[0652]	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccggga ggagatgacc 840				
[0653]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catgccgtg 900				
[0654]	gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960				
[0655]	tccgacggct ccttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020				
[0656]	gmmaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1080				
[0657]	agcctctccc tgtccccggg taaatga				
[0658]	<210> 26				
[0659]	<211> 360				
[0660]	<212> PRT				
[0661]	<213> 人工序列				
[0662]	<220>				
[0663]	<223> 人工序列描述：合成多肽				
[0664]	<400> 26				
[0665]	Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly				
[0666]	1	5	10	15	
[0667]	Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr				
[0668]	20	25	30		
[0669]	Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu				
[0670]	35	40	45		
[0671]	Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp				

[0672]	50	55	60
[0673]	Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp		
[0674]	65	70	75 80
[0675]	Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu		
[0676]	85	90	95
[0677]	Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu		
[0678]	100	105	110
[0679]	Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu		
[0680]	115	120	125
[0681]	Pro Pro Pro Thr Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
[0682]	130	135	140
[0683]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
[0684]	145	150	155 160
[0685]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
[0686]	165	170	175
[0687]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
[0688]	180	185	190
[0689]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
[0690]	195	200	205
[0691]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
[0692]	210	215	220
[0693]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
[0694]	225	230	235 240
[0695]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
[0696]	245	250	255
[0697]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
[0698]	260	265	270
[0699]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
[0700]	275	280	285
[0701]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
[0702]	290	295	300
[0703]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
[0704]	305	310	315 320
[0705]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
[0706]	325	330	335
[0707]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
[0708]	340	345	350
[0709]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0710]	355	360	
[0711]	<210> 27		
[0712]	<211> 1083		
[0713]	<212> DNA		

[0714]	<213> 人工序列		
[0715]	<220>		
[0716]	<223> 人工序列描述：合成多核苷酸		
[0717]	<220>		
[0718]	<221> CDS		
[0719]	<222> (76) .. (396)		
[0720]	<400> 27		
[0721]	atggatcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60		
[0722]	tcgccccggcgcc cgctgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg g 111		
[0723]	Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp		
[0724]	1	5	10
[0725]	gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag 159		
[0726]	Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu		
[0727]	15	20	25
[0728]	cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc 207		
[0729]	Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly		
[0730]	30	35	40
[0731]	acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg gac gat gac ttc aac tgc 255		
[0732]	Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys		
[0733]	45	50	55
[0734]	55 60		
[0735]	tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac 303		
[0736]	Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr		
[0737]	65	70	75
[0738]	ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg 351		
[0739]	Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu		
[0740]	80	85	90
[0741]	85 90		
[0742]	cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca 396		
[0743]	Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr		
[0744]	95	100	105
[0745]	95 105		
[0746]	ggtgtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 456		
[0747]	gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgagggtc 516		
[0748]	acatgcgtgg tggtgacgt gaggcacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagtgc 576		
[0749]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacf 636		
[0750]	taccgtgtgg tcagcgtctt caccgtcctg caccaggact ggctaatgg caaggagttac 696		
[0751]	aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 756		
[0752]	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccggga ggagatgacc 816		
[0753]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catgccgtg 876		
[0754]	gagtggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 936		
[0755]	tccgacggct cttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 996		
[0756]	ggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1056		
[0757]	agcctctccc tgtccccggg taaatga 1083		
[0758]	<210> 28		

[0756]	<211> 335		
[0757]	<212> PRT		
[0758]	<213> 人工序列		
[0759]	<220>		
[0760]	<223> 人工序列描述：合成多肽		
[0761]	<400> 28		
[0762]	Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg		
[0763]	1	5	10
[0764]	Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg		
[0765]	20	25	30
[0766]	Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu		
[0767]	35	40	45
[0768]	Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln		
[0769]	50	55	60
[0770]	Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys		
[0771]	65	70	75
[0772]	Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly		
[0773]	85	90	95
[0774]	Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Gly Gly Thr His		
[0775]	100	105	110
[0776]	Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
[0777]	115	120	125
[0778]	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
[0779]	130	135	140
[0780]	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
[0781]	145	150	155
[0782]	Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
[0783]	165	170	175
[0784]	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
[0785]	180	185	190
[0786]	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
[0787]	195	200	205
[0788]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
[0789]	210	215	220
[0790]	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
[0791]	225	230	235
[0792]	Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
[0793]	245	250	255
[0794]	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
[0795]	260	265	270
[0796]	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
[0797]	275	280	285

[0798]	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
[0799]	290	295	300
[0800]	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
[0801]	305	310	315
[0802]	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0803]	325	330	335
[0804]	<210> 29		
[0805]	<211> 107		
[0806]	<212> PRT		
[0807]	<213> 人工序列		
[0808]	<220>		
[0809]	<223> 人工序列描述：合成多肽		
[0810]	<400> 29		
[0811]	Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg		
[0812]	1	5	10
[0813]	15	20	25
[0814]	Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg		
[0815]	30	35	40
[0816]	45	50	55
[0817]	Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu		
[0818]	60	65	70
[0819]	75	80	85
[0820]	Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln		
[0821]	90	95	100
[0822]	Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys		
[0823]	105	110	115
[0824]	Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr		
[0825]	<210> 30		
[0826]	<211> 1083		
[0827]	<212> DNA		
[0828]	<213> 人工序列		
[0829]	<220>		
[0830]	<223> 人工序列描述：合成多核苷酸		
[0831]	<220>		
[0832]	<221> CDS		
[0833]	<222> (76) .. (396)		
[0834]	<400> 30		
[0835]	atggatcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60		
[0836]	tcgccccggcg ccggccaaaac ccgcgaatgt atttattaca atgctaattg g 111		
[0837]	Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp		
[0838]	1	5	10
[0839]	159	gaa ctc gaa cgg acg aac caa tcc ggg ctc gaa cgg tgt gag ggg gaa	

[0840]	Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu			
[0841]	15	20	25	
[0842]	cag gat aaa cgc ctc cat tgc tat gcg tcg tgg agg aac tcc tcc ggg			207
[0843]	Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly			
[0844]	30	35	40	
[0845]	acg att gaa ctg gtc aag aaa ggg tgc tgg gac gac gat ttc aat tgt			255
[0846]	Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys			
[0847]	45	50	55	60
[0848]	tat gac cgc cag gaa tgt gtc gcg acc gaa gag aat ccg cag gtc tat			303
[0849]	Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr			
[0850]	65	70	75	
[0851]	ttc tgt tgt tgc gag ggg aat ttc tgt aat gaa cgg ttt acc cac ctc			351
[0852]	Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu			
[0853]	80	85	90	
[0854]	ccc gaa gcc ggc ggg ccc gag gtg acc tat gaa ccc ccg ccc acc			396
[0855]	Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr			
[0856]	95	100	105	
[0857]	ggtgtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca			456
[0858]	gtttccctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggta			516
[0859]	acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagtgc			576
[0860]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg			636
[0861]	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctaatgg caaggagtag			696
[0862]	aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc			756
[0863]	aaagggcagg cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccggga ggagatgacc			816
[0864]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catgccgtg			876
[0865]	gagtggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac			936
[0866]	tccgacggct ccttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag			996
[0867]	ggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag			1056
[0868]	agcctctccc tgtccccggg taaatga			1083
[0869]	<210> 31			
[0870]	<211> 321			
[0871]	<212> DNA			
[0872]	<213> 人工序列			
[0873]	<220>			
[0874]	<223> 人工序列描述：合成多核苷酸			
[0875]	<400> 31			
[0876]	gaaacccgcg aatgtattta ttacaatgct aattggaaac tcgaacggac gaaccaatcc			60
[0877]	gggctcgaac ggtgtgaggg ggaacaggat aaacgcctcc attgctatgc gtcgtggagg			120
[0878]	aactcctccg ggacgattga actggtaag aaagggtgct gggacgacga tttcaattgt			180
[0879]	tatgaccgcc aggaatgtgt cgcgaccgaa gagaatccgc aggtctattt ctgttggc			240
[0880]	gaggggaatt tctgtaatga acggttacc cacctccccg aagccggcgg gcccggaggta			300
[0881]	acctatgaac ccccgccccac c			321

- [0882] <210> 32
- [0883] <211> 115
- [0884] <212> PRT
- [0885] <213> 智人
- [0886] <400> 32
- [0887] Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
- [0888] 1 5 10 15
- [0889] Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
- [0890] 20 25 30
- [0891] Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
- [0892] 35 40 45
- [0893] Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
- [0894] 50 55 60
- [0895] Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
- [0896] 65 70 75 80
- [0897] Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
- [0898] 85 90 95
- [0899] Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
- [0900] 100 105 110
- [0901] Ala Pro Thr
- [0902] 115
- [0903] <210> 33
- [0904] <211> 1107
- [0905] <212> DNA
- [0906] <213> 人工序列
- [0907] <220>
- [0908] <223> 人工序列描述：合成多核苷酸
- [0909] <400> 33
- [0910] tacctacgtt acttctctcc cgagacgaca cacgacgacg acacacctcg tcagaagcaa 60
- [0911] agcgggccgc ggagacccgc acccctccga ctctgtcccc tcacgttagat gatgttcggg 120
- [0912] ttgaccctcg acctcgcgtg gtttgtctcg ccggacctcg cgacgcttcc gctcgtcctg 180
- [0913] ttccgcgacg tgacgatgcg gaggaccgcg ttgtcgagac cgtgttagct cgagcacttc 240
- [0914] ttcccgacga ccctactact gaagttgacg atgctatccg tcctcacaca ccggtgactc 300
- [0915] ctcttggggg tccacatgaa gacgacgaca cttccgttga agacgttgct cgcgaagtga 360
- [0916] gttaaacggtc tccgacccccc gggccttcag tgcatgctcg gtggggctg tcgggggtgg 420
- [0917] ccaccacctt gagtgtgtac gggtggcacf ggtcgtggac ttgaggaccc ccctggcagt 480
- [0918] cagaaggaga aggggggttt tgggttcctg tgggagttact agagggcctg gggactccag 540
- [0919] tgtacgcacc accacactgca ctgggtgctt ctgggactcc agttaagtt gaccatgcac 600
- [0920] ctggccgcacc tccacgtatt acggttctgt ttccggcccc tcctcgtcat gttgtcgtgc 660
- [0921] atggcacacc agtcgcagga gtggcaggac gtgggtcctga ccgacttacc gttcctcatg 720
- [0922] ttacacgttcc agaggttgg tggggagggt cgggggttagc tctttggta gaggtttcgg 780
- [0923] ttcccgctcg gggcttctgg tgtccacatg tgggacgggg gttagggccct cctctactgg 840

[0924]	ttcttggtcc agtcggactg gacggaccag tttccgaaga tagggtcgct gtagcggcac	900
[0925]	ctcacccctct cgttaccctgt cgccctcttg ttgatgttct ggtgcggagg gcacgacctg	960
[0926]	aggctgccga ggaagaagga gatatcggtc gagtggcacc tgttctcgtc caccgtcgta	1020
[0927]	cccttgcaga agagtacgag gcactacgta ctccgagacg tggtggtgat gtgcgtcttc	1080
[0928]	tcggagaggg acagggggccc atttact	1107
[0929]	<210> 34	
[0930]	<211> 1083	
[0931]	<212> DNA	
[0932]	<213> 人工序列	
[0933]	<220>	
[0934]	<223> 人工序列描述：合成多核苷酸	
[0935]	<400> 34	
[0936]	tacctacgtt acttctctcc cgagacgaca cacgacgacg acacacctcg tcagaagcaa	60
[0937]	agcgggccgc ggcgactctg tgccctcagc tagatgtatgt tgcggttgac cctcgacctc	120
[0938]	gcgtggttgg tctcgccgga cctcgcgacg cttccgctcg tcctgttcgc cgacgtgacg	180
[0939]	atgcggagga ccgcgttgtc gagaccgtgg tagctcgacg acttcttccc gacgaccctg	240
[0940]	ctactgaagt tgacgatgtc atccgtcctc acacaccgtt gactccttgg ggggttccac	300
[0941]	atgaagacga cgacacttcc gttgaagacg ttgctcgca agttagataaa cggctccgaa	360
[0942]	ccccccggcc ttcatgtcat gctcggtgg ggctgtccac caccttgagt gtgtacgggt	420
[0943]	ggcacgggtc gtggacttga ggacccccc ggcagtcaga aggagaagggg gggttttggg	480
[0944]	ttcctgtgg agtacttagag ggcctggga ctccagtgtt cgcaccacca cctgcactcg	540
[0945]	gtgcttctgg gactccagtt caagttgacc atgcacctcg cgcaccccca cgtattacgg	600
[0946]	ttctgttgc ggcctccct cgtcatgtt tcgtcatgg cacaccatgc gcaggagtgg	660
[0947]	caggacgtgg tcctgaccga ctaccgttc ctcatgttca cggtccagag gttgtttcg	720
[0948]	gagggtcggtt ggtagcttt ttggtagagg ttccgggttc ccgtcggttgc tcttgggtgc	780
[0949]	cacatgtggg acgggggttag ggcctccct tactggttct tggtccagtc ggactggacg	840
[0950]	gaccagtttgc cgaagatagg gtcgtgttag cggcacctca ccctctcgaa acccgctccgc	900
[0951]	ctcttgcgttga tggttgcgttgc cggagggcac gacctgaggc tgccgaggaa gaaggagata	960
[0952]	tcgttgcgtt ggcacctgtt ctgcgtccacc gtcgtccct tgcaaaaag tacgaggcac	1020
[0953]	tacgtactcc gagacgtgtt ggtatgtgc gtcttgcgttgc agagggacag gggccattt	1080
[0954]	act	1083
[0955]	<210> 35	
[0956]	<211> 1083	
[0957]	<212> DNA	
[0958]	<213> 人工序列	
[0959]	<220>	
[0960]	<223> 人工序列描述：合成多核苷酸	
[0961]	<400> 35	
[0962]	tacctacgtt acttctctcc cgagacgaca cacgacgacg acacacctcg tcagaagcaa	60
[0963]	agcgggccgc ggcggctttg ggcgttaca taaataatgt tacgattaac ccttgagctt	120
[0964]	gcctgcttgg ttaggcccga gcttgccaca ctccccccttgc tcctatttgc ggaggtaacg	180
[0965]	atacgcagca cctccttgc gaggccctgc taacttgacc agttttcc cacgaccctg	240

[0966]	ctgctaaagt taacaataact ggccgtcctt acacagcgct ggcttcctt aggccgtccag	300
[0967]	ataaaagacaa caacgctccc cttaaagaca ttacttgcca aatgggtgga ggggcttcgg	360
[0968]	ccgccccggc tccactggat acttggggc gggtggccac cacctttagt gtgtacggg	420
[0969]	ggcacgggtc gtggacttga ggacccccc ggcagtcaga aggagaaggg gggtttggg	480
[0970]	ttcctgtggg agtactagag gcctgggca ctccagtgtc cgcaccacca cctgcactcg	540
[0971]	tgcttctgg gactccaggta caagttgacc atgcacactgc cgcacctcca cgtattacgg	600
[0972]	ttctgtttcg gcgccttcct cgtcatgttgc tcgtgcatttgc cacaccagtc gcaggagtgg	660
[0973]	caggacgtgg tcctgaccga cttaccgttc ctcatgttca cggtccagag gttgtttcg	720
[0974]	gagggtcggtt ggtagctttt ttgttagagg tttcggttcc cggtcggttcc tcttgggtgtc	780
[0975]	cacatgtggg acggggtag ggccttcctc tactggttt tggtccagtc ggactggacg	840
[0976]	gaccagtttgcgaagatagg gtcgctgttag cgccacctca ccctctcggtt acccgtcggtt	900
[0977]	ctttgttga tggttgggtt cggaggcac gacctgaggtc tgccgaggaa gaaggagata	960
[0978]	tcgttcgagt ggcacctgtt ctcgtccacc gtcgtccct tgcagaagag tacgaggcac	1020
[0979]	tacgtactcc gagacgtgtt ggtgatgtgc gtcttctcggtt agagggacag gggccattt	1080
[0980]	act	1083
[0981]	<210> 36	
[0982]	<211> 141	
[0983]	<212> PRT	
[0984]	<213> 智人	
[0985]	<400> 36	
[0986]	Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn	
[0987]	1 5 10 15	
[0988]	Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly	
[0989]	20 25 30	
[0990]	Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser	
[0991]	35 40 45	
[0992]	Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn	
[0993]	50 55 60	
[0994]	Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val	
[0995]	65 70 75 80	
[0996]	Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His	
[0997]	85 90 95	
[0998]	Leu Pro Glu Ala Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile	
[0999]	100 105 110	
[1000]	Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser	
[1001]	115 120 125	
[1002]	Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu	
[1003]	130 135 140	
[1004]	<210> 37	
[1005]	<211> 141	
[1006]	<212> PRT	
[1007]	<213> 人工序列	

- [1008] <220>
- [1009] <223> 人工序列描述：合成多肽
- [1010] <400> 37
- [1011] Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
- [1012] 1 5 10 15
- [1013] Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
- [1014] 20 25 30
- [1015] Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
- [1016] 35 40 45
- [1017] Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
- [1018] 50 55 60
- [1019] Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
- [1020] 65 70 75 80
- [1021] Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
- [1022] 85 90 95
- [1023] Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile
- [1024] 100 105 110
- [1025] Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser
- [1026] 115 120 125
- [1027] Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu
- [1028] 130 135 140
- [1029] <210> 38
- [1030] <211> 370
- [1031] <212> PRT
- [1032] <213> 人工序列
- [1033] <220>
- [1034] <223> 人工序列描述：合成多肽
- [1035] <400> 38
- [1036] Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
- [1037] 1 5 10 15
- [1038] Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
- [1039] 20 25 30
- [1040] Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
- [1041] 35 40 45
- [1042] Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
- [1043] 50 55 60
- [1044] Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
- [1045] 65 70 75 80
- [1046] Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
- [1047] 85 90 95
- [1048] Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile
- [1049] 100 105 110

[1050]	Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser		
[1051]	115	120	125
[1052]	Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu Thr Gly Gly		
[1053]	130	135	140
[1054]	Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
[1055]	145	150	155
[1056]	160		
[1057]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	165	170
[1058]	175		
[1059]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	180	185
[1060]	190		
[1061]	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	195	200
[1062]	205		
[1063]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	210	215
[1064]	220		
[1065]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	225	230
[1066]	235		240
[1067]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu	245	250
[1068]	255		
[1069]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	260	265
[1070]	270		
[1071]	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	275	280
[1072]	285		
[1073]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	290	295
[1074]	300		
[1075]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	305	310
[1076]	315		320
[1077]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp	325	330
[1078]	335		
[1079]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	340	345
[1080]	350		
[1081]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	355	360
[1082]	365		
[1083]	Gly Lys	370	
[1084]	<210> 39		
[1085]	<211> 512		
[1086]	<212> PRT		
[1087]	<213> 智人		
[1088]	<400> 39		
[1089]	Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp		
[1090]	1	5	10
[1091]	15		
[1091]	Pro Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr		

[1092]	20	25	30
[1093]	Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg		
[1094]	35	40	45
[1095]	Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala		
[1096]	50	55	60
[1097]	Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp		
[1098]	65	70	75
[1099]	Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn		
[1100]		85	90
[1101]	Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg		
[1102]		100	105
[1103]	Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro		
[1104]		115	120
[1105]	Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu		
[1106]		130	135
[1107]	Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr		
[1108]		145	150
[1109]	Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro		
[1110]		165	170
[1111]	Gly Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu		
[1112]		180	185
[1113]	Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln		
[1114]		195	200
[1115]	Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys		
[1116]		210	215
[1117]	Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys		
[1118]		225	230
[1119]	His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn		
[1120]		245	250
[1121]	Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser		
[1122]		260	265
[1123]	Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys		
[1124]		275	280
[1125]	His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp		
[1126]		290	295
[1127]	Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg		
[1128]		305	310
[1129]	Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val		
[1130]		325	330
[1131]	Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro		
[1132]		340	345
[1133]	Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu		

[1134]	355	360	365
[1135]	Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile		
[1136]	370	375	380
[1137]	Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys		
[1138]	385	390	395
[1139]	Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu		
[1140]	405	410	415
[1141]	Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val		
[1142]	420	425	430
[1143]	His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro		
[1144]	435	440	445
[1145]	Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp		
[1146]	450	455	460
[1147]	Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu		
[1148]	465	470	475
[1149]	Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu		
[1150]	485	490	495
[1151]	Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile		
[1152]	500	505	510
[1153]	<210> 40		
[1154]	<211> 115		
[1155]	<212> PRT		
[1156]	<213> 智人		
[1157]	<400> 40		
[1158]	Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn		
[1159]	1 5 10 15		
[1160]	Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly		
[1161]	20 25 30		
[1162]	Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser		
[1163]	35 40 45		
[1164]	Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn		
[1165]	50 55 60		
[1166]	Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val		
[1167]	65 70 75 80		
[1168]	Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His		
[1169]	85 90 95		
[1170]	Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr		
[1171]	100 105 110		
[1172]	Ala Pro Thr		
[1173]	115		
[1174]	<210> 41		
[1175]	<211> 100		

- [1176] <212> PRT
- [1177] <213> 智人
- [1178] <400> 41
- [1179] Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
- [1180] 1 5 10 15
- [1181] Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
- [1182] 20 25 30
- [1183] Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser
- [1184] 35 40 45
- [1185] Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
- [1186] 50 55 60
- [1187] Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
- [1188] 65 70 75 80
- [1189] Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
- [1190] 85 90 95
- [1191] Leu Pro Glu Ala
- [1192] 100
- [1193] <210> 42
- [1194] <211> 4
- [1195] <212> PRT
- [1196] <213> 人工序列
- [1197] <220>
- [1198] <223> 人工序列描述：合成肽
- [1199] <400> 42
- [1200] Thr Gly Gly Gly
- [1201] 1
- [1202] <210> 43
- [1203] <211> 368
- [1204] <212> PRT
- [1205] <213> 人工序列
- [1206] <220>
- [1207] <223> 人工序列描述：合成多肽
- [1208] <400> 43
- [1209] Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
- [1210] 1 5 10 15
- [1211] Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
- [1212] 20 25 30
- [1213] Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn
- [1214] 35 40 45
- [1215] Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His
- [1216] 50 55 60
- [1217] Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys

[1218]	65	70	75	80
[1219]	Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys			
[1220]		85	90	95
[1221]	Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly			
[1222]		100	105	110
[1223]	Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro			
[1224]		115	120	125
[1225]	Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr			
[1226]		130	135	140
[1227]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
[1228]		145	150	155
[1229]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
[1230]		165	170	175
[1231]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
[1232]		180	185	190
[1233]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
[1234]		195	200	205
[1235]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
[1236]		210	215	220
[1237]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr			
[1238]		225	230	235
[1239]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
[1240]		245	250	255
[1241]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
[1242]		260	265	270
[1243]	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
[1244]		275	280	285
[1245]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
[1246]		290	295	300
[1247]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
[1248]		305	310	315
[1249]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
[1250]		325	330	335
[1251]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
[1252]		340	345	350
[1253]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[1254]		355	360	365
[1255]	<210> 44			
[1256]	<211> 107			
[1257]	<212> PRT			
[1258]	<213> 人工序列			
[1259]	<220>			

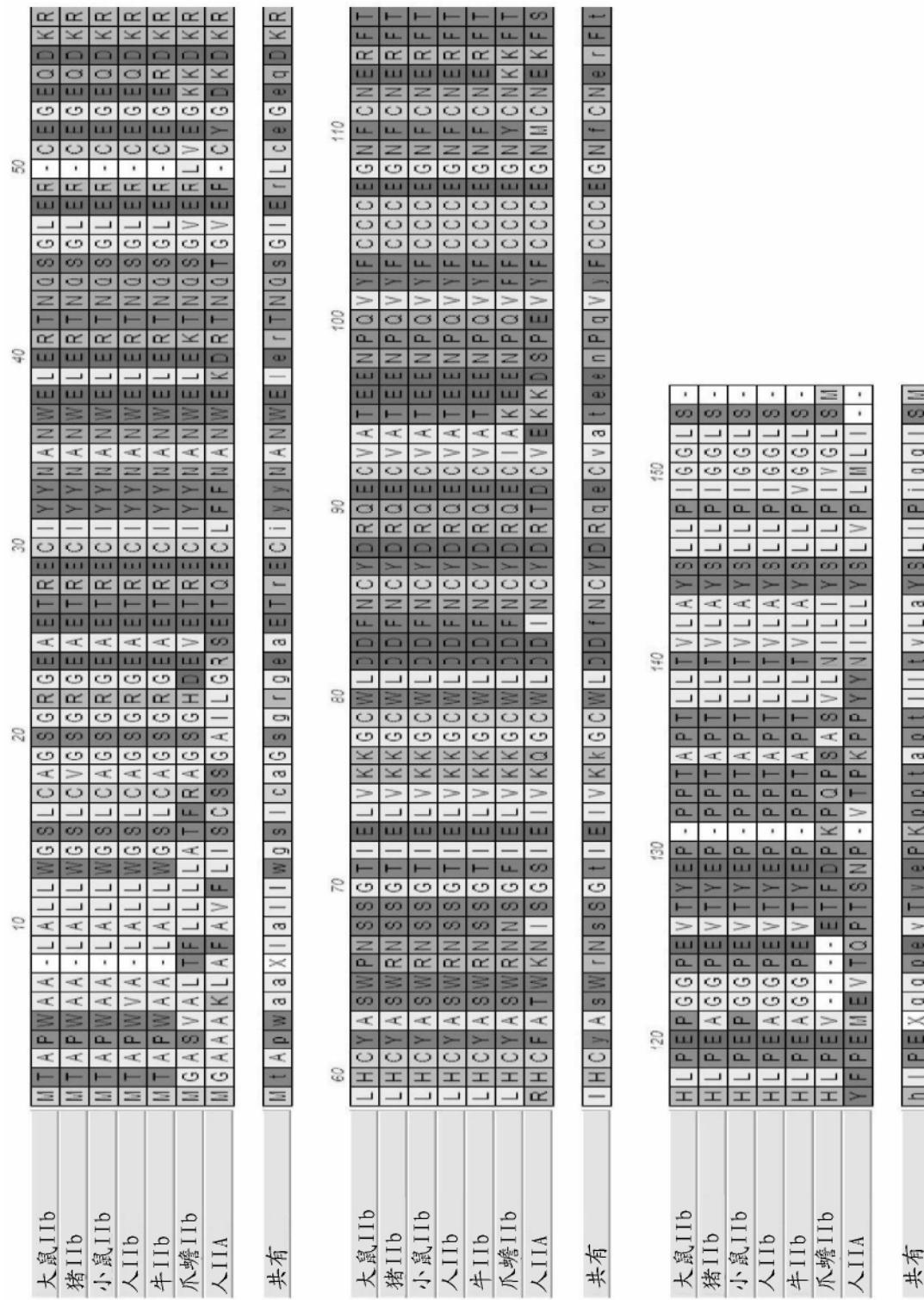
[1260] <223> 人工序列描述: 合成多肽
[1261] <400> 44
[1262] Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
[1263] 1 5 10 15
[1264] Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
[1265] 20 25 30
[1266] Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
[1267] 35 40 45
[1268] Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
[1269] 50 55 60
[1270] Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
[1271] 65 70 75 80
[1272] Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
[1273] 85 90 95
[1274] Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
[1275] 100 105

ActRIIa ILGRSETQEC IFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS
ActRIIb GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGIERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

IEIVKQGOWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM
IELVKKGOWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPPT
GGPEVTYEPP PTAPT

图 1



1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS

51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWDDDFNC YDRQECVATE

101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC

151 PAPELLGGPS VFLFPPPKPD TLMISRTPEV TCVVVVDVSHE DPEVKFNWYV

201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP

251 APIEKTISSKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV

301 EWESNGQOPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH

351 EALHNHYTQK SLSLSPGK

图 3

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCCTCCGA CTCTGTGCC
 101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
 TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG
 151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
 CCGGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG
 201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
 GAGGACCGCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA
 251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TAGCATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
 CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC
 301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
 CTCTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT
 351 GCGCTTCACT CATTGCCAG AGGCTGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
 CGCGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG
 401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCACG
 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTCCTCT TCCCCCCTAA
 GGTGTTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT
 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 TGGGTTCCCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC
 551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC
 601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
 CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT
 651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
 GTTGTGTCGC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCCTGA
 701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
 CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT
 751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAAC
 CGGGGGTAGC TCTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

图 4

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCG CATCCCGGGG GGAGATGACC AAGAACCAAG
 TGTCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC
 851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATGCCGTG
 AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC
 901 GAGTGGGAGA GCAATGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 CTCACCCCTCT CGTTACCCGT CGGCCTTGTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG
 951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
 GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCAC
 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
 TGTTCTCGTC CACCGTCGTC CCCTTGAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA
 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACCA CACGCAGAAC AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG
 CTCCGAGACG TGTTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCC
 1101 TAAATGA (SEQ ID NO:25)
 ATTTACT (SEQ ID NO:33)

图 4续

1 MDAMKRLGCC VLLLCAVAV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSLERC

51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD DDFNCYDRQE CVATEENPQV

101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG

151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA

201 KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS

251 KAKGQPREPO VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP

301 ENNYKTPPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT

351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26)

图 5

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 E T R E C I Y Y
 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
 ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
 TCGGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCCTC GGCGAACAG
 CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC

201 S G T I E L V K K G C W D D D F
 CTCTGGCACCC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA
 GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCCCTG CTACTGAAGT

251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
 TGACGATGCT ATCCGTCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
 ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

351 P E A G G P E V T Y E P P P T
 GCCAGAGGCT GGGGGCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
 CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAAC CCTGGGGGGA
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 GGCTGGGGA CTCCAGTGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

图 6

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC
 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA
 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG
 751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
 TTTCGGTTTC CGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG
 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCA CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
 GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC
 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC
 901 GAGAACAACT ACAAGACAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA
 951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCC
 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
 TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC
 1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 27)
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATT ACT (SEQ ID NO: 34)

图 6续

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
 51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
 101 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPPKDITLM ISRTPEVTCV
 151 VVDVSHEDE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
 201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLR PSREEMTKNQ
 251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLT
 301 DKSRWQOQNV FSCSVMHEAT HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ TD NO: 28)

图 7

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCWDDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPT (SEQ ID NO: 29)

图 8

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 E T R E C I Y Y
 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAC CCGCGAATGT ATTATTACA
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGGCTTG GGCGCTTACA TAAATAATGT

101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
 ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGCACCAACC AATCCGGCT CGAACGGTGT
 TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCGA GCTTGCCACA

151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
 GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC
 CTCCCCCTTG TCCTATTGTC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

201 S G T I E L V K K G C W D D D F
 CTCCGGGACG ATTGAACTCG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTCA
 GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTCC CACGACCTCG CTGCTAAAGT

251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
 ATGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC
 TAACAATACT GGCGGTCCCT ACACAGCGCT GGCTCTCTT AGCGTCCAG

301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
 TATTTCTGTGTT GTGCGAGGG GAATTCTGT AATGAAACGGT TTACCCACCT
 ATAAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

351 P E A G G P E V T Y E P P P T
 CCCCGAAGCC GGCAGGGCCCG AGGTGACCTA TGAAACCCCG CCCACGGGTG
 GGGGCTTCGG CGGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTCCCCAG CACCTGAAC ACTTGGGGGA
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGT GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 GGCCTGGGG A CTCCAGTGT A CGCACCA ACCA CCTGCAC TCG GTGCTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

图 9

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG
 751 AAAGCCAAG GGCAGCCCCG AGAACACACAG GTGTACACCC TGCCCCATC
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGGTAG
 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
 GGCCCTCCTC TACTGGTCT TGTTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC
 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC
 901 GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCGAGGAA
 951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT
 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
 TGCAGAACAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC
 1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 30)
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATT ACT (SEQ ID NO: 35)

图 9续

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTTACA ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC
 AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT
 GGAGGAACTC CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA
 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCCGGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT
 GTTGCGAGGG GAATTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GCGGGCCCG
 AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACC (SEQ ID NO: 31)

图 10

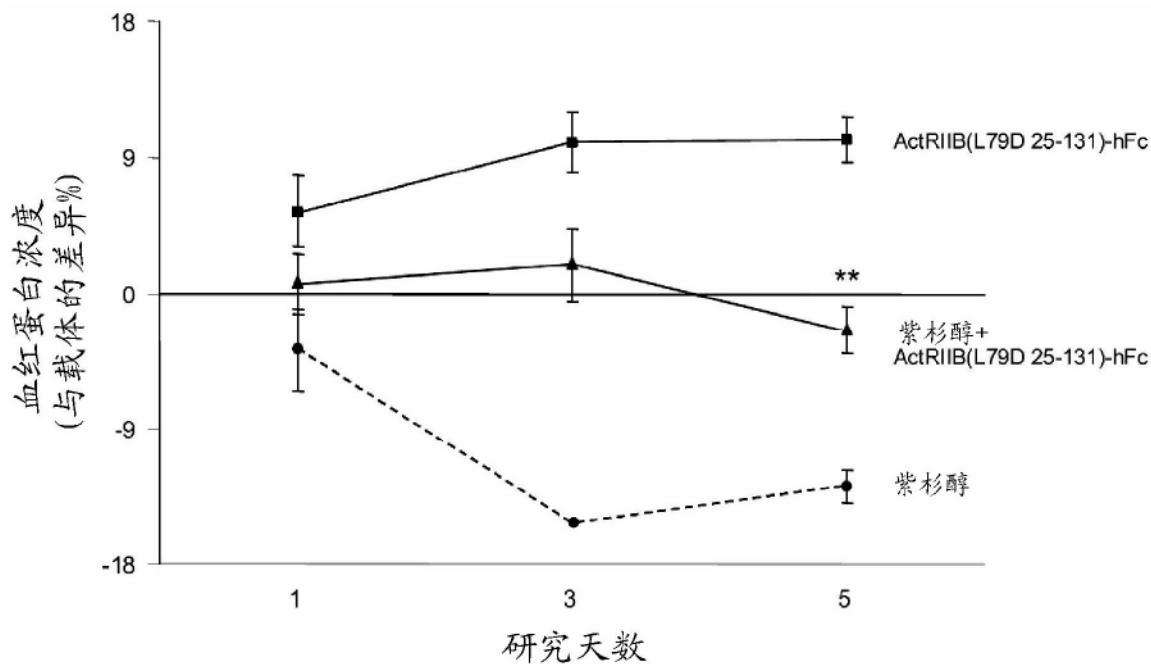


图 11

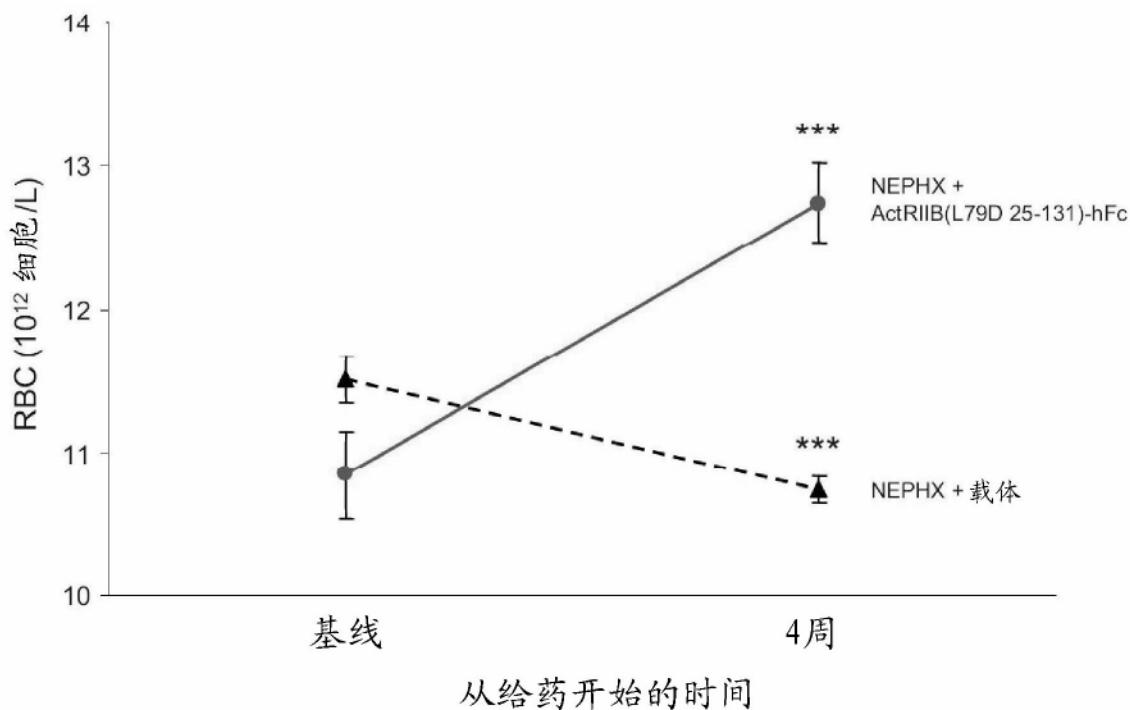


图 12

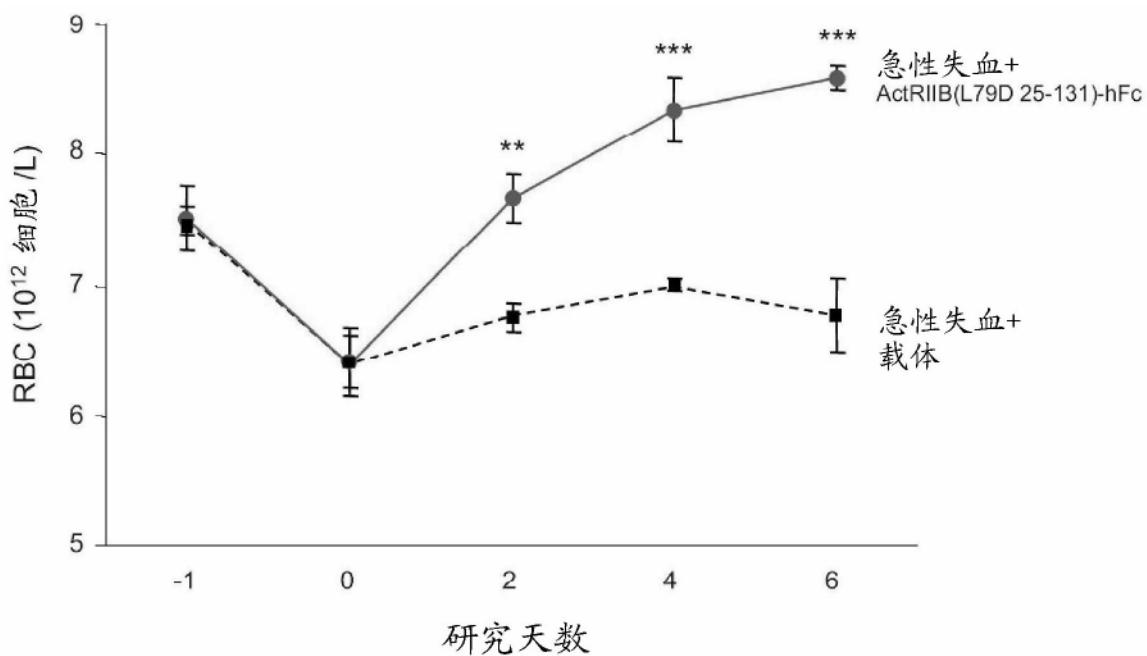
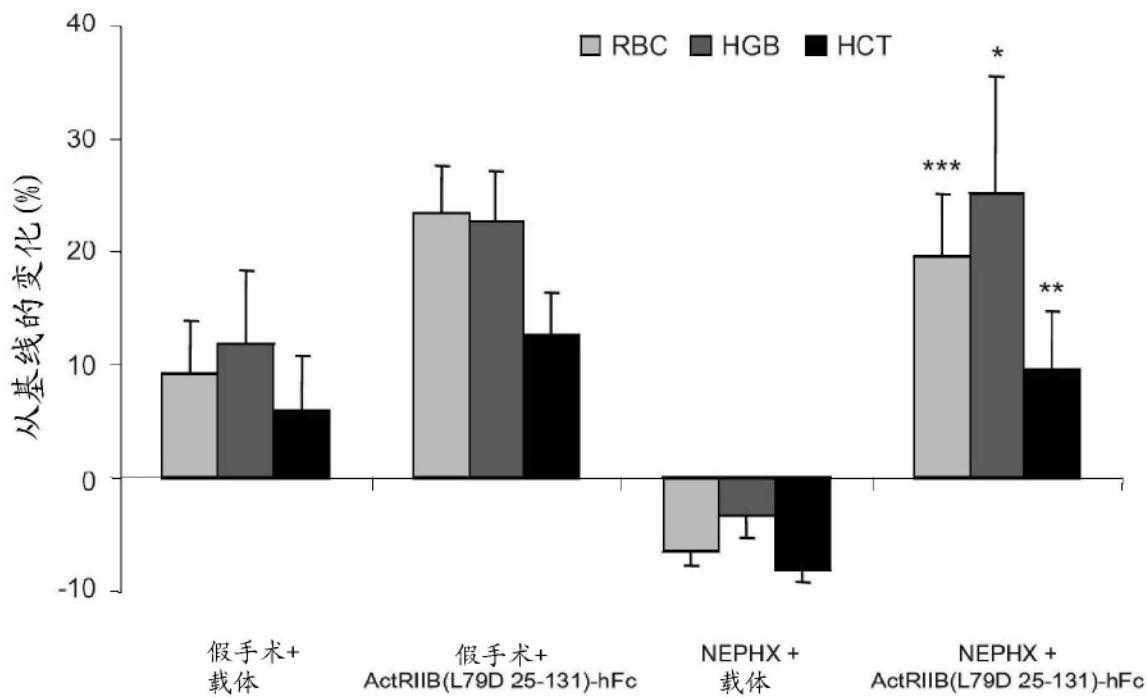


图 14

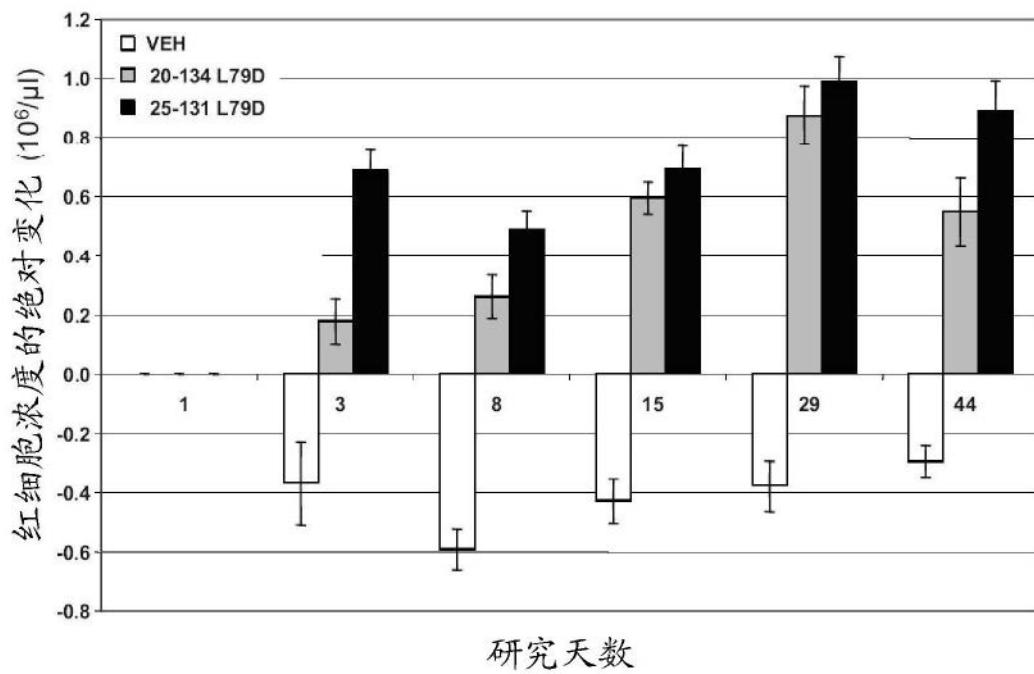


图 15

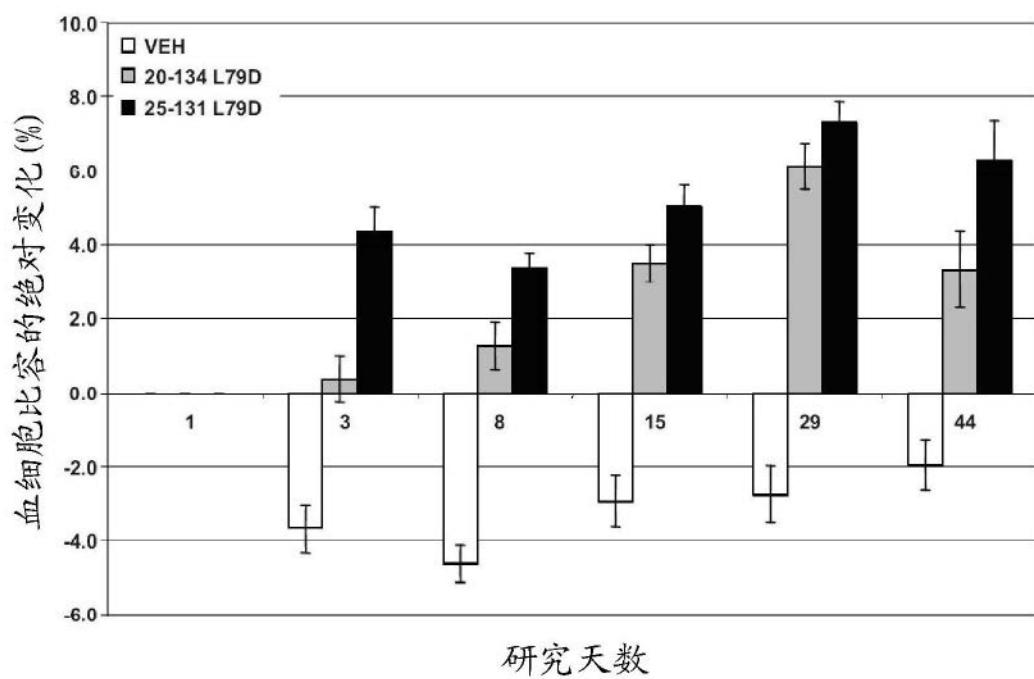


图 16

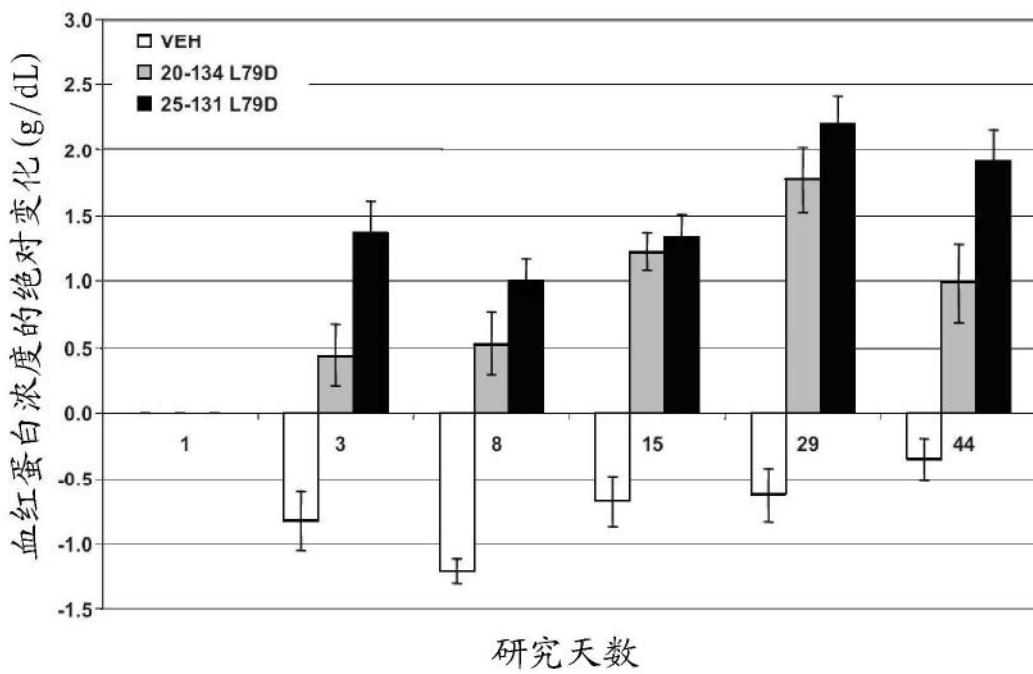


图 17

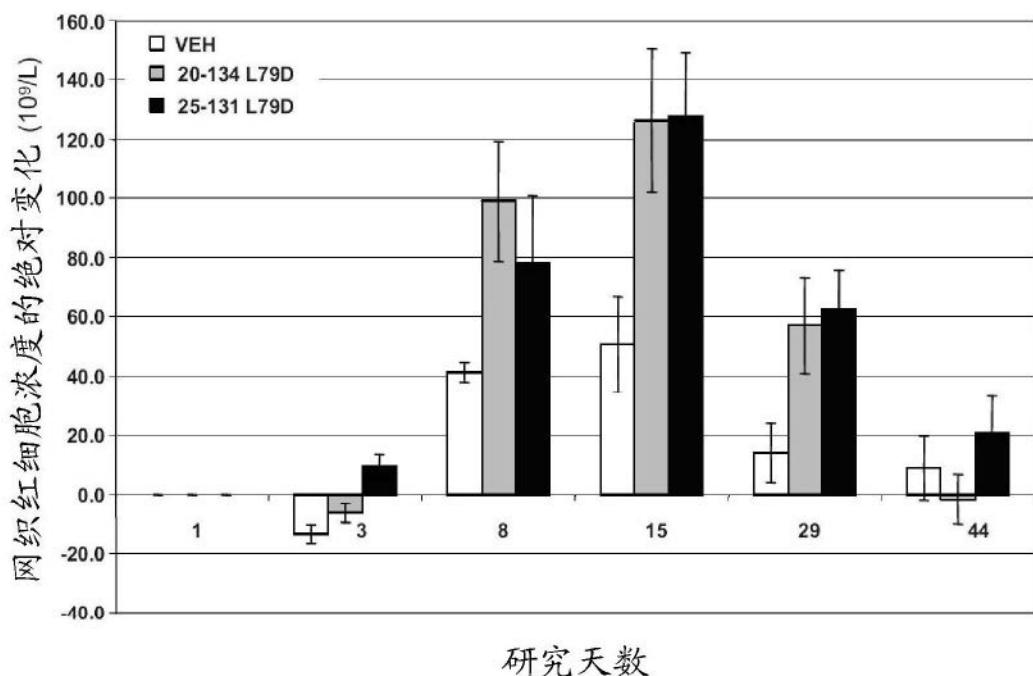


图 18

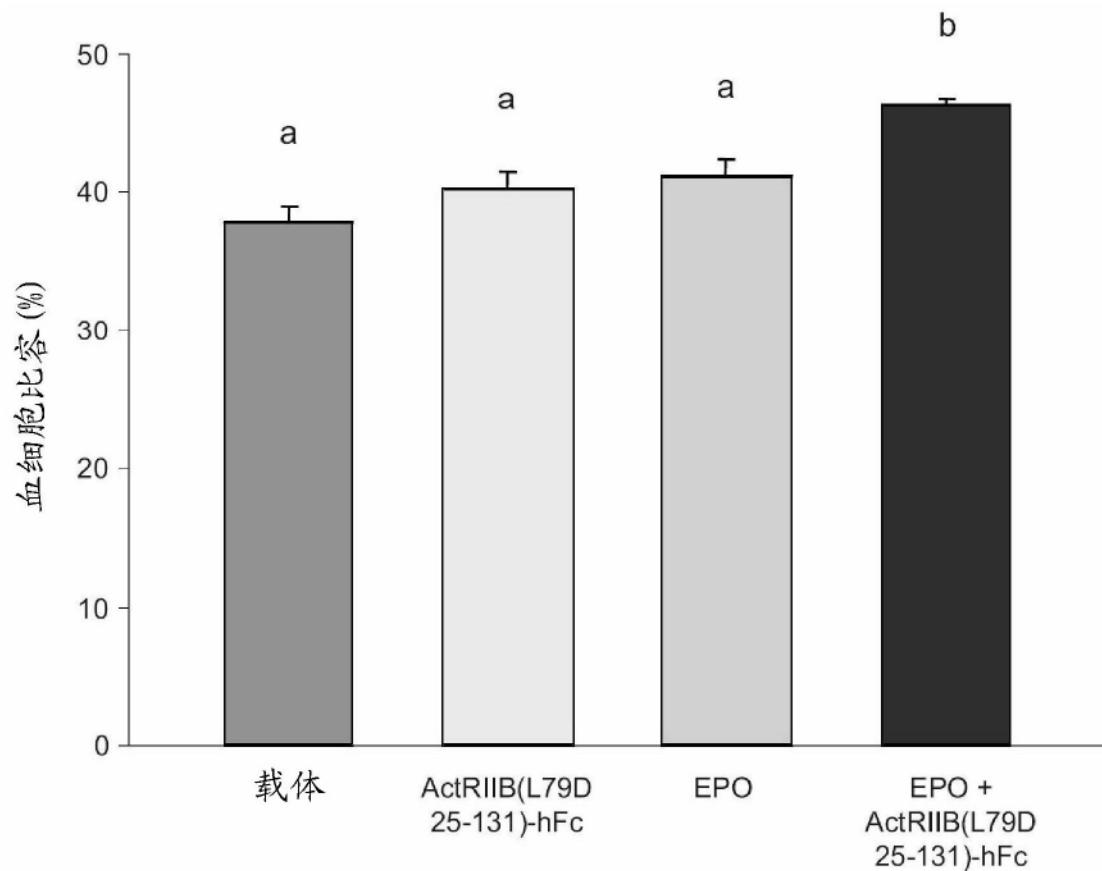


图 19

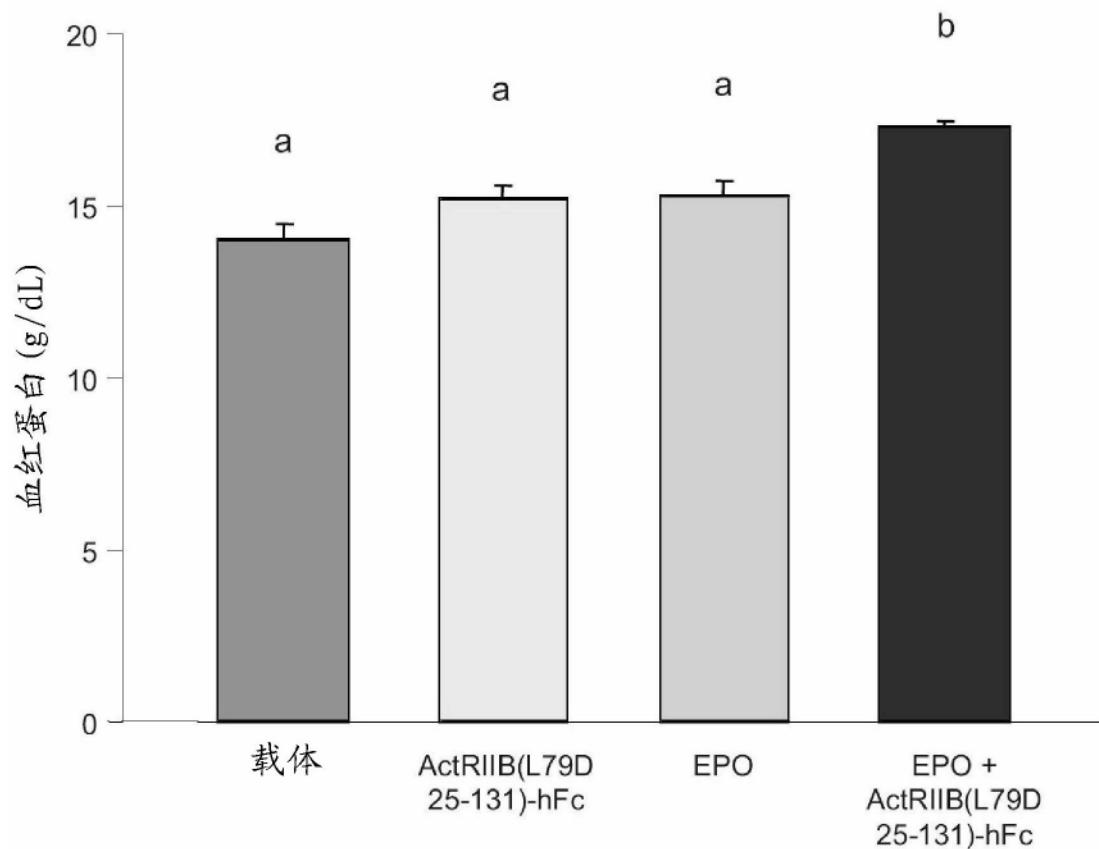


图 20

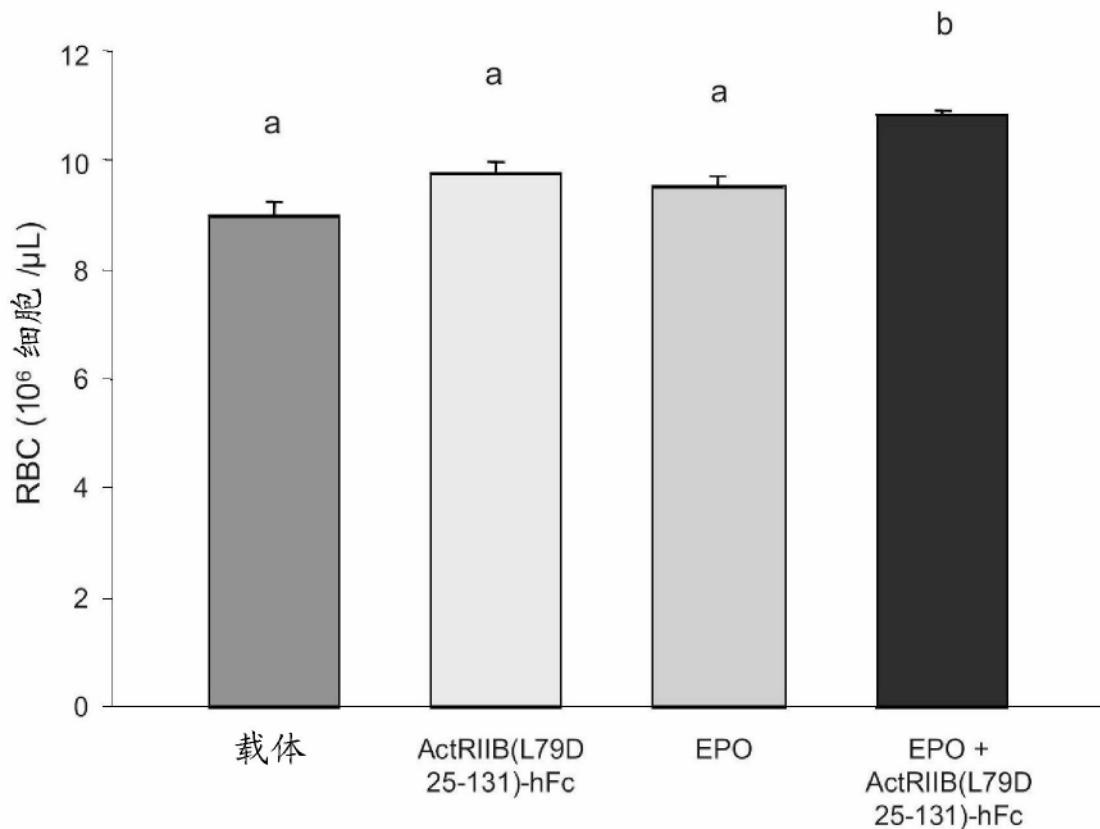


图 21

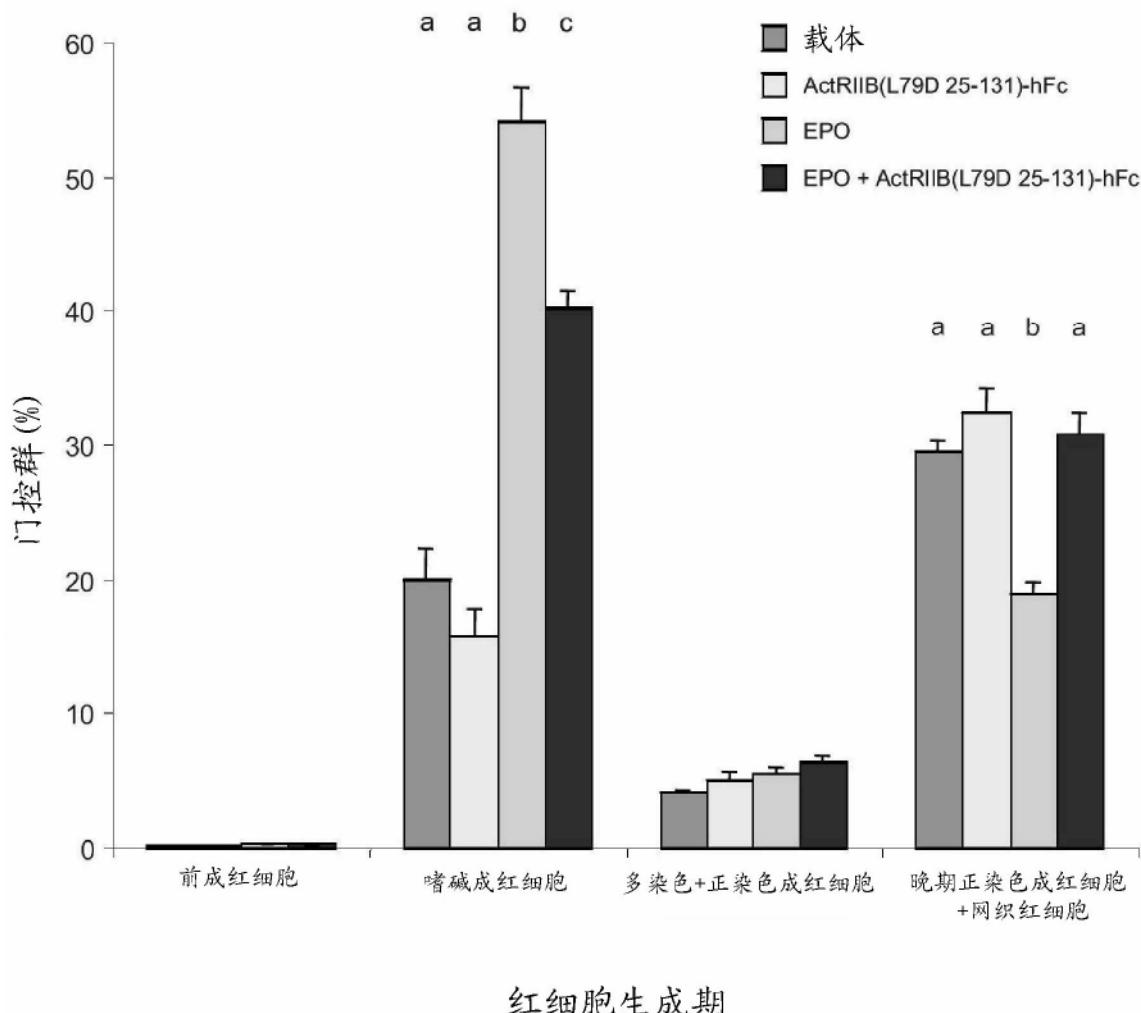


图 22