



(10) 授权公告号 CN 110769844 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 21

(21) 申请号 201880037987.0

M · I · 威尔科因 S · 巴纳斯

(22) 申请日 2018.04.06

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110769844 A

专利代理师 陈扬扬 钱文字

(43) 申请公布日 2020.02.07

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

62/482,963 2017.04.07 US

A61K 38/16 (2006.01)

62/607,706 2017.12.19 US

A61P 1/00 (2006.01)

62/611,334 2017.12.28 US

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

G07K 14/195 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.06

(56) 对比文件

CN 103930117 A, 2014.07.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/026447 2018.04.06

G2T1E5.UniProtKB, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/G2T1E5/entry#sequences.2011>, 第1-2页第25-256个氨基酸.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/187682 EN 2018.10.11

G2T1E5.UniProtKB, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/G2T1E5/entry#sequences.2011>, 第1-2页第25-256个氨基酸.

(73) 专利权人 日内瓦公司

地址 美国加利福尼亚州

审查员 陈苗苗

(72) 发明人 A · W · 韩 A · W · 古德耶

T · 古亚 T · Z · 德桑蒂斯

K · 达巴 T · 竹内 Y · 金

权利要求书2页 说明书75页

序列表23页 附图28页

(54) 发明名称

用于治疗上皮屏障功能紊乱的蛋白质

(57) 摘要

本公开涉及治疗性蛋白质和包含所述蛋白质的药物组合物,其可用于治疗各种人类疾病。在特定方面,公开的治疗性蛋白质可用于治疗人胃肠道炎症性疾病和与上皮细胞屏障功能或完整性降低相关的胃肠道病症。另外,公开的治疗性蛋白质可用于治疗人炎性肠病,包括克罗恩氏病和溃疡性结肠炎。

1. 一种治疗性蛋白质在制备用于治疗炎性肠病的药物中的用途,其中所述治疗性蛋白质是SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物是直肠制剂,肠胃外制剂,静脉内制剂,局部制剂,口服制剂,皮肤制剂,透皮制剂或皮下制剂。

3. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物减轻与炎性肠病相关的至少一种症状。

4. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物减轻与炎性肠病相关的至少一种症状,所述症状选自:腹痛,便血,便脓,发烧,体重减轻,频繁腹泻,疲劳,食欲下降,里急后重和直肠出血。

5. 如权利要求1所述的用途,其中药物减轻胃肠道炎症。

6. 如权利要求1所述的用途,其中药物减轻肠粘膜炎症。

7. 如权利要求1所述的用途,其中药物增加肠组织中粘蛋白的产生。

8. 如权利要求1所述的用途,其中药物增加肠上皮伤口愈合。

9. 如权利要求1所述的用途,其中药物增加肠上皮细胞增殖。

10. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物还包括第二治疗剂。

11. 如权利要求10所述的用途,其中所述第二治疗剂选自:止泻药,5-氨基水杨酸化合物,抗炎剂,抗生素,抗体,抗细胞因子剂,抗炎细胞因子剂,类固醇,皮质类固醇和免疫抑制剂。

12. 一种药物组合物,其包含:

a. 一种治疗性蛋白质,其是SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19;和

b. 药学上可接受的运载体。

13. 如权利要求12所述的药物组合物,其配制用于直肠,肠胃外,静脉内,局部,口服,皮肤,透皮或皮下给予。

14. 如权利要求12所述的药物组合物,其经配制使得所述治疗性蛋白质在患者的胃肠腔和/或肠中有活性。

15. 一种表达载体,其包含:多核苷酸,其编码SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19的蛋白质。

16. 一种宿主细胞,其包含:外源性多核苷酸,其编码SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19的蛋白质。

17. 如权利要求16所述的宿主细胞,其中外源性多核苷酸还编码宿主细胞特异性信号序列。

18. 如权利要求16所述的宿主细胞,其中外源性多核苷酸包含核酸序列SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 20。

19. 如权利要求16所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是原核细胞。

20. 如权利要求16所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是大肠杆菌细胞。

21. 如权利要求16所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真核细胞。

22. 如权利要求16所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢细胞。

23. 一种产生蛋白质的方法,包括:在足以表达所述编码的蛋白质的条件下培养如权利要求16所述的宿主细胞。

24. 一种分离的治疗性蛋白质,其是SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19。

25. 如权利要求24所述的分离的治疗性蛋白质,其中所述蛋白质在体外跨上皮电阻测

定中增加电阻。

26. 如权利要求24所述的分离的治疗性蛋白质, 其中与没有所述蛋白质的情况下进行的测定相比, 所述蛋白质在体外跨上皮电阻测定中增加至少5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 或99%的电阻。

27. 如权利要求24所述的分离的治疗性蛋白质, 其中与激酶抑制剂的对照相比, 所述蛋白质在体外跨上皮电阻测定中增加电阻。

28. 如权利要求24所述的分离的治疗性蛋白质, 其中与星形孢菌素或肌球蛋白轻链激酶的对照相比, 所述蛋白质在体外跨上皮电阻测定中增加电阻。

## 用于治疗上皮屏障功能紊乱的蛋白质

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年12月28日提交的美国临时申请号62/611,334,2017年12月19日提交的美国临时申请号62/607,706和2017年4月7日提交的美国临时申请号62/482,963的优先权,其全部内容通过引用全文纳入本文。

[0003] 电子申请文本说明

[0004] 在此电子形式提交文本的内容整体纳入本文:计算机可读形式序列列表文件名:SEGE\_001\_03W0\_SeqList\_ST25.txt,创建日期,2018年4月4日,文件大小≈45.3千字节。

### 技术领域

[0005] 本公开涉及新型蛋白质和包含所述蛋白质的药物组合物,其尤其用于治疗胃肠道炎症性疾病和上皮屏障功能紊乱。在一些实施方式中,本文所述的蛋白质和药物组合物在治疗或预防与异常渗透性上皮屏障以及炎症肠疾病或病症有关的疾病状态中具有特定应用。

### 背景技术

[0006] 炎症肠病 (IBD) 是一种病因不明的异质性疾病,会导致频繁且带血的肠运动以及对胃肠道粘膜的组织病理学破坏 (Zhang等,2017,Front Immunol,8:942)。虽然尚不清楚疾病的具体诱因,但疾病进展的一项研究计划表明,肠道屏障功能的破坏使细菌或细菌成分移位进入粘膜组织 (Coskun,2014,Front Med (Lausanne),1:24;Martini等,2017,Cell Mol Gastroenterol Hepatol,4:33-46)。细菌移位导致炎症信号转导的激活,从而触发额外的屏障破坏,从而导致屏障破坏,细菌移位和炎症的循环放大环。尽管许多当前的疗法针对炎症,但是缺乏促进粘膜愈合的疗法为促进上皮修复和肠屏障完整性的新疗法提供了机会。

[0007] 根据细菌移位可触发IBD的假设出发,最近的研究表明肠道菌群的有害变化或失调可能促进IBD的发展。

[0008] 当前,市场上可获得的许多IBD疗法仅旨在靶向和抑制所讨论的与IBD相关的炎症反应。尽管有帮助,但这种狭窄的治疗作用模式忽略了上皮屏障完整性在疾病病因学中的重要作用。

[0009] 因此,在本领域中非常需要开发一种治疗剂,该治疗剂不仅抑制免疫系统的炎症反应,而且还起着恢复个人上皮屏障功能的作用。同样,需要生产如本文所述的蛋白质治疗剂,其在蛋白质治疗剂的制造和/或加工中以及在长期储存条件下是稳定的。

### 发明内容

[0010] 本公开满足医学界对可以有效治疗患有胃肠道疾病例如炎症肠病 (IBD) 的对象的剂的重要需求。一方面,提供了可以维持上皮屏障完整性和/或改善上皮屏障修复的新型蛋白质治疗剂。在一些实施方式中,上皮屏障是肠上皮屏障。这些蛋白质治疗剂还可以减轻对象肠道的炎症和/或减轻与肠道炎症有关的症状。

[0011] 本文提供的蛋白质治疗剂可用于治疗可能与胃肠道上皮细胞屏障功能或完整性

降低有关的多种疾病和/或症状。

[0012] 在一些实施方式中,本公开教导了衍生自微生物组的新型蛋白质治疗剂以及利用所述蛋白质治疗剂的方法。在一个特定的实施方式中,提供了衍生自微生物组并且包含与SEQ ID NO:19具有至少约70%,71%,72%,73%,74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%,99.9%或100%序列相同性的氨基酸序列的蛋白质。在一些实施方式中,治疗性蛋白质不包含与SEQ ID NO:3相同的氨基酸序列。在其他实施方式中,治疗性蛋白质包含非天然存在的氨基酸序列。

[0013] 在一些实施方式中,所述蛋白质包含氨基酸序列SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19。在其他实施方式中,该蛋白质包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在其他实施方式中,该蛋白质包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0014] 在一些实施方式中,蛋白质包含与SEQ ID NO:19至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%或99.9%或100%相同的氨基酸序列,其中该氨基酸序列相对于SEQ ID NO:19或相对于SEQ ID NO:3具有至少1、2、3或4个氨基酸取代。在其他实施方式中,氨基酸序列相对于SEQ ID NO:3具有至少2且小于3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个氨基酸取代。在其他实施方式中,治疗性蛋白质包含非天然存在的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方式中,该蛋白质包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在关于SEQ ID NO:3的其他实施方式中,X53为N,S,T,M,R,Q,和/或X83为N,R或K,和/或X84为G或A,和/或X147为C,S,T,M,V,L,A或G,和/或X151为C,S,T,M,V,L,A或G。在其他实施方式中,X53为N,S或K,和/或X83为N或R,和/或X84为G或A,和/或X147为C,V,L或A,和/或X151为C,S,V,L或A。

[0016] 在一些实施方式中,蛋白质的长度为约200至250个氨基酸,210至250个氨基酸,220至250个氨基酸,220至240个氨基酸,230至250个氨基酸,230至240个氨基酸,或230至235个氨基酸,220至275个氨基酸,220至260个氨基酸,230至260个氨基酸,240至250个氨基酸,250至260个氨基酸,230至256个氨基酸,240个氨基酸至256个氨基酸,245个氨基酸至256个氨基酸。在其他实施方式中,治疗性蛋白质的长度为220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259或260个氨基酸。

[0017] 在一些实施方式中,本公开教导了特异性结合包含SEQ ID NO:19或其变体的治疗性蛋白质的抗体或其片段。在其他实施方式中,抗体或其片段不结合包含与SEQ ID NO:3相同的氨基酸序列的蛋白质。在其他实施方式中,抗体或其片段结合包含与SEQ ID NO:19相同的氨基酸序列的蛋白质,但不结合包含与SEQ ID NO:3相同的氨基酸序列的蛋白质。

[0018] 在一些实施方式中,蛋白质在体外测定中增加上皮细胞层的屏障功能,其中该增加是相对于不存在蛋白质时该测定中的屏障功能而言的。在其他实施方式中,体外测定是跨上皮电阻(TEER)测定。在其他实施方式中,屏障功能的增加是比不存在所述蛋白质时测定中的电阻的大至少5%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%或90%的电阻增

加。在一些实施方式中,上皮细胞层是肠上皮细胞层。在其他实施方式中,肠上皮细胞层是包含肠上皮细胞和杯状细胞的细胞层。

[0019] 在一些实施方式中,该蛋白质在体外测定中减少了促炎细胞因子从细胞的分泌。在其他实施方式中,体外测定包括在所述蛋白质存在和不存在下,将单核细胞与热灭活的大肠杆菌一起孵育。在其他实施方式中,至少一种促炎细胞因子选自TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-25, IL-33, IL-8, MCP-1, MIP-3 $\alpha$ , CXCL1和IL-23。

[0020] 在一些实施方式中,该蛋白质在体外测定中增加抗炎细胞因子从细胞的分泌。在其他实施方式中,体外测定包括在所述蛋白质存在和不存在下,将单核细胞与热灭活的大肠杆菌一起孵育。在其他实施方式中,至少一种抗炎细胞因子选自IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ 。

[0021] 在一些实施方式中,该蛋白质减少了给予该蛋白质的对象的肠组织病变。在一些实施方式中,对象因用化学药品处理而诱导患有肠组织损伤。在其他实施方式中,对象因用化学葡聚糖硫酸钠(DSS)处理而诱导肠组织损伤。在其他实施方式中,该对象是哺乳动物。在其他实施方式中,动物是啮齿动物。在其他实施方式中,对象是非人类灵长类动物。

[0022] 在一些实施方式中,治疗性蛋白质减轻了给予该蛋白质的对象的胃肠道炎症。在其他实施方式中,该蛋白质减少对象的肠粘膜炎症。仍在其他实施方式中,该蛋白质改善对象的肠上皮细胞屏障功能或完整性。

[0023] 在一些实施方式中,该蛋白质增加了给予所述蛋白质的对象的肠组织中粘蛋白的量。

[0024] 在一些实施方式中,该蛋白质在给予该蛋白质的对象中增加肠上皮细胞伤口愈合。在其他实施方式中,该蛋白质在体外测定中增加肠上皮细胞伤口愈合。

[0025] 在一些实施方式中,该蛋白质在给予该蛋白质的对象中预防或减少结肠缩短。

[0026] 在一些实施方式中,治疗性蛋白质调节(即增加或减少)给予该蛋白质的对象的血液,血浆,血清,组织和/或粘膜中的细胞因子。

[0027] 在一些实施方式中,该蛋白质降低对象的血液,血浆,血清,组织和/或粘膜中至少一种促炎细胞因子的水平。在其他实施方式中,至少一种促炎细胞因子选自TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-25, IL-33, IL-8, MCP-1, MIP-3 $\alpha$ , CXCL1和IL-23。

[0028] 在一些实施方式中,该蛋白质增加对象的血液,血浆,血清,组织和/或粘膜中至少一种抗炎细胞因子的水平。在其他实施方式中,至少一种抗炎细胞因子选自IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ 。

[0029] 在一些实施方式中,该蛋白质降低对象的血液,血浆,血清,组织和/或粘膜中至少一种抗炎细胞因子的水平。在其他实施方式中,至少一种抗炎细胞因子选自IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ 。

[0030] 在一些实施方式中,本公开内容教导了编码新型蛋白质治疗剂的多核苷酸以及在宿主细胞中表达所述核酸的方法。在一个特定的实施方式中,多核苷酸包含编码与SEQ ID NO:19至少约70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%或99.9%或100%相同的蛋白质的序列。在其他实施方式中,多核苷酸包含编码与SEQ ID NO:19至少

70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%或99.9%或100%相同并且与SEQ ID NO:3小于100%相同的蛋白质的序列。在其他实施方式中,多核苷酸编码蛋白质,其是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的非天然存在的变体。在其他实施方式中,对多核苷酸进行密码子优化以在重组宿主细胞中表达。在其他实施方式中,对多核苷酸进行密码子优化以在大肠杆菌中表达。

[0031] 在一些实施方式中,本公开教导了一种核酸,其包含与SEQ ID NO:20至少70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%相同的序列。在一些实施方式中,该核酸包含与SEQ ID NO:20至少70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%相同且与SEQ ID NO:4小于100%相同的序列。在其他实施方式中,该核酸包含序列,该序列是SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的非天然存在的变体。

[0032] 在一些实施方式中,该蛋白质在N末端和/或C末端被化学修饰。在其他实施方式中,该蛋白质的N末端通过乙酰化被化学修饰。在其他实施方式中,C-末端通过酰胺化被化学修饰。

[0033] 在一些实施方式中,该蛋白质被聚乙二醇化。

[0034] 在一些实施方式中,该蛋白质是基本上纯化的,并且通过糖基化,泛素化,亚硝基化,甲基化,乙酰化或脂质化来修饰。

[0035] 在一些实施方式中,该蛋白质与第二蛋白质融合。在其他实施方式中,第二蛋白质是免疫球蛋白Fc结构域或人血清白蛋白蛋白质结构域。

[0036] 在一些方面,本公开提供了用于治疗炎性肠疾病的药物组合物,其包含:治疗性蛋白质,其包含与SEQ ID NO:19具有至少70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%或100%的序列相同性的氨基酸序列,和药学上可接受的运载体。在一些实施方式中,治疗性蛋白质是纯化的或基本上纯化的。在一些实施方式中,该蛋白质包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在另一个实施方式中,该蛋白质不包含与SEQ ID NO:3相同的序列,或者该蛋白质是SEQ ID NO:3的非天然存在的变体。在其他实施方式中,该蛋白质包含选自SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在其他实施方式中,该蛋白质包含SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施方式中,将药物组合物配制成用于直肠,肠胃外,静脉内,局部,口服,皮肤,透皮或皮下给药。在其他实施方式中,药物组合物是液体,凝胶或乳膏。在其他实施方式中,药物组合物是包含肠溶衣的固体组合物。

[0038] 在一些实施方式中,药物组合物是乳膏,胶囊,液体,凝胶或乳剂。

[0039] 在一些实施方式中,配制药物组合物以提供延迟释放。在其他实施方式中,延迟释放被释放到胃肠道中。在其他实施方式中,延迟释放进入口腔,小肠,大肠和/或直肠。

[0040] 在一些实施方式中,配制药组合物以提供缓释。在其他实施方式中,缓释被释放到胃肠道中。在其他实施方式中,缓释进入口腔,小肠,大肠和/或直肠。在其他实施方式中,缓释组合物在约1至20小时,1至10小时,1至8小时,4至12小时或5至15小时的时间段内释放治疗制剂。

[0041] 在一些实施方式中,药物组合物还包含第二治疗剂。在其他实施方式中,第二治疗剂选自止泻药,5-氨基水杨酸化合物,抗炎剂,抗生素,抗细胞因子剂,抗炎细胞因子剂,类固醇,皮质类固醇,免疫抑制剂,JAK抑制剂,抗整合素生物制剂,抗IL12/23R生物制剂和维生素。

[0042] 在一些实施方式中,药物组合物还包含蛋白酶抑制剂。在其他实施方式中,蛋白酶抑制剂抑制粪便存在和/或血液存在下治疗性蛋白质的降解。

[0043] 如前所述,这些新型蛋白质治疗剂能够促进对象的上皮屏障功能和完整性。在一些实施方式中,上皮屏障功能是肠上皮屏障功能。另外,蛋白质的治疗作用包括抑制IBD个体中的炎症免疫应答。因此,本公开内容提供了利用所教导的治疗性蛋白质来治疗许多胃肠道炎症性病状和涉及受损胃肠道上皮屏障完整性的疾病状态的方法的详细指导。

[0044] 在一些实施方式中,提供了一种用于治疗其患者的炎症肠疾病或病症的方法,其包括:向所述患者给予药物组合物,所述药物组合物包括:i) 包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19具有至少70%,71%,72%,73%,74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%或99.9%或100%的序列相同性的氨基酸序列的治疗性蛋白质;和ii) 药学上可接受的运载体。在该方法的其他实施方式中,该蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19相同的氨基酸序列。在其他实施方式中,该蛋白质与SEQ ID NO:3不相同,或者是SEQ ID NO:3的非天然存在的变体。

[0045] 在一些实施方式中,已经诊断出患者患有肠道炎症。在其他实施方式中,肠道炎症在小肠和/或大肠中。在其他实施方式中,肠道炎症在直肠中。在其他实施方式中,已经诊断出患者患有囊袋炎。

[0046] 在一些实施方式中,已经诊断出患者患有肠溃疡。在其他实施方式中,已经诊断出患者患有肠内皮引流和/或直肠阴道瘘。

[0047] 在一些实施方式中,已经诊断患者患有克罗恩氏病(CD)。在其他实施方式中,CD是轻度活性CD。在其他实施方式中,CD是中等至严重活性CD。在其他实施方式中,已经诊断出患者患有小儿CD。

[0048] 在一些实施方式中,已经诊断出患者患有短肠综合征或肠易激综合症。

[0049] 在一些实施方式中,已经诊断出患者患有粘膜炎。在其他实施方式中,粘膜炎是口腔粘膜炎。在其他实施方式中,粘膜炎是化学疗法诱导的粘膜炎,放射治疗诱导的粘膜炎,化学疗法诱导的口腔粘膜炎或放射治疗诱导的口腔粘膜炎。在其他实施方式中,粘膜炎是胃肠道粘膜炎。在其他实施方式中,胃肠道粘膜炎是小肠,大肠或直肠的粘膜炎。

[0050] 在一些实施方式中,对诊断为患有CD的患者给药导致减少的肠内皮引流和/或直肠阴道瘘的数量。在其他实施方式中,该给药在患有瘘管病的成年患者中维持瘘管闭合。



[0051] 在其他实施方式中,已经将患者诊断为溃疡性结肠炎(UC)。在其他实施方式中,UC是轻度活性UC。在其他实施方式中,UC是中等至严重活性的UC。在其他实施方式中,已经将患者诊断为小儿UC。

[0052] 在一些实施方式中,患者处于从IBD的临床缓解中。在其他实施方式中,患者处于从UC,小儿UC,CD或小儿CD的临床缓解中。

[0053] 在一些实施方式中,患者患有克罗恩氏病或溃疡性结肠炎以外的炎性肠病或病症。在其他实施方式中,患者具有与炎性肠病有关的至少一种症状。

[0054] 在一些实施方式中,给药减轻了患者中的胃肠道炎症和/或减轻了与炎性肠病有关的肠粘膜炎症。在其他实施方式中,给药改善了患者的肠上皮细胞屏障功能或完整性。

[0055] 在一些实施方式中,在给药后患者经历与炎性肠疾病或病症有关的至少一种症状的减轻。在其他实施方式中,至少一种症状选自腹痛,便血,便脓,发烧,体重减轻,频繁腹泻,疲劳,食欲不振,恶心,抽筋,贫血,里急后重和直肠出血。在其他实施方式中,在给药后患者腹泻频率降低,粪便中血液减少和/或直肠出血减少。

[0056] 在一些实施方式中,患者对常规疗法的反应不足。在其他实施方式中,常规疗法是用氨基水杨酸酯,皮质类固醇,硫嘌呤,甲氨蝶呤,JAK抑制剂,鞘氨醇1-磷酸(S1P)受体抑制剂,抗整合素生物制剂,抗IL12/23R或抗-IL23/p10生物制剂,和/或抗肿瘤坏死因子剂或生物制剂进行治疗。

[0057] 在一些实施方式中,所述给药调节(即增加或减少)患者血液,血浆,血清,粘膜或组织中的细胞因子水平。

[0058] 在一些实施方式中,给药抑制患者中至少一种促炎细胞因子的水平。在其他实施方式中,至少一种促炎细胞因子选自TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-25, IL-33, IL-8, MCP-1, MIP-3 $\alpha$ , CXCL1和IL-23。

[0059] 在一些实施方式中,给药增加了患者的血液,血浆,血清,粘膜或组织中的至少一种抗炎细胞因子的水平。在其他实施方式中,至少一种抗炎细胞因子选自IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ 。

[0060] 在一些实施方式中,给药降低了患者的血液,血浆,血清,粘膜或组织中的至少一种抗炎细胞因子的水平。在其他实施方式中,至少一种抗炎细胞因子选自IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ 。

[0061] 在一些实施方式中,给药增加了患者肠腔中粘蛋白的量。

[0062] 在一些实施方式中,给药增加了患者肠上皮细胞伤口的愈合。

[0063] 在一些实施方式中,给药预防或减少患者的结肠缩短。

[0064] 在一些实施方式中,给药包括将药物组合物直肠,静脉内,肠胃外,口服,局部,皮肤,透皮或皮下给予给患者。在其他实施方式中,给药是给予胃肠腔。

[0065] 在一些实施方式中,还向患者给予至少一种第二治疗剂。在其他实施方式中,至少一种第二治疗剂选自止泻药,抗炎剂,抗体,抗生素或免疫抑制剂。在其他实施方式中,至少一种第二治疗剂是氨基水杨酸酯,类固醇或皮质类固醇。在其他实施方式中,至少一种第二治疗剂选自阿达木单抗,聚乙二醇,戈利木单抗,英夫利昔单抗,维多珠单抗,乌斯他单抗,托法替尼和塞妥珠单抗或PEG化塞妥珠单抗。

[0066] 在一些方面,提供了表达载体,其包含编码蛋白质的外源多核苷酸,所述蛋白质包

含与SEQ ID NO:19具有至少70%,71%,72%,73%,74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0067] 在一些实施方式中,多核苷酸编码蛋白质,该蛋白质包含与SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19具有至少99%或100%相同性的氨基酸序列。在其他实施方式中,多核苷酸编码包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的蛋白质。在其他实施方式中,多核苷酸编码包含与SEQ ID NO:3不相同的氨基酸序列的蛋白质。

[0068] 在一些方面,提供了表达系统,其包括宿主细胞和包含前述外源性多核苷酸的表达载体。

[0069] 在一些实施方式中,宿主细胞是原核或真核的。在其他实施方式中,宿主细胞是哺乳动物细胞,酵母细胞或细菌细胞。在其他实施方式中,细菌细胞是大肠杆菌。在其他实施方式中,哺乳动物细胞是CHO细胞。

[0070] 在一些方面,提供了产生蛋白质的方法。

[0071] 在一些实施方式中,用于产生蛋白质的方法包括用前述表达载体转化或转染前述宿主细胞,在足以表达由前述外源性多核苷酸编码的前述蛋白质的条件下培养转化或转染的宿主细胞。在其他实施方式中,该方法还包括从转化或转染的宿主细胞和培养基中纯化蛋白质。

[0072] 在一些实施方式中,提供了治疗疾病,例如肠道上皮屏障功能相关疾病的方法,其利用了本申请和序列表中公开的任何序列。

## 附图说明

[0073] 图1A和图1B显示了如实施例2中所述,在炎症诱导的破坏后通过SG-11对于上皮屏障的完整性的恢复。

[0074] 图2A显示了如实施例3中所述,SG-11给予对由热灭活的大肠杆菌(HK E.coli)诱导的TNF- $\alpha$ 生成的作用。

[0075] 图2B显示如实施例3所述,SG-11给予对由HK大肠杆菌诱导的IL-23生成的作用。

[0076] 图3显示如实施例4所述,SG-11给予对由HK大肠杆菌诱导的IL-10生成的作用。

[0077] 图4显示了如实施例5所述,SG-11给予对HK大肠杆菌刺激后粘蛋白表达的作用。

[0078] 图5显示了如实施例6中所述,SG-11给予对上皮细胞伤口愈合的作用。

[0079] 图6显示了如实施例7中所述,SG-11给予对炎性肠病的DSS模型中的上皮中心屏障功能读数的作用。

[0080] 图7显示了如实施例7所述,SG-11给予对炎症性肠病的DSS模型中对屏障功能受损响应的炎性读数的作用。

[0081] 图8显示了如实施例7中所述,SG-11给予对炎性肠病的DSS模型中体重的作用。

[0082] 图9显示了如实施例7中所述,SG-11给予对炎性肠病的DSS模型中的总体病理的作用。

[0083] 图10A,10B和10C显示了如实施例7所述,来自炎性肠病的DSS模型的近端(图10A),远端(图10B)以及近端和远端(图10C)组织的组织病理学分析结果。

[0084] 图11A显示了如实施例7所述,在炎症肠病的DSS模型中SG-11给予对结肠长度的作用。

[0085] 图11B显示了如实施例7中所述,在炎症肠病的DSS模型中,SG-11给予对结肠重量与长度之比的作用。

[0086] 图12显示如实施例8中所述,在SG-11治疗炎症肠病的DSS模型后,上皮屏障的完整性。

[0087] 图13显示如实施例8中所述,炎症肠病的DSS模型中屏障功能的炎症中心读数。

[0088] 图14显示了如实施例8中所述,在炎症肠病的DSS模型中预防体重减轻。

[0089] 图15A显示了如实施例8所述,在炎症肠病的DSS模型中SG-11给予对结肠长度的作用。

[0090] 图15B显示了如实施例8中所述,在炎症肠病的DSS模型中,SG-11给予对结肠重量与长度之比的作用。

[0091] 图16A,16B和16C显示了如实施例8所述,来自炎症肠病的DSS模型的近端(图16A),远端(图16B)以及近端和远端(图16C)组织的组织病理学分析结果。

[0092] 图17显示了SG-11 (SEQ ID NO:7) 与来自罗斯氏菌 (*Roseburia*) 物种的相似蛋白质序列的多序列比对分析的结果。

[0093] 图18显示来自图18A,图18B,图18C,图18D,图18E,图18F,图18G,图18H和图18I的条件对SG-11稳定性的影响。有关与图18A至图18I相关的条件,请参见实施例14。

[0094] 图19显示来自图19A,图19B,图19C,图19D,图19E,图19F,图19G,图19H和图19I的条件对SG-11V5稳定性的影响。有关与图19A至图19I相关的条件,请参见实施例14。

[0095] 图20显示了如实施例15中所述,在炎症诱导的破坏之后,通过SG-11和SG-11变体对于上皮屏障完整性的恢复。

[0096] 图21A和图21B显示了如实施例16中所述,用SG-11和SG-11变体治疗炎症肠病的DSS模型后的上皮屏障完整性。

[0097] 图22A和图22B显示如实施例16中所述,炎症肠病的DSS模型中屏障功能的炎症中心读数。

[0098] 图23A和图23B显示了如实施例16所述,在炎症肠病的DSS模型中用SG-11或SG-11变体治疗对体重减轻的作用。

[0099] 图24显示了如实施例16所述,在炎症肠病的DSS模型中给予SG-11或SG-11变体对总体病理的作用。

[0100] 图25A和图25B显示了如实施例16所述,在炎症肠病的DSS模型中用SG-11或SG-11变体治疗对结肠长度的作用。

[0101] 图26A和图26B显示了如实施例16所述,在炎症肠病的DSS模型中用SG-11或SG-11变体治疗对结肠重量/长度之比的作用。

[0102] 图27A显示了SG-11 (SEQ ID NO:7) 与SG-11变体 (SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19) 的多序列比对分析的结果,并且图27B显示了基于多序列比对分析的百分比相同性矩阵的结果。由EMBL-EBI提供的Clustal Omega程序用于本文所述的多重比对分析。

[0103] 发明详述

[0104] 本公开提供了新型蛋白质治疗剂,其可用于治疗患有与胃肠道疾病相关的症状的对象。例如,这些蛋白质可以促进或增强上皮屏障功能和/或完整性。该蛋白质还可以抑制IBD个体的炎性免疫反应。本文提供的蛋白质治疗剂可用于治疗与胃肠道上皮细胞屏障功能降低或肠的完整性和炎症相关的多种疾病。

[0105] 在本公开中,还提供了具有与原始蛋白质相当或优于原始蛋白质的治疗活性的蛋白质变体,但是所述蛋白质变体在蛋白质治疗产品的制造和加工以及在长期储存条件下具有增强的稳定性。

[0106] 定义

[0107] 除非另有定义,本申请所用的科技术语与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同。通常,本文所述的化学,分子生物学,细胞和癌症生物学,免疫学,微生物学,药理学以及蛋白质和核酸化学中使用的命名和技术是本领域公知且普遍使用的。因此,虽然以下术语据信是本领域普通技术人员所熟知的,仍给予以下定义以助理解在此公开的主题。

[0108] 本文全文中,“包含”一词或其衍变形式如“包括”或“含有”等应理解为表示包括明示的组分或组分组,但不排除任何其他组分或组分组。

[0109] 术语“一个”或“一种”表示一个/种或多个/种实体,即包括复数含意。因此,“一个”或“一种”、“一或多个/种”和“至少一个/种”可以互换使用。此外,用“一个”或“一种”指示“一个/种元素”时不排除存在多于一个/种元素的情形,除非明确要求仅有或仅为一个/种元素。

[0110] 术语“包括”用于表示“包括但不限于”。“包括”和“包括但不限于”可互换使用。

[0111] 如本文所用,术语“胃肠”或“胃肠道”,“消化道”和“肠”可互换使用,以指代从口腔延伸至肛门并包括口腔,食道,胃,小肠,大肠,直肠和肛门的一系列中空器官。术语“胃肠”或“胃肠道”,“消化道”和“肠”并不总是旨在限于消化道的特定部分。

[0112] 如本文所用,术语“SG-11”是指包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的蛋白质,还指具有与本文所述相同或相似的功能活性的其变体。因此,SG-11在本文中可指包含SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9或由其组成的蛋白质,或其变体或片段。SG-11变体的示例包括但不限于SEQ ID NO:11(SG-11V1),SEQ ID NO:13(SG-11V2),SEQ ID NO:15(SG-11V3),SEQ ID NO:17(SG-11V4)和SEQ ID NO:19(SG-11V5)。在美国临时专利申请(2017年4月7日提交的62/482,963;2017年12月19日提交的62/607,706;2017年12月28日提交的62/611,334,本说明书要求其优先权并通过引用全文纳入本文)中,术语“实验蛋白1”及其变体被使用,并且与本文所用的SG-11或其变体同义。

[0113] “信号序列”(也称为“前序”,“信号肽”,“前导序列”或“前导肽”)是指位于新生蛋白质N端的氨基酸序列,并且其可促进从细胞中分泌出蛋白质。所得的细胞外蛋白成熟形式缺乏信号序列,该信号序列在分泌过程中被切除。

[0114] 本文所用术语“序列相同性”,“相同性百分比”,“同源性百分比”,或者,例如,包含“与……50%相同的序列”是指序列在比较窗中在核苷酸或氨基酸的基础上相同的程度。因此,序列相同性百分比的计算方法可为在比较窗中比较两条最优比对的序列,确定两条序列上出现的相同酸碱基(例如A、T、C、G、I)或氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位点数目以得出

匹配位点的数目,将匹配位点的数目除以比较窗中总位点数目(即窗口大小),并将结果乘以100以得出序列相同性百分比。

[0115] 序列之间的序列相似性或序列相同性(这些术语在本文中可互换使用)的计算可以如下进行。为了确定两条氨基酸序列或两条核酸序列的百分比相同性,可以为了最佳比较目的而对序列进行比对(例如,可以在第一和第二氨基酸或核酸序列的之一或两条中引入缺口以达到最佳对齐,并且出于比较目的可以不考虑非同源序列)。在某些实施方式中,为了比较目的而比对的参考序列的长度为参考序列长度的至少30%,优选至少40%,更优选至少50%,60%,甚至更优选至少70%,80%,90%,或100%。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中某位置上占据的氨基酸残基或核苷酸与第二序列中相应位置上的相同时,则这些分子在该位置是相同的。考虑到用于两个序列的最佳比对而需要引入的缺口数和每个缺口的长度,两条序列之间的百分比相同性与序列共有相同位置的数目相关。

[0116] 在至少两个核酸或多肽的上下文中,短语“基本上相似”和“基本上相同”通常是指多核苷酸或多肽包含与参考多核苷酸或多肽相比具有至少约70%,75%,80%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,99.5%,99.6%,99.7%或甚至99.8%的序列相同性的序列。在一些实施方式中,基本相同的多肽仅由于一个或多个保守氨基酸取代而不同。在一些实施方式中,基本相同的多肽是免疫交叉反应性的。在一些实施方式中,基本相同的核酸分子在严谨条件下(例如,在中等至高严谨性范围内)彼此杂交。

[0117] 如本领域所熟知,如本文所用,术语“核苷酸改变”是指例如核苷酸取代,缺失和/或插入。例如,突变包括产生沉默取代,添加或缺失的变化,其不改变编码蛋白质的性质或活性或蛋白质的制备方式。

[0118] 相关(和衍生)蛋白质包括“变体”蛋白质。变体蛋白质与另一种(即,亲本)蛋白质和/或彼此可相差少量的氨基酸残基。与衍生变体的亲本蛋白质相比,该变体可包括一个或多个氨基酸突变(例如,氨基酸缺失,插入或取代)。

[0119] “保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列。对于特定的核酸序列,保守修饰的变体是指编码相同氨基酸序列或具有一个或多个“保守取代”的氨基酸序列的核酸。保守取代的一个实例是下组之一的氨基酸被相同组的另一个氨基酸交换(参见美国专利号5,767,063;Kyte和Doolittle(1982)J.Mol.Biol.157:105-132)。(1)疏水性:正亮氨酸,Ile,Val,Leu,Phe,Cys,Met;(2)中性亲水性:Cys,Ser,Thr;(3)酸性:Asp,Glu;(4)碱性:Asn,Gln,His,Lys,Arg;(5)影响链取向的残基:Gly,Pro;(6)芳族:Trp,Tyr,Phe;和(7)小氨基酸:Gly,Ala,Ser。因此,相对于氨基酸的术语“保守取代”是指一个或多个氨基酸被另一个化学相似的残基取代,其中所述取代通常不影响蛋白质的功能特性。示例包括具有类似特征的氨基酸残基的取代,例如小氨基酸,酸性氨基酸,极性氨基酸,碱性氨基酸,疏水性氨基酸和芳族氨基酸。在一些实施方式中,本公开内容提供了相对于SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:17中鉴定的氨基酸序列具有至少一个非天然存在的保守氨基酸取代的蛋白质。保守氨基酸取代的一些常见示例性实例如下。

[0120] 术语“氨基酸”或“任何氨基酸”是指任何和所有氨基酸,包括天然存在的氨基酸(例如, $\alpha$ -氨基酸),非天然氨基酸,修饰的氨基酸以及非自然或非天然氨基酸。它包括D-和

L-氨基酸。天然氨基酸包括在自然界中发现的那些氨基酸,例如结合成肽链以形成大量蛋白质的结构模块的23种氨基酸。这些主要是L立体异构体,尽管例如在细菌包膜和一些抗生素中存在一些D-氨基酸。上表中列出了20种“标准”天然氨基酸。“非标准”天然氨基酸是吡咯赖氨酸(存在于产甲烷生物体和其他真核生物中),硒代半胱氨酸(存在于许多非真核生物和大多数真核生物中)和N-甲酰甲硫氨酸(在细菌,线粒体和叶绿体中由起始密码子AUG编码)。“非自然”或“非天然”氨基酸是非天然发生或化学合成的蛋白质氨基酸(即,非天然编码或在遗传密码中未发现的氨基酸)。已知有140多种非天然氨基酸,并且可能有成千上万种以上的组合。“修饰的”氨基酸包括已经被化学修饰以包括该氨基酸上非天然存在的一个或多个基团或化学部分的氨基酸(例如,天然氨基酸)。

[0121] 如本文所用,“合成核苷酸序列”或“合成多核苷酸序列”是未知天然存在或非天然存在的核苷酸序列。通常,当与任何其他天然存在的核苷酸序列相比时,这样的合成核苷酸序列将包含至少一个核苷酸差异。如本文所用,“合成氨基酸序列”或“合成肽序列”或“合成多肽序列”或“合成蛋白质序列”是自然界中未知或天然不存在的氨基酸序列。通常,当与任何其他天然存在的氨基酸序列相比时,这样的合成氨基酸序列将包含至少一个氨基酸差异。

[0122] 如本文所用,“合成蛋白质”或“合成治疗性蛋白质”是指包含氨基酸序列的蛋白质,该氨基酸序列包含相对于天然存在的氨基酸序列而言被不同氨基酸取代的一个或多个氨基酸。即,“合成蛋白质”包含氨基酸序列,该氨基酸序列已被改变以相对于天然存在的氨基酸序列在给定氨基酸位置处包含至少一个非天然存在的取代修饰。

[0123] 如本文所用,相对于核酸序列或氨基酸序列的%序列相同性或%序列同源性,术语“约”是指以0.1%的增量达到并包括 $\pm 1.0\%$ 。例如,“约90%”序列相同性包括89.0%,89.1%,89.2%,89.3%,89.4%,89.5%,89.6%,89.7%,89.8%,89.9%,90%,90.1%,90.2%,90.3%,90.4%,90.5%,90.6%,90.7%,90.8%,90.9%和91%。如果未在%序列相同性的上下文中使用,则“约”表示 $\pm 1\%$ , $2\%$ , $3\%$ , $4\%$ , $5\%$ , $6\%$ , $7\%$ , $8\%$ , $9\%$ 或 $10\%$ ,具体取决于有关值的上下文。

[0124] 在大多数情况下,此处使用的天然和非天然氨基酸残基的名称均遵循IUPAC有机化学命名法委员会和IUPAC-IUB生化命名委员会建议的命名约定,如“ $\alpha$ -氨基酸命名(建议,1974)(Nomenclature of  $\alpha$ -Amino Acids)(Recommendations,1974)”Biochemistry,14(2),(1975)中所示。在本说明书和所附权利要求书中使用的氨基酸和氨酰基残基的名称和缩写与那些建议不同的程度上,将使读者理解它们。

[0125] 在整个说明书中,除非用天然氨基酸的全名(例如丙氨酸,精氨酸等)来表示,否则用常规的三字母或单字母缩写来表示(例如丙氨酸的Ala或A,精氨酸的Arg或R等等)。除非另有说明,否则氨基酸的三字母和单字母的缩写是指氨基酸的L异构形式。如本文所用,术语“L-氨基酸”是指肽的“L”异构体形式,相反,术语“D-氨基酸”是指肽的“D”异构体形式(例如,Dasp,(D)Asp或D-Asp;Dphe,(D)Phe或D-Phe)。D异构体形式的氨基酸残基可以取代任何L-氨基酸残基,只要该肽保留了所需的功能即可。当使用单字母缩写表示时,D-氨基酸通常以小写形式表示。

[0126] 在不太常见或非天然氨基酸的情况下,除非以其全名(例如,肌氨酸,鸟氨酸等)提及,否则其残基通常采用三或四字符代码,包括Sar或Sarc(肌氨酸,即N-甲基甘氨酸),Aib

( $\alpha$ -氨基异丁酸), Dab (2,4-二氨基丁酸), Dapa (2,3-二氨基丙酸),  $\gamma$ -Glu ( $\gamma$ -谷氨酸), Gaba ( $\gamma$ -氨基丁酸),  $\beta$ -Pro (吡咯烷-3-羧酸) 和 8Ado (8-氨基-3,6-二氧杂辛酸), Abu (2-氨基丁酸),  $\beta$ hPro ( $\beta$ -高脯氨酸),  $\beta$ hPhe ( $\beta$ -高苯丙氨酸) 和 Bip ( $\beta,\beta$ -二苯丙氨酸) 和 Ida (亚氨基二乙酸)。

[0127] 本文公开的序列在序列是在氨基末端(N-末端)掺有“Hy-”部分,在羧基末端(C-末端)掺有“-OH”部分或“-NH<sub>2</sub>”部分的序列。在这种情况下,除非另有说明,否则相关序列N末端的“Hy-”部分表示氢原子,对应于N末端存在游离的伯氨基或仲氨基,而序列C末端的“-OH”或“-NH<sub>2</sub>”部分表示羟基或氨基,对应于C末端存在一个酰胺基(CONH<sub>2</sub>)。在本公开的每个序列中,C末端“-OH”部分可以取代C末端“-NH<sub>2</sub>”部分,反之亦然。

[0128] 如本文所用,术语“Ac”是指通过多肽的C-或N-末端的酰化进行的乙酰基保护。在本文所示的某些肽中,位于该肽的C-末端的NH<sub>2</sub>表示氨基。如本文所用,术语“羧基”是指-CO<sub>2</sub>H。

[0129] 本文所用术语“药学上可接受的盐”代表本发明主题的肽、蛋白质或化合物的盐或两性离子形式,它们是水溶性或油溶性的或可分散的;它们适用于治疗疾病,无过度毒性、刺激和过敏反应;它们与合理的利益/风险比相应;并且它们对其预期用途有效。这些盐可以在化合物的最终分离和纯化过程中制备,也可以通过使氨基与合适的酸反应而单独制备。代表性的酸加成盐包括乙酸盐,己二酸盐,藻酸盐,柠檬酸盐,天冬氨酸盐,苯甲酸盐,苯磺酸盐,硫酸氢盐,丁酸盐,樟脑酸盐,樟脑磺酸盐,二葡萄糖酸盐,甘油磷酸盐,半硫酸盐,庚酸盐,己酸盐,甲酸盐,富马酸盐,盐酸盐,氢溴酸盐,氢碘酸盐,2-羟基乙磺酸盐(羟乙磺酸盐),乳酸盐,马来酸盐,间苯磺酸盐,甲磺酸盐,萘磺酸盐,烟酸盐,2-萘磺酸盐,草酸盐,巴莫酸盐,果胶酸盐,过硫酸盐,3-苯基丙酸盐,苦味酸盐,新戊酸盐,丙酸盐,丁二酸盐,酒石酸盐,三氯乙酸盐,三氟乙酸盐,磷酸盐,谷氨酸盐,碳酸氢盐,对甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。此外,本公开的化合物中的氨基可以用以下季铵化:甲基,乙基,丙基和丁基氯化物,溴化物和碘化物;二甲基,二乙基,二丁基和二甲基硫酸盐;癸基,月桂基,肉豆蔻基和苜基氯化物,溴化物和碘化物;和苜基和苜基乙基溴化物。可用于形成治疗上可接受的加成盐的酸的实例包括无机酸(如盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸)和有机酸(如草酸、马来酸、琥珀酸和柠檬酸)。药学上可接受的盐可以合适地是选自例如酸加成盐和碱性盐中的盐。酸加成盐的示例包括盐酸盐,柠檬酸盐和乙酸盐。碱性盐的示例包括其中阳离子选自碱金属阳离子如钠或钾离子,碱土金属阳离子如钙或镁离子以及取代的铵离子的盐。药学上可接受的盐的其他实例描述于“《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)”,第17版,Alfonso R.Gennaro(编),美国宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司,1985年(及其最新版本),在“药物技术百科全书(Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology)”,第3版,James Swarbrick(编),Informa Healthcare USA(公司),纽约,美国,2007年,和J.Pharm.Sci.66:2(1977)中。另外,关于合适的盐的综述,参见《药用盐手册:性质、选择及用途》(Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use),Stahl和Wermuth编著(Wiley-VCH,2002)。

[0130] 如本文所用,术语核酸或多肽的“至少一部分”或“片段”是指具有此类序列的最小尺寸特征的部分,或全长分子的任何较大片段,多达并包括全长分子。

[0131] 如本文所用,术语“引物”是指能够与靶多核苷酸退火的寡核苷酸。

[0132] 如本文所用,短语“重组构建体”,“表达构建体”,“嵌合构建体”,“构建体”和“重组DNA构建体”在本文中可互换使用,并且是普通技术人员所熟知的。

[0133] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指其中可以引入用于产生多肽的重组表达载体以表达该多肽的细胞或细胞系。

[0134] 本文所用的术语“分离的”,“纯化的”,“分开的”和“回收的”是指从至少一种与其天然相关的组分中除去材料(例如蛋白质,核酸或细胞),例如,其浓度为所包含样品的至少为90重量%,或至少95重量%,或至少98重量%。例如,这些术语可以指基本上或基本不含以其天然状态发现的通常伴随其的组分的材料,例如完整的生物系统。

[0135] “对象”、“患者”和“个体”可互换使用,都指人或非人动物。这些术语包括哺乳动物,例如人、非人灵长类动物、畜牧动物(如牛、猪),动物伴侣(如狗、猫)和啮齿动物(如小鼠和大鼠)。某些实施方式中,这些术语指人患者。在示例性实施方式中,该术语是指患有胃肠道炎性疾病的人类患者。

[0136] 如本文所用,“改善”应广义地包括与对照相比,或与所涉及的特征相关的已知平均数量相比,对所确定的疾病状态特征的改善,本领域技术人员认为所述特征通常与所涉及的疾病相关或指示该疾病。例如,与未治疗的人的上皮屏障完整性相比,通过比较用本发明的蛋白质治疗的人的上皮屏障完整性可以证明与本公开的蛋白质的应用相关的“改善的”上皮屏障功能。或者,如本领域技术人员已知的科学或医学出版物中所代表的,可以将用本公开内容的蛋白质治疗的人的上皮屏障完整性与人的平均上皮屏障完整性进行比较。在本公开中,“改善”并不一定要求数据在统计上是有意义的(即, $p < 0.05$ );相反,任何表明一个值(例如平均治疗值)与另一个值(例如平均对照值)不同的可量化差异都可以提升到“改善”水平。

[0137] 如本文所使用的,“抑制和阻遏”和类似术语不应被解释为要求完全抑制或阻遏,尽管这可能在某些实施方式中是期望的。因此,“抑制的免疫应答”或“炎性细胞因子的抑制”不需要绝对抑制。

[0138] 因此,如本文中所使用的,术语“增加”,“抑制”或“减少”或其语法等同物表示相对于参考(例如,基线)测量值,例如在可比较条件下(例如,在开始本文所述治疗之前,在同一个体中,或在没有本文所述治疗的对照个体(或多个对照个体)中的测量值)的值。在一些实施方式中,合适的对照是基线测量值,例如在开始本文描述的治疗之前在同一个体中的测量值,或在不存在本文描述的治疗的情况下在对照个体(或多个对照个体)中的测量值。

[0139] 如本文所用,术语“IBD”或“炎性肠病”是指个体具有慢性或复发性免疫应答和胃肠(GI)道炎症情况中的病症。两种最常见的炎性肠病是溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩氏病(CD)。

[0140] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指以可适用于任何医疗的合理收益/风险比赋予被治疗的对象治疗效果的治疗剂(例如,本发明的肽,多肽或蛋白质)的量。这种治疗效果可以是客观的(即通过测试或标记物可测量的)或主观的(即治疗对象表示出迹象或感觉到效果)。在一些实施方式中,“治疗有效量”是指有效治疗,缓解或预防(例如延迟发作)相关疾病或病症和/或表现出可检测的治疗或预防作用,诸如通过缓解与疾病有关的症状,预防或延迟疾病发作,和/或还减轻疾病症状的严重性或频率而产生的效果的治疗剂或组合物的量。治疗有效量通常以可包括多个单位剂量的给药方案给予。对于任何具体治疗剂,治疗



有效量(和/或有效给药方案内的合适单位剂量)可能变化,例如,根据给药途径、与其他治疗剂的组合。或者或另外地,对于任何特定患者的特定治疗有效量(和/或单位剂量)可以取决于多种因素,包括所治疗疾病的特定形式;病症或前病症的严重性;使用的特定治疗剂的活性;使用的具体组成;患者的年龄,体重,总体健康状况,性别和饮食;所用特定治疗剂的给予时间,给予途径和/或排泄或代谢率;治疗的持续时间;以及医学领域众所周知的类似因素。本公开内容利用治疗有效量的新型蛋白质及其组合物来治疗多种疾病,例如:胃肠道炎症性疾病或涉及胃肠道上皮屏障功能障碍的疾病。在一些实施方式中,所给予的蛋白质或包含该蛋白质的组合物的治疗有效量将减少与IBD有关的炎症或修复胃肠道上皮屏障完整性和/或功能。

[0141] 如本文所用,术语“治疗”(也称为“处理”)是指根据达到期望的效果的治疗方案进行的治疗剂(例如,本发明的肽,多肽或蛋白质)的任何给药,使得其部分或完全缓解,减轻,减弱,抑制,延迟特定疾病,病症和/或病状(例如慢性或反复出现的胃肠道免疫反应和炎症)的一种或多种症状或特征的发作,减轻其严重性和/或降低其发生率;在一些实施方式中,根据治疗方案的治疗剂的给予与期望效果的实现相关。这种治疗可以对于没有显示出相关疾病、病症和/或紊乱的迹象的对象和/或仅显示该疾病、病症和/或紊乱的早期迹象的对象。或者或另外,这种治疗可以对于显示出相关疾病、病症和/或紊乱的已确立迹象的对象。在一些实施方式中,可以对已经被诊断患有相关疾病,病症和/或病状的对象进行治疗。在一些实施方式中,治疗可以针对已知具有一种或多种易感性因子的对象,这些因子与相关疾病,病症和/或病状发展的风险增加在统计学上相关。

[0142] “药物(的)”意味着组合物,试剂,方法等能够具有药物作用,并且还能够将该组合物安全地给予于对象。“药物作用”不限于并可表示该组合物,试剂或方法能够在至少一个个体例如哺乳动物对象,例如人中,在至少5%的对象群体中,至少10%,至少20%,至少30%,至少50%对象中刺激期望的生物化学,遗传,细胞,生理或临床作用等。“药学上可接受的”指被联邦或州政府管理机构批准,或美国药典或其它通常接受的药典所列的动物使用安全,更具体是人使用安全的。“药学上可接受的载剂”或“药学上可接受的赋形剂”是指与本文所述的蛋白质一起给予的稀释剂,佐剂,赋形剂或运载体。

[0143] “预防”是指降低罹患疾病或病症的风险(即,导致该疾病的临床症状中的至少一种不在可能暴露于或易患该疾病但是尚未经历或未显示出该疾病的症状的对象中发展,或导致症状发展的严重程度比没有治疗时轻)。“预防”可指延迟疾病或病症的发作。

[0144] 本文教导的治疗性药物组合物可包含一种或多种天然产物。然而,在某些实施方式中,治疗性药物组合物本身不是天然存在的。此外,在某些实施方式中,与自然界中可能存在的任何单独的天然存在的对应物或组合物组分相比,治疗性药物组合物具有明显不同的特性。即,在某些实施方式中,本文教导的药物组合物(其包含治疗有效量的纯化的蛋白质)具有至少一种结构和/或功能性质,与可能天然存在的组合物的任何单个组分相比,该结构和/或功能性质整体赋予组合物明显不同的特征。法院已确定,包含与任何可能天然存在的单个组分相比具有明显不同的特性的天然产物的组合物是法定主题。因此,所教导的治疗性药物组合物总体上具有明显不同的特征。这些特征在本文教导的数据和实施例中说明。

[0145] 本文阐述了本公开的细节。虽然在本发明的实施或测试中可以采用类似于或等同

于本文所述的那些方法和材料,但下文描述了示例性方法和材料。通过说明书和权利要求书,不难了解本发明的其它特征、目的和优点。

[0146] 从微生物组衍生的治疗性蛋白质-公开概述

[0147] 多种疾病和紊乱与胃肠道上皮细胞屏障功能或完整性降低有关。这些疾病和病症是多方面的,并且以多种方式在诊断上存在。一种这样的疾病是炎性肠病(IBD),其发病率和流行率随着时间的推移并在世界各地出现增加,表明它已成为一种全球性疾病。(Merchinsky等,Virology 142:46-54,2012)。IBD是用于描述具有慢性或复发性胃肠(GI)道免疫反应和炎症的病症的统称。两种最常见的炎性肠病是溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩氏病(CD)。两者均以胃肠道免疫系统的异常反应为标志。通常,免疫细胞可以保护人体免受感染。然而,在患有IBD的人中,这种免疫系统会将肠道中的食物,细菌和其他物质误认为是病原体,并且炎症反应会进入肠道内壁,造成慢性炎症。发生这种情况时,患者会出现IBD症状。

[0148] IBD涉及所有消化道或部分消化道的慢性炎症。UC和CD通常都涉及例如严重的腹泻,腹痛,疲劳和体重减轻。IBD和相关疾病可以使人衰弱,并且有时导致危及生命的并发症。

[0149] 关于肠屏障完整性,肠上皮完整性的丧失在IBD中起关键的致病作用。Maloy, Kevin J.; Powrie, Fiona, “肠道动态平衡及其在炎性肠病中的破坏(Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease),”(2011) Nature. 474 (7351): 298-306。据推测,肠道菌群的有害变化会引起不适当或不受控制的免疫反应,从而导致肠上皮细胞受损。在此关键性肠上皮屏障中的破坏允许微生物群进一步浸润,进而引起进一步的免疫反应。因此,IBD是一种多因素疾病,部分由对肠道微生物群的过度免疫反应所驱动,这可能导致上皮屏障功能的缺陷。

[0150] IBD患者的微生物组概况分析已显示出不同的概况,例如变形杆菌增加,包括粘附侵袭性大肠杆菌,通常以潜在有益微生物如罗斯氏菌种为代价(Machiels等,2014,Cut,63: 1275-1283;Patterson等,2017,Front Immunol,8:1166;Shawki和McCole,2017,Cell Mol Gastroenterol Hepatol,3:41-50)。此外,人罗斯氏菌(*Roseburia hominis*)减少与溃疡性结肠炎患者中的营养不良有关。已发现受IBD影响的个体共生细菌的生物多样性减少了30%至50%,例如厚壁菌(*Firmicutes*) (即毛螺菌(*Lachnospiraceae*))和拟杆菌(*Bacteroidetes*)减少。肠道菌群在炎性肠病中的作用的进一步证据是,与未受影响的个体相比,IBD感染的个体在诊断前的2-5年内更有可能被开抗生素处方。参见Aroniadis OC, Brandt LJ, “粪便微生物群移植:过去,现在和未来(Fecal microbiota transplantation: past, present and future)”, (2013) Curr. Opin. Gastroenterol. 29(1) (2013): 79-84。

[0151] 在各种临床和临床前研究中,已证明保护性细菌群落,益生菌和细菌衍生的代谢产物可改善疾病。例如,尽管粪便微生物转移(FMT)仍然存在挑战,但FMT实验已在IBD患者中取得了一些成功(Moayyedi等,2015,Gastroenterology,149:102-109e106;Qazi等,2017,Gut Microbes,8:574-588;Narula等,2017,Inflamm Bowel Dis,23:1702-1709)。在其他研究中,使用益生菌(包括VSL#3,乳酸杆菌种(*Lactobacillus* spp.)和双歧杆菌种(*Bifidobacterium* spp.))进行的治疗已经在人和动物模型中也显示出有益效果(Srutkova等,2015,PLoS One,10:e0134050;Pan等,2014,Benef Microbes,5:315-322;

Huynh等,2009,Inflamm Bowel Dis,15:760-768;Bibiloni等,2005,Am J Gastroenterol,100:1539-1546)。此外,在IBD和代谢性疾病的动物模型中,细菌产品,如来自鼠李糖乳杆菌GG的p40和黏液曲霉的Amuc-1100已显示出促进屏障功能和保护作用(Yan等,2011,J Clin Invest,121:2242-2253;Plovier等,Nat Med,23:107-113)。

[0152] 尽管使用活微生物种群治疗疾病越来越普遍,但是这种方法依赖于所给予细菌在宿主或患者中存活并以有益和治疗方式与宿主组织相互作用的能力。本文提供的另一种方法是鉴定可影响宿主细胞功能并提供治疗益处的微生物编码的蛋白及其变体。这样的蛋白质可以例如以包含基本上分离或纯化的治疗性细菌衍生蛋白质的药物组合物或经工程改造以将治疗性蛋白质表达为外源性蛋白质的活生物治疗剂(细菌)的形式给予。此外,包括给予治疗性蛋白质的治疗方法不限于肠(小肠,大肠,直肠),还可以包括消化道内其他疾病的治疗,例如口腔粘膜炎。

[0153] 为了鉴定可能在胃肠道炎性疾病中具有治疗应用的微生物来源的蛋白质,分析了健康人或被诊断患有IBD(UC)的人的黏膜活检,以确定这些黏膜活检的微生物组成。通过对健康对象和患病对象的细菌谱进行比较,可以确定可能有益的细菌(健康对象对比患病患者数量较大)或有害细菌(健康对象对比患病患者数量较少)。与上面提到的研究一致,被认为是有益的细菌物种包括人罗斯氏菌(*Roseburia hominis*)。然后进行广泛的生物信息学分析以预测细菌编码的蛋白质,然后鉴定可能由细菌分泌的蛋白质。然后使用一系列体外测定法对预测为分泌蛋白的蛋白质进行表征,以研究每种蛋白质对上皮屏障完整性,细胞因子产生和/或释放以及伤口愈合的作用。然后在结肠炎体内小鼠模型中评估被鉴定为具有增加上皮屏障完整性的功能的蛋白质。一种在本文中标识为“SG-11”的此类蛋白质表现出体外和体内活性,表明其具有为改善上皮屏障完整性以及治疗与上皮屏障完整性有关的疾病和病症以及治疗炎性胃肠疾病,例如IBD提供治疗益处能力,如下文更详细描述。

#### [0154] SG-11蛋白

[0155] 本文中称为SG-11的蛋白质被编码在人罗斯氏菌基因组的768个核苷酸序列(SEQ ID NO:2)内。人罗斯氏菌菌株的完整基因组序列可以在GenBank登录号CP003040中找到(该序列通过引用整体并入本文)。人罗斯氏菌菌株的16S rRNA基因序列可以在GenBank登录号AJ270482中找到。由人罗斯氏菌基因组序列编码的全长蛋白质长度为256个氨基酸(SEQ ID NO:1),其中残基1-24被预测为信号肽,其在体内裂解以产生232个氨基酸的成熟蛋白质(SEQ ID NO:3;由SEQ ID NO:4编码)。重组SG-11可经表达以具有N末端甲硫氨酸(由密码子ATG编码),以产生233个氨基酸的成熟蛋白质(SEQ ID NO:7)。

[0156] 如实施例,例如实施例1中所详述,SG-11在不同的市售和常规使用的表达载体中重组表达。例如,使用以下表达载体表达SG-11(包含SEQ ID NO:3的蛋白质),pGEX表达载体,其表达具有GST标签和蛋白酶位点的目标蛋白质,所述蛋白质在表达和纯化后被切割,pET-28表达载体,其添加N末端FLAG标签的载体,和pD451表达载体,其用于表达由SEQ ID NO:7组成并且不具有N末端标签的SG-11蛋白。对这些蛋白质进行和重复的实验表明,由于使用了不同的蛋白质表达系统和DNA构建体而导致的N末端和/或C末端微小变化在体内和体外测定中均保持了相同的功能活性。应当理解,除非另有说明,否则术语“SG-11”在本文是指本文中描述为SEQ ID NO:3的氨基酸序列以及包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的蛋白质的此类变体(包括但不限于SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7)。SG-11变体可以

包括氨基酸残基的变异(取代,插入,缺失),以及诸如融合构建体和翻译后修饰(磷酸化,糖基化等)的修饰。下表11中提供了SG-11蛋白和编码核酸的一些示例性实施方式。

[0157] 表1

[0158]

氨基酸序列	编码氨基酸序列
<b>SEQ ID NO:1</b>	<b>SEQ ID NO:2</b>
MKRLVCTVCSVLLCAGL	ATGAAGAGATTAGTGTGCACGGTCTGCAGTGTAC
LSGCGTSLEGEESVVYV	TGTTGTGTGCGGGACTTCTCTCCGGATGCGGTAC
GKKGVIASLDVETLDQS	CTCGCTGGAGGGAGAGGAAAGTGTCGTGTACGT
YYDETELKSYVDAEVED	GGGAAAGAAAGGCGTGATAGCGTCGCTGGATGT
YTAEHGKNAVKVESLK	GGAGACGCTCGATCAGTCCTACTACGATGAGAC
VEDGVAKLKMKYKTPE	GGAAGTGAAGTCCTATGTGGATGCAGAGGTGGA
DYTA FNGLIELYQ GK VVA	AGATTACACCGCGGAGCATGGTAAAAATGCAGT
SLAAGYVYDGEFARVEE	CAAGGTGGAGAGCCTTAAGGTGGAAGACGGTGT
GKVVGAATKQDIYSEDD	GGCGAAGCTTAAGATGAAGTACAAGACACCGGA
LKVAIIRANTDVKVDGEI	GGATTATACCGCATTTAATGGAATTGAACTCTAT
CYVSCQNVKLTGKDSVS	CAGGGGAAAGTCGTTGCTTCCCTGGCGGCAGGA
IRDGYYLETGSVTASVD	TACGTCTACGACGGGGAGTTCGCCCCGCGTGGAG
VTGQESVGTEQLSGTEQ	GAAGGCAAGGTTGTGGGAGCTGCCACAAAACAG
MEMTGEPVNADDTEQT	GATATTTACTCTGAGGATGATTTGAAAGTTGCCA
EAAAGDGSFETDVYTFI	TCATCCGTGCCAATACGGATGTGAAGGTGGACG
VYK	GTGAGATCTGCTATGTCTCCTGTCAGAATGTGAA

[0159]

	GCTGACCGGAAAAGACAGTGTGTCGATCCGTGA CGGATATTATCTTGAGACGGGAAGCGTGACGGC ATCCGTGGATGTGACCGGACAGGAGAGCGTCGG GACCGAGCAGCTTTCGGGAACCGAACAGATGGA GATGACCGGGGAGCCGGTGAATGCGGATGATAC CGAGCAGACAGAGGCGGCGGCCGGTGACGGTTC GTTCGAGACAGACGTATATACTTTCATTGTCTAC AAA
<b>SEQ ID NO: 3</b> LEGEESVYVVGKKGVIA SLDVETLDQSYDETEL KSYVDAEVEDYTAEHG KNAVKVESLKVEDGVA KLKMKYKTPEDYTAFN GIELYQGKVVASLAAGY VYDGEFARVEEGKVVG AATKQDIYSEDDLKVAII RANTDVKVDGEICYVSC QNVKLTGKDSVSIRDGY YLETGSVTASVDVTGQE SVGTEQLSGTEQMEMTG EPVNADDTEQTEAAAGD GSFETDVYTFIVYK	<b>SEQ ID NO: 4</b> CTGGAGGGAGAGGAAAGTGTCTGTACGTGGGA AAGAAAGGCGTGATAGCGTCGCTGGATGTGGAG ACGCTCGATCAGTCCTACTACGATGAGACGGAA CTGAAGTCCTATGTGGATGCAGAGGTGGAAGAT TACACCGCGGAGCATGGTAAAAATGCAGTCAAG GTGGAGAGCCTTAAGGTGGAAGACGGTGTGGCG AAGCTTAAGATGAAGTACAAGACACCGGAGGAT TATACCGCATTTAATGGAATTGAACTCTATCAGG GGAAAGTCGTTGCTTCCCTGGCGGCAGGATACGT CTACGACGGGGAGTTCGCCCCGCGTGAGGAAGG CAAGGTTGTGGGAGCTGCCACAAAACAGGATAT TTACTCTGAGGATGATTTGAAAGTTGCCATCATC CGTGCCAATACGGATGTGAAGGTGGACGGTGAG ATCTGCTATGTCTCCTGTCAGAATGTGAAGCTGA CCGAAAAGACAGTGTGTCGATCCGTGACGGAT ATTATCTTGAGACGGGAAGCGTGACGGCATCCGT GGATGTGACCGGACAGGAGAGCGTCGGGACCGA GCAGCTTTCGGGAACCGAACAGATGGAGATGAC CGGGGAGCCGGTGAATGCGGATGATACCGAGCA GACAGAGGCGGCGGCCGGTGACGGTTCGTTCA

[0160]

	GACAGACGTATATACTTTCATTGTCTACAAA
<b>SEQ ID NO:7</b> MLEGEESVVYVGKKGV IASLDVETLDQSYDET ELKSYVDAEVEDYTAE HGKNAVKVESLKVEDG VAKLKMKYKTPEDYTA FNGIELYQGKVVASLAA GYVYDGEFARVEEGKV VGAATKQDIYSEDDLK VAIIRANTDVKVDGEIC YVSCQNVKLTGKDSVSI RDGYYLETGSVTASVD VTGQESVGTEQLSGTEQ MEMTGEPVNADDTEQT EAAAGDGSFETDVYTFI VYK	<b>SEQ ID NO:8</b> ATGTTGGAGGGTGAAGAGTCTGTTGTCTATGTG GGTAAGAAAGGTGTGATCGCGTCCCTGGACGT CGAGACTCTGGACCAGTCTTACTATGATGAAAC CGAGCTGAAGTCGTATGTGGACGCCGAAGTTG AGGATTACACGGCCGAGCACGGCAAAAATGCC GTCAAAGTTGAGAGCTTGAAAGTTGAGGACGG CGTGGCAAAGCTGAAGATGAAATACAAGACCC CAGAGGACTACACGGCGTTCAATGGTATCGAG CTGTATCAGGGCAAAGTCGTCGCATCCCTGGCA GCGGGCTATGTGTACGACGGTGAGTTTGCGCG CGTCGAAGAAGGCAAAGTTGTGGGTGCGGCTA CGAAACAAGATATCTACAGCGAAGATGACCTG AAAGTCGCGATTATTCGTGCTAACACCGATGTT AAAGTTGATGGCGAGATTTGCTACGTTAGCTGT CAAAACGTAAAGCTGACGGGTAAAGATAGCGT GAGCATTCTGTGATGGCTATTATCTGGAAACCGG TAGCGTTACGGCGAGCGTCGATGTTACCGGTCA AGAGAGCGTGGGTACCGAACAGCTGAGCGGCA CCGAACAGATGGAAATGACCGGTGAACCGGTT AACGCAGACGACACGGAACAAACCGAAGCCGC GGCAGGCGACGGTAGCTTCGAGACTGACGTGT ACACCTTTATCGTGTACAAG

[0161]

<b>SEQ ID NO:9</b> MDYKDDDDKGSSHML EGEESVYYVGKKGVAS LDVETLDQSYDETELK SYVDAEVEDYTAEHGK NAVKVESLKVEDGVAK LKMKYKTPEDYTAFNG IELYQGKVVASLAAGY VYDGEFARVEEGKVVG AATKQDIYSEDDLKVAI IRANTDVKVDGEICYVS CQNVKLTGKDSVSIRDG YYLETGSVTASVDVTG QESVGTEQLSGTEQME MTGEPVNADDTEQTEA AAGDGSFETDVYTFIVY K	<b>SEQ ID NO:10</b> ATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGCAG CAGCCATATGCTGGAGGGAGAGGAAAGTGTCTG TGTACGTGGGAAAGAAAGGCGTGATAGCGTCG CTGGATGTGGAGACGCTCGATCAGTCCTACTAC GATGAGACGGAAGTGAAGTCCTATGTGGATGC AGAGGTGGAAGATTACACCGCGGAGCATGGTA AAAATGCAGTCAAGGTGGAGAGCCTTAAGGTG GAAGACGGTGTGGCGAAGCTTAAGATGAAGTA CAAGACACCGGAGGATTATACCGCATTTAATG GAATTGAACTCTATCAGGGGAAAGTCGTTGCTT CCCTGGCGGCAGGATACGTCTACGACGGGGAG TTCGCCCCGCGTGGAGGAAGGCAAGGTTGTGGG AGCTGCCACAAAACAGGATATTTACTCTGAGG ATGATTTGAAAGTTGCCATCATCCGTGCCAATA CGGATGTGAAGGTGGACGGTGAGATCTGCTAT GTCTCCTGTCAGAATGTGAAGCTGACCGGAAA AGACAGTGTGTCGATCCGTGACGGATATTATCT TGAGACGGGAAGCGTGACGGCATCCGTGGATG TGACCGGACAGGAGAGCGTCGGGACCGAGCAG CTTTCGGGAACCGAACAGATGGAGATGACCGG GGAGCCGGTGAATGCGGATGATACCGAGCAGA CAGAGGCGGCGGCCGGTGACGGTTCGTTTCGAG ACAGACGTATATACTTTTCATTGTCTACAAA
<b>SEQ ID NO:19</b> MLEGEESVYYVGKKGV IASLDVETLDQSYDET ELKSYVDAEVEDYTAE HGKSAVKVESLKVEDG	<b>SEQ ID NO:20</b> ATGTTGGAGGGTGAAGAGTCTGTTGTCTATGTG GGTAAGAAAGGTGTGATCGCGTCCCTGGACGT CGAGACTCTGGACCAGTCTTACTATGATGAAAC CGAGCTGAAGTCGTATGTGGACGCCGAAGTTG



[0162]	VAKLKMKYKTPEDYTA FSGIELYQGKVVASLAA GYVYDGEFARVEEGKV VGAATKQDIYSEDDLK VAIIRANTDVKVDGEIV YVSSQNVKLTGKDSVSI RDGYYLETGSVTASVD VTGQESVGTEQLSGTEQ MEMTGEPVNADDTEQT EAAAGDGSFETDVYTFI VYK	AGGATTACACGGCCGAGCACGGCAAATCCGCC GTCAAAGTTGAGAGCTTGAAAGTTGAGGACGG CGTGGCAAAGCTGAAGATGAAATACAAGACCC CAGAGGACTACACGGCGTTCAGCGGTATCGAG CTGTATCAGGGCAAAGTCGTCGCATCCCTGGCA GCGGGCTATGTGTACGACGGTGAGTTTGCGCG CGTCGAAGAAGGCAAAGTTGTGGGTGCGGCTA CGAAACAAGATATCTACAGCGAAGATGACCTG AAAGTCGCGATTATTCGTGCTAACACCGATGTT AAAGTTGATGGCGAGATTGTGTACGTTAGCAG CCAAAACGTAAAGCTGACGGGTAAAGATAGCG TGAGCATTCGTGATGGCTATTATCTGGAAACCG GTAGCGTTACGGCGAGCGTCGATGTTACCGGTC AAGAGAGCGTGGGTACCGAACAGCTGAGCGGC ACCGAACAGATGGAAATGACCGGTGAACCGGT TAACGCAGACGACACGGAACAAACCGAAGCCG CGGCAGGCGACGGTAGCTTCGAGACTGACGTG TACACCTTTATCGTGTACAAG
--------	--	---

[0163] 疾病中的上皮屏障功能

[0164] 近年来的研究已经确定遗传因素和环境因素在IBD的发病中起着重要作用。Markus Neurath,“炎症肠病中的细胞因子(Cytokines in Inflammatory Bowel Disease)”,Nature Reviews Immunology,第14卷,329-342(2014)。这些IBD危险因素的组合似乎引起上皮屏障功能的有害变化,从而使腔内抗原(例如,来自共生菌群的细菌抗原)移位到肠壁。同上。随后,对此类环境触发因素的异常和过度反应(例如促炎性细胞因子释放增加)在遗传易感宿主中引起亚临床或急性粘膜炎症。同上。因此,在IBD中适当的上皮屏障功能的重要性是显而易见的,因为在不能解决急性肠道炎症的对象中,由于粘膜免疫系统不受控制的激活而引起了慢性肠道炎症。具体地,黏膜免疫细胞,例如巨噬细胞,T细胞和先天淋巴样细胞(ILC)的亚组,似乎对共生菌群的微生物产物或抗原产生了反应,例如产生可促进胃肠道慢性炎症的细胞因子。因此,为患者恢复适当的上皮屏障功能可能对解决IBD至关重要。

[0165] SG-11的治疗活性部分通过其对体内和体外上皮屏障功能的有益作用来确定。如实施例2中所示,如通过体外跨上皮电阻(TEER)测定所表明的,SG-11在增加上皮屏障完整性中有活性。TEER分析是用于测量对上皮细胞层的结构和功能完整性的影响的众所周知的方法(Srinivasan等,2015,J Lab Autom,20:107-126;Beduneau等,2014,Eur J Pharm Biopharm,87:290-298;Zolotarevsky等,2002,Gastroenterology,123:163-172;Dewi等,(2004) J.Virol.Methods.121:171-180,和Mandic等,(2004) Clin.Exp.Metast.21:699-



704)。本文进行和描述的测定由由肠上皮细胞和杯状细胞组成的上皮单层组成,以更准确地对肠上皮的结构和功能组件进行建模。培养细胞直至形成紧密的连接,并通过测量跨上皮电阻来评估屏障功能能力。在添加诸如热灭活的大肠杆菌之类的损害之后,上皮层的电阻降低。用于TEER测定的对照试剂包括星形孢菌素和肌球蛋白轻链激酶抑制剂。星形孢菌素是一种广谱激酶抑制剂,起源于棍孢链霉菌(*Streptomyces staurosporeus*),可诱导细胞凋亡。该试剂破坏了约98%的间隙连接,导致TEER测定中的电阻降低。肌球蛋白轻链激酶(MLCK)是由促炎性细胞因子诱导的信号级联反应的末端效应物,其导致连接周围肌动球蛋白环(perijunctional actomyosin ring)收缩,从而导致间隙连接分离。通过抑制MLCK,可以防止紧密连接的破坏。TEER测定中的MLCK抑制剂应降低或防止TEER测定中的电阻降低。

[0166] 在一些实施方式中,如本文所述的SG-11蛋白或其变体或片段可以通过如通过体外TEER测定评估的其增加上皮屏障功能完整性的能力来表征。与在没有蛋白质的情况下进行的TEER测定相比,SG-11蛋白或其变体或片段可以在TEER测定中将电阻增加至少约10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%或90%。

[0167] 另外,实施例6显示SG-11蛋白可以增强或促进上皮伤口愈合,该活性可以在上皮屏障例如肠或粘膜上皮屏障的维持或修复中起作用。

[0168] 考虑到SG-11在体外修复屏障功能完整性的作用,在体内分析了SG-11在IBD啮齿动物模型中减少损伤的能力。实施例7和8(SG-11)和16(SG-11变体)描述了使用DSS(葡聚糖硫酸钠)动物模型进行的研究,该模型已被广泛接受用于研究IBD的药物(Chassaign等,2014,Curr Protoc Immunol,104:Unit-15.25;Kiesler等,2015,Cell Mol Gastroenterol Hepatol)。DSS是一种硫酸化多糖,对结肠上皮有直接毒性,并会导致上皮细胞损伤,由于间隙连接的破坏而导致屏障功能丧失。在这些实验中,在小鼠中诱导结肠炎之前(实施例7)或之后(实施例8)用SG-11治疗动物。作为阳性对照,还用Gly2-GLP2(胰高血糖素样肽2(GLP2)的稳定类似物)治疗小鼠。在实验小鼠结肠炎模型中,已知Gly2-GLP2可促进上皮细胞生长并减少结肠损伤。DSS研究的结果表明,SG-11蛋白在DSS模型中减少体重减轻方面是有效的,DSS模型是IBD治疗剂临床疗效的重要指标。SG-11治疗还降低了总体病理和肠道组织病理学分析的分數。

[0169] 应当指出,在实施例7中,尽管SG-11治疗改善了4KDa-FITC肠通透性读数并降低了LPS结合蛋白(LBP,其为LPS暴露的标志物)的血清水平,但在实施例8中,用SG-11或Gly2-GLP2治疗没有观察到显著作用。考虑到在用普通饮用水代替SG-11或Gly2-GLP2治疗之前,实施例8中的动物用DSS处理了7天,这不足为奇。先前暴露于DSS会导致肠上皮受损,LPS穿过破裂的上皮屏障移位以及诱导LBP分泌。但是,根据4KDa-FITC葡聚糖的测量结果,在用正常饮用水代替DSS后的3-4天内,上皮屏障修复似乎迅速发生(数据未显示,图12)。因此,在测量时(治疗6天后),在治疗与未治疗的动物中难以检测到4KDa-FITC通透性读数的改善。另外,血清中LBP的水平可以独立于在治疗剂治疗之前暴露于DSS持续一段延长的时间的动物中屏障功能的修复(实施例8)。例如,在DSS暴露期间通过LPS移位激活的肝细胞产生并分泌大量LBP。因此,在不受理论束缚的情况下,该研究的短时间段可能不允许足够的时间使肝细胞失活并从DSS处理的动物的血清中清除LBP。因此,可以认为,继续进行血清LBP测量的研究将在较后的时间点显示血清LBP水平降低,但是,如果屏障功能在处理或未处理动物中于从血清清除LBP之前得以恢复,则这两种动物的血清LBP降低可能相似。

[0170] SG-11的变体

[0171] 考虑到SG-11的治疗价值及其在治疗疾病中的用途,对该蛋白质进行了进一步的表征,并对其序列进行了修饰,以改变其一级结构,从而优化了药物的配制和蛋白质的长期保存。

[0172] 如实施例9所述,使用SEQ ID NO:7进行GenBank非冗余蛋白质数据库的BLAST搜索,以鉴定具有相似氨基酸序列并且可以是SG-11的功能同源物或与SG-11具有相似功能的蛋白质。鉴定出三种这样的蛋白质,并将每种预测成熟序列(无N末端信号肽)与SEQ ID NO:7进行比对,以鉴定蛋白质中相对保守的区域和单个位置。这三种蛋白质在本文中以SEQ ID NO:21(源自GenBank登录号WP\_006857001),SEQ ID NO:22(源自GenBank登录号WP\_075679733)和SEQ ID NO:23(源自GenBank登录号WP\_055301040)公开(图17),从而本文提供了包含这3种蛋白质之一或其变体或片段的药物组合物,以及治疗与屏障功能障碍和/或胃肠道疾病或紊乱有关的疾病的方法,包括向有此需要的对象给予药物组合物,其包含SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23中的任一个或其变体或片段。

[0173] 下表2中提供了SG-11变体,SG-11V5氨基酸序列和编码核酸序列的示例性实施方式。

[0174] 表2

[0175]

氨基酸序列	编码核酸序列
<b>SEQ ID NO:19 (SG-11V5)</b>	<b>SEQ ID NO:20</b>
MLEGEESVVYVGKKG	ATGTTGGAGGGTGAAGAGTCTGTTGTCTATGTG
IASLDVETLDQSYDET	GGTAAGAAAGGTGTGATCGCGTCCCTGGACGT
ELKSYVDAEVEDYTAE	CGAGACTCTGGACCAGTCTTACTATGATGAAAC
HGKSAVKVESLKVEDG	CGAGCTGAAGTCGTATGTGGACGCCGAAGTTG
VAKLKMKYKTPEDYTA	AGGATTACACGGCCGAGCACGGCAAATCCGCC
FSGIELYQGKVVASLAA	GTCAAAGTTGAGAGCTTGAAAGTTGAGGACGG
GYVYDGEFARVEEGKV	CGTGGCAAAGCTGAAGATGAAATACAAGACCC
VGAATKQDIYSEDDLK	CAGAGGACTACACGGCGTTCAGCGGTATCGAG
VAIIRANTDVKVDGEIV	CTGTATCAGGGCAAAGTCGTTCGCATCCCTGGCA

[0176]

YVSSQNVKLTGKDSVSI	GCGGGCTATGTGTACGACGGTGAGTTTGCGCG
RDGYYLETGSVTASVD	CGTCGAAGAAGGCAAAGTTGTGGGTGCGGCTA
VTGQESVGTEQLSGTEQ	CGAAACAAGATATCTACAGCGAAGATGACCTG
MEMTGEPVNADDTEQT	AAAGTCGCGATTATTCGTGCTAACACCGATGTT
EAAAGDGSFETDVYTFI	AAAGTTGATGGCGAGATTGTGTACGTTAGCAG
VYK	CCAAAACGTAAAGCTGACGGGTAAAGATAGCG
	TGAGCATTCGTGATGGCTATTATCTGGAAACCG
	GTAGCGTTACGGCGAGCGTCGATGTTACCGGTC
	AAGAGAGCGTGGGTACCGAACAGCTGAGCGGC
	ACCGAACAGATGGAAATGACCGGTGAACCGGT
	TAACGCAGACGACACGGAACAAACCGAAGCCG
	CGGCAGGCGACGGTAGCTTCGAGACTGACGTG
	TACACCTTTATCGTGTACAAG

[0177] 为了增强用于药物制剂和临床应用的SG-11蛋白的稳定性,进行了研究以鉴定和表征纯化的SG-11蛋白的翻译后修饰 (PTM)。这些实验在实施例10-11中描述。这样的分析表明SG-11蛋白至少可以经历甲硫氨酸氧化和天冬酰胺脱酰胺的PTM。此外,在实施例12中描述的实验中,SG-11中的半胱氨酸不太可能在活性蛋白质的纯化的功能构象中形成二硫键,这表明SG-11中的游离巯基可能在含有纯化的蛋白质的溶液中引起聚集。基于这些稳定性研究,且不论如在多序列比对所见的SG-11中残基的保守性质(图17),决定测试在位置147和/或151上的半胱氨酸(参考SEQ ID NO:7)是否可以被其他氨基酸取代。另外,考虑了位置53和83处的保守的天冬酰胺的取代。在一个示例性实施方式中,对SEQ ID NO:7的SG-11序列进行修饰以引入C147V和C151S的取代以产生SEQ ID NO:11(SG-11V1)。在提供的SG-11变体SG-11V2(SEQ ID NO:13;包含G84D,C147V,C151S),SG-11V3(SEQ ID NO:15;包含N83S,C147V,C151S),SG-11V4(SEQ ID NO:17;包括N53S,G84D,C147V,C151S)和SG-11V5(SEQ ID NO:19;包括N53S,N83S,C147V,C151S)中也存在C147V和C151S取代。

[0178] 实施例13表明,与SG-11(SEQ ID NO:7)相比,SG-11V5中的PTM(甲硫氨酸氧化和天冬酰胺脱酰胺)显著降低。在不同温度 and 不同存储缓冲液中均观察到了减少。实施例14描述了进行实验以确定包含半胱氨酸取代的SG-11变体(SG-11V5,SEQ ID NO:19)是否会影响蛋白质在储存缓冲液中的聚集。结果表明,当在不同的存储缓冲液中进行测试时,与SG-11(SEQ ID NO:7)相比,SG-11V5变体的聚集减少。

[0179] 值得注意的是,尽管被取代以产生SG-11V5的氨基酸存在于SG-11蛋白的相对保守的区域中,但是有可能对这4个残基进行取代而不丧失功能活性(实施例15和16,在下面更详细地描述)。

[0180] 基于本文所述的实验数据和分析,考虑了SG-11的变体(例如,SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5)被设计为取代SEQ ID NO:7的氨基酸N53,N83,G84,C147和C151中的任何一个或多个(其中指出的取代是相对于SEQ ID NO:7的残基位置)。下表3中以SEQ ID NO:33的形式提供了该变体的一个实施方式,其中在位置53、83、84、147和151的每一个上的残基表示为X,

表明这5个残基中的一个或多个可各自被任何可能的20种氨基酸取代。在一些实施方式中,该蛋白质包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列。在其他实施方式中,X53为N,S,T,M,R,Q,和/或X83为N,R或K,和/或X84为G或A,和/或X147为C,S,T,M,V,L,A或G,和/或X151为C,S,T,M,V,L,A或G。在其他实施方式中,X53为N,S或K,和/或X83为N或R,和/或X84为G或A,和/或X147为C,V,L或A,和/或X151为C,S,V,L或A。

[0181] 在一些实施方式中,该蛋白质包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,其中X53是除N外的任何氨基酸,X83是除N外的任何氨基酸,X84是除G外的任何氨基酸,X147是除C外的任何氨基酸,和/或X151是除C外的任何氨基酸。

[0182] 表3

[0183] SEQ ID NO:33 和 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列 (参见上述定义)

[0184]

```
MLEGEESV VYVGKKGVASLDVETLDQSY YDETELKSYVD AEVEDYTAEH
GKXAVKVESLKVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAFXXIELYQ GKVVASLAAG
YVYDGEFARVEEGKVVGAA TKQDIYSEDDLKVAIIRANTDV KVDGEIXYV
SXQNVKLTGKDSVSIRDGY YLETGSVTASVDVTGQESVGTEQLSGTEQME
MTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK
```

[0185] 在另一个实例中,所教导的蛋白质的某些氨基酸可以取代蛋白质结构中的其他氨基酸,而不会显著丧失与结构的相互作用结合能力,例如,抗体的抗原结合区域,受体,底物分子上的结合位点等。因此,这些蛋白质将是所公开蛋白质的生物学功能等同物(例如,包含SEQ ID NO:3或其变体)。所谓的“保守”变化不会破坏蛋白质的生物学活性,因为这些结构变化不会影响蛋白质执行其经设计功能的能力。因此,发明人认为可以对本文公开的基因和蛋白质的序列进行多种不同的改变,同时仍实现本公开的目的。

[0186] 本文还提供了SG-11的变体:SEQ ID NO:11(C147V,C151S,“SG11-V1”),SEQ ID NO:13(G84D,C147V,C151S“SG11-V2”),SEQ ID NO:15(N83S,C147V,C151S“SG11-V3”),SEQ ID NO:17(N53S,G84D,C147V,C151S“SG11-V4”)和SEQ ID NO:19(N53S,N83S,C147V,C151S“SG11-V5”)。

[0187] 重要的是,相对于TEER测定(实施例15)和体内DSS小鼠模型(实施例16),包含SEQ ID NO:19的SG-11变体蛋白保持了其活性,表明SG-11的变体可以维持等同于野生型SG-11的治疗功能。具体地,进行了体外TEER和体内DSS模型实验,其中平行使用了SG-11(SEQ ID NO:7)和SG-11V5(SEQ ID NO:19)。实施例15表明SG-11和SG-11V5具有基本相同的体外降低TEER的功能能力。如实施例7和8所述,其中在DSS治疗之前或之后用SG-11治疗DSS模型小鼠,进行实施例16以比较SG-11和SG-11变体的体内功效。实施例16还比较了在DSS治疗前(描述为实施例16A)和在DSS治疗后(描述为实施例16B)用蛋白质对小鼠进行给药。SG-11和SG-11变体减少了体重减轻(图23A和23B)以及总体病理临床评分(图24)。同样,在实施例16A中,SG-11降低了肠的通透性和血清LBP水平,而SG-11V5显示出以剂量依赖性的方式降低了肠的通透性和血清LBP水平(图21A和图22A)。与实施例7和8中观察到的结果相似,实施例16B中SG-11和SG-11变体蛋白没有降低肠通透性或血清LBP水平,其中在长期用DSS攻击后给予治疗性蛋白质并且在有限的一段时间内观察结果。如上所述,认为继续研究将显示

通透性和血清LBP水平均降低。

[0188] 鉴于本文提供的这些数据,治疗性蛋白质与包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或其片段的蛋白质具有至少90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%相同性。在替代实施方式中,治疗性蛋白质与SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:7或其片段具有至少70%,75%,80%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%,99.9%或100%序列相同性。在一些实施方式中,治疗性蛋白质包含与SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:5相同的氨基酸序列。或者,治疗性蛋白质可以是SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的变体的一种,其中治疗性蛋白质相对于SEQ ID NO:7具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代。在一些实施方式中,变体治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:3的非天然存在的变体。换句话说,治疗性蛋白质相对于SEQ ID NO:3包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个非天然存在的氨基酸取代。在一些实施方式中,治疗性蛋白质不包含与SEQ ID NO:7的残基2至233的序列相同的氨基酸序列。

[0189] 在一些实施方式中,可以通过一个或多个氨基酸插入或缺失来修饰或改变SG-11蛋白。插入可以是添加1个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或1至10、1至20、1至30、1至40或1至50个)氨基酸到蛋白质N末端和/或C末端和/或可以是在位于N端和C端氨基酸之间的位置插入1个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或1至10、1至20、1至30、1至40或1至50个)氨基酸。类似地,删除1个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或1至10、1至20、1至30、1至40或1至50个)氨基酸可以出现在N和C末端的任何一个以及内部。

[0190] 在一些实施方式中,提供了包含相对于SEQ ID NO:3的至少一个非天然存在的氨基酸取代的修饰或变体蛋白。在其他实施方式中,变体蛋白包含相对于SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代。在其他实施方式中,修饰的蛋白质包含如SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11 (SG-11V1),SEQ ID NO:13 (SG-11V2),SEQ ID NO:15 (SG-11V3),SEQ ID NO:17 (SG-11V4)或SEQ ID NO:19 (SG-11V5)所示的氨基酸序列。

[0191] 在一些实施方式中,根据本发明的治疗性蛋白质包括任何一种变体蛋白质(例如,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17;或SEQ ID NO:19),其还保留了例如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7所示的全长成熟蛋白质的一种或多种活性。

[0192] 还设想了编码这些蛋白质的多核苷酸序列。普通技术人员众所周知,由于遗传密码的简并性,编码单个多肽序列的2个多核苷酸序列可以共有相对较低的序列相同性。例如,如果编码233个氨基酸序列的多核苷酸中的每个密码子在其第三位均包含至少1个取代基,则这将计算出这2个多核苷酸之间约67%的序列相同性。本公开内容的多核苷酸包含编码与SEQ ID NO:19至少70%,75%,80%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%,99.9%或100%相同的蛋白质的序列。因此,在一些实施方式中,多核苷酸包含与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8至少67%相同,或与SEQ ID NO:20约67%至100%,70%至100%,75%至100%,80%至100%,90%至100%或95%至100%相同的序列或其片段。在一些实施方式中,多核苷酸包含SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20的序列或其片段。

[0193] 在一些实施方式中,与包含SEQ ID NO:3或由其组成的蛋白质相比,所教导的蛋白

质具有明显不同的结构和/或功能特征。

[0194] 如本文所用,术语“SG-11变体”可以包括SG-11蛋白,其例如与包含SEQ ID NO:3的序列的蛋白质相同或不同,并且可以通过例如PTM或与第二种物质(例如蛋白质或肽)的连接或融合而进一步修饰。

[0195] 蛋白质PTM发生在体内,可以通过共价添加官能团或蛋白质,调节性亚基的蛋白水解切割或整个蛋白质的降解来增加蛋白质组的功能多样性。根据本公开内容制备的分离的蛋白质可以在体内或体外经历1次或多次PTM。修饰的类型取决于蛋白质在其中表达的宿主细胞,包括但不限于磷酸化,糖基化,泛素化,亚硝基化(例如S-亚硝基化),甲基化,乙酰化(例如N-乙酰化),脂质化(肉豆蔻酰化,N-肉豆蔻酰化,S-棕榈酰化,法呢基化,S-戊烯酰化,S-棕榈酰化)并且蛋白水解可能影响正常细胞生物学和发病机制的几乎所有方面。如本文公开的分离和/或纯化的SG-11蛋白或其变体或片段可以包含一种或多种上述的翻译后修饰。

[0196] SG-11蛋白或其变体或片段可以是融合蛋白,其中N和/或C末端结构域通过肽键与第二蛋白质融合。本领域技术人员公知的常用融合伴侣包括但不限于人血清白蛋白和IgG的可结晶片段或恒定结构域,Fc。在一些实施方式中,SG-11蛋白或其变体或片段通过二硫键连接至第二蛋白或肽,其中第二蛋白或肽包含半胱氨酸残基。

[0197] 如上所述,可以对本文公开的蛋白质的结构进行修饰和/或改变(例如,取代,插入,缺失)。因此,本公开内容考虑了这些蛋白质,以及编码其的核酸的序列变化,其中它们仍然能够相对于在各种体外和体内测定以及在本公开的治疗的方面评估的功能活性保留明显活性。就功能等同物而言,本领域技术人员充分理解,“生物学功能等同物”蛋白质和/或多核苷酸的定义中固有的是这样的概念,即在分子的限定部分内可以进行同时保留具有可接受水平的等效生物活性的分子的改变数目是有限的。

[0198] 还考虑到SG-11蛋白或其变体或片段是一种当给予对象时可减少与疾病相关的体重减轻,改善临床病理评分和/或使对象的结肠缩短最小化的蛋白质。在一些实施方式中,对象是具有遗传或临床诱导的炎症性疾病或功能失调的上皮屏障功能的哺乳动物。或者,该动物患有特发性胃肠道疾病,包括上皮屏障功能降低或肠炎性疾病。在其他实施方式中,哺乳动物是人,非人灵长类动物或啮齿动物。啮齿动物可以是小鼠或大鼠。

[0199] 在一些实施方式中,根据本公开的SG-11蛋白或其变体或片段是一种可以在体外测定或给予该蛋白质的对象中调节细胞因子的产生和/或分泌的蛋白质。在一些实施方式中,细胞因子的分泌在体外减少。在体外测定或给予蛋白质的对象中产生和/或分泌的细胞因子水平很可能在对象的血液,血清和/或血浆中测量。给予蛋白质可能会导致促炎细胞因子,例如TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-25, IL-33, IL-8, MCP-1, MIP-3, CXCL1和IL-23中的一种或多种的血清水平降低。可选地,细胞因子可以是抗炎细胞因子,在这种情况下,蛋白质的给予导致抗炎细胞因子例如IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$ , 和TGF- $\beta$ 的血清水平增加。

[0200] 在一些实施方式中,当将SG-11蛋白或其变体或其片段给予对象例如哺乳动物(例如,啮齿动物,非人灵长类动物或人)时,其具有减轻胃肠道炎症的功能能力。在其他实施方式中,当给予给对象时,该蛋白质具有减少炎症(即促炎性)细胞因子的功能能力。在其他实施方式中,当将蛋白质给予于对象时,该蛋白质能够减少TNF- $\alpha$ 和/或IL-23。在其他实施方

式中,当给予于对象时,该蛋白质具有增加抗炎细胞因子的功能能力。在一些方面,当给予于对象时,本发明的蛋白质能够增加IL-10。

[0201] 根据本公开的SG-11蛋白或其变体或片段是一种当给予对象(例如,啮齿动物,非人类灵长类动物或人类)时可改善胃肠道上皮细胞屏障功能,降低疾病相关体重减轻,改善临床评分,改善结肠长度和/或结肠重量与长度之比的读数,诱导或增加粘蛋白基因表达(例如muc2表达),增加胃肠道粘液屏障的结构完整性和/或功能(例如,小肠,大肠,口腔和/或食道)和/或减轻胃肠道的炎症的蛋白质。

[0202] 在一些实施方式中,由相对于SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的氨基酸的这种取代,插入和/或缺失产生的SG-11蛋白或其变体或片段保持了基本上与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19的蛋白质相同水平的功能活性水平(例如,能够在TEER测定中增加电阻,其中上皮细胞层被例如热灭活的大肠杆菌破坏)。变体蛋白可用作治疗或预防多种病症的治疗剂,包括但不限于炎性病症和/或屏障功能紊乱,包括但不限于胃肠道(包括口腔,食道和肠道)粘膜的炎症,肠上皮细胞间隙连接完整性受损。在一些实施方式中,当对患有或易患炎性疾病和/或屏障功能紊乱的个体给药时,修饰的蛋白质具有以下一种或多种作用:改善上皮屏障的完整性,例如在炎症诱导的破坏之后;抑制一种或多种免疫细胞产生至少一种促炎细胞因子(例如TNF- $\alpha$ 和/或IL-23);诱导上皮细胞中的粘蛋白产生;和/或改善上皮伤口愈合。此外,修饰或变体SG-11蛋白可用于治疗或预防疾病或病症,例如但不限于炎性肠病,溃疡性结肠炎,克罗恩氏病,短肠综合症,胃肠道粘膜炎症,口腔粘膜炎症,化学疗法诱发的黏膜炎,放射诱发的黏膜炎,坏死性小肠结肠炎,囊袋炎,代谢性疾病,腹腔疾病,炎性肠综合症或化学疗法相关的脂肪性肝炎(CASH)。

[0203] 如所证明的,例如在实施例6中,SG-11蛋白可以增强上皮伤口愈合。因此,本文提供了一种治疗性蛋白质,其包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其变体或片段,其中所述蛋白质可以在体外测定中增加伤口愈合。

#### [0204] 治疗方法

[0205] 考虑将本文所述的SG-11蛋白包括其变体(例如,氨基酸取代,缺失,插入),修饰形式(例如,糖基化,乙酰化),SG-11片段及其融合体用于治疗诊断为患有或患有与胃肠道内炎症和/或胃肠道内上皮屏障功能障碍有关的疾病的对象。

[0206] 本文提供了用于治疗有此需要的对象的方法,该方法包括向该对象给予包含如本公开中所述的SG-11蛋白或其片段或变体的药物组合物。对象可以是被诊断出患有炎性肠病,溃疡性结肠炎,小儿UC,克罗恩氏病,小儿克罗恩氏病,短肠综合症,粘膜炎症GI粘膜炎症,口腔粘膜炎症,食道,胃,小肠(十二指肠,空肠,回肠),大肠(结肠)和/或直肠粘膜炎症,化学疗法诱发的粘膜炎症,放射诱发的黏膜炎,坏死性小肠结肠炎,囊袋炎,代谢性疾病,乳糜泻,肠易激综合征或化学疗法相关的脂肪性肝炎(CASH)。本文所述的SG-11药物组合物的给予也可用于伤口愈合应用。

#### [0207] 炎性肠病

[0208] 炎性肠病(IBD)通常包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩氏病(CD)。炎性肠病的发病机理尚不清楚。已经提出了遗传易感性,并且许多环境因素,包括细菌,病毒和饮食中的抗原,都可能触发正在进行的肠炎性级联反应。同上。IBD可能涉及严重的腹泻、疼痛、疲乏和体重下降。IBD可以使人衰弱,并且有时导致危及生命的并发症。因此,在一些实施方式中,

本文所述的治疗方法可有效减轻,预防或消除上述任何一种或多种症状,其中该方法包括向有需要的患者给予治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含SG-11蛋白或其变体或片段。在一些实施方式中,治疗方法导致缓解。

[0209] 溃疡性结肠炎

[0210] 溃疡性结肠炎是一种在大肠(结肠)和直肠内膜中导致长期炎症和疼痛(溃疡)的炎性肠病。

[0211] 溃疡性结肠炎通常表现为从直肠向近端延伸,在许多患者中延伸至包括整个结肠的浅层连续炎症。没有瘘管,裂痕,脓肿和小肠受累。有限疾病的患者(例如直肠炎)通常有轻度但经常复发的症状,而胰腺炎患者更常见的是严重症状,通常需要住院治疗。Botoman等,“炎性肠病的管理(Management of Inflammatory Bowel Disease)”,*Am.Fam.Physician*,卷57(1):57-68(1998年1月1日)(省略内部引用)。因此,溃疡性结肠炎是一种IBD,会在您的大肠(结肠)和直肠的最内层引起长期的炎症和疮患(溃疡)。

[0212] 克罗恩氏病

[0213] 与溃疡性结肠炎不同,克罗恩氏病可累及整个肠道,从口腔到肛门,并伴有不连续的局灶性溃疡,瘘管形成和肛周受累。回肠末端受累最普遍,通常结肠受累程度不同。患者亚群患有肛周疾病,并伴有裂痕和瘘管形成。在克罗恩氏病患者中,只有2%到3%的患者有上胃肠道的临床显著受累。Botoman等,“炎性肠病的管理(Management of Inflammatory Bowel Disease)”,*Am.Fam.Physician*,卷57(1):57-68(1998年1月1日)(省略内部引用)。因此,克罗恩氏病是一种IBD,会引起消化道内壁发炎。在克罗恩氏病中,炎症经常深入到受影响的组织中。炎症可以涉及消化道的不同区域——大肠、小肠或两者。胶原性结肠炎和淋巴细胞性结肠炎也被认为是炎性肠病,但通常与经典的炎性肠病分开考虑。

[0214] 炎性肠病的临床参数

[0215] 如前所述,炎性肠病包括溃疡性结肠炎和克罗恩氏病。本领域技术人员已知许多评分和临床标志物,可用于获得本文描述的所给予蛋白质在治疗这些病症中的功效。

[0216] 有两种评估IBD患者的一般方法。鉴于IBD表现为胃肠道中炎症和溃疡的表现,因此首先涉及对粘膜的目视检查,并依赖于对粘膜损害迹象的观察。可以使用任何可以评估粘膜的方法。示例包括钡灌肠,X射线和内窥镜检查。内窥镜检查可以是食道,胃和十二指肠检查(食管胃十二指肠镜检查),小肠检查(肠镜检查)或大肠/结肠检查(结肠镜检查,乙状结肠镜检查)。这些技术用于识别发炎,溃疡和异常生长(如息肉)的区域。

[0217] 存在基于这种胃肠道视觉检查的评分系统来确定IBD的状态和严重性,尽管这些患者可能由不同的医疗专业人员进行评估,但这些评分系统旨在确保在这些疾病的诊断和监测以及临床研究评估中对不同患者进行统一评估。Daperno M等(*J Crohns Colitis*.2011;5:484-98)讨论并比较了基于视觉检查UC的评估示例。

[0218] 也存在具有相同目的的临床评分系统。内窥镜检查或其他粘膜检查的结果可以纳入这些临床评分系统,但是这些评分系统还包含基于症状的数据,例如排便频率,直肠出血和医生的整体评估。IBD有多种影响生活质量的症状,因此某些评分系统还考虑了对生活质量影响的定量评估以及症状的量化。

[0219] UC评分系统的一个示例是Mayo评分系统(Schroeder等人,*N Eng J Med*,1987,317:1625-1629),但还存在其他一些较不常用的方法,包括溃疡性结肠炎内镜指数严重程



度(UCEIS)评分(Travis等,2012,Gut,61:535-542),Baron评分(Baron等,1964,BMJ,1:89),溃疡性结肠炎结肠镜检查的严重程度指数(UCCIS)(Thia等,2011,Inflamm Bowel Dis,17:1757-1764),Rachmilewitz内窥镜指数(Rachmilewitz,1989,BMJ,298:82-86),Sutherland指数(也称为UC疾病活动指数(UCDAI)评分系统;Sutherland等,1987,Gastroenterology,92:1994-1998),Matt's评分(Matt's,1961,QJM,30:393-407),和Blackstone指数(Blackstone,1984,炎性肠病(Inflammatory bowel disease).于:Blackstone M0(编)内窥镜解释:胃肠道的正常和病理表现(Endoscopic interpretation:normal and pathologic appearances of the gastrointestinal tract),1984,第464-494页)。有关综述,参见Paine,2014,Gastroenterol Rep2:161-168。因此,本文还考虑了用于治疗诊断有UC和患有UC的对象的方法,其中所述治疗包括给予如本文所述的SG-11蛋白或其变体或片段,并且其中所述治疗导致UC病理降低,如通过测量UCEIS评分,Baron评分,UCCIS评分,Rachmilewitz内窥镜指数,Sutherland指数和/或Blackstone指数来确定。

[0220] CD评分系统的一个示例是克罗恩氏病活动指数(CDAI)(Sands B等,2004,N Engl J Med 350(9):876-85);大多数主要研究都使用CDAI来定义疾病的反应或缓解。CDAI评分的计算包括对7天以上的液体粪便次数,7天以上的腹痛实例和严重程度,7天以上的总体健康状况,肠外并发症(例如,关节炎/关节痛,虹膜炎/葡萄膜炎,结节性红斑,坏疽性脓皮病,口疮性口炎,肛门裂/瘘/脓肿,和/或发烧 $>37.8^{\circ}\text{C}$ 进行评分),7天内使用止泻药,出现腹部肿块,血细胞比容,和体重,以理想/观察之比或与标准重量的百分比偏差显示。根据CDAI评分,将CD分为无症状缓解(0到149分),轻度到中度活性的CD(150到220分),中度到重度活性的CD(221到450分),或重度活性暴发性疾病(451至1000点)。在一些实施方式中,包括向诊断为CD的患者给予治疗有效量的SG-11蛋白或其变体或片段的所述治疗方法导致CD的诊断分数降低。例如,该分数可以将诊断从严重活性变为轻度或中度活性或无症状缓解。

[0221] Harvey-Bradshaw指数是CDAI的简单版本,仅由临床参数组成(Harvey等,1980,Lancet 1(8178):1134-1135)。炎性肠病问卷(IBDQ)也解决了对生活质量的影响(Irvine等,1994,Gastroenterology 106:287-296)。替代方法还包括CDEIS和SES-CD(参见,例如Levesque等,(2015)Gastroenterol.148:3757)。

[0222] 在一些实施方式中,提供了一种治疗IBD,例如UC的方法,其中所述治疗有效降低Mayo评分。Mayo评分是用于评估UC严重程度的内窥镜和临床综合评分表,评分范围为1-12。Mayo评分表是粪便频率,直肠出血,可弯曲的乙状结肠镜或结肠镜检查结果以及医生的整体评价结果的子评分的综合(Paine,2014,Gastroenterol Rep 2:161-168)。对于直肠出血,少于一半的时间中粪便中出现的血斑被指定为1分,大多数粪便中的血液被指定为2分,通过的纯血被指定为3分。关于粪便次数,给正常的每日粪便次数分配0分,给比正常多1或2次粪便分配1分,给比正常多3或4次粪便分配2分,并且比正常多5次或更多次粪便分配3分。对于内窥镜检查组件,得分为0表示正常的粘膜或无活性UC,对于有轻度易碎,血管模式减少和粘膜红斑迹象的轻度疾病的评分为1,对于表现为易碎,糜烂,血管形态完全丧失和明显的红斑的中度疾病的评分为2,溃疡和自发性出血的评分为3(Schroeder等,1987,N Engl J Med,317:1625-1629)。由医生进行的整体评价为:发现正常为0分,轻度结肠炎为1分,中度结肠炎为2分,重度结肠炎为3分。因此,在一些实施方式中,当患者经历以下至少一项中的Mayo评分降低至少1、2或3分时,则用SG-11治疗性蛋白或其变体或片段治疗的患者被成

功治疗:直肠出血,大便中可见血斑,内窥镜评分和医师的整体评估。在一些实施方式中,包括向诊断为UC的患者给予治疗有效量的SG-11蛋白或其变体或片段的所述治疗方法导致UC的诊断分数降低。例如,该评分可以将诊断评分,例如Mayo评分改变至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11分。

#### [0223] 囊袋炎

[0224] 另外地或可替代地,包含SG-11治疗性蛋白质或变体的组合物和本文所述的给予方法可用于治疗囊袋炎。囊袋炎是在UC治疗中通过手术产生的囊壁炎症。具体而言,患有严重UC的对象可能会通过称为回肠吻合术(IPAA)或J袋手术的方法将患病的结肠切除并重新连接肠。囊袋炎病例可在许多患者中复发,表现为急性复发性囊袋炎或慢性顽固性囊袋炎。因此,本文提供了用于治疗囊袋炎,急性囊袋炎或复发性囊袋炎的方法。

[0225] 囊袋炎的活性可分为缓解(无活性囊袋炎),轻度至中度活性(粪便频率增加,尿急和/或不频繁尿失禁)或重度活性(频繁尿失禁和/或患者因脱水而住院)。囊袋炎的持续时间可定义为短期(少于或等于四周)或长期(四周或更长),并且其模式可分为不频繁(1-2次急性发作),复发(三次或更少发作)或连续发作。可以将对药物治疗的反应标记为有反应的治疗或难治性治疗,并指定两种情况下的药物。因此,在一些实施方式中,提供了一种用于治疗被诊断为患有囊袋炎的对象的方法,其中用包含SG-11或其变体或片段的药物组合物进行的治疗导致囊袋炎的严重性降低和/或导致缓解。

#### [0226] 粘膜炎症和粘膜屏障

[0227] 胃肠道(GI)的粘膜是一个复杂的微环境,涉及上皮屏障,免疫细胞和微生物。在健康的结肠中保持微妙的平衡。腔内微生物通过由上皮和粘液组成的屏障与宿主免疫系统物理隔离。IBD的发病机制虽然尚未完全阐明,但可能涉及宿主对粘膜屏障功能异常的共生菌群改变的不适反应。参见,Boltin等,“炎症肠病中的粘蛋白功能更新(Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update)”,J.Clin.Gastroenterol.,卷47(2):106-111(2013年2月)。

[0228] 当癌症治疗(尤其是化学疗法和放射疗法)分解肠壁(从口腔到肛门)的快速分裂的上皮细胞,使粘膜组织易于溃疡和感染时,就会发生粘膜炎症。粘膜组织,也称为粘膜或黏膜,覆盖与空气连通的所有身体通道,例如呼吸道和消化道,并具有分泌粘液的细胞和相关腺体。这种覆盖口腔的衬里部分称为口腔粘膜,是人体最敏感的部分之一,特别容易受到化学疗法和放射线的伤害。口腔是粘膜炎症最常见的位置。尽管口腔粘膜是粘膜毒性和由此产生的粘膜炎症的最常见部位,但应理解,粘膜炎症也可沿整个消化道发生,包括食道,胃,小肠(十二指肠,空肠,回肠),大肠(结肠)和直肠。在一些实施方式中,包含SG-11或其变体或片段的药物组合物在治疗上有效治疗口腔,食道,胃,小肠(十二指肠,空肠,回肠),大肠(结肠)和/或直肠的粘膜。

[0229] 口腔粘膜炎症可导致多种问题,包括疼痛,由于无法进食而引起的营养问题,以及由于粘膜开放性溃疡引起的感染风险增加。它对患者的生活质量有重大影响,并且可能是剂量限制的(即,要求减少随后的化疗剂量)。世界卫生组织有一个诊断口腔粘膜炎症的口腔毒性量表:1级:酸痛±红斑,2级:红斑,溃疡;患者可以吞咽固体食物;3级:广泛性红斑溃疡;患者不能吞咽固体食物;4级:粘膜炎症至无法消化的程度。3级和4级口腔粘膜炎症被认为是严重的粘膜炎症。因此,本文提供了一种用于治疗诊断为口腔粘膜炎症的对象的方法,其中给予包

含SG-11或其变体或片段的药物组合物可使口服毒性的等级从1到4级降低至少1分。

[0230] 结肠缩短

[0231] 溃疡性结肠炎是一种影响结肠粘膜的特发性炎性肠病,临床特征是腹泻,腹痛和便血。疾病的程度是可变的,可能仅累及直肠(溃疡性直肠炎),结肠左侧至脾曲或整个结肠(胰腺炎)。该疾病的严重程度在组织学上也可能相当不同,范围从最小到小范围溃疡和发育不良。癌可能发展。溃疡性结肠炎的典型组织学(微观)病灶是隐窝脓肿,其中隐窝上皮破裂,管腔充满多形核细胞。固有层被白细胞浸润。由于隐窝被破坏,正常的粘膜结构消失,瘢痕缩短并可能使结肠狭窄。因此,结肠缩短可能是结肠炎疾病的结果,并且通常用于诊断。例如,非侵入性腹部平面X射线可以显示急性病人的横结肠气态轮廓。平面膜以及双对比钡灌肠也可证明结肠缩短和胃粘膜消失。溃疡性疾病的指示包括粘膜细节缺失,鹅卵石填充型缺陷和节段受累区域。参见:“溃疡性结肠炎:简介—约翰霍普金斯医学(Ulcerative Colitis:Introduction-Johns Hopkins Medicine)”,网址为:[www.hopkinsmedicine.org/gastroenterology\\_hepatology/\\_pdfs/small\\_large\\_intestine/ulcerative\\_colitis.pdf](http://www.hopkinsmedicine.org/gastroenterology_hepatology/_pdfs/small_large_intestine/ulcerative_colitis.pdf)。

[0232] 此外,本领域公认的结肠炎的体内模型在评估模型中结肠炎的严重性时将利用结肠长度的缩短。参见Kim等,“在DSS诱导的IBD模型中研究肠道炎症(Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD)”,*Journal of Visualized Experiments*,卷60,第2-6页(2012年2月)。

[0233] 非IBD疾病中的上皮屏障功能

[0234] 功能异常的上皮屏障越来越多地参与例如IBD和粘膜病。此外,研究表明,还有许多其他疾病也是由功能异常的上皮屏障引起,联系,关联和/或加重的。这些疾病包括:(1)代谢性疾病,包括:肥胖,2型糖尿病,非酒精性脂肪性肝炎(NASH),非酒精性脂肪性肝病(NAFLD),肝脏疾病和酒精性脂肪性肝炎(ASH);(2)腹腔疾病;(3)坏死性小肠结肠炎;(4)肠易激综合症(IRS);(5)肠感染(例如艰难梭菌(*Clostridium difficile*));(6)其他一般胃肠道疾病;(7)间质性膀胱炎;(8)神经系统疾病或认知障碍(例如阿尔茨海默氏症,帕金森氏症,多发性硬化症和自闭症);(9)化疗相关性脂肪性肝炎(CASH);和(10)上述疾病的儿科形式。参见例如,Everard等,“遗传性肥胖和饮食诱导的瘦素抵抗性小鼠中对益生元的葡萄糖和脂质代谢及肠道菌群反应(Responses of Gut Microbiota and Glucose and Lipid Metabolism to Prebiotics in Genetic Obese and Diet-Induced Leptin-Resistant Mice)”,*Diabetes*,卷60(2011年11月),第2775-2786页;Everard等,“黏液阿克曼氏菌与肠道上皮之间的相互影响控制了饮食引起的肥胖(Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity)”,*PNAS*,卷110,第22期,(2013年5月),第9066-9071页;Cani等,“小鼠中高脂饮食诱导的肥胖症和糖尿病中肠道微生物群控制代谢性内毒素血症引起的炎症的变化(Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice)”,*Diabetes*,卷57,(2008年6月),第1470-1481页;Delzenne等,“在肥胖症中靶向肠道菌群:益生元和益生菌的作用(Targeting gut microbiota in obesity:effects of prebiotics and probiotics)”,*Nature Reviews*,卷7,(2011年11月),第639-646页。因此,为患者恢复适当的上皮屏障功能可能对解决前述

疾病状态至关重要。

[0235] 消化道内腔(包括嘴,食道,胃,小肠,大肠和直肠)中正常功能的上皮屏障对于控制和维持胃肠道和消化道内的微生物组至关重要。微生物组的生态系统包括驻留在胃肠道和消化道中的环境,屏障,组织,粘液,粘蛋白,酶,营养,食物和微生物群落。肠粘膜屏障的完整性和通透性以许多关键方式影响健康。

[0236] 由于粘蛋白分泌的改变,在胃肠道疾病中粘膜屏障完整性的丧失可能与宿主的免疫变化,管腔微生物因子或直接作用的遗传或环境决定因素有关。因此,粘液屏障的不平衡可能是IBD发病机制的中心。Boltin等,“炎症肠病中的粘蛋白功能更新(Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update)”,*J.Clin.Gastroenterol.*,卷47(2):106-111(2013年2月)。

[0237] 粘蛋白是位于胃肠道内的粘液层的主要成分。人类基因组中已知至少有21种粘蛋白(MUC)基因,编码分泌型或膜结合型粘蛋白。正常结直肠中主要的粘蛋白是MUC1,MUC2,MUC3A,MUC3B,MUC4,MUC13和MUC17.1MUC2是杯状细胞中产生的肠道粘液的主要分泌性凝胶成分。参见,Boltin等,“炎症肠病中的粘蛋白功能更新(Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update)”,*J.Clin.Gastroenterol.*,卷47(2):106-111(2013年2月)。MUC2的杯状细胞分泌物与其他分泌的粘蛋白(例如MUC1、3A、3B、4、13和17.1)一起在结肠上皮细胞上形成保护性屏障,从而减少了对肠内容物的暴露,所述肠内容物可能会损害上皮细胞或初免免疫反应。

[0238] IBD中的炎症机制

[0239] 有大量证据表明某些细胞因子与IBD有关。最近的研究表明,细胞因子在克罗恩氏病和溃疡性结肠炎等炎症肠病(IBD)的发病机理中起着至关重要的作用,它们可控制炎症反应的多个方面。Markus Neurath,“炎症肠病中的细胞因子(Cytokines in Inflammatory Bowel Disease)”,*Nature Reviews Immunology*,第14卷,329-342(2014)。特别地,IBD中发生的促炎和抗炎细胞因子之间的不平衡阻碍了炎症的消退,反而导致了疾病永存和组织破坏。同上。最近的研究表明存在调节性细胞因子网络,该网络对疾病的进展具有重要意义。同上。因此,进行实验以研究SG-11对促炎和抗炎细胞因子的产生和/或分泌的作用。

[0240] 促炎细胞因子

[0241] 简而言之,促炎细胞因子是在细胞信号传导中重要并促进全身性炎症的细胞因子。它们主要由活化的巨噬细胞产生,并参与炎症反应的上调。促炎细胞因子来自编码用于翻译小介体分子的基因,这些介体分子在上调后引起应答。白介素-1(IL-1),IL6,IL-12,IL-18,IL-23,CD40L,肿瘤坏死因子(TNF)如TNF- $\alpha$ ,  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ ),粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和MCP-1是充分表征的促炎性细胞因子。炎症的特征在于促炎和抗炎细胞因子之间的相互作用。

[0242] 降低促炎细胞因子的生物活性可用于治疗某些疾病。例如,阻断IL-1或TNF- $\alpha$ 已成功帮助类风湿关节炎,炎症肠病或移植物抗宿主病患者。参见Strober W,Fuss IJ(2011年5月)。“炎症肠病发病机理中的促炎细胞因子(Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases)”,*Gastroenterology*,卷140(6):1756-67。

[0243] 抗炎细胞因子

[0244] 简而言之,抗炎细胞因子是调节促炎细胞因子反应的一系列免疫调节分子。因此,这些分子调节并帮助减少由促炎细胞因子触发的炎症反应。抗炎细胞因子包括例如IL4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$ , 并且转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 被认为是抗炎细胞因子。

[0245] 在本文教导的方法的一些实施方式中,包含SG-11蛋白或其变体或片段的药物组合物的给予能够导致减少由给予组合物的患者的免疫细胞产生至少一种促炎细胞因子(例如TNF- $\alpha$ 和/或IL-23)。在一些实施方式中,所述给药能够引起增加由患者免疫细胞产生至少一种抗炎细胞因子(例如IL-10)。在一些实施方式中,所述给药能够引起减少由患者免疫细胞产生至少一种抗炎细胞因子(例如IL-10)。在一些实施方式中,所述给药能够改善患者上皮细胞中粘蛋白的产生和/或上皮伤口的愈合。

[0246] 用于治疗给药方案取决于所需的治疗效果,给药途径和治疗持续时间。剂量因患者而异,具体取决于疾病的性质和严重程度,患者的体重,患者随后的特殊饮食,同时用药以及本领域技术人员会认识到的其他因素。

[0247] 通常,向患者,例如患有炎症肠病的患者给予每天0.0001至10mg/kg体重的治疗性蛋白质剂量水平。剂量范围通常为每位患者每天约0.5mg至100.0g,可以单剂量或多剂量给药。

[0248] 在一些方面,剂量范围将是每名患者每天约0.5mg至10g,或每名患者每天0.5mg至9g,或每名患者每天0.5mg至8g,或每名患者每天0.5mg至7g,或每位患者每天0.5mg至6g,或每位患者每天0.5mg至5g,或每位患者每天0.5mg至4g,或每位患者每天0.5mg至3g,或每位患者每天0.5mg至2g,或每位患者每天0.5mg至1g。

[0249] 在一些方面,剂量范围将是每名患者每天约0.5mg至900mg,或每名患者每天0.5mg至800mg,或每名患者每天0.5mg至700mg,或每名患者每天0.5mg至600mg,或每位患者每天0.5mg至500mg,或每位患者每天0.5mg至400mg,或每位患者每天0.5mg至300mg,或每位患者每天0.5mg至200mg,或每位患者每天0.5mg至100mg,或每位患者每天0.5mg至50mg,或每位患者每天0.5mg至40mg,或每位患者每天0.5mg至30mg,或每位患者每天0.5mg至20mg,或每位患者每天0.5mg至10mg,或每位患者每天0.5mg至1mg。

[0250] 包含治疗性蛋白质的组合疗法

[0251] 本文教导的包含治疗性蛋白质的药物组合物可以与其他治疗方法和/或药物组合物组合。例如,患有炎症肠病的患者可能已经在服用其医生开的处方药来治疗该疾病。在实施方式中,本文所教导的药物组合物能够与患者现用药物联合给药。

[0252] 例如,本文教导的治疗性蛋白质可以与以下中的一种或多种组合:止泻药,5-氨基水杨酸化合物,抗炎剂,抗生素,抗体(例如靶向炎性细胞因子的抗体,例如靶向抗细胞因子药物的抗体,例如抗TNF- $\alpha$ (例如,阿达木单抗,PEG化塞妥珠单抗,戈利木单抗,英夫利昔单抗,V565)或抗IL-12/IL-23(例如,优特克单抗(ustekinumab),利散珠单抗(risankizumab),布拉兹库单抗(brazikumab),优特克单抗),JAK抑制剂(例如,托法替尼,PF06700841,PF06651600,菲格替尼,乌帕替尼),抗整合素剂(例如,维多丽珠单抗,埃托里珠单抗),S1P抑制剂(例如,埃曲西莫德,奥扎尼莫德,阿米塞莫德),基于细胞的重组药物(例如Cx601),类固醇,皮质类固醇,免疫抑制剂(例如硫唑嘌呤和巯基嘌呤),维生素和/或特殊饮食。

[0253] 可以对经历化学疗法或放射疗法并且患有或处于发展粘膜炎症例如口腔粘膜炎症风

险的癌症患者给予根据本发明的药物组合物与用于治疗粘膜炎例如口腔粘膜炎的试剂的组合。在一些实施方式中,一种治疗方法包括向患有粘膜炎的患者给予包含SG-11或其变体或片段的药物组合物与一种或多种选自氨磷汀,苯佐卡因,苯乙胺,雷尼替丁,奥美拉唑,辣椒素,谷氨酰胺,前列腺素E<sub>2</sub>,维生素E,硫糖铝和别嘌醇的第二治疗剂的组合。

[0254] 在本文方法的一些实施方式中,第二治疗剂与本文所述的SG-11蛋白同时或顺序给予。在一些实施方式中,所述蛋白质和第二试剂协同作用以治疗或预防所述疾病,病症或症状。在其他实施方式中,所述蛋白质和第二试剂叠加作用以治疗或预防所述疾病,病症或症状。

[0255] 包含SG-11治疗性蛋白质的药物组合物

[0256] 本文提供了药物组合物,其包含根据本公开的SG-11蛋白,其变体或片段或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,配制药物组合物以给予于胃肠道内腔,包括口腔,食道,小肠,大肠,直肠和/或肛门。

[0257] 在一些实施方式中,组合物包含与蛋白质的来源相关的一种或多种其他物质,例如,来自生产宿主细胞的细胞成分,或与蛋白质的化学合成相关的物质。在其他实施方式中,将药物组合物配制成包括一种或多种本文所述的第二活性剂。此外,组合物可包含保持活性剂或组合物本身的结构和/或功能活性的成分。这类成分包括但不限于抗氧化剂和各种抗菌剂和抗真菌剂,包括但不限于对羟基苯甲酸酯(例如对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸丙酯),氯丁醇,苯酚,山梨酸,硫柳汞或其组合。

[0258] 术语“药物(的)”或“药学上可接受的”是指当适当地给予于动物例如人时,不会或优选地不产生不利的,过敏的或其他不良反应的组合物。药物组合物或另外的活性成分的制备将是本领域技术人员已知的,例如《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版,马克印刷公司,1990,通过引用并入本文。另外,就动物(如人)给药而言,理解制备应该满足由FDA官方生物学标准要求的无菌性、致热原性、常规安全和纯度标准。

[0259] 根据预期的给药途径以及是否以例如固体,液体或气雾剂形式给药来配制本公开的药物组合物。在一个优选的实施方式中,该组合物可以直肠给药,但是也可以通过注射,输注,口服,鞘内,鼻内,皮下,粘膜,局部直接给予灌注液浸浴的靶细胞,其通过导管、通过灌洗或通过本领域普通技术人员已知的其他方法或前述方法的任意组合的方式进行。包含治疗有效量的蛋白质的液体制剂可以通过灌肠,导管,使用球形注射器经直肠给药。栓剂是配制用于直肠递送的固体剂型的示例。通常,对于栓剂,传统的运载体可以包括例如聚亚烷基二醇,甘油三酯或其组合。在某些实施方式中,栓剂可以从混合物形成,包含例如活性成分范围约0.5%-约10%,且或约1%-约2%。可注射液体组合物通常基于可注射无菌盐水或磷酸盐缓冲盐水或本领域已知的其他可注射运载体。其他液体组合物包括悬浮液和乳液。诸如用于口服给药的固体组合物可以是片剂,丸剂,胶囊剂(例如硬或软壳明胶胶囊),口腔组合物,锭剂,酏剂,混悬剂,糖浆剂,糯米纸囊剂(wafers)或其组合的形式。这种液体和固体组合物中的活性剂,即本文所述的蛋白质,通常是约0.05重量%至10重量%的组分,其余为可注射运载体等。

[0260] 药物组合物可以被配制成控释或缓释组合物,其提供包括在延长的时间段,例如30-60分钟,或1-10小时,2-8小时,8-24小时等上释放包括本公开内容的治疗性蛋白质的活

性剂。可替代地或另外地,配制组合物以释放至宿主体内的特定部位。例如,该组合物可具有肠溶衣以防止活性剂在酸性环境如胃中释放,使其仅在小肠,结肠或直肠的更中性或碱性环境中释放。替代地或另外地,可以配制组合物以提供在口腔,小肠或大肠中的延迟释放。

[0261] 根据预期的给药途径,每种上述制剂可包含至少一种药学上可接受的赋形剂或运载体,例如,用于直肠给药的固体或用于静脉内或肠胃外给药或经由套管给药的液体。本文使用的“药学上可接受的运载体”包含任何和所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、诸如此类的物质和其组合,此应为本领域普通技术人员已知(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》),马克出版公司(Mack Printing Company),1990,第1289-1329页,通过引用纳入本文)。

[0262] 用于给药的药物组合物可以单位剂型存在以促进准确配量。对于固体组合物,典型的单位剂型包括液体组合物或栓剂,丸剂,片剂,胶囊剂等的预填充的,预先测量的安瓿或注射器。在此类组合物的一些实施方式中,活性剂,即本文所述的蛋白质,可以是组分(约0.1至50wt/wt%,1至40wt/wt%,0.1至1wt/wt%,或1至10wt/wt%),其余为各种载剂或载体和加工助剂,有助于形成所需的剂量形式。

[0263] 可以通过物理和生理因素,例如体重,病情的严重程度,所治疗的疾病的类型,先前或同时的治疗干预措施,病人的特发病和给药途径来确定给予患者的本公开的单位剂型的实际剂量。在任何事件中,负责给予的医师将确定组合物中活性成分的浓度,以及对于个体对象合适的剂量。

[0264] 蛋白质表达系统和蛋白质产生

[0265] 本文提供了用于产生本公开的分离的蛋白质的组合物和方法,以及包含编码该蛋白质的多核苷酸序列的表达载体和带有该表达载体的宿主细胞。

[0266] 本公开的蛋白质可以通过常规重组方法来制备,例如,培养用表达载体转化或转染的细胞,所述表达载体包含编码SG-11治疗性蛋白质,其变体或片段的核酸。还提供了包含任何此类载体的宿主细胞。宿主细胞可以是原核或真核的,宿主细胞的示例包括大肠杆菌,酵母或哺乳动物细胞。进一步提供了生产任何本文所述蛋白质的方法,其包括在适于所需蛋白质表达的条件下培养宿主细胞,并从细胞培养物中回收所需蛋白质。然后可以分离和/或纯化回收的蛋白质,以用于体外和体内方法,以及配制成药学上可接受的组合物。在一些实施方式中,蛋白质在原核细胞例如大肠杆菌中表达,并且蛋白质的分离和纯化包括将内毒素降低至人类或其他动物治疗用途可接受的水平步骤。

[0267] 表达载体

[0268] 本文提供表达载体,其包含编码本公开内容的蛋白质或其变体和/或片段的多核苷酸序列。可以使用标准重组技术获得编码本公开内容的蛋白质的多核苷酸序列。所需的编码多核苷酸序列可以从源细菌,即人罗斯氏菌(*R.hominis*)的基因组DNA中扩增得到。或者,可以使用核苷酸合成仪合成多核苷酸。一旦获得,将编码多肽的序列插入能够在宿主细胞中复制和表达异源(外源)多核苷酸的重组载体中。为了本公开的目的,可以使用本领域已知的许多载体。合适载体的选择将主要取决于待插入载体中的核酸的大小以及待用该载

体转化的特定宿主细胞。每个载体包含各种组分,这取决于其功能(异源多核苷酸的扩增或表达,或两者兼有)及其与所驻留的特定宿主细胞的相容性。载体组分通常包括但不限于:复制起点,选择标志物基因,启动子,核糖体结合位点(RBS),信号序列,异源核酸插入物和转录终止序列。

[0269] 通常,含有衍生自与宿主细胞相容的物种的控制序列和复制子的质粒载体与这些宿主结合使用。载体通常携带复制位点以及标记序列,其能够在转化的细胞中提供表型选择。例如,通常使用pBR322,pUC,pET或pGEX载体,一种衍生自大肠杆菌物种的质粒转化大肠杆菌。此类载体包含编码氨苄青霉素(Amp)和四环素(Tet)抗性的基因,因此提供了鉴定转化细胞的简便方法。这些载体以及它们的衍生物或其他微生物质粒或噬菌体还可包含或被修饰为包含可被微生物有机体用于表达内源性蛋白质的启动子。

[0270] 本公开的表达载体可包含启动子,其为位于上游(5')并与编码蛋白质的核苷酸序列可操作地连接的未翻译的调控序列,使得该启动子调控该编码序列的转录。原核启动子通常分为两类,诱导型和组成型。诱导型启动子是响应于培养条件的变化(例如营养物的存在或不存在或温度的变化)而在其控制下启动编码多核苷酸转录水平提高的启动子。被多种潜在宿主细胞识别的大量启动子是众所周知的,技术人员可以根据所需的表达水平选择启动子。适用于原核宿主的启动子包括大肠杆菌启动子,例如lac,trp,tac,trc和ara;被大肠杆菌识别的病毒启动子,例如 $\lambda$ 和T5启动子;以及衍生自T7噬菌体的T7和T7lac启动子。携带包含例如T7启动子的载体的宿主细胞经工程改造以表达T7聚合酶。这样的宿主细胞包括大肠杆菌BL21(DE3),Lemo21(DE3)和NiCo21(DE3)细胞。在一些实施方式中,启动子是在化学或环境因素控制下的诱导型启动子。

[0271] 其他可用的质粒载体包括pIN载体(Inouye等,1985)和pGEX载体,其用于生成谷胱甘肽S-转移酶(GST)可溶性融合蛋白用于随后的纯化和分离或切割。其他合适的融合蛋白是与 $\beta$ -半乳糖苷酶,泛素等的融合蛋白。

[0272] 用于在原核和真核宿主细胞中表达的合适载体是本领域已知的,并且本文中进一步描述了一些。

[0273] 本公开的载体可以进一步包含信号序列,其允许翻译的重组蛋白被宿主细胞识别和加工(即,被信号肽酶切割)。对于不识别和加工对于异源多肽呈天然的信号序列的原核宿主细胞,该信号序列被原核信号序列取代,该原核信号序列选自例如碱性磷酸酶,青霉素酶,Ipp或热稳定的肠毒素II(STII)引导物,LamB,PhoE,PeIB,OmpA和MBP。用于真核表达系统的众所周知的信号序列包括但不限于白介素-2,CD5,免疫球蛋白 $\kappa$ 轻链,胰蛋白酶原,血清白蛋白和催乳激素。

[0274] 如本文所述的SG-11蛋白或其变体或片段可以表达为融合蛋白或多肽。常用融合伴侣包括但不限于人血清白蛋白和IgG的可结晶片段或恒定结构域,Fc。组氨酸标签或FLAG标签也可用于简化从表达培养基或重组细胞裂解物中纯化重组蛋白。融合伴侣可以与目标蛋白质的N和/或C末端融合。

[0275] 宿主细胞

[0276] 用于在本文的载体中克隆或表达DNA的合适宿主细胞包括原核生物,酵母或更高等的真核生物细胞。多种细胞系和培养物可用于宿主细胞,其可通过例如美国典型培养物保藏中心(ATCC)获取,该组织是活培养物和基因材料的档案库。可用于载体复制和/或表达



的细胞类型包括但不限于细菌,例如大肠杆菌(例如大肠杆菌菌株RR1,大肠杆菌LE392,大肠杆菌B,大肠杆菌X 1776(ATCC编号31537),大肠杆菌W3110(F<sup>-</sup>, $\lambda$ <sup>-</sup>,原养型,ATCC编号273325),DH5 $\alpha$ ,JM109和KC8,杆菌(如枯草芽孢杆菌);以及其他肠杆菌科,如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*),粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),各种假单胞菌属物种,以及许多市售细菌宿主,例如SURE®感受态细胞和SOLOPACK™金细胞(STRATAGENE®,La Jolla)。在某些实施方式中,特别考虑将细菌细胞例如大肠杆菌作为宿主细胞。

[0277] 用于载体复制和/或表达的真核宿主细胞的示例包括但不限于HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、COS、CHO、Saos和PC12。另外的真核宿主细胞包括酵母(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))和源自昆虫的细胞(例如草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)或粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*))。来自各种细胞类型和生物体的许多宿主细胞是可获得的,并且是本领域技术人员已知的。类似地,病毒载体可以与真核或原核宿主细胞联合使用,特别是与允许载体复制或表达的宿主细胞联合使用。合适的宿主细胞的选择被认为在本领域技术范围内。

[0278] 众所周知的方法是将重组DNA,即表达载体,导入宿主细胞,以使DNA可复制,既可以作为染色体外元件,也可以作为染色体整合体,从而产生带有目的表达载体的宿主细胞。转染的方法是普通技术人员已知的,例如通过CaPO<sub>4</sub>和电穿孔。根据所用宿主细胞,使用适合于此类细胞的标准技术进行转化。如上文Sambrook等所述,采用氯化钙的钙处理或电穿孔通常用于原核生物或含有大量细胞壁屏障的其他细胞。哺乳动物细胞宿主系统转化的一般方面已在美国专利号4,399,216中描述。通常根据Van Solingen等,J.Bact,130:946(1977)和Hsiao等,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA),76:3829的方法进行向酵母中的转化。将DNA引入细胞的其他方法包括核显微注射,电穿孔,细菌原生质体与完整细胞融合,或使用聚阳离子例如聚对苯二胺,聚鸟氨酸的引入。有关转化哺乳动物细胞的各种技术,请参见Keown等,Methods in Enzymology.185:527-537(1990)和Mansour等,Nature,336:348-352(1988)。

[0279] 因此,本文提供了如上所述的重组载体或表达载体,其包含编码感兴趣的SG-11治疗性蛋白质序列(例如,SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19或其变体和/或片段,如本文所述)的多核苷酸。该多核苷酸可以是例如SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20中的任一种或其变体或片段。此外,本公开教导了携带所述载体的宿主细胞。宿主细胞可以是如上所述的真核或原核细胞。在一个优选的实施方式中,宿主细胞是原核细胞。在另一个优选的实施方式中,宿主细胞是大肠杆菌。

[0280] 在一些实施方式中,编码目的蛋白的多核苷酸是密码子优化的。将密码子优化算法应用于编码蛋白质的多核苷酸序列,以便根据表达宿主的密码子使用偏好为给定的氨基酸选择合适的密码子。许多密码子优化算法还考虑了其他因素,例如mRNA结构,宿主GC含量,核糖体进入位点。密码子优化算法和基因合成服务提供者的一些示例是:AUTM:[www.atum.bio/services/genegps](http://www.atum.bio/services/genegps);金斯瑞公司(GenScript):[www.genscript.com/codon-opt.html](http://www.genscript.com/codon-opt.html);赛默飞世尔(ThermoFisher):[www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html);和整

合DNA技术公司(Integrated DNA Technologies):[www.idtdna.com/CodonOpt](http://www.idtdna.com/CodonOpt)。然后合成核苷酸序列并将其克隆到合适的表达载体中。在本公开中,本公开中的密码子优化的序列包括SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:20。

#### [0281] 产生蛋白质的方法

[0282] 提供了产生本文描述的蛋白质的方法,但却是普通技术人员众所周知的。用经本文描述的表达或克隆载体转化或转染的用于蛋白质生产的宿主细胞在常规营养培养基中培养,所述营养培养基经适当修饰以诱导启动子,选择和/或维持转化体,和/或表达编码所需蛋白质序列的基因。培养条件,例如培养基,温度,pH等,可以由技术人员选择而无需过多的实验。通常,可以在M.Butler编的《哺乳动物细胞生物技术:实践方法》(Mammalian Cell Biotechnology:A Practical Approach) (IRL Press,1991)和《分子克隆:实验室手册》(Sambrook等,1989,冷泉港实验室出版社)中找到使细胞培养物的生产率最大化的原理,方案和实用技术。

[0283] 通常,“纯化的”是指经过分级分离以去除非蛋白质成分和各种其他蛋白质,多肽或肽的特定蛋白质组合物,并且该组合物基本上保留了其活性,例如可以通过,如下文所述或通过本领域普通技术人员已知的蛋白质测定法针对所需的蛋白质,多肽或肽评估的那样。

[0284] 当使用术语“基本上纯化的”时,这将指这样的组合物,其中特定的蛋白质,多肽或肽形成该组合物的主要成分,例如构成该组合物中约50%或更多的蛋白质。在优选的实施方式中,基本上纯化的蛋白质将构成组合物中蛋白质的60%,70%,80%,90%,95%,99%或更多。

[0285] 应用于本公开的“纯化至均质”的肽,多肽或蛋白质是指该肽,多肽或蛋白质具有一定水平的纯度,其中该肽,多肽或蛋白质基本上不含其他蛋白质和生物学成分。例如,纯化的肽,多肽或蛋白质通常将充分不含其他蛋白质成分,从而可以成功地进行降解测序。

[0286] 尽管优选用于某些实施方式中,但没有一般要求始终以其最纯化的状态提供蛋白质,多肽或肽。实际上,可以预期,相对于天然状态,尽管在所需蛋白质组合物中富集的,基本上未纯化的蛋白质,多肽或肽在某些实施方式中将具有效用。

[0287] 根据本公开,量化蛋白质,多肽或肽的纯化程度的各种方法对于本领域技术人员而言将是已知的。这些包括,例如,通过凝胶电泳确定级分的比蛋白活性,或评估级分内的多肽数量。

[0288] 另一个例子是使用特异性结合伴侣纯化特异性融合蛋白。这种纯化方法是本领域常规的。由于本公开提供了特定蛋白质的DNA序列,因此现在可以实践任何融合蛋白纯化方法。这可以通过生成特定的蛋白质-谷胱甘肽S-转移酶融合蛋白,在大肠杆菌中表达以及使用谷胱甘肽-琼脂糖上的亲和色谱法分离至同质或在蛋白质的N-或C-末端上生成多组氨酸标签,随后使用Ni亲和层析纯化来举例说明。但是,鉴于许多DNA和蛋白质是已知的,或者可以使用此处描述的方法进行鉴定和扩增,现在可以使用任何纯化方法。

[0289] 在其他实施方式中,可以使用肽富集的制备物代替纯化的制备物。在本文中,每当使用纯化的时,也可以使用富集的。与野生型相比,制备物不仅可以通过纯化方法来富集,而且还可以通过细菌对肽的过表达或过量生产来富集。这可以使用重组方法或通过选择能

诱导来自野生型细胞的肽表达的条件来完成。

[0290] 可以从培养基或宿主细胞裂解物中回收本发明的重组表达的多肽。合适的纯化程序包括,例如,通过在离子交换(阴离子或阳离子)柱上的分级;乙醇沉淀;反相HPLC;在硅胶或阳离子交换树脂(如DEAE)上进行色谱分离;色谱聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;凝胶过滤或尺寸排阻色谱(SEC),例如使用Sephadex G-75;和金属螯合柱以结合本发明多肽的表位标记形式。可以采用各种蛋白质纯化方法,并且这些方法是本领域已知的,并且描述于例如Deutscher,《酶学方法》(Methods in Enzymology),182(1990);Scopes,《蛋白质纯化:原理和实践》(Protein Purification:Principles and Practice),Springer-Verlag,纽约(1982)。选择的纯化步骤将取决于例如所使用的生产过程的性质和所生产的特定多肽。

[0291] 可以采用本领域熟知的替代方法来制备本发明的多肽。例如,可以使用固相技术通过直接肽合成来产生编码多肽或其部分的序列(参见,例如,Stewart等,1969,《固相肽合成》(Solid-Phase Peptide Synthesis),WH Freeman Co.,加利福尼亚州旧金山;Merrifield,J.1963,Am.Chem.Soc.,85:2149-2154。体外蛋白质合成可以使用手动技术或通过自动化进行。例如,可以使用制造商的说明书用应用生物系统肽合成仪(Applied Biosystems Peptide Synthesizer)(加利福尼亚州福斯特城)完成自动合成。可以分别化学合成本发明的多肽的各个部分或其部分,并使用化学或酶促方法组合以产生全长多肽或其部分。

[0292] 在一些实施方式中,本公开提供了嵌合分子,其包含与异源多肽或氨基酸序列融合的本文中描述的任何多肽,和编码该嵌合分子的多核苷酸。此类嵌合分子的实例包括但不限于与抗原决定簇标签序列,免疫球蛋白的Fc区融合的本文所述的任何多肽。

[0293] 重组细菌递送系统

[0294] 本公开内容设想利用在包含纯化的蛋白质的传统药物制剂之外的递送系统。在一些实施方式中,本公开利用重组细菌递送系统,噬菌体介导的递送系统,壳聚糖-DNA复合物或AAV递送系统。

[0295] 一种特定的重组细菌递送系统基于乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。本质上,可以将编码治疗性蛋白质的基因(例如SEQ ID NO:3)克隆到表达载体中,然后将该载体转化到乳酸乳球菌中。随后,可以将乳酸乳球菌给予于患者。参见例如Bratt等,“在克罗恩氏病中表达白介素-10的转基因细菌的1期试验(A phase 1 trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease)”,*Clinical Gastroenterology and Hepatology*,2006,卷4,第754-759页(“我们用遗传修饰的乳酸乳球菌(LL-Thy12)治疗了克罗恩氏病患者,其中的胸苷酸合酶基因被编码成熟的人白介素-10的合成序列所取代。”);Shigemori等,“分泌生物活性血红素加氧酶-1的乳酸乳球菌口服给药可减轻小鼠急性结肠炎的发展(Oral delivery of *Lactococcus lactis* that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice)”,*Microbial Cell Factories*,2015,卷14:189(“正在研究使用遗传修饰的乳酸菌菌株(gmLAB)粘膜递送治疗性蛋白质,作为一种新的治疗策略。”);Steidler等,“分泌白介素-10的乳酸乳球菌对鼠结肠炎的治疗(Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10)”,*Science*,2000,卷289,第1352-1355页(“细胞因子白介素-10(IL-10)在临床试验中已证明可治疗炎性肠病(IBD)。使用两种小鼠模型,我们证

明IL-10的治疗剂量可通过局部递送经过基因工程改造以分泌细胞因子的细菌来降低。尾内给予分泌IL-10的乳酸乳球菌可使硫酸右旋糖酐钠治疗的小鼠结肠炎减少50%，并预防IL-10/2小鼠中结肠炎的发作。该方案可能会导致更好的方法来对人类IBD进行低成本且长期的管控。”);Hanniffy等,“使用乳酸乳球菌粘膜递送肺炎球菌疫苗可提供针对呼吸道感染的保护(Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection)”,*Journal of Infectious Diseases*,2007,卷195,第185-193页(“在此,我们评估了乳酸乳球菌在细胞内产生肺炎球菌表面蛋白A(PspA)作为粘膜疫苗,以提供抵抗肺炎球菌疾病的保护。”);和Vandenbroucke等,“遗传修饰的乳酸乳球菌主动递送三叶因子可预防和治愈小鼠急性结肠炎(Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice)”,*Gastroenterology*,2004,卷127,第502-513页(“我们已经主动评估了一种急性和慢性结肠炎的新治疗方法,该方法涉及通过口服乳酸乳球菌原位分泌鼠TFF。这种新方法可能导致对人类急性和慢性结肠炎以及上皮损伤的有效治疗。”)。

[0296] 在另一个实施方式中,“合成细菌”可以用于递送SG-11蛋白或其变体或片段,其中益生菌被工程改造以表达SG-11治疗性蛋白(参见例如Durrer和Allen,2017,PLoS One,12:e0176286)。

[0297] 噬菌体已经过遗传工程改造以提供特定的DNA负载或改变宿主的特异性。诸如噬菌体,质粒和转座子之类的转移方法可用于通过转导,转化和偶联等过程将工程改造的DNA序列传递和循环至微生物群落。为了本公开的目的,充分理解工程改造的噬菌体可以通过将编码所述蛋白的核酸纳入噬菌体并利用噬菌体将核酸递送至宿主微生物的本发明的蛋白质的一种可能的递送系统,在噬菌体将核酸递送到其基因组后,该宿主微生物随后将产生蛋白质。

[0298] 与上述工程改造的噬菌体方法相似,可以利用转座子递送系统将编码治疗性蛋白质的核酸纳入留在患者微生物组中的宿主微生物中。参见,Sheth等,“通过原位微生物组工程改造来操纵细菌群落(Manipulating bacterial communities by in situ microbiome engineering)”,*Trends in Genetics*,2016,卷32,期4,第189-200页。

[0299] 以下实施例旨在说明,对本文公开范围不构成限制。

## 实施例

[0300] 以下实验利用体外实验与IBD的体内模型相结合的强大混合,以证明所教导的蛋白质和方法的治疗能力。

### [0301] 实施例1

#### [0302] SG-11及其变体的表达

[0303] 对于以下实施例中描述的实验,通过PCR扩增从人罗斯氏菌(*Roseburia hominis*)获得的基因组DNA(A2-183;DSM 16839型菌株;参见例如Duncan,S.H.,Aminov,R.I.,Scott,K.P.,Louis,P.,Stanton,T.B.,Flint,H.J.(2006).基于来自人粪便的分离株,提出粪便罗斯氏菌(*Roseburia faecis*)新种,人罗斯氏菌(*Roseburia hominis*)新种,和食葡萄糖罗斯氏菌(*Roseburia inulinivorans*)新种(Proposal of *Roseburia faecis* sp.nov.,

*Roseburia hominis* sp.nov.and *Roseburia inulinivorans* sp.nov.,based on isolates from human faeces).Int.J.Syst.Evol.Microbiol.卷56,第2437-2441页)获得编码SG-11 (SEQ ID NO:3)的多核苷酸。然后将编码多核苷酸亚克隆到诱导型表达载体中,并用于转化大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞用于使用本领域常规的培养和纯化方法表达和纯化SG-11或其变体,如下所述。

[0304] SG-11 (包含SEQ ID NO:3) 的表达

[0305] 使用pGEX载体系统实现了用于与本公开有关的各种实验的包含SG-11的氨基酸序列 (SEQ ID NO:5) 的蛋白质的表达和纯化,所述载体系统设计用于诱导型、高水平细胞内表达基因或基因片段。在大肠杆菌中的表达产生带标签的蛋白质,该蛋白质在氨基末端带有GST部分,在羧基末端具有目标蛋白质。该载体具有用于化学诱导型高水平表达的tac启动子和用于任何大肠杆菌宿主的内部 $lacI^q$ 基因。

[0306] 将包含编码SG-11的核苷酸序列的多核苷酸 (来自人罗斯氏菌DSM 16839的SEQ ID NO:3) 插入pGEX-6P-1 (GE医疗生命科学公司 (GE Healthcare Life Science),宾夕法尼亚州匹兹堡) 的多克隆位点 (BamHI和NotI位点) 以GST融合蛋白形式表达SG-11,其然后在Precision蛋白酶位点处进行了切割,从而生成了具有下表4中提供的SEQ ID NO:5的氨基酸序列 (由SEQ ID NO:6编码) 的SG-11。通过两种替代方法表达和纯化该蛋白质。首先,使BL21 (DE3) 转化子在LB和100 $\mu$ g/ml羧苄青霉素和1 $\mu$ g/ml氯霉素中于30 $^{\circ}$ C生长。当培养密度达到0.60D<sub>600</sub>时,用0.4mM IPTG诱导4小时来诱导表达。通过离心收集细胞,然后通过超声裂解,并将可溶性裂解物施加到GST-树脂柱上。用PBS洗涤结合的蛋白质,然后通过添加PreScission蛋白酶将纯化的无标签的SG-11C洗脱,以切割GST标签C末端的蛋白质。

[0307] 使用相同的pGEX表达构建体的另一种表达和纯化方法,是通过在37 $^{\circ}$ C下用50 $\mu$ g/ml羧苄青霉素在LB中培养转化的BL21 (DE3) 细胞来进行的。当培养物达到0.70D<sub>600</sub>的密度时,将其冷却至16 $^{\circ}$ C,并在16 $^{\circ}$ C用1mM IPTG诱导表达15小时。收获细胞并通过超声处理将其裂解,然后将可溶性裂解物加到GSTrap柱上。用HEPES缓冲液洗涤结合的蛋白质,然后通过加入HRV3C蛋白酶洗脱纯化的无标签的SG-11 (SEQ ID NO:5) 以切割GST标签C末端的蛋白质。鉴定并合并通过SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色确定的含有蛋白质的洗脱级分,然后将其施加于HiTrap Q HP阴离子交换柱,然后施加于Superdex 75 (26/60) 制备型尺寸排阻柱 (SEC),以获得最后的制备物。

[0308] 表4

	氨基酸序列	编码核酸序列
[0309]	<b>SEQ ID NO:5</b> GPLGSLEGEESVYYVGK KGVIASLDVETLDQSY DETELKSYVDAEVEDY TAEHGKNAVKVESLKV EDGVAKLKMKYKTPED YTAFNGIELYQGKVVAS LAAGYVYDGEFARVEE GKVVGAAATKQDIYSED DLKVAIIRANTDVKVDG EICYVSCQNVKLTGKDS VSIRDGYYLETGSVTAS VDTVGTQESVGTEQLSG TEQMEMTGEPVNADDT EQTEAAAGDGSFETDV YTFIVYKAAAS	<b>SEQ ID NO:6</b> GGGCCCCTGGGATCCCTGGAGGGAGAGGAAAG TGTCGTGTACGTGGGAAAGAAAGGCGTGATAG CGTCGCTGGATGTGGAGACGCTCGATCAGTCCT ACTACGATGAGACGGAAGTGAAGTCCTATGTG GATGCAGAGGTGGAAGATTACACCGCGGAGCA TGGTAAAAATGCAGTCAAGGTGGAGAGCCTTA AGGTGGAAGACGGTGTGGCGAAGCTTAAGATG AAGTACAAGACACCGGAGGATTATACCGCATT TAATGGAATTGAACTCTATCAGGGGAAAGTCG TTGCTTCCCTGGCGGCAGGATACGTCTACGACG GGGAGTTCGCCCGCGTGGAGGAAGGCAAGGTT GTGGGAGCTGCCACAAAACAGGATATTTACTC TGAGGATGATTTGAAAGTTGCCATCATCCGTGC CAATACGGATGTGAAGGTGGACGGTGAGATCT GCTATGTCTCCTGTCAGAATGTGAAGCTGACCG GAAAAGACAGTGTGTCGATCCGTGACGGATAT TATCTTGAGACGGGAAGCGTGACGGCATCCGT GGATGTGACCGGACAGGAGAGCGTCGGGACCG AGCAGCTTTCGGGAACCGAACAGATGGAGATG ACCGGGGAGCCGGTGAATGCGGATGATACCGA GCAGACAGAGGCGGCGGCCGGTGACGGTTCGT TCGAGACAGACGTATATACTTTCATTGTCTACA AAGCGGCCGCATCG

[0310] 使用pD451-SR载体系统(AUTM,加利福尼亚州纽瓦克)完成不含信号肽的成熟SG-11蛋白的表达和纯化。该表达载体利用了IPTG可诱导的T7启动子。将编码SG-11(SEQ ID NO:3)的多核苷酸(SEQ ID NO:4)在AUTM(加利福尼亚州纽瓦克)进行密码子优化以产生本文提供的SEQ ID NO:8的密码子优化的编码序列。将该密码子优化的编码序列插入pD451-SR载体中,并且所得的构建体提供了本文提供的SEQ ID NO:7的233个氨基酸的SG-11蛋白的表达。

[0311] 用该构建体转化的BL21(DE3)细胞在自动诱导培养基MagicMedia(赛默飞世尔(ThermoFisher))中生长。将培养物在25℃振荡孵育8小时,然后在16℃孵育至多72小时。离心沉淀细胞,重悬于含有50mM NaCl,2mg/ml溶菌酶和蛋白酶抑制剂的100mM Tris-HCl,pH 8.0中,然后将曲通X-100加入悬浮液中。然后将细胞超声处理,并通过离心制备澄清的裂解

物,以通过标准柱色谱技术纯化蛋白质。

[0312] SG-11 (SEQ ID NO:7) 先后用两种阴离子交换柱HiTrap Q HP然后Mono Q纯化。用Mono Q进一步纯化通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色确定的含有部分纯化的蛋白质的级分。Mono Q的纯化方法与HiTrap Q相同。合并含有SG-11的级分,并在缓冲液(50mM磷酸钠,150mM NaCl和10%甘油)中透析。使用SDS-PAGE和分析SEC,Superdex 200Increase 3.2/300分析纯度和均匀度,并评估该制备物的纯度约为92.7%。

[0313] pD451-SR载体系统也用于表达和纯化SG-11变体SG-11V5 (SEQ ID NO:19)。为了产生表达构建体,对SG-11的密码子优化序列 (SEQ ID NO:8) 进行修饰以产生编码SG-11V5 (SEQ ID NO:19)的SEQ ID NO:20的多核苷酸。将SG-11V5编码序列克隆到pD451-SR载体中。

[0314] 使用该构建体转化的BL21 (DE3) 细胞生长,并进行处理以制备澄清的裂解物,如上所述,用于表达SG-11 (SEQ ID NO:7)。

[0315] SG-11V5蛋白通过HiTrap Q纯化,然后通过疏水相互作用色谱 (HIC),HiTrap Butyl HP从澄清的裂解物中纯化。合并含有SG-11V5并通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色确定的级分,并在缓冲液(50mM磷酸钠,150mM NaCl和10%甘油)中的缓冲液中透析。所描述的所有制备用的柱色谱法使用ÄKTA 蛋白纯化系统 (GE医疗生命科学公司 (GE Healthcare Life Sciences),宾夕法尼亚州匹兹堡) 进行。

[0316] 在SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色后,使用牛血清白蛋白作为参比,通过光密度法对纯化的蛋白质进行定量。根据制造商的说明,使用Endosafe® nexgen-MCS™ (查尔斯河公司 (Charles River),马萨诸塞州威尔明顿) 测量内毒素水平。用于本文所述测定的蛋白质的内毒素水平低于1EU/mg。

[0317] 产生表达构建体,其中使用pET-28载体 (西格玛密理博公司 (Sigma Millipore)) 来容纳并表达在SG-11的N-末端带有FLAG标签 (DYKDDDDK;SEQ ID NO:32) 的编码SG-11 (SEQ ID NO:3) 的多核苷酸序列 (SEQ ID NO:4)。完整的FLAG标记的SG-11蛋白序列在本文中以SEQ ID NO:9提供 (并由SEQ ID NO:10编码)。使用该构建体的蛋白质表达在T7启动子的控制下,该启动子可以用异丙基 $\beta$ -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷 (IPTG) 诱导。使用PCR和编码DYKDDDDK的寡核苷酸,将N末端的FLAG标签纳入构建体中。转化的宿主细胞在2xYT培养基中于37℃过夜生长。然后将过夜培养物接种到新鲜的2xYT培养基中,并在37℃下孵育4小时。然后将4小时的培养物接种 (1%接种) 到MagicMedia™大肠杆菌表达培养基 (赛默飞世尔公司 (ThermoFisher)) 中。将细胞在25℃下生长8小时,然后在16℃下生长至多72小时,然后离心收集。蛋白质以可溶形式表达,可以从澄清的裂解物中回收。使用HiTrapQ阴离子交换柱,然后使用Superdex 200Increase 10/300GL SEC纯化表达的蛋白质。使用SDS-PAGE和分析SEC,Superdex 200Increase 3.2/300分析纯度和均匀度,并评估该制备物的纯度约为93.3%。

[0318] 制备SG-11蛋白用于稳定性分析

[0319] SG-11 (SEQ ID NO:7) 及其变体SG-11V5 (SEQ ID NO:19) 用两种阴离子交换柱HiTrap Q然后Mono Q纯化。用Mono Q进一步纯化通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色确定的含有部分纯化的蛋白质的级分。MonoQ的纯化方案与HiTrapQ相同。合并含有SG-11的级分,并在缓冲液(50mM磷酸钠,150mM NaCl和10%甘油)中透析。

[0320] 对于SG-11V5,在HiTrap Q纯化后,用疏水相互作用色谱 (HIC),HiTrap Butyl HP



进一步纯化蛋白质。合并含有SG-11V5并通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色确定的级分,并在缓冲液(50mM磷酸钠,150mM NaCl和10%甘油)中的缓冲液中透析。所描述的所有制备用的柱色谱法使用ÄKTA 蛋白纯化系统(GE医疗生命科学公司(GE Healthcare Life Sciences),宾夕法尼亚州匹兹堡)进行。

[0321] 在SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色后,使用牛血清白蛋白作为参比,通过光密度法对纯化的蛋白质进行定量。根据制造商的说明,使用Endosafe® nexgen-MCS™(查尔斯河公司(Charles River),马萨诸塞州威尔明顿)测量内毒素水平。用于本文所述测定的蛋白质的内毒素水平低于1EU/mg。

#### [0322] 实施例2

[0323] SG-11对炎症诱导的破坏后上皮屏障完整性恢复的作用

[0324] 以下实验证明了本文所公开的SG-11蛋白或其变体恢复胃肠道上皮屏障完整性的治疗能力。因此,该实验证明了治疗性蛋白质用于治疗胃肠道炎性疾病或涉及上皮屏障完整性/功能受损的疾病的功能用途。

[0325] 如下所述在Transwell板中进行测定,其中利用可渗透膜分离细胞进行多种细胞类型的共培养。在顶(顶部)室中,培养由肠上皮细胞和杯状细胞的混合物组成的人结肠上皮细胞,直至通过测量跨上皮电阻(TEER)评估细胞获得紧密的连接形成和屏障功能。在基底侧室中,分开培养单核细胞。上皮细胞用炎性细胞因子引发。该测定法测量了治疗性蛋白质即SG-11对上皮屏障功能,muc2基因表达和细胞因子生成的作用。

[0326] 细胞培养。将HCT8人肠上皮细胞(ATCC目录号CCL-244)维持在RPMI-1640培养基中,该培养基中添加了10%的胎牛血清,100IU/ml青霉素,100µg/ml链霉素,10µg/ml庆大霉素和0.25µg/ml两性霉素(cRPMI)。HT29-MTX人杯状细胞(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)(圣路易斯,密苏里州;目录号12040401))保存在DMEM培养基中,该培养基含有10%胎牛血清,100IU/ml青霉素,100µg/ml链霉素,10µg/ml庆大霉素和0.25µg/ml两性霉素(cDMEM)。上皮细胞经胰蛋白酶消化后传代并从液氮贮存物融化后使用5到15代之间的细胞。U937单核细胞(ATCC目录号700928)保存在cRPMI培养基中作为悬浮培养物,并根据需要通过稀释进行分裂,以将细胞维持在 $5 \times 10^5$ 和 $2 \times 10^6$ 个细胞/ml之间。从液氮中解冻后,使用U937细胞至多至第18代。

[0327] 上皮细胞培养。如先前所述,将HCT8肠上皮细胞和HT29-MTX杯状细胞的混合物分别以9:1的比例铺板在Transwell板的顶室中(Berget等,2017,Int J Mol Sci,18:1573; Beduneau等,2014,Eur J Pharm Biopharm,87:290-298)。每个孔中共接种 $10^5$ 个细胞(每个孔 $9 \times 10^4$ 个HCT8细胞和 $1 \times 10^4$ 个HT29-MTX细胞)。从培养瓶中用胰蛋白酶消化上皮细胞,并通过台盼蓝计数来确定活细胞。将每种细胞类型的正确体积在单个试管中合并并离心。将细胞沉淀重悬于cRPMI中,并加入到Transwell板的顶室中。将细胞在 $37^\circ\text{C}+5\%\text{CO}_2$ 下培养8至10天,每2天更换一次培养基。

[0328] 单核细胞培养。在上皮细胞培养的第6天,将 $2 \times 10^5$ 个细胞/孔的U937单核细胞接种到96孔接收板中。在 $37^\circ\text{C}+5\%\text{CO}_2$ 下培养细胞,每24小时更换一次培养基,持续4天。

[0329] 共培养测定。培养8-10天后,将含有肠上皮细胞的Transwell板用10ng/ml IFN- $\gamma$ 处理,该物质添加到transwell板的基底侧室中,在 $37^\circ\text{C}+5\%\text{CO}_2$ 下处理24小时。24小时后,将新鲜的cRPMI加入到上皮细胞培养板中。在IFN- $\gamma$ 处理后测量跨上皮电阻(TEER)读数,并



将其用作治疗前TEER值。然后将SG-11以 $1\mu\text{g}/\text{ml}$  (40nM)的最终浓度添加到Transwell板的顶室中。肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 抑制剂肽18 (BioTechne, 明尼苏达州明尼阿波利斯) 以50nM使用作为阳性对照, 其预防炎症引起的屏障破坏 (Zolotarevskky等, 202, Gastroenterology, 123:163-172)。细菌衍生的分子星形孢菌素以100nM使用作为阴性对照, 其诱导细胞凋亡并加剧屏障破坏 (Antonsson和Persson, 2009, Anticancer Res, 29: 2893-2898)。将化合物在肠上皮细胞上孵育1小时或6小时。与测试化合物预孵育后, 将含有肠细胞的Transwell插入物转移到含有U937单核细胞的接收板的顶部。然后将热灭活的大肠杆菌 (HK大肠杆菌) (细菌加热至 $80^{\circ}\text{C}$ , 持续40分钟) 加入顶室和基底侧室, 感染复数 (MOI) 为10。将Transwell板在 $37^{\circ}\text{C}+5\%\text{CO}_2$ 下孵育24小时, 然后进行后处理TEER测量。用成熟的SG-11蛋白 (SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:9) 进行TEER测定。

[0330] 数据分析。基于Transwell插入物的表面积 ( $0.143\text{cm}^2$ ), 将以欧姆 ( $\Omega$ ) 为单位的原始电阻值转换为欧姆/平方厘米 ( $\Omega\text{cm}^2$ )。为了调节培养10天后产生的差异抗性, 将单个孔处理后  $\Omega\text{cm}^2$  读数标准化为处理前  $\Omega\text{cm}^2$  的读数。然后将标准化的  $\Omega\text{cm}^2$  值表示为相对于未处理样品的平均  $\Omega\text{cm}^2$  值的变化百分比。

[0331] 在将上皮细胞和单核细胞都暴露于热灭活的大肠杆菌 (HK大肠杆菌) 之前1小时 (图1A) 或6小时 (图1B) 添加SG-11蛋白, 诱导单核细胞产生炎症介质, 从而破坏上皮单层, 如TEER减少所示。肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 抑制剂被用作对照化合物, 已显示可预防由抗菌免疫反应触发的屏障破坏和/或逆转屏障丧失。星形孢菌素用作引起上皮细胞凋亡和/或死亡的对照化合物, 因此导致TEER的急剧下降, 这表明上皮细胞屏障完整性/功能的破坏和/或丧失。在图1A中, SG-11使经HK大肠杆菌破坏的TEER从55.8%增加到62%。在图1B中, SG-11使经HK大肠杆菌破坏的TEER从53.5%增加到60.6%。图1A-1B中的图形表示从两个单独的实验中收集的数据 ( $n=6$ )。

### [0332] 实施例3

[0333] SG-11对由热杀伤的大肠杆菌诱导的TNF- $\alpha$ 和IL-23生成的作用

[0334] 以下实验证明了如本文所公开的SG-11蛋白或其变体降低通过细胞因子产生所测量的免疫活化的治疗能力。因此, 该实验证明了治疗性蛋白质在胃肠炎性疾病或涉及上皮屏障完整性/功能受损的疾病中的潜在功能实用性, 其中细胞因子水平的调节将影响宿主的疾病状态。

[0335] 从实施例2中进行的共培养TEER测定的基底侧室的组织培养上清液中, 测量了单核细胞产生的促炎性细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-23。在TEER读数之后, 将上清液在 $4^{\circ}\text{C}$ 下以10000g离心5分钟以去除细胞碎片。根据制造商的说明 (Magpix仪器和xPonent软件版本4.2; Luminex集团 (德克萨斯州奥斯汀)) 进行Luminex分析。进行Luminex分析以确定单核细胞产生的TNF- $\alpha$ 和IL-23的pg/ml浓度。Luminex分析利用基于微珠的系统对单个样品中的多种细胞因子进行定量。与ELISA一样, Luminex磁珠也被捕获抗体包被, 与样品一起孵育可使靶标与捕获抗体结合。洗涤珠并与荧光标记的检测抗体一起孵育以定量结合的靶标。细胞计数分析用于区分加载了不同荧光染料的珠群, 并通过测量检测抗体信号来量化细胞因子水平。

[0336] 将未处理的细胞和在HK大肠杆菌处理之前用SG-11预孵育6小时的细胞中TNF- $\alpha$ 和IL-23产生标准化为HK大肠杆菌引起的pg/ml浓度, 其设置为1.0。与SG-11预先孵育可降低

TNF- $\alpha$ 和IL-23的产生。结果显示在图2A(TNF- $\alpha$ )和图2B(IL-23)中。图2A和图2B中的图形表示从两个单独的实验中收集的数据(n=6)。

#### [0337] 实施例4

[0338] SG-11对由热杀伤的大肠杆菌诱导的IL-10生成的作用

[0339] 以下实验在TEER测定中测量了SG-11给予对IL-10产生的作用。

[0340] 在来自包含单核细胞的实施例2中所述的共培养TEER测定的基底侧室的组织培养上清液中测量IL-10的产生。进行Luminex分析以确定单核细胞产生的IL-10的pg/ml浓度。将未处理的细胞和在HK大肠杆菌处理之前用SG-11预孵育6小时的细胞中IL-10产生标准化为HK大肠杆菌引起的pg/ml浓度,其设置为1.0。与SG-11一起预孵育可将IL-10产生降低至0.89。结果示于图3。图3中的图形表示从两个单独的实验中收集的数据(n=6)。

#### [0341] 实施例5

[0342] SG-11对用热杀伤的大肠杆菌刺激后的粘蛋白表达的作用

[0343] 以下实验测量如本文公开的SG-11蛋白或其变体增加胃肠组织中粘蛋白表达的作用。因此,该实验证明了治疗性蛋白质SG-11用于治疗胃肠道炎性疾病或涉及上皮屏障完整性/功能受损的疾病的功能用途,其中粘蛋白表达增加将是有益的。

[0344] 在实施例2中描述的共培养TEER测定的顶室中,在上皮细胞单层中测量基因表达。从上皮细胞单层分离总RNA,合成cDNA。在加入HK大肠杆菌持续24小时之前,对由SG-11(1 $\mu$ g/ml;40nM)处理的HCT8和HT29-MTX细胞产生的cDNA进行qRT-PCR处理6小时。*muc2*基因表达以平均倍数变化 $\pm$ SEM表示。通过单向方差分析与HK大肠杆菌进行统计分析,并使用费舍尔LSD检验进行多重比较。

[0345] 对*muc2*基因表达的分析表明,仅HK大肠杆菌处理比未处理的细胞增加了13.6倍(p=0.0007)。用HK大肠杆菌刺激并用SG-11处理的细胞比HK大肠杆菌额外增加了1.4倍(p=0.03)(图4)。图4中的图形表示来自单个实验的数据(n=3)。观察到响应HK大肠杆菌的*muc2*产生显著增加。

#### [0346] 实施例6

[0347] SG-11对上皮细胞伤口愈合的作用

[0348] 以下实验证明了本文公开的蛋白质增加胃肠道上皮细胞伤口愈合的治疗能力。因此,该实验证明了治疗性蛋白质SG-11用于治疗胃肠道炎性疾病或涉及上皮屏障完整性/功能受损的疾病的功能用途,其中增加上皮细胞愈合将是有益的。

[0349] 根据制造商的说明(鸭嘴兽技术公司(Platypus Technologies),威斯康辛州麦迪逊),使用96孔Oris细胞迁移测定,其在每个孔的中心都装有防止细胞附着的堵塞物。

[0350] 使用前将迁移测定板加热至室温,并在添加细胞之前从100%融合孔中取出堵塞物。HCT8肠上皮细胞和HT29-MTX杯状细胞系以9:1的比例使用,每孔总共添加 $5 \times 10^4$ 个细胞( $4.5 \times 10^4$ 个HCT8细胞和 $0.5 \times 10^4$ 个HT29-MTX细胞)。细胞在37 $^{\circ}$ C+5%CO<sub>2</sub>下孵育24小时。然后从所有对照和样品孔中取出堵塞物。对照孔包括用稀释载剂作为空白,30ng/ml表皮生长因子(EGF)作为阳性对照,和100nM星形孢菌素作为阴性对照处理的细胞,均在cRPMI中稀释。样品孔含有在cRPMI中稀释的1 $\mu$ g/ml浓度的SG-11蛋白(SEQ ID NO:5和/或SEQ ID NO:9)。在cRPMI中培养100%和0%的孔。将处理物添加到细胞中,并在37 $^{\circ}$ C+5%CO<sub>2</sub>下孵育48小时。在对活细胞染色之前,从0%孔中取出堵塞物。除去处理培养基,并在含有0.9mM CaCl<sub>2</sub>

和0.5mM  $\text{MgCl}_2$ 的PBS中洗涤细胞。将绿色荧光活性染料Calcein AM以0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度添加到所有含有0.9mM  $\text{CaCl}_2$ 和0.5mM  $\text{MgCl}_2$ 的PBS的孔中,在37 $^{\circ}\text{C}$ +5% $\text{CO}_2$ 下孵育30分钟,除去染料并将其在含有0.9mM  $\text{CaCl}_2$ 和0.5mM  $\text{MgCl}_2$ 的PBS中洗涤,并测量荧光。将在细胞铺板前先去除堵塞物的100%孔的相对荧光值设置为最大效果,并且直到即将染色前保留堵塞物的0%孔的相对荧光值用作基线。样品在100%和0%样品之间标准化,数值表示为生长百分比。

[0351] 如图5所示,在用SG-11处理后观察到生长的显著增加。对照化合物如预期的那样调节了伤口的愈合,EGF增加了增殖,并且星形孢菌素抑制了细胞增殖。图5中的图形表示从5个实验中收集的数据( $n=15$ )。数据代表5个独立的重复实验,其中SG-11SEQ ID NO:5用于1个实验,而SEQ ID NO:9用于4个实验。

#### [0352] 实施例7

[0353] SG-11证明在炎性肠病的并发DSS模型中的治疗活性

[0354] 实施例7和8证明了本文公开的蛋白质在体内模型中治疗炎性肠病的能力。因此,该实验证明了上述体外模型(其描述了重要的功能和可能的作用机理)将转化至炎性肠病的体内模型系统。具体地,用葡聚糖硫酸钠(DSS)处理实施例7和8中的小鼠,所述葡聚糖硫酸钠是已知诱导肠上皮损伤并因此降低肠屏障完整性和功能的化学物质。DSS小鼠是公认的结肠炎模型。在实施例7中,大约在DSS给药同时(之前6小时)用SG-11蛋白处理小鼠。在实施例8中,在用SG-11蛋白处理之前,将小鼠用DSS处理6天。

[0355] 实施例7中给出的图代表了来自3个独立实验的数据,每个实验使用10只小鼠( $n=30$ )。这些实验中使用的SG-11蛋白是没有N末端标签且包含SEQ ID NO:3氨基酸序列的成熟蛋白质(无信号肽)。对于2个实验,SG-11蛋白由SEQ ID NO:5组成;对于第三实验,SG-11蛋白由SEQ ID NO:7组成。

[0356] 圈养八周龄的C57BL/6小鼠,将5只动物关在笼子里,并自由进食和饮水7天。经过7天的适应期后,开始治疗,同时向饮用水中添加2.5%DSS。腹膜内(i.p.)注射蛋白质后,用荧光标记的牛血清白蛋白进行的初步追踪研究表明,蛋白质在腹膜内递送后6小时到达结肠。基于这些结果,在向饮用水中添加2.5%DSS之前6小时,使用50nmol/kg SG-11(1.3mg/kg)或Gly2-GLP2(0.2mg/kg)腹膜内处理小鼠。初始处理六小时后,饮用水换为含有2.5%DSS的水。小鼠在其饮用水中用2.5%葡聚糖硫酸钠(DSS)处理6天。每天早晚两次(b.i.d.) (每8和16小时)以50nmol/kg剂量用SG-11或Gly2-GLP2进行腹膜内注射来继续治疗。每2天准备新鲜的2.5%DSS饮用水。

[0357] 在第六天,将小鼠禁食四小时,然后口服饲喂600mg/kg异硫氰酸荧光素(FITC)标记的4KDa葡聚糖[4KDa-FITC]。处死4KDa-FITC饲喂小鼠后一小时,收集血液并在血清中测量FITC信号。与用载剂处理的DSS小鼠相比,在未处理的小鼠中观察到了4KDa-FITC葡聚糖跨上皮屏障移位的明显增加。另外,与用载剂处理的DSS小鼠相比,在接受DSS并用SG-11处理的小鼠中观察到4KDa-FITC葡聚糖的显著减少。SG-11观察到的4KDa-FITC葡聚糖移位幅度与Gly2-GLP2的阳性对照相似。结果示于图6,并表示为平均值 $\pm$ SEM。图6中的图形表示从3个独立实验中收集的数据( $n=30$ )。

[0358] SG-11改善了炎性肠病的并发DSS模型中屏障功能的炎症中心读数

[0359] 还评估了SG-11对使用和不使用SG-11给药的DSS动物血液中LPS结合蛋白(LBP)水

平的作用。还通过ELISA在实施例7所述的DSS模型中测试的小鼠的血清中测量了与炎症肠病对象的临床疾病活性相关的LPS结合蛋白(LBP)。观察到响应DSS的LBP浓度显著增加。另外,与用载剂处理的DSS小鼠相比,在给予DSS的SG-11处理的小鼠中观察到LBP的显著降低。此外,与对照肽Gly2-GLP2相比,SG-11对LBP浓度具有更大的作用,因为观察到用Gly2-GLP2处理的DSS小鼠和用SG-11处理的DSS小鼠之间的显著差异。结果示于图7,并表示为平均值 $\pm$ SEM。图7中的图形表示从3个独立实验中收集的数据( $n=30$ )。

[0360] SG-11证明在炎症肠病的并发DSS模型中防止体重减轻

[0361] 还评估了本文公开的蛋白质改善患有炎症肠病的动物的体重减轻的治疗能力。体重减轻是炎症肠病的重要且潜在危险的副作用。

[0362] 每天从该实施例中描述的DSS模型中包括的小鼠中测量体重。确定每只小鼠从第0天重量开始的变化百分比。与载剂处理的DSS小鼠相比,SG-11给予DSS处理的小鼠的体重显著改善。在第6天用SG-11处理的小鼠的体重减轻与用Gly2-GLP2观察到的体重减轻相似。结果示于图8。图8中的图形表示从2个独立实验中收集的数据( $n=20$ )。

[0363] SG-11在炎症肠病的DSS模型中显著降低总体病理

[0364] 在该实施例中进行的并发DSS模型中包括的小鼠中进行了总体病理观察。与载剂处理的DSS小鼠相比,SG-11给予DSS处理的小鼠的总体病理显著改善。在给予DSS并用Gly2-GLP2或SG-11处理的小鼠之间,未观察到临床评分的差异。使用的评分系统为:(0)=无总体病理,(1)=粪便中可见血丝,(2)=完全血性粪便颗粒,(3)盲肠中可见血性粪便,(4)在盲肠和大便稀疏中血性粪便,(5)=直肠出血。结果示于图9。图9中的图形表示从3个独立实验中收集的数据( $n=30$ )。这些数据表明,SG-11在改善IBD的症状如粪便中的血液方面具有治疗效果。

[0365] 另外,对来自DSS模型动物的近端和远端结肠组织进行了组织病理学分析。显示了近端(图10A)和远端(图10B)结肠评分(范围0-4)以及结肠的总评分(图10C),其代表了近端和远端结肠评分的总和(按0-8评分)。LMA=粘膜结构丧失,Edema=水肿,INF=炎症,TMI=透壁炎症,MH=粘膜增生,DYS=发育不良。图代表来自两个独立实验的数据,并绘制为平均值 $\pm$ SEM。通过与DSS+载剂相比的单向方差分析,然后进行费舍尔LSD多重比较检验来进行统计分析。

[0366] SG-11使响应DSS处理的结肠缩短作用最小化

[0367] 以下实验通过显示预防或最小化结肠缩短的能力证明了本文公开的蛋白质在体内模型中治疗炎症肠病的治疗能力。

[0368] 在实施例7中描述的DSS模型中包括的小鼠中测量结肠长度。SG-11给予DSS处理的小鼠预防了由DSS引起的结肠缩短。用Gly2-GLP2观察到结肠长度的显著改善,并且Gly2-GLP2处理比SG-11处理有显著改善。结果示于图11A。另外,用Gly2-GLP2或SG-11处理暴露于DSS的小鼠导致结肠重量与长度之比的显著改善(图11B)。图11A和11B中的图表示从3个独立实验( $n=30$ )汇集的数据。数据以平均值 $\pm$ SEM的形式绘制,并从三个独立的实验( $n=30$ )汇总。统计分析是通过单向方差分析进行的,然后进行费舍尔LSD多重比较检验。

[0369] 实施例8

[0370] SG-11证明在炎症疾病的DSS模型中具有治疗活性

[0371] 在该实施例中,进行了实验以研究当在DSS处理7天后向小鼠给予SG-11蛋白时,

SG-11在DSS小鼠模型中的作用。这与以上实施例7的处理方案不同,在实施例7中,在用DSS处理之前不久向小鼠给予SG-11蛋白。该实施例进一步证明了本文所公开的蛋白质在体内模型中治疗炎性肠病的治疗能力,因此证明了上述体外模型将转化为炎性肠病的体内模型系统,该体外模型描述了重要的功能和可能的作用机理。

[0372] 圈养八周龄的雄性C57BL/6小鼠,将5只动物关在笼子里,并自由进食和饮水7天。在适应了7天之后,为小鼠提供了含有2.5%DSS的饮用水,持续7天。在7天DSS给予期间,每天准备新鲜的2.5%DSS水。对于该治疗性DSS研究,将用于治疗动物的SG-11在其N末端与FLAG标签(DYKDDDDK;SEQ ID NO:31)融合。

[0373] 在第7天,恢复了正常的饮用水,开始用50nmol/kg SG-11(1.3mg/kg)或Gly2-GLP2(0.2mg/kg)处理。每天两次(b.i.d.)进行处理,每天早上和晚上服用一次(每8和16小时一次),持续6天。

[0374] 如下所述,就动物健康方面分析了治疗结果,包括体重和总体病理,结肠组织的组织病理学,屏障破坏的评估以及LPS结合蛋白的水平。

[0375] 在早晨处理期间每天测量体重。然后收获结肠组织,并以厘米为单位测量长度,并称重组织。通过一对镊子轻轻移动结肠组织从结肠冲洗粪便并除去残留的PBS。然后称重结肠组织,并确定以mg/mm为单位的结肠重量与长度之比。体重测量后,将近端和远端结肠组织储存用于RNA和蛋白质分析,并将其余组织固定在10%中性缓冲福尔马林中用于组织病理学检查。通过在血清4KDa-FITC转运,血清LBP浓度,结肠长度,和结肠重量与长度之比上与DSS+载剂比较的单因素方差分析进行统计学分析,同时进行双向方差分析以分析体重。在所有分析中,均使用费舍尔LSD多重比较检验。图代表来自两个实验的数据,并绘制为平均值±SEM。

[0376] 该治疗模型测量了已建立的DSS损伤的恢复。因为未经处理的小鼠也已从饮用水中除去DSS后恢复,如在DSS处理6天后观察到的4KDa-FITC信号没有增加(图12)。此外,在Gly2-GLP2或SG-11处理后,未观察到LBP降低(图13)。因此,在DSS的治疗模型中没有观察到屏障功能读数的变化。

[0377] 尽管在治疗性DSS模型中未观察到屏障功能读数的变化,但是观察到临床参数的显著改善,例如体重(图14),结肠长度(图15A)和结肠重量与长度之比(图15B)。与屏障读数类似,基于带血粪便的总体病理评分系统不再适用,因为即使DSS小鼠在处理6天后也已经恢复。但是,尽管结肠中没有可见的血液,但仍观察到结肠变厚。从总体病理观察结果可见,使用SG-11处理可观察到结肠变厚的频率降低(DSS+载剂中88%,DSS+SG-11中25%,费舍尔精确检验 $p<0.0001$ ,数据未显示)。

[0378] 对来自上述治疗性DSS模型的近端和远端结肠组织进行了组织病理学分析。显示了近端(图16A)和远端(图16B)结肠评分(范围0-4)以及结肠的总评分,其代表了近端和远端结肠评分的总和(范围0-8)(图16C)。LMA=粘膜结构丧失,Edema=水肿,INF=炎症,TMI=透壁炎症,MH=粘膜增生,DYS=发育不良。图代表来自两个独立实验的数据,并绘制为平均值±SEM。通过与DSS+载剂相比的单向方差分析,然后通过费舍尔LSD多重比较检验进行统计分析。

[0379] SG-11和Gly2-GLP2处理可导致粘膜结构评分的损失适度但显著降低,而炎症和透壁炎症评分均无变化。与实施例7中提供的结果相似,用SG-11和Gly2-GLP2观察到了相似的

组织病理学改变模式,提供了SG-11可以靶向上皮细胞的额外证据。

#### [0380] 实施例9

[0381] 稳定和治疗活性SG-11变体的设计

[0382] SG-11是一种来自共生细菌人罗斯氏菌的治疗性蛋白质。在DSS模型中以人罗斯氏菌作为益生菌的给药证明具有改善肠屏障功能(4KDa-FITC和LBP),体重和临床评分的功效(数据未显示)。

[0383] 翻译后修饰(PTM)可能会影响治疗性蛋白质的重组生产,而翻译后修饰(PTM)可能会在大规模表达和纯化以及长期保存期间发生。这样的PTM包括但不限于甲硫氨酸的氧化,天冬酰胺的脱酰胺和两个半胱氨酸之间的分子间和/或分子内二硫键。为了降低PTM风险,通过替换掉可能影响蛋白质稳定性的残基对SG-11进行了修饰。实施例9-14描述了描述改善的蛋白质稳定性以及维持体外和体内活性的研究。

[0384] 第一步,将SG-11氨基酸序列(SEQ ID NO:7)与相似的原核蛋白质进行比对。基于搜索结果鉴定的残基可用于氨基酸取代,以增强治疗性蛋白质的稳定性。

[0385] 首先,对GenBank非冗余蛋白数据库(NCBI BLAST/默认参数/BLOSUM62矩阵)进行Blast搜索,以鉴定可能与SG-11同源的其他原核蛋白质。鉴定的蛋白质序列显示在图17中。SEQ ID NO:21是来自肠炎罗斯氏菌(*Roseburia intestinalis*)的假定蛋白质(GenBank:WP\_006857001.1;BLAST E值:3e-90);SEQ ID NO:22是来自罗斯氏菌种831b的假定蛋白质(GenBank:WP\_075679733.1;BLAST E值:4e-58);SEQ ID NO:23是来自食葡萄糖罗斯氏菌(*Roseburia inulinivorans*)的假定蛋白质(GenBank:WP\_055301040.1;BLAST E值:1e-83)。

[0386] SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23中的每一个是所示蛋白质的预测成熟形式(缺乏信号肽),并且包含N末端甲硫氨酸。进行这些序列与SG-11(SEQ ID NO:7)的多序列比对,以鉴定蛋白质之间保守的区域。比对在图17中显示。该比对用于鉴定在不同蛋白质中最保守的残基,以便评估取代特定氨基酸的潜在影响。SG-11的部分在某种程度上保守或高度保守,其中蛋白质中特定位置的氨基酸在所有4个比对的蛋白质中或至少在4个蛋白质的2个(位置)或3个(位置)中相同。SG-11的这些同源物中的高序列保守性表明,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23也可能具有在维持健康的上皮屏障中重要的功能。因此,本发明提供了利用SEQ ID NO:21-23治疗本发明疾病的方法及其制备方法。

#### [0387] 实施例10

[0388] SG-11的翻译后修饰(PTM)分析

[0389] 使用LC/MS/MS进行了研究以鉴定特别容易发生PTM的SG-11残基。由LakePharma(加利福尼亚州贝尔蒙)进行分析,以:1)确认SG11的氨基酸序列(SEQ ID NO:9),和2)确定任何可能导致生物学活性和免疫原性降低的翻译后修饰,特别是脱酰胺和氧化。

[0390] 对于肽图分析和PTM分析,将样品用DTT和IAA处理,然后进行胰蛋白酶消化。然后,使用蛋白质BEH C18柱通过与Xevo G2-XS QTOF质谱仪偶联的Waters ACQUITY UPLC分析消化的样品。

[0391] 肽图和测序证实了预测的氨基酸序列,并且还指示了多个脱酰胺位点和一个氧化位点。其中,N53的7.84%和N83的3.77%被脱酰胺。表6中给出的这些结果表明,N53和N83是在非胁迫条件下脱酰胺的主要位点。N53表示位于成熟SG-11中第53位的天冬酰胺(Asn;N),

其中甲硫氨酸位于第一位 (SEQ ID NO:7)。

[0392] 表6:SG-11的翻译后修饰

[0393]	氨基酸 <sup>1</sup>	SEQ ID NO	肽	修饰方式	%总离子 <sup>2</sup>	%肽 <sup>3</sup>
	N53	30	NAVK	脱酰胺	0.01	7.84
	N83	26	TPEDYTAFNGIELYQGK	脱酰胺	0.25	3.77
	N137	27	ANTDVK	脱酰胺	0.25	1.03
	N153	28	VDGEICYVSCQNVK	脱酰胺	0.01	0.2
	M1	24	MLEGEESVVYVGK	氧化	<0.01	N/A

[0394] <sup>1</sup>SG-11中的氨基酸位置 (SEQ ID NO:7)

[0395] <sup>2</sup>标准化至总肽离子强度

[0396] <sup>3</sup>标准化至有或没有修饰的相应前体的总强度

[0397] 实施例11

[0398] SG-11的受迫降解

[0399] 还在下表7所示的一系列胁迫条件下测试了SG-11 (SEQ ID NO:9), 以进一步表征重组的纯化的SG-11的稳定性。通过SEC-HPLC分析胁迫的样品中是否存在聚集体和/或降解物。进行LC/MS/MS以确定脱酰胺和氧化水平。

[0400] 表7

[0401]	胁迫因素		分析方法	标准	观察
	温度(2周)	4°C	HPLC	%单体 (>90%通过)	溶液澄清
		25°C	HPLC	%单体 (>90%通过)	溶液澄清
		37°C	HPLC	%单体	溶液澄清
		40°C	uPLC LC/MS/MS	%单体	溶液澄清
	氧化	过氧化氢	uPLC	%氧化和位点	溶液澄清

[0402]

	(0.005%) 40°C, 16 小时	LC/MS/MS		
机械胁迫	350 rpm 摇动, 4°C, 24 小时	HPLC	%单体 (>90%通过)	溶液澄清
pH	pH 4 和 pH 9	uPLC LC/MS/MS	%脱酰胺位点	溶液澄清
冻融 (6 个 循环)	-80°C 至 室温	HPLC	%单体	溶液澄清

[0403] 对于此分析,SG-11 (SEQ ID NO:9) 在PBS+10%甘油 (50mM磷酸钠,150mM NaCl, 10%甘油,pH 8.0) 中的浓度为1mg/ml,在pH 4和pH 9下的测试除外。对于pH 4,在乙酸钠缓冲液 (50mM乙酸钠,150mM NaCl,pH 4) 中以1mg/ml的浓度制备SG-11 (SEQ ID NO:9)。对于pH 9,在CAPSO (3-环己基氨基-2-羟基-1-丙烷磺酸) 缓冲液 (50mM CAPSO,150mM NaCl,10mg/ml) 中以1mg/ml的浓度制备SG-11 (SEQ ID NO:9)。

[0404] 分析表明,在4°C下处理的SG-11 (SEQ ID NO:9) 样品的聚集体水平较低。随着温度升高,聚集增加。在37°C时,发生了大部分聚集。相反,机械应力和反复的冻融不会导致蛋白质聚集或降解。

[0405] 通过在40°C下孵育两周,氧化 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理) 或高pH 9分别处理三个样品,如实施例10所述,通过LC/MS/MS对PTM进行分析。如下表8所示,在40°C的样品处理下,几乎100%的脱酰胺作用后,N83发生了显著的脱酰胺作用。在过氧化氢处理的样品中观察到N83显著脱酰胺 (37%) 和M200氧化 (63.9%)。7.84%的N53在未经任何处理的情况下被脱酰胺。

[0406] 表8

[0407]

肽	修饰 <sup>1</sup>	%			
		40°C	氧化	pH 9	无处理



[0408]

MLEGEESVVYVGK (SEQ ID NO:24)	无修饰	99.82	99.88	99.94	99.78
	M 的氧化	0.18	0.12	0.06	0.22
GVIASLDVETLDQSYDETELK (SEQ ID NO:25)	无修饰	99.91	99.93	99.95	100
	脱酰胺 Q30	0.09	0.07	0.05	0
TPEDYTAFNGIELYQGK (SEQ ID NO:26)	无修饰	0	63	80.9	82.57
	脱酰胺 N83	99.88	37	19.1	17.43
	脱酰胺 N83	0.12	0	0	0
	脱酰胺 Q89				
ANTDVK (SEQ ID NO:27)	无修饰	85.39	83.56	76.05	98.96
	脱酰胺 N137	14.61	16.44	23.95	1.04
VDGEICYVSCQNVK (SEQ ID NO:28)	无修饰	44.85	63.23	8.76	99.98
	氨 甲 酰 甲 基 化 C147	33.59	34.52	71.71	NA
	氨 甲 酰 甲 基 化 C151	18.45	1.93	12.45	NA
	脱酰胺 N153 脱酰胺 Q152	0	0	0.35	0.02
	脱酰胺 N153 氨 甲 酰 甲 基 化 C151	3.1	0.31	0.28	0
GYYLETGSVTASVDVTGQESVGTE QLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQT EAAAGDGSFETDVYTFIVYK (SEQ ID NO:29)	无修饰	96.38	19.17	88.16	100
	脱酰胺 N206	3.62	0	11.84	0
	脱酰胺 Q152				
	氧化 M				
	氧化 M198	0	16.92	0	0
NAVK (SEQ ID NO:30)	氧化 M200	0	63.9	0	0
	脱酰胺 N53	NA	NA	NA	7.84

[0409] <sup>1</sup>SG-11中的氨基酸位置 (SEQ ID NO:7)

[0410] 还原后,游离半胱氨酸被碘乙酰胺人工氨甲酰甲基化,以阻止半胱氨酸残基在测定中被氧化。

[0411] 实施例12

[0412] SG-11的稳定性和半胱氨酸残基

[0413] 在缓冲液C (100mM磷酸钠, pH 7.0, 0.5M山梨糖醇) 中在37℃下孵育1周并在4℃下孵育3周后, 评估SG-11 (SEQ ID NO:9) 的稳定性。通过用缓冲液D (100mM磷酸钠, pH 7.0, 10%甘油) 平衡的分析尺寸排阻色谱法 (SEC) 监测聚集物形成来评估稳定性。与新鲜解冻的蛋白质相比, 在4℃下保存3周后未观察到明显变化, 因为两个样品均在1.57mL处显示单峰。但是, 在37℃下孵育1周后, 除了在1.57mL处的单体峰 (最小的峰) 之外, 样品还清楚地显示出在1.29和1.41mL处的聚集峰。聚集的原因如下调查。在SG-11中的147和151位 (相对于SEQ ID NO:7) 存在两个半胱氨酸残基。Ellman试剂测定揭示了SG-11 (SEQ ID NO:9) 中存在游离巯基, 这表明Cys<sup>147</sup>和/或Cys<sup>151</sup>没有形成稳定的二硫键。由于游离巯基可能通过形成不良的分子间二硫键而引起聚集, 因此研究了还原剂 (例如β-巯基乙醇) 的存在是否可以阻止聚集。在37℃下孵育4天后, 在缓冲液 (50mM磷酸钠, 150mM NaCl和10%甘油) 中存在2.5% (v/v) β-巯基乙醇的情况下, 聚集被大大抑制, 与没有β-巯基乙醇的情况下形成的聚集体相反。结果表明, Cys<sup>147</sup>和/或Cys<sup>151</sup>提供了导致聚集的游离巯基。

[0414] 实施例13

[0415] SG-11变体的翻译后修饰

[0416] 尽管SG-11蛋白在高温下稳定, 但在下游加工阶段, 一周内在37℃下形成聚集可能是有问题的。通过LC/MS/MS发现的天冬酰胺残基脱酰胺基也是一个危险因素。为了改善包含SEQ ID NO:3的蛋白质或其变体的可制造性, 在设计SG-11变体 (例如SG-11V1 (SEQ ID NO:11), SG-11V2 (SEQ ID NO:13), SG-11V3 (SEQ ID NO:15), SG-11V4 (SEQ ID NO:17) 和SG-11V5 (SEQ ID NO:19)) 中考虑实施例10-12的结果以减少有害PTM的发生。

[0417] 实施例13-16描述了进行以表征氨基酸取代对SG-11变体SG-11V5 (SEQ ID NO:19, 相对于SEQ ID NO:7包括N53S, N83S, C147V, C151S) 的稳定性和功能的作用的实验。SG-11V5 (如实施例1所述表达和纯化)。

[0418] 根据在SG-11 (SEQ ID NO:9) 处于胁迫条件下 (实施例11) 时观察到的PTM, 使用实施例11中所述的方法对SG-11V5 (SEQ ID NO:19) 进行LC-MS/MS以分析翻译后修饰, 并与SG-11 (SEQ ID NO:7) 的PTM进行比较。

[0419] 为了进行该分析, 比较了野生型SG-11 (SEQ ID NO:7) 和SG-11V5 (SEQ ID NO:19) 的PTM。在第一分析中 (结果在下表9中提供), 蛋白质以1mg/ml的浓度存储在缓冲液1 (50mM NaPO<sub>4</sub><sup>-</sup>, pH8, 150mM NaCl, 10%甘油) 中, 并在4℃或40℃下存储2周。然后用DTT和IAA处理蛋白质, 然后进行胰蛋白酶消化。然后, 使用蛋白质BEH C18柱通过与Xevo G2-XS QTOF质谱仪偶联的Waters ACQUITY UPLC分析消化的样品。通过LC-MS/MS对蛋白质进行分析表明, 与SG-11在4℃和40℃相比, SG11V5蛋白的起始甲硫氨酸氧化和N137脱酰胺化的百分比均显著降低。

[0420] 表9

[0421]	蛋白质	PTM 位点	修饰	4°C	40°C
	SG-11 (SEQ ID NO:7)	MLEGEESVVYVGK (SEQ ID NO:26)	M1 的氧化	8.9%	12.5%
	SG-11V5 (SEQ ID NO:19)	MLEGEESVVYVGK (SEQ ID NO:26)	M1 的氧化	2.5%	4.7%
	SG-11 (SEQ ID NO:7)	TPEDYTAFNGIELYQ GK (SEQ ID NO:26)	N83 的脱酰胺	19.4%	98.1%
[0422]	SG-11V5	TPEDYTAFSGIELYQ	N83 的脱酰胺	--	--
	(SEQ ID NO:19)	GK (SEQ ID NO:28)			
	SG-11 (SEQ ID NO:7)	ANTDVK (SEQ ID NO:24)	N137 的脱酰胺	1.0%	0.9%
	SG-11V5 (SEQ ID NO:19)	ANTDVK (SEQ ID NO:24)	N137 的脱酰胺	0.1%	0.3%

[0423] 在第二次分析中,将SG-11 (SEQ ID NO:7)和SG-11V5 (SEQ ID NO:19)蛋白分别在40°C下在不同缓冲液中分别保存。结果列于下表10。该实验中使用的存储缓冲液为100mM  $\text{NaPO}_4^-$ , pH7, 含10%山梨糖醇(+Sor)或不含10%山梨糖醇(-Sor)和含10%甘油(+Gly)或不含10%甘油(-Gly),如表10中所示。如表10中的数据所示,与在所有缓冲液条件下的SG-11 (SEQ ID NO:7)蛋白相比,SG-11V5 (SEQ ID NO:19)蛋白在第一位的甲硫氨酸氧化大大降低。在至少存在甘油以及山梨糖醇和甘油同时存在的情况下,两种蛋白质的N137脱酰胺水平也存在差异,导致N137脱酰胺大大降低。这些数据表明,SG-11蛋白中的氨基酸取代可对溶液中该蛋白质的PTM产生显著的有益作用。

[0424] 表10

[0425]

蛋白质	PTM 位点	修饰	- Sor - Gly	+ Sor - Gly	- Sor + Gly	+ Sor + Gly
<b>SG-11</b> (SEQ ID NO:7)	MLEGEESVVYVGK (SEQ ID NO:26)	M1 的氧化	20%	12.1 %	38.6 %	27.8 %

[0426]

<b>SG-11V 5</b> (SEQ ID NO:19)	MLEGEESVVYVGK (SEQ ID NO:26)	M1 的氧化	2.7%	3.3%	5.6%	5.9%
<b>SG-11</b> (SEQ ID NO:7)	TPEDYTAFNGIELYQ GK (SEQ ID NO:26)	N83 的脱酰胺	98.1 %	93.9 %	96.2 %	87.4 %
<b>SG-11V 5</b> (SEQ ID NO:19)	TPEDYTAFSGIELYQ GK (SEQ ID NO:28)	N83 的脱酰胺	--	--	--	--
<b>SG-11</b> (SEQ ID NO:7)	ANTDVK (SEQ ID NO:24)	N137 的脱酰胺	0.9%	2.6%	3.0%	2.5%
<b>SG-11V 5</b> (SEQ ID NO:19)	ANTDVK (SEQ ID NO:24)	N137 的脱酰胺	1.5%	3.3%	0.4%	0.1%

[0427] 实施例14

[0428] SG-11变体构建和稳定性分析

[0429] 尽管SG-11蛋白在高温下非常稳定,但在下游加工阶段,一周内在37℃下形成聚集可能是个问题。通过LC/MS/MS发现的天冬酰胺残基脱酰胺基也是一个危险因素。为了改善包含SEQ ID NO:3或其变体的蛋白质的可制造性,将表示为SG-11 (SEQ ID NO:7) 的蛋白质突变为包含以下4个取代:N53S,N83S,C147V和C151S。具有4个取代的该变体被称为SG-11V5,在本文中以SEQ ID NO:19提供。在不同的存储缓冲液配方中测试了纯化的SG-11和SG-11V5的稳定性。SG-11V5 (SEQ ID NO:19) 与SEQ ID NO:7具有约98.3%的序列相同性。

[0430] SG-11的稳定性分析

[0431] 图18显示多种条件对SG-11 (SEQ ID NO:7) 稳定性的影响。具体而言,将纯化的SG-11 (SEQ ID NO:7) 在pH 5.2 (图18A,18B和18C), pH 7.0 (图18D,18E和18F) 和pH 8.0 (图18G,18H和18I) 中孵育。还在3种不同的pH条件下测试了添加剂的效果:150mM NaCl (图18A,18D和18G);150mM NaCl和100mM精氨酸 (图18B,18E和18H);以及150mM NaCl和0.5M山梨糖醇 (图18C,18F和18I)。通过分析性SEC分析稳定性。箭头指示单体形式的保留时间。

[0432] SG-11V5的稳定性分析

[0433] 图19显示多种条件对SG-11V5 (SEQ ID NO:19) 稳定性的影响。将SG-11V5 (SEQ ID NO:19) 在pH 5.2 (图19A,19B和19C), pH 7.0 (图19D,19E和19F) 和pH 8.0 (图19G,19H和19I) 中孵育。还在3种不同的pH条件下测试了添加剂的效果:150mM NaCl (图19A,19D和19G);150mM NaCl和100mM精氨酸 (图19B,19E和19H);以及150mM NaCl和0.5M山梨糖醇 (图19C,19F和19I)。通过分析性SEC分析稳定性。箭头指示单体形式的保留时间。

[0434] 在pH 7.0的100mM精氨酸存在下,纯化的SG-11 (SEQ ID NO:7) 蛋白的聚集体形成被大大抑制。但是,在较早的保留时间观察到一些小峰,这表明除单体形式外,还有其他形式。在该实施例中测试的所有条件下,SG-11V5 (SEQ ID NO:19) 均未显示大量聚集。即使没有任何添加剂,也观察到离散的单体峰。100mM精氨酸或0.5M山梨糖醇抑制了1.34mL处的小聚集峰。在pH 5.2下沉淀纯化的SG-11 (SEQ ID NO:7) 和SG-11V5 (SEQ ID NO:19)。

[0435] 高温会增加蛋白质由于脱酰胺作用而导致的对降解和聚集的敏感性。为了最大程度地减少与脱酰胺和聚集相关的潜在负担,在SG-11中引入了突变N53S,N83S C147V和C151S。因此,SG-11V5在pH7.0和pH8.0下显示出改善的稳定性。

[0436] 实施例15

[0437] SG-11V5的体外功能分析

[0438] 进行体外TEER测定以证明SG-11变体例如SG-11V5保持与维持上皮屏障功能有关的功能,如SG-11蛋白所示 (参见例如实施例2)。

[0439] 如实施例2所述进行细胞培养。简言之,培养8-10天后,将含有肠细胞的Transwell板用加到transwell板的基底侧室中的10ng/ml IFN- $\gamma$  在37℃+5%CO<sub>2</sub>下处理24小时。24小时后,将新鲜的cRPMI加入到上皮细胞培养板中。在IFN- $\gamma$  处理后测量跨上皮电阻 (TEER) 读数,并将其用作治疗前TEER值。然后将SG-11 (SEQ ID NO:9) 或SG-11V5 (SEQ ID NO:19) 以1 $\mu$ g/ml (40nM) 的最终浓度添加到Transwell板的顶室中。肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 抑制剂肽18 (BioTechne,明尼苏达州明尼阿波利斯) 以50nM使用作为阳性对照用于预防炎症引起的屏障破坏 (Zolotarevskky等,202,Gastroenterology,123:163-172)。将化合物在肠上皮细

胞上孵育6小时。与测试化合物预孵育后,将含有肠细胞的Transwell插入物转移到含有U937单核细胞的接收板的顶部。然后将热灭活的大肠杆菌(HK大肠杆菌)(细菌加热至80℃,持续40分钟)加入顶室和基底侧室,感染复数(MOI)为10。将Transwell板在37℃+5%CO<sub>2</sub>下孵育24小时,然后进行后处理TEER测量。SG-11(SEQ ID NO:9)使经HK大肠杆菌破坏的TEER从78.6%增加到89.5% ( $p<0.0001$ ),而SG-11V5(SEQ ID NO:19)使之增加到89.1% ( $p<0.0001$ ) (图20)。使用与HK大肠杆菌比较的单向方差分析,然后进行费舍尔LSD多重比较检验进行统计分析。图20中的图形表示在两个单独的实验( $n=12$ )中从四个平板收集的数据。

#### [0440] 实施例16

##### [0441] SG-11V5的体内功能分析

[0442] 接下来,重复如以上实施例7和8中所述进行的DSS动物模型实验,以平行测试SG-11或SG-11V5(SEQ ID NO:19)。在这些实验中,在开始用DSS治疗的同时(如实施例7)或在先前的DSS给药之后,将SG-11或SG-11V5给予小鼠。唯一的区别是实施例8中的小鼠用SG-11或SG-11V5(SEQ ID NO:19)处理4天而不是6天。

[0443] 在第一DSS小鼠模型(实施例16A;与实施例7相同的方法)中,在第0天用腹膜内(i.p.)试验化合物处理小鼠,并在6小时后开始DSS处理。给药剂量包括50nmol/kg的SG-11(SEQ ID NO:9) (1.3mg/ml)和Gly2-GLP2(0.2mg/kg),以及SG-11V5(SEQ ID NO:19)的剂量反应,包括16nmol/kg (0.4mg/ml), 50nmol/kg (1.3mg/ml)和158nmol/kg (4.0mg/kg)。小鼠在其饮水水中用2.5%DSS处理6天(从第0天到第6天)。在DSS暴露期间,每天给予两次治疗性蛋白质处理。

[0444] 在第二实验(实施例16B;与实施例8相同的方法)中,向小鼠提供含有2.5%DSS的饮用水持续7天。在第7天,恢复了正常的饮用水,开始50nmol/kg SG-11(SEQ ID NO:9) (1.3mg/kg), SG-11V5(SEQ ID NO:19) (1.3mg/kg)或Gly2-GLP2(0.2mg/kg)的腹膜内处理。每天两次(b.i.d.)进行处理,每天早上和晚上服用一次(每8和16小时一次),持续4天。对于两种DSS模型(实施例16A和16B),在DSS给予期间每2天制备新鲜的2.5%DSS水。

[0445] 在每个DSS实验结束时,将小鼠禁食4小时,然后口服600mg/kg异硫氰酸荧光素(FITC) [4KDa-FITC]标记的4KDa葡聚糖。处死4KDa-FITC饲喂小鼠后一小时,收集血液并在血清中测量FITC信号。对于第一模型,与未处理的小鼠相比,在用载剂处理的DSS小鼠中观察到了跨越上皮屏障的4KDa-FITC葡聚糖移位明显增加。结果显示在图21A中:SG-11(SEQ ID NO:9)显著降低了4KDa-FITC信号( $p=0.04$ )。SG-11V5(SEQ ID NO:19)也降低了4KDa-FITC信号,尽管差异未达到统计学显著( $p=0.21$ )。在图21B中,类似于实施例8中的先前结果,未观察到4KDa-FITC的增加,因此未观察到SG-11或SG-11V5处理的效果。两张图中的数据均以平均值 $\pm$ SEM的形式绘制,每个图代表来自单个实验的数据(每组 $n=10$ )。

##### [0446] SG-11V5对炎性肠病的DSS模型中屏障功能的炎症中心读数的作用

[0447] 在完成以上DSS模型之后,按照实施例7中详述的方案,以屏障功能的炎症中心读数测量LBP水平。在完成两种DSS模型(实施例16A和16B)后,收集血液并分离血清。使用可商购的ELISA试剂盒(恩佐生物科学公司(Enzo Life Sciences),纽约州法明代尔)在血清中测量LPS结合蛋白(LBP)水平。结果在图22A(实施例16A)和图22B(实施例16B)中提供。响应于DSS暴露,在实施例16A DSS模型中观察到LBP显著增加。在50nmol/kg剂量下,SG-11(SEQ ID NO:9)和SG-11V5(SEQ ID NO:19)观察到了LBP的类似降低,尽管两者均不是统计学显著

的。然而,以158nmol/kg的较高剂量进行SG-11V5(SEQ ID NO:19)处理导致LBP产生显著降低( $p=0.003$ ) (图22A)。在实施例16B DSS模型中,暴露于DSS导致LBP产生的显著增加(图22B)。然而,在任何处理中均未观察到LBP降低,并且对于SG-11(SEQ ID NO:9)和SG-11V5(SEQ ID NO:19)均观察到相似的作用。不受理论束缚,认为在循环中LBP的半衰期较长(据报道为12-24小时)可能使得很难观察到在开始治疗之前引起LBP响应(给予DSS)的模型中系统性LBP水平降低(Behrendt, D., J. Dembinski, A. Heep, 和 P. Bartmann. 2004. 早产儿的脂多糖结合蛋白(Lipopolysaccharide binding protein in preterm infants). Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 89:F551-554)。

[0448] 在炎症肠病的DSS模型中SG-11和SG-11V5对体重的作用

[0449] 在实施例16A和实施例16B中的整个实验模型中均测量体重。在实施例16A DSS模型(图23A)中,对于50nmol/kg的SG-11(SEQ ID NO:9)和SG-11V5(SEQ ID NO:19)处理观察到相似的体重变化,并且对于158nmol/kg的SG-11V5(SEQ ID NO:19)在第6天观察到体重的显著改善。在治疗性DSS模型中观察到相似的模式,其中50nmol/kg的剂量SG-11(SEQ ID NO:9)和SG-11V5(SEQ ID NO:19)的体重有相似的变化,且两者在第11天在统计学上都有体重变化改善( $p<0.05$ )。对于图23A和图23B,将数据绘制为平均值 $\pm$ SEM,并且每个图表示来自单个实验的数据。与采用费舍尔LSD多重比较检验的DSS+载剂组相比,使用双向ANOVA进行统计分析。

[0450] 在炎症肠病的DSS模型中SG-11和SG-11V5对总体病理的作用

[0451] 如以上实施例7所述,对实施例16A进行了结肠组织的总体病理观察。简言之,使用基于可见血液水平和粪便颗粒稠度的评分系统。使用的评分系统为:(0) = 无总体病理,(1) = 粪便中可见血丝,(2) = 完全血性粪便颗粒,(3) 盲肠中可见血性粪便,(4) 在盲肠和大便稀疏中血性粪便,(5) = 直肠出血。对于SG-11(SEQ ID NO:9)和SG-11V5(SEQ ID NO:19),以50nmol/kg的剂量获得了相似的结果,并且对SG-11V5(SEQ ID NO:19)观察到了剂量依赖性效应,160nmol/kg的剂量有显著改善( $p<0.002$ )。图24所示的数据以平均值 $\pm$ SEM表示,并且包括来自单个实验的数据。统计分析是通过单向方差分析进行的,然后进行费舍尔LSD多重比较检验。

[0452] 在炎症肠病的DSS模型中SG-11和SG-11V5对结肠长度的作用

[0453] 还分析了来自实施例16的DSS模型的SG-11和SG-11变体蛋白对结肠长度的作用。对于实施例16A(图25A)或实施例16B(图25B) DSS模型进行结肠长度测量。在两个DSS模型中,SG-11(SEQ ID NO:9)和SG-11V5(SEQ ID NO:19)获得了相似的结果,其中两种治疗方案均导致结肠长度显著增加。然而,在实施例16A的DSS模型中,SG-11V5(SEQ ID NO:19)未观察到对结肠长度的剂量依赖性作用。两张图中的数据均以平均值 $\pm$ SEM表示,代表来自单个实验的数据。使用与DSS+载剂相比的单向方差分析,然后进行费舍尔LSD多重比较检验进行统计分析。

[0454] 在炎症肠病的DSS模型中SG-11和SG-11V5对结肠重量与长度之比的作用

[0455] 还分析了来自实施例16的DSS模型的SG-11和SG-11变体蛋白对结肠重量与长度之比的作用。在实施例16A(图26A)和实施例16B(图26B) DSS模型治疗方案中,SG-11(SEQ ID NO:9)和SG-11V5(SEQ ID NO:19)之间的结肠重量与长度之比相似。在实施例16A的处理中,所有处理和剂量均显著改善了结肠的重量与长度之比( $p<0.05$ )。在实施例16B的处理方案

中,SG-11 (SEQ ID NO:9) 和SG-11V5 (SEQ ID NO:19) 均显著改善了结肠的重量与长度之比 ( $p<0.01$ ), 而阳性对照Gly2-GLP2则没有。使用与DSS+载剂相比的单向方差分析, 然后进行费舍尔LSD多重比较检验进行统计分析。数据以平均值 $\pm$ SEM的形式绘制, 每个图代表一个实验的数据。

[0456] 尽管出于理解清楚的目的, 前述公开通过说明和示例的方式提供了一些细节, 但本领域技术人员可理解在不偏离本发明的精神或范围的情况下可实施各种改变和改进, 在所附权利要求中描述的本公开的范围。因此, 该描述不应被解释为限制本公开的范围。

[0457] 表11展示带详细信息的本公开的SEQ ID NO。

[0458] 表11

[0459]

SEQ ID NO	类型	说明	名称
1	PRT	带信号序列的全长蛋白质	SG-11
2	DNA	SEQ ID NO:1 的编码序列 (cds)	
3	PRT	没有信号序列并且没有“起始甲硫氨酸”的 SEQ ID NO:1	SG-11
4	DNA	SEQ ID NO:3 的 cds	
5	PRT	在 pGEX6 载体中表达并被 Precision 蛋白酶切割的 SEQ ID NO:3	SG-11
6	DNA	SEQ ID NO:5 的 cds	
7	PRT	带“起始甲硫氨酸”的 SEQ ID NO:3	SG-11
8	DNA	SEQ ID NO:7 的 cds (密码子优化)	
9	PRT	带 N-末端 FLAG 标签的 SEQ ID NO:3	SG-11
10	DNA	SEQ ID NO:9 的 cds (非密码子优化)	
11	PRT	SEQ ID NO:7 的人工变体(C147V, C151S)	SG-11V1
12	DNA	SEQ ID NO:11 的 cds (密码子优化)	
13	PRT	SEQ ID NO:7 的人工变体(G84D, C147V, C151S)	SG-11V2
14	DNA	SEQ ID NO:13 的 cds (密码子优化)	
15	PRT	SEQ ID NO:7 的人工变体(N83S, C147V, C151S)	SG-11V3
16	DNA	SEQ ID NO:15 的 cds (密码子优化)	
17	PRT	SEQ ID NO:7 的人工变体(N53S, G84D,	SG-11V4



[0460]

		C147V, C151S)	
18	DNA	SEQ ID NO:17 的 cds (密码子优化)	
19	PRT	SEQ ID NO:7 的人工变体 (N53S, N83S, C147V, C151S)	SG-11V5
20	DNA	SEQ ID NO:19 的 cds (密码子优化)	
21	PRT	肠炎罗斯氏菌 ( <i>R. intestinalis</i> ) 假想蛋白 (GenBank WP_006857001.1)	
22	PRT	罗斯氏菌种 831b 假想蛋白 (GenBank WP_075679733 .1)	
23	PRT	食葡糖罗斯氏菌 ( <i>R. inulinivorans</i> ) 假想蛋白 (GenBank WP_055301040.1)	
24	PRT	来自表 6 和 8 的 SEQ ID NO:7 片段	
25	PRT	来自表 6 的 SG-11 片段	
26	PRT	来自表 6 的 SG-11 片段	
27	PRT	来自表 6 的 SG-11 片段	
28	PRT	来自表 6 的 SG-11 片段	
29	PRT	来自表 8 的 SG-11 片段	
30	PRT	来自表 6 和 8 的 SG-11 片段	
31	PRT	来自表 8 的 SG-11 片段	
32	PRT	FLAG 标签	FLAG
33	PRT	在 53, 83, 84, 147 和 151 位有 X 的变体蛋白	
34	PRT	在 53, 83, 84, 147 和 151 位有 X 的变体蛋白	

[0461] 本公开的带编号的实施方式

[0462] 尽管有所附权利要求,但是本公开显示了以下带编号的实施方式:

[0463] 治疗方法

[0464] 1.一种治疗胃肠道上皮细胞屏障功能紊乱的方法,包括:

[0465] a.向有需要的患者给予药物组合物,其包含:

[0466] i.一种治疗性蛋白质,其包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和/或SEQ ID NO:19有至少约85%的序列相同性的氨基酸序列;和

[0467] ii.药学上可接受的运载体。

[0468] 2.如权利要求1所述的方法,其中所述胃肠道上皮细胞屏障功能紊乱是与胃肠道壁完整性降低相关的疾病。

[0469] 3.如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述胃肠道上皮细胞屏障功能紊乱是与胃肠道粘膜上皮完整性降低相关的疾病。

[0470] 4.如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述胃肠道上皮细胞屏障功能紊乱是与肠上皮完整性降低相关的疾病。

[0471] 5.如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述胃肠道上皮细胞屏障功能紊乱选自以下的至少一种:炎性肠病,克罗恩氏病,溃疡性结肠炎,囊袋炎,肠易激综合症,肠感染,艰难梭菌感染,代谢性疾病,肥胖症,2型糖尿病,非酒精性脂肪性肝炎,非酒精性脂肪肝,肝脏疾病,酒精性脂肪性肝炎,乳糜泻,坏死性小肠结肠炎,胃肠道疾病,短肠综合征,胃肠道粘膜炎,化学疗法诱发的粘膜炎,辐射诱发的粘膜炎,口腔粘膜炎,间质性膀胱炎,神经系统疾病,认知障碍,阿尔茨海默氏症,帕金森氏症,多发性硬化症,自闭症,化疗相关的脂肪性肝炎(CASH)和上述疾病的儿科形式。

[0472] 6.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述胃肠道上皮细胞屏障功能紊乱是炎性肠病。

[0473] 7.如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述胃肠道上皮细胞屏障功能紊乱是克罗恩氏病。

[0474] 8.如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述胃肠道上皮细胞屏障功能紊乱是溃疡性结肠炎。

[0475] 9.如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约90%序列相同性的氨基酸序列。

[0476] 10.如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约95%序列相同性的氨基酸序列。

[0477] 11.如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约97%序列相同性的氨基酸序列。

[0478] 12.如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约98%序列相同性的氨基酸序列。

[0479] 13.如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约99%序列相同性的氨基酸序列。

[0480] 14.如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:19。

[0481] 15.如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0482] 16. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0483] 17. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0484] 18. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0485] 19. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0486] 20. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0487] 21. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0488] 22. 如权利要求1-21中任一项所述的方法,其中给予包括直肠,肠胃外,静脉内,局部,口服,皮肤,透皮或皮下给予。

[0489] 23. 如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述给予是针对所述患者的口腔,胃肠腔和/或肠。

[0490] 24. 如权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述患者经历与胃肠道上皮细胞屏障功能紊乱相关的至少一种症状的减轻。

[0491] 25. 如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述患者经历与胃肠道上皮细胞屏障功能紊乱相关的至少一种症状的减轻,所述症状选自:腹痛,便血,便脓,发烧,体重减轻,频繁腹泻,疲劳,食欲下降,里急后重和直肠出血。

[0492] 26. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中给予减轻了所述患者的胃肠道炎症。

[0493] 27. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中给予减轻了所述患者的肠粘膜炎症。

[0494] 28. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中给予增加了所述患者的肠组织中粘蛋白的产生。

[0495] 29. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中给予增加了所述患者的肠上皮伤口愈合。

[0496] 30. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中给予增加了所述患者的肠上皮细胞增殖。

[0497] 31. 如权利要求1-30中任一项所述的方法,还包括:向所述患者给予至少一种第二治疗剂。

[0498] 32. 如权利要求1-31中任一项所述的方法,其还包括:向所述患者给予至少一种第二治疗剂,所述第二治疗剂选自:止泻药,5-氨基水杨酸化合物,抗炎剂,抗生素,抗体,抗细胞因子剂,抗炎细胞因子剂,类固醇,皮质类固醇和免疫抑制剂。

[0499] 药物组合物

[0500] 1. 一种药物组合物,其包含:

[0501] a. 一种治疗性蛋白质,其包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ

ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和/或SEQ ID NO:19有至少约85%的序列相同性的氨基酸序列;和

[0502] b.药学上可接受的运载体。

[0503] 2.如权利要求1所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约90%序列相同性的氨基酸序列。

[0504] 3.如权利要求1-2中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约95%序列相同性的氨基酸序列。

[0505] 4.如权利要求1-3中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约97%序列相同性的氨基酸序列。

[0506] 5.如权利要求1-4中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约98%序列相同性的氨基酸序列。

[0507] 6.如权利要求1-5中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约99%序列相同性的氨基酸序列。

[0508] 7.如权利要求1-6中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:19。

[0509] 8.如权利要求1-7中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0510] 9.如权利要求1-7中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0511] 10.如权利要求1-7中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0512] 11.如权利要求1-7中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0513] 12.如权利要求1-7中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0514] 13.如权利要求1-7中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0515] 14.如权利要求1-7中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0516] 15.如权利要求1-14中任一项所述的药物组合物,其配制用于直肠,肠胃外,静脉内,局部,口服,皮肤,透皮或皮下给予。

[0517] 16.如权利要求1-15中任一项所述的药物组合物,其经配制使得所述治疗性蛋白质在患者的胃肠腔和/或肠中有活性。

[0518] 表达载体

[0519] 1. 一种表达载体,其包含:多核苷酸,其编码包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约85%序列相同性的氨基酸序列的蛋白质。

[0520] 2. 如权利要求1所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约90%序列相同性的氨基酸序列。

[0521] 3. 如权利要求1-2中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约95%序列相同性的氨基酸序列。

[0522] 4. 如权利要求1-3中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约97%序列相同性的氨基酸序列。

[0523] 5. 如权利要求1-4中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约98%序列相同性的氨基酸序列。

[0524] 6. 如权利要求1-5中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约99%序列相同性的氨基酸序列。

[0525] 7. 如权利要求1-6中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和SEQ ID NO:19。

[0526] 8. 如权利要求1-7中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0527] 9. 如权利要求1-7中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0528] 10. 如权利要求1-7中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0529] 11. 如权利要求1-7中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0530] 12. 如权利要求1-7中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0531] 13. 如权利要求1-7中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0532] 14. 如权利要求1-7中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0533] 15. 如权利要求1-7中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0534] 16. 如权利要求1-7中任一项所述的表达载体,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID

NO:19的氨基酸序列。

[0535] 宿主细胞

[0536] 1.一种宿主细胞,其包含:外源性多核苷酸,其编码包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约85%序列相同性的氨基酸序列的蛋白质。

[0537] 2.如权利要求1所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约90%序列相同性的氨基酸序列。

[0538] 3.如权利要求1-2中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约95%序列相同性的氨基酸序列。

[0539] 4.如权利要求1-3中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约97%序列相同性的氨基酸序列。

[0540] 5.如权利要求1-4中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约98%序列相同性的氨基酸序列。

[0541] 6.如权利要求1-5中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:19具有至少约99%序列相同性的氨基酸序列。

[0542] 7.如权利要求1-6中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和SEQ ID NO:19。

[0543] 8.如权利要求1-7中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0544] 9.如权利要求1-7中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0545] 10.如权利要求1-7中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0546] 11.如权利要求1-7中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0547] 12.如权利要求1-7中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0548] 13.如权利要求1-7中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0549] 14.如权利要求1-7中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0550] 15.如权利要求1-7中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0551] 16.如权利要求1-7中任一项所述的宿主细胞,其中所述编码的蛋白质包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0552] 17.如权利要求1-16中任一项所述的宿主细胞,其中外源性多核苷酸还编码宿主细胞特异性信号序列。

[0553] 18.如权利要求1-17中任一项所述的宿主细胞,其中外源性多核苷酸包含与选自以下的氨基酸序列具有至少约85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列相同性的核酸序列:SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,和SEQ ID NO:20。

[0554] 19.如权利要求1-18中任一项所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是原核细胞。

[0555] 20.如权利要求1-19中任一项所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是大肠杆菌细胞。

[0556] 21.如权利要求1-18中任一项所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真核细胞。

[0557] 22.如权利要求1-18和21中任一项所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢细胞。

[0558] 23.一种产生蛋白质的方法,包括:在足以表达所述编码的蛋白质的条件下培养如权利要求1-22中任一项所述的宿主细胞。

[0559] 分离的蛋白质

[0560] 1.一种分离的治疗性蛋白质,其包含:与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和/或SEQ ID NO:19有至少约85%的序列相同性的氨基酸序列。

[0561] 2.如权利要求1所述的分离的治疗性蛋白质,包含:与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和/或SEQ ID NO:19具有至少约90%序列相同性的氨基酸序列。

[0562] 3.如权利要求1-2中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和/或SEQ ID NO:19具有至少约95%序列相同性的氨基酸序列。

[0563] 4.如权利要求1-3中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和/或SEQ ID NO:19具有至少约97%序列相同性的氨基酸序列。

[0564] 5.如权利要求1-4中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和/或SEQ ID NO:19具有至少约98%序列相同性的氨基酸序列。

[0565] 6.如权利要求1-5中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和/或SEQ ID NO:19具有至少约99%序列相同性的氨基酸序列。

[0566] 7.如权利要求1-6中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和SEQ ID NO:19。

[0567] 8.如权利要求1-7中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0568] 9.如权利要求1-7中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0569] 10.如权利要求1-7中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0570] 11.如权利要求1-7中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0571] 12.如权利要求1-7中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0572] 13.如权利要求1-7中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0573] 14.如权利要求1-7中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0574] 15.如权利要求1-7中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0575] 16.如权利要求1-7中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,包含:SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0576] 17.如权利要求1-16中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,其中所述蛋白质在体外跨上皮电阻测定中增加电阻。

[0577] 18.如权利要求1-17中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,其中与没有所述蛋白质的情况下进行的测定相比,所述蛋白质在体外跨上皮电阻测定中增加至少约5%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,或99%的电阻。

[0578] 19.如权利要求1-18中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,其中与激酶抑制剂的对照相比,所述蛋白质在体外跨上皮电阻测定中增加电阻。

[0579] 20.如权利要求1-19中任一项所述的分离的治疗性蛋白质,其中与星形孢菌素或肌球蛋白轻链激酶的对照相比,所述蛋白质在体外跨上皮电阻测定中增加电阻。

[0580] 合成的治疗性蛋白质

[0581] 1.一种合成的治疗性蛋白质,包含:与SEQ ID NO:19具有至少约90%序列相同性的氨基酸序列。

[0582] 2.如权利要求1所述的蛋白质,包含:与SEQ ID NO:19具有至少约95%序列相同性的氨基酸序列。

[0583] 3.如权利要求1-2中任一项所述的蛋白质,包含:与SEQ ID NO:19具有至少约97%序列相同性的氨基酸序列。

[0584] 4.如权利要求1-3中任一项所述的蛋白质,包含:与SEQ ID NO:19具有至少约98%序列相同性的氨基酸序列。

[0585] 5.如权利要求1-4中任一项所述的蛋白质,包含:与SEQ ID NO:19具有至少约99%序列相同性的氨基酸序列。

[0586] 6.如权利要求1-5中任一项所述的蛋白质,包含:SEQ ID NO:19的氨基酸序列。



- [0587] 7.如权利要求1-6中任一项所述的蛋白质,其中第147位的氨基酸是缬氨酸。
- [0588] 8.如权利要求1-6中任一项所述的蛋白质,其中第151位的氨基酸是丝氨酸。
- [0589] 9.如权利要求1-6中任一项所述的蛋白质,其中第147位的氨基酸是缬氨酸,并且第151位的氨基酸是丝氨酸。
- [0590] 10.如权利要求1-5中任一项所述的蛋白质,其中第84位的氨基酸是天冬氨酸。
- [0591] 11.如权利要求1-5中任一项所述的蛋白质,其中第84位的氨基酸是天冬氨酸,第147位的氨基酸是缬氨酸,并且第151位的氨基酸是丝氨酸。
- [0592] 12.如权利要求1-6中任一项所述的蛋白质,其中第83位的氨基酸是丝氨酸。
- [0593] 13.如权利要求1-6中任一项所述的蛋白质,其中第83位的氨基酸是丝氨酸,第147位的氨基酸是缬氨酸,并且第151位的氨基酸是丝氨酸。
- [0594] 14.如权利要求1-6中任一项所述的蛋白质,其中第53位的氨基酸是丝氨酸。
- [0595] 15.如权利要求1-5中任一项所述的蛋白质,其中第53位的氨基酸是丝氨酸,并且第84位的氨基酸是天冬氨酸,并且第147位的氨基酸是缬氨酸,并且第151位的氨基酸是丝氨酸。
- [0596] 16.如权利要求1-6中任一项所述的蛋白质,其中第53位的氨基酸是丝氨酸,并且第83位的氨基酸是丝氨酸,并且第147位的氨基酸是缬氨酸,并且第151位的氨基酸是丝氨酸。
- [0597] 17.如权利要求1-6中任一项所述的蛋白质,其中第147位的氨基酸不是半胱氨酸,第151位的氨基酸不是半胱氨酸,第83位的氨基酸不是天冬酰胺,和/或第53位的氨基酸不是天冬酰胺。
- [0598] 18.如权利要求1-17中任一项所述的蛋白质,其中所述蛋白质在体外跨上皮电阻测定中增加电阻。
- [0599] 19.一种药物组合物,包含:如权利要求1-17中任一项所述的蛋白质和药学上可接受的运载体。
- [0600] 20.一种治疗胃肠道上皮细胞屏障功能紊乱的方法,包括:
- [0601] a.向有需要的患者给予药物组合物,其包含:
- [0602] i.一种治疗性蛋白质,其包含与SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,和/或SEQ ID NO:19有至少约85%的序列相同性的氨基酸序列;和
- [0603] ii.药学上可接受的运载体。
- [0604] 通过引用纳入
- [0605] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请通过援引整体纳入本文以用于所有目的。
- [0606] 然而,本文对任何参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请的援引均不是也不应视为承认或以任何形式示意它们构成世界上任何国家的有效的现有技术或是公知常识的一部分。
- [0607] 参考文献
- [0608] Molodecky等2012,随时间增加炎性肠病的发病率和流行率,基于系统综述(Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with

time, based on systematic review), *Gastroenterology* 142(1):46-54.

[0609] Aroniadis等, 2013, 粪便微生物群移植: 过去, 现在和未来 (Fecal microbiota transplantation: past, present and future), *Curr. Opin. Gastroenterol.* 29(1):79-84.

[0610] Maloy等, 2011, 肠道动态平衡及其在炎性肠病中的破坏 (Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease), *Nature* 474(7351):298-306.

[0611] Needleman等, 1970, 可应用于搜索两种蛋白质的氨基酸序列的相似性的一般方法 (A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins) *J. Mol. Biol.*, 48(3):444-453.

[0612] Myers等, 1988, 线性空间的最优比对 (Optimal alignments in linear space), *CABIOS* 4:11-17.

[0613] Altschul, 等, 1990, 局部比对检索基本工具 (Basic local alignment search tool), *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

[0614] Altschul等, 1997, 缺口BLAST和PSI-BLAST: 新一代蛋白质数据库检索程序 (Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs), *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402.

[0615] Henikoff等, 1992, 来自蛋白质模块的氨基酸取代矩阵 (Amino acid substitution matrices from protein blocks), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(22):10915-10919.

[0616] Karlin等, 1993, 分子序列中多重高评分区段的应用和统计 (Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5873-5877.

[0617] Higgins等, 1988, CLUSTAL: 用在微计算机上进行多重序列比对的程序包 (CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer), *Gene* 73:237-244.

[0618] Person等, 1988, 生物序列比较的改进工具 (Improved tools for biological sequence comparison), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-2448.

[0619] Bowie等, 1990, 破译蛋白质序列中的信息: 对氨基酸取代的耐受 (Deciphering the message in protein sequences: tolerance to amino acid substitutions), *Science* 247:1306-1310.

[0620] IUPAC有机化学命名法委员会 (CNOC) 和IUPAC-IUB生化命名委员会 (CBN), 1975,  $\alpha$ -氨基酸命名 (建议, 1974), *Biochemistry* 14:449-462.

[0621] 《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences), 第17版, Alfonso R. Gennaro (编), 美国宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司, 1985.

[0622] 《药物技术百科全书》(Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology), 第3版, James Swarbrick (编), Informa Healthcare USA (公司), 美国纽约, 2007.

[0623] Berge等, 1977, 药用盐 (Pharmaceutical salts), *J. Pharm. Sci.* 66:1-19.

[0624] 《药用盐手册: 性质、选择和应用》(Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use), Stahl和Wermuth, Wiley-VCH, 2002.

- [0625] 关于Bergstrom,427F.2d 1394, (CCPA 1970)
- [0626] 关于Bergy,596F.2d 952(CCPA 1979)
- [0627] 帕克-戴维斯公司(Parke-Davis&Co.)对H.K.马尔福德公司(H.K.Mulford&Co.), 189F.95(S.D.N.Y.1911)部分确认,部分修改,196F.496(第二巡回上诉法院.1912)
- [0628] 默克公司(Merck&Co.,Inc.)对奥林马西森化学公司(Olin Mathieson Chemical Corporation),253F.2d 156(第四巡回上诉法院.1958)
- [0629] Horhota等,2006,甘油核苷三磷酸酯:合成和聚合酶底物活性(Glycerol nucleoside triphosphates:Synthesis and polymerase substrate activities), Organic Letters 8:5345-5347.
- [0630] Botoman等,1998,炎性肠病管理(Management of Inflammatory Bowel Disease),Am.Fam.Physician,57(1):57-68.
- [0631] Neurath,2014,炎性肠病中的细胞因子(Cytokines in Inflammatory Bowel Disease),Nature Reviews Immunology 14:329-342.
- [0632] Zhang等,2007,细胞因子,炎症和疼痛(Cytokines,Inflammation and Pain), Int.Anesthesiol.Clin.45(2):27-37.
- [0633] Strober等,炎性肠病病理中的促炎细胞因子(Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases),Gastroenterology 140(6): 1756-1767.
- [0634] Boltin等,2013,炎性肠病中的粘蛋白功能:更新(Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease:An Update),J.Clin.Gastroenterol.47(2):106-111.
- [0635] Kim等,2012,DSS诱导的IBD模型中研究肠炎症(Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD).Journal of Visualized Experiments, 60:2-6.
- [0636] Levesque等,2015从临床试验和实践看炎性肠病治疗的趋同目标(Converging goals of treatment of inflammatory bowel disease from clinical trials and practice),Gastroenterology 148:37-51.
- [0637] Best等,1976,克罗恩氏病活性指数开发.国家合作克罗恩氏病研究(Development of a Crohn's disease activity index.National Cooperative Crohn's Disease Study),Gastroenterol.70:439-444.
- [0638] Johansson,等,2014,在鼠结肠炎模型和溃疡性结肠炎患者中,细菌均会穿透通常难以穿透的内结肠粘液层(Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis),Gut 63:281-291.
- [0639] Simmonds等,2014,儿童新发炎性肠病的Paneth细胞化生(Paneth cell metaplasia in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children),BMC Gastroenterol.14:93.
- [0640] Gassler等,2001,炎性肠病与肠细胞连接改变有关(Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions), Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.281:G216-G228.

- [0641] Dewi,等,2004,人内皮细胞通透性的体外评估:炎性细胞因子和登革热病毒感染的影响(In vitro assessment of human endothelial cell permeability:effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection).J.Virol.Methods.121:171-180.
- [0642] Mandic,等,2004,通过电阻击穿测定评估头颈部鳞状细胞癌的侵袭性(Evaluation of head and neck squamous cell carcinoma invasiveness by the electrical resistance breakdown assay),Clin.Exp.Metast.21:699-704.
- [0643] Dewi,等,2008,外周血单个核细胞增加了登革病毒感染的内皮细胞的通透性与血管内皮钙粘蛋白的下调相关(Peripheral blood mononuclear cells increase the permeability of dengue virus-infected endothelial cells in association with down-regulation of vascular endothelial cadherin),J.Gen.Virol.89:642-652.
- [0644] Sands,2004,从症状到诊断:各种形式的肠道炎症之间的临床区别(From symptom to diagnosis:clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation),Gastroenterology 126:1518-1532.
- [0645] Danese等,2006,炎性肠病的病因(Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases),World J.Gastroenterol.12:4807-4812.
- [0646] Duncan,S.H.,Aminov,R.I.,Scott,K.P.,Louis,P.,Stanton,T.B.,Flint,H.J. (2006).基于来自人粪便的分离株,提出粪便罗斯氏菌(*Roseburia faecis*)新种,人罗斯氏菌(*Roseburia hominis*)新种,和食葡萄糖罗斯氏菌(*Roseburia inulinivorans*)新种(Proposal of *Roseburia faecis* sp.nov.,*Roseburia hominis* sp.nov.and *Roseburia inulinivorans* sp.nov.,based on isolates from human faeces).Int.J.Syst.Evol.Microbiol.第56卷,第2437-2441页.
- [0647] 国际人类基因组测序联盟(2004)完成人类基因组的常染色体序列(International Human Genome Sequencing Consortium(2004)Finishing the euchromatic sequence of the human genome).Nature.431,931-45.
- [0648] Jensen O.N.(2004)修饰特异性蛋白质组学:通过质谱表征翻译后修饰(Modification-specific proteomics:Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry).Curr Opin Chem Biol.8,33-41.
- [0649] Ayoubi T.A.和Van De Ven W.J.(1996)替代启动子调控基因表达(Regulation of gene expression by alternative promoters).FASEB J.10,453-60.
- [0650] Walsh C.(2006)《蛋白质的翻译后修饰:扩大自然界的库存(Posttranslational modification of proteins:Expanding nature's inventory)》.科罗拉多州恩格尔伍德:罗伯茨出版公司(Roberts and Co.Publishers).xxi,第490页.
- [0651] Gaston B.M.等(2003)细胞生物学中的S-亚硝基化信号传导(S-nitrosylation signaling in cell biology).Mol Interv.3,253-63.
- [0652] Jaffrey S.R.和Snyder S.H.(2001)用于检测S-亚硝化蛋白质的生物素开关方法(The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins).Sci STKE.2001,p11.
- [0653] Han P.和Chen C.(2008)在S-亚硝基化蛋白质分析中无洗涤剂的生物素开关结合

液相色谱/串联质谱 (Detergent-free biotin switch combined with liquid chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of S-nitrosylated proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom*).22,1137-45.

[0654] Imai S.等 (2000) 转录沉默和长寿蛋白SIR2是NAD依赖性组蛋白脱乙酰基酶 (Transcriptional silencing and longevity protein SIR2 is an NAD-dependent histone deacetylase). *Nature*.403,795-800.

[0655] Glozak M.A.等 (2005) 非组蛋白的蛋白质的乙酰化和脱乙酰化 (Acetylation and deacetylation of non-histone proteins). *Gene*.363,15-23.

[0656] Yang X.J.和Seto E. (2008) 赖氨酸乙酰化:编码的串扰与其他翻译后修饰 (Lysine acetylation: Codified crosstalk with other posttranslational modifications). *Mol Cell*.31,449-61.

[0657] Bratt,等,“一项在克罗恩氏病中表达白细胞介素-10的转基因细菌的1期试验 (A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease),” *Clinical Gastroenterology and Hepatology*,2006,卷4,第754-759页.

[0658] Shigemori,等,“口服递送分泌生物活性血红素加氧酶-1的乳酸乳球菌可减轻小鼠急性结肠炎的发展 (Oral delivery of *Lactococcus lactis* that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice).” *Microbial Cell Factories*,2015,卷14:189.

[0659] Steidler,等,“用分泌白介素10的乳酸乳球菌治疗鼠结肠炎 (Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10),” *Science*,2000,卷289,第1352-1355页.

[0660] Hanniffy,等,“使用乳酸乳球菌粘膜递送肺炎球菌疫苗可预防呼吸道感染 (Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection),” *Journal of Infectious Diseases*,2007,卷195,第185-193页.

[0661] Vandenbroucke,等,“转基因乳酸乳球菌主动递送三叶因子可预防和治愈小鼠急性结肠炎 (Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice),” *Gastroenterology*,2004,卷127,第502-513页.

[0662] Sheth,等,“通过原位微生物组工程改造来操纵细菌群落 (Manipulating bacterial communities by in situ microbiome engineering),” *Trends in Genetics*,2016,卷32,期4,第189-200页.

[0663] Lerner等,“营养不良可能通过宿主蛋白的不适当翻译后修饰引发自身免疫性疾病 (Dysbiosis may trigger autoimmune diseases via inappropriate post-translational modification of host proteins).” *Frontiers in Microbiology*,2016,卷7,文章84.

[0664] Machiels,K.,M.Joossens,J.Sabino,V.De Preter,I.Arijs,V.Eeckhaut,V.Ballet,K.Claes,F.Van Immerseel,K.Verbeke,M.Ferrante,J.Verhaegen,P.Rutgeerts,和S.Vermeire.2014.产生丁酸盐的物种人罗斯氏菌 (*Roseburia hominis*) 和

普氏粪杆菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*) 的减少定义了溃疡性结肠炎患者的营养不良 (A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis). *Gut* 63:1275-1283.

[0665] Patterson, A.M., I.E. Mulder, A.J. Travis, A. Lan, N. Cerf-Bensussan, V. Gaboriau-Routhiau, K. Garden, E. Logan, M.I. Delday, A.G.P. Coutts, E. Monnais, V.C. Ferraria, R. Inoue, G. Grant, 和 R.I. Aminov. 2017. 人肠共生人罗斯氏菌促进并调节先天免疫 (Human Gut Symbiont *Roseburia hominis* Promotes and Regulates Innate Immunity). *Front Immunol* 8:1166.

[0666] Shawki, A., 和 D.F. McCole. 2017. 粘附侵袭性大肠杆菌引起肠上皮屏障功能障碍的机制 (Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive *Escherichia coli*). *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 13:41-50.

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 第二基因组股份有限公司(Second Genome, Inc.)
- [0003] A • W • 韩(Han, Andrew Wonhee)
- [0004] A • W • 古德耶(Goodyear, Andrew Whitman)
- [0005] T • 古亚(Gujral, Tarunmeet)
- [0006] T • Z • 德桑蒂斯(DeSantis, Todd Zachary)
- [0007] K • 达巴(Dabbagh, Karim)
- [0008] T • 竹内(Takeuchi, Toshihiko)
- [0009] Y • 金(Jin, Ye)
- [0010] M • I • 威尔科匈(Willcoxson, Michi Izumi)
- [0011] S • 巴纳斯(Banas, Stefanie)
- [0012] <120> 用于治疗上皮屏障功能紊乱的蛋白质
- [0013] <130> SEGE-001/03W0 321077-2031
- [0014] <150> US 62/611,334
- [0015] <151> 2017-12-28
- [0016] <150> US 62/607,706
- [0017] <151> 2017-12-19
- [0018] <150> US 62/482,963
- [0019] <151> 2017-04-07
- [0020] <160> 34
- [0021] <170> PatentIn version 3.5
- [0022] <210> 1
- [0023] <211> 256
- [0024] <212> PRT
- [0025] <213> 人罗斯氏菌(Roseburia hominis)
- [0026] <400> 1
- [0027] Met Lys Arg Leu Val Cys Thr Val Cys Ser Val Leu Leu Cys Ala Gly
- [0028] 1 5 10 15
- [0029] Leu Leu Ser Gly Cys Gly Thr Ser Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val
- [0030] 20 25 30
- [0031] Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu
- [0032] 35 40 45
- [0033] Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala
- [0034] 50 55 60
- [0035] Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val
- [0036] 65 70 75 80
- [0037] Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr
- [0038] 85 90 95

[0039]	Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln		
[0040]	100	105	110
[0041]	Gly Lys Val Val Ala Ser Leu Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu		
[0042]	115	120	125
[0043]	Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln		
[0044]	130	135	140
[0045]	Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn		
[0046]	145	150	155
[0047]	Thr Asp Val Lys Val Asp Gly Glu Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn		
[0048]	165	170	175
[0049]	Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr		
[0050]	180	185	190
[0051]	Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu		
[0052]	195	200	205
[0053]	Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr		
[0054]	210	215	220
[0055]	Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala		
[0056]	225	230	235
[0057]	Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys		
[0058]	245	250	255
[0059]	<210> 2		
[0060]	<211> 768		
[0061]	<212> DNA		
[0062]	<213> 人罗斯氏菌(Roseburia hominis)		
[0063]	<400> 2		
[0064]	atgaagagat tagtgtgcac ggtctgcagt gtactgttgt gtgcgggact tctctccgga	60	
[0065]	tgcggtacct cgctggaggg agaggaaagt gtcgtgtacg tgggaaagaa aggcgtgata	120	
[0066]	gcgtcgctgg atgtggagac gctcgatcag tcctactacg atgagacgga actgaagtcc	180	
[0067]	tatgtggatg cagaggtgga agattacacc gcggagcatg gtaaaaatgc agtcaaggtg	240	
[0068]	gagagcctta aggtggaaga cggtgtggcg aagcttaaga tgaagtacaa gacaccggag	300	
[0069]	gattataccg catttaatgg aattgaactc tatcagggga aagtcgttgc ttccctggcg	360	
[0070]	gcaggatacg tctacgacgg ggagttcgcc cgcgtggagg aaggcaaggt tgtgggagct	420	
[0071]	gccacaaaac aggatattta ctctgaggat gatttgaaag ttgccatcat ccgtgccaat	480	
[0072]	acggatgtga aggtggacgg tgagatctgc tatgtctcct gtcagaatgt gaagctgacc	540	
[0073]	ggaaaagaca gtgtgtcgat ccgtgacgga tattatcttg agacgggaag cgtgacggca	600	
[0074]	tccgtggatg tgaccggaca ggagagcgtc gggaccgagc agctttcggg aaccgaacag	660	
[0075]	atggagatga ccggggagcc ggtgaatgcg gatgataccg agcagacaga ggccggcgcc	720	
[0076]	ggtgacggtt cgttcgagac agacgtatat actttcattg tctacaaa	768	
[0077]	<210> 3		



[0078]	<211>	232
[0079]	<212>	PRT
[0080]	<213>	人罗斯氏菌(Roseburia hominis)
[0081]	<400>	3
[0082]	Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val Ile	
[0083]	1	5 10 15
[0084]	Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu Thr	
[0085]	20	25 30
[0086]	Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala Glu	
[0087]	35	40 45
[0088]	His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp Gly	
[0089]	50	55 60
[0090]	Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala	
[0091]	65	70 75 80
[0092]	Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu Ala	
[0093]	85	90 95
[0094]	Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly Lys	
[0095]	100	105 110
[0096]	Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp Leu	
[0097]	115	120 125
[0098]	Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly Glu	
[0099]	130	135 140
[0100]	Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp Ser	
[0101]	145	150 155 160
[0102]	Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr Ala	
[0103]	165	170 175
[0104]	Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu Ser	
[0105]	180	185 190
[0106]	Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp Asp	
[0107]	195	200 205
[0108]	Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr Asp	
[0109]	210	215 220
[0110]	Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys	
[0111]	225	230
[0112]	<210>	4
[0113]	<211>	696
[0114]	<212>	DNA
[0115]	<213>	人罗斯氏菌(Roseburia hominis)
[0116]	<400>	4

[0117]	ctggagggag aggaaagtgt cgtgtacgtg ggaaagaaag gcgtgatagc gtcgctggat	60
[0118]	gtggagacgc tcgatcagtc ctactacgat gagacggaac tgaagtccta tgtggatgca	120
[0119]	gaggtggaag attacaccgc ggagcatggt aaaaatgcag tcaaggtgga gaggccttaag	180
[0120]	gtggaagacg gtgtggcgaa gcttaagatg aagtacaaga caccggagga ttataccgca	240
[0121]	tttaatggaa ttgaactcta tcaggggaaa gtcgttgctt ccctggcggc aggatacgtc	300
[0122]	tacgacgggg agttcgcccg cgtggaggaa ggcaagggtg tgggagctgc cacaaaaacag	360
[0123]	gatatttact ctgaggatga tttgaaagtt gccatcatcc gtgccaatac ggatgtgaag	420
[0124]	gtggacggtg agatctgcta tgtctcctgt cagaatgtga agctgaccgg aaaagacagt	480
[0125]	gtgtcgatcc gtgacggata ttatcttgag acgggaagcg tgacggcatc cgtggatgtg	540
[0126]	accggacagg agagcgtcgg gaccgagcag ctttcgggaa ccgaacagat ggagatgacc	600
[0127]	ggggagccgg tgaatgcgga tgataccgag cagacagagg cggcggccgg tgacggttcg	660
[0128]	ttcgagacag acgtatatac tttcattgtc tacaaa	696
[0129]	<210>	5
[0130]	<211>	241
[0131]	<212>	PRT
[0132]	<213>	人工序列
[0133]	<220>	
[0134]	<223>	在pGEX6载体中表达并被Precision蛋白酶切割的SG11
[0135]	<400>	5
[0136]	Gly Pro Leu Gly Ser Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly	
[0137]	1 5 10 15	
[0138]	Lys Lys Gly Val Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser	
[0139]	20 25 30	
[0140]	Tyr Tyr Asp Glu Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu	
[0141]	35 40 45	
[0142]	Asp Tyr Thr Ala Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu	
[0143]	50 55 60	
[0144]	Lys Val Glu Asp Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro	
[0145]	65 70 75 80	
[0146]	Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val	
[0147]	85 90 95	
[0148]	Val Ala Ser Leu Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg	
[0149]	100 105 110	
[0150]	Val Glu Glu Gly Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr	
[0151]	115 120 125	
[0152]	Ser Glu Asp Asp Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val	
[0153]	130 135 140	
[0154]	Lys Val Asp Gly Glu Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu	
[0155]	145 150 155 160	

[0156]	Thr Gly Lys Asp Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr
[0157]	165 170 175
[0158]	Gly Ser Val Thr Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly
[0159]	180 185 190
[0160]	Thr Glu Gln Leu Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro
[0161]	195 200 205
[0162]	Val Asn Ala Asp Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly
[0163]	210 215 220
[0164]	Ser Phe Glu Thr Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys Ala Ala Ala
[0165]	225 230 235 240
[0166]	Ser
[0167]	<210> 6
[0168]	<211> 723
[0169]	<212> DNA
[0170]	<213> 人工序列
[0171]	<220>
[0172]	<223> 在pGEX6载体中表达并被Precision蛋白酶切割的SG11
[0173]	<400> 6
[0174]	gggcccctgg gatccctgga gggagaggaa agtgtcgtgt acgtgggaaa gaaaggcgtg 60
[0175]	atagcgtcgc tggatgtgga gacgctcgat cagtcctact acgatgagac ggaactgaag 120
[0176]	tcctatgtgg atgcagaggt ggaagattac accgcggagc atggtaaaaa tgcagtcaag 180
[0177]	gtggagagcc ttaaggtgga agacggtgtg gcgaagctta agatgaagta caagacaccg 240
[0178]	gaggattata ccgcatttaa tggaattgaa ctctatcagg ggaaagtcgt tgcttccctg 300
[0179]	gcggcaggat acgtctacga cggggagtgc gccgcgtgg aggaaggcaa ggttgtggga 360
[0180]	gctgccacaa aacaggatat ttactctgag gatgatttga aagttgccat catccgtgcc 420
[0181]	aatacggatg tgaaggtgga cggtgagatc tgctatgtct cctgtcagaa tgtgaagctg 480
[0182]	accgaaaaag acagtgtgtc gatccgtgac ggatattatc ttgagacggg aagcgtgacg 540
[0183]	gcatccgtgg atgtgaccgg acaggagagc gtcgggaccg agcagctttc gggaaccgaa 600
[0184]	cagatggaga tgaccgggga gccggtgaat gcggatgata ccgagcagac agaggcggcg 660
[0185]	gccggtgacg gttcgttcga gacagacgta tatactttca ttgtctacaa agcggccgca 720
[0186]	tcg 723
[0187]	<210> 7
[0188]	<211> 233
[0189]	<212> PRT
[0190]	<213> 人工序列
[0191]	<220>
[0192]	<223> 带起始甲硫氨酸的SG11
[0193]	<400> 7
[0194]	Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val

[0195]	1	5	10	15
[0196]	Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu			
[0197]	20	25	30	
[0198]	Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala			
[0199]	35	40	45	
[0200]	Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp			
[0201]	50	55	60	
[0202]	Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr			
[0203]	65	70	75	80
[0204]	Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu			
[0205]	85	90	95	
[0206]	Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly			
[0207]	100	105	110	
[0208]	Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp			
[0209]	115	120	125	
[0210]	Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly			
[0211]	130	135	140	
[0212]	Glu Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp			
[0213]	145	150	155	160
[0214]	Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr			
[0215]	165	170	175	
[0216]	Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu			
[0217]	180	185	190	
[0218]	Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp			
[0219]	195	200	205	
[0220]	Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr			
[0221]	210	215	220	
[0222]	Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys			
[0223]	225	230		
[0224]	<210> 8			
[0225]	<211> 699			
[0226]	<212> DNA			
[0227]	<213> 人工序列			
[0228]	<220>			
[0229]	<223> 带起始甲硫氨酸的SG11			
[0230]	<400> 8			
[0231]	atgttgagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg	60		
[0232]	gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac	120		
[0233]	gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaaatg ccgtcaaagt tgagagcttg	180		

[0234] aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240  
 [0235] gcgttcaatg gtatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300  
 [0236] gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360  
 [0237] caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420  
 [0238] aaagttgatg gcgagatttg ctacgttagc tgtcaaacg taaagctgac gggtaaagat 480  
 [0239] agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggtg gcgttacggc gagcgtcgat 540  
 [0240] gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600  
 [0241] accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660  
 [0242] agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699  
 [0243] <210> 9  
 [0244] <211> 246  
 [0245] <212> PRT  
 [0246] <213> 人工序列  
 [0247] <220>  
 [0248] <223> 带N-末端FLAG标签的SG11  
 [0249] <400> 9  
 [0250] Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Ser His Met Leu Glu  
 [0251] 1 5 10 15  
 [0252] Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val Ile Ala Ser  
 [0253] 20 25 30  
 [0254] Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu Thr Glu Leu  
 [0255] 35 40 45  
 [0256] Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala Glu His Gly  
 [0257] 50 55 60  
 [0258] Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp Gly Val Ala  
 [0259] 65 70 75 80  
 [0260] Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Asn  
 [0261] 85 90 95  
 [0262] Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu Ala Ala Gly  
 [0263] 100 105 110  
 [0264] Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly Lys Val Val  
 [0265] 115 120 125  
 [0266] Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp Leu Lys Val  
 [0267] 130 135 140  
 [0268] Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly Glu Ile Cys  
 [0269] 145 150 155 160  
 [0270] Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp Ser Val Ser  
 [0271] 165 170 175  
 [0272] Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr Ala Ser Val

[0273]	180	185	190
[0274]	Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu Ser Gly Thr		
[0275]	195	200	205
[0276]	Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp Asp Thr Glu		
[0277]	210	215	220
[0278]	Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr Asp Val Tyr		
[0279]	225	230	235
[0280]	Thr Phe Ile Val Tyr Lys		240
[0281]	245		
[0282]	<210> 10		
[0283]	<211> 738		
[0284]	<212> DNA		
[0285]	<213> 人工序列		
[0286]	<220>		
[0287]	<223> 带N-末端FLAG标签的SG11(未密码子优化)		
[0288]	<400> 10		
[0289]	atggactaca aagacgatga cgacaagggc agcagccata tgctggaggg agaggaaagt 60		
[0290]	gtcgtgtacg tgggaaagaa aggcgtgata gcgtcgctgg atgtggagac gctcgatcag 120		
[0291]	tcctactacg atgagacgga actgaagtcc tatgtggatg cagaggtgga agattacacc 180		
[0292]	gcggagcatg gtaaaaatgc agtcaaggtg gagagcctta aggtggaaga cgggtgtggcg 240		
[0293]	aagcttaaga tgaagtacaa gacaccggag gattataaccg catttaatgg aattgaactc 300		
[0294]	tatcagggga aagtcgttgc ttccctggcg gcaggatacg tctacgacgg ggagttcgcc 360		
[0295]	cgcgtaggagg aaggcaaggt tgtgggagct gccacaaaac aggatattta ctctgaggat 420		
[0296]	gatttgaaag ttgccatcat ccgtgccaat acggatgtga aggtggacgg tgagatctgc 480		
[0297]	tatgtctcct gtcagaatgt gaagctgacc ggaaaagaca gtgtgtcgat ccgtgacgga 540		
[0298]	tattatcttg agacgggaag cgtgacggca tccgtggatg tgaccggaca ggagagcgtc 600		
[0299]	gggaccgagc agctttcggg aaccgaacag atggagatga ccggggagcc ggtgaatgcg 660		
[0300]	gatgataccg agcagacaga ggcggcggcc ggtgacggtt cgttcgagac agacgtatat 720		
[0301]	actttcattg tctacaaa 738		
[0302]	<210> 11		
[0303]	<211> 233		
[0304]	<212> PRT		
[0305]	<213> 人工序列		
[0306]	<220>		
[0307]	<223> SG11的人工变体 (C147V, C151S)		
[0308]	<400> 11		
[0309]	Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val		
[0310]	1	5	10
[0311]	Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu		15

[0312]	20	25	30
[0313]	Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala		
[0314]	35	40	45
[0315]	Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp		
[0316]	50	55	60
[0317]	Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr		
[0318]	65	70	75
[0319]	Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu		
[0320]	85	90	95
[0321]	Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly		
[0322]	100	105	110
[0323]	Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp		
[0324]	115	120	125
[0325]	Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly		
[0326]	130	135	140
[0327]	Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp		
[0328]	145	150	155
[0329]	Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr		
[0330]	165	170	175
[0331]	Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu		
[0332]	180	185	190
[0333]	Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp		
[0334]	195	200	205
[0335]	Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr		
[0336]	210	215	220
[0337]	Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys		
[0338]	225	230	
[0339]	<210> 12		
[0340]	<211> 699		
[0341]	<212> DNA		
[0342]	<213> 人工序列		
[0343]	<220>		
[0344]	<223> SG11的人工变体 (C147V, C151S) (密码子优化)		
[0345]	<400> 12		
[0346]	atgttgagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aagtgatgat cgcgtccctg 60		
[0347]	gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120		
[0348]	gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaaatg ccgtcaaagt tgagagcttg 180		
[0349]	aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240		
[0350]	gcgttcaatg gtatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300		

[0351] gtgtacgacg gtgagtttgc ggcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360  
 [0352] caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420  
 [0353] aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480  
 [0354] agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggtg gcgttacggc gagcgtcgat 540  
 [0355] gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600  
 [0356] accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660  
 [0357] agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699  
 [0358] <210> 13  
 [0359] <211> 233  
 [0360] <212> PRT  
 [0361] <213> 人工序列  
 [0362] <220>  
 [0363] <223> SG11的人工变体 (G84D, C147V, C151S)  
 [0364] <400> 13  
 [0365] Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val  
 [0366] 1 5 10 15  
 [0367] Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu  
 [0368] 20 25 30  
 [0369] Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala  
 [0370] 35 40 45  
 [0371] Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp  
 [0372] 50 55 60  
 [0373] Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr  
 [0374] 65 70 75 80  
 [0375] Ala Phe Asn Asp Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu  
 [0376] 85 90 95  
 [0377] Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly  
 [0378] 100 105 110  
 [0379] Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp  
 [0380] 115 120 125  
 [0381] Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly  
 [0382] 130 135 140  
 [0383] Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp  
 [0384] 145 150 155 160  
 [0385] Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr  
 [0386] 165 170 175  
 [0387] Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu  
 [0388] 180 185 190  
 [0389] Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp



[0390]	195	200	205
[0391]	Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr		
[0392]	210	215	220
[0393]	Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys		
[0394]	225	230	
[0395]	<210> 14		
[0396]	<211> 699		
[0397]	<212> DNA		
[0398]	<213> 人工序列		
[0399]	<220>		
[0400]	<223> SG11的人工变体 (G84D, C147V, C151S) (密码子优化)		
[0401]	<400> 14		
[0402]	atgttggagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg	60	
[0403]	gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac	120	
[0404]	gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaaatg ccgtcaaagt tgagagcttg	180	
[0405]	aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg	240	
[0406]	gcgttcaatg acatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat	300	
[0407]	gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa	360	
[0408]	caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt	420	
[0409]	aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat	480	
[0410]	agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccgta gcgttacggc gagcgtcgat	540	
[0411]	gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg	600	
[0412]	accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt	660	
[0413]	agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag	699	
[0414]	<210> 15		
[0415]	<211> 233		
[0416]	<212> PRT		
[0417]	<213> 人工序列		
[0418]	<220>		
[0419]	<223> SG11的人工变体 (N83S, C147V, C151S)		
[0420]	<400> 15		
[0421]	Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val		
[0422]	1 5 10 15		
[0423]	Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu		
[0424]	20 25 30		
[0425]	Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala		
[0426]	35 40 45		
[0427]	Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp		
[0428]	50 55 60		

[0429]	Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr
[0430]	65 70 75 80
[0431]	Ala Phe Ser Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu
[0432]	85 90 95
[0433]	Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly
[0434]	100 105 110
[0435]	Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp
[0436]	115 120 125
[0437]	Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly
[0438]	130 135 140
[0439]	Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp
[0440]	145 150 155 160
[0441]	Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr
[0442]	165 170 175
[0443]	Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu
[0444]	180 185 190
[0445]	Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp
[0446]	195 200 205
[0447]	Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr
[0448]	210 215 220
[0449]	Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
[0450]	225 230
[0451]	<210> 16
[0452]	<211> 699
[0453]	<212> DNA
[0454]	<213> 人工序列
[0455]	<220>
[0456]	<223> SG11的人工变体 (N83S, C147V, C151S) (密码子优化)
[0457]	<400> 16
[0458]	atgttgagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60
[0459]	gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120
[0460]	gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaaatg ccgtcaaagt tgagagcttg 180
[0461]	aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240
[0462]	gcgttcagcg gtatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300
[0463]	gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360
[0464]	caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420
[0465]	aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480
[0466]	agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggtg gcgttacggc gagcgtcgat 540
[0467]	gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600

[0468] accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660  
 [0469] agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699  
 [0470] <210> 17  
 [0471] <211> 233  
 [0472] <212> PRT  
 [0473] <213> 人工序列  
 [0474] <220>  
 [0475] <223> SG11的人工变体 (N53S, G84D, C147V, C151S)  
 [0476] <400> 17  
 [0477] Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val  
 [0478] 1 5 10 15  
 [0479] Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu  
 [0480] 20 25 30  
 [0481] Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala  
 [0482] 35 40 45  
 [0483] Glu His Gly Lys Ser Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp  
 [0484] 50 55 60  
 [0485] Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr  
 [0486] 65 70 75 80  
 [0487] Ala Phe Asn Asp Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu  
 [0488] 85 90 95  
 [0489] Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly  
 [0490] 100 105 110  
 [0491] Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp  
 [0492] 115 120 125  
 [0493] Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly  
 [0494] 130 135 140  
 [0495] Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp  
 [0496] 145 150 155 160  
 [0497] Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr  
 [0498] 165 170 175  
 [0499] Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu  
 [0500] 180 185 190  
 [0501] Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp  
 [0502] 195 200 205  
 [0503] Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr  
 [0504] 210 215 220  
 [0505] Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys  
 [0506] 225 230

[0507]	<210> 18
[0508]	<211> 699
[0509]	<212> DNA
[0510]	<213> 人工序列
[0511]	<220>
[0512]	<223> SG11的人工变体 (N53S, G84D, C147V, C151S) (密码子优化)
[0513]	<400> 18
[0514]	atgttggagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60
[0515]	gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120
[0516]	gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaccg ccgtcaaagt tgagagcttg 180
[0517]	aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240
[0518]	gcgttcaatg acatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300
[0519]	gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360
[0520]	caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420
[0521]	aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480
[0522]	agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat 540
[0523]	gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600
[0524]	accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660
[0525]	agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699
[0526]	<210> 19
[0527]	<211> 233
[0528]	<212> PRT
[0529]	<213> 人工序列
[0530]	<220>
[0531]	<223> SG11的人工变体 (N53S, N83S, C147V, C151S)
[0532]	<400> 19
[0533]	Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val
[0534]	1 5 10 15
[0535]	Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu
[0536]	20 25 30
[0537]	Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala
[0538]	35 40 45
[0539]	Glu His Gly Lys Ser Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp
[0540]	50 55 60
[0541]	Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr
[0542]	65 70 75 80
[0543]	Ala Phe Ser Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu
[0544]	85 90 95
[0545]	Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly

[0546]	100	105	110
[0547]	Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp		
[0548]	115	120	125
[0549]	Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly		
[0550]	130	135	140
[0551]	Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp		
[0552]	145	150	155
[0553]	Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr		
[0554]	165	170	175
[0555]	Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu		
[0556]	180	185	190
[0557]	Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp		
[0558]	195	200	205
[0559]	Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr		
[0560]	210	215	220
[0561]	Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys		
[0562]	225	230	
[0563]	<210> 20		
[0564]	<211> 699		
[0565]	<212> DNA		
[0566]	<213> 人工序列		
[0567]	<220>		
[0568]	<223> SG11的人工变体 (N53S, N83S, C147V, C151S) (密码子优化)		
[0569]	<400> 20		
[0570]	atgttgagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60		
[0571]	gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120		
[0572]	gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaatccg ccgtcaaagt tgagagcttg 180		
[0573]	aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240		
[0574]	gcgttcagcg gtatcgagctgtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300		
[0575]	gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360		
[0576]	caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420		
[0577]	aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480		
[0578]	agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat 540		
[0579]	gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600		
[0580]	accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660		
[0581]	agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699		
[0582]	<210> 21		
[0583]	<211> 227		
[0584]	<212> PRT		

[0585]	<213> 肠炎罗斯氏菌(Roseburia intestinalis)															
[0586]	<400> 21															
[0587]	Met	Leu	Asp	Ala	Asp	Thr	Asp	Thr	Val	Tyr	Val	Gln	Lys	Asn	Gly	Thr
[0588]	1				5					10					15	
[0589]	Val	Leu	Ser	Val	Asp	Val	Glu	Thr	Leu	Asp	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Asp	Glu
[0590]					20				25					30		
[0591]	Thr	Glu	Leu	Lys	Asp	Tyr	Val	Thr	Asp	Ala	Val	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gly
[0592]				35					40					45		
[0593]	Glu	His	Gly	Lys	Ser	Ala	Val	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Ser	Val	Lys	Asp
[0594]		50						55				60				
[0595]	Gly	Thr	Ala	Thr	Leu	Lys	Met	Lys	Tyr	Lys	Thr	Pro	Glu	Asp	Tyr	Thr
[0596]	65					70					75				80	
[0597]	Gly	Phe	Asn	Gly	Ile	Glu	Leu	Tyr	Glu	Gly	Lys	Val	Val	Lys	Ala	Leu
[0598]					85					90					95	
[0599]	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asp	Phe	Lys	Thr	Asp	Phe	Val	Ser	Val	Glu	Asp	Gly
[0600]				100					105					110		
[0601]	Lys	Val	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Lys	Glu	Glu	Ile	Tyr	Ser	Gly	Glu	Asp
[0602]				115					120					125		
[0603]	Leu	Lys	Val	Val	Ile	Ile	Lys	Ala	Asn	Arg	Asp	Val	Lys	Val	Asp	Gly
[0604]		130						135						140		
[0605]	Thr	Ile	Cys	Tyr	Val	Ser	Ser	Glu	Asn	Val	Lys	Leu	Thr	Gly	Thr	Asp
[0606]	145					150					155				160	
[0607]	Ser	Val	Ser	Ile	Arg	Asp	Gly	Tyr	Ser	Leu	Asn	Ser	Gly	Ser	Thr	Ala
[0608]					165					170					175	
[0609]	Asp	Glu	Ser	Asp	Ser	Asp	Glu	Asn	Ile	Ala	Asp	Gly	Thr	Glu	Ser	Ile
[0610]				180					185					190		
[0611]	Gly	Gly	Ser	Thr	Glu	Val	Ser	Asp	Thr	Asp	Val	Asn	Asp	Asp	Thr	Thr
[0612]			195						200					205		
[0613]	Tyr	Val	Lys	Asp	Asp	Gly	Ala	Phe	Glu	Thr	Asp	Val	Tyr	Thr	Tyr	Ile
[0614]		210					215						220			
[0615]	Ile	Tyr	Lys													
[0616]	225															
[0617]	<210> 22															
[0618]	<211> 215															
[0619]	<212> PRT															
[0620]	<213> 罗斯氏菌种831b															
[0621]	<400> 22															
[0622]	Met	Leu	Asp	Val	Glu	Glu	Ser	Thr	Val	Tyr	Val	Gln	Lys	Asn	Gly	Ser
[0623]	1				5					10					15	

[0624]	Val	Ile	Ser	Thr	Asp	Ile	Glu	Asp	Phe	Ser	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Asp	Glu
[0625]				20					25						30	
[0626]	Asp	Glu	Leu	Lys	Asp	Tyr	Ile	Gly	Asp	Glu	Ile	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ser
[0627]				35					40						45	
[0628]	Glu	Asn	Gly	Lys	Lys	Ser	Val	Ser	Leu	Glu	Ser	Val	Ser	Val	Lys	Asp
[0629]				50					55						60	
[0630]	Ser	Val	Ala	Lys	Leu	Thr	Met	Lys	Tyr	Lys	Thr	Ala	Glu	Asp	Tyr	Thr
[0631]				65					70						75	
[0632]	Asn	Phe	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Tyr	Thr	Gly	Thr	Ile	Val	Lys	Ala	Met
[0633]									85						90	
[0634]	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asp	Phe	Gly	Val	Asp	Phe	Val	Ser	Val	Lys	Asp	Gly
[0635]									100						105	
[0636]	Ala	Val	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Val	Asp	His	Asp	Asp
[0637]									115						120	
[0638]	Tyr	Lys	Val	Ala	Val	Ile	Lys	Ala	Asn	Thr	Asp	Val	Lys	Val	Asp	Gly
[0639]									130						135	
[0640]	Thr	Ile	Val	Tyr	Val	Ser	Ser	Gln	Asn	Val	Lys	Val	Thr	Gly	Lys	Asn
[0641]									145						150	
[0642]	Thr	Val	Ser	Ile	Arg	Glu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ala	Asp	Thr	Thr	Asn	Val
[0643]									165						170	
[0644]	Val	Gly	Ser	Thr	Glu	Thr	Val	Ala	Glu	Thr	Glu	Ala	Glu	Glu	Ala	Asn
[0645]									180						185	
[0646]	Gln	Thr	Glu	Ala	Val	Leu	Glu	Asp	Glu	Phe	Ala	Ser	Glu	Ser	Asp	Val
[0647]									195						200	
[0648]	Tyr	Thr	Tyr	Val	Ile	Phe	Lys									
[0649]									210						215	
[0650]	<210> 23															
[0651]	<211> 236															
[0652]	<212> PRT															
[0653]	<213> 食葡萄糖罗斯氏菌(Roseburia inulinivorans)															
[0654]	<400> 23															
[0655]	Met	Leu	Glu	Ala	Asp	Thr	Asn	Thr	Val	Tyr	Val	Ser	Lys	His	Gly	Lys
[0656]									1						5	
[0657]	Val	Val	Ser	Met	Asp	Val	Glu	Gln	Leu	Asp	Gln	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Glu
[0658]									20						25	
[0659]	Thr	Glu	Leu	Lys	Glu	Phe	Val	Asp	Ser	Ala	Val	Asp	Glu	Tyr	Asn	Thr
[0660]									35						40	
[0661]	Glu	Asn	Gly	Lys	Asn	Ser	Val	Lys	Val	Asp	Asp	Leu	Thr	Val	Glu	Asp
[0662]									50						55	
															60	

[0663]	Gly Thr Ala Lys Leu Arg Met Asp Tyr Glu Thr Val Asp Asp Tyr Thr
[0664]	65 70 75 80
[0665]	Ala Phe Asn Gly Val Glu Leu Tyr Glu Gly Lys Ile Val Gln Ala Leu
[0666]	85 90 95
[0667]	Ala Ala Gly Tyr Asp Phe Asp Thr Asp Phe Ala Gly Val Asp Lys Asp
[0668]	100 105 110
[0669]	Gly Cys Val Thr Gly Val Thr Arg Gly Asp Ile Leu Ala Gln Glu Asp
[0670]	115 120 125
[0671]	Leu Lys Val Val Ile Ile Lys Ala Asn Thr Asp Val Lys Ile Asp Gly
[0672]	130 135 140
[0673]	Lys Ile Leu Tyr Val Ser Cys Asp Asn Val Thr Val Thr Gly Lys Asp
[0674]	145 150 155 160
[0675]	Ser Val Ser Ile Lys Glu Gly Thr Gly Ile Glu Lys Thr Trp Ile Thr
[0676]	165 170 175
[0677]	Glu Ala Glu Glu Val Pro Ser Thr Glu Ala Val Leu Glu Thr Glu Ser
[0678]	180 185 190
[0679]	Thr Glu Asp Ala Gly Asp Val Ile Glu Gly Glu Val Ile Ile Gly Thr
[0680]	195 200 205
[0681]	Glu Glu Ala Ser Gly Asn Asp Val Val Thr Asn Leu Ser Gly Gly Ser
[0682]	210 215 220
[0683]	Ser Gly Thr Asp Val Tyr Thr Tyr Ile Ile Tyr Lys
[0684]	225 230 235
[0685]	<210> 24
[0686]	<211> 13
[0687]	<212> PRT
[0688]	<213> 人工序列
[0689]	<220>
[0690]	<223> 带起始甲硫氨酸的SG11的片段
[0691]	<400> 24
[0692]	Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys
[0693]	1 5 10
[0694]	<210> 25
[0695]	<211> 22
[0696]	<212> PRT
[0697]	<213> 人罗斯氏菌(Roseburia hominis)
[0698]	<400> 25
[0699]	Gly Val Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr
[0700]	1 5 10 15
[0701]	Asp Glu Thr Glu Leu Lys



[0702]	20	
[0703]	<210>	26
[0704]	<211>	17
[0705]	<212>	PRT
[0706]	<213>	人罗斯氏菌 (Roseburia hominis)
[0707]	<400>	26
[0708]	Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly	
[0709]	1	5 10 15
[0710]	Lys	
[0711]	<210>	27
[0712]	<211>	6
[0713]	<212>	PRT
[0714]	<213>	人罗斯氏菌 (Roseburia hominis)
[0715]	<400>	27
[0716]	Ala Asn Thr Asp Val Lys	
[0717]	1	5
[0718]	<210>	28
[0719]	<211>	14
[0720]	<212>	PRT
[0721]	<213>	人罗斯氏菌 (Roseburia hominis)
[0722]	<400>	28
[0723]	Val Asp Gly Glu Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys	
[0724]	1	5 10
[0725]	<210>	29
[0726]	<211>	67
[0727]	<212>	PRT
[0728]	<213>	人罗斯氏菌 (Roseburia hominis)
[0729]	<400>	29
[0730]	Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr Ala Ser Val Asp Val Thr	
[0731]	1	5 10 15
[0732]	Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu Ser Gly Thr Glu Gln Met	
[0733]		20 25 30
[0734]	Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp Asp Thr Glu Gln Thr Glu	
[0735]		35 40 45
[0736]	Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr Asp Val Tyr Thr Phe Ile	
[0737]		50 55 60
[0738]	Val Tyr Lys	
[0739]	65	
[0740]	<210>	30

[0741] <211> 4  
 [0742] <212> PRT  
 [0743] <213> 人罗斯氏菌 (*Roseburia hominis*)  
 [0744] <400> 30  
 [0745] Asn Ala Val Lys  
 [0746] 1  
 [0747] <210> 31  
 [0748] <211> 17  
 [0749] <212> PRT  
 [0750] <213> 人罗斯氏菌 (*Roseburia hominis*)  
 [0751] <400> 31  
 [0752] Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Ser Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly  
 [0753] 1 5 10 15  
 [0754] Lys  
 [0755] <210> 32  
 [0756] <211> 8  
 [0757] <212> PRT  
 [0758] <213> 人工序列  
 [0759] <220>  
 [0760] <223> FLAG标签  
 [0761] <400> 32  
 [0762] Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 [0763] 1 5  
 [0764] <210> 33  
 [0765] <211> 233  
 [0766] <212> PRT  
 [0767] <213> 人工序列  
 [0768] <220>  
 [0769] <223> SG11的人工变体  
 [0770] <220>  
 [0771] <221> misc\_feature  
 [0772] <222> (53) .. (53)  
 [0773] <223> Xaa可以是任何天然氨基酸  
 [0774] <220>  
 [0775] <221> misc\_feature  
 [0776] <222> (83) .. (84)  
 [0777] <223> Xaa可以是任何天然氨基酸  
 [0778] <220>  
 [0779] <221> misc\_feature

[0780] <222> (147) .. (147)  
 [0781] <223> Xaa可以是任何天然氨基酸  
 [0782] <220>  
 [0783] <221> misc\_feature  
 [0784] <222> (151) .. (151)  
 [0785] <223> Xaa可以是任何天然氨基酸  
 [0786] <400> 33  
 [0787] Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val  
 [0788] 1 5 10 15  
 [0789] Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu  
 [0790] 20 25 30  
 [0791] Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala  
 [0792] 35 40 45  
 [0793] Glu His Gly Lys Xaa Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp  
 [0794] 50 55 60  
 [0795] Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr  
 [0796] 65 70 75 80  
 [0797] Ala Phe Xaa Xaa Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu  
 [0798] 85 90 95  
 [0799] Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly  
 [0800] 100 105 110  
 [0801] Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp  
 [0802] 115 120 125  
 [0803] Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly  
 [0804] 130 135 140  
 [0805] Glu Ile Xaa Tyr Val Ser Xaa Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp  
 [0806] 145 150 155 160  
 [0807] Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr  
 [0808] 165 170 175  
 [0809] Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu  
 [0810] 180 185 190  
 [0811] Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp  
 [0812] 195 200 205  
 [0813] Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr  
 [0814] 210 215 220  
 [0815] Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys  
 [0816] 225 230  
 [0817] <210> 34  
 [0818] <211> 233

[0819] <212> PRT  
 [0820] <213> 人工序列  
 [0821] <220>  
 [0822] <223> SG11的人工变体  
 [0823] <220>  
 [0824] <221> misc\_feature  
 [0825] <222> (53) .. (53)  
 [0826] <223> Xaa是除Asn以外的任何氨基酸  
 [0827] <220>  
 [0828] <221> misc\_feature  
 [0829] <222> (83) .. (83)  
 [0830] <223> Xaa是除Asn以外的任何氨基酸  
 [0831] <220>  
 [0832] <221> misc\_feature  
 [0833] <222> (84) .. (84)  
 [0834] <223> Xaa是除Gly以外的任何氨基酸  
 [0835] <220>  
 [0836] <221> misc\_feature  
 [0837] <222> (147) .. (147)  
 [0838] <223> Xaa是除Cys以外的任何氨基酸  
 [0839] <220>  
 [0840] <221> misc\_feature  
 [0841] <222> (151) .. (151)  
 [0842] <223> Xaa是除Cys以外的任何氨基酸  
 [0843] <400> 34  
 [0844] Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val  
 [0845] 1 5 10 15  
 [0846] Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu  
 [0847] 20 25 30  
 [0848] Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala  
 [0849] 35 40 45  
 [0850] Glu His Gly Lys Xaa Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp  
 [0851] 50 55 60  
 [0852] Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr  
 [0853] 65 70 75 80  
 [0854] Ala Phe Xaa Xaa Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu  
 [0855] 85 90 95  
 [0856] Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly  
 [0857] 100 105 110

---

[0858]	Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp
[0859]	115 120 125
[0860]	Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly
[0861]	130 135 140
[0862]	Glu Ile Xaa Tyr Val Ser Xaa Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp
[0863]	145 150 155 160
[0864]	Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr
[0865]	165 170 175
[0866]	Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu
[0867]	180 185 190
[0868]	Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp
[0869]	195 200 205
[0870]	Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr
[0871]	210 215 220
[0872]	Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
[0873]	225 230

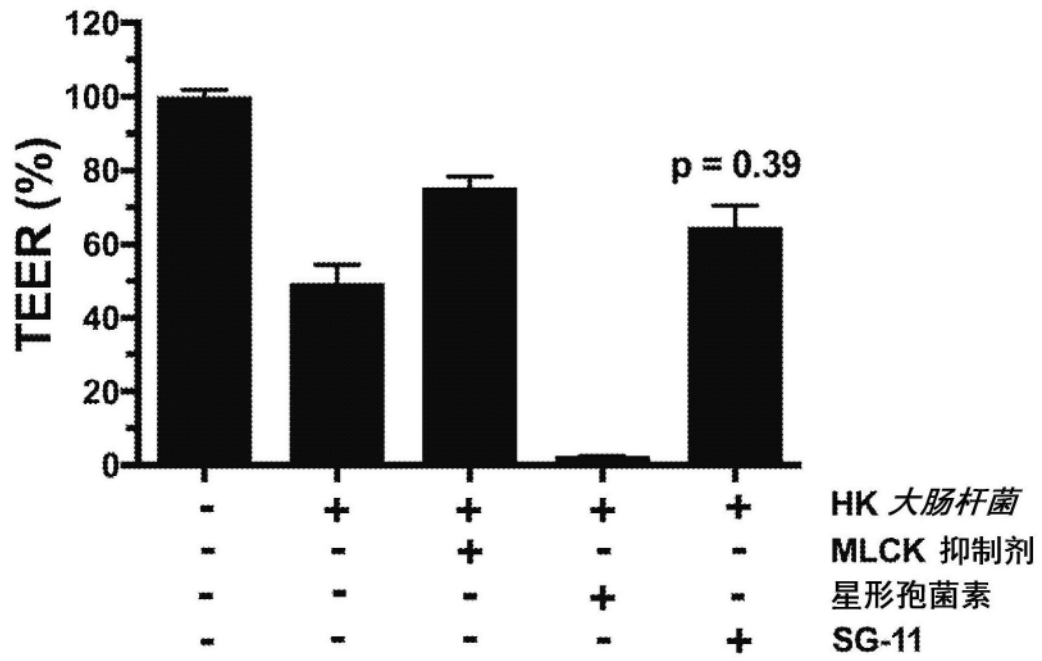


图1A

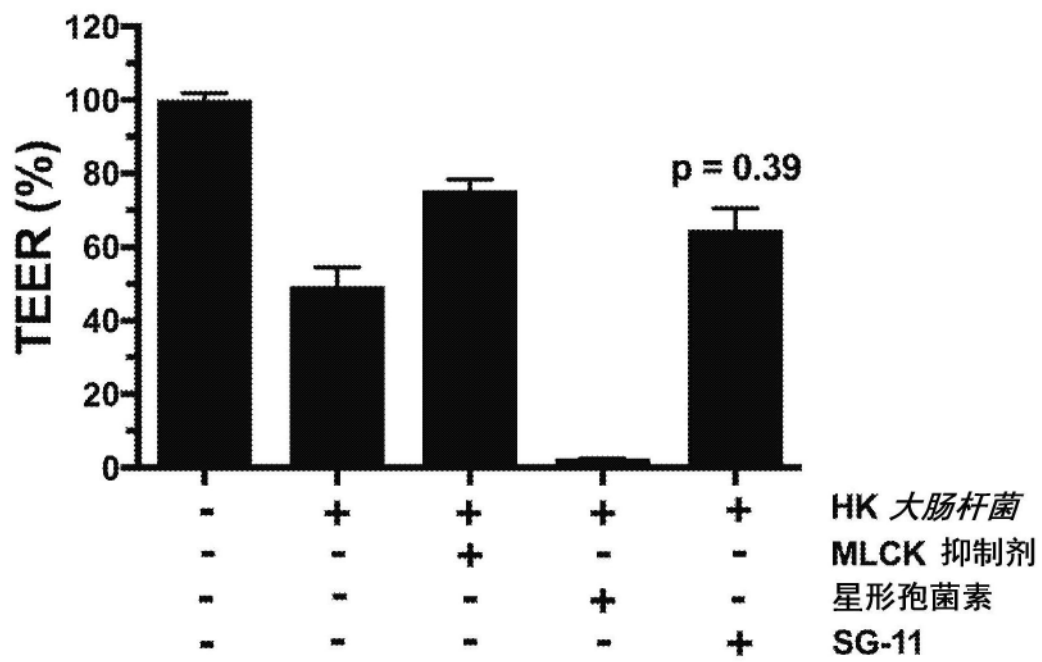


图1B

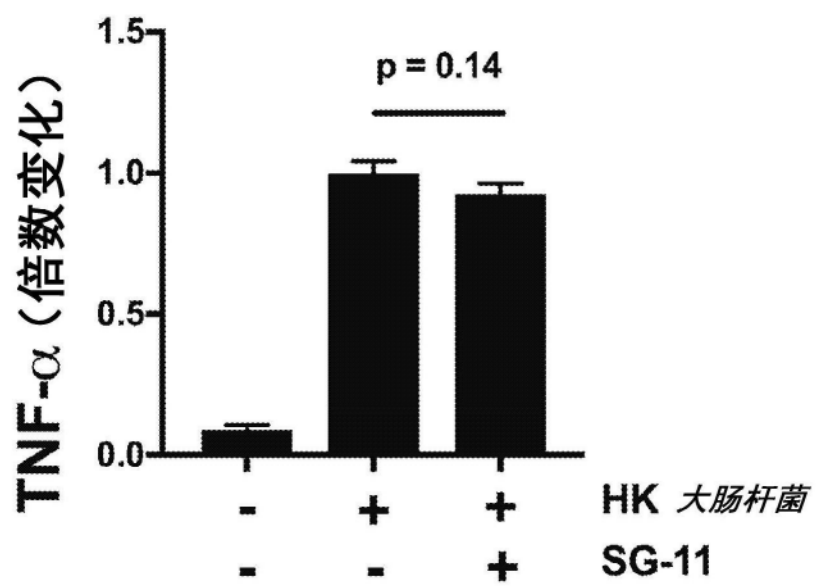


图2A

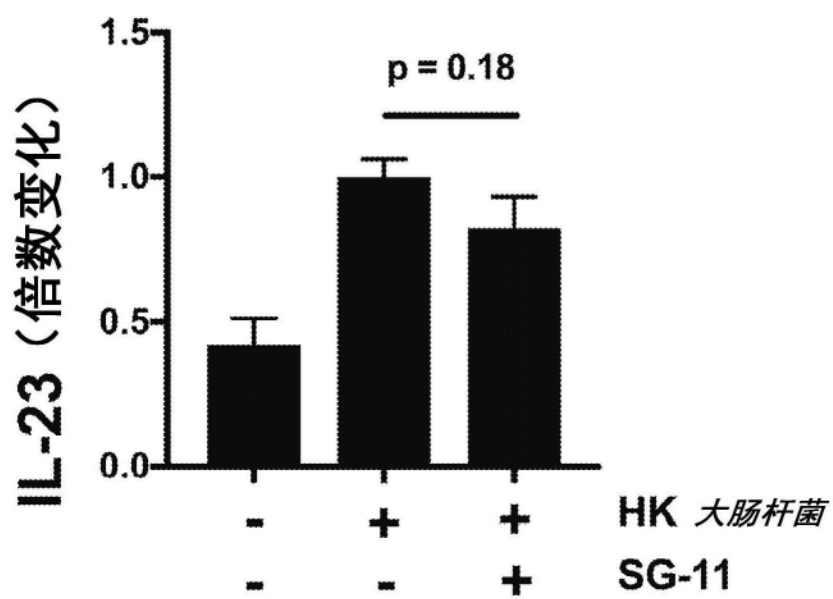


图2B

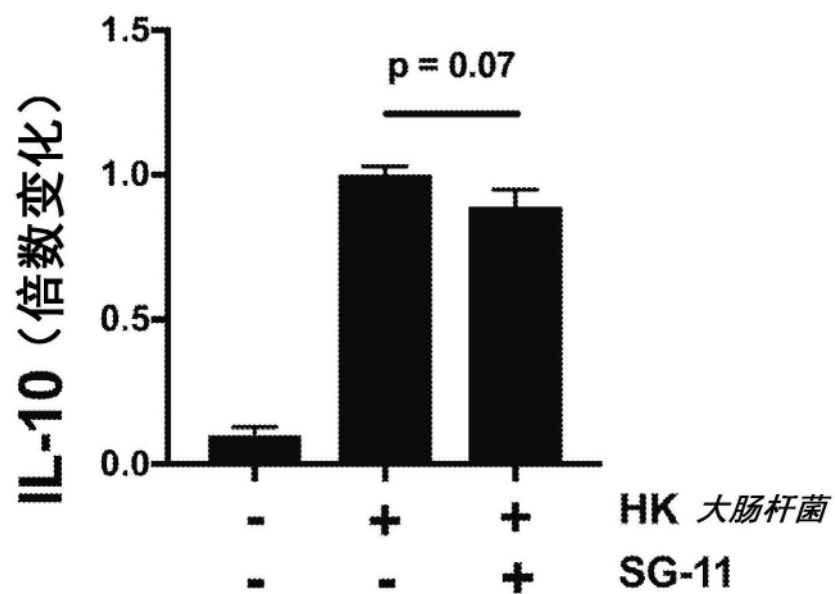


图3

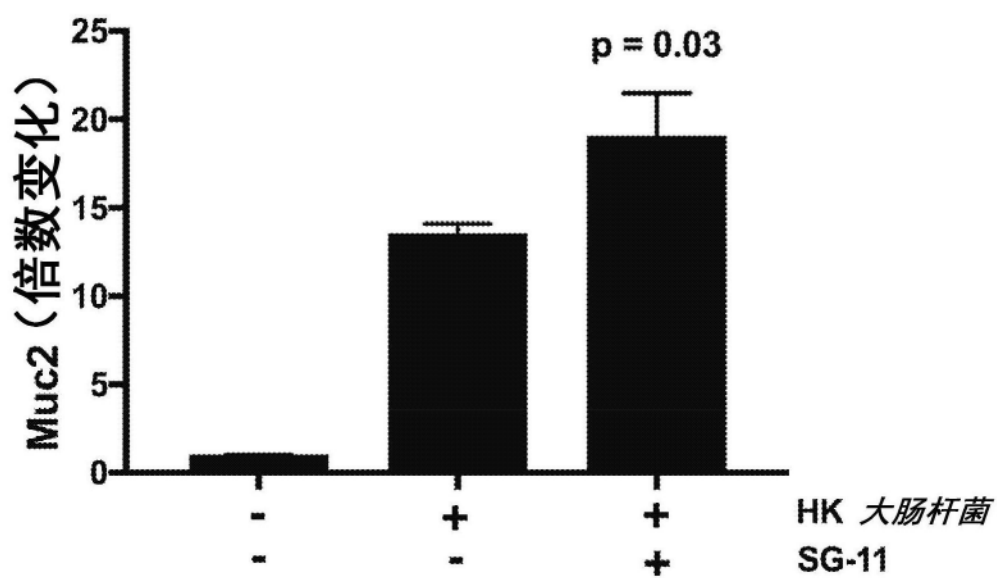


图4



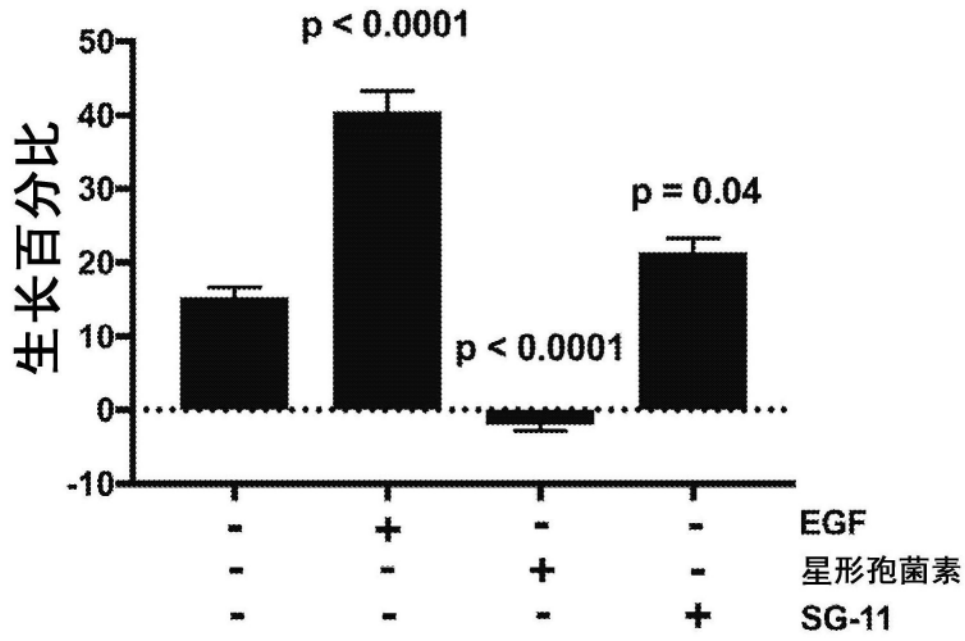


图5

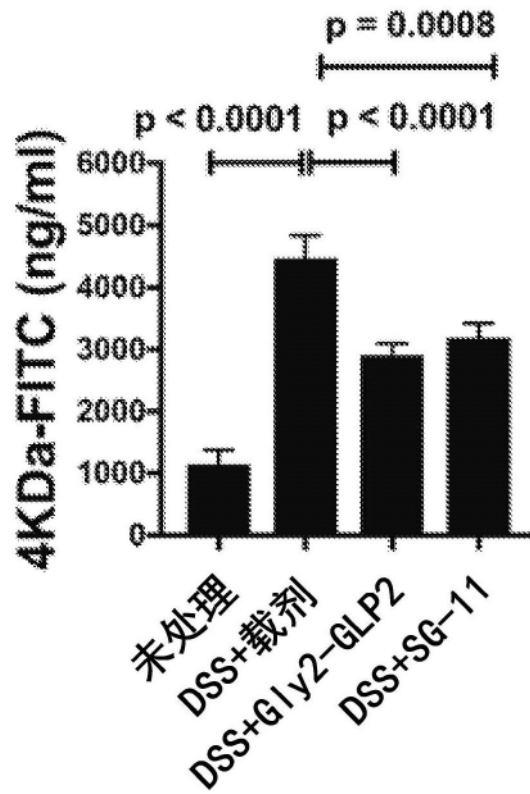


图6

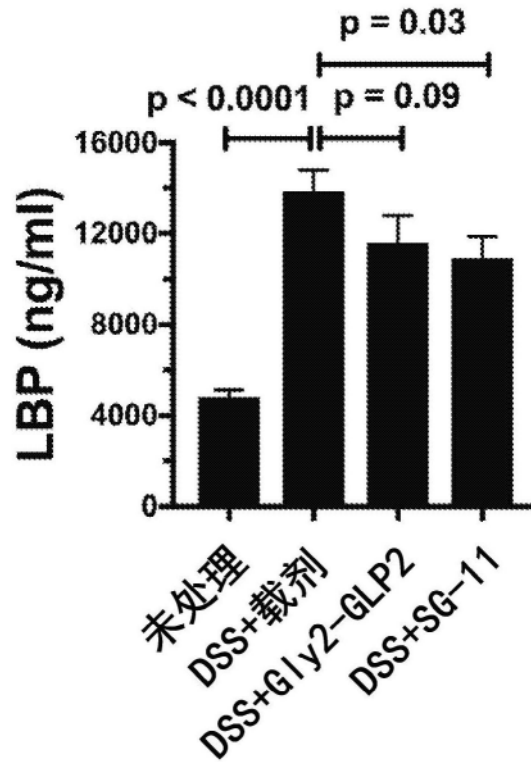


图7

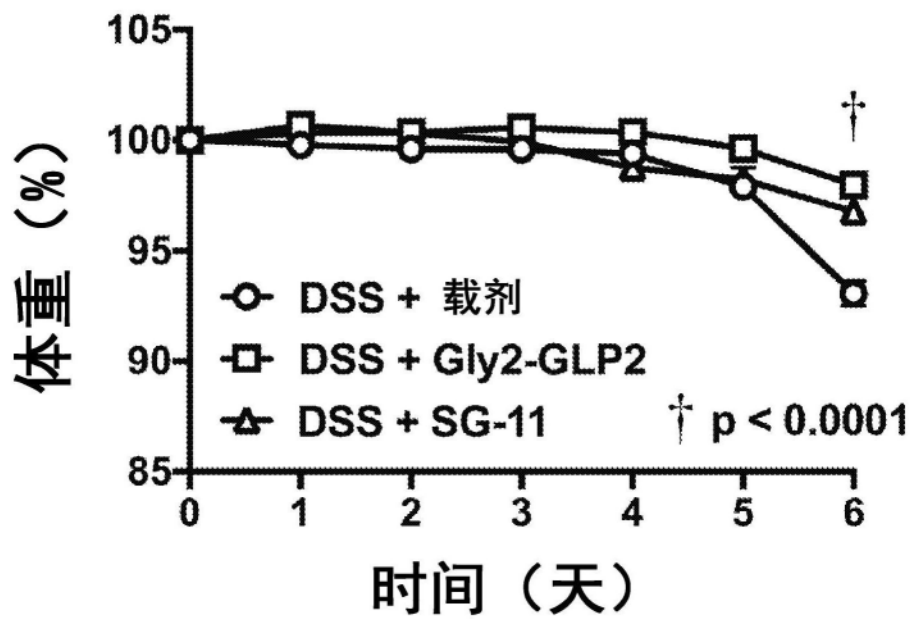


图8

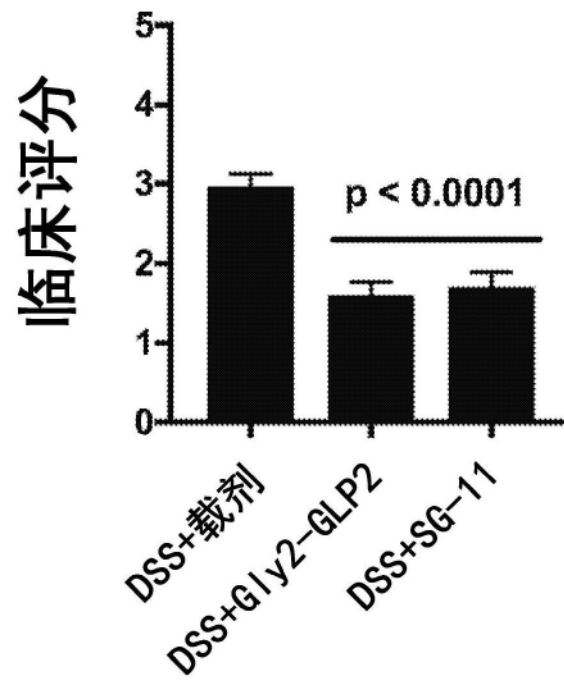


图9

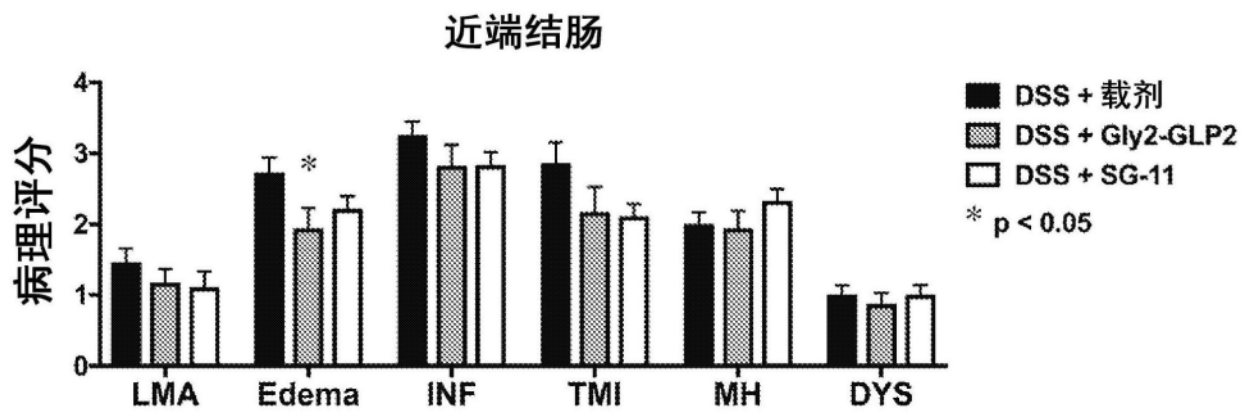


图10A

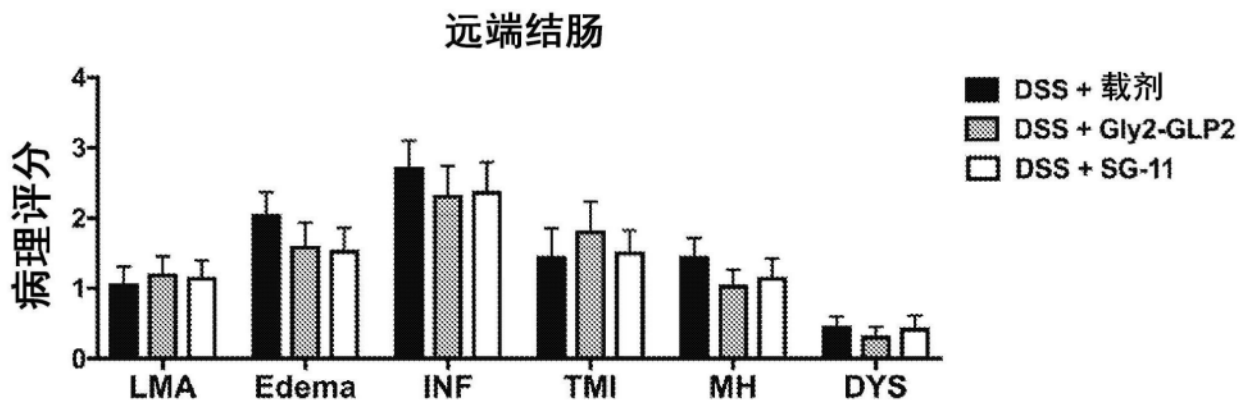


图10B

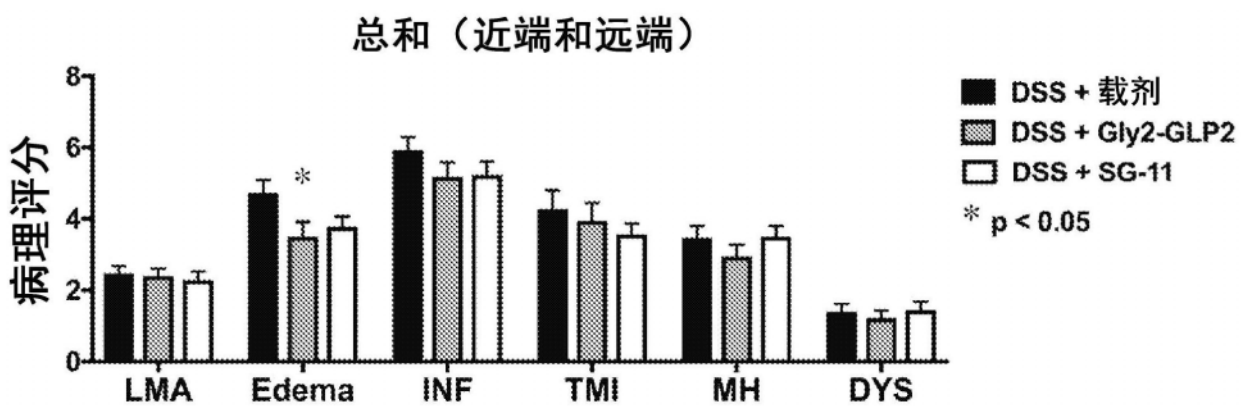


图10C

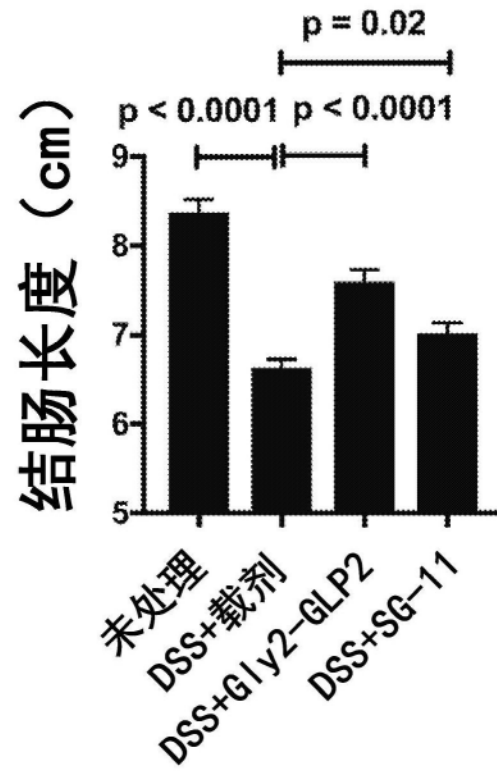


图11A

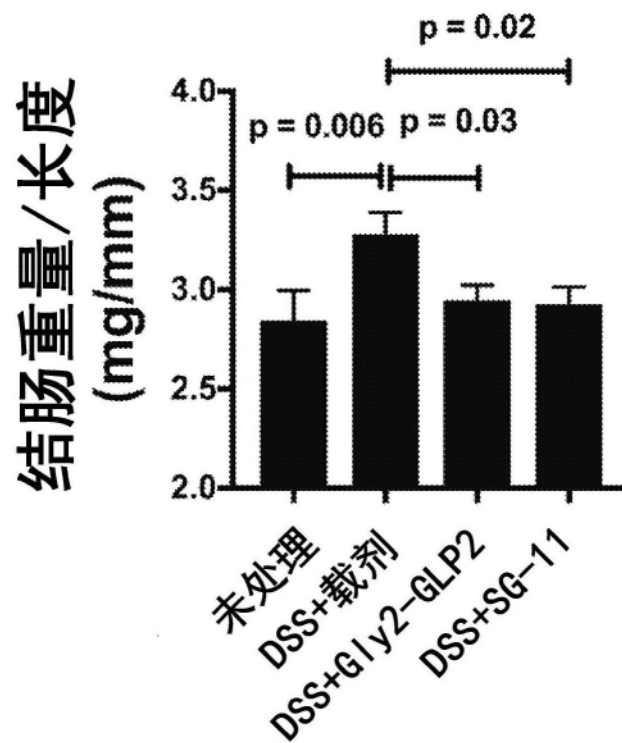


图11B

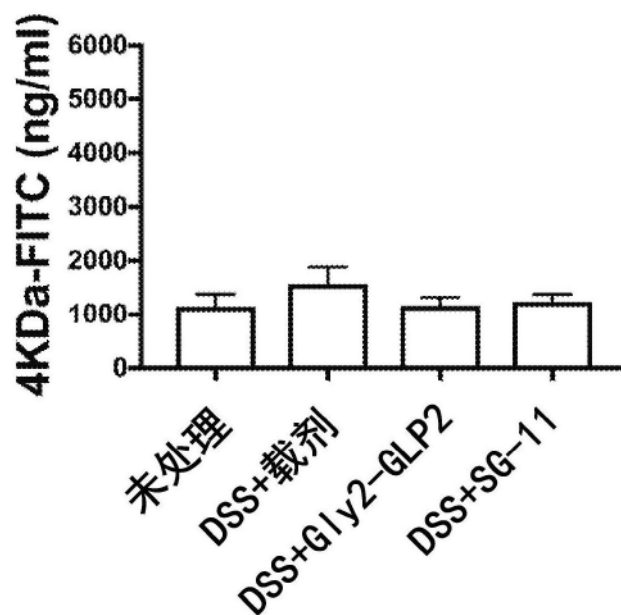


图12

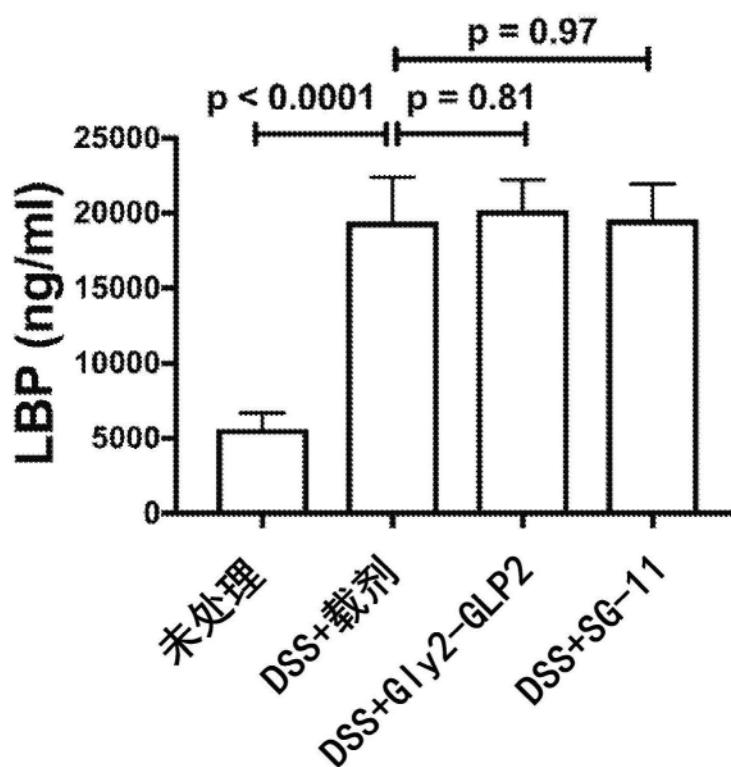


图13

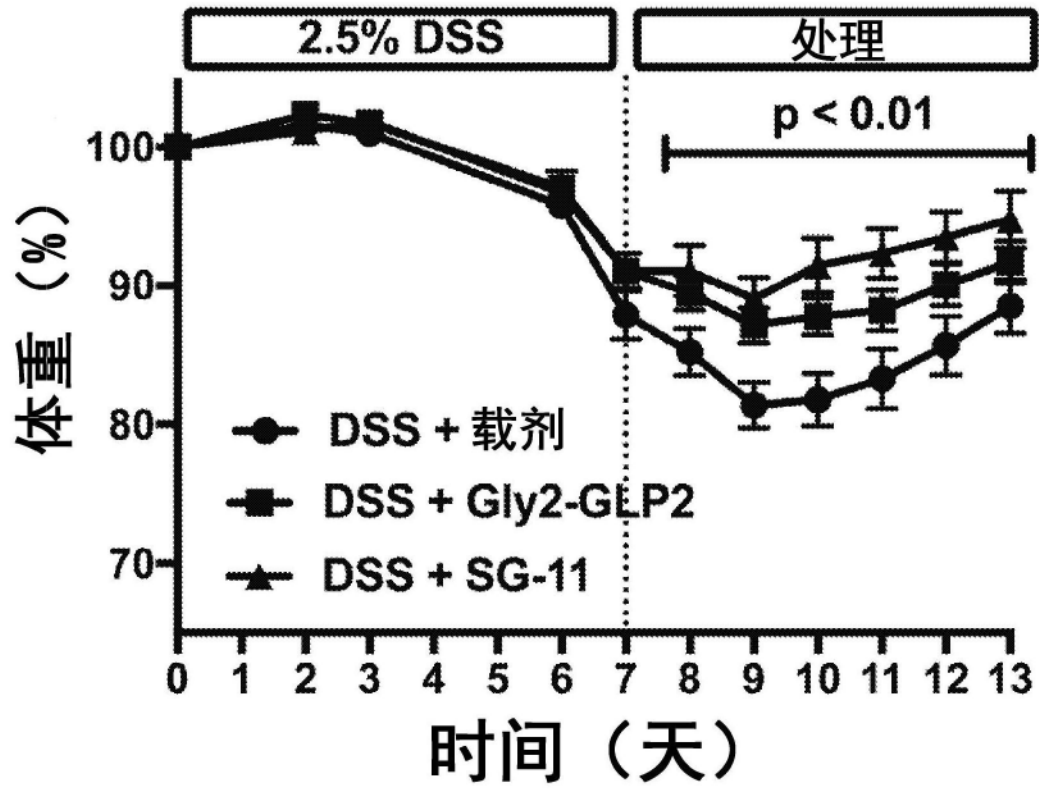


图14

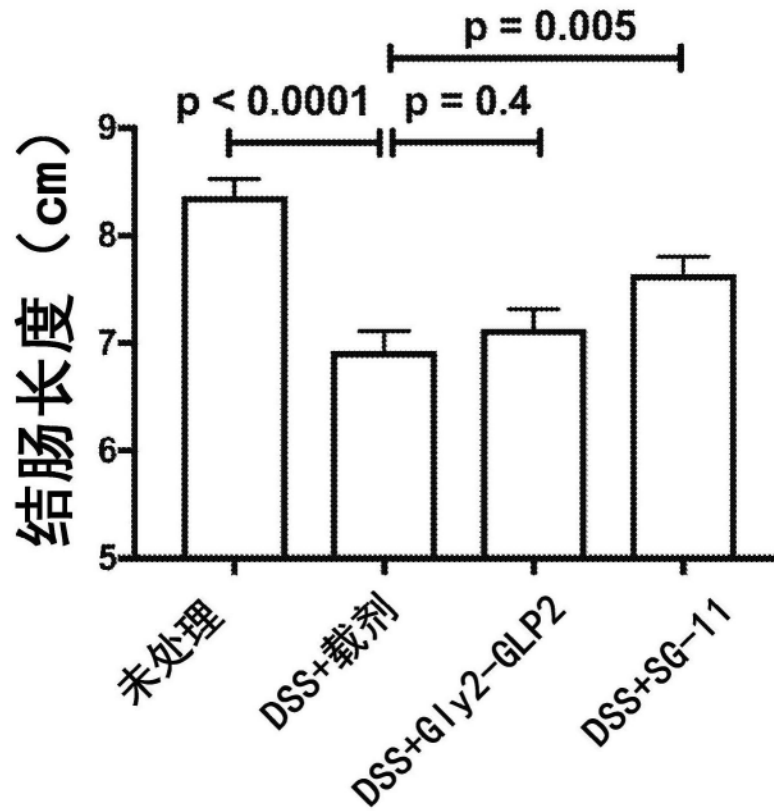


图15A

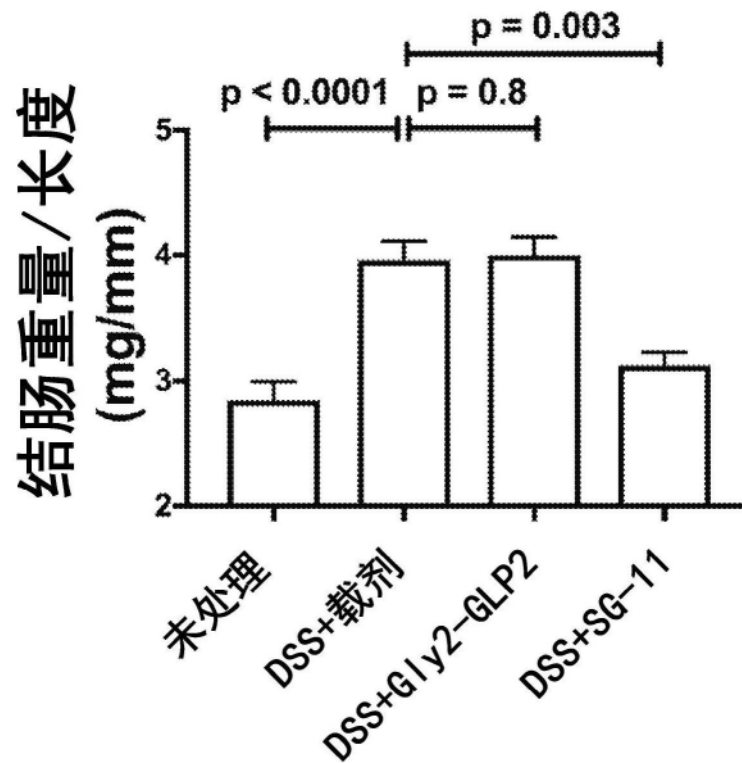


图15B



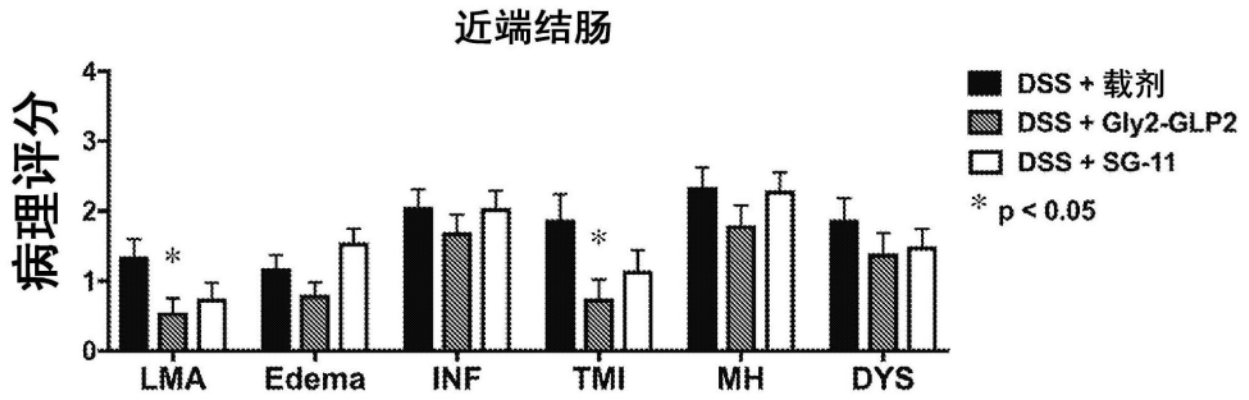


图16A

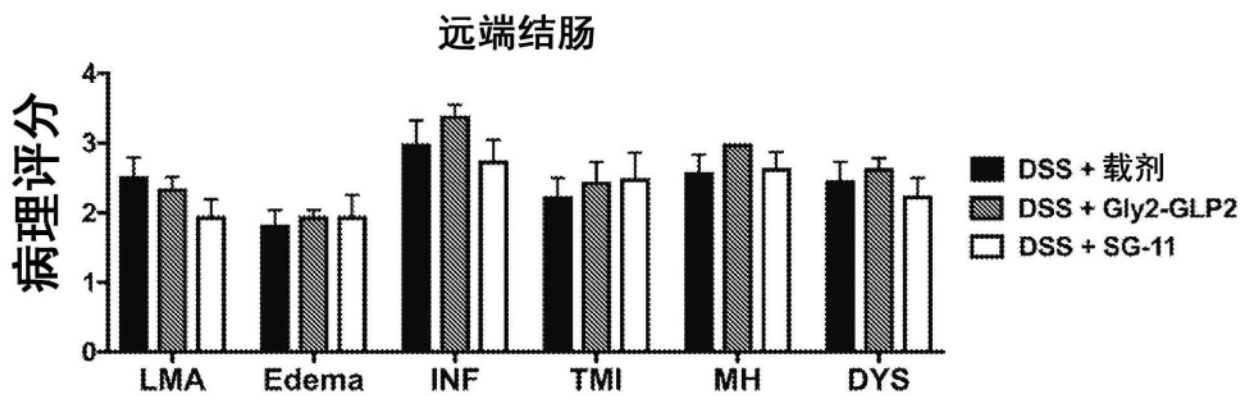


图16B

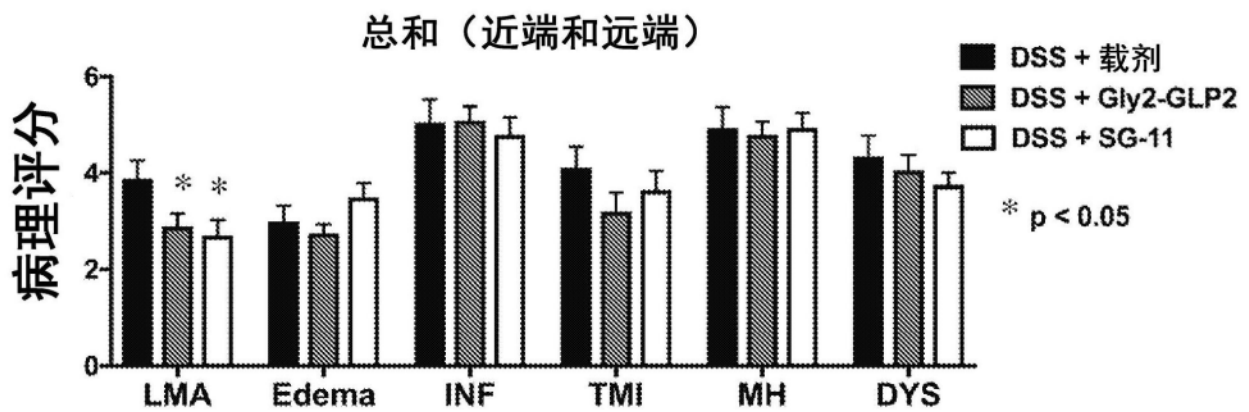


图16C

SG-11	1	<u>M</u> LEGEESVVY	VGKKGVIASL	DVETLDQSY	DETELKSYVD	AEVEDYTAEH
WP_006857001	1	<u>M</u> LDADTDVY	VQKNGTVLSV	DVETLDKDYY	DETELKDYVT	DAVSTYTGEH
WP_075679733	1	<u>M</u> LDVEESTVY	VQKNGSVIST	DIEDFSADYY	DEDELKDYIG	DEISSYTSEN
WP_055301040	1	<u>M</u> LEADTNTVY	VSKHGKVSM	DVEQLDQSY	DETELKEFVD	SAVDEYNTEN
	51					100
SG-11		GK <u>N</u> AVKVESL	KVEDGVAKLK	MKYKTPEDYT	AF <u>N</u> NGIELYQG	KVVASLAAGY
WP_006857001		GK <u>S</u> AVKLENL	SVKDGTATLK	MKYKTPEDYT	GF <u>N</u> NGIELYEG	KVVKALAAGY
WP_075679733		GK <u>K</u> SVSLESV	SVKDSVAKLT	MKYKTAEDYT	NF <u>N</u> NGVELYTG	TIVKAMAAGY
WP_055301040		GK <u>N</u> SVKVDDL	TVEDGTAKLR	MDYETVDDYT	AF <u>N</u> NGVELYEG	KIVQALAAGY
	101					150
SG-11		VYDGEFARVE	EGKVVGAAATK	QDIYSEDDLK	VAIIRAN <u>N</u> TDV	KVDGEI <u>C</u> YVS
WP_006857001		DFKTDVFSVE	DGKVTGTATK	EEIYSGEDLK	VVIIKAN <u>N</u> RDV	KVDGTI <u>C</u> YVS
WP_075679733		DFGVDFVSVK	DGAVTGTATK	DEIVDHDDYK	VAVIKAN <u>N</u> TDV	KVDGTI <u>V</u> YVS
WP_055301040		DFDTEFAGVD	KDGCVTGVTR	GDILAQEDLK	VVIIKAN <u>N</u> TDV	KIDGKI <u>L</u> YVS
	151					200
SG-11		<u>C</u> QNVKLTGKD	SVSIRDGYL	ETGSVTASVD	VTGQESVGTE	QLSGTEQMEM
WP_006857001		<u>S</u> ENVKLTGTD	SVSIRDGYSL	NSGSTADESD	SDENIADGTE	SIGGSTEV..
WP_075679733		<u>S</u> QNVKVTGKN	TVSIREGYLA	ADTTNVVGS.	.....TE	TVAET.....
WP_055301040		<u>C</u> DNVTVTGKD	SVSIKEGTGI	EKTWITEAEE	VPST.....E	AVLETESTED
	201					241
SG-11		TGEPVN....	....ADDTEQ	TEAAAGDGSF	ETDVYTFIVY	K
WP_006857001		....SD....	....TDVNDD	TTYVKDDGAF	ETDVYTYIIY	K
WP_075679733		....EA....	....EEANQT	EAVLEDEFAS	ESDVYTYVIF	K
WP_055301040		AGDVIEGEVI	IGTEEASGND	VVTNLSSGSS	GTDVYTYIIY	K

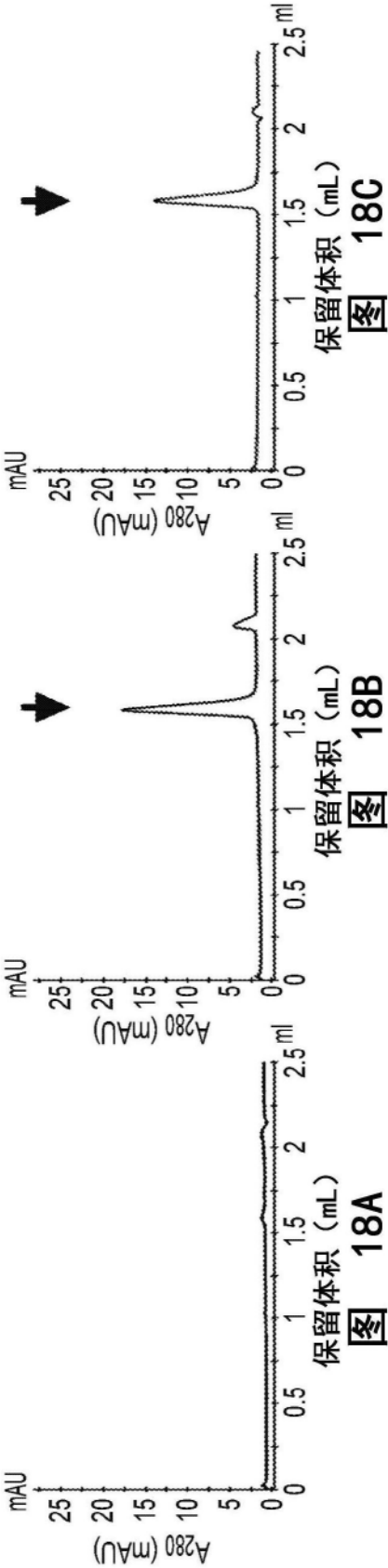
SG-11: SEQ ID NO:7

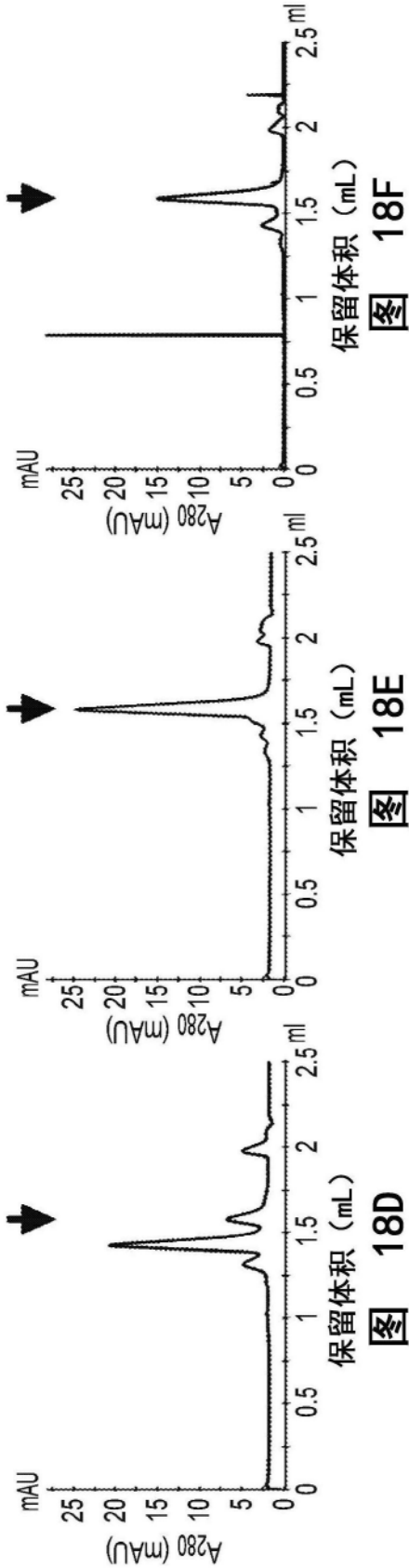
WP\_006857001: SEQ ID NO:21

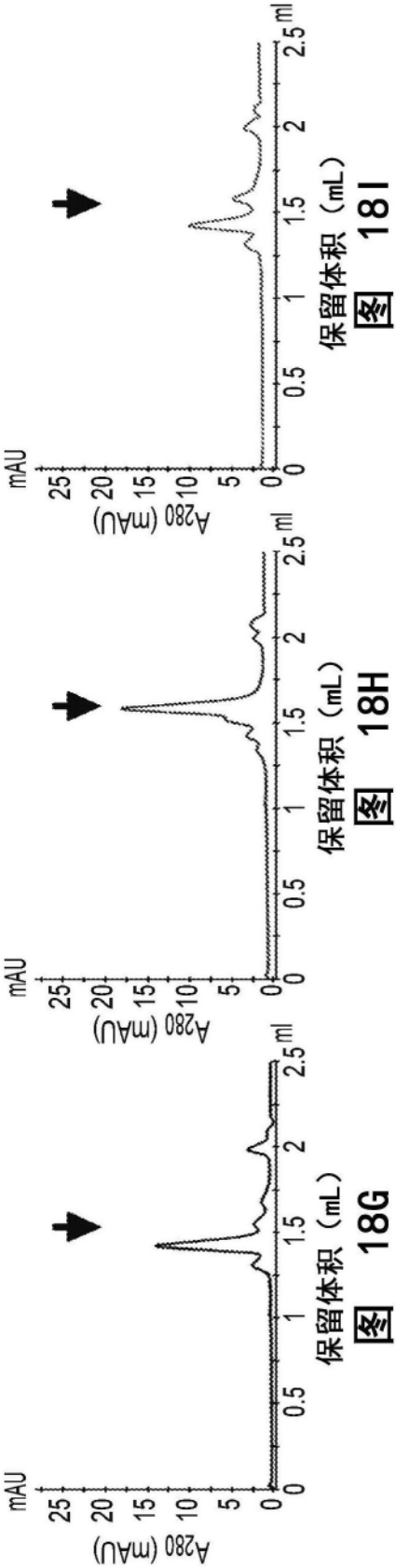
WP\_075679733: SEQ ID NO:22

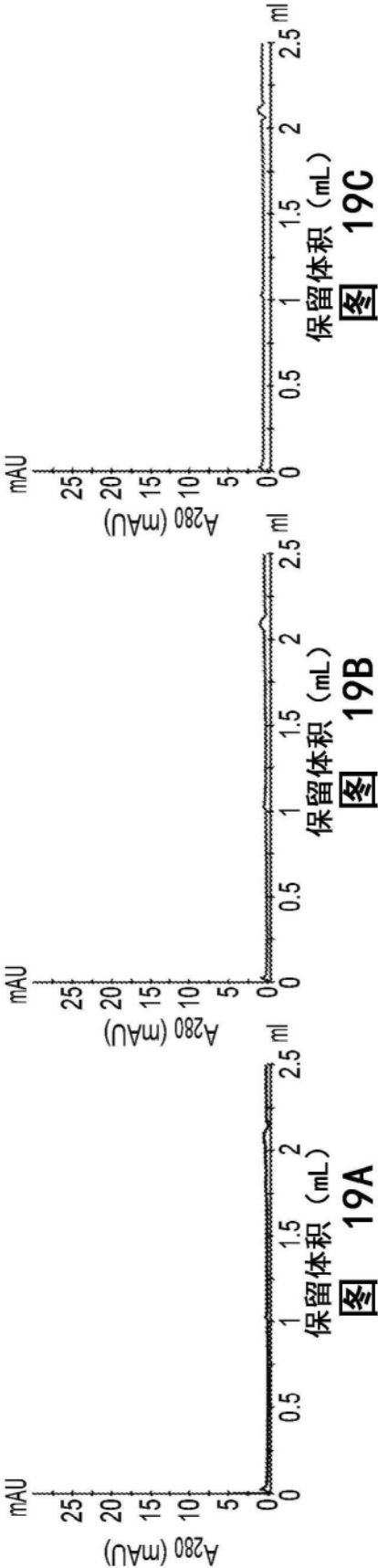
WP\_055301040: SEQ ID NO:23

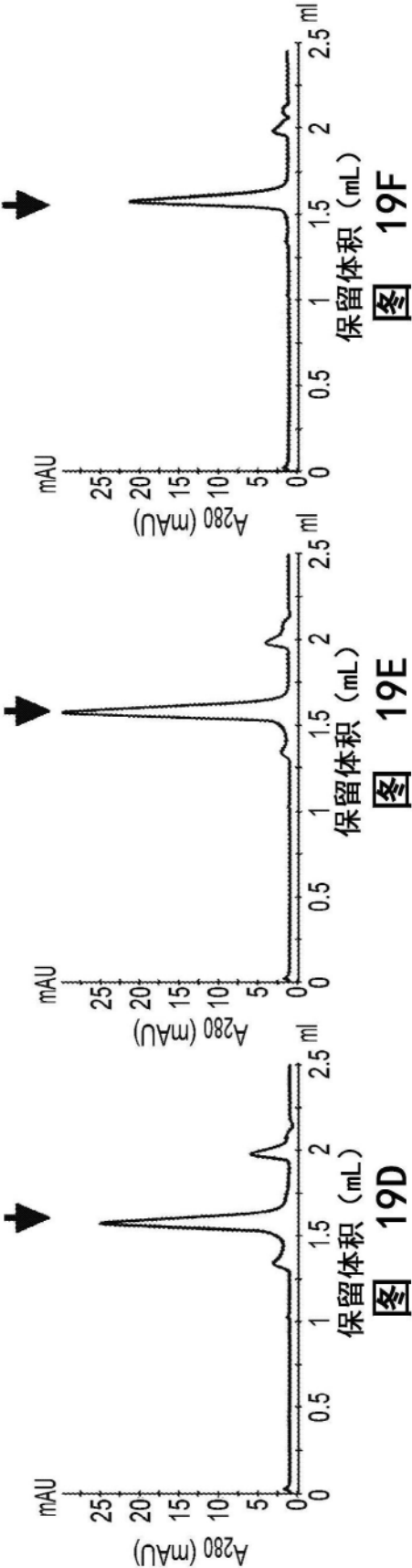
图17

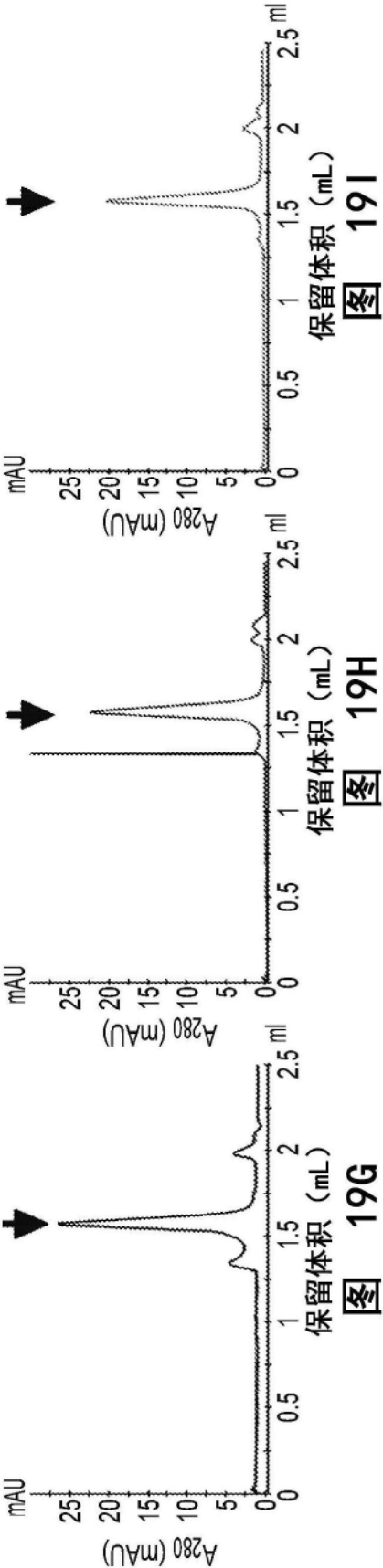














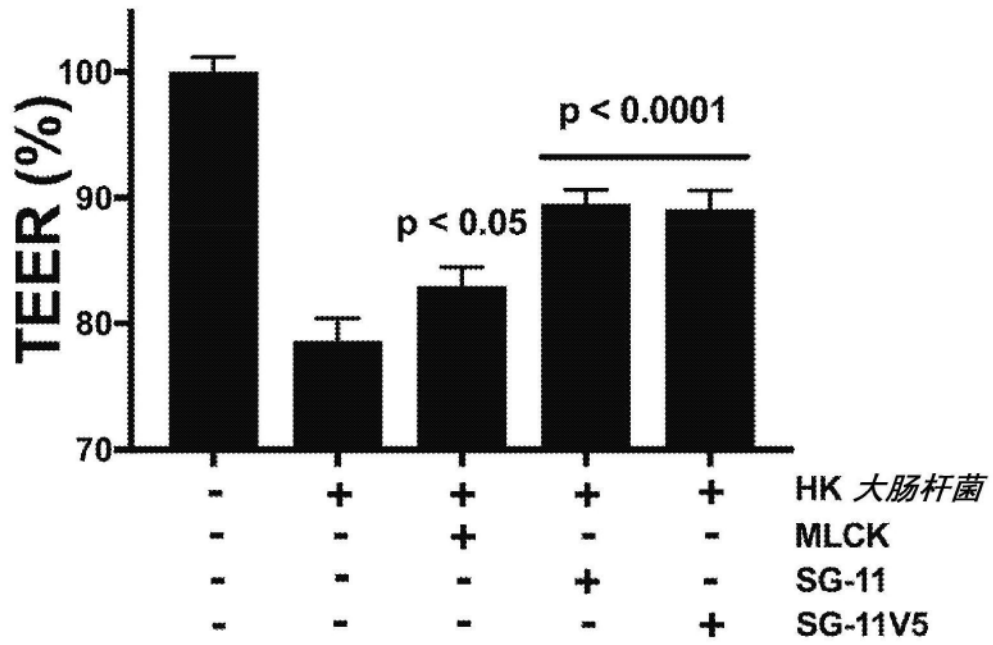


图20

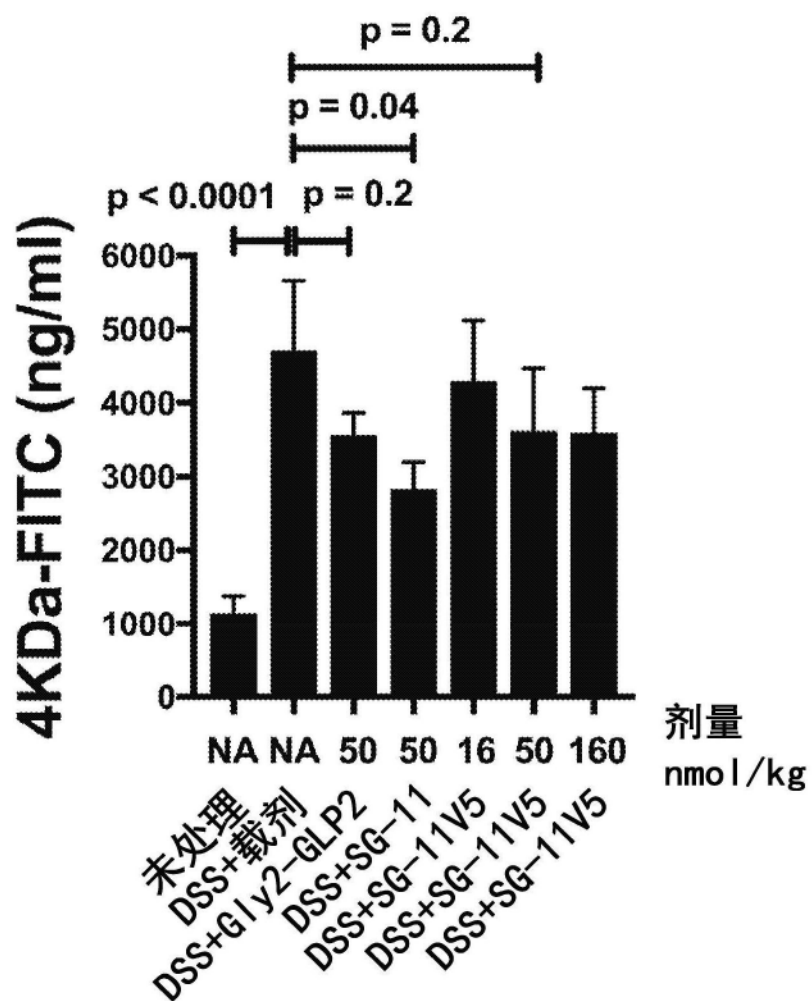


图21A

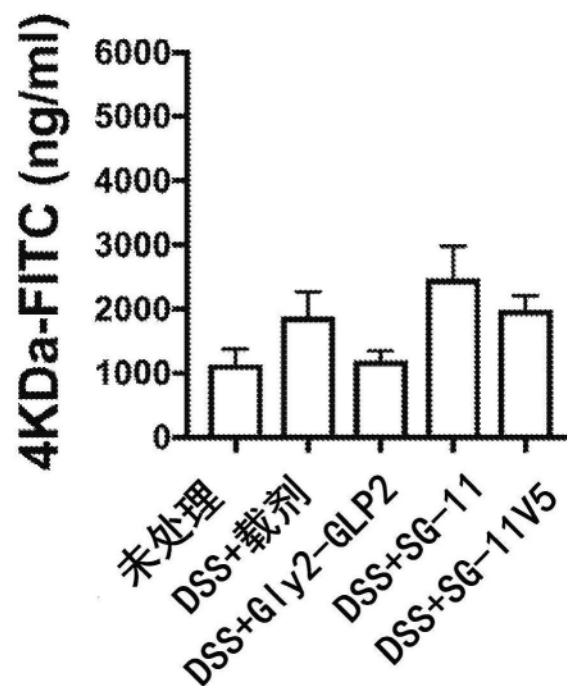


图21B

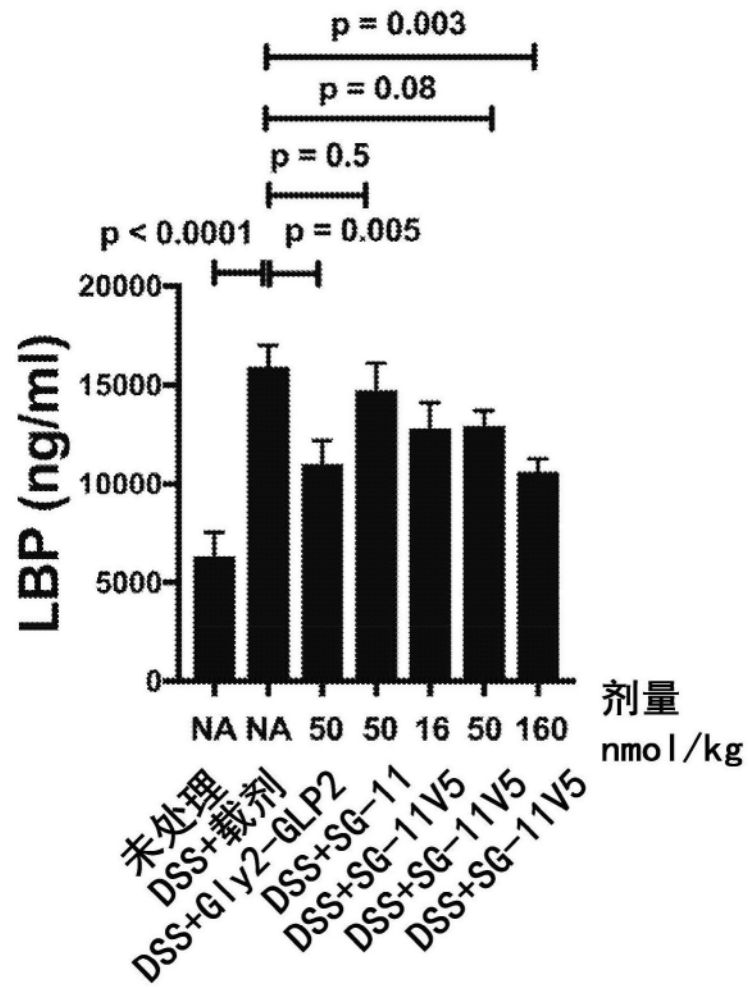


图22A

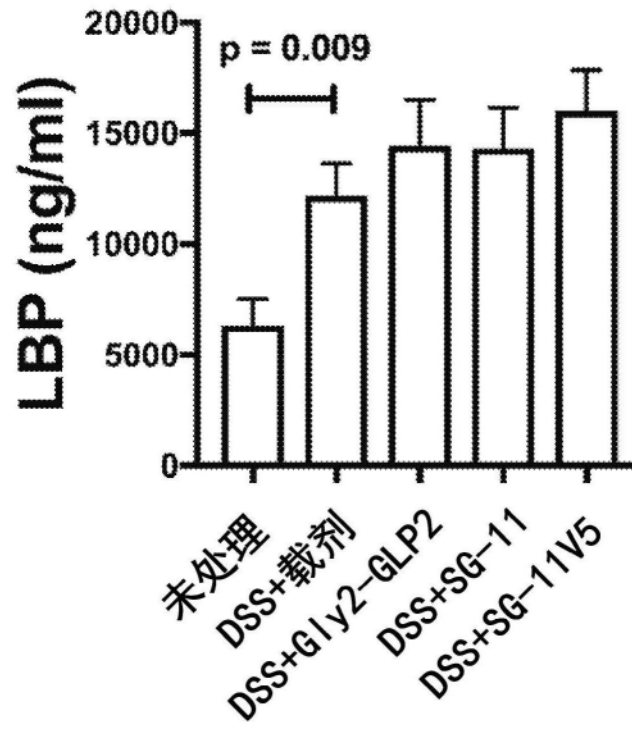


图22B

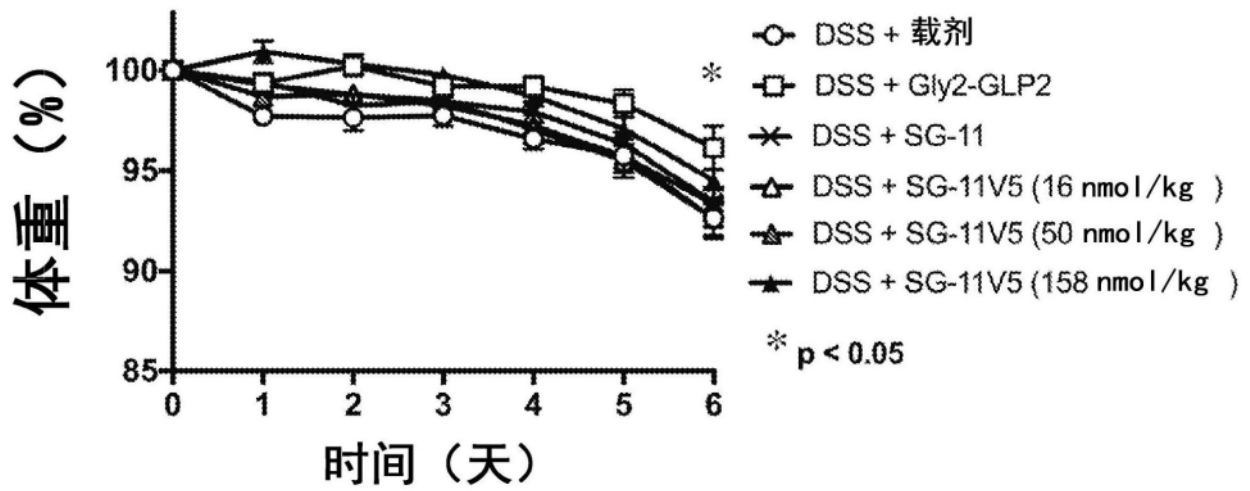


图23A

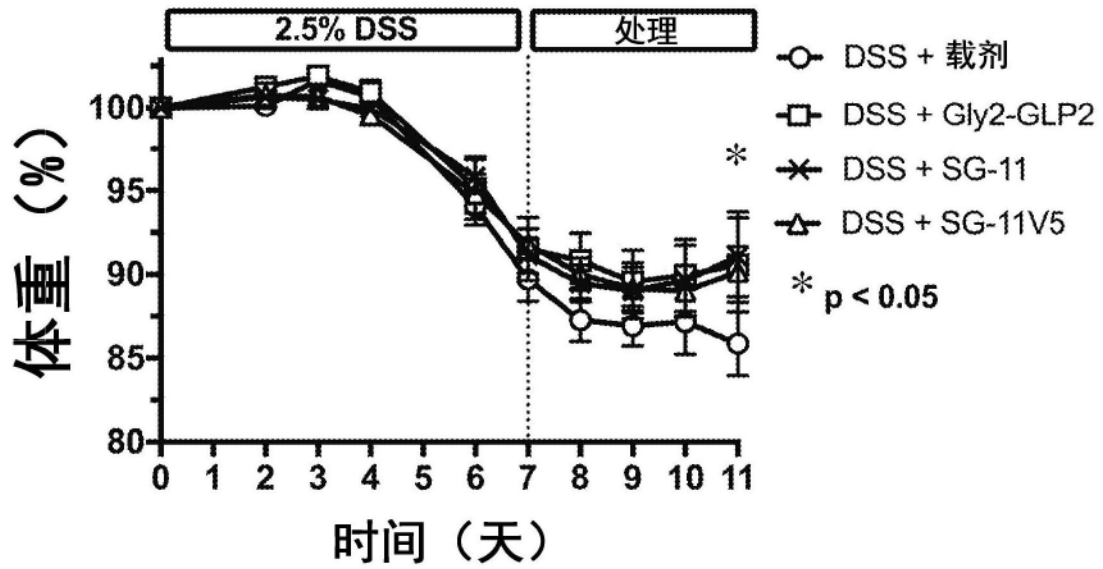


图23B

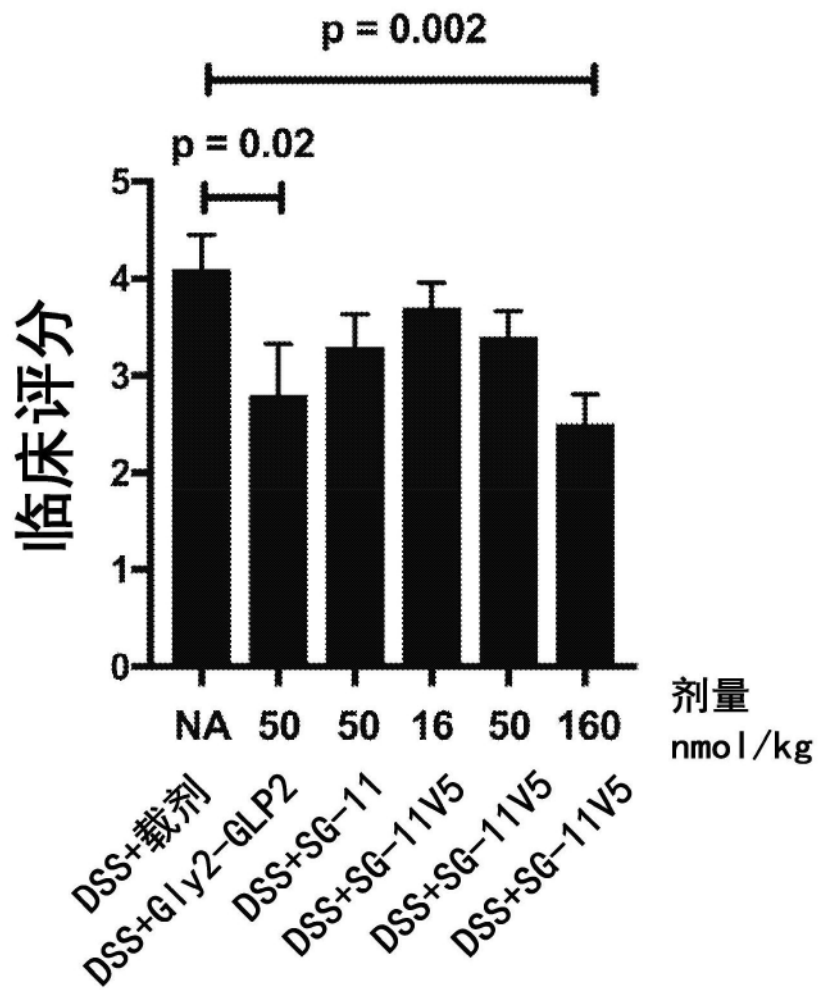


图24

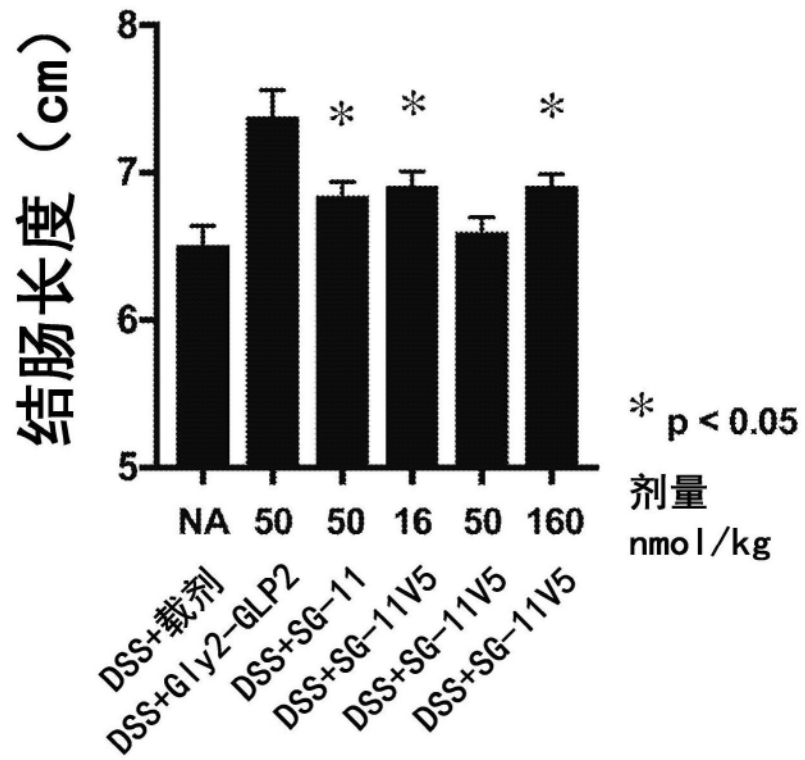


图25A

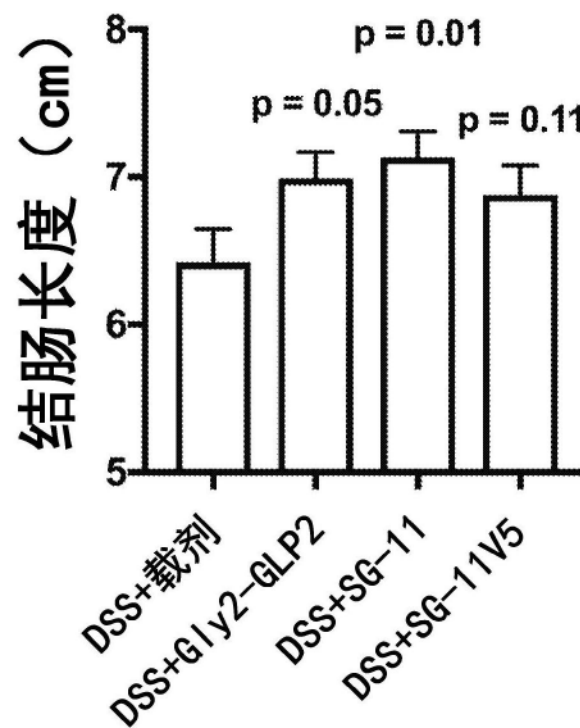


图25B

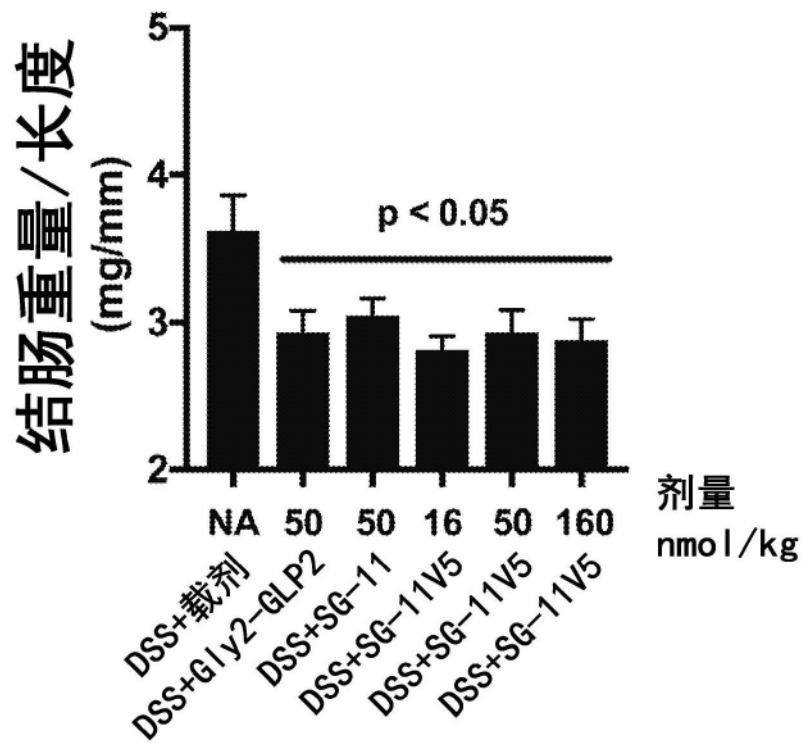


图26A

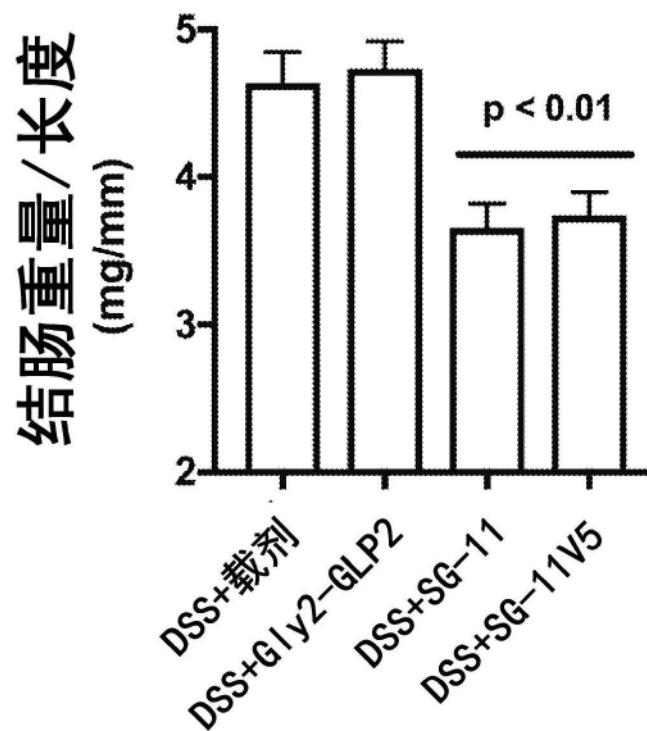


图26B



```

SEQ ID NO:7      MLEGEESVYVVGKKGVIASLDVETLDSYDETTELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL      60
SEQ ID NO:11     MLEGEESVYVVGKKGVIASLDVETLDSYDETTELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL      60
SEQ ID NO:13     MLEGEESVYVVGKKGVIASLDVETLDSYDETTELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL      60
SEQ ID NO:15     MLEGEESVYVVGKKGVIASLDVETLDSYDETTELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL      60
SEQ ID NO:17     MLEGEESVYVVGKKGVIASLDVETLDSYDETTELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL      60
SEQ ID NO:19     MLEGEESVYVVGKKGVIASLDVETLDSYDETTELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL      60
*****

SEQ ID NO:7      KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAENGIELYQKGKVASLAAGYVVDGEFARVEEGKVGAATK      120
SEQ ID NO:11     KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAENGIELYQKGKVASLAAGYVVDGEFARVEEGKVGAATK      120
SEQ ID NO:13     KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAENGIELYQKGKVASLAAGYVVDGEFARVEEGKVGAATK      120
SEQ ID NO:15     KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAENGIELYQKGKVASLAAGYVVDGEFARVEEGKVGAATK      120
SEQ ID NO:17     KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAENGIELYQKGKVASLAAGYVVDGEFARVEEGKVGAATK      120
SEQ ID NO:19     KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAENGIELYQKGKVASLAAGYVVDGEFARVEEGKVGAATK      120
*****

SEQ ID NO:7      QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIYVVSQNVKLTGKDSVSIIRDGYLLETGSVTASVD      180
SEQ ID NO:11     QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIYVVSQNVKLTGKDSVSIIRDGYLLETGSVTASVD      180
SEQ ID NO:13     QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIYVVSQNVKLTGKDSVSIIRDGYLLETGSVTASVD      180
SEQ ID NO:15     QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIYVVSQNVKLTGKDSVSIIRDGYLLETGSVTASVD      180
SEQ ID NO:17     QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIYVVSQNVKLTGKDSVSIIRDGYLLETGSVTASVD      180
SEQ ID NO:19     QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIYVVSQNVKLTGKDSVSIIRDGYLLETGSVTASVD      180
*****

SEQ ID NO:7      VTGQESVGTEQLSGTEQMENTGEFVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK      233
SEQ ID NO:11     VTGQESVGTEQLSGTEQMENTGEFVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK      233
SEQ ID NO:13     VTGQESVGTEQLSGTEQMENTGEFVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK      233
SEQ ID NO:15     VTGQESVGTEQLSGTEQMENTGEFVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK      233
SEQ ID NO:17     VTGQESVGTEQLSGTEQMENTGEFVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK      233
SEQ ID NO:19     VTGQESVGTEQLSGTEQMENTGEFVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK      233
*****

```

图27A

	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:19
1: SEQ_ID_NO_7	100.00	99.14	98.71	98.71	98.28	98.28
2: SEQ_ID_NO_11	99.14	100.00	99.57	99.57	99.14	99.14
3: SEQ_ID_NO_13	98.71	99.57	100.00	99.14	99.57	98.71
4: SEQ_ID_NO_15	98.71	99.57	99.14	100.00	98.71	99.57
5: SEQ_ID_NO_17	98.28	99.14	99.57	98.71	100.00	99.14
6: SEQ_ID_NO_19	98.28	99.14	98.71	99.57	99.14	100.00

图27B