



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105658672 A
(43) 申请公布日 2016. 06. 08

(21) 申请号	201480057870. 0	C07K 14/475(2006. 01)
(22) 申请日	2014. 08. 21	C07K 16/22(2006. 01)
(30) 优先权数据		A61K 38/16(2006. 01)
	61/868713 2013. 08. 22 US	A61P 9/10(2006. 01)
	61/906270 2013. 11. 19 US	A61P 35/00(2006. 01)
	61/906849 2013. 11. 20 US	
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	2016. 04. 21	
(86) PCT国际申请的申请数据	PCT/US2014/052130 2014. 08. 21	
(87) PCT国际申请的公布数据	W02015/027082 EN 2015. 02. 26	
(71) 申请人	阿塞勒隆制药公司	
地址	美国麻萨诸塞州	
(72) 发明人	R. 库马 A. 格林伯格 D. S. 萨科 R. 卡斯通瓜伊 R. 斯蒂夫斯	
(74) 专利代理机构	中国专利代理(香港)有限公司 72001	
代理人	罗文锋 黄希贵	
(51) Int. Cl.	C07K 19/00(2006. 01)	权利要求书4页 说明书57页 附图5页

(54) 发明名称
TGF-β 受体 II 型变体及其用途

(57) 摘要
在某些方面,本公开内容涉及可用于选择性地拮抗 Tβ RII 配体的包含 Tβ RII 多肽胞外域的截短的配体结合部分的多肽。本公开内容进一步提供用于治疗或预防 TGFβ 相关病症的组合物和方法。

1 MPGQELRTVN GSQMLIVLLV LSWLPHGGAL SLAEASRAS FPGSELHSED
51 SRFRELRKRY EDLLTRLRAN QSWEDSNTDL VPAPAVRILT PEVRLGSGGH
101 LHLRISR AAL PEG LPEASRL HRALFR LSPT ASRSWDVTRP LRRQLSLARP
151 QAPALHLRLS PPSQSDQLL AESSSAR PQL ELHLRPQAAR GRRRARARNG
201 DHCPLGPGR CRLHTVRASL EDLGWADWVL SPREVQVTMC IGACPSQFRA
251 ANMHAQIKTS LHRLKPETVP A?CCVPASYN PMVLIQKTD TGVSLQTYDDL
301 LAKDCHCI (SEQ ID NO: 1)

1. 一种包含来自TBRII胞外域的第一氨基酸序列和异源氨基酸序列的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由与以下序列有至少80%同一性的氨基酸序列组成:

a) 始于SEQ ID NO: 5的23-35位的任一个和止于SEQ ID NO: 5的153-159位的任一个的序列,或

b) 始于SEQ ID NO: 6的23-60位的任一个和止于SEQ ID NO: 6的178-184位的任一个的序列。

2. 权利要求1的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由始于SEQ ID NO: 5的23位和止于SEQ ID NO: 5的159位的序列组成。

3. 权利要求1的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由始于SEQ ID NO: 5的29位和止于SEQ ID NO: 5的159位的序列组成。

4. 权利要求1的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由始于SEQ ID NO: 5的35位和止于SEQ ID NO: 5的159位的序列组成。

5. 权利要求1的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由始于SEQ ID NO: 5的23位和止于SEQ ID NO: 5的153位的序列组成。

6. 权利要求1的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由始于SEQ ID NO: 5的29位和止于SEQ ID NO: 5的153位的序列组成。

7. 权利要求1的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由始于SEQ ID NO: 5的35位和止于SEQ ID NO: 5的153位的序列组成。

8. 权利要求1的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由始于SEQ ID NO: 6的23位和止于SEQ ID NO: 6的184位的序列组成。

9. 权利要求1的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由始于SEQ ID NO: 6的29位和止于SEQ ID NO: 6的184位的序列组成。

10. 权利要求1的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由始于SEQ ID NO: 6的23位和止于SEQ ID NO: 6的178位的序列组成。

11. 权利要求1的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由始于SEQ ID NO: 6的29位和止于SEQ ID NO: 6的178位的序列组成。

12. 权利要求1-11中任一项的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列由在相当于SEQ ID NO: 47的36位的位置处具有D和/或在相当于SEQ ID NO: 47的76位的位置处具有K的序列组成。

13. 一种TBRII融合多肽,其包含与SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 13的序列有至少80%同一性的第一氨基酸序列或其活性片段和第二异源部分,其中所述第一氨基酸序列在相当于SEQ ID NO: 47的36位的位置处具有D和/或在相当于SEQ ID NO: 47的76位的位置处具有K。

14. 权利要求13的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列包含相当于SEQ ID NO: 7的氨基酸1-12的1-12个氨基酸或相当于SEQ ID NO: 13的氨基酸1-37的1-37个氨基酸的N端截短。

15. 权利要求13或14的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列包含相当于SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 13的氨基酸1-6的6个氨基酸的N端截短。

16. 权利要求13或14的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列包含相当于SEQ ID

NO: 7的氨基酸1-12的12个氨基酸或相当于SEQ ID NO: 13的氨基酸1-37的37个氨基酸的N端截短。

17. 权利要求13-16中任一项的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列包含相当于SEQ ID NO: 7的氨基酸137-132或SEQ ID NO: 13的氨基酸162-157的1-6个氨基酸的C端截短。

18. 权利要求13-17中任一项的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列包含相当于SEQ ID NO: 7的氨基酸132-137或SEQ ID NO: 13的氨基酸157-162的6个氨基酸的C端截短。

19. 权利要求1-18中任一项的TBRII融合多肽,其中所述第一氨基酸序列包含在相当于SEQ ID NO: 47的117和118位的残基之间的相当于SEQ ID NO: 18的插入。

20. 权利要求1-19中任一项的TBRII融合多肽,其中所述异源部分包含提高以下一种或多种的一个或多个多肽部分:体内稳定性、体内半寿期、摄取/给予、组织定位或分布、蛋白质复合体的形成和/或纯化。

21. 权利要求1-20中任一项的TBRII融合多肽,其中所述异源部分包含选自以下的多肽部分:免疫球蛋白Fc结构域和血清白蛋白。

22. 权利要求21的TBRII融合多肽,其中所述免疫球蛋白Fc结构域通过接头与TBRII多肽连接。

23. 权利要求1-22中任一项的TBRII融合多肽,其中所述多肽包括选自以下的一个或多个修饰的氨基酸残基:糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸和与有机衍生剂缀合的氨基酸。

24. 权利要求23的TBRII融合多肽,其中所述多肽被糖基化。

25. 一种TBRII融合多肽,其包含由包含与选自SEQ ID NO: 7-17和47-49的氨基酸序列有至少95%同一性的氨基酸序列的TBRII胞外域的一部分组成的第一氨基酸序列和第二异源部分。

26. 一种TBRII融合多肽,其包含由包含与选自SEQ ID NO: 7-17和47-49的氨基酸序列有至少97%同一性的氨基酸序列的TBRII胞外域的一部分组成的第一氨基酸序列和第二异源部分。

27. 一种TBRII融合多肽,其包含由包含与选自SEQ ID NO: 7-17和47-49的氨基酸序列有至少98%同一性的氨基酸序列的TBRII胞外域的一部分组成的第一氨基酸序列和第二异源部分。

28. 一种TBRII融合多肽,其包含由包含与选自SEQ ID NO: 7-17和47-49的氨基酸序列有至少99%同一性的氨基酸序列的TBRII胞外域的一部分组成的第一氨基酸序列和第二异源部分。

29. 一种TBRII融合多肽,其包含由包含是选自SEQ ID NO: 7-17和47-49的氨基酸序列的氨基酸序列的TBRII胞外域的一部分组成的第一氨基酸序列和第二异源部分。

30. 一种多肽,其包含与选自SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62的氨基酸序列有至少95%同一性的氨基酸序列。

31. 一种多肽,其包含与选自SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62的氨基酸序列有至少97%同一性的氨基酸序列。

32. 一种多肽,其包含与选自SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62的氨基酸序列有至少98%同一性的氨基酸序列。

33. 一种多肽,其包含与选自SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62的氨基酸序列有至少99%同一性的氨基酸序列。

34. 一种多肽,其包含选自SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62的氨基酸序列。

35. 一种TBRII多肽,其包含由在严格条件下与选自SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、36、38、40、42和44的核苷酸序列的互补序列杂交的核酸编码的氨基酸序列。

36. 权利要求1-35中任一项的多肽,其中所述多肽以小于 1×10^{-8} M的平衡解离常数(K_D)结合人GDF15。

37. 权利要求1-36中任一项的多肽,其中所述多肽具有CHO细胞中多肽表达特有的糖基化形式。

38. 一种同二聚体,其包含两个权利要求1-37中任一项限定的多肽。

39. 一种分离的多核苷酸,其包含权利要求1-37中任一项的多肽的编码序列。

40. 一种重组多核苷酸,其包含与权利要求39的多核苷酸有效连接的启动子序列。

41. 一种细胞,其用权利要求35的分离的多核苷酸或权利要求40的重组多核苷酸转化。

42. 权利要求41的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

43. 权利要求42的细胞,其中所述细胞是CHO细胞或人细胞。

44. 一种药物制剂,其包含权利要求1-37中任一项的多肽或权利要求38的同二聚体和药学上可接受的赋形剂。

45. 一种调节细胞对TGF β 超家族成员的应答的方法,所述方法包括使细胞暴露于权利要求1-37中任一项的多肽或权利要求38的同二聚体中。

46. 一种治疗有需要的患者的与TGF β 超家族成员有关的疾病或病况的方法,所述方法包括给予患者有效量的权利要求1-37中任一项的多肽或权利要求38的同二聚体。

47. 权利要求46的方法,其中所述TGF β 超家族成员是TGF β 1、TGF β 3或GDF15。

48. 权利要求46或47的方法,其中所述疾病或病况是癌症。

49. 权利要求48的方法,其中所述癌症选自胃癌、肠癌、皮肤癌、乳腺癌、黑素瘤、骨癌和甲状腺癌。

50. 权利要求46或47的方法,其中所述疾病或病况是纤维化或硬化疾病或病症。

51. 权利要求50的方法,其中所述纤维化或硬化疾病或病症选自硬皮病、动脉粥样硬化、肝纤维化、弥漫性系统性硬化、肾小球性肾炎、神经瘢痕形成、皮肤瘢痕形成、放射诱导的纤维化、肝纤维化和骨髓纤维化。

52. 权利要求46或47的方法,其中所述疾病或病况是心脏病。

53. 权利要求46或47的方法,其中所述疾病或病况选自遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)、马方综合征、Loeys-Dietz综合征、家族性胸主动脉瘤综合征、动脉迂曲综合征、先兆子痫、动脉粥样硬化、再狭窄和肥厚型心肌病/充血性心力衰竭。

54. 一种与GDF15结合并阻断GDF15和TBRII之间的相互作用的抗体或其抗原结合片段。

55. 一种包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列或其结合TBRII的片段的GDF15多肽,其中所述GDF15多肽相对于蛋白质污染物为至少95%纯的。

56. 一种包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列或其与权利要求1-37中任一项的多肽结合的片段的GDF15多肽,其中所述GDF15多肽相对于蛋白质污染物是至少95%纯的。

57. 权利要求55的GDF15多肽,其中所述GDF15多肽以不大于 10^{-8} M的平衡解离常数(K_D)结合TBR11。

58. 权利要求56的GDF15多肽,其中所述GDF15多肽以不大于 10^{-8} M的平衡解离常数(K_D)与权利要求1-37中任一项的多肽结合。

59. 权利要求55-58中任一项的GDF15多肽,其中所述多肽通过在CHO细胞中表达产生。

60. 一种浓缩或纯化GDF15的方法,所述方法包括使含有GDF15的样品与权利要求1-37中任一项的多肽接触。

61. 一种多肽,其包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列有至少90%同一性的氨基酸序列。

62. 权利要求61的多肽,其包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列有至少95%同一性的氨基酸序列。

63. 权利要求61的多肽,其包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列有至少99%同一性的氨基酸序列。

64. 权利要求61的多肽,其包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

65. 权利要求61的多肽,其由与SEQ ID NO:50的氨基酸序列相同的氨基酸序列组成。

66. 一种核酸,其编码权利要求61-65中任一项的多肽。

67. 一种核酸,其包含SEQ ID NO: 51的核酸序列。

68. 一种通过在哺乳动物细胞中表达权利要求67的核酸产生的多肽。

69. 权利要求68的多肽,其中所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。

TGF- β 受体II型变体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求2013年8月22日提交的美国临时申请61/868,713、2013年11月19日提交的美国临时申请61/906,270和2013年11月20日提交的美国临时申请61/906,849的优先权。优先权申请的公开内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0002] 发明背景

转化生长因子- β (TGF β)超家族的成员是参与例如增殖、分化、凋亡、运动、胞外基质产生、组织重建、血管生成、免疫应答、细胞粘附等基本细胞功能的多效细胞因子,并且还在像慢性炎症病况和癌症那样不同的疾病状态的病理生理学中起关键作用。TGF β 超家族的成员被归类为主要的家族分组,其包括TGF β 、骨形态生成蛋白(BMP)、成骨蛋白(OP)、生长和分化因子(GDF)、抑制素/激活素、mullerian抑制物质(MIS)和神经胶质衍生神经营养因子(GDNF)。

[0003] TGF β 超家族成员通过诱导特异性I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体异聚复合体的形成而将其信号跨质膜转导,所述复合体进而激活特定亚类的SMAD蛋白(一些抑制性,一些刺激性)。SMAD分子化合物将信号传送入核,在核中它们与其它蛋白质联合指导转录反应。

[0004] 功能失常的TGF β 超家族信号转导与几种临床病症有关,包括癌症、纤维化、骨病、糖尿病性肾病以及慢性血管病,例如动脉粥样硬化。

[0005] 因此,本公开内容的一个目标是提供用于调节TGF β 超家族信号转导的组合物和方法。

[0006] 发明概述

在某种程度上,本公开内容提供TBRII多肽和所述TBRII多肽作为GDF15、TGF β 1或TGF β 3的选择性拮抗剂的用途。如本文所述,包含有或没有其它突变的TBRII胞外域(ECD)的部分或全部的多肽,以不同的亲和力结合和/或抑制GDF15、TGF β 1或TGF β 3。因此,在某些方面,本公开内容提供TBRII多肽用于选择性抑制TGF β 超家族相关病症。

[0007] 在某些方面,本公开内容提供在TBRII的胞外域中包含突变和/或截短的多肽。在某些方面,本公开内容提供包含来自TBRII胞外域的第一氨基酸序列和异源氨基酸序列的TBRII融合多肽,其中第一氨基酸序列包含与a)始于SEQ ID NO: 5的23-35位的任一个和止于SEQ ID NO: 5的153-159位的任一个的序列或b)始于SEQ ID NO: 6的23-60位的任一个和止于SEQ ID NO: 6的178-184位的任一个的序列有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性或相同的氨基酸序列或由其组成。

[0008] 在某些方面,本公开内容提供包含与人IgG2的Fc结构域的至少一部分融合的TBRII的野生型或改变和/或截短的胞外域的多肽。因此在某些方面,本公开内容提供包含来自TBRII胞外域的第一氨基酸序列和异源氨基酸序列的TBRII融合多肽,其中第一氨基酸序列包含与a)始于SEQ ID NO: 5的23-35位的任一个和止于SEQ ID NO: 5的153-159位的任一个的序列或b)始于SEQ ID NO: 6的23-60位的任一个和止于SEQ ID NO: 6的178-184位的任一个的序列有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少

99%同一性或相同的氨基酸序列或由其组成,且其中所述多肽含有第二多肽序列,第二多肽序列包含至少人IgG2的恒定结构域,且可任选包含与SEQ ID NO: 19有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,且其中接头任选位于第一多肽和第二多肽之间。一个实例以SEQ ID NO:50提供,并由SEQ ID NO:51的核酸序列编码。在某些实施方案中,本公开内容提供具有包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列或由其组成的氨基酸序列的多肽。在某些实施方案中,本公开内容提供由包含与SEQ ID NO:51的核酸序列有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核酸序列或由其组成的核酸序列编码的多肽。

[0009] 在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含始于SEQ ID NO: 5的23位和止于SEQ ID NO: 5的159位的序列或由其组成。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含始于SEQ ID NO: 5的29位和止于SEQ ID NO: 5的159位的序列或由其组成。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含始于SEQ ID NO: 5的35位和止于SEQ ID NO: 5的159位的序列或由其组成。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含始于SEQ ID NO: 5的23位和止于SEQ ID NO: 5的153位的序列或由其组成。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含始于SEQ ID NO: 5的29位和止于SEQ ID NO: 5的153位的序列或由其组成。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含始于SEQ ID NO: 5的35位和止于SEQ ID NO: 5的153位的序列或由其组成。

[0010] 在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含始于SEQ ID NO: 6的23位和止于SEQ ID NO: 6的184位的序列或由其组成。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含始于SEQ ID NO: 6的29位和止于SEQ ID NO: 6的184位的序列或由其组成。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含始于SEQ ID NO: 6的23位和止于SEQ ID NO: 6的178位的序列或由其组成。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含始于SEQ ID NO: 6的29位和止于SEQ ID NO: 6的178位的序列或由其组成。

[0011] 在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含在相当于SEQ ID NO: 47的36位的位置处具有D和/或在相当于SEQ ID NO: 47的76位的位置处具有K的序列或由其组成。

[0012] 在某些方面,本公开内容提供包含与SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 13的序列有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性或相同的第一氨基酸序列或其活性片段和第二异源部分的TBRII融合多肽,其中第一氨基酸序列在相当于SEQ ID NO: 47的36位的位置处具有D和/或在相当于SEQ ID NO: 47的76位的位置处具有K。

[0013] 在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含相当于SEQ ID NO: 7的氨基酸1-12的1-12个氨基酸或相当于SEQ ID NO: 13的氨基酸1-37的1-37个氨基酸的N端截短。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含相当于SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 13的氨基酸1-6的6个氨基酸的N端截短。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含相当于SEQ ID NO: 7的氨基酸1-12的12个氨基酸或相当于SEQ ID NO: 13的氨基酸1-37的37个氨基酸的N端截短。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含相当于SEQ ID NO: 7的氨基酸137-132或SEQ ID NO: 13的氨基酸162-157的1-6个氨基酸的C端截短。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含相当于SEQ ID NO: 7的氨基酸132-137或SEQ ID NO: 13的氨基酸157-162的6个氨基酸的C端截短。在一些实施方案中,第一氨基酸序列包含在相当于SEQ ID NO: 47的117和118位的残基

之间的相当于SEQ ID NO: 18的插入。

[0014] 在一些实施方案中,异源部分包含提高以下一种或多种的一个或多个多肽部分:体内稳定性、体内半寿期、摄取/给予、组织定位或分布、蛋白质复合体的形成和/或纯化。在一些实施方案中,异源部分包含选自以下的多肽部分:免疫球蛋白Fc结构域和血清白蛋白。在又一个实施方案中,免疫球蛋白Fc结构域通过接头与TBRII多肽连接。

[0015] 在一些实施方案中,多肽包括选自以下的一个或多个修饰的氨基酸残基:糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸和与有机衍生剂缀合的氨基酸。在一些实施方案中,多肽被糖基化。

[0016] 在某些方面,本公开内容提供TBRII融合多肽,其包含由包含与选自SEQ ID NO: 7-17和47-49的氨基酸序列有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列的TBRII胞外域的一部分组成的第一氨基酸序列和第二异源部分。在某些方面,本公开内容提供TBRII融合多肽,其包含由包含与选自SEQ ID NO: 7-17和47-49的氨基酸序列有至少96%同一性的氨基酸序列的TBRII胞外域的一部分组成的第一氨基酸序列和第二异源部分。在某些方面,本公开内容提供TBRII融合多肽,其包含由包含与选自SEQ ID NO: 7-17和47-49的氨基酸序列有至少97%同一性的氨基酸序列的TBRII胞外域的一部分组成的第一氨基酸序列和第二异源部分。在某些方面,本公开内容提供TBRII融合多肽,其包含由包含与选自SEQ ID NO: 7-17和47-49的氨基酸序列有至少98%同一性的氨基酸序列的TBRII胞外域的一部分组成的第一氨基酸序列和第二异源部分。在某些方面,本公开内容提供TBRII融合多肽,其包含由包含与选自SEQ ID NO: 7-17和47-49的氨基酸序列有至少99%同一性的氨基酸序列的TBRII胞外域的一部分组成的第一氨基酸序列和第二异源部分。

[0017] 在某些方面,本公开内容提供包含与选自SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41和43的氨基酸序列有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列或其前导序列除去的部分或由其组成的多肽,例如,包含与选自SEQ ID NO: 53、54、55、56、57、58、59、60、61和62的氨基酸序列有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列或由其组成的多肽。在某些方面,本公开内容提供包含与选自SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41和43的氨基酸序列有至少96%同一性的氨基酸序列或其前导序列除去的部分或由其组成的多肽,例如,包含与选自SEQ ID NO: 53、54、55、56、57、58、59、60、61和62的氨基酸序列有至少96%同一性的氨基酸序列或由其组成的多肽。在某些方面,本公开内容提供包含选自SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41和43的氨基酸序列有至少97%同一性的氨基酸序列或其前导序列除去的部分或由其组成的多肽,例如,包含与选自SEQ ID NO: 53、54、55、56、57、58、59、60、61和62的氨基酸序列有至少97%同一性的氨基酸序列或由其组成的多肽。在某些方面,本公开内容提供包含与选自SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41和43的氨基酸序列有至少98%同一性的氨基酸序列或其前导序列除去的部分或由其组成的多肽,例如,包含与选自SEQ ID NO: 53、54、55、56、57、58、59、60、61和62的氨基酸序列有至少98%同一性的氨基酸序列或由其组成的多肽。在某些方面,本公开内容提供包含与选自SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41和43的氨基酸序列有至少99%同一性的氨基酸序列或其前导序列除去的部分或由其组成的多肽,例如,包含与选自SEQ ID NO:

53、54、55、56、57、58、59、60、61和62的氨基酸序列有至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成的多肽。在某些方面，本公开内容提供包含选自SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41和43的氨基酸序列或其前导序列除去的部分或由其组成的多肽，例如，包含选自SEQ ID NO: 53、54、55、56、57、58、59、60、61和62的氨基酸序列或由其组成的多肽。

[0018] 在某些方面，本公开内容提供包含由在严格条件下与选自SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、36、38、40、42和44的核苷酸序列的互补序列杂交的核酸编码的氨基酸序列的TBRII多肽。

[0019] 在前面提到的每一个中，可选择不包括全长TBRII ECD的TBRII多肽。TBRII多肽可用作单体蛋白质或呈二聚形式。TBRII多肽还可与第二多肽部分融合以提供改进的性质，例如延长半寿期或更容易生产或纯化。融合可以是直接的，或可将接头插入TBRII多肽和任何其它部分之间。接头可以是结构化的或非结构化的，可由1、2、3、4、5、10、15、20、30、50个或更多个氨基酸组成，任选相对不含二级结构。

[0020] 在一些实施方案中，本公开内容的TBRII多肽以小于 1×10^{-8} M的平衡解离常数(K_D)结合人GDF15。

[0021] 在一些实施方案中，本公开内容的TBRII多肽具有CHO细胞中多肽表达特有的糖基化形式。

[0022] 在一些实施方案中，本公开内容提供包含本公开内容的2个TBRII多肽的同二聚体。

[0023] 在一些实施方案中，本公开内容提供包含本公开内容的TBRII多肽的编码序列的分离的多核苷酸。在一些实施方案中，本公开内容提供包含与分离的多核苷酸有效连接的启动子序列的重组多核苷酸。在一些实施方案中，本公开内容提供用本公开内容的分离的多核苷酸或重组多核苷酸转化的细胞。在一些实施方案中，细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中，细胞是CHO细胞或人细胞。在一些实施方案中，细胞是HEK-293细胞。

[0024] 在某些方面，本公开内容提供包含本公开内容的TBRII多肽或同二聚体和药学上可接受的赋形剂的药物制剂。

[0025] 在某些方面，本公开内容提供调节细胞对TGF β 超家族成员的应答的方法，所述方法包括使细胞暴露于本公开内容的TBRII多肽或同二聚体中。

[0026] 在某些方面，本公开内容提供治疗有需要的患者的与TGF β 超家族成员有关的疾病或病况的方法，所述方法包括给予患者有效量的本公开内容的TBRII多肽或同二聚体。在一些实施方案中，TGF β 超家族成员是TGF β 1、TGF β 3或GDF15。

[0027] 在一些实施方案中，疾病或病况是癌症。在一些实施方案中，癌症选自胃癌、肠癌、皮肤癌、乳腺癌、黑素瘤、骨癌和甲状腺癌。

[0028] 在一些实施方案中，疾病或病况是纤维化或硬化疾病或病症。在一些实施方案中，纤维化或硬化疾病或病症选自硬皮病、动脉粥样硬化、肝纤维化、弥漫性系统性硬化、肾小球性肾炎、神经瘢痕形成(neural scarring)、皮肤瘢痕形成、放射诱导的纤维化、肝纤维化和骨髓纤维化。

[0029] 在一些实施方案中，疾病或病况是心脏病。

[0030] 在一些实施方案中，疾病或病况选自遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)、马方综合征(Marfan syndrome)、Loeys-Dietz综合征、家族性胸主动脉瘤综合征、动脉迂曲综合

征、先兆子痫、动脉粥样硬化、再狭窄和肥厚型心肌病/充血性心力衰竭。

[0031] 在某些方面,本公开内容提供与GDF15结合并阻断GDF15和TBRII之间的相互作用的抗体或其抗原结合片段。

[0032] 在某些方面,本公开内容提供包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列或其结合TBRII的片段的GDF15多肽,其中相对于蛋白质污染物,GDF15多肽为至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%纯的。

[0033] 在某些方面,本公开内容提供包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列或其结合本公开内容的TBRII多肽的片段的GDF15多肽,其中相对于蛋白质污染物,GDF15多肽为至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%纯的。

[0034] 在一些实施方案中,GDF15多肽以不大于 10^{-8} M的平衡解离常数(K_D)结合TBRII。在一些实施方案中,GDF15多肽以不大于 10^{-8} M的平衡解离常数(K_D)结合本公开内容的TBRII多肽。

[0035] 在一些实施方案中,GDF15多肽通过在CHO细胞中表达产生。

[0036] 在某些方面,本公开内容提供浓缩或纯化GDF15的方法,所述方法包括使含有GDF15的样品与本公开内容的TBRII多肽接触。

[0037] 附图简述

图1显示人GDF15的天然前体的氨基酸序列(NCBI参考序列:NP_004855.2)。实心下划线表示成熟的GDF15(残基197-308),具有通过测序测定的N端。虚线下划线表示前导序列(残基1-29)。

[0038] 图2显示编码人GDF15的天然前体的核苷酸序列。实心下划线表示编码成熟GDF15的序列(核苷酸589-924),虚线下划线表示编码前导序列的序列(核苷酸1-87)。用于破坏NM_004864.2的SfoI位点的沉默突变(G456A)用双下划线标出。

[0039] 图3显示鼠GDF15的天然前体的氨基酸序列(NP_035949.2)。实心下划线表示成熟的GDF15(残基192-303),具有通过测序测定的N端。虚线下划线表示前导序列(残基1-30)。

[0040] 图4显示编码鼠GDF15的天然前体的核苷酸序列(来源于NM_011819.2)。实心下划线表示编码成熟GDF15的序列(核苷酸574-909),虚线下划线表示编码前导序列的序列(核苷酸1-90)。

[0041] 图5显示人TGF β 受体II型(hTBRII)的B(短)同种型的天然前体的氨基酸序列(NP_003233.4)。实心下划线表示成熟胞外域(ECD)(残基23-159),双下划线表示A(长)同种型中被置换的缬氨酸。虚线下划线表示前导序列(残基1-22)。

[0042] 图6显示人TBRII的A(长)同种型的天然前体的氨基酸序列(NP_001020018.1)。实心下划线表示成熟的ECD(残基23-184),双下划线表示剪接产生的异亮氨酸取代。虚线下划线表示前导序列(残基1-22)。

[0043] 图7表示hTBRII_短截短及其hTBRII_长对应物的N端比对。存在于hTBRII_长截短的25个氨基酸插入用下划线标出。注意剪接过程引起侧接短同种型的插入位点的缬氨酸被长同种型中的异亮氨酸置换。用方框标出的序列表示前导序列。

[0044] 发明详述

1. 概述

本文所述蛋白质是人的形式,除非另有说明。蛋白质的NCBI索引如下:人TBRII同种型A

(hTβRII_长), NP_001020018.1; 人TβRII同种型B (hTβRII_短), NP_003233.4; 人GDF15, NP_004855.2; 鼠GDF15, NP_035949.2。图1-6中给出人和小鼠的天然TβRII和GDF15蛋白的序列。

[0045] TGFβ超家族含有多生长因子, 其具有共同的序列元件和结构基序。已知这些蛋白质在脊椎动物和无脊椎动物两者中对多种细胞类型发挥生物作用。该超家族的成员在图式形成和组织特化的胚胎发育期间发挥重要功能, 可影响各种分化过程, 包括脂肪形成、肌发生、软骨发生、心脏发生、血细胞生成、神经发生和上皮细胞分化。通过操控TGFβ家族成员的活性, 常常可引起生物体的重大生理改变。例如Piedmontese和Belgian Blue牛品种在GDF8 (亦称肌肉生长抑制素) 基因中携带引起肌肉质量明显增加的功能缺失突变。Grobet等, *Nat Genet.* 1997, 17(1):71-4。类似地, 在人中, GDF8的无活性等位基因与肌肉质量增加和据报道的异常强度有关。Schuelke等, *N Engl J Med* 2004, 350:2682-8。

[0046] TGF-β信号受I型 (例如TβRI) 和II型 (例如TβRII) 丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异聚复合体介导, 所述受体在配体刺激时使下游SMAD蛋白磷酸化并激活下游SMAD蛋白 (Massagué, 2000, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178)。这些I型和II型受体是跨膜蛋白, 由具有富半胱氨酸区的配体结合胞外域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸特异性的胞质结构域组成。I型受体是信号转导所必需的; II型受体是结合配体和表达I型受体所必需的。I型和II型受体在配体结合后形成稳定的复合体, 导致I型受体被II型受体磷酸化。TGFβ具有3种哺乳动物同种型TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3, 各自在体内具有截然不同的功能。TGFβ与TβRII的结合是引发导致SMAD2磷酸化的TGFβ信号转导途径活化和活化SMAD2/SMAD4复合体转运至核中以调节基因表达的关键步骤。

[0047] 生长分化因子15 (GDF15) 是TGFβ家族的成员。与含有特有的半胱氨酸结基序的TGFβ超家族的其它配体一样, 合成具有较大前域(prodomain)的成熟的GDF15 (Harrison等, *Growth Factors* 29:174, 2011; Shi等, *Nature* 474:343, 2011), 该前域通过在典型的RXXR位点被弗林蛋白酶样蛋白酶切割除去以产生成熟的二聚GDF15。GDF15在文献中被描述为巨噬细胞抑制细胞因子-1 (MIC-1)、胎盘骨形态发生蛋白(PLAB)、胎盘转化生长因子β (PTGFβ)、前列腺衍生因子(PDF)和非甾体抗炎激活基因-1 (NAG-1), 反映了这种蛋白质所隐含的不同功能。GDF15与几种生理和病理情况有关。例如, GDF15在胎盘中高表达, 并且是维持妊娠所必需的。GDF15浓度还在患有前列腺癌、结肠直肠癌或胰腺癌以及神经胶质瘤的患者血清中明显增加。未表明GDF15在生物化学上直接与任何受体结合或相互作用。本公开内容部分涉及TGFβ II型受体TβRII以高亲和力与GDF15结合且是GDF15的功能受体的发现。本文证实TβRII融合多肽和含有TβRII的配体结合部分的其它多肽抑制GDF15诱导的基因活化。GDF15信号转导的有效抑制提供TβRII是GDF15的功能II型受体的证据, 开启了用于在该信号转导途径中的治疗性干预的新手段。因此, 在某种程度上, 本公开内容鉴定了GDF15多肽的生理学的高亲和力受体。

[0048] 出乎意料的是, 本文表明可溶性TβRII多肽对GDF15具有高特异性、高亲和力结合。TβRII是已知的TGFβ的II型受体, 并以高亲和力与TGFβ1和TGFβ3结合。人TβRII以通过胞外域(ECD)的可变剪接产生的至少2种同种型(A (长)和B (短))天然存在(图6和5和SEQ ID NO: 6和5)。长同种型具有25个氨基酸插入, 剪接过程引起侧接短同种型的插入位点的缬氨酸被长同种型中的异亮氨酸置换。可溶性受体胞外域可起清除剂或配体陷阱(ligand trap)的作用以抑制配体-受体相互作用。配体陷阱(例如掺入天然TβRII胞外结构域(胞外

域)的可溶性TBR11-Fc融合蛋白)可起针对TBR11配体(包括TGF β 1、TGF β 3和根据本文公开的研究结果GDF15)的泛抑制剂(pan-inhibitor)的作用。虽然在一些治疗背景下,这种较广泛的配体结合和信号抑制可能是有利的,但在其它背景下,更大选择性的分子可能较好。十分需要显示选择性配体结合特征的配体陷阱,例如TBR11胞外域多肽。本公开内容涉及以下出乎意料的发现,即包含TBR11的胞外域的截短部分和/或胞外域内的突变的多肽对由GDF15、TGF β 1或TGF β 3引起的细胞信号转导具有不同的抑制作用。在某种程度上,本公开内容提供由TBR11胞外域的一系列突变和/或截短产生、显示完全不同于天然TBR11胞外域的不同的配体结合特征的配体陷阱。本文公开的变体TBR11多肽提供相对于天然全长胞外域的有利性质,并且体内可用于选择性地抑制由不同TBR11配体介导的途径。

[0049] 因此,在某些方面,本公开内容提供TBR11多肽作为GDF15、TGF β 1或TGF β 3的拮抗剂用于治疗各种GDF15-、TGF β 1-或TGF β 3-相关病症。虽然不希望受任何特殊作用机制的束缚,但预期所述多肽通过与GDF15、TGF β 1或TGF β 3结合并抑制这些配体形成三元信号转导复合体的能力起作用。

[0050] 用于本说明书的术语一般具有其在本领域、在本发明背景内和在使用各术语的特定背景下的普通含义。下面或本说明书的其它部分论述了某些术语,以在描述本发明的组合物和方法以及如何制备和使用它们时对实施者提供额外指导。从使用术语的特定背景来看,术语的任何应用的范围或含义都将是显而易见的。

[0051] 2. TBR11多肽

天然存在的TBR11蛋白是跨膜蛋白,其中蛋白质的一部分位于细胞外(胞外部分),蛋白质的一部分位于细胞内(胞内部分)。本公开内容的方面包括包含TBR11的胞外域内的突变和/或胞外域的截短部分的变体TBR11多肽。如上所述,人TBR11以通过胞外域(ECD)的可变剪接产生的至少2种同种型(A(长)和B(短))天然存在(图6和5和SEQ ID NO: 6和5)。相当于SEQ ID NO: 5的残基23-159的SEQ ID NO: 7,表示TBR11的短同种型天然全长胞外域。相当于SEQ ID NO: 6的残基23-184的SEQ ID NO: 13,表示TBR11长同种型的天然全长胞外域。除非另有说明,否则有关基于TBR11短和长同种型的变体的氨基酸位置编号分别是指天然前体SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6的相应位置。

[0052] 在某些实施方案中,本公开内容提供变体TBR11多肽。本公开内容的TBR11多肽可结合并抑制TGF β 超家族成员的功能,所述成员例如但不限于GDF15、TGF β 1或TGF β 3。TBR11多肽可包括由与天然存在的TBR11多肽的截短的ECD结构域(其C端出现在SEQ ID NO: 5的氨基酸153-159的任一个上)有至少80%同一性、任选至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列组成或包含所述氨基酸序列的多肽。TBR11多肽可包括由与天然存在的TBR11多肽的截短的ECD结构域(其C端出现在SEQ ID NO: 6的氨基酸178-184的任一个处)有至少80%同一性、任选至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列组成或包含所述氨基酸序列的多肽。任选TBR11多肽不包括来自SEQ ID NO: 5的氨基酸160-567组成的序列或来自SEQ ID NO: 6的氨基酸185-592组成的序列的大于5个连续氨基酸或大于10、20、30、40、50、52、60、70、80、90、100、150或200或更多个连续氨基酸。未加工的TBR11多肽可包括或不包括任何信号序列以及信号序列N端的任何序列。如本文所述,成熟的(加工的) TBR11多肽的N端可出现在SEQ ID NO: 5的氨基酸23-35或SEQ ID NO: 6的23-60的任一个处。成熟TBR11多肽的实例包括但不限于SEQ ID NO: 5的氨基酸23-159

(SEQ ID NO: 7所示)、SEQ ID NO: 5的氨基酸29-159 (SEQ ID NO: 9所示)、SEQ ID NO: 5的氨基酸35-159 (SEQ ID NO: 10所示)、SEQ ID NO: 5的氨基酸23-153 (SEQ ID NO: 11所示)、SEQ ID NO: 5的氨基酸29-153 (SEQ ID NO: 48所示)、SEQ ID NO: 5的氨基酸35-153 (SEQ ID NO: 47所示)、SEQ ID NO: 6的氨基酸23-184 (SEQ ID NO: 13所示)、SEQ ID NO: 6的氨基酸29-184 (SEQ ID NO: 15所示)、SEQ ID NO: 6的氨基酸60-184 (SEQ ID NO: 10所示)、SEQ ID NO: 6的氨基酸23-178 (SEQ ID NO: 16所示)、SEQ ID NO: 6的氨基酸29-178 (SEQ ID NO: 49所示)和SEQ ID NO: 6的氨基酸60-178 (SEQ ID NO: 47所示)。同样地,TBRII多肽可包含由SEQ ID NO: 30的核苷酸73-465、SEQ ID NO: 34的核苷酸73-447、SEQ ID NO: 38的核苷酸73-465、SEQ ID NO: 38的核苷酸91-465或SEQ ID NO: 38的核苷酸109-465或其沉默变体或在严格杂交条件(所述条件通常是本领域已知的,但可例如包括在50% v/v甲酰胺、5x SSC、2% w/v封闭剂、0.1% N-月桂酰肌氨酸和0.3% SDS中在65°C下杂交过夜,并在例如5x SSC中在约65°C下洗涤)下与其互补序列杂交的核酸编码的多肽。本领域技术人员应了解,基于TBRII的长同种型的相应变体可包括编码25个氨基酸插入以及插入的C端的侧翼位置处的保守Val-Ile取代的核苷酸序列。TBRII多肽因此可包括分离的TBRII多肽的胞外部分,包括短和长同种型两者、其变体(包括例如在相当于SEQ ID NO: 5的氨基酸23-159或SEQ ID NO: 6的氨基酸23-184的序列中包含不大于2、3、4、5、10、15、20、25、30或35个氨基酸取代的变体)、其片段和包含前述的任一个的融合蛋白,但在各种情况下,优选前述TBRII多肽的任一个将保持对GDF15、TGFβ1或TGFβ3中的至少一种的基本亲和力。一般而言,可将TBRII多肽设计为在生物学相关温度、pH水平和摩尔渗透压浓度下可溶于水溶液中。

[0053] 在一些实施方案中,本公开内容的变体TBRII多肽包含胞外域中赋予改变的配体结合特征的一个或多个突变。TBRII多肽可在氨基酸序列中包括相对于天然存在的TBRII多肽的相应部分的1、2、5个或更多个变化。在一些实施方案中,突变导致相当于SEQ ID NO: 5的70位的位置处的取代、插入或缺失。在一些实施方案中,突变导致相当于SEQ ID NO: 5的110位的位置处的取代、插入或缺失。实例包括但不限于分别相当于SEQ ID NO: 5的70和110位的位置处的N至D取代或D至K取代。所述变体TBRII多肽的实例包括但不限于SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 17所示序列。TBRII多肽可包含由SEQ ID NO: 26的核苷酸73-483、SEQ ID NO: 42的核苷酸73-465或其沉默变体或在严格杂交条件下与其互补序列杂交的核酸编码的多肽或其部分。

[0054] 在一些实施方案中,本公开内容的变体TBRII多肽还包含位于人TBRII ECD的C端附近的谷氨酸残基对(SEQ ID NO: 5的151和152位或SEQ ID NO: 6的176和177位)之间的36个氨基酸(SEQ ID NO: 18)的插入,如天然存在于人TBRII同种型C中的一样(Konrad等, BMC Genomics 8:318,2007)。

[0055] 本公开内容进一步证实可对TBRII多肽进行修饰以选择性地拮抗TBRII配体。此处提供的数据表明,包含TBRII多肽的较短的N端和C端截短的变体的Fc融合蛋白显示对通过GDF15、TGFβ1和TGFβ3介导的细胞信号转导的不同的抑制作用。具体地说,发现与TBRII短同种型的全长胞外域相比,始于SEQ ID NO: 5的氨基酸29或35并分别携带胞外域的6或12个氨基酸N端截短的N端截短变体最有效地抑制GDF15,最不有效地抑制TGFβ3,而抑制TGFβ1至中等程度。止于SEQ ID NO: 5的氨基酸153并携带胞外域的6个氨基酸C端截短的C端截短变

体对配体结合没有实质作用,因此可与全长形式互换使用。发现相当于SEQ ID NO: 5的70位的位置处的N至D取代有效抑制TGFβ3、对GDF15具有中等作用,并对TGFβ1具有可忽略的作用。N70残基表示可能的糖基化位点。此外,发现与TβRII短同种型的全长胞外域相比,包含相当于SEQ ID NO: 5的110位的位置处的D至K取代的Fc融合蛋白最有效地抑制GDF15、最不适地抑制TGFβ1、抑制TGFβ3至中等程度。110位附近的区域与已知的TβRII配体TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3的选择性无关。因此,料想不到的是,预期含有ECD的突变例如但不限于N70D和D110K(残基的编号相当于SEQ ID NO: 5的编号)和/或始于氨基酸29和35之间和/或止于氨基酸153和氨基酸159之间的TβRII多肽均有活性,并且对于不同的配体均显示大不相同的抑制效能。可能需要使用这些截短变体形式的任一个,这取决于临床或实验背景。

[0056] 在某些实施方案中,TβRII多肽与GDF15结合,且TβRII多肽不显示与TGFβ1或TGFβ3实质结合。在某些实施方案中,TβRII多肽与TGFβ1结合,且TβRII多肽不显示与GDF15或TGFβ3实质结合。在某些实施方案中,TβRII多肽与TGFβ3结合,且TβRII多肽不显示与GDF15或TGFβ1实质结合。可在溶液中或在表面等离子体共振系统(例如Biacore™系统)中使用纯化的蛋白质评价结合。

[0057] 在某些实施方案中,TβRII多肽抑制GDF15细胞信号转导,且TβRII多肽对TGFβ1或TGFβ3具有中等或有限的抑制作用。在某些实施方案中,TβRII多肽抑制TGFβ1细胞信号转导,TβRII多肽对GDF15或TGFβ3具有中等或有限的抑制作用。在某些实施方案中,TβRII多肽抑制TGFβ3细胞信号转导,且TβRII多肽对GDF15或TGFβ1具有中等或有限的抑制作用。对细胞信号转导的抑制作用可通过本领域已知方法评价。

[0058] 总之,TβRII多肽的活性部分可包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列23-153、23-154、23-155、23-156、23-157或23-158,以及始于SEQ ID NO: 5的氨基酸24-35的任一个的这些序列的变体。同样地,TβRII多肽的活性部分可包含SEQ ID NO: 6的氨基酸序列23-178、23-179、23-180、23-181、23-182或23-183以及始于SEQ ID NO: 6的氨基酸24-60的任一个的这些序列的变体。示例性的TβRII多肽包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列29-159、35-159、23-153、29-153和35-153或SEQ ID NO: 6的氨基酸序列29-184、60-184、23-178、29-178和60-178。还考虑了这些范围内的变体,特别是与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6的相应部分有至少80%、85%、90%、95%或99%同一性的变体。可选择不包括由SEQ ID NO: 5的氨基酸160-567或SEQ ID NO: 6的氨基酸185-592组成的序列的TβRII多肽。

[0059] 如上所述,本公开内容提供与天然存在的TβRII多肽共有规定程度的序列同一性或相似性的TβRII多肽。为了测定2个氨基酸序列的百分比同一性,对序列进行比对用于最佳比较目的(例如,可在第一和第二氨基酸或核酸序列的一个或两个中引入空位用于最佳比对,并可忽略非同源序列用于比较目的)。然后比较相应氨基酸位置处的氨基酸残基。当第一序列的一个位置被与第二序列的相应位置相同的氨基酸残基占据时,则在该位置处的分子是相同的(本文所用氨基酸“同一性”等同于氨基酸“同源性”)。考虑需要引入用于2个序列的最佳比对的空位的数目和各空位的长度,2个序列间的百分比同一性是序列所共有的相同位置数的函数。

[0060] 序列的比较和2个序列的百分比同一性和相似性的测定可应用数学算法完成(Computational Molecular Biology, Lesk, A. M.编辑, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W.编

辑, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M.和Griffin, H. G.编辑, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 以及Sequence Analysis Primer, Gribskov, M.和Devereux, J.编辑, M Stockton Press, New York, 1991)。

[0061] 在一个实施方案中,应用整合到GCG软件包的GAP程序(可获自<http://www.gcg.com>)中的Needleman和Wunsch (J Mol. Biol. (48):444-453 (1970))算法,测定2个氨基酸序列间的百分比同一性。在一个具体的实施方案中,在GAP程序中使用下列参数:Blosum 62矩阵或PAM250矩阵,16、14、12、10、8、6或4的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重。在又一个实施方案中,2个核苷酸序列间的百分比同一性应用GCG软件包的GAP程序测定(Devereux, J.等, Nucleic Acids Res. 12(1):387 (1984)) (可获自<http://www.gcg.com>)。示例性的参数包括使用NWSgapdna.CMP矩阵和40、50、60、70或80的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重。除非另有说明,否则2个氨基酸序列间的百分比同一性使用Blosum 62矩阵、10的空位权重和3的长度权重,应用GAP程序测定,并且如果所述算法无法计算所需的百分比同一性,则应选择本文公开的合适的备选方法。

[0062] 在另一个实施方案中,应用整合到ALIGN程序(2.0版)中的E. Myers和W. Miller的算法(CABIOS, 4:11-17 (1989)),使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分,测定2个氨基酸序列间的百分比同一性。

[0063] 测定2个氨基酸序列间的最佳总体比对的另一个实施方案可应用基于Brutlag等(Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990))的算法的FASTDB计算机程序测定。在序列比对中,查询序列和主题序列均为氨基酸序列。所述全局序列比对的结果以百分比同一性为单位提供。在一个实施方案中,氨基酸序列同一性应用基于Brutlag等(Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990))的算法的FASTDB计算机程序进行。在一个具体的实施方案中,用于计算氨基酸比对的百分比同一性和相似性的参数包括:矩阵=PAM 150,k-元组=2,错配罚分=1,连接罚分(Joining Penalty)=20,随机组长度(Randomization Group Length)=0,截止点分数=1,空位罚分=5和空位大小罚分=0.05。

[0064] TBRII多肽可另包括N端处的不同前导序列的任一个。所述序列可允许肽表达并靶向真核系统中的分泌途径。参见例如Ernst等,美国专利号5,082,783 (1992)。或者,可使用天然TBRII信号序列以实现从细胞中排出。可能的前导序列包括天然前导序列、组织纤溶酶原激活物(TPA)和蜜蜂蜂毒肽(分别为SEQ ID NO. 22-24)。掺入TPA前导序列的TBRII-Fc融合蛋白的实例包括SEQ ID NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41和43。信号肽的加工可随所选择的前导序列、所用细胞类型和培养条件连同其它变量而变化,因此成熟的TBRII多肽的实际N端起始位点可在N端或C端方向移动1、2、3、4或5个氨基酸。TBRII-Fc融合蛋白的实例包括SEQ NO: 25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62,如本文下划线标示的TBRII多肽部分所示(参见实施例)。本领域技术人员应了解,基于TBRII的长同种型的相应变体可包括25个氨基酸插入以及插入的C端的侧翼位置处的保守Val-Ile取代。

[0065] 在某些实施方案中,本公开内容考虑TBRII多肽的特定突变以改变多肽的糖基化。可选择这类突变,使得引入或剔除一个或多个糖基化位点,例如O-联糖基化位点或N-联糖

基化位点。天冬酰胺连接的糖基化识别位点一般包含被合适的细胞糖基化酶特异性识别的三肽序列,即天冬酰胺-X-苏氨酸(或天冬酰胺-X-丝氨酸)(其中“X”为任何氨基酸)。还可通过添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基至野生型TBRII多肽的序列,或者用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代野生型TBRII多肽的序列,来进行改变(对于O-联糖基化位点)。在糖基化识别位点第一或第三氨基酸位置的一个或两个上的各种氨基酸取代或缺失(和/或在第二位置上的氨基酸缺失)在修饰三肽序列上导致非糖基化。在TBRII多肽上增加糖部分的数目的另一种方法是将糖苷与TBRII多肽化学偶联或酶促偶联。根据所采用的偶联方式,可将糖连接至:(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离羧基;(c)游离巯基,例如半胱氨酸的巯基;(d)游离羟基,例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的羟基;(e)芳族残基,例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳族残基;或(f)谷氨酰胺的酰胺基。这些方法参见1987年9月11日公布的WO 87/05330以及Aplin和Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 第259-306页,通过引用结合到本文中。可用化学方法和/或酶方法实现TBRII多肽上存在的一个或多个糖部分的脱去。化学去糖基化可包括例如将TBRII多肽暴露于化合物三氟甲烷磺酸或等同化合物中。这种处理导致除连接糖(N-乙酰氨基葡萄糖或N-乙酰半乳糖胺)以外的大部分或所有糖被切割,同时保持氨基酸序列完整。化学去糖基化另参见Hakimuddin等(1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52和Edge等(1981) Anal. Biochem. 118:131。可按Thotakura等(1987) Meth. Enzymol. 138:350所述,通过使用各种内切糖苷酶和外切糖苷酶完成TBRII多肽上的糖部分的酶促切割。适当时,可根据所采用的表达系统类型,调整TBRII多肽的序列,因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞均可引入可受所述肽的氨基酸序列影响的不同糖基化模式。一般而言,用于人的TBRII多肽可在提供适当糖基化的哺乳动物细胞系(例如HEK293或CHO细胞系)中表达,虽然预期其它哺乳动物表达细胞系、具有工程改造的糖基化酶的酵母细胞系以及昆虫细胞也是有用的。

[0066] 本公开内容还考虑产生突变体、特别是数套TBRII多肽的组合突变体以及截短突变体的方法;组合突变体库尤其可用于鉴定功能变体序列。筛选这类组合文库的目的可以是产生例如可用作激动剂或拮抗剂或者总之具有新活性的TBRII多肽变体。下面提供各种筛选测定法,这类测定法可用来评价变体。例如,可针对与TBRII配体结合的能力筛选TBRII多肽变体,以防止TBRII配体与TBRII多肽结合或干扰由TBRII配体引起的信号转导。还可在基于细胞的测定法或体内测定法中,特别是实施例公开的任何测定法中,测试TBRII多肽或其变体的活性。

[0067] 可以产生相对于包含天然存在的TBRII多肽的胞外域的TBRII多肽具有选择性或通常提高的效能的组合来源的变体。同样地,诱变可引起血清半寿期显著不同于相应的野生型TBRII多肽的变体。例如,可使改变的蛋白质对蛋白水解降解或导致天然TBRII多肽破坏或以别的方式消除或失活的其它过程更稳定或更不稳定。可使用这类变体和编码变体的基因,通过调节TBRII多肽的半寿期来改变TBRII多肽水平。例如,短的半寿期可引起较短暂的生物作用,并可允许较严格地控制患者内的重组TBRII多肽水平。在Fc融合蛋白中,可在接头(如有的话)和/或Fc部分中进行突变以改变蛋白质的半寿期。

[0068] 可通过编码多肽文库的基因的简并文库产生组合文库,所述多肽各自包含可能的TBRII多肽序列的至少一部分。例如,可以酶的方法将合成寡核苷酸的混合物与基因序列连接,使得可能的TBRII多肽核苷酸序列的简并组可作为个别多肽表达,或者作为一组较大的

融合蛋白表达(例如用于噬菌体展示)。

[0069] 存在许多可从简并寡核苷酸序列产生可能的TBRII多肽变体的文库的方法。简并基因序列的化学合成可在自动DNA合成仪中进行,合成基因然后与用于表达的合适载体连接。简并寡核苷酸的合成是本领域众所周知的(参见例如Narang,SA (1983) *Tetrahedron* 39:3;Itakura等(1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, 主编AG Walton,Amsterdam: Elsevier, 第273-289页;Itakura等(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323;Itakura等(1984) *Science* 198:1056;Ike等(1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477)。这类技术已应用于其它蛋白质的定向进化中(参见例如Scott等(1990) *Science* 249:386-390;Roberts等(1992) *PNAS USA* 89:2429-2433;Devlin等(1990) *Science* 249:404-406;Cwirla等(1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382;以及美国专利号5,223,409、5,198,346和5,096,815)。

[0070] 或者,可利用其它诱变形式产生组合文库。例如,可采用以下诱变,通过筛选从文库中产生和分离TBRII多肽变体:例如丙氨酸扫描诱变等(Ruf等(1994) *Biochemistry* 33: 1565-1572;Wang等(1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099;Balint等(1993) *Gene* 137: 109-118;Grodberg等(1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601;Nagashima等(1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892;Lowman等(1991) *Biochemistry* 30:10832-10838;以及Cunningham等(1989) *Science* 244:1081-1085);通过接头扫描诱变(Gustin等(1993) *Virology* 193:653-660;Brown等(1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652;McKnight等(1982) *Science* 232:316);通过饱和诱变(Meyers等(1986) *Science* 232:613);通过PCR诱变(Leung等(1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19);或者通过随机诱变,包括化学诱变等(Miller等(1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY;以及Greener等(1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34)。接头扫描诱变,特别在组合背景下,是用于鉴定截短(生物活性)形式的TBRII多肽的有吸引力的方法。

[0071] 本领域已知用于筛选通过点突变和截短制备的组合文库的基因产物和在这方面筛选具有某种性质的基因产物的cDNA文库的各种技术。这类技术一般可适用于快速筛选由TBRII多肽的组合诱变所产生的基因文库。最广泛采用的筛选大型基因文库的技术通常包括将基因文库克隆至可复制的表达载体中,用所得载体文库转化合适的细胞,并在其中所需活性的检测有利于相对容易地分离编码其产物被检测的基因的载体的条件下,表达组合基因。优选的测定法包括TBRII配体结合测定法和配体介导的细胞信号转导测定法。

[0072] 在某些实施方案中,除天然存在于TBRII多肽中的任何修饰以外,本公开内容的TBRII多肽还可包含翻译后修饰。这类修饰包括但不限于乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化、聚乙二醇化(聚乙二醇)和酰化。因此,修饰的TBRII多肽可含有非氨基酸成分,例如聚乙二醇、脂质、单糖或多糖和磷酸酯。可按本文有关其它TBRII多肽变体方面所述,测试这类非氨基酸成分对TBRII多肽的功能性的作用。如果TBRII多肽在细胞中通过切割TBRII多肽的新生形式产生,则翻译后加工对于蛋白质的正确折叠和/或功能也可能十分重要。对于这类翻译后活性,不同的细胞(例如CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)具有特殊的细胞机器和特有机制,可选择不同的细胞以确保TBRII多肽的正确修饰和加工。

[0073] 在某些方面,TBRII多肽的功能变体或修饰形式包括具有TBRII多肽的至少一部分

和一个或多个融合结构域的融合蛋白。这类融合结构域的众所周知的实例包括但不限于聚组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S转移酶(GST)、硫氧还蛋白、A蛋白、G蛋白、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。可选择融合结构域以提供所需要的性质。例如,一些融合结构域特别可用于通过亲和层析法分离融合蛋白。为了亲和纯化的目的,使用用于亲和层析法的相关基质,例如谷胱甘肽缀合树脂、淀粉酶缀合树脂和镍缀合树脂或钴缀合树脂。这类基质的许多种可以“试剂盒”形式获得,例如Pharmacia GST纯化系统和可与(HIS₆)融合配偶体一起使用的QIAexpress™系统(Qiagen)。作为另一个实例,可选择融合结构域以促进TBRII多肽的检测。这类检测结构域的实例包括各种荧光蛋白(例如GFP)以及“表位标签”,其通常是短肽序列,可获得其特异性抗体。易获得其特异性单克隆抗体的众所周知的表位标签包括FLAG、流感病毒血凝素(HA)和c-myc标签。在一些情况下,融合结构域具有蛋白酶切割位点(例如因子Xa或凝血酶的切割位点),其允许相关蛋白酶部分消化融合蛋白,从而从中释放重组蛋白。然后,可通过随后的层析分离,从融合结构域分离出释放的蛋白质。在某些优选的实施方案中,TBRII多肽与体内稳定TBRII多肽的结构域(“稳定剂”结构域)融合。所谓“稳定”意指延长血清半寿期的任何事物,不论这是否是因为破坏减少、肾清除率降低或其它药代动力学作用。已知与免疫球蛋白的Fc部分的融合物赋予多种蛋白质所需要的药代动力学性质。同样,与人血清白蛋白的融合物可赋予所需要的性质。可选择的融合结构域的其它类型包括多聚化(例如二聚化、四聚化)结构域和功能结构域。

[0074] 作为具体实例,本公开内容提供包含与3个Fc结构域序列之一(例如SEQ ID NO: 19、20和21)融合的TBRII多肽的变体的融合蛋白。任选Fc结构域在例如Asp-265、Lys-322和Asn-434等残基(按照相应的全长IgG编码)处具有一个或多个突变。在某些情况下,相对于野生型Fc结构域,具有这些突变的一个或多个(例如Asp-265突变)的突变型Fc结构域与Fc γ 受体结合的能力降低。在其它情况下,相对于野生型Fc结构域,具有这些突变的一个或多个(例如Asn-434突变)的突变型Fc结构域与MHC I类相关Fc-受体(FcRN)结合的能力提高。

[0075] 要了解,融合蛋白的不同成分可以与所需功能性一致的任何方式排列。例如,可将TBRII多肽置于异源结构域的C端,或者,可将异源结构域置于TBRII多肽的C端。TBRII多肽结构域和异源结构域在融合蛋白中不必邻接,并且任一结构域的C端或N端或在结构域之间可包括其它结构域或氨基酸序列。

[0076] 本文所用术语“免疫球蛋白Fc结构域”或简称“Fc”要理解为是指免疫球蛋白链恒定区、优选免疫球蛋白重链恒定区的羧基端部分或其部分。例如,免疫球蛋白Fc区可包含1) CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域,2) CH1结构域和CH2结构域,3) CH1结构域和CH3结构域,4) CH2结构域和CH3结构域,或5)两个或更多个结构域和免疫球蛋白铰链区的组合。在一个优选的实施方案中,免疫球蛋白Fc区包含至少免疫球蛋白铰链区CH2结构域和CH3结构域,并优选缺乏CH1结构域。

[0077] 在一个实施方案中,重链恒定区来源于其中的免疫球蛋白类别为IgG (Ig γ) (γ 亚类1、2、3或4)。可使用免疫球蛋白的其它类别IgA (Ig α)、IgD (Ig δ)、IgE (Ig ϵ)和IgM (Ig μ)。合适免疫球蛋白重链恒定区的选择详细论述于美国专利号5,541,087和5,726,044。为获得特定结果的来自某些免疫球蛋白类别和亚类的特定的免疫球蛋白重链恒定区序列的选择被视为在本领域的技术水平内。编码免疫球蛋白Fc区的DNA构建体的部分优选包含铰链结构域的至少一部分,优选Fc γ 的CH₃结构域或IgA、IgD、IgE或IgM任一种的同源结构

域的至少一部分。

[0078] 此外,预期免疫球蛋白重链恒定区内氨基酸的取代或缺失可用于实施本文公开的方法和组合物。一个实例可为将氨基酸取代引入上部CH2区以产生对Fc受体的亲和力降低的Fc变体(Cole等(1997) J. Immunol. 159:3613)。

[0079] 在某些实施方案中,本公开内容可获得TBRII多肽的分离和/或纯化形式,其自其它蛋白质和/或其它TBRII多肽类分离或以别的方式基本不含(例如至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%没有)其它蛋白质和/或其它TBRII多肽类。TBRII多肽一般可通过从重组核酸表达来产生。

[0080] 在某些实施方案中,本公开内容包括包含TBRII蛋白胞外部分的编码序列的编码可溶性TBRII多肽的核酸。在进一步的实施方案中,本公开内容还涉及包含这类核酸的宿主细胞。宿主细胞可以是任何原核细胞或真核细胞。例如,本公开内容的多肽可在细菌细胞(例如大肠杆菌(*E. coli*))、昆虫细胞(例如使用状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达。其它合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。因此,本公开内容的一些实施方案还涉及产生TBRII多肽的方法。

[0081] 3. 编码TBRII多肽的核酸

在某些方面,本公开内容提供编码本文公开的TBRII多肽(包括片段、功能变体和融合蛋白)的任一种的分离核酸和/或重组核酸。SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、36、38、40、42和44编码与IgG2 Fc或N端截短IgG1 Fc结构域融合的TBRII胞外域的变体。主题核酸可为单链或双链的。这类核酸可以是DNA或RNA分子。这些核酸可用于例如用于制备TBRII多肽的方法中或可用作直接的治疗剂(例如在反义物、RNAi或基因疗法方法中)。

[0082] 在某些方面,要进一步了解,编码TBRII多肽的主题核酸包括作为SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、36、38、40、42和44的变体的核酸。变体核苷酸序列包括因一个或多个核苷酸取代、添加或缺失而不同的序列,例如等位基因变体。

[0083] 在某些实施方案中,本公开内容提供与SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、36、38、40、42和44有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的分离核酸序列或重组核酸序列。本领域普通技术人员应认识到,与SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、36、38、40、42和44互补的核酸序列和SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、36、38、40、42和44的变体也落入本公开内容的范围内。在其它实施方案中,本公开内容的核酸序列可以是分离的、重组的和/或与异源核苷酸序列融合或在DNA文库中。

[0084] 在其它实施方案中,本公开内容的核酸还包括在高严格条件下与SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、36、38、40、42和44中规定的核苷酸序列或SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、36、38、40、42和44的互补序列或其片段杂交的核苷酸序列。如上所述,本领域普通技术人员容易了解,可以改变促进DNA杂交的合适的严格性条件。例如,可在6.0 x 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)下于约45℃进行杂交,接着2.0 x SSC于50℃洗涤。例如,可从约2.0 x SSC于50℃的低严格性到约0.2 x SSC于50℃的高严格性,选择洗涤步骤的盐浓度。另外,可从室温(约22℃)下的低严格性条件提高洗涤步骤的温度到约65℃下的高严格性条件。温度和盐两者均可改变,或者可保持温度或盐浓度恒定,而改变另一个变量。在一些实施方案中,本公开内容提供在6 x SSC于室温的低严格性条件下杂交接着2 x SSC于室温洗涤的核酸。

[0085] 由于遗传密码的简并性所致不同于SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、36、38、40、42和

44所示核酸的分离核酸也在本公开内容的范围内。例如,多种氨基酸用不只一个三联体指定。指定同一氨基酸的密码子或同义密码子(例如CAU和CAC是组氨酸的同义密码子),可导致不影响蛋白质的氨基酸序列的“沉默”突变。然而,预期在哺乳动物细胞中可存在确实引起主题蛋白质氨基酸序列改变的DNA序列多态性。本领域技术人员认识到,由于天然等位基因变化所致,在给定物种的个体之间,这些变化可存在编码特定蛋白质的核酸的一个或多个核苷酸(多至约3-5%的核苷酸)中。任何和所有这类核苷酸变化和所得氨基酸多态性也在本公开内容的范围内。

[0086] 本领域技术人员应认识到,基于TBRII的长同种型的相应变体可包括编码25个氨基酸插入以及插入C端的侧翼位置处的保守Val-Ile取代的核苷酸序列。还应认识到,基于TBRII的长(A)或短(B)同种型的相应变体可包括包含在天然存在的TBRII同种型C所述相同位置处编码36个氨基酸插入(SEQ ID NO: 18)的108个核苷酸的插入的变体核苷酸序列(参见实例)。

[0087] 在某些实施方案中,在表达构建体中,本公开内容的重组核酸可与一个或多个调节核苷酸序列有效连接。调节核苷酸序列一般可适于用于表达的宿主细胞。本领域已知用于各种宿主细胞的合适表达载体和合适调节序列的许多类型。所述一个或多个调节核苷酸序列通常可包括但不限于启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始序列和终止序列、翻译起始序列和终止序列及增强子或激活物序列。本公开内容考虑本领域已知的组成型启动子或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子或将不止一种启动子的元件组合的杂合启动子。表达构建体可存在于细胞的附加体(例如质粒)上,或者表达构建体可插入染色体中。在一个优选的实施方案中,表达载体含有选择标记基因以供转化宿主细胞的选择。选择标记基因是本领域众所周知的,并可随所采用的宿主细胞而改变。

[0088] 在本文公开的某些方面,在包含编码TBRII多肽并与至少一个调节序列有效连接的核苷酸序列的表达载体中提供主题核酸。调节序列是本领域公认的,并被选择来指导表达TBRII多肽。因此,术语调节序列包括启动子、增强子和其它表达调控元件。示例性的调节序列描述于Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)。例如,当与DNA序列有效连接时控制DNA序列表达的各种表达调控序列的任一种,可被用于这些载体以表达编码TBRII多肽的DNA序列。这类有用的表达调控序列包括例如SV40的早期启动子和晚期启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、其表达受T7 RNA聚合酶指导的T7启动子、噬菌体λ的主要操纵基因和启动子区、fd外壳蛋白的调控区、3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶启动子(例如Pho5)、酵母α-交配因子启动子、杆状病毒系统的多角体(polyhedron)启动子和已知控制原核细胞或真核细胞或其病毒的基因表达的其它序列及其各种组合。应当了解,表达载体的设计可取决于以下这类因素,例如待转化的宿主细胞的选择和/或欲表达的蛋白质类型。此外,还应考虑载体拷贝数、控制该拷贝数的能力和由该载体编码的任何其它蛋白质(例如抗生素标记)的表达。

[0089] 可通过将克隆的基因或其部分连接至适于在原核细胞、真核细胞(酵母、禽、昆虫或哺乳动物)或两者中表达的载体中来产生本公开内容所包括的重组核酸。用于产生重组TBRII多肽的表达载体包括质粒和其它载体。例如,合适的载体包括用于在原核细胞(例如大肠杆菌)中表达的以下类型的质粒:pBR322衍生质粒、pEMBL衍生质粒、pEX衍生质粒、pBTac

衍生质粒和pUC衍生质粒。

[0090] 一些哺乳动物表达载体既含有利于载体在细菌中繁殖的原核序列,又含有在真核细胞中表达的一个或多个真核转录单位。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg衍生载体是适于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的实例。这些载体的一些用来源于细菌质粒(例如pBR322)的序列修饰,以利于在原核细胞和真核细胞两者中复制和进行药物抗性选择。或者,可使用诸如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或埃巴病毒(pHEBo、pREP衍生物和p205)等病毒衍生物在真核细胞中瞬时表达蛋白质。其它病毒(包括反转录病毒)表达系统的实例可参见下面基因疗法递送系统的描述。用于质粒制备和宿主生物转化中的各种方法是本领域众所周知的。对于原核和真核细胞两者的其它合适的表达系统以及通用重组方法,参见MolecularCloning A Laboratory Manual, 第3版, 编辑Sambrook, Fritsch和Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。在某些情况下,可能需要通过利用杆状病毒表达系统来表达重组多肽。这类杆状病毒表达系统的实例包括pVL衍生载体(例如pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW衍生载体(例如pAcUW1)和pBlueBac衍生载体(例如含 β -gal的pBlueBac III)。

[0091] 在某些实施方案中,可设计在CHO细胞中产生主题TBRII多肽的载体,例如Pcmv-Script载体(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4载体(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)和pCI-neo载体(Promega, Madison, Wisc.)。在一个优选的实施方案中,可设计在HEK-293细胞中产生主题TBRII多肽的载体。显然,可使用主题基因构建体在于培养基中繁殖的细胞中使主题TBRII多肽表达,例如产生蛋白质(包括融合蛋白或变体蛋白)以便纯化。

[0092] 本公开内容还涉及用包括一个或多个主题TBRII多肽的编码序列(例如SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、36、38、40、42或44)的重组基因转染的宿主细胞。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如,本文公开的TBRII多肽可在细菌细胞(例如大肠杆菌)、昆虫细胞(例如使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达。其它合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0093] 因此,本公开内容进一步涉及产生主题TBRII多肽的方法。例如,可将用编码TBRII多肽的表达载体转染的宿主细胞在允许TBRII多肽表达发生的合适条件下培养。可使TBRII多肽分泌并从细胞和含有TBRII多肽的培养基的混合物中分离出来。或者,可使TBRII多肽保持在胞质或在膜部分中,然后收获、裂解细胞并分离蛋白质。细胞培养物包括宿主细胞和培养基。用于细胞培养的合适培养基是本领域众所周知的。可采用本领域已知的用于纯化蛋白质的技术,包括离子交换层析法、凝胶过滤层析法、超滤法、电泳、使用对TBRII多肽的特定表位有特异性的抗体进行的免疫亲和纯化以及用结合与TBRII多肽融合的结构域的物质进行的亲和纯化(例如A蛋白柱可用来纯化TBRII-Fc融合物),将主题TBRII多肽从细胞培养基、宿主细胞或两者中分离出来。在一个优选的实施方案中,TBRII多肽是含有促进其纯化的结构域的融合蛋白。例如,通过一系列的柱层析步骤达到纯化,所述步骤包括例如任何顺序的下列三种或更多种方法:A蛋白层析法、Q琼脂糖凝胶层析法、苯基琼脂糖凝胶层析法、大小排阻层析法和阳离子交换层析法。纯化可用病毒过滤和缓冲液更换来完成。

[0094] 在另一个实施方案中,编码纯化前导序列(例如重组TBRII多肽的所需部分的N端上的聚-(His)/肠激酶切割位点序列)的融合基因,可允许使用 Ni^{2+} 金属树脂通过亲和层析

法对表达的融合蛋白进行纯化。然后,纯化前导序列随后可通过肠激酶处理除去,得到纯化的TBRII多肽(例如参见Hochuli等(1987) *J. Chromatography* 411:177;以及Janknecht等,PNAS USA 88:8972)。

[0095] 制备融合基因的技术是众所周知的。基本上,编码不同多肽序列的各种DNA片段的连接按照常规技术进行,采用用于连接的平端或交错端,限制性内切酶消化以提供合适末端,适当时补平黏性末端,碱性磷酸酶处理以避免不需要的连接,并进行酶促连接。在另一个实施方案中,融合基因可通过常规技术合成,包括自动DNA合成仪。或者,可使用在两个连续基因片段之间产生互补突出端的锚定引物进行基因片段的PCR扩增,所述基因片段随后可退火得到嵌合基因序列(参见例如Current Protocols in Molecular Biology,编辑Ausubel等,John Wiley & Sons:1992)。

[0096] 作为TBRII、TGF β 1、TGF β 3和GDF15拮抗剂的核酸化合物类别的实例包括反义核酸、RNAi构建体和催化性核酸构建体。核酸化合物可以是单链或双链的。双链化合物还可包括其中链的一条或另一条是单链的突出端区或非互补区。单链化合物可包括自我互补区,意指化合物形成具有双螺旋结构区的所谓“发夹”或“茎-环”结构。核酸化合物可包含以下核苷酸序列,其与由不超过全长TBRII核酸序列或配体核酸序列的1000个、不超过500个、不超过250个、不超过100个或不超过50、35、30、25、22、20或18个核苷酸组成的区域互补。互补区优选为至少8个核苷酸,任选至少10或至少15个核苷酸,例如介于15和25个核苷酸之间。互补区可落入靶转录物的内含子、编码序列或非编码序列中,例如编码序列部分。核酸化合物的长度一般可为约8-约500个核苷酸或碱基对,例如约14-约50个核苷酸。核酸可以是DNA(特别对于用作反义物)、RNA或RNA:DNA杂合体。任一条链可包括DNA和RNA的混合物以及不容易归类为DNA或RNA的修饰形式。同样,双链化合物可以是DNA:DNA、DNA:RNA或RNA:RNA,任一条链还可包括DNA和RNA的混合物,以及不易归类为DNA或RNA的修饰形式。核酸化合物可包括各种修饰的任一种,包括骨架(天然核酸中的糖-磷酸酯部分,包括核苷酸间键)或碱基部分(天然核酸的嘌呤或嘧啶部分)的一种或多种修饰。反义核酸化合物的长度可优选为约15-约30个核苷酸,并且通常含有一种或多种修饰以改进特性,例如在血清、细胞或化合物很可能被递送至的部位(例如在口服递送化合物的情况下为胃,而对吸入化合物而言为肺)中的稳定性。在RNAi构建体的情况下,与靶转录物互补的链一般是RNA或其修饰物。另一条链可以是RNA、DNA或任何其它变异物。双链或单链“发夹”RNAi构建体的双链体部分的长度可优选为18-40个核苷酸,任选长度为约21-23个核苷酸,只要它用作切酶底物即可。催化性核酸或酶促核酸(enzymatic nucleic acid)可以是核酶或DNA酶,并且还可含有修饰形式。当在生理条件下和在其中无义或有义对照几乎没有作用或者没有作用的浓度下与细胞接触时,核酸化合物可抑制靶标表达达约50%、75%、90%或更高。测试核酸化合物的作用的优选浓度为1、5和10微摩尔。也可测试核酸化合物对例如血管生成的作用。

[0097] 4. Fc-融合蛋白的变化

本申请还提供具有改造的Fc区或变体Fc区的TBRII-Fc融合蛋白。这类抗体与Fc融合蛋白可用于例如调节效应子功能,例如依赖抗原的细胞毒性(ADCC)和依赖补体的细胞毒性(CDC)。此外,修饰可改进抗体与Fc融合蛋白的稳定性。通过将合适的核苷酸变化引入DNA或通过肽合成来制备抗体与Fc融合蛋白的氨基酸序列变体。这类变体包括例如本文公开的抗体与Fc融合蛋白的氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或取代。进行缺失、插入和取代

的任何组合以得到最终构建体,条件是最终构建体具有所需特性。氨基酸变化也可改变抗体与Fc融合蛋白的翻译后加工,例如改变糖基化位点的数目或位置。

[0098] 可通过将变化引入氨基酸序列,包括但不限于Bluestone等(参见WO 94/28027和WO 98/47531;另参见Xu等, 2000 Cell Immunol 200;16-26)描述的Ala-Ala突变,来产生效应子功能降低的抗体与Fc融合蛋白。因此,在某些实施方案中,具有恒定区内的突变(包括Ala-Ala突变)的本公开内容的抗体与Fc融合蛋白可用来降低或消除效应子功能。按照这些实施方案,抗体与Fc融合蛋白可包含在234位至丙氨酸的突变或在235位至丙氨酸的突变或其组合。在一个实施方案中,抗体或Fc融合蛋白包含IgG4构架,其中Ala-Ala突变可描述在234位从苯丙氨酸到丙氨酸的突变和/或在235位从亮氨酸到丙氨酸的突变。在另一个实施方案中,抗体或Fc融合蛋白包含IgG1构架,其中Ala-Ala突变可描述在234位从亮氨酸到丙氨酸的突变和/或在235位从亮氨酸到丙氨酸的突变。抗体或Fc融合蛋白可备选或另外携带其它突变,包括CH2结构域的点突变K322A (Hezareh等, 2001 J Virol. 75: 12161-8)。

[0099] 在具体的实施方案中,可对抗体或Fc融合蛋白进行修饰以增强或抑制依赖补体的细胞毒性(CDC)。可通过将一个或多个氨基酸取代、插入或缺失引入Fc区,来实现受调节的CDC活性(参见例如美国专利号6,194,551)。备选或此外,可将半胱氨酸残基引入Fc区,从而允许在该区形成链间二硫键。由此产生的同二聚抗体可具有改进或降低的内化能力和/或增强或减弱的补体介导的细胞杀死。参见Caron等, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)和Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992);W099/51642;Duncan和Winter Nature 322: 738-40 (1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821和W094/29351。

[0100] 5. GDF15-TBRII信号转导

本公开内容部分涉及TGFB II型受体(TBRII)以高亲和力与GDF15结合的发现。迄今为止,未表明GDF15在生物化学上直接与受体结合或相互作用。不充分或不适当的配体纯化可能是市购可获得的GDF15失活的可能原因。本文公开了证实TBRII结合活性的示例性GDF15多肽和制备和纯化这类多肽的方法。来自人和小鼠的天然前体GDF15蛋白和核苷酸的序列见图1-4。成熟的人GDF15从SEQ ID NO: 1的残基197延伸至308。同样地,成熟的小鼠GDF15从SEQ ID NO: 3的残基192延伸至303。在某些实施方案中,本公开内容使得可获得从其它蛋白质和/或其它GDF15多肽类分离或以别的方式基本不含(例如至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%没有)其它蛋白质和/或其它GDF15多肽类的GDF15多肽或其片段的分离和/或纯化形式。本公开内容的GDF15多肽以高亲和力与TBRII结合。可在溶液中或在表面等离子体共振系统(例如Biacore™系统)中,使用纯化的蛋白质评价结合。对于TBRII多肽,GDF15多肽可具有约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} M或更小的亲和力(解离常数)。优选按照本文所述方法分离和纯化本公开内容的GDF15多肽。GDF15多肽一般通过从重组核酸表达来产生。

[0101] GDF15多肽可包括由与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3的GDF15多肽有至少80%同一性、任选至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列组成或包含所述氨基酸序列的多肽或其功能片段。GDF15多肽可包括由与包含SEQ ID NO: 1的残基197-308或SEQ ID NO: 3的残基192-303的GDF15多肽有至少80%同一性、任选至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列组成或包含所述氨基酸序列的多肽或其功能片段。未加工的GDF15多肽可包括或不包括任何信号序列以及信号序列N端的任何序列。

GDF15多肽可包括SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3或其分别相当于SEQ ID NO: 1的197-308或SEQ ID NO: 3的残基19-303的部分的变体(包括在SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3的序列中包含例如不大于2、3、4、5、10、15、20、25、30或35个氨基酸取代的变体)、其片段和包含前述的任一个的融合蛋白,但在各种情况下,优选前述GDF15多肽的任一个对TBRII多肽可具有基本亲和力。

[0102] 在某些实施方案中,除天然存在于GDF15多肽中的任何修饰以外,本公开内容的GDF15多肽还可包含翻译后修饰。这类修饰包括但不限于乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化、聚乙二醇化(聚乙二醇)和酰化。因此,修饰的GDF15多肽可含有非氨基酸成分,例如聚乙二醇、脂质、单糖或多糖和磷酸酯。可按本文有关其它GDF15多肽方面所述,测试这类非氨基酸成分对GDF15多肽的功能性的作用。如果GDF15多肽在细胞中通过切割GDF15多肽的新生形式产生,则翻译后加工对于蛋白质的正确折叠和/或功能也可能十分重要。对于这类翻译后活性,不同的细胞(例如CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK-293)具有特殊的细胞机器和特有机制,可选择不同的细胞以确保GDF15多肽的正确修饰和加工。

[0103] 在某些实施方案中,本公开内容包括编码前体和成熟GDF15多肽的核酸。在其它实施方案中,本公开内容还涉及包含这类核酸的宿主细胞。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如,本公开内容的多肽可在细菌细胞(例如大肠杆菌)、昆虫细胞(例如使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达。其它合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。因此,本公开内容的一些实施方案还涉及产生GDF15多肽的方法。

[0104] 在某些方面,本公开内容提供编码本文公开的GDF15多肽(包括片段、功能变体和融合蛋白)的任一种的分离和/或重组核酸。主题核酸可以是单链或双链的。这类核酸可以是DNA或RNA分子。这些核酸可用于例如用于制备GDF15多肽的方法中或用作直接的治疗剂(例如在反义物、RNAi或基因疗法方法)。

[0105] 在某些方面,编码GDF15多肽的主题核酸要进一步理解为包括作为SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3的变体的核酸。变体核苷酸序列包括因一个或多个核苷酸取代、添加或缺失而不同的序列,例如等位基因变体。

[0106] 在某些实施方案中,本公开内容提供与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的分离核酸序列或重组核酸序列。本领域普通技术人员应认识到,与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3互补的核酸序列和SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3的变体也落入本公开内容的范围内。在其它实施方案中,本公开内容的核酸序列可以是分离的、重组的和/或与异源核苷酸序列融合,或在DNA文库中。

[0107] 在其它实施方案中,本公开内容的核酸还包括在高严格条件下与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3规定的核苷酸序列、SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3的互补序列或其片段杂交的核苷酸序列。如上所述,本领域普通技术人员容易了解,可以改变促进DNA杂交的合适的严格性条件。例如,可在6.0 x 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中于约45℃进行杂交,接着2.0 x SSC于50℃洗涤。例如,可从约2.0 x SSC于50℃的低严格性到约0.2 x SSC于50℃的高严格性,选择洗涤步骤的盐浓度。另外,可从室温(约22℃)下的低严格性条件提高洗涤步骤的温度到约65℃下的高严格性条件。温度和盐两者均可改变,或者可保持温度或盐浓度恒定,而改变另一个变量。在一些实施方案中,本公开内容提供在6 x SSC于室温的低严格性条件下杂交接着2 x SSC于室温洗涤的核酸。

[0108] 由于遗传密码的简并性所致不同于SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3所示核酸的分离核酸也在本公开内容的范围内。例如,多种氨基酸用不只一个三联体指定。指定同一氨基酸的密码子或同义密码子(例如CAU和CAC是组氨酸的同义密码子),可导致不影响蛋白质的氨基酸序列的“沉默”突变。然而,预期在哺乳动物细胞中可存在确实引起主题蛋白质氨基酸序列改变的DNA序列多态性。本领域技术人员应认识到,由于天然等位基因变化所致,在给定物种的个体之间,这些变化可存在编码特定蛋白质的核酸的一个或多个核苷酸(多至约3-5%的核苷酸)中。任何和所有这类核苷酸变化和所得氨基酸多态性也在本公开内容的范围内。

[0109] 在某些实施方案中,在表达构建体中,本公开内容的重组核酸可与一个或多个调节核苷酸序列有效连接。调节核苷酸序列一般可适于用于表达的宿主细胞。本领域已知用于各种宿主细胞的合适表达载体和合适调节序列的许多类型。所述一个或多个调节核苷酸序列通常可包括但不限于启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始序列和终止序列、翻译起始序列和终止序列及增强子或激活物序列。本公开内容考虑本领域已知的组成型启动子或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子或将不止一种启动子的元件组合的杂合启动子。表达构建体可存在于细胞的附加体(例如质粒)上,或者表达构建体可插入染色体中。在一个优选的实施方案中,表达载体含有选择标记基因以供转化宿主细胞的选择。选择标记基因是本领域众所周知的,并可随所采用的宿主细胞而改变。

[0110] 在本文公开的某些方面,在包含编码GDF15多肽并与至少一个调节序列有效连接的核苷酸序列的表达载体中提供主题核酸。调节序列是本领域公认的,并被选择来指导表达GDF15多肽。因此,术语调节序列包括启动子、增强子和其它表达调控元件。示例性的调节序列描述于Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)。例如,当与DNA序列有效连接时控制DNA序列表达的各种表达调控序列的任一种,可被用于这些载体以表达编码GDF15多肽的DNA序列。这类有用的表达调控序列包括例如SV40的早期启动子和晚期启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、其表达受T7 RNA聚合酶指导的T7启动子、噬菌体λ的主要操纵基因和启动子区、fd外壳蛋白的调控区、3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶启动子(例如Pho5)、酵母α-交配因子启动子、杆状病毒系统的多角体启动子和已知控制原核细胞或真核细胞或其病毒的基因表达的其它序列及其各种组合。应当了解,表达载体的设计可取决于以下这类因素,例如待转化的宿主细胞的选择和/或欲表达的蛋白质类型。此外,还应考虑载体拷贝数、控制该拷贝数的能力和由该载体编码的任何其它蛋白质(例如抗生素标记)的表达。

[0111] 可通过将克隆的基因或其部分连接至适于在原核细胞、真核细胞(酵母、禽、昆虫或哺乳动物)或两者中表达的载体中来产生本公开内容所包括的重组核酸。用于产生重组GDF15多肽的表达载体包括质粒和其它载体。例如,合适的载体包括用于在原核细胞(例如大肠杆菌)中表达的以下类型的质粒:pBR322衍生质粒、pEMBL衍生质粒、pEX衍生质粒、pBTac衍生质粒和pUC衍生质粒。

[0112] 一些哺乳动物表达载体既含有利于载体在细菌中繁殖的原核序列,又含有在真核细胞中表达的一个或多个真核转录单位。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg衍生载体是适于转染真核

细胞的哺乳动物表达载体的实例。这些载体的一些用来源于细菌质粒(例如pBR322)的序列修饰,以利于在原核细胞和真核细胞两者中复制和进行药物抗性选择。或者,可使用诸如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或埃巴病毒(pHEBo、pREP衍生物和p205)等病毒衍生物在真核细胞中瞬时表达蛋白质。其它病毒(包括反转录病毒)表达系统的实例可参见下面基因疗法递送系统的描述。用于质粒制备和宿主生物转化中的各种方法是本领域众所周知的。对于原核和真核细胞两者的其它合适的表达系统以及通用重组方法,参见MolecularCloning A Laboratory Manual, 第3版, 编辑Sambrook, Fritsch和Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。在某些情况下,可能需要通过利用杆状病毒表达系统来表达重组多肽。这类杆状病毒表达系统的实例包括pVL衍生载体(例如pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW衍生载体(例如pAcUW1)和pBlueBac衍生载体(例如含 β -gal的pBlueBac III)。

[0113] 在一个优选的实施方案中,可设计在CHO细胞中产生主题TBR11多肽的载体,例如Pcmv-Script载体(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4载体(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)和pCI-neo载体(Promega, Madison, Wisc.)和UCOE[™]衍生载体(Millipore)。显然,可使用主题基因构建体在于培养基中繁殖的细胞中使主题GDF15多肽表达,例如产生蛋白质(包括融合蛋白或变体蛋白)以便纯化。

[0114] 本公开内容还涉及包括用一个或多个主题GDF15多肽的编码序列(例如SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO:3)的重组基因转染的宿主细胞。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如,本文公开的GDF15多肽可在细菌细胞(例如大肠杆菌)、昆虫细胞(例如使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达。其它合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。在一个优选的实施方案中,本文公开的GDF15多肽在CHO细胞中表达。

[0115] 因此,本发明进一步涉及产生主题GDF15多肽的方法。例如,可将用编码GDF15多肽的表达载体转染的宿主细胞在允许GDF15多肽表达发生的合适条件下培养。可使GDF15多肽分泌并从细胞和含有GDF15多肽的培养基的混合物中分离出来。或者,可使TBR11多肽保持在胞质或在膜部分中,然后收获、裂解细胞并分离蛋白质。细胞培养物包括宿主细胞和培养基。用于细胞培养的合适培养基是本领域众所周知的。可采用本领域已知的用于纯化蛋白质的技术,包括离子交换层析法、凝胶过滤层析法、超滤法、电泳、使用对GDF15多肽的特定表位有特异性的抗体进行的免疫亲和纯化以及用结合与GDF15多肽融合的结构域的物质进行的亲和纯化(例如A蛋白柱可用来纯化GDF15-Fc融合物),将主题GDF15多肽从细胞培养基、宿主细胞或两者中分离出来。在一个优选的实施方案中,GDF15多肽是含有促进其纯化的结构域的融合蛋白。例如,通过一系列的柱层析步骤达到纯化,所述步骤包括例如任何顺序的下列三种或更多种方法:A蛋白层析法、Q琼脂糖凝胶层析法、苯基琼脂糖凝胶层析法、大小排阻层析法和阳离子交换层析法。纯化可用病毒过滤和缓冲液更换来完成。

[0116] 在一个优选的实施方案中,采用一系列阳离子交换柱层析步骤,将主题GDF15多肽从培养基中纯化。用于阳离子交换柱的材料实例可以是具有例如羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸基(P)和磺酸基(S)等取代基的树脂。用于阳离子交换柱层析法的材料的实例包括SP Sepharose[™] Fast Flow、Q Sepharose[™] Fast Flow、DEAE Sepharose[™] Fast Flow、Capto[™] S、Capto[™] DEAE (GE Healthcare)、S HyperCel[™] (Pall)、TOYOPEARL GigaCap S-650 (TOSOH)或弱阳离子交换体例如羧甲基。优选SP Sepharose[™]

Fast Flow和Q Sepharose™ Fast Flow。

[0117] 为了开始纯化,需要时,可调节稳定表达GDF15多肽的宿主细胞的条件培养基的参数,例如pH、离子强度和温度。在一些实施方案中,冲洗层析柱,在与含多肽的上清液接触之前用一种或多种溶液平衡。这类溶液可包括例如缓冲液(例如介于1-500 mM、25-100 mM、15-30 mM之间或20 mM的例如Tris、MES、HEPES、组氨酸、磷酸盐或乙酸钠)和/或盐(例如介于0-2 M、1-2 M或500 mM-1M之间的例如NaCl、NaPO₄、乙酸钠或CaCl₂)。平衡溶液的pH的范围一般为3.5-10(例如介于pH 3.5-6、4.0-5.5、4.5-4.8之间或4.7)。在使柱与含多肽的流体接触后,可洗涤结合的柱。洗涤溶液可包括缓冲液(例如介于1-500 mM、25-100 mM、15-30 mM之间或20 mM的例如Tris、MES、HEPES、组氨酸、磷酸盐或乙酸钠)和/或盐(例如介于0-2 M、1-2 M、100 mM-1M或100 mM-500 mM之间的例如NaCl、NaPO₄、乙酸钠或CaCl₂)和/或添加剂(例如胍、脲、蔗糖、精氨酸或精氨酸衍生物)和/或溶剂(例如乙醇、乙腈或聚乙二醇)。洗涤溶液一般具有介于3.5和10之间的pH(例如介于4.5和8.0之间的pH)。可采用pH、盐类型、盐浓度、溶剂类型、溶剂浓度、置换剂类型、置换剂浓度或其组合的步进或梯度变化,将多肽从柱中洗脱。一般而言,为了将多肽从柱中洗脱,使培养基与洗脱缓冲液接触。在一些实施方案中,洗脱缓冲液含有缓冲液(例如10-100 mM、25-75 mM或50 mM的例如HEPES或Tris)和/或含有盐(例如0-2 M、例如10-100 mM的例如NaCl或CaCl₂)。在一些实施方案中,洗脱缓冲液可含有甘氨酸、乙酸或柠檬酸(例如20-250 mM或150 mM)。洗脱缓冲液还可含有乙酸(例如20 mM-约50 mM)、添加剂(例如1-10 M、2-8 M或6 M的例如胍、脲或蔗糖)和/或溶剂(例如乙醇、乙腈、聚乙二醇,例如1-10%溶剂、例如5%溶剂)。洗脱缓冲液的pH的范围可为约5.0-约10.0。在一些实施方案中,可改变(例如逐步改变)pH以产生梯度洗脱。在一些实施方案中,洗脱缓冲液的pH为约8.0。在一些实施方案中,进行一系列柱层析步骤。

[0118] 本文提供的数据表明,TBRII多肽用作GDF15信号转导的拮抗剂。虽然可溶性TBRII多肽、特别是TBRII-Fc是优选的拮抗剂,但是预期其它类型的GDF15拮抗剂是有用的,包括抑制GDF15或TBRII产生的抗GDF15抗体、抗TBRII抗体、反义物、RNAi或核酶核酸和GDF15或TBRII的其它抑制剂,特别是破坏GDF15-TBRII结合的抑制剂。

[0119] 与GDF15多肽起特异性反应且与GDF15多肽结合使得与其竞争结合(竞争性地结合)TBRII多肽或以别的方式抑制GDF15介导的信号转导的抗体可用作GDF15多肽活性的拮抗剂。同样地,与TBRII多肽有特异性反应且破坏GDF15结合的抗体可用作拮抗剂。

[0120] 可通过标准方案,使用来源于GDF15多肽或TBRII多肽的免疫原,制备抗蛋白质/抗肽抗血清或单克隆抗体(参见例如Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow和Lane编辑(Cold Spring Harbor Press: 1988))。哺乳动物,例如小鼠、仓鼠或兔可用免疫原形式的GDF15多肽、能够诱导抗体应答的抗原片段或融合蛋白免疫接种。赋以蛋白质或肽免疫原性的技术包括与载体缀合或本领域众所周知的其它技术。可在佐剂存在下给予GDF15或TBRII多肽的免疫原性部分。可通过检测血浆或血清中的抗体效价监测免疫接种的过程。可应用标准ELISA或其它免疫测定法用免疫原作为抗原评价抗体水平。

[0121] 在动物用GDF15多肽的抗原制备物进行免疫接种后,可获得抗血清,如有需要,可从血清中分离出多克隆抗体。为了产生单克隆抗体,可从经免疫接种的动物中收获产抗体细胞(淋巴细胞),并通过标准体细胞融合方法与永生化细胞(例如骨髓瘤细胞)融合,得到杂交瘤细胞。这类技术是本领域众所周知的,包括例如杂交瘤技术(最初由Kohler和

Milstein, (1975) Nature, 256:495-497 开发); 人B细胞杂交瘤技术(Kozbar等(1983) Immunology Today, 4: 72); 以及产生人单克隆抗体的EBV-杂交瘤技术(Cole等(1985) Monoclonal Antibodies and Cancer herapy, Alan R. Liss, Inc. 第77-96页)。可按免疫化学法筛选杂交瘤细胞以产生与GDF15多肽特异性反应的抗体, 并从包含这类杂交瘤细胞的培养物中分离单克隆抗体。

[0122] 本文使用的术语“抗体”旨在包括其同样与主题多肽特异性反应的片段。可采用常规技术使抗体片段化, 并以与上述用于完整抗体同样的方法针对效用筛选片段。例如, 可通过用胃蛋白酶处理抗体得到F(ab)₂片段。可处理所得F(ab)₂片段, 以将二硫桥还原得到Fab片段。本发明的抗体还旨在包括双特异性、单链、嵌合、人源化和完整人分子, 其具有由抗体的至少一个CDR区提供的对TBRII或GDF15多肽的亲和力。抗体还可包含与之连接并且能够检出的标记(例如标记可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)。

[0123] 在某些实施方案中, 抗体是重组抗体, 该术语包括部分通过分子生物学技术产生的任何抗体, 包括CDR移植抗体或嵌合抗体、人抗体或从文库选择抗体结构域装配的其它抗体、单链抗体和单一结构域抗体(例如人V_H蛋白或骆驼(camelid) V_H蛋白)。在某些实施方案中, 本发明的抗体是单克隆抗体, 而在某些实施方案中, 本发明可获得产生新抗体的方法。例如, 产生与GDF15多肽或TBRII多肽特异性结合的单克隆抗体的方法, 可包括给予小鼠一定量的有效刺激可检测免疫应答的包含抗原多肽的免疫原性组合物, 由小鼠得到产抗体细胞(例如得自脾的细胞), 并将产抗体细胞与骨髓瘤细胞融合, 得到产抗体杂交瘤, 测试产抗体杂交瘤以鉴定产生与抗原特异性结合的单克隆抗体的杂交瘤。一旦得到所述杂交瘤, 便可将杂交瘤在细胞培养物中增殖, 任选在杂交瘤衍生细胞产生与抗原特异性结合的单克隆抗体的培养条件下增殖。可从细胞培养物中纯化出单克隆抗体。

[0124] 正如本领域通常理解的一样, 用于提及抗体的形容词“与……特异性反应的”意指抗体在目标抗原(例如GDF15多肽)与其它非目标抗原之间有足够选择性, 使得所述抗体至少可用于在特定的生物样品类型中检测目标抗原的存在情况。在某些使用抗体的方法例如治疗应用中, 在结合中可能需要较高度度的特异性。单克隆抗体通常具有有效区分所需抗原和交叉反应多肽的较大趋势(与多克隆抗体相比)。影响抗体: 抗原相互作用的特异性的一个特征是抗体对抗原的亲和力。虽然可在不同亲和力范围内达到所需特异性, 但是一般优选的抗体具有约10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹或更小的亲和力(解离常数)。假定在GDF15和TBRII之间有高亲和力, 则预期中和抗GDF15或抗TBRII抗体一般可具有10⁻⁹或更低的解离常数。

[0125] 另外, 用于筛选抗体以鉴定所需要的抗体的技术可影响所得抗体的性质。例如, 如果抗体被用于在溶液中结合抗原, 则可能需要测试溶液结合。可获得用于测定抗体和抗原之间的相互作用以鉴定特别需要的抗体的各种不同技术。这类技术包括ELISA、表面等离子体共振结合测定法(例如BiacoreTM结合测定法, Biacore AB, Uppsala, Sweden)、夹心测定法(例如顺磁珠系统, IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland)、蛋白质印迹、免疫沉淀测定法和免疫组织化学法。

[0126] 作为GDF15或TBRII拮抗剂的核酸化合物类别的实例包括反义核酸、RNAi构建体和催化性核酸构建体。核酸化合物可以是单链或双链的。双链化合物还可包括其中链的一条或另一条是单链的突出端区或非互补区。单链化合物可包括自我互补区, 意指化合物形成具有双螺旋结构区的所谓“发夹”或“茎-环”结构。核酸化合物可包含以下核苷酸序列, 其与

由不超过全长GDF15核酸序列或TBR11核酸序列的1000个、不超过500个、不超过250个、不超过100个或不超过50、35、30、25、22、20或18个核苷酸组成的区域互补。互补区优选为至少8个核苷酸,任选至少10或至少15个核苷酸,例如15-25个核苷酸。互补区可落入靶转录物的内含子、编码序列或非编码序列中,例如编码序列部分。核酸化合物的长度一般可为约8-约500个核苷酸或碱基对,例如约14-约50个核苷酸。核酸可以是DNA(特别对于用作反义物)、RNA或RNA:DNA杂合体。任一条链可包括DNA和RNA的混合物以及不容易归类为DNA或RNA的修饰形式。同样,双链化合物可以是DNA:DNA、DNA:RNA或RNA:RNA,任一条链还可包括DNA和RNA的混合物,以及不易归类为DNA或RNA的修饰形式。核酸化合物可包括各种修饰的任一种,包括骨架(天然核酸中的糖-磷酸酯部分,包括核苷酸间键)或碱基部分(天然核酸的嘌呤或嘧啶部分)的一种或多种修饰。反义核酸化合物的长度可优选为约15-约30个核苷酸,并且通常含有一种或多种修饰以改进特性,例如在血清、细胞或化合物很可能被递送至的部位(例如在口服递送化合物的情况下为胃,而对吸入化合物而言为肺)中的稳定性。在RNAi构建体的情况下,与靶转录物互补的链一般是RNA或其修饰物。另一条链可以是RNA、DNA或任何其它变异物。双链或单链“发夹”RNAi构建体的双链体部分的长度可优选为18-40个核苷酸,任选长度为约21-23个核苷酸,只要它用作切酶底物即可。催化性核酸或酶促核酸可以是核酶或DNA酶,并且还可含有修饰形式。当在生理条件下和在其中无义或有义对照几乎没有作用或者没有作用的浓度下与细胞接触时,核酸化合物可抑制靶标表达达约50%、75%、90%或更高。测试核酸化合物的作用的优选浓度为1、5和10微摩尔。

[0127] 6. 筛选测定法

在某些方面,本发明涉及TBR11多肽(例如可溶性TBR11多肽)和GDF15多肽鉴定作为GDF15-TBR11信号转导途径的激动剂或拮抗剂的化合物(物质)的用途。可对通过这种筛选法鉴定的化合物进行测试以评价其体外调节GDF15信号转导活性的能力。任选还可在动物模型中对这些化合物进行测试以评价其体内调节组织生长的能力。

[0128] 有许多针对通过靶向GDF15和TBR11多肽调节组织生长筛选治疗剂的方法。在某些实施方案中,可进行高通量的化合物筛选以鉴定干扰GDF15或TBR11介导的细胞信号转导的物质。在某些实施方案中,进行所述测定法以筛选和鉴定特异性抑制或降低TBR11多肽与GDF15结合的化合物。或者,所述测定法可用于鉴定增强TBR11多肽与GDF15结合的化合物。在又一个实施方案中,可通过其与GDF15或TBR11多肽相互作用的能力来鉴定化合物。

[0129] 各种测定形式便可满足需要,然而根据本公开内容,本领域的普通技术人员仍应了解未在本文明确描述的测定形式。如本文所述,可通过任何组合化学方法产生本发明的试验化合物(物质)。或者,主题化合物可以是体内或体外合成的天然存在的生物分子。待测定其起组织生长调节剂作用的能力的化合物(物质)可通过例如细菌、酵母、植物或其它生物产生(例如天然产物)、以化学法产生(例如小分子,包括肽模拟物)或以重组法产生。本发明考虑的试验化合物包括非肽基有机分子、肽、多肽、肽模拟物、糖、激素和核酸分子。在一个具体的实施方案中,试验物质是有机小分子,分子量小于约2,000道尔顿。

[0130] 本发明的试验化合物可以单一分散体提供,或者以较复杂的文库提供,例如通过组合化学制备的文库。这些文库可包含例如醇、烷基卤化物、胺、酰胺、酯、醛、醚和有机化合物的其它类别。向试验系统中提供的试验化合物可呈分离形式或作为化合物的混合物,尤其在最初的筛选步骤中。任选化合物可任选用其它化合物衍生化并有利于化合物

分离的衍生化基团。衍生化基团的非限制实例包括生物素、荧光素、洋地黄毒苷(digoxigenin)、绿色荧光蛋白、同位素、聚组氨酸、磁珠、谷胱甘肽S转移酶(GST)、可光活化的交联剂或其任何组合。

[0131] 在测试化合物文库和天然提取物的许多药物筛选程序中,需要高通量测定法以便在给定时间内使研究的化合物的数目最大化。在无细胞系统(例如可用纯化的或半纯化的蛋白质衍生)中进行的测定法,常常优选作为“初步”筛选,因为可产生无细胞系统以允许快速显现和相对容易地检测由试验化合物介导的分子靶标中的改变。此外,在体外系统中一般可忽略试验化合物的细胞毒性或生物利用度的作用,测定法反而主要集中在药物对分子靶标的作用,如可表现在TβRII多肽和GDF15之间结合亲和力的改变。

[0132] 仅举例来说,在本发明的示例性筛选测定法中,将目标化合物与通常能够与GDF15结合的分离和纯化的TβRII多肽接触。然后向化合物和TβRII多肽的混合物中加入含有TβRII配体的组合物。TβRII/GDF15复合体的检测和定量测定提供用于测定化合物抑制(或增强)在TβRII多肽和GDF15之间形成复合体的功效的手段。可通过从使用不同浓度的试验化合物所得到的数据绘制剂量反应曲线,来评价化合物的功效。此外,还可进行对照测定,以提供比较基线。例如,在对照测定中,将分离和纯化的GDF15加入含有TβRII多肽的组合物中,在缺乏试验化合物时,定量测定TβRII/GDF15复合体的形成。应了解,一般可以改变可使反应物混合的顺序,并且可以同时混合。此外,可使用细胞提取物和裂解物替换经纯化的蛋白质以提供合适的无细胞测定系统。

[0133] 可通过各种技术,检测TβRII多肽和GDF15之间的复合体形成。例如,可使用例如可检测标记的蛋白质,例如放射性标记(例如³²P、³⁵S、¹⁴C或³H)、荧光标记(例如FITC)或酶标记的TβRII多肽或GDF15,通过免疫测定或通过层析检测,定量测定复合体形成的调节。

[0134] 在某些实施方案中,本发明考虑在直接或间接测定TβRII多肽与其结合蛋白间的相互作用的程度中,采用荧光偏振测定法和荧光共振能量转移(FRET)测定法。另外,其它检测方式,例如基于光波导(PCT公布号WO 96/26432和美国专利号5,677,196)、表面等离子体共振(SPR)、表面电荷传感器和表面力传感器的检测方式都适于本发明的许多实施方案。

[0135] 此外,本发明考虑采用相互作用陷阱测定法(interaction trap assay),亦称“双杂合测定法(two hybrid assay)”,鉴定干扰或增强TβRII多肽与其结合蛋白间的相互作用的物质。参见例如美国专利号5,283,317;Zervos等(1993) Cell 72:223-232;Madura等(1993) J Biol Chem 268:12046-12054;Bartel等(1993) Biotechniques 14:920-924;以及Iwabuchi等(1993) Oncogene 8:1693-1696)。在一个具体的实施方案中,本发明考虑采用反相双杂交系统(reverse two hybrid system)鉴定离解TβRII多肽与其结合蛋白间的相互作用的化合物(例如小分子或肽)。参见例如Vidal和Legrain,(1999) Nucleic Acids Res 27:919-29;Vidal和Legrain,(1999) Trends Biotechnol 17:374-81;以及美国专利号5,525,490、5,955,280和5,965,368。

[0136] 在某些实施方案中,通过其与本发明的TβRII或GDF15多肽相互作用的能力来鉴定主题化合物。化合物和TβRII或GDF15多肽间的相互作用可以是共价的或非共价的。例如,可采用体外生化方法在蛋白质水平上鉴定这类相互作用,包括光致交联、放射性同位素标记配体结合和亲和层析法(Jakoby WB等,1974,Methods in Enzymology 46:1)。在某些情况下,可在基于机制的测定法中筛选化合物,例如检测与GDF15或TβRII多肽结合的化合物的

测定法。这可包括固相或液相结合事件。或者,可将编码GDF15或TBRII多肽的基因与报道系统(例如 β -半乳糖苷酶、萤光素酶或绿色荧光蛋白)一起转染至细胞中,优选通过高通量筛选针对文库进行筛选或用文库的各个成员进行筛选。可采用基于其它机制的结合测定法,例如检测自由能变化的结合测定法。结合测定法可用固定于孔、珠粒或芯片或被固定化抗体俘获或被毛细管电泳分离的靶标进行。一般可采用比色法或荧光法或表面等离子体共振检测结合的化合物。

[0137] 在某些方面,本发明提供用于调节(刺激或抑制)GDF15介导的细胞信号转导的方法和物质。因此,可在体外或体内在完整细胞或组织中测定所鉴定的任何化合物,以证实其调节GDF15信号转导的能力。可将本领域已知的各种方法用于此目的。

[0138] 7. 示例性治疗应用

本文使用的“预防”病症或病况的治疗药是指以下化合物,其在统计样本中,与未治疗对照样品相比,减少治疗样品中的病症或病况的发生,或者与未治疗对照样品相比,延缓病症或病况的一种或多种症状发作或者降低病症或病况的一种或多种症状的严重程度。本文使用的术语“治疗”包括病况一旦确诊便改善或根除病况。在任一情况下,可通过医师给出的诊断和给予治疗剂的预期结果来分辨预防或治疗。

[0139] 本公开内容提供通过给予受试者有效量的TBRII多肽(包括所述TBRII多肽的TBRII-Fc融合蛋白或核酸拮抗剂(例如反义物或siRNA),下文统称为“治疗剂”)治疗或预防与TGF β 超家族成员相关的疾病或病况的方法。在一些实施方案中,疾病或病况与GDF15、TGF β 1或TGF β 3信号转导失调有关。还提供用于治疗某些心血管疾病或血管疾病的方法和组合物。另外,本公开内容提供用于治疗或预防癌症的方法和组合物。另外,本公开内容提供用于治疗或预防纤维化病症和病况的方法和组合物。

[0140] 具体地说,本公开内容的多肽治疗剂可用于治疗或预防慢性血管或心血管疾病。这类的示例性病症包括但不限于心脏病(包括心肌病、心肌梗塞、心绞痛和心瓣膜疾病);肾病(包括慢性肾小球炎症、糖尿病性肾衰竭和狼疮相关肾炎);与动脉粥样硬化或其它类型的动脉硬化相关病症(包括中风、脑出血、蛛网膜下腔出血、心绞痛和肾动脉硬化);血栓性病症(包括脑血栓形成、血栓性肠坏死);糖尿病并发症(包括糖尿病相关肾病、白内障、糖尿病相关肾病、糖尿病相关神经病、糖尿病相关坏疽和糖尿病相关慢性感染);血管炎性病症(系统性红斑狼疮、关节风湿病、关节动脉炎、大细胞动脉炎、川崎病、大动脉炎、Churg-Strauss综合征和诺赫-舍恩莱因紫癜(Henoch-Schoenlein purpura));糖尿病血管病变和心脏病症例如先天性心脏病、心肌病(例如扩张型、肥厚型、限制性心肌病)和充血性心力衰竭。示例性病症还包括但不限于遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)、马方综合征、Loeys-Dietz综合征、家族性胸主动脉瘤综合征、动脉迂曲综合征、先兆子痫和再狭窄。

[0141] 可单独或与可用于治疗TGF β 相关心血管病症和/或病况的一种或多种药剂或治疗方式(例如治疗剂)组合将TBRII多肽给予受试者。在某些实施方案中,第二药剂或治疗方式选自以下一种或多种:血管成形术、 β 阻断剂、抗高血压药、强心药、抗血栓药、血管扩张药、激素拮抗剂、内皮素拮抗剂、钙通道阻断剂、磷酸二酯酶抑制剂、血管紧张素2型拮抗剂和/或细胞因子阻断剂/抑制剂。

[0142] 具体地说,本公开内容的多肽治疗剂可用于治疗或预防癌症(肿瘤)。术语“癌症”和“癌症的”是指或描述其特征通常为细胞生长/增殖不受控制的哺乳动物生理学病况。癌

症或肿瘤性病症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。这类癌症的更具体的实例包括鳞状上皮细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、阴道癌、甲状腺癌、肝癌、胃癌、肠癌、皮肤癌、骨癌、胃癌、黑素瘤和各种类型的头颈癌,包括鳞状上皮细胞头颈癌。肿瘤性病症和相关病况的其它实例包括食管癌、泡膜细胞瘤、卵巢男胚瘤、子宫内膜增生、子宫内膜异位症、纤维肉瘤、绒毛膜癌、鼻咽癌、喉癌、肝胚细胞瘤、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、皮肤癌、血管瘤、海绵状血管瘤、成血管细胞瘤、成视网膜细胞瘤、星形细胞瘤、成胶质细胞瘤、神经鞘瘤、少突神经胶质瘤、成神经管细胞瘤、成神经细胞瘤、横纹肌肉瘤、骨源性肉瘤、平滑肌肉瘤、尿道癌、维尔姆斯瘤(Wilm's tumor)、肾细胞癌、前列腺癌、斑痣性错构瘤病相关异常血管增生和梅格斯综合征(Meigs' syndrome)。特别适于用本文所述治疗剂治疗的癌症的特征可在于以下一种或多种:癌症具有在肿瘤或血清中可检测的高TBR11水平;GDF15、TGFβ1或TGFβ3表达水平或生物活性升高;是转移性的或有变成转移性的风险,或其任何组合。

[0143] 在这类方法的某些实施方案中,可在一起(同时)或在不同的时间(序贯)给予一种或多种多肽治疗剂。另外,可与用于治疗癌症或抑制血管生成的另一类型的化合物一起给予多肽治疗剂。

[0144] 在某些实施方案中,本公开内容的主题方法可单独使用。或者,主题方法可与针对增殖性病症(例如肿瘤)的治疗或预防的其它常规抗癌治疗方法联用。例如,这类方法可用于预防性癌症预防、手术后癌症复发和转移预防,并可用作其它常规癌症疗法的辅助剂。本公开内容认识到可通过使用主题多肽治疗剂提高常规癌症疗法(例如化学疗法、放射疗法、光线疗法、免疫疗法和手术)的疗效。

[0145] 已表明一系列常规化合物具有抗癌或抗瘤活性。已在化学疗法中将这些化合物用作药剂,以缩小实体瘤、防止转移和进一步生长或减少白血病或骨髓恶性肿瘤中恶性细胞的数目。虽然化学疗法在治疗各种类型的恶性肿瘤中是有效的,但是许多抗癌化合物引起不期望的副作用。已表明,当将两种或更多种不同的治疗组合时,治疗可协同起作用,并允许降低各种治疗的剂量,从而降低因较高剂量的各种化合物发挥的有害副作用。在其它情况下,对治疗不应恶性肿瘤可对两种或更多种不同的治疗的组合疗法起反应。

[0146] 当本文公开的治疗剂与另一种常规抗肿瘤药组合同时或序贯给予时,这类治疗剂可提高抗肿瘤药的治疗作用或克服细胞对所述抗肿瘤药的抗性。这允许降低抗肿瘤药的剂量,从而降低不期望的副作用或恢复抗性细胞中抗肿瘤药的疗效。

[0147] 按照本公开内容,本文所述多肽治疗剂可与用于治疗疾病的其它组合物和方法联用。例如,可用与TBR11多肽组合的手术、放射或化学疗法按常规治疗肿瘤,然后可将TBR11多肽随后给予患者以延长微转移的蛰伏并稳定任何残留的原发性肿瘤。

[0148] 在本发明的某些方面,可用于与TBR11多肽的组合肿瘤疗法的其它治疗剂包括其它癌症疗法:例如手术、细胞毒性剂、包括辐射或给予放射性物质的放射治疗、化学治疗剂、抗激素药、生长抑制药、抗癌组合物和用本文所列和本领域已知的抗癌药治疗或其组合。

[0149] 本文所用术语“细胞毒性剂”是指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性同位素(例如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和Lu的放射性同位素)、化学治疗剂,例如甲氨蝶呤、阿霉素、长春花属生物碱(长春新碱、长春

碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其它嵌入剂、酶和其片段(例如溶核酶)、抗生素和毒素(例如小分子毒素)或细菌、真菌、植物或动物源的酶促活性毒素,包括其片段和/或变体,以及下文公开的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。下面描述了其它细胞毒性剂。杀肿瘤剂致使肿瘤细胞遭破坏。

[0150] “化学治疗剂”是可用于治疗癌症的化合物。化学治疗剂的实例包括烷化剂,例如塞替派和CYTOXAN®环磷酰胺;烷基磺酸酯,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;吡啶啉类,例如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺和methy lamelamines,包括六甲蜜胺、曲他胺、三乙烯磷酰胺(trietylenephosphoramidate)、三乙烯硫代磷酰胺和三羟甲蜜胺;acetogenins(尤其是bullatacin和bullatacinone); δ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚、MARINOL®); β -lapachone;拉帕醇;秋水仙碱;桦木酸;喜树碱(包括合成类似物托泊替康(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康、CAMPTOSAR®)、乙酰基喜树碱、东莨菪亭和9-氨基喜树碱);苔藓抑素;callystatin;CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);鬼臼毒素;鬼臼酸;替尼泊苷;念珠藻环肽(特别是念珠藻环肽1和念珠藻环肽8);多拉司他汀;duocarmycin(包括合成类似物、KW-2189和CB1-TM1);艾榴素;pancratistatin;匍枝珊瑚醇;海绵素;氮芥,例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、环磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀、曲磷胺、乌拉莫司汀;亚硝基脲,例如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素,例如烯二炔类抗生素(例如卡奇霉素、特别是卡奇霉素 γ 11和卡奇霉素 ω 11(参见例如Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)));烯二炔蒽环类抗生素,包括烯二炔蒽环类抗生素A;埃斯波霉素;以及新制癌菌素发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素、放线菌素、authramycin、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、carabycin、去甲柔红霉素、嗜癌霉素、chromomycinis、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉子基(pyrrolino)-多柔比星和去氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、马赛罗霉素、丝裂霉素(例如丝裂霉素C)、麦考酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、紫菜霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物,例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、thiamiprine、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素,例如卡鲁睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素药(anti-adrenals),例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,例如亚叶酸;醋葡萄糖醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基酮戊酸;恩尿嘧啶;安吡啶;bestrabucil;比生群;依达曲沙;秋水仙胺;地吡醌;elfornithine;依利醋铵;埃坡霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;美坦生类化合物,例如美登素和安丝菌素;米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇(mopidanmol);尼曲吡啶(nitraerine);喷司他丁;phenamet;吡柔比星;洛索蒽醌;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK®多糖复合体(JHS Natural Products, Eugene, OR);雷佐生;利索新;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢菌毒素(尤其T-2毒素、verracurin A、杆孢菌素A和anguidine);乌拉坦;长春地辛(ELDISINE®、

FILDESIN®); 达卡巴嗪; 甘露莫司汀; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷; gacytosine; 阿拉伯糖苷C (“Ara-C”); 塞替派; 紫杉醇类, 例如TAXOL® 紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™ Cremophor-free、紫杉醇的白蛋白工程化纳米粒制剂(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)和TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨(GEMZAR®); 6-硫鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 甲氨蝶呤; 铂类似物, 例如顺铂和卡铂; 长春碱(VELBAN®); 铂; 依托泊苷(VP-16); 异环磷酰胺; 米托蒽醌; 长春新碱(ONCOVIN®); 奥沙利铂; leucovorin; 长春瑞滨(NAVELBINE®); 诺安托; 依达曲沙; 道诺霉素; 氨基蝶呤; 伊班膦酸盐; 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 类视黄醇, 例如视黄酸; 卡培他滨(XELODA®); 上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物; 以及上述两种或更多种的组合, 例如CHOP, 一个环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙组合疗法的缩略语, 以及FOLFOX, 一个与5-FU和leucovorin组合的奥沙利铂(ELOXATIN™)治疗方案的缩略语。

[0151] 该定义中还包括起调节、降低、阻断或抑制可促进癌生长的激素的作用, 且常常呈系统或全身治疗形式的抗激素药。它们可以是激素本身。实例包括抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM), 包括例如他莫昔芬(包括NOLVADEX® 他莫昔芬)、EVISTA® 雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、keoxifene、LY1 17018、奥那司酮和FARESTON® 托瑞米芬; 抗黄体酮; 雌激素受体下调剂(ERD); 起抑制或中断卵巢作用的作用剂, 例如促性腺素释放素(LHRH)激动剂, 例如LUPRON® 和ELIGARD® 醋酸亮丙立德、醋酸戈舍瑞林、醋酸布舍瑞林和曲普瑞林(tripterelin); 其它抗雄激素, 例如氟他胺、尼鲁米特和比卡鲁胺; 以及抑制芳香酶(其调节肾上腺的雌激素产生)的芳香酶抑制剂, 例如4(5)-咪唑、氨鲁米特、MEGASE® 醋酸甲地孕酮、AROMASIN® 依西美坦、福美坦、法倔唑、RIVIS OR® 伏氯唑、FEMARA® 来曲唑和ARIMIDEX® 阿那曲唑。另外, 化学治疗剂的这类定义包括二膦酸盐, 例如氯膦酸盐(例如BONEFOS® 或OSTAC®)、DIDROC AL® 依替膦酸、NE-58095、ZOMET A® 唑来膦酸/唑来膦酸盐、FOSAMAX® 阿伦膦酸盐、AREDIA® 帕米膦酸盐、SKELID® 替鲁膦酸盐或ACTONEL® 利塞膦酸盐; 以及曲沙他滨(一种1,3-二氧杂环戊烷核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是抑制参与异常细胞增殖的信号转导途径的基因表达的反义寡核苷酸, 例如PKC- α 、Raf、H-Ras和表皮生长因子受体(EGF-R); 疫苗, 例如THERATOPE® 疫苗和基因疗法疫苗, 例如ALLOVECTIN® 疫苗、LEUVECTIN® 疫苗和VAXID® 疫苗; LURTOTECAN® 拓扑异构酶1抑制剂; ABARELIX® rmRH; 托西拉帕替尼(一种ErbB-2和EGFR双重酪氨酸激酶小分子抑制剂, 亦称GW572016)和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0152] “生长抑制剂”当在本文使用时是指体外或体内抑制细胞生长的化合物或组合物。因此, 生长抑制剂可以是显著降低S期中细胞的百分比的生长抑制剂。生长抑制药的实例包括阻断细胞周期过程(处于S期以外的位置)的抑制剂, 例如引起G1停滞和M期停滞的抑制剂。经典的M期阻断剂包括长春花属生物碱(长春新碱和长春碱)、紫杉烷类和拓扑异构酶II抑制剂, 例如多柔比星、表柔比星、柔红霉素、依托泊苷和博来霉素。阻滞G1的那些抑制剂也可波及到S期停滞, 例如DNA烷化剂, 例如他莫昔芬、泼尼松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶和ara-C。更多的信息可参见The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn和Israel编辑, 第1章, Murakami等标题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs (“细胞周期调节、癌基因和抗肿瘤药)”(WB

Saunders: Philadelphia, 1995), 尤其第13页。紫杉烷类(紫杉醇和多西他赛)是均来源于紫杉树的抗癌药。来源于欧洲紫杉的多西他赛(TAXOTERE[®], Rhone -Poulenc Rorer)是紫杉醇(TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。紫杉醇和多西他赛促进从微管蛋白二聚体装配成微管, 并通过防止解聚稳定微管, 这导致在细胞中抑制有丝分裂。

[0153] 在另外其它的实施方案中, TBRII多肽可用于治疗或预防纤维化。本文所用术语“纤维化”是指器官或组织的细胞中过量纤维性结缔组织的异常形成或发生。虽然与纤维化有关的过程可作为正常组织形成或修复的一部分发生, 但这些过程的失调可导致细胞组成改变和过量结缔组织沉积, 其逐步损害组织或器官功能。纤维组织的形成可产生于修复性或反应性过程。纤维化病症或病况包括但不限于与血管疾病例如心脏病、脑病和外周血管病相关的纤维增殖性病症, 以及与组织和器官系统包括心脏、皮肤、肾、腹膜、肠和肝相关的纤维增殖性病症(如公开于例如Wynn, 2004, Nat Rev 4:583-594, 通过引用结合到本文中)。可治疗的示例性病症包括但不限于肾纤维化, 包括与损伤/纤维化有关的肾病, 例如与糖尿病有关的慢性肾病(例如糖尿病性肾病)、狼疮、硬皮病、肾小球肾炎、局灶性节段性肾小球硬化和IgA肾病; 肠纤维化, 例如硬皮病和放射诱导的肠纤维化; 肝纤维化, 例如肝硬化、酒精性肝纤维化、胆管损伤、原发性胆汁性肝硬化、感染性或病毒性肝纤维化、先天性肝纤维化和自身免疫性肝炎; 以及其它纤维化病况, 例如囊性纤维化、心内膜心肌纤维化、纵隔纤维化、结节病、硬皮病、脊髓损伤/纤维化、骨髓纤维化、血管再狭窄、动脉粥样硬化、注射性纤维化(这可作为肌肉注射的并发症发生, 尤其在儿童中)、心内膜心肌纤维化、腹膜后纤维化和肾源性系统性纤维化。

[0154] 本文所用术语“纤维化病症”、“纤维化病况”和“纤维化疾病”可互换使用, 是指以纤维化为特征的病症、病况或疾病。纤维化病症的实例包括但不限于硬化病症(例如硬皮病、动脉粥样硬化、弥漫性系统性硬化)、血管纤维化、胰腺纤维化、肝纤维化(例如肝硬化)、肾纤维化、肌骨骼纤维化、心脏纤维化(例如心内膜心肌纤维化、特发性心肌病)、皮肤纤维化(例如硬皮病、创伤后、手术皮肤瘢痕形成、瘢痕瘤和皮肤瘢痕瘤形成)、眼纤维化(例如青光眼、眼硬化症、结膜和角膜瘢痕形成和翼状胬肉)、骨髓纤维化、进行性系统性硬化病(PSS)、慢性移植物抗宿主病、佩罗尼病、膀胱镜检查后尿道狭窄、特发性和药物诱导性腹膜后纤维化、纵隔纤维化、增生性纤维化、增生性纤维变性、杜普伊特伦病(Dupuytren's disease)、狭窄、神经瘢痕形成、皮肤瘢痕形成和放射诱导性纤维化。

[0155] 如本文所用, 抑制细胞的纤维化反应包括但不限于抑制以下细胞的纤维化反应: 肝(或肝组织)内的一种或多种细胞; 肾(或肾组织)内的一种或多种细胞; 肌肉组织内的一种或多种细胞; 心脏(或心脏组织)内的一种或多种细胞; 胰腺内的一种或多种细胞; 皮肤内一种或多种细胞; 骨内的一种或多种细胞、血管系统内的一种或多种细胞、一种或多种干细胞或眼内的一种或多种细胞。

[0156] 本发明考虑与一种或多种其它治疗方式组合的TBRII多肽的应用。因此, 除TBRII多肽的应用以外, 还可将用于治疗纤维化病症的一种或多种“标准”疗法给予受试者。例如, 可将TBRII多肽与细胞毒素、免疫抑制剂、放射性毒性剂和/或治疗性抗体组合(即共同)给予。本发明考虑的具体的共治疗剂包括但不限于类固醇类(例如皮质甾类, 例如泼尼松)、免疫抑制药和/或抗炎药(例如 γ -干扰素、环磷酰胺、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、青霉胺、环孢菌素、秋水仙碱、抗胸腺细胞球蛋白、麦考酚酸酯和羟氯喹)、细胞毒性药物、钙通道阻断剂(例如

硝苯地平)、血管紧张素转化酶抑制剂(ACE)抑制剂、对-氨基苯甲酸(PABA)、二甲亚砜、转化生长因子 β (TGF β)抑制剂、白介素-5 (IL-5)抑制剂和泛胱天蛋白酶抑制剂。

[0157] 可与T β RII多肽联用的其它抗纤维化药包括但不限于凝集素(如描述于例如美国专利号:7,026,283,其完整内容通过引用结合到本文中),以及Wynn等(2007,J Clin Invest 117:524-529,其完整内容通过引用结合到本文中)描述的抗纤维化药。例如,其它抗纤维化药和疗法包括但不限于各种抗炎药/免疫抑制药/细胞毒性药(包括秋水仙碱、硫唑嘌呤、环磷酰胺、泼尼松、沙利度胺、己酮可可碱和茶碱)、TGF β 信号转导调节剂(包括松弛素、SMAD7、HGF和BMP7以及TGF β 1、T β RI、T β RII、EGR-1和CTGF抑制剂)、细胞因子和细胞因子受体拮抗剂(IL-1 β 、IL-5、IL-6、IL-13、IL-21、IL-4R、IL-13R α 1、GM-CSF、TNF- α 、制癌蛋白M、W1SP-1和PDGF的抑制剂)、细胞因子和趋化因子(IFN- γ 、IFN- α/β 、IL-12、IL-10、HGF、CXCL10和CXCL11)、趋化因子拮抗剂(CXCL1、CXCL2、CXCL12、CCL2、CCL3、CCL6、CCL17和CCL18的抑制剂)、趋化因子受体拮抗剂(CCR2、CCR3、CCR5、CCR7、CXCR2和CXCR4的抑制剂)、TLR拮抗剂(TLR3、TLR4和TLR9的抑制剂)、血管生成拮抗剂(VEGF特异性抗体和腺苷脱氨酶替代疗法)、抗高血压药(ANG 11、ACE和醛固酮的 β 阻断剂和抑制剂)、血管活性物质(ET-1受体拮抗剂和bosentan)、合成和加工胶原的酶的抑制剂(脯氨酰羟化酶抑制剂)、B细胞拮抗剂(利妥昔单抗)、整联蛋白/粘附分子拮抗剂(阻断 α 1 β 1和 α v β 6整联蛋白的分子以及整联蛋白相关激酶抑制剂和ICAM-1和VCAM-1的特异性抗体)、靶向成肌纤维细胞的促凋亡药物、MMP抑制剂(MMP2、MMP9和MMP12的抑制剂)和TIMP抑制剂(TIMP-1的特异性抗体)。

[0158] 可在同一制剂中或分别给予T β RII多肽和共治疗剂或协同疗法。在分别给药的情况下,可在共治疗剂或协同疗法之前、之后或与之同时给予T β RII多肽。一种药剂可先于或后于另一种药剂给药数分钟到数周的间隔。在其中两种或更多种不同种类的治疗剂分别施于受试者的实施方案中,通常会确保每次递送的时间之间的可观的一段时间不届满,使得这些不同种类的药剂仍能够对靶组织或细胞发挥有利的联合作用。

[0159] 8. 药物组合物

可将本文所述治疗剂(例如T β RII多肽)配制成药物组合物。可以常规方式使用一种或多种生理学上可接受的载体或赋形剂配制按照本公开内容使用的药物组合物。这类制剂一般将是基本无热原的,与大部分管理机构的要求相容。

[0160] 在某些实施方案中,本公开内容的治疗方法包括全身或者以植入物或装置局部给予组合物。当给药时,用于本公开内容的治疗组合物呈无致热原的生理学上可接受的形式。还可任选包含在上述组合物中的T β RII信号转导拮抗剂以外的治疗上有用的物质,在本文公开的方法中可与主题化合物(例如T β RII多肽)同时或序贯给予。

[0161] 通常可胃肠外(特别是静脉内或皮下)给予本文公开的蛋白质治疗剂。适于胃肠外给予的药物组合物可包含一种或多种T β RII多肽以及一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性溶液或非水性溶液、分散体、混悬液或乳液或者无菌粉剂(所述粉剂可在临用前重构成无菌注射用溶液或分散体),其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期接受者血液等渗的溶质或者助悬剂或增稠剂。可用于本公开内容的药物组合物的合适水性载体和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(例如橄榄油)和注射用有机酯(例如油酸乙酯)。可通过例如使用包衣材料(例如卵磷脂),在分散体的情况下通过保持所需要的粒径,以及通过使用表面活性剂,来保持适当的

流动性。

[0162] 如有需要,组合物和制剂可以可装有一个或多个含有活性成分的单位剂型的药包或分配装置提供。药包可例如包含金属箔或塑料薄片,例如泡罩包装。药包或分配装置可附有给药说明书。

[0163] 另外,组合物可以递送至靶组织部位的形式装入胶囊或注射。在某些实施方案中,本发明的组合物可包含基质,其能够将一种或多种治疗化合物(例如TBRII多肽)递送到靶组织部位,为发育组织提供结构,并且最好能够被吸收进体内。例如,基质可提供慢释的TBRII多肽。这类基质可由目前用于其它植入医学应用的材料形成。

[0164] 基质材料的选择取决于生物相容性、生物降解能力、机械性能、美容外观和界面性质。主题组合物的具体应用将界定适当的制剂。组合物可能的基质可以是生物可降解的和化学成分确定的硫酸钙、磷酸三钙、羟磷灰石、聚乳酸和聚酐。其它可能的材料是生物可降解的和生物学上明确限定的,例如骨或真皮胶原。其它基质由纯的蛋白质或胞外基质组分组成。其它可能的基质是非生物可降解的和化学上确定的,例如烧结羟磷灰石、生物玻璃、铝酸盐或其它陶瓷。基质可由任何上述类型的材料的组合组成,例如聚乳酸和羟磷灰石或胶原和磷酸三钙。生物陶瓷可在组成方面改变,例如呈钙-铝酸盐-磷酸盐,并进行加工以改变孔径、颗粒大小、颗粒形状和生物降解能力。

[0165] 在某些实施方案中,本发明的方法可以例如以下形式口服给予:胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基料,一般为蔗糖和阿拉伯胶或西黄蓍胶)、散剂、颗粒剂,或者作为水性液体或非水性液体中的溶液剂或混悬剂、或作为水包油或油包水液体乳剂、或作为酏剂或糖浆剂、或作为软锭剂(使用惰性基料,例如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口剂等,各自含有预定量的物质作为活性成分。药剂还可作为大丸剂、药糖剂或糊剂给予。

[0166] 在口服给药的固体剂型(胶囊剂、片剂、丸剂、糖衣丸、散剂、颗粒剂等)中,可将一种或多种本发明的治疗化合物与一种或多种药学上可接受的载体例如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或以下的任一种混合:(1)填充剂或增充剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)湿润剂,例如甘油;(4)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)溶液阻滞剂,例如石蜡;(6)吸收促进剂,例如季铵化合物;(7)润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(8)吸收剂,例如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固态聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物;和(10)着色剂。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可包含缓冲剂。在使用诸如乳糖以及高分子量聚乙二醇等赋形剂的软充填和硬充填明胶胶囊剂中,相似类型的固体组合物也可用作填充剂。

[0167] 用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏剂。除活性成分以外,液体剂型可含有常用于本领域的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(具体地说为棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和失水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂以外,口服组合物还可包含辅料,例如润湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0168] 除活性化合物以外,混悬剂可含有助悬剂,例如乙氧基化异十八醇、聚氧乙烯山梨糖醇和失水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝(aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂和西黄蓍胶及其混合物。

[0169] 本发明的组合物还可含有辅料,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过加入多种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等,来确保防止微生物的作用。组合物中还可能需要包含等渗剂(例如糖、氯化钠等)。另外,可通过加入延迟吸收的物质(例如单硬脂酸铝和明胶),使可注射药物形式的吸收延长。

[0170] 要了解,主治医师在考虑修正本发明的主题化合物(例如TBRII多肽)的作用的各种因素后,可确定剂量方案。各种因素包括但不限于患者的年龄、性别和饮食、疾病严重程度、给药时间和其它临床因素。任选剂量可随用于重构的基质类型和组合物中化合物的类型而改变。向最终组合物中加入其它已知的生长因子也可影响剂量。可通过定期评价骨生长和/或修复,例如X射线(包括DEXA)、组织形态学测定和四环素标记,来监测进程。

[0171] 在某些实施方案中,本发明还提供用于体内产生TBRII多肽的基因疗法。这类疗法可通过将TBRII多核苷酸序列引入受累于上文所列病症的细胞或组织中,来达到其治疗效果。可使用重组表达载体(例如嵌合病毒或胶体分散系统)实现TBRII多核苷酸序列的递送。优选的TBRII多核苷酸序列的治疗递送是使用靶向脂质体。

[0172] 可用于本文教导的基因疗法的各种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、痘苗病毒或优选RNA病毒(例如反转录病毒)。优选反转录病毒载体是鼠或禽反转录病毒的衍生物。可插入单一外源基因的反转录病毒载体的实例包括但不限于:莫洛尼鼠白血病毒(MoMuLV)、Harvey鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)和劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV)。许多其它的反转录病毒载体可掺入多个基因。所有的这些载体可转移或整合选择标记的基因,使得可鉴定和产生转导细胞。可通过连接例如糖、糖脂或蛋白质,使反转录病毒载体具有靶标特异性。通过使用抗体来完成优选的打靶。本领域的技术人员应认识到,可将特异性多核苷酸序列插入反转录病毒基因组或与病毒包膜连接,以供含有TBRII多核苷酸的反转录病毒载体的靶标特异性递送。在一个优选的实施方案中,载体靶定骨或软骨。

[0173] 或者,可通过常规磷酸钙转染,将组织培养细胞用编码反转录病毒结构基因gag、pol和env的质粒直接转染。然后将这些细胞用含有目标基因的载体质粒转染。所得细胞释放反转录病毒载体到培养基中。

[0174] TBRII多核苷酸的另一种靶定递送系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括大分子复合体、纳米囊、微球、珠粒和脂质型系统,其包括水包油乳液、微团、混合微团和脂质体。优选的本发明的胶体系统是脂质体。脂质体是可体外和体内用作递送载体的人工膜囊泡。RNA、DNA和完整病毒体可包封在水性内部,并以生物活性形式递送至细胞(参见例如Fraley等, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981)。使用脂质体载体的有效基因转移方法是本领域已知的,参见例如Mannino等, Biotechniques, 6:682, 1988。脂质体的组成一般是磷脂的组合,一般与类固醇(尤其是胆固醇)组合。也可以使用其它磷脂或其它脂质。脂质体的物理特性取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在情况。

[0175] 可用于产生脂质体的脂质的实例包括磷脂酰化合物,例如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷脂。说明性的磷脂包括蛋黄磷脂

酰胆碱(egg phosphatidylcholine)、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。根据例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性靶定脂质体也是可行的,并且是本领域已知的。

[0176] 本公开内容提供可以改变成包括酸和碱以调节pH以及缓冲剂以保持pH在窄范围内的制剂。

[0177] 实例

现对本发明进行了大致描述,通过参照下列实施例可更容易地理解本发明,包括了所述实施例仅为了说明本发明的某些实施方案的目的,并无意限制本发明。

[0178] 实施例1. 生物活性GDF15的产生

GDF15 (亦称巨噬细胞抑制细胞因子-1)在生物化学上未显示直接与任何受体结合或相互作用。申请人首次尝试使用市购可获得的在哺乳动物CHO细胞中产生的人GDF15 (R&D Systems),鉴定对GDF15具有高亲和力结合的天然受体但未成功。与含有特有的半胱氨酸结基序的TGF β 超家族中的其它配体一样,合成具有较大前域的成熟GDF15 (Harrison等, Growth Factors 29:174, 2011;Shi等, Nature 474:343, 2011),所述前域通过在典型的RXXR位点被弗林蛋白酶样蛋白酶切割除去,产生成熟的二聚GDF15。因为不充分或不适当的配体纯化可能是市购可获得的GDF15失活的可能原因,所以申请人测试了用于GDF15的不同的纯化方法。

[0179] CHO细胞中GDF15的稳定表达

申请人使用CHO细胞表达人GDF15 (hGDF15)和鼠GDF15 (mGDF15)用于进一步研究。hGDF15的天然前体的氨基酸序列见图1,相应的核苷酸序列(与天然序列相比具有沉默的单一核苷酸取代)见图2。mGDF15前体的天然氨基酸和核苷酸序列分别见图3和图4。对于在CHO细胞中表达,将编码人或鼠GDF15前体的基于UCOE[™]的构建体稳定转染至CHO-PACE细胞系。以10 nM、20 nM和50 nM的甲氨蝶呤水平选择克隆,然后合并形成集落的任何克隆(每甲氨蝶呤浓度一个或两个)。不进行基因扩增,因为难以扩增UCOE[™]库同时保持表达的稳定性和高表达库,并用于产生hGDF15和mGDF15,而不是稀释克隆。

[0180] 人GDF15的纯化

为了开始纯化,稳定表达hGDF15的CHO细胞的条件培养基用乙酸调节至pH 4.7。在环境温度下温育培养基10分钟后,通过离心除去沉淀。将上清液用0.8 μ m一次性过滤器过滤。将SP Sepharose[™] Fast Flow柱(GE Healthcare)用缓冲液A (20 mM乙酸钠,pH 4.7)和B (20 mM乙酸钠、1M NaCl,pH 4.7)平衡。以100 cm/小时进行上样。柱用20% B (200 mM NaCl)洗涤直到无更多蛋白质从柱中洗脱出,然后反冲洗至0% B以除去任何残留的盐。蛋白质用50 mM Tris、6M脲,pH 8.0 (Tris+脲合并物)洗脱直到无更多蛋白质从柱中洗脱出,接着用50 mM Tris、6M脲、1M NaCl,pH 8.0 (Tris+脲+盐合并物)洗脱。将各合并物在4℃下在50 mM 4-吗啉乙磺酸(MES,pH 6.5)中透析过夜。

[0181] 根据蛋白质印迹分析,使存在于Tris+脲+盐合并物中的GDF15降解,因此弃去该合并物。将Tris+脲合并物上样到之前用缓冲液A (50 mM MES,pH 6.5)和B (50 mM MES、1M NaCl,pH 6.5)平衡的Q Sepharose[™] Fast Flow柱(GE Healthcare)中。收集流出液,将柱用10% B (100 mM NaCl)洗涤,接着以120 cm/小时用5个柱体积的10-50% B梯度(100-500 mM NaCl)洗涤。在通过蛋白质印迹评价流出液和洗涤流分后,主要在流出液中发现蛋白质。将流出液注入含缓冲液A (水/0.1% TFA)和B (乙腈/0.1% TFA)的与HPLC连接的反相制备

型C4柱(Vydac)中。在1小时内以4.5 mL/分钟的25-40% B梯度产生最佳分离。所收集的流分通过SDS-PAGE凝胶(Sypro Ruby)和蛋白质印迹评价以选择用于在离心蒸发器中浓缩的流分。

[0182] 鼠GDF15的纯化

条件培养基的pH用乙酸调节至 pH 4.7。在环境温度下温育培养基10分钟后,通过离心除去沉淀。将上清液用0.8 μm 一次性过滤器过滤。将SP Sepharose™ Fast Flow柱(GE Healthcare)用缓冲液A (20 mM乙酸钠,pH 4.7)和B (20 mM乙酸钠、1M NaCl,pH 4.7)平衡。以100-150 cm/小时进行上样,将柱用缓冲液A洗涤直到无更多蛋白质从柱中洗脱出。以60% B (600 mM NaCl)进行洗涤3-4个柱体积,接着用100% B (1M NaCl)洗涤3-4个柱体积。继续用50 mM Tris、6M脲,pH 8.0洗脱以除去仍与树脂结合的任何蛋白质。

[0183] 通过蛋白质印迹分析SP-柱流分的非还原样品。虽然大部分蛋白质存在于Tris洗脱流分中,但之前的实验表明,存在于这些流分中的mGDF15基本上是无活性的,因此不用于进一步纯化。相反,用存在于100% B洗脱(盐-洗脱合并物)的蛋白质继续纯化。将该合并物注入与HPLC连接的反相制备型C4柱(Vydac)中。缓冲液A为水/0.1% TFA,缓冲液B为乙腈/0.1% TFA。在1小时内以4.5 mL/分钟以25-40% B梯度洗脱蛋白质。在通过SDS-PAGE凝胶(Sypro Ruby)和蛋白质印迹评价反相柱流分后,合并含有纯mGDF15的流分,并在离心蒸发器中浓缩。

[0184] hGDF15和mGDF15的身份各自通过N端测序证实。两种类型的纯化的GDF15在两个不同的细胞系中刺激SMAD2/3磷酸化,从而提供配体活性的证实。

[0185] 实施例2. 以高亲和力结合GDF15的TGF β 超家族受体的鉴定

一旦获得有活性的GDF15蛋白,则针对与按实施例1所述产生和纯化的人或鼠GDF15的结合筛选包含TGF β 超家族受体的受体-Fc融合蛋白。这些融合蛋白掺入IgG1 Fc结构域,购自R&D Systems或内部产生。在5种II型受体(TGF β 受体II型、激活素受体II型A、激活素受体IIB型、BMP受体II型和MIS受体II型)中,仅TGF β 受体II型(T β RII)显示与GDF15的可检测结合($k_a = 2.92 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_d = 0.001 \text{ s}^{-1}$),通过用俘获的受体-Fc融合蛋白的表面等离子体共振测定。hGDF15在37°C下以9.56 nM的平衡解离常数(K_D)与俘获的hT β RII-Fc结合。7种I型受体(ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6和ALK7)中无一显示与GDF15可检测的结合(mGDF15在20 nM或200 nM下)。

[0186] 人T β RII以通过胞外域(ECD)的可变剪接产生的至少2种同种型(A (长)和B (短))天然存在(图5、6)。用于上述筛选的hT β RII-hG1Fc融合蛋白(R&D Systems)掺入野生型T β RII短同种型。在跟踪分析中,通过表面等离子体共振发现mGDF15与掺入野生型T β RII长同种型(R&D Systems)的融合蛋白结合的亲和力与掺入T β RII短同种型的融合蛋白的亲和力非常类似(K_D 在37°C下分别为2.7 nM和4.8 nM)。有关GDF15结合观察到这些短和长的同种型大致相等,申请人然后产生了受体-Fc融合蛋白,其由通过最小接头在其C端与人IgG2 Fc结构域融合的hT β RII短的野生型ECD(SEQ ID NO: 7)组成。除非另有说明,否则有关基于T β RII短和长同种型的变体的氨基酸位置编号分别是指天然前体SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6的相应位置。

[0187] 鉴于T β RII与GDF15的高亲和力结合,我们测试了T β RII是否可用作GDF15的抑制剂。在用含有CAGA-12启动子构建体的报道基因转染的A549细胞中测试了融合蛋白hT β RII短

(23-159)-hG2Fc,发现其在这类细胞中以0.15-0.5 nM的IC₅₀抑制hGDF15诱导的基因活化。GDF15信号转导被hTβRII_短ECD有效抑制提供了TβRII是GDF15的高亲和力受体的额外证据。即使GDF15在无细胞条件下不显示与ALK5的可检测结合,但与对照处理相比,在A549细胞(一种人肺上皮细胞系)中通过siRNA方法抑制内源ALK5 mRNA显著降低mGDF15介导的信号转导。相比之下,在A549细胞中,通过siRNA方法抑制其它I型受体(ALK2、ALK3、ALK4和ALK7)无法改变GDF15介导的信号转导。该结果表明,GDF15三重信号转导复合体包括ALK5 (TGFβ受体I型)作为其I型受体,因此提供TβRII作为GDF15的功能II型受体的确切证据。

[0188] 实施例3. 受体融合蛋白变体的产生

TβRII ECD变体

因为TβRII还以高亲和力与TGFβ1和TGFβ3结合,所以天然TβRII-Fc融合蛋白影响这些配体以及GDF15的信号转导。虽然在一些治疗背景下这种较广泛的配体结合可能是有利的,但在其它背景下,更大选择性的分子可能较好。因此,申请人通过产生包含人TβRII ECD的变体的融合蛋白寻找对GDF15选择性提高或降低的多肽。下面所示野生型hTβRII_短(23-159)序列(SEQ ID NO: 7)用作下列5种受体ECD变体(SEQ ID NO: 8-12)的基础。使野生型hTβRII_短(23-159)与IgG2的Fc部分融合,得到新的基础Fc融合物构建体。参见下面的SEQ ID NO. 50、51和52。

```

1   TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
51  ITSICEKFPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKCI
101 MKEKKKPGET FFMCS CSSDE CNDNIIFSEE YNTSNPD (SEQ ID NO: 7)

```

[0189] (1) 下面显示hTβRII_短(23-159/D110K)氨基酸序列(SEQ ID NO: 8),其中取代的残基用下划线标出。

```

1   TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
51  ITSICEKFPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHKFI LEDAASPKCI
101 MKEKKKPGET FFMCS CSSDE CNDNIIFSEE YNTSNPD (SEQ ID NO: 8)

```

[0190] (2) 下面显示N端截短的hTβRII_短(29-159)氨基酸序列(SEQ ID NO: 9)。

```

1   QKSVNNDMIV TDNNGAVKEP QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE
51  KPQEV VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKK
101 PGETFFMCSC SSDECNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 9)

```

[0191] (3) 下面显示N端截短的hTβRII_短(35-159)氨基酸序列(SEQ ID NO: 10)。

```

1   DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKFPQEV
51  VAVWRKNDEN ITLETVCHDP KLPYHDFILE DAASPKCIMK EKKKPGETFF
101 MCSCSSDECN DNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 10)

```

[0192] (4) 下面显示C端截短的hTβRII_短(23-153)氨基酸序列(SEQ ID NO: 11)。

```

1   TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVRFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
51  ITSICEKFPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKCI
101 MKEKKKPGET FFMCS CSSDE CNDNIIFSEE Y (SEQ ID NO: 11)

```

[0193] (5) 下面显示C端截短的hTBRII_短(23-153/N70D)氨基酸序列(SEQ ID NO: 12),其中取代的残基用下划线标出。

```

1   TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPOLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSDCS
51  ITSICEKPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKEI
101 MKEKKKPGET FFMCS CSSDE CNDNIIFSEE Y (SEQ ID NO: 12)

```

[0194] 申请人还预期基于以下所示野生型hTBRII_长(23-184)序列(SEQ ID NO: 13)的5种相应的变体(SEQ ID NO: 14-17),其中25个氨基酸插入用下划线标出。注意剪接导致插入的C端的侧翼位置处的保守氨基酸取代(Val→Ile)。几种hTBRII_短变体及其hTBRII_长对应物的序列关系见图7。

```

1   TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
51  PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEV CVAV WRKNDENITL
101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
151 IFSEEYNTSN PD (SEQ ID NO: 13)

```

[0195] (1) 下面显示hTBRII_长(23-184/D135K)氨基酸序列(SEQ ID NO: 14),其中取代的残基用双下划线表示。

```

1   TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
51  PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEV CVAV WRKNDENITL
101 ETVCHDPKLP YHKFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
151 IFSEEYNTSN PD (SEQ ID NO: 14)

```

[0196] (2) 下面显示N端截短的hTBRII_长(29-184)氨基酸序列(SEQ ID NO: 15)。

```

1   QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN RTAHPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPOLCKF
51  CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI TSICEKPQEV CVAVWRKNDENITLETVCHD
101 PKLPYHDFIL EDAASPKCIM KEKKKPGETF FMCSCSSDEC NDNIIFSEEY
151 NTSNPD (SEQ ID NO: 15)

```

[0197] (3) 下面显示N端截短的hTBRII_长(60-184)氨基酸序列(与SEQ ID NO: 10相同)。

```

1   DMIIVTDNNGA VKFPOLCKFC DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPQEV
[0198] 51  VAVWRKNDEN ITLETVCHDF KLPYHDFILE DAASPKCIM KEKKKPGETFF
101 MCSCSSDECN DNIIFSEEYN TSNPD

```

(与SEQ ID NO: 10相同)

(4) 下面显示C端截短的hTBRII_长(23-178)氨基酸序列(SEQ ID NO: 16)。

```

1   TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
51  PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEV CVAV WRKNDENITL
101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
151 IFSEEY (SEQ ID NO: 16)

```

[0199] (5) 下面显示C端截短的hTBRII_长(23-178/N95D)氨基酸序列(SEQ ID NO: 17),其

中取代的残基用双下划线表示。

```

1   TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
51  PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSDCSITSIC EKPQEVCVAV WRKNDENITL
101 ETVCHDFKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
151 IFSEFY      (SEQ ID NO: 17)

```

[0200] 其它TBRII ECD变体包括：

(A) 下面显示N端和C端截短的hTBRII_短(35-153)或hTBRII_长(60-178)氨基酸序列(SEQ ID NO: 47)。

```

1   DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPQEV
51  VAVWRKNDEN ITLETVCHDP KLPYHDFILE DAASPKCIMK EKKKPGETFF
101 MCSCSSDECN DNIIFSEFY      (SEQ ID NO: 47)

```

[0201] (B) 下面显示N端和C端截短的hTBRII_短(29-153)氨基酸序列(SEQ ID NO: 48)。

```

1   QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE
51  KPQEVCVAVW RKNDENITL TVCHDPKLPY HDFILEDAA S PKCIMKEKKK
101 PGETFFMCSC SSDECNDNII FSEFY      (SEQ ID NO: 48)

```

[0202] (C) 下面显示N端和C端截短的hTBRII_长(29-178)氨基酸序列(SEQ ID NO: 49)。

```

1   QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN RTAHFLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF
51  CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI TSICEKPQEV CVAVWRKNDENITLETVCHD
101 PKLPYHDFIL EDAASPKCIM KEKKKPGETF FMCSCSSDEC NDNIIFSEFY
      (SEQ ID NO: 49)

```

[0203] 像天然存在于hTBRII同种型C (Konrad等,BMC Genomics 8:318,2007)中一样,可将上述变体的任一个(SEQ ID NO: 8-12,14-17和47-49)在位于hTBRII ECD的C端附近的谷氨酸残基对(SEQ ID NO: 5的151和152位或SEQ ID NO: 6的176和177位)之间掺入36个氨基酸的插入序列(SEQ ID NO: 18)。

```
GRCKIRHIGS NNRLQRSTCQ NTGWESAHVM KTPGFR (SEQ ID NO: 18)
```

[0204] 例如,下面表示hTBRII_短(29-159)变体(SEQ ID NO: 9)的侧接任选插入位点的配对谷氨酸残基(下划线)。

```

1   QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE
51  KPQEVCVAVW RKNDENITL TVCHDPKLPY HDFILEDAA S PKCIMKEKKK
101 PGETFFMCSC SSDECNDNII FSEYNTSNP D      (SEQ ID NO: 9)

```

[0205] Fc结构域变体

产生hTBRII-hFc融合蛋白,其中上述5种hTBRII_短变体各自在其C端(通过最小接头)与人IgG2 Fc结构域融合,其具有下列氨基酸序列(SEQ ID NO: 19):

```

1   VECPPPCFAPP VAGPSVFLFP EKPDKTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51  FNWYVDGVEV HNAKTKFREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
101 NKGLPAFIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT EPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSVMHEALHN HYTQKSLSLs PGK (SEQ ID NO: 19)

```

申请人预期包含备选Fc结构域(包括全长人IgG1 Fc (hG1Fc) (SEQ ID NO: 20,见下)和N端截短的人IgG1 Fc (hG1Fc_短) (SEQ ID NO: 21,见下))的hTBRII-hFc融合蛋白。任选可连接与Fc结构域无关的多肽以替换Fc结构域。

```

1   GGPCKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP EKPDKTLMIS RTPEVTCVVV
51  DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKFREE QYNSTFRVVS VLTVLHQDWL
101 NGKEYKCKVS NKALPAFIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS
151 LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PEVLDSGDSF FLYSKLTVDK
201 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLs PGK (SEQ ID NO: 20)

```

```

1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKARGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLs LSPGK (SEQ ID NO: 21)

```

[0206] 前导序列变体

考虑了下列3个前导序列:

- (1) 天然:MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIAS (SEQ ID NO: 22)
- (2) 组织纤溶酶原激活物(TPA):MDAMKRLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 23)
- (3) 蜜蜂蜂毒肽(HBML):MKFLVNLVFMVYISYIYA (SEQ ID NO: 24)

hTBRII-hFc融合蛋白的表达

将选择的hTBRII-hFc蛋白变体掺入TPA前导序列,并具有SEQ ID NO: 25、29、33、37和41所示未加工的氨基酸序列(参见实施例5)。这些变体相应的核苷酸序列为SEQ ID NO: 26、30、34、38和42。使所选择的各含G2Fc结构域(SEQ ID NO: 19)的hTBRII-hFc变体在HEK-293细胞中表达,通过过滤和A蛋白层析法从条件培养基中纯化。通过SDS-PAGE和蛋白质印迹分析评价用于报道基因测定法的样品的纯度。

[0207] 申请人预期具有SEQ ID NO: 27、31、35、39和43所示未加工的氨基酸序列的其它hTBRII-hFc蛋白变体和SEQ ID NO: 28、32、36、40和44所示相应的核苷酸序列。

[0208] 野生型短构建体hTBRII_短(23-159)-hG2Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 50显示如下。

```

TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
ITSICEKFPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKCI
MKEKKKPGET FFMCS CSSDE CNDNIIFSEE YNTSNPDTGG GVECPCPCAP
PVAGPSVFLF PPKFKDTLMI SRTFEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE
VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE
KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
NGQFENNYKT TPFMLDS DGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 50)

```

[0209] 该蛋白质从如下所示包括TPA前导序列的构建体(SEQ ID NO:52)表达。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1  MDAMKRQLCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
51  QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEV CVAVW RKNDENITL
101 TVCHDPKLPY HDFILED AAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
151 FSEEYNTSNP DTGGGVECPP CPAPPVAGPS VFLFPKPKD TLMISRTPEV
201 TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV
251 HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT
301 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTFPMLD SDGSFFLYSK
351 LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTOK SLSLSPGK
      (SEQ ID NO: 52)

```

[0210] 编码SEQ ID NO:52的核酸序列显示如下:

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGCCG CCACGATCCC ACGCACGTT CAGAAGTCGG
101 TTAATAACGA CATGATAGTC ACTGACAACA ACGGTGCAGT CAAGTTTCCA
151 CAACTGTGTA AATTTTGTGA TGTGAGATTT TCCACCTGTG ACAACCAGAA
201 ATCCTGCATG AGCAACTGCA GCATCACCTC CATCTGTGAG AAGCCACAGG
251 AAGTCTGTGT GGCTGTATGG AGAAAGAATG ACGAGAACAT AACACTAGAG
301 ACAGTTTGCC ATGACCCCAA GCTCCCCTAC CATGACTTTA TTCTGSAAGA

```

```

351  TGCTGCTTCT CCAAAGTGCA TTATGAAGGA AAAAAAAAAAG CCTGGTGAGA
401  CTTTCTTCAT GTGTTCTGTG AGCTCTGATG AGTGCAATGA CAACATCATC
451  TTCTCAGAAG AATATAACAC CAGCAATCCT GACACCGGTG GTGGAGTCGA
501  GTGCCCCACCG TGCCCGAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCCTCT
551  TCCECCCAAA AECCEAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC
601  ACGTGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA
651  CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG
701  AGGAGCAGTT CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCGTG
751  CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA
801  AGGECTCCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC
851  CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC
901  AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA
951  CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCCGAGAAC AACTACAAGA
1001 CCACACCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG
1051 CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAAACGTCT TCTCATGCTC
1101 CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC
1151 TGTCTCCGGG TAAA (SEQ ID NO: 51)

```

实施例4. 在基于细胞的测定法中通过受体融合蛋白变体的差异配体抑制

采用A549细胞中的报道基因测定法测定hTBR11-hFc变体抑制GDF15、TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3的活性的能力。该测定法基于pGL3(CAGA)12报道质粒(Dennler等, 1998, EMBO 17: 3091-3100)以及Renilla报道质粒(pRLCMV)转染的人肺癌细胞系以控制转染效率。CAGA基序存在于TGFβ-反应基因的启动子(例如PAI-1)中,使得该载体通用于通过SMAD2和SMAD3的因子信号转导。

[0211] 在测定的第一天,以 6.5×10^4 个细胞/孔将A549细胞(ATCC[®]:CCL-185[™])分布在48孔板中。在第二天,使含有10 μg pGL3(CAGA)12、100ng pRLCMV、30 μl X-tremeGENE 9 (Roche Applied Science)和970 μl OptiMEM (Invitrogen)的溶液预温育30分钟,然后加入补充0.1% BSA的Eagle最小必需培养基(EMEM, ATCC[®])中,将其加入铺板细胞(500 μl/孔)中用于在室温下温育过夜。在第三天,除去培养基,使细胞与如下所述制备的配体和抑制剂的混合物一起在37°C下温育过夜。

[0212] 在48孔板上在200 μl体积的测定缓冲液(EMEM + 0.1 % BSA)中制备连续稀释的试验品。加入含有试验配体的等体积的测定缓冲液,得到等于之前测定的EC50的最终配体浓度。人GDF15和鼠GDF15在内部产生(见上文),而人TGFβ1、人TGFβ2和人TGFβ3获自PeproTech。使试验溶液在37°C下温育30分钟,然后将250 μl混合物加入所有孔中。一式两份测定各浓度的试验品。在与试验溶液温育过夜后,将细胞用磷酸缓冲盐水漂洗,然后用被动裂解缓冲液(Promega E1941)裂解,并在-70°C下保存过夜。在第4和最后一天,在轻轻振荡的同时使板升温至室温。将细胞裂解物一式两份转移到化学发光板(96孔)上,在发光计中用来自Dual-Luciferase Reporter Assay系统(Promega E1980)的试剂分析以确定归一化萤光素酶活性。

[0213] 采用该测定法针对通过TβRII配体对细胞信号转导的可能的抑制作用筛选受体融合蛋白变体。与之前有关野生型TβRII_短-Fc和TβRII_长-Fc的报告(de1 Re等,J Biol Chem 279:22765,2004)一致,受测变体甚至在高浓度下无一能够抑制TGFβ2。然而hTβRII-hFc变体料想不到地显示由GDF15、TGFβ1和TGFβ3介导的细胞信号转导的差异抑制。与野生型TβRII_短(23-159)-G2Fc相比,TβRII_短(23-159/D110K)-G2Fc变体显示GDF15的有效抑制,但丧失TGFβ1的抑制,且TGFβ3抑制大大降低(~50倍)(参见下表)。第110位位于TβRII的“钩”区(Radaev等,J Biol Chem 285:14806,2010),但并未表明在公认的TβRII配体TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3之间提供选择性。因此,该变体显示差异配体抑制的特征,其中GDF15最有效地被抑制,TGFβ1最不有效地被抑制,且TGFβ3被抑制至中等程度。

构建体		IC ₅₀ (nM)		
		mGDF15 (35 ng/ml)	hTGFβ1 (640 pg/ml)	hTGFβ3 (270 pg/ml)
全长野生型 ECD	TβRII _短 (23-159)-G2Fc	~0.12	1.73	0.14
具有 D110K 取代的全长 ECD	TβRII _短 (23-159/D110K)-G2Fc	~0.7	ND (> 73.6)	~6.9

ND, 未测定

[0214] 在第2个实验中,将具有N端截短的TβRII ECD的变体的效能与全长野生型TβRII ECD的进行比较。如下表所示,与TβRII_短(23-159)-G2Fc (野生型)相比,TβRII_短(29-159)-G2Fc和TβRII_短(35-159)-G2Fc显示抑制TGFβ3的能力大大减弱,但抑制GDF15的能力未减弱(N' Δ6)或仅略减弱(N' Δ12)。与野生型相比,N端截短对TGFβ1的抑制的影响在量级上是中等的。因此,这2种变体显示差异配体抑制的特征,其中GDF15最有效地被抑制,TGFβ3最不有效地被抑制,TGFβ1被抑制至中等程度。

构建体		IC ₅₀ (nM)		
		hGDF15 (70 或 112 ng/ml)	hTGFβ1 (640 pg/ml)	hTGFβ3 (270 pg/ml)
全长野生型 ECD	TβRII _短 (23-159)-G2Fc	0.14 - 0.53	0.52	0.37
N'Δ6 ECD	TβRII _短 (29-159)-G2Fc	0.40	2.05	ND (> 7.5)
N'Δ12 ECD	TβRII _短 (35-159)-G2Fc	0.92	2.51	ND (> 7.5)

ND, 未测定

[0215] 在第3个实验中,我们测定了C端截短的TβRII ECD中的N70D取代对效能的作用。该天冬氨酸残基表示可能的糖基化位点。如下表所示,TβRII_短(23-153/N70D)-G2Fc显示与TβRII_短(23-153)-G2Fc相比,抑制TGFβ1的能力大大减弱,而抑制TGFβ3的能力几乎未减弱。与TβRII_短(23-153)-G2Fc和野生型两者相比,N70D取代对GDF15抑制的作用在量级上是中等的。因此,具有N70D取代的C端截短变体显示差异配体抑制的特征,其中TGFβ3最有效地被抑制,TGFβ1最不有效地被抑制,GDF15被抑制至中等程度。

构建体		IC ₅₀ (nM)		
		hGDF15 (70 ng/ml)	hTGFβ1 (640 pg/ml)	hTGFβ3 (270 pg/ml)
全长野生型 ECD	TβRII _Δ (23-159)-G2Fc	0.14	ND	ND
C'Δ6 ECD	TβRII _Δ (23-153)-G2Fc	0.18	2.62	0.14
具有 N70D 取代的 C'Δ6 ECD	TβRII _Δ (23-153/N70D)-G2Fc	2.42	17.7	0.28

[0216] 总起来,这些结果表明,申请人产生了显示极不同的配体结合特征的TβRII ECD的截短物和突变物。值得注意地,该实证显示适当表达和纯化的GDF15与TβRII直接相互作用,并可被包含TβRII ECD变体的融合蛋白差异性抑制。这些变体的活性特征可概括于下表。

配体选择性的概括				
构建体		配体抑制的程度		
		有效	中等	可忽略
全长野生型 ECD	TβRII _Δ (23-159)-G2Fc	GDF15 TGFβ1 TGFβ3	---	TGFβ2
具有 D110K 取代的 全长 ECD	TβRII _Δ (23-159/D110K)-G2Fc	GDF15	TGFβ3	TGFβ1 TGFβ2
N'Δ6 ECD	TβRII _Δ (29-159)-G2Fc	GDF15	TGFβ1	TGFβ2 TGFβ3
N'Δ12 ECD	TβRII _Δ (35-159)-G2Fc	GDF15	TGFβ1	TGFβ2 TGFβ3
具有 N70D 取代的 C'Δ6 ECD	TβRII _Δ (23-153/N70D)-G2Fc	TGFβ3	GDF15	TGFβ1 TGFβ2

[0217] 我们预测,这些TβRII_短ECD变体的TβRII_长ECD对应物将显示类似的配体选择性。另外,C'Δ6截短的ECD(例如对于TβRII_短和TβRII_长同种型分别为SEQ ID NO: 11和16)可用作其中引入突变和N端截短的TβRII_短或TβRII_长的基础序列。

[0218] 实施例5. 示例性hTβRII-hFc核酸和蛋白质

该实施例概述了可用于按照本文提供的方法在HEK-293或CHO细胞中表达TβRII构建体以提供从细胞培养物中分离的蛋白质的核酸构建体。在各种情况下,可使从细胞培养物中分离的成熟蛋白质除去前导序列(以下各序列中的虚线下划线)。

[0219] 第1项显示hTβRII_短(23-159/D110K)-hG2Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 25)。双下划线表示D110K取代。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SFGATIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP

```

51  QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCAVAVW RKNDENITILE
101 TVCHDPKLPY HKFILEDAAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SDECDNDNII
151 FSEELYNTSNP DTGGGVCECPP CPAPPVAGPS VFLFPKPKD TLMISRTFEV
201 TCVVVDVSHE DFEVQFNWYV DGVEVHNAKT KFREEQFNST FRVVSVLTVV
251 HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREFQVY TLPPSREEMT
301 KNQVSLTCLV KGFYPSPDIIV EWESNGQFEN NYKTTFPMLD SDGSFFLYSK
351 LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
      (SEQ ID NO: 25)

```

[0220] 第2项显示编码hTBRII_短(23-159/D110K)-hG2Fc的核苷酸序列(SEQ ID NO: 26)。双下划线表示D110K取代。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTECTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
101 TTAATAACGA CATGATAGTC ACTGACAACA ACGGTGCAGT CAAGTTTCCA
151 CAACTGTGTA AATTTTGTGA TGTGAGATT TCCACCTGTG ACAACCAGAA
201 ATCCTGCATG AGCAACTGCA GCATCACCTC CATCTGTGAG AAGCCACAGG
251 AAGTCTGTGT GGCTGTATGG AGAAAGAATG ACGAGAACAT AACACTAGAG
301 ACAGTTTGCC ATGACCCCAA GCTCCCTTAC CATAAGTTTA TTCTGGAAGA
351 TGCTGCTTCT CCAAAGTGCA TTATGAAGGA AAAAAAAG OCTGCTGAGA
401 CTTTCTTCAT GTGTTCTCTG AGCTCTGATG AGTGCAATGA CAACATCATC
451 TTCTCAGAAG AATATAACAC CAGCAATCCT GACACCGGTG GTGGAAGTGA
501 GTGCCACCG TGCCAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCTCT
551 TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC
601 ACGTGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA
651 CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG
701 AGGAGCAGTT CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTGTG
751 CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCACAA
801 AGGCCTCCCA GCCCCTATCG AGAAAACCAT CTCAAAACC AAAGGSCAGC
851 CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC
901 AAGAACCAGS TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA
951 CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA
1001 CCACACCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT CTACAGCAAG
1051 CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC
1101 CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC
1151 TGTCTCCGGG TAAA      (SEQ ID NO: 26)

```

[0221] 第3项显示hTBRII_短(23-159/D110K)-hG1Fc_短的氨基酸序列(SEQ ID NO: 27)。双下划线表示D110K取代。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 MDAMKRGLOC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
51 QLCKPCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPOEVCVAVW RKNDENITLE
101 TVCHDPKLPY HKFILEDAAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
151 FSEELYNTSNP DTGGGTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPKP KDTLMISRTP
201 EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT
251 VLRQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEXTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
301 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSEFLY
351 SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALRNHYT QKSLSLSPGK

```

(SEQ ID NO: 27)

[0222] 第4项显示编码hTBRII_短(23-159/D110K)-hG1Fc_短的核苷酸序列(SEQ ID NO: 28)。双下划线表示D110K取代。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
101 TTAATAACGA CATGATAGTC ACTGACAACA ACGGTGCAGT CAAGTTTCCA
151 CAACTGTGTA AATTTGTGTA TGTGAGATTT TCCACCTGTG ACAACCAGAA
201 ATCCTGCATG AGCAACTGCA GCATCACCTC CATCTGTGAG AAGCCACAGG
251 AAGTCTGTGT GGCTGTATGG AGAAAGAATG ACGAGAACAT AACACTAGAG
301 ACAGTTTGGC ATGACCCCAA GCTCCCTTAC CATAAGTTTA TTCTGGAAGA
351 TGCTGCTTCT CCAAAGTGCA TTATGAAGGA AAAAAAAAAA CCTGGTGAGA
401 CTTTCTTCAT GTGTTCTCTG AGCTCTGATG AGTGCAATGA CAACATCATC
451 TTCTCAGAG AATATAACAC CAGCAATCCT GACACCGGTG GTGGAACCTA
501 CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAC CTGGGGGGGA CCGTCAGTCT
551 TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT
601 GAGGTCAEAT GCGTGGTGTT GGACGTEAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA
651 GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC
701 CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CFTCTCACC
751 GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC
801 CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG
851 GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGAGGAG
901 ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC
951 CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGSAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC
1001 ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAT
1051 AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAAGGGA ACGTCTTCTC
1101 ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC
1151 TCTCCCTGTC CCGGGCTAAA (SEQ ID NO: 28)

```

[0223] 第5项显示hTβRII_短(29-159)-hG2Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 29)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1  MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAQKSVNN DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC
51  DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPFQEVV VAVWRKNDEN ITLETVCHDF
101 KLPYHDFILE DAASPKCIMR EKKKPGETFF MCSCSSUECN DNIIFSEEYN
151 TSNPDTGGGV ECPPCPAPFV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
201 VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN
251 GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
301 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTF PMLDSGGSFF LYSKLTVDKS
351 FWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 29)

```

[0224] 第6项显示编码hTβRII_短(29-159)-hG2Fc的核苷酸序列(SEQ ID NO: 30)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCCAGAAGTC GGTAAATAAC GACATGATAG
101 TCACTGACAA CAACGGTGCA GTCAAGTTTC CACAAGTGTG TAAATTTTGT
151 GATGTGAGAT TTTCCACCTG TGACAACCAG AAATCCTGCA TGAGCAACTG
201 CAGCATCACC TCCATCTGTG AGAAGCCACA GGAAGTCTGT GTGGCTGTAT
251 GGAGAAAGAA TGACGAGAAC ATAACACTAG AGACAGTTTG CCATGACCCC
301 AAGCTCCCTT ACCATGACTT TATTCTGGAA GATGCTGCTT CTCCAAAGTG
351 CATTATGAAG GAAAAAAAAA AGCCTGGTGA GACTTTCTTC ATGTGTTTCT
401 GTAGCTCTGA TGAGTGCAAT GACAACATCA TCTTCTCAGA AGAATATATC
451 ACCAGCAATC CTGACACCGG TGGTGGAGTC GAGTGCCAC CCGTCCCGAGC
501 ACCACCTGTG GCAGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA AAACCCAAGG
551 ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCTGAGG TCACGTGCGT GGTGGTGGAC
601 GTGAGCCACG AAGACCCCGA GGTCCAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT
651 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCACG GGAGGAGCAG TTCAACAGCA
701 CGTTCGGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCG TGCACCAGGA CTGGCTGAAC
751 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGGCCTCC CAGCCCCCAT
801 CGAGAAAACC ATCTCCAAAA CCAAAGGGCA GCCCGAGAA CCACAGGTGT
851 ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG
901 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTACCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA

```

```

951 GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACACCT CCCATGCTGG
1001 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCCT GGACAAGAGC
1051 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT
1101 GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAG
      (SEQ ID NO: 30)

```

[0225] 第7项显示hTBRII_短(29-159)-hG1Fc_短的氨基酸序列(SEQ ID NO: 31)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 MDAMKRGLOC VLLLCGAVFV SPGAQKSVNN DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC
51 DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPQEV VAVWRKNDEN ITLETVCHDP
101 KLPYHDFILE DAASPKCIMK EKKKPGETFF MCSCSSDECN DNIIFSEEYN
151 TSNFDTGGGT HTCPCPCAPE LLGGPSVFLF FPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
201 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKFRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDN
251 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQF REPQVYTLPP SREEMTKNOV
301 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPFVLDSDGS FFLYSKLTVD
351 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 31)

```

[0226] 第8项显示编码hTBRII_短(29-159)-hG1Fc_短的核苷酸序列(SEQ ID NO: 32)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGCGG CCCAGAAATC GGTTAATAAC GACATGATAG
101 TCACTGACAA CAACGGTGCA GTCAAGTTTC CACAACTGTG TAAATTTTGT
151 GATGTGAGAT TTTCCACCTG TGACAACCAG AAATCCTGCA TGAGCAACTG
201 CAGCATCACC TCCATCTGTG AGAAGCCACA GGAAGTCTGT GTGGCTGTAT
251 GGAGAAAGAA TGACGAGAAC ATAACACTAG AGACAGTTG CCATGACCCC
301 AAGCTCCCTT ACCATGACTT TATTCCTGGA GATGCTGCTT CTCCAAAGTG
351 CATTATGAAG GAAAAAAAAA AGCCTGGTGA GACTTTCTTC ATGTGTTCTT
401 GTAGCTCTGA TGAGTGCAAT GACAACATCA TCTTCTCAGA AGAATATAAC
451 ACCAGCAATC CTGACACCGG TGGTGGAACT CACACATGCC CACCGTGCCG
501 AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC
551 CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG
601 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA
651 CGGCGTGSAG GTGCATAATG CCAAGACAAA CCCGCGGGAG GAGCAGTACA
701 ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG
751 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCTCCCGAGC
801 CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACAC

```

```

851 AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC
901 AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA
951 GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAGAGACC ACGCCTCCCG
1001 TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ATAGCAAGCT CACCSTGGAC
1051 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATSCATGA
1101 GGCTCTGCAC AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCCCGGGTA
1151 AA (SEQ ID NO: 32)

```

[0227] 第9项显示hTβRII_短(35-159)-hG2Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 33)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 MDAMKRGSLCC VLLLCGAVFV SPGADMIVTD NNGAVKFPQL CKPCDVRFSF
51 CDNOKSCMSN CSITSICEKP QEVCAVAVWRK NDENITLETV CHDPKLPYHD
101 FILEDAASPK CIMKEKKKPG ETFFMCSCSS DECNDNIIFS EBYNTSNPDT
151 GGGVECPPCF APPVAGPSVF LFFPKFKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
201 EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
251 KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
301 FYPSDIAVEW ESNGQFENNY KTTTPMLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
351 VFSCBYMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 33)

```

[0228] 第10项显示编码hTβRII_短(35-159)-hG2Fc的核苷酸序列(SEQ ID NO: 34)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 ATGSATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTST GTGCTGCTGC TGTGTGSAGC
51 AGICTTEGTT TCGCCCGGCG CCGACATGAT AGTCACTGAC AACAAACSGT
101 CAGTCAAGTT TCCACAACCTG TGTAATTTT GTGATGTGAG ATTTTCCACC
151 TGTGACAACC AGAAATCCTG CATGAGCAAC TGCAGCATCA CCTCCATCTG
201 TGAGAAGCCA CAGGAAGTCT GTGTGGCTGT ATGGAGAAAG AATGACGAGA
251 ACATAACACT AGAGACAGTT TGCCATGACC CCAAGCTCCC CTACCATGAC
301 TTTATTCTGG AAGATGCTGC TTCTCCAAAG TGCATTATGA AGGAAAAAAA
351 AAAGCCTGGT GAGACTTTCT TCATGTGTTC CTGTAGCTCT GATGAGTGCA
401 ATGACAACAT CATCTTCTCA GAAGAATATA ACACCAGCAA TCCTGACACC
451 GGTGGTGGAG TCGAGTGCCC ACCGTGCCCA GCACCACCTG TGGCAGGACC
501 GTCAGTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC
551 GCACCCCTGA GGTACGCTGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCC
601 GAGGTCCAGT TCAACTGGTA CGTGGACGOC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA
651 GACAAAGCCA CGGGAGGAGC AGTTCAACAG CACGTTCCGT GTGGTCAGCG
701 TCCTCACCGT CGTGCACCA GACTGGCTGA ACGGCAAGGA GTACAAGTGC
751 AAGGTCTCCA ACAAAGGCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA

```

```

801  AACCAAAGGG CAGCCCCGAG AACACASGT GTACACCOCTG CCCCATCCC
851  GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC
901  TTCTACCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCCGA
951  GAACAACACTAC AAGACCACAC CTCCCATGCT GGAATCCGAC GGCTCCTTCT
1001 TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAAGTGSCA GCAGGGGAAC
1051 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA
1101 GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAA (SEQ ID NO: 34)

```

[0229] 第11项显示hTβRII_短(35-159)-hG1Fc_短的氨基酸序列(SEQ ID NO: 35)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1  MDAMKPGLOC VLLLCGAVFV SPGADMIVTD NNGAVKFPQL CMFCDVRFST
51  CDNQKSCMSN CSITSICEKP QEVCAVVRK NDENITLETV CHDPKLPYHD
101 FILEDAASPK CIMKEKKKPG ETFFMCSCSS DECNDNIIPS EYNTSNPDT
151 GGGTHTCPFC PAPELLGGPS VFLPPKPKD TLMISRTPEV TCVVDVSHE
201 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
251 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPOVY TLPFSREEMT KNOVSLTCLV
301 KGFYPDIAV EWESNGQPN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
351 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 35)

```

[0230] 第12项显示编码hTβRII_短(35-159)-hG1Fc_短的核苷酸序列(SEQ ID NO: 36)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGACATGAT AGTCACTGAC AACAAAGGTC
101 CAGTCAAGTT TCCACAACCTG TGTAAATTTT GTGATGTGAG ATTTTCCACC
151 TGTGACAACC AGAAATCCTG CATGAGCAAC TGCAGCATCA CCTCCATCTG
201 TGAGAAGCCA CAGGAAGTCT GTGTGGCTGT ATGGAGAAAG AATGACGAGA
251 ACATAACACT AGAGACAGTT TGCCATGACC CCAAGCTCCC CTACCATGAC
301 TTTATTCTGG AAGATGCTGC TTCTCCAAAG TGCATTATGA AGGAAAAAAA
351 AAAGCCTGGT GAGACTTTCT TCATGTETTC CTGTAGCTCT GATGAGTGCA
401 ATGACAACAT CATCTTCTCA GAAGAATATA ACACCAGCAA TCCTGACACC
451 GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG AACTCCTGGG
501 GGGACCGTCA GTCTTCTCTT TCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA
551 TCTCCCGGAC CCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA
601 GACCCGTGAGG TCAAGTTCAA CTGCTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA
651 TGCCAAGACA AAGCEGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCAGC TACCGTGTGG
701 TCAGCGTCCT CACCGTCTCT CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC
751 AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT

```

```

801 CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCGAGAAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC
851 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC
901 AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG EAGTGGGAGA GCAATGGGCA
951 GCGGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCCTCC CGTGCTGGAC TCCGACGGCT
1001 CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG
1051 GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA
1101 CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG TAAA

```

(SEQ ID NO: 36)

[0231] 第13项显示hTβRII_短(23-153)-hG2Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 37)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 MDAMFRGLCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSVNNDMIV TDWNGAVKFP
51 QLCKFCDFRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCAVAV RKNDENITLE
101 TVCHDPKLPY HDFILEDAA S PKCIMKENKM PGETFFMCSC SSDECNDNII
151 FSEBYTGGGV ECPFCFAPPV AGPSVFLPPP KPKDTLMISR TFEVTCVVVD
201 VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN
251 GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
301 TCLVRGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP FMLDSGGSFF LYSKLTVDKS
351 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 37)

```

[0232] 第14项显示编码hTβRII_短(23-153)-hG2Fc的核苷酸序列(SEQ ID NO: 38)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAAGTCG
101 TTAATAACGA CATGATAGTC ACTGACAACA ACGGTGCAGT CAAGTTTCCA
151 CAACTGTGTA AATTTTGTGA TGTGAGATT TCCACCTGTG ACAACCAGAA
201 ATCCTGCATG AGCAACTGCA GCATCACCTC CATCTGTGAG AAGCCACAGG
251 AAGTCTGTGT GGCTGTATGG AGAAAGAATG ACGAGAACAT AACACTAGAG
301 ACAGTTTGCC ATGACCCCAA GCTCCCCTAC CATGACTTTA TTCTGGAAGA
351 TGCTGCTTCT CCAAAGTGCA TTATGAAGGA AAAAAAAG CCTGGTGAGA
401 CTTTCTTCAT GTGTTCTGTG AGCTCTGATG AGTGCAATGA CAACATCATC
451 TTCTCAGAAG AATATACCGG TGGTGGAGTC GAGTGCCAC CGTGCCAGC
501 ACCACCTGTG GCAGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA AAACCEAAGG
551 ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACGTGCGT GGTGGTGGAC
601 GTGAGCCACG AAGACCCCGA GGTCCAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT
651 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCACG GGAGGAGCAG TTCAACAGCA
701 CGTTCCGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCG TGCACCAGGA CTGCTGAAC

```

```

751  GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGGCCTCC CAGCCCCCAT
801  CGAGAAAACC ATCTCCAAA CCAGAGGGCA GCCCGAGAA CCACAGGTGT
851  ACAOCCTGOC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTCAOCCTG
901  ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTACCCGAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA
951  GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACACCT CCCATGCTGG
1001 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC
1051 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT
1101 GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAG
      (SEQ ID NO: 38)

```

[0233] 第15项显示hTBR_{II短}(23-153)-hG1Fc_短的氨基酸序列(SEQ ID NO: 39)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1  MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGATIFPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
51  QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCVAVW RKNDENITLE
101 TVCHDPMLPY HDFILEDARS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
151 FSEBYTGGGT HTCPFPCPFE LLGGPSVFLF PFKPKDTLMI SRTPEVTCVY
201 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYBVV SVLTVLHQDW
251 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPOVYTLPP SREEMTKNQV
301 SLTCLVMGFY PSDIAVEWES NGQFENNYKT TPFVLDSDGS FFLYSLTVD
351 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK      (SEQ ID NO: 39)

```

[0234] 第16项显示编码hTBR_{II短}(23-153)-hG1Fc_短的核苷酸序列(SEQ ID NO: 40)。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51  AGTCTTCSTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
101 TTAATAACGA CATGATAGTC ACTGACAACA ACGGTGCAGT CAAGTTTCCA
151 CAACTGTGTA AATTTTGTGA TGTGAGATTT TCCACCTGTG ACAACCAGAA
201 ATCCTGCATG AGCAACTGCA GCATCACCTC CATCTGTGAG AAGCCACAGG
251 AAGTCTGTGT GGCTGTATGG AGAAAGAATG ACGAGAACAT AACACTAGAG
301 ACAGTTTGCC ATGACCCCAA GCTCCCTTAC CATGACTTTA TTCTGGAAGA
351 TGCTGCTTCT CCAAAGTGCA TTATGAAGGA AAAAAAAG CCTGGTGAGA
401 CTTTCTTCAT GTGTTCTGT AGCTCTGATG AGTGCAATGA CAACATCATC
451 TTCTCAGAAG AATATACCGG TGGTGGAACT CACACATGCC CACCGTSCCC
501 AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCTCTTTC CCCCCAAAAC
551 CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTAC ATGCGTGGTG
601 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA
651 CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA

```

```

701 ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG
751 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC
801 CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCCAC
851 AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC
901 AGCCTGACCT GCCTGCTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA
951 GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG
1001 TGCTGGACTC CGACCGCTCC TTCTTCCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC
1051 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA
1101 GGCTCTGCAC AACCCTTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCCCGGGTA
1151 AA (SEQ ID NO: 40)

```

[0235] 第17项显示hTβRII_短(23-153/N70D)-hG2Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 41)。双下划线表示N70D取代。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGATIPFHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFF
51 QLCKFC DVERF STCDNQKSCM SDCSITSICE KPQEVCVAVW RKNDENITLE
101 TVCHDP KLPY HDFILED AAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
151 FSE EYTGGSV ECPPCFAPPV AGPSVFLFEP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
201 VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVS V LTVVHQDWLN
251 GKEYKCKVSN RGLPAPIEKT ISKTGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
301 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
351 RNQQGNVFSC SVMHEALHNR YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 41)

```

[0236] 第18项显示编码hTβRII_短(23-153/N70D)-hG2Fc的核苷酸序列(SEQ ID NO: 42)。双下划线表示N70D取代。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
101 TTAATAAGCA CATGATAGTC ACTGACAACA ACGGTGCAGT CAAGTTTCCA
151 CAACTGTGTA AATTTTGTGA TGTGAGATTT TCCACCTGTG ACAACCAGAA
201 ATCCTGCGATG AGCGACTGCA GCATCACCTC CATCTGTGAG AAGCCACAGG
251 AAGTCTGTGT GGCTGTATGG AGAAAGAATG ACGAGAACAT AACACTAGAG
301 ACAGTTTGCC ATGACCCCAA GCTCCCCTAC CATGACTTTA TTCTGGAAGA
351 TGCTGCTTCT CCAAAGTGCA TTATGAAGGA AAAAAAAG CCTGGTGAGA
401 CTTTCTTCAT GTGTTCTGT AGCTCTGATG AGTGCAATGA CRACATCATC
451 TTCTCAGAAG AATATACCGG TGGTGGAGTC GAGTGCCAC CGTGCCAGC
501 ACCACCTGTG GCAGGACCGT CAGTCTTCT CTTCCTCCCA AAACCCAAGG

```

```

551 ACACCCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACGTGCGT GGTGGTGGAC
601 GTGAGCCACG AAGACCCCGA GGTCCAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT
651 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCACG GGAGGAGCAG TTCAACAGCA
701 CGTTCGGTGT GGTCCAGGTC CTCACCGTCG TGCACCAGGA CTGGCTGAAC
751 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGGCTCC CAGCCCCCAT
801 CGAGAAAACC ATCTCCAAAA CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT
851 ACACCCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAAOCA GGTCCAGCCTG
901 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTACCCGAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA
951 GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACACCT CCCATGCTGG
1001 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCCT GGACAAGAGC
1051 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT
1101 GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAG
      (SEQ ID NO: 42)

```

[0237] 第19项显示hTBRII_短(23-153/N70D)-hG1Fc_短的氨基酸序列(SEQ ID NO: 43)。双下划线表示N70D取代。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SFGATIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
51 QLCKFC DVPF STCDNOKSCM SDCSITSICE KFQEVCAVAV RKNDENITLE
101 TVCHDP KLPY HDFILED AAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
151 FSEEYTG GGT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
201 VDVSHED PEV KFNWYVD GVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
251 LNGKEYK CKV SNKALPA PIE KTISKARGQP REFQVYTLFP SREEMTRNQV
301 SLTCLVK GPFY PSDIAVE WES NGQPENNYKT TFPVLDSDGS FFLYSKLTVD
351 KSRWQQG NVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPCK (SEQ ID NO: 43)

```

[0238] 第20项显示编码hTBRII_短(23-153/N70D)-hG1Fc_短的核苷酸序列(SEQ ID NO: 44)。双下划线表示N70D取代。虚线下划线表示前导序列,实心下划线表示接头。

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
101 TTAATAACGA CATGATAGTC ACTGACAACA ACGGTGCAGT CAAGTTTCCA
151 CAACTGTGTA AATTTTGTGA TGTGAGATTT TCCACCTGTG ACAACCAGAA
201 ATCCTGCATG AGCGACTGCA GCATCACCTC CATCTGTGAG AAGCCACAGG
251 AAGTCTGTGT GGCTGTATGG AGAAAGAATG ACGAGAACAT AACACTAGAG
301 ACAGTTTGCC ATGACCCCAA GCTCCCCTAC CATGACTTTA TTCTGGAAGA
351 TGCTGCTTCT CCAAAGTGCA TTATGAAGGA AAAAAAAAAAG CCTGGTGAGA

```

```

401 CTTTCCTTCAT GTGTTCTGT AGCTCTGATG AGTGCAATGA CAACATCATC
451 TTCTCAGAAG AATATACCGG TGGTGGAACT CACACATGCC CACCGTGCCC
501 AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC
551 CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG
601 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA
651 CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA
701 ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG
751 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC
801 CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC
851 AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC
901 AGCCTGACCT GCGTGGTCAA AGGTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA
951 GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG
1001 TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCTT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC
1051 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA
1101 GGCTCTGCAC AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCCCGGGTA
1151 AA (SEQ ID NO: 44)

```

[0239] 第21项显示hTBRII_短(23-159/D110K)-hG2Fc的成熟氨基酸序列(即无前导序列)(SEQ ID NO: 53)。双下划线表示D110K取代。单下划线表示接头。

```

TIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCAVAVW RKNDENITLE
TVCHDPKLPY HKFILEDAAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
FSEELYNTSNF DTGGGVECPE CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV
TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KFREEQFNST FRVVSVLTVV
HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEXTISKT KGQPREPOVY TLPPSREEMT
KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
(SEQ ID NO: 53)

```

[0240] 第22项显示hTBRII_短(23-159/D110K)-hG1Fc_短的成熟氨基酸序列(即无前导序列)(SEQ ID NO: 54)。双下划线表示D110K取代。单下划线表示接头。

```

TIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCAVAVW RKNDENITLE
TVCHDPKLPY HKFILEDAAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII

```

FSEFYNTSNP DTGGGTHTCP ECPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP
 EVTCVVVDVS HEDPEVKFNV YVDGVEVHNA KTKFREEQYN STYRVVSVLT
 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFFLY
 SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO: 54)

[0241] 第23项显示hTBR_{II}短(29-159)-hG2Fc的成熟氨基酸序列(即无前导序列)(SEQ ID NO: 55)。单下划线表示接头。

QKSVNN DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC
 DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPQEV VAVWRKNDEN ITLETVCHDF
 KLPYHDFILE DAASPKCIMK EKKKPGETFF MCSCSSDECN DNIIFSEEYN
 TSNPDTGGGV ECFPCPAPPV AGFSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVS LTVVHQDWLN
 GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 55)

[0242] 第24项显示hTBR_{II}短(29-159)-hG1Fc短的成熟氨基酸序列(即无前导序列)(SEQ ID NO: 56)。单下划线表示接头。

QKSVNN DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC
 DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPQEV VAVWRKNDEN ITLETVCHDF
 KLPYHDFILE DAASPKCIMK EKKKPGETFF MCSCSSDECN DNIIFSEEYN
 TSNPDTGGGT HTCFFCPAPE LLGGPSVFLP PFKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV
 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 56)

[0243] 第25项显示hTBR_{II}短(35-159)-hG2Fc的成熟氨基酸序列(即无前导序列)(SEQ ID NO: 57)。单下划线表示接头。

DMIVTD NNGAVKFPQL CKFCDVRFST
 CDNQKSCMSN CSITSICEKP QEVCVAVWRK NDENITLETV CHDPKLPYHD
 FILEDAASPK CIMKEKKKPG ETFFMCSCSS DECNDNIIFS EYNTSNPDT

GGGVECPFCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTFEVTC VVVDVSHEDP
 EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
 KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
 FYFSDIAVEW ESNGQPENNY KTTFFMLDSD GSFFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 57)

[0244] 第26项显示hTβRII_短(35-159)-hG1Fc_短的成熟氨基酸序列(即无前导序列)(SEQ ID NO: 58)。单下划线表示接头。

DMIVTD NNGAVKFPQL CKFCDVRFST
 CDNQKSCMSN CSITSICEKP QEVCVAVWRK NDNITLETV CHDPKLPYHD
 FILEDAASPK CIMKEKKKPS ETFFMCSCSS DECNDNIIFS EEYNTSNFDI
GGGTHTCFPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH
 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAV EWESNGQPN NYKTTFPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSPGK (SEQ ID NO: 58)

[0245] 第27项显示hTβRII_短(23-153)-hG2Fc_短的成熟氨基酸序列(即无前导序列)(SEQ ID NO: 59)。单下划线表示接头。

TIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
 QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCVAVW RKNDENITLE
 TVCHDPKLPY HDFILEDAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
FSEEYTGGGV ECPFCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TFEVTCVVVD
 VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN
 GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 59)

[0246] 第28项显示hTβRII_短(23-153)-hG1Fc_短的成熟氨基酸序列(即无前导序列)(SEQ ID NO: 60)。单下划线表示接头。

TIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
 QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCVAVW RKNDENITLE
 TVCHDPKLPY HDFILEDAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
FSEEYTGGGT HTCPFCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW

```

LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV
SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD
KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 60)

```

[0247] 第29项显示hTBRII_短(23-153/N70D)-hG2Fc的成熟氨基酸序列(即无前导序列)(SEQ ID NO: 61)。双下划线表示N70D取代。单下划线表示接头。

```

TIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
QLCKPCDVRF STCDNQKSCM SDCSITSICE KPQEVCAVAVW RKNDENITLE
TVCHDPKLPY HDFILEDAAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
FSEEEYTGGGV ECPFCPAFPV AGPSVFLFPF KFKDTLMISR TPEVTCVVVD
VSHEDPEVOF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSF LTVVHQDWLN
GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QEPENNYKTF PMLDSGGSFF LYSKLTVDKS
RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 61)

```

[0248] 第30项显示hTBRII_短(23-153/N70D)-hG1Fc_短的成熟氨基酸序列(即无前导序列)(SEQ ID NO: 62)。双下划线表示N70D取代。单下划线表示接头。

```

TIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
QLCKPCDVRF STCDNQKSCM SDCSITSICE KPQEVCAVAVW RKNDENITLE
TVCHDPKLPY HDFILEDAAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
PSEEYTGGGT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV
SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD
KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 62)

```

[0249] 通过引用结合

本文提及的所有出版物和专利均通过引用以其整体结合到本文中,就像每个独立出版物或专利具体而单独指明通过引用结合一样。

[0250] 虽然论述了主题的具体实施方案,但上述说明书是说明性的而非限制性的。当回顾本说明书和随附权利要求书时,许多变动对本领域技术人员而言将变得显而易见。应参照权利要求书及其等同内容的整个范围和说明书及这类变化来确定本发明的整个范围。

```

1   MPGQELRTVN GSQMLLVLLV LSWLPHGGAL SLAEASRAS PGPSELHSED
51  SRFRELRKRY EDLLTRLRAN QSWEDSNTDL VPAPAVRILT PEVRLGSGGH
101 LHLRISRAAL PEGLPASRL HRALFRLSPT ASRSWDVTRP LRRQLSLARP
151 QAPALHLRLS PPPSQSDQLL AESSSARPQL ELHLRPQAAR GRRRARARNG
201 DHCPLGPGRC CRLHTVRASL EDLGWADWVL SPREVQVTMC IGACPSQFRA
251 ANMHAQIKTS LHRLKPDTPV APCCVPASYN PMVLIQKTD GVSLQTYDDL
301 LAKDCHCI (SEQ ID NO: 1)

```

图 1

```

1   ATGCCCCGGGC AAGAACTCAG GACGGTGAAT GGCTCTCAGA TGCTCCTGGT
51  GTTGCTGGTG CTCTCGTGGC TGCCGCATGG GGGCGCCCTG TCTCTGGCCC
101 AGGCGAGCCG CGCAAGTTTC CCGGGACCCT CAGAGTTGCA CTCCGAAGAC
151 TCCAGATTCC GAGAGTTGCG GAAACGCTAC GAGGACCTGC TAACCAGGCT
201 GCGGGCCAAC CAGAGCTGGG AAGATTCGAA CACCGACCTC GTCCCGGCCC
251 CTGCAGTCCG GATACTCACG CCAGAAGTGC GGCTGGGATC CGGCGGCCAC
301 CTGCACCTGC GTATCTCTCG GGCCGCCCTT CCCGAGGGGC TCCCCGAGGC
351 TCCCCGCCTT CACCGGGCTC TGTTCGGCT GTCCCCGACG GCGTCAAGGT
401 CGTGGGACGT GACACGACCG CTGCGGCGTC AGCTCAGCCT TGCAAGACCC
451 CAGGCACCCG CGCTGCACCT GCGACTGTCG CCGCCGCCGT CGCAGTCGGA
501 CCAACTGCTG GCAGAATCTT CGTCCGCACG GCCCCAGCTG GAGTTGCACT
551 TGCGGCCGCA AGCCGCCAGG GGGCGCCGCA GAGCGCGTGC GCGCAACGGG
601 GACCACTGTC CGCTCGGGCC CGGGCGTTGC TGCCGTCTGC ACACGGTCCG
651 CGCGTCGCTG GAAGACCTGG GCTGGGCCGA TTGGGTGCTG TCGCCACGGG
701 AGGTGCAAGT GACCATGTGC ATCGGCGCGT GCCCGAGCCA GTTCCGGGCG
751 GCAAACATGC ACGCGCAGAT CAAGACGAGC CTGCACCGCC TGAAGCCCGA
801 CACGGTGCCA GCGCCCTGCT GCGTGCCCGC CAGCTACAAT CCCATGGTGC
851 TCATTCAAAA GACCGACACC GGGGTGTCAC TCCAGACCTA TGATGACTTG
901 TTAGCCAAAG ACTGCCACTG CATA (SEQ ID NO: 2)

```

图 2

1 MAPPALQAQP PGGSQLRFL FLLLLLLLLLS WPSQGDALAM PEQRPSGPES
51 QLNADELGR FQDLLSRLHA NQSREDSNSE PSPDPAVRIL SPEVRLGSHG
101 QLLLRVNRAS LSQGLPEAYR VHRALLLLTP TARPWDITRP LKRALSLRGP
151 RAPALRLRLT PPPDLAMLPS GGTQLELRRLR VAAGRGRRSA HAHPRDSCPL
201 GPGRCCHLET VQATLEDLGW SDWVLSRQL QLSMCVGECP HLYRSANTHA
251 QIKARLHGLQ PDKVPAPCCV PSSYTPVVLH HRTDSGVSLQ TYDDLVARGC
301 HCA (SEQ ID NO: 3)

图 3

1 ATGGCCCCGC CCGCGCTCCA GGCCAGCCT CCAGGCGGCT CTCAACTGAG
51 GTTCTGCTG TTCCTGCTGC TGTGCTGCT GCTGCTGTCA TGGCCATCGC
101 AGGGGGACGC CCTGGCAATG CCTGAACAGC GACCCTCCGG CCCTGAGTCC
151 CAACTCAACG CCGACGAGCT ACGGGGTCGC TTCCAGGACC TGCTGAGCCG
201 GCTGCATGCC AACCAGAGCC GAGAGGACTC GAACTCAGAA CCAAGTCCTG
251 ACCCAGCTGT CCGGATACTC AGTCCAGAGG TGAGATTGGG GTCCACGGC
301 CAGCTGCTAC TCCGCGTCAA CCGGGCGTCG CTGAGTCAGG GTCTCCCCGA
351 AGCCTACCGC GTGCACCGAG CGCTGCTCCT GCTGACGCCG ACGGCCGCC
401 CCTGGGACAT CACTAGGCCC CTGAAGCGTG CGCTCAGCCT CCGGGGACCC
451 CGTGCTCCCG CATTACGCCT GCGCCTGACG CCGCCTCCGG ACCTGGCTAT
501 GCTGCCCTCT GGCGGCACGC AGCTGGAAC TCGCTTACGG GTAGCCGCCG
551 GCAGGGGGCG CCGAAGCGCG CATGCGCACC CAAGAGACTC GTGCCCCACTG
601 GGTCCAGGGC GCTGCTGTCA CTTGGAGACT GTGCAGGCAA CTCTTGAAGA
651 CTTGGGCTGG AGCGACTGGG TGCTGTCCCC GCGCCAGCTG CAGCTGAGCA
701 TGTGCGTGGG CGAGTGTCCT CACCTGTATC GCTCCGCGAA CACGCATGCG
751 CAGATCAAAG CACGCCTGCA TGGCCTGCAG CCTGACAAGG TGCCTGCCCC
801 GTGCTGTGTC CCCTCCAGCT ACACCCCGGT GGTTCCTATG CACAGGACAG
851 ACAGTGGTGT GTCAGTGCAG ACTTATGATG ACCTGGTGGC CCGGGGCTGC
901 CACTGCGCT (SEQ ID NO: 4)

图 4

1 mgrgllrglw plhivlwtri astipphvqk synndmivtd nngavkfpql
51 ckfcdvrfst cdnqkscmsn csitsicekp qevcvavwrk ndenitletv
101 chdpklpyhd filedaaspk cimkekkkpg etffmcscss decndniifs
151 eeyntsnpdlllvifqvtgi slpplgvai sviiifycyr vnrqqklsst
201 wetgktrklm efsehcaiil eddrdisst canninhnte llpieldtlv
251 gkgrfaevyk akkqntseq fetvavkifp yeeyaswkte kdifsdinlk
301 henilqflta eerktelgkq ywlitafhak gnlqeylthr viswedlrkl
351 gsslargiah lhsdhtpcgr pkmpivhrdl kssnilvknd ltccldcfdgl
401 slrldptlsv ddlansgqvg tarymapevl esrmnlenve sfkqtdvysm
451 alvlwemtsr cnavgevkdy eppfgskvre hpcvesmkdn vlrdgrpei
501 psfwlnhqgi qmvetltec wdhdpearlt aqcvaerfse lehldrlsgr
551 scseekiped gslnttk (SEQ ID NO: 5)

图 5

1 mgrgllrglw plhivlwtri astipphvqk sdvemeaqkd eiicpscnrt
51 ahplrhinnd mivtdnngav kfpqlckfcd vrfstcdnqk scmsncsits
101 icekpqevcv avwrkndeni tletvchdpk lpyhdfiled aaspkcimke
151 kkkpgetffm cscssdecnd niifseeynt snpdlllvif qvtgisllpp
201 lgvaisviii fycyrvnrqq klsstwetgk trklmefseh caiiledrds
251 disstcanni nhntellpie ldtlvgkgrf aevyakaklkq ntseqfetva
301 vkifpyeeya swktekdifs dinlkhenil qfltaeerkt elgkqywlit
351 afhakgnlqe ylthrviswe dlrklgssla rgiahlhsdh tpcgrpkmpi
401 vhrdlkssni lvkndltccl cdfglslrld ptlsvddlan sgqvgtarym
451 apevlesrmn lenvesfkqt dvysmalvlw emtsrcnavg evkdyepffg
501 skvrehpcve smkdnvlrdr grpeipsfwl nhqgiqmnce tltecwdhdp
551 earltaqcva erfselehld rlsgrscsee kipedgslnt tk
(SEQ ID NO: 6)

图 6

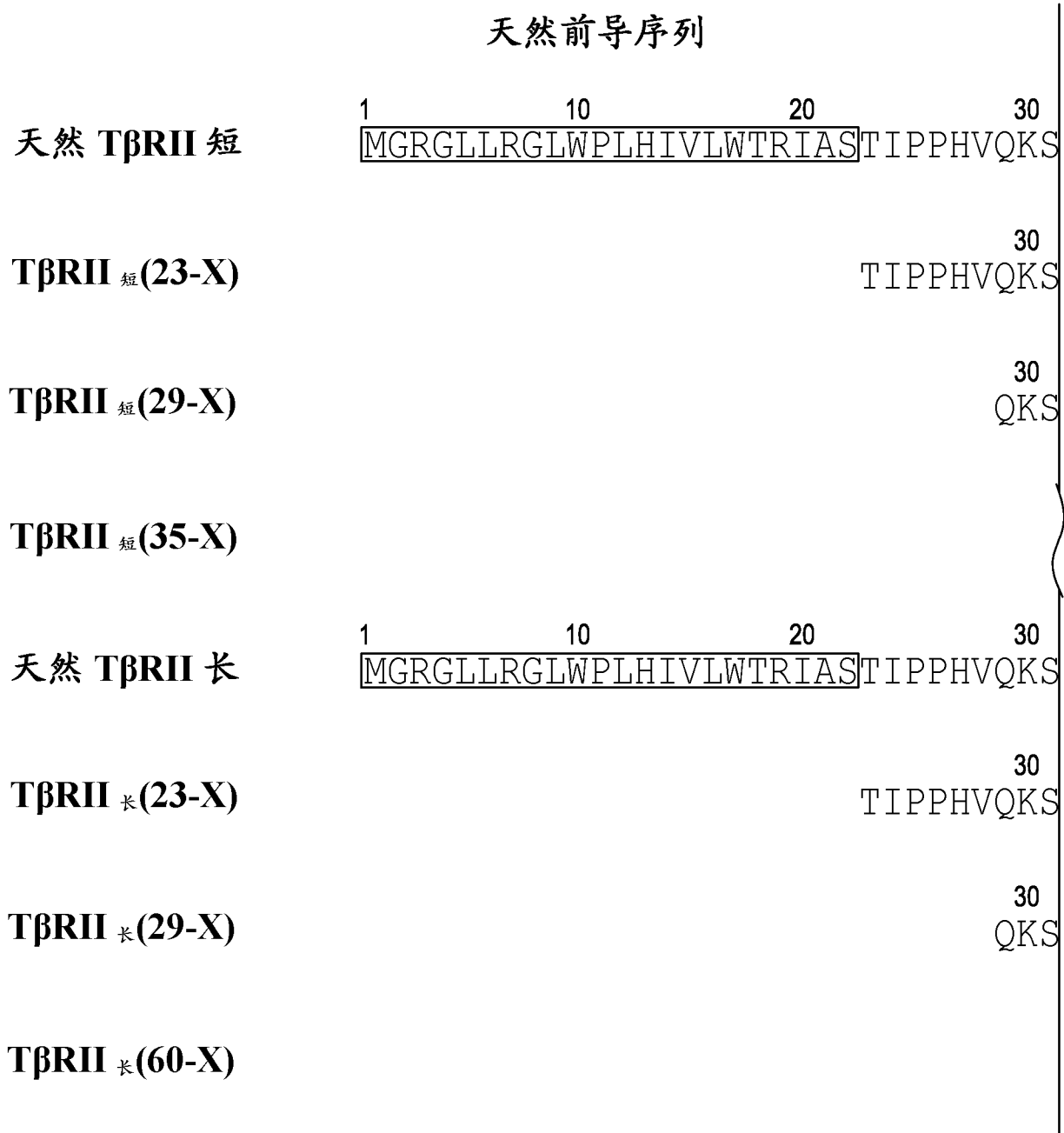


图 7

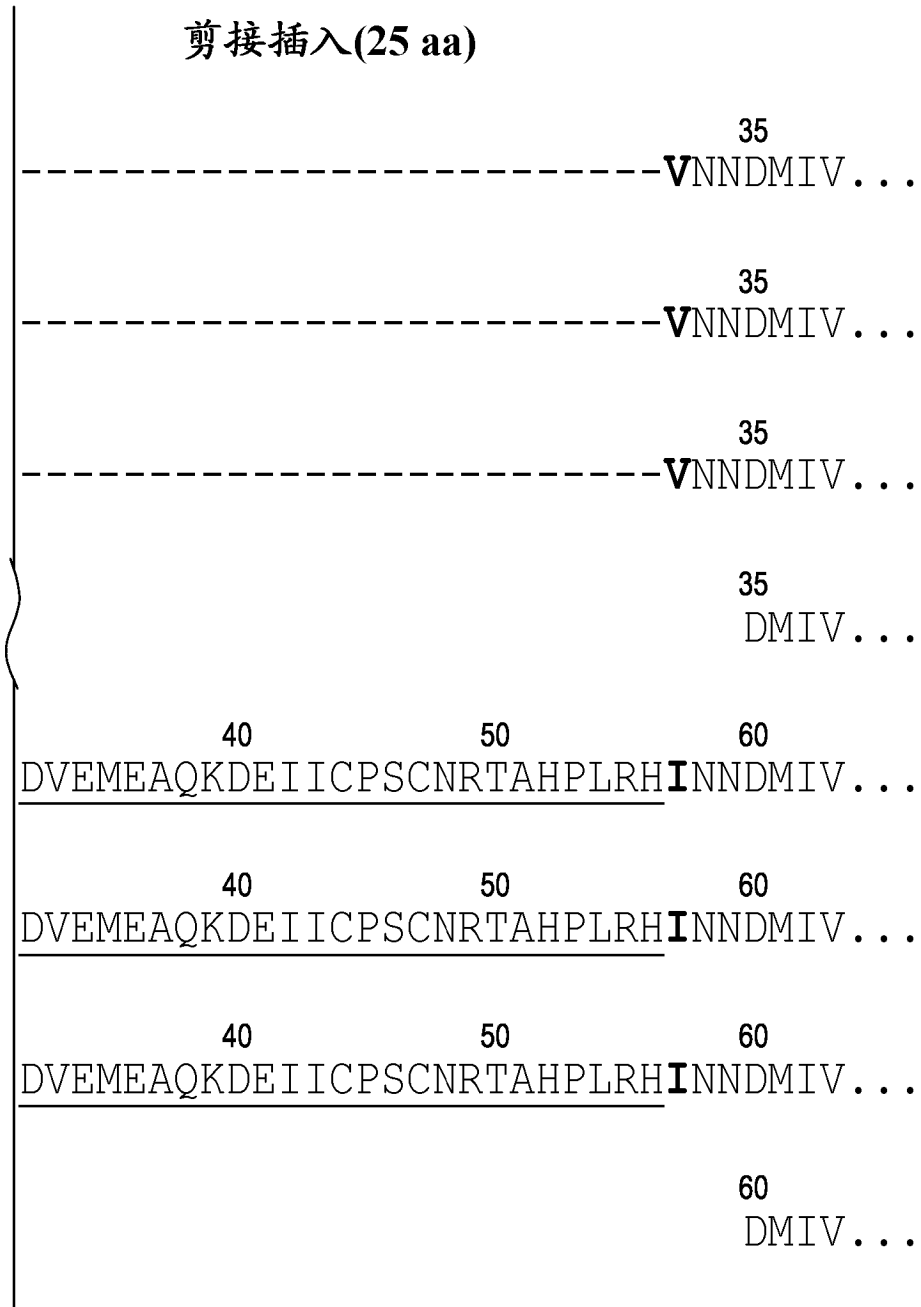


图 7 (续)