

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

C12N 15/16

# [12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/63 C12N 5/10

C07K 14/575 C07K 16/26

A01K 67/027

[21] 申请号 97194312.5

[43]公开日 1999年5月19日

[11]公开号 CN 1217023A

[22]申请日 97.2.28 [21]申请号 97194312.5

[30]优先权

[32]96.3.1 [33]US [31]08/609,408

[86]国际申请 PCT/US97/03209 97.2.28

[87]国际公布 WO97/32022 英 97.9.4

[85]进入国家阶段日期 98.11.2

[71]申请人 安姆根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 N·赫尔恩戴

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 温宏艳

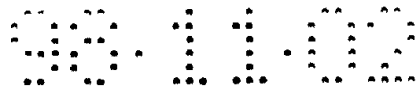
权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 犬 OB 蛋白组合物和方法

[57]摘要

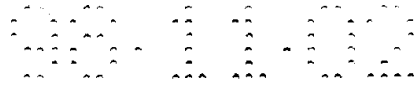
所提供的是犬 OB 蛋白和相关组合物及方法。还提供了犬 OB 氨基酸序列,相关的核酸序列,载体,宿主细胞,生产重组产物的方法,相关的抗体和/或诊断组合物,药用组合物,及转基因动物。

ISSN 1008-4274



## 权 利 要 求 书

1. 一种选自下述氨基酸(根据 Seq. ID. No. 1 的编号)的犬 OB 蛋白:
  - ( a ) -21 到 146 ;
  - 5 ( b ) +1 到 146 ;
  - ( c ) +1 到 146 met -1 ; 以及
  - ( d ) 上述 ( a ) , ( b ) , 或 ( c ) 中的任何一种, 在 28 位缺失谷氨酰胺残基的一种犬 OB 蛋白;  
可任选地存在于一种药学上可接受的稀释剂、佐剂或载体中。
- 10 2. 纯化和分离的 DNA , 编码选自下述氨基酸(根据 Seq. ID. No. 1 的编号)的一种犬 OB 蛋白:
  - ( a ) -21 到 146 ;
  - ( b ) +1 到 146 ; 以及
  - ( c ) +1 到 146 met -1 .
  - 15 ( d ) 上述 ( a ) , ( b ) , 或 ( c ) 中任何一种, 在 28 位上缺乏一个谷氨酰胺残基。
    3. 权利要求 2 的 DNA , 其为 cDNA .
    4. 权利要求 2 的 DNA , 其为基因组 DNA .
    5. 权利要求 2 的 DNA , 选自 ( 根据 Seq. ID. No. 2 ) :
      - 20 ( a ) Seq. ID. No. 2 编码犬 OB 蛋白 -22 到 +146 的部分 ( 根据 Seq. ID. No. 1 ) ;
      - ( b ) Seq. ID. No. 2 编码犬 OB 蛋白 +1 到 +146 的部分 ( 根据 Seq. ID. No. 1 ) ;
      - ( c ) 还编码 -1 位 met 残基的 ( b ) 部分的 DNA ; 以及
      - 25 ( d ) 上述 ( a ) , ( b ) 或 ( c ) 部分的任一 DNA , 缺乏编码 Seq. ID. No. 1 中 28 位谷氨酰胺的密码子。
        6. 包含权利要求 2 , 3 , 4 或 5 中任何一种 DNA 的载体。
        7. 一种真核或原核宿主细胞, 含有权利要求 2 , 3 , 4 或 5 的 DNA , 或含有包含权利要求 2 , 3 , 4 或 5 的 DNA 的载体。
        - 30 8. 一种生产犬 OB 蛋白的方法, 包括在合适的条件下, 培养原核或真核宿主细胞群体并得到所产生的犬 OB 蛋白产物, 该宿主细胞包含了权利要求 2 , 3 , 4 中的任何一种 DNA , 或包含了带有权利要求 2 ,



3, 4 或 5 中的任何一种 DNA 的载体。

9. 一种选择性结合分子, 它选择性地结合犬 OB 蛋白。

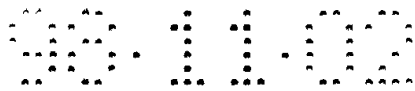
10. 一种单克隆抗体, 它选择性地结合犬 OB 蛋白。

5 11. 一种包含选择性结合分子的试剂盒, 该分子选择性结合犬 OB 蛋白。

12. 一种治疗狗的方法, 包括施用权利要求 1 的治疗有效量的犬 OB 蛋白。

13. 权利要求 12 的方法, 其中所说的狗是要治疗肥胖, II 型糖尿病, 升高的血脂水平, 或者是为了增加瘦体重。

10 14. 一种具有改变了的犬 OB 蛋白表达的转基因狗。



## 说明书

### 犬 OB 蛋白组合物和方法

#### 5 发明领域

本发明涉及犬 OB 蛋白和相关核酸，载体，宿主细胞，产物的制备方法，选择性结合分子，衍生物，药物组合物，和诊断学、治疗学及美容学方法。

#### 发明背景

10 虽然肥胖的分子基础在很大程度上还属未知，“OB 基因”和编码蛋白（“OB 蛋白”）的确定倒是给机体用以调节脂肪沉积的机制投去了一抹亮光。张等，《自然》杂志 372: 425-432 (1994); 亦见于，《自然校正》（the Correction at Nature）374: 479 (1995)。在 ob/ob 突变小鼠（由于 OB 基因产物的生产缺陷导致的小鼠肥胖）以及正常的、野生型小鼠的体内，OB 蛋白都是有活性的。其生物学活性，从各种作用中间，主要显示出降低体重的作用。总的来看，Barinaga，“肥胖”蛋白使小鼠变苗条，《科学》269: 475-476 (1995)。

例如，已知在 ob/ob 突变小鼠，给予 OB 蛋白导致血清胰岛素水平及血清葡萄糖水平的下降。还已知给予 OB 蛋白导致机体脂肪的减少。20 这些已在 ob/ob 突变小鼠及非肥胖正常小鼠都已观察到。Pelley 等，《科学》269: 540-543 (1995); Halaas 等，《科学》269: 543-546 (1995)。还见于 Campfield 等，《科学》269: 546-549 (1995)（外周和中央给予微克剂量的 OB 蛋白导致 ob/ob 及食物诱导的肥胖小鼠食物摄入和机体重量的下降，但在 db/db 肥胖小鼠无此现象。）在这些报告中均未观察到毒性，包括最高剂量。25

还有一项治疗肥胖动物的不合适的需要，尤其是宠物，肥胖会引起与高血脂水平、动脉斑（arterial plaque），高胆固醇，及高血压伴随而来的心血管问题。而且，II 型糖尿病也与肥胖相关联。所有这些情况皆可在狗身上发生，尤其是当狗的食谱中蛋白和脂肪的水平不适当时。

30 另外，尤其是对观赏狗，把狗喂养得有期望数量的脂肪，这是受欢迎的，或者说是有利可图的。

因此这样一种治疗或美容组合物将是合乎需要的：它可以让狗安全

有效地服用以减轻体重，减少脂肪，治疗高 - 或低脂血症（dyslipidemias）或糖尿病。

### 发明概述

5 本发明涉及犬 OB 蛋白和相关核酸、载体、宿主细胞，生产方法，相关组合物，制造及其应用的方法。

### 附图简述

10 图 1：显示的是现有犬 OB 蛋白氨基酸序列的线图（上部序列，当有一个引导序列存在时指一个前蛋白）和天然的人 OB 蛋白（张等，上文）（底，也指一个蛋白原（pre-protein））。用 1994 年 9 月第 8 版的威斯康星软件包（Wisconsin Package）程序手册（Program Manual for the Wisconsin Package）。遗传学计算机组，575 科学 Drive，Madison, Wisconsin, USA 其相似性百分率为 90.476。严格应用氨基酸一致性识别，其一致性百分率在 80.952。

15 图 2：显示的是目前的犬 OB 蛋白的氨基酸序列的线图（上部序列，同样指一个蛋白原）及天然的鼠 OB 蛋白（张等，上文）（下部，也指一个蛋白原）。用图 1 同样的分析方法，相似性百分率是 86.905。严格应用氨基酸一致性其百分率为 78.571。

20 图 3：显示的是犬、人、鼠的 OB 蛋白氨基酸序列和一个共有的氨基酸序列的线图。列出的共有的序列是基于保守的氨基酸区域。某点上的氨基酸在不同的种如有不同，则在该点指定最常出现的氨基酸。

### 发明详述

本发明指向犬 OB 蛋白及相关核酸，载体，宿主细胞，生产方法，有关组合物，和生产及其应用的方法。

### 蛋白组合物

25 全长犬 OB 蛋白显示于 Seq. ID. No. 1（下面）。引导序列（指 Seq. ID. No. 1 的序号）是 -21 到 -1。成熟蛋白基本上由（指 Seq. ID. No. 1 的序号）1 到 146 组成。而且，此处的犬 OB 蛋白可以有或缺失 +28 位（指 Seq. ID. No. 1 成熟蛋白的序号）的谷氨酰胺（“Q”）。可以用细菌表达 N - 末端是甲硫氨酰残基的成熟蛋白另一方面，可以选择附加其他引导序列以利表达。

30 这样，现有的犬 OB 蛋白可以从如下氨基酸序列中选择（指 Seq. ID. No. 1）：

- ( a ) -21 到 146 ;
- ( b ) +1 到 146 ;
- ( c ) +1 到 146 , 有 N - 末端甲硫氨酸( 此处经常指“+1 到 146 met -1” ) ; 以及

5       ( d ) 氨基酸序列, 属于上述 ( a ) , ( b ) 或 ( c ) 的一种 ( subpart ) , 在其 28 位上缺失谷氨酰胺残基。

这些将在下面得到更充分的阐述, 任选地, 可将现有的犬 OB 蛋白与药学上可接受的稀释剂, 佐剂或载体一起配制。

#### 核酸组合物和方法

10       编码犬 OB 蛋白的核酸显示于 Seq. ID. No. 2 ( 如下 ) 。本发明的新核酸序列包括用于确保在原核或真核宿主细胞中表达犬 OB 蛋白的序列, 此犬 OB 蛋白选自如下氨基酸序列 ( 指 Seq. ID. No. 1 ) :

( a ) -21 到 146 ;

( b ) +1 到 146 ;

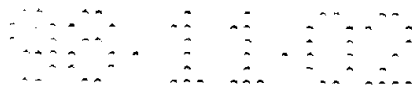
15       ( c ) +1 到 146 , N - 末端为甲硫氨酸; 以及

( d ) 来自上述 ( a ) , ( b ) 或 ( c ) 的氨基酸序列, 缺乏编码 28 位谷氨酰胺残基的密码子 ( 指 Seq. ID. No. 1 ) 。

核酸可经纯化和分离, 以使期望的编码区域可用来生产当前的多肽, 例如, 为了诊断的目的, 下面将进行更充分的阐述。本发明的 DNA 序列具体地包括: ( a ) Seq. ID. No. 2 ( 如下 ) 的 DNA ; ( b ) Seq. ID. No. 2 ( 如下 ) 编码氨基酸 1 到 146 的 DNA 序列部分。还包括编码犬 OB 蛋白的等位基因变异形式的 DNA 序列, 诸如编码 28 位谷氨酰胺缺失的氨基酸序列及经改造的编码犬 OB 蛋白的 DNA 序列的那些形式。这些经改造的序列可以很容易地按照 Alton 等的方法构建而成, 方  
25       法见 PCT 申请公开 WO 83/04053 。

编码当前犬 OB 蛋白的基因组 DNA 含有附加的非编码碱基, 或内含子, 这些基因组 DNA 可通过将 Seq. ID. No. 2 显示的全部或部分 cDNA 与基因组 DNA 源, 诸如一个犬基因组 DNA 文库杂交而获得。这些基因组 DNA 将编码功能性犬 OB 蛋白, 然则, 可能用 cDNAs 更切合实际, 因为它仅包含编码区域, 重组操作就便利了。  
30

当前的核酸序列可包括整合进了按所选择的非哺乳动物宿主“优选”表达的密码子; 提供了限制性核酸内切酶的切割位点, 提供了附加



的起始、终止和中间 DNA 序列，以利于和已有表达载体相构建。

而且，还可以制备当前 DNAs 的反义核酸。此反义核酸可能有利于调节体内 OB 蛋白的效应。例如，可以制备一个反义核酸，以有效地使一个细胞产生犬 OB 蛋白的能力丧失。

5 如上所述本发明的 DNA 序列也是用来当成标记探针以分离编码 OB 蛋白的人基因组 DNA 的合适材料，以及相关蛋白如 cDNA 及其他哺乳动物物种的基因组序列，此 DNA 序列在不同的蛋白质合成（如，在昆虫细胞中）方法中或在遗传治疗中可能有用。本发明的 DNA 序列可望有利于发展转基因哺乳动物，它可用作“真核”宿主以生产目的产  
10 物，及大量生产目的产品。一般情况，参考 Palmiter 等，《科学》 222: 809-814 (1983)。

#### 载体和宿主细胞

对于本发明的另一个方面，此处叙述的编码犬 OB 蛋白的 DNA 序列，将提供与目前尚未获得的某些哺乳动物蛋白氨基酸序列有关的有价  
15 值的的信息。换句话说，本发明提供的 DNA 序列将有利于制造新的、有用的病毒和环状质粒 DNA 载体，新的、有用的转化和转染的原核及真核宿主细胞（包括培养的细菌和酵母细胞，及哺乳动物细胞），及新的、有用的培养能表达犬 OB 蛋白的宿主细胞生长的方法。

此处提供的 DNA（或对应的 RNAs）也可用于基因治疗，例如，  
20 治疗其特征在于 OB 蛋白表达不足的情况，例如肥胖。一般来说，适宜于基因治疗的载体（例如被修饰用于基因治疗目的的反转录病毒或腺病毒载体，纯度及药学特性皆可接受者）可处理成比方说可以送进肺内的形式。这些载体可以整合进编码当前多肽的核酸，以在所期望的位点表达。基因治疗中为了一种目的蛋白，一个载体中可以包含多于一份拮欠  
25 的该蛋白的基因。另一方面也可不用载体，以利于在宿主中保持相对恒定的表达。例如，同源重组将有利于整合进宿主基因组。（这可用于生产目的，例如，美国专利号 5,272,071 及 WO 91/09955。）核酸可置入一种药学上可接受的载体中，例如一种脂溶液载体（例如，带电脂类），一种脂质体，或多肽载体（例如，多聚赖氨酸）。一篇关于基因治疗的  
30 综述文章，此处用作参考文献，即 Verma，科学的美国人，1990 (11): 68-84。

此处还提供了生产犬 OB 蛋白的方法。这些生产方法包括在合适条

件下培养含有编码犬 OB 蛋白 DNA 的宿主细胞。此处所指的是体外扩增此种宿主细胞的方法。这些宿主细胞可以是真核或原核，也可以包含一个包括此处所提供的犬 OB 编码 DNA 的载体。另一方面，这种含有犬 OB 蛋白 DNA 的宿主细胞可能是通过同源重组而得到（见：例如，  
5 美国专利 5,272,071 和 WO 91/09955，如上文所提及的）或通过变通了的其他表达犬 OB 蛋白的方法而得到者。这样就可以通过收集而得到所要的犬 OB 蛋白。任选地，可进一步对此犬 OB 蛋白作进一步纯化或处理，制备所需的制剂。

### 转基因动物

10 也许有人想要生产不同的狗，它们的犬 OB 水平有差异。这可以通过转基因狗来实现。制备转基因狗的一个方法是用一个“转基因”对狗胚胎进行遗传学操作，典型的“转基因”包括一个启动子和一个目的 DNA。在这个例子中，目的 DNA 可从以上列举的那些当中选取。启动子可选用组织特异性表达者，例如肝特异性表达。随后可把此转基因插入狗胚胎。这可通过微注射或其他方式实现。一个或多个此类胚胎随后  
15 移植到假孕的养母狗体内，胚胎发育，小狗出生。本领域的技术人员可发现制备转基因动物的其他方法。这些转基因动物可以是犬 OB 蛋白表达水平升高的，这样就制成了较苗条的动物，或者是通过例如用缺失的犬 OB DNA 作为转基因而“剔除”犬 OB 表达的转基因动物。一次可制  
20 备一或多个类似动物（例如，多胚植入及多胎）；这些动物可进一步喂养。这样，此处提供的是已改变了犬 OB 蛋白表达的转基因狗。这些改变可称为犬 OB 蛋白的数量（即，上升或下降）或定点表达（即组织特异性表达）。此处还提供这种转基因动物的后代。

25 这些动物可用于宠物、观赏犬、养殖等目的，或用于在体生物学测定。

### 衍生物，药物组合物

此蛋白也可通过将一或几个化学部分连到蛋白分子上面制备其衍生物。经化学修饰的衍生物可进一步制成经下述给药途径的制剂：动脉内，腹膜内，肌肉内，皮下，静脉内，口服，鼻吸经肺的，局部的或  
30 其他的给药途径。生物活性蛋白的化学修饰已发现在特定情况下有额外的好处，例如，提高治疗蛋白的稳定性和循环时间，降低免疫原性。见美国专利号 4,179,337，Davis 等，1979 年 12 月 18 日授权公告。综述见

Abuchowski 等, 见药物酶 ( Enzymes as Drugs ) 。 ( J. S. Holcerberg 和 J. Roberts 编, 1981: 367-383 ) 。阐述蛋白修饰和融合蛋白的综述文章是 Francis, 生长因子聚焦 ( Focus on Growth Factors ) 3: 4-10 (1992 年 5 月) ( 由 Mediscript, Mountview Court, Friern Barnet Lane, London N20, OLD, UK 发表 ) 。

#### 5 用于衍生的化学部分

10 宜于衍生的化学部分可选自多种水溶性聚合物。新选择的聚合物必须是水溶性的, 才使得它所连接的蛋白质在水环境中不会沉淀, 例如在生理环境中。优选地为了制备的终产物可用于治疗, 此聚合物需是药

15 学上可接受的。本领域的技术人员基于此聚合物/蛋白质偶合物将用于治疗

的考虑, 将会选择合适的聚合物, 倘如此, 也将会考虑最佳剂量, 循环时间, 对蛋白降解的抵抗力, 及其他问题。对此蛋白而言, 其修饰作用的效应将要通过给予此蛋白或其衍生物而搞清楚, 给药是通过所需要的方式 ( 即, 通过渗透泵, 或者, 更优选地, 通过注射或输注, 或者,

20 举例来说, 更进一步配制成口服的, 经肺或鼻吸给药), 同时按此处所述的方法观察其生物学效应。

水溶性聚合物选自, 例如, 聚乙二醇, 乙二醇和丙二醇的共聚物, 羧甲基纤维素, 葡聚糖, 聚乙烯醇, 聚乙烯吡咯烷酮, 聚 - 1, 3 - 二氧

25 环己烷, 聚 - 1, 3, 6 - 三氧环己烷, 乙烯/马来酸酐共聚物, 聚氨基酸类 ( 或均聚物或随机或非随机共聚物 ), 以及葡聚糖和聚 ( n - 乙烯吡咯烷酮 ) 聚乙二醇, 丙二醇均聚物, 聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物, 聚氧亚乙基化多元醇类, 聚苯乙烯马来酸酯和聚乙烯醇。聚乙二醇 ( 缩 ) 丙醛由于其在水中的稳定性而在制备中有好处。所需要的聚合物的分子量是根据所需的特征以及聚合物的分支程度通过经验来确定的。

25 融合蛋白可通过将多聚氨基酸类连接到 OB 蛋白分子而制备。例如, 多聚氨基酸可以是一个载体蛋白, 可用以增加该蛋白的循环半衰期。为了治疗和美容目的, 这些多聚氨基酸必须是不产生中和抗原反应, 或其他副反应的。这些多聚氨基酸可选自血清白蛋白 ( 如犬血清白蛋白 ), 一种抗体或其部分 ( 例如一种抗体恒定区, 有时称为 “Fc” )

30 或其他多聚氨基酸。如下所示, 多聚氨基酸的连接位点可以是 OB 蛋白分子的 N - 末端, 或其他地方, 也可以是通过一个化学 “接头” 部分, 例如一个多聚氨基酸连接物连接到 OB 蛋白。



容易，所以用如上的还原法烷基化生产 N - 末端产品的方法受到欢迎。

### 药用组合物

本发明的再一个方面，是使用该蛋白及其衍生物的药用组合物的方法。这些药用组合物的给药方法可以是注射，或口服、经肺、鼻剂、经皮或其他方式。一般说来，本发明理解的药用组合物包括本发明的有效剂量蛋白或衍生物产品，以及药学上可接受的稀释剂，防腐剂，溶剂，乳化剂，佐剂和/或载体。这些组合物包括含有不同缓冲液成分（如，Tris-HCl，乙酸盐，磷酸盐）的稀释液，pH 和离子强度；添加剂如去污剂和增溶剂（如，Tween 80, Polysorbate 80），抗氧化剂（如，抗坏血酸，偏二硫酸钠），防腐剂（如硫柳汞，（Thimersol）苧醇）和膨胀剂（如，乳糖，甘露糖醇），在这些聚合组合物如，聚乳酸，聚乙醇酸等的颗粒制备过程中整合进以上物质，或置入脂质体中。Hyaluronic acid 也可以用，可能有增加在循环中维持时间的效应。这些组合物将影响到其物理状态，稳定性，体内释放率，以及该蛋白及衍生物的体内清除率。参见，例如，雷明顿药理学科学，18 版（1990，麦克出版公司，Easton, PA 18042）1435~1712 页，此处引作参考文献。组合物可制成水剂，或干粉，例如冻干制剂。可植入的缓释剂也正在考虑，它是经皮制剂。

此处考虑应用的是口服固体剂量形式，大体情况在雷明顿药理学科学，1990 年 18 版（麦克出版公司，Easton, PA 18042）第 89 章中已有叙述，此处引作参考文献。固体剂量形式包括片剂，胶囊，丸剂，锭剂或糖锭，扁囊剂或团球药丸。而且，脂质或蛋白包囊也用以按方配制现有组合物（举例而言，美国专利号 4,925,673 所报道的蛋白样小球）。脂质包囊也可以用，脂质小体可由多种聚合物衍生而来（例如，美国专利号 5,013,556）。关于治疗学上可能的固体剂量形式 Marshall, K. 已有叙述，见 G.S. Banker 和 C.T. Rhodes 编辑的《现代药理学》1979 年第 10 章，此处引作参考文献。总的来说，制剂当中要包括该蛋白（或类似物或衍生物），以及在胃环境中保护药物而在肠中使生物活性成分释放出来的惰性成分。

还需特别关注的是上述衍生蛋白质的口服剂量形式。对蛋白进行化学修饰以使其衍生物能通过口服而有效。一般地，此处所说的化学修饰是将至少一个分子连接到蛋白（或多肽）分子之上，此分子将（a）阻

止蛋白降解；及 (b) 从胃或肠中吸收到血流当中。还希望此蛋白的综合稳定性升高，在机体内的循环时间增长。此类分子的例子包括：聚乙二醇，乙二醇和丙二醇的共聚物。羧甲基纤维素，葡聚糖，聚乙烯醇，聚乙烯吡咯烷酮和聚脯氨酸。Abuchowski 和 Davis，可溶性聚合物-酶加合物，见：“药用酶”，Hocenberg 和 Roberts 编，Wiley-Interscience，纽约 NY，(1981) 367-383 页；Newmark 等，应用生物化学杂志，1982 (4)；185~189。其他可用的聚合物包括聚-1,3-二氧环己烷和聚-1,3,6-三氧杂环己烷。

10 蛋白质 (或衍生物) 的释放位点可以是胃，小肠 (十二指肠，空肠或回肠)，或大肠。本领域的技术人员可以找到有关配制方法使药物在胃内不溶解，而在十二指肠或肠的其他地方释放物质。最好是能使药物释放避开胃部环境的有害影响，或者对蛋白 (或衍生物) 进行保护，或者使生物活性物质的释放在胃部环境之外，例如在肠中。

15 为了确保对胃环境的抵抗力，有对至少是 pH 5.0 不可透过的包膜是必须的。用作肠衣的更常规的惰性材料有例如，偏苯三酸酯酸纤维素 (CAT)，苯二甲酸羟丙基甲基纤维素 (HPMCP)，HPMCP 50，HPMCP 55，聚苯二酸乙酸乙烯酯 (PVAP)，Eudragit L30D，Aquateric，苯二酸·醋酸纤维素 (CAP)，Eudragit L, Eudragit S，以及 Shellac。这些包衣可被用作混合膜。

20 包膜或包膜混合物也可用于片剂，这倒并不是为了防护胃环境。它可包括糖衣，或是使片剂容易吞服的包膜。膜囊可包括一个硬壳 (如明胶) 以送服干药即粉剂，对液体药物，可用软的明胶外壳。扁囊剂的外壳材料可以是厚的淀粉或其他可食用的纸。对丸剂，锭剂，铸型片剂或研制片剂，湿性聚集技术可敷应用。

25 该药物可包括在这样的制剂中：(将药物) 精制成许多颗粒，细粒或药丸尺寸小到 1 mm 左右。该物质胶囊给药的配制方法也可以是粉剂，轻微压缩的栓剂或者甚至是片剂形状的。该药物可通过浓缩制备。

30 染料和调味剂都可以包括在内。例如，该蛋白 (或衍生物) 可通过配制 (如用脂质体或微球包囊化) 然后进一步用可食用的产品包衣，如食物或饮料。

可以用惰性材料稀释或增加药物的体积。这些稀释剂可以包括碳水化合物，尤其是甘露糖醇， $\alpha$ -乳糖，无水乳糖，纤维素，蔗糖，修

饰的葡聚糖或淀粉。某些无机盐也可用作填充剂，包括三磷酸钙，碳酸镁和氯化钠。一些市场可买到的稀释剂如 Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress 及 Avicell。

5 治疗制剂中可包括崩解剂，制成固体剂量形式。用作崩解剂的物质包括但并不局限于淀粉，此淀粉包括基于淀粉的商品化崩解剂 Explotab。淀粉羟乙酸钠，安伯来特（离子交换树脂商品名称），羧甲基纤维素钠，超支链淀粉（ultramyllopectin），藻酸钠，白明胶，橙皮，酸性羧甲基纤维素，天然海绵和皂土都可以用。崩解剂的另一种形式是不溶性的阳离子交换树脂。粉状树胶也可用作崩解剂以及粘合剂，这些粉状树胶包括琼脂，梧桐胶或黄蓍胶。海藻酸及其钠盐也用作崩解剂。

10 粘合剂可用以使药剂粘合在一起形成坚硬的片剂，包括的物质来自天然产物，如阿拉伯树胶，西黄蓍胶，淀粉和明胶。其他包括甲基纤维素（MC），乙基纤维素（EC）和羧甲基纤维素（CMC）。聚乙烯吡咯烷酮（PVP）和羟丙基甲基纤维素（HPMC）两者均可用于酒精溶液中使药物颗粒化。

15 药物制剂中可以包括抗摩擦剂以防在配制过程中粘连。润滑油可用作药物与死墙（die wall）之间的垫层，这些可以包括在内但也不是必需；硬脂酸包括其镁盐和钙盐，聚四氟乙烯（PTFE），液体石蜡，植物油和蜂蜡。可溶性润滑剂也可以用，如十二烷基硫酸钠，十二烷基硫酸镁，不同分子量的聚乙二醇，Carbowax 4000 和 6000。

可以加入可能有利于改善药物配制过程中的流体性质，在浓缩过程中帮助分子重排的助流剂。这些助流剂可能包括淀粉，滑石，热原硅和水化硅铝醇盐（silicoaluminate）。

25 为了帮助药物溶解到水环境中，可以加进表面活性剂用作湿润剂。表面活性剂可以包括阳离子去污剂如十二烷基硫酸钠，二辛基磺基琥珀酸钠或二辛基磺酸钠。可以使用阴离子去污剂并可包括氯化苄烷胺或氯化苄烯胺（benzethonium）。潜在的非离子型去污剂可包含在制剂中当作表面活性剂的名单是聚月桂乙二醇 400，polyoxyl 40 stearate，聚氧乙烯还原蓖麻油 10，50 和 60，甘油单硬酯酸酯，聚山梨酯 40，60，30 65 和 80，蔗糖脂肪酸酯，甲基纤维素和羧甲基纤维素。这些表面活性剂可以单独或者以不同化率混合物的形式置于该蛋白或衍生物的制剂中。

有可能增强该蛋白（或衍生物）吸收的添加剂如脂肪酸油酸，亚油酸和亚麻酸。

控制释放制剂可能是吸引人的。药物可以掺入惰性基质，即树胶，它可通过扩散或渗漏机制使药物释放。缓慢降解基质也可以掺入制剂中。此药物缓慢释放的另一种形式是通过一种基于 Oros 治疗系统的方法（Alza 公司），即药物用半透膜封闭，它通过渗透效应使水进入而把药物从单个小孔中推出。有些肠衣也有延迟释放效应。

在配制中用到其他包衣。它们包括一系列的糖，这样糖可用于包衣锅（pan）。治疗剂也可以置于膜包片剂，此种情况所用材料分为两组。第一组是非肠溶物质，包括甲基纤维素，乙基纤维素，羟乙基纤维素，甲基羟-乙基纤维素，羟丙基纤维素，羟丙基-甲基纤维素，羧甲基纤维素钠，providone 和聚乙二醇。第二组包含肠溶物质，通常是邻苯二甲酸酯。

可以用各种材料的混合物来制备最理想的膜包衣。膜包衣可以在一个包衣锅中制出，或在一个流体化了的拉床中或通过浓缩包衣。

此处同时关注的是由肺给服该蛋白或其衍生物。吸气时该蛋白（衍生物）被送进哺乳动物的肺中，通过肺上皮基底层进入血流中。（这方面的其他报告包括 Adjei 等，《药学研究》7: 565-569 (1990); Adjei 等，《国际制药学杂志》63: 135-144 (1990) (醋酸亮丙缩材); Braquet 等，《心血管药理学杂志》13 (增刊, 5): s. 143-146 (1989) (内皮素-1); Hubbard 等，《内科年鉴》3:206-212 (1989) ( $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶); Smith 等，《临床调查杂志》84: 1145-1146 (1989) ( $\alpha 1$ 蛋白酶); Oswein 等，“蛋白质的雾化作用”，《药物吸入给服专题研究进展 II》，Keystone, Colorado, 1990 年 3 月 (重组人生长激素); Debs 等，《免疫杂志》140: 3482-3488 (1988) (干扰素- $\gamma$  和肿瘤坏死因子 $\alpha$ ) 和 Platz 等; 美国专利号 5,284,656 (粒细胞集落刺激因子)。蛋白（或衍生物）的经鼻给服也受到关注。通过其他粘膜转运而给药也受到关注。

本领域的技术人员可通过给药和观察所期望的治疗效果而确定有效剂量。优选地，该分子的制剂在  $0.10 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{day}^{-1}$  和  $1\text{g}/\text{kg}\cdot\text{day}^{-1}$  之间将产生所期望的治疗效果。有效剂量将通过应用诊断工具随后决定。例如，测量血中（或血浆或血清）OB 蛋白数量的诊断可以被首先采用，以判定 OB 蛋白的内源性水平。这些诊断工具可以是抗体分析形式，例

如抗体三明治分析。内源性 OB 蛋白的数量一开始得以定量，基线确定下来。在整个治疗过程中；内源性和外源性 OB 蛋白（也即是说，蛋白，类似物或衍生物，在体内找到的都算，不管是自身产生的还是给服的）的定量一直在持续，由此决定治疗剂量。因此在治疗过程中，剂量将变化，开始用的剂量相对较高。直到出现治疗效果，而在用较低剂量使治疗效果得以保持。

#### 选择性结合分子

本发明的进一步具体化是选择性结合分子，如选择性结合犬 OB 蛋白的单克隆抗体。早先由 Kohler 和 Milstein 在《欧洲免疫学杂志》1976 (6): 511-519 报道的杂交瘤技术已被广泛用于生产杂交瘤细胞系，以分泌针对许多特异性抗原的高水平的单克隆抗体。也可以制备重组抗体（见 Huse 等，《科学》1989 (246): 1275）。这些重组抗体可进一步修饰，例如对补体结合区进行修饰以增加或改变亲和力，或改变这些抗体的恒定区使之像犬的抗体稳定区。这些抗体可以做成试剂盒用来做诊断。可用一个诊断试剂盒来测定一个个体内犬 OB 蛋白的定位和/或数量。诊断试剂盒，例如一个“三明治”类型的分析试验，可用以测定一个个体是否有结合犬 OB 蛋白的受体，或者是否有那种在不同程度上降低了结合能力的受体。如后所述，这些抗体可用犬 OB 蛋白的免疫原性部分制备，尤其是那些只有犬 OB 蛋白才有的免疫原性部分。

#### 用法

治疗。治疗应用包括减轻体重，糖尿病的预防或治疗，降血脂（治疗相关症状），增加瘦体重及增加胰岛素敏感性。另外，本组合物可用于制造一或多种药剂以治疗或改善以上诸症。

减轻体重。本组合物和方法可用于减轻体重。这些已在小鼠模型中证实（参见上述），给予该 OB 蛋白导致体重丢失。体重丢失主要是针对多脂肪组织，或脂肪。这些体重丢失可以和伴随症状的治疗相关联，如下所述，这样就组成了一个治疗应用。另外，如果丢失体重的唯一目的是为了改善外观，例如对观赏狗或育种狗，则此处提供的方法也可用于美容学。

#### 糖尿病治疗

本组合物和方法可用于预防和治疗 II 型糖尿病。由于 II 型糖尿病可与肥胖相关，用本发明减轻体重也可以缓和或阻止糖尿病的发展。而

且，甚至在剂量不足以导致体重丢失的情况下，本组合物也可用以预防或改善糖尿病。

### 降血脂

本组合物和方法可用来调节血脂水平。最终想的还有一点，当只要  
5 求血脂水平降低或要保持降低的血脂水平时，剂量将不足以引起体重下降。这样，在对肥胖动物的起始治疗过程中，剂量将定在体重丢失和伴随的血脂水平下降刚出现的地方。一旦达到了足够的体重丢失，将采取的剂量水平要求既要足以防止重新增加体重，还要足以维持期望的血脂水平。这些剂量可以通过经验决定，由于OB蛋白的效应是可逆的。例如  
10 如Campfield等《科学》269: 546-549 (1995) 547页。这样，当一个剂量导致了不希望出现体重下降时出现了体重下降，人们就可以采用较低剂量，以获得期望的血脂水平，却仍然保持所期望的体重。

增加瘦体重或胰岛素敏感性。最理想的情况是，在只希望增加机体瘦肉质量的时候，此剂量不足以引起体重下降。这样，在治疗一个肥胖  
15 人的起始阶段，剂量可定在这个地方即体重下降及伴随的脂肪组织减少/瘦肉增加同时发生。一旦达到足够的体重降低，就将给予这样的剂量：足以防止体重回升，也足以保持期望的瘦体重增加（或，防止瘦体重减少）。这些剂量可通过经验确定，因为OB蛋白的效应是可逆的。例如，Campfield等，《科学》269: 546~549 (1995), 547页。这样，当一个  
20 剂量导致了不希望出现体重下降时出现了体重下降，人们就可以采用一个较低剂量，以达到使瘦体重如所期望的增加而仍然保持期望体重的目的。至于增加一个人对胰岛素的敏感性，相似的剂量考虑应在重视之列。瘦体重增加同时体重下降，达到这一点足以使一个人治疗糖尿病服用的胰岛素（或者，可能的情况下，支链淀粉或其他可能的糖尿病治疗  
25 药物）的量降低。为了增加整体实力，必须有类似的剂量考虑。瘦体重的增加伴随着整体实力的增强可以通过不足以导致体重丢失的剂量而达到。其他好处，例如红血细胞的增多（及血中氧合作用的增强）和骨吸收或骨质疏松症的减少也将在没有体重下降的情况下达到。

组合治疗。本组合物和方法可以和其他治疗方法联合应用，例如改  
30 变食谱和运动。其他药物，例如那些对糖尿病治疗有用的药物（例如，胰岛素，也可能有支链淀粉），胆固醇和降血压药物（例如那些降低血脂水平或其他心血管药物），活性增强药物（例如，苯丙胺），和食欲

遏制剂。这些药物的服用可以是同时的，也可是依次的。另外，本方法也可以和手术程序联合使用，例如用以改善身体的整体外观的美容手术（例如，脂肪抽吸术或激光手术，用以减轻身体质量的，或植入手术用以增加机体外观体积的）。心脏手术，例如分流术或其他旨在减轻由脂肪沉积引起血管堵塞而导致的有害症状，例如动脉粥样斑，同时应用本组合物和方法可能会使机体得到的益处增加。除去胆结石的方法，例如超声波和激光技术，也可以在本治疗方法之前、之中、之后使用。而且，本方法可在骨折、肌肉损伤的手术或治疗之后以及其他治疗之后使用，它将有利于瘦肉组织的体积增加。

10 诊断学

此处的犬 OB 蛋白或核酸可用于诊断的目的。例如，RNAs 或 DNAs 可用于定性或检测个体内犬 OB DNA 基因或基因产物的缺陷。例如，一个肥胖的个体可能有一个有缺陷的犬 OB 基因。该 DNAs 可用以和来自个体的核酸杂交以检测类似缺陷，例如通过 PCR 技术。犬 OB 蛋白可用于定性个体的犬 OB 蛋白结合 OB 受体的能力，或检测其其他生物学活性。例如，可以准备这样一个分析试验以分析 OB 蛋白改变脂肪代谢的能力，即准备一群表达 OB 受体的脂肪细胞，并用这些细胞去接触 OB 蛋白。脂肪含量的调节，脂肪的特性或其他特性均可以监控。为了诊断，该蛋白或核酸可以和一种检测标记物相结合，例如放射性同位素，荧光素或化学发光化合物，或本领域的技术人员能得到的其他标记物。这些核酸可用于组织分布分析（例如，检测犬 OB mRNA 转录物在不同组织类型中的分布）或用于其他分析的决定 OB 受体的分布。

氨基酸和 DNA 序列

以下是当前所指的犬 OB 蛋白和相关 DNA 的序列表。

25 对氨基酸序列（Seq. ID No. 1）而言，其成熟蛋白的第一个氨基酸在位置+1，是一个缬氨酸（“V”），是用粗体字所显示。可以取消引导序，在位置-1 加一个甲硫氨酸残基，以使在细菌系统中易于表达。另一方面，也可进行其他的 N - 末端修饰，例如切割氨基酸试剂的识别位点，以利于生产没有 N - 末端蛋氨酸残基的蛋白质。例如，可在 N - 末端包括一个酶识别位点以利生产（缩写成“1 - 146 met -1”）。另外，也可以生产 28 位没有谷氨酰胺的版本。

如上所述，可以改变 DNA（Seq. ID. No.2）但不改变编码的氨基

酸序列。这些改变可能是，例如，包括限制位点以使复制和载体插入变得容易，或为了包括在某些系统中优先表达的密码子，例如细菌表达或真核表达。

犬 OB 蛋白 ( Seq. ID. No.1 )

5  
-21 MRCGPLCRFL WLWPLYSCVE AVPIRKVQDD TKTLIKTIVA RINDISHTQS  
30 VSSKQRVAGL DFIPGLQPVL SLSRMDQTLA IYQQILNSLH SRNVVQISND  
80 LENLRDLLHL LASSKSCPLP RARGLETFES LGGVLEASLY STEVVALSRL  
130 QAALQDMLRR LDLSPGC\*

10 犬 OB 蛋白 DNA ( Seq. ID No.2 )

1 ATGCGTTGTG GACCTCTGTG CCGATTCCTG TGGCTTTGGC CCTATCTGTC  
51 CTGTGTTGAA GCTGTGCCAA TCCGAAAAGT CCAGGATGAC ACCAAAACCC  
101 TCATCAAGAC GATTGTCGCC AGGATCAATG ACATTTTACA CACGCAGTCT  
151 GTCTCCTCCA AACAGAGGGT CGCTGGTCTG GACTTCATTC CTGGGCTCCA  
15 201 ACCAGTCCCTG AGTTTGTCCA GGATGGACCA GACGTTGGCC ATCTACCAAC  
251 AGATCCTCAA CAGTCTGCAT TCCAGAAATG TGGTCCAAAT ATCTAATGAC  
301 CTGGAGAACC TCCGGGACCT TCTCCACCTG CTGGCCTCCT CCAAGAGCTG  
351 CCCCTTGCCC CGGGCCAGGG GCCTGGAGAC CTTTGAGAGC CTGGGCGGGC  
401 TCCTGGAAGC CTCACTCTAC TCCACAGAGG TGGTGGCTCT GAGCAGACTG  
20 451 CAGGCGGCC TCCAGGACAT GCTTCGGCGG CTGGACCTCA GCCCTGGGTG  
501 CTGA

虽然本发明已经用优选的实施方案进行了叙述，容易理解本领域的技术人员可以进行变通和修饰。因此，可以认为所附的权利要求涵盖了  
25 本发明范围内的所有等价变异形式。

序列 表

(1) 一般信息:

(i) 申请人: AMGEN INC.

(ii) 发明题目: 犬 OB 蛋白组合物和方法

5 (iii) 序列数: 10

(iv) 通信地址:

(A) 收信人: Amgen Inc.

(B) 街道: 1840 Dehavilland Drive

(C) 城市: 千橡树

10 (D) 州: 加利弗尼亚

(E) 国家: 美国

(F) 邮区: 91320

(v) 计算机可读形式:

(A) 媒介类型: 软盘

15 (B) 计算机: IBM 兼容性个人计算机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: Patentin Release #1.0, Version #1.30

(vi) 当前申请数据

(A) 申请号:

20 (B) 申请日:

(C) 分类:

(viii) 代理人/代理机构信息:

(A) 姓名: Pessin, Karol M.

(C) 参考号/文档号: A-387

25

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 167 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

30 (C) 链型: 单一

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1 :

35 Met Arg Cys Gly Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu  
1 5 10 15

.....

Ser Cys Val Glu Ala Val Pro Ile Arg Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys  
 20 25 30  
 5 Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Ala Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr  
 35 40 45  
 Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro  
 50 55 60  
 Gly Leu Gln Pro Val Leu Ser Leu Ser Arg Met Asp Gln Thr Leu Ala  
 65 70 75 80  
 10 Ile Tyr Gln Gln Ile Leu Asn Ser Leu His Ser Arg Asn Val Val Gln  
 85 90 95  
 Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala  
 100 105 110  
 Ser Ser Lys Ser Cys Pro Leu Pro Arg Ala Arg Gly Leu Glu Thr Phe  
 115 120 125  
 15 Glu Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val  
 130 135 140  
 Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Arg  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys  
 20 165

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 504 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

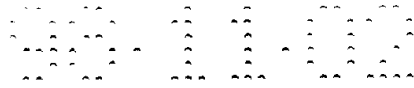
(C) 链型: 单一

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

30 ATGCGTTGTG GACCTCTGTG CCGATTCCCTG TGGCTTTGGC CCTATCTGTC CTGTGTTGAA 60  
 GCTGTGCCAA TCCGAAAAGT CCAGGATGAC ACCAAAACCC TCATCAAGAC GATTGTGCGC 120  
 AGGATCAATG ACATTTACACA CACGCAGTCT GTCTCCTCCA AACAGAGGGT CGCTGGTCTG 180  
 35 GACTTCATTC CTGGGCTCCA ACCAGTCCTG AGTTTGTCCA GGATGGACCA GACGTTGGCC 240

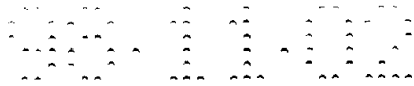


ATCTACCAAC AGATCCTCAA CAGTCTGCAT TCCAGAAATG TGGTCCAAAT ATCTAATGAC 300  
CTGGAGAACC TCCGGGACCT TCTCCACCTG CTGGCCTCCT CCAAGAGCTG CCCCTTGCCC 360  
CGGGCCAGGG GCCTGGAGAC CTTTGAGAGC CTGGGCGGCG TCCTGGAAGC CTCACTCTAC 420  
5 TCCACAGAGG TGGTGGCTCT GAGCAGACTG CAGGCGGCC TCCAGGACAT GCTTCGGCGG 480  
CTGGACCTCA GCCCTGGGTG CTGA 504

(2) SEQ ID NO:3 的信息:

- 10 (i) 序列特征:  
(A) 长度: 167 氨基酸  
(B) 类型: 氨基酸  
(C) 链型: 单一  
(D) 拓扑学: 线性  
15 (ii) 分子类型: 蛋白  
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

Met Arg Cys Gly Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu  
1 5 10 15  
Ser Cys Val Glu Ala Val Pro Ile Arg Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys  
20 25 30  
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Ala Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr  
35 40 45  
Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro  
50 55 60  
Gly Leu Gln Pro Val Leu Ser Leu Ser Arg Met Asp Gln Thr Leu Ala  
65 70 75 80  
Ile Tyr Gln Gln Ile Leu Asn Ser Leu His Ser Arg Asn Val Val Gln  
85 90 95  
Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala  
100 105 110  
Ser Ser Lys Ser Cys Pro Leu Pro Arg Ala Arg Gly Leu Glu Thr Phe  
115 120 125  
Glu Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val  
130 135 140



Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Arg  
145 150 155 160

Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys  
165

5 (2) SEQ ID NO:4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 167 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

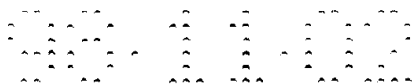
(C) 链型: 单一

10 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

15 Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu  
1 5 10 15  
Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys  
20 25 30  
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr  
35 40 45  
Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro  
50 55 60  
Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala  
65 70 75 80  
Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln  
85 90 95  
Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala  
100 105 110  
Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu  
115 120 125  
Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val  
130 135 140  
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln  
145 150 155 160  
Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys  
165



(2) SEQ ID NO:5 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 167 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单一

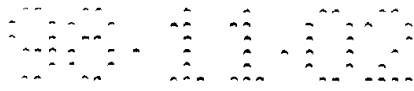
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

5

```
Met Arg Cys Gly Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
1          5          10          15
Ser Cys Val Glu Ala Val Pro Ile Arg Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
20          25          30
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Ala Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
35          40          45
Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro
50          55          60
Gly Leu Gln Pro Val Leu Ser Leu Ser Arg Met Asp Gln Thr Leu Ala
65          70          75          80
Ile Tyr Gln Gln Ile Leu Asn Ser Leu His Ser Arg Asn Val Val Gln
85          90          95
Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala
100         105         110
Ser Ser Lys Ser Cys Pro Leu Pro Arg Ala Arg Gly Leu Glu Thr Phe
115         120         125
Glu Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val
130         135         140
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Arg
145         150         155         160
Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys
165
```



(2) SEQ ID NO:6 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 167 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5

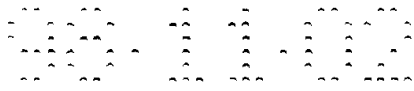
(C) 链型: 单一

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu  
1 5 10 15  
Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys  
20 25 30  
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr  
35 40 45  
Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro  
50 55 60  
Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala  
65 70 75 80  
Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln  
85 90 95  
Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala  
100 105 110  
Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro  
115 120 125  
Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val  
130 135 140  
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln  
145 150 155 160  
Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys  
165



(2) SEQ ID NO:7 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 167 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5 (C) 链型: 单一

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

10 Met Arg Cys Gly Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu  
1 5 10 15  
Ser Cys Val Glu Ala Val Pro Ile Arg Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys  
20 25 30  
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Ala Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr  
35 40 45  
Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro  
50 55 60  
Gly Leu Gln Pro Val Leu Ser Leu Ser Arg Met Asp Gln Thr Leu Ala  
65 70 75 80  
Ile Tyr Gln Gln Ile Leu Asn Ser Leu His Ser Arg Asn Val Val Gln  
85 90 95  
Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala  
100 105 110  
Ser Ser Lys Ser Cys Pro Leu Pro Arg Ala Arg Gly Leu Glu Thr Phe  
115 120 125  
Glu Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val  
130 135 140  
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Arg  
145 150 155 160  
Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys  
165

(2) SEQ ID NO:8 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 167 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单一

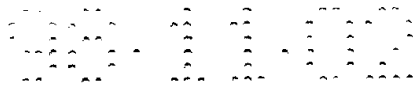
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8:

5

```
Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
1          5          10          15
Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
20          25          30
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
35          40          45
Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
50          55          60
Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
65          70          75          80
Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln
85          90          95
Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala
100         105         110
Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu
115         120         125
Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val
130         135         140
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln
145         150         155         160
Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys
165
```



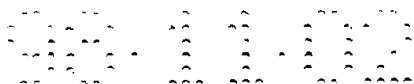
(2) SEQ ID NO:9 的信息:

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 167 氨基酸
  - (B) 类型: 氨基酸
  - (C) 链型: 单一
  - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 9:

```

Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu
1           5           10           15
Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
20           25           30
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
35           40           45
Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
50           55           60
Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
65           70           75           80
Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln
85           90           95
Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala
100          105          110
Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro
115          120          125
Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val
130          135          140
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln
145          150          155          160
Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys
165

```



(2) SEQ ID NO:10 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 167 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5 (C) 链型: 单一

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 10:

10

Met Xaa Trp Gly Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu  
1 5 10 15  
Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys  
20 25 30  
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr  
35 40 45  
Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro  
50 55 60  
Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala  
65 70 75 80  
Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Leu Pro Ser Arg Asn Val Xaa Gln  
85 90 95  
Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala  
100 105 110  
Phe Ser Lys Ser Cys Xaa Leu Pro Xaa Ala Ser Gly Leu Glu Thr Xaa  
115 120 125  
Glu Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val  
130 135 140  
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Xaa Gln  
145 150 155 160  
Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys  
165





10	犬 人 鼠	-21	MrcGPLCREFL WLPYLS <sup>1</sup> CVe AVPIrKVQDD TKTLIKTIVa RINDISHTQs MhWgtLCgFL WLPYLFYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQs McWrPLCREFL WLn <sup>3</sup> YLSYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQs	29
15	共有序列		M-WGPLCREFL WLPYLSYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQs	
20	犬 人 鼠	30	VSSKQRVaGL DFIPGLqPVL SLSrMDQTLA IYQILnSLh SRNVVQISND VSSKQkVTGL DFIPGLHPIL tLSKMDQTLA VYQQILTSMP SRNVIQISND VsaKQRVTGL DFIPGLHPIL SLSKMDQTLA VYQQVLTSLP SqNVLQIaND	79
	共有序列		VSSKQRVTGL DFIPGLHPIL SLSKMDQTLA VYQQILTSLP SRNV-QISND	
25	犬 人 鼠	80	LENLRDLLHL LA <sup>3</sup> SKSCpLP RA <sup>1</sup> GLETFES LGGVLEASLY STEVVALSRL LENLRDLLHV LAFSKSChLP WASGLETLDs LGGVLEASgY STEVVALSRL LENLRDLLHL LAFSKSCsLP qtSGLqkPeS LdGVLEASLY STEVVALSRL	129
30	共有序列		LENLRDLLHL LAFSKSC-LP -ASGLET-ES LGGVLEASLY STEVVALSRL	
35	犬 人 鼠	130	QaaLQDMLRi LDLSPGC QGS <sup>1</sup> LQDMLMQ LDLSPGC QGS <sup>1</sup> LQDiLqQ LDvSpeC	146
	共有序列		QGS <sup>1</sup> LQDML-Q LDLSPGC	