



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104292340 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201410213485. 2

A61K 47/48 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 02. 05

A61K 48/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 5/06 (2006. 01)

60/764, 761 2006. 02. 03 US

(62) 分案原申请数据

200780012026. 6 2007. 02. 05

(71) 申请人 奥普科生物制品有限公司

地址 以色列耐斯茨奥纳

(72) 发明人 F·法里斯 U·E·菲马

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006. 01)

C12N 15/62 (2006. 01)

C12N 15/85 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12P 21/02 (2006. 01)

A61K 38/27 (2006. 01)

A61K 38/21 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书55页

序列表30页 附图6页

(54) 发明名称

长效多肽及其生产和施用方法

(57) 摘要

本发明提供包括至少两个与感兴趣的肽连接的绒毛膜促性腺激素的羧基末端肽 (CPT) 的多肽以及编码所述多肽的多核苷酸。也提供包括本发明的多肽和多核苷酸的药物组合物及其使用方法。

1. 一种包含感兴趣的肽的多肽,其中第一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽与所述感兴趣的肽的氨基末端连接,且第二个和第三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽与所述感兴趣的肽的羧基末端连接,其中所述绒毛膜促性腺激素羧基末端肽包含氨基酸序列 SSSSKAPPPS,并且其中所述感兴趣的肽是干扰素。

2. 权利要求 1 的多肽,其中所述干扰素是干扰素- β (INF- β)。

3. 权利要求 1 的多肽,其中所述感兴趣的肽是糖基化的。

4. 权利要求 1 的多肽,其中所述感兴趣的肽是非糖基化的。

5. 权利要求 1-4 任一项的多肽,其中所述干扰素的序列包含选自表 1 所示序列的氨基酸序列。

6. 权利要求 1-4 任一项的多肽,其中所述干扰素的序列是 SEQ ID NO:24。

7. 权利要求 1-6 任一项的多肽,其中至少一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽是截短的,且其中所述截短的绒毛膜促性腺激素羧基末端肽包含至少一个糖基化位点。

8. 权利要求 1-7 任一项的多肽,其中至少一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽是糖基化的。

9. 权利要求 1-8 任一项的多肽,其进一步包含信号肽。

10. 权利要求 9 的多肽,其中所述信号肽包含选自 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:26 所示序列的氨基酸序列。

11. 权利要求 1-10 任一项的多肽,其中至少一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽通过连接物与所述干扰素连接。

12. 权利要求 11 的多肽,其中所述连接物是肽键。

13. 一种多核苷酸,其编码权利要求 1 的多肽。

14. 权利要求 13 的多核苷酸,其中所述多肽进一步包含信号肽。

15. 权利要求 14 的多核苷酸,其中所述信号肽包含选自 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:26 所示序列的氨基酸序列。

16. 一种表达载体,其包含权利要求 13-15 任一项的多核苷酸。

17. 一种细胞,其包含权利要求 16 的表达载体。

18. 一种药物组合物,其包含权利要求 1-12 任一项的多肽、13-15 任一项的多核苷酸、权利要求 16 的表达载体、权利要求 17 的细胞,或其组合。

19. 权利要求 1-12 任一项的多肽或 13-15 任一项的多核苷酸在制备用于治疗对象中病毒性或增殖性病变的药物组合物中的用途。

20. 权利要求 19 的用途,其中至少一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽包含选自 SEQ ID NO:17-18 所示序列的氨基酸序列。

21. 一种提高感兴趣的肽的生物学半衰期并保持其生物学活性的方法,其包括将第一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽与感兴趣的肽的氨基末端连接以及将第二个和第三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽与感兴趣的肽的羧基末端连接的步骤,从而提高所述感兴趣的肽的生物学半衰期,其中所述绒毛膜促性腺激素羧基末端肽包含氨基酸序列 SSSSKAPPPS,并且其中所述感兴趣的肽是干扰素。

22. 权利要求 21 的方法,其中至少一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽包含选自 SEQ ID NO:17-18 所示序列的氨基酸序列。

23. 一种在分离的细胞中产生干扰素的方法,其包括以包含编码多肽的编码部分的表达载体转染所述细胞的步骤,所述多肽由干扰素、两个与所述干扰素羧基末端连接的绒毛膜促性腺激素羧基末端肽和一个与所述干扰素氨基末端连接的绒毛膜促性腺激素羧基末端肽组成,其中所述绒毛膜促性腺激素羧基末端肽包含氨基酸序列 SSSSKAPPPS,从而在分离的细胞中产生干扰素。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述多肽进一步包含信号肽。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述信号肽包含选自 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:26 所示序列的氨基酸序列。

长效多肽及其生产和施用方法

[0001] 本发明是申请日为 2007 年 2 月 5 日, 申请号为 200780012026.6, 标题为“长效多肽及其生产和施用方法”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明提供包括至少两个与感兴趣的肽连接的绒毛膜促性腺激素的羧基末端肽 (CPT) 的多肽以及编码所述多肽的多核苷酸。也提供包括本发明的多肽和多核苷酸的药物组合物及其使用方法。

背景技术

[0003] 多肽在血液、肝脏或肾脏中都容易被变性或酶降解。因此, 多肽一般都具有短的循环半衰期, 通常是数个小时。由于它们的低稳定性, 通常需要按持续的频率来转运肽药物, 以便保持活性肽的有效血浆浓度。此外, 因为通常需要通过输注来施用肽药物, 因此频繁的注射肽药物会给对象带来相当多的不适。因此, 需要延长药物性多肽的半衰期同时保持其高药物疗效的技术。这种期待中的肽药物也应当满足增强血清稳定性、高活性以及当被注射到对象体内时诱导不必要的免疫应答的低可能性的要求。

[0004] 不利的药物动力学例如短半衰期可以妨碍许多其他有希望的药物候选物的药物开发。血清半衰期是分子的一种经验特征, 必须要通过实验地测定出每种新的潜在药物的半衰期。例如, 对于低分子量多肽药物而言, 生理清除机制例如肾脏滤过可以使得保持药物的治疗水平变为难以实现, 主要是因为所需给药方案的价格或频率。相反地, 长的血清半衰期也是不利的, 因为这样的药物或其代谢物具有毒性副作用。

发明内容

[0005] 在一个实施方式中, 本发明提供了包括至少两个与感兴趣的多肽序列相连接的绒毛膜促性腺激素羧基末端肽 (CTP) 氨基酸序列的多肽。

[0006] 在另一个实施方式中, 本发明提供了包括与感兴趣的多肽序列的氨基末端连接的第一个绒毛膜促性腺激素 CTP 氨基酸 (AA) 序列以及与感兴趣的多肽序列的羧基末端连接的第二个 CTP 氨基酸序列的多肽。

[0007] 在另一个实施方式中, 本发明提供了包括两个与感兴趣的多肽序列的羧基末端连接的绒毛膜促性腺激素 CTP 序列的多肽。

[0008] 在另一个实施方式中, 本发明提供了包括与感兴趣的多肽序列的氨基末端连接的第一个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列以及与感兴趣的多肽序列的羧基末端连接的第二个和第三个 CTP AA 序列的多肽。

[0009] 在另一个实施方式中, 本发明提供了包括至少三个与感兴趣的多肽序列相连接的绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列的多肽。

[0010] 在另一个实施方式中, 本发明提供了包括编码多肽的序列的多核苷酸, 所述多肽包括至少两个与感兴趣的多肽序列相连接的绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列。

[0011] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括编码与感兴趣的多肽序列的氨基末端连接的第一个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列以及与感兴趣的多肽序列的羧基末端连接的第二个 CTP AA 序列的核苷酸序列的多核苷酸。

[0012] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括编码两个与感兴趣的多肽序列的羧基末端连接的绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列的序列的多核苷酸。

[0013] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括编码与感兴趣的多肽序列的氨基末端连接的第一个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列以及与感兴趣的多肽序列的羧基末端连接的第二个和第三个 CTP AA 序列的序列的多核苷酸。

[0014] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括编码至少三个与感兴趣的多肽序列相连接的绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列的序列的多核苷酸。

[0015] 在另一个实施方式中,本发明提供了治疗对象的生长、体重相关性病变或代谢性病变的方法,所述方法包括给对象施用治疗有效量的 CTP-hGH 的步骤,据此治疗患有生长或体重相关性病变的对象。hGH 一般是用于治疗生长疾病,特别是生长激素缺乏相关性疾病。在我们的实施例中,我们证实了垂体切除小鼠(不再分泌生长激素)在注射 CTP-hGH 之后重新得到了生长。

[0016] 在另一个实施方式中,本发明提供了提高感兴趣的多肽序列的生物半衰期的方法,包括将至少两个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列连接于感兴趣的多肽序列的步骤。

[0017] 在另一个实施方式中,本发明提供了给所需治疗的对象施用感兴趣的多肽序列的方法,包括将至少两个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列连接于感兴趣的肽系列的步骤。

[0018] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括至少两个与 EPO 肽相连接的绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列的多肽。

[0019] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括与 EPO 肽的氨基末端连接的第一个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列以及与 EPO 肽的羧基末端连接的第二个 CTP AA 序列的多肽。

[0020] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括两个与 EPO 肽的羧基末端相连接的绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列的多肽。

[0021] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括与 EPO 肽的氨基末端连接的第一个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列以及与 EPO 肽的羧基末端连接的第二个和第三个 CTP AA 序列的多肽。

[0022] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括至少三个与 EPO 肽相连接的绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列的多肽。

[0023] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括编码至少两个与 EPO 肽相连接的绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列的核苷酸序列的多核苷酸。

[0024] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括编码与 EPO 肽的氨基末端连接的第一个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列以及与 EPO 肽的羧基末端连接的第二个 CTP AA 序列的核苷酸序列的多核苷酸。

[0025] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括编码两个与感兴趣的多肽序列的羧基末端连接的绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列的核苷酸序列的多核苷酸。

[0026] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括编码与感兴趣的多肽序列的氨基末端连接的第一个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列以及与感兴趣的多肽序列的羧基末端连接的第

二个和第三个 CTP AA 序列的核苷酸序列的多核苷酸。

[0027] 在另一个实施方式中,本发明提供了包括编码至少三个与感兴趣的多肽序列相连接的绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列多肽的核苷酸序列的多核苷酸。

[0028] 在另一个实施方式中,本发明提供了治疗或降低对象的贫血发生率的方法,包括给对象施用治疗有效量的 EPO-CTP 的步骤,据此治疗患有贫血的对象。

附图说明

[0029] 图 1A-1F 是显示六个 EPO-CTP 构建体的图。

[0030] 图 1A 是多肽 SEQ ID NO:1 的图。

[0031] 图 1B 是多肽 SEQ ID NO:2 的图。

[0032] 图 1C 是多肽 SEQ ID NO:3 的图。

[0033] 图 1D 是多肽 SEQ ID NO:4 的图。

[0034] 图 1E 是多肽 SEQ ID NO:5 的图。

[0035] 图 1F 是多肽 SEQ ID NO:6 的图。

[0036] 图 2 是显示经转染的 DG44 细胞表达 EPO-CTP 变体的照片。如在“样品制备”中所述的制备来自转染细胞的最终测试样品,并在 SDS-PAGE 上跑胶。用免疫印迹检测蛋白。

[0037] 图 3 是显示重组 hEPO 衍生物和 EPO-3 (SEQ ID NO:3) 的体内生物学活性的图表。ICR 小鼠 (每组 7 只) 接受每周单次 IV 注射 (15 μ g/kg) EPO-3、rhEPO-WT (SEQ ID NO:16)、Recormon (商品化 EPO) 或每周 3 次 Recormon (5 μ g/kg) 共 3 周。对照动物 IV 注射 PBS。每周收集血样 3 次,检测出红细胞压积水平。每个点都代表红细胞压积的组内平均值 (%) $\pm$ SE。

[0038] 图 4 是显示重组 hEPO 衍生物和 EPO-1 (SEQ ID NO:1) 的体内生物学活性的图表。ICR 小鼠 (每组 7 只) 接受每周单次 IV 注射 (15 μ g/kg) EPO-1、rhEPO-WT (SEQ ID NO:16)、Recormon (商品化 EPO) 或每周 3 次 Recormon (5 μ g/kg) 共 3 周。对照动物 IV 注射 PBS。每周收集血样 3 次,检测出红细胞压积水平。每个点都代表红细胞压积的组内平均值 (%) $\pm$ SE。

[0039] 图 5 是显示重组 hEPO 衍生物和 EPO-2 (SEQ ID NO:2) 的体内生物学活性的图表。ICR 小鼠 (每组 7 只) 接受每周单次 IV 注射 (15 μ g/kg) EPO-2、rhEPO-WT (SEQ ID NO:16)、Recormon (商品化 EPO) 或每周 3 次 Recormon (5 μ g/kg) 共 3 周。对照动物 IV 注射 PBS。每周收集血样 3 次,检测出红细胞压积水平。每个点都代表红细胞压积的组内平均值 (%) $\pm$ SE。

[0040] 图 6 是显示在单次推注剂量 EPO-0 (SEQ ID NO:16)、EPO-3 (SEQ ID NO:3) 和 Aranesp 之后的网织红细胞水平变化的时距图。

[0041] 图 7 是显示在单次推注剂量 EPO-0 (SEQ ID NO:16)、EPO-3 (SEQ ID NO:3) 和 Aranesp 之后的血红蛋白水平变化 (表示为相对于基线水平的变化) 的时距图。

[0042] 图 8 是显示在单次推注剂量 EPO-0 (SEQ ID NO:16)、EPO-3 (SEQ ID NO:3) 和 Aranesp 之后的红细胞压积水平变化 (表示为相对于基线水平的变化) 的时距图。

[0043] 图 9 是显示 IV 注射后的 EPO-0 (SEQ ID NO:16)、EPO-3 (SEQ ID NO:3) 和 Aranesp 的血清浓度的图。

[0044] 图 10 是显示 MOD-4020 (SEQ ID NO:36)、MOD-4021 (SEQ ID NO:37)、MOD-4022 (SEQ ID NO:38)、MOD-4023 (SEQ ID NO:39) 和 MOD-4024 (SEQ ID NO:40) 的分子量和身份的免疫印迹。照片表明与商品化和野生型的 hGH 一样,抗 hGH 抗体可以识别出 MOD-7020-4

变体。

[0045] 图 11 是显示垂体切除小鼠在施用本发明的 GH-CTP 多肽之后的体重增长的条线图。

具体实施方式

[0046] 在一个实施方式中,本发明描述了长效多肽以及生产和使用所述多肽的方法。在一个实施方式中,长效多肽包括人绒毛膜促性腺激素(hCG)的羧基末端肽(CTP)。在一个实施方式中,CTP 作为保护剂起到抗蛋白降解或抗源自所述蛋白的肽降解的作用。在一个实施方式中,CTP 延长了蛋白或源自所述蛋白的肽的循环半衰期。在一个实施方式中,CTP 增强了蛋白或源自蛋白的肽的效力。

[0047] 在另一个实施方式中,“CTP 肽”、“羧基末端肽”和“CTP 序列”在此可以互换使用。在另一个实施方式中,羧基末端肽是全长 CTP。在另一个实施方式中,羧基末端肽是截短的 CTP。每种可能性都代表着本发明的独立的实施方式。

[0048] 在另一个实施方式中,“EPO 肽”和“EPO 序列”在此可以互换使用。在另一个实施方式中,EPO 肽是 EPO 蛋白。在另一个实施方式中,羧基末端肽是截短的 EPO 蛋白。每种可能性都代表着本发明的独立的实施方式。

[0049] 在另一个实施方式中,“信号序列”和“信号肽”在此可以互换使用。在另一个实施方式中,当涉及多核苷酸时,“序列”可以指的是编码部分。每种可能性都代表着本发明的独立的实施方式。

[0050] 在另一个实施方式中,“感兴趣的肽”和“感兴趣的多肽序列”在此可以互换使用。在另一个实施方式中,感兴趣的肽是全长蛋白。在另一个实施方式中,感兴趣的肽是蛋白片段。每种可能性都代表着本发明的独立的实施方式。

[0051] 在一个实施方式中,提供了包括至少两个与感兴趣的多肽序列相连接的绒毛膜促性腺激素的羧基末端肽(CTP)序列的多肽,其中至少两个 CTP 序列中的第一个 CTP 序列与感兴趣的多肽序列的氨基末端连接以及至少两个 CTP 序列中的第二个序列与感兴趣的多肽序列的羧基末端连接。在另一个实施方式中,羧基末端肽(CTP)序列是人绒毛膜促性腺激素的 CTP 序列。

[0052] 在另一个实施方式中,羧基末端肽(CTP)经连接物与感兴趣的多肽序列相连接。在另一个实施方式中,连接 CTP 序列和感兴趣的多肽序列的连接物是共价键。在另一个实施方式中,连接 CTP 序列和感兴趣的多肽序列的连接物是肽键。在另一个实施方式中,连接 CTP 序列和感兴趣的多肽序列的连接物是取代肽键。

[0053] 在另一个实施方式中,术语“感兴趣的多肽序列”指的是任一多肽序列,例如具有生物学活性的多肽序列。在另一个实施方式中,肽是糖基化的肽。在另一个实施方式中,肽是非糖基化的肽。从延长其循环半衰期中获益的多肽实例包括但不限于促红细胞生成素(EPO)、干扰素、人生长激素(hGH)和胰高血糖素样肽-1(GLP-1)。

[0054] 在另一个实施方式中,人绒毛膜促性腺激素(hCG)的羧基末端肽(CTP)与蛋白融合。在另一个实施方式中,人绒毛膜促性腺激素(hCG)的羧基末端肽(CTP)与糖蛋白融合。在另一个实施方式中,人绒毛膜促性腺激素(hCG)的羧基末端肽(CTP)与糖蛋白激素融合。在另一个实施方式中,人绒毛膜促性腺激素(hCG)的羧基末端肽(CTP)与源自糖蛋白激素

的肽融合。在一些实施方式中,糖蛋白激素包括 EPO、FSH、或 TSH 以及源自上述激素的肽。

[0055] 在一些实施方式中,多肽的氨基末端以及多肽的羧基末端的 CTP 序列提供了增强的抗蛋白降解的保护性。在一些实施方式中,多肽的氨基末端以及多肽的羧基末端的 CTP 序列为所连接的蛋白提供了延长的半衰期。

[0056] 在一些实施方式中,多肽的氨基末端的 CTP、多肽的羧基末端的 CTP 序列、以及至少一个额外的与羧基末端的 CTP 序列串联连接的 CTP 序列提供了增强的抗蛋白降解的保护性。在一些实施方式中,多肽的氨基末端的 CTP、多肽的羧基末端的 CTP 序列、以及至少一个额外的与羧基末端的 CTP 序列串联连接的 CTP 序列为所连接的蛋白提供了延长的半衰期。多肽的氨基末端的 CTP、多肽的羧基末端的 CTP 序列、以及至少一个额外的与羧基末端的 CTP 序列串联连接的 CTP 序列为所连接的蛋白提供了增强的活性。

[0057] 在一些实施方式中,多肽的氨基末端的 CTP、多肽的羧基末端的 CTP 序列、以及至少一个额外的与氨基末端的 CTP 序列串联连接的 CTP 序列提供了增强的抗蛋白降解的保护性。在一些实施方式中,多肽的氨基末端的 CTP、多肽的羧基末端的 CTP 序列、以及至少一个额外的与氨基末端的 CTP 序列串联连接的 CTP 序列为所连接的蛋白提供了延长的半衰期。多肽的氨基末端的 CTP、多肽的羧基末端的 CTP 序列、以及至少一个额外的与氨基末端的 CTP 序列串联连接的 CTP 序列为所连接的蛋白提供了增强的活性。

[0058] 在另一个实施方式中,本发明的羧基末端肽(CTP)包括如 SEQ ID NO:17 所示的来自人绒毛膜促性腺激素第 112 到 145 位氨基酸(AA)的 AA 序列。在另一个实施方式中,本发明的羧基末端肽(CTP)包括如 SEQ ID NO:18 所示的来自人绒毛膜促性腺激素的第 118 到 145 位 AA 的 AA 序列。在另一个实施方式中,CTP 序列也可以开始于人绒毛膜促性腺激素的第 112 到 118 位之间的任一位点以及终止于第 145 位。在一些实施方式中,CTP 序列肽是 28、29、30、31、32、33、或 34AA 长度并开始于 CTP AA 序列的第 112、113、114、115、116、117 或 118 位。

[0059] 在另一个实施方式中,CTP 肽是绒毛膜促性腺激素 CTP 的变体,其与天然 CTP 有着 1 到 5 个保守 AA 取代的不同,如美国专利 5,712,122 所述。在另一个实施方式中,CTP 肽是绒毛膜促性腺激素 CTP 的变体,其与天然 CTP 有着 1 个保守 AA 取代的不同。在另一个实施方式中,CTP 肽是绒毛膜促性腺激素 CTP 的变体,其与天然 CTP 有着 2 个保守 AA 取代的不同。在另一个实施方式中,CTP 肽是绒毛膜促性腺激素 CTP 的变体,其与天然 CTP 有着 3 个保守 AA 取代的不同。在另一个实施方式中,CTP 肽是人绒毛膜促性腺激素 CTP 的变体,其与天然 CTP 有着 4 个保守 AA 取代的不同。在另一个实施方式中,CTP 肽是绒毛膜促性腺激素 CTP 的变体,其与天然 CTP 有着 5 个保守 AA 取代的不同。在另一个实施方式中,本发明的 CTP 肽氨基酸序列与天然 CTP AA 序列或其肽至少 70% 同源。在另一个实施方式中,本发明的 CTP 肽氨基酸序列与天然 CTP AA 序列或其肽至少 80% 同源。在另一个实施方式中,本发明的 CTP 肽氨基酸序列与天然 CTP AA 序列或其肽至少 90% 同源。在另一个实施方式中,本发明的 CTP 肽氨基酸序列与天然 CTP AA 序列或其肽至少 95% 同源。

[0060] 在另一个实施方式中,本发明的 CTP 肽 DNA 序列与天然 CTP DNA 序列或其肽至少 70% 同源。在另一个实施方式中,本发明的 CTP 肽 DNA 序列与天然 CTP DNA 序列或其肽至少 80% 同源。在另一个实施方式中,本发明的 CTP 肽 DNA 序列与天然 CTP DNA 序列或其肽至少 90% 同源。在另一个实施方式中,本发明的 CTP 肽 DNA 序列与天然 CTP DNA 序列或其

肽至少 95% 同源。

[0061] 在另一个实施方式中,至少其中一个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列是被截短的。在另一个实施方式中,两个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列都是被截短的。在另一个实施方式中,其中两个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列是被截短的。在另一个实施方式中,其中两个或多个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列是被截短的。在另一个实施方式中,所有绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列都是被截短的。在另一个实施方式中,截短的 CTP 包括 SEQ ID NO:43 的前 10 个 AA。在另一个实施方式中,截短的 CTP 包括 SEQ ID NO:43 的前 11 个 AA。在另一个实施方式中,截短的 CTP 包括 SEQ ID NO:43 的前 12 个 AA。在另一个实施方式中,截短的 CTP 包括 SEQ ID NO:43 的前 13 个 AA。在另一个实施方式中,截短的 CTP 包括 SEQ ID NO:43 的前 14 个 AA。在另一个实施方式中,截短的 CTP 包括 SEQ ID NO:43 的前 15 个 AA。在另一个实施方式中,截短的 CTP 包括 SEQ ID NO:43 的前 16 个 AA。在另一个实施方式中,截短的 CTP 包括 SEQ ID NO:43 的最后 14 个 AA。每种可能性都代表着本发明的独立的实施方式。

[0062] 在另一个实施方式中,至少其中一个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列是被糖基化的。在另一个实施方式中,两个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列都是被糖基化的。在另一个实施方式中,其中两个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列是被糖基化的。在另一个实施方式中,其中两个或多个绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列是被糖基化的。在另一个实施方式中,所有绒毛膜促性腺激素 CTP AA 序列都是被糖基化的。在另一个实施方式中,本发明的 CTP 序列包括至少一个糖基化位点。在另一个实施方式中,本发明的 CTP 序列包括 2 个糖基化位点。在另一个实施方式中,本发明的 CTP 序列包括 3 个糖基化位点。在另一个实施方式中,本发明的 CTP 序列包括 4 个糖基化位点。

[0063] 在一些实施方式中,根据本发明的教导利用促红细胞生成素(EPO)。在一些实施方式中,任何 EPO 编码 AA 序列都是 EPO 序列。在一些实施方式中,任何 EPO 编码核酸序列都是 EPO 序列。在一些实施方式中,与重组 EPO 以及 EPO 和 CTP 的其他组合相比较,CTP 序列与 EPO 蛋白的氨基和羧基末端的连接造成了 EPO 刺激促红细胞生成能力的增强(图 3 到 5 和实施例 4 的表 6)。在一些实施方式中,如实施例 3 的表 4 所证实的那样,与三个 CTP 序列相连接的 EPO 没有削弱结合其受体的结合力,这表明与三个 CTP 序列相连接的 EPO 在刺激 TF-1 细胞增殖方面与野生型 EPO 同等有效。在一些实施方式中,本发明的 EPO-CPT 多肽如 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:6 所示。

[0064] 在一个实施方式中,“促红细胞生成素”指的是哺乳动物的促红细胞生成素。在一个实施方式中,“促红细胞生成素”指的是人促红细胞生成素,例如 GenBank 编号 AAA52400。

[0065] 在一个实施方式中,本发明的促红细胞生成素或 EPO 序列也指的是同源物。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定的那样,本发明的促红细胞生成素 AA 序列与 GenBank 编号 AAA52400 所示促红细胞生成素至少 50% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定的那样,本发明的促红细胞生成素 AA 序列与 GenBank 编号 AAA52400 所示的促红细胞生成素至少 60% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定的那样,本发明的促红细胞生成素 AA 序列与 GenBank 编号 AAA52400 所示的促红细胞生成素至少 70% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)

的 BlastP 软件(默认参数)确定的那样,本发明的促红细胞生成素 AA 序列与 GenBank 编号 AAA52400 所示的促红细胞生成素至少 80% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定的那样,本发明的促红细胞生成素 AA 序列与 GenBank 编号 AAA52400 所示的促红细胞生成素至少 90% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定的那样,本发明的促红细胞生成素 AA 序列与 GenBank 编号 AAA52400 所示的促红细胞生成素至少 95% 同源。

[0066] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗贫血的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端具有至少一个额外的 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:2 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:3 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:4 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:5 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:6 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:16 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:22 所示的 EPO 肽。

[0067] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗贫血的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗贫血的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:20 所示的核酸。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗贫血的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:21 所示的核酸。

[0068] 在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于抑制贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于抑制贫血的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制

贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端具有至少一个额外的 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:2 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:3 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:4 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:5 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:6 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:16 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:22 所示的 EPO 肽。

[0069] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制贫血的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制贫血的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:20 所示的核酸。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制贫血的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:21 所示的核酸。

[0070] 在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端具有至少一个额外的 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:2 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:3 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:4 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提

供了用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:5 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:6 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:16 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:22 所示的 EPO 肽。

[0071] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽和在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽的如 SEQ ID NO:20 所示的核酸。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽和在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的如 SEQ ID NO:21 所示的核酸。

[0072] 在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端具有至少一个额外的 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:2 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:3 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:4 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:5 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:6 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:16 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:22 所示的 EPO 肽。

[0073] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制肿瘤相关性贫血的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制肿瘤相关性贫血的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:20 所示的核酸。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制肿瘤相关性贫血的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:21 所示的核酸。

[0074] 在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端具有至少一个额外的 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:2 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:3 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:4 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:5 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:6 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:16 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:22 所示的 EPO 肽。

[0075] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤缺氧的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:20 所示的核酸。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤缺氧的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽和在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的如 SEQ ID NO:21 所示的核酸。

[0076] 在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠

病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端具有至少一个额外的 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:2 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:3 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:4 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:5 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:6 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:16 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:22 所示的 EPO 肽。

[0077] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:20 所示的核酸。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽和在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的如 SEQ ID NO:21 所示的核酸。

[0078] 在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两

个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端具有至少一个额外的 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:2 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:3 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:4 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:5 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:6 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:16 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:22 所示的 EPO 肽。

[0079] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:20 所示的核酸。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制慢性感染例如 HIV、炎性肠病、或脓毒症发作的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:21 所示的核酸。

[0080] 在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末

端具有至少一个额外的 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:2 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:3 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:4 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:5 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:6 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:16 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:22 所示的 EPO 肽。

[0081] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:20 所示的核酸。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗肿瘤化疗后的疲劳综合征的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:21 所示的核酸。

[0082] 在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端具有至少一个额外的 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:2 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:3 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:4 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高干细胞植入的在

N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:5 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:6 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:16 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:22 所示的 EPO 肽。

[0083] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高干细胞植入的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高干细胞植入的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:20 所示的核酸。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高干细胞植入的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:21 所示的核酸。

[0084] 在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法还提供了用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端具有至少一个额外的 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:1 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:2 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:3 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:4 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:5 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:6 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有至

少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:16 所示的 EPO 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:22 所示的 EPO 肽。

[0085] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 EPO 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:20 所示的核酸。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增加再生障碍性贫血或骨髓异常增生综合征患者的存活率的 EPO 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:21 所示的核酸。

[0086] 在一些实施方式中,本发明的同源性也包括缺失、插入或取代变体,包括其 AA 取代以及其生物学活性的多肽片段。在一个实施方式中,取代变体包括用丝氨酸取代促红细胞生成素 AA 序列 104 位的甘氨酸(SEQ ID NO:22)。

[0087] 在一些实施方式中,根据本发明的教导利用了人生长激素(hGH)。在一些实施方式中,CTP 序列与 hGH 蛋白的氨基末端和羧基末端的连接造成了效力的增加(图 11)。在一些实施方式中,CTP 序列与 hGH 蛋白的氨基末端和羧基末端的连接造成了体内活性的延长。在一个实施方式中,本发明的 CTP-hGH 多肽如 SEQ ID NO:39-41 所示。

[0088] 在一个实施方式中,术语“人生长激素”(hGH)指的是表现出 hGH 活性(即刺激生长)的多肽,例如 GenBank 编号 P01241 所示的多肽(SEQ ID NO:47)。

[0089] 在一个实施方式中,“人生长激素”(hGH)指的是表现出 hGH 活性(即刺激生长)的多肽,例如 GenBank 编号 P01241 所示的多肽。在一个实施方式中,本发明的 hGH 也指的是同源物。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的 hGH AA 序列与 GenBank 编号 P01241 所示的 hGH 序列至少 50% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的 hGH AA 序列与 GenBank 编号 P01241 所示的 hGH 序列至少 60% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的 hGH AA 序列与 GenBank 编号 P01241 所示的 hGH 序列至少 70% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的 hGH AA 序列与 GenBank 编号 P01241 所示的 hGH 序列至少 80% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的 hGH AA 序列与 GenBank 编号 P01241 所示的 hGH 序列至少 90% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的 hGH AA 序列与 GenBank 编号 P01241 所示的 hGH 序列至少 95% 同源。

[0090] 示例性的本发明的 CTP-hGH 多肽是 SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40 和 SEQ ID NO:41 所示的多肽。

[0091] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于刺激肌肉生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激肌肉生长的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激肌肉生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激肌肉生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激肌肉生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激肌肉生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激肌肉生长的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激肌肉生长的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激肌肉生长的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激肌肉生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激肌肉生长的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0092] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于刺激肌肉生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于刺激肌肉生长的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于刺激肌肉生长的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于刺激肌肉生长的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0093] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于刺激骨骼生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激骨骼生长的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激骨骼生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激骨骼生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激骨骼生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激骨骼生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激骨骼生长的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激骨骼生长的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激骨骼生长的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的

方法提供了用于刺激骨骼生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激骨骼生长的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0094] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于刺激骨骼生长的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于刺激骨骼生长的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于刺激骨骼生长的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于刺激骨骼生长的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0095] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于保持肌肉质量的本发明的 hGH 肽。

[0096] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于保持骨骼质量的本发明的 hGH 肽。

[0097] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于保持骨骼质量的本发明的 hGH-CTP 核酸序列。

[0098] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于治疗消耗性疾病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗消耗性疾病的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗消耗性疾病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗消耗性疾病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗消耗性疾病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗消耗性疾病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗消耗性疾病的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗消耗性疾病的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗消耗性疾病的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗消耗性疾病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗消耗性疾病的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0099] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗消耗性疾病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗消耗性疾病的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗消耗性疾病的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽

以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗消耗性疾病的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0100] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于增强心脏功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增强心脏功能的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增强心脏功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增强心脏功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增强心脏功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增强心脏功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增强心脏功能的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增强心脏功能的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增强心脏功能的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增强心脏功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增强心脏功能的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0101] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增强心脏功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增强心脏功能的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增强心脏功能的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增强心脏功能的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0102] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于增加脂解作用的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加脂解作用的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加脂解作用的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加脂解作用的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加脂解作用的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加脂解作用的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加

脂解作用的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加脂解作用的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加脂解作用的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加脂解作用的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加脂解作用的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0103] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增加脂解作用的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增加脂解作用的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增加脂解作用的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于增加脂解作用的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0104] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于改善液体平衡的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于改善液体平衡的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于改善液体平衡的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于改善液体平衡的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于改善液体平衡的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于改善液体平衡的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于改善液体平衡的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于改善液体平衡的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于改善液体平衡的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于改善液体平衡的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于改善液体平衡的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0105] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于改善液体平衡的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于改善液体平衡的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于改善液体平衡的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于改善液体平衡的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0106] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于治疗骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗骨质疏松的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗骨质疏松的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗骨质疏松的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗骨质疏松的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗骨质疏松的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0107] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗骨质疏松的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗骨质疏松的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于治疗骨质疏松的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0108] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于抑制骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制骨质疏松的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制骨质疏松的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制骨质疏松的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制骨质疏松的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的

方法提供了用于抑制骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于抑制骨质疏松的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0109] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制骨质疏松的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制骨质疏松的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制骨质疏松的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于抑制骨质疏松的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0110] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高运动能力的本发明的 hGH 肽。

[0111] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于提高肺功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高肺功能的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高肺功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高肺功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高肺功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高肺功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高肺功能的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高肺功能的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高肺功能的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高肺功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高肺功能的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0112] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高肺功能的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高肺功能的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高肺功能的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高肺功能的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0113] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于提高免疫力的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,

本发明的方法提供了用于提高免疫力的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高免疫力的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高免疫力的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高免疫力的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高免疫力的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高免疫力的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高免疫力的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高免疫力的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高免疫力的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于提高免疫力的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0114] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高免疫力的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高免疫力的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高免疫力的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于提高免疫力的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0115] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于再生重要器官的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于再生重要器官的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于再生重要器官的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于再生重要器官的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于再生重要器官的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于再生重要器官的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于再生重要器官的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于再生重要器官的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于再生重要器官的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于再生重要器官的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于再生重要器官的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0116] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于再生重要器官的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于再生重要器官的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于再生重要器官的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于再生重要器官的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0117] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于增加健康感的本发明的 hGH 肽。

[0118] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于恢复 REM 睡眠的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于恢复 REM 睡眠的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于恢复 REM 睡眠的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:23 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于恢复 REM 睡眠的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:36 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于恢复 REM 睡眠的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:37 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于恢复 REM 睡眠的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:38 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于恢复 REM 睡眠的如 SEQ ID NO:39 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于恢复 REM 睡眠的如 SEQ ID NO:40 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于恢复 REM 睡眠的如 SEQ ID NO:41 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于恢复 REM 睡眠的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的如 SEQ ID NO:42 所示的 hGH 肽。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于恢复 REM 睡眠的如 SEQ ID NO:44 所示的 hGH 肽。

[0119] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于恢复 REM 睡眠的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于恢复 REM 睡眠的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于恢复 REM 睡眠的包括 N 末端的一个 CTP AA 肽以及 C 末端的两个 CTP AA 肽的 hGH 肽的核酸序列 SEQ ID NO:45。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了编码用于恢复 REM 睡眠的 hGH 肽以及 N 末端的一个 CTP AA 肽和 C 末端的两个 CTP AA 肽的核酸序列 SEQ ID NO:46。

[0120] 在一些实施方式中,本发明的同源性也包括缺失、插入或取代变体,包括其 AA 取代以及其生物学活性的多肽片段。在一个实施方式中,取代变体是用缬氨酸取代 hGH 的 65 位的谷氨酰胺的变体(SEQ ID NO:23)(Gellerfors et al., J Pharm Biomed Anal 1989, 7:173-83)。

[0121] 在一些实施方式中,根据本发明的教导利用了干扰素。在一些实施方式中,CTP 序

列与干扰素蛋白的氨基末端和羧基末端的连接造成了效力的增加。在一些实施方式中,CTP 序列与干扰素蛋白的氨基末端和羧基末端的连接造成了体内活性的延长。

[0122] 在一个实施方式中,“干扰素”指的是哺乳动物 I 型干扰素多肽。在一个实施方式中,“干扰素”指的是哺乳动物 II 型干扰素多肽。在一些实施方式中,利用了本领域一般熟练人员已知的额外的合适的干扰素多肽。在一些实施方式中,干扰素是 α 干扰素。在一些实施方式中,干扰素是 β 干扰素。在一些实施方式中,干扰素是 γ 干扰素。在一些实施方式中,干扰素是 ω 干扰素。在一些实施方式中,干扰素是亚种干扰素。在一个实施方式中,亚种干扰素是 IFN- α 2a。在一个实施方式中,亚种干扰素是 IFN- α 2b。在一个实施方式中,亚种干扰素是 IFN- β 1a。在一个实施方式中,亚种干扰素是 IFN- β 1b。

[0123] 在一些实施方式中,本发明的干扰素表现出干扰素活性例如抗病毒或抗增殖活性。在一些实施方式中,下面的表 1 列出了干扰素的非受限实例的 GenBank 编号。

[0124] 在一个实施方式中,本发明的干扰素也指的是同源物。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的干扰素 AA 序列与表 1 所列的干扰素序列至少 50% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的干扰素 AA 序列与表 1 所列的干扰素序列至少 60% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的干扰素 AA 序列与表 1 所列的干扰素序列至少 70% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的干扰素 AA 序列与表 1 所列的干扰素序列至少 80% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的干扰素 AA 序列与表 1 所列的干扰素序列至少 90% 同源。在一个实施方式中,如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样,本发明的干扰素 AA 序列与表 1 所列的干扰素序列至少 95% 同源。在一些实施方式中,本发明的同源性也包括缺失、插入或取代变体,包括其 AA 取代以及其生物学活性的多肽片段。在一个实施方式中,取代变体包括用丝氨酸取代干扰素 β 的 17 位的半胱氨酸(SEQ ID NO:24)。

[0125] 下面的表 1 列出了干扰素实例以及它们相应的 NCBI 序列号。

[0126] 表 1

[0127]

干扰素名称	NCBI 序列号
干扰素 α 1	NP_076918.1
干扰素 α 10	NP_002162.1
干扰素 α 13	NP_008831.2
干扰素 α 14	NP_002163.1
干扰素 α 16	NP_002164.1
干扰素 α 17	NP_067091.1

干扰素 α 2	NP_000596.2
干扰素 α 21	NP_002166.1
干扰素 α 4	NP_066546.1
干扰素 α 5	NP_002160.1
干扰素 α 6	NP_066282.1
干扰素 α 7	NP_066401.2
干扰素 α 8	NP_002161.2
干扰素 β 1	NP_002167.1
干扰素 ϵ 1	NP_795372.1
干扰素 γ	NP_000610.2
干扰素 ϵ	NP_064509.1
干扰素 Ω 1	NP_002168.1

[0128]

[0129] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于治疗或抑制多发性硬化的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的干扰素 β 1 肽。在另一个实施方式中,本发明提供了用于治疗或抑制多发性硬化的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的干扰素 β 1 肽。在另一个实施方式中,本发明提供了用于治疗或抑制多发性硬化的如 SEQ ID NO:24 所示的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有一个 CTP AA 肽的干扰素 β 1 肽。在另一个实施方式中,本发明提供了用于治疗或抑制多发性硬化的如 SEQ ID NO:24 所示的干扰素 β 1 肽,其在 N 末端额外具有 SEQ ID NO:26 的信号肽以及在 SEQ ID NO:26 的 N 末端具有至少一个 CTP AA 肽,而在 SEQ ID NO:24 的 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽。

[0130] 在一些实施方式中,根据本发明的教导利用了胰高血糖素样肽 -1。在一些实施方式中,CTP 序列与“胰高血糖素样肽 -1”的氨基末端和羧基末端的连接造成了效力的增加。在一些实施方式中,CTP 序列与肽的氨基末端和羧基末端的连接造成了体内活性的延长。在一些实施方式中,CTP 序列与胰高血糖素样肽的氨基末端和羧基末端的连接造成了体内活性的延长。

[0131] 在一个实施方式中,“胰高血糖素样肽”(GLP-1)指的是哺乳动物多肽。在一个实施方式中,“胰高血糖素样肽”(GLP-1)指的是人多肽。在一些实施方式中,从胰高血糖素前蛋白原(Genbank 号为 NP002045)解离出 GLP-1,其具有结合 GLP-1 受体并启动信号传导途径造成促胰岛素活性的能力。在一个实施方式中,“促胰岛素活性”指的是应答于升高的葡

葡萄糖水平刺激胰岛素分泌的能力, 据此引起细胞摄取葡萄糖以及降低血浆葡萄糖水平。在一些实施方式中, GLP-1 多肽包括但不限于美国专利 5, 118, 666 所述的那些专利, 在此通过引用将其并入本申请。

[0132] 在一个实施方式中, “GLP-1”指的是多肽, 例如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的如 SEQ ID NO:25 所示的序列。在一个实施方式中, 本发明的 GLP-1 也指的是 GLP-1 同源物。在一个实施方式中, 如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样, 本发明的 GLP-1AA 序列与 SEQ ID NO:25 所示的 GLP-1 序列至少 50% 同源。在一个实施方式中, 如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样, 本发明的 GLP-1AA 序列与 SEQ ID NO:25 所示的 GLP-1 序列至少 60% 同源。在一个实施方式中, 如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样, 本发明的 GLP-1AA 序列与 SEQ ID NO:25 所示的 GLP-1 序列至少 70% 同源。在一个实施方式中, 如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样, 本发明的 GLP-1AA 序列与 SEQ ID NO:25 所示的 GLP-1 序列至少 80% 同源。在一个实施方式中, 如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样, 本发明的 GLP-1AA 序列与 SEQ ID NO:25 所示的 GLP-1 序列至少 90% 同源。在一个实施方式中, 如用国立生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件(默认参数)确定出的那样, 本发明的 GLP-1AA 序列与 SEQ ID NO:25 所示的 GLP-1 序列至少 95% 同源。

[0133] 在另一个实施方式中, 本发明的方法提供了用于治疗或抑制 II 型糖尿病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 GLP-1 肽。在另一个实施方式中, 本发明的方法提供了用于治疗或抑制 II 型糖尿病的在 N 末端额外具有一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有两个 CTP AA 肽的 GLP-1 肽。在另一个实施方式中, 本发明的方法提供了用于治疗或抑制 II 型糖尿病的在 N 末端额外具有至少一个 CTPAA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 GLP-1 肽。

[0134] 在一个实施方式中, 同源性也指的是缺失、插入或取代变体, 包括其 AA 取代及其生物学活性多肽片段。

[0135] 在一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是 EPO。在一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是干扰素。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是 hGH。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是 GLP-1。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是胰岛素。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是脑啡肽。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是 ACTH。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是胰高血糖素。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是胰岛素样生长因子。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是表皮生长因子。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是酸性或碱性成纤维细胞生长因子。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是血小板衍生生长因子。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是粒细胞-CSF。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是巨噬细胞-CSF。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是 IL-2。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是 IL-3。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是肿瘤坏死因子。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是 LHRH。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是 LHRH 类似物。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是生长抑素。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是生长激素释放因子。在另一个实施方式中, 感兴趣的多肽序列是内啡肽。在另一个实施方式中, 感

兴趣的多肽序列是肺泡表面活性剂蛋白。在另一个实施方式中,感兴趣的多肽序列是利钠因子。在另一个实施方式中,感兴趣的多肽序列是粘附素。在另一个实施方式中,感兴趣的多肽序列是血管生成抑制素。在另一个实施方式中,感兴趣的多肽序列是内皮他汀。在另一个实施方式中,感兴趣的多肽序列是受体肽。在另一个实施方式中,感兴趣的多肽序列是受体结合配体。在另一个实施方式中,感兴趣的多肽序列是抗体。在另一个实施方式中,感兴趣的多肽序列是抗体片段。在另一个实施方式中,感兴趣的多肽序列是包括任何修饰形式的肽或蛋白。

[0136] 在另一个实施方式中,本发明的肽包括在N末端额外具有至少一个CTP AA肽以及在C末端额外具有一个CTP AA肽的感兴趣的肽。在另一个实施方式中,在N末端额外具有至少一个CTP AA肽以及在C末端额外具有一个CTP AA肽的感兴趣的肽包括选自下面列表中的蛋白:胰岛素、人血白蛋白/白蛋白、Activase altiplase/tPA、腺苷脱氨酶、免疫球蛋白、葡糖脑苷酯酶、Leukine-sargramostim/GM-CSF、CSF、Venoglobulin-S/IgG、Proleukin aldesleukin、DNA 酶、VIII 因子、Helixate、L-天冬酰胺酶、WinRho SDF Rh I、Retavase retaplase/tPA、IX 因子、FSH、球蛋白、纤维蛋白、白介素-11、becaplermin/PDGF、水蛭素/herudin、TNF、胸腺球蛋白、VIIa 因子、干扰素 α -2a、干扰素 α n-1、干扰素 α -N3、干扰素 β -1b、干扰素 γ -1b、白介素-2、HGH 或单克隆抗体。

[0137] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗糖尿病的在N末端额外具有至少一个CTP AA肽以及在C末端额外具有一个CTP AA肽的胰岛素。

[0138] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗低血容量性休克、血液透析或心肺搭桥的在N末端额外具有至少一个CTP AA肽以及在C末端额外具有一个CTP AA肽的白蛋白。

[0139] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗急性心肌梗死、急性大面积肺栓塞、或缺血性中风(的整个变化(change throughout))的在N末端额外具有至少一个CTP AA肽以及在C末端额外具有一个CTP AA肽的Activase-altiplase/tPA。

[0140] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗重度联合免疫缺陷病的在N末端额外具有至少一个CTP AA肽以及在C末端额外具有一个CTP AA肽的腺苷脱氨酶。

[0141] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗移植受体的在N末端额外具有至少一个CTP AA肽以及在C末端额外具有一个CTP AA肽的免疫球蛋白。

[0142] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供的免疫球蛋白是CMV 免疫球蛋白。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗戈谢病的在N末端额外具有至少一个CTP AA肽以及在C末端额外具有一个CTP AA肽的葡糖脑苷酯酶。

[0143] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于刺激造血祖细胞的在N末端额外具有至少一个CTP AA肽以及在C末端额外具有一个CTP AA肽的Leukine-sargramostim/GM-CSF。

[0144] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗粒细胞减少症的在N末端额外具有至少一个CTP AA肽以及在C末端额外具有一个CTP AA肽的G-CSF。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗免疫缺陷病的在N末端额外具有至少一个CTP AA肽以及在C末端额外具有一个CTP AA肽的Venoglobulin-S/IgG。

[0145] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肾癌或转移性黑色素

瘤的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有一个 CTP AA 肽的 Proleukin-aldesleukin。

[0146] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗囊性纤维化的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有一个 CTP AA 肽的 DNA 酶。

[0147] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗血友病 A 的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有一个 CTP AA 肽的 VIII 因子。

[0148] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗血友病 A 的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有一个 CTP AA 肽的 Helixate。

[0149] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗急性淋巴细胞白血病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有一个 CTP AA 肽的 L-天冬酰胺酶。

[0150] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗 Rh 同种免疫和免疫性血小板减少性紫癜的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有一个 CTP AA 肽的 WinRho SDF Rh IgG。

[0151] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗急性心肌梗死的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有一个 CTP AA 肽的 Retavase retaplase/tPA。

[0152] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗血友病 B 的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 IX 因子。

[0153] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗血友病 B 的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 IX 因子。

[0154] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于在辅助生殖中刺激排卵的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 FSH。

[0155] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于预防呼吸道合胞病毒的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的球蛋白。

[0156] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于外伤处理和止血的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的纤维蛋白。在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于化疗诱导的血小板减少症的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的白介素 11。

[0157] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗糖尿病足溃疡的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 becaplermin/PDGF。

[0158] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于肝素诱导的血小板减少症的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 lepirudin/herudin。

[0159] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗类风湿关节炎的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的可溶性 TNF。

[0160] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗器官移植排异病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的胸腺球蛋白。

[0161] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗血友病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 VIIa 因子。

[0162] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗艾滋病相关性卡波丝肉瘤的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的干扰素 α -2a。

[0163] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗毛细胞白血病、生殖器疣、艾滋病相关性卡波丝肉瘤、丙型肝炎、乙型肝炎、恶性黑色素瘤和滤泡性淋巴瘤的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的干扰素 α -2b。

[0164] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗生殖器疣的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的干扰素 α -N3。

[0165] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗慢性肉芽肿病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的干扰素 γ -1b。

[0166] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗丙型肝炎感染的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的干扰素 α n-1。

[0167] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗肾癌和转移性黑色素瘤的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的白介素 2。

[0168] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗多发性硬化的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的干扰素 β -1b。

[0169] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗消耗性疾病、AIDS、恶液质或 hGH 缺乏症的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 hGH。

[0170] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于器官移植的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 OKT3 单克隆抗体。

[0171] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于预防冠状动脉介入和血管成形术的并发症的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的 Reo 单克隆抗体。

[0172] 在另一个实施方式中,本发明的方法提供了用于治疗结直肠癌、非霍奇金淋巴瘤、肾脏移植排异、转移性乳腺癌或预防呼吸道合胞病毒病的在 N 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽以及在 C 末端额外具有至少一个 CTP AA 肽的单克隆抗体。

[0173] 在一个实施方式中,本发明被应用于兽医医学。在一个实施方式中,本发明提供家养哺乳动物的治疗方法,所述哺乳动物被保持为人类伴侣(例如狗、猫、马)、具有显著的商业价值(例如奶牛、肉牛、运动用动物)、具有显著的科学价值(例如濒危物种的圈养或自由的样本)或者具有其他的价值。

[0174] 在一个实施方式中,本发明的多肽、抗体或多核苷酸被施用给动物(例如鼠、大鼠、兔、仓鼠、豚鼠、猪、小型猪、鸡、骆驼、山羊、马、牛、绵羊、狗、猫、非人类灵长类动物和人)。在一个实施方式中,所引用的应用具有在多种宿主中的用途。在一些实施方式中,这些宿主包括但不限于人、鼠、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马、小鼠、大鼠、仓鼠、猪、小型猪、鸡、山羊、牛、绵羊、狗、猫或非人类灵长类动物。

[0175] 在一个实施方式中,用本发明的方法治疗农场动物。在一个实施方式中,农场动物包括猪、牛、奶牛、马、山羊、绵羊、鸡、火鸡、鹅、鸭和相关物种。在一个实施方式中,用本发明的方法治疗实验用动物。在一个实施方式中,实验用动物包括大鼠、小鼠、豚鼠、兔、山羊、

猴、狗、猫等。在一个实施方式中,用本发明的方法治疗动物园动物。在一个实施方式中,动物园动物包括动物园中的所有脊椎动物。在一个实施方式中,用本发明的方法治疗水生动物。在一个实施方式中,水生动物包括鱼、鳗鱼、龟、海豹、企鹅、鲨鱼、鲸鱼和相关物种。在一个实施方式中,用本发明的方法治疗家养动物。在一个实施方式中,家养动物包括任何宠物例如猫和狗或者人类喂养的动物例如马、骆驼、猪、山羊、兔、鸡、火鸡、鹅、鸭等。

[0176] 在本发明中,术语猪包括猪 (pig)、小猪 (piglet)、猪 (hog)、小母猪 (gilt)、barrow、公猪 (boar) 和母猪 (sow)。在另一个实施方式中,“牛”指的是幼仔、母牛、奶牛、小母牛、阉牛 (steer) 和公牛。

[0177] 在一个实施方式中,本发明的方法利用牛生长激素。在一个实施方式中,本发明的方法利用人工牛生长激素。在一个实施方式中,人工牛生长激素具有 NCBI 序列编号 AAA72262 所示的序列。在另一个实施方式中,人工牛生长激素是本领域已知的任一其他的人工牛生长激素。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0178] 在一个实施方式中,本发明的方法利用绵羊生长激素。在一个实施方式中,绵羊生长激素具有 NCBI 序列编号 NP_001009315 所示的序列。在另一个实施方式中,绵羊生长激素是本领域已知的任一其他的绵羊生长激素。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0179] 在一个实施方式中,本发明的方法利用马生长激素。在一个实施方式中,马生长激素具有 NCBI 序列编号 AAA21027 所示的序列。在另一个实施方式中,马生长激素是本领域已知的任一其他的马生长激素。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0180] 在一个实施方式中,本发明的方法利用鸡生长激素。在一个实施方式中,鸡生长激素具有 NCBI 序列编号 CAA3561 所示的序列。在另一个实施方式中,鸡生长激素是本领域已知的任一其他的鸡生长激素。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0181] 在一个实施方式中,本发明的方法利用小鼠生长激素。在一个实施方式中,小鼠生长激素具有 NCBI 序列编号 NP_032143 所示的序列。在另一个实施方式中,小鼠生长激素是本领域已知的任一其他的小鼠生长激素。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0182] 在一个实施方式中,本发明的方法利用罗非鱼生长激素。在一个实施方式中,罗非鱼生长激素具有 NCBI 序列编号 CAA00818 所示的序列。在另一个实施方式中,罗非鱼生长激素是本领域已知的任一其他的罗非鱼生长激素。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0183] 在一个实施方式中,本发明的方法利用牛 EPO。在一个实施方式中,本发明的方法利用人工牛 EPO。在一个实施方式中,人工牛 EPO 具有 NCBI 序列编号 NP_776334 所示的序列。在另一个实施方式中,人工牛 EPO 是本领域已知的任一其他的人工牛 EPO。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0184] 在一个实施方式中,本发明的方法利用猪 EPO。在一个实施方式中,猪 EPO 具有 NCBI 序列编号 NP_999299 所示的序列。在另一个实施方式中,猪 EPO 是本领域已知的任一其他的猪 EPO。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0185] 在一个实施方式中,本发明的方法利用绵羊 EPO。在一个实施方式中,绵羊 EPO 具有 NCBI 序列编号 NP_001019908 所示的序列。在另一个实施方式中,绵羊 EPO 是本领域已知的任一其他的绵羊 EPO。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0186] 在一个实施方式中,本发明的方法利用小鼠 EPO。在一个实施方式中,小鼠 EPO 具

有 NCBI 序列编号 CAA72707 所示的序列。在另一个实施方式中,小鼠 EPO 是本领域已知的任一其他的小鼠 EPO。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0187] 在一个实施方式中,本发明的方法利用牛 GLP-1。在一个实施方式中,牛 GLP-1 具有 NCBI 序列编号 P01272 所示的序列。在另一个实施方式中,牛 GLP-1 是本领域已知的任一其他的牛 GLP-1。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0188] 在一个实施方式中,本发明的方法利用绵羊 GLP-1。在一个实施方式中,绵羊 GLP-1 具有 NCBI 序列编号 Q8MJ25 所示的序列。在另一个实施方式中,绵羊 GLP-1 是本领域已知的任一其他的绵羊 GLP-1。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0189] 在一个实施方式中,本发明的方法利用猪 GLP-1。在一个实施方式中,鸡 GLP-1 具有 NCBI 序列编号 P01274 所示的序列。在另一个实施方式中,鸡 GLP-1 是本领域已知的任一其他的鸡 GLP-1。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0190] 在一个实施方式中,本发明的方法利用小鼠 GLP-1。在一个实施方式中,小鼠 GLP-1 具有 NCBI 序列编号 NP_032127 所示的序列。在另一个实施方式中,小鼠 GLP-1 是本领域已知的任一其他的小鼠 GLP-1。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0191] 在一个实施方式中,本发明的方法利用牛干扰素 α 。在一个实施方式中,牛干扰素 α 具有 NCBI 序列编号 ABD57311 所示的序列。在另一个实施方式中,牛干扰素 α 是本领域已知的任一其他的牛干扰素 α 。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0192] 在一个实施方式中,本发明的方法利用绵羊干扰素 α 。在一个实施方式中,绵羊干扰素 α 具有 NCBI 序列编号 CAA41790 所示的序列。在另一个实施方式中,绵羊干扰素 α 是本领域已知的任一其他的绵羊干扰素 α 。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0193] 在一个实施方式中,本发明的方法利用猪干扰素 α 。在一个实施方式中,猪干扰素 α 具有 NCBI 序列编号 AAP92118 所示的序列。在另一个实施方式中,猪干扰素 α 是本领域已知的任一其他的猪干扰素 α 。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0194] 在一个实施方式中,本发明的方法利用小鼠干扰素 α 。在一个实施方式中,小鼠干扰素 α 具有 NCBI 序列编号 AAA37886 所示的序列。在另一个实施方式中,小鼠干扰素 α 是本领域已知的任一其他的小鼠干扰素 α 。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0195] 在一些实施方式中,CTP 序列修饰在容许使用更低剂量方面是有利的。

[0196] 在一些实施方式中,“多肽”在此包括天然多肽(降解产物、合成方法合成的多肽或重组多肽)以及肽模拟物(一般是合成方法合成的多肽)以及类肽和半类肽,其是多肽的类似物,在一些实施方式中,其具有使得多肽在机体内更为稳定或者更能够穿透到细胞内的修饰。

[0197] 在一些实施方式中,修饰包括但不限于 N 末端修饰、C 末端修饰、多肽键修饰包括但不限于 $\text{CH}_2\text{-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S=O}$ 、 O=C-NH 、 $\text{CH}_2\text{-O}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 S=C-NH 、 CH=CH 或 CF=CH 、骨架修饰以及残基修饰。用于制备肽模拟化合物的方法是本领域公知道,并在 Quantitative Drug Design, C. A. Ramsden Gd., Chapter 17. 2, F. Choplin Pergamon Press (1992) 中有所说明,在此通过引用将其全部内容并入本申请。下面提供了这方面的更多的细节。

[0198] 在一些实施方式中,取代了多肽内的多肽键(-CO-NH-)。在一些实施方式中,用 N-甲基键($\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$)取代多肽键。在一些实施方式中,用酯键($\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$)取代多肽键。在一些实施方式中,用酮甲基键($\text{-CO-CH}_2\text{-}$)取代多肽键。

在一些实施方式中,用 α 氮杂键($-\text{NH}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$)取代多肽键,其中 R 是任何烷基例如甲基、卡巴键(carba bonds)($-\text{CH}_2-\text{NH}-$)。在一些实施方式中,用羟乙烯键($-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$)取代多肽键。在一些实施方式中,用硫代酰胺键($-\text{CS}-\text{NH}-$)取代多肽键。在一些实施方式中,用烯双键($-\text{CH}=\text{CH}-$)取代多肽键。在一些实施方式中,用逆酰胺键(retro amide bonds)($-\text{NH}-\text{CO}-$)取代多肽键。在一些实施方式中,用多肽衍生物($-\text{N}(\text{R})-\text{CH}_2-\text{CO}-$)取代多肽键,其中 R 是天然存在于碳原子上的“正常”侧链。在一些实施方式中,这些修饰发生于沿着多肽链的任一键上,甚至同时发生在多个肽键上(2 到 3 个键)。

[0199] 在一些实施方式中,多肽的天然芳香族 AA 例如 Trp、Tyr 和 Phe 可以被合成地非天然酸例如苯胺乙酸、TIC、Naphthylelanine (No1)、Phe 的环甲基衍生物、Phe 的卤素衍生物或 o- 甲基-Tyr 所取代。在一些实施方式中,本发明的多肽包括一个或多个修饰 AA 或者一个或多个非 AA 单体(例如脂肪酸、复合糖等)。

[0200] 在一个实施方式中,“AA”被理解为包括 20 种天然存在的 AA;那些常常在体内翻译后被修饰的 AA 包括例如羟脯氨酸、磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸;和其他少见 AA 包括但不限于 2- 氨基己二酸、羟赖氨酸、异锁链赖氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸和鸟氨酸。在一个实施方式中,“AA”包括 D-AA 和 L-AA。

[0201] 在一些实施方式中,在需要可溶形式的多肽的治疗方法中利用了本发明的多肽。在一些实施方式中,本发明的多肽包括一种或多种非天然的或天然的极性 AA,包括但不限于丝氨酸和苏氨酸,由于它们含羟基的侧链使得它们能够增加多肽的溶解度。

[0202] 在一些实施方式中,利用了线性形式的本发明的多肽,尽管本领域人员都认为环状结构不会严重的干扰多肽的特征,因此也可以利用环形的多肽。

[0203] 在一些实施方式中,本发明的多肽是生物化学合成的,例如通过使用固相技术。在一些实施方式中,这些生物化学方法包括专用固相合成、部分固相合成、片段缩合或经典的溶液合成。在一些实施方式中,当多肽是相当短的(约 5 到 15kDa)和 / 或当不能通过重组技术生成(即不能由核酸序列编码)以及因此涉及到不同的化学作用时,才使用这些方法。

[0204] 在一些实施方式中,固相多肽合成方法是本领域人员公知的,在 J ohn Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Polypeptide Syntheses(2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984) 中有所描述。在一些实施方式中,用预备队高效液相色谱法纯化出合成多肽(Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N. Y.) 并且可以用本领域人员已知的方法经 AA 测序确定出所述多肽的组成。

[0205] 在一些实施方式中,用重组蛋白技术产生本发明的多肽。在一些实施方式中,重组蛋白技术被用于产生相对长的多肽(例如大于 18 到 25 个 AA)。在一些实施方式中,重组蛋白技术被用于产生大量的本发明的多肽。在一些实施方式中, Bitter et al., (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544; Studier et al. (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89; Brisson et al. (1984) Nature 310:511-514; Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6:307-311; Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-1680 和 Brogli et al., (1984) Science 224:838-843; Gurley et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565 和 Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp421-463 都描述了重组蛋白技术。

[0206] 在一个实施方式中,用编码本发明的多肽的多核苷酸合成本发明的多肽。在一些实施方式中,编码本发明的多肽的多核苷酸被连接到表达载体内,所述载体包括对顺式调节序列(例如启动子序列)的转录控制。在一些实施方式中,顺式调节序列适用于指导组成型表达本发明的多肽。在一些实施方式中,本发明的顺式调节序列适用于指导组织特异性表达本发明的多肽。在一些实施方式中,顺式调节序列适用于指导诱导型表达本发明的多肽。

[0207] 在一些实施方式中,SEQ ID NOs:20、21、44、45 和 46 给出了表达本发明的多肽的多核苷酸。

[0208] 在一些实施方式中,适用于本发明的组织特异性启动子包括在特殊细胞群中发挥功能的序列,实例包括但不限于启动子例如肝脏特异的白蛋白启动子(Pinkert et al., (1987) *Genes Dev.* 1:268-277)、淋巴组织特异性启动子(Calame et al., (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275),特别是 T 细胞受体(Winoto et al., (1989) *EMBO J.* 8:729-733)和免疫球蛋白(Banerji et al. (1983) *Cell* 33:729-740)的启动子、神经元特异性启动子例如神经纤维启动子(Byrne et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477)、胰腺特异性启动子(Edlunch et al. (1985) *Science* 230:912-916)或乳腺特异性启动子例如乳清启动子(美国专利 4,873,316 和欧洲申请文献 264,166)。适用于本发明的诱导型启动子包括例如四环素诱导型启动子(Srour, M. A., et al., 2003. *Thromb. Haemost.* 90:398-405)。

[0209] 在一个实施方式中,术语“多核苷酸”指的是单链或双链的核酸序列,其可以是孤立的或者按 RNA 序列、互补的多核苷酸序列(cDNA)、基因组多核苷酸序列和/或复合的多核苷酸序列(例如上述的组合)的形式提供的。

[0210] 在一个实施方式中,“互补多核苷酸序列”指的是利用逆转录酶或任何其他的 RNA 依赖性 DNA 聚合酶逆转录信使 RNA 产生的序列。在一个实施方式中,序列可以是利用 DNA 聚合酶在体内或体外扩增到的序列。

[0211] 在一个实施方式中,“基因组多核苷酸序列”指的是源自(分离自)染色体的序列,因此其代表着染色体的连续部分。

[0212] 在一个实施方式中,“复合多核苷酸序列”指的是序列,其是至少部分互补的以及至少部分基因组的。在一个实施方式中,复合序列可以包括一些编码本发明的多肽所需的外显子序列以及一些插入所述外显子之间的内含子序列。在一个实施方式中,内含子序列可以是任一来源的,包括其他基因的内含子,通常包括保守剪切信号序列。在一个实施方式中,内含子序列包括顺式作用的表达调节元件。

[0213] 在一个实施方式中,本发明的多核苷酸还包括编码用于分泌本发明的多肽的信号肽的信号序列。在一些实施方式中,信号序列包括但不限于如 SEQ ID NO:19 所示的 EPO 的内源信号序列或如 SEQ ID NO:26 所示的 IFN-1 的内源信号序列。在另一个实施方式中,信号序列位于 CTP 序列的 N 末端,CTP 序列依次位于感兴趣的肽的 N 末端;例如序列是(a)信号序列-(b)CTP-(c)相关序列-(d)任选的 1 个或多个额外的 CTP 序列。在另一个实施方式中,在感兴趣的肽的信号序列以及感兴趣的多肽序列本身之间被插入了一个或多个 CTP 序列,因此阻断了相关的野生型序列。每种可能性都代表本发明的独立的实施方式。

[0214] 在一个实施方式中,在表达和分泌之后,从前体蛋白中解离出信号肽,产生成熟蛋白。

[0215] 在一些实施方式中,利用实施例 1 所述的 PCR 技术或者本领域人员已知的任何其他的方法或操作制备出本发明的多核苷酸。在一些实施方式中,操作涉及连接两个不同的 DNA (见例如“Current Protocols in Molecular Biology”, eds. Ausubel et al., John Wiley&Sons, 1992)。

[0216] 在一个实施方式中,本发明的多核苷酸被插入到了表达载体(例如核酸构建体)内,使得能够表达重组多肽。在一个实施方式中,本发明的表达载体包括使得所述载体适合于原核细胞内的复制和整合的附加序列。在一个实施方式中,本发明的表达载体包括使得所述载体适合于真核细胞内的复制和整合的附加序列。在一个实施方式中,本发明的表达载体包括穿梭载体,其使得所述载体适合于原核细胞和真核细胞内的复制和整合。在一些实施方式中,克隆载体包括转录和翻译启动序列(例如启动子、增强子)以及转录和翻译终止子(例如多腺苷化信号)。

[0217] 在一个实施方式中,多种原核或真核细胞都可以被用作表达本发明的多肽的宿主表达系统。在一些实施方式中,这些宿主表达系统包括但不限于微生物例如经含多肽编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌;经含多肽编码序列的重组酵母菌表达载体转化的酵母菌;经含多肽编码序列的重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒 CaMV、番茄花叶病毒 TMV)感染或经含多肽编码序列的重组质粒表达载体例如 Ti 质粒转化的植物细胞系统。

[0218] 在一些实施方式中,使用非细菌的表达系统(例如哺乳动物表达系统例如 CHO 细胞)表达本发明的多肽。在一个实施方式中,被用于在哺乳动物细胞中表达本发明的多核苷酸的表达载体是包括 CMV 启动子和新霉素耐药基因的 pCI-DHFR 载体。在实施例 1 的一个实施方式中描述了 pCI-dhfr 载体的构建。

[0219] 在一些实施方式中,在本发明的细菌系统中,根据所表达多肽的目标用途可以有利地选择出多种表达载体。在一个实施方式中,需要大量的多肽。在一个实施方式中,需要指导表达高水平蛋白产物的载体,所述载体可能是与疏水性信号序列的融合物,所述疏水性信号序列指导所表达的产物进入到细菌的细胞浆内或者其中容易纯化出蛋白产物的培养基内。在一个实施方式中,用特殊的解离位点遗传加工特定的融合蛋白,这有助于回收多肽。在一个实施方式中,适用于这些加工处理的载体包括但不限于大肠杆菌表达载体的 pET 系列(Studier et al., Methods in Enzymol. 185:60-89(1990))。

[0220] 在一个实施方式中,使用酵母菌表达系统。在一个实施方式中,可以在酵母菌中使用多种含有组成型或诱导型启动子的载体,如美国专利申请 5,932,447 所述。在另一个实施方式中,可以使用促进外来 DNA 序列整合到酵母菌染色体内的载体。

[0221] 在一个实施方式中,本发明的表达载体还可以包括例如容许从单一 mRNA 例如内核糖体进入位点(IRES)翻译出一些蛋白的额外的多核苷酸序列以及用于启动子嵌合多肽的基因组整合的序列。

[0222] 在一些实施方式中,哺乳动物表达载体包括但不限于购自 Invitrogen 的 pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81、购自 Promega 的 pCI、购自 Strategene 的 pMbac、pPbac、pBK-RSV 及 pBK-CMV、和购自 Clontech 的 pTRES、以及它们的衍生物。

[0223] 在一些实施方式中,本发明使用含有来自真核病毒例如逆转录病毒的调节元件的表达载体。SV40 载体包括 pSVT7 和 pMT2。在一些实施方式中,源自牛乳头状瘤病毒的载体包括 pBV-1MTHA,以及源自 Epstein Bar 病毒包括 pHEB0、和 p205。其他示例载体包括 pMSG、pAV009/A⁺、pMT010/A⁺、pMAMneo-5、杆状病毒 pDSVE、和容许在 SV-40 早期启动子、SV-40 晚期启动子、金属硫蛋白启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒启动子、Rous 肉瘤病毒启动子、多角体蛋白启动子、或其在真核细胞中显示为有效的启动子的指导下表达蛋白的任何其他的载体。

[0224] 在一些实施方式中,重组病毒载体可以用于体内表达本发明的多肽,因为它们提供了优点例如横向感染和靶向特异性。在一个实施方式中,横向感染在例如逆转录病毒的生命周期内是固有的,并且它是其中单个受感染细胞产生多个出芽脱落并感染邻近细胞的子代病毒粒的过程。在一个实施方式中,结果是大片面积被快速感染的,大部分区域都不是被初始病毒颗粒最初感染的地方。在一个实施方式中,产生了不能横向传播的病毒载体。在一个实施方式中,这个特征是有用的,只要所需的目的是将特殊基因引入到有限数目的靶向细胞内。

[0225] 在一个实施方式中,可以用不同的方法将本发明的表达载体引入到细胞内。在 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995); Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) 和 Gilboa et al. *Biotechniques* 4(6):504-512, 1986 中普遍地描述了这些方法,包括稳定或临时转染、脂染、电穿孔和重组病毒载体感染。另外,美国专利 5,464,764 和 5,487,992 面熟了正负选择法。

[0226] 在一些实施方式中,经病毒感染引入核酸比其他方法例如脂染和电穿孔有着一些优点,因为病毒的感染性质使得可以获得更高的转染效率。

[0227] 在一个实施方式中,要知道也可以从通过采用任何合适的上面所述的施用模式被施用给个体的核酸构建体中表达出本发明的多肽(即体内基因治疗)。在一个实施方式中,通过适当的基因转运载体/方法(转染、转导、同源重组等)以及所需的表达系统可以将核酸构建体引入到合适的细胞内,然后培养扩增出修饰细胞并将其返回到个体内(即体外基因治疗)。

[0228] 在一个实施方式中,已经在动物模型例如啮齿类动物(Bohl et al., *Blood* 2000;95:2793-2798)、灵长类动物(Gao et al., *Blood*, 2004, Volume 103, Number 9)中尝试了 EPO 的体内基因治疗,并且已经证实了其在慢性肾功能衰竭患者的人体临床试验中的成功性(Lippin et al *Blood* 2005, 106, Number 7)。

[0229] 在一个实施方式中,使用植物表达载体。在一个实施方式中,多肽编码序列的表达是受多种启动子的驱动的。在一些实施方式中,使用病毒启动子例如 CaMV 的 35S RNA 和 19S RNA 启动子(Brisson et al., *Nature* 310:511-514 (1984))、或 TMV 的包被蛋白启动子(Takamatsu et al., *EMBO J.* 6:307-311 (1987))。在另一个实施方式中,使用植物启动子例如 RUBISCO 的小亚基(Coruzzi et al., *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); 和 Brogli et al., *Science* 224:838-843 (1984)) 或热休克蛋白启动子例如大豆 hsp17.5-E 或 hsp17.3-B

(Gurley et al., Mol. Cell. Biol. 6:559-565(1986))。在一个实施方式中,利用 Ti 质粒、Ri 质粒、植物病毒载体、直接 DNA 转化、微注射、电穿孔和其他本领域人员公知的技术将构建体引入到植物细胞内。见例如 Weissbach&Weissbach 的 Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp421-463(1988)。本发明也可以使用本领域公知的其他表达系统例如昆虫和哺乳动物宿主细胞系统。

[0230] 要明白除了包含转录和翻译所插入的编码序列(编码多肽)所必需的元件外,本发明的表达构建体也可以包括被遗传加工成优化所表达的多肽的稳定性、生产、纯化、产率或活动性的序列。

[0231] 在一些实施方式中,可以用不同的方法将本发明的表达载体引入到宿主细胞系统内。在一些实施方式中,在 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York(1989, 1992); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995); Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) 和 Gilboa et al. Biotechniques 4(6):504-512, 1986 中普遍地描述了这些方法,包括稳定或临时转染、脂染、电穿孔和重组病毒载体感染。另外,美国专利 5,464,764 和 5,487,992 面熟了正负选择法。

[0232] 在一些实施方式中,在有效的条件下培养转化细胞,所述条件容许表达大量的重组多肽。在一些实施方式中,有效的培养条件包括但不限于容许蛋白产生的有效的培养基、生物反应器、温度、pH 和氧条件。在一个实施方式中,有效的培养基指的是其中细胞被培养产生本发明的重组多肽的任何培养基。在一些实施方式中,培养基通常包括具有可同化的碳源、氮源和磷源以及合适的盐、矿物质、金属和其他养分例如微生物的水溶液。在一些实施方式中,可以在传统发酵生物反应器、摇晃瓶、试管、微滴定皿和 Petri 板中培养本发明的细胞。在一些实施方式中,在适合于重组细胞的温度、pH 和氧含量中实施培养。在一些实施方式中,培养条件是在本领域一般熟练人员的专业知识之内。

[0233] 在一些实施方式中,取决于生产所用的载体和宿主细胞,所形成的本发明的多肽仍在重组细胞内、被分泌到发酵培养基中、被分泌到两个细胞膜之间的空间内例如大肠杆菌的周质空间、或者保留在细胞的外表面或病毒膜上。

[0234] 在一个实施方式中,在预定的培养时间之后,完成重组多肽的回收。

[0235] 在一个实施方式中,术语“回收重组多肽”在此指的是收集含有多肽的发酵培养基以及不必暗示分离或纯化的附加步骤。

[0236] 在一个实施方式中,利用多种标准的蛋白纯化技术纯化出本发明的多肽,所述技术例如但不限于亲和层析、离子交换层析、过滤、电泳、疏水作用层析、凝胶过滤层析、反相层析、伴刀豆球蛋白 A 层析、层析聚焦和差异溶解。

[0237] 在一个实施方式中,为了促进回收,可以将所表达的编码序列遗传加工成编码本发明的多肽并融合可裂解的基序。在一个实施方式中,可以设计融合蛋白,使得可以通过亲和层析;例如通过在特异于可裂解基序的柱上的固定可以容易地分离出多肽。在一个实施方式中,裂解位点被遗传加工在多肽和可裂解基序之间,以及通过用在该位点

上特异地裂解所述融合蛋白的适当的酶或试剂的处理可以从层析柱上释放出多肽(见例如 Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70(1988); 和 Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859(1990))。

[0238] 在一个实施方式中,本发明的多肽可以恢复到“基本上纯的”形式。

[0239] 在一个实施方式中,术语“基本上纯度”指的是容许在此所述的应用中有效应用所述蛋白的纯度。

[0240] 在一个实施方式中,也可以用体外表达系统合成本发明的多肽。在一个实施方式中,体外合成方法是本领域公知的,以及系统的组件是可商品化获得的。

[0241] 在一个实施方式中,实施例 1 举例说明了利用重组 DNA 技术产生 CTP-EPO-CTP 多肽。

[0242] 在一些实施方式中,合成并纯化出重组多肽;在体内或体外检测出它们的治疗疗效。在一个实施方式中,利用实施例 2 到 6 和 8 到 9 所述的各种检测法可以验证本发明的重组 EPO 肽的结合活性。在一个实施方式中,通过测定多肽刺激 TF-1 细胞增殖的能力可以验证体外结合活性。在一个实施方式中,通过分析红细胞压积水平(图 3 到 5)和 / 或网织红细胞百分比可以推算出体内活性。

[0243] ● 在一个实施方式中,可以用本发明的 EPO 肽治疗患有各种促红细胞生成素相关性病变的对象。在一些实施方式中,对象是人类对象。

[0244] ● 在一些实施方式中,术语“促红细胞生成素相关性病变”指的是与促红细胞生成素的低于正常的、异常的或不适当的调控相关的任何病变。在一些实施方式中,用本领域人员可接受并利用的任何测量方法确定出与这些病变相关的促红细胞生成素的水平。在一些实施方式中,促红细胞生成素相关性病变通常包括贫血性病变。

[0245] 在一些实施方式中,“贫血性病变”指的是与贫血相关的任何病变、疾病或病态。在一些实施方式中,贫血性病变包括但不限于再生障碍性贫血、自身免疫性溶血性贫血、骨髓移植、Churg-Strauss 综合征、Diamond-Blackfan 贫血、范可尼贫血、Felty 综合征、移植宿主病、造血干细胞移植、溶血尿毒症综合征、骨髓异常增生综合征、夜间阵发性血红蛋白尿、骨髓纤维化、全血细胞减少症、纯红细胞再生障碍性贫血、过敏性紫癜、铁粒幼细胞性贫血、难治性贫血伴原始细胞增多、类风湿关节炎、Shwachman 综合征、镰刀细胞病、重度地中海贫血、轻度地中海贫血、血小板减少性紫癜等。

[0246] 在一个实施方式中,本发明包括 CTP-hGH-CTP 多肽。在一个实施方式中,如实施例 7 所示,用重组 DNA 技术方法产生 CTP-hGH-CTP 多肽。在一个实施方式中,在体内检测本发明的 CTP-hGH-CTP 多肽的治疗疗效。在一个实施方式中,在体外检测出本发明的 CTP-hGH-CTP 多肽的治疗疗效。在一个实施方式中,用先前经人生长激素受体转染过的 Nb2(催乳素依赖性鼠淋巴瘤细胞株(ECACC 细胞库))或 FCD-P1 小鼠细胞株测定出本发明的重组 hGH 多肽的结合活性。在一个实施方式中,hGH 与这些受体的结合诱导了细胞增殖,其中在一个实施方式中,通过 MTT 细胞染色测定出作为 hGH 活性的函数的细胞增殖。在一个实施方式中,通过测定经治疗后的生长激素缺陷动物在一定时间内的体重增加推算出体内活性。

[0247] 在一些实施方式中,本发明的人生长激素多肽可以被用于治疗患有生长和体重相关性病变的对象,所述病变例如是生长缺陷疾病、HIV 感染患者的 AIDS 消耗的、衰老的和受损的免疫功能、代谢性疾病、手术恢复、充血性心肌病、肝移植、肝切除术后的肝脏再生、慢

性肾功能衰竭、肾性骨营养不良、骨质疏松、软骨发育不良 / 软骨发育不全、骨骼发育不良、慢性炎性或营养性疾病例如克隆病、短肠综合征、幼年型慢性关节炎、囊性纤维化、男性不育、X-连锁低血磷性佝偻病、唐氏综合征、脊柱裂、Noonan 综合征、肥胖、肌肉强度受损和纤维肌痛。

[0248] 在一些实施方式中，本发明的干扰素多肽被用于治疗患有各种病变的对象，例如毛细胞白血病 (HCL)、卡波丝肉瘤 (KS)、慢性髓细胞白血病 (CML)、慢性丙型肝炎 (CHC)、尖锐湿疣 (CA)、慢性乙型肝炎、恶性黑色素瘤、滤泡性非霍奇金淋巴瘤、多发性硬化、慢性肉芽肿疾病、鸟型复合分支杆菌 (MAC)、肺纤维化和骨质疏松。

[0249] 在一些实施方式中，本发明的胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 被用于治疗患有非胰岛素依赖性糖尿病、肥胖、中风、心肌梗死、中风、应激性高糖血症、或肠易激综合征的对象。

[0250] 在一个实施方式中，可以给个体提供本发明的多肽本身。在一个实施方式中，可以作为药物组合物的一部分给个体提供本发明的多肽，其中所述多肽与可药用载体混合。

[0251] 在一个实施方式中，“药物组合物”指的是一种或多种在此所述的活性组分与其他化学组分例如生理上适宜的载体和赋形剂的制剂。药物组合物的目的是为了有助于给有机体施用化合物。

[0252] 在一个实施方式中，“活性组分”指的是感兴趣的多肽序列，其具有生物学作用。

[0253] 在一些实施方式中，本发明的任一组合物都包括至少两个以任何形式与相关蛋白结合的 CTP 序列。在一个实施方式中，本发明提供了组合制剂。在一个实施方式中，“组合制剂”特别定义为“部件试剂盒”，其中可以单独地或者通过使用不同的固定组合以及不同量的组合物伴侣即同时、同步、分开或依次地剂量上述的组合伴侣。在一些实施方式中，然后例如可以同时地或按时间交错地施用部件试剂盒的部件，即在不同的时间点以及相同的或不同的时间间隔内施用部件试剂盒的任何部件。在一些实施方式中，可以施用组合制剂中一定比例的组合伴侣的总量。在一个实施方式中，组合制剂可以有所不同，例如为了满足所治疗的患者亚群的需要或者单个患者的需要，其中不同的需要可能是因为特殊的疾病、疾病的严重度、年龄、性别或体重造成的，本领域人员容易确定出这一点。

[0254] 在一个实施方式中，短句“生理可用载体”和“可药用载体”可以互换使用，其指的是不会对有机体引起严重刺激并且不会消除所施用的化合物的生物学活性以及性能的载体或稀释剂。佐剂包含于这些短句的含义中。在一个实施方式中，其中一种可药用载体所含的组分可以是例如聚乙二醇 (PEG)，这是一种在有机和水介质中有着较大溶解度范围的生物兼容的聚合物 (Mutter et al. (1979))。

[0255] 在一个实施方式中，“赋形剂”指的是被加入到药物组合物中以便进一步有助于活性组分的施用的惰性物质。在一个实施方式中，赋形剂包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、蔬菜油和聚乙二醇。

[0256] 在“Remington's Pharmaceutical Sciences”Mack Publishing Co., Easton, PA (最后一版) 中可以找到用于制剂和施用药物的技术，在此通过引用将其并入本申请。

[0257] 在一个实施方式中，合适的施用途径例如包括口服、经直肠、经粘膜、经鼻、肠道或肠外转运包括肌肉内、皮下和髓内注射以及鞘内、直接脑室内、静脉内、腹腔内、鼻内、或眶内注射。

[0258] 在一个实施方式中，以局部而不是全身的方式施用制剂，例如通过将制剂直接注

射到患者机体的特殊区域内。

[0259] 本发明涉及各种剂量范围的实施方式。在一个实施方式中,本发明的多肽的剂量是在 0.05 到 80mg/ 天的范围内。在一个实施方式中,剂量是在 0.05 到 50mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 0.1 到 20mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 0.1 到 10mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 0.1 到 5mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 0.5 到 5mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 0.5 到 50mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 5 到 80mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 35 到 65mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 35 到 65mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 20 到 60mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 40 到 60mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 45 到 60mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 40 到 60mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 60 到 120mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 120 到 240mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 40 到 60mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 240 到 400mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 45 到 60mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 15 到 25mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 5 到 10mg/ 天的范围内。在另一个实施方式中,剂量是在 55 到 65mg/ 天的范围内。

[0260] 在一个实施方式中,剂量为 20mg/ 天。在另一个实施方式中,剂量为 30mg/ 天。在另一个实施方式中,剂量为 40mg/ 天。在另一个实施方式中,剂量为 50mg/ 天。在另一个实施方式中,剂量为 60mg/ 天。在另一个实施方式中,剂量为 70mg/ 天。在另一个实施方式中,剂量为 80mg/ 天。在另一个实施方式中,剂量为 90mg/ 天。在另一个实施方式中,剂量为 100mg/ 天。

[0261] 在一个实施方式中,口服施用包括单位药物剂型包括片剂、胶囊、锭剂、咀嚼片、悬浮液、乳剂等。这些单位药物剂量包括安全和有效量的所需化合物,在一个实施方式中,每种化合物的剂量是从约 0.7 或 3.5mg 到约 280mg/70kg,或者在另一个实施方式中,是从约 0.5 或 10mg 到约 210mg/70kg。适用于制备用于口服施用的单位药物剂型的可药用载体是本领域公知的。在一些实施方式中,片剂通常包括传统的药物兼容的佐剂作为惰性稀释剂例如碳酸钙、碳酸钠、甘露醇、乳糖和纤维素;结合剂例如淀粉、明胶和蔗糖;崩解剂例如淀粉、海藻酸和交联羧甲基纤维素(croscarmellose);润滑剂例如硬脂酸镁、硬脂酸和滑石粉。在一个实施方式中,助流剂例如二氧化硅可以被用于提高粉末混合物的流动性。在一个实施方式中,可以添加色素例如 FD&C 染料来改善外观。甜味剂和调味剂例如阿司帕坦(aspartame)、糖精、薄荷脑、薄荷油、和水果香料是咀嚼片的有用佐剂。胶囊通常包括一种或多种在此所述的固体稀释剂。在一些实施方式中,载体组分的选择取决于此要考虑例如味道、费用和储藏稳定性,这对于本发明的目的都不是重要的,本领域人员可以容易地进行选择。

[0262] 在一个实施方式中,口服药物剂型包括预定的释放谱。在一个实施方式中,本发明的口服药物剂型包括延长释放的片剂、胶囊、锭剂或咀嚼片。在一个实施方式中,本发明的口服药物剂型包括缓慢释放的片剂、胶囊、锭剂或咀嚼片。在一个实施方式中,本发明的口服药物剂型包括速释片剂、胶囊、锭剂或咀嚼片。在一个实施方式中,根据本领域人员已知的药物活性组分的所需释放谱制剂出口服药物剂型。

[0263] 在一些实施方式中,口服组合物包括液态溶液、乳液、悬浮液等。在一些实施方式中,适用于制备这些组合物的可药用载体是本领域公知的。在一些实施方式中,液态口服组合物包括从约 0.012% 到约 0.933% 所需组合物,或者在另一个实施方式中,从约 0.033% 到约 0.7%。

[0264] 在一些实施方式中,用于本发明方法中的组合物包括溶液或乳液,在一些实施方式中,其为水性溶液或乳液,包括安全 and 有效量的本发明的化合物以及任选地包括其他用于局部鼻内施用的化合物。在一些实施方式中,组合物包括从约 0.01% 到约 10.0%w/v 的对象化合物,更优选的从约 0.1% 到约 2.0,其被用于经鼻内途径全身转运化合物。

[0265] 在另一个实施方式中,通过静脉内、动脉内、或肌肉内注射液体制剂来施用药物组合物。在一些实施方式中,液体剂型包括溶液、悬浮液、分散剂、乳液、油等。在一个实施方式中,静脉内施用药物组合物,药物组合物因此被制剂成适合于静脉内施用的形式。在另一个实施方式中,动脉内施用药物组合物,药物组合物因此被制剂成适合于动脉内施用的形式。在另一个实施方式中,肌肉内施用药物组合物,药物组合物因此被制剂成适合于肌肉内施用的形式。

[0266] 此外,在另一个实施方式中,将药物组合物局部施用到体表,药物组合物因此被制剂成适合于局部施用的形式。合适的局部用制剂包括凝胶、软膏、乳膏、洗剂、滴剂等。对于局部施用而言,本发明的化合物与额外的合适的治疗性药物组合,在有或没有药物载体的生理可用稀释剂中被制备并应用为溶液、悬浮液或乳剂。

[0267] 在一个实施方式中,用本领域公知的方法例如传统的混合、溶解、颗粒化、制锭、磨细、乳化、包囊化、包埋(entrapping)或冻干方法生产本发明的药物组合物。

[0268] 在一个实施方式中,利用一种或多种包括赋形剂和辅佐剂的生理可用载体按传统方式制剂出用于本发明的药物组合物,所述辅佐剂有助于将活性组分加工到可药用的制剂中。在一个实施方式中,制剂取决于所选的施用途径。

[0269] 在一个实施方式中,在水溶液中制剂出本发明的注射液。在一个实施方式中,在生理兼容的缓冲液例如 Hank 溶液、Ringer 溶液或生理缓冲液中制剂出本发明的注射液。在一些实施方式中,对于经粘膜施用而言,所述制剂可以使用适合于所穿透屏障的穿透剂。这些穿透剂通常是本领域已知的。

[0270] 在一个实施方式中,在此所述的制剂被制剂成肠外施用例如经推注注射或连续输注。在一些实施方式中,用于注射的制剂为单位药物剂型例如安瓿或者与任选的所添加的防腐剂一起存在于多剂量容器内。在一些实施方式中,组合物是悬浮液、溶液或油性或水性载体中的乳剂,以及含有制剂物例如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。

[0271] 在一些实施方式中,组合物也包括防腐剂例如苯扎氯胺和硫柳汞等;螯合剂例如依地酸钠等;缓冲剂例如磷酸、柠檬酸和乙酸;张力剂例如氯化钠、氯化钾、凝胶、甘露醇等;抗氧化剂例如抗坏血酸、乙酰半胱氨酸、焦亚硫酸钠(sodium metabisulfite)等;芳香剂;粘度调节剂例如聚合物包括纤维素及其衍生物;聚乙烯醇以及按需调节这些水性组合物的 pH 值得酸和碱。在一些实施方式中,组合物也包括局麻药或其他活性物。组合物也可以被用作喷雾剂、雾化剂、滴剂等。

[0272] 在一些实施方式中,用于肠外施用的药物组合物包括水溶性的活性制剂的水溶液。另外,在一些实施方式中,活性组分的悬浮液被制备成合适的基于油或水的注射悬浮

液。在一些实施方式中,合适的亲脂溶剂或载体包括脂肪油例如芝麻油、或合成脂肪酸酯例如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。在一些实施方式中,水性注射悬浮液含有增加悬浮液粘度的物质例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。在一些实施方式中,悬浮液也含有增加活性组分的溶解度以便容许制备出高浓缩溶液的合适的稳定剂或物质。

[0273] 在另一个实施方式中,可以在载体中转运活性化合物,特别是脂质体(见 Langer, Science 249:1527-1533(1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365(1989); Lopez-Berestein, 同上, pp. 317-327)。

[0274] 在另一个实施方式中,经可控释放系统转运的药物组合物被制剂成用于静脉输注、可植入渗透泵、经皮贴片、脂质体或其他施用模式。在一个实施方式中,使用泵(见 Langer, 同上; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201(1987); Buchwald et al., Surgery 88:507(1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574(1989))。在另一个实施方式中,使用聚合材料。仍在另一个实施方式中,可控释放系统可以被置于治疗靶点例如脑的近段,因此只要求一部分全身剂量(见例如 Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138(1984))。Langer 的综述 (Science 249:1527-1533(1990)) 中讨论了其他可控的释放系统。

[0275] 在一些实施方式中,活性组分是粉末形式,在使用之前用合适的载体例如无菌的、无热源的水溶液进行重建。在一些实施方式中,组合物被制剂成用于雾化和吸入施用。在另一个实施方式中,组合物被包装于带有雾化工具的容器内。

[0276] 在一个实施方式中,利用例如传统栓剂基质例如可可脂或其他甘油脂将本发明的制剂制剂成直肠内用的组合物例如栓剂或保留灌肠。

[0277] 在一些实施方式中,适用于本发明的药物组合物包括其中含有获得目标目的的有效量的活性组分的组合物。在一些实施方式中,治疗有效量表示活性组分有效地预防、缓解或消除疾病的症状或延长所治疗患者的生存期的量。

[0278] 在一个实施方式中,确定出治疗有效量是在本领域人员的能力范围之内。

[0279] 组合物也包括防腐剂例如苯扎氯胺和硫柳汞等;螯合剂例如依地酸钠等;缓冲剂例如磷酸、柠檬酸和乙酸;张力剂例如氯化钠、氯化钾、凝胶、甘露醇等;抗氧化剂例如抗坏血酸、乙酰半胱氨酸、焦亚硫酸钠 (sodium metabisulfite) 等;芳香剂;粘度调节剂例如聚合物包括纤维素及其衍生物;聚乙烯醇以及按需调节这些水性组合物的 pH 值得酸和碱。在一些实施方式中,组合物也包括局麻药或其他活性物。组合物也可以被用作喷雾剂、雾化剂、滴剂等。

[0280] 可以作为可药用载体或其组分的物质的一些实例是糖例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物例如羧甲基纤维素、乙基纤维素和甲基纤维素;西黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石粉;固体润滑剂例如硬脂酸和硬脂酸镁;硫酸钙;蔬菜油例如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油;多元醇例如丙二醇、甘油山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;海藻酸;乳化剂例如 TweenTM 牌乳化剂;湿润剂例如十二烷基硫酸钠;色素;芳香剂;压片剂;稳定剂;抗氧化剂;防腐剂;无致热源水;等张盐;和磷酸缓冲液。对与化合物联合使用的可药用载体的选择基本取决于化合物的施用方式。在一个实施方式中,如果对象化合物是注射用的,那么可药用载体是无菌生理盐水以及血液兼容的悬

浮剂, pH 值被调整到约 7.4。

[0281] 另外, 组合物还包括结合剂(例如阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶、卡波姆、乙基纤维素、古尔胶、羟丙基纤维素、羟丙甲基纤维素、聚维酮)、崩解剂(例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、古尔胶、淀粉羟乙酸钠)、各种 pH 值和离子强度的缓冲剂(例如 Tris-HCl、乙酸、磷酸)、预防表面吸收的添加剂例如白蛋白或凝胶、去污剂(例如 Tween20、Tween80、Pluronic F68、胆酸盐)、蛋白酶抑制剂、表面活性剂(例如十二烷基硫酸钠)、渗透增强剂、增溶剂(例如甘油、聚乙二醇)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠、丁羟茴醚)、稳定剂(例如羟丙基纤维素、羟丙甲基纤维素)、增粘剂(例如卡波姆、二氧化硅胶体、乙基纤维素、古尔胶)、甜味剂(例如阿斯帕坦、柠檬酸)、防腐剂(例如硫柳汞、苯甲醇、对羟基苯甲酸)、润滑剂(例如硬脂酸、硬脂酸镁、聚乙二醇、十二烷基硫酸钠)、助流剂(例如二氧化硅胶体)、成形剂(例如邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸三乙酯)、乳化剂(例如卡波姆、羟丙基纤维素、十二烷基硫酸钠)、聚合物涂层(例如泊洛沙姆(poloxamers)或 poloxamines)、和成膜剂(例如乙基纤维素、丙烯酸、聚甲基丙烯酸酯)和 / 或佐剂。

[0282] 用于糖浆、酏剂、乳剂和悬浮液的常用载体组分包括乙醇、甘油、聚丙二醇、聚乙二醇、液体蔗糖、山梨醇和水。对于悬浮液而言, 常用的悬浮剂包括甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、纤维素(例如 Avicel™、RC-591)、黄蓍胶、和海藻酸钠; 常用湿润剂包括卵磷脂和聚氧化乙烯山梨聚糖(例如聚山梨醇 80)。常用防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯和苯甲酸钠。在另一个实施方式中, 口服液体组合物也含有一种或多种组分例如在此所述的甜味剂、芳香剂和色素。组合物也包括活性物质整合到多聚体化合物例如聚乳酸、聚羟乙酸、水凝胶等的颗粒制剂内或者整合到脂质体、微乳剂、微粒、单层或多层载体、红细胞血影或球形体内。这些组合物将影响着物理状态、溶剂度、稳定性、体内释放率和体内清除率。

[0283] 本发明也涉及经聚合物(例如泊洛沙姆或 poloxamines)及与针对组织特异性受体、配体或抗原的抗体偶合的或者与组织特异性受体的配体偶合的化合物涂层的颗粒组合物。

[0284] 在一些实施方式中, 通过与水溶性聚合物例如聚乙二醇、聚乙二醇和聚丙二醇的共聚体、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚维酮或聚脯氨酸的共价连接修饰化合物。在另一个实施方式中, 经修饰的化合物比相应的未修饰化合物在静脉注射后表现出显著更长的血液半衰期。在一个实施方式中, 修饰也增加了化合物在水溶液中的溶解度、消除了聚集、增强了化合物的物理和化学的稳定性, 以及极大地降低了化合物的免疫原性和反应性。在另一个实施方式中, 通过施用比未修饰化合物更少频率或更低剂量的这种聚合物-化合物加合物(abduct)可以获得所需的体内生物学活性。

[0285] 在一些实施方式中, 最初可以从体外检测法估计出需要准备的有效量或剂量。在一个实施方式中, 可以在动物模型中配置剂量, 这些信息可以被用于更准确地测定出人体中的有用剂量。

[0286] 在一个实施方式中, 用体外、细胞培养物或试验动物的标准药物方法可以确定出在此所述的活性组分的毒性和治疗疗效。在一个实施方式中, 从这些体外和细胞培养检测法及动物研究中获得的数据可以被用于制定出用于人体的剂量范围。在一个实施方式中, 每个医生可以根据患者的病变选择准确的制剂、施用途径和剂量(见例如 Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1p. 1)。

[0287] 在一个实施方式中,根据所治疗的病变的严重度和应答性,剂量可以是单次或多次施用,治疗疗程持续数天到数周或者直到达到治愈或者实现了疾病状态的减轻。

[0288] 在一个实施方式中,所施用的组合物的量显然要取决于所治疗的对象、痛苦的严重度、施用方式和处方医生的判断等。

[0289] 在一个实施方式中,也可以制备出包括被制剂于兼容的药物载体中的本发明的制剂的组合物,所述组合物被放置于合适的载体内,并标记出用于治疗所标出的病变。

[0290] 在一个实施方式中,本发明的组合物被放入包装或分注装置例如 FDA 认证的试剂盒内,其含有一个或多个含有活性组分的单位药物剂型。在一个实施方式中,包装例如包括金属箔或塑料箔例如透明包装。在一个实施方式中,包装或分注装置附带有施用说明书。在一个实施方式中,包装或分注装置提供有与容器相连的管理药品的生产、使用或销售的政府部门认可形式的通知,所述通知是政府部分对组合物形式或人体或兽医施用的认证的反映,在一个实施方式中,这种通知是经美国食品药品监督管理局认证的标注用于处方药物的通知或者是所认证的产品插页。

[0291] 在一个实施方式中,要明白可以给个体提供本发明的多肽以及额外的活性剂,以便获得比单独药物治疗本身更高的治疗作用。在另一个实施方式中,对与组合治疗相关的不良副作用采取措施(例如互补药物的剂量和选择)。

[0292] 在了解下面的实施例之后,本发明的其他的目的、优点和新特点对于本领域一般熟练人员是显而易见的,这些实施例不是限制性的。另外,在上面所述的以及在下面章节的权利要求书中的权利要求的本发明的各种实施方式和部分中的每个实施方式和部分都可以在下面的实施例中找到试验支持。

[0293] 实施例

[0294] 在此所用的名词以及本发明所用的实验室方法一般都包括分子技术、生物化学技术、微生物学技术和重组 DNA 技术。这些技术在文献中有着充分的解释说明。见例如 "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 美国专利 4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659 和 5,272,057 给出的方法学; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); 在专利和科学文献中广泛的描述了可获得的免疫检测法,见例如美国专利 3,791,932、3,839,153、3,850,752、3,850,578、

3,853,987、3,867,517、3,879,262、3,901,654、3,935,074、3,984,533、3,996,345、4,034,074、4,098,876、4,879,219、5,011,771 和 5,281,521;“Oligonucleotide Synthesis”Gait,M. J.,ed.(1984);“Nucleic Acid Hybridization”Hames,B. D.,and Higgins S. J.,eds.(1985);“Transcription and Translation”Hames,B. D.,and Higgins S. J.,eds.(1984);“Animal Cell Culture”Freshney,R. I.,ed.(1986);“Immobilized Cells and Enzymes”IRLPRESS,(1986);“A Practical Guide to Molecular Cloning”Perbal,B.,(1984)和“Methods in Enzymology”Vol.1-317,Academic Press;“PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications”,Academic Press,San Diego,CA(1990);Marshak et al.,“Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual”CSHL Press(1996);在此通过引用将全部内容并入本申请。在本说明书的全文中都提供了其他常用的参考文献。

[0295] 实施例1:EPO构建体的产生

[0296] 材料和方法:

[0297] 表达载体 pCI-dhfr 的构建:pCI-neo 哺乳动物表达载体购自 Promega (编号 E1841)。载体含有 CMV IE 增强子/启动子和新霉素磷酸转移酶基因。pSV2-dhfr 克隆购自 ATCC (编号 37146)。质粒含有小鼠 dhfr 基因。如下进行 pCI-dhfr 载体的构建:

[0298] a. 用限制性内切酶 BglIII 消化 pSV2-dhfr 质粒(dhfr 基因的 3'末端)。用 DNA 聚合酶 I 大(Klenow)片段填充 5' 突出端,形成平端。然后用限制性内切酶 AvrII 消化 DNA (dhfr 基因的 5' 末端)。分离出 dhfr 基因(AvrII 平端)片段。

[0299] b. 用限制性内切酶 BstXI 消化 pCI-neo 载体(neo 基因的 3'末端)。用 DNA 聚合酶 I 大(Klenow)片段去除 3'突出端,形成平端。然后用限制性内切酶 AvrII 消化 DNA(neo 基因的 5'末端)。分离出表达载体(AvrII 平端)。

[0300] c. 将 dhfr 基因连接到 pCI 载体内,形成含有 dhfr 基因的表达载体(pCI-dhfr)。

[0301] hEPO-CTP 变体的构建:在不同位置上融合含有 hCG β 亚基的 C 末端肽(CTP)的盒基因和人 EPO (NP_000790.2)的编码序列。如图 1A-D 所示,构建出 4 个 EPO-CTP 变体。将 proEPO 信号肽用于构建分泌性 EPO-CTP 变体。将含 XbaI-NotI 片段的 Epo 序列连接到本发明的 pCI-dhfr 表达载体内。

[0302] 下面的表 2 总结了用于构建本发明的含 CTP 多肽的引物序列。

[0303] 表 2

[0304]

引物号	SEQ ID NO	序列	限制性位点(序列中下划线部分)
1	7	5' AATCTAGAGGTCATCATGGGGGTGC 3'	XbaI
2	8	5'ATTGCGGCCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG 3'	NotI
17 ^R	9	5' TAAATATTGGGGTGTCCGAGGGCCC 3'	SspI

[0305]

10	10	5'CCAATATTACCACAAGCCCCACCACGCCTCAT 3'	SspI
11 ^R	11	5'TGCGGCCGCGGATCCTTATCTGTCCCCTGTCCTGC 3'	NotI
15	12	5' GCCCTGCTGTCGGAAGC 3'	
2 ^R	13	5' ATTGCGGCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG	NotI
23 ^R	14	5'CTTTGAGGAAGAGGAGCCCAGGACTGGGAGGC3'	
24	15	5' CCTGGGCTCCTCTTCCTCAAAGGC 3'	
38 ^R	16	5' GCTTCCGACAGCAGGGC 3'	

[0306] EP0-1701-1-p17-6 (Epo-1 - SEQ ID NO:1):用利用上面引物(SEQ ID NOs:7-16)的PCR构建出702bp的XbaI - NotI片段。然后将含XbaI - NotI PCR片段的Epo-ctp序列连接到pCI-dhfr表达载体内。

[0307] EP0-2701-2-p24-2 (Epo-2-SEQ ID NO:2):用701-1-p17-6的XbaI/ApaI片段取代pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH-ctpx2)的XbaI/ApaI片段(hGH-ctp),产生Epo-ctpx2。

[0308] EP0-4-701-4-p42-1 (Epo-4 - SEQ ID NO:4):首先,在XbaI/SspI消化之后,用利用引物1和17的PCR构建出来自pCI-dhfr-EP0-ctp (701-1-p17-6)的片段。形成含有EP0和部分5' CTP的片段。其次,通过以pGT123-hEpo作为模板以及利用引物10和引物11的重叠PCR构建出新片段。SspI/NotI消化形成含有3'部分CTP和Epo的片段。将两个片段都连接到pCI-dhfr内,构建出p701-4-p42-1克隆。

[0309] EP0-3-p56-6 (Epo-3SEQ ID NO:3):引物购自Sigma-Genosys。利用引物15 (SEQ ID NO:12)和引物2^R (SEQ ID NO:13)以及pCI-dhfr-EP0-ctp x2 (701-2-p24-2)的质粒DNA作为模板进行PCR反应。作为PCR扩增的结果,形成了486bp产物,并将其连接到TA克隆载体(Invitrogen,编号K2000-01)内。分离出含StuI - NotI片段的*Epo-ctp x2序列(209bp)。

[0310] 进行3个序贯的PCR反应。利用引物1(SEQ ID NO:7)和引物23^R(SEQ ID NO:14)以及pGT123-epo-ctp的质粒DNA作为模板进行第一个PCR反应;作为PCR扩增的结果,形成了80bp产物(信号肽)。

[0311] 利用引物24 (SEQ ID NO:15)和引物11^R (SEQ ID NO:11)以及701-4-p42-1的质粒DNA作为模板进行第二个PCR反应;作为PCR扩增的结果,形成了610bp产物。

[0312] 利用引物1 (SEQ ID NO:7)和引物11^R (SEQ ID NO:11)以及先前两个反应产物的混合物作为模板进行第三个PCR反应;作为PCR扩增的结果,形成了700bp产物并分离出XbaI-StuI片段。将两个片段(XbaI-StuI和StuI - NotI)插入到表达载体pCI-dhfr的真核细胞表达载体内(三次连接),产生701-3-p56-6克隆。

[0313] EP0-5-p91-4 (Epo-5SEQ ID NO:5-(ctp-Epo):从Sigma-Genosys定制引物。利用引物1 (SEQ ID NO:7)和引物11^R (SEQ ID NO:11)以及pCI-dhfr-ctp-EP0-ctp x2 (701-3-p56-6)的质粒DNA作为模板进行PCR反应;作为PCR扩增的结果,形成了670bp产物,并将其连接到TA克隆载体(Invitrogen,编号K2000-01)内。将含XbaI - NotI片段的ctp-Epo序列连接到我们的表达载体pCI-dhfr内,产生701-5-p91-4克隆。

[0314] EP0-6-p90-1 (Epo-6SEQ ID NO:6-(ctp-Epo-ctp):进行三个PCR反应。利用引物1 (SEQ ID NO:7)和引物38^R (SEQ ID NO:16)以及701-3-p56-6的质粒DNA作为模板进行

第一个 PCR 反应 ; 作为 PCR 扩增的结果, 形成了 400bp 产物。

[0315] 利用引物 15 (SEQ ID NO:12) 和引物 2^R (SEQ ID NO:13) 以及 701-1-p17-6 的质粒 DNA 作为模板进行第二个 PCR 反应 ; 作为 PCR 扩增的结果, 形成了 390bp 产物。

[0316] 利用引物 1 (SEQ ID NO:7) 和引物 2^R (SEQ ID NO:13) 以及先前两个反应产物的混合物作为模板进行最后一个 PCR 反应 ; 作为 PCR 扩增的结果, 形成了 787bp 产物并将其连接到 TA 克隆载体 (Invitrogen, 编号 K2000-01) 内。将含 XbaI - NotI 片段的 ctp-Epo-ctp 序列连接到真核细胞表达载体 pCI-dhfr 内, 产生 701-6-p90-1 克隆。

[0317] 实施例 2 :EPO-CTP 多肽的表达和分离

[0318] 材料和方法

[0319] DNA 转染和克隆选择 : 利用 FuGENE6 试剂 (FuGENE 转染剂 -Roche 编号 815091001) 用含有 EPO-CTP 变体的 pCI-DHFR 表达载体转让 DG44 细胞。在转染后 48 个小时时, 稀释细胞并将其按每孔 50 到 200 个细胞种植在选择培养基 (CD DG44 培养基 w/o HT (Gibco:Scotland part:#07990111A) Sku num.:ME060027 加有 8mM L-谷氨酰胺 (Biological Industries ; 编号 03-020-1A) 以及 18mL/L10%Pluronic F-68 溶液 (Gibco : 编号 40040-032)) 中。利用商品化 ELISA 筛选出具有最高蛋白产量的选择克隆。将每种变体的 3 到 5 个生产克隆冷冻作为备用细胞库。所选的每种变体的克隆适合于在更大规模培养物中生长, 最大到定轨摇晃平台上的 1L 烧瓶内培养。收集上清液, 并用 ELISA、SDS-PAGE 和免疫印迹分析。在倒掉一部分后, 将含蛋白的上清液冷冻, 直到进一步使用。

[0320] 细胞培养 : 将 DG44 细胞保持在 37°C、湿化 8%CO₂ 孵育器的具有 HT (Gibco 编号 12610-010) 以及加有 8mM L-谷氨酰胺 (Biological Industries 编号 03-020-1A) 和 18mL/L 的 10%Pluronic F-68 溶液 (Gibco 编号 240040-032) 的 DG44 培养基中。将转染克隆保持在没有 HT、次黄嘌呤和胸腺嘧啶以及有 Pluronic 酸和 L-谷氨酰胺的 DG44 基础培养基中。

[0321] 样品制备 : 收集、过滤并用 ELISA 分析样品, 以便确定出蛋白浓度。用 SDS-PAGE 和免疫印迹确定出纯度和身份。在 ELISA 之后, 确定出样品浓度, 并用 PBS 对溶液进行透析。在倒掉一部分液体之后, 将含蛋白的上清液保存在 -20°C 直到进一步使用。

[0322] 免疫印迹 : 将样品在非变性的 15%SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上电泳。容许凝胶在 25mM Tris 和 192mM 甘氨酸的 20%(体积 / 体积) 甲醇溶液中平衡 10 分钟。利用 Mini Trans-Blot 电泳槽 (Biorad Laboratories, Richmond, CA) (250mA, 3h) 将蛋白转移到 0.2 μm 孔径的硝酸纤维素膜 (Sigma, Saint Louis, MO) 上。将硝酸纤维素膜在室温下 5% 脱脂奶粉中孵育 2 个小时。将膜与 EPO 抗血清 (1:1000 滴度) 在 4°C 孵育过夜, 随后在含 0.1%Tween 的 PBS 中连续洗涤 3 次 (每次洗涤 10 分钟)。将膜与和辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的二抗 (Zymed, San Francisco, CA) 在室温下孵育 2 个小时, 随后洗涤 3 次。最后, 将硝酸纤维素膜与增强化学发光底物 (ECL) (Pierce, Rockford, IL) 反应 5 分钟, 用华特纸片干燥, 并暴露于 X 线胶片。

[0323] 结果

[0324] 下面的表 3 显示了从 5 种所选克隆中获得的各种 CTP 修饰的 EPO 形式的浓度以及它们的用于进一步测试的制剂。

[0325] 表 3

[0326]

#版本	# 克隆	母液滴度 IU/ml ¹	根据 Epo3 滴度在假上清 液中稀释后 IU/ml ²	超滤后滴度 IU/ml ³
Epo0 SEQ ID NO: 16	17	3093	102	335
Epo1 SEQ ID NO: 1	47	1049	104	291
Epo2 SEQ ID NO: 2	67	2160	110	303
Epo3 SEQ ID NO: 3	85	105	119	392
Epo4 SEQ ID NO: 4	112	6100	ND	342

[0327] 1. 用 ELISA (Quantikine IVD Epo ELISA, DEP00, R&D Systems) 测定出 EPO 变体的母液浓度。

[0328] 2. 样品 EPO-0、2 和 4 被假上清液稀释成 105IU/ml (调整为 Epo3 滴度), EPO0= 在与 CTP 修饰 EPO 相同的系统中所表达的野生型 EPO。

[0329] 3. 所有样品被浓缩并经 PBS 超滤透析到终浓度为 180IU/ml。

[0330] 用如图 2 所示的免疫印迹检测所有蛋白。

[0331] 实施例 3: 本发明的 EPO-CTP 多肽的生物学活性

[0332] TF-1 生物学活性测试表示 EPO-CTP 变体结合其受体然后刺激造成细胞增殖的活性的能力。因此, 该测试被作为评价本发明的 EPO-CTP 多肽的生物学效力的第一个步骤。

[0333] 材料和方法

[0334] 细胞增殖分析: 用细胞株 TF-1 进行增殖分析, 测定出作为 EPO 功能的 MTT 细胞株水平 (Kitamura et al., Kitamura, T. et al. (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates; Hammerling U. et al. In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. Journal of Pharm. Biomed. Analysis 14(11):1455-1469 (1996))。洗涤指数生长的 TF-1 细胞两次, 并按约 10^4 细胞 / 孔铺板到微滴定板上, 在具有滴定稀释系列的 EPO (Recormon)、EPO 标准物 (NIBSC 标准物)、rhEPO (MOD-7010)、MOD-701 变体 (EPO-1、EPO-2、EPO-3 和 EPO-4) 的基础培养基中孵育 48 个小时。在检测细胞增殖前 4 个小时, 向孔内加入 MTT 试剂, 并用 ELISA 阅读器测定出吸光度。从 Eprex (人体激素的 Epoetin (EPO) 人造形式) 剂量效应标准曲线中得到每个变体蛋白的计算出的蛋白浓度。

[0335] 结果

[0336] 用 Epo 依赖性细胞株人红白血病 TF-1 (DSMZ 细胞库) 确定出 EPO 肽的体外生物学活性 (Dong et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 339, Issue 1, 6 January 2006, Pages 380-385)。进行 MTT 检测 (Hammerling U. et al. In vitro

bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. Journal of Pharm. Biomed. Analysis 14(11):1455-1469 (1996)), 并用国际标准物(NIBSC 的 Epo ampoule code 87/684) 校准用于产生标准曲线的 EPO 实验室标准物。

[0337] 下面的表 4 总结了结果。结果说明用 2 和 0.5 IU/ml 浓度的 EPO3 和 EPO0 获得了最高的效力。

[0338] 表 4

[0339]

<i>Eprex STD</i>	<i>TF-1 生物学活性 IU/ml</i>						
IU/ml	EPO 0	EPO 1	EPO 2	EPO 3	EPO 4	Recormon	EPO st
	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID		
	NO: 16	NO: 1	NO: 2	NO: 3	NO: 4		
2	4.93	2.32	2.13	6.91	3.55	3.44	7.40
0.5	1.60	0.76	0.53	1.34	0.84	0.87	1.53

[0340] 结论

[0341] 如上面的表 4 所示, EPO-CTP 多肽得到了不同水平的效力, 说明了受体结合方面的差异。EPO-CTP 多肽在 CTP 盒的数目以及其所融合的位置方面都有所不同。EPO-1 和 EPO-2 在 EPO 的 C 末端含有一个 CTP 序列或者 2 个 CTP 序列, 而 EPO-3 在其 N 末端含有 1 个 CTP 以及在 C 末端含有 2 个 CTP 序列。EPO-4 是经 CTP 序列连接的两个 EPO 分子的二聚体。EPO-3 表现出与 WT-EPO 相当相似的效力水平, 而 EPO-1 和 EPO-4 只有约 50% 的 WT-EPO 水平, EPO-2 效力甚至不到 50%。

[0342] 实施例 4: 在小鼠模型中评价本发明的 EPO-CTP 多肽

[0343] 进行下面的实施例, 以便比较本发明的 EPO-CTP 多肽和商品化 EPO 的生物学活性。

[0344] 材料和方法

[0345] 动物:

[0346]

物种/株: 约 20 到 25g 两种性别的 ICR 或 CD-1 小鼠;

每组动物数: n=7

组数: 9

动物总数: n=63

[0347] 研究试验设计: 如下面表 5 所列的设计试验。

[0348] 表 5

[0349]

组号	每组小鼠数	处理		给药方案
		化合物	剂量水平	
1		载体	0	
2		假处理		
3		MOD-7010	15 μg/kg	
4		MOD-7011		
5		MOD-7012		
6		MOD-7013		
7		MOD-7014		
8		商品化 rhEPO	15 μg/kg	
9			5 μg/kg	每周 3 次

[0350] 动物处理 :通过静脉推注给所有动物都施用对照或本发明的测试 EPO 肽。注射体积不超过 10ml/kg。试验时间为 22 天。每天都进行发病率和死亡率的检查。

[0351] 网织红细胞计数和红细胞压积(hct)检测 :在第 1 次相应的载体或治疗物注射之后的第 2 天和 14 个小时时,对所有测试动物进行网织红细胞计数。在开始最初的处理(“0”基线对照)以及在第 1 次载体或治疗物注射后的 24 个小时对所有动物各进行 1 次 hct 检测,此后每周检测两次,直到研究结束(第 22 天)。

[0352] 结果

[0353] 图 3 到 5 所列的红细胞压积结果显示与 EP01、EP02、Recormon1、Recormon3、rhEPO 和载体相比较, EP03 具有最高的相对于基线的红细胞压积变化。下面的表 6 总结了经 EP0-CTP 多肽处理小鼠的网织红细胞百分比的结果。这些结果说明 EP0-3 是最强大促红细胞产生的刺激物。

[0354] 表 6

[0355]

	%网织红细胞	
天数	2	14
对照	3.72	3.46
	1.08	0.8
假处理	3.5	3.64
	0.6	1.13
7010 SEQ ID NO: 16	3.5	3.9
	0.6	1.54
7011 SEQ ID NO: 1	3.52	1.94
	1.38	1.08
7012 SEQ ID NO: 2	3.82	3.0
	1.02	0.88
7013 SEQ ID NO: 3	2.66	5.20
	0.97	2.96
7014 SEQ ID NO: 4	3.48	3.82
	0.71	0.90
Recormon 1/W	3.23	3.27
	0.73	0.59
Recormon 3/w	4.13	4.24
	1.21	1.14

[0356] 结论

[0357] 设计了体内试验测定出两个参数：第一个是测定促红细胞产生参数例如网织红细胞百分百和血红蛋白、RBC 和红细胞压积水平的增加。第二个是测定经每周注射 1 次的每种变体的生物学活性的持久性。

[0358] 在正常小鼠中观察到了 EPO 在其刺激促红细胞产生的能力方面的优越性能。

[0359] 实施例 5：本发明的多肽与 Aranesp 的生物学活性的比较

[0360] 进行下面的试验，以比较单次推注剂量的一些本发明的 EPO-CTP 多肽、商品化 EPO 和 Aranesp 的生物学活性。Aranesp 是商品化的长效重组促红细胞生成素，其中引入了两个位点突变，形成了两个额外的 N 糖基化位点以及所整合的唾液酸残基数目的增加。

[0361] 材料和方法

[0362] 动物

[0363] 种类 / 株：约 20 到 25g 的雌性 CD-1 小鼠

[0364] 每组动物数：n=3

[0365] 研究的试验设计：下面的表 7 总结了试验设计。

[0366] 表 7

[0367]

组 #	测试物	每组动物数	给药溶液浓度($\mu\text{g/mL}$)	给药体积(mL/kg)	时间点 * (施用后小时数)
1	MOD-7010 SEQ ID NO: 11	3	1.5	10	药物施用后的 0 (给药前)、0.25、0.5、1、2、6、24、48、96、168、216、264 和 336 个小时
2	MOD-7013 SEQ ID NO: 3	3	1.5	10	药物施用后的 0.25、0.5、1、2、6、24、48、96、168、216、264 和 336 个小时
3	Aranesp	3	1.5	10	药物施用后的 0.25、0.5、1、2、6、24、48、96、168、216、264 和 336 个小时

[0368] 动物处理 :通过静脉推注给所有动物都施用对照或本发明的测试 EPO 肽。注射体积不超过 10mL/kg 。试验时间为 14 天。每天都进行发病率和死亡率的检查。

[0369] 网织红细胞计数和红细胞压积(hct)检测 :如上所述的进行网织红细胞计数红细胞压积检测。

[0370] 结果

[0371] 图 6 到 9 给出了结果。在单次静脉注射 $15\mu\text{g/kg}$ EP03 之后,促红细胞生成素相关的所有三个血液参数即网织红细胞数、血红蛋白水平和红细胞压积相对于同样注射剂量的 rhEPO 或 Aranesp 所得到的数值都有所提高。

[0372] 实施例 6 :本发明的 EPO-CTP 多肽与 Aranesp 的药代动力学的比较

[0373] 进行下面的试验,以便比较本发明的 EPO-CTP 多肽、商品化 EPO 和 Aranesp 的药代动力学。

[0374] 材料和方法

[0375] 分析血清样本,以便测定出每种样品的特异浓度水平。用 WinNonLin 非代谢区分分析处理浓度和时间点数据。所测定的参数包括 AUC、CL、 K_e 、 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 T_{max} 、和 V_d 。

[0376] 用两个 ELISA 试剂盒平行测定血清浓度。用 StemCell ELISA 试剂盒测定 EPO-3 血清浓度,同时用 R&D system ELISA 试剂盒测定出 EPO-0 和 Aranesp 血清浓度。

[0377] 结果

[0378] 表 8 总结了药代动力学分析的结果。这些结果显示 EP03 表现出了良好的所示的药代动力学性能测定值例如 AUC 测定值、 $t_{1/2}$ 和 C_{max} 。EP0-0、EP0-3 和 Aranesp 的 T_{max} 测定值相等。

[0379] 表 8

[0380]

参数	单位	EP0-0	EP0-3	Aranesp
AUClast	$\text{hr}\cdot\text{mIU/mL}$	31739	306072	178661

CL [^]	mL/hr/kg	1.1152	0.2188	0.1207
Ke	l/hr	0.157	0.0529	0.0639
t1/2	hr	4.4139	13.1141	10.84
Cmax	mIU/mL	10766	16466	13266
Tmax	Hr	0.25	0.25	0.25
Vdz	mL/kg	7.1017	4.1394	1.8877

[0381] 图9图解说明了血清浓度分析的结果。这些结果表明血清中的EPO-3在约190个小时之后仍是可测的。血清中的EPO-0和Aranesp分别在约140个小时和50个小时之后是不可测的。

[0382] 结论

[0383] 从CD-1小鼠血液中清除EPO-3(MOD-7013)的速度要明显比rhEPO或Aranesp的清楚速度更慢。相应的计算出的半衰期时间是:rhEPO-4.41h;Aranesp-0.84h;和MOD-7013-13.11h。

[0384] 实施例7:hGH构建体的产生

[0385] 材料和方法

[0386] 合成了四种hGH克隆(20kD蛋白的变体)。将来自四种变体的含hGH序列的XbaI-NotI片段连接到先前经XbaI-NotI消化过的真核表达载体pCI-dhfr内。制备出4种克隆(401-0、1、2、3和4)的DNA。也合成了来自22KD蛋白的另一种部分hGH克隆(1到242bp)(0606114)。从Sigma-Genosys订购引物。下面的表9给出了用于产生本发明的hGH-CTP多肽的引物序列。

[0387] 表9

[0388]

引物号	SEQ ID NO	序列	限制性位点(序列中下划线部分)
25	27	5' <u>CTCTAGAGG</u> ACATGGCCAC 3'	XbaI
32 ^R	28	5' ACAGGGAGGTCTGGGGGTTCTGCA 3'	
33	29	5' TGCAGAACCCCCAGACCTCCCTGTGC 3'	
4 ^R	30	5' CCAAACATCATCAATGTATCTTA 3'	
25	31	5' <u>CTCTAGAGG</u> ACATGGCCAC 3'	XbaI
35 ^R	32	5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3'	
34	33	5' GCCTTTGACACCTACCAGGAGTTCG 3'	
37 ^R	34	5'ACGCGGCCCGCATCCAGACCTTCATCACTGAGGC 3'	NotI
39 ^R	35	5' <u>GCGGCCGCGG</u> ACTCATCAGAAGCCGCAGCTGCCC 3'	

[0389] 402-0-p69-1 (hGH) SEQ ID NO:36 的构建:MOD-4020 是野生型重组人生长激素(没有 CTP),其被制备作为下面所述试验中的对照。

[0390] 进行三个 PCR 反应。用引物 25 和引物 32^R 以及 0606114 (hGH1-242bp 的部分克隆)的质粒 DNA 作为模板实施第一个反应;作为 PCR 扩增的结果形成了 245bp 产物。

[0391] 用引物 33 和引物 4^R 以及 401-0-p57-2 的质粒 DNA 作为模板实施第二个反应;作为 PCR 扩增的结果形成了 542bp 产物。

[0392] 用引物 25 和引物 4^R 以及先前两个反应产物的混合物作为模板实施最后一个反应;作为 PCR 扩增的结果形成了 705bp 产物,并将其连接到 TA 克隆载体(Invitrogen,编号 K2000-01)内。将含 hGH-0 序列的 XbaI-NotI 片段连接到真核表达载体 pCI-dhfr 内。将该载体转染到 DG-44CHO 细胞内。细胞生长在无蛋白培养基中。

[0393] 402-1-p83-5 (hGH-CTP)-SEQ ID NO:37 and 402-2-p72-3 (hGH-CTPx2) - SEQ ID NO:38 的构建:MOD-4021 是重组人生长激素,其与 1 个拷贝的人绒毛膜促性腺激素 β 链的 C 末端肽(CTP)融合。MOD-4021 的 CTP 盒被连接到 C 末端(1 个盒)。MOD-4022 是重组人生长激素,其与 2 个拷贝的人绒毛膜促性腺激素 β 链的 C 末端肽(CTP)融合。MOD-4021 的 2 个 CTP 盒都被连接到 C 末端(2 个盒)。

[0394] 用与构建 Hgh-0 的相同方式进行 hGH-CTP 和 hGH-CTP-CTP 的构建。pCI-dhfr-401-1-p20-1 (hGH*-ctp)和 pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH*-ctp x2)都被用作第二个 PCR 反应中的模板。

[0395] 在 DG-44CHO 细胞中表达 MOD-4021 和 MOD-4022。细胞在无蛋白的培养基中生长。MOD-4021 的分子量是 30.5Kd,因为 hGH 的分子量为 $\sim$ 22Kd,而每个“CTP 盒”为总分子量贡献了 8.5Kd (见图 10)。MOD-4022 的分子量为 $\sim$ 39Kd (见图 10)。

[0396] 402-3-p81-4 (CTP-hGH-CTP-CTP) - SEQ ID NO:39 和 402-4-p82-9 (CTP*hGH-CTP-CTP) - SEQ ID NO:40 的构建:MOD-4023 是重组人生长激素,其与 3 个拷贝的人绒毛膜促性腺激素 β 链的 C 末端肽(CTP)融合。MOD-4021 的 3 个 CTP 盒被连接到 N 末端(1 个盒)和 C 末端(2 个盒)。MOD-4024 是重组人生长激素,其与 1 个截短拷贝以及 2 个完整拷贝的人绒毛膜促性腺激素 β 链的 C 末端肽(CTP)融合。MOD-4021 的截短的 CTP 盒被连接到 N 末端以及 2 个 CTP 盒被连接到 C 末端(2 个盒)。

[0397] 进行三个 PCR 反应。用引物 25 和引物 35^R 以及 p401-3-p12-5 或 401-4-p22-1 的质粒 DNA 作为模板实施第一个反应;作为 PCR 扩增的结果形成了 265 或 220bp 产物。用引物 34 和引物 37^R 以及 TA-hGH-2-q65-1 的质粒 DNA 作为模板实施第二个反应;作为 PCR 扩增的结果形成了 695bp 产物。用引物 25 和引物 37^R 以及先前两个反应产物的混合物作为模板实施最后一个反应;作为 PCR 扩增的结果形成了 938 或 891bp 产物,并将其连接到 TA 克隆载体(Invitrogen,编号 K2000-01)内。将含 hGH-0 序列的 XbaI-NotI 片段连接到我们的真核表达载体 pCI-dhfr 内。

[0398] 在 DG-44CHO 细胞中表达 MOD-4023 和 MOD-4024。细胞在无蛋白的培养基中生长。MOD-4023 的分子量是 $\sim$ 47.5Kd (见图 10)。MOD-4024 的分子量为 $\sim$ 43.25Kd (见图 10)。

[0399] 402-6-p95a-8 (CTP-hGH-CTP)-SEQ ID NO:41 的构建:用与构建 hGH-3 相同的方式进行 hGH-6 的构建。pCI-dhfr-402-1-p83-5 (hGH-ctp)被用作第二个 PCR 反应的模板。

[0400] 402-5-p96-4 (CTP-hGH)-SEQ ID NO:42 的构建:用引物 25 和引物 39^R 以及 pCI-dhfr

r-ctp-EP0-ctp (402-6-p95a-8) 的质粒 DNA 作为模板进行 PCR 反应, 作为 PCR 扩增的结果形成了 763bp 产物, 并将其连接到 TA 克隆载体 (Invitrogen, 编号 K2000-01) 内。将含 cpt-hGH 序列的 XbaI-NotI 片段连接到我们的真核表达载体 pCI-dhfr 内。以产生 402-5-p96-4 克隆。

[0401] 实施例 8: 本发明的 hGH-CTP 多肽的体内生物学活性测试

[0402] 进行下面的试验, 以便测试 hGH-CTP 多肽潜在的长效生物学活性, 并与商品化的重组人 GH 和 MOD-4020 进行比较。

[0403] 材料和方法

[0404] 雌性垂体切除大鼠 (60 到 100g) 接受每周一次皮下注射 21.7 μ g hGH-CTP 多肽或者每日皮下注射一次 5 μ g 对照的商品化 rhGH。

[0405] 在治疗前、第一次注射后 24 个小时、然后每隔一日直到第 21 天试验结束时都给所有动物测量体重。每个点都表示组的平均体重增加百分比 ((d0 天体重 - 最后 1 天体重) / d0 天体重)。依据每日注射一次商品化 hGH 标准化平均体重增加。表 10 给出了治疗方案。

[0406] 表 10

[0407]

编号	药物	N	途径	治疗计划	等摩尔剂量 (μ g/大鼠)	累计剂量 (μ g/大鼠)	剂量体 积(ml)
1	载体	7	s.c.	第 1、7 和 13 天; 1/W	NA	NA	0.25
2	假处理	7	s.c.	第 1、7 和 13 天; 1/W	NA	NA	0.25
3	MOD-4020 SEQ ID NO: 36	7	s.c.	第 1、7 和 13 天; 1/W	21.7	65	0.25
4	MOD-4021 SEQ ID NO: 37	7	s.c.	第 1、7 和 13 天; 1/W	21.7	65	0.25
5	MOD-4022 SEQ ID NO: 38	7	s.c.	第 1、7 和 13 天; 1/W	21.7	65	0.25
6	MOD-4023 SEQ ID NO: 39	7	s.c.	第 1、7 和 13 天; 1/W	21.7	65	0.25
7	MOD-4024 SEQ ID NO: 40	7	s.c.	第 1、7 和 13 天; 1/W	21.7	65	0.25
8	商品化 hGH v.1	7	s.c.	第 1、7 和 13 天; 1/W	21.7	65	0.25
9	商品化 hGH v.1	7	s.c.	第 1-13 天; d/W	5	65	0.25

[0408] 结果

[0409] 图 11 给出了结果。这些结果显示与商品化 rhGH 诱导 100% 体重增加相比较，MOD-4023 (SEQ ID NO:39) 和 MOD-4024 (SEQ ID NO:40) 诱导出了超过 120% 体重增加。

[0410] 结论

[0411] 3 个每周一次剂量(注射日 :1、7 和 13 天)的 21.7 μ g MOD-4023 (SEQ ID NO:39) 和 MOD-4024 (SEQ ID NO:40) 诱导垂体切除大鼠的体重增加比注射相同累计剂量的商品化 rhGH (每日施用一次 5 μ g 剂量共 13 天) 所诱导的体重增加多 30%。

[0001]

序列表

<110> MODIGENE INC

<120> 长效多肽及其生产和施用方法

<130> P-9520-PC1

<140> PCT

<141> 2007-02-05

<160> 47

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

[0002]

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
195 200 205

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
210 215 220

<210> 2
<211> 249
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

[0003]

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
195 200 205

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser
210 215 220

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
225 230 235 240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
245

<210> 3
<211> 277
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
20 25 30

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
35 40 45

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
50 55 60

Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
65 70 75 80

Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
85 90 95

[0004]

Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
100 105 110

Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
115 120 125

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
130 135 140

Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
145 150 155 160

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
165 170 175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
180 185 190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
195 200 205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser
210 215 220

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
225 230 235 240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
245 250 255

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
260 265 270

Pro Ile Leu Pro Gln
275

<210> 4

<211> 387

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu

[0005]

20	25	30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu 35 40 45		
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu 50 55 60		
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg 65 70 75 80		
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu 85 90 95		
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser 100 105 110		
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly 115 120 125		
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu 130 135 140		
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile 145 150 155 160		
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu 165 170 175		
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp 180 185 190		
Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser 195 200 205		
Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro 210 215 220		
Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala 225 230 235 240		
Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu 245 250 255		
Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp		

[0006]

260	265	270
Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu		
275	280	285
Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn		
290	295	300
Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val		
305	310	315
Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln		
325	330	335
Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg		
340	345	350
Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn		
355	360	365
Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr		
370	375	380
Gly Asp Arg		
385		
<210> 5		
<211> 221		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 5		
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu		
1	5	10
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys		
20	25	30
Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser		
35	40	45
Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser		
50	55	60
Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile		
65	70	75
		80

[0007]

Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
85 90 95

Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
100 105 110

Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
115 120 125

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
130 135 140

Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
145 150 155 160

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
165 170 175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
180 185 190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
195 200 205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
210 215 220

<210> 6
<211> 249
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
20 25 30

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
35 40 45

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
50 55 60

[0008]

Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
65 70 75 80

Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
85 90 95

Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
100 105 110

Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
115 120 125

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
130 135 140

Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
145 150 155 160

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
165 170 175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
180 185 190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
195 200 205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser
210 215 220

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
225 230 235 240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
245

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial short sequence

<400> 7

aatctagagg tcatcatggg ggtgc

25

[0009]

<210>	8	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Artificial short sequence	
<400>	8	
	attgcggccg cggatccaga agacctttat tg	32
<210>	9	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Artificial short sequence	
<400>	9	
	taaatattgg ggtgtccgag ggccc	25
<210>	10	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Artificial short sequence	
<400>	10	
	ccaatattac cacaagcccc accacgctc at	32
<210>	11	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Artificial short sequence	
<400>	11	
	tgcggccgcg gatccttata tgteccctgt cctgc	35
<210>	12	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Artificial short sequence	
<400>	12	
	gccctgetgt cggaagc	17

[0010]

<210>	13	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Artificial short sequence	
<400>	13	
	attgcggccg cggatccaga agacctttat tg	32
<210>	14	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Artificial short sequence	
<400>	14	
	ctttgaggaa gaggagccca ggactgggag gc	32
<210>	15	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Was it fun? Wierd? Tell me about it	
<400>	15	
	cctgggetcc tcttctctcaa aggc	24
<210>	16	
<211>	193	
<212>	PRT	
<213>	Homo sapiens	
<400>	16	
	Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu	
	1 5 10 15	
	Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu	
	20 25 30	
	Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu	
	35 40 45	
	Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu	
	50 55 60	

[0011]

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 17
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial short sequence

<400> 17

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
20 25 30

Pro Gln

<210> 18
<211> 28

[0012]

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial short sequence

<400> 18

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
20 25

<210> 19
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly
20 25

<210> 20
<211> 786
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 20

```
tctagaggtc atcatggggg igcacgaatg tctgcctgg ctgtggttc tctgtccct 60
tctgtcgtc cctctgggco tcccagtcct gggtctctet tctcaaagg cccctcccc 120
gagcttcca agtccatccc gactccggg gccctggac accccaatat taccacaagc 180
cccaccagc ctcctctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga 240
ggccgagaa atcacgacgg gctgtgciga aactgcage ttgaatgaga atatcactgt 300
cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gagtcgggc agcaggccgt 360
agaagtctgg cagggcctgg cctgtctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt 420
ggteaactet tcccagcgt gggagccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg 480
cttcgcage ctaccactc igcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc 540
tccagatgcg gctcagctg ctccactccg aacaatcaet gctgacaatt tccgcaaaet 600
cttcagagtc tactccaatt tctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660
caggacaggg gacagatcct ctctctaaa ggcctctccc ccgagccttc caagtccatc 720
```

[0013]

cgcactcccg gggccctcgg acaccccgat cctcccacaa taaaggtctt ctggatccgc	780
ggccgc	786
<210> 21	
<211> 873	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 21	
tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tctgcctgg ctgtggcttc tctgtccct	60
tctgtcgtc cctctgggccc tcccagtcct gggctcctct tctcaaagg cccctcccc	120
gagccttcca agtccatccc gactcccggg gccctcggac accccaatct taccacaagc	180
cccaccacgc ctcctctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga	240
ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga acactgcagc ttgaatgaga atatcactgt	300
cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt	360
agaagtctgg cagggcctgg cccigtgtgc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt	420
ggtaactct tcccagccgt gggagccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg	480
ccttcgcagc ctcaccactc tcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc	540
tccagatgag gccacagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact	600
cttcagagtc tactccaatt tcttcgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg	660
caggacaggg gacagatcct ctctctcaaa ggcctctccc ccgagccttc caagtccttc	720
ccgactcccg gggccctccg acacaccaat cctgccacag agcagctcct ctaaggcccc	780
tctccatcc ctgccatccc cctcccggt gccctggccc tctgacccc ctatcctgcc	840
tcagtgatga aggtcttctg gatccgcggc cgc	873
<210> 22	
<211> 221	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 22	
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu	
1 5 10 15	
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu	
20 25 30	
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu	
35 40 45	

[0014]

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Ser Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
195 200 205

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
210 215 220

<210> 23

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
20 25 30

[0015]

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
50 55 60

Val Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
180 185 190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
210 215

<210> 24

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15

[0016]

Ser Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 26
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

[0017]

<400> 26

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser
20

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial short sequence

<400> 27

ctctagagga catggccac 19

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial short sequence

<400> 28

acagggaggt ctgggggttc tgca 24

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial short sequence

<400> 29

tcagaaacct ccagacctcc ctgtgc 26

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial short sequence

<400> 30

ccaaactcat caatgtatct ta 22

<210> 31

<211> 19

[0018]

<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Artificial short sequence	
<400> 31	
ctctagagga catggccac	19
<210> 32	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Artificial short sequence	
<400> 32	
cgaactcctg gtaggtgtca aaggc	25
<210> 33	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Artificial short sequence	
<400> 33	
gcctttgaca cctaccagga gttcg	25
<210> 34	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Artificial short sequence	
<400> 34	
acggcgccgc atccagacct tcatcaactga ggc	33
<210> 35	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Artificial short sequence	
<400> 35	
gcggcccgcg actcatcaga agccgcagct gccc	34
<210> 36	
<211> 217	

[0019]


```

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1          5          10          15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
          20          25          30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
          35          40          45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
50          55          60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
65          70          75          80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
          85          90          95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
          100          105          110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
          115          120          125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
          130          135          140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145          150          155          160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
          165          170          175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
          180          185          190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
          195          200          205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
210          215

```

[0020]

```

<210> 37
<211> 245
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1          5          10          15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
          20          25          30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
          35          40          45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
          50          55          60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
65          70          75          80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
          85          90          95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
          100          105          110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
          115          120          125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
          130          135          140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145          150          155          160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
          165          170          175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
          180          185          190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
          195          200          205

```

[0021]

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
210 215 220

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
225 230 235 240

Pro Ile Leu Pro Gln
245

<210> 38

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser

[0022]

	165	170	175
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe	180	185	190
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys	195	200	205
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro	210	215	220
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr	225	230	235
Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu	245	250	255
Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro	260	265	270
Gln			
<210> 39			
<211> 301			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 39			
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu	1	5	10
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala	20	25	30
Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp	35	40	45
Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe	50	55	60
Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp	65	70	75
Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr	85	90	95

[0023]

```

Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
    100                      105                      110

Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
    115                      120                      125

Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
    130                      135                      140

Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
    145                      150                      155                      160

Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
    165                      170                      175

Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
    180                      185                      190

Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
    195                      200                      205

Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
    210                      215                      220

Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
    225                      230                      235                      240

Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
    245                      250                      255

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
    260                      265                      270

Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
    275                      280                      285

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
    290                      295                      300

<210> 40
<211> 285
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

```

[0024]

Met	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Leu	1	5	10	15
Cys	Leu	Pro	Trp	Leu	Gln	Glu	Gly	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	20	25	30	
Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe	35	40	45	
Asp	Asn	Ala	Met	Leu	Arg	Ala	His	Arg	Leu	His	Gln	Leu	Ala	Phe	Asp	50	55	60	
Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Glu	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Lys	Glu	Gln	Lys	Tyr	65	70	75	80
Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro	Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile	85	90	95	
Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu	100	105	110	
Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val	115	120	125	
Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Ser	130	135	140	
Asp	Ser	Asn	Val	Tyr	Asp	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly	Ile	Gln	145	150	155	160
Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Ile	165	170	175	
Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser	Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp	180	185	190	
Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	Lys	Asp	Met	195	200	205	
Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Val	Gln	Cys	Arg	Ser	Val	Glu	210	215	220	
Gly	Ser	Cys	Gly	Phe	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	225	230	235	240

[0025]

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
245 250 255

Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
260 265 270

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
275 280 285

<210> 41
<211> 273
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
20 25 30

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
35 40 45

Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
50 55 60

Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
65 70 75 80

Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
85 90 95

Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
100 105 110

Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
115 120 125

Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
130 135 140

Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
145 150 155 160

[0026]

Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
165 170 175

Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
180 185 190

Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
195 200 205

Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
210 215 220

Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
225 230 235 240

Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
245 250 255

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
260 265 270

Gln

<210> 42

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
20 25 30

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
35 40 45

Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
50 55 60

Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
65 70 75 80

Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr

[0027]

	85	90	95
Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile	100	105	110
Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu	115	120	125
Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val	130	135	140
Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser	145	150	155
Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln	165	170	175
Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile	180	185	190
Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp	195	200	205
Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met	210	215	220
Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu	225	230	235
Gly Ser Cys Gly Phe	245		

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial short protein

<400> 43

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro	1	5	10
---	---	---	----

<210> 44

<211> 853

<212> DNA

[0028]

<213> Homo sapiens

<400> 44

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg	60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctctctctct aaggtccac ccccatctct	120
gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttcccccac	180
catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct	240
ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag	300
cttctctcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa	360
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat	420
ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttccccaaca gcctggtgta	480
cggcgccagc gacagcaacg tgtaagacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac	540
cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagacctc	600
cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct	660
gtactgcctc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag	720
aagcgtggag ggagctgctg gcttcagctc cagcagcaag gcccccccc cgagcctgcc	780
ctccccaagc aggtgcctcg ggcctccga cacaccaatc ctgcctcagt gatgaaggtc	840
tggatgcggc cgc	853

<210> 45

<211> 937

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg	60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctctctctct aaggtccac ccccatctct	120
gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttcccccac	180
catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct	240
ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag	300
cttctctcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa	360
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat	420
ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttccccaaca gcctggtgta	480
cggcgccagc gacagcaacg tgiacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac	540
cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagacctc	600

[0029]

```

cagcaagtgc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct 660
gtactgcttc agaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag 720
aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gcccctcccc cgagcctgcc 780
ctccccaagc aggetgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgccacaga gcagctcctc 840
taaggccctt ctccatccc tgccatcccc ctcccggctg cctggccctt ctgacacccc 900
tatcctgcct cagtgatgaa ggtctggatg cggccgc 937

```

<210> 46
 <211> 889
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

```

<400> 46
tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcggcag ctctttctct aaggtccac ccccgagcct 120
gcccttcccc accatcccc tgagcagget gttcgacaac gccatgctga gggctcacag 180
getgcaccag ctggcctttg acacctacca ggagttcgag gaagcctaca tccccaagga 240
gcagaagtac agcttcctgc agaaccacca gacctccctg tgcttcagcg agagcatccc 300
cacccccage aacagagagg agaccagca gaagagcaac ctggagctgc tgaggatctc 360
cctgctgctg atccagagct ggcctggagc cgtgcagttc ctgagaagcg tgttcgcaa 420
cagcctgggtg tacggcgcca ggcacagcaa cgtgtacgac ctgctgaagg acctggagga 480
gggcatccag accctgatgg gccggctgga ggacggcagc cccaggaccg gccagatctt 540
caagcagacc tacagcaagt tcgacaccaa cagccacaac gacgacgcc tgctgaagaa 600
ctacgggctg ctgtactgct tcagaaagga catggacaag gtggagacct tcctgaggat 660
cgtgcagtgc agaagcgtgg agggcagctg cggttcagc tccagcagca aggcccttc 720
cccgagcctg ccttcccaa gcaggtgcc tgggcccttc gacacaccaa tctgcccaca 780
gagcagctcc tctaaggccc ctctccatc cctgccatcc cctcccggc tgcctggccc 840
ctctgacacc cctatcctgc ctcatgatg aaggtctgga tgcggccgc 889

```

<210> 47
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

```

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1           5           10           15

```

[0030]

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
180 185 190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
210 215

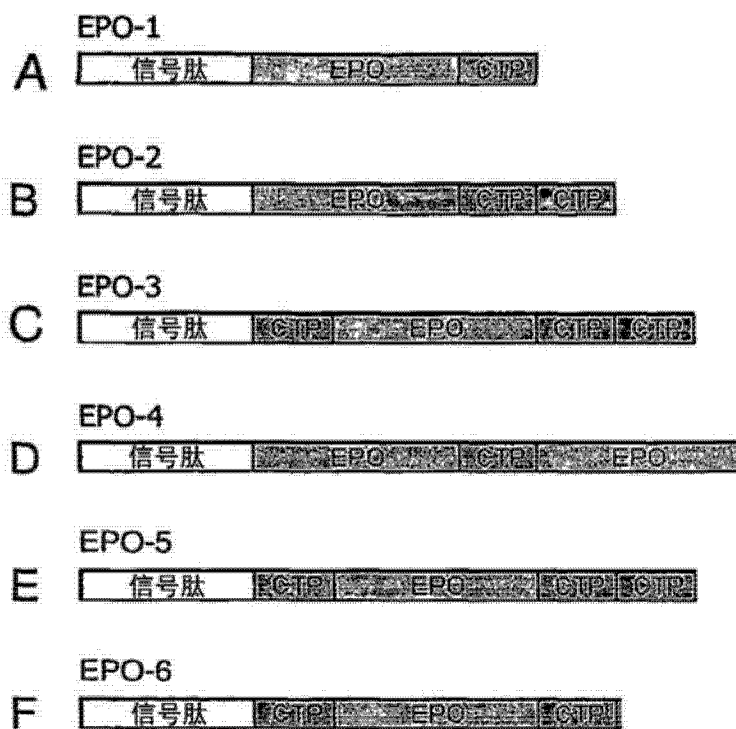


图 1A-F

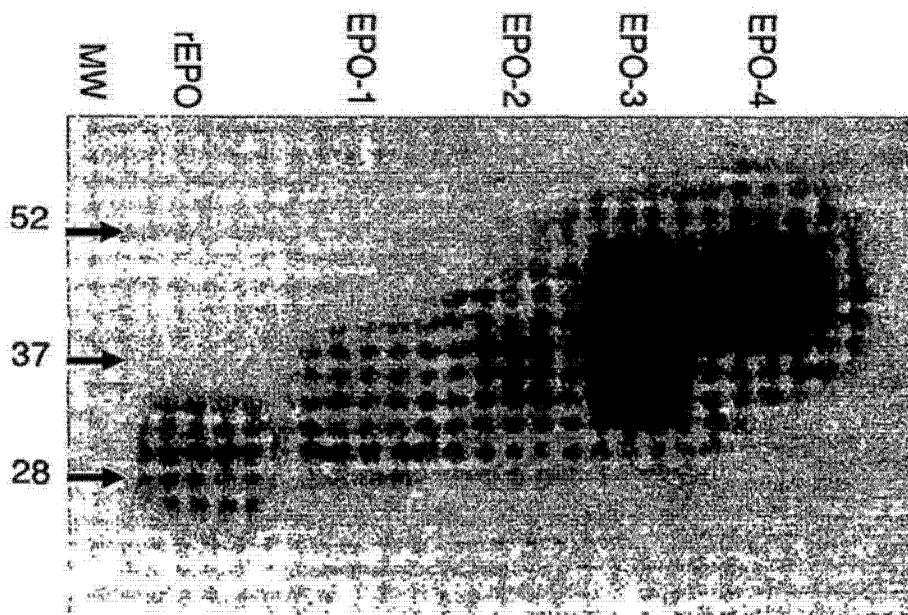


图 2

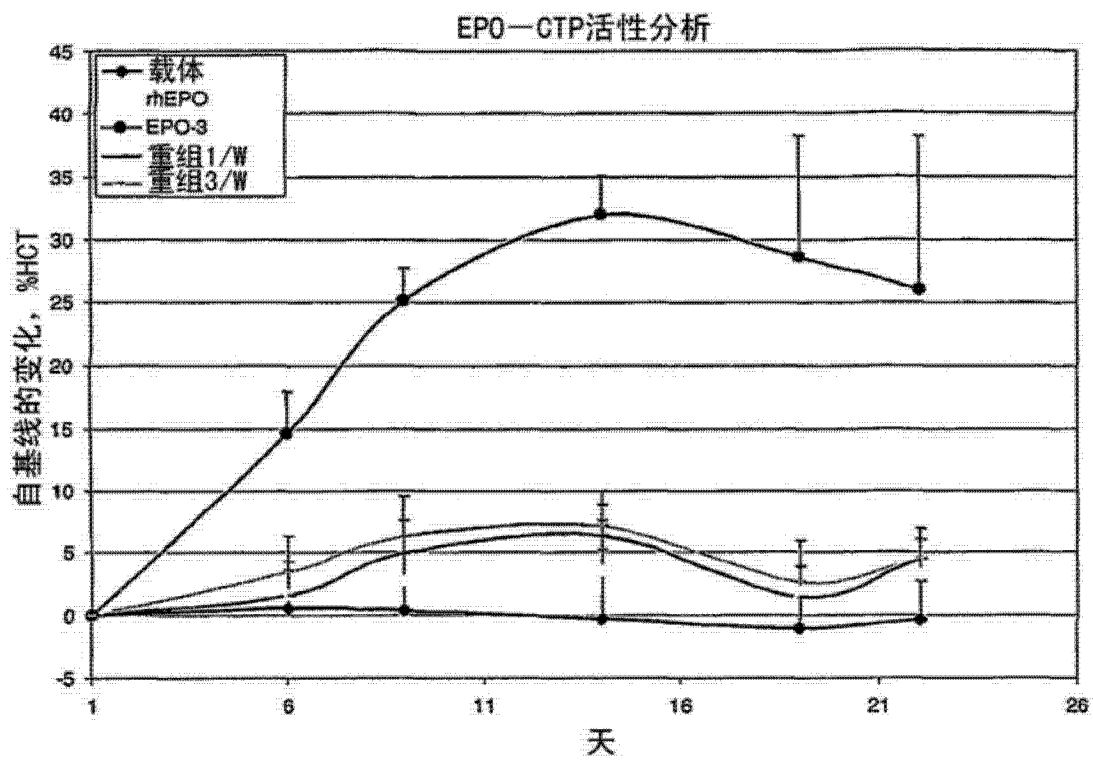


图 3

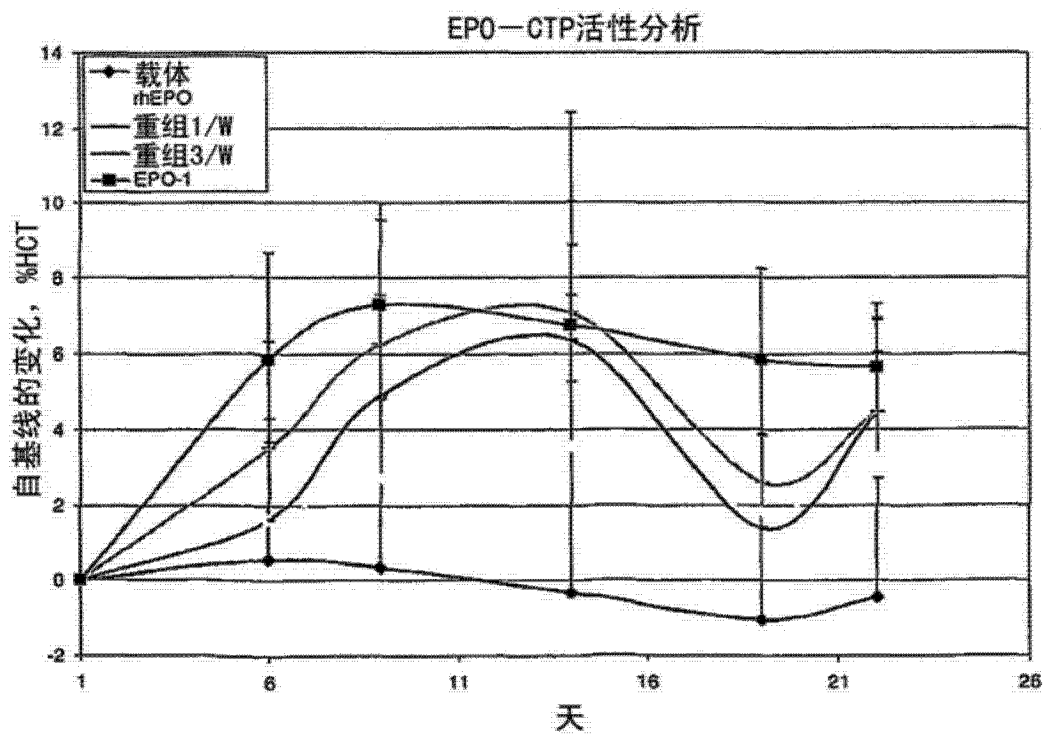


图 4

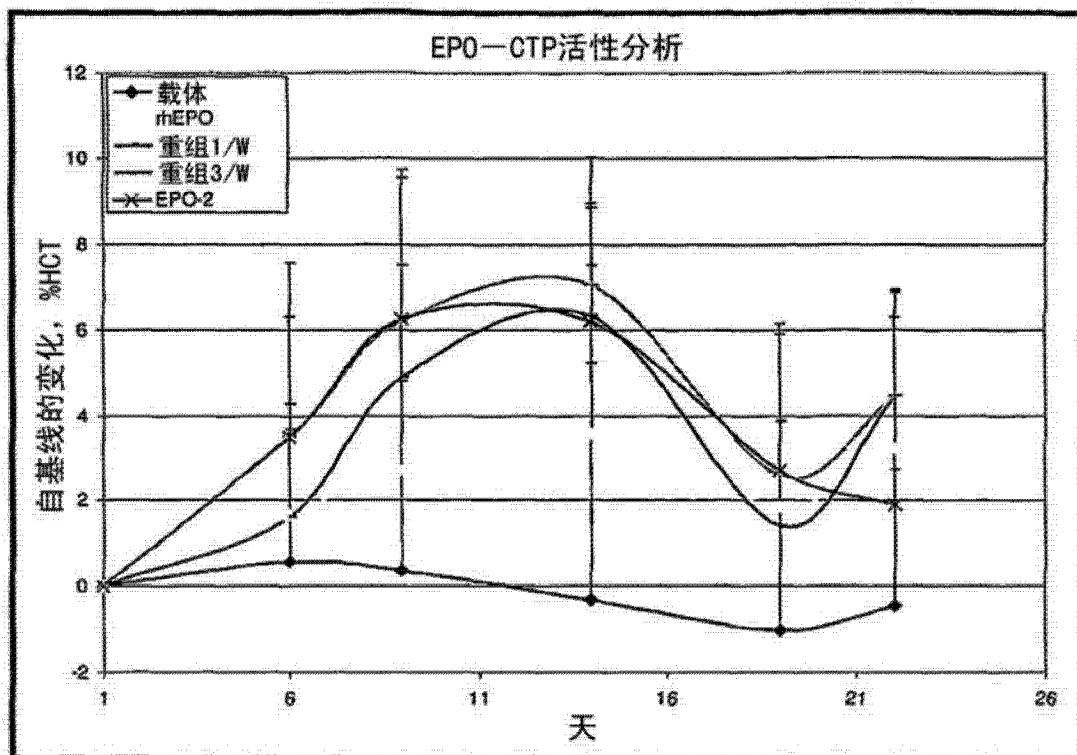


图 5

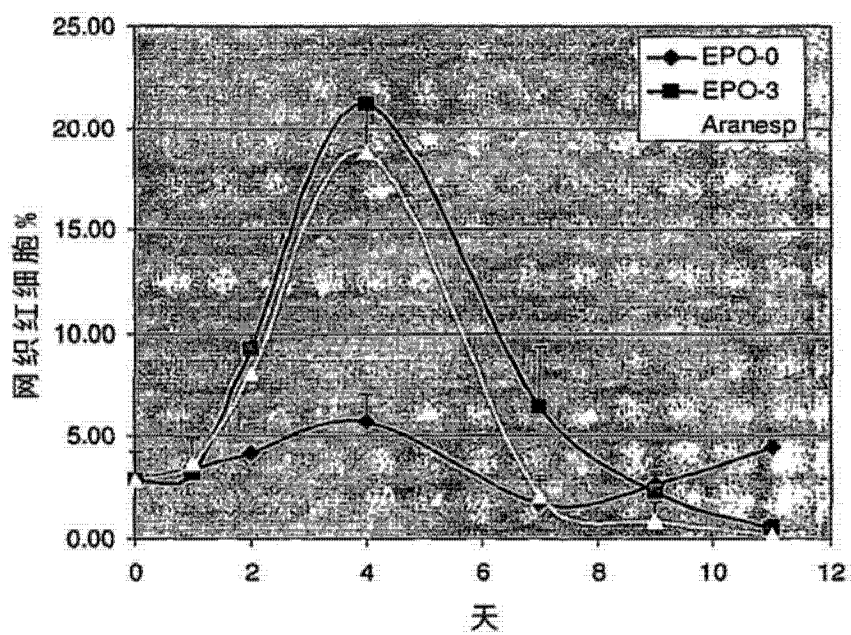


图 6

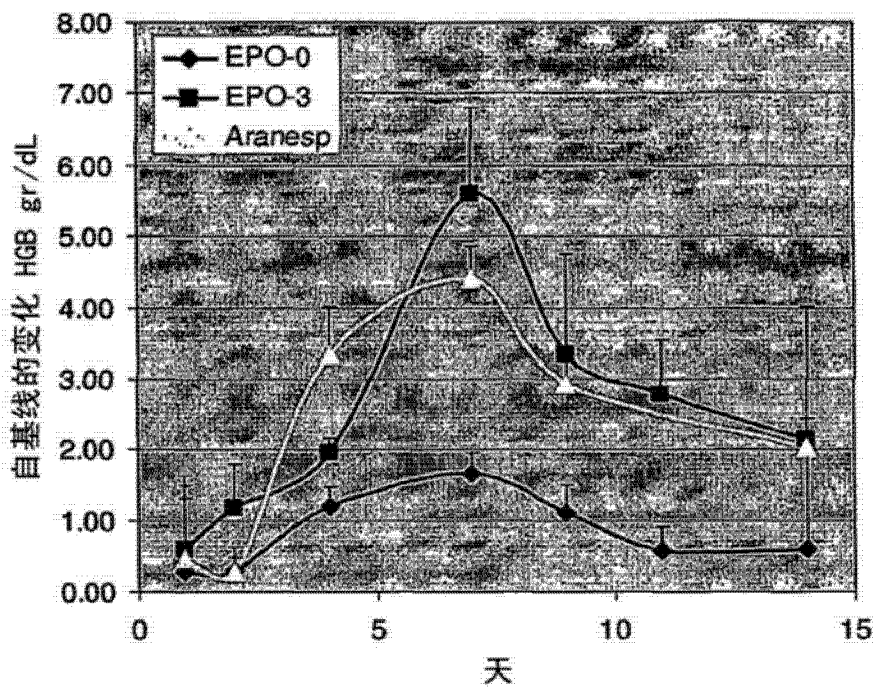


图 7

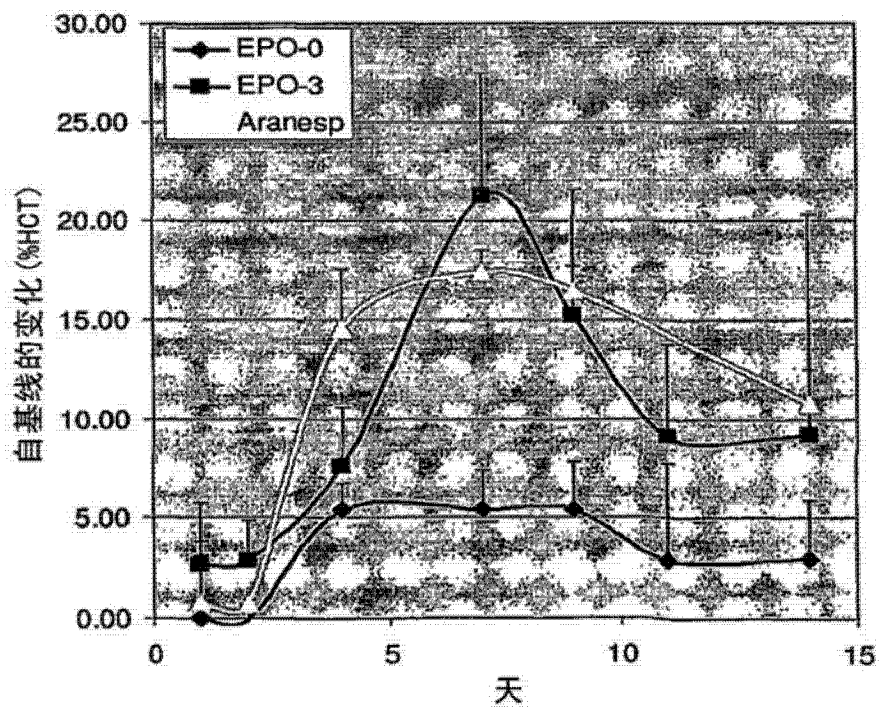


图 8

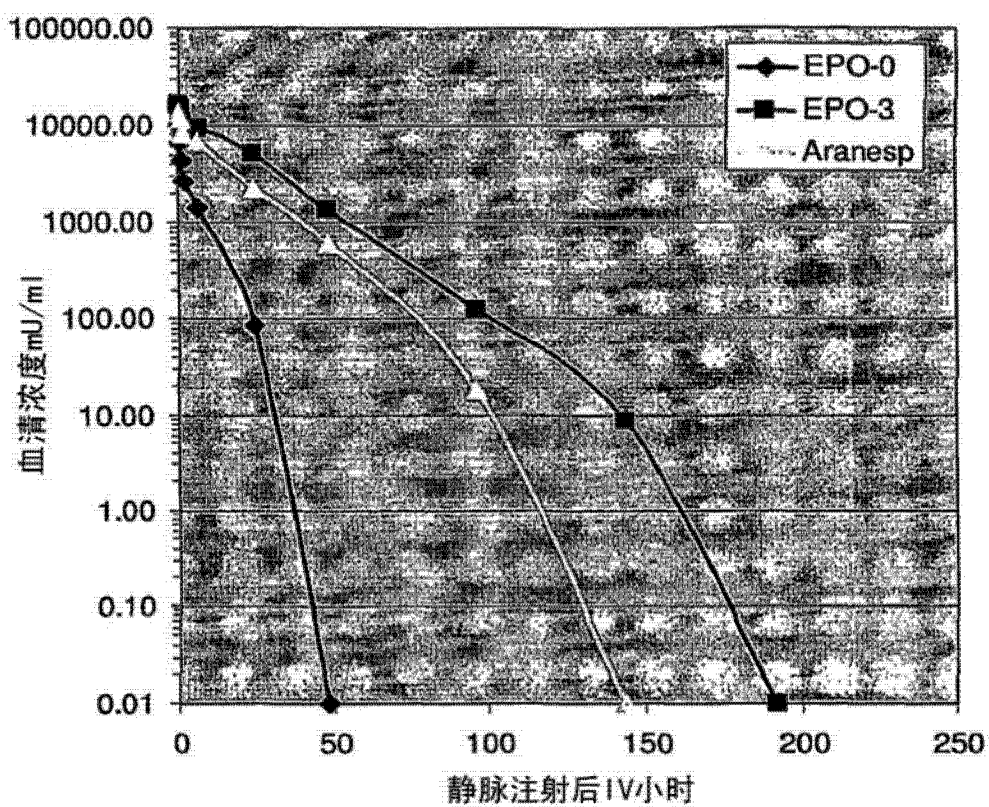


图 9

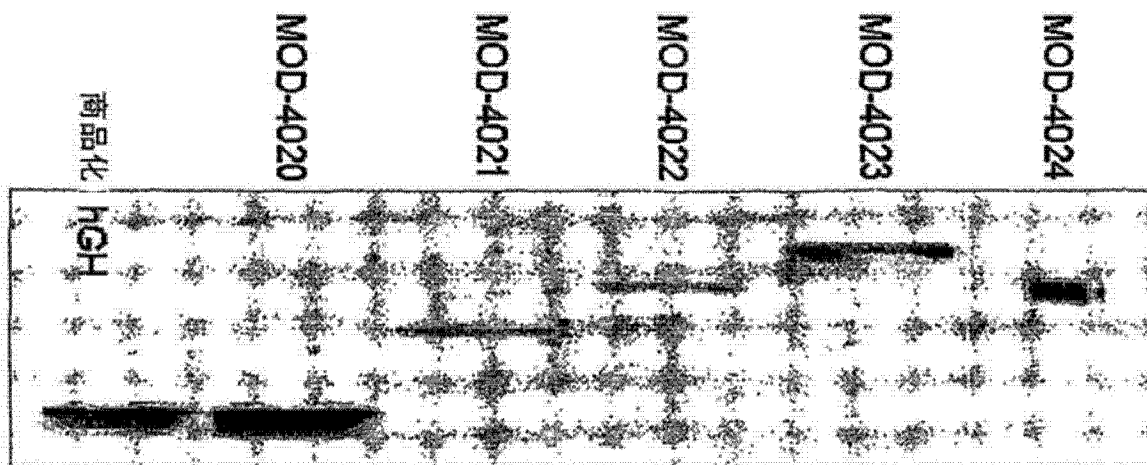


图 10

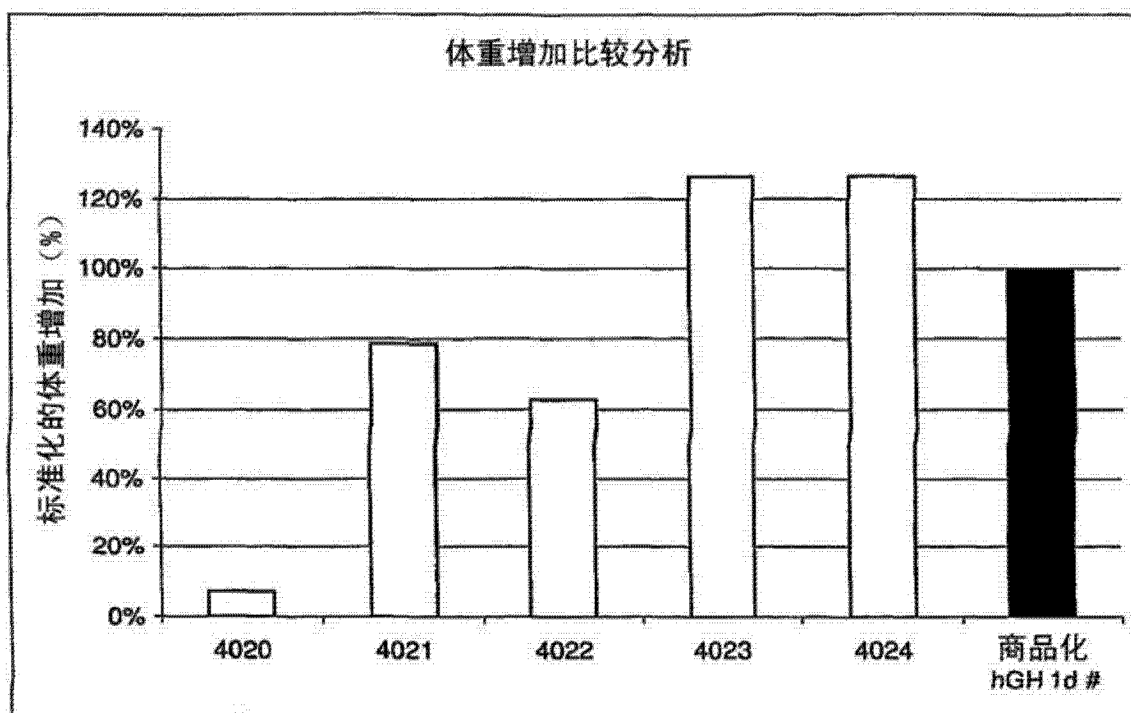


图 11