



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111182880 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 09

(21) 申请号 201880064338.X

CN 105555297 A, 2016.05.04

(22) 申请日 2018.08.01

US 2012003222 A1, 2012.01.05

CN 103998462 A, 2014.08.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111182880 A

罗云波等. “下游工程案例”. 《食品生物技术导论》. 化学工业出版社, 2006, 第271页.

(43) 申请公布日 2020.05.19

余元勋等. Wnt信号通路及疾病. 《中国分子骨质疏松症学》. 安徽科学技术出版社, 2016, 第103页.

(30) 优先权数据

62/539,960 2017.08.01 US

62/630,448 2018.02.14 US

刘粤酶等. 常用缓冲液及酸碱指示剂. 《生物化学实验教程》. 人民卫生出版社, 1997, 第150页.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.01

Emiko Mihara等. “Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by aserum glycoprotein afamin/ α -albumin”. 《Elife》. 2016, (第5期), 第1-19页.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/044886 2018.08.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/028186 EN 2019.02.07

Emiko Mihara等. “Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by aserum glycoprotein afamin/ α -albumin”. 《Elife》. 2016, (第5期), 第1-19页.

(73) 专利权人 安卡萨再生疗法公司

地址 美国加利福尼亚州

JEN-CHIHHSIEH等. “Biochemical characterization of Wnt-Frizzled interactions using asoluble, biologically active vertebrate Wnt protein”. 《PANS》. 1999, 第96卷(第7期), 3546-3551.

(72) 发明人 袁平 吉尔·赫尔姆斯 朱英

刘波 史蒂芬妮·加斯特

审查员 邱棋

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

专利代理师 武晶晶

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101416058 A, 2009.04.22

CN 104768579 A, 2015.07.08

权利要求书4页 说明书70页

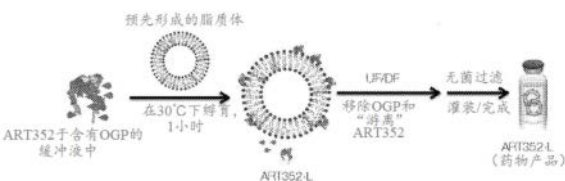
序列表28页 附图42页

(54) 发明名称

WNT组合物和从无血清培养条件进行的工艺方法

(57) 摘要

本文公开用于在无血清条件下产生Wnt多肽的方法和组合物。本文还公开从无血清条件纯化所述Wnt多肽的方法。



CN 111182880 B

1. 一种制备功能活性Wnt3A多肽的方法,所述方法包括:
 - a) 在条件培养基中在细胞中共表达Wnt3A多肽和卷曲蛋白-8多肽以产生多个Wnt3A多肽-卷曲蛋白-8多肽复合物;
 - b) 从所述条件培养基收集所述多个Wnt3A多肽-卷曲蛋白-8多肽复合物;
 - c) 使所述多个Wnt3A多肽-卷曲蛋白-8多肽复合物与含糖清洁剂缓冲液一起孵育以产生包含第一Wnt3A组合物和卷曲蛋白-8多肽组合物的混合物,所述第一Wnt3A组合物包含功能非活性Wnt3A多肽;
 - d) 用固定有磺化多芳族化合物的管柱使所述第一Wnt3A组合物从所述混合物分离以产生第二Wnt3A组合物,所述第二Wnt3A组合物包含所述功能活性Wnt3A多肽和所述糖清洁剂;和
 - e) 使所述第二Wnt3A组合物与脂质体的水溶液接触以产生最终Wnt3A组合物,所述最终Wnt3A组合物包含功能活性Wnt3A多肽。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述糖清洁剂包括葡萄糖苷清洁剂。
3. 如权利要求2所述的方法,其中所述葡萄糖苷清洁剂是正己基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正庚基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正辛基- α -D-吡喃葡萄糖苷、辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷、正辛基- β -D-吡喃半乳糖苷、正壬基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正癸基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二基- β -D-吡喃葡萄糖苷或甲基-6-O-(N-庚基氨基甲酰基)- α -D-吡喃葡萄糖苷。
4. 如权利要求2所述的方法,其中所述葡萄糖苷清洁剂选自正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷和辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷。
5. 如权利要求2所述的方法,其中所述葡萄糖苷清洁剂是正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷。
6. 如权利要求2所述的方法,其中所述葡萄糖苷清洁剂是辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷。
7. 如权利要求2所述的方法,其中所述糖清洁剂包括麦芽糖苷清洁剂。
8. 如权利要求7所述的方法,其中所述麦芽糖苷清洁剂是正癸基- β -D-吡喃麦芽糖苷、正十二基- β -D-吡喃麦芽糖苷或6-环己基-1-己基- β -D-吡喃麦芽糖苷。
9. 如权利要求1所述的方法,其中所述缓冲液中所述糖清洁剂的浓度是:
0.1%至5%w/v。
10. 如权利要求1所述的方法,其中还用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲合色谱管柱、混合模式管柱、尺寸排阻色谱管柱或它们的组合纯化所述第二Wnt3A组合物至少一次以产生第三Wnt3A组合物。
11. 如权利要求1所述的方法,其中在与所述缓冲液一起孵育以产生包含所述第一Wnt3A组合物的所述混合物之前,还用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲合色谱管柱纯化所述多个Wnt3A多肽-卷曲蛋白-8多肽复合物。
12. 如权利要求11所述的方法,其中所述方法包括:
 - a) 在包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的第一亲合色谱管柱上纯化所述多个Wnt3A多肽-卷曲蛋白-8多肽复合物以产生Wnt3A多肽-卷曲蛋白-8多肽复合物的所洗脱混合物;
 - b) 使Wnt3A多肽-卷曲蛋白-8多肽复合物的所述所洗脱混合物与含糖清洁剂的所述缓冲液一起孵育以产生包含所述第一Wnt3A组合物和卷曲蛋白-8多肽组合物的所述混合

物,所述第一Wnt3A组合物包含功能非活性Wnt3A多肽;

c) 用固定有磺化多芳族化合物的管柱使所述第一Wnt3A组合物从所述混合物分离以产生所述第二Wnt3A组合物,所述第二Wnt3A组合物包含所述功能活性Wnt3A多肽和所述糖清洁剂;

d) 用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的第二亲和色谱管柱、混合模式管柱和尺寸排阻色谱管柱以串联方式纯化所述第二Wnt3A组合物以产生第三Wnt3A组合物;和

e) 使所述第三Wnt3A组合物与脂质体的水溶液接触以产生所述最终Wnt3A组合物,所述最终Wnt3A组合物包含功能活性Wnt3A多肽。

13. 如权利要求12所述的方法,其中用于所述混合模式管柱的洗脱缓冲液包含0.1M至2M精氨酸。

14. 如权利要求12所述的方法,其中用于所述第二亲和色谱管柱、所述混合模式管柱和所述尺寸排阻色谱管柱中的每一者的洗脱缓冲液包含所述糖清洁剂。

15. 如权利要求1所述的方法,其中步骤d)的所述分离包括用包含在第一盐浓度下的第一缓冲溶液和在第二盐浓度下的第二缓冲溶液的阶段梯度来洗脱所述第一Wnt3A组合物。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述第一缓冲溶液包含在以下浓度下的盐:
10mM至100mM。

17. 如权利要求15所述的方法,其中所述第二缓冲溶液包含在1M或更高的浓度下的盐。

18. 如权利要求16所述的方法,其中所述盐包括氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、磷酸钙、磷酸钾、磷酸镁、磷酸钠、硫酸铵、氯化铵或磷酸铵。

19. 如权利要求1所述的方法,其中所述卷曲蛋白-8多肽包括卷曲蛋白-8融合多肽。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述卷曲蛋白-8融合多肽包含截短卷曲蛋白-8多肽。

21. 如权利要求20所述的方法,其中所述截短卷曲蛋白-8多肽包含卷曲蛋白-8的富含半胱氨酸的区域(CRD)。

22. 如权利要求20所述的方法,其中所述截短卷曲蛋白-8多肽包含SEQ ID NO:4的氨基酸残基25至氨基酸残基172的区域。

23. 如权利要求19所述的方法,其中所述卷曲蛋白-8融合多肽还包含IgG Fc部分。

24. 如权利要求19所述的方法,其中所述卷曲蛋白-8融合多肽包含:

SEQ ID NO:5的序列;或

SEQ ID NO:18的序列。

25. 如权利要求1所述的方法,其中所述Wnt3A多肽包含异源性信号序列或天然信号序列。

26. 如权利要求1所述的方法,其中所述Wnt3A多肽包含SEQ ID NO:1的序列。

27. 如权利要求1所述的方法,其中所述Wnt3A多肽包含1至33个氨基酸的C末端截短。

28. 如权利要求1所述的方法,其中所述Wnt3A多肽包含SEQ ID NO:2的序列。

29. 如权利要求1所述的方法,其中所述Wnt3A多肽在对应于如SEQ ID NO:1中阐述的氨基酸残基209的氨基酸位置处包含脂质修饰。

30. 如权利要求29所述的方法,其中所述Wnt3A多肽被棕榈酸修饰。

31. 如权利要求12所述的方法,其中所述第二亲和色谱管柱从所述第二Wnt3A组合物移

除残余卷曲蛋白-8融合蛋白。

32. 如权利要求10所述的方法, 其中所述混合模式管柱从所述第二Wnt3A组合物移除Wnt3A多肽片段。

33. 如权利要求10所述的方法, 其中所述尺寸排阻色谱管柱从所述第二Wnt3A组合物移除残余Wnt3A多肽片段以产生所述第三Wnt3A组合物。

34. 如权利要求1所述的方法, 其中所述最终Wnt3A组合物具有以下脂质体粒度分布:
10nm至1 μ m。

35. 一种功能活性Wnt3A多肽, 所述功能活性Wnt3A多肽通过如权利要求1所述的方法产生。

36. 一种脂质体Wnt3A组合物, 所述脂质体Wnt3A组合物包含通过如权利要求1所述的方法产生的功能活性Wnt3A多肽。

37. 脂质体Wnt3A多肽在制备具有增强的细胞存活的骨移植物中的用途, 其中所述脂质体Wnt3A多肽通过根据权利要求1的方法生成。

38. 一种Wnt3A培养系统, 所述Wnt3A培养系统包含:

- a) 包含少于9%血清的最低血清培养基;
- b) 定位在所述最低血清培养基中的Wnt3A多肽-卷曲蛋白-8多肽复合物; 和
- c) 来自用编码所述Wnt3A多肽的第一表达载体和编码所述卷曲蛋白-8多肽的第二表达载体转染的经工程改造细胞系的细胞;

其中所述Wnt3A多肽和所述卷曲蛋白-8多肽在所述细胞中共表达, 并且使所述细胞在所述最低血清培养基存在下生长。

39. 如权利要求38所述的培养系统, 其中所述卷曲蛋白-8多肽包括卷曲蛋白-8融合多肽。

40. 如权利要求39所述的培养系统, 其中所述卷曲蛋白-8融合多肽包含截短卷曲蛋白-8多肽。

41. 如权利要求40所述的培养系统, 其中所述截短卷曲蛋白-8多肽包含卷曲蛋白-8的富含半胱氨酸的区域(CRD)。

42. 如权利要求40所述的培养系统, 其中所述截短卷曲蛋白-8多肽包含SEQ ID NO:4的氨基酸残基1至氨基酸残基151或SEQ ID NO:4的氨基酸残基1至氨基酸残基172的区域。

43. 如权利要求38所述的培养系统, 其中所述卷曲蛋白-8融合多肽还包含IgG Fc部分。

44. 如权利要求39所述的培养系统, 其中所述卷曲蛋白-8融合蛋白包含:

SEQ ID NO:5的序列; 或

SEQ ID NO:18的序列。

45. 如权利要求38所述的培养系统, 其中所述Wnt3A多肽包含异源性信号序列或天然信号序列。

46. 如权利要求38所述的培养系统, 其中所述Wnt3A多肽包含SEQ ID NO:1的序列。

47. 如权利要求38所述的培养系统, 其中所述Wnt3A多肽包含1至33个氨基酸的C末端截短。

48. 如权利要求38所述的培养系统, 其中所述Wnt3A多肽包含SEQ ID NO:2的序列。

49. 如权利要求38所述的培养系统, 其中所述Wnt3A多肽在对应于如SEQ ID NO:1中阐

述的氨基酸残基209的氨基酸位置处包含脂质修饰。

50. 如权利要求38所述的培养系统,其中所述Wnt3A多肽被棕榈酸修饰。

51. 如权利要求38所述的培养系统,其中所述经工程改造细胞系是cGMP可相容细胞系。

52. 工程改造的细胞,其包含编码Wnt3A多肽的外源性核酸以及编码卷曲蛋白-8多肽的外源性核酸,其中所述Wnt3A多肽和所述卷曲蛋白-8多肽共表达在所述工程改造的细胞中。

53. 如权利要求52所述的工程改造的细胞,其中所述卷曲蛋白-8多肽包括卷曲蛋白-8融合多肽。

54. 如权利要求53所述的工程改造的细胞,其中所述卷曲蛋白-8融合多肽包括截短的卷曲蛋白-8多肽。

55. 如权利要求54所述的工程改造的细胞,其中所述截短的卷曲蛋白-8包括卷曲蛋白-8的富含半胱氨酸的结构域(CRD)。

56. 如权利要求55所述的工程改造的细胞,其中所述截短的卷曲蛋白-8包括包含SEQ ID NO:4的氨基酸残基25至氨基酸残基172的区域。

57. 如权利要求56所述的工程改造的细胞,其中所述卷曲蛋白-8融合多肽还包括IgG Fc部分。

58. 如权利要求53所述的工程改造的细胞,其中所述卷曲蛋白-8融合多肽包含:

SEQ ID NO:5的序列;或

SEQ ID NO:18的序列。

59. 如权利要求52所述的工程改造的细胞,其中所述Wnt3A多肽包含SEQ ID NO:1的序列。

60. 如权利要求59所述的工程改造的细胞,其中所述Wnt3A多肽包含1至33个氨基酸的C末端截短。

WNT组合物和从无血清培养条件进行的工艺方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2017年8月1日提交的美国临时申请号62/539,960和2018年2月14日提交的美国临时申请号62/630,448的权益,所述美国临时申请中的每一者都以引用的方式整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已以ASCII格式电子提交,并且据此以引用的方式整体并入本文的序列表。于2018年7月30日创建的所述ASCII拷贝名为47271-708_601_SL.txt,并且大小是63,855字节。

[0005] 发明背景

[0006] Wnt蛋白形成高度保守的分泌型信号传导分子的家族,所述信号传导分子结合由卷曲蛋白(Frizzled)和低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)编码的细胞表面受体。WNT基因家族由在结构上相关的编码分泌型信号传导蛋白的基因组成。这些蛋白已牵涉于肿瘤发生中和若干发育过程中,包括在胚胎发生期间调控细胞命运和样式形式。一旦结合,配体即引发细胞内事件的级联,所述事件最终导致通过 β -连环蛋白(β -catenin)和DNA结合蛋白TCF的核活性来使靶标基因转录。

发明内容

[0007] 在某些实施方案中,本文公开Wnt组合物和从无血清条件产生Wnt的方法。在一些实施方案中,Wnt组合物包括Wnt3A组合物。在一些实施方案中,本文所述包括从无血清条件产生Wnt3A的方法。

[0008] 在某些实施方案中,本文公开一种制备功能活性Wnt多肽的方法,所述方法包括:
(a) 使多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物与含糖清洁剂缓冲液一起孵育以产生包含第一Wnt组合物和伴侣蛋白组合物的混合物,所述第一Wnt组合物包含功能非活性Wnt多肽;
(b) 用固定有磺化多芳族化合物的管柱使所述第一Wnt组合物从所述混合物分离以产生第二Wnt组合物,所述第二Wnt组合物包含所述功能活性Wnt多肽和所述糖清洁剂;
(c) 任选地,用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲合色谱管柱、混合模式管柱、尺寸排阻色谱管柱或它们的组合纯化所述第二Wnt组合物至少一次以产生第三Wnt组合物;和
(d) 使所述第二Wnt组合物或任选地使所述第三Wnt组合物与脂质体的水溶液接触以产生最终Wnt组合物,所述最终Wnt组合物包含功能活性Wnt多肽。在一些实施方案中,糖清洁剂包括葡萄糖苷清洁剂。在一些实施方案中,葡萄糖苷清洁剂是正己基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正庚基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正辛基- α -D-吡喃葡萄糖苷、辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷、正辛基- β -D-吡喃半乳糖苷、正壬基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正癸基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二基- β -D-吡喃葡萄糖苷或甲基-6-O-(N-庚基氨基甲酰基)- α -D-吡喃葡萄糖苷。在一些实施方案中,葡萄糖苷清洁剂选自正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷和辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷。在一些实施方案中,葡萄糖苷清洁剂是正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷。在一些实施方案中,葡萄糖苷清洁剂是辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷。在一些实施方案中,糖清洁剂包

括麦芽糖苷清洁剂。在一些实施方案中,麦芽糖苷清洁剂是正癸基- β -D-吡喃麦芽糖苷、正十二基- β -D-吡喃麦芽糖苷或6-环己基-1-己基- β -D-吡喃麦芽糖苷。在一些实施方案中,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约0.1%至约5%w/v。在一些实施方案中,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约0.1%、0.5%、1%、1.5%或约2%w/v。在一些实施方案中,在与缓冲液一起孵育以产生包含第一Wnt组合物的混合物之前,还用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲合色谱管柱纯化多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物。在一些实施方案中,亲合色谱管柱是蛋白A管柱。在一些实施方案中,用包含小于5、小于4或小于3的pH的缓冲液从亲合色谱管柱洗脱多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物。在一些实施方案中,方法包括:(a)在包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的第一亲合色谱管柱上纯化多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物以产生Wnt多肽-伴侣蛋白复合物的所洗脱混合物;(b)使Wnt多肽-伴侣蛋白复合物的所述所洗脱混合物与包含糖清洁剂的缓冲液一起孵育以产生包含第一Wnt组合物和伴侣蛋白组合物的混合物,所述第一Wnt组合物包含功能非活性Wnt多肽;(c)用固定有碘化多芳族化合物的管柱使所述第一Wnt组合物从所述混合物分离以产生第二Wnt组合物,所述第二Wnt组合物包含功能活性Wnt多肽和所述糖清洁剂;(d)用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的第二亲合色谱管柱、混合模式管柱和尺寸排阻色谱管柱以串联方式纯化所述第二Wnt组合物以产生第三Wnt组合物;和(e)使所述第三Wnt组合物与脂质体的水溶液接触以产生最终Wnt组合物,所述最终Wnt组合物包含功能活性Wnt多肽。在一些实施方案中,第一亲合色谱管柱和第二亲合色谱管柱各自独立地是蛋白A管柱。在一些实施方案中,用于混合模式管柱的洗脱缓冲液包含约0.1M至约2M、约0.1M至约1M、或约0.1M至约0.5M精氨酸。在一些实施方案中,用于第二亲合色谱管柱、混合模式管柱和尺寸排阻色谱管柱中的每一者的洗脱缓冲液包含糖清洁剂。在一些实施方案中,步骤b)的分离包括用包含在第一盐浓度下的第一缓冲溶液和在第二盐浓度下的第二缓冲溶液的梯度来洗脱第一Wnt组合物。在一些实施方案中,第一缓冲溶液包含在约10mM至约100mM的浓度下的盐。在一些实施方案中,第一缓冲溶液包含在约10mM、20mM、30mM、40mM、50mM或更高的浓度下的盐。在一些实施方案中,第二缓冲溶液包含在约1M、1.5M、2M或更高的浓度下的盐。在一些实施方案中,盐包括氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、磷酸钙、磷酸钾、磷酸镁、磷酸钠、硫酸铵、氯化铵或磷酸铵。在一些实施方案中,伴侣蛋白包括卷曲蛋白。在一些实施方案中,伴侣蛋白包括Wntless。在一些实施方案中,伴侣蛋白包括Afamin。在一些实施方案中,伴侣蛋白包括卷曲蛋白-8融合蛋白。在一些实施方案中,卷曲蛋白-8融合蛋白包含截短卷曲蛋白-8蛋白。在一些实施方案中,截短卷曲蛋白-8蛋白包含卷曲蛋白-8的富含半胱氨酸的区域(CRD)。在一些实施方案中,截短卷曲蛋白-8蛋白包含跨越SEQ ID NO:4的氨基酸残基25至氨基酸残基172的区域。在一些实施方案中,卷曲蛋白-8融合蛋白还包含IgG Fc部分。在一些实施方案中,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些实施方案中,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些实施方案中,Wnt多肽包含异源性信号序列。在一些实施方案中,Wnt多肽包含天然信号序列。在一些实施方案中,Wnt多肽包含标签。在一些实施方案中,标签包括HIS(6x)标签(SEQ ID NO:19)、FLAG标签或PA标签。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽、Wnt5B多肽或Wnt10B多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些实施方案中,Wnt3A多肽是包含与SEQ ID NO:1的约90%、95%、99%或更大序列同一性的

多肽。在一些实施方案中，Wnt3A多肽包含约1至约33个氨基酸的截短。在一些实施方案中，截短是C末端截短。在一些实施方案中，Wnt3A多肽是具有C末端截短的SEQ ID NO:1的多肽。在一些实施方案中，Wnt3A多肽包含与SEQ ID NO:2的约90%、95%、99%或更大序列同一性。在一些实施方案中，Wnt3A多肽由SEQ ID NO:2组成。在一些实施方案中，Wnt多肽在对应于如SEQ ID NO:1中阐述的氨基酸残基209的氨基酸位置处包含脂质修饰。在一些实施方案中，Wnt多肽被棕榈酸修饰。在一些实施方案中，第二亲和色谱管柱从第二Wnt组合物移除残余卷曲蛋白-8融合蛋白。在一些实施方案中，混合模式管柱从第二Wnt组合物移除Wnt多肽片段。在一些实施方案中，尺寸排阻色谱管柱从第二Wnt组合物移除残余Wnt多肽片段以产生第三Wnt组合物。在一些实施方案中，相对于在不存在糖清洁剂下纯化的等同Wnt组合物，第二Wnt组合物是大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%纯净的。在一些实施方案中，相对于在不存在糖清洁剂下纯化的等同Wnt组合物，第三Wnt组合物是大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%纯净的。在一些实施方案中，最终Wnt组合物具有约10nm至约1 μ m、10nm至约500nm、约50nm至约300nm、约50nm至约200nm、约100nm至约500nm、约100nm至约300nm、或约100nm至约200nm的脂质体粒度分布。在一些实施方案中，最终Wnt组合物具有小于约1 μ m、小于约500nm、小于约300nm、小于约200nm或小于约150nm的脂质体粒度分布。在一些实施方案中，还从包含共表达Wnt多肽和伴侣蛋白的细胞的培养基收集多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物。在一些实施方案中，细胞是cGMP可相容细胞。在一些实施方案中，cGMP可相容细胞是cGMP可相容哺乳动物细胞，任选地选自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系、人胚肾(HEK)细胞系或幼小仓鼠肾(BHK)细胞系。

[0009] 在某些实施方案中，本文公开一种制备功能活性Wnt多肽的方法，所述方法包括：(a) 在条件培养基中在细胞中共表达Wnt多肽和伴侣蛋白以产生多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物；(b) 从所述条件培养基收集所述多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物；(c) 使所述多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物与包含糖清洁剂的缓冲液一起孵育以产生包含第一Wnt组合物和伴侣蛋白组合物的混合物，所述第一Wnt组合物包含功能非活性Wnt多肽；(d) 用固定有碘化多芳族化合物的管柱使所述第一Wnt组合物从所述混合物分离以产生第二Wnt组合物，所述第二Wnt组合物包含所述功能活性Wnt多肽和所述糖清洁剂；和(e) 使所述第二Wnt组合物与脂质体的水溶液接触以产生最终Wnt组合物，所述最终Wnt组合物包含功能活性Wnt多肽。在一些实施方案中，糖清洁剂包括葡萄糖苷清洁剂。在一些实施方案中，葡萄糖苷清洁剂是正己基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正庚基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正辛基- α -D-吡喃葡萄糖苷、辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷、正辛基- β -D-吡喃半乳糖苷、正壬基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正癸基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二基- β -D-吡喃葡萄糖苷或甲基-6-O-(N-庚基氨基甲酰基)- α -D-吡喃葡萄糖苷。在一些实施方案中，葡萄糖苷清洁剂选自正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷和辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷。在一些实施方案中，葡萄糖苷清洁剂是正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷。在一些实施方案中，葡萄糖苷清洁剂是辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷。在一些实施方案中，糖清洁剂包括麦芽糖苷清洁剂。在一些实施方案中，麦芽糖苷清洁剂是正癸基- β -D-吡喃麦芽糖苷、正十二基- β -D-吡喃麦芽糖苷或6-环己基-1-己基- β -D-吡喃麦芽糖苷。在一些实施方案中，缓冲液中糖清洁剂的浓度是：约0.1%至约5%w/v；或约0.1%、0.5%、1%、1.5%或约2%w/v。在一些实施方案中，还用包含与抗体的Fc部分相互

作用的多肽的亲合色谱管柱、混合模式管柱、尺寸排阻色谱管柱或它们的组合纯化第二Wnt组合物至少一次以产生第三Wnt组合物。在一些实施方案中,在与缓冲液一起孵育以产生包含第一Wnt组合物的混合物之前,还用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲合色谱管柱纯化多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物。在一些实施方案中,亲合色谱管柱是蛋白A管柱。在一些实施方案中,用包含小于5、小于4或小于3的pH的缓冲液从亲合色谱管柱洗脱多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物。在一些实施方案中,方法包括:(a)在包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的第一亲合色谱管柱上纯化多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物以产生Wnt多肽-伴侣蛋白复合物的所洗脱混合物;(b)使Wnt多肽-伴侣蛋白复合物的所述所洗脱混合物与包含糖清洁剂的缓冲液一起孵育以产生包含第一Wnt组合物和伴侣蛋白组合物的混合物,所述第一Wnt组合物包含功能非活性Wnt多肽;(c)用固定有碘化多芳族化合物的管柱使所述第一Wnt组合物从所述混合物分离以产生第二Wnt组合物,所述第二Wnt组合物包含功能活性Wnt多肽和所述糖清洁剂;(d)用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的第二亲合色谱管柱、混合模式管柱和尺寸排阻色谱管柱以串联方式纯化所述第二Wnt组合物以产生第三Wnt组合物;和(e)使所述第三Wnt组合物与脂质体的水溶液接触以产生最终Wnt组合物,所述最终Wnt组合物包含功能活性Wnt多肽。在一些实施方案中,第一亲合色谱管柱和第二亲合色谱管柱各自独立地是蛋白A管柱。在一些实施方案中,用于混合模式管柱的洗脱缓冲液包含约0.1M至约2M、约0.1M至约1M、或约0.1M至约0.5M精氨酸。在一些实施方案中,用于第二亲合色谱管柱、混合模式管柱和尺寸排阻色谱管柱中的每一者的洗脱缓冲液包含糖清洁剂。在一些实施方案中,步骤d)的分离包括用包含在第一盐浓度下的第一缓冲溶液和在第二盐浓度下的第二缓冲溶液的阶段梯度来洗脱第一Wnt组合物。在一些实施方案中,第一缓冲溶液包含在以下浓度下的盐:约10mM至约100mM;或约10mM、20mM、30mM、40mM、50mM或更高。在一些实施方案中,第二缓冲溶液包含在约1M、1.5M、2M或更高的浓度下的盐。在一些实施方案中,盐包括氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、磷酸钙、磷酸钾、磷酸镁、磷酸钠、硫酸铵、氯化铵或磷酸铵。在一些实施方案中,伴侣蛋白包括卷曲蛋白。在一些实施方案中,伴侣蛋白包括卷曲蛋白-8融合蛋白。在一些实施方案中,卷曲蛋白-8融合蛋白包含截短卷曲蛋白-8蛋白。在一些实施方案中,截短卷曲蛋白-8蛋白包含卷曲蛋白-8的富含半胱氨酸的区域(CRD)。在一些实施方案中,截短卷曲蛋白-8蛋白包含跨越SEQ ID NO:4的氨基酸残基25至氨基酸残基172的区域。在一些实施方案中,卷曲蛋白-8融合蛋白还包含IgG Fc部分。在一些实施方案中,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性;或与SEQ ID NO:18的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些实施方案中,Wnt多肽包含异源性信号序列或天然信号序列。在一些实施方案中,Wnt多肽包含标签,任选地是HIS (6x) 标签(SEQ ID NO:19)、FLAG标签或PA标签。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些实施方案中,Wnt3A多肽包含与SEQ ID NO:1的约90%、95%、99%或更大序列同一性。在一些实施方案中,Wnt3A多肽包含约1至约33个氨基酸的截短,任选地是C末端截短。在一些实施方案中,Wnt3A多肽包含与SEQ ID NO:2的约90%、95%、99%或更大序列同一性,或由SEQ ID NO:2组成。在一些实施方案中,Wnt多肽在对应于如SEQ ID NO:1中阐述的氨基酸残基209的氨基酸位置处包含脂质修饰。在一些实施方案中,Wnt多肽被棕榈酸修饰。在一些实施方案中,第二亲合色谱管柱从第二Wnt组合物移除残余卷曲蛋白-8融合蛋白。在一些实施方案中,混合

模式管柱从第二Wnt组合物移除Wnt多肽片段。在一些实施方案中,尺寸排阻色谱管柱从第二Wnt组合物移除残余Wnt多肽片段以产生第三Wnt组合物。在一些实施方案中,相对于在不存在糖清洁剂下纯化的等同Wnt组合物,第二Wnt组合物是大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%纯净的。在一些实施方案中,相对于在不存在糖清洁剂下纯化的等同Wnt组合物,第三Wnt组合物是大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%纯净的。在一些实施方案中,最终Wnt组合物具有以下脂质体粒度分布:约10nm至约1 μ m、10nm至约500nm、约50nm至约300nm、约50nm至约200nm、约50nm至约150nm、约100nm至约500nm、约100nm至约300nm、或约100nm至约200nm;小于约1 μ m、小于约500nm、小于约300nm、小于约200nm或小于约150nm;或约50nm、约100nm或约150nm。

[0010] 在某些实施方案中,本文公开一种通过上述方法产生的功能活性Wnt多肽。

[0011] 在某些实施方案中,本文公开一种脂质体Wnt组合物,所述脂质体Wnt组合物包含通过上述方法产生的功能活性Wnt多肽。

[0012] 在某些实施方案中,本文公开一种增强有需要的受试者的骨移植物中的细胞存活的方法,所述方法包括:(a)以离体方式使包含经分离哺乳动物骨移植物材料的样品与包含通过上述方法产生的脂质体Wnt多肽的组合物一起孵育,所述经分离哺乳动物骨移植物材料包含细胞;和(b)将增强的细胞移植至靶标部位中。在一些实施方案中,将步骤a)的细胞孵育至少10分钟、20分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、6小时或更久。在一些实施方案中,在约室温下或在约37℃下孵育步骤a)的细胞。在一些实施方案中,相对于未暴露的哺乳动物骨移植物材料,增强的细胞包含增强的成骨能力。

[0013] 在某些实施方案中,本文公开一种增强有需要的受试者的骨缺损部位处的细胞存活的方法,所述方法包括:向所述骨缺损部位施用包含通过上述方法产生的脂质体Wnt多肽的组合物,其中所述脂质体Wnt多肽使在所述骨缺损部位处的细胞存活增强。在一些实施方案中,方法还包括在骨缺损部位处施用牙科或整形外科植入物。在一些实施方案中,在施用包含脂质体Wnt多肽的组合物之前向骨缺损部位施用牙科或整形外科植入物。在一些实施方案中,在施用包含脂质体Wnt多肽的组合物之后向骨缺损部位施用牙科或整形外科植入物。在一些实施方案中,在施用包含脂质体Wnt多肽的组合物之后约1天、2天、5天、7天、2周、30天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或更久向骨缺损部位施用牙科或整形外科植入物。在一些实施方案中,牙科或整形外科植入物和包含脂质体Wnt多肽的组合物同时向骨缺损部位施用。在一些实施方案中,脂质体Wnt多肽使牙科或整形外科植入物的骨整合增强。在一些实施方案中,受试者是人。

[0014] 在某些实施方案中,本文公开一种Wnt组合物,所述Wnt组合物包含纯化Wnt多肽中间体和约0.1%至约5%w/v的浓度下的糖清洁剂。在一些实施方案中,糖清洁剂包括葡萄糖苷清洁剂。在一些实施方案中,葡萄糖苷清洁剂是正己基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正庚基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正辛基- α -D-吡喃葡萄糖苷、辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷、正辛基- β -D-吡喃半乳糖苷、正壬基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正癸基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二基- β -D-吡喃葡萄糖苷或甲基-6-O-(N-庚基氨基甲酰基)- α -D-吡喃葡萄糖苷。在一些实施方案中,葡萄糖苷清洁剂选自正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷和辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷。在一些实施方案中,葡萄糖苷清洁剂是正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷。在一

些实施方案中,葡萄糖苷清洁剂是辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷。在一些实施方案中,糖清洁剂包括麦芽糖苷清洁剂。在一些实施方案中,麦芽糖苷清洁剂是正癸基- β -D-吡喃麦芽糖苷、正十二基- β -D-吡喃麦芽糖苷或6-环己基-1-己基- β -D-吡喃麦芽糖苷。在一些实施方案中,糖清洁剂的浓度是约0.1%、0.5%、1%、1.5%或约2%w/v。在一些实施方案中,Wnt组合物具有约5、5.5或6的pH。在一些实施方案中,Wnt组合物还包含缓冲液,所述缓冲液包含在约10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、40mM或50mM的浓度下的乙酸盐。在一些实施方案中,纯化Wnt多肽中间体从以下步骤获得:(a)在条件培养基中在细胞中共表达Wnt多肽和伴侣蛋白以产生多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物;(b)从所述条件培养基收集所述多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物;(c)使所述多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物与包含糖清洁剂的缓冲液一起孵育以产生包含第一Wnt组合物和伴侣蛋白组合物的混合物,所述第一Wnt组合物包含功能非活性Wnt多肽;和(d)用固定有磺化多芳族化合物的管柱、包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲色谱管柱、混合模式管柱、尺寸排阻色谱管柱或它们的组合从所述混合物纯化所述第一Wnt组合物,以产生包含纯化Wnt多肽中间体和所述糖清洁剂的Wnt组合物。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些实施方案中,Wnt3A多肽是包含与SEQ ID NO:1的约90%、95%、99%或更大序列同一性的多肽。在一些实施方案中,Wnt3A多肽包含约1至约33个氨基酸的截短,任选地是C末端截短。在一些实施方案中,Wnt3A多肽包含与SEQ ID NO:2的约90%、95%、99%或更大序列同一性,或由SEQ ID NO:2组成。在一些实施方案中,Wnt多肽在对应于如SEQ ID NO:1中阐述的氨基酸残基209的氨基酸位置处包含脂质修饰。在一些实施方案中,Wnt多肽被棕榈酸修饰。在一些实施方案中,纯化Wnt多肽中间体的浓度是约20 μ g/mL至约50 μ g/mL、约25 μ g/mL至约50 μ g/mL、约30 μ g/mL至约50 μ g/mL、约20 μ g/mL至约40 μ g/mL、约25 μ g/mL至约40 μ g/mL、约25 μ g/mL至约30 μ g/mL、约30 μ g/mL至约50 μ g/mL、或约30 μ g/mL至约40 μ g/mL;或约20 μ g/mL、约25 μ g/mL、约30 μ g/mL、约35 μ g/mL、约40 μ g/mL、约45 μ g/mL或约50 μ g/mL。

[0015] 在某些实施方案中,本文公开一种Wnt培养系统,所述Wnt培养系统包含:(a)最低血清培养基;(b)定位在所述最低血清培养基中的Wnt多肽-伴侣蛋白复合物;和(c)来自用编码所述Wnt多肽的第一表达载体和编码所述伴侣蛋白的第二表达载体转染的经工程改造细胞系的细胞;其中所述Wnt多肽和所述伴侣蛋白在所述细胞中共表达,并且使所述细胞在所述最低血清培养基存在下生长。在一些实施方案中,伴侣蛋白包括卷曲蛋白。在一些实施方案中,伴侣蛋白包括Wntless。在一些实施方案中,伴侣蛋白包括Afamin。在一些实施方案中,伴侣蛋白包括卷曲蛋白-8融合蛋白。在一些实施方案中,卷曲蛋白-8融合蛋白包含截短卷曲蛋白-8蛋白。在一些实施方案中,截短卷曲蛋白-8蛋白包含卷曲蛋白-8的富含半胱氨酸的区域(CRD)。在一些实施方案中,截短卷曲蛋白-8蛋白包含跨越SEQ ID NO:4的氨基酸残基1至氨基酸残基151或跨越SEQ ID NO:4的氨基酸残基1至氨基酸残基172的区域。在一些实施方案中,卷曲蛋白-8融合蛋白还包含IgG Fc部分。在一些实施方案中,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些实施方案中,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些实施方案中,Wnt多肽包含标签。在一些实施方案中,标签包括HIS标签、FLAG标签或PA标签。在一些实施方案中,Wnt多肽包含异源性信号序列。在一些实施方案中,Wnt多肽包含天然信号序列。在一些实施方案中,Wnt多肽是

Wnt3A多肽、Wnt5B多肽或Wnt10B多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些实施方案中,Wnt3A多肽包含与SEQ ID NO:1的约90%、95%、99%或更大序列同一性。在一些实施方案中,Wnt3A多肽包含约1至约33个氨基酸的截短。在一些实施方案中,截短是C末端截短。在一些实施方案中,Wnt3A多肽是具有C末端截短的SEQ ID NO:1的多肽。在一些实施方案中,Wnt3A多肽包含与SEQ ID NO:2的约90%、95%、99%或更大序列同一性。在一些实施方案中,Wnt3A多肽由SEQ ID NO:2组成。在一些实施方案中,经工程改造细胞系是cGMP可相容细胞系。在一些实施方案中,cGMP可相容细胞系是cGMP可相容哺乳动物细胞系。在一些实施方案中,cGMP可相容哺乳动物细胞系是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系、人胚肾(HEK)细胞系或幼小仓鼠肾(BHK)细胞系。在一些实施方案中,cGMP可相容哺乳动物细胞系是CHO-S或CHO-K1衍生细胞系。在一些实施方案中,第一表达载体和第二表达载体各自独立地是cGMP可相容载体。在一些实施方案中,第一表达载体和第二表达载体各自独立地是哺乳动物载体。在一些实施方案中,哺乳动物载体是OpticVec、pTarget、pcDNA4T04、pcDNA4.0、UCOE表达载体或GS系统表达载体。

附图说明

[0016] 本公开的各个方面特定地阐述于随附权利要求中。通过参考阐述其中利用本公开的的原理的说明性实施方案的以下详细描述以及附图,将获得对本公开的特征和优势的更充分了解,在所述附图中:

[0017] 图1说明在外源性卷曲蛋白-8融合蛋白(Fz-151-Fc)存在下或在共表达的卷曲蛋白-8融合蛋白(Fz-151-Fc)存在下,Wnt3A表达的比较研究。

[0018] 图2A-图2B显示卷曲蛋白-8融合蛋白(Fz-151-Fc)的共表达使Wnt3A聚集降低(图2A),并且还使Wnt3A单体的量增加(图2B)。Wnt3A多肽由稳定细胞系产生。

[0019] 图3说明本文所述的四种示例性纯化策略。

[0020] 图4A-图4D说明策略1的纯化细节。图4A显示策略1的一示例性纯化流程。图4B显示各种级分的银染色。条件是非还原性条件。图4C显示用以确定Wnt3A多肽的存在性和浓度的对各种级分的western印迹分析。图4D说明Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。

[0021] 图5A-图5D说明策略2的纯化细节。图5A说明蛋白A级分的考马斯(Coomassie)染色。图5B显示各种级分的银染色。图5C显示用以确定Wnt3A多肽的存在性和浓度的对各种级分的western印迹分析。图5D说明Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。

[0022] 图6A-图6B说明策略3的纯化细节。图6A显示各种级分的银染色。图6B说明Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。

[0023] 图7说明策略4的纯化细节。图7A显示蛋白A级分的考马斯染色。图7B显示各种级分的银染色。图7C说明Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。

[0024] 图8A-图8C说明Wnt3A多肽与Wntless(WLS)的共表达。图8A显示在共表达的Wntless存在下,Wnt3A表达增加。图8B显示Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。图8C显示Wnt3A在稳定细胞系中的表达。

[0025] 图9说明Wnt3A与Afamin的共表达。

[0026] 图10A-图10B说明分别用:PA、FLAG和His标签加以标签化的三种示例性Wnt3A多肽的表达和活性。图10A说明所分泌标签化Wnt3A多肽的浓度。图10B显示Wnt3A多肽在LSL测定

中的活性。

[0027] 图11显示包含不同His标签-接头构建体的Wnt3A变体(ART352^{his}变体)的活性。

[0028] 图12显示Wnt3A变体-ART352^{his}的来自Ni-NTA管柱的各种级分的活性。

[0029] 图13A-图13C显示Wnt3A多肽在ELISA测定中的浓度。

[0030] 图14说明用于纯化FLAG标签化Wnt3A多肽：

[0031] FLAG-TEV-hWnt3A的纯化流程。

[0032] 图15A-图15F显示FLAG标签化Wnt3A多肽的活性和浓度。图15A-图15C显示Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。图15D-图15F显示Wnt3A多肽的浓度。

[0033] 图16A-图16C显示从0.75L培养物培养的Wnt3A的活性。图16A：从肝素纯化获得的级分；图16B：说明标准偏差；图16C：根据肝素级分的LUC/LAC。

[0034] 图17A-图17F显示从10L培养物培养的Wnt3A的活性和浓度。图17A：从肝素纯化获得的级分；图17B：说明标准偏差；图17C：根据肝素级分的LUC/LAC；图17D：根据所收集级分的Wnt3A浓度；图17E：说明关于图17D的标准偏差；以及图17F：说明来自示例性级分的最终浓度。

[0035] 图18说明与hFZD8 CRD-Fc复合的Wnt3A的活性。

[0036] 图19说明本文所述的一示例性纯化流程。

[0037] 图20A-图20B显示用1%CHAPS(图20A)或1%OGP(图20B)进行的Wnt3A(ART352)纯化的示例性凝胶图像。

[0038] 图21A-图21B说明WNT3A(ART352)洗脱物在1%OGP(图21A)或1%CHAPS(图21B)的情况下的LSL活性。

[0039] 图22说明用混合模式管柱进行的纯化的一示例性凝胶图像。

[0040] 图23A-图23B说明用包含1%CHAPS(图23A)或1%OGP(图23B)的缓冲液纯化的Wnt3A多肽。

[0041] 图24A-图24B说明相较于CHAPS,OGP在2种不同温度即4℃(图24A)和23℃(图24B)下使WNT3A蛋白稳定。

[0042] 图25说明一示例性脂质体Wnt3A配制方法。

[0043] 图26说明使用示例性Wnt3A多肽ART352获得的一代表性标准曲线。灵敏性范围是从约0.003μg/mL至约1.6μg/mL。

[0044] 图27显示溶液条件对自体移植物中的细胞活力的影响。相较于零时间点(白色棒条)，在盐水中孵育2小时导致自体移植物中的凋亡细胞的百分比倍增。相比之下，在ART352-L中孵育使时间和温度依赖性凋亡增加降低回到在对照自体移植物中观察到的水平。

[0045] 图28显示温度对自体移植物中的细胞活力的影响。对于保持在盐水中的样品，4℃的保持温度使自体移植物中的细胞死亡降低，而37℃的保持温度使自体移植物中的细胞死亡增加。

[0046] 图29显示时间和温度对示例性脂质体Wnt3A多肽ART352-L的胞吞的影响。对经DiI标记ART352-L的胞吞随时间和温度而增加。这些数据表明对于离体保持的从15分钟至2小时的预定持续期，在37℃下孵育支持营养物摄取。数据证明对ART352-L的摄取会改善与标准自体移植物操作相关联的细胞死亡。

[0047] 图30显示ART352-L稳定性随时间和温度而变化。历经2小时的过程,ART352-L显示最小(4.9%)活性损失。

[0048] 图31显示活性ART352-L从孵育溶液的胞吞移除。在不存在自体移植物下,孵育溶液中的ART352-L水平保持在100%。在自体移植物存在下,活性ART352-L从溶液的移除以温度和时间依赖性方式发生。

[0049] 图32显示对与经ART352-L处理自体移植物相关联的游离活性ART352-L的评估。无论离体孵育步骤的温度或持续期如何,经ART352-L处理自体移植物都显示无证据表明存在残余游离活性ART352。

[0050] 图33显示由源于自体移植物的细胞达成的从孵育溶液对ART352-L的移除以及摄取。

具体实施方式

[0051] Wnt涉及于广泛多种与骨发生的程序相关的细胞决定中。举例来说,Wnt调控影响间质祖细胞向骨骼发生命运定型的两种转录因子sox9和Runx2的表达水平。Wnt还影响细胞分化成骨母细胞还是软骨细胞。在成年动物中,有大量证据表明Wnt信号传导调控骨量。举例来说,使Wnt信号传导增加的功能获得突变与若干高骨量综合征相关,所述综合征包括I型骨质疏松以及骨内膜骨质增生或常染色体显性骨质硬化。使Wnt信号传导降低的功能丧失突变导致低骨量疾病:骨质疏松-假神经胶质瘤。Wnt抑制剂Dkk1的产生增加与多发性骨髓瘤相关联,所述多发性骨髓瘤是一种具有增加的骨再吸收作为它的一种区别性特征的疾病,并且Wnt抑制剂骨硬化蛋白(Sclerostin)的损失与包括硬化性骨化病和范布切姆病(van Buchem disease)的高骨量疾病相关联。

[0052] Wnt信号传导在细胞决定中的作用已大部分通过在体外进行的实验来确定,在所述实验中,Wnt信号传导被消除或阻断。在一些情况下,Wnt信号由于它的受体卷曲蛋白的配体结合结构域过量而受阻断。

[0053] Wnt多肽包含协调细胞发育和生物过程的一个家族的信号传导分子。在一些情况下,Wnt多肽调节干细胞自我更新、凋亡和细胞运动性。在其他情况下,Wnt多肽促进发育,例如像组织体内平衡。Wnt多肽是高度疏水性蛋白质,并且在一些情况(例如某些培养基条件)下具有降低的生物功能,或丧失生物功能。在一些情况下,与外源性试剂(例如脂质体)一起配制Wnt多肽允许所述Wnt多肽维持生物功能。举例来说,已显示使Wnt多肽与脂质囊泡(例如脂质体)组合会产生具有生物活性(Minear等,Wnt proteins promote bone regeneration.Sci.Transl.Med.2,29ra30(2010);以及Popelut等,The acceleration of implant osseointegration by liposomal Wnt3A,Biomaterials 31 9173e9181(2010);美国专利号7,335,643和7,153,832)的Wnt制剂(Morrell NT,Leucht P,Zhao L,Kim J-B,ten Berge D等(2008)Liposomal Packaging Generates Wnt Protein with In Vivo Biological Activity.PLoS ONE 3(8):e2930;以及Zhao等,Controlling the in vivo activity of Wnt liposomes,Methods Enzymol 465:331-47(2009))。

[0054] 在一些情况下,Wnt多肽在血清存在下从培养细胞分泌。血清含有多种脂质组分,所述组分在一些情况下在体外使高度疏水性Wnt多肽稳定。疏水性基于存在为Wnt活性所需的棕榈酰化。然而,由于安全性原因,包括FDA和EMA的监管机构通常要求从意图在人中使用

的药物移除所有动物产品。另外,如果尚未遵循适当程序以防止病毒和其他病原体污染,那么用于制造受FDA监管的医学产品的胎牛血清是受到禁止的。

[0055] 在一些情况下,Wnt多肽由表面活性剂加以稳定。尽管表面活性剂保护疏水性Wnt免遭聚集;然而,能够使Wnt多肽稳定的浓度水平对人细胞具有细胞毒性,在一些情况下导致细胞溶解。

[0056] 本文公开在最低血清条件(例如无血清条件)下产生Wnt多肽的方法和培养系统。在一些实施方案中,本文所述的方法包括(a)使多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物与含糖清洁剂缓冲液一起孵育以产生包含第一Wnt组合物和伴侣蛋白组合物的混合物,所述第一Wnt组合物包含功能非活性Wnt多肽;(b)用固定有碘化多芳族化合物的管柱使所述第一Wnt组合物从所述混合物分离以产生第二Wnt组合物,所述第二Wnt组合物包含功能活性Wnt多肽和所述糖清洁剂;(c)任选地,用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲合色谱管柱、混合模式管柱、尺寸排阻色谱管柱或它们的组合纯化所述第二Wnt组合物至少一次以产生第三Wnt组合物;和(d)使所述第二Wnt组合物或任选地使所述第三Wnt组合物与脂质体的水溶液接触以产生最终Wnt组合物,所述最终Wnt组合物包含功能活性Wnt多肽。

[0057] 在一些实施方案中,本文所述的方法包括(a)在条件培养基中在细胞中共表达Wnt多肽与伴侣蛋白以产生Wnt多肽-伴侣蛋白复合物;(b)从所述条件培养基收集所述Wnt多肽-伴侣蛋白复合物;(c)将所述Wnt多肽-伴侣蛋白复合物引入固定有碘化多芳族化合物的管柱中以产生所洗脱Wnt多肽-伴侣蛋白复合物;(d)通过包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲合色谱管柱处理所述所洗脱Wnt多肽-伴侣蛋白复合物以产生经处理Wnt多肽;和(e)使所述经处理Wnt多肽与脂质体的水溶液接触以产生脂质体Wnt多肽。

[0058] 在一些实施方案中,本文所述的方法包括(a)在条件培养基中在细胞中共表达Wnt多肽与伴侣蛋白以产生Wnt多肽-伴侣蛋白复合物;(b)从所述条件培养基收集所述Wnt多肽-伴侣蛋白复合物;(c)将所述Wnt多肽-伴侣蛋白复合物引入包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲合色谱管柱中以产生所洗脱Wnt多肽-伴侣蛋白复合物;(d)通过固定有碘化多芳族化合物的管柱处理所述所洗脱Wnt多肽-伴侣蛋白复合物以产生经处理Wnt多肽;和(e)使所述经处理Wnt多肽与脂质体的水溶液接触以产生脂质体Wnt多肽。

[0059] 在额外实施方案中,本文所述还包括一种Wnt培养系统,所述Wnt培养系统包含(a)最低血清培养基;(b)定位在所述最低血清培养基中的Wnt多肽-伴侣蛋白复合物;和(c)来自用编码所述Wnt多肽的第一表达载体和编码所述伴侣蛋白的第二表达载体转染的经工程改造细胞系的细胞;其中所述Wnt多肽和所述伴侣蛋白在所述细胞中共表达,并且使所述细胞在所述最低血清培养基存在下生长。

[0060] Wnt多肽

[0061] Wnt多肽或蛋白形成高度保守的分泌型信号传导分子的家族,所述信号传导分子在胚胎发生期间调控细胞与细胞相互作用。在一些实施方案中,Wnt多肽包括Wnt1、Wnt2、Wnt2B(或Wnt13)、Wnt3、Wnt3A、Wnt4、Wnt5A、Wnt5B、Wnt6、Wnt7A、Wnt7B、Wnt8A、Wnt8B、Wnt9A(Wnt14或Wnt14B)、Wnt9B(Wnt14B或Wnt15)、Wnt10A、Wnt10B(或Wnt12)、Wnt11、Wnt-16A和Wnt-16B多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽选自Wnt3A多肽、Wnt5A多肽和Wnt10B多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt5A多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt10B多肽。当在本文中使用时,术语“Wnt”或“Wnt基因产物”或“Wnt

多肽”涵盖天然序列Wnt多肽、Wnt多肽变体、Wnt多肽片段和嵌合Wnt多肽。

[0062] “天然序列”多肽是与源于自然界的Wnt多肽具有相同氨基酸序列的多肽。所述天然序列多肽可从产生内源性Wnt蛋白的细胞分离,或可通过重组或合成手段产生。因此,天然序列多肽可具有例如天然存在的人多肽、鼠多肽、或来自任何其他哺乳动物物种或来自非哺乳动物物种例如果蝇(*Drosophila*)、秀丽隐杆线虫(*C.elegans*)等的多肽的氨基酸序列。

[0063] 术语“天然序列Wnt多肽”包括不限于Wnt1、Wnt2、Wnt2B(或Wnt13)、Wnt3、Wnt3A、Wnt4、Wnt5A、Wnt5B、Wnt6、Wnt7A、Wnt7B、Wnt8A、Wnt8B、Wnt9A(Wnt14或Wnt14B)、Wnt9B(Wnt14B或Wnt15)、Wnt10A、Wnt10B(或Wnt12)、Wnt11、Wnt-16A和Wnt-16B多肽。在一些情况下,术语“天然序列Wnt多肽”包括人Wnt多肽。在一些情况下,人Wnt多肽包括人Wnt1、Wnt2、Wnt2B(或Wnt13)、Wnt3、Wnt3A、Wnt4、Wnt5A、Wnt5B、Wnt6、Wnt7A、Wnt7B、Wnt8A、Wnt8B、Wnt9A(Wnt14或Wnt14B)、Wnt9B(Wnt14B或Wnt15)、Wnt10A、Wnt10B(或Wnt12)、Wnt11、Wnt-16A和Wnt-16B多肽。在一些情况下,人Wnt多肽是人Wnt3A多肽。在一些情况下,人Wnt多肽是人Wnt5A。在额外情况下,人Wnt多肽是人Wnt10B。

[0064] 在一些情况下,Wnt1通过GenBank参考号NP005421.1和AAH74799.1来提及。Wnt2通过GenBank参考号NP003382.1和AAH78170.1来提及。一般来说,Wnt2在脑的丘脑中,在胎儿肺与成人肺两者中,或在胎盘中表达。Wnt2B具有两种亚型,并且它们的GenBank参考号分别是NP004176.2和NP078613.1。在一些情况下,亚型1在成人心脏、脑、胎盘、肺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠和/或结肠中表达。在成人脑中,它主要见于尾状核、底丘脑核和丘脑中。在一些情况下,它还在胎儿脑、肺和肾中被检测到。在一些情况下,亚型2在胎儿脑、胎儿肺、胎儿肾、尾状核、睾丸和/或癌细胞系中表达。

[0065] Wnt3和Wnt3A在发育神经管的形态发生期间在细胞-细胞信号传导中起独特作用。在一些情况下,人Wnt3的mRNA序列具有GenBank参考号AB067628.1,并且人Wnt3的蛋白质序列具有GenBank参考号BAB70502.1。人Wnt3A的mRNA序列具有GenBank参考号AB060284.1,并且人Wnt3A的蛋白质序列具有GenBank编号BAB61052.1和AAI03924.1。另外,人Wnt3A具有GenBank登录号BC103922和登录号BC103921。在一些情况下,术语“天然序列Wnt蛋白”或“天然序列Wnt多肽”包括具有或不具有起始N末端甲硫氨酸(Met)以及具有或不具有天然信号序列的Wnt3A天然多肽(例如具有登录号BAB61052.1和AAI03924.1的多肽)。在一些情况下,所述术语包括具有或不具有它的N末端甲硫氨酸(Met)以及具有或不具有天然信号序列的SEQ ID NO:2的具有352个氨基酸的天然人Wnt3A多肽。

[0066] 在一些实施方案中,Wnt4具有GenBank参考号NP110388.2和BAC23080.1。Wnt5A具有GenBank参考号NP003383.1和NP003383.2。Wnt5B具有GenBank参考号BAB62039.1和AAG38659。Wnt6具有GenBank参考号NP006513.1和BAB55603.1。Wnt7A具有GenBank参考号NP004616.2和BAA82509.1。在一些情况下,它在胎盘、肾、睾丸、子宫、胎儿肺、胎儿脑或成人脑中表达。Wnt7B具有GenBank参考号NP478679.1和BAB68399.1。在一些情况下,它在胎儿脑、肺和/或肾中,或在成人脑、肺和/或前列腺中表达。Wnt8A具有至少两种选择性转录物,具有GenBank参考号NP114139.1和NP490645.1。Wnt8B在前脑中表达。它具有GenBank参考号NP003384.1。Wnt10A具有GenBank参考号AAG45153和NP079492.2。Wnt10B在大多数成人组织中被检测到,其中在心脏和骨骼肌中的水平最高。它具有GenBank参考号NP003385.2。在一

些情况下,Wnt11在胎儿肺、肾、成人心脏、肝、骨骼肌和胰腺中表达。它具有GenBank参考号NP004617.2。Wnt14具有GenBank参考号NP003386.1。Wnt15在胎儿肾或成人肾中表达,或在脑中表达。它具有GenBank参考号NP003387.1。Wnt16具有通过选择性剪接产生的两种亚型Wnt-16A和Wnt-16B。亚型Wnt-16A在胰腺中表达。亚型Wnt-16B在外周淋巴器官诸如脾、阑尾和淋巴结中,或在肾中表达,但不在骨髓中表达。Wnt16A和Wnt16B的GenBank参考号分别是NP476509.1和NP057171.2。列出的所有GenBank、SwissProt和其他数据库序列都以引用的方式明确并入本文。

[0067] “变异”多肽意指如下定义的与天然序列多肽具有小于100%序列同一性的生物活性多肽。所述变体包括其中在天然序列的N末端或C末端或内部添加一个或多个氨基酸残基;约一个至四十个氨基酸残基被缺失,以及任选地被一个或多个氨基酸残基取代的多肽;以及以上多肽的衍生物,其中氨基酸残基已被共价修饰以致所得产物具有非天然存在的氨基酸。

[0068] 在一些情况下,生物活性Wnt变体具有与天然序列Wnt多肽具有至少约80%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,生物活性Wnt变体具有与天然序列Wnt多肽具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、96%、97%或99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,生物活性Wnt变体具有与天然序列Wnt多肽具有至少约95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,生物活性Wnt变体具有与天然序列Wnt多肽具有至少约99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,生物活性Wnt变体是Wnt3A、Wnt5A或Wnt10B。在一些实施方案中,生物活性Wnt变体是Wnt3A变体,例如所述Wnt3A变体的氨基酸序列与Wnt3A的天然序列具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、96%、97%或99%氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,生物活性Wnt变体是人Wnt3A变体。

[0069] 在一些实施方案中,生物活性Wnt变体是截短Wnt多肽。在一些情况下,截短从N末端进行。在其他情况下,截短从C末端进行。在一些情况下,Wnt多肽被截短了5个至40个之间的氨基酸、5个至35个之间的氨基酸、10个至35个之间的氨基酸、10个至33个之间的氨基酸、10个至30个之间的氨基酸、15个至33个之间的氨基酸、15个至30个之间的氨基酸、20个至35个之间的氨基酸、20个至33个之间的氨基酸、20个至30个之间的氨基酸、25个至33个之间的氨基酸、或25个至30个之间的氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽在C末端被截短了5个至40个之间的氨基酸、5个至35个之间的氨基酸、10个至35个之间的氨基酸、10个至33个之间的氨基酸、10个至30个之间的氨基酸、15个至33个之间的氨基酸、15个至30个之间的氨基酸、20个至35个之间的氨基酸、20个至33个之间的氨基酸、20个至30个之间的氨基酸、25个至33个之间的氨基酸、或25个至30个之间的氨基酸。在一些情况下,截短Wnt多肽是截短Wnt3A多肽、截短Wnt5A多肽或截短Wnt10B多肽。

[0070] 在一些实施方案中,Wnt多肽在C末端被截短了1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽在C末端被截短了5个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽在C末端被截短了10个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽在C末端被截短了15个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽在C末端被截短了20个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽在C末端被截短了25个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt

多肽在C末端被截短了30个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽在C末端被截短了31个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽在C末端被截短了32个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽在C末端被截短了33个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽在C末端被截短了34个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽在C末端被截短了35个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt多肽另外在N末端被截短,条件是多肽维持生物活性。在一些情况下,截短Wnt多肽是截短Wnt3A多肽、截短Wnt5A多肽或截短Wnt10B多肽。

[0071] 在一些实施方案中,截短Wnt多肽是截短Wnt3A多肽。在一些情况下,截短从N末端进行。在其他情况下,截短从C末端进行。在一些情况下,Wnt3A多肽被截短了5个至40个之间的氨基酸、5个至35个之间的氨基酸、10个至35个之间的氨基酸、10个至33个之间的氨基酸、10个至30个之间的氨基酸、15个至33个之间的氨基酸、15个至30个之间的氨基酸、20个至35个之间的氨基酸、20个至33个之间的氨基酸、20个至30个之间的氨基酸、25个至33个之间的氨基酸、或25个至30个之间的氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了5个至40个之间的氨基酸、5个至35个之间的氨基酸、10个至35个之间的氨基酸、10个至33个之间的氨基酸、10个至30个之间的氨基酸、15个至33个之间的氨基酸、15个至30个之间的氨基酸、20个至35个之间的氨基酸、20个至33个之间的氨基酸、20个至30个之间的氨基酸、25个至33个之间的氨基酸、或25个至30个之间的氨基酸。

[0072] 在一些实施方案中,Wnt3A多肽在C末端被截短了1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了5个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了10个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了15个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了20个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了25个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了30个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了31个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了32个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了33个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了34个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽在C末端被截短了35个或更多个氨基酸。在一些情况下,Wnt3A多肽另外在N末端被截短,条件是多肽维持生物活性。

[0073] 在一些情况下,生物活性Wnt变体在一个或多个氨基酸位置处包含脂质修饰。在一些情况下,脂质修饰在Wnt变体上等同于SEQ ID NO:1中阐述的位置209的位置处。在一些情况下,Wnt变体是Wnt3A、Wnt5A或Wnt 10B。在一些情况下,Wnt变体是Wnt3A。在一些情况下,Wnt3A变体在等同于SEQ ID NO:1中阐述的残基209的位置处包含脂质修饰。在一些情况下,Wnt多肽被脂肪酸例如饱和脂肪酸或不饱和脂肪酸修饰。在一些情况下,Wnt多肽被不饱和脂肪酸(例如单不饱和脂肪酸诸如棕榈油酸)修饰。在其他情况下,Wnt多肽被饱和脂肪酸(例如棕榈酸)修饰。在额外情况下,Wnt多肽被棕榈酸修饰。在一些情况下,修饰是棕榈酰化。在一些情况下,Wnt3A变体是截短Wnt3A多肽,所述截短Wnt3A多肽在等同于SEQ ID NO:1中阐述的残基209的位置处包含脂质修饰(例如饱和脂肪酸修饰诸如棕榈酸)。

[0074] 在一些情况下,生物活性Wnt变体还包含通过糖基化修饰的残基。在一些情况下,修饰存在于等同于SEQ ID NO:1中阐述的位置82和/或298的位置处。在一些情况下,Wnt变

体是Wnt3A、Wnt5A或Wnt 10B。在一些情况下，Wnt变体是Wnt3A。在一些情况下，Wnt3A变体还包含通过糖基化修饰的残基。在一些情况下，Wnt3A变体还在等同于SEQ ID NO:1中阐述的残基82和/或残基298的一个或多个位置处包含糖基化残基。在一些情况下，Wnt3A变体是截短Wnt3A多肽。

[0075] 在一些实施方案中，生物活性Wnt变体还包含标签。在一些情况下，标签是亲和标签。在其他情况下，标签是表位标签。本文所述的示例性标签包括但不限于多组氨酸标签、PA标签、FLAG标签、人流感血凝素 (HA) 标签、Myc标签、谷胱甘肽-S转移酶 (GST)、钙调蛋白 (calmodulin) 结合蛋白 (CBP)、麦芽糖结合蛋白 (MBP)、ABDz1标签 (白蛋白)、HaloTag®、肝素结合肽 (HB) 标签、多Arg标签、多Lys标签、S标签、Strep-II标签和SUMO标签。在一些情况下，多组氨酸标签以串联方式包含约6至12、约6至10或约6至8个组氨酸残基。在一些情况下，多组氨酸标签以串联方式包含约6至10个组氨酸残基。在一些情况下，多组氨酸标签以串联方式包含约6至8个组氨酸残基。在一些情况下，多组氨酸标签包含约10个组氨酸残基 (10xHis (SEQ ID NO:20))。在一些情况下，多组氨酸标签包含约6个组氨酸残基 (6xHis (SEQ ID NO:19))。在一些情况下，PA标签包含由抗人平足蛋白 (podoplanin) 抗体NZ-1识别的十二肽。在一些情况下，十二肽包含序列GVAMPGAEDDVV (SEQ ID NO:21)。在一些情况下，FLAG标签是小肽标签，并且任选地包含序列DYKDDDDK (SEQ ID NO:22)。在一些情况下，HA标签源于促进流感病毒感染它的宿主的能力的表面糖蛋白，并且任选地包含序列YPYDVPDYA (SEQ ID NO:23)。在一些情况下，Myc标签源于由c-Myc基因编码的Myc蛋白，并且任选地包含序列EQKLISEEDL (SEQ ID NO:24)。在一些情况下，Wnt变体是Wnt3A、Wnt5A或Wnt 10B。在一些情况下，Wnt变体是Wnt3A。在一些情况下，Wnt3A变体是截短Wnt3A多肽。

[0076] 在一些实施方案中，标签直接连接于生物活性Wnt变体。在所述情况下，标签直接连接于生物活性Wnt变体的N末端。在其他情况下，标签直接连接于生物活性Wnt变体的C末端。在一些情况下，Wnt变体是Wnt3A、Wnt5A或Wnt 10B。在一些情况下，Wnt变体是Wnt3A。在一些情况下，Wnt3A变体是截短Wnt3A多肽。

[0077] 在一些实施方案中，标签通过接头间接连接于生物活性Wnt变体。在一些情况下，接头是可裂解接头，包括例如凝血酶 (thrombin)、因子Xa、TEV、或肠激酶多肽基序。在一些情况下，凝血酶可裂解接头包含LVPRGS (SEQ ID NO:25) 识别基序。在一些情况下，因子Xa接头包含共有位点I- (E/D) -G-R。在一些情况下，TEV接头包含共有位点E-N-L-Y-F-Q- (G/S) (SEQ ID NO:26)。在一些情况下，肠激酶接头包含基序DDDDK (SEQ ID NO:27)。在一些情况下，标签通过接头间接连接于生物活性Wnt变体的C末端。在其他情况下，标签通过接头间接连接于生物活性Wnt变体的N末端。在一些情况下，Wnt变体是Wnt3A、Wnt5A或Wnt 10B。在一些情况下，Wnt变体是Wnt3A。在一些情况下，Wnt3A变体是截短Wnt3A多肽。

[0078] 在一些情况下，接头是非可裂解接头。在一些情况下，非可裂解接头包括例如多甘氨酸残基、多丙氨酸残基、或甘氨酸和丙氨酸残基的组合。示例性非可裂解接头包括但不限于GGG、GGGGG (SEQ ID NO:28) 和GGGGAGGGG (SEQ ID NO:29)。在一些情况下，Wnt变体是Wnt3A、Wnt5A或Wnt 10B。在一些情况下，Wnt变体是Wnt3A。在一些情况下，Wnt3A变体是截短Wnt3A多肽。

[0079] 在一些情况下，生物活性Wnt变体包含一个或多个标签 (例如2、3、4、5个或更多个标签)。在一些情况下，一个或多个标签直接或通过接头间接连接于生物活性Wnt变体的N末

端,并且任选地,一个或多个额外标签直接或通过接头间接连接于生物活性Wnt变体的C末端。在一个实施方案中,生物活性Wnt变体的N末端包含多组氨酸标签(例如通过接头以间接方式),并且生物活性Wnt变体的C末端包含额外标签。在另一实施方案中,生物活性Wnt变体的C末端包含多组氨酸标签(例如通过接头以间接方式),并且生物活性Wnt变体的N末端包含额外标签。在一些情况下,Wnt变体是Wnt3A、Wnt5A或Wnt10B。在一些情况下,Wnt变体是Wnt3A。在一些情况下,Wnt3A变体是截短Wnt3A多肽。

[0080] 术语“氨基酸”是指含有氨基与羧基两者的分子。适合氨基酸包括但不限于天然存在的氨基酸以及通过有机合成或其他代谢途径制备的非天然存在的氨基酸的D-异构体与L-异构体两者。如本文所用的术语氨基酸包括不限于 α -氨基酸、天然氨基酸、非天然氨基酸和氨基酸类似物。

[0081] 术语“ α -氨基酸”是指含有结合于指定为 α -碳的碳的氨基与羧基两者的分子。

[0082] 术语“ β -氨基酸”是指呈 β 构型的含有氨基与羧基两者的分子。

[0083] 术语“天然存在的氨基酸”是指通常见于在自然界中合成的肽中,并且通过单字母缩写A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y和V而得知的二十种氨基酸中的任一者。

[0084] 下表1显示天然氨基酸的性质的概述:

	3-	1-	侧	侧链	
	字母	字母	链	电荷	亲水性
[0085] 氨基酸	代码	代码	极性	(pH 7.4)	指数
丙氨酸	Ala	A	非极性	中性	1.8
精氨酸	Arg	R	极性	正性	-4.5

[0086]

天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	-3.5
天冬氨酸	Asp	D	极性	负性	-3.5
半胱氨酸	Cys	C	极性	中性	2.5
谷氨酸	Glu	E	极性	负性	-3.5
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	-3.5
甘氨酸	Gly	G	非极性	中性	-0.4
组氨酸	His	H	极性	正性 (10%)	-3.2
				中性 (90%)	
异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性	4.5
亮氨酸	Leu	L	非极性	中性	3.8
赖氨酸	Lys	K	极性	正性	-3.9
甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性	1.9
苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性	2.8
脯氨酸	Pro	P	非极性	中性	-1.6
丝氨酸	Ser	S	极性	中性	-0.8
苏氨酸	Thr	T	极性	中性	-0.7
色氨酸	Trp	W	非极性	中性	-0.9
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	-1.3
缬氨酸	Val	V	非极性	中性	4.2

[0087] “疏水性氨基酸”包括小疏水性氨基酸和大疏水性氨基酸。“小疏水性氨基酸”是甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸和它们的类似物。“大疏水性氨基酸”是缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸和它们的类似物。“极性氨基酸”是丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、酪氨酸和它们的类似物。“带电荷氨基酸”是赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和它们的类似物。

[0088] 术语“氨基酸类似物”是指在结构上类似于氨基酸,并且可在形成肽模拟大环时取代氨基酸的分子。氨基酸类似物包括不限于 β -氨基酸和其中氨基或羧基被具有类似反应性的基团取代(例如用仲胺或叔胺取代伯胺,或用酯取代羧基)的氨基酸。

[0089] 术语“非天然氨基酸”是指不是通常见于在自然界中合成的肽中,并且通过单字母缩写A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y和V而得知的二十种氨基酸中的一者的氨基酸。非天然氨基酸或氨基酸类似物包括不限于以下氨基酸类似物。

[0090] 氨基酸类似物包括 β -氨基酸类似物。 β -氨基酸类似物的实例包括但不限于以下:环状 β -氨基酸类似物; β -丙氨酸;(R)- β -苯丙氨酸;(R)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-乙酸;(R)-3-氨基-4-(1-萘基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2,4-二氯苯基)丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-氯苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-氰基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-氟苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-呋喃基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-萘基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-噻吩基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-三氟甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨

基-4-(3,4-二氯苯基)丁酸;(R)-3-氨基-4-(3,4-二氟苯基)丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-苯并噻吩基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-氯苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-氰基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-氟苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-吡啶基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-噻吩基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-三氟甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-溴苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-氯苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-氰基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-氟苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-碘苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-硝基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-吡啶基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-三氟甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-五氟-苯基丁酸;(R)-3-氨基-5-己烯酸;(R)-3-氨基-5-己炔酸;(R)-3-氨基-5-苯基戊酸;(R)-3-氨基-6-苯基-5-己烯酸;(S)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-乙酸;(S)-3-氨基-4-(1-萘基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2,4-二氯苯基)丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-氯苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-氰基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-氟苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-呋喃基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-萘基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-噻吩基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-三氟甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3,4-二氯苯基)丁酸;(S)-3-氨基-4-(3,4-二氟苯基)丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-苯并噻吩基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-氯苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-氰基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-氟苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-吡啶基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-噻吩基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-三氟甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-溴苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-氯苯基)丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-氰基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-氟苯基)丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-碘苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-硝基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-吡啶基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-三氟甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-五氟-苯基丁酸;(S)-3-氨基-5-己烯酸;(S)-3-氨基-5-己炔酸;(S)-3-氨基-5-苯基戊酸;(S)-3-氨基-6-苯基-5-己烯酸;1,2,5,6-四氢吡啶-3-甲酸;1,2,5,6-四氢吡啶-4-甲酸;3-氨基-3-(2-氯苯基)-丙酸;3-氨基-3-(2-噻吩基)-丙酸;3-氨基-3-(3-溴苯基)-丙酸;3-氨基-3-(4-氯苯基)-丙酸;3-氨基-3-(4-甲氧基苯基)-丙酸;3-氨基-4,4,4-三氟-丁酸;3-氨基己二酸;D-β-苯丙氨酸;β-亮氨酸;L-β-高丙氨酸;L-β-高天冬氨酸γ-苯甲酯;L-β-高谷氨酸δ-苯甲酯;L-β-高异亮氨酸;L-β-高亮氨酸;L-β-高甲硫氨酸;L-β-高苯丙氨酸;L-β-高脯氨酸;L-β-高色氨酸;L-β-高缬氨酸;L-Nω-苯甲基氧基羰基-β-高赖氨酸;Nω-L-β-高精氨酸;O-苯甲基-L-β-高羟基脯氨酸;O-苯甲基-L-β-高丝氨酸;O-苯甲基-L-β-高苏氨酸;O-苯甲基-L-β-高酪氨酸;γ-三苯甲基-L-β-高天冬酰胺;(R)-β-苯丙氨酸;L-β-高天冬氨酸γ-叔丁酯;L-β-高谷氨酸δ-叔丁酯;L-Nω-β-高赖氨酸;Nδ-三苯甲基-L-β-高谷氨酰胺;Nω-2,2,4,6,7-五甲基-二氢苯并呋喃-5-磺酰基-L-β-高精氨酸;O-叔丁基-L-β-高羟基-脯氨酸;O-叔丁基-L-β-高丝氨酸;O-叔丁基-L-β-高苏氨酸;O-叔丁基-L-β-高酪氨酸;2-氨基环戊烷甲酸;和2-氨基环己烷甲酸。

[0091] 氨基酸类似物包括丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸或亮氨酸的类似物。丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸和亮氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下:α-甲氧基甘氨酸;α-烯丙基-L-丙氨酸;α-氨基异丁酸;α-甲基-亮氨酸;β-(1-萘基)-D-丙氨酸;β-(1-萘基)-L-丙氨酸;β-(2-萘基)-D-丙氨酸;β-(2-萘基)-L-丙氨酸;β-(2-吡啶基)-D-丙氨酸;β-(2-吡啶基)-L-丙氨酸;β-(2-噻吩基)-D-丙氨酸;β-(2-噻吩基)-L-丙氨酸;β-(3-苯并噻吩基)-D-丙氨酸;β-

(3-苯并噻吩基)-L-丙氨酸;β-(3-吡啶基)-D-丙氨酸;β-(3-吡啶基)-L-丙氨酸;β-(4-吡啶基)-D-丙氨酸;β-(4-吡啶基)-L-丙氨酸;β-氯-L-丙氨酸;β-氰基-L-丙氨酸;β-环己基-D-丙氨酸;β-环己基-L-丙氨酸;β-环戊烯-1-基-丙氨酸;β-环戊基-丙氨酸;β-环丙基-L-Ala-OH. 二环己铵盐;β-叔丁基-D-丙氨酸;β-叔丁基-L-丙氨酸;γ-氨基丁酸;L-α,β-二氨基丙酸;2,4-二硝基-苯基甘氨酸;2,5-二氢-D-苯基甘氨酸;2-氨基-4,4,4-三氟丁酸;2-氟-苯基甘氨酸;3-氨基-4,4,4-三氟-丁酸;3-氟-缬氨酸;4,4,4-三氟-缬氨酸;4,5-脱氢-L-leu-OH. 二环己铵盐;4-氟-D-苯基甘氨酸;4-氟-L-苯基甘氨酸;4-羟基-D-苯基甘氨酸;5,5,5-三氟-亮氨酸;6-氨基己酸;环戊基-D-Gly-OH. 二环己铵盐;环戊基-Gly-OH. 二环己铵盐;D-α,β-二氨基丙酸;D-α-氨基丁酸;D-α-叔丁基甘氨酸;D-(2-噻吩基)甘氨酸;D-(3-噻吩基)甘氨酸;D-2-氨基己酸;D-2-茛满基甘氨酸;D-烯丙基甘氨酸-二环己铵盐;D-环己基甘氨酸;D-正缬氨酸;D-苯基甘氨酸;β-氨基丁酸;β-氨基异丁酸;(2-溴苯基)甘氨酸;(2-甲氧基苯基)甘氨酸;(2-甲基苯基)甘氨酸;(2-噻唑基)甘氨酸;(2-噻吩基)甘氨酸;2-氨基-3-(二甲基氨基)-丙酸;L-α,β-二氨基丙酸;L-α-氨基丁酸;L-α-叔丁基甘氨酸;L-(3-噻吩基)甘氨酸;L-2-氨基-3-(二甲基氨基)-丙酸;L-2-氨基己酸二环己铵盐;L-2-茛满基甘氨酸;L-烯丙基甘氨酸. 二环己铵盐;L-环己基甘氨酸;L-苯基甘氨酸;L-炔丙基甘氨酸;L-正缬氨酸;N-α-氨基甲基-L-丙氨酸;D-α,γ-二氨基丁酸;L-α,γ-二氨基丁酸;β-环丙基-L-丙氨酸;(N-β-(2,4-二硝基苯基))-L-α,β-二氨基丙酸;(N-β-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)乙基)-D-α,β-二氨基丙酸;(N-β-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)乙基)-L-α,β-二氨基丙酸;(N-β-4-甲基三苯甲基)-L-α,β-二氨基丙酸;(N-β-烯丙基氧基羰基)-L-α,β-二氨基丙酸;(N-γ-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)乙基)-D-α,γ-二氨基丁酸;(N-γ-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)乙基)-L-α,γ-二氨基丁酸;(N-γ-4-甲基三苯甲基)-D-α,γ-二氨基丁酸;(N-γ-4-甲基三苯甲基)-L-α,γ-二氨基丁酸;(N-γ-烯丙基氧基羰基)-L-α,γ-二氨基丁酸;D-α,γ-二氨基丁酸;4,5-脱氢-L-亮氨酸;环戊基-D-Gly-OH;环戊基-Gly-OH;D-烯丙基甘氨酸;D-高环己基丙氨酸;L-1-苊基丙氨酸;L-2-氨基己酸;L-烯丙基甘氨酸;L-高环己基丙氨酸;和N-(2-羟基-4-甲氧基-Bzl)-Gly-OH.

[0092] 氨基酸类似物包括精氨酸或赖氨酸的类似物。精氨酸和赖氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下:瓜氨酸;L-2-氨基-3-胍基丙酸;L-2-氨基-3-脒基丙酸;L-瓜氨酸;Lys(Me)₂-OH;Lys(N₃)-OH;Nδ-苯甲基氧基羰基-L-鸟氨酸;Nω-硝基-D-精氨酸;Nω-硝基-L-精氨酸;α-甲基-鸟氨酸;2,6-二氨基庚二酸;L-鸟氨酸;(Nδ-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代-环己-1-亚基)乙基)-D-鸟氨酸;(Nδ-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代-环己-1-亚基)乙基)-L-鸟氨酸;(Nδ-4-甲基三苯甲基)-D-鸟氨酸;(Nδ-4-甲基三苯甲基)-L-鸟氨酸;D-鸟氨酸;L-鸟氨酸;Arg(Me)(Pbf)-OH;Arg(Me)₂-OH(不对称);Arg(Me)₂-OH(对称);Lys(ivDde)-OH;Lys(Me)₂-OH.HCl;Lys(Me)₃-OH氯化物;Nω-硝基-D-精氨酸;和Nω-硝基-L-精氨酸。

[0093] 氨基酸类似物包括天冬氨酸或谷氨酸的类似物。天冬氨酸和谷氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下:α-甲基-D-天冬氨酸;α-甲基-谷氨酸;α-甲基-L-天冬氨酸;γ-亚甲基-谷氨酸;(N-γ-乙基)-L-谷氨酰胺;[N-α-(4-氨基苯甲酰基)]-L-谷氨酸;2,6-二氨基庚二酸;L-α-氨基辛二酸;D-2-氨基己二酸;D-α-氨基辛二酸;α-氨基庚二酸;亚氨基二乙酸;L-2-氨基己二酸;苏式-β-甲基-天冬氨酸;γ-羧基-D-谷氨酸γ,γ-二叔丁酯;γ-

羧基-L-谷氨酸 γ , γ -二叔丁酯;Glu(OAll)-OH;L-Asu(OtBu)-OH;和焦谷氨酸。

[0094] 氨基酸类似物包括半胱氨酸和甲硫氨酸的类似物。半胱氨酸和甲硫氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于Cys(法尼基)-OH、Cys(法尼基)-OMe、 α -甲基-甲硫氨酸、Cys(2-羟基乙基)-OH、Cys(3-氨基丙基)-OH、2-氨基-4-(乙基硫基)丁酸、丁硫氨酸、丁硫氨酸亚砷亚胺、乙硫氨酸、甲硫氨酸甲基氯化硫、硒代甲硫氨酸、磺基丙氨酸、[2-(4-吡啶基)乙基]-DL-青霉胺、[2-(4-吡啶基)乙基]-L-半胱氨酸、4-甲氧基苯甲基-D-青霉胺、4-甲氧基苯甲基-L-青霉胺、4-甲基苯甲基-D-青霉胺、4-甲基苯甲基-L-青霉胺、苯甲基-D-半胱氨酸、苯甲基-L-半胱氨酸、苯甲基-DL-高半胱氨酸、氨基甲酰基-L-半胱氨酸、羧基乙基-L-半胱氨酸、羧基甲基-L-半胱氨酸、二苯基甲基-L-半胱氨酸、乙基-L-半胱氨酸、甲基-L-半胱氨酸、叔丁基-D-半胱氨酸、三苯基甲基-L-高半胱氨酸、三苯基甲基-D-青霉胺、胱硫醚、高胱氨酸、L-高胱氨酸、(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸、硒代-L-胱氨酸、胱硫醚、Cys(StBu)-OH和乙酰胺基甲基-D-青霉胺。

[0095] 氨基酸类似物包括苯丙氨酸和酪氨酸的类似物。苯丙氨酸和酪氨酸的氨基酸类似物的实例包括 β -甲基-苯丙氨酸、 β -羟基苯丙氨酸、 α -甲基-3-甲氧基-DL-苯丙氨酸、 α -甲基-D-苯丙氨酸、 α -甲基-L-苯丙氨酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸、2,4-二氯-苯丙氨酸、2-(三氟甲基)-D-苯丙氨酸、2-(三氟甲基)-L-苯丙氨酸、2-溴-D-苯丙氨酸、2-溴-L-苯丙氨酸、2-氯-D-苯丙氨酸、2-氯-L-苯丙氨酸、2-氰基-D-苯丙氨酸、2-氰基-L-苯丙氨酸、2-氟-D-苯丙氨酸、2-氟-L-苯丙氨酸、2-甲基-D-苯丙氨酸、2-甲基-L-苯丙氨酸、2-硝基-D-苯丙氨酸、2-硝基-L-苯丙氨酸、2,4;5-tri羟基-苯丙氨酸、3,4,5-三氟-D-苯丙氨酸、3,4,5-三氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-D-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、3,4-二氟-D-苯丙氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二羟基-L-苯丙氨酸、3,4-二甲氧基-L-苯丙氨酸、3,5,3'-三碘-L-甲状腺原氨酸、3,5-二碘-D-酪氨酸、3,5-二碘-L-酪氨酸、3,5-二碘-L-甲状腺原氨酸、3-(三氟甲基)-D-苯丙氨酸、3-(三氟甲基)-L-苯丙氨酸、3-氨基-L-酪氨酸、3-溴-D-苯丙氨酸、3-溴-L-苯丙氨酸、3-氯-D-苯丙氨酸、3-氯-L-苯丙氨酸、3-氯-L-酪氨酸、3-氰基-D-苯丙氨酸、3-氰基-L-苯丙氨酸、3-氟-D-苯丙氨酸、3-氟-L-苯丙氨酸、3-氟-酪氨酸、3-碘-D-苯丙氨酸、3-碘-L-苯丙氨酸、3-碘-L-酪氨酸、3-甲氧基-L-酪氨酸、3-甲基-D-苯丙氨酸、3-甲基-L-苯丙氨酸、3-硝基-D-苯丙氨酸、3-硝基-L-苯丙氨酸、3-硝基-L-酪氨酸、4-(三氟甲基)-D-苯丙氨酸、4-(三氟甲基)-L-苯丙氨酸、4-氨基-D-苯丙氨酸、4-氨基-L-苯丙氨酸、4-苯甲酰基-D-苯丙氨酸、4-苯甲酰基-L-苯丙氨酸、4-双(2-氯乙基)氨基-L-苯丙氨酸、4-溴-D-苯丙氨酸、4-溴-L-苯丙氨酸、4-氯-D-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、4-氰基-D-苯丙氨酸、4-氰基-L-苯丙氨酸、4-氟-D-苯丙氨酸、4-氟-L-苯丙氨酸、4-碘-D-苯丙氨酸、4-碘-L-苯丙氨酸、高苯丙氨酸、甲状腺氨酸、3,3-二苯丙氨酸、甲状腺原氨酸、乙基-酪氨酸和甲基-酪氨酸。

[0096] 氨基酸类似物包括脯氨酸的类似物。脯氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于3,4-脱氢-脯氨酸、4-氟-脯氨酸、顺式-4-羟基-脯氨酸、噻唑烷-2-甲酸和反式-4-氟-脯氨酸。

[0097] 氨基酸类似物包括丝氨酸和苏氨酸的类似物。丝氨酸和苏氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于3-氨基-2-羟基-5-甲基己酸、2-氨基-3-羟基-4-甲基戊酸、2-氨基-3-乙氧基丁酸、2-氨基-3-甲氧基丁酸、4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸、2-氨基-3-苯甲基氧基丙

酸、2-氨基-3-苯甲基氧基丙酸、2-氨基-3-乙氧基丙酸、4-氨基-3-羟基丁酸和 α -甲基丝氨酸。

[0098] 氨基酸类似物包括色氨酸的类似物。色氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下： α -甲基-色氨酸； β -(3-苯并噻吩基)-D-丙氨酸； β -(3-苯并噻吩基)-L-丙氨酸；1-甲基-色氨酸；4-甲基-色氨酸；5-苯甲基氧基-色氨酸；5-溴-色氨酸；5-氯-色氨酸；5-氟-色氨酸；5-羟基-色氨酸；5-羟基-L-色氨酸；5-甲氧基-色氨酸；5-甲氧基-L-色氨酸；5-甲基-色氨酸；6-溴-色氨酸；6-氯-D-色氨酸；6-氯-色氨酸；6-氟-色氨酸；6-甲基-色氨酸；7-苯甲基氧基-色氨酸；7-溴-色氨酸；7-甲基-色氨酸；D-1,2,3,4-四氢-去甲哈尔满-3-甲酸；6-甲氧基-1,2,3,4-四氢去甲哈尔满-1-甲酸；7-氮杂色氨酸；L-1,2,3,4-四氢-去甲哈尔满-3-甲酸；5-甲氧基-2-甲基-色氨酸；和6-氯-L-色氨酸。

[0099] 在一些实施方案中，氨基酸类似物是外消旋的。在一些实施方案中，使用氨基酸类似物的D异构体。在一些实施方案中，使用氨基酸类似物的L异构体。在其他实施方案中，氨基酸类似物包含呈R或S构型的手性中心。在其他实施方案中， β -氨基酸类似物的一个或多个氨基被保护基例如叔丁基氧基羰基(BOC基团)、9-苄基甲基氧基羰基(FMOC)、甲苯磺酰基等取代。在其他实施方案中，对 β -氨基酸类似物的羧酸官能团进行保护，例如保护成它的酯衍生物。在一些实施方案中，使用氨基酸类似物的盐。

[0100] “非必需”氨基酸残基是可从多肽的野生型序列加以改变而不消除或实质上改变所述多肽的基本生物学或生物化学活性(例如受体结合或活化)的残基。“必需”氨基酸残基是当从多肽的野生型序列加以改变时，导致消除或实质上消除所述多肽的基本生物学或生物化学活性的残基。

[0101] “保守性氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸取代。本领域中已定义具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如K、R、H)、具有酸性侧链的氨基酸(例如D、E)、具有不带电荷极性侧链的氨基酸(例如G、N、Q、S、T、Y、C)、具有非极性侧链的氨基酸(例如A、V、L、I、P、F、M、W)、具有 β 分支侧链的氨基酸(例如T、V、I)和具有芳族侧链的氨基酸(例如Y、F、W、H)。因此，多肽中的所预测非必需氨基酸残基例如用来自同一侧链家族的另一氨基酸残基替换。可接受的取代的其他实例是基于电子等排考虑(例如正亮氨酸取代甲硫氨酸)或其他性质(例如2-噻吩基丙氨酸取代苯丙氨酸，或6-Cl-色氨酸取代色氨酸)的取代。

[0102] 在无血清条件下培养Wnt多肽

[0103] 在一些实施方案中，本文公开在无血清条件下产生Wnt多肽的方法。在一些实施方案中，Wnt多肽与伴侣蛋白共表达。在一些情况下，Wnt多肽与共表达的伴侣蛋白形成复合物，并且Wnt多肽-伴侣蛋白复合物使Wnt多肽稳定，并且使Wnt多肽表达增强。在一些情况下，Wnt多肽是生物活性Wnt多肽(例如人生物活性Wnt多肽)。在一些情况下，Wnt多肽是Wnt3A、Wnt5A或Wnt10B多肽。在一些情况下，Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下，Wnt多肽是人Wnt3A多肽。在一些情况下，Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0104] 在一些情况下，本文所述的伴侣蛋白包括促进大分子结构的装配或解装配的蛋白质或其片段。在一些情况下，伴侣蛋白包括促进分泌、表达、稳定性和/或纯化的蛋白质或其片段。如本文在Wnt多肽的情形下所用，伴侣蛋白包括促进Wnt多肽的分泌、表达、稳定性和/

或纯化的蛋白质或其片段。此外,如本文在Wnt多肽的情形下所用,伴侣蛋白是与Wnt多肽在来自经工程改造细胞系的细胞中共表达的蛋白质或其片段。在所述情况下,培养条件是无血清条件。

[0105] 在一些实施方案中,本文所述的伴侣蛋白包括卷曲蛋白、Wntless、Afrin或Porcupine。在一些情况下,伴侣蛋白包括卷曲蛋白。卷曲蛋白是一个家族的在Wnt信号传导路径中充当受体的G蛋白偶联受体蛋白质。在一些情况下,在这个家族中有十个成员,即卷曲蛋白-1(FZD1)、卷曲蛋白-2(FZD2)、卷曲蛋白-3(FZD3)、卷曲蛋白-4(FZD4)、卷曲蛋白-5(FZD5)、卷曲蛋白-6(FZD6)、卷曲蛋白-7(FZD7)、卷曲蛋白-8(FZD8)、卷曲蛋白-9(FZD9)和卷曲蛋白-10(FZD10)。在一些情况下,卷曲蛋白与Wnt多肽共表达,从而形成例如1:1复合物。在一些情况下,选自FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9和FZD10的卷曲蛋白与Wnt多肽共表达。在一些情况下,相对于在不存在卷曲蛋白下的Wnt多肽,与Wnt多肽共表达的所述卷曲蛋白使所述Wnt多肽的分泌改进,使所述Wnt多肽稳定,和/或使所述Wnt多肽的表达增强。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。

[0106] 在一些实施方案中,伴侣蛋白包括卷曲蛋白-8(FZD8)。由FZD8基因编码的卷曲蛋白-8是七跨膜结构域蛋白质,并且是Wnt多肽的受体。在一些情况下,FZD8与Wnt多肽共表达。在一些情况下,FZD8与Wnt多肽的摩尔比是1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1或4:1。在一些情况下,FZD8与Wnt多肽的摩尔比是1:4。在一些情况下,FZD8与Wnt多肽的摩尔比是1:2。在一些情况下,FZD8与Wnt多肽的摩尔比是1:1。在一些情况下,FZD8与Wnt多肽的摩尔比是2:1。在一些情况下,FZD8与Wnt多肽的摩尔比是4:1。在一些情况下,相对于在不存在FZD8下的Wnt多肽,与Wnt多肽共表达的FZD8使所述Wnt多肽的分泌改进,使所述Wnt多肽稳定,并且使所述Wnt多肽的表达增强。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。

[0107] 在一些情况下,人卷曲蛋白-8(NCBI参考序列:NP_114072.1;SEQ ID NO:4)在长度方面包含694个氨基酸。在一些情况下,卷曲蛋白-8包含27个氨基酸的信号序列、248个氨基酸的细胞外N末端、以及89个氨基酸的C末端。在一些情况下,N末端还包含两个推定N连接的糖基化位点,即多脯氨酸区段和多甘氨酸区段。此外,N末端包含在长度方面是约120个氨基酸的富含半胱氨酸的结构域(CRD)。卷曲蛋白-8的C末端包含Thr-x-Val三肽、Lys-Thr-x-x-Trp基序和在长度方面是25个氨基酸的多甘氨酸重复序列。在一些情况下,人FZD8与Wnt多肽共表达。在一些情况下,人FZD8与Wnt多肽的摩尔比是1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1或4:1。在一些情况下,人FZD8与Wnt多肽的摩尔比是1:4。在一些情况下,人FZD8与Wnt多肽的摩尔比是1:2。在一些情况下,人FZD8与Wnt多肽的摩尔比是1:1。在一些情况下,人FZD8与Wnt多肽的摩尔比是2:1。在一些情况下,人FZD8与Wnt多肽的摩尔比是4:1。在一些情况下,相对于在不存在人FZD8下的Wnt多肽,与Wnt多肽共表达的人FZD8使所述Wnt多肽的分泌改进,使所述Wnt多肽稳定,并且使所述Wnt多肽的表达增强。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。

[0108] 在一些情况下,本文所述的卷曲蛋白-8多肽包含与人卷曲蛋白-8的约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些情况下,本文所述的卷曲蛋白-8多肽包含与SEQ ID NO:4的约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%

或99%序列同一性。在一些情况下,包含与SEQ ID NO:4的约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽共表达。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是例如1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1或4:1。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是1:4。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是1:2。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是1:1。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是2:1。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是4:1。在一些情况下,相对于不存在卷曲蛋白-8蛋白下的Wnt多肽,与Wnt多肽共表达的卷曲蛋白-8蛋白使所述Wnt多肽的分泌改进,使所述Wnt多肽稳定,并且使所述Wnt多肽的表达增强。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。

[0109] 在一些实施方案中,本文所述的伴侣蛋白包括卷曲蛋白-8融合蛋白。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含截短卷曲蛋白-8蛋白。在一些情况下,截短卷曲蛋白-8蛋白包含卷曲蛋白-8的富含半胱氨酸的区域(CRD)。在一些情况下,截短卷曲蛋白-8蛋白包含跨越SEQ ID NO:4的氨基酸残基1至氨基酸残基151的区域。在其他情况下,截短卷曲蛋白-8蛋白包含跨越SEQ ID NO:4的氨基酸残基1至氨基酸残基172的区域。

[0110] 在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白还包含抗体的Fc部分。在一些情况下,抗体选自IgA、IgD、IgE、IgG或IgM。在一些情况下,抗体是IgG。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含截短卷曲蛋白-8蛋白(例如卷曲蛋白-8的CRD部分)和IgG Fc部分。

[0111] 在一些情况下,截短卷曲蛋白-8蛋白直接共价连接于Fc部分。在其他情况下,截短卷曲蛋白-8蛋白通过接头共价连接于Fc部分。在一些情况下,接头包含一系列的甘氨酸、丙氨酸或它们的组合。在一些情况下,接头包含氨基酸序列IEGRMD(SEQ ID NO:6)。

[0112] 在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少80%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少85%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少90%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少95%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少96%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少97%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少98%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的至少99%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:5的100%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白由以SEQ ID NO:5阐述的序列组成。

[0113] 在一些情况下,包含与SEQ ID NO:5的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽共表达。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是例如1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1或4:1。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是1:4。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是1:2。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是1:1。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是2:1。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是4:1。在一些情况下,相对于不存在卷曲蛋白-8蛋白下的Wnt多肽,与Wnt多肽共表达的卷曲蛋白-8

蛋白使所述Wnt多肽的分泌改进,使所述Wnt多肽稳定,并且使所述Wnt多肽的表达增强。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0114] 在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的至少80%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的至少85%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的至少90%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的至少95%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的至少96%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的至少97%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的至少98%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的至少99%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白包含与SEQ ID NO:18的100%序列同一性。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白由以SEQ ID NO:18阐述的序列组成。

[0115] 在一些情况下,包含与SEQ ID NO:18的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽共表达。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是例如1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1或4:1。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是1:4。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是1:2。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是1:1。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是2:1。在一些情况下,卷曲蛋白-8多肽与Wnt多肽的摩尔比是4:1。在一些情况下,相对于不存在卷曲蛋白-8蛋白下的Wnt多肽,与Wnt多肽共表达的卷曲蛋白-8蛋白使所述Wnt多肽的分泌改进,使所述Wnt多肽稳定,并且使所述Wnt多肽的表达增强。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0116] Wntless

[0117] 在一些实施方案中,伴侣蛋白包括Wntless。Wntless,也称为G蛋白偶联受体177 (GPR177)或平滑性打断蛋白同源物(EVI),是一种充当经脂质修饰Wnt蛋白的伴侣蛋白,调控Wnt蛋白的Wnt表达、亚细胞定位、结合和细胞器特异性缔合的多次穿膜跨膜蛋白。人Wntless由Wntless WNT配体分泌介体(WLS)基因(也称为EVI、FLJ23091、mig-14、MRP或Wntless同源物)编码。在一些情况下,人Wntless包括亚型1、2和3。

[0118] 在一些情况下,Wntless与本文所述的Wnt多肽相互作用。在一些情况下,Wntless与本文所述的生物功能性Wnt多肽选择性相互作用。在一些情况下,生物功能性Wnt多肽是经脂质修饰Wnt多肽。

[0119] 在一些情况下,与Wnt多肽共表达的Wntless使Wnt多肽表达增强,使Wnt多肽分泌改进,和/或使Wnt多肽稳定。在一些情况下,这是相对于不存在Wntless下在等同细胞中的Wnt多肽来说的。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。

[0120] 在一些情况下,Wntless多肽包含与SEQ ID NO:7的至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些情况下,包含与SEQ ID NO:7的至少70%、

80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的Wntless多肽与Wnt多肽共表达。在一些情况下,Wntless多肽与Wnt多肽的摩尔比是例如1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1或4:1。在一些情况下,与Wnt多肽共表达的Wntless多肽使Wnt多肽表达增强,使Wnt多肽分泌改进,和/或使Wnt多肽稳定。在一些情况下,这是相对于在不存在Wntless下在等同细胞中的Wnt多肽来说的。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0121] Afamin

[0122] 在一些实施方案中,伴侣蛋白包括Afamin。Afamin,作为一种血清糖蛋白,是白蛋白基因家族的成员,并且由AFM基因编码。在一些情况下,Afamin与本文所述的Wnt多肽相互作用。在一些情况下,Afamin与本文所述的生物功能性Wnt多肽选择性相互作用。在一些情况下,生物功能性Wnt多肽是经脂质修饰Wnt多肽。

[0123] 在一些情况下,与Wnt多肽共表达的Afamin使Wnt多肽表达增强,使Wnt多肽分泌改进,和/或使Wnt多肽稳定。在一些情况下,这是相对于在不存在Afamin下在等同细胞中的Wnt多肽来说的。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。

[0124] 在一些情况下,Afamin多肽包含与SEQ ID NO:8的至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些情况下,包含与SEQ ID NO:8的至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的Afamin多肽与Wnt多肽共表达。在一些情况下,Afamin与Wnt多肽的摩尔比是例如1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1或4:1。在一些情况下,与Wnt多肽共表达的Afamin多肽使Wnt多肽表达增强,使Wnt多肽分泌改进,和/或使Wnt多肽稳定。在一些情况下,这是相对于在不存在Afamin下在等同细胞中的Wnt多肽来说的。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0125] Porcupine

[0126] 在一些实施方案中,伴侣蛋白包括Porcupine。由基因PORCN编码的Porcupine(或porcupine同源物、PPN、MG61、可能的蛋白质-半胱氨酸N-棕榈酰基转移酶、或蛋白质-丝氨酸O-棕榈油酰基转移酶porcupine)是一种涉及于Wnt蛋白的加工中的多次穿膜跨膜内质网蛋白。在一些情况下,Porcupine还包括五个不同亚型(亚型1-5)。

[0127] 在一些情况下,Porcupine与本文所述的Wnt多肽相互作用。在一些情况下,Porcupine与本文所述的生物功能性Wnt多肽选择性相互作用。在一些情况下,生物功能性Wnt多肽是经脂质修饰Wnt多肽。

[0128] 在一些情况下,Porcupine与Wnt多肽共表达,例如以使Wnt多肽表达增强,使Wnt多肽分泌改进,和/或使Wnt多肽稳定。在一些情况下,这是相对于在不存在Porcupine下在等同细胞中的Wnt多肽来说的。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。

[0129] 在一些情况下,Porcupine多肽包含与SEQ ID NO:9的至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些情况下,包含与SEQ ID NO:9的至少70%、

80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的Porcupine多肽与Wnt多肽共表达。在一些情况下, Porcupine与Wnt多肽的摩尔比是例如1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1或4:1。在一些情况下, 与Wnt多肽共表达的Porcupine多肽使Wnt多肽表达增强, 使Wnt多肽分泌改进, 和/或使Wnt多肽稳定。在一些情况下, 这是相对于在不存在Porcupine下在等同细胞中的Wnt多肽来说的。在一些情况下, Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下, Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下, Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0130] 处理从最低血清条件产生的Wnt多肽的方法

[0131] 在一些实施方案中, 本文描述从包含最低血清条件的培养物收集Wnt多肽(例如Wnt多肽-伴侣蛋白复合物), 以及随后纯化所述Wnt多肽以产生经分离Wnt多肽的方法。在一些实施方案中, 收集稳定Wnt多肽-伴侣蛋白复合物, 接着加以处理以产生活性Wnt多肽。在一些情况下, 来自稳定Wnt多肽-伴侣蛋白复合物的Wnt多肽是非活性的, 但一旦Wnt多肽从Wnt多肽-伴侣蛋白复合物解离即变得具有活性。

[0132] 在一些实施方案中, 方法包括在条件培养基中在细胞中共表达Wnt多肽与伴侣蛋白以产生Wnt多肽-伴侣蛋白复合物, 从所述条件培养基收集所述Wnt多肽-伴侣蛋白复合物, 将所述Wnt多肽-伴侣蛋白复合物引入固定有磺化多芳族化合物的多个珠粒或包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲色谱管柱中以产生经处理Wnt多肽, 以及使所述经处理Wnt多肽与脂质体的水溶液接触以产生脂质体Wnt多肽。

[0133] 在一些实施方案中, 方法包括(a)在条件培养基中在细胞中共表达Wnt多肽与伴侣蛋白以产生Wnt多肽-伴侣蛋白复合物; (b)从所述条件培养基收集所述Wnt多肽-伴侣蛋白复合物; (c)将所述Wnt多肽-伴侣蛋白复合物引入固定有磺化多芳族化合物的管柱中以产生所洗脱Wnt多肽-伴侣蛋白复合物; (d)通过包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲色谱管柱处理所述所洗脱Wnt多肽-伴侣蛋白复合物以产生经处理Wnt多肽; 和(e)使所述经处理Wnt多肽与脂质体的水溶液接触以产生脂质体Wnt多肽。

[0134] 在一些实施方案中, 本文还描述一种方法, 所述方法包括(a)在条件培养基中在细胞中共表达Wnt多肽与伴侣蛋白以产生Wnt多肽-伴侣蛋白复合物; (b)从所述条件培养基收集所述Wnt多肽-伴侣蛋白复合物; (c)将所述Wnt多肽-伴侣蛋白复合物引入包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲色谱管柱中以产生所洗脱Wnt多肽-伴侣蛋白复合物; (d)通过固定有磺化多芳族化合物的管柱处理所述所洗脱Wnt多肽-伴侣蛋白复合物以产生经处理Wnt多肽; 和(e)使所述经处理Wnt多肽与脂质体的水溶液接触以产生脂质体Wnt多肽。

[0135] 在一些实施方案中, 本文另外描述一种制备功能活性Wnt多肽的方法, 所述方法包括: (a)使多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物与包含糖清洁剂的缓冲液一起孵育以产生包含第一Wnt组合物和伴侣蛋白组合物的混合物, 所述第一Wnt组合物包含功能非活性Wnt多肽; (b)用固定有磺化多芳族化合物的管柱使所述第一Wnt组合物从所述混合物分离以产生第二Wnt组合物, 所述第二Wnt组合物包含所述功能活性Wnt多肽和所述糖清洁剂; (c)任选地, 用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的亲色谱管柱、混合模式管柱、尺寸排阻色谱管柱或它们的组合纯化所述第二Wnt组合物至少一次以产生第三Wnt组合物; 和(d)使所述第二Wnt组合物或任选地使所述第三Wnt组合物与脂质体的水溶液接触以产生最终Wnt组合物, 所述最终Wnt组合物包含功能活性Wnt多肽。

[0136] 在一些实施方案中,本文还描述一种制备功能活性Wnt多肽的方法,所述方法包括:(a)在包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的第一亲和色谱管柱上纯化多个Wnt多肽-伴侣蛋白复合物以产生Wnt多肽-伴侣蛋白复合物的所洗脱混合物;(b)使Wnt多肽-伴侣蛋白复合物的所述所洗脱混合物与包含糖清洁剂的缓冲液一起孵育以产生包含第一Wnt组合物和伴侣蛋白组合物的混合物,所述第一Wnt组合物包含功能非活性Wnt多肽;(c)用固定有磺化多芳族化合物的管柱使所述第一Wnt组合物从所述混合物分离以产生第二Wnt组合物,所述第二Wnt组合物包含所述功能活性Wnt多肽和所述糖清洁剂;(d)用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的第二亲和色谱管柱、混合模式管柱和尺寸排阻色谱管柱以串联方式纯化所述第二Wnt组合物以产生第三Wnt组合物;和(e)使所述第三Wnt组合物与脂质体的水溶液接触以产生最终Wnt组合物,所述最终Wnt组合物包含功能活性Wnt多肽。

[0137] 在一些情况下,磺化多芳族化合物的一非限制性实例是辛巴蓝F3GA(Cibacron blue F3GA)。在一些情况下,辛巴蓝F3GA是一种三嗪基染料。在一些情况下,固定有三嗪基染料的珠粒用于上文所述的纯化步骤中。在一些情况下,固定有辛巴蓝F3GA的色谱管柱的一非限制性实例是蓝色琼脂糖(Blue Sepharose)管柱。

[0138] 在一些实施方案中,纯化以批式模式在使用固定有磺化多芳族化合物的多个珠粒的情况下进行。一般来说,Wnt多肽(例如Wnt多肽-伴侣蛋白复合物)在含有低浓度的盐的结合缓冲液中结合于固定有磺化多芳族化合物的珠粒。高盐使蛋白质与珠粒之间的非共价离子相互作用去稳定,由此允许洗脱Wnt多肽(例如Wnt多肽-伴侣蛋白复合物)。在一些实施方案中,用于结合缓冲液中的盐的浓度是至多0、0.01、5、10、15、20、25、30、40、50mM或更小。在一些实施方案中,用于结合缓冲液中的盐的浓度是至少0、0.01、5、10、15、20、25、30、40、50mM或更大。在一些实施方案中,一种或多种洗涤缓冲液用于移除未结合杂质。在一些实施方案中,使用至多1、2、3、4、5个或更多个洗涤步骤。在一些实施方案中,使用至少1、2、3、4、5个或更少个洗涤步骤。在一些实施方案中,用于洗涤缓冲液中的盐的浓度是至少30、40、50、60、70、80、90、100mM或更大。在一些实施方案中,用于洗涤缓冲液中的盐的浓度是至多30、40、50、60、70、80、90、100mM或更小。在一些实施方案中,随后进行一个或多个洗脱步骤。在一些实施方案中,洗脱缓冲液中盐的浓度是至少80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1500、2000mM或更大。在一些实施方案中,洗脱缓冲液中盐的浓度是至多80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1500、2000mM或更小。示例性盐包括氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、磷酸钙、磷酸钾、磷酸镁、磷酸钠、硫酸铵、氯化铵、磷酸铵等。在一些情况下,本文所述的缓冲液(例如结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液)的pH是至少4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9或更高。在一些情况下,缓冲液的pH是至多4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9或更低。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽、Wnt5A多肽或Wnt10B多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0139] 在一些实施方案中,使用固定有磺化多芳族化合物的管柱进行纯化。一般来说,Wnt多肽(例如Wnt多肽-伴侣蛋白复合物)在含有低浓度的盐的结合缓冲液中结合于固定有磺化多芳族化合物的管柱。高盐使蛋白质与管柱珠粒之间的非共价离子相互作用去稳定,

由此允许洗脱Wnt多肽(例如Wnt多肽-伴侣蛋白复合物)。在一些实施方案中,用于结合缓冲液中的盐的浓度是至多0、0.01、5、10、15、20、25、30、40、50mM或更小。在一些实施方案中,用于结合缓冲液中的盐的浓度是至少0、0.01、5、10、15、20、25、30、40、50mM或更大。在一些实施方案中,一种或多种洗涤缓冲液用于移除未结合杂质。在一些实施方案中,使用至多1、2、3、4、5个或更多个洗涤步骤。在一些实施方案中,使用至少1、2、3、4、5个或更少个洗涤步骤。在一些实施方案中,用于洗涤缓冲液中的盐的浓度是至少30、40、50、60、70、80、90、100mM或更大。在一些实施方案中,用于洗涤缓冲液中的盐的浓度是至多30、40、50、60、70、80、90、100mM或更小。在一些实施方案中,随后进行一个或多个洗脱步骤。在一些实施方案中,洗脱缓冲液中盐的浓度是至少80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1500、2000mM或更大。在一些实施方案中,洗脱缓冲液中盐的浓度是至多80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1500、2000mM或更小。示例性盐包括氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、磷酸钙、磷酸钾、磷酸镁、磷酸钠、硫酸铵、氯化铵、磷酸铵等。在一些情况下,本文所述的缓冲液(例如结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液)的pH是至少4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9或更高。在一些情况下,缓冲液的pH是至多4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9或更低。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽、Wnt5A多肽或Wnt10B多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0140] 在一些实施方案中,用亲和色谱法对本文所述的Wnt多肽的纯化以批式模式或使用管柱进行,并且采用例如用于纯化本文所述的标签的各种固定化珠粒。如上所讨论,本文涵盖的一种或多种标签包括:多组氨酸标签、PA标签、FLAG标签、人流感血凝素(HA)标签、Myc标签、谷胱甘肽-S转移酶(GST)、钙调蛋白(calmodulin)结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、ABDz1标签(白蛋白)、**HaloTag®**、肝素结合肽(HB)标签、多Arg标签、多Lys标签、S标签、Strep-II标签和SUMO标签。

[0141] 在一些情况下,亲和色谱方法是一种基于抗体的纯化方法。举例来说,在所述情况下,多个珠粒被固定有识别抗体的Fc部分的多肽(例如蛋白A)。一般来说,Wnt多肽,例如Wnt多肽-伴侣蛋白复合物,并且具体来说是伴侣蛋白,在处于约6.5或更高的pH下(例如处于约6.8、7、7.2、7.5、7.7、7.8、8、8.5或更高的pH下)的结合缓冲液中结合于固定有例如蛋白A多肽的管柱。在一些情况下,供与包括蛋白A多肽的亲和色谱法一起使用的洗脱缓冲液包含酸性pH,并且用于洗脱Wnt多肽。在一些情况下,洗脱缓冲液包含约2、2.5、3.3.5、4、5或约6的pH。在一些情况下,洗脱缓冲液包含约3的pH。在一些情况下,洗脱步骤包括分段pH梯度。在一些情况下,分段pH梯度包括pH从约6降低至约3。在一些情况下,pH降低是:约6、约5、约4、约3.5和约3。在一些情况下,包含Wnt多肽的所洗脱级分还通过Tris-HCl缓冲液加以中和。在一些情况下,Tris-HCl缓冲液包含约9.5的pH,并且在1M浓度下。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0142] 在一些实施方案中,混合模式色谱管柱用于纯化本文所述的Wnt多肽。混合模式色谱法(MMC)描述一种利用固定相与分析物之间的两种或更多种不同形式的相互作用来实现

它们的分离的色谱方法。在一些情况下,混合模式色谱方法被进一步分成两种亚型,即物理MMC和化学MMC。物理MMC方法利用包含两种或更多种类型的填充材料的固定相,所述填充材料处于呈“串联管柱”形式的两个不同管柱中,如在“双相管柱”的情况下处于同一管柱的相对两端中,或如在“混合床管柱”的情况下处于单一管柱中的均质化相中。化学MMC方法利用含有两个或更多个官能基的一种类型的填充材料。举例来说,化学MMC可利用疏水性和/或亲水性相互作用与离子交换相互作用来使纯化期间的选择性增加。化学MMC的示例性类型包括但不限于阴离子交换/反相(AEX/RP)、阳离子交换/反相(CEX/RP)、阴离子交换/阳离子交换/反相(AEX/CEX/RP)、AEX/HILIC、CEX/HILIC和AEX/CEX/HILIC。示例性MMC管柱包括但不限于Acclaim Trinity P1 LC管柱(ThermoFisher)、Acclaim混合模式WCX-1LC管柱(ThermoFisher)、Acclaim混合模式HILIC-1LC管柱(ThermoFisher)、OmniPac PAX和PCX系列的HPLC管柱(ThermoFisher)和 **Bio-Gel®** HT管柱(Bio-Rad)。

[0143] 在一些实施方案中,混合模式色谱管柱用于纯化Wnt多肽。在一些情况下,物理MMC管柱用于纯化Wnt多肽。在其他情况下,化学MMC管柱用于纯化Wnt多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽、Wnt5A多肽或Wnt10B多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0144] 在一些实施方案中,尺寸排阻色谱法(SEC)管柱用于纯化本文所述的Wnt多肽。尺寸排阻色谱法,也称为分子筛色谱法,基于分子的尺寸以及在一些情况下基于分子的分子量来分离溶液中的分子。示例性SEC管柱包括但不限于基于二氧化硅的管柱诸如 **TSKgel®** SW型管柱(Sigma-Aldrich);以及基于聚甲基丙烯酸酯的管柱诸如 **TSKgel®** PW型管柱(Sigma-Aldrich)。

[0145] 在一些实施方案中,尺寸排阻色谱法(SEC)管柱用于纯化Wnt多肽。在一些情况下,基于二氧化硅的SEC管柱用于纯化Wnt多肽。在其他情况下,基于聚甲基丙烯酸酯的SEC管柱用于纯化Wnt多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽、Wnt5A多肽或Wnt10B多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0146] 在一些实施方案中,将清洁剂配制至上述结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液中。示例性清洁剂包括阴离子清洁剂,诸如烷基苯磺酸盐(alkylbenzenesulfonate)、羧酸盐、磺酸盐、石油磺酸盐、烷基苯磺酸盐(alkylbenzenesulphonate)、萘磺酸盐、烯烴磺酸盐、烷基硫酸盐、硫酸盐、硫酸化天然油和脂肪、硫酸化酯和硫酸化链烷醇酰胺;阳离子清洁剂,诸如季铵盐、具有酰胺键的胺、聚氧乙烯烷基胺和聚氧乙烯脂环胺、n,n',n'四取代的乙二胺和2-烷基-1-羟乙基-2-咪唑啉;非离子清洁剂,诸如聚氧乙烯(例如吐温(Tween)、曲通(Triton)和布里杰(Brij)系列的清洁剂)和糖清洁剂(例如辛基硫代葡萄糖苷和麦芽糖苷);以及两性或两性离子清洁剂诸如CHAPS。在一些情况下,清洁剂使本文所述的Wnt多肽稳定。在一些情况下,清洁剂通过与Wnt多肽竞争与伴侣蛋白(例如卷曲蛋白融合蛋白)的结合来充当竞争性拮抗剂。

[0147] 在一些实施方案中,清洁剂是糖清洁剂。在一些情况下,糖清洁剂是葡萄糖苷清洁剂。在其他情况下,清洁剂是麦芽糖苷清洁剂。示例性葡萄糖苷清洁剂包括但不限于正己基-β-D-吡喃葡萄糖苷、正庚基-β-D-吡喃葡萄糖苷、正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷、正辛基-α-

D-吡喃葡萄糖苷、辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷、正辛基- β -D-吡喃半乳糖苷、正壬基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正癸基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二基- β -D-吡喃葡萄糖苷和甲基-6-O-(N-庚基氨基甲酰基)- α -D-吡喃葡萄糖苷。示例性麦芽糖苷清洁剂包括但不限于正癸基- β -D-吡喃麦芽糖苷、正十二基- β -D-吡喃麦芽糖苷和6-环己基-1-己基- β -D-吡喃麦芽糖苷。

[0148] 在一些实施方案中,缓冲液,诸如上述结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液,包含糖清洁剂。在一些情况下,缓冲液(例如结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液)包含葡萄糖苷清洁剂。在所述情况下,缓冲液(例如结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液)包含正己基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正庚基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正辛基- α -D-吡喃葡萄糖苷、辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷、正辛基- β -D-吡喃半乳糖苷、正壬基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正癸基- β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二基- β -D-吡喃葡萄糖苷或甲基-6-O-(N-庚基氨基甲酰基)- α -D-吡喃葡萄糖苷。在一些情况下,缓冲液包含正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷或辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷。在一个实施方案中,缓冲液包含正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷(也称为正辛基葡萄糖苷、OGP、OG、C8G1c、辛基- β -吡喃葡萄糖苷或辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷)。在另一实施方案中,缓冲液包含辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷(也称为辛基硫代葡萄糖苷或OTG)。

[0149] 在一些实施方案中,缓冲液(例如结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液)包含麦芽糖苷清洁剂。在所述情况下,缓冲液(例如结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液)包含正癸基- β -D-吡喃麦芽糖苷、正十二基- β -D-吡喃麦芽糖苷或6-环己基-1-己基- β -D-吡喃麦芽糖苷。

[0150] 在一些实施方案中,本文所述的缓冲液中糖清洁剂的浓度是约0.05%至约5%w/v(重量/体积)。在一些情况下,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约0.1%至约5%、约0.5%至约4%、约1%至约3%、约2%至约5%、或3%至约5%w/v。在一些情况下,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或约5%w/v。在一些情况下,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约0.1%w/v。在一些情况下,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约0.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约1%w/v。在一些情况下,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约1.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约2%w/v。在一些情况下,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约2.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约3%w/v。在一些情况下,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约4%w/v。在一些情况下,缓冲液中糖清洁剂的浓度是约5%w/v。在一些情况下,缓冲液是基于乙酸盐的缓冲液(例如包含约10mM、20mM、30mM、50mM或更大的浓度)。在一些情况下,缓冲液展现约5、5.5、6、6.5或7的pH。

[0151] 在一些实施方案中,糖清洁剂是葡萄糖苷清洁剂。在一些情况下,缓冲液中葡萄糖苷清洁剂的浓度是约0.05%至约5%、约0.1%至约5%、约0.5%至约4%、约1%至约3%、约2%至约5%、或3%至约5%w/v。在一些情况下,缓冲液中葡萄糖苷清洁剂的浓度是约0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或约5%w/v。在一些情况下,缓冲液中葡萄糖苷清洁剂的浓度是约0.1%w/v。在一些情况下,缓冲液中葡萄糖苷清洁剂的浓度是约0.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中葡萄糖苷清洁剂的浓度是约1%w/v。在一些情况下,缓冲液中葡萄糖苷清洁剂的浓度是约1.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中葡萄糖苷清洁剂的浓度是约2%w/v。在一些

情况下,缓冲液中葡萄糖苷清洁剂的浓度是约2.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中葡萄糖苷清洁剂的浓度是约3%w/v。在一些情况下,缓冲液中葡萄糖苷清洁剂的浓度是约4%w/v。在一些情况下,缓冲液中葡萄糖苷清洁剂的浓度是约5%w/v。在一些情况下,缓冲液是基于乙酸盐的缓冲液(例如包含约10mM、20mM、30mM、50mM或更大的浓度)。在一些情况下,缓冲液展现约5、5.5、6、6.5或7的pH。

[0152] 在一些实施方案中,糖清洁剂是正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷。在一些情况下,缓冲液中正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度是约0.05%至约5%、约0.1%至约5%、约0.5%至约4%、约1%至约3%、约2%至约5%、或3%至约5%w/v。在一些情况下,缓冲液中正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度是约0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或约5%w/v。在一些情况下,缓冲液中正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度是约0.1%w/v。在一些情况下,缓冲液中正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度是约0.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度是约1%w/v。在一些情况下,缓冲液中正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度是约1.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度是约2%w/v。在一些情况下,缓冲液中正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度是约2.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度是约3%w/v。在一些情况下,缓冲液中正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度是约4%w/v。在一些情况下,缓冲液中正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度是约5%w/v。在一些情况下,缓冲液是基于乙酸盐的缓冲液(例如包含约10mM、20mM、30mM、50mM或更大的浓度)。在一些情况下,缓冲液展现约5、5.5、6、6.5或7的pH。

[0153] 在一些实施方案中,糖清洁剂是辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷。在一些情况下,缓冲液中辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷的浓度是约0.05%至约5%、约0.1%至约5%、约0.5%至约4%、约1%至约3%、约2%至约5%、或3%至约5%w/v。在一些情况下,缓冲液中辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷的浓度是约0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或约5%w/v。在一些情况下,缓冲液中辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷的浓度是约0.1%w/v。在一些情况下,缓冲液中辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷的浓度是约0.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷的浓度是约1%w/v。在一些情况下,缓冲液中辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷的浓度是约1.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷的浓度是约2%w/v。在一些情况下,缓冲液中辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷的浓度是约2.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷的浓度是约3%w/v。在一些情况下,缓冲液中辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷的浓度是约4%w/v。在一些情况下,缓冲液中辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷的浓度是约5%w/v。在一些情况下,缓冲液是基于乙酸盐的缓冲液(例如包含约10mM、20mM、30mM、50mM或更大的浓度)。在一些情况下,缓冲液展现约5、5.5、6、6.5或7的pH。

[0154] 在一些实施方案中,糖清洁剂是麦芽糖苷清洁剂。在一些情况下,缓冲液中麦芽糖苷清洁剂的浓度是约0.05%至约5%、约0.1%至约5%、约0.5%至约4%、约1%至约3%、约2%至约5%、或3%至约5%w/v。在一些情况下,缓冲液中麦芽糖苷清洁剂的浓度是约0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或约5%w/v。在一些情况下,缓冲液中麦芽糖苷清洁剂的浓度

是约0.1%w/v。在一些情况下,缓冲液中麦芽糖苷清洁剂的浓度是约0.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中麦芽糖苷清洁剂的浓度是约1%w/v。在一些情况下,缓冲液中麦芽糖苷清洁剂的浓度是约1.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中麦芽糖苷清洁剂的浓度是约2%w/v。在一些情况下,缓冲液中麦芽糖苷清洁剂的浓度是约2.5%w/v。在一些情况下,缓冲液中麦芽糖苷清洁剂的浓度是约3%w/v。在一些情况下,缓冲液中麦芽糖苷清洁剂的浓度是约4%w/v。在一些情况下,缓冲液中麦芽糖苷清洁剂的浓度是约5%w/v。在一些情况下,缓冲液是基于乙酸盐的缓冲液(例如包含约10mM、20mM、30mM、50mM或更大的浓度)。在一些情况下,缓冲液展现约5、5.5、6、6.5或7的pH。

[0155] 在一些实施方案中,清洁剂是CHAPS、曲通X-100或聚山梨醇酯80。在一些实施方案中,CHAPS、曲通X-100或聚山梨醇酯80的百分比是至少0.01%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%或更大。在一些实施方案中,CHAPS、曲通X-100或聚山梨醇酯80的百分比是至多0.01%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%或更小。在一些情况下,清洁剂的百分比是重量/体积(w/v)百分比。

[0156] 在一些情况下,使用诸如三(羟基甲基)甲胺盐酸盐(Tris-HCl)、3-[[三(羟基甲基)氨基]丙烷磺酸(TAPS)、N,N-双(2-羟基乙基)甘氨酸(Bicine)、N-三(羟基甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、3-[N-三(羟基甲基)甲基氨基]-2-羟基丙烷磺酸(TAPSO)、4-2-羟基乙基-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES)、3-(N-吗啉代)丙烷磺酸(MOPS)、哌嗪-N,N'-双(2-乙烷磺酸)(PIPES)、2-(N-吗啉代)乙烷磺酸(MES)等的缓冲组分。在一些情况下,缓冲液的pH是至少4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9或更高。在一些情况下,缓冲液的pH是至多4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9或更低。

[0157] 在一些情况下,将碱性氨基酸配制至上述结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液中。示例性碱性氨基酸包括组氨酸、精氨酸、赖氨酸、羟基赖氨酸、鸟氨酸和瓜氨酸。在一些情况下,将选自:组氨酸、精氨酸、赖氨酸、羟基赖氨酸、鸟氨酸或瓜氨酸的碱性氨基酸配制至上述结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液中。在一些情况下,结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液中碱性氨基酸的浓度是约0.1M至约2M(例如约0.1M至约1.5M、约0.1M至约1M、约0.1M至约0.5M、约0.2M至约1.5M、约0.2M至约1M、约0.3M至约1M、或约0.3M至约0.5M)。

[0158] 在一些情况下,碱性氨基酸是精氨酸。在一些情况下,结合缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液中精氨酸的浓度是约0.1M至约2M。在一些情况下,洗脱缓冲液中精氨酸的浓度是约0.1M至约2M。在一些情况下,洗脱缓冲液中精氨酸的浓度是约0.1M至约1.5M、约0.1M至约1M、约0.1M至约0.5M、约0.2M至约1.5M、约0.2M至约1M、约0.3M至约1M、或约0.3M至约0.5M。在一些情况下,洗脱缓冲液中精氨酸的浓度是约0.1M至约0.5M。在一些情况下,洗脱缓冲液中精氨酸的浓度是约0.1M、0.2M、0.3M、0.4M、0.5M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1M或约1.5M。

[0159] 在一些情况下,用于混合模式色谱管柱的洗脱缓冲液包含约0.1M至约2M浓度的精氨酸。在一些情况下,洗脱缓冲液包含约0.1M至约1.5M、约0.1M至约1M、约0.1M至约0.5M、约0.2M至约1.5M、约0.2M至约1M、约0.3M至约1M、或约0.3M至约0.5M浓度的精氨酸。在一些情况下,洗脱缓冲液包含约0.1M至约0.5M浓度的精氨酸。在一些情况下,洗脱缓冲液包含约0.1M、0.2M、0.3M、0.4M、0.5M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1M或约1.5M浓度的精氨酸。

[0160] 在一些实施方案中,纯化策略包括第一步骤,其中将包含Wnt多肽-伴侣蛋白复合物的溶液(例如条件培养基)上样于包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的第一亲和色谱管柱上以产生Wnt多肽-伴侣蛋白复合物的所洗脱混合物。在一些情况下,来自第一亲和色谱管柱的洗脱物还在包含糖清洁剂(例如葡萄糖苷清洁剂,诸如正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷或辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷)的缓冲溶液中孵育。在一些情况下,缓冲溶液中糖清洁剂(例如葡萄糖苷清洁剂,诸如正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷或辛基 β -D-1-硫代吡喃葡萄糖苷)的浓度是约0.1%、0.5%、1%、1.5%或约2%w/v;或约1%w/v。在一些情况下,接着将洗脱物上样于固定有碘化多芳族化合物的管柱上以产生包含功能活性Wnt多肽和糖清洁剂的第三Wnt组合物,例如以从第二Wnt组合物移除伴侣蛋白(例如卷曲蛋白-8融合蛋白)。在一些情况下,用于固定有碘化多芳族化合物的管柱的洗脱缓冲液包含阶段梯度。在其他情况下,用于固定有碘化多芳族化合物的管柱的洗脱缓冲液包含从约0.5M至约2M盐,从约0.6M至约2M盐,或从约0.8M至约2M盐的盐梯度。在一些情况下,还用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的第二亲和色谱管柱、混合模式管柱、尺寸排阻色谱管柱或它们的组合纯化第二Wnt组合物,以产生第三Wnt组合物。在一些情况下,还用包含与抗体的Fc部分相互作用的多肽的第二亲和色谱管柱,继之以混合模式管柱,以及最终用尺寸排阻色谱管柱以串联方式纯化第二Wnt组合物以产生第三Wnt组合物。在一些情况下,第二亲和色谱管柱从第二Wnt组合物移除残余伴侣蛋白(例如卷曲蛋白-8融合蛋白)。在一些情况下,混合模式管柱从第二Wnt组合物移除Wnt多肽片段。在一些情况下,尺寸排阻色谱管柱从第二Wnt组合物移除残余Wnt多肽片段以产生第三Wnt组合物。

[0161] 在一些实施方案中,纯化策略包括第一步骤,其中将包含Wnt多肽-伴侣蛋白复合物的溶液(例如条件培养基)上样于固定有碘化多芳族化合物的管柱上,继之以第二步骤,其中还在亲和色谱管柱上处理从所述第一步骤洗脱的Wnt多肽(例如Wnt多肽-伴侣蛋白复合物)以产生纯化Wnt多肽。在一些情况下,在上样于固定有碘化多芳族化合物的管柱上之前,还将清洁剂添加至包含Wnt多肽(例如Wnt多肽-伴侣蛋白复合物)的溶液中。在一些情况下,还用脂质体的水溶液处理纯化Wnt多肽以产生脂质体Wnt多肽。

[0162] 在一些实施方案中,纯化策略包括第一步骤,其中将包含Wnt多肽-伴侣蛋白复合物的溶液(例如条件培养基)上样于亲和色谱管柱上,继之以第二步骤,所述第二步骤包括固定有碘化多芳族化合物的管柱。在一些情况下,将清洁剂添加至来自第一步骤的所洗脱Wnt多肽中,随后将包含所述清洁剂的所洗脱Wnt多肽上样于固定有碘化多芳族化合物的管柱上。在一些情况下,还用脂质体的水溶液处理从固定有碘化多芳族化合物的管柱洗脱的纯化Wnt多肽以产生脂质体Wnt多肽。

[0163] 在一些实施方案中,纯化策略包括从条件培养基收集Wnt多肽-伴侣蛋白复合物,并且上样于亲和色谱管柱上。在一些情况下,还用脂质体的水溶液处理来自管柱的洗脱物以产生脂质体Wnt多肽。

[0164] 在一些实施方案中,图3中说明的纯化策略用于纯化本文所述的Wnt多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽、Wnt10B多肽或Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt3A多肽是本文所述的例如包含修饰和/或截短的Wnt3A变体。

[0165] 在一些情况下,Wnt3A蛋白对它的结合配偶体的亲和力是至少约1.1nM、1.3nM、1.5nM、1.7nM、2nM、2.3nM、2.5nM、2.7nM、3nM、3.1nM、3.2nM、3.3nM、3.4nM、3.5nM、3.6nM、

3.7nM、3.8nM、3.9nM或更大nM。在一些情况下,Wnt3a蛋白对它的结合配偶体的亲和力是至多约1.1nM、1.3nM、1.5nM、1.7nM、2nM、2.3nM、2.5nM、2.7nM、3nM、3.1nM、3.2nM、3.3nM、3.4nM、3.5nM、3.6nM、3.7nM、3.8nM、3.9nM或更小nM。

[0166] 在一些实施方案中,在再经受纯化步骤之前,测量所洗脱Wnt多肽的浓度和产率。在一些实施方案中,产率是至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高。在一些实施方案中,产率是至多约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更低。在一些实施方案中,纯度是至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高。在一些实施方案中,纯度是至多约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更低。

[0167] 在一些实施方案中,Wnt多肽(例如Wnt3A多肽)被纯化至至少约5 μ g/ml;通常是至少约10 μ g/ml,更通常是至少约50 μ g/ml的初始浓度,并且可在大于约100 μ g/ml下存在。

[0168] 在一些实施方案中,还在脂质体中配制经分离Wnt多肽(例如Wnt3A多肽)。在一些情况下,用清洁剂使Wnt多肽(例如Wnt3A多肽)在制剂中稳定。在一些情况下,用脂质使Wnt多肽(例如Wnt3A多肽)在制剂中稳定。

[0169] 在一些实施方案中,使用本领域中熟知的方法制造脂质体。脂质体是人工制备的球形囊泡,所述囊泡由层状相脂质双层和水性核心组成。存在若干类型的脂质体,诸如多层囊泡(MLV)、小单层脂质体囊泡(SUV)、大单层囊泡(LUV)和脂质卷囊泡。在一些情况下,脂质体由磷脂形成。在一些实施方案中,磷脂被分成具有二酰基甘油酯结构的那些或源于鞘磷脂的那些。在一些实施方案中,二酰基甘油酯结构包括磷脂酸(磷脂酸酯)(PA)、磷脂酰乙醇胺(脑磷脂)(PE)、磷脂酰胆碱(卵磷脂)(PC)、磷脂酰丝氨酸(PS)、以及磷酸肌醇诸如磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰肌醇磷酸酯(PIP)、磷脂酰肌醇双磷酸酯(PIP2)和磷脂酰肌醇三磷酸酯(PIP3)。在一些实施方案中,鞘磷脂包括神经酰胺磷酸胆碱、神经酰胺磷酸乙醇胺和神经酰胺磷脂。在一些实施方案中,脂质体由磷脂酰胆碱形成。

[0170] 在一些实施方案中,脂质还基于它的相转变温度(T_m)或液晶相与凝胶相之间的温度界面加以选择。在一些实施方案中, T_m 受头部基团种类、烃长度、不饱和度和电荷的影响。举例来说,短脂质(含有8、10或12尾部碳链长度的脂质)在低于4 $^{\circ}$ C的温度下具有液晶相。然而,由这些短链碳脂质制造的脂质体对细胞具有毒性,因为它们使细胞膜溶解。由较长碳链脂质制造的脂质体不对细胞具有毒性,但它们的转变温度是较高的。举例来说,具有16尾部碳长度的1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)具有约41 $^{\circ}$ C的 T_m 。在一些实施方案中,本文所用的脂质具有在约10 $^{\circ}$ C与约37 $^{\circ}$ C,15 $^{\circ}$ C与约30 $^{\circ}$ C,18 $^{\circ}$ C与约27 $^{\circ}$ C,或21 $^{\circ}$ C与约25 $^{\circ}$ C之间的 T_m 。在一些实施方案中,本文所用的脂质具有至少22 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、24 $^{\circ}$ C或更高的 T_m 。在一些实施方案中,本文所用的脂质具有至多22 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、24 $^{\circ}$ C或更低的 T_m 。在一些实施方案中,本文所用的脂质具有至少约12、13、14或更大的尾部碳长度。在一些实施方案中,本文所用的脂质具有至多约12、13、14或更小的尾部碳长度。

[0171] 在一些实施方案中,脂质还基于脂质体的净电荷加以选择。在一些实施方案中,脂质体在约4.0与约10.0,约5.0与约9.0,约6.5与约8.0,约7.0与约7.8,或约7.2与约7.6之间的pH下具有净电荷0。在一些实施方案中,脂质体在约7.3、约7.4或约7.5的pH下具有净电荷0。在一些实施方案中,脂质体在约4.0与约10.0,约5.0与约9.0,约6.5与约8.0,约7.0与约7.8,或约7.2与约7.6之间的pH下具有净正电荷。在一些实施方案中,脂质体在约7.3、约7.4

或约7.5的pH下具有净正电荷。在一些实施方案中,脂质体在约4.0与约10.0,约5.0与约9.0,约6.5与约8.0,约7.0与约7.8,或约7.2与约7.6之间的pH下具有净负电荷。在一些实施方案中,脂质体在约7.3、约7.4或约7.5的pH下具有净负电荷。

[0172] 在一些实施方案中,脂质选自1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、1-十四酰基-2-十六酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(MPPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸-L-丝氨酸(DMPS)和1,2-二己酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DMPG)。在一些实施方案中,脂质是DMPC。

[0173] 在一些实施方案中,额外脂质被制造至脂质体中。在一些实施方案中,额外脂质是胆固醇。在一些情况下,磷脂酰胆碱诸如DMPC和胆固醇的浓度由诸如比率的值确定。在一些实施方案中,磷脂酰胆碱诸如DMPC和胆固醇的浓度比率在约50:50、约55:45、约60:40、约65:35、约70:30、约75:25、约80:20、约85:15、约90:10、约95:5、约99:1或约100:0之间。在一些实施方案中,磷脂酰胆碱诸如DMPC和胆固醇的浓度比率是约90:10。在一些实施方案中,浓度单位是摩尔(mole)。在一些实施方案中,比率是摩尔:摩尔。

[0174] 在一些实施方案中,用基于乙醇注射的方法制备脂质体。在一些情况下,所述方法如Wagner等“The Crossflow Injection Technique:An improvement of the Ethanol Injection Method,”*Journal of Liposome Research*,12(3):259-270(2002)中所述。

[0175] 在一些实施方案中,Wnt多肽用脂质体在至少约0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05、0.055、0.06、0.065、0.07、0.075、0.08、0.085、0.09、0.095、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4ng/ μ L或更大的浓度下复原。在一些实施方案中,Wnt多肽用脂质体在至多约0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05、0.055、0.06、0.065、0.07、0.075、0.08、0.085、0.09、0.095、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4ng/ μ L或更小的浓度下复原。在一些实施方案中,Wnt多肽用脂质体在约0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05、0.055、0.06、0.065、0.07、0.075、0.08、0.085、0.09、0.095、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4ng/ μ L的浓度下复原。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽、Wnt5A多肽或Wnt10b多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽。

[0176] 在一些实施方案中,Wnt多肽用脂质体在至少约0.1:50、0.5:30、1:20或1:14Wnt多肽:脂质体或更大的比率下复原。在一些实施方案中,Wnt多肽用脂质体在至多约0.1:50、0.5:30、1:20或1:14Wnt多肽:脂质体或更小的比率下复原。在一些情况下,比率是体积与体积比率。在一些情况下,Wnt多肽的单位是纳克单位。

[0177] 在一些实施方案中,用脂质体复原Wnt多肽所处的温度是至少在约15 $^{\circ}$ C与约37 $^{\circ}$ C,约18 $^{\circ}$ C与约33 $^{\circ}$ C,约20 $^{\circ}$ C与约30 $^{\circ}$ C,约25 $^{\circ}$ C与约30 $^{\circ}$ C,或约20 $^{\circ}$ C与约28 $^{\circ}$ C之间。在一些实施方案中,温度是至少在约15 $^{\circ}$ C与约37 $^{\circ}$ C之间。在一些实施方案中,温度是至少在约18 $^{\circ}$ C与约33 $^{\circ}$ C之间。在一些实施方案中,温度是至少在约20 $^{\circ}$ C与约30 $^{\circ}$ C之间。在一些实施方案中,温度是至少约21 $^{\circ}$ C、22 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、24 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、26 $^{\circ}$ C、27 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、29 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C或更高。在一些实施方案中,温度是至多约21 $^{\circ}$ C、22 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、24 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、26 $^{\circ}$ C、27 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、29 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C或更低。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽、Wnt5A多肽或Wnt10b多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽。

[0178] 在一些实施方案中,使Wnt多肽与脂质体一起孵育至少10分钟、20分钟、30分钟、1小时、1.5小时、2小时、2.5小时、3小时、4小时、5小时、6小时或更久。在一些情况下,使Wnt多肽与脂质体一起孵育约10分钟、20分钟、30分钟、1小时、1.5小时、2小时、2.5小时、3小时、4小时、5小时、6小时或更久。在一些情况下,使Wnt多肽与脂质体一起孵育至少30分钟。在一些情况下,使Wnt多肽与脂质体一起孵育至少1小时。在一些情况下,使Wnt多肽与脂质体一起孵育至少1.5小时。在一些情况下,使Wnt多肽与脂质体一起孵育至少2小时。在一些情况下,使Wnt多肽与脂质体一起孵育至少3小时。

[0179] 在一些实施方案中,Wnt多肽整合至脂质体膜中。在一些情况下,Wnt多肽从脂质体膜伸出至脂质膜的表面上。在一些情况下,Wnt多肽不并入脂质体的水性核心中。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽、Wnt5A多肽或Wnt10B多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些实施方案中,Wnt3A多肽整合至脂质体膜中。在一些情况下,Wnt3A多肽从脂质体膜伸出至脂质膜的表面上。在一些情况下,Wnt3A多肽不并入脂质体的水性核心中。

[0180] 在一些实施方案中,脂质体Wnt多肽具有约10nm至约1 μ m、10nm至约500nm、约50nm至约300nm、约50nm至约200nm、约100nm至约500nm、约100nm至约300nm、或约100nm至约200nm的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有10nm至约500nm的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有约50nm至约300nm的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有约50nm至约200nm的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有约100nm至约200nm的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有约150nm至约200nm的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有约50nm至约150nm的脂质体粒度分布。

[0181] 在一些实施方案中,脂质体Wnt多肽具有小于约1 μ m、小于约500nm、小于约300nm、小于约200nm或小于约150nm的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有小于约1 μ m的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有小于约500nm的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有小于约300nm的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有小于约200nm的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有小于约170nm的脂质体粒度分布。在一些情况下,脂质体Wnt多肽具有小于约150nm的脂质体粒度分布。

[0182] 在一些实施方案中,用脂质体复原的Wnt多肽被称为脂质体Wnt多肽或L-Wnt。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽、Wnt5A多肽或Wnt10B多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些实施方案中,用脂质体复原的Wnt3A多肽被称为脂质体Wnt3A多肽或L-Wnt3A。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt5A多肽。在一些实施方案中,用脂质体复原的Wnt5A多肽被称为脂质体Wnt5A多肽或L-Wnt5A。在一些实施方案中,Wnt多肽是Wnt10B多肽。在一些实施方案中,用脂质体复原的Wnt10B多肽被称为脂质体Wnt10B多肽或L-Wnt10B。

[0183] 在一些实施方案中,L-Wnt经受离心步骤,并且接着混悬于缓冲液中。示例性缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲盐水(PBS)或基于蔗糖的缓冲液诸如磷酸盐/蔗糖缓冲液、组氨酸/蔗糖缓冲液、柠檬酸盐/蔗糖缓冲液、乙酸盐/蔗糖缓冲液、基于蔗糖/NaCl的缓冲液、磷酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液、组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液、柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液、或乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液。在一些情况下,基于蔗糖的缓冲液包含约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,基于蔗糖的缓冲液包含约300mM蔗糖。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖缓冲液包

含约5mM磷酸盐至约50mM磷酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM磷酸盐和约300mM蔗糖。在一些情况下,组氨酸/蔗糖缓冲液包含约10mM组氨酸和约300mM蔗糖。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖缓冲液包含约5mM柠檬酸盐至约50mM柠檬酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM柠檬酸盐和约300mM蔗糖。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖缓冲液包含约5mM乙酸盐至约50mM乙酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM乙酸盐和约300mM蔗糖。在一些情况下,基于蔗糖/NaCl的缓冲液包含约50mM蔗糖至约300mM蔗糖和约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,基于蔗糖/NaCl的缓冲液包含约100mM蔗糖和100mM NaCl。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM磷酸盐至约50mM磷酸盐、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM磷酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM组氨酸至约50mM组氨酸、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM组氨酸、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM柠檬酸盐至约50mM柠檬酸盐、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM柠檬酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM乙酸盐至约50mM乙酸盐、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM乙酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。

[0184] 在一些实施方案中,L-Wnt经受过滤步骤。在一些情况下,过滤步骤包括超滤、透滤、纳滤、无菌过滤或它们的组合。示例性过滤膜包括但不限于乙酸钠纤维素(CA)、聚砜(PS)、聚醚砜(PES)、聚丙烯腈(PAN)、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚丙烯(PP)、聚乙烯(PE)和聚氯乙烯(PVC)。在一些情况下,L-Wnt经受一种或多种过滤,诸如超滤、透滤、纳滤、无菌过滤或它们的组合。在一些情况下,L-Wnt经受超滤和纳滤以移除一种或多种生物污染物诸如蛋白质污染物和微生物污染物。在一些情况下,纳滤移除一种或多种病毒污染物。在一些情况下,L-Wnt还经受透滤步骤以达成缓冲液交换。示例性缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲盐水(PBS)或基于蔗糖的缓冲液诸如磷酸盐/蔗糖缓冲液、组氨酸/蔗糖缓冲液、柠檬酸盐/蔗糖缓冲液、乙酸盐/蔗糖缓冲液、基于蔗糖/NaCl的缓冲液、磷酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液、组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液、柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液、或乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液。在一些情况下,基于蔗糖的缓冲液包含约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,基于蔗糖的缓冲液包含约300mM蔗糖。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖缓冲液包含约5mM磷酸盐至约50mM磷酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM磷酸盐和约300mM蔗糖。在一些情况下,组氨酸/蔗糖缓冲液包含约10mM组氨酸和约300mM蔗糖。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖缓冲液包含约5mM柠檬酸盐至约50mM柠檬酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM柠檬酸盐和约300mM蔗糖。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖缓冲液包含约5mM乙酸盐至约50mM乙酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM乙酸盐和约300mM蔗糖。在一些情况下,基于蔗糖/NaCl的缓冲液包含约50mM蔗糖至约300mM蔗糖和约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,基于蔗糖/NaCl的缓冲液包含约100mM蔗糖和100mM NaCl。在一些情况下,磷酸盐/

蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM磷酸盐至约50mM磷酸盐、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM磷酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM组氨酸至约50mM组氨酸、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM组氨酸、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM柠檬酸盐至约50mM柠檬酸盐、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM柠檬酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM乙酸盐至约50mM乙酸盐、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM乙酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,L-Wnt经受无菌过滤步骤。

[0185] 在一些情况下,在氮气下储存L-Wnt。在一些情况下,L-Wnt在氮气下是稳定的而无实质性活性损失。

[0186] 在一些情况下,在约1℃与约8℃之间的温度下储存L-Wnt。在一些情况下,L-Wnt在至少约1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃或更高的温度下是稳定的而无实质性活性损失。在一些情况下,L-Wnt在至多约1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃或更低的温度下是稳定的而无实质性活性损失。

[0187] 在一些情况下,在约-80℃至约-20℃的温度下储存L-Wnt。在一些情况下,L-Wnt在约-80℃的温度下是稳定的而无实质性活性损失。在一些情况下,L-Wnt在约-20℃的温度下是稳定的而无实质性活性损失。

[0188] 在一些实施方案中,L-Wnt持续至少约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、115、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、356、400、700、1000天或更久是稳定的而无实质性活性损失。在一些实施方案中,L-Wnt持续至多约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、115、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、356、400、700、1000天或更短时间是稳定的而无实质性活性损失。

[0189] 在一些实施方案中,L-Wnt3A经受离心步骤,并且接着混悬于缓冲液中。示例性缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲盐水(PBS)或基于蔗糖的缓冲液诸如磷酸盐/蔗糖缓冲液、组氨酸/蔗糖缓冲液、柠檬酸盐/蔗糖缓冲液、乙酸盐/蔗糖缓冲液、基于蔗糖/NaCl的缓冲液、磷酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液、组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液、柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液、或乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液。在一些情况下,基于蔗糖的缓冲液包含约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,基于蔗糖的缓冲液包含约300mM蔗糖。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖缓冲液包含约5mM磷酸盐至约50mM磷酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM磷酸盐和约300mM蔗糖。在一些情况下,组氨酸/蔗糖缓冲液包含约10mM组氨酸和约300mM蔗糖。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖缓冲液包含约5mM柠檬酸盐至约50mM柠檬酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM柠檬酸盐和约300mM蔗糖。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖缓冲液包含约5mM乙酸盐至约50mM乙酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM乙酸盐

和约300mM蔗糖。在一些情况下,基于蔗糖/NaCl的缓冲液包含约50mM蔗糖至约300mM蔗糖和约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,基于蔗糖/NaCl的缓冲液包含约100mM蔗糖和100mM NaCl。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM磷酸盐至约50mM磷酸盐、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM磷酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM组氨酸至约50mM组氨酸、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM组氨酸、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM柠檬酸盐至约50mM柠檬酸盐、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM柠檬酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM乙酸盐至约50mM乙酸盐、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM乙酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。

[0190] 在一些实施方案中,L-Wnt3A经受过滤步骤。在一些情况下,过滤步骤包括超滤、透滤、纳滤、无菌过滤或它们的组合。示例性过滤膜包括但不限于乙酸纤维素(CA)、聚砜(PS)、聚醚砜(PES)、聚丙烯腈(PAN)、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚丙烯(PP)、聚乙烯(PE)和聚氯乙烯(PVC)。在一些情况下,L-Wnt3A经受一种或多种过滤,诸如超滤、透滤、纳滤、无菌过滤或它们的组合。在一些情况下,L-Wnt3A经受超滤和纳滤以移除一种或多种生物污染物诸如蛋白质污染物和微生物污染物。在一些情况下,纳滤移除一种或多种病毒污染物。在一些情况下,L-Wnt3A还经受透滤步骤以达成缓冲液交换。示例性缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲盐水(PBS)或基于蔗糖的缓冲液诸如磷酸盐/蔗糖缓冲液、组氨酸/蔗糖缓冲液、柠檬酸盐/蔗糖缓冲液、乙酸盐/蔗糖缓冲液、基于蔗糖/NaCl的缓冲液、磷酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液、组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液、柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液、或乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液。在一些情况下,基于蔗糖的缓冲液包含约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,基于蔗糖的缓冲液包含约300mM蔗糖。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖缓冲液包含约5mM磷酸盐至约50mM磷酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM磷酸盐和约300mM蔗糖。在一些情况下,组氨酸/蔗糖缓冲液包含约10mM组氨酸和约300mM蔗糖。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖缓冲液包含约5mM柠檬酸盐至约50mM柠檬酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM柠檬酸盐和约300mM蔗糖。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖缓冲液包含约5mM乙酸盐至约50mM乙酸盐和约50mM蔗糖至约500mM蔗糖。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖缓冲液包含约10mM乙酸盐和约300mM蔗糖。在一些情况下,基于蔗糖/NaCl的缓冲液包含约50mM蔗糖至约300mM蔗糖和约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,基于蔗糖/NaCl的缓冲液包含约100mM蔗糖和100mM NaCl。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM磷酸盐至约50mM磷酸盐、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,磷酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM磷酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM组氨酸至约50mM组氨酸、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,组氨酸/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM组氨酸、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM柠檬酸盐至约50mM柠檬酸盐、约50mM

蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,柠檬酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM柠檬酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约5mM乙酸盐至约50mM乙酸盐、约50mM蔗糖至约300mM蔗糖、以及约5mM NaCl至约200mM NaCl。在一些情况下,乙酸盐/蔗糖/NaCl缓冲液包含约10mM乙酸盐、约100mM蔗糖和约100mM NaCl。在一些情况下,L-Wnt3A经受无菌过滤步骤。

[0191] 在一些情况下,在氮气下储存L-Wnt3A。在一些情况下,L-Wnt3A在氮气下是稳定的而无实质性活性损失。

[0192] 在一些情况下,在约1℃与约8℃之间的温度下储存L-Wnt3A。在一些情况下,L-Wnt3A在至少约1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃或更高的温度下是稳定的而无实质性活性损失。在一些情况下,L-Wnt3A在至多约1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃或更低的温度下是稳定的而无实质性活性损失。

[0193] 在一些情况下,在约-80℃至约-20℃的温度下储存L-Wnt3A。在一些情况下,L-Wnt3A在约-80℃的温度下是稳定的而无实质性活性损失。在一些情况下,L-Wnt3A在约-20℃的温度下是稳定的而无实质性活性损失。

[0194] 在一些实施方案中,L-Wnt3A持续至少约10、20、30、40、50、60、70、80 90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、356、400、700、1000天或更久是稳定的而无实质性活性损失。在一些实施方案中,L-Wnt3A持续至多约10、20、30、40、50、60、70、80 90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、356、400、700、1000天或更短时间是稳定的而无实质性活性损失。

[0195] 在一些情况下,术语“无实质性活性损失”是指脂质体Wnt多肽的功能活性接近于不存在脂质体下相应天然Wnt多肽的功能活性。在一些情况下,相较于天然Wnt多肽的功能活性,脂质体Wnt多肽的功能活性是至少约100%、99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40%或更大。在一些情况下,相较于天然Wnt多肽的功能活性,脂质体Wnt多肽的功能活性是至多约100%、99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40%或更小。在一些情况下,使用测定检测Wnt多肽的功能活性,所述测定诸如像质谱分析法、在本文中其他地方描述的与生物标志物分析相关的测定、移植手术诸如肾包膜下移植手术、脊柱融合手术,ALP、TRAP和TUNEL染色,免疫组织化学分析、以及微型CT分析和定量移植植物生长。

[0196] 在一些情况下,术语“稳定”是指Wnt多肽处于折叠状态,并且未展开或降解。在一些情况下,术语“稳定”还指Wnt多肽保留功能活性而无实质性活性损失。在一些情况下,用于测定稳定性的测定包括确定Wnt多肽的活性的测定,诸如上述那些,并且还包括诸如基于LSL细胞的测定,诸如基于小鼠LSL细胞的测定。

[0197] 在一些实施方案中,还评估Wnt多肽和脂质体Wnt多肽(分别例如Wnt3A多肽和L-Wnt3A)的数量、纯度、效能和安全性。在一些情况下,通过利用色谱方法(例如HPLC方法)来测定Wnt多肽和脂质体Wnt多肽(分别例如Wnt3A多肽和L-Wnt3A)的数量(或浓度)。在一些情况下,HPLC方法是RP-HPLC方法。

[0198] 在一些情况下,通过利用色谱方法(例如HPLC方法)、尺寸分离方法(例如SDS-PAGE)或电荷分离方法(毛细管等电聚焦(cIEF)方法)来测定Wnt多肽和脂质体Wnt多肽(分别例如Wnt3A多肽和L-Wnt3A)的纯度。

[0199] 在一些实施方案中,通过利用本文所述的LSL测定来测定Wnt多肽和脂质体Wnt多肽(分别例如Wnt3A多肽和L-Wnt3A)的效能。

[0200] 在一些实施方案中,通过利用例如微生物计数测试(例如如USP 61 (USP29-NF24)中所述)和/或内毒素测试(例如如USP 85 (USP29-NF24)中所述)来测定Wnt多肽和脂质体Wnt多肽(分别例如Wnt3A多肽和L-Wnt3A)的安全性。

[0201] 在一些实施方案中,测定Wnt多肽和脂质体Wnt多肽(分别例如Wnt3A多肽和L-Wnt3A)的重量摩尔渗透浓度。在一些情况下,根据如USP 785 (USP29-NF24)中所述的指导方针测定Wnt多肽和脂质体Wnt多肽(分别例如Wnt3A多肽和L-Wnt3A)的重量摩尔渗透浓度。

[0202] 在一些实施方案中,Wnt多肽和脂质体Wnt多肽(分别例如Wnt3A多肽和L-Wnt3A)包含小于

[0203] 表达构建体

[0204] 在一些实施方案中,通过重组方法产生包含一个或多个变体的Wnt多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A、Wnt5A或Wnt10B多肽。在一些情况下,包含一个或多个变体的Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,包含一个或多个变体的Wnt多肽是Wnt5A多肽。在一些情况下,包含一个或多个变体的Wnt多肽是Wnt10B多肽。

[0205] 通过将适当核苷酸变化引入Wnt多肽DNA中来制备氨基酸序列变体,包括在C末端被截短的变体。所述变体代表在天然存在的Wnt多肽的氨基酸序列内或在所述氨基酸序列的末端中的一者或两者处的残基插入、取代和/或指定缺失。进行插入、取代和/或指定缺失(例如截短)的任何组合以获得最终构建体,条件是最终构建体具有如本文定义的所需生物活性。氨基酸变化还可改变Wnt多肽的翻译后过程,诸如改变糖基化位点的数目或位置,改变膜锚定特征,和/或通过插入、缺失或以其他方式影响Wnt多肽的前导序列来改变Wnt多肽的细胞内定位。

[0206] 在一些实施方案中,Wnt多肽内的一个或多个变体包括取代、插入、缺失或它们的组合。在一些情况下,Wnt3A多肽包含取代、插入、缺失或它们的组合。在一些情况下,Wnt5A多肽包含取代、插入、缺失或它们的组合。在其他情况下,Wnt10B多肽包含取代、插入、缺失或它们的组合。

[0207] 在一些情况下,编码Wnt3A多肽的DNA由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2表示。在一些情况下,编码Wnt3A多肽的DNA例如通过使SEQ ID NO:1的序列截短,或通过利用SEQ ID NO:2的序列来制备。在一些情况下,Wnt多肽编码基因还通过如本领域中已知的寡核苷酸合成、扩增等获得。

[0208] 将编码Wnt多肽的核酸(例如cDNA或基因组DNA)插入可复制载体中以进行表达。许多所述载体是可用的。载体组分通常包括但不限于以下中的一者或多者:复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。优选地,选择GMP可相容载体,例如可商购获得的载体OpticVec、pTarget、pcDNA4T04、pcDNA4.0等。

[0209] 在一些情况下,包含编码Wnt多肽的第一核酸的载体还包含编码伴侣蛋白的第二核酸,所述第二核酸可操作地连接于所述第一核酸。在一些情况下,伴侣蛋白是卷曲蛋白、Wntless、Afamin或Porcupine。在一些情况下,伴侣蛋白是卷曲蛋白-8。在一些情况下,伴侣蛋白是卷曲蛋白-8融合蛋白(例如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:18)。在一些情况下,载体是多顺反子(例如双顺反子)载体,其中第一核酸和第二核酸处于同一启动子下,并且第一核酸

与第二核酸之间的载体区域包含IRES元件或2A肽。在一些情况下,2A肽包括:T2A([GSG]-EGRGSLTTCGDVEENPGP)(SEQ ID NO:30)、P2A([GSG]-ATNFSLLKQAGDVEENPGP)(SEQ ID NO:31)、E2A([GSG]-QCTNYALLKLAGDVESNPGP)(SEQ ID NO:32)和F2A([GSG]-VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP)(SEQ ID NO:33)。在一些情况下,载体包含第一核酸和第二核酸,但两个核酸处于两个不同启动子下。

[0210] 在一些实施方案中,编码Wnt多肽的第一核酸和编码伴侣蛋白的第二核酸被构建在两个不同载体中。

[0211] 在一些实施方案中,使用耐受最低血清培养条件的表达载体。在一些情况下,最低血清培养条件包括减血清培养条件、无蛋白质培养条件、化学成分确定的培养基培养条件、或无血清培养条件。在一些实施方案中,使用耐受减血清培养条件的表达载体。在一些实施方案中,使用耐受无蛋白质培养条件的表达载体。在一些实施方案中,使用耐受化学成分确定的培养基培养条件的表达载体。

[0212] 在一些实施方案中,使用耐受无血清培养基条件的表达载体。在一些情况下,表达载体导致高拷贝数的所需转录物以及目标蛋白质的分泌。在一些情况下,表达载体可与cGMP可相容哺乳动物细胞系相容。哺乳动物表达载体的非限制性实例包括pOptivec载体、pTarget™载体、BacMam pCMV-Dest载体、Flp-In™核心系统、Gateway®载体套组、HaloTag®载体、Flexi®载体、pCMVTNT™载体、pcDNA4.0和pcDNA™4/T0载体。在一些实施方案中,表达载体选自pOptivec和pTarget™载体。pOptivec载体是一种适合于TOPO®的双顺反子质粒,所述质粒允许快速克隆在CMV启动子的下游的含有哺乳动物分泌信号和目标基因的基因。二氢叶酸还原酶选择标记允许进行快速选择。在一些情况下,这个载体用于短暂转染CHO-S细胞。在一些情况下,pTarget™载体用于短暂转染CHO-S细胞,以及用于创建表达Wnt多肽(例如Wnt3A)的稳定细胞系。

[0213] 编码序列还将包括允许Wnt的分泌的信号序列。信号序列可为载体的组分,或它可为插入载体中的Wnt编码DNA的一部分。所选异源性信号序列优选是由宿主细胞识别和加工(即由信号肽酶裂解)的异源性信号序列。在哺乳动物细胞表达中,可使用天然信号序列,或其他哺乳动物信号序列可为适合的,诸如来自其他动物Wnt多肽的信号序列和来自同一或相关物种的分泌型多肽的信号序列,以及病毒分泌前导物,例如单纯性疱疹gD信号。

[0214] 表达载体可含有选择基因,也被称为可选择标记。这个基因编码为在选择性培养基中生长的经转化宿主细胞的存活或生长所必需的蛋白质。未用含有选择基因的载体转化的宿主细胞在培养基中将不会存活。典型选择基因编码以下蛋白质:所述蛋白质(a)赋予对抗生素或其他毒素例如氨苄青霉素(ampicillin)、新霉素(neomycin)、甲氨蝶呤(methotrexate)或四环素(tetracycline)的抗性,(b)弥补营养缺陷性缺陷,或(c)供给不可从复合培养基获得的关键营养物。

[0215] 表达载体将含有由宿主生物体识别,并且可操作地连接于Wnt编码序列的启动子。启动子是定位在结构基因的起始密码子的上游(5') (通常在约100至1000bp内)的非翻译序列,所述非翻译序列控制它们所可操作地连接的特定核酸序列的转录和翻译。所述启动子通常属于两个类别,即诱导型和组成型。诱导型启动子是响应于培养条件的某一变化来引发在它们的控制下从DNA进行的转录的水平增加的启动子,所述变化例如存在或不存在营

养物或温度变化。由多种潜在宿主细胞识别的许多启动子是熟知的。天然Wnt多肽启动子序列与许多异源性启动子两者均可用于引导Wnt多肽的表达。然而,异源性启动子是优选的,因为它们通常容许达成更大转录和更高产率。

[0216] 在哺乳动物宿主细胞中从载体的转录可例如由从病毒(诸如多瘤病毒、鸡痘病毒、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头状瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒,并且最优选是猿猴病毒40(SV40))的基因组,从异源性哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子、PGK(磷酸甘油酸激酶)启动子或免疫球蛋白启动子,从热激启动子获得的启动子控制,条件是所述启动子可与宿主细胞系统相容。SV40病毒的早期启动子和晚期启动子便于以还含有SV40病毒复制起点的SV40限制片段形式获得。人巨细胞病毒的立即早期启动子便于以HindIII E限制片段形式获得。

[0217] 转录可通过将增强子序列插入载体中来增加。增强子是DNA的顺式作用性元件,通常约10至300bp,作用于启动子以使它的转录增加。增强子相对不依赖于定向和位置,已被发现在转录单元的5'和3',在内含子内,以及在编码序列自身内。来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶(elastase)、白蛋白、 α -胎蛋白(α -fetoprotein)和胰岛素)的许多增强子序列现时是已知的。然而,通常将使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括在复制起点的后侧上的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复制起点的后侧上的多瘤病毒增强子、以及腺病毒增强子。增强子可在编码序列的5'或3'位置处剪接至表达载体中,但优选位于启动子的5'位点处。

[0218] 用于哺乳动物宿主细胞中的表达载体还将含有为终止转录以及使mRNA稳定所必需的序列。所述序列通常可从真核或病毒DNA或cDNA的5'非翻译区获得,以及有时可从3'非翻译区获得。这些区域含有被转录为编码Wnt多肽的mRNA的非翻译部分中的多腺苷酸化片段的核苷酸区段。

[0219] 对含有以上所列的组分中的一者或多者的适合载体的构建采用标准技术。以产生所需载体所需的形式对经分离质粒或DNA片段进行裂解,调适,以及再连接。

[0220] 在一些情况下,使用提供在哺乳动物细胞中的短暂表达的表达载体。一般来说,短暂表达涉及使用能够在宿主细胞中高效复制的表达载体,以致所述宿主细胞积累许多拷贝的所述表达载体,并且转而合成高水平的由所述表达载体编码的所需多肽。包含适合表达载体和宿主细胞的短暂表达系统允许对由所克隆DNA编码的多肽进行便利阳性鉴定,以及关于所需生物学或生理学性质对所述多肽进行快速筛选。

[0221] 在一些实施方案中,使用提供在哺乳动物细胞中的稳定表达的表达载体。在所述情况下,包含适合表达载体和宿主细胞的稳定表达系统提供大规模生产(例如超过40L、超过50L、超过100L、超过150L、超过200L、超过250L、或超过300L培养物)。

[0222] 在一些情况下,使用无血清培养基。无血清培养基的非限制性实例包括CD CHO培养基、CD CHO AGT™培养基、CD OptiCHO™培养基、CHO-S-SFM II(任选地包括次黄嘌呤和胸苷)、CD 293AGT™培养基、腺病毒表达培养基(AEM)、FreeStyle™ 293表达培养基、FreeStyle™ CHO表达培养基、CD FortiCHO™培养基、EX-CELL®302无血清培养基、EX-CELL®325PF CHO无血清培养基、EX-CELL®CD CHO-2无动物组分培养基、EX-CELL®CD CHO-3培养基、EX-CELL®CDH0 DHFR⁻无动物组分培养基和ActiPro培养基。

[0223] 可进行本发明方法以便符合FDA或WHO关于GMP生产的指导方针。关于所述GMP生产

的指导方针可从相关监管机构获得。参见例如“WHO good manufacturing practices:main principles for pharmaceutical products. Annex 3 in:WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Forty-fifth report. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO技术报告丛书, 第961号)” ; “ICH Q5B guideline. Analysis of the expression construct in cells used for production of r-DNA derived protein products. Geneva, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1995” ; “Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development, 第2版 Geneva, UNDP/World Bank/WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2009” ; 各自以引用的方式明确并入本文。

[0224] 通常, 使用细胞库系统产生由重组DNA获得的生物治疗剂, 所述细胞库系统涉及制造商的源于主细胞库的工作细胞库(WCB)。本发明包括用于使WNT3A蛋白分泌的载体转染的中国仓鼠卵巢(CHO) (例如CHO-S或CHO-K1) 细胞的冷冻等分试样, 所述细胞可用作主细胞库或用作工作细胞库。

[0225] 在一些实施方案中, 生产规模(或细胞培养规模) 是超过40L、超过50L、超过100L、超过150L、超过200L、超过250L、或超过300L。在一些情况下, 生产规模(或细胞培养规模) 是超过100L。在一些情况下, 生产规模(或细胞培养规模) 是超过200L。在一些情况下, 生产规模(或细胞培养规模) 是超过300L。在一些情况下, 生产规模(或细胞培养规模) 是约100L。在一些情况下, 生产规模(或细胞培养规模) 是约200L。在一些情况下, 生产规模(或细胞培养规模) 是约300L。

[0226] 在一些实施方案中, 使宿主细胞悬浮生长。

[0227] 细胞系

[0228] 在一些实施方案中, 用编码Wnt多肽的表达载体转染cGMP可相容细胞系。示例性cGMP可相容细胞系包括哺乳动物细胞系, 诸如中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞系、人胚肾(HEK) 细胞系或幼小仓鼠肾(BHK) 细胞系; 或昆虫细胞系, 诸如Sf9细胞系、Sf21细胞系、Tn-368细胞系或High Five(BTI-TN-5B1-4) 细胞系。

[0229] 在一些情况下, 将编码Wnt多肽的表达载体转染于选自以下的cGMP可相容细胞系中: 中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞系、人胚肾(HEK) 细胞系、幼小仓鼠肾(BHK) 细胞系、Sf9细胞系、Sf21细胞系、Tn-368细胞系或High Five(BTI-TN-5B1-4) 细胞系。在一些情况下, 将编码Wnt多肽的表达载体转染于CHO细胞系中。在一些情况下, 将编码Wnt多肽的表达载体转染于BHK细胞系中。在一些情况下, 将编码Wnt多肽的表达载体转染于HEK细胞系中。在一些情况下, 将编码Wnt多肽的表达载体转染于Sf9细胞系中。在一些情况下, 将编码Wnt多肽的表达载体转染于Sf21细胞系中。在一些情况下, 将编码Wnt多肽的表达载体转染于Tn-368细胞系中。在一些情况下, 将编码Wnt多肽的表达载体转染于High Five细胞系中。在一些情况下, Wnt多肽是Wnt3A多肽、Wnt 5A多肽或Wnt 10B多肽。

[0230] 在一些实施方案中, Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下, 将编码Wnt3A多肽的表达载体转染于选自以下的cGMP可相容细胞系中: 中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞系、人胚肾(HEK) 细胞系、幼小仓鼠肾(BHK) 细胞系、Sf9细胞系、Sf21细胞系、Tn-368细胞系或High Five

(BTI-TN-5B1-4)细胞系。在一些情况下,将编码Wnt3A多肽的表达载体转染于CHO细胞系中。在一些情况下,将编码Wnt3A多肽的表达载体转染于BHK细胞系中。在一些情况下,将编码Wnt3A多肽的表达载体转染于HEK细胞系中。在一些情况下,将编码Wnt3A多肽的表达载体转染于Sf9细胞系中。在一些情况下,将编码Wnt3A多肽的表达载体转染于Sf21细胞系中。在一些情况下,将编码Wnt3A多肽的表达载体转染于Tn-368细胞系中。在一些情况下,将编码Wnt3A多肽的表达载体转染于High Five细胞系中。

[0231] 示例性CHO细胞系包括但不限于CHO-S、CHO-K1、CHO-DXB11 (或CHO-DUKX) 和CHO-DG44细胞系。在一些情况下,将编码Wnt多肽的表达载体转染于CHO-S细胞系或CHO-K1细胞系中。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽、Wnt5A多肽或Wnt10B多肽。在一些情况下,将编码Wnt3A多肽的表达载体转染于CHO-S细胞系中。在一些情况下,将编码Wnt3A多肽的表达载体转染于CHO-K1细胞系中。在一些情况下,将编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的Wnt3A多肽的表达载体转染于CHO-S细胞系中。在一些情况下,将编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的Wnt3A多肽的表达载体转染于CHO-K1细胞系中。在额外情况下,将编码包含变体(例如缺失或截短)的Wnt3A多肽的表达载体转染于CHO-S细胞系中。在额外情况下,将编码包含变体(例如缺失或截短)的Wnt3A多肽的表达载体转染于CHO-K1细胞系中。

[0232] 在一些情况下,用编码包含缺失或截短的Wnt3A多肽的表达载体转染的CHO-S细胞的组合允许蛋白质有效分泌至最低血清培养基(例如无血清条件)中。在一些情况下,缺失或截短是C末端缺失或截短。在一些情况下,Wnt3A多肽如以SEQ ID NO:1所说明。在一些情况下,用编码其中相对于SEQ ID NO:1(BC103921),C末端被截短的Wnt3A多肽的表达载体转染的CHO-S细胞的组合允许在不存在血清或其他动物产品下蛋白质有效分泌至培养基中。

[0233] 在一些情况下,用编码包含缺失或截短的Wnt3A多肽的表达载体转染的CHO-K1细胞的组合允许蛋白质有效分泌至最低血清培养基(例如无血清条件)中。在一些情况下,缺失或截短是C末端缺失或截短。在一些情况下,Wnt3A多肽如以SEQ ID NO:1所说明。在一些情况下,用编码其中相对于SEQ ID NO:1(BC103921),C末端被截短的Wnt3A多肽的表达载体转染的CHO-S细胞的组合允许在不存在血清或其他动物产品下蛋白质有效分泌至培养基中。在一些情况下,使CHO-K1细胞以悬浮物形式生长。

[0234] 如在本文中其他地方所述,最低血清培养基有时包含少于9%血清。在一些情况下,血清是FBS。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是至多约0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或更少。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是至少约0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或更多。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约0.05%。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约0.1%。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约0.5%。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约1%。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约2%。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约3%。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约4%。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约5%。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约6%。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约7%。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约8%。在一些情况下,存在于最低血清培养基中的FBS是约9%。在其他情况下,最低血清培养基是无血清培养基。

[0235] 有时,最低血清培养基包含从植物水解产物而非动物来源的蛋白质或组分获得的组分,诸如肽和/或多肽。在其他情况下,最低血清培养基包含重组蛋白和/或激素,并且不包含FBS、牛血清白蛋白或人血清白蛋白。在额外情况下,最低血清培养基包含低分子量成分,并且任选地包含合成肽和/或激素。

[0236] 在一些实施方案中,最低血清培养基含有一种或多种额外补充物。在一些实施方案中,额外补充物是脂质补充物。脂质补充物的非限制性实例包括脂质混合物1(Sigma-Aldrich)、脂质混合物2(Sigma-Aldrich)、**Lipogro®** (Rocky Mountain Biologicals)和化学成分确定的脂质浓缩物(Life Technologies)。在一些实施方案中,无血清培养基含有脂质补充物。

[0237] 在一些情况下,最低血清培养基是无血清的化学成分确定培养基。在一些情况下,无血清的化学成分确定培养基大致上不含动物源性组分。

[0238] 在一些实施方案中,本公开方法包括在无血清培养基中在Wnt多肽(例如Wnt3A多肽)得以表达和分泌所处的条件下培养用包含可操作地连接于启动子的所述Wnt多肽(例如Wnt3A多肽)的表达载体转染的CHO细胞(例如CHO-S细胞或CHO-K1细胞),所述Wnt多肽包含用于达成分泌的信号序列,所述信号序列可为天然Wnt(例如Wnt3A)信号序列或异源性信号序列。在一些情况下,Wnt多肽是可操作地连接于启动子的包含用于达成分泌的信号序列的C末端截短Wnt多肽(例如Wnt3A多肽),所述信号序列可为天然Wnt(例如Wnt3A)信号序列或异源性信号序列,所述Wnt多肽在所述Wnt多肽(例如Wnt3A多肽)得以表达和分泌所处的条件下获得。在一些实施方案中,方法还包括用表达载体转染细胞的初始步骤。在某一实施方案中,方法包括从培养基纯化由此产生的多肽。在一些实施方案中,Wnt多肽(例如Wnt3A多肽)被纯化至适于GMP临床使用的程度。在一些实施方案中,将由此纯化的Wnt多肽(例如Wnt3A多肽)包装成单位剂量制剂。

[0239] 在一些实施方案中,使CHO细胞悬浮生长。

[0240] 在其他实施方案中,CHO细胞是贴壁的。

[0241] 在一些实施方案中,培养基包含血清替代物。在一些实施方案中,血清替代物不含动物产品。在一些实施方案中,血清替代物包含纯化蛋白质,例如胰岛素、转铁蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白等中的一者或多者,但缺乏例如生长因子、类固醇激素、糖皮质激素、细胞粘附因子、可检测Ig、有丝分裂原等。血清替代物可在多达约0.1%、多达约0.25%、多达约0.5%、多达约0.75%、多达约1%、多达约2.5%、多达约5%、多达约7.5%或多达约10%的浓度下存在于培养基中。血清替代物可在多达约0.1%的浓度下存在于培养基中。血清替代物可在多达约0.25%的浓度下存在于培养基中。血清替代物可在多达约0.5%的浓度下存在于培养基中。血清替代物可在多达约0.75%的浓度下存在于培养基中。血清替代物可在多达约1%的浓度下存在于培养基中。血清替代物可在多达约2.5%的浓度下存在于培养基中。血清替代物可在多达约5%的浓度下存在于培养基中。血清替代物可在多达约7.5%的浓度下存在于培养基中。血清替代物可在多达约10%的浓度下存在于培养基中。

[0242] 适合培养基可选自本领域中已知的那些,包括但不限于DMEM、RPMI-1640、MEM、伊斯科夫氏培养基(Iscove's)、CHO细胞培养基;等。适合血清替代物包括在无动物产品下产生的那些,或仅具有纯化动物蛋白质组分的那些。适于这个目的的可商购获得的补充物包括但不限于CellEss、ITS(例如ITS3或ITS3+)、Excyte、OneShot、Knockout以及它们的如本领域

中所知的类似物。在一些情况下,ITS补充物是包含胰岛素、转铁蛋白和硒的混合物的补充物。培养基可还包含不限于诸如GlutaMax™(基于谷氨酰胺的二肽)、抗生素(例如多西环素(doxycycline))、G418、非必需氨基酸、杀稻瘟菌素(blasticidine)等的组分。

[0243] Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约10ng/ml、至少约25ng/ml、至少约50ng/ml、至少约75ng/ml、至少约100ng/ml、至少约250ng/ml、至少约500ng/ml、至少约750ng/ml、至少约1μg/ml、至少约1.1μg/ml、至少约1.25μg/ml、至少约1.5μg/ml、至少约1.75μg/ml、至少约2.5μg/ml、至少约5μg/ml、至少约7.5μg/ml、至少约10μg/ml、至少约15μg/ml、至少约20μg/ml、至少约25μg/ml、至少约30μg/ml或更高。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约10ng/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约25ng/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约50ng/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约75ng/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约100ng/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约250ng/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约500ng/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约750ng/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约1μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约1.1μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约1.25μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约1.5μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约1.75μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约2.5μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约5μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约7.5μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约10μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约15μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约20μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约25μg/ml。Wnt多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约30μg/ml。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt5A多肽。在一些情况下,Wnt多肽是Wnt 10B多肽。

[0244] 在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些情况下,Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平是至少约10ng/ml、至少约25ng/ml、至少约50ng/ml、至少约75ng/ml、至少约100ng/ml、至少约250ng/ml、至少约500ng/ml、至少约750ng/ml、至少约1μg/ml、至少约1.1μg/ml、至少约1.25μg/ml、至少约1.5μg/ml、至少约1.75μg/ml、至少约2.5μg/ml、至少约5μg/ml、至少约7.5μg/ml、至少约10μg/ml、至少约15μg/ml、至少约20μg/ml、至少约25μg/ml、至少约30μg/ml或更高。

[0245] Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约10ng/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约25ng/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约50ng/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约75ng/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约100ng/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约250ng/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约500ng/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约750ng/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约1μg/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约1.1μg/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约1.25μg/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约1.5μg/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可

为至少约1.75 μ g/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约2.5 μ g/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约5 μ g/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约7.5 μ g/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约10 μ g/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约15 μ g/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约20 μ g/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约25 μ g/ml。Wnt3A多肽向无血清培养基中的分泌水平可为至少约30 μ g/ml。

[0246] 在一些实施方案中,所表达和分泌的Wnt多肽的C末端被截短了5个至40个之间的氨基酸。在一些情况下,所表达和分泌的Wnt多肽的C末端被截短了5个至35个之间的氨基酸、10个至35个之间的氨基酸、10个至33个之间的氨基酸、10个至30个之间的氨基酸、15个至33个之间的氨基酸、15个至30个之间的氨基酸、20个至35个之间的氨基酸、20个至33个之间的氨基酸、20个至30个之间的氨基酸、25个至33个之间的氨基酸、或25个至30个之间的氨基酸。

[0247] 在一些实施方案中,所表达和分泌的Wnt多肽的C末端被截短了1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33个或更多个氨基酸,并且可另外在N末端或C末端被截短,条件是蛋白质维持生物活性。在一些实施方案中,Wnt多肽被截短了5个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt多肽被截短了10个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt多肽被截短了15个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt多肽被截短了20个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt多肽被截短了25个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt多肽被截短了30个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt多肽被截短了33个氨基酸。

[0248] 在一些情况下,Wnt多肽是Wnt3A多肽。在一些实施方案中,所表达和分泌的Wnt3A多肽的C末端被截短了1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33个或更多个氨基酸,并且可另外在N末端或C末端被截短,条件是蛋白质维持生物活性。在一些实施方案中,Wnt3A多肽被截短了5个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt3A多肽被截短了10个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt3A多肽被截短了15个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt3A多肽被截短了20个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt3A多肽被截短了25个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt3A多肽被截短了30个氨基酸。在一些实施方案中,Wnt3A多肽被截短了33个氨基酸。

[0249] 在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:1具有至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:1具有至少70%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:1具有至少85%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:1具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:1具有至少96%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:1具有至少97%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:1具有至少98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:1具有至少99%序列同一性的序列。

[0250] 在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:2具有至少70%、80%、85%、

90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:2具有至少70%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:2具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:2具有至少85%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:2具有至少96%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:2具有至少97%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:2具有至少98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Wnt3A多肽具有与SEQ ID NO:2具有至少99%序列同一性的序列。

[0251] Wnt多肽组合物和制剂

[0252] 本文提供组合物,其中分泌至最低血清培养基(例如无血清培养基诸如无血清的化学成分确定培养基)中或处于药学上可接受的赋形剂中的生物活性Wnt多肽在至少约0.1 µg/ml;至少约0.25µg/ml;至少约0.5µg/ml;至少约0.75µg/ml;至少约1µg/ml;至少约2.5µg/ml;至少约5µg/ml;至少约7.5µg/ml;至少约10µg/ml;至少约25µg/ml;至少约30µg/ml;至少约50µg/ml;至少约75µg/ml;至少约100µg/ml;至少约250µg/ml;至少约500µg/ml;至少约750µg/ml;至少约1mg/ml;至少约2.5mg/ml;至少约5mg/ml;至少约7.5mg/ml;至少约10mg/ml;至少约25mg/ml;至少约50mg/ml;至少约75mg/ml;至少约100mg/ml;或更大的浓度下。

[0253] 在一些实施方案中,将通过本发明的方法和培养系统产生的蛋白质并入多种制剂中以用于治疗性施用。在一个方面,通过与适当的药学上可接受载体或稀释剂组合将药剂配制成药物组合物,并且配制成呈固体、半固体或液体形式的制剂,诸如片剂、胶囊、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液、栓剂、注射液、吸入剂、凝胶剂、微球体等。因此,蛋白质和/或其他化合物的施用可以各种方式实现。蛋白质和/或其他化合物在施用之后可为全身性的,或可借助于制剂,或通过使用起在植入部位处维持活性剂量的作用的植入物而为局部化的。

[0254] 在药物剂型中,蛋白质和/或其他化合物可以它们的药学上可接受的盐形式施用,或它们还可单独或以适当联合方式以及与其他药物活性化合物组合加以使用。可使药剂组合以提供混合活性。以下方法和赋形剂是示例性的,并且不应解释为限制本发明。

[0255] 药物制剂可以单位剂型提供,其中术语“单位剂型”是指适合作为用于人受试者的单位剂量的物理离散单元,每个单元含有预定量的蛋白质以及药学上可接受的稀释剂、载体或媒介物,所述预定量以足以产生所需作用的量加以计算。本发明的单位剂型的规格取决于所用特定组合物和待实现的作用以及在宿主中与组合物相关的药物效应动力学。

[0256] 药学上可接受的赋形剂诸如媒介物、佐剂、载体或稀释剂是可商购获得的。此外,药学上可接受的辅助物质,诸如pH调整和缓冲剂、张力调整剂、稳定剂、湿润剂等是可商购获得的。可用于本发明的方法和组合物中的任何化合物都可以药学上可接受的碱加成盐形式提供。“药学上可接受的碱加成盐”是指维持游离酸的生物有效性和性质,在生物学方面或在其他方面并非不合需要的那些盐。这些盐由向游离酸中添加无机碱或有机碱来制备。由无机碱获得的盐包括但不限于钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝盐等。优选无机盐是铵、钠、钾、钙和镁盐。由有机碱获得的盐包括但不限于以下各物的盐:伯胺、仲胺和叔胺、包括天然存在的经取代胺的经取代胺、环胺和碱性离子交换树脂,例如异丙胺、三甲胺、二乙

胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因(caffeine)、普鲁卡因(procaine)、海卓胺(hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡糖胺、甲基还原葡糖胺、可可碱(theobromine)、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、多胺树脂等。特别优选的有机碱是异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己胺、胆碱和咖啡因。

[0257] 视所治疗的患者或患者样品和病状以及施用途而定,蛋白质可以约0.001 μ g至约10 μ g的剂量向患者样品施用,或以约0.001 μ g/kg至约10 μ g/kg体重(每天)的剂量施用于患者中。

[0258] 技术人员将易于了解剂量水平可随特定酶、症状的严重性以及受试者对副作用的易感性而变化。一些蛋白质相比于其他蛋白质是更强大的。给定酶的优选剂量可易于由本领域技术人员通过多种手段来确定。一种优选手段是测量给定化合物的生理效能。

[0259] 本发明组合物可用于防治性目的以及治疗性目的。如本文所用,术语“治疗”是指预防疾病与治疗疾病或预先存在的病状两者,并且更通常是指使在所需组织、部位、时机等的Wnt3A活性增强。本发明提供在治疗进行性疾病方面的重大进步,并且有助于使患者的临床症状稳定和/或改进。所述治疗合乎需要地在受影响组织中功能丧失之前进行,但还可有助于恢复丧失的功能或防止进一步功能丧失。治疗作用的证据可为任何疾病严重性减弱或病状改进,例如骨愈合增强等治疗作用可以临床效果衡量,或可通过生物化学测试确定。或者,可查看疾病的症状减轻。

[0260] 在本发明的其他实施方案中,提供细胞组合物,其中细胞包含表达载体,所述表达载体包含可操作地连接于启动子的包含用于达成分泌的信号序列的C末端截短Wnt3A蛋白,所述信号序列可为天然Wnt3A信号序列或异源性信号序列。在一些实施方案中,细胞是CHO细胞(例如CHO-S细胞或CHO-K1细胞)。在一些实施方案中,细胞以包含无血清培养基的组合物形式提供。在其他实施方案中,细胞是冷冻的以及有活力的,并且任选地以适于接种培养的等分试样提供。

[0261] 细胞可在约 10^3 个细胞/毫升、 10^4 个细胞/毫升、 10^5 个细胞/毫升、 10^6 个细胞/毫升、 10^7 个细胞/毫升、多达约 10^8 个细胞/毫升或更大的浓度下提供在容器中,例如冷冻等分试样。细胞可冷冻在任何适合培养基中以维持细胞的活力,并且所述培养基可包括DMSO。细胞组合物可以GMP形式提供,例如可用于主细胞库或工作细胞库中的组合物,所述组合物由处于确定条件和克隆史下的单一宿主细胞获得,接着被分配至多个容器中。

[0262] 在一些实施方案中,组合物中Wnt多肽的比活性通过以下方式测量:在功能性测定中测定活性水平,所述功能性测定例如是 β -连环蛋白的稳定化,促进干细胞的生长等;在非功能性测定中定量存在的Wnt多肽的量,所述非功能性测定例如是免疫染色、ELISA、western印迹、在考马斯或银染色凝胶上定量等;以及确定生物活性Wnt与总Wnt的比率。通常,大致上同质组合物中如由此确定的比活性将是起始物质的比活性的至少约5%,通常是起始物质的比活性的至少约10%,并且可为约25%、约50%、约90%或更大。

[0263] 关于Wnt的生物活性的测定包括 β -连环蛋白的活化,所述活化可例如通过连续稀释Wnt组合物来测量。关于Wnt生物活性的一示例性测定使Wnt组合物与用Wnt响应性荧光素酶报道体质粒和组成型LacZ表达构建体稳定转染的细胞例如小鼠L细胞接触。荧光素酶/ β 半乳糖苷酶(luc/lac)比率容许根据细胞数目使活性归一化。持续足以使 β -连环蛋白活化

的时期通常是至少约1小时来培养细胞,并且加以溶解。通过与用可商购获得的Wnt蛋白产生的标准曲线进行比较,分析细胞溶解产物的luc/lac表达水平。其他测定包括C57MG转变以及在非洲蟾蜍动物极帽测定中诱导靶标基因。

[0264] 在一些实施方案中,Wnt组合物包含剂与剂之间的统一性。在一些实施方案中,Wnt组合物具有剂与剂之间的小于20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或更小的Wnt浓度变化。在一些情况下,Wnt组合物具有剂与剂之间的小于20%的Wnt浓度变化。在一些情况下,Wnt组合物具有剂与剂之间的小于15%的Wnt浓度变化。在一些情况下,Wnt组合物具有剂与剂之间的小于10%的Wnt浓度变化。在一些情况下,Wnt组合物具有剂与剂之间的小于5%的Wnt浓度变化。在一些情况下,Wnt组合物具有剂与剂之间的小于4%的Wnt浓度变化。在一些情况下,Wnt组合物具有剂与剂之间的小于3%的Wnt浓度变化。在一些情况下,Wnt组合物具有剂与剂之间的小于2%的Wnt浓度变化。在一些情况下,Wnt组合物具有剂与剂之间的小于1%的Wnt浓度变化。在一些情况下,Wnt组合物具有剂与剂之间的小于0.5%的Wnt浓度变化。在一些情况下,Wnt组合物具有剂与剂之间的小于0.1%的Wnt浓度变化。

[0265] 在一些实施方案中,Wnt组合物大致上不含生物污染物(例如微生物诸如细菌、病毒或分支杆菌;或宿主细胞或细胞碎片)。在一些情况下,Wnt组合物包含至多5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%或更少的生物污染物。

[0266] 在一些实施方案中,Wnt组合物大致上不含化学污染物(例如一种或多种在纯化步骤期间和/或在脂质体复原步骤期间利用的缓冲液组分)。在一些情况下,Wnt组合物包含至多5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、0.001%或更少的化学污染物。在一些情况下,化学污染物包括乙醇。在一些情况下,化学污染物包括清洁剂。在一些情况下,化学污染物包括糖清洁剂(例如正己基-β-D-吡喃葡萄糖苷、正庚基-β-D-吡喃葡萄糖苷、正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷、正辛基-α-D-吡喃葡萄糖苷、辛基β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷、正辛基-β-D-吡喃半乳糖苷、正壬基-β-D-吡喃葡萄糖苷、正癸基-β-D-吡喃葡萄糖苷、正十二基-β-D-吡喃葡萄糖苷或甲基-6-O-(N-庚基氨基甲酰基)-α-D-吡喃葡萄糖苷)。

[0267] 使用方法

[0268] 在某些实施方案中,本文描述一种用通过上述方法制备的脂质体Wnt多肽使在骨移植物中的细胞存活增强的方法。在一些实施方案中,增强有需要的受试者的骨移植物中的细胞存活的方法包括以离体方式使包含经分离哺乳动物骨移植物材料的样品与包含通过上述方法产生的脂质体Wnt多肽的组合物一起孵育,所述经分离哺乳动物骨移植物材料包含细胞;以及将增强的细胞移植至靶标部位中。

[0269] 在一些情况下,将细胞孵育至少5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、6小时或更久。在一些情况下,将细胞孵育至少5分钟。在一些情况下,将细胞孵育至少10分钟。在一些情况下,将细胞孵育至少15分钟。在一些情况下,将细胞孵育至少20分钟。在一些情况下,将细胞孵育至少30分钟。在一些情况下,将细胞孵育至少60分钟。在一些情况下,将细胞孵育至少2小时。在一些情况下,将细胞孵育至少6小时或更久。

[0270] 在一些情况下,将细胞孵育至多30分钟、1小时、1.5小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时或更短时间。在一些情况下,将细胞孵育至多30分钟。在一些情况下,将细胞孵育至多1小时。在一些情况下,将细胞孵育至多1.5小时。在一些情况下,将细胞孵育至多2小

时。在一些情况下,将细胞孵育至多3小时。在一些情况下,将细胞孵育至多6小时。

[0271] 在一些情况下,将细胞孵育约5分钟至约6小时、约10分钟至约6小时、约30分钟至约6小时、约5分钟至约3小时、约10分钟至约3小时、约15分钟至约3小时、约30分钟至约3小时、约5分钟至约2小时、约10分钟至约2小时、约15分钟至约2小时、约20分钟至约2小时、约30分钟至约2小时、约5分钟至约1小时、约10分钟至约1小时、约15分钟至约1小时、或约30分钟至约1小时。在一些情况下,将细胞孵育约5分钟至约6小时。在一些情况下,将细胞孵育约10分钟至约6小时。在一些情况下,将细胞孵育约30分钟至约6小时。在一些情况下,将细胞孵育约5分钟至约3小时。在一些情况下,将细胞孵育约10分钟至约3小时。在一些情况下,将细胞孵育约15分钟至约3小时。在一些情况下,将细胞孵育约20分钟至约3小时。在一些情况下,将细胞孵育约30分钟至约3小时。在一些情况下,将细胞孵育约5分钟至约2小时。在一些情况下,将细胞孵育约10分钟至约2小时。在一些情况下,将细胞孵育约15分钟至约2小时。在一些情况下,将细胞孵育约20分钟至约2小时。在一些情况下,将细胞孵育约30分钟至约2小时。在一些情况下,将细胞孵育约5分钟至约1小时。在一些情况下,将细胞孵育约10分钟至约1小时。在一些情况下,将细胞孵育约15分钟至约1小时。在一些情况下,将细胞孵育约20分钟至约1小时。在一些情况下,将细胞孵育约30分钟至约1小时。

[0272] 在一些情况下,在约室温下或在约37℃下孵育细胞。在一些情况下,室温包括小于30℃、小于29℃、小于28℃、小于27℃、小于26℃、小于25℃、小于24℃、小于23℃或小于22℃的温度。在一些情况下,室温包括约20℃至约30℃、约22℃至约28℃、或约24℃至约26℃的温度。在一些情况下,室温包括约22℃、约23℃、约24℃、约25℃、约26℃、约27℃或约28℃。

[0273] 在一些情况下,在约34℃至约39℃的温度下孵育细胞。在一些情况下,在约35℃至约38℃、约35℃至约37℃、约36℃至约39℃、约36℃至约38℃、或约36℃至约37℃的温度下孵育细胞。在一些情况下,在约35℃至约38℃的温度下孵育细胞。在一些情况下,在约35℃至约37℃的温度下孵育细胞。在一些情况下,在约36℃至约39℃的温度下孵育细胞。在一些情况下,在约36℃至约38℃的温度下孵育细胞。在一些情况下,在约36℃至约37℃的温度下孵育细胞。在一些情况下,在约37℃下孵育细胞。

[0274] 在一些情况下,在约2℃至约8℃、约2℃至约6℃、约4℃至约8℃、或约2℃至约4℃的温度下孵育细胞。

[0275] 在一些情况下,相对于未暴露的哺乳动物骨移植物材料,增强的细胞包含增强的成骨能力。

[0276] 在一些情况下,通过手术程序从受试者获得细胞。在一些情况下,不从手术部位移除细胞。在额外情况下,在使经处理细胞返回至受试者中之前,细胞不经遗传修饰,不在培养中扩增,或还诸如通过离心来处理。

[0277] 在一些实施方案中,本文还描述一种用通过上述方法制备的脂质体Wnt多肽使在骨缺损部位处的细胞存活增强的方法。在一些实施方案中,增强有需要的受试者的骨缺损部位处的细胞存活的方法包括向所述骨缺损部位施用包含通过上述方法产生的脂质体Wnt多肽的组合物,其中所述脂质体Wnt多肽使在所述骨缺损部位处的细胞存活增强。在一些情况下,方法还包括在骨缺损部位处施用牙科或整形外科植入物。

[0278] 在一些情况下,骨缺损部位是例如归因于骨折或手术程序的损伤部位,例如牙或骨损伤部位。

[0279] 在一些情况下,骨缺损部位是牙缺损部位,例如用于牙科植入物的部位。牙科植入物包括用于放置在颌骨中的骨内膜植入物,所述植入物包括螺钉、圆柱体或板;以及用于放置在齿龈下但在颌骨上或高于颌骨的骨膜下植入物。在一些情况下,牙科植入包括两阶段植入,所述两阶段植入涉及用以将植入物放置至例如颌骨中的初始手术程序,继之以在稍后时间点用以连接基台的后续手术程序。在其他情况下,牙科植入包括单阶段牙科植入,其中使基台连接于植入物可在不需要第二手术程序下实现。

[0280] 在一些情况下,在施用包含脂质体Wnt多肽的组合物之前向骨缺损部位施用牙科或整形外科植入物。举例来说,在施用包含脂质体Wnt多肽的组合物之前约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、30天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、1年或更久向骨缺损部位施用牙科或整形外科植入物。

[0281] 在其他情况下,在施用包含脂质体Wnt多肽的组合物之后向骨缺损部位施用牙科或整形外科植入物。举例来说,可在施用包含脂质体Wnt多肽的组合物之后约1天、2天、5天、7天、2周、30天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或更久向骨缺损部位施用牙科或整形外科植入物。

[0282] 在额外情况下,牙科或整形外科植入物和包含脂质体Wnt多肽的组合物同时向骨缺损部位施用。

[0283] 在一些情况下,脂质体Wnt多肽使牙科或整形外科植入物的骨整合增强。

[0284] 试剂盒/制品

[0285] 在某些实施方案中,本文公开供与一种或多种本文所述的方法、工艺和组合物一起使用的试剂盒和制品。所述试剂盒包括托架、包装或容器,其被划分来容纳一个或多个诸如小瓶、管等的容器,所述一个或多个容器中的每一者都包含待用于本文所述的方法中的单独要素中的一者。适合容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。在一些实施方案中,容器由诸如玻璃或塑料的多种材料形成。在一些情况下,容器是单次使用容器。

[0286] 本文提供的制品含有包装材料。包装材料的实例包括但不限于瓶、管、袋、容器、瓶以及适于所选制剂和预定施用和治疗模式的任何包装材料。

[0287] 举例来说,一个或多个容器包括Wnt多肽或脂质体Wnt多肽。一个或多个容器任选地包括小瓶,例如玻璃小瓶诸如单次使用玻璃小瓶。试剂盒还任选地包括与它在本文所述的方法中的使用相关的标识性描述或标签或说明。

[0288] 试剂盒通常包括列出内含物和/或使用说明的标签和具有使用说明的包装插页。通常还将包括一组说明。

[0289] 在一个实施方案中,标签在容器上或与容器相伴。在一个实施方案中,标签在容器上,此时形成所述标签的字母、数字或其他字符被附着、模制或蚀刻至所述容器自身中;标签与容器相伴,此时它存在于还容纳所述容器的贮器或托架内,例如呈包装插页形式。在一个实施方案中,标签用于指示内含物将用于特定治疗应用。标签还指示关于诸如在本文所述的方法中使用内含物的说明。

[0290] 某些术语

[0291] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与由要求保护的主题所属领域中的技术人员通常理解相同的含义。应了解先前一般性描述和以下详细描述仅具有示例性和说明性,并且不限制要求保护的任何主题。在本申请中,除非另外明确陈述,否

则单数的使用包括复数。必须注意的是,除非上下文另外明确规定,否则如说明书和随附权利要求中所用,单数形式“一个(种)(a/an)”和“这个(种)(the)”包括复数个指示物。在本申请中,除非另外陈述,否则“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括(including)”以及其他形式诸如“include”、“includes”和“included”的使用不具有限制性。

[0292] 如本文所用,范围和量可表示为“约”某一特定值或范围。约还包括精确量。因此,“约5 μ L”意指“约5 μ L”,并且还意指“5 μ L”。通常,术语“约”包括将被预期在实验误差例如 $\pm 5\%$ 、 $\pm 10\%$ 或 $\pm 15\%$ 内的量。

[0293] 本文所用的章节标题仅出于组织目的,并且不应解释为限制所述主题。

[0294] 除非另外定义,否则本文所用的技术和科学术语具有与由本发明所属领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。Singleton等,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology第2版,J.Wiley&Sons(New York, NY 1994)向本领域技术人员提供对本申请中使用的许多术语的一般性指导。

[0295] 本公开方法以及用以测定它们在特定受试者或应用中的功效的测试可使用本领域标准程序根据本文教义进行。因此,本公开的实施可采用在本领域技术人员的范围内的常规分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学技术。所述技术充分说明于文献中,诸如“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”,第2版(Sambrook等,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(M.J.Gait编,1984);“Animal Cell Culture”(R.I.Freshney编,1987);“Methods in Enzymology”(Academic Press, Inc.);“Handbook of Experimental Immunology”(D.M.Weir和C.C.Blackwell编);“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”(J.M.Miller和M.P.Calos编,1987);“Current Protocols in Molecular Biology”(F.M.Ausubel等人编,1987);“PCR: The Polymerase Chain Reaction”(Mullis等人编,1994);和“Current Protocols in Immunology”(J.E.Coligan等人编,1991);以及所有前述文献的更新或修订版本。

[0296] 如本文所用,“可商购获得的”化合物可从商业来源获得,所述商业来源包括但不限于Acros Organics(Pittsburgh PA)、Aldrich Chemical(Milwaukee WI,包括Sigma Chemical和Fluka)、Apin Chemicals Ltd.(Milton Park UK)、Avocado Research(Lancashire U.K.)、BDH Inc.(Toronto, Canada)、Bionet(Cornwall, U.K.)、Chemservice Inc.(West Chester PA)、Crescent Chemical Co.(Hauppauge NY)、Eastman Organic Chemicals, Eastman Kodak Company(Rochester NY)、Fisher Scientific Co.(Pittsburgh PA)、Fisons Chemicals(Leicestershire UK)、Frontier Scientific(Logan UT)、ICN Biomedicals, Inc.(Costa Mesa CA)、Key Organics(Cornwall U.K.)、Lancaster Synthesis(Windham NH)、Maybridge Chemical Co.Ltd.(Cornwall U.K.)、Parish Chemical Co.(Orem UT)、Pfaltz&Bauer, Inc.(Waterbury CN)、Polyorganix(Houston TX)、Pierce Chemical Co.(Rockford IL)、R&D systems, Inc.(Minneapolis MN)、Riedel de Haen AG(Hannover, Germany)、Spectrum Quality Product, Inc.(New Brunswick, NJ)、TCI America(Portland OR)、Trans World Chemicals, Inc.(Rockville MD)、Wako Chemicals USA, Inc.(Richmond VA)、Novabiochem和Argonaut Technology。

[0297] 化合物还可通过为本领域普通技术人员所知的方法制备。如本文所用,“为本领域普通技术人员所知的方法”可通过各种参考书籍和数据库来找到。详述适用于制备本发明

化合物的反应物的合成,或提供对描述制备的文章的引用的适合参考书籍和专著包括例如“Synthetic Organic Chemistry”, John Wiley&Sons, Inc., New York; S.R. Sandler等, “Organic Functional Group Preparations”, 第2版, Academic Press, New York, 1983; H.O. House, “Modern Synthetic Reactions”, 第2版, W.A. Benjamin, Inc. Menlo Park, Calif. 1972; T.L. Gilchrist, “Heterocyclic Chemistry”, 第2版, John Wiley&Sons, New York, 1992; J. March, “Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure”, 第4版, Wiley-Interscience, New York, 1992。特定和类似反应物还可通过由美国化学学会的化学文摘服务社制定的已知化学物质索引来找到, 所述索引可在大多数公共图书馆和大学图书馆中获得, 以及可通过在线数据库来获得(对于更多细节, 可联系华盛顿哥伦比亚特区的美国化学学会(American Chemical Society, Washington, D.C.))。目录中的已知但不可商购获得的化学物质可通过定制化学合成机构来制备, 其中许多标准化学物质供应机构(例如以上所列的那些)提供定制合成服务。

[0298] 如本文所用, 最低血清条件包括血清存在被降低, 例如具有约9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1.5%、1%、0.5%、0.25%、0.2%、0.1%、0.05%血清或更低的血清条件。在一些情况下, 最低血清条件包含9%至0%、5%至0.05%、5%至0.1%、5%至0.25%、4%至0.05%、4%至0.1%、4%至0.2%、3%至0.05%、3%至0.1%、3%至0.2%、3%至0.25%、2%至0.05%、2%至0.01%、2%至0.25%、或2%至0.5%血清。在一些情况下, 最低血清条件包括减血清培养基、无蛋白质培养基、化学成分确定的培养基、或无血清培养基。在一些情况下, 减血清培养基包含约1%至约5%血清(例如胎牛血清)。在一些情况下, 无蛋白质培养基不含有动物来源的任何蛋白质或组分, 但有时含有从植物水解产物获得的肽和/或多肽。在一些情况下, 化学成分确定的培养基包含重组蛋白和/或激素(例如重组白蛋白和胰岛素以及化学成分确定的脂质), 并且不含有胎牛血清、牛血清白蛋白或人血清白蛋白。在一些情况下, 化学成分确定的培养基是无蛋白质的化学成分确定培养基, 所述培养基包含低分子量成分, 并且有时还含有合成肽和/或激素。在一些情况下, 化学成分确定的培养基是无肽无蛋白质的化学成分确定培养基。在一些情况下, 无血清培养基(或成分确定的培养基)包含成分不确定的动物源性产品诸如血清白蛋白、水解产物、生长因子、激素、载体蛋白和附着因子。在一些实施方案中, 本文所用的最低血清条件是指包含小于9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1.5%、1%、0.5%、0.25%、0.2%、0.1%或0.05%血清的培养基条件。在一些实施方案中, 本文所用的最低血清条件是指包含9%至0%、5%至0.05%、5%至0.1%、5%至0.25%、4%至0.05%、4%至0.1%、4%至0.2%、3%至0.05%、3%至0.1%、3%至0.2%、3%至0.25%、2%至0.05%、2%至0.01%、2%至0.25%、或2%至0.5%血清的培养基条件。在一些实施方案中, 本文所用的最低血清条件是指减血清培养基条件。在一些实施方案中, 本文所用的最低血清条件是指无蛋白质培养基条件。在一些实施方案中, 本文所用的最低血清条件是指化学成分确定的培养基条件。在一些实施方案中, 如本文所用的最低血清条件是指无血清培养基条件。在一些实施方案中, 如本文所用的最低血清条件是指无血清的化学成分确定培养基条件。

[0299] 实施例

[0300] 这些实施例仅出于说明目的而提供, 并且不限制本文提供的权利要求的范围。

[0301] 实施例1-一般性方法

[0302] 质粒DNA按比例扩大

[0303] 每个DNA表达构建体都按比例扩大以获得适于转染的量。使质粒DNA在琼脂糖凝胶上运行以进行品质评估,并且在继续进行转染之前确认序列。

[0304] CHO细胞短暂转染

[0305] 将悬浮CHO细胞接种于振荡烧瓶中,并且使用补充以4mM GlutaMAX的CD OptiCHO培养基加以扩增。在转染当天,将经扩增细胞接种至具有新鲜培养基的新烧瓶中。与OC-400处理组件一起使用MaxCyte STX可缩放转染系统,将每个DNA构建体短暂转染至CHO细胞中。在转染之后一天对细胞进行从37℃至32℃的温度变动,并且以分批补料培养方式加以维持,其中每日添加3.4%MaxCyte补料直至在第7天生产运行结束。表2对说明性Wnt3A变体的转染细节进行说明。

[0306] 表2.

	构建体	所用DNA量	在转染时的细胞密度	在转染时的细胞活力	在收集时的细胞密度	在收集时的细胞活力
[0307]	Wnt3A变体4 (His-hWnt3A) (SEQ ID NO: 13)	0.2 mg	4.0 x 10 ⁶ 个细胞/ 毫升	95%	7.18 x 10 ⁶ 个细胞/毫升	68%

[0308] His标签化蛋白的IMAC纯化

[0309] 收集来自短暂生产运行的条件培养基,并且通过离心和过滤加以澄清。将上清液上样于用结合缓冲液[例如20mM Tris-HCl、500mM NaCl、1%CHAPS]预平衡的固定化金属(镍)亲和色谱法(IMAC)管柱上。使含有40mM咪唑的洗涤缓冲液[例如20mM Tris-HCl、500mM NaCl、1%CHAPS]穿过管柱直至OD280值(NanoDrop,Thermo Scientific)接近零。用咪唑浓度递增直至0.5M的线性梯度洗脱靶标蛋白质。洗脱物收集于级分中。

[0310] CE-SDS分析

[0311] 使用LabChip GXII(Perkin Elmer)对每个所洗脱级分进行CE-SDS分析,并且加以分析。

[0312] 实施例2-Wnt3A多肽与卷曲蛋白-8融合蛋白的共表达

[0313] 卷曲蛋白-8融合蛋白(SEQ ID NO:5)是一种包含卷曲蛋白-8的前151个氨基酸残基通过多Gly接头连接于IgG1的Fc区的可溶性蛋白质。在一些情况下,卷曲蛋白-8融合蛋白与Wnt3A的共表达使Wnt3A的表达增加,并且使Wnt3A聚集降低。在一些情况下,Wnt3A-卷曲蛋白-8复合物使Wnt3A失活,并且使Wnt3A稳定。从复合物移除卷曲蛋白-8融合蛋白会使Wnt3A再活化。

[0314] 图1说明在外源性卷曲蛋白-8融合蛋白(Fz-151-Fc)存在下或在共表达的卷曲蛋白-8融合蛋白(Fz-151-Fc)存在下,Wnt3A表达的比较研究。如泳道2中所说明,相对于在外源性卷曲蛋白-8融合蛋白存在下的Wnt3A表达,与卷曲蛋白-8融合蛋白共表达的Wnt3A的表

达增加至约5倍。泳道1显示在外源性卷曲蛋白-8融合蛋白存在下的Wnt3A表达。

[0315] 图2显示卷曲蛋白-8融合蛋白(Fz-151-Fc)的共表达使Wnt3A聚集降低,并且还使Wnt3A单体的量增加。Wnt3A多肽由稳定细胞系产生。

[0316] 图3说明本文所述的四种示例性纯化策略。

[0317] 图4说明策略1的纯化细节。图4A显示策略1的一示例性纯化流程。图4B显示各种级分的银染色。条件是非还原性条件。图4C显示用以确定Wnt3A多肽的存在性和浓度的对各种级分的western印迹分析。图4D说明Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。

[0318] 图5说明策略2的纯化细节。图5A说明蛋白A级分的考马斯染色。图5B显示各种级分的银染色。图5C显示用以确定Wnt3A多肽的存在性和浓度的对各种级分的western印迹分析。图5D说明Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。

[0319] 图6说明策略3的纯化细节。图6A显示各种级分的银染色。图6B说明Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。

[0320] 图7说明策略4的纯化细节。图7A显示蛋白A级分的考马斯染色。图7B显示各种级分的银染色。图7C说明Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。

[0321] 实施例3-Wnt3A多肽与伴侣蛋白的共表达

[0322] Wntless是一种与功能性经脂质修饰Wnt多肽结合,并且为Wnt多肽从高尔基体运输至细胞表面所需的细胞内伴侣蛋白。

[0323] 图8说明Wnt3A多肽与Wntless(WLS)的共表达。图8A显示在共表达的Wntless存在下,Wnt3A表达增加。图8B显示Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。图8C显示Wnt3A在稳定细胞系中的表达。

[0324] 图9说明Wnt3A与Afamin的共表达。在一些情况下,Afamin的共表达使Wnt3A浓度增加约10%。

[0325] 实施例4-标签化Wnt3A多肽的表达和产生

[0326] 图10说明分别用:PA、FLAG和His标签加以标签化的三种示例性Wnt3A多肽的表达和活性。图10A说明所分泌标签化Wnt3A多肽的浓度。图10B显示Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。

[0327] 图11显示包含不同His标签-接头构建体的Wnt3A变体(ART352^{his}变体)的活性。

[0328] 图12显示Wnt3A变体-ART352^{his}的来自Ni-NTA管柱的各种级分的活性。

[0329] 图13-图15显示N末端标签化Wnt3A多肽的表达和产生。在本文中用于图13-图15的Wnt3A多肽构建体是:

[0330] TT6093:PA-TEV-Wnt3A

[0331] TT6094:FLAG-TEV-Wnt3A

[0332] TT6095:His-TEV-Wnt3A

[0333] TT6096:Wnt3A

[0334] 在第7天收集条件培养基。

[0335] 图13A-图13C说明N末端标签化Wnt3A多肽在ELISA测定中的浓度。

[0336] 图14说明用于纯化FLAG标签化Wnt3A多肽:FLAG-TEV-hWnt3A的纯化流程。在40mL条件培养基中短暂转染CHO细胞。将CHAPS在1%的最终浓度下添加至条件培养基中。接着将溶液上样于0.25mL HM2琼脂糖管柱上,并且用5个管柱体积的洗脱缓冲液洗脱,所述洗脱缓

冲液包含处于1X PBS缓冲液中的在100 μ g/mL下的FLAG肽和1%CHAPS。

[0337] 图15显示FLAG标签化Wnt3A多肽的活性和浓度。图15A-图15C显示Wnt3A多肽在LSL测定中的活性。图15D-图15F显示Wnt3A多肽的浓度。

[0338] 实施例5-在两种不同培养体积下纯化Wnt3A多肽

[0339] 从0.75L培养物或10L培养物纯化包含SEQ ID NO:2的Wnt3A。首先将条件培养基上样于5mL蓝色琼脂糖管柱上,随后用肝素管柱纯化。图16显示从0.75L培养物培养的Wnt3A的活性。图17显示从10L培养物培养的Wnt3A的活性和浓度。

[0340] 实施例6-用示例性糖清洁剂OGP纯化Wnt3A多肽

[0341] 在这个实验中,在与脂质体一起孵育之前,利用示例性糖清洁剂OGP作为Wnt蛋白的竞争性拮抗剂与稳定剂两者。OGP,在本文中也称为正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷、OG、C8Glc、辛基- β -葡萄糖苷、辛基- β -吡喃葡萄糖苷或辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷,是一种非离子清洁剂,已显示其与人卷曲蛋白5受体的富含半胱氨酸的结构域(CRD)相互作用。在这个研究中,显示OGP在纯化Wnt多肽复合物期间能够在与Wnt竞争结合融合卷曲蛋白8蛋白中胜出,以及在纯化期间使Wnt多肽稳定。

[0342] CHO细胞被工程改造来共表达示例性截短Wnt3A多肽和包含Fc标签化CRD结构域的经修饰人卷曲蛋白8蛋白(hFZD8 CRD-Fc)。所分泌Wnt3A多肽与hFZD8 CRD-Fc形成可溶性复合物。基于LSL细胞基测定,未检测到复合物中的Wnt3A多肽的活性(图18)。

[0343] 纯化流程说明于图19中。简要说来,从条件培养基收集Wnt3A多肽-hFZD8 CRD-Fc复合物,并且上样于第一蛋白A管柱上。洗脱缓冲液的pH是小于约4.0。使来自第一蛋白A管柱的洗脱物与包含约1%OGP的缓冲溶液一起孵育。接着将经孵育洗脱物上样于蓝色琼脂糖管柱上以使hFZD8 CRD-Fc从Wnt3A多肽分离。0.8-2M NaCl(处于还包含约1%OGP的洗脱缓冲液中)的线性梯度用于收集Wnt3A多肽。还使Wnt3A多肽经受采用串联方式的第二蛋白A管柱,继之以混合模式管柱和尺寸排阻色谱管柱,以产生纯化Wnt3A多肽。

[0344] CHAPS用作对照。

[0345] 图20A-图20B显示用1%CHAPS或1%OGP进行的Wnt3A纯化的示例性凝胶图像。如图20B中所示,相对于图20A,用OGP替换CHAPS使得能够更高效分离Wnt3A(ART352)-FZD复合物。此外,对OGP的包括使得一旦Wnt3A(ART352)从与FZD的相互作用释放,就使它稳定。

[0346] 图21A-图21B说明WNT3A(ART352)洗脱物在1%OGP(图21A)或1%CHAPS(图21B)的情况下的LSL活性。

[0347] 图22说明用混合模式管柱进行的纯化的一示例性凝胶图像。Wnt3A洗脱物的纯度是约大于90%。

[0348] 图23A-图23B说明用包含1%CHAPS或1%OGP的缓冲液纯化的Wnt3A多肽。相比于用包含1%OGP的缓冲液(图23B),在包含用包含1%CHAPS的缓冲液纯化的Wnt3A多肽的溶液中观察到更多杂质(图23A)。

[0349] 图24A-图24B说明相较于CHAPS,OGP在2种不同温度即4 $^{\circ}$ C(图24A)和23 $^{\circ}$ C(图24B)下使WNT3A蛋白稳定。

[0350] 图25说明一示例性脂质体Wnt3A配制方法。

[0351] 实施例7-两种不同Wnt3A制造方法的比较

[0352] 比较了Wnt3A和一示例性Wnt3A多肽ART352的制造方法。表3说明相应Wnt3A多肽的

制造细节。

[0353]	药物物质性质	Wnt3A	ART352
	宿主细胞	贴壁CHO	适合于悬浮的CHO
	细胞培养	含有血清	化学成分确定，无蛋白质
[0354]	基		
	细胞培养方法	分批	补料分批
	纯化方法	固定有磺化多芳族化合物的单一色谱管柱	多个色谱步骤, 包括固定有磺化多芳族化合物的管柱、亲和色谱管柱和混合模式管柱
	制剂	功能活性Wnt多肽于含有CHAPS的缓冲液中	功能活性Wnt多肽于含有糖清洁剂的缓冲液中

[0355] 表4显示L-Wnt3A和一示例性脂质体Wnt3A多肽ART352-L的制造细节。

[0356]	药物产品性质	L-Wnt3A	ART352-L
	制造方法	用离心过滤器使WNT3A浓缩, 使WNT3A与预先形成的脂质体一起在室温下孵育过夜	使ART352与预先形成的脂质体一起在25-30°C下孵育2小时所得ART352-L经受超滤和透滤, 并且在最终缓冲液中配制

[0357] 表5说明两种方法的效能和纯度差异。

[0358]		L-Wnt3A (ng/ μ L)	ART352-L (ng/ μ L)
	效能	0.68	0.82
	纯度	约50%	>90%

[0359] 实施例8-效能的测定

[0360] 效能的计算

[0361] 虫荧光素由荧光素酶转化成氧化虫荧光素, 并且几乎所有通过这个反应而释放的能量都呈通过板读取器检测的光的形式。因为荧光素酶的表达受到TCF/LEF结合位点的控制, 所以荧光素酶的表达与Wnt活性成比例。

[0362] 使用4参数逻辑曲线拟合程序来产生由相对发光单位 (RLU) 相对于表示为 μ g/mL的ART352(x) 浓度所表示的标准曲线:

[0363] 其中: x=自变量, 即剂量

[0364] A=左渐近值

[0365] B=弯曲希尔斜率(curvature hill slope)

[0366] C=药物产生半数最大响应所处的有效浓度(EC50), μ g/mL

[0367] D=右渐近值

[0368] 使用下式计算对照和一个或多个样品的比效能百分比：

$$[0369] \frac{\text{标准物的EC50}(\mu\text{g/mL})}{\text{对照或一个或多个样品的EC50}(\mu\text{g/mL})} \times 100\%$$

[0370] 其中：EC50=半数最大有效浓度

[0371] 示例性Wnt3A多肽ART352和脂质体Wnt3A多肽ART352-L的效能通过将样品的读出数据与在已知浓度下测试的参考标准物(参见下文参考标准物章节)的读出数据进行比较来确定。在0.003-1.6 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内的一代表性标准曲线显示于图26中。

[0372] 在表6中比较WNT3A/L-WNT3A以及ART352/ART352-L的效能结果。

[0373]	效能结果 ($\mu\text{g/mL}$)	在 40 mL 批 次的情况下的 WNT3A	来自第一50 L批次的 ART352	来自第二50 L 批次的 ART352
	蛋白质	0.5	5.5	17.9
	蛋白质的脂质体制 剂	0.68	0.36	0.82

[0374] 在最终确定GMP方法之前的制造方法开发期间,相较于第二50L批次,使用次优方法制造了第一50L批次的ART352-L。因此,相较于来自从第二批次产生的ART352和ART352-L的相应结果,来自第一批次的ART352和ART352-L展现较低效能。这些数据显示LSL测定对于检测有意义的批次与批次间效能差异具有适合灵敏性。

[0375] 实施例9-自体移植物处理和操作的方法开发

[0376] 溶液条件和温度对自体移植物中的细胞活力的影响

[0377] 从髂嵴收集自体移植物。为确定凋亡基线,立刻处理一个子组的自体移植物以进行TUNEL染色(白色棒条,图27)。这代表零时离体时间点。

[0378] 将剩余自体移植物放置在盐水中,或含有ART352-L(有效浓度=0.5ng/ μL)的盐水中。持续离体保持的最大持续期例如2小时来孵育自体移植物,并且采用最大温度例如37 $^{\circ}\text{C}$ 。分别使用如Allen等,“Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis,”J Pharmacol Toxicol Methods 37(4):215-228(1997);以及Kapuscinski,J. “Dapi:A DNA-specific fluorescent probe,”Biotechnic& histochemistry:official publication of the Biological Stain Commission.70(5):220-233(1995)中所述的TUNEL和DAPI来定量细胞活力和凋亡。这些研究显示:

[0379] -相较于在零时间点的对照自体移植物,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在盐水中保持2小时的自体移植物展现显著更多的濒死细胞(图27)。

[0380] -相较于在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在盐水中保持2小时的自体移植物中的凋亡程度,在相同条件下保持的经ART352-L处理自体移植物展现显著更少的濒死细胞(图27)。

[0381] 收集并立刻分析的自体移植物(例如零时间点样品)充当TUNEL的阴性对照。收集剩余自体移植物,接着在4 $^{\circ}\text{C}$ 、23 $^{\circ}\text{C}$ 或37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置在盐水中5分钟或60分钟。使用台盼蓝拒染法定量细胞活力(图28)。在23 $^{\circ}\text{C}$ 下保持的样品充当TUNEL的阳性对照。自体移植物处于盐水

中。这些数据显示：

[0382] -在收集时的细胞活力代表零时间点基线条件(白色棒条,图28)。

[0383] -在4℃下保持自体移植物5分钟使在零时间点观察到的坏死的量增加24%(图28)。

[0384] -在23℃下保持自体移植物使在零时间点观察到的坏死细胞的数目近似倍增(图28)。相较于4℃的保持温度,23℃的保持温度还使坏死细胞的数目显著增加(图28)。

[0385] -在37℃下保持自体移植物使在零时间点观察到的坏死细胞的数目近似增至三倍(图28)。相较于4℃的保持温度,37℃的保持温度还使坏死细胞的数目显著增加(图28)。

[0386] 时间、温度和溶液条件对通过胞吞作用达成的营养物摄取的组合影响

[0387] 为监测和定量通过胞吞作用达成的营养物摄取,收集自体移植物,并且使用标准方案分离骨髓基质细胞(BMSC)。在测试之前,从培养基移除BMSC,洗涤,接着用ART352-L(0.8ng/μL)处理。脂质体用亲脂性荧光染料DiI加以标签化,以追踪它们的分布。

[0388] 接着在23℃下或在37℃下保持用ART352-L处理的BMSC 15-120分钟,例如离体孵育步骤的建议持续期。这些数据证明:

[0389] -对经荧光标记脂质体即ART352-L的摄取随时间而增加(图29)。

[0390] -对经荧光标记脂质体的摄取的速率随温度而增加;例如在23℃下,线的斜率=1142.3,而在37℃下,线的斜率=2792.9(图29)。

[0391] 这些数据表明对于离体保持时期的预定持续期,相比于23℃的孵育温度,在37℃下孵育更好地支持通过胞吞作用达成的营养物摄取。接下来的实验测试如果将孵育温度设置在37℃下,那么药物产品ART352-L是否持续离体保持时期的预定持续期是稳定的。

[0392] 脂质体Wnt3a多肽ART352-L的稳定性随时间和温度而变化

[0393] 在37℃下持续离体孵育步骤的相关时间过程例如15分钟至2小时来评估ART352-L的稳定性。在4℃下的ART352-L稳定性用作阳性对照。来自稳定性评估的结果指示当在4℃下维持ART352-L 2小时时,ART352-L不展现可检测的活性变化,如根据用非GLP ART352-L进行的稳定性研究,通过回归分析所确定(图30)。

[0394] 当在37℃下维持ART352-L 2小时时,ART352-L展现4.9%活性变化(图30)。因此,历经离体孵育步骤的预定持续期例如15分钟至2小时,ART352-L显示最小活性损失。这些数据支持开发其中使用37℃的保持温度的自体移植物操作程序。

[0395] 用以评估通过胞吞作用从孵育溶液移除活性ART352-L的速率的研究

[0396] ART352-L由自体移植物中的细胞加以胞吞,因此,ART352-L活性从孵育溶液丧失。监测ART352-L浓度从离体孵育溶液的随时间和温度而变化的降低速率。

[0397] 在所指示温度下持续所指示时期在ART352-L中孵育自体移植物的等分试样。在所述时期结束时,从孵育溶液移除自体移植物的等分试样,并且LSL测定用于检测剩余在孵育溶液中的活性ART352-L。

[0398] 在其中不包括骨移植物的情况下,100%的初始ART352-L活性剩余在孵育溶液中(图31)。在其中自体移植物被包括在孵育溶液中的情况下,在4℃下孵育15分钟之后,大部分(68%)的初始ART352-L活性剩余在孵育溶液中(图31)。在23℃下孵育15分钟之后,56%的初始ART352-L活性剩余在孵育溶液中(图31)。

[0399] 在37℃的预定目标温度下孵育15分钟之后,24%的初始ART352-L活性剩余在孵育

溶液中(图31)。在孵育30分钟之后,剩余6%的原始ART352-L活性(图31)。在60分钟之后,剩余在孵育溶液中的活性ART352-L的量是2%(图31)。

[0400] 对经ART352-L处理自体移植物的评估

[0401] 基于LSL细胞的测定用于检测残余游离活性ART352-L是否与经ART352-L处理自体移植物相关联。阳性对照和阴性对照用于这个系列的实验中:阴性对照由携带空表达载体的CHO-K1株系组成(图32)。阳性对照由携带ART352表达载体的相同CHO-K1株系组成(图32)。将在CHO-K1空载体细胞的情况下检测到的Wnt活性水平确定为基线(图32)。

[0402] 从成年大鼠收集自体移植物,用ART352-L(有效浓度=0.86 μ g/mL)处理,接着在4 $^{\circ}$ C(蓝色棒条)、23 $^{\circ}$ C(绿色棒条)或37 $^{\circ}$ C下孵育15、30或60分钟。(图32)。在所指示离体保持时期之后,将ART352-L自体移植物放置在LSL细胞上,并且孵育18小时,此后定量荧光素酶表达水平。

[0403] 如图32中所示,未发现残余游离活性ART352-L与任何经ART352-L处理自体移植物相关联。

[0404] 由源于自体移植物的细胞以时间和温度依赖性方式达成的对活性ART352-L从孵育溶液的移除以及对它的胞吞摄取

[0405] 进行两个定量分析以评估由自体移植物中的细胞从孵育溶液移除残余游离活性ART352-L的速率,以及评估由自体移植物中的细胞达成的ART352-L胞吞速率。

[0406] -为测量游离活性ART352-L从孵育溶液的移除,收集自体移植物,并且立刻放置在含有ART352-L(有效浓度=0.86ng/ μ L)的孵育溶液中。使自体移植物在它们的孵育溶液在23 $^{\circ}$ C或37 $^{\circ}$ C下加以保持。在15、30和60分钟之后,移除各种孵育溶液的等分试样,并且使用LSL测定来测试ART352-L活性。

[0407] -为评估由自体移植物中的细胞达成的ART352-L胞吞速率,收集自体移植物,并且遵循标准化程序分离BMSC。使细胞数目标准化,接着用以荧光亲脂性染料DiI加以标签化的ART352-L处理。使细胞在23 $^{\circ}$ C或37 $^{\circ}$ C下加以保持。在15、30、60和120分钟之后,使细胞集结,混悬于PBS中,接着使用板读取器定量荧光信号。

[0408] 这些数据证明ART352-L从孵育溶液向自体移植物的细胞中的移动随时间和温度而变化(图33)。

[0409] 实施例10

[0410] 下表7说明本申请中公开的序列。

[0411]

蛋白质名称		SEQ ID NO:
Wnt3A 多肽 (亚型2) (智人)	MAPLGYFLLCSLKQALGSYPIWWSLAVGPQY SSLGSQPILCASIPGLVPKQLRFCRNYVEIMPSV AEGIKIGIQECQHQFRGRRWNCTTVHDSLAIIFGP VLDKATRESAFVHAIASAGVAFVTRSCAEGTA AICGCSSRHQGSPGKGWKWGGCSEDIEFGGMV SREFADARENRPDARSAMNRHNNEAGRQAIAS HMHLKCKCHGLSGSCEVKTCWWSQPDFRAIGD FLKDKYDSASEMVVEKHRESRGWVETLRPRYT YFKVPTERDLVYYEASPNFCEPNPETGSFGTRD RTCNVSSHGIDGCDLLCCGRGHNARAERRREK CRCVFHWCCYVSCQECTRVYDVHTCKNPGSRA GNSAHQPPHPQPPVRFHPPLRRAGKVP	1
Wnt3A 多肽 (亚型1) (智人)	MAPLGYFLLCSLKQALGSYPIWWSLAVGPQY SSLGSQPILCASIPGLVPKQLRFCRNYVEIMPSV AEGIKIGIQECQHQFRGRRWNCTTVHDSLAIIFGP VLDKATRESAFVHAIASAGVAFVTRSCAEGTA AICGCSSRHQGSPGKGWKWGGCSEDIEFGGMV SREFADARENRPDARSAMNRHNNEAGRQAIAS	2

[0412]

	HMHLKCKCHGLSGSCEVKTCWWSQPDFRAIGD FLKDKYDSASEMVVEKHRESRGWVETLRPRYT YFKVPTERDLVYYEASPNFCEPNPETGSFGTRD RTCNVSSHGIDGCDLLCCGRGHNARAERRREK CRCVFHWCCYVSCQECTRVYDVHTCK	
Wnt3A核苷酸 (智人)	ATGGCCCCAC TCGGATACTT CTTACTCCTC TGCAGCCTGA AGCAGGCTCT GGGCAGCTAC CCGATCTGGT GGTCGCTGGC TGTTGGGCCA CAGTATTCCT CCCTGGGCTC GCAGCCCATC CTGTGTGCCA GCATCCCGGG CCTGGTCCCC AAGCAGCTCC GCTTCTGCAG GAACTACGTG GAGATCATGC CCAGCGTGGC CGAGGGCATC AAGATTGGCA TCCAGGAGTG CCAGCACCAG TTCCGCGGCC GCCGGTGGAA CTGCACCACC GTCCACGACA GCCTGGCCAT CTTCGGGCCC GTGCTGGACA AAGCTACCAG GGAGTCGGCC TTTGTCCACG CCATTGCCTC AGCCGGTGTG GCCTTTGCAG TGACACGCTC ATGTGCAGAA GGCACGGCCG CCATCTGTGG CTGCAGCAGC CGCCACCAGG GCTCACCAGG CAAGGGCTGG AAGTGGGGTG GCTGTAGCGA GGACATCGAG TTTGGTGGGA TGGTGTCTCG GGAGTTCGCC GACGCCCCGGG AGAACCGGCC AGATGCCCGC TCAGCCATGA ACCGCCACAA CAACGAGGCT GGGCGCCAGG CCATCGCCAG CCACATGCAC CTCAAGTGCA AGTGCCACGG GCTGTCGGGC AGCTGCGAGG TGAAGACATG CTGGTGGTCG CAACCCGACT TCCGCGCCAT CGGTGACTTC CTCAAGGACA AGTACGACAG CGCCTCGGAG ATGGTGGTGG AGAAGCACCG GGAGTCCCGC GGCTGGGTGG AGACCCTGCG GCCGCGCTAC ACCTACTTCA AGGTGCCCAC GGAGCGCGAC CTGGTCTACT ACGAGGCCTC GCCCAACTTC TGCGAGCCCA ACCCTGAGAC GGGCTCCTTC GGCACGCGCG ACCGCACCTG CAACGTCAGC TCGCACGGCA TCGACGGCTG CGACCTGCTG TGCTGCGGCC GCGGCCACAA CGCGCGAGCG GAGCGGCGCC GGGAGAAGTG CCGCTGCGTG TTCCACTGGT GCTGCTACGT CAGCTGCCAG	3

[0413]

GAGTGCACGC GCGTCTACGA CGTGCACACC
 TGCAAGTAGG CACCGGCCGC GGCTCCCCCT
 GGACGGGGCG GGCCCTGCCT GAGGGTGGGC
 TTTTCCCTGG GTGGAGCAGG ACTCCCACCT
 AAACGGGGCA GTACTCCTCC CTGGGGGGCG
 GACTCCTCCC TGGGGGTGGG GCTCCTACCT
 GGGGGCAGAA CTCCTACCTG AAGGCAGGGC
 TCCTCCCTGG AGCTAGTGTC TCCTCTCTGG
 TGGCTGGGCT GCTCCTGAAT GAGGCGGAGC
 TCCAGGATGG GGAGGGGCTC TGC GTTGGCT
 TCTCCCTGGG GACGGGGCTC CCCTGGACAG
 AGGCGGGGCT ACAGATTGGG CGGGGCTTCT
 CTTGGGTGGG ACAGGGCTTC TCCTGCGGGG
 GCGAGGCCCC TCCCAGTAAG GGC GTGGCTC
 TGGGTGGGCG GGGCACTAGG TAGGCTTCTA
 CCTGCAGGCG GGGCTCCTCC TGAAGGAGGC
 GGGGCTCTAG GATGGGGCAC GGCTCTGGGG
 TAGGCTGCTC CCTGAGGGCG GAGCGCCTCC
 TTAGGAGTGG GGTTTTATGG TGGATGAGGC
 TTCTTCCTGG ATGGGGCAGA GCTTCTCCTG
 ACCAGGGCAA GGCCCCTTCC ACGGGGGCTG
 TGGCTCTGGG TGGGCGTGGC CTGCATAGGC
 TCCTTCCTGT GGGTGGGGCT TCTCTGGGAC
 CAGGCTCCAA TGGGGCGGGG CTTCTCTCCG
 CGGGTGGGAC TCTTCCCTGG GAACCGCCCT
 CCTGATTAAG GCGTGGCTTC TGCAGGAATC
 CCGGCTCCAG AGCAGGAAAT TCAGCCCACC
 AGCCACCTCA TCCCCAACCC CCTGTAAGGT
 TCCATCCACC CCTGCGTCGA GCTGGGAAGG
 TTCCATGAAG CGAGTCGGGT CCCCACCCG
 TGCCCCTGGG ATCCGAGGGC CCCTCTCCAA
 GCGCCTGGCT TTGGAATGCT CCAGGCGCGC
 CGACGCCTGT GCCACCCCTT CCTCAGCCTG
 GGGTTTGACC ACCCACCTGA CCAGGGGGCCC
 TACCTGGGGA AAGCCTGAAG GGCCTCCCAG
 CCCCCAACCC CAAGACCAAG CTTAGTCCTG
 GGAGAGGACA GGGACTTCGC AGAGGCAAGC
 GACCGAGGCC CTCCCAAAGA GGCCCGCCCT
 GCCC GGGCTC CCACACCGTC AGGTACTCCT

[0414]

	<p>GCCAGGGAAC TGGCCTGCTG CGCCCCAGGC CCCGCCCCGTC TCTGCTCTGC TCAGCTGCGC CCCCTTCTTT GCAGCTGCCC AGCCCCTCCT CCCTGCCCTC GGGTCTCCCC ACCTGCACTC CATCCAGCTA CAGGAGAGAT AGAAGCCTCT CGTCCCGTCC CTCCCTTTCC TCCGCCTGTC CACAGCCCCT TAAGGGAAAG GTAGGAAGAG AGGTCCAGCC CCCAGGCTG CCCAGAGCTG CTGGTCTCAT TTGGGGGCGT TCGGGAGGTT TGGGGGGCAT CAACCCCCCG ACTGTGCTGC TCGCGAAGGT CCCACAGCCC TGAGATGGGC CGGCCCCCTT CCTGGCCCCCT CATGGCGGGA CTGGAGAAAT GGTCCGCTTT CCTGGAGCCA ATGGCCCCGGC CCCTCCTGAC TCATCCGCCT GGCCCGGGAA TGAATGGGGA GGCCGCTGAA CCCACCCGGC CCATATCCCT GGTTGCCTCA TGGCCAGCGC CCCTCAGCCT CTGCCACTGT GAACCGGCTC CCACCCTCAA GGTGCGGGGA GAAGAAGCGG CCAGGCGGGG CGCCCCAAGA GCCCAAAGA GGGCACACCG CCATCCTCTG CCTCAAATTC TGC GTTTTTTG GTTTAATGT TATATC</p>	
<p>卷曲蛋白-8 (前体) (智人) (NCBI登 录号 NP_114072. 1)</p>	<p>MEWGYLLEVTSLAALALLQRSSGAAAASAKE LACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEA GLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSTMYTPICLED YKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPWD RMRCDRLEQGNPD TLCMDYNRTDLTTAAPSP PRRLPPPPGEQPPSGSGHGRPPGARPPHRGGGR GGGGGDAAAPPARGGGGGGKARPPGGGAAPC EPGCQCRAPMVS SVSSERHPLYNRVKTGQIANC ALPCHNPFFSQDERAFTVFWIGLWSVLCFVSTF ATVSTFLIDMERFKYPERPIIFLSACYLFVSVGYL VRLVAGHEKVACSGGAPGAGGAGGAGGAAAG AGAAGAGAGGPGGRGEYEELGAVEQHVR YET TGPALCTVVFLLVYFFGMASSIWWVILSLTWFL AAGMKWGNEAIAAGYSQYFH LAAWLVPSVK SIA VLALSSVDGDPVAGICYVGNQSLDNLRGFVLAP LVIYLFITMFLLAGFVSLFRIRSVIKQQDGPTKT HKLEKLMIRLGLFTVLYTVPAAVVVACL FYEQ</p>	4

[0415]

	HNRPRWEATHNCPCLRDLPDQARRPDYAVF MLKYFMCLVVGITSGVWVWSGKTLESWRSCLC TRCCWASKGA AVGGGAGATAAGGGGGPGGG GGGGPGGGGGPGGGGGSLYSDVSTGLTWRS GT ASSVSYPKQMPLSQV	
卷曲蛋白-8 融合蛋白1	MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKE LACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEA GLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLC SMYTPICLED YKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGF AWPD RMRC DRLPEQGNPD TLCMDYGGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	5
Wntless (前体) (智人) (NCBI登 录号 Q5T9L3.2)	MAGAI IENMSTKKLCIVGGILLVFQIIAFLVGG LI APGPTTAVSYMSVKCV DARKNHHKTKWFVPW GPNHCDKIRDIEEAIPREIEANDIVFSVHIPLPHM EMSPWFQFMLFILQLDIAFKLNNQIRENAEVSM DVSLAYRDDAFAEWTEMAHERVPRKLKCTFTS PKTPEHEGRYYECDVLPFMEIGSV AHKFYLLNI RLPVNEKKKINVGIGEIKDIRLVGIHQNGGFTKV WFAMKTFLTPSIFIIMVWYWRRITMMSRPPVLL EKVIFALGISMTFINIPVEWFSIGFDWTWMLLFG DIRQGIFYAMLLSFWIIFCGEHMMDQHERNHIA GYWKQVGPIAVGSFCLFIFDMCERGVQLTNP FY SIWTTDIGTELAMAFIIVAGICLCLYFLFLCFMVF QVFRNISGKQSSLPAMSKVRR LHYEGLIFRFKFL MLITLACAAMTVIFFIVSQVTEGHWKWGGVTV QVNSAFFTGIYGMWNLYVFALMFLYAPSHKNY GEDQSNGDLGVHSGEELQLTTTITHVDGPTEIY KLTRKEAQE	7
Afamin (智人) (NCBI登 录号)	MKLLKLTGFIFFLF LTESLTLPTQPRDIENFNST QKFIEDNIEYITIIAFAQYVQEATFEEMEKL VKD MVEYKDRCMADKTLPECSKLPNNVLQEKICAM EGLPQKHNF SHCCSKVDAQRRLCFFYNKKSDV GFLPPFPTLDPEEK CQAYESNRESLLNHFLYEVA RRNPFVFAPTLLTVAVHFEEVAKSCCEEQNKVN	8

[0416]

AAA21612.1)	CLQTRAIPVTQYLKAFSSYQKHVCGALLKFGTK VVHFIYIAILSQKFKIEFKELISLVEDVSSNYDG CCEGDVVQCIRDTSKVMNHICSKQDSISSKIKEC CEKKIPERGQCIINSNKDDRPKDLSLREGKFTDS ENVCQERDADPDFTFFAKFTFEYSRRHPDLSIPEL LRIVQIYKDLLRNCCNTENPPGCYRYAEDKFNE TTEKSLKMVQQECKHFQNLGKDGLKYHYLIRL TKIAPQLSTEELVSLGEKMVTAFTTCCTLSEefa CVDNLADLVFGELCGVNENRTINPAVDHCKKT NFAFRRPCFESLKADKTYVPPPFsQDLFTFHAD MCQSQNEELQRKTDRFLVNLVKLKHELTDEEL QSLFTNFANVVDKCCKAESPEVCFNEESPKIGN	
Porcupine (智人) (NCBI登 录号 NP_073736. 2) (亚型A)	MATFSRQEFFQQLQGCLLPTAQQGLDQIWLLL AICLACRLLWRLGLPSYLKHASTVAGGFFSLYH FFQLHMOVVVLLSLLCYLVFLCRHSSHRGVF LSVTILYLLMGEMHMDTVTWHKMRGAQMI VAMKAVSLGFDLDRGEVGTVPSPVEFMGYLYF VGTIVFGPWISFHSYLQAVQGRPLSCRWLQKVA RSLALALLCLVLSTCVGPYLFYFIPLNGDRLLR KWLRAYESAVSFHSNYFVGFLSEATATLAGA GFTEEKDHLEWDLTVSKPLNVELPRSMVEVVT SWNLPMsywLNNYVFKNALRLGTFSaVLVTY AASALLHGFSFHLAAVLLSLAFITYVEHVLRKR LARILSACVLSKRCPDcSHQHRLGLGVRALNL LFGALAI FHlayLgSLFDVDVDDTTEEQGYGM AYTVHKWSELSWASHWVTFGCWIFYRLIG	9
Wnt3A变体 1 (SP-PA-TEV- hWnt3A) 信号肽 (SP) - VH21	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGVAMPGAEDDVV RENLYFQKGdGSSyPIWWSLAVGPQYSSLGSQP ILCASIPGLVPKQLRfCRNYVEIMPSVAEGIKIGI QECQHQRGRrWNCTTVHDSLAI fGPVLDKAT RESAFVHAIASAGVAFaVTRSCAEGTAAICGCS SRHQGSPGKGWKWGGCSEdIEFGGMVSREFAD ARENRPDARSAMNRHNNEAGRQAIAshMHLK CKCHGLSGSCEVKTCWWSQPDFRAIGDFLKDK YDSASEMVVEKHRESRGWVETLRPRYTYFKVP TERDLVYYEASPNFCEPNPETGSFGTRDRTCNV SSHGIDGCDLLCCGRGHNAERREKCRcVF HWCCYVSCQECTRVYDVHTCK	10
Wnt3A变体	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDYKDDDDKENLYF	11

[0417]

2 (SP-FLAG-T EV-hWnt3A) (SP-VH21)	QGSYPIWWSLAVGPQYSSLGSQPILCASIPGLVP KQLRFCRNYVEIMPSVAEGIKIGIQECQHQRGR RWNCTTVHDSLAIFGPVLDKATRESAFVHAIAS AGVAFVTRSCAEGTAAICGCSSRHQGSPGKG WKWGGCSEDIEFGGMVSREFADARENRPDARS AMNRHNNEAGRQAIASHMHLKCKCHGLSGSCE VKTCWWSQPDFRAIGDFLKD KYDSASEMVVEK HRESRGWVETLRPRYTYFKVPTERDLVYYEASP NFCEPNPETGSFGTRDRTC NVSSHGIDGCDLLC CGRGHNARAERRREKCRCVFHWCCYVSCQECT RVYDVHTCK	
Wnt3A 变体 3 (SP-His ₆ -T EV-hWnt3A) (SP-VH21)	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSHHHHHHENLYFQG SYPIWWSLAVGPQYSSLGSQPILCASIPGLVPKQ LRFCRNYVEIMPSVAEGIKIGIQECQHQRGR WNCTTVHDSLAIFGPVLDKATRESAFVHAIASA GVAFVTRSCAEGTAAICGCSSRHQGSPGKGW KWGGCSEDIEFGGMVSREFADARENRPDARSA MNRHNNEAGRQAIASHMHLKCKCHGLSGSCEV KTCWWSQPDFRAIGDFLKD KYDSASEMVVEKH RESRGWVETLRPRYTYFKVPTERDLVYYEASPN FCEPNPETGSFGTRDRTC NVSSHGIDGCDLLCC GRGHNARAERRREKCRCVFHWCCYVSCQECTR VYDVHTCK	12
Wnt3A 变体 4 (His-hWnt 3A)	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSHHHHHHSYPIWWS LAVGPQYSSLGSQPILCASIPGLVPKQLRFCRNY VEIMPSVAEGIKIGIQECQHQRGRRWNCTTVH DSLAIFGPVLDKATRESAFVHAIASAGVAFVTR SCAEGTAAICGCSSRHQGSPGKGWKWGGCSE DIEFGGMVSREFADARENRPDARSAMNRHNNE AGRQAIASHMHLKCKCHGLSGSCEVKTCWWS QPDFRAIGDFLKD KYDSASEMVVEKHRESRGW VETLRPRYTYFKVPTERDLVYYEASPNFCEPNP ETGSFGTRDRTC NVSSHGIDGCDLLCCGRGHNA RAERRREKCRCVFHWCCYVSCQECTRVYDVHT CK	13
Wnt3A 变体 5 (His-GGG-	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSHHHHHHGGGSYPI WWSLAVGPQYSSLGSQPILCASIPGLVPKQLRF CRNYVEIMPSVAEGIKIGIQECQHQRGRRWN	14

[0418]

hWnt3A)	TTVHDSLAIIFGPVLDKATRESAFVHAIASAGVA FAVTRSCAEGTAAICGCSSRHQGSPPGKGWKWG GCSEDIIEFGGMVSREFADARENRPDARSAMNR HNNEAGRQAIASHMHLKCKCHGLSGSCEVKTC WWSQPDFRAIGDFLKDKYDSASEMVVEKHRES RGWVETLRPRYTYFKVPTERDLVYYEASPNFCE PNPETGSFGTRDRTCNVSSHGIDGCDLLCCGRG HNARAERRREKCRCVFHWCCYVSCQECTRVY DVHTCK	
Wnt3A变体 5 (His-G4A G4-hWnt3A)	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSHHHHHHGGGGAG GGGSYPIWWSLAVGPQYSSLGSQPILCASIPGLV PKQLRFCRNYVEIMPSVAEGIKIGIQECQHQRG RRWNCTTVHDSLAIIFGPVLDKATRESAFVHAIA SAGVAFVTRSCAEGTAAICGCSSRHQGSPPGK WKWGGCSEDIIEFGGMVSREFADARENRPDARS AMNRHNNEAGRQAIASHMHLKCKCHGLSGSCE VKTCWWSQPDFRAIGDFLKDKYDSASEMVVEK HRESRGWVETLRPRYTYFKVPTERDLVYYEASP NFCEPNPETGSFGTRDRTCNVSSHGIDGCDLLC CGRGHNARAERRREKCRCVFHWCCYVSCQECT RVYDVHTCK	15
卷曲蛋白-8 (FZD8) 截 短变体1	MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKE LACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEA GLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSTMYTPICLED YKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAWPD RMRCDDLPEQGNPDTLCDY	16
卷曲蛋白-8 (FZD8) 截 短变体2	MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKE LACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEA GLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSTMYTPICLED YKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAWPD RMRCDDLPEQGNPDTLCDYNRTDLTTAAPSP PRRLPPPPP	17
卷曲蛋白-8 融合蛋白2	MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKE LACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEA GLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSTMYTPICLED YKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAWPD RMRCDDLPEQGNPDTLCDYNRTDLTTAAPSP PRRLPPPPPGGGGGGGDKTHTCPCPAPELLGG	18

[0419]

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
--

[0420] 尽管本文已显示和描述本公开的优选实施方案,但将对本领域技术人员明显的是所述实施方案仅通过举例方式来提供。在不脱离本公开的情况下,众多改变、变化和替代现将为本领域技术人员所想到。应了解本文所述的本公开的实施方案的各种替代方案可用于实施本公开。意图以下权利要求限定本公开的范围,并且在这些权利要求的范围内的方法和结构以及它们的等同物由所述权利要求涵盖。

[0001]	序列表																		
[0002]	<110> 安卡萨再生疗法公司																		
[0003]	<120> WNT组合物和从无血清培养条件进行的工艺方法																		
[0004]	<130> 47271-708.601																		
[0005]	<140>																		
[0006]	<141>																		
[0007]	<150> 62/630,448																		
[0008]	<151> 2018-02-14																		
[0009]	<150> 62/539,960																		
[0010]	<151> 2017-08-01																		
[0011]	<160> 33																		
[0012]	<170> PatentIn version 3.5																		
[0013]	<210> 1																		
[0014]	<211> 385																		
[0015]	<212> PRT																		
[0016]	<213> 智人																		
[0017]	<400> 1																		
[0018]	Met	Ala	Pro	Leu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Lys	Gln	Ala			
[0019]	1				5					10					15				
[0020]	Leu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Pro	Gln	Tyr			
[0021]					20					25					30				
[0022]	Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	Gln	Pro	Ile	Leu	Cys	Ala	Ser	Ile	Pro	Gly	Leu			
[0023]					35					40					45				
[0024]	Val	Pro	Lys	Gln	Leu	Arg	Phe	Cys	Arg	Asn	Tyr	Val	Glu	Ile	Met	Pro			
[0025]					50					55					60				
[0026]	Ser	Val	Ala	Glu	Gly	Ile	Lys	Ile	Gly	Ile	Gln	Glu	Cys	Gln	His	Gln			
[0027]	65					70					75					80			
[0028]	Phe	Arg	Gly	Arg	Arg	Trp	Asn	Cys	Thr	Thr	Val	His	Asp	Ser	Leu	Ala			
[0029]						85					90					95			
[0030]	Ile	Phe	Gly	Pro	Val	Leu	Asp	Lys	Ala	Thr	Arg	Glu	Ser	Ala	Phe	Val			
[0031]						100					105					110			
[0032]	His	Ala	Ile	Ala	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Phe	Ala	Val	Thr	Arg	Ser	Cys			
[0033]						115					120					125			
[0034]	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Ala	Ile	Cys	Gly	Cys	Ser	Ser	Arg	His	Gln	Gly			
[0035]						130					135					140			
[0036]	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Glu	Asp	Ile	Glu			
[0037]	145						150					155				160			
[0038]	Phe	Gly	Gly	Met	Val	Ser	Arg	Glu	Phe	Ala	Asp	Ala	Arg	Glu	Asn	Arg			
[0039]							165					170				175			
[0040]	Pro	Asp	Ala	Arg	Ser	Ala	Met	Asn	Arg	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg			
[0041]							180						185				190		

[0042]	Gln	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Met	His	Leu	Lys	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Leu
[0043]			195						200						205	
[0044]	Ser	Gly	Ser	Cys	Glu	Val	Lys	Thr	Cys	Trp	Trp	Ser	Gln	Pro	Asp	Phe
[0045]			210						215						220	
[0046]	Arg	Ala	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asp	Ser	Ala	Ser	Glu
[0047]			225				230					235				240
[0048]	Met	Val	Val	Glu	Lys	His	Arg	Glu	Ser	Arg	Gly	Trp	Val	Glu	Thr	Leu
[0049]					245						250					255
[0050]	Arg	Pro	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Phe	Lys	Val	Pro	Thr	Glu	Arg	Asp	Leu	Val
[0051]					260						265					270
[0052]	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Ser	Pro	Asn	Phe	Cys	Glu	Pro	Asn	Pro	Glu	Thr	Gly
[0053]					275											285
[0054]	Ser	Phe	Gly	Thr	Arg	Asp	Arg	Thr	Cys	Asn	Val	Ser	Ser	His	Gly	Ile
[0055]					290											300
[0056]	Asp	Gly	Cys	Asp	Leu	Leu	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	His	Asn	Ala	Arg	Ala
[0057]					305											320
[0058]	Glu	Arg	Arg	Arg	Glu	Lys	Cys	Arg	Cys	Val	Phe	His	Trp	Cys	Cys	Tyr
[0059]						325										335
[0060]	Val	Ser	Cys	Gln	Glu	Cys	Thr	Arg	Val	Tyr	Asp	Val	His	Thr	Cys	Lys
[0061]					340											350
[0062]	Asn	Pro	Gly	Ser	Arg	Ala	Gly	Asn	Ser	Ala	His	Gln	Pro	Pro	His	Pro
[0063]					355											365
[0064]	Gln	Pro	Pro	Val	Arg	Phe	His	Pro	Pro	Leu	Arg	Arg	Ala	Gly	Lys	Val
[0065]					370											380
[0066]	Pro															
[0067]																385
[0068]	<210>	2														
[0069]	<211>	352														
[0070]	<212>	PRT														
[0071]	<213>	智人														
[0072]	<400>	2														
[0073]	Met	Ala	Pro	Leu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Lys	Gln	Ala
[0074]																
[0075]	Leu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Pro	Gln	Tyr
[0076]																
[0077]	Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	Gln	Pro	Ile	Leu	Cys	Ala	Ser	Ile	Pro	Gly	Leu
[0078]																
[0079]	Val	Pro	Lys	Gln	Leu	Arg	Phe	Cys	Arg	Asn	Tyr	Val	Glu	Ile	Met	Pro
[0080]																
[0081]	Ser	Val	Ala	Glu	Gly	Ile	Lys	Ile	Gly	Ile	Gln	Glu	Cys	Gln	His	Gln
[0082]																
[0083]	Phe	Arg	Gly	Arg	Arg	Trp	Asn	Cys	Thr	Thr	Val	His	Asp	Ser	Leu	Ala

[0084]	85	90	95
[0085]	Ile Phe Gly Pro Val Leu Asp Lys Ala Thr Arg Glu Ser Ala Phe Val		
[0086]	100	105	110
[0087]	His Ala Ile Ala Ser Ala Gly Val Ala Phe Ala Val Thr Arg Ser Cys		
[0088]	115	120	125
[0089]	Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ile Cys Gly Cys Ser Ser Arg His Gln Gly		
[0090]	130	135	140
[0091]	Ser Pro Gly Lys Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Glu Asp Ile Glu		
[0092]	145	150	155
[0093]	Phe Gly Gly Met Val Ser Arg Glu Phe Ala Asp Ala Arg Glu Asn Arg		
[0094]	165	170	175
[0095]	Pro Asp Ala Arg Ser Ala Met Asn Arg His Asn Asn Glu Ala Gly Arg		
[0096]	180	185	190
[0097]	Gln Ala Ile Ala Ser His Met His Leu Lys Cys Lys Cys His Gly Leu		
[0098]	195	200	205
[0099]	Ser Gly Ser Cys Glu Val Lys Thr Cys Trp Trp Ser Gln Pro Asp Phe		
[0100]	210	215	220
[0101]	Arg Ala Ile Gly Asp Phe Leu Lys Asp Lys Tyr Asp Ser Ala Ser Glu		
[0102]	225	230	235
[0103]	Met Val Val Glu Lys His Arg Glu Ser Arg Gly Trp Val Glu Thr Leu		
[0104]	245	250	255
[0105]	Arg Pro Arg Tyr Thr Tyr Phe Lys Val Pro Thr Glu Arg Asp Leu Val		
[0106]	260	265	270
[0107]	Tyr Tyr Glu Ala Ser Pro Asn Phe Cys Glu Pro Asn Pro Glu Thr Gly		
[0108]	275	280	285
[0109]	Ser Phe Gly Thr Arg Asp Arg Thr Cys Asn Val Ser Ser His Gly Ile		
[0110]	290	295	300
[0111]	Asp Gly Cys Asp Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Asn Ala Arg Ala		
[0112]	305	310	315
[0113]	Glu Arg Arg Arg Glu Lys Cys Arg Cys Val Phe His Trp Cys Cys Tyr		
[0114]	325	330	335
[0115]	Val Ser Cys Gln Glu Cys Thr Arg Val Tyr Asp Val His Thr Cys Lys		
[0116]	340	345	350
[0117]	<210> 3		
[0118]	<211> 2826		
[0119]	<212> DNA		
[0120]	<213> 智人		
[0121]	<400> 3		
[0122]	atggccccac tcggatactt cttactcctc tgcagcctga agcaggtctt gggcagctac	60	
[0123]	ccgatctggt ggtcgctggc tgttgggcca cagtattcct ccctgggctc gcagcccatc	120	
[0124]	ctgtgtgcca gcatccggg cctggtcccc aagcagctcc gcttctgcag gaactacgtg	180	
[0125]	gagatcatgc ccagcgtggc cgagggcacg aagattggca tccaggagtg ccagcaccag	240	

[0126]	ttccgcggcc gccggtggaa ctgcaccacc gtccacgaca gcctggccat cttcgggccc	300
[0127]	gtgctggaca aagctaccag ggagtcggcc tttgtccacg ccattgcctc agccggtgtg	360
[0128]	gcctttgcag tgacacgctc atgtgcagaa ggcacggccg ccattctgtg ctgcagcagc	420
[0129]	cgccaccagg gctcaccagg caagggtctg aagtggggtg gctgtagcga ggacatcgag	480
[0130]	tttggtggga tgggtgtctc ggagttccg gacgcccggg agaaccggcc agatgcccgc	540
[0131]	tcagccatga accgccacaa caacgaggct gggcgccagg ccatcgccag ccacatgcac	600
[0132]	ctcaagtgea agtgccacgg gctgtcgggc agctgcgagg tgaagacatg ctgggtggtc	660
[0133]	caaccgcact tccgcgccat cgggtgactt ctcaaggaca agtacgacag cgcctcggag	720
[0134]	atggtggtgg agaagcaccg ggagtcccg ggctgggtgg agaccctgcg gccgcgtac	780
[0135]	acctacttca aggtgcccac ggagcgcgac ctggtctact acgaggcctc gcccaacttc	840
[0136]	tgcgagccca accctgagac gggctccttc ggcacgcgcg accgcacctg caacgtcagc	900
[0137]	tcgcacggca tcgacggtg cgacctgtg tgcctgcggc gcggccacaa cgcgcgagcg	960
[0138]	gagcggcgcc gggagaagtg ccgctgcgtg ttccactggt gctgctacgt cagctgccag	1020
[0139]	gagtgcacgc gcgtctacga cgtgcacacc tgcaagtagg caccggccgc ggctccccct	1080
[0140]	ggacggggcg ggccctgcct gaggggtggc ttttccctgg gtggagcagg actcccacct	1140
[0141]	aaacggggca gtactcctcc ctgggggcgg gactcctccc tgggggtggg gctcctacct	1200
[0142]	gggggcagaa ctctacctg aaggcagggc tctcctctgg agctagtgtc tctctcttg	1260
[0143]	tggctgggct gctcctgaat gaggcggagc tccaggatgg ggaggggctc tgcgttggct	1320
[0144]	tctccctggg gacggggctc ccctggacag aggcggggct acagattggg cggggcttct	1380
[0145]	cttgggtggg acagggttc tctgcgggg gcgaggcccc tcccagtaag ggctgtgctc	1440
[0146]	tgggtgggcg gggcactagg taggttctc cctgcaggcg gggctcctcc tgaaggaggc	1500
[0147]	gggctctag gatggggcac ggctctgggg taggtgtctc cctgaggcg gagcgctcc	1560
[0148]	ttaggagtgg ggttttatgg tggatgagc ttcttcttg atggggcaga gcttctcctg	1620
[0149]	accaggcaa ggcccttcc acgggggctg tggctctggg tgggctggc ctgcataggc	1680
[0150]	tcttctctgt ggggtgggct tctctgggac caggctccaa tggggcgggg cttctctccg	1740
[0151]	cgggtgggac tcttccctgg gaaccgcct cctgattaag gcgtggcttc tgcaggaaatc	1800
[0152]	ccggctccag agcaggaaat tcagcccacc agccacctca tccccaccc cctgtaaggt	1860
[0153]	tccatccacc cctgcgtcga gctgggaagg ttccatgaag cgagtcgggt cccaacccg	1920
[0154]	tggccctggg atccgagggc cctctccaa gcgcttggt ttggaatgct ccaggcgcgc	1980
[0155]	cgacgctgt gccacccctt cctcagcctg gggtttgacc acccactga ccaggggccc	2040
[0156]	tacctgggga aagcctgaag ggcctcccag ccccaaccc caagaccaag cttagtcctg	2100
[0157]	ggagaggaca gggacttcgc agaggcaagc gaccgaggcc ctcccaaaga ggcccgcct	2160
[0158]	gcccgggctc ccacaccgtc aggtactcct gccagggaac tggcctgtg cggcccaggc	2220
[0159]	cccggcgctc tctgtctgc tcagctgcgc ccccttctt gcagctgccc agcccctcct	2280
[0160]	ccctgccctc gggctctccc acctgcactc catccagcta caggagagat agaagcctct	2340
[0161]	cgtcccgtcc ctcccttcc tccgctgtc cacagcccct taagggaag gtaggaagag	2400
[0162]	aggtccagcc cccaggtg cccagagctg ctggtctcat ttggggcgct tcgggaggtt	2460
[0163]	tggggggcat caacccccg actgtgtctc tcgcgaaggt cccacagccc tgagatgggc	2520
[0164]	cggccccctt cctggcccc catggcgga ctggagaaat ggtccgctt cctggagcca	2580
[0165]	atggcccggc ccctcctgac tcatccgctt ggcccgggaa tgaatgggga ggccgctgaa	2640
[0166]	cccaccggc ccatatccct ggttgccctc tggccagcgc ccctcagcct ctgccactgt	2700
[0167]	gaaccggctc ccacctcaa ggtgcgggga gaagaagcgg ccaggcgggg cggcccaaga	2760

[0168] gcccaaaaga gggcacaccg ccatacctctg cctcaaattc tgcgtttttg gttttaatgt 2820
 [0169] tatatc 2826
 [0170] <210> 4
 [0171] <211> 694
 [0172] <212> PRT
 [0173] <213> 智人
 [0174] <400> 4
 [0175] Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
 [0176] 1 5 10 15
 [0177] Ala Leu Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
 [0178] 20 25 30
 [0179] Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
 [0180] 35 40 45
 [0181] Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu
 [0182] 50 55 60
 [0183] Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys
 [0184] 65 70 75 80
 [0185] Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
 [0186] 85 90 95
 [0187] Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu
 [0188] 100 105 110
 [0189] Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
 [0190] 115 120 125
 [0191] Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
 [0192] 130 135 140
 [0193] Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Thr Thr Ala Ala
 [0194] 145 150 155 160
 [0195] Pro Ser Pro Pro Arg Arg Leu Pro Pro Pro Pro Gly Glu Gln Pro
 [0196] 165 170 175
 [0197] Pro Ser Gly Ser Gly His Gly Arg Pro Pro Gly Ala Arg Pro Pro His
 [0198] 180 185 190
 [0199] Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly Gly Gly Gly Asp Ala Ala Ala Pro Pro
 [0200] 195 200 205
 [0201] Ala Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Ala Arg Pro Pro Gly Gly Gly
 [0202] 210 215 220
 [0203] Ala Ala Pro Cys Glu Pro Gly Cys Gln Cys Arg Ala Pro Met Val Ser
 [0204] 225 230 235 240
 [0205] Val Ser Ser Glu Arg His Pro Leu Tyr Asn Arg Val Lys Thr Gly Gln
 [0206] 245 250 255
 [0207] Ile Ala Asn Cys Ala Leu Pro Cys His Asn Pro Phe Phe Ser Gln Asp
 [0208] 260 265 270
 [0209] Glu Arg Ala Phe Thr Val Phe Trp Ile Gly Leu Trp Ser Val Leu Cys

[0210]	275	280	285
[0211]	Phe Val Ser Thr Phe Ala Thr Val Ser Thr Phe Leu Ile Asp Met Glu		
[0212]	290	295	300
[0213]	Arg Phe Lys Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Ala Cys Tyr		
[0214]	305	310	315
[0215]	Leu Phe Val Ser Val Gly Tyr Leu Val Arg Leu Val Ala Gly His Glu		
[0216]	325	330	335
[0217]	Lys Val Ala Cys Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly		
[0218]	340	345	350
[0219]	Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly		
[0220]	355	360	365
[0221]	Gly Pro Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Glu Glu Leu Gly Ala Val Glu Gln		
[0222]	370	375	380
[0223]	His Val Arg Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys Thr Val Val Phe		
[0224]	385	390	395
[0225]	Leu Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile		
[0226]	405	410	415
[0227]	Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly Asn Glu		
[0228]	420	425	430
[0229]	Ala Ile Ala Gly Tyr Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Leu Val		
[0230]	435	440	445
[0231]	Pro Ser Val Lys Ser Ile Ala Val Leu Ala Leu Ser Ser Val Asp Gly		
[0232]	450	455	460
[0233]	Asp Pro Val Ala Gly Ile Cys Tyr Val Gly Asn Gln Ser Leu Asp Asn		
[0234]	465	470	475
[0235]	Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Val Ile Tyr Leu Phe Ile Gly		
[0236]	485	490	495
[0237]	Thr Met Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser		
[0238]	500	505	510
[0239]	Val Ile Lys Gln Gln Asp Gly Pro Thr Lys Thr His Lys Leu Glu Lys		
[0240]	515	520	525
[0241]	Leu Met Ile Arg Leu Gly Leu Phe Thr Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala		
[0242]	530	535	540
[0243]	Ala Val Val Val Ala Cys Leu Phe Tyr Glu Gln His Asn Arg Pro Arg		
[0244]	545	550	555
[0245]	Trp Glu Ala Thr His Asn Cys Pro Cys Leu Arg Asp Leu Gln Pro Asp		
[0246]	565	570	575
[0247]	Gln Ala Arg Arg Pro Asp Tyr Ala Val Phe Met Leu Lys Tyr Phe Met		
[0248]	580	585	590
[0249]	Cys Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Val Trp Ser Gly Lys		
[0250]	595	600	605
[0251]	Thr Leu Glu Ser Trp Arg Ser Leu Cys Thr Arg Cys Cys Trp Ala Ser		

[0252]	610	615	620
[0253]	Lys Gly Ala Ala Val Gly Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Ala Gly Gly		
[0254]	625	630	635 640
[0255]	Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly		
[0256]	645	650	655
[0257]	Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Leu Tyr Ser Asp Val Ser Thr Gly		
[0258]	660	665	670
[0259]	Leu Thr Trp Arg Ser Gly Thr Ala Ser Ser Val Ser Tyr Pro Lys Gln		
[0260]	675	680	685
[0261]	Met Pro Leu Ser Gln Val		
[0262]	690		
[0263]	<210> 5		
[0264]	<211> 385		
[0265]	<212> PRT		
[0266]	<213> 人工序列		
[0267]	<220>		
[0268]	<223> 人工序列的描述:合成的		
[0269]	多肽		
[0270]	<400> 5		
[0271]	Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu		
[0272]	1	5	10 15
[0273]	Ala Leu Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu		
[0274]	20	25	30
[0275]	Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr		
[0276]	35	40	45
[0277]	Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu		
[0278]	50	55	60
[0279]	Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys		
[0280]	65	70	75 80
[0281]	Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys		
[0282]	85	90	95
[0283]	Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu		
[0284]	100	105	110
[0285]	Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala		
[0286]	115	120	125
[0287]	Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro		
[0288]	130	135	140
[0289]	Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys		
[0290]	145	150	155 160
[0291]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
[0292]	165	170	175
[0293]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		

[0294]	180	185	190
[0295]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
[0296]	195	200	205
[0297]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
[0298]	210	215	220
[0299]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
[0300]	225	230	235 240
[0301]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
[0302]	245	250	255
[0303]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
[0304]	260	265	270
[0305]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
[0306]	275	280	285
[0307]	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
[0308]	290	295	300
[0309]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
[0310]	305	310	315 320
[0311]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
[0312]	325	330	335
[0313]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
[0314]	340	345	350
[0315]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[0316]	355	360	365
[0317]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0318]	370	375	380
[0319]	Lys		
[0320]	385		
[0321]	<210> 6		
[0322]	<211> 6		
[0323]	<212> PRT		
[0324]	<213> 人工序列		
[0325]	<220>		
[0326]	<223> 人工序列的描述:合成的		
[0327]	肽		
[0328]	<400> 6		
[0329]	Ile Glu Gly Arg Met Asp		
[0330]	1	5	
[0331]	<210> 7		
[0332]	<211> 541		
[0333]	<212> PRT		
[0334]	<213> 智人		
[0335]	<400> 7		

[0336]	Met	Ala	Gly	Ala	Ile	Ile	Glu	Asn	Met	Ser	Thr	Lys	Lys	Leu	Cys	Ile
[0337]	1				5					10					15	
[0338]	Val	Gly	Gly	Ile	Leu	Leu	Val	Phe	Gln	Ile	Ile	Ala	Phe	Leu	Val	Gly
[0339]					20					25					30	
[0340]	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Gly	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Ser	Tyr	Met	Ser	Val
[0341]					35					40					45	
[0342]	Lys	Cys	Val	Asp	Ala	Arg	Lys	Asn	His	His	Lys	Thr	Lys	Trp	Phe	Val
[0343]					50					55					60	
[0344]	Pro	Trp	Gly	Pro	Asn	His	Cys	Asp	Lys	Ile	Arg	Asp	Ile	Glu	Glu	Ala
[0345]	65									70				75		80
[0346]	Ile	Pro	Arg	Glu	Ile	Glu	Ala	Asn	Asp	Ile	Val	Phe	Ser	Val	His	Ile
[0347]										85					90	
[0348]	Pro	Leu	Pro	His	Met	Glu	Met	Ser	Pro	Trp	Phe	Gln	Phe	Met	Leu	Phe
[0349]										100					105	
[0350]	Ile	Leu	Gln	Leu	Asp	Ile	Ala	Phe	Lys	Leu	Asn	Asn	Gln	Ile	Arg	Glu
[0351]										115					120	
[0352]	Asn	Ala	Glu	Val	Ser	Met	Asp	Val	Ser	Leu	Ala	Tyr	Arg	Asp	Asp	Ala
[0353]										130					135	
[0354]	Phe	Ala	Glu	Trp	Thr	Glu	Met	Ala	His	Glu	Arg	Val	Pro	Arg	Lys	Leu
[0355]	145									150				155		160
[0356]	Lys	Cys	Thr	Phe	Thr	Ser	Pro	Lys	Thr	Pro	Glu	His	Glu	Gly	Arg	Tyr
[0357]										165					170	
[0358]	Tyr	Glu	Cys	Asp	Val	Leu	Pro	Phe	Met	Glu	Ile	Gly	Ser	Val	Ala	His
[0359]										180					185	
[0360]	Lys	Phe	Tyr	Leu	Leu	Asn	Ile	Arg	Leu	Pro	Val	Asn	Glu	Lys	Lys	Lys
[0361]										195					200	
[0362]	Ile	Asn	Val	Gly	Ile	Gly	Glu	Ile	Lys	Asp	Ile	Arg	Leu	Val	Gly	Ile
[0363]										210					215	
[0364]	His	Gln	Asn	Gly	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Trp	Phe	Ala	Met	Lys	Thr	Phe
[0365]	225									230				235		240
[0366]	Leu	Thr	Pro	Ser	Ile	Phe	Ile	Ile	Met	Val	Trp	Tyr	Trp	Arg	Arg	Ile
[0367]										245					250	
[0368]	Thr	Met	Met	Ser	Arg	Pro	Pro	Val	Leu	Leu	Glu	Lys	Val	Ile	Phe	Ala
[0369]										260					265	
[0370]	Leu	Gly	Ile	Ser	Met	Thr	Phe	Ile	Asn	Ile	Pro	Val	Glu	Trp	Phe	Ser
[0371]										275					280	
[0372]	Ile	Gly	Phe	Asp	Trp	Thr	Trp	Met	Leu	Leu	Phe	Gly	Asp	Ile	Arg	Gln
[0373]										290					295	
[0374]	Gly	Ile	Phe	Tyr	Ala	Met	Leu	Leu	Ser	Phe	Trp	Ile	Ile	Phe	Cys	Gly
[0375]	305									310				315		320
[0376]	Glu	His	Met	Met	Asp	Gln	His	Glu	Arg	Asn	His	Ile	Ala	Gly	Tyr	Trp
[0377]										325					330	

[0378]	Lys	Gln	Val	Gly	Pro	Ile	Ala	Val	Gly	Ser	Phe	Cys	Leu	Phe	Ile	Phe
[0379]				340					345					350		
[0380]	Asp	Met	Cys	Glu	Arg	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Asn	Pro	Phe	Tyr	Ser	Ile
[0381]			355					360					365			
[0382]	Trp	Thr	Thr	Asp	Ile	Gly	Thr	Glu	Leu	Ala	Met	Ala	Phe	Ile	Ile	Val
[0383]		370					375					380				
[0384]	Ala	Gly	Ile	Cys	Leu	Cys	Leu	Tyr	Phe	Leu	Phe	Leu	Cys	Phe	Met	Val
[0385]	385				390					395						400
[0386]	Phe	Gln	Val	Phe	Arg	Asn	Ile	Ser	Gly	Lys	Gln	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala
[0387]				405						410					415	
[0388]	Met	Ser	Lys	Val	Arg	Arg	Leu	His	Tyr	Glu	Gly	Leu	Ile	Phe	Arg	Phe
[0389]			420							425					430	
[0390]	Lys	Phe	Leu	Met	Leu	Ile	Thr	Leu	Ala	Cys	Ala	Ala	Met	Thr	Val	Ile
[0391]		435							440					445		
[0392]	Phe	Phe	Ile	Val	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	Gly	His	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly
[0393]		450					455					460				
[0394]	Val	Thr	Val	Gln	Val	Asn	Ser	Ala	Phe	Phe	Thr	Gly	Ile	Tyr	Gly	Met
[0395]	465					470					475					480
[0396]	Trp	Asn	Leu	Tyr	Val	Phe	Ala	Leu	Met	Phe	Leu	Tyr	Ala	Pro	Ser	His
[0397]				485						490						495
[0398]	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu	Asp	Gln	Ser	Asn	Gly	Asp	Leu	Gly	Val	His	Ser
[0399]			500							505					510	
[0400]	Gly	Glu	Glu	Leu	Gln	Leu	Thr	Thr	Thr	Ile	Thr	His	Val	Asp	Gly	Pro
[0401]		515						520					525			
[0402]	Thr	Glu	Ile	Tyr	Lys	Leu	Thr	Arg	Lys	Glu	Ala	Gln	Glu			
[0403]		530					535						540			
[0404]	<210> 8															
[0405]	<211> 599															
[0406]	<212> PRT															
[0407]	<213> 智人															
[0408]	<400> 8															
[0409]	Met	Lys	Leu	Leu	Lys	Leu	Thr	Gly	Phe	Ile	Phe	Phe	Leu	Phe	Phe	Leu
[0410]	1			5					10					15		
[0411]	Thr	Glu	Ser	Leu	Thr	Leu	Pro	Thr	Gln	Pro	Arg	Asp	Ile	Glu	Asn	Phe
[0412]				20					25					30		
[0413]	Asn	Ser	Thr	Gln	Lys	Phe	Ile	Glu	Asp	Asn	Ile	Glu	Tyr	Ile	Thr	Ile
[0414]			35						40					45		
[0415]	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Val	Gln	Glu	Ala	Thr	Phe	Glu	Glu	Met	Glu
[0416]		50						55					60			
[0417]	Lys	Leu	Val	Lys	Asp	Met	Val	Glu	Tyr	Lys	Asp	Arg	Cys	Met	Ala	Asp
[0418]	65					70					75					80
[0419]	Lys	Thr	Leu	Pro	Glu	Cys	Ser	Lys	Leu	Pro	Asn	Asn	Val	Leu	Gln	Glu

[0420]		85		90		95
[0421]	Lys Ile Cys Ala Met Glu Gly Leu Pro Gln Lys His Asn Phe Ser His					
[0422]		100		105		110
[0423]	Cys Cys Ser Lys Val Asp Ala Gln Arg Arg Leu Cys Phe Phe Tyr Asn					
[0424]		115		120		125
[0425]	Lys Lys Ser Asp Val Gly Phe Leu Pro Pro Phe Pro Thr Leu Asp Pro					
[0426]		130		135		140
[0427]	Glu Glu Lys Cys Gln Ala Tyr Glu Ser Asn Arg Glu Ser Leu Leu Asn					
[0428]		145		150		155
[0429]	His Phe Leu Tyr Glu Val Ala Arg Arg Asn Pro Phe Val Phe Ala Pro					
[0430]		165		170		175
[0431]	Thr Leu Leu Thr Val Ala Val His Phe Glu Glu Val Ala Lys Ser Cys					
[0432]		180		185		190
[0433]	Cys Glu Glu Gln Asn Lys Val Asn Cys Leu Gln Thr Arg Ala Ile Pro					
[0434]		195		200		205
[0435]	Val Thr Gln Tyr Leu Lys Ala Phe Ser Ser Tyr Gln Lys His Val Cys					
[0436]		210		215		220
[0437]	Gly Ala Leu Leu Lys Phe Gly Thr Lys Val Val His Phe Ile Tyr Ile					
[0438]		225		230		235
[0439]	Ala Ile Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ile Glu Phe Lys Glu Leu Ile					
[0440]		245		250		255
[0441]	Ser Leu Val Glu Asp Val Ser Ser Asn Tyr Asp Gly Cys Cys Glu Gly					
[0442]		260		265		270
[0443]	Asp Val Val Gln Cys Ile Arg Asp Thr Ser Lys Val Met Asn His Ile					
[0444]		275		280		285
[0445]	Cys Ser Lys Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Ile Lys Glu Cys Cys Glu					
[0446]		290		295		300
[0447]	Lys Lys Ile Pro Glu Arg Gly Gln Cys Ile Ile Asn Ser Asn Lys Asp					
[0448]		305		310		315
[0449]	Asp Arg Pro Lys Asp Leu Ser Leu Arg Glu Gly Lys Phe Thr Asp Ser					
[0450]		325		330		335
[0451]	Glu Asn Val Cys Gln Glu Arg Asp Ala Asp Pro Asp Thr Phe Phe Ala					
[0452]		340		345		350
[0453]	Lys Phe Thr Phe Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Leu Ser Ile Pro					
[0454]		355		360		365
[0455]	Glu Leu Leu Arg Ile Val Gln Ile Tyr Lys Asp Leu Leu Arg Asn Cys					
[0456]		370		375		380
[0457]	Cys Asn Thr Glu Asn Pro Pro Gly Cys Tyr Arg Tyr Ala Glu Asp Lys					
[0458]		385		390		395
[0459]	Phe Asn Glu Thr Thr Glu Lys Ser Leu Lys Met Val Gln Gln Glu Cys					
[0460]		405		410		415
[0461]	Lys His Phe Gln Asn Leu Gly Lys Asp Gly Leu Lys Tyr His Tyr Leu					

[0462]	420	425	430
[0463]	Ile Arg Leu Thr Lys Ile Ala Pro Gln Leu Ser Thr Glu Glu Leu Val		
[0464]	435	440	445
[0465]	Ser Leu Gly Glu Lys Met Val Thr Ala Phe Thr Thr Cys Cys Thr Leu		
[0466]	450	455	460
[0467]	Ser Glu Glu Phe Ala Cys Val Asp Asn Leu Ala Asp Leu Val Phe Gly		
[0468]	465	470	475
[0469]	Glu Leu Cys Gly Val Asn Glu Asn Arg Thr Ile Asn Pro Ala Val Asp		
[0470]	485	490	495
[0471]	His Cys Cys Lys Thr Asn Phe Ala Phe Arg Arg Pro Cys Phe Glu Ser		
[0472]	500	505	510
[0473]	Leu Lys Ala Asp Lys Thr Tyr Val Pro Pro Pro Phe Ser Gln Asp Leu		
[0474]	515	520	525
[0475]	Phe Thr Phe His Ala Asp Met Cys Gln Ser Gln Asn Glu Glu Leu Gln		
[0476]	530	535	540
[0477]	Arg Lys Thr Asp Arg Phe Leu Val Asn Leu Val Lys Leu Lys His Glu		
[0478]	545	550	555
[0479]	Leu Thr Asp Glu Glu Leu Gln Ser Leu Phe Thr Asn Phe Ala Asn Val		
[0480]	565	570	575
[0481]	Val Asp Lys Cys Cys Lys Ala Glu Ser Pro Glu Val Cys Phe Asn Glu		
[0482]	580	585	590
[0483]	Glu Ser Pro Lys Ile Gly Asn		
[0484]	595		
[0485]	<210> 9		
[0486]	<211> 450		
[0487]	<212> PRT		
[0488]	<213> 智人		
[0489]	<400> 9		
[0490]	Met Ala Thr Phe Ser Arg Gln Glu Phe Phe Gln Gln Leu Leu Gln Gly		
[0491]	1	5	10
[0492]	Cys Leu Leu Pro Thr Ala Gln Gln Gly Leu Asp Gln Ile Trp Leu Leu		
[0493]	20	25	30
[0494]	Leu Ala Ile Cys Leu Ala Cys Arg Leu Leu Trp Arg Leu Gly Leu Pro		
[0495]	35	40	45
[0496]	Ser Tyr Leu Lys His Ala Ser Thr Val Ala Gly Gly Phe Phe Ser Leu		
[0497]	50	55	60
[0498]	Tyr His Phe Phe Gln Leu His Met Val Trp Val Val Leu Leu Ser Leu		
[0499]	65	70	75
[0500]	Leu Cys Tyr Leu Val Leu Phe Leu Cys Arg His Ser Ser His Arg Gly		
[0501]	85	90	95
[0502]	Val Phe Leu Ser Val Thr Ile Leu Ile Tyr Leu Leu Met Gly Glu Met		
[0503]	100	105	110

[0504]	His Met Val Asp Thr Val Thr Trp His Lys Met Arg Gly Ala Gln Met		
[0505]	115	120	125
[0506]	Ile Val Ala Met Lys Ala Val Ser Leu Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gly		
[0507]	130	135	140
[0508]	Glu Val Gly Thr Val Pro Ser Pro Val Glu Phe Met Gly Tyr Leu Tyr		
[0509]	145	150	155
[0510]	Phe Val Gly Thr Ile Val Phe Gly Pro Trp Ile Ser Phe His Ser Tyr		
[0511]	165	170	175
[0512]	Leu Gln Ala Val Gln Gly Arg Pro Leu Ser Cys Arg Trp Leu Gln Lys		
[0513]	180	185	190
[0514]	Val Ala Arg Ser Leu Ala Leu Ala Leu Leu Cys Leu Val Leu Ser Thr		
[0515]	195	200	205
[0516]	Cys Val Gly Pro Tyr Leu Phe Pro Tyr Phe Ile Pro Leu Asn Gly Asp		
[0517]	210	215	220
[0518]	Arg Leu Leu Arg Lys Trp Leu Arg Ala Tyr Glu Ser Ala Val Ser Phe		
[0519]	225	230	235
[0520]	His Phe Ser Asn Tyr Phe Val Gly Phe Leu Ser Glu Ala Thr Ala Thr		
[0521]	245	250	255
[0522]	Leu Ala Gly Ala Gly Phe Thr Glu Glu Lys Asp His Leu Glu Trp Asp		
[0523]	260	265	270
[0524]	Leu Thr Val Ser Lys Pro Leu Asn Val Glu Leu Pro Arg Ser Met Val		
[0525]	275	280	285
[0526]	Glu Val Val Thr Ser Trp Asn Leu Pro Met Ser Tyr Trp Leu Asn Asn		
[0527]	290	295	300
[0528]	Tyr Val Phe Lys Asn Ala Leu Arg Leu Gly Thr Phe Ser Ala Val Leu		
[0529]	305	310	315
[0530]	Val Thr Tyr Ala Ala Ser Ala Leu Leu His Gly Phe Ser Phe His Leu		
[0531]	325	330	335
[0532]	Ala Ala Val Leu Leu Ser Leu Ala Phe Ile Thr Tyr Val Glu His Val		
[0533]	340	345	350
[0534]	Leu Arg Lys Arg Leu Ala Arg Ile Leu Ser Ala Cys Val Leu Ser Lys		
[0535]	355	360	365
[0536]	Arg Cys Pro Pro Asp Cys Ser His Gln His Arg Leu Gly Leu Gly Val		
[0537]	370	375	380
[0538]	Arg Ala Leu Asn Leu Leu Phe Gly Ala Leu Ala Ile Phe His Leu Ala		
[0539]	385	390	395
[0540]	Tyr Leu Gly Ser Leu Phe Asp Val Asp Val Asp Asp Thr Thr Glu Glu		
[0541]	405	410	415
[0542]	Gln Gly Tyr Gly Met Ala Tyr Thr Val His Lys Trp Ser Glu Leu Ser		
[0543]	420	425	430
[0544]	Trp Ala Ser His Trp Val Thr Phe Gly Cys Trp Ile Phe Tyr Arg Leu		
[0545]	435	440	445

[0546]	Ile Gly
[0547]	450
[0548]	<210> 10
[0549]	<211> 377
[0550]	<212> PRT
[0551]	<213> 人工序列
[0552]	<220>
[0553]	<223> 人工序列的描述:合成的
[0554]	多肽
[0555]	<400> 10
[0556]	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
[0557]	1 5 10 15
[0558]	Val His Ser Gly Val Ala Met Pro Gly Ala Glu Asp Asp Val Val Arg
[0559]	20 25 30
[0560]	Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Lys Asp Gly Ser Ser Tyr Pro Ile Trp
[0561]	35 40 45
[0562]	Trp Ser Leu Ala Val Gly Pro Gln Tyr Ser Ser Leu Gly Ser Gln Pro
[0563]	50 55 60
[0564]	Ile Leu Cys Ala Ser Ile Pro Gly Leu Val Pro Lys Gln Leu Arg Phe
[0565]	65 70 75 80
[0566]	Cys Arg Asn Tyr Val Glu Ile Met Pro Ser Val Ala Glu Gly Ile Lys
[0567]	85 90 95
[0568]	Ile Gly Ile Gln Glu Cys Gln His Gln Phe Arg Gly Arg Arg Trp Asn
[0569]	100 105 110
[0570]	Cys Thr Thr Val His Asp Ser Leu Ala Ile Phe Gly Pro Val Leu Asp
[0571]	115 120 125
[0572]	Lys Ala Thr Arg Glu Ser Ala Phe Val His Ala Ile Ala Ser Ala Gly
[0573]	130 135 140
[0574]	Val Ala Phe Ala Val Thr Arg Ser Cys Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ile
[0575]	145 150 155 160
[0576]	Cys Gly Cys Ser Ser Arg His Gln Gly Ser Pro Gly Lys Gly Trp Lys
[0577]	165 170 175
[0578]	Trp Gly Gly Cys Ser Glu Asp Ile Glu Phe Gly Gly Met Val Ser Arg
[0579]	180 185 190
[0580]	Glu Phe Ala Asp Ala Arg Glu Asn Arg Pro Asp Ala Arg Ser Ala Met
[0581]	195 200 205
[0582]	Asn Arg His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Gln Ala Ile Ala Ser His Met
[0583]	210 215 220
[0584]	His Leu Lys Cys Lys Cys His Gly Leu Ser Gly Ser Cys Glu Val Lys
[0585]	225 230 235 240
[0586]	Thr Cys Trp Trp Ser Gln Pro Asp Phe Arg Ala Ile Gly Asp Phe Leu
[0587]	245 250 255

[0588]	Lys Asp Lys Tyr Asp Ser Ala Ser Glu Met Val Val Glu Lys His Arg		
[0589]	260	265	270
[0590]	Glu Ser Arg Gly Trp Val Glu Thr Leu Arg Pro Arg Tyr Thr Tyr Phe		
[0591]	275	280	285
[0592]	Lys Val Pro Thr Glu Arg Asp Leu Val Tyr Tyr Glu Ala Ser Pro Asn		
[0593]	290	295	300
[0594]	Phe Cys Glu Pro Asn Pro Glu Thr Gly Ser Phe Gly Thr Arg Asp Arg		
[0595]	305	310	315
[0596]	Thr Cys Asn Val Ser Ser His Gly Ile Asp Gly Cys Asp Leu Leu Cys		
[0597]	325	330	335
[0598]	Cys Gly Arg Gly His Asn Ala Arg Ala Glu Arg Arg Arg Glu Lys Cys		
[0599]	340	345	350
[0600]	Arg Cys Val Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Ser Cys Gln Glu Cys Thr		
[0601]	355	360	365
[0602]	Arg Val Tyr Asp Val His Thr Cys Lys		
[0603]	370	375	
[0604]	<210> 11		
[0605]	<211> 368		
[0606]	<212> PRT		
[0607]	<213> 人工序列		
[0608]	<220>		
[0609]	<223> 人工序列的描述:合成的		
[0610]	多肽		
[0611]	<400> 11		
[0612]	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly		
[0613]	1	5	10
[0614]	Val His Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Glu Asn Leu Tyr Phe		
[0615]	20	25	30
[0616]	Gln Gly Ser Tyr Pro Ile Trp Trp Ser Leu Ala Val Gly Pro Gln Tyr		
[0617]	35	40	45
[0618]	Ser Ser Leu Gly Ser Gln Pro Ile Leu Cys Ala Ser Ile Pro Gly Leu		
[0619]	50	55	60
[0620]	Val Pro Lys Gln Leu Arg Phe Cys Arg Asn Tyr Val Glu Ile Met Pro		
[0621]	65	70	75
[0622]	Ser Val Ala Glu Gly Ile Lys Ile Gly Ile Gln Glu Cys Gln His Gln		
[0623]	85	90	95
[0624]	Phe Arg Gly Arg Arg Trp Asn Cys Thr Thr Val His Asp Ser Leu Ala		
[0625]	100	105	110
[0626]	Ile Phe Gly Pro Val Leu Asp Lys Ala Thr Arg Glu Ser Ala Phe Val		
[0627]	115	120	125
[0628]	His Ala Ile Ala Ser Ala Gly Val Ala Phe Ala Val Thr Arg Ser Cys		
[0629]	130	135	140

[0630]	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Ala	Ile	Cys	Gly	Cys	Ser	Ser	Arg	His	Gln	Gly
[0631]	145						150				155					160
[0632]	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Glu	Asp	Ile	Glu
[0633]						165					170					175
[0634]	Phe	Gly	Gly	Met	Val	Ser	Arg	Glu	Phe	Ala	Asp	Ala	Arg	Glu	Asn	Arg
[0635]					180						185				190	
[0636]	Pro	Asp	Ala	Arg	Ser	Ala	Met	Asn	Arg	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg
[0637]				195					200				205			
[0638]	Gln	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Met	His	Leu	Lys	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Leu
[0639]	210						215					220				
[0640]	Ser	Gly	Ser	Cys	Glu	Val	Lys	Thr	Cys	Trp	Trp	Ser	Gln	Pro	Asp	Phe
[0641]	225						230					235				240
[0642]	Arg	Ala	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asp	Ser	Ala	Ser	Glu
[0643]					245						250					255
[0644]	Met	Val	Val	Glu	Lys	His	Arg	Glu	Ser	Arg	Gly	Trp	Val	Glu	Thr	Leu
[0645]				260						265				270		
[0646]	Arg	Pro	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Phe	Lys	Val	Pro	Thr	Glu	Arg	Asp	Leu	Val
[0647]				275					280				285			
[0648]	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Ser	Pro	Asn	Phe	Cys	Glu	Pro	Asn	Pro	Glu	Thr	Gly
[0649]	290						295					300				
[0650]	Ser	Phe	Gly	Thr	Arg	Asp	Arg	Thr	Cys	Asn	Val	Ser	Ser	His	Gly	Ile
[0651]	305					310					315					320
[0652]	Asp	Gly	Cys	Asp	Leu	Leu	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	His	Asn	Ala	Arg	Ala
[0653]					325						330				335	
[0654]	Glu	Arg	Arg	Arg	Glu	Lys	Cys	Arg	Cys	Val	Phe	His	Trp	Cys	Cys	Tyr
[0655]					340						345				350	
[0656]	Val	Ser	Cys	Gln	Glu	Cys	Thr	Arg	Val	Tyr	Asp	Val	His	Thr	Cys	Lys
[0657]			355					360					365			
[0658]	<210> 12															
[0659]	<211> 366															
[0660]	<212> PRT															
[0661]	<213> 人工序列															
[0662]	<220>															
[0663]	<223> 人工序列的描述:合成的															
[0664]	多肽															
[0665]	<400> 12															
[0666]	Met	Glu	Trp	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Phe	Phe	Leu	Ser	Val	Thr	Thr	Gly
[0667]	1				5					10					15	
[0668]	Val	His	Ser	His	His	His	His	His	His	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly
[0669]				20					25					30		
[0670]	Ser	Tyr	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Pro	Gln	Tyr	Ser	Ser
[0671]			35					40					45			

[0672]	Leu Gly Ser Gln Pro Ile Leu Cys Ala Ser Ile Pro Gly Leu Val Pro
[0673]	50 55 60
[0674]	Lys Gln Leu Arg Phe Cys Arg Asn Tyr Val Glu Ile Met Pro Ser Val
[0675]	65 70 75 80
[0676]	Ala Glu Gly Ile Lys Ile Gly Ile Gln Glu Cys Gln His Gln Phe Arg
[0677]	85 90 95
[0678]	Gly Arg Arg Trp Asn Cys Thr Thr Val His Asp Ser Leu Ala Ile Phe
[0679]	100 105 110
[0680]	Gly Pro Val Leu Asp Lys Ala Thr Arg Glu Ser Ala Phe Val His Ala
[0681]	115 120 125
[0682]	Ile Ala Ser Ala Gly Val Ala Phe Ala Val Thr Arg Ser Cys Ala Glu
[0683]	130 135 140
[0684]	Gly Thr Ala Ala Ile Cys Gly Cys Ser Ser Arg His Gln Gly Ser Pro
[0685]	145 150 155 160
[0686]	Gly Lys Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Glu Asp Ile Glu Phe Gly
[0687]	165 170 175
[0688]	Gly Met Val Ser Arg Glu Phe Ala Asp Ala Arg Glu Asn Arg Pro Asp
[0689]	180 185 190
[0690]	Ala Arg Ser Ala Met Asn Arg His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Gln Ala
[0691]	195 200 205
[0692]	Ile Ala Ser His Met His Leu Lys Cys Lys Cys His Gly Leu Ser Gly
[0693]	210 215 220
[0694]	Ser Cys Glu Val Lys Thr Cys Trp Trp Ser Gln Pro Asp Phe Arg Ala
[0695]	225 230 235 240
[0696]	Ile Gly Asp Phe Leu Lys Asp Lys Tyr Asp Ser Ala Ser Glu Met Val
[0697]	245 250 255
[0698]	Val Glu Lys His Arg Glu Ser Arg Gly Trp Val Glu Thr Leu Arg Pro
[0699]	260 265 270
[0700]	Arg Tyr Thr Tyr Phe Lys Val Pro Thr Glu Arg Asp Leu Val Tyr Tyr
[0701]	275 280 285
[0702]	Glu Ala Ser Pro Asn Phe Cys Glu Pro Asn Pro Glu Thr Gly Ser Phe
[0703]	290 295 300
[0704]	Gly Thr Arg Asp Arg Thr Cys Asn Val Ser Ser His Gly Ile Asp Gly
[0705]	305 310 315 320
[0706]	Cys Asp Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Asn Ala Arg Ala Glu Arg
[0707]	325 330 335
[0708]	Arg Arg Glu Lys Cys Arg Cys Val Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Ser
[0709]	340 345 350
[0710]	Cys Gln Glu Cys Thr Arg Val Tyr Asp Val His Thr Cys Lys
[0711]	355 360 365
[0712]	<210> 13
[0713]	<211> 359

[0714]	<212> PRT																			
[0715]	<213> 人工序列																			
[0716]	<220>																			
[0717]	<223> 人工序列的描述:合成的																			
[0718]	多肽																			
[0719]	<400> 13																			
[0720]	Met	Glu	Trp	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Phe	Phe	Leu	Ser	Val	Thr	Thr	Gly				
[0721]	1				5						10					15				
[0722]	Val	His	Ser	His	His	His	His	His	His	Ser	Tyr	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser				
[0723]				20					25					30						
[0724]	Leu	Ala	Val	Gly	Pro	Gln	Tyr	Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	Gln	Pro	Ile	Leu				
[0725]			35					40					45							
[0726]	Cys	Ala	Ser	Ile	Pro	Gly	Leu	Val	Pro	Lys	Gln	Leu	Arg	Phe	Cys	Arg				
[0727]	50						55					60								
[0728]	Asn	Tyr	Val	Glu	Ile	Met	Pro	Ser	Val	Ala	Glu	Gly	Ile	Lys	Ile	Gly				
[0729]	65				70						75					80				
[0730]	Ile	Gln	Glu	Cys	Gln	His	Gln	Phe	Arg	Gly	Arg	Arg	Trp	Asn	Cys	Thr				
[0731]				85						90				95						
[0732]	Thr	Val	His	Asp	Ser	Leu	Ala	Ile	Phe	Gly	Pro	Val	Leu	Asp	Lys	Ala				
[0733]			100						105					110						
[0734]	Thr	Arg	Glu	Ser	Ala	Phe	Val	His	Ala	Ile	Ala	Ser	Ala	Gly	Val	Ala				
[0735]			115					120					125							
[0736]	Phe	Ala	Val	Thr	Arg	Ser	Cys	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Ala	Ile	Cys	Gly				
[0737]	130						135					140								
[0738]	Cys	Ser	Ser	Arg	His	Gln	Gly	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly				
[0739]	145				150						155					160				
[0740]	Gly	Cys	Ser	Glu	Asp	Ile	Glu	Phe	Gly	Gly	Met	Val	Ser	Arg	Glu	Phe				
[0741]				165						170				175						
[0742]	Ala	Asp	Ala	Arg	Glu	Asn	Arg	Pro	Asp	Ala	Arg	Ser	Ala	Met	Asn	Arg				
[0743]			180							185				190						
[0744]	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Gln	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Met	His	Leu				
[0745]			195						200					205						
[0746]	Lys	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Leu	Ser	Gly	Ser	Cys	Glu	Val	Lys	Thr	Cys				
[0747]	210						215					220								
[0748]	Trp	Trp	Ser	Gln	Pro	Asp	Phe	Arg	Ala	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	Lys	Asp				
[0749]	225				230						235					240				
[0750]	Lys	Tyr	Asp	Ser	Ala	Ser	Glu	Met	Val	Val	Glu	Lys	His	Arg	Glu	Ser				
[0751]				245							250				255					
[0752]	Arg	Gly	Trp	Val	Glu	Thr	Leu	Arg	Pro	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Phe	Lys	Val				
[0753]			260							265				270						
[0754]	Pro	Thr	Glu	Arg	Asp	Leu	Val	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Ser	Pro	Asn	Phe	Cys				
[0755]			275					280						285						

[0756]	Glu Pro Asn Pro Glu Thr Gly Ser Phe Gly Thr Arg Asp Arg Thr Cys
[0757]	290 295 300
[0758]	Asn Val Ser Ser His Gly Ile Asp Gly Cys Asp Leu Leu Cys Cys Gly
[0759]	305 310 315 320
[0760]	Arg Gly His Asn Ala Arg Ala Glu Arg Arg Arg Glu Lys Cys Arg Cys
[0761]	325 330 335
[0762]	Val Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Ser Cys Gln Glu Cys Thr Arg Val
[0763]	340 345 350
[0764]	Tyr Asp Val His Thr Cys Lys
[0765]	355
[0766]	<210> 14
[0767]	<211> 362
[0768]	<212> PRT
[0769]	<213> 人工序列
[0770]	<220>
[0771]	<223> 人工序列的描述:合成的
[0772]	多肽
[0773]	<400> 14
[0774]	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
[0775]	1 5 10 15
[0776]	Val His Ser His His His His His His Gly Gly Gly Ser Tyr Pro Ile
[0777]	20 25 30
[0778]	Trp Trp Ser Leu Ala Val Gly Pro Gln Tyr Ser Ser Leu Gly Ser Gln
[0779]	35 40 45
[0780]	Pro Ile Leu Cys Ala Ser Ile Pro Gly Leu Val Pro Lys Gln Leu Arg
[0781]	50 55 60
[0782]	Phe Cys Arg Asn Tyr Val Glu Ile Met Pro Ser Val Ala Glu Gly Ile
[0783]	65 70 75 80
[0784]	Lys Ile Gly Ile Gln Glu Cys Gln His Gln Phe Arg Gly Arg Arg Trp
[0785]	85 90 95
[0786]	Asn Cys Thr Thr Val His Asp Ser Leu Ala Ile Phe Gly Pro Val Leu
[0787]	100 105 110
[0788]	Asp Lys Ala Thr Arg Glu Ser Ala Phe Val His Ala Ile Ala Ser Ala
[0789]	115 120 125
[0790]	Gly Val Ala Phe Ala Val Thr Arg Ser Cys Ala Glu Gly Thr Ala Ala
[0791]	130 135 140
[0792]	Ile Cys Gly Cys Ser Ser Arg His Gln Gly Ser Pro Gly Lys Gly Trp
[0793]	145 150 155 160
[0794]	Lys Trp Gly Gly Cys Ser Glu Asp Ile Glu Phe Gly Gly Met Val Ser
[0795]	165 170 175
[0796]	Arg Glu Phe Ala Asp Ala Arg Glu Asn Arg Pro Asp Ala Arg Ser Ala
[0797]	180 185 190

[0798]	Met Asn Arg His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Gln Ala Ile Ala Ser His		
[0799]	195	200	205
[0800]	Met His Leu Lys Cys Lys Cys His Gly Leu Ser Gly Ser Cys Glu Val		
[0801]	210	215	220
[0802]	Lys Thr Cys Trp Trp Ser Gln Pro Asp Phe Arg Ala Ile Gly Asp Phe		
[0803]	225	230	235 240
[0804]	Leu Lys Asp Lys Tyr Asp Ser Ala Ser Glu Met Val Val Glu Lys His		
[0805]	245	250	255
[0806]	Arg Glu Ser Arg Gly Trp Val Glu Thr Leu Arg Pro Arg Tyr Thr Tyr		
[0807]	260	265	270
[0808]	Phe Lys Val Pro Thr Glu Arg Asp Leu Val Tyr Tyr Glu Ala Ser Pro		
[0809]	275	280	285
[0810]	Asn Phe Cys Glu Pro Asn Pro Glu Thr Gly Ser Phe Gly Thr Arg Asp		
[0811]	290	295	300
[0812]	Arg Thr Cys Asn Val Ser Ser His Gly Ile Asp Gly Cys Asp Leu Leu		
[0813]	305	310	315 320
[0814]	Cys Cys Gly Arg Gly His Asn Ala Arg Ala Glu Arg Arg Arg Glu Lys		
[0815]	325	330	335
[0816]	Cys Arg Cys Val Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Ser Cys Gln Glu Cys		
[0817]	340	345	350
[0818]	Thr Arg Val Tyr Asp Val His Thr Cys Lys		
[0819]	355	360	
[0820]	<210> 15		
[0821]	<211> 368		
[0822]	<212> PRT		
[0823]	<213> 人工序列		
[0824]	<220>		
[0825]	<223> 人工序列的描述:合成的		
[0826]	多肽		
[0827]	<400> 15		
[0828]	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly		
[0829]	1	5	10 15
[0830]	Val His Ser His His His His His His Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly		
[0831]	20	25	30
[0832]	Gly Gly Ser Tyr Pro Ile Trp Trp Ser Leu Ala Val Gly Pro Gln Tyr		
[0833]	35	40	45
[0834]	Ser Ser Leu Gly Ser Gln Pro Ile Leu Cys Ala Ser Ile Pro Gly Leu		
[0835]	50	55	60
[0836]	Val Pro Lys Gln Leu Arg Phe Cys Arg Asn Tyr Val Glu Ile Met Pro		
[0837]	65	70	75 80
[0838]	Ser Val Ala Glu Gly Ile Lys Ile Gly Ile Gln Glu Cys Gln His Gln		
[0839]	85	90	95

[0840]	Phe Arg Gly Arg Arg Trp Asn Cys Thr Thr Val His Asp Ser Leu Ala
[0841]	100 105 110
[0842]	Ile Phe Gly Pro Val Leu Asp Lys Ala Thr Arg Glu Ser Ala Phe Val
[0843]	115 120 125
[0844]	His Ala Ile Ala Ser Ala Gly Val Ala Phe Ala Val Thr Arg Ser Cys
[0845]	130 135 140
[0846]	Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ile Cys Gly Cys Ser Ser Arg His Gln Gly
[0847]	145 150 155 160
[0848]	Ser Pro Gly Lys Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Glu Asp Ile Glu
[0849]	165 170 175
[0850]	Phe Gly Gly Met Val Ser Arg Glu Phe Ala Asp Ala Arg Glu Asn Arg
[0851]	180 185 190
[0852]	Pro Asp Ala Arg Ser Ala Met Asn Arg His Asn Asn Glu Ala Gly Arg
[0853]	195 200 205
[0854]	Gln Ala Ile Ala Ser His Met His Leu Lys Cys Lys Cys His Gly Leu
[0855]	210 215 220
[0856]	Ser Gly Ser Cys Glu Val Lys Thr Cys Trp Trp Ser Gln Pro Asp Phe
[0857]	225 230 235 240
[0858]	Arg Ala Ile Gly Asp Phe Leu Lys Asp Lys Tyr Asp Ser Ala Ser Glu
[0859]	245 250 255
[0860]	Met Val Val Glu Lys His Arg Glu Ser Arg Gly Trp Val Glu Thr Leu
[0861]	260 265 270
[0862]	Arg Pro Arg Tyr Thr Tyr Phe Lys Val Pro Thr Glu Arg Asp Leu Val
[0863]	275 280 285
[0864]	Tyr Tyr Glu Ala Ser Pro Asn Phe Cys Glu Pro Asn Pro Glu Thr Gly
[0865]	290 295 300
[0866]	Ser Phe Gly Thr Arg Asp Arg Thr Cys Asn Val Ser Ser His Gly Ile
[0867]	305 310 315 320
[0868]	Asp Gly Cys Asp Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Asn Ala Arg Ala
[0869]	325 330 335
[0870]	Glu Arg Arg Arg Glu Lys Cys Arg Cys Val Phe His Trp Cys Cys Tyr
[0871]	340 345 350
[0872]	Val Ser Cys Gln Glu Cys Thr Arg Val Tyr Asp Val His Thr Cys Lys
[0873]	355 360 365
[0874]	<210> 16
[0875]	<211> 151
[0876]	<212> PRT
[0877]	<213> 智人
[0878]	<400> 16
[0879]	Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
[0880]	1 5 10 15
[0881]	Ala Leu Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu

[0882]	20	25	30
[0883]	Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr		
[0884]	35	40	45
[0885]	Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu		
[0886]	50	55	60
[0887]	Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys		
[0888]	65	70	75
[0889]	Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys		
[0890]	85	90	95
[0891]	Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu		
[0892]	100	105	110
[0893]	Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala		
[0894]	115	120	125
[0895]	Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro		
[0896]	130	135	140
[0897]	Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr		
[0898]	145	150	
[0899]	<210> 17		
[0900]	<211> 172		
[0901]	<212> PRT		
[0902]	<213> 智人		
[0903]	<400> 17		
[0904]	Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu		
[0905]	1	5	10
[0906]	Ala Leu Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu		
[0907]	20	25	30
[0908]	Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr		
[0909]	35	40	45
[0910]	Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu		
[0911]	50	55	60
[0912]	Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys		
[0913]	65	70	75
[0914]	Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys		
[0915]	85	90	95
[0916]	Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu		
[0917]	100	105	110
[0918]	Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala		
[0919]	115	120	125
[0920]	Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro		
[0921]	130	135	140
[0922]	Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Thr Thr Ala Ala		
[0923]	145	150	155

[0924]	Pro Ser Pro Pro Arg Arg Leu Pro Pro Pro Pro Pro
[0925]	165 170
[0926]	<210> 18
[0927]	<211> 406
[0928]	<212> PRT
[0929]	<213> 人工序列
[0930]	<220>
[0931]	<223> 人工序列的描述:合成的
[0932]	多肽
[0933]	<400> 18
[0934]	Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
[0935]	1 5 10 15
[0936]	Ala Leu Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
[0937]	20 25 30
[0938]	Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
[0939]	35 40 45
[0940]	Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu
[0941]	50 55 60
[0942]	Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys
[0943]	65 70 75 80
[0944]	Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
[0945]	85 90 95
[0946]	Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu
[0947]	100 105 110
[0948]	Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
[0949]	115 120 125
[0950]	Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
[0951]	130 135 140
[0952]	Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Thr Thr Ala Ala
[0953]	145 150 155 160
[0954]	Pro Ser Pro Pro Arg Arg Leu Pro Pro Pro Pro Gly Gly Gly Gly
[0955]	165 170 175
[0956]	Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[0957]	180 185 190
[0958]	Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
[0959]	195 200 205
[0960]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
[0961]	210 215 220
[0962]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
[0963]	225 230 235 240
[0964]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
[0965]	245 250 255

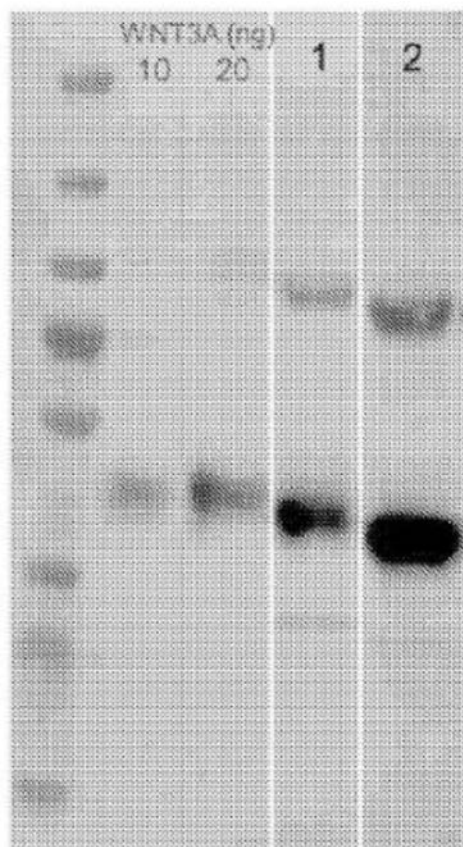
[0966]	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
[0967]	260 265 270
[0968]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
[0969]	275 280 285
[0970]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
[0971]	290 295 300
[0972]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
[0973]	305 310 315 320
[0974]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
[0975]	325 330 335
[0976]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
[0977]	340 345 350
[0978]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
[0979]	355 360 365
[0980]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
[0981]	370 375 380
[0982]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
[0983]	385 390 395 400
[0984]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0985]	405
[0986]	<210> 19
[0987]	<211> 6
[0988]	<212> PRT
[0989]	<213> 人工序列
[0990]	<220>
[0991]	<223> 人工序列的描述:合成的
[0992]	6xHis标签
[0993]	<400> 19
[0994]	His His His His His His
[0995]	1 5
[0996]	<210> 20
[0997]	<211> 10
[0998]	<212> PRT
[0999]	<213> 人工序列
[1000]	<220>
[1001]	<223> 人工序列的描述:合成的
[1002]	10xHis标签
[1003]	<400> 20
[1004]	His His His His His His His His His His
[1005]	1 5 10
[1006]	<210> 21
[1007]	<211> 12

[1008]	<212>	PRT
[1009]	<213>	人工序列
[1010]	<220>	
[1011]	<223>	人工序列的描述:合成的
[1012]		肽
[1013]	<400>	21
[1014]	Gly Val Ala Met Pro Gly Ala Glu Asp Asp Val Val	
[1015]	1	5 10
[1016]	<210>	22
[1017]	<211>	8
[1018]	<212>	PRT
[1019]	<213>	人工序列
[1020]	<220>	
[1021]	<223>	人工序列的描述:合成的
[1022]		肽
[1023]	<400>	22
[1024]	Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys	
[1025]	1	5
[1026]	<210>	23
[1027]	<211>	9
[1028]	<212>	PRT
[1029]	<213>	人工序列
[1030]	<220>	
[1031]	<223>	人工序列的描述:合成的
[1032]		肽
[1033]	<400>	23
[1034]	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala	
[1035]	1	5
[1036]	<210>	24
[1037]	<211>	10
[1038]	<212>	PRT
[1039]	<213>	人工序列
[1040]	<220>	
[1041]	<223>	人工序列的描述:合成的
[1042]		肽
[1043]	<400>	24
[1044]	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu	
[1045]	1	5 10
[1046]	<210>	25
[1047]	<211>	6
[1048]	<212>	PRT
[1049]	<213>	人工序列

[1050] <220>
[1051] <223> 人工序列的描述:合成的
[1052] 肽
[1053] <400> 25
[1054] Leu Val Pro Arg Gly Ser
[1055] 1 5
[1056] <210> 26
[1057] <211> 7
[1058] <212> PRT
[1059] <213> 人工序列
[1060] <220>
[1061] <223> 人工序列的描述:合成的
[1062] 肽
[1063] <220>
[1064] <221> MOD_RES
[1065] <222> (7) .. (7)
[1066] <223> Gly或Ser
[1067] <400> 26
[1068] Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Xaa
[1069] 1 5
[1070] <210> 27
[1071] <211> 5
[1072] <212> PRT
[1073] <213> 人工序列
[1074] <220>
[1075] <223> 人工序列的描述:合成的
[1076] 肽
[1077] <400> 27
[1078] Asp Asp Asp Asp Lys
[1079] 1 5
[1080] <210> 28
[1081] <211> 6
[1082] <212> PRT
[1083] <213> 人工序列
[1084] <220>
[1085] <223> 人工序列的描述:合成的
[1086] 肽
[1087] <400> 28
[1088] Gly Gly Gly Gly Gly Gly
[1089] 1 5
[1090] <210> 29
[1091] <211> 9

[1092]	<212>	PRT
[1093]	<213>	人工序列
[1094]	<220>	
[1095]	<223>	人工序列的描述:合成的
[1096]		肽
[1097]	<400>	29
[1098]		Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly
[1099]	1	5
[1100]	<210>	30
[1101]	<211>	21
[1102]	<212>	PRT
[1103]	<213>	明脉扁刺蛾β四体病毒
[1104]	<220>	
[1105]	<221>	MISC_FEATURE
[1106]	<222>	(1) .. (3)
[1107]	<223>	可能存在或可能不存在
[1108]	<400>	30
[1109]		Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
[1110]	1	5 10 15
[1111]		Glu Asn Pro Gly Pro
[1112]		20
[1113]	<210>	31
[1114]	<211>	22
[1115]	<212>	PRT
[1116]	<213>	猪捷申病毒-1
[1117]	<220>	
[1118]	<221>	MISC_FEATURE
[1119]	<222>	(1) .. (3)
[1120]	<223>	可能存在或可能不存在
[1121]	<400>	31
[1122]		Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
[1123]	1	5 10 15
[1124]		Glu Glu Asn Pro Gly Pro
[1125]		20
[1126]	<210>	32
[1127]	<211>	23
[1128]	<212>	PRT
[1129]	<213>	马鼻炎A病毒
[1130]	<220>	
[1131]	<221>	MISC_FEATURE
[1132]	<222>	(1) .. (3)
[1133]	<223>	可能存在或可能不存在

[1134] <400> 32
[1135] Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
[1136] 1 5 10 15
[1137] Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[1138] 20
[1139] <210> 33
[1140] <211> 25
[1141] <212> PRT
[1142] <213> 口蹄疫病毒
[1143] <220>
[1144] <221> MISC_FEATURE
[1145] <222> (1) .. (3)
[1146] <223> 可能存在或可能不存在
[1147] <400> 33
[1148] Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
[1149] 1 5 10 15
[1150] Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[1151] 20 25



泳道1阳性对照：10 mg/L Fz-151-Fc，
第6天收集

泳道2：共表达Fz-151-Fc，
第6天收集

图1

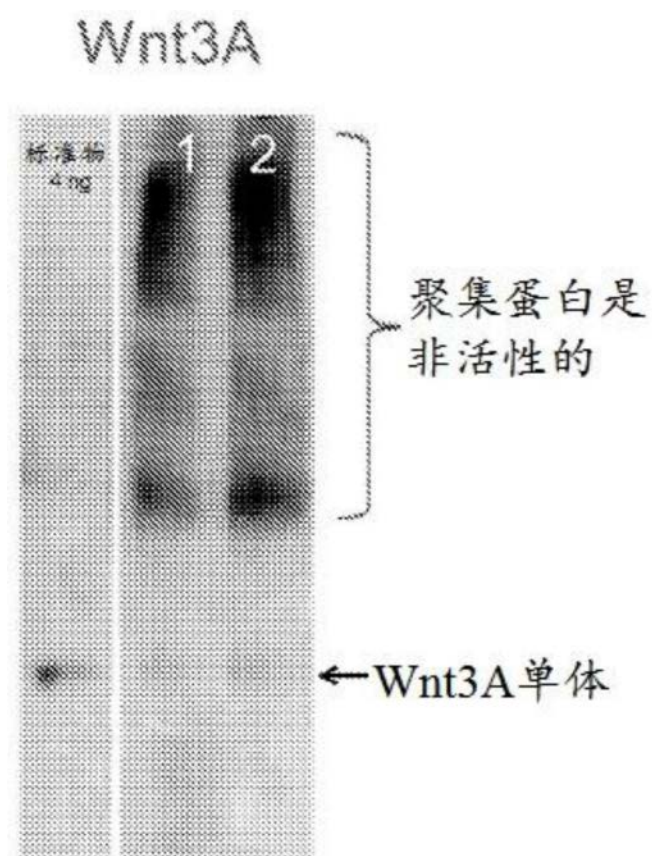


图2A

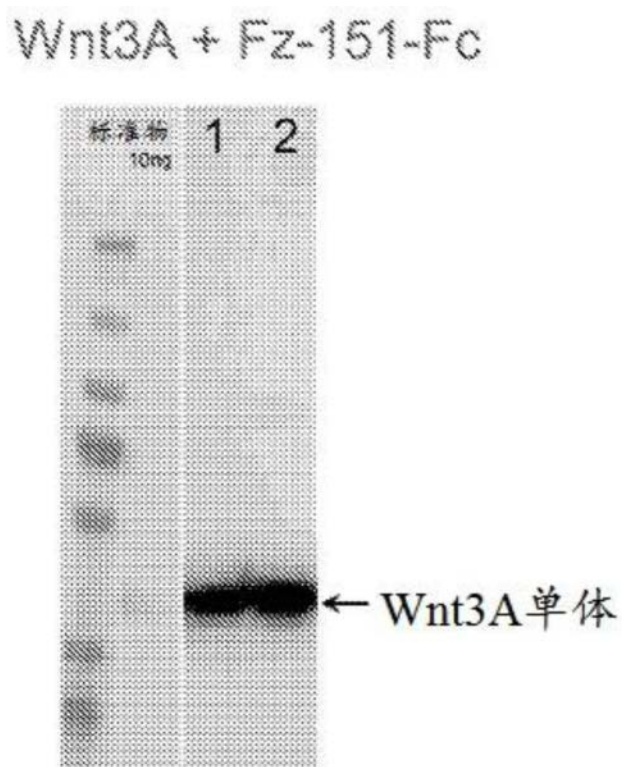


图2B

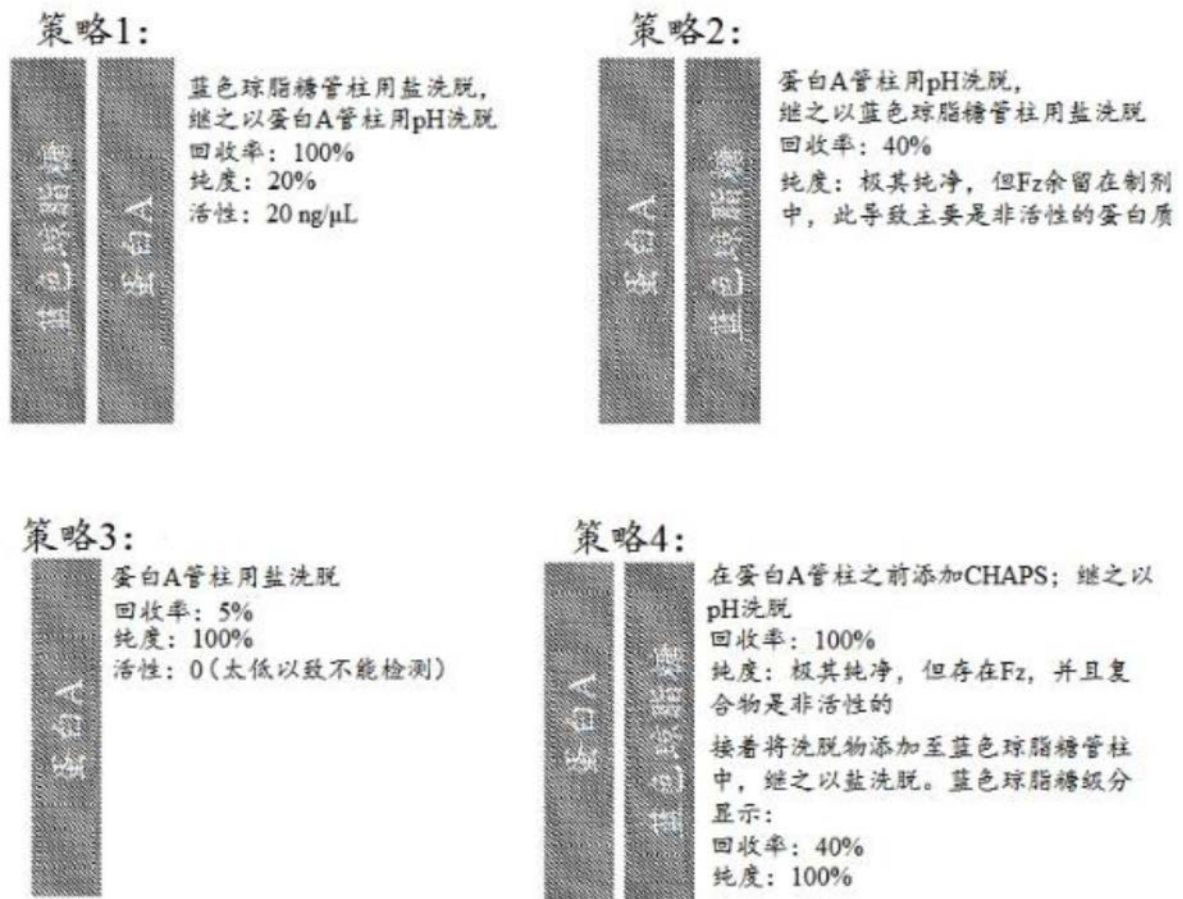


图3

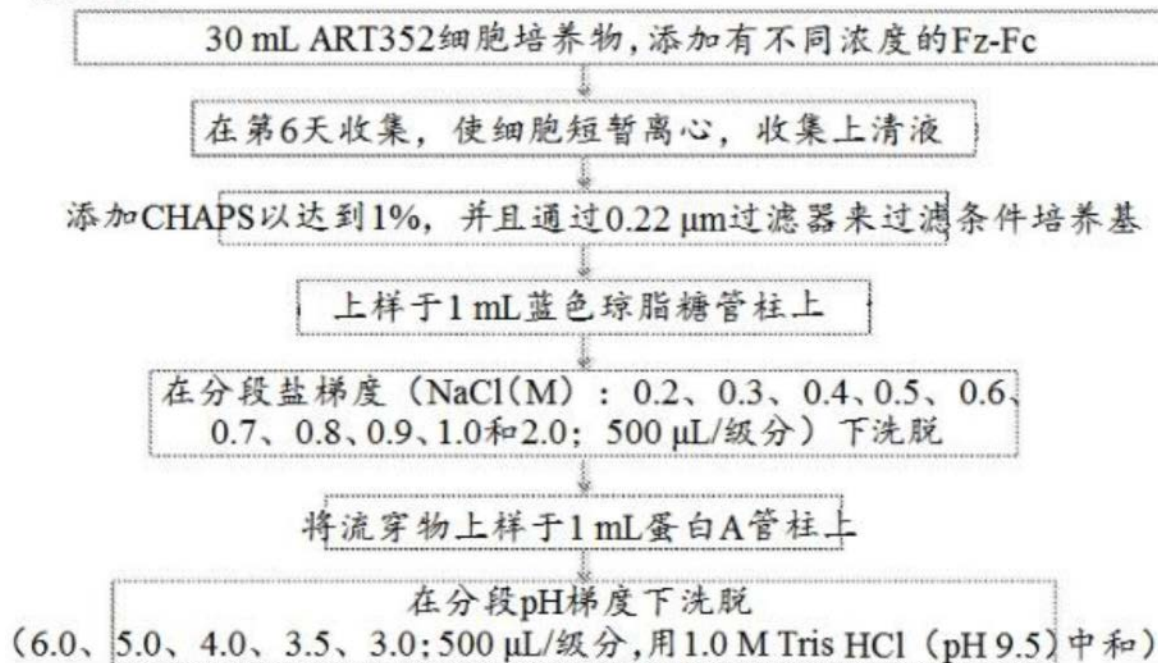
策略1:

图4A

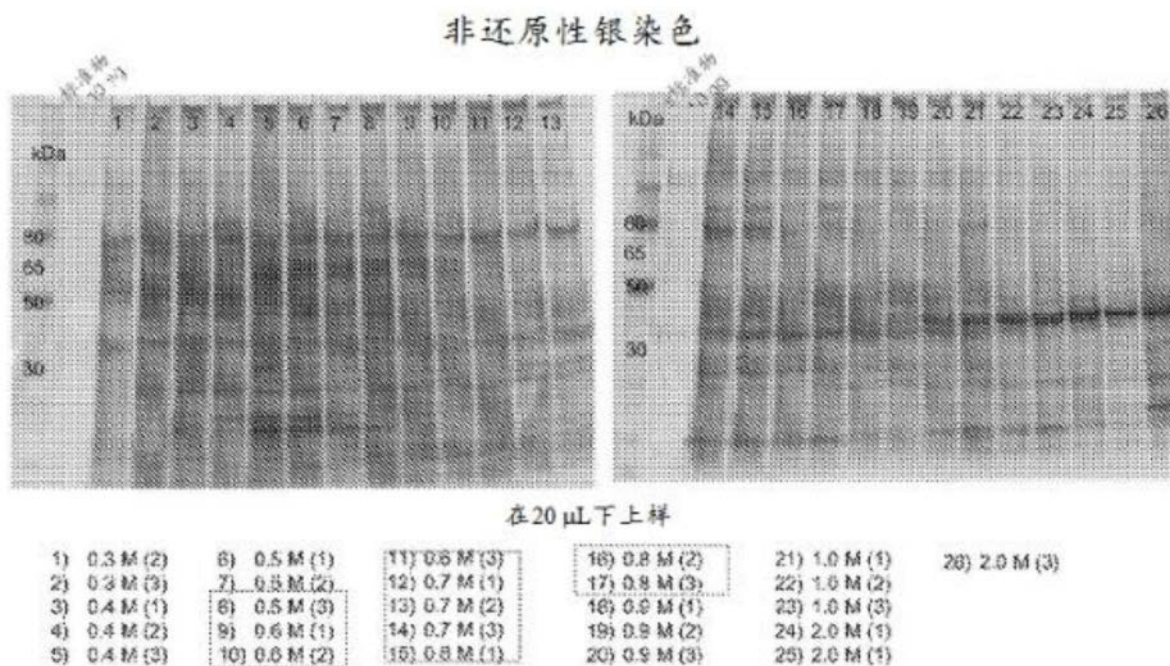


图4B

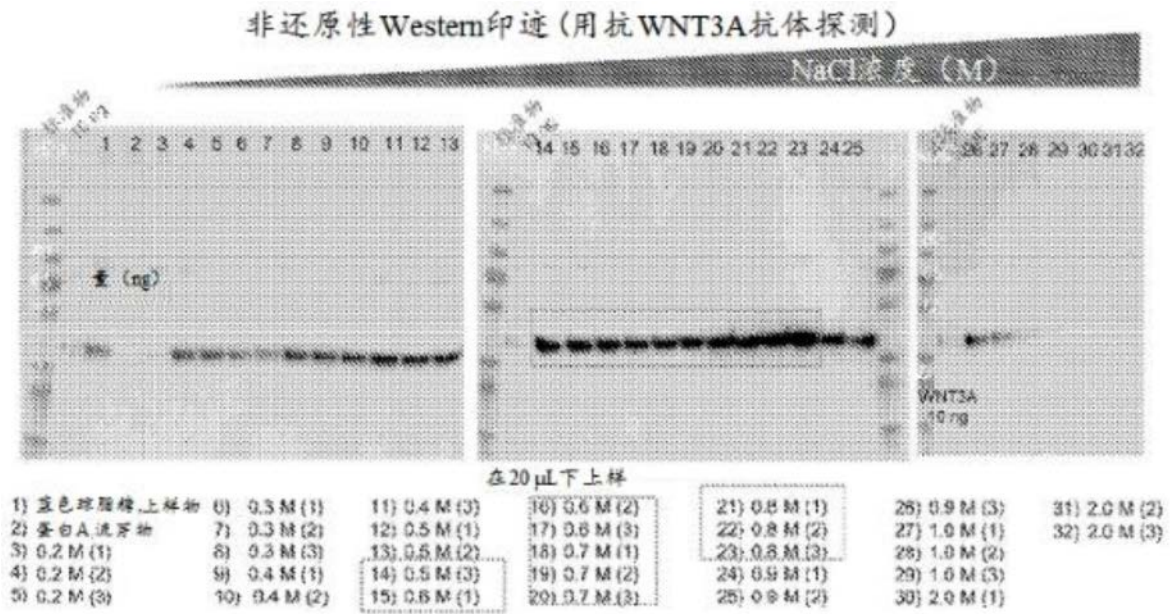


图4C

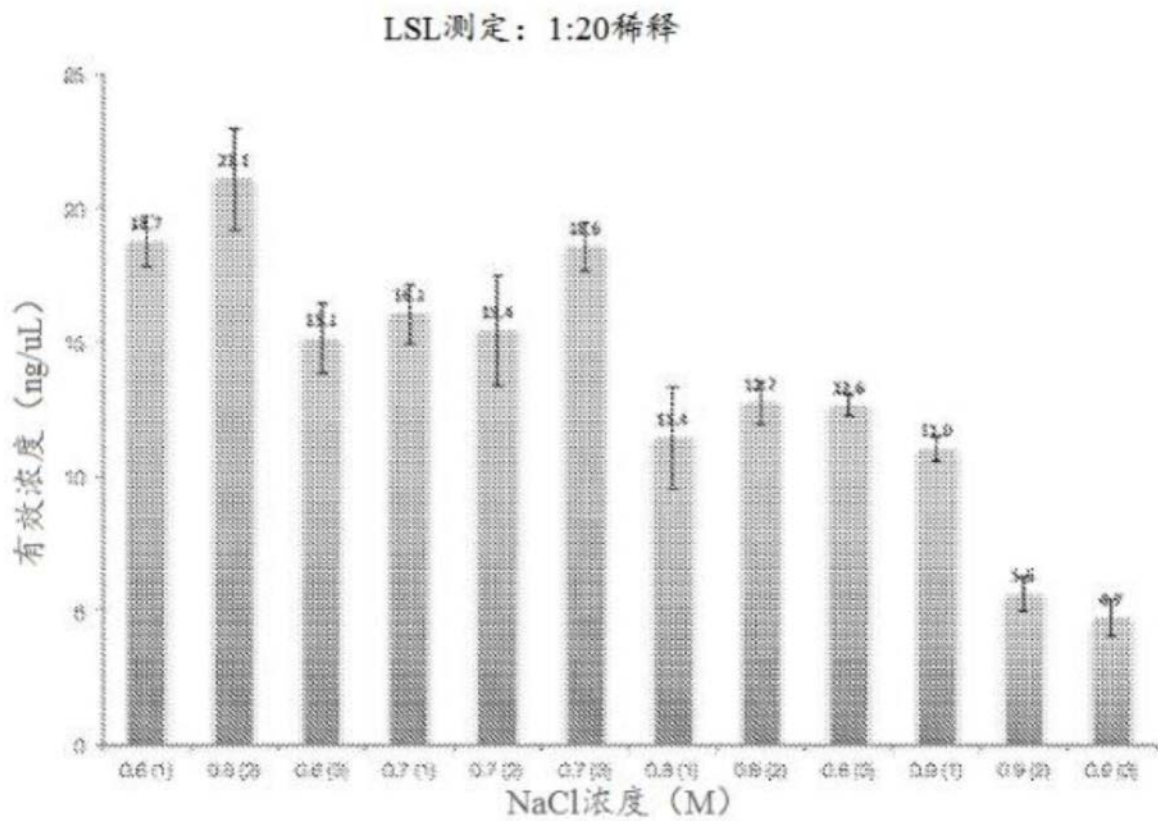


图4D

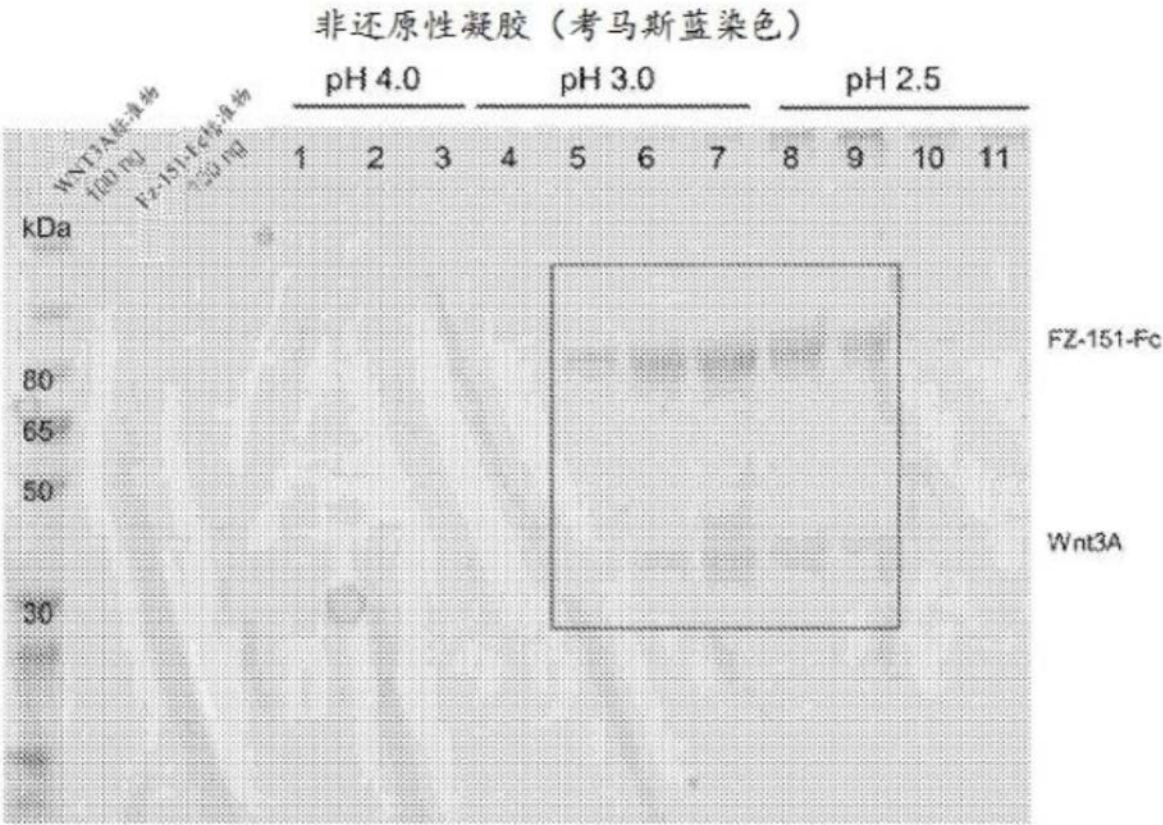


图5A

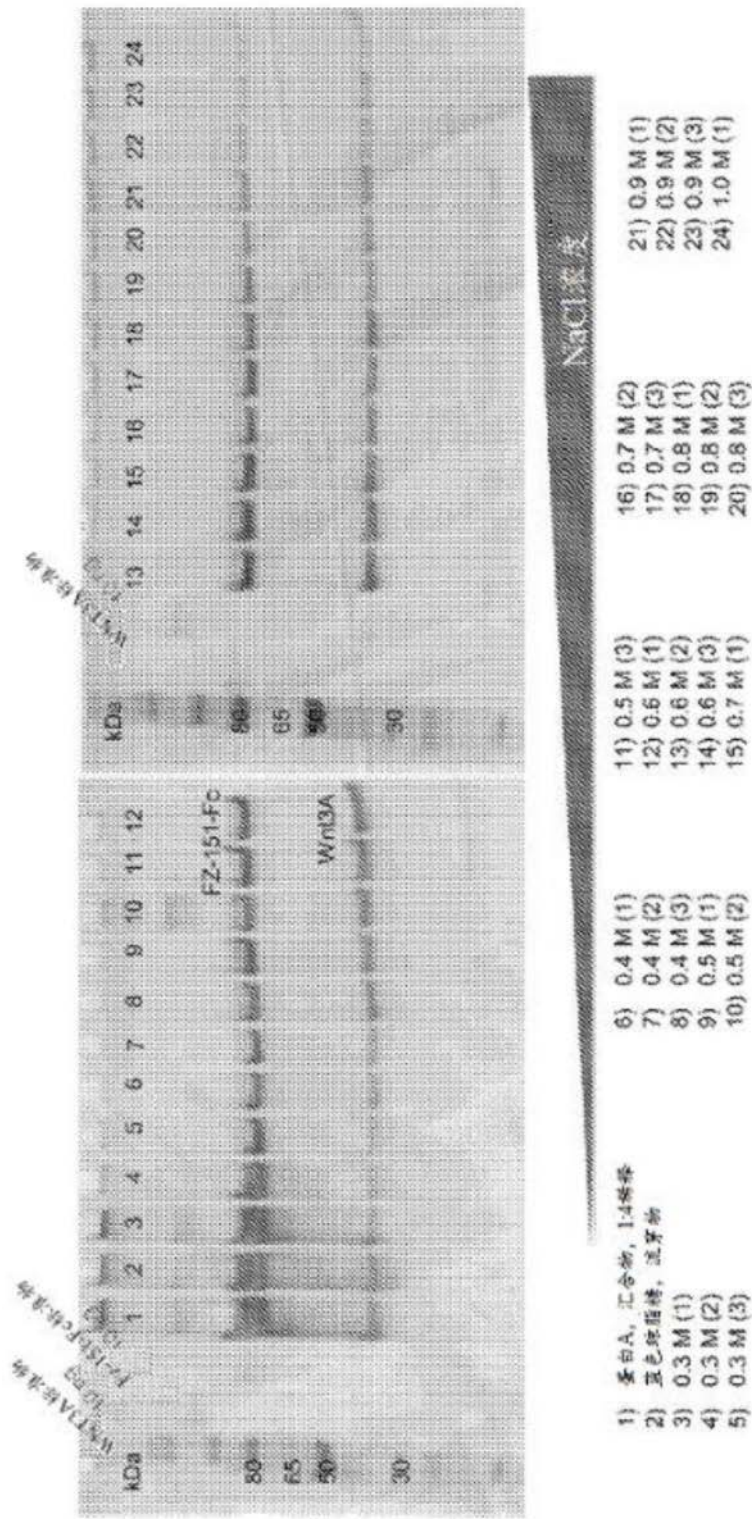


图5B

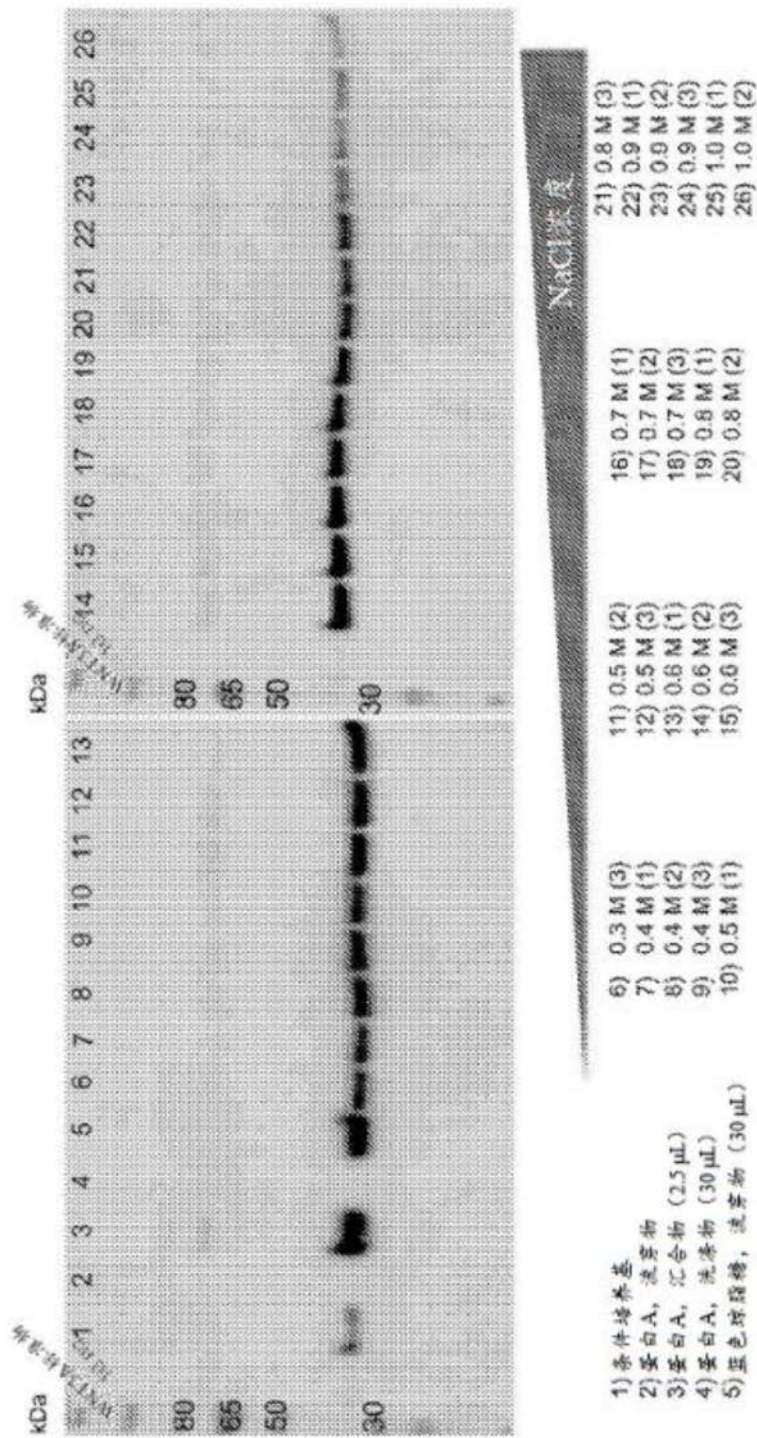


图5C

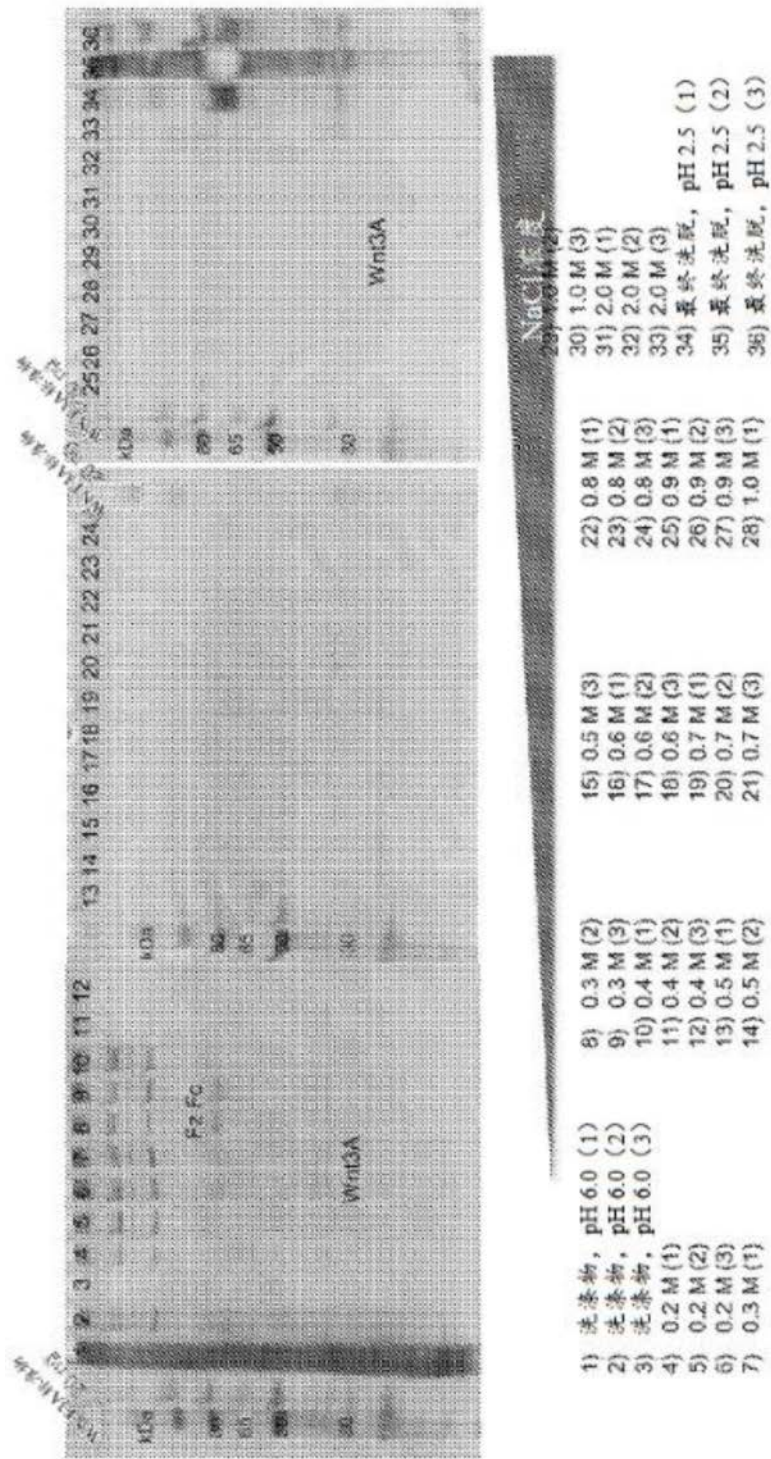


图6A

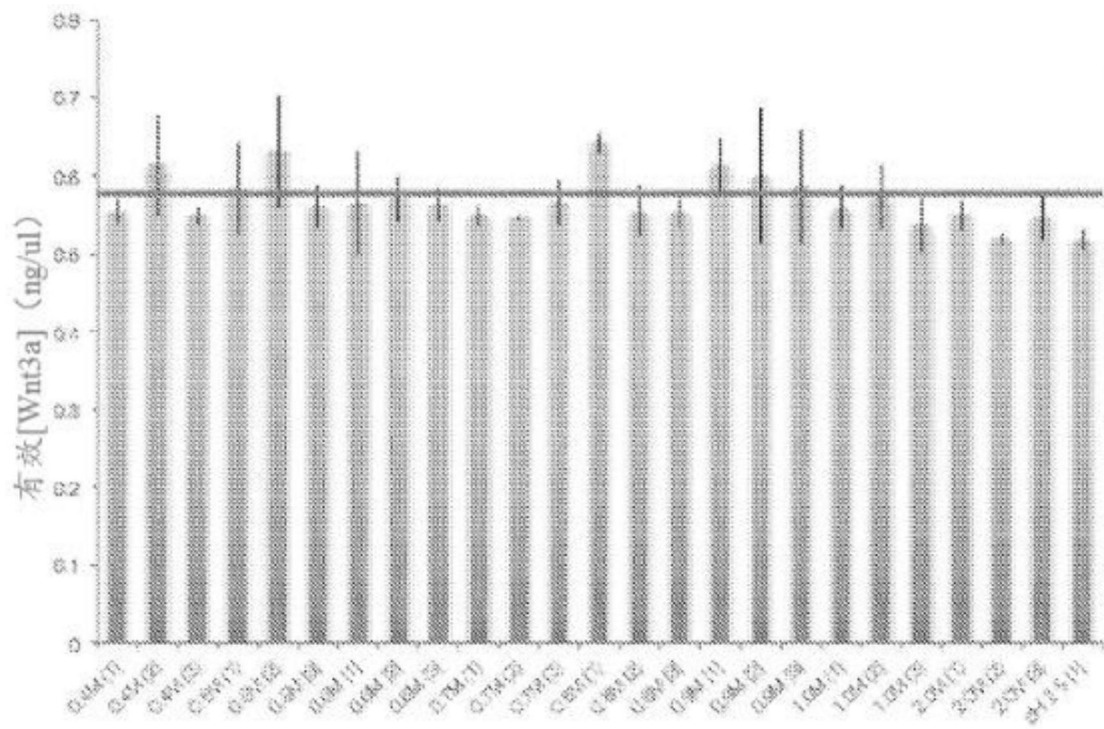


图6B

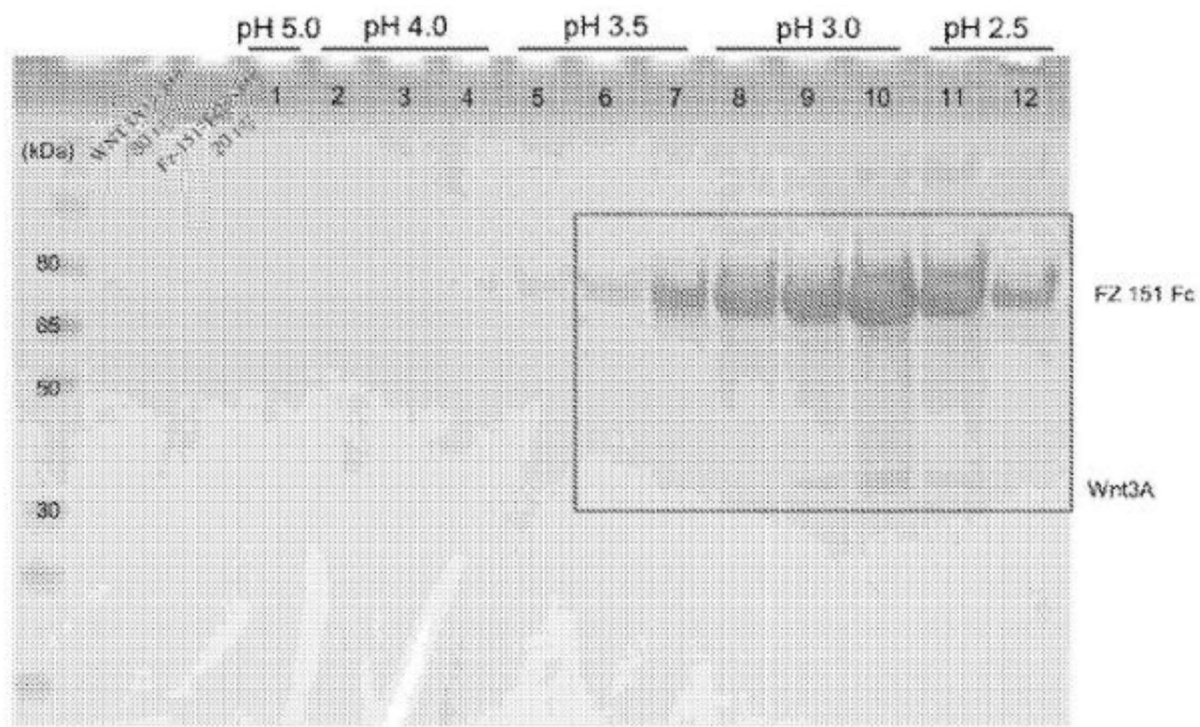


图7A

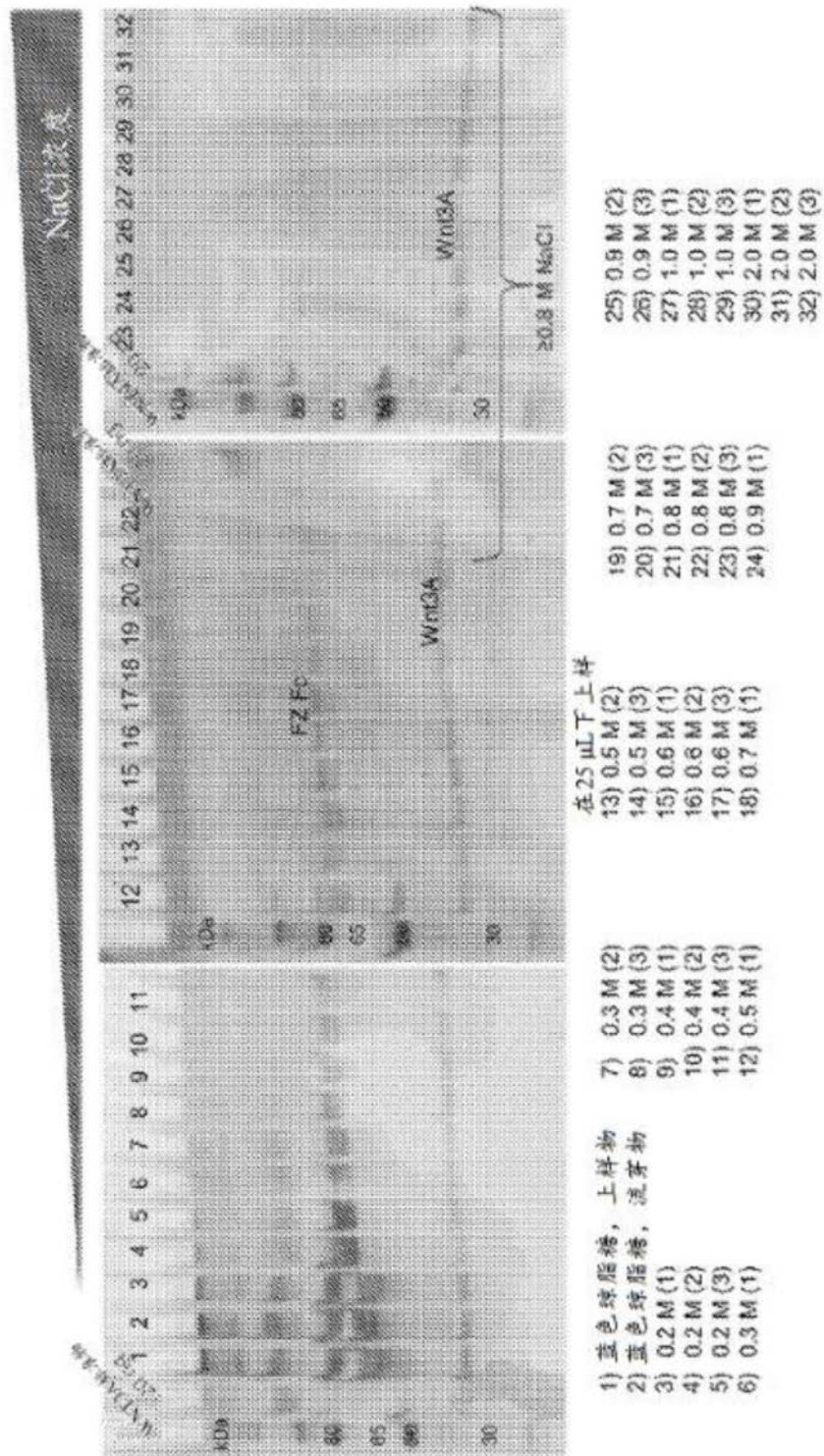


图7B

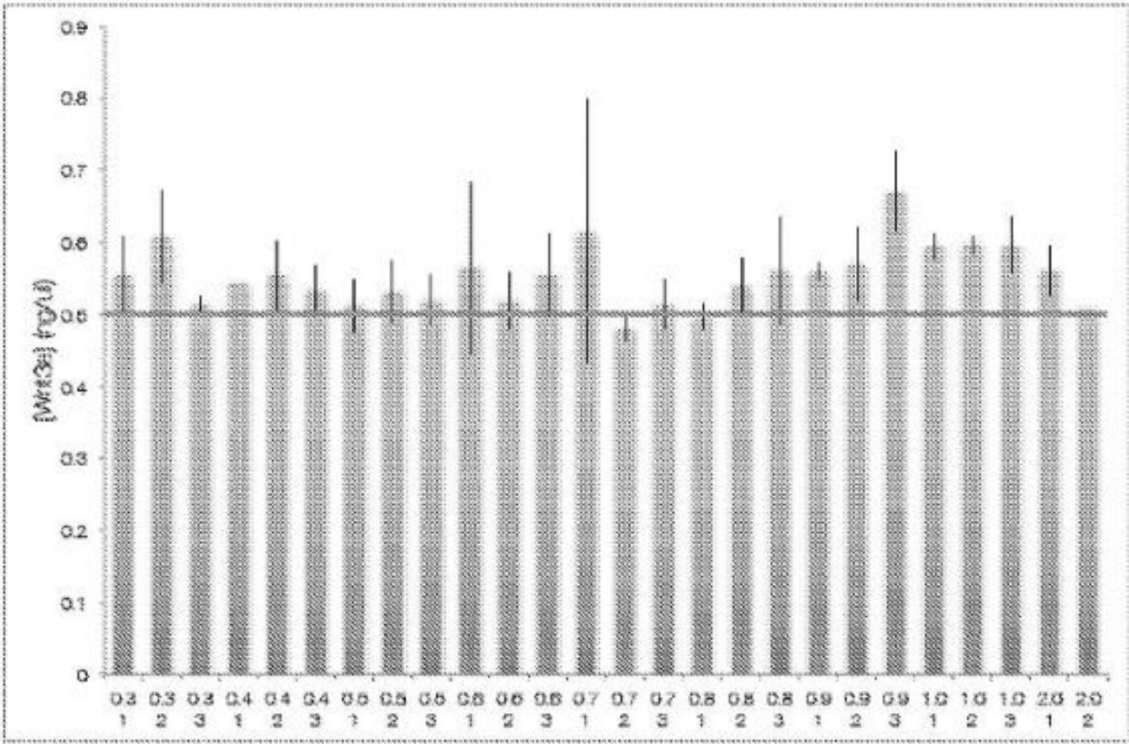


图7C

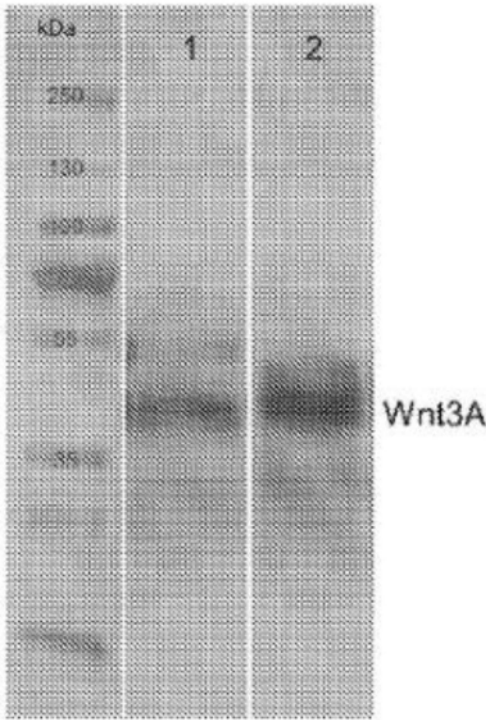


图8A

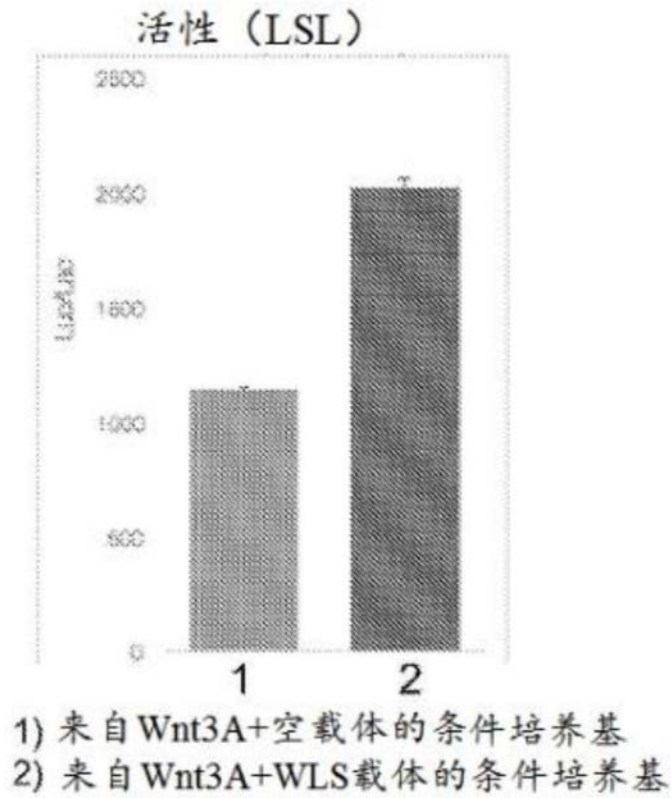


图8B

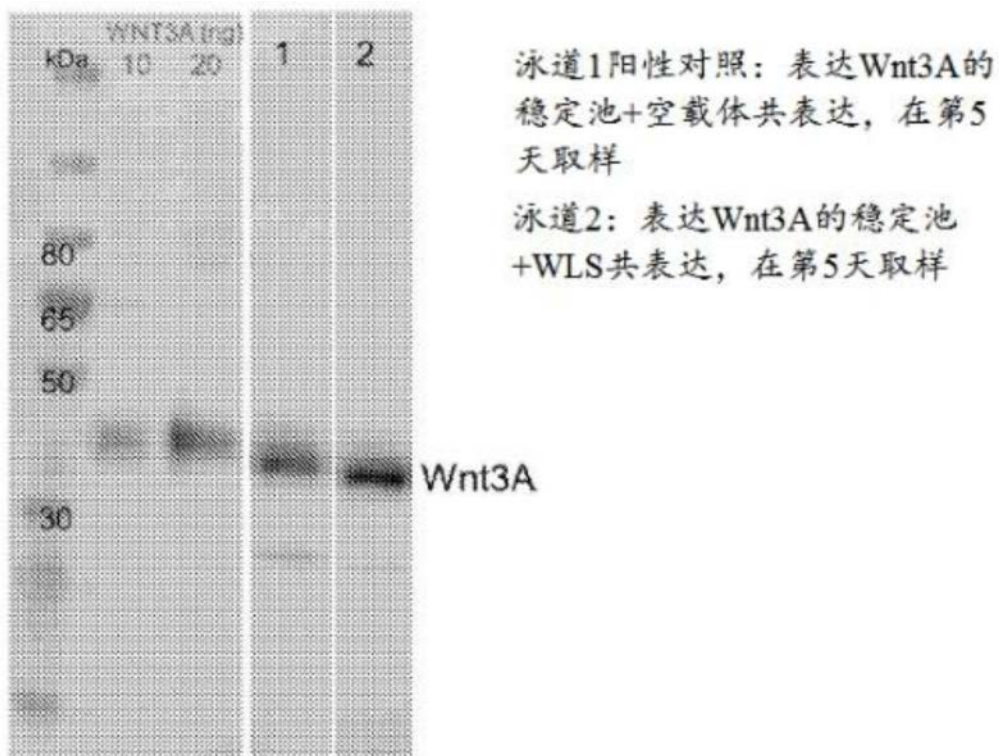


图8C

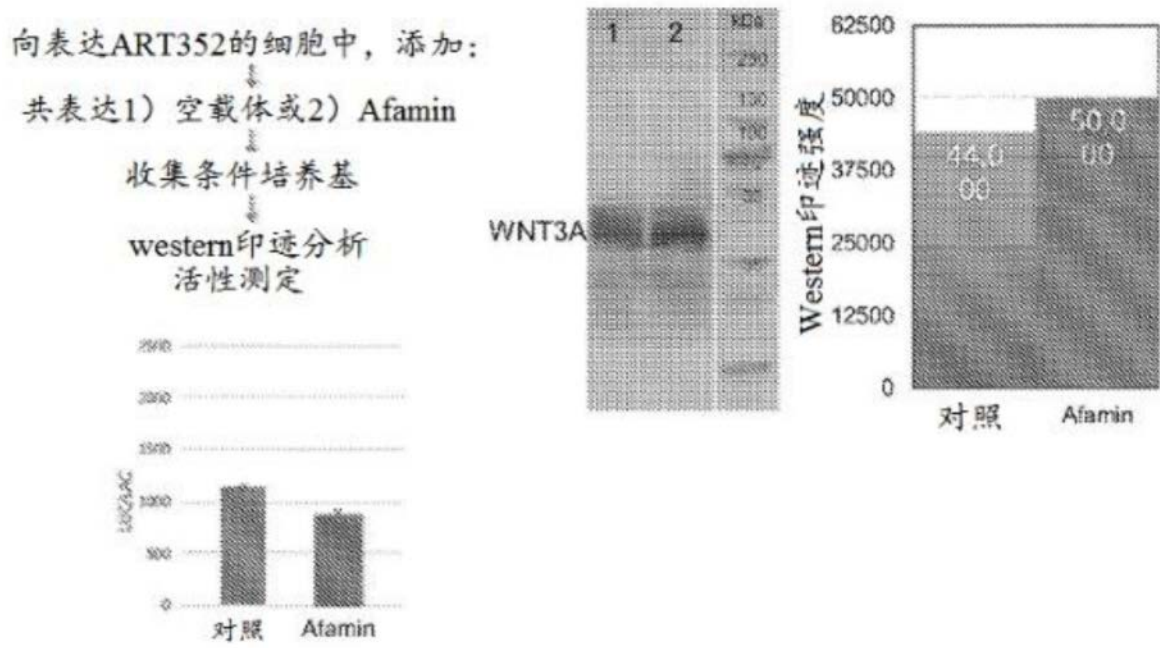


图9

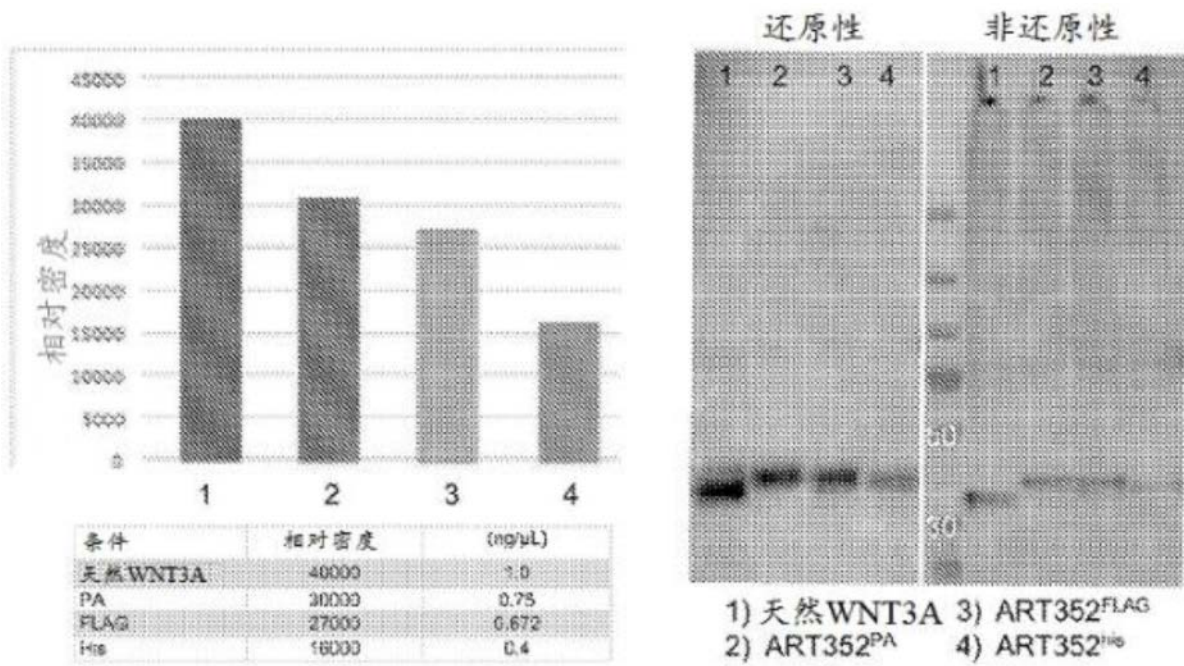


图10A

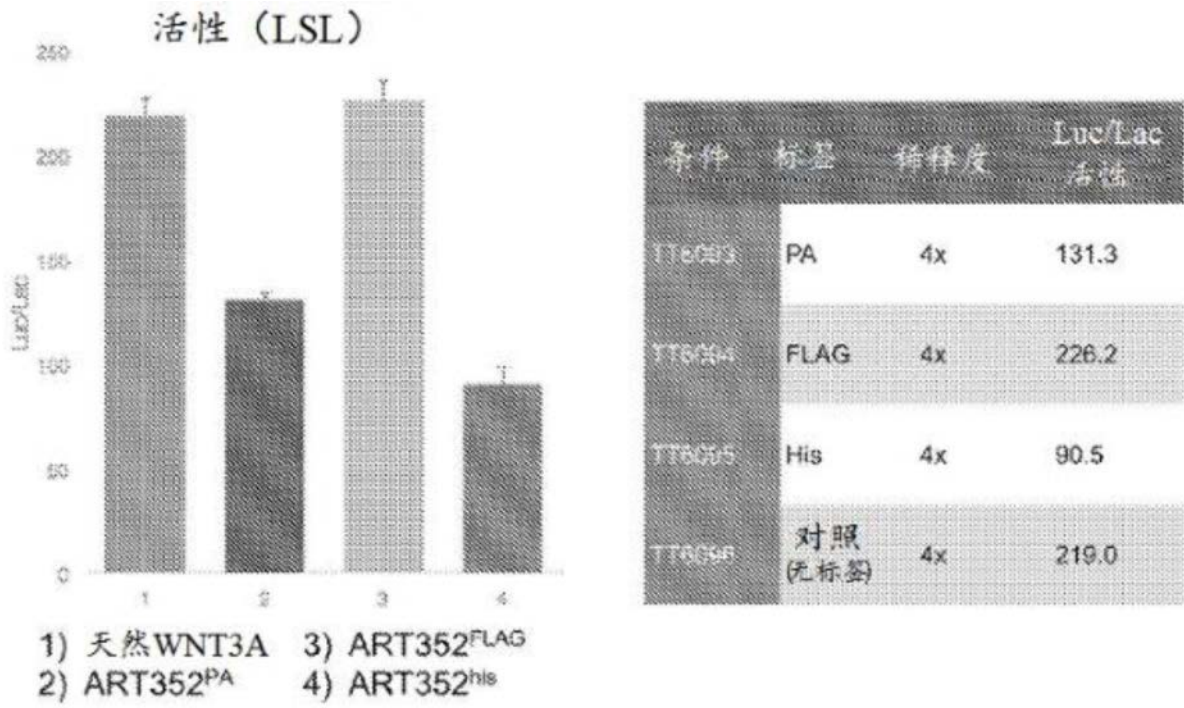


图10B

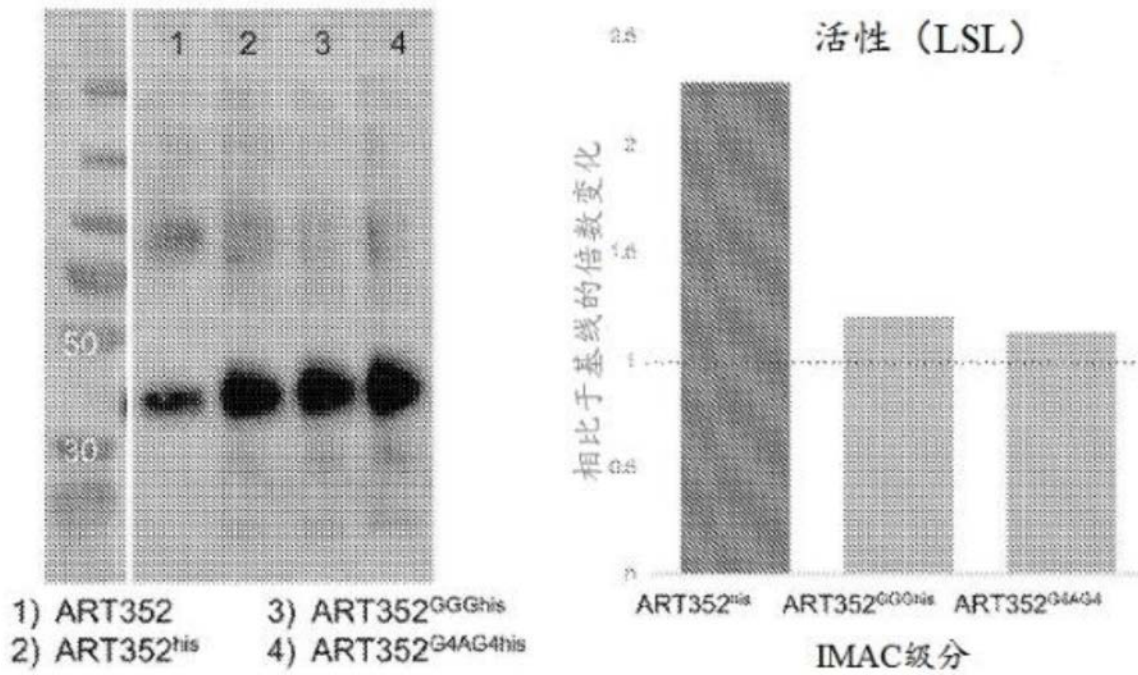


图11

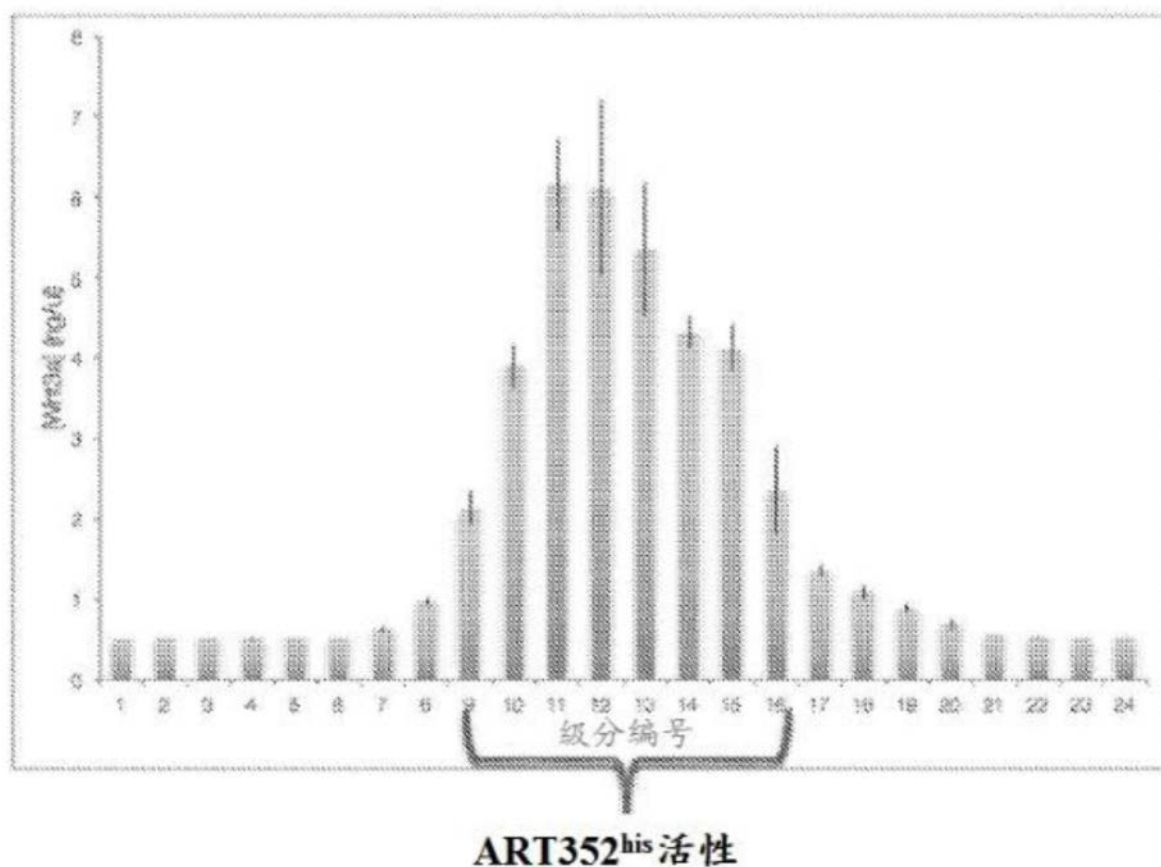


图12

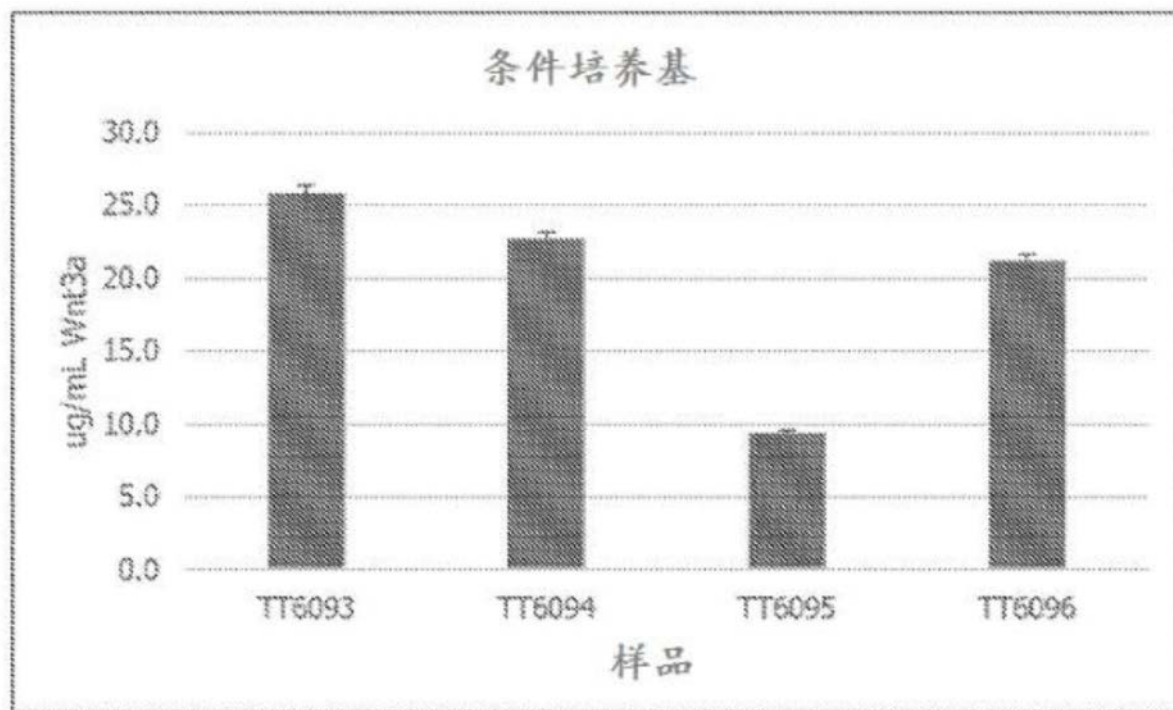


图13A

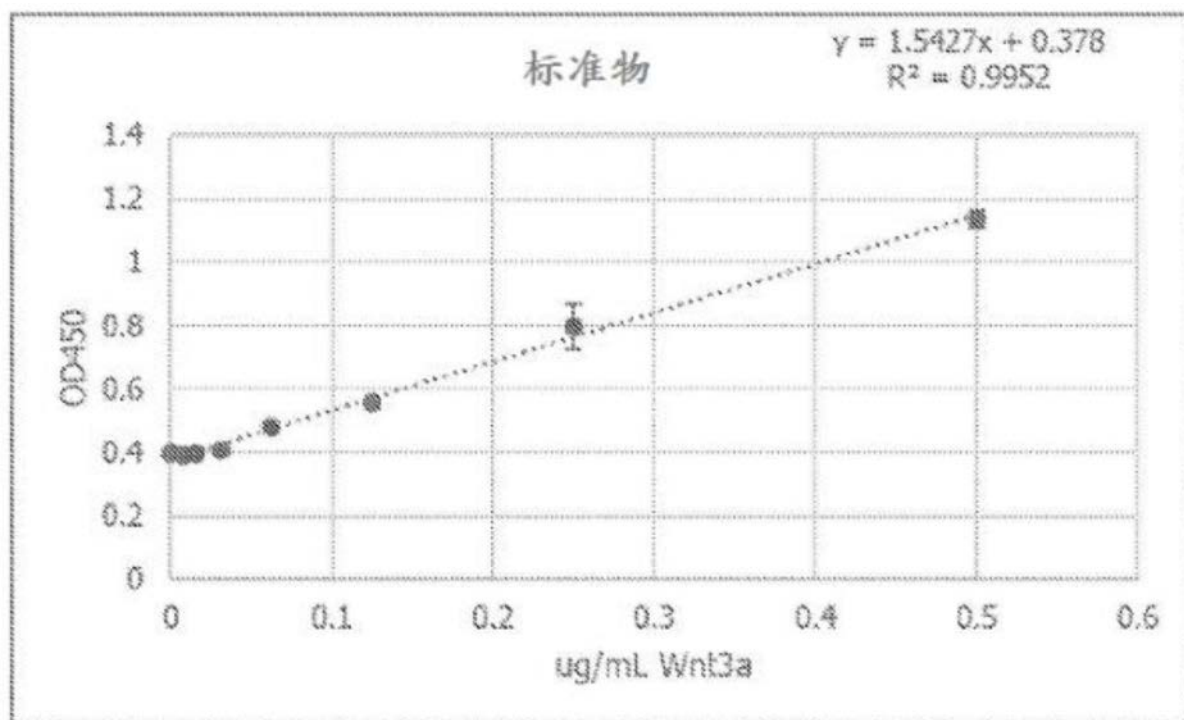


图13B

标识符	标签	稀释度	ug/mL	最终计算浓度
TT6093	PA	50X	0.52	25.8
TT6094	FLAG	50X	0.45	22.7
TT6095	His	50X	0.19	9.4
TT6096	N/A	50X	0.42	21.2

图13C

将CHAPS添加至CM
(条件培养基) 中, 最终1%



上样至0.25 ml管柱中



PBS洗涤, 20 CV
(管柱体积)



用5 CV洗脱缓冲液洗脱

图14

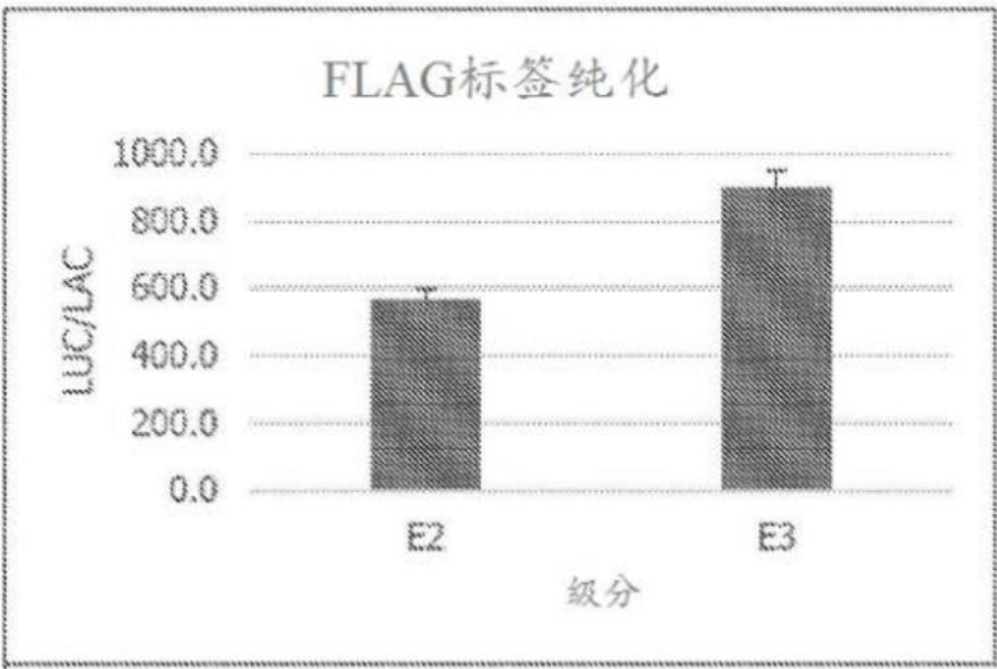


图15A

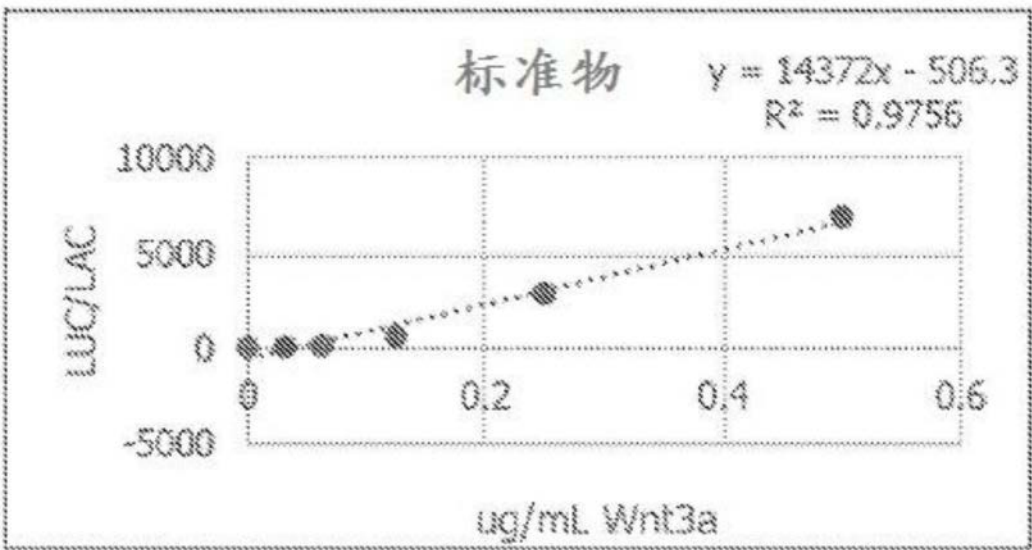


图15B

级分	稀释度	LUC/LAC
E2	20X	567.1
E3	20X	899.1

图15C

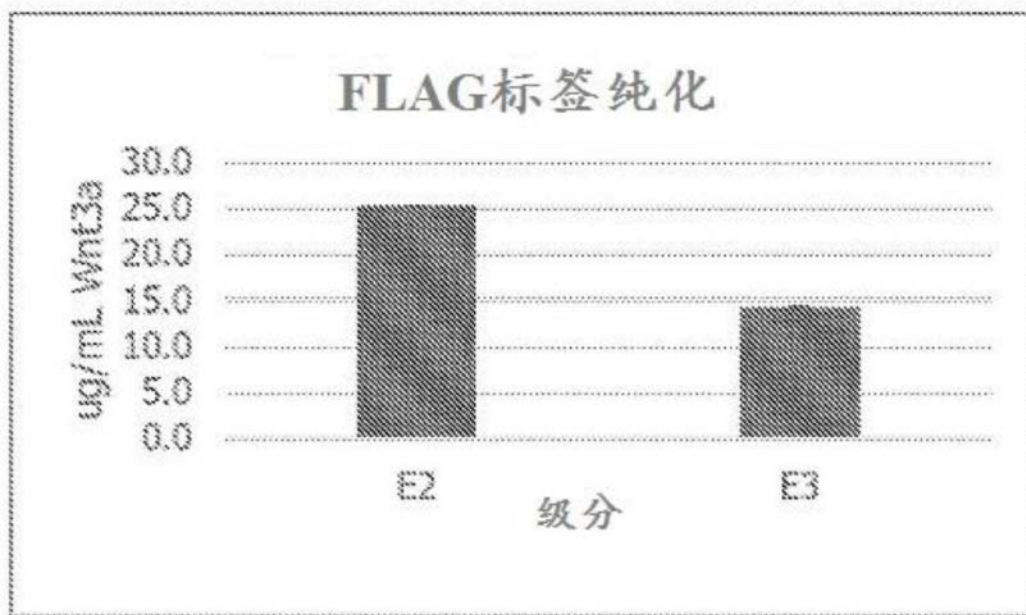


图15D

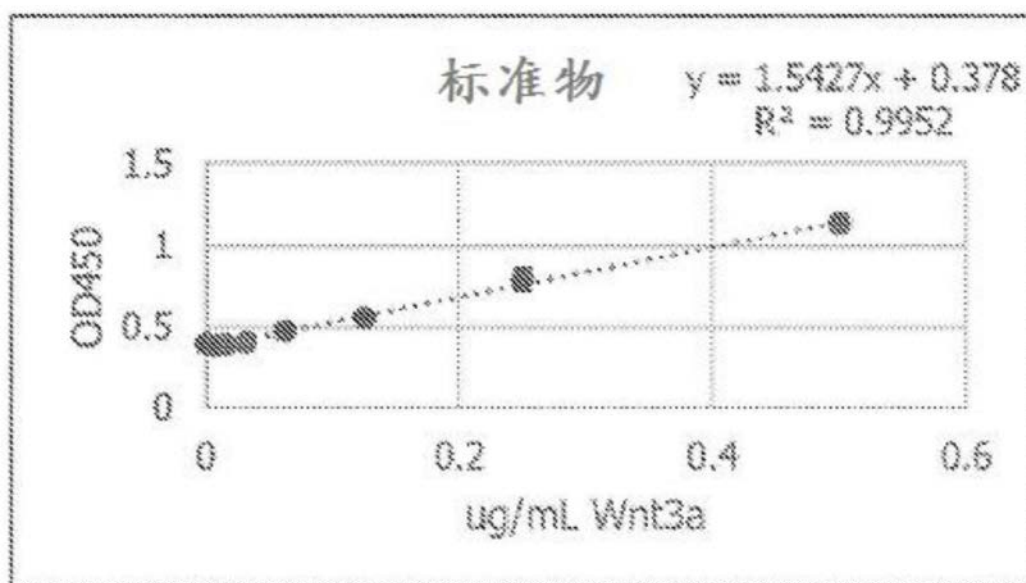


图15E

级分	稀释度	ug/mL	最终计算浓度
E2	25X	0.410	25.3
E3	25X	0.123	14.2

图15F

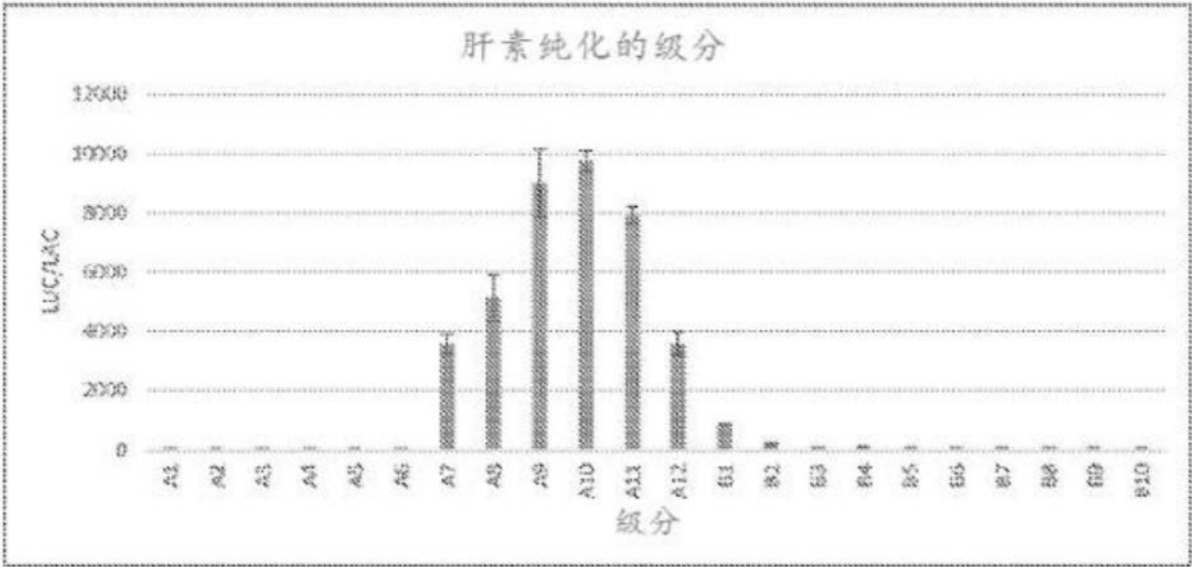


图16A

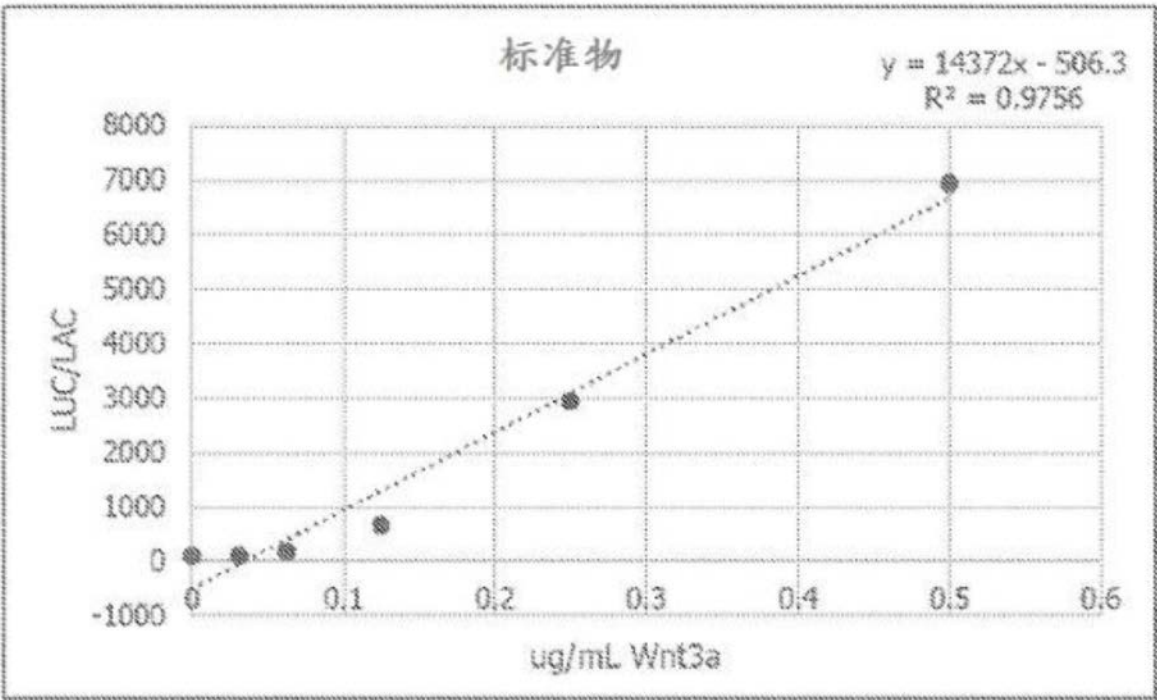


图16B

肝素级分	稀释度	LUC/LAC
A7	60X	974.8
A8	60X	5049.5
A9	80X	6070.7
A10	80X	6557.7
A11	80X	1914.8
A12	60X	509.9

图16C

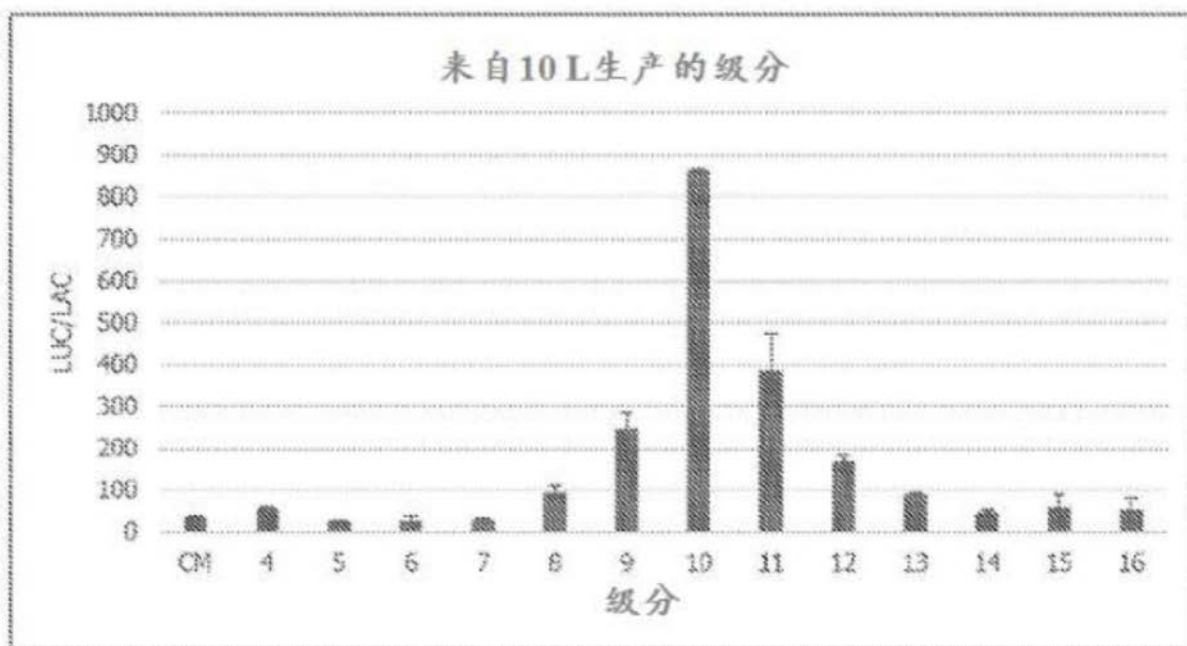


图17A

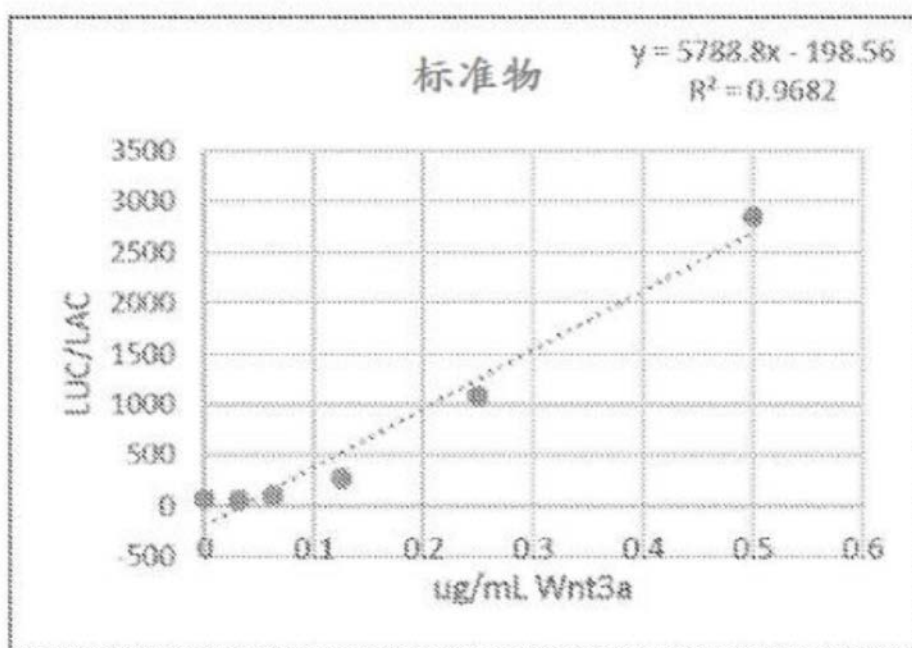


图17B

级分	稀释度	LUC/LAC
CM	4X	36.1
4	20X	54.5
5	20X	25.6
6	20X	25.6
7	20X	30.6
8	20X	94.8
9	20X	246.2
10	20X	863.9
11	20X	386.0
12	20X	168.1
13	20X	91.3
14	20X	45.5
15	20X	60.3
16	20X	53.5

图17C

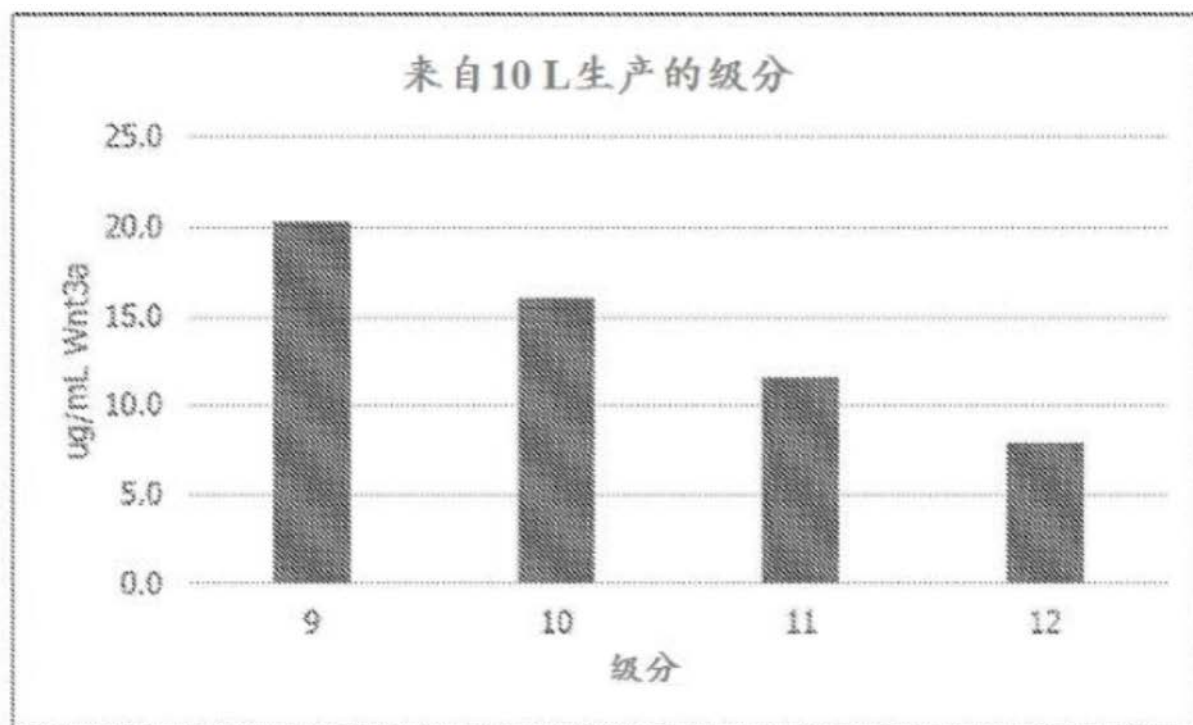


图17D

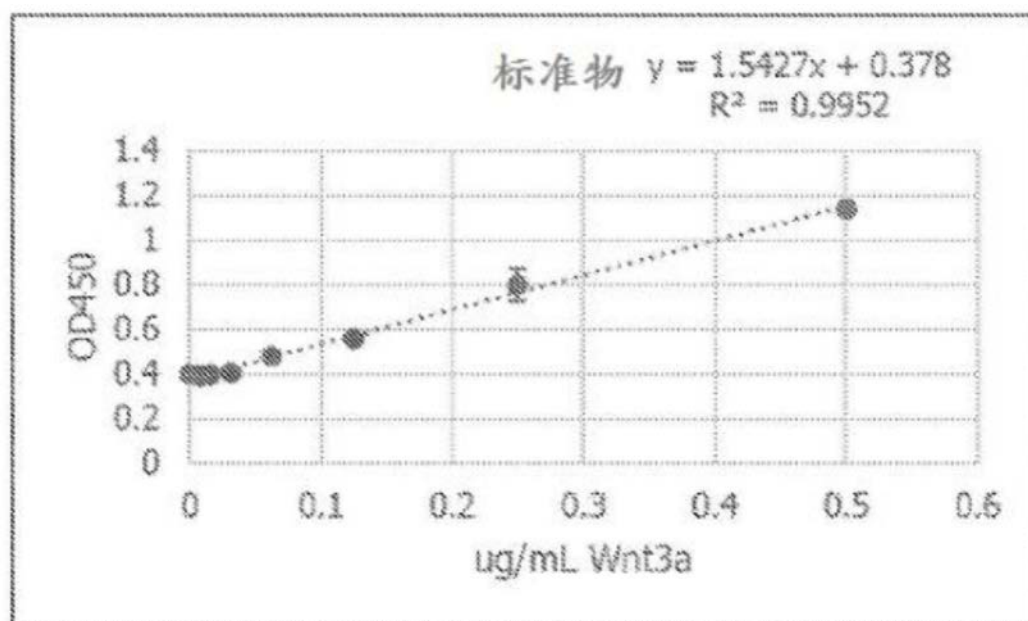
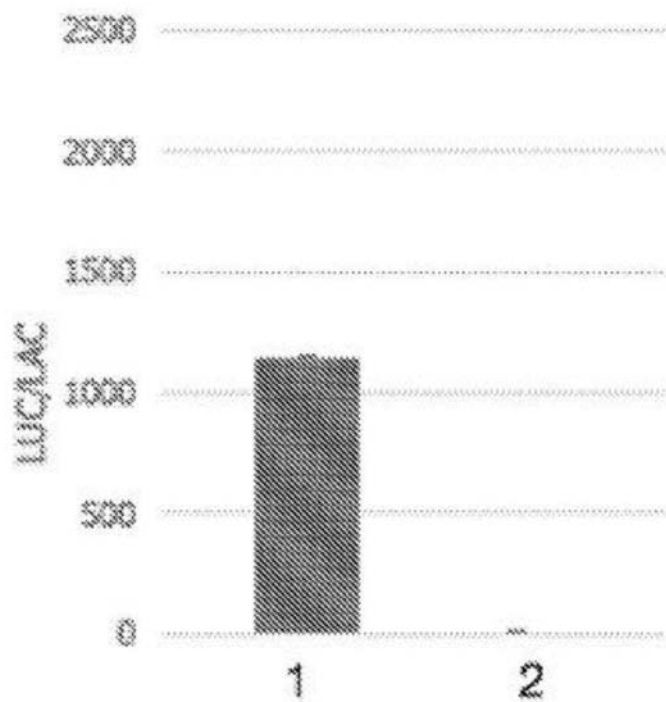


图17E

级分	稀释度	ug/mL	最终计算浓度
9	25X	0.81	20.3
10	25X	0.64	16.0
11	25X	0.46	11.6
12	25X	0.32	7.9

图17F



与以下各物共表达的WNT3A:

- 1) 空载体
- 2) hFZD8 CRD-Fc

图18

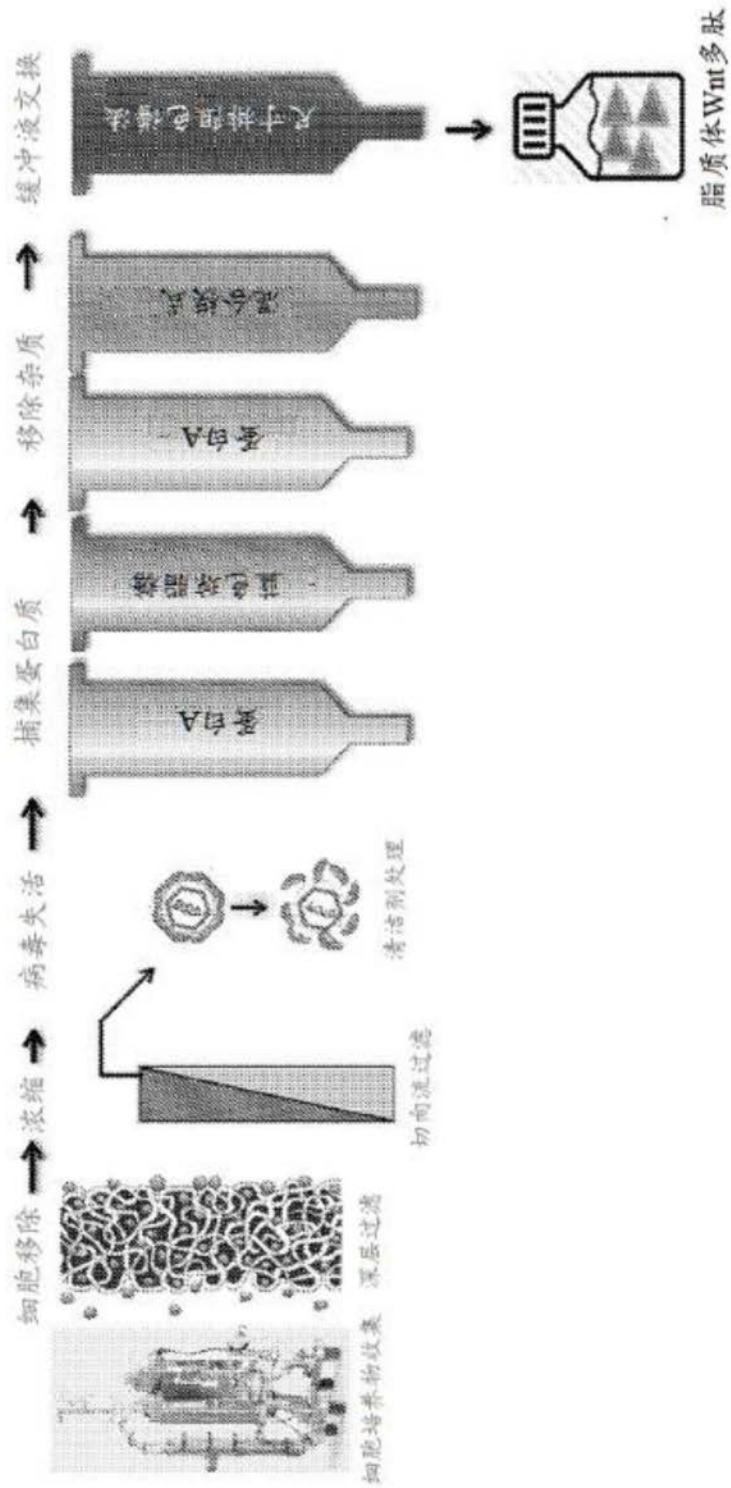


图19

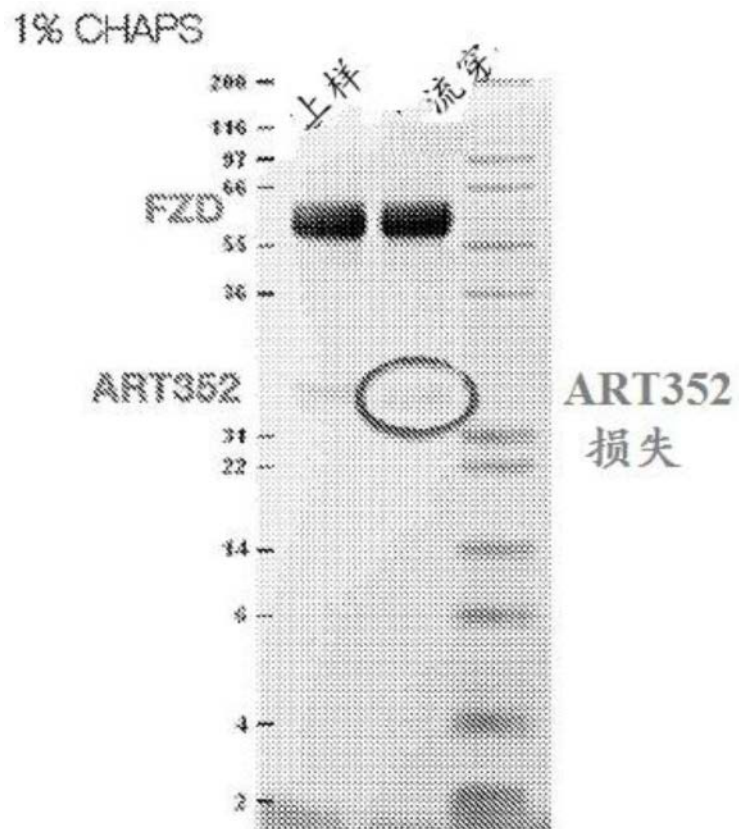


图20A

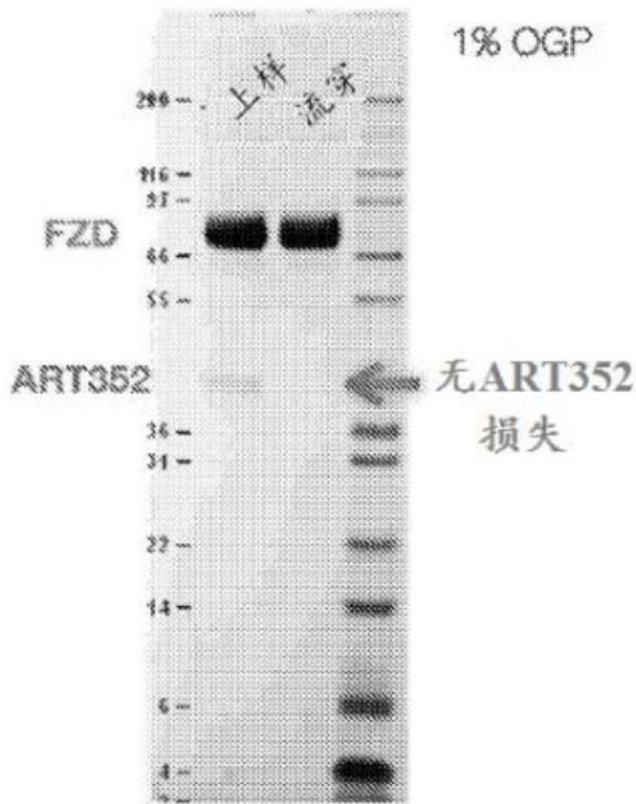


图20B

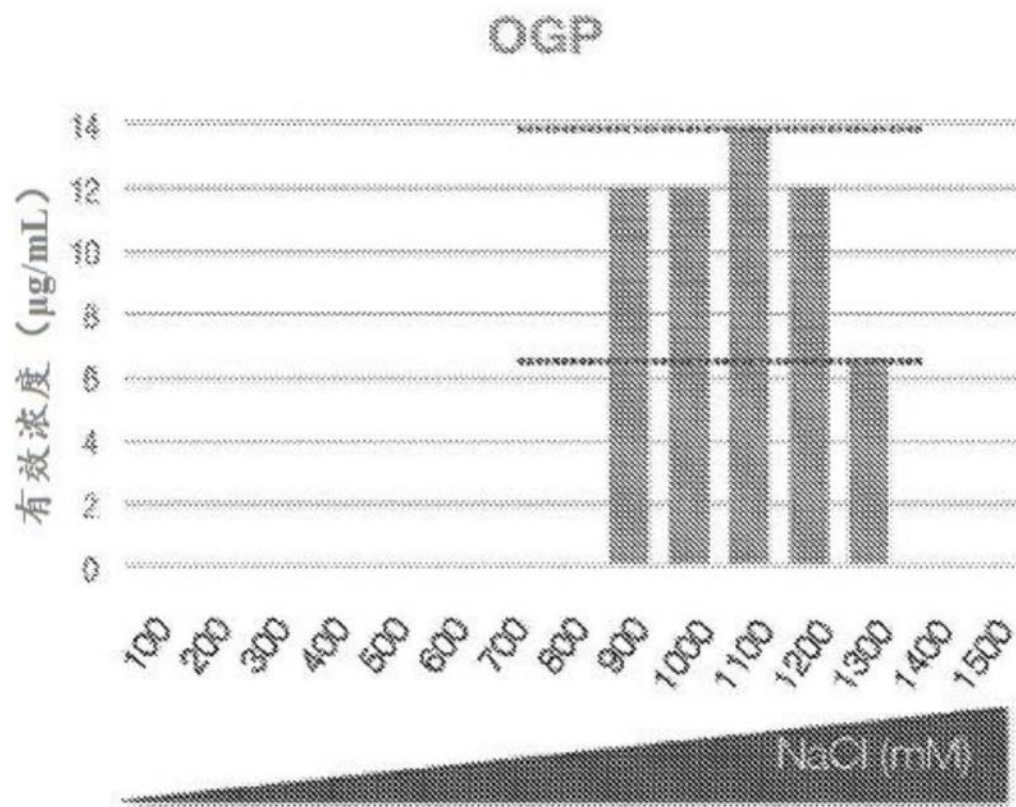


图21A

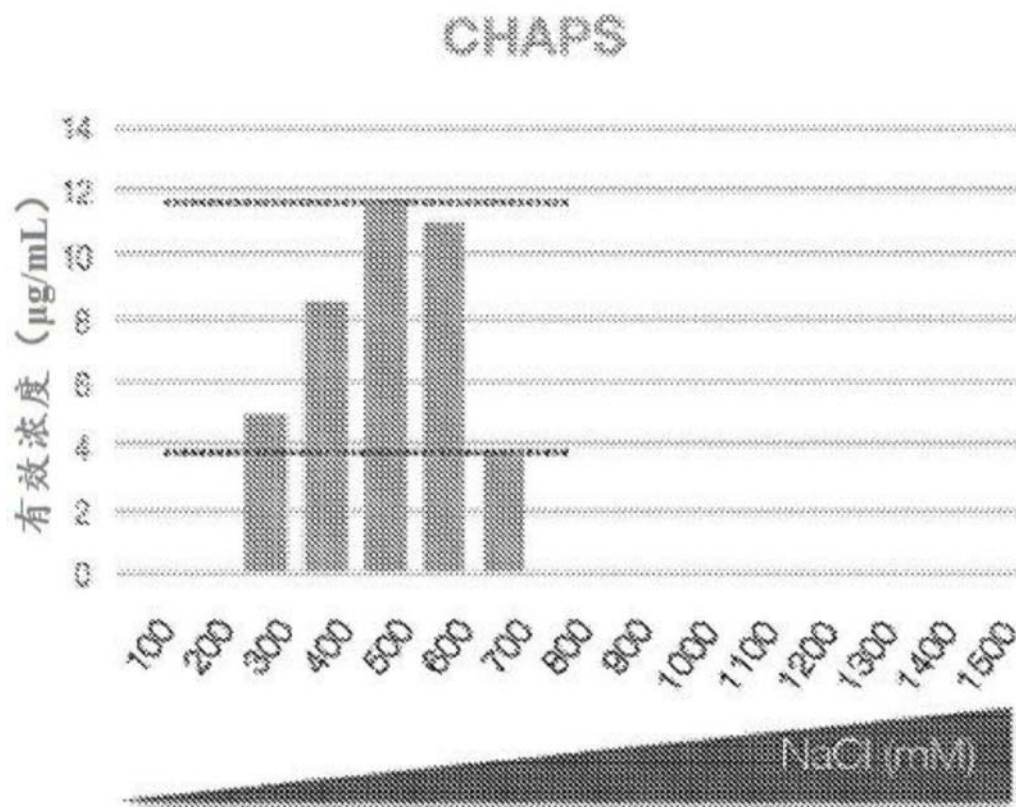


图21B

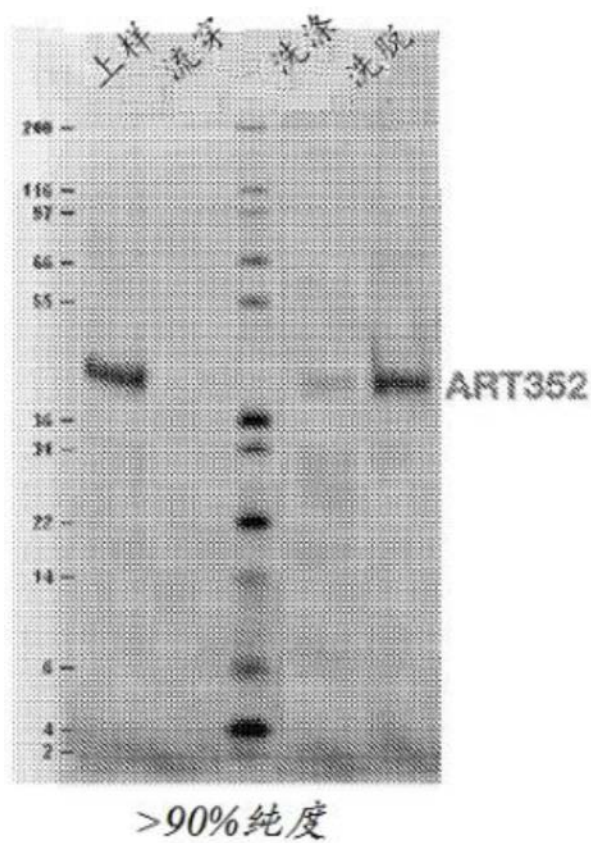


图22

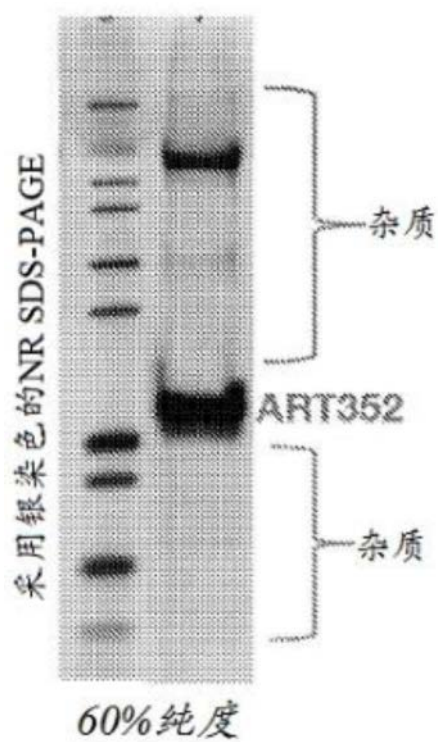


图23A

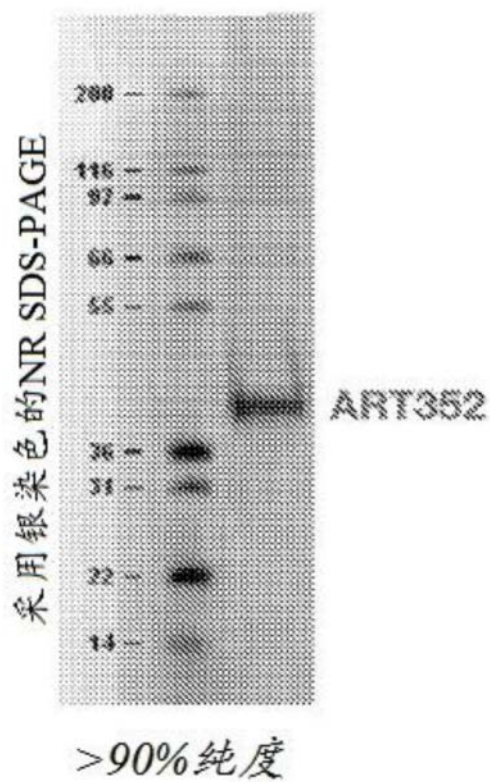


图23B

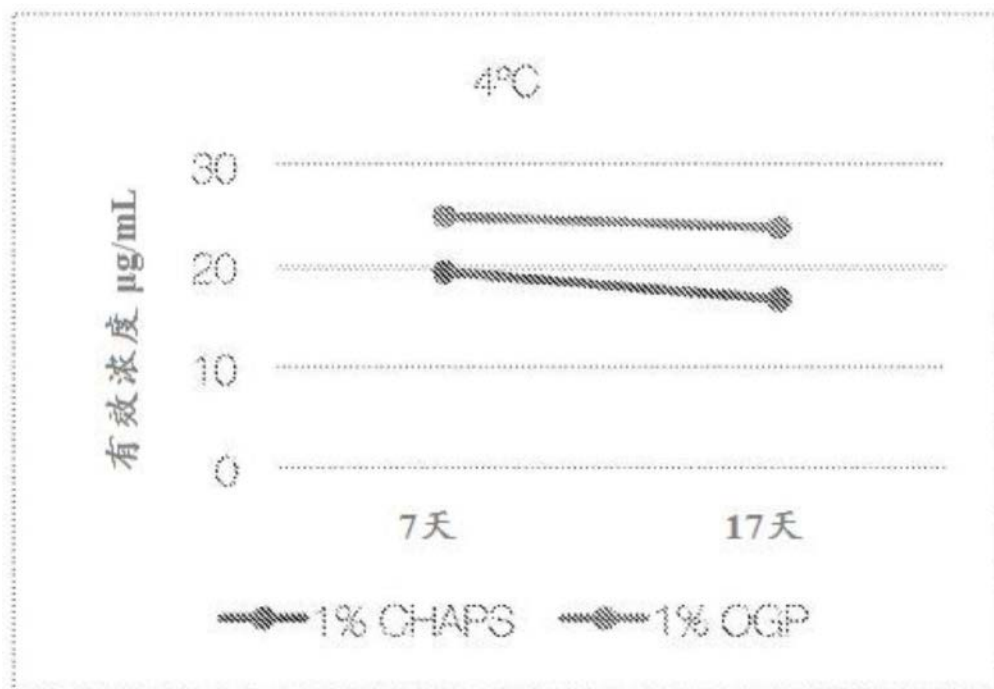


图24A

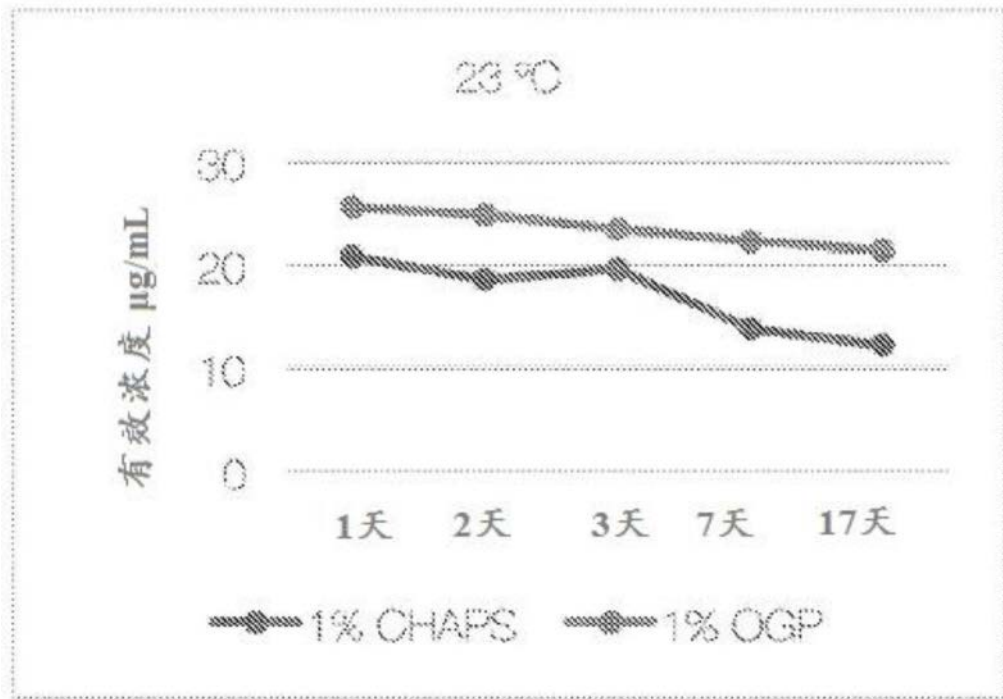


图24B

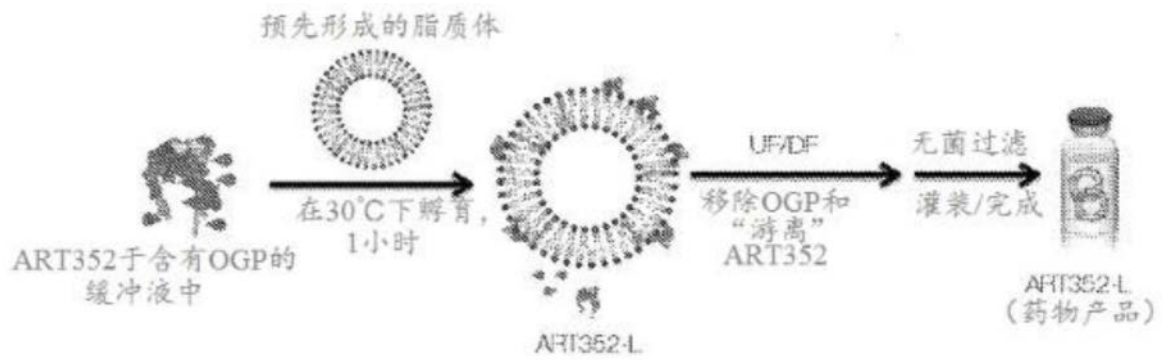


图25

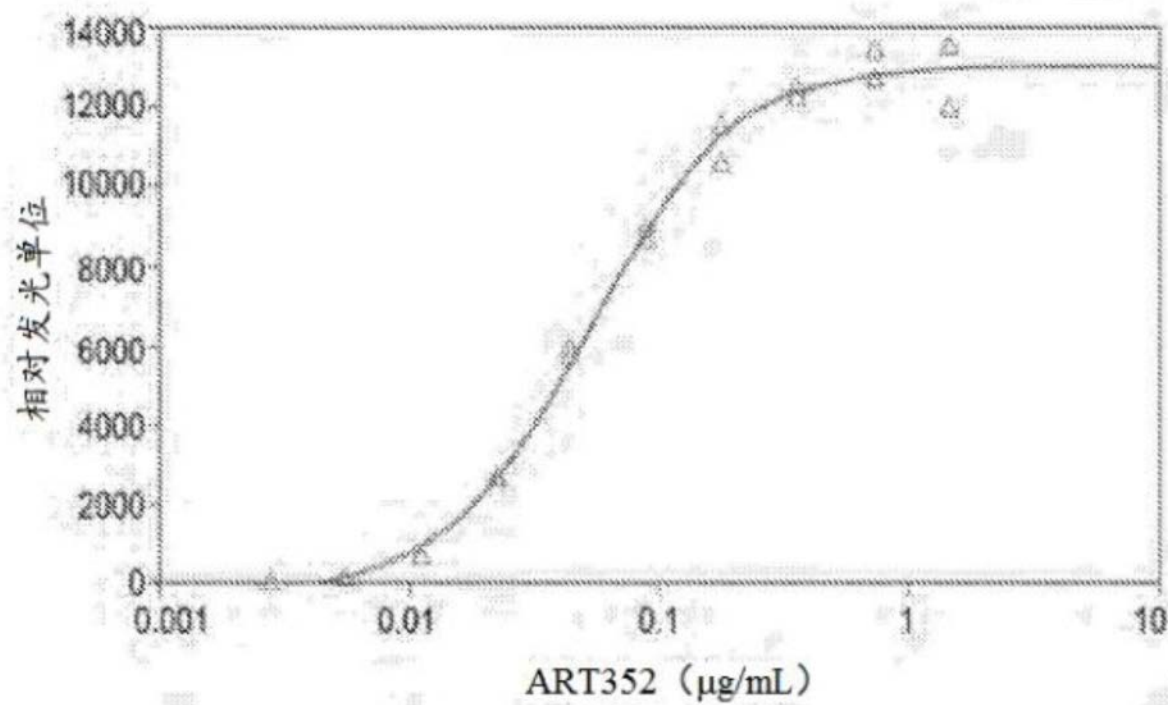


图26

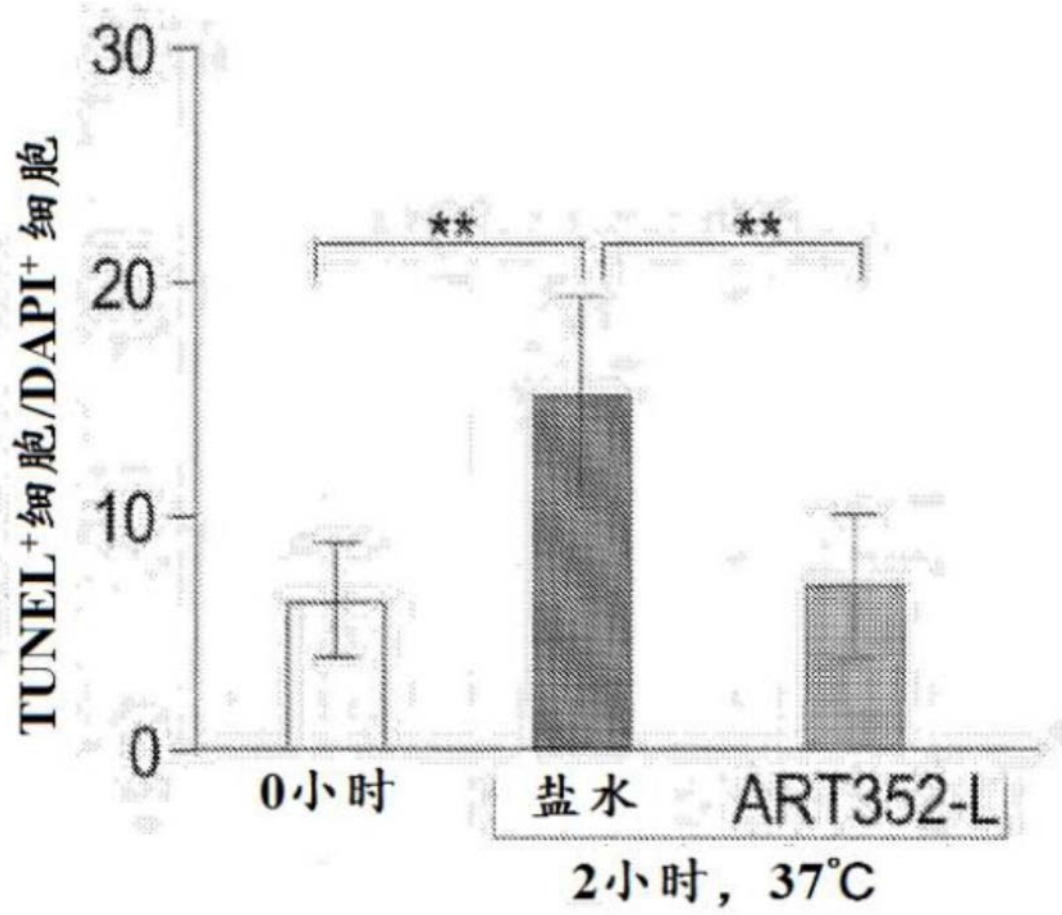


图27

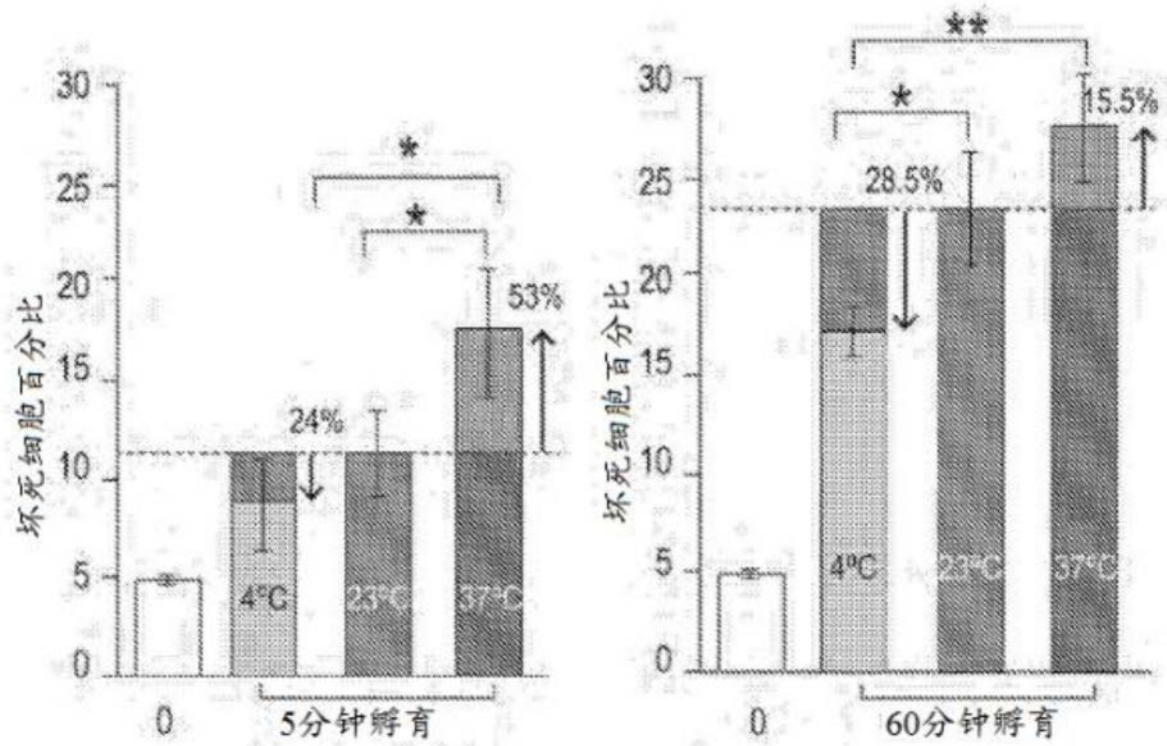


图28

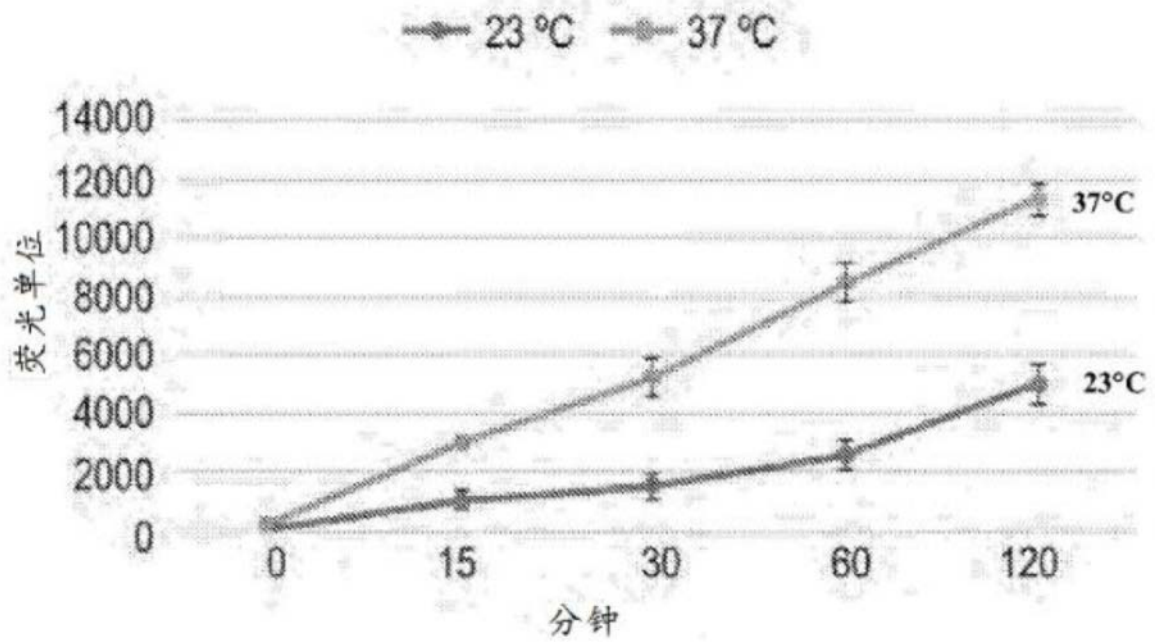


图29

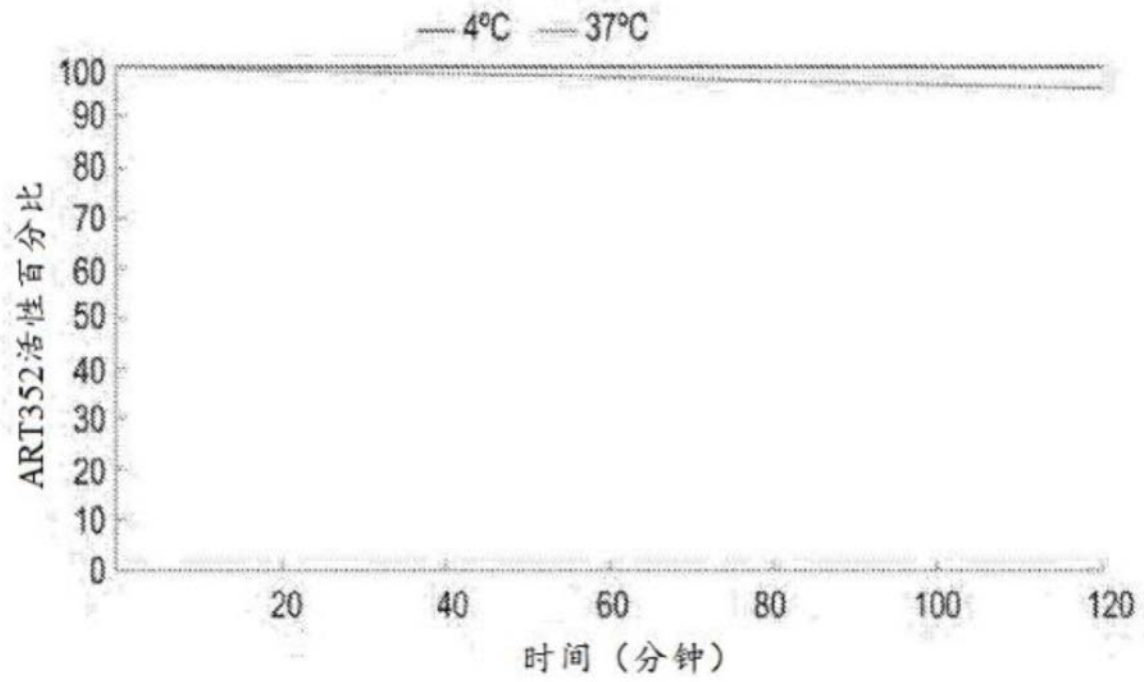


图30

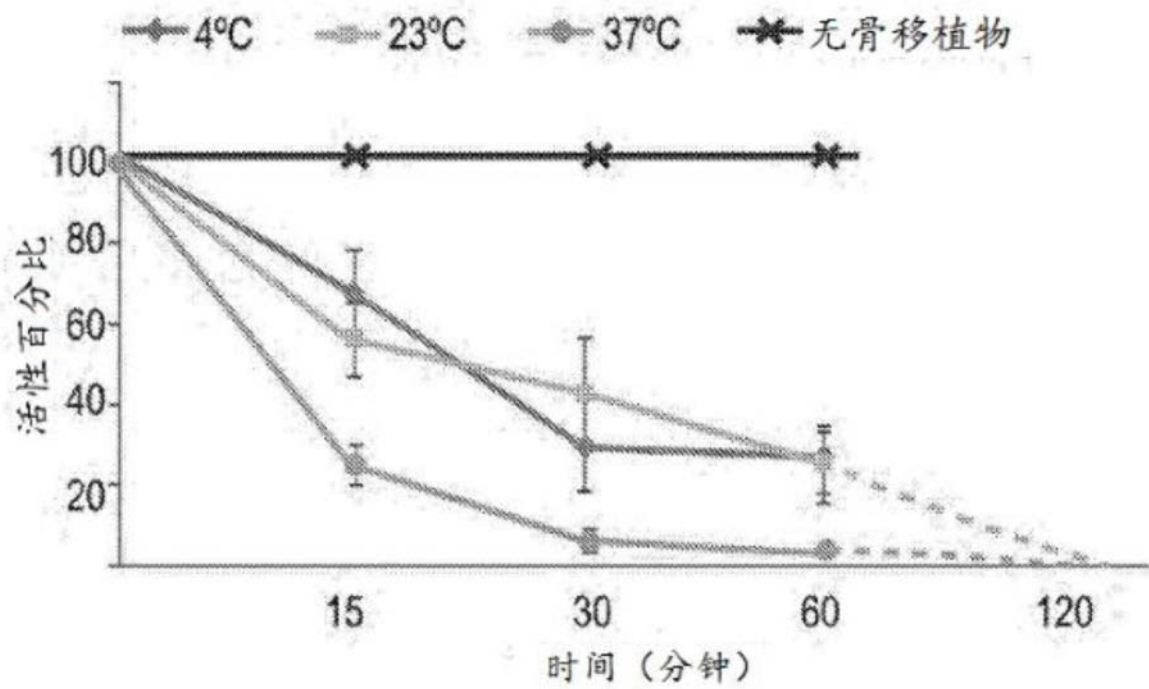


图31

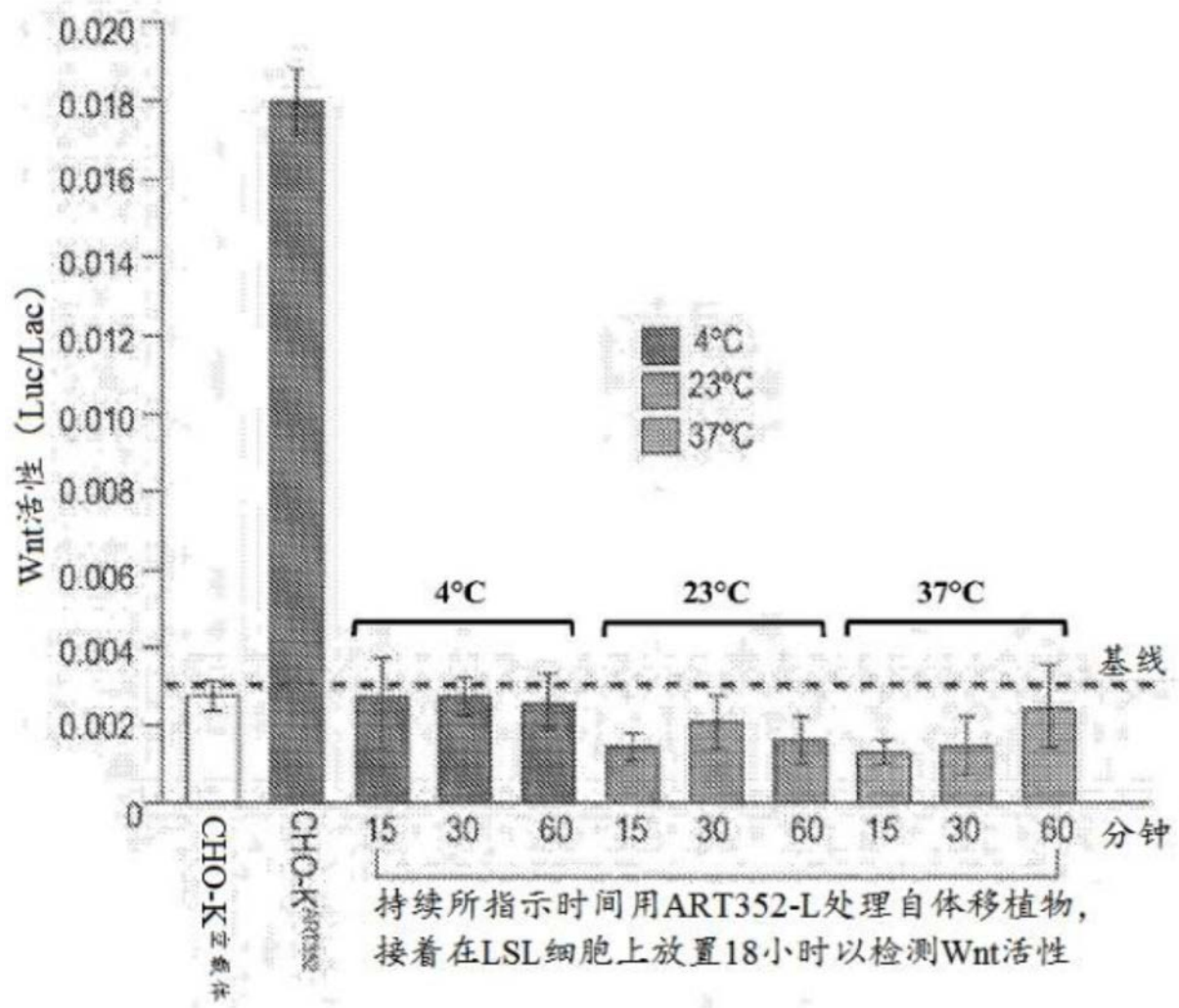


图32

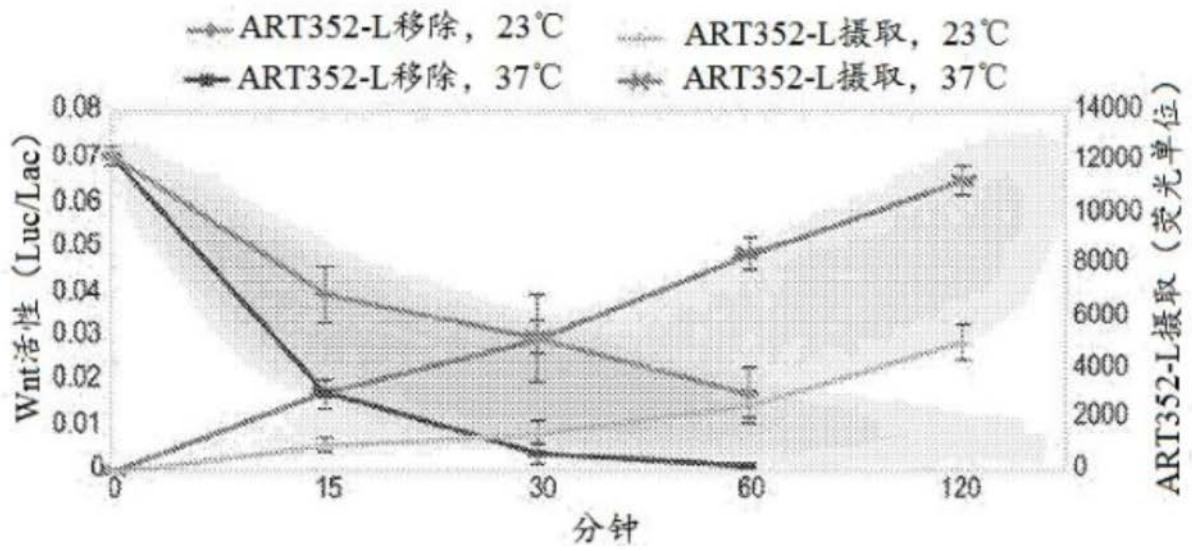


图33