



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119751697 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 04

(21) 申请号 202411964603.3

(22) 申请日 2019.10.22

(30) 优先权数据
62/748603 2018.10.22 US

(62) 分案原申请数据
201980085401.2 2019.10.22

(71) 申请人 詹森药业有限公司
地址 比利时贝尔瑟

(72) 发明人 S·马利坎 M·M·兰金
X·林-施密特 C·黄 J·菲尔曼
S·郑 S·朗格拉 S·M·纳尔逊

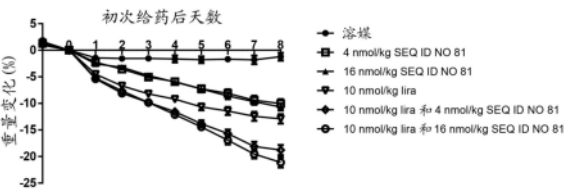
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
专利代理师 黄登高 彭昶

(51) Int.Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 5/50 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书64页
序列表(电子公布) 附图11页

(54) 发明名称
胰高血糖素样肽1(GLP1)-生长分化因子15
(GDF15)融合蛋白及其用途

(57) 摘要
本发明涉及GLP1-GDF15融合蛋白及其用途。本文提供了GLP1-GDF15融合蛋白,该GLP1-GDF15融合蛋白包含GLP1或GLP1变体肽、第一接头肽、血清白蛋白、第二接头肽和GDF15蛋白。



1. 一种胰高血糖素样肽-1 (GLP1) /生长分化因子15 (GDF15) 融合蛋白, 其中所述GLP1-GDF15融合蛋白包含GLP1肽、第一接头肽、血清白蛋白、第二接头肽和GDF15蛋白。

2. 根据权利要求1所述的GLP1-GDF15融合蛋白, 其中所述GLP1肽包含选自SEQ ID NO: 1-4的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的GLP1-GDF15融合蛋白, 其中所述第一接头肽包含选自SEQ ID NO: 5-25的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1所述的GLP1-GDF15融合蛋白, 其中所述血清白蛋白包含选自SEQ ID NO: 26或SEQ ID NO: 27的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1所述的GLP1-GDF15融合蛋白, 其中所述第二接头肽包含选自SEQ ID NO: 28-30的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1所述的GLP1-GDF15融合蛋白, 其中所述GDF15蛋白包含选自SEQ ID NO: 31或SEQ ID NO: 32的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1所述的GLP1-GDF15融合蛋白, 其中所述GLP1-GDF15融合蛋白包含选自SEQ ID NO: 34-43、47、48、51-74和84的氨基酸序列。

8. 一种分离的核酸, 所述分离的核酸编码根据权利要求1所述的GLP1-GDF15融合蛋白。

9. 一种载体, 所述载体包含根据权利要求8所述的分离的核酸。

10. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含根据权利要求8所述的分离的核酸或根据权利要求9所述的载体。

11. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含根据权利要求1所述的GLP1-GDF15融合蛋白以及药学上可接受的载体。

12. 一种用于治疗或预防有需要的受试者的疾病或障碍的方法, 其中所述疾病或障碍选自: 肥胖症、I型或II型糖尿病、代谢综合征、胰岛素抗性、葡萄糖耐受性受损、高血糖症、高胰岛素血症、高甘油三酯血症、由于先天性高胰岛素血症 (CHI) 引起的低血糖症、血脂异常、动脉粥样硬化、糖尿病性肾病、以及其他心血管危险因素诸如高血压和与未管控的胆固醇和/或脂质水平相关的心血管危险因素、骨质疏松症、炎症、非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、肾脏疾病和湿疹, 所述方法包括向所述有需要的受试者施用有效量的根据权利要求11所述的药物组合物。

13. 一种减少有需要的受试者的食物摄取的方法, 所述方法包括向所述有需要的受试者施用有效量的根据权利要求11所述的药物组合物。

14. 一种调节有需要的受试者的GLP1受体活性的方法, 所述方法包括向所述有需要的受试者施用有效量的根据权利要求11所述的药物组合物。

15. 一种调节有需要的受试者的GDF15受体 (GFRAL) 活性的方法, 所述方法包括向所述有需要的受试者施用有效量的根据权利要求11所述的药物组合物。

16. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述药物组合物经由注射施用。

17. 一种试剂盒, 所述试剂盒包括根据权利要求1所述的GLP1-GDF15融合蛋白、根据权利要求8所述的分离的核酸和/或根据权利要求9所述的载体。

18. 根据权利要求17所述的试剂盒, 其中所述试剂盒还包括用于注射的装置。

19. 一种制备药物组合物的方法, 所述药物组合物包含根据权利要求1所述的GLP1-GDF15融合蛋白, 所述方法包括将所述GLP1-GDF15融合蛋白与药学上可接受的载体组合以

获得所述药物组合物。

20. 一种制备根据权利要求1所述的GLP1-GDF15融合蛋白的方法,所述方法包括在制备所述GLP1-GDF15融合蛋白的条件下培养包含编码所述GLP1-GDF15融合蛋白的核酸的细胞,并从细胞或培养物回收所述GLP1-GDF15融合蛋白。

胰高血糖素样肽1 (GLP1) -生长分化因子15 (GDF15) 融合蛋白 及其用途

[0001] 本申请是申请日为2019年10月22日,申请号为201980085401.2,发明名称为“胰高血糖素样肽1 (GLP1) -生长分化因子15 (GDF15) 融合蛋白及其用途”的发明专利的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明整体涉及新型胰高血糖素样肽1 (GLP1) -生长分化因子15 (GDF15) 融合蛋白。GLP1-GDF15融合蛋白调节GLP1R和/或GDF15R。本发明还涉及药物组合物及其使用方法。新型GLP1-GDF15融合蛋白可用于预防、治疗或改善疾病或障碍,诸如肥胖症、2型糖尿病、代谢综合征、胰岛素抗性和血脂异常等等。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2018年10月22日提交的美国临时申请62/784,603的优先权,该申请的公开内容全文以引用方式并入本文。

背景技术

[0005] GDF15 (TGF β 家族的成员) 是一种分泌蛋白,其在血浆中作为25kDa同源二聚体循环,并通过与脑干表达的受体GFRAL相互作用而引发其生物学功能 (Mullican等人, Nat Med., 第23卷, 第1150-1157页 (2017年); Yang等人, Nat Med., 第23卷, 第1158-1166页 (2017年); Hsu等人, Nature, 第550卷, 第255-259页 (2017年), Emmerson等人, Nat Med, 第23卷, 第1215-1219页 (2017年))。在大多数个体中, GDF15的血浆水平在介于150pg/mL和1150pg/mL之间的范围内 (Tsai等人, J Cachexia Sarcopenia Muscle, 第3卷, 第239-243页 (2012年))。GDF15的升高的血浆水平与因厌食症引起的体重减轻以及癌症、肾衰竭和心脏衰竭引起的恶病质相关联。此外, GDF15在Roux-en-Y胃旁路术 (RYGB) 后经历体重减轻的患者中有所增加 (Vila等人, Clin Chem, 第57卷, 第309-316页 (2011年))。

[0006] 在啮齿动物中, 体重减轻与GDF15之间的相关性是保守的。GDF15的过表达导致食物摄取减少、体重减轻, 并且在高脂肪饮食喂养时保护小鼠免受肥胖、肝脏脂肪变性和葡萄糖耐受不良 (Baek等人, Gastroenterology, 第131卷, 第1553-1560页 (2006年); Johnen等人, Nat Med, 第13卷, 第1333-1340页 (2007年); Chrysovergis等人, Int J Obesity, 第38卷, 第1555-1564页 (2014年); Macia等人, PloS One, 第7卷, 第e34868页 (2012年); Jones等人, Cell Reports, 第22卷, 第1522-1530页 (2018年); Xiong等人, Sci Trans Med, 第9卷, 第412页 (2017年))。用GDF15转染的前列腺肿瘤细胞的异种移植物也导致食物摄取减少并且体重减轻 (Johnen等人, Nat Med, 第13卷, 第1333-1340页 (2007年))。相反地, 许多研究者已报道, 缺乏GDF15的小鼠比野生型动物增加更大的体重和更大的脂肪量 (Strelau等人, J Neurosci, 第29卷, 第13640-13648页 (2009年); Casanovas等人, Haematologica, 第98卷, 第444-447页 (2013年); Bonaterra等人, J Amer Heart Assoc, 第1卷, 第e002550页 (2012年); Tsai等人, PloS one, 第8卷, 第e55174页 (2013年))。

[0007] 已经在小鼠、大鼠和猴中证实了药理学上施用GDF15可能会减少能量摄取, 并进而

引起体重减轻。用重组GDF15处理的瘦小鼠进食少并且体重减轻 (Johnen等人, Nat Med, 第13卷, 第1333-1340页 (2007年); Hsu等人, Nature, 第550卷, 第255-259页 (2017年); Mullican等人, Nat Med, 第23卷, 第1150-1157页 (2017年); Tsai等人, Int J Obesity, 第42卷, 第561-571页 (2018年))。在施用GDF15之后, 在遗传和饮食诱导的大鼠和小鼠肥胖症模型中也观察到食物摄取减少和体重减轻 (Johnen等人, Nat Med, 第13卷, 第1333-1340页 (2007年); Hsu等人, Nature, 第550卷, 第255-259页 (2017年); Mullican等人, Nat Med, 第23卷, 第1150-1157页 (2017年); Yang等人, Nat Med, 第23卷, 第1158-1166页 (2017年); Tsai等人, Int J Obesity, 第42卷, 第561-571页 (2018年); Xiong等人, Sci Trans Med, 第9卷, 第412页 (2017年))。在饮食诱导的肥胖小鼠中GDF15治疗介导的体重减轻导致代谢改善, 包括葡萄糖稳态增强以及血浆甘油三酯和胆固醇降低。这些效果可平移至更高的物种, 因为在自发肥胖非人灵长类中使用重组人GDF15的六周每日治疗方案降低了食物摄取、体重和血浆甘油三酯浓度并改善了葡萄糖耐受性 (Xiong等人, Sci Trans Med, 第9卷, 第412页 (2017年))。此外, 先前已证实, 重组GDF15的半衰期通过与血清白蛋白 (HSA) 融合而延长, 并且预测其为适用于在人类中每周一次给药的治疗剂 (Mullican等人, Nat Med, 第23卷, 第1150-1157页 (2017年) 和美国专利公布2017/0327560)。

[0008] GLP1是来源于肠道的肠内分泌细胞的肽激素, 其也减少食物摄取, 从而导致体重减轻。该功能通过与中枢神经系统内的GLP1受体 (GLP1R) 相互作用来介导, 并且外周组织中的这种配体/受体相互作用具有另外的生物学效果, 这些生物学效果包括增强葡萄糖刺激的胰岛素分泌、抑制胰高血糖素释放和减慢胃排空 (Druker等人, Cell Met, 第27卷, 第740-756页 (2018年))。利用所有这些生物学效果, GLP1R激动剂改善了人类的葡萄糖稳态并驱使人类体重减轻。此外, 虽然尚未确定确切机制, 但据报道用GLP1R激动剂治疗会显著改善糖尿病患者的心血管结果 (Lim等人, Trends Endocrinol Metab., 第29卷, 第238-248页 (2018年))。GLP1R激动剂治疗剂是具有防止酶裂解的修饰的基于天然人类GLP1或毒蜥外泌肽-4 (从大毒蜥的唾液中分离的肽) 的肽序列。GLP1R激动剂可以经由延长半衰期的平台诸如脂化、抗体Fc或血清白蛋白 (HSA) 递送 (Cheang和Moyle, Chem Med Chem, 第13卷, 第662-671页 (2018年))。

[0009] 因此, 期望获得分别相对于GLP1或GDF15具有改善的代谢稳定性和药代动力学类型的GLP1类似物或其衍生物和/或GDF15类似物或其衍生物。此类衍生物将提供具有更大的作用持续时间的GLP1受体和GDF15受体调节, 使得它们适用作需要此类调节的受试者的治疗剂。

[0010] 上述讨论仅被提出提供对本领域所面对的问题的实质的更好理解, 并且不应以任何方式理解为认可此类参考文献构成本申请的“现有技术”。

发明内容

[0011] 在一个总的方面, 本发明涉及新型胰高血糖素样肽1 (GLP1) - 生长分化因子15 (GDF15) 融合蛋白。GLP1-GDF15融合蛋白调节GLP1R和/或GDF15R (GFRAL)。

[0012] 本文提供了胰高血糖素样肽1 (GLP1) - 生长分化因子15 (GDF15) 融合蛋白。GLP1-GDF15融合蛋白包含GLP1肽、第一接头肽、血清白蛋白、第二接头肽和GDF15蛋白。

[0013] 在某些实施方案中, GLP1肽包含选自SEQ ID NO: 1-4的氨基酸序列。

- [0014] 在某些实施方案中,第一接头肽包含选自SEQ ID NO:5-25的氨基酸序列。
- [0015] 在某些实施方案中,血清白蛋白包含选自SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列。
- [0016] 在某些实施方案中,第二接头肽包含选自SEQ ID NO:28-30的氨基酸序列。
- [0017] 在某些实施方案中,GDF15蛋白包含选自SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32的氨基酸序列。
- [0018] 在某些实施方案中,GLP1-GDF15融合蛋白包含选自SEQ ID NO:33-74和SEQ ID NO:84的氨基酸序列。
- [0019] 还提供了编码本发明的GLP1-GDF15融合蛋白的分离的核酸。还提供了包含本发明的分离的核酸的载体。还提供了包含本发明的分离的核酸或本发明的载体的宿主细胞。
- [0020] 还提供了包含本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。
- [0021] 还提供了用于治疗或预防有需要的受试者的疾病或障碍的方法,其中所述疾病或障碍选自:肥胖症、I型或II型糖尿病、代谢综合征、胰岛素抗性、葡萄糖耐受性受损、高血糖症、高胰岛素血症、高甘油三酯血症、由于先天性高胰岛素血症 (CHI) 引起的低血糖症、血脂异常、动脉粥样硬化、糖尿病性肾病,以及其他心血管危险因素诸如高血压和与未管控的胆固醇和/或脂质水平相关的心血管危险因素、骨质疏松症、炎症、非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、肾脏疾病和湿疹,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的药物组合物。
- [0022] 还提供了减少有需要的受试者的食物摄取的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的药物组合物。
- [0023] 还提供了调节有需要的受试者的GLP1受体活性的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的药物组合物。
- [0024] 还提供了调节有需要的受试者的GDF15受体 (GFRAL) 活性的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的药物组合物。
- [0025] 在某些实施方案中,该药物组合物经由注射而施用。
- [0026] 还提供了包括本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、本发明的分离的核酸和/或本发明的载体的试剂盒试剂盒还可例如包括用于注射的装置。
- [0027] 还提供了制备包含本发明的GLP1-GDF15融合蛋白的药物组合物的方法。该方法包括将GLP1-GDF15融合蛋白与药学上可接受的载体组合以获得药物组合物。
- [0028] 还提供了制备本发明的GLP1-GDF15融合蛋白的方法。该方法包括在制备GLP1-GDF15融合蛋白的条件下培养包含编码GLP1-GDF15融合蛋白的核酸的细胞,以及从细胞或培养物中回收GLP1-GDF15融合蛋白。

附图说明

- [0029] 结合附图进行阅读时,能够更好地理解前述发明内容和以下对本专利申请的优选实施方案的详细说明。但是,应当理解,本专利申请不限于附图中示出的精确实施方案。
- [0030] 图1示出了展示接受每日施用利拉鲁肽 (lira) 和/或每隔一日施用HSA-GDF15 (SEQ ID NO:81) 的DIO小鼠的体重变化百分比 (从第0天开始) 的曲线图。

[0031] 图2示出了展示接受每日施用GLP1-GSA-GDF15 (SEQ ID NO:72)、GLP1-GSA-GDF15 (I89R) (SEQ ID NO:73, I89R突变消除GDF15活性)、GLP1(9-39)-GSA-GDF15 (SEQ ID NO:74, 消除GLP1活性) 或GSA-GDF15 (SEQ ID NO:75) 的DIO小鼠的平均体重变化百分比 (从第0天开始) 的曲线图。杜拉鲁肽处理用作阳性对照, 而溶媒处理用作阴性对照。 $\pm$ SEM, $n=8$ 。

[0032] 图3示出了GLP1-GDF15融合蛋白的示意图。

[0033] 图4示出了展示皮下施用SEQ ID NO:45、49、50、33、46和44对C57BL/6小鼠的食物摄取的影响的曲线图。数据表示为与处理之前24小时的食物摄取相比食物摄取变化的百分比。

[0034] 图5示出了展示如通过免疫亲和捕获-胰蛋白酶消化LC-MS/MS分析确定的施用于小鼠之后24小时GLP1-GDF15融合蛋白 (SEQ ID NO:45、49、50、33、46和44) 的血浆浓度的曲线图。

[0035] 图6示出了展示皮下施用SEQ ID NO:45、50、46和44对GFRAL缺乏的小鼠的食物摄取的影响的曲线图。数据表示为食物摄取 (与溶媒处理相比) 相对于在24小时具有完整GLP1臂的测试制品的血浆浓度的变化百分比。

[0036] 图7示出了展示皮下施用SEQ ID NO:45对GFRAL缺乏的小鼠的食物摄取的影响的曲线图。数据表示为食物摄取 (与溶媒处理相比) 相对于在24小时具有完整GLP1臂的测试制品的血浆浓度的变化百分比。

[0037] 图8示出了展示皮下施用SEQ ID NO:33对GFRAL缺乏的小鼠的食物摄取的影响的曲线图。数据表示为食物摄取 (与溶媒处理相比) 相对于在24小时具有完整GLP1臂的测试制品的血浆浓度的变化百分比。

[0038] 图9示出了展示皮下施用SEQ ID NO:50、46和44对小鼠葡萄糖耐受性的影响的曲线图。数据表示为与溶媒处理相比 Δ AUC相对于具有完整GLP1肽或GLP1肽变体的GLP1-GDF15融合蛋白的血浆浓度的变化百分比。

[0039] 图10示出了展示皮下施用SEQ ID NO:45和49对小鼠葡萄糖耐受性的影响的曲线图。数据表示为与溶媒处理相比 Δ AUC相对于具有完整GLP1肽或GLP1肽变体的GLP1-GDF15融合蛋白的血浆浓度的变化百分比。

[0040] 图11示出了展示皮下施用SEQ ID NO:33对小鼠葡萄糖耐受性的影响的曲线图。数据表示为与溶媒处理相比 Δ AUC相对于具有完整GLP1肽或GLP1肽变体的GLP1-GDF15融合蛋白的血浆浓度的变化百分比。

[0041] 图12示出了展示皮下施用SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:36对小鼠葡萄糖耐受性的影响的曲线图。数据表示为与溶媒处理相比 Δ AUC相对于具有完整GLP1肽或GLP1肽变体的GLP1-GDF15融合蛋白的血浆浓度的变化百分比。

[0042] 图13示出了展示皮下施用SEQ ID NO:45和44对食蟹猴的分级葡萄糖输注期间胰岛素分泌的影响的曲线图。数据表示为归一化为葡萄糖AUC的ISR AUC (与基线相比) 相对于具有完整GLP1肽或GLP1肽变体的GLP1-GDF15融合蛋白的血浆浓度的倍数变化。

[0043] 图14示出了展示在饮食诱导的肥胖小鼠中每日皮下施用GLP1-GDF15融合蛋白 (SEQ ID NO:45和44) 的体重减轻功效的曲线图。数据表示为从第0天开始的体重变化百分比。

[0044] 图15示出了展示如通过免疫亲和捕获-胰蛋白酶消化LC-MS/MS分析确定的在饮食

诱导的肥胖小鼠中每日施用GLP1-GDF15融合蛋白(SEQ ID NO:45和44)7天后其血浆浓度的曲线图。

[0045] 图16示出了展示在自发肥胖的非人灵长类中在基线处和在4周内每次QW皮下施用GLP1-GDF15融合蛋白(SEQ ID NO:44和83)之后食物摄取的3天变化百分比的曲线图。数据是针对个体受试者呈现的,并且在其血浆中无可检测水平的测试制品的个体受试者不包括在附图中,如x轴下面所概述。

[0046] 图17示出了展示如通过免疫测定法确定的在自发肥胖的非人灵长类中用QW施用的不同浓度的GLP1-GDF15融合蛋白(SEQ ID NO:44和83)治疗4周期间总测试制品的血浆浓度的曲线图。数据以平均值($\pm$ SEM)呈现。

[0047] 图18示出了展示如通过免疫测定法确定的在自发肥胖的非人灵长类中用QW施用的不同浓度的GLP1-GDF15融合蛋白(SEQ ID NO:44)治疗4周期间含GLP1部分测试制品的血浆浓度的曲线图。数据以平均值($\pm$ SEM)呈现。

[0048] 图19示出了展示在自发肥胖的非人灵长类中用Q3D施用的递增浓度的GLP1-GDF15融合蛋白(SEQ ID NO:44、83和84)治疗21天之前、期间和之后的绝对每日食物摄取的曲线图。数据以每组十名受试者的平均值($\pm$ SEM)呈现。

[0049] 图20示出了展示在自发肥胖的非人灵长类中用Q3D施用的递增浓度的GLP1-GDF15融合蛋白(SEQ ID NO:44、83和84)治疗21天之后的体重变化(相对于基线)的曲线图。数据以每组十名受试者的平均值($\pm$ SEM)呈现。

[0050] 图21示出了展示如通过免疫测定法确定的在自发肥胖的非人灵长类中用Q3W施用的递增浓度的GLP1-GDF15融合蛋白(SEQ ID NO:44、83和84)治疗21天期间和之后总测试制品的血浆浓度的曲线图。数据是针对个体受试者呈现的。

[0051] 图22示出了展示如通过免疫测定法测定的在自发肥胖非人灵长类中用Q3D施用的递增浓度的GLP1-GDF15融合蛋白(SEQ ID NO:44和84)处理21天期间和之后含GLP1部分测试制品的血浆浓度的曲线图。数据是针对个体受试者呈现的。

具体实施方式

[0052] 背景以及说明书全篇中引用或描述了各种出版物、文章和专利;这些参考文献中的每一者全文均以引用方式并入本文。本说明书中包括的对文件、行为、材料、装置、文章等的讨论旨在为本发明提供上下文。此类讨论并不是承认这些事项中的任一事项或全部事项均相对于所公开或受权利要求书保护的任何发明形成现有技术的一部分。

[0053] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。否则,本文所用的某些术语具有本说明书中所述的含义。

[0054] 应该注意的是,除非上下文清楚地指明,否则如本文和所附权利要求中所用的单数形式“一个/一种”和“所述/该”包括复数引用物。

[0055] 除非另有说明,否则任何数值,例如本文所述的浓度或浓度范围,应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。因此,数值通常包括所述值 $\pm 10\%$ 。例如,1mg/mL的浓度包括0.9mg/mL至1.1mg/mL。同样,1%至10%(w/v)的浓度范围包括0.9%(w/v)至11%(w/v)。除非上下文另有明确指示,否则如本文所用,使用的数值范围明确地包括所有可能的子范围、

该范围之内的所有单个数值,包括此类范围之内的整数和该范围之内的分数。

[0056] 除非另有说明,否则在一系列元素之前的术语“至少”应理解为指代系列中的每个元素。本领域的技术人员将会认识到、或仅使用常规实验就能够确定本文所述发明的具体实施方案的多种等同物。此类等同物旨在由本发明所涵盖。

[0057] 如本文所用,术语“包含”、“包括”、“具有”或“含有”或其任何其他变型应被理解是指包括指明的整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组,并且旨在是非排他性的或开放式的。例如,包含元素列表的组合物、混合物、过程、方法、制品或设备不一定仅限于那些元素,而是可以包括这些组合物、混合物、过程、方法、制品或设备未明确列出或固有的其他元素。此外,除非明确地指明相反,否则“或”是指包括性的或而不是指排他性的或。例如,条件A或B由以下任一项满足:A为真(或存在)而B为假(或不存在),A为假(或不存在)而B为真(或存在),以及A和B均为真(或存在)。

[0058] 如本文所用,多个列举的要素之间的连接术语“和/或”被理解为包含单个选项和组合选项两者。例如,在两个要素由“和/或”连接的情况下,第一种选项是指在没有第二个要素的情况下适用第一个要素。第二种选项是指在没有第一个要素的情况下适用第二个要素。第三种选项是指适合一起使用第一要素和第二要素。这些选项中的任一种均被理解为落在含义内,并且因此满足如本文所用的术语“和/或”的要求。多于一种选项的并行适用性也被理解为落在含义内,并且因此满足术语“和/或”的要求。

[0059] 还应当理解,当提及优选发明的部件的尺寸或特性时,本文使用的“约”、“大约”、“大致”、“基本上”和类似的术语表示所描述的尺寸/特性不是严格的边界或参数,并且不排除在功能上相同或相似的微小变化,如本领域普通技术人员所理解的。至少,包括数值参数的这种参考将包括使用本领域已接受的数学和工业原理(例如,舍入、测量或其他系统误差、制造公差等)的变化,不会改变最低有效数字。

[0060] 在两个或更多个核酸或多肽序列(例如,GLP1肽、接头肽、血清白蛋白、GDF15蛋白和编码肽的多核苷酸)的上下文中,术语“相同”或“同一性”百分比是指当进行比较和比对以获得最大对应性时,如根据本公开使用下列序列比较算法之一或通过使用本领域中已知的方法的目视检查所测量的,相同的或具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸的两个或更多个序列或子序列。

[0061] 对于序列比对,通常将一个序列作为参考序列,将测试序列与其进行对比。当使用序列比对算法时,将测试序列和参考序列输入计算机中,指定子序列坐标(如果必要的话),并指定序列算法的程序参数。然后,序列比较算法基于指定的程序参数来计算对于测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0062] 用于比较的序列的最佳比对可例如通过Smith&Waterman的局部同源性算法进行,《高等应用数学》第2卷:第482页(1981年)(Adv. Appl. Math. 2:482(1981)),通过使用Needleman&Wunsch的同源比对算法进行,《分子生物学杂志》,第48卷:第443页(1970年)(J Mol. Biol. 48:443(1970)),通过搜索Pearson&Lipman的相似性方法进行,《美国国家科学院院刊》,第85卷:第2444页(1988年)(Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 85:2444(1988)),通过这些算法(GAP, BESTFIT, FASTA和TFASTA,在威斯康星州遗传学软件包,遗传学计算小组,威斯康辛州,麦迪逊,科学街区575号(575 Science Dr., Madison, WI)计算机化实施,或通过目测(大体参见,《分子生物学实验室指南》(Current Protocols in Molecular Biology),

F.M.Ausubel等人编辑,《实验室指南》,格林尼出版协会和约翰威利父子公司的合资企业(1995年增补版)(Ausubel))。

[0063] 适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的示例为BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等人的(1990年)《分子生物学杂志》,第215卷,第403-410页(J.Mol.Biol.215:403-410)和Altschul等人的(1997年)核酸研究第25卷:第3389-3402页(Nucleic Acids Res.第25卷:第3389-3402页。用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得。该算法涉及首先通过识别查询序列中长度为W的短字词来识别高评分序列对(HSP),当与数据库序列中相同长度的字词比对时,该短字词匹配或满足一些正值阈值分数T。T被称为邻近字词分数阈值(Altschul等人,出处同上)。这些初始邻近字词命中充当用于发起搜索以找到包含它们的较长HSP的种子。然后将字词命中沿每个序列在两个方向上延伸,只要可增加累积的比对分数。

[0064] 除了计算序列同一性百分比之外,BLAST算法还对两条序列之间的相似性进行统计分析(参见例如Karlin和Altschul,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,第90卷,第5873-5787页(1993年))。BLAST算法提供的一种相似性量度是最小总和概率(P(N)),其提供了两条核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中最小总和概率小于约0.1,更优选地小于约0.01,并且最优选地小于约0.001,则认为核酸类似于参考序列。

[0065] 两个核酸序列或多肽基本上相同的另一个指示是通过第一核酸编码的多肽与通过第二核酸编码的多肽免疫地交叉反应,如下所述。因此,多肽通常与第二多肽基本上相同,例如,其中两个肽仅通过保守置换而不同。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是,两个分子在严格条件下彼此杂交。

[0066] 如本文所用,“受试者”是指任何动物,优选哺乳动物,最优选人。如本文所用,术语“哺乳动物”涵盖任何哺乳动物。哺乳动物的示例包括但不限于奶牛、马、绵羊、猪、猫、狗、小鼠、大鼠、兔子、豚鼠、猴子、人等,更优选地包括人。

[0067] 就本发明方法而言,术语“施用”意指通过使用本发明的缀合物或化合物或其形式、组合物或药物来治疗性地或预防性地预防、治疗或改善本文所述的综合征、障碍或疾病的方法。此类方法包括在治疗过程中的不同时间施用有效量的所述缀合物、化合物、其形式、组合物或药物,或者以组合形式同时施用。本发明的方法应理解为涵盖所有已知的治疗性处理方案。

[0068] 术语“有效量”意指在组织系统、动物或人中引起生物学反应或药物反应的活性缀合物、化合物或药剂的量,而所述生物学反应或药物反应正是研究人员、兽医、医生或其他临床医师所寻求的,包括预防、治疗或改善所治疗的综合征、障碍或疾病,或预防、治疗或改善所治疗的综合征、障碍或疾病的症状。

[0069] 如本文所用,术语“组合物”旨在涵盖包含指定量的指定成分的产品,以及通过组合指定量的指定成分而直接或间接得到的任何产品。

[0070] 术语“分离的”可指基本上不含其来源的细胞材料、细菌材料、病毒材料或培养基(当通过重组DNA技术产生时)、或化学前体或其他化学物质(当化学合成时)的核酸或多肽。此外,分离的多肽是指可作为分离的多肽施用给受试者的多肽;换句话讲,如果多肽粘附到柱或嵌入凝胶中,则可简单地认为其不是“分离的”。此外,“分离的核酸片段”或“分离的肽”

是不作为片段天然存在的和/或通常不处于功能状态的核酸或蛋白片段。

[0071] 如本文所用,同义地称为“核酸分子”、“核苷酸”或“核酸”的术语“多核苷酸”是指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,其可为未修饰的RNA或DNA或者修饰的RNA或DNA。“多核苷酸”包括但不限于单链和双链的DNA、为单链区和双链区的混合物的DNA、单链和双链的RNA以及为单链区和双链区的混合物的RNA、包含可为单链或更典型地为双链或者为单链区和双链区的混合物的DNA和RNA的杂合分子。此外,“多核苷酸”是指包含RNA或DNA或RNA和DNA两者的三链区。术语多核苷酸还包括含有一个或多个修饰的碱基的DNA或RNA,以及具有出于稳定性或其它原因而被修饰的主链的DNA或RNA。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化的碱基和稀有碱基诸如肌苷。可以对DNA和RNA进行多种修饰;因此,“多核苷酸”包括通常天然存在的多核苷酸的化学修饰、酶修饰或代谢修饰形式,以及病毒和细胞特有的DNA和RNA的化学形式。“多核苷酸”也包括相对短的核酸链,通常被称为寡核苷酸。

[0072] 如本文所用,术语“表达”是指基因产物的生物合成。该术语涵盖基因到RNA的转录。该术语还涵盖RNA到一个或多个多肽的翻译,并且还涵盖所有天然存在的转录后和翻译后修饰。表达的多肽可处于宿主细胞的细胞质内,处于胞外环境诸如细胞培养物的生长培养基中,或锚定至细胞膜。

[0073] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”或“蛋白”可指由氨基酸组成的分子,并且可被本领域的技术人员识别为蛋白。本文使用氨基酸残基的常规单字母或三字母代码。术语“肽”、“多肽”和“蛋白”在本文中可互换使用,是指任何长度的氨基酸的聚合物,包括包含连接的(例如,融合的)肽/多肽(例如,融合蛋白)的那些。该聚合物可为直链或支链的,其可包含经修饰的氨基酸,并且其可夹杂有非氨基酸。该术语还涵盖已被天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物;天然修饰或干预修饰例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,诸如与标记组分缀合。该定义还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸等)以及本领域已知的其他修饰的多肽。

[0074] 本文所述的肽序列根据通常的惯例书写,其中肽的N-末端区域在左侧,并且C-末端区域在右侧。虽然氨基酸的同分异构形式是已知的,但除非另外明确指明,它是所表示的氨基酸的L形式。

[0075] 胰高血糖素样肽1 (GLP1) -生长分化因子15 (GDF15) 融合蛋白

[0076] 虽然GDF15和GLP1信号传导可减少食物摄取,但这些效果似乎彼此独立。例如,在鼠中不存在GLP1R的情况下维持GDF15效果,相反地,GLP1处理在不存在GFRAL的情况下仍然导致食物摄取效果(Hsu等人,Nature,第550卷,第255-259页(2017年);Mullican等人,Nat Med,第23卷,第1150-1157页(2017年))。因此,假设同时针对两种机制可导致比单独任一种机制更大的食物摄取减少和体重减轻。通过融合到人血清白蛋白将GDF15和GLP1激动剂的独立但互补的药理学与适于每周一次施用的单个完全重组分子组合将递送关于体重减轻、胰岛素敏感性、胰岛素分泌和心血管结果的有益效果。该方法的主要挑战是以均衡的方式在分子内递送每种激动剂,该方式以期望的水平接合对应的受体,足以实现所有期望的效果,但避免了对目标的不利影响。这种均衡可通过调节分子的任一激动剂臂的效能和/或药代动力学特性来微调。

[0077] 在一个总的方面,本发明涉及胰高血糖素样肽1 (GLP1) -生长分化因子15 (GDF15) 融合蛋白。GLP1-GDF15融合蛋白包含GLP1或GLP1变体肽、第一接头肽(例如,氨基(N)-末端

接头)、人血清白蛋白(HSA)、第二接头肽(例如,羧基(C)-末端接头)以及GDF15或GDF15变体蛋白。

[0078] 胰高血糖素样肽1(GLP1)或GLP1变体肽

[0079] 胰高血糖素样肽1(GLP1)是在肠中合成并响应于食物的摄取而释放的胰岛素促泌剂。它主要以两种形式分泌:GLP1-(7-37)和GLP1-(7-36)NH₂,这两种形式均结合到存在于许多组织和脑干中的特异性GLP1受体(GLP1R),这些组织包括胰腺β细胞,在胰腺β细胞中它增强葡萄糖刺激的胰岛素分泌,并且在脑干中它控制饱腹感和食量大小。

[0080] 许多GLP1类似物和衍生物是已知的,并且在本文中可称为“GLP1变体”。这些GLP1变体肽可包括毒蜥外泌肽,这是在希拉毒蜥的毒液中发现的肽。这些毒蜥外泌肽与天然GLP1具有序列同源性,并且可结合GLP1受体并引发信号转导级联反应。

[0081] 已证实GLP1和GLP1变体肽以多种方式起作用,这些方式可包括但不限于减少食物摄取、刺激胰岛素释放、降低胰高血糖素分泌、抑制胃排空和提高葡萄糖利用。

[0082] GLP1R属于7-跨膜异源三聚体G蛋白偶联受体的B类家族,并且在广泛范围的组织内表达,这些组织包括但不限于胰岛、心脏、肾、胃、肠、迷走神经的结状神经节神经元以及中枢神经系统(CNS)的若干区域(包括下丘脑和脑干)的α-细胞、β-细胞和δ-细胞。GLP1R可偶联到Gα_s、Gα_q、Gα_i和Gα_o(Montrose-Rafizadeh等人,Endocrinology,第140卷,第1132-1140页(1999年);Hallbrink等人,BiochimBiophys Acta 1546:79-86(2001)),从而导致细胞内钙、腺苷酸环化酶和磷脂酶C增加,以及PKA、PKC、PI-3K、Epac2和MAPK信号转导途径的激活(Drucker等人,PNAS 84:3434-8(1987);Wheeler等人,Endocrinology 133:57-62(1993);以及Holz等人,JBC 270:17749-57(1995))。

[0083] 本文提供了包含第一组分的GLP1-GDF15融合蛋白,其中第一组分是GLP1或GLP1变体肽。如本文所用,术语“GLP1肽”、“GLP1变体肽”、“GLP1肽变体”和“GLP1或GLP1变体肽”可互换使用。GLP1或GLP1变体肽可包含表1中提供的序列中的一种序列。GLP1或GLP1变体肽可与表1中提供的序列中的一种序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性。GLP1或GLP1变体肽序列可基于以下标准中的至少一个标准来选择:(i)表达收率和纯度,(ii)体外稳定性,(iii)体外效能,(iv)与GDF15或GDF15变体蛋白结合的体外效能的保留,(v)丝氨酸木糖基化或丝氨酸木糖基化潜力的缺乏,以及(vi)GLP1-GDF15融合蛋白的特性(例如,体内稳定性、体内效能(即,GLP1或GLP1变体肽以及GDF15或GDF15变体蛋白是否能够分别对GLP1R和GDF15R(GFRAL)受体具有激动剂活性))。

[0084] 构成GLP1融合肽的第一组分的GLP1或GLP1变体肽旨在涵盖与天然GLP1具有足够同源性和功能性的肽。GLP1或GLP1变体肽被设计成能够结合到组织(包括胰腺和脑干)中的GLP1受体,从而产生与天然GLP1结合这些组织中的GLP1受体时相同的信号传导通路并表现出相同或相似的生理活性。

[0085] 表1:胰高血糖素样肽1及其变体

[0086]	GLP1 或 GLP1 变体肽	肽序列	SEQ ID NO:
	(A8S, A30E) GLP1(7-36)	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGR	1
	(A8G, G22E, R36G) GLP1 (7-36)	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGG	2
	毒晰外泌肽 4 (1-39)	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGGPS SGAPPPS	3
	毒晰外泌肽 4 (1-28)	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN	4

[0087] 第一接头肽:氨基末端接头(N-末端接头)

[0088] 本文提供了包含第二组分的GLP1-GDF15融合蛋白,其中第二组分是第一接头肽(即,氨基末端接头肽)。第一接头肽可包含表2中提供的序列之一。第一接头肽可与表2中提供的序列中的一种序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0089] 第一接头肽可例如包含约5个至约60个氨基酸残基、约10个至约50个氨基酸残基、约10个至约60个氨基酸残基、约5个至约50个氨基酸残基、约15个至约40个氨基酸残基、约12个至约30个氨基酸残基、约12个至约42个氨基酸残基、约20个至约25个氨基酸残基、约8个至约48个氨基酸残基、约10个至约46个氨基酸残基、约12个至约44个氨基酸残基、约14个至约42个氨基酸残基、约16个至约40个氨基酸残基、约18个至约38个氨基酸残基、约20个至约36个氨基酸残基、约20个至约42个氨基酸残基、约22个至约34个氨基酸残基、约24至约32个氨基酸残基、约26个至约30个氨基酸残基、或其间的任何值的氨基酸残基。第一接头肽可包含5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个或60个氨基酸残基。

[0090] 在某些实施方案中,第一接头肽可包含丙氨酸-脯氨酸重复序列(即,AP重复序列),其中AP二肽可被称为AP单元。AP重复序列可包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个或27个AP单元。在某些实施方案中,第一接头肽可例如包含2个至25个AP单元、5个至25个单元、4个至23个AP单元、6个至21个AP单元、8个至19个AP单元、10个至17个AP单元、12个至15个AP单元、5个至10个AP单元、5个至15个AP单元、10个至25个AP单元、15个至25个AP单元、20个至25个AP单元、或其间的任何值的单元。在某些实施方案中,AP重复序列可在丙氨酸-丝氨酸二肽(即,AS单元)和甘氨酸-丝氨酸二肽(即,GS单元)的内部。AS单元可例如位于第一接头肽的氨基末端处。GS单元可例如位于第一接头肽的羧基末端处。

[0091] 在某些实施方案中,第一接头肽可包含甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸重复序列(即, G_4S 重复序列),其中 G_4S 五肽可被称为 G_4S 单元。 G_4S 重复序列可包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个 G_4S 单元。在某些实施方案中,第一接头肽可例如包含2个至15个 G_4S 单元、4个至13个 G_4S 单元、6个至11个 G_4S 单元、8个至9个 G_4S 单元、2个至8个 G_4S 单元、2个至6个 G_4S 单元、6个至8个 G_4S 单元、7个至8个 G_4S 单元、7个至9个 G_4S 单元、7个至10个 G_4S 单元、或其间的任何值的单元。在某些实施方案中,AS或GS单

元可例如位于第一接头肽的氨基末端处。

[0092] 在某些实施方案中,第一接头肽可包含甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丙氨酸重复序列(即, G_4A 重复序列),其中 G_4A 五肽可被称为 G_4A 单元。 G_4A 重复序列可包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个 G_4A 单元。在某些实施方案中,第一接头肽可例如包含2个至15个 G_4A 单元、4个至13个 G_4A 单元、6个至11个 G_4A 单元、8个至9个 G_4A 单元、2个至8个 G_4A 单元、2个至4个 G_4A 单元、2个至6个 G_4A 单元、4个至6个 G_4A 单元、4个至8个 G_4A 单元、6个至8个 G_4A 单元、6个至9个 G_4A 单元、6个至10个 G_4A 单元、或其间的任何值的单元。在某些实施方案中,甘氨酸-丙氨酸二肽单元(即GA单元)可例如位于第一接头肽的氨基末端处。

[0093] 在某些实施方案中,第一接头肽可为聚甘氨酸肽。聚甘氨酸肽可包含约6个至约50个甘氨酸残基、约10个至约45个甘氨酸残基、约15个至约40个甘氨酸残基、约20个至约35个甘氨酸残基、约25个至约30个甘氨酸残基、约20个至约25个甘氨酸残基、或其间的任何数量的甘氨酸残基。聚甘氨酸第一接头肽可包含6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个或50个甘氨酸残基。

[0094] 第一接头肽序列可以基于以下标准中的至少一个标准来选择:(i)表达收率和纯度,(ii)体外效能,(iii)体外稳定性,(iv)丝氨酸木糖基化或丝氨酸木糖基化潜力的缺乏,以及(v)GLP1-GDF15融合蛋白的特性(例如,体内稳定性、体内效能(即,GLP1或GLP1变体肽以及GDF15或GDF15变体蛋白是否能够分别对GLP1R和GDF15R(GFRAL)具有激动剂活性))。

[0095] 表2:第一接头肽(N-末端接头肽)

第一接头肽	肽序列	SEQ ID NO:
1-1	APAPAPAPAP	5
1-2	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP	6
1-3	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP	7
1-4	AP	8
1-5	AP	9
1-6	ASAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGS	10
1-7	ASAPAPAPAPAPGS	11
1-8	ASGGGSGGGGS	12
1-9	ASGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	13
1-10	GAGGGGAGGGGA	14
1-11	GAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	15
1-12	GGGGAGGGGAGGGGA	16
1-13	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	17
1-14	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	18
1-15	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	19

[0097]	1-16	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	20
	1-17	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	21
	1-18	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	22
	1-19	GGGGSGGGSGGGGS	23
	1-20	GGGGSGGGSGGGGS	24
	1-21	GGGGSGGGSGGGGS	25

[0098] 血清白蛋白

[0099] 本文提供了包含第三组分的GLP1-GDF15融合蛋白,其中第三组分为血清白蛋白(例如,人血清白蛋白(HSA)或大猩猩血清白蛋白(GSA))。天然人血清白蛋白包含35个半胱氨酸(Cys,C)残基,其形成17个二硫键,其中Cys-34残基是分子中唯一的游离半胱氨酸。通过捕获多种反应性氧物质(ROS)和反应性氮物质(RNS),已示出这种游离的Cys-34作为自由基清除剂起作用(Taverna等人,Ann.Intensive Care,第3卷,第4页(2013年))。这种游离的Cys突变成丝氨酸(Ser)以最大程度降低由于氧化引起异质性的风险。

[0100] 血清白蛋白可包含表3中提供的序列中的一种序列。血清白蛋白可与表3中提供的序列中的一种序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。血清白蛋白序列可以基于以下标准中的至少一个标准来选择:(i)体外稳定性,(ii)体外效能,以及(iii)GLP1-GDF15融合蛋白的特性(例如,体内稳定性和体内效能(即,GLP1或GLP1变体肽以及GDF15或GDF15变体蛋白是否能够分别对GLP1R和GDF15R受体具有激动剂活性))。

[0101] 表3:血清白蛋白

半衰期 延长蛋 白	蛋白序列	SEQ ID NO:
[0102]	HSA (C34S) DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVN EVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMA DCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDMCTAFHDNEE TFLKKLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLS QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADD RADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADF VESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKT YETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHP EAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRR PCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVE LVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGL	26
	GSA (C34S) DAHKSEVAHRFKDLGEETFKALVLV AFAQYLQQSPFEDHVKLVN EVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMA DCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDMCTAFHDNEE TFLKKLYE IARRHPYFYAPELLFFAARYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLS QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADD RADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCLA EVENDEMPADLPSLAADF VESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKT YETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHP EAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRR PCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALAE LVKHKPKATKEQLKTVMD DFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGL	27

[0103] 第二接头肽:羧基末端接头(C-末端接头)

[0104] 本文提供了包含第四组分的GLP1-GDF15融合蛋白,其中第四组分是第二接头肽(即,羧基末端接头肽)。第二接头肽可包含表4中提供的序列之一。第二接头肽可与表4中提供的序列中的一种序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性。

[0105] 第二接头肽可例如包含约5个至约60个氨基酸残基、约10个至约50个氨基酸残基、约10个至约60个氨基酸残基、约5个至约50个氨基酸残基、约15个至约40个氨基酸残基、约12个至约30个氨基酸残基、约12个至约42个氨基酸残基、约20个至约25个氨基酸残基、约8个至约48个氨基酸残基、约10个至约46个氨基酸残基、约12个至约44个氨基酸残基、约14个至约42个氨基酸残基、约16个至约40个氨基酸残基、约18个至约38个氨基酸残基、约20个至约36个氨基酸残基、约20个至约42个氨基酸残基、约22个至约34个氨基酸残基、约24至约32个氨基酸残基、约26个至约30个氨基酸残基、或其间的任何值的氨基酸残基。第二接头肽可包含5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50

个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个或60个氨基酸残基。

[0106] 在某些实施方案中,第二接头肽可包含丙氨酸-脯氨酸重复序列(即,AP重复序列),其中AP二肽可被称为AP单元。AP重复序列可包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个或27个AP单元。在某些实施方案中,第二接头肽可例如包含2个至25个AP单元、5个至25个单元、4个至23个AP单元、6个至21个AP单元、8个至19个AP单元、10个至17个AP单元、12个至15个AP单元、5个至10个单元、5个至15个单元、10个至25个单元、15个至25个单元、20个至25个单元、或其间的任何值的单元。在某些实施方案中,AP重复序列可在丙氨酸-丝氨酸二肽(即,AS单元)和甘氨酸-丝氨酸二肽(即,GS单元)的内部。AS单元可例如位于第二接头肽的氨基末端处。GS单元可例如位于第二接头肽的羧基末端处。

[0107] 在某些实施方案中,第二接头肽可包含甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸重复序列(即, G_4S 重复序列),其中 G_4S 五肽可被称为 G_4S 单元。 G_4S 重复序列可包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个 G_4S 单元。在某些实施方案中,第二接头肽可例如包含2个至15个 G_4S 单元、4个至13个 G_4S 单元、6个至11个 G_4S 单元、8个至9个 G_4S 单元、2个至8个 G_4S 单元、2个至6个 G_4S 单元、6个至8个 G_4S 单元、7个至8个 G_4S 单元、7个至9个 G_4S 单元、7个至10个 G_4S 单元、或其间的任何值的单元。在某些实施方案中,AS或GS单元可例如位于第二接头肽的氨基末端处。

[0108] 在某些实施方案中,第二接头肽可包含甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丙氨酸重复序列(即, G_4A 重复序列),其中 G_4A 五肽可被称为 G_4A 单元。 G_4A 重复序列可包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个 G_4A 单元。在某些实施方案中,第二接头肽可例如包含2个至15个 G_4A 单元、4个至13个 G_4A 单元、6个至11个 G_4A 单元、8个至9个 G_4A 单元、2个至8个 G_4A 单元、2个至4个 G_4A 单元、2个至6个 G_4A 单元、4个至6个 G_4A 单元、4个至8个 G_4A 单元、6个至8个 G_4A 单元、6个至9个 G_4A 单元、6个至10个 G_4A 单元、或其间的任何值的单元。在某些实施方案中,甘氨酸-丙氨酸二肽单元(即GA单元)可例如位于第二接头肽的氨基末端处。

[0109] 在某些实施方案中,第二接头肽可为聚甘氨酸肽。聚甘氨酸肽可包含约6个至约50个甘氨酸残基、约10个至约45个甘氨酸残基、约15个至约40个甘氨酸残基、约20个至约35个甘氨酸残基、约25个至约30个甘氨酸残基、约20个至约25个甘氨酸残基、或其间的任何数量的甘氨酸残基。聚甘氨酸第二接头肽可包含6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个或50个甘氨酸残基。

[0110] 第二接头肽序列可以基于以下标准中的至少一个标准来选择:(i)表达收率和纯度,(ii)体外效能,(iii)体外稳定性,(iv)丝氨酸木糖基化或丝氨酸木糖基化潜力的缺乏,以及(v)GLP1-GDF15融合蛋白的特性(例如,体内稳定性、体内效能(即,GLP1或GLP1变体肽以及GDF15或GDF15变体蛋白是否能够分别对GLP1R和GDF15R(GFRAL)具有激动剂活性))。

[0111] 表4:第二接头肽(C-末端接头肽)

[0112]	第二接头肽	肽序列	SEQ ID NO:
	2-1	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP	28
	2-2	GAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	29
	2-3	GSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	30

[0113] GDF15或GDF15变体蛋白

[0114] 生长分化因子15(GDF15)是属于转化生长因子 β (TGF- β)超家族的蛋白。GDF15是作为25-kDa二聚体循环的分泌蛋白。GDF15也被称为前列腺衍生因子(PDF)、巨噬细胞抑制细胞因子-1(MIC-1)、NSAID(非甾体抗炎药)激活基因(NAG-1)和胎盘TGF- β (PTGF β)。

[0115] GDF15功能尚未完全阐明,但涉及多种生物过程,包括但不限于能量稳态、体重调节、以及由癌症和慢性疾病驱动的恶病质。已经在小鼠、大鼠和猴中证实了药理学上施用GDF15可能会减少能量摄取,并进而引起体重减轻。(Johnen等人,Nat Med,第13卷,第1333-1340页(2007年);Hsu等人,Nature,第550卷,第255-259页(2017年);Mullican等人,Nat Med,第23卷,第1150-1157页(2017年);Tsai等人,Int J Obesity,第42卷,第561-571页(2018年))。GDF15治疗介导的体重减轻导致代谢改善,包括葡萄糖稳态增强以及血浆甘油三酯和胆固醇降低(Xiong等人,Sci Trans Med,第9卷,第412页(2017年))。

[0116] GDF15结合到GDNF家族 α 样受体(GFRAL),GFRAL是仅位于脑干的神经元中的跨膜受体(Mullican等人、Hsu等人、Yang等人、Emmerson等人)。在GDF15结合时,GFRAL与RET络合,RET是刺激下游细胞内磷酸化级联(包括AKT、ERK和PLC的翻译后修饰)的酪氨酸激酶 γ 。虽然该级联的附加分子和细胞组分仍然有待阐明,但GDF15/GFRAL信号传导的最终效果是减少食物摄取和体重减轻(Mullican和Rangwala,2018年)。

[0117] 本文提供了包含第五组分的GLP1-GDF15融合蛋白,其中第五组分是GDF15或GDF15变体蛋白。GDF15蛋白可包含表5中提供的序列,并且GDF15变体蛋白可包含表5中提供的序列的变体。GDF15或GDF15变体肽可与表5中提供的序列中的一种序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。GDF15和/或GDF15变体蛋白序列可基于以下标准中的至少一个标准来选择:(i)表达收率和纯度,(ii)体外稳定性,(iii)体外效能,(iv)与GLP1或GLP1变体蛋白结合的体外效能的保留,(v)丝氨酸木糖基化或丝氨酸木糖基化潜力的缺乏,以及(vi)GLP1-GDF15融合蛋白的特性(例如,体内稳定性、体内效能(即,GLP1或GLP1变体肽以及GDF15或GDF15变体蛋白是否能够分别对GLP1R和/或GDF15R(GFRAL)受体具有激动剂活性))。

[0118] 构成GLP1-GDF15融合蛋白的第五组分的GDF15或GDF15变体蛋白旨在涵盖与激活天然GDF15R(GFRAL)具有足够同源性和功能性的肽。GDF15或GDF15变体蛋白被设计成能够结合到脑干中的GFRAL,从而产生与天然GDF15结合这些神经元中的GFRAL时相同的信号传导通路并且对食物摄取表现出相同的影响。

[0119] 表5:GDF15或GDF15变体蛋白

[0120]	GDF15 或 GDF15 变体蛋白	蛋白序列	SEQ ID NO:
	GDF15 变体 1	DHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP ASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI	31
	GDF15 WT 成熟	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPA PCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI	32

[0121] GLP1-GDF15融合蛋白

[0122] 本文提供了GLP1-GDF15融合蛋白,该GLP1-GDF15融合蛋白包含如前所述的第一组分、第二组分、第三组分、第四组分和第五组分。第一组分是GLP1或GLP1变体肽,第二组分是第一接头肽,第三组分是血清白蛋白,第四组分是第二接头肽,并且第五组分是GDF15或GDF15变体蛋白。GLP1-GDF15融合蛋白可包含表6中提供的序列中的一种序列。GLP1-GDF15融合蛋白可与表6中提供的序列中的一种序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。GLP1-GDF15融合蛋白可以基于以下标准中的至少一个标准来选择:(i)表达收率和纯度,(ii)体外效能,(iii)体外稳定性,(iv)丝氨酸木糖基化的缺乏,以及(v)GLP1-GDF15融合蛋白的物理特性(例如,体内稳定性、体内效能(即,GLP1或GLP1变体肽以及GDF15或GDF15变体蛋白是否能够分别对GLP1R和GDF15R具有激动剂活性)),以及(vi)体内双激动药理学的期望平衡。

[0123] 对于在一个分子中递送双重药理学的融合蛋白治疗剂,重要的是适当调节每个部分的药代动力学/药效动力学(PK/PD)特性,使得两种激动剂均在预期剂量的治疗范围内。对各种胰高血糖素样肽-1(GLP1)-生长分化因子15(GDF15)融合蛋白的广泛研究导致发现具有递送GLP1和GDF15两种激动剂的最佳平衡剂量的独特特性的新型分子,该融合蛋白包含GLP1肽或GLP1变体肽序列、第一接头肽序列、血清白蛋白序列、第二接头肽序列以及GDF15或GDF15变体蛋白序列的各种组合。已证实,当以特定剂量范围使用时,这些新型GLP1-GDF15融合蛋白在体内接合GDF15R(GFRAL)方面与HSA-GDF15一样有效(参见实施例11)。此外,以相同剂量范围(参见实施例11)使用的GLP1-GDF15融合蛋白出乎意料地在接合GLP1R方面与杜拉鲁肽(GLP1-Fc)一样有效,并且没有不利的副作用,但是GLP1部分暴露浓度比在杜拉鲁肽中大10-30倍。GLP1肽作为与HSA-GDF15的融合肽的递送出乎意料地改变了GLP1部分的体内效能,但使得新型胰高血糖素样肽-1(GLP1)-生长分化因子15(GDF15)融合蛋白能够具有两种激动剂的最佳平衡。

[0124] 表6:GLP1-GDF15融合蛋白

[0125]

GLP1- GDF15 融合蛋白	蛋白序列	SEQ ID NO:
1	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGAGGGGAGGGG AGGGGAGGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQS PFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCT AFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCSLQKFGERAFAKAWAV ARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKEVTECHGDLLECADDRADLA KYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAAD FVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTY ETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKP KATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQA ALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPGPRCCRLHTVRASLED LGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD TVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI	33
2	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGAGGGGAGGGG ADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNV EVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMAD CCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETF LKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP KLDELDEGKASSAKQRLKCSLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPA EFAEVSKLVTDLTKEVTECHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAA AADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALL VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAP APAPAPAPAPAPAPAPDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWV LSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDVTPAPCCV PASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI	34

[0126]

[0127]

5	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGAPAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAPAPDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQ QSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVA TLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVM CTAFHDNEETFLKKYLYEIIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAW AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADDRAD LAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLA ADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAK TYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCSELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPC FSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVK HKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAA SQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPGPRCCRLHTVRAS LEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRL KPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	37
6	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGAGGGGAGGGG AGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGADAHKSEVAHRFKDLGEE NFKALVLIAFAQYLQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDD NPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIIARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVHTE CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIA EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYAR RHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE EPQNLKQNCSELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRV TKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDK ETCFAEEGKKLVAA SQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCP GPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA ANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQT YDDLLAKDCHCI	38

[0128]

7	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNNGGPSSGAPPPSAPAPAPAP APDAHKS EVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAK TCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP ERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEI ARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELRLDE GKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSK LVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD VFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLRALAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKV PQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTCKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAET FTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAP APAPAPAPDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMV LIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI	39
8	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNNGGPSSGAPPPSAPAPAPAP APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVL IAFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLF GDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRL VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRY KAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQK GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDL ECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV VLLLRALAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIK QNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTCKCTES LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEE GKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPLGPGRCR LHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQI KTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAK DCHCI	40

[0129]

9	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSAPAPAPAP APAPAPAPAPAPDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQS PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCT AFHDNEETFLKKYLYEIIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA ADKAACLPLKDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAV ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADDRADLA KYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAAD FVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTY ETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAK RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKP KATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQA ALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPGPRCCRLHTVRASLED LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD TVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI	41
10	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGAGG GGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGADAHKSEVAH RFDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE CFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIIARRH PYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLPLKDELDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG MFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKV FDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVS TPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH EKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHA DICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAP APAPDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCI GACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQK TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI	42

[0130]

11	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPSGGGGAGG GGAGGGGAGGGGAGGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIA FAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGD KLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKA AFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGE RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEC ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQN CELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKC CKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLV NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGK KLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPGPRCCRLH TVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKT SLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDC HCI	43
12	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPSAPAPAPAP APDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVN EVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMAD CCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETF LKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP KLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPK AEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLNLLRLAKTYETTLEKCCA AADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALL VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAP APAPAPAPAPAPAPAPDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWV LSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCV PASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	44

[0131]

[0132]

[0133]

17	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGAGGGGAGGGG AGGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDH VKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHD NEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKA ACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLS QRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK DVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTL KCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCA EDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDE TYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLG AGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAD HCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPS QFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTG SLQTYDDLAKDCHCI	49
18	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGAGGGGAGGGG AGGGGAGGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQS PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRPVRPEVDVMCT AFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAV ARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLA KYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAAD FVESKD VCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTY ETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKP KATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQA ALGLGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAG GGGADHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIG ACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQK TDGTGVS LQTYDDLAKDCHCI	50

[0134]

19	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGAGGGGAGGGGAGG GGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGADAHKSEVAHRFKDLG EENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKASSAKQR LKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVH TECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHC IAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EY ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV SRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSD RVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSE KERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKAD DKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLG WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV PAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI	51
20	HGEGTFTSDL SKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGAGGGGA GGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNE ETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAC LLPKLDELREDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQR FPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQ DSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEK CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNA LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAED YLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQL KAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPL GPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA ANMHAQIKTSLHRLKPDTV PAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI	52

[0135]

21	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGAGGGGAGGGG AGGGGAGGGGAGGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFA QYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRP EVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGER AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECA DDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPAD LPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCC KHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVN RRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNP MVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI	53
22	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGAGGGGAGGGG AGGGGAGGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQS PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCT AFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA ADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAV ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADRADLA KYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAAD FVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTY ETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFEQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAK RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKP KATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQA ALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI	54

[0136]

23	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQY LQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRPVRPEVD VMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTE CCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDR ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRL AKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELF EQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKH PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRP CFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELV KHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA ASQAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVL IQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI	55
24	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSP FEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRPVRPEVDVMCT AFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA ADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAV ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLA KYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAAD FVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTY ETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELF EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKP KATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQA ALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI	56

[0137]

25	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGASAPAPAPAPAPAPAP APAPAPGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFED HVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRET YGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADK AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARL SQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVES KDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTL EKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKF QNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATK EQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAAASQAALGL GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDH CPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGS LQTYDDLLAKDCHCI	57
26	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGASGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEE NFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDD NPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTE CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIA EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYAR RHPDYSVVLRLAKTYETTL EKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE EPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRV TKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDK ETCFAEEGKKLVAAASQAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVP APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI	58

[0138]

27	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDAHKSEVAH RFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE CFLQHKDDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRH PYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG MFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV FDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFQGEYKFQNALLVRYTKKVPQVS TPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH EKTVPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHA DICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLSGGGSGGGSGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDHCPLGPGRCRLHTVR ASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI	59
28	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASAPAPAP APAPAPAPAPAPAGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQY LQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRPVRPEVD VMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT CCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDR ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRL AKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELF EQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKH PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTVPVSDRVTKCTESLVNRRP CFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELV KHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVA ASQAALGLSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMV LIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI	60

[0139]

29	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASAPAPAPAPAPAPAP APAPAPGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFED HVKL VNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRET YGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADK AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARL SQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVES KDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTL EKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKF QNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATK EQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAA SQAALGL GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDH CPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI	61
30	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEE NFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENC KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDD NPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTE CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIA EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYAR RHPDYSV VLLLRLAKTYETTL EKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE EPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRV TKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDK ETCFAEEGKKLVAA SQAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVP APCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI	62

[0140]

31	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGSGGGGSGGGGS DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAlAQYLQQSPFEDHVKLVNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC CAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPK LDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKA EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSIS SKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAA ADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLS VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKA VMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGP GRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN MHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYD DLLAKDCHCI	63
32	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGSGG GGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAlAQYLQQSPFED HVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRET YGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADK AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARL SQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVES KDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLE EKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKF QNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATK EQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDH CPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI	64

[0141]

33	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASGGGGSGGGGSDAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEF AKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ EPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAE VSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA KDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPH ECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLN QLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNA ETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRCCR LHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQI KTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLAK DCHCI	65
34	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASAPAPAPAPAGSDA HKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTE FAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAK QEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKY LYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDE LRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFA EVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKL KECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAE AKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADP HECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVL NQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFN AETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMD DFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRCC RLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDL AKDCHCI	66

[0142]

35	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASGGGGS GGGGS DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNE ETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAC LLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQR FPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQ DSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKC CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNA LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAED YLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQL KAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDHCPL GPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA ANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQT YDDLAKDCHCI	67
36	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASAPAPAP APAPGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNE ETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAC LLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQR FPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQ DSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKC CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNA LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAED YLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQL KAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDHCPL GPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA ANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQT YDDLAKDCHCI	68

[0143]

37	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGASGGGGSGGGGSDAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEF AKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ EPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAE VSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA KDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPH ECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLN QLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNA ETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRCCR LHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQI KTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLAK DCHCI	69
38	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGASAPAPAPAPAPGSDA HKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTE FAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAK QEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKY LYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDE LRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFA EVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKL KECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAE AKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADP HECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVL NQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFN AETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMD DFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRCC RLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDL AKDCHCI	70

[0144]

39	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRGGGGSGGGGSGGGGS DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC CAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPK LDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKA EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSIS SKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAA ADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLS VVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKA VMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGP GRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN MHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYD DLLAKDCHCI	71
40	HGEFTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVGSGGGGGSGGGGSGGGGS DAHKSEVAHRFKDLGEETFKALVLVAFFAQYLQQSPFEDHVKLVNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC CAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAARYKAAFTTECCQAADKAACLLPK LDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKA EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSIS SKLKECCEKPLLEKSHCLA EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAA ADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLS VVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQTALAE LVKHKPKATKEQLKTV MDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPG RCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN MHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYD DLLAKDCHCI	72

[0145]	41 HGEFTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGSGGGGSGGGGS DAHKSEVAHRFKDLGEETFKALVLVAFAYLQQSPFEDHVKLVNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC CAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAARYKAAFTTECCQAADKAACLLPK LDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKA EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSIS SKLKECCEKPLLEKSHCLA EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAA ADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLS VVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALAELVKHKPKATKEQLKTV MDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGG SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPG RCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN MHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLRQKTDGTGVS LQTY DLLAKDCHCI	73
	42 EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGSGGGGSGGGGSDA HKSEVAHRFKDLGEETFKALVLVAFAYLQQSPFEDHVKLVNEVT EFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKK YLYEIAARRHPYFYAPELLFFAARYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLD ELRDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK LKECCEKPLLEKSHCLA EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNKY AEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLV YTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSV VLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKE FNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALAELVKHKPKATKEQLKTV MDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGG SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPG RCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN MHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYD DLLAKDCHCI	74

[0146] GLP1-GDF15融合多核苷酸和载体

[0147] 在另一个总的方面,本发明涉及编码本发明的GLP1-GDF15融合蛋白的分离的核酸。本领域的技术人员将理解,可以改变(例如置换、缺失、插入等)蛋白质的编码序列而不改变蛋白质的氨基酸序列。因此,本领域的技术人员将理解,可变更编码本发明的融合蛋白的核酸序列而不改变蛋白质的氨基酸序列。

[0148] 在另一个总的方面,本发明涉及包含编码本发明的融合蛋白的分离的核酸的载体。根据本公开,可使用本领域的技术人员已知的任何载体,诸如质粒、粘端质粒、噬菌体载体或病毒载体。在一些实施方案中,载体是重组表达载体,诸如质粒。载体可包括建立表达载体的常规功能的任何元件,例如启动子、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择标记和复制起点。启动子可为组成型、诱导型或阻抑型启动子。能够向细胞递送核酸的多种表达载体在本领域中是已知的,并且在本文可用于在细胞中制备融合蛋白。常规克隆技术或人工基因合成可用于根据本发明的实施方案生成重组表达载体。

[0149] 在另一个总的方面,本发明涉及包含编码本发明的融合蛋白的分离的核酸的宿主

细胞。鉴于本公开,本领域的技术人员已知的任何宿主细胞可用于重组表达本发明的融合蛋白。在一些实施方案中,宿主细胞是大肠杆菌(E.coli) TG1或BL21细胞、CHO-DG44或CHO-K1细胞或HEK293细胞。根据具体实施方案,通过常规方法诸如化学转染、热休克或电穿孔将重组表达载体转化到宿主细胞中,其中将该重组表达载体稳定整合到宿主细胞基因组中,使得重组核酸有效表达。

[0150] 在另一个总的方面,本发明涉及制备本发明的融合蛋白的方法,该方法包括在制备本发明的融合蛋白的条件下培养包含编码融合蛋白的核酸的细胞,并且从细胞或细胞培养物(例如从上清液)回收融合蛋白。可以从细胞收获表达的融合蛋白,并且根据本领域已知以及如本文所述的常规技术进行纯化。

[0151] 药物组合物

[0152] 在另一个总的方面,本发明涉及药物组合物,该药物组合物包含本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸以及药学上可接受的载体。如本文所用,术语“药物组合物”意指包含本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸连同药学上可接受的载体的产品。本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸以及包含它们的组合物还可用于制造用于本文所述的治疗应用的药物。

[0153] 如本文所用,术语“载体”是指任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、油、类脂、含脂质囊泡、微球体、脂质体包囊、或本领域公知的用于药物制剂中的其他材料。应当理解,载体、赋形剂或稀释剂的特征将取决于具体应用的施用途径。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指不干扰根据本发明的组合物的效果或根据本发明的组合物的生物活性的非毒性材料。根据本公开,根据具体实施方案,适用于肽药物组合物的任何药学上可接受的载体均可用于本发明。

[0154] 在本发明中使用的药学上可接受的酸式盐/阴离子盐包括且不限于乙酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、酒石酸氢盐、溴化物、依地酸钙、樟脑磺酸盐、碳酸盐、氯化物、柠檬酸盐、二盐酸盐、依地酸盐、乙二磺酸盐、依托酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、对羟乙酰氨基苯磺酸盐、己基间苯二酚盐、海巴明、氢溴酸盐、盐酸盐、羟萘酸盐、碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基溴化物、甲基硝酸盐、甲基硫酸盐、粘液酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、双羟萘酸盐、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、次乙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、鞣酸盐、酒石酸盐、茶氯酸盐、甲苯磺酸盐和三乙碘化物。有机酸或无机酸还包括其不限于氢碘酸、过氯酸、硫酸、磷酸、丙酸、乙醇酸、甲磺酸、羟基乙磺酸、草酸、2-萘磺酸、对甲苯磺酸、环己烷氨基磺酸、糖精酸或三氟乙酸。

[0155] 药学上可接受的碱盐/阳离子盐包括不限于铝、2-氨基-2-羟甲基-丙烷-1,3-二醇(也被称为三(羟甲基)氨基甲烷、氨基丁三醇或“TRIS”)、氨、苄星青霉素、叔丁胺、氯普鲁卡因、胆碱、环己胺、二乙醇胺、乙二胺、锂、L-赖氨酸、镁、葡甲胺、N-甲基-D-葡萄糖胺、哌啶、钾、普鲁卡因、奎宁、钠、三乙醇胺或锌。

[0156] 在本发明一些实施方案中,提供了药物制剂,该药物制剂含量为约0.001mg/mL至约100mg/mL、约0.01mg/mL至约50mg/mL或约0.1mg/mL至约25mg/mL的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸。该药物制剂可具有约3.0至约10,例如约3至约7、或约5至约9的pH。该制剂还可包含选自以下的至少一种成分:缓冲体系、防腐剂、张

度剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。

[0157] 药物活性成分与药学上可接受的载体的制剂为本领域中已知的,例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy (例如第21版(2005)以及任何后续版本)。附加成分的非限制性示例包括:缓冲剂、稀释剂、溶剂、张度调节剂、防腐剂、稳定剂和螯合剂。一种或多种药学上可接受的载体可用于配制本发明的药物组合物。

[0158] 在本发明的一个实施方案中,药物组合物为液体制剂。液体制剂的一个优选示例为水性制剂,即包含水的制剂。液体制剂可包含溶液、悬浮液、乳液、微乳液、凝胶等等。水性制剂通常包含至少50% w/w的水,或至少60% w/w、70% w/w、75% w/w、80% w/w、85% w/w、90% w/w或至少95% w/w的水。

[0159] 在一个实施方案中,药物组合物可被配制为可例如经由注射装置(例如,注射器或输液泵)注射的注射剂。注射可例如皮下、肌内、腹膜内或静脉内递送。

[0160] 在另一个实施方案中,药物组合物为固体制剂,例如冷冻干燥或喷雾干燥的组合物,其可按原样使用,或在使用前由医师或患者添加溶剂和/或稀释剂。固体剂型可包括片剂,诸如压片和/或包衣片,以及胶囊剂(例如硬明胶胶囊或软明胶胶囊)。药物组合物也可例如用于重构的小药囊、糖衣丸、粉末、颗粒剂、锭剂或粉末的形式。

[0161] 剂型可为速释型,在这种情况下它们可包含水可溶或水可分散的载体,或者它们可被延迟释放、缓释或改变释放,在这种情况下它们可包含在胃肠道中调节剂型的溶解速率的水不溶的聚合物。

[0162] 在其他实施方案中,药物组合物可在鼻内、颊内或舌下递送。

[0163] 水性制剂中的pH可介于pH 3和pH 10之间。在本发明的一个实施方案中,制剂的pH为约7.0至约9.5。在本发明的另一个实施方案中,制剂的pH为约3.0至约7.0。

[0164] 在本发明的另一个实施方案中,药物组合物包含缓冲剂。缓冲剂的非限制性示例包括:精氨酸、天冬氨酸、二羟乙基甘氨酸、柠檬酸盐、磷酸氢二钠、富马酸、甘氨酸、双甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、马来酸、苹果酸、乙酸钠、碳酸钠、磷酸二氢钠、磷酸钠、琥珀酸盐、酒石酸、三嗪和三(羟甲基)氨基甲烷,以及它们的混合物。缓冲剂可单独存在或在聚集体中以约0.01mg/ml至约50mg/ml,例如约0.1mg/ml至约20mg/ml的浓度存在。包含这些特定缓冲剂中的每一种的药物组合物构成本发明的可供选择的实施方案。

[0165] 在本发明的另一个实施方案中,药物组合物包含防腐剂。防腐剂的非限制性示例包括:苄索氯铵、苯甲酸、苄醇、溴代硝基丙二醇、4-羟基苯甲酸丁酯、氯丁醇、氯甲酚、氯己啶、氯苯甘油醚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、4-羟基苯甲酸乙酯、咪脲、4-羟基苯甲酸甲酯、苯酚、2-苯氧基乙醇、2-苯基乙醇、4-羟基苯甲酸丙酯、脱氢乙酸钠、硫柳汞以及它们的混合物。防腐剂可单独存在或在聚集体中以约0.01mg/ml至约50mg/ml,例如约0.1mg/ml至约20mg/ml的浓度存在。包含这些特定防腐剂中的每一种的药物组合物构成本发明可供选择的实施方案。

[0166] 在本发明的另一个实施方案中,药物组合物包含等渗剂。该实施方案的非限制性示例包括盐(诸如氯化钠)、氨基酸(诸如甘氨酸、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸和苏氨酸)、糖醇(诸如甘油、1,2-丙二醇、丙二醇)、1,3-丙二醇和1,3-丁二醇)、聚乙二醇(例如,PEG400)以及它们的混合物。等渗剂的另一个示例包括糖。糖的非限制性示例可以是单糖、二糖或多糖,或水溶性葡聚糖,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木

糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、葡聚糖、支链淀粉、糊精、环糊精、 α 和 β -HPCD、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素钠。等渗剂的另一个示例是糖醇,其中术语“糖醇”被定义为具有至少一个-OH基团的C(4-8)烃。糖醇的非限制性示例包括甘露糖醇、山梨醇、肌醇、半乳糖醇、己六醇、木糖醇和阿拉伯糖醇。包含本段中列出的每种等渗剂的药物组合物构成本发明的可供选择的实施方案。等渗剂可单独存在或在聚集体中以约0.01mg/ml至约50mg/ml,例如约0.1mg/ml至约20mg/ml的浓度存在。包含这些特定等渗剂中的每一种的药物组合物构成本发明的可供选择的实施方案。

[0167] 在本发明的另一个实施方案中,药物组合物包含螯合剂。螯合剂的非限制性示例包括柠檬酸、天冬氨酸、乙二胺四乙酸(EDTA)的盐、以及它们的混合物。螯合剂可单独存在或在聚集体中以约0.01mg/ml至约50mg/ml,例如约0.1mg/ml至约20mg/ml的浓度存在。包含这些特定螯合剂中的每一种的药物组合物构成本发明的可供选择的实施方案。

[0168] 在本发明的另一个实施方案中,药物组合物包含稳定剂。稳定剂的非限制性示例包括一种或多种聚集抑制剂、一种或多种氧化抑制剂、一种或多种表面活性剂和/或一种或多种蛋白酶抑制剂。

[0169] 在本发明的另一个实施方案中,药物组合物包含稳定剂,其中所述稳定剂为羧基-/羟基纤维素及其衍生物(诸如HPC、HPC-SL、HPC-L和HPMC)、环糊精、2-甲基硫基乙醇、聚乙二醇(诸如PEG 3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯基吡咯烷酮、盐(诸如氯化钠)、含硫的物质,诸如硫代甘油或巯基乙酸。稳定剂可单独存在或在聚集体中以约0.01mg/ml至约50mg/ml,例如约0.1mg/ml至约20mg/ml的浓度存在。包含这些特定稳定剂中的每一种的药物组合物构成本发明的可供选择的实施方案。

[0170] 在本发明的另一个实施方案中,药物组合物包含一种或多种表面活性剂,优选一种表面活性剂、至少一种表面活性剂或两种不同的表面活性剂。术语“表面活性剂”是指任何由水溶性部分(亲水性)和脂溶性和部分(亲脂性)组成的分子或离子。例如,表面活性剂可选自:阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂和/或两性离子表面活性剂。表面活性剂可单独存在或在聚集体中以约0.1mg/ml至约20mg/ml的浓度存在。包含这些特定表面活性剂中的每一种的药物组合物构成本发明的可供选择的实施方案。

[0171] 在本发明的另一个实施方案中,药物组合物包含一种或多种蛋白酶抑制剂,诸如例如EDTA和/或苯甲脒盐酸盐(HCl)。蛋白酶抑制剂可单独存在或在聚集体中以约0.1mg/ml至约20mg/ml的浓度存在。包含这些特定蛋白酶抑制剂中的每一种的药物组合物构成本发明的可供选择的实施方案。

[0172] 本发明的药物组合物可包含一定量的足以在组合物储存期间减少多肽的聚集形成的氨基酸碱基。术语“氨基酸碱基”是指一种或多种氨基酸(诸如甲硫氨酸、组氨酸、咪唑、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)或它们的类似物。任何氨基酸可以其游离碱形式或其盐形式存在。可以存在氨基酸碱基的任何立体异构体(即L、D或它们的混合物)。氨基酸碱基可单独存在或以约0.01mg/ml至约50mg/ml,例如约0.1mg/ml至约20mg/ml的浓度与其他氨基酸碱基组合地存在。包含这些特定氨基酸碱基中的每一种的药物组合物构成本发明的可供选择的实施方案。

[0173] 本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸的药学上可接受的盐包括由无机或有机的酸或碱形成的常规无毒盐或季铵盐。此类酸加成盐的示例包括乙酸

盐、己二酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、十二烷基硫酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、硝酸盐、草酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐和酒石酸盐。碱盐包括铵盐、碱金属盐诸如钠盐和钾盐、碱土金属盐诸如钙盐和镁盐、有机碱盐诸如二环己胺盐以及氨基酸诸如精氨酸的盐。另外,可以将碱性含氮基团用例如烷基卤进行季铵化。

[0174] 本发明的药物组合物可以通过能够实现其预期目的的任何方式施用。示例包括通过肠胃外、皮下、静脉内、肌内、腹膜内、透皮、口腔或眼等途径给药。可通过口服途径给药。适用于肠胃外给药的制剂包括水溶性形式的活性缀合物(例如,水溶性盐)的水溶液、酸性溶液、碱性溶液、右旋糖水溶液、等渗碳水化合物溶液以及环糊精包合配合物。

[0175] 本发明还涵盖制备药物组合物的方法,该方法包括将药学上可接受的载体与本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸中的任一者混合。另外,本发明包括通过将一种或多种药学上可接受的载体与本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸中的任一者混合而制备的药物组合物。

[0176] 此外,本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸可具有一种或多种多晶型物或无定形结晶形式,并因此旨在被包括在本发明的范围内。此外,GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸可以与例如水形成溶剂化物(即水合物)或与常用有机溶剂形成溶剂化物。本文所用的术语“溶剂化物”意指本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸与一个或多个溶剂分子的物理缔合。该物理缔合涉及不同程度的离子键合和共价键合,包括氢键合。在某些情况下,溶剂化物将能够在例如一个或多个溶剂分子掺入在结晶固体的晶格中时分离出来。术语“溶剂化物”旨在既涵盖溶液相溶剂化物又涵盖可分离的溶剂化物。合适的溶剂化物的非限制性示例包括乙醇化物、甲醇化物等。

[0177] 本发明旨在将本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸的多晶型物和溶剂化物包括在其范围内。因此,在本发明的治疗方法中,术语“施用”应涵盖用于利用本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸或者其多晶型物或溶剂化物治疗、改善或预防本文所述的综合征、障碍或疾病的方法,其虽然没有被具体公开,但将明显包括在本发明的范围之内。

[0178] 在另一个实施方案中,本发明涉及用作药物的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸。

[0179] 本发明在其范围内包括本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸的前药。一般来讲,此类前药将是GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸的功能衍生物,其可容易地在体内转化成所需要的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸。因此,在本发明的治疗方法中,术语“施用”应涵盖用具体公开的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸或者用可能未具体公开的但在施用给患者后在体内转化成指定的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸治疗所述的各种障碍。选择和制备适宜前药衍生物的常规方法描述于例如“Design of Prodrugs”H. Bundgaard编辑,Elsevier,1985中。

[0180] 在用于制备本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸的方法中的任何方法中,可能有必要和/或期望保护有关分子中的任何分子上的敏感基团或反应

性基团。这可通过常规保护基团来实现,诸如Protective Groups in Organic Chemistry, ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; 和T.W. Greene和P.G.M. Wuts的,《有机合成中的保护性基团》,约翰威利父子公司,1991年(Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley&Sons, 1991),这些文献各自以引用方式全文并入本文以用于所有目的。保护基团可使用本领域已知的方法在方便的后续阶段去除。

[0181] 使用方法

[0182] 本发明涉及用于预防、治疗或改善有需要的受试者的GDF15受体(GDF15R、GFRAL)介导的综合征和/或GLP1受体介导的综合征、障碍或疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸和/或药物组合物。

[0183] 本发明还提供了用于预防、治疗或改善有需要的受试者的障碍、疾病或病症或所述障碍、疾病或病症的任何一种或多种症状,或延迟其发作的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸和/或药物组合物。

[0184] 根据具体实施方案,疾病、障碍或病症选自:肥胖症、I型或II型糖尿病、代谢综合征(即,综合征X)、胰岛素抗性、葡萄糖耐受性受损(例如,葡萄糖耐受不良)、高血糖症、高胰岛素血症、高甘油三酯血症、由于先天性高胰岛素血症(CHI)引起的低血糖症、血脂异常、动脉粥样硬化、糖尿病性肾病、以及其他心血管危险因素诸如高血压和与未管控的胆固醇和/或脂质水平相关的心血管危险因素、骨质疏松症、炎症、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肾脏疾病、湿疹、睡眠呼吸暂停、骨关节炎、多囊卵巢综合征、慢性肾综合征、抑郁症和/或癌症。

[0185] 根据具体实施方案,治疗有效量是指足以实现下列效应中的一者、两者、三者、四者、或更多者的治疗量:(i)减少或改善欲被治疗的疾病、障碍、或病症的严重程度或与其相关的症状;(ii)减少所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状的持续时间;(iii)预防所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状发展;(iv)引起所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状消退;(v)预防所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状发展或发作;(vi)预防所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状复发;(vii)减少患有所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状的受试者的住院治疗;(viii)减少患有所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状的受试者的住院时间;(ix)提高患有所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状的受试者的存活;(xi)抑制或减少受试者中所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状;(xii)增强或改善另一种疗法的预防或治疗效果。和/或(xiii)提高患有待治疗的疾病、障碍或病症的受试者的生活质量。

[0186] 治疗有效量或剂量可根据各种因素,诸如欲被治疗的疾病、障碍或病症、施用方式、目标部位、受试者的生理状态(包括例如年龄、体重、健康)而变化,不论受试者是人或动物、施用的其他药物,以及是否为预防性或治疗性治疗。最佳地滴定治疗剂量以优化安全性和功效。

[0187] 如本文所用,术语“治疗”、“处理”和“疗法”均旨在意指与疾病、障碍、或病症有关的至少一种可测量物理参数的改善或逆转,其不一定是受试者中可识别的,但能够在受试者中识别。术语“处理”和“治疗”也可指导致消退,预防发展,或至少延缓疾病、障碍或病症

的发展。在一个具体实施方案中，“治疗”、“处理”和“疗法”是指减轻、预防发展或发作，或缩短与疾病、障碍或病症相关的一种或多种症状的持续时间。在特定实施方案中，“处理”和“治疗”是指预防疾病、障碍或病症的复发。在特定实施方案中，“处理”和“治疗”是指患有疾病、障碍或病症的受试者的存活提高。在特定实施方案中，“处理”和“治疗”是指受试者中疾病、障碍或病症的消除。

[0188] 在一个实施方案中，本发明提供了用于预防、治疗或改善有需要的受试者的肥胖症或肥胖症的任一种或多种症状，或延迟其发作的方法，该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸和/或药物组合物。在一些实施方案中，相对于在施用本文所述的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸、药物组合物、形式或药物中的任一者之前的受试者体重，或者与未接受本文所述的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸、组合物、形式或药物中的任一者的对照受试者相比，受试者的体重减少例如介于约0.01%至约0.1%之间、介于约0.1%至约0.5%之间、介于约0.5%至约1%之间、介于约1%至约5%之间、介于约2%至约3%之间、介于约5%至约10%之间、介于约10%至约15%之间、介于约15%至约20%之间、介于约20%至约25%之间、介于约25%至约30%之间、介于约30%至约35%之间、介于约35%至约40%之间、介于约40%至约45%之间或介于约45%至约50%之间。

[0189] 在一些实施方案中，在体重上的降低持续例如约1周、约2周、约3周、约1月、约2月、约3月、约4月、约5月、约6月、约7月、约8月、约9月、约10月、约11月、约1年、约1.5年、约2年、约2.5年、约3年、约3.5年、约4年、约4.5年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约15年或约20年。

[0190] 本发明提供了预防、治疗或改善有需要的受试者的综合征、障碍或疾病或者所述综合征、障碍或疾病的任一种或多个症状，或延迟其发作的方法，其中所述综合征、障碍或疾病选自：肥胖症、I型或II型糖尿病、代谢综合征（即，综合征X）、胰岛素抗性、葡萄糖耐受性受损（例如，葡萄糖耐受不良）、高血糖症、高胰岛素血症、高甘油三酯血症、由于先天性高胰岛素血症（CHI）引起的低血糖症、血脂异常、动脉粥样硬化、糖尿病性肾病、以及其他心血管危险因素诸如高血压和与未管控的胆固醇和/或脂质水平相关的心血管危险因素、骨质疏松症、炎症、非酒精性脂肪肝病（NAFLD）、非酒精性脂肪性肝炎（NASH）、肾脏疾病和湿疹，该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸和/或药物组合物。

[0191] 如本文所用，代谢综合征是指受试者具有任何以下的一种或多种：高血糖（例如，高空腹血糖）、高血压、胆固醇水平异常（例如，低HDL水平）、甘油三酯水平异常（例如，高甘油三酯）、大腰围（即，腰围）、腹部区域脂肪增加、胰岛素抵抗、葡萄糖耐受不良、C-反应蛋白水平升高（即，促炎症状态）和增加的血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1和纤维蛋白原含量（即，血栓前状态）。

[0192] 本发明提供了减少有需要的受试者的食物摄取的方法，该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸和/或药物组合物。在一些实施方案中，相对于在施用本文所述的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸、组合物、形式、药物或组合中的任一者之前的受试者的食物摄取，或者与未接受本文所述的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸、组合物、形

式、药物或组合中的任一者的对照受试者相比,受试者的食物摄取减少例如介于约0.01%至约0.1%之间、介于约0.1%至约0.5%之间、介于约0.5%至约1%之间、介于约1%至约5%之间、介于约2%至约3%之间、介于约5%至约10%之间、介于约10%至约15%之间、介于约15%至约20%之间、介于约20%至约25%之间、介于约25%至约30%之间、介于约30%至约35%之间、介于约35%至约40%之间、介于约40%至约45%之间或介于约45%至约50%之间。

[0193] 在一些实施方案中,在食物摄取上的降低持续例如约1周、约2周、约3周、约1月、约2月、约3月、约4月、约5月、约6月、约7月、约8月、约9月、约10月、约11月、约1年、约1.5年、约2年、约2.5年、约3年、约3.5年、约4年、约4.5年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约15年或约20年。

[0194] 本发明提供了减少有需要的受试者的糖化血红蛋白(A1C)的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸和/或药物组合物。在一些实施方案中,相对于在施用本文所述的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸、组合物、形式、药物或组合中的任一者之前的受试者的A1C,或相比于未接受本文所述的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸、组合物、形式、药物或组合中的任一者的对照受试者,受试者的A1C减少例如约介于约0.001%和约0.01%之间、介于约0.01%和约0.1%之间、介于约0.1%和约0.2%之间、介于约0.2%和约0.3%之间、介于约0.3%和约0.4%之间、介于约0.4%和约0.5%之间、介于约0.5%和约1%之间、介于约1%和约1.5%之间、介于约1.5%和约2%之间、介于约2%和约2.5%之间、介于约2.5%和约3%之间、介于约3%和约4%之间、介于约4%和约5%之间、介于约5%和约6%之间、介于约6%和约7%之间、介于约7%和约8%之间、介于约8%和约9%之间或介于约9%和约10%之间。

[0195] 在其他实施方案中,提供了用于降低有需要的受试者的空腹血糖水平的方法,这些方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸和/或药物组合物。相对于在施用本文所述的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸、组合物、形式、药物或组合中的任一者之前的受试者的空腹血糖水平,或者相比于未接受本文所述的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸、组合物、形式、药物或组合中的任一者的对照受试者,空腹血糖水平可降低至小于约140mg/dL至约150mg/dL、小于约140mg/dL至约130mg/dL、小于约130mg/dL至约120mg/dL、小于约120mg/dL至约110mg/dL、小于约110mg/dL至约100mg/dL、小于约100mg/dL至约90mg/dL或小于约90mg/dL至约80mg/dL。

[0196] 本发明提供了调节有需要的受试者的GLP1受体活性和GDF15受体活性的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸和/或药物组合物。如本文所用,“调节”是指增加或降低受体活性。

[0197] 在一些实施方案中,将有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸或其形式、组合物或药物每天一次、每天两次、每天三次、每天四次、每天五次、每天六次、每天七次或每天八次施用于对其有需要的受试者。在其他实施方案中,将有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸或其形式、组合物或药物每隔一天一次、每周一次、每周两次、每周三次、每周四次、每周五次、每周六次、每月两

次、每月三次、或每月四次施用于对其有需要的受试者。

[0198] 本发明的另一个实施方案包括预防、治疗或改善有需要的受试者的疾病、障碍或综合征或者所述疾病、障碍或综合征中的任一者的一种或多种症状,或延迟其发作的方法,该方法包括以联合疗法的形式向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸和/或药物组合物。在某些实施方案中,联合疗法为第二治疗剂。在某些实施方案中,联合疗法为外科疗法。

[0199] 如本文所用,在将两种或更多种疗法施用于受试者的上下文中,术语“联合”是指使用多于一种疗法。

[0200] 如本文所用,联合疗法是指向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸或其形式、组合物或药物,同时施用一种或多种附加治疗剂、或一种或多种外科疗法。在一些实施方案中,一种或多种附加治疗剂或外科疗法可以与有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸同一天施用,并且在其他实施方案中,一种或多种附加治疗剂或外科疗法可以与有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸同一周或同一月施用。

[0201] 本发明还设想利用联合疗法来预防、治疗或改善有需要的受试者的本文所述的疾病、障碍、综合征或症状中任一者,或延迟其发作,该联合疗法包括与以下治疗剂中的任一种或多种治疗剂联合向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸和/或药物组合物:二肽基肽酶-4 (DPP-4) 抑制剂(例如西他列汀、沙格列汀、利格列汀、阿格列汀等);GLP1受体激动剂(例如,短效GLP1受体激动剂,诸如艾塞那肽和利西拉肽;中效GLP1受体激动剂,诸如利拉鲁肽;长效GLP1受体激动剂,诸如缓释艾塞那肽、阿必鲁泰、度拉糖肽);钠-葡萄糖协同转运蛋白-2 (SGLT-2) 抑制剂(例如,坎格列净(canagliflozin)、达格列净(dapagliflozin)、恩格列净(empagliflozin));胆汁酸多价螯合剂(例如,考来维仑等);多巴胺受体激动剂(例如,速释的溴麦角环肽);双胍(例如,二甲双胍等);胰岛素;胃泌酸调节素;磺酰脲类(例如,氯环丙脲、格列美脲、格列吡嗪、优降糖、格列本脲、格列波脲、格列派特、格列吡脲、甲磺吡啶脲、甲苯磺丁脲、乙酰苯磺酰环己脲、氨磺丁脲等);和噻唑烷二酮类(例如;吡格列酮、罗格列酮、洛贝格列酮、环格列酮、达格列酮、恩格列酮,奈格列酮、利格列酮、曲格列酮等)。在一些实施方案中,当与本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸组合提供时,附加治疗剂的剂量有所减少。在一些实施方案中,当与本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸组合使用时,附加治疗剂可以比当各自单独使用时更低的剂量使用。

[0202] 本发明设想利用联合疗法来预防、治疗或改善有需要的受试者的本文所述的疾病、障碍、综合征或症状中的任一者,或延迟其发作,该联合疗法包括与外科疗法联合向有需要的受试者施用有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-GDF15融合多核苷酸和/或药物组合物。在某些实施方案中,外科疗法可为肥胖症外科手术(例如,胃旁路手术,诸如胆管空肠胃旁路术外科手术;袖状胃减容术;可调式胃束带手术;胆胰分流十二指肠转位术;内置胃气球;胃折叠术;以及它们的组合)。

[0203] 在其中一种或多种附加治疗剂或外科疗法与有效量的本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸同一天施用的实施方案中,可以在附加治疗剂或外科疗法之前、之后或同时施用本发明的GLP1-GDF15融合蛋白和/或GLP1-GDF15融合多核苷酸。

术语“联合”的使用并不限制疗法施用于受试者的次序。例如,第一疗法(例如,本文所述的组合物)可在第二疗法施用于受试者之前(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、或12周以前),与此同时,或之后(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、或12周以后)施用。

[0204] 实施方案

[0205] 本发明还提供了以下非限制性实施方案。

[0206] 实施方案1为一种胰高血糖素样肽-1 (GLP1)/生长分化因子15 (GDF15)融合蛋白,其中GLP1-GDF15融合蛋白包含GLP1肽、第一接头肽、血清白蛋白、第二接头肽和GDF15蛋白。

[0207] 实施方案2为根据实施方案1所述的GLP1-GDF15融合蛋白,其中GLP1肽包含选自SEQ ID NO:1-4的氨基酸序列。

[0208] 实施方案3为根据实施方案1或2所述的GLP1-GDF15融合蛋白,其中第一接头肽包含选自SEQ ID NO:5-25的氨基酸序列。

[0209] 实施方案4为根据实施方案1-3中任一项所述的GLP1-GDF15融合蛋白,其中血清白蛋白包含选自SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0210] 实施方案5为根据实施方案1-4中任一项所述的GLP1-GDF15融合蛋白,其中第二接头肽包含选自SEQ ID NO:28-30的氨基酸序列。

[0211] 实施方案6为根据实施方案1-5中任一项所述的GLP1-GDF15融合蛋白,其中GDF15蛋白包含选自SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0212] 实施方案7为一种GLP1-GDF15融合蛋白,其中GLP1-GDF15融合蛋白包含选自SEQ ID NO:33-74和84的氨基酸序列。

[0213] 实施方案8为一种分离的核酸,该分离的核酸编码根据实施方案1-7中任一项所述的GLP1-GDF15融合蛋白。

[0214] 实施方案9为一种载体,该载体包含根据实施方案8所述的分离的核酸。

[0215] 实施方案10为一种宿主细胞,该宿主细胞包含根据权利要求8所述的分离的核酸或根据权利要求9所述的载体。

[0216] 实施方案11为一种药物组合物,该药物组合物包含根据实施方案1-7中任一项所述的GLP1-GDF15融合蛋白以及药学上可接受的载体。

[0217] 实施方案12为一种用于治疗或预防有需要的受试者的肥胖症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案11所述的药物组合物。

[0218] 实施方案13为根据实施方案12所述的方法,其中向有需要的受试者施用有效量的药物组合物导致与施用药物组合物之前的受试者的体重相比,体重减少约5%至约10%、约10%至约15%、约15%至约20%、或约20%至约25%。

[0219] 实施方案14为一种用于治疗或预防有需要的受试者的疾病或障碍的方法,其中所述疾病或障碍选自:肥胖症、I型或II型糖尿病、代谢综合征、胰岛素抗性、葡萄糖耐受性受损、高血糖症、高胰岛素血症、高甘油三酯血症、由于先天性高胰岛素血症(CHI)引起的低血糖症、血脂异常、动脉粥样硬化、糖尿病性肾病、以及其他心血管危险因素诸如高血压和与未管控的胆固醇和/或脂质水平相关的心血管危险因素、骨质疏松症、炎症、非酒精性脂肪

肝病 (NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、肾脏疾病和湿疹,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案11所述的药物组合物。

[0220] 实施方案15为根据实施方案14所述的方法,其中所述疾病或障碍为肥胖症。

[0221] 实施方案16为根据实施方案14所述的方法,其中所述疾病或障碍为I型糖尿病。

[0222] 实施方案17为根据实施方案14所述的方法,其中所述疾病或障碍为II型糖尿病。

[0223] 实施方案18为根据实施方案14所述的方法,其中所述疾病或障碍为代谢综合征。

[0224] 实施方案19为根据实施方案14所述的方法,其中所述疾病或障碍为肾脏疾病。

[0225] 实施方案20为根据实施方案14所述的方法,其中所述疾病或障碍为非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)。

[0226] 实施方案21为根据实施方案14所述的方法,其中所述疾病或障碍为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

[0227] 实施方案22为一种减少有需要的受试者的食物摄取的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案11所述的药物组合物。

[0228] 实施方案23为根据实施方案22所述的方法,其中向有需要的受试者施用有效量的药物组合物导致与施用药物组合物之前的受试者的食物摄取相比,食物摄取减少约5%至约10%、约10%至约15%、约15%至约20%、约20%至约25%、约25%至约30%、约30%至约35%、约35%至约40%、约40%至约45%、或约45%至约50%。

[0229] 实施方案24为一种调节有需要的受试者的GLP1受体活性的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案11所述的药物组合物。

[0230] 实施方案25为一种调节有需要的受试者的GDF15受体活性的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案11所述的药物组合物。

[0231] 实施方案26为根据实施方案11-25中任一项所述的方法,其中药物组合物经由注射施用。

[0232] 实施方案27为根据实施方案26所述的方法,其中注射是皮下、肌内、腹膜内、或静脉内递送的。

[0233] 实施方案28为根据实施方案11-27中任一项所述的方法,其中药物组合物与第二治疗剂联合施用。

[0234] 实施方案29为根据实施方案11-28中任一项所述的方法,其中将药物组合物每天、每周或每月施用于有需要的受试者。

[0235] 实施方案30为根据实施方案29所述的方法,其中药物组合物每天一次、两次、三次、四次、五次或六次施用。

[0236] 实施方案31为根据实施方案29所述的方法,其中药物组合物每周一次、两次、三次、四次、五次或六次施用。

[0237] 实施方案32为根据实施方案29所述的方法,其中药物组合物每月一次、两次、三次或四次施用。

[0238] 实施方案33为一种试剂盒,该试剂盒包含根据实施方案1-7中任一项所述的GLP1-GDF15融合蛋白、根据实施方案8所述的分离的核酸和/或根据实施方案9所述的载体。

[0239] 实施方案34为根据实施方案33所述的试剂盒,其中试剂盒还包括用于注射的装置。

[0240] 实施方案35为一种制备药物组合物的方法,该药物组合物包含根据实施方案1-7中任一项所述的GLP1-GDF15融合蛋白,该方法包括将GLP1-GDF15融合蛋白与药学上可接受的载体组合以获得药物组合物。

[0241] 实施方案36为一种制备根据实施方案1-7中任一项所述的GLP1-GDF15融合蛋白的方法,该方法包括在制备GLP1-GDF15融合蛋白的条件下培养包含编码GLP1-GDF15融合蛋白的核酸的细胞,并从细胞或培养物回收GLP1-GDF15融合蛋白。

[0242] 实施例

[0243] 实施例1:GLP1和GDF15激动剂的组合

[0244] 在饮食诱导的肥胖(DIO)小鼠中测试组合GLP1和GDF15激动剂的潜在累加体重减轻效果。将利拉鲁肽(一种GLP1激动剂)单独施用或与HSA-GDF15(SEQ ID NO:81)分子组合施用8天。每天皮下施用利拉鲁肽,同时每两天进食HSA-GDF15。与任一种单一药剂相比,在接受两种激动剂的动物中体重减轻更大,表明当组合这些独立机制时具有累加体重减轻的潜力(图1)。

[0245] 实施例2:GLP1-GDF15融合蛋白的设计

[0246] 如下设计由GLP1肽或GLP1变体肽、血清白蛋白和GDF15蛋白或GDF15变体蛋白构成的重组融合蛋白:GLP1肽或GLP1变体肽经由GLP1肽或GLP1变体肽的C末端处的第一接头肽连接到人血清白蛋白的N末端。人血清白蛋白经由第二接头肽在GDF15蛋白或GDF15蛋白变体的C-末端处连接到N-末端。该设计旨在使GDF15二聚化界面不受到扰动,并且允许形成天然链间二硫化物,从而获得约170KDa的同型二聚体。整个分子被设计成以重组方式制备,仅需要一个基因(图3)。

[0247] GLP1肽或GLP1变体肽包括毒蜥外泌肽4(9-39)肽(其为来自希拉毒蜥的使人GLP1受体激动的毒液肽)或具有突变的人GLP1(7-36)肽。SEQ ID NO:1包含(A8S,A30E)突变(突变位置的编号是指表1中的GLP1肽突变,不是从融合蛋白开始),并且SEQ ID NO:2包含来自人GLP1肽(UniProtKB-P0127598-127)的(A8G,G22E,R36G)突变。SEQ ID NO:3包含毒蜥外泌肽4肽(UniProtKB-P2634948-86)。

[0248] 天然人血清白蛋白(UniProtKB-P0276825-609)包含35个半胱氨酸(Cys,C)残基,这些残基形成17个分子内二硫键,留下Cys-34作为唯一的游离半胱氨酸。通过捕获多种反应性氧物质(ROS)和反应性氮物质(RNS),已示出这种游离的Cys-34作为自由基清除剂起作用(Taverna等人,Ann.Intensive Care,第3卷,第4页(2013年))。因此,这种游离Cys突变为Ser以产生SEQ ID NO:26,从而最大程度降低化学反应性和由于氧化引起的异质性风险。

[0249] 成熟GDF15(UniProtKB-Q99988197-308)的N末端包含易蛋白水解位点(R198)和易脱酰胺位点(N199)。因此,融合蛋白包含GDF15(201-308)(SEQ ID NO:31),其中缺失那些易感性位点。

[0250] 实施例3:表达和纯化方法

[0251] 在以上实施例中利用的GLP1-GDF15融合蛋白、GLP1-第一接头-血清白蛋白(例如HSA、GSA)、血清白蛋白(例如HSA、GSA)-第二接头-GDF15蛋白和/或GDF15蛋白在HEK Expi293F™(ThermoFisher Scientific公司,目录号A14527)或ExpiCHO-S™(MA州Waltham市的ThermoFisher Scientific公司,目录号A29127)中表达。为了在HEK Expi293F™中表达,根据制造商的建议,通过瞬时转染将编码GLP1-GDF15融合蛋白的质粒转染到细胞中。简

而言之,在设置为37°C、8%CO₂和125RPM的振荡孵育箱中将Expi293F细胞在Expi293™表达培养基(ThermoFisher Scientific公司)中保持悬浮。使细胞传代,使得在转染当天,可以实现稀释至每毫升 2.5×10^6 个细胞,维持细胞活力为95%或更好。使用ExpiFectamine™293转染试剂盒(ThermoFisher Scientific公司)进行瞬时转染。对于每毫升待转染的稀释细胞,将一毫克质粒DNA稀释到OptiMEM™SFM复合培养基中。以1:2.6的比率(v/v,DNA:试剂)使用ExpiFectamine™293试剂,并且也将该试剂稀释到OptiMEM™中,并使其在室温下温育5分钟。将稀释DNA和转染试剂合并二十分钟,允许DNA/脂质复合物形成,然后添加到细胞。在孵育过夜之后,将Expi293™进料和ExpiFectamine™293增强子添加至细胞。在37°C下振荡的情况下将细胞培养四天,之后收获培养上清液。

[0252] 在设置为37°C、8%CO₂和125RPM的振荡孵育箱中将ExpiCHO-S™细胞在ExpiCHO™表达培养基(ThermoFisher Scientific公司)中保持悬浮。使细胞传代,使得在转染当天,可以实现稀释至每毫升 6.0×10^6 个细胞,维持细胞活力为98%或更好。使用ExpiFectamine™CHO转染试剂盒(ThermoFisher Scientific公司)进行瞬时转染。对于每毫升待转染的稀释细胞,将一毫克质粒DNA稀释到OptiPRO™SFM复合培养基中。在1:3比率(v/v,DNA:试剂)下使用ExpiFectamine™CHO试剂,并且也稀释到OptiPRO™中。将稀释DNA和转染试剂合并一分钟,允许DNA/脂质复合物形成,然后添加到细胞。在孵育过夜之后,将ExpiCHO™进料和ExpiFectamine™CHO增强子添加至细胞。在32°C下振荡的情况下将细胞培养五天,之后收获培养上清液。

[0253] 通过单步亲和力和捕获或使用亲和力和捕获的两步方法,然后通过制备性尺寸排阻色谱法(SEC)抛光步骤,从收获的培养上清液中纯化GLP1-GDF15融合蛋白。将来自瞬时转染的ExpiCHO™细胞的细胞上清液上样到预平衡的(dPBS,pH 7.2)近似容量为每毫升树脂10mg蛋白的HSA CaptureSelect柱(来自ThermoFisher Scientific公司的CaptureSelect人白蛋白亲和基质)上。上样后,通过用最多12倍柱体积(CV)的dPBS(pH7.2)洗涤柱,然后用3倍CV的1M NaCl的50mM磷酸钠(pH 7.4)溶液洗涤柱来除去未结合的蛋白和杂质。用最多10倍CV的0.1M乙酸钠(pH3.5)将结合到柱的GLP1-GDF15融合蛋白洗脱到含有10%(按体积计)1M Tris(未滴定)的级分管中。将峰级分合并并在0.2μm膜上过滤,然后将缓冲液更换为pH 7.2的dPBS或继续至4°C下的SEC步骤。

[0254] 对于SEC步骤,将来自捕获步骤的蛋白浓缩至适当的体积,然后上样到26/60superdex 200柱(英国Little Chalfont市的GE Healthcare公司)上。将从SEC柱洗脱的高纯度(通过SDS-PAGE测定)的蛋白级分合并。蛋白浓度(得自任一种方法)通过在BioTek Synergy HTTM分光光度计上280nm处的吸光度来测定。通过SDS-PAGE和分析型尺寸排阻HPLC(SE-HPLC,Dionex HPLC系统)来评估纯化的蛋白质的质量。使用LAL测定法(Pyrotell®-T,MA州East Falmouth市的Associates ofCape Cod公司)测量内毒素水平。

[0255] 实施例4:在一个分子上递送GLP1和GDF15两种激动剂的双重目标接合和累加效果

[0256] 通过评估在八天内用激动剂与大猩猩血清白蛋白(GSA)融合处理的DIO小鼠的体重减轻来测试通过在一个分子上递送GLP1和GDF15两种激动剂实现累加效果的潜力。GSA在这些工具分子中用作HSA的替代物。小鼠接受皮下施用8nmol/kg的GLP1-GSA-GDF15(SEQ ID NO:72)、GLP1-GSA-GDF15(I89R)(SEQ ID NO:73,I89R突变消除GDF15活性)、GLP1(9-36)-GSA-GDF15(SEQ ID NO:74)或GSA-GDF15(SEQ ID NO:75),后两者均被设计成表示降解的

GLP1。另外两组动物用作对照和参照物,一组单独接受溶媒或另一组施用GLP1激动剂杜拉鲁肽。用GLP1-GSA-GDF15 (SEQ ID NO:72) 处理的小鼠比用GLP1 (9-36) -GSA-GDF15 (SEQ ID NO:74)、GLP1-GSA-GDF15 (I89R) (SEQ ID NO:73) 和GSA-GDF15 (SEQ ID NO:75) 处理的小鼠具有更大的体重减轻,从而提供GLP1R和GFRAL均可用单个分子激动从而产生累加功效的概念的证据(图2)。

[0257] 实施例5:GLP1肽或GLP1肽变体和第一接头肽对体外人GLP1R效能、离体人和活内小鼠血浆稳定性的影响

[0258] 不同的GLP1肽或GLP1肽变体和不同的第一接头肽在测量hGLP1-过表达HEK细胞中的环腺苷单磷酸盐(cAMP)水平的测定法中对体外hGLP1受体效能具有不同的影响。根据试剂盒说明书,在使用Lance竞争性cAMP免疫测定法(Massachusetts州Waltham市的PerkinElmer公司)测量细胞内cAMP产生的基于细胞的测定法中针对体外GLP1R效能筛选融合物。在测定法中使用稳定表达小鼠或人GLP1R的克隆HEK293细胞。使用Prism统计软件(CA州San Diego市的GraphPad Software公司),使用所得数据来计算化合物EC₅₀值。一般来讲,在体外hGLP1R测定法中,GLP1变体(SEQ ID NO:1)不如其他两种GLP1变体(SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3)有效。

[0259] 评估在人血浆中的离体稳定性。简而言之,通过离心从肝素化血液中产生新鲜、非冷冻的人血浆。一边轻轻地混合,一边将融合蛋白在37°C下在该基质中温育0小时、4小时、24小时、48小时、72小时和96小时。通过免疫亲和捕获-胰蛋白酶消化LC-MS/MS分析来监测融合分子的GLP1区域随时间推移在人血浆中的稳定性。选定胰蛋白酶肽,即HSE (HSEGTFTSDVSSYLEGQAAK) (SEQ ID NO:76)、HGE-1 (HGEGTFTSDVSSYLEEQAAK) (SEQ ID NO:77) 和HGE-2 (HGEGTFTSDLSK) (SEQ ID NO:78) 分别位于GLP1肽或GLP1变体肽(SEQ ID NO:1、2和3)的N末端处。在抗-GDF15免疫亲和捕获和胰蛋白酶消化后,通过LC-MS/MS监测这些选定胰蛋白酶肽,这些选定胰蛋白酶肽用作具有完整含N末端GLP1的融合分子浓度的替代量度。利用该方法,所测试的所有分子均表现出在人血浆中随时间推移合理的GLP1稳定性。

[0260] 评估小鼠体内稳定性。将融合蛋白以2mg/kg PBS溶液(pH 7)的剂量皮下施用给雄性C57B1/6小鼠。在施用后0小时、4小时、24小时和48小时,将血液样品收集到含有蛋白酶抑制剂的K3E Sarstedt采血管中。通过离心制备血浆。通过免疫亲和捕获-胰蛋白酶消化LC-MS/MS分析来监测在小鼠中融合蛋白的GLP1区域在体内随时间推移的稳定性。选定胰蛋白酶肽,即HSE (HSEGTFTSDVSSYLEGQAAK) (SEQ ID NO:76)、HGE-1 (HGEGTFTSDVSSYLEEQAAK) (SEQ ID NO:77) 和HGE-2 (HGEGTFTSDLSK) (SEQ ID NO:78) 分别位于包含融合蛋白的SEQ ID NO:1、2和3的N末端处。在抗-GDF15免疫亲和捕获和胰蛋白酶消化后,通过LC-MS/MS监测这些选定胰蛋白酶肽,这些选定胰蛋白酶肽用作具有完整含N末端GLP1的融合蛋白浓度的替代量度。利用该方法,在小鼠中所测试的所有分子在体内随时间推移表现出合理的GLP1稳定性。

[0261] 表7提供了针对所指示的GLP1-GDF15融合蛋白而言,测量GLP1R过表达细胞的cAMP水平的体外GLP1受体效能、离体人血浆稳定性和体内小鼠血浆稳定性(两者均通过质谱评估)的结果。

[0262] 表7:GLP1-GDF15融合蛋白的体外hGLP1R效能、离体人血浆稳定性和体内小鼠血浆稳定性

[0263]

分子			体外 hGLP1R 效 能		通过 MS 测定的离体人血浆稳 定性（相对于 t=0 的完整 GLP1%）					通过 MS 测定的体 内小鼠血浆稳定性 （相对于相同分子 上的 HSA 的完整 GLP1%）		
序列 ID	GLP1(S EQ ID NO)	第一接头 肽(SEQ ID NO)	(nM)	+/- 误差	4h	24h	48h	72h	96h	4h	24h	48h
68	3	1-7(11)	0.09	0.04	90.8	94	89.5	74.4	70.1	93.4	57.6	31.5
60	3	1-6(10)	0.09	0.03	未测试					未测试		
59	3	1-9(13)	0.1	0.05								
64	3	1-19(23)	0.12	0.03	87.4	80	75.7	62.2	56.9	80.3	51.7	32.9
67	3	1-8(12)	0.13	0.02	86.5	89.8	76	68.2	64.7	88.8	55	34.1
70	2	1-7(11)	0.26	0.1	122.7	125.8	122.1	102.9	99.5	93.1	71.2	44.8
62	1	1-9(13)	0.35	0.1	未测试					未测试		

[0264]

69	2	1-8(12)	0.38	0.03	102.3	100.1	102.7	84.7	91.3	81.5	69.6	64.9
63	2	1-19(23)	0.39	0.15	92.5	88.7	82.2	77.8	77.3	109	95	74.6
61	1	1-6(10)	0.39	0.09	未测试					未测试		
66	1	1-7(11)	0.6	0.14	107.5	99	91.2	80.5	70.7	112	55.9	37.3
71	1	1-19(23)	1.5	0.13	100.2	93.6	84.9	62.6	60.6	87	52	30
65	1	1-8(12)	2.98	0.74	100.7	84.9	84.8	69.4	65.4	102	59.3	45.8

[0265] 实施例6:通过消除第一接头肽和第二接头肽中的丝氨酸残基去除O连接的木糖基化

[0266] 测试包含甘氨酸-丝氨酸接头的分子的O连接的木糖水平,因为据报道木糖聚糖附接到甘氨酸-丝氨酸接头(Spahr等人,mAbs,第6卷,第4期,第904-914页)。简而言之,通过在pH为8.0的胍-HCl缓冲液中稀释用于变性,然后添加DTT用于还原并且在37°C下温育1小时来制备样品。还原后,使用刚刚制备的碘代乙酰胺将样品在室温下在黑暗中烷基化60分钟。然后,将DTT加入样品中以螯合未反应的碘代乙酰胺。接下来,使用Zeba旋转脱盐柱根据制造商规程在pH为8.0的50mM Tris、1mM CaCl₂中使样品脱盐,并且用胰蛋白酶(Promega公司)在37°C下消解4小时。消解后,将TFA加入每个样品中以便淬灭消解反应。将消解的样品保持在4°C下并在24小时内注入LC/MS中。

[0267] 使用Agilent Infinity 1290UHPLC(Agilent Technologies公司)以0.1mL/min的流速将消解的样品注入Agilent AdvanceBio Peptide Map微孔高分辨率快速柱中。将柱温保持在65°C。质谱级HPLC溶剂(0.1%甲酸,以及B:100%ACN的0.1%甲酸溶液)购自VWR。使用2%至40%ACN的0.1%甲酸溶液的50分钟梯度从柱洗脱蛋白水解肽。使用3.5kV的喷雾电压、20的鞘气、7的辅助气体、299°C的离子传输管和100°C的气化器,将柱流出物经由加热的电喷雾电离探针(HESI)引入Thermo Orbitrap Q-Exactive质谱仪。

[0268] 进行前2项数据依赖性实验,其中前体扫描设置为Orbitrap检测、70,000分辨率、质量范围150m/z-2000m/z、AGC目标1.0e6、最大注入时间50ms、1次微扫描、正极性。前体决策标准为单同位素前体选择肽,电荷态:2-7,动态排除:6.0秒并且前体强度阈值为5e4。通过四极杆分离前体肽,其中分离窗口为1.6m/z,并且将其发送至碰撞室。28的碰撞能量导致肽的高能量碰撞解离(HCD)。然后将这些片段转移到轨道阱中进行质量测量。轨道阱设置为

17,500分辨率,200-2000m/z范围,AGC目标5e5,最大注入时间100ms,1次微扫描,以及在质心模式下采集光谱。

[0269] 使用Byonic (Protein Metrics公司) 搜索算法处理肽图谱数据。将核心木糖糖胺聚糖及其单同位素质量的定制文库添加到搜索参数中作为Ser特异性修饰。将Byonic搜索结果导入Byologic (Protein Metrics公司),用于基于经修饰的和未经修饰的肽物质的提取离子色谱图(XIC)区域进行定量。

[0270] 含有G₄S第一接头肽和第二接头肽的GLP1-GDF15融合蛋白在第一接头肽和第二接头肽的丝氨酸残基上显示出各种水平的O连接的木糖基化。表8示出了从ExpiCHO细胞瞬时表达的三种此类分子的结果。木糖的水平是蛋白环境依赖性的,并且在将GLP1肽或GLP1肽变体连接到HSA蛋白的第一接头肽中范围从“未检出”到1%,并且在将HSA蛋白连接到GDF15蛋白或GDF15蛋白变体的第二接头肽中范围从11.61%到56.2%。为了避免接头肽上潜在O连接的木糖基化风险,设计并生成在第一接头肽和/或第二接头肽中不含丝氨酸残基的GLP1-GDF15融合蛋白。这些GLP1-GDF15融合蛋白包含接头,该接头包含AP重复序列、G₄A重复序列或聚甘氨酸重复序列。

[0271] 表8:在包含G₄S接头肽的GLP1-GDF15融合蛋白的第一接头肽或第二接头肽中的丝氨酸残基上检测到的木糖水平。

[0272]

序列 ID	接头基序		通过肽图谱分析的总木糖%相对丰度
64	将 GLP1 连接到 HSA 的第一接头肽(1-9)	SEQ ID NO: 13 AS-8x(G4S)	未检出
	将 HSA 连接到 GDF15 的第二接头肽(2-3)	SEQ ID NO: 30 GS-8x(G4S)	11.61
67	将 GLP1 连接到 HSA 的第一接头肽(1-8)	SEQ ID NO: 12 AS-2x(G4S)	1.0
	将 HSA 连接到 GDF15 的第二接头肽(2-3)	SEQ ID NO: 30 GS-8x(G4S)	56.2
63	将 GLP1 连接到 HSA 的第一接头肽(1-19)	SEQ ID NO: 23 3x(G4S)	0.5
	将 HSA 连接到 GDF15 的第二接头肽(2-3)	SEQ ID NO: 30 GS-8x(G4S)	23.1

[0273] 实施例7:GLP1R和GDF15R的体外效能

[0274] 测试GLP1-GDF15融合蛋白的体外活性,以得到在基于细胞的测定法中GLP1R和GDF15R两者效能。通过测量稳定转染以过表达人或食蟹猴GFRAL的SK-N-AS人神经母细胞瘤细胞中的磷酸化AKT (Ser473) 水平来确定GDF15R (GFRAL) 活性。使用磷酸化AKT (Ser473) 测定试剂盒 (MA州Beford市的Cisbio公司) 根据制造商的说明书来测量用各种浓度的融合分子处理GFRAL表达细胞后AKT的磷酸化。使用Prism统计软件 (San Diego市的GraphPad Software公司),使用所得数据来计算化合物EC₅₀值。表9中所测试的GLP1-GDF15融合蛋白具有类似的GDF15R效能,其中EC₅₀在4.6nM-6.9nM的范围内。

[0275] 通过测量稳定转染以过表达人、小鼠或食蟹猴GLP1R的克隆HEK293细胞中的cAMP水平来确定融合蛋白的GLP1R效能。根据试剂盒说明书,使用Lance竞争性cAMP免疫测定法 (Massachusetts州Waltham市的Perkin Elmer公司) 测量用不同浓度的融合分子处理细胞

后的细胞内cAMP的产生。使用Prism统计软件(San Diego市的GraphPad Software公司),使用所得数据来计算化合物EC₅₀值。

[0276] 当将GLP1肽或GLP1肽变体连接到HSA蛋白的第一接头肽中的丝氨酸残基被丙氨酸替换或移除(从G₄S转换为G₄A或具有类似长度的聚G接头)时,当在人或小鼠GLP1R测定法中测试时GLP1活性不受影响。此外,将HSA蛋白连接到GDF15蛋白或GDF15蛋白变体的第二接头肽从GS-8x(G₄S)改变为GA-8x(G₄A)不影响GLP1R效能。此外,制备在第一接头(5X(G₄A)、8X(G₄A)、5X(AP)、10X(AP)、20X(AP)、25X(AP))中具有增加数目的重复序列的融合蛋白,并且在人GLP1R测定法中进行测试。结果表明,这些融合蛋白以不同效能激活GLP1R信号传导。

[0277] 表9:GLP1-GDF15融合蛋白对GLP1R和GDF15R的体外效能

SEQ ID NO:	cAMP 诱导								
	hGLP1R			mGLP1R			cGLP1R		
	EC50(nM)	STD	n	EC50(nM)	STD	n	EC50(nM)	STD	n
45	0.070	0.012	2	0.023	0.003	2	0.155	0.125	4
47	0.081	0.038	2	0.029	0.007	2	0.156	0.074	4
48	0.092	0.040	2	0.037	0.006	2	0.163	0.038	4

49	0.127	0.058	2	0.040	0.001	2	0.170	0.031	4
50	0.095	0.050	2	0.029	0.004	2	0.154	0.029	4
33	0.120	0.051	2	0.034	0.000	2	0.190	0.140	4
46	0.065	0.008	2	0.030	0.001	2	0.117	0.003	2
44	0.076	0.037	2	0.032	0.004	2	0.109	0.039	2
GLP1	0.011	0.004	25	0.012	0.004	21	0.013	0.003	8
杜拉鲁肽	0.038	0.010	27	0.020	0.004	23	0.045	0.014	8
利拉鲁肽	0.057	0.025	18	0.052	0.022	14	0.079	0.022	2
阿必鲁泰	0.981	0.438	23	1.486	0.624	19	1.759	0.735	6

SEQ ID NO:	磷酸化-AKT (Ser473)					
	hGDF15R			cGDF15R		
	EC50(nM)	95% CI	n	EC50(nM)	95% CI	n
45	4.561	3.975-5.258	1	1.031	0.6679-1.4	1
47	5.899	5.146-6.813	1	0.937	0.7413-1.137	1
48	6.283	5.479-7.281	1	1.585	1.374-1.819	1
49	4.825	4.11-5.726	1	1.157	0.7357-1.62	1
50	5.983	5.333-6.731	1	1.225	0.9865-1.473	1
33	5.251	4.523-6.113	1	1.004	0.7745-1.243	1
46	6.917	6.3-7.623	1	1.521	1.267-1.805	1
44	4.945	4.393-5.572	1	1.350	1.102-1.614	1

[0281] 实施例8:第一接头肽和第二接头肽对蛋白纯度和稳定性的影响

[0282] 使用尺寸排阻高效液相色谱法(SE-HPLC),通过定量主要物质以及代表聚集体的高分子量(HMW)物质和代表片段的低分子量(LMW)物质的百分比来检查分子的纯度和稳定性。简而言之,为了测定蛋白纯度,将20μg蛋白注入采用pH为7.2的1x DPBS流动相(Gibco目录号14190-136)的Tosoh TSKgel BioAssist G3SWXL(目录号20026)柱上。在室温下以1mL/min的流速洗脱蛋白物质,并且使用配备有可变波长检测器的Dionex Ultimate3000 HPLC系统来监测UV-280nm吸光度值。为了确定蛋白稳定性,将100μg蛋白注入到采用pH为7.0的0.2M磷酸钠流动相的Tosoh TSKgel BioAssist G3SWXL(目录号20026)柱上。在室温下以

0.7mL/min的流速洗脱蛋白质物质,并且使用配备有可变波长检测器的Dionex Ultimate3000 HPLC系统来监测UV-280nm吸光度值。使用Chromeleon软件分析数据。

[0283] 当GLP1-GDF15融合蛋白由ExpiCHO细胞中的瞬时表达制成并且按照实施例2中所述的方法通过亲和捕获纯化时,与含有GA-8x (G₄A) 第二接头肽 (SEQ ID NO:29) 的分子相比,具有10x (AP) 第二接头肽 (SEQ ID NO:28) 的GLP1-GDF15融合蛋白 (将HSA蛋白连接到GDF15蛋白或GDF15蛋白变体) 一致地导致较低百分比的低分子量 (LMW) 物质 (表10)。在纯化期间通过抛光步骤去除LMW物质,并且通过SE-HPLC确定所得最终GLP1-GDF15融合蛋白的纯度大于97%。

[0284] 测试这些GLP1-GDF15融合蛋白在限定应激条件下的稳定性。为了迫使产生化学诱导的氧化应激,将样品暴露于最终浓度为0.1%的过氧化氢,并在黑暗中温育6小时,然后加入过氧化氢酶以终止反应。在金属诱导的氧化条件下,将最终浓度为30μM的亚铁添加到样品中。在黑暗中温育两周后,加入EDTA以终止反应。为了测试低pH下的稳定性,将样品透析到pH为3.5的50mM醋酸盐缓冲液中,保持6小时并透析回到pH为7.4的0.1M磷酸钠中。为了测试样品在热应激下的稳定性,使用截留分子量为30KDa1的超速离心过滤器将其浓缩至大约10mg/mL,并在PBS中在40°C下保持两周。将经历上述化学或金属诱导的氧化以及低pH条件或热应激条件的这些样品在分析型尺寸排阻色谱 (TOSOH柱) 中以1mL/min的流速进行分析,在室温下运行20分钟。收集UV-280nm (Agilent 1100LC系统) 的信号,并用Chemstation (Agilent公司) 进行数据分析。

[0285] 表11示出了第二接头对GLP1-GDF15融合蛋白在热应激 (40°C下2周) 下的稳定性的影响。包含10x (AP) 第二接头肽 (SEQ ID NO:28) 的GLP1-GDF15融合蛋白导致与包含GA-8x (G₄A) 第二接头肽 (SEQ ID NO:29) 的GLP1-GDF15融合蛋白相比形成更低水平的LMW物质,这表明AP第二接头肽与G₄A第二接头肽相比热稳定性更高。在其他所测试的应激条件 (低pH、金属诱导或化学诱导的氧化) 下,样品的LMW物质的水平保持在最低水平,这类似于非应激样品。

[0286] 执行差示扫描量热法 (DSC) 以确定GLP1-HSA-GDF15蛋白的热稳定性。使用自动化MicroCal VP-毛细管DSC仪器在pH为7.4的PBS缓冲液中以大约0.5mg/mL-1mg/mL评估样品。热扫描以1°C/min的线性速率从25°C跨越至95°C。每次运行使用15分钟的预扫描时间和10秒的过滤周期。使用Origin7软件包中的非-2状态拟合函数处理数据。DSC结果表明,这些GLP1-GDF15融合蛋白具有63-72°C范围内的熔融温度 (T_m) (表12),类似于不含GLP1肽或GLP1肽变体的HSA-GDF15融合蛋白。

[0287] 表10:通过SE-HPLC确定,具有不同的第一接头肽和第二接头肽的GLP1-GDF15融合蛋白在亲和纯化后显示出各种水平的低分子量物质。

[0288]

SEQ ID NO:	第一接头肽 (SEQ ID NO)	第二接头肽 (SEQ ID NO)	亲和纯化后的 SE-HPLC		
			HMW %	主要物质%	LMW %
45	10x(AP) (6)	10x(AP) (28)	0-1.32	98.68-100	0
33	5x(G ₄ A) (18)	10x(AP) (28)	0	100	0
44	5x(AP) (5)	10x(AP) (28)	0	100	0
47	25x(G) (22)	GA-8x(G ₄ A) (29)	2.3	86.64	11.06
48	20x(G) (21)	GA-8x(G ₄ A) (29)	5.56	83.77	10.67
49	4x(G ₄ A) (17)	GA-8x(G ₄ A) (29)	2.93	94.64	2.43
46	5x(AP) (5)	GA-8x(G ₄ A) (29)	0	92.33	7.67
50	5x(G ₄ A) (18)	GA-8x(G ₄ A) (29)	0.77-3	89.71-91.00	7.29-8.22

[0289] 表11:具有不同的第一接头肽和第二接头肽的GLP1-GDF15融合蛋白在热应激(40℃下2周)下显示出各种水平的低分子量物质。

[0290]

SEQ ID NO:	GLP1 肽或 GLP1 肽变体	第一接头肽 (SEQ ID NO:)	第二接头肽 (SEQ ID NO:)	所有步骤纯化后的 SE-HPLC 主要物质%	40℃下 2 周后的 SE-HPLC		
					HMW %	主要物质%	LMW %
45	基于 GLP1	10x(AP) (6)	10x(AP) (28)	98.68-100	5.32	92.6	2.13
33	基于 GLP1	5x(G ₄ A) (18)	10x(AP) (28)	100	2.5	95.4	2.1
44	基于毒蜥外泌肽 4	5x(AP) (5)	10x(AP) (28)	100	7.3	90.8	2.6
47	基于 GLP1	25x(G) (22)	GA-8x(G ₄ A) (29)	100	0.91	93.9	5.19
48	基于 GLP1	20x(G) (21)	GA-8x(G ₄ A) (29)	97.13	5.22	86.97	7.81
49	基于 GLP1	4x(G ₄ A) (17)	GA-8x(G ₄ A) (29)	100	0.42	93.56	6.02
50	基于 GLP1	5x(G ₄ A) (18)	GA-8x(G ₄ A) (29)	100	0.49	92.17	7.34
46	基于毒蜥外泌肽 4	5x(AP) (5)	GA-8x(G ₄ A) (29)	100	5.9	74.5	19.6

[0291] 表12:通过差示扫描量热法(DSC)测定的GLP1-GDF15融合蛋白的T_m。

[0292]

SEQ ID NO:	GLP1 肽或 GLP1 肽变体	第一接头肽 (SEQ ID NO:)	第二接头肽 (SEQ ID NO:)	通过 DSC 测定的 Tm (°C)			
				Tm1	Tm2	Tm3	Tm4
45	基于 GLP1	10x(AP) (6)	10x(AP) (28)	64.88	68.79	73.38	76.59
33	基于 GLP1	5x(G4A) (18)	10x(AP) (28)	63.96	68.38	73.37	76.44
47	基于 GLP1	25x(G) (22)	GA-8x(G4A) (29)	68.31	74.55	77.98	na
48	基于 GLP1	20x(G) (21)	GA-8x(G4A) (29)	64.74	69.28	74.27	77.15
49	基于 GLP1	4x(G4A) (17)	GA-8x(G4A) (29)	64.64	69.58	74.29	77.04
50	基于 GLP1	5x(G4A) (18)	GA-8x(G4A) (29)	63.39	67.78	72.8	75.99
46	基于毒蜥外泌肽 4	5x(AP) (5)	GA-8x(G4A) (29)	72.07	74.81	77.02	na
44	基于毒蜥外泌肽 4	5x(AP) (5)	10x(AP) (29)	69.79	73.82	76.23	na

[0293] 实施例9:离体人血浆研究

[0294] 在人血浆中离体评估GLP1-GDF15融合蛋白的稳定性。简而言之,通过离心从肝素化血液产生新鲜、非冷冻的人血浆。一边轻轻地混合,一边将融合蛋白在37°C下在该基质中温育0小时、4小时、24小时、48小时、72小时和96小时。通过用抗-GDF15抗体进行免疫亲和捕获并用抗HSA抗体(“总形式”)或抗GLP1 N-末端特异性抗体(“GLP1活性形式”)进行免疫检测来监测融合分子随时间推移在人血浆中的浓度。表13和表14示出了这两种免疫测定法的结果。

[0295] 表13:通过抗GDF15捕获抗体和抗HSA检测抗体测量的采用免疫测定法确定的离体人血浆稳定性。

[0296]

时间点 (小时)	浓度 (µg/mL)							归一化至 0 小时的回收率%						
	SEQ ID: 50	SEQ ID: 33	SEQ ID: 49	SEQ ID: 48	SEQ ID: 47	SEQ ID: 45	SEQ ID: 44	SEQ ID: 50	SEQ ID: 33	SEQ ID: 49	SEQ ID: 48	SEQ ID: 47	SEQ ID: 45	SEQ ID: 44
0	13.69	13.13	13.14	12.69	13.32	12.79	13.77	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
4	14.14	13.56	12.83	13.20	12.53	12.89	13.30	103.3	103.3	97.6	104.0	94.0	100.8	96.6
24	13.84	13.49	12.16	13.21	13.31	12.76	12.53	101.1	102.8	92.5	104.0	99.9	99.8	91.0
48	12.84	13.57	12.21	12.56	12.48	11.88	11.55	93.8	103.4	92.9	98.9	93.7	92.9	83.9
72	13.18	14.00	11.21	12.12	12.35	12.18	12.93	96.3	106.7	85.3	95.5	92.7	95.2	93.9
96	12.92	13.01	11.23	12.09	12.16	12.32	12.34	94.4	99.1	85.4	95.2	91.3	96.3	89.6

[0297] 表14:采用免疫测定法,通过抗GDF15捕获抗体和抗GLP1检测抗体(识别对GLP1的活性形式具有特异性的N-末端GLP1)得出的离体人血浆稳定性。

时间 点 (小 时)	浓度 (µg/mL)							归一化至 0 小时的回收率%						
	SEQ ID: 50	SEQ ID: 33	SEQ ID: 49	SEQ ID: 48	SEQ ID: 47	SEQ ID: 45	SEQ ID: 44	SEQ ID: 50	SEQ ID: 33	SEQ ID: 49	SEQ ID: 48	SEQ ID: 47	SEQ ID: 45	SEQ ID: 44
[0298] 0	11.45	10.93	11.28	11.54	11.50	11.99	12.04	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
4	11.60	10.86	10.85	11.44	11.00	11.35	10.88	101.3	99.4	96.2	99.1	95.7	94.6	90.4
24	10.32	10.50	10.17	10.43	10.08	10.64	9.73	90.2	96.1	90.2	90.4	87.7	88.7	80.8
48	9.07	9.66	9.47	9.40	8.28	10.26	8.95	79.2	88.4	83.9	81.5	72.0	85.6	74.3
72	8.68	9.22	8.71	8.76	6.30	9.17	9.13	75.8	84.4	77.3	75.9	54.8	76.4	75.9
96	8.37	9.71	7.94	8.24	6.62	9.14	8.21	73.1	88.8	70.4	71.4	57.6	76.2	68.2

[0299] 实施例10:多物种药代动力学

[0300] 小鼠药代动力学

[0301] 将来源于SEQ ID NO:50、45、46和44的GLP1-GDF15融合蛋白以在pH为7的PBS中5mg/kg剂量IV和SC施用给雌性C57BL/6小鼠。收集血液样品,处理血浆并在两种给药途径后至多4天测量药物浓度。IV和SC施用后血浆中的分析物浓度通过免疫亲和捕获-胰蛋白酶消化LC-MS/MS分析测量。选定胰蛋白酶肽,即ALV (ALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK) (SEQ ID NO:79)、HGE-1 (HGEGTFTSDVSSYLEEQAAK) (SEQ ID NO:77)、HGE-2 (HGEGTFTSDLSK) (SEQ ID NO:78)和TDT (TDTGVSLQTYDDLAK) (SEQ ID NO:80),它们分别位于HSA蛋白的N末端、GLP1肽或GLP1肽变体的N末端以及GDF15蛋白或GDF15蛋白变体的C末端附近。监测这些替代肽使得能够对GLP1-GDF15融合蛋白的每个区域 (GLP1、HSA、GDF15) 进行药代动力学评估。血浆药物浓度-时间曲线汇总于表15-22中。

[0302] 表15:在C57BL/6雌性小鼠中单次皮下 (SC) 施用后,随时间推移的SEQ ID NO:50的血浆浓度 (µg/mL) 和标准平均误差 (SEM,n=3)。

SC	浓度 (µg/mL)			SEM		
	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
[0303] 2	14.780	15.140	16.360	0.905	1.014	1.063
6	26.700	37.300	30.180	1.248	5.012	1.563
24	19.980	36.780	28.880	0.691	2.956	0.944
48	10.716	22.940	19.640	0.330	1.677	0.458
72	5.034	10.790	12.960	0.286	0.525	0.631
96	2.450	7.218	8.444	0.244	0.844	0.699

[0304] 表16:在C57BL/6雌性小鼠中单次静脉内 (IV) 施用后,随时间推移的SEQ ID NO:50的血浆浓度 (µg/mL) 和标准平均误差 (SEM,n=3)。

IV	浓度 (µg/mL)			SEM		
	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
[0305] 0.5	68.320	71.760	82.860	4.188	6.659	5.408
6	45.020	48.560	60.660	1.427	1.487	1.707
24	16.900	23.820	28.340	0.991	0.913	1.646
48	9.472	20.620	20.540	0.510	0.843	1.365
72	5.048	12.118	14.440	0.303	0.996	0.842
96	2.144	5.404	7.926	0.103	0.365	0.445

[0306] 表17:在C57BL/6雌性小鼠中单次皮下(SC)施用后,随时间推移的SEQ ID NO:45的血浆浓度($\mu\text{g/mL}$)和标准平均误差(SEM,n=3)。

[0307]	SC	浓度 (μg/mL)			SEM		
	时间 (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
	2	13.536	12.032	12.512	3.674	3.373	3.499
	6	21.780	20.540	22.120	3.155	2.770	3.161
	24	18.020	27.580	26.520	1.712	3.014	2.732
	48	8.856	20.060	18.980	0.469	1.183	1.248
	72	4.348	18.180	15.260	0.329	1.697	1.065
	96	1.786	9.866	9.676	0.164	0.907	0.854

[0308] 表18:在C57BL/6雌性小鼠中单次静脉内(IV)施用后,随时间推移的SEQ ID NO:45的血浆浓度($\mu\text{g/mL}$)和标准平均误差(SEM,n=3)。

[0309]

IV	浓度 (μg/mL)			SEM		
时间 (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
0.5	76.800	69.080	69.560	7.469	7.052	7.981
6	56.180	57.040	59.460	5.162	5.781	5.527
24	21.120	30.860	30.680	1.668	2.444	2.480
48	10.398	22.560	21.500	0.855	2.104	2.152
72	4.794	18.800	16.180	0.368	1.880	1.030
96	1.986	10.854	10.284	0.134	0.837	0.707

[0310] 表19:在C57BL/6雌性小鼠中单次皮下(SC)施用后,随时间推移的SEQ ID NO:46的血浆浓度($\mu\text{g/mL}$)和标准平均误差(SEM,n=3)。

[0311]	SC	浓度（μg/mL）			SEM		
	时间 （h）	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
	2	3.420	2.850	3.720	0.376	0.311	0.337
	6	5.718	6.522	7.516	0.730	0.704	0.609
	24	4.792	8.504	9.154	0.398	0.708	0.858
	48	2.146	5.766	6.910	0.389	0.541	0.455
	72	0.689	2.818	3.286	0.061	0.260	0.336
	96	0.205	1.270	1.516	0.026	0.137	0.186

[0312] 表20:在C57BL/6雌性小鼠中单次静脉内(IV)施用后,SEQ ID NO:46的血浆浓度($\mu\text{g/mL}$)和标准平均误差(SEM,n=3)。

[0313]

IV	浓度 (μg/mL)			SEM		
时间 (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
0.5	55.525	42.525	57.875	15.521	10.592	15.368
6	27.125	24.750	34.950	5.185	4.660	6.461
24	4.933	9.423	11.280	0.255	0.893	0.879
48	1.355	5.023	5.893	0.125	0.278	0.702
72	0.510	2.623	2.968	0.049	0.269	0.329
96	0.196	1.345	1.593	0.020	0.155	0.171

[0314] 表21:在C57BL/6雌性小鼠中单次皮下(SC)施用后,SEQ ID NO:44的血浆浓度(μg/mL)和标准平均误差(SEM,n=3)。

[0315]

SC	浓度 (μg/mL)			SEM		
时间 (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
2	6.340	6.124	6.792	2.029	1.845	2.289
6	8.534	10.310	10.672	1.697	1.721	1.876
24	4.646	10.098	10.018	0.969	1.801	1.874
48	1.879	6.264	6.480	0.486	1.171	1.162
72	0.691	3.678	3.694	0.153	0.766	0.760
96	0.194	1.758	1.860	0.048	0.304	0.331

[0316] 表22:在C57BL/6雌性小鼠中单次静脉内(IV)施用后,SEQ ID NO:44的血浆浓度(μg/mL)和标准平均误差(SEM,n=3)。

[0317]

IV	浓度(mg/mL)			SEM		
时间 (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
0.5	57.920	53.300	60.760	4.648	3.971	4.489
6	29.560	33.360	37.400	2.266	2.199	2.176
24	4.564	10.420	10.684	0.424	0.393	0.560
48	1.300	6.276	6.022	0.217	0.312	0.250
72	0.540	3.396	3.562	0.040	0.257	0.195
96	0.159	1.784	1.804	0.025	0.180	0.123

[0318] 使用表15-22中的数据的数据的非房室药代动力学分析(NCA)表明,在SC和IV施用四种GLP1-GDF15融合蛋白后,在C57BL/6小鼠中测试的GLP1肽或GLP1肽变体的终末半衰期为14-23小时,GDF15蛋白或GDF15蛋白变体的终末半衰期为22-49小时,并且HSA蛋白的终末半衰期为22-47小时(表23)。

[0319] 表23:在雌性C57BL/6小鼠中IV和SC施用5mg/kgGLP1-GDF15融合蛋白时其估计终末半衰期。

[0320]

SEQ ID NO:	区域	半衰期 (小时) NCA SC 给药	半衰期 (小时) NCA IV 给药
50	GDF15	39.4	39.8
50	GLP1	22.5	24.4
50	HSA	29.5	24.8
45	GDF15	49.4	46.7
45	GLP1	21.8	20.1
45	HSA	46.9	38.3
46	GDF15	21.9	25.4
46	GLP1	14.2	17.2
46	HSA	22.0	25.3
44	GDF15	26.7	28.4
44	GLP1	15.8	15.2
44	HSA	28.8	26.5

[0321] 猴子药代动力学

[0322] 将来源于SEQ ID NO:33、50、45、46和44的GLP1-GDF15融合蛋白以在pH为7的PBS中0.5mg/kg的剂量SC施用给未施用该融合蛋白的雄性食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)。在最多21天内收集血液样品,处理血浆并使用免疫测定生物分析法测量药物浓度。免疫测定法策略包括抗GDF15捕获抗体和用识别完整GLP1的抗体(“活性”形式)或用识别HSA的抗体检测(“总”形式)。血浆药物浓度-时间曲线汇总于表24和表25中。

[0323] 表24:如通过免疫测定法所测定的,在食蟹猴中单次SC施用活性SEQ ID NO:33、50、45、46和44后随时间推移的其平均(平均值,n=3)血浆浓度 (ng/mL)。

[0324]

时间	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 33
给药前	<2.50	<2.50	<2.50	<2.50	<1.25
6 小时	1747.72	2530.81	2457.83	1667.36	1880.02
24 小时	3057.60	3492.18	3946.41	3191.24	3151.63
48 小时	3177.96	3416.86	3655.95	3643.12	3448.62
72 小时	2689.49	3013.14	3015.11	2991.62	2949.14
120 小时	1501.85	1669.39	1402.39	2029.62	1991.88
168 小时	813.84	1020.04	725.75	1208.07	1246.28
240 小时	378.81	471.08	265.28	564.57	583.56
336 小时	137.73	192.90	81.18	197.74	211.92
432 小时	53.16	61.11	25.47	70.28	79.78
528 小时	23.10	35.96	10.60	25.70	36.59

[0325] 表25:如通过免疫测定法所测定的,在食蟹猴中单次SC施用总SEQ ID NO:33、50、45、46和44后随时间推移的其平均(平均值,n=3)血浆浓度 (ng/mL)。

[0326]

时间点	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 33
给药前	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00
6 小时	1628.27	2299.98	2139.00	1427.28	1726.39
24 小时	3350.99	3873.18	4639.00	3430.23	3451.14
48 小时	3956.92	4427.70	5607.40	4892.71	4542.34
72 小时	3672.20	4399.17	5310.44	4303.43	4514.28
120 小时	2699.22	3612.21	4616.56	4133.96	4114.96
168 小时	1930.94	2745.57	3902.73	3237.20	3431.95
240 小时	1261.95	1964.84	2820.20	2353.01	2504.95
336 小时	719.72	1357.09	2005.69	1597.70	1682.87
432 小时	442.57	806.98	1399.11	964.85	1096.51
528 小时	328.35	532.75	961.88	708.00	879.52

[0327] 表24和表25中数据的药代动力学分析表明,SC施用后食蟹猴中活性分子的终末半衰期为2-3天,并且总分子的终末半衰期为5-8天(表26)。

[0328] 表26:食蟹猴中SC施用0.5mg/kgSEQ ID NO:50、33、45、46和44后的其终末半衰期。

[0329]

SEQ ID NO:	检测	半衰期 (d)
44	有源	3.2
	总计	6.6
46	有源	2.6
	总计	4.6
50	有源	2.9
	总计	6.6
45	有源	2.3
	总计	7.6
33	有源	3.0
	总计	7.8

[0330] 实施例11:GLP1-GDF15融合蛋白的体内效能

[0331] 对C57BL/6雄性小鼠中的食物摄取的评估:该实验的目的是展示对应于SEQ ID NO:50、33、49、45、46和44的分子对抑制C57BL/6小鼠中的食物摄取的体内药代动力学效果。在皮下施用GLP1-GDF15融合蛋白(测试制品)或对照(PBS溶媒或杜拉鲁肽)之前和之后,在下午4:00和下午5:00之间测量24小时食物摄取。每24小时记录每个笼子的食物重量的变化。结果表示为与处理之前24小时相比食物摄取的变化百分比,并且部分取决于研究中使用的每种测试制品的循环浓度(图4)。在施用后24小时,通过免疫亲和捕获-胰蛋白酶消化LC-MS/MS分析确定测试制品的循环浓度。监测选定胰蛋白酶肽,即ALV(ALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK)(SEQ ID NO:79)、HGE-1(HGEGTFTSDVSSYLEEQAQK)(SEQ ID NO:77)、HGE-2(HGEGTFTSDLSK)(SEQ ID NO:78)和TDT(TDTGVSLQTYDDLAK)(SEQ ID NO:80),它们分别位于HSA蛋白的N末端、GLP1肽或GLP1肽变体的N末端以及GDF15蛋白或GDF15蛋白变体的C末端附近。VVS肽(VVSVLTVLHQDWLNGK)(SEQ ID NO:82)位于杜拉鲁肽的Fc部分中。监测这些替代肽使得能够对GLP1-GDF15融合蛋白的每个区域(GLP1、HSA、GDF15)进行药代动力学评估。血浆药物浓度示于图5中。结果表明,相对于溶媒处理的动物,向C57BL/6小鼠皮下施用SEQ ID NO:50、33、49、45、46和44显著抑制了食物摄取。

[0332] 对GFRAL KO小鼠中GLP1R介导的食物摄取效果的评估:抑制C57BL/6小鼠中的食物摄取是GLP1R和GDF15R (GFRAL) 两者接合的结果。为了确定SEQ ID NO:50、33、45、46和44对食物摄取的GLP1R特异性效果,使用缺乏GFRAL的小鼠。这些实验的目的是确定当以预测对小鼠中的HSA-GDF15融合蛋白有效的剂量施用融合蛋白时该融合蛋白接合GLP1R的程度(图1和图2以及US20170327560A1)。在皮下施用GLP1-GDF15融合蛋白(测试制品:3nmol/kg和10nmol/kg)或对照(PBS溶媒或杜拉鲁肽)之前和之后,在下午4:00和5:00之间测量24小时食物摄取。每24小时记录每个笼子的食物重量的变化。包含完整GLP1肽或GLP1肽变体的融合分子的循环浓度在施用后24小时通过免疫亲和捕获-胰蛋白酶消化LC-MS/MS分析和位于GLP1肽或GLP1肽变体的N-末端附近的胰蛋白酶肽HGE-1 (HGEFTFTSDVSSYLEEQAQK) (SEQ ID NO:77)或HGE-2 (HGEFTFTSDLSK) (SEQ ID NO:78)的选择性监测来确定。结果以食物摄取的变化百分比相对于HGE肽(完整GLP1肽或GLP1肽变体)的血浆浓度作图(图6、图7和图8)。结果表明,递送具有SEQ ID NO:50、33、45、46和44的融合蛋白导致GLP1R以先前证明对HSA-GDF15有效的剂量接合。令人惊讶的是,GLP1R接合引发了类似于Fc-GLP1激动剂杜拉鲁肽的期望药效动力学应答,尽管其GLP1部分暴露浓度比杜拉鲁肽大10-30倍。如果融合蛋白的GLP1组分在体内与杜拉鲁肽一样有效,则GLP1R接合将远高于所期望的,从而可能导致所预测的人体不良事件,诸如恶心和呕吐。因此,GLP1肽作为与HSA-GDF15的融合肽递送以实现两种激动剂的期望平衡的方式影响GLP1R的体内效能。

[0333] 对空腹DIO小鼠中GLP1R介导的葡萄糖耐受性的评估:在饮食诱导的肥胖小鼠中,胰腺中GLP1R激动导致胰岛素分泌增强和葡萄糖摄取增加,并且可使用腹膜内葡萄糖耐受性测试来测量。这些实验的目的是确定当以预测对小鼠中的HSA-GDF15融合蛋白有效的剂量施用融合蛋白时该融合蛋白接合GLP1R的程度(图1和图2以及US20170327560A1)。从6周龄开始用研究饮食D12492喂养雄性C57BL/6小鼠,直到在20周龄开始给药以诱导肥胖症。使用进食后血糖和体重测量值将小鼠随机分成治疗组。在下午4:00,将小鼠转移到干净的笼中,并供应水;在研究期间停止供应食物。在停止供食时皮下施用对照(PBS溶媒和杜拉鲁肽)和测试制品(SEQ ID NO:33、50、49、45、46、44和36)(1nmol/kg、3nmol/kg和10nmol/kg)。施用后17小时,收集基线葡萄糖并且每kg体重腹膜内施用1g葡萄糖。在葡萄糖推注后10分钟、30分钟、60分钟和120分钟时测量血糖。包含完整GLP1肽或GLP1肽变体的融合分子的循环血浆浓度在120分钟时间点后通过免疫亲和捕获-胰蛋白酶消化LC-MS/MS分析和位于GLP1肽或GLP1肽变体的N-末端附近的胰蛋白酶肽HGE-1 (HGEFTFTSDVSSYLEEQAQK) (SEQ ID NO:77)或HGE-2 (HGEFTFTSDLSK) (SEQ ID NO:78)的选择性监测来立即确定。将葡萄糖水平作为时间的函数作图,并且针对每只动物计算归一化为基线葡萄糖水平后的曲线下面积(Δ AUC)。将结果作图为 Δ AUC的变化百分比(与溶媒处理相比)相对于HGE肽(完整GLP1激动剂)的血浆浓度(图9、图10、图11和图12)。结果表明,以先前证明对HSA-GDF15有效的剂量递送具有SEQ ID NO:33、50、49、45、46、44和36的融合蛋白导致GLP1R接合。令人惊讶的是,GLP1R接合引发了类似于Fc-GLP1激动剂杜拉鲁肽的期望药效动力学应答,尽管其GLP1部分暴露浓度比杜拉鲁肽大10-30倍。如果融合蛋白的GLP1组分在体内与杜拉鲁肽一样有效,则GLP1R接合将远高于所期望的,从而可能导致所预测的人体不良事件,诸如恶心和呕吐。因此,GLP1肽作为与HSA-GDF15的融合肽递送以实现两种激动剂的期望平衡的方式影响GLP1R的体内效能。

[0334] 使用梯度葡萄糖输注评估灵长类中的GLP1R接合:非人灵长类中静脉内梯度葡萄糖输注(GGI)时的胰岛素分泌用于评估SEQ ID NO:45和44的GLP1R接合。这些实验的目的是确定当以预测对非人灵长类中的HSA-GDF15融合蛋白有效的剂量施用融合蛋白时该融合蛋白接合GLP1R的程度(Mullican等人,2017年以及US20170327560A1)。在16小时过夜禁食后,在镇静食蟹猴中进行GGI过程,以将基线和处理应答与两个GGI过程之间的14天恢复期进行比较。在第1天,在停止供食后立即给动物食用溶媒。在第2天,将动物麻醉,并且用间隔10分钟收集的两个血液样品建立基线。以8mg/kg/min的葡萄糖输注速率在0分钟时开始GGI1,然后以12mg/kg/min、16mg/kg/min和24mg/kg/min输注。每个输注速率施用40分钟的时间。以20分钟的间隔采集血液样品以测量葡萄糖、胰岛素和C-肽,将结果作为时间的函数作图,并确定在每只动物中测量的每种分析物的曲线下面积(AUC)。然后基于动物从GGI1的基线胰岛素分泌速率(ISR)将动物随机分成测试制品处理组。在第15天,在禁食过夜之前,以不同的剂量浓度(0.1mg/kg至1.1mg/kg融合蛋白和0.016mg/kg至0.1mg/kg杜拉鲁肽)给动物食用测试制品。如第2天所述在第16天执行第二GGI(GGI2)。通过专门设计用于监测具有完整GLP1肽或肽变体的测试制品的免疫测定法,在葡萄糖输注之前在时间点0处收集的的血浆样品上评估化合物暴露。图13中的数据报告为归一化为葡萄糖AUC的ISR AUC与基线相比的治疗诱导倍数变化相对于具有完整GLP1的测试制品的血浆浓度。杜拉鲁肽用作Fc-GLP1激动剂参照物。结果表明,递送具有SEQ ID NO:45和44的融合蛋白导致GLP1R以先前证明对HSA-GDF15有效的剂量接合。令人惊讶的是,GLP1R接合引发了类似于Fc-GLP1激动剂杜拉鲁肽的期望药效动力学应答,尽管其GLP1部分暴露浓度比杜拉鲁肽大10-30倍。如果融合蛋白的GLP1组分在体内与杜拉鲁肽一样有效,则GLP1R接合将远高于所期望的,从而可能导致所预测的人体不良事件,诸如恶心和呕吐。因此,GLP1肽作为与HSA-GDF15的融合肽递送以实现两种激动剂的期望平衡的方式影响GLP1R的体内效能。

[0335] 图6-图13中所示的结果表明,与杜拉鲁肽的Fc融合GLP1肽相比,同源二聚体GLP1-GDF15双激动剂中的GLP1体内活性或在临床前物质中的效能有所降低。这使得两种激动剂(GLP1肽或GLP1肽变体以及GDF15蛋白或GDF15蛋白变体)能够在一个分子上平衡;因此,允许以也实现GDF15蛋白或GDF15蛋白变体在预测治疗范围内暴露的有效浓度递送GLP1肽或GLP1肽变体。

[0336] 对在小鼠中重复给药后GLP1-GDF15融合蛋白的体重减轻功效的评估:在饮食诱导的肥胖小鼠中测试GLP1-GDF15融合蛋白引起体重减轻的能力。每天向小鼠皮下施用不同浓度的测试制品(SEQ ID NO:45和44)、杜拉鲁肽或溶媒对照,持续七天。在整个研究中监测体重,并且图14示出了相对于第0天(刚好在第一剂量之前)体重随时间推移的变化百分比。在处理七天后,通过免疫亲和捕获-胰蛋白酶消化LC-MS/MS分析确定测试制品的循环浓度。监测选定胰蛋白酶肽,即ALV(ALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK)(SEQ ID NO:79)、HGE-1(HGEGTFTSDVSSYLEEQAQK)(SEQ ID NO:77)、HGE-2(HGEGTFTSDLSK)(SEQ ID NO:78)和TDT(TDTGVSLQTYDDLAK)(SEQ ID NO:80),它们分别位于HSA蛋白的N末端、GLP1肽或GLP1肽变体的N末端以及GDF15蛋白或GDF15蛋白变体的C末端附近。VVS肽(VVSVLTVLHQDWLNGK)(SEQ ID NO:82)位于杜拉鲁肽的Fc部分中。监测这些替代肽使得能够对GLP1-GDF15融合蛋白的每个区域(GLP1、HSA、GDF15)进行药代动力学评估。血浆药物浓度示于图15中。结果表明,重复施用SEQ ID NO:45和44导致饮食诱导的肥胖小鼠以浓度依赖性方式体重减轻。

[0337] 对GLP1-GDF15融合蛋白在非人灵长类中的食物摄取效果的评估。

[0338] 在自发肥胖的食蟹猴中测试GLP1-GDF15融合蛋白减少食物摄取的能力。受试者皮下施用不同浓度的测试制品或溶媒QW,持续4周的时间,该测试制品具有和不具有活性GLP1部分(分别为SEQ ID NO:44和83;SEQ ID NO:83,其包含融合到AP10接头的HSA肽,该接头融合到GDF15肽,先前公开于美国专利10,336,812中)。在给药之前和整个研究期间监测食物摄取。基线处和每次施用测试制品后食物摄取的3天变化百分比示于图16中。研究期间食蟹猴血浆中SEQ ID NO:44和83的浓度使用两种单独的免疫测定方法来确定,以检测“总”分子(HSA检测)和“活性”GLP1部分(N-末端GLP1肽检测)。血浆药物浓度示于图17和图18中。结果表明,施用SEQ ID NO:44和83减少了自发肥胖的非人灵长类的食物摄取。

[0339] 对在非人灵长类中21天剂量逐步增加后GLP1-GDF15融合蛋白的食物摄取和体重影响的评估。

[0340] 在自发肥胖的食蟹猴中测试GLP1-GDF15融合蛋白减少食物摄取并引起体重减轻的能力。受试者每三天皮下施用含有活性GDF15和GLP1、仅活性GDF15或仅活性GLP1部分(分别为SEQ ID NO:44、83、84;SEQ ID NO:84包含融合到AP5接头肽的GLP1肽,该AP5接头肽融合到HSA肽,该HSA肽融合到AP10接头肽,该AP10接头肽融合到具有I89R突变的GDF15肽;先前在美国专利10,336,812中公开了具有I89R突变的GDF15肽)的测试制品,持续21天的时间。第0天给予初始剂量0.7nmol/kg,并且在每次施用逐步增加至20nmol/kg。图19中示出了给药前、21天处理期间和测试制品冲洗期间的每日食物摄取。在整个研究中监测体重,并且图20示出了相对于基线体重随时间推移的变化百分比。研究期间食蟹猴血浆中测试制品的浓度使用两种单独的免疫测定方法来确定,以检测“总”分子(HSA检测;SEQ ID NOS:44、83、84)和“活性”GLP1部分(N-末端GLP1肽检测;仅针对SEQ ID NO:44和84)。血浆药物浓度示于图21和图22中。结果表明,重复施用SEQ ID NO:44、83、84导致自发肥胖的非人灵长类的食物摄取减少和随后的体重减轻。

[0341] 本领域的技术人员应当理解,在不脱离本发明的广义的发明构思的情况下,可对上述实施方案作出修改。因此,应当理解,本发明不局限于所公开的特定实施方案,但本发明旨在涵盖在本发明实质和范围内的修改,如本说明书所定义。

[0342] 本文引用的所有文献均以引用方式并入本文。

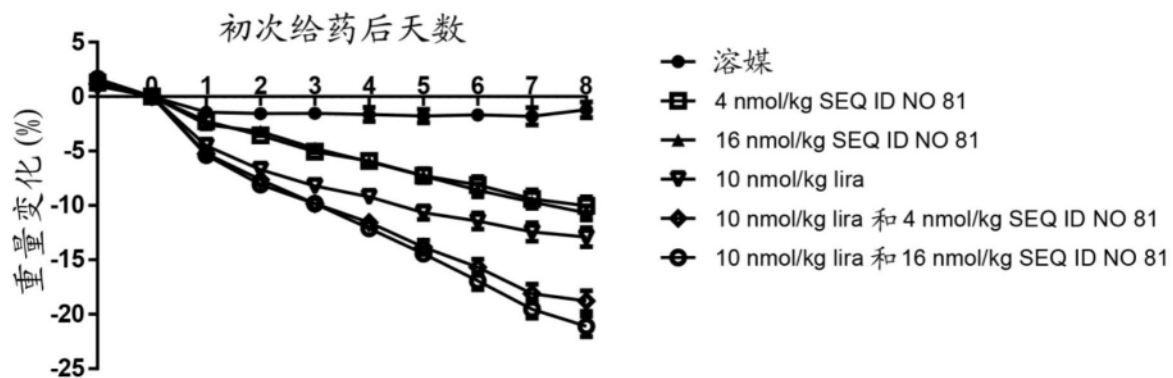


图1

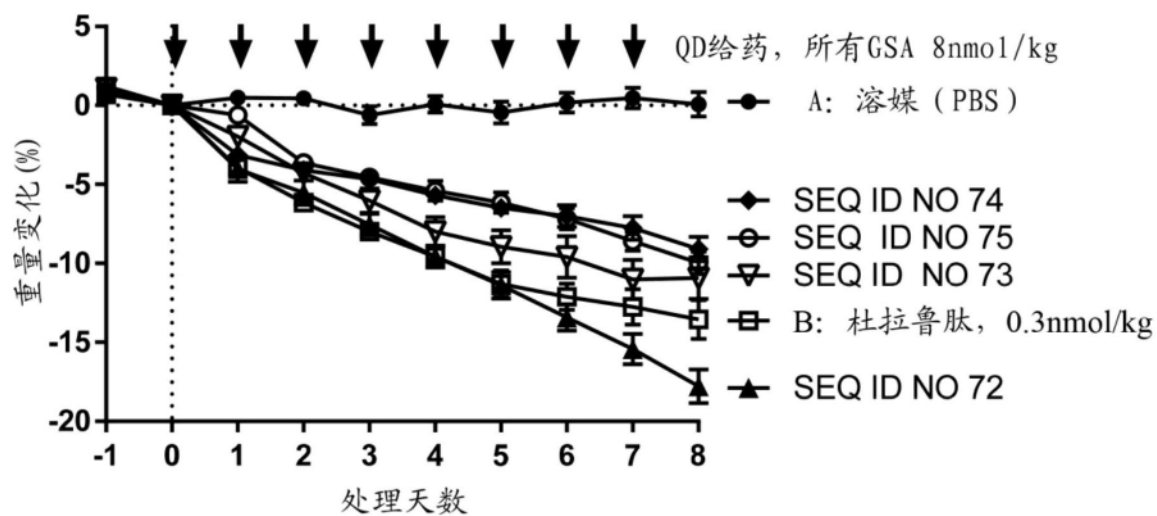


图2

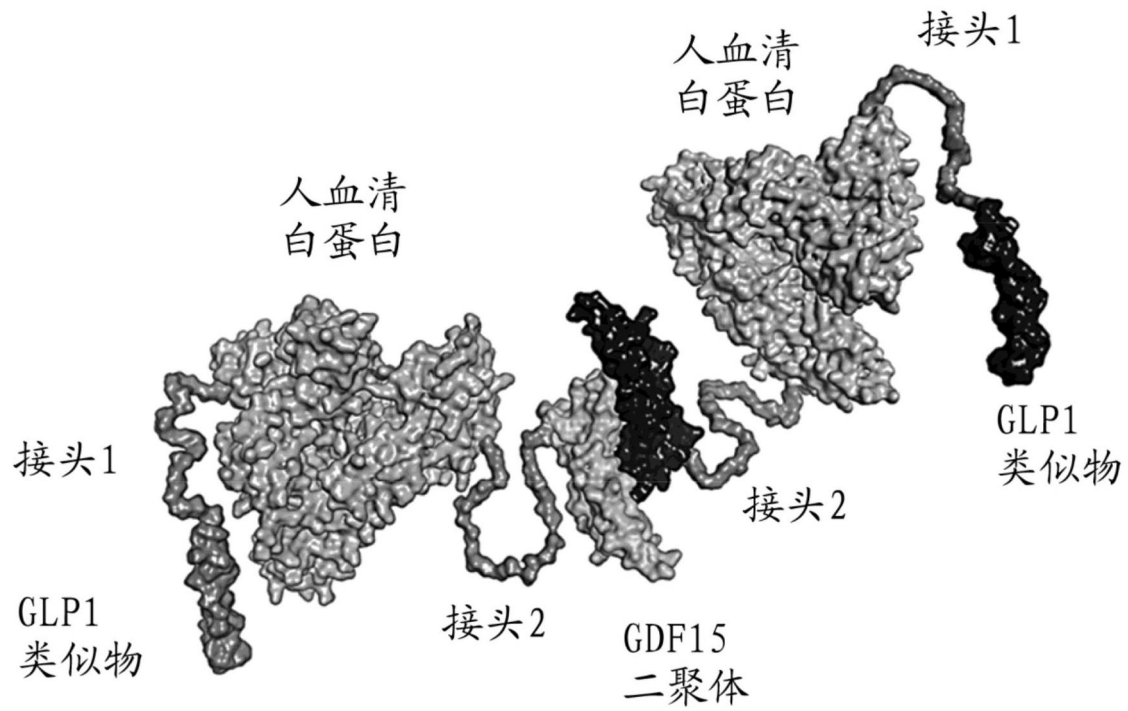


图3

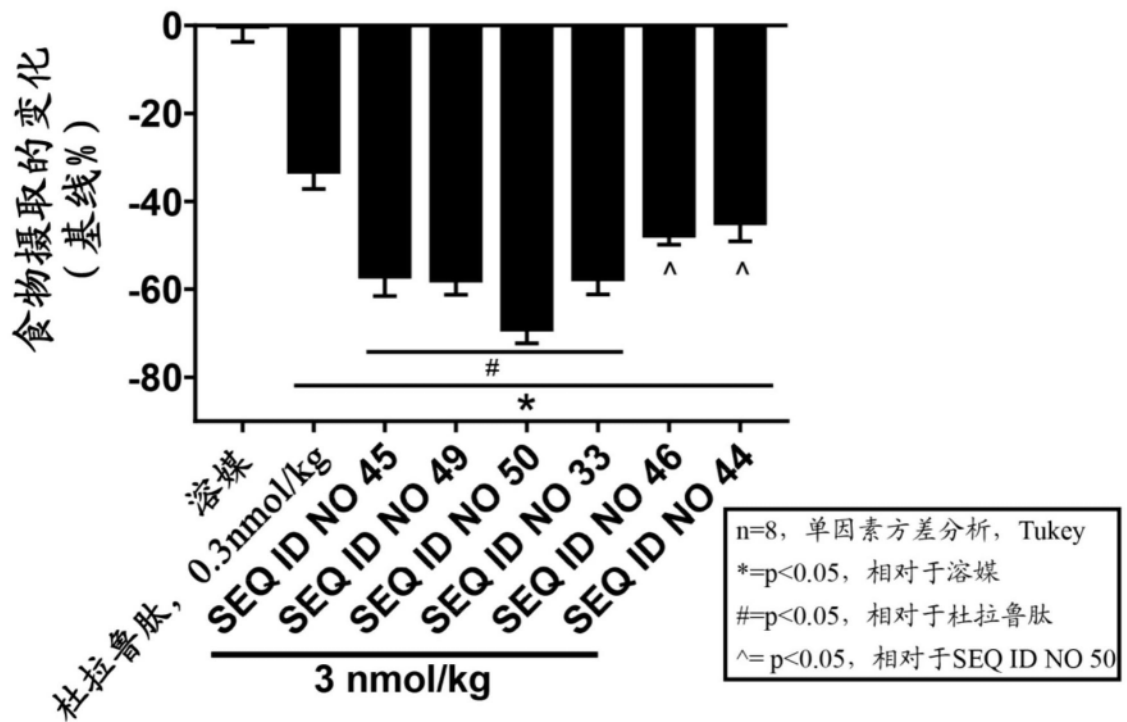


图4

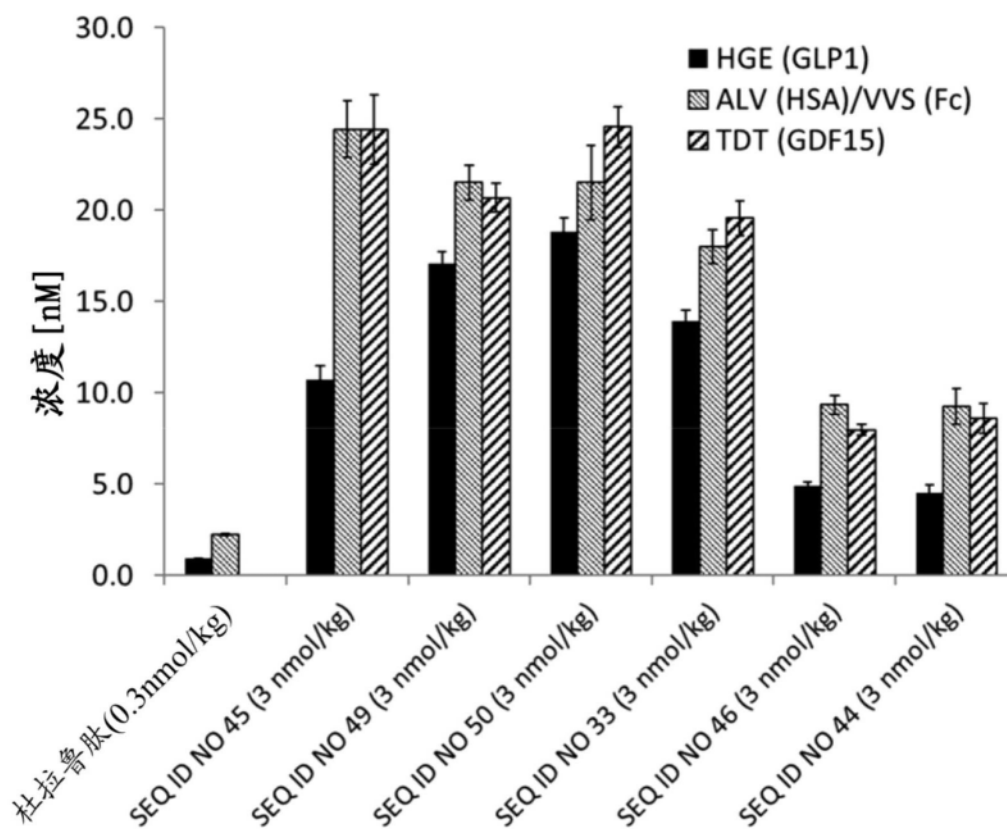


图5

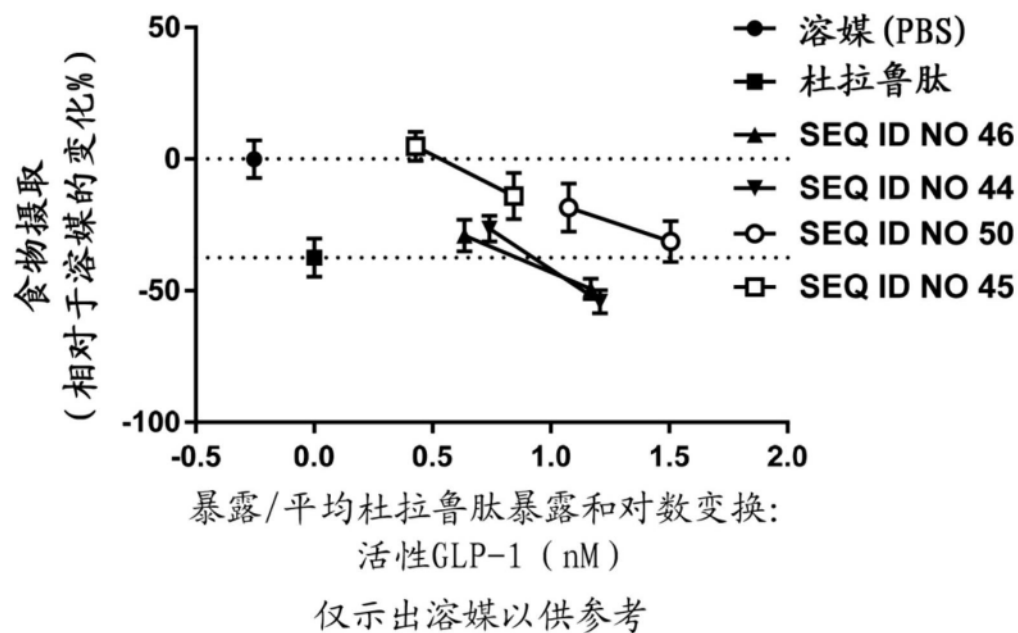


图6

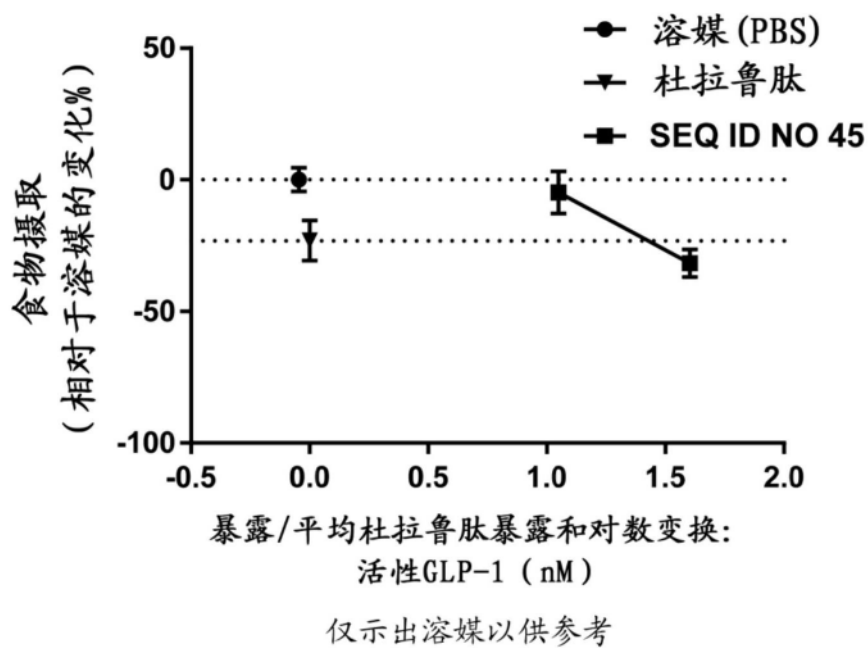


图7

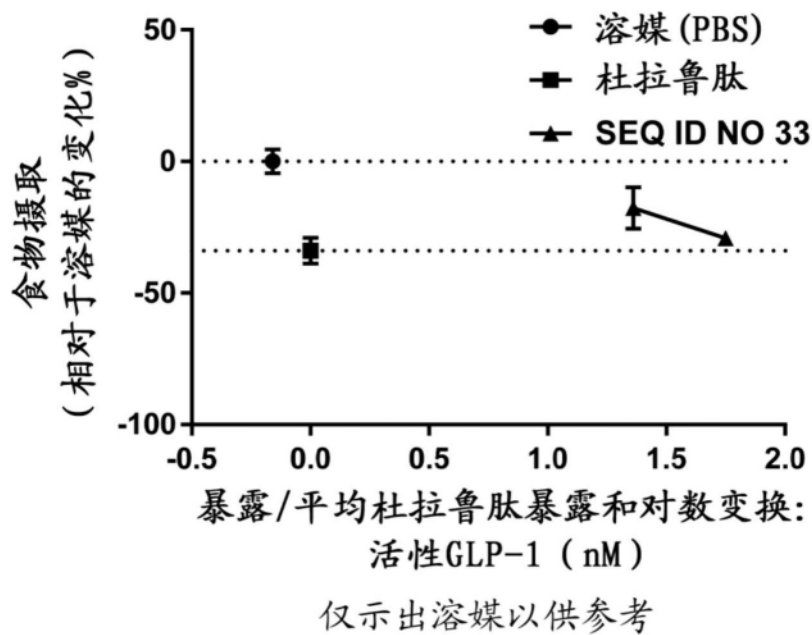


图8

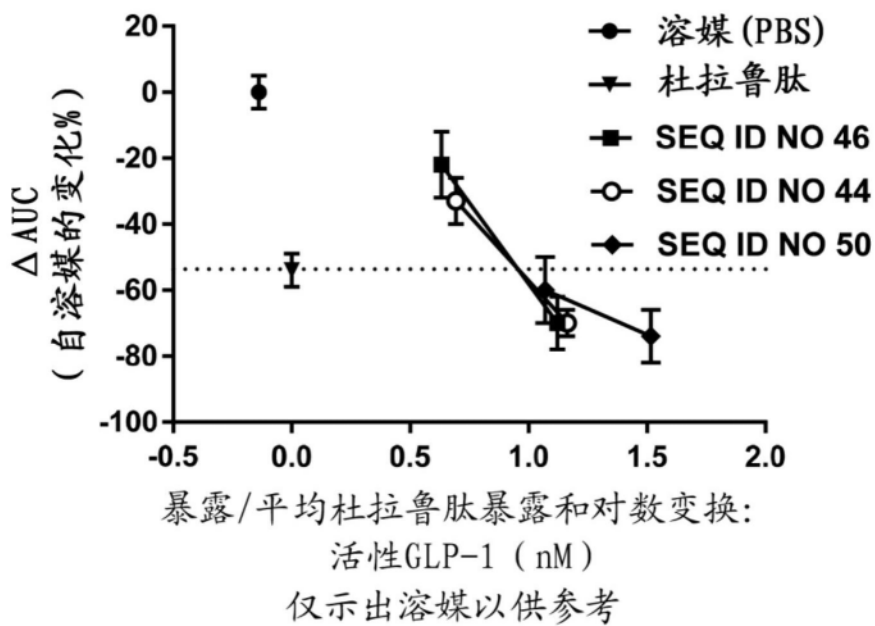


图9

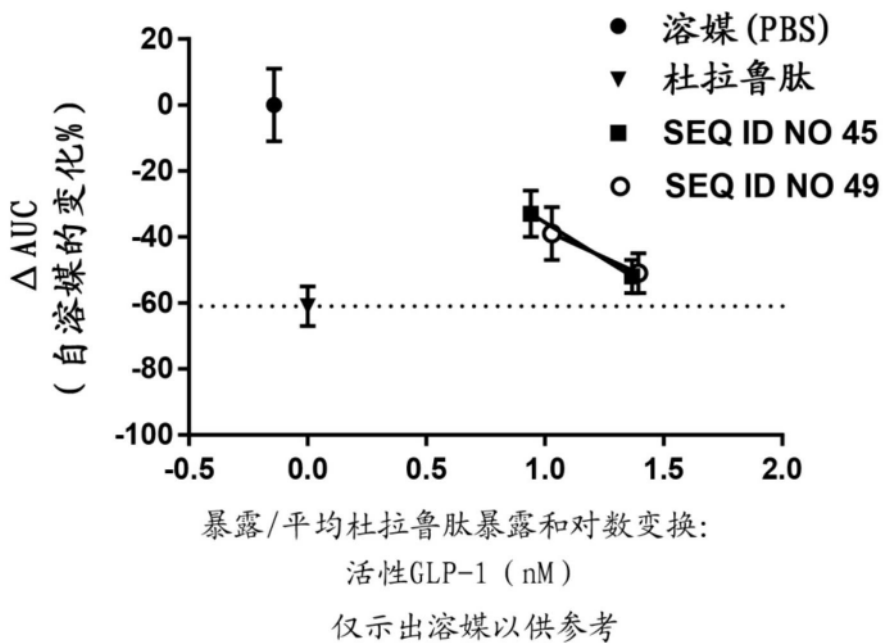


图10

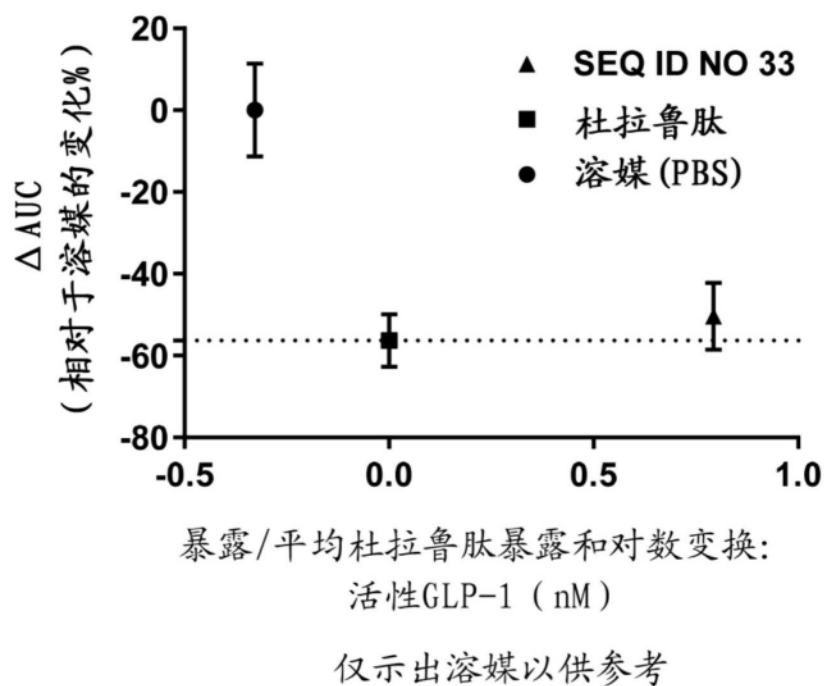


图11

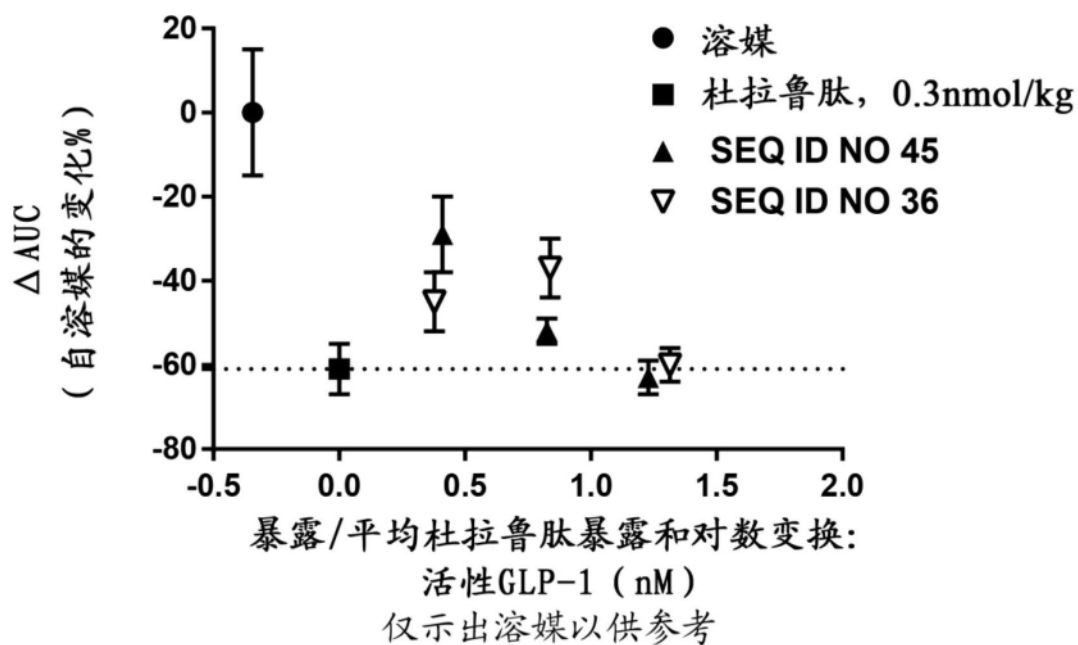


图12

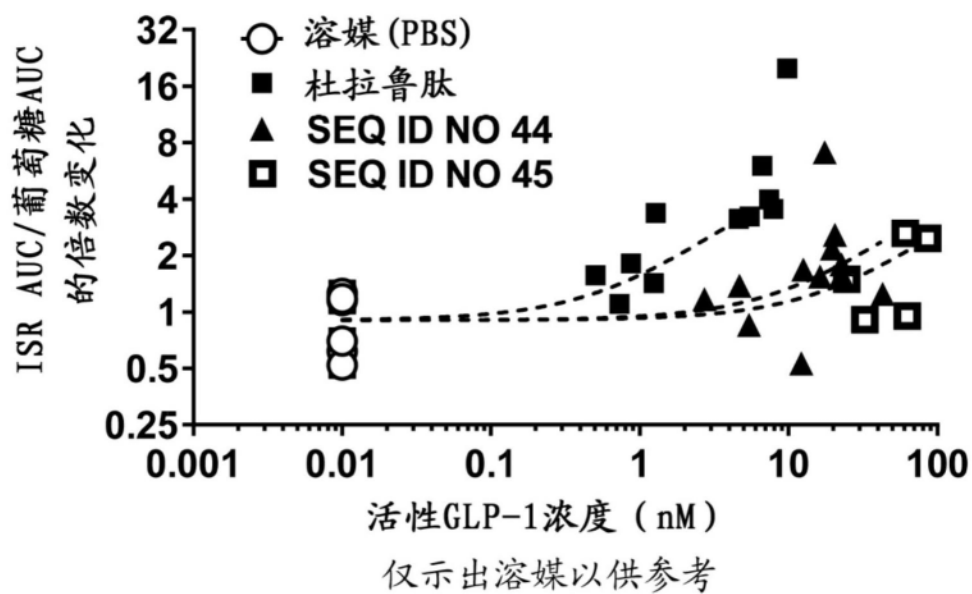


图13

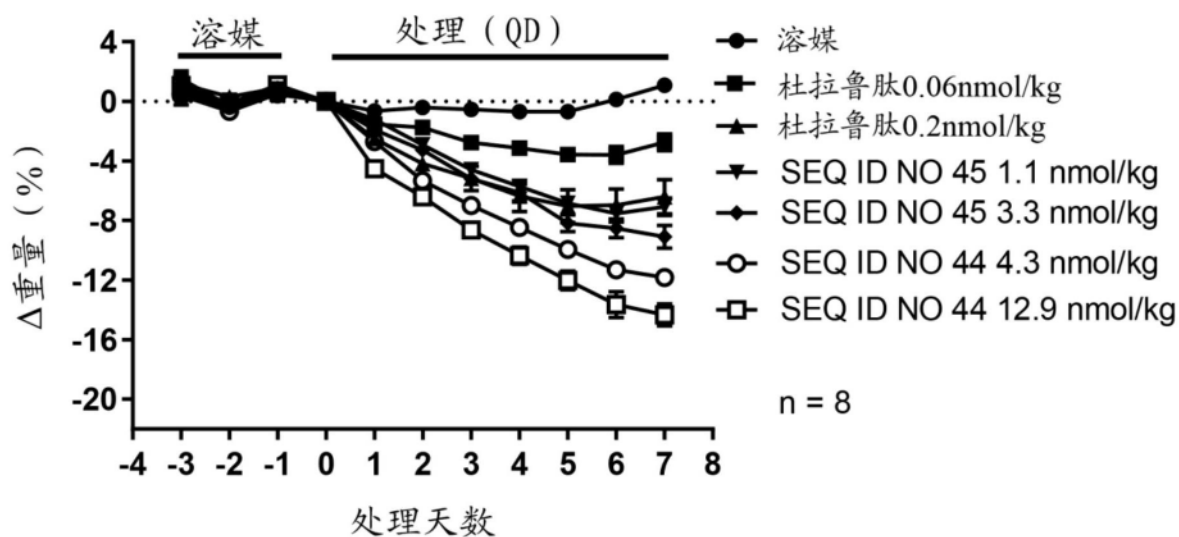


图14

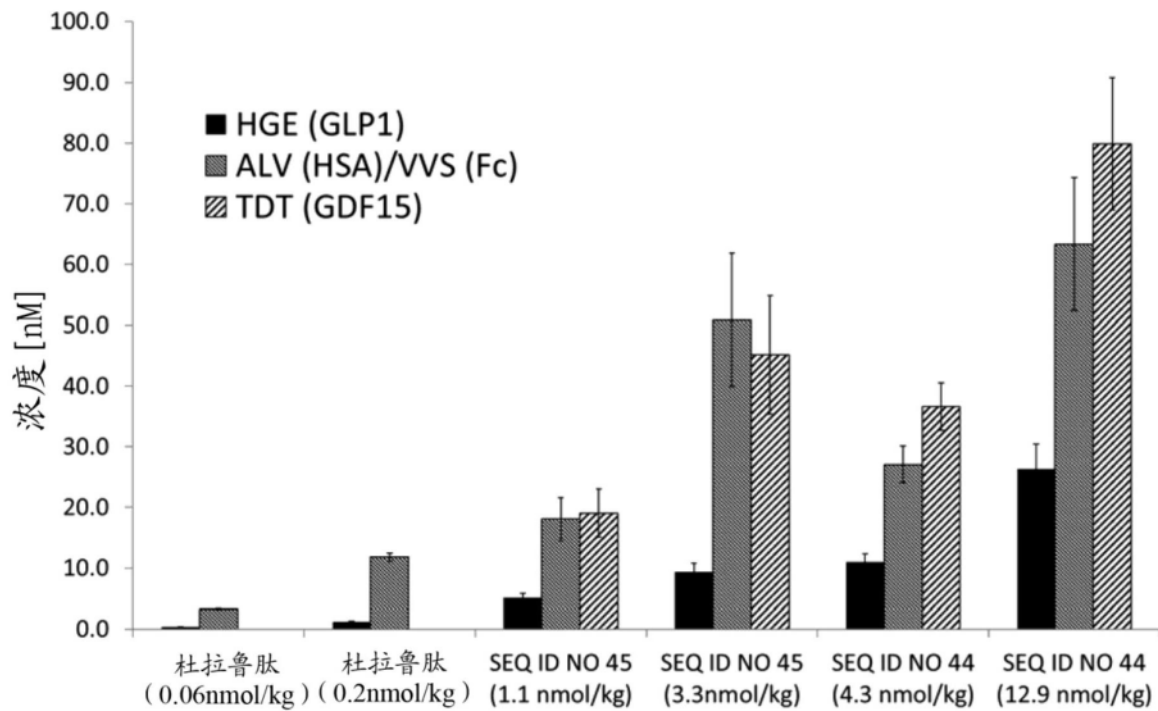


图15

给药后3天自基线
的平均F1%变化

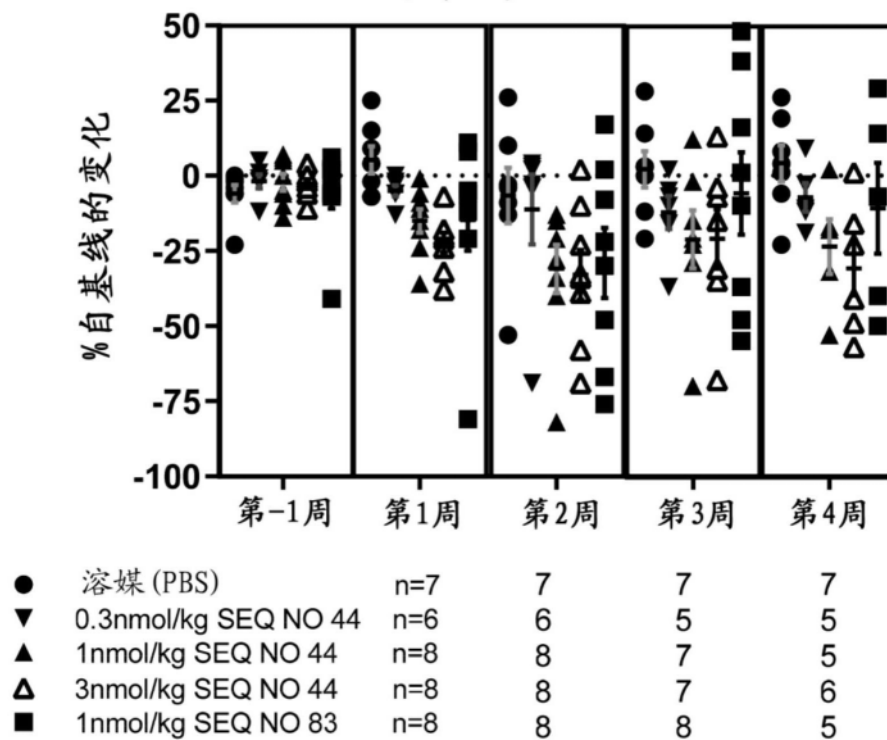


图16

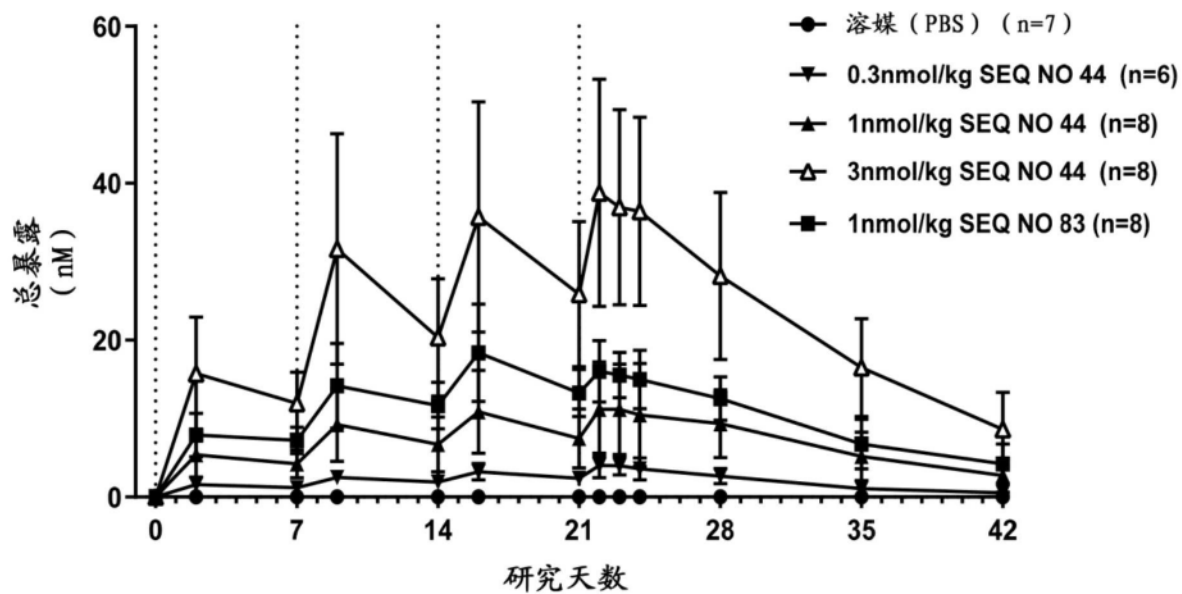


图17

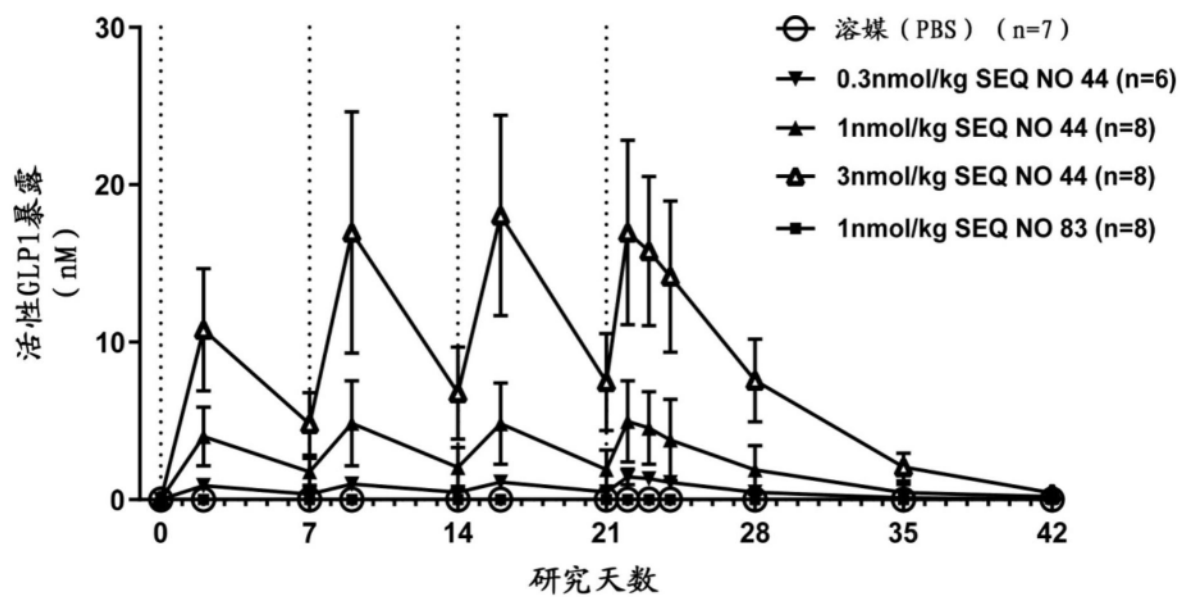


图18

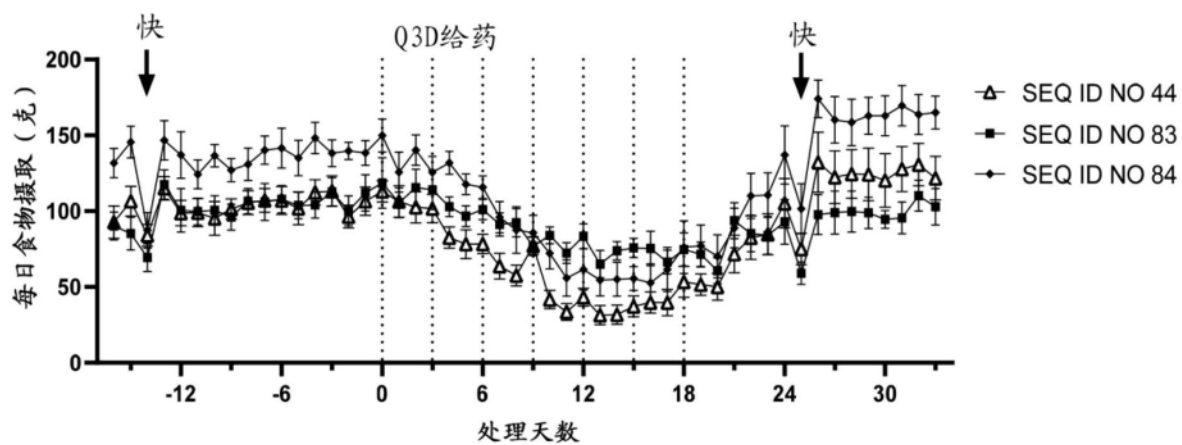


图19

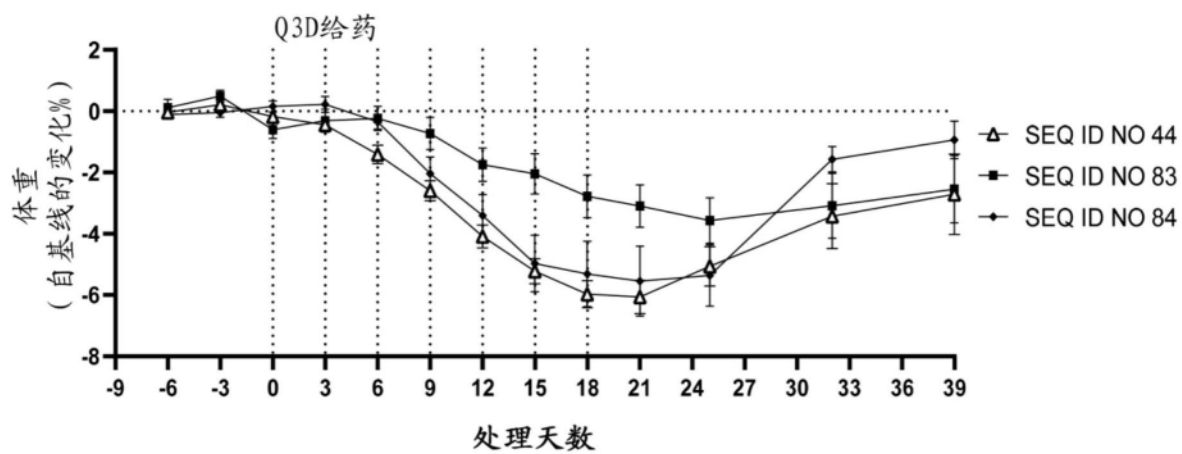


图20

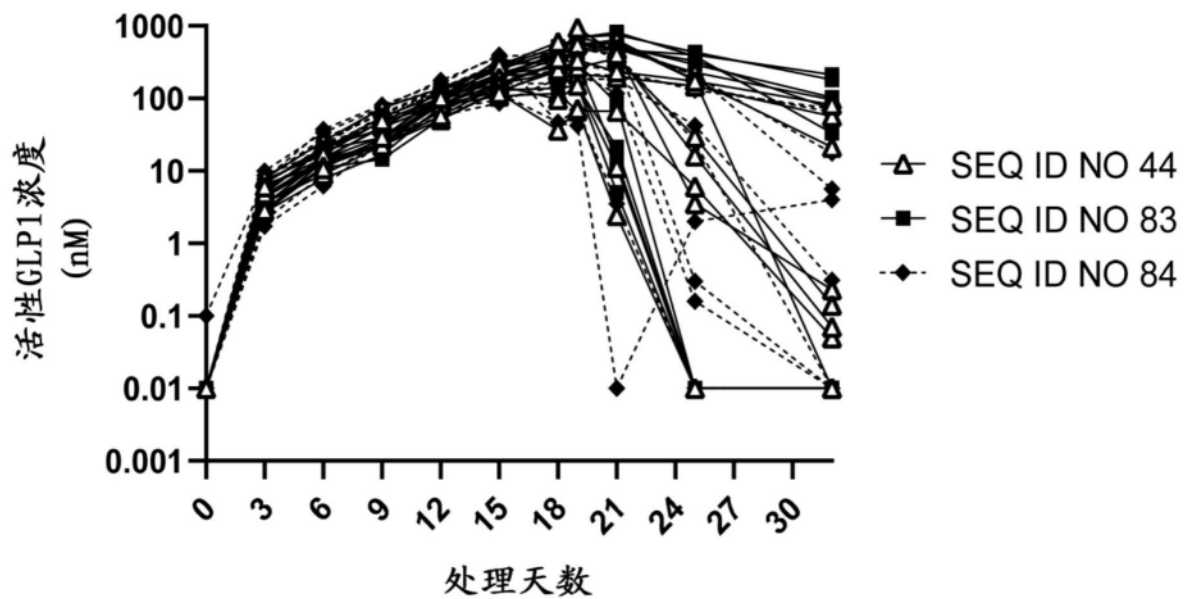


图21

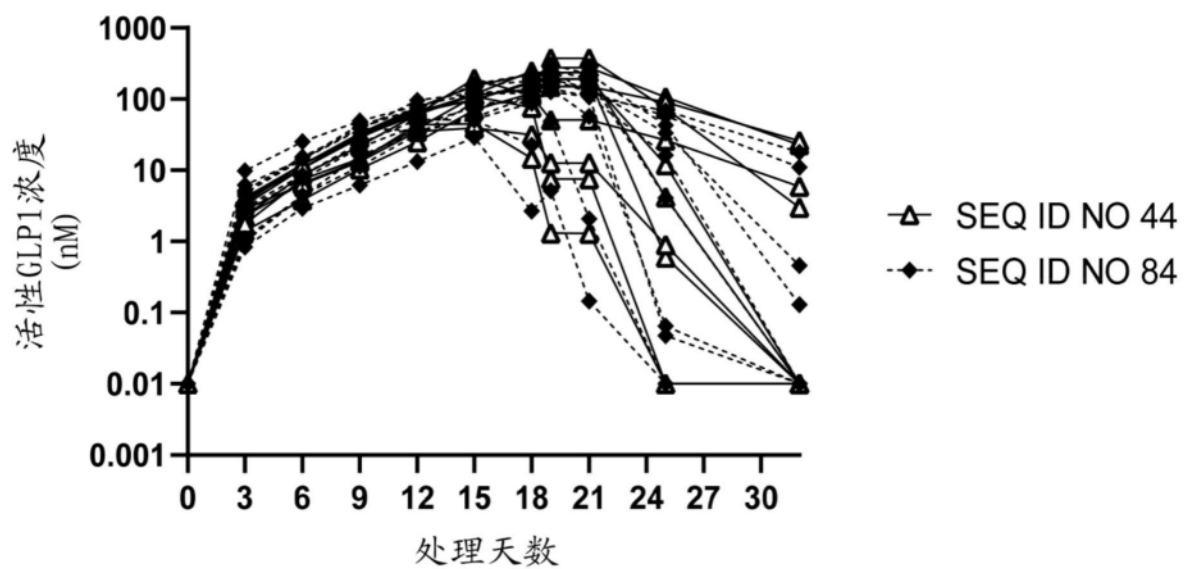


图22