



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113993993 A

(43) 申请公布日 2022.01.28

(21) 申请号 202080041580.2

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(22) 申请日 2020.04.03

代理人 董志勇

(30) 优先权数据

62/830,230 2019.04.05 US

62/983,142 2020.02.28 US

62/984,650 2020.03.03 US

(51) Int.Cl.

C12N 9/14 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/026643 2020.04.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/206302 EN 2020.10.08

(71) 申请人 耶鲁大学

地址 美国康涅狄格州

权利要求书10页 说明书62页

(72) 发明人 P·斯塔巴赫 D·布拉多克

序列表41页 附图31页

(54) 发明名称

ENPP1多肽及其使用方法

(57) 摘要

本公开内容包括具有改善的体内半衰期的ENPP1突变体多肽。

1. 一种ENPP1多肽融合体,其包括与免疫球蛋白的Fc区融合的ENPP1多肽,其中所述ENPP1多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T。

2. 根据权利要求1所述的多肽融合体,其中所述Fc区包括选自与SEQ ID NO:7有关的M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K和N1065F的至少一种突变。

3. 根据权利要求1所述的多肽融合体,其中所述Fc区包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、M883Y、M883Y/S885T/T887E和H1064K/N1065F的至少一种突变。

4. 根据权利要求1所述的多肽融合体,其中所述ENPP1多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N、K27T和V29N的至少一种突变。

5. 根据权利要求4所述的多肽融合体,其中所述ENPP1多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N/K27T和V29N的至少一种突变。

6. 根据权利要求1所述的多肽融合体,其中所述ENPP1多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的K369N和I371T的至少一种突变。

7. 根据权利要求6所述的多肽融合体,其中所述ENPP1多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变K369N/I371T。

8. 根据权利要求1所述的多肽融合体,其中所述ENPP1多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D和S766N的至少一种突变。

9. 根据权利要求8所述的多肽融合体,其中所述ENPP1多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N/V536T、P554L/R545T、E592N、E592N/R741D和S766N的至少一种突变。

10. 根据权利要求1所述的多肽融合体,其中所述ENPP1多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的E864N和L866T的至少一种突变。

11. 根据权利要求10所述的多肽融合体,其中所述ENPP1多肽至少包括与SEQ ID NO:7有关的突变E864N/L866T。

12. 根据权利要求1所述的多肽融合体,包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N、K27T、V29N、C25N/K27T、K369N、I371T、K369N/I371T、P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D、S766N、P534N/V536T、P554L/R545T、E592N/R741D、E864N、L866T、E864N/L866T、M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K、N1065F、M883Y/S885T/T887E、H1064K/N1065F的至少一种突变。

13. 根据权利要求1所述的多肽融合体,其中所述Fc区为IgG的。

14. 根据权利要求1所述的多肽融合体,其包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N、V536T、R545T、P554L、S766N和E592N的至少一种突变。

15. 根据权利要求1所述的多肽融合体,其包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N/Y536T、P554L/R545T和E592N的至少一种突变。

16. 根据权利要求1所述的多肽融合体,其包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、E864N/L866T、P534N/V536T/H1064K/N1065F、P554L/R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F和P534N/V536T/M883Y/S885T/T887E的至少一种突变。

17. 一种ENPP1多肽融合体,其包括ENPP1多肽和免疫球蛋白的Fc区,所述多肽融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、M883Y、S885T和T887E。

18. 一种ENPP1多肽融合体,其包括ENPP1多肽和免疫球蛋白的Fc区,所述多肽融合体包

括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。

19. 一种ENPP1多肽融合体,其包括ENPP1多肽和免疫球蛋白的Fc区,所述多肽融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、E592N、H1064K和N1065F。

20. 一种ENPP1突变体多肽,其包括SEQ ID NO:7的氨基酸23-849,其中所述突变体多肽包括突变I256T并进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N、V536T、P554L、R545T和E592N的突变。

21. 根据权利要求20所述的突变体多肽,其包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

22. 根据权利要求20-21的任一项所述的突变体多肽,其缺乏信号肽序列。

23. 根据权利要求20所述的突变体多肽,其中所述突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N/V536T、P554L/R545T和E592N的至少一种突变。

24. 根据权利要求21所述的突变体多肽,其包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、P534N/V536T/H1064K/N1065F、P554L/R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F和P534N/V536T/M883Y/S885T/T887E的突变。

25. 根据权利要求21所述的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的S885N突变。

26. 根据权利要求20所述的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的S766N突变。

27. 根据权利要求21所述的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变M883Y、S885T和T887E。

28. 根据权利要求21所述的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变P534N、V536T、H1064K和N1065F。

29. 根据权利要求20所述的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变P554L和R545T。

30. 根据权利要求21所述的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变S766N、H1064K和N1065F。

31. 根据权利要求21所述的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变E592N、H1064K和N1065F。

32. 根据权利要求21所述的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。

33. 根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体或根据权利要求20所述的突变体多肽,其由稳定转染人ST6 β -半乳糖苷 α -2,6-唾液酸转移酶(也称为ST6GAL1)的CHO细胞系表达。

34. 根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体或根据权利要求20所述的突变体多肽,其在补充了唾液酸和/或N-乙酰甘露糖胺(也称为1,3,4-O-Bu₃ManNAc)的细胞培养物中生长。

35. 一种在有需要的受试者中减少或预防病理性钙化进展的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体或根据权利要求20所述的突变体多肽。

36. 一种在有需要的受试者中减少或预防病理性骨化进展的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体或根据权利要求20所述的突变体多肽。

37. 一种在有需要的受试者中减少或预防软组织异位钙化进展的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体或根据权利要求20所述的突变体多肽。

38. 一种在有需要的受试者中治疗、逆转或预防后纵韧带骨化(OPLL) 进展的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体或根据权利要求20所述的突变体多肽。

39. 一种在有需要的受试者中治疗、恢复或预防低血磷性佝偻病进展的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体或根据权利要求20所述的突变体多肽。

40. 一种在被诊断患有选自以下至少一种疾病的受试者中减少或预防至少一种疾病进展的方法: 慢性肾病(CKD)、终末期肾病(ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病(CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化(OPLL)、低血磷性佝偻病、骨关节炎、衰老相关的动脉硬化、特发性婴儿动脉钙化(IIAC)、婴儿全身动脉钙化(GACI) 和动脉粥样硬化斑块钙化, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体或根据权利要求20所述的突变体多肽。

41. 一种在有需要的受试者中减少或预防衰老相关的动脉硬化进展的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体或根据权利要求20所述的突变体多肽。

42. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述病理性钙化选自特发性婴儿动脉钙化(IIAC) 和动脉粥样硬化斑块钙化。

43. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述病理性骨化选自后纵韧带骨化(OPLL)、低血磷性佝偻病和骨关节炎。

44. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述软组织钙化选自IIAC和骨关节炎。

45. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述软组织选自动脉粥样硬化斑块、肌肉动脉、关节、脊柱、关节软骨、椎盘软骨、血管和结缔组织。

46. 一种在焦磷酸盐(PPi) 水平低于PPi正常水平的受试者中提高PPi水平的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体的多肽或根据权利要求20所述的突变体多肽, 从而在进行所述施用后, 所述受试者中所述PPi的水平被升高至至少2 μ M的正常水平, 并被维持在大约相同水平下。

47. 一种在焦磷酸盐(PPi) 水平低于PPi正常水平的受试者中减少或预防病理性钙化或骨化进展的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体或根据权利要求20所述的突变体多肽, 从而减少所述受试者中的病理性钙化或骨化或预防所述受试者中的病理性钙化或骨化的进展。

48. 一种在有需要的受试者中治疗由细胞外焦磷酸盐(PPi) 浓度减少所表现出的ENPP1缺乏症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1、17、18和19的任一项所述的多肽融合体或根据权利要求20所述的突变体多肽, 从而升高所述受试者中所述PPi的水平。

49. 根据权利要求35-41和46-48的任一项所述的方法, 其中所述多肽融合体或突变体多肽是哺乳动物细胞中表达的ENPP1前体蛋白质的分泌产物, 其中所述ENPP1前体蛋白质包

括信号肽序列和ENPP1多肽,其中所述ENPP1前体蛋白质经过蛋白水解处理以产生所述ENPP1多肽。

50.根据权利要求49所述的方法,其中在所述ENPP1前体蛋白质中,所述信号肽序列与所述ENPP1多肽的N端缀合。

51.根据权利要求49所述的方法,其中所述信号肽序列选自ENPP1信号肽序列、ENPP2信号肽序列、ENPP7信号肽序列和ENPP5信号肽序列。

52.根据权利要求35-41和46-48的任一项所述的方法,其中急性或慢性地向所述受试者施用所述多肽融合体或突变体多肽。

53.根据权利要求35-41和46-48的任一项所述的方法,其中局部地、区域地、肠胃外地或全身地向所述受试者施用所述多肽融合体或突变体多肽。

54.根据权利要求35-41和46-48的任一项所述的方法,其中通过选自以下的至少一个途径向所述受试者施用所述多肽融合体或突变体多肽:皮下、口服、气雾剂、吸入、直肠、阴道、经皮肤、皮下、鼻内、颊、舌下、肠胃外、鞘内、胃内、眼、肺和局部。

55.根据权利要求35-41和46-48的任一项所述的方法,其中所述多肽融合体或突变体多肽作为药物组合物向受试者施用,所述药物组合物进一步包括至少一种药学上可接受的载体。

56.根据权利要求35-41和46-48的任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

57.根据权利要求56所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

58.一种ENPP1突变体多肽,其包含一个或多个与SEQ ID NO:7有关的氨基酸取代,其中所述多肽包括相对于SEQ ID NO:7在位置256处的氨基酸取代。

59.根据权利要求58所述的ENPP1突变体多肽,其中所述ENPP1突变体多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:7的氨基酸23-849具有至少90%同一性。

60.一种ENPP1突变体多肽,其包括SEQ ID NO:7的氨基酸23-849,

其中相对于SEQ ID NO:7的氨基酸23-849存在不超过十(10)个氨基酸取代,并且其中所述ENPP1突变体多肽包括相对于SEQ ID NO:7在位置256处的氨基酸取代。

61.根据权利要求58-60的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述氨基酸取代是相对于SEQ ID NO:7在位置256处苏氨酸(T)取代异亮氨酸(I)。

62.根据权利要求58-60的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述氨基酸取代是相对于SEQ ID NO:7在位置256处丝氨酸(S)取代异亮氨酸(I)。

63.一种ENPP1突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7的氨基酸23-849具有至少90%同一性的氨基酸序列,

其中所述突变体多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T,并且

其中所述突变体多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N、V536T、P554L、R545T和E592N的突变。

64.根据权利要求63所述的ENPP1突变体多肽,其中所述突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N/V536T、P554L/R545T和E592N的至少一个氨基酸取代。

65.根据权利要求63所述的ENPP1突变体多肽,其中所述突变体多肽包括氨基酸取代V29N。

66.根据权利要求58-61的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述突变体多肽包括

SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

67. 一种ENPP1突变体多肽融合体,其包括根据权利要求58-66的任一项所述的ENPP1突变体多肽和异源蛋白。

68. 根据权利要求67所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述异源蛋白是FcRn结合结构域。

69. 根据权利要求67-68的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述异源蛋白在所述融合体的所述ENPP1突变体多肽的羧基末端。

70. 根据权利要求67-68的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述异源蛋白在所述融合体的所述ENPP1突变体多肽的氨基末端。

71. 根据权利要求68-70的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述FcRn结合结构域是白蛋白多肽。

72. 根据权利要求68-70的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述FcRn结合结构域是免疫球蛋白分子的Fc部分。

73. 根据权利要求72的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述免疫球蛋白分子是IgG1。

74. 根据权利要求68-73的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述FcRn结合结构域相对于野生型FcRn结合结构域包括一个或多个氨基酸取代。

75. 根据权利要求68-70和72-74的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述FcRn结合结构域是人IgG1分子的Fc部分并且包括以下氨基酸取代:每个相对于SEQ ID NO:7的M883Y、S885T和T887E。

76. 根据权利要求68-70和72-75的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括一个或多个以下取代:每个与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、P534N/V536T/H1064K/N1066、P554L/R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F或P534N/V536T/M883Y/S885T/T887E。

77. 根据权利要求68-70和72-76的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括与SEQ ID NO:7有关的S885N突变。

78. 根据权利要求68-70和72-77的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括与SEQ ID NO:7有关的S766N突变。

79. 根据权利要求68-70和72-78的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变M883Y、S885T和T887E。

80. 根据权利要求68-70和72-79的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变P534N、V536T、H1064K和N1065F。

81. 根据权利要求68-70和72-80的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变P554L和R545T。

82. 根据权利要求68-70和72-81的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变S766N、H1064K和N1065F。

83. 根据权利要求68-70和72-82的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变E592N、H1064K和N1065F。

84. 根据权利要求68-70和72-83的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。

85. 根据权利要求68-70和72-84的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述Fc区包括选自与SEQ ID NO:7有关的M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K和N1065F的至少一种突变。

86. 根据权利要求68-70和72-85的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述Fc区包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、M883Y、M883Y/S885T/T887E和H1064K/N1065F的至少一种突变。

87. 根据权利要求68-70和72-86的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体或根据权利要求58-65的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述融合体包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N、K27T和V29N的至少一种突变。

88. 根据权利要求68-70和72-87的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体或根据权利要求58-65和85的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述融合体或所述ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N/K27T和V29N的至少一种突变。

89. 根据权利要求68-70和72-88的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体或根据权利要求58-65和87-88的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述融合体或所述ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的K369N和I371T的至少一种突变。

90. 根据权利要求68-70和72-89的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体或权利要求58-65和87-89的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述融合体或ENPP1突变体多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变K369N/I371T。

91. 根据权利要求68-70和72-90的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体或根据权利要求58-65和87-90的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D和S766N的至少一种突变。

92. 根据权利要求68-70和72-91的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体或根据权利要求58-65和87-91的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N/V536T、P554L/R545T、E592N、E592N/R741D和S766N的至少一种突变。

93. 根据权利要求68-70和72-92的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体或根据权利要求58-65和87-92的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N、K27T、V29N、C25N/K27T、K369N、I371T、K369N/I371T、P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D、S766N、P534N/V536T、P554L/R545T、E592N/R741D、E864N、L866T、E864N/L866T、M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K、N1065F、M883Y/S885T/T887E、H1064K/N1065F的至少一种突变。

94. 根据权利要求68-70和72-93的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体或根据权利要求58-65和87-93的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N、V536T、R545T、P554L、S766N和E592N的至少一种突变。

95. 根据权利要求68-70和72-94的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体或根据权利要求58-65和87-94的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N/V536T、P554L/R545T和E592N的至少一种突

变。

96. 根据权利要求68-70和72-95的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体或根据权利要求58-65和87-95的任一项所述的ENPP1突变体多肽,其中所述融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、E864N/L866T、P534N/V536T/H1064K/N1065F、P554L/R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F和P534N/V536T/M883Y/S885T/T887E的至少一种突变。

97. 根据权利要求68-70和72-96的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、M883Y、S885T和T887E。

98. 根据权利要求68-70和72-96的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。

99. 根据权利要求68-70和72-96的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体,其中所述融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、E592N、H1064K和N1065F。

100. 根据权利要求67-99的任一项所述的融合体,其包括接头氨基酸序列。

101. 根据权利要求100所述的融合体,其中所述接头氨基酸序列连接所述融合体的所述ENPP1突变体多肽部分和所述异源蛋白。

102. 根据权利要求100-101的任一项所述的融合体,其中所述接头氨基酸序列包括SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9。

103. 一种核酸,其编码根据权利要求58-66的任一项所述的ENPP1突变体多肽或根据权利要求67-102的任一项所述的融合体。

104. 一种载体,其包括根据权利要求103所述的核酸。

105. 一种表达载体,其包括根据权利要求103所述的核酸。

106. 细胞或多种细胞,每种细胞包括根据权利要求103所述的核酸、根据权利要求104所述的载体和/或根据权利要求105所述的表达载体。

107. 根据权利要求106所述的细胞或多种细胞,其中所述细胞是CHO细胞和/或NS0细胞。

108. 根据权利要求107所述的细胞或多种细胞,其中用人ST6B-半乳糖苷 α -2,6-唾液酸转移酶稳定转染所述CHO细胞。

109. 一种产生ENPP1突变体多肽或融合体的方法,所述方法包括在适合于由所述一种或多种细胞表达所述ENPP1突变体多肽或融合体的条件下培养根据权利要求106-108的任一项所述的细胞或多种细胞。

110. 根据权利要求109所述的方法,其中在补充有唾液酸和/或N-乙酰甘露糖胺的培养基中培养所述细胞。

111. 根据权利要求109-110的任一项所述的方法,进一步包括从所述细胞、多种细胞或其中培养所述细胞或多种细胞的培养基中纯化所述ENPP1突变体多肽或融合体。

112. 通过根据权利要求111所述的方法纯化的ENPP1突变体多肽或融合体。

113. 一种缀合物,其包括(i)根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽和/或根据权利要求67-102和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽融合体和(ii)异源部分。

114. 根据权利要求113所述的缀合物,其中所述异源部分是聚乙二醇。

115. 药物组合物,其包括根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽、根据权利要求67-102和112的任一项所述的融合体、根据权利要求103所述的核酸、根据权利要求104所述的载体、根据权利要求105所述的表达载体和/或根据权利要求113-114的任一项所述的缀合物和药学上可接受的载体。

116. 一种在有需要的受试者中减少或预防病理性钙化进展的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的:

- (a) 根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽;
- (b) 根据权利要求67-102和112的任一项所述的融合体;
- (c) 根据权利要求113-114的任一项所述的缀合物;和/或
- (d) 根据权利要求115所述的药物组合物,

从而减少或预防所述受试者的病理性钙化的进展。

117. 一种在有需要的受试者中减少或预防病理性骨化进展的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的:

- (a) 根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽;
- (b) 根据权利要求67-102和112的任一项所述的融合体;
- (c) 根据权利要求113-114的任一项所述的缀合物;和/或
- (d) 根据权利要求115所述的药物组合物,

从而减少或预防所述受试者的病理性骨化的进展。

118. 一种在有需要的受试者中减少或预防软组织异位钙化进展的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的:

- (a) 根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽;
- (b) 根据权利要求67-102和112的任一项所述的融合体;
- (c) 根据权利要求113-114的任一项所述的缀合物;和/或
- (d) 根据权利要求115所述的药物组合物,

从而减少或预防所述受试者的软组织异位钙化的进展。

119. 一种在有需要的受试者中治疗、逆转或预防后纵韧带骨化(OPLL)进展的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的:

- (a) 根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽;
- (b) 根据权利要求67-102和112的任一项所述的融合体;
- (c) 根据权利要求113-114的任一项所述的缀合物;和/或
- (d) 根据权利要求115所述的药物组合物,

从而减少、逆转或预防所述受试者的后纵韧带骨化(OPLL)。

120. 一种在有需要的受试者中治疗、恢复或预防低血磷性佝偻病进展的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的:

- (a) 根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽;
- (b) 根据权利要求67-102和112的任一项所述的融合体;
- (c) 根据权利要求113-114的任一项所述的缀合物;和/或
- (d) 根据权利要求115所述的药物组合物,

从而减少、逆转或预防所述受试者的低血磷性佝偻病的进展。

121. 一种在被诊断患有选自以下至少一种疾病的受试者中减少或预防至少一种疾病进展的方法：慢性肾病 (CKD)、终末期肾病 (ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病 (CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化 (OPLL)、低血磷性佝偻病、骨关节炎、衰老相关的动脉硬化、特发性婴儿动脉钙化 (IIAC)、婴儿全身动脉钙化 (GACI) 和动脉粥样硬化斑块钙化，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的：

- (a) 根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽；
- (b) 根据权利要求67-102和112的任一项所述的融合体；
- (c) 根据权利要求113-114的任一项所述的缀合物；和/或
- (d) 根据权利要求115所述的药物组合物，

从而减少或预防所述疾病的进展。

122. 一种在有需要的受试者中减少或预防衰老相关的动脉硬化进展的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的：

- (a) 根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽；
- (b) 根据权利要求67-102和112的任一项所述的融合体；
- (c) 根据权利要求113-114的任一项所述的缀合物；和/或
- (d) 根据权利要求115所述的药物组合物，

从而减少或预防所述受试者的衰老相关的动脉硬化的进展。

123. 一种在焦磷酸盐 (PPi) 水平低于PPi正常水平的受试者中提高PPi水平的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的：

- (a) 根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽；
- (b) 根据权利要求67-102和112的任一项所述的融合体；
- (c) 根据权利要求113-114的任一项所述的缀合物；和/或
- (d) 根据权利要求115所述的药物组合物，

从而在进行所述施用后，所述受试者的所述PPi水平被升高至至少 $2\mu\text{M}$ 的正常水平，并被维持在大约相同水平下。

124. 一种在焦磷酸盐 (PPi) 水平低于PPi正常水平的受试者中减少或预防病理性钙化或骨化进展的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的：

- (a) 根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽；
- (b) 根据权利要求67-102和112的任一项所述的融合体；
- (c) 根据权利要求113-114的任一项所述的缀合物；和/或
- (d) 根据权利要求115所述的药物组合物，

从而减少所述受试者的病理性钙化或骨化或预防所述受试者的病理性钙化或骨化的进展。

125. 一种在有需要的受试者中治疗由细胞外焦磷酸盐 (PPi) 浓度降低表现出的ENPP1缺乏症的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的：

- (a) 根据权利要求58-66、87-96和112的任一项所述的ENPP1突变体多肽；
- (b) 根据权利要求67-102和112的任一项所述的融合体；
- (c) 根据权利要求113-114的任一项所述的缀合物；和/或
- (d) 根据权利要求115所述的药物组合物，

从而升高所述受试者的所述PPi水平。

126. 根据权利要求116-125的任一项所述的方法,其中急性或慢性地向所述受试者施用所述突变体多肽、融合体、缀合物或药物组合物。

127. 根据权利要求116-126的任一项所述的方法,其中局部地、区域地、肠胃外地或全身地向所述受试者施用突变体多肽、融合体、缀合物或药物组合物。

128. 根据权利要求116-127的任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

ENPP1多肽及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C.§119(e),本申请要求于2019年4月5日提交的美国临时专利申请号62/830,230、于2020年2月28日提交的美国临时专利申请号62/983,142和于2020年3月3日提交的美国临时专利申请号62/984,650的优先权,在此通过引用将所有这些申请的全部内容并入本文。

背景技术

[0003] 人外核苷酸焦磷酸酶(ENPP)蛋白家族包含七种水解磷酸二酯键的细胞外糖基化蛋白质(即ENPP1-ENPP7)。ENPP是细胞表面酶,但ENPP2除外,ENPP2输出到质膜,但被弗林蛋白酶切割并释放到细胞外液中。ENPP酶具有高度的序列和结构同源性,但显示出涵盖核苷酸到脂质的多样化底物特异性。

[0004] ENPP1(也称为PC-1)是一种2型细胞外膜结合糖蛋白,其位于成骨细胞和软骨细胞的矿物质沉积基质囊泡上,并且将细胞外核苷酸(主要是ATP)水解为一磷酸腺苷(AMP)和无机焦磷酸盐(PPi)。PPi作为异位组织矿化的有效抑制剂起作用;其通过与新生的羟基磷灰石(HA)晶体结合,从而预防这些晶体的未来生长。ENPP1通过核苷三磷酸(NTP)的水解产生PPi,进行性强直性蛋白(ANK)将细胞内PPi转运到细胞外空间,并且组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)通过将PPi直接水解为Pi去除PPi。

[0005] 异位组织矿化与多种人类疾病相关,所述疾病包括慢性关节疾病和急性致命的新生儿综合征。为预防有害的组织钙化,必须使促进和抑制组织矿化的因素保持紧密的平衡。细胞外无机焦磷酸盐(PPi)和磷酸盐(Pi)的平衡是异位组织矿化的重要调节剂。三种细胞外酶TNAP、ANK和ENPP1的活性分别紧密控制哺乳动物中Pi和PPi的浓度在1-3mM和2-3 μ M。PPi是生物矿化的调节剂,其抑制由无定形磷酸钙形成碱性磷酸钙。

[0006] 已显示ENPP1多肽有效治疗某些异位组织钙化疾病。已显示ENPP1-Fc降低GACI(婴儿全身动脉钙化)小鼠模型中的全身动脉钙化,GACI是婴儿中发生的并且涉及广泛动脉钙化的严重疾病(Albright等人,2015,Nature Comm.10006)。还已经描述了ENPP1的融合蛋白治疗严重组织钙化疾病(PCT申请公开号W02014/126965和W02016/187408),并且已经描述了包括骨靶向结构域的ENPP1的融合蛋白治疗GACI(PCT申请公开号W0/2012/125182)。

[0007] 在本领域中需要可以用于体内治疗某些钙化或骨化疾病的多肽。这样的多肽应具有体内半衰期,其允许将多肽方便且有效地给药于有需要的受试者。本发明满足了这一需求。

发明内容

[0008] 本公开内容提供了包括与免疫球蛋白的Fc区融合的ENPP1多肽的ENPP1多肽融合体,其中该多肽融合体包括如本文所述的至少一个点突变。本公开内容进一步提供了ENPP1突变体多肽,其包括如本文其他地方所述的至少一个点突变。本公开内容进一步提供了多肽融合体和/或突变体多肽,它们中的任一种由稳定转染了人ST6 β -半乳糖苷 α -2,6-唾液酸

转移酶 (ST6GAL1) 的 CHO 细胞系表达。本公开内容进一步提供了多肽融合体和/或突变体多肽, 它们中的任一种在补充有唾液酸和/或 N-乙酰甘露糖胺 (1,3,4-O-Bu3ManNAc) 的细胞培养物中生长。

[0009] 本公开内容进一步提供了在有需要的受试者中减少和/或预防病理性钙化进展的方法, 该方法包括向该受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽融合体和/或突变体多肽。

[0010] 本公开内容进一步提供了在有需要的受试者中减少和/或预防病理性骨化进展的方法, 该方法包括向该受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽融合体和/或突变体多肽。

[0011] 本公开内容进一步提供了在有需要的受试者中减少和/或预防软组织的异位钙化进展的方法, 该方法包括向该受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽融合体和/或突变体多肽。

[0012] 本公开内容进一步提供了在有需要的受试者中治疗、逆转和/或预防后纵韧带骨化 (OPLL) 进展的方法, 该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽融合体和/或突变体多肽。

[0013] 本公开内容进一步提供了在有需要的受试者中治疗、恢复 (revert) 和/或预防低血磷性佝偻病进展的方法, 该方法包括向该受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽融合体和/或突变体多肽。

[0014] 本公开内容进一步提供了在被诊断患有至少一种选自以下疾病的受试者中减少和/或预防至少一种疾病进展的方法: 慢性肾病 (CKD)、终末期肾病 (ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病 (CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化 (OPLL)、低血磷性佝偻病、骨关节炎、衰老相关的动脉硬化、特发性婴儿动脉钙化 (IIAC)、婴儿全身动脉钙化 (GACI) 以及动脉粥样硬化斑块钙化, 该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽融合体和/或突变体多肽。

[0015] 本公开内容进一步提供了在有需要的受试者中减少和/或预防衰老相关的动脉硬化进展的方法, 该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽融合体和/或突变体多肽。

[0016] 本公开内容进一步提供了在焦磷酸盐 (PPi) 水平低于 PPi 正常水平的受试者中提高 PPi 水平的方法, 该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽融合体和/或突变体多肽, 由此在施用后, 受试者中 PPi 的水平升高至至少 2 μ M 的正常水平, 并维持在大约相同的水平下。

[0017] 本公开内容进一步提供了在焦磷酸盐 (PPi) 水平低于 PPi 正常水平的受试者中减少和/或预防病理性钙化或骨化进展的方法, 该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽融合体和/或突变体多肽, 由此减少了受试者中的病理性钙化或骨化和/或预防受试者中的病理性钙化或骨化的进展。

[0018] 本公开内容进一步提供了治疗在有需要的受试者中由细胞外焦磷酸盐 (PPi) 浓度减少所表现出的 ENPP1 缺乏症的方法, 该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽融合体和/或突变体多肽, 从而升高受试者中的 PPi 的水平。

附图说明

[0019] 当结合附图阅读时,将更好地理解本公开内容的说明性实施方式的以下详细描述。为了说明本公开内容,在附图中示出了示例性实施方式。然而,应当理解,本公开内容不限于附图中所示实施方式的精确设置和手段。

[0020] 图1示出了本公开内容中考虑的ENPP1多肽(SEQ ID NO:7)。点突变参考SEQ ID NO:7鉴定,所述SEQ ID NO:7也可以称为“母本化合物”、“母本多肽”或“构建体#770”。标记方案参考SEQ ID NO:7所示的编号方案来鉴定氨基酸编号和残基,然后是已取代SEQ ID NO:7中的残基的氨基酸。例如,突变C25N指的是天冬酰胺(Asn或N)取代在SEQ ID NO:7的第25位的半胱氨酸(Cys或C)。图例:(A) =来自hENPP7的N端信号序列;黑色的所有区域(B)均代表来自没有正式结构域定义的hENPP1中的序列;(C) =hENPP1的生长调节素B结构域;(D) =hENPP1的催化结构域;(E) =hENPP1的内切核酸酶结构域;(F) =来自Invivogen质粒pFUSE-hIgG1-Fc的Fc结构域;(G) =hENPP1和Fc结构域之间的四氨基酸接头;(H) =已知的糖基化残基。

[0021] 图2A示出了母本构建体#770的结构域结构。人ENPP1的2个生长调节素B结构域、催化结构域和内切核酸酶结构域在N端与人ENPP7的信号序列融合,在c端与人IgG1的Fc结构域融合。图2B示出了母本构建体#770的药代动力学分析。在皮下注射后17小时血浆活性初始升高后,血浆活性急剧下降,计算的半衰期为34小时。图2C示出了工程改造到母本构建体#770中的另外N-糖基化共有序列的非限制性作用。AUC的药代动力学图(柱,左侧y轴)和以小时为单位的半衰期(线,右侧y轴)表明与母本构建体#770相比,具有I256T突变的克隆7在AUC和半衰期方面具有明显的增加。图2D示出了消化的肽片段²⁴¹SGTFFWPGSDVEINGTFFPDIYK²⁶²的质谱,显示了与ENPP1-Fc克隆19,而不是母本构建体#770相关的大量唾液酸糖肽(sialoglycopeptide)峰(底部)。图2E示出了以下发现,Michaelis-Menten动力学分析表明,与黑色的母本构建体#770相比,两个含I256T的克隆(黄色的克隆17,红色的克隆19),在两种不同酶浓度下,在不同底物浓度下的酶的速度几乎相同。

[0022] 图3示出了柱状图,总结了在小鼠(n=3-5)中单次注射某些ENPP1多肽后血浆磷酸二酯酶活性(如使用胸苷5'-单磷酸对硝基苯酯测定法或pNP-TMP测定法测量的)。在25小时后,所有多肽中的磷酸二酯酶活性均保持升高,用构建体#981观察到了在75小时时的更高活性(感兴趣的构建体列于本文其他地方包括的表中)。

[0023] 图4示出了构建体#981的体内药代动力学数据,如使用pNP-TMP测定法测量的,以记录皮下注射该构建物后小鼠血浆样品中的酶活性。基于单次皮下推注5只小鼠,半衰期估计为122小时左右。达到半衰期的单独实验在本文其他地方描述。

[0024] 图5示出了构建体#1014、在补充有1,3,4-O-Bu₃ManNAc的培养基中生长的CHO细胞中制备的构建体#1014(在图中表示为“1014A”)和构建体#981的选择的体内药代动力学数据。如本文其他地方所述,构建体的半衰期可以从等式1中导出。

[0025] 图6示出了ENPP1中三个已知的糖基化位点,它们均位于随机的螺旋区:(A) =Asn;(B) =N-乙酰氨基葡萄糖。一个另外的糖基化位点(通过表面糖蛋白动力学测量所鉴定)位于α-螺旋中并以红色标记。在PDB不稳定区域中存在一个共有的NLT(Asn Leu Thr),尚不知其是糖基化的。在hENPP1中发现了另外四个共有序列,其糖基化状态未知。钙原子(C);2个锌原子(D);ATP分子(E)。

[0026] 图7A示出了人ENPP1的某些结构域,这些结构域具有已知的导致人类疾病“婴儿全身动脉钙化”(GACI)的功能失去突变。在某些实施方式中,不将糖基化位点引入临近具有已知的导致GACI的功能失去突变的区域(如图7A所示)。

[0027] 图7B示出了ENPP1的晶体结构,具有其中突出标记了已知的导致GACI的功能失去突变的残基(并标有*)。(B)中的残基位于催化结构域中,并对应于T238A。如图6中:钙原子(C);2个锌原子(D);ATP分子(E)。

[0028] 图8A-8D示出了来自ENPP1多肽的高通量TMP-pNP(胸苷单磷酸对硝基苯酯)测定的针对磷酸二酯酶活性的选择结果。这是一种高通量测定,被发明人设计为快速筛选引入构建体#770中的糖基化同种型。该图说明了设计和执行能够快速评估母本多肽——构建体#770——突变体形式的生物学功效的高通量筛选。(H)中的构建体编号表示引入突变之前的原始WT克隆。(*)中的构建体编号显示具有可能的功能获得突变的克隆。

[0029] 图9A是示出人IgG1的Fc结构域的带状图。将该结构域融合到ENPP1的C端部分以提高功效。引入Fc结构域中的突变以增强FcRn的pH-依赖性再循环。(A) = 消除酸性依赖性结合的位点。(B) = 增强结合的位点。(C) = 半胱氨酸二硫键。品红 = 已知的糖基化位点。图9B显示了已知增强FcRn的pH-依赖性再循环的人IgG1的Fc结构域的突变。

[0030] 图10包括图和表,其示出了糖基化对ENPP1多肽的PK(根据半衰期,以小时计)和生物利用度的影响。除了构建体#922的I256T突变,所有突变的PK与构建体#CC07(770B)中的PK相当。在ENPP3中等效的糖基化位点之后建模这种突变(位于催化结构域的插入环中)。进一步地,构建体#951的PK值与构建体#CC07的PK值相似,但在用ST6GAL1稳定转染的细胞系中生长的构建体#951(构建体#951-ST)显示出改善的PK和生物利用度。包含I256T突变的构建体#922的生物利用度得以改善。构建体#930与构建体#CC07相比,具有相似的半衰期,但更低的生物利用度。相比之下,构建体#1020具有比构建体#CC07更高的生物利用度。在表中给出了PK和生物利用度数据,如图4、5和13所示确定并使用等式1计算。

[0031] 图11包括图和表,其示出糖基化和H1064K/N1065F Fc突变对ENPP1多肽的半衰期(PK,以小时计)和生物利用度(AUC)的影响。所有含H1064/N1065的构建体均显示出相比构建体#770B改善的半衰期和AUC值。值得注意的是,构建体#1048和#1051对应于两个不同的克隆中的相同的cDNA,这说明本文提供的PK/AUC分析的可重复性。构建体#1064也在稳定转染ST6GAL1(构建体#1064-ST)的细胞系中生长。构建体#1057也在稳定转染ST6GAL1(“-ST”)的细胞系中生长(构建体#1057-ST),并在稳定转染ST6GAL1且补充了1,3,4-O-Bu₃-ManNAc的(“-A”)的细胞系中生长(构建体#1057-ST-A)。构建体#1089与构建体#1014相同,但增加了突变以消除潜在的胰蛋白酶切割位点。构建体#1014也在稳定转染ST6GAL1的细胞系中生长,但在这种情况下PK和生物利用度没有改善。在表中给出了PK和生物利用度数据,如图4、图5和图13所示确定并使用等式1计算。

[0032] 图12包括图和表,其示出了糖基化和M883Y/S885T/T887E Fc突变对ENPP1多肽的PK(根据半衰期,以小时计)和生物利用度的影响。构建体#1030的AUC低于其他构建体,这可能是由于S766N突变。当在稳定转染ST6GAL1的细胞系中生长时,构建体#981、#1028和#1101显示PK和AUC值二者的增加。构建体#1101具有改善的PK和AUG值。PK和生物利用度数据在表中给出,如图4、图5和图13所示确定并使用等式1计算。

[0033] 图13包括一组图,其示出了在稳定转染人 α -2,6-ST的CHO细胞中表达构建体以产

生具有同时拥有 α -2,3和 α -2,6键的末端唾液酸残基的重组生物制剂的影响。这些细胞称为ST6GAL1细胞或ST细胞(表示为“-ST”)。该图还示出了在存在唾液酸或称为1,3,4-O-Bu₃-ManNAc(表示为“-A”)的高通量唾液酸前体的情况下,在ST6GAL1细胞中生长构建体的影响。在表中给出了PK和生物利用度数据,如图4、图5和图13所示确定并使用等式1计算。

[0034] 图14A示出了与母本克隆770和含I256T的克隆7相比,含有Fc-HR突变(克隆9、10、11、12和15)和Fc-MST突变(克隆8、13、14、16和17)的克隆的药代动力学分析。曲线下面积(左侧y轴)由柱表示,以小时为单位的半衰期(右侧y轴)由线表示。尽管与克隆16和17(线)相比,克隆7的半衰期仅适度增加,但由于其注射后更大的初始活性,其具有几乎不明确的AUC(柱)。图14B示出了由曲线下面积的斜率表示的生物可用性。仅含有I256T突变的克隆7最初在血浆中非常活跃,但会迅速减少,AUC为红色。仅含有Fc MST突变的克隆14-ST最初不如克隆7活跃,但具有较长的半衰期,其由浅斜率(灰色AUC)指示。将两个突变组合为一个克隆,即AUC为黄色的克隆19-ST,产生的酶具有更高的初始活性和更长的半衰期。图14C示出了在未修饰的CHO细胞或过表达 α -2,6-唾液酸转移酶(α -2,6-ST)的CHO细胞或过表达 α -2,6-ST联合1,3,4-O-Bu₃ManNAc补充的CHO细胞中生长的克隆的AUC(柱,左轴)和以小时为单位的半衰期(线,右轴)。在所有情况下,添加 α -2,6-ST(克隆1、2、9、10、14、15、17和18)都增加了克隆的半衰期和AUC。利用过表达 α -2,6-ST的CHO细胞,和过表达 α -2,6-ST联合1,3,4-O-Bu₃ManNAc补充的CHO细胞的克隆9(3个左侧箭头)的AUC和半衰期都增加。与克隆7相比,克隆19(3个右侧箭头)也具有与克隆9相似的与1,3,4-O-Bu₃ManNAc补充相关的半衰期和AUC的增加。图14D显示了以下发现:在单独或稳定转染人 α -2,6-ST或 α -2,6-ST和唾液酸前体1,3,4-O-Bu₃ManNAc的组合的CHO K1细胞中生长的克隆9的具有脉冲安培检测(HPAE-PAD)的阴离子交换色谱法显示出利用每次治疗N-乙酰神经氨酸含量的百分比逐渐增加。图14E示出了与在单独CHO细胞(标记为9)或过表达 α -2,6-ST的CHO细胞(标记为9(ST))或过表达 α -2,6-ST联合1,3,4-O-Bu₃ManNAc补充的CHO细胞(标记为9(ST)A)中生长的克隆9相比,在单独的CHO细胞中生长的母本构建体#770(标记为770)的AUC药代动力学分析。克隆9含有Fc-HN突变,与母本克隆770相比,其提供半衰期和AUC的轻度增加。然而,当克隆9在过表达 α -2,6-ST或 α -2,6-ST联合1,3,4-O-Bu₃ManNAc补充的CHO细胞中生长时,其表现出逐渐增大的AUC和半衰期。

[0035] 图15A示出了与含Fc-MST/I256T的克隆17-ST、19-ST和19-ST-A相比,含Fc-MST的克隆14-ST的AUC药代动力学分析。含Fc-MST的克隆的AUC可以通过I256T突变进一步增强,并且在1,3,4-O-Bu₃ManNAc前体存在下生长时增加甚至更多。图15B示出了与克隆19-ST-A相比,母本克隆770的AUC药代动力学。当同时含有Fc-MST和I256T突变的克隆19在过表达 α -2,6-ST并补充有1,3,4-O-Bu₃ManNAc的CHO细胞中生长时,其生物利用度增加了近18倍。图15C示出了以下发现:N-聚糖分型(profiling)的MALDI-TOF/TOF分析揭示当基于含有至少一个用于转移唾液酸的半乳糖的结构进行计算时,与母本克隆770(78.4%)相比,克隆19-ST-A中的含唾液酸的%聚糖(99.2%)更高。图15D示出了在以0.3mg/kg的母本克隆770(红色方块)或优化的ENPP1-Fc克隆19-ST(红色圆圈)的单次给药后的药效动力学影响,如通过在Enpp1^{asj/asj}小鼠中PPi的产生测量的(左侧y-轴)。正常小鼠(灰色阴影)中PPi的生理水平介于1.5和2.5 μ m的PPi之间,而Enpp1^{asj/asj}小鼠的PPi具有几乎无法检测到的含量。克隆770的单次给药恢复PPi的生理水平,其恢复到89小时前的基线,而克隆19-ST可保持接近生理

水平长达 (out to) 263小时。与PPi生成相关的误差条看起来比与酶活性%相关的误差条 (右侧y轴) 大得多 (比较红色圆圈与黑色圆圈)。

[0036] 图16A-16B示出了ENPP1的结构域和引入母本多肽 (SEQ ID NO:7) 中的选择的点突变。该图鉴定了引入到SEQ ID NO:7中的具体点突变。已被稳定转染到稳定转染人 α -2,6-ST的CHO细胞中的构建体用“ST”指代。在表中给出了PK和生物利用度数据,如图4、图5和图13所示确定并使用等式1计算。

[0037] 图17示出了通过信号序列 (N端区域) 区域突变分类的本公开内容的某些构建体的生物利用度 (如曲线下面积或AUC)。

[0038] 图18示出了通过内切核酸酶区域突变分类的本公开内容的某些构建体的生物利用度 (如曲线下面积或AUC)。

[0039] 图19A包括示出用质粒cDNA共转染ENPP1-Fc和hST6GAL1二者的稳定CHO细胞亚克隆的图像,其中通过多聚甲醛固定的细胞使用兔抗hST6GAL1抗体 (R&D Systems目录号AF5924),然后是驴多克隆山羊IgG Alexa Fluor594 (Abcam Ab150140) 免疫荧光筛选 α -2,6-唾液酸转移酶的表达。用相同抗体通过蛋白质印迹也呈阳性的那些细胞克隆观察到特征性高尔基体定位。图19B示出使用与图19A相同的一抗的代表性蛋白质印迹证明了大约48kD处的单条带,其表明本研究中的一些CHO细胞亚克隆在不同强度下表达 α -2,6-唾液酸转移酶。第一条泳道是未转染的CHO细胞裂解物,作为阴性对照。接下来的3个泳道是未修饰的母本质粒770的3个独特的亚克隆,标记为A、B和C。其他泳道是文中用于克隆1、2、10、14和18的亚克隆选择。“X”代表本文未进一步使用的构建体的亚克隆。

具体实施方式

[0040] 在一方面,本公开内容涉及与本领域已知的ENPP1-Fc多肽相比,某些ENPP1-Fc衍生物具有改善的体内半衰期的发现。

[0041] 在一非限制性方面,促进糖基化以保护ENPP1-Fc多肽免于降解。这是通过在ENPP1的三维模型的指导下将另外的N-聚糖共有序列引入预测的三级结构的外表面上来实现的。

[0042] 在另一非限制性方面,通过突变Fc结构域以增强融合蛋白对新生儿受体 (FcRn) 的亲合力,增加了pH依赖性FcRn介导的细胞再循环。

[0043] 在另一非限制性方面,通过在用人ST6 β -半乳糖苷 α -2,6-唾液酸转移酶 (也称为ST6GAL1) 稳定转染的CHO细胞系中表达ENPP1-Fc来增强融合蛋白的唾液酸化。

[0044] 在另一非限制性方面,通过向细胞培养基中补充N-乙酰甘露糖胺 (也称为1,3,4-O-Bu3ManNAc),增强了唾液酸封端,N-乙酰甘露糖胺是唾液酸的“高通量”前体。

[0045] 在某些实施方式中,通过在用人 α -2,6-唾液酸转移酶稳定转染的CHO细胞中表达生物制剂来增强蛋白质唾液酸化,当在皮下给药时,实质上改善了ENPP1-Fc的生物利用度 (C_{max})。在其他实施方式中,通过操纵Fc结构域增加pH依赖性FcRn介导的细胞再循环导致体内生物半衰期的改善。在仍其他实施方式中,结合用人 α -2,6-唾液酸转移酶稳定转染的CHO细胞并使细胞在N-乙酰甘露糖胺中生长导致半衰期和/或生物暴露 (AUC) 的明显增加。在仍其他实施方式中,将本文所述的两种或更多种方法组合成单个构建体导致半衰期和/或生物暴露 (AUC) 的明显增加。

[0046] 在某些实施方式中,与本领域中其他ENPP1-Fc多肽相比,本公开内容的多肽被更

高度地糖基化。在其他实施方式中,与本领域中其他ENPP1-Fc多肽相比,本公开内容的多肽具有对新生儿孤儿受体(FcRn)更高的亲和力。在仍其他实施方式中,与本领域中其他ENPP1-Fc多肽相比,本公开内容的多肽具有更高的体内半衰期。在仍其他实施方式中,改变了母本多肽(构建体#770)的动力学性质,使得该变化代表酶速率常数中的“功能获得”改变。在仍其他实施方式中,某些位点定向诱变不会显著改变母本多肽(构建体#770)的动力学特性,因此所得突变酶具有与母本多肽基本相同的酶速率常数。在仍其他实施方式中,母本多肽中的某些点突变导致在突变残基处引入聚糖,增加突变体多肽的生物暴露。在仍其他非限制性实施方式中,突变体多肽的生物暴露增加是由于突变体多肽的生物吸收和/或循环增加。

[0047] 在某些实施方式中,与包含SEQ ID NO:7的氨基酸23-849或由其组成的可溶性ENPP1多肽相比,本文所述的任何ENPP1突变体多肽保留ENPP1催化活性。在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽保留包含SEQ ID NO:7的氨基酸23-849或由其组成的可溶性ENPP1多肽的至少约30%(例如,至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%或100%)的催化活性。在某些实施方式中,本文所述的任一种ENPP1突变体多肽比包含SEQ ID NO:7的氨基酸23-849或由其组成的可溶性ENPP1多肽具有更高的催化活性。

[0048] 在某些实施方式中,与包含SEQ ID NO:7的氨基酸23-849或由其组成的可溶性ENPP1多肽相比,本文所述的任何ENPP1突变体多肽在哺乳动物中具有改善的药代动力学和/或生物利用度性质。在某些实施方式中,任何ENPP1突变体多肽在哺乳动物中具有相比于包含SEQ ID NO:7的氨基酸23-849或由其组成的可溶性ENPP1多肽的循环半衰期至少30%(例如,至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、100%、120%、140%、160%、180%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或大于500%)的循环半衰期。在某些实施方式中,本文所述的任一种ENPP1突变体多肽的AUC大于包含SEQ ID NO:7的氨基酸23-849或由其组成的可溶性ENPP1多肽的AUC。

[0049] 在某些实施方式中,与本领域中描述的ENPP-1多肽相比,本公开内容的ENPP1-Fc多肽的体内半衰期至少高约1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18或20倍。在其他实施方式中,与本领域中其他ENPP1-Fc多肽相比,本公开内容的多肽以更低的剂量和/或更低的频率施用于受试者。在仍其他实施方式中,本公开内容的多肽每月一次、每月两次、每月三次和/或每月四次施用于受试者。在仍其他实施方式中,与本领域的其他ENPP1-Fc多肽相比,本公开内容的多肽的较低频率施用导致更好的患者依从性和/或增加的功效。

[0050] 在某些实施方式中,本公开内容的ENPP1-Fc多肽可用于提高焦磷酸盐(PPi)水平低于正常水平(约2 μ M)的受试者中的PPi水平。在其他实施方式中,本公开内容的ENPP1-Fc多肽可用于减少或预防PPi水平低于正常水平的受试者中的病理性钙化或骨化进展。在仍其他实施方式中,本公开内容的ENPP1-Fc多肽可用于治疗受试者中由细胞外PPi浓度减少所表现出的ENPP1缺乏症。

[0051] 在某些实施方式中,在施用第一剂量的本公开内容的构建体后实现的血浆PPi的稳态水平维持至少2天、至少4天、至少一周或至少一个月的时间段。

[0052] 在某些实施方式中,在两天后、四天后、一周后或一个月后的适当时间间隔后,向

受试者施用第二剂量的本公开内容的构建体,使得血浆PPi的稳态水平维持在恒定或稳态水平,并且不返回受试者在施用第一剂量的本公开内容的构建体之前的PPi的较低水平。

[0053] 不希望被理论所束缚,相信将血浆PPi的稳态浓度维持在正常水平减少和/或预防受试者的病理性钙化和病理性骨化的进展。

[0054] 某些ENPP1多肽、其突变体或其突变体片段先前已在国际PCT申请公开号W02012/125182、W0 2014/126965、W0 2016/187408和W0 2018/027024中公开,其全部内容通过引用并入本文。

[0055] 现在将详细参考所公开主题的某些实施方式。尽管将结合所列举的权利要求描述所公开的主题,但是应当理解,所例示的主题并不旨在将权利要求限制于所公开的主题。

[0056] 在整个文档中,应以灵活的方式解释以范围格式表示的值,以不仅包括明确列举为范围限制的数值,而且还包括该范围内包含的所有单个数值或子范围,好像每个数值和子范围都被明确叙述。例如,“约0.1%至约5%”或“约0.1%至5%”的范围应解释为不仅包括约0.1%至约5%,而且包括指定范围内的单个值(例如1%、2%、3%和4%)以及子范围(例如0.1%至0.5%、1.1%至2.2%、3.3%至4.4%)。除非另外指出,否则陈述“约X至Y”具有与“约X至约Y”相同的含义。同样地,除非另外指出,否则陈述“约X、Y或约Z”与“约X、约Y或约Z”具有相同的含义。

[0057] 定义

[0058] 如本文所用,以下每个术语在本章节中具有与其相关的含义。除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语通常具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。通常,本文所用的命名法以及动物药理学、药物科学、分离科学和有机化学中的实验室程序是本领域众所周知的和常用的。应当理解,步骤的顺序或执行某些动作的顺序并不重要,只要本教导仍然可操作。章节标题的任何使用均旨在帮助阅读文档,而不应理解为限制性的;与章节标题相关的信息可能发生在该具体章节之内或之外。本文中所引用的所有出版物、专利和专利文件都通过引用以其整体并入本文,就像通过引用将其单独地并入一样。

[0059] 在本申请中,在元件或部件被认为包括在陈述的元件或部件的列举中和/或从陈述的元件或部件的列举中选择的情况下,应当理解,该元件或部件可以是陈述的元件或部件中的任何一个,并且可以是选自两个或更多个所陈述的元件或部件。

[0060] 在本文所述的方法中,可以以任何顺序执行动作,除非明确地陈述了时间或操作序列。此外,可以同时执行指定的动作,除非明确的要求语言陈述了它们是分开执行的。例如,可以在单个操作中同时执行所要求保护的进行X的动作和所要求保护的进行Y的动作,并且所得的方法将落入所要求保护的方法的字面范围内。

[0061] 在本文中,除非上下文另外明确指出,否则术语“一个”、“一种”或“该”用于包括一个或多个。除非另有说明,否则术语“或”用于表示非排他性的“或”。陈述“A和B中的至少一个”或“A或B中的至少一个”与“A、B或A和B”具有相同的含义。

[0062] 为了清楚起见,以下符号惯例被应用于本公开内容。无论如何,本文中不遵循该惯例的任何教导仍然是本公开内容的一部分,并且鉴于所公开的教导的上下文可以被完全理解。蛋白质符号以非斜体大写字母公开。作为非限制性实例,“ENPP1”是指蛋白质。在某些实施方式中,如果蛋白质是人类蛋白质,则在蛋白质符号前使用“h”。在其他实施方式中,如果

蛋白质是小鼠蛋白质,则在符号前使用“m”。因此,人ENPP1被称为“hENPP1”,而小鼠ENPP1被称为“mENPP1”。人类基因符号以斜体大写字母公开。作为非限制性实例,对应于蛋白质hENPP1的人类基因是ENPP1。公开了小鼠基因符号,其中第一个字母为大写,其余字母为小写;进一步地,小鼠基因符号是斜体的。作为非限制性实例,制造蛋白质mEnpp1的小鼠基因是Enpp1。有关基因突变的符号显示为大写文本。

[0063] 当涉及诸如量、时间持续时间等等的可测量值时,本文所使用的“约”意指涵盖指定值的±20%或±10%,在某些实施方式中为±5%,在某些实施方式中为±1%,在某些实施方式中为±0.1%的变化,因为这样的变化适用于执行所公开的方法。

[0064] 如果疾病或紊乱的症状的严重性、患者经历这种症状的频率或两者都降低,则“减轻”该疾病或紊乱。

[0065] 如本文所用,术语“改变”、“缺陷”、“变异”或“突变”是指在细胞中影响其编码的多肽的功能、活性、表达(转录或翻译)或构象的基因的突变,包括错义和无义突变、插入、缺失、移码和过早终止。

[0066] 如本文所用,术语“抗体”是指能够与抗原上特异性表位特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是衍生自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白,也可以是完整免疫球蛋白的免疫反应部分。

[0067] ENPP1的“ATP水解活性”可以通过使用ATP裂解测定法确定。ENPP1易于将ATP水解为AMP和PP_i。使用ATP作为底物确定ENPP1的稳态Michaelis-Menten酶常数。可以通过酶促反应的HPLC分析证明ENPP1裂解ATP,并通过使用ATP、AMP和ADP标准品确认底物和反应产物的身份。在存在ENPP1的情况下,ATP底物随时间降解,并具有酶产物AMP的积累。使用不同浓度的ATP底物,在存在ATP的情况下导出ENPP1的初始速率(rate velocity),并将数据拟合到曲线上以得出酶速率常数。在生理pH值下,ENPP1的动力学速率常数为K_m=144μM和k_{cat}=7.8s⁻¹。

[0068] 如本文所用,术语“AUC”是指血浆药物浓度-时间曲线(AUC)下的面积,并且与施用一定剂量药物后对药物的实际身体暴露相关。在某些实施方式中,AUC以mg*h/L表达。AUC可用于测量药物的生物利用度,其为通过任何途径施用后被完整吸收的并到达作用部位或全身循环的未改变药物的分数。

[0069] 可以使用线性梯形法或对数梯形法来计算AUC。线性梯形法使用数据点之间的线性插值来计算AUC。OGD和FDA要求此方法,并且其为生物等效性试验的标准。对于给定的时间间隔(t₁-t₂),AUC可以计算如下:

$$[0070] \quad AUC = \frac{1}{2}(C_1 + C_2)(t_2 - t_1)$$

[0071] 其中C₁和C₂是时间间隔(t₁和t₂)内的平均浓度。

[0072] 对数梯形法使用数据点之间的对数插值来计算AUC。当浓度降低时,这种方法更准确,这是因为药物消除是指数的(这使得它在对数刻度上呈线性)。对于给定的时间间隔(t₁-t₂),AUC可以计算如下(假设C₁>C₂):

$$[0073] \quad AUC = \frac{C_1 - C_2}{\ln(C_1) - \ln(C_2)}(t_2 - t_1)$$

[0074] 如本文所用,术语“生物利用度”是指活性部分(蛋白质、药物或代谢产物)进入全

身循环从而进入作用部位或通过任何途径施用后进入全身循环的程度和速率。活性部分的生物利用度在很大程度上由剂型的性质决定,而后者部分取决于其设计和制造。给定药物或蛋白质的制剂之间生物利用度的差异可具有临床显著性;因此,了解药物制剂是否等效是至关重要的。药物或蛋白质的生物利用度的最可靠量度是血浆浓度-时间曲线下的面积(AUC)。AUC与到达全身循环的未改变药物或治疗性蛋白质的总量成正比。如果药物或治疗性蛋白质的血浆浓度曲线基本上是可叠加的,则可以认为其吸收程度和速率是生物等效的。对于药物的静脉内剂量,生物利用度定义为一(unity)。对于通过其他施用途径施用的药物,生物利用度通常小于一。不完全的生物利用度可能是由于可细分为剂型效应、膜效应和施用部位效应的类别的许多因素造成的。半衰期和AUC提供有关药物或生物制剂的生物利用度的信息。

[0075] 如本文所用,如本文所用的术语“保守变异”或“保守取代”是指氨基酸残基被另一个生物学上相似的残基置换。保守变异或取代不可能改变肽链的形状。保守变异或取代的实例包括用另一个疏水残基置换一个疏水残基(例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸),或用另一个极性残基取代一个极性残基,例如用赖氨酸取代精氨酸、用天冬氨酸取代谷氨酸或用天冬酰胺取代谷氨酰胺。

[0076] 如本文所用,本公开内容的“构建体”是指包含ENPP1多肽或其片段或位点定向突变体的融合多肽。

[0077] “疾病”是动物的健康状态,其中动物无法维持体内稳态,并且其中如果疾病没有得到改善,则动物的健康状况将继续恶化。

[0078] 动物的“紊乱”是一种健康状态,其中动物能够维持体内稳态,但其中与没有该紊乱的情况相比,动物的健康状态不利。如果不治疗,紊乱不一定会导致动物健康状况进一步下降。

[0079] 如本文所用,术语“有效量”、“药物有效量”和“治疗有效量”是指无毒但足以提供期望的生物学结果的试剂量。该结果可以是减少和/或减轻疾病的体征、症状或原因,或生物系统的任何其他期望的改变。在任何单独情况下,本领域普通技术人员可以使用常规实验确定适当的治疗量。

[0080] 如本文所用,术语“ENPP”或“NPP”是指外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶。

[0081] 如本文所用,术语“ENPP1蛋白质”或“ENPP1多肽”是指由ENPP1基因编码的外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶-1蛋白质。编码的蛋白质是II型跨膜糖蛋白,并裂解多种底物,其包括核苷酸和核苷酸糖的磷酸二酯键以及核苷酸和核苷酸糖的焦磷酸键。ENPP1蛋白质具有跨膜结构域和可溶性细胞外结构域。细胞外结构域进一步细分为生长调节素B结构域、催化结构域和核酸酶结构域。野生型ENPP1的序列和结构在Braddock等人的PCT申请公开号W0 2014/126965中详细描述,其通过引用以其整体并入本文。

[0082] 如本文所用,术语“人ENPP1”是指如NCBI登录号NP_006199中所述的人ENPP1序列。如本文所用,术语“可溶性人ENPP1”是指对应于NCBI登录号NP_006199的残基96至925的多肽。如本文所用,关于ENPP1的术语“酶促活性的”定义为能够结合并水解ATP成AMP和将PPi和/或结合并水解AP3a成ATP。

[0083] 如本文所用,术语“ENPP1前体蛋白质”是指在ENPP1的N端具有其信号肽序列的ENPP1。在蛋白水解后,信号序列从ENPP1裂解,以提供ENPP1蛋白质。在本公开内容中有用的

信号肽序列包括但不限于ENPP1信号肽序列、ENPP2信号肽序列、ENPP7信号肽序列和/或ENPP5信号肽序列。

[0084] 如本文所用,术语“ENPP1-Fc”是指与IgG分子(优选地,人IgG)的FcR结合结构域重组融合和/或化学缀合(包括共价和非共价缀合)的ENPP1。在某些实施方式中,ENPP1的C端与FcR结合结构域的N端融合或缀合。

[0085] 如本文所用,术语“Fc”是指人IgG(免疫球蛋白)Fc结构域。考虑将诸如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的IgG亚型用作Fc结构域。

[0086] 如本文所用,“Fc区”是IgG分子的一部分,其与通过木瓜蛋白酶消化IgG分子获得的可结晶片段相关。Fc区包含通过二硫键连接的IgG分子的两条重链的C端一半。它没有抗原结合活性,但包含碳水化合物部分以及补体和Fc受体(包括FcRn受体)的结合位点。Fc片段包含整个第二恒定结构域CH2(根据Kabat编号系统,人IgG1的残基231-340)和第三恒定结构域CH3(残基341-447)。术语“IgG铰链-Fc区”或“铰链-Fc片段”是指由Fc区(残基231-447)和从Fc区的N端延伸的铰链区(残基216-230)组成的IgG分子区域。术语“恒定结构域”是指免疫球蛋白分子的一部分,其相对于免疫球蛋白的另一部分,即含有抗原结合位点的可变结构域,具有更保守的氨基酸序列。恒定结构域包含重链的CH1、CH2和CH3结构域以及轻链的CHL结构域。

[0087] 如本文所用,术语“Fc受体”是指在某些细胞(包括B淋巴细胞、滤泡树突性细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、人类血小板和肥大细胞等等)表面上发现的蛋白质,其有助于免疫系统的保护功能。Fc受体与附连至感染细胞或入侵病原体上的抗体结合。免疫球蛋白Fc受体(FcR)在所有造血细胞上表达,并在抗体介导的免疫反应中发挥关键作用。免疫复合物与FcR的结合激活效应细胞,这导致吞噬作用、IgG-调理颗粒的内吞作用、炎症介质的释放以及抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。已针对所有类型的免疫球蛋白描述了Fc受体: IgG的Fc γ R和新生儿FcR(FcRn)、IgE的Fc ϵ R、IgA的Fc α R、IgD的Fc δ R和IgM的Fc μ R。除了FcRn和Fc ϵ RII以外,所有已知的Fc受体在结构上均属于免疫球蛋白超家族,FcRn和Fc ϵ RII分别与I类主要组织相容性抗原和C型凝集素在结构上相关(Fc Receptors, Neil A. Fanger等, Encyclopedia of Immunology (第二版), 1998年)。

[0088] 如本文所用,术语“FcRn受体”是指新生儿Fc受体(FcRn),也称为Brambell受体,它是人体内由FCGRT基因编码的蛋白质。FcRn特异性结合抗体的Fc结构域。FcRn通过减少内皮细胞中的溶酶体降解来延长IgG和血清白蛋白的半衰期。IgG、血清白蛋白和其他血清蛋白质通过胞饮作用持续内在化。通常,血清蛋白质从内体运输到溶酶体,在那里其被降解。FcRn介导的IgG跨上皮细胞的转胞吞作用是可能的,这是因为FcRn在酸性pH(<6.5)下结合IgG,但在中性或更高pH下不结合。IgG和血清白蛋白在弱酸性pH(<6.5)下由FcRn结合,并循环到细胞表面,在那里其在血液的中性pH(>7.0)下被释放。这样,IgG和血清白蛋白避免溶酶体降解。

[0089] IgG分子的Fc部分位于重链的恒定区,尤其是在CH2结构域中。Fc区结合Fc受体(FcRn),Fc受体是B细胞的表面受体,也是补体系统的蛋白质。IgG分子的Fc区与FcRn的结合激活了带有受体的细胞,并从而激活了免疫系统。已经鉴定了对小鼠Fc-小鼠FcRn和人Fc-人FcRn相互作用至关重要的Fc残基(Dall'Acqua等人,2002, J. Immunol. 169(9):5171-80)。FcRn结合结构域包括IgG分子的CH2结构域(或其FcRn结合部分)。

[0090] 如本文所用,术语“片段”应用于核酸时,是指较大核酸的子序列。核酸的“片段”可以是至少约15、50-100、100-500、500-1000、1000-1500个核苷酸、1500-2500或2500个核苷酸(及其之间的任何整数值)。如本文所用,术语“片段”应用于蛋白质或肽时,是指较大蛋白质或肽的子序列,长度可以至少为约20、50、100、200、300或400个氨基酸(及其之间的任何整数值)。

[0091] 在氨基酸序列的功能衍生物的上下文中,术语“功能等效物”或“功能衍生物”是指保留与本文所示的ENPP1-Fc构建体的序列的生物学活性(功能或结构)基本上相似的生物学活性(功能或结构)的分子。功能衍生物或等效物可以是天然衍生物或合成制备的。本公开内容的功能等效多肽也可以是使用本领域已知的一种或多种结构和/或序列比对技术鉴定的多肽。

[0092] 示例性功能衍生物包括具有一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加的氨基酸序列,条件是蛋白质的生物学活性是保守的。取代的氨基酸期望地具有与被取代的氨基酸相似的化学-物理性质。期望的相似的化学-物理性质包括电荷、蓬松性、疏水性、亲水性等的相似性。通常,两个多肽之间大于30%的同一性被认为是功能等效的指示。优选地,本公开内容的功能等效多肽与ENPP1-Fc构建体的序列同一性程度大于80%。更优选的多肽具有分别大于85%、90%、95%、98%或99%的同一性程度。可以通过使用WO2016/187408中所述的涉及ATP裂解的酶学测定法来确定用于确定功能等效物或功能衍生物是否具有与ENPP1-Fc构建体相同或相似或更高的生物学活性的方法。

[0093] “基因转移”和“基因递送”是指将具体核酸序列可靠地插入靶细胞的方法或系统。

[0094] “诱导型”启动子是核苷酸序列,当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作连接时,仅当细胞中存在对应于该启动子的诱导物时,才导致基因产物在细胞中产生。

[0095] 如本文所用,用于本公开内容中考虑的蛋白质和/或多肽(例如,包含FcRn结合位点的ENPP1多肽)的术语“体内半衰期”是指从动物的循环系统和/或其他组织清除动物内施用量一半所需的时间。当作为时间的函数构建ENPP1-Fc融合蛋白的清除率曲线时,该曲线通常是两相的,其具有极快的 α 相(这表示所施用的分子在血管内和血管外空间之间的平衡,并且部分地取决于分子的大小)和更长的 β 相(其表示分子在血管内空间的分解代谢)。在某些实施方式中,术语“体内半衰期”实际上对应于 β 相中的分子的半衰期。

[0096] 如本文所用的术语“指导材料”,包括在用于鉴定或减轻或治疗本文所述的多种疾病或紊乱的试剂盒中的出版物、记录、图表或可用于传达本公开内容的核酸、肽和/或化合物的有用性的任何其他表达介质。

[0097] “分离的”是指从天然状态改变或移出。例如,活体动物中天然存在的核酸或多肽不是“分离的”,但与其天然状态的共存材料部分或完全分开的相同核酸或多肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在,或可以存在于非天然环境中,例如宿主细胞中。

[0098] “分离的核酸”是指已在天然存在的状态下位于其侧翼的序列分开的核酸区段或片段,即已从通常与该片段相邻的序列(即在其天然存在的基因组中与该片段相邻的序列)中移出的DNA片段。该术语还适用于已从天然伴随核酸的其他组分中基本上纯化的核酸,即在细胞中天然伴随核酸的RNA或DNA或蛋白质。因此,该术语包括,例如,重组DNA,其并入到载体、并入到自主复制的质粒或病毒、或并入到原核生物或真核生物的基因组DNA中,或其

独立于其他序列作为单独分子(即,作为通过PCR或限制性内切酶消化产生的cDNA或基因组或cDNA的片段)存在。它还包括为编码另外的多肽序列的杂交基因的一部分的重组DNA。

[0099] “寡核苷酸”或“多核苷酸”是在长度上范围为至少2个,在一些实施方式中,至少为8个、15个或25个核苷酸,但可以高达50、100、1000或5000个核苷酸长度的核酸或与多核苷酸特异性杂交的化合物。

[0100] 术语“可操作地连接”是指调节序列和异源核酸序列之间的功能键,其导致后者的表达。例如,当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子与编码序列可操作地连接。通常地,可操作连接的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区时,在同一阅读框中。

[0101] 如本文所用,术语“患者”、“个体”或“受试者”是指人类。

[0102] 如本文所用,术语“药物组合物”或“组合物”是指在本公开内容中有用的至少一种化合物与药学上可接受的载体的混合物。该药物组合物促进了化合物向患者的施用。本领域中存在多种施用化合物的技术,其包括但不限于皮下、静脉内、口服、气雾剂、吸入、直肠、阴道、经皮肤、鼻内、颊、舌下、肠胃外、鞘内、胃内、眼、肺和局部施用。

[0103] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指不消除化合物的生物学活性或性质并且相对无毒的材料,例如载体或稀释剂,即,该材料可以被施用至个体,而不会引起不良的生物学影响或以有害的方式与组合物中所含的任何组分相互作用。

[0104] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或载体,例如液体或固体填充剂、稳定剂、分散剂、悬浮剂、稀释剂、赋形剂、增稠剂、溶剂或包囊材料,其参与在患者体内或向患者体内携带或运输本公开内容中有用的化合物,使得化合物可以执行其预期功能。每种载体在与制剂中其他成分(包括在本公开内容中有用的化合物)相容的意义上必须是“可接受的”,并且对患者无害。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物。如本文所用,“药学上可接受的载体”还包括与本公开内容中有用的化合物的活性相容的任何和所有包衣、抗菌和抗真菌剂以及吸收延迟剂等,并且是患者生理上可接受的。“药学上可接受的载体”可以进一步包括本公开内容中有用的化合物的药学上可接受的盐。在本公开内容的实践中使用的药物组合物中可能包含的其他另外的成分是本领域内已知的并且在例如Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA) 中进行了描述,其通过引入并入本文。

[0105] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指由药学上可接受的无毒酸和碱(包括无机酸、无机碱、有机酸、无机碱、溶剂化物、水合物和其包合物)制备的施用的化合物的盐。

[0106] 如本文所用,术语“血浆焦磷酸盐(PPi)水平”是指动物血浆中存在的焦磷酸盐的量。在某些实施方式中,动物包括大鼠、小鼠、猫、狗、人、奶牛和马。由于从血小板释放,有必要测量血浆中的PPi而不是血清中的PPi。有多种测量PPi的方式,其中一种是通过使用具有修改的尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)焦磷酸化酶的酶测定法(Lust和Seegmiller, 1976, Clin. Chim. Acta 66:241-249; Cheung和Suhadolnik, 1977, Anal. Biochem 83:61-63)。健康受试者的正常PPi水平范围通常为约1 μ m至约3 μ m,在一些情况下为1-2 μ m之间。ENPP1表达缺陷的受试者倾向于表现出较低的PPi水平,其范围比正常水平低至少10%、比正常水平低至

少20%、比正常水平低至少30%、比正常水平低至少40%、比正常水平低至少50%、比正常水平低至少60%、比正常水平低至少70%、比正常水平低至少80%及其任何组合。在患有病理性钙化或骨化疾病的患者中,发现血浆中的PPi水平低于1 μ M,在一些情况下低于检测水平。在一些情况下,患有病理性钙化或骨化疾病的受试者的血浆PPi水平低于0.5 μ M (Arterioscler Thromb, Vasc Biol. 2014, 34 (9) :1985-9; Braddock等人, 2015, Nat Commun. 6:10006)。

[0107] 如本文所用,术语“多肽”是指由通过肽键连接的氨基酸残基、相关的天然存在的结构变体和合成的非天然存在的其类似物组成的聚合物。

[0108] 如本文所用,术语“PPi”是指焦磷酸盐。

[0109] 如本文所用,术语“预防”或“防止”是指如果没有紊乱或疾病发生,则没有紊乱或疾病发展,或如果已经有紊乱或疾病发展,则没有进一步的紊乱或疾病发展。还考虑了人预防与紊乱或疾病有关的一些或全部症状的能力。

[0110] 如本文所用,术语“启动子”定义为被细胞的合成机器或引入的合成机器识别的DNA序列,其需要启动多核苷酸序列的特异性转录。

[0111] 如本文所用,术语“启动子/调节序列”是指表达与启动子/调节序列可操作连接的基因产物所需的核酸序列。在一些情况下,该序列可以是核心启动子序列,而在其他情况下,该序列还可以包括增强子序列和基因产物表达所需的其他调节元件。启动子/调节序列可以例如是以组织特异性方式表达基因产物的序列。

[0112] 如本文所用,术语“重组多肽”定义为通过使用重组DNA方法产生的多肽。

[0113] 如本文所用,术语“重组DNA”定义为通过连接来自不同来源的DNA段而产生的DNA。

[0114] 如本文所用的“样品”或“生物样品”是指从受试者分离的生物材料。生物样品可以包含适合于检测受试者的生理或病理过程的mRNA、多肽或其他标志物的任何生物材料,并且可以包含获自个体的流体、组织、细胞和/或非细胞材料。

[0115] 如本文所用,术语“信号肽”是指在蛋白质翻译期间结合在感兴趣的新生蛋白质的氨基末端的氨基酸残基的序列(例如,长度范围为10至30个残基)。信号肽在内质网运输后被信号识别颗粒(SRP)识别并被信号肽酶切割(Lodish等人, 2000, Molecular Cell Biology, 第4版)。

[0116] 如本文所用,“基本上纯化”是指基本上不含其他组分。例如,基本上纯化的多肽是已经与其通常以其天然存在状态缔合的其他组分分开的多肽。非限制性实施方式包括95%的纯度、99%的纯度、99.5%的纯度、99.9%的纯度和100%的纯度。

[0117] “组织特异性”启动子是这样的核苷酸序列,当其与基因编码或指定的多核苷酸可操作连接时,基本上仅当细胞是与启动子对应的组织类型的细胞时,才导致基因产物在细胞中产生。

[0118] 如本文所用,短语“在转录控制下”或“可操作地连接”是指启动子相对于多核苷酸处于正确的位置和方向,以控制RNA聚合酶的转录起始和多核苷酸的表达。

[0119] 如本文所用,术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。“转染”或“转化”或“转导”的细胞已被外源核酸转染、转化或转导。细胞包括原代受试者细胞及其后代。

[0120] 如本文所用,术语“治疗”定义为将治疗剂,即在本公开内容中有用的化合物(单独

或与另一种药剂组合)应用或施用至患者,或将治疗剂应用或施用至来自患者的分离的组织或细胞系(例如,用于诊断或离体应用),该患者具有疾病或紊乱、疾病或紊乱的症状或可能发展疾病或紊乱的可能性,旨在治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改良、改善或影响疾病或紊乱、疾病或紊乱的症状或发展疾病或紊乱的可能性。基于从药物基因组学领域获得的知识,可以具体地定制或修改这样的治疗。

[0121] 如本文所用,术语“变体”是在序列上分别与参考核酸序列或肽序列不同但保留参考分子的基本性质的核酸序列或肽序列。核酸变体序列的变化可能不会改变参考核酸编码的肽的氨基酸序列,或者可能导致氨基酸取代、添加、缺失、融合和截短。肽变体序列的变化通常是有限的或保守的,因此参考肽和变体的序列总体上非常相似,并且在许多区域中是相同的。变体和参考肽的氨基酸序列可能差异仅在以任何组合的一个或多个取代、添加或缺失。核酸或肽的变体可以是天然存在的例如等位基因变体,或者可以是未知天然存在的变体。核酸和肽的非天然存在的变体可以通过诱变技术或通过直接合成来制备。

[0122] “载体”是包括分离的核酸并且可以用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。许多载体在本领域中是已知的,其包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲化合物缔合的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语也应解释为包括非质粒和非病毒的促进核酸转移到细胞中的化合物,例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体等等。

[0123] 如本文所用,术语“病毒”定义为由包裹在蛋白质外壳中的核酸(RNA或DNA)组成的颗粒——具有或不具有外部脂质包膜,其能够用其核酸转染细胞。

[0124] 如本文所用,术语“野生型”是指从天然存在来源分离的基因或基因产物。野生型基因在人群中最常见,并因此被任意设计为“正常”或“野生型”基因形式。相反,术语“修饰的”或“突变体”是指与野生型基因或基因产物相比,在序列和/或功能性质(即改变的特性)上显示出改变的基因或基因产物。可以分离天然存在的突变体;通过与野生型基因或基因产物相比其具有改变的特性(包括改变的核酸序列)这一事实来对其进行鉴定。

[0125] 本文使用以下缩写:1,3,4-0-Bu₃ManNAc,N-乙酰甘露糖胺;ST6GAL1、ST6β-半乳糖苷α-2,6-唾液酸转移酶。

[0126] 范围:在整个的本公开内容中,本公开内容的多个方面可以以范围格式呈现。应当理解,以范围格式进行的描述仅是为了方便和简洁,而不应被解释为对本公开内容范围的不灵活的限制。因此,应该将范围的描述视为已明确公开了在该范围内的所有可能的子范围以及单个数值。例如,应将例如从1到6的范围描述视为已明确公开了子范围,例如从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等,以及该范围内的单个数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的广度如何,这都适用。

[0127] 多肽

[0128] 一方面,本公开内容提供了ENPP1-Fc多肽。本公开内容考虑本公开内容的多肽可具有本文所述的一种或多种突变。

[0129] 在另一方面,本公开内容提供了在与SEQ ID NO:7有关的位置256处包含至少一个氨基酸取代的ENPP1突变体多肽。在某些实施方式中,氨基酸取代是相对于SEQ ID NO:7在位置256处用苏氨酸(T)取代异亮氨酸(I)。在某些实施方式中,氨基酸取代是相对于SEQ ID

N0:7在位置256处用丝氨酸(S)取代异亮氨酸(I)。

[0130] 在某些实施方式中,ENPP1突变体多肽包括ENPP1的催化结构域。在某些实施方式中,ENPP1突变体多肽包括ENPP1的内切核酸酶结构域。在某些实施方式中,ENPP1突变体多肽缺乏ENPP1的核酸酶结构域。在某些实施方式中,ENPP1突变体多肽缺乏ENPP1的跨膜结构域。在某些实施方式中,ENPP1突变体多肽缺乏ENPP1的胞内结构域。在某些实施方式中,ENPP1突变体多肽缺乏ENPP1的胞内结构域和跨膜结构域二者。在某些实施方式中,ENPP1突变体多肽缺乏信号序列。在某些实施方式中,ENPP1突变体多肽包括与SEQ ID N0:7的氨基酸23-849至少约90%(例如,至少约91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%)同一性的氨基酸序列。

[0131] 在另一方面,本公开内容提供包括与SEQ ID N0:7的氨基酸23-849至少约90%(例如,至少约91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的ENPP1突变体多肽,其中该突变体多肽在与SEQ ID N0:7有关的位置256处包括氨基酸取代。在某些实施方式中,氨基酸取代是I256T。在某些实施方式中,氨基酸取代是I256S。

[0132] 在仍另一方面,本公开内容提供了包括SEQ ID N0:7的氨基酸23-849的ENPP1突变体多肽,其中相对于SEQ ID N0:7的氨基酸23-849存在不超过十(10)个(例如,不超过9个、不超过8个、不超过7个、不超过6个、不超过5个、不超过4个、不超过3个、不超过2个或不超过1个)氨基酸取代。在某些实施方式中,ENPP1突变体多肽相对于SEQ ID N0:7在位置256处包括氨基酸取代。在某些实施方式中,氨基酸取代是I256T。在某些实施方式中,氨基酸取代是I256S。

[0133] 在某些实施方式中,ENPP1多肽包括如图16A和/或图16B中陈述的信号序列中的至少一种突变。

[0134] 在某些实施方式中,多肽包含与SEQ ID N0:7有关的突变I256T。

[0135] 在某些实施方式中,突变选自与SEQ ID N0:7有关的C25N、K27T和V29N。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的C25N。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的K27T。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的V29N。在某些实施方式中,ENPP1多肽包括选自与SEQ ID N0:7有关的C25N/K27T和V29N的至少一种突变。

[0136] 在某些实施方式中,ENPP1多肽包括如图16A和/或图16B中陈述的催化区中的至少一种突变。在某些实施方式中,突变选自与SEQ ID N0:7有关的I256T、K369N和I371T。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的I256Y。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的K369N。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的I371T。在某些实施方式中,ENPP1多肽包括与SEQ ID N0:7有关的选自I256T和K369N/I371T的至少一种突变。

[0137] 在某些实施方式中,ENPP1多肽包括如表1、表2、表3、表4、表5、图7A、图16A、图16B、图17和/或图18中陈述的内切核酸酶结构域中的至少一种突变。在某些实施方式中,突变选自与SEQ ID N0:7有关的P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D和S766N。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的P534N。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的V536T。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的R545T。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的P554L。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的E592N。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的R741D。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID N0:7有关的S766N。在某些实施方式中,ENPP1多肽包括选自与SEQ ID N0:7有关的P534N/

V536T、P554L/R545T、E592N、E592N/R741D和S766N的至少一种突变。

[0138] 在某些实施方式中,ENPP1多肽包括如图16A和/或图16B中陈述的接头区中的至少一种突变。在某些实施方式中,突变选自与SEQ ID NO:7有关的E864N和L866T。在某些实施方式中,ENPP1多肽至少包括与SEQ ID NO:7有关的突变E864/L866T。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID NO:7有关的E864N。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID NO:7有关的L866T。

[0139] 在某些实施方式中,多肽包括ENPP1多肽和FcRn结合结构域,其中FcRn结合结构域包括表1、表2、图7A、图16A、图16B、图17和/或图18中陈述的任一突变。在某些实施方式中,突变选自与SEQ ID NO:7有关的M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K和N1065F。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID NO:7有关的M883Y。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID NO:7有关的S885N。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID NO:7有关的S885T。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID NO:7有关的T887E。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID NO:7有关的H1064K。在某些实施方式中,突变是与SEQ ID NO:7有关的N1065F。在某些实施方式中,FcRn结合结构域包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、M883Y、M883Y/S885T/T887E和H1064K/N1065F的至少一种突变。

[0140] 在某些实施方式中,ENPP1多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N、K27T、V29N、C25N/K27T、I256T、K369N、I371T、K369N/I371T、P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D、S766N、P534N/V536T、P554L/R545T、E592N/R741D、E864N、L866T、E864N/L866T、M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K、N1065F、M883Y/S885T/T887E、H1064K/N1065F的至少一种突变。

[0141] 在某些实施方式中,多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、E864N/L866T、P534N/V536T/H1064K/N1065F、P554L/R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F和P534N/V536T/M883Y/S885T/T887E的至少一种突变。

[0142] 在某些实施方式中,多肽包括ENPP1多肽和FcRn结合结构域,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变M883Y、S885T和T887E。

[0143] 在某些实施方式中,多肽包括ENPP1多肽和FcRn结合结构域,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。

[0144] 在某些实施方式中,多肽包括ENPP1多肽和FcRn结合结构域,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变E592N、H1064K和N1065F。

[0145] 在某些实施方式中,多肽包括ENPP1突变体多肽,其中突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N、V536T、P554L、R545T和E592N的ENPP1突变。

[0146] 在某些实施方式中,ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N/V536T、P554L/R545T和E592N的至少一种突变。

[0147] 在某些实施方式中,多肽进一步包括IgG的FcRn结合结构域。

[0148] 在某些实施方式中,多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、P534N/V536T/H1064K/N1065F、P554L/R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F和P534N/V536T/M883Y/S885T/T887E的突变。

[0149] 在某些实施方式中,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的在FcRn结合结构域中的S885N突变。

[0150] 在某些实施方式中,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的在ENPP1突变体多肽中的

S766N突变。

[0151] 在某些实施方式中,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的在FcRn结合结构域中的突变M883Y、S885T和T887E。

[0152] 在某些实施方式中,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的在ENPP1突变体多肽中的突变P534N和V536T以及在FcRn结合结构域中的突变H1064K和N1065F。

[0153] 在某些实施方式中,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的在ENPP1突变体多肽中的突变P554L和R545T。

[0154] 在某些实施方式中,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的在ENPP1突变体多肽中的突变S766N以及在FcRn结合结构域中的突变H1064K和N1065F。

[0155] 在某些实施方式中,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的在ENPP1突变体多肽中的突变E592N以及在FcRn结合结构域中的突变H1064K和N1065F。

[0156] 在某些实施方式中,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的在ENPP1突变体多肽中的突变P534N和V536T以及在FcRn结合结构域中的突变M883Y、S885T和T887E。

[0157] 在某些实施方式中,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T。

[0158] 在某些实施方式中,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、M883Y、S885T和T887E。

[0159] 在某些实施方式中,多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变V29N、I256T、P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。

[0160] 在另一方面,本公开内容的特征在于包括与SEQ ID NO:7的氨基酸23-849至少约90% (例如,至少约91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的ENPP1突变体多肽,其中突变体多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T,并且进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N、V536T、P554L、R545T和E592N的突变。

[0161] 在某些实施方式中,本文所述的任何突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N/V536T、P554L/R545T和E592N的至少一种氨基酸取代。

[0162] 在某些实施方式中,本文所述的任何突变体多肽包括氨基酸取代V29N。

[0163] 在某些实施方式中,突变体多肽包括SEQ ID NO:11中描述的氨基酸序列或由其组成。

[0164] 特征还在于ENPP1突变体多肽融合体,其包括本文所述的任何ENPP1突变体多肽和异源蛋白,例如FcRn结合结构域。在某些实施方式中,异源蛋白在融合体的ENPP1突变体多肽部分的羧基末端。在某些实施方式中,异源蛋白在融合体的ENPP1突变体多肽部分的氨基末端。

[0165] 在本文所述的任何融合体的某些实施方式中,FcRn结合结构域是白蛋白多肽。在某些实施方式中,FcRn结合结构域是免疫球蛋白分子例如IgG1免疫球蛋白分子的Fc部分。

[0166] 在本文所述的任何融合体的某些实施方式中,FcRn结合结构域相对于野生型FcRn结合结构域包括一个或多个氨基酸取代。在某些实施方式中,FcRn结合结构域是人IgG1分子的Fc部分并且包括以下氨基酸取代:每个相对于SEQ ID NO:7的M883Y、S885T和T887E (MST/YTE取代)。

[0167] 在某些实施方式中,本文所述的融合体包括一个或多个以下取代:每个与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、P534N/V536T/H1064K/N1065F、P554L/

- R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F或P534N/V536T/M883Y/S885T/T887E。
- [0168] 在本文描述的任何ENPP1突变体多肽或融合体的某些实施方式中,ENPP1突变体多肽包括SEQ ID NO:11中描述的氨基酸序列或由其组成。
- [0169] 在本文描述的任何ENPP1突变体多肽或融合体的某些实施方式中,ENPP1突变体多肽包括SEQ ID NO:12中描述的氨基酸序列或由其组成。
- [0170] 在某些实施方式中,本文所述的任何融合体包括:(a)包括SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中描述的氨基酸序列或由其组成的ENPP1突变体多肽,(b)变体人IgG1 Fc区,例如SEQ ID NO:14中描述的氨基酸序列,其在ENPP1突变体多肽的羧基末端;(c)分开(a)和(b)的接头氨基酸序列,其中接头序列是LIN(SEQ ID NO:8)或GGGS(SEQ ID NO:9)。
- [0171] 本文的特征还在于本文所述的任一种ENPP1突变体多肽或ENPP1突变体多肽融合体与异源部分(例如但不限于小分子)的缀合物。在某些实施方式中,异源部分增加或进一步增加突变体多肽在哺乳动物中的药代动力学和/或生物利用度。在某些实施方式中,异源部分是乙二醇和/或丙二醇的低聚物,例如但不限于聚乙二醇(PEG)和/或聚丙二醇(PPG)。
- [0172] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽融合体或缀合物包括与SEQ ID NO:7有关的S885N突变。
- [0173] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽、融合体或缀合物包括与SEQ ID NO:7有关的S766N突变。
- [0174] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽融合体或缀合物包括与SEQ ID NO:7有关的突变M883Y、S885T和T887E。
- [0175] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽、融合体或缀合物包括与SEQ ID NO:7有关的突变P534N、V536T、H1064K和N1065F。
- [0176] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽、融合体或缀合物包括与SEQ ID NO:7有关的突变P554L和R545T。
- [0177] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽、融合体或缀合物包括与SEQ ID NO:7有关的突变S766N、H1064K和N1065F。
- [0178] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽、融合体或缀合物包括与SEQ ID NO:7有关的突变E592N、H1064K和N1065F。
- [0179] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽、融合体或缀合物包括与SEQ ID NO:7有关的突变P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。
- [0180] 在另一方面,本公开内容提供了包括与免疫球蛋白的Fc区融合的ENPP1突变体多肽的ENPP1突变体多肽融合体,其中ENPP1突变体多肽包括在相对于SEQ ID NO:7的位置256处的取代。
- [0181] 在本文所述的任何融合体的某些实施方式中,Fc区包括选自与SEQ ID NO:7有关的M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K和N1065F的至少一种突变。
- [0182] 在本文所述的任何融合体的某些实施方式中,Fc区包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、M883Y、M883Y/S885T/T887E和H1064K/N1065F的至少一种突变。
- [0183] 在某些实施方式中,ENPP1突变体多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N、K27T和V29N的至少一种突变。
- [0184] 在某些实施方式中,本文所述的ENPP1突变体多肽或融合体包括选自与SEQ ID

N0:7有关的C25N/K27T和V29N的至少一种突变。

[0185] 在某些实施方式中,本文所述的ENPP1突变体多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的K369N和I371T的至少一种突变。

[0186] 在某些实施方式中,本文所述的ENPP1突变体多肽或包括此类突变体多肽的融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变K369N/I371T。

[0187] 在某些实施方式中,本文所述的ENPP1突变体多肽或包括此类突变体多肽的融合体进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D和S766N的至少一种突变。

[0188] 在某些实施方式中,本文所述的ENPP1突变体多肽或包括此类突变体多肽的融合体包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N/V536T、P554L/R545T、E592N、E592N/R741D和S766N的至少一种突变。

[0189] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽或融合体进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的E864N和L866T的至少一种突变。

[0190] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽或融合体至少包括与SEQ ID NO:7有关的突变E864N/L866T。

[0191] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽或融合体包括与SEQ ID NO:7有关的C25N、K27T、V29N、C25N/K27T、K369N、I371T、K369N/I371T、P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D、S766N、P534N/V536T、P554L/R545T、E592N/R741D、E864N、L866T、E864N/L866T、M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K、N1065F、M883Y/S885T/T887E、H1064K/N1065F的至少一种突变。

[0192] 在某些实施方式中,本文所述的任何融合体包括IgG例如IgG1的Fc区。

[0193] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽,或包括此类ENPP1突变体多肽的融合蛋白包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N、V536T、R545T、P554L、S766N和E592N的至少一种突变。

[0194] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽,或包括此类ENPP1突变体多肽的融合蛋白包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N/Y536T、P554L/R545T和E592N的至少一种突变。

[0195] 在某些实施方式中,本文所述的任何ENPP1突变体多肽,或包括此类ENPP1突变体多肽的融合蛋白包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、E864N/L866T、P534N/V536T/H1064K/N1065F、P554L/R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F和P534N/V536T/M883Y/S885T/T887E的至少一种突变。

[0196] 在某些实施方式中,本文所述的任何融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、M883Y、S885T和T887E。

[0197] 在某些实施方式中,本文所述的任何融合体包括ENPP1多肽和免疫球蛋白的Fc区,该多肽融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。

[0198] 在某些实施方式中,本文所述的任何融合体包括含有ENPP1多肽和免疫球蛋白Fc区的ENPP1多肽融合体,该多肽融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、E592N、H1064K和N1065F。

[0199] 在某些实施方式中,本文所述的ENPP1突变体多肽融合体包括接头氨基酸序列,例

如,在融合体的ENPP1突变体多肽部分和异源蛋白质部分之间。在某些实施方式中,接头氨基酸序列包括SEQ ID NO:8或由其组成。在某些实施方式中,接头氨基酸序列包括SEQ ID NO:9或由其组成,其中n=1、n=2、n=3、n=4、n=5、n=6、n=7、n=8、n=9或n=10。

[0200] 在仍另一方面,本公开内容的特征在于包括SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16中描绘的氨基酸序列或由其组成的含ENPP1的多肽及其缀合物。

[0201] 在某些实施方式中,ENPP1多肽缺乏核酸酶结构域。在其他实施方式中,ENPP1多肽被截短以去除核酸酶结构域。在仍其他实施方式中,将ENPP1多肽截短以去除相对于SEQ ID NO:1的从约残基524至约残基885的核酸酶结构域,仅留下相对于SEQ ID NO:1从约残基186至约残基586的催化结构域,该催化结构域用于保持蛋白质的催化活性。

[0202] 在某些实施方式中,与SEQ ID NO:1相比,ENPP1多肽被ENPP1的细胞外区域的区段修饰,该区段在信号肽之后和在跨膜与细胞外结构域之间包含肽酶切割位点。

[0203] 在某些实施方式中,与SEQ ID NO:1相比,ENPP1多肽被在跨膜和细胞外结构域之间含有弗林蛋白酶切割位点的ENPP1的细胞外区域的区段修饰。在其他实施方式中,与SEQ ID NO:1相比,ENPP1多肽没有被在跨膜和细胞外结构域之间含有弗林蛋白酶切割位点的ENPP1的细胞外区域的区段修饰。

[0204] 在某些实施方式中,与SEQ ID NO:1相比,ENPP1多肽被含有信号肽酶切割位点的ENPP2的细胞外区域的区段修饰。在其他实施方式中,与SEQ ID NO:1相比,ENPP1多肽没有被含有信号肽酶切割位点的ENPP2的细胞外区域的区段修饰。

[0205] 在仍另一方面,本公开内容提供了从用人ST6 β -半乳糖苷 α -2,6-唾液酸转移酶(也称为ST6GAL1)稳定转染CHO细胞系表达的ENPP1突变体多肽、含ENPP1的多肽或融合体。

[0206] 在仍另一方面,本公开内容提供了在补充有唾液酸和/或N-乙酰甘露糖胺(也称为1,3,4-O-Bu₃ManNAc)的细胞培养物中生长的ENPP1突变体多肽、含ENPP1的多肽或融合体。

[0207] 本文还提供了药物组合物,其包括本文所述的ENPP1突变体多肽、ENPP1突变体多肽融合体、缀合物或其他多肽和蛋白质中的任一种以及药学上可接受的载体。

[0208] 在某些实施方式中,多肽是可溶的。在其他实施方式中,多肽是重组的多肽。在仍其他实施方式中,多肽包括缺乏ENPP1跨膜结构域的ENPP1多肽。在仍其他实施方式中,多肽包括ENPP1多肽,其中ENPP1跨膜结构域已被去除(和/或被截短)并用另一个多肽的跨膜结构域置换,所述另一个多肽例如(作为非限制性实例)ENPP2、ENPP5或ENPP7。

[0209] 在某些实施方式中,多肽包括导致ENPP1多肽的前体分泌的信号肽,该前体经过蛋白水解处理以产生包含ENPP1多肽的多肽。在其他实施方式中,信号肽选自ENPP2、ENPP5和ENPP7的信号肽。在仍其他实施方式中,多肽包括ENPP1多肽,该ENPP1多肽包括ENPP1的跨膜结构域;和另一个多肽,例如(作为非限制性实例)ENPP2。在仍其他实施方式中,ENPP1多肽包括包含ENPP2跨膜结构域的前体ENPP1多肽的裂解产物。在仍其他实施方式中,ENPP2跨膜结构域包含SEQ ID NO:7的残基12-30,其对应于IISLFTFAVGVNIGLFTA。

[0210] 在某些实施方式中,ENPP1多肽在C端融合至人免疫球蛋白1(IgG1)、人免疫球蛋白2(IgG2)、人免疫球蛋白3(IgG3)和/或人免疫球蛋白4(IgG4)的Fc结构域。在其他实施方式中,ENPP1多肽在N端融合至人免疫球蛋白1(IgG1)、人免疫球蛋白2(IgG2)、人免疫球蛋白3(IgG3)和/或人免疫球蛋白4(IgG4)的Fc结构域。在仍其他实施方式中,IgFc结构域的存在改善了半衰期、溶解度,降低了免疫原性并增加了ENPP1多肽的活性。

[0211] 在某些实施方式中,ENPP1多肽在C端融合至人血清白蛋白。人血清白蛋白可以通过包括但不限于天然存在的或工程改造的二硫键的化学接头与ENPP1蛋白质缀合,或通过ENPP1或其片段和/或变体的遗传融合。

[0212] 在某些实施方式中,多肽被进一步聚乙二醇化(与聚(乙二醇)链融合)。

[0213] 在某些实施方式中,多肽对底物ATP的 k_{cat} 值大于或等于约 $3.4(\pm 0.4) s^{-1}酶^{-1}$,其中该 k_{cat} 通过测量多肽的ATP水解速率来确定。

[0214] 在某些实施方式中,多肽对底物ATP的 K_M 值小于或等于约 $2\mu M$,其中 K_M 通过测量多肽的ATP水解速率来确定。

[0215] 在某些实施方式中,多肽被配制成液体制剂。在其他实施方式中,本公开内容提供了药物组合物的干燥产物形式,其包含治疗量的本公开内容的多肽,由此该干燥产物可重构为液体形式的化合物的溶液。

[0216] 本公开内容提供了试剂盒,其包含本公开内容的至少一种多肽,或其盐或溶剂化物,以及在本公开内容的方法中使用多肽的说明书。

[0217] 在某些实施方式中,多肽缺乏带负电荷的骨靶向序列。在仍其他实施方式中,聚天冬氨酸结构域(约2至约20或更多个连续的天冬氨酸残基)是带负电荷的骨靶向序列的非限制性实例。在其他实施方式中,多肽具有带负电荷的骨靶向序列。

[0218] 应当理解,根据本公开内容的ENPP1多肽不仅包括天然人蛋白质,而且还包括具有天然蛋白质的ATP水解活性的其任何片段、衍生物、融合体、缀合物或突变体。如此处在本公开内容中所用的,短语“ENPP1多肽,其突变体或突变体片段”还包括包含ENPP1多肽,其突变体或突变体片段的任何化合物或多肽(例如但不限于融合蛋白)。根据本公开内容的融合蛋白被认为是ENPP1的生物等效物,但由于体内生物暴露增加(如通过“曲线下面积”(AUC)或在药代动力学实验中半衰期增加判断的),旨在提供更长的半衰期或更高的效力。

[0219] 载体和细胞

[0220] 本文还提供了编码本文所述的ENPP1突变体多肽、含ENPP1的多肽或融合体中的任何一种的核酸。本公开内容进一步提供包含此类核酸的载体,例如表达载体。还提供了包含本文所述的核酸、载体或表达载体的任何一种的细胞、多个细胞或多种细胞(例如哺乳动物细胞)。还提供了用于产生蛋白质(例如,本文所述的ENPP1突变体多肽、含ENPP1的多肽或融合体中的任何一种)的方法,在某些实施方式中,该方法包括在适合于由细胞或多种细胞从核酸、载体或表达载体表达蛋白质的条件下培养细胞、多个细胞或多种细胞。该方法还可包括从细胞、多个细胞或多种细胞,或从其中培养细胞、多个细胞或多种细胞的培养基中纯化蛋白质。此外,本公开内容提供了通过任何此类方法纯化的蛋白质。

[0221] 本公开内容进一步提供了包含编码本公开内容多肽的重组核酸的自主复制或整合的哺乳动物细胞载体。在某些实施方式中,载体包含质粒或病毒。在其他实施方式中,载体包含哺乳动物细胞表达载体。在仍其他实施方式中,载体进一步包含至少一种指导和/或控制多肽表达的核酸序列。在仍其他实施方式中,重组核酸编码包括本公开内容的ENPP1多肽和信号肽的多肽,其中该多肽在从细胞分泌后经过蛋白水解处理以产生本公开内容的ENPP1多肽。

[0222] 在仍另一方面,本公开内容提供了包括本公开内容载体的分离的宿主细胞。在某些实施方式中,细胞是非人类细胞。在其他实施方式中,细胞是哺乳动物的。在仍其他实施

方式中,本公开内容的载体包括编码包含本公开内容的ENPP1多肽和信号肽的多肽的重组核酸。在仍其他实施方式中,多肽在从细胞分泌后经过蛋白水解处理,以产生本公开内容的ENPP1多肽。

[0223] ENPP1的克隆与表达

[0224] 如US 2015/0359858 A1中所述的制备ENPP1或ENPP1多肽,其通过引用以其整体并入本文。ENPP1是跨膜蛋白质,其位于具有不同膜内结构域的细胞表面。为了将ENPP1表达为可溶性细胞外蛋白质,可以将ENPP1的跨膜结构域与ENPP2的跨膜结构域交换,这导致可溶的重组ENPP1在杆状病毒培养物的细胞外液中积累。

[0225] 任何其他已知蛋白质的信号序列也可以用于靶向ENPP1的细胞外结构域以进行分泌,例如但不限于免疫球蛋白 κ 和 λ 轻链蛋白质的信号序列。进一步的,本公开内容不应解释为限于本文所述的多肽,而是还包括包含ENPP1细胞外结构域的任何酶活性截短的多肽。

[0226] 通过省略跨膜结构域使ENPP1可溶。通过用人ENPP2 (NCBI登录号NP_00112433 5,例如残基12-30)的相应亚结构域置换人ENPP1跨膜区(例如残基77-98),修饰人ENPP1 (SEQ ID NO:1)以表达可溶的重组蛋白质。修饰的ENPP1序列被克隆到具有随后是C端9-F11S标签的TEV蛋白酶切割位点的修饰的pFastbac FIT载体中,并在昆虫细胞中克隆和表达,并且两种蛋白质均在如前所述的杆状病毒系统中表达 (Albright等人,2012,Blood,120:4432-4440;Saunders等人,2011,J.Biol.Chem.18:994-1004;Saunders等人,2008,Mol.Cancer Ther.7:3352-3362),这导致可溶的重组蛋白质在细胞外液中积累。

[0227] ENPP1和ENPP1融合蛋白的生产和纯化

[0228] 在某些实施方式中,可溶的ENPP1多肽——包括IgG Fc结构域或其酶/生物活性片段,可有效治疗、减少和/或预防本文所考虑的疾病或紊乱的进展。在其他实施方式中,可溶的ENPP1多肽不包括骨靶向结构域,例如2-20个连续的聚天冬氨酸残基或2-20个连续的聚谷氨酸残基。

[0229] 为了生产可溶的重组ENPP1以供体外使用,将ENPP1与IgG的Fc结构域融合(称为“NPP1-Fc”),并且融合蛋白在稳定的CHO细胞系中表达。使用适合的载体,也可以从HEK293细胞、杆状病毒昆虫细胞系统或CHO细胞或毕赤酵母表达系统中表达蛋白质。蛋白质可以在贴壁细胞或悬浮细胞中产生。优选地,融合蛋白在CHO细胞中表达。为了建立稳定的细胞系,将编码ENPP1构建体的核酸序列克隆到用于大规模蛋白质生产的合适载体中。

[0230] 已知许多表达系统可用于生产ENPP1融合蛋白,包括细菌(例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)、酵母(例如酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母和巴斯德毕赤酵母)、丝状真菌(例如曲霉)、植物细胞、动物细胞和昆虫细胞。所期望的蛋白质可以以常规方式产生,例如从插入宿主染色体中或游离质粒上的编码序列产生。

[0231] 可以用任何通常的方式,例如电穿孔,用期望蛋白质的编码序列转化酵母。通过电穿孔转化酵母的方法在Becker和Guarente,1990,Methods Enzymol.194:182中公开。成功转化的细胞,即含有本公开内容DNA构建体的细胞,可以通过众所周知的技术进行鉴定。例如,引入表达构建体所产生的细胞可以生长以生产所期望的多肽。可以收获细胞并进行裂解,并使用诸如Southern,1975,J.Mol.Biol.98:503和/或Berent等人,1985,Biotech 3:208中描述的方法检查细胞的DNA含量,以检测DNA的存在。可选地,可以使用抗体检测上清液中蛋白质的存在。

[0232] 有用的酵母质粒载体包括pRS403-406和pRS413-416,并且通常可从Strat:1.gene Cloning Systems,La Jolla,CA,USA获得。质粒pRS403、pRS404、pRS405和pRS406是酵母整合质粒(Y1p),并且并入了酵母选择性标记I-11S3、TRP1、LEU2和IJRA3。质粒pRS413-416是酵母着丝粒质粒(YCp)。

[0233] 已经开发了多种方法来通过互补的粘性末端将DNA与载体有效连接。例如,可以将互补的均聚物束(homopolymer tract)添加到DNA区段中以插入到载体DNA中。然后通过互补的均聚物尾之间的氢键将载体和DNA区段连接起来以形成重组DNA分子。

[0234] 含有一个或多个限制性位点的合成接头提供了将DNA区段连接到载体的可选的方法。通过内切核酸酶限制性消化产生的DNA区段用噬菌体T4 DNA聚合酶或大肠杆菌DNA聚合酶I处理,这些酶是去除具有3'-5'-外切核酸酶活性的突出的3'-单链末端,并利用其聚合活性填充凹入的3'-末端的酶。

[0235] 这些活性的组合因此产生了平端DNA区段。然后在能够催化平端DNA分子的连接的酶(例如,噬菌体T4 DNA连接酶)的存在下,将平端区段与大量摩尔过量的接头分子一起温育。因此,反应的产物是在其末端带有聚合接头序列的DNA区段。这些DNA区段随后用适当的限制性内切酶裂解,并连接至表达载体,该表达载体已被产生与DNA区段末端相容的末端的酶裂解。

[0236] 然后建立单个稳定转染的细胞的克隆,并筛选期望的融合蛋白的高表达克隆。可以在96孔板中以高通量方式使用如前所述的合成酶底物pNP-TMP(Albright等人,2015,Nat.Commun.6:10006)完成筛选ENPP1蛋白表达的单细胞克隆。通过筛选鉴定高表达克隆后,蛋白质生产可以在摇瓶或生物反应器中完成,如在Albright等人,2015,Nat.Commun.6:10006中描述的。

[0237] ENPP1的纯化可以使用本领域已知的标准纯化技术的组合来完成。其实例在上面ENPP1蛋白质的生产中描述。纯化后,将ENPP1-Fc透析至补充有 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 的PBS(PBSplus)——浓缩至5和7mg/ml之间,并以200-500 μ l的等分部分在-80 $^{\circ}$ C下冷冻。就在使用前将等分部分融化,并通过在PBSplus中稀释将溶液的比活性调节至31.25au/ml(或约0.7mg/ml,取决于制品)。

[0238] 基因疗法

[0239] 编码本公开内容中有一种或多种多肽的核酸可用于治疗本文考虑的疾病或紊乱的基因疗法方案。可以将编码一种或多种多肽的改进构建体插入合适的基因疗法载体并施用于患者以治疗或预防感兴趣的疾病或紊乱。

[0240] 载体,例如病毒载体,已在现有技术中用于将基因导入多种不同的靶细胞。通常将载体暴露于靶细胞,以便转化可以在足够比例的细胞中发生,以从所需多肽(例如受体)的表达提供有用的治疗或预防效果。转染的核酸可以永久地并入每个靶细胞的基因组中,提供持久的效果,或者可选地治疗可能必须定期重复。在某些实施方式中,(病毒)载体用编码本公开内容的一种或多种多肽的遗传物质在体内转染肝细胞。

[0241] 多种载体——病毒载体和质粒载体二者都是本领域已知的(参见例如美国专利号5,252,479和WO 93/07282)。具体地,许多病毒已被用作基因转移载体,包括乳多空病毒(例如SV40)、牛痘病毒、疱疹病毒(包括HSV和EBV)、以及逆转录病毒。现有技术中的许多基因疗法方案已经使用失能的鼠逆转录病毒。最近发布的几项专利涉及用于进行基因疗法的方法

和组合物(参见例如美国专利号6,168,916;6,135,976;5,965,541和6,129,705)。前述专利中的每一个均通过引用以其整体并入本文。

[0242] AAV-介导的基因疗法:

[0243] AAV是属于依赖病毒属的细小病毒,其具有使其特别适合基因疗法应用的数个特征。例如,AAV可以感染多种宿主细胞,包括非分裂细胞。此外,AAV可以感染来自多种物种的细胞。重要的是,AAV与任何人类或动物疾病无关,并且在整合后似乎不会改变宿主细胞的生理性质。最后,AAV在广泛的物理和化学条件下稳定,这使其适合生产、存储和运输要求。

[0244] AAV基因组是线性单链DNA分子,其含有大约4,700个核苷酸(AAV-2基因组由4,681个核苷酸组成,AAV-4基因组由4,767个核苷酸组成),通常包含内部非重复区段,每端侧接反向末端重复序列(ITR)。ITR的长度约为145个核苷酸(AAV-1的ITR为143个核苷酸),并具有多种功能,包括作为复制起点和作为病毒基因组的包装信号。

[0245] 基因组的内部非重复部分包括两个大的开放阅读框(ORF),称为AAV复制(rep)和衣壳(cap)区域。这些ORF编码复制和衣壳基因产物,允许复制、组装和包装完整的AAV病毒粒子。更具体地,从AAV rep区域表达至少四种病毒蛋白的家族:Rep 78、Rep 68、Rep 52和Rep 40,所有这些均以其表观分子量命名。AAV cap区域编码至少三种蛋白质:VP1、VP2和VP3。

[0246] AAV是一种辅助依赖型病毒,也就是说,它需要与辅助病毒(例如腺病毒、疱疹病毒或牛痘病毒)共感染以便形成功能完整的AAV病毒粒子。在不与辅助病毒共感染的情况下,AAV建立潜伏状态,其中病毒基因组插入宿主细胞染色体或以游离基因形式存在,但不会产生感染性病毒粒子。随后辅助病毒的感染“挽救”整合的基因组,使其能够复制并包装到病毒衣壳中,从而重建感染性病毒粒子。虽然AAV可以感染来自不同物种的细胞,但辅助病毒必须与宿主细胞属于同一物种。因此,例如,人AAV在已与犬腺病毒共感染的犬细胞中复制。

[0247] 为了产生含有异源核酸序列的感染性重组AAV(rAAV),可以用含有异源核酸序列但缺乏AAV辅助功能基因rep和cap的AAV载体转染合适的宿主细胞系。然后可以在单独的载体上提供AAV辅助功能基因。此外,载体上只能提供AAV生产所需的辅助病毒基因(即辅助功能基因),而不提供具有复制能力的辅助病毒(例如腺病毒、疱疹病毒或牛痘病毒)。

[0248] 总的来说,可以在一个或多个载体上提供AAV辅助功能基因(即,rep和cap)和附属功能基因。然后可以在宿主细胞中表达辅助和附属功能基因产物,其中它们将反式作用于含有异源核酸序列的rAAV载体上。然后将含有异源核酸序列的rAAV载体复制和包装,就如同它是野生型(wt)AAV基因组一样,形成重组病毒粒子。当患者的细胞被产生的rAAV病毒粒子感染时,异源核酸序列进入患者细胞并在其中表达。由于患者的细胞缺乏rep和cap基因以及附属功能基因,rAAV无法进一步复制和包装他们的基因组。此外,如果没有rep和cap基因源,wtAAV就无法在患者的细胞中形成。

[0249] 有11种已知的AAV血清型,AAV-1到AAV-11(Mori,et al.,2004,Virology 330(2):375-83)。AAV-2是人群中最普遍的血清型;一项研究估计,至少80%的普通人群已经感染了wt AAV-2(Berns and Linden,1995,Bioessays 17:237-245)。AAV-3和AAV-5在人群中也很普遍,感染率高达60%(Georg-Fries,et al.,1984,Virology 134:64-71)。AAV-1和AAV-4是猿猴分离株,尽管这两种血清型都可以转导人类细胞(Chiorini,et al.,1997,J Virol 71:6823-6833;Chou,et al.,2000,Mol Ther 2:619-623)。在六种已知的血清型中,最好地

表征了AAV-2。例如,AAV-2已被用于一系列广泛的体内转导实验,并已显示转导许多不同的组织类型,包括:小鼠(美国专利号5,858,351;美国专利号6,093,392),狗肌肉;小鼠肝脏(Couto,et al.,1999,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:12725-12730;Couto,et al.,1997,J.Virol.73:5438-5447;Nakai,et al.,1999,J.Virol.73:5438-5447和Snyder,et al.,1997,Nat.Genet.16:270-276);小鼠心脏(Su,et al.,2000,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:13801-13806);兔肺(Flotte,et al.,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:10613-10617);和啮齿动物光受体(Flannery et al.,1997,Proc.Natl.Acad.Sci.USA94:6916-6921)。

[0250] AAV-2的广泛组织趋向性可用于递送组织特异性转基因。例如,AAV-2载体已被用于递送以下基因:将囊性纤维化跨膜传导调节基因递送到兔肺(Flotte,et al.,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:10613-10617);将Factor NIII基因(Burton,et al.,1999,Proc.Natl.Acad.Sci.USA96:12725-12730)和因子IX基因(Nakai,et al.,1999,J.Virol.73:5438-5447;Snyder,et al.,1997,Nat.Genet.16:270-276;美国专利号.6,093,392)递送到小鼠肝脏、狗和小鼠肌肉(美国专利号6,093,392);将促红细胞生成素基因递送到小鼠肌肉(美国专利号5,858,351);将血管内皮生长因子(VEGF)基因递送到小鼠心脏(Su,et al.,2000,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:13801-13806);和将芳香族1-氨基酸脱羧酶基因(aromatic 1-amino acid decarboxylase gene)递送到猴神经元。某些rAAV递送的转基因的表达在实验室动物中具有治疗作用;例如,据报道因子IX的表达在血友病B的狗模型中恢复表型正常性(美国专利号.6,093,392)。此外,至小鼠心肌的rAAV递送的NEGF的表达导致新生血管形成(Su,et al.,2000,Proc.Natl.Acad.Sci.USA97:13801-13806),而至帕金森病猴大脑的rAAV递送的AADC的表达导致多巴胺能功能的恢复。

[0251] 将感兴趣的蛋白质递送至哺乳动物的细胞是通过首先产生包括编码感兴趣的蛋白质的DNA的AAV载体然后将该载体施用于哺乳动物来实现的。因此,本公开内容应被解释为包含含有编码感兴趣的一种或多种多肽的DNA的AAV载体。一旦掌握了本公开内容,包括编码这种/这些多肽的DNA的AAV载体的产生对于技术人员来说将是显而易见的。

[0252] 在某些实施方式中,本公开内容的rAAV载体包括若干必需的DNA元件。在某些实施方式中,这些DNA元件包括至少两个拷贝的AAV ITR序列、启动子/增强子元件、转录终止信号、任何需要的5'或3'非翻译区,它们位于编码感兴趣的蛋白质的DNA或其生物活性片段的侧翼。本公开内容的rAAV载体还可以包括感兴趣的蛋白质的内含子的一部分。此外,任选地,本公开内容的rAAV载体包括编码感兴趣的突变多肽的DNA。

[0253] 在某些实施方式中,载体包括启动子/调节序列,该启动子/调控序列包括能够驱动异源基因在许多不同细胞类型中以高水平表达的混杂启动子。此类启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)即刻早期启动子/增强子序列、劳斯肉瘤病毒启动子/增强子序列等。在某些实施方式中,本公开内容的rAAV载体中的启动子/调节序列是CMV即刻早期启动子/增强子。然而,用于驱动异源基因表达的启动子序列也可以是诱导型启动子,例如但不限于类固醇诱导型启动子,或者可以是组织特异性启动子,例如但不限于,肌肉组织特异性的骨骼 α -肌动蛋白启动子和肌肉肌酸激酶启动子/增强子等。

[0254] 在某些实施方式中,本公开内容的rAAV载体包括转录终止信号。虽然本公开内容的载体中可以包括任何转录终止信号,但在某些实施方式中,转录终止信号是SV40转录终止信号。

[0255] 在某些实施方式中,本公开内容的rAAV载体包括编码感兴趣多肽或感兴趣多肽的生物活性片段的分离的DNA。本公开内容应被解释为包括感兴趣的多肽的任何哺乳动物序列,其是已知的或未知的。因此,本公开内容应被解释为包括来自除人类之外的哺乳动物的基因,其多肽以与人类多肽基本相似的方式发挥功能。优选地,包括编码感兴趣的多肽的基因的核苷酸序列与编码感兴趣的多肽的基因约50%同源,更优选约70%同源,甚至更优选约80%同源,最优选约90%同源。

[0256] 此外,本公开内容应被解释为包括野生型蛋白质序列的天然存在的变体或重组衍生的突变体,这些变体或突变体使得由此编码的多肽在本公开的基因疗法方法中与全长多肽在治疗上一样有效,或者甚至比全长多肽在治疗上更有效。

[0257] 本公开内容还应被解释为包括保留多肽生物活性的DNA编码变体。此类变体包括已经或可以使用重组DNA技术修饰的蛋白质或多肽,使得蛋白质或多肽具有增强其在本文所述方法中使用的适用性的另外的性质,例如但不限于赋予血浆中蛋白质稳定性增强和蛋白质比活性增强的变体。类似物可以通过保守的氨基酸序列差异或通过不影响序列的修饰或通过两者而与天然存在的蛋白质或肽不同。例如,可以进行保守的氨基酸改变,虽然它们改变了蛋白质或肽的一级序列,但通常不会改变其功能。

[0258] 本公开内容不限于实验实施例中举例说明的具体rAAV载体;相反,本公开内容应当被解释为包括任何合适的AAV载体,其包括但不限于基于AAV-1、AAV-3、AAV-4和AAV-6等的载体。

[0259] 本公开内容还包括以有效提供治疗效果的量治疗患有疾病或紊乱的哺乳动物的方法。该方法包括向哺乳动物施用编码感兴趣的多肽的rAAV载体。优选地,哺乳动物是人。

[0260] 通常,在单次注射中施用的病毒载体基因组的数量/哺乳动物在约 1×10^8 至约 5×10^{16} 的范围内。优选地,单次注射中施用的病毒载体基因组的数量/哺乳动物为约 1×10^{10} 至约 1×10^{15} ;更优选地,单次注射中施用的病毒载体基因组的数量/哺乳动物为约 5×10^{10} 至约 5×10^{15} ;并且,最优选地,在单次注射中施用的病毒载体基因组的数量/哺乳动物为约 5×10^{11} 至约 5×10^{14} 。

[0261] 当本公开内容的方法包括多位点同时注射,或包括在数小时(例如,从约少于一小时至约两或三小时)的时间段内注射到不同位点的数次多位点注射时,施用的病毒基因组的总数可以与单点注射方法中所述的相同,或其分数或倍数。

[0262] 为了以单点注射施用本公开内容的rAAV载体,在某些实施方式中,将包含病毒的组合物直接注射到受试者的器官(例如但不限于受试者的肝脏)中。

[0263] 为了施用于哺乳动物,可以将rAAV载体悬浮在药学上可接受的载体中,例如pH为约7.8的HEPES缓冲盐水中。其他有用的药学上可接受的载体包括但不限于甘油、水、盐水、乙醇和其他药学上可接受的盐溶液,例如磷酸盐和有机酸的盐。这些和其他药学上可接受的载体的实例描述于Remington's Pharmaceutical Sciences(1991,Mack Publication Co.,New Jersey)中。

[0264] 本公开内容的rAAV载体也可以以试剂盒的形式提供,该试剂盒包括,例如,在干燥盐制剂中的载体的冻干制剂、用于悬浮载体/盐组合物的无菌水和用于悬浮载体并将其施用于哺乳动物的说明书。

[0265] 序列

[0266] SEQ ID NO:1:hENPP1氨基酸序列

[0267] MERDGCAGGGSRGEGGRAPREGPAGNGRDRGRSHAAEAPGDPQAAASLLAPMDVGEEPLEKAARARTA
KDPNTYKVLVSLVLSVCVLTITLGCIFGLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCLDYQETCIEPEHI
WTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDDCDKGDCCINYSVVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAE
YLHTWGGLLPVI SKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEW
YKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLEEPS
SGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPA
ARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCG
SGFHGSDNVFSNMQUALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEV
HPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQ
DILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPVSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNI
VPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCK
DTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSILKLT
HLPTFSQED

[0268] SEQ ID NO:2:ENPP2氨基酸序列

[0269] MARRSSFQSCQIIISLFTFAVGVNICLGFTAHRIKRAEGWEEGPPTVLSDSPWTNISGSCKGRCFELQEA
GPPDCRCDNLCKSYTSCCHDFDELCLKTARGWECTKDRCGEVRNEENACHCEDCLARGDCCTNYQVVCCKGESHVVD
DDCEEIKAAECPAGFVRPPLIIFSVDGFRASYMKKGSKVMPIEKL RSCGTHSPYMRPVYPTKTFPNLYTLATGLYP
ESHGIVGNSMYDPVDFATFHLRGREKFNHRWWGGQPLWITATKQGVKAGTFFWSVVI PHERRILTILQWLTLPDHER
PSVYAFYSEQPDFSGHKYGPFGPEMTNPLREIDKIVGQLMDGLKQLKLRHCVNVI FVDHGMEDVTCDRTEFLSNYL
TNVDDITLVPGTLGRIRSKFSNNAKYDPKAI IANLTCKKPDQHFKPYLQHLPKRLHYANNRRIEDIHLLVERRWHV
ARKPLDVYKPKSGKCFQGDHGFNDKVNMQTVFVGYGSTFKYKTKVPPFENIELYNVMCDLLGLKPAPNNGTHGSL
NHLRLTNTFRPTMPEEVTRPNYPGIMYLQSDFDLGTCDKVEPKNKLDELNKRLLHTKGSTEATRKFGRSRNENKE
NINGNFEPKREHLLYGRPAVLYRTRYDILYHTDFESGYSEIFLMPLWTSYTVSKQAEVSSVPDHLTSCVRPDVRS
PSFSQNCCLAYKNDKQMSYGFLLPYPYLSSSPEAKYDAFLVTNMVMPYAFKRVWNYFQRVLVKKYASERNGVNVISGP
IFDYDYDGLHDTEDKIKQYVEGSSIPVPTHYYSIITSCLDFTQPADKCDGPLSVSSFILPHRPDNEESCNSSEDESK
WVEELMKMHTARVRDIEHLTSLDFFRKT SRSYPEILTLKTYLHTYESEI

[0270] SEQ ID NO:3:hIgG Fc结构域,Fc

[0271] DKTHTCPPELPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0272] SEQ ID NO:4:hENPP5蛋白质输出信号序列

[0273] MTSKFLVSVFILAALSSTTFS-Xaa₂₃Xaa₂₄,

[0274] 其中Xaa₂₃不存在或为L,和

[0275] 其中如果Xaa₂₃不存在则Xaa₂₄不存在,并且如果Xaa₂₃为L,则Xaa₂₄不存在或为Q

[0276] SEQ ID NO:5:hENPP7蛋白质输出信号序列

[0277] MRGPAVLLTV ALATLLAPGAGA

[0278] SEQ ID NO:6:hENPP7蛋白质输出信号序列

[0279] MRGPAVLLTV ALATLLAPGA

[0280] SEQ ID NO:7:ENPP1-Fc

MRGPAVLLTVALATLLAPGAGAPSCAKEVKSCCKGRFCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLD
YQETCIEPEHIWTCNKFRFCGEKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCE
SINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFP
NHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGT
FFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSY
GPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYL
DVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKS

[0281] **DRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFE**
NIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGC
SCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMP
LWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGI
YSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYGRCDSLENL
RQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDS
WVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSILKLLKTHLPTFSQED*RSDKTHTCPPCAP*
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 [0282] *QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS*
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0283] 粗体:信号序列

[0284] 常规:ENPP1细胞外结构域

[0285] 带下划线:接头序列

[0286] 斜体:Fc结构域

[0287] SEQ ID NO:8:示例性氨基酸接头序列

[0288] LIN

[0289] SEQ ID NO:9:示例性氨基酸接头序列

[0290] (GGGS)_n

[0291] n是1和10之间并且包括1和10的整数,例如n=1、n=2、n=3、n=4、n=5、n=6、n=7、n=8、n=9或n=10。

[0292] SEQ ID NO:10:人ENPP1的示例性细胞外结构域

[0293] **PSCAKEVKSCCKGRFCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRFCGEKRLTRSLCAC**
DDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLLKCGTY
TKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTTF
WPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDG
MVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIA
RNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYG
PGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCN
PSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTE
DFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRKY
YAEERNGVNVVSGPVDFDYGRCDSLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHLCENLDTLAFILPH
RTDNSESCVHGKHDSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSILKLLKTHLPTFSQED

[0294] SEQ ID NO:11: 示例性ENPP1突变体多肽(以粗体/下划线显示相对于野生型人ENPP1的取代)

[0295] PSCA**KEV**K**SCK**GRCFERTFGNCRCDAA**CV**ELGN**CC**LDYQETCIEPEHIWTCNK**FRC**GEKR
L**TR**SLCAC**SDD**CKDKGDCCIN**YSS**V**CQ**GEK**SW**VEEP**CES**IN**EP**Q**CP**AG**FET**P**PT**LL**FL**SLDG
FRAEYLHTWG**GL**LPV**ISK**L**KK**CGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNK**M**
YDPKMNAS**FL**KSKEKFNPEWYK**GE**PIWVTAKY**QGL**KSGTFFWPGSDVEING**T**FPDIYK
MYNGSV**PFE**ERILAVLQWLQ**LP**KDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDG
MVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQG**SCK**KYIYLNKYLG**DV**KN**IK**VIYGPAA**RL**
RPSD**V**PKYYSFN**YEG**IARNL**SC**REP**NQ**HF**KPY**LKHFLPKRLH**FA**KSD**RIE**PLTFYLD**PQ**W
[0296] Q**L**ALNP**SER**KYCGSGFHGSDNVFSNM**QAL**FVGYG**PG**FKHGIEADTFENIEVYNLMCDLL
NLTPAP**NG**THGSLNHLLKNPVYTPKH**PK**EVHPLV**QC**PFTRNPRDNLGCSCNP**SIL**PIEDF
QTQFNLTVA**E**EK**IK**HETLPYGRPRVLQK**ENT**ICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDR
NDSFSTEDFSN**CL**YQDFR**IP**LS**VH**CKSFYK**NN**TKVSYG**FL**SPPQLNKNSSGIYSEALLTTN
IVPMYQ**SF**Q**VI**WRYFHD**TLL**RKYA**ER**NGV**NV**SGPVDFD**YD**GRCD**SLE**NLRQ**KRR**VI
RNQEILIP**TH**FFIVLT**SCK**DTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDN**SE**SCVHGKH**DSS**WVEELL
MLHRARITDVEHITGLSFY**QQR**KEPVSDILK**LK**THLPTFSQED

[0297] SEQ ID NO:12: 示例性ENPP1突变体多肽(以粗体/下划线显示相对于野生型人ENPP1的取代)

PSCA**KE**NK**SCK**GRCFERTFGNCRCDAA**CV**ELGN**CC**LDYQETCIEPEHIWTCNK**FRC**GEK
RL**TR**SLCAC**SDD**CKDKGDCCIN**YSS**V**CQ**GEK**SW**VEEP**CES**IN**EP**Q**CP**AG**FET**P**PT**LL**FL**SLD
GFRAEYLHTWG**GL**LPV**ISK**L**KK**CGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNK
MYDPKMNAS**FL**KSKEKFNPEWYK**GE**PIWVTAKY**QGL**KSGTFFWPGSDVEING**T**FPDIY
KMYNGSV**PFE**ERILAVLQWLQ**LP**KDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVD
GMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQG**SCK**KYIYLNKYLG**DV**KN**IK**VIYGPAA
RLRPSD**V**PKYYSFN**YEG**IARNL**SC**REP**NQ**HF**KPY**LKHFLPKRLH**FA**KSD**RIE**PLTFYLD**P**
[0298] Q**W**QLALNP**SER**KYCGSGFHGSDNVFSNM**QAL**FVGYG**PG**FKHGIEADTFENIEVYNLMC
DLLNLTPAP**NG**THGSLNHLLKNPVYTPKH**PK**EVH**N**L**T**Q**CP**PFTRNPRDNLGCSCNP**SIL**PI
EDFQTQFNLTVA**E**EK**IK**HETLPYGRPRVLQK**ENT**ICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSY**T**
VDRNDSFSTEDFSN**CL**YQDFR**IP**LS**VH**CKSFYK**NN**TKVSYG**FL**SPPQLNKNSSGIYSEAL
LTTNIVPMYQ**SF**Q**VI**WRYFHD**TLL**RKYA**ER**NGV**NV**SGPVDFD**YD**GRCD**SLE**NLRQ**K**
RRVIRNQEILIP**TH**FFIVLT**SCK**DTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDN**SE**SCVHGKH**DSS**WV
EELLMLHRARITDVEHITGLSFY**QQR**KEPVSDILK**LK**THLPTFSQED

[0299] SEQ ID NO:13: 示例性人IgG1 Fc区

[0300] DK**TH**TC**PP**CP**AP**ELLGGPSVFL**FP**PK**PD**TL**MI**SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
K**PRE**EQYN**ST**YRVVSVLTVLHQD**WL**NGKEYKCKVSN**KAL**PA**IE**KT**ISK**AKG**QPRE**QVYTLPPSREEMTK**NQ**VSLT
CL**VK**GFYPSD**IA**VEWESNG**QP**ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV**DK**SRW**QQ**GNV**FSC**SV**MHE**ALHNHYT**QK**LSL
SPGK

[0301] SEQ ID NO:14: 示例性变体人IgG1 Fc区(含有MST/YTE取代(粗体/下划线))

[0302] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0303] SEQ ID NO:15: 示例性的含ENPP1的融合体:ENPP1细胞外结构域(SEQ ID NO:10;
斜体)在其C端与(GGGGS)₁(SEQ ID NO:9(n=1);带双下划线)融合,后者在其C端与变体人
IgG Fc区(SEQ ID NO:14;未修改的文本)融合

PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRFCGEKRLT
RSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAE
YLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGHIDNKMYDPKMNAS
FSLKSKEKFNPEWYKGEPIWWTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEERIL
AVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLH
RCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNL
SCREPNQHFQPKYKHLKFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVF
SNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPK
[0304] *HPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSNPSILPIEDFQTFQNLVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQK*
ENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKN
NTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSG
PVDFDYDGRCDSENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHLCENLDTLAFILPHR
TDNSESCVHGHKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVS DILKLTHTLPTFSQED
GGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0305] 斜体:ENPP1细胞外结构域

[0306] 带双下划线:接头序列

[0307] 整齐的:IgG Fc区

[0308] SEQ ID NO:16: 示例性的含ENPP1的融合体:ENPP1细胞外结构域(SEQ ID NO:10;
斜体)在其C端与氨基酸序列LIN(SEQ ID NO:8;带双下划线)融合,后者在其C端与变体人
IgG Fc区(SEQ ID NO:14;未修改的文本)融合

PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRFCGEKRLT
RSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAE
[0309] *YLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGHIDNKMYDPKMNAS*
FSLKSKEKFNPEWYKGEPIWWTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEERIL
AVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLH

[0310] *RCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNL
SCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSGFHGSDNVF
SNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPK
HPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQK
ENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKN
NTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSG
PVDFDYDGRCDSELENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHR
TDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKCLKTHLPTFSQED
LINDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

[0311] 斜体:ENPP1细胞外结构域

[0312] 带双下划线:接头序列

[0313] 整齐的:IgG Fc区

[0314] SEQ ID NO:17:示例性的ENPP1变体多肽融合体:ENPP1突变体多肽(SEQ ID NO:11;斜体)在其C端与LIN(SEQ ID NO:8;带双下划线)融合,后者在其C端与变体人IgG Fc区(SEQ ID NO:14;未修改的文本)融合

[0315] *PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRGCEKRLT
RSLCACSDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAE
YLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNAS
FSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGTFPDIYKMYNGSVPFEEIL
AVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSEVIKALQRVDGMVGMMDGLKELNLH
RCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNL
SCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSGFHGSDNVF
SNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPK
HPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQK
ENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKN
NTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSG
PVDFDYDGRCDSELENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHR
TDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKCLKTHLPTFSQED
LINDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

[0316] SEQ ID NO:18:示例性的ENPP1变体多肽融合体:ENPP1突变体多肽(SEQ ID NO:11;斜体)在其C端与(GGGGS)₁(SEQ ID NO:9;n=1;双下划线)融合,后者在其C端与变体人IgG Fc区(SEQ ID NO:14;未修改的文本)融合

PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRS
 LCACSDDCCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLH
 TWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLK
 SKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGTFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQ
 WLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLI
 LISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQ
 HFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFV
 GYGPFGKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQ
 [0317] CPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQF
 MSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQ
 LNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDFDYDGRCD
 LENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDS
 WVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKTKHLPTFSQEDGGGGGSDKTHTCPPCP
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0318] 方法

[0319] 本公开内容包括在有需要的受试者中减少或预防病理性钙化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0320] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中减少或预防病理性骨化进展的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0321] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中减少或预防软组织的异位钙化进展的方法,其包括减少、改善或预防血管钙化,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0322] 本公开内容进一步包括减少或预防由ENPP1缺乏症引起的疾病进展的方法。ENPP1缺乏症的特征在于在有需要的受试者中降低的ENPP1活性水平或缺陷的ENPP1表达水平(分别与正常健康受试者中ENPP1活性水平或ENPP1表达水平相比),该方法包括向该受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0323] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中减少或预防由血浆PPi的较低水平引起的疾病进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽以将受试者的血浆PPi增加到正常水平(1-3 μ M)或高于正常水平(比正常水平高30-50%),然后将血浆PPi此后维持在恒定的正常水平或高于正常水平。该方法进一步包括以两天、三天、一周或一个月的间隔施用另外的治疗有效量,以将受试者的血浆PPi维持在恒定的正常水平或高于正常水平,以便减少或预防病理性钙化或骨化的进展。

[0324] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、逆转或预防后纵韧带骨化(OPLL)进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0325] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、恢复或预防低血磷性佝偻病进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0326] 本公开内容进一步包括在被诊断患有选自以下至少一种疾病的受试者中减少或预防至少一种疾病进展的方法:慢性肾病(CKD)、终末期肾病(ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病(CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化(OPLL)、低血磷性佝偻病、骨关节炎、衰老相关的动脉

硬化、特发性婴儿动脉钙化 (IIAC)、婴儿全身动脉钙化 (GACI) 和动脉粥样硬化斑块钙化,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0327] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中减少和/或预防衰老相关的动脉硬化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0328] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中减少或预防由ENPP1缺乏症(例如,分别与在正常健康受试者中ENPP1活性水平或ENPP1表达水平相比,降低的ENPP1活性水平和/或缺陷的ENPP1表达水平)引起的疾病进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0329] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中减少或预防由血浆PPi水平低于正常水平引起的疾病进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽以增加和/或维持受试者的血浆PPi在正常PPi水平(约1-3 μ M)的约90%、95%、100%、105%、110%、120%、130%、140%或150%的水平。在某些实施方式中,该方法进一步包括每两天、三天、一周或一个月进一步施用本公开内容的多肽,以将血浆PPi水平维持在正常PPi水平的约90%、95%、100%、105%、110%、120%、130%、140%或150%,因此预防病理性钙化或骨化的进展。

[0330] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、逆转或预防弹性假黄色瘤(PXE)进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0331] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、逆转或预防动脉血管中动脉粥样硬化斑块钙化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0332] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、逆转或预防骨关节炎进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0333] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、逆转或预防由于早衰引起的动脉硬化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0334] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、逆转或预防X连锁低血磷性佝偻病(XLH)、遗传性低血磷性佝偻病(HHRH)、低血磷性骨病(HBD)、常染色体显性低血磷性佝偻病(ADHR)和/或和常染色体隐性低血磷性佝偻病进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0335] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、逆转或预防年龄有关的骨质减少进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0336] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、逆转或预防强直性脊柱炎进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0337] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、逆转或预防小儿镰状细胞性贫血中风进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开内容的多肽。

[0338] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中减少或预防病理性钙化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ENPP1突变体多肽、融合体、含ENPP-1的多肽或缀合物的任一种,从而减少或预防受试者的病理性钙化的进展。

[0339] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中减少或预防病理性骨化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ENPP1突变体多肽、融合体、含ENPP-1的多肽或缀合物的任一种,从而减少或预防受试者的病理性骨化的进展。

[0340] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中减少或预防软组织的异位钙化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ENPP1突变体多肽、融合体、含ENPP-1的多肽或缀合物的任一种,从而减少或预防受试者的软组织的异位钙化的进展。

[0341] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、逆转或预防后纵韧带骨化(OPLL)进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ENPP1突变体多肽、融合体、含ENPP-1的多肽或缀合物的任一种,从而减少、逆转或预防受试者的后纵韧带骨化(OPLL)。

[0342] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗、恢复或预防低血磷性佝偻病进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ENPP1突变体多肽、融合体、含ENPP-1的多肽或缀合物的任一种,从而减少、逆转或预防受试者的低血磷性佝偻病的进展。

[0343] 本公开内容进一步包括在被诊断患有选自以下至少一种疾病的受试者中减少或预防至少一种疾病进展的方法:慢性肾病(CKD)、终末期肾病(ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病(CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化(OPLL)、低血磷性佝偻病、骨关节炎、衰老相关的动脉硬化、特发性婴儿动脉钙化(IIAC)、婴儿全身动脉钙化(GACI)和动脉粥样硬化斑块钙化,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ENPP1突变体多肽、融合体、含ENPP-1的多肽或缀合物的任一种,从而减少或预防该疾病的进展。

[0344] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中减少或预防衰老相关的动脉硬化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ENPP1突变体多肽、融合体、含ENPP-1的多肽或缀合物的任一种,从而减少或预防受试者的衰老相关的动脉硬化的进展。

[0345] 本公开内容进一步包括提高焦磷酸盐(PPi)水平低于PPi正常水平的受试者中的PPi水平的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ENPP1突变体多肽、融合体、含ENPP-1的多肽或缀合物的任一种,从而在进行施用后升高受试者中PPi的水平至少至 $2\mu\text{M}$ 的正常水平,并且维持在大约相同的水平下。

[0346] 本公开内容进一步包括在焦磷酸盐(PPi)水平低于PPi正常水平的受试者中减少或预防病理性钙化和骨化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ENPP1突变体多肽、融合体、含ENPP-1的多肽或缀合物的任一种,从而减少受试者的病理性钙化或骨化或预防受试者的病理性钙化或骨化的进展。

[0347] 本公开内容进一步包括在有需要的受试者中治疗由细胞外焦磷酸盐(PPi)浓度降低表现出的ENPP1缺乏症的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ENPP1突变体多肽、融合体、含ENPP-1的多肽或缀合物的任一种,从而升高受试者的PPi水平。

[0348] 在某些实施方式中,病理性钙化选自特发性婴儿动脉钙化(IIAC)和动脉粥样硬化斑块钙化。

[0349] 在某些实施方式中,病理性骨化选自后纵韧带骨化(OPLL)、低血磷性佝偻病和骨关节炎。

[0350] 在某些实施方式中,软组织钙化选自IIAC和骨关节炎。

[0351] 在本文所述的任何方法的某些实施方式中,软组织选自动脉粥样硬化斑块、肌肉动脉、关节、脊柱、关节软骨、椎盘软骨、血管和结缔组织。在其他实施方式中,软组织包括动

脉粥样硬化斑块。在仍其他实施方式中,软组织组织包括肌肉动脉。在仍其他实施方式中,软组织选自关节和脊柱。在仍其他实施方式中,关节选自手关节和脚关节。在仍其他实施方式中,软组织选自关节软骨和椎间盘软骨。在仍其他实施方式中,软组织包括血管。在仍其他实施方式中,软组织包括结缔组织。

[0352] 在某些实施方式中,受试者被诊断患有早衰。

[0353] 在本文所述的任何方法的某些实施方式中,ENPP1突变体多肽、融合体或含ENPP1的多肽是在哺乳动物细胞中表达的ENPP1前体蛋白质的分泌产物,其中ENPP1前体蛋白质包含信号肽序列和ENPP1多肽,其中ENPP1前体蛋白质经过蛋白水解处理以产生ENPP1多肽。在某些实施方式中,本发明内容的多肽是在哺乳动物细胞中表达的ENPP1前体蛋白质的分泌产物。在其他实施方式中,ENPP1前体蛋白质包括信号肽序列和ENPP1多肽,其中ENPP1前体蛋白质经过蛋白水解处理成为本公开内容的多肽。在仍其他实施方式中,在ENPP1前体蛋白质中,信号肽序列与ENPP1多肽的N端缀合。在蛋白水解后,信号序列从ENPP1前体蛋白质上裂解,以提供ENPP1多肽。在某些实施方式中,信号肽序列选自ENPP1信号肽序列、ENPP2信号肽序列、ENPP7信号肽序列和ENPP5信号肽序列。

[0354] 在某些实施方式中,急性或慢性地向受试者施用多肽。在其他实施方式中,局部地、区域地、肠胃外地或全身地向受试者施用多肽。

[0355] 在某些实施方式中,受试者是哺乳动物。在其他实施方式中,哺乳动物是人类。

[0356] 在某些实施方式中,通过选自以下的至少一个途径施用ENPP1突变体多肽、含ENPP1多肽或融合体或其前体蛋白质:皮下、口服、气雾剂、吸入、直肠、阴道、经皮肤、皮下、鼻内、颊、舌下、肠胃外、鞘内、胃内、眼、肺和局部。在其他实施方式中,ENPP1突变体多肽、含ENPP1多肽或融合体或其前体蛋白质作为药物组合物向受试者施用,该药物组合物进一步包括至少一种药学上可接受的载体。

[0357] 在某些实施方式中,急性或慢性地向受试者施用ENPP1突变体多肽、含ENPP1多肽或融合体或其前体蛋白质。在其他实施方式中,局部地、区域地或全身地向受试者施用ENPP1突变体多肽、含ENPP1多肽或融合体或其前体蛋白质。在仍另一个实施方式中,多肽或其前体蛋白质在编码的载体上递送,其中该载体编码蛋白质,并且在将所述载体施用于受试者后,其从载体转录并翻译。

[0358] 本领域的技术人员将理解,当配备包括本文详述的方法的本公开内容时,本公开内容不限于在确定疾病或紊乱后对其的治疗。具体地,疾病或紊乱的症状不必已表现出至对受试者危害的点;实际上,在施用治疗之前不需要在受试者中检测到疾病或紊乱。也就是说,在本公开内容可以提供益处之前,不必已发生疾病或紊乱的显著病理学。

[0359] 因此,如本文更充分描述的,本公开内容包括预防受试者中的疾病和紊乱的方法,其中如本文其他地方所讨论的,本公开内容的多肽可以在疾病或紊乱发生之前施用于受试者,从而预防疾病或紊乱发展。具体地,当疾病或紊乱的症状尚未表现出至对受试者危害的点时;实际上,在施用治疗之前不需要在受试者中检测到疾病或紊乱。也就是说,在本公开内容可以提供益处之前,不必已发生疾病或紊乱的显著病理学。因此,本公开内容包括用于受试者中疾病或紊乱的预防或延迟发作,或减少其进展或生长的方法,因为可以在检测到疾病或紊乱之前向受试者施用本公开内容的多肽。在某些实施方式中,对具有强烈的疾病或紊乱家族病史的受试者施用本公开内容的多肽,从而预防或延迟疾病或紊乱的发作或进

展。

[0360] 借助本文的公开内容,本领域技术人员将因此理解,预防受试者的疾病或紊乱包括向受试者施用本公开内容的多肽作为针对疾病或紊乱的预防措施。

[0361] 药物组合物和制剂

[0362] 本公开内容在本文所述方法内提供包括本公开内容的多肽的药物组合物。

[0363] 这样的药物组合物是适合于向受试者施用的形式,或者药物组合物可以进一步包括一种或多种药学上可接受的载体、一种或多种另外的成分或这些的一些组合。如本领域所公知的,药物组合物的多种组分可以以生理上可接受的盐的形式存在,例如与生理上可接受的阳离子或阴离子组合。

[0364] 在实施方式中,可以施用用于实践本公开内容的方法的药物组合物以递送1ng/kg/天和100mg/kg/天之间的剂量。在其他实施方式中,可以施用用于实践本公开内容的药物组合物以递送1ng/kg/天和500mg/kg/天之间的剂量。

[0365] 本公开内容的药物组合物中活性成分、药学上可接受的载体和任何另外成分的相对量将变化,这取决于所治疗受试者的身份、大小和状况,并进一步取决于药物组合物施用的途径。例如,组合物可包括约0.1%和约100% (w/w) 之间的活性成分。

[0366] 在本公开内容的方法中有用的药物组合物可以适当地开发用于吸入、口服、直肠、阴道、肠胃外、局部、经皮肤、肺、鼻内、颊、眼、鞘内、静脉内或另一施用途。其他考虑的制剂包括设计的 (projected) 纳米颗粒、脂质体制剂、含有活性成分的重新密封的红细胞和基于免疫学的制剂。一种或多种施用途对普通技术人员而言是显而易见的,并且取决于许多因素,其包括所治疗疾病的类型和严重度、所治疗的兽类或人类患者的类型和年龄等。

[0367] 本文所述的药物组合物的制剂可以通过药理学领域中已知的或以后开发的任何方法来制备。通常地,这种制备方法包括使活性成分与载体或一种或多种其他辅料成分缩合的步骤,然后如有必要或期望,将产品成型或包装成期望的单剂量或多剂量单位。

[0368] 如本文所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的离散量的药物组合物。活性成分的量通常等于将被施用于受试者的活性成分的剂量或该剂量的方便分数,例如该剂量的一半或三分之一。单位剂型可以是单一日剂量或多个日剂量之一(例如每天约1至4或多次)。当使用多个日剂量时,对于每个剂量的单位剂型可以相同或不同。

[0369] 施用/给药

[0370] 施用方案可能会影响有效量的构成。例如,可以每天或依次施用数个分剂量以及交错剂量,或可以连续输注剂量,或也可以是弹丸注射。进一步地,如在治疗或预防情况的紧急情况下所指示的,治疗制剂的剂量可以成比例地增加或减少。在某些实施方式中,向受试者施用本公开内容的化合物将受试者的血浆PPi升高至接近正常,其中哺乳动物的PPi的正常水平为1-3 μ M。“接近正常”是指比正常低或高0至1.2 μ M或0-40%、比正常低或高30nM至0.9 μ M或1-30%、比正常低或高0到0.6 μ M或0-20%、比正常低或高0到0.3 μ M或0-10%。

[0371] 本公开内容的组合物向患者例如哺乳动物施用可以使用已知的程序、以有效治疗患者疾病或紊乱的剂量和时间段进行。达到治疗效果所必需的治疗化合物的有效量可根据多种因素而变化,例如所用具体化合物的活性;施用时间;化合物的排泄速率;治疗的持续时间;与化合物组合使用的其他药物、化合物或材料;疾病或紊乱的状态,所治疗患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康状况和以前的病史,以及医学领域众所周知的类似因素。可

以调整剂量方案以提供最佳的治疗反应。剂量根据治疗化合物的生物活性确定,而生物学活性又取决于治疗化合物曲线的半衰期和血浆时间下的面积。根据本公开内容的多肽可以以每2天、或每4天、或每周或每月的适当时间间隔进行施用,以实现血浆PPi的连续水平,该水平接近PPi的正常水平(1-3 μ M)或高于PPi的正常水平(高于30-50%)。还可以基于半衰期或从体内清除治疗多肽的速率来确定本公开内容的多肽的治疗剂量。根据本公开内容的多肽以每2天、或每4天、每周或每月的适当时间间隔施用,以实现ENPP1的酶促活性的恒定水平。

[0372] 例如,可以每天施用数个分剂量或可以根据治疗情况的紧急程度的指示成比例地降低剂量。本公开内容的治疗化合物的有效剂量范围的非限制性实例为约0.01至50mg/kg体重/天。在某些实施方式中,本公开内容的治疗化合物的有效剂量范围为约50ng至500ng/kg体重,优选为100ng至300ng/kg体重。本领域普通技术人员将能够研究相关因素并确定治疗化合物的有效量而无需过多的实验。

[0373] 化合物可以以每天数次频繁地施用至患者,或者可以较不频繁地施用,例如每天一次、每周一次、每两周一次、每月一次或甚至更少频繁地,例如每几个月一次或者甚至一年一次或更少。应当理解,在非限制性实例中,每天给药的化合物的量可以以每天、每隔一天、每2天、每3天、每4天或每5天施用。例如,利用每隔一天施用,可以在周一开始每天5mg的剂量,在周三施用第一次后续的一天5mg的剂量,在周五施用第二次后续的一天5mg的剂量,依此类推。剂量的频率对技术人员而言是显而易见的,并且取决于许多因素,例如但不限于所治疗疾病的类型和严重性以及患者的类型和年龄。

[0374] 可以改变本公开内容药物组合中活性成分的实际剂量水平,以获得对于具体患者、组合物和施用模式有效实现所期望的治疗反应而对患者无毒的活性成分的量。

[0375] 具有本领域普通技术的医生,例如医师,可以容易地确定并开出所需的药物组合物的有效量。例如,医师或兽医可以以比所需低的水平开始在药物组合中使用的本公开内容的化合物的剂量,以实现期望的治疗效果并逐渐增加剂量直至实现所需效果。

[0376] 在某些实施方式中,本公开内容的组合物以每天一次至五次或更多次范围的剂量施用于患者。在其他实施方式中,本公开内容的组合物以包括但不限于每天、每两天、每三天一次至一周一次和每两周一次范围的剂量施用于患者。本公开内容的多种组合物的施用频率取决于许多因素因受试者而异,其包括但不限于年龄、要治疗的疾病或紊乱、性别、整体健康和其他因素。因此,本公开内容不应解释为限于任何特定的剂量方案和精确的剂量,并且由主治医师考虑到与患者有关的所有其他因素,来确定施用至任何患者的组合物。

[0377] 在某些实施方式中,本公开内容涉及包装的药物组合物,其包括装有治疗有效量的本公开内容化合物单独或与第二种药剂组合的容器;以及使用该化合物治疗、预防或减轻患者疾病或紊乱的一种或多种症状的说明书。

[0378] 施用途径

[0379] 本公开内容的任何组合物的施用途径包括吸入、口服、经鼻、经直肠、肠胃外、舌下、经皮肤、经粘膜(例如舌下、舌、(经)颊、(经)尿道、阴道(如经-和阴道周的)、鼻(内)和(经)直肠)、膀胱内、肺内、十二指肠内、胃内、鞘内、皮下、肌内、皮内、动脉内、静脉内、支气管内、吸入和局部施用。

[0380] 合适的组合物和剂型包括例如片剂、胶囊剂、囊片、丸剂、凝胶帽、锭剂、分散剂、悬

浮剂、溶液剂、糖浆剂、颗粒剂、珠剂、经皮贴剂、凝胶剂、散剂、小糖丸、乳浆剂、锭剂、霜剂、糊剂、膏药、洗剂、圆片(disc)、栓剂、用于鼻或口服施用的液体喷雾剂、用于吸入的干粉或雾化制剂、用于膀胱内施用的组合物和制剂等。可用于本公开内容的制剂和组合物不限于本文所述的具体制剂和组合物。

[0381] 肠胃外施用

[0382] 如本文所用,药物组合物的“肠胃外施用”包括特征在于以受试者组织的物理破坏和通过组织中的该破坏施用药物组合物的任何施用途径。因此,肠胃外施用包括但不限于通过注射组合物、通过手术切口施加组合物、通过穿透组织的非手术伤口施加组合物等来施用药物组合物。具体地,考虑肠胃外施用包括但不限于皮下、静脉内、腹膜内、肌内、胸骨内注射和肾透析输注技术。

[0383] 另外的施用形式

[0384] 本公开内容的另外的剂型包括在美国专利号6,340,475、6,488,962、6,451,808、5,972,389、5,582,837和5,007,790中所述的剂型。本公开内容的另外的剂型还包括在美国专利申请号20030147952、20030104062、20030104053、20030044466、20030039688和20020051820中所述的剂型。本公开内容的另外的剂型还包括在PCT申请号WO 03/35041、WO 03/35040、WO 03/35029、WO 03/35177、WO 03/35039、WO 02/96404、WO 02/32416、WO 01/97783、WO 01/56544、WO 01/32217、WO 98/55107、WO 98/11879、WO 97/47285、WO 93/18755和WO 90/11757中所述的剂型。

[0385] 控释制剂和药物递送系统

[0386] 可以使用常规技术制备本公开内容药物组合物的控释或缓释制剂。在一些情况下,所使用的剂型可以以其中一种或多种活性成分的缓慢或受控释放提供,使用例如羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基质、凝胶、渗透膜、渗透系统、多层包衣、微粒、脂质体或微球或其组合,以提供以不同比例的所期望的释放特性。本公开内容考虑适用于口服施用的单一单位剂型(例如片剂、胶囊剂、软胶囊和囊片),其适于受控释放。

[0387] 在某些实施方式中,本公开内容的制剂可以是但不限于短期、快速抵消以及受控的例如缓释、延迟释放和脉冲式释放的制剂。

[0388] 术语缓释在其常规意义上是指可在延长的时间段内提供逐渐药物释放的药物制剂,尽管不一定,但其可能导致药物血液水平在延长的时间段内基本恒定。该时间段可能长达一个月或更长时间,并且应该是比以弹丸形式施用的相同量的药剂更长的释放。为了缓释,可将化合物与为化合物提供缓释性质的合适的聚合物或疏水性材料一起制备。因此,使用本公开内容方法的化合物可以以微粒形式(例如通过注射)或以圆片或圆盘形式(通过植入)施用。在本公开内容的一些实施方式中,使用缓释制剂将本公开内容的化合物单独或与另一种药剂组合施用至患者。

[0389] 术语延迟释放在本文中以其常规含义使用,是指在药物施用后的一些延迟之后提供药物的初始释放的药物制剂,尽管不一定,但其包括约10分钟至多至约12小时的延迟。术语脉冲式释放在本文中以其常规含义使用,是指以药物施用后产生药物脉冲的血浆曲线的方式提供药物释放的药物制剂。术语立即释放在本文中以其常规含义使用,是指在药物施用后立即提供药物释放的药物制剂。

[0390] 如本文所用,短期是指在药物施用后多至并包括约8小时、约7小时、约6小时、约5

小时、约4小时、约3小时、约2小时、约1小时、约40分钟、约20分钟或约10分钟的任何时间段及药物施用后其任何或所有全部或部分增量。

[0391] 如本文所用,快速抵消是指在药物施用后多至并包括约8小时、约7小时、约6小时、约5小时、约4小时、约3小时、约2小时、约1小时、约40分钟、约20分钟或约10分钟的任何时间段及其任何或所有全部或部分增量。

[0392] 仅使用常规实验,本领域普通技术人员将认识到或能够确定本文所述的具体程序、实施方式、权利要求和实施例的许多等效物。这些等效物被认为在本公开内容的范围内并且被所附权利要求书覆盖。例如,应当理解,对反应和制备条件的修改——利用本领域公认的替代方案和仅使用常规实验,都在本申请的范围之内。

[0393] 应当理解,无论本文在何处提供数值和范围,这些数值和范围所涵盖的所有数值和范围均应涵盖在本公开内容的范围内。此外,所有落入这些范围内的数值以及值范围的上限或下限也在本申请的考虑中。

[0394] 以下实施例进一步说明了本公开内容的各个方面。然而,它们决不是对如本文所述的本公开内容的教导或公开内容的限制。

[0395] 实施例

[0396] 现在参考以下实施例描述本公开内容。提供这些实施例仅出于说明目的,并且本公开内容不限于这些实施例,而是涵盖由于本文提供的教导而显而易见的所有变化。

[0397] 方法和材料

[0398] 除非特别提及,否则使用本文其他地方所述的方案执行在有或没有补充情况下在CHO细胞或修饰的CHO细胞中的构建体表达、 V_{max} 测定、 K_m/K_{cat} 测定、AUC测定、半衰期测定。

[0399] ENPP1-Fc突变体构建体的生成

[0400] 修饰人NPP1(人:NCBI登录号NP_006199)以表达可溶的重组蛋白质,通过分别亚克隆入pFUSE-hlgG1-Fc1或pFUSE-mlgG1-Fc1质粒(InvivoGen, San Diego CA),将重组蛋白质与IgG1融合。使用市售试剂盒(Q5®位点定向诱变试剂盒/New England Biolabs)使用位点定向诱变从SEQ ID NO:7生成构建体。将由此生成的构建体进行测序以验证核酸序列,然后用于蛋白质表达。

[0401] ENPP1-Fc突变体构建体的表达

[0402] 在博莱霉素(Zeocin)/庆大霉素选择下,在CHO K1细胞(Sigma Aldrich, 85051005)中建立了ENPP1-Fc构建体的稳定转染,并使其适于悬浮生长。适应的细胞用于接种液体培养物在CD FORTI CHO™培养基(A1148301, Thermo Fischer)或PEPROGROW™ AF-CHO (PeproTech AF-CHO)在37°C和5%CO₂下于摇瓶中生长,在高湿度下以120rpm搅拌。将培养物逐渐扩展至预期的目标体积,然后再维持另外的2天以积累细胞外蛋白质。

[0403] ENPP1-Fc突变体构建体在修饰的CHO细胞中的表达

[0404] 修饰CHO-K1细胞,以生成稳定表达人 α -2,6-唾液酸转移酶(α -2,6-ST)酶的CHO-K1-MOD细胞。在CHO K1-MOD细胞中建立了ENPP1-Fc构建体的稳定转染,并按照与上述相同的方案表达蛋白质。任选地,在一些构建体中,表达相应构建体的CHO-K1-MOD细胞的培养基补充了唾液酸或称为1,3,4-O-Bu3ManNAc的唾液酸“高通量”前体,以促进蛋白质生产期间更高水平的糖基化。

[0405] ENPP1-Fc突变体构建体的纯化

[0406] 将液体培养物以 $4300 \times g$ 离心5mm,并通过 $0.2\mu\text{m}$ 膜过滤上清液,并使用Pellicon®3 0.0.11m² Ultracell®30D盒(Millipore,Billerica MA)通过切向流进行浓缩。然后在多步骤过程中通过色谱法技术的组合纯化浓缩的上清液。这些技术顺序进行,并且可以包括以下任何一种:与蛋白A或蛋白G的亲色谱法、阳离子交换色谱法、阴离子交换色谱法、尺寸排除色谱法、疏水交换色谱法、高压液相色谱法(HPLC)、沉淀步骤、萃取步骤、冻干步骤和/或结晶步骤。连续地使用这些步骤中的任何一个,蛋白质化学领域的普通技术人员可以将所述的物质组合物纯化为同质性,使得在银染凝胶上没有污染的蛋白质带。然后使用Pierce LAL发色内毒素定量试剂盒(Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit)(目录号88282)测试所得蛋白质样品,以确保其所有均不含内毒素。

[0407] 为了量化克隆最优化的生物学影响,通过在单次皮下给药每种同种型后的多个时间点测定血浆PPi浓度,对选择的ENPP1-Fc同种型的药效动力学影响进行定量。

[0408] K_m/K_{cat} 测定

[0409] HPLC测定了ENPP1构建体的ATP的稳态水解。简而言之,通过在含有20mM Tris (pH7.4)、150mM NaCl、4.5mM KCl、14mM ZnCl₂、1mM MgCl₂和1mM CaCl₂的反应缓冲液中向不同浓度的ATP添加10nM PPi来开始酶反应。在不同的时间点,移出50μl反应溶液,并用等体积的3M甲酸猝灭。将猝灭的反应溶液加载到在5mM乙酸铵 (pH 6.0) 溶液中平衡的C-18 (5m t 250×4.6mm) 柱(Higgins Analytical)上,并用0%至20%甲醇梯度洗脱。通过259nm下的UV吸光度监测底物和产物,并根据其对应峰和标准曲线的积分进行定量。

[0410] V_{max} 测定

[0411] 对于制备的每种突变体,使用胸苷5'-单磷酸对硝基苯酯(pNP-TMP)分析磷酸二酯酶活性(Saunders等人,2008,Mol.Cancer Ther.7(10):3352-62;Albright等人,2015,Nat Commun.6:10006)。

[0412] 曲线下面积测定

[0413] 血浆浓度对比时间曲线下的面积(也称为曲线下面积(AUC))可以用作评估用于血管外药物递送的分布体积(V)、总消除清除率(CL)和生物利用度(F)的手段。使用标准等式执行对于每个表达和纯化的ENPP1-Fc构建体的血浆时间曲线下面积,以确定单次皮下注射生物制剂后的半衰期和生物利用度,如等式1所述。

[0414] 半衰期确定

[0415] 药物半衰期($t_{1/2}$)是指血浆浓度或体内药物或生物制剂的量减少50%所花费的时间。遵循现有技术 and/或本文所述的方案,例如等式1,执行对于每种表达和纯化的ENPP1-Fc构建体的半衰期值,所述方案允许在单次皮下注射生物制剂后确定半衰期和生物利用度。

[0416] 药物半衰期可以使用等式1计算,该等式将单次注射施用到皮下贮存的药物的全身分数浓度与时间之间的关系相关联。将数据绘制为吸收的药物分数(F)随时间(t)的变化,允许通过将数据拟合为在时间 $t=0$ 时在皮下贮存处施用的药物的总全身吸收等式,确定消除常数(k_e)和吸收常数(k_a)。

$$[0417] \quad F = \frac{k_a}{(k_a - k_e)} [e^{-k_e t} - e^{-k_a t}] \quad (\text{等式 1})$$

[0418] 实施例1:糖基化突变的选择和优化

[0419] 对AENPP1-Fc构建体进行突变,以引入推定的另外糖基化位点和/或增加Fc对新生

儿孤儿受体 (FcRn) 的亲合力。在本文其他地方说明了测试的突变, 并且在下面说明了所讨论的具体构建体。

[0420] 通过引入另外的N-联糖基化位点并增强融合蛋白的pH依赖性再循环来寻求改善ENPP1-Fc的药代动力学性质。作为指导选择另外的N-联糖基化位点的方法, 使用了来源于小鼠ENPP1晶体的X射线衍射的电子密度图, 这揭示了在ENPP1中有4个糖基化位点。这些位点被假设存在于高度同源的人ENPP1中, 此外, 人ENPP1还含有另外4个N-联糖基化共有序列, 其糖基化状态是未知的(图7B)。

[0421] 为了鉴定不会对催化活性产生不利影响的适于高糖基化的ENPP1区域, 使用了GACI患者中ENPP1的结构建模、临床数据和遗传数据的组合。首先, 在ENPP2-7中鉴定了N-联糖基化共有序列, 并且评估了易于通过改变单个相邻残基而允许引入糖基化位点的序列。然后使用标准软件在结构上对ENPP2-7进行建模, 以使序列穿过小鼠ENPP1结构(PDB ID码4GTW)。提议的糖基化位点的位置与GACI中已知的不活化的ENPP1突变的位点(图7A-7B)以及酶中二硫键的位置进行比较。如果预测提议的糖基化位点的空间位置干扰任何一个, 则丢弃该位点。这些建模研究导致鉴定了另外的N-联糖基化程序的数个潜在位点, 这些位点可以被容易地引入ENPP1中, 而期望不会破坏蛋白质的折叠或酶促活性(图8A-8D、16A-16B和17)。

[0422] 然后通过位点定向诱变将另外的N-联糖基化共有序列引入人ENPP1-Fc(h ENPP1-Fc, 构建体#770)中。该蛋白质在96孔板的CHO细胞中瞬时表达并且如方法所述, 使用pNP-TMP作为发色底物, 在高通量测定中一式三份筛选每个克隆的细胞外上清液的酶促活性(图7A-7D)。10种ENPP1-Fc同种型中pNP-TMP水解的速率等于或优于构建体#770(图7A-7D), 并且如本文别处所述, 选择这10种糖型用于彼此和与IgG1 Fc结构域的组合优化。

[0423] FcRn是人类IgG1 Fc血清半衰期的主要稳态调节剂, 而增强了Fc与FcRn的pH依赖性相互作用的Fc结构域中的突变延长了生物抗体的循环半衰期。本文检查了据报道增强pH依赖性再循环的两个Fc突变——H433K/N434F(以下称为HN突变)和M242Y/S254T/T246E(以下称为MST突变)的影响(图9A-9B)。Fc结构域的两个变体中的任一个与证明可接受的水解速率的10个ENPP1-Fc糖型中的一种或多种随机组合, 从而创建了12个另外的ENPP1-Fc克隆(表3)。选择这些克隆中的一些以测试多种糖型对ENPP1-Fc药代动力学的影响, 其中选择了在不同蛋白质结构域上的两个在空间上不同的推定的糖基化位点, 以增强对蛋白质表面积的潜在聚糖屏蔽作用(表3; 构建体#1057、#1064、#1014、#1040、#1101)。其他克隆仅测试了Fc突变对单独的pK性质的影响或在单一另外的推定糖基化存在的情况下对pK性质的影响(表3; 分别为构建体#981和#1051)。

[0424] 实施例2: 使用CHO细胞系和生长条件的表达

[0425] 在重组产生的蛋白质中, 由于CHO和人糖基化模式的相似性, 非人类中国仓鼠卵巢(CHO)细胞被广泛用于生物制剂的生产。然而, 两者之间存在糖基化差异, 最明显的是人N-联聚糖的末端唾液酸残基具有 α -2,3键和 α -2,6键二者, 而CHO细胞仅含有 α -2,3键。

[0426] 为了测试CHO和人类细胞之间的末端唾液酸化差异是否影响本系统中的PK和生物利用度, 建立了稳定表达人 α -2,6-唾液酸转移酶(α -2,6-ST)的CHO细胞系作为宿主, 并将该克隆用于生产7种ENPP1同种型, 以比较 α -2,6键对多种构建体(表5; 以'-ST'结尾的构建体编号)中PK和生物利用度的影响。为了探索生长条件对PK和生物利用度的影响, 用选定的

ENPP1-Fc同种型稳定转染的细胞(CHO K1细胞和稳定转染人 α -2,6-ST的CHO K1细胞二者)均在蛋白质生产过程中补充了唾液酸的“高通量”前体,其称为1,3,4-O-Bu₃ManNAc(表5)。

[0427] 使用相同的纯化方案将ENPP1-Fc同种型纯化至均质,并如本文其他地方所述确定Michaelis-Menton酶速率常数和药代动力学性质。最后,通过在单次皮下给药每种同种型后的多个时间点测定血浆PPi浓度,对选择的ENPP1-Fc同种型的药效动力学影响进行定量。半衰期和曲线下面积通过绘制每时间(t)吸收的药物分数(F)来确定,通过将数据拟合为在时间t=0时在皮下贮库处施用的药物的总全身吸收等式1中得出消除(ke)和吸收(ka)常数。

[0428] 实施例3:另外的N-联糖基化位点的药代动力学影响

[0429] 母本同种型的代表性图在图2B中显示,产生的半衰期为34小时,和曲线下面积(AUC)为3,027(构建体#770,表)。

[0430] 使用上述的计算机模拟预测和HTS方法添加N-联糖基化位点以两种糖型显著增加了小鼠对ENPP1-Fc的体内暴露——在构建体#1020中增加了4倍和在构建体#922中增加了7.7倍(图10和表2),并将I256T突变引入构建体#922中另外地增加了160%的半衰期。残基256接近人ENPP1中的催化苏氨酸,它负责亲核加成到磷酸酐底物上。不希望受任何理论限制,序列变异存在于人类ENPP3的类似位点处。这可以是底物偏好的调节剂:ENPP2缺乏该环,可以在催化袋中容纳更大的脂质底物;ENPP1和ENPP3二者都有环,但只有ENPP3具有N-聚糖共有序列(N-GCS)。

[0431] 通过SDS-PAGE凝胶比较表2中ENPP1-Fc同种型的大小,以确定哪些序列变异导致糖基化增加,并且显示出分子量的增加与糖基化的添加一致。为了确定构建体#1020中的序列变化是否成功引入糖基化,使用了MALDI-TOF,它也证实了这些位点存在糖基化。

[0432] 一方面,并非每个N-GCS实际上都被糖基化:可能会发生与N-GCS位置相关的位阻,使得Asn残基由于具体的侧翼氨基酸而无法接受聚糖。因此,在分析纯化蛋白质的聚糖含量之前,无法确定具体N-GCS的任何Pk效应是由于新聚糖的屏蔽现象还是氨基酸变化改变了酶的动力学或两者。因此,应通过聚糖分析验证对与N-GCS相关的PK的任何影响。质谱法用于确认ENPP1-Fc克隆19,其具有位于消化的肽片段²⁴¹SGTFFWPGSDVEINGTFPDIYK²⁶²中的I256T突变,与缺少I256T突变的母本ENPP1-Fc克隆相比,通过唾液酸糖肽峰的丰度表明(图2D),其确实在Asn254位置糖基化。

[0433] 为了确定生物制剂可用性的10倍增加是由于生物制剂吸收和保留的增强还是由于酶功能获得而导致血浆内的活性更高,在两种不同的浓度下进行测定母本构建体(构建体#770)和两种含有I256T的构建体(克隆17和克隆19)的Michaelis-Menten动力学常数,并且在任一酶的K_m或K_{cat}之间没有观察到显著差异(图2E)。在某些非限制性实施方式中,通过在位置256处添加聚糖诱导的增加的生物暴露与增加生物制剂吸收和/或生物制剂循环有关。在某些非限制性实施方式中,通过在位置256处添加聚糖诱导的增加的生物暴露不是由于酶功能获得。

[0434] 实施例4:Fc IgG1突变的药代动力学影响(图10-11)

[0435] Fc结构域中含有增强其对FcRn亲和力并增加pH依赖性抗体再循环的突变的抗体从未用于融合至Fc结构域的治疗酶中。一些Fc突变成功地增加了Fc结构域对FcRn受体的亲和力,但在体内抗体PK中导致不良的PK性质,而其他的则显示增强了体内PK性质。

[0436] FcRn是人IgG1 Fc血清半衰期的主要稳态调节剂。为了确定类似的Fc变化是否增强了酶融合蛋白的PK性质,研究了先前用于生物抗体的Fc中的两个具体的IgG1突变——H433K/N434F和M242Y/S254T/T246E。通常地,M242Y/S254T/T246E突变被发现发现在改善ENPP1-Fc的性质上优于H433K/N434F。例如,构建体#981——与构建体#770相比仅具有M242Y/S254T/T246E突变,使半衰期增加了3.3倍和使AUC增加了5.8倍。相比之下,在多种ENPP1突变的情况下,具有H433K/N434F突变的构建体实现了更为适度的介于1.2-1.7倍之间的半衰期增加。

[0437] 通常,Fc MST突变以比Fc HN突变更大程度上增加了生物暴露(表3,图14A-14E)。例如,与HN突变相比(在存在另外的聚糖的情况下使AUC增加了4.5倍),将MST突变添加到母本同种型使AUC增加了6倍和使半衰期增加了约2.5倍(比较表3和图14A-14E中的克隆14与克隆9-12)。然而,在一些情况下,特定N-GCS突变实际上降低特定Fc突变情况下的生物利用度,即残基766处的N-GCS突变降低含有MST-Fc的构建体(比较克隆8和克隆14,表3,图14A)以及含有HN-Fc的构建体(比较克隆9和克隆11,表3,图14A)的AUC。作为实验设计和可重复性的证明,建立了两个独立的CHO细胞克隆,其具有相同的突变,并且在每个的药效动力学性质中发现几乎没有变化(比较表3中的克隆11和12)。请注意,由Fc突变诱导的PK改善没有上升到在残基256处添加N-聚糖所获得的改善水平,这强调了选择糖基化对药代动力学的重要性。为了比较MST Fc突变的PK效果与位置256处添加聚糖(经由I256T突变)的效果,将ENPP1-Fc同种型的血浆活性随时间绘图(图14B)。该图表明Fc突变通过增加血浆中生物制剂的半衰期来增强PK,如克隆14对比克隆7中活性对比时间曲线的斜率降低所证明的。相反,添加I256T糖基化通过增加药物吸收到血浆中来增强PK,即增加 C_{max} ,这由克隆7中存在的更大的最大活性证明(图14B)。虽然与单独I256T糖型的效果相比,将MST Fc突变与I256T高糖基化组合仅使总体生物暴露(AUC)增加了16%,但对母本同种型的净效果是基本上11.5倍,这支持使用组合两种方法使生物利用度最大化(比较克隆7和17,表3和图14A)。

[0438] 实施例5:宿主细胞和生长条件的影响

[0439] 已成功使用了在已稳定转染人 α -2,6-ST的CHO细胞中表达蛋白质以产生具有末端唾液酸残基的重组生物制剂,该末端唾液酸残基同时拥有 α -2,3和 α -2,6键,据报道,取决于生物制剂增加和减少了PK性质。仓鼠和人类之间存在糖基化差异,最值得注意的是,人类N-连接聚糖含有具有 α -2,3和 α -2,6键二者的末端唾液酸残基,而CHO细胞仅含有 α -2,3键。

[0440] 为了确定 α -2,6键是否会影响ENPP1-Fc的PK性质,直接比较了在CHOK1细胞或稳定转染了人 α -2,6-ST的CHOK1细胞二者之一中产生的7种ENPP1-Fc同种型的体内暴露(AUC)和半衰期(表4)。在稳定转染人 α -2,6-ST的CHOK1细胞中产生生物制剂的总体趋势是有益的。在生物体暴露于药物(AUC)中,注意到了最强的影响,这表明响应的同种型中AUC增加了1.7-4.6倍(构建体#1057、#1028、#951、#930和#981)。另一个趋势是初始AUC更低的同种型(构建体#951和#1057)中,AUC影响幅度更大。但是,更长效的同种型(构建体#1028和#981)中的影响相当大,其产生的AUC值比CHOK1细胞中产生的母本多肽大8-10倍。

[0441] α -2,6键对半衰期的影响较为适度,在响应的构建体中增加了20-30%。为了理解 α -2,6键对AUC和半衰期蛋的不同影响,比较了CHO k1细胞和1078细胞中产生的同种型的蛋白质活性对比时间的变化。

[0442] 实施例6:利用高通量唾液酸前体生长的药代动力学影响

[0443] 为了确定生长条件对PK性质的影响,在选择的克隆的培养基中补充了“高通量”唾液酸前体1,3,4- O -Bu₃ManNAc或唾液酸本身。对CHOK1细胞补充1,3,4- O -Bu₃ManNAc几乎没有改善ENPP1-Fc的PK性质,但是当在稳定转染人 α -2,6-ST的CHOK1细胞中产生该生物制剂时,对半衰期和AUC的影响是值得注意的(图13和表4)。PK的改善主要是由于皮下给药生物制剂的全身再吸收的增加,而不是由于半衰期增加(注意克隆7和克隆14的C_{max}差异,图14B)。

[0444] 例如,用1,3,4- O -Bu₃ManNAc补充产生构建体#1014(克隆15)的CHOK1细胞的细胞培养基对增强AUC几乎没有作用,并且似乎会降低同种型的半衰期。

[0445] 相比之下,当将1,3,4- O -Bu₃ManNAc添加到用 α -2,6-ST稳定转染的CHOK1细胞中产生的构建体#1057(克隆9,在信号序列和核酸酶结构域中具有两个另外的糖基化以及HN Fc突变)的细胞培养基中时,效果更为显著:通过在含有人 α -2,6-ST的CHO细胞中表达克隆,该克隆的生物暴露可以增加2.6倍,并且通过用唾液酸前体补充那些细胞的生长培养基,另外地增加1.4倍。与在未补充1,3,4- O -Bu₃ManNAc的培养基中生长的CHOK1中产生的相同同种型相比,这些作用导致AUC和半衰期净增加4倍和2倍(图13和表4)。当在用人 α -2,6-ST稳定转染并在唾液酸前体1,3,4- O -Bu₃ManNAc存在下生长的CHO K1细胞中表达时,ENPP1-Fc的N-乙酰神经氨酸含量百分比逐渐增加(图14E),与可以通过这些方法增加酶生物制剂中的唾液酸含量并且这样做有利地影响药代动力学的观点一致。

[0446] 在仅含有人 α -2,6-ST的CHO细胞中表达生物制剂的效果范围从最差表现同种型的4.5倍到最佳表现构建体中更适度的效果(克隆1对比克隆1-ST,表5和图14C)。然而,如克隆17所证明的,这些适度的效果导致了实质的总体增加。在含有人 α -2,6-ST的CHO细胞中表达克隆17使AUC适度增加了28%,然而,由于这些优化生物制剂的增强性质,这种效果是起始克隆的AUC绝对值的3倍。克隆770之上的最终增强是克隆17的11.5倍和克隆17-ST的14.5倍(表5和图15A)。消除克隆17中信号序列和核酸酶结构域中的糖基化不会导致生物利用度的损失,这证明这些糖基化对于克隆的性能是可消耗的(expendable)(图15A,克隆17-ST和19-ST)。在含有唾液酸前体1,3,4- O -Bu₃ManNAc的培养基中表达克隆19-ST产生了非常有活性的多肽。源自在含有1,3,4- O -Bu₃ManNAc的生长培养基中表达蛋白质的增加由图15A中深灰色阴影的区域表示,当与母本构建体相比时,生物利用度净增加近18倍(图15B)。母本克隆和最终产品中唾液酸化含量的质谱分析揭示,相比于克隆19-ST-A中99.2%位点,母本克隆中只有78.4%的可用位点(具有至少一个用于转移唾液酸的半乳糖的聚糖)被唾液酸化(图15C)。该组合的发现证明了唾液酸封端糖基化在酶生物制剂中的重要性,以及所述方法在增强聚糖优化的酶生物制剂的生物利用度方面的能力。

[0447] 实施例6:药代动力学影响

[0448] ENPP1-Fc是哺乳动物中唯一能够生成血浆PPi的酶,因此血浆PPi是预测ENPP1酶替代疗法对ENPP1缺乏症疗效的生物标志物。为了确定优化的ENPP1-Fc同种型的药效动力学影响,对Enpp1^{asj/asj}小鼠皮下给药0.3mg/Kg的构建体#770或克隆19-ST并在血浆中测量血浆PPi和酶存在,持续263小时(图15D)。以构建体#770给药的小鼠中的血浆PPi在给药24小时后升高至正常范围,但在48小时返回到基线,而克隆19-ST将血浆PPi升高至正常范围的约两倍并保持高于或处于正常范围内持续约250小时。这些实验表明,在优化的ENPP1-Fc同种型中观察到的药代动力学影响直接转化为增强的药效动力学活性。

[0449] 表1

[0450]

构建体	突变	结构域
770	WT	ENPP7 信号序列 (aa 1-23)
909	V29N	
克隆 3 (构建体 976)	C25N, K27T	
912	I70N	SMB 结构域 (aa 24-109)
914	R81N	
916	K97N, D99T	
917	E115N, P117T	接头 1 (aa 110-133)
920	P125T	
克隆 7 (构建体 922)	I256T (在 ENPP3 中发现, 位于插入环内部)	插入环 (aa 246-265)
923	A276N / L278T (在 α 螺旋中发现, 并在 ENPP4 晶体结构中被证实糖基化)	催化 (aa 266-519)
926	D285N, R287T	
927	Y364T	
克隆 2 (构建体 930)	K369N, I371T	
931	H409T	
933	P448L S449T	
936	P522L, V523T	接头 2 (aa 520-571)
937	V523N	
940	K527N, P529T	
941	P544L, R545T	
943	G549T	
944	P554H (在大象 ENPP1 中发现)	
948	P558N, E560T	
952	P534N, V536T	
克隆 1	E592N	内切核酸酶

	(构建体 951)	(在北极熊和狢狢 ENPP1 中发现的与人类中 E668K GACI 突变相同的位置)	(aa 572-849)
	955	P643N, S645T	
	956	S766N	
	958	V793N, G795T	
	961	G795N, H797T (在小鼠 Enpp3 中发现)	
	962	E864N, L866T	Fc 结构域(aa 852-1078)
	970	S885N	
	964	G972N, P974T	
	1013	S1075N, P1076G, G1077T	
	975	H1064K, N1065F	FcRn 新生儿受体
[0451]	克隆 14 (构建体 981)	M883Y, S885T, T887E	
	1014	V29N; E592N; H1064K, N1065F	N-端区域; 内切核酸酶; Fc 结构域
	克隆 6 (构建体 1020)	C25N, K27T; E864N, L866T	N-端区域 Fc 结构域
	1040	V29N; P534N, V536T; M883Y, S885T, T887E	N-端区域; 接头 2; Fc 结构域
	1057	V29N; S766N; H1064K, N1056F	N-端区域; 内切核酸酶; Fc 结构域
	1062	C25N, K27T; P534N, V536T; H1064K, N1065F	N-端区域; 接头 2; Fc 结构域

[0452] 表2: 另外的N-联糖基化对药代动力学 (PK) 的影响。

构建体	突变	结构域	AUC	半衰期 (小时)
770	无		3,027	34.2
970	S885N	Fc		
956	S766N	内切核酸酶		
[0453] 941	P544L, R545T	内切核酸酶		
951 (克隆 1)	E592N	内切核酸酶	1,789	40
930 (克隆 2)	K369N, I371T	催化	2,545	35.4
976 (克隆 3)	C25N, K27T	N-端区域	3,636	36.4
1047	V29N;	N-端区域和接头	4,373	37.6

[0454]	(克隆 4)	E864N, L866T			
	1024 (克隆 5)	C25N, K27T; S766N	N-端区域和 内切核酸酶	4,537	34.9
	1020 (克隆 6)	C25N, K27T; E864N, L866T	N-端区域和 接头	12,829	37
	922 (克隆 7)	I256T	催化	30,570	69

[0455] 表3:Fc突变对药代动力学(PK)的影响。

构建体	突变	聚糖结构域	AUC	半衰期 (小时)
770	无		3,027	34.2
1062	C25N, K27T; P534N, V536T; H1064K, N1065F	N-端区域和 内切核酸酶		
1063	C25N, K27T; E864N, L866T; H1064K, N1065F	N-端区域和 内切核酸酶		
1030 (克隆 8)	S766N; M883Y, S885T, T887E	内切核酸酶	1,912	45.4
1057 (克隆 9)	V29N; S766N; H1064K, N1065F	N-端区域和 内切核酸酶	5,826	64.6
1064 (克隆 10)	C25N, K27T; S766N, H1064K, N1065F	N-端区域和 内切核酸酶	7,540	50.6
1051 (克隆 11)	V29N H106K, N1065F	N-端区域和 内切核酸酶	13,918	57.1
1082 (克隆 13)	V29N; E592N; M883Y, S885T, T887E	内切核酸酶	14,978	70
1028	E592N; M883Y, S885T, T887E	内切核酸酶	16,932	80.1
981 (克隆 14)	M883Y, S885T, T887E	无	17,587	84
1014 (克隆 15)	V29N; E592N; H1064K, N1065F	N-端区域和 内切核酸酶	21,752	99.9
1040 (克隆 16)	V29N; P534N, V536T; M883Y, S885T, T887E	N-端区域和 内切核酸酶	32,391	119.4
1101 (克隆 17)	V29N; I256T; M883Y, S885T, T887E	N-端区域和 催化	35,021	126.3

[0457] 表4:细胞系和突变对药代动力学(PK)的影响。使用稳定转染人 α -2,6-唾液酸转移酶(α -2,6-ST)的修饰的CHO细胞系制备标记为“-ST”的那些构建体;当与正常CHO细胞系中

表达的融合蛋白相比时,这增强了融合蛋白的唾液酸化的量。增强的构建体唾液酸化导致AUC和半衰期值的改善。

[0458]

构建体	突变	结构域	AUC	半衰期 (小时)
770	无		3,027	34.2
1057 (克隆 9)	V29N; S766N; H1064K, N1065F	N-端区域和 内切核酸酶	5,826	64.6
1057-ST (克隆 9-ST)	V29N; S766N H1064K, N1065F	N-端区域和 内切核酸酶	15,337	87.4
1028 (克隆 18)	E592N M883Y, S885T, T887E	内切核酸酶	16,932	80.1
1028-ST (克隆 18-ST)	E592N M883Y, S885T, T887E	内切核酸酶	25,500	100
951 (克隆 1)	E592N	内切核酸酶	1,789	40
951-ST (克隆 1-ST)	E592N	内切核酸酶	8,379	49.3
930 (克隆 2)	K369N, I371T	催化	2,545	35.4
930-ST (克隆 2-ST)	K369N, I371T	催化	4,407	36.3
981 (克隆 14)	M883Y, S885T, T887E	无	17,587	122.5
981-ST (克隆 14-ST)	M883Y, S885T, T887E	无	30,021	122.5
1014 (克隆 15)	V29N; E592N; H1064K, N1065F	N-端区域和 内切核酸酶	21,752	99.9
1014-ST (克隆 15-ST)	V29N; E592N H1064K, N1065F	N-端区域和 内切核酸酶	13,882	96.2
1101 (克隆 17)	V29N; I256T M883Y, S885T, T887E	N-端区域和 催化	35,021	126.3
1101-ST (克隆 17-ST)	V29N; I256T M883Y, S885T, T887E	N-端区域和 催化	37,239	152.9
1064 (克隆 10)	C25N, K27T; S766N; H1064K, N1065F	信号序列, 核酸酶结构域, Fc 结构域	7,540	50.6
1064-ST	C25N, K27T;	信号序列,	20,062	70.1

[0459]	(克隆 10)	S766N; H1064K, N1065F	核酸酶结构域, Fc 结构域		
	1082 (克隆 13)	V29N; E592N; M883Y, S885T, T887E	信号序列, 核酸酶结构域, Fc 结构域	14,978	70
	922 (克隆 7)	I256T	催化结构域	30,570	69

[0460] 表5:唾液酸补充对药代动力学(PK)的影响。使用稳定转染人 α -2,6-唾液酸转移酶(α -2,6-ST)的修饰的CHO细胞系制备标记为“-ST”的那些构建体;当与正常CHO细胞系中表达的融合蛋白相比时,这增强了融合蛋白的唾液酸化的量。那些标记为“-A”的构建体是在蛋白质生产期间在补充有1,3,4-O-Bu₃ManNAc(唾液酸的“高通量”前体)的培养基中生长的细胞中制备的。

构建体	突变	结构域	AUC	半衰期 (小时)
1057	V29N; S766N; H1064K, N1065F	N-端区域和内切核酸酶	5,826	64.6
1057-ST	V29N; S766N; H1064K/N1065F	N-端区域和内切核酸酶	15,337	87.4
1057-ST-A	V29N; S766N; H1064K/N1065F	N-端区域和内切核酸酶	23,867	124.9
1014	V29N; E592N; H1064K/N1065F	N-端区域和内切核酸酶	21,752	99.9
1014-A	V29N; E592N; H1064K/N1065F	N-端区域和内切核酸酶		
1101	V29N; I256T M883Y/S885T/T887E	N-端区域和催化	35,021	126.3
1101-A	V29N; I256T M883Y/S885T/T887E	N-端区域和催化	37,239	152.9
1118-ST (克隆 19)	I256T; M883Y, S885T, T887E	催化结构域; Fc 结构域	44,085	159
1118-ST-A (克隆 19)	I256T; M883Y, S885T, T887E	催化结构域; Fc 结构域	53,620	235

[0462] 表6:多肽和对应突变的列表

[0463]

多肽	突变区域	突变的残基
970	Fc	S885N
956	内切核酸酶	S766N
981	Fc	M883Y, S885T, T887E
1020	N 端区域和接头区域	C25N, K27T, E864N, L866T
1062	N 端、内切核酸酶和 Fc	C25N, K27T, P534N, V536T, H1064K, N1065F
941	内切核酸酶	P554L and R545T
1057	N 端、内切核酸酶和 Fc	V29N, S766N, H1064K, N1065F
1014	N 端、内切核酸酶和 Fc	V29N, E592N, H1064K, N1065F
1040	N 端、内切核酸酶和 Fc	V29N, P534N, V536T, M883Y, S885T, T887E
930	催化	K369N and I371T
951	内切核酸酶	E592N
976	N 端	C25N, K27T
1024	N 端和内切核酸酶	C25N, K27T, S766N
1028	内切核酸酶和 Fc	E592N, M883Y, S885T, T887E
1030	内切核酸酶和 Fc	S766N, M883Y, S885T, T887E
1047	N 端和接头区域	V29N, E864N, L866T
1051	N 端和 Fc	V29N, H1064K, N1065F
1062	N 端区域、内切核酸酶和 Fc	C25N, K27T, P534N, V536T, H1064K, N1065F
1063	N 端区域、接头和 Fc	C25N, K27T, E864N, L866T, H1064K, N1065F
1064	N 端区域、内切核酸酶和 Fc	C25N, K27T/S766N/H1064K

		N1065F
[0464] 1082	N 端区域、内切核酸酶和 Fc	V29N, E592N, M883Y, S885T, T887E
1089	N 端区域、内切核酸酶、胰蛋白酶 KO 和 Fc	V29N, E592N, R741A, H1064K, N1065F

[0465] 表7:ENPP1多肽中突变的列表

[0466] 突变的残基	突变的残基
C25N	P558N
K27T	E560T
V29N	E591N
E115N	E592K
P117T	E592N
P125T	P643T
A276N	S645T
L278T	S765N
D285N	S766N
R287T	S885N
Y364T	R741A
K369N	V793N
I371T	H794S
H409T	G795T
P448L	G795N
S449T	H797T
P521L	E864N
V522T	L866T
V522N	H1064K
K526N	N1065K
P528T	M883Y
P534N	S885T
V536T	T887E
P543L	M1059L
R544T	N1065S
R545T	I884A
G548T	H941A
P554H	H1066A
P554L	

[0467] 列举的实施方式:

- [0468] 提供以下示例性实施方式,其编号不应解释为指定重要性等级。
- [0469] 实施方式1提供了一种ENPP1多肽融合体,其包括与免疫球蛋白的Fc区融合的ENPP1多肽,其中ENPP1多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T。
- [0470] 实施方式2提供了根据实施方式1的多肽融合体,其中该Fc区包括选自与SEQ ID NO:7有关的M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K和N1065F的至少一种突变。
- [0471] 实施方式3提供了根据实施方式1的多肽融合体,其中该Fc区包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、M883Y、M883Y/S885T/T887E和H1064K/N1065F的至少一种突变。
- [0472] 实施方式4提供了根据实施方式1-3的任一项的多肽融合体,其中该ENPP1多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N、K27T和V29N的至少一种突变。
- [0473] 实施方式5提供了根据实施方式1-4的任一项的多肽融合体,其中该ENPP1多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N/K27T和V29N的至少一种突变。
- [0474] 实施方式6提供了根据实施方式1-5的任一项的多肽融合体,其中该ENPP1多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的K369N和I371T的至少一种突变。
- [0475] 实施方式7提供了根据实施方式1-6的任一项的多肽融合体,其中该ENPP1多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变K369N/I371T。
- [0476] 实施方式8提供了根据实施方式1-7的任一项的多肽融合体,其中该ENPP1多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D和S766N的至少一种突变。
- [0477] 实施方式9提供了根据实施方式1-8的任一项的多肽融合体,其中该ENPP1多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N/V536T、P554L/R545T、E592N、E592N/R741D和S766N的至少一种突变。
- [0478] 实施方式10提供了根据实施方式1-9的任一项的多肽融合体,其中该ENPP1多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的E864N和L866T的至少一种突变。
- [0479] 实施方式11提供了根据实施方式1-10的任一项的多肽融合体,其中该ENPP1多肽至少包括与SEQ ID NO:7有关的突变E864N/L866T。
- [0480] 实施方式12提供了根据实施方式1-11的任一项的多肽融合体,包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N、K27T、V29N、C25N/K27T、K369N、I371T、K369N/I371T、P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D、S766N、P534N/V536T、P554L/R545T、E592N/R741D、E864N、L866T、E864N/L866T、M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K、N1065F、M883Y/S885T/T887E、H1064K/N1065F的至少一种突变。
- [0481] 实施方式13提供了根据实施方式1-12的任一项的多肽融合体,其中该Fc区为IgG的。
- [0482] 实施方式14提供了根据实施方式1-13的任一项的多肽融合体,其包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N、V536T、R545T、P554L、S766N和E592N的至少一种突变。
- [0483] 实施方式15提供了根据实施方式1-13的任一项的多肽融合体,其包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N/Y536T、P554L/R545T和E592N的至少一种突变。
- [0484] 实施方式16提供了根据实施方式1-13的任一项的多肽融合体,其包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、E864N/L866T、P534N/V536T/H1064K/N1065F、P554L/R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F和P534N/V536T/

M883Y/S885T/T887E的至少一种突变。

[0485] 实施方式17提供了一种ENPP1多肽融合体,其包括ENPP1多肽和免疫球蛋白的Fc区,该多肽融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、M883Y、S885T和T887E。

[0486] 实施方式18提供了一种ENPP1多肽融合体,其包括ENPP1多肽和免疫球蛋白的Fc区,该多肽融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。

[0487] 实施方式19提供了一种ENPP1多肽融合体,其包括ENPP1多肽和免疫球蛋白的Fc区,该多肽融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、E592N、H1064K和N1065F。

[0488] 实施方式20提供了一种ENPP1突变体多肽,其包括SEQ ID NO:7的氨基酸23-849,其中该突变体多肽包括突变I256T并进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N、V536T、P554L、R545T和E592N的突变。

[0489] 实施方式21提供了根据实施方式20的突变体多肽,其包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0490] 实施方式22提供了根据实施方式20-21的任一项的突变体多肽,其包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0491] 实施方式23提供了根据实施方式20-23的任一项的突变体多肽,其中该突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N/V536T、P554L/R545T和E592N的至少一种突变。

[0492] 实施方式24提供了根据实施方式21-23的任一项的突变体多肽,其包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、P534N/V536T/H1064K/N1065F、P554L/R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F和P534N/V536T/M883Y/S885T/T887E的突变。

[0493] 实施方式25提供了根据实施方式21-24的任一项的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的S885N突变。

[0494] 实施方式26提供了根据实施方式20-25的任一项的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的S766N突变。

[0495] 实施方式27提供了根据实施方式21-26的任一项的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变M883Y、S885T和T887E。

[0496] 实施方式28提供了根据实施方式21-27的任一项的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变P534N、V536T、H1064K和N1065F。

[0497] 实施方式29提供了根据实施方式20-28的任一项的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变P554L和R545T。

[0498] 实施方式30提供了根据实施方式21-29的任一项的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变S766N、H1064K和N1065F。

[0499] 实施方式31提供了根据实施方式21-30的任一项的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变E592N、H1064K和N1065F。

[0500] 实施方式32提供了根据实施方式21-31的任一项的突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7有关的突变P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。

[0501] 实施方式33提供了根据实施方式1-19的任一项的多肽融合体或根据实施方式20-

32的任一项的突变体多肽,其由稳定转染人ST6B-半乳糖苷 α -2,6-唾液酸转移酶(也称为ST6GAL1)的CHO细胞系表达。

[0502] 实施方式34提供了根据实施方式1-19的任一项的多肽融合体或根据实施方式20-32的任一项的突变体多肽,其在补充了唾液酸和/或N-乙酰甘露糖胺(也称为1,3,4-O-Bu₃ManNAc)的细胞培养物中生长。

[0503] 实施方式35提供了一种在有需要的受试者中减少或预防病理性钙化进展的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-19和33-34的任一项的多肽融合体或根据实施方式20-34的任一项的突变体多肽。

[0504] 实施方式36提供了一种在有需要的受试者中减少或预防病理性骨化进展的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-19和31-34的任一项的多肽融合体或根据实施方式20-34的任一项的突变体多肽。

[0505] 实施方式37提供了一种在有需要的受试者中减少或预防软组织异位钙化进展的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-19和33-34的任一项的多肽融合体或根据实施方式20-34的任一项的突变体多肽。

[0506] 实施方式38提供了一种在有需要的受试者中治疗、逆转或预防后纵韧带骨化(OPLL)进展的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-19和33-34的任一项的多肽融合体或根据实施方式20-34的任一项的突变体多肽。

[0507] 实施方式39提供了一种在有需要的受试者中治疗、恢复或预防低血磷性佝偻病进展的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-19和33-34的任一项的多肽融合体或根据实施方式20-34的任一项的突变体多肽。

[0508] 实施方式40提供了一种在被诊断患有选自以下至少一种疾病的受试者中减少或预防至少一种疾病进展的方法:慢性肾病(CKD)、终末期肾病(ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病(CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化(OPLL)、低血磷性佝偻病、骨关节炎、衰老相关的动脉硬化、特发性婴儿动脉钙化(IIAC)、婴儿全身动脉钙化(GACI)和动脉粥样硬化斑块钙化,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-19和33-34的任一项的多肽融合体或根据实施方式20-34的任一项的突变体多肽。

[0509] 实施方式41提供了一种在有需要的受试者中减少或预防衰老相关的动脉硬化进展的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-19和33-34的任一项的多肽融合体或根据实施方式20-34的任一项的突变体多肽。

[0510] 实施方式42提供了根据实施方式35的方法,其中该病理性钙化选自特发性婴儿动脉钙化(IIAC)和动脉粥样硬化斑块钙化。

[0511] 实施方式43提供了根据实施方式36的方法,其中该病理性骨化选自后纵韧带骨化(OPLL)、低血磷性佝偻病和骨关节炎。

[0512] 实施方式44提供了根据实施方式37的方法,其中该软组织钙化选自IIAC和骨关节炎。

[0513] 实施方式45提供了根据实施方式37的方法,其中该软组织选自动脉粥样硬化斑块、肌肉动脉、关节、脊柱、关节软骨、椎盘软骨、血管和结缔组织。

[0514] 实施方式46提供了一种在焦磷酸盐(PPi)水平低于PPi正常水平的受试者中提高PPi水平的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-19和33-34的任

一项的多肽融合体的多肽或根据实施方式20-34的任一项的突变体多肽,从而在进行该施用后,该受试者中PPi的水平被升高至至少2 μ M的正常水平,并被维持在大约相同水平下。

[0515] 实施方式47提供了一种在焦磷酸盐(PPi)水平低于PPi正常水平的受试者中减少或预防病理性钙化或骨化进展的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-19和33-34的任一项的多肽融合体或根据实施方式20-34的任一项的突变体多肽,从而减少该受试者中的病理性钙化或骨化或预防该受试者中的病理性钙化或骨化的进展。

[0516] 实施方式48提供了一种在有需要的受试者中治疗由细胞外焦磷酸盐(PPi)浓度减少所表现出的ENPP1缺乏症的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-19和33-34的任一项的多肽融合体或根据实施方式20-34的任一项的突变体多肽,从而升高该受试者中PPi的水平。

[0517] 实施方式49提供了根据实施方式35-48的任一项的方法,其中该多肽融合体或突变体多肽是哺乳动物细胞中表达的ENPP1前体蛋白质的分泌产物,其中该ENPP1前体蛋白质包括信号肽序列和ENPP1多肽,其中该ENPP1前体蛋白质经过蛋白水解处理以产生该ENPP1多肽。

[0518] 实施方式50提供了根据实施方式49的方法,其中在该ENPP1前体蛋白质中,该信号肽序列与该ENPP1多肽的N端缀合。

[0519] 实施方式51提供了根据实施方式49-50的任一项的方法,其中该信号肽序列选自ENPP1信号肽序列、ENPP2信号肽序列、ENPP7信号肽序列和ENPP5信号肽序列。

[0520] 实施方式52提供了根据实施方式35-51的任一项的方法,其中急性或慢性地向该受试者施用该多肽融合体或突变体多肽。

[0521] 实施方式53提供了根据实施方式35-52的任一项的方法,其中局部地、区域地、肠胃外地或全身地向该受试者施用该多肽融合体或突变体多肽。

[0522] 实施方式54提供了根据实施方式35-53的任一项的方法,其中通过选自以下的至少一个途径向该受试者施用该多肽融合体或突变体多肽:皮下、口服、气雾剂、吸入、直肠、阴道、经皮肤、皮下、鼻内、颊、舌下、肠胃外、鞘内、胃内、眼、肺和局部。

[0523] 实施方式55提供了根据实施方式35-54的任一项的方法,其中该多肽融合体或突变体多肽作为药物组合物向受试者施用,该药物组合物进一步包括至少一种药学上可接受的载体。

[0524] 实施方式56提供了根据实施方式35-55的任一项的方法,其中该受试者是哺乳动物。

[0525] 实施方式57提供了根据实施方式56的方法,其中该哺乳动物是人。

[0526] 实施方式58提供了一种ENPP1突变体多肽,其包含一个或多个与SEQ ID NO:7有关的氨基酸取代,其中该多肽包括相对于SEQ ID NO:7在位置256处的氨基酸取代。

[0527] 实施方式59提供了根据实施方式58的ENPP1突变体多肽,其中该ENPP1突变体多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:7的氨基酸23-849具有至少90%同一性。

[0528] 实施方式60提供了ENPP1突变体多肽,其包括SEQ ID NO:7的氨基酸23-849,其中相对于SEQ ID NO:7的氨基酸23-849存在不超过十(10)个氨基酸取代,并且其中ENPP1突变体多肽包括相对于SEQ ID NO:7在位置256处的氨基酸取代。

[0529] 实施方式61提供了根据实施方式58-60的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该氨基

酸取代是相对于SEQ ID NO:7在位置256处苏氨酸(T)取代异亮氨酸(I)。

[0530] 实施方式62提供了根据实施方式58-60的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该氨基酸取代是相对于SEQ ID NO:7在位置256处丝氨酸(S)取代异亮氨酸(I)。

[0531] 实施方式63提供了ENPP1突变体多肽,其包括与SEQ ID NO:7的氨基酸23-849具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中该突变体多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T,并且其中该突变体多肽进一步包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N、V536T、P554L、R545T和E592N的突变。

[0532] 实施方式64提供了根据实施方式63的ENPP1突变体多肽,其中该突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N/V536T、P554L/R545T和E592N的至少一个氨基酸取代。

[0533] 实施方式65提供了根据实施方式63的ENPP1突变体多肽,其中该突变体多肽包括氨基酸取代V29N。

[0534] 实施方式66提供了根据实施方式58-61的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该突变体多肽包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0535] 实施方式67提供了ENPP1突变体多肽融合体,其包括根据实施方式58-66的任一项的ENPP1突变体多肽和异源蛋白。

[0536] 实施方式68提供了根据实施方式67的ENPP1突变体多肽融合体,其中该异源蛋白是FcRn结合结构域。

[0537] 实施方式69提供了根据实施方式67-68的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该异源蛋白在融合体的ENPP1突变体多肽的羧基末端。

[0538] 实施方式70提供了根据实施方式67-68的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该异源蛋白在融合体的ENPP1突变体多肽的氨基末端。

[0539] 实施方式71提供了根据实施方式68-70的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该FcRn结合结构域是白蛋白多肽。

[0540] 实施方式72提供了根据实施方式68-70的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该FcRn结合结构域是免疫球蛋白分子的Fc部分。

[0541] 实施方式73提供了根据实施方式72的ENPP1突变体多肽融合体,其中该免疫球蛋白分子是IgG1。

[0542] 实施方式74提供了根据实施方式68-73的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该FcRn结合结构域相对于野生型FcRn结合结构域包括一个或多个氨基酸取代。

[0543] 实施方式75提供了根据实施方式68-70和72-74的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该FcRn结合结构域是人IgG1分子的Fc部分并且包括以下氨基酸取代:每个相对于SEQ ID NO:7的M883Y、S885T和T887E。

[0544] 实施方式76提供了根据实施方式68-70和72-75的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括一个或多个以下取代:每个与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、P534N/V536T/H1064K/N1066、P554L/R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F或P534N/V536T/M883Y/S885T/T887E。

[0545] 实施方式77提供了根据实施方式68-70和72-76的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括与SEQ ID NO:7有关的S885N突变。

[0546] 实施方式78提供了根据实施方式68-70和72-77的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括与SEQ ID NO:7有关的S766N突变。

[0547] 实施方式79提供了根据实施方式68-70和72-78的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变M883Y、S885T和T887E。

[0548] 实施方式80提供了根据实施方式68-70和72-79的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变P534N、V536T、H1064K和N1065F。

[0549] 实施方式81提供了根据实施方式68-70和72-80的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变P554L和R545T。

[0550] 实施方式82提供了根据实施方式68-70和72-81的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变S766N、H1064K和N1065F。

[0551] 实施方式83提供了根据实施方式68-70和72-82的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变E592N、H1064K和N1065F。

[0552] 实施方式84提供了根据实施方式68-70和72-83的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。

[0553] 实施方式85提供了根据实施方式68-70和72-84的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该Fc区包括选自与SEQ ID NO:7有关的M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K和N1065F的至少一种突变。

[0554] 实施方式86提供了根据实施方式68-70和72-85的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该Fc区包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、M883Y、M883Y/S885T/T887E和H1064K/N1065F的至少一种突变。

[0555] 实施方式87提供了根据实施方式68-70和72-86的任一项的ENPP1突变体多肽融合体或根据实施方式58-65的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该融合体包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N、K27T和V29N的至少一种突变。

[0556] 实施方式88提供了根据实施方式68-70和72-87的任一项的ENPP1突变体多肽融合体或根据实施方式58-65和85的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该融合体或该ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N/K27T和V29N的至少一种突变。

[0557] 实施方式89提供了根据实施方式68-70和72-88的任一项的ENPP1突变体多肽融合体或根据实施方式58-65和87-88的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该融合体或该ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的K369N和I371T的至少一种突变。

[0558] 实施方式90提供了根据实施方式68-70和72-89的任一项的ENPP1突变体多肽融合体或实施方式58-65和87-89的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该融合体或ENPP1突变体多肽包括与SEQ ID NO:7有关的突变K369N/I371T。

[0559] 实施方式91提供了根据实施方式68-70和72-90的任一项的ENPP1突变体多肽融合体或根据实施方式58-65和87-90的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D和S766N的至少一种突变。

[0560] 实施方式92提供了根据实施方式68-70和72-91的任一项的ENPP1突变体多肽融合体或根据实施方式58-65和87-91的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N/V536T、P554L/R545T、E592N、E592N/R741D和

S766N的至少一种突变。

[0561] 实施方式93提供了根据实施方式68-70和72-92的任一项的ENPP1突变体多肽融合体或根据实施方式58-65和87-92的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的C25N、K27T、V29N、C25N/K27T、K369N、I371T、K369N/I371T、P534N、V536T、R545T、P554L、E592N、R741D、S766N、P534N/V536T、P554L/R545T、E592N/R741D、E864N、L866T、E864N/L866T、M883Y、S885N、S885T、T887E、H1064K、N1065F、M883Y/S885T/T887E、H1064K/N1065F的至少一种突变。

[0562] 实施方式94提供了根据实施方式68-70和72-93的任一项的ENPP1突变体多肽融合体或根据实施方式58-65和87-93的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的P534N、V536T、R545T、P554L、S766N和E592N的至少一种突变。

[0563] 实施方式95提供了根据实施方式68-70和72-94的任一项的ENPP1突变体多肽融合体或根据实施方式58-65和87-94的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S766N、P534N/V536T、P554L/R545T和E592N的至少一种突变。

[0564] 实施方式96提供了根据实施方式68-70和72-95的任一项的ENPP1突变体多肽融合体或根据实施方式58-65和87-95的任一项的ENPP1突变体多肽,其中该融合体或ENPP1突变体多肽包括选自与SEQ ID NO:7有关的S885N、S766N、M883Y/S885T/T887E、E864N/L866T、P534N/V536T/H1064K/N1065F、P554L/R545T、S766N/H1064K/N1065F、E592N/H1064K/N1065F和P534N/V536T/M883Y/S885T/T887E的至少一种突变。

[0565] 实施方式97提供了根据实施方式68-70和72-96的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、M883Y、S885T和T887E。

[0566] 实施方式98提供了根据实施方式68-70和72-96的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、P534N、V536T、M883Y、S885T和T887E。

[0567] 实施方式99提供了根据实施方式68-70和72-96的任一项的ENPP1突变体多肽融合体,其中该融合体包括与SEQ ID NO:7有关的突变I256T、E592N、H1064K和N1065F。

[0568] 实施方式100提供了根据实施方式67-99的任一项的融合体,其包括接头氨基酸序列。

[0569] 实施方式101提供了根据实施方式100的融合体,其中该接头氨基酸序列连接融合体的ENPP1突变体多肽部分和异源蛋白。

[0570] 实施方式102提供了根据实施方式100-101的任一项的融合体,其中该接头氨基酸序列包括SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9。

[0571] 实施方式103提供了一种核酸,其编码根据实施方式58-66的任一项的ENPP1突变体多肽或根据实施方式67-102的任一项的融合体。

[0572] 实施方式104提供了一种载体,其包括根据实施方式103的核酸。

[0573] 实施方式105提供了一种表达载体,其包括根据实施方式103的核酸。

[0574] 实施方式106提供了细胞或多种细胞,每种细胞包括根据实施方式103的核酸、根据实施方式104的载体和/或根据实施方式105的表达载体。

[0575] 实施方式107提供了根据实施方式106的细胞或多种细胞,其中该细胞是CHO细胞和/或NS0细胞。

[0576] 实施方式108提供了根据实施方式107的细胞或多种细胞,其中用人ST6 β -半乳糖苷 α -2,6-唾液酸转移酶稳定转染CHO细胞。

[0577] 实施方式109提供了一种产生ENPP1突变体多肽或融合体的方法,该方法包括在适合于由一种或多种细胞表达ENPP1突变体多肽或融合体的条件下培养根据实施方式106-108的任一一项的细胞或多种细胞。

[0578] 实施方式110提供了根据实施方式109的方法,其中在补充有唾液酸和/或N-乙酰甘露糖胺的培养基中培养细胞。

[0579] 实施方式111提供了根据实施方式109-110的任一一项的方法,进一步包括从细胞、多种细胞或其中培养细胞或多种细胞的培养基中纯化ENPP1突变体多肽或融合体。

[0580] 实施方式112提供了通过根据实施方式111的方法纯化的ENPP1突变体多肽或融合体。

[0581] 实施方式113提供了缀合物,其包括(i)根据实施方式58-66、87-96和112的任一一项的ENPP1突变体多肽和/或根据实施方式67-102和112的任一一项的ENPP1突变体多肽融合体和(ii)异源部分。

[0582] 实施方式114提供了根据实施方式113的缀合物,其中该异源部分是聚乙二醇。

[0583] 实施方式115提供了药物组合物,其包括根据实施方式58-66、87-96和112的任一一项的ENPP1突变体多肽、根据实施方式67-102和112的任一一项的融合体、根据实施方式103的核酸、根据实施方式104的载体、根据实施方式105的表达载体和/或根据实施方式113-114的任一一项的缀合物和药学上可接受的载体。

[0584] 实施方式116提供了一种在有需要的受试者中减少或预防病理性钙化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a)根据实施方式58-66、87-96和112的任一一项的ENPP1突变体多肽;(b)根据实施方式67-102和112的任一一项的融合体;(c)根据实施方式113-114的任一一项的缀合物;和/或(d)根据实施方式115的药物组合物,从而减少或预防受试者的病理性钙化的进展。

[0585] 实施方式117提供了一种在有需要的受试者中减少或预防病理性骨化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a)根据实施方式58-66、87-96和112的任一一项的ENPP1突变体多肽;(b)根据实施方式67-102和112的任一一项的融合体;(c)根据实施方式113-114的任一一项的缀合物;和/或(d)根据实施方式115的药物组合物,从而减少或预防受试者的病理性骨化的进展。

[0586] 实施方式118提供了一种在有需要的受试者中减少或预防软组织异位钙化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a)根据实施方式58-66、87-96和112的任一一项的ENPP1突变体多肽;(b)根据实施方式67-102和112的任一一项的融合体;(c)根据实施方式113-114的任一一项的缀合物;和/或(d)根据实施方式115的药物组合物,从而减少或预防受试者的软组织异位钙化的进展。

[0587] 实施方式119提供了一种在有需要的受试者中治疗、逆转或预防后纵韧带骨化(OPLL)进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a)根据实施方式58-66、87-96和112的任一一项的ENPP1突变体多肽;(b)根据实施方式67-102和112的任一一项的融合体;

(c) 根据实施方式113-114的任一项的缀合物;和/或(d) 根据实施方式115的药物组合物,从而减少、逆转或预防受试者的后纵韧带骨化(OPLL)。

[0588] 实施方式120提供了一种在有需要的受试者中治疗、恢复或预防低血磷性佝偻病进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) 根据实施方式58-66、87-96和112的任一项的ENPP1突变体多肽;(b) 根据实施方式67-102和112的任一项的融合体;(c) 根据实施方式113-114的任一项的缀合物;和/或(d) 根据实施方式115的药物组合物,从而减少、逆转或预防受试者的低血磷性佝偻病的进展。

[0589] 实施方式121提供了一种在被诊断患有选自以下至少一种疾病的受试者中减少或预防至少一种疾病进展的方法:慢性肾病(CKD)、终末期肾病(ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病(CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化(OPLL)、低血磷性佝偻病、骨关节炎、衰老相关的动脉硬化、特发性婴儿动脉钙化(IIAC)、婴儿全身动脉钙化(GACI)和动脉粥样硬化斑块钙化,方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) 根据实施方式58-66、87-96和112的任一项的ENPP1突变体多肽;(b) 根据实施方式67-102和112的任一项的融合体;(c) 根据实施方式113-114的任一项的缀合物;和/或(d) 根据实施方式115的药物组合物,从而减少或预防疾病的进展。

[0590] 实施方式122提供了一种在有需要的受试者中减少或预防衰老相关的动脉硬化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) 根据实施方式58-66、87-96和112的任一项的ENPP1突变体多肽;(b) 根据实施方式67-102和112的任一项的融合体;(c) 根据实施方式113-114的任一项的缀合物;和/或(d) 根据实施方式115的药物组合物,从而减少或预防受试者的衰老相关的动脉硬化的进展。

[0591] 实施方式123提供了一种在焦磷酸盐(PPi)水平低于PPi正常水平的受试者中提高PPi水平的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) 根据实施方式58-66、87-96和112的任一项的ENPP1突变体多肽;(b) 根据实施方式67-102和112的任一项的融合体;(c) 根据实施方式113-114的任一项的缀合物;和/或(d) 根据实施方式115的药物组合物,从而在进行施用后,该受试者的PPi水平被升高至至少2 μ M的正常水平,并被维持在大约相同水平下。

[0592] 实施方式124提供了一种在焦磷酸盐(PPi)水平低于PPi正常水平的受试者中减少或预防病理性钙化或骨化进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) 根据实施方式58-66、87-96和112的任一项的ENPP1突变体多肽;(b) 根据实施方式67-102和112的任一项的融合体;(c) 根据实施方式113-114的任一项的缀合物;和/或(d) 根据实施方式115的药物组合物,从而减少该受试者的病理性钙化或骨化或预防受试者的病理性钙化或骨化的进展。

[0593] 实施方式125提供了一种在有需要的受试者中治疗由细胞外焦磷酸盐(PPi)浓度降低表现出的ENPP1缺乏症的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) 根据实施方式58-66、87-96和112的任一项的ENPP1突变体多肽;(b) 根据实施方式67-102和112的任一项的融合体;(c) 根据实施方式113-114的任一项的缀合物;和/或(d) 根据实施方式115的药物组合物,从而升高受试者的PPi水平。

[0594] 实施方式126提供了根据实施方式116-125的任一项的方法,其中急性或慢性地向该受试者施用该突变体多肽、融合体、缀合物或药物组合物。

[0595] 实施方式127提供了根据实施方式116-126的任一项的方法,其中局部地、区域地、肠胃外地或全身地向该受试者施用突变体多肽、融合体、缀合物或药物组合物。

[0596] 实施方式128提供了根据实施方式116-127的任一项的方法,其中该受试者是人。

[0597] 本文引用的每篇专利、专利申请和出版物的各自的公开内容通过引用以其整体并入本文。尽管已经参照具体的实施方式公开了本公开内容,但是显然,本领域的其他技术人员可以设计出本公开内容的其他实施方式和变型,而不脱离本公开内容的真实精神和范围。所附权利要求书旨在被解释为包括所有这样的实施方式和等效变型。

序列表

<110> 耶鲁大学

P.斯塔巴赫

D.布拉多克

<120> ENPP1多肽及其使用方法

<130> 047162-7180W02

<150> US 62/830,230

<151> 2019-04-05

<150> US 62/983,142

<151> 2020-02-28

<150> US 62/984,650

<151> 2020-03-03

<160> 18

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 925

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

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

```

145	150	155	160
Arg Ser Leu Cys	Ala Cys Ser Asp	Asp Cys Lys Asp	Lys Gly Asp Cys
	165	170	175
Cys Ile Asn Tyr	Ser Ser Val Cys	Gln Gly Glu Lys	Ser Trp Val Glu
	180	185	190
Glu Pro Cys Glu	Ser Ile Asn Glu	Pro Gln Cys Pro	Ala Gly Phe Glu
	195	200	205
Thr Pro Pro Thr	Leu Leu Phe Ser	Leu Asp Gly Phe	Arg Ala Glu Tyr
	210	215	220
Leu His Thr Trp	Gly Gly Leu Leu	Pro Val Ile Ser	Lys Leu Lys Lys
225	230	235	240
Cys Gly Thr Tyr	Thr Lys Asn Met	Arg Pro Val Tyr	Pro Thr Lys Thr
	245	250	255
Phe Pro Asn His	Tyr Ser Ile Val	Thr Gly Leu Tyr	Pro Glu Ser His
	260	265	270
Gly Ile Ile Asp	Asn Lys Met Tyr	Asp Pro Lys Met	Asn Ala Ser Phe
	275	280	285
Ser Leu Lys Ser	Lys Glu Lys Phe	Asn Pro Glu Trp	Tyr Lys Gly Glu
	290	295	300
Pro Ile Trp Val	Thr Ala Lys Tyr	Gln Gly Leu Lys	Ser Gly Thr Phe
305	310	315	320
Phe Trp Pro Gly	Ser Asp Val Glu	Ile Asn Gly Ile	Phe Pro Asp Ile
	325	330	335
Tyr Lys Met Tyr	Asn Gly Ser Val	Pro Phe Glu Glu	Arg Ile Leu Ala
	340	345	350
Val Leu Gln Trp	Leu Gln Leu Pro	Lys Asp Glu Arg	Pro His Phe Tyr
	355	360	365
Thr Leu Tyr Leu	Glu Glu Pro Asp	Ser Ser Gly His	Ser Tyr Gly Pro
	370	375	380
Val Ser Ser Glu	Val Ile Lys Ala	Leu Gln Arg Val	Asp Gly Met Val
385	390	395	400
Gly Met Leu Met	Asp Gly Leu Lys	Glu Leu Asn Leu	His Arg Cys Leu
	405	410	415
Asn Leu Ile Leu	Ile Ser Asp His	Gly Met Glu Gln	Gly Ser Cys Lys
	420	425	430
Lys Tyr Ile Tyr	Leu Asn Lys Tyr	Leu Gly Asp Val	Lys Asn Ile Lys
	435	440	445
Val Ile Tyr Gly	Pro Ala Ala Arg	Leu Arg Pro Ser	Asp Val Pro Asp
450	455	460	

Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys
 465 470 475 480
 Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro
 485 490 495
 Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe
 500 505 510
 Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys
 515 520 525
 Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met
 530 535 540
 Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu
 545 550 555 560
 Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu
 565 570 575
 Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn
 580 585 590
 His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val
 595 600 605
 His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu
 610 615 620
 Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr
 625 630 635 640
 Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr
 645 650 655
 Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys
 660 665 670
 Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu
 675 680 685
 Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser
 690 695 700
 Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu
 705 710 715 720
 Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser
 725 730 735
 Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile
 740 745 750
 Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser
 755 760 765
 Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr

770	775	780
Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp		
785	790	795
Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys		800
	805	810
Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe		815
	820	825
Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys		830
	835	840
Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn		845
	850	860
Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu		865
	870	875
Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr		880
	885	890
Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu		895
	900	905
Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu Asp		910
	915	920
		925
<210> 2		
<211> 888		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 2		
Met Ala Arg Arg Ser Ser Phe Gln Ser Cys Gln Ile Ile Ser Leu Phe		
1	5	10
Thr Phe Ala Val Gly Val Asn Ile Cys Leu Gly Phe Thr Ala His Arg		15
	20	25
Ile Lys Arg Ala Glu Gly Trp Glu Glu Gly Pro Pro Thr Val Leu Ser		30
	35	40
Asp Ser Pro Trp Thr Asn Ile Ser Gly Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe		45
	50	55
Glu Leu Gln Glu Ala Gly Pro Pro Asp Cys Arg Cys Asp Asn Leu Cys		60
65	70	75
Lys Ser Tyr Thr Ser Cys Cys His Asp Phe Asp Glu Leu Cys Leu Lys		80
	85	90
Thr Ala Arg Gly Trp Glu Cys Thr Lys Asp Arg Cys Gly Glu Val Arg		95
	100	105
Asn Glu Glu Asn Ala Cys His Cys Ser Glu Asp Cys Leu Ala Arg Gly		110

115	120	125
Asp Cys Cys Thr Asn Tyr Gln Val Val Cys Lys Gly Glu Ser His Trp		
130	135	140
Val Asp Asp Asp Cys Glu Glu Ile Lys Ala Ala Glu Cys Pro Ala Gly		
145	150	155
Phe Val Arg Pro Pro Leu Ile Ile Phe Ser Val Asp Gly Phe Arg Ala		
165	170	175
Ser Tyr Met Lys Lys Gly Ser Lys Val Met Pro Asn Ile Glu Lys Leu		
180	185	190
Arg Ser Cys Gly Thr His Ser Pro Tyr Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr		
195	200	205
Lys Thr Phe Pro Asn Leu Tyr Thr Leu Ala Thr Gly Leu Tyr Pro Glu		
210	215	220
Ser His Gly Ile Val Gly Asn Ser Met Tyr Asp Pro Val Phe Asp Ala		
225	230	235
Thr Phe His Leu Arg Gly Arg Glu Lys Phe Asn His Arg Trp Trp Gly		
245	250	255
Gly Gln Pro Leu Trp Ile Thr Ala Thr Lys Gln Gly Val Lys Ala Gly		
260	265	270
Thr Phe Phe Trp Ser Val Val Ile Pro His Glu Arg Arg Ile Leu Thr		
275	280	285
Ile Leu Gln Trp Leu Thr Leu Pro Asp His Glu Arg Pro Ser Val Tyr		
290	295	300
Ala Phe Tyr Ser Glu Gln Pro Asp Phe Ser Gly His Lys Tyr Gly Pro		
305	310	315
Phe Gly Pro Glu Met Thr Asn Pro Leu Arg Glu Ile Asp Lys Ile Val		
325	330	335
Gly Gln Leu Met Asp Gly Leu Lys Gln Leu Lys Leu His Arg Cys Val		
340	345	350
Asn Val Ile Phe Val Gly Asp His Gly Met Glu Asp Val Thr Cys Asp		
355	360	365
Arg Thr Glu Phe Leu Ser Asn Tyr Leu Thr Asn Val Asp Asp Ile Thr		
370	375	380
Leu Val Pro Gly Thr Leu Gly Arg Ile Arg Ser Lys Phe Ser Asn Asn		
385	390	395
Ala Lys Tyr Asp Pro Lys Ala Ile Ile Ala Asn Leu Thr Cys Lys Lys		
405	410	415
Pro Asp Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys Gln His Leu Pro Lys Arg		
420	425	430

Leu His Tyr Ala Asn Asn Arg Arg Ile Glu Asp Ile His Leu Leu Val
 435 440 445
 Glu Arg Arg Trp His Val Ala Arg Lys Pro Leu Asp Val Tyr Lys Lys
 450 455 460
 Pro Ser Gly Lys Cys Phe Phe Gln Gly Asp His Gly Phe Asp Asn Lys
 465 470 475 480
 Val Asn Ser Met Gln Thr Val Phe Val Gly Tyr Gly Ser Thr Phe Lys
 485 490 495
 Tyr Lys Thr Lys Val Pro Pro Phe Glu Asn Ile Glu Leu Tyr Asn Val
 500 505 510
 Met Cys Asp Leu Leu Gly Leu Lys Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His
 515 520 525
 Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Arg Thr Asn Thr Phe Arg Pro Thr Met
 530 535 540
 Pro Glu Glu Val Thr Arg Pro Asn Tyr Pro Gly Ile Met Tyr Leu Gln
 545 550 555 560
 Ser Asp Phe Asp Leu Gly Cys Thr Cys Asp Asp Lys Val Glu Pro Lys
 565 570 575
 Asn Lys Leu Asp Glu Leu Asn Lys Arg Leu His Thr Lys Gly Ser Thr
 580 585 590
 Glu Ala Glu Thr Arg Lys Phe Arg Gly Ser Arg Asn Glu Asn Lys Glu
 595 600 605
 Asn Ile Asn Gly Asn Phe Glu Pro Arg Lys Glu Arg His Leu Leu Tyr
 610 615 620
 Gly Arg Pro Ala Val Leu Tyr Arg Thr Arg Tyr Asp Ile Leu Tyr His
 625 630 635 640
 Thr Asp Phe Glu Ser Gly Tyr Ser Glu Ile Phe Leu Met Pro Leu Trp
 645 650 655
 Thr Ser Tyr Thr Val Ser Lys Gln Ala Glu Val Ser Ser Val Pro Asp
 660 665 670
 His Leu Thr Ser Cys Val Arg Pro Asp Val Arg Val Ser Pro Ser Phe
 675 680 685
 Ser Gln Asn Cys Leu Ala Tyr Lys Asn Asp Lys Gln Met Ser Tyr Gly
 690 695 700
 Phe Leu Phe Pro Pro Tyr Leu Ser Ser Ser Pro Glu Ala Lys Tyr Asp
 705 710 715 720
 Ala Phe Leu Val Thr Asn Met Val Pro Met Tyr Pro Ala Phe Lys Arg
 725 730 735
 Val Trp Asn Tyr Phe Gln Arg Val Leu Val Lys Lys Tyr Ala Ser Glu

740	745	750
Arg Asn Gly Val Asn Val Ile Ser Gly Pro Ile Phe Asp Tyr Asp Tyr		
755	760	765
Asp Gly Leu His Asp Thr Glu Asp Lys Ile Lys Gln Tyr Val Glu Gly		
770	775	780
Ser Ser Ile Pro Val Pro Thr His Tyr Tyr Ser Ile Ile Thr Ser Cys		
785	790	795
Leu Asp Phe Thr Gln Pro Ala Asp Lys Cys Asp Gly Pro Leu Ser Val		
805	810	815
Ser Ser Phe Ile Leu Pro His Arg Pro Asp Asn Glu Glu Ser Cys Asn		
820	825	830
Ser Ser Glu Asp Glu Ser Lys Trp Val Glu Glu Leu Met Lys Met His		
835	840	845
Thr Ala Arg Val Arg Asp Ile Glu His Leu Thr Ser Leu Asp Phe Phe		
850	855	860
Arg Lys Thr Ser Arg Ser Tyr Pro Glu Ile Leu Thr Leu Lys Thr Tyr		
865	870	875
Leu His Thr Tyr Glu Ser Glu Ile Met Ala Arg Arg Ser Ser Phe Gln		
885	1	5
Ser Cys Gln Ile Ile Ser Leu Phe Thr Phe Ala Val Gly Val Asn Ile		
10	15	20
Cys Leu Gly Phe Thr Ala His Arg Ile Lys Arg Ala Glu Gly Trp Glu		
25	30	35
Glu Gly Pro Pro Thr Val Leu Ser Asp Ser Pro Trp Thr Asn Ile Ser		
45	50	55
Gly Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu Leu Gln Glu Ala Gly Pro Pro		
60	65	70
Asp Cys Arg Cys Asp Asn Leu Cys Lys Ser Tyr Thr Ser Cys Cys His		
75	80	85
Asp Phe Asp Glu Leu Cys Leu Lys Thr Ala Arg Gly Trp Glu Cys Thr		
90	95	100
Lys Asp Arg Cys Gly Glu Val Arg Asn Glu Glu Asn Ala Cys His Cys		
105	110	115
Ser Glu Asp Cys Leu Ala Arg Gly Asp Cys Cys Thr Asn Tyr Gln Val		
125	130	135
Val Cys Lys Gly Glu Ser His Trp Val Asp Asp Asp Cys Glu Glu Ile		
140	145	150
Lys Ala Ala Glu Cys Pro Ala Gly Phe Val Arg Pro Pro Leu Ile Ile		
155	160	165

Phe Ser Val Asp Gly Phe Arg Ala Ser Tyr Met Lys Lys Gly Ser Lys
 170 175 180
 Val Met Pro Asn Ile Glu Lys Leu Arg Ser Cys Gly Thr His Ser Pro
 185 190 195 200
 Tyr Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn Leu Tyr Thr
 205 210 215
 Leu Ala Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile Val Gly Asn Ser
 220 225 230
 Met Tyr Asp Pro Val Phe Asp Ala Thr Phe His Leu Arg Gly Arg Glu
 235 240 245
 Lys Phe Asn His Arg Trp Trp Gly Gly Gln Pro Leu Trp Ile Thr Ala
 250 255 260
 Thr Lys Gln Gly Val Lys Ala Gly Thr Phe Phe Trp Ser Val Val Ile
 265 270 275 280
 Pro His Glu Arg Arg Ile Leu Thr Ile Leu Gln Trp Leu Thr Leu Pro
 285 290 295
 Asp His Glu Arg Pro Ser Val Tyr Ala Phe Tyr Ser Glu Gln Pro Asp
 300 305 310
 Phe Ser Gly His Lys Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Glu Met Thr Asn Pro
 315 320 325
 Leu Arg Glu Ile Asp Lys Ile Val Gly Gln Leu Met Asp Gly Leu Lys
 330 335 340
 Gln Leu Lys Leu His Arg Cys Val Asn Val Ile Phe Val Gly Asp His
 345 350 355 360
 Gly Met Glu Asp Val Thr Cys Asp Arg Thr Glu Phe Leu Ser Asn Tyr
 365 370 375
 Leu Thr Asn Val Asp Asp Ile Thr Leu Val Pro Gly Thr Leu Gly Arg
 380 385 390
 Ile Arg Ser Lys Phe Ser Asn Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Lys Ala Ile
 395 400 405
 Ile Ala Asn Leu Thr Cys Lys Lys Pro Asp Gln His Phe Lys Pro Tyr
 410 415 420
 Leu Lys Gln His Leu Pro Lys Arg Leu His Tyr Ala Asn Asn Arg Arg
 425 430 435 440
 Ile Glu Asp Ile His Leu Leu Val Glu Arg Arg Trp His Val Ala Arg
 445 450 455
 Lys Pro Leu Asp Val Tyr Lys Lys Pro Ser Gly Lys Cys Phe Phe Gln
 460 465 470
 Gly Asp His Gly Phe Asp Asn Lys Val Asn Ser Met Gln Thr Val Phe

475	480	485
Val Gly Tyr Gly Ser Thr Phe	Lys Tyr Lys Thr Lys	Val Pro Pro Phe
490	495	500
Glu Asn Ile Glu Leu Tyr Asn Val Met Cys Asp Leu Leu Gly Leu Lys		
505	510	515
520	525	530
Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Arg		
535	540	545
Thr Asn Thr Phe Arg Pro Thr Met Pro Glu Glu Val Thr Arg Pro Asn		
550	555	560
Tyr Pro Gly Ile Met Tyr Leu Gln Ser Asp Phe Asp Leu Gly Cys Thr		
565	570	575
Cys Asp Asp Lys Val Glu Pro Lys Asn Lys Leu Asp Glu Leu Asn Lys		
580	585	590
Arg Leu His Thr Lys Gly Ser Thr Glu Ala Glu Thr Arg Lys Phe Arg		
595	600	605
Gly Ser Arg Asn Glu Asn Lys Glu Asn Ile Asn Gly Asn Phe Glu Pro		
610	615	620
Arg Lys Glu Arg His Leu Leu Tyr Gly Arg Pro Ala Val Leu Tyr Arg		
625	630	635
Thr Arg Tyr Asp Ile Leu Tyr His Thr Asp Phe Glu Ser Gly Tyr Ser		
640	645	650
Glu Ile Phe Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Ser Lys Gln		
655	660	665
Ala Glu Val Ser Ser Val Pro Asp His Leu Thr Ser Cys Val Arg Pro		
670	675	680
Asp Val Arg Val Ser Pro Ser Phe Ser Gln Asn Cys Leu Ala Tyr Lys		
685	690	695
Asn Asp Lys Gln Met Ser Tyr Gly Phe Leu Phe Pro Pro Tyr Leu Ser		
700	705	710
Ser Ser Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Leu Val Thr Asn Met Val		
715	720	725
Pro Met Tyr Pro Ala Phe Lys Arg Val Trp Asn Tyr Phe Gln Arg Val		
730	735	740
Leu Val Lys Lys Tyr Ala Ser Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Ile Ser		
745	750	755
Gly Pro Ile Phe Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Leu His Asp Thr Glu Asp		
760	765	770
Lys Ile Lys Gln Tyr Val Glu Gly Ser Ser Ile Pro Val Pro Thr His		
775	780	785
		790

Tyr Tyr Ser Ile Ile Thr Ser Cys Leu Asp Phe Thr Gln Pro Ala Asp
 795 800 805
 Lys Cys Asp Gly Pro Leu Ser Val Ser Ser Phe Ile Leu Pro His Arg
 810 815 820
 Pro Asp Asn Glu Glu Ser Cys Asn Ser Ser Glu Asp Glu Ser Lys Trp
 825 830 835 840
 Val Glu Glu Leu Met Lys Met His Thr Ala Arg Val Arg Asp Ile Glu
 845 850 855
 His Leu Thr Ser Leu Asp Phe Phe Arg Lys Thr Ser Arg Ser Tyr Pro
 860 865 870
 Glu Ile Leu Thr Leu Lys Thr Tyr Leu His Thr Tyr Glu Ser Glu Ile
 875 880 885
 <210> 3
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 3
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23) .. (23)

<223> Xaa23缺失或为Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24) .. (24)

<223> 如果Xaa23缺失则Xaa24缺失,并且如果Xaa23为Leu则Xaa24缺失或为Gln

<400> 4

Met Thr Ser Lys Phe Leu Leu Val Ser Phe Ile Leu Ala Ala Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Ser Thr Thr Phe Ser Xaa Xaa
 20

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Met Arg Gly Pro Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Leu Ala Thr Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Pro Gly Ala Gly Ala
 20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Met Arg Gly Pro Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Leu Ala Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Pro Gly Ala
 20
 <210> 7
 <211> 1078
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 重组合成
 <400> 7
 Met Arg Gly Pro Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Leu Ala Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Pro Gly Ala Gly Ala Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys Ser Cys
 20 25 30
 Lys Gly Arg Cys Phe Glu Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg Cys Asp Ala
 35 40 45
 Ala Cys Val Glu Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys
 50 55 60
 Ile Glu Pro Glu His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu
 65 70 75 80
 Lys Arg Leu Thr Arg Ser Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp
 85 90 95
 Lys Gly Asp Cys Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys
 100 105 110
 Ser Trp Val Glu Glu Pro Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro
 115 120 125
 Ala Gly Phe Glu Thr Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe
 130 135 140
 Arg Ala Glu Tyr Leu His Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser
 145 150 155 160
 Lys Leu Lys Lys Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr
 165 170 175
 Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Pro Glu Ser His Gly Ile Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met
 195 200 205
 Asn Ala Ser Phe Ser Leu Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp
 210 215 220

Tyr Lys Gly Glu Pro Ile Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys
 225 230 235 240
 Ser Gly Thr Phe Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Ile
 245 250 255
 Phe Pro Asp Ile Tyr Lys Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu
 260 265 270
 Arg Ile Leu Ala Val Leu Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg
 275 280 285
 Pro His Phe Tyr Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His
 290 295 300
 Ser Tyr Gly Pro Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val
 305 310 315 320
 Asp Gly Met Val Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu
 325 330 335
 His Arg Cys Leu Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln
 340 345 350
 Gly Ser Cys Lys Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val
 355 360 365
 Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser
 370 375 380
 Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg
 385 390 395 400
 Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys
 405 410 415
 His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu
 420 425 430
 Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro
 435 440 445
 Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val
 450 455 460
 Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys
 465 470 475 480
 His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu
 485 490 495
 Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His
 500 505 510
 Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His
 515 520 525
 Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro

530	535	540
Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu		
545	550	555
Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile		
	565	570
Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu		
	580	585
Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser		
	595	600
Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn		
610	615	620
Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe		
625	630	635
Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn		
	645	650
Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn		
	660	665
Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro		
675	680	685
Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu		
690	695	700
Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly		
705	710	715
Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn		
	725	730
Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro		
	740	745
Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr		
	755	760
Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His		
770	775	780
Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser		
785	790	795
Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val		
	805	810
Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val		
	820	825
Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu		
835	840	845

Asp Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 850 855 860
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 865 870 875 880
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 885 890 895
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 900 905 910
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 915 920 925
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 930 935 940
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 945 950 955 960
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 965 970 975
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 980 985 990
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 995 1000 1005
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 1010 1015 1020
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 1025 1030 1035
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 1040 1045 1050
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 1055 1060 1065
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 1070 1075
 <210> 8
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <400> 8
 Leu Ile Asn
 1

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <400> 9
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 10
 <211> 827
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 重组合成
 <400> 10
 Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu
 1 5 10 15
 Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly
 20 25 30
 Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile
 35 40 45
 Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr Arg Ser
 50 55 60
 Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp Lys Gly Asp Cys Cys Ile
 65 70 75 80
 Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu Glu Pro
 85 90 95
 Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu Thr Pro
 100 105 110
 Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu His
 115 120 125
 Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys Cys Gly
 130 135 140
 Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro
 145 150 155 160
 Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile
 165 170 175
 Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met Asn Ala Ser Phe Ser Leu

	180		185		190
Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Pro Ile					
	195		200		205
Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe Phe Trp					
	210		215		220
Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Ile Phe Pro Asp Ile Tyr Lys					
225		230		235	240
Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala Val Leu					
	245		250		255
Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu					
	260		265		270
Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Ser					
	275		280		285
Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val Asp Gly Met Val Gly Met					
	290		295		300
Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Arg Cys Leu Asn Leu					
305		310		315	320
Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys Lys Tyr					
	325		330		335
Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile					
	340		345		350
Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr					
	355		360		365
Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu					
	370		375		380
Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg					
385		390		395	400
Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu					
	405		410		415
Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys					
	420		425		430
Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala					
	435		440		445
Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp					
	450		455		460
Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn					
465		470		475	480
Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu					
	485		490		495

Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro
 500 505 510
 Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys
 515 520 525
 Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe
 530 535 540
 Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro
 545 550 555 560
 Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu
 565 570 575
 Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro
 580 585 590
 Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu
 595 600 605
 Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro
 610 615 620
 Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly
 625 630 635 640
 Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser
 645 650 655
 Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln
 660 665 670
 Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu
 675 680 685
 Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp
 690 695 700
 Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg
 705 710 715 720
 Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe Ile Val
 725 730 735
 Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn
 740 745 750
 Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu
 755 760 765
 Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu
 770 775 780
 Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr Gly Leu
 785 790 795 800
 Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu

	805		810		815
Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu Asp					
	820		825		
<210> 11					
<211> 827					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 重组合成					
<400> 11					
Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu					
1	5		10		15
Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly					
	20		25		30
Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile					
	35		40		45
Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr Arg Ser					
	50		55		60
Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp Lys Gly Asp Cys Cys Ile					
65	70		75		80
Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu Glu Pro					
	85		90		95
Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu Thr Pro					
	100		105		110
Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu His					
	115		120		125
Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys Cys Gly					
	130		135		140
Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro					
145	150		155		160
Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile					
	165		170		175
Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met Asn Ala Ser Phe Ser Leu					
	180		185		190
Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Pro Ile					
	195		200		205
Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe Phe Trp					
	210		215		220
Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Thr Phe Pro Asp Ile Tyr Lys					

225	230	235	240
Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala Val Leu			
	245	250	255
Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu			
	260	265	270
Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Ser			
	275	280	285
Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val Asp Gly Met Val Gly Met			
	290	295	300
Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Arg Cys Leu Asn Leu			
305	310	315	320
Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys Lys Tyr			
	325	330	335
Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile			
	340	345	350
Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr			
	355	360	365
Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu			
	370	375	380
Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg			
385	390	395	400
Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu			
	405	410	415
Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys			
	420	425	430
Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala			
	435	440	445
Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp			
	450	455	460
Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn			
465	470	475	480
Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu			
	485	490	495
Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro			
	500	505	510
Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys			
	515	520	525
Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe			
	530	535	540

Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro
 545 550 555 560
 Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu
 565 570 575
 Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro
 580 585 590
 Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu
 595 600 605
 Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro
 610 615 620
 Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly
 625 630 635 640
 Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser
 645 650 655
 Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln
 660 665 670
 Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu
 675 680 685
 Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp
 690 695 700
 Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg
 705 710 715 720
 Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe Ile Val
 725 730 735
 Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn
 740 745 750
 Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu
 755 760 765
 Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu
 770 775 780
 Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr Gly Leu
 785 790 795 800
 Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu
 805 810 815
 Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu Asp
 820 825

<210> 12

<211> 827

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组合成

<400> 12

```

Pro Ser Cys Ala Lys Glu Asn Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu
1           5           10           15
Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly
          20           25           30
Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile
          35           40           45
Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr Arg Ser
          50           55           60
Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp Lys Gly Asp Cys Cys Ile
65           70           75           80
Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu Glu Pro
          85           90           95
Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu Thr Pro
          100          105          110
Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu His
          115          120          125
Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys Cys Gly
          130          135          140
Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro
145           150           155           160
Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile
          165          170          175
Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met Asn Ala Ser Phe Ser Leu
          180          185          190
Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Pro Ile
          195          200          205
Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe Phe Trp
          210          215          220
Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Thr Phe Pro Asp Ile Tyr Lys
225           230           235           240
Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala Val Leu
          245          250          255
Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu
          260          265          270
Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Ser

```

275	280	285
Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val Asp Gly Met Val Gly Met		
290	295	300
Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Arg Cys Leu Asn Leu		
305	310	315
Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys Lys Tyr		
325	330	335
Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile		
340	345	350
Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr		
355	360	365
Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu		
370	375	380
Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg		
385	390	395
Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu		
405	410	415
Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys		
420	425	430
Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala		
435	440	445
Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp		
450	455	460
Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn		
465	470	475
Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu		
485	490	495
Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Asn		
500	505	510
Leu Thr Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys		
515	520	525
Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe		
530	535	540
Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro		
545	550	555
Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu		
565	570	575
Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro		
580	585	590

Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu
 595 600 605
 Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro
 610 615 620
 Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly
 625 630 635 640
 Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser
 645 650 655
 Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln
 660 665 670
 Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu
 675 680 685
 Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp
 690 695 700
 Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg
 705 710 715 720
 Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe Ile Val
 725 730 735
 Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn
 740 745 750
 Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu
 755 760 765
 Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu
 770 775 780
 Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr Gly Leu
 785 790 795 800
 Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu
 805 810 815
 Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu Asp
 820 825
 <210> 13
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 13
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 14
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 重组合成
 <400> 14
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 15
 <211> 1059
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 重组合成
 <400> 15
 Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu
 1 5 10 15
 Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly
 20 25 30
 Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile
 35 40 45
 Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr Arg Ser
 50 55 60

370	375	380
Pro Asn Gln His Phe Lys	Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu	Pro Lys Arg
385	390	395
Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu		
405	410	415
Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys		
420	425	430
Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala		
435	440	445
Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp		
450	455	460
Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn		
465	470	475
Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu		
485	490	495
Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro		
500	505	510
Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys		
515	520	525
Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe		
530	535	540
Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro		
545	550	555
Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu		
565	570	575
Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro		
580	585	590
Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu		
595	600	605
Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro		
610	615	620
Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly		
625	630	635
Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser		
645	650	655
Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln		
660	665	670
Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu		
675	680	685

Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp
 690 695 700
 Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg
 705 710 715 720
 Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe Ile Val
 725 730 735
 Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn
 740 745 750
 Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu
 755 760 765
 Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu
 770 775 780
 Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr Gly Leu
 785 790 795 800
 Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu
 805 810 815
 Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu Asp Gly Gly Gly Gly Ser
 820 825 830
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 835 840 845
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
 850 855 860
 Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 865 870 875 880
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 885 890 895
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 900 905 910
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 915 920 925
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 930 935 940
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 945 950 955 960
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 965 970 975
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 980 985 990
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

995	1000	1005
Val Leu Asp Ser Asp Gly	Ser Phe Phe Leu Tyr	Ser Lys Leu Thr
1010	1015	1020
Val Asp Lys Ser Arg Trp	Gln Gln Gly Asn Val	Phe Ser Cys Ser
1025	1030	1035
Val Met His Glu Ala Leu	His Asn His Tyr Thr	Gln Lys Ser Leu
1040	1045	1050
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
1055		
<210> 16		
<211> 1057		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 重组合成		
<400> 16		
Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu		
1	5	10
Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly		
	20	25
Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile		
	35	40
Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr Arg Ser		
	50	55
Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp Lys Gly Asp Cys Cys Ile		
65	70	75
Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu Glu Pro		
	85	90
Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu Thr Pro		
	100	105
Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu His		
	115	120
Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys Cys Gly		
	130	135
Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro		
145	150	155
Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile		
	165	170
Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met Asn Ala Ser Phe Ser Leu		

	180		185		190
Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Pro Ile					
	195		200		205
Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe Phe Trp					
	210		215		220
Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Ile Phe Pro Asp Ile Tyr Lys					
225		230		235	240
Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala Val Leu					
	245		250		255
Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu					
	260		265		270
Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Ser					
	275		280		285
Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val Asp Gly Met Val Gly Met					
	290		295		300
Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Arg Cys Leu Asn Leu					
305		310		315	320
Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys Lys Tyr					
	325		330		335
Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile					
	340		345		350
Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr					
	355		360		365
Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu					
	370		375		380
Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg					
385		390		395	400
Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu					
	405		410		415
Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys					
	420		425		430
Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala					
	435		440		445
Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp					
	450		455		460
Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn					
465		470		475	480
Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu					
	485		490		495

Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro
 500 505 510
 Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys
 515 520 525
 Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe
 530 535 540
 Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro
 545 550 555 560
 Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu
 565 570 575
 Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro
 580 585 590
 Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu
 595 600 605
 Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro
 610 615 620
 Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly
 625 630 635 640
 Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser
 645 650 655
 Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln
 660 665 670
 Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu
 675 680 685
 Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp
 690 695 700
 Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg
 705 710 715 720
 Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe Ile Val
 725 730 735
 Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn
 740 745 750
 Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu
 755 760 765
 Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu
 770 775 780
 Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr Gly Leu
 785 790 795 800
 Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu

	805	810	815
Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu Asp Leu Ile Asn Asp Lys			
	820	825	830
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
	835	840	845
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr			
	850	855	860
Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
865	870	875	880
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
	885	890	895
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	900	905	910
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
	915	920	925
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
	930	935	940
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
945	950	955	960
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
	965	970	975
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	980	985	990
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
	995	1000	1005
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	1010	1015	1020
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	1025	1030	1035
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
	1040	1045	1050
Ser Pro Gly Lys			
	1055		
<210> 17			
<211> 1057			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 重组合成			

<400> 17

Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu
 1 5 10 15
 Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly
 20 25 30
 Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile
 35 40 45
 Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr Arg Ser
 50 55 60
 Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp Lys Gly Asp Cys Cys Ile
 65 70 75 80
 Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu Glu Pro
 85 90 95
 Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu Thr Pro
 100 105 110
 Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu His
 115 120 125
 Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys Cys Gly
 130 135 140
 Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro
 145 150 155 160
 Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile
 165 170 175
 Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met Asn Ala Ser Phe Ser Leu
 180 185 190
 Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Pro Ile
 195 200 205
 Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe Phe Trp
 210 215 220
 Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Thr Phe Pro Asp Ile Tyr Lys
 225 230 235 240
 Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala Val Leu
 245 250 255
 Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu
 260 265 270
 Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Ser
 275 280 285
 Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val Asp Gly Met Val Gly Met
 290 295 300

Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Arg Cys Leu Asn Leu
 305 310 315 320
 Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys Lys Tyr
 325 330 335
 Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile
 340 345 350
 Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr
 355 360 365
 Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu
 370 375 380
 Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg
 385 390 395 400
 Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu
 405 410 415
 Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys
 420 425 430
 Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala
 435 440 445
 Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp
 450 455 460
 Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn
 465 470 475 480
 Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu
 485 490 495
 Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro
 500 505 510
 Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys
 515 520 525
 Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe
 530 535 540
 Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro
 545 550 555 560
 Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu
 565 570 575
 Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro
 580 585 590
 Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu
 595 600 605
 Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 930 935 940
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 945 950 955 960
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 965 970 975
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 980 985 990
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 995 1000 1005
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 1010 1015 1020
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 1025 1030 1035
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 1040 1045 1050
 Ser Pro Gly Lys
 1055
 <210> 18
 <211> 1059
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 重组合成
 <400> 18
 Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu
 1 5 10 15
 Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly
 20 25 30
 Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile
 35 40 45
 Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr Arg Ser
 50 55 60
 Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp Lys Gly Asp Cys Cys Ile
 65 70 75 80
 Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu Glu Pro
 85 90 95
 Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu Thr Pro
 100 105 110

Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu His
 115 120 125
 Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys Cys Gly
 130 135 140
 Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro
 145 150 155 160
 Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile
 165 170 175
 Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met Asn Ala Ser Phe Ser Leu
 180 185 190
 Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Pro Ile
 195 200 205
 Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe Phe Trp
 210 215 220
 Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Thr Phe Pro Asp Ile Tyr Lys
 225 230 235 240
 Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala Val Leu
 245 250 255
 Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu
 260 265 270
 Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Ser
 275 280 285
 Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val Asp Gly Met Val Gly Met
 290 295 300
 Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Arg Cys Leu Asn Leu
 305 310 315 320
 Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys Lys Tyr
 325 330 335
 Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile
 340 345 350
 Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr
 355 360 365
 Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu
 370 375 380
 Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg
 385 390 395 400
 Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu
 405 410 415
 Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys

	420		425		430
Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala					
	435		440		445
Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp					
	450		455		460
Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn					
465		470		475	480
Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu					
	485		490		495
Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro					
	500		505		510
Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys					
	515		520		525
Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe					
	530		535		540
Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro					
545		550		555	560
Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu					
	565		570		575
Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro					
	580		585		590
Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu					
	595		600		605
Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro					
	610		615		620
Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly					
625		630		635	640
Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser					
	645		650		655
Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln					
	660		665		670
Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu					
	675		680		685
Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp					
	690		695		700
Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg					
705		710		715	720
Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe Ile Val					
	725		730		735

Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn
 740 745 750
 Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu
 755 760 765
 Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu
 770 775 780
 Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr Gly Leu
 785 790 795 800
 Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu
 805 810 815
 Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu Asp Gly Gly Gly Gly Ser
 820 825 830
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 835 840 845
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
 850 855 860
 Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 865 870 875 880
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 885 890 895
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 900 905 910
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 915 920 925
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 930 935 940
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 945 950 955 960
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 965 970 975
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 980 985 990
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 995 1000 1005
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 1010 1015 1020
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 1025 1030 1035
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

1040	1045	1050
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
1055		

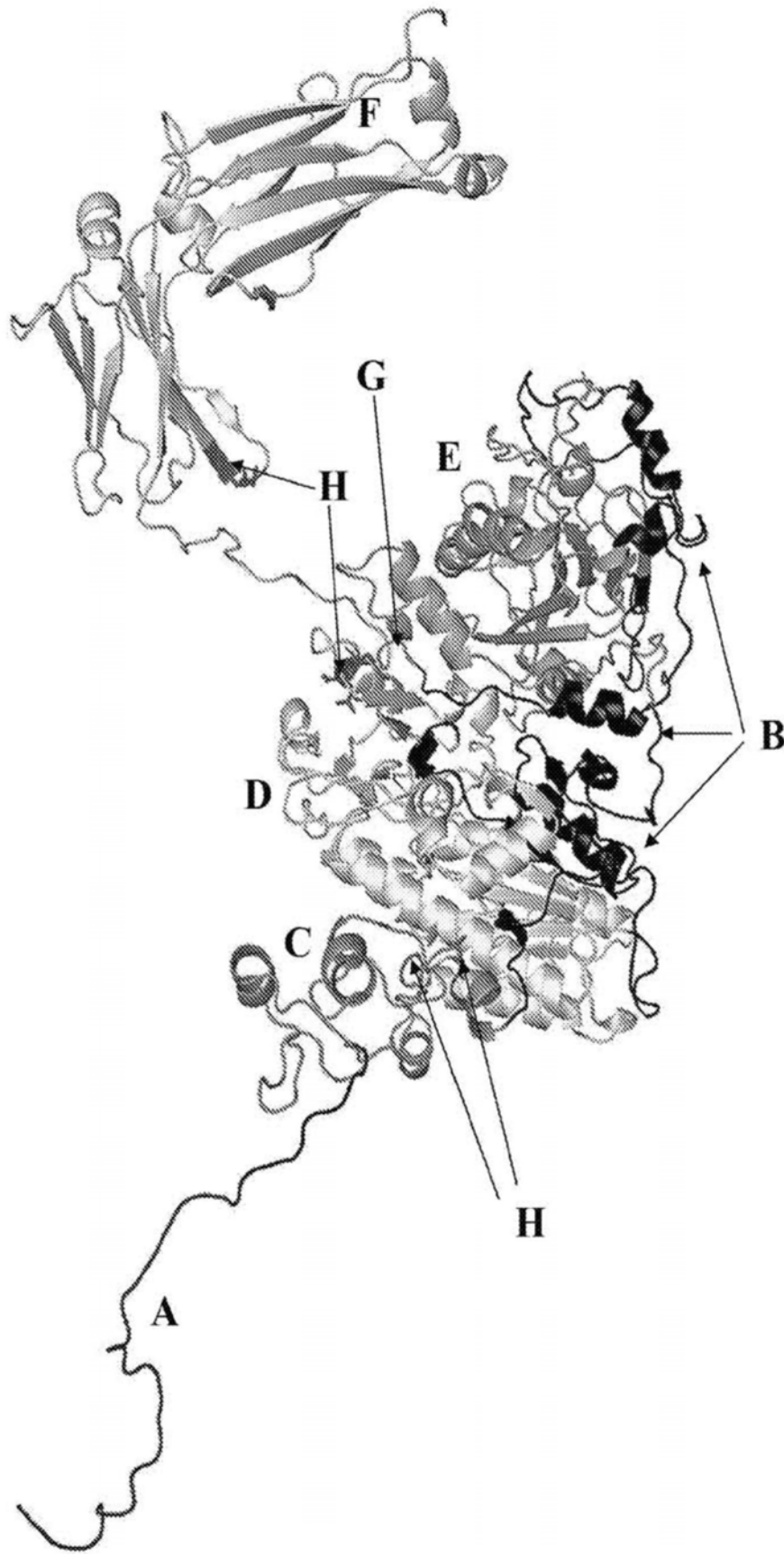


图1

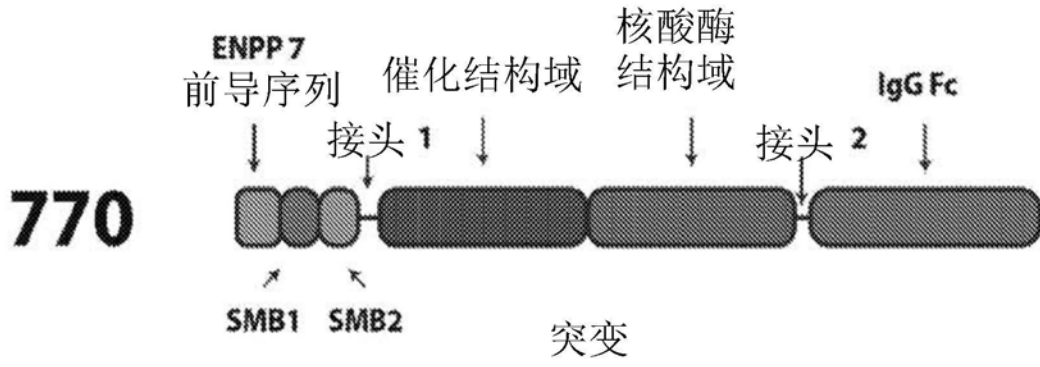


图2A

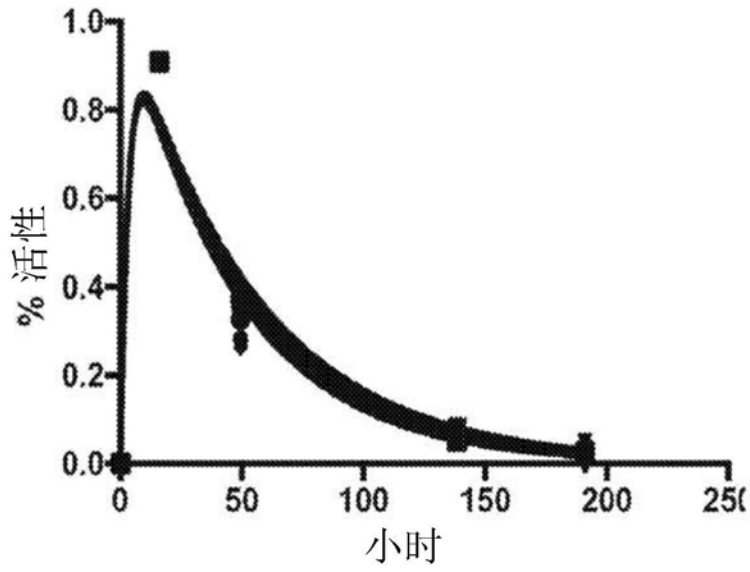


图2B

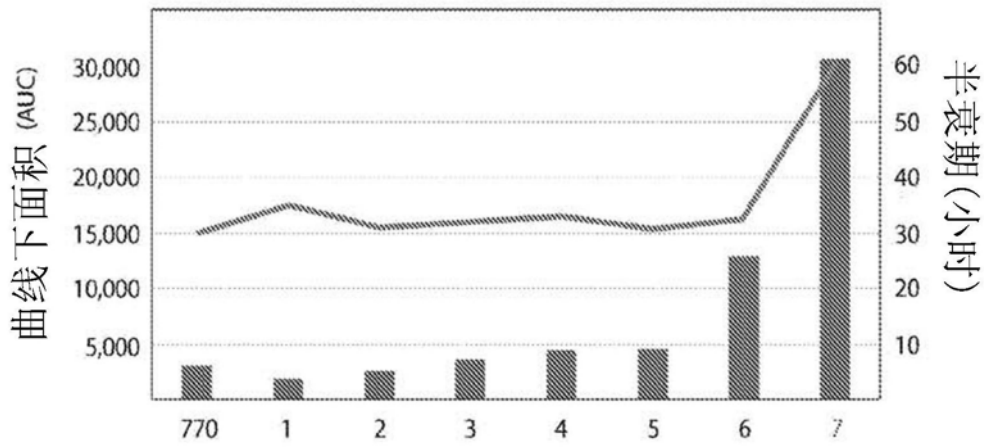
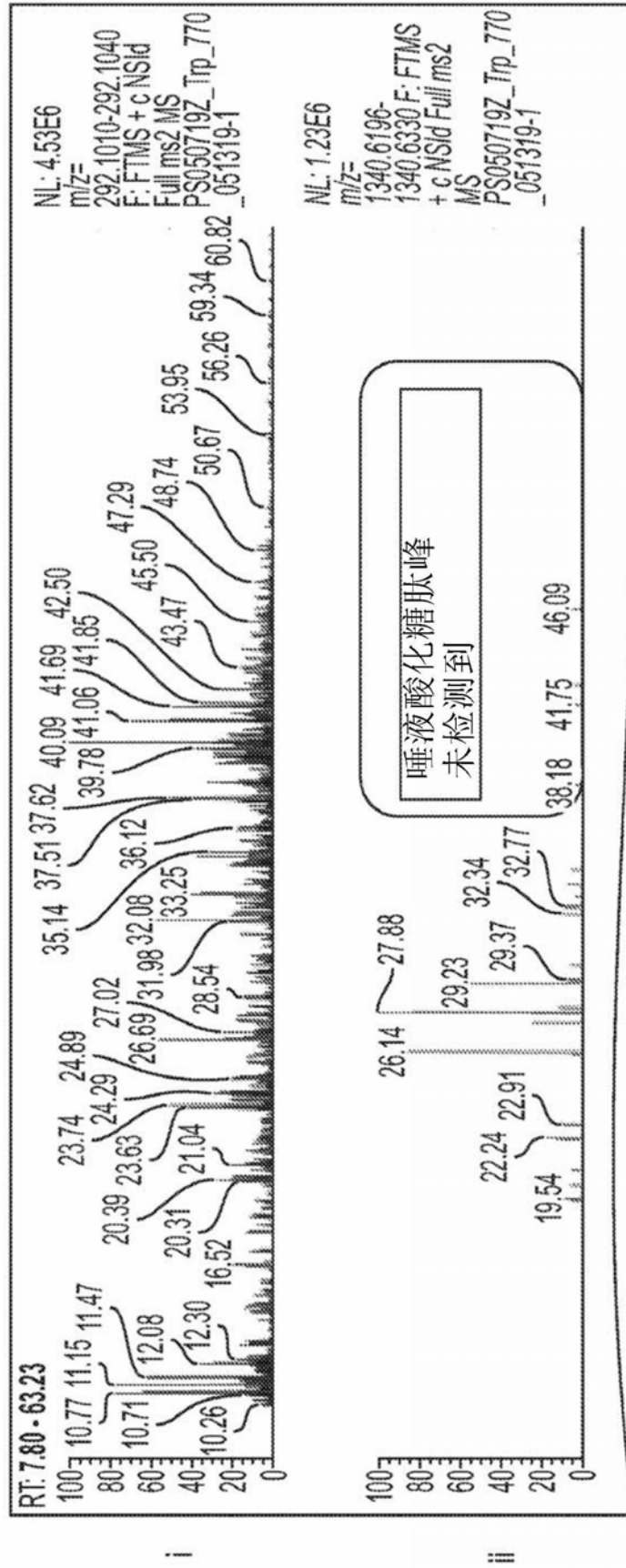


图2C



i

ii

图2D

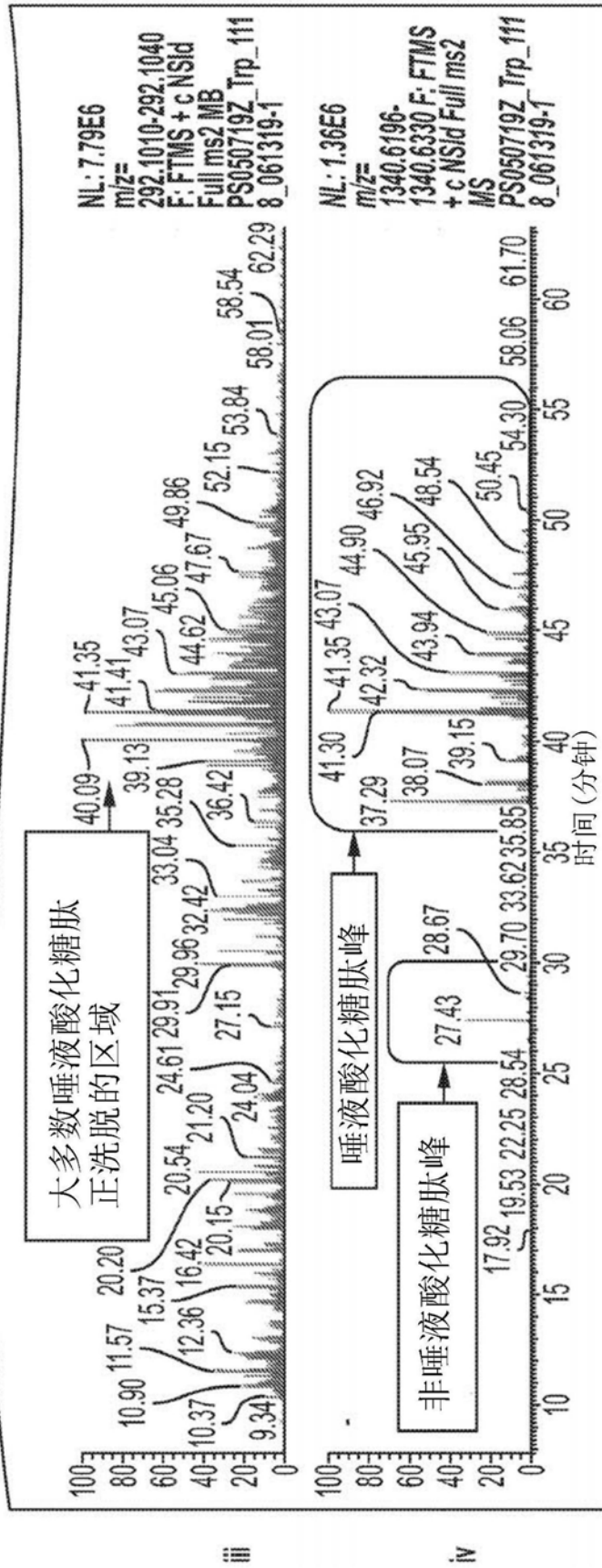


图2D续

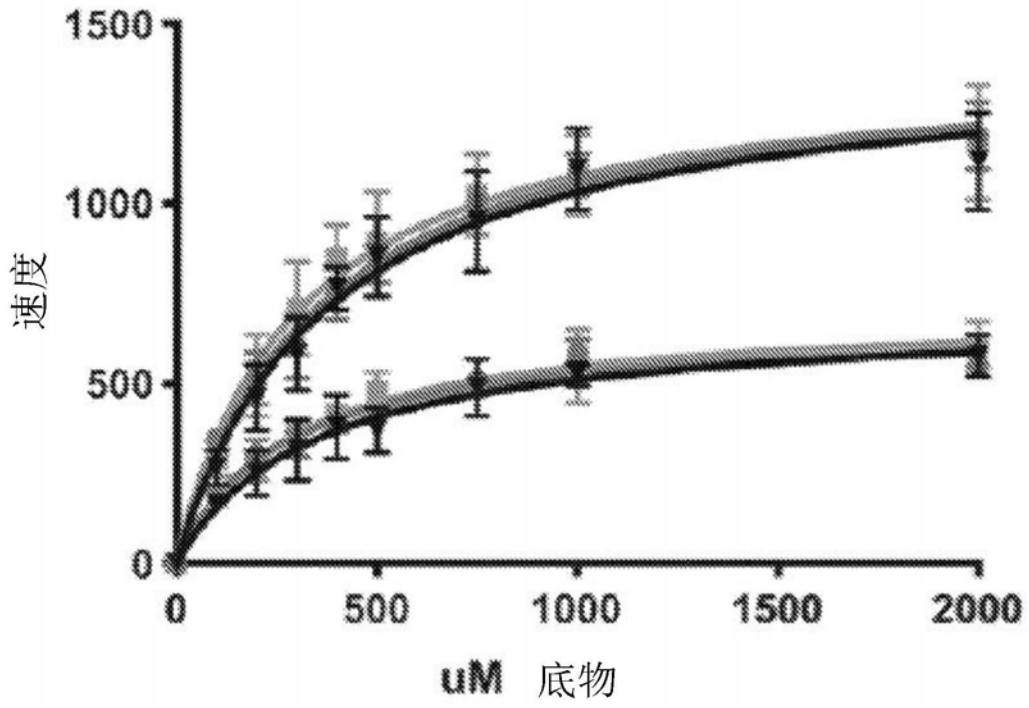


图2E

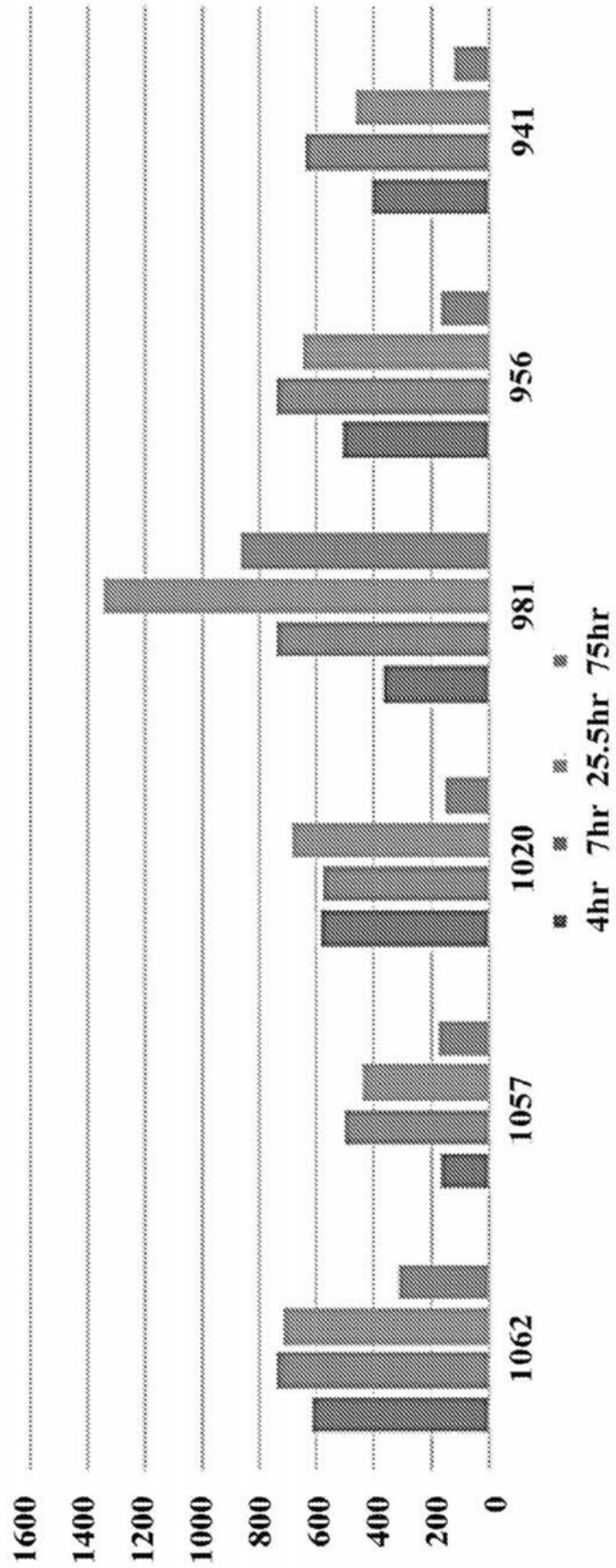


图3

4 hr	7 hr	18 hr	25.5 hr	48 hr	75 hr	91 hr
348	1,072	1,912	1,512	1,552	892	668
416	536	1,476	1,244	1,104	844	908
	492	1,628	1,488		904	692
		1,280	1,312		932	640
		1,716	1,172		788	

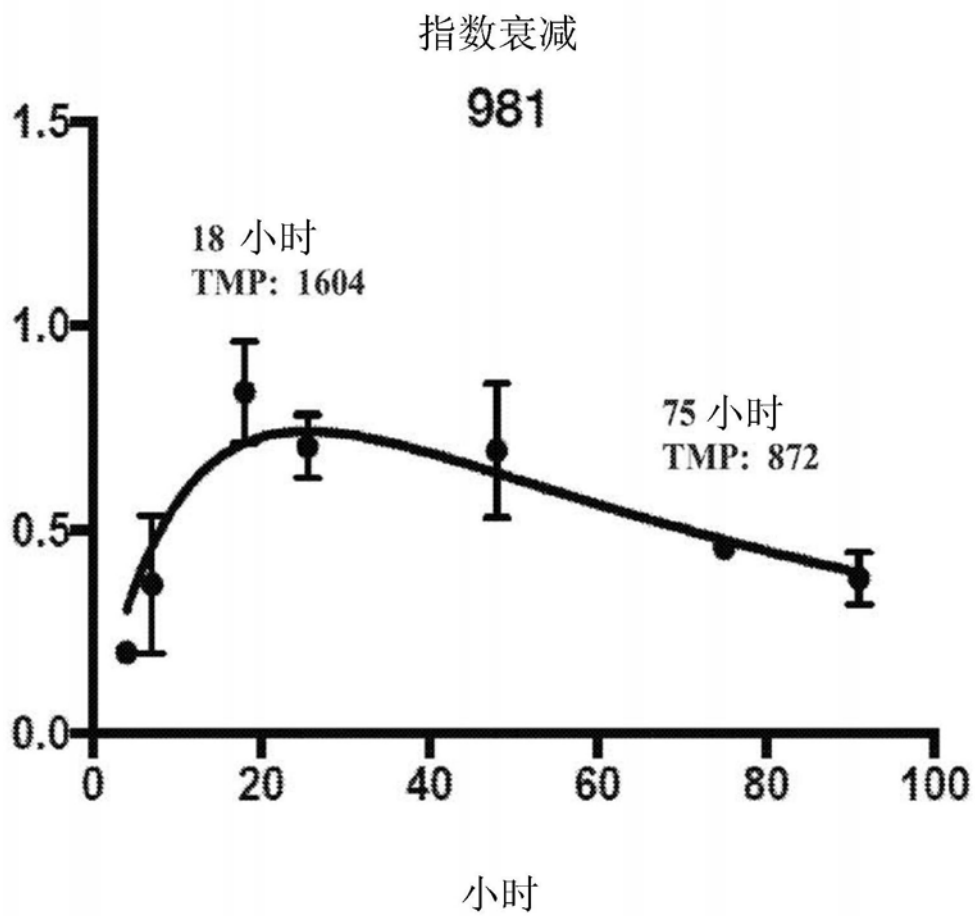


图4

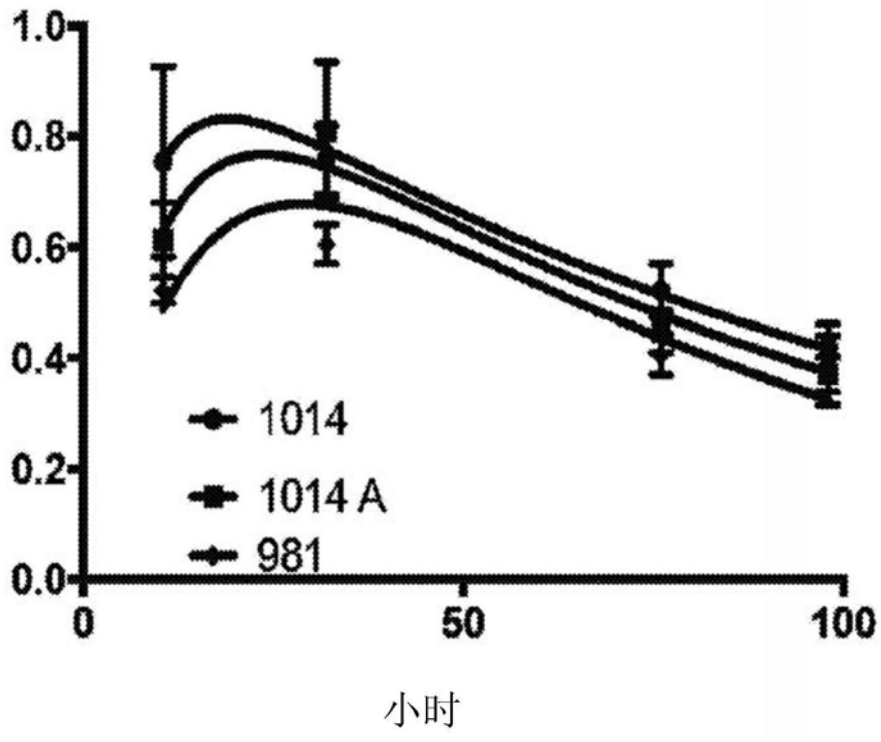


图5

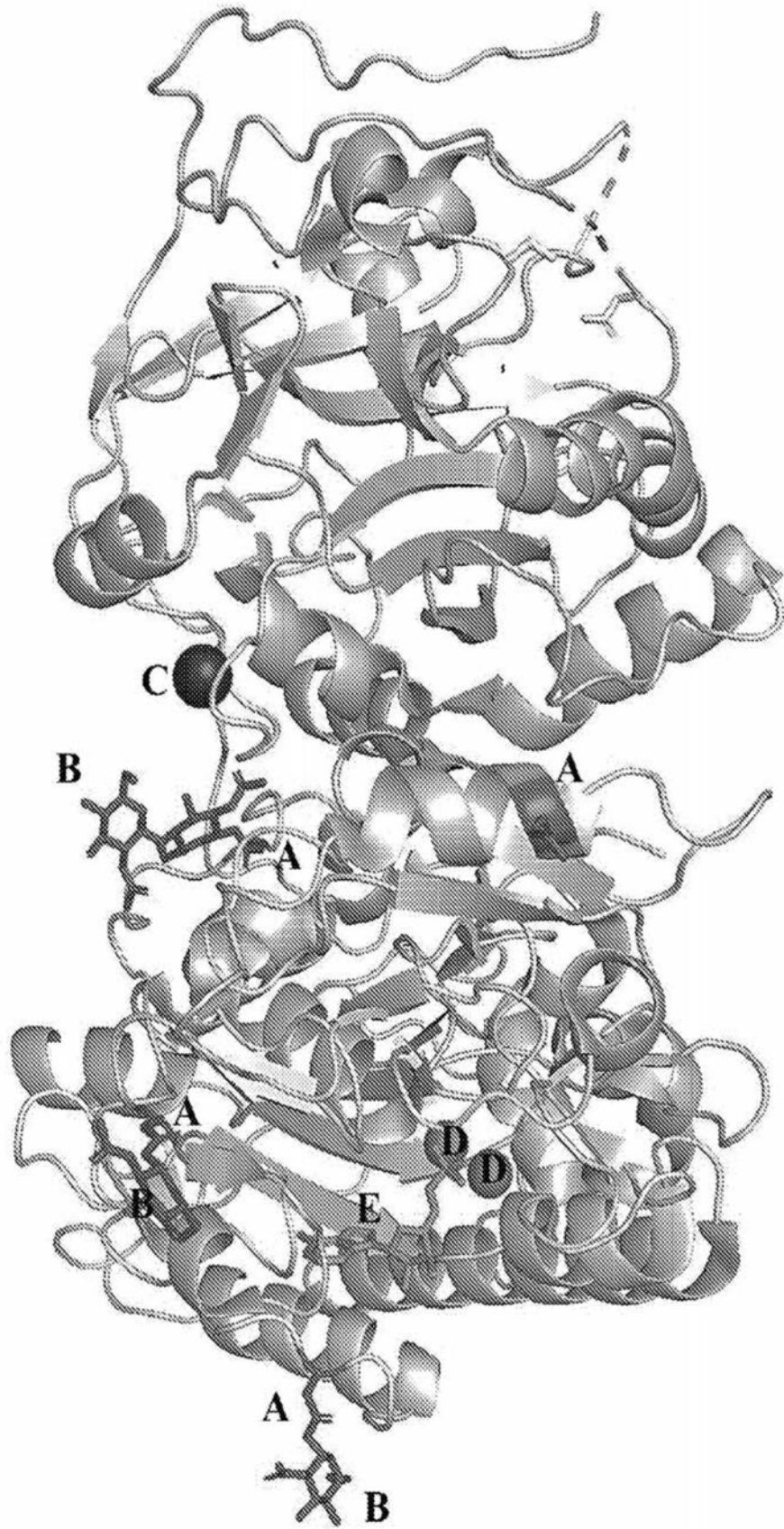


图6

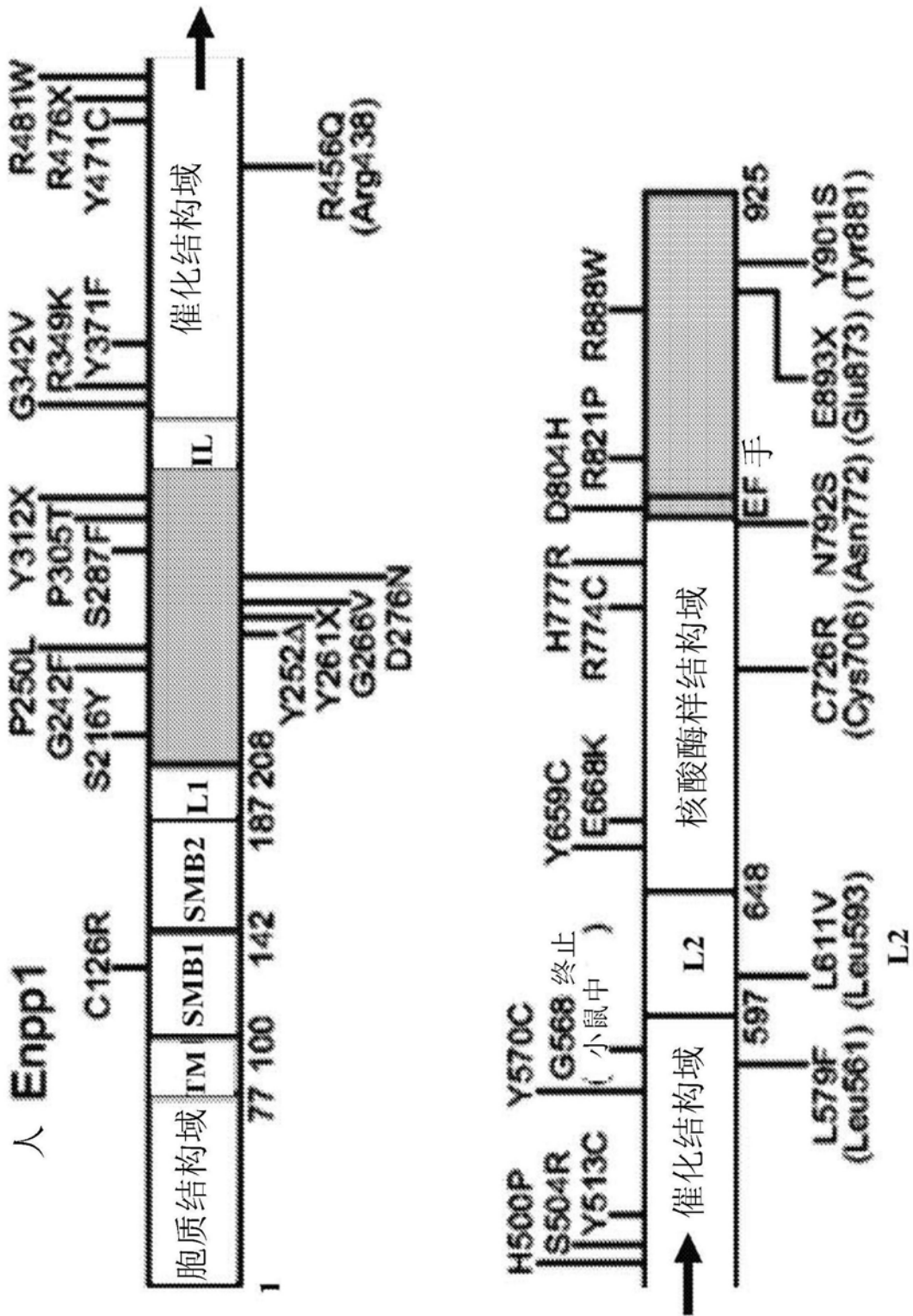


图7A

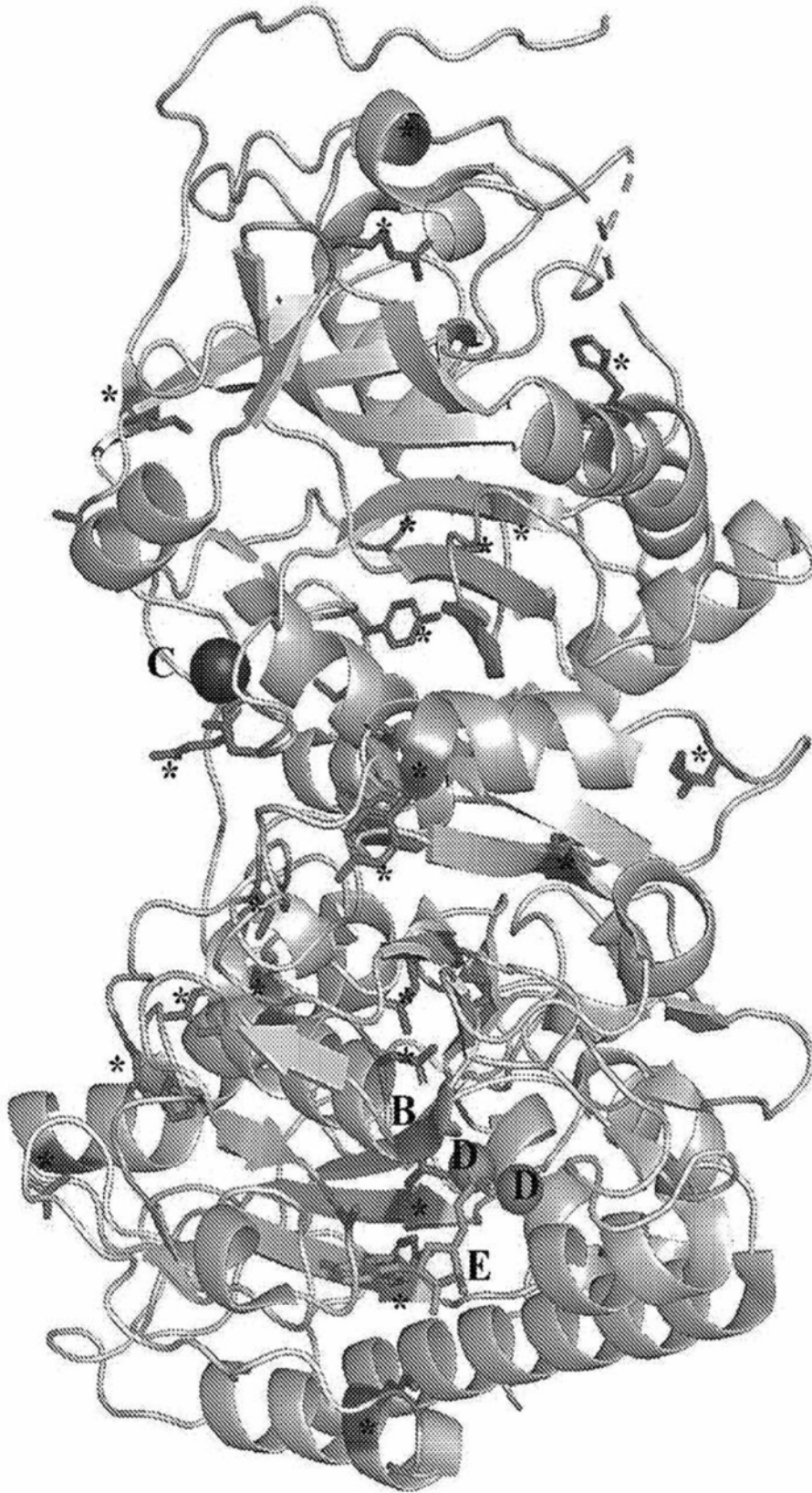


图7B

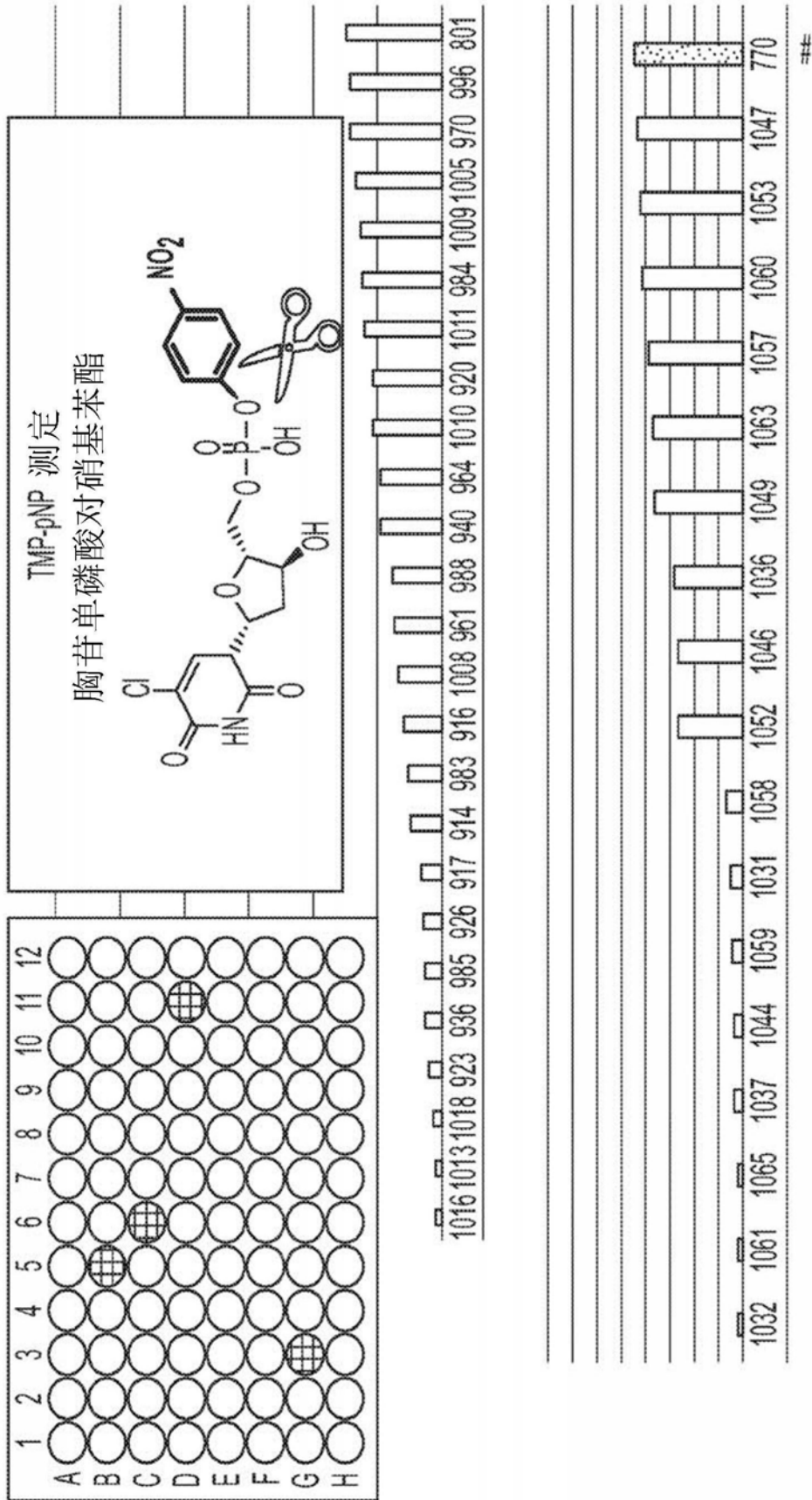


图8A

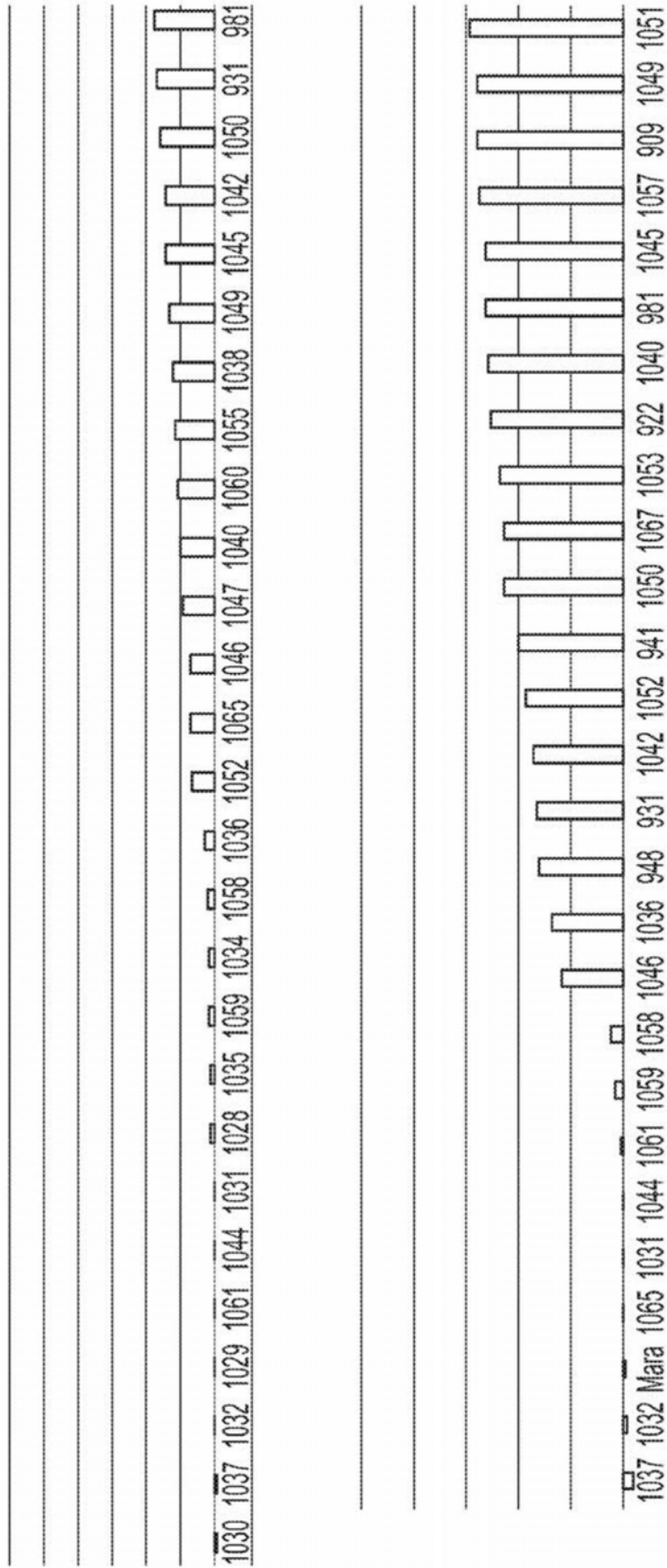


图8C

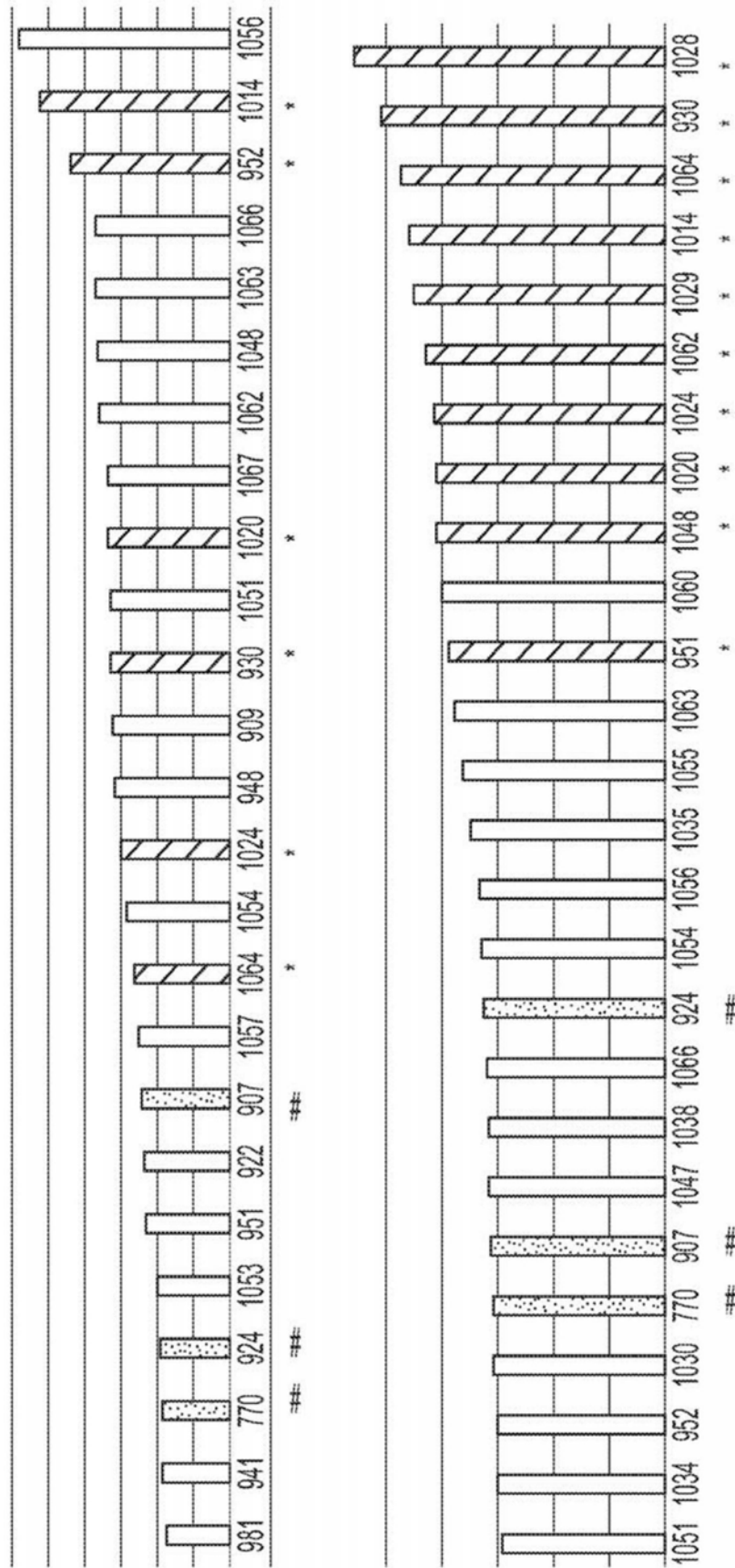


图8D

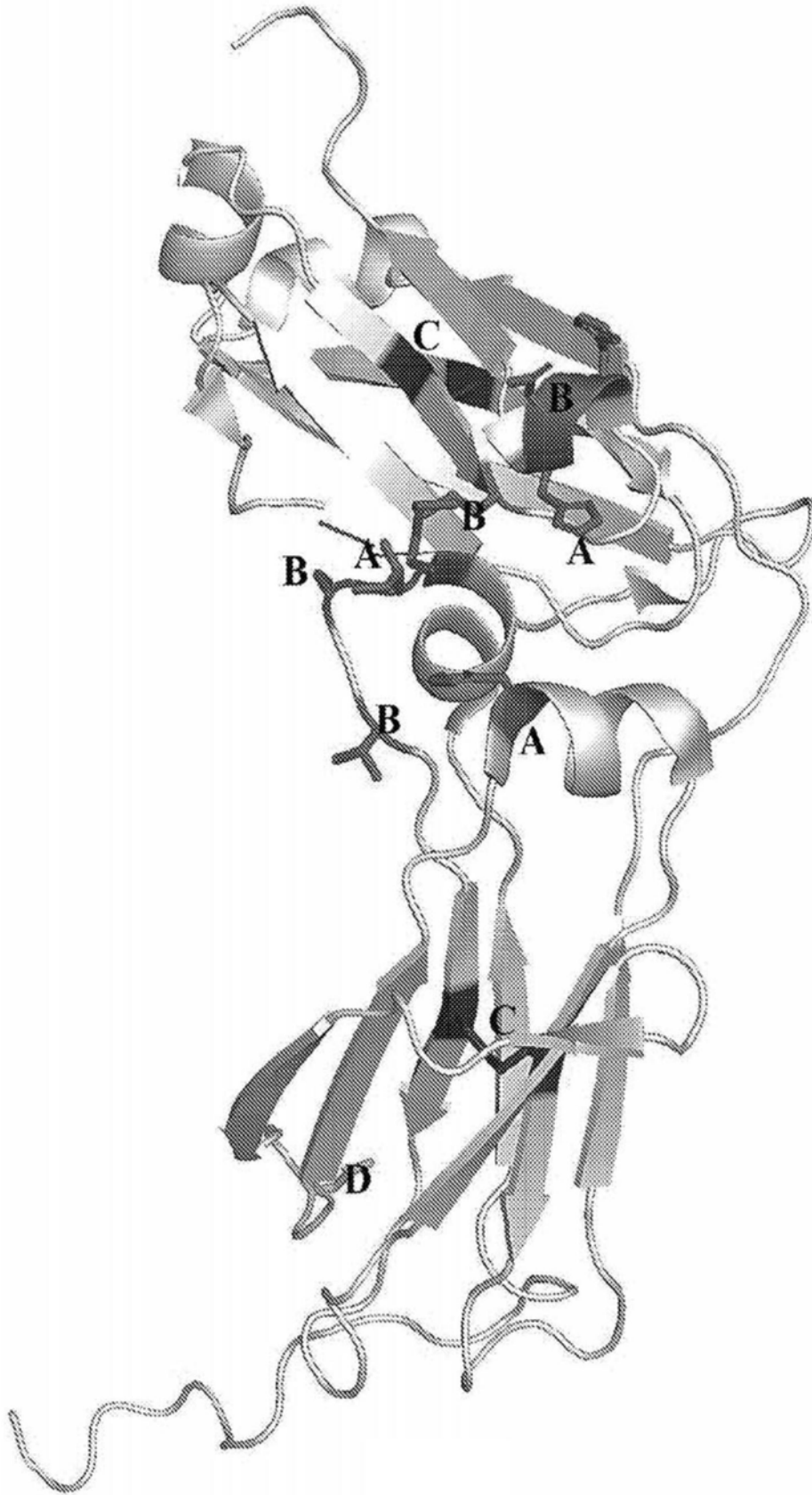


图9A

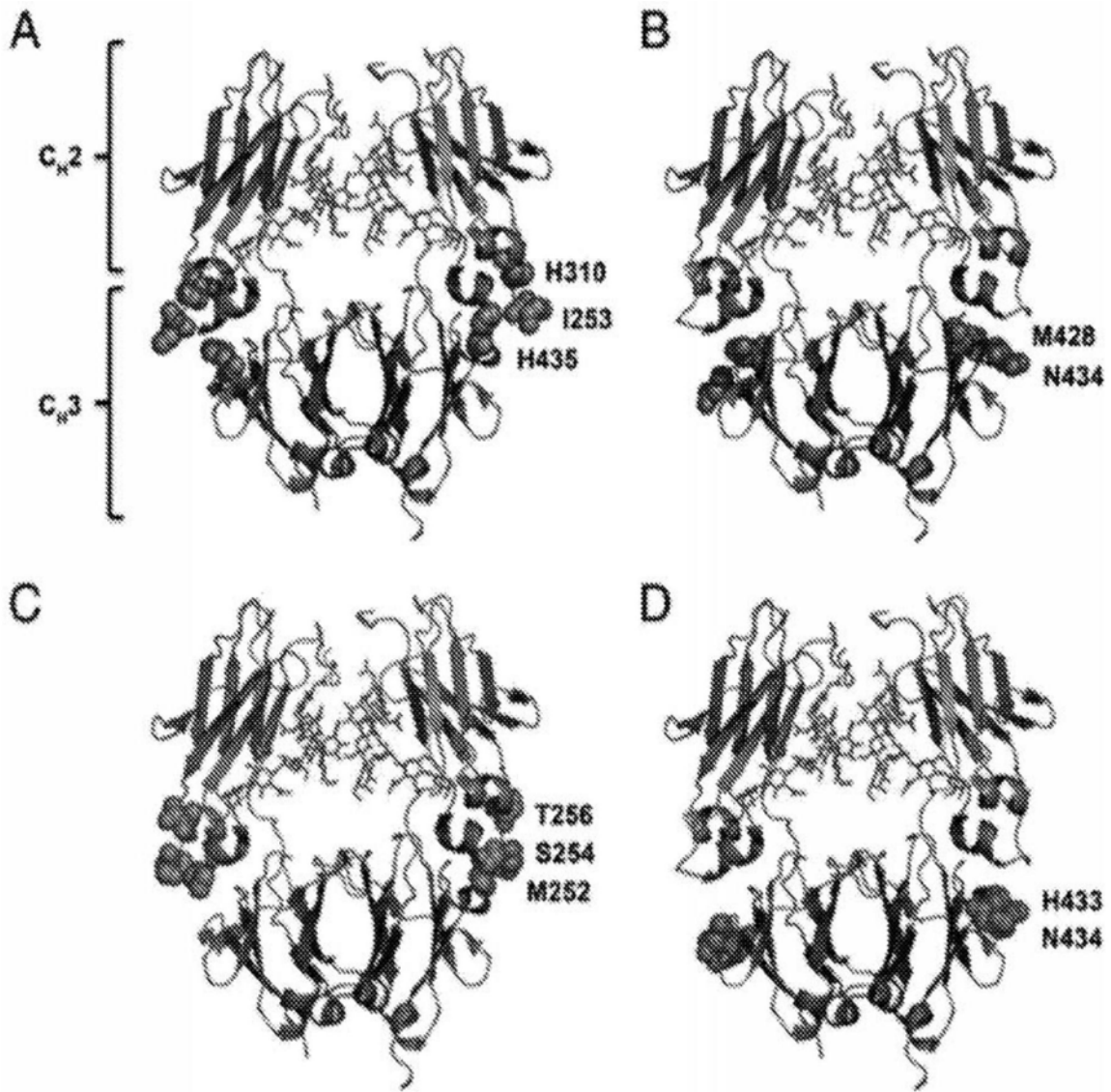
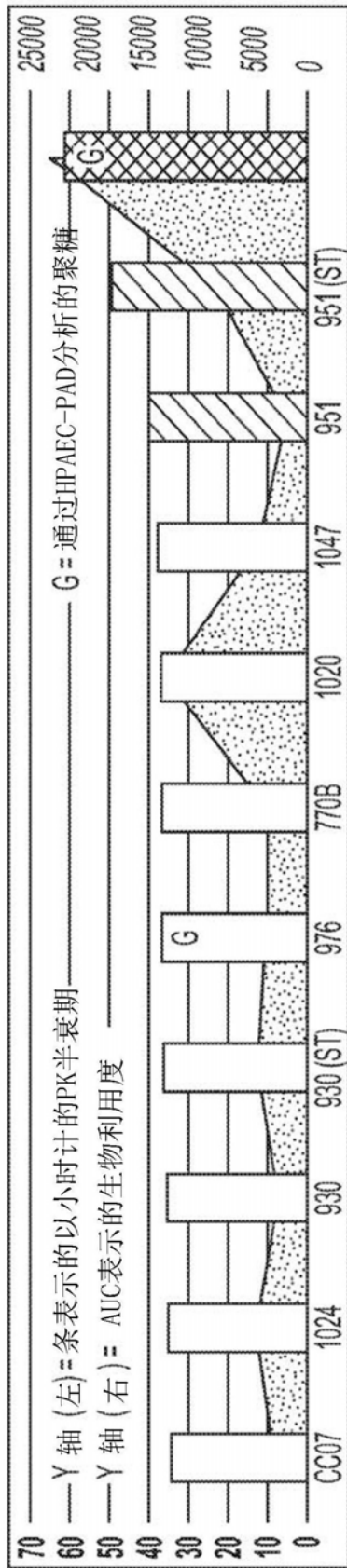


图9B



	AUC	PK	信号序列	催化	核酸内切酶	接头
CC07	3027	34.2				
1024	4537	34.9	C25N K27T		S766N	
930	2545	35.4		K369N / I371T		
930 (ST)	4407	36.3		K369N / I371T		
976	3636	36.4	C25N K27T			
770B	3647	36.4				
1020	12829	37	C25N K27T			E864N L866T
1047	4373	37.6	V29N		E592N	E864N L866T
951	1789	40			E592N	
951 (ST)	8379	49.3			E592N	
922	23393	61.8		I256T		

图10

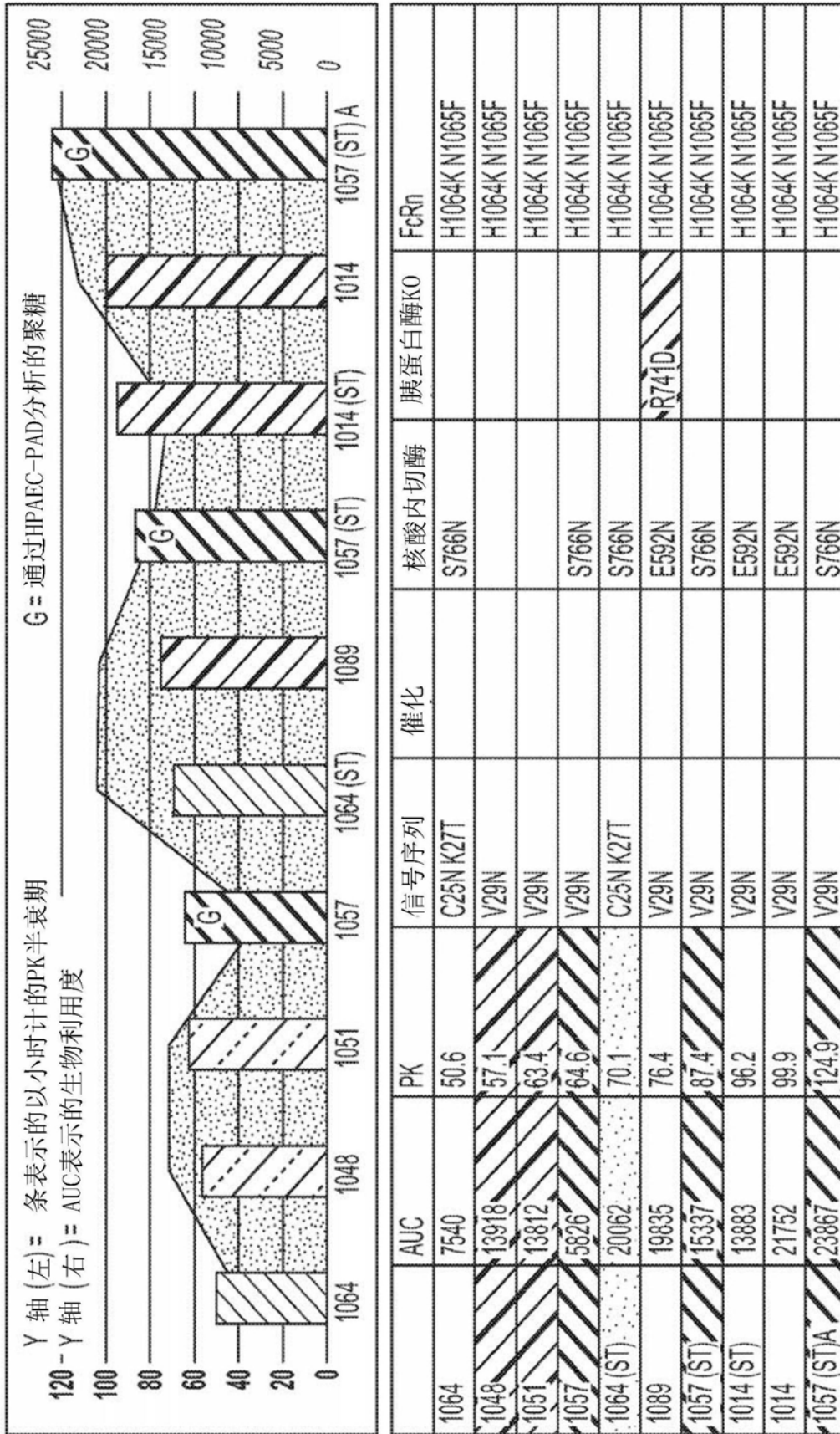
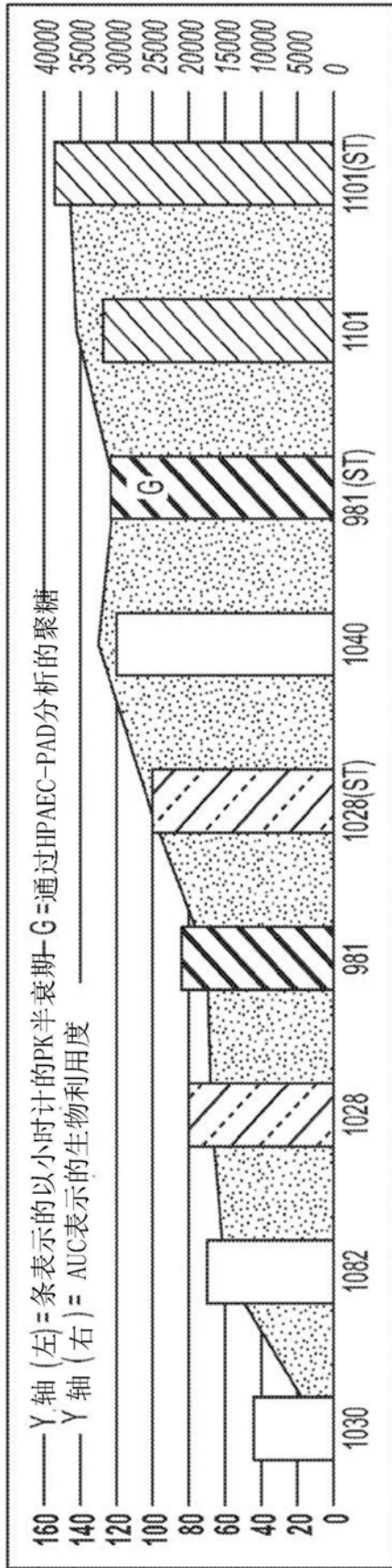


图11



Variant	AUC	PK	信号序列	催化	核酸内切酶	FcRn
1030	1912	45.4			S766N	M883Y S885T T887E
1082	14978	70	V29N		E592N	M883Y S885T T887E
1028	16932	80.1			E592N	M883Y S885T T887E
981	17587	84			E592N	M883Y S885T T887E
1028(ST)	25500	100			E592N	M883Y S885T T887E
1040	32391	119.4	V29N		P534N V536T	M883Y S885T T887E
981(ST)	30021	122.5				M883Y S885T T887E
1101	35021	126.3	V29N	I256T	P534N V536T	M883Y S885T T887E
1101(ST)	37239	152.9	V29N	I256T	P534N V536T	M883Y S885T T887E

图12

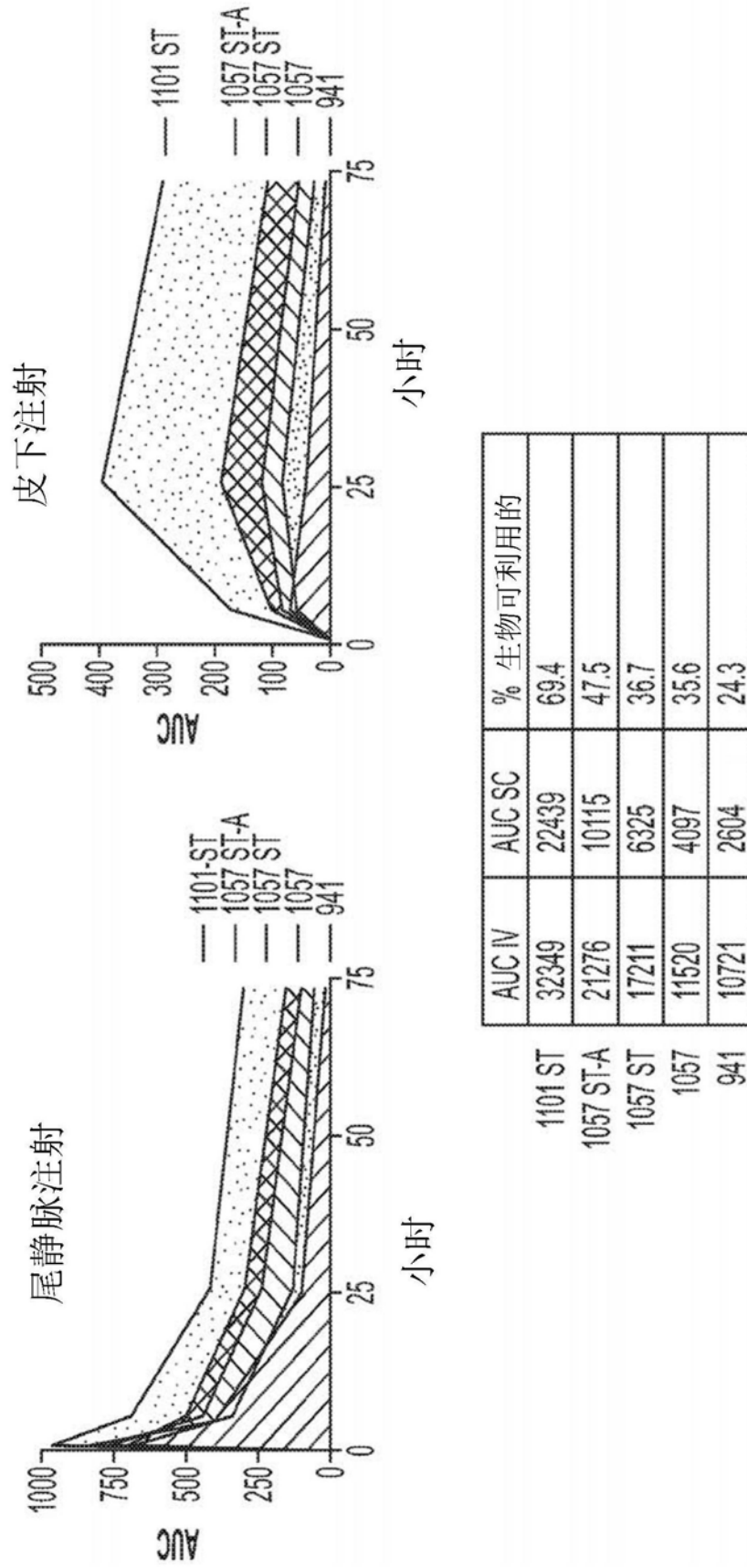


图13

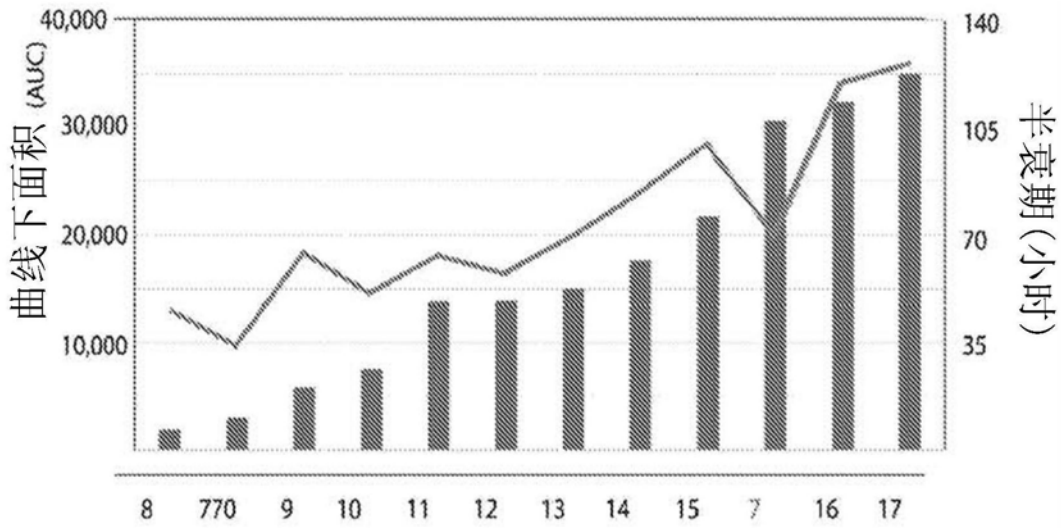


图14A

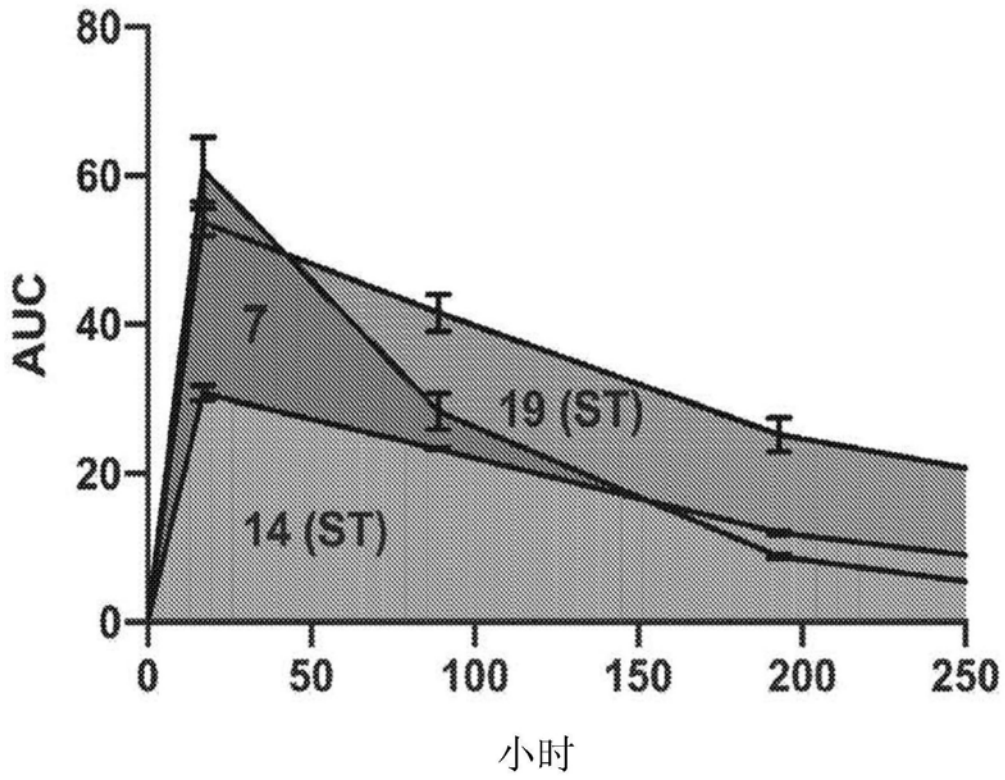


图14B

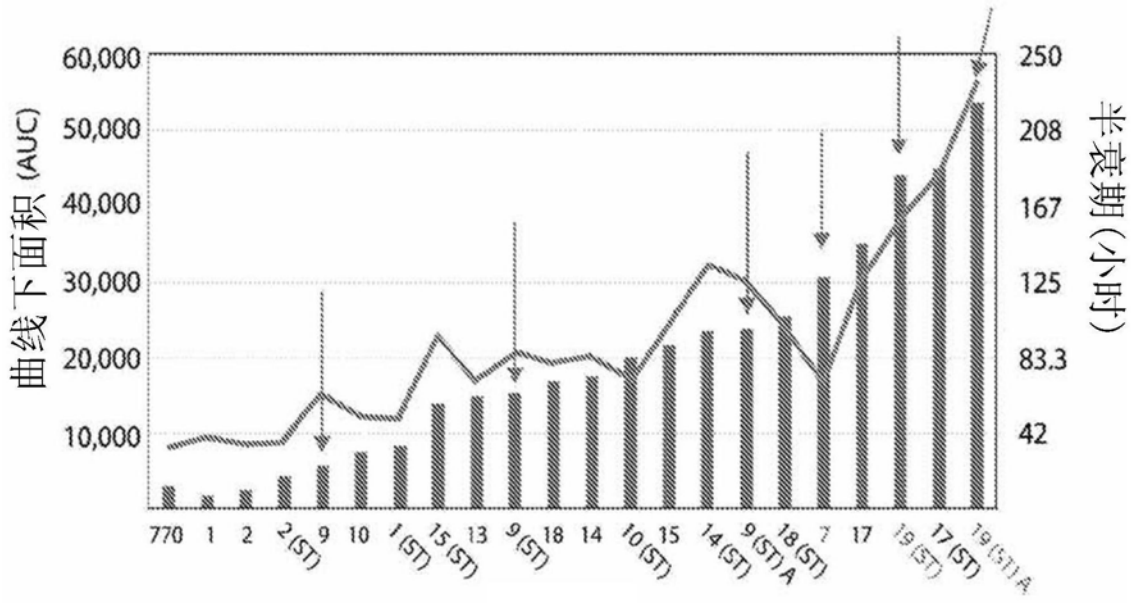


图14C

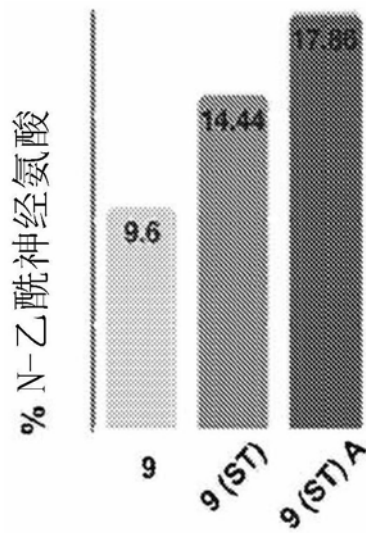


图14D

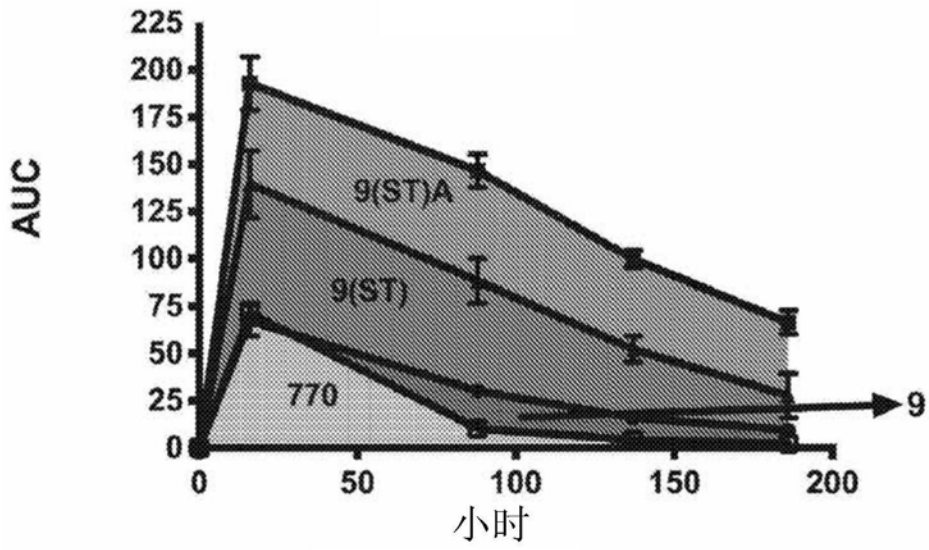


图14E

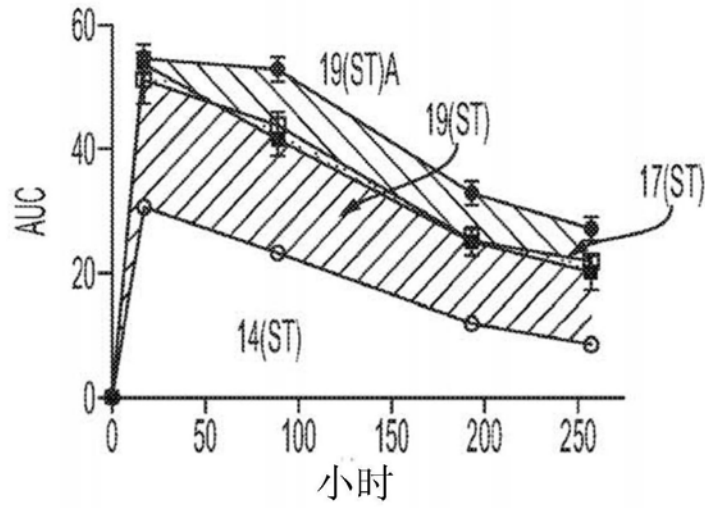


图15A

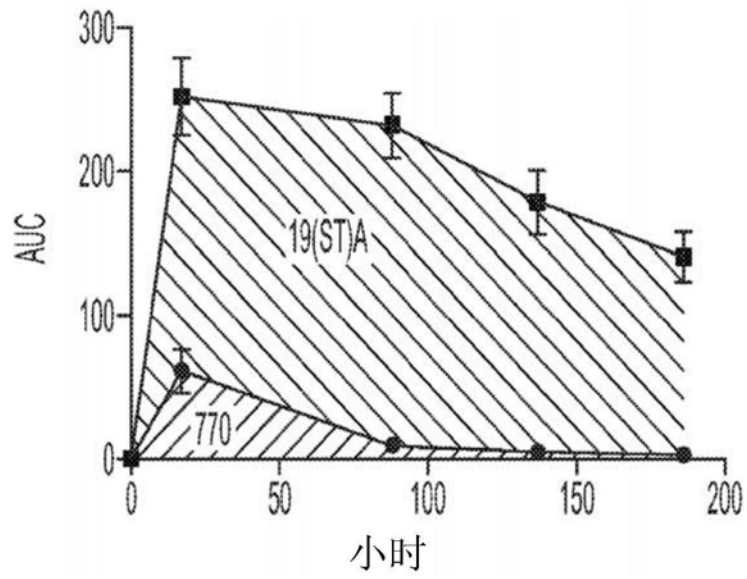


图15B

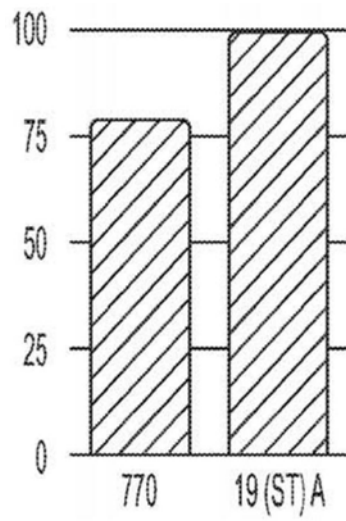


图15C

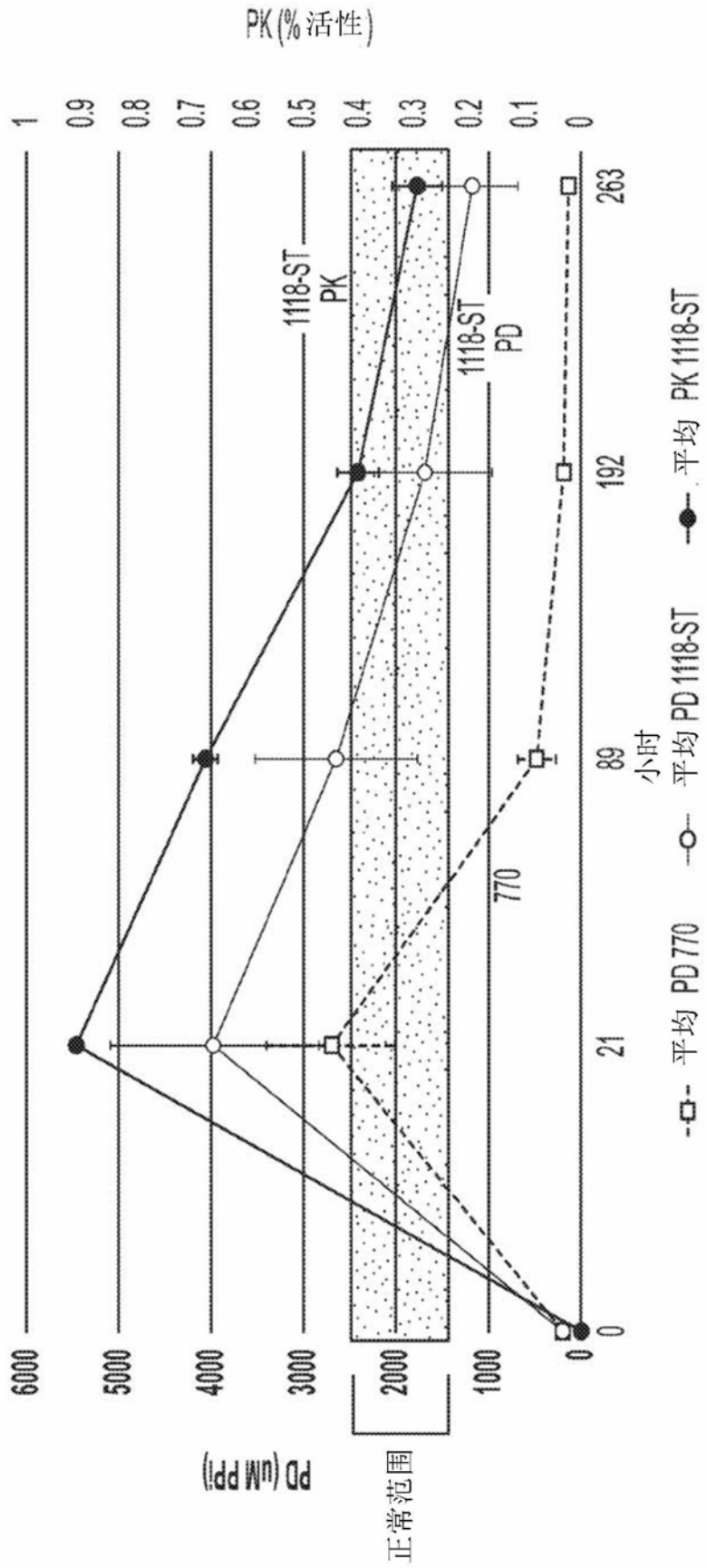
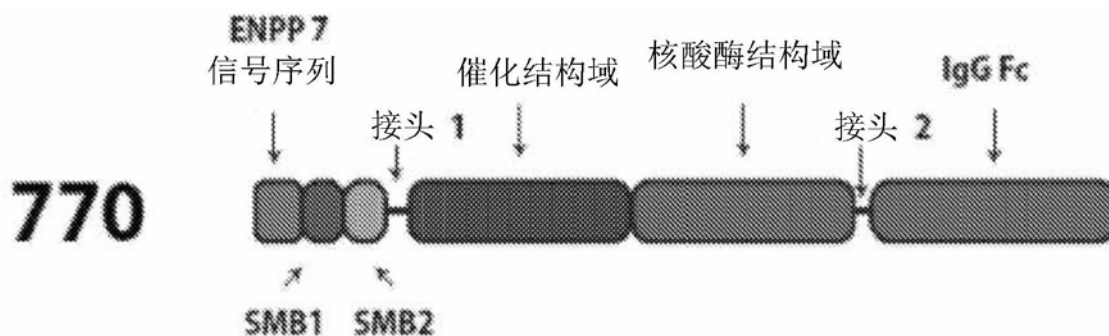
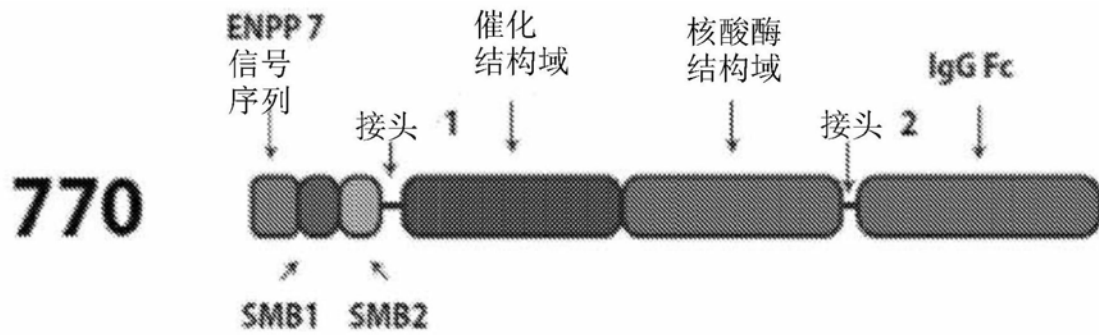


图15D



构建体	突变					唾液酸转移酶	PK	曲线下面积 (AUC)
	信号序列	催化结构域	核酸酶结构域	接头 2	Fc 结构域			
770							34.2	3,027
922							61.8	23393
930		K369N I317T					35.4	2,545
951			E592N				40	1,789
976	C25N K27T						36.4	3,636
981					M883Y S885T T887E		84	17,587
1014	V29N		E592N		H1064K N1065F		99.9	21,752
1020	C25N K27T			E864N L866T			37	12,829
1024	C25N K27T		S766N				34.9	4,537
1028			E592N		M883Y S885T T887E		80.1	16,932
1030			S766N		M883Y S885T T887E		45.4	1,912
1040	V29N		P534N V536T		M883Y S885T T887E		119.4	32,391
1047	V29N			E864N L866T			37.6	4,373
1048	V29N				H1064K N1065F		57.1	13,918
1051	V29N				H1064K N1065F		63.4	13,812

图16A



构建体	突变					唾液酸 转移酶	PK	曲线下 面积 (AUC)
	信号 序列	催化 结构域	核酸酶 结构域	接头 2	Fc 结构域			
1057	V29N		S766N		H1064K N1065F		64.6	5,826
1064	C25N K27T		S766N		H1064K N1065F		50.6	7,540
1082	V29N		E592N		M883Y S885T T887E		70	14,978
1101	V29N	I256T	P534N V536T		H1064K N1065F		126.3	35,021
1014-ST	V29N		E592N		H1064K N1065F	Y	96.2	13,883
1028-ST			E592N		M883Y S885T T887E	Y	100	25,500
1057-ST	V29N		S766N		H1064K N1065F	Y	87.4	15,337
1057-ST-A	V29N		S766N		H1064K N1065F	Y	124.9	23,867
1064-ST	C25N K27T		S766N		H1064K N1065F	Y	70.1	20,062
1089 (蛋白酶 KO)	V29N		E592N R741D		H1064K N1065F		76.4	19,835
1101-ST	V29N	I256T	P534N V536T		M883Y S885T T887E	Y	152.9	35,021
770B							36.4	3,647
930-ST		K369N I317T				Y	36.3	4,407
951-ST			E592N			Y	49.3	8,379
981-ST					M883Y S885T T887E	Y	122.5	30,021

图16B

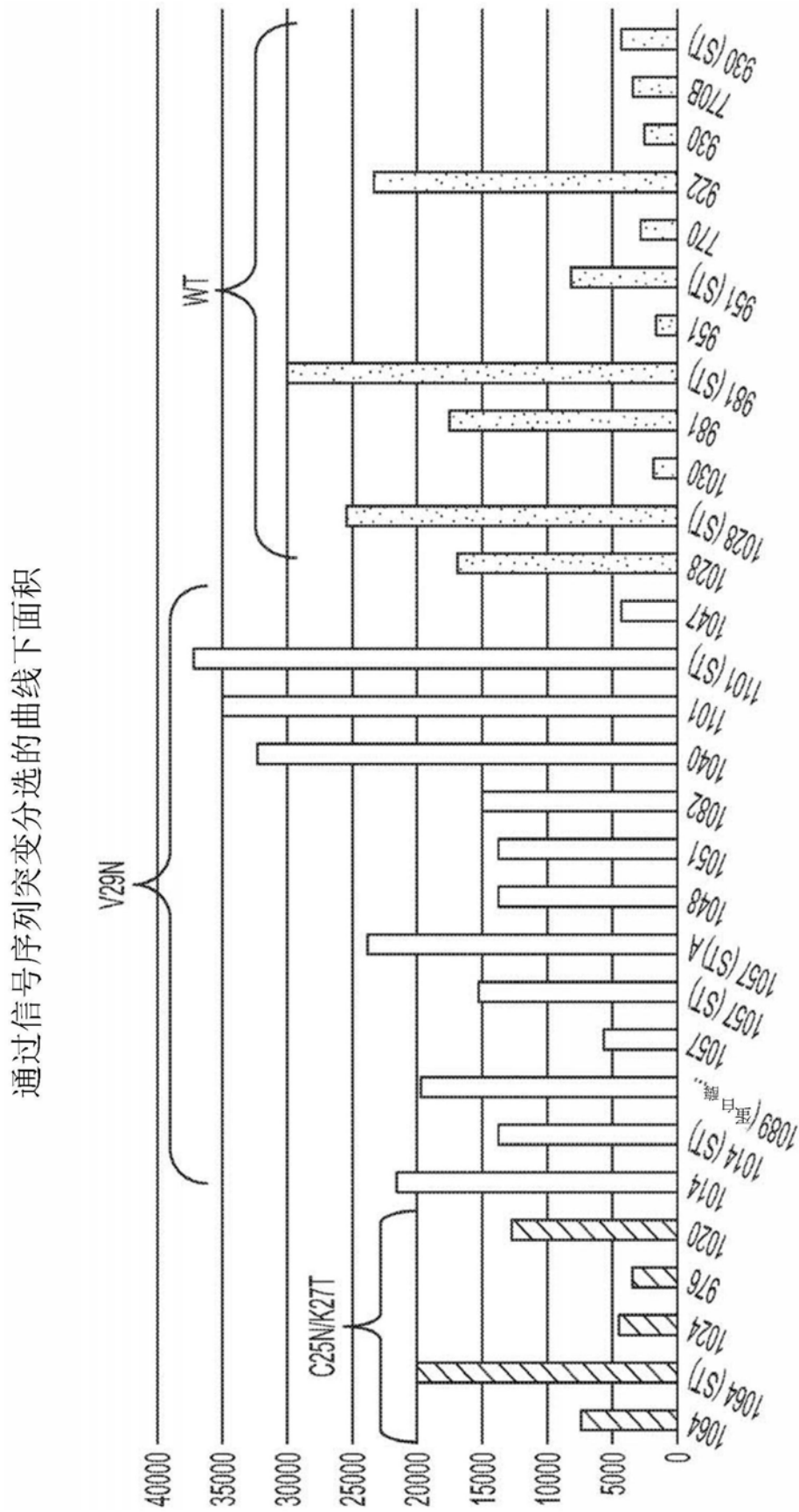


图17

通过核酸酶突变分选的曲线下面积

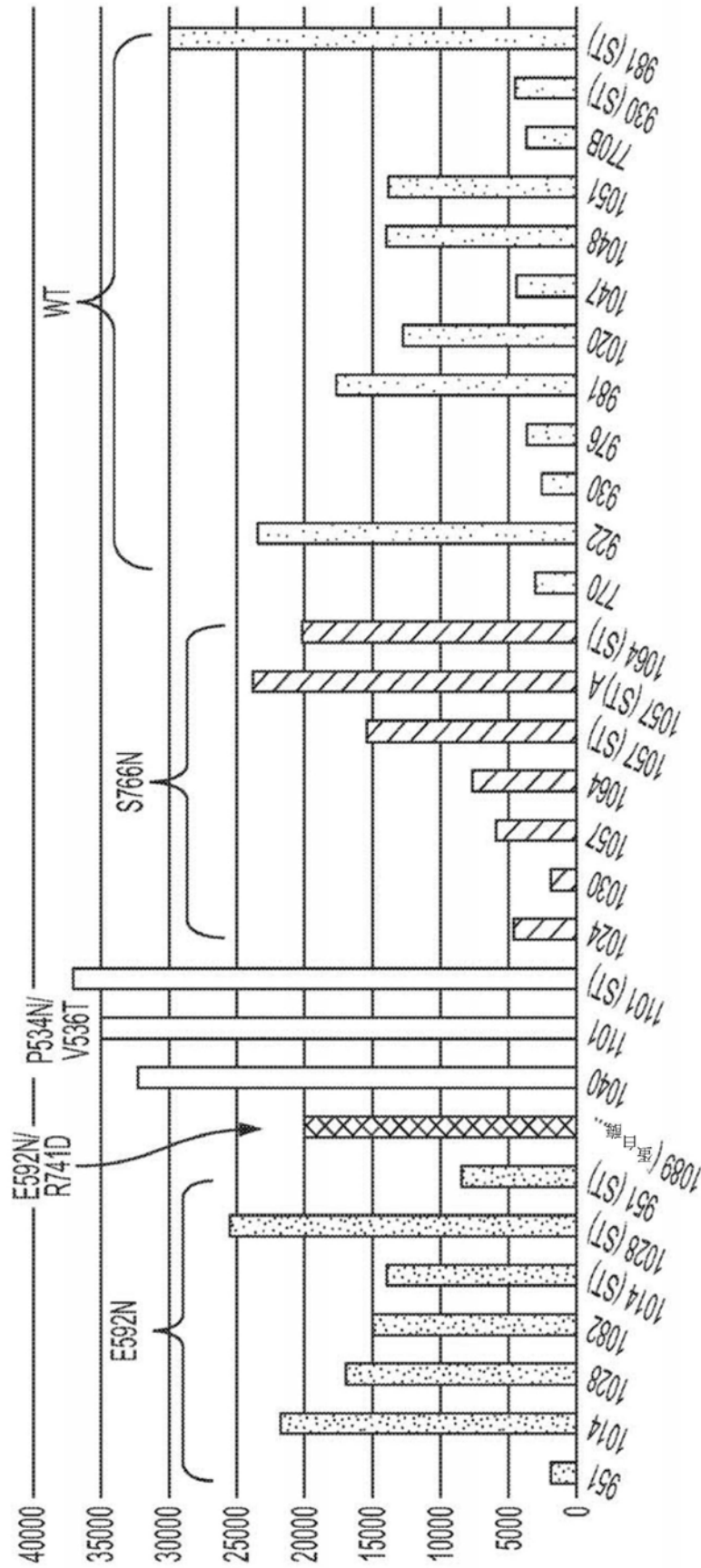


图18

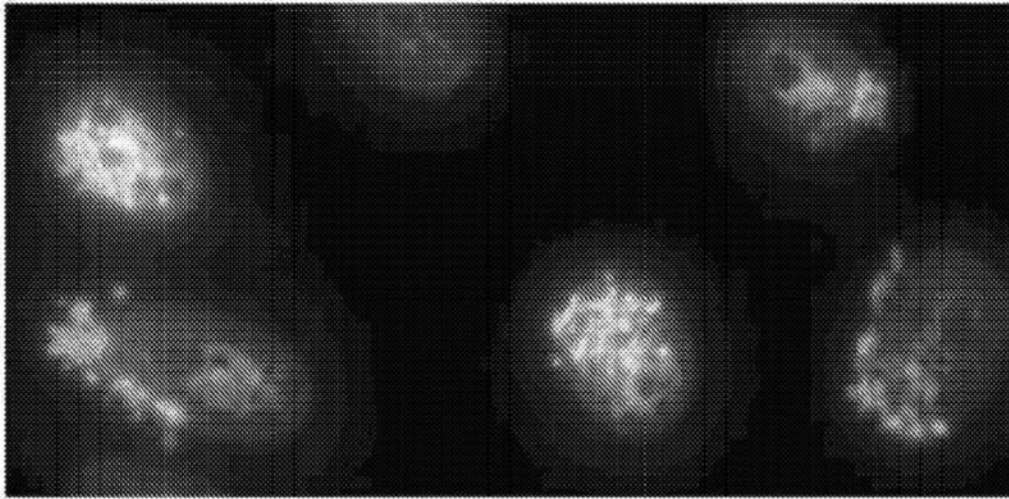


图19A

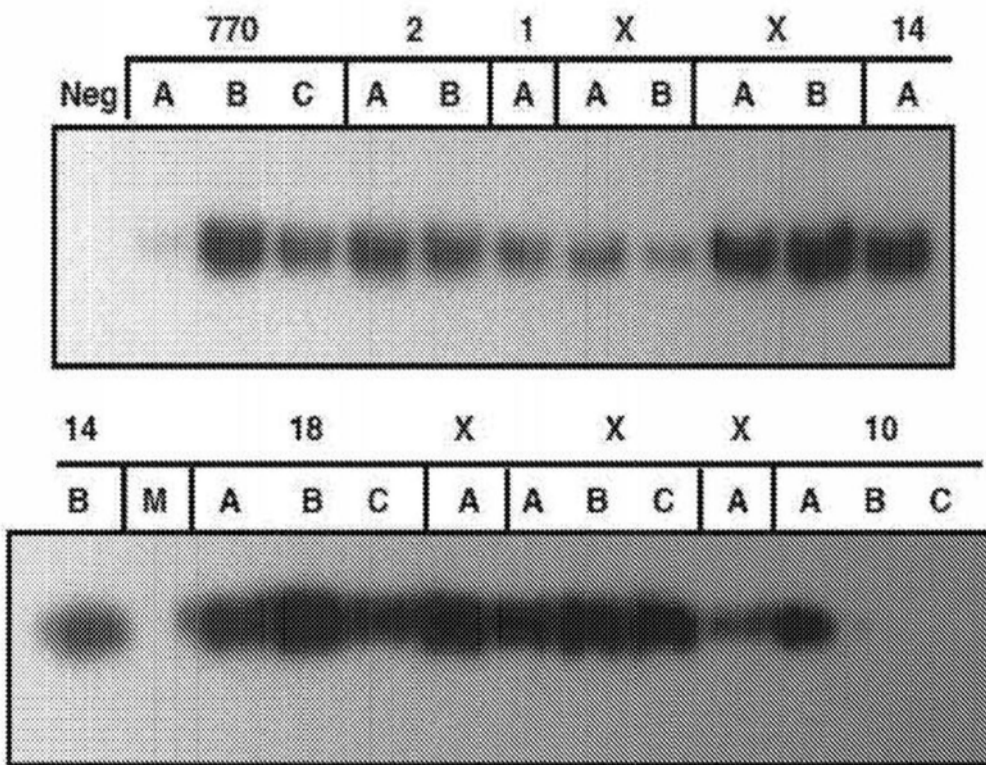


图19B