



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108884135 B

(45) 授权公告日 2024.03.26

(21) 申请号 201680074679.6

(72) 发明人 P·巴特莱特 A·博伊德

(22) 申请日 2016.10.27

M·盖罗梅塔 L·库珀

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

申请公布号 CN 108884135 A

专利代理人 刘晓东

(43) 申请公布日 2018.11.23

(51) Int.CI.

(30) 优先权数据

C07K 14/435 (2006.01)

2015904387 2015.10.27 AU

A61K 38/17 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 25/28 (2006.01)

2018.06.20

A61P 9/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 35/00 (2006.01)

PCT/AU2016/051010 2016.10.27

(56) 对比文件

(87) PCT国际申请的公布数据

EP 2260864 A1, 2010.12.15

W02017/070738 EN 2017.05.04

US 2011111444 A1, 2011.05.12

(73) 专利权人 昆士兰大学

US 2013288278 A1, 2013.10.31

地址 澳大利亚昆士兰州

审查员 安玉萍

专利权人 昆士兰医学研究学院委员会

权利要求书2页 说明书29页

序列表52页 附图17页

(54) 发明名称

治疗方法以及可用于其中的药剂

(57) 摘要

本公开总体涉及由经由促红细胞生成素产生性肝细胞瘤受体激酶EphA4的信号传导加重的疾病和病症的治疗,以及可用于此类治疗的药剂。

1. EphA4-X在制备用于治疗哺乳动物受试者中由Eph介导的信号传导加重的疾病或病症的药剂中的用途,其中所述EphA4是哺乳动物EphA4多肽,其包含经修饰的氨基酸序列,所述氨基酸序列中至少一个N-糖基化位点已经被消除,其中X选自由蛋白质、免疫球蛋白分子的一部分和聚醚组成的组,其中所述EphA4-X与具有SEQ ID NO:1所示参考氨基酸序列的人EphA4-Fc的区别在于:人EphA4-Fc的氨基酸残基216、321和/或389处的天冬酰胺被谷氨酰胺所取代,其中所述氨基酸残基216、321和389的编号是在19个氨基酸的信号序列不存在的情况下计算的。

2. 权利要求1的用途,其中X是免疫球蛋白分子的Fc部分。

3. 权利要求2的用途,其中所述Fc是IgG4 Fc或IgG1 Fc。

4. 经修饰而消除了至少一个N-糖基化位点的EphA4-Fc在制备药剂中的用途,所述药剂用于治疗哺乳动物受试者中由EphA4介导的信号传导加重的疾病或病症,其中所述经修饰而消除了至少一个N-糖基化位点的EphA4-Fc与具有SEQ ID NO:1所示参考氨基酸序列的人EphA4-Fc的区别在于:人EphA4-Fc的氨基酸残基216、321和/或389处的天冬酰胺被谷氨酰胺所取代,其中所述氨基酸残基216、321和389的编号是在19个氨基酸的信号序列不存在的情况下计算的。

5. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述疾病或病症是中枢神经系统的疾病或病症。

6. 权利要求5的用途,其中所述中枢神经系统的疾病或病症是神经退行性病症。

7. 权利要求6的用途,其中所述神经退行性病症是运动神经元疾病。

8. 权利要求5的用途,其中所述疾病或病症是对脑或脊髓的创伤或损伤或者神经元炎症。

9. 权利要求8的用途,其中所述对脑的损伤是中风或外伤性脑损伤或溶栓后的脑损伤。

10. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述疾病或病症是全身脉管系统的疾病或病症。

11. 权利要求10的用途,其中全身脉管系统的疾病或病症是缺血再灌注损伤或器官再灌注。

12. 权利要求11的用途,其中所述缺血再灌注损伤是肠缺血再灌注损伤、肾再灌注或肝再灌注。

13. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述疾病或病症是心肌梗塞、炎性病症或癌症。

14. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述哺乳动物受试者是人。

15. 权利要求4的用途,其中所述经修饰的EphA4-Fc包含选自SEQ ID NO:2至8的氨基酸序列。

16. 权利要求15的用途,其中所述经修饰的EphA4-Fc包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

17. 一种EphA4-X,其中所述EphA4是哺乳动物EphA4多肽,其包含经修饰的氨基酸序列,所述经修饰的氨基酸序列中已经消除了至少一个N-糖基化位点,其中X选自蛋白质、免疫球蛋白的一部分和聚醚,所述EphA4-X与具有SEQ ID NO:1所示参考氨基酸序列的人EphA4-Fc的区别在于:人EphA4-Fc的氨基酸残基216、321和/或389处的天冬酰胺被谷氨酰胺所取代,

其中所述氨基酸残基216、321和389的编号是在19个氨基酸的信号序列不存在的情况下计算的。

18. 一种EphA4-Fc, 其中所述EphA4是哺乳动物EphA4多肽, 其包含消除了至少一个N-糖基化位点的经修饰的氨基酸序列, 所述EphA4-Fc与具有SEQ ID NO:1所示参考氨基酸序列的人EphA4-Fc的区别在于: 人EphA4-Fc的氨基酸残基216、321和/或389处的天冬酰胺被谷氨酰胺所取代, 其中所述氨基酸残基216、321和389的编号是在19个氨基酸的信号序列不存在的情况下计算的。

19. 权利要求18的EphA4-Fc, 其包含选自SEQ ID NO:2至8的氨基酸序列。

20. 权利要求19的EphA4-Fc, 其包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

21. 权利要求18至20中任一项的EphA4-Fc, 其用于治疗哺乳动物受试者中由Eph介导的信号传导加重的疾病或病症。

22. 权利要求21的EphA4-Fc, 其中所述哺乳动物受试者是人。

23. 一种药物组合物, 其包含权利要求18至20中任一项的EphA4-Fc和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。

治疗方法以及可用于其中的药剂

[0001] 申请数据

[0002] 本申请与2015年10月27日提交的标题为“*A method of treatment and agents useful for same*”的澳大利亚临时专利申请第2015904387号相关并要求其优先权,该申请的全部内容通过引用整体并入本文。本说明书涉及序列表。“*ST25.txt*”文件是ANSI格式。该文件在此通过引用从AU 2015904387整体并入本说明书中。

[0003] 背景

[0004] 领域

[0005] 本公开总地来说涉及由经由促红细胞生成素产生性-肝细胞瘤(Eph)受体激酶家族的信号传导加重的疾病和病症的治疗,以及涉及可用于此类治疗的药剂。

[0006] 相关领域的描述

[0007] 在说明书结尾处按字母顺序收集本说明书中由作者引用的出版物的书目细节。

[0008] 在本说明书中对任何在先出版物(或源自其的信息)或对已知的任何事物的引用不是,也不应该被视为承认或认可或以任何形式暗示该在先出版物(或源自其的信息)或已知的事物形成本说明书所涉及的努力的领域中的公知常识的一部分。

[0009] 成年哺乳动物中枢神经系统(CNS)在疾病或创伤后仅具有有限的功能再生能力(Spanevello等(2013) *J.Neurotrauma* 30:1023-1034)。例如,脊髓损伤后成功的临床干预已成为难以实现的目标。

[0010] 已经提出阻断CNS疾病或损伤部位处的抑制性分子作为促进轴突再生和功能恢复的策略(Goldshmit等(2004) *J.Neurosci.* 24:10,064-10,073; Goldshmit等(2011) *PLoS ONE* 6:e24636)。一组抑制性分子是Eph受体:肝配蛋白配体信号传导系统(国际专利公开号W0 2000/024413)的成员。Eph受体活性还涉及CNS外的病症,诸如心肌梗塞、炎症和癌症(由Boyd等(2014) *Nat.Rev.Drug Discovery* 13:39-62; Coulthard等(2012) *Am J Path* 181:1493-1503综述)。

[0011] Eph:肝配蛋白家族分为两个亚组A和B(Qin等(2010) *J.Biol.Chem.* 285:644-654; Bowden等(2009) *Structure* 17:1386-1397)。一种特定的Eph受体,即EphA4,及其配体在脊髓损伤后被上调,并且这对抗轴突再生(Fabes等(2006) *Eur.J.Neurosci.* 23:1721-1730; Arocho等(2011) *Cell.Mol.Neurobiol.* 31:1057-1069)。因此,Eph:肝配蛋白信号传导通路的成员被认为是合适的治疗靶标并不令人惊讶。事实上,包含EphA4的胞外结构域和IgG的Fc区的可溶性融合蛋白(称为“EphA4-Fc”)对EphA4的拮抗作用可导致轴突再生(WO 2000/24413; Goldshmit等(2004)同上; Goldshmit等(2011)同上); Spanevello等(2013) *J.Neurotrauma* 30:1023-1034。

[0012] 尽管认识到Eph:肝配蛋白信号传导系统可作为潜在的治疗策略,但EphA4-Fc的相对快速清除限制了这种形式的疗法的功效。迫切需要开发其施用可维持抑制性血清浓度的药剂。一种选择是调查蛋白质的翻译后修饰诸如糖基化。

[0013] 然而,文献对糖基化在蛋白质功能和药代动力学中所起的作用的记载并不一致。例如,Yamada等(2013) *Virology* 94:270-275发现,N-聚糖添加可以增强病毒产生,而N-聚糖

位点的缺失可以降低有效产生并使病毒组分不稳定。Takahashi等(2008) *Biochimica et Biophysica Acta* 1780:520-524发现除去N-聚糖位点导致蛋白质表达的显著损失, Gerometta和Adams (W02014/124487) 对于大多数N-聚糖位点所观察到的结果也是如此, 尽管当一些N-聚糖残基发生突变时存在适度的PK改善。Ferluga等(2013) *J.Biol.Chem.* 288 (25):18448-18457发现去糖基化对肝配蛋白-A1活性具有负面影响。Elliot等(2003) *Nature Biotechnology* 21(4):414-421显示引入新的N-糖基化位点显著增加了重组人EP0、瘦素和Mp1配体的体内活性并延长了其作用持续时间。类似地, Stork等(2008) *J.Biol.Chem.* 283:7804-7812将N-聚糖位点引入双特异性单链双抗体中, 因此延长了循环半衰期。然而, Jones等(2007) *Glycobiology* 17(5):529-540和Goetze et al. (2011) *Glycobiology*, 21(7):949-959证明了含有N-聚糖的Fc-融合蛋白和抗体的体内清除可能取决于N-聚糖结构。

[0014] 因此, 不清楚并且当然无法预测修饰蛋白质性质的Eph信号传导拮抗剂上的糖基化模式所造成的影响。

[0015] 概述

[0016] 氨基酸序列由序列标识符(SEQ ID NO)表示。SEQ ID NO在数字上对应于序列标识符<400>1 (SEQ ID NO:1), <400>2 (SEQ ID NO:2)等。表1中提供了序列标识符的概述。在权利要求后提供了序列表。

[0017] 本公开实现了治疗疾病或病症的方法, 所述疾病或病症的功能恢复受到Eph:肝配蛋白介导的信号传导的不利影响。本发明的开发部分取决于Eph:肝配蛋白信号传导拮抗剂EphA4-Fc具有特别短的半衰期的确定。本文中实现了EphA4-Fc的修饰形式, 其中N-糖基化位点被全部或部分消除。本文中还实现了对任何Eph分子进行功能上等同的修饰。令人惊讶的是, Eph分子的修饰形式在血清中比未经修饰的Eph分子在血清中更长时间地保持有效拮抗活性。任何Eph分子可受益于包括EphA分子(例如EphA1至A8)和EphB分子(例如EphB1至B6)的修饰突变, 以及与半衰期延长或稳定化分子(诸如但不限于免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如人血清白蛋白[HSA])或聚醚化合物(例如聚乙二醇[PEG]))融合或偶联的这些形式。在一个实施方案中, 所述疾病或病症在中枢神经系统(CNS)或全身脉管系统中。实例包括脑或脊髓损伤、外伤性脑损伤或溶栓后的脑操作、神经退行性疾病(例如运动神经元疾病[MND])、神经元炎症以及心脏或其他器官的缺血再灌注损伤(例如肾再灌注)、心肌梗塞和肝再灌注、炎症和癌症。

[0018] 为了简洁起见, 基于Eph糖基化的拮抗剂被称为“Eph-X”, 意指经修饰以去除至少一个N-糖基化位点, 与分子X融合或偶联的Eph, 其中X为半衰期延长分子, 其选自但不限于免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。在一个实施方案中, Eph-X是EphA4-X, 其中X是免疫球蛋白分子的一部分、蛋白质或聚醚, 其中EphA4经修饰以消除至少一个N-糖基化位点。

[0019] 因此, 本说明书是关于治疗哺乳动物受试者中由Eph介导的信号传导加重的疾病或病症的方法的教导, 所述方法包括施用有效量的融合分子Eph-X, 所述Eph经修饰以消除至少一个N-糖基化位点, 其中Eph-X融合分子中的Eph是与Eph介导的信号传导相关的Eph, 并且X是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(如HSA)或聚醚(例如PEG)。在一个实施方案中, 本说明书是关于治疗哺乳动物受试者中由EphA4介导的信

号传导加重的疾病或病症的方法的教导,所述方法包括施用有效量的EphA4-X,其中Eph经修饰以消除至少一个N-糖基化位点,X为免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。

[0020] 在另一个实施方案中,本说明书教导了用于治疗哺乳动物受试者中由EphA-或EphB-介导的信号传导加重的疾病或病症的方法,所述方法包括施用有效量的EphA-X或EphB-X,所述EphA或EphB经修饰以消除至少一个N-糖基化位点,其中EphA选自EphA1至A8,EphB为EphB1至B6,X为免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。本文提出并且实现了:消除N-糖基化位点可以导致更长的血清半衰期而不显著丧失拮抗功能。在一个实施方案中,X为Fc,诸如但不限于IgG4 Fc或IgG1 Fc。在一个实施方案中,哺乳动物受试者是人受试者。

[0021] 在一个实施方案中,本说明书是关于治疗哺乳动物受试者中由EphA4介导的信号传导加重的疾病或病症的方法的教导,所述方法包括施用有效量的EphA4-Fc,所述Eph经修饰而消除了至少一个N-糖基化位点。哺乳动物受试者包括人受试者。Fc包括IgG4 Fc或IgG1 Fc。

[0022] 在一个实施方案中,消除的N-糖基化位点位于选自具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的人EphA4-Fc的第216位、第321位和第389位的氨基酸残基处,或来自另一物种的EphA4中的等同处或另一种EphA或EphB中的等同处。这些氨基酸位置是基于缺少该19个氨基酸信号肽序列(SEQ ID NO:33)而计算的。具有信号序列的对应的氨基酸位置分别为235、340和408。例如,鼠源性EphA4-Fc(SEQ ID NO:9)在与人形式相同的位置处具有N-糖基化位点。在一个实施方案中,消除了两个或更多个N-糖基化位点。在一个另外的实施方案中,两个或全部三个N-糖基化位点被消除。EphA2、A3、A4和EphB4中潜在的N-糖基化位点示于图11A至D[SEQ ID NO:29至32]中。

[0023] 方便地,通过取代人EphA4-Fc的氨基酸位置216、321和/或389(对应于具有前导序列的位置235、340和408)中的一个或多个位置处或来源于另一物种的EphA4-Fc中的等同位置处或另一种EphA或EphB中的等同位置处的天冬酰胺(Asn;N)残基来消除N-糖基化位点。这被称为Z₁n_bZ₂取代,其中Z₁是天冬酰胺(Asn;N),Z₂是除天冬酰胺外的任何氨基酸残基。在一个实施方案中,Z₂是谷氨酰胺(Gln;Q)。

[0024] 因此,就EphA4而言,本文实现了用于治疗人受试者中由EphA4介导的信号传导加重的疾病或病症的方法,所述方法包括施用有效量的N-糖基化修饰的EphA4-Fc,其具有选自SEQ ID NO:2至8的氨基酸序列或在最佳比对后与SEQ ID NO:2至8中的任一个具有至少80%相似性的氨基酸序列,条件是相同的N糖基化位点仍被消除。

[0025] 另外,本说明书是关于治疗人受试者中CNS或全身脉管系统的疾病或病症或者心脏或其他器官(例如,肾或肝)的缺血-再灌注损伤或者心肌梗塞、炎症(神经元或全身性的)或癌症的方法的教导,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列所定义的但携带单个或多个选自下述的氨基酸取代的人EphA4-Fc分子,所述氨基酸取代由N216Z、N321Z、N389Z、N216Z+N321Z、N216Z+N389Z、N321Z+N389Z和N216Z+N321Z+N389Z组成的组中定义,其中Z是除天冬酰胺外的任意氨基酸。在该19个氨基酸的前导(信号)肽序列不存在的情况下计算这些氨基酸位置。如果包含前导序列(SEQ ID NO:33),则位置分别为:N235Z、N340Z、N408Z、N235Z+N340Z、N235Z+N408Z、N340Z+N408Z和N235Z+N340Z+

N408Z。

[0026] 在一个实施方案中, Z是谷氨酰胺 (Gln;Q)。

[0027] 本说明书还教导了消除了至少一个N-糖基化位点的经修饰的EphA4-Fc分子, 其具有增加的血清半衰期并且保留了EphA4信号传导拮抗作用。经修饰的人EphA4-Fc分子的实例包括SEQ ID NO:2至8或非人类哺乳动物诸如小鼠中的等同物(如SEQ ID NO:10至16所示的)。如上所示, 本发明扩展至任何经修饰的Eph, 诸如但不限于消除了N-糖基化位点的EphA(例如EphA1至A8)和EphB(例如EphB1至B6)。本文还涵盖药物组合物和治疗性试剂盒。

[0028] 表1

[0029] 序列标识符概述

SEQUENCE ID NO:	描述
1	未经修饰的人 EphA4-Fc 的氨基酸序列
2	经修饰的人 EphA4-Fc 的氨基酸序列, 其在氨基酸 216 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
3	经修饰的人 EphA4-Fc 的氨基酸序列, 其在氨基酸 321 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
4	在氨基酸 389 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺取代的经修饰的人 EphA4-Fc 的氨基酸序列
5	经修饰的人 EphA4-Fc 的氨基酸序列, 其在氨基酸 216 和 321 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
6	经修饰的人 EphA4-Fc 的氨基酸序列, 其在氨基酸 216 和 389 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
7	经修饰的人 EphA4-Fc 的氨基酸序列, 其在氨基酸 321 和 389 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代

SEQUENCE ID NO:	描述
8	经修饰的人 EphA4-Fc 的氨基酸序列，其在氨基酸 216、321 和 389 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
9	未经修饰的鼠 EphA4-Fc 的氨基酸序列
10	经修饰的鼠 EphA4-Fc 的氨基酸序列，其在氨基酸 216 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
11	经修饰的鼠 EphA4-Fc 的氨基酸序列，其在氨基酸 321 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
12	经修饰的鼠 EphA4-Fc 的氨基酸序列，其在氨基酸 389 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
13	经修饰的鼠 EphA4-Fc 的氨基酸序列，其在氨基酸 216 和 321 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
14	经修饰的鼠 EphA4-Fc 的氨基酸序列，其在氨基酸 216 和 389 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
15	经修饰的鼠 EphA4-Fc 的氨基酸序列，其在氨基酸 321 和 389 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
16	经修饰的鼠 EphA4-Fc 的氨基酸序列，其在氨基酸 216、321 和 389 处包含天冬酰胺至谷氨酰胺的取代
17	用于在氨基酸位置 216 处诱变人 EphA4-Fc 的有义引物的核苷酸序列
18	用于在引物位置 216 处诱变人 EphA4-Fc 的反义引物的核苷酸序列
19	用于在氨基酸位置 321 处诱变人 EphA4-Fc 的有义引物的核苷酸序列
20	用于在引物位置 321 处诱变人 EphA4-Fc 的反义引物的核苷酸序列
21	用于在氨基酸位置 389 处诱变人 EphA4-Fc 的有义引物的核苷酸序列

[0031]

SEQUENCE ID NO:	描述
22	用于在引物位置 389 处诱变人 EphA4-Fc 的反义引物的核苷酸序列
23	用于在氨基酸位置 216 处诱变鼠 EphA4-Fc 的有义引物的核苷酸序列
24	用于在氨基酸位置 216 处诱变鼠 EphA4-Fc 的反义引物的核苷酸序列
25	用于在氨基酸位置 321 处诱变鼠 EphA4-Fc 的有义引物的核苷酸序列
26	用于在氨基酸位置 321 处诱变鼠 EphA4-Fc 的反义引物的核苷酸序列
27	用于在氨基酸位置 389 处诱变鼠 EphA4-Fc 的有义引物的核苷酸序列
28	用于在氨基酸位置 389 处诱变鼠 EphA4-Fc 的反义引物的核苷酸序列
29	具有在氨基酸 407 和 435 处显示的预测 N-糖基化位点的细胞外 EphA2 的氨基酸序列 ¹
30	具有在氨基酸 232、337、391、404 和 493 处显示的预测 N-糖基化位点的细胞外 EphA4 的氨基酸序列 ¹
31	具有在氨基酸 235、340 和 408 处显示的预测 N-糖基化位点的细胞外 EphA3 的氨基酸序列 ¹
32	具有在氨基酸 203、335 和 426 处显示的预测 N-糖基化位点的细胞外 EphB4 的氨基酸序列 ¹
33	在表达期间被切割的 EphA4 N 末端前导序列(信号肽序列)的氨基酸序列
34	EphA4-Fc 的 III 型纤连蛋白(FN1)区域的胰蛋白酶切肽片段的氨基酸序列

[0032]

SEQUENCE ID NO:	描述
[0033]	35 EphA4-Fc 的富含半胱氨酸结构域(CRD)区域的胰蛋白酶切肽片段的氨基酸序列
	36 EphA4-Fc 的 Fc 部分的 CH2 铰链区的胰蛋白酶切肽片段的氨基酸序列
	37 EphA4-Fc 的 III 型纤连蛋白(FN1)区域的胰蛋白酶切肽片段的氨基酸序列

[0034] ¹这些氨基酸序列和位置含有N-末端前导(信号)序列。

[0035] 附图简述

[0036] 一些图包含彩色表示或实体。彩色照片可在请求后从专利权人或从适当的专利局获得。如果从专利局获得,则可能征收费用。

[0037] 图1是在小鼠中注射后人EphA4-Fc浓度的动力学的图示。在静脉内(IV)或腹膜内(IP)注射单次20mg/kg体重大后测量血清人EphA4-Fc浓度。

[0038] 图2A是野生型人EphA4-Fc的氨基酸序列的图示,其显示随后突变为谷氨酰胺(Q)的天冬酰胺(N)残基的N-连接糖基化位点。该氨基酸序列不含在表达过程中被切除的19个氨基酸的前导序列。

[0039] 图2B是与野生型人EphA4-Fc相比较的经修饰的人EphA4-Fc的SDS PAGE的照片图。1. N216Q取代;2. 双重N216Q+N321Q取代;3. 三重N216Q+N321Q+N389Q取代;4. 野生型人EphA4-Fc。在19个氨基酸的信号序列(SEQ ID NO:33)不存在的情况下计算氨基酸位置编号。

[0040] 图2C是与野生型鼠EphA4-Fc相比的经修饰的鼠EphA4-Fc的SDS PAGE的照片图。1. 野生型鼠EphA4-Fc;2. 单个N321Q取代;3. 三重N216Q+N321Q+N389Q取代。在19个氨基酸的信号序列(SEQ ID NO:33)不存在的情况下计算氨基酸位置编号。

[0041] 图3显示了EphA4突变体与肝配蛋白A4的结合。偶联有链霉抗生物素蛋白的Octet探针用缀合有生物素的肝配蛋白A4-Fc蛋白修饰。单独的探针用于结合WT EphA4-Fc(B1)、双突变型(D1)或三突变型(F1)蛋白。达到饱和时,探针被交换到结合缓冲液中以允许解离。

[0042] 图4是用于检测EphA4(分析物)的夹心ELISA的示意图。

[0043] 图5是使用图4中概述的测定配置的野生型和突变型人EphA4-Fc的ELISA标准曲线的图示。● = 野生型, ■ = 突变型(三重)。

[0044] 图6是野生型和突变型人EphA4-Fc在大鼠血清中的药代动力学分析的图示。

[0045] ■ Wt Rat 1

[0046] ■ Wt Rat 2

[0047] ■ Wt Rat 3

[0048] ■ Mut Rat 1

[0049] ■ Mut Rat 2

[0050] ■ Mut Rat 3

[0051] 图7是显示两种不同浓度下EphA4-Fc与表达肝配蛋白A4(左图)、肝配蛋白A1(中图)和肝配蛋白B3(右图)的CHO细胞的结合的图示。

[0052] 图8是肝配蛋白Fc蛋白与表达鼠EphA4的CHO细胞结合的图示。

[0053]  ephrin A1

[0054]  ephrin A4

[0055]  ephrin B3

[0056] 图9是EphA4蛋白与固定化的肝配蛋白结合的ELISA检测的图解表示。

[0057] 图10A至C是人EphA4野生型对比突变体针对肝配蛋白-Fc的结合曲线的图示。A.肝配蛋白A4:WT对比突变体；B.肝配蛋白A5:WT对比突变体；C.肝配蛋白B3:WT对比突变体。“WT”意指没有N-糖基化位点变化的“野生型”。突变体是指三重N-聚糖突变体。●WT■突变体

[0058] 图11A至D显示来自(A) EphA2、(B) EphA3、(C) EphA4和(D) EphB4的细胞外Eph氨基酸序列,其中对预测的N-糖基化位点突出显示了这些位点的位置(也参见表1和SEQ ID NO:29至32)。19聚体前导序列在表达过程中被切掉。

[0059] 图12是EpHA4-Fc蛋白的示意图。EphA4区域(浅灰色)和Fc区域(深灰色)被标识出来(不按比例)。EphA4信号肽(S)位于蛋白质的N端,接着是配体结合域(LBD)、富含半胱氨酸域(CRD)和两个III型纤连蛋白重复序列(FN1)和(FN2) [Xu等(2013) Proc Natl. Acad. Sci. USA 100:14634-14639]。蛋白质的IgG4Fc部分包括铰链(H)区以及CH2和CH3恒定免疫球蛋白结构域。展示了含有四个N连接位点N216、N321、N389和N606(分别对应于具有信号序列[SEQ ID NO:33]的N235、N340、N408和N625)的观察到的胰蛋白酶解肽,其N-连接共有位点加以下划线表示。胰蛋白酶肽的氨基和羧基末端残基已用来自EphA4-Fc序列的相应氨基酸编号注释。通过胰蛋白酶的任何另外的观察到的蛋白水解切割或胰蛋白酶肽序列内的Glu-C也已用相应的氨基酸编号注释。

[0060] 图13是EphA4-Fc的每个N-连接位点处的聚糖组成的示意图。从EphA4-Fc在N-连接位点N216、N321、N389和N606(分别对应于具有信号序列[SEQ ID NO:33]的N235、N340、N408和N625)处观察到的聚糖组成的定性分布。

[0061]  少和高甘露糖

[0062]  无岩藻糖或唾液酸

[0063]  有岩藻糖无唾液酸

[0064]  岩藻糖和唾液酸

[0065]  有唾液酸无岩藻糖

[0066] 图14是以下方面的示意图:A)还原的、蛋白A纯化的单一、双重和三重去糖基化的和野生型的人EphA4-Fc蛋白的SDS-PAGE分析。B) SEC和C) SV-AUC沉降曲线揭示了三重突变体型(红色)和野生型(蓝色)人EphA4-Fc蛋白的单个主峰,表明不存在大小显著不同的蛋白质种类。分子量标准(黑色)的色谱图已包含在SEC曲线图中,在相应峰的上方标注了标准的质量(甲状腺球蛋白-670kDa;牛 γ -球蛋白-158kDa;卵白蛋白-44kDa;马肌红蛋白-17kDa和维生素B₁₂-1.35kDa)。

[0067] 图15A至C是诱变的去糖基化和野生型人EphA4-Fc蛋白的配体结合的图示。A) EphA4-Fc去糖基化和野生型蛋白与固定的肝配蛋白A5(i)和肝配蛋白A4(ii)的肝配蛋白-

结合ELISA;B) EphA4-Fc去糖基化和野生型蛋白与缀合有生物素的EphrinA4-Fc蛋白质标记的链霉抗生物素蛋白偶联octet探针的结合的octet生物传感器分析;C) EphA4-Fc去糖基化和野生型蛋白与表达EphrinA5的CHO细胞系的结合的流式细胞术分析。

[0068] 图16A是显示第18周EphA4-Fc对比对照的后肢握力强度的图示;图16B是显示第20周EphA4-Fc对比对照的转杆落下延迟时间(RotaRod latency to fall time)的图示。

[0069] 图17是显示SOD1^{G93A}小鼠中杂合条件性敲除EphA4在转杆测试中表现出显著改善的行为表现的图示(*p<0.05,**p<0.01;缩写:EphA4^{F/W};SOD1^{G93A},EphA4^{flox/WT} x ChAT-Cre^{KI/KI} x SOD1^{G93A};EphA4^{WT/WT};SOD1^{G93A},EphA4^{flox/flox} x ChAT-Cre^{WT/WT} x SOD1^{G93A})。

[0070] 图18是显示SOD1^{G93A}小鼠中杂合条件性敲除EphA4表现出在17周时保存腰运动神经元的图示。(缩写:EphA4^{F/W};SOD1^{G93A},EphA4^{flox/WT} x ChAT-Cre^{KI/KI} x SOD1^{G93A};EphA4^{WT/WT};SOD1^{G93A},EphA4^{flox/flox} x ChAT-Cre^{WT/WT} x SOD1^{G93A})。

[0071] 图19是野生型EphA2对比EphA2在聚糖位点的突变体形式作为清除速率的函数的图示。结果显示药代动力学(PK)行为没有改善。

[0072] 详述

[0073] 在整个本说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包括”或诸如“包含”或“含有”的变化将被理解为意指包含所述要素或整数或方法步骤,或者要素或整数或方法步骤的组,但不排除任何要素或整数或方法步骤,或者要素或整数或方法步骤的组。

[0074] 如本说明书中所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一个/种(a)”,“一个/种(an)”和“该(the)”包括复数方面。因此,例如,提及“突变”包括单一突变以及两个或更多个突变;提及“拮抗剂”包括单一拮抗剂以及两种或更多种拮抗剂;提及“本公开”包括本公开教导的单个和多个方面;等等。术语“发明”涵盖本文教导和实现了的各个方面。在本发明的宽度内实现了所有这些方面。本文中设想的任何变体和衍生物均被本发明的“形式”所涵盖。

[0075] 本公开教导通过至少一个消除N-糖基化位点的氨基酸取代而修饰的Eph与组分或分子X之间的融合或偶联分子(基于糖基化的Eph拮抗剂),其中X是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。融合或偶联分子称为“Eph-X”,其中Eph包括EphA或EphB,X是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。提及“EphA”包括EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7和EphA8。提及“EphB”包括EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5和EphB6。提及“经修饰的”形式包括在氨基酸残基处消除至少一个N-糖基化位点的对Eph的“修饰”、“突变体”和“突变”。本公开教导了氨基酸残基的单个或多个突变,其中所述突变是取代。为方便起见,本文将氨基酸取代形式的突变或修饰定义为Z₁n_bZ₂,其中Z₁是取代前的氨基酸,Z₂是取代后的氨基酸,n_b是氨基酸残基编号。本发明扩展至包含消除至少一个N-糖基化位点的经修饰的氨基酸序列的Eph。Eph包括EphA(例如EphA1至A8)和EphB(例如EphB1至B6)。因此,基于Eph糖基化的拮抗剂(Eph-X)意指与X融合或偶联的经修饰以消除至少一个N-糖基化位点的Eph,其中X是延长半衰期的分子,诸如Fc部分。当Eph是EphA4,则该分子是EphA4-X,其中X是免疫球蛋白分子的一部分(例如Fc)、蛋白质或聚醚。

[0076] 在一个实施方案中,Eph是与IgG Fc(例如IgG4 Fc或IgG1 Fc)融合的经修饰以消除至少一个N-糖基化位点的EphA4。

[0077] 人EphA4与人IgG Fc部分的该融合分子被称为“EphA4-Fc”。为了方便起见,非突变的EphA4-Fc在本文中被称为野生型(WT)EphA4-Fc,即使其是人工产生的分子。同样,非突变的Eph-X被称为WT Eph-X,其中X是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HA)或聚醚(例如PEG)。

[0078] 为避免疑义,本发明扩展至融合或偶联的Eph-X分子,其中Eph是EphA或EphB,X是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。一个例子是EphA4-X。X组分是半衰期或稳定性赋予分子。

[0079] 在一个实施方案中,Eph-X是EphA4-X诸如EphA4-Fc。EphA4-Fc可以以多种方式表示,诸如重组(r)人(Hu)EphA4-Fc。WT人EphA4-Fc的氨基酸序列示于SEQ ID N0:1中。在SEQ ID N0:1中设想了除去N-糖基化位点的取代突变。实例包括在选自氨基酸残基编号216、321和389的位点处的天冬酰胺(Asn;N)的取代,分别表示为N216Z、N321Z和N389Z,其中Z是除天冬酰胺(Asn;N)外的任意氨基酸,并且其中所述突变除去该残基处的N-糖基化位点。这些氨基酸位置基于其中19个氨基酸的前导(信号)序列已被切掉的序列。信号序列是SEQ ID N0:33。如果包括信号序列,则位置分别为235、340和408。对应于位点216、321或389的SEQ ID N0:1(WT EphA4-Fc)中的单突变包括取代为谷氨酰胺(Gln;Q),即分别N216Q、N321Q和N389Q。这些分别对应于SEQ ID N0:2、SEQ ID N0:3和SEQ ID N0:4。同样地,这也是基于19个氨基酸的N末端信号序列的不存在。为了避免疑义,没有前导序列的EphA4-Fc的氨基酸序列始于氨基酸序列VTGSRVYPANE。

[0080] 还可引入多个突变,诸如N216Z+N321Z、N216Z+N389Z和N321Z+N389Z的双重取代,其中Z是除天冬酰胺(Asn;N)外的任意氨基酸,并且双重取代除去了2个N-糖基化位点。实例包括N216Q+N321Q, N216Q+N389Q和N321Q+N389Q(分别为SEQ ID N0:5、SEQ ID N0:6和SEQ ID N0:7)。N216Z+N321Z+N389Z的三重突变,其中Z是除天冬酰胺(Asn;N)外的任意氨基酸,并且三重取代除去了3个N-糖基化位点。一个例子包括N216Q+N321Q+N389Q(SEQ ID N0:8)。

[0081] 类似的命名法被用于非人源的EphA4-Fc分子,诸如野生型鼠EphA4-Fc(SEQ ID N0:9)。这可在氨基酸位置216、321和/或389处包含相同取代突变,如由N216Z、N321Z、N389Z、N216Z+N321Z、N216Z+N389Z、N321Z+N389Z和N216Z+N321Z+N389Z表示的,其中Z是除天冬酰胺(Asn;N)外的任意氨基酸,并且突变去除了1、2或3个N-糖基化位点。实例包括N216Q、N321Q、N389Q、N216Q+N321Q、N216Q+N389Q、N321Q+N389Q和N216Q+N321Q+N389Q(分别为SEQ ID N0:10至16)。

[0082] 因此,本文提出从野生型EphA4-Fc除去至少1个N-糖基化位点(诸如1、2或3个N-糖基化位点)可增加其血清半衰期而不降低其拮抗EphA4介导的信号传导的能力,从而使得分子在治疗原本被EphA4介导的信号传导加重的中枢神经系统(CNS)或全身脉管系统的疾病或病症方面令人惊讶地更有效。类似的评论适用于具有消除至少一个N-糖基化位点的氨基酸突变的其他Eph分子。例如,EphA2在氨基酸位置407和435处包含预测的N-糖基化位点;EphA3在氨基酸位置232、337、391、404和493处包含预测的N-糖基化位点;EphB4包含氨基酸203、335和426处的位点。

[0083] CNS的疾病或病症包括脑的损伤或疾病(例如中风、神经退行性疾病(例如运动神经元疾病[MND])、外伤性脑损伤或溶栓后的脑损伤)或导致神经胶质增生的脊髓和/或胶质瘢痕形成和/或神经元炎症。通过拮抗Eph介导的信号传导,推测存在神经胶质增生、神经胶

质瘢痕形成和/或炎症的减少,并且这导致或促进轴突再生。术语“神经胶质增生”包括导致胶质化反应(gliotic response) (包括轴突生长的抑制) 的任何病症。

[0084] 全身脉管系统的疾病或病症包括心血管病症和缺血再灌注损伤。后者可发生在心脏或其他地方,诸如肠缺血再灌注损伤或器官诸如肾再灌注或肝再灌注。可能有其他下游病症也可通过经修饰的Eph-X (例如EphA4-X) 改善,诸如糖尿病。其他病症包括心肌梗塞、非CNS相关炎症、再灌注损伤、器官损伤诸如肾或肝再灌注和癌症。

[0085] 因此,本说明书教导了用于治疗哺乳动物受试者中由Eph介导的信号传导加重的疾病或病症的方法,所述方法包括施用有效量的Eph-X,所述Eph经修饰以消除至少一个N-糖基化位点,其中所述Eph选自EphA1至A8和EphB1至B6,并且X为免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。本文中提出通过消除N-糖基化位点可导致更长的血清半衰期而不显著丧失拮抗功能,并且使得其能够实施。将Eph与X偶联或融合。

[0086] 在一个实施方案中,Eph-X是EphA4-X诸如EphA4-Fc。因此,本发明设想了治疗哺乳动物受试者中由EphA4介导的信号传导加重的疾病或病症的方法,所述方法包括施用有效量的经修饰以消除至少N-糖基化位点的EphA4-Fc。疾病和病症,包括并涵盖CNS或全身脉管系统的疾病或病症以及相应的疾病或病症以及心肌梗塞、非CNS相关炎症、再灌注损伤、器官损伤和癌症。在一个实施方案中,哺乳动物受试者是人受试者。

[0087] 在一个实施方案中,本说明书教导了用于治疗哺乳动物受试者中由EphA4介导的信号传导加重的疾病或病症的方法,所述方法包括施用有效量的EphA4-X,所述Eph经修饰以至少消除一个N-糖基化位点,其中X是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。本文提出消除N-糖基化位点可导致更长的血清半衰期而不显著丧失拮抗功能,并且使得其能够实施。提及“更长的血清半衰期”包括促进增加或增强的稳定性。

[0088] 在一个实施方案中,由Eph介导的信号传导加重的疾病或病症是CNS的疾病或病症。

[0089] 因此,本文实现了治疗哺乳动物受试者中的CNS疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的Eph-X分子,所述Eph经修饰以消除至少一个N-糖基化位点,其中Eph选自EphA1至A8和EphB1至B6,X为免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。在一个实例中,Eph-X为EphA4-X,诸如EphA4-Fc。

[0090] 在另一个实施方案中,所述疾病或病症是全身脉管系统的疾病或病症。

[0091] 因此,本文教导了治疗哺乳动物受试者中全身脉管系统的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的Eph-X分子,所述Eph经修饰以消除至少一个N-糖基化位点,其中X是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。

[0092] 在一个实施方案中,取决于所治疗的受试者而选择经修饰的EphA4。例如,可将人源EphA4-Fc突变体用于治疗人受试者。

[0093] 本文中实现了治疗人受试者中通过Eph介导的信号传导加重的CNS疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的人Eph-X分子,所述Eph经修饰以消除至少一个

N-糖基化位点,其中Eph选自EphA1至A8和EhB1至B6,并且X是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。

[0094] 本文中还教导了治疗人受试者中全身脉管系统的疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的经修饰以消除至少一个N糖基化位点的人EphA4-Fc分子。

[0095] 合适的经修饰的人EphA4-Fc分子包括消除了一个、两个或三个N-糖基化位点的那些EphA4-Fc分子。这通过在SEQ ID N0:1的残基编号216、321和/或389(或如果包括19个氨基酸残基的前导序列(SEQ ID N0:33),则为235、340和/或408)中的任何一个或多个编号处以及EphA或EphB分子中的功能等同位置处用除天冬酰胺外的任意其它氨基酸取代天冬酰胺(Asp;N)来实现。

[0096] 因此,本说明书对于治疗人受试者中CNS或全身脉管系统的疾病或病症的方法具有指导意义,所述方法包括向受试者施用有效量的如下定义的人EphA4-Fc分子:SEQ ID N0:1所示的氨基酸序列,但具有由N216Z、N321Z、N389Z、N216Z+N321Z、N216Z+N389Z、N321Z+N389Z和N216Z+N321Z+N389Z组成的组定义的单个或多个氨基酸取代,其中Z为除天冬酰胺外的任意氨基酸。在19个氨基酸的信号序列(SEQ ID N0:33)不存在的情况下计算氨基酸位置编号。

[0097] 在一个实施方案中,Z为谷氨酰胺(Gln;Q)。

[0098] 因此,本说明书实现了用于治疗人受试者中的CNS或全身脉管系统的疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的由选自SEQ ID N0:2至SEQ ID N0:8的氨基酸序列定义的EphA4-Fc。

[0099] 在一个具体的实施方案中,EphA4-Fc含有N216Q+N321Q+N389Q的三重氨基酸取代。在19个氨基酸的信号序列(SEQ ID N0:33)不存在的情况下计算氨基酸位置编号。

[0100] 因此,本说明书实现了用于治疗人受试者中的CNS或全身脉管系统的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的由氨基酸序列SEQ ID N0:8定义的EphA4-Fc。

[0101] 如上所述,EphA4-Fc分子的选择取决于所治疗的哺乳动物。例如,本发明扩展至使用如本文教导的经修饰的鼠EphA4-Fc测试小鼠动物模型。

[0102] 同样如上所述,修饰的EphA4-Fc已失去至少一个N-糖基化位点但保持其拮抗EphA4介导的信号传导的能力,同时与相应的野生型EphA4-Fc相比具有更长的血清半衰期。这并不是说选定的EphA4-Fc不包含另外的氨基酸取代、缺失和/或添加、翻译后修饰或糖基化模式的其他变化。

[0103] 因此,提及SEQ ID N0:2至8和SEQ ID N0:10至16时包括在最佳比对后与SEQ ID N0:2至8或SEQ ID N0:10至16中的任一个具有至少约80%相似性的氨基酸序列,条件是在氨基酸残基编号216、321和/或389处存在将天冬酰胺取代为除天冬酰胺外的任意其他氨基酸并且这除去了N-糖基化位点。在19个氨基酸的信号序列(SEQ ID N0:33)不存在的情况下计算氨基酸位置编号。

[0104] “至少80%的相似性”是指80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0105] 如本文中所用,术语“相似性”包括在氨基酸水平上所比较的序列之间的确切同一性。当在氨基酸水平存在非同一性的情况下,“相似性”包括在结构、功能、生物化学和/或构

象水平上仍然彼此相关的氨基酸。在一个实施方案中,氨基酸序列比较在同一性而非相似性水平上进行。

[0106] 用于描述两个或更多个多肽之间的序列关系的术语包括“参考序列”、“比较窗口”、“序列相似性”、“序列同一性”、“百分比序列相似性”、“百分比序列同一性”、“实质相似”和“实质同一”。“参考序列”包括但不限于长度为10至100个氨基酸残基。因为两个多肽可以各自包含(1)在两个多肽之间相似的序列(即,仅完整氨基酸序列的一部分)和(2)两个多肽之间不同的序列,因此两个(或更多个)多肽之间的序列比较通常通过在“比较窗口”上比较这两个多肽的序列以鉴定和比较局部区域的序列相似性来进行。“比较窗口”是指与参考序列比较的通常12个连续残基的概念片段。比较窗口与参考序列(其不包含添加或缺失)相比可包含约20%或更少的添加或缺失(即缺口)以用于两个序列的最佳比对。用于对齐比较窗口的序列最佳比对可以通过计算机化的算法实现(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0中的BLASTP 2.2.32+,GAP,BESTFIT,FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575 Science Drive Madison, WI, USA)或通过检查和通过选择的各种方法中的任何方法生成的最佳比对(即导致比较窗口中同源性百分比最高)来进行。还可以参考例如由Altschule等(1997)Nucl. Acids. Res. 25(17):3389-3212公开的BLAST家族的程序。序列分析的详细讨论可见于Ausubel等(1994-1998)In:Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley& Sons Inc.中的第19.3单元。其它比对软件包括BWA(Li和Durbin(2010)Bioinformatics 26:589-595)和Bowtie(Langmead等(2009)Genome Biol 10:R25)和BLAT(Kent(2002)Genome Res 12:656-664)。

[0107] 如本文中所用,术语“序列相似性”和“序列同一性”是指序列在比较窗口中基于逐个氨基酸相同或者在功能或结构上相似的程度。因此,例如,通过在比较窗口中比较两个最佳比对的序列,确定在两个序列中存在相同氨基酸残基(例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置的数目以产生匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗口中的位置总数(即窗口大小),并将结果乘以100得出序列同一性的百分比,由此计算“序列同一性的百分比”。出于本发明的目的,“序列同一性”将被理解为表示通过任何合适的方法或计算机算法,使用在软件附带的参考手册中使用的标准默认值计算的“匹配百分比”。类似的评论适用于序列相似性。

[0108] 本文中设想的其他突变体包括具有对侧链的修饰、在蛋白质合成期间掺入了非天然氨基酸和使用了对Eph-X施加构象限制的交联剂的类似物。该术语也不排除Eph-X的其他修饰,例如乙酰化和磷酸化等。定义中包括例如含有一种或多种氨基酸类似物的多肽。

[0109] 本发明设想的侧链修饰的实例包括氨基的修饰,诸如通过与醛反应,接着用NaBH4还原进行的还原性烷基化;利用乙酰亚胺甲酯的脒化;利用乙酸酐的酰化;利用氰酸酯对氨基进行的氨甲酰化;利用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)对氨基进行的三硝基苯基化;利用琥珀酸酐和四氢邻苯二甲酸酐对氨基的酰化;以及利用吡哆醛-5-磷酸对赖氨酸进行吡哆醇化,然后用NaBH4还原。

[0110] 精氨酸残基的胍基可以通过与试剂诸如2,3-丁二酮、苯基乙二醛和乙二醛形成杂环缩合产物而被修饰。

[0111] 羧基可以通过碳二亚胺活化(经由O-酰基异脲形成),然后随后例如衍生为相应的酰胺而被修饰。

[0112] 疏基可以通过以下方法来修饰,所述方法是诸如利用碘乙酸或碘乙酰胺的羧甲基化;过甲酸氧化成磺基丙氨酸(cysteic acid);与其他硫醇化合物形成混合二硫化物;与马来酰亚胺、马来酸酐或其它取代的马来酰亚胺反应;使用4-氯汞苯甲酸酯、4-氯汞苯磺酸、苯基氯化汞、2-氯汞4-硝基苯酚和其他汞制剂形成汞衍生物;在碱性pH下用氰酸酯进行氨基甲酰化。

[0113] 色氨酸残基可以通过例如用N-溴代琥珀酰亚胺氧化或用2-羟基-5-硝基苄基溴或硫卤化物(sulphenyl halide)使吲哚环烷基化来修饰。另一方面,酪氨酸残基可以通过用四硝基甲烷进行硝化以形成3-硝基酪氨酸衍生物来改变。

[0114] 组氨酸残基的咪唑环的修饰可以通过用碘乙酸衍生物进行烷基化或用焦碳酸二乙酯进行N-乙氧羰基化来完成。

[0115] 在肽合成过程中掺入非天然氨基酸和衍生物的实例包括但不限于使用正亮氨酸、4-氨基丁酸、4-氨基-3-羟基-5-苯基戊酸、6-氨基己酸、叔丁基甘氨酸、正缬氨酸、苯基甘氨酸、鸟氨酸、肌氨酸、4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸、2-噻吩基丙氨酸和/或氨基酸的D-异构体。

[0116] 本文还设想了包含消除了至少一个N-糖基化位点的经修饰的氨基酸序列的经修饰的EphA4-Fc。例如,关于如SEQ ID N0:1中定义的人EphA4-Fc,在残基216、321和/或389处的天冬酰胺(Asn;N)被除天冬酰胺外的任何氨基酸取代。

[0117] 因此,本文中实现了经修饰的人EphA4-Fc,其在修饰前包含如SEQ ID N0:1所示的氨基酸序列,并且其中所述修饰选自由N216Z、N321Z、N389Z、N216Z+N321Z、N216Z+N389Z、N321Z+N389Z和N216Z+N321Z+N389Z,其中Z是除天冬酰胺(Asn;N)外的任意氨基酸。

[0118] 在一个实施方案中,Z是谷氨酰胺(Gln;Q)。

[0119] 因此,本文教导了具有选自SEQ ID N0:2至8的氨基酸序列的经修饰的人EphA4-Fc。在一个具体的实施方案中,经修饰的人EphA4-Fc由SEQ ID N0:8定义并且包含三重取代N216Q+N321Q+N389Q。

[0120] 本文还设想了经修饰的非人EphA4-Fc分子,诸如经修饰以消除至少一个N-糖基化位点的鼠EphA4-Fc。实例包括由具有选自N216Z、N321Z、N389Z、N216Z+N321Z、N216Z+N321Z、N321Z+N389Z和N216Z+N321Z+N389Z的取代突变的SEQ ID N0:9所示氨基酸序列定义的鼠EphA4-Fc,其中Z是除天冬酰胺(Asn;N)外的任意氨基酸。

[0121] 当Z是谷氨酰胺(Gln;Q)时,实例包括选自SEQ ID N0:10至16的经修饰的鼠EphA4-Fc。上面给出的氨基酸位置是在19个氨基酸的前导序列(SEQ ID N0:33)不存在的情况下计算的。通过将19加到所述氨基酸位置来确定相应的位置。因此,261、321和389的相应位置分别是235、340和408。

[0122] 在一个实施方案中,经修饰的EphA4-Fc分子呈分离形式。

[0123] 如上所示,本发明扩展至包含消除了至少一个N-糖基化位点的经修饰的氨基酸序列的任何Eph分子。Eph分子的实例包括EphA1至A8和EphB1至B6。这种经修饰的Eph分子可以与免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)偶联或融合。

[0124] 还可将本发明的经修饰的Eph-X(例如EphA4-Fc)分子与一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂组合以形成药物组合物。药学上可接受的载体可含有生理上可

接受的化合物,其用于例如稳定制剂。生理上可接受的化合物可包括例如碳水化合物诸如葡萄糖、蔗糖或葡聚糖、抗氧化剂诸如抗坏血酸或谷胱甘肽、螯合剂、低分子量蛋白质、减少肽或多肽的清除或水解的组合物,或赋形剂或其他稳定剂和/或缓冲剂。去垢剂还可用于稳定或增加或减少药物组合物(包括脂质体载体)的吸收。用于肽和多肽的药学上可接受的载体和制剂是本领域技术人员已知的并且详细地描述于科学和专利文献中,参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Company,Easton,PA,1990("Remington's")。

[0125] 其他生理上可接受的化合物包括润湿剂、乳化剂、分散剂或特别可用于防止微生物生长或作用的防腐剂。各种防腐剂是众所周知的,包括例如苯酚和抗坏血酸。本领域技术人员将会理解,包括生理上可接受的化合物的药学上可接受的载体的选择取决于例如本发明的调节剂的施用途径和其特定的生理化学特性。

[0126] 以药物组合物形式施用药剂可以通过本领域技术人员已知的任何方便的手段并取决于疾病或病症或损伤部位来进行。施用途径包括但不限于经呼吸道、气管内、鼻咽、静脉内、腹膜内、皮下、颅内、皮内、肌肉、眼内、鞘内、脑内、鼻内、输注、口服、直肠、贴剂和植入物。也可以使用逆行运输或直接注射入大脑。

[0127] 对于口服施用,可以将化合物配制成固体或液体制剂,诸如胶囊、丸剂、片剂、锭剂、散剂、混悬剂或乳剂。在制备口服剂型的组合物时,可以使用任何常用的药物介质,诸如,例如在口服液体制剂(诸如,例如混悬剂、酏剂和溶液剂)的情况下水、二醇类、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂、悬浮剂等;或在口服固体制剂(诸如,例如粉末、胶囊和片剂)的情况下,载体诸如淀粉、糖、稀释剂、成粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。由于它们易于施用,片剂和胶囊剂代表最有利的口服剂量单位形式,在这种情况下显然使用固体药物载体。如果需要,片剂可以通过标准技术进行糖衣或肠衣包衣。可封装活性剂以使其稳定通过胃肠道,同时允许通过血脑屏障,参见例如,国际专利公开号WO 96/11698。

[0128] 当口服施用时,本发明的药剂可以被保护而免于消化。这可以通过将核酸、肽或多肽与组合物复合以使其抵抗酸和酶促水解或通过将核酸、肽或多肽包装在适当抗性载体诸如脂质体中来实现。保护化合物免于消化的手段在本领域是公知的,参见例如Fix (1996) Pharm Res 13:1760-1764; Samanen等 (1996) J Pharm Pharmacol 48:119-135; 美国专利号5,391,377,其中描述了用于口服递送治疗剂的脂质组合物。

[0129] 适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液(当为水溶性时)或分散液和用于即时制备无菌注射液或分散液的无菌粉末,或者可呈乳膏形式或适用于局部施用的其他形式。通常,局部施用针对的是存在于使其能够全身性地进入身体的制剂中的Eph-X(例如EphA4-Fc)分子。其在制造和储存条件下必须是稳定的,并且必须防止微生物诸如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和植物油的溶剂或分散介质。例如,可通过使用诸如卵磷脂的包衣,在分散的情况下通过维持所需的粒度和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来预防微生物的作用。在许多情况下,优选包含等渗剂,例如糖或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射组合物的延长吸收。

[0130] 通过以下方式制备无菌可注射溶液剂:将药剂以要求的量连同上文列举的多种另

外的成分一起并入适当的溶剂中,根据需要随后过滤灭菌。通常,通过将多种灭菌的活性成分并入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物含有基础分散介质和来自上文所列举那些成分中的所要求的其他成分。在用于制备无菌可注射溶液剂的无菌粉末情况下,优选的制备方法是真空干燥技术和冷冻干燥技术,所述技术产生活性成分的粉末,外加来自其先前无菌过滤的溶液中的任何额外的所需成分。

[0131] 对于胃肠外施用,可将药剂溶解在药物载体中,并以溶液或悬浮液形式施用。说明性的合适的载体是水、盐水、右旋糖溶液、果糖溶液、乙醇或动物油、植物油或合成来源的油。载体还可含有其他成分,例如防腐剂、悬浮剂、增溶剂、缓冲剂等。当将药物鞘内施用时,还可将其溶解在脑脊髓液中。

[0132] 对于经粘膜或透皮施用,可使用适合于透过屏障的渗透剂来递送药剂。此类渗透剂在本领域中通常是已知的,例如对于经粘膜施用,有胆汁盐和夫西地酸衍生物。另外,去垢剂也可用于促进渗透。经粘膜施用可以通过鼻腔喷雾剂或使用栓剂(例如Sani and Chien(1996) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 13:85-184)。对于局部透皮施用,将药剂配制成软膏、乳膏、药膏(salves)、粉剂和凝胶。透皮给药系统还可包括贴剂。

[0133] 对于吸入,可使用本领域已知的任何系统来递送本发明的药剂,所述系统包括干粉气溶胶、液体递送系统、喷气式喷雾器、推进剂系统等,参见例如Patton(1998) *Nat Biotech* 16:141-143;用于多肽大分子的产品和吸入递送系统。例如,可将药物制剂以气雾剂或薄雾的形式施用。对于气溶胶施用,可将制剂以精细粉末形式与表面活性剂和推进剂一起提供。在另一方面,用于将制剂递送至呼吸组织的装置是其中使制剂蒸发的吸入器。其他液体输送系统包括例如空气喷射雾化器。

[0134] 还可以以持续递送或缓释机制施用本发明的药剂,所述机制可内部递送制剂。例如,可生物降解的微球体或胶囊或能够持续递送肽的其它可生物降解的聚合物构型可包括在本发明的制剂中(例如Putney和Burke(1998) *Nat Biotech* 16:153-157)。

[0135] 在制备本发明的药物中,可使用和操纵各种配方修改(formulation modifications)来改变药代动力学和生物分布。本领域普通技术人员已知许多用于改变药代动力学和生物分布的方法。此类方法的实例包括保护由诸如蛋白质、脂质(例如,脂质体)、碳水化合物或合成聚合物等物质组成的囊泡中的本发明组合物。关于药代动力学的一般讨论,参见例如Remington's。

[0136] 取决于施用方法,本发明的药物组合物可以以各种单位剂型施用。典型药物组合物的剂量对于本领域技术人员来说是公知的。这样的剂量通常是建议性的,并且根据具体的治疗情况、患者耐受性等进行调整。足以实现这一点的药剂的量被定义为“有效量”。用于该用途的剂量方案和有效量,即“给药方案”,将取决于各种因素,包括疾病或病症的分期、疾病或病症的严重程度、患者健康的一般状态、患者的身体状况、年龄、药物制剂和活性剂的浓度等。在计算患者的剂量方案时,也考虑施用方式。剂量方案还必须考虑药代动力学,即药物组合物的吸收速率、生物利用度、代谢、清除率等。参见例如Remington's; Eggleton and Davis(1997) *Peptides* 18:1431-1439; Langer(1990) *Science* 249:1527-1533。

[0137] 在一个实施方案中,以提供约5至100 μ g/mL的可检测血清水平的量施用糖基化位点修饰的Eph-X,诸如EphA4-Fc,持续3至20天。“5-100”是指5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、

40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100 μ g/mL。表述“3至20”意指3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一个实施方案中,在3至10天中以给予5至20 μ g/mL的血清水平的量提供具有一个或多个经修饰的N-糖基化位点的糖基化位点修饰的Eph-X,诸如EphA4-Fc。这些量包括持续约6-7天的约10 μ g/mL的血清水平。因此,给药包括每周的量。

[0138] 根据这些方法,可将根据本发明定义的药剂和/或药物组合物与一种或多种其他药剂组合来进行共施用。本文提及的“共施用”是指经由相同或不同途径在同一制剂中或在两种不同的制剂同时施用,或者通过相同或不同途径顺序施用。本文中提及的“顺序”施用是指两种类型的药剂和/或药物组合物施用之间的以秒、分、小时或天计的时间差。药剂和/或药物组合物的共施用可以以任何顺序进行。在这方面特别优选的药剂是促进神经发生和/或轴突生长和/或抑制炎症的药剂,诸如但不限于细胞因子和生长因子,以及炎性细胞因子的抑制剂,诸如INF γ 拮抗剂。

[0139] 或者,靶向疗法可用于通过使用靶向系统诸如抗体或细胞特异性配体或特定核酸分子而将活性成分更特异地递送至某些类型的细胞。由于多种原因,靶向可能是想要的,例如,如果药剂具有不可接受的毒性或者否则需要太高的剂量或否则将不能进入靶细胞的情形。

[0140] 药剂可以不直接施用药剂,而是在靶细胞中,例如在病毒载体(诸如上文所述的)中或在基于细胞的递送系统(诸如美国专利号5,550,050和国际专利公开号W0 92/19195、W0 94/25503、W0 95/01203、W0 95/05452、W0 96/02286、W0 96/02646、W0 96/38971、W0 96/40959和W0 97/12635中描述的)中产生它们。可将载体靶向靶细胞。基于细胞的递送系统被设计来在所需的靶位点植入患者体内并且包含靶剂的编码序列。或者,可以以前体形式施用药剂,以通过在待治疗的细胞中产生的或靶向所述细胞的活化剂转化为活性形式。参见,例如,欧洲专利申请号0 425 731A和国际专利公开号W0 90/07936。

[0141] 本文还设想了经修饰以消除至少一个N-糖基化位点的Eph-X在制备药剂中的用途,所述药剂用于治疗哺乳动物受试者(包括人受试者)中的由Eph介导的信号传导加重的疾病或病症,其中Eph选自EphA1至A8和EhB1至B6,X是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。

[0142] 本文中教导了经修饰以消除至少一个N-糖基化位点的Eph-X,其用于治疗哺乳动物受试者(包括人受试者)中的由Eph介导的信号传导加重的疾病或病症,其中Eph选自EphA1至A8以及EhB1到B6,并且X是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。

[0143] 本文还设想了经修饰以去除至少一个N-糖基化位点的EphA4-Fc在制备药剂中的用途,所述药剂用于治疗哺乳动物受试者(包括人受试者)中的由EphA4介导的信号传导加重的疾病或病症。

[0144] 本文中教导了经修饰以消除至少一个N-糖基化位点的EphA4-Fc,其用于治疗哺乳动物受试者(包括人受试者)中的由EphA4介导的信号传导加重的疾病或病症,其中Eph选自EphA1至A8以及EhB1至B6,并且X是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。

[0145] 在另一方面,本发明提供了包含组合物(例如本发明的药剂)的试剂盒。如本文所述,试剂盒还可含有教导本发明的方法和用途的说明材料。

实施例

[0146] 现在通过以下非限制性实施例进一步描述本发明。

[0147] 方法

[0148] 定点诱变

[0149] 使用Quik Change Site Directed Mutagenesis (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) 依次突变在预测的糖基化位点216、321和389处编码天冬酰胺(Asn;N)的核苷酸以编码谷氨酰胺。简言之,将人和小鼠EphA4-Fc中所需诱变位点侧翼的互补寡核苷酸(表2和3)分别与密码子优化的wt-hEphA4-hFc和wt-mEphA4-mFc模板DNA退火,并使用PfuTurbo DNA聚合酶进行延伸。循环参数如下:

[0150] 1个循环:95°C 30秒,接着18个循环:95°C 30秒,55°C 1分钟,68°C 8分钟。用Dpn1限制性内切酶消化野生型甲基化模板DNA,然后将其转化至NEB 5- α 感受态大肠杆菌(New England BioLabs)中。扩增单个菌落后,使用QIAGEN plasmid miniprep试剂盒纯化质粒DNA,然后通过DNA测序确认糖基化位点的诱变。

[0151] 质粒DNA的瞬时转染

[0152] 将HEK293T细胞(ATCC,CRL-11268)在含有5% v/v CO₂的潮湿气氛中于补充有10% v/v 胎牛血清(GIBCO Life Technologies)的RPMI 1640培养基(GIBCO Life Technologies)中培养。根据制造商的指导使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)将质粒DNA转染至HEK293T细胞中。在转染后第6天收获培养物上清液,并使用MabSelect琼脂糖基质(GE Healthcare Life Sciences),通过蛋白A亲和层析纯化。

[0153] SDS-PAGE分析

[0154] 将蛋白A纯化的样品在还原剂β巯基乙醇存在的情况下进行SDS-PAGE分析。简言之,将样品在10% v/v SDS聚丙烯酰胺凝胶上电泳,然后用考马斯亮蓝R-250(Sigma)染色。

[0155] EphA4-Fc ELISA测定

[0156] 在4°C用50mM碳酸盐缓冲液pH 9.5中的1F9mAb(3 μ g/ml)包被EIA 96孔板(Costar, Corning Inc.)过夜,然后在室温下用5% w/v BSA、PBS中的0.05% v/v Tween-20(PBST)封闭1小时。在用PBST洗涤三次后,添加稀释的EphA4-Fc分析物,并在室温下孵育1小时。在用PBST洗涤3次后,添加PBS中的生物素化的1A7mAb(1 μ g/ml),并在室温下孵育1小时。在用PBST洗涤3次后,添加在PBS中以1/500稀释的超链霉抗生物素蛋白-HRP(Thermo Fischer Scientific),并在室温下孵育1小时。在用PBST洗涤3次后,通过加入OPD(SigmaFast[商标])进行最终的检测,在492nm处测量终产物。

[0157] EphA4-Fc的酶促消化

[0158] 通过在4°C下用100mM NH₄HCO₃缓冲液(含1% w/v SDS)中的10mM二硫苏糖醇将115 μ g蛋白质还原18小时,来实现从纯化的EphA4-Fc产生肽和糖肽。随后在室温下进一步还原2小时,然后用25mM碘乙酰胺在黑暗中将半胱氨酸残基烷基化,进行2小时。如先前所述(Dave等(2015) Curr. Protoc. Protein Sci. 63:16.13.11-16.13.21)),将还原和烷基化的蛋白质进行甲醇沉淀并消化。简言之,使用1mL甲醇(-20°C)将蛋白质样品与1 μ g测序级胰蛋白酶

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 共沉淀并在-20℃下孵育过夜。然后将沉淀在4℃下离心15分钟,吸出上清液。用1mL的-20℃甲醇(90% v/v)将沉淀物再洗涤两次,离心,然后加入30μL 0.1M三乙基碳酸氢铵。通过温和涡旋混合将蛋白质重新悬浮,在短暂离心后,将蛋白质在37℃孵育2小时。最后,加入另外2μg胰蛋白酶(蛋白质:酶的最终比例为38:1, w/w),将消化物在22℃下再孵育6小时。将胰蛋白酶消化的蛋白质的等分试样在37℃下用从金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) V8 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 分离的Glu-C进一步消化12小时(蛋白质:酶, 40:1, w/w)。在Glu-C消化后,使用制造商的指南,用C18 ZipTip(10μL移液管吸头,具有0.6μL树脂床; Millipore, MA, USA) 将所得肽和糖肽脱盐,然后进行MS分析。

[0159] LC-MS

[0160] 在偶联至nanoACQUITY UPLC (Waters Corporation, MA) 的Orbitrap Fusion (商标) Tribrid (商标) 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) 上进行MS分析, 其中在Waters C18 2G Symmetry (**100 Å**, 5μm, 180μm x 20mm) 捕获柱上进行捕获, 并在与捕获柱连线的Waters C18 BEH (**130 Å**, 1.7μm的粒径, 75μm x 200mm) 柱上进行梯度洗脱。这被称为“LC-MS” (Dave等 (2015) 同上)。在进行MS之前, 将消化的样品用三氟乙酸进行酸化, 每次分析注射50ng胰蛋白酶消化物和100ng胰蛋白酶/Glu-C消化物。

[0161] 将样品加载到捕获器上并在5分钟内以15μL/分钟的流速使用98%溶剂A(0.1% v/v) (甲酸水溶液) 和2%溶剂B(100% v/v) (含有0.1% v/v甲酸的CH₃CN) 进行洗涤。随后以0.3 μL/分钟的流速将肽洗脱到分析柱上, 同时斜升通过一系列线性梯度: 在60分钟内从2% B升至40% B, 在15分钟内升至70% B, 在5分钟内升至95% B并在95% B保持5分钟。通过装配有PicoTip (商标) 发射器 (涂层P200P, 尖端10±1μm, New Objective, MA) 的Nanospray Flex [商标] (NG) 离子源 (Thermo Scientific) 将来自分析柱的洗脱物连续引入质谱仪。

[0162] 在300-1800 (m/z) 范围内以200m/z、120K的分辨率在Orbitrap中对nUHPLC-分级分离的胰蛋白酶解肽进行MS全谱扫描 (MS survey scans), 其中自动增益控制 (AGC) 目标为200,000, 并且最大注入时间为50ms。使用2.5的隔离窗口选择电荷状态为2-7且强度大于5000的最密集前体 (precursors), 并使用30% 的标准化碰撞能量, 通过高能 (束型) 碰撞解离 (HCD) 进行碎片化。碎片离子的质量分析在Orbitrap中进行, 其中将分辨率设置为60K, AGC目标为50,000, 最大注射时间为60ms。一旦选定, 将前体排除30秒。

[0163] 非糖基化肽的数据分析

[0164] 使用Proteome Discoverer (v. 1.4.1.14 Thermo Fisher Scientific Inc. Bremen, Germany) 和具有过滤器功能的搜索引擎Mascot (v. 2.5.1, Matrix Science Ltd., London, UK) 针对全人蛋白质组数据库 (ID: UP000005640, 具有从Uniprot网站下载的70,076个序列) 和EphA4-Fc序列搜索从胰蛋白酶消化的EphA4-Fc的分析中生成的MS RAW文件。使用以下参数: 用胰蛋白酶消化; 最多两次未切割; 10ppm前体质量容差; 0.02Da片段容差; 脲甲基半胱氨酸 (carbamidomethyl cysteine) 的固定修饰和单氧化甲硫氨酸的动态修饰以及天冬酰胺和谷氨酰胺的脱酰胺。置信肽谱匹配 (Confident peptide-spectrum matches) 使用0.05的假发现率阈值进行分配, 并且需要两种不同的肽用于置信蛋白质鉴定。

[0165] 糖基化肽的数据分析

[0166] 利用Byonic软件(Bern等(2002) Current Protocols in Bioinformatic John Wiley&Sons, Inc., NJ, USA),使用与Proteome Discoverer搜索相同的质量容差和固定修改分析来自EphA4-Fc的胰蛋白酶和胰蛋白酶/Glu-C消化物的MS RAW文件。将酶规则设定为对Arg或Lys的C端切割(胰蛋白酶消化的样品)或对Arg、Lys、Glu或Asp的C端切割(组合的胰蛋白酶/Glu-C消化物),并且对于胰蛋白酶消化的样品将未切割设定为2,对于胰蛋白酶/Glu-C样品将未切割设定为3。每个肽允许附接在N-连接的共有位点(Asn-X-S/T)上的一个聚糖和一个单氧化甲硫氨酸。将肽输出选项更改为“显示全部N-糖肽”,并且针对含有EphA4-Fc序列的蛋白质FASTA文件和除去了所有含N-羟乙酰神经氨酸(NeuGc)的聚糖组成的Byonic N-连接的聚糖数据库(309_Mammalian no sodium)搜索谱。在对Byonic结果进行人工检查之后,对于糖肽选择100的截断分数。

[0167] 对于利用OxoExtract(内部软件程序)的分析,另外地使用信噪比(S/N)阈值为0在Proteome Discoverer中将来自EphA4-Fc的胰蛋白酶和胰蛋白酶/Glu-C消化物的MS RAW文件转换成mzML。OxoExtract选择存在于±10ppm质量窗口内的氧鎓离子[HexNAc+H]⁺进行每次MS/MS扫描。该诊断性氧鎓离子源自糖肽的聚糖部分的碎片化,并且离子的鉴定促进了糖肽的MS/MS谱的选择。HexNAc氧鎓离子和其它单糖和寡糖氧鎓离子(代表Hex、Fuc和NeuAc)也可用于确认附接的聚糖的组成。另外针对其它预先定义的单糖和寡糖氧鎓离子和源自EphA4-Fc的计算机消化的理论N-连接糖肽碎片离子,搜索通过OxoExtract选择的所有含有HexNAc氧鎓离子的MS/MS谱。使用含有N-连接的共有序列N-X-S/T的理论EphA4-Fc肽计算N-连接的糖肽碎片离子,并且所述N-连接的糖肽碎片离子包括肽+HexNAc₁、肽+HexNAc₂和肽+HexNAc₁dHex₁以及肽b-和y-离子。当使用HCD将N-连接的糖肽碎片化时,通常产生肽+HexNAc₁离子,并且可将所述肽+HexNAc₁离子用于测定肽部分的质量。在GlycoMod(Cooper等(2001) Proteomics 1:340-349)中自动搜索所有含有HexNAc氧鎓离子的MS/MS谱以确定附接的N-连接的聚糖的组成,所述MS/MS谱还含有与理论肽+HexNAc₁离子的m/z匹配的离子。对于使用GlycoMod的搜索,从理论肽+HexNAc₁离子的肽部分计算肽质量,并将10ppm质量容差(mass tolerance)应用于观察到的前体质量。该数据用于验证由Byonic分配的糖肽,确认相关的氧鎓离子和肽+HexNAc₁离子的存在,鉴定具有核心岩藻糖基化的聚糖组成并且搜索未由Byonic分配的糖肽。

[0168] 接受任何糖肽分配的最低要求是存在肽+HexNAc₁离子或多于四个肽b-和y-离子。如果肽部分的序列包含甲硫氨酸残基,则需要至少两个肽b-或y-离子来证明潜在的氧化或其不存在。必须存在相关的聚糖氧鎓离子以验证分配的聚糖组成,并检查洗脱曲线以确保糖肽在预期的保留时间洗脱。

[0169] 尺寸排阻色谱

[0170] 将突变型和野生型EphA4-Fc注射到TSK-GEL SWXL保护柱(6.0mm ID×400mm, 7-μm颗粒)上,随后使用Agilent 1200色谱系统将其洗脱到TSK-GEL G3000SWXL HPLC柱(7.8mm ID×300mm, 5-μm颗粒)上。流速为0.8mL/分钟,流动相含有100mM磷酸钠(pH6.8)和200mM NaCl。通过UV吸收(280nm波长)监测洗脱的蛋白质。使用以下标准:甲状腺球蛋白(670kDa)、牛γ-球蛋白(158kDa)、卵白蛋白(44kDa)、马肌红蛋白(17kDa)和维生素B₁₂(1.35kDa)[BioRad]。

[0171] 分析性超速离心

[0172] 将纯化的蛋白质针对含有10mM磷酸钾(pH 7.6)的缓冲液透析过夜。使用配有AnTi-60转子的XL-I分析超速离心机(Beckman Coulter, Fullerton, CA)分析样品。将蛋白质样品加载到双扇区epon中央部分(double-sector epon centrepieces)的样品室中,并在参考室中加入缓冲液。使用40,000rpm的转子速度和280nm的波长在20℃下获得径向吸光度数据,在连续扫描模式下径向增量为0.003cm。使用程序SEDFIT (Schuck和Rossmanith (2000) Biopolymers 54:328-341) 将沉降边界拟合在不假定异质性(c(s))的情况下描述沉降系数分布的沉降的模型。使用p=0.95、浮动摩擦比和在0.1-15S范围内的150个沉降系数增量的正则化参数来拟合数据。

[0173] 氨基酸位置的数字标记

[0174] EphA4中的三个N-糖基化位点可用包含SEQ ID NO:33所示的19个氨基酸的前导(信号)序列的氨基酸序列进行编号,或者在没有该序列的情况下进行确定。在没有该序列的情况下,位点是N216、N321和N389。如果包含该前导序列,则位置分别为N235、N340和N408。本文使用这两种编号系统。

[0175] 表2

[0176] 人EphA4-Fc诱变寡核苷酸

	氨基酸 位置 ¹	寡核苷酸	SEQ ID NO:
[0177]	216	有义: 5' GCAGCTCGTG <u>CAAAACAGCGAAGAG</u> 3' 反义: 5' CTCTTCGCTG <u>TTGCACGCAGCTGC</u> 3'	17 18
	321	有义: 5' ATCAGCAACGTG <u>CAAGAGACAAGCGTG</u> 3' 反义: 5' CACGCTTGTCT <u>TTGCACGTTGCTGAT</u> 3'	19 20
	389	有义: 5' CTGGCCCACAC <u>CCAATACACCTTCGAG</u> 3' 反义: 5' CTCGAAGGTGT <u>ATTGGGTGTGGGCCAG</u> 3'	21 22

[0178] ¹在19个氨基酸的信号序列不存在的情况下计算的。

[0179] 表3

[0180] 小鼠EphA4-Fc诱变寡核苷酸

氨基酸位置 ¹	寡核苷酸	SEQ ID NO:
[0181]	216 有义: 5'AGGGGGTCCTGCGTGC <u>A</u> GAACAGTGAAGA AAAG 3' 反义: 5'CTTTCTTC <u>ACTGTT</u> CTGCACGCAGGACCCCT 3'	23 24
	321 有义: 5' GATCTCCAACGTGCC <u>AGG</u> GAGACTTCTGTG 3' 反义: 5' CACAGAAGTCTC <u>CTGCACG</u> TGGAGATC 3'	25 26
	389 ¹ 有义: 5' CTGGCCCACACAC <u>AGT</u> TACACCTTCGAG 3' 反义: 5' CTCGAAGGTGT <u>ACTG</u> TGTGGGCCAG 3'	27 28

[0182] ¹在19个氨基酸的信号序列不存在的情况下计算的。

[0183] 实施例1

[0184] EphA4-Fc融合蛋白的糖基化缺陷型表现出改善的药代动力学行为

[0185] 在研究EphA4-Fc对EphA4介导的信号传导的拮抗作用(例如,参见Goldshmit等(2011)同上;Spanevello等(2011)同上和Goldshmit等(2004)同上)期间,显而易见的是,融合蛋白的半衰期比预期的短(图1)。为了确定EphA4-Fc的糖基化是否可能是快速蛋白质清除中的一个因素,分析了EphA4的潜在糖基化位点。使用在线NetGlyN 1.0和NetGlyc 1.0程序来检查EphA4和密切相关的EphA3蛋白质的预测的糖基化位点,其中这些位点先前已被分析过(Boyd等(1992)J.Biol.Chem.267 (5):3262-3267)。对于两种蛋白质,都未预测到O-连接位点。对于EphA4,在人EphA4中存在以及小鼠EphA4中的相应位点处存在3个预测的N连接位点(图2A)。在小鼠和人EphA4-Fc构建体中将这些位点处的天冬酰胺残基诱变为谷氨酰胺(关于诱变寡聚物,参见表2和3)。不清楚这种取代在消除N糖基化位点的同时是否会对蛋白质结构或功能以及表达或药代动力学具有任何不利影响。

[0186] 将表达质粒的野生型和突变型形式转染至293T细胞中,5天后收获培养物上清液。通过蛋白A琼脂糖色谱回收重组Fc蛋白。在小鼠和人EphA4-Fc的情况下,三重突变蛋白的产量略低,在不同的运行中,其为野生型蛋白产量的60%与70%之间。在每种情况下,与野生型相比,三重突变蛋白的分子量较低,质量减少与EphA4细胞外结构域的去糖基化一致(图2B和2C)。初步的结合研究确实显示了三重(和双重)突变体与肝配蛋白A4的结合与野生型相似(图3)。

[0187] 使用两种EphA4单克隆抗体建立夹心ELISA测定法,所述EphA4单克隆抗体结合EphA4的细胞外结构域中的独立表位(图4)。如图5所示,该测定法在测量野生型和突变型人EphA4-Fc方面灵敏度相同。

[0188] 在大鼠中进行药代动力学研究。将Wistar大鼠(6-8周龄)随机分成组(每组3只),并通过尾静脉注射以6mg/kg注射hEphA4-hFc突变体或野生型Fc蛋白。在不同的时间点:注射后0.25小时、2小时、18小时、48小时、72小时和第6天,通过切割尾端采集150-200μL血液,并将其收集到Microvette采血管中。在以直立位孵育30-45分钟后,将管以11,000rpm离心10分钟,然后除去血清。在通过ELISA分析之前将血清储存在-80°C(图6)。

[0189] 野生型蛋白质的半衰期小于24小时,在48小时之前降至1μg/mL以下。基于先前使

用野生型EphA4-Fc的实验,以该水平结合关键肝配蛋白B3配体(图7和8)是不足以阻断肝配蛋白B3的,并且确实不足以阻断与肝配蛋白A蛋白的较低亲和力相互作用。相反地,突变型蛋白在6天时仍高于10 μ g/mL,表明在大部分的该时间段内可能对竞争性阻断有效。肝配蛋白A1、肝配蛋白A4-Fc和肝配蛋白B3Fc与野生型EphA4的结合显示证实了结合的亲和力,并显示出与可溶性EphA4-Fc结合固定化肝配蛋白的模式相同的模式(图8)。

[0190] 为了分析突变型EphA4-Fc对比野生型EphA4-Fc与肝配蛋白A1、A4和B3的结合,建立ELISA,其中分析与固定化肝配蛋白的结合(图9)。结果示于图10中。很明显,结合没有显著差异,表明两种蛋白质对三种肝配蛋白配体具有相当的亲和力(突变型蛋白的略微明显增加的灵敏度可能归因于其略低的分子量)。

[0191] 实施例2

[0192] 经修饰的Eph分子的生成

[0193] 图11A至D(SEQ ID N0:29至32)提供了EphA2、EphA3、EphA4和EphB4细胞外结构域的氨基酸序列,标出了推定的N-糖基化位点(也参见表1)。使用本文所述的方法,消除一个或多个或所有N-糖基化位点,然后融合或偶联至免疫球蛋白或免疫球蛋白片段(例如Fc部分)、蛋白质或蛋白质片段(例如HSA)或聚醚(例如PEG)。在一个实施方案中,将经修饰的Eph分子与免疫球蛋白(Ig)Fc部分诸如IgG1 Fc或IgG4 Fc融合。

[0194] 实施例3

[0195] 非糖基化EphA4-Fc的延长的半衰期

[0196] EphA4-Fc非糖基化肽的序列覆盖

[0197] 当针对包含EphA4-Fc和人蛋白质组的蛋白质数据库进行搜索时,对用胰蛋白酶消化的EphA4 Fc的质谱分析鉴定了44种蛋白质。EphA4-Fc的蛋白质序列是具有93%蛋白质覆盖度的最高评分蛋白质。观察具有来自EphA4-Fc的全部四个N-连接的共有位点的肽,并手动研究谱以确认这些肽分配。蛋白质N-末端处的一个区域未被测序(氨基酸残基1-24),其中含有信号肽。高水平的序列覆盖度表明正确的蛋白被纯化并确认了预期的氨基酸序列。在其余的43种蛋白中,只有19种含有超过两种肽,6种具有超过30%的序列覆盖度。鉴于低的肽匹配数目和序列覆盖度水平,这些蛋白质不太可能导致了观察到的糖肽库。

[0198] 从EphA4-Fc鉴定的N-连接的糖肽

[0199] 重组融合蛋白EphA4-Fc含有四个N-连接的共有位点(图12);三个位于融合蛋白的EphA4部分中,对应于全长EphA4的细胞外结构域(UniProt ID:P54764-1)中的位点N235、N340和N408。重组EphA4-Fc的第四个N-连接的位点N625位于蛋白质的IgG4Fc结构域内,并且对应于所有IgG亚类的每个重链的C_H2结构域中的N297(Zauner等(2013)Mol.Cell.Proteomics 12:856-865)。为了全面调查位点特异性聚糖异质性,在通过质谱法(MS)分析之前,使用酶的组合消化EphA4Fc。最初消化是利用胰蛋白酶,除了当脯氨酸位于切割位点的羧基侧时外,其切割赖氨酸(Lys/K)和精氨酸(Arg/R)的C端的肽键。然后将胰蛋白酶消化的样品用Glu-C进行消化,所述Glu-C切割谷氨酸(Glu/E)C端的肽键并以较低速率切割天冬氨酸(Asp/D)C端的肽键[Breddam和Meldal(1992)European Journal of Biochemistry FEBS 206:103-107]。在分开的色谱MS/MS实验中分析胰蛋白酶和胰蛋白酶/Glu-C消化的样品。EphA4 Fc的消化物的质谱分析能够鉴定212个含有四个潜在N-连接的糖基化位点之一的完整糖肽。由于不同的酶消化和切割事件,所鉴定的糖肽含有十二个肽部

分中的一个，并跨越N-连接的共有位点。

[0200] 在EphA4-Fc的每个N连接的位点处鉴定的聚糖组成

[0201] 对所有四个N-连接的位点观察到总共69种聚糖组成。当在每个N-连接的位点仅考虑一次每种聚糖组成时，在位点N235、N340、N408和N625处分别检测到总共34、23、44和23种聚糖(以具有19个氨基酸的前导序列计算)。应该指出，特定的脊椎动物单糖是异构的(例如GalNAc/GlcNAc或Man/Gal/Glc)，因此完整糖肽的质谱分析不能区分附接的聚糖中的单糖异构体。在这项工作中已经实施了命名法来表示这种模糊性，其中N-乙酰基己糖胺(HexNAc)和己糖胺(Hex)分别用于代表GlcNAc/GalNAc和Man/Gal/Glu。脱氧己糖(dHex)代表异构体单糖岩藻糖(Fuc)和木糖；在本文中，根据哺乳动物N-连接的生物合成的已知规则，以及观察到在HEK细胞中产生的N-连接的聚糖(Moremom等(2012) Nat. Rev. Mol. Cell Biol 13:448-462；Andre等(2007) Proteomics 7:3880-3895)，推测dHex为Fuc。在图13中可以看到每个N-连接的位点处的聚糖组成的定性差异。在四个N-连接的位点之间，岩藻糖基化的复合结构和杂合结构的数目明显不同。在位点N235、N340和N625处(在19个氨基酸的前导序列存在的情况下计算的)，分别在97%、100%和78%的杂合结构和复合结构上观察到岩藻糖基化。而在位点N408处，只有45%的杂合结构和复合结构分配有含岩藻糖的组成。具有唾液酸化作用(N-乙酰神经氨酸/NeuAc)的聚糖的比例在位点N235(41%)处最高，其次是位点N340(26%)、N408(22%)和N625(22%)。

[0202] 通过定向诱变缺失糖基化位点

[0203] 为了分析糖基化对蛋白质功能的影响，类似于实施例2，将人EphA4-Fc表达载体进行系统突变，使得EphA4细胞外结构域中的三个关键天冬酰胺残基的密码子被谷氨酰胺残基的密码子替换。将所得的单、双重和三重突变体载体转染到HEK293细胞中，并使用蛋白A亲和色谱从细胞上清液回收表达的蛋白质。如图14A所示，突变的蛋白质显示出与糖部分损失一致的逐渐降低的分子量。通过尺寸排阻色谱(SEC) [图14B]和沉降速率分析超速离心(SV-AUC) [图14C]评估野生型和突变型EphA4-Fc蛋白的构象差异和寡聚状态。在SEC期间，在9.58分钟洗脱的突变型EphA4-Fc的洗脱时间略有变化，而野生型在9.03分钟被洗脱。对SV-AUC数据的分析揭示了表观沉降系数的狭窄分布，其中野生型的主峰在~6.3S，突变体的主峰在~6.2S。这证实了在SDS-PAGE和SEC中观察到的均一性。对于野生型和突变体，分别给出了174kDa和156kDa的分子量估计。这些估计与针对EphA4-Fc均二聚体(约168kDa)计算的值一致，突变体的较低分子量与存在于野生型上的N-聚糖的去除一致。拟合的摩擦比表明蛋白质具有伸长的构象，并且与突变体相比对于野生型蛋白质观察到略高的比率(1.76对比1.66)。

[0204] 去糖基化和野生型EphA4-Fc的配体结合活性

[0205] 使用三种方法进行突变型和“野生型”EphA4Fc蛋白的分析：肝配蛋白-结合ELISA(图15A)、Octet生物传感器分析(图15B)和与表达肝配蛋白的细胞系的结合的流式细胞术分析(图15C)。所有这些技术均显示突变型蛋白保留了与肝配蛋白配体结合的能力，其中亲和力与未突变的EphA4-Fc蛋白的相当。使用编码EphA4-小鼠Fc蛋白的载体进行相同的程序，并再次显示突变不影响功能。总之，数据表明>1μg/mL的浓度将使所有肝配蛋白A配体饱和，并且>10μg/mL将足以使肝配蛋白B3位点饱和。

[0206] 实施例4

[0207] EphA4-Fc糖基化突变体的药代动力学分析

[0208] 为了评估糖基化是否是体内清除的决定性因素,在小鼠中研究了未突变的人EphA4-Fc蛋白以及单、双重和三重突变型蛋白的药代动力学行为。所有的突变导致体内半衰期的一定延长,但这在单突变体中最不明显,在双重突变体中更强,当所有三个糖基化位点都被缺失时得到最多延长。直接在大鼠(以一式三份进行)中比较三重突变型蛋白质相对于野生型蛋白质的药代动力学,观察到突变型蛋白质的半衰期有更显著的延长,而未突变的蛋白质被非常迅速地清除。很明显,三重突变型蛋白质表现出简单的对数线性清除率,与未突变的蛋白质相反,所述未突变的蛋白质显示出更复杂的快速初始清除率,随后是平稳期,与在预测的天冬酰胺键联残基处的糖基化的异质性一致。还在小鼠中分析了“野生型”和突变的小鼠EphA4-Fc蛋白。与人EphA4-Fc一样,三重突变型蛋白质显示出极大延长的体内半衰期。

[0209] 实施例5

[0210] EphA4-Fc中的N-糖基化的作用

[0211] 研究表明EphA4-Fc被快速清除,需要在小鼠和大鼠SCI研究中频繁给药(Goldshmit等(2011)同上)。为了探索糖基化在该快速清除中的可能作用,分析了EphA4-Fc的糖基化(实施例2-4)。源自胰蛋白酶消化的和胰蛋白酶/G1u-C消化的EphA4-Fc的完整糖肽的质谱分析证实了融合蛋白内的四个预测的N-连接位点被糖基化。与预测一致,在该蛋白质的EphA4区域内没有检测到O-连接的糖基化位点。此外,还观察到具有在全部四个N-连接的位点没有糖基化的肽,表明在EphA4-Fc蛋白库中使用了N-连接的位点,但它们并不总被糖基化。定性地,具有唾液酸化的聚糖的比例在位点N235(41%)处最高,其次是位点N340(26%)、N408(22%)和N625(22%)。在位点N235观察到的更高程度的唾液酸化可降低无唾液酸糖蛋白或甘露糖受体介导的清除的水平,从而解释了突变该位点对清除的影响最小。这些氨基酸位置是基于存在19个氨基酸的N末端前导序列计算的。

[0212] 通过SDS-PAGE、SEC和SV-AUC(分别为图14A-C)分析突变型和野生型EphA4-Fc蛋白的纯度、构象和寡聚状态。如根据沉降速度判断的,当考虑到N-聚糖差异时,突变型和野生型EphA4-Fc似乎都是稳定的二聚体,分子量与计算值相当接近。有趣的是,突变体和野生型的SEC洗脱时间(分别为9.58和9.03分钟)显著高于基于理论分子量的预期洗脱,所述预期洗脱应该对应于牛 γ -珠蛋白(158kDa,洗脱时间11.0分钟),表明两种分子都具有非球形结构。总之,SEC和SV-AUC的结果表明野生型EphA4具有稍大的流体动力学体积或更长的构象(与SEC中的更早洗脱和SV-AUC中更高的拟合摩擦比一致)。

[0213] 野生型EphA4-Fc在开始的24-48小时内表现出快速清除,占绝大部分循环药物,但随后在其余时间点达到平台。这可能归因于含有去唾液酸化的N-聚糖的EphA4-Fc变体的优先清除,而含有唾液酸化聚糖或不含N-糖基化的那些结构在体内得以保留。药代动力学研究显示了糖基化对体内蛋白质半衰期的明显影响。虽然单个位点的突变显示出可变的作用,但具有完全去糖基化的EphA4区域的蛋白质显示出可用性的最大延长。重要的是,20mg/kg的剂量能够维持血清浓度,基于10 μ g/mL的浓度能够最大限度地结合所有肝配蛋白A和肝配蛋白B配体,这样的血清浓度将会阻断所有肝配蛋白位点6-7天。这是非常重要的,因为与需要每隔1-2天递送以有效地作为诱饵受体药物的糖基化蛋白相反,其提供了实现以每周一次的间隔进行EphA4-Fc给药的可能性。

[0214] 文献在糖基化在蛋白质功能性和药代动力学中发挥的作用方面是不一致的。有趣的是,肝配蛋白A1的去糖基化对其与EphA2的结合亲和力具有负面影响,而非糖基化肝配蛋白A1的产生导致蛋白质的错误折叠(Fegula等(2013)同上)。在其中突变N-糖基化位点导致了蛋白质表达显著损失的其它蛋白质中也观察到了这种效应(Takahashi等(2008)同上; Mishina等(1985)Nature 313:313,364-369)。因此,尚不清楚修改糖基化模式对蛋白质性质的Eph信号传导拮抗剂会造成什么影响。与越来越多的研究显示在蛋白质治疗剂中维持或引入N-连接的位点的益处相反,本发明是部分地基于以下令人感兴趣的结果预测的:其中在消除三个N-连接的位点后功能性得到保留,并且药代动力学性质得到显著改善。此外,这些结果提供了对EphA4N-连接的糖基化的作用的深入了解,揭示了N连接的共有位点对于配体结合性质不是必需的。

[0215] 实施例6

[0216] 临床前EphA4-Fc运动神经元疾病(MND)数据显示疗效

[0217] 在MND SOD1^{G93A}小鼠模型中施用EphA4-Fc改善了行为表现。研究了对SOD1^{G93A}小鼠进行EphA4-Fc全身性施用。简言之,用EphA4-Fc融合蛋白的鼠同源物或盐水对照处理SOD1^{G93A}小鼠。功能测试每周进行一次,实验在第24周结束。评估前后肢握力以及使用转杆测试评估平衡和协调。与对照组相比,经处理的小鼠在18周龄、19周龄、20周龄和21周龄时具有明显更大的后肢握力。在第18至24周期间,经处理的小鼠在转杆测试中的行为表现与对照相比增强,到第20周时增强达到统计学显著性(图16A和B)。应根据与SOD1^{G93A}模型相关的挑战(Vaqueur等(2013)Nat Rev Drug Discov 12:287-305;Kobeleva等(2013)Neurogene Dis.Manag.3:525-537),特别是由SOD1突变诱导的疾病严重程度来检查这些结果。鉴于诱发的运动功能的实质损失,治疗组中存在统计学显著差异。对于动物的各个群组,该实验已被重复4次,并且在所有情况下,对于EphA4-Fc处理已经看到行为表现的显著改善。

[0218] 实施例7

[0219] EphA4基因消融MND模型

[0220] 为了评估阻断EphA4信号传导对MND的所有影响,在SOD1^{G93A}小鼠的运动神经元中缺失EphA4基因,从而提供对EphA4参与SOD-1依赖性疾病和EphA4-Fc疗法的相对功效的深入了解。这是通过杂交3个小鼠品系以在SOD1^{G93A}小鼠中建立细胞类型特异性EphA4基因缺失系统来进行的,其可评估EphA4的特异性遗传消融对MND进展的作用(SOD1^{G93A}、EphA4^{flox/flox}和ChAT-Cre^{KI/KI})。EphA4^{flox/flox}小鼠具有拥有带flox的外显子3的EphA4的条件等位基因(Hermann等(2010)Genesis 48:101-105)。当EphA4^{flox/flox}小鼠与ChAT-Cre^{KI/KI}小鼠杂交时,Cre介导的将外显子3切除而将外显子2与外显子4剪接在一起引起下游序列的移框,在表达ChAT的细胞中产生无效的EphA4基因。EphA4的这种条件性消除建立在SOD1^{G93A}小鼠背景上。育种策略需要四轮繁殖,数量基于每窝产6只动物的产生,达到预期的基因型比例。

[0221] EphA4^{flox/flox} x ChAT-Cre^{KI/KI} x SOD1^{G93A}、EphA4^{flox/WT} x ChAT-Cre^{KI/KI} x SOD1^{G93A}小鼠以及EphA4^{flox/flox} x ChAT-Cre^{WT/WT} x SOD1^{G93A}小鼠间的体重和行为表现。在本研究中包括野生型(C57BL/6J)小鼠的EphA4的条件性消除和野生型小鼠作为对照组,其为EphA4^{flox/flox} x ChAT-Cre^{KI/KI} x C57和EphA4^{flox/flox} x ChAT-Cre^{WT/WT} x C57小鼠。通过在5周龄后测量体重来监测疾病发作和进展。行为表现从8周开始评估,然后每周使用转杆和后

肢握力强度测试来进行监测。测试对组进行了盲法。通过利用抗ChAT抗体在脊髓的腰部膨大中进行免疫组织化学染色并对ChAT阳性细胞(运动神经元)进行计数来评估运动神经元存活。运动神经元的数量与行为表现直接相关。获得的数据表明转杆测试值从第14周开始下降,然而,与EphA4^{flox/flox} x ChAT-Cre^{WT/WT} x SOD1^{G93A}小鼠不同,EphA4^{flox/WT} x ChAT-Cre^{KI/KI} x SOD^{G93A}小鼠的表现下降得慢得多,在第18周和第19周产生显著差异(图17)。

[0222] 当比较同一实验中的运动神经元计数时,与野生型对照相比,杂合子EphA4-耗尽的SOD1小鼠在17周时表现出腰部运动神经元的保留(图18)。

[0223] 实施例8

[0224] 聚糖位点突变对EphA2-Fc的影响

[0225] 方法

[0226] EphA2-Fc的质粒制备

[0227] 由(GenScript USA Inc.)合成、克隆密码子优化的人EphA2-FcDNA并对其进行序列确认,其中在预测的糖基化位点407和435处编码天冬酰胺(ASN;N)的核苷酸编码谷氨酰胺。将质粒转化至NEB 5- α 感受态大肠杆菌(E.coli)(New England BioLabs)中,从单个菌落扩增,使用QIAGEN plasmid midiprep试剂盒纯化DNA。

[0228] 质粒DNA的瞬时转染

[0229] 将HEK293T细胞(ATCC,CRL-11268)在含有5%v/v CO₂的潮湿气氛下在补充有10%v/v胎牛血清(GIBCO Life Technologies)的RPMI 1640培养基(GIBCO Life Technologies)中进行培养。根据制造商的指导使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)将质粒DNA转染至HEK293T细胞中。在转染后第6天收获培养物上清液,并使用MabSelect琼脂糖基质(GE Healthcare Life Sciences),通过蛋白A亲和色谱纯化。

[0230] EphA4-Fc在大鼠体内的药代动力学

[0231] 将大鼠随机分成两组,通过尾静脉以1mg/kg的浓度注射突变型EphA2-Fc或野生型EphA2-Fc。然后,在处理后不同的时间点,即2小时、18小时、48小时和6天,通过切割大鼠尾的尖端采集300-400 μ l血液样品。每次采血后,将所有样品在室温下直立放置孵育1小时以使其凝固,然后以11000rpm离心10分钟。血清保存于-80℃以用于ELISA测定。

[0232] EphA2-Fc ELISA测定

[0233] 在4℃用50mM碳酸盐缓冲液pH 9.5中的4B3 mAb(3 μ g/ml)包被EIA 96孔板(Costar,Corning Inc.)过夜,然后用5%w/v BSA、PBS中的0.05%v/v Tween-20(PBST)在室温下封闭1小时。用PBST洗涤三次后,加入稀释的EphA4-Fc分析物并在室温下孵育1小时。用PBST洗涤3次后,加入PBS中的生物素化1F7 mAb(1 μ g/ml),并在室温下孵育一周。用PBST洗涤3次后,加入在PBS中以1/500稀释的超链霉抗生物素蛋白-HRP(Thermo Fischer Scientific),并在室温下孵育1小时。用PBST洗涤3次后,通过加入OPD(SigmaFast[商标])进行最终检测,在492nm处测量终产物。

[0234] 结果

[0235] 结果示于图19中。EphA2聚糖位点的突变不导致该分子的药代动力学(PK)改善。这些数据突出显示了聚糖位点去除对PK的不可预测性。

[0236] —• MUTant Rat1

[0237] —■ Mutant Rat2

- [0238] → WT Rat1
- [0239] → WT Rat2
- [0240] → WT Rat3

[0241] 本领域技术人员将认识到,除了具体描述的那些以外,可对本文所述的公开内容进行变化和修改。应该理解的是,本公开设想了所有这些变化和修改。本公开还使得能够进行单独地或共同地在本说明书中提及或指示的所有步骤、特征、组合物和化合物以及任何两个或更多个步骤或特征或组合物或化合物的任何和所有组合。

- [0242] 文献目录

- [0243] Altschulet al. (1997) Nucl. Acids. Res. 25 (17) :3389-3402
- [0244] Andre et al. (2007) Proteomics 7:3880-3895
- [0245] Arochoet al. (2011) Cell. Mol. Neurobiol. 31:1057-1069
- [0246] Ausubelet al. (1994-1998) In: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons Inc.
- [0247] Bern et al. (2002) Current Protocols in Bioinformatic John Wiley&Sons, Inc., NJ, USA
- [0248] Bowden et al. (2009) Structure 17:1386-1397
- [0249] Boyd et al. (1992) J. Biol. Chem. 267 (5) :3262-3267
- [0250] Boyd et al. (2014) Nat. Rev. Drug Discovery 13:39-62
- [0251] Breddam and Meldal (1992) European Journal of Biochemistry FEBS 206: 103-107
- [0252] Cooper et al. (2001) Proteomics 1:340-349
- [0253] Coulthardet al. 2014) AMJ Path 18:1493-1503
- [0254] Dave et al. (2015) Curr. Protoc. Protein Sci. 63:16.13.11-16.13.21
- [0255] Egletton and Davis (1997) Peptides 18:1431-1439
- [0256] Elliot et al. (2003) Nature Biotechnology 21 (4) :414-421
- [0257] Fabeset al. (2006) Eur. J. Neurosci. 23:1721-1730
- [0258] Ferlugaet al. (2013) J. Biol. Chem. 288 (25) :18448-18457
- [0259] Fix (1996) , Pharm Res 13:1760-1764
- [0260] Goetzeet al. (2011) Glycobiology 21 (7) :949-959
- [0261] Goldshmitet al. (2004) J. Neurosci. 24:10,064-10,073
- [0262] Goldshmitet al. (2011) PLoS ONE 6:e24636
- [0263] Hermannet al. (2010) Genesis 48:101-105
- [0264] Jones et al. (2007) Glycobioloty 17 (5) :529-540
- [0265] Kent (2002) Genome Res 12:656-664
- [0266] Kobelevaet al. (2013) Neurodgene Dis. Manag. 3:525-537
- [0267] Langer (1990) Science 249:1527-1533
- [0268] Langmead et al. (2009) Genome Biol 10:R25
- [0269] Li and Durbin (2010) Bioinformatics 26:589-595
- [0270] Mishinaet al. (1985) Nature 313:313,364-369

- [0271] Moremenet al. (2012) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol* 13:448-462
- [0272] Patton (1998) *Nat Biotech* 16:141-143
- [0273] Putney and Burke (1998) *Nat Biotech* 16:153-157
- [0274] Qin et al. (2010) *J.Biol.Chem.* 285:644-654
- [0275] Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990
- [0276] Samanen et al. (1996) *J Pharm Pharmacol* 48:119-135
- [0277] Sayani and Chien (1996) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 13:85-184
- [0278] Schuck and Rossmanith (2000) *Biopolymers* 54:328-341
- [0279] Spanevello et al. (2013) *J.Neurotrauma* 30:1023-1034
- [0280] Takahashi et al. (2008) *Biochimica et Biophysica Acta* 1780:520-524
- [0281] Stork et al. (2008) *J Biol Chem* 283:7804-7812
- [0282] Vaqueuret al. (2013) *Nat Rev Drug Discov* 12:287-305
- [0283] Xu et al. (2013) *Proc Natl.Acad.Sci.USA* 100:14634-14639
- [0284] Yamada et al. (2013) *Virology* 94:270-275
- [0285] Zauneret al. (2013) *Mol.Cell.Proteomics* 12:856-865

序列表

<110> UNIVERSITY OF QUEENSLAND
THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH

<120> 治疗方法以及可用于其中的药剂

<130> 35257575/EJH

<150> AU 2015904387

<151> 2015-10-27

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 756

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 1

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

[0001]

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr
115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro

210

215

220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

[0002]

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Glu

515	520	525
-----	-----	-----

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
530 535 540

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
545 550 555 560

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
565 570 575

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
580 585 590

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
595 600 605

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
610 615 620

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
625 630 635 640

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
645 650 655

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
660 665 670

[0003]

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
675 680 685

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
690 695 700

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
705 710 715 720

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
725 730 735

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
740 745 750

Ser Leu Gly Lys
755

<210> 2

<211> 756

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 2

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
 35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp
 50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
 85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
 100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr
 115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
 130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
 145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
 165 170 175

[0004] Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
 180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Gln Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

 Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

 Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

 Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

 Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

 Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

 Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

 Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

 Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

 Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

 Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

 Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Glu
 515 520 525

 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 530 535 540

 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 545 550 555 560

 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 565 570 575

 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 580 585 590

 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 595 600 605

 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 610 615 620

 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 625 630 635 640

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
645 650 655

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
660 665 670

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
675 680 685

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
690 695 700

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
705 710 715 720

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
725 730 735

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
740 745 750

Ser Leu Gly Lys
755

<210> 3
<211> 756
<212> PRT
<213> 合成的

[0006]

<400> 3

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr
115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
 145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
 165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
 180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

[0007] Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Gln Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Glu
 515 520 525

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 530 535 540

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 545 550 555 560

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 565 570 575

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 580 585 590

[0008] Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 595 600 605

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 610 615 620

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 625 630 635 640

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 645 650 655

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 660 665 670

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 675 680 685

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 690 695 700

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 705 710 715 720

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 725 730 735

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 740 745 750

Ser Leu Gly Lys
 755

<210> 4
 <211> 756
 <212> PRT
 <213> 合成的

<400> 4

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
 20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
 35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp
 50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
 85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
 [0009] 100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr
 115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
 130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
 145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
 165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
 180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

[0010] Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Glu
 515 520 525

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 530 535 540

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 545 550 555 560

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
565 570 575

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
580 585 590

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
595 600 605

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
610 615 620

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
625 630 635 640

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
645 650 655

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
660 665 670

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
675 680 685

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
690 695 700

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
705 710 715 720

[0011]

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
725 730 735

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
740 745 750

Ser Leu Gly Lys
755

<210> 5
<211> 756
<212> PRT
<213> 合成的

<400> 5

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile

65	70	75	80
Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met			
85	90	95	
Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn			
100	105	110	
Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr			
115	120	125	
Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile			
130	135	140	
Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys			
145	150	155	160
Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val			
165	170	175	
Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu			
180	185	190	
Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val			
195	200	205	
Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Gln Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro			
210	215	220	
Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn			
225	230	235	240
Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala			
245	250	255	
Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala			
260	265	270	
Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys			
275	280	285	
Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met			
290	295	300	
Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val			
305	310	315	320
Gln Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly			
325	330	335	
Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala			
340	345	350	
Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr			
355	360	365	
Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu			

370

375

380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Glu
 515 520 525

[0013]

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 530 535 540

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 545 550 555 560

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 565 570 575

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 580 585 590

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 595 600 605

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 610 615 620

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 625 630 635 640

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 645 650 655

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 660 665 670

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

675	680	685
-----	-----	-----

Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
690															
695															
700															

Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr
705															
710															

Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
725															
730															

Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
740															
745															

Ser	Leu	Gly	Lys
755			

<210>	6
<211>	756
<212>	PRT
<213>	合成的

<400>	6
-------	---

Val	Thr	Gly	Ser	Arg	Val	Tyr	Pro	Ala	Asn	Glu	Val	Thr	Leu	Leu	Asp
1															
5															
10															
15															

Ser	Arg	Ser	Val	Gln	Gly	Glu	Leu	Gly	Trp	Ile	Ala	Ser	Pro	Leu	Glu
20															
25															
30															

[0014] Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile

35															
40															

Arg	Thr	Tyr	Gln	Val	Cys	Asn	Val	Met	Glu	Pro	Ser	Gln	Asn	Asn	Trp
50															
55															
60															

Leu	Arg	Thr	Asp	Trp	Ile	Thr	Arg	Glu	Gly	Ala	Gln	Arg	Val	Tyr	Ile
65															
70															
75															
80															

Glu	Ile	Lys	Phe	Thr	Leu	Arg	Asp	Cys	Asn	Ser	Leu	Pro	Gly	Val	Met
85															
90															
95															

Gly	Thr	Cys	Lys	Glu	Thr	Phe	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Asp	Asn
100															
105															
110															

Asp	Lys	Glu	Arg	Phe	Ile	Arg	Glu	Asn	Gln	Phe	Val	Lys	Ile	Asp	Thr
115															
120															

Ile	Ala	Ala	Asp	Glu	Ser	Phe	Thr	Gln	Val	Asp	Ile	Gly	Asp	Arg	Ile
130															
135															
140															

Met	Lys	Leu	Asn	Thr	Glu	Ile	Arg	Asp	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Lys	Lys
145															
150															
155															
160															

Gly	Phe	Tyr	Leu	Ala	Phe	Gln	Asp	Val	Gly	Ala	Cys	Ile	Ala	Leu	Val
165															
170															
175															

Ser	Val	Arg	Val	Phe	Tyr	Lys	Lys	Cys	Pro	Leu	Thr	Val	Arg	Asn	Leu
180															
185															
190															

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Gln Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

[0015] Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Glu
 515 520 525

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 530 535 540

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 545 550 555 560

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 565 570 575

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 580 585 590

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 595 600 605

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 610 615 620

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 625 630 635 640

[0016] Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 645 650 655

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 660 665 670

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 675 680 685

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 690 695 700

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 705 710 715 720

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 725 730 735

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 740 745 750

Ser Leu Gly Lys
 755

<210> 7
 <211> 756
 <212> PRT
 <213> 合成的

<400> 7

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
 20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
 35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp
 50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
 85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
 100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr
 115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
 130 135 140

[0017] Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
 145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
 165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
 180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Gln Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

[0018] Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Glu
 515 520 525

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 530 535 540

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 545 550 555 560

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 565 570 575

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 580 585 590

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 595 600 605

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 610 615 620

 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 625 630 635 640

 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 645 650 655

 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 660 665 670

 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 675 680 685

 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 690 695 700

 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 705 710 715 720

 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 725 730 735

 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 740 745 750

[0019] Ser Leu Gly Lys
755

<210> 8
 <211> 756
 <212> PRT
 <213> 合成的

<400> 8

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr
 115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
 130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
 145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
 165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
 180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Gln Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

[0020] Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Gln Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Glu
 515 520 525

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 530 535 540

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 545 550 555 560

[0021] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 565 570 575

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 580 585 590

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 595 600 605

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 610 615 620

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 625 630 635 640

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 645 650 655

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 660 665 670

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 675 680 685

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 690 695 700

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 705 710 715 720

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
725 730 735

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
740 745 750

Ser Leu Gly Lys
755

<210> 9
<211> 750
<212> PRT
<213> 合成的

<400> 9

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

[0022]

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala	245	250	255
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala	260	265	270
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys	275	280	285
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met	290	295	300
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val	305	310	315	320
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----	-----

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly	325	330	335
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala	340	345	350
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr	355	360	365
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu	370	375	380
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

[0023]

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val	385	390	395	400
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----	-----

Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr	405	410	415
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu	420	425	430
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro	435	440	445
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln	450	455	460
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp	465	470	475	480
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----	-----

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala	485	490	495
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr	500	505	510
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr	515	520	525
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe

530 535 540

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
545 550 555 560

Lys Val Thr Cys Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
565 570 575

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
580 585 590

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
595 600 605

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
610 615 620

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
625 630 635 640

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
645 650 655

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
660 665 670

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
675 680 685

[0024]

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
690 695 700

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
705 710 715 720

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
725 730 735

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
740 745 750

<210> 10

<211> 750

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 10

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
 85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
 100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
 115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
 130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
 145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
 165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
 180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205

[0025] Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Gln Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

序 列 表

CN 108884135 B

26/52 页

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
 [0026] 515 520 525

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 530 535 540

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 545 550 555 560

Lys Val Thr Cys Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 565 570 575

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 580 585 590

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 595 600 605

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 610 615 620

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 625 630 635 640

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
 645 650 655

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
 660 665 670

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
675 680 685

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
690 695 700

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
705 710 715 720

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
725 730 735

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
740 745 750

<210> 11

<211> 750

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 11

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
[0027] 35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Gln Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

[0028] Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
515 520 525

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
530 535 540

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
545 550 555 560

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
565 570 575

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
580 585 590

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
595 600 605

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
610 615 620

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
625 630 635 640

[0029] Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
645 650 655

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
660 665 670

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
675 680 685

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
690 695 700

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
705 710 715 720

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
725 730 735

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
740 745 750

<210> 12

<211> 750

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 12

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
 20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
 35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
 50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
 85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
 100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
 115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
 130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
 145 150 155 160

[0030] Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
 165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
 180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

[0031] Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
 515 520 525

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 530 535 540

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 545 550 555 560

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 565 570 575

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 580 585 590

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 595 600 605

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 610 615 620

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
625 630 635 640

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
645 650 655

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
660 665 670

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
675 680 685

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
690 695 700

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
705 710 715 720

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
725 730 735

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
740 745 750

<210> 13

<211> 750

<212> PRT

<213> 合成的

[0032] <400> 13

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val	Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val	
165	170	175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val	Arg Asn Leu	
180	185	190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser	Ser Leu Val	
195	200	205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Gln Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro		
210	215	220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn			
225	230	235	240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala		
245	250	255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala		
260	265	270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys		
275	280	285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met		
290	295	300

[0033]

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val			
305	310	315	320

Gln Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly		
325	330	335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala		
340	345	350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr		
355	360	365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu		
370	375	380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val			
385	390	395	400

Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr		
405	410	415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu		
420	425	430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro		
435	440	445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln

450	455	460
-----	-----	-----

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
515 520 525

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
530 535 540

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
545 550 555 560

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
565 570 575

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
580 585 590

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
595 600 605

[0034]

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
610 615 620

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
625 630 635 640

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
645 650 655

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
660 665 670

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
675 680 685

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
690 695 700

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
705 710 715 720

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
725 730 735

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
740 745 750

<210> 14

<211> 750
<212> PRT
<213> 合成的

<400> 14

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
115 120 125

[0035] Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Gln Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala
245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala
260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

 Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

 Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

 Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

 Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

 Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

 Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

 Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

 Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

 [0036] Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

 Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

 Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

 Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

 Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

 Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
 515 520 525

 Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 530 535 540

 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 545 550 555 560

 Lys Val Thr Cys Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 565 570 575

 Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 580 585 590

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
595 600 605

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
610 615 620

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
625 630 635 640

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
645 650 655

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
660 665 670

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
675 680 685

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
690 695 700

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
705 710 715 720

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
725 730 735

[0037] Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
740 745 750

<210> 15

<211> 750

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 15

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
 115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
 130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
 145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
 165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
 180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

[0038] Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Gln Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
 515 520 525

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 530 535 540

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 545 550 555 560

[0039] Lys Val Thr Cys Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 565 570 575

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 580 585 590

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 595 600 605

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 610 615 620

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 625 630 635 640

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
 645 650 655

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
 660 665 670

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
 675 680 685

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
 690 695 700

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
 705 710 715 720

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
725 730 735

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
740 745 750

<210> 16
<211> 750
<212> PRT
<213> 合成的

<400> 16

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
[0040] 85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Gln Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320

Gln Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380

[0041] Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
 515 520 525

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 530 535 540

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
545 550 555 560

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
565 570 575

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
580 585 590

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
595 600 605

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
610 615 620

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
625 630 635 640

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
645 650 655

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
660 665 670

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
675 680 685

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
690 695 700

[0042]

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
705 710 715 720

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
725 730 735

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
740 745 750

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> 合成的

<400> 17

gcagctgcgt gcaaaacagc gaagag

26

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> 合成的

<400> 18

ctttcgctg ttttgcacgc agctgc

26

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> 合成的

<400> 19

atcagcaacg tgcaagagac aagcgtg	27
<210> 20 <211> 27 <212> DNA <213> 合成的	
<400> 20 cacgcttgc tcttgcacgt tgctgat	27
<210> 21 <211> 27 <212> DNA <213> 合成的	
<400> 21 ctggcccaca cccaaatacac cttcgag	27
<210> 22 <211> 27 <212> DNA <213> 合成的	
<400> 22 ctcgaaggtg tattgggtgt gggccag	27
<210> 23 <211> 33 <212> DNA <213> 合成的	
<400> 23 aggggtcct gcgtgcagaa cagtgaagaa aag	33
[0043]	
<210> 24 <211> 33 <212> DNA <213> 合成的	
<400> 24 ctttcttca ctgttctgca cgcaggaccc cct	33
<210> 25 <211> 29 <212> DNA <213> 合成的	
<400> 25 gatctccaac gtgccaggag acttctgtg	29
<210> 26 <211> 28 <212> DNA <213> 合成的	
<400> 26 cacagaagtc tcctgcacgt tggagatc	28
<210> 27 <211> 27 <212> DNA <213> 合成的	
<400> 27 ctggcccaca cacagtacac cttcgag	27
<210> 28	

<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	合成的		
<400>	28		
ctcgaaggta tactgtgtt gggccag			27
<210>	29		
<211>	540		
<212>	PRT		
<213>	合成的		
<400>	29		
Met Glu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Cys Phe Ala Leu Leu Trp Gly Cys			
1	5	10	15
Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Gln Gly Lys Glu Val Val Leu Leu			
20	25	30	
Asp Phe Ala Ala Ala Gly Gly Glu Leu Gly Trp Leu Thr His Pro Tyr			
35	40	45	
Gly Lys Gly Trp Asp Leu Met Gln Asn Ile Met Asn Asp Met Pro Ile			
50	55	60	
Tyr Met Tyr Ser Val Cys Asn Val Met Ser Gly Asp Gln Asp Asn Trp			
65	70	75	80
Leu Arg Thr Asn Trp Val Tyr Arg Gly Glu Ala Glu Arg Ile Phe Ile			
85	90	95	
[0044]			
Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg Asp Cys Asn Ser Phe Pro Gly Gly Ala			
100	105	110	
Ser Ser Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Ala Glu Ser Asp Leu			
115	120	125	
Asp Tyr Gly Thr Asn Phe Gln Lys Arg Leu Phe Thr Lys Ile Asp Thr			
130	135	140	
Ile Ala Pro Asp Glu Ile Thr Val Ser Ser Asp Phe Glu Ala Arg His			
145	150	155	160
Val Lys Leu Asn Val Glu Glu Arg Ser Val Gly Pro Leu Thr Arg Lys			
165	170	175	
Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Ile Gly Ala Cys Val Ala Leu Leu			
180	185	190	
Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Lys Cys Pro Glu Leu Leu Gln Gly Leu			
195	200	205	
Ala His Phe Pro Glu Thr Ile Ala Gly Ser Asp Ala Pro Ser Leu Ala			
210	215	220	
Thr Val Ala Gly Thr Cys Val Asp His Ala Val Val Pro Pro Gly Gly			
225	230	235	240
Glu Glu Pro Arg Met His Cys Ala Val Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro			

245	250	255
-----	-----	-----

Ile Gly Gln Cys Leu Cys Gln Ala Gly Tyr Glu Lys Val Glu Asp Ala		
260	265	270

Cys Gln Ala Cys Ser Pro Gly Phe Phe Lys Phe Glu Ala Ser Glu Ser		
275	280	285

Pro Cys Leu Glu Cys Pro Glu His Thr Leu Pro Ser Pro Glu Gly Ala		
290	295	300

Thr Ser Cys Glu Cys Glu Glu Gly Phe Phe Arg Ala Pro Gln Asp Pro		
305	310	315
320		

Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro His Tyr Leu Thr		
325	330	335

Ala Val Gly Met Gly Ala Lys Val Glu Leu Arg Trp Thr Pro Pro Gln		
340	345	350

Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Ile Val Tyr Ser Val Thr Cys Glu Gln		
355	360	365

Cys Trp Pro Glu Ser Gly Glu Cys Gly Pro Cys Glu Ala Ser Val Arg		
370	375	380

Tyr Ser Glu Pro Pro His Gly Leu Thr Arg Thr Ser Val Thr Val Ser		
385	390	395
400		

[0045]

Asp Leu Glu Pro His Met Asn Tyr Thr Phe Thr Val Glu Ala Arg Asn		
405	410	415

Gly Val Ser Gly Leu Val Thr Ser Arg Ser Phe Arg Thr Ala Ser Val		
420	425	430

Ser Ile Asn Gln Thr Glu Pro Pro Lys Val Arg Leu Glu Gly Arg Ser		
435	440	445

Thr Thr Ser Leu Ser Val Trp Ser Ile Pro Pro Pro Gln Gln Ser		
450	455	460

Arg Val Trp Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Arg Lys Lys Gly Asp Ser Asn		
465	470	475
480		

Ser Tyr Asn Val Arg Arg Thr Glu Gly Phe Ser Val Thr Leu Asp Asp		
485	490	495

Leu Ala Pro Asp Thr Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu Thr Gln		
500	505	510

Glu Gly Gln Gly Ala Gly Ser Lys Val His Glu Phe Gln Thr Leu Ser		
515	520	525

Pro Glu Gly Ser Gly Asn Leu Ala Val Ile Gly Gly		
530	535	540

<210> 30

<211> 541
<212> PRT
<213> 合成的

<400> 30

Met Asp Cys Gln Leu Ser Ile Leu Leu Leu Ser Cys Ser Val Leu
1 5 10 15

Asp Ser Phe Gly Glu Leu Ile Pro Gln Pro Ser Asn Glu Val Asn Leu
20 25 30

Leu Asp Ser Lys Thr Ile Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ser Tyr Pro
35 40 45

Ser His Gly Trp Glu Glu Ile Ser Gly Val Asp Glu His Tyr Thr Pro
50 55 60

Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Asp His Ser Gln Asn Asn
65 70 75 80

Trp Leu Arg Thr Asn Trp Val Pro Arg Asn Ser Ala Gln Lys Ile Tyr
85 90 95

Val Glu Leu Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Ile Pro Leu Val
100 105 110

Leu Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Met Glu Ser Asp
115 120 125

[0046] Asp Asp His Gly Val Lys Phe Arg Glu His Gln Phe Thr Lys Ile Asp
130 135 140

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

Ile Leu Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Glu Val Gly Pro Val Asn Lys
165 170 175

Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Val Ala Leu
180 185 190

Val Ser Val Arg Val Tyr Phe Lys Lys Cys Pro Phe Thr Val Lys Asn
195 200 205

Leu Ala Met Phe Pro Asp Thr Val Pro Met Asp Ser Gln Ser Leu Val
210 215 220

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Lys Glu Glu Asp Pro Pro
225 230 235 240

Arg Met Tyr Cys Ser Thr Glu Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Lys
245 250 255

Cys Ser Cys Asn Ala Gly Tyr Glu Glu Arg Gly Phe Met Cys Gln Ala
260 265 270

Cys Arg Pro Gly Phe Tyr Lys Ala Leu Asp Gly Asn Met Lys Cys Ala
275 280 285

Lys Cys Pro Pro His Ser Ser Thr Gln Glu Asp Gly Ser Met Asn Cys
 290 295 300

Arg Cys Glu Asn Asn Tyr Phe Arg Ala Asp Lys Asp Pro Pro Ser Met
 305 310 315 320

Ala Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ser Pro Arg Asn Val Ile Ser Asn Ile
 325 330 335

Asn Glu Thr Ser Val Ile Leu Asp Trp Ser Trp Pro Leu Asp Thr Gly
 340 345 350

Gly Arg Lys Asp Val Thr Phe Asn Ile Ile Cys Lys Lys Cys Gly Trp
 355 360 365

Asn Ile Lys Gln Cys Glu Pro Cys Ser Pro Asn Val Arg Phe Leu Pro
 370 375 380

Arg Gln Phe Gly Leu Thr Asn Thr Thr Val Thr Val Thr Asp Leu Leu
 385 390 395 400

Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Asp Ala Val Asn Gly Val Ser
 405 410 415

Glu Leu Ser Ser Pro Pro Arg Gln Phe Ala Ala Val Ser Ile Thr Thr
 420 425 430

[0047] Asn Gln Ala Ala Pro Ser Pro Val Leu Thr Ile Lys Lys Asp Arg Thr
 435 440 445

Ser Arg Asn Ser Ile Ser Leu Ser Trp Gln Glu Pro Glu His Pro Asn
 450 455 460

Gly Ile Ile Leu Asp Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Gln Glu Gln
 465 470 475 480

Glu Thr Ser Tyr Thr Ile Leu Arg Ala Arg Gly Thr Asn Val Thr Ile
 485 490 495

Ser Ser Leu Lys Pro Asp Thr Ile Tyr Val Phe Gln Ile Arg Ala Arg
 500 505 510

Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Thr Asn Ser Arg Lys Phe Glu Phe Glu Thr
 515 520 525

Ser Pro Asp Ser Phe Ser Ile Ser Gly Glu Ser Ser Gln
 530 535 540

<210> 31
 <211> 547
 <212> PRT
 <213> 合成的

<400> 31

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile
 1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr
 20 25 30

Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser
 35 40 45

Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn
 50 55 60

Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln
 65 70 75 80

Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg
 85 90 95

Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro
 100 105 110

Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu
 115 120 125

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys
 130 135 140

Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly
 145 150 155 160

[0048] Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu
 165 170 175

Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile
 180 185 190

Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val
 195 200 205

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

Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys
 225 230 235 240

Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro
 245 250 255

Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu
 260 265 270

Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala
 275 280 285

Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala
 290 295 300

Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala
 305 310 315 320

Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile
325 330 335

Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln
340 345 350

Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys
355 360 365

Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val
370 375 380

His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile
385 390 395 400

Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val
405 410 415

Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val
420 425 430

Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln
435 440 445

Ala Lys Glu Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro
450 455 460

[0049] Asp Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Val Lys Tyr Tyr Glu
465 470 475 480

Lys Asp Gln Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg
485 490 495

Asn Thr Asp Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His
500 505 510

Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu
515 520 525

Glu Val Thr Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala
530 535 540

Asn Ser Thr
545

<210> 32
<211> 537
<212> PRT
<213> 合成的

<400> 32

Met Glu Leu Arg Val Leu Leu Cys Trp Ala Ser Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Glu Glu Thr Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Thr Ala Asp Leu Lys Trp
20 25 30

Val Thr Phe Pro Gln Val Asp Gly Gln Trp Glu Glu Leu Ser Gly Leu
 35 40 45

Asp Glu Glu Gln His Ser Val Arg Thr Tyr Glu Val Cys Asp Val Gln
 50 55 60

Arg Ala Pro Gly Gln Ala His Trp Leu Arg Thr Gly Trp Val Pro Arg
 65 70 75 80

Arg Gly Ala Val His Val Tyr Ala Thr Leu Arg Phe Thr Met Leu Glu
 85 90 95

Cys Leu Ser Leu Pro Arg Ala Gly Arg Ser Cys Lys Glu Thr Phe Thr
 100 105 110

Val Phe Tyr Tyr Glu Ser Asp Ala Asp Thr Ala Thr Ala Leu Thr Pro
 115 120 125

Ala Trp Met Glu Asn Pro Tyr Ile Lys Val Asp Thr Val Ala Ala Glu
 130 135 140

His Leu Thr Arg Lys Arg Pro Gly Ala Glu Ala Thr Gly Lys Val Asn
 145 150 155 160

Val Lys Thr Leu Arg Leu Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu
 165 170 175

Ala Phe Gln Asp Gln Gly Ala Cys Met Ala Leu Leu Ser Leu His Leu
 [0050] 180 185 190

Phe Tyr Lys Lys Cys Ala Gln Leu Thr Val Asn Leu Thr Arg Phe Pro
 195 200 205

Glu Thr Val Pro Arg Glu Leu Val Val Pro Val Ala Gly Ser Cys Val
 210 215 220

Val Asp Ala Val Pro Ala Pro Gly Pro Ser Pro Ser Leu Tyr Cys Arg
 225 230 235 240

Glu Asp Gly Gln Trp Ala Glu Gln Pro Val Thr Gly Cys Ser Cys Ala
 245 250 255

Pro Gly Phe Glu Ala Ala Glu Gly Asn Thr Lys Cys Arg Ala Cys Ala
 260 265 270

Gln Gly Thr Phe Lys Pro Leu Ser Gly Glu Gly Ser Cys Gln Pro Cys
 275 280 285

Pro Ala Asn Ser His Ser Asn Thr Ile Gly Ser Ala Val Cys Gln Cys
 290 295 300

Arg Val Gly Tyr Phe Arg Ala Arg Thr Asp Pro Arg Gly Ala Pro Cys
 305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Ser Ala Pro Arg Ser Val Val Ser Arg Leu Asn Gly
 325 330 335

Ser Ser Leu His Leu Glu Trp Ser Ala Pro Leu Glu Ser Gly Gly Arg
340 345 350

Glu Asp Leu Thr Tyr Ala Leu Arg Cys Arg Glu Cys Arg Pro Gly Gly
355 360 365

Ser Cys Ala Pro Cys Gly Gly Asp Leu Thr Phe Asp Pro Gly Pro Arg
370 375 380

Asp Leu Val Glu Pro Trp Val Val Val Arg Gly Leu Arg Pro Asp Phe
385 390 395 400

Thr Tyr Thr Phe Glu Val Thr Ala Leu Asn Gly Val Ser Ser Leu Ala
405 410 415

Thr Gly Pro Val Pro Phe Glu Pro Val Asn Val Thr Thr Asp Arg Glu
420 425 430

Val Pro Pro Ala Val Ser Asp Ile Arg Val Thr Arg Ser Ser Pro Ser
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ala Trp Ala Val Pro Arg Ala Pro Ser Gly Ala Val
450 455 460

Leu Asp Tyr Glu Val Lys Tyr His Glu Lys Gly Ala Glu Gly Pro Ser
465 470 475 480

Ser Val Arg Phe Leu Lys Thr Ser Glu Asn Arg Ala Glu Leu Arg Gly
485 490 495

[0051]

Leu Lys Arg Gly Ala Ser Tyr Leu Val Gln Val Arg Ala Arg Ser Glu
500 505 510

Ala Gly Tyr Gly Pro Phe Gly Gln Glu His His Ser Gln Thr Gln Leu
515 520 525

Asp Glu Ser Glu Gly Trp Arg Glu Gln
530 535

<210> 33

<211> 19

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 33

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15

Cys Asp Ala

<210> 34

<211> 25

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 34

Val Ser Ile Thr Arg Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu
1 5 10 15

Ile Trp Ala Val Asn Gly Val Ser Lys
20 25

<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> 合成的

<400> 35

Gly Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro Lys
1 5 10

<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> 合成的

<400> 36

[0052] Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
1 5 10

<210> 37
<211> 41
<212> PRT
<213> 合成的

<400> 37

Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala
1 5 10 15

Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val Asn Glu Thr Val Asn Leu Glu Trp
20 25 30

Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly Gly Arg
35 40

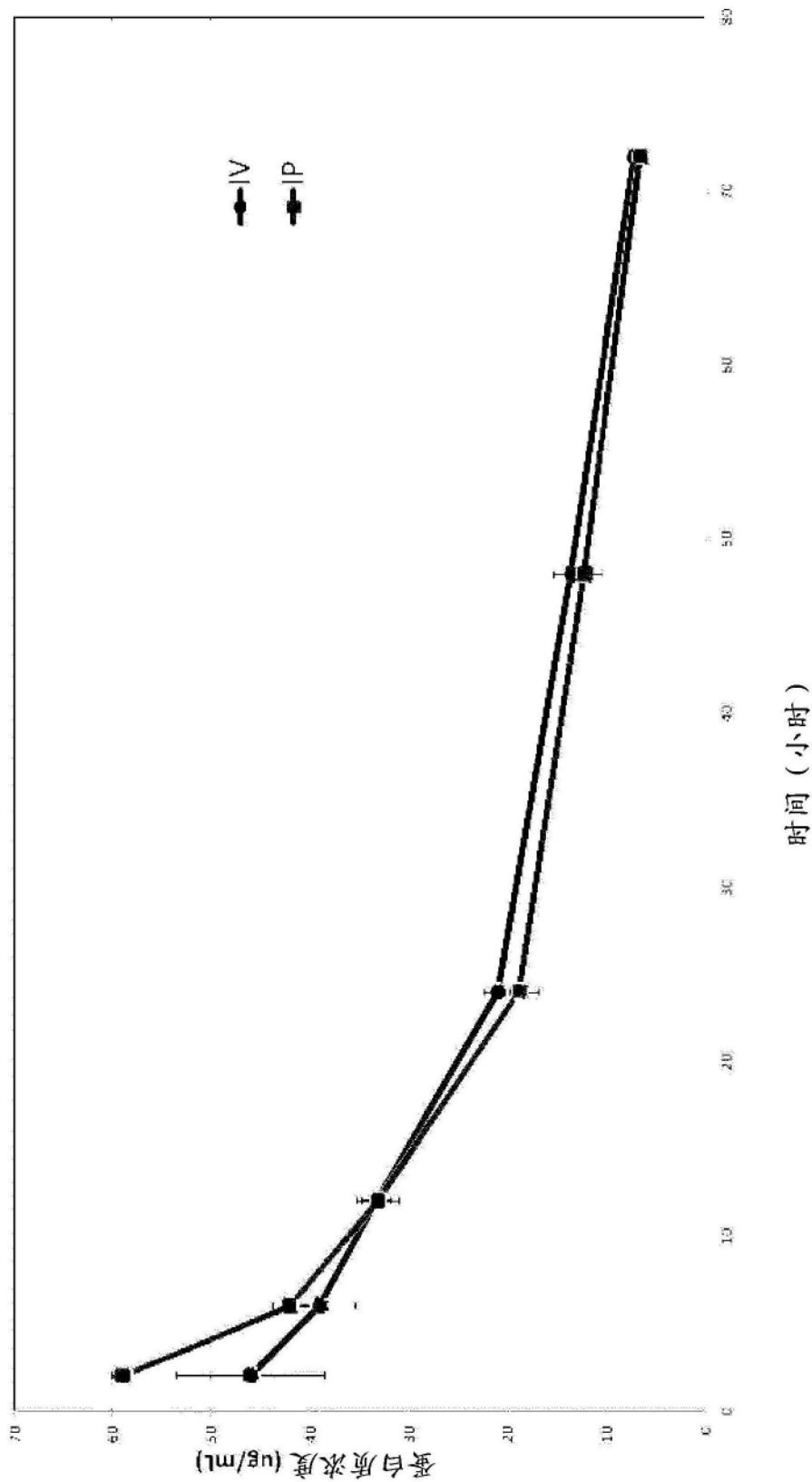


图1

A

VTGSRVYPANEVTLLDSRSVQGELGWIASPLEGGWEEVSIMDEKNTPIRTYQVCNVMEPSQNNWLRTDWITREGAQRVYI 80
 EIKFTLRDCNSLPGVMGCKETFNLYYYESDNDKERFIRENQFVKIDTIAADESFTQVDIGDRIMKLNTIEDVGPLSKK 160
 GFYLAQFDVGACIALVSVRVFYKKCPLTVRNLAQFPDTITGADTSSLVEVRGSCVNSEEKDPKMYCGADGEWLVPIGN 240
 CLCNAGHEERSGECQACKIGYYKALSTDATCAKCPPHSYSVWEGATSCDRGFFRADNDAASMPCTRPPSAPLNLISNV 320
 NETSVNLEWSSPQNTGGRQDIISYNVVCKKCGAGDPSKCRPCGGVHYTPQQNGLKTTKVSITDLLAHTNYTFEIWA
 NGV 400
 SKYNPNPDQSVSUTVTTNQAAPSSIALVQAKEVTRYSVVALAWLEPDRPNVGILEYEVKYYEKDQNERSYRIVRTAARNTD 480
 IKGLNPLTSYVFHVRARTAAGYGDFSEPLEVTTNTVPSRIIGDGANSES KYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTL 560
 MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS 640
 TEKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT 720
 VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:1)

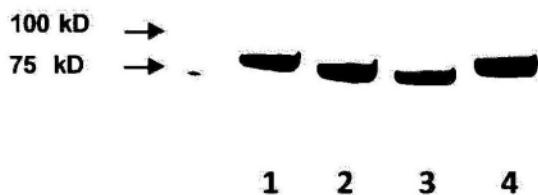
B**C**

图2

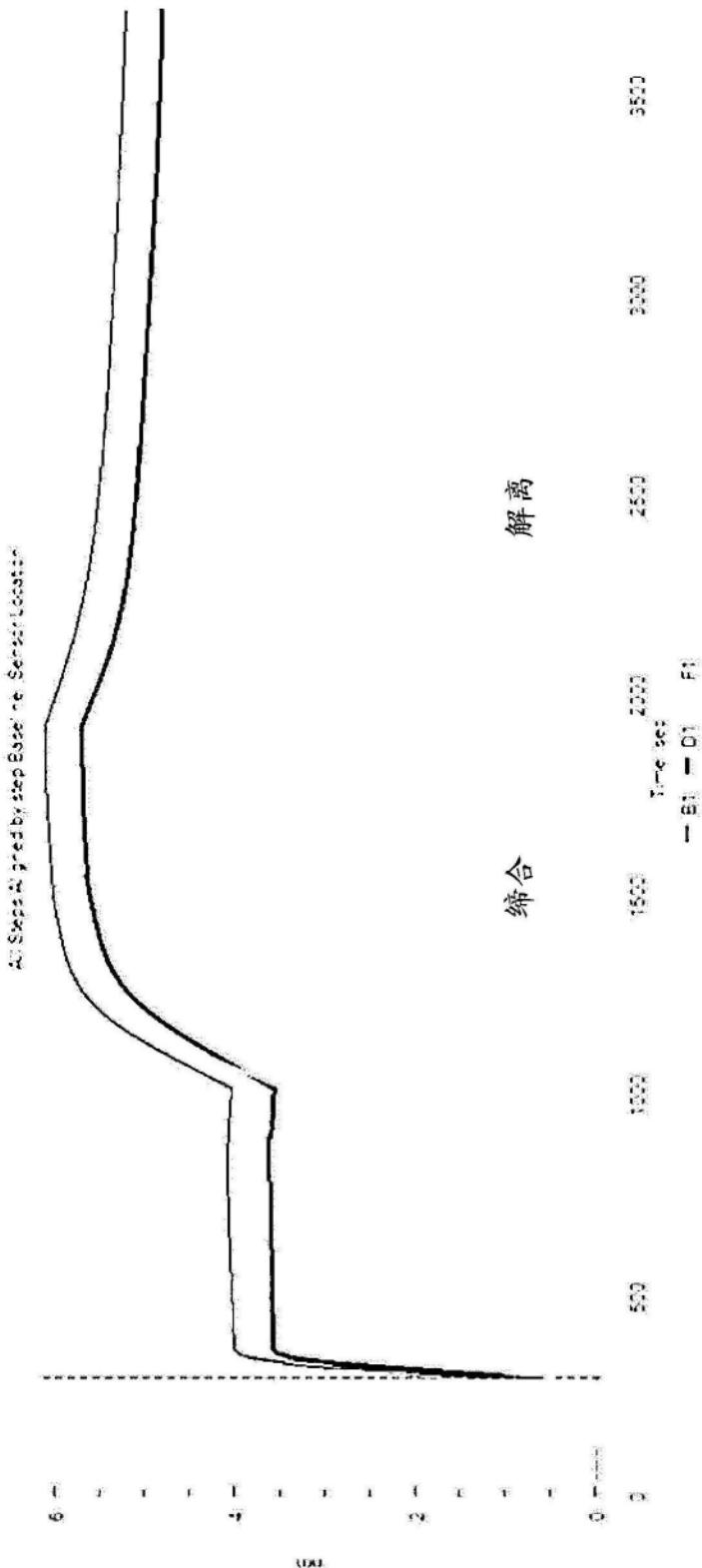


图3

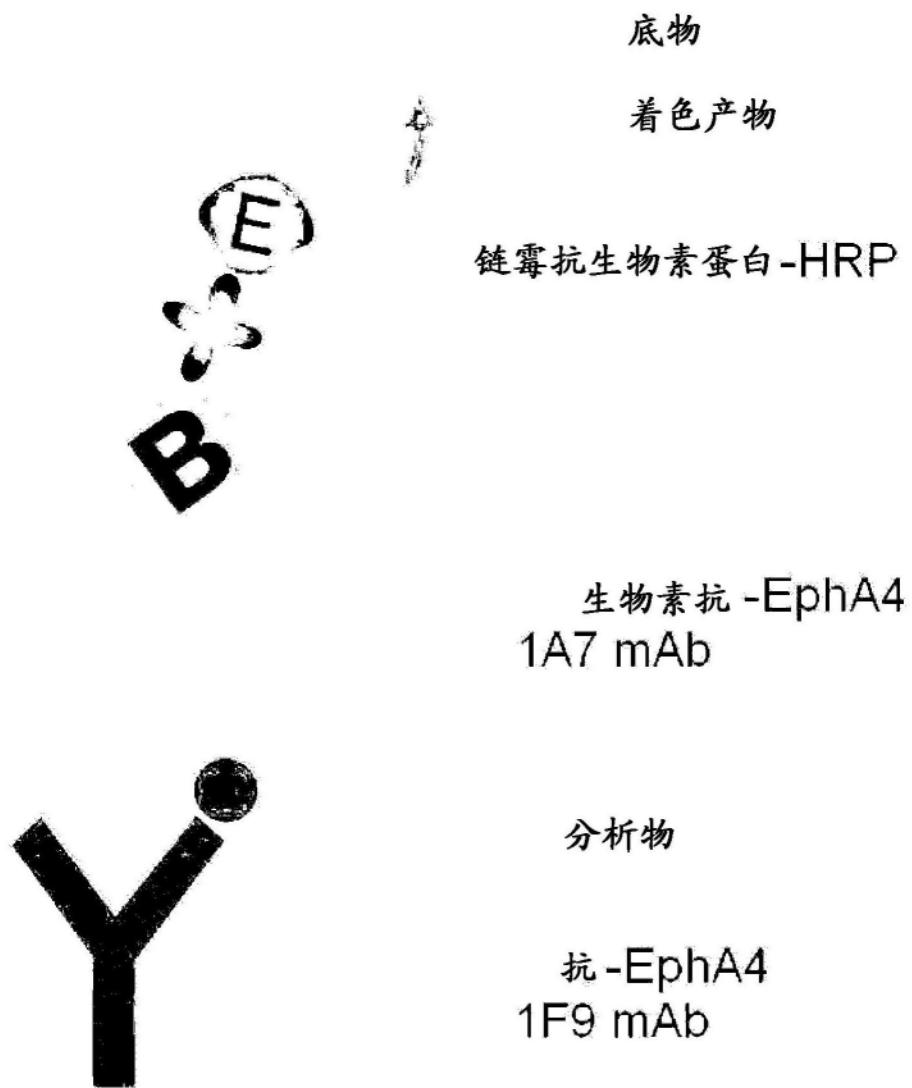


图4

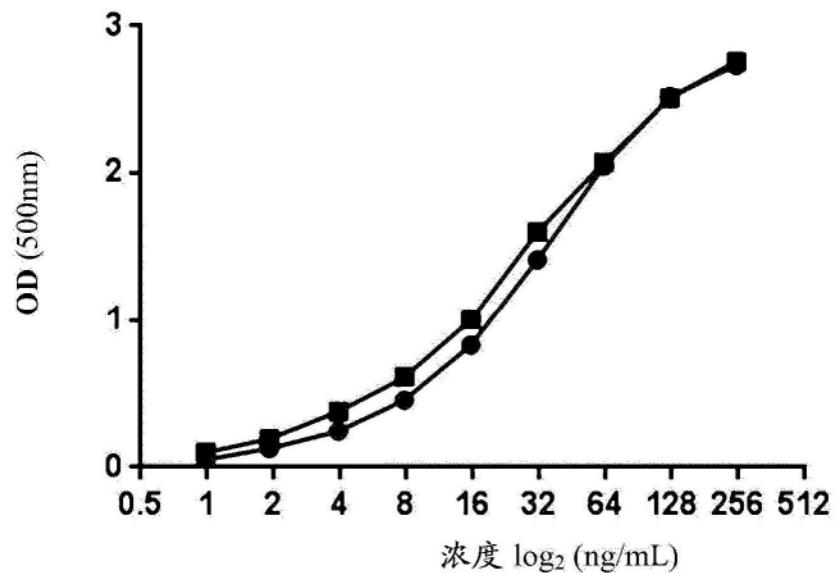


图5

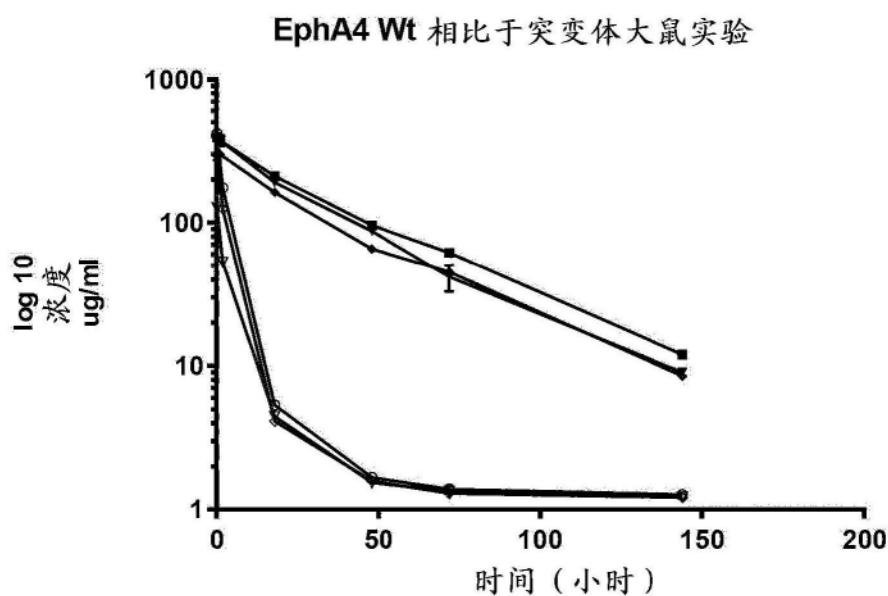


图6

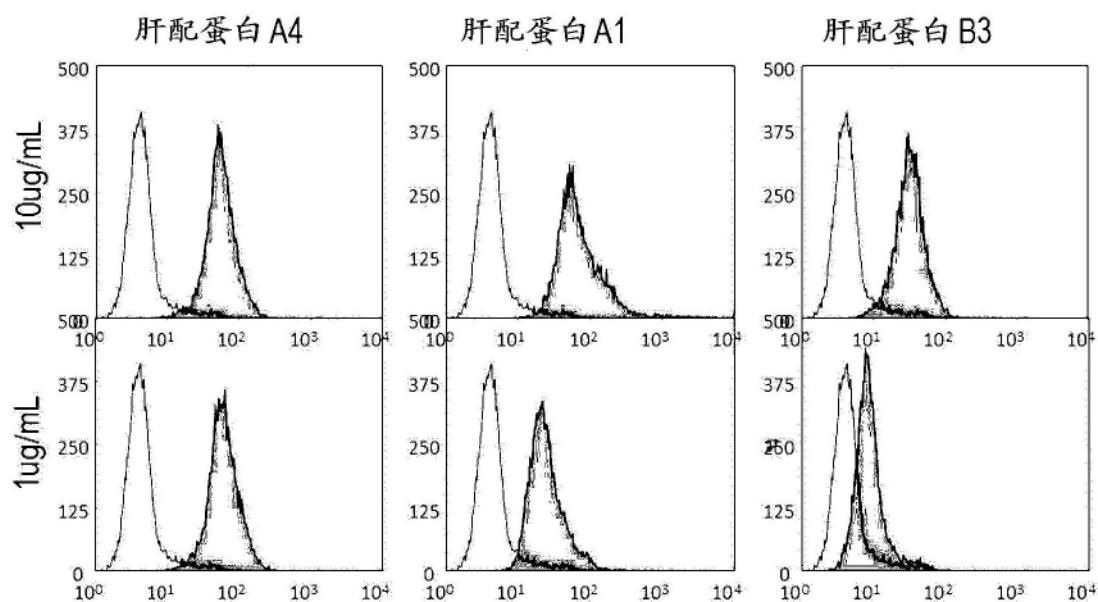


图7

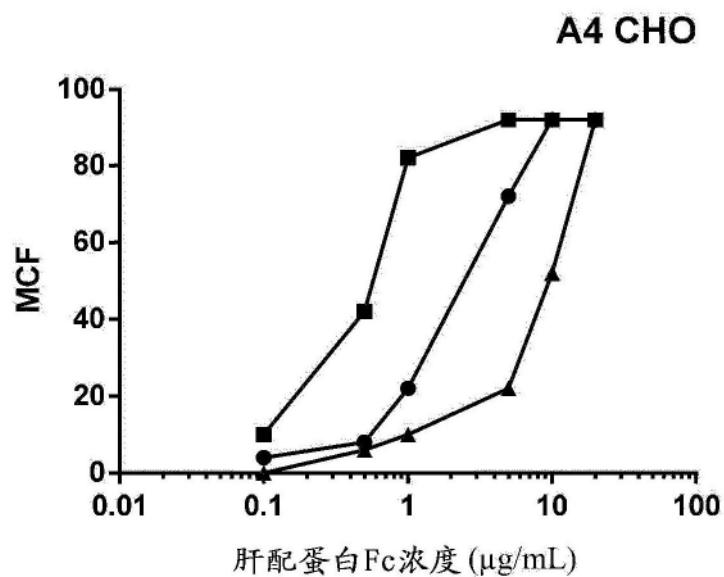


图8

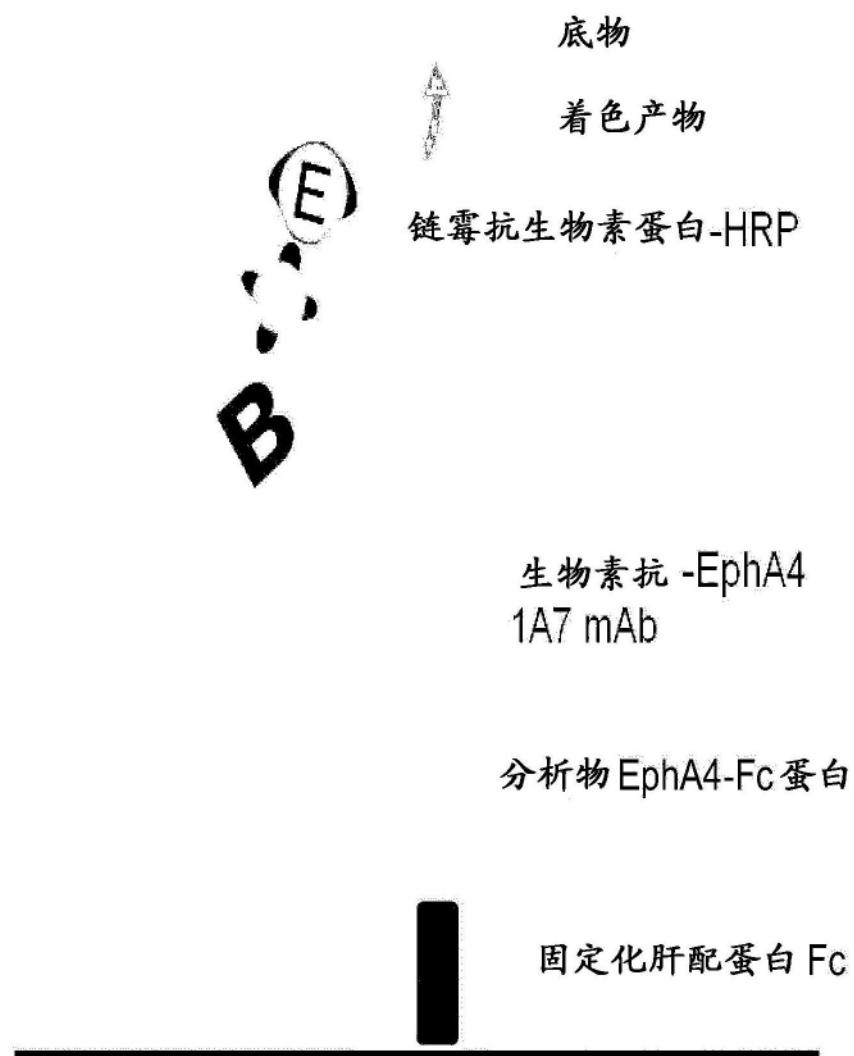
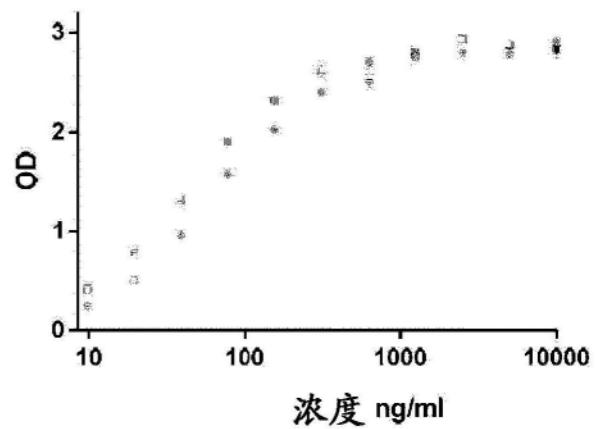


图9

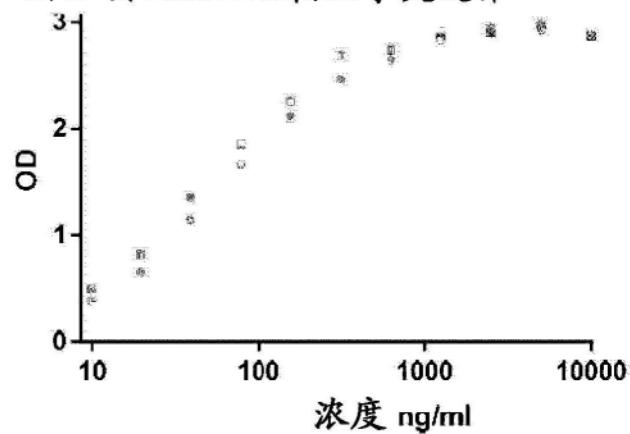
A

肝配蛋白A4:WT 相比于突变体



B

肝配蛋白A5:WT 相比于突变体



C

肝配蛋白B3: WT 相比于突变体

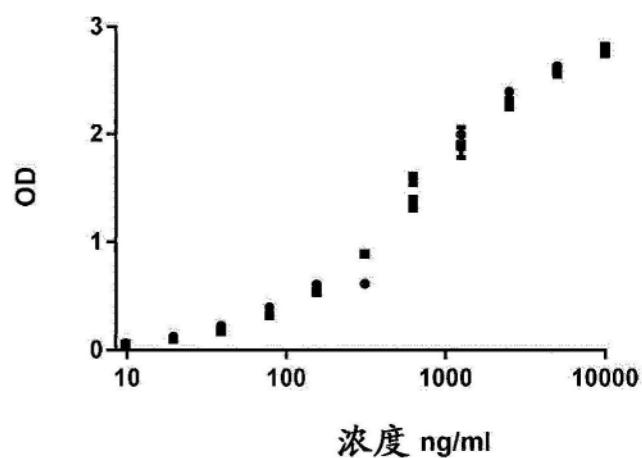


图10

A. 包括23个氨基酸信号序列的EphA2胞外区

10	20	30	40	50
MELQAAARACF	ALLWGCALAA	AAAAAQGKEVV	LLDFAAAGGE	LGWLTHPYGK
60	70	80	90	100
GWDLMQNIMN	DMPIYMY SVC	NVMSGDQDNW	LRTNWVYRGE	AERIFIELKF
110	120	130	140	150
TVRDCNSFPG	GASSCKETFN	LYYAESLDY	GTNFQKRLFT	KIDTIAPDEI
160	170	180	190	200
TVSSDFEARH	VKLNVEERSV	GPLTRKGFY L	AFQDIGACVA	LLSVRVYYKK
210	220	230	240	250
CPELLQGLAH	FPETIAGSDA	PSLATVAGTC	VDHAVVPPGG	EEPRMHCAVD
260	270	280	290	300
GEWLVPIGQC	LCQAGYEKVE	DACQACSPGF	FKFEASESPC	LECPHTLPS
310	320	330	340	350
PEGATSCECE	EGFFRAPQDP	ASMPCTRPPS	APHYLTA VGM	GAKVELRWTP
360	370	380	390	400
PQDSGGREDI	VYSVTCEQCW	PESGECPGPCE	ASVRYSEPPH	GLTRTSVTVS
410	420	430	440	450
DLEPHM NYTF	TVEARNGVSG	LVTSR SFRTA	SVSIN QTEPP	KVRLEGRSTT
460	470	480	490	500
SLSVSW SIPP	PQQSRVWKYE	VTYRKKGDSN	SYNVRRT EGF	SVTLDDLAPD
510	520	530	540	550
TTYLVQVQAL	TQEGQGAGSK	VHEFQTLSPE	GSGNLAVIGG	

(SEQ ID NO:29)

B. 包括20个氨基酸信号序列的EphA3胞外区

10	20	30	40	50
MDCQLSILL	LSCSVLD SFG	ELIPQPSNEV	NLLDSKTIQG	ELGWISYP SH
60	70	80	90	100
GWEEISGVDE	HYTPIRTYQV	CNVM DHSQNN	WLRTNWVPRN	SAQK IYVELK
110	120	130	140	150
FTLRDCNSIP	LVLGTCKETF	NLYYME SDDD	HGVKFREHQF	TKIDTIAADE
160	170	180	190	200
SFTQMDLGDR	ILKL NTEIRE	VGPVNKKGFY	LAFQDV GACV	ALVSVRVYFK
210	220	230	240	250
KCPFTVKNLA	MFPDTVP MDS	QSLVEVRGSC	VN NSKEEDPP	RMYCSTEGEW
260	270	280	290	300
LVPIGKCSCN	AGYEERGFMC	QACRPGFYKA	LDGNM KCAKC	PPHSSTQEDG
310	320	330	340	350
SMNCRCEN NY	FRADKDPPSM	ACTRPPSSPR	NVISNI NETS	VILDWSWPLD
360	370	380	390	400
TGGRKDVT FN	IICKKCGWNI	KQCEPCSPNV	RFLPRQFGLT	NT TTVTVT DLL
410	420	430	440	450
AHT NYTF EID	AVNGVSELSS	PPRQFAAVSI	TTNQAAPSPV	LTIKKDR TSR
460	470	480	490	500
NSISLSWQEP	EHPNGIILDY	EVKYYEKQEQ	ETSYTILRAR	GT N VTISSLK
510	520	530	540	550
PDTIYVFQIR	ARTAAGYGTN	SRKF EFE TSP	DSFSISGE SS	Q

(SEQ ID NO:30)

图11A和B

C. 包括19个氨基酸信号序列的EphA4胞外区

10	20	30	40	50
MAGIFYFALF	SCLFGICDAV	TGSRVYPANE	VTLLDSRSVQ	GELGWIASPL
60	70	80	90	100
EGGWEEVSIM	DEKNTPIRTY	QVCNVMEPSQ	NNWLRTDWIT	REGAQRVYIE
110	120	130	140	150
IKFTLRLDCNS	LPGVMGTCKE	TFNLYYYYESD	NDKERFIREN	QFVKIDTIAA
160	170	180	190	200
DESFTQVDIG	DRIMKLNTEI	RDVGPLSKKG	FYLAFQDVGA	CIALVSVRVF
210	220	230	240	250
YKKCPLTVRN	LAQFPDTITG	ADTSSLVEVR	GSCVNNSEEK	DVPKMYCGAD
260	270	280	290	300
GEWLVPIGNC	LCNAGHEERS	GECQACKIGY	YKALSTDATC	AKCPPHSYSV
310	320	330	340	350
WEGATSCCTCD	RGFFRADNDA	ASMPCTRPPS	APLNLISNVN	ETSVNLEWSS
360	370	380	390	400
PQNTGGRQDI	SYNVVCKKCG	AGDPSKCRPC	GSGVHYTPQQ	NGLKTTKVSI
410	420	430	440	450
TDLLAHTNYT	FEIWAVNGVS	KYNPNPDQSV	SVTVTTNQAA	PSSIALVQAK
460	470	480	490	500
EVTRYVALA	WLEPDRPNVG	ILEYEVKYYE	KDQNERSYRI	VRTAARNTDI
510	520	530	540	550
KGLNPLTSYV FHVRARTAAG YGDFSEPLEV TTNTVPSRII GDGANST				
(SEQ ID NO:31)				

D. 包括15个氨基酸信号序列的EphB4胞外区

10	20	30	40	50
MELRVLLCWA	SLAAALEETL	LNTKLETADL	KWVTFPQVDG	QWEELSGLDE
60	70	80	90	100
EQHSVRYTYEV	CDVQRAPGQA	HWLRTGWVPR	RGAVHVYATL	RFTMLECLSL
110	120	130	140	150
PRAGRSCCKET	FTVFYYESDA	DTATALTPAW	MENPYIKVDT	VAAEHLTRKR
160	170	180	190	200
PGAEATGKVN	VKTLRLGPLS	KAGFYLAQDQ	QGACMALLSL	HLFYKKCAQL
210	220	230	240	250
TVNLTRFPET	VPRELVPVVA	GSCVVDAVPA	PGPSPSLYCR	EDGQWAEQPV
260	270	280	290	300
TGCSCAPGFE	AAEGNTKCR	CAQGTFKPLS	GEGSCQPCPA	NSHSNTIGSA
310	320	330	340	350
VCQCRVGYFR	ARTDPRGAPC	TPPPSAPRSV	VSRLNGSSLH	LEWSAPLESG
360	370	380	390	400
GREDLTYALR	CRECRPGGSC	APCGGDLTFD	PGPRDLVEPW	VVVRGLRPDF
410	420	430	440	450
TYTFEVTALN	GVSSLATGPV	PFEPVNVTTD	REVPPAVSDI	RVTRSSPSSL
460	470	480	490	500
SLAWAVPRAP	SGAVLDYEVK	YHEKGAEGPS	SVRFLKTSEN	RAELRGLKRG
510	520	530	540	550
ASYLQVQRAR SEAGYGPFGQ EHHSQTLDE SEGWREQ				
(SEQ ID NO:32)				

图11C和D

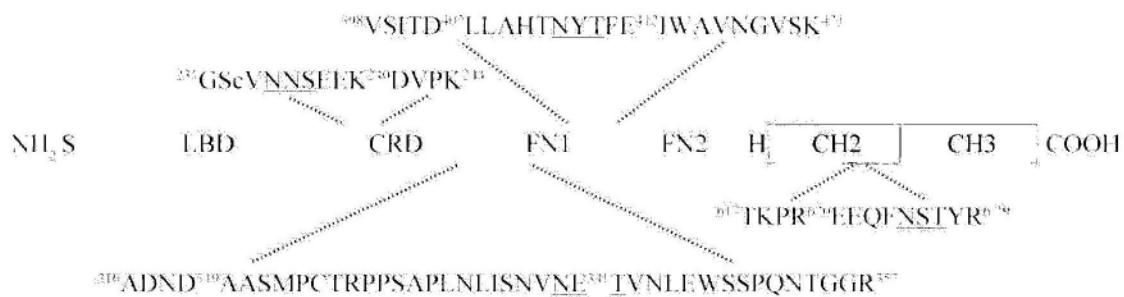


图12

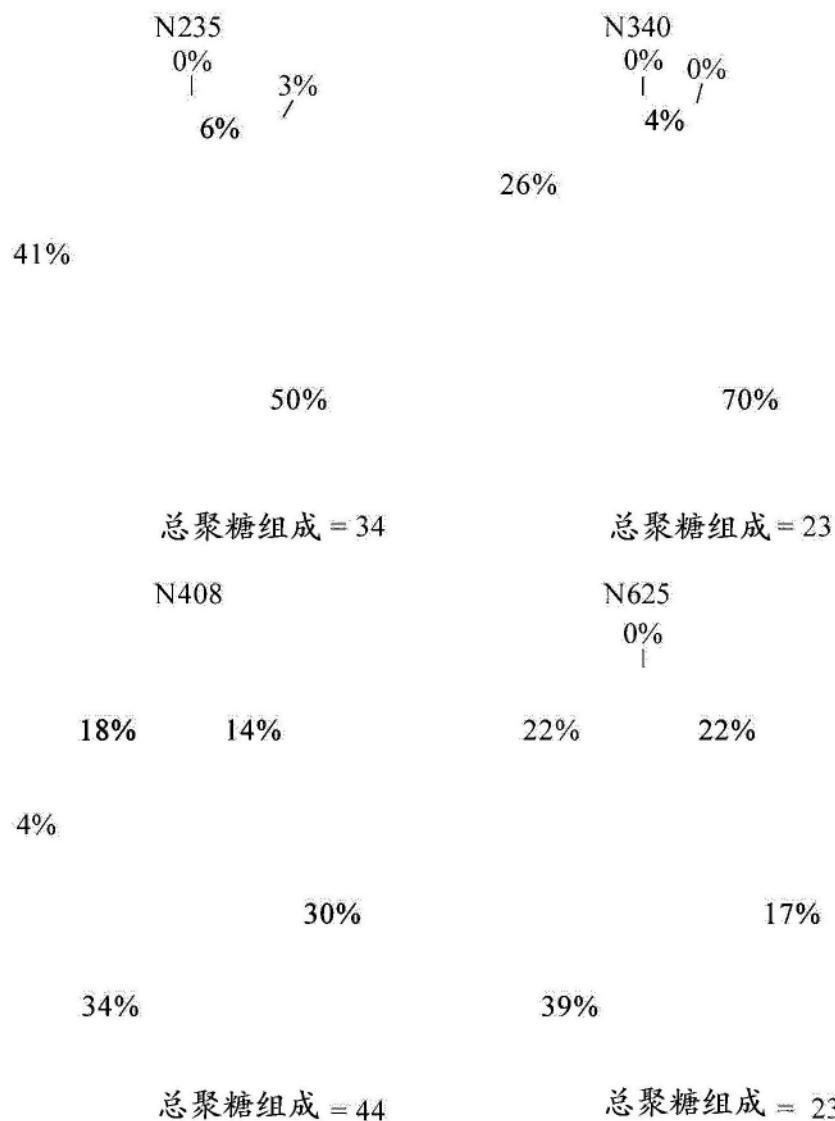


图13

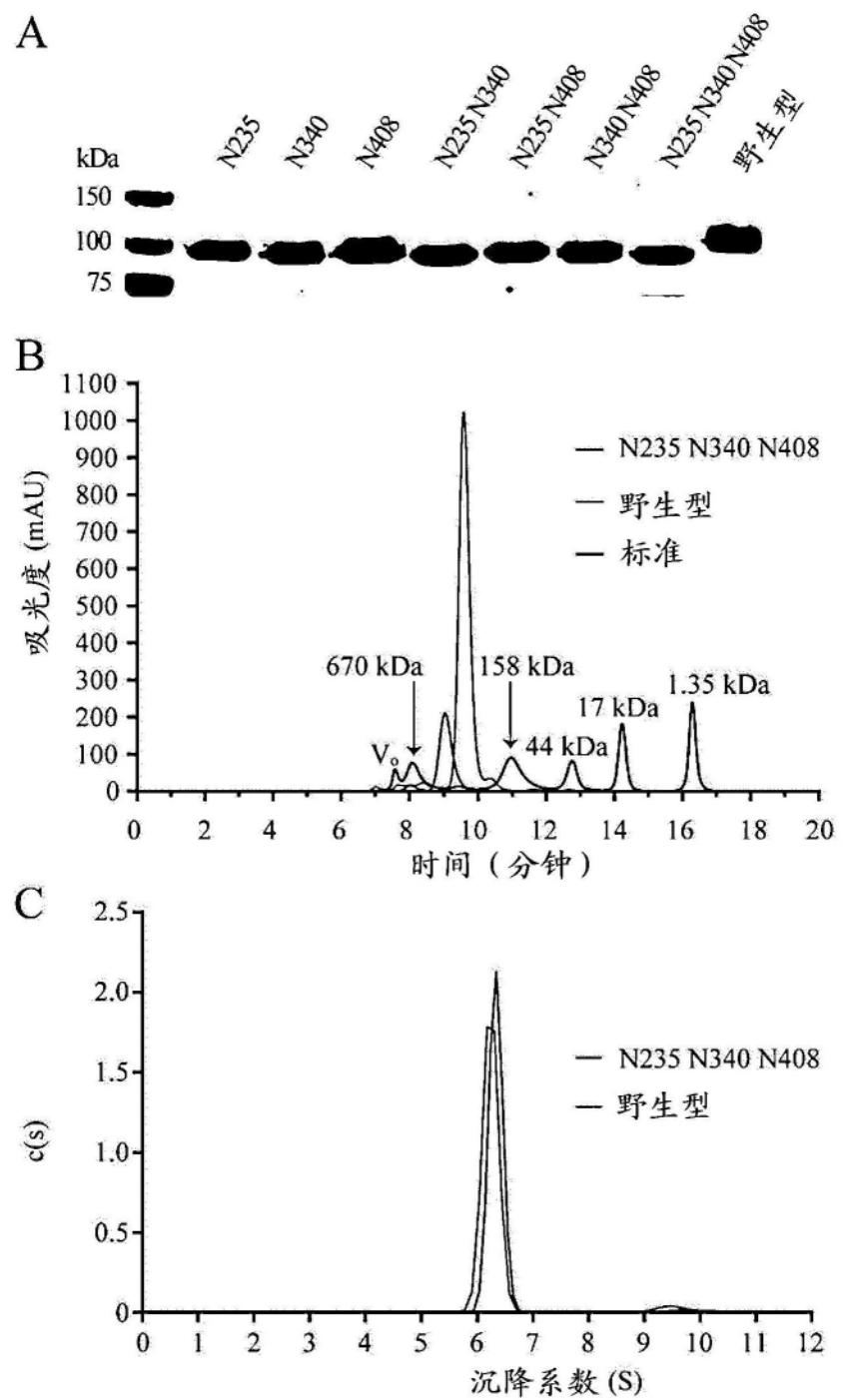
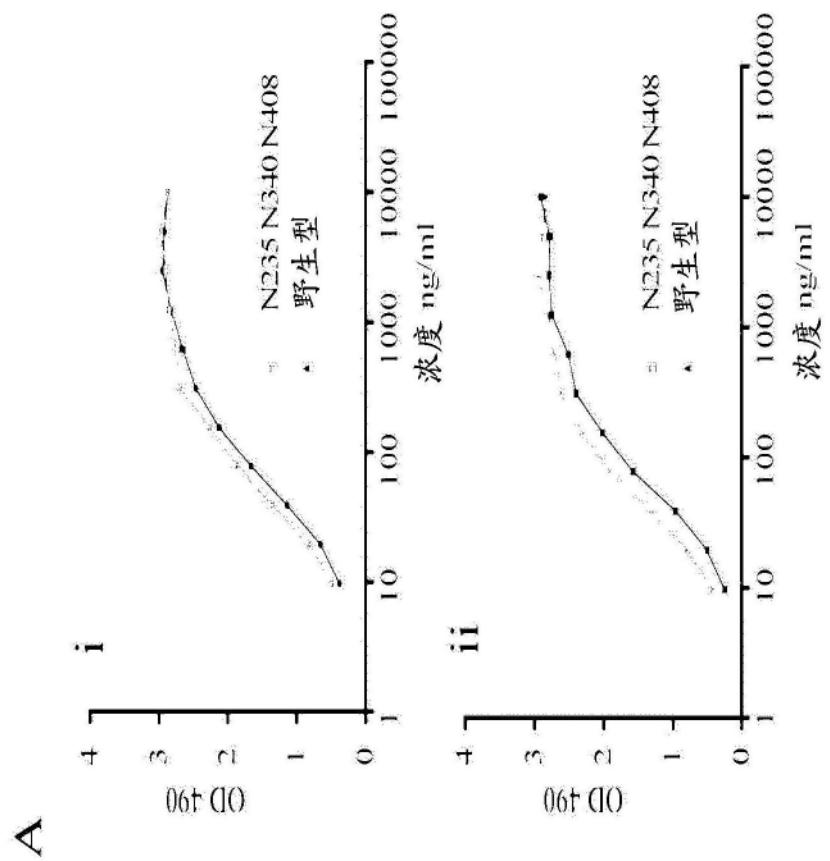


图14



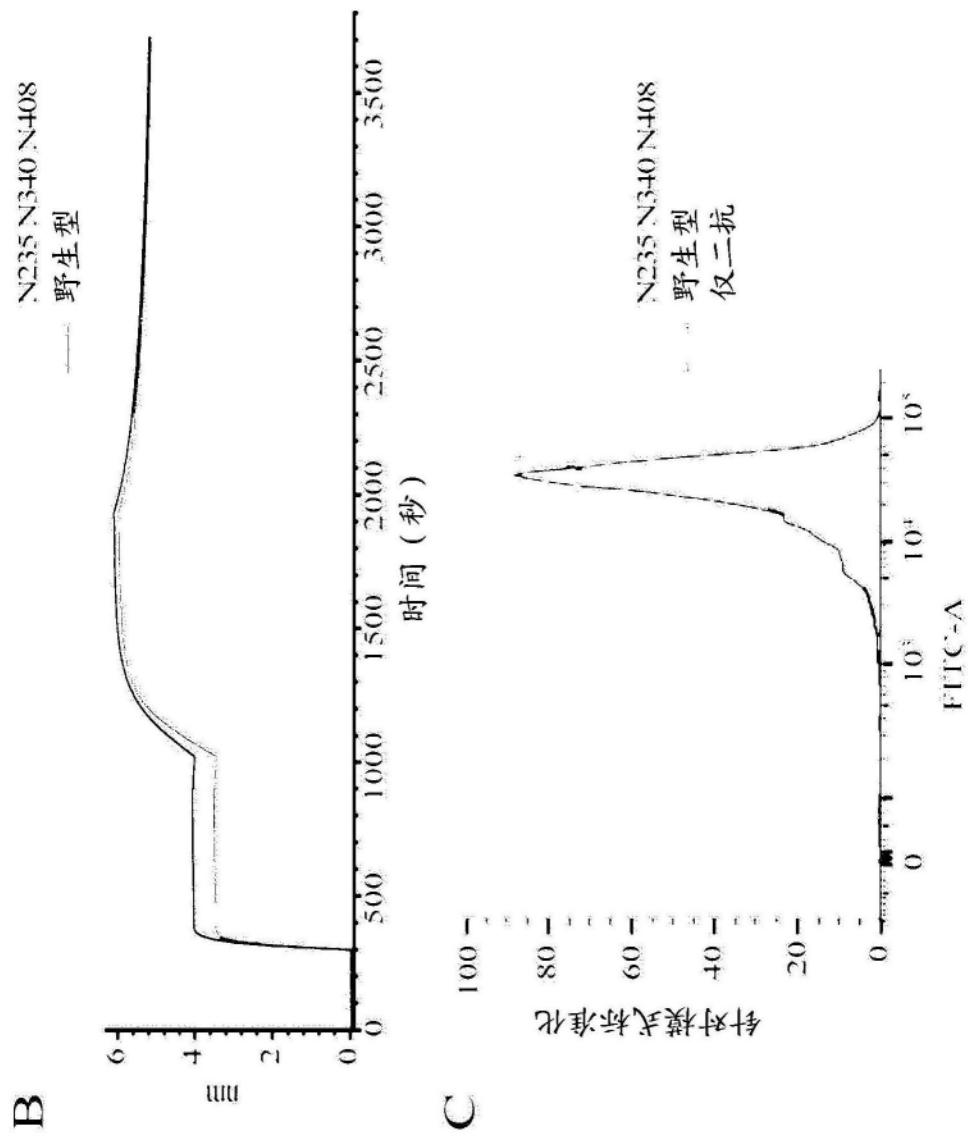
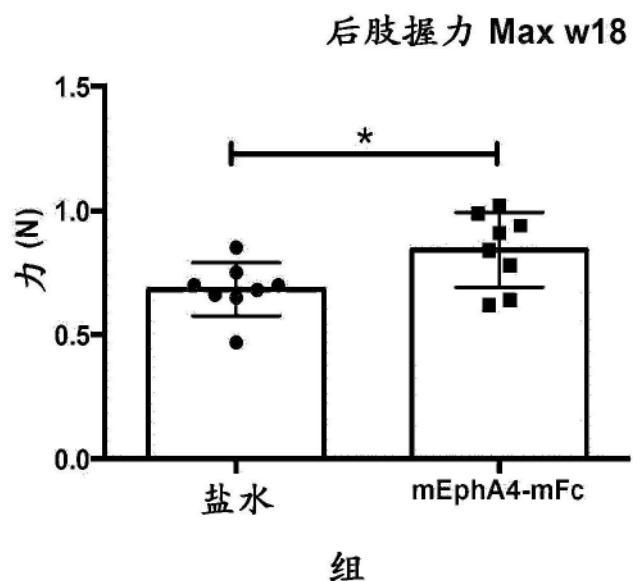


图15

(A)



(b)

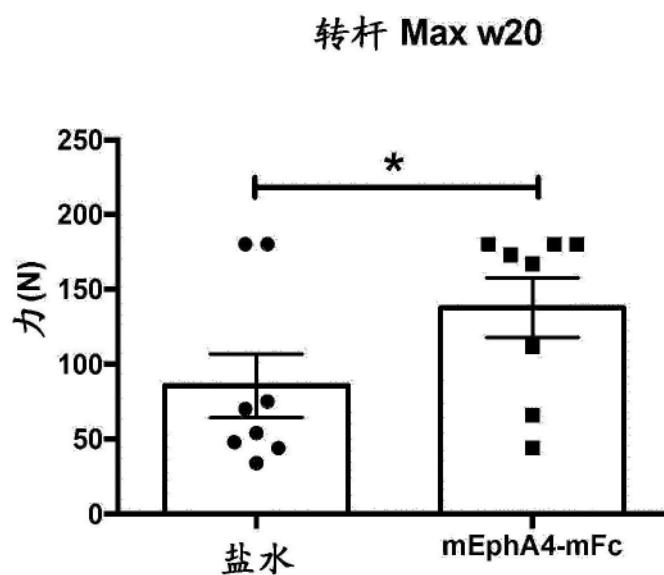


图16

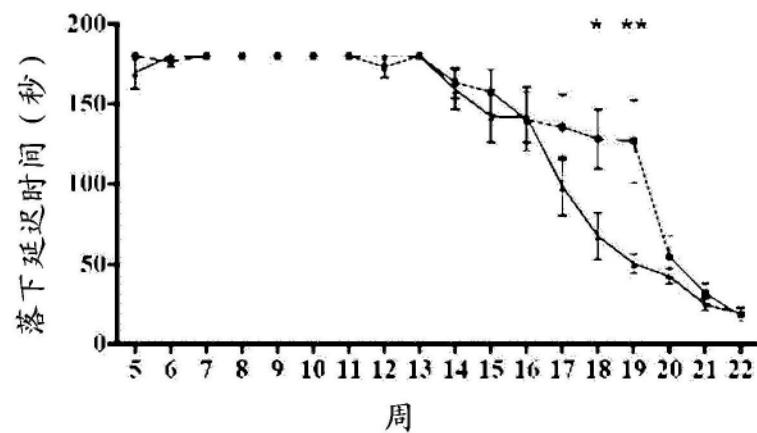


图17

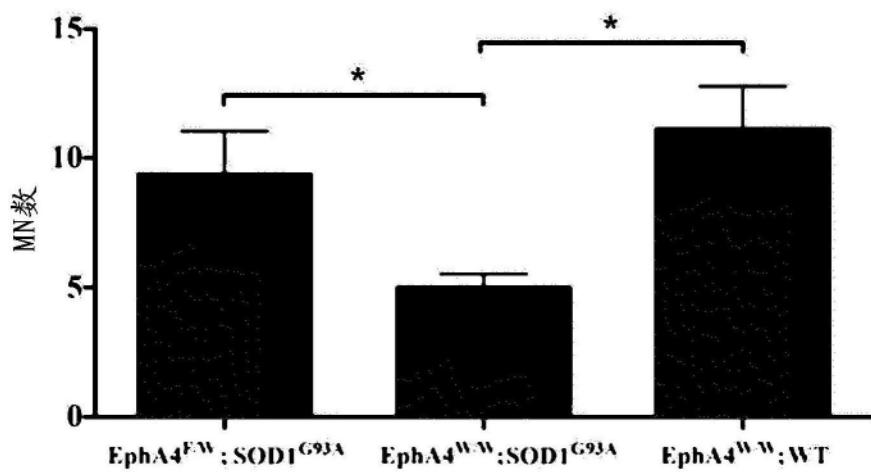


图18

EphA2 Wt 相比于突变体大鼠实验

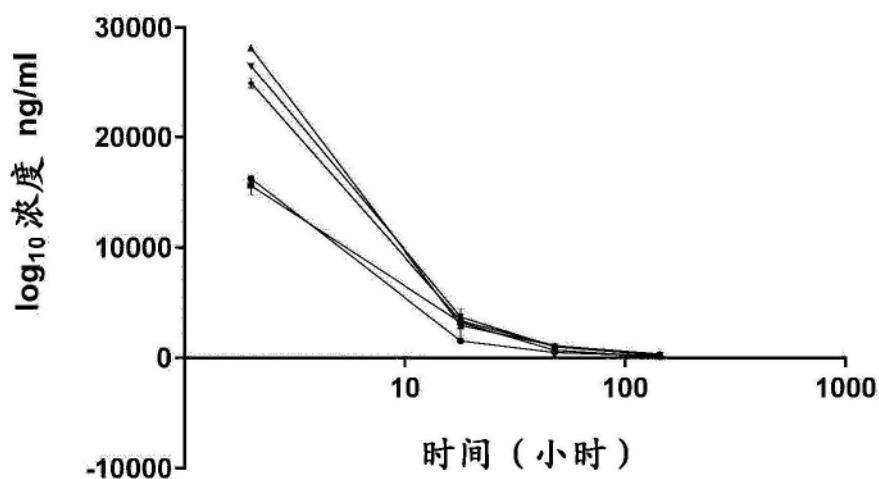


图19