



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I797116 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：107112165

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 04 月 09 日

(51)Int. Cl. : A61K38/16 (2006.01)

A61P1/00 (2006.01)

C12N15/12 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

C07K14/435 (2006.01)

(30)優先權：2017/04/07 美國

62/482,963

2017/12/19 美國

62/607,706

2017/12/28 美國

62/611,334

(71)申請人：美商第二基因體公司(美國) SECOND GENOME, INC. (US)

美國

(72)發明人：韓 安德魯 源熙 HAN, ANDREW WONHEE (US)；固德易 安德魯 惠特曼 GOODYEAR, ANDREW WHITMAN (US)；古吉拉爾 特朗密 GUJRAL, TARUNMEET (IN)；德桑提斯 陶德 柴克里 DESANTIS, TODD ZACHARY (US)；達布巴 卡里姆 DABBAGH, KARIM (US)；竹內 俊彥 TAKEUCHI, TOSHIHIKO (US)；秦業 JIN, YE (US)；威爾卡森 米基 和泉 WILLCOXON, MICHU IZUMI (JP)；巴納斯 史蒂芬妮 BANAS, STEFANIE (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 103930117A

CN 105407908A

網路文獻 UniProtKB G2T1E5 2011/11/16

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：27 共 195 頁

(54)名稱

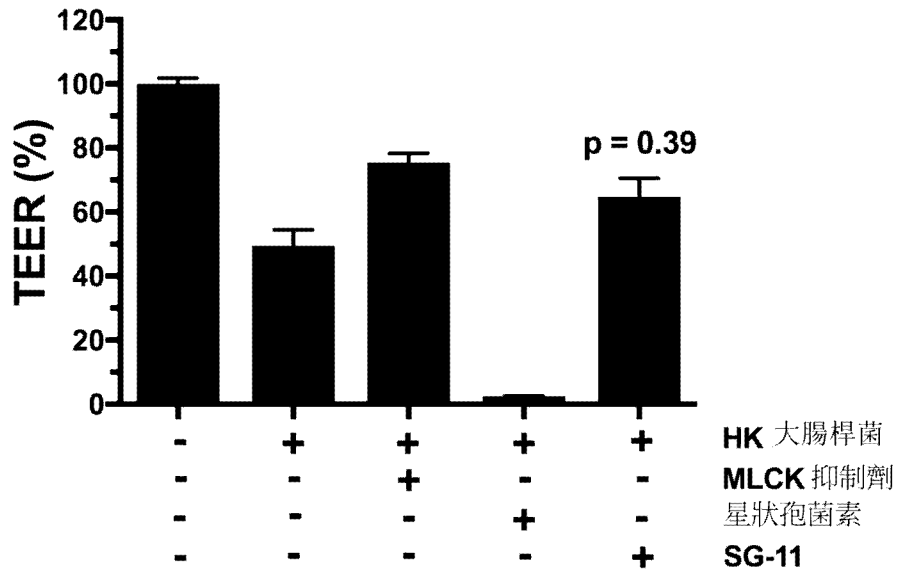
用於治療上皮細胞屏障功能病症的蛋白質

(57)摘要

本發明係關於用於治療多種人類疾病之治療性蛋白質及包含該等蛋白質之醫藥組合物。在具體態樣中，所揭示治療性蛋白質可用於治療人類胃腸發炎性疾病及與經降低上皮細胞屏障功能或完整性相關之胃腸病況。此外，該等所揭示治療性蛋白質可用於治療人類發炎性腸病，尤其包括克隆氏病(Crohn's disease)及潰瘍性結腸炎。

The disclosure relates to therapeutic proteins and pharmaceutical compositions comprising said proteins, which have utility in treating various human diseases. In particular aspects, the disclosed therapeutic proteins are useful for treating human gastrointestinal inflammatory diseases and gastrointestinal conditions associated with decreased epithelial cell barrier function or integrity. Further, the disclosed therapeutic proteins are useful for treating human inflammatory bowel disease, including inter alia, Crohn's disease and ulcerative colitis.

指定代表圖：



【圖1A】



I797116

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療上皮細胞屏障功能病症的蛋白質

【英文發明名稱】

PROTEINS FOR THE TREATMENT OF EPITHELIAL BARRIER
FUNCTION DISORDERS

【中文】

本發明係關於用於治療多種人類疾病之治療性蛋白質及包含該等蛋白質之醫藥組合物。在具體態樣中，所揭示治療性蛋白質可用於治療人類胃腸發炎性疾病及與經降低上皮細胞屏障功能或完整性相關之胃腸病況。此外，該等所揭示治療性蛋白質可用於治療人類發炎性腸病，尤其包括克隆氏病(Crohn's disease)及潰瘍性結腸炎。

【英文】

The disclosure relates to therapeutic proteins and pharmaceutical compositions comprising said proteins, which have utility in treating various human diseases. In particular aspects, the disclosed therapeutic proteins are useful for treating human gastrointestinal inflammatory diseases and gastrointestinal conditions associated with decreased epithelial cell barrier function or integrity. Further, the disclosed therapeutic proteins are useful for treating human inflammatory bowel disease, including *inter alia*, Crohn's disease and ulcerative colitis.

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療上皮細胞屏障功能病症的蛋白質

【英文發明名稱】

PROTEINS FOR THE TREATMENT OF EPITHELIAL BARRIER
FUNCTION DISORDERS

【技術領域】

本發明係關於新穎蛋白質及包含該等蛋白質之醫藥組合物，其尤其應用於治療胃腸發炎性疾病及上皮細胞屏障功能病症。在一些實施例中，本文所述之蛋白質及醫藥組合物具體應用於治療或預防與異常可滲透上皮細胞屏障相關之疾病狀態以及發炎性腸病或病症。

【先前技術】

發炎性腸病(IBD)係未知病因之異質性疾病，引起頻繁及出血性腸蠕動，伴隨有胃腸黏膜之組織病理學損傷(Zhang 等人，2017, Front Immunol, 8:942)。儘管疾病之特定觸發因素仍未明確定義，但疾病進展之一個提議表明腸屏障功能之破壞會使細菌或細菌組分易位至黏膜組織中(Coskun, 2014, Front Med (Lausanne), 1:24；Martini 等人，2017, Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 4:33-46)。細菌易位使得發炎性信號傳導活化，觸發額外屏障破壞，引起屏障破壞、細菌易位及發炎之環狀擴大迴路。儘管許多當前療法靶向發炎，但缺少促進黏膜癒合之療法為促進上皮細胞修復及腸屏障完整之新穎療法提供了機會。

基於細菌易位可觸發IBD之假說展開，最新研究已展示腸微生物區之有害變化或生態失調可促進IBD之發展。

目前，許多市售IBD治療劑僅旨在靶向及阻抑所論述與IBD相關之發炎反應。儘管有用，但此狹窄之治療作用模式忽視了上皮細胞屏障完整性在疾病病因學中所起之重要作用。

因此，業內極大地需要研發出一種治療劑，其不僅阻抑免疫系統之發炎反應，且亦協同起恢復個體之上皮細胞屏障功能之作用。業內亦需要製造一種蛋白質治療劑，例如本文所述之蛋白質治療劑，其在蛋白質治療劑之整個製造及/或處理期間以及在長期儲存條件下較為穩定。

【發明內容】

本發明解決了醫學界對可有效地治療患有胃腸道病症(例如發炎性腸病(IBD))之個體之治療劑的重要需求。在一態樣中，提供新穎蛋白質治療劑，其可維持上皮細胞屏障完整性及/或改良上皮細胞屏障修復。在一些實施例中，上皮細胞屏障係腸上皮細胞屏障。該等蛋白質治療劑亦可減輕個體之腸發炎及/或減少與腸發炎相關之症狀。

本文所提供之蛋白質治療劑可用於治療與經降低胃腸上皮細胞屏障功能或完整性相關之多種疾病及/或症狀。

在一些實施例中，本發明教示衍生自微生物群系之新穎蛋白質治療劑及使用該等蛋白質治療劑之方法。在具體實施例中，提供衍生自微生物群系且包含與SEQ ID NO:19具有至少約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%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%序列一致性之胺基酸序列的蛋白質。在一些實施例中，治療性蛋白質不包含與SEQ ID NO:3一致之胺基酸序列。在

其他實施例中，治療性蛋白質包含非天然胺基酸序列。

在一些實施例中，蛋白質包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19之胺基酸序列。在其他實施例中，蛋白質包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列。在其他實施例中，蛋白質包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列。

在一些實施例中，蛋白質包含與SEQ ID NO:19至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%或100%一致之胺基酸序列，其中相對於SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:3，胺基酸序列具有至少1個、2個、3個或4個胺基酸取代。在其他實施例中，相對於SEQ ID NO:3，胺基酸序列具有至少2個且小於3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個或35個胺基酸取代。在其他實施例中，治療性蛋白質包含非天然胺基酸序列。

在一些實施例中，蛋白質包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列。在關於SEQ ID NO:3之其他實施例中，X53係N、S、T、M、R、Q，及/或X83係N、R或K，及/或X84係G或A，及/或X147係C、S、T、M、V、L、A或G，及/或X151係C、S、T、M、V、L、A或G。在其他實施例中，X53係N、S或K，及/或X83係N或R，及/或X84係G或A，及/或X147係C、V、L或A，及/或X151係C、S、V、L或A。

在一些實施例中，蛋白質之長度為約200至250個胺基酸、210至250

個胺基酸、220至250個胺基酸、220至240個胺基酸、230至250個胺基酸、230至240個胺基酸或230至235個胺基酸、220至275個胺基酸、220至260個胺基酸、230至260個胺基酸、240至250個胺基酸、250至260個胺基酸、230至256個胺基酸、240個胺基酸至256個胺基酸、245個胺基酸至256個胺基酸。在其他實施例中，治療性蛋白質之長度為220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259或260個胺基酸。

在一些實施例中，本發明教示特異性結合包含SEQ ID NO:19之治療性蛋白質或其變體之抗體或其片段。在其他實施例中，抗體或其片段不結合包含與SEQ ID NO:3一致之胺基酸序列之蛋白質。在其他實施例中，抗體或其片段結合包含與SEQ ID NO:19一致之胺基酸序列之蛋白質但不結合包含與SEQ ID NO:3一致之胺基酸序列的蛋白質。

在一些實施例中，蛋白質增加活體外分析中上皮細胞層之屏障功能，其中增加係相對於不存在蛋白質之分析中之屏障功能而言。在其他實施例中，活體外分析係跨上皮細胞電阻(TEER)分析。在其他實施例中，屏障功能增加係與不存在蛋白質之分析中之電阻相比電阻增加至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一些實施例中，上皮細胞層係腸上皮細胞層。在其他實施例中，腸上皮細胞層係包含腸細胞及杯狀細胞之細胞層。

在一些實施例中，蛋白質減少活體外分析中促發炎細胞介素自細胞之分泌。在其他實施例中，活體外分析包含在蛋白質存在及不存在下一起培育單核細胞與熱滅活大腸桿菌。在其他實施例中，至少一種促發炎細胞

介素選自由以下組成之群：TNF- α 、IL-17、IL-1 β 、IL-2、IFN- γ 、IL-6、IL-12、IL-25、IL-33、IL-8、MCP-1、MIP-3 α 、CXCL1及IL-23。

在一些實施例中，蛋白質增加活體外分析中抗發炎細胞介素自細胞之分泌。在其他實施例中，活體外分析包含在蛋白質存在及不存在下一起培育單核球與熱殺死之大腸桿菌。在實施例中，至少一種抗發炎細胞介素選自由以下組成之群：IL-4、IL-10、IL-13、IFN- α 及TGF- β 。

在一些實施例中，蛋白質減輕投與蛋白質之個體之腸組織病理。在一些實施例中，藉由用化學品處理誘導個體以具有腸組織損傷。在其他實施例中，用化學品聚葡萄糖硫酸鈉(DSS)處理個體以誘發腸組織損傷。在其他實施例中，個體係哺乳動物。在其他實施例中，動物係齧齒類動物。在其他實施例中，個體係非人類靈長類動物。

在一些實施例中，治療性蛋白質減輕投與蛋白質之個體之胃腸發炎。在其他實施例中，蛋白質減輕個體之腸黏膜發炎。在其他實施例中，蛋白質改良個體之腸上皮細胞屏障功能或完整性。

在一些實施例中，蛋白質增加投與該蛋白質之個體之腸組織中黏蛋白之量。

在一些實施例中，蛋白質增加投與蛋白質之個體之腸上皮細胞傷口癒合。在其他實施例中，蛋白質增加活體外分析中之腸上皮細胞傷口癒合。

在一些實施例中，蛋白質預防或減輕投與蛋白質之個體之結腸縮短。

在一些實施例中，治療性蛋白質調節(即增加或減少)投與蛋白質之個體之血液、血漿、血清、組織及/或黏膜中之細胞介素。

在一些實施例中，蛋白質減少個體之血液、血漿、血清、組織及/或黏膜中至少一種促發炎細胞介素之含量。在其他實施例中，至少一種促發炎細胞介素選自由以下組成之群：TNF- α 、IL-17、IL-1 β 、IL-2、IFN- γ 、IL-6、IL-12、IL-25、IL-33、IL-8、MCP-1、MIP-3 α 、CXCL1及IL-23。

在一些實施例中，蛋白質增加個體之血液、血漿、血清、組織及/或黏膜中至少一種抗發炎細胞介素之含量。在其他實施例中，至少一種抗發炎細胞介素選自由以下組成之群：IL-4、IL-10、IL-13、IFN- α 及TGF- β 。

在一些實施例中，蛋白質減少個體之血液、血漿、血清、組織及/或黏膜中至少一種抗發炎細胞介素之含量。在其他實施例中，至少一種抗發炎細胞介素選自由以下組成之群：IL-4、IL-10、IL-13、IFN- α 及TGF- β 。

在一些實施例中，本發明教示編碼新穎蛋白質治療劑之多核苷酸及在宿主細胞中表現該等核酸之方法。在具體實施例中，多核苷酸包含編碼與SEQ ID NO:19至少約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%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%或100%一致之蛋白質之序列。在其他實施例中，多核苷酸包含編碼與SEQ ID NO:19至少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%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致且與SEQ ID NO:3小於100%一致之蛋白質之序列。在其他實施例中，多核苷酸編碼為SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3之非天然變體之蛋白質。在其他實施例中，多核苷酸經密碼子最佳化以在重組宿主細胞中表現。在其他實施例中，多核苷酸經密碼子最佳化以在大腸桿菌中表現。

在一些實施例中，本發明教示包含與SEQ ID NO:20至少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%一致之序列之核酸。在其他實施例中，核酸包含與SEQ ID NO:20至少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%或99%一致且與SEQ ID NO:4小於100%一致之序列。在其他實施例中，核酸包含為SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4之非天然變體之序列。

在一些實施例中，蛋白質之N末端及/或C末端經化學修飾。在其他實施例中，蛋白質之N末端藉由乙醯化經化學修飾。在其他實施例中，C末端藉由醯胺化經化學修飾。

在一些實施例中，蛋白質經聚乙二醇化。

在一些實施例中，蛋白質實質上經純化且藉由醣基化、泛素化、亞硝醯化、甲基化、乙醯化或脂化修飾。

在一些實施例中，蛋白質融合至第二蛋白質。在其他實施例中，第

二蛋白質係免疫球蛋白Fc結構域或人類血清白蛋白結構域。

在一些態樣中，本發明提供用於治療發炎性腸病之醫藥組合物，其包含：包含與SEQ ID NO:19具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或100%序列一致性之胺基酸序列之治療性蛋白質，及醫藥上可接受之載劑。在一些實施例中，治療性蛋白質經純化或實質上經純化。在一些實施例中，蛋白質包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列。在替代性實施例中，蛋白質不包含與SEQ ID NO:3一致之序列或蛋白質係SEQ ID NO:3之非天然變體。在其他實施例中，蛋白質包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17及SEQ ID NO:19。在其他實施例中，蛋白質包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19之胺基酸序列。

在一些實施例中，醫藥組合物經調配用於直腸、非經腸、靜脈內、局部、經口、真皮、經皮或皮下投與。在其他實施例中，醫藥組合物係液體、凝膠或乳霜。在其他實施例中，醫藥組合物係包含腸溶包衣之固體組合物。

在一些實施例中，醫藥組合物係乳霜、膠囊、液體、凝膠或乳液。

在一些實施例中，醫藥組合物經調配以提供延遲釋放。在其他實施例中，延遲釋放係釋放至胃腸道中。在其他實施例中，延遲釋放係釋放至口腔、小腸、大腸及/或直腸中。

在一些實施例中，醫藥組合物經調配以提供持續釋放。在其他實施例中，持續釋放係釋放至胃腸道中。在其他實施例中，持續釋放係釋放至

口腔、小腸、大腸及/或直腸中。在其他實施例中，持續釋放組合物在約1至20小時、1至10小時、1至8小時、4至12小時或5至15小時之時間段內釋放治療性調配物。

在一些實施例中，醫藥組合物進一步包含第二治療劑。在其他實施例中，第二治療劑選自由以下組成之群：抗腹瀉劑、5-胺基柳酸化合物、抗發炎劑、抗生素、抗細胞介素劑、抗發炎細胞介素劑、類固醇、皮質類固醇、免疫阻抑劑、JAK抑制劑、抗整聯蛋白生物劑、抗IL12/23R生物劑及維生素。

在一些實施例中，醫藥組合物進一步包含蛋白酶抑制劑。在其他實施例中，蛋白酶抑制劑在糞便存在下及/或在血液存在下抑制治療性蛋白之降解。

如上文所提及，該等新穎蛋白質治療劑能夠促進個體之上皮細胞屏障功能及完整性。在一些實施例中，上皮細胞屏障功能係腸上皮細胞屏障功能。另外，蛋白質之治療效應包括阻抑IBD個體之發炎性免疫反應。因此，本發明提供使用所教示治療性蛋白質治療胃腸發炎性病況及涉及受損的胃腸上皮細胞屏障完整性之疾病狀態之宿主的方法之詳細指導。

在一些實施例中，提供治療有需要之患者之發炎性腸病或病症之方法，該方法包含向患者投與醫藥組合物，該醫藥組合物包含：i)包含與SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19具有至少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%、99.1%、99.2%、99.3%、

99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%或100%序列一致性之胺基酸序列之治療性蛋白質；及ii)醫藥上可接受之載劑。在該方法之其他實施例中，蛋白質包含與SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19一致之胺基酸序列。在其他實施例中，蛋白質與SEQ ID NO:3不一致或係SEQ ID NO:3之非天然變體。

在一些實施例中，患者經診斷患有腸發炎。在其他實施例中，腸發炎處於小腸及/或大腸中。在其他實施例中，腸發炎處於直腸中。在其他實施例中，患者經診斷患有儲袋炎。

在一些實施例中，患者經診斷患有腸潰瘍。在其他實施例中，患者經診斷患有腸穿孔及/或直腸陰道瘻。

在一些實施例中，患者經診斷患有克隆氏病(Crohn's disease，CD)。在其他實施例中，CD係輕度活動性CD。在其他實施例中，CD係中度至重度活動性CD。在其他實施例中，患者經診斷患有小兒CD。

在一些實施例中，患者經診斷患有短腸症候群或刺激性腸症候群。

在一些實施例中，患者經診斷患有黏膜炎。在其他實施例中，黏膜炎係口腔黏膜炎。在其他實施例中，黏膜炎係化學療法誘發之黏膜炎、放射療法誘發之黏膜炎、化學療法誘發之口腔黏膜炎或放射療法誘發之口腔黏膜炎。在其他實施例中，黏膜炎係胃腸黏膜炎。在其他實施例中，胃腸黏膜炎係小腸、大腸或直腸之黏膜炎。

在一些實施例中，投與經診斷患有CD之患者可減少腸穿孔及/或直腸陰道瘻之次數。在其他實施例中，投與維持患有瘻管性疾病之成年患者之瘻閉合。

在其他實施例中，患者經診斷患有潰瘍性結腸炎(UC)。在其他實施例中，UC係輕度活動性UC。在其他實施例中，UC係中度至重度活動性UC。在其他實施例中，患者經診斷患有小兒UC。

在一些實施例中，患者處於自IBD臨床緩解中。在其他實施例中，患者處於自UC、小兒UC、CD或小兒CD臨床緩解中。

在一些實施例中，患者患有除克隆氏病或潰瘍性結腸炎外之發炎性腸病或病症。在其他實施例中，患者具有至少一個與發炎性腸病相關之症狀。

在一些實施例中，投與減輕患者之與發炎性腸病相關之胃腸發炎及/或減輕患者之與發炎性腸病相關之腸黏膜發炎。在其他實施例中，投與改良患者之腸上皮細胞屏障功能或完整性。

在一些實施例中，在投與後，患者經歷與發炎性腸病或病症相關之至少一個症狀之減輕。在其他實施例中，至少一個症狀選自由以下組成之群：腹痛、便中有血、便中有膿、發燒、體重減輕、頻繁腹瀉、疲勞、食慾減退、噁心、痙攣、貧血、裡急後重及直腸出血。在其他實施例中，在投與後，患者會經歷經減緩的腹瀉頻率、減緩便血及/或減緩直腸出血。

在一些實施例中，患者已經歷對習用療法之反應不足。在其他實施例中，習用療法係使用胺基柳酸鹽、皮質類固醇、硫代嘌呤、胺甲喋呤、JAK抑制劑、神經鞘胺醇1-磷酸(S1P)受體抑制劑、抗整聯蛋白生物劑、抗IL12/23R或抗IL23/p10生物劑及/或抗腫瘤壞死因子劑或生物劑。

在一些實施例中，投與調節(即增加或減少)患者之血液、血漿、血清、黏膜或組織中細胞介素之含量。

在一些實施例中，投與阻抑患者中至少一種促發炎細胞介素之含

量。在其他實施例中，至少一種促發炎細胞介素選自由以下組成之群：TNF- α 、IL-17、IL-1 β 、IL-2、IFN- γ 、IL-6、IL-12、IL-25、IL-33、IL-8、MCP-1、MIP-3 α 、CXCL1及IL-23。

在一些實施例中，投與增加患者之血液、血漿、血清、黏膜或組織中至少一種抗發炎細胞介素之含量。在其他實施例中，至少一種抗發炎細胞介素選自由以下組成之群：IL-4、IL-10、IL-13、IFN- α 及TGF- β 。

在一些實施例中，投與減少患者之血液、血漿、血清、黏膜或組織中至少一種抗發炎細胞介素之含量。在其他實施例中，至少一種抗發炎細胞介素選自由以下組成之群：IL-4、IL-10、IL-13、IFN- α 及TGF- β 。

在一些實施例中，投與增加患者之腸管腔中黏蛋白之量。

在一些實施例中，投與增加患者之腸上皮細胞傷口癒合。

在一些實施例中，投與預防或減輕患者之結腸縮短。

在一些實施例中，投與包含向患者直腸、靜脈內、非經腸、經口、局部、真皮、經皮或皮下投與醫藥組合物。在其他實施例中，投與至胃腸管腔。

在一些實施例中，亦向患者投與至少一種第二治療劑。在其他實施例中，至少一種第二治療劑選自由以下組成之群：抗腹瀉劑、抗發炎劑、抗體、抗生素或免疫阻抑劑。在其他實施例中，至少一種第二治療劑係胺基柳酸鹽、類固醇或皮質類固醇。在其他實施例中，至少一種第二治療劑選自由以下組成之群：阿達木單抗(adalimumab)、聚乙二醇(pegol)、戈利木單抗(golimumab)、英利昔單抗(infliximab)、維多珠單抗(vedolizumab)、優特克單抗(ustekinumab)、托法替尼(tofacitinib)及賽妥珠單抗(certolizumab)或聚乙二醇化賽妥珠單抗。

在一些態樣中，提供表現載體，其包含編碼包含與SEQ ID NO:19具有至少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%一致性之胺基酸序列之蛋白質的外源性多核苷酸。

在一些實施例中，多核苷酸編碼包含與以下序列具有至少99%或100%一致性之胺基酸序列之蛋白質：SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19。在其他實施例中，多核苷酸編碼包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之蛋白質。在其他實施例中，多核苷酸編碼包含與SEQ ID NO:3不一致之胺基酸序列之蛋白質。

在一些態樣中，提供表現系統，其包含宿主細胞及包含上文所提及外源性多核苷酸之表現載體。

在一些實施例中，宿主細胞為原核或真核。在其他實施例中，宿主細胞係哺乳動物細胞、酵母細胞或細菌細胞。在其他實施例中，細菌細胞係大腸桿菌。在其他實施例中，哺乳動物細胞係CHO細胞。

在一些態樣中，提供產生蛋白質之方法。

在一些實施例中，產生蛋白質之方法包含用上文所提及之表現載體轉變或轉染上文所提及之宿主細胞，在足以表現由上文所提及之外源性多核苷酸編碼之上文所提及蛋白質之條件下培養經轉變或轉染之宿主細胞。在其他實施例中，方法進一步包含自經轉變或轉染之宿主細胞及培養基純化蛋白質。

在一些實施例中，提供治療疾病(例如腸上皮細胞屏障功能相關疾病)

之方法，其使用本申請案及序列表中所揭示之任一序列。

【圖式簡單說明】

圖1A及圖1B顯示在發炎誘發之破壞後SG-11對上皮細胞屏障完整性之恢復，如實例2中所述。

圖2A顯示SG-11投與對熱滅活大腸桿菌(HK大腸桿菌)誘導之TNF- α 產生之效應，如實例3中所述。

圖2B顯示SG-11投與對HK大腸桿菌誘導之IL-23產生之效應，如實例3中所述。

圖3顯示SG-11投與對HK大腸桿菌誘導之IL-10產生之效應，如實例4中所述。

圖4顯示SG-11投與對用HK大腸桿菌刺激後之黏蛋白表現之效應，如實例5中所述。

圖5顯示SG-11投與對上皮細胞傷口癒合之效應，如實例6中所述。

圖6顯示在DSS發炎性腸病模型中SG-11投與對上皮細胞中心屏障功能讀出之效應，如實例7中所述。

圖7顯示在DSS發炎性腸病模型中SG-11投與對因應受損的屏障功能之發炎性讀出之效應，如實例7中所述。

圖8顯示在DSS發炎性腸病模型中SG-11投與對體重之效應，如實例7中所述。

圖9顯示在DSS發炎性腸病模型中SG-11投與對大體病理之效應，如實例7中所述。

圖10A、10B及10C顯示DSS發炎性腸病模型之近端(**圖10A**)、遠端(**圖10B**)以及近端及遠端二者(**圖10C**)組織之組織病理學分析之結果，如實

例7中所述。

圖11A顯示在DSS發炎性腸病模型中SG-11投與對結腸長度之效應，如實例7中所述。

圖11B顯示在DSS發炎性腸病模型中SG-11投與對結腸重量對長度比率之效應，如實例7中所述。

圖12顯示DSS發炎性腸病模型之SG-11治療後之上皮細胞屏障完整性，如實例8中所述。

圖13顯示在DSS發炎性腸病模型中屏障功能之發炎中心讀出，如實例8中所述。

圖14顯示在DSS發炎性腸病模型中體重減輕之預防，如實例8中所述。

圖15A顯示在DSS發炎性腸病模型中SG-11投與對結腸長度之效應，如實例8中所述。

圖15B顯示在DSS發炎性腸病模型中SG-11投與對結腸重量對長度比率之效應，如實例8中所述。

圖16A、16B及16C顯示DSS發炎性腸病模型之近端(**圖16A**)、遠端(**圖16B**)以及近端及遠端二者(**圖16C**)組織之組織病理學分析之結果，如實例8中所述。

圖17顯示SG-11 (SEQ ID NO:7)與來自羅斯拜瑞氏菌(*Roseburia*)物種之相似蛋白質序列之多序列比對分析之結果。

圖18顯示**圖18A、圖18B、圖18C、圖18D、圖18E、圖18F、圖18G、圖18H及圖18I**之條件對SG-11穩定性之效應。關於與**圖18A至圖18I**相關之條件參見實例14。

圖 19 顯示 **圖 19A**、**圖 19B**、**圖 19C**、**圖 19D**、**圖 19E**、**圖 19F**、**圖 19G**、**圖 19H** 及 **圖 19I** 之條件對 SG-11V5 穩定性之效應。關於與 **圖 19A** 至 **圖 19I** 相關之條件參見實例 14。

圖 20 顯示在發炎誘發之破壞後 SG-11 及 SG-11 變體對上皮細胞屏障完整性之恢復，如實例 15 中所述。

圖 21A 及 **圖 21B** 顯示用 SG-11 及 SG-11 變體治療 DSS 發炎性腸病模型後之上皮細胞屏障完整性，如實例 16 中所述。

圖 22A 及 **圖 22B** 顯示在 DSS 發炎性腸病模型中屏障功能之發炎中心讀出，如實例 16 中所述。

圖 23A 及 **圖 23B** 顯示在 DSS 發炎性腸病模型中用 SG-11 或 SG-11 變體治療對體重減輕之效應，如實例 16 中所述。

圖 24 顯示在 DSS 發炎性腸病模型中投與 SG-11 或 SG-11 變體對大體病理之效應，如實例 16 中所述。

圖 25A 及 **圖 25B** 顯示在 DSS 發炎性腸病模型中用 SG-11 或 SG-11 變體治療對結腸長度之效應，如實例 16 中所述。

圖 26A 及 **圖 26B** 顯示在 DSS 發炎性腸病模型中用 SG-11 或 SG-11 變體治療對結腸重量對長度比率之效應，如實例 16 中所述。

圖 27A 顯示 SG-11 (SEQ ID NO:7) 與 SG-11 變體 (SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19) 之多序列比對分析之結果，且 **圖 27B** 顯示基於多序列比對分析之矩陣一致性百分數之結果。將由 EMBL-EBI 提供之 Clustal Omega 程式用於本文所述之多比對分析。

【實施方式】

相關申請案交叉參考

本申請案主張於2017年12月28日提出申請之美國臨時申請案第62/611,334號、於2017年12月19日提出申請之美國臨時申請案第62/607,706號及於2017年4月07日提出申請之美國臨時申請案第62/482,963號的優先權益，該等申請案各自之全文皆以引用方式併入本文中。

電子提交之文字檔案之說明

本文電子提交之文字檔案之內容之全文皆以引用方式併入本文中：序列表之電腦可讀格式拷貝，檔案名稱：SEGE_001_03WO_SeqList_ST25.txt；創建日期：2018年4月4日；檔案大小約等於45.3千位元組)。

本發明提供新穎蛋白質治療劑，其可用於治療具有與胃腸道病症相關之症狀之個體。舉例而言，該等蛋白質可促進或增強上皮細胞屏障功能及/或完整性。該蛋白質亦可阻抑IBD個體之發炎性免疫反應。本文所提供之蛋白質治療劑可用於治療與經降低胃腸上皮細胞屏障功能或完整性及腸發炎相關之多種疾病。

本發明亦提供具有與原始蛋白質相當或優異之治療活性之蛋白質變體，但該等蛋白質變體在蛋白質治療劑產品之整個製造及處理期間以及在長期儲存條件下具有增強的穩定性。

定義

除非本文中另有定義，否則本申請案中所用之科學及技術術語應具有熟習此項技術者通常理解之含義。通常，本文所述與化學、分子生物學、細胞及癌症生物學、免疫學、微生物學、藥理學以及蛋白質及核酸化

學結合使用之命名及其技術係業內所熟知且常用之彼等。因此，儘管認為以下術語為熟習此項技術者充分理解，但陳述以下定義以幫助解釋目前所揭示之標的物。

在本說明書通篇中，詞語「包含」(「comprise」)或變化形式(例如「包含(comprises)」或「包含(comprising)」)應理解為暗指包括所述組分或組分之群，但不排除任何其他組分或組分之群。

術語「一(a或an)」係指一或多個該實體，即可指複數個指示物。因此，術語「一(a或an)」、「一或多個(one or more)」及「至少一個(at least one)」在本文中可互換使用。另外，除非上下文明確要求存在一個且僅一個元件，否則藉由不定冠詞「一(a或an)」提及「一個元件」並不排除存在一個以上之元件之可能性。

術語「包括」用於意指「包括(但不限於)」。「包括」及「包括(但不限於)」可互換使用。

如本文所用之術語「胃腸」或「胃腸道」、「消化道」及「腸」可互換使用且係指自口腔延伸至肛門且包括口腔、食管、胃、小腸、大腸、直腸及肛門之中空器官系列。術語「胃腸」或「胃腸道」、「消化道」及「腸」並不總是意欲限於消化道之特定部分。

如本文所用之術語「SG-11」係指包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之蛋白質亦及其具有相同或相似之功能活性之變體，如本文所述。因此，SG-11在本文中可指包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9或由其組成之蛋白質或其變體或片段。SG-11變體之實例包括(但不限於) SEQ ID NO:11 (SG-11V1)、SEQ ID NO:13 (SG-11V2)、SEQ ID NO:15 (SG-11V3)、SEQ ID NO:17 (SG-

11V4)及SEQ ID NO:19 (SG-11V5)。在美國臨時專利申請案(於2017年4月7日提出申請之62/482,963；於2017年12月19日提出申請之62/607,706；於2017年12月28日提出申請之62/611,334，本說明書主張針對其之優先權且其各自之全文皆以引用方式併入本文中)中，使用術語「實驗蛋白1」及其變體且與如本文所用之SG-11或其變體同義。

「信號序列」(亦稱為「前序列」、「信號肽」、「前導序列」或「前導肽」)係指位於初生蛋白之N末端且可促進蛋白質自細胞分泌之胺基酸序列。細胞外蛋白之所得成熟形式缺少在分泌過程期間裂解掉之信號序列。

如本文所用之列舉「序列一致性」、「一致性百分數」、「同源性百分數」或例如包含「與.....50%一致之序列」係指在比較窗內序列基於逐個核苷酸或逐個胺基酸一致之程度。因此，「序列一致性百分比」可藉由以下方式來計算：在比較窗內比較兩個最佳比對序列，確定兩個序列中出現一致核酸鹼基(例如A、T、C、G、I)或一致胺基酸殘基(例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys及Met)時之位置數以獲得匹配位置數，用匹配位置數除以比較窗中之總位置數(即窗大小)，並用結果乘以100以獲得序列一致性百分比。

可如下計算序列之間之序列相似性或序列一致性(該等術語在本文中可互換使用)。為確定兩個胺基酸序列或兩個核酸序列之一致性百分數，可出於最佳比較之目的比對該等序列(例如，可將空位引入第一及第二胺基酸或核酸序列中之一或兩者中用於最佳比對，且可出於比較目的忽視非同源序列)。在某些實施例中，出於比較目的比對之參考序列之長度佔參

考序列長度的至少30%，較佳至少40%，更佳至少50%、60%，且甚至更佳至少70%、80%、90%或100%。然後比較相應胺基酸位置或核苷酸位置處之胺基酸殘基或核苷酸。當第一序列中之位置被與第二序列中之相應位置相同之胺基酸殘基或核苷酸佔據時，則該等分子在該位置處一致。兩個序列之間之一致性百分數隨該等序列共享之一致位置數而變化，其中考慮到為達成兩個序列之最佳比對而需要引入之空位數及每一空位之長度。

片語「實質上相似」及「實質上一致」在至少兩個核酸或多肽之情況下通常意指，多核苷酸或多肽包含與參考多核苷酸或多肽相比具有至少約70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%或甚至99.8%序列一致性之序列。在一些實施例中，實質上一致之多肽僅相差一或多個保守胺基酸取代。在一些實施例中，實質上一致之多肽係免疫交叉反應性的。在一些實施例中，實質上一致之核酸分子在嚴格條件下(例如在中等至高嚴格度範圍內)彼此雜交。

如本文所用之術語「核苷酸變化」係指例如核苷酸取代、缺失及/或插入，如業內所充分理解。舉例而言，突變含有產生沉默取代、添加或缺失、但不改變經編碼蛋白質之性質或活性或製造蛋白質之方法的變化。

相關(及衍生)蛋白質涵蓋「變體」蛋白。變體蛋白可與另一(即親代)蛋白質及/或彼此相差少量胺基酸殘基。變體與衍生出其之親代蛋白相比可包括一或多個胺基酸突變(例如胺基酸缺失、插入或取代)。

「經保守修飾之變體」適用於胺基酸及核酸序列二者。對於特定核酸序列，經保守修飾之變體係指編碼一致胺基酸序列或具有一或多個「保守取代」之胺基酸序列之核酸。保守取代之實例係用以下群組中之一者之

胺基酸交換同一群組中之另一胺基酸(參見美國專利第5,767,063號；Kyte及Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.* 157:105-132)。(1)疏水：正白胺酸、Ile、Val、Leu、Phe、Cys、Met；(2)中性親水：Cys、Ser、Thr；(3)酸性：Asp、Glu；(4)鹼性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；(5)影響鏈定向之殘基：Gly、Pro；(6)芳香族：Trp、Tyr、Phe；及(7)小胺基酸：Gly、Ala、Ser。因此，術語胺基酸之「保守取代」表示一或多個胺基酸經另一化學上相似之殘基替代，其中該取代通常不影響蛋白質之功能性質。實例包括具有相似特徵之胺基酸殘基之取代，例如小胺基酸、酸性胺基酸、極性胺基酸、鹼性胺基酸、疏水胺基酸及芳香族胺基酸。在一些實施例中，本發明提供相對於SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:17中所鑑別出之胺基酸序列具有至少一個非天然保守胺基酸取代之蛋白質。保守胺基酸取代之一些常見實例性實例參見下文。

術語「胺基酸」或「任何胺基酸」係指任何及所有胺基酸，包括天然胺基酸(例如 α -胺基酸)、非天然(*unnatural*)胺基酸、經修飾胺基酸及非天然或非天然(*non-natural*)胺基酸。其包括D-胺基酸及L-胺基酸二者。天然胺基酸包括在自然界中發現之彼等，例如組合至肽鏈中形成大量蛋白質之結構單元之23種胺基酸。該等胺基酸主要係L立體異構物，但例如在細菌包膜及一些抗生素中存在少量D-胺基酸。20種「標準」天然胺基酸列示於上表中。「非標準」天然胺基酸係吡咯離胺酸(發現於產甲烷生物體及其他真核生物中)、硒基半胱胺酸(存在於許多非真核生物以及大多數真核生物中)及N-甲醯基甲硫胺酸(在細菌、粒線體及葉綠體中由起始密碼子AUG編碼)。「非天然(*unnatural*或*non-natural*)」胺基酸係天然存在或化學合成之非蛋白胺基酸(即，非天然編碼或在遺傳密碼中發現之彼等)。業

內已知140多種非天然胺基酸且成千上萬個組合係可能的。「經修飾」胺基酸包括已經化學修飾以包括並非天然存在於胺基酸中之一或多個基團或化學部分之胺基酸(例如天然胺基酸)。

如本文所用之「合成核苷酸序列」或「合成多核苷酸序列」係未知在自然界中存在或並非天然之核苷酸序列。通常，與任何其他天然核苷酸序列相比，此一合成核苷酸序列將包含至少一個核苷酸差別。如本文所用之「合成胺基酸序列」或「合成肽序列」或「合成多肽序列」或「合成蛋白序列」係未知在自然界中存在或並非天然之胺基酸序列。通常，與任何其他天然胺基酸序列相比，此一合成胺基酸序列將包含至少一個胺基酸差別。

如本文所用之「合成蛋白質」或「合成治療性蛋白質」意指包含胺基酸序列之蛋白質，該胺基酸序列相對於天然胺基酸序列含有一或多個經不同胺基酸取代之胺基酸。亦即，「合成蛋白質」包含已經改變以相對於天然胺基酸序列在給定胺基酸位置含有至少一個非天然取代修飾之胺基酸序列。

如本文用於核酸序列或胺基酸序列之序列一致性%或序列同源性%之術語「約」意指以0.1%增量達到至多 $\pm 1.0\%$ 且包括 $\pm 1.0\%$ 。舉例而言，「約90%」序列一致性包括89.0%、89.1%、89.2%、89.3%、89.4%、89.5%、89.6%、89.7%、89.8%、89.9%、90%、90.1%、90.2%、90.3%、90.4%、90.5%、90.6%、90.7%、90.8%、90.9%及91%。若非用於序列一致性%之情況下，則「約」意指 $\pm 1\%$ 、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%，此端視所討論值之上下文而定。

在極大程度上，本文所用之天然及非天然胺基酸殘基之名稱遵循

IUPAC 有機化學命名委員會 (Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry) 及 IUPAC-IUB 生物化學命名委員會 (Commission on Biochemical Nomenclature) 建議之命名慣例，如「Nomenclature of α -Amino Acids (Recommendations, 1974)」Biochemistry, 14(2), (1975) 中所述。就本說明書及隨附申請專利範圍中所用之胺基酸及胺基殘基之名稱及縮寫不同於彼等建議而言，其將為讀者所明瞭。

在本說明書通篇中，除非天然胺基酸以其全名(例如丙胺酸、精胺酸等)提及，否則其係藉由其習用三字母或單字母縮寫來表示(例如對於丙胺酸Ala或A，對於精胺酸Arg或R等)。除非另外指示，否則胺基酸之三字母及單字母縮寫係指胺基酸之L-異構形式。如本文所用之術語「L-胺基酸」係指肽之「L」異構形式，且相反地術語「D-胺基酸」係指肽之「D」異構形式(例如Dasp、(D)Asp或D-Asp；Dphe、(D)Phe或D-Phe)。呈D異構形式之胺基酸殘基可取代任何L-胺基酸殘基，只要肽保留期望功能即可。在提及使用單字母縮寫時，D-胺基酸按慣例可以小寫指示。

在較不常見或非天然胺基酸之情形下，除非其以全名(例如肌胺酸、鳥胺酸等)提及，否則通常將三或四字符代碼用於其殘基，包括Sar或Sarc(肌胺酸，即N-甲基甘胺酸)、Aib (α -胺基異丁酸)、Dab (2,4-二胺基丁酸)、Dapa (2,3-二胺基丙酸)、 γ -Glu (γ -羧胺酸)、Gaba (γ -胺基丁酸)、 β -Pro (吡咯啉-3-甲酸)及8Ado (8-胺基-3,6-二氧雜辛酸)、Abu (2-胺基丁酸)、 β hPro (β -高脯胺酸)、 β hPhe (β -高苯丙胺酸)及Bip (β,β -二苯丙胺酸)及Ida (亞胺基二乙酸)。

本文所揭示之序列尤其係在序列之胺基末端(N末端)納入「Hy-」部分、且在序列之羧基末端(C末端)納入「-OH」部分或「-NH₂」部分之序

列。在該等情形下且除非另外指示，否則所討論序列N末端之「Hy-」部分指示氫原子，對應於在N末端存在游離一級或二級胺基，而序列C末端之「-OH」或「-NH₂」部分分別指示羥基或胺基，對應於在C末端存在醯胺基(CONH₂)。在本發明之每一序列中，C末端「-OH」部分可取代C末端「-NH₂」部分，且反之亦然。

如本文所用之術語「Ac」係指經由醯化多肽之C或N末端之乙醯基保護。在本文所顯示之某些肽中，位於肽C末端之NH₂指示胺基。如本文所用之術語「羧基」係指-CO₂H。

如本文所用之術語「醫藥上可接受之鹽」表示本發明肽、蛋白質或化合物之鹽或兩性離子形式，其為水溶性或油溶性或可分散且適於治療疾病而無過度毒性、刺激及過敏反應；其與合理效益/風險比相稱且可有效地用於其預期用途。該等鹽可在化合物之最終分離及純化期間製備或藉由使胺基與適宜酸反應單獨製備。代表性酸加成鹽包括乙酸鹽、己二酸鹽、海藻酸鹽、檸檬酸鹽、天冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、硫酸氫鹽、丁酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、二葡萄糖酸鹽、甘油磷酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、甲酸鹽、富馬酸鹽、鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥基乙烷磺酸鹽(羥乙基磺酸鹽)、乳酸鹽、馬來酸鹽、均三甲苯磺酸鹽、甲烷磺酸鹽、萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、2-萘磺酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、果膠酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、苦味酸鹽、新戊酸鹽、丙酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、三氯乙酸鹽、三氟乙酸鹽、磷酸鹽、麩胺酸鹽、碳酸氫鹽、對甲苯磺酸鹽及十一烷酸鹽。本發明化合物中之胺基亦可用以下各項四級銨化：甲基、乙基、丙基及丁基之氯化物、溴化物及碘化物；硫酸二甲酯、硫酸二乙酯、硫酸二丁酯及硫酸二戊酯；癸基、月桂

基、肉豆蔻基及硬脂基之氯化物、溴化物及碘化物；以及苺基及苺乙基之溴化物。可用於形成治療上可接受之加成鹽之酸之實例包括無機酸，例如鹽酸、氫溴酸、硫酸及磷酸；及有機酸，例如草酸、馬來酸、琥珀酸及檸檬酸。治療上可接受之鹽可適宜地為選自例如酸加成鹽及鹼性鹽之鹽。酸加成鹽之實例包括氯化物鹽、檸檬酸鹽及乙酸鹽。鹼性鹽之實例包括其中陽離子選自鹼金屬陽離子(例如鈉或鉀離子)、鹼土金屬陽離子(例如鈣或鎂離子)以及經取代銨離子之鹽。醫藥上可接受之鹽之其他實例闡述於「Remington's Pharmaceutical Sciences」，第17版，Alfonso R. Gennaro (編輯), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985 (及其更新版本)；「Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology」，第3版，James Swarbrick (編輯), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007；及J. Pharm. Sci. 66: 2 (1977)中。關於適宜鹽之綜述亦參見*Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*，Stahl及Wermuth (Wiley-VCH, 2002)。

如本文所用之術語核酸或多肽之「至少一部分」或「片段」意指具有該等序列之最小大小特徵或全長分子之任何較大片段、至多為全長分子且包括全長分子之部分。

如本文所用之術語「引子」係指能夠黏著至靶多核苷酸之寡核苷酸。

如本文所用之片語「重組構築體」、「表現構築體」、「嵌合構築體」、「構築體」及「重組DNA構築體」在本文中可互換使用且為熟習此項技術者所熟知。

如本文所用之術語「宿主細胞」係指用於產生多肽之重組表現載體

可引入其中以表現多肽之細胞或細胞系。

如本文所用之術語「經分離」、「經純化」、「經分開」及「經回收」係指材料(例如蛋白質、核酸或細胞)例如以至少90重量%或至少95重量%或至少98重量%之含有其之樣品之濃度自至少一個其天然締合之組分移除。舉例而言，該等術語可指材料實質上或基本上不含通常伴隨其之組分，如在其天然狀態(例如完整生物系統)中發現。

術語「患者」、「個體(subject及individual)可互換使用且係指人類或非人類動物。該等術語包括哺乳動物(例如人類、非人類靈長類動物)、家畜動物(例如牛、豬)、伴侶動物(例如犬、貓)及齧齒類動物(例如小鼠及大鼠)。在某些實施例中，該等術語係指人類患者。在實例性實施例中，該等術語係指患有胃腸發炎性病況之人類患者。

如本文所用之「經改良」應廣泛地涵蓋疾病狀態之經鑑別特徵之改良，與對照相比或與所討論特徵相關之已知平均量相比，熟習此項技術者認為該特徵通常與所討論疾病相關聯或指示所討論疾病。舉例而言，與施加本發明蛋白質相關之「經改良」上皮細胞屏障功能可藉由比較用本發明蛋白質治療之人類之上皮細胞屏障完整性與未經治療之人類之上皮細胞屏障完整性來展示。或者，可比較用本發明蛋白質治療之人類之上皮細胞屏障完整性與人類之平均上皮細胞屏障完整性，如熟習此項技術者已知之科學或醫學出版物中所表示。在本發明中，「經改良」不必要求數據在統計學上顯著(即 $p < 0.05$)；相反，展示一值(例如平均治療值)不同於另一值(例如平均對照值)之任何可量化差別可上升至「經改良」之程度。

如本文所用之「抑制及阻抑」及類似術語不應理解為需要完全抑制或阻抑，但此在一些實施例中可為合意的。因此，「受抑制之免疫反應」

或「抑制發炎性細胞介素」無需絕對抑制。

因此，如本文所用之術語「增加」、「阻抑」或「減少」或其語法等效形式指示相對於參考(例如基線)量測值之值，該參考量測值係例如在相當條件下(例如在同一個體中在起始本文所述治療之前)獲得之量測值，或在無本文所述治療之對照個體(或多個對照個體)中之量測值。在一些實施例中，適宜對照係基線量測值，例如在同一個體中在起始本文所述治療之前之量測值或在未經本文所述治療之對照個體(或多個對照個體)中之量測值。

如本文所用之術語「IBD」或「發炎性腸病」係指其中個體具有胃腸(GI)道之慢性或復發性免疫反應及發炎之病況。兩種最常見之發炎性腸病係潰瘍性結腸炎(UC)及克隆氏病(CD)。

如本文所用之術語「治療有效量」係指以適用於任何醫學治療之合理效益/風險比賦予所治療個體治療效應之治療劑(例如本發明之肽、多肽或蛋白質)的量。此一治療效應可為客觀(即可藉由一些測試或標記物量測)或主觀的(即個體給出效應之指示或感覺效應)。在一些實施例中，「治療有效量」係指可有效地治療、改善或預防相關疾病或病況(例如延遲其發作)、及/或展現可檢測治療或預防效應(例如藉由改善與疾病相關之症狀、預防或延遲疾病之發作亦及/或減輕疾病症狀之嚴重程度或頻率)之治療劑或組合物之量。治療有效量通常係在可包含多個單位劑量之投藥方案中投與。對於任何具體治療劑，治療有效量(及/或有效投藥方案內之適宜單位劑量)可端視例如投與途徑或與其他治療劑之組合而變化。或者或另外，用於任何特定患者之具體治療有效量(及/或單位劑量)可端視多種因素變化，包括所治療疾病之具體形式；病況或前病況之嚴重程度；所用具

體治療劑之活性；所用具體組合物；患者之年齡、體重、一般健康狀況、性別及飲食；所用具體治療劑之投與時間、投與途徑及/或排泄或代謝速率；治療持續時間；及如醫學業內所熟知之類似因素。本發明使用治療有效量之新穎蛋白質及包含其之組合物來治療多種疾病，例如：胃腸發炎性疾病或涉及胃腸上皮細胞屏障功能障礙之疾病。在一些實施例中，所投與蛋白質或包含其之組合物之治療有效量將減輕與IBD相關之發炎或修復胃腸上皮細胞屏障完整性及/或功能。

如本文所用之術語「治療(treatment)」(亦「治療(treat)」或「治療(treating)」)係指根據治療方案之治療劑(例如本發明之肽、多肽或蛋白質)之任何投與，該治療方案所達成之期望效應在於其部分或完全緩和、改善、減輕、抑制特定疾病、病症及/或病況之一或多個症狀或特徵(例如胃腸(GI)道之慢性或復發性免疫反應及發炎)、延遲其發作、降低其嚴重程度及/或減小其發病率；在一些實施例中，根據治療方案投與治療劑與期望效應之達成相關聯。該治療可用於不展現相關疾病、病症及/或病況之跡象之個體及/或僅展現疾病、病症及/或病況之早期跡象之個體。或者或另外，該治療可用於展現相關疾病、病症及/或病況之一或多個確立跡象之個體。在一些實施例中，治療可用於經診斷患有相關疾病、病症及/或病況之個體。在一些實施例中，治療可用於已知具有一或多種在統計學上與增加的罹患相關疾病、病症及/或病況風險相關聯之敏感因素之個體。

「醫藥」意指組合物、試劑、方法及諸如此類能夠達成醫藥效應，且亦指組合物能夠安全地投與個體。「醫藥效應」可意指(但不限於)組合物、試劑或方法能夠在至少一個個體(例如哺乳動物個體，例如人類)中、

在至少5%之個體群體、至少10%、至少20%、至少30%、至少50%及諸如此類之個體中刺激期望生物化學、遺傳、細胞、生理或臨床效應。「醫藥上可接受」意指經聯邦或州政府管理機構批准或列示於美國藥典(U.S. Pharmacopoeia)或其他公認藥典中安全地用於動物、且更具體而言安全地用於人類中。「醫藥上可接受之媒劑」或「醫藥上可接受之賦形劑」係指與如本文所述之蛋白質一起投與之稀釋劑、佐劑、賦形劑或載劑。

「預防(preventing或prevention)」係指降低獲得疾病或病症之風險(即，使疾病之至少一個臨床症狀不在可暴露於或易患該疾病但尚未經歷或展示該疾病之症狀之個體中發生，或使症狀以低於治療不存在時之嚴重程度發生)。「預防(preventing或prevention)」可指延遲疾病或病症之發作。

本文所教示之治療性醫藥組合物可包含一或多種天然產物。然而，在某些實施例中，治療性醫藥組合物本身不存在於自然界中。此外，在某些實施例中，治療性醫藥組合物具有與可存在於自然界中之任何個別天然對應體或組合物組分相比顯著不同之特徵。亦即，在某些實施例中，包含治療有效量之經純化蛋白質之本文所教示之醫藥組合物具有至少一種結構及/或功能性質，其賦予組合物整體與組合物之可天然存在之任何單一個別組分相比顯著不同之特徵。法院已確定，包含天然產物且與可天然存在之任何個別組分相比具有顯著不同特徵之組合物係法定標的物。因此，所教示治療性醫藥組合物整體具有顯著不同之特徵。該等特徵說明於本文所教示之數據及實例中。

本發明之細節陳述於本文中。儘管類似或等效於本文所述方法及材料之方法及材料可用於本發明之實踐或測試中，但現闡述說明性方法及材

料。根據說明及申請專利範圍可明瞭本發明之其他特徵、目標及優點。

衍生自微生物群系之治療性蛋白質 - 本發明之概述

多種疾病及病症與經降低胃腸上皮細胞屏障功能或完整性相關。該等疾病及病症具有多面性且以多種方式在診斷上呈現。一種該疾病係發炎性腸病(IBD)，其發病率及盛行率隨時間且在世界之不同地區增加，此指示其作為全球性疾病出現。(Molodecky 等人，*Gastroenterol* 142:46-54, 2012)。IBD係闡述具有胃腸(GI)道之慢性或復發性免疫反應及發炎之病況之總稱。兩種最常見之發炎性腸病係潰瘍性結腸炎(UC)及克隆氏病(CD)。二者皆以GI免疫系統之異常反應為特徵。通常，免疫細胞保護身體免於感染。然而，在患有IBD的人中，此免疫系統將腸中之食物、細菌及其他材料誤認為病原體且發炎反應進入腸襯裡中，從而產生慢性發炎。發生此種情況時，患者經歷IBD之症狀。

IBD涉及消化道之全部或部分之慢性發炎。UC及CD二者通常涉及例如嚴重腹瀉、腹痛、疲勞及體重減輕。IBD及相關病症可使人虛弱且有時引起危及生命之併發症。

對於腸屏障完整性，腸上皮細胞完整性之喪失在IBD中起關鍵致病作用。*Maloy, Kevin J.; Powrie, Fiona*, 「Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease」, (2011) *Nature*. 474 (7351): 298-306。假設腸微生物區之有害變化誘發不適當或不受控之免疫反應，從而引起腸上皮細胞損傷。此關鍵腸上皮細胞屏障之破壞容許進一步浸潤微生物區，進而引發其他免疫反應。因此，IBD係多因子疾病，其部分地由對腸管微生物區之過度免疫反應驅動，此可引起上皮細胞屏障功能缺陷。

IBD 患者之微生物群系剖析已揭露多種概況，例如增多的變形菌 (Proteobacteria)，包括黏附侵襲性大腸桿菌，通常以潛在有益的微生物 (例如羅斯拜瑞氏菌屬(*Roseburia spp*))為代價(Machiels等人，2014, *Cut*, 63:1275-1283；Patterson等人，2017, *Front Immunol*, 8:1166；Shawki 及McCole, 2017, *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 3:41-50)。此外，人羅斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)與潰瘍性結腸炎患者之生態失調相關。已發現IBD侵襲之個體使共生細菌之生物多樣性減小30%-50%，例如厚壁菌 (Firmicutes，即毛螺旋菌(*Lachnospiraceae*))及類桿菌(Bacteroidetes)減少。腸道菌群在發炎性腸病之病因中之作用之其他證據係與未受侵襲之個體相比，IBD侵襲之個體更可能在其診斷前2-5年時段已開具抗生素處方。參見Aroniadis OC, Brandt LJ, 「Fecal microbiota transplantation: past, present and future」, (2013) *Curr. Opin. Gastroenterol*. 29 (1) (2013): 79-84。

在多個臨床及臨床前研究中已展示，保護性細菌群落、益生菌及細菌衍生之代謝物會改良疾病。舉例而言，糞便微生物轉移(FMT)實驗已顯示在IBD患者中取得一定成功，但使用FMT仍存在挑戰(Moayyedi等人，2015, *Gastroenterology*, 149:102-109 e106；Qazi等人，2017, *Gut Microbes*, 8:574-588；Narula等人，2017, *Inflamm Bowel Dis*, 23:1702-1709)。在其他研究中亦已顯示，使用益生菌(包括VSL#3、乳桿菌屬(*Lactobacillus spp.*)及雙歧桿菌屬(*Bifidobacterium spp.*))治療在人類及動物模型中具有有益效應(Srutkova等人，2015, *PLoS One*, 10:e0134050；Pan等人，2014, *Benef Microbes*, 5:315-322；Huynh等人，2009, *Inflamm Bowel Dis*, 15:760-768；Bibiloni等人，2005, *Am J*

Gastroenterol, 100:1539-1546)。此外已顯示，在IBD及代謝疾病之動物模型中，細菌產物(例如來自鼠李糖乳桿菌(*L. rhamnosus*) GG之p40及來自嗜黏蛋白艾克曼菌(*A. muciniphila*)之Amuc-1100)分別促進屏障功能及保護(Yan等人，2011, J Clin Invest, 121:2242-2253；Plovier等人，Nat Med, 23:107-113)。

儘管使用活微生物群體來治療疾病愈來愈普遍，但該等方法依賴於所投與細菌在宿主或患者中存活及以有益治療方式與宿主組織相互作用之能力。本文所提供之替代方法係鑑別出可影響宿主之細胞功能且提供治療益處之微生物編碼之蛋白質及其變體。該等蛋白質可例如以包含實質上經分離或純化之治療性細菌衍生蛋白質之醫藥組合物形式或以經改造以將治療性蛋白質表現為外源性蛋白質之活生物治療劑(細菌)形式投與。此外，包含投與治療性蛋白質之治療方法並不限於腸管(小腸、大腸、直腸)，但亦可包括治療消化道內之其他病症，例如口腔黏膜炎。

為鑑別出在胃腸發炎性病症中可具有治療應用之微生物衍生蛋白質，分析健康或經診斷患有IBD (UC)之人類之黏膜生檢以確定該等黏膜生檢之微生物組成。比較健康與患病個體之細菌概況鑑別出可能有益(健康個體中之數量多於患病個體)或有害(健康個體中之數量低於患病個體)之細菌。鑑別為有益之細菌物種尤其係人羅斯拜瑞氏菌，此與上文所提及之研究一致。然後實施延展性生物資訊學分析以預測由細菌編碼之蛋白質且然後鑑別出可能由細菌分泌之彼等蛋白質。然後利用一系列活體外分析表徵經預測為分泌性蛋白之蛋白質以研究每一蛋白質對上皮細胞屏障完整性、細胞介素產生及/或釋放及傷口癒合之效應。然後在活體內小鼠結腸炎模型中評價鑑別為起增加上皮細胞屏障完整性作用之蛋白質。在本文中

鑑別為「SG-11」之一種該蛋白質展示活體外及活體內活性二者，指示該蛋白質提供治療益處用於改良上皮細胞屏障完整性及治療與上皮細胞屏障完整性相關之疾病及病症以及治療發炎性胃腸疾病(例如IBD)的能力，如下文更詳細闡述。

SG-11蛋白質

在本文中稱為SG-11之蛋白質係在存在於人羅斯拜瑞氏菌之基因體中之768個核苷酸序列(SEQ ID NO:2)內編碼。人羅斯拜瑞氏菌株之完整基因體序列可參見基因庫登錄號CP003040 (該序列全部以引用方式併入本文中)。人羅斯拜瑞氏菌株之16S rRNA基因序列可參見基因庫登錄號AJ270482。由人羅斯拜瑞氏菌基因體序列編碼之全長蛋白質之長度為256個胺基酸(SEQ ID NO:1)，其中殘基1-24經預測為信號肽，其在活體內裂解產生232個胺基酸之成熟蛋白質(SEQ ID NO:3；由SEQ ID NO:4編碼)。重組SG-11可經表現具有N末端甲硫胺酸(由密碼子ATG編碼)以產生233個胺基酸之成熟蛋白質(SEQ ID NO:7)。

如實例(例如實例1)中所詳述，SG-11在不同市售及常用表現載體中重組表現。舉例而言，使用pGEX表現載體(其表現具有GST標籤及在表現及純化後裂解之蛋白酶位點之所關注蛋白質)、pET-28表現載體(其添加N末端FLAG標籤)及pD451表現載體(其用於表現由SEQ ID NO:7組成且不具N末端標籤之SG-11蛋白質)表現SG-11 (一種包含SEQ ID NO:3之蛋白質)。使用該等蛋白質實施及重複之實驗顯示，因使用不同蛋白質表現系統及DNA構築體引起之少量N末端及/或C末端變化在活體內及活體外分析中保留等效功能活性。應理解，除非另外指示，否則術語「SG-11」在本文中係指在本文中繪示為SEQ ID NO:3之胺基酸序列及包含SEQ ID NO:3

之胺基酸序列之蛋白質之該等變體(包括(但不限於) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7)。SG-11變體可包括胺基酸殘基之變化(取代、插入、缺失)以及修飾(例如融合構築體及轉譯後修飾(磷酸化、醯基化等))。SG-11蛋白質及編碼核酸之一些實例性實施例提供於下表1中。

表1

胺基酸序列	編碼核酸序列
SEQ ID NO:1 MKRLVCTVCSVLLC AGLLSGCGTSLEGEE SVVYVGKKGVIASL DVETLDQSYDETE LKSYVDAEVEDYTA EHGKNAVKVESLKV EDGVAKLKMKYKTP EDYTAFNGIELYQG KVVASLAAGYVYD GEFARVEEGKVVGA ATKQDIYSEDDLKV AIIRANTDVKVDGEI CYVSCQNVKLTGKD SVSIRDGYYLETGSV TASVDVTGQESVGT EQLSGTEQMEMTGE PVNADDTEQTEAAA GDGSFETDVYTFIVY K	SEQ ID NO:2 ATGAAGAGATTAGTGTGCACGGTCTGCA GTGTACTGTTGTGTGCGGGACTTCTCTCC GGATGCGGTACCTCGCTGGAGGGAGAGG AAAGTGTCGTGTACGTGGGAAAGAAAGG CGTGATAGCGTCGCTGGATGTGGAGACG CTCGATCAGTCCTACTACGATGAGACGG AACTGAAGTCCTATGTGGATGCAGAGGT GGAAGATTACACCGCGGAGCATGGTAAA AATGCAGTCAAGGTGGAGAGCCTTAAGG TGGAAGACGGTGTGGCGAAGCTTAAGAT GAAGTACAAGACACCGGAGGATTATACC GCATTTAATGGAATTGAACTCTATCAGG GGAAAGTCGTTGCTTCCCTGGCGGCAGG ATACGTCTACGACGGGGAGTTCGCCCCG GTGGAGGAAGGCAAGGTTGTGGGAGCTG CCACAAAACAGGATATTTACTCTGAGGA TGATTTGAAAGTTGCCATCATCCGTGCCA ATACGGATGTGAAGGTGGACGGTGAGAT CTGCTATGTCTCCTGTCAGAATGTGAAGC TGACCGGAAAAGACAGTGTGTGTCGATCCG TGACGGATATTATCTTGAGACGGGAAGC GTGACGGCATCCGTGGATGTGACCGGAC

胺基酸序列	編碼核酸序列
	AGGAGAGCGTCGGGACCGAGCAGCTTTC GGGAACCGAACAGATGGAGATGACCGG GGAGCCGGTGAATGCGGATGATACCGAG CAGACAGAGGCGGCGGCCGGTGACGGTT CGTTCGAGACAGACGTATATACTTTTCATT GTCTACAAA
SEQ ID NO: 3 LEGEESVVYVGKKG VIASLDVETLDQSY DETELKSYVDAEVE DYTAEHGKNAVKVE SLKVEDGVAKLKMK YKTPEDYTA FN GIEL YQGKVVASLAAGY VYDGEFARVEEGKV VGAATKQDIYSEDD LKVAIIRANTDVKV DGEICYVSCQNVKL TGKDSVSIRDGYYLE TGSVTASVDVTGQE SVGTEQLSGTEQME MTGEPVNADDTEQT EAAAGDGSFETDVY TFIVYK	SEQ ID NO: 4 CTGGAGGGAGAGGAAAGTGTCGTGTACG TGGGAAAGAAAGGCGTGATAGCGTCGCT GGATGTGGAGACGCTCGATCAGTCCTAC TACGATGAGACGGA ACTGAAGTCCTATG TGGATGCAGAGGTGGAAGATTACACCGC GGAGCATGGTAAAAATGCAGTCAAGGTG GAGAGCCTTAAGGTGGAAGACGGTGTGG CGAAGCTTAAGATGAAGTACAAGACACC GGAGGATTATACCGCATTTAATGGAATT GAACTCTATCAGGGGAAAGTCGTTGCTT CCCTGGCGGCAGGATACGTCTACGACGG GGAGTTCGCCCCGCGTGGAGGAAGGCAAG GTTGTGGGAGCTGCCACAAAACAGGATA TTTACTCTGAGGATGATTTGAAAGTTGCC ATCATCCGTGCCAATACGGATGTGAAGG TGGACGGTGAGATCTGCTATGTCTCCTGT CAGAATGTGAAGCTGACCGGAAAAGACA GTGTGTCGATCCGTGACGGATATTATCTT GAGACGGGAAGCGTGACGGCATCCGTGG ATGTGACCGGACAGGAGAGCGTCGGGAC CGAGCAGCTTTCGGGAACCGAACAGATG GAGATGACCGGGGAGCCGGTGAATGCGG ATGATACCGAGCAGACAGAGGCGGCGGC

胺基酸序列	編碼核酸序列
	CGGTGACGGTTCGTTTCGAGACAGACGTA TATACTTTCATTGTCTACAAA
SEQ ID NO:7 MLEGEESVVYVGKK GVIASLDVETLDQSY YDETELKSYVDAEV EDYTAEHGKNAVKV ESLKVEDGVAKLKM KYKTPEDYTAENGIE LYQGKVVASLAAGY VYDGEFARVEEGKV VGAATKQDIYSEDD LKVAHIRANTDVKV DGEICYVSCQNVKL TGKDSVSIRDGYYLE TGSVTASVDVTGQE SVGTEQLSGTEQME MTGEPVNADDTEQT EAAAGDGSFETDVY TFIVYK	SEQ ID NO:8 ATGTTGGAGGGTGAAGAGTCTGTTGTCT ATGTGGGTAAGAAAGGTGTGATCGCGTC CCTGGACGTCGAGACTCTGGACCAGTCT TACTATGATGAAACCGAGCTGAAGTCGT ATGTGGACGCCGAAGTTGAGGATTACAC GGCCGAGCACGGCAAAAATGCCGTCAA GTTGAGAGCTTGAAAGTTGAGGACGGCG TGGCAAAGCTGAAGATGAAATACAAGAC CCCAGAGGACTACACGGCGTTCAATGGT ATCGAGCTGTATCAGGGCAAAGTCGTCG CATCCCTGGCAGCGGGCTATGTGTACGA CGGTGAGTTTGCGCGCGTCGAAGAAGGC AAAGTTGTGGGTGCGGCTACGAAACAAG ATATCTACAGCGAAGATGACCTGAAAGT CGCGATTATTCGTGCTAACACCGATGTTA AAGTTGATGGCGAGATTTGCTACGTTAG CTGTCAAAACGTAAAGCTGACGGGTAAA GATAGCGTGAGCATTCGTGATGGCTATT ATCTGGAAACCGGTAGCGTTACGGCGAG CGTCGATGTTACCGGTCAAGAGAGCGTG GGTACCGAACAGCTGAGCGGCACCGAAC AGATGGAAATGACCGGTGAACCGGTAA CGCAGACGACACGGAACAAACCGAAGC CGCGGCAGGCGACGGTAGCTTCGAGACT GACGTGTACACCTTTATCGTGTACAAG
SEQ ID NO:9 MDYKDDDDDKGSSH	SEQ ID NO:10 ATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGG

胺基酸序列	編碼核酸序列
MLEGEESVVYVGKK GVIASLDVETLDQSY YDETELKSYVDAEV EDYTAEHGKNAVKV ESLKVEDGVAKLKM KYKTPEDYTAENGIE LYQGKVVASLAAGY VYDGEFARVEEGKV VGAATKQDIYSEDD LKVAIIRANTDVKV DGEICYVSCQNVKL TGKDSVSIRDGYYLE TGSVTASVDVTGQE SVGTEQLSGTEQME MTGEPVNADDTEQT EAAAGDGSFETDVY TFIVYK	GCAGCAGCCATATGCTGGAGGGAGAGGA AAGTGTCGTGTACGTGGGAAAGAAAGGC GTGATAGCGTCGCTGGATGTGGAGACGC TCGATCAGTCCTACTACGATGAGACGGA ACTGAAGTCCTATGTGGATGCAGAGGTG GAAGATTACACCGCGGAGCATGGTAAAA ATGCAGTCAAGGTGGAGAGCCTTAAGGT GGAAGACGGTGTGGCGAAGCTTAAGATG AAGTACAAGACACCGGAGGATTATACCG CATTTAATGGAATTGAACTCTATCAGGG GAAAGTCGTTGCTTCCCTGGCGGCAGGA TACGTCTACGACGGGGAGTTCGCCCCGCG TGGAGGAAGGCAAGGTTGTGGGAGCTGC CACAAAACAGGATATTTACTCTGAGGAT GATTTGAAAGTTGCCATCATCCGTGCCA ATACGGATGTGAAGGTGGACGGTGAGAT CTGCTATGTCTCCTGTCAGAATGTGAAGC TGACCGGAAAAGACAGTGTGTTCGATCCG TGACGGATATTATCTTGAGACGGGAAGC GTGACGGCATCCGTGGATGTGACCGGAC AGGAGAGCGTCGGGACCGAGCAGCTTTC GGGAACCGAACAGATGGAGATGACCGG GGAGCCGGTGAATGCGGATGATACCGAG CAGACAGAGGCGGCGGCCGGTGACGGTT CGTTCGAGACAGACGTATATACTTTTCATT GTCTACAAA
SEQ ID NO:19 MLEGEESVVYVGKK GVIASLDVETLDQSY YDETELKSYVDAEV	SEQ ID NO:20 ATGTTGGAGGGTGAAGAGTCTGTTGTCT ATGTGGGTAAGAAAGGTGTGATCGCGTC CCTGGACGTGAGACTCTGGACCAGTCT

胺基酸序列	編碼核酸序列
EDYTAEHGKSAVKV ESLKVEDGVAKLKM KYKTPEDYTAFIGIE LYQGKVVASLAAGY VYDGEFARVEEGKV VGAATKQDIYSEDD LKVAIIRANTDVKV DGEIVYVSSQNVKL TGKDSVSIRDGYYLE TGSVTASVDVTGQE SVGTEQLSGTEQME MTGEPVNADDTEQT EAAAGDGSFETDVY TFIVYK	TACTATGATGAAACCGAGCTGAAGTCGT ATGTGGACGCCGAAGTTGAGGATTACAC GGCCGAGCACGGCAAATCCGCCGTCAA GTTGAGAGCTTGAAAGTTGAGGACGGCG TGGCAAAGCTGAAGATGAAATACAAGAC CCCAGAGGACTACACGGCGTTCAGCGGT ATCGAGCTGTATCAGGGCAAAGTCGTCTG CATCCCTGGCAGCGGGCTATGTGTACGA CGGTGAGTTTGCGCGCGTCTGAAGAAGGC AAAGTTGTGGGTGCGGCTACGAAACAAG ATATCTACAGCGAAGATGACCTGAAAGT CGCGATTATTCGTGCTAACACCGATGTTA AAGTTGATGGCGAGATTGTGTACGTTAG CAGCCAAAACGTAAAGCTGACGGGTAAA GATAGCGTGAGCATTCGTGATGGCTATT ATCTGGAAACCGGTAGCGTTACGGCGAG CGTCGATGTTACCGGTCAAGAGAGCGTG GGTACCGAACAGCTGAGCGGCACCGAAC AGATGGAAATGACCGGTGAACCGGTAA CGCAGACGACACGGAACAAACCGAAGC CGCGGCAGGCGACGGTAGCTTCGAGACT GACGTGTACACCTTTATCGTGTACAAG

疾病中之上皮細胞屏障功能

近年來，多個研究已鑑別出遺傳及環境因素二者在IBD之發病機制中之主要作用。Markus Neurath, 「Cytokines in Inflammatory Bowel Disease」, Nature Reviews Immunology, 第14.卷, 329-342 (2014)。該等IBD風險因子之組合似乎起始上皮細胞屏障功能之有害變化，藉此容許管腔抗原(例如來自共生微生物區之細菌性抗原)易位至腸壁中。參見上

文。隨後，對該等環境觸發因素之異常及過度反應(例如增加的促發炎細胞介素釋放)引起遺傳敏感宿主之亞臨床或急性黏膜發炎。參見上文。因此，適當上皮細胞屏障功能在IBD中之重要性顯而易見，此乃因在未能解決急性腸發炎之個體中，發展由黏膜免疫系統之不受控活化誘發之慢性腸發炎。具體而言，黏膜免疫細胞(例如巨噬細胞、T細胞及先天淋巴樣細胞(ILC)之亞組)似乎藉由例如產生可促進胃腸道慢性發炎之細胞介素因應微生物產物或共生微生物區之抗原。因此，恢復患者之適當上皮細胞屏障功能可能為使IBD消退之關鍵。

SG-11之治療活性係部分地藉由其在活體外及活體內對上皮細胞屏障功能之有益效應來鑑別。如實例2中所顯示，SG-11在增加上皮細胞屏障完整性方面有活性，如藉由活體外跨上皮細胞電阻(TEER)分析所顯示。TEER分析係所熟知用於量測對上皮細胞層之結構及功能完整性之效應之方法(Srinivasan等人，2015, J Lab Autom, 20:107-126；Beduneau等人，2014, Eur J Pharm Biopharm, 87:290-298；Zolotarevsky等人，2002, Gastroenterology, 123:163-172；Dewi等人(2004) J. Virol. Methods. 121:171-180及Mandic等人(2004) Clin. Exp. Metast. 21:699-704。)。本文所實施及闡述之分析係由腸細胞及杯狀細胞構成之上皮細胞單層組成以更準確地對腸上皮細胞之結構及功能組分建模。培養細胞直至形成緊密接合且藉由量測跨上皮細胞電阻評價屏障功能能力。添加刺激物(例如熱滅活大腸桿菌)後，跨上皮細胞層之電阻減小。可用於TEER分析中之對照試劑包括星狀孢菌素及肌凝蛋白輕鏈激酶抑制劑。星狀孢菌素係一種源自根孢鏈黴菌(*Streptomyces staurosporeus*)之廣譜激酶抑制劑，其誘發細胞凋亡。此試劑破壞約98%之間隙接合，從而引起TEER分析中之

電阻減小。肌凝蛋白輕鏈激酶(MLCK)係促發炎細胞介素誘導之信號傳導級聯中之末端效應物，其引起接合周圍肌動凝蛋白環收縮，從而使間隙接合分離。藉由抑制MLCK，防止緊密接合破壞。TEER分析中之MLCK抑制劑應減小或防止TEER分析中之電阻減小。

在一些實施例中，如本文所述之SG-11蛋白質或其變體或片段之特徵可在於其增加上皮細胞屏障功能完整性之能力，如藉由活體外TEER分析所評價。與不存在蛋白質時實施之TEER分析相比，SG-11蛋白質或其變體或片段可使TEER分析中之電阻增加至少約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

另外，實例6顯示，SG-11蛋白質可增強或促進上皮細胞傷口癒合，該活性可起維持或修復上皮細胞屏障(例如腸或黏膜上皮細胞屏障)之作用。

根據SG-11修復活體外屏障功能完整性之效應，分析活體內SG-11在齧齒類動物IBD模型中減少損傷之能力。實例7及8 (SG-11)及16 (SG-11變體)闡述使用DSS (聚葡萄糖硫酸鈉)動物模型進行之研究，該模型業內公認用於研究IBD藥劑(Chassaign等人，2014, Curr Protoc Immunol, 104:Unit-15.25；Kiesler等人，2015, Cell Mol Gastroenterol Hepatol)。DSS係一種硫酸化多醣，其直接毒殺結腸上皮細胞且引起上皮細胞損傷，因間隙接合破壞而導致屏障功能損失。在該等實驗中，在小鼠中誘發結腸炎之前(實例7)或之後(實例8)用SG-11治療動物。作為陽性對照，亦用類升糖素肽2 (GLP2)之穩定類似物Gly2-GLP2治療小鼠。已知在實驗小鼠結腸炎模型中Gly2-GLP2促進上皮細胞生長且減少結腸損傷。DSS研究之結果顯示，SG-11蛋白質可有效地減少DSS模型之體重減輕，其係IBD治療

劑之臨床效能之重要指標。SG-11治療亦減小大體病理及腸組織病理學分析之評分。

應注意，儘管在實例7中SG-11治療會改良4Kda-FITC腸滲透率讀出且減小LPS結合蛋白(LBP - LPS暴露之標記物)之血清含量，但在實例8中用SG-11或Gly2-GLP2治療後未觀察到顯著效應。考慮到在更換為正常飲用水及用SG-11或Gly2-GLP2治療之前用DSS將實例8中之動物治療7天時，此並不令人驚訝。此先前暴露於DSS引起腸上皮細胞損傷、LPS易位穿過破壞的上皮細胞屏障及誘導LBP分泌。然而，基於4KDa-FITC聚葡萄糖量測值，上皮細胞屏障修復似乎在將DSS更換為正常飲用水後3-4天內快速進行(數據未顯示，圖12)。因此，難以檢測在量測時(在治療6天後)經治療對未經治療動物之4KDa-FITC滲透率讀出之改良。另外，在治療性治療之前暴露於DSS達延長時間段之動物中，血清中LBP之含量可獨立於屏障功能修復(實例8)。例如，藉由在DSS暴露期間使LPS易位活化之肝細胞產生並分泌大量LPB。因此且不受限於理論，短研究時間段可不容許足夠時間使肝細胞失活及自DSS處理之動物之血清清除LBP。因此，認為藉由量測後續時間點之血清LBP繼續研究將顯示血清LBP含量減少，然而，若屏障功能在兩種動物中在LBP可自血清清除之前恢復，則經治療及未經治療之動物之血清LBP減少可能相似。

SG-11之變體

鑒於SG-11之治療價值及其於治療疾病之用途，進一步表徵蛋白質且其序列經修飾以改變其一級結構，從而最佳化蛋白質之醫藥調配物及長期儲存。

如實例9中所述，使用SEQ ID NO:7來實施基因庫非冗餘蛋白數據庫

之BLAST搜尋以鑑別出具有相似胺基酸序列且可為功能同系物或具有與SG-11之功能相似之功能的蛋白質。鑑別出三種該蛋白質且比對各自之所預測成熟序列(不含N末端信號肽)與SEQ ID NO:7以鑑別出蛋白質內相對保守之區域及個別位置。該3種蛋白質在本文中揭示為SEQ ID NO:21 (衍生自基因庫登錄號WP_006857001)、SEQ ID NO:22 (衍生自基因庫登錄號 WP_075679733) 及 SEQ ID NO:23 (衍生自基因庫登錄號 WP_055301040) (圖17)，且因此本文提供包含該3種蛋白質中之1種或其變體或片段之醫藥組合物以及治療與屏障功能病症相關之疾病及/或胃腸疾病或病症之方法，其包含向有需要之個體投與包含SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22及SEQ ID NO:23中之任一者或其變體或片段之醫藥組合物。

SG-11變體、SG-11V5胺基酸序列及編碼核酸序列之實例性實施例提供於下表2中。

表2

胺基酸序列	編碼核酸序列
SEQ ID NO:19 (SG-11V5) MLEGEESVVYVGKK GVIASLDVETLDQSY YDETELKSYVDAEV EDYTAEHGKSAVKV ESLKVEDGVAKLKM KYKTPEDYTAFIGIE LYQGKVVASLAAGY VYDGEFARVEEGKV VGAATKQDIYSEDD	SEQ ID NO:20 ATGTTGGAGGGTGAAGAGTCTGTTGTCT ATGTGGGTAAGAAAGGTGTGATCGCGTC CCTGGACGTCGAGACTCTGGACCAGTCT TACTATGATGAAACCGAGCTGAAGTCGT ATGTGGACGCCGAAGTTGAGGATTACAC GGCCGAGCACGGCAAATCCGCCGTCAA GTTGAGAGCTTGAAAGTTGAGGACGGCG TGGCAAAGCTGAAGATGAAATACAAGAC CCCAGAGGACTACACGGCGTTCAGCGGT ATCGAGCTGTATCAGGGCAAAGTCGTCTG

胺基酸序列	編碼核酸序列
LKVAIIRANTDVKV DGEIVYVSSQNVKL TGKDSVSIRDGYYLE TGSVTASVDVTGQE SVGTEQLSGTEQME MTGEPVNADDTEQT EAAAGDGSFETDVY TFIVYK	CATCCCTGGCAGCGGGCTATGTGTACGA CGGTGAGTTTGCGCGCGTCGAAGAAGGC AAAGTTGTGGGTGCGGCTACGAAACAAG ATATCTACAGCGAAGATGACCTGAAAGT CGCGATTATTCGTGCTAACACCGATGTTA AAGTTGATGGCGAGATTGTGTACGTTAG CAGCCAAAACGTAAAGCTGACGGGTAAA GATAGCGTGAGCATTCGTGATGGCTATT ATCTGGAAACCGGTAGCGTTACGGCGAG CGTCGATGTTACCGGTCAAGAGAGCGTG GGTACCGAACAGCTGAGCGGCACCGAAC AGATGGAAATGACCGGTGAACCGGTAA CGCAGACGACACGGAACAAACCGAAGC CGCGGCAGGCGACGGTAGCTTCGAGACT GACGTGTACACCTTTATCGTGTACAAG

為增強SG-11蛋白質用於醫藥調配物及臨床應用之穩定性，實施研究以鑑別並表徵經純化SG-11蛋白質之轉譯後修飾(PTM)。該等實驗闡述於實例10-11中。該分析顯示，SG-11蛋白質可經歷至少甲硫胺酸氧化及天冬醯胺去醯胺之PTM。此外，實驗闡述在實例12中，SG-11中之半胱胺酸在活性蛋白質之經純化功能構形中不太可能形成二硫鍵，此表明SG-11中之游離硫氫基可引起含有經純化蛋白質之溶液聚集。基於該等穩定性研究且儘管如在多序列比對(圖17)中可見SG-11中之殘基具有保守性質，決定測試位置147及/或151 (相對於SEQ ID NO:7)之半胱胺酸是否可經不同胺基酸取代。亦考慮取代位置53及83之保守天冬醯胺。在實例性實施例中，SEQ ID NO:7之SG-11序列經修飾以引入C147V及C151S取代以生成SEQ ID NO:11 (SG-11V1)。C147V及C151S取代亦存在於所提供SG-11

變體 SG-11V2 (SEQ ID NO:13 ; 包含 G84D 、 C147V 、 C151S) 、 SG-11V3 (SEQ ID NO:15 ; 包含 N83S 、 C147V 、 C151S) 、 SG-11V4 (SEQ ID NO:17 ; 包含 N53S 、 G84D 、 C147V 、 C151S) 及 SG-11V5 (SEQ ID NO:19 ; 包含 N53S 、 N83S 、 C147V 、 C151S) 中。

實例13顯示，PTM (甲硫胺酸氧化及天冬醯胺去醯胺)在SG-11V5中與SG-11 (SEQ ID NO:7)相比顯著減少。在不同溫度下及不同儲存緩衝液中皆觀察到減少。實例14闡述一實驗，其經實施以確定包含半胱胺酸取代之SG-11變體(SG-11V5，SEQ ID NO:19)是否影響蛋白質在儲存緩衝液中之聚集。結果顯示，在不同儲存緩衝液中測試時，SG-11V5變體具有與SG-11 (SEQ ID NO:7)相比減少的聚集。

應注意，儘管經取代生成SG-11V5之胺基酸存在於SG-11蛋白質之相對保守之區域，但取代該4種殘基而不損失功能活性係可能的(實例15及16，更詳細闡述於下文中)。

基於本文所述之實驗數據及分析，預期SG-11之變體(例如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5)經設計以取代SEQ ID NO:7之胺基酸N53、N83、G84、C147及C151中之任一者或多者(其中所註明取代處於相對於SEQ ID NO:7之殘基位置)。此變體之實施例在下表3中提供為SEQ ID NO:33，其中位置53、83、84、147及151中每一者之殘基表示為X，指示該5個殘基中之一或多者可各自取代任何可能的20個胺基酸。在一些實施例中，蛋白質包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列。在其他實施例中，X53係N、S、T、M、R、Q，及/或X83係N、R或K，及/或X84係G或A，及/或X147係C、S、T、M、V、L、A或G，及/或X151係C、S、T、M、V、L、A或G。在其他實施例中，X53係N、S或K，及/或X83係N或R，

及/或X84係G或A，及/或X147係C、V、L或A，及/或X151係C、S、V、L或A。

在一些實施例中，蛋白質包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列，其中X53係除N外之任一胺基酸，X83係除N外之任一胺基酸，X84係除G外之任一胺基酸，X147係除C外之任一胺基酸，及/或X151係除C外之任一胺基酸。

表3

SEQ ID NO:33及SEQ ID NO:34之胺基酸序列(參見上文定義)
MLEGEESVVYVGKKGVIASLDVETLDQSYDETELKSYVDAEVED YTAEHGK <u>X</u> AVKVESLKVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAF <u>XX</u> IELYQG KVVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAAATKQDIYSEDDLKVAIIRA NTDVKVDGEI <u>X</u> YVS <u>X</u> QNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVTASVDVT GQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVY TFIVYK

在另一實例中，所教示蛋白質之某些胺基酸可取代蛋白質結構中之其他胺基酸而不會顯著損失與諸如受質分子上之結合位點、受體、抗體之抗原結合區域及諸如此類結構相互作用結合之能力。因此，該等蛋白質係為所揭示蛋白質之生物功能等效物(例如包含SEQ ID NO:3或其變體)。所謂的「保守」變化不會破壞蛋白質之生物活性，此乃因該結構變化並不影響蛋白質實施其經設計功能之能力。因此本發明者預期，可在本文所揭示基因及蛋白質之序列中製造多個變化，同時仍滿足本發明之目標。

本文亦提供SG-11之變體：SEQ ID NO:11 (C147V、C151S，「SG11-V1」)、SEQ ID NO:13 (G84D、C147V、C151S，「SG11-V2」)、SEQ ID NO:15 (N83S、C147V、C151S，「SG11-V3」)、SEQ ID NO:17 (N53S、G84D、C147V、C151S，「SG11-V4」)及SEQ ID

NO:19 (N53S、N83S、C147V、C151S，「SG11-V5」)。

重要的是，對於TEER分析(實例15)及活體內DSS小鼠模型(實例16)二者，包含SEQ ID NO:19之SG-11變體蛋白質仍維持其活性，此顯示SG-11之變體可維持等效於野生型SG-11之治療功能。具體而言，實施活體外TEER及活體內DSS模型實驗，其中SG-11 (SEQ ID NO:7)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19)係平行使用。實例15顯示，SG-11及SG-11V5具有基本上相同之減少活體外TEER之功能能力。如在DSS處理之前或之後用SG-11治療DSS模型小鼠之實例7及8中所述，實施實例16以比較SG-11及SG-11變體之活體內效能。實例16亦比較在DSS處理之前(如實例16A所述)及在DSS處理之後(如實例16B所述)向小鼠投與蛋白質。SG-11及SG-11變體降低體重減輕(圖23A及23B)以及大體病理臨床評分(圖24)。另外在實例16A中，SG-11降低腸滲透率及血清LBP含量，而SG-11V5顯示以劑量依賴性方式降低腸滲透率及血清LBP含量(圖21A及圖22A)。與實例7及8中所觀察到之結果類似，在用DSS延長攻擊後投與治療性蛋白質且在有限時間段內觀察結果之實例16B中，SG-11及SG-11變體蛋白質不會降低腸滲透率或血清LBP含量。如上文所論述，認為繼續研究將顯示滲透率及血清LBP含量二者皆降低。

鑒於該等數據，本文提供與包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列或其片段之蛋白質至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之治療性蛋白質。在替代性實施例中，治療性蛋白質與SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:7或其片段具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%序列一致性。在一些實

施例中，治療性蛋白質包含與SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:5一致之胺基酸序列。或者，治療性蛋白質可為SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7之變體，其中治療性蛋白質相對於SEQ ID NO:7具有1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸取代。在一些實施例中，變體治療性蛋白質包含SEQ ID NO:3之非天然變體。換言之，治療性蛋白質相對於SEQ ID NO:3包含1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個非天然胺基酸取代。在一些實施例中，治療性蛋白質不包含與SEQ ID NO:7之殘基2至233之序列一致之胺基酸序列。

在一些實施例中，SG-11蛋白質可藉由一或多個胺基酸插入或缺失修飾或改變。插入可為將1或多個(例如1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或1至10個、1至20個、1至30個、1至40個或1至50個)胺基酸添加至蛋白質之N末端及/或C末端及/或可在位於N末端與C末端胺基酸之間之位置插入1或多個(例如1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或1至10個、1至20個、1至30個、1至40個或1至50個)胺基酸。類似地，可在N末端及C末端中之任一者處及在內部中缺失1或多個(例如1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或1至10個、1至20個、1至30個、1至40個或1至50個)胺基酸。

在一些實施例中，提供相對於SEQ ID NO:3含有至少一個非天然胺基酸取代之經修飾或變體蛋白質。在其他實施例中，變體蛋白質相對於SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7包含1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸取代。在其他實施例中，經修飾蛋白質含有如以下中所繪示之胺基酸序列：SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 (SG-11V1)、SEQ ID NO:13 (SG-11V2)、SEQ ID

NO:15 (SG-11V3)、SEQ ID NO:17 (SG-11V4)或SEQ ID NO:19 (SG-11V5)。

在一些實施例中，本發明之治療性蛋白質涵蓋亦保留例如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7中所繪示之全長成熟蛋白質之一或多種活性的任一變體蛋白質(例如SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19)。

亦設想編碼該等蛋白質之多核苷酸序列。熟習此項技術者熟知，因遺傳密碼之簡併性，編碼單一多肽序列之2個多核苷酸序列可共享相對較低之序列一致性。舉例而言，若編碼233胺基酸序列之多核苷酸中之每個密碼子在其第三位置含有至少1個取代，則將計算出2個多核苷酸之間之約67%序列一致性。本發明之多核苷酸包含編碼與SEQ ID NO:19至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致之蛋白質之序列。因此，在一些實施例中，多核苷酸包含與SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8至少67%一致、或與SEQ ID NO:20約67%至100%、70%至100%、75%至100%、80%至100%、90%至100%或95%至100%一致之序列或其片段。在一些實施例中，多核苷酸包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20之序列或其片段。

在一些實施例中，與包含SEQ ID NO:3或由其組成之蛋白質相比，所教示蛋白質具有顯著不同之結構及/或功能特徵。

如本文所用之術語「SG-11變體」可包括例如與包含SEQ ID NO:3之

序列之蛋白質一致或不一致且藉由例如PTM或融合或連接至第二藥劑(例如蛋白質或肽)進一步修飾之SG-11蛋白質。

蛋白質PTM發生在活體內且可藉由官能基或蛋白質之共價添加、調控亞單元之蛋白質水解裂解或整個蛋白質之降解來增加蛋白質體之功能多樣性。根據本發明製備之經分離蛋白質可經歷1或多個活體內或活體外PTM。修飾之類型取決於表現蛋白質之宿主細胞且包括(但不限於)磷酸化、醯基化、泛素化、亞硝醯化(例如S-亞硝醯化)、甲基化、乙醯化(例如N-乙醯化)、脂化(肉豆蔻醯基化、N-肉豆蔻醯基化、S-棕櫚醯基化、法尼基化、S-異戊二烯化、S-棕櫚醯基化)且蛋白質分解可影響正常細胞生物學及發病機制之幾乎所有態樣。如本文所揭示之經分離及/或純化之SG-11蛋白質或其變體或片段可包含一或多個上文所列舉之轉譯後修飾。

SG-11蛋白質或其變體或片段可為其中N末端及/或C末端結構域經由肽鍵融合至第二蛋白質之融合蛋白。熟習此項技術者所熟知之常用融合伴侶包括(但不限於)人類血清白蛋白及可結晶片段或IgG之恆定結構域Fc。在一些實施例中，SG-11蛋白質或其變體或片段經由二硫鍵連接至第二蛋白質或肽，其中第二蛋白質或肽包含半胱胺酸殘基。

如上文所提及，可在本文所揭示蛋白質之結構中製造修飾及/或變化(例如取代、插入、缺失)。因此，本發明涵蓋該等蛋白質及編碼其之核酸之序列之變化形式，其中其仍能夠保留在多個活體外及活體內分析中以及在本發明治療態樣中評價之功能活性之實質活性。關於功能等效物，熟習此項技術者應充分理解，在「生物功能等效」蛋白質及/或多核苷酸之定義中固有之概念係可在分子之所定義部分內製造、同時使分子保留可接受程度之等效生物活性之變化數較為有限。

亦涵蓋，SG-11蛋白質或其變體或片段在投與個體時可減少個體之疾病相關之體重減輕，改良臨床病理學評分及/或最小化結腸縮短。在一些實施例中，個體係具有遺傳或臨床誘發之發炎性病變或功能不良之上皮細胞屏障之哺乳動物。或者，動物患有涉及上皮細胞屏障功能降低之特發性胃腸道病變或腸發炎性病變。在其他實施例中，哺乳動物係人類、非人類靈長類動物或齧齒類動物。齧齒類動物可為小鼠或大鼠。

在一些實施例中，本發明之SG-11蛋白質或其變體或片段可調節活體外分析中或投與蛋白質之個體中之細胞介素之產生及/或分泌。在一些實施例中，細胞介素之分泌在活體外減少。在活體外分析中或投與蛋白質之個體中產生及/或分泌之細胞介素之量可能在個體之血液、血清及/或血漿中進行量測。投與蛋白質可減小促發炎細胞介素(例如TNF- α 、IL-17、IL-1 β 、IL-2、IFN- γ 、IL-6、IL-12、IL-25、IL-33、IL-8、MCP-1、MIP-3 α 、CXCL1及IL-23中之一或多者)之血清含量。或者，細胞介素可為抗發炎細胞介素，在該情形下投與蛋白質可增加抗發炎細胞介素(例如IL-4、IL-10、IL-13、IFN- α 及TGF- β)之血清含量。

在一些實施例中，SG-11蛋白質或其變體或片段在投與個體(例如哺乳動物，例如齧齒類動物、非人類靈長類動物或人類)時具有減輕胃腸發炎之功能能力。在其他實施例中，蛋白質在投與個體時具有減少發炎性(即促發炎)細胞介素之功能能力。在其他實施例中，蛋白質在投與個體時能夠減少TNF- α 及/或IL-23。在其他實施例中，蛋白質在投與個體時具有增加抗發炎細胞介素之功能能力。在一些態樣中，本發明蛋白質在投與個體時能夠增加IL-10。

本發明之SG-11蛋白質或其變體或片段在投與個體(例如齧齒類動

物、非人類靈長類動物或人類)時可改良胃腸上皮細胞屏障功能，減少疾病相關之體重減輕，改良臨床評分，改良結腸長度及/或結腸重量對長度讀出，誘導或增加黏蛋白基因表現(例如muc2表現)，增加胃腸黏膜屏障之結構完整性及/或功能(例如在小腸、大腸、口腔及/或食管中)及/或減輕胃腸道之發炎。

在一些實施例中，源自相對於SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7之胺基酸之此一取代、插入及/或缺失之SG-11蛋白質或其變體或片段維持實質上與SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19之蛋白質相同之功能活性程度(例如能夠增加TEER分析中之電阻，其中上皮細胞層被例如熱滅活大腸桿菌破壞)。變體蛋白質可作為治療劑用於治療或預防多種病況，包括(但不限於)發炎性病況及/或屏障功能病症，包括(但不限於)胃腸(包括口、食管及腸)黏膜發炎、腸上皮細胞間隙接合完整性受損。在一些實施例中，經修飾蛋白質在投與患有或易患發炎性病況及/或屏障功能病症之個體時具有一或多個以下效應：例如在發炎誘發之破壞後改良上皮細胞屏障完整性；阻抑一或多種免疫細胞之至少一種促發炎細胞介素(例如TNF- α 及/或IL-23)之產生；誘導上皮細胞中之黏蛋白產生；及/或改良上皮細胞傷口癒合。此外，經修飾或變體SG-11蛋白質可用於治療或預防病症或病況，例如(但不限於)發炎性腸病、潰瘍性結腸炎、克隆氏病、短腸症候群、GI黏膜炎、口腔黏膜炎、化學療法誘發之黏膜炎、輻射誘發之黏膜炎、壞死性小腸結腸炎、儲袋炎、代謝疾病、乳糜瀉、發炎性腸症候群或化學療法相關之脂肪性肝炎(CASH)。

如例如實例6中所展示，SG-11蛋白質可增強上皮細胞傷口癒合。因此，本文提供包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7之胺基酸序列之治療性蛋

白質或其變體或片段，其中該蛋白質可增加活體外分析中之傷口癒合。

治療方法

涵蓋本文所述之SG-11蛋白質，包括變體(例如胺基酸取代、缺失、插入)、修飾(例如醮基化、乙醯化)、SG-11片段及其融合物，其用於治療經診斷患有或患有與胃腸道內之發炎及/或胃腸道內之上皮細胞屏障功能之功能障礙相關之病症之個體。

本文提供治療有需要之個體之方法，其包含向個體投與包含SG-11蛋白質或其片段或變體之醫藥組合物，如本發明中所述。個體可經診斷患有發炎性腸病、潰瘍性結腸炎、小兒UC、克隆氏病、小兒克隆氏病、短腸症候群、黏膜炎GI黏膜炎、口腔黏膜炎、食管、胃、小腸(十二指腸、空腸、迴腸)、大腸(結腸)及/或直腸之黏膜炎、化學療法誘發之黏膜炎、輻射誘發之黏膜炎、壞死性小腸結腸炎、儲袋炎、代謝疾病、乳糜瀉、刺激性腸症候群或化學療法相關之脂肪性肝炎(CASH)。投與本文所述之SG-11醫藥組合物亦可用於傷口癒合應用。

發炎性腸病

發炎性腸病(IBD)通常包括潰瘍性結腸炎(UC)及克隆氏病(CD)。發炎性腸病之發病機制係未知的。已表明遺傳傾向性，且許多環境因素(包括細菌、病毒及可能地食物性抗原)可觸發持續的腸道發炎性級聯。參見上文。IBD可引起嚴重腹瀉、疼痛、疲勞及體重減輕。IBD可使人虛弱且有時引起危及生命之併發症。因此，在一些實施例中，如本文所述之治療方法可有效地減輕、預防或消除上文所述症狀中之任一者或多者，其中該方法包含向有需要之患者投與治療有效量之包含SG-11蛋白質或其變體或片段之醫藥組合物。在一些實施例中，治療方法引起消退。

潰瘍性結腸炎

潰瘍性結腸炎係引起大腸(結腸)及直腸之最內層襯裡之長期發炎及瘡瘍(潰瘍)之發炎性腸病。

潰瘍性結腸炎通常呈現為淺持續性發炎，自近端直腸延伸至在許多患者中包括整個結腸。不存在瘻、裂傷、膿瘍及小腸累及。患有限制性疾病(例如直腸炎)之患者通常具有輕度但頻繁復發之症狀，而患有全結腸炎之患者更常具有嚴重症狀，通常需要住院。Botoman 等人，「Management of Inflammatory Bowel Disease」, Am. Fam. Physician，第57卷(1):57-68 (1998年1月01日) (省略內部引用)。因此，潰瘍性結腸炎係引起大腸(結腸)及直腸之最內層襯裡之長期發炎及瘡瘍(潰瘍)之IBD。

克隆氏病

與潰瘍性結腸炎不同，克隆氏病可涉及整個腸道，自口腔至肛門，且具有不連續局灶性潰瘍、瘻形成及肛周累及。末端迴腸最常受侵襲，通常具有不同程度之結腸累及。患者之亞組患有肛周疾病，伴有裂傷及瘻形成。僅2%至3%之克隆氏病患者具有臨床上顯著之上胃腸道累及。Botoman等人，「Management of Inflammatory Bowel Disease」, Am. Fam. Physician，第57卷(1):57-68 (1998年1月01日) (省略內部引用)。因此，克隆氏病係引起消化道襯裡發炎之IBD。在克隆氏病中，發炎通常深擴散至受侵襲之組織中。發炎可涉及消化道之不同區域，即大腸、小腸或二者。膠原性結腸炎及淋巴球性結腸炎亦視為發炎性腸病，但通常認為與經典發炎性腸病不同。

發炎性腸病之臨床參數

如先前所論述，發炎性腸病涵蓋潰瘍性結腸炎及克隆氏病。可使用熟習此項技術者已知之多個評分及臨床標記物來評價投與本文所述蛋白質在治療該等病況中之效能。

業內存在兩種評估IBD患者之一般方法。鑒於IBD表現為GI道之發炎及潰瘍之外觀的事實，第一種涉及黏膜之視覺檢查且依賴於黏膜損傷跡象之觀察。可使用容許評價黏膜之任一程序。實例包括鋇液灌腸、x射線及內視鏡檢查。內視鏡檢查可用於食管、胃及十二指腸(食管胃十二指腸鏡檢查)、小腸(腸鏡檢查)或大腸/結腸(結腸鏡檢查、乙狀結腸鏡檢查)。該等技術用於鑑別發炎、潰瘍及異常生長(例如息肉)之區域。

存在基於此GI道之視覺檢查之評定系統來確定IBD之狀況及嚴重程度，且該等評定系統意欲確保對不同患者進行統一評價，但事實上在該等疾病之診斷及監測以及臨床研究評估中患者可由不同的醫學專業人士來評價。基於UC之視覺檢查評估之實例論述且比較於Daperno M等人(J Crohns Colitis. 2011 5:484-98)中。

亦存在臨床評定系統，具有相同目的。黏膜之內視鏡檢查或其他檢查之發現可納入該等臨床評定系統中，但該等評定系統亦納入基於症狀(例如排便頻率、直腸出血及醫師之總體評價)之數據。IBD具有多個影響生活品質之症狀，因此該等評定系統中之某些亦將對生活品質之效應之定量評價以及症狀之量化考慮在內。

UC評定系統之一個實例係Mayo評定系統(Schroeder等人，N Eng J Med,1987, 317:1625-1629)，但存在其他不常用之評定系統且包括潰瘍性結腸炎內視鏡檢查嚴重程度指數(UCEIS)評分(Travis等人，2012, Gut, 61:535-542)、Baron評分(Baron等人，1964, BMJ, 1:89)、潰瘍性結腸炎

結腸鏡檢查嚴重程度指數(UCCIS) (Thia等人，2011, *Inflamm Bowel Dis*, 17:1757-1764)、Rachmilewitz內視鏡檢查指數(Rachmilewitz, 1989, *BMJ*, 298:82-86)、Sutherland指數(亦稱為UC疾病活動指數(UCDAI)評定系統；Sutherland等人，1987, *Gastroenterology*, 92:1994-1998)、Matts評分(Matts, 1961, *QJM*, 30:393-407)及Blackstone指數(Blackstone, 1984, *Inflammatory bowel disease*. Blackstone MO (編輯) *Endoscopic interpretation: normal and pathologic appearances of the gastrointestinal tract*, 1984，第464-494頁)。關於綜述參見Paine, 2014, *Gastroenterol Rep* 2:161-168。因此，本文亦涵蓋治療經診斷患有及患有UC之個體之方法，其中治療包含投與如本文所述之SG-11蛋白質或其變體或片段且其中治療可減輕UC病理，如藉由量測UCEIS評分、Baron評分、UCCIS評分、Rachmilewitz內視鏡檢查指數、Sutherland指數及/或Blackstone指數所確定。

CD評定系統之實例係克隆氏病活動指數(CDAI) (Sands B等人，2004, *N Engl J Med* 350 (9): 876-85)；最主要研究使用CDAI來確定疾病之反應或消退。CDAI評分之計算包括將7天內液狀糞便之次數、7天內腹痛之情況及嚴重程度、7天內之總體幸福感、腸外併發症(例如關節炎/關節痛、虹膜炎/眼色素層炎、結節性紅斑、壞疽性膿皮症、口瘡性口炎、肛裂/瘻/膿瘍及/或發燒 $> 37.8^{\circ}\text{C}$)、7天內抗腹瀉藥物之使用、腹塊之存在、血容比及體重評定為理想/觀察之比率或與標準重量之偏差百分比。基於CDAI評分，CD分類為無症狀消退(0至149分)、輕度至中度活動性CD (150至220分)、中度至重度活動性CD (221至450分)或重度活動性暴病(451至1000分)。在一些實施例中，包含向經診斷患有CD之患者投與治

療有效量之SG-11蛋白質或其變體或片段之治療方法使CD之診斷評分減小。舉例而言，評分可使診斷自重度活動性變成輕度或中度活動性或無症狀消退。

Harvey-Bradshaw指數係CDAI之較簡單形式，其僅由臨床參數組成(Harvey等人，1980, Lancet 1(8178):1134-1135)。對生活品質之影響亦藉由發炎性腸病問卷(IBDQ)得以解決(Irvine等人，1994, Gastroenterology 106: 287-296)。替代性方法進一步包括CDEIS及SES CD(例如，參見Levesque等人(2015) Gastroentrol. 148:37 57)。

在一些實施例中，提供治療IBD(例如UC)之方法，其中治療可有效地減小Mayo評分。Mayo評分係用於評價UC之嚴重程度之組合型內視鏡檢查及臨床量表且具有1-12之等級。Mayo評分係排便頻率、直腸出血、靈活直腸乙狀結腸鏡檢查或結腸鏡檢查之發現及醫師之總體評價之子評分之複合評分(Paine, 2014, Gastroenterol Rep 2:161-168)。關於直腸出血，向在短於一半時間在糞便中可見血絲指配1分，大部分糞便帶血指配2分，且純血液通過指配3分。關於排便頻率，向每日正常排便次數指配0分，比正常多1或2次排便指配1分，比正常多3或4次排便指配2分，且比平常多5次或更多次排便指配3分。關於內視鏡檢查組分、評分0指示正常黏膜或不活動性UC，將評分1給予具有輕度易碎性、減少的血管模式及黏膜紅斑證據之輕度疾病，將評分2給予具有易碎性、糜爛、血管模式完全喪失及顯著紅斑之中度疾病，且將評分3給予潰瘍及自發出血(Schroeder等人，1987, N Engl J Med, 317:1625-1629)。醫師之總體評價將0分指配於正常發現，1分指配於輕度結腸炎，2分指配於中度結腸炎且3分指配於重度結腸炎。因此，在一些實施例中，用SG-11治療性蛋白質或其變體或

片段治療之患者在患者經歷以下中之至少一者之**Mayo**評分減小至少1分、2分或3分時得到成功治療：直腸出血、糞便中可見血絲、內視鏡檢查子評分及醫師之總體評價。在一些實施例中，包含向經診斷患有UC之患者投與治療有效量之**SG-11**蛋白質或其變體或片段之治療方法使UC之診斷評分減小。舉例而言，評分可使診斷評分(例如**Mayo**評分)減小至少1分、2分、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分或11分。

儲袋炎

另外或或者，如本文所述包含**SG-11**治療性蛋白質或變體之組合物及投與方法可用於治療儲袋炎。儲袋炎係在UC之治療中以手術方式產生之儲袋襯裡之發炎。具體而言，患有嚴重UC之個體可使其患病結腸移除且藉由稱為迴腸肛管吻合術(IPAA)或J-儲袋手術之程序使腸再連接。儲袋炎病症在許多患者中可復發，表現為急性再發性儲袋炎或慢性持續性儲袋炎。因此，本文提供治療儲袋炎、急性儲袋炎或復發性儲袋炎之方法。

儲袋炎活動性可分類為消退(非活動性儲袋炎)、輕度至中度活動性(排便頻率增加、急便及/或不頻繁失禁)或重度活動性(頻繁失禁及/或患者因脫水而住院)。儲袋炎之持續時間可定義為急性(小於或等於4週)或慢性(4週或以上)且模式分類為不頻繁(1-2次急性發作)、再發性(3次或更少發作)或持續性。對醫學治療之反應可標記為治療反應性或治療難治性，且指定任一情形之藥劑。因此，在一些實施例中，提供治療經診斷患有儲袋炎之個體之方法，其中用包含**SG-11**或其變體或片段之醫藥組合物治療引起儲袋炎之嚴重程度降低及/或引起消退。

黏膜炎及黏膜屏障

胃腸(GI)道之黏膜係涉及上皮細胞屏障、免疫細胞及微生物之複雜

微環境。在健康結腸中維持著微妙的平衡。管腔微生物在物理上藉由上皮細胞及黏液組成之屏障與宿主免疫系統分開。儘管尚未完全闡明IBD之發病機制，但其可涉及對改變的共生菌群之不適當宿主反應及功能不良之黏膜屏障。參見Boltin等人，「Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update」, J. Clin. Gastroenterol.，第47卷(2):106-111 (2013年2月)。

黏膜炎發生在癌症治療(尤其化學療法及輻射)分解襯於腸道(自口腔穿行至肛門)裡面之快速分裂之上皮細胞而使黏膜組織容易發生潰瘍及感染時。黏膜組織(亦稱為黏膜(mucosa)或黏膜(mucous membrane))襯於與空氣連通之所有身體通道(例如呼吸及消化道)裡面，且具有分泌黏液之細胞及相關腺體。此襯裡之覆蓋口腔之部分稱為口腔黏膜，其係身體之最敏感部分且尤其對化學療法及輻射敏感。口腔係黏膜炎之最常見位置。儘管口腔黏膜係黏膜毒性及所得黏膜炎之最頻繁位點，但應理解黏膜炎亦可沿整個消化道(包括食管、胃、小腸(十二指腸、空腸、迴腸)、大腸(結腸)及直腸)發生。在一些實施例中，包含SG-11或其變體或片段之醫藥組合物可在治療上有效地治療口腔、食管、胃、小腸(十二指腸、空腸、迴腸)、大腸(結腸)及/或直腸之黏膜炎。

口腔黏膜炎可引起若干問題，包括疼痛、因無法進食引起之營養問題及因黏膜中之瘡口增加的感染風險。其對患者之生活品質具有顯著影響且可為劑量限制性的(即需要減少後續化學療法劑量)。世界衛生組織具有診斷口腔黏膜炎之口腔毒性量表：1級：瘡瘍±紅斑，2級：紅斑、潰瘍；患者可吞嚥固體食物；3級：潰瘍伴有大面積紅斑；患者無法吞嚥固體食物；4級：黏膜炎至無法營養之程度。3級及4級口腔黏膜炎視為重度黏膜

炎。因此，本文提供治療經診斷患有口腔黏膜炎之個體之方法，其中投與包含SG-11或其變體或片段之醫藥組合物使口腔毒性降低1至4等級量表之至少1分。

結腸縮短

潰瘍性結腸炎係影響結腸黏膜且臨床特徵在於腹瀉、腹痛及便血之特發性發炎性腸病。疾病之程度可發生變化且可涉及僅直腸(潰瘍性直腸炎)、結腸之左側至脾曲或整個結腸(全結腸炎)。疾病之嚴重程度在組織學上亦可顯著變化，介於最輕度至花狀潰瘍及異型增生範圍內。可形成癌瘤。潰瘍性結腸炎之典型組織學(顯微)病灶係隱窩膿瘍，其中隱窩之上皮細胞分解且管腔充滿多型核細胞。固有層經白血球浸潤。由於隱窩被破壞，故失去正常黏膜架構且所得結癥縮短並可使結腸變窄。因此，結腸縮短可為結腸炎疾病之結果且通常用於診斷學。舉例而言，非侵入性腹平x射線可展示急症患者之橫結腸之氣態輪廓。藉由平片以及雙對比鋇液灌腸亦可展示結腸縮短及失去結腸袋標記。潰瘍性疾病之徵兆包括喪失黏膜細節、鵝卵石樣充盈缺損及累及分段區域。參見「Ulcerative Colitis: Introduction - Johns Hopkins Medicine」，www.hopkinsmedicine.org/gastroenterology_hepatology/_pdfs/small_large_intestine/ulcerative_colitis.pdf。

此外，業內公認之活體內結腸炎模型將利用結腸長度之縮短來評定在該模型中結腸炎之嚴重程度。參見Kim等人，「Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD」，*Journal of Visualized Experiments*，第60卷，第2-6頁(2012年2月)。

非IBD疾病中之上皮細胞屏障功能

在例如IBD及黏膜炎中愈來愈多地涉及到上皮細胞屏障之不適當作用。此外，研究已顯示之多種其他疾病亦係由上皮細胞屏障之不適當作用引起、與其相關、與其相關聯及/或因其加劇。該等疾病包括：(1)代謝疾病，包括肥胖症、2型糖尿病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、肝病及酒精性脂肪性肝炎(ASH)；(2)乳糜瀉；(3)壞死性小腸結腸炎；(4)刺激性腸症候群(IRS)；(5)腸道感染(例如難養芽胞梭菌)；(6)其他一般胃腸病症；(7)間質性膀胱炎；(8)神經病症或認知障礙(例如阿茲海默氏病、帕金森氏病、多發性硬化及自閉症)；(9)化學療法相關之脂肪性肝炎(CASH)；及(10)上文所提及疾病之小兒形式。參見例如：Everard等人，「Responses of Gut Microbiota and Glucose and Lipid Metabolism to Prebiotics in Genetic Obese and Diet-Induced Leptin-Resistant Mice」，Diabetes，第60卷(2011年11月)，第2775-2786頁；Everard等人，「Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity」，PNAS，第110卷，第22期(2013年5月)，第9066-9071頁；Cani等人，「Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice」，Diabetes，第57卷(2008年6月)，第1470-1481頁；Delzenne等人，「Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics」，Nature Reviews，第7卷(2011年11月)，第639-646頁。因此，恢復患者之適當上皮細胞屏障功能可能為使上文所提及之疾病狀態消退之關鍵。

消化道管腔(包括口腔、食管、胃、小腸、大腸及直腸)中之上皮細胞屏障之適當作用係控制及維持胃腸道及消化道內之微生物群系之關鍵。微

生物群系之生態系統包括駐留於胃腸道及消化道中之環境、屏障、組織、黏液、黏蛋白、酶、營養素、食物及微生物群落。腸黏膜屏障之完整性及滲透率以多個關鍵方式影響健康狀況。

因黏蛋白分泌變化而使胃腸病症中之黏膜屏障喪失完整性可能與宿主免疫變化、管腔微生物因子或直接起作用之遺傳或環境決定因素相關。因此，黏膜屏障之失衡可為IBD發病機制之核心。Boltin等人，「Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update」, J. Clin. Gastroenterol., 第47卷(2):106-111 (2013年2月)。

黏蛋白係瀕於GI道裡面之黏膜層之主要成分。在人類基因體中已知至少21種編碼分泌性或膜結合黏蛋白之黏蛋白(MUC)基因。正常結腸直腸中之優勢黏蛋白係MUC1、MUC2、MUC3A、MUC3B、MUC4、MUC13及MUC17.1。MUC2係在杯狀細胞中產生之腸黏液之主要分泌性凝膠形成組分。參見Boltin等人，「Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update」, J. Clin. Gastroenterol., 第47卷(2):106-111 (2013年2月)。MUC2之杯狀細胞分泌與其他分泌性黏蛋白(例如MUC1、3A、3B、4、13及17.1)一起在結腸上皮細胞上形成保護屏障，從而減少暴露於可損害上皮細胞或引發免疫反應之腸內容物。

IBD之發炎機制

有明顯證據顯示某些細胞介素參與IBD。最新研究已展示，細胞介素在其控制發炎反應之多個態樣之發炎性腸病(IBD) (例如克隆氏病及潰瘍性結腸炎)之發病機制中起關鍵作用。Markus Neurath, 「Cytokines in Inflammatory Bowel Disease」, Nature Reviews Immunology, 第14卷, 329-342 (2014)。具體而言，發生在IBD中之促發炎與抗發炎細胞介

素之間之不平衡阻礙發炎之消退且相反引起疾病延續及組織破壞。參見上文。最新研究表明調控細胞介素網絡之存在對疾病進展具有重要意義。參見上文。因此，實施實驗以研究SG-11對促發炎及抗發炎細胞介素之產生及/或分泌之效應。

促發炎細胞介素

簡言之，促發炎細胞介素係在細胞信號傳導中至關重要且促進全身發炎之細胞介素。其主要係由活化巨噬細胞產生且參與發炎反應之上調。促發炎細胞介素源自編碼在上調後誘導反應之小調劑分子之轉譯的基因。介白素-1 (IL-1)、IL-6、IL-12、IL-18、IL-23、CD40L、腫瘤壞死因子(TNF) (例如TNF- α)、 γ -干擾素(IFN- γ)、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子及MCP-1充分表徵為促發炎細胞介素。發炎之特徵在於促發炎與抗發炎細胞介素之間之相互作用。

降低促發炎細胞介素之生物活性可用於治療一些疾病。例如，阻斷IL-1或TNF- α 已成功地幫助患有類風濕性關節炎、發炎性腸病或移植物抗宿主病之患者。參見Strober W, Fuss IJ (2011年5月). 「Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases」, *Gastroenterology*, 第140卷(6): 1756-67。

抗發炎細胞介素

簡言之，抗發炎細胞介素係調控促炎性細胞介素反應之一系列免疫調控分子。因此，該等分子調節且幫助減輕由促發炎細胞介素觸發之發炎反應。抗發炎細胞介素包括例如IL-4、IL-10、IL-13、IFN- α ，且轉變生長因子- β (TGF- β)識別為抗發炎細胞介素。

在本文所教示方法之一些實施例中，投與包含SG-11蛋白質或其變體

或片段之醫藥組合物能夠使投與組合物之患者之免疫細胞的至少一種促發炎細胞介素(例如TNF- α 及/或IL-23)之產生減少。在一些實施例中，投與能夠使患者之免疫細胞之至少一種抗發炎細胞介素(例如IL-10)之產生增加。在一些實施例中，投與能夠使患者之免疫細胞之至少一種抗發炎細胞介素(例如IL-10)之產生減少。在一些實施例中，投與能夠改良患者之上皮細胞之黏蛋白產生及/或上皮細胞傷口癒合。

用於治療之投藥方案端視期望治療效應、投與途徑及治療之持續時間而定。劑量將隨患者發生變化，此取決於疾病之性質及嚴重程度、患者之體重、患者因此遵循之特殊飲食、同步藥劑及熟習此項技術者將意識到之其他因素。

通常，將介於0.0001至10 mg/kg體重/天之治療性蛋白質之劑量值投與患者，例如患有發炎性腸病之患者。劑量範圍通常將為約0.5 mg至100.0 g/患者/天，其可以單一或多個劑量投與。

在一些態樣中，劑量範圍將為約0.5 mg至10 g/患者/天、或0.5 mg至9 g/患者/天、或0.5 mg至8 g/患者/天、或0.5 mg至7 g/患者/天、或0.5 mg至6 g/患者/天、或0.5 mg至5 g/患者/天、或0.5 mg至4 g/患者/天、或0.5 mg至3 g/患者/天、或0.5 mg至2 g/患者/天、或0.5 mg至1 g/患者/天。

在一些態樣中，劑量範圍將為約0.5 mg至900 mg/患者/天、或0.5 mg至800 mg/患者/天、或0.5 mg至700 mg/患者/天、或0.5 mg至600 mg/患者/天、或0.5 mg至500 mg/患者/天、或0.5 mg至400 mg/患者/天、或0.5 mg至300 mg/患者/天、或0.5 mg至200 mg/患者/天、或0.5 mg至100 mg/患者/天、或0.5 mg至50 mg/患者/天、或0.5 mg至40 mg/患者/天、或0.5 mg至30 mg/患者/天、或0.5 mg至20 mg/患者/天、或0.5 mg至10 mg/

患者/天、或0.5 mg至1 mg/患者/天。

包含治療性蛋白質之組合療法

包含治療性蛋白質之本文所教示之醫藥組合物可與其他治療療法及/或醫藥組合物組合。舉例而言，患有發炎性腸病之患者可能已經服用其醫師開具用於治療該病況之醫藥。在實施例中，本文所教示之醫藥組合物能夠與患者之現有藥劑結合投與。

舉例而言，本文所教示之治療性蛋白質可與以下中之一或多者組合：抗腹瀉劑、5-胺基柳酸化合物、抗發炎劑、抗生素、抗體(例如靶向發炎性細胞介素之抗體，例如靶向抗細胞介素劑之抗體(例如抗TNF- α ，例如阿達木單抗、聚乙二醇化賽妥珠單抗、戈利木單抗、英利昔單抗、V565)，或抗IL-12/IL-23 (例如優特克單抗、瑞沙單抗(risankizumab)、貝子庫單抗(brazikumab)、優特克單抗)、JAK抑制劑(例如托法替尼、PF06700841、PF06651600、非戈替尼(filgotinib)、烏帕替尼(upadacitinib))、抗整聯蛋白劑(例如維多珠單抗、依卓利珠單抗(etrolizumab))、S1P抑制劑(例如依特拉西莫德(etrasimod)、奧紮莫德(ozanimod)、阿米莫德(amiselimod))、基於重組細胞之藥劑(例如Cx601)、類固醇、皮質類固醇、免疫阻抑劑(例如硫唑嘌呤及巯嘌呤)、維生素及/或專門飲食。

可向經歷化學療法或放射療法且患有或具有罹患黏膜炎(例如口腔黏膜炎)風險之癌症患者投與本發明之醫藥組合物與用於治療黏膜炎(例如口腔黏膜炎)之組合。在一些實施例中，治療方法包含向患有黏膜炎之患者投與包含SG-11或其變體或片段之醫藥組合物及一或多種選自由以下組成之群之第二治療劑的組合：阿米福汀(amifostine)、苯唑卡因

(benzocaine)、苄達明(benzydamine)、雷尼替丁(ranitidine)、奧美拉唑(omeprazole)、辣椒素(capsaicin)、麝香胺酸、前列腺素E2、維生素E、斯克拉非(sucralfate)及別嘌呤醇。

在本文方法之一些實施例中，第二治療劑係與本文所述之SG-11蛋白質結合(同時或依序)投與。在一些實施例中，蛋白質及第二藥劑協同地用於治療或預防疾病或病況或症狀。在其他實施例中，蛋白質及第二藥劑加和地用於治療或預防疾病或病況或症狀。

包含SG-11治療性蛋白質之醫藥組合物

本文提供醫藥組合物，其包含本發明之SG-11蛋白質、其變體或片段或其醫藥上可接受之鹽及醫藥上可接受之賦形劑。在一些實施例中，醫藥組合物經調配用於投與胃腸管腔，包括口腔、食管、小腸、大腸、直腸及/或肛門。

在一些實施例中，組合物包含一或多種與蛋白質之來源(例如產生宿主細胞之細胞組分)相關之其他物質或與蛋白質之化學合成相關之物質。在其他實施例中，醫藥組合物經調配以包括一或多種如本文所述之第二活性劑。此外，組合物可包含保留活性劑或組合物自身之結構及/或功能活性之成分。該等成分包括(但不限於)抗氧化劑及多種抗細菌及抗真菌劑，包括(但不限於)對羥苯甲酸酯(例如對羥苯甲酸甲酯、對羥苯甲酸丙酯)、氯丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞或其組合。

術語「醫藥」或醫藥上可接受」係指在視需要投與動物(例如人類)時不產生或較佳不產生不良、過敏或其他不利反應之組合物。熟習此項技術者根據本揭示內容將獲知醫藥組合物或其他活性成分之製備，如藉由 Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Printing

Company, 1990 (以引用方式併入本文中)所例示。另外，對於動物(例如人類)投與而言，應理解，製劑應符合FDA生物學標準辦公室(FDA Office of Biological Standards)所要求之無菌性、致熱原性、一般安全性及純度標準。

本發明之醫藥組合物係根據預期投與途徑及其係例如以固體、液體抑或氣溶膠形式投與來調配。在較佳實施例中，組合物可經直腸投與，但亦可經局部、藉由注射、藉由輸注、經口、鞘內、鼻內、皮下、黏膜、直接對靶細胞進行局部灌注浴、經由導管、經由灌洗或藉由如熟習此項技術者已知之其他方法或前述各項之任一組合來投與。包含治療有效量之蛋白質之液體調配物可藉由灌腸、導管、使用球形注射器經直腸投與。栓劑係經調配用於直腸遞送之固體劑型之實例。一般而言，對於栓劑，傳統載劑可包括例如聚伸烷基二醇、甘油三酯或其組合。在某些實施例中，栓劑可自含有例如約0.5%至約10%及或約1%至約2%範圍內之活性成分之混合物形成。可注射液體組合物通常基於可注射無菌鹽水或磷酸鹽緩衝鹽水或業內已知之其他可注射載劑。其他液體組合物包括懸浮液及乳液。例如用於經口投與之固體組合物可呈以下形式：錠劑、丸劑、膠囊(例如硬殼或軟殼明膠膠囊)、經頰組合物、糖錠劑、酏劑、懸浮液、糖漿、糯米紙囊劑或其組合。該等液體及固體組合物中之活性劑(即如本文所述之蛋白質)通常係約0.05重量%至10重量%之組分，其餘為可注射載劑及諸如此類。

醫藥組合物可調配為控制或持續釋放組合物，其提供包括本發明治療性蛋白質之活性劑在延長時間段內(例如在30-60分鐘內或在1-10小時、2-8小時、8-24小時內等)之釋放。或者或另外，組合物經調配用於釋放至宿主體內之特定位點。舉例而言，組合物可具有腸溶包衣以防止活性劑在

酸性環境(例如胃)中釋放，容許僅在小腸、結腸或直腸之更具中性或鹼性環境中釋放。或者或另外，組合物可經調配以提供口腔、小腸或大腸中之延遲釋放。

端視預期投與途徑，上文所述調配物中之每一者可含有至少一種醫藥上可接受之賦形劑或載劑，例如用於直腸投與之固體或用於靜脈內或非經腸投與或經由套管投與之液體。如本文所用之「醫藥上可接受之載劑」包括如熟習此項技術者已知之任一及所有溶劑、分散介質、包衣、表面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗細菌劑、抗真菌劑)、等滲劑、吸收延遲劑、鹽、防腐劑、藥物、藥物穩定劑、凝膠、黏合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、矯味劑、染料、該等類似材料及其組合(例如，參見 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 18 版，Mack Printing Company, 1990，第1289-1329頁，其以引用方式併入本文中)。

用於投與之醫藥組合物可以單位劑型存在以有助於準確投藥。典型單位劑型包括液體組合物之預填充、預量測安瓿或注射器或在固體組合物之情形下包括栓劑、丸劑、錠劑、膠囊或諸如此類。在該等組合物之一些實施例中，活性劑(即如本文所述之蛋白質)可為組分(約0.1至50 wt/wt%、1至40 wt/wt%、0.1至1 wt/wt%或1至10 wt/wt%)，且其餘為有助於形成期望投藥形式之各種媒劑或載劑及處理助劑。

投與患者之本發明單位劑型中之實際劑量可藉由身體及生理因素來確定，例如體重、病況之嚴重程度、所治療疾病之類型、先前或同步治療介入、患者之特發病及投與途徑。在任一情形下，負責投與之執業醫師將決定組合物中活性成分之濃度及用於個別個體之適當劑量。

蛋白質表現系統及蛋白質產生

本文提供用於產生本發明之經分離蛋白質之組合物及方法以及含有編碼該等蛋白質之多核苷酸序列之表現載體及攜載該等表現載體之宿主細胞。

本發明蛋白質可藉由常規重組方法製備，例如培養用含有編碼SG-11治療性蛋白質、其變體或片段之核酸之表現載體轉變或轉染之細胞。亦提供包含任一該載體之宿主細胞。宿主細胞可為原核或真核且宿主細胞之實例包括大腸桿菌、酵母或哺乳動物細胞。進一步提供用於產生任一本文所述蛋白質之方法且該方法包含在適於表現期望蛋白質之條件下培養宿主細胞及自細胞培養物回收期望蛋白質。然後可分離及/或純化所回收蛋白質用於活體外及活體內方法中以及用於調配物成醫藥上可接受之組合物。在一些實施例中，在原核細胞(例如大腸桿菌)中表現蛋白質且蛋白質之分離及純化包括步驟使內毒素減少至為人類或其他動物中之治療應用可接受之量。

表現載體

本文提供表現載體，其包含編碼本發明蛋白質或其變體及/或片段之多核苷酸序列。編碼本發明蛋白質之多核苷酸序列可使用標準重組技術獲得。期望編碼多核苷酸序列可自來源細菌(即人羅斯拜瑞氏菌)之基因體DNA擴增。或者，多核苷酸可使用核苷酸合成器合成。獲得後，將編碼多肽之序列立即插入能夠在宿主細胞中複製及表現異源(外源性)多核苷酸之重組載體中。業內可獲得及已知之許多載體可用於本發明之目的。適當載體之選擇將主要端視欲插入載體中之核酸之大小及欲用載體轉變之具體宿主細胞而定。每一載體含有多種組分，此端視其功能(異源多核苷酸之擴增或表現或二者)及其與其所駐留之具體宿主細胞之相容性而定。載體

組分通常包括(但不限於)：複製起點、選擇標記物基因、啟動子、核糖體結合位點(RBS)、信號序列、異源核酸插入物及轉錄終止序列。

一般而言，含有衍生自與宿主細胞相容之物種之複製子及控制序列之質體載體係與該等宿主結合使用。載體通常攜帶複製位點以及能夠提供經轉變細胞中之表型選擇之標記序列。舉例而言，通常使用pBR322、pUC、pET或pGEX載體(一種衍生自大腸桿菌物種之質體)來轉變大腸桿菌。該等載體含有編碼胺苄青黴素(Amp)及四環素(Tet)抗性之基因且因此提供易於鑑別經轉變細胞之方法。該等載體以及其衍生物或其他微生物質體或噬菌體亦可含有或經修飾以含有可由微生物生物體用於表現內源性蛋白質之啟動子。

本發明之表現載體可包含啟動子(非轉譯調控序列)，其位於編碼蛋白質之核苷酸序列之上游(5')且可操作連接至該編碼蛋白質之核苷酸序列，使得啟動子調控該編碼序列之轉錄。原核啟動子通常分成兩類，誘導型及組成型。誘導型啟動子係在其控制下因應培養條件之變化(例如存在或不存在營養素或溫度變化)起始增加編碼多核苷酸之轉錄量的啟動子。由多種潛在宿主細胞識別之大量啟動子為業內所熟知且熟習此項技術者可根據期望表現量選擇啟動子。適用於原核宿主之啟動子包括大腸桿菌啟動子(例如*lac*、*trp*、*tac*、*trc*及*ara*)、由大腸桿菌識別之病毒啟動子(例如 λ 及T5啟動子)及衍生自T7噬菌體之T7及T7*lac*啟動子。攜載包含T7啟動子之載體之宿主細胞例如經改造以表現T7聚合酶。該等宿主細胞包括大腸桿菌BL21(DE3)、Lemo21(DE3)及NiCo21(DE3)細胞。在一些實施例中，啟動子係在化學或環境因素之控制下之誘導型啟動子。

其他有用之質體載體包括pIN載體(Inouye等人，1985)；及pGEX載

體，用於生成麩胱甘肽S-轉移酶(GST)可溶性融合蛋白以供隨後純化及分離或裂解。其他適宜融合蛋白係具有 β -半乳糖苷酶、泛素之彼等及諸如此類。

適於在原核及真核宿主細胞二者中表現之載體為業內已知且一些進一步闡述於本文中。

本發明載體可進一步包含容許宿主細胞識別及加工(即藉由信號肽酶裂解)所轉譯重組蛋白之信號序列。由於原核宿主細胞並不識別及加工異源多肽之天然信號序列，故該信號序列經選自例如由以下組成之群之原核信號序列取代：鹼性磷酸酶、青黴素酶、Ipp或熱穩定腸毒素II (STII)前導序列、LamB、PhoE、PeIB、OmpA及MBP。所熟知用於真核表現系統中之信號序列包括(但不限於)介白素-2、CD5、免疫球蛋白 κ 輕鏈、胰蛋白酶原、血清白蛋白及泌乳素。

如本文所述之SG-11蛋白質或其變體或片段可表現為融合蛋白或多肽。常用融合伴侶包括(但不限於)人類血清白蛋白及可結晶片段或IgG之恆定結構域Fc。亦可使用組胺酸標籤或FLAG標籤來簡化重組蛋白自表現培養基或重組細胞溶解物之純化。融合伴侶可融合至所關注蛋白質之N末端及/或C末端。

宿主細胞

適於選殖或表現本文載體中之DNA之宿主細胞包括原核生物、酵母或更高級真核生物細胞。可獲得多種細胞系及培養物用作宿主細胞，且其可例如經由美國模式培養物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC)獲得，該美國模式培養物保藏所係充當活培養物及遺傳材料之檔案館之組織。可用於載體複製及/或表現之細胞類型包括(但不限於)細菌，

例如大腸桿菌(例如大腸桿菌菌株RR1、大腸桿菌LE392、大腸桿菌B、大腸桿菌X 1776 (ATCC編號31537)以及大腸桿菌W3110 (F-、 λ -、原始營養，ATCC編號273325)、DH5 α 、JM109及KC8；桿菌，例如枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)；及其他腸桿菌科，例如鼠傷寒沙門桿菌(*Salmonella typhimurium*)、黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)；各種假單胞菌屬種類以及多種市售細菌宿主(例如SURE®勝任細胞及SOLOPACK™ Gold細胞(STRATAGENE®, La Jolla))。在某些實施例中，尤其涵蓋細菌細胞(例如大腸桿菌)作為宿主細胞。

用於複製及/或表現載體之真核宿主細胞之實例包括(但不限於)HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos及PC12。其他真核宿主細胞包括酵母(例如巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)及啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))及衍生自昆蟲(例如草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)或粉紋夜蛾(*Trichoplusia ni*))之細胞。可自多種細胞類型及生物體獲得許多宿主細胞且將為熟習此項技術者獲知。類似地，可結合真核或原核宿主細胞、尤其容許複製或表現載體之宿主細胞使用病毒載體。適當宿主細胞之選擇為熟習此項技術者所熟知。

業內熟知將重組DNA (即表現載體)引入宿主細胞中以使得DNA可作為染色體外元件或作為染色體整合體複製、由此生成攜載所關注表現載體之宿主細胞的方法。例如藉由CaPO₄及電穿孔之轉染方法為熟習此項技術者已知。端視所用宿主細胞，使用適於該等細胞之標準技術實施轉變。採用氯化鈣之鈣處理(如Sambrook等人，上文文獻中所述)或電穿孔通常用於含有實質細胞壁屏障之原核生物或其他細胞。哺乳動物細胞宿主系統轉變之一般態樣已闡述於美國專利第4,399,216號中。轉變至酵母中通常係根

據Van Solingen等人，J. Bact, 130:946 (1977)及Hsiao等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)之方法實施。將DNA引入細胞中之其他方法包括核顯微注射、電穿孔、細菌原生質體與完整細胞融合或使用聚陽離子(例如、聚凝胺、聚鳥胺酸)引入。關於轉變哺乳動物細胞之各種技術參見Keown等人，Methods in Enzymology. 185:527-537 (1990)及Mansour等人，Nature, 336:348-352 (1988)。

因此，本文提供如上文所述且包含編碼所關注SG-11治療性蛋白質序列(例如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19或其變體及/或片段，如本文所述)之多核苷酸之重組載體或表現載體。多核苷酸可為例如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20中之任一者或其變體或片段。此外，本發明教示攜載載體之宿主細胞。宿主細胞可為如上文所詳述之真核或原核細胞。在較佳實施例中，宿主細胞係原核細胞。在另一較佳實施例中，宿主細胞係大腸桿菌。

在一些實施例中，編碼所關注蛋白質之多核苷酸經密碼子最佳化。將密碼子最佳化算法施加至編碼蛋白質之多核苷酸序列以基於表現宿主之密碼子使用偏好性選擇適於給定胺基酸之密碼子。許多密碼子最佳化算法亦將其他因素(例如mRNA結構、宿主GC含量、核糖體進入位點)考慮在內。密碼子最佳化算法及基因合成服務提供者之一些實例係：AUTM: www.atum.bio/services/genegps；GenScript: www.genscript.com/codon-opt.html；ThermoFisher: www.thermofisher.com/us/en/home/life-

science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html ； 及 Integrated DNA Technologies: www.idtdna.com/CodonOpt。然後合成核苷酸序列且將其選殖至適當表現載體中。在本發明中，本發明中之密碼子最佳化序列包括SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18及SEQ ID NO:20。

產生蛋白質之方法

提供產生本文所述蛋白質之方法，但為熟習此項技術者所熟知。將用於蛋白質產生之用本文所述之表現或選殖載體轉變或轉染之宿主細胞培養於經修飾適於誘導啟動子、選擇及/或維持轉變子及/或表現編碼期望蛋白質序列之基因之習用營養素培養基中。培養條件(例如培養基、溫度、pH及諸如此類)可由熟習此項技術者無需過多實驗來選擇。一般而言，用於最大化細胞培養物之生產力之原理、方案及實用技術可參見Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler編輯(IRL Press, 1991)及Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook等人，1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

通常，「經純化」將係指特定蛋白質組合物已經受分級分離以移除非蛋白質組分及各種其他蛋白質、多肽或肽，且該組合物實質上保留其活性，如可例如藉由如下文所述或如熟習期望蛋白質、多肽或肽技術者已知之蛋白質分析評價。

在使用術語「實質上經純化」時，此將係指其中特定蛋白質、多肽或肽形成組合物之主要組分、例如構成組合物中約50%或以上之蛋白質之組合物。在較佳實施例中，實質上經純化之蛋白質將構成組合物中60%、

70%、80%、90%、95%、99%或甚至更高之蛋白質。

如適用於本發明之「純化至均質」之肽、多肽或蛋白質意指該肽、多肽或蛋白質具有該肽、多肽或蛋白質實質上不含其他蛋白質及生物組分之純度。舉例而言，經純化之肽、多肽或蛋白質通常將充分不含其他蛋白質組分，以使得可成功地實施降解測序。

儘管較佳用於某些實施例中，但一般並不要求蛋白質、多肽或肽始終以其最純狀態提供。實際上，預期相對於天然狀態仍然富集於期望蛋白質組合物中之較不實質上純化之蛋白質、多肽或肽將在某些實施例中具有效用。

根據本發明，多種量化蛋白質、多肽或肽之純度之方法將為熟習此項技術者已知。該等方法包括例如測定部分之具體蛋白質活性或藉由凝膠電泳評價部分內多肽之數量。

另一實例係使用特定結伴侶純化特定融合蛋白。該等純化方法為業內之常規方法。由於本發明提供特定蛋白質之DNA序列，故現可實踐任一融合蛋白純化方法。此係藉由生成特定蛋白質-麩胱甘肽S-轉移酶融合蛋白、在大腸桿菌中表現並使用麩胱甘肽-瓊脂糖上之親和層析分離至均質或在蛋白質之N末端或C末端生成聚組胺酸標籤並隨後使用Ni-親和層析純化來例示。然而，鑒於已知許多DNA及蛋白質或可使用本文所述之方法鑑別及擴增，現可採用任一純化方法。

在其他實施例中，可使用肽富集之製劑來替代經純化製劑。在此文件中，無論何時使用經純化，亦可使用富集。製劑可不僅藉由純化方法富集，且亦可藉由與野生型相比細菌過表現或過度產生肽來富集。此可使用重組方法或藉由選擇將誘導肽自野生型細胞表現之條件來實現。

可自培養基或自宿主細胞溶解物回收本發明之經重組表現之多肽。適宜純化程序包括例如藉由離子交換(陰離子或陽離子)管柱上之分級分離；乙醇沈澱；反相HPLC；二氧化矽或陽離子交換樹脂(例如DEAE)上之層析；層析聚焦；SDS-PAGE；硫酸銨沈澱；使用例如Sephadex G-75之凝膠過濾或粒徑篩析層析(SEC)；及結合本發明多肽之帶表位標籤形式之金屬螯合管柱。可採用多種蛋白質純化方法且該等方法為業內已知並闡述於例如 Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982)中。所選純化步驟將端視例如所用產生製程及所產生具體多肽之性質而定。

可使用業內所熟知之替代性方法來製備本發明之多肽。舉例而言，可藉由使用固相技術直接肽合成來產生編碼多肽或其部分之序列(例如，參見Stewart等人，1969, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif.；Merrifield. J. 1963, *Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154)。可使用手動技術或藉由自動化實施活體外蛋白質合成。自動化合成可例如使用Applied Biosystems肽合成器(Foster City, Calif.)使用製造商之說明書來實現。本發明多肽或其部分之多個部分可以化學方式單獨合成且使用化學或酶方法組合以產生全長多肽或其部分。

在一些實施例中，本發明提供包含任一本文所述之多肽融合至異源多肽或胺基酸序列之嵌合分子及編碼嵌合分子之多核苷酸。該等嵌合分子之實例包括(但不限於)任一本文所述之多肽融合至表位標識序列(免疫球蛋白之Fc區)。

重組細菌遞送系統

本發明涵蓋利用包含經純化蛋白質之傳統醫藥調配物外之遞送系統。在一些實施例中，本發明利用重組細菌遞送系統、噬菌體介導之遞送系統、幾丁聚醣-DNA複合物或AAV遞送系統。

一具體重組細菌遞送系統係基於乳酸鏈球菌(*Lactococcus lactis*)。基本上，可將編碼治療性蛋白質(例如SEQ ID NO:3)之基因選殖至表現載體中，且然後將載體轉變至乳酸鏈球菌中。隨後，可將乳酸鏈球菌投與患者。參見例如Bratt等人，「A phase 1 trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease」, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2006，第4卷，第754-759頁(「用經遺傳修飾之乳酸鏈球菌(*LL-Thy12*)治療克隆氏病患者，其中胸腺嘧啶核苷酸合酶基因用編碼成熟人類介白素-10之合成序列替代。」)；Shigemori等人，「Oral delivery of *Lactococcus lactis* that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice」, *Microbial Cell Factories*, 2015，第14卷:189 (「正研究使用經遺傳修飾之乳酸細菌菌株(gmLAB)黏膜遞送治療性蛋白質作為新的治療策略。」)；Steidler等人，「Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10」, *Science*, 2000，第289卷，第1352-1355頁(「細胞介素介白素-10 (IL-10)已顯示在臨床試驗中用於治療發炎性腸疾病(IBD)之前景。使用兩種小鼠模型顯示，IL-10之治療劑量可藉由局部遞送經遺傳改造以分泌細胞介素之細菌來降低。胃內投與分泌IL-10D之乳酸鏈球菌使得用硫酸葡聚糖鈉治療之小鼠之結腸炎減少50%且預防IL-102/2小鼠之結腸炎發作。此方法可產生成本有效且長期管控人類之IBD之較佳方法。」)；Hanniffy等人，「Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine

using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection」, Journal of Infectious Diseases, 2007, 第195卷, 第185-193頁(「在此處評估細胞內產生肺炎球菌表面蛋白A (PspA)之乳酸鏈球菌作為賦予針對肺炎球菌疾病之保護之黏膜疫苗。」); 及Vandenbroucke等人, 「Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice」, Gastroenterology, 2004, 第127卷, 第502-513頁(「已積極地評估藉由經口投與乳酸鏈球菌之涉及原位分泌鼠類TFF之急性及慢性結腸炎之新的治療方法。此新穎方法可有效地管控人類之急性及慢性結腸炎及上皮細胞損傷。」)。

在另一實施例中, 可使用「合成細菌」來遞送SG-11蛋白質或其變體或片段, 其中益生菌細菌經改造以表現SG-11治療性蛋白質(例如, 參見Durrer及Allen, 2017, PLoS One, 12:e0176286)。

噬菌體已經遺傳改造以遞送特異性DNA酬載或改變宿主特異性。可使用多種轉移方法(例如噬菌體、質體及轉位子)經由諸如轉導、轉變及接合等過程將經改造DNA序列遞送並循環至微生物群落。出於本發明之目的, 充分理解經改造噬菌體可為本發明蛋白質之一種可能遞送系統, 其藉由將編碼該蛋白質之核酸納入噬菌體中並利用噬菌體將核酸遞送至宿主微生物、然後將在使噬菌體將核酸遞送至其基因體中後產生蛋白質。

與上文所提及之經改造噬菌體方法相似, 可利用轉位子遞送系統將編碼治療性蛋白質之核酸納入駐留於患者微生物群系中之宿主微生物中。參見 Sheth 等人, 「Manipulating bacterial communities by in situ microbiome engineering」, Trends in Genetics, 2016, 第32卷, 第4期,

第189-200頁。

以下實例意欲說明但不限制本發明。

實例

以下實驗利用活體外實驗與活體內IBD模型組合之穩健混合物以證實所教示蛋白質及方法之治療能力。

實例1

SG-11及其變體之表現

對於下文實例中所述之實驗，藉由PCR擴增自人羅斯拜瑞氏菌(A2-183；DSM 16839型菌株)獲得之基因體DNA獲得編碼SG-11 (SEQ ID NO:3)之多核苷酸；參見例如Duncan, S. H., Aminov, R. I., Scott, K. P., Louis, P., Stanton, T. B., Flint, H. J. (2006). Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 第56卷，第2437-2441頁。然後將編碼多核苷酸亞選殖至誘導型表現載體中且用於轉變大腸桿菌BL21(DE3)細胞，使用業內常規之培養及純化方法表現及純化如下文所詳述之SG-11或其變體。

SG-11 (包含SEQ ID NO:3)之表現。

如下文所述用於本發明多個實驗之包含SG-11之胺基酸序列(SEQ ID NO:5)之蛋白質之表現及純化係使用pGEX載體系統達成，該載體系統經設計用於基因或基因片段之誘導型大量細胞內表現。在大腸桿菌中表現產生GST部分在胺基末端且所關注蛋白質在羧基末端之帶標籤之蛋白質。載體具有用於化學誘導型大量表現之tac啟動子及用於任一大腸桿菌宿主中之內部1aq1^q基因。

將包含編碼SG-11 (SEQ ID NO:3，來自人羅斯拜瑞氏菌DSM 16839)之核苷酸序列之多核苷酸插入pGEX-6P-1 (GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, PA)之多選殖位點(*Bam*HI及*Not*I位點)中以將SG-11表現為GST融合蛋白，然後使其在Precision蛋白酶位點裂解，生成具有SEQ ID NO:5之胺基酸序列(由SEQ ID NO:6編碼)之SG-11，提供於下表4中。藉由2種替代方法表現及純化此蛋白質。在第一種方法中，使BL21(DE3)轉變子生長於30℃下LB及100 µg/ml卡本西林(carbenicillin)及1 µg/ml氯黴素(chloramphenicol)中。在達到0.6 OD₆₀₀之培養物密度時使用0.4 mM IPTG誘導表現達4 h。藉由離心收穫細胞，然後藉由超音波處理溶解，且將可溶性溶解物施加至GST樹脂管柱。用PBS洗滌結合蛋白且然後藉由添加PreScission蛋白酶以裂解GST標籤C末端之蛋白質來溶析經純化無標籤之SG-11C。

使用相同的pGEX表現構築體藉由使經轉變BL21(DE3)細胞生長於37℃ LB及50 µg/ml卡本西林中實施另一表現及純化方法。當培養物達到0.7 OD₆₀₀之密度時，將其冷卻至16℃且在16℃下使用1 mM IPTG誘導表現達15 h。收穫細胞且藉由超音波處理溶解，並將可溶性溶解物施加至GSTrap管柱。用HEPES緩衝液洗滌結合蛋白且然後藉由添加HRV3C蛋白酶以裂解GST標籤C末端之蛋白質來溶析經純化無標籤之SG-11 (SEQ ID NO:5)。鑑別並彙集如藉由SDS-PAGE及考馬斯亮藍(Coomassie Brilliant Blue)染色所測定含有蛋白質之經溶析部分，然後施加至HiTrap Q HP陰離子交換管柱，然後施加至Superdex 75 (26/60)製備型粒徑篩析管柱(SEC)，以獲得最終製劑。

表4

胺基酸序列	編碼核酸序列
SEQ ID NO:5 GPLGSLEGEESVVY VGKKGVIASLDVET LDQSYDETELKSY VDAEVEDYTAEHGK NAVKVESLKVEDGV AKLKMKYKTPEDYT AFNGIELYQGKVVA SLAAGYVVDGEFAR VEEGKVVGAAATKQD IYSEDDLKVAHIRAN TDVKVDGEICYVSC QNVKLTGKDSVSIR DGYYLETGSVTASV DVTGQESVGTEQLS GTEQMEMTGEPVNA DDTEQTEAAAGDGS FETDVYTFIVYKAA AS	SEQ ID NO:6 GGCCCCCTGGGATCCCTGGAGGGAGAGG AAAGTGTCGTGTACGTGGGAAAGAAAGG CGTGATAGCGTCGCTGGATGTGGAGACG CTCGATCAGTCCTACTACGATGAGACGG AACTGAAGTCCTATGTGGATGCAGAGGT GGAAGATTACACCGCGGAGCATGGTAAA AATGCAGTCAAGGTGGAGAGCCTTAAGG TGGAAGACGGTGTGGCGAAGCTTAAGAT GAAGTACAAGACACCGGAGGATTATACC GCATTTAATGGAATTGAACTCTATCAGG GGAAAGTCGTTGCTTCCCTGGCGGCAGG ATACGTCTACGACGGGGAGTTCGCCCCG GTGGAGGAAGGCAAGGTTGTGGGAGCTG CCACAAAACAGGATATTTACTCTGAGGA TGATTTGAAAGTTGCCATCATCCGTGCCA ATACGGATGTGAAGGTGGACGGTGAGAT CTGCTATGTCTCCTGTCAGAATGTGAAGC TGACCGGAAAAGACAGTGTGTCGATCCG TGACGGATATTATCTTGAGACGGGAAGC GTGACGGCATCCGTGGATGTGACCGGAC AGGAGAGCGTCGGGACCGAGCAGCTTTC GGGAACCGAACAGATGGAGATGACCGG GGAGCCGGTGAATGCGGATGATACCGAG CAGACAGAGGCGGCGGCCGGTGACGGTT CGTTCGAGACAGACGTATATACTTTCATT GTCTACAAAGCGGCCGCATCG

使用pD451-SR載體系統(AUTM, Newark, CA)進行不具信號肽之成

熟SG-11蛋白質之表現及純化。此表現載體利用IPTG誘導型T7啟動子。在AUTM (Newark, CA)將編碼SG-11 (SEQ ID NO:3)之多核苷酸(SEQ ID NO:4)密碼子最佳化以生成經密碼子最佳化之編碼序列，在本文中提供為SEQ ID NO:8。將此經密碼子最佳化之編碼序列插入pD451-SR載體中且所得構築體提供233胺基酸SG-11蛋白質之表現，在本文中提供為SEQ ID NO:7。

使經構築體轉變之BL21(DE3)細胞生長於自動誘導培養基MagicMedia (ThermoFisher)中。將培養物在25℃振盪下培育8小時，然後16℃培育至多72 h。藉由離心使細胞沈澱，重懸浮於含有50 mM NaCl、2 mg/ml溶菌酶及蛋白酶抑制劑之100 mM Tris-HCl, pH 8.0中，然後將Triton X-100添加至懸浮液。然後對細胞進行超音波處理且藉由離心製備澄清溶解物，藉由標準管柱層析技術純化該蛋白質。

用兩種陰離子交換管柱HiTrap Q HP、然後Mono Q純化SG-11 (SEQ ID NO:7)。使用Mono Q進一步純化如藉由SDS-PAGE及考馬斯藍染色所測定含有經部分純化之蛋白質之部分。Mono Q之純化方案與HiTrap Q相同。彙集含有SG-11之部分且於緩衝液(50 mM磷酸鈉、150 mM NaCl及10%甘油)中透析。使用SDS-PAGE及分析型SEC Superdex 200 Increase 3.2/300分析純度及均一度，且該製劑經評價具有約92.7%純度。

亦使用pD451-SR載體系統來表現及純化SG-11變體G-11V5 (SEQ ID NO:19)。為生成表現構築體，修飾SG-11之經密碼子最佳化之序列(SEQ ID NO:8)以生成編碼SG-11V5 (SEQ ID NO:19)之SEQ ID NO:20之多核苷酸。將SG-11V5編碼序列選殖至pD451-SR載體中。

使經構築體轉變之BL21(DE3)細胞生長且處理用於製備如上文所述

用於表現SG-11 (SEQ ID NO:7)之澄清溶解物。

藉由HiTrap Q純化、然後藉由疏水相互作用層析(HIC) HiTrap丁基HP自澄清溶解物純化SG-11V5蛋白質。彙集如藉由SDS-PAGE及考馬斯藍染色所測定含有SG-11V5之部分且於緩衝液(50 mM磷酸鈉、150 mM NaCl及10%甘油)中透析。闡述用於製備之所有管柱層析均使用ÄKTA蛋白質純化系統(GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)實施。

在SDS-PAGE及考馬斯亮藍染色後藉由密度測定使用牛血清白蛋白作為參考來量化經純化蛋白質。使用Endosafe® nexgen-MCS™ (Charles River, Wilmington, MA)根據製造商之說明書來量測內毒素含量。用於本文所述分析之蛋白質之內毒素含量低於1 EU/mg。

生成表現構築體，其中使用pET-28載體(Sigma Millipore)來攜載及表現編碼SG-11 (SEQ ID NO:3)及SG-11 N末端之FLAG標籤(DYKDDDDK；SEQ ID NO:32)之多核苷酸序列(SEQ ID NO:4)。完整帶FLAG標籤之SG-11蛋白質序列在本文中提供為SEQ ID NO:9 (且由SEQ ID NO:10編碼)。使用此構築體之蛋白質表現係在T7啟動子控制下進行，其可使用異丙基 β -D-1-硫代半乳吡喃糖苷(IPTG)來誘導。使用PCR及編碼DYKDDDDK之寡核苷酸將N末端之FLAG標籤納入構築體中。使經轉變宿主細胞在37°C下在2xYT培養基中生長過夜。然後將過夜培養物接種至新鮮的2xYT培養基中且在37°C下培育4小時。然後將4小時培養物接種(1%接種)至MagicMedia™大腸桿菌表現培養基(ThermoFisher)中。使細胞在25°C下生長8 h且然後在16°C下生長至多72 h，然後藉由離心收穫。蛋白質表現為可溶形式，容許自澄清溶解物回收。使用HiTrapQ陰離子交換管柱、然後使用Superdex 200 Increase 10/300 GL SEC純化所表現蛋白

質。使用SDS-PAGE及分析型SEC Superdex 200 Increase 3.2/300分析純度及均一度，且該製劑經評價具有約93.3%純度。

製備SG-11蛋白質用於穩定性分析

使用兩種陰離子交換管柱HiTrap Q、隨後Mono Q來純化SG-11 (SEQ ID NO:7)及其變體SG-11V5 (SEQ ID NO:19)。使用Mono Q進一步純化如藉由SDS-PAGE及考馬斯藍染色所測定含有經部分純化之蛋白質之部分。MonoQ之純化方案與HiTrapQ相同。彙集含有SG-11之部分且在緩衝液(50 mM磷酸鈉、150 mM NaCl及10%甘油)中透析。

對於SG-11V5，在HiTrap Q純化後，使用疏水相互作用層析(HIC) HiTrap丁基HP進一步純化蛋白質。彙集如藉由SDS-PAGE及考馬斯藍染色所測定含有SG-11V5之部分且在緩衝液(50 mM磷酸鈉、150 mM NaCl及10%甘油)中透析。闡述用於製備之所有管柱層析均使用ÄKTA蛋白質純化系統(GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)實施。

在SDS-PAGE及考馬斯藍染色後藉由密度測定使用牛血清白蛋白作為參考來量化經純化蛋白質。使用Endosafe® nexgen-MCSTM (Charles River, Wilmington, MA)根據製造商之說明書來量測內毒素含量。用於本文所述分析之蛋白質之內毒素含量低於1 EU/mg。

實例2

在發炎誘發之破壞後SG-11對恢復上皮細胞屏障完整性之效應

以下實驗展示如本文所揭示之SG-11蛋白質或其變體恢復胃腸上皮細胞屏障完整性之治療能力。因此，該實驗展示治療性蛋白質治療胃腸發炎性病變或涉及上皮細胞屏障完整性/功能受損之疾病之功能效用。

如下文所述在trans-well板中實施分析，其中利用可滲透膜分離細胞

實施多個細胞類型之共培養。在頂端(頂部)室中，培養由腸細胞及杯狀細胞之混合物組成之人類結腸上皮細胞直至細胞獲得緊密接合處形成且藉由量測跨上皮細胞電阻(TEER)來評價屏障功能能力。在底側室中，單獨培養單核球。用發炎性細胞介素引發上皮細胞。分析量測治療性蛋白質(即SG-11)對上皮細胞屏障功能、muc2基因表現及細胞介素產生之效應。

細胞培養. 將HCT8人類腸細胞細胞系(ATCC目錄號CCL-244)維持在補充有10%胎牛血清、100 IU/ml青黴素、100 µg/ml鏈黴素、10 µg/ml慶大黴素及0.25 µg/ml兩性黴素之RPMI-1640培養基(cRPMI)中。將HT29-MTX人類杯狀細胞(Sigma-Aldrich (St. Louis, MO；目錄號12040401)維持在含有10%胎牛血清、100 IU/ml青黴素、100 µg/ml鏈黴素、10 µg/ml慶大黴素及0.25 µg/ml兩性黴素之DMEM培養基(cDMEM)中。藉由胰蛋白酶化使上皮細胞傳代且在自液氮原液解凍後使用5代至15代。將U937單核球(ATCC目錄號700928)維持在cRPMI培養基中作為懸浮液培養物，且split藉由視需要稀釋分流以將細胞維持在 5×10^5 於 2×10^6 個細胞/ml之間。使用自液氮原液解凍後至多第18代之U937細胞。

上皮細胞培養. 將HCT8腸細胞及HT29-MTX杯狀細胞之混合物以9:1比率分別平鋪於transwell板之頂端室中，如先前所述(Berget等人，2017, Int J Mol Sci, 18:1573；Beduneau等人，2014, Eur J Pharm Biopharm, 87:290-298)。將總共 10^5 個細胞平鋪於每孔中(每孔 9×10^4 後HCT8細胞及 1×10^4 個HT29-MTX細胞)。自培養瓶將上皮細胞胰蛋白酶化且藉由台盼藍(trypan blue)計數測定活細胞。將適當體積之每一細胞類型合併於單一管中且離心。將細胞沈澱物重懸浮於cRPMI中且添加至transwell板之頂端室。將細胞在 $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ 下培養8至10天，且每2天

更換培養基。

單核球培養. 在上皮細胞培養之第6天，將 2×10^5 個細胞/孔U937單核球平鋪至96孔接收板中。在 $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ 下培養細胞且每24小時持續四天更換培養基。

共培養物分析. 在培養8-10天後，在 $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ 下用添加至transwell板底側室之10 ng/ml IFN- γ 將含有腸細胞之transwell板處理24小時。24小時後，將新鮮cRPMI添加至上皮細胞培養板。在IFN- γ 處理後量測跨上皮細胞電阻(TEER)讀數且將其用作處理前TEER值。然後將SG-11以1 $\mu\text{g/ml}$ (40 nM)之最終濃度添加至transwell板之頂端室。使用50 nM之肌凝蛋白輕鏈激酶(MLCK)抑制肽18 (BioTechne, Minneapolis, MN)作為預防發炎誘發之屏障破壞之陽性對照 (Zolotarevskky 等人，202, Gastroenterology, 123:163-172)。使用100 nM之細菌衍生分子星狀孢菌素作為誘導細胞凋亡及加劇屏障破壞之陰性對照 (Antonsson及Persson, 2009, Anticancer Res, 29:2893-2898)。將化合物在腸細胞上培育1小時或6小時。在與測試化合物一起預培育後，將含有腸細胞之transwell插入物轉移至含有U937單核球之接收板之頂部上。然後將熱滅活大腸桿菌(HK大腸桿菌) (將細菌加熱至 80°C 並保持40分鐘)添加至頂端及底側室二者且感染複數(MOI)為10。將Transwell板在 $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ 下培育24小時並進行處理後TEER量測。使用成熟SG-11蛋白質(SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:9)實施TEER分析。

數據分析. 基於transwell插入物之表面積(0.143 cm^2)，將原始電阻值(歐姆， Ω)轉化成歐姆/平方公分(Ωcm^2)。為調整在10天培養期間形成之差分電阻，將個別孔之處理後 Ωcm^2 讀數正規化至處理前 Ωcm^2 讀數。然後將

正規化 Ωcm^2 值表示為自未經處理樣品之平均 Ωcm^2 值變化之%。

在使上皮細胞及單核球二者暴露於熱滅活大腸桿菌(HK大腸桿菌)之前1小時(圖1A)或6小時(圖1B)添加SG-11蛋白質，誘導單核球產生發炎調劑，從而破壞上皮細胞單層，如藉由TEER減小所指示。使用肌凝蛋白輕鏈激酶(MLCK)抑制劑作為對照化合物，已顯示其防止屏障破壞及/或逆轉由抗細菌免疫反應觸發之屏障損失。使用星狀孢菌素作為對照化合物，其引起上皮細胞凋亡及/或死亡，由此使得TEER顯著減小，此指示上皮細胞屏障完整性/功能之破壞及/或損失。在圖1A中，SG-11使TEER自藉由HK大腸桿菌誘導之55.8%破壞增加至62%。在圖1B中，SG-11使TEER自藉由HK大腸桿菌誘導之53.5%破壞增加至60.6%。圖1A-1B中之圖代表自兩次個別實驗彙集之數據(n = 6)。

實例3

SG-11對由熱滅活大腸桿菌誘導之TNF- α 及IL-23產生之效應

以下實驗展示如本文所揭示之SG-11蛋白質或其變體降低免疫活化之治療能力，如藉由細胞介素產生所量測。該實驗由此展示治療性蛋白質治療胃腸發炎性疾病或涉及上皮細胞屏障完整性/功能受損之疾病之潛在功能效用，且調節細胞介素含量將影響宿主之疾病狀態。

量測在實例2中實施之共培養物TEER分析之底側室之組織培養物上清液中藉由單核球之促發炎細胞介素TNF- α 及IL-23之產生。在TEER讀數後，將上清液在4°C下在10,000 g下離心5分鐘以移除細胞碎片。根據製造商之說明書實施Luminex分析(Magpix instrument and xPonent軟體第4.2版；Luminex Corporation (Austin, TX))。實施Luminex分析以測定單核球產生之TNF- α 及IL-23之pg/ml濃度。Luminex分析使用基於珠粒之系統

來量化單一樣品之多種細胞介素。與ELISA一樣，用捕獲抗體包覆Luminex珠粒，且與樣品一起培育容許靶結合至捕獲抗體。洗滌珠粒且與經螢光標記之檢測抗體一起培育用於量化所結合靶。使用細胞分析來區分負載有差異螢光染料之珠粒群體，並藉由量測檢測抗體信號量化細胞介素含量。

將在HK大腸桿菌處理之前未經處理之細胞及與SG-11一起預培育6小時之細胞中之TNF- α 及IL-23產生正規化至由HK大腸桿菌引發之pg/ml濃度，其設定為1.0。與SG-11一起預培育減少TNF- α 及IL-23產生二者。結果顯示於圖2A (TNF- α)及圖2B (IL-23)中。圖2A及圖2B中之圖代表自兩次個別實驗彙集之數據(n = 6)。

實例4

SG-11對由熱滅活大腸桿菌誘導之IL-10產生之效應

以下實驗量測SG-11投與對TEER分析中之IL-10產生之效應。

量測含有單核球之實例2中所述之共培養物TEER分析之底側室之組織培養物上清液中的IL-10產生。實施Luminex分析以測定單核球產生之IL-10之pg/ml濃度。將在HK大腸桿菌處理之前未經處理之細胞及與SG-11一起預培育6小時之細胞中之IL-10產生正規化至由HK大腸桿菌引發之pg/ml濃度，其設定為1.0。與SG-11一起預培育使IL-10產生減少至0.89。結果顯示於圖3中。圖3中之圖代表自兩次個別實驗彙集之數據(n = 6)。

實例5

SG-11對用熱滅活大腸桿菌刺激後之黏蛋白表現之效應

以下實驗量測如本文所揭示之SG-11蛋白質或其變體增加胃腸組織中之黏蛋白表現之效應。因此，該實驗展示治療性蛋白質SG-11治療胃腸發

炎性疾病或涉及上皮細胞屏障完整性/功能受損之疾病之功能效用，其中增加黏蛋白表現將係有益的。

量測實例2中所述之共培養物TEER分析之頂端室之上皮細胞單層中之基因表現。自上皮細胞單層分離總RNA，合成cDNA。對自經SG-11 (1 $\mu\text{g/ml}$; 40 nM)處理6小時、然後添加HK大腸桿菌並保持24小時之HCT8及HT29-MTX細胞生成之cDNA實施qRT-PCR。將muc2基因表現繪製為平均倍數變化 $\pm$ SEM。藉由與HK大腸桿菌相比之單因子ANOVA實施統計分析且使用費雪LSD測試(Fishers LSD test)進行多重比較。

muc2基因表現之分析揭露，僅HK大腸桿菌處理比未經處理之細胞增加13.6倍($p = 0.0007$)。用HK大腸桿菌刺激且用SG-11治療之細胞比HK大腸桿菌具有額外1.4倍增加($p = 0.03$) (圖4)。圖4中之圖代表單一實驗之數據($n = 3$)。觀察到因應HK大腸桿菌muc2產生顯著增加。

實例6

SG-11對上皮細胞傷口癒合之效應

以下實驗展示如本文所揭示之蛋白質增加胃腸上皮細胞傷口癒合之治療能力。因此，該實驗展示治療性蛋白質SG-11治療胃腸發炎性疾病或涉及上皮細胞屏障完整性/功能受損之疾病之功能效用，其中增加上皮細胞傷口癒合將係有益的。

根據製造商之說明書使用在每一孔之中心含有防止細胞附接之塞之96孔Oris細胞遷移分析(Platypus Technologies, Madison, WI)。

在使用前將遷移分析板升溫至室溫且在添加細胞之前自100%鋪滿之孔移除塞。以9:1比率使用HCT8腸細胞及HT29-MTX杯狀細胞系，且每孔添加總共 5×10^4 個總細胞(4.5×10^4 個HCT8細胞及 0.5×10^4 個HT29-MTX細

胞)。將細胞在37°C + 5% CO₂下培育24小時。然後自所有對照及樣品孔移除塞。對照孔包括用稀釋劑媒劑處理之細胞作為空白，30 ng/ml表皮生長因子(EGF)作為陽性對照及100 nM星狀孢菌素作為陰性對照，其皆稀釋於cRPMI中。樣品孔含有稀釋於cRPMI中之濃度為1 µg/ml之SG-11蛋白質(SEQ ID NO:5及/或SEQ ID NO:9)。將100%及0%孔培養於cRPMI中。將處理添加至細胞且在37°C + 5% CO₂下培育48小時。在對活細胞染色之前，自0%孔移除塞。移除處理培養基且在含有0.9 mM CaCl₂及0.5 mM MgCl₂之PBS中洗滌細胞。將綠色螢光活力染料Calcein AM以含有0.9 mM CaCl₂及0.5 mM MgCl₂之PBS中之0.5 µg/ml之濃度添加至所有孔，在37°C + 5% CO₂下培育30 min，移除染料且在含有0.9 mM CaCl₂及0.5 mM MgCl₂之PBS中洗滌細胞並量測螢光。將在細胞平鋪之前移除塞之100%孔之相對螢光值設定為最大效應，且使用塞保留在原位直至即將染色前之0%孔作為基線。使樣品在100%與0%樣品之間正規化且將值表示為生長%。

如圖5中所顯示，在用SG-11治療後觀察到生長顯著增加。對照化合物調節傷口癒合，如使用增加增殖之EGF及阻抑細胞增殖之星狀孢菌素所預期。圖5中之圖代表自5次實驗彙集之數據(n = 15)。數據表示5次獨立重複實驗，其中將SG-11 SEQ ID NO:5用於1次實驗中且將SEQ ID NO:9用於4次實驗中。

實例7

在同步DSS發炎性腸病模型中SG-11展示治療活性

實例7及8展示如本文所揭示之蛋白質在活體內模型中治療發炎性腸病之能力。因此，該實驗展示闡述重要功能及可能的機制作用模式之上文

所提及活體外模型將轉化成發炎性腸病之活體內模型系統。具體而言，用已知誘發腸上皮細胞損傷且藉此降低腸屏障完整性及功能之化學品聚葡萄糖硫酸鈉(DSS)治療實例7及8中之小鼠。DSS小鼠係公認結腸炎模型。在實例7中，用SG-11蛋白質治療小鼠大致與投與DSS (之前6小時)同步。在實例8中，用DSS將小鼠治療6天，然後用SG-11蛋白質治療。

實例7中所呈現之圖代表自3次獨立實驗彙集之數據，該等實驗各自使用10隻小鼠(n=30)。用於該等實驗中之SG-11蛋白質係不具N末端標籤且包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之成熟蛋白質(無信號肽)。對於2次實驗，SG-11蛋白質係由SEQ ID NO:5組成；對於第三次實驗，SG-11蛋白質係由SEQ ID NO:7組成。

以5隻動物/籠圈養8週齡之C57BL/6小鼠，且隨意給予食物及水持續7天。在7天馴化時段後，開始治療，同時將2.5% DSS添加至飲用水。在腹膜內(i.p.)注射蛋白質後使用經螢光標記之牛血清白蛋白之初步追蹤研究展示蛋白質在i.p.遞送後6小時到達結腸。基於該等結果，在將2.5% DSS添加至飲用水之前6 hr用50奈莫耳/kg SG-11 (1.3 mg/kg)或Gly2-GLP2 (0.2 mg/kg) i.p.治療小鼠。在初始治療後6小時，將飲用水更換為含有2.5% DSS之水。用飲用水中之2.5%聚葡萄糖硫酸鈉(DSS)將小鼠治療6天。使用SG-11或Gly2-GLP2在早上及晚上(每8 hr及16 hr)每天兩次(b.i.d.)藉由以50奈莫耳/kg i.p.注射繼續治療。每2天準備新鮮2.5% DSS飲用水。

在第6天時，使小鼠禁食4小時且然後經口管飼600 mg/kg經異硫氰酸螢光黃(FITC)標記之4KDa聚葡萄糖[4KDa-FITC]。在4KDa-FITC管飼後1小時，使小鼠安樂死，收集血液且量測血清中之FITC信號。與媒劑治療

之DSS小鼠相比，在未經治療之小鼠中觀察到4KDa-FITC聚葡萄糖穿過上皮細胞屏障之易位顯著增加。另外，與用媒劑治療之DSS小鼠相比，在接受DSS且用SG-11治療之小鼠中觀察到4KDa-FITC聚葡萄糖顯著減少。對SG-11觀察到之4KDa-FITC聚葡萄糖易位之量值與Gly2-GLP2陽性對照相似。結果顯示於圖6中，且以平均值 $\pm$ SEM呈現。圖6中之圖代表自3次獨立實驗彙集之數據(n = 30)。

在同步DSS發炎性腸病模型中SG-11改良屏障功能之發炎中心讀出

亦評價SG-11對投與及未投與SG-11之DSS動物之血液中之LPS結合蛋白(LBP)含量的效應。LPS結合蛋白(LBP)與患有發炎性腸病之個體之臨床疾病活動性相關，其亦係藉由在實例7中所述之DSS模型中測試之小鼠血清之ELISA來量測。觀察到因應DSS LBP濃度顯著增加。另外，與用媒劑治療之DSS小鼠相比，在給予DSS之經SG-11治療之小鼠中觀察到LBP顯著減少。此外，與對照肽Gly2-GLP2相比，SG-11對LBP濃度具有較大影響，此乃因在用Gly2-GLP2治療之DSS小鼠與用SG-11治療之DSS小鼠之間觀察到顯著差異。結果顯示於圖7中，且以平均值 $\pm$ SEM呈現。圖7中之圖代表自3次獨立實驗彙集之數據(n=30)。

在同步DSS發炎性腸病模型中SG-11防止體重減輕

如本文所揭示之蛋白質可改善患有發炎性腸病症動物之體重減輕的治療能力亦經評價。體重減輕係發炎性腸病之顯著且潛在危險之副作用。

每日量測包括在此實例中所述之DSS模型中之小鼠的體重。確定每一小鼠自第0天之起始體重變化之%。與經媒劑治療之DSS小鼠相比，向經DSS處理之小鼠投與SG-11會顯著增加體重。在第6天時用SG-11處理之小鼠之體重減輕與使用Gly2-GLP2觀察到之體重減輕相似。結果顯示於圖

8中。圖8中之圖形係從2次獨立實驗所彙集之數據(n = 20)。

在DSS發炎性腸病模型中SG-11顯著減輕大體病理

在包括在此實例中實施之同步DSS模型中之小鼠中進行大體病理觀察。與經媒劑治療之DSS小鼠相比，向經DSS處理之小鼠投與SG-11會顯著改善大體病理。在給予DSS且用Gly2-GLP2或SG-11治療之小鼠之間未觀察到臨床評分差異。所用評定系統係：(0) =無大體病理，(1) =在糞便中可見血絲，(2) =完全帶血之糞粒，(3)在盲腸中可見帶血之糞便物質，(4)在盲腸及稀糞中可見帶血之糞便物質，(5) =直腸出血。結果顯示於圖9中。圖9中之圖形係從3次獨立實驗所彙集之數據(n = 30)。該等數據顯示，SG-11在治療上可有效地改善IBD之症狀，例如血便。

另外，對DSS模型動物之近端及遠端結腸組織實施組織病理學分析。呈現近端(圖10A)及遠端(圖10B)結腸評分(範圍0-4)以及結腸之總評分(圖10C)，其代表近端及遠端結腸評分之總和(基於0-8之標度評定)。LMA =黏膜架構損失，Edema =水腫，INF =發炎，TMI =整層發炎，MH =黏膜增生，DYS =異型增生。各圖代表自兩次獨立實驗彙集之數據，且繪製為平均值± SEM。藉由與DSS +媒劑相比之單因子ANOVA實施統計分析，然後進行費雪LSD測試用於多重比較。

SG-11最小化因應DSS處理之結腸縮短效應

以下實驗證明如本文所揭示之蛋白質可治療活體內模型之發炎性腸病之治療能力，其係藉由預防或最小化結腸縮短之能力所顯示。

量測包括在實例7中所述之DSS模型中之小鼠之結腸長度。向經DSS處理之小鼠投與SG-11預防由DSS引發之結腸縮短。使用Gly2-GLP2觀察到結腸長度顯著改良且與SG-11治療相比，Gly2-GLP2治療具有顯著改

良。結果顯示於圖11A中。另外，使用Gly-2-GLP2或SG-11治療暴露於DSS之小鼠可顯著改良結腸重量對長度比率(圖11B)。圖11A及11B中之圖代表自3次獨立實驗彙集之數據($n = 30$)。數據繪製為平均值 $\pm$ SEM且係從三次獨立實驗所彙集($n = 30$)。藉由單因子ANOVA實施統計分析，然後進行費雪LSD多重比較測試。

實例8

在DSS發炎性疾病模型中SG-11展示治療活性

在此實例中，實施實驗以研究在DSS處理7天後向小鼠投與SG-11蛋白質時SG-11在DSS小鼠模型中之效應。此不同於其中在即將用DSS處理前向小鼠投與SG-11蛋白質之上文實例7之治療方案。此實例進一步展示如本文所揭示之蛋白質治療活體內模型之發炎性腸病之治療能力且因此展示闡述重要功能及可能的機制作用模式之上文所提及之活體外模型將轉化成發炎性腸病之活體內模型系統。

以5隻動物/籠圈養8週齡之雄性C57BL/6小鼠且隨意給予食物及水持續7天。在7天馴化時段後，向小鼠提供含有2.5% DSS之飲用水達7天。在7天DSS投與期間每2天準備新鮮2.5% DSS水。對於此治療性DSS研究，使用於治療動物之SG-11之N末端與FLAG標籤(DYKDDDDK；SEQ ID NO:31)融合。

在第7天時，恢復正常飲用水且起始50奈莫耳/kg SG-11 (1.3 mg/kg) 或Gly2-GLP2 (0.2 mg/kg)之i.p.治療。使用早上及晚上劑量(每8小時及16小時)持續6天每天兩次(b.i.d.)投與治療。

如下文所詳述，針對動物健康狀況分析治療之結果，包括體重及大體病理、結腸組織之組織病理學、屏障破壞之評價及LPS結合蛋白之含

量。

在早上治療期間每日量測體重。然後收穫結腸組織且量測長度(公分)並對組織稱重。自結腸沖洗掉糞便物質且藉由使結腸組織輕輕運行穿過一對鑷子來移除殘餘PBS。然後對結腸組織稱重且測定結腸重量對長度比率(mg/mm)。在量測重量後，將近端及遠端結腸組織存庫用於RNA及蛋白質分析且將剩餘組織固定於10%中性緩衝福馬林中用於組織病理學。藉由與DSS+媒劑相比之單因子ANOVA對血清4KDa-FITC易位、血清LBP濃度、結腸長度及結腸重量對長度比率實施統計分析，同時實施二因子ANOVA用於分析體重。在所有分析中，使用費雪LSD測試進行多重比較。各圖代表自兩次實驗彙集之數據，且繪製為平均值 $\pm$ SEM。

此治療性模型量測所確立DSS刺激物之恢復。由於未經治療之小鼠亦在自飲用水移除DSS後恢復，故在DSS處理6天後未觀察到4KDa-FITC信號增加(圖12)。此外，在Gly2-GLP2或SG-11治療後未觀察到LBP減少(圖13)。因此，在治療性DSS模型中未觀察到屏障功能讀出發生變化。

儘管在治療性DSS模型中未觀察到屏障功能讀出發生變化，但觀察到臨床參數(例如體重(圖14)、結腸長度(圖15A)及結腸重量對長度(圖15B))顯著改良。與屏障讀出類似，基於血便之大體病理評分系統不再相關，此乃因甚至DSS小鼠在治療6天後亦得以恢復。然而，儘管無可見血液留在結腸中，但仍觀察到結腸增厚。根據大體病理觀察結果，使用SG-11治療觀察到結腸增厚之頻率減小(藉由費雪精確性測試，在DSS + 媒劑中為88%且在DSS + SG-11中為25%， $p < 0.0001$ ，數據未顯示)。

對上文所述治療性DSS模型之近端及遠端結腸組織實施組織病理學分析。呈現近端(圖16A)及遠端(圖16B)結腸評分(範圍0-4)及以及結腸之

總評分，其代表近端及遠端結腸評分之總和(範圍0-8) (圖16C)。LMA = 黏膜架構損失，Edema =水腫，INF =發炎，TMI =整層發炎，MH =黏膜增生，DYS =異型增生。各圖代表自兩次獨立實驗彙集之數據，且繪製為平均值 $\pm$ SEM。藉由與DSS +煤劑相比之單因子ANOVA實施統計分析，然後進行費雪LSD測試用於多重比較。

SG-11及Gly2-GLP2治療產生適度但顯著之黏膜架構損失評分減小，且發炎及整層發炎評分無變化。與實例7中所提供之結果類似，使用SG-11及Gly2-GLP2觀察到類似組織病理學變化模式，從而提供SG-11可靶向上皮細胞之額外證據。

實例9

穩定及治療活性SG-11變體之設計

SG-11係衍生自共生細菌人羅斯拜瑞氏菌之治療性蛋白質。在DSS模型中投與人羅斯拜瑞氏菌作為益生菌展示改良腸屏障功能(4KDa-FITC及LBP)、體重及臨床評分之效能(數據未顯示)。

轉譯後修飾(PTM)可影響治療性蛋白質之重組產生，治療性蛋白質之重組產生亦可受可在大規模表現及純化期間以及在長期儲存期間發生之轉譯後修飾(PTM)之影響。該等PTM包括(但不限於)甲硫胺酸之氧化、天冬醯胺之去醯胺及兩個半胱胺酸之間之分子間及/或分子內二硫鍵。為降低PTM風險，藉由替代可影響蛋白質穩定性之殘基來進行SG-11之修飾。闡述改良蛋白質穩定性及維持活體外及活體內活性之研究闡述於實例9-14中。

作為第一步驟，比對SG-11胺基酸序列(SEQ ID NO:7)與類似原核蛋白。可將基於搜尋結果鑑別出之殘基用於增強治療性蛋白質之穩定性之胺

基酸取代。

首先，實施基因庫非冗餘蛋白質數據庫之Blast搜尋(NCBI BLAST/預設參數/BLOSUM62矩陣)以鑑別出可能與SG-11同源之其他原核蛋白。所鑑別蛋白質序列顯示於圖17中。SEQ ID NO:21係腸羅斯拜瑞氏菌之假定蛋白(基因庫：WP_006857001.1；BLAST E值：3e-90)；SEQ ID NO:22係羅斯拜瑞氏菌831b之假定蛋白(基因庫：WP_075679733.1；BLAST E值：4e-58)；且SEQ ID NO:23係菊粉羅斯拜瑞氏菌之假定蛋白(基因庫：WP_055301040.1；BLAST E值：1e-83)。

SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22及SEQ ID NO:23中之每一者係所指示蛋白質之所預測成熟形式(缺少信號肽)且含有N末端甲硫胺酸。實施該等序列與SG-11 (SEQ ID NO:7)之多序列比對以鑑別出蛋白質中保守之區域。比對顯示於圖17中。使用該比對鑑別不同蛋白質中最保守之殘基以評價取代特定胺基酸之潛在影響。SG-11之部分稍微或高度保守，其中在蛋白質特定位置之胺基酸在所有4種經比對蛋白質中或至少在4種蛋白質之2者(位置)或3者(位置)中一致。SG-11之該等同系物中之高序列保守表明SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22及SEQ ID NO:23在維持健康上皮細胞屏障方面亦可具有重要功能。因此，本發明提供使用SEQ ID NO 21-23治療本發明疾病之方法及製備其之方法。

實例10

SG-11之轉譯後修飾(PTM)分析

使用LC/MS/MS實施研究以鑑別出SG-11之尤其易於PTM之殘基。藉由LakePharma (Belmont, CA)實施分析以1)確認SG11之胺基酸序列(SEQ ID NO:9)，及2)確定可降低生物活性及免疫原性之任何轉譯後修飾，尤其

去醯胺及氧化。

對於肽圖譜分析及PTM分析，用DTT及IAA處理樣品，然後進行胰蛋白酶消化。然後藉由耦聯至Xevo G2-XS QTOF質譜儀之Waters ACQUITY UPLC使用蛋白質BEH C18管柱分析所消化樣品。

肽圖譜分析及測序確認所預測胺基酸序列且亦指示多個去醯胺位點及一個氧化位點。其中7.84%之N53及3.77%之N83發生去醯胺。表6中所呈現之該等結果指示，N53及N83在非應力條件下係主要的去醯胺位點。N53指示位於成熟SG-11之第53位之天冬醯胺(Asn；N)，且甲硫胺酸位於第一位(SEQ ID NO:7)。

表6： SG-11之轉譯後修飾

胺基酸 ¹	SEQ ID NO	肽	修飾	總離子 % ²	肽 % ³
N53	30	NAVK	去醯胺	0.01	7.84
N83	26	TPEDYTAFNGIELYQGK	去醯胺	0.25	3.77
N137	27	ANTDVK	去醯胺	0.25	1.03
N153	28	VDGEICYVSCQNVK	去醯胺	0.01	0.2
M1	24	MLEGEESVVYVGK	氧化	<0.01	N/A

¹ SG-11 (SEQ ID NO:7)中之胺基酸位置

² 正規化至總肽離子強度

³ 正規化至具或不具修飾之相應前體之總強度

實例11

SG-11之強制降解

亦在下表7中所顯示之一系列應力條件下測試SG-11 (SEQ ID NO:9)

以進一步表徵重組經純化SG-11之穩定性。藉由SEC-HPLC分析受應力樣品之聚集物及/或降解物之存在。實施LC/MS/MS以測定去醯胺及氧化之程度。

表7

應力因子		分析方法	準則	觀察結果
溫度(2週)	4℃	HPLC	單體% (>90%通過)	溶液澄清
	25℃	HPLC	單體% (>90%通過)	溶液澄清
	37℃	HPLC	單體%	溶液澄清
	40℃	uPLC LC/MS/MS	單體%	溶液澄清
氧化	氫過氧化 物(0.005%) 40℃, 16 hr	uPLC LC/MS/MS	氧化位點%	溶液澄清
機械應力	350 rpm振 盪, 4℃, 24 hr	HPLC	單體% (>90%通過)	溶液澄清
pH	pH 4及pH 9	uPLC LC/MS/MS	去醯胺位點%	溶液澄清
冷凍及解凍 (6個週期)	-80℃至室 溫	HPLC	單體%	溶液澄清

對於此分析，SG-11 (SEQ ID NO:9)係以1 mg/ml之濃度存在於PBS + 10%甘油(50 mM磷酸鈉、150 mM NaCl、10%甘油, pH 8.0)中，只是在pH 4及pH 9下測試。對於pH 4，SG-11 (SEQ ID NO:9)係以1 mg/ml之濃度於乙酸钠緩衝液(50 mM乙酸钠、150 mM NaCl, pH 4)中製備。對於pH 9，SG-11 (SEQ ID NO:9)係以1 mg/ml之濃度於CAPSO (3-環己基胺基-2-羥基-1-丙烷磺酸)緩衝液(50 mM CAPSO、150 mM NaCl, pH 9)中製備。

分析顯示，在4℃下處理之SG-11 (SEQ ID NO:9)樣品具有低聚集物含量。隨著溫度升高，聚集增加。在37℃下發生大量聚集。相比之下，機械應力及重複冷凍及解凍不會引起蛋白質聚集或降解。

分別藉由在40℃下培育兩週、氧化(H₂O₂處理)或高pH 9處理三個樣品，藉由LC/MS/MS分析PTM，如實例10中所述。如下表8中所顯示，N83在40℃下樣品處理後發生顯著去醯胺且幾乎100%去醯胺。在用過氧化氫處理之樣品中觀察到N83之顯著去醯胺(37%)及M200之氧化(63.9%)。7.84%之N53在無任何處理下發生去醯胺。

表8

肽	修飾 ¹	%			
		40℃	氧化	pH 9	無處理
MLEGEESVVYVGK (SEQ ID NO:24)	無修飾	99.82	99.88	99.94	99.78
	M氧化	0.18	0.12	0.06	0.22
GVIASLDVETLDQSYDETELK (SEQ ID NO:25)	無修飾	99.91	99.93	99.95	100
	去醯胺Q30	0.09	0.07	0.05	0
TPEDYTAFNGLIELYQGK (SEQ ID NO:26)	無修飾	0	63	80.9	82.57
	去醯胺N83	99.88	37	19.1	17.43
	去醯胺N83 去醯胺Q89	0.12	0	0	0
ANTDVK (SEQ ID NO:27)	無修飾	85.39	83.56	76.05	98.96
	去醯胺N137	14.61	16.44	23.95	1.04
VDGEICYVSCQNVK (SEQ ID NO:28)	無修飾	44.85	63.23	8.76	99.98
	脲甲基C147	33.59	34.52	71.71	NA
	脲甲基C151	18.45	1.93	12.45	NA
	去醯胺N153 去醯胺Q152	0	0	0.35	0.02
	去醯胺N153 脲甲基C151	3.1	0.31	0.28	0

肽	修飾 ¹	%			
		40℃	氧化	pH 9	無處理
GYYLETGSVTASVDVTGQESVGTE QLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQT EAAAGDGSFETDVYTFIVYK (SEQ ID NO:29)	無修飾	96.38	19.17	88.16	100
	去醯胺N206	3.62	0	11.84	0
	去醯胺Q152				
	氧化M				
	氧化M198	0	16.92	0	0
	氧化M200	0	63.9	0	0
NAVK (SEQ ID NO:30)	去醯胺N53	NA	NA	NA	7.84

¹ SG-11 (SEQ ID NO:7)中之胺基酸位置

在還原後，藉由碘乙醯胺將游離半胱胺酸人工脲基甲基化以在分析中阻斷半胱胺酸殘基之氧化。

實例12

SG-11之半胱胺酸殘基及穩定性

在37℃下培育一週並在4℃下在緩衝液C (100 mM磷酸鈉, pH 7.0, 0.5 M山梨醇)中培育3週後評估SG-11 (SEQ ID NO:9)之穩定性。穩定性係藉由使用經緩衝液D (100 mM磷酸鈉, pH 7.0, 10%甘油)平衡之分析型粒徑篩析層析(SEC)監測聚集形成來評價。與剛剛解凍之蛋白質相比在4℃下儲存3週後未觀察到顯著變化，此乃因兩種樣品皆在1.57 mL處顯示單峰。然而，在37℃下培育一週後，除1.57 mL處之單體(其係最小峰)外，樣品清晰地在1.29及1.41 mL處顯示聚集峰。聚集之原因經研究如下。在SG-11之位置147及151 (相對於SEQ ID NO:7)發現兩個半胱胺酸殘基。埃爾曼試劑分析(Ellman's reagent assay)揭露在SG-11 (SEQ ID NO:9)中存在游離硫氫基，此指示Cys¹⁴⁷及/或Cys¹⁵¹不會形成穩定二硫鍵。由於游離硫氫基可藉由形成不合意分子間二硫鍵引起聚集，故檢查存

在還原劑(例如 β -巰基乙醇)是否可防止聚集。在2.5% (v/v) β -巰基乙醇存在下在緩衝液(50 mM磷酸鈉、150 mM NaCl及10%甘油)中在37°C下培育4天後聚集極大地受阻，此與無 β -巰基乙醇時形成之聚集不同。結果表明提供游離硫氫基之Cys¹⁴⁷及/或Cys¹⁵¹引起聚集。

實例13

SG-11變體之轉譯後修飾

儘管SG-11蛋白質在高溫下較為穩定，但在37°C下在一週中形成聚集在下游處理階段期間可能成問題。藉由LC/MS/MS發現之天冬醯胺殘基之去醯胺亦係風險因子。為改良包含SEQ ID NO:3之蛋白質或其變體之可製造性，在SG-11變體(例如SG-11V1 (SEQ ID NO:11)、SG-11V2 (SEQ ID NO:13)、SG-11V3 (SEQ ID NO:15)、SG-11V4 (SEQ ID NO:17)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19))之設計中考慮實例10至12之結果以降低有害PTM之發生率。

實例13-16闡述經實施以表徵胺基酸取代對SG-11變體G-11V5 (SEQ ID NO:19，相對於SEQ ID NO:7包含N53S、N83S、C147V、C151S)之穩定性及功能之效應的實驗。SG-11V5 (如實例1中所述表現及純化)。

根據在使SG-11 (SEQ ID NO:9)經受應力條件(實例11)時觀察到之PTM，使用實例11中所述之方法藉由LC-MS/MS分析SG-11V5 (SEQ ID NO:19)之轉譯後修飾，其與SG-11 (SEQ ID NO:7)之PTM進行比較。

對於此分析，比較野生型SG-11 (SEQ ID NO:7)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19)之PTM。在第一分析(結果提供於下表9中)中，蛋白質係以1 mg/ml之濃度儲存於緩衝液1 (50 mM NaPO₄⁻, pH 8, 150 mM NaCl、10%甘油)中且在4°C或40°C下儲存2週。然後用DTT及IAA處理蛋白質，隨後

進行胰蛋白酶消化。然後藉由耦聯至Xevo G2-XS QTOF質譜儀之Waters ACQUITY UPLC使用蛋白質BEH C18管柱分析所消化樣品。藉由LC-MS/MS分析蛋白質顯示，在4℃及40℃二者下與SG-11相比SG11V5蛋白質具有顯著較低之起始甲硫胺酸氧化百分比及N137去醯胺百分比。

表9

蛋白質	PTM位點	修飾	4℃	40℃
SG-11 (SEQ ID NO:7)	MLEGEESVYVVGK (SEQ ID NO:26)	M1氧化	8.9%	12.5%
SG-11V5 (SEQ ID NO:19)	MLEGEESVYVVGK (SEQ ID NO:26)	M1氧化	2.5%	4.7%
SG-11 (SEQ ID NO:7)	TPEDYTAFNGIELYQGK (SEQ ID NO:26)	N83去醯胺	19.4%	98.1%
SG-11V5 (SEQ ID NO:19)	TPEDYTAFSGIELYQGK (SEQ ID NO:28)	N83去醯胺	--	--
SG-11 (SEQ ID NO:7)	ANTDVK (SEQ ID NO:24)	N137去醯胺	1.0%	0.9%
SG-11V5 (SEQ ID NO:19)	ANTDVK (SEQ ID NO:24)	N137去醯胺	0.1%	0.3%

在第二分析中，將SG-11 (SEQ ID NO:7)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19)蛋白質各自儲存在40℃之多種緩衝液中。結果提供於下表10中。

用於此實驗中之儲存緩衝液係100 mM NaPO4-, pH7，含10%山梨醇(+Sor)或不含10%山梨醇(-Sor)及含10%甘油(+Gly)或不含10%甘油(-Gly)，如表10中所指示。如表10中之數據展示，在所有緩衝液條件下，SG-11V5 (SEQ ID NO:19)蛋白質之第一位之甲硫胺酸之氧化與SG-11 (SEQ ID NO:7)蛋白質相比極大地減少。兩種蛋白質在使得N137去醯胺極大地減少之至少甘油存在下亦及山梨醇及甘油二者存在下之N137去醯胺之程度亦不同。該等數據顯示，取代SG-11蛋白質中之胺基酸對溶液中蛋白質之PTM可具有顯著有益之效應。

表10

蛋白質	PTM位點	修飾	- Sor - Gly	+ Sor - Gly	- Sor + Gly	+ Sor + Gly
SG-11 (SEQ ID NO:7)	MLEGEESVVYVGK (SEQ ID NO:26)	M1氧化	20%	12.1%	38.6%	27.8%
SG-11V5 (SEQ ID NO:19)	MLEGEESVVYVGK (SEQ ID NO:26)	M1氧化	2.7%	3.3%	5.6%	5.9%
SG-11 (SEQ ID NO:7)	TPEDYTAFNGIELYQGK (SEQ ID NO:26)	N83去醯胺	98.1%	93.9%	96.2%	87.4%
SG-11V5 (SEQ ID NO:19)	TPEDYTAFSGIELYQGK (SEQ ID NO:28)	N83去醯胺	--	--	--	--

蛋白質	PTM位點	修飾	- Sor - Gly	+ Sor - Gly	- Sor + Gly	+ Sor + Gly
ID NO:19)						
SG-11 (SEQ ID NO:7)	ANTDVK (SEQ ID NO:24)	N137 去 醯 胺	0.9%	2.6%	3.0%	2.5%
SG-11V5 (SEQ ID NO:19)	ANTDVK (SEQ ID NO:24)	N137 去 醯 胺	1.5%	3.3%	0.4%	0.1%

實例14

SG-11變體構築及穩定性分析

儘管SG-11蛋白質在高溫下極其穩定，但在37℃下在一週內形成聚集在下游處理階段可成問題。藉由LC/MS/MS發現之天冬醯胺殘基之去醯胺亦係風險因子。為改良包含SEQ ID NO:3之蛋白質或其變體之可製造性，使繪示為SG-11 (SEQ ID NO:7)之蛋白質突變以含有以下4種取代：N53S、N83S、C147V及C151S。具有4種取代之此變體命名為SG-11V5，在本文中提供為SEQ ID NO:19。在不同的儲存緩衝液調配物中測試經純化SG-11及SG-11V5之穩定性。SG-11V5 (SEQ ID NO:19)與SEQ ID NO:7具有約98.3%序列一致性。

SG-11之穩定性分析

圖18顯示各條件對SG-11 (SEQ ID NO:7)穩定性之效應。具體而言，在pH 5.2 (圖18A、18B及18C)、pH 7.0 (圖18D、18E及18F)及pH

8.0 (圖18G、18H及18I)下培育經純化SG-11 (SEQ ID NO:7)。亦在3種不同pH條件下測試添加劑之效應：150 mM NaCl (圖18A、18D及18G)；150 mM NaCl及100 mM精胺酸(圖18B、18E及18H)；及150 mM NaCl及0.5 M山梨醇(圖18C、18F及18I)。藉由分析型SEC分析穩定性。箭頭指示單體形式之滯留時間。

SG-11V5之穩定性分析

圖19顯示各條件對SG-11V5 (SEQ ID NO:19)穩定性之效應。在pH 5.2 (圖19A、19B及19C)、pH 7.0 (圖19D、19E及19F)及pH 8.0 (圖19G、19H及19I)下培育SG-11V5 (SEQ ID NO:19)。亦在3種不同pH條件下測試添加劑之效應：150 mM NaCl (圖19A、19D及19G)；150 mM NaCl及100 mM Arg (圖19B、19E及19H)；及150 mM NaCl及0.5 M山梨醇(圖19C、19F及19I)。藉由分析型SEC分析穩定性。箭頭指示單體形式之滯留時間。

在100 mM精胺酸(pH 7.0)存在下，經純化SG-11 (SEQ ID NO:7)蛋白質之聚集物形成極大地受阻。然而，在早期滯留時間下觀察到一些小峰，此指示存在不同於單體形式之形式。SG-11V5 (SEQ ID NO:19)在此實例中測試之所有條件下皆未顯示大量聚集。甚至在無任何添加劑時，仍觀察到離散單體峰。1.34 mL處之小聚集峰被100 mM精胺酸或0.5 M山梨醇阻抑。經純化SG-11 (SEQ ID NO:7)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19)在pH 5.2下發生沈澱。

升高溫度可因去醯胺增加蛋白質對降解及聚集之敏感性。為最小化與去醯胺及聚集相關之潛在易感性，將突變N53S、N83S C147V及C151S引入SG-11中。因此，SG-11V5在pH 7.0及pH 8.0下顯示改良之穩定性。

實例15

SG-11V5之活體外功能分析

實施活體外TEER分析以證實SG-11變體(例如SG-11V5)維持與維持上皮細胞屏障功能相關之功能，如針對SG-11蛋白質所顯示(例如參見實例2)。

如實例2中所述實施細胞培養。簡言之，在培養8-10天後，在37°C + 5% CO₂下用添加至transwell板底側室之10 ng/ml IFN- γ 將含有腸細胞之transwell板處理24小時。24小時後，將新鮮cRPMI添加至上皮細胞培養板。在IFN- γ 處理後量測跨上皮細胞電阻(TEER)讀數且將其用作處理前TEER值。然後將SG-11 (SEQ ID NO:9)或SG-11V5 (SEQ ID NO:19)以1 μ g/ml (40 nM)之最終濃度添加至transwell板之頂端室。使用50 nM之肌凝蛋白輕鏈激酶(MLCK)抑制劑肽18 (BioTechne, Minneapolis, MN)作為預防發炎誘發之屏障破壞之陽性對照 (Zolotarevskky 等人，202, Gastroenterology, 123:163-172)。將化合物在腸細胞上培育6小時。與測試化合物一起預培育後，將含有腸細胞之transwell插入物轉移至含有U937單核球之接收板之頂部上。然後將熱滅活大腸桿菌(HK大腸桿菌)(將細菌加熱至80°C並保持40分鐘)添加至頂端及底側室二者且感染複數(MOI)為10。將Transwell板在37°C + 5% CO₂下培育24小時且進行處理後TEER量測。SG-11 (SEQ ID NO:9)使TEER自藉由HK大腸桿菌之78.6%破壞增加至89.5% ($p < 0.0001$)，而SG-11V5 (SEQ ID NO:19)增加至89.1% ($p < 0.0001$) (圖20)。使用與HK大腸桿菌相比之單因子ANOVA實施統計分析，然後進行費雪LSD多重比較測試。圖20中之圖代表自在兩次個別實驗中實施之四個板彙集之數據($n = 12$)。

實例16

SG-11V5之活體內功能分析

然後，重複如上文實例7及8中所述實施之DSS動物模型實驗以平行測試SG-11或SG-11V5 (SEQ ID NO:19)。在該等實驗中，與開始用DSS處理同時(如在實例7中)或在先前DSS投與後，將SG-11或SG-11V5投與小鼠。差別僅在於用SG-11或SG-11V5 (SEQ ID NO:19)將實例8中之小鼠治療4天而非6天。

在第一DSS小鼠模型(實例16A；方法與實例7相同)中，在第0天用測試化合物腹膜內(i.p.)治療小鼠且6小時後起始DSS處理。所投與劑量包括50 奈莫耳/kg SG-11 (SEQ ID NO:9) (1.3 mg/ml) 及 Gly2-GLP2 (0.2 mg/kg)，且SG-11V5 (SEQ ID NO:19)之劑量反應包括16奈莫耳/kg (0.4 mg/ml)、50奈莫耳/kg (1.3 mg/ml)及158奈莫耳/kg (4.0 mg/kg)。用飲用水中之2.5% DSS將小鼠治療6天(第0天至第6天)。每天兩次投與治療性蛋白質治療達DSS暴露之持續時間。

在第二實驗(實例16B；方法與實例8相同)中，向小鼠提供含有2.5% DSS之飲用水達7天。在第7天時恢復正常飲用水且起始50奈莫耳/kg之SG-11 (SEQ ID NO:9) (1.3 mg/kg)、SG-11V5 (SEQ ID NO:19) (1.3 mg/kg)或Gly2-GLP2 (0.2 mg/kg)之i.p.治療。使用早上及晚上劑量(每8小時及16小時)每天兩次(b.i.d.)持續4天投與治療。對於兩種DSS模型(實例16A及16B)，在DSS投與期間每2天準備新鮮2.5% DSS水。

在每一DSS實驗結束時，使小鼠禁食4小時且然後經口管飼600 mg/kg經異硫氰酸螢光黃(FITC)標記之4KDa聚葡萄糖[4KDa-FITC]。在4KDa-FITC管飼後1小時，使小鼠安樂死，收集血液且量測血清中之FITC

信號。對於第一模型，與未經治療之小鼠相比，在媒劑治療之DSS小鼠中觀察到4KDa-FITC聚葡萄糖穿過上皮細胞屏障之易位顯著增加。結果圖解說明於**圖21A**中：SG-11 (SEQ ID NO:9)顯著減少4KDa-FITC信號($p = 0.04$)。SG-11V5 (SEQ ID NO:19)亦減少4KDa-FITC信號，但差別未達到統計學顯著性($p = 0.21$)。在**圖21B**中，與實例8中之先前結果相似，未觀察到4KDa-FITC增加且因此未觀察到SG-11或SG-11V5治療之效應。兩個圖中之數據繪製為平均值 $\pm$ SEM且每一圖代表個別實驗之數據($n = 10$ /組)。

在DSS發炎性腸病模型中SG-11V5對屏障功能之發炎中心讀出之效應

在完成上述DSS模型後，遵循實例7中所詳述之方案量測LBP含量作為屏障功能之發炎中心讀出。在完成兩種DSS模型(實例16A及16B)後，收集血液且分離血清。使用市售ELISA套組(Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY)量測血清中之LPS結合蛋白(LBP)含量。結果提供於**圖22A** (實例16A)及**圖22B** (實例16B)中。在實例16A DSS模型中觀察到因應DSS暴露LBP顯著增加。在50奈莫耳/kg劑量SG-11 (SEQ ID NO:9)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19)下，觀察到LBP之相似減少，但二者在統計學上皆不顯著。然而，158奈莫耳/kg之較高劑量下之SG-11V5 (SEQ ID NO:19)治療使得LBP產生顯著減少($p = 0.003$) (**圖22A**)。在實例16B DSS模型中，暴露於DSS使得LBP產生顯著增加(**圖22B**)。然而，對於任一治療未觀察到LBP減少且對於SG-11 (SEQ ID NO:9)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19)二者觀察到相似效應。不受限於理論，認為LBP之長循環半衰期(據報導為12-24小時)可使得難以在開始治療之前引發LBP反應(投與DSS)之模型中觀察到全身LBP含量減少(Behrendt, D., J. Dembinski, A. Heep

及 P. Bartmann. 2004. Lipopolysaccharide binding protein in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89: F551-554)。

在DSS發炎性腸病模型中SG-11及SG-11V5對體重之效應

在實例16A及實例16B二者中之整個實驗模型中量測體重。在實例16A DSS模型(圖23A)中，對50奈莫耳/kg之SG-11 (SEQ ID NO:9)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19)治療觀察到相似之體重趨勢，且在第6天對158奈莫耳/kg之SG-11V5 (SEQ ID NO:19)觀察到顯著體重改良。在50奈莫耳/kg劑量之SG-11 (SEQ ID NO:9)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19)具有相似之體重變化且二者在第11天具有統計學上改良之體重變化($p < 0.05$)之治療性DSS模型中觀察到相似模式。對於圖23A及圖23B，數據繪製為平均值 $\pm$ SEM且每一圖代表個別實驗之數據。使用與DSS + 媒劑組相比之二因子ANOVA及費雪LSD多重比較測試實施統計分析。

在DSS發炎性腸病模型中SG-11及SG-11V5對大體病理之效應

如上文實例7中所述對實例16A進行結腸組織之大體病理觀察。簡言之，使用基於可見血液程度及糞粒稠度之評定系統。所用評定系統係：(0) = 無大體病理，(1) = 在糞便中可見血絲，(2) = 完全帶血之糞粒，(3) 在盲腸中可見帶血之糞便物質，(4) 在盲腸及稀糞中可見帶血之糞便物質，(5) = 直腸出血。對劑量為50奈莫耳/kg之SG-11 (SEQ ID NO:9)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19)觀察到相似結果且對SG-11V5 (SEQ ID NO:19)觀察到劑量依賴效應，其中160奈莫耳/kg劑量引起顯著改良($p < 0.002$)。圖24中所圖解說明之數據呈現為平均值 $\pm$ SEM且包括個別實驗之數據。使用單因子ANOVA實施統計分析，然後進行費雪LSD多重比較測試。

在DSS發炎性腸病模型中SG-11及SG-11V5對結腸長度之效應

亦分析實例16之DSS模型之SG-11及SG-11變體蛋白質對結腸長度之效應。對實例16A (圖25A)或實例16B (圖25B) DSS模型進行結腸長度量測。在兩種DSS模型中使用SG-11 (SEQ ID NO:9)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19)獲得相似結果，其中兩種治療方案使得結腸長度顯著增加。然而，在實例16A之DSS模型中使用SG-11V5 (SEQ ID NO:19)未觀察到對結腸長度之劑量依賴效應。兩個圖中之數據呈現為平均值 $\pm$ SEM且代表個別實驗之數據。使用與DSS + 媒劑相比之單因子ANOVA實施統計分析，然後進行費雪LSD多重比較測試。

在DSS發炎性腸病模型中SG-11及SG-11V5對結腸重量對長度比率之效應

亦分析實例16之DSS模型之SG-11及SG-11變體蛋白質對結腸重量對長度比率之效應。在實例16A (圖26A)及實例16B (圖26B) DSS模型治療方案中結腸重量對長度比率在SG-11 (SEQ ID NO:9)與SG-11V5 (SEQ ID NO:19)之間相似。在實例16A治療中，所有治療及劑量皆顯著改良結腸重量對長度比率($p < 0.05$)。在實例16B治療方案中，SG-11 (SEQ ID NO:9)及SG-11V5 (SEQ ID NO:19)皆顯著改良結腸重量對長度比率($p < 0.01$)，而陽性對照Gly2-GLP2不改良結腸重量對長度比率。藉由與DSS + 媒劑相比之單因子ANOVA使用費雪LSD多重比較測試實施統計分析。數據繪製為平均值 $\pm$ SEM且每一圖代表單一實驗之數據。

儘管已藉助用於清楚理解之目的之說明及實例一定詳細地闡述了前述揭示內容，但熟習此項技術者將明瞭，可在不背離隨附申請專利範圍中所描繪之本發明精神及範圍下實踐某些改變及修改。因此，不應將說明理解為限制本發明之範圍。

表11展示本發明之SEQ ID NO之詳細資訊。

表11

SEQ ID NO	類型	說明	名稱
1	PRT	含有信號序列之全長蛋白質	SG-11
2	DNA	SEQ ID NO:1之編碼序列(cds)	
3	PRT	不含信號序列且不含「起始甲硫胺酸」之SEQ ID NO:1	SG-11
4	DNA	SEQ ID NO:3之cds	
5	PRT	在pGEX6載體中表現且由Prescission蛋白酶清除之SEQ ID NO:3	SG-11
6	DNA	SEQ ID NO:5之cds	
7	PRT	含有「起始甲硫胺酸」之SEQ ID NO:3	SG-11
8	DNA	SEQ ID NO:7之cds (密碼子最佳化)	
9	PRT	具有N末端FLAG標籤之SEQ ID NO:3	SG-11
10	DNA	SEQ ID NO:9之cds (未經密碼子最佳化)	
11	PRT	SEQ ID NO:7之人工變體(C147V、C151S)	SG-11V1
12	DNA	SEQ ID NO:11之cds (密碼子最佳化)	
13	PRT	SEQ ID NO:7之人工變體(G84D、C147V、C151S)	SG-11V2
14	DNA	SEQ ID NO:13之cds (密碼子最佳化)	
15	PRT	SEQ ID NO:7之人工變體(N83S、C147V、C151S)	SG-11V3
16	DNA	SEQ ID NO:15之cds (密碼子最佳化)	
17	PRT	SEQ ID NO:7之人工變體(N53S、G84D、C147V、C151S)	SG-11V4
18	DNA	SEQ ID NO:17之cds (密碼子最佳化)	
19	PRT	SEQ ID NO:7之人工變體(N53S、N83S、C147V、C151S)	SG-11V5
20	DNA	SEQ ID NO:19之cds (密碼子最佳化)	
21	PRT	腸羅斯拜瑞氏菌假定蛋白(基因庫WP_006857001.1)	

SEQ ID NO	類型	說明	名稱
22	PRT	羅斯拜瑞氏菌831b假定蛋白(基因庫WP_075679733.1)	
23	PRT	菊粉羅斯拜瑞氏菌假定蛋白(基因庫WP_055301040.1)	
24	PRT	表6及8之SEQ ID NO:7之片段	
25	PRT	表6之SG-11之片段	
26	PRT	表6之SG-11之片段	
27	PRT	表6之SG-11之片段	
28	PRT	表6之SG-11之片段	
29	PRT	表8之SG-11之片段	
30	PRT	表6及8之SG-11之片段	
31	PRT	表8之SG-11之片段	
32	PRT	FLAG標籤	FLAG
33	PRT	X處於位置53、83、84、147及151之變體蛋白	
34	PRT	X處於位置53、83、84、147及151之變體蛋白質	

本發明之編號實施例

無論隨附申請專利範圍如何，本發明陳述以下編號實施例：

治療方法

1. 一種治療胃腸上皮細胞屏障功能病症之方法，其包含：

a. 向有需要之患者投與醫藥組合物，其包含：

i. 治療性蛋白質，其包含與以下序列具有至少約85%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19；及

ii. 醫藥上可接受之載劑。

2. 如技術方案1之方法，其中胃腸上皮細胞屏障功能病症係與經降低胃腸壁完整性相關之疾病。

3. 如技術方案1至2中任一者之方法，其中胃腸上皮細胞屏障功能病症係與經降低胃腸黏膜上皮細胞完整性相關之疾病。

4. 如技術方案1至3中任一者之方法，其中胃腸上皮細胞屏障功能病症係與經降低腸上皮細胞完整性相關之疾病。

5. 如技術方案1至4中任一者之方法，其中胃腸上皮細胞屏障功能病症係選自由以下組成之群之至少一者：發炎性腸病、克隆氏病、潰瘍性結腸炎、儲袋炎、刺激性腸症候群、腸道感染、難養芽胞梭菌感染、代謝疾病、肥胖症、2型糖尿病、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪肝病、肝病、酒精性脂肪性肝炎、乳糜瀉、壞死性小腸結腸炎、胃腸病症、短腸症候群、GI黏膜炎、化學療法誘發之黏膜炎、輻射誘發之黏膜炎、口腔黏膜炎、間質性膀胱炎、神經病症、認知障礙、阿茲海默氏病、帕金森氏病、多發性硬化、自閉症、化學療法相關之脂肪性肝炎(CASH)及上文所提及疾病之小兒形式。

6. 如技術方案1至5中任一者之方法，其中胃腸上皮細胞屏障功能病症係發炎性腸病。

7. 如技術方案1至6中任一者之方法，其中胃腸上皮細胞屏障功能病症係克隆氏病。

8. 如技術方案1至6中任一者之方法，其中胃腸上皮細胞屏障功能病症係潰瘍性結腸炎。

9. 如技術方案1至8中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含與以下

序列具有至少約90%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

10.如技術方案1至9中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含與以下序列具有至少約95%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

11.如技術方案1至10中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含與以下序列具有至少約97%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

12.如技術方案1至11中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含與以下序列具有至少約98%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

13.如技術方案1至12中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含與以下序列具有至少約99%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

14.如技術方案1至13中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 19。

15.如技術方案1至14中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列。

16.如技術方案1至14中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列。

17.如技術方案1至14中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。

18.如技術方案1至14中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列。

19.如技術方案1至14中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列。

20.如技術方案1至14中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列。

21.如技術方案1至14中任一者之方法，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列。

22.如技術方案1至21中任一者之方法，其中投與包含直腸、非經腸、靜脈內、局部、經口、真皮、經皮或皮下投與。

23.如技術方案1至22中任一者之方法，其中投與至患者之口腔、胃腸管腔及/或腸。

24.如技術方案1至23中任一者之方法，其中患者經歷與胃腸上皮細胞屏障功能病症相關之至少一個症狀之減輕。

25.如技術方案1至24中任一者之方法，其中患者經歷與胃腸上皮細胞屏障功能病症相關之至少一個症狀之減輕，該至少一個症狀選自由以下組成之群：腹痛、便中有血、便中有膿、發燒、體重減輕、頻繁腹瀉、疲

勞、食慾減退、裡急後重及直腸出血。

26.如技術方案1至25中任一者之方法，其中投與會減輕患胃腸發炎。

27.如技術方案1至25中任一者之方法，其中投與會減輕患者腸黏膜發炎。

28.如技術方案1至25中任一者之方法，其中投與會增加患者腸組織中黏蛋白之產生。

29.如技術方案1至25中任一者之方法，其中投與會增加患者腸上皮細胞傷口癒合。

30.如技術方案1至25中任一者之方法，其中投與會增加患者腸上皮細胞增殖。

31.如技術方案1至30中任一者之方法，其進一步包含向患者投與至少一種第二治療劑。

32.如技術方案1至31中任一者之方法，其進一步包含向患者投與至少一種第二治療劑，該第二治療劑選自由以下組成之群：抗腹瀉劑、5-胺基柳酸化合物、抗發炎劑、抗生素、抗體、抗細胞介素劑、抗發炎細胞介素劑、類固醇、皮質類固醇及免疫阻抑劑。

醫藥組合物

1. 一種醫藥組合物，其包含：

a. 治療性蛋白質，其包含與以下序列具有至少約85%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19；及

b. 醫藥上可接受之載劑。

2. 如技術方案1之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含與以下序列具有至少約90%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

3. 如技術方案1至2中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含與以下序列具有至少約95%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

4. 如技術方案1至3中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含與以下序列具有至少約97%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

5. 如技術方案1至4中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含與以下序列具有至少約98%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

6. 如技術方案1至5中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含與以下序列具有至少約99%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

7. 如技術方案1至6中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及

SEQ ID NO: 19。

8. 如技術方案1至7中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列。

9. 如技術方案1至7中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列。

10. 如技術方案1至7中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。

11. 如技術方案1至7中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列。

12. 如技術方案1至7中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列。

13. 如技術方案1至7中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列。

14. 如技術方案1至7中任一者之醫藥組合物，其中治療性蛋白質包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列。

15. 如技術方案1至14中任一者之醫藥組合物，其經調配用於直腸、非經腸、靜脈內、局部、經口、真皮、經皮或皮下投與。

16. 如技術方案1至15中任一者之醫藥組合物，其經調配使得治療性蛋白質在患者之胃腸管腔及/或腸中具有活性。

表現載體

1. 一種表現載體，其包含多核苷酸，該多核苷酸編碼包含與以下序列具有至少約85%序列一致性之胺基酸序列之蛋白質：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ

ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

2. 如技術方案1之表現載體，其中經編碼蛋白質包含與以下序列具有至少約90%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

3. 如技術方案1至2中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含與以下序列具有至少約95%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

4. 如技術方案1至3中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含與以下序列具有至少約97%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

5. 如技術方案1至4中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含與以下序列具有至少約98%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

6. 如技術方案1至5中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含與以下序列具有至少約99%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

7. 如技術方案1至6中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ

ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 19。

8. 如技術方案1至7中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列。

9. 如技術方案1至7中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列。

10. 如技術方案1至7中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列。

11. 如技術方案1至7中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列。

12. 如技術方案1至7中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。

13. 如技術方案1至7中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列。

14. 如技術方案1至7中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列。

15. 如技術方案1至7中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列。

16. 如技術方案1至7中任一者之表現載體，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列。

宿主細胞

1. 一種宿主細胞，其包含外源性多核苷酸，該外源性多核苷酸編碼包含與以下序列具有至少約85%序列一致性之胺基酸序列之蛋白質：SEQ

ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

2. 如技術方案1之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含與以下序列具有至少約90%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

3. 如技術方案1至2中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含與以下序列具有至少約95%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

4. 如技術方案1至3中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含與以下序列具有至少約97%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

5. 如技術方案1至4中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含與以下序列具有至少約98%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

6. 如技術方案1至5中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含與以下序列具有至少約99%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

7. 如技術方案1至6中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 19。

8. 如技術方案1至7中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列。

9. 如技術方案1至7中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列。

10. 如技術方案1至7中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列。

11. 如技術方案1至7中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列。

12. 如技術方案1至7中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。

13. 如技術方案1至7中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列。

14. 如技術方案1至7中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列。

15. 如技術方案1至7中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列。

16. 如技術方案1至7中任一者之宿主細胞，其中經編碼蛋白質包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列。

17. 如技術方案1至16中任一者之宿主細胞，其中外源性多核苷酸進

一步編碼宿主細胞特異性信號序列。

18.如技術方案1至17中任一者之宿主細胞，其中外源性多核苷酸包含與選自由以下組成之群之核酸序列具有至少約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核酸序列：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18及SEQ ID NO: 20。

19.如技術方案1至18中任一者之宿主細胞，其中宿主細胞係原核細胞。

20.如技術方案1至19中任一者之宿主細胞，其中宿主細胞係大腸桿菌細胞。

21.如技術方案1至18中任一者之宿主細胞，其中宿主細胞係真核細胞。

22.如技術方案1至18及21中任一者之宿主細胞，其中宿主細胞係中國倉鼠卵巢細胞。

23.一種產生蛋白質之方法，其包含在足以表現經編碼蛋白質之條件下培養如技術方案1至22中任一者之宿主細胞。

經分離蛋白質

1.一種經分離治療性蛋白質，其包含與以下序列具有至少約85%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

2.如技術方案1之經分離治療性蛋白質，其包含與以下序列具有至

少約90%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

3. 如技術方案1至2中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含與以下序列具有至少約95%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

4. 如技術方案1至3中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含與以下序列具有至少約97%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

5. 如技術方案1至4中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含與以下序列具有至少約98%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

6. 如技術方案1至5中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含與以下序列具有至少約99%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

7. 如技術方案1至6中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 19。

8. 如技術方案1至7中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列。

9. 如技術方案1至7中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列。

10. 如技術方案1至7中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列。

11. 如技術方案1至7中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列。

12. 如技術方案1至7中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。

13. 如技術方案1至7中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列。

14. 如技術方案1至7中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列。

15. 如技術方案1至7中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列。

16. 如技術方案1至7中任一者之經分離治療性蛋白質，其包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列。

17. 如技術方案1至16中任一者之經分離治療性蛋白質，其中蛋白質使活體外跨上皮細胞電阻分析中之電阻增加。

18. 如技術方案1至17中任一者之經分離治療性蛋白質，其中與不存在蛋白質時實施之分析相比，蛋白質使活體外跨上皮細胞電阻分析中之電阻增加至少約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、

90%、95%或99%。

19.如技術方案1至18中任一者之經分離治療性蛋白質，其中與激酶抑制劑對照相比，蛋白質使活體外跨上皮細胞電阻分析中之電阻增加。

20.如技術方案1至19中任一者之經分離治療性蛋白質，其中與星狀孢菌素或肌凝蛋白輕鏈激酶之對照相比，蛋白質使活體外跨上皮細胞電阻分析中之電阻增加。

合成治療性蛋白質

1.一種合成治療性蛋白質，其包含與SEQ ID NO: 19具有至少約90%序列一致性之胺基酸序列。

2.如技術方案1之蛋白質，其包含與SEQ ID NO: 19具有至少約95%序列一致性之胺基酸序列。

3.如技術方案1至2中任一者之蛋白質，其包含與SEQ ID NO: 19具有至少約97%序列一致性之胺基酸序列。

4.如技術方案1至3中任一者之蛋白質，其包含與SEQ ID NO: 19具有至少約98%序列一致性之胺基酸序列。

5.如技術方案1至4中任一者之蛋白質，其包含與SEQ ID NO: 19具有至少約99%序列一致性之胺基酸序列。

6.如技術方案1至5中任一者之蛋白質，其包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列。

7.如技術方案1至6中任一者之蛋白質，其中位置147之胺基酸係纈胺酸。

8.如技術方案1至6中任一者之蛋白質，其中位置151之胺基酸係絲胺酸。

9. 如技術方案1至6中任一者之蛋白質，其中位置147之胺基酸係纈胺酸，且位置151之胺基酸係絲胺酸。

10. 如技術方案1至5中任一者之蛋白質，其中位置84之胺基酸係天冬胺酸。

11. 如技術方案1至5中任一者之蛋白質，其中位置84之胺基酸係天冬胺酸，且位置147之胺基酸係纈胺酸，且位置151之胺基酸係絲胺酸。

12. 如技術方案1至6中任一者之蛋白質，其中位置83之胺基酸係絲胺酸。

13. 如技術方案1至6中任一者之蛋白質，其中位置83之胺基酸係絲胺酸，且位置147之胺基酸係纈胺酸，且位置151之胺基酸係絲胺酸。

14. 如技術方案1至6中任一者之蛋白質，其中位置53之胺基酸係絲胺酸。

15. 如技術方案1至5中任一者之蛋白質，其中位置53之胺基酸係絲胺酸，且位置84之胺基酸係天冬胺酸，且位置147之胺基酸係纈胺酸，且位置151之胺基酸係絲胺酸。

16. 如技術方案1至6中任一者之蛋白質，其中位置53之胺基酸係絲胺酸，且位置83之胺基酸係絲胺酸，且位置147之胺基酸係纈胺酸，且位置151之胺基酸係絲胺酸。

17. 如技術方案1至6中任一者之蛋白質，其中位置147之胺基酸不為半胱胺酸，位置151之胺基酸不為半胱胺酸，位置83之胺基酸不為天冬醯胺，及/或位置53之胺基酸不為天冬醯胺。

18. 如技術方案1至17中任一者之蛋白質，其中蛋白質使活體外跨上皮細胞電阻分析中之電阻增加。

19.一種醫藥組合物，其包含如技術方案1至17中任一者之蛋白質及醫藥上可接受之載劑。

20.一種治療胃腸上皮細胞屏障功能病症之方法，其包含：

a. 向有需要之患者投與醫藥組合物，其包含：

i. 治療性蛋白質，其包含與以下序列具有至少約85%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19；及

ii. 醫藥上可接受之載劑。

以引用方式併入

本文所引用之所有參考文獻、論文、公開案、專利、專利公開案及專利申請案之全文出於所有目的皆以引用方式併入本文中。

然而，提及本文所引用之任何參考文獻、論文、公開案、專利、專利公開案及專利申請案並不為且不應視為承認或任何形式的表明其構成有效的先前技術或形成世界上任何國家之一般常識之一部分。

參考文獻

Molodecky等人，2012, Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review, *Gastroenterology* 142(1): 46-54。

Aroniadis 等人，2013, Fecal microbiota transplantation: past, present and future, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 29(1): 79-84。

Maloy 等人，2011, Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease, *Nature* 474(7351): 298-306。

Needleman等人，1970, A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins J. Mol. Biol., 48(3): 444-453。

Myers等人，1988, Optimal alignments in linear space, CABIOS 4: 11-17。

Altschul等人，1990, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215: 403-410。

Altschul等人，1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402。

Henikoff等人，1992, Amino acid substitution matrices from protein blocks, Proc. Natl. Acad. Sci. 89(22): 10915-10919。

Karlin等人，1993, Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 5873-5877。

Higgins等人，1988, CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer, Gene 73: 237-244。

Person等人，1988, Improved tools for biological sequence comparison, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 2444-2448。

Bowie等人，1990, Deciphering the message in protein sequences: tolerance to amino acid substitutions, Science 247: 1306-1310。

IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature

(CBN), 1975, Nomenclature of α -Amino Acids, (Recommendations 1974), Biochemistry 14: 449-462。

Remington's Pharmaceutical Sciences，第 17 版，Alfonso R. Gennaro (編輯), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985。

Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology，第 3 版，James Swarbrick (編輯), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007。

Berge 等人，1977, Pharmaceutical salts, J. Pharm. Sci. 66: 1-19。

Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Stahl 及 Wermuth, Wiley-VCH, 2002。

In re Bergstrom, 427 F.2d 1394, (CCPA 1970)。

In re Bergy, 596 F.2d 952 (CCPA 1979)。

Parke-Davis & Co. v. H.K. Mulford & Co., 189 F. 95 (S.D.N.Y. 1911) aff'd in part, rev'd in part, 196 F. 496 (2d Cir. 1912)。

Merck & Co., Inc., v. Olin Mathieson Chemical Corporation, 253 F.2d 156 (4th Cir. 1958)。

Horhota 等人，2006, Glycerol nucleoside triphosphates: Synthesis and polymerase substrate activities, Organic Letters 8: 5345-5347。

Botoman 等人，1998, Management of Inflammatory Bowel Disease, Am. Fam. Physician, 57(1): 57-68。

Neurath, 2014, Cytokines in Inflammatory Bowel Disease, Nature Reviews Immunology 14: 329-342。

Zhang 等人，2007, Cytokines, Inflammation and Pain, Int. Anesthesiol. Clin. 45(2): 27-37。

Strober 等人，Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases, *Gastroenterology* 140 (6): 1756-1767。

Boltin 等人，2013, Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease: An Update, *J. Clin. Gastroenterol.* 47(2):106-111。

Kim 等人，2012, Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD, *Journal of Visualized Experiments*, 60: 2-6。

Levesque 等人，2015 Converging goals of treatment of inflammatory bowel disease from clinical trials and practice, *Gastroenterology* 148: 37-51。

Best 等人，1976, Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study, *Gastroenterol.* 70: 439-444。

Johansson 等人，2014, Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis, *Gut* 63:281-291。

Simmonds 等人，2014, Paneth cell metaplasia in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children, *BMC Gastroenterol.* 14:93。

Gassler 等人，2001, Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281:G216-G228。

Dewi 等人，2004, *In vitro* assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J. Virol. Methods.* 121: 171-180。

Mandic 等人，2004, Evaluation of head and neck squamous cell carcinoma invasiveness by the electrical resistance breakdown assay, Clin. Exp. Metast. 21: 699-704。

Dewi 等人，2008, Peripheral blood mononuclear cells increase the permeability of dengue virus-infected endothelial cells in association with down-regulation of vascular endothelial cadherin, J. Gen. Virol. 89:642-652。

Sands, 2004, From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation, Gastroenterology 126: 1518-1532。

Danese 等人，2006, Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases, World J. Gastroenterol. 12: 4807-4812。

Duncan, S. H., Aminov, R. I., Scott, K. P., Louis, P., Stanton, T. B., Flint, H. J. (2006). Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 第 56 卷，第 2437-2441 頁。

International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 431, 931-45。

Jensen O. N. (2004) Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. Curr Opin Chem Biol. 8, 33-41。

Ayoubi T. A. 及 Van De Ven W. J. (1996) Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J.* 10, 453-60。

Walsh C. (2006) Posttranslational modification of proteins : Expanding nature's inventory. Englewood, Colo.: Roberts and Co. Publishers. xxi, 490 p. p。

Gaston B. M. 等人，(2003) S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Interv.* 3, 253-63。

Jaffrey S. R. 及 Snyder S. H. (2001) The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE.* 2001, pl1。

Han P. 及 Chen C. (2008) Detergent-free biotin switch combined with liquid chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of S-nitrosylated proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 22, 1137-45。

Imai S. 等人，(2000) Transcriptional silencing and longevity protein SIR2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* 403, 795-800。

Glozak M. A. 等人，(2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene.* 363, 15-23。

Yang X. J. 及 Seto E. (2008) Lysine acetylation: Codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell.* 31, 449-61。

Bratt 等人，「A phase 1 trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease,」 *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2006，第4卷，第754-759頁。

Shigemori 等人，「Oral delivery of *Lactococcus lactis* that secretes

bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice,」 *Microbial Cell Factories*, 2015, 第14卷:189。

Steidler等人, 「Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10,」 *Science*, 2000, 第289卷, 第1352-1355页。

Hanniffy等人, 「Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection,」 *Journal of Infectious Diseases*, 2007, 第195卷, 第185-193页。

Vandenbroucke等人, 「Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice,」 *Gastroenterology*, 2004, 第127卷, 第502-513页。

Sheth 等人, 「Manipulating bacterial communities by in situ microbiome engineering,」 *Trends in Genetics*, 2016, 第32卷, 第4期, 第189-200頁。

Lerner 等人, 「Dysbiosis may trigger autoimmune diseases via inappropriate post-translational modification of host proteins,」 *Frontiers in Microbiology*, 2016, 第7卷, 第84條。

Machiels, K., M. Joossens, J. Sabino, V. De Preter, I. Arijs, V. Eeckhaut, V. Ballet, K. Claes, F. Van Immerseel, K. Verbeke, M. Ferrante, J. Verhaegen, P. Rutgeerts及S. Vermeire. 2014. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63: 1275-1283。

Patterson, A. M., I. E. Mulder, A. J. Travis, A. Lan, N. Cerf-Bensussan, V. Gaboriau-Routhiau, K. Garden, E. Logan, M. I. Delday, A. G. P. Coutts, E. Monnais, V. C. Ferraria, R. Inoue, G. Grant 及 R. I. Aminov. 2017. Human Gut Symbiont *Roseburia hominis* Promotes and Regulates Innate Immunity. *Front Immunol* 8: 1166 °

Shawki, A. 及 D. F. McCole. 2017. Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 3: 41-50 °

【序列表】

<110> 美商第二基因體公司 (SECOND GENOME, INC.)

<120> 用於治療上皮細胞屏障功能病症的蛋白質

<130> SEGE-001/03WO 321077-2031

<140> TW 107112165

<141> 2018-04-09

<150> US 62/611,334

<151> 2017-12-28

<150> US 62/607,706

<151> 2017-12-19

<150> US 62/482,963

<151> 2017-04-07

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 256

<212> PRT

<213> 人羅斯拜瑞氏菌

<400> 1

Met Lys Arg Leu Val Cys Thr Val Cys Ser Val Leu Leu Cys Ala Gly

1 5 10 15

Leu Leu Ser Gly Cys Gly Thr Ser Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val

20 25 30

Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu

35 40 45

Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala

50 55 60

Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val

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

<210> 2
<211> 768
<212> DNA

<213> 人羅斯拜瑞氏菌

<400> 2

atgaagagat tagtgtgcac ggtctgcagt gfactgttgt gtgcgggact tctctccgga	60
tgcggtacct cgctggaggg agaggaaagt gtcgtgtacg tgggaaagaa aggcgtgata	120
gcgtcgctgg atgtggagac gctcgatcag tcctactacg atgagacgga actgaagtcc	180
tatgtggatg cagagggtga agattacacc gcggagcatg gtaaaaatgc agtcaagggtg	240
gagagcctta aggtggaaga cgggtgtggcg aagcttaaga tgaagtacaa gacaccggag	300
gattataccg catttaatgg aattgaactc tatcagggga aagtcgttgc ttccttggcg	360
gcaggatacg tctacgacgg ggagttcgcc cgcgtggagg aaggcaaggt tgtgggagct	420
gccacaaaac aggatattta ctctgaggat gatttgaaag ttgccatcat ccgtgccaat	480
acggatgtga aggtggacgg tgagatctgc tatgtctcct gtcagaatgt gaagctgacc	540
ggaaaagaca gtgtgtcgat ccgtgacgga tattatcttg agacgggaag cgtgacggca	600
tccgtggatg tgaccggaca ggagagcgtc gggaccgagc agctttcggg aaccgaacag	660
atggagatga ccggggagcc ggtgaatgcg gatgataccg agcagacaga ggcggcggcc	720
ggtgacggtt cgttcgagac agacgtatat actttcattg tctacaaa	768

<210> 3

<211> 232

<212> PRT

<213> 人羅斯拜瑞氏菌

<400> 3

Leu	Glu	Gly	Glu	Glu	Ser	Val	Val	Tyr	Val	Gly	Lys	Lys	Gly	Val	Ile
1			5						10					15	

Ala	Ser	Leu	Asp	Val	Glu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Thr
			20						25					30	

Glu	Leu	Lys	Ser	Tyr	Val	Asp	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Tyr	Thr	Ala	Glu
		35					40					45			

His	Gly	Lys	Asn	Ala	Val	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Lys	Val	Glu	Asp	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

50	55	60
Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala		
65	70	7580
Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu Ala		
	85	9095
Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly Lys		
	100	105110
Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp Leu		
	115	120125
Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly Glu		
	130	135140
Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp Ser		
145	150	155160
Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr Ala		
	165	170175
Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu Ser		
	180	185190
Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp Asp		
	195	200205
Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr Asp		
	210	215220
Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys		
225	230	

<210> 4
<211> 696
<212> DNA

<213> 人羅斯拜瑞氏菌

<400> 4

ctggaggag aggaaagtgt cgtgtacgtg ggaaagaaag gcgtgatagc gtcgctggat	60
gtggagacgc tcgatcagtc ctactacgat gagacggaac tgaagtccta tgtggatgca	120
gaggtggaag attacaccgc ggagcatggt aaaaatgcag tcaagggtgga gaggccttaag	180
gtggaagacg gtgtggcgaa gcttaagatg aagtacaaga caccggagga ttataccgca	240
tttaatggaa ttgaactcta tcaggggaaa gtcgtttgctt ccctggcggc aggatacgtc	300
tacgacgggg agttcgcccg cgtggaggaa ggcaaggttg tgggagctgc cacaaaacag	360
gatatttact ctgaggatga tttgaaagtt gccatcatcc gtgccaatac ggatgtgaag	420
gtggacggtg agatctgcta tgtctcctgt cagaatgtga agctgaccgg aaaagacagt	480
gtgtcgatcc gtgacggata ttatcttgag acgggaagcg tgacggcatc cgtggatgtg	540
accggacagg agagcgtcgg gaccgagcag ctttcgggaa ccgaacagat ggagatgacc	600
ggggagccgg tgaatgcgga tgataccgag cagacagagg cggcggccgg tgacggttcg	660
ttcgagacag acgtatatac tttcattgtc tacaaa	696

<210> 5

<211> 241

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 在pGEX6載體中表現且由Pprecision蛋白酶裂解之SG11

<400> 5

Gly	Pro	Leu	Gly	Ser	Leu	Glu	Gly	Glu	Glu	Ser	Val	Val	Tyr	Val	Gly
1				5					10					15	

Lys	Lys	Gly	Val	Ile	Ala	Ser	Leu	Asp	Val	Glu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser
			20					25						30	

Tyr	Tyr	Asp	Glu	Thr	Glu	Leu	Lys	Ser	Tyr	Val	Asp	Ala	Glu	Val	Glu
		35					40						45		

Asp Tyr Thr Ala Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu
50 55 60

Lys Val Glu Asp Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro
65 70 75 80

Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val
85 90 95

Val Ala Ser Leu Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg
100 105 110

Val Glu Glu Gly Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr
115 120 125

Ser Glu Asp Asp Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val
130 135 140

Lys Val Asp Gly Glu Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu
145 150 155 160

Thr Gly Lys Asp Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr
165 170 175

Gly Ser Val Thr Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly
180 185 190

Thr Glu Gln Leu Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro
195 200 205

Val Asn Ala Asp Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly
210 215 220

Ser Phe Glu Thr Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys Ala Ala Ala
225 230 235 240

Ser

<210> 6
<211> 723
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 在pGEX6載體中表現且由Pprecision蛋白酶裂解之SG11

<400> 6
gggcccctgg gatccctgga gggagaggaa agtgtcgtgt acgtgggaaa gaaaggcgtg 60

atagcgtcgc tggatgtgga gacgctcgat cagtcctact acgatgagac ggaactgaag 120

tcctatgtgg atgcagaggt ggaagattac accgcggagc atggtaaaaa tgcagtcaag 180

gtggagagcc ttaagggtgga agacgggtgtg gcgaagccta agatgaagta caagacaccg 240

gaggattata ccgcatttaa tgggaattgaa ctctatcagg ggaaagtcgt tgcttcacctg 300

gcggcaggat acgtctacga cggggagtgc gccgcgtgg aggaaggcaa ggttgtggga 360

gctgccacaa aacaggatat ttactctgag gatgatttga aagttgccat catccgtgcc 420

aatacggatg tgaagggtgga cgggtgagatc tgctatgtct cctgtcagaa tgtgaagctg 480

accggaaaag acagtgtgtc gatccgtgac ggatattatc ttgagacggg aagcgtgacg 540

gcatccgtgg atgtgaccgg acaggagagc gtcgggaccg agcagctttc gggaaccgaa 600

cagatggaga tgaccgggga gccggtgaat gcggatgata ccgagcagac agaggcggcg 660

gccggtgacg gttcgttcga gacagacgta tatactttca ttgtctacaa agcggccgca 720

tcg 723

<210> 7
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有起始甲硫胺酸之SG11

<400> 7

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val
1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu
20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala
35 40 45

Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp
50 55 60

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr
65 70 75 80

Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu
85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly
100 105 110

Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp
115 120 125

Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly
130 135 140

Glu Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp
145 150 155 160

Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr
165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu
180 185 190

Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp
195 200 205

Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr
210 215 220

Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
225 230

<210> 8
<211> 699
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有起始甲硫胺酸之SG11

<400> 8
atgttggagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60

gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120

gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaaatg ccgtcaaagt tgagagcttg 180

aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240

gcgttcaatg gtatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300

gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360

caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtgcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420

aaagttgatg gcgagatttg ctacgttagc tgtcaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480

agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat 540

gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600

accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660

agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699

<210> 9
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有N末端FLAG標籤之SG11

<400> 9

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Ser His Met Leu Glu
1 5 10 15

Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val Ile Ala Ser
 20 25 30

Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu Thr Glu Leu
 35 40 45

Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Gly Asp Tyr Thr Ala Glu His Gly
 50 55 60

Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp Gly Val Ala
65 70 75 80

Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Asn
 85 90 95

Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu Ala Ala Gly
 100 105 110

Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly Lys Val Val
 115 120 125

Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp Leu Lys Val
 130 135 140

Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly Glu Ile Cys
145 150 155 160

Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp Ser Val Ser
 165 170 175

Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr Ala Ser Val
 180 185 190

Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu Ser Gly Thr
195 200 205

Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp Asp Thr Glu
210 215 220

Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr Asp Val Tyr
225 230 235 240

Thr Phe Ile Val Tyr Lys
245

- <210> 10
- <211> 738
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
<223> 具有N末端FLAG標籤之SG11(未經密碼子最佳化)

<400> 10	
atggactaca aagacgatga cgacaagggc agcagccata tgctggaggg agaggaaagt	60
gtcgtgtacg tgggaaagaa aggcgtgata gcgtcgctgg atgtggagac gctcgatcag	120
tcctactacg atgagacgga actgaagtcc tatgtggatg cagaggtgga agattacacc	180
gcggagcatg gtaaaaatgc agtcaagggt gagagccita aggtggaaga cggtgtggcg	240
aagcttaaga tgaagtacaa gacaccggag gattataccg catttaatgg aattgaactc	300
tatcagggga aagtcgttgc ttccctggcg gcaggatacg tctacgacgg ggagttcgcc	360
cgcgtggagg aaggcaaggt tgtgggagct gccacaaaac aggatattta ctctgaggat	420
gatttgaaag ttgccatcat ccgtgccaat acggatgtga aggtggacgg tgagatctgc	480
tatgtctcct gtcagaatgt gaagctgacc gaaaagaca gtgtgtcgat ccgtgacgga	540
tattatcttg agacgggaag cgtgacggca tccgtggatg tgaccggaca ggagagcgtc	600
gggaccgagc agctttcggg aaccgaacag atggagatga ccggggagcc ggtgaatgcg	660
gatgataccg agcagacaga ggcggcggcc ggtgacggtt cgttcgagac agacgtatat	720
actttcattg tctacaaa	738

<210>	11
<211>	233
<212>	PRT
<213>	人工序列
<220>	
<223>	SG11之人工變體(C147V、C151S)
<400>	11
Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val	
1 5 10 15	
Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu	
20 25 30	
Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala	
35 40 45	
Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp	
50 55 60	
Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr	
65 70 75 80	
Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu	
85 90 95	
Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly	
100 105 110	
Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp	
115 120 125	
Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly	
130 135 140	
Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp	
145 150 155 160	

Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr
165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu
180 185 190

Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp
195 200 205

Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr
210 215 220

Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
225 230

<210> 12
<211> 699
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SG11之人工變體(C147V、C151S)(經密碼子最佳化)

<400> 12
atgttggagg gtgaagagtc tgtttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60

gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120

gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaaatg ccgtcaaagt tgagagcttg 180

aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240

gcgttcaatg gtatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300

gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360

caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtgcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420

aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480

agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat 540

gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600

accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt660

agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag699

<210> 13

<211> 233

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SG11之人工變體(G84D、C147V、C151S)

<400> 13

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val

151015

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu

202530

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala

354045

Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp

505560

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr

65707580

Ala Phe Asn Asp Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu

859095

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly

100105110

Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp

115120125

Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly

130135140

aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat

480

agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat

540

gttacccggtc aagagagcgt ggggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg

600

accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt

660

agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag

699

<210> 15

<211> 233

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SG11之人工變體(N83S、C147V、C151S)

<400> 15

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val

1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu

20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala

35 40 45

Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp

50 55 60

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr

65 70 75 80

Ala Phe Ser Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu

85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly

100 105 110

Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp

115

120

125

Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly

130

135

140

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

145

150

155

160

Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr

165

170

175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu

180

185

190

Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp

195

200

205

Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr

210

215

220

Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys

225

230

<210> 16

<211> 699

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SG11之人工變體(N83S、C147V、C151S)(經密碼子最佳化)

<400> 16

atgttggagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aagtgatgat cgcgtccctg 60

gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120

gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaaatg ccgtcaaagt tgagagcttg 180

aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240

gcgttcagcg gtatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300

gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa

360

caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt

420

aaagttagtg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat

480

agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat

540

gttaccggtc aagagagcgt ggggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg

600

accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt

660

agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag

699

<210> 17

<211> 233

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SG11之人工變體(N53S、G84D、C147V、C151S)

<400> 17

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val

1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu

20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala

35 40 45

Glu His Gly Lys Ser Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp

50 55 60

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr

65 70 75 80

Ala Phe Asn Asp Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu

85 90 95

107112165

表單編號 A0202

第18頁・共32頁(序列表)

1113214191-0

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly
100 105 110

Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp
115 120 125

Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly
130 135 140

Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp
145 150 155 160

Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr
165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu
180 185 190

Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp
195 200 205

Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr
210 215 220

Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
225 230

<210> 18
<211> 699
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SG11之人工變體(N53S、G84D、C147V、C151S)(經密碼子最佳化)

<400> 18
atgttgagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60

gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120

gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaatccg ccgtcaaagt tgagagcttg	180
aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg	240
gcgttcaatg acatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat	300
gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa	360
caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt	420
aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat	480
agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat	540
gttaccggtc aagagagcgt ggggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg	600
accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt	660
agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag	699

<210> 19
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SG11之人工變體(N53S、N83S、C147V、C151S)

<400> 19

Met	Leu	Glu	Gly	Glu	Glu	Ser	Val	Val	Tyr	Val	Gly	Lys	Lys	Gly	Val
1			5					10						15	

Ile	Ala	Ser	Leu	Asp	Val	Glu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Glu
			20					25						30	

Thr	Glu	Leu	Lys	Ser	Tyr	Val	Asp	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Tyr	Thr	Ala
			35					40						45	

Glu	His	Gly	Lys	Ser	Ala	Val	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Lys	Val	Glu	Asp
			50				55							60	

Gly	Val	Ala	Lys	Leu	Lys	Met	Lys	Tyr	Lys	Thr	Pro	Glu	Asp	Tyr	Thr
							70				75				80

Ala Phe Ser Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu
85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly
100 105 110

Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp
115 120 125

Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly
130 135 140

Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp
145 150 155 160

Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr
165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu
180 185 190

Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp
195 200 205

Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr
210 215 220

Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
225 230

- <210> 20
- <211> 699
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> SG11之人工變體(N53S、N83S、C147V、C151S)(經密碼子最佳化)

<400> 20

atgttggagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg60

gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac120

gccgaagtig aggattacac ggccgagcac ggcaaatccg ccgtcaaagt tgagagcttg180

aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg240

gcgttcagcg gtatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat300

gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa360

caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt420

aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat480

agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat540

gttaccggtc aagagagcgt ggggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg600

accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt660

agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag699

<210> 21

<211> 227

<212> PRT

<213> 腸羅斯拜瑞氏菌

<400> 21

Met Leu Asp Ala Asp Thr Asp Thr Val Tyr Val Gln Lys Asn Gly Thr

1 5 10 15

Val Leu Ser Val Asp Val Glu Thr Leu Asp Lys Asp Tyr Tyr Asp Glu

20 25 30

Thr Glu Leu Lys Asp Tyr Val Thr Asp Ala Val Ser Thr Tyr Thr Gly

35 40 45

Glu His Gly Lys Ser Ala Val Lys Leu Glu Asn Leu Ser Val Lys Asp

50 55 60

Gly Thr Ala Thr Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr

65	70	75	80
Gly Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Glu Gly Lys Val Val Lys Ala Leu	85	90	95
Ala Ala Gly Tyr Asp Phe Lys Thr Asp Phe Val Ser Val Glu Asp Gly	100	105	110
Lys Val Thr Gly Thr Ala Thr Lys Glu Glu Ile Tyr Ser Gly Glu Asp	115	120	125
Leu Lys Val Val Ile Ile Lys Ala Asn Arg Asp Val Lys Val Asp Gly	130	135	140
Thr Ile Cys Tyr Val Ser Ser Glu Asn Val Lys Leu Thr Gly Thr Asp	145	150	155
Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Ser Leu Asn Ser Gly Ser Thr Ala	165	170	175
Asp Glu Ser Asp Ser Asp Glu Asn Ile Ala Asp Gly Thr Glu Ser Ile	180	185	190
Gly Gly Ser Thr Glu Val Ser Asp Thr Asp Val Asn Asp Asp Thr Thr	195	200	205
Tyr Val Lys Asp Asp Gly Ala Phe Glu Thr Asp Val Tyr Thr Tyr Ile	210	215	220
Ile Tyr Lys	225		
<210>	22		
<211>	215		
<212>	PRT		
<213>	羅斯拜瑞氏菌831b		
<400>	22		

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

Tyr	Thr	Tyr	Val	Ile	Phe	Lys													
210						215													
<210> 23																			
<211> 236																			
<212> PRT																			
<213> 菊粉羅斯拜瑞氏菌																			
<400> 23																			
Met	Leu	Glu	Ala	Asp	Thr	Asn	Thr	Val	Tyr	Val	Ser	Lys	His	Gly	Lys				
1				5					10					15					
Val	Val	Ser	Met	Asp	Val	Glu	Gln	Leu	Asp	Gln	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Glu				
			20					25						30					
Thr	Glu	Leu	Lys	Glu	Phe	Val	Asp	Ser	Ala	Val	Asp	Glu	Tyr	Asn	Thr				
		35					40					45							
Glu	Asn	Gly	Lys	Asn	Ser	Val	Lys	Val	Asp	Asp	Leu	Thr	Val	Glu	Asp				
	50					55					60								
Gly	Thr	Ala	Lys	Leu	Arg	Met	Asp	Tyr	Glu	Thr	Val	Asp	Asp	Tyr	Thr				
65				70					75						80				
Ala	Phe	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Tyr	Glu	Gly	Lys	Ile	Val	Gln	Ala	Leu				
				85					90					95					
Ala	Ala	Gly	Tyr	Asp	Phe	Asp	Thr	Asp	Phe	Ala	Gly	Val	Asp	Lys	Asp				
		100					105						110						
Gly	Cys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Arg	Gly	Asp	Ile	Leu	Ala	Gln	Glu	Asp				
		115				120					125								
Leu	Lys	Val	Val	Ile	Ile	Lys	Ala	Asn	Thr	Asp	Val	Lys	Ile	Asp	Gly				
	130				135					140									
Lys	Ile	Leu	Tyr	Val	Ser	Cys	Asp	Asn	Val	Thr	Val	Thr	Gly	Lys	Asp				

145	150	155	160
Ser Val Ser Ile Lys Glu Gly Thr Gly Ile Glu Lys Thr Trp Ile Thr			
	165	170	175
Glu Ala Glu Glu Val Pro Ser Thr Glu Ala Val Leu Glu Thr Glu Ser			
	180	185	190
Thr Glu Asp Ala Gly Asp Val Ile Glu Gly Glu Val Ile Ile Gly Thr			
	195	200	205
Glu Glu Ala Ser Gly Asn Asp Val Val Thr Asn Leu Ser Gly Gly Ser			
	210	215	220
Ser Gly Thr Asp Val Tyr Thr Tyr Ile Ile Tyr Lys			
225	230	235	
<210>	24		
<211>	13		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	具有起始甲硫胺酸之SG11之片段		
<400>	24		
Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys			
1	5	10	
<210>	25		
<211>	22		
<212>	PRT		
<213>	人羅斯拜瑞氏菌		
<400>	25		
Gly Val Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr			
1	5	10	15
Asp Glu Thr Glu Leu Lys			
	20		

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> 人羅斯拜瑞氏菌

<400> 26

Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly
1 5 10 15

Lys

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> 人羅斯拜瑞氏菌

<400> 27

Ala Asn Thr Asp Val Lys
1 5

<210> 28
<211> 14
<212> PRT
<213> 人羅斯拜瑞氏菌

<400> 28

Val Asp Gly Glu Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys
1 5 10

<210> 29
<211> 67
<212> PRT
<213> 人羅斯拜瑞氏菌

<400> 29

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

Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu Ser Gly Thr Glu Gln Met
20 25 30

Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp Asp Thr Glu Gln Thr Glu
35 40 45

Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr Asp Val Tyr Thr Phe Ile
50 55 60

Val Tyr Lys
65

<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> 人羅斯拜瑞氏菌

<400> 30

Asn Ala Val Lys
1

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> 人羅斯拜瑞氏菌

<400> 31

Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Ser Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly
1 5 10 15

Lys

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FLAG標籤

<400> 32

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 33
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SG11之人工變體

<220>
<221> misc_feature
<222> (53)..(53)
<223> Xaa可為任一天然胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (83)..(84)
<223> Xaa可為任一天然胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (147)..(147)
<223> Xaa可為任一天然胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (151)..(151)
<223> Xaa可為任一天然胺基酸

<400> 33

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val
1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu
20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala
35 40 45

Glu His Gly Lys Xaa Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp

50	55	60
Gly Val Ala Lys Leu	Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr	
65	70	7580
Ala Phe Xaa Xaa Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu		
	85	9095
Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly		
	100	105110
Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp		
	115	120125
Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly		
	130	135140
Glu Ile Xaa Tyr Val Ser Xaa Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp		
	145	150155160
Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr		
	165	170175
Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu		
	180	185190
Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp		
	195	200205
Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr		
	210	215220
Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys		
	225	230

<210> 34
<211> 233
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SG11之人工變體

<220>

<221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> Xaa係除Asn外之任一胺基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (83)..(83)

<223> Xaa係除Asn外之任一胺基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (84)..(84)

<223> Xaa係除Gly外之任一胺基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (147)..(147)

<223> Xaa係除Cys外之任一胺基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (151)..(151)

<223> Xaa係除Cys外之任一胺基酸

<400> 34

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val
1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu
20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala
35 40 45

Glu His Gly Lys Xaa Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp
50 55 60

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr

65	70	75	80
Ala Phe Xaa Xaa Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu			
85	90	95	
Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly			
100	105	110	
Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp			
115	120	125	
Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly			
130	135	140	
Glu Ile Xaa Tyr Val Ser Xaa Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp			
145	150	155	160
Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr			
165	170	175	
Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu			
180	185	190	
Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp			
195	200	205	
Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr			
210	215	220	
Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys			
225	230		

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種治療性蛋白質的用途，其係用於製備治療患者之胃腸上皮細胞屏障功能病症之藥物，其中：

(i). 該治療性蛋白質包含與以下序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19，或

(ii). 該治療性蛋白質包含選自以下組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 19，且

其中該治療性蛋白質經調配用於直腸、非經腸、靜脈內、局部、經口、真皮、經皮或皮下投與；以及

其中該胃腸上皮細胞屏障功能病症係與經降低胃腸壁完整性相關、與經降低胃腸黏膜上皮細胞完整性相關、或與經降低腸上皮細胞完整性相關之疾病，或該胃腸上皮細胞屏障功能病症與以下組成之群之至少一者相關：發炎性腸病、克隆氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、儲袋炎、刺激性腸症候群、腸道感染、難養芽胞梭菌(*Clostridium difficile*)感染、代謝疾病、肥胖症、2型糖尿病、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪肝病、肝病、酒精性脂肪性肝炎、乳糜瀉、壞死性小腸結腸炎、胃腸病症、短腸症候群、GI黏膜炎、化學療法誘發之黏膜炎、輻射誘發之黏膜炎、口腔黏膜炎、間質性膀胱炎、神經病症、認知障礙、阿茲海默氏病(Alzheimer's)、

帕金森氏病(Parkinson's)、多發性硬化、自閉症、化學療法相關之脂肪性肝炎(chemotherapy associated steatohepatitis ; CASH)及上文所提及疾病之小兒形式者。

【請求項2】

如請求項1之用途，其中該患者經歷與該胃腸上皮細胞屏障功能病症相關之至少一個症狀之減輕。

【請求項3】

一種醫藥組合物，其包含：

a. 治療性蛋白質，其包含(i) 與以下序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19，或(ii) 胺基酸序列，其係選自以下組成之群：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 19；及

b. 醫藥上可接受之載劑；

其中該醫藥組合物經調配用於直腸、非經腸、靜脈內、局部、經口、真皮、經皮或皮下投與。

【請求項4】

如請求項3之醫藥組合物，其係經調配使得該治療性蛋白質在該患者之胃腸管腔及/或腸中具有活性。

【請求項5】

一種宿主細胞，其包含外源性多核苷酸，該外源性多核苷酸編碼包含與以下序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列之治療性蛋白質：

SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19。

【請求項6】

如請求項5之宿主細胞，其中該外源性多核苷酸進一步編碼宿主細胞特異性信號序列。

【請求項7】

一種經分離治療性蛋白質，其包含與以下序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及/或SEQ ID NO: 19，其中該經分離治療性蛋白質不包含與SEQ ID NO: 3一致之胺基酸序列。

【請求項8】

如請求項7之經分離治療性蛋白質，其中該蛋白質在活體外跨上皮細胞電阻分析中會增加電阻。

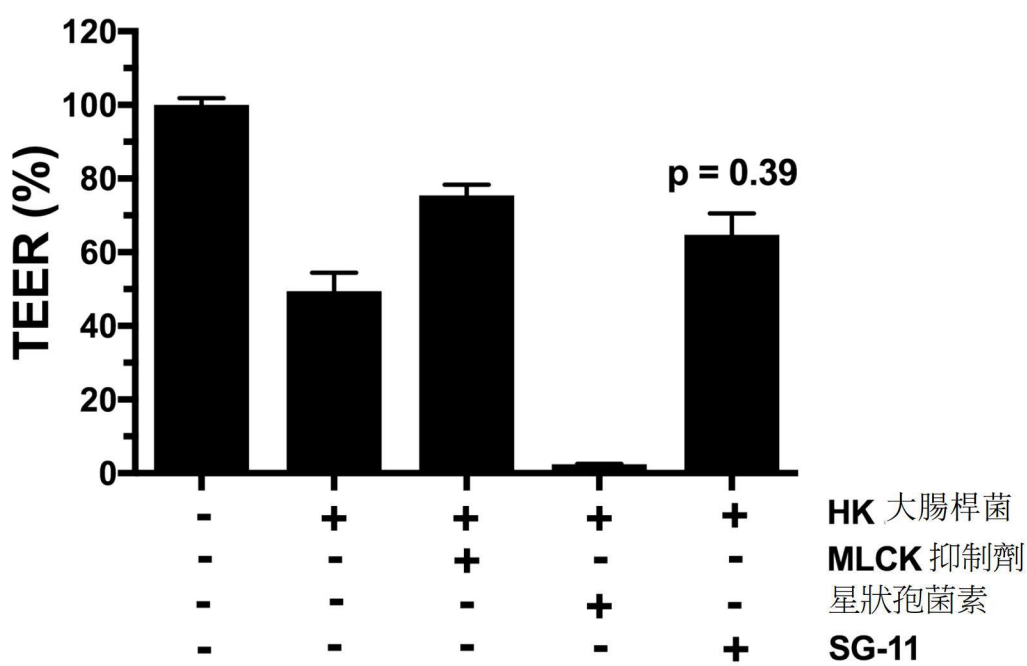
【請求項9】

一種醫藥組合物，其包含：

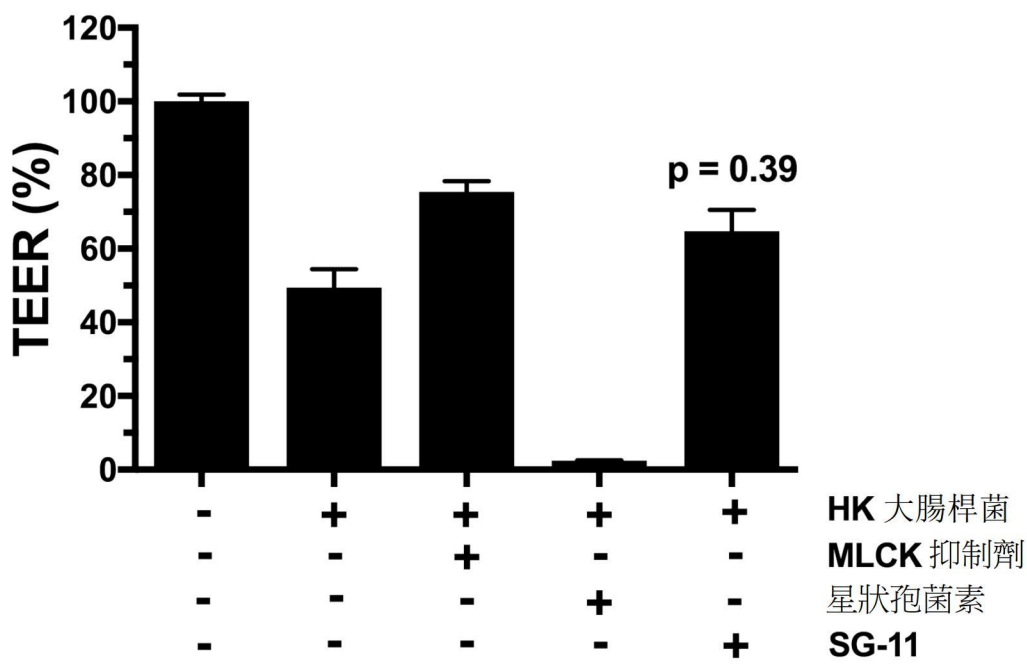
如請求項5之宿主細胞；及

醫藥上可接受之載劑。

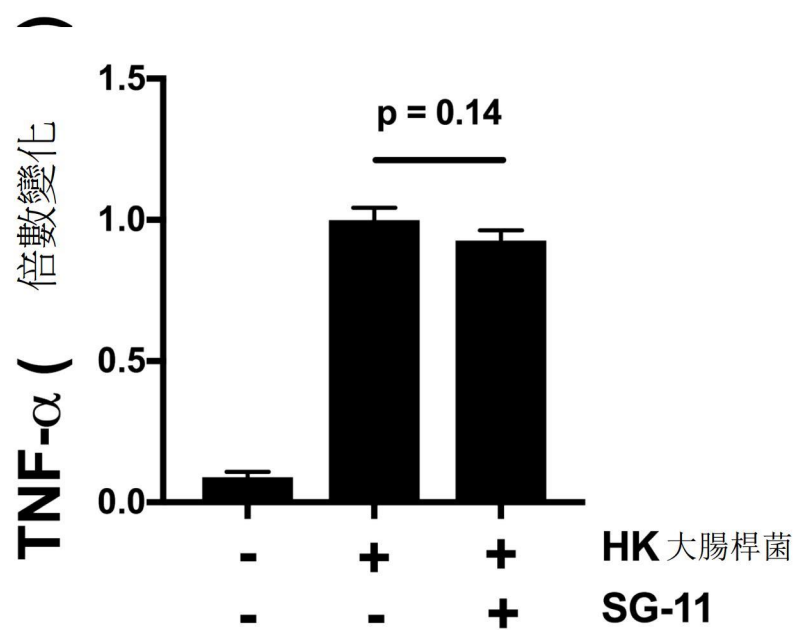
【發明圖式】



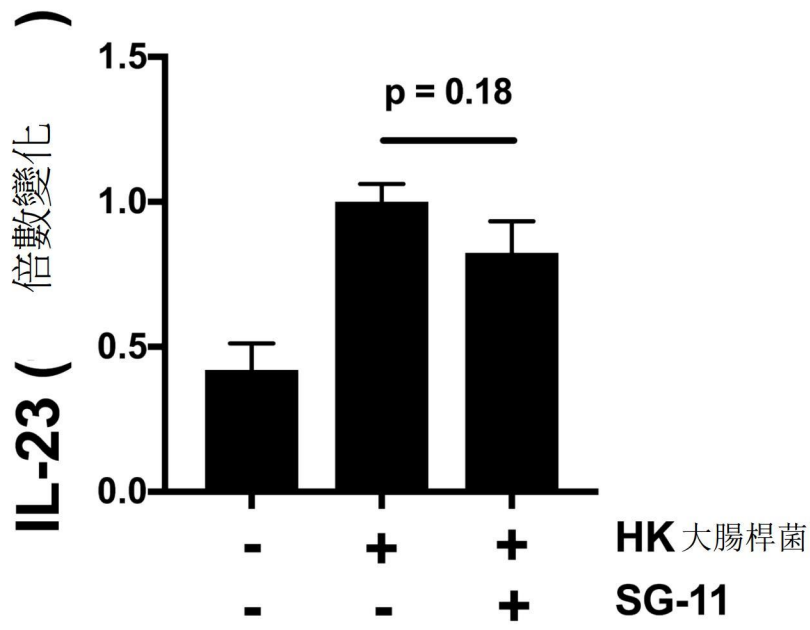
【圖1A】



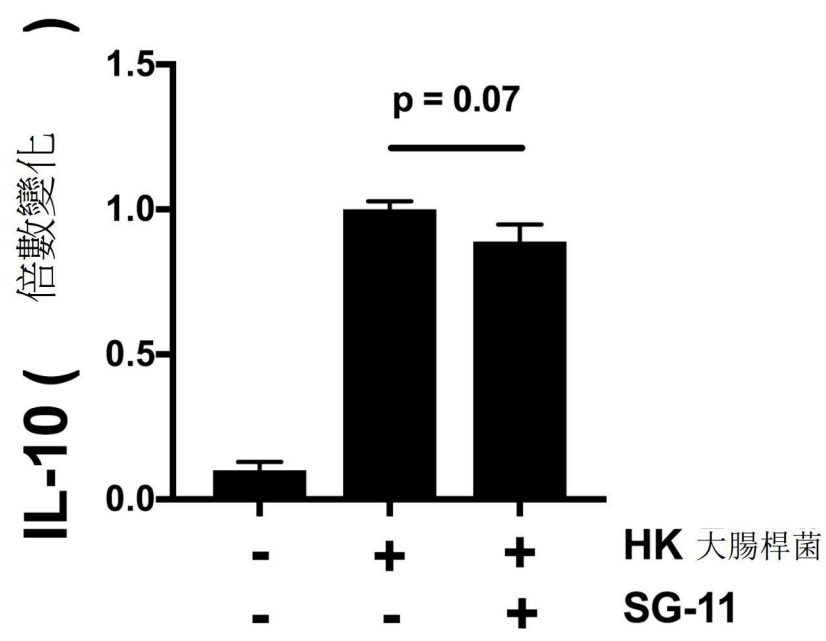
【圖1B】



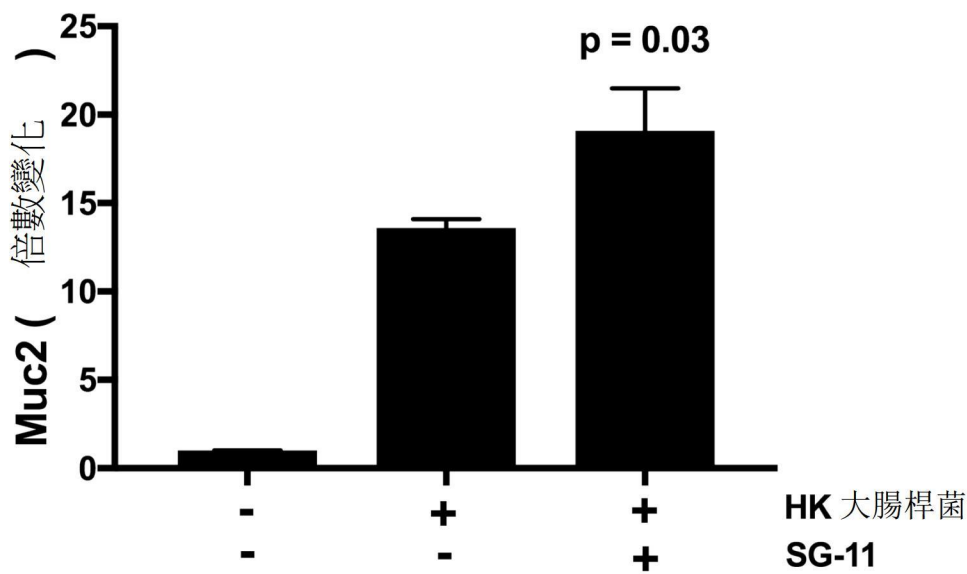
【圖2A】



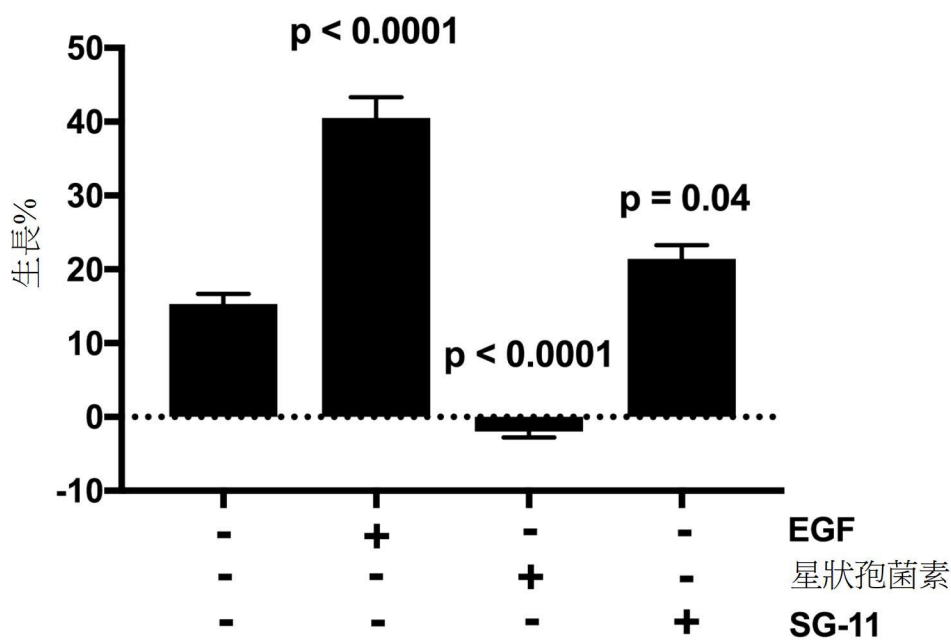
【圖2B】



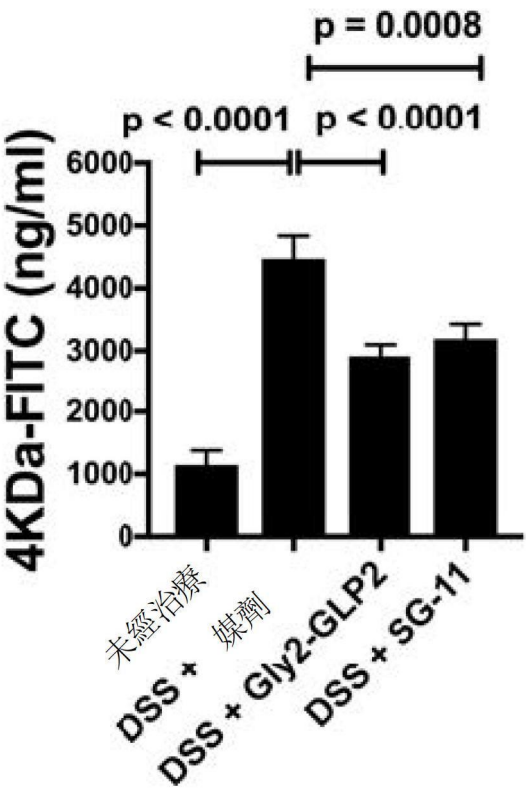
【圖3】



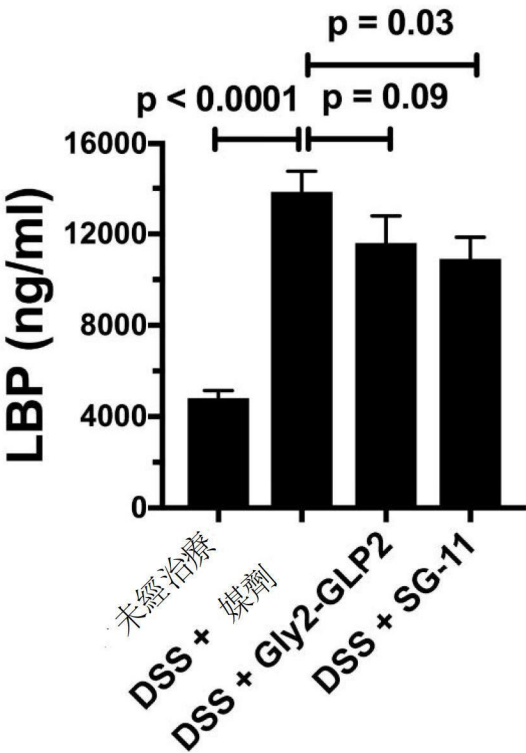
【圖4】



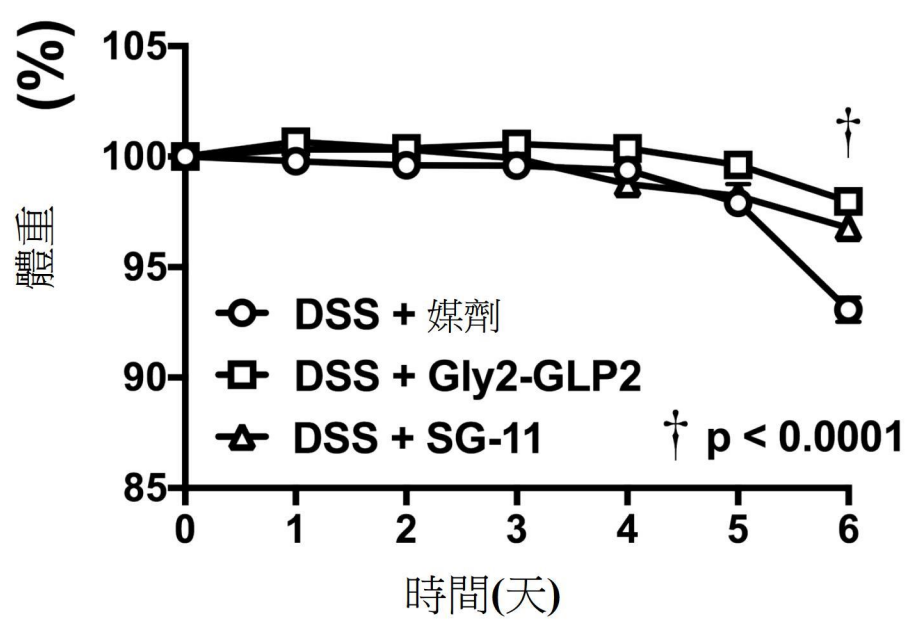
【圖5】



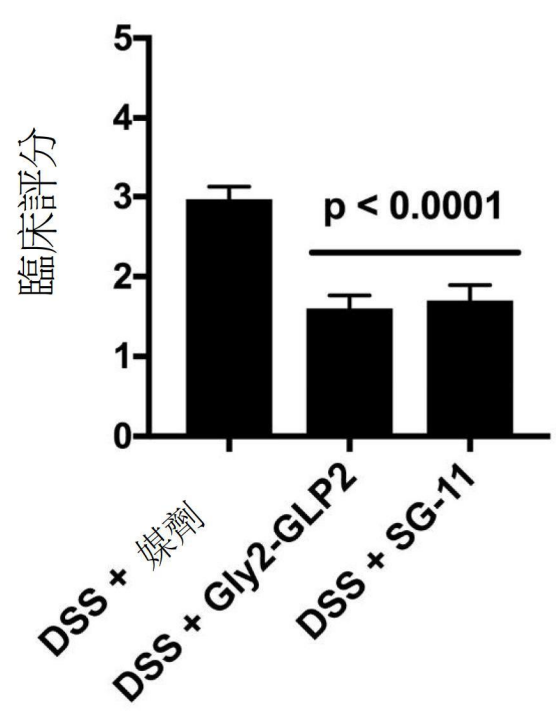
【圖6】



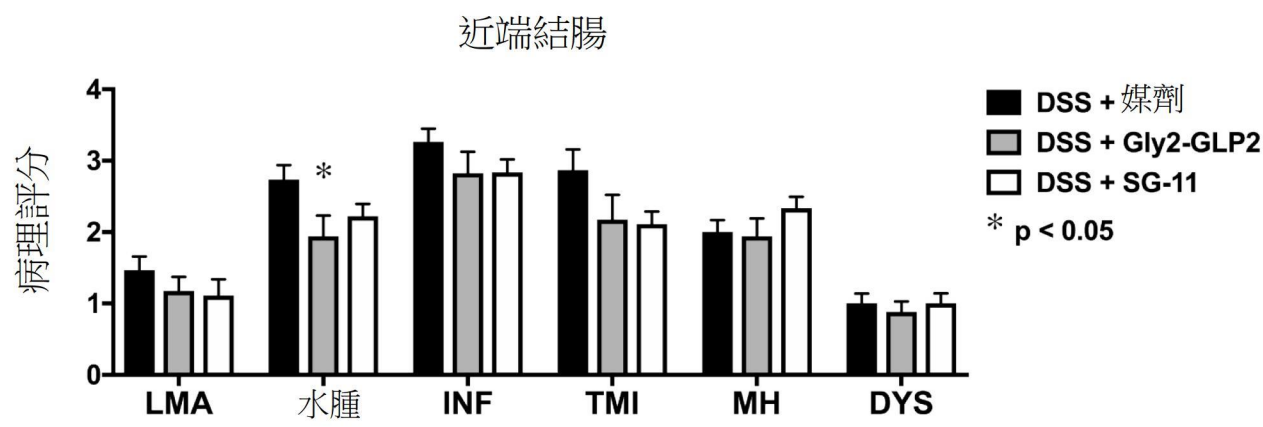
【圖7】



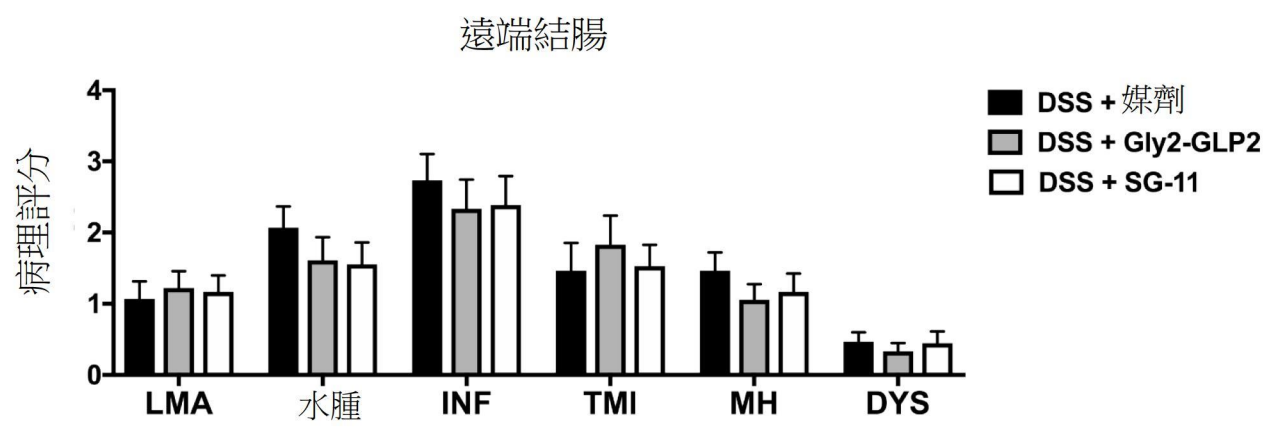
【圖8】



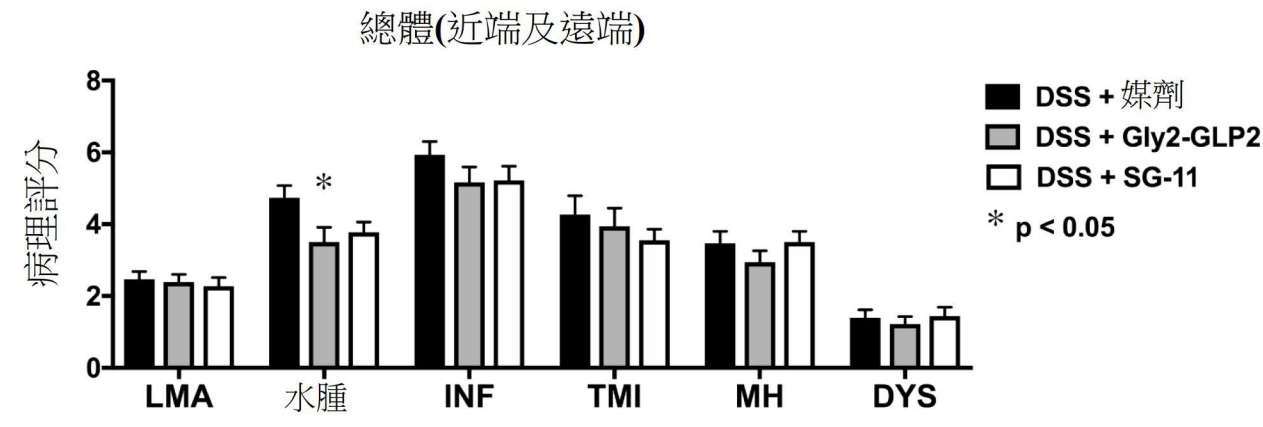
【圖9】



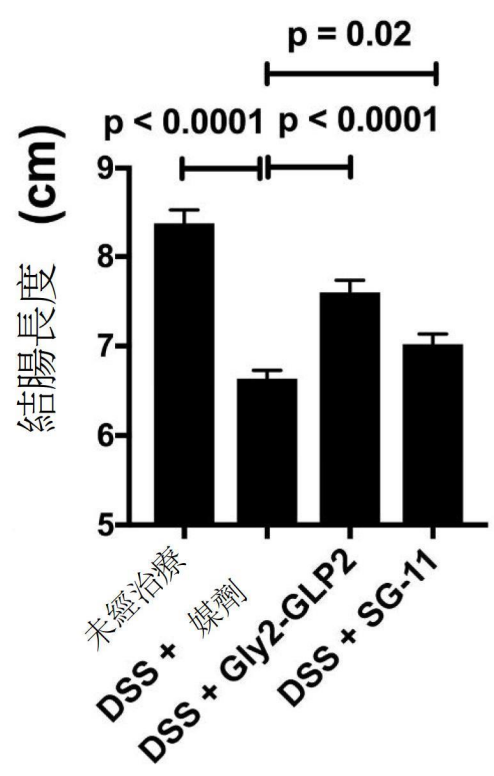
【圖10A】



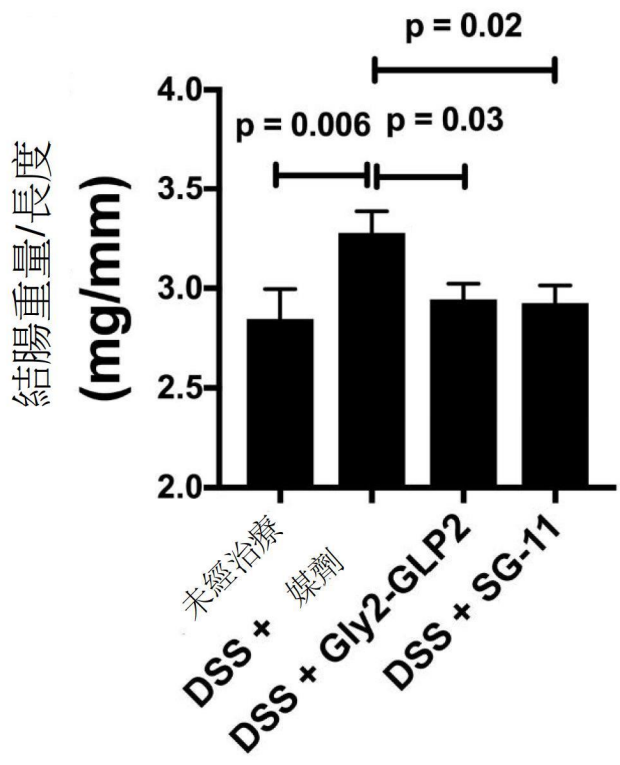
【圖10B】



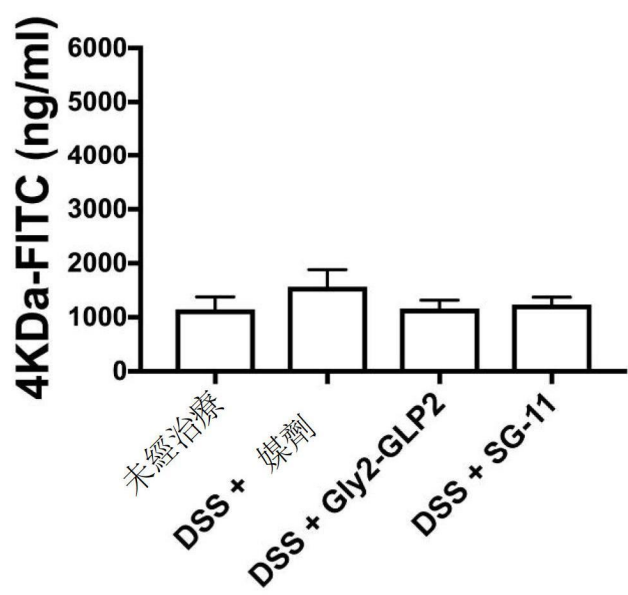
【圖10C】



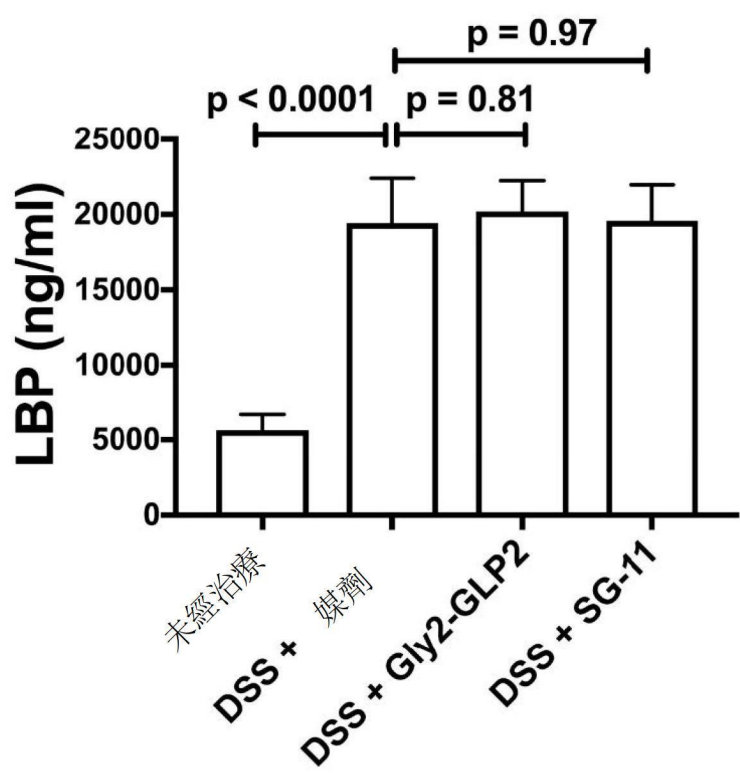
【圖11A】



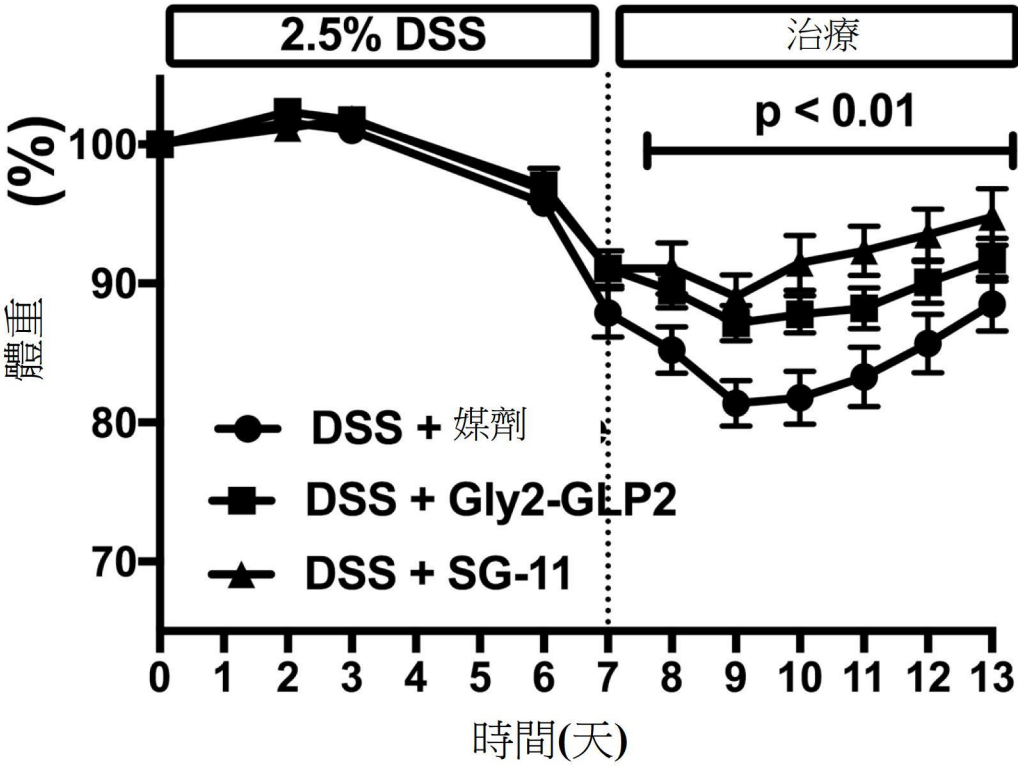
【圖11B】



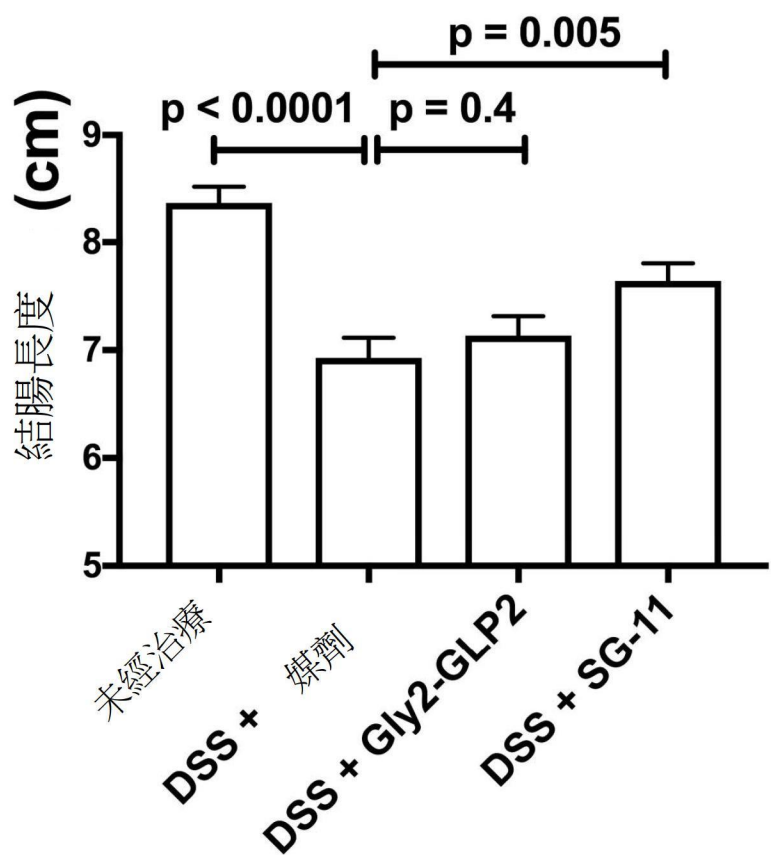
【圖12】



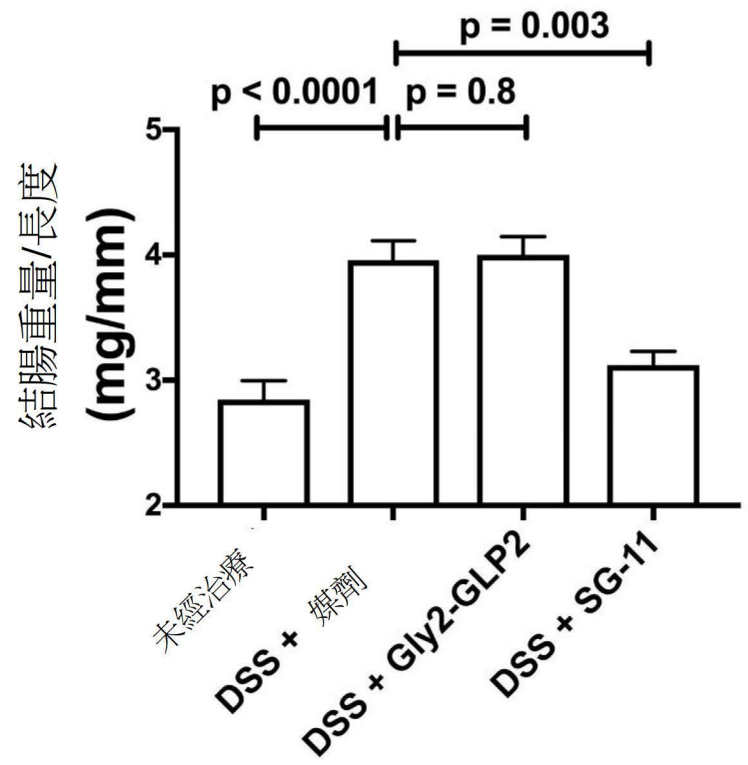
【圖13】



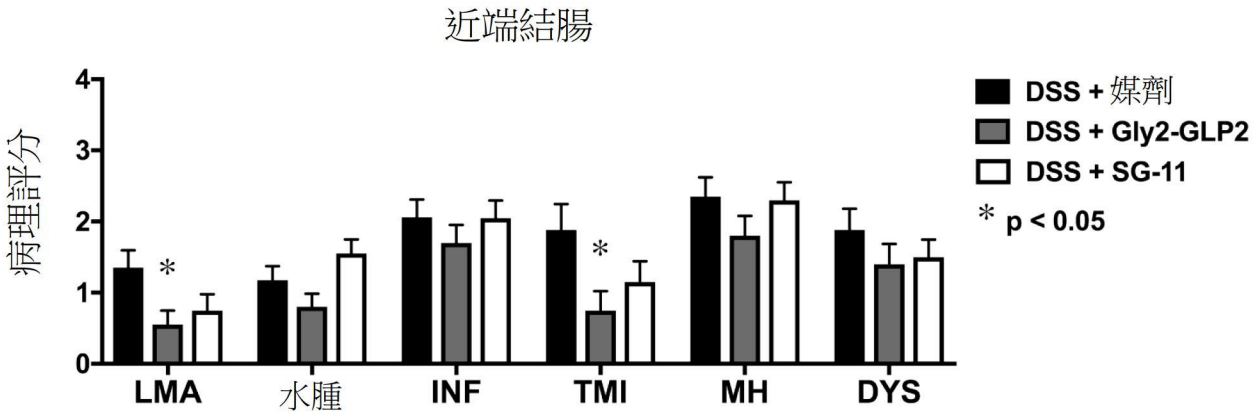
【圖14】



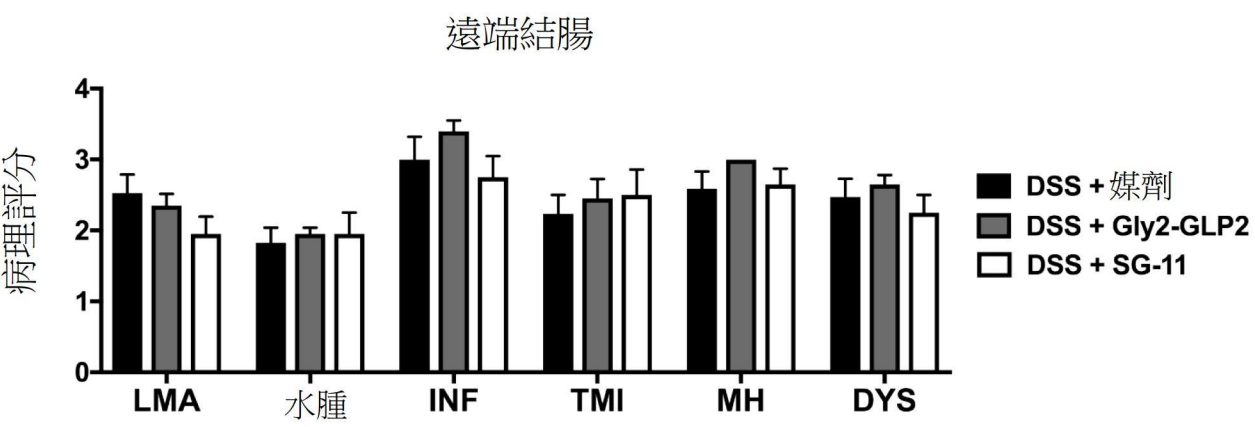
【圖15A】



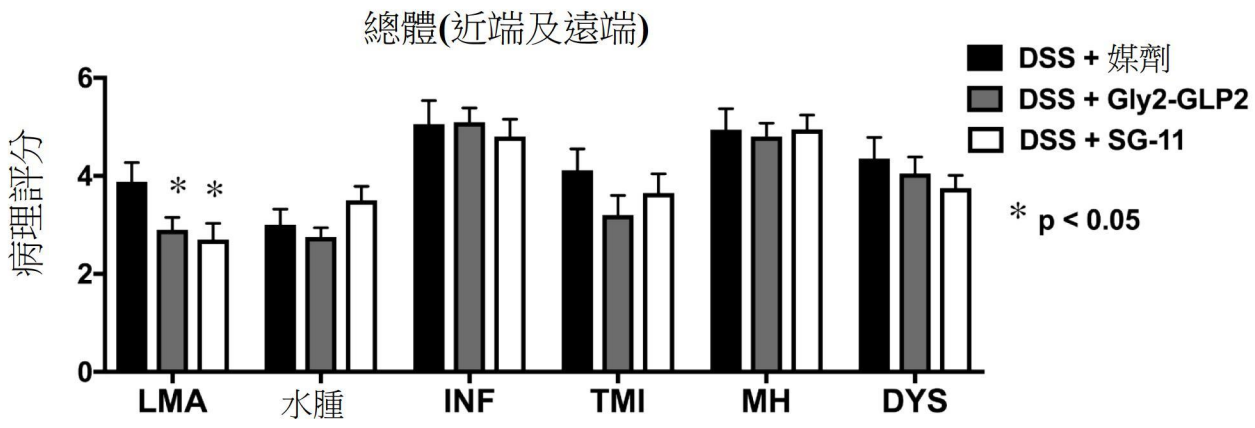
【圖15B】



【圖16A】



【圖16B】

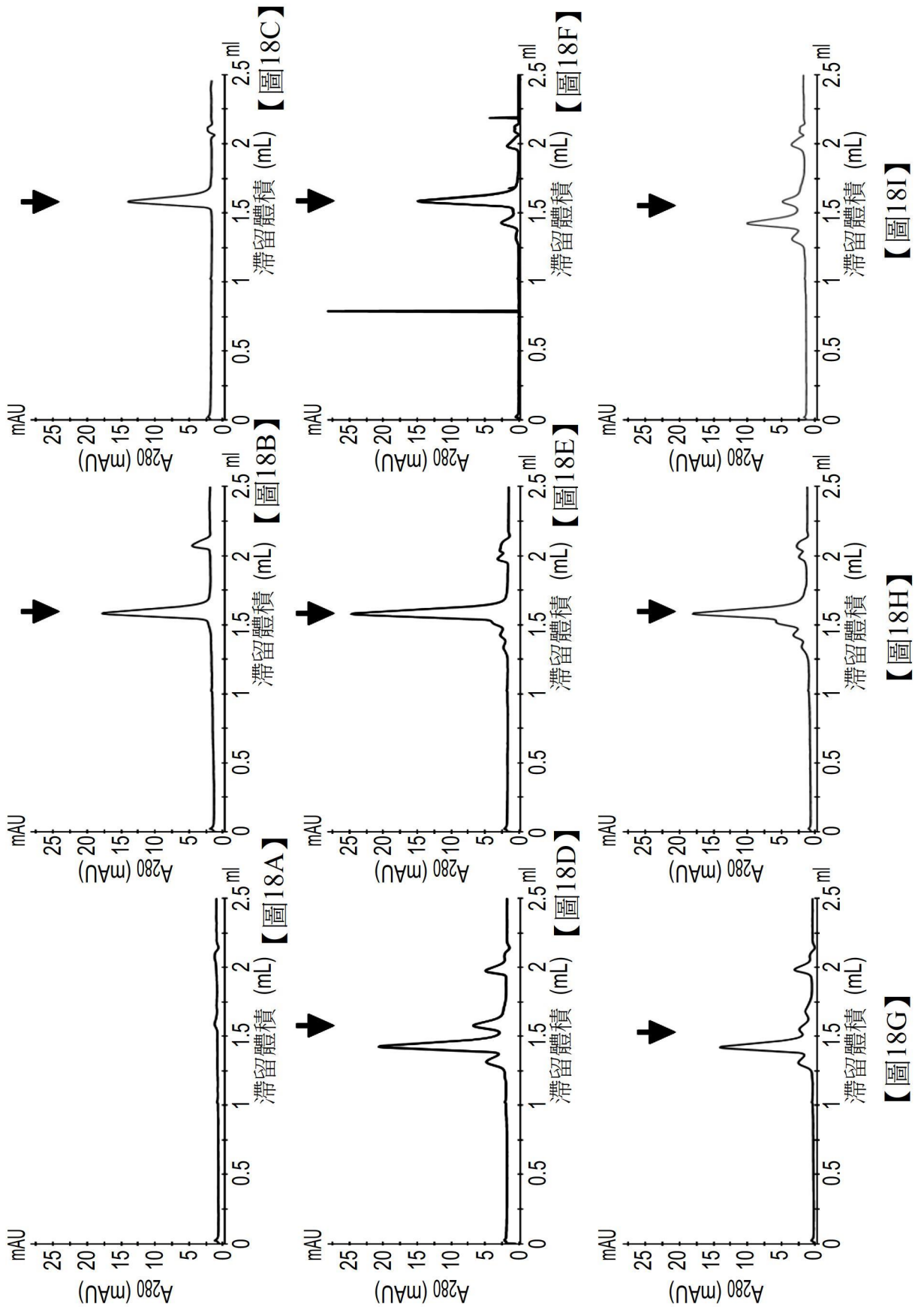


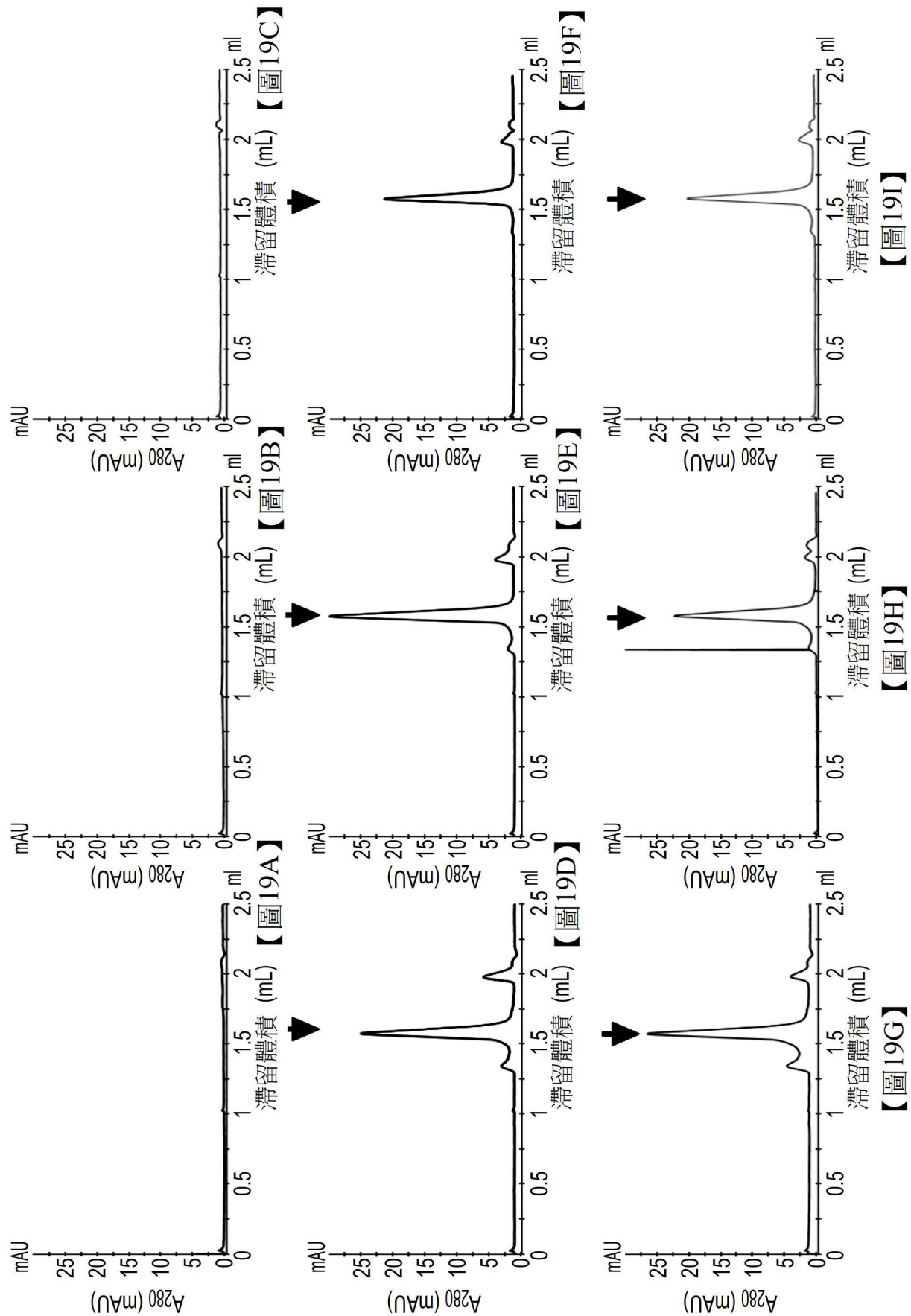
【圖16C】

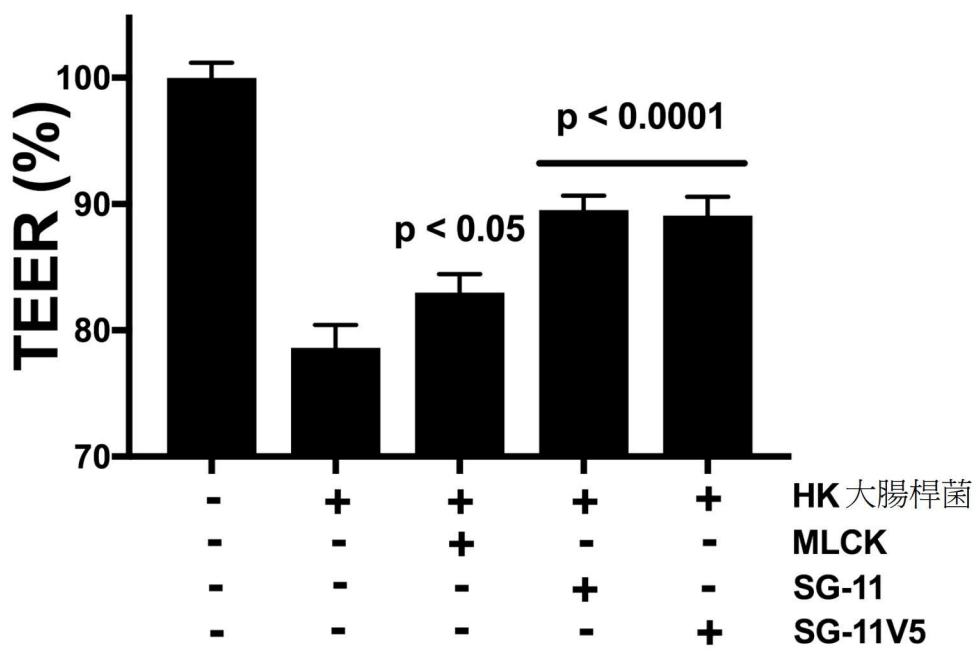
SG-11	1	<u>M</u> LEGEESVVY	VGKKGVIASL	DVETLDQSY	DETELKSYVD	AEVEDYTAEH
WP_006857001	1	<u>M</u> LDADTDTVY	VQKNGTVLSV	DVETLDKDY	DETELKDYVT	DAVSTYTGEH
WP_075679733	1	<u>M</u> LDVEESTVY	VQKNGSVIST	DIEDFSADY	DEDELKDYIG	DEISSYTSEN
WP_055301040	1	<u>M</u> LEADTNTVY	VSKHGKVSM	DVEQLDQSY	DETELKEFVD	SAVDEYNTEN
	51					100
SG-11		GK <u>N</u> AVKVESL	KVEDGVAKLK	MKYKTPEDYT	AF <u>N</u> NGIELYQG	KVVASLAAGY
WP_006857001		GK <u>S</u> AVKLENL	SVKDGTATLK	MKYKTPEDYT	GF <u>N</u> NGIELYEG	KVVKALAAGY
WP_075679733		GK <u>K</u> SVSLESV	SVKDSVAKLT	MKYKTAEDYT	NF <u>N</u> NGVELYTG	TIVKAMAAGY
WP_055301040		GK <u>N</u> SVKVDDL	TVEDGTAKLR	MDYETVDDYT	AF <u>N</u> NGVELYEG	KIVQALAAGY
	101					150
SG-11		VYDGEFARVE	EGKVVGAAATK	QDIYSEDDLK	VAIIRAN <u>T</u> TDV	KVDGEI <u>C</u> YVS
WP_006857001		DFKTDFVSVE	DGKVTGTATK	EEIYSGEDLK	VVIKAN <u>N</u> RDV	KVDGTI <u>C</u> YVS
WP_075679733		DFGVDFVSVK	DGAVTGTATK	DEIVDHDDYK	VAVIKAN <u>N</u> TDV	KVDGTI <u>V</u> YVS
WP_055301040		DFDTDFAGVD	KDGCVTGVTR	GDILAQEDLK	VVIKAN <u>N</u> TDV	KIDGKI <u>L</u> YVS
	151					200
SG-11		<u>C</u> QNVKLTGKD	SVSIRDGYL	ETGSVTASVD	VTGQESVGTE	QLSGTEQMEM
WP_006857001		<u>S</u> ENVKLTGTD	SVSIRDGYSL	NSGSTADESD	SDENIADGTE	SIGGSTEV..
WP_075679733		<u>S</u> QNVKVTGKN	TVSIREGYLA	ADTTNVVGS.	TE	TVAET.....
WP_055301040		<u>C</u> DNVTVTGKD	SVSIKEGTGI	EKTWITEAEE	VPST.....E	AVLETESTED
	201					241
SG-11		TGEPVN....	ADDTEQ	TEAAAGDGSF	ETDVYTFIVY	K
WP_006857001		SD....	TDVNDD	TTYVKDDGAF	ETDVYTYIIY	K
WP_075679733		EA....	EEANQT	EAVLEDEFAS	ESDVYTYVIF	K
WP_055301040		AGDVIEGEVI	IGTEEASGND	VVTNLSGGSS	GTDVYTYIIY	K

SG-11: SEQ ID NO:7
WP_006857001: SEQ ID NO:21
WP_075679733: SEQ ID NO:22
WP_055301040: SEQ ID NO:23

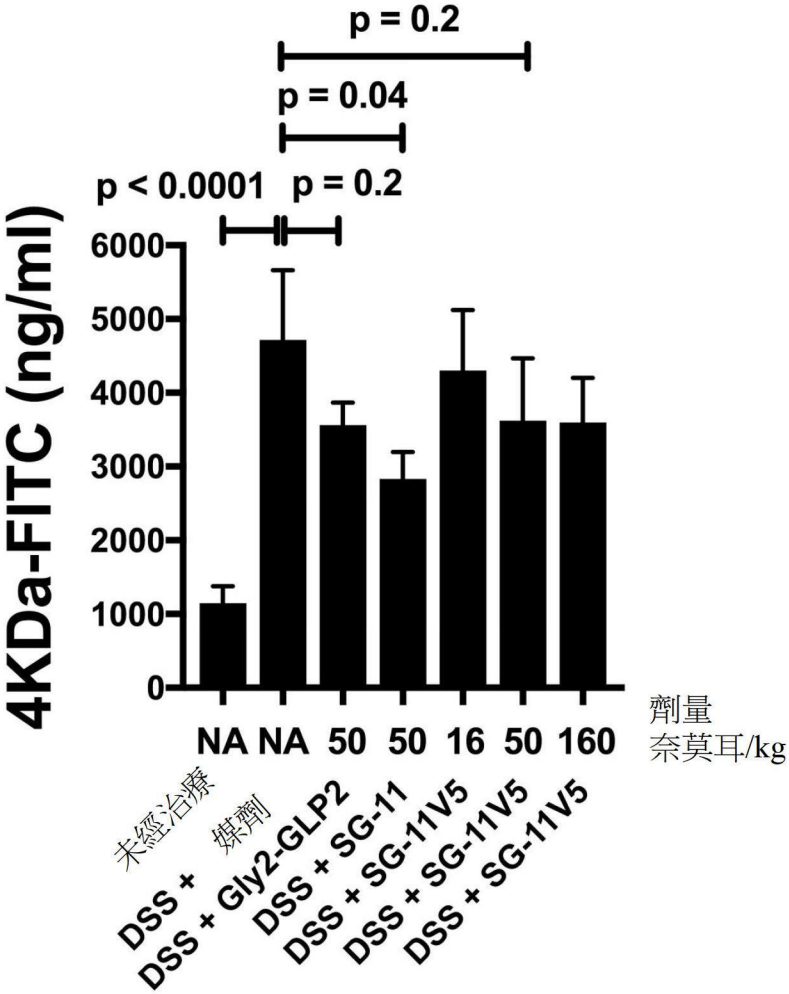
【圖17】



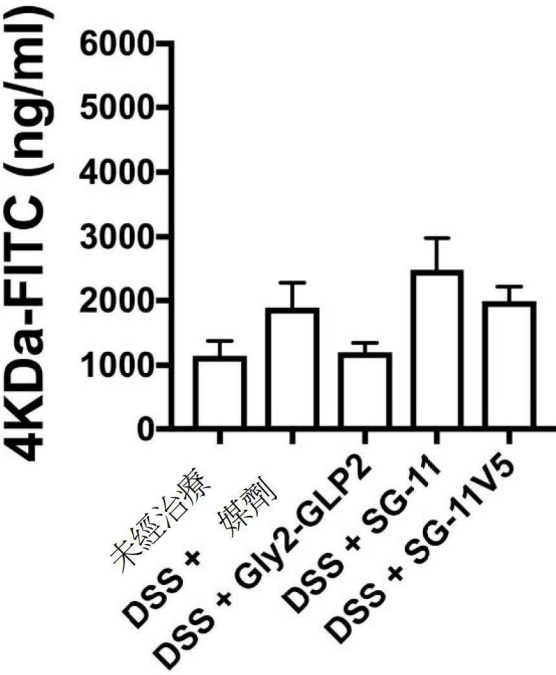




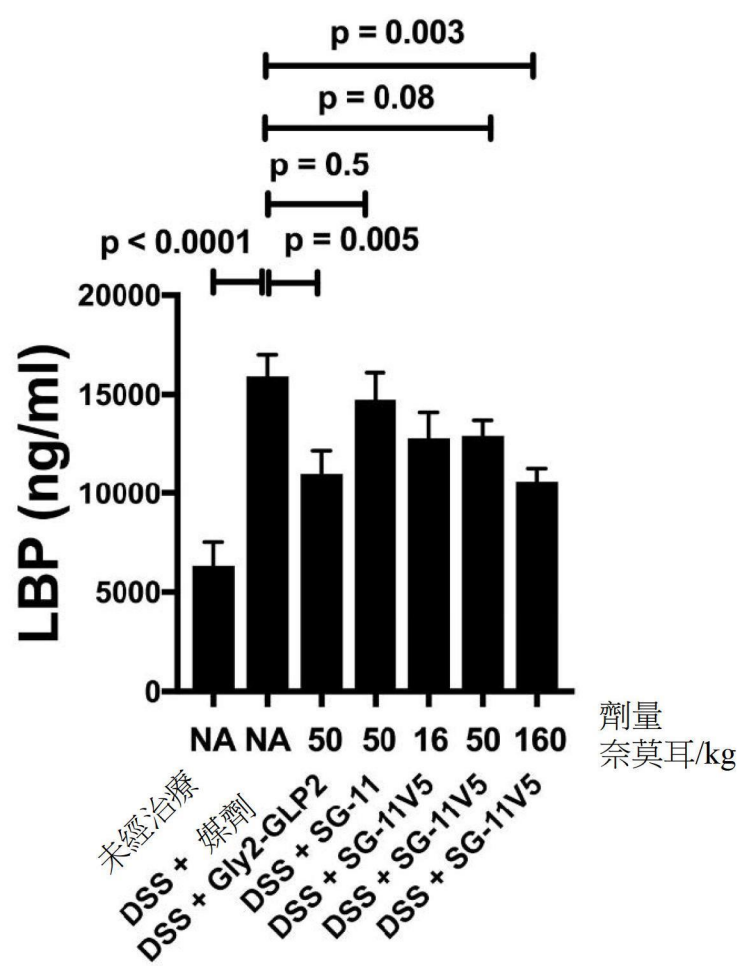
【圖20】



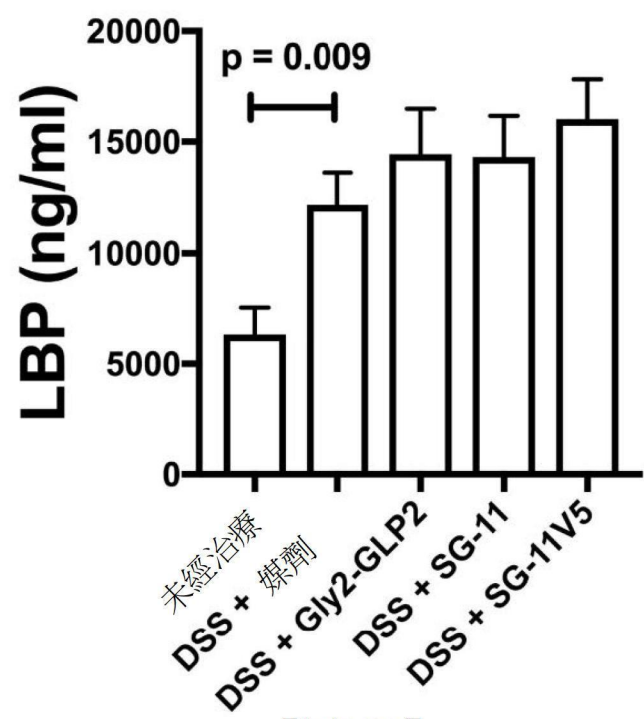
【圖21A】



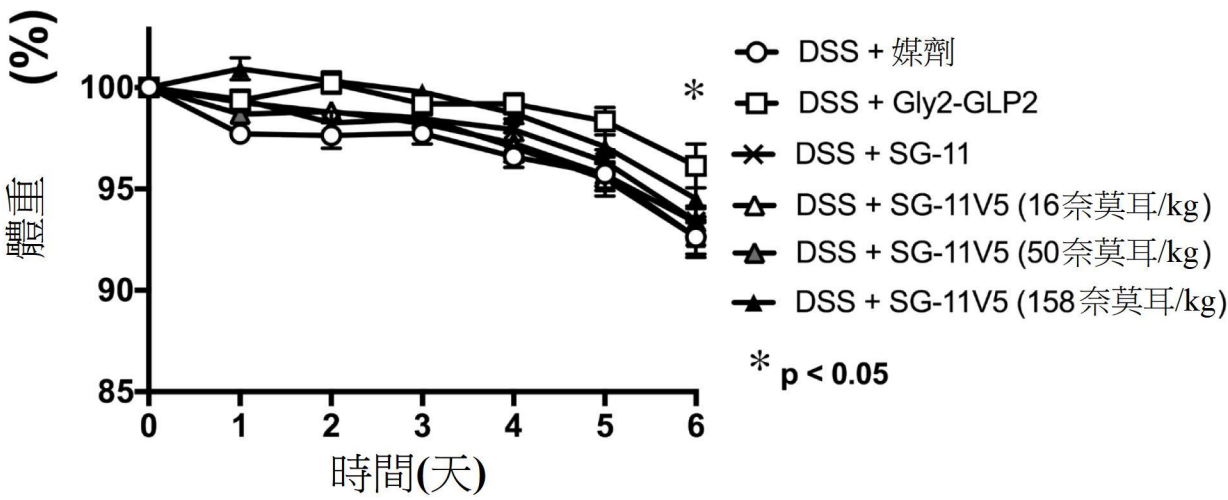
【圖21B】



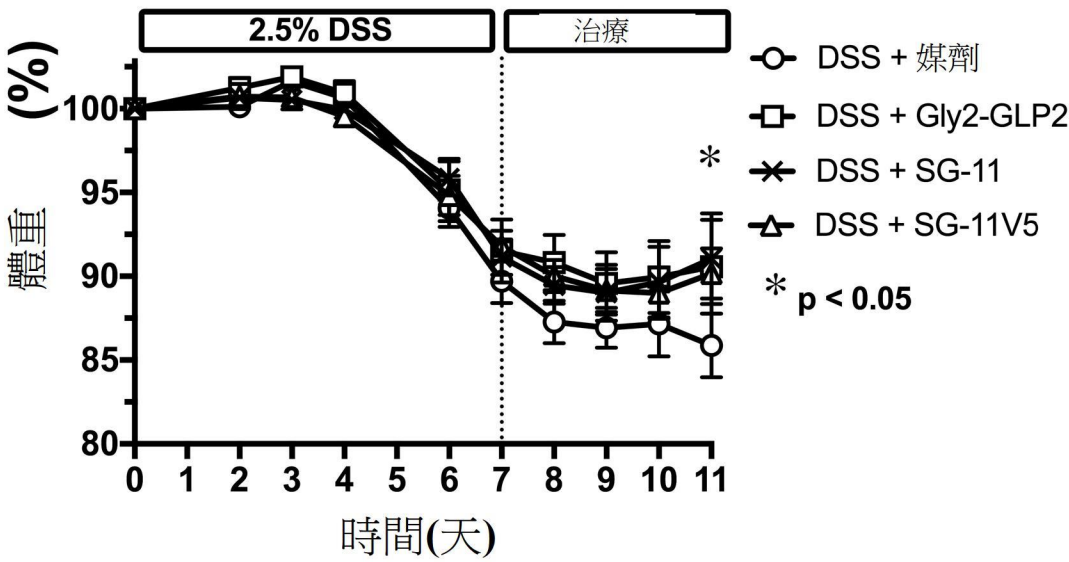
【圖22A】



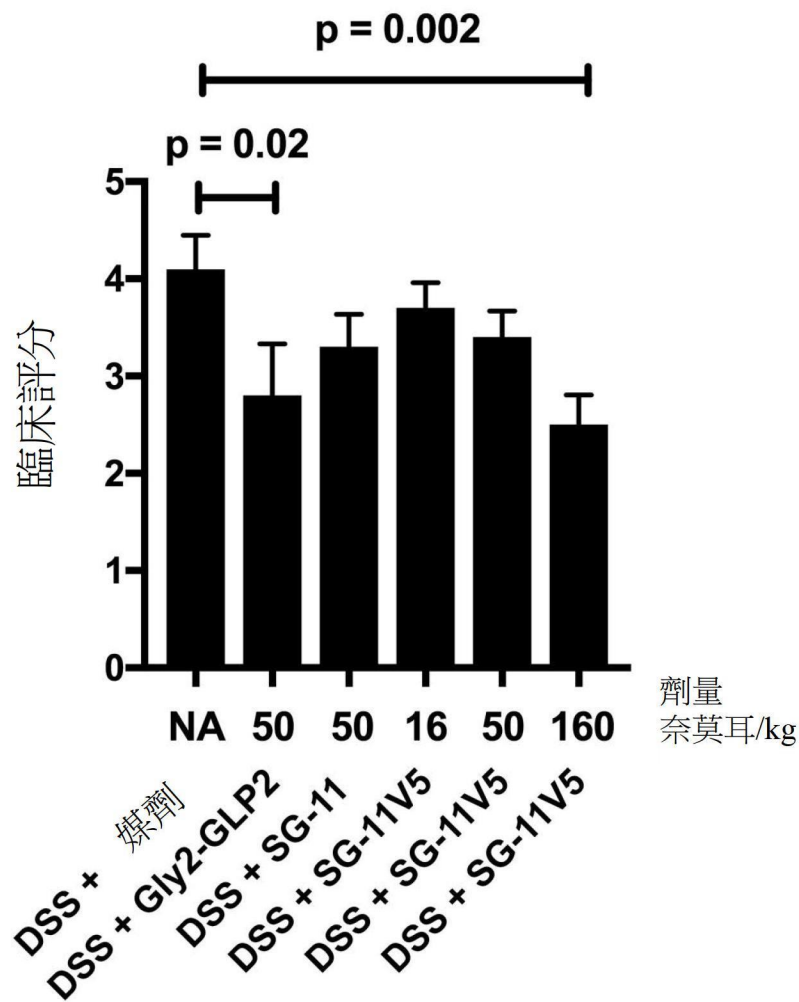
【圖22B】



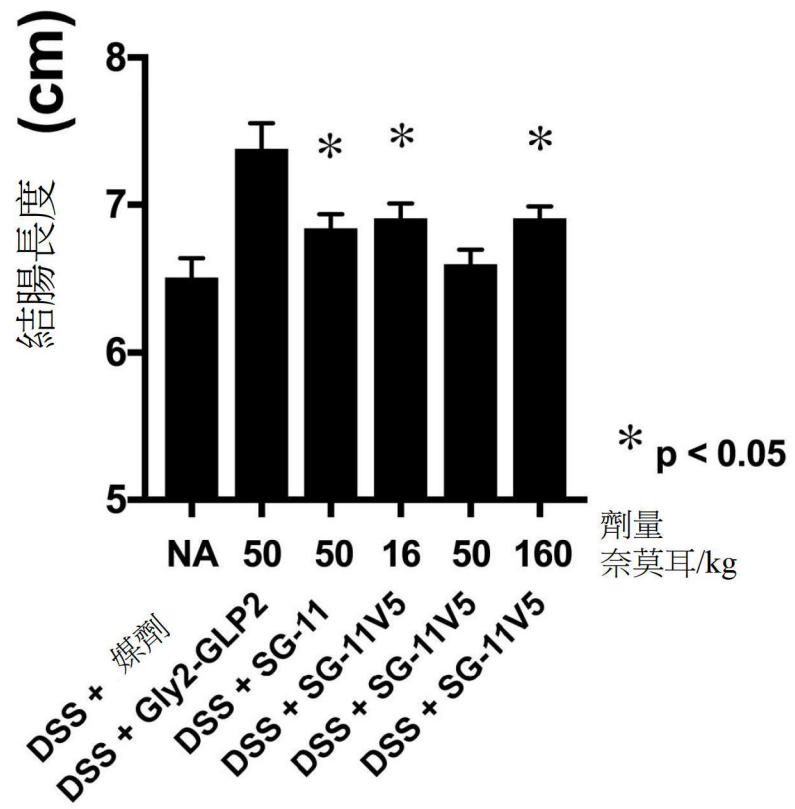
【圖23A】



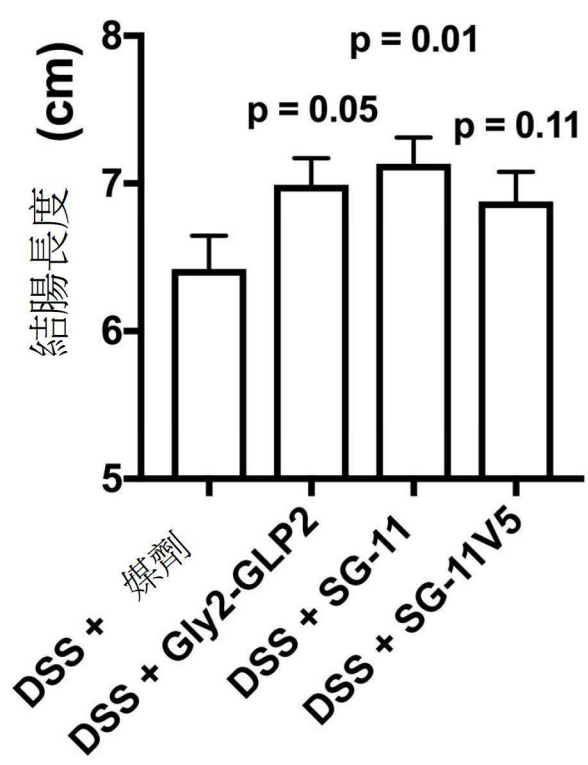
【圖23B】



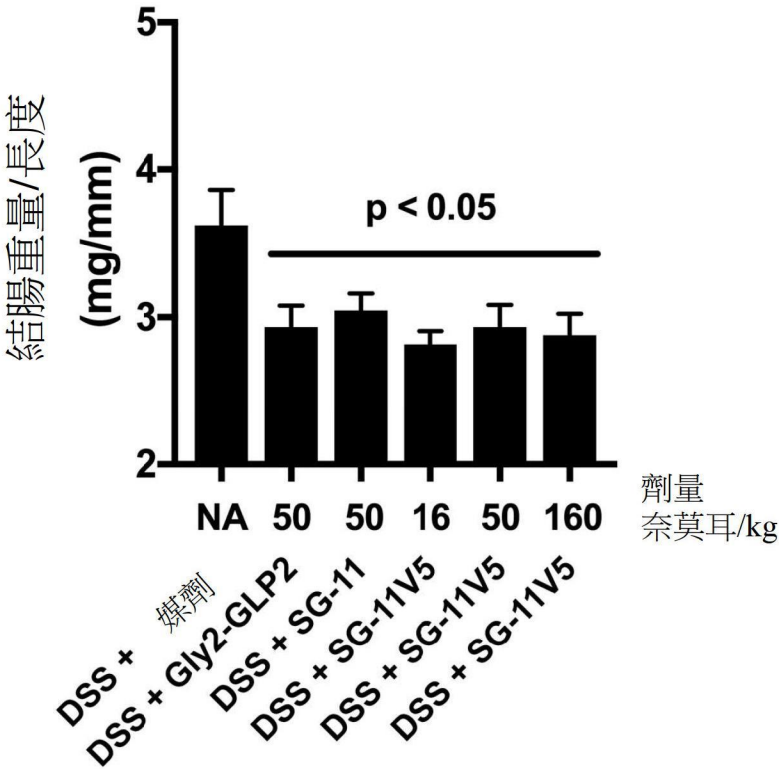
【圖24】



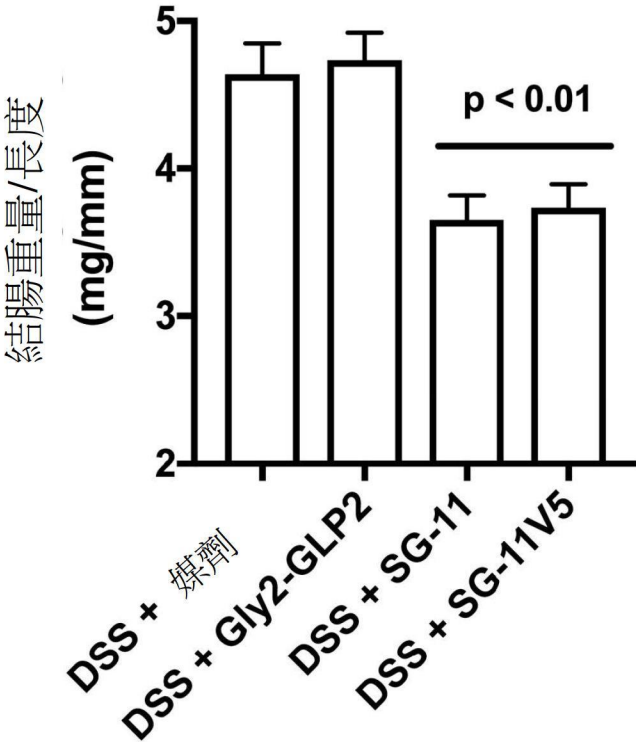
【圖25A】



【圖25B】



【圖26A】



【圖26B】

SEQ ID NO:7	MLEGEESVVYVGKKGVASLDVETLDQSYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL	60
SEQ ID NO:11	MLEGEESVVYVGKKGVASLDVETLDQSYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL	60
SEQ ID NO:13	MLEGEESVVYVGKKGVASLDVETLDQSYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL	60
SEQ ID NO:15	MLEGEESVVYVGKKGVASLDVETLDQSYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL	60
SEQ ID NO:17	MLEGEESVVYVGKKGVASLDVETLDQSYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL	60
SEQ ID NO:19	MLEGEESVVYVGKKGVASLDVETLDQSYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL	60

SEQ ID NO:7	KVEDGVAKLKMKYKTPEDYAFNGIELYQGKVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK	120
SEQ ID NO:11	KVEDGVAKLKMKYKTPEDYAFNGIELYQGKVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK	120
SEQ ID NO:13	KVEDGVAKLKMKYKTPEDYAFNGIELYQGKVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK	120
SEQ ID NO:15	KVEDGVAKLKMKYKTPEDYAFNGIELYQGKVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK	120
SEQ ID NO:17	KVEDGVAKLKMKYKTPEDYAFNGIELYQGKVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK	120
SEQ ID NO:19	KVEDGVAKLKMKYKTPEDYAFNGIELYQGKVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK	120

SEQ ID NO:7	QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIVYVSSQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVTASVD	180
SEQ ID NO:11	QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIVYVSSQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVTASVD	180
SEQ ID NO:13	QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIVYVSSQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVTASVD	180
SEQ ID NO:15	QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIVYVSSQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVTASVD	180
SEQ ID NO:17	QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIVYVSSQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVTASVD	180
SEQ ID NO:19	QDIYSEDDLKVAIIIRANTDVKVDGEIVYVSSQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVTASVD	180

SEQ ID NO:7	VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK	233
SEQ ID NO:11	VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK	233
SEQ ID NO:13	VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK	233
SEQ ID NO:15	VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK	233
SEQ ID NO:17	VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK	233
SEQ ID NO:19	VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIVYK	233

【圖27A】

	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:19
1: SEQ ID NO 7	100.00	99.14	98.71	98.71	98.28	98.28
2: SEQ ID NO 11	99.14	100.00	99.57	99.57	99.14	99.14
3: SEQ ID NO 13	98.71	99.57	100.00	99.14	99.57	98.71
4: SEQ ID NO 15	98.71	99.57	99.14	100.00	98.71	99.57
5: SEQ ID NO 17	98.28	99.14	99.57	98.71	100.00	99.14
6: SEQ ID NO 19	98.28	99.14	98.71	99.57	99.14	100.00

【圖27B】