



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103370083 B

(45)授权公告日 2016.11.16

(21)申请号 201180057092.1

(22)申请日 2011.09.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103370083 A

(43)申请公布日 2013.10.23

(30)优先权数据

61/387,391 2010.09.28 US

61/422,085 2010.12.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.05.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/053770 2011.09.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/050923 EN 2012.04.19

(73)专利权人 艾米琳制药有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 阿斯利康制药公司

(72)发明人 M.埃里克森 D.C.利特辛格

S.S.戈什 Z.郭 S.内拉维特拉

L.马梅多瓦 O.E.利维

C.J.索雷斯 M.P.萨曼特 C.孙

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 岑晓东

(51)Int.Cl.

A61K 47/48(2006.01)

C07K 14/575(2006.01)

(56)对比文件

CN 101765608 A,2010.06.30,

Hongjian Li et al..A Protease-Based Strategy for the Controlled Release of Therapeutic Peptides.《Angew. Chem. Int. Ed.》.2010,第49卷(第29期),第4930-4933页.

(续)

审查员 赵菁

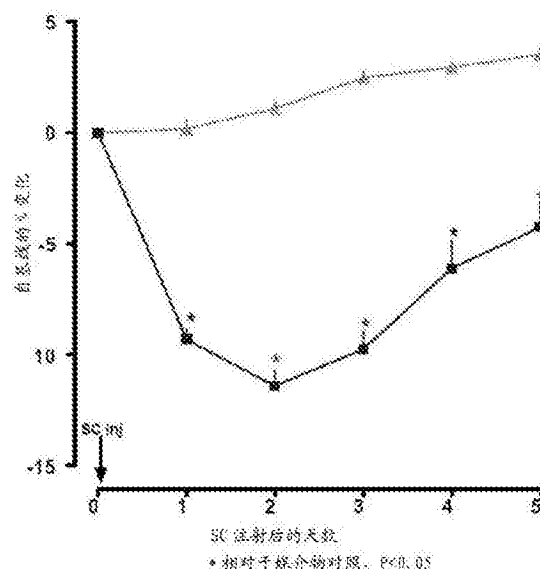
权利要求书1页 说明书69页
序列表64页 附图23页

(54)发明名称

具有增强的作用持续时间的工程化多肽

(57)摘要

提供了具有良好的作用持续时间、高效力和/或方便的剂量给药方案等的化合物,所述剂量施用方案包括口服施用。所述化合物是工程化多肽,其中掺有与一种或多种生物学活性多肽组合的清蛋白结合域。还提供了针对疾病和病症的药物组合物 and 治疗方法,所述疾病和病症包括肥胖症和超重、糖尿病、血脂障碍、高脂血、阿耳茨海默氏病、脂肪肝病、短肠综合征、帕金森氏病、心血管疾病、以及中枢神经系统的其它病症。



[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Jan Terje Andersen and Inger Sandlie.The Versatile MHC Class I-related FcRn Protects IgG and Albumin from Degradation;Implications for Development of New Diagnostics and Therapeutics.《Drug Metab. Pharmacokinet.》.2009,第24卷(第4期),第318-332页.

Goran Bertilsson et al..Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of parkinson's disease.《Journal of Neuroscience Research》.2007,第86卷(第2期),第326-338页.

1. 一种工程化多肽, 其由SEQ ID NO:95或与SEQ ID NO:95具有至少90%序列同一性的多肽组成。

2. 依照权利要求1的工程化多肽, 其由与SEQ ID NO:95具有至少90%序列同一性的多肽组成。

3. 依照权利要求1的工程化多肽, 其由与SEQ ID NO:95具有至少95%序列同一性的多肽组成。

4. 依照权利要求1的工程化多肽, 其由SEQ ID NO:95组成。

5. 依照权利要求1-4中任意一项的工程化多肽在制备用于治疗受试者中的疾病或病症的药物中的用途, 其中所述治疗包括以有效治疗所述疾病或病症的量施用依照权利要求1-4中任意一项的工程化多肽给有此需要的受试者, 其中所述疾病或病症为糖尿病、超重或肥胖症。

6. 依照权利要求5的用途, 其中所述疾病或病症为糖尿病。

7. 依照权利要求6的用途, 其中所述疾病或病症为I型糖尿病、II型糖尿病或前驱糖尿病。

8. 依照权利要求7的用途, 其中所述疾病或病症为II型糖尿病。

9. 依照权利要求5的用途, 其中所述有此类治疗需要的受试者是肥胖的。

10. 一种药物组合物, 其包含依照权利要求1-4中任一项的工程化多肽和药学可接受赋形剂。

11. 依照权利要求10的药物组合物, 其中所述药物组合物是口服药物组合物。

12. 依照权利要求10的药物组合物, 其中所述药物组合物是持续释放的或长效的药物组合物。

13. 依照权利要求10的药物组合物, 其中所述药物组合物是每日一次的药物组合物。

14. 依照权利要求10的药物组合物, 其中所述药物组合物是每日两次的药物组合物。

15. 依照权利要求10的药物组合物, 其中所述药物组合物是每周一次的药物组合物。

16. 权利要求10的药物组合物, 其用于治疗受试者中的疾病或病症, 其中所述疾病或病症为糖尿病、超重或肥胖症。

17. 权利要求16的药物组合物, 其中所述疾病或病症为糖尿病。

18. 权利要求17的药物组合物, 其中所述疾病或病症为I型糖尿病、II型糖尿病或前驱糖尿病。

19. 权利要求1至4中任一项的工程化多肽或权利要求10至18中任一项的药物组合物, 其中所述工程化多肽或药物组合物提供每周一次的施用。

20. 权利要求1至4中任一项的工程化多肽或权利要求10至18中任一项药物组合物, 其中所述工程化多肽或药物组合物提供每日一次的施用。

21. 权利要求1至4中任一项的工程化多肽或权利要求10至18中任一项药物组合物, 其中所述工程化多肽或药物组合物提供每日两次的施用。

22. 依照权利要求5-9中任一项的用途, 其中所述药物提供每周一次的施用。

23. 依照权利要求5-9中任一项的用途, 其中所述药物提供每日一次的施用。

24. 依照权利要求5-9中任一项的用途, 其中所述药物提供每日两次的施用。

具有增强的作用持续时间的工程化多肽

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2010年9月28日提交的美国临时专利申请61/387,391和2010年12月10日提交的美国临时专利申请61/422,085的优先权,其公开内容各通过提述完整并入本文并用于所有目的。

[0003] 发明背景

[0004] 本申请涉及具有优良的作用持续时间、高效力和/或包括口服施用在内的方便的剂量施用方案的化合物及其使用方法。本文中提供了工程化多肽,其中掺入有与生物学活性肽组合的清蛋白结合域。不希望受任何理论束缚的,认为由于本文中描述的工程化多肽可以结合清蛋白,因此所述化合物在循环时可以被扣留(例如结合至清蛋白),从而由于例如降低的肾清除率和/或降解导致增加的作用持续时间。适合于这类治疗的疾病包括肥胖症(obesity)和超重(overweight)、糖尿病(diabetes)、血脂障碍(dyslipidemia)、高脂血症(hyperlipidemia)、短肠综合征(short bowel syndrome)、阿耳茨海默(Alzheimer)氏病、脂肪肝病(fatty liver disease)、帕金森(Parkinson)氏病、心血管疾病(cardiovascular disease)、以及中枢神经系统的其它病症、或其组合。

[0005] 仍然需要开发可用于上文所描述的代谢疾病、状况和病症的多肽。因此,本发明的一个目的在于提供可用于治疗上述状况的具有延长的半衰期的工程化多肽及其生成和使用方法。

[0006] 本文中引用的每篇专利、专利申请和出版物通过提述据此完整并入本文并用于所有目的。

[0007] 发明概述

[0008] 提供了对清蛋白具有结合亲和力和另外的治疗效用的工程化多肽。所述化合物是工程化多肽,其包含如本文中限定的能够结合清蛋白的清蛋白结合域(ABD)多肽和与ABD共价连接的激素域(HD)多肽,该HD多肽可以是生物学活性的且能引发有益的生物学应答。任选地,本文中描述的任何ABD或HD多肽可以在工程化多肽中经由接头L(例如如本文中描述的L1)共价键合。不希望受任何理论束缚的,认为由于本文中描述的工程化多肽能结合清蛋白,因此所述化合物在受试者中可以被扣留,从而导致在受试者中增加的作用持续时间。

[0009] 在第一个方面,提供了如本文中描述的工程化多肽。所述工程化多肽包含如本文中描述的清蛋白结合域多肽(ABD)和激素域(HD1)。所述激素域包含多肽,该多肽为毒蜥外泌肽、毒蜥外泌肽片段、或毒蜥外泌肽类似物。

[0010] 在另一个方面,提供了用于在需要治疗的受试者中治疗疾病或病症的方法。所述方法包括对受试者施用如本文中描述的工程化多肽。

[0011] 在又一个方面,提供了包含与药学可接受赋形剂组合的本文中描述的工程化多肽化合物的药物组合物。

[0012] 在又一个方面,是编码工程化多肽及其中间体的多核苷酸、拥有这类多核苷酸的表达载体、表达这类多核苷酸的宿主细胞、以及用于其表达、合成、翻译后修饰和分离的手段。

[0013] 本发明的一个优点在于能完全通过重组方法合成所述工程化多肽,从而避免了复杂的或额外的合成或化学步骤和相关的反应性试剂和催化剂。因此,本发明的多肽的合成能比化学衍生化的、具有延长的作用持续时间的化合物要便宜得多。除了较长的作用持续时间(例如,在人受试者中至少一周,尽管若期望的话也可以实现每日一次)外,另一个优点是相对小的大小,其可以允许口服递送以改进病人依从性。

[0014] 本文中披露的化合物在OGTT DOA(针对作用持续时间的口服葡萄糖耐受性测试)测试中显示出令人惊讶的功效,其在小鼠中为至少24小时和甚至更长达到2天(这转换到人中为7天或更长),在糖尿病肥胖(ob/ob)小鼠中有力的血液葡萄糖控制和体重降低,并且提供小鼠中至少2天内的剂量依赖性食物摄取减少。在正常大鼠中,皮下和静脉内剂量施用后化合物的暴露持续数天(甚至长达4天,这转换到人中为至少1周)。化合物在血浆中且对于血浆蛋白酶是稳定的,在结合至血清清蛋白时是有活性的,且令人惊讶地,如本文中显示的提供比毒蜥外泌肽-4更高的最大体内功效。甚至更令人惊讶地,所述化合物适用于口服递送。

附图说明

[0015] 图1A:在OGTT DOA测试中施用化合物15剂量后1天,于强饲前的血液葡萄糖水平(BGL)数据直方图。媒介物均值强饲前葡萄糖:117mg/dL。图例(从左至右):媒介物(空心)、2nmol/kg(对角线从左上至右下);25nmol/kg(对角线从左下至右上);250nmol/kg(细对角线)。图1B:30分钟时血液葡萄糖中的变化。媒介物均值强饲前葡萄糖:117mg/dL。图例:同图1A中。*对媒介物对照的 $p < 0.5$;ANOVA,邓奈特氏检验(Dunnett's test)。

[0016] 图2A:在OGTT DOA测试中施用化合物15剂量后2天,于强饲前的血液葡萄糖水平(BGL)数据直方图。媒介物均值强饲前葡萄糖:135mg/dL。图例(从左至右):媒介物(空心)、25nmol/kg(垂直线);250nmol/kg(对角线)。图2B:30分钟时血液葡萄糖中的变化。媒介物均值强饲前葡萄糖:135mg/dL。图例:同图2A中。*对媒介物对照的 $p < 0.5$;ANOVA,邓奈特氏检验。

[0017] 图3A:在OGTT DOA测试中施用化合物15和化合物8剂量后1天,于强饲前的血液葡萄糖水平(BGL)数据直方图。媒介物均值强饲前葡萄糖:117mg/dL。图例(从左至右):媒介物(空心);2nmol/kg化合物15(对角线从左上至右下);25nmol/kg化合物15(对角线从左下至右上);250nmol/kg化合物15(细对角线);2nmol/kg化合物8(瓦片形);25nmol/kg化合物8(水平线);250nmol/kg化合物8(点形)。图3B:30分钟时血液葡萄糖中的变化。媒介物均值强饲前葡萄糖:117mg/dL。图例:同图1A中。*对媒介物对照的 $p < 0.5$;ANOVA,邓奈特氏检验。

[0018] 图4:化合物15在HSD喂养的麻醉大鼠中的效果。图4A:静脉内葡萄糖耐受性测试(IVGTT)后的葡萄糖时间过程。图例:媒介物(三角形尖头朝上);化合物15240nmol/kg(盒状)。图4B:描述IVGTT后葡萄糖(AUC, 0-60分钟)的直方图。图例:媒介物(左);化合物15(右)。图4C:IVGTT后胰岛素的时间过程。图例:如图4A中。图4D:描绘胰岛素中变化的直方图(AUC, 0-30分钟)。图例:如图4B中。图4E:sc注射化合物15后体重中变化的时间过程。图例:如图4A中。图4F:sc注射化合物15后每日食物摄取的直方图。图例:对每一天,直方图按从左至右的顺序绘出了媒介物和化合物15(240nmol/kg)。*对媒介物对照的 $p < 0.05$;邓奈特氏检验。

[0019] 图5:化合物15在ob/ob小鼠中的效果。图5A:以250nmol/kg注射化合物15后体重中变化的时间过程(0-10日)。图例:媒介物(正方形);化合物15(三角形)。图5B:如对于图5A描述的,剂量施用后血液葡萄糖中变化的时间过程。图例:如图5A中。图5C:如对于图5A描述的,剂量施用后HbA_{1c}中变化的时间过程。图例:如图5A中。*对媒介物对照的 $p<0.5$;ANOVA,邓奈特氏检验。

[0020] 图6:化合物15在Zucker Diabetic Fatty大鼠中的效果。图6A:在用化合物15处理Zucker Diabetic Fatty大鼠后体重中变化的时间过程。图6B:在用化合物15处理后血浆葡萄糖(mg/dL)的时间过程。图例:媒介物(实心盒状);化合物15(0.17mg/kg)(三角形尖头朝上);化合物15(0.5mg/kg)(三角形尖头朝下)。

[0021] 图7:OGTT DOA中的比较。将30分钟时血液葡萄糖中的变化(%强饲前)作为化合物15,8和10相比于毒蜥外泌肽-4的效果进行评估。图例:化合物按直方图的从左至右的次序为:媒介物;化合物152nmol/kg;化合物1525nmol/kg;化合物15250nmol/kg;化合物82nmol/kg;化合物825nmol/kg;化合物8250nmol/kg;化合物1025nmol/kg;化合物10250nmol/kg;毒蜥外泌肽-4250nmol/kg。*对媒介物对照的 $p<0.5$;ANOVA,邓奈特氏检验。

[0022] 图8:呈现了在5小时时间过程内人血浆中剩余的化合物百分比的时间谱。图例:肽(SEQ ID NO:4)(封闭盒状);化合物7(空心盒状);化合物31(叉形);化合物15(空心菱形);GLP-1(7-36)酰胺(封闭菱形)。

[0023] 图9:施用化合物31剂量后1天,于强饲前的血液葡萄糖水平(BGL)数据直方图。媒介物均值强饲前葡萄糖:126mg/dL。图例:媒介物(空心),化合物31(25nmol/kg;封闭)。图例:同图1A。*对媒介物对照的 $p<0.5$;ANOVA,邓奈特氏检验。

[0024] 图10:图10A显示了化合物31在正常小鼠中6小时内在抑制食物摄取上的效果的时间过程。图例:媒介物(盒);化合物311nmol/kg(菱形);化合物3110nmol/kg(叉形);化合物3130nmol/kg(圆形);化合物31100nmol/kg(星形)。图10B绘出了化合物31在正常小鼠中54小时内在抑制食物摄取上的效果的时间过程。图例(对每一时段从左至右):媒介物(空心);[¹⁴Leu]毒蜥外泌肽-41nmol/kg(垂直线);[¹⁴Leu]毒蜥外泌肽-410nmol/kg(对角线,左上至右下);[¹⁴Leu]毒蜥外泌肽-430nmol/kg(对角线,左下至右上);[¹⁴Leu]毒蜥外泌肽-4100nmol/kg(细对角线);化合物311nmol/kg(垂直线);化合物3110nmol/kg(浅色点);化合物3130nmol/kg(深色点);化合物31100nmol/kg(方格形)。

[0025] 图11:图11A(化合物15)和图11B(化合物21)绘出了与利拉鲁肽(liraglutide)相比,在血液葡萄糖中变化的时间过程,所有都是每周施用两次的(BIW)。图例(图11A-11B):媒介物(盒状);利拉鲁肽250nmol/kg BIW(封闭三角形);测试化合物25nmol/kg BIW(空心三角形);测试化合物250nmol/kg BIW(菱形)。图11C绘出了直方图,其显示对于每周两次施用(BIW)的化合物15和化合物21,与通过连续皮下输注(CSI)施用的毒蜥外泌肽-4相比,HbA_{1c}的降低(从基线的%变化)。图例(从左至右):媒介物(空心);化合物1525nmol/kg BIW(细方格形);化合物15250nmol/kg BIW(点形);化合物2125nmol/kg BIW(对角交叉);化合物21250nmol/kg BIW(垂直-水平交叉);毒蜥外泌肽-47.2nmol/kg/日CSI(深色瓦片形);毒蜥外泌肽-4100nmol/kg/日CSI(浅色瓦片形)。图11D绘出了对于每周两次施用(BIW)的化合物15和化合物21,与通过连续皮下输注(CSI)施用的毒蜥外泌肽-4相比,体重中的降低(从基线的%变化)。图例(从左至右):如图11C中。

[0026] 图12:图12A-12C绘出了在正常Harlan Sprague-Dawley(HSD)大鼠中皮下给药的例示性工程化多肽化合物15和化合物21的药动学(PK)概况和生物学活性。图12A绘出了化合物降低食物摄取的效果。图12B绘出了化合物降低体重的效果。图12C绘出了单剂后化合物的PK概况。图例:媒介物(盒状);化合物21(三角形);化合物15(菱形)。

[0027] 图13:图13A-13C绘出了在正常Harlan Sprague-Dawley(HSD)大鼠中静脉内给药的例示性工程化多肽化合物31相比于未缀合的毒蜥外泌肽类似物的药动学(PK)概况和生物学活性。图13A绘出了化合物降低食物摄取的效果。图13B绘出了化合物降低体重的效果。图13C绘出了单剂后化合物的PK概况。插入:2nmol/kg IV的 $[^{14}\text{Leu}]$ 毒蜥外泌肽-4和2nmol/kg IV的化合物31的时间对PK结果(pg/mL)的列表。图例:媒介物(菱形); $[^{14}\text{Leu}]$ 毒蜥外泌肽-4 2nmol/kg IV(盒状);化合物31 2nmol/kg IV(圆形)。

[0028] 图14:该图绘出了口服递送后例示性工程化多肽(化合物15)相比于未缀合的毒蜥外泌肽类似物降低血液葡萄糖的生物学活性时间过程。见实施例18。均值处理前葡萄糖:~623mg/dL。图例:媒介物(封闭盒);毒蜥外泌肽-4类似物(空心盒);化合物15(菱形)。

[0029] 发明详述

[0030] I. 定义

[0031] “肥胖症”和“超重”指具有比正常预期更大的重量的哺乳动物,并且可以通过例如身体外观、如本领域中已知的体重指数(BMI)、腰臀围比、皮褶厚度、腰围等来确定。疾病控制和预防中心(CDC)将超重定义为成人具有25至29.9的BMI;并将肥胖定义为成人具有30或更高的BMI。存在用于测定肥胖症的其它量度。例如,CDC宣称具有大于1.0的腰臀比的人是超重的。

[0032] “瘦体重”指无脂肪的体重,即总体重减去身体脂肪重量为瘦体重。可以通过如本领域中已知的方法如流体静力学称量(hydrostatic weighing)、计算机化室(computerized chamber)、双能x-射线吸收测量学、皮肤卡尺(skincaliper)、磁共振成像(MRI)和生物电阻抗分析(BIA)来测量瘦体重。

[0033] “哺乳动物”指一般具有软毛或毛发,活产其后代,并且用乳喂养其后代的温血动物。哺乳动物包括人;同伴动物(例如犬、猫);家畜动物(例如牛、马、绵羊、猪、山羊);野生动物等等。在一个实施方案中,所述哺乳动物是雌性。在一个实施方案中,所述哺乳动物是女性。在一个实施方案中,所述哺乳动物是猫或犬。在一个实施方案中,所述哺乳动物是患糖尿病的哺乳动物,例如具有2型糖尿病的人。在一个实施方案中,所述哺乳动物是肥胖的患糖尿病的哺乳动物,例如具有2型糖尿病的肥胖哺乳动物。术语“受试者”在本文中描述的方法的背景中指哺乳动物。

[0034] 在多肽背景中的“片段”在本文中在习惯的化学意义上指多肽的一部分。例如,片段可以源自亲本多肽的一个或多个残基的N端缺失或C端缺失,和/或片段可以源自亲本多肽的一个或多个残基的内部缺失。“片段”在抗体的背景中指抗体中可以与生物学活性分子连接以调控溶解度、受试者内的分布等的部分。例如,毒蜥外泌肽-4(1-30)描述了毒蜥外泌肽-4的生物学活性片段,其中缺失毒蜥外泌肽C末端“尾部”氨基酸31-39。术语“亲本”在多肽背景中在习惯的意义上指充当修饰,例如插入、缺失和/或取代前的参照结构的多肽。术语“缀合”在本文中描述的工程化多肽的背景中指组分多肽例如ABD、HD1等之间的共价连接。术语“融合”在本文中描述的工程化多肽的背景中指组分多肽例如ABD、HD1等之间经由

肽主链末端氨基或羧基官能团中任一或两者的共价连接。可以合成或重组制备工程化多肽。通常使用重组生物技术来进行融合,然而也可以通过化学合成和缀合方法来进行。

[0035] 如用于本文的,“类似物”在多肽的背景中指相对于亲本化合物具有氨基酸的插入、缺失和/或取代的化合物。如用于本文的,“类似物序列”在多肽的背景中指相对于亲本氨基酸序列(例如野生型序列、天然序列)具有氨基酸的插入、缺失和/或取代的氨基酸序列。类似物可以具有优越的稳定性、溶解度、效力、半衰期等等。在一些实施方案中,类似物是相对于亲本化合物具有至少50%,例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或甚至更高的序列同一性的化合物。在一个优选的实施方案中,类似物具有自插入、缺失、添加和取代中的任意一种或其组合独立选出的1至5处氨基酸修饰。在本文中的任一个实施方案中,毒蜥外泌肽类似物可以具有自插入、缺失、添加和取代中的任意一种或其组合独立选出的1至5处氨基酸修饰,并且优选地保留相对于亲本化合物的至少50%,例如50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或甚至更高的序列同一性,且甚至更优选地相对于亲本化合物至少80%,85%,90%,95%,98%或甚至更高的序列同一性,并且优选地,所述亲本化合物为毒蜥外泌肽-4、毒蜥外泌肽-4(1-38)、毒蜥外泌肽-4(1-37)、毒蜥外泌肽-4(1-36)、毒蜥外泌肽-4(1-35)、毒蜥外泌肽-4(1-34)、毒蜥外泌肽-4(1-33)、毒蜥外泌肽-4(1-32)、毒蜥外泌肽-4(1-31)、毒蜥外泌肽-4(1-30)、毒蜥外泌肽-4(1-29)或毒蜥外泌肽-4(1-28),且最优选地,所述亲本化合物具有毒蜥外泌肽-4的序列。在一个实施方案中,至少对应于毒蜥外泌肽-4的位置1,4,6,7和9的氨基酸是如在天然毒蜥外泌肽-4中的,且进一步地在毒蜥外泌肽-4的位置1,4,6,7和9以外的位置处的1至5个修饰是保守的氨基酸取代。例如,在本文中实施方案的又一个实施方案中,毒蜥外泌肽类似物至少将氨基酸保留为如在毒蜥外泌肽-4的位置3,4,6,5,7,8,9,10,11,13,15,18,19,22,23,25,26和/或30中发现的,且进一步优选地,使得不超过剩余位置中的1至5个被另一种氨基酸取代,最优选地被化学保守的氨基酸取代。在本文的所有类似物中,在位置1和/或2处的任意取代或修饰会保留对DPP-IV切割的抗性,而同时保留或改进促胰岛素活性,如本领域已知的毒蜥外泌肽-4类似物如脱氨基-组氨酰-毒蜥外泌肽-4的。如本领域中惯用的,术语“保守的”在氨基酸取代的背景中指保留电荷类型(例如阴离子、阳离子、中性、极性,等等)、疏水性或亲水性、体积(bulk)(例如范德华(van der Waals)接触等等)和/或功能性(例如羟基、胺、巯基等等)特性的取代。术语“非保守的”指非保守的氨基酸取代。

[0036] “同一性”、“序列同一性”等在比较两种或更多种核酸或多肽序列的背景中,指根据使用本领域中已知的序列比较算法例如BLAST或BLAST2.0测量,相同的或具有规定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即在比较窗或指定区里为了最大对应性而比较和比对时,在规定区域里约50%同一性,优选地50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性)的两种或更多种序列或亚序列。此定义包括具有缺失和/或添加的序列、以及那些具有取代的序列、以及天然存在的(例如多态性或等位)变体、和人工制备的变体。在优选的算法中,如本领域中已知的,解决缺口等。对于序列比较,通常一种序列作用为与测试序列比较的参照序列。当使用序列比较算法时,使测试和参照序列进入计算机中,在必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。优选地,可以使用缺省程序参数或可以指定备选参数。然后,序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参照序列的百分比序列同一性。可以进行比较序列的最佳比对,例如通过

Smith&Waterman,1981,Adv.Appl.Math.2:482的局部同源性算法,通过Needleman&Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443的同源性比对算法,通过Pearson&Lipman,1988,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA85:2444的搜索相似性方法,通过这些算法的计算机化实现(WisconsinGenetics软件包中的GAP,BESTFIT,FASTA和TFASTA,Genetics ComputerGroup,575Science Dr.,Madison,Wis.),或通过手动比对和视觉检查来进行。参见例如Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等编1995增刊))。适合于测定百分比序列同一性和序列相似性的算法的优选例子包括BLAST和BLAST2.0算法,其记载于Altschul等,1977,Nuci.Acids Res.25:3389-3402和Altschul等,1990,J.Mol.Biol.215:403-410。如本领域中已知的,使用BLAST和BLAST2.0来测定本发明的核酸和蛋白质的百分比序列同一性。用于实施BLAST分析的软件经由国家生物技术信息中心(National Center forBiotechnology Information)的网站公开可获得。此算法牵涉首先通过鉴定询问序列中长度W的短词来鉴定高得分序列对(HSP),所述短词在与数据库序列中相同长度的词比对时匹配或满足某一正值的阈值得分T。T称为相邻词得分阈值(Altschul等,同前)。这些初始的相邻词命中(hits)作用为启动搜索以寻找含有它们的较长HSP的种子。将词命中沿着每条序列以两个方向延伸,只要可以增加累积比对得分。例如对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;总是>0)和N(错配残基的惩罚得分;总是<0)来计算累积得分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积得分。在如下情况时停止每个方向的词命中延伸:累积比对得分从其最大实现值下降数量X;由于一个或多个负评分残基比对的积累,累积得分变为0以下;或达到任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用字长(W)为11,期望值(E)为10,M=5,N=-4和两条链的比较作为缺省。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字长为3,期望值(E)为10,和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff&Henikoff,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10915)比对(B)为50,期望值(E)为10,M=5,N=-4和两条链的比较作为缺省。

[0037] 术语“约”在数字值背景中指数字值的+/-10%。

[0038] 术语“肽”和“多肽”在本文中所描述的工程化多肽的组分的背景中是同义的。

[0039] II.化合物

[0040] 在第一个方面,提供了工程化多肽化合物,其序列包含清蛋白结合域(ABD)多肽序列和至少一种多肽激素域(HD1)序列。术语“清蛋白结合域”、“ABD”等指如本文中描述的能够结合清蛋白的多肽。术语“激素域”、“激素域多肽”等指能够在受试者中引发生物学应答的GP-1受体激动剂多肽。例示性激素域包括但不限于,毒蜥外泌肽、毒蜥外泌肽片段或毒蜥外泌肽类似物。

[0041] 令人惊讶地,发现毒蜥外泌肽、毒蜥外泌肽类似物或活性片段可以融合至自链球菌菌株G148的细菌蛋白G的清蛋白结合域衍生的具有非常高亲和力的清蛋白结合域(ABD),而保留充足的毒蜥外泌肽-4生物学活性且具有延长的作用持续时间,例如在啮齿动物中至少为3天且甚至为5天,这转换到人受试者中为至少一周或更长的持续时间。“作用持续时间”在习惯意义中指在治疗方案中允许更不频繁的剂量施用。由此,延长的作用持续时间会允许不那么频繁和/或更方便的剂量施用时间表。这是令人惊讶的,部分因为还未彻底证明这类ABD肽是作为治疗蛋白载体的有力平台,它们是相对疏水性的,其可以与附接的治疗肽不利地相互作用,且不能作为至少一种肽激素家族的载体。具体地,大鼠胰淀素(amylin)在

缀合或融合至本文中描述的ABD时,未在啮齿类模型中展现出任何显著的或长效的体内活性,而在同样的啮齿类模型中发现各种毒蜥外泌肽-ABD构建体是有活性的且具有较长的作用持续时间。

[0042] 生物学活性组分。涵盖用在本文中描述的化合物和方法中的生物学活性化合物组分包括瘦蛋白。术语“生物学活性化合物”等在习惯意义中指可以引发生物学应答的化合物,例如多肽等。

[0043] 毒蜥外泌肽。毒蜥外泌肽是在吉拉毒蜥(*Gila monster*)和墨西哥有须蜥蜴(*Mexican Bearded Lizard*)(亚利桑那州和墨西哥北部内生的爬行类)的唾液分泌中发现的肽。毒蜥外泌肽-3存在于珠毒蜥(*Heloderma horridum*)(墨西哥有须蜥蜴)的唾液分泌中,且毒蜥外泌肽-4存在于钝尾毒蜥(*Heloderma suspectum*)(吉拉毒蜥)的唾液分泌中。参见Eng等,1990,*J. Biol. Chem.*, 265:20259-62;Eng等,1992,*J. Biol. Chem.*, 267:7402-7405。毒蜥外泌肽-3和毒蜥外泌肽-4的序列分别如下:

[0044] HSDGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂(SEQ ID NO:1);

[0045] HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂(SEQ ID NO:2)。

[0046] Hargrove等(*Regulatory Peptides*, 2007, 141:113-119)报告了毒蜥外泌肽-4肽类似物,其为全长C末端酰胺化的毒蜥外泌肽-4肽类似物,相比于天然的毒蜥外泌肽-4在位置14处具有单个核苷酸差异。[¹⁴Leu]毒蜥外泌肽-4的序列如下: HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂(SEQ ID NO:3)。另一种毒蜥外泌肽-4肽类似物是毒蜥外泌肽-4的头32个氨基酸(在位置14和28处具有氨基酸取代)和接着来自非哺乳动物(蛙)GLP1的C末端的5个氨基酸序列的嵌合体:[Leu¹⁴, Gln²⁸]毒蜥外泌肽-4(1-32)-fGLP-1(33-37)。该化合物具有以下序列: HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS (SEQ ID NO:4)。本领域中还已知毒蜥外泌肽-4的C末端截短的、生物学活性形式,如毒蜥外泌肽-4(1-28)、毒蜥外泌肽-4(1-29)、毒蜥外泌肽-4(1-30)、毒蜥外泌肽-4(1-31)、毒蜥外泌肽-4(1-32)及其酰胺化形式。所有这些毒蜥外泌肽类似物都适合作为本发明的工程化多肽的组分。如本领域中惯用的,肽化合物名称中的方括号(即“[]”)指方括号中的残基或化学特征的取代。例如, [¹⁴Leu]毒蜥外泌肽-4、[¹⁴Leu]Ex-4等指在位置14处具有亮氨酸的毒蜥外泌肽-4。氨基酸的数字位置可以由本领域中常规采用的多种方式中前附或后附数字指示。例如,术语¹⁴Leu, Leu14, 14Leu, Leu¹⁴等在指位置14处的亮氨酸时是同义的。

[0047] 理解的是,在一些实施方案中,C末端酰胺或其它C末端加帽模块可以存在于本文中描述的化合物中。

[0048] 尽管毒蜥外泌肽与胰高血糖素样肽家族的数个成员具有一些序列相似性,最高对GLP-1(7-36)NH₂(Goke等, 1993, *J. Biol. Chem.*, 268:19650-55)[GLP-1(7-37)NH₂的序列: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG(SEQ ID NO:5)](有时也称为“GLP-1”,其具有刺激胰岛素从胰β细胞分泌的促胰岛素效果)的同源性为53%,但是毒蜥外泌肽不是GLP-1同源物。

[0049] 药理学研究已经报告了毒蜥外泌肽-4可以体外作用于某些胰岛素分泌细胞上的GLP-1受体,然而,还已经报告了毒蜥外泌肽-4可以作用于不受GLP-1作用的受体。还有,毒蜥外泌肽-4与GLP-1在体内共有一些,但并非所有的生物学特性,且其比GLP-1具有显著更长的作用持续时间。基于它们的促胰岛素活性,已经提出了毒蜥外泌肽-3和毒蜥外泌肽-4用于治疗糖尿病并预防高血糖症的用途(Eng, 美国专利No. 5,424,286,通过提述完整并入

本文并用于所有目的),并且实际上,在美国和欧洲已经批准了将毒蜥外泌肽-4用作治疗2型糖尿病的治疗物。

[0050] 实际上,认为毒蜥外泌肽并非像Chen和Drucker(他们从吉拉毒蜥克隆了毒蜥外泌肽基因)报告(J.Biol.Chem.272:4108-15(1997))的是哺乳动物GLP-1的物种同源物。如下观察结果,即吉拉毒蜥还具有分开的胰高血糖素原(自其加工GLP-1)基因,其比毒蜥外泌肽更类似于哺乳动物胰高血糖素原,指示了毒蜥外泌肽不是GLP-1的唯一物种同源物。

[0051] 使用毒蜥外泌肽激动剂来调节胃肠能动性性的方法记载于美国专利No.6,858,576(即基于1997年8月8日提交的美国申请流水号08/908,867,其为1996年8月8日提交的美国申请流水号08/694,954的部分附加)。使用毒蜥外泌肽激动剂来降低食物摄取的方法记载于美国专利No.6,956,026(即基于1998年1月7日提交的美国申请流水号09/003,869,其要求1997年1月7日提交的美国申请No.60/034,905、1997年8月7日提交的60/055,404、1997年11月14日提交的60/065,442和1997年11月14日提交的60/066,029的权益)。

[0052] 可用在本文描述的工程化多肽中的新的毒蜥外泌肽激动剂化合物序列记载于W099/07404(即1998年8月6日提交的PCT/US98/16387)、W099/25727(即1998年11月13日提交的PCT/US98/24210)、W099/25728(即1998年11月13日提交的PCT/US98/24273)、W099/40788、W000/41546、和W000/41548,它们连同其授权的对应美国专利都通过提述并入本文中并用于所有目的。如本领域中已知的用于测定体外和体内毒蜥外泌肽活性的方法,包括促胰岛素的、食物摄取抑制活性和重量降低活性,记载于本文和上文引用以及本文中记载的其它引用中。

[0053] 某些例示性毒蜥外泌肽、毒蜥外泌肽激动剂、和毒蜥外泌肽类似物激动剂包括:毒蜥外泌肽片段毒蜥外泌肽-4(1-30)(His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly);毒蜥外泌肽-4(1-28),毒蜥外泌肽-4(1-29),毒蜥外泌肽-4(1-30),毒蜥外泌肽-4(1-31)和毒蜥外泌肽-4(1-32)。类似物包括在¹⁴Met位置(即¹⁴Met)处用非氧化的氨基酸如亮氨酸的取代。例子包括[¹⁴Leu]毒蜥外泌肽-4,[¹⁴Leu]毒蜥外泌肽-4(1-30),[¹⁴Leu]毒蜥外泌肽-4(1-28)和[¹⁴Leu,²⁵Phe]毒蜥外泌肽-4。

[0054] 用于本文中描述的工程化多肽的毒蜥外泌肽类似物激动剂包括那些记载于美国专利No.7,223,725(通过提述并入本文中并用于所有目的)的,如具有下式的化合物:
Xaa₁Xaa₂Xaa₃Gly Xaa₅Xaa₆Xaa₇Xaa₈Xaa₉Xaa₁₀Xaa₁₁Xaa₁₂Xaa₁₃Xaa₁₄Xaa₁₅Xaa₁₆Xaa₁₇Ala
Xaa₁₉Xaa₂₀Xaa₂₁Xaa₂₂Xaa₂₃Xaa₂₄Xaa₂₅Xaa₂₆Xaa₂₇Xaa₂₈-Z₁;其中Xaa₁为His,Arg或Tyr;Xaa₂为Ser,Gly,Ala或Thr;Xaa₃为Ala,Asp或Glu;Xaa₅为Ala或Thr;Xaa₆为Ala,Phe,Tyr;Xaa₇为Thr或Ser;Xaa₈为Ala,Ser或Thr;Xaa₉为Asp或Glu;Xaa₁₀为Ala,Leu,Ile,Val,或Met;Xaa₁₁为Ala或Ser;Xaa₁₂为Ala或Lys;Xaa₁₃为Ala或Gln;Xaa₁₄为Ala,Leu,Ile,Val或Met;Xaa₁₅为Ala或Glu;Xaa₁₆为Ala或Glu;Xaa₁₇为Ala或Glu;Xaa₁₉为Ala或Val;Xaa₂₀为Ala或Arg;Xaa₂₁为Ala或Leu;Xaa₂₂为Ala,Phe,Tyr;Xaa₂₃为Ile,Val,Leu,或Met;Xaa₂₄为Ala,Glu或Asp;Xaa₂₅为Ala,Trp,Phe,Tyr;Xaa₂₆为Ala或Leu;Xaa₂₇为Ala或Lys;Xaa₂₈为Ala或Asn;Z₁为-OH,-NH₂,Gly-Z₂,Gly Gly-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser Ser-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser Ser Gly-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser Ser Gly Ala-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆Xaa₃₇-Z₂或GlyGly Xaa₃₁Ser Ser Gly Ala

Xaa₃₆Xaa₃₇Xaa₃₈-Z₂;Xaa₃₁,Xaa₃₆,Xaa₃₇和Xaa₃₈独立地是Pro或不存在;且Z₂为-OH或-NH₂。在上文所描述的任一种毒蜥外泌肽类似物中,还具体地涵盖了那些其中进行了将对应于Xaa₁的组氨酸用以下任意一种替换的:D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、β-羟基-组氨酸、高组氨酸、N-α-乙酰-组氨酸、α-氟甲基-组氨酸、α-甲基-组氨酸、3-吡啶基丙氨酸、2-吡啶基丙氨酸、4-吡啶基丙氨酸、4-咪唑乙酰、脱-氨基-组氨酰(咪唑丙酰)、β-羟基-咪唑丙酰、N-二甲基-组氨酰或β-羧基-咪唑丙酰。本文中具体地涵盖了本文中描述的这样的毒蜥外泌肽类似物,其中进行了将Xaa₂处的甘氨酸用以下任一种替换:D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-氨基环丙基)羧酸、(1-氨基环丁基)羧酸、(1-氨基环戊基)羧酸、(1-氨基环己基)羧酸、(1-氨基环庚基)羧酸、或(1-氨基环辛基)羧酸。

[0055] 依照一个实施方案,例示性化合物包括那些具有上式的,其中:Xaa₁为His或Arg;Xaa₂为Gly或Ala;Xaa₃为Asp或Glu;Xaa₅为Ala或Thr;Xaa₆为Ala或Phe;Xaa₇为Thr或Ser;Xaa₈为Ala,Ser或Thr;Xaa₉为Asp或Glu;Xaa₁₀为Ala,或Leu;Xaa₁₁为Ala或Ser;Xaa₁₂为Ala或Lys;Xaa₁₃为Ala或Gln;Xaa₁₄为Ala或Leu;Xaa₁₅为Ala或Glu;Xaa₁₆为Ala或Glu;Xaa₁₇为Ala或Glu;Xaa₁₉为Ala或Val;Xaa₂₀为Ala或Arg;Xaa₂₁为Ala或Leu;Xaa₂₂为Phe;Xaa₂₃为Ile,Val;Xaa₂₄为Ala,Glu或Asp;Xaa₂₅为Ala,Trp或Phe;Xaa₂₆为Ala或Leu;Xaa₂₇为Ala或Lys;Xaa₂₈为Ala或Asn;Z₁为-OH,-NH₂,Gly-Z₂,Gly Gly-Z₂,Gly GlyXaa₃₁-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser Ser-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser SerGly-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser Ser Gly Ala-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆Xaa₃₇-Z₂,Gly Gly Xaa₃₁Ser SerGly Ala Xaa₃₆Xaa₃₇Xaa₃₈-Z₂;Xaa₃₁,Xaa₃₆,Xaa₃₇和Xaa₃₈独立地为Pro或不存在,且Z₂为-OH或-NH₂;只要Xaa₃,Xaa₅,Xaa₆,Xaa₈,Xaa₁₀,Xaa₁₁,Xaa₁₂,Xaa₁₃,Xaa₁₄,Xaa₁₅,Xaa₁₆,Xaa₁₇,Xaa₁₉,Xaa₂₀,Xaa₂₁,Xaa₂₄,Xaa₂₅,Xaa₂₆,Xaa₂₇和Xaa₂₈中不超过3个为Ala。在上文所描述的任一种毒蜥外泌肽类似物中,还具体地涵盖了那些其中进行了将对应于位置Xaa₁的组氨酸用以下任一种替换的:D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、β-羟基-组氨酸、高组氨酸、N-α-乙酰-组氨酸、α-氟甲基-组氨酸、α-甲基-组氨酸、3-吡啶基丙氨酸、2-吡啶基丙氨酸、4-吡啶基丙氨酸、4-咪唑乙酰、脱-氨基-组氨酰(咪唑丙酰)、β-羟基-咪唑丙酰、N-二甲基-组氨酰或β-羧基-咪唑丙酰。本文中具体地涵盖了本文中描述的这样的毒蜥外泌肽类似物,其中进行了将Xaa₂处的甘氨酸用以下任一种替换:D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-氨基环丙基)羧酸、(1-氨基环丁基)羧酸、(1-氨基环戊基)羧酸、(1-氨基环己基)羧酸、(1-氨基环庚基)羧酸、或(1-氨基环辛基)羧酸。

[0056] 其它例示性化合物包括那些在W099/25727中列出的、其中被鉴定为化合物2-23的。依照另一个实施方案,提供了这样的化合物,其中Xaa₁₄为Leu,Ile或Val,更优选为Leu,和/或Xaa₂₅为Trp,Phe或Tyr,更优选为Trp或Phe。这些化合物会不那么容易受到体外和体内以及化合物合成期间的氧化降解。

[0057] 适合用在本发明的融合多肽中的毒蜥外泌肽类似物的其它例子包括那些记载于2003年3月4日公开的美国专利6528486(通过提述并入本文中并用于所有目的)中的。具体地,毒蜥外泌肽类似物包括那些如下的毒蜥外泌肽或毒蜥外泌肽类似物,其由对毒蜥外泌肽-4具有至少90%同源性、任选地在位置34-39处具有1和5个之间的缺失、和有4-20个氨基酸单元的肽序列的C末端延伸共价结合至所述毒蜥外泌肽组成,其中所述肽延伸序列中的每个氨基酸单元选自下组:Ala,Leu,Ser,Thr,Tyr,Asn,Gln,Asp,Glu,Lys,Arg,His和Met。

更优选地,所述延伸为有4-20个氨基酸残基的肽序列。更优选地,所述延伸为有4-20个氨基酸残基的肽序列,例如在4-15个的范围内,更优选地在4-10个的范围内,特别是在4-7个氨基酸残基的范围内,例如4,5,6,7,8或10个氨基酸残基,其中优选为6个氨基酸残基。最优选地,依照美国专利6528486,所述延伸肽含有至少1个Lys残基,且甚至更优选地,3至7个赖氨酸,且甚至最优选地,6个赖氨酸。

[0058] 例如,一种类似物为HGEFTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPP SKKKKKK(SEQ ID NO:118)(也称为([脱-³⁶Pro]毒蜥外泌肽-4(1-39)-Lys₆)。其它例示性类似物包括

[0059] Lys₆-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-(Lys)₆(H-Lys₆-des Pro³⁶毒蜥外泌肽-4(1-39)-Lys₆)(SEQ ID NO:184);

[0060] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser(H-[des³⁶Pro, ^{37,38}Pro]毒蜥外泌肽-4(1-39)-NH₂)(SEQ ID NO:185);

[0061] Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser(H-(Lys)₆-[des³⁶Pro, ^{37,38}Pro]毒蜥外泌肽-4(1-39)(SEQ ID NO:186);

[0062] Asn-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser(H-Asn-(Glu)₅-[des³⁶Pro, ^{37,38}Pro]毒蜥外泌肽-4(1-39)(SEQ ID NO:187);

[0063] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)₆([des³⁶Pro, ^{37,38}Pro]毒蜥外泌肽-4(1-39)-(Lys)₆)(SEQ ID NO:188);

[0064] (Lys)₆-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)₆(H-(Lys)₆-[脱³⁶Pro, ^{37,38}Pro]毒蜥外泌肽-4(1-39)-(Lys)₆)(SEQ ID NO:189);和

[0065] Asp-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)₆(Asn-(Glu)₅-[des³⁶Pro, ^{37,38}Pro]毒蜥外泌肽-4(1-39)-(Lys)₆)(SEQ ID NO:190)。如本领域中习惯的,氨基酸重复可以由列出重复数目的下标数字指示;即Lys₆、(Lys)₆等指六个赖氨酸基(SEQ ID NO:191)。在上文所描述的任一种毒蜥外泌肽类似物中,具体地涵盖了那些其中进行了将对应于位置1的组氨酸用以下任一种替换的:D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、β-羟基-组氨酸、高组氨酸、N-α-乙酰-组氨酸、α-氟甲基-组氨酸、α-甲基-组氨酸、3-吡啶基丙氨酸、2-吡啶基丙氨酸、4-吡啶基丙氨酸、4-咪唑乙酰、脱-氨基-组氨酸(或咪唑丙酰)、β-羟基-咪唑丙酰、N-二甲基-组氨酸或β-羧基-咪唑丙酰。本文中具体涵盖了本文中描述的这样的毒蜥外泌肽类似物,其中进行了将位置2处的甘氨酸用以下任一种替换:D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-氨基环丙基)羧酸、

(1-氨基环丁基)羧酸、(1-氨基环戊基)羧酸、(1-氨基环己基)羧酸、(1-氨基环庚基)羧酸、或(1-氨基环辛基)羧酸。

[0066] 适合用在工程化多肽构建体的毒蜥外泌肽类似物的其它例子是那些记载于公开的PCT申请W02004035623(通过提述并入本文中并用于所有目的)中的,特别是那些由天然存在的氨基酸构成的,其描述了尤其在位置¹³Gln,¹⁴Met,²⁵Trp或²⁸Asn处相对于毒蜥外泌肽-4(1-39)的对应位置,具有至少1个经修饰的氨基酸残基的毒蜥外泌肽类似物。依照该公开内容有另外的这类类似物,其另外包含1-7个氨基酸的C末端延伸,该延伸包含至少1个Lys氨基酸和更优选地,至少5个Lys氨基酸单元,如6个或7个Lys氨基酸单元。

[0067] 适合用在工程化多肽构建体的毒蜥外泌肽类似物的其它例子是那些记载于公开的PCT申请W0/2010/120476,名为“N-Terminus Conformationally Constrained GLP-1 Receptor Agonist Compounds”(通过提述并入本文中并用于所有目的)的,其描述了在毒蜥外泌肽或毒蜥外泌肽类似物的N末端部分具有经修饰的氨基酸残基以在该区创建高β转角属性的毒蜥外泌肽类似物。例如,类似物设计为通过创建构象受限区来模拟氨基酸残基His1Gly2Glu3,包括在His1Gly2Glu3处含有噻唑烷-脯氨酸肽模拟物的毒蜥外泌肽类似物(参见例如其中图17A-F中描述的化合物),该噻唑烷-脯氨酸肽模拟物可以用作毒蜥外泌肽-4、利西拉来(lixisenatide)、或本文中描述的其它类似物中的修饰。

[0068] 在本文中描述的任一种毒蜥外泌肽、毒蜥外泌肽类似物和式中,具体涵盖了那些其中进行了将对应于位置1的组氨酸用以下任一种替换的:L-组氨酸、D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、β-羟基-组氨酸、高组氨酸、N-α-乙酰-组氨酸、α-氟甲基-组氨酸、α-甲基-组氨酸、3-吡啶基丙氨酸、2-吡啶基丙氨酸、4-吡啶基丙氨酸、4-咪唑乙酰、脱-氨基-组氨酰(咪唑丙酰)、β-羟基-咪唑丙酰、N-二甲基-组氨酰或β-羧基-咪唑丙酰。例如,优选用于如本文中描述的工程化多肽缀合物的、其中His1位置经修饰的毒蜥外泌肽类似物是(4-咪唑乙酰)毒蜥外泌肽-4、(脱-氨基-组氨酰)毒蜥外泌肽-4(或(咪唑丙酰)毒蜥外泌肽-4)、(β-羟基-咪唑丙酰)毒蜥外泌肽-4、(N-二甲基-组氨酰)毒蜥外泌肽-4和(β-羧基-咪唑丙酰)毒蜥外泌肽-4。本文中具体涵盖了本文中描述的这样的毒蜥外泌肽或毒蜥外泌肽类似物,其中进行了将位置2处的甘氨酸用以下任一种替换:D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-氨基环丙基)羧酸、(1-氨基环丁基)羧酸、(1-氨基环戊基)羧酸、(1-氨基环己基)羧酸、(1-氨基环庚基)羧酸、或(1-氨基环辛基)羧酸。

[0069] 上文的任一种毒蜥外泌肽类似物或其活性片段(有或无至ABD的接头)都适用于本发明的工程化多肽。

[0070] 清蛋白结合域(ABD)肽。用在本发明的清蛋白结合域(ABD)肽是那些对清蛋白具有可比地高亲和力的且衍生于链球菌菌株G148的细菌蛋白G的清蛋白结合域。如此,涵盖用于本文中描述的工程化多肽的ABD肽包括那些具有有如由Jonsson等描述的清蛋白结合基序的(Protein Eng.Design&Selection,2008,21:515-527)以及其中描述的ABD肽,和还记载于PCT公开申请No.W02009/016043的那些基序和ABD肽,以及其类似物,特别是那些具有至少85%氨基酸同一性的。在一个实施方案中,所述ABD肽可以包括包含以下氨基酸序列的清蛋白结合基序(“ABM”):

[0071] GVSD X₅YK X₈X₉I X₁₁X₁₂A X₁₄TVEGV X₂₀AL X₂₃X₂₄X₂₅I(SEQ ID NO:119)

[0072] 其中,彼此独立地,

[0073] X₅选自Y和F;

[0074] X₈选自N,R和S;

[0075] X₉选自V,I,L,M,F和Y;

[0076] X₁₁选自N,S,E和D;

[0077] X₁₂选自R,K和N;

[0078] X₁₄选自K和R;

[0079] X₂₀选自D,N,Q,E,H,S,R和K;

[0080] X₂₃选自K,I和T;

[0081] X₂₄选自A,S,T,G,H,L和D;并

[0082] X₂₅选自H,E和D。

[0083] 优选地,ABD肽以至多 1×10^{-6} M,且甚至更优选地,以至多 1×10^{-9} M(更紧密的亲合力)的相互作用K_D值结合清蛋白。术语“K_D”指如本领域中惯用的解离常数。更优选地,相互作用K_D值为至多 1×10^{-10} M,甚至更优选地,为至多 1×10^{-11} M,然而甚至更优选地,为至多 1×10^{-12} M,且甚至进一步地为至多 1×10^{-13} M。举例而言, 1×10^{-14} M的K_D值的是至多为 1×10^{-13} M的相互作用K_D值。可以如PCT公开申请No.WO2009/016043中描述的测定K_D值(优选对人血清清蛋白)。在一个实施方案中涵盖了上述类,前提是氨基酸序列并非GVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEI(SEQ ID NO:120)。

[0084] 如本文中和所引用的参考内容中显示的,可以不管氨基酸变化而保留ABD肽的清蛋白结合能力,只要这类变化保留了ABD肽的足够的三级结构。这类变化包括例如取代,其中将属于氨基酸残基某一功能组(例如疏水、亲水、极性的等)的氨基酸残基交换为来自同一功能组的另一种氨基酸残基。因此,在ABD肽的一个这类实施方案中,基序X₅是Y。在ABD的一个实施方案中,X₈选自N和R,且具体地可以是R。在一个实施方案中,X₉是L。在一个实施方案中,X₁₁选自N和S,且具体地可以是N。在一个实施方案中,X₁₂选自R和K,如X₁₂为R或X₁₂为K。在一个实施方案中,X₁₄是K。在一个实施方案中,X₂₀选自D,N,Q,E,H,S和R,且具体地可以是E。在一个实施方案中,X₂₃选自K和I,且具体地可以是K。在一个实施方案中,X₂₄选自A,S,T,G,H和L。在一个更特定的实施方案中,X₂₄是L。在一个甚至更特定的实施方案中,“X₂₃X₂₄”是KL。在另一个甚至更特定的实施方案中,“X₂₃X₂₄”是TL。在一个实施方案中,X₂₄选自A,S,T,G和H。在一个更特定的实施方案中,X₂₄选自A,S,T,G和H且X₂₃是I。在一个实施方案中,X₂₅是H。

[0085] 在上文通式内的各清蛋白结合基序的序列包括那些在PCT公开申请No.WO2009/016043(通过提述并入本文并用于所有目的)中披露为SEQ ID NO:1-257的。在清蛋白结合多肽的某些实施方案中,清蛋白结合基序由选自SEQ ID NO:1-257的氨基酸序列组成。在本发明该方面的一个更特定的实施方案中,所述基序序列选自PCT公开申请No.WO2009/016043的SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:49,SEQ ID NO:53,SEQ ID NO:54,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:155,SEQ ID NO:239,SEQ ID NO:240,SEQ ID NO:241,SEQ ID NO:242,SEQ ID NO:243,SEQ ID NO:244和SEQ ID NO:245。还在本发明该方面的更特定的实施方案中,所述基序序列选自PCT公开申请No.WO2009/016043的SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:239。在本文和下文中还描述了含有这些清蛋白结合基序且由此适合缀合或融合至如本文中描述的激素域的清蛋白结合多肽,并例示在表1和实施例。不受理论束缚的,但认为清蛋白结

合基序可以形成三螺旋束蛋白域的部分。举例而言,基序可以与互连环基本构成或形成三螺旋束蛋白域内的两个 α 螺旋的部分。因此,在本发明的具体实施方案中,这类三螺旋束蛋白域选自来自链球菌菌株G148的细菌受体蛋白G的三螺旋域的组。在该实施方案的不同变体中,基序形成其一部分的三螺旋束蛋白域选自下组:来自链球菌菌株G148的域GA1、域GA2和域GA3,特别是域GA3。

[0086] 在其中基序“形成三螺旋束蛋白域的部分”的本发明的实施方案中,其被理解为将清蛋白结合基序的序列“插入”到或“移植”到或“融合”至天然存在的(或原始的)三螺旋束域中,从而该基序替换原始域中类似的结构性基序。举例而言且不希望受理论束缚的,认为该基序构成了三螺旋束的3个螺旋中的2个,并且可以替换任何三螺旋束中的这类2螺旋基序。实施本文中披露的2个基序螺旋对三螺旋束域的2个螺旋的替换,使得不影响多肽的基本结构。也就是说,依照本发明的该实施方案的多肽主链的总体折叠与三螺旋束蛋白域的(其形成一部分)会是实质相同的,例如具有相同次序的相同二级结构元件等。由此,如果依照该实施方案的多肽具有与原始域相同的折叠,那么对本文中的工程化多肽有用的基序可以形成三螺旋束域的部分,表明共有基本的结构特性,这些特性例如导致类似的CD光谱。

[0087] 因此,在一个实施方案中,清蛋白结合域多肽是三螺旋束蛋白域,其包含如上文限定的清蛋白结合基序和构成三螺旋构象的剩余部分的其它序列。毒蜥外泌肽或其类似物或活性片段可以融合至这类清蛋白结合域多肽以创建如本文中描述的工程化多肽。适合缀合或融合至毒蜥外泌肽化合物的清蛋白结合域多肽可以包含氨基酸序列:LAELAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY(SEQ ID NO:182),该氨基酸序列共价连接至清蛋白结合基序(ABM),该清蛋白结合基序(ABM)进一步共价连接至氨基酸序列LAALP(SEQ ID NO:183),其中ABM是如本文中限定的清蛋白结合基序,X_a选自V和E;X_b选自L,E和D;X_c选自N,L和I;X_d选自R和K;且X_e选自D和K。在一些实施方案中,适合缀合或融合至毒蜥外泌肽化合物的清蛋白结合域多肽是氨基酸序列:LAELAKX_a X_b A X_c X_d EL X_e KY(SEQ ID NO:182),该氨基酸序列共价连接至清蛋白结合基序(ABM),该清蛋白结合基序(ABM)进一步共价连接至氨基酸序列LAALP(SEQ ID NO:183),如上文所描述的。

[0088] 在一些实施方案中,所述清蛋白结合域多肽包含氨基酸序列LAELAK X_aX_b A X_c X_d EL X_e KY GVSD X₅YK X₈X₉I X₁₁X₁₂A X₁₄TVEGV X₂₀AL X₂₃X₂₄X₂₅I LAALP(SEQ ID NO:121),其中X_a选自V和E;X_b选自L,E和D;X_c选自N,L和I;X_d选自R和K;X_e选自D和K;X₅选自Y和F;X₈选自N,R和S;X₉选自V,I,L,M,F和Y;X₁₁选自N,S,E和D;X₁₂选自R,K和N;X₁₄选自K和R;X₂₀选自D,N,Q,E,H,S,R和K;X₂₃选自K,I和T;X₂₄选自A,S,T,G,H,L和D;且X₂₅选自H,E和D。

[0089] 另外对于ABD序列在本文中的每个实施方案,任选地,C末端脯氨酸(对应于上文位置46)可以不存在。任选地,甚至还对于ABD序列的每个实施方案,位置45处的亮氨酸可以存在或不存在。“ABD序列”是单价或二价的(如合适的)、形成本文中披露的工程化多肽的部分的ABD化合物的序列。“肽激素域(HD1)序列”是单价或二价的(如合适的)、形成本文中披露的工程化多肽的部分的肽激素域(HD1)化合物的序列。“毒蜥外泌肽序列”是单价或二价的(如合适的)、形成本文中披露的工程化多肽的部分的毒蜥外泌肽化合物的序列。“毒蜥外泌肽类似物序列”是单价或二价的(如合适的)、形成本文中披露的工程化多肽的部分的毒蜥外泌肽类似物化合物的序列。“毒蜥外泌肽活性片段序列”是单价或二价的(如合适的)、形成本文中披露的工程化多肽的部分的毒蜥外泌肽活性片段化合物的序列。“毒蜥外泌肽类

似物活性片段序列”是单价或二价的(如合适的)、形成本文中披露的工程化多肽的部分的毒蜥外泌肽类似物活性片段的序列。“清蛋白结合基序(ABM)序列”是单价或二价的(如合适的)、形成本文中披露的工程化多肽的部分的ABM的序列。除非另外规定的,理解当工程化多肽“包含”化合物(例如ABD或HD1)时,该工程化多肽的序列包含该化合物的序列(例如ABD序列或HD1序列)。

[0090] 由于存在清蛋白结合基序,ABD肽以至多 1×10^{-6} M和甚至更优选地至多 1×10^{-9} M(更紧密的亲合力)的相互作用KD值结合清蛋白。更优选地,相互作用 K_D 值为至多 1×10^{-10} M,甚至更优选地为至多 1×10^{-11} M,甚至还更优选地为至多 1×10^{-12} M,且甚至进一步地为至多 1×10^{-13} M。最优选地,所述值是针对人血清清蛋白(“HSA”)的亲合力。

[0091] 在该清蛋白结合多肽的一个实施方案中, X_a 为V。在该多肽的一个实施方案中, X_b 为L。在该多肽的一个实施方案中, X_c 为N。在该多肽的一个实施方案中, X_d 为R。在该多肽的一个实施方案中, X_e 为D。

[0092] 在某些实施方案中, X_a 为E。在某些实施方案中, X_b 为D。在某些实施方案中, X_c 为I。在某些实施方案中, X_d 为K。在某些实施方案中, X_a 独立地为E,和/或独立地 X_b 为D,和/或独立地 X_c 为I,和/或独立地 X_d 为K。在某些实施方案中,清蛋白结合域多肽为LAELAKEDAIKELDKYGVSDYYKRLISKAKTVEGVKALISEILAALP(SEQ ID NO:122)。在某些实施方案中,清蛋白结合域多肽为LAELAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP(SEQ ID NO:123)。在某些实施方案中,清蛋白结合域多肽为LAELAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP(SEQ ID NO:124)。

[0093] 适合与如本文中描述的活性激素域肽融合的各清蛋白结合域多肽的序列记载于Jonsson等(同上)且作为SEQ ID NO:258-514记载于PCT公开申请No.WO2009/016043,通过提述并入本文。在下表1中披露了选出的序列。本发明还涵盖了与选自SEQ ID NO:258-514的序列具有85%或更高同一性的氨基酸序列的清蛋白结合多肽。在具体的实施方案中,所述清蛋白结合多肽的序列选自PCT公开申请No.WO2009/016043中的SEQ ID NO:259,SEQ ID NO:260,SEQ ID NO:266,SEQ ID NO:272,SEQ ID NO:282,SEQ ID NO:284,SEQ ID NO:303,SEQ ID NO:306,SEQ ID NO:310,SEQ ID NO:311,SEQ ID NO:312,SEQ ID NO:412,SEQ ID NO:496,SEQ ID NO:497,SEQ ID NO:498,SEQ ID NO:499,SEQ ID NO:500,SEQ ID NO:501和SEQ ID NO:502,以及与其具有85%或更高同一性的序列。在本发明该方面的更特定的实施方案中,所述清蛋白结合多肽的序列选自PCT公开申请No.WO2009/016043中的SEQ ID NO:260,SEQ ID NO:310和SEQ ID NO:496及与其具有85%或更高同一性的序列。在另外的实施方案中,所述清蛋白结合多肽的序列选自PCT公开申请No.WO2009/016043中的SEQ ID NO:260,SEQ ID NO:270,SEQ ID NO:272,SEQ ID NO:291,SEQ ID NO:294,SEQ ID NO:298,SEQ ID NO:299,SEQ ID NO:300,SEQ ID NO:400,SEQ ID NO:484,SEQ ID NO:485,SEQ ID NO:486,SEQ ID NO:487,SEQ ID NO:488,SEQ ID NO:489和SEQ ID NO:490,以及与其具有85%或更高同一性的序列。

[0094] 例示性ABD种类包括但不限于,具有下表1和实施例下列出的序列的化合物。亦参见PCT公开申请No.WO2009/016043,其通过提述完整并入本文中并用于所有目的。可用于本文中描述的化合物、方法和药物组合物的ABD肽序列可以是本文中披露或本领域中已知的ABD肽序列的片段或类似物,只要其含有清蛋白结合基序序列并以本文中描述的亲和力结

合清蛋白。

[0095] 表1.选出的ABD肽

[0096]

ABD肽序列	SEQ ID NO:
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP	23

[0097]

ABD肽序列	SEQ ID NO:
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKSYINRAKTVEGVHTLIGHILAALP	24
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVNALTHHILAALP	25
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINRARTVEGVHALIDHILAALP	26
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP	27
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKKNLINRAKTVEGVSSLKGHILAALP	28
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP	29
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKKNLINRAKTVEGVDALIAHILAALP	30
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKSLINRAKTVEGVDALTSHILAALP	31
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKKNLINRAKTVEGVNSLTSHILAALP	32
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKKNVINKAKTVEGVEALIADILAALP	33
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVQALIAHILAALP	34
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP	35
LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKRLISKAKTVEGVKALISEILAALP	122
LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP	123
LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP	124

[0098] 如本文中使用的,术语“清蛋白结合”和“对清蛋白的结合亲和力”指多肽的一种特性,其可以例如通过使用表面等离子体共振技术来进行测试,如在本领域已知的Biacore仪器中。例如,如在下面实施例中描述的,可以在实验中测试清蛋白结合亲和力,其中将清蛋白或其片段固定化到仪器的传感器芯片上,并使含有待测试多肽的样品通过该芯片。或者,将待测试的多肽固定化到仪器的传感器芯片上,并使含有清蛋白或其片段的样品通过该芯片。在这方面,清蛋白可以是来自哺乳动物的血清清蛋白,如人血清清蛋白。技术人员然后会理解通过这类实验所获得的结果建立该多肽对清蛋白的结合亲和力的至少一种定性量度。如果期望定量量度,例如以测定相互作用的 K_D 值,那么还可以使用表面等离子体共振方

法。结合值可以例如在Biacore2000仪器(GE Healthcare)中限定。将清蛋白适当地固定化在测量的传感器芯片上,并通过系列稀释来制备要测定其亲和力的多肽的样品并进行注射。然后,可以从结果计算出 K_D 值,其使用例如由仪器制造商(GE Healthcare)提供的BIAevaluation4.1软件的1:1Langmuir结合模型。

[0099] 在一个实施方案中,依照该方面的清蛋白结合多肽结合清蛋白,使得相互作用的 k_{off} 值至多为 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$,如至多 $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ 。

[0100] 在本文描述的工程化多肽中使用的ABD的另一个优选的实施方案中,工程化多肽的清蛋白结合多肽部分的氨基酸序列包含选自本文中所描述序列中的任一种的ABD,包括那些来自表1或本文列表中的,且还包括它们的脱-Pro46形式。

[0101] 在一个实施方案中,依照该方面的清蛋白结合多肽还包含位于本文中限定和例示的ABD序列的N-和/或C末端处的一个或多个另外的氨基酸残基。这些另外的氨基酸残基在进一步增强多肽对清蛋白的结合,及改进所折叠的清蛋白结合域的构象稳定性中可能起着作用,但同样可能很好地用于其它目的,例如涉及多肽的生成、纯化、体内或体外稳定、偶联、标记或检测中的一种或多种、以及其任意组合。这类另外的氨基酸可以包含加入以用于化学偶联(例如对HD1)目的的一个或多个氨基酸残基。

[0102] 由此,例如,位于ABD氨基酸序列的N或C末端处紧接 α 螺旋之前或之后的氨基酸在一个实施方案中可以影响构象稳定性。一种促进改善的构象稳定性的氨基酸残基的例子是位于如上限定的ABD氨基酸序列的N末端处的丝氨酸残基。此N末端丝氨酸残基在一些情况下可以形成规范的S-X-X-E加帽盒,其通过牵涉丝氨酸侧链 γ 氧和谷氨酸残基多肽主链NH之间的氢键键合。此N末端加帽可以促进构成依照本披露第一个方面的清蛋白结合多肽的三螺旋域的第一 α 螺旋的稳定。

[0103] 由此,在一个实施方案中,另外的氨基酸包含位于多肽N末端的至少一个丝氨酸残基。换言之,ABD氨基酸序列前面有1个或多个丝氨酸残基。在清蛋白结合多肽的另一个实施方案中,另外的氨基酸包含位于ABD序列N末端的甘氨酸残基。理解ABD氨基酸序列前面可以有1个、2个、3个、4个或任意合适数目的氨基酸残基。由此,ABD氨基酸序列前面可以有单个丝氨酸残基、单个甘氨酸残基或两者的组合,如甘氨酸-丝氨酸(GS)组合或甘氨酸-丝氨酸-丝氨酸(GSS)组合。一种具有N末端丝氨酸的这类ABD的例子是SLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAA LP(SEQ ID NO:176)。对应的脱-脯氨酸形式会是SLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAAL(SEQ ID NO:177)。

[0104] 在又一个实施方案中,另外的氨基酸残基包含位于本文中限定的ABD多肽N末端处的丙氨酸,或在上文ABD序列的N末端处与丝氨酸组合为丙氨酸-丝氨酸序列。在又一个实施方案中,另外的氨基酸残基包含位于本文中限定的ABD多肽N末端处的谷氨酸。

[0105] 类似地,可以利用C末端加帽来改进构成清蛋白结合多肽的三螺旋域的第三 α 螺旋的稳定性。存在于上文限定的ABD氨基酸序列的C末端处的C末端脯氨酸残基可以至少部分起着作为加帽残基的作用。C末端处脯氨酸残基后的赖氨酸残基可以进一步促进清蛋白结合多肽的第三螺旋的稳定性,其通过赖氨酸残基的 ϵ 氨基基团和位于多肽主链中赖氨酸前面2个和3个残基的氨基酸羰基基团(例如上文限定的ABD氨基酸序列的亮氨酸和丙氨酸残基的羰基基团)之间的氢键键合。由此,在一个实施方案中,另外的氨基酸包含位于多肽C末端处的赖氨酸残基。

[0106] 如上文论述的,所述另外的氨基酸可能与清蛋白结合多肽的生成有关。具体地,当通过化学肽合成来生成依照第一个方面的清蛋白结合多肽时,C末端脯氨酸后的一个或多个任选的氨基酸残基可能提供益处。这类另外的氨基酸残基可以例如,防止在合成的二肽阶段时形成不期望的物质如哌嗪二酮(diketopiperazine)。这类氨基酸残基的一个例子是甘氨酸。由此,在一个实施方案中,另外的氨基酸包含在多肽C末端处的甘氨酸残基,其如上文所说明的紧接脯氨酸残基后或紧接另外的赖氨酸和/或甘氨酸残基后。或者,多肽生成可能受益于ABD氨基酸序列的C末端脯氨酸残基的酰胺化。在此情况下,C末端脯氨酸包含在羧基碳处的另外的胺基。

[0107] 技术人员已知用于完成C末端修饰的方法,如通过用于肽合成的不同类型的预制基质。

[0108] 在另一个实施方案中,另外的氨基酸残基包含位于多肽N和/或C末端处的半胱氨酸残基。这类半胱氨酸残基可以紧接如本文中限定的ABD氨基酸序列之前和/或之后,或可以紧接如上文描述的任何其它另外的氨基酸残基之前和/或之后。通过向多肽链添加半胱氨酸残基,可以获得用于清蛋白结合多肽的位点定向缀合的巯基。或者,可以以与引入半胱氨酸残基类似的方式将硒代半胱氨酸残基引入多肽链的C末端,以促进位点特异性缀合(Cheng等,NatProt1:2,2006)。

[0109] 在一个实施方案中,清蛋白结合多肽包含不超过2个半胱氨酸残基。在另一个实施方案中,清蛋白结合多肽包含不超过1个半胱氨酸残基。

[0110] 在另一个实施方案中,清蛋白结合多肽的另外的氨基酸残基包含用于纯化或检测该多肽的“标签”,如六组氨酸(His₆)标签,或用于与对标签特异性的和/或要用在纯化中的抗体相互作用的“myc”(“c-Myc”)标签或“FLAG”标签。技术人员知道其它备选。

[0111] 例如,在优选的工程化多肽实施方案中,ABD包含

[0112] LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP(SEQ ID NO:35),且其N末端延伸的ABD序列形式包含

[0113] SLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP(SEQ ID NO:176)和

[0114] GSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP(SEQ ID NO:178)。位置2中的丝氨酸将该序列加帽,使得相比于在该位置中具有甘氨酸或丙氨酸将T_m提高了约2°C。丙氨酸也可以紧接丝氨酸之前,如在ASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP(SEQ ID NO:179)中的。还优选的是在每一条上文ABD序列中不存在C末端脯氨酸、甘氨酸或两者的对应的多肽。因此,还优选其中ABD包含脱-脯氨酸形式的序列,该形式可以改进相比于亲本形式

[0115] LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL(SEQ ID NO:35)的产量,且其N末端延伸的ABD序列形式包含

[0116] SLAEAKVLANRELD KYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL(SEQ ID NO:177)和

[0117] GSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL(SEQ ID NO:180)和

[0118] ASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL(SEQ ID NO:181)。在本文中披露的任一条ABD序列的一个方面,对毒蜥外泌肽-4或毒蜥外泌肽类似物的接头是如本文中披露的包含甘氨酸的接头,例如G,GGG,GGG,GGGS(SEQ ID NO:192),TGGGGAS(SEQ ID NO:193),

[0119] TGGGGGAS(SEQ ID NO:194)或TGGGGSAS(SEQ ID NO:195)。

[0120] 在本文中披露的任一条ABD序列的一个方面,对毒蜥外泌肽-4或毒蜥外泌肽类似物的C末端的接头是如本文中披露的包含甘氨酸的接头,例如G,GGG,GGG,GGGS,TGGGGAS,TGGGGGAS和TGGGGSAS。

[0121] 在本文中描述的工程化多肽,特别是那些其C末端以脯氨酸或其它已知在肽合成期间外消旋的氨基酸结束的工程化多肽的一个实施方案中,可以向C末端加入甘氨酸以抵消C末端氨基酸残基的外消旋化带来的潜在问题。或者,C末端氨基酸可以处于其(α -氨基)酰胺化形式,例如脯氨酸对脯氨酸酰胺,而不是以甘氨酸结束。然而,如果期望通过重组而不是化学合成来生成酰胺化的多肽,那么可以通过本领域中已知的数种方法来实施C末端氨基酸的酰胺化,例如使用酰胺化PAM酶。

[0122] 工程化多肽的另一个方面是ABD可以提供难溶或低可溶性毒蜥外泌肽变体的水性溶液中溶解度的增加。该特性可以由ABD自身赋予,或由于工程化多肽在体内或体外结合至高度可溶的清蛋白而来的复合物,该结合增加了工程化多肽在水性溶液中的溶解度。由此,在另外这一方面的实施方案中,提供了组合物,其包含本身在水中具有不超过1mg/ml、或不超过2mg/ml、或不超过5mg/ml的溶解度的毒蜥外泌肽化合物,其共价偶联至清蛋白结合域作为如本文中描述的融合蛋白或缀合物,其中所述化合物和清蛋白结合多肽、融合蛋白或缀合物是共价偶联的,且工程化多肽的溶解度大于未融合(或未缀合的)的天然毒蜥外泌肽化合物。

[0123] 结合清蛋白。血清清蛋白是哺乳动物血清中最丰富的蛋白质(40g/L;在人中约0.7),其中它结合多种分子,包括但不限于脂质和胆红素(Peters T,1985,Advances in Protein Chemistry37:161)。已经观察到血清清蛋白的半衰期与动物的大小直接成比例,其中例如人血清清蛋白(HSA)具有19天的半衰期且兔血清清蛋白具有约5天的半衰期(McCurdy TR等,J.Lab.Clin.Med.143:115,2004)。人血清清蛋白广泛分布于体内,尤其是在肠和血液区室中,其中它主要牵涉渗量的维持。结构上地,清蛋白是包含3个同源域和总计584或585个氨基酸的单链蛋白质(Dugaiczky L等,1982,Proc.Natl.Acad.Sci.USA79:71)。清蛋白含有17个二硫键和单个反应性巯基C34,但缺乏N连接和O连接的碳水化合物模块(Peters,1985,同上;Nicholson JP等,2000,Br J Anaesth85:599)。缺乏糖基化使得清蛋白的重组表达简单化。清蛋白的该特性,加上其三维结构为已知的这一事实(参见例如He,XM和Carter,DC,Nature358:2091992),已经使其成为用于重组融合蛋白的有吸引力的候选物。这类融合蛋白一般在单个多肽链中组合治疗性蛋白(在施用该蛋白本身时其会被从体内快速清除)和血浆蛋白(其展现出天然的缓慢清除)(Sheffield WP,Curr.DrugTargets Cardiovasc.Haematol.Disord.1:12001)。这类融合蛋白在需要不那么频繁的注射和体内治疗性蛋白的更高水平中可以提供临床优点。然而,本文中的工程化多肽不与清蛋白缀合,而是含有允许对清蛋白的非共价结合的基序。

[0124] 清蛋白半衰期。已经观察到清蛋白在不同物种中的半衰期一般遵循基于动物重量的异速生长律(allometric scaling)。例如,小鼠、大鼠、兔和人中的半衰期已经分别估算为1,1.9,5.6和19天。实际上,幂拟合分析(power fitting analysis)(Davies&Morris,1993,Pharm.Res.(N.Y.)10:1093-1095)提供了以下等式:

[0125] 清蛋白半衰期(天)= $3.75 \times \text{体重(kg)}^{0.368}$ 。

[0126] 其它实施方案。理解的是,还涵盖本文中披露的每种多肽包含位于N末端的甲硫氨酸,其符合其天然存在的第一个氨基酸的阅读框,例如Met-毒蜥外泌肽-4,其为具有添加的N末端甲硫氨酸的毒蜥外泌肽-4。还理解的是在C末端Gly出现在本文中列出的工程化多肽序列中的情况下,该残基可能在后续酰胺化期间丢失。一些实施方案是合成中的中间体,例如如那些具有用于如本领域中已知的亲和纯化的“His标签”,且任选地可以随后将其除去以得到适用于治疗用途的成熟工程化多肽。

[0127] 在本文中描述的任一种工程化多肽的一些实施方案中,毒蜥外泌肽类似物相对于亲本毒蜥外泌肽序列可以具有至少70%,例如70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或甚至更高的序列同一性。在一些实施方案中,所述亲本毒蜥外泌肽是毒蜥外泌肽-4,且毒蜥外泌肽类似物相对于毒蜥外泌肽-4可以具有至少70%,例如70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或甚至更高的序列同一性。如本领域中已知的,GLP-1(胰高血糖素样肽1)并非毒蜥外泌肽;且GLP-1的序列被明确从适合于本文中描述的工程化多肽的毒蜥外泌肽序列中排除。

[0128] 在一些实施方案中,提供具有如本文中描述的接头(例如L1)的化合物,所述接头将多肽激素域与ABD肽共价连接。在一些实施方案中,第一接头(L1)在工程化多肽内共价连接HD1。在一些实施方案中,L1是键。在一些实施方案中,多肽激素域(例如如本文中描述的HD1)可以经由肽接头共价连接至ABD肽。任何接头都是任选的;即任何接头都可以简单地作为键。当存在时,接头的化学结构并不重要,因为它主要起着间隔功能。在一个实施方案中,接头包含由肽键连接的1至30个氨基酸。所述氨基酸可以选自20种天然存在的(即生理学上的)氨基酸。或者,可以通过化学合成、翻译后化学修饰或通过由宿主细胞中的重组表达通过体内掺入来掺入非天然的氨基酸。这些氨基酸中的一些可以是糖基化的。在另一个实施方案中,所述1至30个氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、和赖氨酸,以及另外选自天冬氨酸和谷氨酸。在另一个实施方案中,接头是由多数无空间位阻的氨基酸构成的,所述氨基酸如甘氨酸、丙氨酸和/或丝氨酸。“无空间位阻的”在习惯意义中指具有小侧链,例如0-2个非氢原子的氨基酸,从而使得相对于具有较大侧链的氨基酸例如Leu, Trp, Tyr, Phe等的空间位阻最小化。聚甘氨酸例如(Gly)₃, (Gly)₄(SEQ ID NO:125), (Gly)₅(SEQ ID NO:126)特别有用,聚丙氨酸、聚(Gly-Ala)、聚(Gly-Ser)也特别有用。带电荷的聚甘氨酸可以是有用的,且包含例如聚(Gly-Glu)(SEQ ID NO:127),聚(Gly-Lys)(SEQ ID NO:128),聚(Gly-Asp)(SEQ ID NO:129)和聚(Gly-Arg)(SEQ ID NO:130)基序(其中n可以是1至6)。接头的其它特定例子是(Gly)₃Lys(Gly)₄(SEQ ID NO:131);(Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂(SEQ ID NO:132);(Gly)₃Cys(Gly)₄(SEQ ID NO:133);和GlyProAsnGlyGly(SEQ ID NO:134)。Gly和Ala的组合以及Gly和Ser的组合特别有用。由此,在另一个实施方案中,肽接头选自下组:甘氨酸丰富的肽,例如Gly-Gly-Gly;序列[Gly-Ser]_n(SEQ ID NO:135),[Gly-Gly-Ser]_n(SEQ ID NO:136),[Gly-Gly-Gly-Ser]_n(SEQ ID NO:137)和[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n(SEQ ID NO:138),其中n为1,2,3,4,5或6,例如[Gly-Gly-Gly-Gly Ser]₃。“甘氨酸丰富的肽”指包含多个甘氨酸残基的多肽,优选地多数为甘氨酸残基,更优选地甘氨酸残基占优势。

[0129] 在某些实施方案中,可以使用带电荷的接头。这类带电荷接头可以含有相当数目的酸性残基(例如Asp, Glu等),或可以含有相当数目的碱性残基(例如Lys, Arg等),从而使得接头分别具有低于7或高于7的pI。如技术人员理解的,在所有其它因素相同的情况下,在

给定的接头中酸性或碱性残基的相对量越大,接头的pI会相应地更高或更低。这类接头会赋予本文中披露的工程化多肽以有利特性,如修饰肽pI(等电点),其可以转而增加这类多肽在特定pH处的溶解度和/或稳定性特征,如在生理学pH(例如包含在pH7.2和pH7.6之间),或在包含这类多肽的药物组合物中。如本领域中已知的,可以通过在某种组合物中配制来提高肽的溶解度,所述组合物具有比肽的pI高或低至少1个或超过1个pH单位的pH。

[0130] 举例而言,“酸性接头”是具有小于7;包含6和7之间;包含5和6之间;包含4和5之间;包含3和4之间;包含2和3之间;或包含1和2之间的pI的接头。类似地,“碱性接头”是具有高于7;包含7和8之间;包含8和9之间;包含9和10之间;包含10和11之间;包含11和12之间,或包含12和13之间的pI的接头。在某些实施方案中,酸性接头会含有选自下组的序列:[Gly-Glu]_n(SEQ ID NO:139);[Gly-Gly-Glu]_n(SEQ ID NO:140);[Gly-Gly-Gly-Glu]_n(SEQ ID NO:141);[Gly-Gly-Gly-Gly-Glu]_n(SEQ ID NO:142),[Gly-Asp]_n(SEQ ID NO:143);[Gly-Gly-Asp]_n(SEQ ID NO:144);[Gly-Gly-Gly-Asp]_n(SEQ ID NO:145);[Gly-Gly-Gly-Gly-Asp]_n(SEQ ID NO:146),其中n是1,2,3,4,5,6,7,8,9,10或更大;例如[Gly-Gly-Glu]₆。在某些实施方案中,碱性接头会含有选自下组的序列:[Gly-Lys]_n(SEQ ID NO:147);[Gly-Gly-Lys]_n(SEQ ID NO:148);[Gly-Gly-Gly-Lys]_n(SEQ ID NO:149);[Gly-Gly-Gly-Gly-Lys]_n(SEQ ID NO:150),[Gly-Arg]_n(SEQ ID NO:151);[Gly-Gly-Arg]_n(SEQ ID NO:152);[Gly-Gly-Gly-Arg]_n(SEQ ID NO:153);[Gly-Gly-Gly-Gly-Arg]_n(SEQ ID NO:154),其中n是1,2,3,4,5,6,7,8,9,10或更大;例如[Gly-Gly-Lys]₆。

[0131] 另外,可以制备具有某些结构性基序或特征如 α 螺旋的接头。例如,这类接头可以含有选自下组的序列:[Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]_n(SEQ ID NO:155),其中n是1,2,3,4,5,6,7,8,9,10或更大;例如[Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]₃,[Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]₄,或[Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]₅。本领域技术人员可以容易地测定任何特定接头序列的螺旋含量。

[0132] 除肽接头以外的生物相容性接头可以用于将毒蜥外泌肽的C末端共价附接至ABD或ABM序列的N末端。所述接头可以是生物相容性聚合物,优选地水可溶的,且更优选地约50kD至约5000kD,或约50kD至500kD,或约100kD至500kD。例示性的生物相容的水溶性聚合物接头是PEG接头,如-(CH₂-CH₂-O)_n-,其中n使得PEG接头可以具有100至5000kD,优选为100至500kD的分子量。这类接头可以是-NH-CH₂-CH₂-(O-CH₂-CH₂)_n-O-CH₂-CO-,其中n使得PEG接头可以具有100kD至5000kD,优选为10kD至500kD的分子量。可以使用其它生物相容性聚合物,如包括但不限于多糖、聚丙二醇、以及丙烯和乙二醇的共聚物。通常这类接头在各端可以包含反应性基团,其可以是相同或不同的反应性基团。这类具有反应性基团的接头是已知的且可获的。优选地,所述反应性基团与肽的N末端氨基或C末端羧基是反应性的。例如,反应性基团可以是丁醛、丙醛、醛、琥珀酰亚胺或马来酰亚胺模块,如本领域中已知的。不那么优选的是烷基接头如-NH-(CH₂)_n-C(O)-,其中n=2-20,且其可以进一步被任何无空间位阻肽功能的基团取代,所述基团如低级烷基(例如C₁-C₆)、低级酰基、卤素、CN和NH₂。

[0133] 还应当理解的是适合依照本发明使用的接头可以具有一种或多种上文和本文所描述的特征和基序。例如,接头可以包括酸性接头以及结构性基序如 α 螺旋。类似地,接头可以包含碱性接头和结构性基序如 α 螺旋。接头可以包含酸性接头、碱性接头和结构性基序如 α 螺旋。另外,还应当理解的是依照本发明的工程化多肽可以具有超过1种接头,且这类接头中每一种都可以具有一种或多种上文所描述的特征。

[0134] 本文中描述的接头是例示性的,且在本发明范围内的接头可以长得多并可以包含其它残基。在一个实施方案中,明确排除了其中毒蜥外泌肽序列没有接头而直接连接至ABD序列的工程化多肽。

[0135] 在一些实施方案中,所述工程化多肽在C末端处包含ABD序列,且在N末端包含HD1序列。在某些优选的实施方案中,N末端为毒蜥外泌肽序列、毒蜥外泌肽片段序列或毒蜥外泌肽类似物序列。另外对于包含ABD和HD1的实施方案,所述工程化多肽可以具有结构HD1-ABD。

[0136] 理解的是,在没有明确指示本文中列出的工程化多肽的N末端和/或C末端的情况下,要从N末端向C末端方向读取工程化多肽。例如,在HD1具有毒蜥外泌肽化合物或其类似物的序列的情况下,术语HD1-ABD,HD1-L1-ABD,HD1-ABD等意指,在没有明确指示N末端和/或C末端的情况下,毒蜥外泌肽序列或其类似物位于工程化多肽的N末端,且ABD位于C末端。相反地,如果明确指示了N末端和/或C末端,那么要依照对末端的明确指示来读取工程化多肽。例如,术语HD1_{C-term}-ABD,HD1-L1-ABD_{N-term}等意味着ABD位于工程化多肽的N末端,且HD1位于C末端。

[0137] 在一些实施方案中,本文中描述的工程化多肽对血清清蛋白的亲合力不同于单独的ABD多肽(即在缺乏融合的激素域的情况下)的亲合力。为了获得有效的结合,所述工程化多肽可以对血清清蛋白具有结合亲合力,从而使解离常数 K_D 为例如低于约 $10^{-6}M$, $10^{-7}M$, $10^{-8}M$, $10^{-9}M$, $10^{-10}M$, $10^{-11}M$, $10^{-12}M$, $10^{-13}M$, $10^{-14}M$ 或甚至 $10^{-15}M$ 。在一些实施方案中,该亲合力并非是十分紧的,使得工程化多肽可以从清蛋白解离并引发生物学应答,例如结合至受体如毒蜥外泌肽受体。可以如记载于PCT公开申请No.WO2009/016043中的来测量亲合力(优选地对人血清清蛋白),该申请通过提述完整并入本文并用于所有目的,包括但不限于测定法和合成方法。

[0138] 在一些实施方案中,本文中描述的工程化多肽优于相应的化合物,所述化合物具有缀合至激素域的可以延长血浆半衰期的不同模块(例如PEG或Fc的或清蛋白)。在此背景中,术语“优于”指可以在评估疾病或病症的治疗中权衡的多种功能特性。例如,本文中描述的工程化多肽可以比具有缀合至激素域的不同模块的相应化合物需要更少的生物学活性(激素域)组分,例如比它少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍或甚至更少。对于另外的例子,本文中描述的工程化多肽可以具有更高的效力,例如1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍或甚至更高的效力。

[0139] 本文中涵盖的工程化多肽包括如下表2中列出的化合物。一种优选的化合物是化合物31。

[0140] 表2.选出的例示性工程化多肽

[0141]

化合物	序列
5	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS ASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHIL AALP (SEQ ID NO:40)
6	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS GGGSGGGSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAK TVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:41)
7	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGGASL AEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL P (SEQ ID NO:42)
8	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSGGG SGGGSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEG VEALKLHILAALP (SEQ ID NO:43)
10	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSSASLAEAKVLA

[0142]

化合物	序列
	NRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:51)
15	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASL AEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL P (SEQ ID NO:163)
21	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAE AKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:99)
23	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLSE AKEMAIRELDANGVSDFYKDKIDDAKTVEGVVALKDLILNSLP (SEQ ID NO:169)
24	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAK AKADAIEILKKYGIGDYYIKLINNGKTAEGVTALKDEILASLP (SEQ ID NO:170)
31	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEA KVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO: 95)
32	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELD KYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO: 97)
33	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKV LANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO: 96)
34	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS ASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHIL AALP (SEQ ID NO:55);

[0143] 本文中涵盖的另外的多肽化合物包括如在下表3A中列出的化合物:

[0144] 表3A. 选出的例示性工程化多肽

[0145]

化合物	序列
9	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSG GGASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALK

[0146]

化合物	序列
	LHILAALP (SEQ ID NO:53)
11	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSG GGASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRAKL LHILAALP (SEQ ID NO:62)
12	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGASLAEAKVL ANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRAKLHILAALP (SEQ ID NO:67)
19	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGG SASYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:166)
20	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGYGV SDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:167)

[0147] 具体涵盖了其中不存在N末端甲硫氨酸的上文序列的化合物。N末端甲硫氨酸主要为了便于细菌表达而存在。然而,本发明的工程化肽可以在真核宿主细胞(例如酵母(例如毕赤酵母(Pichia))、哺乳动物、杆状病毒)或具有翻译后N末端蛋白水解加工的其它宿主细胞中表达而得到N末端氨基酸,如在期望的激素或ABD序列(即没有添加的甲硫氨酸或其它前导序列)的天然存在的成熟肽对应物中发现的。或者,用于表达和/或分泌(和甚至纯化)的N末端序列可以是一种例如通过使用蛋白酶如TEV可以翻译后除去的N末端序列。

[0148] 本文中涵盖的另外的工程化多肽化合物(具有多种HD1,L1和ABD组分)包含具有本文列表中的任一种工程化多肽(包括在下表3B中披露的那些)的结构化合物。

[0149] 表3B.选出的例示性工程化多肽

[0150]

序列
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGASLAEAKVLANRELD KYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:51)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGASLAEAKVLANRELD KYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:52)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSGGGSGASL

[0151]

序列
AEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:53)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSGGGASL AEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:54)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSGGGSLAE AKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:55)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSGGGSG GGSGGGSGGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKL HILAALP (SEQ ID NO:56)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSGGGSLAEAK VLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:57)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSGGGSGGG SGGGSGGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHIL AALP (SEQ ID NO:58)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKTGGGG SGGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:59)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKTGGGG SGGGSGGGGGGGSGGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (SEQ ID NO:60)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGSLAEAKVLA NRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:61)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSGGGASL AEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:62)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSGGGSLAE AKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID

[0152]

序列
NO:63)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSGGGSG GGSGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKL HILAALP (SEQ ID NO:64)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGGSASLAEAKV LANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:65)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSGGGSGGGSG GGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILA ALP (SEQ ID NO:66)
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNTGGGGGSASLAEAKVLANRELD KYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:67)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNTGGGGGSASLAEAKVLANRELD KYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:68)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSGGGGSASL AEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:70)
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGGSASLAE AKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:71)
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSGGGSG GGSGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKL HILAALP (SEQ ID NO:72)
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGGSASLAEAK VLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:73)
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSGGGSGGG SGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHIL AALP (SEQ ID NO:74)
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKTGGGG

[0153]

序列
SASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:75)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKTGGGG SGGGSGGGSGGGGSAS LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:76)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLA NRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:77)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLA NRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:78)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANRE LDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:79)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVS DFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:80)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVS DFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:81)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLA NRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:82)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANR ELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:83)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKGGGLA EAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:84)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLA NRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:85)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVS DYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:86)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLA NRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:87)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANRE

[0154]

序列
LDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:88)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:89)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:90)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:91)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:92)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:93)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:94)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:95)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:96)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:97)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:98)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:99)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:100)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:101)

[0155]

序列
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGGSLAEAKVLANRELDKYGVS DYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:102)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKVLA NRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:103)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANRE LDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:104)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNNGGSLAEAKVLANRELDKYGVS DYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:105)
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNNGGSLAEAKVLANRELDKYGVS DYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:106)
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKVLA NRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:107)
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANR ELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:108)
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKGGSLA EAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:109)

[0156] III. 设计和生成方法

[0157] 构建体的设计。可以在氨基酸水平上设计本文中描述的工程化多肽。然后,可以使用本领域中已知的多种软件产品回译(back translate)这些序列,从而例如针对基于期望的表达宿主的蛋白质表达、密码子优化、限制性位点内容优化核苷酸序列。例如,可以针对基于大肠杆菌的蛋白质表达和限制性位点内容优化核苷酸序列。基于感兴趣的核苷酸序列,可以为多步PCR提供重叠的寡核苷酸,如本领域中已知的。可以在本领域中公知的条件下在多重PCR反应中使用这些寡核苷酸以建立编码感兴趣蛋白质的cDNA。一个例子是1X Amplitaq缓冲液、1.3mM MgCl₂、200uM dNTP、4U Amplitaq Gold、0.2uM每种引物(Amplitaq Gold, ABI),循环参数为:(94C:30秒、58C:1分钟、72C:1分钟),35个循环。

[0158] 如本领域中已知的,可以将限制性位点添加至PCR产物的末端以在载体连接中使用。特定的位点可以包括NdeI和XhoI,使得cDNA然后可以在pET45b表达载体(Novagen)中的合适的阅读框中。通过使用这些位点,可以除去此载体中的任何N端His标签,因为那样的话翻译起始位点会在该标签的下游。一旦完成表达构建物,如本领域中已知的,可以使用例如T7启动子引物、T7终止子引物和标准ABI BigDye Term v3.1方案通过测序进行验证。可以从例如ABI3730DNA分析仪获得序列信息,并且可以使用Vector NTI v.10软件(Invitrogen)对其分析。可以以模块方式设计表达构建体,从而可以容易地切出并改变接

头序列,如本领域中已知的。

[0159] 可以将本领域中已知的或本文中描述的蛋白酶识别位点掺入构建体中,该构建体可用于本文中描述的重组工程化多肽的设计、构建、操作和生成。

[0160] 例示性构建体.可用于生成本文中涵盖的工程化多肽的构建体包括编码下表4中列出的多肽的构建体。

[0161] 表4.用于生成工程化多肽的选出的例示性构建体

[0162]

化合物	序列
P1	MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGEFTSDLSKQMEEEAVRLFIE WLKNTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGV DFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:156)
P2	MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGEFTSDLSKQMEEEAVRLFIE WLKNTGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKT EGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:157)
P3	MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGEFTSDLSKQMEEEAVRLFIE WLKNTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGV DYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:158)
P4	MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGEFTSDLSKQMEEEAVRLFIE WLKNTGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKT EGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:159)
P5	MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDE IADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATK VGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHSHHHSSGLVPRGSGMK ETAALKFERQHMDSPDLGTENLYFQHGEFTSDLSKQLEEEAVR LFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASLAEAK

[0163]

化合物	序列
	VLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:160)
P6	MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDE IADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATK VGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHSHHHSSGLVPRGSGMK ETAAAKFERQHMDSPDLGTENLYFQHGEFTFTSDLSKQMEEEAV RLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASLAEAKVLANRELDK YGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:161)
P7	MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDE IADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATK VGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHSHHHSSGLVPRGSGMK ETAAAKFERQHMDSPDLGTENLYFQHGEFTFTSDLSKQMEEEAV RLFIEWLKNTGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINR AKTVEGVRALKLHILAALP (SEQ ID NO:162)

[0164] 通用生成方法。可以使用本领域中已知的生物学、化学和/或重组DNA技术来制备本文中描述的工程化多肽化合物。例示性方法记载于本文以及美国专利No.6,872,700; W02007/139941; W02007/140284; W02008/082274; W02009/011544; 和美国公开文本No.2007/0238669中,其披露内容通过提述完整并入本文并用于所有目的。本文中列出了其它用于制备所述化合物的方法。

[0165] 可以使用标准的固相肽合成技术,如自动化或半自动化的肽合成仪来制备本文中描述的工程化多肽。简单且通用地,可以分开制备ABD和治疗性激素肽然后将其缀合在一起,或者可以制备为单独的多肽。由此,清蛋白结合多肽、治疗激素或工程化多肽或者可以通过非生物学肽合成来生成,其使用氨基酸和/或反应性侧链受保护的氨基酸衍生物,所述非生物学肽合成包括逐步偶联所述氨基酸和/或氨基酸衍生物以形成反应性侧链受保护的依照第一个方面的多肽,从多肽的反应性侧链除去保护性基团,并在水性溶液中折叠该多肽。如此,使用正常的氨基酸(例如甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸)和经预保护的氨基酸衍生物在溶液中或在有机溶剂中的固体支持物上序贯建立多肽序列。当建立完整的多肽序列时,除去保护基,并允许多肽在水性溶液中折叠。

[0166] 依照本披露的各种多肽可逆地折叠,而ABD域可逆地折叠成三螺旋束域(无添加因子),且因此自发折叠。可以通过某方法生成工程化的缀合物,包括依照例如如本文中描述的任意方法(如通过非生物学肽合成)生成清蛋白结合多肽,并将生成的ABD多肽与本文中限定的治疗性激素缀合,本文中的ABD完全可逆地折叠。这是通过圆二色谱分析评估的;一种谱取于20°C,且第二种谱在加热至90°C接着回到20°C后取。在此规程中,测定如本领域中已知的T_m并发现其在变性多肽折叠后不变化。

[0167] 通常,使用这类技术,将用 α -N-氨基甲酰基保护的氨基酸和对树脂上的生长肽链附着的氨基酸于RT在惰性溶剂(例如二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮、二氯甲烷等)中存在偶联剂(例如二环己基碳二亚胺、1-羟基苯并三唑等)的情况下存在碱(例如二异丙基乙胺等)的情况下偶联。使用试剂(例如三氟乙酸、哌啶等)从所得的肽-树脂除去 α -N-氨基甲酰基保护基,并且用下一期望的、要对肽链添加的、用N保护的氨基酸重复偶联反应。合适的N保护基是本领域中公知的,如叔丁基氧羰基(t-butyloxycarbonyl)(tBoc)、苄基甲氧羰基(fluorenylmethoxycarbonyl)(Fmoc)等。可以从Applied Biosystems Inc.(Foster City, CA)购买溶剂、氨基酸衍生物和肽合成仪中使用的4-甲基二苯甲基胺树脂。

[0168] 对于化学合成,可以对工程化多肽使用固相肽合成,因为一般地,固相合成是一种具有向商业规模的卓越可扩展性的直接方法,且一般与相对长的工程化多肽相容。可以使用NMP/HOBt(选项1)系统和具有加帽的tBoc或Fmoc化学(参见Applied Biosystems ABI430A肽合成仪用户手册,版本1.3B1988年7月1日,第6部分,第49页-第70页,Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)用自动肽合成仪(430A型, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)来实施固相肽合成。可以用HF切割Boc-肽-树脂(-5°C 至 0°C , 1小时)。可以用交替的水和乙酸从树脂提取肽,并将滤液冻干。可以依照标准方法(例如Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems, Inc., 1990, 第6页-第12页)来切割Fmoc-肽树脂。也可以使用Advanced Chem Tech合成仪(MPS350型, Louisville, Ky.)来装配肽。

[0169] 也可以使用本领域中已知的方法,如Sambrook等, 1989, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第2版, Cold Spring Harbor使用重组DNA技术来制备本文中描述的化合物(毒蜥外泌肽、ABD、接头、工程化多肽)。可以通过本领域已知的方法来制备非肽化合物。例如,可以使用本领域中已知的方法,如记载于Bartlett等, 1986, Bioorg. Chem., 14:356-377的方法来制备含有磷酸的氨基酸和含有这类氨基酸的肽。可以使用本领域方法或如本文中描述的来缀合化合物。

[0170] 或者,可以通过本领域中公知的重组技术来生成工程化多肽。参见例如Sambrook等, 1989(同上)。可以从多核苷酸表达通过重组技术生成的这些工程化多肽。考虑到密码子选择的简并性,本领域技术人员会领会编码这类工程化多肽的多核苷酸(包括DNA和RNA)可以从野生型cDNA(例如毒蜥外泌肽-4)获得,并且在期望时可以进一步工程化改造以掺入指定的取代。这些多核苷酸序列可以掺入促进mRNA在微生物宿主中的转录和翻译的密码子。可以依照本领域中公知的方法容易地构建这类制造序列。参见例如W083/04053,其通过提述完整并入本文中并用于所有目的。任选地,上述多核苷酸还可以编码N端甲硫氨酰基残基。可用于本发明的非肽化合物可以通过本领域中已知的方法来制备。例如,可以使用本领域中已知的方法来制备含有磷酸的氨基酸和含有这类氨基酸的肽。参见例如Bartlett和Landen, 1986, Bioorg. Chem. 14:356-77。

[0171] 可以利用多种表达载体/宿主系统以含有并表达工程化多肽编码序列。这些包括但不限于微生物如用重组噬菌体、质粒或粘粒DNA表达载体转化的细菌;用酵母表达载体转化的酵母;用病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒, CaMV;烟草花叶病毒, TMV)转染或用细菌表达载体(例如Ti或pBR322质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。可用于重组蛋白质生成的哺乳动物细胞包括但不限于, VERO细胞、HeLa细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系、COS细胞(如COS-7)、WI38、BHK、HepG2、

3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562和293细胞。用于蛋白质重组表达的例示性方案是在本文中描述的和/或本领域中已知的。

[0172] 因而,多核苷酸序列可用于生成新的且有用的病毒和质粒DNA载体、新的且有用的经转化的和经转染的原核和真核宿主细胞(包括培养物中培养的细菌、酵母和哺乳动物细胞)、和新的且有用的方法,该方法用于能够表达本工程化多肽的这类宿主细胞的培养生长。编码本文中工程化多肽的多核苷酸序列在工程化多肽的生成不足会得到减轻或其水平升高的需要会得到满足的情况中可用于基因疗法。

[0173] 本发明还提供了用于本工程化多肽的重组DNA生成的方法。提供了用于从含有编码工程化多肽的核酸的宿主细胞生成工程化多肽的方法,包括:(a)在促进DNA分子表达的条件下培养含有编码工程化多肽的多核苷酸的宿主细胞;并(b)获得工程化多肽。

[0174] 宿主细胞可以是原核或真核的,并且包括细菌、哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、猴细胞、幼仓鼠肾细胞、癌细胞或其它细胞)、酵母细胞和昆虫细胞。

[0175] 用于表达重组蛋白质的哺乳动物宿主系统也是本领域技术人员公知的。可以对宿主细胞菌株选择加工表达的蛋白质或产生在提供蛋白质活性中会有用的某些翻译后修饰的特定能力。对多肽的这类修饰包括但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化和酰化。切割蛋白质的“前原(prepro)”形式的翻译后加工对于正确的插入、折叠和/或功能也可能是重要的。不同宿主细胞(如CHO、HeLa、MDCK、293、WI38,等等)对于这类翻译后活动具有特异性细胞机器和特征性机制,并且可以对其选择以确保对引入的外来蛋白质的正确修饰和加工。

[0176] 或者,可以采用酵母系统来生成本发明的工程化多肽。通过PCR扩增工程化多肽DNA的编码区。使用含有 α 交配因子基因的核苷酸1-20的一种引物和与此基因的核苷酸255-235互补的另一种引物在PCR反应中从酵母基因组DNA扩增编码酵母前原 α 前导序列的DNA(Kurjan和Herskowitz,1982,Cell,30:933-43)。将该前原 α 前导编码序列和工程化多肽编码序列片段连接到含有酵母醇脱氢酶(ADH2)启动子的质粒中,从而使该启动子指导由融合的前原 α 因子和成熟的工程化多肽组成的融合蛋白的表达。如由Rose和Broach(Rose&Broach,1990,Meth.Enz.,185:234-79,Goeddel编,Academic Press,Inc.,San Diego,CA)教导的,载体进一步包含在克隆位点下游的ADH2转录终止子、酵母“2微米”复制起点、酵母leu-2d基因、酵母REP1和REP2基因、大肠杆菌 β -内酰胺酶基因、和大肠杆菌复制起点。 β -内酰胺酶和leu-2d基因分别提供细菌和酵母中的选择。leu-2d基因还促进酵母中质粒的拷贝数增加以诱导更高水平的表达。REP1和REP2基因编码牵涉质粒拷贝数调节的蛋白质。

[0177] 使用已知的方法例如醋酸锂处理(Steams等,1990,.Meth.Enz.185:280-297),将前段中描述的DNA构建体转化到酵母细胞中。当耗尽生长培养基中的葡萄糖后诱导ADH2启动子(Price等,1987,Gene55:287)。前原 α 序列实现从细胞分泌融合蛋白。伴随地,酵母KEX2蛋白从成熟的工程化多肽切割前原序列(Bitter等,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA81:5330-5334)。

[0178] 也可以使用商品化的表达系统,例如毕赤酵母表达系统(Invitrogen,San Diego,CA)遵循制造商的用法说明书在酵母例如毕赤酵母(Pichia)中重组表达本发明的工程化多肽。此系统也依赖于前原 α 序列来指导分泌,但是插入物的转录在甲醇诱导后由醇氧化酶(AOX1)启动子驱动。从酵母生长培养基纯化分泌性工程化多肽,其通过例如用于从细菌和

哺乳动物细胞上清液纯化所述工程化多肽的方法进行。

[0179] 或者,可以将编码工程化多肽的DNA克隆到杆状病毒表达载体例如pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA)中。然后,依照制造商的指导(PharMingen)或已知的技术使用此工程化多肽编码载体来感染例如在sf9无蛋白质培养基中培养的草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞,及生成重组蛋白。使用本领域中已知的方法,例如肝素-Sepharose柱(Pharmacia, Piscataway, New Jersey)和序贯分子分筛柱(sequential molecular sizing column)(Amicon, Beverly, Massachusetts)从培养基纯化并浓缩蛋白质,并将其在合适的溶液,例如PBS中重悬。可以使用SDS-PAGE分析来表征蛋白质,例如通过显示确认期望的工程化多肽大小的单一条带来进行,全氨基酸氨基酸序列分析(例如Proton2090肽测序仪上的Edman测序),或其N端序列的确认也可以。

[0180] 例如,可以将编码预测的成熟工程化多肽的DNA序列克隆到含有期望的启动子和任选地前导序列的质粒中(参见例如Better等,1988, Science240:1041-1043)。可以通过自动化测序确认此构建体的序列。然后使用标准方法将该质粒转化到大肠杆菌菌株MC1061中,该方法采用CaCl₂温育和热休克处理细菌(Sambrook等,同上)。在补充有羧苄西林(carbenicillin)的LB培养基中培养经转化的细菌,并通过在合适的培养基中生长诱导表达蛋白质的生成。若存在的话,前导序列会影响成熟工程化多肽的分泌,并且在分泌期间被切割。通过本文中描述的方法从细菌培养基纯化分泌性重组工程化多肽。

[0181] 或者,可以在昆虫系统中表达工程化多肽。用于蛋白质表达的昆虫系统是本领域技术人员公知的。在一种这类系统中,将苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核型多角体病毒(AcNPV)用作载体在草地夜蛾细胞中或在粉纹夜蛾(*Trichoplusia*)幼虫中表达外来基因。将工程化多肽编码序列克隆到病毒的非必需区(如多角体蛋白基因)中,并置于多角体蛋白启动子的控制下。工程化多肽的成功插入会使得多角体蛋白无活性,并生成缺乏外壳蛋白外壳的重组病毒。然后,使用重组病毒来感染草地夜蛾细胞或粉纹夜蛾幼虫,其中表达本发明的工程化多肽(Smith等,1983, J. Virol. 46:584; Engelhard等,1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA91:3224-3227)。

[0182] 在另一个例子中,可以通过PCR扩增编码工程化多肽的DNA序列,并且将其克隆到合适的载体例如pGEX-3X(Pharmacia, Piscataway, New Jersey)中。pGEX载体设计为生成融合蛋白,其包含由载体编码的谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和由插入载体克隆位点中的DNA片段编码的蛋白质。可以生成包含例如合适的切割位点的PCR引物。然后,可以从融合蛋白的GST部分切割重组融合蛋白。将pGEX-3X/工程化多肽构建体转化到大肠杆菌XL-1Blue细胞(Stratagene, La Jolla, CA)中,并分离个别转化体,在LB培养基(补充有羧苄西林)中于37°C培养至波长600nm处光密度为0.4,接着在存在0.5mM异丙基β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)的情况下再温育4小时。将来自个别转化体的质粒DNA纯化,并使用自动化测序仪来部分测序以确认正确取向的期望的工程化多肽编码基因插入物的存在。

[0183] 当预期在细菌中以不溶性包含体生成时,可以如上文描述的或如下纯化融合蛋白。通过离心收获细胞;在0.15M NaCl, 10mM Tris, pH8, 1mM EDTA中清洗;并用0.1mg/mL溶菌酶(Sigma Chemical Co.)于RT处理15分钟。通过超声处理使裂解液澄清,并通过以12,000xg离心10分钟使细胞碎片沉淀。将含有融合蛋白的团粒在50mM Tris, pH8, 和10mM EDTA

中重悬,在50%甘油上成层,并以6000xg离心30分钟。将团粒在无 Mg^{++} 和 Ca^{++} 的标准磷酸盐缓冲盐水溶液(PBS)中重悬。通过将重悬的团粒在变性SDS聚丙烯酰胺凝胶中分级来对融合蛋白进一步纯化(Sambrook等,见上文)。将凝胶在0.4M KCl中浸泡以显现蛋白质,将该蛋白质切出,并在缺少SDS的凝胶运行缓冲液中电洗脱。如果GST/工程化多肽融合蛋白在细菌中以可溶性蛋白质生成,那么可以使用GST纯化模块(Pharmacia Biotech)将其纯化。

[0184] 融合蛋白可以进行消化以从成熟的工程化多肽切割GST。将消化反应(0.5mL PBS中20-40 μ g融合蛋白,20-30个单位人凝血酶(4000U/mg(Sigma))于RT温育16-48小时,并在变性SDS-PAGE凝胶上加载以分级反应产物。将凝胶在0.4M KCl中浸泡以显现蛋白质条带。可以使用自动化测序仪(Applied Biosystems473A型,Foster City,CA)通过部分氨基酸序列分析确认与工程化多肽的预期分子量对应的的蛋白质条带的身份。

[0185] 在本发明工程化多肽的重组表达的特别例示性方法中,可以通过磷酸钙方法用在pCMV载体(5'CMV启动子,3'HGH多聚A序列)和pSV2neo(含有neo抗性基因)中含有工程化多肽cDNA的质粒共转染哺乳动物293细胞。在一个实施方案中,应当在转染前用ScaI将载体线性化。类似地,可以使用一种备选的构建体,其使用掺有neo基因的类似pCMV载体。从单一细胞克隆选择稳定的细胞系,其通过在含有0.5mg/mL G418(新霉素样抗生素)的生长培养基中有限稀释10-14天来进行。通过ELISA或Western印迹针对工程化多肽的表达筛选细胞系,并且扩大高表达细胞系以用于大规模生长。

[0186] 优选的是使用经转化的细胞进行长期、高产量的蛋白质生成,因此稳定表达是期望的。一旦用含有与期望的表达盒一起的选择标志物的载体转化这类细胞,可以允许细胞在将它们转换到选择培养基前在富集培养基中生长1-2天。选择标志物设计为赋予对选择的抗性,并且其存在允许成功表达导入序列的细胞的生长和回收。可以使用适合于细胞的组织培养技术增殖经稳定转化的细胞的抗性块。

[0187] 可以使用许多选择系统来回收已经经过转化以用于重组蛋白质生成的细胞。这类选择系统包括但不限于分别在tk、hgprt或aprt细胞中的HSV胸苷激酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶基因。还有,可以将抗代谢物抗性用作对以下基因选择的基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性;gpt,其赋予对霉酚酸的抗性;neo,其赋予对氨基糖苷G418的抗性;also,其赋予对绿磺隆(chlorsulfuron)的抗性;和hygro,其赋予对潮霉素的抗性。可用的其它可选择基因包括trpB(其允许细胞利用吡啶代替色氨酸),或hisD(其允许细胞利用组氨酸(histidinol)代替组氨酸)。为转化体的鉴定给出视觉指示的标志物包括花色素苷、 β -葡糖醛酸糖苷酶及其底物、GUS、和萤光素酶及其底物萤光素。

[0188] 可以使用自动化肽合成和重组技术的组合来生成本发明的工程化多肽。举例而言,可以合成或重组制备毒蜥外泌肽化合物和ABD的任一种或两者(以及任选地接头),然后使用本领域中已知的方法将其连接在一起,所述方法如“天然化学连接”或其已知变体,其中形成结合亲本化合物的酰胺键。参见例如美国专利No.6,326,468,其通过提述并入本文中并用于所有目的。或者,例如,本发明的工程化多肽可以含有修饰的组合,所述修饰包括缺失、取代、插入和通过PEG化(或其它模块,例如聚合物、脂肪酰基链、C端酰胺化)的衍生化。可以在各阶段中生成这类工程化多肽。在第一阶段,可以通过如描述的重组技术来生成中间工程化多肽,其含有缺失、取代、插入和其任意组合的修饰。然后,在如本文中描述的任选纯化步骤后,经由用合适的PEG化试剂(例如来自NeKtar Transforming Therapeutics,

San Carlos, CA)的化学修饰将中间工程化多肽PEG化(或进行其它化学衍生化,例如酰化、C端酰胺化)以产生期望的工程化多肽衍生物。本领域技术人员会领会,可以将上文所描述的规程一般化以适用于含有修饰的组合的工程化多肽,所述修饰选自缺失、取代、插入、衍生化和本领域中公知的且由本发明涵盖的其它修饰手段。

[0189] 可以通过使用甘氨酸氨基酸-C末端延伸前体来完成C末端酰胺化,所述前体在例如酵母(例如毕赤酵母)中作为将分泌到培养基中的 α -因子融合蛋白合成。纯化后,可以通过酶促酰胺化,例如肽基甘氨酸 α -酰胺化单加氧酶(PAM)将工程化多肽前体的C末端甘氨酸转化为酰胺。参见例如Cooper等,1989, *Biochem. Biophys. Acta*, 1014:247-258。亦参见美国专利6319685(其通过提述完整并入本文并用于所有目的),其教导了用于酶促酰胺化的方法,包括来自大鼠的 α 酰胺化酶,其在 α 酰胺化酶中为充分纯以展现出至少约25mU/mg蛋白的比活性,且足够免除蛋白水解杂质以适合用于从天然来源纯化或通过重组DNA技术生成的底物。

[0190] 可以通过本领域中已知的许多方法,包括如本文中描述的方法来纯化肽。在一种方法中,使用Waters Delta Prep3000系统通过RP-HPLC(制备型和分析型)纯化肽。可以使用C4、C8或C18制备柱(10 μ , 2.2X25cm; Vydac, Hesperia, CA)来分离肽,并且可以使用C4、C8或C18分析柱(5 μ , 0.46X25cm; Vydac)来测定纯度。可以将溶剂(A=0.1%TFA/水和B=0.1%TFA/CH₃CN)以1.0ml/分钟的流速投递至分析柱,以15ml/分钟投递制备柱。可以在Waters Pico Tag系统上实施氨基酸分析,并使用Maxima程序处理。可以通过蒸汽相酸水解(115°C, 20-24h)将肽水解。可以将水解产物衍生化,并通过标准方法分析(Cohen等, *THE PICO TAG METHOD: A MANUAL OF ADVANCED TECHNIQUES FOR AMINO ACID ANALYSIS*, 第11页-第52页, Millipore Corporation, Milford, Mass. (1989))。可以通过M-Scan, Incorporated(West Chester, Pa.)实施快速原子轰击分析。可以使用碘化铯或碘化铯/甘油来实施质量校正。使用飞行时间检测的等离子体解吸电离分析可以在Applied Biosystems Bio-Ion20质谱仪上实施。

[0191] 工程化多肽表达测定法。用于测定宿主细胞的蛋白质表达水平的方法是可行的。在以下典型的方案中例示了可用于测定宿主细胞的蛋白质表达水平的规程。用2 μ l质粒DNA(工程化多核苷酸的表达载体)转化约25 μ l BL21大肠杆菌细胞。可以将细胞铺板,并在37°C温育过夜或于室温(RT)在48小时期间里温育。可以选出单个菌落,并用于在4ml具有合适抗生素的LB培养基中培养起始培养物达约6小时。通过向900 μ l储液添加100 μ l 80%无菌甘油来制备甘油储液,然后可以将其温和混合并在-80°C贮存。对于TCP未诱导的样品可以取出250 μ l样品。可以用5 μ l起始培养物接种等分试样,例如2ml含有合适抗生素的Magic培养基,然后可以将其于37°C以300rpm温育过夜(长达24小时)。如本领域中已知的, Magic培养基是自身诱导的。或者,可以在250ml或125ml Thompson烧瓶中用60 μ l起始培养物接种60ml含有合适抗生素的Magic培养基,然后将其于30°C以300rpm温育过夜(长达24小时)。温育后,可以从每管取出250 μ l培养物,并将细胞沉淀。可以将细胞在1ml 50mM Tris pH8, 150mM NaCl中重悬,可以对其添加0.1体积(100 μ l) POP培养试剂和1 μ l r-溶菌酶(在r-溶菌酶缓冲液中以1:750稀释)。可以将混合物充分混合,并于RT温育至少10分钟。然后,将制备物以14000xg离心10分钟。可以将上清液(可溶性级分)取出并保留,并且可以制备样品以进行凝胶分析(15 μ l + 5 μ l LDS)。可以将剩余的包含体团粒通过超声处理在1ml 1% SDS中重悬。可以制备样品以进行凝胶分析(15 μ l + 5 μ l LDS)。对于未诱导的样品,可以添加1.0体积POP培养试剂和1 μ l r-溶

菌酶(在r-溶菌酶缓冲液中以1:750稀释)。可以将溶液充分混合,并于RT温育至少10分钟。这些样品可以不需要离心。然后,可以制备样品以进行凝胶分析(15ul+5ul LDS)。可以在1X MES缓冲液中运行非还原性NU-PAGE凝胶(4-12%),并用SimplyBlue微波方案染色。可以进行脱色过夜,如本领域中已知的。可以保留凝胶图像,并进行分析以测定蛋白质表达水平。

[0192] 可以如下表达并纯化工程化多肽。设计期望工程化多肽的蛋白质序列并使用商业化软件回翻为DNA序列以克隆到大肠杆菌表达载体中。以寡核苷酸获得核酸序列并使用标准PCR扩增技术连接在一起,或者使用标准限制酶从现有表达构建体消化出序列,然后又将其连接在一起。将表达感兴趣蛋白质的序列置于质粒pET45中,其具有用于可诱导表达的T7启动子。在通过测序验证了构建体后,纯化载体DNA并将其转化到表达宿主(通常为BL21(DE3))中。选出单个菌落以在4ml LB培养基中生长起始培养物达~6小时。通过向900ul储液加入100ul 180%甘油来制备甘油储液并储存于-80℃。任选地,保留500ul未诱导的样品用于凝胶分析。使用60ul起始培养物在125ml Thompson瓶中接种60ml培养物(例如MagicMedia™大肠杆菌表达培养基;Invitrogen, USA; 参见Glenn等, J. Biol. Chem. 2008, 283(19):12717-29),并于30℃过夜温育。取出250ul样品用于分析。通过离心收集成为团粒的细胞,并冷冻用于后续处理。如下实施细胞提取物的制备和用镍树脂的首次通过纯化。将大肠杆菌细胞团粒完全重悬于体积等于起始培养物体积的裂解缓冲液(50mM TrisHCl, 150mM NaCl, pH8.0)中。然后,使细胞以100psi 3次通过微射流仪(microfluidizer)(Microfluidics, MA)。将细胞提取物在16,000xg离心30分钟以除去碎片。向细胞提取物添加EGTA(150mM储液)至终浓度为3mM EGTA。然后,将裂解产物施加到已经清洗和预平衡的Ni-NTA Superflow柱上。接着在用50mL洗脱缓冲液(25mM TrisHCl, 50mM NaCl, 250mM咪唑, pH8.0)洗脱结合的蛋白质前,用加EGTA的裂解缓冲液(50mM TrisHCl, 150mM NaCl, pH8.0, 3mM EGTA)清洗结合至柱的蛋白质。His标签的切割和后续纯化如下。将洗脱的蛋白质用Amicon-Ultra15离心滤器装置(Millipore, USA)浓缩,然后用25mM TrisHCl, pH8.0, 50mM NaCl稀释以准备蛋白酶消化,其将HisTag从期望蛋白质的N末端切除。向蛋白质溶液加入0.1%β-巯基乙醇和1%Turbo TEV蛋白酶(2mg/mL, 10,000单位/mg; Exellgen, USA),将其混合并在室温温育达4小时并随后在4℃过夜。将Ni-NTA Superflow柱(Qiagen, USA)用50mM TrisHCl, 100mM NaCl, 45mM咪唑, pH8.0预平衡。将TEV消化反应物用50mM TrisHCl, 150mM NaCl, pH8.0稀释2倍。将稀释过的消化反应物小心地施加到Ni-NTA柱顶部并收集流经物。向该柱加入10mL 50mM trisHCl, 100mM NaCl, 45mM咪唑, pH8.0以洗脱任何未结合的蛋白质。收集来自柱的洗脱蛋白质并合并,然后使用大小排阻层析(2x, 用Superdex75HiLoad26/60柱, GE Healthcare Biosciences, USA)进行精制。使用EndoTrap Red(Lonza, Switzerland)依照制造商说明书除去任何剩余的细菌内毒素。

[0193] 包含体制备。对于在包含体级分中找到的工程化多肽,以下规程可以是有益的。对于每50ml培养物,可以将细胞团粒在最少100ml裂解缓冲液中重悬。在添加30ml时,可以使用10ml移液管来重悬,然后再用70ml冲洗管。可以将重悬的细胞溶液以100PSI(min)多次运行(例如4次通过)流过微射流仪(microfluidizer),注意贯穿整个过程将室在冰水中保持。可以以14000xg将流化的浆体离心20分钟(例如JLA10.5, 10,000rpm, 使用250ml nalgene瓶)。在用移液管尖端破坏后,可以将包含体团粒在冰上在冰冷的裂解缓冲液中用搅拌棒和搅拌盘于4℃重悬1小时。在用移液管尖端破坏后,可以将团粒在蒸馏H₂O中用搅拌棒和搅拌

盘于4℃第二次重悬1小时,接着以14000 $\times$ g离心15分钟。可以将上清液取出并弃去。可以于-80℃贮存所得物。

[0194] 蛋白质纯化。如本文中描述的,众多用于分离表达的多肽的方法是已知的。优选分泌的工程化多肽。然而,以下是如若形成包含体的一个例子。可以将包含体团粒在合适体积的溶解缓冲液(8M尿素或8M胍,50mM Tris,10mM DTT,pH7.75)中在RT溶解1小时。溶解的团粒可以以27000g离心20分钟。可以将经过滤(例如0.4 μ m)的上清液于RT逐滴转移到适当体积的重折叠缓冲液(50mM Tris-HCl,1M尿素,0.8M精氨酸,4mM半胱氨酸,1mM胱胺;pH8)中。然后,可以将所得物在温和混合的情况下置于4℃过夜或更长。可以将样品浓缩,并在4℃环境中使用GE Healthsciences AKTA FPLC™以1-2ml/分钟在凝胶过滤柱(Superdex7526/60)上运行。可以将含有合适蛋白质的级分经由SDS-PAGE鉴定,合并,并运行通过第二凝胶过滤柱。然后,可以将合并的蛋白质在Amicon滤器中浓缩至合适的浓度,并使用例如Endosafe PTS阅读器(Charles River)测定内毒素水平,如本领域中已知的。一旦蛋白质样品已经通过内毒素标准,那么就可以将其无菌过滤,分配成等分试样,并运行经过质量控制测定法。质量控制测定法可以包括分析型HPLC-SEC、非还原性SDS PAGE和RP HPLC-MS以获得大致质量。可以在1xPBS(137mM氯化钠、2.7mM氯化钾、4.3mM磷酸二钠、1.4mM磷酸单钾,pH7.2)中获得蛋白质,分配成等分试样,并速冻以于-70℃至-80℃贮存。

[0195] IV. 使用和治疗疾病的方法

[0196] 适应症。涵盖通过本文中描述的多肽化合物和方法有益治疗的多种疾病和病症。

[0197] 肥胖症和超重。肥胖症及其关联病症(包括超重)是美国和全世界的常见且严重的公共健康问题。上身肥胖症是2型糖尿病已知的最强的风险因子,并且是心血管疾病的强风险因子。肥胖症是高血压、动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、中风、胆囊疾病、骨关节炎、睡眠呼吸暂停、生殖病症如多囊卵巢综合征、乳腺癌、前列腺癌和结肠癌、以及全身麻醉并发症发生率增加的公认的风险因子。参见例如Kopelman,2000,Nature404:635-43。

[0198] 肥胖症缩短寿命,并且携带上文所列出的合并症,以及病症如感染、静脉曲张、黑棘皮病、湿疹、运动不耐(exercise intolerance)、胰岛素抗性、高血压血胆固醇过多、胆石症、矫形损伤(orthopedic injury)和血栓栓塞性疾病的严重风险。参见例如Rissanen等,1990,Br.Med.J.,301:835-7。肥胖症也是称作胰岛素抗性综合征或“综合征X”和代谢综合征的一组状况的风险因子。肥胖症和关联病症的全世界医学成本是巨大的。

[0199] 认为肥胖症的发病机制是多因素的。一个问题是,在肥胖的受试者中,营养利用度和能量消耗不进入平衡,直到存在有过量的脂肪组织。中枢神经系统(CNS)控制能量平衡,并协调适合于动物代谢状态的多种行为的、自主的和内分泌的活动。控制这些活动的机制或系统在前脑(例如下丘脑)、后脑(例如脑干)和脊髓间广泛分布。最终,来自这些系统的代谢(即燃料利用度)和认知(即习得偏爱)信息得到整合,并且开启(进餐获取和启动)或关闭(进餐终止)参与食欲(食物寻找)和完成(摄食)行为的决定。认为下丘脑主要负责整合这些信号,然后向脑干发出命令。脑干核控制完成运动控制系统的元件(例如负责咀嚼和吞咽的肌肉)。因而,这些CNS核照字面意义称为构成摄取行为的“最终共同途径”。

[0200] 神经解剖学和药理学证据支持能量和营养稳态的信号在前脑核中整合,而且完成运动控制系统驻留于脑干核中,可能在围绕三叉神经运动核的区域中。在下丘脑和脑干之间有广泛的交互连接。多种CNS定向性抗肥胖症治疗剂(例如小分子和肽)主要聚焦于驻留

于下丘脑中的前脑基质和/或驻留于脑干中的后脑基质。

[0201] 肥胖症仍然是一种不太好治疗的、慢性的、基本上难治的代谢性病症。因而,需要可用于受试者中的重量减轻和/或重量维持的新疗法。这类疗法会对受试者的健康产生深刻的有益效果。

[0202] 糖尿病和心血管疾病。认为糖尿病是一种复杂的慢性疾病,其中糖尿病患者中占所有病例死亡的60%至70%是心血管并发症的结果。糖尿病不仅被视为冠心病风险等同体,而且还鉴定为不利事件的独立预测物,所述不利事件包括复发性心肌梗死、充血性心力衰竭、和心血管事件后的死亡。预期采用更紧密的葡萄糖控制和心血管风险因子的攻击性治疗会降低冠心病并发症的风险,并且改善糖尿病患者间的总体存活。然而,糖尿病患者比非糖尿病患者以2至3倍更可能经历急性心肌梗死,并且糖尿病患者比非糖尿病患者少活8至13年。

[0203] 了解糖尿病/急性心肌梗死患者的高风险性质,美国心脏病学会/美国心脏学会(American College of Cardiology/American Heart Association,“ACC/AHA”)不稳定心绞痛(unstable angina)或非ST-升高心肌梗死(统称为“ACS”)住院患者管理临床实践指南最近认为住院糖尿病患者是一个需要高血糖症攻击性管理的特殊群体。具体地,该指南宣称住院糖尿病/ACS患者的降葡萄糖疗法应当目标为达到小于10mg/dL的餐前葡萄糖、小于180mg/dL的最大每日目标(maximum daily target)、和小于7%的出院后血红蛋白A1c。

[0204] 在全国性老年ACS患者样本中,表明糖尿病患者中30天死亡率的增加与医院收治后具有较高葡萄糖值的患者一致。参见“Diabetic Coronary Artery Disease& Intervention,”Coronary Therapeutics2002,Oak Brook,IL,2002年9月20日。有越来越多的证据的是,医院收治后持续的高血糖而非短暂升高的葡萄糖与严重的不利事件相关。尽管不容易知道患者中高血糖和血管风险的理想度量,但是表现为住院期间的均值葡萄糖值对死亡率最具预测性。在来自美国的超过40家医院的ACS患者的不同研究中,发现与医院收治后的随机葡萄糖值形成对比,持续性高血糖对住院死亡率更具预测性。参见AcuteCoronary Syndrome Summit:A State of the Art Approach,Kansas City,MO,2002年9月21日。与收治后的葡萄糖值相比,在整个住院里葡萄糖控制的 $\log$ 回归模型对死亡率最具预测性。在120mg/dL上葡萄糖每升高10mg/dL,住院期间的死亡风险几乎增加2倍。在连续性糖尿病/ACS患者的一个较小分组中,随着医院收治后葡萄糖水平升高,存在有1年时死亡率的分级增加。在医院背景中,ACC/AHA指南建议启动攻击性胰岛素疗法以实现住院期间的较低血液葡萄糖。

[0205] 脂质调节疾病。血脂障碍是血液中正常脂质组分受破坏。认为延长的胰岛素水平的升高可以导致血脂障碍。高脂血是血液中存在升高或异常水平的脂质和/或脂蛋白。脂肪肝,例如非酒精性脂肪肝(NAFLD)指一大批肝病,其范围为简单的脂肪肝(脂肪变性(steatosis)),至非酒精性脂肪肝炎(NASH),至肝硬化(cirrhosis)(不可逆的、进行性肝瘢痕化)。NAFLD的所有阶段共同具有肝脏细胞(肝细胞)中的脂肪积累(脂肪浸润)。

[0206] 另外,不希望受任何理论束缚,认为2型糖尿病中的相对胰岛素缺陷、葡萄糖毒性、和通过经由门静脉从腹内脂肪组织投递的升高而增加的肝游离脂肪酸负荷暗示为脂肪肝病症的可能原因。实际上,已经假设进食行为是驱动肥胖症的代谢综合征及其许多必然结果(包括NASH)的关键因素。因而,如已经在2型糖尿病中证明的,针对减少食物摄取并增加

小餐次数的治疗可以有效治疗并预防NASH。促进胰岛素分泌和体重减少,并延迟胃排空的药物也有效改善葡萄糖耐受性,并且如此可以改善脂肪肝及其伴随的高胰岛素血症。如此,毒蜥外泌肽、毒蜥外泌肽类似物激动剂、毒蜥外泌肽衍生物激动剂,特别是毒蜥外泌肽-4的使用可以完全适合作为针对此状况的治疗形式。因而,本文中描述的工程化多肽(其包括毒蜥外泌肽或生物学活性(激素域)肽组分、或其片段或类似物)在治疗脂肪肝病症中可以是有益的。

[0207] 阿耳茨海默氏病。如本领域中已知的,阿耳茨海默氏病(AD)与脑中的斑块和缠结(其包括A- β 蛋白的失调)有关。已经报告了对神经元GLP-1受体的刺激在调节神经元可塑性和细胞存活中起着重要作用。已经报告了GLP-1诱导神经突长出并保护培养的神经元细胞中免于兴奋中毒性细胞死亡和氧化性损伤。报告了GLP-1和毒蜥外泌肽-4在小鼠大脑中降低淀粉样- β 肽(A- β 蛋白)的内源性水平并降低神经元中的 β -淀粉样前体蛋白(β -APP)的水平。参见例如Perry等,2004,Curr. Drug Targets 5(6):565-571。用本文中披露的工程化化合物治疗可以为与阿耳茨海默氏病相关的治疗靶物提供益处。

[0208] 帕金森氏病。帕金森氏病(PD)与“原发性帕金森综合征(parkinsonism)”(即由于无继发性系统起因的神经变性过程所导致的孤立的帕金森综合征)同义。帕金森综合征的特征在于由多巴胺丧失所导致的震颤、僵硬、和运动迟缓的症状。不希望受任何理论束缚的,认为毒蜥外泌肽-4可能通过作为小胶质细胞-钝化因子起作用来充当多巴胺能神经元的存活因子,并且表明毒蜥外泌肽-4可能是用于神经变性疾病如PD的一种有价值的治疗剂。

[0209] 代谢综合征X。代谢综合征X的特征为胰岛素抗性、血脂障碍、高血压、和脂肪组织的内脏分布,并且在2型糖尿病的病理生理学中起着枢要作用。还已经发现了它与NASH、纤维化、和肝损伤高度关联。因而,本文中描述的工程化多肽可用于治疗代谢综合征X。

[0210] 类固醇诱发的糖尿病。众所周知,糖皮质激素影响碳水化合物代谢。响应外源性糖皮质激素施用的,在周缘组织中观察到增加的肝葡萄糖生成和降低的胰岛素分泌以及胰岛素刺激的葡萄糖摄取。此外,糖皮质激素治疗改变了胰岛素原(P1)/免疫反应性胰岛素(IRI)比率,如本领域中已知的。在无糖尿病的受试者中由糖皮质激素诱发的高血糖症的典型特征包括空腹血糖的最小值提高、餐后高血糖逾常、对外源胰岛素的不敏感性、和对二甲双胍或磺酰脲疗法的无响应性。因此,本文中描述的工程化多肽(其包含毒蜥外泌肽生物学活性(激素域)肽组分、或其片段或类似物)可以在治疗类固醇诱发的糖尿病中有益。

[0211] 人免疫缺陷病毒(HIV)治疗诱发的糖尿病。在将人免疫缺陷病毒(HIV)-1蛋白酶抑制剂(PI)引入常规的临床使用后,很快就出现了将PT使用与高血糖症的产生关联的报告。尽管用PI治疗的约1%至6%的HIV感染受试者会产生糖尿病,但有相当大的比例会产生胰岛素抗性和受损的葡萄糖耐受性。因此,本文中描述的工程化多肽(其包含毒蜥外泌肽生物学活性(激素域)肽组分、或其片段或类似物)可以在治疗HIV治疗诱发的糖尿病中有益。

[0212] 成人中潜伏的自身免疫性糖尿病(LADA)。认为在诊断为2型糖尿病的患者中有约10%存在进展的自身免疫性糖尿病,亦称为成人中潜伏的自身免疫性糖尿病(LADA)。LADA患者具有针对胰岛细胞细胞质抗原或更经常地谷氨酸脱羧酶的循环抗体。这些受试者展现出1型和2型糖尿病两者的临床特征属性。尽管在自身免疫性糖尿病的缓慢进展形式中比快速进展形式更好地保留了胰岛素分泌,但LADA受试者中的胰岛素分泌倾向于随时间而衰退。

因此,本文中描述的工程化多肽(其包含毒蜥外泌肽生物学活性(激素域)肽组分、或其片段或类似物)可以在治疗LADA中有用。

[0213] 无知觉性低血糖症(HU)。即使仅仅在低血糖症的单次最近发作后,也可能发生防御性葡萄糖反调节(counterregulation)。经历重复的低血糖症发作的受试者经常不能识别通常与低血糖症相关的症状或即将来临的胰岛素休克(shock),一种称为“无知觉性低血糖症”的疾患。由于患者未意识到他或她的自身状态,血糖水平随后可能会降得如此之低,使得产生严重的神经学问题,包括昏迷和发作(seizure)。因此,本文中描述的工程化多肽(其包含毒蜥外泌肽生物学活性(激素域)肽组分、或其片段或类似物)可用于治疗HU。

[0214] 限制性肺病。已经在肺中局部化了GLP-1受体。毒蜥外泌肽可以经由GLP-1受体引发生物学应答。具体地,结节病是经常牵涉肺的系统性肉芽肿疾病。尽管结节病经典地被视为限制性肺病,但气道阻碍在过去若干年中已经变成该疾病的公认特征。结节病可以在任何水平上影响气道,且当牵涉包含了小气道时,其可能类似于更常见的阻碍性气道疾病,如哮喘和慢性支气管炎。因此,本文中描述的工程化多肽(其包含毒蜥外泌肽生物学活性(激素域)肽组分、或其片段或类似物)可以在治疗限制性肺病中有用,因为这类激素域肽可以改善肺的弹性或延迟刚性。

[0215] 短肠综合征(SBS)。已经报告了毒蜥外泌肽-4对于短肠综合征的治疗有效。参见Kunkel等Neurogastroenterol.Motil.(2011)。SBS是一种严重的临床病症,其特征在于腹泻和营养剥夺。由回肠中的L细胞生成的胰高血糖素样肽-1(GLP-1)调节近端肠运输。当发生大范围的回肠切除时,如在SBS中的,GLP-1水平可能是缺陷的。艾塞那肽(Exenatide)改善了患有SBS的患者的营养状态和肠症状。因此,SBS患者可以用本文中描述的工程化多肽治疗。可以实现肠频率和形态中的改善并获得不再与膳食相关的肠运动。一种另外的优点是,可以终止总的胃肠外营养。本文中的这些化合物会在SBS患者的肠习性、营养状态和生活质量中提供实质性改善,并还可以减少对胃肠外营养和小肠移植的需要。

[0216] 因此,在一个方面,提供了用于治疗受试者中疾病或病症的方法。所述受试者需要治疗该疾病或病症。在一些实施方案中,需要治疗的受试者是肥胖的。所述疾病或病症可以是糖尿病、超重、肥胖症、阿耳茨海默氏病、脂肪肝病、血脂障碍、冠心病、中风、SBS或高脂血、或本文中论述的其它疾病。糖尿病可以包括I型、II型糖尿病、妊娠糖尿病或前驱糖尿病以及HIV或类固醇诱发的糖尿病。治疗方法包括以能有效治疗该疾病或病症的量对受试者施用如本文中描述的工程化多肽。特别可用于这些疾病的是本文中描述的化合物,其具有降低葡萄糖的活性(例如连接于ABD的毒蜥外泌肽-4或其片段或类似物)、具有减轻体重或降低食物摄取的活性、降低HbA1c、延迟胃排空、降低血浆胰高血糖素和/或肠能动性的益处。

[0217] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是糖尿病、超重或肥胖症、或血脂障碍或高脂血。所述工程化多肽可以包含ABD和HD1多肽,和任选地接头K1,其中HD1是毒蜥外泌肽或其片段或类似物。因此,所述工程化多肽可以具有以下一种结构:HD1-ABD或HD1-L1-ABD。

[0218] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是糖尿病、超重、肥胖症、血脂障碍、阿耳茨海默氏病、脂肪肝病、SBS或高脂血。所述工程化多肽可以包含毒蜥外泌肽或其片段或类似物。因此,所述工程化多肽可以具有以下一种结构:HD1-ABD或HD1-L1-ABD。在一些实施方案中,工程化多肽中的毒蜥外泌肽是毒蜥外泌肽-4。在一些实施方案中,所述毒蜥外泌肽片段是

毒蜥外泌肽-4的片段。在一些实施方案中,毒蜥外泌肽类似物与毒蜥外泌肽-4具有至少70%,例如70%,75%,80%,85%,90%,95%或甚至更高的同一性。特别可用于这些疾病的是本文中描述的化合物,其具有降低葡萄糖的活性(例如连接于ABD的毒蜥外泌肽-4或其片段或类似物)、具有减轻体重或降低食物摄取的活性、降低HbA1c、延迟胃排空、降低血浆胰高血糖素和/或肠能动性的益处。

[0219] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是糖尿病、超重、肥胖症、血脂障碍、阿耳茨海默氏病、脂肪肝病、SBS或高脂血。所述工程化多肽可以包含毒蜥外泌肽或其片段或类似物。因此,所述工程化多肽可以具有以下一种结构:HD1-ABD或HD1-L1-ABD。在一些实施方案中,所述毒蜥外泌肽是毒蜥外泌肽-4。在一些实施方案中,所述毒蜥外泌肽片段是毒蜥外泌肽-4的片段。在一些实施方案中,所述毒蜥外泌肽类似物与毒蜥外泌肽-4具有至少70%,例如70%,75%,80%,85%,90%,95%或甚至更高的同一性。特别可用于这些疾病的是本文中描述的化合物,其具有降低葡萄糖的活性(例如连接于ABD的毒蜥外泌肽-4或其片段或类似物)、具有减轻体重或降低食物摄取的活性、降低HbA1c、延迟胃排空、降低血浆胰高血糖素和/或肠能动性的益处。所述工程化多肽可以仅包含毒蜥外泌肽或其类似物或片段作为激素域。

[0220] 所述疾病或病症可以是糖尿病、超重、肥胖症、血脂障碍、阿耳茨海默氏病、脂肪肝病、SBS、高脂血、帕金森氏病或心血管疾病、或本文中描述的其它疾病。所述工程化多肽可以包含毒蜥外泌肽或其片段或类似物。因此,所述工程化多肽可以具有以下一种结构:HD1-ABD或HD1-L1-ABD。在一些实施方案中,所述毒蜥外泌肽为毒蜥外泌肽-4。在一些实施方案中,所述毒蜥外泌肽片段是毒蜥外泌肽-4的片段。在一些实施方案中,所述毒蜥外泌肽类似物与毒蜥外泌肽-4具有至少70%,例如70%,75%,80%,85%,90%,95%或甚至更高的同一性。特别可用于这些疾病的是本文中描述的化合物,其具有降低葡萄糖的活性(例如连接于ABD的毒蜥外泌肽-4或其片段或类似物)、具有减轻体重或降低食物摄取的活性、降低HbA1c、延迟胃排空、降低血浆胰高血糖素和/或肠能动性的益处。

[0221] 可以由本文中描述的化合物和方法治疗的其它疾病和病症包括类固醇诱发的糖尿病、HIV治疗诱发的糖尿病、成人中潜伏的自身免疫性糖尿病(LADA)、非酒精性脂肪肝炎(NASH)和非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、无知觉性低血糖症(HU)、限制性肺病包括结节病、和代谢综合征X。所述工程化多肽可以包含毒蜥外泌肽或其片段或类似物。因此,所述工程化多肽可以具有以下一种结构:HD1-ABD或HD1-L1-ABD。在一些实施方案中,所述毒蜥外泌肽是毒蜥外泌肽-4。在一些实施方案中,所述毒蜥外泌肽片段是毒蜥外泌肽-4的片段。在一些实施方案中,所述毒蜥外泌肽类似物与毒蜥外泌肽-4具有至少70%,例如70%,75%,80%,85%,90%,95%或甚至更高的同一性。特别可用于这些疾病的是本文中描述的化合物,其具有降低葡萄糖的活性(例如连接于ABD的毒蜥外泌肽-4或其片段或类似物)、具有减轻体重或降低食物摄取的活性、延迟胃排空、降低HbA1c、降低血浆胰高血糖素和/或肠能动性的益处。所述工程化多肽可以仅包含毒蜥外泌肽或其类似物或片段作为激素域。所述疾病或病症可以是糖尿病、超重、肥胖症、血脂障碍、阿耳茨海默氏病、脂肪肝病、高脂血、帕金森氏病或心血管疾病、或本文中描述的其它疾病。

[0222] 可以由本文中描述的化合物和方法治疗的其它疾病和病症包括类固醇诱发的糖尿病、HIV治疗诱发的糖尿病、成人中潜伏的自身免疫性糖尿病(LADA)、非酒精性脂肪肝炎(NASH)和非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、无知觉性低血糖症(HU)、限制性肺病包括结节病、和

代谢综合征X。特别可用于这些疾病的是本文中描述的化合物,其具有降低葡萄糖的活性(例如连接于ABD的毒蜥外泌肽-4或其片段或类似物)。

[0223] V. 测定法

[0224] 用于生成和测定本文中描述的工程化多肽的方法一般是技术人员可获的。此外,具体的方法记载于本文以及本文引用的专利公开内容和其它引用内容中,其通过提述并入以用于此另外目的。

[0225] GLP-1受体结合和功能测定法:可以以任何数目的已知方法来测量GLP-1受体结合活性。例如,在一种方法中,使用结合置换测定法来测量结合活性,其中受体来源是RINm5F细胞膜,且配体是 $[^{125}\text{I}]$ GLP-1或碘化的毒蜥外泌肽(1-39)或碘化的毒蜥外泌肽(9-39)。将均质化的RINm5F细胞膜在20mM HEPES缓冲液中与40,000cpm $[^{125}\text{I}]$ GLP-1(或毒蜥外泌肽)示踪剂、以及各种浓度的测试化合物于23°C温育2小时,并不断混合。将反应混合物经由用0.3%PEI溶液预浸泡的玻璃滤器垫过滤,并用冰冷的磷酸盐缓冲盐水漂洗。使用闪烁计数器测定所结合计数。使用GraphPad Prism®软件(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)来计算结合亲和力。

[0226] 可以使用已知的方法和细胞和组织来实施功能性GLP-1受体活化的体外测定法。例如,对具有GLP-1受体的细胞的毒蜥外泌肽-4刺激可以诱导腺苷酸环化酶活化、cAMP合成、膜去极化中的增加、胞内钙升高和葡萄糖诱导的胰岛素分泌中的增加。参见例如Holz等,1995, J. Biol. Chem. 270(30):17749-57。可以使用利用了rMTC6-23(克隆6)细胞系的基于细胞的测定法,基于生成的cAMP来测定化合物的GLP-1受体激动剂活性。在该生物测定法的一个实施方案中,化合物的GLP-1受体激动剂活性通过与用6-23(克隆6)细胞的基于细胞的测定法中cAMP生成的相关性来定量测定。该基于细胞的测定法使用活的6-23(克隆6)细胞。所述6-23(克隆6)细胞可从美国典型培养物保藏中心作为ATCC® No. CRL-1607™和从欧洲细胞培养物保藏中心作为ECACC No. 87042206获得。在另一个实施方案中,所述基于细胞的测定法是均相时间分辨(homogeneous time-resolved)荧光测定法(HTRF®)。

HTRF®试剂盒是从Cisbio International(Bedford, Mass.)商业可获的。使用HTRF®试剂盒的方法是本领域中已知的且该试剂盒一般包含指导手册,例如关于如何准备样品、标准物、校正曲线并进行实验。基于细胞的均相时间分辨荧光测定法记载于美国专利No. 5,527,684(其公开内容通过提述并入本文中)和可从Cisbio HTRF® Product Center获得的文件访问No. 62AM4PEBrev02(2007年8月)。参见www.htfr.com/products/gper/camp/,其公开内容通过提述并入本文中。在一种优选的方法中,生物测定法在使用了HTRF® cAMP dynamic21,000测定试剂盒(可从Cisbio以目录No. 62AM4PEB获得)的基于细胞的测定法中使用了大鼠甲状腺癌6-23(克隆6)细胞。按照试剂盒中的说明书来准备HTRF®标准物和校正。可以在有或没有清蛋白的情况下实施测定法。

[0227] 可以使用已知方法来进行针对活性和作用持续时间以及药动学的体内测定法。例如,可以使用口服葡萄糖耐受测试(OGTT)来实施持续时间,其在口服施用葡萄糖之前的期望的时间点上对受试者施用药物(以测量药物作用持续时间;OGTT DOA),并测量葡萄糖血液水平(例如在鼠中容易地进行)。还可以使用静脉内葡萄糖耐受测试(IVGTT)来测量活性和持续时间,其中在IV施用葡萄糖之前的期望的时间点上对受试者施用药物(IVGTT

DOA),并测量血糖水平(例如可以在大鼠中容易地进行)。优选的工程化化合物在单次药物剂量施用后在血糖上具有的期望效果为至少24小时持续时间,优选地,在单剂药物后为至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、和至少1周的持续时间。

[0228] 例如,在紧接基线样品后 $t=0$ 时,将测试多肽皮下注射到NIH/Swiss雌性小鼠中。在期望的时间段,如第1天内的 $t=2,4$ 和8小时取血液样品,然后每天如此直至第5天或直至第7天或更长。用OneTouch® Ultra® (LifeScan, Inc., a Johnson&Johnson Company, Milpitas, CA)测量血糖。对于活性持续时间(DOA)的测定,如对于药物的葡萄糖控制活性,可以在药物施用后的期望点上实施OGTT或IVGTT。还可以测量体重、以及食物摄取、或其它药理学或药动学参数。例如,使雌性NIH/Swiss小鼠(8-20周龄)分组居住,有12:12小时的光照:黑暗周期,于0600开灯。除非如记载的,水和标准的球形小鼠食品饮食是随意可用的。在实验当天早上,将动物分为实验组并在约0630小时开始禁食。在典型研究中, $n=2$ 笼,有3只小鼠/笼。在时间 $=0$ 分钟时,取血糖样品,紧接着立即将媒介物或化合物以范围从约 1nmol/kg 至 25nmol/kg 的量腹膜内注射。可以在单剂后于30, 60, 120, 180和240分钟时测量血糖并每日如此达1周或更长。在该实验的变体中,在更长的时段如14或28天内每日一次或甚至每周一次地提供剂量。通过将在测量的时间点例如60分钟或1天时的血糖除以时间 $=0$ 分钟时的血糖来计算百分比(%)治疗前。通过ANOVA来鉴定显著的处理效果($p<0.05$)。当存在显著差异时,使用邓奈特氏检验(Prism® v.4.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA)将测试均值与对照均值进行比较。可以用OneTouch® Ultra® (LifeScan, Inc., a Johnson&Johnson Company, Milpitas, CA)测量血糖。*对媒介物对照的 $p<0.05$; ANOVA, 邓奈特氏检验。还可以测量其它参数。

[0229] 针对食物摄取抑制的体内测定法:对于工程化多肽,可以以各种已知的方法来测试其持续时间和食欲抑制程度以及其在体重降低上的持续时间和影响程度。例如,可以测试所述多肽在小鼠食物摄取测定法中的食欲抑制以及其在饮食诱发的肥胖(DIO)小鼠的体重增加上的影响。下文描述了这类测定法的实验方案。

[0230] 例如,使雌性NIH/Swiss小鼠(8-24周龄)成组居住,有12:12小时光照:黑暗周期,并在0600开灯。除非如记载的,水和标准的球形小鼠食品饮食是随意可用的。动物禁食开始于实验前一天,约1500小时。在实验当天早上,将动物分为实验组。在典型的研究中,为 $n=4$ 笼,有3只小鼠/笼。在时间 $=0$ 分钟,对所有动物进行媒介物或测试化合物的腹膜内注射,通常以范围从约 2nmol/kg 至 75nmol/kg 的量,并立即给予预先称重的标准食品量(10-15g)。在各时间,通常为30, 60, 和120分钟或更长时取出食物并称重(如每日地)以测定消耗的食物量(Morley, Flood等, 1994, Am. J. Physiol. 267: R178-R184)。通过从最初在时间 $=0$ 时提供的食物重量减去在例如30或60分钟时间点时剩余的食物重量来计算食物摄取。显著的治疗效果由ANOVA鉴定($p<0.05$)。在存在显著差异的情况下,使用邓奈特氏检验(Prism v.2.01, GraphPad Software Inc., San Diego, Calif.)将测试均值与对照均值进行比较。还可以测量体重。

[0231] 体重、脂肪重分配、和瘦体重测定法:还可以如下实施对体重和相关影响的测定法。在Sprague-Dawley大鼠中的饮食诱发的肥胖症(DIO)是研究肥胖和能量内稳态调节的一种有价值的模型。这些大鼠是从一种(Crl:CD®(SD)BR)大鼠系产生的,该大鼠系在有相

对高的脂肪和能量的饮食时倾向于变得肥胖。参见例如,Levin,1994,Am.J.Physiol.267:R527-R535,Levin等,1997,Am.J.Physiol.273:R725-R730。DIO雄性大鼠从Charles River Laboratories,Inc.(Wilmington,MA)获得。使大鼠在鞋盒状笼中于22°C、以12/12小时光照黑暗周期分开居住。以中度高脂肪饮食随意维持大鼠(32%kcal来自脂肪;Research Diets D1226B)。这些动物通常达到约500g的均值体重。使Levin DIO大鼠在7天时适应于笼居环境。在适应的3晚期间,动物接受媒介物的单次腹腔内(IP)注射。在测试日黑暗周期开始时,对大鼠施用化合物或媒介物(例如10%DMSO)的单次IP注射。贯穿研究的整个过程中,通过自动化食物摄取测量系统(BioDAQ,Research Diets)以5秒时间间隔来测量食物摄取。每晚记录体重。

[0232] 在药物处理之前或之后可以使用NMR(Echo Medical Systems,Houston,TX)来测量身体组成。对于身体组成的测量,将大鼠短暂置于(~1分钟)通风良好的树脂玻璃管中,然后将其插入到专门的啮齿动物NMR机器中。这使得能够计算出脂肪和干的瘦组织的实际克数的变化(例如处理后身体脂肪的克数-基线处的身体脂肪的克数=身体脂肪克数的变化)和脂肪和干的瘦组织的%身体组成中的变化(例如%处理后身体脂肪-%基线处身体脂肪=%身体脂肪中的变化)。所有数据都呈现为均值±SEM。将方差分析(ANOVA)和事后检验用于检验组差异。P值<0.05视为显著的。使用针对Windows的PRISM® 4(GraphPad Software, Inc.,San Diego,CA)来实施统计学分析和绘图。图和结果通常呈现为百分比体重、身体脂肪中的经媒介物校正的变化和身体蛋白质中的变化。

[0233] VI. 药物组合物

[0234] 在一个方面,提供了包含与药学可接受赋形剂(例如载体)组合的本文中描述的化合物的药物组合物。如本文中使用的,术语“药学可接受载体”指药用赋形剂,例如适合于肠或胃肠外应用的药学、生理学可接受的有机或无机载体物质,其不与活性剂有害地起反应。合适的药学可接受载体包括水、盐溶液(例如林格(Ringer)氏溶液等)、醇、油、明胶、和碳水化合物如乳糖、直链淀粉或淀粉、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、和聚乙烯吡咯烷。可以将这类制剂灭菌,并且在期望时与不与本发明的化合物有害地起反应的辅助剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、染料、和/或芳香物质等混合。

[0235] 在另一个方面,提供了药物组合物,其包含了如本文中描述的工程化多肽与药学可接受赋形剂的组合。在一个实施方案中,所述药物组合物是口服药物组合物,如本文中描述的。在一些实施方案中,所述药物组合物是长效药物组合物。术语“长效”在药物组合物施用的背景中指作用持续时间。因此,可以以例如1小时、2小时、4小时、8小时、12小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、1个月或甚至更长的时间间隔施用长效药物组合物。在一个实施方案中,施用为每日两次的。在一个优选的实施方案中,施用为每日一次的。在一个更优选的实施方案中,施用为每周一次的。在一些实施方案中,所述工程化多肽选自本文中表2、3A和3B中列出的工程化多肽。在一些实施方案中,所述工程化多肽选自本文中表2和3A中列出的工程化多肽。在一些实施方案中,所述工程化多肽选自本文中表2中列出的工程化多肽。

[0236] A. 配制剂

[0237] 可以对受试者单独地或者可以共施用本文中描述的工程化多肽。共施用意为包括单独或组合地(超过一种化合物)同时或序贯施用化合物。例如,已经发现了可以用包括瘦

蛋白(例如美曲普汀)和胰淀素(例如普兰林肽(pramlintide))的联合疗法有益地治疗肥胖症。参见例如美国公开的申请No.2008/0207512。因此,本文中描述的、包含ABD和毒蜥外泌肽化合物的、可用于治疗例如肥胖症和超重的工程化多肽可以单独施用以实现这类治疗,或者与瘦蛋白或瘦蛋白激动剂(例如美曲普汀)和/或胰淀素或胰淀素激动剂(例如普兰林肽)共施用。

[0238] 在一些实施方案中,本文中描述的配制剂和方法还提供了将毒蜥外泌肽、毒蜥外泌肽类似物或毒蜥外泌肽类似物激动剂工程化多肽与一种或多种抗糖尿病剂共施用,所述抗糖尿病剂如抗高血糖剂,例如胰岛素(包括常规的、短效的、长效的和基础胰岛素)、胰淀素、普兰林肽、二甲双胍和噻唑烷二酮类(thiazolidinediones)(包括罗西格列酮(rosiglitazone)和吡格列酮(pioglitazone))。

[0239] 在一些实施方案中,本文中描述的配制剂和方法进一步提供了与一种或多种胆固醇和/或甘油三酯降低剂共施用毒蜥外泌肽、毒蜥外泌肽类似物或毒蜥外泌肽类似物激动剂工程化多肽。例示性药剂包括HMG CoA还原酶抑制剂(例如阿托伐他汀(atorvastatin)、氟伐他汀(fluvastatin)、洛伐他汀(lovastatin)、普伐他汀(pravastatin)、罗苏伐他汀(rosuvastatin)、辛伐他汀(simvastatin));胆汁螯合剂(例如考来维仑(colesevelam)、考来烯胺(cholestyramine)、考来替泊(colestipol));贝特类(fibrates)(例如非诺贝特(fenofibrate)、氯贝丁酯(clofibrate)、吉非贝齐(gemfibrozil));依泽替米贝(ezetimibe)、烟碱酸、普罗布考(probuco1)、洛伐他汀/烟酸(niacin)组合;阿托伐他汀/氨氯地平(amlodipine)组合;和辛伐他汀/依泽替米贝组合。

[0240] 本披露提供了用作药物(即在疗法中使用)的组合物,因为所述毒蜥外泌肽化合物是有治疗活性的化合物,并且令人惊讶地在融合至ABD时保留活性。本文中具体地涵盖并例示了包含工程化多肽(液体或干剂形式)和任选地至少一种药学可接受载体和/或赋形剂的组合物。

[0241] 所述组合物能够在体内或体外结合清蛋白。在某些情况下,在活的生物体以外形成组合物与清蛋白的复合物,即向组合物加入外源性清蛋白可能是有益的。这类组合物可以是冻干的,只要制剂适合在环境温度储存。由此,本披露还提供了如上文限定的组合物,其进一步包含清蛋白如人血清白蛋白,且其任选地处于干剂形式。

[0242] 可以通过分开施用毒蜥外泌肽、毒蜥外泌肽激动剂、或毒蜥外泌肽类似物激动剂工程化多肽和第二药剂,或通过施用包含毒蜥外泌肽、毒蜥外泌肽激动剂、或毒蜥外泌肽类似物激动剂工程化多肽和第二药剂的单一的药物制剂来实现共施用。第二药剂的合适的剂量方案一般是本领域中已知的。

[0243] 在期望时,所述制备物还可以与如本领域中已知的其它活性物质(例如以减低代谢性降解)或其它治疗活性剂共施用。可以将本文中描述的毒蜥外泌肽工程化多肽与其它活性抗糖尿病剂或抗肥胖剂(如瘦蛋白或瘦蛋白激动剂和胰淀素或胰淀素激动剂化合物,例如包括达瓦林肽(davalintide)及其类似物的胰淀素)一起施用。

[0244] 胰淀素。胰淀素是由胰腺β细胞合成的肽激素,其响应营养物摄取而与胰岛素共分泌。胰淀素的序列在哺乳动物物种间高度保守,其与降钙素基因相关肽(CGRP)、降钙素、垂体中间叶激素、和肾上腺髓质素具有结构相似性,如本领域中已知的。胰淀素的葡萄糖调节作用补充胰岛素的葡萄糖调节作用,其通过经由抑制营养物刺激的胰高血糖素分泌调节循

环中葡萄糖出现的速率,并减缓胃排空来实现。在用胰岛素治疗的糖尿病患者中,普兰林肽(人胰淀素的一种合成的且等效的类似物)通过抑制不适当地升高的餐后胰高血糖素分泌并延缓胃排空来降低餐后葡萄糖偏移(excursion)。大鼠胰淀素、人胰淀素和普兰林肽的序列如下:

[0245] KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY(SEQ ID NO:6);

[0246] KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSSTNVGSNTY(SEQ ID NO:7);

[0247] KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSNTY(SEQ ID NO:8)。

[0248] 达瓦林肽。达瓦林肽,也称为“AC-2307”,是一种可用于治疗多种疾病适应症的有力的胰淀素激动剂。参见W02006/083254和W02007/114838,每篇通过提述完整并入本文中并用于所有目的。达瓦林肽是一种嵌合肽,其具有胰淀素或降钙素及其类似物的N端环区、降钙素或其类似物的 α -螺旋区的至少一部分的 α -螺旋区或具有胰淀素 α -螺旋区和降钙素 α -螺旋区或其类似物的一部分的 α -螺旋区、和胰淀素或降钙素的C端尾部区。人降钙素、鲑鱼降钙素和达瓦林肽的序列如下:

[0249] CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP(SEQ ID NO:9);

[0250] CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTNTGSGTP(SEQ ID NO:10);

[0251] KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY(SEQ ID NO:11)。

[0252] 不希望受任何理论束缚,认为胰淀素和达瓦林肽及其片段和类似物可要求C端酰胺化来引发完全的生物学应答。理解的是,可以在C端酰胺化胰淀素化合物,如本文中描述的那些胰淀素化合物,其包括胰淀素和/或达瓦林肽及其片段和类似物。

[0253] “胰淀素激动剂化合物”包括天然的胰淀素肽、胰淀素类似物肽、和其它具有胰淀素激动剂活性的化合物(例如小分子)。“胰淀素激动剂化合物”可以自天然来源衍生,可以是合成的,或可以自重组DNA技术衍生。胰淀素激动剂化合物具有胰淀素激动剂受体结合活性,并且可以包含氨基酸(例如天然的、非天然的或其组合),肽模拟物,化学模块等。使用胰淀素受体结合测定法或通过在比目鱼肌测定法中测量胰淀素激动剂活性,熟练技术人员会识别胰淀素激动剂化合物。在一个实施方案中,胰淀素激动剂化合物在胰淀素受体结合测定法中会具有约200nM或更低、约100nM或更低、或约50nM或更低的 IC_{50} ,所述胰淀素受体结合测定法诸如在本文、美国专利No.5,686,411、和美国公开文本No.2008/0176804(其公开内容通过提述完整并入本文并用于所有目的)中描述的胰淀素受体结合测定法。在一个实施方案中,胰淀素激动剂化合物在比目鱼肌测定法(如在本文中和美国专利No.5,686,411中记载的)中会具有约20nM或更低、约15nM或更低、约10nM或更低、或约5nM或更低的 EC_{50} 。在一个实施方案中,胰淀素激动剂化合物与^{25,28,29}Pro-人胰淀素具有至少90%或100%序列同一性。在一个实施方案中,胰淀素激动剂化合物是胰淀素(例如人胰淀素、大鼠胰淀素等)和降钙素(例如人降钙素、鲑鱼降钙素等)的肽嵌合物。合适的且例示性的胰淀素激动剂化合物还记载于美国公开文本No.2008/0274952中,其公开内容通过提述完整并入本文并用于所有目的。

[0254] 当与另一种活性剂共施用,可以同时或连续地施用一起或分开配制的化合物。由于本文中的工程化化合物固有就是长效的,因此它们适用于每日一次、每周或更长时间一次的施用。因此,在例如以每周一次施用毒蜥外泌肽工程化多肽剂量期间,另一种药剂可以按需要的以1剂或多剂施用,例如每日一次、每日两次、每周一次。

[0255] 已经报告了其它药剂如胰淀素化合物的单次或多次使用制剂。例如,已经配制并成功施用了以每日一次、两次和三次给药来治疗糖尿病和肥胖症的普兰林肽。

[0256] 这些药用化合物可以与药学可接受载体或稀释剂以及任何其它已知的佐剂和赋形剂一起配制,其依照常规技术如那些披露于E.W.Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中的常规技术进行。亦参见Wang等(1988)J.of Parenteral Sci.and Tech., Technical Report No.10,Supp.42:2S。

[0257] 一般而言,可以将工程化多肽配制成稳定的、安全的药物组合物以对患者施用。涵盖在本发明方法中使用的药物配制剂可以包含约0.01至1.0%(w/v),在某些情况下0.05至1.0%的工程化多肽、约0.02至0.5%(w/v)的乙酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐或谷氨酸盐缓冲物(其允许最终组合物的pH为约3.0至约7.0);约1.0至10%(w/v)的碳水化合物或多元醇张力调节剂,以及任选地,约0.005至1.0%(w/v)的选自下组的防腐剂:间甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、乙酯、丙酯和丁酯以及酚。如果配制的肽要包含在多次使用产品中,那么一般包含这类防腐剂。

[0258] 在一个具体的实施方案中,本工程化多肽的药用配制剂可以含有一定浓度范围的化合物,例如在这些实施方案中在约0.01%至约98%w/w之间、或在约1至约98%w/w之间、或优选地在80%-90%w/w之间、或优选地在约0.01%至约50%w/w之间、或更优选地在约10%至约25%w/w之间。可以使用足量的注射用水来获得期望的溶液浓度。

[0259] 若期望的话,也可以存在其它张力调节剂如氯化钠以及其它已知的赋形剂。在一些情况下,这类赋形剂可用于维持化合物的总体张力。可以以各种浓度将赋形剂包含在目前描述的配制剂中。例如,可以以下列浓度范围包含赋形剂:约0.02%至约20%w/w,优选地约0.02%和0.5%w/w之间,约0.02%至约10%w/v,或约1%至约20%w/w。另外,与目前制剂自身类似,可以以固态(包括粉末的)、液态、半固态或凝胶形式包含赋形剂。

[0260] 药用配制剂可以以各种形式,例如固体、液体、半固体或液体构成。如本文中使用的,术语“固体”意指涵盖此术语的所有正常使用,例如,粉末或冻干配制剂。目前描述的配制剂可以是冻干的。

[0261] 术语缓冲剂、缓冲溶液和缓冲的溶液在提及氢离子浓度或pH使用时,指系统(特别是水性溶液)在添加酸或碱后、或用溶剂稀释后对抗pH变化的能力。缓冲溶液(其在添加酸或碱时经历较小的pH变化)的特征在于,存在弱酸和该弱酸的盐、或弱碱或该弱碱的盐。前一种系统的一个例子是醋酸和醋酸钠。只要添加的水合氢离子和氢氧根离子的量不超过缓冲系统将其中和的能力,pH的变化就是略微的。

[0262] 如本文中描述的,多种液体媒介物适合用于工程化多肽的配制剂,例如水或水性/有机溶剂混合物或悬浮液。

[0263] 通过将配制剂的pH维持在通过本领域中已知的方法确定的范围中来增强如本文中描述的那样使用的工程化多肽配制剂的稳定性。在某些实施方案中,将配制剂的pH维持在约3.5至5.0或约3.5至6.5,在一些实施方案中约3.7至4.3或约3.8至4.2的范围中。在一些实施方案中,pH可以为约4.0、约5.0、约6.0、约7.0、约8.0、约9.0或甚至更高。在一些实施方案中,pH可以在生理学范围pH6-8,优选地pH7-7.6中。

[0264] 在某些实施方案中,具有工程化多肽的缓冲液是醋酸盐缓冲液(优选地,最终配制剂浓度为约1-5至约60mM)、磷酸盐缓冲液(优选地,最终配制剂浓度为约1-5至约30mM)或谷

氨酸盐缓冲液(优选地,最终配制剂浓度为约1-5至约60mM)。在一些实施方案中,缓冲剂是醋酸盐(优选地,最终配制剂浓度为约5至约30mM)。

[0265] 配制剂中可以包含稳定剂,但是并非是必要需要的。然而,如果包含的话,可用在本发明的实践中的稳定剂是碳水化合物或多元醇。可用在本发明实践中的合适稳定剂是约1.0至10%(w/v)碳水化合物或多元醇。多元醇和碳水化合物在其主链中具有相同特征,即-CHOH-CHOH-,其负责稳定化蛋白质。多元醇包括诸如山梨糖醇、甘露醇、甘油和聚乙二醇(PEG)等化合物。这些化合物是直链分子。在另一方面,碳水化合物如甘露糖、核糖、蔗糖、果糖、海藻糖、麦芽糖、肌醇和乳糖是可以含有酮或醛基团的环状分子。已经证明了这两类化合物在使蛋白质稳定化免于通过升高的温度及通过冷冻-融化或冷冻-干燥过程引起的变性中是有效的。合适的碳水化合物包括:半乳糖、阿拉伯糖、乳糖或对糖尿病患者没有不利影响的任何其它碳水化合物,即该碳水化合物没有代谢为在血液中形成大得不可接受的浓度的葡萄糖。适合于糖尿病的这类碳水化合物是本领域中公知的。蔗糖和果糖适合于在非糖尿病应用(例如治疗肥胖症)中与化合物一起使用。

[0266] 在某些实施方案中,如果包含稳定剂,那么用多元醇如山梨糖醇、甘露醇、肌醇、甘油、木糖醇和聚丙二醇/聚乙二醇共聚物以及具有分子量200,400,1450,3350,4000,6000,8000和甚至更高的各种聚乙二醇(PEG)使化合物稳定化。在一些实施方案中,甘露醇是优选的多元醇。本发明的冻干配制剂的另一个有用的特征在于,用用来维持其稳定性的相同配制剂组分维持本文中描述的冻干配制剂的张力。在一些实施方案中,甘露醇是优选的用于此目的的多元醇。

[0267] 美国药典(USP)宣称必须向包含在多剂量容器中的制剂添加抑制细菌或抑制真菌浓度的抗微生物剂。它们在使用时必须以足够的浓度存在,从而阻止在用皮下针和注射器、或使用其它侵入性投递手段(如笔型注射器)取出内容物的部分时疏忽引入到制剂中的微生物的增殖。必须评估抗微生物剂以确保与配方的所有其它组分的相容性,并且应当在总配方中评估其活性以确保在一种配制剂中有效的特定药剂在另一种中不是无效的。不罕见的是,发现一种特定的抗微生物剂在一种配制剂中会是有效的,但是在另一种配制剂中不是有效的。

[0268] 防腐剂在常见的药学意义中是阻止或抑制微生物生长并且可以为此目的添加到药物配制剂以避免随之发生微生物对配制剂的酸败的物质。尽管防腐剂的量不大,不过其可以影响肽的总体稳定性。

[0269] 尽管用在药物组合物中的防腐剂可以在0.005至1.0%(w/v)的范围内,在一些实施方案中单独的或与其它防腐剂组合的每种防腐剂的范围为:苯甲醇(0.1-1.0%)、或间甲酚(0.1-0.6%)、或酚(0.1-0.8%)或对羟基苯甲酸甲酯(0.05-0.25%)和乙酯或丙酯或丁酯(0.005%-0.03%)的组合。羟基苯甲酸酯类是对羟基苯甲酸的低级烷基酯。在Remington's Pharmaceutical Sciences(同上)中列出了每种防腐剂的详细描述。

[0270] 当处于液体形式时,工程化多肽可能没有吸附到玻璃容器中的玻璃上的趋势,因此可能不需要表面活性剂来进一步稳定化药物配制剂。然而,对于处于液体形式时确实具有这类趋势的化合物,应当在其配制剂中使用表面活性剂。然后,可以将这些配制剂冻干。表面活性剂经常因疏水性破坏及通过盐桥分离两者而引起蛋白质的变性。相对低浓度的表面活性剂可以施加有力的变性活性,这是由于表面活性剂模块与蛋白质上反应性位点之间

的强相互作用。然而,对此相互作用的审慎使用能使蛋白质稳定化而免于界面或表面变性。任选地,能进一步稳定化工程化多肽的表面活性剂可以以占总配制剂的约0.001至0.3%(w/v)的范围存在,且包括聚山梨酯80(即聚氧乙烯(20)山梨聚糖单油酸酯)、CHAPS®(即3-[(3-胆氨丙基)二甲基铵基]1-丙烷磺酸盐)、Brij®(例如Brij® 35,其为(聚氧乙烯(23)月桂醚)、泊洛沙姆(poloxamer)、或另一种非离子型表面活性剂。

[0271] 还可以期望添加氯化钠或其它盐以调节药物配制剂的张力,这取决于选择的张力调节剂。然而,这是任选的,并且取决于选择的具体配制剂。优选地,胃肠外配制剂可以是等张的或实质性等张的。

[0272] 优选的用于胃肠外产品的媒介物是水。可以通过蒸馏或反渗透来制备具有适合胃肠外施用的质量的水。注射用水是优选用在药物配制剂中的水性媒介物。

[0273] 有可能的是,其它成分可以存在于药物配制剂中。这类其它成分可以包括例如湿润剂、乳化剂、油、抗氧剂、膨胀剂、张力修饰剂、螯合剂、金属离子、油质媒介物、蛋白质(例如人血清清蛋白、明胶或蛋白质)和两性离子(例如氨基酸如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。另外,聚合物溶液或与聚合物的混合物提供肽受控释放的机会。当然,这类其它成分不应当不利地影响本发明的药物配制剂的总体稳定性。

[0274] 容器也是注射配制剂的组成部分,并且可以视为组件,因为没有完全惰性或不以某种方式影响其含有的液体的容器,特别若液体是水性的话。因此,具体注射液的容器选择必须基于容器以及溶液组成、和其会进行的处理的考虑。如果必要的话,也可以通过使用硼硅酸盐玻璃,例如Wheaton I型硼硅酸盐玻璃#33(Wheaton I型-33)或其等同物(Wheaton Glass Co.)使肽对小瓶玻璃表面的吸附最小化。对于制造可接受的类似硼硅酸盐玻璃小瓶和药筒(cartridge)的其它供应商包括Kimbel Glass Co., West Co., Bunder Glas GMBH和Form a Vitrum。可以通过在存在5%甘露醇和0.02%Tween80的情况下在Wheaton I型-33硼硅酸盐血清小瓶中配制并冻干至化合物终浓度为0.1mg/ml和10mg/ml使化合物的生物学和化学特性稳定化。

[0275] 对于要通过注射投递的配制剂,为了允许将针从皮下注射器导入多剂量小瓶中并在取出针时就提供再密封,优选地,将每个小瓶的开口端用由铝带适当固定的橡皮塞闭合物密封。

[0276] 可以将玻璃小瓶的塞子如West4416/50, 4416/50(以特氟纶(Teflon)为表面)和4406/40、Abbott5139或任何等同的塞子用作注射用药物的闭合物。对于包含肽性抗肥胖症药剂的配制剂,这些塞子与肽以及配制剂其它组分是相容的。发明人还已发现,这些塞子在使用患者使用模式测试时通过了塞子完整性测试,例如塞子可以经受至少100次注射。或者,可以将肽冻干入小瓶、注射器或药筒中以用于随后的重建。可以将本发明的液体配制剂填充到1或2室的药筒、或1或2室的注射器中。

[0277] 上文所描述的药物配制剂的每种组分是本领域中已知的,且记载于PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS: PARENTERAL MEDICATIONS, 第1卷, 第2版, Avis等编, Marcel Dekker, New York, N.Y. 1992, 其通过提述完整并入本文。

[0278] 上述液体配制剂的制造过程一般牵涉混合、无菌过滤和填充步骤。混合规程牵涉以特定次序(防腐剂,接着是稳定剂/张力剂、缓冲剂和肽)溶解成分或同时溶解。

[0279] 备选的配制剂(例如非胃肠外)可以不需要灭菌。然而,如果灭菌是期望或必需的话,可以在开发本发明的肽药物配制剂中使用任何合适的灭菌方法。典型的灭菌方法包括过滤、蒸汽(湿热)、干热、气体(例如环氧乙烷、甲醛、二氧化氯、环氧丙烷、 β -丙内酯(propiolactone)、臭氧、三氯硝基甲烷(chloropicrin)、过氧乙酸甲基溴等)、暴露于辐射源、和无菌操作。过滤是本发明液体配制剂灭菌的优选方法。无菌过滤牵涉过滤通过0.45 μ m和0.22 μ m(1或2),其可以串联连接。过滤后,将溶液填充到合适的小瓶或容器中。

[0280] 在某些实施方案中,将本文中描述的工程化多肽对受试者外部施用。在一些实施方案中,本发明的液体药物配制剂意图用于胃肠外施用。合适的施用途径包括肌内、静脉内、皮下、皮内、关节内、鞘内等等。在一些实施方案中,皮下施用途径是优选的。在某些实施方案中,粘膜投递也是优选的。这些途径包括但不限于口服、鼻、舌下、肺部和含服途径,其可以包括液体、半固体或固体形式的肽的施用。对于包含工程化多肽的配制剂,经由这些途径的施用可以由于与胃肠外投递相比降低的生物利用度而需要实质上更多的化合物来获得期望的生物学效果。

[0281] 另外,可以通过形成聚合的微囊剂、基质、溶液、植入物和装置,并胃肠外施用它们或通过手术手段来实现胃肠外受控释放投递。受控释放配制剂的例子记载于美国专利No.6,368,630,6,379,704,和5,766,627中,其通过提述并入本文。这些剂量形式由于有些肽在聚合物基质或装置中包载而可以具有较低的生物利用度。参见例如美国专利No.6,379,704,6,379,703,和6,296,842,每篇通过提述完整并入本文并用于所有目的。

[0282] 可以以剂量单位形式提供所述化合物,该剂量单位形式含有在一剂或多剂中会有有效的工程化多肽量。

[0283] 如本领域技术人员会公认的,工程化多肽的有效量会随许多因素而变化,包括受试者的年龄和重量、受试者的身体状况、待治疗的状况、和本领域中已知的其它因素。工程化多肽的有效量还会随施用的具体组合而变化。如本文中描述的,联合施用工程化多肽可以允许任何施用的工程化多肽的降低量成为有效量。

[0284] 施用可以通过口服途径,包括跨细胞、旁细胞或受体介导的途径。不希望受任何理论束缚的,含有如本文中描述的毒蜥外泌肽的工程化多肽是可口服利用的,部分是由于它们大小相对较小且对于肠酶相对稳定。已经报告了由吸收/渗透增强剂打开的肠细胞之间的紧密接口宽少于20nm。参见例如Chao等,1998,J. Drug Targeting,6:37-43。因此,如本文中描述的足够小(例如低于10kD或15kD)的工程化多肽可以通过肠壁并结合入口系统中的清蛋白,由此进入循环。本发明工程化多肽的口服施用可以是每日两次、每日一次、每隔一日一次、每三天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次或甚至每月一次。可以使用适合用于其它肽的口服递送系统。在一个实施方案中,口服施用系统可以具有相对快的摄取概况,例如从1至4小时,在此情况中工程化多肽所固有的长作用持续时间可以提供延长的期望的作用持续时间,如每天一次或每周一次施用。作用持续时间可以例如通过对ABD及其对清蛋白的亲力的选择来进行选择。尽管不希望受任何理论束缚的,认为对清蛋白的更高的亲和力会得到更长的循环时间,从而提供更长的作用持续时间。可以使用已知的体外和体内方法来测试口服递送。例如,可以用含有工程化多肽(与或不与渗透/吸收增强剂和/或蛋白酶抑制剂一起配制)的溶液口服强喂小鼠,从而测试口服可用度和任何加入的赋形剂的影响。在递送后可以随时间测量药效(治疗效果)和药动学(药物特性)的任意一种或两者,如

药物血浆水平、急性或持续的葡萄糖和/或HbA1c降低、胰岛素血浆水平、食物摄取抑制或体重减轻。

[0285] B. 有效剂量

[0286] 本文中提供的药物组合物包括如下的组合物,其中以治疗有效量,即以有效实现其意图目的的量含有活性成分。对具体应用有效的实际量会取决于所治疗的状况,等等。例如,当在治疗糖尿病的方法中施用,这类组合物会含有有效实现期望结果(例如降低受试者中的空腹血液葡萄糖)的活性成分量。当在治疗肥胖症的方法中施用,这类组合物会含有有效实现期望结果(例如降低体重)的活性成分量。

[0287] 施用的化合物的剂量和频率(单剂或多剂)可以随着多种因素而变化,包括施用途径;接受者的体格、年龄、性别、健康、体重、体重指数、和饮食;所治疗疾病症状的性质和程度(例如响应本文中描述的化合物的疾病;空腹血糖);存在其它疾病或其它健康相关问题;同时治疗的种类;和来自任何疾病或治疗方案的并发症。可以与本发明的方法和化合物联合使用其它治疗方案或药剂。

[0288] 可以从动物模型中确定人用的治疗有效量。例如,可以将人用剂量配制为已经达到发现在动物中有效的浓度。可以通过监测一种或多种生理学参数,包括但不限于血液葡萄糖和体重,并将该剂量向上或向下调节来调节人用剂量,如上文所描述的且本领域中已知的。

[0289] 剂量可以随患者要求和所采用的化合物而变化。在本发明的背景中,对患者施用的剂量应当足以随时影响患者中的有益治疗响应。剂量大小也会通过任何不利副作用的存在、性质和程度来确定。一般地,治疗以较小的剂量启动,该剂量小于化合物的最佳剂量。此后,将剂量增加较小的增量,直到达到各情形下的最佳效果。在本发明的一个实施方案中,剂量范围是0.001%至10%w/v。在另一个实施方案中,剂量范围是0.1%至5%w/v。

[0290] 然而,考虑到本文中工程化多肽的延长的半衰期,药物化合物的典型剂量可以含有从下限为每天约1 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 50 μ g, 100 μ g至150 μ g,到上限为每周约达50 μ g、达100 μ g、达150 μ g、达200 μ g或甚至达300 μ g。可以以分开的单位剂量并以期望的间期,例如每日一次或每周一次地递送剂量。

[0291] 可以个别调节剂量量和时间间隔以提供对所治疗的特定临床适应症有效的施用化合物的水平。这会提供与个体疾病状态的严重性匹配的治疗方案。

[0292] 利用本文中提供的教导,可以计划有效的预防性或治疗性处理方案,其不引起实质性毒性,但是对于治疗特定患者表明的临床症状却是完全有效的。此计划应当牵涉活性化合物的认真选择,其通过考虑下列因素如化合物效力、相对生物利用度、患者体重、不利副作用的存在和严重性、优选的施用模式、和所选药剂的毒性概况来进行。

[0293] 本发明的工程化多肽的令人惊讶的节省剂量特性,连同其长得令人惊讶的血浆半衰期和药理学作用持续时间,提供了优越的药剂。在含有毒蜥外泌肽的工程化多肽的情况中还令人惊讶地是其口服可用度。所述优越的特性包括节省剂量,其允许更低的剂量施用,由此产生更少的或不那么严重的副作用和改善的商品成本,和/或用于每日一次或每周一次施用的更节省成本和更简单的制剂,这是单独的亲本化合物目前所不能实现的。

[0294] C. 毒性

[0295] 特定化合物的毒性和治疗效果之间的比率是其治疗指数,并且可以表示为LD₅₀(在

50%群体中致命的化合物量)和ED₅₀(在50%群体中有效的化合物量)之间的比率。优选展现出高治疗指数的化合物。从细胞培养测定法和/或动物研究中获得的治疗指数数据可以用于制定人用的剂量范围。优选地,这类化合物的剂量位于包括具有很少毒性或无毒性的ED₅₀的血浆浓度范围内。剂量可以随采用的剂量形式和利用的施用途径而在此范围内变化。参见例如Fingl等,于:THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS,第1章,第1页,1975。确切的配制剂、施用途径和剂量可以由各个临床医师根据患者状况和使用化合物的特定方法进行选择。

[0296] 不希望受任何理论束缚的,认为如本文中描述的ABD清蛋白结合域与激素域的融合可以提供降低的免疫原性,如由相对于无ABD融合的激素域的免疫应答中的降低所鉴定出的。参见例如WO2009/016043,通过提述完整并入本文并用于所有目的。

[0297] VII. 实施例

[0298] 可用在下面实施例中的肽包括:

[0299]

HaPGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP;

[0300]

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKLAELAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:164);

[0301]

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKLAELAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:165);

[0302]

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLKNAKEDAI AELKKAGITSDFYFNAVNKAKTVEEV NALKNEILKALP(化合物22)(SEQ ID NO:168);

[0303] H(Aib)QGTFTSDYSKYLDEQAAKEFIAWLMNTYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:171);

[0304] HSQGTFTSDYSKYLDEQAAKEFIAWLMNTYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:172);

[0305] HSQGTFTSDYSKYLDEQAAKEFIAWLMNTGGGSYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:173);HaPGTFTSDLSKQMEEE

[0306]

AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (化合物14),和

[0307] [[L y s 2 7 #] H G E G T F T S D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N G G P S S G A P P P S] [L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K R L I N K A K T V E G V E A L K L H I L A A L P - G G G - #] (化合物30)。如本领域中习惯的,小写字母氨基酸缩写(例如“a”)指示D-氨基酸(例如D-Ala)。在侧链连接的肽化合物的命名中,方括号(“[”)指示分开的片段而交叉排线(“#”)指示连接位置。

[0308] 实施例1:毒蜥外泌肽类似物-ABD工程化多肽的纯化

[0309] 方法。初始生成例示性化合物15(SEQ ID NO:163),其具有纳入了如本领域中已知的His₆(SEQ ID NO:49)“标签”的N末端延伸,序列为:MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGEFTFTSDLSK

QLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAA
LP(SEQ ID NO:50)。

[0310] 细胞提取物制备。为了制备细胞提取物,将来自50mL细胞培养物的细胞团粒彻底重悬于60mL裂解缓冲液(50mM TrisHCl,150mM NaCl,pH8.0)中。使重悬的细胞以100PSI运行通过微射流仪(Microfluidics,MA)三次。将细胞提取物以16,000xg离心30分钟以除去碎片。向细胞提取物加入EGTA(150mM储液)至终浓度为3mM。

[0311] Ni-NTA层析。将10ml Ni-NTA superflow的50%悬浮液堆积到15mL空柱。用10mL水、50mL裂解缓冲液和20mL有3mM EGTA的裂解缓冲液(50mMTrisHCl,150mM NaCl,pH8.0,3mM EGTA)清洗该柱。将细胞提取物小心地施加到Ni-NTA柱的顶部,并收集流经物。用30mL有EGTA的裂解缓冲液(50mM TrisHCl,150mM NaCl,pH8.0,3mM EGTA)来清洗该柱。将10mL洗脱缓冲液(25mM TrisHCl,50mM NaCl,250mM咪唑,pH8.0)施加到柱顶部,并收集洗脱级分(2mL/级分)。实施SDS-PAGE来检查流经物和每一级分。合并含有经His标记的化合物的级分。

[0312] TEV蛋白酶消化。将His₆标记的化合物用25mM TrisHCl,50mM NaCl,pH8.0稀释3倍。添加β-巯基乙醇(0.1%)和2%Turbo TEV蛋白酶(2mg/mL,10,000单位/mg,Accelagen),并将所得物混合并于RT温育2小时和于4°C过夜。

[0313] 用Ni-NTA除去切割的His标签和Turbo TEV。将6ml Ni-NTA superflow的50%悬浮液堆积到15mL空柱。用20mL水和20mL50mM TrisHCl,100mMNaCl,45mM咪唑,pH8.0清洗该柱。将TEV消化反应物用50mM TrisHCl,150mM NaCl,pH8.0稀释2倍。将稀释的消化反应物小心地添加到Ni-NTA柱顶部,并收集流经物。将10mL50mM TrisHCl,100mM NaCl,45mM咪唑,pH8.0添加到柱以洗脱任何未结合的蛋白质。收集流经物并合并。

[0314] 第一大小排阻层析(SEC)。用0.2um滤器过滤Ni-NTA流经物。用390mLPBS预平衡Superdex75HiLoad26/60柱。将过滤的流经物用样品泵注射到HiLoad26/60柱。用1.5CV PBS洗脱蛋白质,并合并单体峰。

[0315] 第二大小排阻层析。用0.2um滤器过滤第一SEC合并物。用390mL PBS预平衡Superdex75HiLoad26/60柱。将过滤的流经物用样品泵注射到HiLoad26/60柱。用1.5CV PBS洗脱蛋白质,并合并单体峰。

[0316] 第三大小排阻层析。用0.2um滤器过滤第二SEC合并物。用390mL PBS预平衡Superdex75HiLoad26/60柱。将过滤的流经物用样品泵注射到HiLoad26/60柱。用1.5CV PBS洗脱蛋白质,并合并单体峰。

[0317] 用EndoTrap Red除去残余内毒素。第三SEC合并物仍然含有~20EU/mg内毒素,其通过使用EndoTrap Red除去。简言之,将0.5mL凝胶浆料活化,其通过向浆料加入1mL再生缓冲液并通过温和晃动管约5秒来进行混合。离心并吸出上清液。将此步骤再重复两次。加入1mL平衡缓冲液,并通过温和晃动管约5秒来进行混合。离心并吸出上清液。将此步骤再重复两次。将蛋白样品(5.5mL)加入到树脂并在RT温育90分钟,在温育时伴随着管的温和摇动或旋转。将所得物以1200x g离心5分钟,并将上清液转移到干净的管中。

[0318] 结果。在所采用的条件下,最终纯化的蛋白质在SDS-PAGE凝胶上作为约6kD蛋白移动。LC-MS显示分子量正确,为9827道尔顿。从50mL细胞培养物的蛋白质产量是3.3mg。

[0319] 实施例2:毒蜥外泌肽-ABD工程化多肽的活性

[0320] 本发明的毒蜥外泌肽-ABD工程化多肽在体外细胞活化测定法中保留了充分的毒蜥外泌肽活性。另外,当以单剂施用给哺乳动物时,工程化多肽与毒蜥外泌肽-4相比对于降血糖和体重降低提供了急剧改进的作用持续时间。令人惊讶地,在啮齿动物模型中作用持续时间可以延伸至至少1天,甚至至少4天,和甚至至少7天或更长,这转换到人受试者中为至少1周的作用持续时间,由此适合每日两次、每日一次、每周三次、每周两次或甚至每周一次的施用。

[0321] 可以使用表达GLP-1受体的细胞系来测定本文中披露的化合物的功能活性。参见例如美国专利申请公开US20110097751A1,通过提述并入用于此测定方法。在本实施例中,使用内源性表达GLP-1R的细胞来测定功能活性,并将cAMP诱导检测为毒蜥外泌肽活性的量度。使用HTRF测定试剂盒(Cisbio International(Bedford,Mass.))。该生物测定法在基于细胞的测定法中使用大鼠甲状腺癌6-23(克隆6)细胞,使用HTRF® cAMP dynamic21,000测定试剂盒,其可从Cisbio以目录号62AM4PEB获得。按照试剂盒中的说明书来准备HTRF®标准物和校正。以384孔形式使用基于细胞的HTRF(CisBio)cAMP测定试剂盒进行化合物处理30分钟后,测量cAMP的累积。相对于用10uM福斯高林(forskolin)(腺苷酸环化酶的构成型激活因子)的细胞处理测定肽的功效,并通过使用拟合至4参数模型的非线性回归分析的浓度-响应曲线分析来测定肽的效力(EC₅₀)。在下表5中提供了针对效力(EC₅₀)的GLP-1受体功能活性(cAMP诱导)的结果,其中值被标准化至毒蜥外泌肽-4标准物。ABD域未结合或活化GLP-1受体。

[0322] 表5.GLP-1R功能活性

[0323]

描述	GLP-1R功能活性 (EC ₅₀), nM
毒蜥外泌肽-4	0.004
[Leu ¹⁴ ,Gln ²⁸]毒蜥外泌肽-4(1-32)-fGLP-1(33-37) (SEQ ID NO: 4)	0.016

[0324]

描述	GLP-1R功能活性 (EC ₅₀), nM
毒蜥外泌肽-4 (1-28)酰胺	0.011
化合物5	0.982
化合物6	0.0325
化合物15	0.091
化合物8	0.048
化合物10	0.146
化合物21	0.131
化合物31	0.62
化合物32	2.043
化合物33	0.77

[0325] 实施例3:OGTT DOA活性

[0326] 研究了施用各种量的化合物15的肽化合物后1天在葡萄糖强饲(1.5k/kg右旋糖)前和葡萄糖强饲后30分钟时在血糖上的影响,结果显示于图1A-1B。化合物31在25nmol/kg在给药后24小时还显示出活性,如图9中显示的。以图中指示的剂量对禁食4小时的NIH/Swiss小鼠施用药物。竖条代表均值±sd。在t=-1日时IP注射肽。在t=0对禁食4小时的NIH/Swiss雌鼠进行葡萄糖强饲(1.5g/kg)。用 OneTouch® Ultra® (LifeScan, Inc., a Johnson&Johnson Company, Milpitas, CA)测量血糖。*对媒介物对照的p<0.05;ANOVA, 邓奈特氏检验。此OGTT DOA指示药物活性在其施用后至少24小时存在。在t=24小时(葡萄糖测定法前1天)给药时,毒蜥外泌肽-4(未缀合的)在此测定法中无效,即使以更高的剂量也是如此。

[0327] 实施例4:OGTT DOA活性

[0328] 研究了施用各种量的化合物15后2天在葡萄糖强饲(1.5k/kg右旋糖)前和30分钟时在血糖上的影响,结果显示于图2A-2B。以图中指示的剂量对禁食4小时的NIH/Swiss小鼠施用药物。此OGTT DOA指示药物活性在其施用后至少48小时存在。

[0329] 实施例5:OGTT DOA活性

[0330] 进行了化合物15和8在血糖上影响的比较,结果描述于图3A-3B。以图中指示的剂量对禁食4小时的NIH/Swiss小鼠施用药物。此OGTT DOA指示药物活性在其施用后至少24小时存在。

[0331] 实施例6:化合物15对HSD喂养的麻醉大鼠的影响

[0332] 研究了给药后5天,用化合物15(240nmol/kg)的处理在Sprague Dawley喂养的麻醉大鼠中的影响。图4A中绘出了IVGTT后血浆葡萄糖的时间过程。积分的(AUC₀₋₆₀)葡萄糖水平描绘在图4B的直方图中。在图4C中绘出了测试受试者中在胰岛素水平中的变化的时间过

程。积分的胰岛素水平(AUC₀₋₃₀)描绘在图4D中。在图4E中绘出了测试受试者的体重变化(自基线的%变化)的时间过程。图4F中提供了测试受试者的每日食物摄取的直方图描述。此IVGTTDOA指示药物活性在其施用后至少5天存在,特别对于在体重和每日食物摄取上的影响而言。

[0333] 实施例7:化合物15在ob/ob小鼠中的影响

[0334] 研究了剂量施用后化合物15在ob/ob小鼠中对体重、葡萄糖和HbA_{1c}的影响的时间过程。如图5A中描绘的,在用250nmol/kg化合物15处理时出现显著体重降低。图5B-5C中描绘了葡萄糖(%处理前)和HbA_{1c}(%处理前)的变化。点代表均值±s.d.(标准偏差)。在天数=0时,在未禁食的雄性ob/ob小鼠中收集基线样品后立即sc注射化合物15。除非另外指出的,本文中描述的血糖测量采用了OneTouch® Ultra®装置(LifeScan, Inc. Milipitas, CA)。化合物21也显示出体重降低和HbA_{1c}降低。

[0335] 实施例8:化合物15在Zucker Diabetic Fatty(ZDF)大鼠中的活性

[0336] 为了评估本文中描述的例示性化合物的联合的降低体重和葡萄糖的功效,研究了化合物15在~14周龄的雄性ZDF大鼠中的剂量依赖性效果。基线葡萄糖为426mg/dL,且基线体重为431g。组大小n=8。图6A描绘了处理后体重中变化(%经媒介物校正)的时间过程。图6B描绘了血浆葡萄糖的时间过程。

[0337] 实施例9:化合物15,8和10在OGTT DOA(作用持续时间)上的活性

[0338] 研究了化合物15,8和10在30分钟时在血糖变化(%强饲前)上的影响,如图7中描绘的。在此图中,竖条代表均值±s.d。在t=-1日时IP注射测试化合物。在t=0时对禁食4小时的NIH/Swiss雌鼠施用葡萄糖强饲(1.5g/kg)。如本文中描述的测量血糖。此OGTT DOA指示药物活性在其施用后至少24小时存在。

[0339] 实施例10:化合物在24小时处的OGTT DOA(作用持续时间)上的活性

[0340] 如上文描述的研究了本文中披露的化合物在30分钟时在血糖变化(%强饲前)上的影响。在t=-1日时以25nmol/kg IP注射测试化合物。在t=0时对禁食4小时的NIH/Swiss雌鼠施用葡萄糖强饲(1.5g/kg)。如本文中描述的测量血糖。此OGTT DOA指示药物活性在其施用后至少24小时存在。在下表6中呈现结果。化合物30(连接赖氨酸27的)和化合物32没有产生葡萄糖降低,指示着在这些条件下于24小时处不存在。毒蜥外泌肽-4(未缀合)在此测定法中在t-24小时施用时无效的,即使以更高的剂量也如此。在位置3处有脯氨酸的化合物14在体外功能测定法中基本无活性,且在降葡萄糖OGTT测定法中无活性(且可能是增加重量的)(数据未显示)。具有清蛋白结合序列(来自大消化链球菌(P.magnus)的PAB蛋白)的化合物22在上文测定法中具有极小(如果有的话)的重量降低(3%)。具有截短的ABD的化合物19和化合物20仍保持体外活性,但持续时间缩短,其在OGTT DOA测定法中分别具有6%和8%的葡萄糖降低。

[0341] 表6. OGTT中剂量施用后24小时处的葡萄糖降低

[0342]

描述	相比于媒介物的%葡萄糖降低
化合物5	-28
化合物6	-18
化合物15	-21

化合物8	-21
化合物10	-22
化合物21	-23
化合物23	-23
化合物24	-17

[0343]

描述	相比于媒介物的%葡萄糖降低
化合物31	-22
化合物33	-19

[0344] 实施例11.血清清蛋白结合

[0345] 可以通过实施任意数目的方法来表征工程化多肽化合物对清蛋白的结合,所述方法包括本文中描述的Biacore。在此实施例中,用BioRad ProteOnXPR36系统(Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA; ProteOn XPR36蛋白质相互作用阵列系统,目录号#176-0100)进行结合测量,其于25℃使用GLC传感器芯片。对于胺偶联,将GLC芯片活化5分钟,其使用从起始的储液在水中稀释30倍的磺基-NHS/EDC1:1混合物,如下文显示的。将每份清蛋白样品都在10mM醋酸钠pH5.0中稀释为25ug/ml,并于分开的传感器表面上注射5分钟。然后将每一表面用1M乙醇胺pH8.5封闭。将每种清蛋白以2000-5000共振单位的密度偶联。测试工程化多肽的结合,其将5nM用作3倍稀释系列中的最高浓度。运行缓冲液含有10mM HEPES pH7.4,150mM NaCl,3mMEDTA和0.005% tween-20。所有样品都使用3倍稀释的系列进行测试。一式两份地测试每个浓度系列。监测最高浓度的解离相达3小时。

[0346] 对工程化多肽测量的相对 K_D 呈现在下表7中。结果显示清蛋白结合多肽以高亲和力与血清清蛋白结合。括号中的数字代表最后有效数字中的标准偏差。如从下表看到的,融合至清蛋白结合域SEQ ID NO:35的毒蜥外泌肽多肽保留了对来自各物种的血清清蛋白(特别是人血清清蛋白)的非常高的亲和力,即使在与未缀合的ABD肽本身相比的情况下。

[0347] 表7

[0348]

化合物	人SA	犬SA	猴SA	小鼠SA	大鼠SA
SEQ ID NO:35	16(4)pM	201(2)pM	123(1)pM	1.24(1)nM	18(5)pM
化合物15	68pM	513pM	91pM	1.25nM	200pM
化合物21	85pM	397pM	78pM	1.33nM	16pM

[0349] 实施例12.存在血清清蛋白时的活性

[0350] 证明了在存在血清清蛋白时对工程化多肽化合物体外活性的表征。可以在存在和不存在清蛋白,特别是人血清清蛋白的情况下实施测定法。上文数据是在存在约0.1%牛血清清蛋白(BSA)的情况下测定的。下表呈现了上文描述的受体活化(cAMP诱导)测定法的功能活性,但是是在存在来自各种物种的血清清蛋白的情况下的。如可以看到的,令人惊讶地,即使当化合物结合至血清清蛋白如人血清清蛋白时,尽管存在较大的血清清蛋白,其可能有空间位阻且甚至在清蛋白结合所得化合物的表观斯托克氏(Stoke's)半径中产生变化,然而工程化多肽保留GLP-1受体激动剂活性。鉴于ABD和工程化多肽对一些物种的血清清蛋白(例如人血清清蛋白)的皮摩尔级亲和力,认为工程化多肽有效地、完全地结合至此

测定法中存在的清蛋白(且由此也在体内在循环血液中)。由于化合物结合至清蛋白的极高的亲和力(如上文)且血液中存在高浓度的血清清蛋白,因此预期该化合物在体内基本上会以结合状态存在,但令人惊讶地提供充足的毒蜥外泌肽功能(如本文中证明的)。

[0351] 表8

[0352]

化合物	0.1%牛清蛋白	1%牛清蛋白	1%人清蛋白	1%大鼠清蛋白
GLP-1(7-36)酰胺	0.0306	0.0058	0.0112	0.0179
化合物15	0.7854	0.2204	0.185	0.2473
化合物21	1.1013	0.2234	0.2022	0.2164
化合物31	1.1408	0.2313	0.2139	0.2358
GLP-1(7-36)酰胺正常测定法条件	0.0256	0.0224	0.0165	0.0153

[0353] 实施例13. 化合物对人血浆和人血浆酶是稳定的

[0354] 检查化合物对人血浆和人细胞膜蛋白酶的稳定性。如下实施代表性肽在人血浆中的稳定性。以充分体积制备人血浆中10 μ g/ml化合物,从而对于时间段(5小时),从0时间点开始每10分钟就取出100 μ L样品。在向人血浆加入化合物后,温和地混合样品并将100 μ L混合物样品转移到微离心管中以代表0时间点。将剩余样品置于37 $^{\circ}$ C培养箱中,以600RPM混合60分钟。以10分钟为间期,取出100 μ L混合物样品并转移到单独的微离心管中。在0时间点时且在每个10分钟间期将100 μ L样品转移后,提取每份收集的样品,其通过缓慢加入100 μ L冷的0.2%甲酸:乙腈,同时混合。在加入乙腈溶液后,将样品高速涡旋混合达15秒。将提取的样品存储于-20 $^{\circ}$ C达至少20分钟,然后在5 $^{\circ}$ C以11,000 $\times$ g离心10分钟。将每份样品的上清液转移到新的微离心管中,再次离心,并最终转移用于LC/MS分析。在Agilent HLPC(LC/MS1200)上使用在含有0.1%三氟乙酸的水中梯度5-95%的乙腈进行样品分析。表9呈现了标准化到标准物(100%)后的结果。图8呈现了在5小时时间过程中保留在人血浆中的化合物百分比的时间概况。

[0355] 表9.

[0356]

化合物	在人血浆中稳定的百分比
GLP-1(7-37)酰胺(SEQ ID NO:5)	41.7
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS (SEQ ID NO:4)	100
化合物15	96.0
化合物21	89.5
化合物31	93.7

[0357] 如下实施代表性肽在人肾刷状缘膜(brush border membrane)(KBBM)测定法中的相对稳定性。人肾刷状缘膜蛋白提取物富含各种肽酶。将5 μ L(约7微克/mL蛋白质)蛋白提取制备物(hKBBMP)用625 μ L HEPES缓冲液(25mM, pH7.4)在有O环封口的聚丙烯微离心管中稀释以避免溶剂挥发。在单独的小瓶中,制备肽储液(在50%乙腈于水中为300 μ M)并将70 μ L此溶液加入到上文hKBBMP溶液中。通过手动晃动来温和地混合溶液,从而使得最终肽浓度为30 μ M。然后将此溶液100 μ L等分试样到6个不同的管中,并在1个管中加入200 μ L酶终止溶液(50%乙腈于水中,有0.1%TFA)。将此管用于测量时间t=0分钟时的初始肽浓度,而使用水浴将所有其它5个管在37 $^{\circ}$ C温育。在1、2、3、4和5小时的间期时,取出每个管并用200 μ L终止溶液结束。最终,将所有6个管以1800xg离心10分钟以除去任何沉淀的蛋白质。将上清液(10 μ L)转移到HPLC自动取样器中,并通过使用选择的离子计数方法(selected ion count method)来测量AUC。每份样品都以一式三份运行,并计算平均AUC以用于数据分析。在有大检测器的Agilent HPLC上用有0.1%TFA梯度的乙腈实施样品分析。使用GraphPad Prism[®] 5软件,绘出从酶促消化的时间t=0至5小时所剩余的亲本肽的百分数。该数据报告为每种肽对阳性对照的相对肽稳定性。如记载的,以n=6运行样品,且CV在20%以内。在表10中呈现了来自hKBBM稳定性测定法的结果。

[0358] 表10.

[0359]

化合物	稳定百分比
GLP-1(7-37)酰胺(SEQ ID NO:5)	16
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS (SEQ ID NO:4)	100
化合物21	103

[0360] 实施例14. 缺乏空泡形成

[0361] 对于一些药物如一些聚乙二醇化蛋白质,可能在近曲小管衬里的上皮细胞的细胞质中形成不期望的空泡,这是一种不期望的毒性度量。本申请的工程化清蛋白结合化合物不形成肾空泡。每天在熄灯前3小时,对C57BL6雌鼠(n=2笼,3只小鼠/笼)称重。在第0-6日,

称重后立即给小鼠皮下注射测试化合物。在第7天杀死小鼠并将肾用于组织病理学。肾皮质管上皮细胞的细胞质空泡形成的严重度得分如下：得分1=最小(8-15%);2=温和(16-35%);3=中度(36-60%);4=显著(>60%)。已知导致空泡形成的阳性对照化合物得分为3。ABD多肽本身得分为0。化合物15得分为0。

[0362] 实施例15.对正常小鼠中抑制食物摄取的影响

[0363] 测定了测试化合物在抑制正常小鼠的食物摄取上的影响的时间过程。如图10A中绘出的,在用化合物31处理6小时内出现了剂量依赖性的显著的体重降低。图10B显示了单剂化合物后在正常小鼠中持续至少54小时的剂量依赖性的、持续的食物摄取抑制。毒蜥外泌肽类似物的效果在24小时内消失。最高剂量的化合物31甚至在3天时仍然显著抑制食物摄取。点代表n=4笼(3只小鼠/笼)的均值±sd。在t=0时IP注射肽。在注射后立即引入食物,并在t=30,60,120,180,240,300,360min,24h,30h,48h和54h时测量消耗的量。*对媒介物对照的p<0.05;ANOVA,邓奈特氏检验。ED50对于化合物31为~10nmol/kg且对于[Leu14]毒蜥外泌肽-4为2nmol/kg。

[0364] 实施例16:毒蜥外泌肽-清蛋白结合域多肽在糖尿病ob/ob小鼠中的影响

[0365] 为了证明本文中描述的毒蜥外泌肽-清蛋白结合域工程化多肽的长期暴露在葡萄糖降低、HbA1c降低、和体重降低上的影响,用化合物15和化合物21处理糖尿病ob/ob小鼠。研究给药后测试化合物在ob/ob小鼠中在体重、葡萄糖降低和HbA1c降低上的影响的时间过程,将4周时的值呈现于图11A,11B,11C和11D。图11A(化合物15)和11B(化合物21)绘出了相比于利拉鲁肽在血糖中的变化,所有都是每周两次(BIW)给药的。图11C绘出了相比于通过连续皮下输注(CSI)给药的毒蜥外泌肽-4,每周两次(BIW)给药的化合物15和化合物21的HbA1c降低(从基线处的%变化)。图11D绘出了相比于通过连续皮下输注(CSI)给药的毒蜥外泌肽-4,每周两次(BIW)给药的化合物15和化合物21的体重降低(从基线处的%变化)。令人惊讶地,如从图11A和11B看到的,对于长期暴露时的葡萄糖降低,每种化合物在等摩尔给药都优于利拉鲁肽。而且,在与利拉鲁肽等摩尔给药时,化合物15和化合物21每种都比利拉鲁肽[N-ε-(γ-Glu(N-α-十六酰基))-Lys26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-酸(一种长效清蛋白结合GLP-1衍生物)在降低HbA1c和降低体重中更有效(数据未显示)。在每周两次腹膜内(IP)提供25和250nmol/kg的每种化合物达28天的情况下,如图11C中绘出的,处理后出现显著的HbA1c降低,且在图11D中,处理后出现显著的体重降低。点代表均值±s.d.(标准偏差)。在天数=0时,在未禁食的雄性ob/ob小鼠中收集基线样品后立即IP注射每种测试化合物。对25nmol/kg biw(每周两次)剂量所观察到的效果大于对通过连续输注(CSI)以~7.2nmol/kg/d给药(已知该剂量提供毒蜥外泌肽-4的最大功效)的毒蜥外泌肽-4所观察到的。由此在可比的等摩尔剂量,化合物15和化合物21超过了毒蜥外泌肽-4的最大有效剂量的降糖和降体重效果。在250nmol/kg时,化合物15显著高于且化合物21为2倍有效于毒蜥外泌肽-4的最大有效剂量。除非另外指出的,本文中描述的血糖测量采用了 OneTouch® Ultra®装置(LifeScan, Inc. Milpitas, CA)。

[0366] 令人惊讶地,尽管相比于如上文所观察到的未缀合的毒蜥外泌肽-4的体外效力降低,但本文中披露的融合至清蛋白结合多肽的毒蜥外泌肽的急性(6小时内)体内活性在最大功效方面类似于未缀合的毒蜥外泌肽的,且在效力方面(例如ED50)仅稍低(数倍),如在通过小鼠中的食物摄取的降低测量时(数据未显示)。甚至更令人惊讶地,长期暴露的效果

显示本文中披露的融合至清蛋白结合多肽的毒蜥外泌肽与毒蜥外泌肽-4(连续输注)一样有力且甚至具有更大的效力,但能够提供更大的最大效果。此外,根据对小鼠或大鼠清蛋白的非常高的亲和力和低解离速率,所有的工程化化合物在体内测定法(以及体外测定法)中都有效结合至清蛋白。由此,工程化多肽甚至在结合至清蛋白时也保留GLP-1R功能活性。这是令人惊讶地,部分因为已经报告了清蛋白化合物例如利拉鲁肽仅在从清蛋白解离时为显著活性的。而且其他人已经报告了需要从其所缀合的清蛋白结合肽蛋白水解移出毒蜥外泌肽,从而获得毒蜥外泌肽功能。因此,如本文中显示的体内活性甚至是更令人惊叹的。

[0367] 实施例17:工程化多肽在体内的长持续时间和作用

[0368] 为了进一步证明本文中描述的工程化多肽的长半衰期和长活性持续时间,使用大鼠测定了药动学(PK)和药效学(PD)特性。呈现了在正常的Harlan Sprague-Dawley(HSD)大鼠中皮下施用的例示性工程化多肽化合物15和化合物21的药动学概况和生物学活性。在 $t=0$ 时将重组工程化化合物化合物21和化合物15以 25nmol/kg 皮下注射到正常的HSD大鼠中。在 $t=1$ 小时、3小时、6小时、24小时、48小时、72小时、96小时和168小时时经由尾部出血从喂养的HSD雄性大鼠中收集血液。每日测量食物和身体重量。图12A绘出了化合物15和化合物21减少食物摄取的影响。图12B绘出了化合物15和化合物21降低体重的影响。图12C绘出了单剂后化合物15和化合物21的PK概况。点代表均值 $\pm$ sd。

[0369] 对两种例示性工程化多肽都观察到至少长达7天的暴露。在大鼠中通过此皮下递送,化合物15具有54小时的表观半衰期,化合物21具有61小时的表观半衰期。通过异速生长律且考虑到工程化多肽对人清蛋白的强亲和力,在人受试者中预期至少一样长且甚至更长的物理学和生物学活性持续时间。因此,化合物可用于至少每日两次(例如早上和晚上)、至少每日一次、每周两次、和甚至每周一次的施用,特别是在人受试者中。

[0370] 呈现了在正常的Harlan Sprague-Dawley(HSD)大鼠中静脉内施用的例示性工程化多肽的药动学概况和生物学活性。在 $t=0$ 时将重组工程化化合物化合物31以 2nmol/kg 静脉内注射到正常的HSD大鼠中。在 $t=1$ 小时、3小时、6小时、24小时、48小时、72小时、96小时和168小时时经由尾部出血从喂养的HSD雄性大鼠中收集血液。每日测量食物和身体重量。图13A绘出了化合物31减少食物摄取的影响。图13B绘出了化合物31降低体重的影响。图13C绘出了单剂IV后化合物31的PK概况。半衰期估算为约至少14小时,点代表均值 $\pm$ sd。

[0371] 甚至以这些相对较低的剂量时,对此例示性工程化多肽都观察到长达7天的暴露。通过异速生长律且考虑到工程化多肽对人清蛋白的强亲和力,在人受试者中预期至少一样长且甚至更长的物理学和生物学活性持续时间。因此,化合物可用于至少每日两次(例如早上和晚上)、至少每日一次、每周两次、和甚至每周一次的施用,特别是在人受试者中。

[0372] 实施例18:口服递送工程化多肽实现系统性分布

[0373] 使用代表性工程化化合物来研究口服递送及肠摄取。用 240nmol/kg 的下列化合物对糖尿病db/db小鼠口服(通过强饲入口)给药:毒蜥外泌肽类似物[Leu14,Gln28]毒蜥外泌肽-4-(1-32)-fGLP-1-(33-37)酸和化合物15。数据显示工程化肽是口服生物可用的,甚至在有可以增强递送和摄取的其它特定赋形剂的情况下在配制物PBS/丙二醇(50:50)中。与毒蜥外泌肽类似物相比,超过毒蜥外泌肽类似物分子量两倍的化合物15(都以 1mg/kg 的剂量)在相同配制物中也是口服生物可用的。结果指示在口服施用两种化合物都有活性,且在一定条件下测试到120分钟时是等同有效的。结果呈现在图14中。点代表均值 $\pm$ sd。在

取了基线样品后,立即在t=0时通过强饲经口施用肽。小鼠是禁食2小时的db/db小鼠。因此,本文中呈现的化合物可用于至少每日两次(例如早上和晚上)、至少每日一次、每周三次、每周两次、和甚至每周一次的口服施用,特别是在人受试者中。

[0374] VIII.实施方案

[0375] 实施方案1.一种工程化多肽,其包含:清蛋白结合域多肽(ABD)序列和选自毒蜥外泌肽序列、毒蜥外泌肽类似物序列、毒蜥外泌肽活性片段序列或毒蜥外泌肽类似物活性片段序列的第一肽激素域(HD1)序列。

[0376] 实施方案2.依照实施方案1的工程化多肽,其进一步包含共价连接所述ABD序列和所述HD1序列的第一接头(L1)。

[0377] 实施方案3.依照实施方案1至2中任一项的工程化多肽,其中所述工程化多肽包含所述ABD序列作为C末端模块和所述HD1序列作为N末端模块。

[0378] 实施方案4.依照实施方案3的工程化多肽,其具有结构:HD1-ABD。

[0379] 实施方案5.依照实施方案3的工程化多肽,其具有结构HD1-L1-ABD。

[0380] 实施方案6.依照实施方案1至5中任一项的工程化多肽,其中所述HD1序列由所述毒蜥外泌肽序列或所述毒蜥外泌肽类似物序列组成。

[0381] 实施方案7.依照实施方案6的工程化多肽,其中所述毒蜥外泌肽序列是毒蜥外泌肽-4序列。

[0382] 实施方案8.依照实施方案6的工程化多肽,其中所述毒蜥外泌肽活性片段序列是毒蜥外泌肽-4(1-28)、毒蜥外泌肽-4(1-29)、毒蜥外泌肽-4(1-30)、毒蜥外泌肽-4(1-31)或毒蜥外泌肽-4(1-32)(SEQ ID NO:2)的序列。

[0383] 实施方案9.依照实施方案6的工程化多肽,其中所述毒蜥外泌肽或毒蜥外泌肽类似物的序列包含选自下组的序列:(SEQ ID NO:3),(SEQ ID NO:4),(SEQ ID NO:2),(SEQ ID NO:111),(SEQ ID NO:112),(SEQ ID NO:113),(SEQ ID NO:114),(SEQ ID NO:115),(SEQ ID NO:116),(SEQ ID NO:117),和(SEQ ID NO:118)。

[0384] 实施方案10.依照实施方案1至9中任一项的工程化多肽,其中所述毒蜥外泌肽类似物序列与毒蜥外泌肽-4序列或与选自由任意一条以下序列组成的组的毒蜥外泌肽类似物序列具有至少70%同一性:(SEQ ID NO:3),(SEQ ID NO:4),(SEQ ID NO:2),(SEQ ID NO:111),(SEQ ID NO:112),(SEQ ID NO:113),(SEQ ID NO:114),(SEQ ID NO:115),(SEQ ID NO:116),(SEQ ID NO:117),和(SEQ ID NO:118)。

[0385] 实施方案11.依照实施方案1至10中任一项的工程化多肽,其中相对于毒蜥外泌肽-4序列或具有选自下组的序列的毒蜥外泌肽类似物,所述毒蜥外泌肽类似物序列包含1至5处氨基酸修饰:(SEQ ID NO:3),(SEQ ID NO:4),(SEQ ID NO:2),(SEQ ID NO:111),(SEQ ID NO:112),(SEQ ID NO:113),(SEQ ID NO:114),(SEQ ID NO:115),(SEQ ID NO:116),(SEQ ID NO:117),和(SEQ ID NO:118),所述修饰独立地选自插入、缺失、添加和取代的任意一种或组合。

[0386] 实施方案12.依照实施方案1至11中任一项的工程化多肽,其中所述ABD序列包含清蛋白结合基序(ABM)序列。

[0387] 实施方案13.依照实施方案1至11中任一项的工程化多肽,其中所述ABD序列包含由以下氨基酸序列组成的清蛋白结合基序(ABM)序列:

[0388] GVSD X₅YK X₈X₉I X₁₁X₁₂A X₁₄TVEGV X₂₀AL X₂₃X₂₄X₂₅I (SEQ ID NO:119)

[0389] 其中,

[0390] X₅选自Y和F;

[0391] X₈选自N,R和S;

[0392] X₉选自V,I,L,M,F和Y;

[0393] X₁₁选自N,S,E和D;

[0394] X₁₂选自R,K和N;

[0395] X₁₄选自K和R;

[0396] X₂₀选自D,N,Q,E,H,S,R和K;

[0397] X₂₃选自K,I和T;

[0398] X₂₄选自A,S,T,G,H,L和D;且

[0399] X₂₅选自H,E和D。

[0400] 实施方案14. 依照实施方案1至13中任一项的工程化多肽, 其中所述ABD序列包含不由氨基酸序列GVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEI (SEQ ID NO:120)组成的清蛋白结合基序(ABM)序列。

[0401] 实施方案15. 依照实施方案1至14中任一项的工程化多肽, 其中所述ABD序列包含以下氨基酸序列:

[0402] LAEAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY (SEQ ID NO:182), 该氨基酸序列共价连接至清蛋白结合基序(ABM)序列, 该清蛋白结合基序(ABM)序列进一步共价连接至氨基酸序列LAALP (SEQ ID NO:183),

[0403] 其中

[0404] X_a选自V和E;

[0405] X_b选自L,E和D;

[0406] X_c选自N,L和I;

[0407] X_d选自R和K;且

[0408] X_e选自D和K。

[0409] 实施方案16. 依照实施方案1至15中任一项的工程化多肽, 其中所述ABD序列包含以下氨基酸序列:

[0410] LAEAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY GVSD X₅YK X₈X₉I X₁₁X₁₂A X₁₄TVEGVX₂₀AL X₂₃X₂₄X₂₅I LAALP (SEQ ID NO:121)

[0411] 其中

[0412] X_a选自V和E;

[0413] X_b选自L,E和D;

[0414] X_c选自N,L和I;

[0415] X_d选自R和K;

[0416] X_e选自D和K;

[0417] X₅选自Y和F;

[0418] X₈选自N,R和S;

[0419] X₉选自V,I,L,M,F和Y;

- [0420] X₁₁选自N,S,E和D;
- [0421] X₁₂选自R,K和N;
- [0422] X₁₄选自K和R;
- [0423] X₂₀选自D,N,Q,E,H,S,R和K;
- [0424] X₂₃选自K,I和T;
- [0425] X₂₄选自A,S,T,G,H,L和D;且
- [0426] X₂₅选自H,E和D。
- [0427] 实施方案17.依照实施方案16的工程化多肽,其中在所述ABD序列中不存在C末端脯氨酸。
- [0428] 实施方案18.依照实施方案16至17中任一项的工程化多肽,其中在所述ABD序列中位置45处的亮氨酸不存在。
- [0429] 实施方案19.依照实施方案16至18中任一项的工程化多肽,其中所述ABD序列还包含选自A,AS,G或GS的N末端添加。
- [0430] 实施方案20.依照实施方案16的工程化多肽,其中所述ABD序列包含氨基酸序列
- [0431] LAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP(SEQ ID NO:35)。
- [0432] 实施方案21.依照实施方案16的工程化多肽,其中所述ABD序列选自下组的序列:(SEQ ID NO:23),(SEQ ID NO:24),(SEQ ID NO:25),(SEQ ID NO:26),(SEQ ID NO:27),(SEQ ID NO:28),(SEQ ID NO:29),(SEQ ID NO:30),(SEQ ID NO:31),(SEQ ID NO:32),(SEQ ID NO:33),(SEQ ID NO:34),(SEQ ID NO:35),(SEQ ID NO:122),(SEQ ID NO:123)和(SEQ ID NO:124)。
- [0433] 实施方案22.依照实施方案1至11中任一项的工程化多肽,其中所述ABD的序列与具有选自下组序列的ABD的序列具有至少85%同一性:(SEQ ID NO:23),(SEQ ID NO:24),(SEQ ID NO:25),(SEQ ID NO:26),(SEQ ID NO:27),(SEQ ID NO:28),(SEQ ID NO:29),(SEQ ID NO:30),(SEQ ID NO:31),(SEQ ID NO:32),(SEQ ID NO:33),(SEQ ID NO:34),(SEQ ID NO:35),(SEQ ID NO:122),(SEQ ID NO:123)和(SEQ ID NO:124)。
- [0434] 实施方案23.依照实施方案16至22中任一项的工程化多肽,其中在所述ABD序列中不存在C末端脯氨酸。
- [0435] 实施方案24.依照实施方案16至23中任一项的工程化多肽,其中在所述ABD序列中在位置45处不存在亮氨酸。
- [0436] 实施方案25.依照实施方案2至24中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1是1至30个氨基酸的肽接头。
- [0437] 实施方案26.依照实施方案2至25中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1选自20种天然存在的氨基酸。
- [0438] 实施方案27.依照实施方案2至25中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1包含非天然的氨基酸,其通过化学合成、翻译后化学修饰或通过宿主细胞中的重组表达通过体内掺入来掺入。
- [0439] 实施方案28.依照实施方案2至27中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和赖氨酸。
- [0440] 实施方案29.依照实施方案2至28中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1包含的

多数氨基酸是无空间位阻的。

[0441] 实施方案30.依照实施方案2至29中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1包含聚甘氨酸、聚丙氨酸、聚(Gly-Ala)、或聚(Gly-Ser)。

[0442] 实施方案31.依照实施方案30的工程化多肽,其中所述接头L1包含序列(Gly)₃, (Gly)₄(SEQ ID NO:196)或(Gly)₅(SEQ ID NO:197)。

[0443] 实施方案32.依照实施方案2至29中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1包含序列(Gly)₃Lys(Gly)₄(SEQ ID NO:131);(Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂(SEQ ID NO:132);(Gly)₃Cys(Gly)₄(SEQ ID NO:133);或GlyProAsnGlyGly(SEQ ID NO:134)。

[0444] 实施方案33.依照实施方案2至32中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1包含Gly和Ala的组合。

[0445] 实施方案34.依照实施方案2至32中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1包含Gly和Ser的组合。

[0446] 实施方案35.依照实施方案2至34中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1选自由富含甘氨酸的肽组成的组。

[0447] 实施方案36.依照实施方案2至35中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1包含N末端TG二肽。

[0448] 实施方案37.依照实施方案2至36中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1包含C末端AS二肽。

[0449] 实施方案38.依照实施方案2至37中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1包含N末端TG二肽和C末端AS二肽。

[0450] 实施方案39.依照实施方案2至38中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1包含选自下组的序列: TG-(GGGS)₁(SEQ ID NO:198), TG-(GGGS)₂(SEQ ID NO:199), TG-(GGGS)₃(SEQ ID NO:200), TG-(GGGS)₄(SEQ ID NO:201), TG-(GGGS)₅(SEQ ID NO:202), (GGGS)₁-AS(SEQ ID NO:203), (GGGS)₂-AS(SEQ ID NO:204), (GGGS)₃-AS(SEQ ID NO:205), (GGGS)₄-AS(SEQ ID NO:206), (GGGS)₅-AS(SEQ ID NO:207), TG-(GGGS)₁-AS(SEQ ID NO:208), TG-(GGGS)₂-AS(SEQ ID NO:209), TG-(GGGS)₃-AS(SEQ ID NO:210), TG-(GGGS)₄-AS(SEQ ID NO:211), 和TG-(GGGS)₅-AS(SEQ ID NO:212)。

[0451] 实施方案40.依照实施方案39中任一项的工程化多肽,其中所述接头L1中TG二肽或AS二肽不存在或被一对选自T,A,S和G的氨基酸替换。

[0452] 实施方案41.依照实施方案1至40中任一项的工程化多肽,其以小于约 10^{-6} mol/L的解离常数结合血清清蛋白。

[0453] 实施方案42.依照实施方案41的工程化多肽,其以小于约 10^{-9} mol/L的解离常数结合血清清蛋白。

[0454] 实施方案43.依照实施方案42的工程化多肽,其以小于约 10^{-12} mol/L的解离常数结合血清清蛋白。

[0455] 实施方案44.依照实施方案1至43中任一项的工程化多肽,其中所述多肽具有至少1天的作用持续时间。

[0456] 实施方案45.依照实施方案44的工程化多肽,其中所述多肽具有至少3天的作用持续时间。

[0457] 实施方案46.依照实施方案45的工程化多肽,其中所述多肽具有至少6天的作用持续时间。

[0458] 实施方案47.依照实施方案1至46中任一项的工程化多肽,其中所述多肽在人受试者中具有至少6天的作用持续时间。

[0459] 实施方案48.依照实施方案1至47中任一项的工程化多肽,其包含:(SEQ ID NO:40),(SEQ ID NO:41),(SEQ ID NO:42),(SEQ ID NO:43),(SEQ ID NO:51),(SEQ ID NO:163),(SEQ ID NO:99),(SEQ ID NO:169),(SEQ ID NO:170),(SEQ ID NO:95),(SEQ ID NO:97),(SEQ ID NO:96),(SEQ ID NO:55),(SEQ ID NO:53),(SEQ ID NO:62),(SEQ ID NO:67),(SEQ ID NO:166),(SEQ ID NO:167),(SEQ ID NO:51),(SEQ ID NO:52),(SEQ ID NO:53),(SEQ ID NO:54),(SEQ ID NO:55),(SEQ ID NO:56),(SEQ ID NO:57),(SEQ ID NO:58),(SEQ ID NO:59),(SEQ ID NO:60),(SEQ ID NO:61),(SEQ ID NO:62),(SEQ ID NO:63),(SEQ ID NO:64),(SEQ ID NO:65),(SEQ ID NO:66),(SEQ ID NO:67),(SEQ ID NO:68),(SEQ ID NO:70),(SEQ ID NO:71),(SEQ ID NO:72),(SEQ ID NO:73),(SEQ ID NO:74),(SEQ ID NO:75),(SEQ ID NO:76),(SEQ ID NO:77),(SEQ ID NO:78),(SEQ ID NO:79),(SEQ ID NO:80),(SEQ ID NO:81),(SEQ ID NO:82),(SEQ ID NO:83),(SEQ ID NO:84),(SEQ ID NO:85),(SEQ ID NO:86),(SEQ ID NO:87),(SEQ ID NO:88),(SEQ ID NO:89),(SEQ ID NO:90),(SEQ ID NO:91),(SEQ ID NO:92),(SEQ ID NO:93),(SEQ ID NO:94),(SEQ ID NO:95),(SEQ ID NO:96),(SEQ ID NO:97),(SEQ ID NO:98),(SEQ ID NO:99),(SEQ ID NO:100),(SEQ ID NO:101),(SEQ ID NO:102),(SEQ ID NO:103),(SEQ ID NO:104),(SEQ ID NO:105),(SEQ ID NO:106),(SEQ ID NO:107),(SEQ ID NO:108)或(SEQ ID NO:109)。

[0460] 实施方案49.依照实施方案1至47中任一项的工程化多肽,其包含:(SEQ ID NO:40),(SEQ ID NO:41),(SEQ ID NO:42),(SEQ ID NO:43),(SEQ ID NO:51),(SEQ ID NO:163),(SEQ ID NO:99),(SEQ ID NO:169),(SEQ ID NO:170),(SEQ ID NO:95),(SEQ ID NO:97),(SEQ ID NO:96),(SEQ ID NO:55),(SEQ ID NO:53),(SEQ ID NO:62),(SEQ ID NO:67),(SEQ ID NO:166)或(SEQ ID NO:167)。

[0461] 实施方案50.依照实施方案1至47中任一项的工程化多肽,其包含:(SEQ ID NO:40),(SEQ ID NO:41),(SEQ ID NO:42),(SEQ ID NO:43),(SEQ ID NO:51),(SEQ ID NO:163),(SEQ ID NO:99),(SEQ ID NO:169),(SEQ ID NO:170),(SEQ ID NO:95),(SEQ ID NO:97),(SEQ ID NO:96)或(SEQ ID NO:55)。

[0462] 实施方案51.一种用于治疗受试者中的疾病或病症的方法,包括将依照实施方案1-50中任意一项的工程化多肽以有效治疗所述疾病或病症的量施用给有此需要的受试者。

[0463] 实施方案52.依照实施方案51的方法,其中所述疾病或病症为糖尿病、超重、肥胖症、阿耳茨海默氏病、短肠综合征、脂肪肝病、血脂障碍、冠心病、中风、高脂血、或帕金森氏病。

[0464] 实施方案53.依照实施方案52的方法,其中所述疾病或病症为糖尿病、超重、肥胖症、短肠综合征、或帕金森氏病。

[0465] 实施方案54.依照实施方案53的方法,其中所述疾病或病症为I型糖尿病、II型糖尿病或前驱糖尿病。

- [0466] 实施方案55.依照实施方案52的方法,其中所述疾病或病症为II型糖尿病。
- [0467] 实施方案56.依照实施方案52的方法,其中所述疾病或病症为血脂障碍或高脂血。
- [0468] 实施方案57.依照实施方案52的方法,其中所述有此类治疗需要的受试者是肥胖的。
- [0469] 实施方案58.一种药物组合物,其包含依照实施方案1-50中任一项的工程化多肽和药学可接受赋形剂。
- [0470] 实施方案59.依照实施方案58的药物组合物,其中所述药物组合物是口服药物组合物。
- [0471] 实施方案60.依照实施方案58至59中任一项的药物组合物,其中所述药物组合物是持续释放的或长效的药物组合物。
- [0472] 实施方案61.依照实施方案58至60中任一项的药物组合物,其中所述药物组合物是每日一次的药物组合物。
- [0473] 实施方案62.依照实施方案58至60中任一项的药物组合物,其中所述药物组合物是每日两次的药物组合物。
- [0474] 实施方案63.依照实施方案58至60中任一项的药物组合物,其中所述药物组合物是每周一次的药物组合物。
- [0475] 实施方案64.实施方案58至63中任一项的药物组合物,其用于治疗受试者中的疾病或病症。
- [0476] 实施方案65.实施方案64的药物组合物,其中所述疾病或病症为糖尿病、超重、肥胖症、阿耳茨海默氏病、脂肪肝病、短肠综合征、血脂障碍、冠心病、中风、高脂血、或帕金森氏病。
- [0477] 实施方案66.实施方案65的药物组合物,其中所述疾病或病症为糖尿病、超重、肥胖症、短肠综合征、或帕金森氏病。
- [0478] 实施方案67.实施方案66的药物组合物,其中所述疾病或病症为I型糖尿病、II型糖尿病或前驱糖尿病。
- [0479] 实施方案68.实施方案1至67中任一项的工程化多肽或药物组合物,其中所述工程化多肽或药物组合物提供每周一次的施用。
- [0480] 实施方案69.实施方案1至67中任一项的工程化多肽或药物组合物,其中所述工程化多肽或药物组合物提供每日一次的施用。
- [0481] 实施方案70.实施方案1至67中任一项的工程化多肽或药物组合物,其中所述工程化多肽或药物组合物提供每日两次的施用。
- [0482] 实施方案71.实施方案58至70中任一项的药物组合物,其中所述工程化多肽包含:
(SEQ ID NO:40),(SEQ ID NO:41),(SEQ ID NO:42),(SEQ ID NO:43),(SEQ ID NO:51),
(SEQ ID NO:163),(SEQ ID NO:99),(SEQ ID NO:169),(SEQ ID NO:170),(SEQ ID NO:
95),(SEQ ID NO:97),(SEQ ID NO:96),(SEQ ID NO:55),(SEQ ID NO:53),(SEQ ID NO:
62),(SEQ ID NO:67),(SEQ ID NO:166),(SEQ ID NO:167),(SEQ ID NO:51),(SEQ ID NO:
52),(SEQ ID NO:53),(SEQ ID NO:54),(SEQ ID NO:55),(SEQ ID NO:56),(SEQ ID NO:
57),(SEQ ID NO:58),(SEQ ID NO:59),(SEQ ID NO:60),(SEQ ID NO:61),(SEQ ID NO:
62),(SEQ ID NO:63),(SEQ ID NO:64),(SEQ ID NO:65),(SEQ ID NO:66),(SEQ ID NO:

67),(SEQ ID NO:68),(SEQ ID NO:70),(SEQ ID NO:71),(SEQ ID NO:72),(SEQ ID NO:73),(SEQ ID NO:74),(SEQ ID NO:75),(SEQ ID NO:76),(SEQ ID NO:77),(SEQ ID NO:78),(SEQ ID NO:79),(SEQ ID NO:80),(SEQ ID NO:81),(SEQ ID NO:82),(SEQ ID NO:83),(SEQ ID NO:84),(SEQ ID NO:85),(SEQ ID NO:86),(SEQ ID NO:87),(SEQ ID NO:88),(SEQ ID NO:89),(SEQ ID NO:90),(SEQ ID NO:91),(SEQ ID NO:92),(SEQ ID NO:93),(SEQ ID NO:94),(SEQ ID NO:95),(SEQ ID NO:96),(SEQ ID NO:97),(SEQ ID NO:98),(SEQ ID NO:99),(SEQ ID NO:100)(SEQ ID NO:101),(SEQ ID NO:102),(SEQ ID NO:103),(SEQ ID NO:104),(SEQ ID NO:105),(SEQ ID NO:106),(SEQ ID NO:107),(SEQ ID NO:108)或(SEQ ID NO:109)。

[0483] 实施方案72.实施方案58至71中任一项的药物组合物,其中所述工程化多肽包含:(SEQ ID NO:40),(SEQ ID NO:41),(SEQ ID NO:42),(SEQ ID NO:43),(SEQ ID NO:51),(SEQ ID NO:163),(SEQ ID NO:99),(SEQ ID NO:169),(SEQ ID NO:170),(SEQ ID NO:95),(SEQ ID NO:97),(SEQ ID NO:96),(SEQ ID NO:55),(SEQ ID NO:53),(SEQ ID NO:62),(SEQ ID NO:67),(SEQ ID NO:166)或(SEQ ID NO:167)。

[0484] 实施方案73.实施方案58至71中任一项的药物组合物,其中所述工程化多肽包含:(SEQ ID NO:40),(SEQ ID NO:41),(SEQ ID NO:42),(SEQ ID NO:43),(SEQ ID NO:51),(SEQ ID NO:163),(SEQ ID NO:99),(SEQ ID NO:169),(SEQ ID NO:170),(SEQ ID NO:95),(SEQ ID NO:97),(SEQ ID NO:96)或(SEQ ID NO:55)。

[0485] 实施方案74.实施方案58至67中任一项的药物组合物,其中所述工程化多肽包含(SEQ ID NO:95)的序列。

序列表

<110> 艾米琳制药有限公司 (Amylin Pharmaceuticals, Inc.)
 Erickson, Mary
 Litzinger, David C.
 Ghosh, Soumitra S.
 Guo, Zijian
 <120> 具有增强的作用持续时间的工程化多肽
 <130> 92494-819793
 <150> US 61/387,391
 <151> 2010-09-28
 <150> US 61/422,085
 <151> 2010-12-10
 <160> 212
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 珠毒蜥 (Heloderma horridum)
 <400> 1
 His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 [0001]
 <210> 2
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 钝尾毒蜥 (Heloderma suspectum)
 <400> 2
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 <210> 3
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 3
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 4
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 4

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser
 35

<210> 5
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 5

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

[0002]

<210> 6
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠(Rattus Norvegicus)

<400> 6

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 7
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 7

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 8
 <211> 37
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 9

<211> 32

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe
1 5 10 15

Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
20 25 30

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> 鲑鱼(Oncorhynchus gorbusha)

[0003]

<400> 10

Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15

His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Gly Thr Pro
20 25 30

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Leu Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15

His Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Asn Thr Tyr
20 25 30

<210> 12

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
20 25

<210> 13

<400> 13
000

<210> 14

<400> 14
000

<210> 15

<400> 15
000

<210> 16

<400> 16
000

<210> 17

<400> 17
000

<210> 18

<400> 18
000

<210> 19

<400> 19
000

[0004]

<210> 20

<400> 20
000

<210> 21

<400> 21
000

<210> 22

<400> 22
000

<210> 23

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 23

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

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

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 24

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 24

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val His Thr Leu Ile Gly His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 25

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 25

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Asn Ala Leu Thr His His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

[0005]

<210> 26

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 26

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Arg Ala Arg Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val His Ala Leu Ile Asp His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 27

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 27

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 28
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 28

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

Gly Val Ser Ser Leu Lys Gly His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 29
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 29

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

[0006]

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

Gly Val Glu Ala Leu Thr Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 30
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 30

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

Gly Val Asp Ala Leu Ile Ala His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 31
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 31

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Ser Leu Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Asp Ala Leu Thr Ser His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 32
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 32

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Asn Ser Leu Thr Ser His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 33
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 33

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Asn Val Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Ile Ala Asp Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 34
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 34

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

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

Gly Val Gln Ala Leu Ile Ala His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 35

[0007]

<211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 35
 Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15
 Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30
 Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 36
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 36
 Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15
 Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

[0008]

Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

 <210> 37
 <400> 37
 000

 <210> 38
 <400> 38
 000

 <210> 39
 <400> 39
 000

 <210> 40
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 40
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
 35 40 45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
65 70 75 80

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 41
<211> 105
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 41

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys
50 55 60

[0009]

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

Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu
85 90 95

Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
100 105

<210> 42
<211> 91
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 42

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser Leu Ala Glu
35 40 45

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

Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu
65 70 75 80

Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 43
<211> 103
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 43

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
35 40 45

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

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

Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu
85 90 95

[0010]

His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
100

<210> 44

<400> 44
000

<210> 45

<400> 45
000

<210> 46

<400> 46
000

<210> 47

<400> 47
000

<210> 48

<400> 48
000

<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 49

His His His His His His
1 5

<210> 50
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 50
 Met Ala His His His His His His Val Gly Thr Gly Ser Asn Glu Asn
 1 5 10 15
 Leu Tyr Phe Gln His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys
 20 25 30
 Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln
 35 40 45
 Gly Gly Pro Ser Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 50 55 60
 Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr
 65 70 75 80
 Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 85 90 95
 Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 100 105 110

[0011]

<210> 51
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 51
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
 35 40 45
 Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala
 50 55 60
 Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
 65 70 75 80
 Leu Pro

<210> 52
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

<400> 52

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
35 40 45

Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala
50 55 60

Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
65 70 75 80

Leu Pro

<210> 53

<211> 94

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 53

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
50 55 60

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
65 70 75 80

Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 54

<211> 94

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 54

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser

[0012]

```

          35          40          45
Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 50          55          60

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
 65          70          75          80

Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
          85          90

```

<210> 55
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 55

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1          5          10          15

```

```

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20          25          30

```

```

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
 35          40          45

```

```

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 50          55          60

```

[0013]

```

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
 65          70          75          80

```

```

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
          85          90

```

<210> 56
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 56

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1          5          10          15

```

```

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20          25          30

```

```

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35          40          45

```

```

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys
 50          55          60

```

```

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

```

```

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

```

```

85          90          95
Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
100          105

<210> 57
<211> 91
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 57
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1          5          10          15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20          25          30
Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu
35          40          45
Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp
50          55          60
Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu
65          70          75          80
Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85          90

```

[0014]

```

<210> 58
<211> 103
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 58
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1          5          10          15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20          25          30
Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
35          40          45
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu
50          55          60
Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg
65          70          75          80
Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu
85          90          95
His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
100

<210> 59

```

<211> 98
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 59
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Thr Gly Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
 50 55 60
 Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala
 65 70 75 80
 Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
 85 90 95
 Leu Pro

[0015]

<210> 60
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 60
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Thr Gly Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
 50 55 60
 Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
 85 90 95
 Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 100 105

<210> 61
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 61

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
50 55 60

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 62

<211> 94

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 62

[0016]

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
50 55 60

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
65 70 75 80

Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 63

<211> 93

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 63

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
 35 40 45
 Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 50 55 60
 Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 65 70 75 80
 Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85 90

<210> 64
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 64

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45

[0017]

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys
 50 55 60

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

Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu
 85 90 95

Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 100 105

<210> 65
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 65

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu
 35 40 45

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

Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg
65 70 75 80

Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 66

<211> 103

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 66

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
35 40 45

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

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

[0018]

Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu
85 90 95

His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
100

<210> 67

<211> 82

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 67

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
35 40 45

Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala
50 55 60

Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
65 70 75 80

Leu Pro

<210> 68
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 68
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
 35 40 45
 Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala
 50 55 60
 Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
 65 70 75 80
 Leu Pro

[0019]

<210> 69
 <400> 69
 000
 <210> 70
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 70
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
 35 40 45
 Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 50 55 60
 Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
 65 70 75 80
 Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85 90

 <210> 71
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>

<223> 合成多肽

<400> 71

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
35 40 45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
65 70 75 80

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 72

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 72

[0020]

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys
50 55 60

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

Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu
85 90 95

Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
100 105

<210> 73

<211> 91

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 73

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu
 35 40 45
 Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp
 50 55 60
 Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg
 65 70 75 80
 Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85 90

<210> 74
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 74

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

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

[0021]

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 35 40 45

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

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

Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu
 85 90 95

His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 100

<210> 75
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 75

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Thr Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
 50 55 60

Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala
 65 70 75 80

Lys Thr Val Gln Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
 85 90 95

Leu Pro

<210> 76
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 76

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Thr Gly Gly Gly
 35 40 45

[0022]

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
 50 55 60

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

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
 85 90 95

Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 100 105 110

<210> 77
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 77

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
 35 40 45

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

Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 78
<211> 88
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 78

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
50 55 60

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

[0023]

<210> 79
<211> 86
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 79

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu
50 55 60

Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 80
<211> 77
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽
 <400> 80
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 35 40 45
 Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
 50 55 60
 Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 65 70 75

<210> 81
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽
 <400> 81
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 35 40 45
 Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
 50 55 60
 Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 65 70 75

[0024]

<210> 82
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 82
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
 35 40 45
 Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
 50 55 60

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 83
<211> 86
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 83

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu
50 55 60

Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

[0025]

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 84
<211> 93
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 84

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Gly Gly Gly Leu
35 40 45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
65 70 75 80

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 85
<211> 88

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 85
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
50 55 60

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

[0026]

<210> 86
<211> 77
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 86
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
35 40 45

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
50 55 60

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

<210> 87
<211> 88
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 87
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

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

Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 88

<211> 86

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 88

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

[0027]

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 89

<211> 77

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 89

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
35 40 45

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
50 55 60

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

<210> 90
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 90
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 50 55 60
 Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 65 70 75

[0028]

<210> 91
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 91
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
 35 40 45
 Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys
 50 55 60
 Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
 65 70 75 80
 Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85

<210> 92
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成多肽

 <400> 92
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 93

<211> 93

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 93

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Gly Gly Leu
35 40 45

[0029]

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
65 70 75 80

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 94

<211> 88

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 94

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

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

Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 95
<211> 88
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 95

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
50 55 60

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

[0030]

<210> 96
<211> 86
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 96

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu
50 55 60

Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 97
<211> 77
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 97

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Ser Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
35 40 45

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
50 55 60

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

<210> 98

<211> 77

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 98

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

[0031]

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Ser Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
35 40 45

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
50 55 60

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

<210> 99

<211> 88

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 99

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
50 55 60

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 100
<211> 86
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 100

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu
50 55 60

Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

[0032]

<210> 101
<211> 93
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 101

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Gly Gly Ser Leu
35 40 45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
65 70 75 80

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 102
<211> 77
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽
 <400> 102
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Ser Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 50 55 60
 Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 65 70 75

<210> 103
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽
 <400> 103
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
 35 40 45
 Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys
 50 55 60
 Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
 65 70 75 80
 Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85

<210> 104
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽
 <400> 104
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Ser Leu Ala Gln Ala Lys Val Leu Ala
 35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile
 50 55 60
 Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His
 65 70 75 80
 Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85

<210> 105
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 105

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Ser Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 50 55 60

[0034]

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 65 70 75
 <210> 106
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 106
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Ser Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 50 55 60
 Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 65 70 75

<210> 107
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成多肽

<400> 107

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

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

Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 108

<211> 86

<212> PAT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 108

[0035]

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 109

<211> 93

<212> PAT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 109

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Gly Ser Leu
35 40 45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
65 70 75 80

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 110

<400> 110
000

<210> 111

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 111

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

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

[0036]

Lys Glu Ile Ile Ser
35

<210> 112

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 112

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser
35

<210> 113

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 113

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

	20	25	30
	Ser Gly Ala Pro Pro Ser		
	35		
<210>	114		
<211>	43		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	114		
	His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu		
	1 5 10 15		
	Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser		
	20 25 30		
	Lys Glu Ile Ile Ser Lys Lys Lys Lys Lys		
	35 40		
<210>	115		
<211>	45		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	115		
[0037]	His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu		
	1 5 10 15		
	Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser		
	20 25 30		
	Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys		
	35 40 45		
<210>	116		
<211>	43		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	116		
	His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu		
	1 5 10 15		
	Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser		
	20 25 30		
	Lys Glu Ile Ile Ser Lys Lys Lys Lys Lys		
	35 40		
<210>	117		
<211>	44		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		

<400> 117

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40

<210> 118

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 118

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40

<210> 119

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa 可为 Y 或 F(Xaa can be Y or F)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa 可为 N, R 或 S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa 可为 V, I, L, M, F 或 Y

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa 可为 N, S, E 或 D

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa 可为 R, K 或 N

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa 可为 K 或 R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa 可为 D, N, Q, E, H, S, R 或 K

[0038]

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa 可为 K, I 或 T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa 可为 A, S, T, G, H, L 或 D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> Xaa 可为 H, E 或 D

<400> 119

Gly Val Ser Asp Xaa Tyr Lys Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Ala Xaa Thr Val
1          5          10          15

Glu Gly Val Xaa Ala Leu Xaa Xaa Xaa Ile
          20          25

<210> 120
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 120

Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val
1          5          10          15

```

[0039] Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile
 20 25

```

<210> 121
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa 可为 V 或 E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa 可为 L, E 或 D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa 可为 N, I 或 I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa 可为 R 或 K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa 可为 D 或 K

<220>
<221> MISC_FEATURE

```

```

<222> (20)..(20)
<223> Xaa 可为 Y 或 F

<220>
<221> MISC.FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa 可为 N, R 或 S

<220>
<221> MISC.FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa 可为 V, I, L, M, P 或 Y

<220>
<221> MISC.FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> Xaa 可为 N, S, E 或 D

<220>
<221> MISC.FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> Xaa 可为 R, K 或 N

<220>
<221> MISC.FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> Xaa 可为 K 或 R

<220>
<221> MISC.FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> Xaa 可为 D, N, Q, E, H, S, R 或 K

<220>
<221> MISC.FEATURE
<222> (38)..(38)
<223> Xaa 可为 K, I 或 T

[0040] <220>
<221> MISC.FEATURE
<222> (39)..(39)
<223> Xaa 可为 A, S, T, G, H, I 或 D

<220>
<221> MISC.FEATURE
<222> (40)..(40)
<223> Xaa 可为 H, E 或 D

<400> 121
Leu Ala Glu Ala Lys Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Glu Leu Xaa Lys Tyr Gly
1          5          10          15

Val Ser Asp Xaa Tyr Lys Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Ala Xaa Thr Val Glu
20          25          30

Gly Val Xaa Ala Leu Xaa Xaa Xaa Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35          40          45

<210> 122
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 122
Leu Ala Glu Ala Lys Glu Asp Ala Ile Lys Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1          5          10          15

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

```

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ser Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 123
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 123

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Asp Ala Ile Lys Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

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

Gly Val Glu Ala Leu Thr Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 124
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 124

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Asp Ala Ile Lys Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

[0041]

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

Gly Val Glu Ala Leu Ile Ser Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 125
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 125

Gly Gly Gly Gly
1

<210> 126
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 126

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 127
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(6)
<223> Xaa 可为 Gly 或不存在

<400> 127
Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa Glu
1 5

<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(6)
<223> Xaa 可为 Gly 或不存在

<400> 128
Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa Lys
1 5

<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

[0042]

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(6)
<223> Xaa 可为 Gly 或不存在

<400> 129
Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa Asp
1 5

<210> 130
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(6)
<223> Xaa 可为 Gly 或不存在

<400> 130
Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa Arg
1 5

<210> 131
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽
<400> 131
Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽
<400> 132
Gly Gly Gly Asn Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽
<400> 133
Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

[0043]

<210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽
<400> 134
Gly Pro Asn Gly Gly
1 5

<210> 135
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽
<400> 135
Gly Ser
1

<210> 136
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽
<400> 136
Gly Gly Ser
1

<210> 137
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 137

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 138
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 138

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 139
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 139

[0044]

Gly Glu
1

<210> 140
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 140

Gly Gly Glu
1

<210> 141
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 141

Gly Gly Gly Glu
1

<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 142

[0045]

Gly Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 143
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 143

Gly Asp
1

<210> 144
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 144

Gly Gly Asp
1

<210> 145
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 145

Gly Gly Gly Asp
1

<210> 146
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 146

Gly Gly Gly Gly Asp
1 5

<210> 147
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 147

Gly Lys
1

<210> 148
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0046]

<223> 合成多肽

<400> 148

Gly Gly Lys
1

<210> 149

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 149

Gly Gly Gly Lys
1

<210> 150

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 150

Gly Gly Gly Gly Lys
1 5

<210> 151

<211> 2

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 151

Gly Arg
1

<210> 152

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 152

Gly Gly Arg
1

<210> 153

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 153

Gly Gly Gly Arg
1

<210> 154

<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 154

Gly Gly Gly Gly Arg
1 5

<210> 155
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 155

Glu Ala Ala Ala Lys
1 5

<210> 156
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 156

Met Ala His His His His His Val Gly Thr Gly Ser Asn Glu Asn
1 5 10 15

[0047]

Leu Tyr Phe Gln His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys
20 25 30

Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
35 40 45

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
50 55 60

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

Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala
85 90 95

Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
100 105 110

Leu Pro

<210> 157
<211> 102
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 157

Met Ala His His His His His Val Gly Thr Gly Ser Asn Glu Asn
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gln His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys
 20 25 30
 Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
 35 40 45
 Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
 50 55 60
 Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu
 65 70 75 80
 Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His
 85 90 95
 Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 100

<210> 158
 <211> 114
 <212> P8T
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 158

Met Ala His His His His His Val Gly Thr Gly Ser Asn Glu Asn
 1 5 10 15

[0048]

Leu Tyr Phe Gln His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys
 20 25 30
 Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
 35 40 45
 Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 50 55 60
 Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
 65 70 75 80
 Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala
 85 90 95
 Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
 100 105 110

Leu Pro

<210> 159
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 159

Met Ala His His His His His Val Gly Thr Gly Ser Asn Glu Asn
 1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gln His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys
 20 25 30
 Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
 35 40 45
 Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
 50 55 60
 Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile
 65 70 75 80
 Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His
 85 90 95
 Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 100

<210> 160
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 160

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
 1 5 10 15

[0049]

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
 20 25 30
 Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
 35 40 45
 Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
 50 55 60
 Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
 65 70 75 80
 Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
 85 90 95
 Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
 100 105 110
 Ser Gly His Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 115 120 125
 Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
 130 135 140
 His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln His
 145 150 155 160
 Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu
 165 170 175

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser
180 185 190

Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
195 200 205

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
210 215 220

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
225 230 235 240

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
245 250 255

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
260

<210> 161
<211> 253
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 161

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
35 40 45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
50 55 60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
85 90 95

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
100 105 110

Ser Gly His Met His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
115 120 125

Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
130 135 140

His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln His
145 150 155 160

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
165 170 175

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly Gly
180 185 190

[0050]

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
195 200 205

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
210 215 220

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
225 230 235 240

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245 250

<210> 162
<211> 241
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 合成多肽

<400> 162

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
35 40 45

[0051]

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
50 55 60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
85 90 95

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
100 105 110

Ser Gly His Met His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
115 120 125

Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
130 135 140

His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln His
145 150 155 160

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
165 170 175

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp
195 200 205

Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys
210 215 220

Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
225 230 235 240

Pro

<210> 163
<211> 91
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 163

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

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

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu
35 40 45

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

[0052]

Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu
65 70 75 80

Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 164
<211> 74
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 164

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Leu Ala Glu Ala
20 25 30

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe
35 40 45

Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala
50 55 60

Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70

<210> 165
<211> 73
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽
 <400> 165
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Leu Ala Glu Ala Lys
 20 25 30
 Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr
 35 40 45
 Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu
 50 55 60
 Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 65 70

<210> 166
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽
 <400> 166
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Tyr
 35 40 45
 Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 50 55 60
 Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 65 70 75

[0053]

<210> 167
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 167
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
 35 40 45
 Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
 50 55 60

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70

<210> 168

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 168

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Lys Asn Ala Lys Glu
35 40 45

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

Phe Asn Ala Val Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Glu Val Asn Ala Leu
65 70 75 80

Lys Asn Glu Ile Leu Lys Ala Leu Pro
85

[0054]

<210> 169

<211> 88

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 169

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ser Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Met Ala Ile Arg Glu Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
50 55 60

Asp Lys Ile Asp Asp Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Val Ala Leu Lys
65 70 75 80

Asp Leu Ile Leu Asn Ser Leu Pro
85

<210> 170

<211> 88

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 170

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Lys Ala Lys Ala
35 40 45

Asp Ala Ile Glu Ile Leu Lys Lys Tyr Gly Ile Gly Asp Tyr Tyr Ile
50 55 60

Lys Leu Ile Asn Asn Gly Lys Thr Ala Glu Gly Val Thr Ala Leu Lys
65 70 75 80

Asp Glu Ile Leu Ala Ser Leu Pro
85

<210> 171

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MOD RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

[0055]

<400> 171

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr Tyr Gly Val
20 25 30

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
35 40 45

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
50 55 60

<210> 172

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 172

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr Tyr Gly Val
20 25 30

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
35 40 45

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
50 55 60

<210> 173
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 173

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr Gly Gly Gly
20 25 30

Ser Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys
35 40 45

Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
50 55 60

Pro
65

<210> 174

<400> 174
000

[0056] <210> 175

<400> 175
000

<210> 176
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 176

Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr
1 5 10 15

Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
20 25 30

Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 177
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 177

Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr
1 5 10 15

Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
20 25 30

Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 178

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 178

Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 179

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 179

[0057]

Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 180

<211> 47

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 180

Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 181

<211> 47

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽
<400> 181
Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys
1 5 10 15
Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr
20 25 30
Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 182
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> Xaa 可为 V 或 E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa 可为 L, E 或 D

[0058]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa 可为 N, L 或 I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa 可为 R 或 K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa 可为 D 或 K

<400> 182
Leu Ala Glu Ala Lys Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Glu Leu Xaa Lys Tyr
1 5 10 15

<210> 183
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 183

Leu Ala Ala Leu Pro
1 5

<210> 184
<211> 50
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 184

Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu
1 5 10 15

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
20 25 30

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys
35 40 45

Lys Lys
50

<210> 185

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 185

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Trp Leu Lys Asn Gly Gly
20 25 30

Pro Ser Ser Gly Ala Ser
35

[0059]

<210> 186

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 186

Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu
1 5 10 15

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
20 25 30

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser
35 40

<210> 187

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 187

Asn Glu Glu Glu Glu Glu His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu
1 5 10 15

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
20 25 30

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser
35 40

<210> 188
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 188

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40

<210> 189
<211> 48
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 189

Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu
1 5 10 15

[0060]

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
20 25 30

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40 45

<210> 190
<211> 48
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 190

Asp Glu Glu Glu Glu Glu His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu
1 5 10 15

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
20 25 30

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40 45

<210> 191
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 191

Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5

<210> 192
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 192

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 193
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 193

Thr Gly Gly Gly Gly Ala Ser
1 5

<210> 194
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 194

Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser
1 5

<210> 195
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 195

Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5

<210> 196
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 196

Gly Gly Gly Gly
1

<210> 197
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0061]

[0062]

<223> 合成多肽

<400> 197

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 198

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 198

Thr Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 199

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 199

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 200

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 200

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 201

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 201

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 202

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 202

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Ser
20

<210> 203
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 203

Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5

<210> 204
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 204

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5 10

<210> 205
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

[0063]

<220>
<223> 合成多肽

<400> 205

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5 10

<210> 206
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 206

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Ala Ser

<210> 207
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 207

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Ala Ser
20

<210> 208
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 208

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5

<210> 209
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 209

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5 10

<210> 210
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 210

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5 10 15

<210> 211
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 211

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Ala Ser
20

<210> 212
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 212

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
20

[0064]

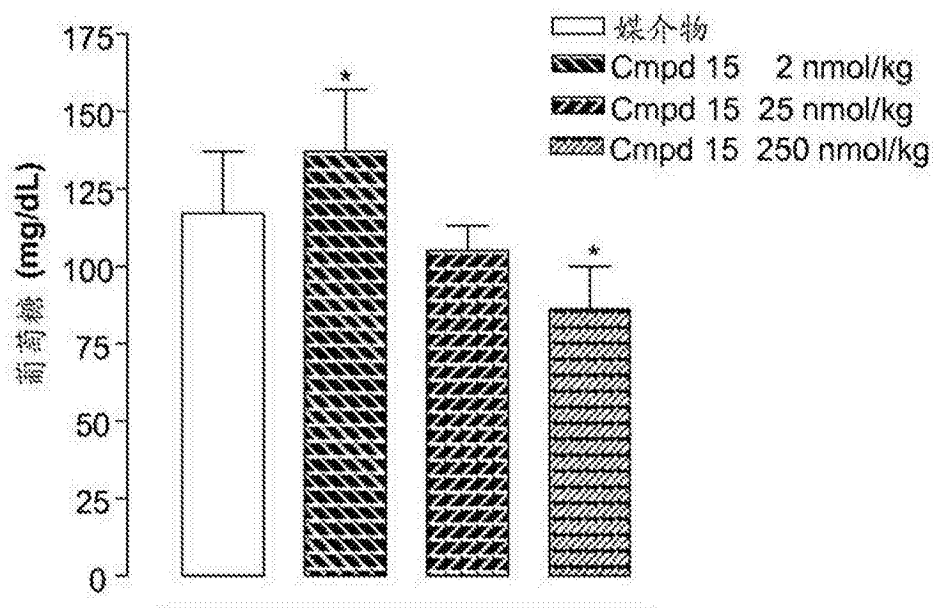


图1A

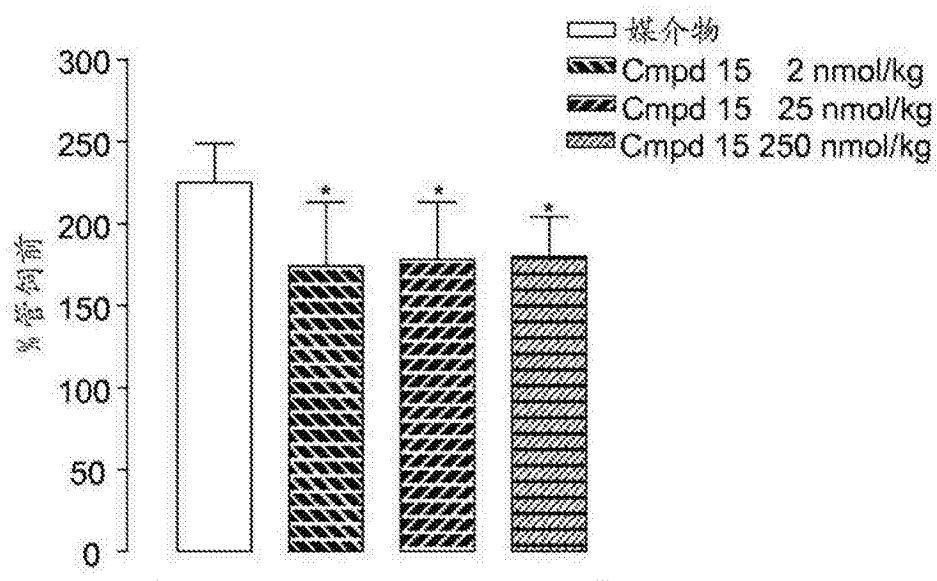


图1B

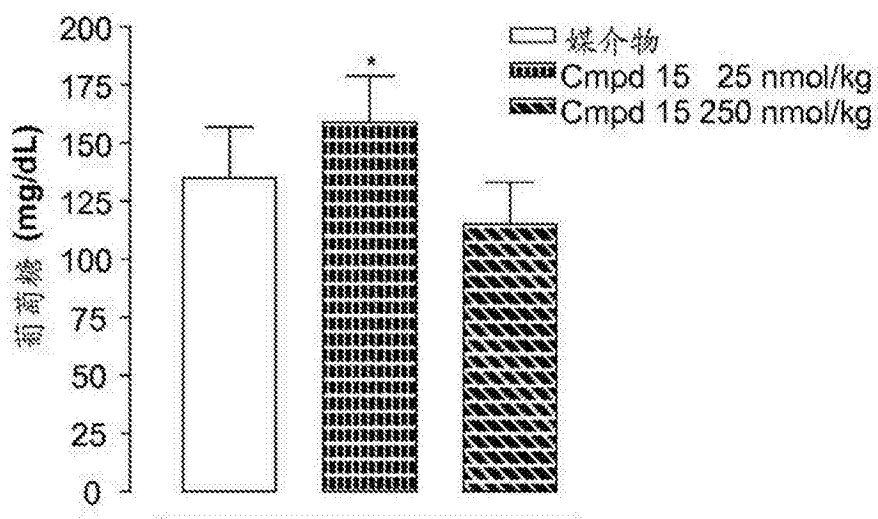


图2A

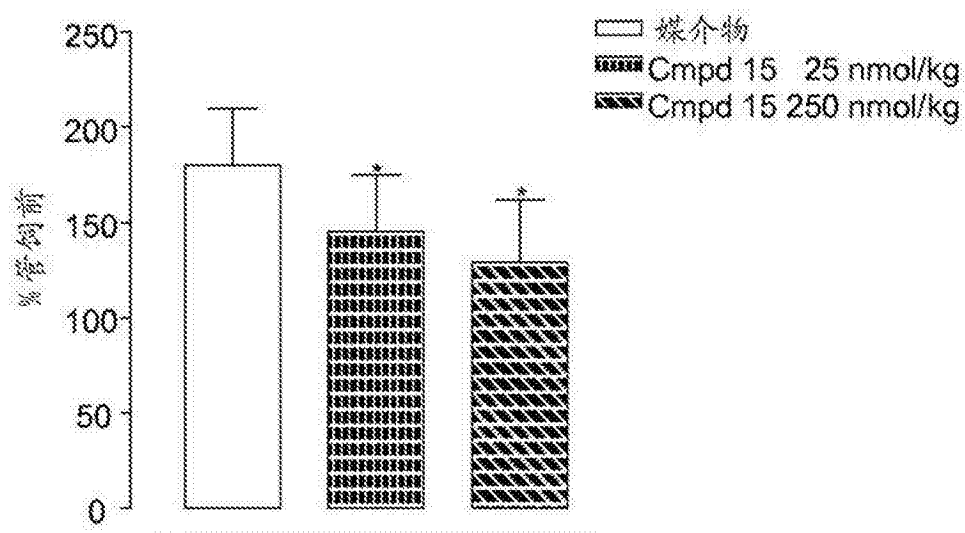


图2B

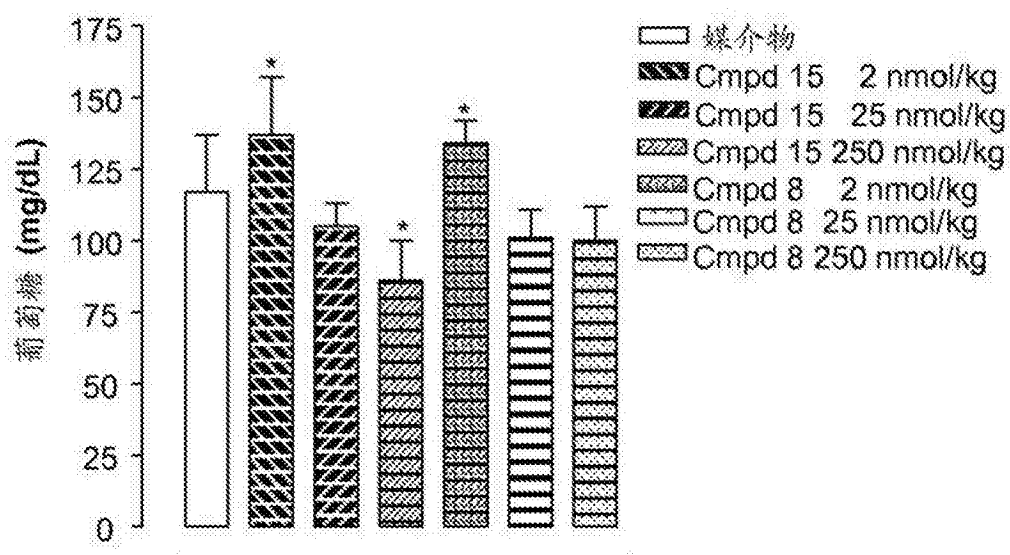


图3A

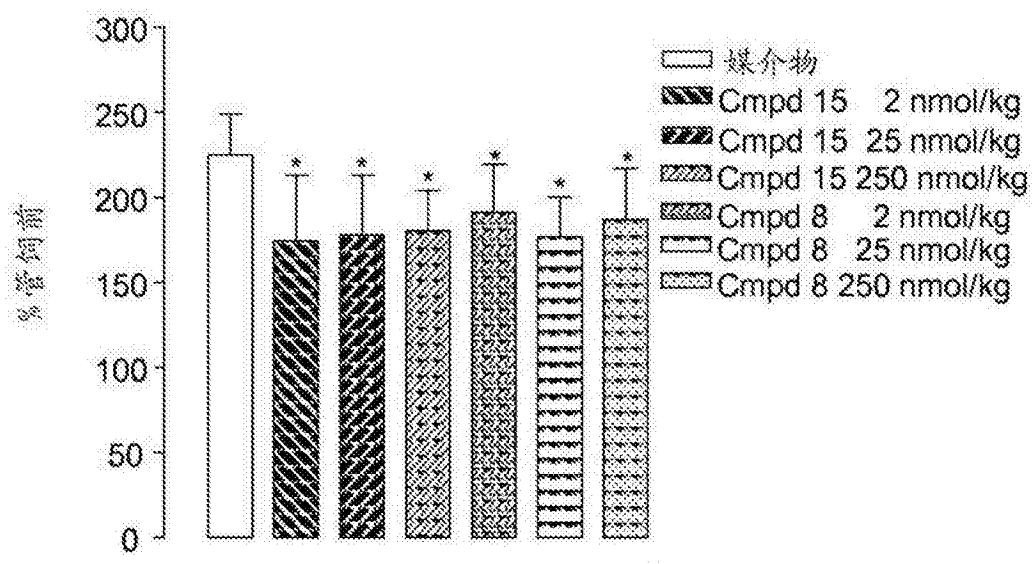


图3B

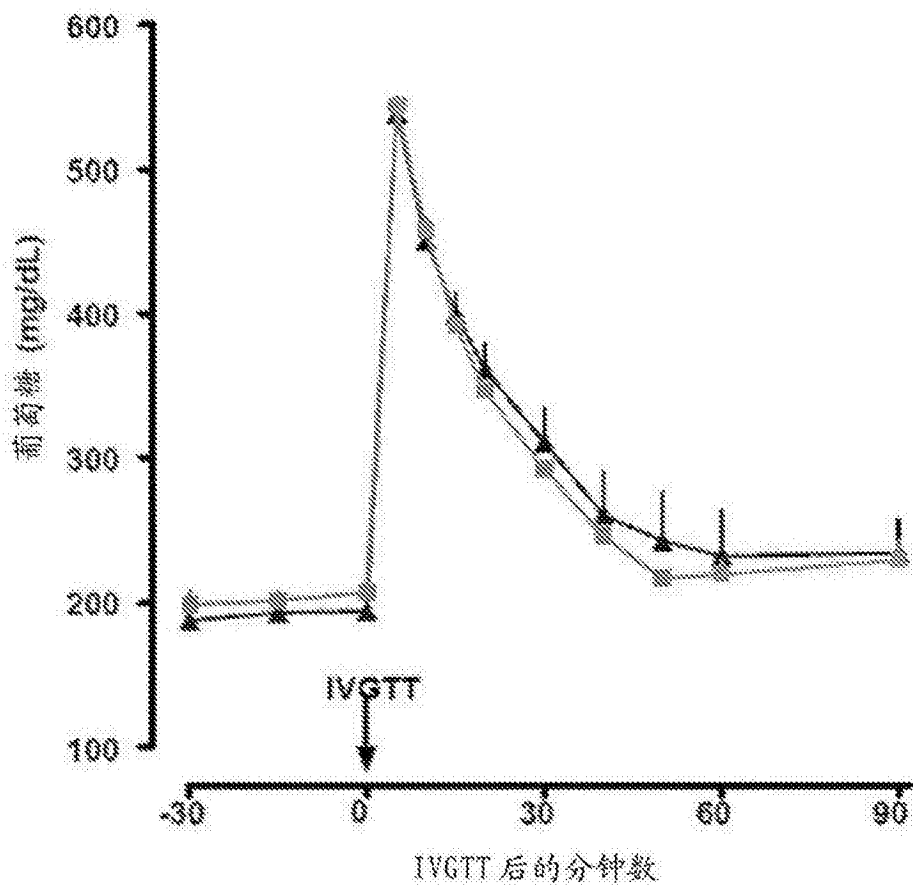
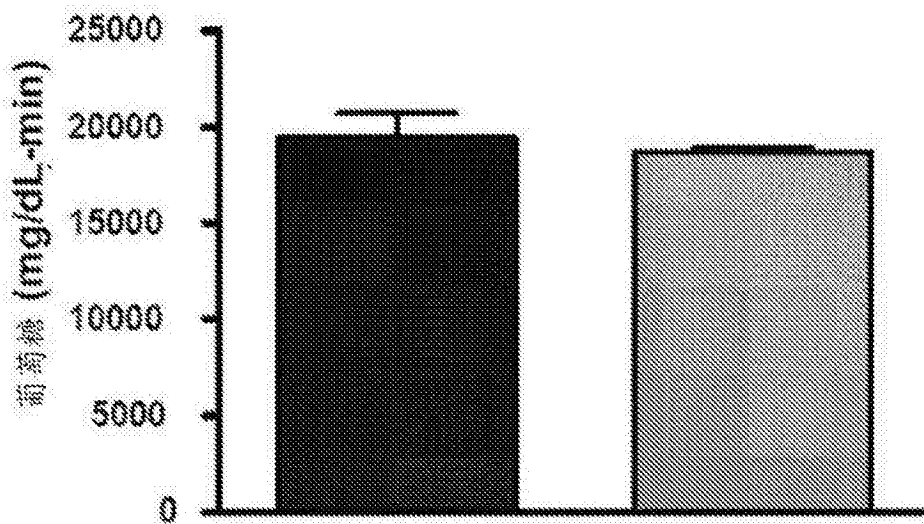


图4A



* 相对于媒介物对照, $P < 0.05$

图4B

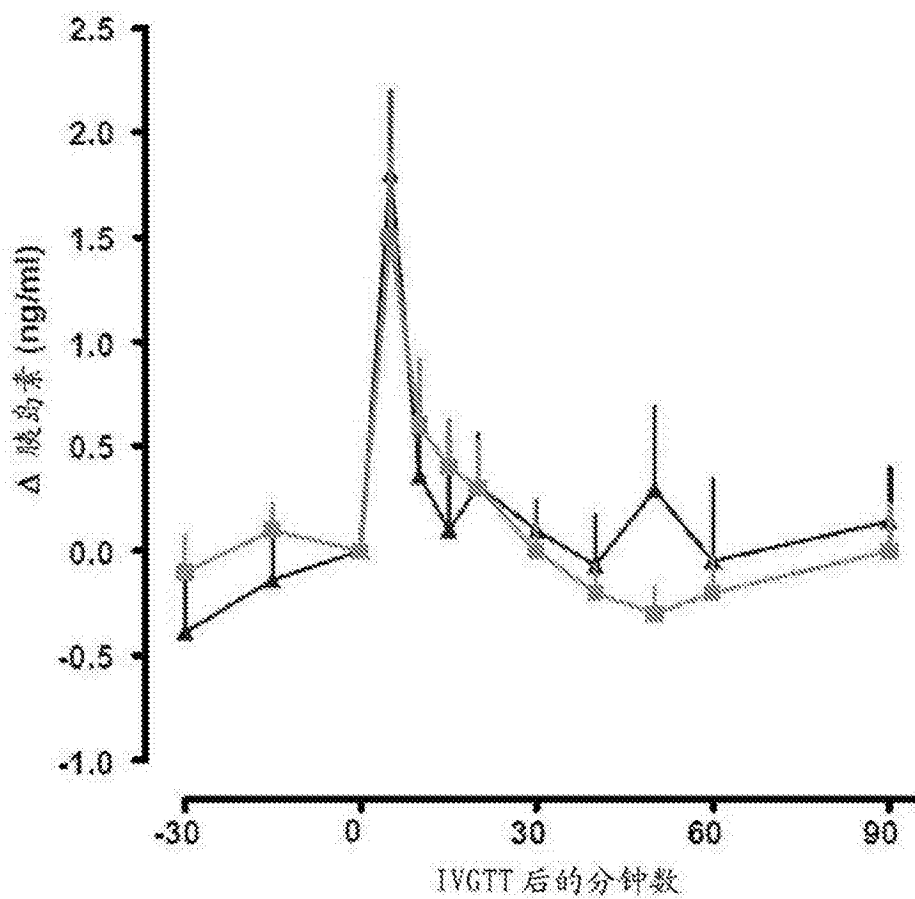
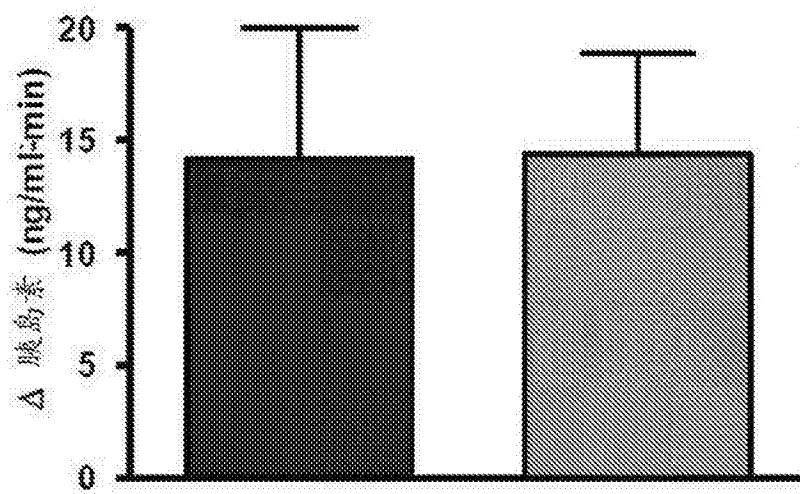


图4C



* 相对于媒介物对照, $P < 0.05$

图4D

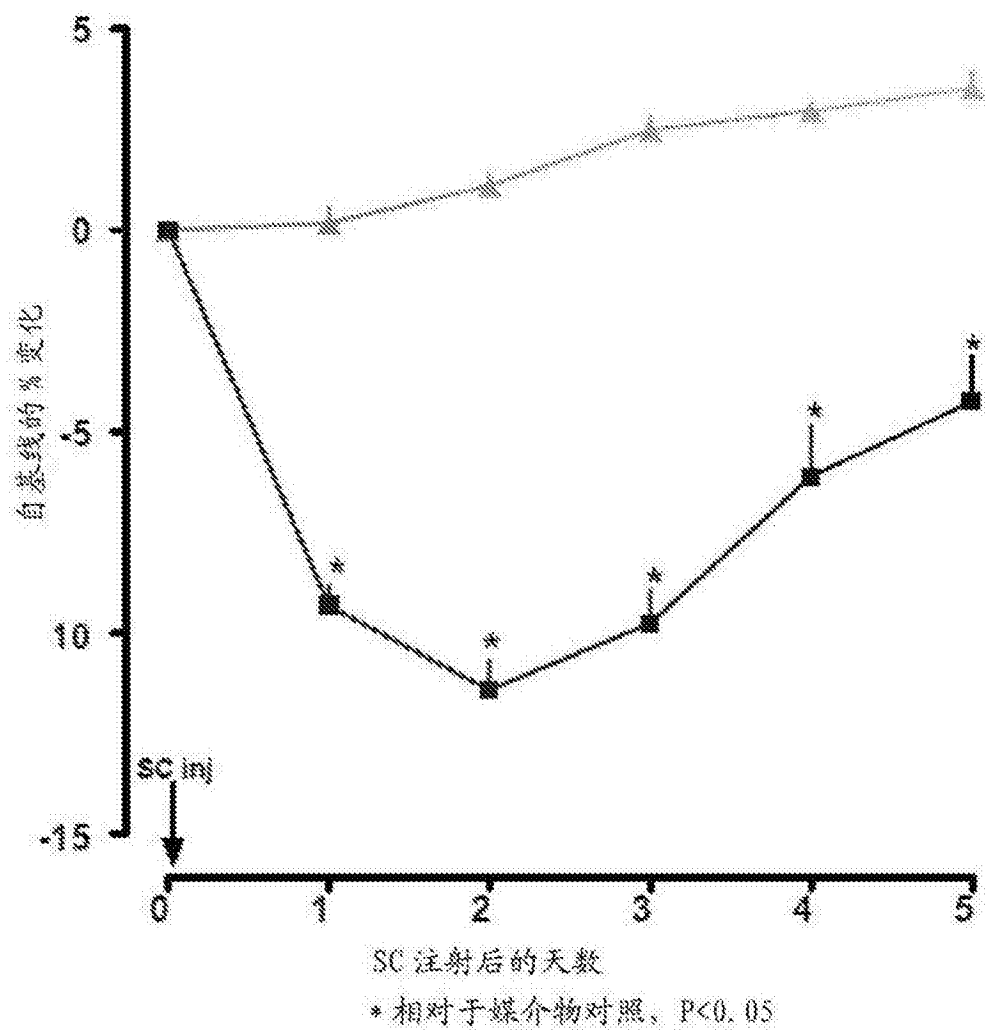


图4E

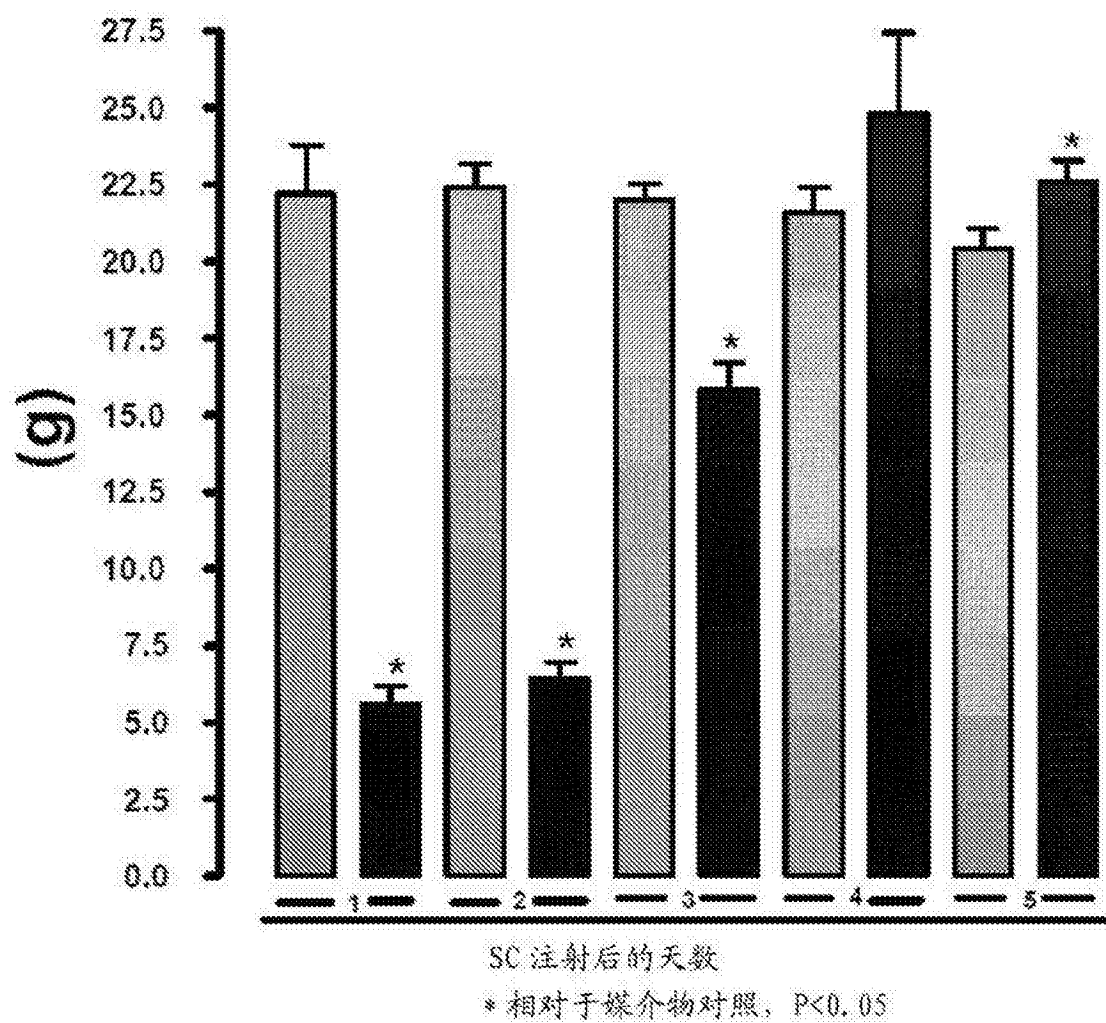


图4F

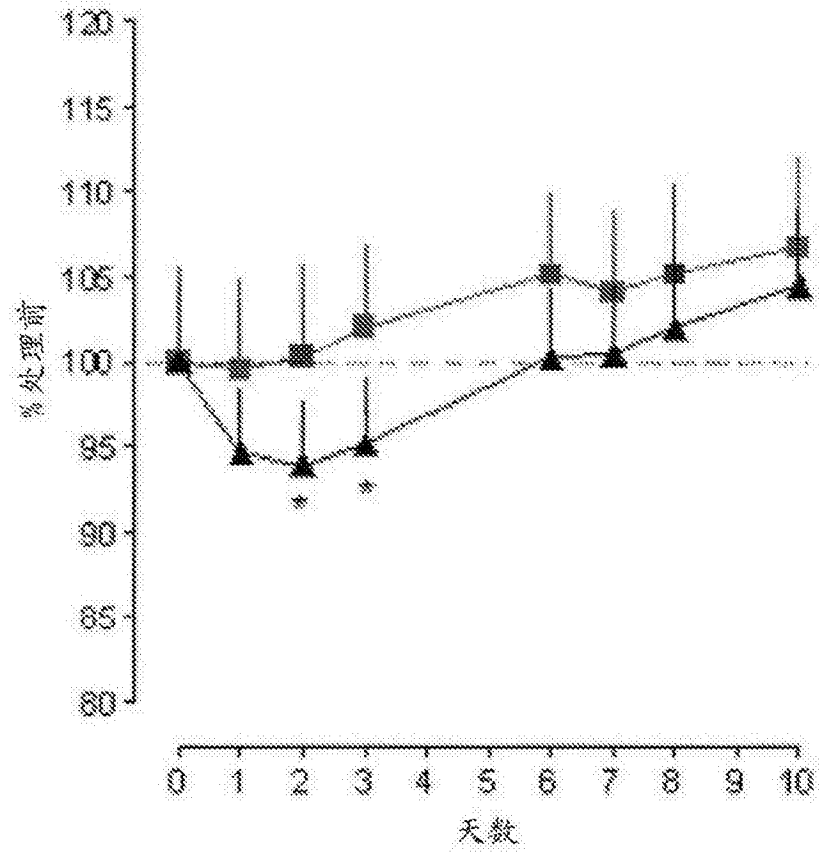


图5A

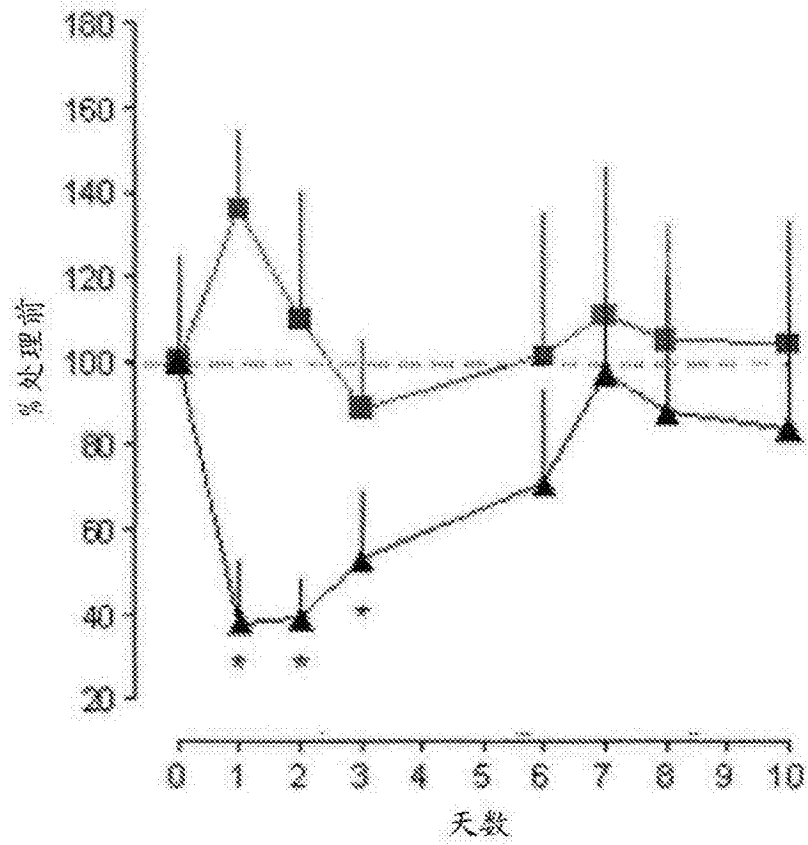


图5B

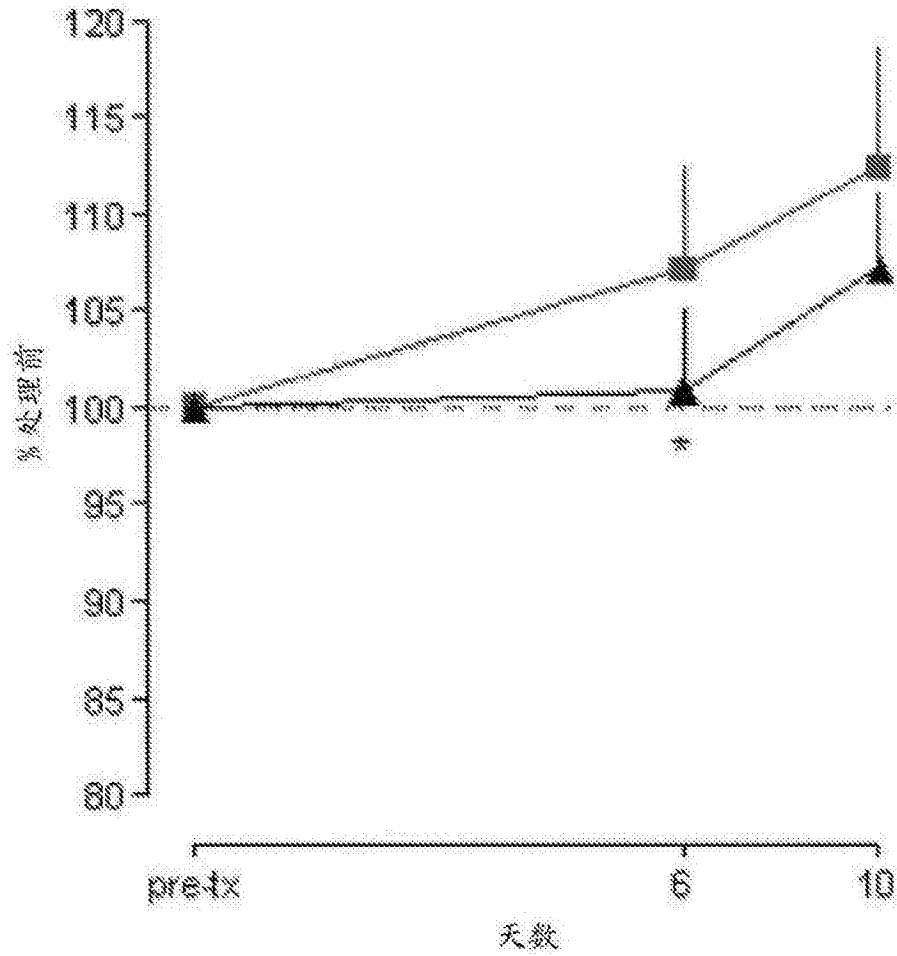


图5C

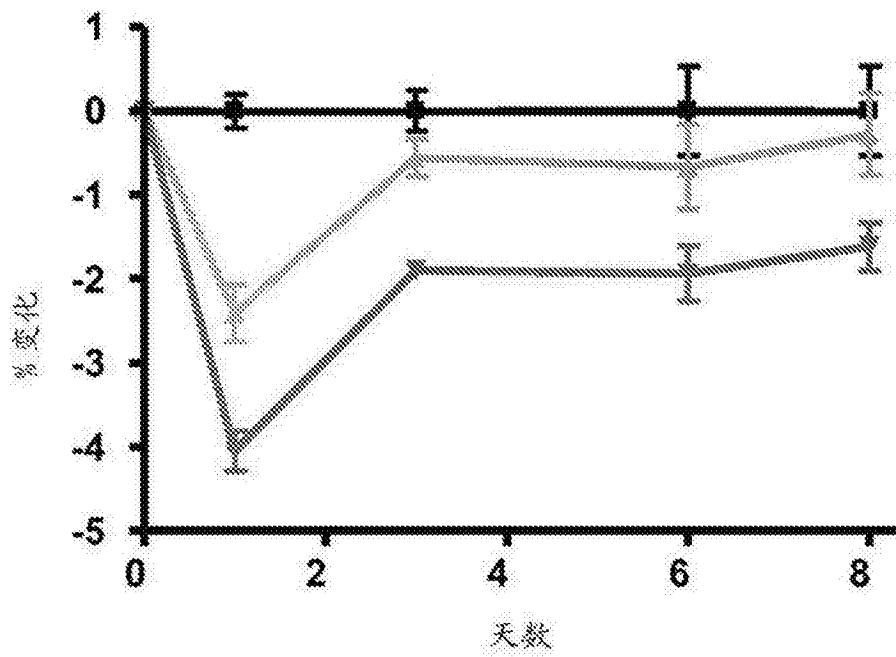
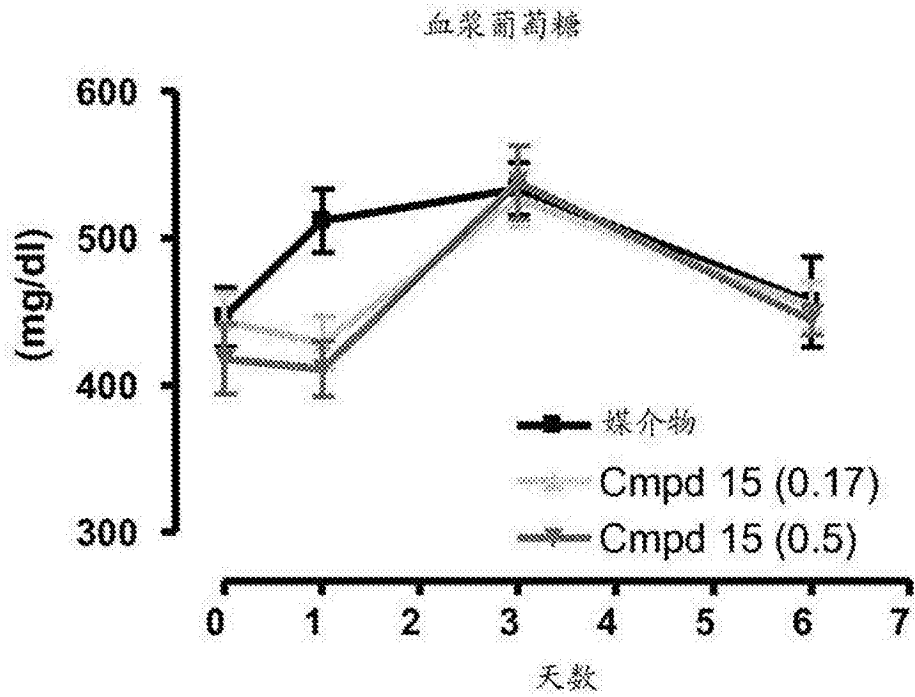


图6A



* 排除 HI (>600) 的血糖测计仪读数

图6B

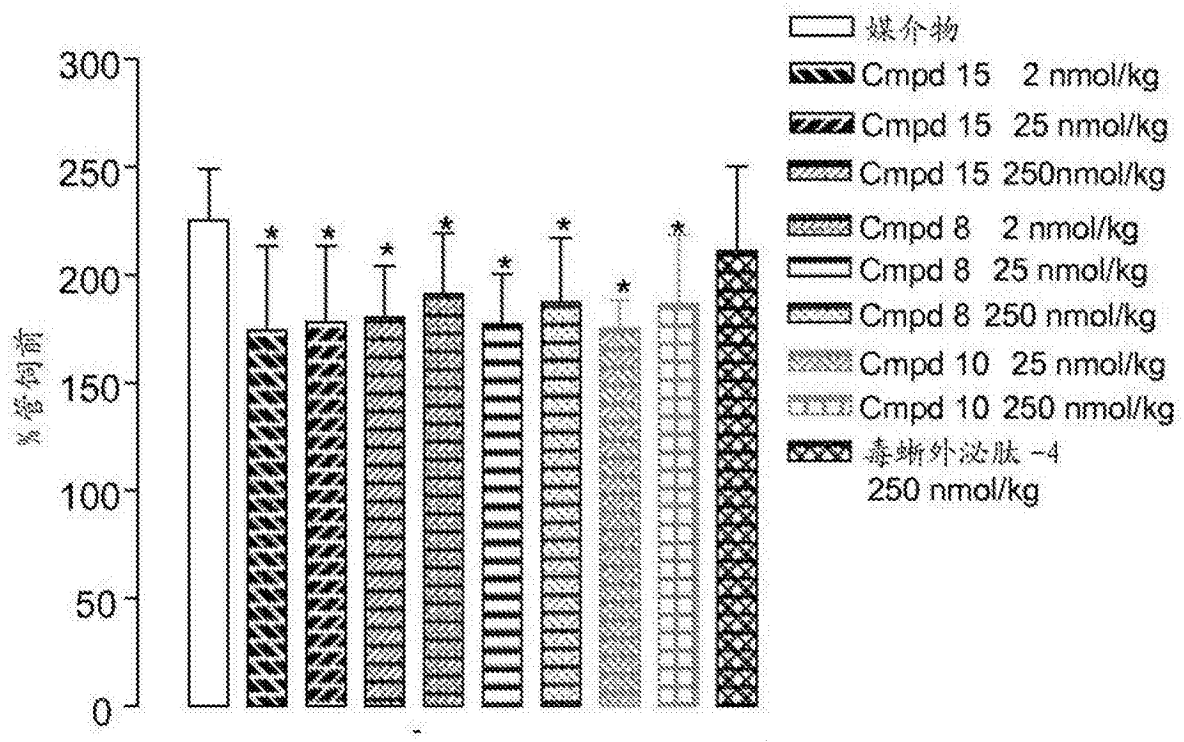


图7

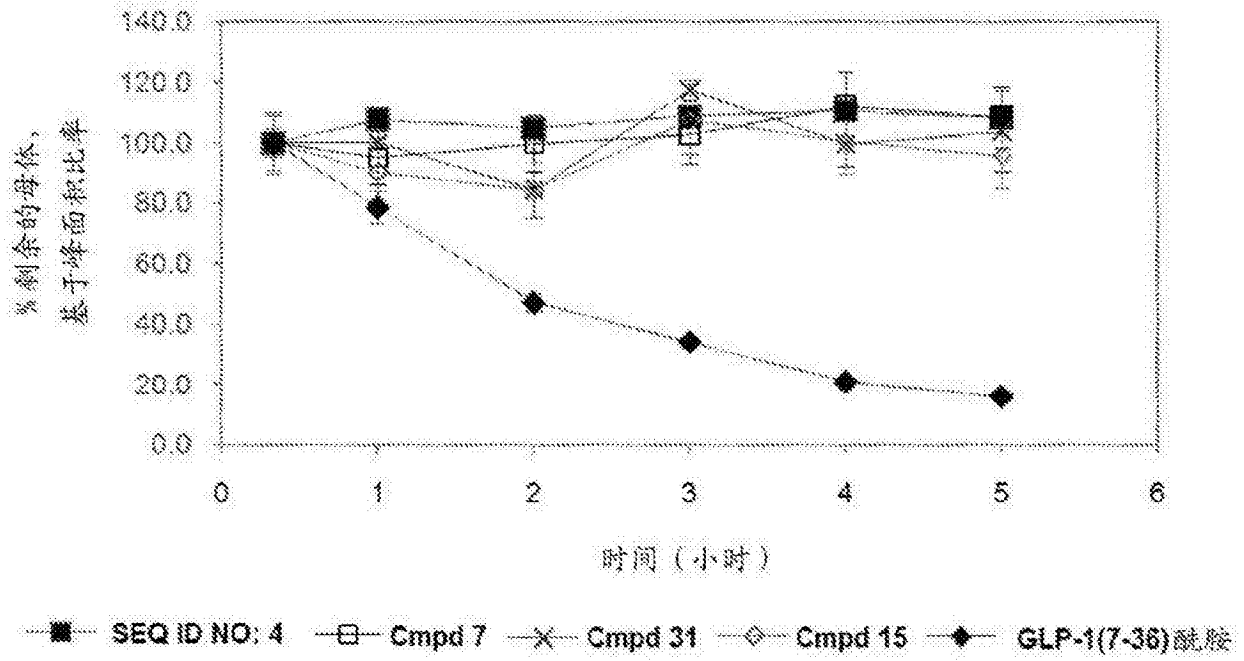


图8

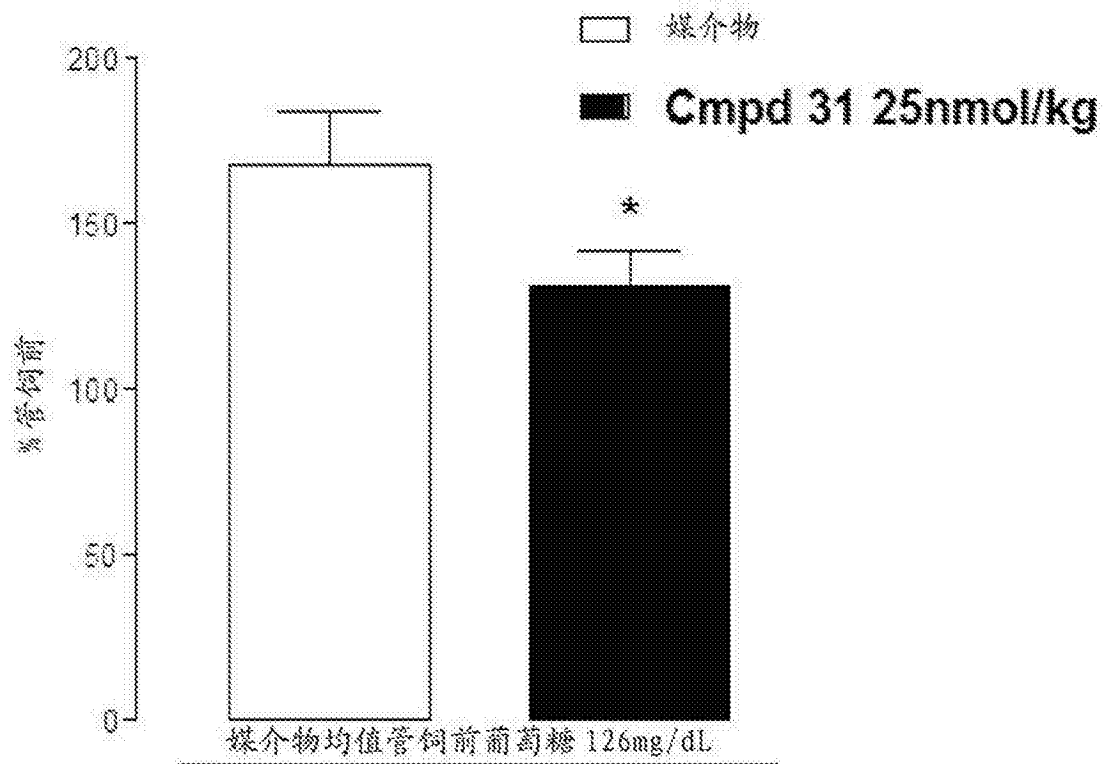


图9

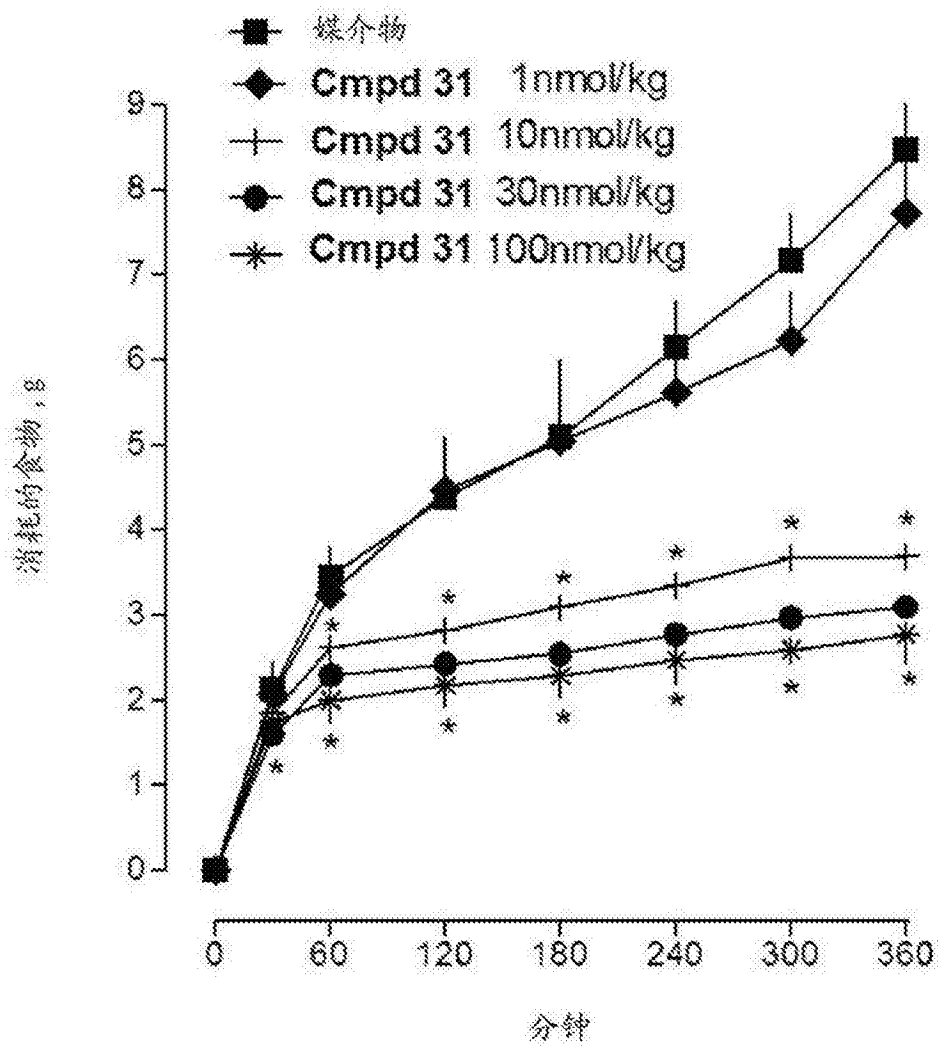


图10A

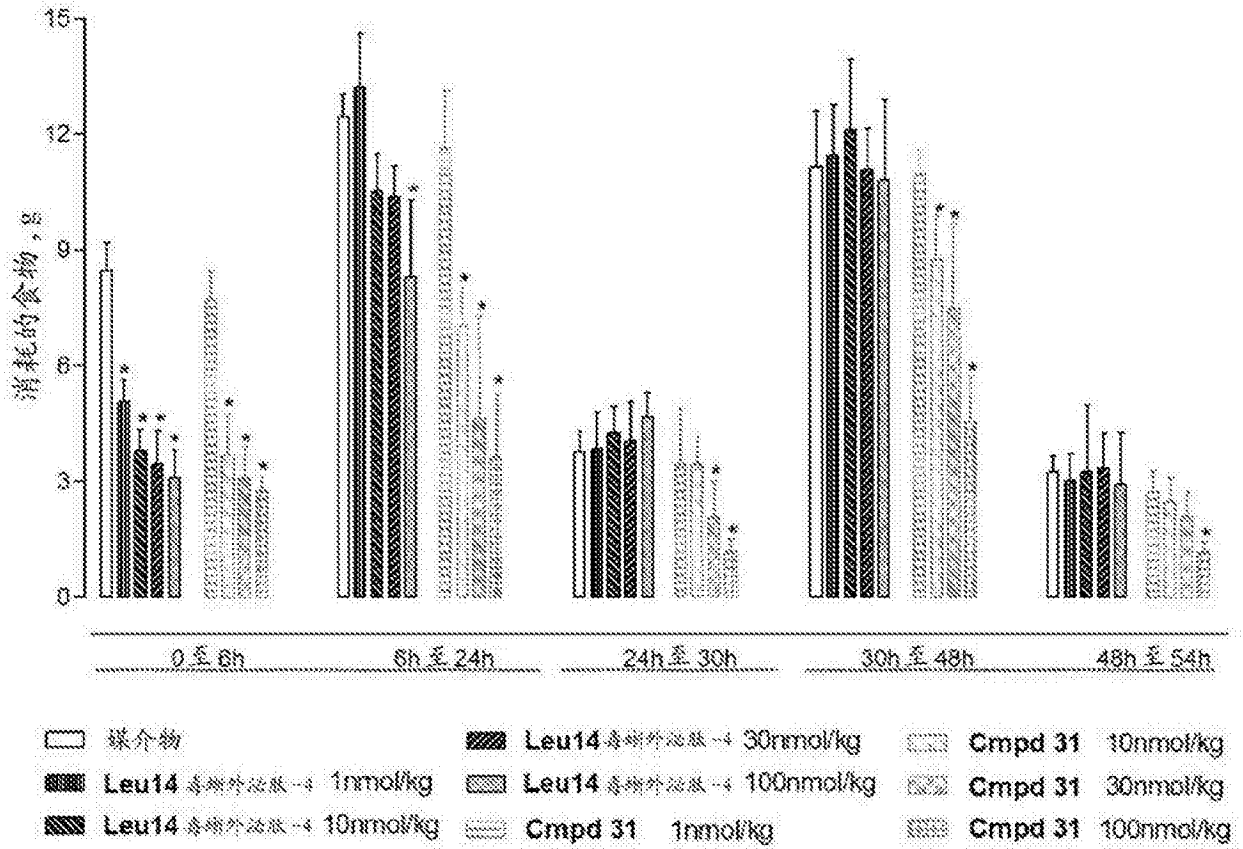


图10B

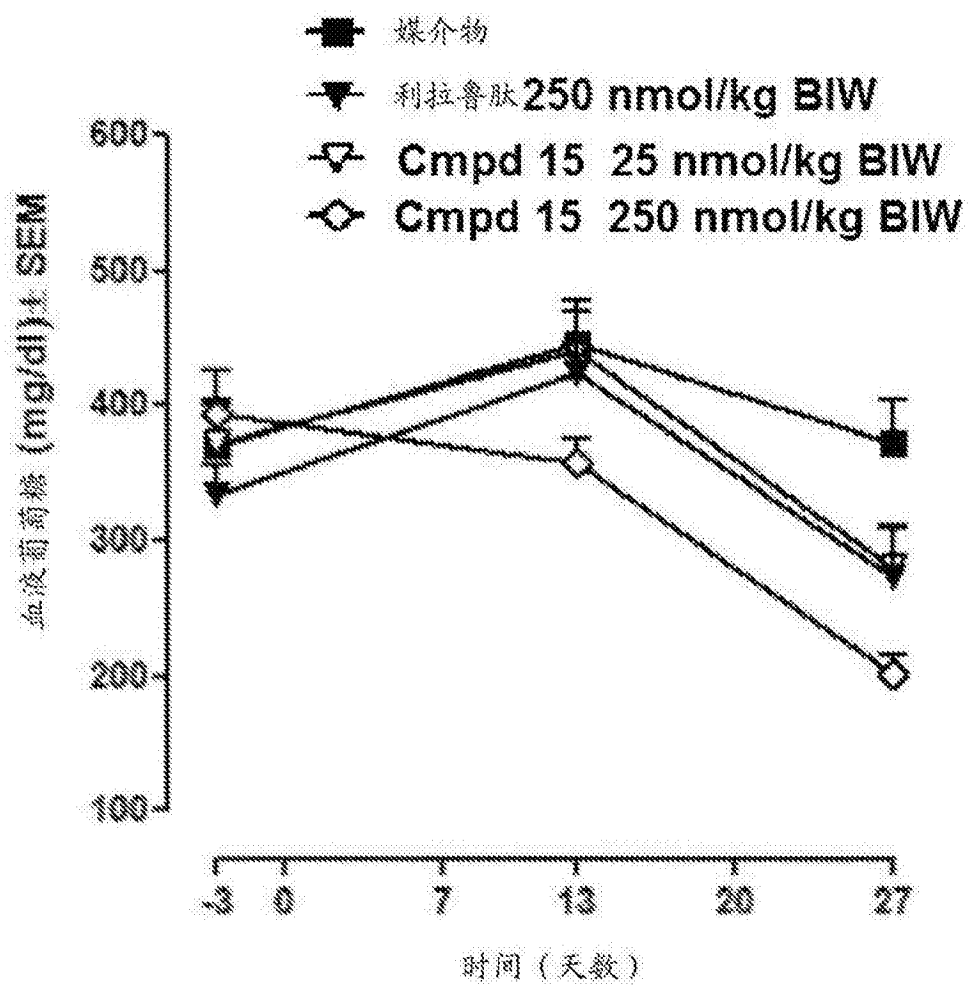


图11A

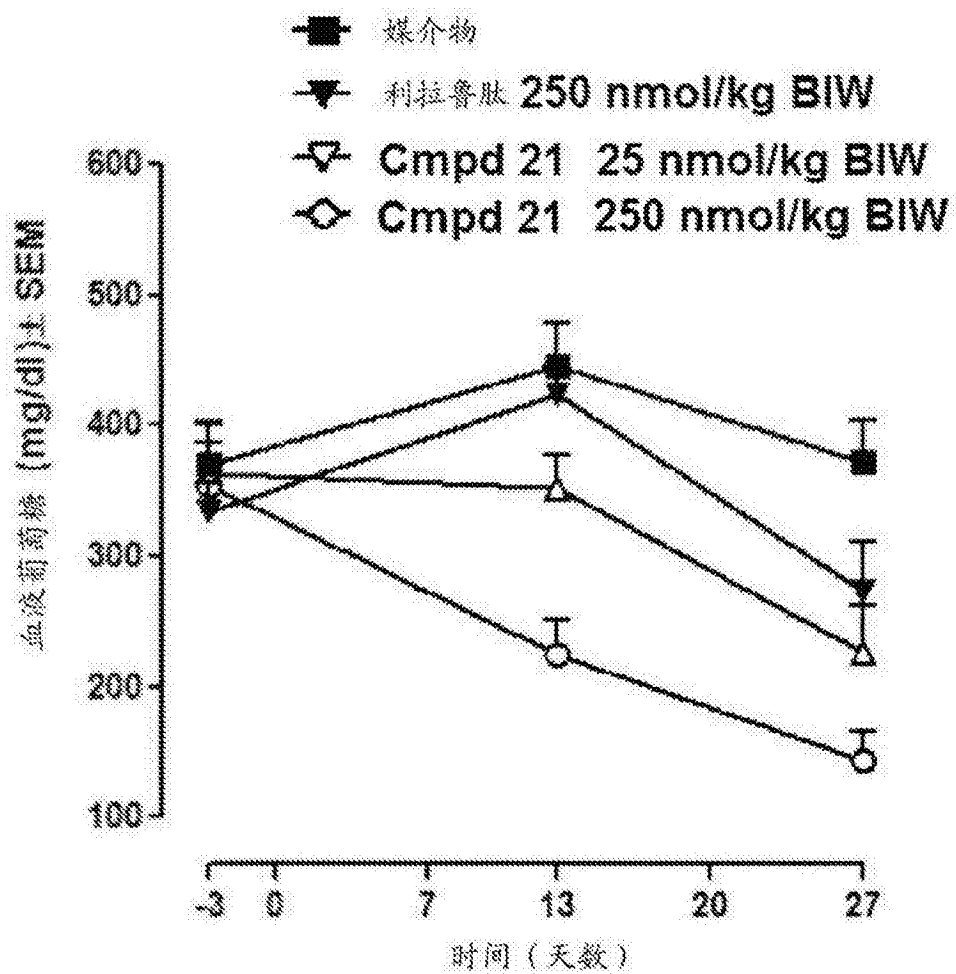


图11B

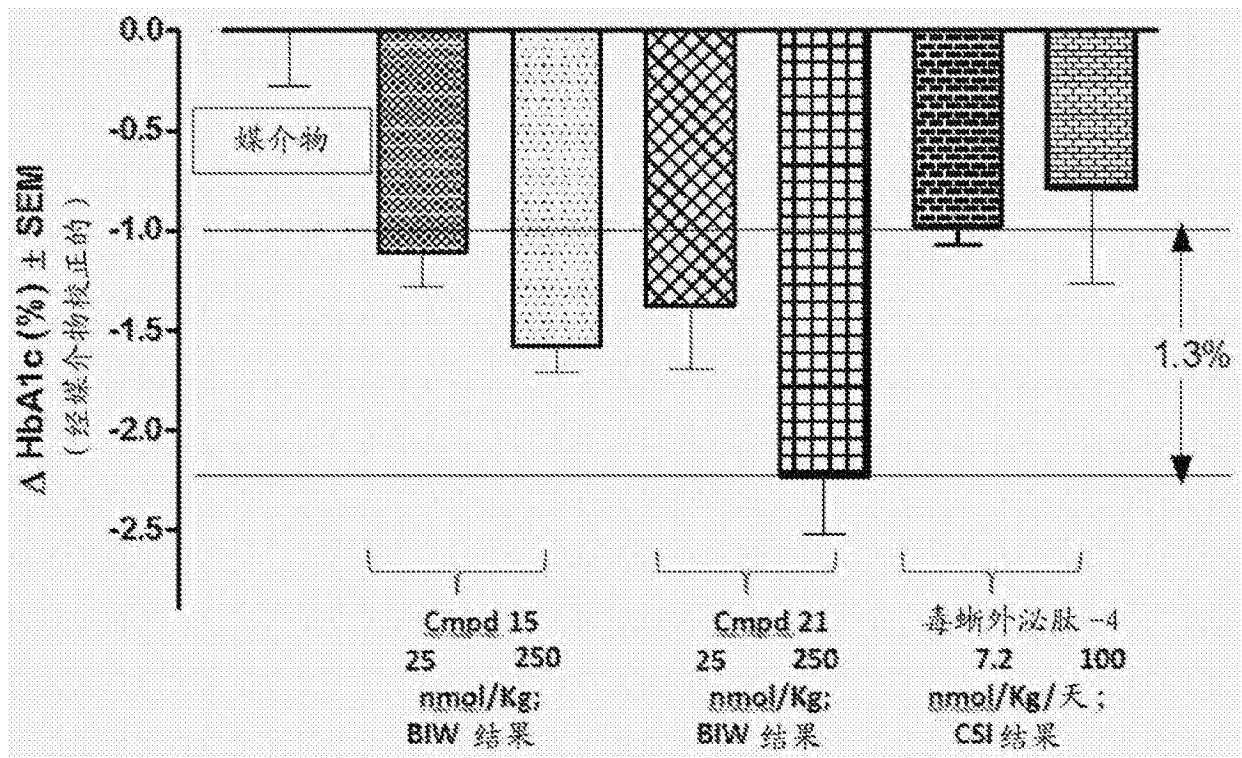


图11C

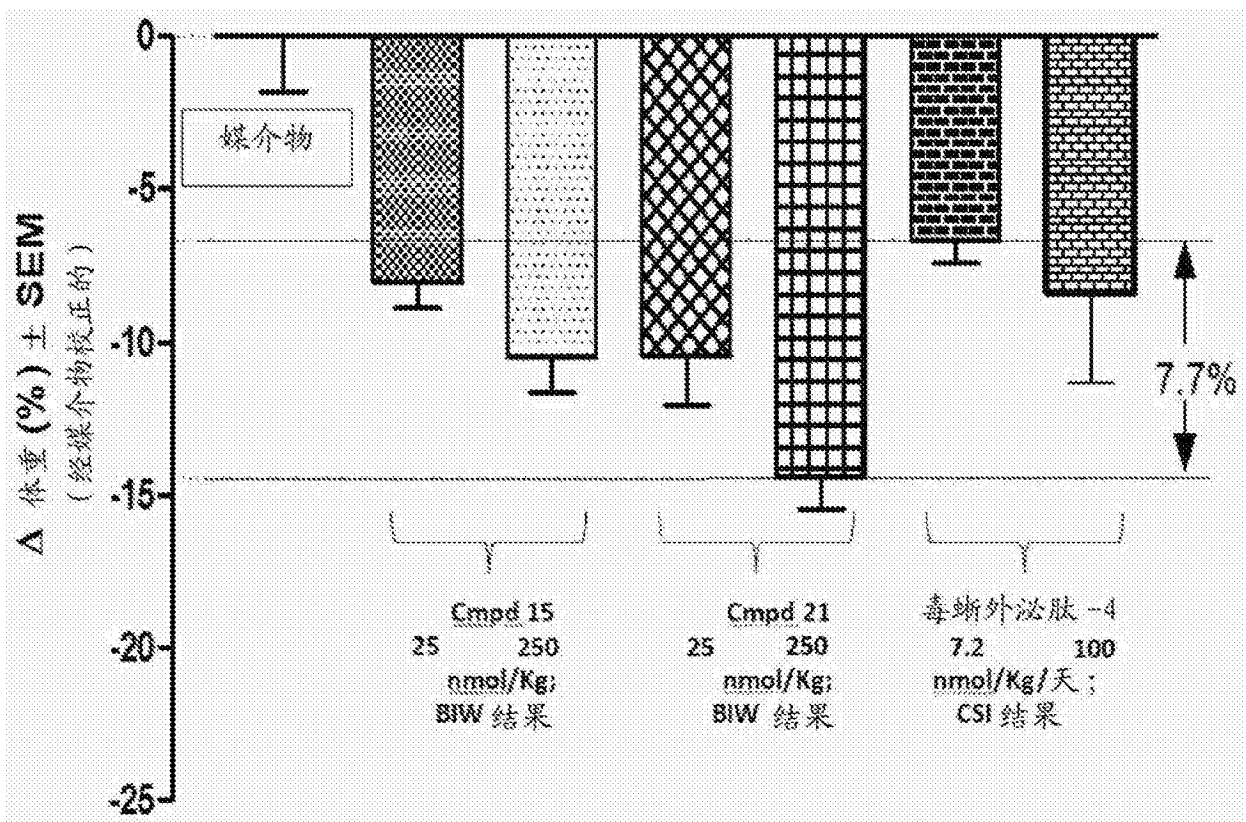


图11D

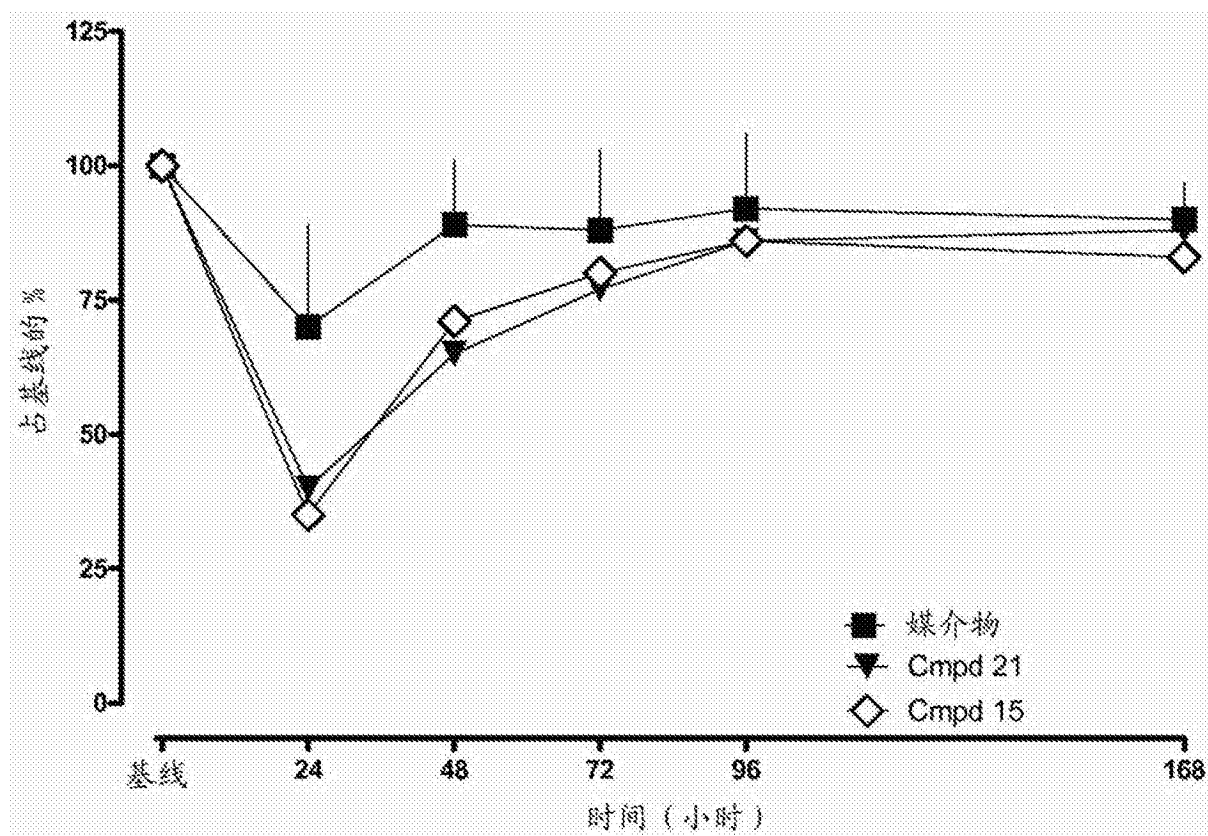


图12A

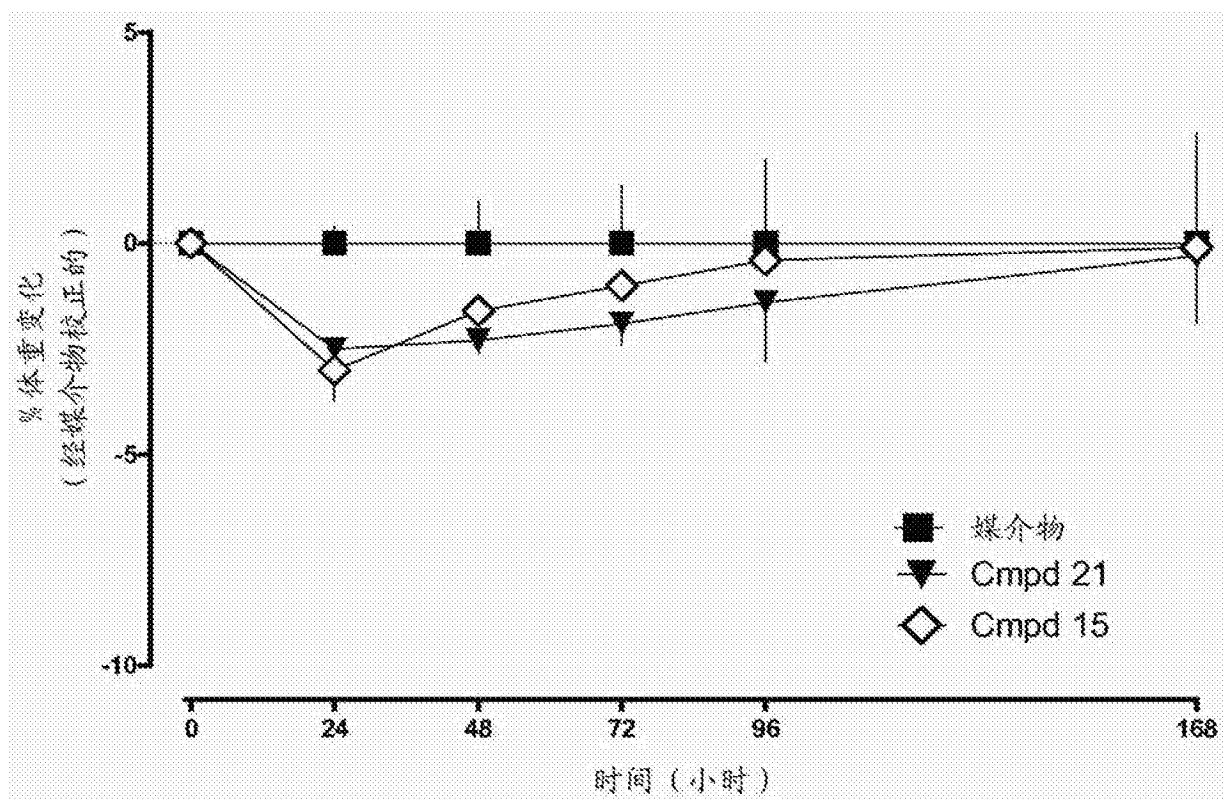


图12B

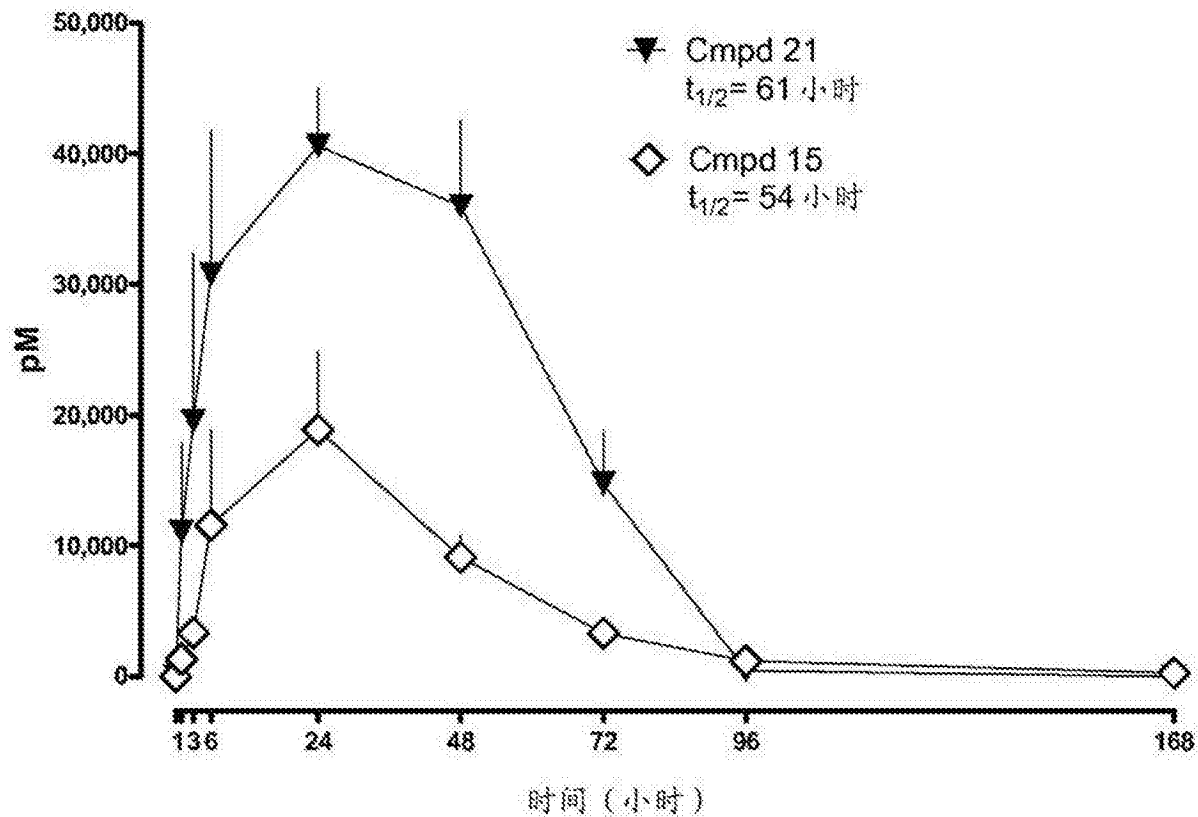


图12C

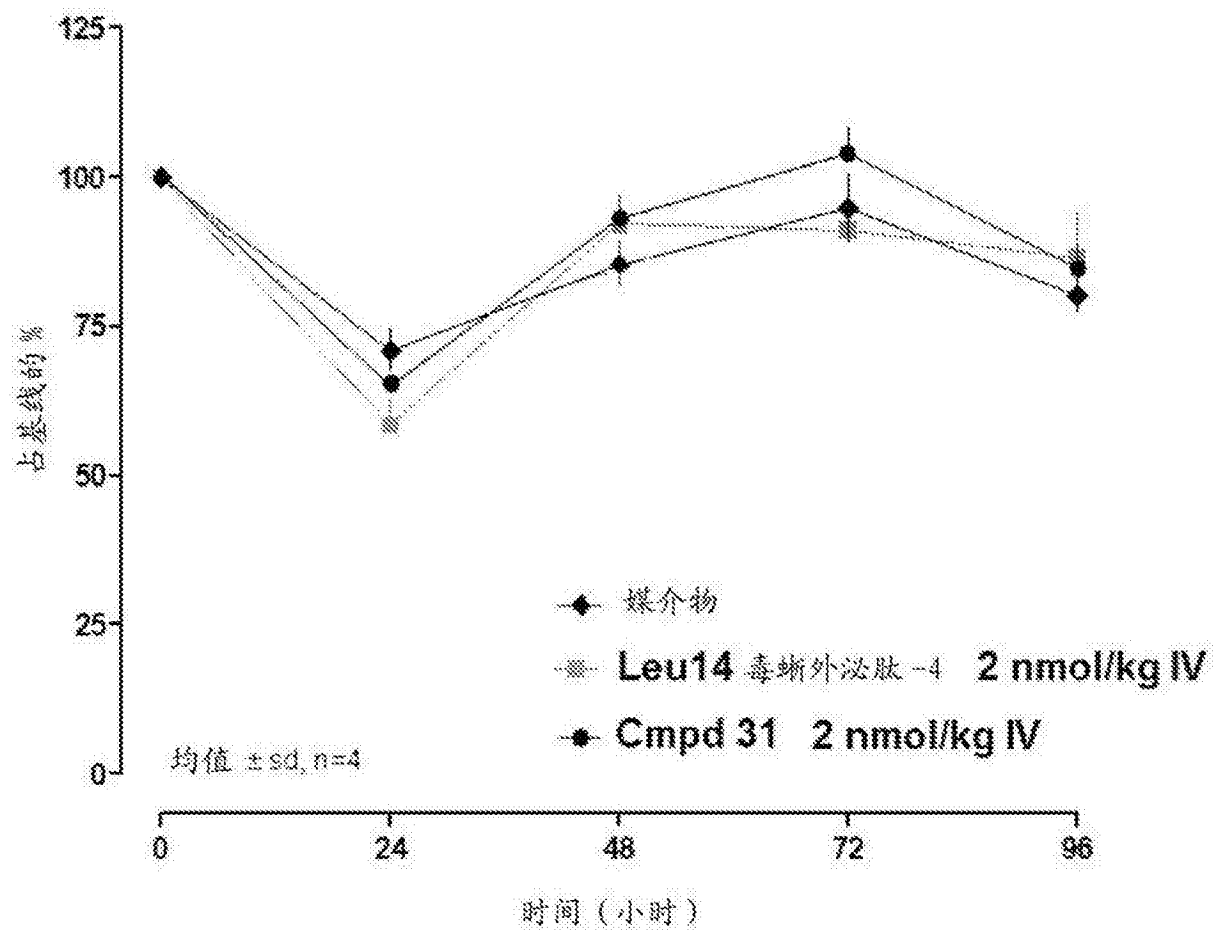


图13A

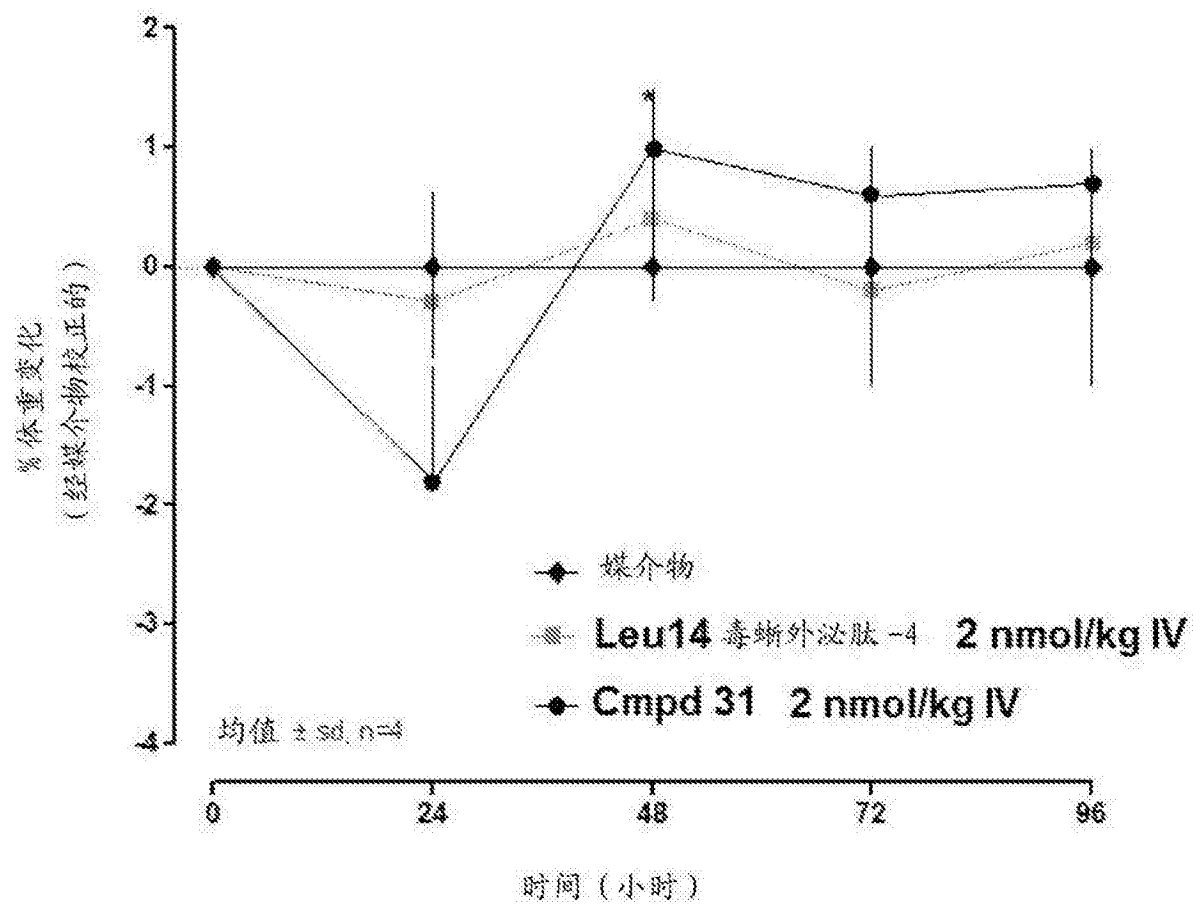


图13B

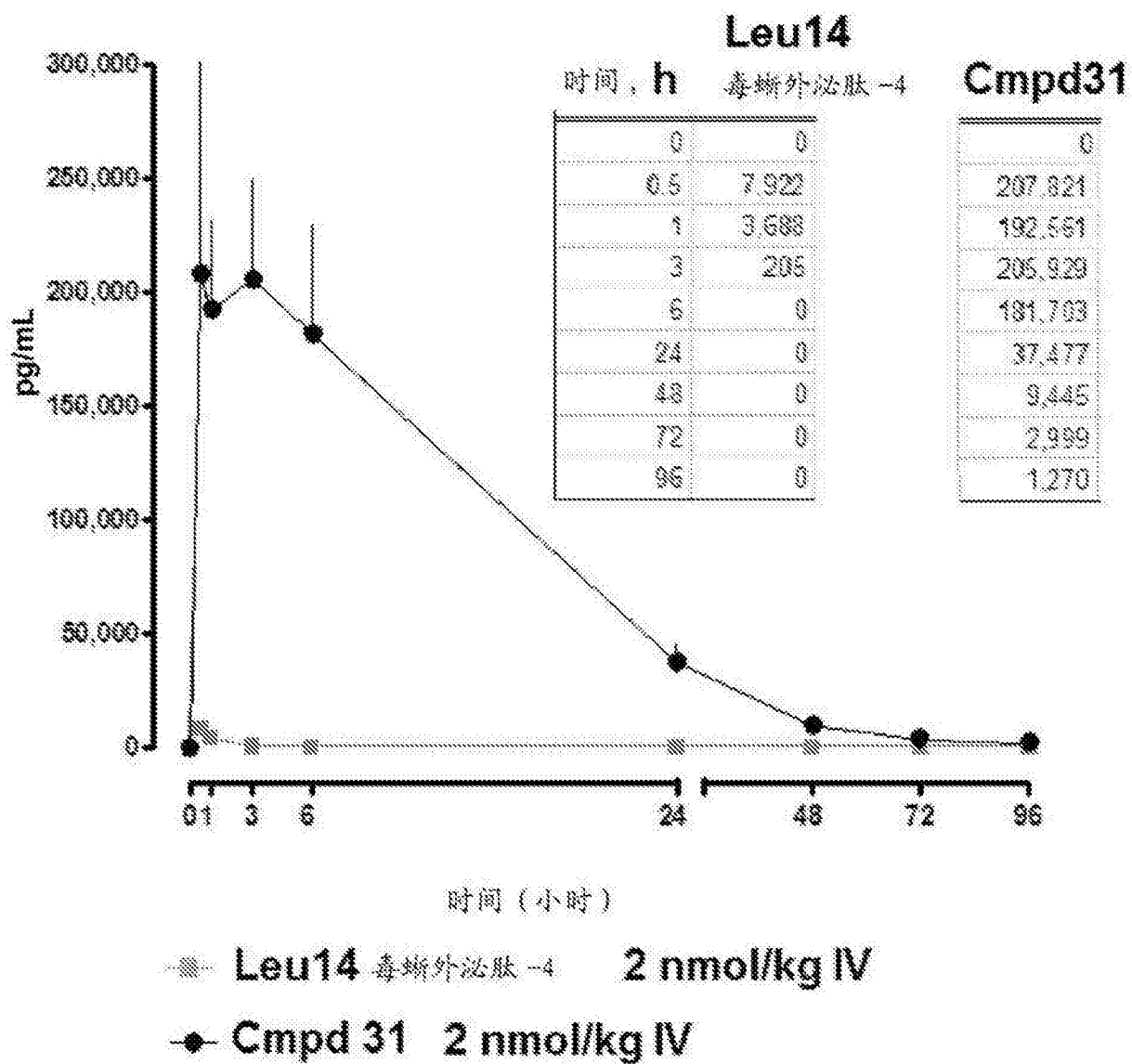


图13C

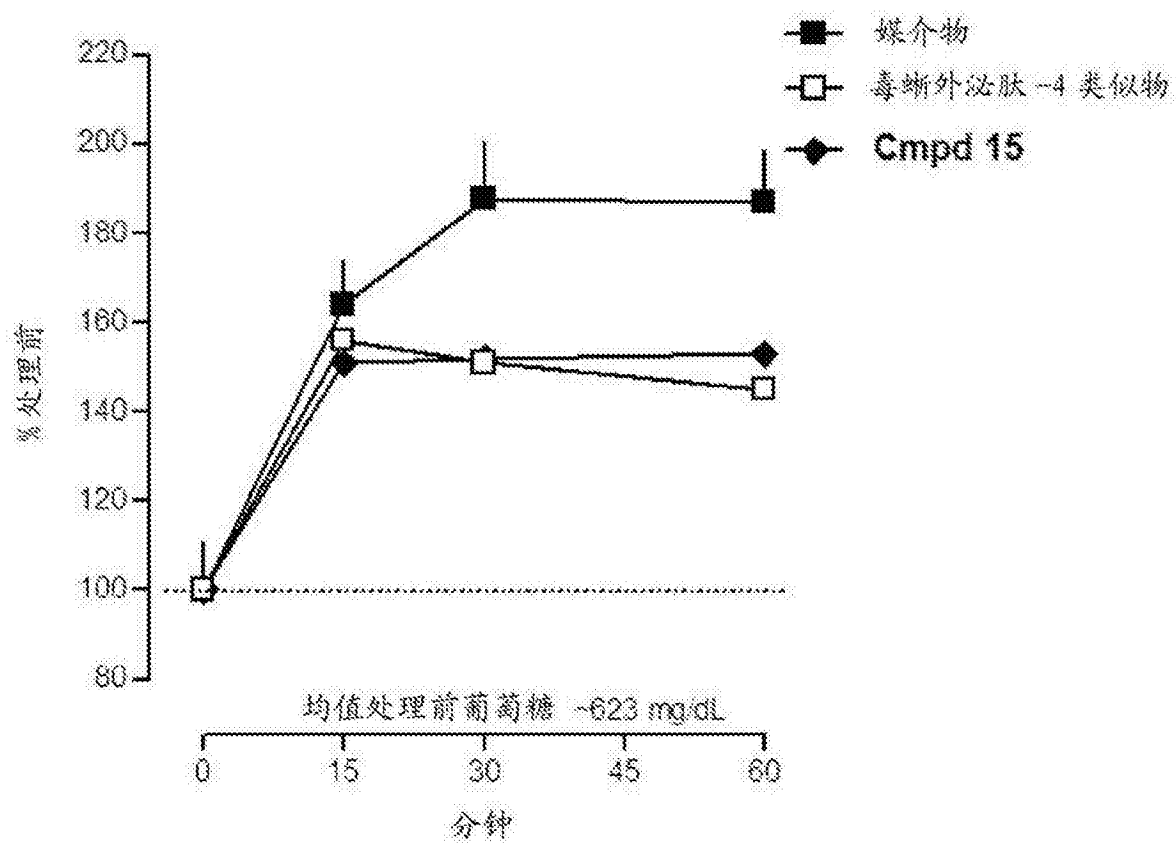


图14