



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106687128 A

(43)申请公布日 2017. 05. 17

(21)申请号 201580049362.2

(74)专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理有限公司 11329

(22)申请日 2015.10.29

代理人 孙涛 肖鹏

(30)优先权数据

62/073,737 2014.10.31 US

62/244,604 2015.10.21 US

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

C07K 14/475(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.03.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/058111 2015.10.29

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/069921 EN 2016.05.06

(71)申请人 NGM生物制药有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 沈文彦 D·林德浩特
R·霍尔丹卡 H·梅特恩

权利要求书6页 说明书58页
序列表95页 附图7页

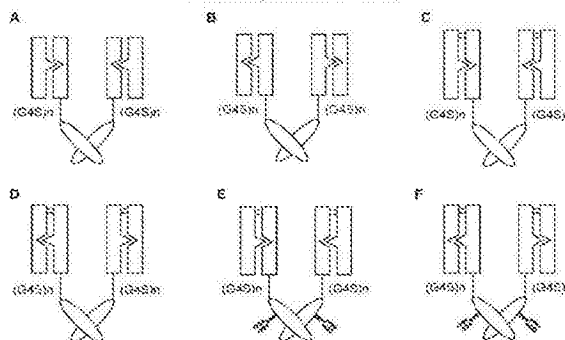
(54)发明名称

用于治疗代谢病症的组合物和方法

(57)摘要

本文描述一种包含GDF15多肽的复合物。提供治疗患有诸如葡萄糖代谢病症的代谢病症和/或体重病症的个体的方法及与此相关的组合物。

铁螯合(Fc)-GDF15分子的设计



1. 一种复合物,其包含:

包含IgG Fc序列的第一多肽,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列;以及

包含IgG Fc序列的第二多肽,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列,

其中所述第一多肽与所述第二多肽经由将所述第一多肽的所述突起安置于所述第二多肽的所述空腔中而二聚化,以及

其中所述第一多肽的C末端或所述第二多肽的C末端缀合至包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白的N末端。

2. 一种复合物,其包含第一异二聚体和第二异二聚体,所述第一异二聚体和第二异二聚体各自包含:

第一多肽和第二多肽,其中:

所述第一多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列;以及

所述第二多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列;

其中所述第一多肽与所述第二多肽经由将所述第一多肽的所述突起安置于所述第二多肽的所述空腔中而二聚化,

其中所述第一多肽的C末端或所述第二多肽的C末端缀合至包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白的N末端,以及

其中所述第一异二聚体中的所述GDF15突变蛋白与所述第二异二聚体中的所述GDF15突变蛋白二聚化,从而形成包含所述第一异二聚体和所述第二异二聚体的所述复合物。

3. 如权利要求1-2中任一项所述的复合物,其中所述第一多肽的所述C末端缀合至所述GDF15突变蛋白的所述N末端。

4. 如权利要求1-2中任一项所述的复合物,其中所述第二多肽的所述C末端缀合至所述GDF15突变蛋白的所述N末端。

5. 一种复合物,其包含第一多肽,所述第一多肽包含:

IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列,其中所述第一多肽与包含IgG Fc序列的第二多肽二聚化,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列;以及

GDF15突变蛋白,所述GDF15突变蛋白包含至少一个N连接的糖基化共有位点,其中所述第一多肽的所述C末端缀合至所述GDF15突变蛋白的所述N末端。

6. 一种复合物,其包含第一多肽,所述第一多肽包含:

IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列,其中所述第一多肽与包含IgG Fc序列的第二多肽二聚化,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列;以及

GDF15突变蛋白,所述GDF15突变蛋白包含至少一个N连接的糖基化共有位点,其中所述第一多肽的C末端缀合至所述GDF15突变蛋白的N末端。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的复合物,其中所述GDF15突变蛋白包含与野生型

GDF15的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)至少90%相同的连续氨基酸序列。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的复合物,其中所述GDF15突变蛋白包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的至少一个取代,所述取代产生所述N连接的糖基化共有位点。

9. 如权利要求8所述的复合物,其中所述取代包含D5T或D5S。

10. 如权利要求8所述的复合物,其中所述取代包含R21N。

11. 如权利要求8所述的复合物,其中所述GDF15突变蛋白包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的以下各对取代中的至少一者,所述取代产生所述N连接的糖基化共有位点:

- i) R16N和H18T或R16N和H18S;
- ii) S23N和E25T或S23N和E25S;
- iii) S50N和F52T或S50N和F52S;
- iv) F52N和A54T或F52N和A54S;
- v) R53N和A55T或R53N和A55S;
- vi) S64N和H66T或S64N和H66S;
- vii) K91N和D93T或K91N和D93S;
- viii) D93N和G95T或D93N和G95S;
- ix) T94N和V96T或T94N和V96S;
- x) V96N和L98T或V96N和L98S;
- xi) S97N和Q99T或S97N和Q99S; 以及
- xii) A106N和D108T或A106N和D108S

12. 如权利要求11所述的复合物,其包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的以下各对取代中的至少一者:

- S23N和E25T或S23N和E25S;
- R53N和A55T或R53N和A55S;
- S64N和H66T或S64N和H66S;
- K91N和D93T或K91N和D93S;
- D93N和G95T或D93N和G95S;
- S97N和Q99T或S97N和Q99S; 以及
- A106N和D108T或A106N和D108S。

13. 如权利要求11所述的复合物,其包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的以下各对取代中的至少一者:

- S64N和H66T或S64N和H66S;
- K91N和D93T或K91N和D93S;
- D93N和G95T或D93N和G95S; 以及
- S97N和Q99T或S97N和Q99S。

14. 如权利要求11所述的复合物,其包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的以下各对取代中的至少一者:

- K91N和D93T或K91N和D93S; 以及
- D93N和G95T或D93N和G95S。

15. 如前述权利要求中任一项所述的复合物,其中所述GDF15突变蛋白包含至少98个氨

基酸长且与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的连续氨基酸序列,其中所述多肽的C末端氨基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

16. 如权利要求15所述的复合物,其中所述连续氨基酸序列是至少98个氨基酸长且不包括对应于存在于SEQ ID NO:1的N末端的第一个氨基酸的第一个氨基酸,其中所述C末端氨基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

17. 如权利要求15所述的复合物,其中所述连续氨基酸序列是至少98个氨基酸长且不包括对应于存在于SEQ ID NO:1的所述N末端之前两个氨基酸之前两个氨基酸,其中所述C末端氨基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

18. 如权利要求15中任一项所述的复合物,其中所述连续氨基酸序列是至少98个氨基酸长且不包括对应于存在于SEQ ID NO:1的所述N末端之前三个氨基酸之前三个氨基酸,其中所述C末端氨基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

19. 如权利要求15所述的复合物,其中所述连续氨基酸序列是至少98个氨基酸长且不包括对应于存在于SEQ ID NO:1的所述N末端之前六个氨基酸之前六个氨基酸,其中所述C末端氨基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

20. 如权利要求15所述的复合物,其中所述连续氨基酸序列是至少98个氨基酸长且不包括对应于存在于SEQ ID NO:1的所述N末端之前十四个氨基酸之前十四个氨基酸。

21. 如前述权利要求中任一项所述的复合物,其中所述第一多肽或所述第二多肽的所述C末端经由接头缀合至所述GDF15突变蛋白的所述N末端。

22. 如前述权利要求中任一项所述的复合物,其中所述IgG Fc包含与SEQ ID NO:2中的氨基酸序列至少90%相同的连续氨基酸序列。

23. 如前述权利要求中任一项所述的复合物,其中所述工程化的突起包含人IgG1Fc序列中的相应氨基酸的至少一个取代,其中根据EU编号,所述取代处于选自以下组成的组的位置:氨基酸残基347、366和394。

24. 如权利要求23所述的复合物,其中根据EU编号,所述至少一个取代选自以下组成的组:Q347W/Y、T366W/Y和T394W/Y。

25. 如前述权利要求中任一项所述的复合物,其中所述工程化的空腔包含人IgG1Fc序列中的相应氨基酸的至少一个取代,其中根据EU编号,所述取代处于选自以下组成的组的位置:氨基酸残基366、368、394、405和407。

26. 如权利要求25所述的复合物,其中根据EU编号,所述至少一个取代选自以下组成的组:T366S、L368A、T394S、F405T/V/A和Y407T/V/A。

27. 如前述权利要求中任一项所述的复合物,其中根据EU编号,所述突起包含取代T366W/Y,且所述空腔包含所述取代T366S、L368A和Y407T/V/A。

28. 如前述权利要求中任一项所述的复合物,其中根据EU编号,所述突起包含所述取代T366W/Y,且所述空腔包含所述取代Y407T/V/A。

29. 如前述权利要求中任一项所述的复合物,其中根据EU编号,所述突起包含所述取代T366Y,且所述空腔包含所述取代Y407T。

30. 如前述权利要求中任一项所述的复合物,其中根据EU编号,所述突起包含所述取代T366W,且所述空腔包含所述取代Y407A。

31. 如前述权利要求中任一项所述的复合物,其中根据EU编号,所述突起包含所述取代

T394Y,且所述空腔包含所述取代Y407T。

32. 如前述权利要求中任一项所述的复合物,其中所述第一多肽经由在存在于所述第一多肽和所述第二多肽中的所述Ig Fc序列中的铰链区之间所形成的一个或两个二硫键与所述第二多肽二聚化。

33. 一种核酸,其编码如前述权利要求中任一项所述的第一多肽和第二多肽。

34. 如权利要求33所述的核酸,其中所述核酸可操作地连接至使得所述第一多肽和所述第二多肽由所述核酸表达的表达式控制元件。

35. 一种载体,其包含如权利要求33-34中任一项所述的核酸分子。

36. 如权利要求35所述的载体,其中所述载体包含病毒载体。

37. 一种宿主细胞,其表达如权利要求1-32中任一项所述的第一多肽和第二多肽。

38. 一种宿主细胞,其包含如权利要求33-34中任一项所述的核酸分子或如权利要求35-36中任一项所述的载体。

39. 一种编码如前述权利要求中任一项所述的第一多肽的第一核酸和一种编码如前述权利要求中任一项所述的第二多肽的第二核酸。

40. 如权利要求39所述的第一核酸和第二核酸,其中所述核酸各自可操作地连接至使得所述第一多肽和所述第二多肽分别由所述第一核酸和所述第二核酸表达的表达式控制元件。

41. 一种包含如权利要求39-40中任一项所述的第一核酸的第一载体和一种包含如权利要求39-40中任一项所述的第二核酸的第二载体。

42. 如权利要求41所述的第一载体和第二载体,其中所述载体各自包含病毒载体。

43. 一种宿主细胞,其表达如权利要求1-32中任一项所述的第一多肽和第二多肽。

44. 一种包含如权利要求39-40中任一项所述的第一核酸和第二宿主细胞的宿主细胞;或一种包含如权利要求41-42中任一项所述的第一载体和第二载体的宿主细胞。

45. 一种表达如权利要求1-32中任一项所述的第一多肽的第一宿主细胞和一种表达如权利要求1-32中任一项所述的第二多肽的第二宿主细胞。

46. 一种包含如权利要求39-40中任一项所述的第一核酸的第一宿主细胞和一种包含如权利要求39-40中任一项所述的第二核酸的第二宿主细胞;或一种包含如权利要求41-42中任一项所述的第一载体的第一宿主细胞和一种包含如权利要求40-41中任一项所述的第二载体的第二宿主细胞。

47. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-32中任一项所述的复合物和药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

48. 如权利要求47所述的药物组合物,其还包含至少一种另外预防剂或治疗剂。

49. 一种抗体,其特异性地结合至如权利要求1-32中任一项所述的GDF15突变蛋白。

50. 一种药物组合物,其包含如权利要求49所述的抗体和药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

51. 如权利要求50所述的药物组合物,其还包含至少一种另外预防剂或治疗剂。

52. 一种无菌容器,其包括如权利要求47-48和50-51中任一项所述的药物组合物。

53. 如权利要求52所述的无菌容器,其中所述无菌容器是注射器。

54. 一种试剂盒,其包含如权利要求52-53中任一项所述的无菌容器。

55. 一种制备如权利要求1-32中任一项所述的复合物的方法,所述方法包括:
培养表达所述第一多肽和所述第二多肽的宿主细胞;以及
分离包含所述第一多肽和所述第二多肽的复合物。
56. 一种治疗或预防受试者的体重病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求1-32中任一项所述的复合物,其中所述复合物以有效治疗或预防所述受试者的所述体重病症的量施用。
57. 一种治疗或预防受试者的葡萄糖代谢病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求1-32中任一项所述的复合物,其中所述复合物以有效治疗或预防所述受试者的所述葡萄糖代谢病症的量施用。
58. 如权利要求56-57中任一项所述的方法,其中所述施用使得所述受试者的食物摄入减少。
59. 如权利要求56-57中任一项所述的方法,其中所述施用使得所述受试者的体重减轻。
60. 如权利要求56-57中任一项所述的方法,其中所述施用使得所述受试者的血糖降低。
61. 如权利要求57所述的方法,其中所述葡萄糖代谢病症是糖尿病。
62. 如权利要求56-61中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。
63. 如权利要求56-62中任一项所述的方法,其中所述受试者是肥胖的。
64. 如权利要求56-63中任一项所述的方法,其中所述施用通过胃肠外注射来进行。
65. 如权利要求64所述的方法,其中所述胃肠外注射是皮下注射。
66. 如权利要求56-65中任一项所述的方法,其中所述施用包括每天施用所述复合物。
67. 如权利要求56-65中任一项所述的方法,其中所述施用包括每周两次施用所述复合物。
68. 如权利要求56-65中任一项所述的方法,其中所述施用包括每周一次施用所述复合物。
69. 如权利要求56-65中任一项所述的方法,其中所述施用包括每两周施用所述复合物。
70. 如权利要求56-65中任一项所述的方法,其中所述施用包括每月一次施用所述复合物。
71. 一种包含如权利要求1-32中任一项所述的复合物的组合物,其用于治疗或预防受试者的体重病症。
72. 如权利要求71所述的组合物,其用于治疗所述受试者的所述体重病症,其中所述组合物以有效治疗所述受试者的所述体重病症的量向所述受试者施用。
73. 如权利要求71所述的组合物,其用于预防所述受试者的所述体重病症,其中所述组合物以有效预防所述受试者的所述体重病症的量向所述受试者施用。
74. 一种包含如权利要求1-32中任一项所述的复合物的组合物,其用于治疗或预防受试者的葡萄糖代谢病症。
75. 如权利要求74所述的组合物,其用于治疗受试者的葡萄糖代谢病症,其中所述组合物以有效治疗所述受试者的所述葡萄糖代谢病症的量施用。

76. 如权利要求74所述的组合物,其用于预防受试者的葡萄糖代谢病症,其中所述组合物以有效预防所述受试者的所述葡萄糖代谢病症的量施用。

77. 如权利要求71-76中任一项所述的组合物,其中施用所述组合物使得所述受试者的食物摄入减少。

78. 如权利要求71-76中任一项所述的组合物,其中施用所述组合物使得所述受试者的体重减轻。

79. 如权利要求71-76中任一项所述的组合物,其中施用所述组合物使得所述受试者的血糖减少。

80. 如权利要求71-76中任一项所述的组合物,其中所述受试者患有糖尿病或处于发展糖尿病的风险中。

81. 如权利要求71-80中任一项所述的组合物,其中所述组合物被配制用于胃肠外注射。

用于治疗代谢病症的组合物和方法

[0001] 序列表的以引用方式并入

[0002] 与本文一起提供作为于2015年10月28日创建且大小为188KB的文本文件“NGMB-142_SeqList.txt”的序列表。文本文件的内容以引用的方式整体并入本文中。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求于2014年10月31日提交的美国临时申请序列号62/073,737和于2015年10月21日提交的美国临时申请序列号62/244,604的优先权权益,所述申请以引用的方式整体并入本文中。

发明领域

[0005] 本发明尤其涉及适用于治疗代谢相关病状的多肽复合物及其组合物。

[0006] 引言

[0007] 肥胖最通常由过度食物摄入加上有限能量消耗和/或缺乏体育锻炼所引起。肥胖增加发展诸如以下的各种疾病的可能性:糖尿病、高血压、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、睡眠呼吸暂停、痛风、风湿病和关节炎。此外,死亡风险与肥胖直接相关,以使得例如身体质量指数超过40导致预期寿命平均降低超过10年。

[0008] 当前药理学治疗形式包括靶向多种受体类别(例如CB1、5-HT_{2c}和NPY)的食欲抑制剂;下丘脑中的食欲回路调节剂和胃饥饿素的分子作用;和靶向脂酶的营养吸收抑制剂。不幸地,当前形式中尚无一者显示有效治疗肥胖,而不引起有害作用,所述有害作用中的一些可能非常严重。

[0009] 高血糖水平刺激胰腺β细胞分泌胰岛素。胰岛素进而刺激葡萄糖进入肌肉和脂肪细胞,从而导致糖原和甘油三酯的储存和蛋白质的合成。各种细胞类型上胰岛素受体的活化通过增加葡萄糖摄取和利用以及通过降低肝葡萄糖输出来降低循环葡萄糖水平。此调控网路内的破坏可导致糖尿病和相关病理性综合征,其影响大的且日益增大百分比的人群体。

[0010] 患有葡萄糖代谢病症的患者可能患有高血糖、高胰岛素血症和/或葡萄糖不耐症。往往与葡萄糖和/或胰岛素水平异常相关的病症的实例是胰岛素抗性,其中肝脏细胞、脂肪细胞和肌细胞丧失其对正常血液胰岛素水平作出反应的能力。

[0011] 鉴于肥胖症、糖尿病和相关代谢病症和非代谢病症的发病率和严重性,调节例如食欲、葡萄糖和/或胰岛素水平和增强患者中对波动的葡萄糖水平的生物反应的治疗形式仍受到关注。

[0012] 已将野生型GDF15(还称为MIC-1(巨噬细胞抑制性细胞因子-1))与体重调节相联系(Tsai VW等人,PLoS One 2013;8(2):e55174;US8,192,735)。

[0013] 概述

[0014] 提供用于治疗代谢病症的修饰的GDF15多肽。修饰的GDF15多肽可存在于复合物中。本公开的复合物可包含两种GDF15多肽。

[0015] 在某些情况下,本发明的复合物包含:包含IgG Fc序列的第一多肽,所述IgG Fc序

列包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列;和包含IgG Fc序列的第二多肽,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列,其中所述第一多肽与所述第二多肽经由将所述第一多肽的突起安置于所述第二多肽的空腔中而二聚化,且其中所述第一多肽的C末端或所述第二多肽的C末端缀合至包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白的N末端。

[0016] 在某些情况下,本发明的复合物包含第一异二聚体和第二异二聚体,所述第一异二聚体和所述第二异二聚体各自包含第一多肽和第二多肽,所述第一多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列;且所述第二多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列;其中所述第一多肽与所述第二多肽经由将所述第一多肽的突起安置于所述第二多肽的空腔中而二聚化,其中所述第一多肽的C末端或所述第二多肽的C末端缀合至包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白的N末端,且其中所述第一异二聚体中的GDF15突变蛋白与所述第二异二聚体中的GDF15突变蛋白二聚化,从而形成包含所述第一异二聚体和所述第二异二聚体的复合物。

[0017] 在示例性实施方案中,所述第一多肽的C末端可缀合至GDF15突变蛋白的N末端。在其他情况下,所述第二多肽的C末端可缀合至GDF15突变蛋白的N末端。

[0018] 本文还涵盖一种包含IgG Fc序列的第一多肽,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列,其中所述第一多肽与第二多肽二聚化,所述第二多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列;和包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白,其中所述第一多肽的C末端缀合至GDF15突变蛋白的N末端。所述第一多肽可存在于还可包含第二多肽的复合物中。

[0019] 本文还公开一种包含IgG Fc序列的第一多肽,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列,其中所述第一多肽与第二多肽二聚化,所述第二多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列;和包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白,其中所述第一多肽的C末端缀合至GDF15突变蛋白的N末端。所述第一多肽可存在于还可包含第二多肽的复合物中。

[0020] 在某些情况下,所述复合物中的GDF15突变蛋白可包含与野生型GDF15的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)至少90%相同的连续氨基酸序列。例如,GDF15突变蛋白可包含SEQ ID NO:1中相应氨基酸的产生N连接的糖基化共有位点的至少一个取代,例如所述取代可以是D5T或D5S。在其他情况下,所述取代可以是R21N。

[0021] 在示例性情况下,所述GDF15突变蛋白可包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的产生N连接的糖基化共有位点的以下多对取代中的至少一者:R16N和H18T/S;S23N和E25T/S;L24N和D26T/S;S50N和F52T/S;F52N和A54T/S;Q51N和R53T/S;R53N和A55T/S;S64N和H66T/S;L65N和R67T/S;S82N和N84T/S;K91N和D93T/S;D93N和G95T/S;T94N和V96T/S;V96N和L98T/S;S97N和Q99T/S;以及A106N和D108T/S。

[0022] 在示例性情况下,GDF15突变蛋白可包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的产生N连接的糖基化共有位点的以下多对取代中的至少一者:R16N和H18T;S23N和E25T;L24N和D26T;S50N和F52T;F52N和A54T;Q51N和R53T;R53N和A55T;S64N和H66T;L65N和R67T;S82N和N84T;K91N和D93T;D93N和G95T;T94N和V96T;V96N和L98T;S97N和Q99T;以及A106N和D108T。

[0023] 在一些情况下,所述GDF15突变蛋白可包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的产生N连接的糖基化共有位点的以下多对取代中的至少一者:R16N和H18S;S23N和E25S;L24N和D26S;S50N和F52S;F52N和A54S;Q51N和R53S;R53N和A55S;S64N和H66S;L65N和R67S;S82N和N84S;K91N和D93S;D93N和G95S;T94N和V96S;V96N和L98S;S97N和Q99S;以及A106N和D108S。

[0024] 在某些实施方案中,所述GDF15突变蛋白可包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的以下多对取代中的至少一者:S23N和E25T/S;R53N和A55T/S;S64N和H66T/S;K91N和D93T/S;D93N和G95T/S;S97N和Q99T/S;以及A106N和D108T/S。

[0025] 在某些实施方案中,所述GDF15突变蛋白可包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的以下多对取代中的至少一者:S23N和E25T;R53N和A55T;S64N和H66T;K91N和D93T;D93N和G95T;S97N和Q99T;以及A106N和D108S。

[0026] 在某些实施方案中,所述GDF15突变蛋白可包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的以下多对取代中的至少一者:S23N和E25S;R53N和A55S;S64N和H66S;K91N和D93S;D93N和G95S;S97N和Q99S;以及A106N和D108S。

[0027] 在某些实施方案中,所述GDF15突变蛋白可包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的以下多对取代中的至少一者:S64N和H66T/S;K91N和D93T/S;D93N和G95T/S;以及S97N和Q99T/S。例如,所述GDF15突变蛋白可包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的以下多对取代中的至少一者:S64N和H66T;K91N和D93T;D93N和G95T;以及S97N和Q99T;或S64N和H66S;K91N和D93S;D93N和G95S;以及S97N和Q99S。

[0028] 在其他实施方案中,所述GDF15突变蛋白可包含SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的以下多对取代中的至少一者:K91N和D93T或D93S;以及D93N和G95T或G95S。

[0029] 在其他实施方案中,所述复合物中的GDF15突变蛋白可包含可为至少98个氨基酸长且可与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少90%相同的连续氨基酸序列,其中所述GDF15突变蛋白的C末端氨基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

[0030] 在其他实施方案中,连续氨基酸序列可以是至少98个氨基酸长且可与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同,其中所述GDF15突变蛋白的C末端氨基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

[0031] 存在于本文所公开的复合物中的示例性GDF15突变蛋白包含至少98个氨基酸长、与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少90%相同且相对于SEQ ID NO:1具有氨基酸缺失的连续氨基酸序列。例如,多肽可相对于SEQ ID NO:1具有N末端截短。所述N末端截短相对于SEQ ID NO:1可具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多个氨基酸,例如1-14个氨基酸、2-14个氨基酸、3-14个氨基酸、2-3个氨基酸、3-5个氨基酸或4-6个氨基酸。

[0032] 本文所公开的示例性复合物包含GDF15突变蛋白,所述GDF15突变蛋白包含至少98个氨基酸长且与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的连续氨基酸序列,其中多肽的C末端氨基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

[0033] 在某些情况下,GDF15突变蛋白中的连续氨基酸序列是至少98个氨基酸长且不包含对应于存在于SEQ ID NO:1的N末端的第一个氨基酸的第一个氨基酸,其中C末端氨基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

[0034] 在某些情况下,所述GDF15突变蛋白中的连续氨基酸序列是至少98个氨基酸长且不包含对应于存在于SEQ ID NO:1的N末端之前两个氨基酸之前两个氨基酸,其中C末端氨

基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

[0035] 在某些情况下,所述连续氨基酸序列是至少98个氨基酸长且不包含对应于存在于SEQ ID NO:1的N末端之前三个氨基酸之前三个氨基酸,其中C末端氨基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

[0036] 在某些情况下,所述连续氨基酸序列是至少98个氨基酸长且不包含对应于存在于SEQ ID NO:1的N末端之前六个氨基酸之前六个氨基酸,其中C末端氨基酸对应于SEQ ID NO:1中位置112处的异亮氨酸。

[0037] 在某些情况下,所述连续氨基酸序列是至少98个氨基酸长且不包含对应于存在于SEQ ID NO:1的N末端之前十四个氨基酸之前十四个氨基酸。

[0038] 在某些情况下,所述第一多肽(例如Fc-钮)或第二多肽(例如Fc-孔)的C末端经由接头缀合至GDF15突变蛋白的N末端。示例性接头包括序列(G₄S)_n,其中n=1-10,例如1-5或2-5,例如2、3、4或5。

[0039] 在某些情况下,IgG Fc包含与SEQ ID NO:2(人IgG1Fc序列)中的氨基酸序列至少90%相同的连续氨基酸序列。工程化的突起可包含人IgG1Fc序列中的相应氨基酸的至少一个取代,其中根据EU编号,所述取代位于选自由以下组成的组的位置处:氨基酸残基347、366和394。例如,根据EU编号,所述至少一个取代选自由以下组成的组:Q347W/Y、T366W/Y和T394W/Y。

[0040] 在某些情况下,工程化的空腔包含人IgG1Fc序列中的相应氨基酸的至少一个取代,其中根据EU编号,所述取代位于选自由以下组成的组的位置处:氨基酸残基366、368、394、405和407。例如,根据EU编号,所述至少一个取代选自由以下组成的组:T366S、L368A、T394S、F405T/V/A和Y407T/V/A。

[0041] 在某些情况下,根据EU编号,突起可包含取代T366W/Y且空腔可包含取代T366S、L368A和Y407T/V/A。

[0042] 例如,根据EU编号,突起可包含取代T366W/Y且空腔可包含取代Y407T/V/A。在其他情况下,根据EU编号,突起可包含取代T366Y且空腔可包含取代Y407T。在其他实例中,根据EU编号,突起可包含取代T366W且空腔可包含取代Y407A。在其他实例中,根据EU编号,突起可包含取代T394Y且空腔可包含取代Y407T。

[0043] 在某些实施方案中,所述第一多肽和第二多肽的IgG Fc序列可各自包含铰链区,所述铰链区在所述第一多肽与所述第二多肽之间形成至少一个二硫键。在某些实施方案中,所述第一多肽和第二多肽的IgG Fc序列可各自包含铰链区、CH2区和CH3区,其中所述铰链区在所述第一多肽与所述第二多肽之间形成至少一个二硫键。

[0044] 本文还提供一种编码以上所描述的第一多肽和第二多肽的核酸分子。所述核酸分子可操作地连接至使得编码所述多肽的核酸分子在体外或体内表达的表达控制元件。还涵盖一种包含核酸分子的载体。所述载体可以是病毒载体。在某些情况下,提供一种编码所述第一多肽的第一核酸和一种编码所述第二多肽的第二核酸。核酸各自可操作地连接至使得所述第一多肽和第二多肽分别由第一核酸和第二核酸表达的表达控制元件。还公开一种包含所述第一核酸的第一载体和一种包含所述第二核酸的第二载体。如在此所提及,所述载体可以是病毒载体。

[0045] 一些实施方案包括表达以上所提及的多肽中的一者或多者的转化宿主细胞。例

如,提供一种包含所述第一核酸和第二核酸的宿主细胞。所述宿主细胞表达所述第一多肽和所述第二多肽。

[0046] 在本公开的特定实施方案中,将以上所提及的复合物中的一者或多者进行配制以产生药物组合物,其中所述组合物还包含一种或多种药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。在某些实施方案中,药物组合物还包含至少一种另外的预防剂或治疗剂。

[0047] 还提供一种以上所提及的用于治疗或预防受试者的体重病症;用于治疗或预防受试者的葡萄糖代谢病症的复合物中的一种或多种的组合物(例如药物组合物)。所述组合物可包含有效治疗或预防受试者的体重病症的量的复合物。所述组合物可包含有效治疗或预防受试者的葡萄糖代谢病症的量的复合物。

[0048] 本公开的其他实施方案包含一种特异性地结合至以上所提及的第一多肽或第二多肽中的一者的抗体。

[0049] 此外,本公开涵盖包含与至少一种药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂一起配制的如以上所描述的抗体的药物组合物。此类药物组合物还可含有至少一种另外的预防剂或治疗剂。

[0050] 本发明的某些实施方案涵盖一种含有以上所提及的药物组合物和任选的一种或多种另外组分的无菌容器。例如(但不限于),无菌容器可以是注射器。在其他实施方案中,无菌容器是试剂盒的一个部件;所述试剂盒还可含有例如含有至少一种预防剂或治疗剂的第二无菌容器。

[0051] 本文还公开一种制备以上所提及的多肽和复合物的方法。所述方法可包括培养表达所述多肽的宿主细胞;和分离包含所表达的多肽的复合物。

[0052] 本公开还涵盖一种通过向受试者施用治疗有效量的以上所提及的复合物来治疗或预防受试者(例如人)的葡萄糖代谢病症的方法。在一些方法中,治疗或预防使得受试者的血糖减少、受试者的血浆胰岛素减少、体重减轻和/或食物摄入减少或受试者的葡萄糖耐受性增加。在特定实施方案中,葡萄糖代谢病症是糖尿病。

[0053] 还公开一种治疗或预防受试者的体重病症的方法。所述方法可包括向所述受试者施用本发明的复合物,其中所述复合物以有效治疗或预防所述受试者的体重病症的量施用。在一些方法中,治疗或预防使得所述受试者的体重减轻和/或食物摄入减少。

[0054] 在一些实施方案中,受试者是肥胖的和/或具有体重病症。

[0055] 虽然不限于任何特定施用途径或给药方案,但在一些实施方案中施用通过胃肠外(例如皮下)注射来进行。

[0056] 附图简述

[0057] 图1描绘(Fc/Fc)-GDF15分子的异二聚体的同二聚复合物的卡通示意图,其中Fc/Fc多肽是钮入孔Fc对(A-F),以及GDF15分子上用于增强异二聚体的同二聚复合物的表达和组装的N-连接聚糖并入(E,F)。

[0058] 图2A描绘因工程化的(Fc/Fc)-GDF15复合物的Expi 293F瞬时表达产生的回收率。回收率如下:(0=聚集体/无表达、<25mg/L、25mg/L-49.9mg/L、50mg/L-74.9mg/L、75mg/L-99.0mg/L、>100mg/L)。在(Fc/Fc)-GDF15中在GDF15序列上添加N-连接聚糖在纯化之后提供总回收率的显著增加。图2B提供因不缀合至Fc的野生型GDF15和GDF15糖基化突变体(糖突变蛋白)的Expi 293F瞬时表达产生的回收率。

[0059] 图3描绘在膳食诱导肥胖(DIO)小鼠模型中在每周一次皮下递送0.4nmol/kg的(Fc/Fc)-GDF15复合物持续4周,接着以14天恢复期后的体重减轻。B13a/B13b变体与B9a/B9b和B11a/B11b变体相比具有显著改善的功效。

[0060] 图4描绘在DIO小鼠模型中在每周一次皮下递送0.4nmol/kg的(Fc/Fc)-GDF15复合物持续4周,接着以14天恢复期后的体重减轻百分比。在给药后恢复14天之后,B13a/B13b变体的减去媒介物的体重变化%大于20%。

[0061] 图5描绘在DIO小鼠模型中在每周一次皮下递送4.0nmol/kg的(Fc/Fc)-GDF15复合物持续4周,接着以14天恢复期后的体重减轻。

[0062] 图6描绘在DIO小鼠模型中在每周一次皮下递送4.0nmol/kg的(Fc/Fc)-GDF15复合物持续4周,接着以14天恢复期后的体重减轻百分比。

[0063] 图7和8概述所观察到的图3和5中所描绘的0.4nmol/kg和4.0nmol/kg剂量组的各组DIO小鼠(n=6)的体重降低(包括SEM和p值)。对于所有组,经由未配对t检验(*=p<0.05,**=p<0.01且***=p<0.001)。

[0064] 图9概述图4和6中所描绘的0.4nmol/kg和4.0nmol/kg剂量组的各组DIO小鼠(n=6)的体重降低百分比(包括SEM和p值)。对于所有组,经由未配对t检验(*=p<0.05,**=p<0.01且***=p<0.001)。

[0065] 详述

[0066] 在进一步描述本公开的方法和组合物之前,应了解本公开不限于本文所阐述的特定实施方案,且还应了解本文所用术语仅出于描述特定实施方案的目的,且不在具限制性。

[0067] 在提供数值范围的情况下,应了解在所述范围的上限与下限之间的各中间值(除非上下文另外明确规定,否则以下限单位的十分之一为间隔)和任何其他所陈述值或在所述所陈述范围内的中间值涵盖于本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括于所述较小范围内,且还涵盖于本发明内,受所陈述范围内任何具体排除的限制的限制。在所陈述范围包括一个或两个限制的情况下,排除那些被包括的限制中的任一者或两者的范围也包括在本发明中。除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。

[0068] 必须指出,除非上下文另外明确规定,否则如本文和所述权利要求中所用,单数形式“一个(种)(a/an)”和“所述”包括复数指示物。因此,例如,提及“复合物”包括提及一种或多种复合物等。应进一步指出,权利要求可撰写成排除任何任选的要素。因此,此陈述旨在充当结合对权利要求要素的引述使用诸如“仅仅”、“仅”等的此类排他性术语或使用“负”限制之前提基础。

[0069] 本文所论述的出版物仅仅由于其公开内容在本申请提交日期之前而提供。不应将本文中的任何内容理解为承认本发明由于先前发明而无权先于此类出版物。另外,所提供的出版日期可不同于可能需要单独证实的实际出版日期。

[0070] 定义

[0071] 在本文中可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指任何长度的聚合形式的氨基酸,其可包括遗传编码和非遗传编码氨基酸、化学或生物化学修饰或衍生氨基酸和具有修饰的多肽主链的多肽。所述术语包括融合蛋白,包括但不限于具有或不具有N末端甲硫

氨酸残基的与异源氨基酸序列的融合蛋白、与异源和同源前导序列的融合蛋白；免疫标记蛋白等。在特定实施方案中，所述术语是指具有任何长度的聚合形式的氨基酸，其包括遗传编码氨基酸。在特定实施方案中，所述术语是指具有任何长度的聚合形式的氨基酸，其包括融合至异源氨基酸序列的遗传编码氨基酸。在特定实施方案中，所述术语是指长度为98-112个氨基酸的氨基酸，其任选地融合至异源序列。在特定实施方案中，在适当时，当提及本文所公开并描述的蛋白质和分子时，术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指如本文所定义的多肽。

[0072] 如本文所用的术语“复合物”是指包含至少两种多肽的蛋白质复合物，所述多肽各自包含N末端和C末端。所述至少两种多肽可经由共价和非共价相互作用（例如，静电、 π 作用、范德华力和疏水作用）中的一者或两者彼此缔合。所述至少两种多肽可相同，即具有相同氨基酸序列；或可不同，即不具有相同氨基酸序列。在两种多肽相同的情况下，具有两种多肽的复合物称为同二聚体。在多肽不同的情况下，具有两种多肽的复合物称为异二聚体。在三种多肽相同的情况下，具有三种多肽的复合物称为同三聚体。在三种多肽中的至少一者不同于其他多肽的情况下，具有三种多肽的复合物称为异三聚体。在四种多肽相同的情况下，具有四种多肽的复合物称为同四聚体。在四种多肽中的至少一者不同于其他多肽的情况下，具有四种多肽的复合物称为异四聚体。在第一多肽与第二多肽二聚化以形成异二聚体且两种此类异二聚体二聚化以形成复合物的四种多肽（两个第一多肽分子和两个第二多肽分子）的示例性复合物可称为两种异二聚体的同二聚复合物。

[0073] 本公开涵盖如上文所定义的复合物，包括但不限于具有与第二多肽缔合的第一多肽的异二聚体，其中所述第一多肽是“钮”Fc且第二多肽是“孔”Fc，且其中第一多肽或第二多肽融合至GDF15（或GDF15突变蛋白，诸如本文所描述的GDF15突变蛋白）氨基酸序列。所述第一多肽和第二多肽可经由非共价相互作用（例如疏水作用，诸如Fc的钮区与孔区之间的疏水性相互作用）、共价键（例如二硫键，诸如第一多肽和第二多肽中Fc的铰链区之间的一个或两个或更多个二硫键）或两者彼此物理缔合。

[0074] 本公开还涵盖包含两种彼此缔合的异二聚体的复合物，各异二聚体具有第一多肽和第二多肽，其中所述第一多肽是“钮”Fc且第二多肽是“孔”Fc，且其中第一多肽或第二多肽融合至GDF15（或GDF15突变蛋白）氨基酸序列。在复合物内，两种异二聚体可通过非共价相互作用（例如疏水作用）、共价键（例如二硫键）或两者物理缔合。复合物中各个异二聚体中的第一多肽和第二多肽可通过非共价相互作用（例如疏水作用）、共价键（例如二硫键）或两者彼此物理缔合。

[0075] 本公开还涵盖包含两种彼此缔合的异二聚体的复合物，各异二聚体具有第一多肽和第二多肽，其中第一多肽是“钮”Fc且第二多肽为“孔”Fc，且其中第一多肽或第二多肽融合至GDF15（或GDF15突变蛋白）氨基酸序列。在复合物内，两种异二聚体可通过GDF15多肽之间的非共价相互作用（例如疏水作用）或共价相互作用（例如二硫键）物理缔合，且各个异二聚体中的第一多肽和第二多肽可通过非共价相互作用（例如钮入孔）、共价键（例如二硫键）或两者彼此物理缔合。

[0076] 术语“患者”或“受试者”可互换地用于指人或非人动物（例如哺乳动物）。

[0077] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等是指在已诊断、观察和其类似方式得出疾病、病症或病状或其症状之后开始的行为过程（诸如施用药剂，例如

多肽、复合物或包含多肽、复合物的药物组合物),以暂时或永久地消除、减轻、抑制、缓和或缓解折磨受试者的疾病、病症或病状的潜在病因中的至少一种或与折磨受试者的疾病、病症、病状相关的症状中的至少一种。因此,治疗包括抑制(即阻止疾病、病症或病状或与其相关的临床症状发生或进一步发展)活性疾病(例如从而降低在血流中胰岛素和/或葡萄糖的水平、以增加葡萄糖耐受性,从而使葡萄糖水平的波动减至最小和/或从而防止产生由葡萄糖稳态破坏引起的疾病、降低体重、抑制体重增加)。

[0078] 如本文所用的术语“需要治疗”是指由医师或其他照护者作出的受试者需要或将受益于治疗的判断。此判断是基于医师或照护者的专长领域中的多种因素来进行。

[0079] 术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”、“预防(prevention)”等是指通常在倾向于具有特定疾病、病症或病状的受试者的情形下,以一定方式(例如在疾病、病症、病状或其症状发作之前)开始以暂时或永久地预防、压制、抑制或降低受试者发生疾病、病症、病状或其类似者的风险(如通过例如不存在临床症状来确定)或延迟其发作的行为过程(诸如施用药剂,例如多肽、复合物或包含多肽、复合物的药物组合物)。在某些情况下,所述术语还指减缓疾病、病症或病状的进展或抑制其发展成有害的或以其他方式不需要的病况。

[0080] 如本文所用的术语“需要预防”是指由医师或其他照护者作出的受试者需要或将受益于预防性照护的判断。此判断是基于医师或照护者的专长领域中的多种因素来进行。

[0081] 短语“治疗有效量”是指单独或作为药物组合物的一部分且以单次剂量或作为一系列剂量的一部分,以当向患者施用时能够对疾病、病症或病状的任何症状、方面或特征具有任何可检测、积极作用的量向受试者施用药剂。治疗有效量可通过测量相关生理作用来确定。例如,在高血糖病状的情况下,血糖的降低或减少或葡萄糖耐受性测试中的改善可用于确定药剂的量是否有效治疗高血糖病状。例如,治疗有效量是足以减少或降低任何水平(例如,基线水平)的空腹血糖(FPG)的量,其中例如所述量足以使大于200mg/dl的FPG水平降至小于200mg/dl,其中所述量足以使175mg/dl与200mg/dl之间的FPG水平降至小于起始水平,其中所述量足以使150mg/dl与175mg/dl之间的FPG水平降至小于起始水平,其中所述量足以使125mg/dl与150mg/dl之间的FPG水平降至小于起始水平等(例如使FPG水平降至小于125mg/dl、小于120mg/dl、小于115mg/dl、小于110mg/dl等)。在HbA1c水平的情况下,有效量是足以使水平减少或降低超过约10%至9%、超过约9%至8%、超过约8%至7%、超过约7%至6%、超过约6%至5%等的量。更具体地说,本公开涵盖HbA1c水平减少或降低约0.1%、0.25%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、33%、35%、40%、45%、50%或更多。治疗有效量可结合给药方案和对受试者的病状的诊断分析等进行调节。

[0082] 短语“以足以实现改变的量”意指在施用特定治疗之前(例如基线水平)与之后测量的指示物水平之间存在可检测差异。指示物包括任何客观参数(例如葡萄糖或胰岛素的水平或食物摄入或体重)或主观参数(例如受试者的幸福感或食欲)。

[0083] 如本文所用的短语“葡萄糖耐受性”是指当葡萄糖摄入波动时,受试者控制血糖和/或血浆胰岛素含量的能力。例如,葡萄糖耐受性涵盖受试者在约120分钟内使血糖水平降回在摄入葡萄糖之前所测定的水平的能力。

[0084] 术语“糖尿病”和“糖尿病的”是指经常以高血糖和糖尿为特征的涉及胰岛素不充分产生或利用的碳水化合物代谢的进行性疾病。术语“糖尿病前期”和“糖尿病前期的”是指

受试者不具有典型地在糖尿病中所观察到的特征、症状等但具有若不进行治疗则可能发展成糖尿病的特征、症状等的病况。这些病况的存在可使用例如空腹血糖 (FPG) 测试或口服葡萄糖耐受性测试 (OGTT) 来确定。两者通常需要受试者在开始测试之前空腹至少8小时。在FPG测试中,在空腹结束之后测量受试者的血糖;一般而言,受试者空腹过夜且在早上受试者进食之前测量血糖。健康受试者的FPG浓度通常将在约90与约100mg/dl之间,“糖尿病前期”受试者的FPG浓度通常将在约100与约125mg/dl之间,而“糖尿病”受试者的FPG含量通常将高于约126mg/dl。在OGTT中,在空腹之后测量受试者的血糖,且在饮用富含葡萄糖的饮料之后两小时再次测量。消耗富含葡萄糖的饮料之后两小时,健康受试者的血糖浓度通常低于约140mg/dl,糖尿病前期受试者的血糖浓度通常是约140至约199mg/dl,而糖尿病受试者的血糖浓度通常是约200mg/dl或高于200mg/dl。虽然以上提及的血糖值有关人受试者,但在鼠受试者中正常血糖、中度高血糖和明显高血糖按比例不同。在四小时空腹之后,健康鼠受试者的FPG浓度通常将在约100与约150mg/dl之间,“糖尿病前期”鼠受试者的FPG浓度通常将在约175与约250mg/dl之间,而“糖尿病”鼠受试者的FPG浓度通常将高于约250mg/dl。

[0085] 如本文所用的术语“胰岛素抗性”是指正常量的胰岛素不能产生正常生理或分子反应的病况。在一些情况下,内源性产生或外源性施用的超生理量的胰岛素能够完全或部分克服胰岛素抗性且产生生物反应。

[0086] 术语“代谢综合征”是指包括但不限于以下特性的相关群集:高胰岛素血症、葡萄糖耐受性异常、肥胖症、脂肪再分配至腹部或上身部分、高血压、纤维蛋白溶解异常和血脂异常,其以高甘油三酯、低高密度脂蛋白 (HDL)-胆固醇和高小而密的低密度脂蛋白 (LDL) 粒子为特征。具有代谢综合征的受试者处于发展2型糖尿病和/或其他病症(例如动脉粥样硬化)的危险的中。

[0087] 短语“葡萄糖代谢病症”涵盖以与受试者中相对于健康个体葡萄糖水平增加和/或胰岛素水平增加相关的临床症状或临床症状组合为特征的任何病症。葡萄糖和/或胰岛素水平增加可表现于以下疾病、病症和病况中:高血糖症、II型糖尿病、妊娠期糖尿病、I型糖尿病、胰岛素抗性、葡萄糖耐受性受损、高胰岛素血症、葡萄糖代谢受损、糖尿病前期、其他代谢病症(诸如代谢综合征,其还称为综合征X)和肥胖症等。本公开的复合物及其组合物可用于例如实现和/或维持葡萄糖稳态,例如使血流中的葡萄糖水平降低和/或使胰岛素水平降低至在健康受试者中所发现的范围。

[0088] 如本文所用的术语“高血糖症”是指相对于健康受试者,升高量的葡萄糖在受试者的血浆中循环的病况。高血糖症可使用本领域中已知的方法诊断,包括如本文所描述测量空腹血糖水平。

[0089] 如本文所用的术语“高胰岛素血症”是指当伴随着血糖水平增加或者正常时,存在升高水平的循环胰岛素的病况。高胰岛素血症可由与以下相关的胰岛素抗性引起:血脂异常,诸如高甘油三酯、高胆固醇、高低密度脂蛋白 (LDL) 和低高密度脂蛋白 (HDL);高尿酸水平;多囊性卵巢综合征;II型糖尿病和肥胖症。在血浆胰岛素水平高于约2 μ U/mL时诊断为高胰岛素血症。

[0090] 如本文所用,短语“体重病症”是指与过高体重和/或增强的食欲相关的病况。各种参数用于确定受试者与参考健康受试者相比是否过重,包括受试者的年龄、身高、性别和健康状态。例如,可通过评估受试者的身体质量指数 (BMI) 来考虑受试者过重或肥胖,身体质

量指数通过受试者的体重(千克)除以受试者的身高(米)的平方来计算。BMI在约18.5至约24.9kg/m²范围内的成人视为具有正常重量;BMI在约25与约29.9kg/m²之间的成人可视为过重(肥胖前期);且BMI为约30kg/m²或更高的成人可视为肥胖。增强的食欲经常促成过高体重。存在若干与增强的食欲相关的病状,包括例如夜间进食综合征,其特征在于往往与失眠相关的早上厌食和晚上贪食,但其可与下丘脑损伤有关。

[0091] 术语“活化剂”是指例如刺激、增加、活化、促进、增强活化、敏化或上调一种或多种药剂(例如用于治疗或预防代谢病症的多肽或复合物)的功能或活性的试剂。此外,活化剂包括通过与本发明的多肽相同的作用机制起作用(即以类似于多肽的方式调节与多肽相同的信号传导途径的试剂)且能够引发类似于(或大于)多肽的生物反应的试剂。活化剂的实例包括激动剂,诸如小分子化合物。

[0092] 术语“调节剂”统指本发明的多肽和活化剂。

[0093] 术语“调节(modulate)”、“调节(modulation)”等是指试剂(例如活化剂)直接或间接增加一种或多种多肽(或编码其的核酸分子)的功能或活性的能力;或试剂产生类似于一种或多种多肽的作用的能力。

[0094] 应了解,在本公开通篇中根据单字母或三字母代码提及氨基酸。为了读者的方便,以下提供单字母和三字母氨基酸代码:

	G	甘氨酸	Gly		P	脯氨酸	Pro
	A	丙氨酸	Ala		V	缬氨酸	Val
	L	亮氨酸	Leu		I	异亮氨酸	Ile
	M	甲硫氨酸	Met		C	半胱氨酸	Cys
[0095]	F	苯丙氨酸	Phe		Y	酪氨酸	Tyr
	W	色氨酸	Trp		H	组氨酸	His
	K	赖氨酸	Lys		R	精氨酸	Arg
	Q	谷氨酰胺	Gln		N	天冬酰胺	Asn
	E	谷氨酸	Glu		D	天冬氨酸	Asp

[0096]	S	丝氨酸	Ser		T	苏氨酸	Thr
--------	---	-----	-----	--	---	-----	-----

[0097] 如本文所用,术语“变体”涵盖天然存在的变体(例如同源物和等位基因变体)和非天然存在的变体(例如,重组修饰的)。天然存在的变体包括同源物,即自一种物种至另一物种,分别在核苷酸或氨基酸序列方面不同的核酸和多肽。天然存在的变体包括等位基因变体,即在一种物种内自一个个体至另一个体,分别在核苷酸或氨基酸序列方面不同的核酸和多肽。非天然存在的变体包括分别在核苷酸或氨基酸序列中包含变化的核酸和多肽,其中序列变化是人工引入的,例如变化在实验室或其他设备中通过人的干预(“人的手”)而产生。

[0098] 关于GDF15的术语“天然”或“野生型”是指生物活性的天然存在的GDF15,包括生物活性的天然存在GDF15变体。所述术语包括112氨基酸人GDF15成熟序列(SEQ ID NO:1)。

[0099] 如本文所用的术语“突变蛋白”广义上是指重组蛋白,即在氨基酸序列中包含人工引入的变化(例如氨基酸序列中的在实验室或其他设备中通过人的干预(“人的手”)产生的

变化)的多肽。这些多肽通常携带单个或多个氨基酸取代或缺失,且经常衍生自己已经历定点或随机诱变的克隆基因或完全合成的基因。因此,本发明的“GDF15突变蛋白”涵盖例如相对于参考多肽(例如相对于天然/野生型成熟人GDF15 (SEQ ID NO:1))的氨基酸取代和/或氨基酸缺失(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14或更多个氨基酸的N末端截短)。

[0100] 如本文关于天然人GDF15或GDF15突变蛋白所用,术语“修饰的”、“修饰”等是指改变人GDF15、天然存在的GDF15变体或GDF15突变蛋白的性质的一种或多种变化,其中所述变化不改变GDF15多肽(天然或突变蛋白)本身的一级氨基酸序列。此类性质包括例如溶解度、循环半衰期、稳定性、清除率、免疫原性或致敏性和可制造性(例如成本和效率)。“修饰”包括不改变GDF15多肽(天然或突变蛋白)本身的一级氨基酸序列的共价化学修饰。可对人GDF15、天然存在的GDF15变体或GDF15突变蛋白进行的变化包括但不限于以下中的一种或多种:聚乙二醇化(共价连接一个或多个聚乙二醇(PEG)分子或其衍生物);糖基化(例如N-糖基化)、聚唾液酸化和羟乙基淀粉化(hesylation);麦芽糖结合蛋白融合;白蛋白融合(例如HSA融合);通过例如缀合脂肪酸链(酰化作用)进行的白蛋白结合;Fc-融合;以及与PEG模拟物融合。一些特定实施方案需要涉及融合至Fc的修饰,而其他特定修饰需要涉及糖基化的修饰,或其组合。

[0101] 术语“DNA”、“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”等在本文中可互换地用于指任何长度的聚合形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸的非限制性实例包括线性和环状核酸、信使RNA(mRNA)、互补DNA(cDNA)、重组多核苷酸、载体、探针、引物等。

[0102] 术语“探针”是指DNA或RNA中对应于目标基因或序列的片段,其中所述片段已进行放射性标记(例如通过并入³²P或³⁵S)或以另外一些可检测分子(诸如生物素、地高辛(digoxigenin)或荧光素)标记。在具有互补序列的数段DNA或RNA将杂交时,可使用探针来例如标记病毒斑、细菌菌落或凝胶上含有目标基因的条带。探针可以是克隆DNA或其可以是合成的DNA链;后者可用于如下自分离蛋白质获得cDNA或基因组克隆:通过例如对蛋白质的一部分进行微测序,合成携带所述序列的寡核苷酸,放射性标记所述序列且使用其作为探针来筛选cDNA库或基因组库。

[0103] 术语“异源”是指两种组分根据结构定义为衍生自不同来源。例如,在多肽的背景下,“异源”多肽可包括衍生自不同多肽的可操作地连接的氨基酸序列(例如第一组分包含重组多肽,且第二组分衍生自天然GDF15多肽)。类似地,在编码嵌合多肽的多核苷酸的背景下,“异源”多核苷酸可包括可衍生自不同基因的可操作地连接的核酸序列(例如第一组分来自编码根据本文所公开的一个实施方案的多肽的核酸,且第二组分来自编码载体多肽的核酸)。其他示例性“异源”核酸包括包含编码序列的核酸可操作地连接至来自不同于编码序列的基因来源的调控元件(例如启动子)的表达构建体(例如用于提供在可具有不同于启动子、编码序列或两者的基因来源的目标宿主细胞中的表达)。例如,可操作地连接至编码GDF15多肽或其结构域的多核苷酸的T7启动子被称为是异源核酸。在重组细胞的背景下,“异源”可指存在具有不同于其所在的宿主细胞的基因来源的核酸(或基因产物,诸如多肽)。

[0104] 术语“可操作地连接”是指分子之间为提供所需功能而连接。例如,在核酸的背景下,“可操作地连接”是指核酸序列之间的功能性连接。举例而言,核酸表达控制序列(诸如

启动子、信号序列或转录因子结合位点阵列) 可操作地连接至第二多核苷酸, 其中表达控制序列影响第二多核苷酸的转录和/或翻译。在多肽的背景下, “可操作地连接” 是指氨基酸序列(例如不同结构域) 之间为提供所描述多肽活性的功能性键联。

[0105] 如本文所用, 在多肽结构的背景下, “N末端”(或“氨基末端”) 和“C末端”(或“羧基末端”) 分别指多肽的最远氨基和羧基端, 而术语“N末端的”和“C末端的”是指多肽的氨基酸序列中分别相对于N末端和C末端的位置, 且分别可包括N末端和C末端的残基。“紧接着N末端”或“紧接着C末端”是指相对于第二氨基酸残基的第一氨基酸残基的位置, 其中所述第一和第二氨基酸残基共价结合以提供连续氨基酸序列。

[0106] 在氨基酸序列或多核苷酸序列(例如“衍生自”GDF15多肽的氨基酸序列) 的背景下, “衍生自”意在指示多肽或核酸具有基于参考多肽或核酸(例如天然存在的GDF15多肽或GDF15编码核酸) 的序列, 且不意在限制蛋白质或核酸的来源或制备方法。举例而言, 术语“衍生自”包括参考氨基酸或DNA序列的同源物或变体。

[0107] 在多肽的背景下, 术语“分离”是指若目标多肽是天然存在的, 则其处于不同于其可天然存在的环境中。“分离”意在包括实质上富集目标多肽和/或其中目标多肽部分或实质上纯化的样品内的多肽。在多肽并非天然存在的情况下, “分离”指示多肽已自其通过合成或重组手段制备的环境中分离。

[0108] “富集”意指样品以非天然方式加以操纵(例如在实验室中, 例如由科学工作者或临床医师进行), 以使得目标多肽按以下浓度存在: a) 与起始样品(诸如生物样品, 例如多肽天然存在或多肽在施用之后存在的样品) 中的多肽浓度相比较(例如至少大3倍、至少大4倍、至少大8倍、至少大64倍或大更多倍) 的浓度, 或b) 大于制备多肽的环境(例如在细菌细胞中) 的浓度。

[0109] “实质上纯”指示组分(例如多肽、二聚体、四聚体、复合物) 构成组合物总含量的大于约50%, 且通常总多肽含量的大于约60%。更通常, “实质上纯”是指总组合物的至少75%、至少85%、至少90%或更多为目标组分的组合物。在一些情况下, 所述组分将构成组合物总含量的大于约90%或大于约95%。

[0110] 术语“抗体”(Ab) 和“免疫球蛋白”(Ig) 是指具有相同结构特征的糖蛋白。虽然抗体对特定抗原展现结合特异性, 但免疫球蛋白包括抗体与缺乏抗原特异性的其他抗体样分子两者。以下详细描述抗体。

[0111] 术语“单克隆抗体”是指获自实质上同源抗体的群体的抗体, 即包含所述群体的个别抗体为相同的, 除了可以微小量存在的可能天然存在的突变。单克隆抗体具高度特异性, 其针对单一抗原位点。与多克隆抗体制剂相比之下, 其可包括针对不同决定簇(表位) 的不同抗体, 各单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

[0112] 在抗体的背景下, 术语“分离的”是指抗体已与其天然环境的污染物组分分离和/或自其天然环境的污染物组分中回收; 此类污染物组分包括可妨碍抗体的诊断性或治疗性用途的物质, 且可包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。

[0113] 短语“保守氨基酸取代”是指以下组内的氨基酸残基的取代: 1) L、I、M、V、F; 2) R、K; 3) F、Y、H、W、R; 4) G、A、T、S; 5) Q、N; 以及6) D、E。保守氨基酸取代可通过将蛋白质中的氨基酸用具有类似侧链酸性、碱性、电荷、极性或尺寸的侧链的氨基酸置换来保留蛋白质活性。对取代、插入或缺失的指导可基于不同变体蛋白质或来自不同物种的蛋白质的氨基酸序列的

比对来进行。

[0114] 生长分化因子15 (GDF15)

[0115] GDF15 (还称为MIC-1 (巨噬细胞抑制细胞因子-1)、PDF (前列腺分化因子)、PLAB (胎盘骨形态发生蛋白)、NAG-1 (非类固醇消炎药 (NSAID) 活化基因)、TGF-PL和PTGFB) 是转化生长因子 β (TGF- β) 超家族的成员。GDF15 (其被合成为62kDa细胞内前体蛋白形式,所述62kDa细胞内前体蛋白随后由furin样蛋白酶裂解) 以25kDa二硫化物连接蛋白形式被分泌。(参见例如Fairlie等人, *J. Leukoc. Biol.* 65:2-5 (1999))。GDF15 mRNA可见于包括肝、肾、胰腺、结肠和胎盘的若干组织中,且在诸如肝、肾、心脏和肺的器官损伤期间GDF15在肝中的表达可显著上调。

[0116] GDF15前体是308个氨基酸的多肽 (NCBI参考序列NP_004855.2), 其含有29个氨基酸的信号肽、167个氨基酸的前肽结构域和具有112个氨基酸的成熟结构域,所述成熟结构域由furin样蛋白酶自前肽结构域切除。308-氨基酸GDF15多肽被称为“全长”GDF15多肽; 112-氨基酸GDF15多肽 (“全长”GDF15的氨基酸197-308) 是“成熟”GDF15多肽 (SEQ ID NO: 1)。除非另外指出,否则术语“GDF15”是指112个氨基酸的成熟人序列。此外,特定GDF15残基的数字参考是指112个氨基酸的成熟序列 (即残基1是Ala (A), 且残基112是Ile (I); 参见SEQ ID NO: 1)。值得注意的是,虽然GDF15前体氨基酸序列预示三个切除位点,从而产生三种推定形式的“成熟”人GDF15 (即110、112和115个氨基酸), 但是将112个氨基酸的成熟序列视为恰当的。

[0117] 本公开的范围包括来自包括以下的其他哺乳动物物种的GDF15直向同源物及其修饰形式和其用途: 小鼠 (NP_035949)、黑猩猩 (XP_524157)、猩猩 (XP_002828972)、恒河猴 (EHH29815)、大熊猫 (XP_002912774)、长臂猿 (XP_003275874)、豚鼠 (XP_003465238)、雪貂 (AER98997)、奶牛 (NP_001193227)、猪 (NP_001167527)、狗 (XP_541938) 和鸭嘴兽 (*Ornithorhynchus anatinus*); AFV61279)。成熟形式的人GDF15与小鼠直向同源物具有约67%氨基酸相同性。

[0118] 为了方便起见,此后所描述的修饰的人GDF15分子、GDF15变体 (例如突变蛋白) 和修饰的GDF15突变蛋白以下统称为“多肽”。应注意,结合本公开的多肽和核酸分子对“人”的任何提及不意在限制获得多肽或核酸的方式或其来源,而是仅参考所述序列,因为其可对应于天然存在的人多肽或核酸分子的序列。在特定实施方案中,修饰的人GDF15分子是N-糖基化二聚体。除人多肽和编码其的核酸分子之外,本公开涵盖来自其他物种的GDF15相关多肽和相应核酸分子。

[0119] A. 具有所需物理性质的多肽

[0120] 本公开部分地涵盖包括与SEQ ID NO: 1的氨基酸序列 (成熟112个氨基酸长的人GDF15) 至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的连续氨基酸序列的多肽。所述多肽可相对于SEQ ID NO: 1的氨基酸序列包含一个或多个氨基酸取代和/或缺失。在某些实施方案中,除氨基酸取代之外,本公开的多肽还可相对于SEQ ID NO: 1的氨基酸序列包含氨基酸缺失。在一些实施方案中,本公开的多肽可相对于SEQ ID NO: 1的氨基酸序列包含氨基酸缺失。

[0121] 出于方便和清楚的目的,使用SEQ ID NO: 1的氨基酸序列作为本文中所存在的多肽的参考序列。因此,氨基酸残基位置在本文中参考SEQ ID NO: 1进行编号。以下呈现SEQ

ID NO:1的序列:

[0122] ARNGDHCPLGPGRCRLHTVSRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLK
PDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

[0123] 在一些实施方案中,本公开的多肽可包含一个、两个、三个或更多个氨基酸取代、添加或缺失,从而在SEQ ID NO:1中不存在N连接的糖基化共有位点的位置处引入一个或多个N连接的糖基化共有位点。N连接的糖基化共有位点包括序列NXS/T,其中N是Asn;X是不同于脯氨酸的氨基酸;随后是Ser (S) 或Thr (T)。

[0124] 本公开的多肽的实例包括在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中不存在糖基化共有位点(例如N连接的糖基化共有位点)的氨基酸位置处具有一个、两个、三个、四个或更多个糖基化共有位点的多肽。

[0125] 在某些实施方案中,多肽可相对于SEQ ID NO:1包含一个氨基酸取代,从而在取代位置处提供一个N连接的糖基化共有位点(例如SEQ ID NO:1中的NGD序列可通过一个取代变成NGT/S;取代位置加下划线)。在其他情况下,多肽可相对于SEQ ID NO:1包含两个氨基酸取代,从而在取代位置处提供一个N连接的糖基化共有位点(例如SEQ ID NO:1中的KTD序列可通过两个取代变成NTT/S;取代位置加下划线)。在一些实施方案中,多肽可相对于SEQ ID NO:1包含三个氨基酸取代,从而在取代位置处提供一个N连接的糖基化共有位点(例如SEQ ID NO:1中的GPG序列可通过三个取代变成NTT/S;取代位置加下划线)。

[0126] 在某些实施方案中,多肽可相对于SEQ ID NO:1包含一个或多个氨基酸缺失,从而在缺失位置处提供N连接的糖基化共有位点。例如,SEQ ID NO:1中的NGDHCPLGPGRCRLHT (SEQ ID NO:119) 序列可通过缺失氨基酸D至H(加下划线)而改变,从而提供N连接的糖基化共有位点:NGT。

[0127] 在某些实施方案中,多肽可相对于SEQ ID NO:1包含一个或多个氨基酸添加,从而在添加位置处提供N连接的糖基化共有位点。通过添加一个氨基酸引入N连接的糖基化共有位点的实例包括添加N至SEQ ID NO:1中的序列LHT中,从而产生序列LNHT,其中NHT是N连接的糖基化共有位点。

[0128] 如上文所提及,多肽可相对于SEQ ID NO:1包含一个或多个取代且取代可如SEQ ID NO:1中相应氨基酸的位置进行编号。

[0129] 在某些实施方案中,多肽可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的连续氨基酸序列,其中所述连续氨基酸序列具有取代D5T/S或R21N。

[0130] 在某些实施方案中,多肽可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的连续氨基酸序列,其中所述连续氨基酸序列具有相对于SEQ ID NO:1中的相应氨基酸的以下多对取代中的至少一者:

[0131] i. R16N和H18T或R16N和H18S;

[0132] ii. S23N和E25T或S23N和E25S;

[0133] iii. L24N和D26T或L24N和D26S;

[0134] iv. S50N和F52T或S50N和F52S;

[0135] v. F52N和A54T或F52N和A54S;

[0136] vi. Q51N和R53T或Q51N和R53S;

[0137] vii.R53N和A55T或R53N和A55S;

[0138] viii.S64N和H66T或S64N和H66S;

[0139] ix.L65N和R67T或L65N和R67S;

[0140] x.S82N和N84T或S82N和N84S;

[0141] xi.K91N和D93T或K91N和D93S;

[0142] xii.D93N和G95T或D93N和G95S;

[0143] xiii.T94N和V96T或T94N和V96S;

[0144] xiv.V96N和L98T或V96N和L98S;

[0145] xv.S97N和Q99T或S97N和Q99S; 和

[0146] xvi.A106N和D108T或A106N和D108S

[0147] 例如,上述i)中的取代表示多肽在对应于SEQ ID NO:1中的氨基酸位置18的氨基酸位置处具有苏氨酸(T)或丝氨酸(S),其中在SEQ ID NO:1中组氨酸(H)存在于氨基酸位置18处。类似地,在位置5处D以T或S取代可由D5T/S表示。多肽中相对于SEQ ID NO:1的相应氨基酸的位置可通过比对氨基酸序列来确定。

[0148] 在某些实施方案中,多肽可包含两个氨基酸取代(一对取代),其在SEQ ID NO:1中不存在N-糖基化共有序列的位置处提供单个N-糖基化共有序列。此类取代的实例包括R16N和H18T/S;K91N和D93T/S;T94N和V96T/S;以及上文所列的其他取代。R16N和H18T/S表示多肽在对应于SEQ ID NO:1的位置16的位置处具有N,其中在SEQ ID NO:1中R存在,且多肽在对应于SEQ ID NO:1中存在H的位置18的位置处具有T或S。由于SEQ ID NO:1中的序列RXH(在位置16-18处)不包含N-连接糖基化共有序列的任何残基,所以所述对取代使得N-连接糖基化共有序列引入。

[0149] 在替代实施方案中,单个氨基酸取代可足以提供N-连接糖基化共有序列,例如,由于序列NGD(在位置3-5处)存在于SEQ ID NO:1中,D以T或S单个取代分别产生序列NGT或NGS,其均是N-糖基化共有序列。

[0150] 在某些情况下,可向野生型GDF15中引入超过一个N-糖基化共有序列。例如,野生型GDF15氨基酸序列可通过取代和/或缺失修饰以提供一个、两个、三个、四个或更多个N-糖基化共有序列。在某些实施方案中,多肽可包括112个连续氨基酸,其与SEQ ID NO:1的112氨基酸序列具有至少90%的序列同一性,其中112个连续氨基酸包括一个、两个、三个、四个或更多个N-糖基化共有序列,诸如1-12、1-10、1-8、1-6、1-4、1-3或1-2个N-糖基化共有序列。

[0151] 在某些实施方案中,多肽可包含112个连续氨基酸,其与SEQ ID NO:1的112氨基酸序列具有至少90%的序列同一性,其中112个连续氨基酸包括本文所阐述的各对取代中的一对、两对、三对、四对或更多对。

[0152] 本公开还涵盖作为上文所描述的多肽的活性片段(例如子序列)的多肽。活性片段或子序列的长度可以是40个氨基酸至111个氨基酸,例如40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、98、106、109或多至111个氨基酸。

[0153] 多肽与参考序列相比在限定长度的连续氨基酸(例如“比较窗口”)上具有限定的序列同一性。用于比较的序列的比对方法是本领域中熟知的。用于比较的序列的最佳比对可例如通过Smith和Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) 的局部同源算法、通过

Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) 的同源比对算法、通过Pearson和Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988) 的相似性查找法、通过这些算法的计算机化实现方式 (Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis. 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA) 或通过人工比对和视觉检查 (参见例如Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编1995补充版) 来进行。

[0154] 作为实例, 适合的多肽可包含与SEQ ID NO:1中具有40、45、50、55、60、65、70、75、80、85或多至112个氨基酸的连续段具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0155] 本文所公开的多肽的示例性片段包含相对于SEQ ID NO:1具有氨基酸缺失的多肽。例如, 多肽可相对于SEQ ID NO:1具有N末端截短和/或C末端截短。截短可相对于参考多肽 (例如SEQ ID NO:1) 具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多个氨基酸。在某些实施方案中, 相对于SEQ ID NO:1, 目标多肽可包含引入N-连接糖基化共有序列的一个或多个取代, 诸如本文所公开的多肽; 和N末端截短和/或C末端截短。

[0156] 在某些实施方案中, 多肽可以是至少98个氨基酸长且与SEQ ID NO:1中具有98个氨基酸的相应段具有至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。此多肽可缺少存在于SEQ ID NO:1的N末端的前两个至前十四个氨基酸 (例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个氨基酸), 而保留存在于SEQ ID NO:1的C末端的氨基酸。换言之, 缺失氨基酸对应于SEQ ID NO:1的N末端氨基酸。

[0157] 在某些实施方案中, GDF15突变蛋白可以是至少106个氨基酸长且与SEQ ID NO:1中具有106个氨基酸的相应段具有至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。GDF15突变蛋白可缺少存在于SEQ ID NO:1的N末端的前六个氨基酸。

[0158] 在某些实施方案中, 多肽可以是至少109个氨基酸长且与SEQ ID NO:1中具有109个氨基酸的相应段具有至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。GDF15突变蛋白可缺少存在于SEQ ID NO:1的N末端的前三个氨基酸。

[0159] 本公开的示例性多肽相对于WT hGDF15可包含两个N末端氨基酸 (Δ N2) 缺失且可融合至N末端的Fc序列。然而, 当提及氨基酸取代的位置时, 所指示的残基编号是对应于WT成熟hGDF15 (WT; SEQ ID NO:1) 中的位置的编号。因此, 在多肽的N末端丢失在N末端的前两个氨基酸的氨基酸N可称为残基3, 不过其在GDF15突变蛋白多肽氨基酸序列中是第一个氨基酸且前面是异源氨基酸序列 (例如Fc)。

[0160] 如上文所提及, 相对于SEQ ID NO:1的序列, 这些多肽片段可包含引入N-糖基化共有序列的一个或多个氨基酸取代, 诸如一个、两个或更多个本文所公开的氨基酸取代。

[0161] 如以上所指出且如以下更详细描述, 本公开的多肽可通过例如以下来修饰: 聚乙二醇化 (共价连接一个或多个聚乙二醇 (PEG) 分子或其衍生物); 糖基化 (例如N-糖基化); 聚唾液酸化; 白蛋白融合分子, 包含血清白蛋白 (例如人血清白蛋白 (HSA)、犬血清白蛋白或牛血清白蛋白 (BSA)); 通过例如缀合脂肪酸链 (酰化作用) 进行的白蛋白结合; Fc-融合; 以及与PEG模拟物融合。在某些实施方案中, 修饰以位点特异性方式引入。在其他实施方案中, 修饰包括接头。接头可使修饰部分缀合至多肽。

[0162] 在特定实施方案中, 本公开涵盖通过与白蛋白缀合来修饰成熟人GDF15和GDF15突变蛋白 (诸如以上所描述的多肽)。在其他实施方案中, 本公开涵盖经由N-糖基化或O-糖基

化来修饰多肽。以下进一步描述白蛋白及其多肽缀合物(例如融合蛋白)和糖基化多肽的特征。

[0163] Fc-GDF15融合多肽及其复合物

[0164] 在示例性实施方案中,本文所公开的GDF15多肽可以融合多肽形式存在,所述融合多肽包含融合至本文所描述的多肽(例如人GDF15分子、修饰的人GDF15分子、GDF15突变蛋白和修饰的GDF15突变蛋白)中的一者或多者的氨基酸序列的Fc多肽或其片段。如本文所提供,GDF15多肽可以是野生型多肽或突变蛋白,例如糖基化突变蛋白。如本文所用,在多肽(例如GDF15多肽)的背景下,“糖基化突变蛋白”或“糖突变蛋白”或“糖基化变体”或“糖变体”是指在氨基酸序列中的一个位置处包含一个或多个糖基化共有位点的多肽,在所述位置处参考(野生型)多肽不包含糖基化共有位点。在某些情况下,融合多肽可包含融合至本文所公开的GDF15糖突变蛋白的N末端的Fc-序列。

[0165] 本文所描述或本领域中已知的任何Fc多肽序列均可以是本公开的融合蛋白的组分。融合蛋白的组分可任选地通过接头(诸如本文所描述的那些接头)共价键合。在本公开的实施方案中的一些中,融合蛋白包含Fc多肽序列作为N末端部分且包含本文所描述的多肽作为C末端部分。

[0166] 在某些情况下,本文所公开的Fc-GDF15融合多肽的Fc配偶体可以是具有人IgG Fc(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的序列或其变体的Fc。提供呈SEQ ID NO:2形式的人IgG1Fc的氨基酸序列:

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED

PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

[0167] APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE

NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 2)

[0168] 铰链区是斜体的,CH2结构域加下划线且CH3结构域加双下划线。Fc序列中氨基酸的位置的编号根据EU编号(Edelman,G.M.等人,Proc.Natl.Acad.USA,63,78-85(1969))来进行。因此,根据EU编号,SEQ ID NO:2中位置1处的谷氨酸残基“E”编号是216;CH2结构域以编号为231的丙氨酸(A)开始;CH3结构域以编号341的甘氨酸(G)开始。

[0169] 本文所公开的Fc-GDF15融合多肽的Fc配偶体可以是具有与SEQ ID NO:2至少90%相同(例如与SEQ ID NO:2至少93%、至少95%、至少97%、至少98%或更高相同)的连续氨基酸序列的Fc。在某些实施方案中,Fc配偶体可以是包含CH3结构域或与SEQ ID NO:2中的CH3结构域至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的连续氨基酸序列的Fc片段。在某些实施方案中,Fc配偶体可以是包含CH2结构域和CH3结构域或与SEQ ID NO:2中的CH2和CH3结构域至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%和100%相同的连续氨基酸序列的Fc片段。在某些实施方案中,Fc配偶体可以是包含部分铰链区、CH2结构域和CH3结构域或与SEQ ID NO:2中的铰链区、CH2结构域和CH3结构域至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%和100%相同的连续氨基酸序列的Fc片段。在某些实施方案中,Fc配偶体可具有与SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0170] 在某些情况下, Fc-GDF15融合多肽的Fc配偶体可包含工程化的突起, 所述突起可与包含工程化的空腔的另一Fc多肽缔合。在其他情况下, Fc-GDF15融合多肽的Fc配偶体可包含工程化的空腔, 所述空腔可与包含工程化的突起的另一Fc多肽缔合。具有工程化的突起和/或空腔的示例性Fc序列描述于US 8,216,805中。在某些情况下, 突起和空腔可工程化至Fc多肽的CH3结构域中。在某些情况下, 与本公开的Fc-GDF15融合多肽缔合的Fc配偶体不缀合至GDF15多肽。因此, Fc配偶体与Fc-GDF15融合多肽二聚化, 从而形成异二聚体, 且每个异二聚体具有一个GDF15分子。

[0171] “突起”或“钮”可通过将第一多肽中CH3结构域中的小氨基酸侧链用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)置换而工程化。任选地在第二多肽的CH3结构域中通过将大氨基酸侧链用较小者(例如丙氨酸或苏氨酸)置换而产生具有与突起相同或类似尺寸的补体“空腔”或“孔”。

[0172] “第一多肽”可以是待与第二多肽缔合的任何多肽。第一多肽和第二多肽在“界面”(以下所定义)处相遇。除界面之外, 第一多肽可包含一个或多个另外结构域, 诸如CH2结构域或铰链区。在某些情况下, 第一多肽包含可形成第一多肽的界面的CH3结构域。

[0173] “第二多肽”可以是待经由“界面”与第一多肽缔合的任何多肽。除界面之外, 第二多肽可包含一个或多个另外结构域, 诸如CH2结构域或铰链区。在某些情况下, 第二多肽包含可形成第二多肽的界面的CH3结构域。

[0174] “界面”包含第一多肽中的那些“接触”氨基酸残基(或其他非氨基酸基团, 诸如碳水化合物基团、NADH、生物素、FAD或血红素基团), 所述“接触”氨基酸残基与第二多肽的界面中的一个或多个“接触”氨基酸残基(或其他非氨基酸基团)相互作用。在某些情况下, 界面可以是免疫球蛋白的结构域, 诸如恒定结构域(或其片段)。在某些情况下, 界面包含免疫球蛋白的CH3结构域, 其衍生自IgG抗体, 例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。

[0175] “突起”是指至少一个氨基酸侧链, 其自第一多肽的界面伸出且因此可安置于在邻近界面(即第二多肽的界面)中的补体空腔中, 从而稳定异二聚体, 且由此例如相对于同二聚体形成更有利于异二聚体形成。空腔可存在于原始界面中或可以合成方式(例如通过改变编码界面的核酸)引入。突起可以合成方式(例如通过改变编码界面的核酸)、例如通过重组手段引入。

[0176] “空腔”是指至少一个氨基酸侧链, 其自第二多肽的界面凹入并且因此容纳第一多肽的邻近界面上的相应突起。空腔可存在于原始界面中或可以合成方式(例如通过改变编码界面的核酸)引入。例如, 将编码第二多肽的界面的核酸改变以编码空腔。

[0177] 突起还称为“钮”, 且空腔还称为“孔”。示例性突起和空腔公开于US8,216,805中且在以下氨基酸位置处包含取代: 347、366、368、394、405和407。氨基酸位置的编号根据EU编号来进行。工程化的突起可包含人IgG1Fc序列中的相应氨基酸的至少一个取代, 其中所述取代位于选自自由以下组成的组的位置处: 氨基酸残基347、366和394。例如, 至少一个取代选自自由以下组成的组: Q347W/Y、T366W/Y和T394W/Y。在某些情况下, 工程化的空腔包含人IgG1Fc序列中的相应氨基酸的至少一个取代, 其中所述取代位于选自自由以下组成的组的位置处: 氨基酸残基366、368、394、405和407。例如, 至少一个取代选自自由以下组成的组: T366S、L368A、T394S、F405T/V/A和Y407T/V/A。

[0178] 在某些情况下, 突起可包含取代T366W/Y且空腔可包含取代T366S、L368A和Y407T/

V/A。

[0179] 例如,突起可包含取代T366W/Y且空腔可包含取代Y407T/V/A。在其他情况下,突起可包含取代T366Y且空腔可包含取代Y407T。在其他实例中,突起可包含取代T366W且空腔可包含取代Y407A。在其他实例中,突起可包含取代T394Y且空腔可包含取代Y407T。

[0180] 在某些实施方案中,融合多肽中GDF15多肽的Fc配偶体可包含改进融合多肽的性质的另外突变。因此,本文所描述的第一多肽和第二多肽中的Fc序列可包含另外突变。例如,Fc配偶体序列可包含去掉(例如降低或消除)以其他方式可为Fc配偶体的特征的IgG效应子功能的突变。在某些情况下,Fc配偶体序列可包含去掉诸如以下的效应子功能的突变:补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。

[0181] 四种人IgG同种型以不同亲和力结合活化Fc γ 受体(Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa)、抑制性Fc γ RIIb受体和补体(C1q)的第一组分,从而产生非常不同的效应子功能。因此,结合区内的突变可对效应子功能具有显著影响。

[0182] IgG结合于Fc γ R抑或C1q取决于位于铰链区和CH2结构域中的残基。CH2结构域的两个区域对于Fc γ R和C1q结合为关键的,且在IgG2和IgG4中具有独特的序列。在位置233-236处IgG2残基和在位置327、330和331处IgG4残基取代至人IgG1中显示极大降低ADCC和CDC活性(Armour KL.等人,1999.Eur J Immunol.29(8):2613-24;Shields RL等人,2001,J Biol Chem.276(9):6591-604)。此外,Idusogie等人证实在包含K322的不同位置处的丙氨酸取代使补体活化显著降低(Idusogie EE.等人,2000.J Immunol.164(8):4178-84)。类似地,鼠IgG2A的CH2结构域中的突变显示减少与Fc γ RI和C1q的结合(Steurer W.等人,1995.J Immunol.155(3):1165-74)。在某些实施方案中,Fc多肽可在CH2结构域中包含去掉IgG效应子功能的突变。CH2区中的示例性突变包含:APELLGPP(SEQ ID NO:96) \rightarrow APALLGPP(SEQ ID NO:98);APELLGPP(SEQ ID NO:96) \rightarrow APELAGPP(SEQ ID NO:99);以及APELLGPP(SEQ ID NO:96) \rightarrow APALAGPP(SEQ ID NO:97)。

[0183] 在一些实施方案中,缀合至GDF15糖突变蛋白的Fc多肽包含部分或全部野生型铰链序列(通常在其N末端)。在一些实施方案中,Fc多肽不包含功能性或野生型铰链序列。在某些情况下,Fc序列可包含以下铰链序列中的一者:EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:100);KSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:101);SCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:102);CDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:103);DKTHTCPPCP(SEQ ID NO:104);KTHTCPPCP(SEQ ID NO:105);THTCPPCP(SEQ ID NO:106);或CPPCP(SEQ ID NO:107);或其具有一个或多个取代(例如1-6个取代,例如1-5、1-4、1、2、3、4、5或6个取代)的变体。在某些情况下,Fc序列可包含与另一Fc的铰链区形成共价键(例如一个或多个二硫键)的铰链区。因此,在某些实施方案中,本文所公开的复合物中的第一和第二多肽可经由第一多肽和第二多肽的铰链区之间的共价相互作用缔合。共价相互作用可包括一个或两个分子间二硫键。

[0184] 在本文详细描述内容中,涵盖缀合至GDF15糖突变蛋白的包含Fc钮或孔序列的第一多肽。这种多肽可呈与第二Fc多肽的复合物形式,所述第二Fc多肽与第一多肽可经由将Fc序列的钮放入孔中而物理缔合。

[0185] 在某些情况下,公开一种第一Fc多肽与第二Fc多肽的复合物。所述第一或第二多肽中的一者可以是Fc与GDF15的融合多肽。如本文所指出,GDF15多肽可包含糖基化突变,从

而导致GDF15多肽的糖基化。糖基化GDF15多肽还可称为GDF15-聚糖或GDF15-糖突变蛋白。GDF15-聚糖或GDF15-糖突变蛋白可如本文所公开。在某些情况下,融合至本文所提供的Fc-钮或Fc-孔多肽的GDF15-聚糖或GDF15-糖突变蛋白可以是包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的连续氨基酸序列的多肽,其中所述连续氨基酸序列相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有取代D5T;D5S;或R21N。在某些实施方案中,融合至Fc-钮或Fc-孔多肽的GDF15-聚糖或GDF15-糖突变蛋白可以是具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽,其中所述氨基酸序列相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列包含以下多对取代中的一者或多者:

- [0186] xvii. R16N和H18T或R16N和H18S;
- [0187] xviii. S23N和E25T或S23N和E25S;
- [0188] xix. S50N和F52T或S50N和F52S;
- [0189] xx. F52N和A54T或F52N和A54S;
- [0190] xxi. R53N和A55T或R53N和A55S;
- [0191] xxii. S64N和H66T或S64N和H66S;
- [0192] xxiii. K91N和D93T或K91N和D93S;
- [0193] xxiv. D93N和G95T或D93N和G95S;
- [0194] xxv. T94N和V96T或T94N和V96S;
- [0195] xxvi. V96N和L98T或V96N和L98S;
- [0196] xxvii. S97N和Q99T或S97N和Q99S;以及
- [0197] xxviii. A106N和D108T或A106N和D108S

[0198] 在某些情况下,复合物可包含第一和第二多肽。第一多肽可包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列可包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列;且第二多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列可包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列,其中第一多肽与第二多肽经由将第一多肽的突起安置于第二多肽的空腔中而二聚化,且其中第一多肽的C末端或第二多肽的C末端缀合至包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白的N末端。因此,复合物包含第一多肽与第二多肽的异二聚体。由于第一或第二多肽融合至本文所公开的GDF15突变蛋白,所以每个异二聚体存在一个GDF15分子。在某些情况下,GDF15突变蛋白可以是本文所描述的GDF15突变蛋白。

[0199] 如本文所论述,第一多肽和第二多肽可相互作用以经由共价和/或非共价相互作用(诸如疏水性相互作用、二硫键或两者)形成异二聚体。

[0200] 在某些实施方案中,公开包含第一异二聚体和第二异二聚体的复合物。第一异二聚体和第二异二聚体各自可包含第一多肽和第二多肽,其中第一多肽可包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列可包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列;第二多肽可包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列可包含含有至少一个工程化的空腔的CH3序列;其中第一多肽与第二多肽经由将第一多肽的突起安置于第二多肽的空腔中而二聚化,其中第一多肽的C末端或第二多肽的C末端缀合至包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白的N末端,其中第一异二聚体中的GDF15突变蛋白与第二异二聚体中的GDF15突变蛋白二聚化,从而形成包含第一异二聚体和第二异二聚体的复合物。在复合物包含与第二异二聚体物理缔合的第

一异二聚体的本公开复合物中,每个异二聚体-异二聚体复合物存在两个GDF15分子。

[0201] 如本文所指出,第一多肽和第二多肽可相互作用以经由共价和/或非共价相互作用(诸如疏水性相互作用、二硫键或两者)形成异二聚体,且第一异二聚体和第二异二聚体二聚体可相互作用以通过共价和/或非共价相互作用(诸如疏水性相互作用、二硫键或两者)形成二聚体-二聚体复合物。

[0202] 在某些情况下,存在于各个本文所描述的异二聚体中(例如两个异二聚体的复合物中)的GDF15突变蛋白的序列可相同或不同。在某些情况下,两个异二聚体的复合物中的GDF15突变蛋白的序列可相同。

[0203] 本文公开用于融合至GDF15突变蛋白且作为Fc-GDF15融合蛋白的结合配偶体的示例性Fc序列。在某些实施方案中,存在于本公开的复合物中的Fc序列的除工程化的“钮”和“孔”序列之外的序列可类似或相同。

[0204] 在某些情况下,可相互作用以形成本文所公开的复合物的第一多肽和第二多肽可如下阐述为配对I至VIII。在以下所列序列中,人免疫球蛋白G1(hIgG1)Fc序列随后是接头序列(加下划线),随后是GDF15突变蛋白序列(粗体)。

[0205] 配对I:

[0206] 第一多肽:hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₂-ΔN₂-GDF15(N3-I112)(D5T)

DKTHTCPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 [0207] TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS^{CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS}
 GGGGSNGTHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAA
 NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD^{TGVSLQTYDDLAKDCHCI}
 (SEQ ID NO: 3)

[0208] 第二多肽:hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

DKTHTCPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 [0209] TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS^{CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK} (SEQ
 ID NO: 4)

[0210] 配对II:

[0211] 第一多肽:hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN₂-GDF15(N3-I112)(D5T)

- DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 [0212] TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS
GGGSGGGSGGGSGGGGSNGTHCPLGPRCCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQV
TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVS LQ
TYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 5)
- [0213] 第二多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)
 DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 [0214] TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO: 6)
- [0215] 配对III:
- [0216] 第一多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G4S)₅ - ΔN3-GDF15 (G4-I112) (R21N)
 DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 [0217] TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS
GGGSGGGSGGGSGGGGSGDHCPLGPRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVS LQT
YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 7)
- [0218] 第二多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)
 DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 [0219] TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO: 8)
- [0220] 配对IV:
- [0221] 第一多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G4S)₅ - ΔN3-GDF15 (G4-I112) (S23N/E25T)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 [0222] TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDHCPLGPGRCCLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQT
YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 9)

[0223] 第二多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 [0224] TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO: 10)

[0225] 配对V:

[0226] 第一多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G4S)₅ - Δ N3-GDF15 (G4-I112) (F52N/A54T)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 [0227] TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQNRANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQT
YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 11)

[0228] 第二多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 [0229] TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO: 12)

[0230] 配对VI:

[0231] 第一多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G4S)₅ - Δ N3-GDF15 (G4-I112) (R53N/A55T)

[0232] DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

- NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS
GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFNATNMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSQT
YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 13)
- [0234] 第二多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)
DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
- [0235] TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 14)
- [0236] 配对VII:
- [0237] 第一多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G4S)₅ - Δ N3-GDF15 (G4-I112) (K91N/D93T)
DKTIITCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
- [0238] TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS
GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSQT
YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 15)
- [0239] 第二多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)
DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
- [0240] NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
- [0241] ID NO: 16)
- [0242] 配对VIII:
- [0243] 第一多肽:hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G4S)₅ - Δ N3-GDF15 (G4-I112) (D93N/G95T)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 [0244] TPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
 MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTNTTVSLQT
 YDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 17)

[0245] 第二多肽: hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 [0246] TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO: 18)

[0247] 在某些情况下,可相互作用以形成本文所公开的复合物的第一多肽和第二多肽可分别具有与如以上在配对I至VIII中所公开的第一多肽和第二多肽的氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列。例如,序列同一性可以是至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或更高。

[0248] 在某些实施方案中,复合物可包含具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的第一多肽;和具有与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的第二多肽,其中第一多肽和第二多肽经由至少一个分子间二硫键共价连接。本文还提供一种包含第一异二聚体和第二异二聚体的复合物,所述第一异二聚体和第二异二聚体各自包含具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的第一多肽;和具有与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的第二多肽。

[0249] 在某些实施方案中,复合物可包含具有与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的第一多肽;和具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的第二多肽,其中第一多肽和第二多肽经由至少一个分子间二硫键共价连接。本文还提供一种包含第一异二聚体和第二异二聚体的复合物,所述第一异二聚体和第二异二聚体各自包含具有与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的第一多肽;和具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的第二多肽。

[0250] 在某些实施方案中,复合物可包含具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的第一多肽;和具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列

的第二多肽,其中第一多肽和第二多肽经由至少一个分子间二硫键共价连接。本文还提供一种包含第一异二聚体和第二异二聚体的复合物,所述第一异二聚体和第二异二聚体各自包含具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的第一多肽;和具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的第二多肽。

[0251] 在特定实施方案中,本文所公开的复合物可包含两个异二聚体,各异二聚体包含:

[0252] (a) hIgG1-Fc多肽,其包含钮(Fc-钮)且具有序列:

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO: 127); 和

[0253] (b) hIgG1-Fc多肽,其包含孔(Fc-孔)且具有以下序列:

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO: 4),

[0254] 其中Fc-钮(a)或Fc-孔(b)在C末端融合至GDF15糖突变蛋白的N末端。GDF15糖突变蛋白的序列可如下:

[0255]

ARNGTHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPC
 CVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:128;GDF15 (A1-I112) D5T);或

[0256]

NGTHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCV
 PASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:129; Δ N2-GDF15 (N3-I112) D5T);或

[0257]

GTHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP
 ASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:130; Δ N3-GDF15 (G4-I112) D5T);或

[0258]

GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP
 ASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:131; Δ N3-GDF15 (G4-I112) R21N);或

[0259]

GDHCPLGPGRCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP
 ASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:132; Δ N3-GDF15 (G4-I112) (S23N/
 E25T));或

[0260]

GDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQNRNANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:133; Δ N3-GDF15 (G4-I112) (F52N/
A54T));或

[0261]

GDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFNATNMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:134; Δ N3-GDF15 (G4-I112) (R53N/
A55T));或

[0262]

GDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP
ASYNPMVLIQNTTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:135; Δ N3-GDF15 (G4-I112) (K91N/
D93T));或

[0263]

GDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTNTTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:136; Δ N3-GDF15 (G4-I112) (D93N/
G95T))。

[0264] 在某些实例中,Fc-钮的氨基酸序列可与SEQ ID NO:127的氨基酸序列至少85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同。在某些实例中,Fc-孔的氨基酸序列可与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同。在某些实例中,GDF15突变蛋白的氨基酸序列可与SEQ ID NO:128-136中任一者的氨基酸序列至少85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同。

[0265] Fc-钮或Fc-孔可经由接头序列(G₄S)_n(其中n=1-10,诸如2、3、4或5)与GDF15糖突变蛋白连接。

[0266] 在某些实例中,本公开的复合物的回收率可以是至少50mg/L,例如至少超过55mg/L、60mg/L、65mg/L、70mg/L、75mg/L、80mg/L、85mg/L、90mg/L、95mg/L、100mg/L、110mg/L、120mg/L、130mg/L、140mg/L、150mg/L、160mg/L、170mg/L、180mg/L、190mg/L、200mg/L或更多。在某些情况下,本发明的复合物的回收率可以是至少50mg/L-300mg/L,诸如60mg/L-300mg/L、75mg/L-300mg/L、75mg/L-250mg/L、75mg/L-200mg/L、75mg/L-175mg/L、75mg/L-150mg/L、100mg/L-300mg/L、100mg/L-250mg/L、100mg/L-200mg/L、100mg/L-150mg/L、100mg/L-125mg/L、110mg/L-300mg/L或150mg/L-300mg/L。复合物的回收率是指自培养表达形成存在于各充分组装复合物中的两个二聚体的第一多肽和第二多肽的宿主细胞的培养基获得的充分组装的二聚体-二聚体复合物的量。

[0267] 本公开还涵盖Fc多肽融合配偶体和包含所述Fc多肽融合配偶体的融合蛋白,其中Fc多肽融合配偶体被修饰为带电荷的Fc对的一个配偶体。“带电荷Fc对的配偶体”是指(i)“带负电荷”的Fc序列(任选地缺少铰链区),且包含带电荷对突变或(ii)“带正电荷”的“Fc序列”(任选地缺少铰链区),且包含带电荷对突变。“带正电荷”和“带负电荷”在本文中用于便于提及以描述Fc序列中的电荷对突变的性质,而不指示整个序列或构建体必然具有正电荷或负电荷。适合用于本公开的多肽构建体(例如GDF15糖突变蛋白、修饰的GDF15糖突变蛋白)中的带电荷Fc氨基酸序列描述于例如W02013/113008中。

[0268] 带正电荷的Fc (“Fc (+)”) 的实例包括包含缺少铰链区的Fc序列的天冬氨酸-至-赖氨酸突变 (E356K) 和谷氨酸-至-赖氨酸突变 (D399K) 的Fc。带负电荷的Fc (“Fc (-)”) 的实例包括在缺少铰链区的Fc序列中包含两个赖氨酸-至-天冬氨酸突变 (K392D、K409D) 的Fc。此外, C末端赖氨酸 (K477) 还可任选地缺失。当Fc (+) 多肽融合蛋白 (例如Fc (+) GDF15突变蛋白融合蛋白) 和Fc (-) 多肽融合蛋白 (例如Fc (-) GDF15突变蛋白融合蛋白) 在一起孵育时, 天冬氨酸残基通过静电力与赖氨酸残基缔合, 从而促进GDF15多肽融合蛋白的Fc (+) 序列与Fc (-) 序列之间形成Fc异二聚体。

[0269] 本公开还涵盖命名为“半”构建体或“半Fc”构建体的构建体, 其包含通过将第一Fc序列的N末端连接至第二Fc序列的C末端的接头串联连接的两个Fc序列。在一些实施方案中, 单体包含通过将GDF15序列的N末端连接至第一Fc序列的C末端的第一接头连接至第一Fc序列的多肽 (例如成熟修饰的GDF15或GDF15糖突变蛋白) 序列, 其中第一Fc序列通过将第一Fc序列的N末端连接至第二Fc序列的C末端的第二接头连接至第二Fc序列。第一Fc序列和第二Fc序列还通过Fc铰链区缔合。两个此类单体缔合以形成二聚体, 其中单体经由两个多肽序列之间的链间二硫键连接。关于适合在本公开的GDF15突变蛋白情况下使用的半Fc多肽的实例, 参见W02013/113008。

[0270] 本公开还涵盖具有Fc多肽或其片段的多聚体 (包括带电荷Fc对的配偶体 (例如Fc的多聚体)) 的融合蛋白。

[0271] 本公开的复合物具有改进的性质, 诸如增加的溶解度、减少的聚集作用和/或增加的血清半衰期。在某些情况下, 复合物的溶解度通常相对于非缀合重组人GDF15和Fc (钮或孔) 缀合型野生型GDF15提高。在某些实施方案中, 在pH 7.0下的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中, 复合物的溶解度是至少1mg/mL。在其他实施方案中, 复合物的溶解度是至少2mg/mL、至少3mg/mL、至少4mg/mL或至少5mg/mL。在其他实施方案中, 在pH 7.0下的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中, 复合物的溶解度是至少6mg/mL、至少7mg/mL、至少8mg/mL、至少9mg/mL或至少10mg/mL。在特定实施方案中, 复合物的溶解度大于10mg/mL。

[0272] **糖基化**: 出于本公开的目的, “糖基化”意在泛指使聚糖连接至蛋白质、脂质或其他有机分子的酶过程。结合本公开使用术语“糖基化”通常旨在意指添加或缺失一个或多个碳水化合物部分 (通过移除潜在糖基化位点或通过用化学和/或酶手段消除糖基化), 和/或添加可能存在或可能不存在于天然序列中的一个或多个糖基化位点。此外, 所述短语包括天然蛋白的糖基化的质变, 其涉及所存在的各种碳水化合物部分的性质和比例的变化。

[0273] 糖基化可显著影响蛋白质的物理性质且还可在蛋白质稳定性、分泌和亚细胞定位中为重要的。实际上, 本文所描述的GDF15突变蛋白多肽的糖基化赋予其物理性质的有益改进。举例而言但不限于, GDF15突变蛋白的溶解度可通过糖基化改进, 且此类改进可为实质性的 (参见实施例)。通过此类修饰的GDF15突变蛋白展现的溶解度改进可例如能够产生比非糖基化GDF15/GDF15突变蛋白更适合用于药物施用的制剂。糖基化GDF15/GDF15突变蛋白多肽还可展现增强的稳定性。此外, 多肽可改进一种或多种药物动力学性质, 诸如半衰期。

[0274] 糖基化位点的添加可如以上所描述通过改变氨基酸序列来实现。多肽的改变可例如通过添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基 (对于O-连接糖基化位点) 或天冬酰胺残基 (对于N-连接糖基化位点) 或由其取代来进行。N-连接和O-连接寡糖的结构和各类型中所发现的糖残基可不同。在两者上共同发现的一种类型的糖是N-乙酰神经氨酸 (以下称为唾液

酸)。唾液酸通常是N-连接与O-连接寡糖的末端残基且因其负电荷而可赋予糖蛋白酸性性质。本公开的一个特定实施方案包含如以上所描述的N-糖基化变体的产生和使用。

[0275] 增加多肽上的碳水化合物部分的数目的另一方式是通过使糖苷化学或酶偶联至多肽。

[0276] 二氢叶酸还原酶 (DHFR) 缺乏型中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞是用于产生重组糖蛋白的常用宿主细胞。这些细胞不表达酶 β -半乳糖苷 α -2,6-唾液酸基转移酶,并且因此不以 α -2,6键联形式添加唾液酸至在这些细胞中所产生的糖蛋白的N-连接寡糖。

[0277] 在特定实施方案中,包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白是糖基化的。因此,在特定实施方案中,本文所公开的复合物中的GDF15突变蛋白可在引入GDF15突变蛋白的N连接的糖基化共有位点处糖基化。在某些情况下,虽然本文所公开的复合物可包含糖基化GDF15,诸如在由细胞系表达期间产生的糖基化GDF15,但复合物可在产生后进行处理以移除碳水化合物部分。产生后移除碳水化合物部分可使得在于真核宿主细胞中表达期间附着于GDF15突变蛋白(和Fc序列)的实质上所有碳水化合物基团移除。

[0278] 因此,本公开涵盖在多肽序列的N末端和/或C末端缀合一种或多种另外组分或分子,诸如另一蛋白质(例如具有与主题蛋白质异源的氨基酸序列的蛋白质),或载体分子。因此,可提供呈与另一组分或分子的缀合物形式的示例性多肽序列。

[0279] 多肽还可缀合至大的缓慢代谢大分子,诸如蛋白质;多糖,诸如琼脂糖凝胶、琼脂糖、纤维素、纤维素珠粒;聚合氨基酸,诸如聚谷氨酸、聚赖氨酸;氨基酸共聚物;灭活病毒粒子;灭活细菌毒素,诸如来自白喉、破伤风、霍乱、白细胞毒素分子的类毒素;灭活细菌;以及树突细胞。如果需要,则可使用此类缀合形式来产生针对本公开的多肽的抗体。在某些情况下,本文所描述的复合物中的GDF15可以是缀合至大的缓慢代谢巨分子的多肽。

[0280] 用于缀合的另外候选组分和分子包括适合于分离或纯化的那些。特定非限制性实例包括结合分子,诸如生物素(生物素-亲和素特异性结合对)、抗体、受体、配体、凝集素或包含固体载体的分子,所述固体载体包括例如塑胶或聚苯乙烯珠粒、板或珠粒、磁性珠粒、测试条和膜。

[0281] 诸如阳离子交换色谱法的纯化方法可用于通过电荷差异分离结合物,其有效地将缀合物分离成其各种分子量。例如,可负载阳离子交换柱且然后用约20mM乙酸钠(pH约4)洗涤,且然后用在约3至5.5的pH值下(例如在pH约4.5下)缓冲的线性(0M至0.5M)NaCl梯度洗脱。通过阳离子交换色谱法获得的级分的内容物可使用例如质谱法、SDS-PAGE的常规方法或用于根据分子量分离分子实体的其他已知方法根据分子量进行鉴别。

[0282] **接头**:用于修饰本公开的多肽序列的前述组分和分子中的任一者均可任选地经由接头缀合。适合的接头包括“柔性接头”,其通常具有足够的长度,以允许修饰的多肽序列与所连接组分和分子之间一定程度的移动。接头分子可以是约6-50个原子长。接头分子还可以是例如芳基乙炔、含有2-10个单体单元的乙二醇寡聚物、二胺、二酸、氨基酸或其组合。适合的接头可容易地选择且可具有任何适合的长度,诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30、30-50个氨基酸。

[0283] 示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物(G_n)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物、甘氨酸-丝氨酸聚合物(例如(G_mS_o) $_n$ 、($GSGGS$) $_n$ (SEQ ID NO:120)、($G_mS_oG_m$) $_n$ 、($G_mS_oG_mS_oG_m$) $_n$ (SEQ ID NO:121)、($GSGGS_m$) $_n$ (SEQ ID NO:122)、($GSGS_mG$) $_n$ (SEQ ID NO:123)和

(GGGS_m)_n (SEQ ID NO:124) 及其组合,其中m、n和o各自独立地选自至少1至20(例如1-18、2-16、3-14、4-12、5-10、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)的整数;和其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,且因此可充当组分之间的中性系链。示例性柔性接头包括但不限于GGSG (SEQ ID NO:21)、GGSGG (SEQ ID NO:22)、GSGSG (SEQ ID NO:23)、GSGGG (SEQ ID NO:24)、GGGSG (SEQ ID NO:25)和GSSSG (SEQ ID NO:26)。

[0284] 另外柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n或甘氨酸-丝氨酸聚合物(例如(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:120)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:125)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:126),其中n=1至50,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30、30-50)。示例性柔性接头包括但不限于GGGS (SEQ ID NO:19)、GGGGS (SEQ ID NO:20)、GGSG (SEQ ID NO:21)、GGSGG (SEQ ID NO:22)、GSGSG (SEQ ID NO:23)、GSGGG (SEQ ID NO:24)、GGGSG (SEQ ID NO:25)和GSSSG (SEQ ID NO:26)。这些接头序列的多聚体(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30或30-50个)可连接在一起以提供可用于将异源氨基酸序列缀合至本文所公开的多肽的柔性接头。如本文所描述,异源氨基酸序列可以是信号序列和/或融合配偶体,诸如白蛋白、Fc序列等。

[0285] 接头的实例包括例如(GGGGS)_n (SEQ ID NO:126),其中n是1至约10的整数(例如n=1、2、3、4、5、6、7、8、9或10);GGGSGGSIEGR (SEQ ID NO:48);GGGGG (SEQ ID NO:27);EGGGS (SEQ ID NO:28)。

[0286] 在一些情况下,接头可以是可裂解接头,例如酶可裂解接头。在其他情况下,接头可以是非可裂解接头,例如在体内正常生理条件下不酶裂解的接头。

[0287] 例如,蛋白水解可裂解接头可包括基质金属蛋白酶(MMP)裂解位点,例如选自以下的MMP的裂解位点:胶原酶-1、胶原酶-2和胶原酶-3(MMP-1、MMP-8和MMP-13);明胶酶A和B(MMP-2和MMP-9);基质溶解素1、2和3(MMP-3、MMP-10和MMP-11);基质溶解因子(MMP-7);以及膜金属蛋白酶(MT1-MMP和MT2-MMP)。MMP-9的裂解序列是Pro-X-X-Hy(其中,X表示任意残基;Hy,疏水性残基)(SEQ ID NO:29),例如Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr)(SEQ ID NO:30),例如Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser(SEQ ID NO:31)或Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr(SEQ ID NO:32)。蛋白酶裂解位点的另一实例是纤溶酶原活化剂裂解位点,例如uPA或组织纤溶酶原活化剂(tPA)裂解位点。uPA和tPA的裂解序列的特定实例包括包含Val-Gly-Arg的序列。另一个实例是凝血酶裂解位点,例如CGLVPAGSGP(SEQ ID NO:33)。包含蛋白酶裂解位点的其他适合的接头包括包含以下氨基酸序列中的一者或多者的接头:1) SLLKSRMVPNFN(SEQ ID NO:34)或SLLIARRM PNFN(SEQ ID NO:35),由组织蛋白酶B裂解;SKLVQASASGVN(SEQ ID NO:36)或SSYLKASDAPDN(SEQ ID NO:37),由埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)蛋白酶裂解;RPKPQQFFGLMN(SEQ ID NO:38),由MMP-3(基质溶解素)裂解;SLRPLALWRSFN(SEQ ID NO:39),由MMP-7(基质溶解因子)裂解;SPQGIAGQRNFN(SEQ ID NO:40),由MMP-9裂解;DVDERDVRGFASFL(SEQ ID NO:41),由嗜热菌蛋白酶样MMP裂解;SLPLGLWAPNFN(SEQ ID NO:42),由基质金属蛋白酶2(MMP-2)裂解;SLLIFRSWANFN(SEQ ID NO:43),由组织蛋白酶L裂解;SGVVIATVIVIT(SEQ ID NO:44),由组织蛋白酶D裂解;SLGPQGIWQFN(SEQ ID NO:45),由基质金属蛋白酶1(MMP-1)裂解;KKSPGRVVGGSV(SEQ ID NO:46),由尿激酶型纤溶酶原活化剂裂解;PQGLLGAPGILG(SEQ ID NO:47),由膜1型基质金属蛋白酶(MT-MMP)裂解;HGPEGLRVGFYESDVMGRGHARLVHVEEPT(SEQ ID NO:94),由基质溶解素3(或MMP-11)、嗜热菌蛋白酶、成纤维细胞胶原酶和基质溶解素-1裂解;GPQGLAGQRGIV(SEQ ID NO:49),由基质金

属蛋白酶13(胶原酶-3)裂解;GGSGQRGRKALE(SEQ ID NO:50),由组织型纤溶酶原活化剂(tPA)裂解;SLSALLSSDIFN(SEQ ID NO:51),由人前列腺特异性抗原裂解;SLPRFKIIGGFN(SEQ ID NO:52),由激肽释放酶(hK3)裂解;SLLGIAVPGNFN(SEQ ID NO:53),由嗜中性粒细胞弹性酶裂解;以及FFKNIVTPRTPP(SEQ ID NO:54),由钙蛋白酶(钙活化中性蛋白酶)裂解。

[0288] 除本文所提供的特定氨基酸序列和核酸序列之外,本公开还涵盖具有序列与所述氨基酸和核酸至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同的序列的多肽和核酸。在两个或更多个多核苷酸序列或两个或更多个氨基酸序列的背景下,术语“相同”或“同一性”百分比是指当在指定区域上比较和比对最大对应性时,两个或更多个序列或子序列相同,或具有指定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(例如在指定区域上至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同)。本公开尤其涵盖存在于复合物中的第一和第二多肽,第一多肽和第二多肽具有序列分别与本文所提供的第一和第二多肽对的第一和第二多肽的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0289] 产生多肽的方法

[0290] 本公开的多肽可通过任何适合的方法来产生,包括重组和非重组方法(例如化学合成)。

[0291] A. 化学合成

[0292] 在化学合成多肽的情况下,合成可经由液相或固相方法来进行。固相肽合成(SPPS)允许并入非天然氨基酸和/或肽/蛋白质主链修饰。各种形式的SPPS(诸如Fmoc和Boc)均可用于合成本公开的多肽。化学合成的细节是本领域中已知的(例如Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med. Chem. 6:3-10;和Camarero J.A.等人,2005 Protein Pept Lett. 12:723-8)。

[0293] B. 重组产生

[0294] 在使用重组技术产生多肽的情况下,可产生呈细胞内蛋白或呈分泌蛋白形式的多肽,其使用任何适合的构建体和任何适合的宿主细胞,所述任何适合的宿主细胞可以是原核或真核细胞,分别诸如细菌(例如大肠杆菌(E.coli))或酵母宿主细胞。可用作宿主细胞的真核细胞的其他实例包括昆虫细胞、哺乳动物细胞和/或植物细胞。在使用哺乳动物宿主细胞的情况下,其可包括人细胞(例如HeLa、293、H9和Jurkat细胞);小鼠细胞(例如NIH3T3、L细胞和C127细胞);灵长类动物细胞(例如Cos 1、Cos 7和CV1)和仓鼠细胞(例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)。在特定实施方案中,多肽和包含多肽的复合物在CHO中产生。在其他实施方案中,多肽和包含多肽的复合物在酵母细胞中产生,且在特定实施方案中,可以是遗传工程化以产生具有哺乳动物样N-聚糖的糖蛋白的酵母细胞。

[0295] 适合用于表达多肽的多种宿主-载体系统均可根据本领域中已知的标准程序加以使用。参见例如Sambrook等人,1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York;和Ausubel等人1995 Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons编。用于将遗传物质引入宿主细胞的方法包括例如转化、电穿孔、缀合、磷酸钙法等。可选择用于转移的方法以提供所引入的多肽编码核酸的稳定表达。多肽编码核酸可以可遗传附加型元件(例如质粒)形式提供或可进行基因组整合。多种用于产生目标多肽的适当载体是可商购的。

[0296] 载体可在宿主细胞中提供染色体外维护或可提供向宿主细胞基因组中的整合。表达载体提供转录和翻译调控序列,且可在编码区在转录起始区以及转录和翻译终止区的转录控制下可操作地连接的情况下提供诱导性或组成性表达。一般而言,转录和翻译调控序列可包括但不限于启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或活化子序列。启动子可以是组成性或诱导性的,且可以是强组成性启动子(例如T7)。

[0297] 表达构建体通常具有定位于启动子序列附近的适宜限制性位点以提供编码目标蛋白质的核酸序列的插入。可存在在表达宿主中起作用的选择性标记以促进对含有载体的细胞的选择。此外,表达构建体可包含另外元件。例如,表达载体可具有一个或两个复制系统,从而允许其维持于生物体中,例如用于表达的哺乳动物或昆虫细胞中和用于克隆和扩增的原核宿主中。此外,表达构建体可含有选择性标记基因以允许选择转化的宿主细胞。选择性基因是本领域中熟知的且将随所用宿主细胞而不同。

[0298] 蛋白质的分离和纯化可根据本领域中已知的方法来实现。例如,蛋白质可通过亲和力和纯化分离自遗传修饰以组成性地和/或在诱导后表达蛋白质的细胞的溶解产物;生长宿主细胞的培养基;或合成反应混合物,所述亲和力纯化可涉及使样品(细胞溶解产物、培养基或反应混合物)与特异性地结合至所述蛋白质的标记接触,洗涤以移除非特异性结合材料,且将特异性结合的蛋白质洗脱。分离的蛋白质可通过渗析和蛋白质纯化方法中常用的其他方法进一步纯化。在一个实施方案中,蛋白质可使用金属螯合物色谱法分离。蛋白质可含有修饰以促进分离。在某些实施方案中,本公开的复合物可基于尺寸进行分离。

[0299] 在某些实施方案中,包含第一多肽和第二多肽的复合物可分离自培养表达第一多肽和第二多肽的宿主细胞的培养基,第一多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列;第二多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列;其中第一多肽与第二多肽经由将第一多肽的突起安置于第二多肽的空腔中而二聚化,其中第一多肽的C末端或第二多肽的C末端缀合至包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白的N末端。

[0300] 在某些实施方案中,包含第一异二聚体和第二异二聚体的复合物可自培养表达第一多肽和第二多肽的宿主细胞的培养基分离,第一异二聚体和第二异二聚体各自包含第一多肽和第二多肽,第一多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的突起的CH3序列;第二多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列;其中第一多肽与第二多肽经由将第一多肽的突起安置于第二多肽的空腔中而二聚化,其中第一多肽的C末端或第二多肽的C末端缀合至包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白的N末端,其中第一异二聚体中的GDF15突变蛋白与第二异二聚体中的GDF15突变蛋白二聚化,从而形成包含第一异二聚体和第二异二聚体的复合物。

[0301] 如本文所指出,第一和第二核酸可存在于单一宿主细胞或两种不同宿主细胞中的单一载体或分开的载体中。在某些情况下,本公开的第一多肽和第二多肽可分别由可存在于表达于相同细胞中的第一和第二核酸编码。在第一和第二核酸存在于不同细胞中的实施方案中,细胞可在产生过程期间的某一点融合。

[0302] 复合物可制备成实质上纯或分离的形式(例如不含其他多肽)。复合物可以相对于可存在的其他组分(例如其他多肽或其他复合物(例如同二聚体、同四聚体)或其他宿主细

胞组分)富集所述复合物的组合物形式存在。例如,可提供纯化复合物(例如异二聚体-异二聚体复合物),以使得复合物以实质上不含其他所表达的蛋白质(例如小于90%、小于60%、小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%、小于5%或小于1%的组合物由其他表达蛋白质组成)的组合物形式存在。

[0303] 抗体

[0304] 本公开提供抗体,其包括特异性地结合本公开的多肽或融合蛋白的分离抗体。术语“抗体”涵盖完整单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)和包括Fab和F(ab')₂的抗体结合片段,前提条件是其展现所需生物活性。基本全抗体结构单元包含四聚体,且各四聚体由两对相同多肽链组成,各对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。各链的氨基末端部分包含具有约100至110或更多个氨基酸的主要负责抗原识别的可变区。相比之下,各链的羧基末端部分限定主要负责效应子功能的恒定区。人轻链被归类为κ和λ,而人重链被归类为μ、δ、γ、α或ε,且将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。结合片段通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶或化学裂解来产生。结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv和单链抗体。

[0305] 各重链在一端具有可变结构域(VH),随后是许多恒定结构域。各轻链具有在一端的可变结构域(VL)和在其另一端的恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对准,且轻链可变结构域与重链的可变结构域对准。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过具有约12或更多个氨基酸的“J”区连接,且重链还包含具有多约10个氨基酸的“D”区。抗体链全部展现相同的相对保守框架区(FR)一般结构,所述相对保守框架区通过三个超可变区(还称为“互补决定区”或“CDR”)连接。各对的两条链的CDR通过框架区对准,从而能够结合至特定表位。自N末端至C末端,轻链和重链均包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0306] 完整抗体具有两个结合位点,且除了在双功能或双特异性抗体中,两个结合位点相同。双特异性或双功能抗体是具有两个不同重链/轻链对和两个不同结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可通过包括杂交瘤融合或连接Fab'片段的多种方法来产生。

[0307] 如上文所阐述,结合片段可通过完整抗体的酶或化学裂解来产生。用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同抗原结合片段(还称为“Fab”片段)和不具有抗原结合活性的“Fc片段”。用胃蛋白酶消化抗体产生F(ab')₂片段,其中抗体分子的两条臂保持连接且包含两个抗原结合位点。F(ab')₂片段具有交联抗原的能力。

[0308] 如本文所用,术语“Fab”是指抗体中包含VH和VL区以及轻链的恒定结构域和重链的CH1结构域的片段。

[0309] 当在本文中使用时,术语“Fv”是指抗体中保留抗原识别与抗原结合位点两者的最小片段。在双链Fv种类中,此区域包括呈非共价缔合形式的一个重链可变结构域与一个轻链可变结构域的二聚体。在单链Fv种类中,一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可通过柔性肽接头共价连接,以使得轻链和重链可以类似于双链Fv种类的“二聚”结构形式缔合。正是在此组态中,各可变结构域的三个CDR相互作用以限定VH-VL二聚体的表面上的抗原结合位点。虽然六个CDR一起赋予抗体的抗原结合特异性,但即使单一可变结构域(或仅包含三个对抗原具特异性的CDR的Fv的一半)还具有识别并结合抗原的能力。

[0310] 当在本文中使用时,术语“互补决定区”或“CDR”是指与特定配体接触且决定其特

异性的免疫受体的部分。

[0311] 术语“高变区”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含CDR的氨基酸残基和/或“高变环”的那些残基。

[0312] 如本文所用,术语“表位”是指抗体在蛋白质抗原上的结合位点。表位决定簇通常包含化学活性表面分组的诸如氨基酸的分子或糖侧链,以及特定三维结构和电荷特征。当解离常数 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 或 $\leq 10\text{nM}$ 时,认为抗体结合抗原。增加的平衡常数(“ K_D ”)意指表位与抗体之间存在较小亲和力,而降低的平衡常数意指表位与抗体之间存在较大亲和力。 K_D “不超过”某一量的抗体意指抗体将以给定 K_D 或更强地结合于表位。尽管 K_D 描述表位与抗体的结合特征,但“效力”描述关于抗体功能的抗体本身的有效性。平衡常数与效力之间未必存在相关性;因此,例如,相对低的 K_D 不自然而然地意指高效力。

[0313] 关于抗体的术语“选择性地结合”不意指抗体仅结合至单一物质,而意指抗体对第一物质的 K_D 小于抗体对第二物质的 K_D 。排他地结合至表位的抗体仅结合至单一表位。

[0314] 当向人施用时,含有啮齿动物(即鼠或大鼠)可变区和/或恒定区的抗体有时与例如快速自体内清除或身体对抗体产生免疫反应相关。为避免使用源自啮齿动物的抗体,可通过向啮齿动物中引入人抗体功能以使得啮齿动物产生完全人抗体来产生完全人抗体。除非本文具体地确定,否则“人”抗体和“完全人”抗体可互换使用。术语“完全人”在区分仅部分为人的抗体与全然或完全为人的抗体时可适用。熟练的技术人员了解产生完全人抗体的各种方法。

[0315] 为解决可能的人抗小鼠抗体反应,可使用嵌合或以其他方式人源化的抗体。嵌合抗体具有人恒定区和鼠可变区,且因此可在一些患者中观察到人抗嵌合抗体反应。因此,有利的是提供针对多聚酶的完全人抗体以避免可能的人抗小鼠抗体或人抗嵌合抗体反应。

[0316] 完全人单克隆抗体可例如通过用熟练的技术人员已知的技术产生杂交瘤细胞系来制备。其他制备方法涉及使用编码特定抗体的序列来转化适合的哺乳动物宿主细胞,诸如CHO细胞。转化可通过用于将多核苷酸引入宿主细胞的任何已知方法来进行,包括例如将多核苷酸包装于病毒中(或包装至病毒载体中)且用病毒(或载体)或通过本领域中已知的转染程序转导宿主细胞。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞中的方法是本领域中熟知的,且包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、多核苷酸封装于脂质体中和直接微量注射DNA至核中。可作用于表达的宿主的哺乳动物细胞系是本领域中熟知的,且包括但不限于CHO细胞、HeLa细胞和人肝细胞癌细胞。

[0317] 可使用抗体来检测本公开的多肽。例如,可使用抗体作为诊断剂,其通过检测受试者中一种或多种本公开多肽的水平,且将所检测到的水平与标准对照水平或先前确定的受试者中(例如在任何疾病之前)的基线水平相比较来进行。

[0318] 治疗性和预防性用途

[0319] 本公开提供用于如本文所描述通过施用本公开的复合物或其组合物治疗或预防诸如以下的代谢和代谢相关疾病的方法:肥胖症和其他体重病症、高血糖症、高胰岛素血症、葡萄糖不耐症和葡萄糖代谢病症。此类方法还可通过例如降低症状的严重性或频率而对一种或多种与疾病、病症或病状相关的症状具有有利作用。

[0320] 为确定受试者是否可以是通过本文所提供的方法治疗或预防体重病症(例如肥胖症)的候选者,应评价诸如但不限于病原学和受试者的病状的程度(例如受试者与参考健康

受试者相比有多过重)的参数。例如,BMI在约25与约29.9kg/m²之间的成人可视为过重(肥胖前期),而BMI为30kg/m²或更高的成年可视为肥胖。如本文所论述,本发明的复合物可实现食欲抑制,例如降低食欲,从而导致体重减轻。

[0321] 为确定受试者是否可以通过本文所提供的方法治疗或预防高血糖症、高胰岛素血症、葡萄糖不耐症和/或葡萄糖病症的候选者,可使用本领域中已知的各种诊断方法。此类方法包括本文中其他地方描述的那些(例如空腹血糖(FPG)评价和口服葡萄糖耐受性测试(oGTT))。

[0322] 本文所提供的复合物当向受试者施用以治疗或预防诸如肥胖症和其他体重病症、高血糖症、高胰岛素血症、葡萄糖不耐症、葡萄糖代谢病症的代谢和代谢相关疾病时,可使得血糖水平降低、体重减轻和/或食物摄入减少。

[0323] 在某些实施方案中,与在不存在复合物施用的情况下相比,本文涵盖的复合物可将血糖水平、体重和/或食物摄入降低至少5%。例如,与开始治疗或预防之前相比,本文涵盖的复合物可将血糖水平、体重和/或食物摄入降低至少10%、20%、30%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0324] 在某些实施方案中,用于治疗代谢病症的本公开复合物可以是每个复合物包含两个异二聚体分子的复合物,其中各异二聚体是相同的,且包含第一多肽和第二多肽,其中第一多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列可包含含有至少一个工程化的突起的CH3序列;第二多肽包含IgG Fc序列,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列;其中第一多肽与第二多肽经由将第一多肽的突起安置于第二多肽的空腔中而二聚化,其中在各异二聚体中第一多肽的C末端或第二多肽的C末端缀合至包含至少一个N连接的糖基化共有位点的GDF15突变蛋白的N末端,其中异二聚体中的GDF15突变蛋白与另一异二聚体中的GDF15突变蛋白二聚化,从而形成包含两个异二聚体的复合物。

[0325] 在其他实施方案中,用于治疗代谢病症的本公开复合物可以是每个复合物包含两个异二聚体分子(异二聚体与异二聚体缔合)的复合物,其中各异二聚体是相同的,且各异二聚体包含具有IgG Fc序列的第一多肽,所述IgG Fc序列可包含含有至少一个工程化的突起的CH3序列,其中第一多肽的C末端融合至GDF15糖突变蛋白的N末端;和包含IgG Fc序列的第二多肽,所述IgG Fc序列包含具有至少一个工程化的空腔的CH3序列;其中第一多肽与第二多肽经由将第一多肽的突起安置于第二多肽的空腔中而二聚化以形成异二聚体,其中异二聚体中的GDF15突变蛋白与另一异二聚体中的GDF15突变蛋白二聚化,从而形成包含两个异二聚体的复合物。

[0326] 药物组合物

[0327] 本公开的复合物可呈适合用于向受试者施用的组合物形式。一般而言,此类组合物是包含一种或多种复合物和一种或多种药学上可接受或生理学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂的“药物组合物”。在某些实施方案中,复合物以治疗有效量存在于药物组合物中。药物组合物可用于本公开的方法中;因此,例如,为实践本文所描述的治疗性和预防性方法和用途,可向受试者离体或体内施用药物组合物。如本文所指出,复合物可以是或可以不是糖基化的。例如,复合物可在产生于真核宿主细胞中时进行糖基化且可在配制成药物组合物之前经历移除碳水化合物部分的过程。碳水化合物部分的移除可使得在复合物中多肽的糖基化显著降低或在复合物中完全不存在多肽的糖基化。

[0328] 在特定实施方案中,本公开提供用于通过施用复合物、N-糖基化复合物或其组合物来治疗葡萄糖代谢或体重病症的方法。在特定实施方案中,本公开方法用于通过施用复合物、N-糖基化复合物或其组合物来减少食物摄入或降低体重。本公开进一步提供前述序列、复合物、N-糖基化复合物或其组合物在制造用于治疗选自诸如以下的代谢和代谢相关疾病的病状的药剂中的用途:肥胖症和其他体重病症、高血糖症、高胰岛素血症、葡萄糖不耐症和葡萄糖代谢病症。本公开进一步提供一种前述序列、复合物、N-糖基化复合物或其组合物在制造用于治疗葡萄糖代谢或体重病症的药剂中的用途。本公开进一步提供一种前述序列、复合物、N-糖基化复合物或其组合物在制造用于降低食物摄入或体重的药剂中的用途。

[0329] 本文还提供用于治疗或预防选自诸如以下的代谢和代谢相关疾病的病状的本文所公开的序列、复合物和N-糖基化复合物的组合物(例如药物组合物):肥胖症和其他体重病症、高血糖症、高胰岛素血症、葡萄糖不耐症和葡萄糖代谢病症。本公开进一步提供一种用于治疗葡萄糖代谢或体重病症的前述序列、复合物或N-糖基化复合物的组合物(例如药物组合物)。本公开进一步提供一种用于降低食物摄入或体重的前述序列、复合物或N-糖基化复合物的组合物(例如药物组合物)。

[0330] 本公开的药物组合物可配制成与预期施用方法或途径相容;示例性施用途径阐述于本文中。此外,为治疗或预防如由本公开涵盖的疾病、病症和病状,药物组合物可与如本文所描述的其他治疗活性剂或化合物(例如降葡萄糖剂)组合使用。

[0331] 药物组合物通常包含治疗有效量的由本公开涵盖的复合物中的至少一者和一种或多种药学上和生理学上可接受的配制试剂。适合的药学上可接受或生理学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂包括但不限于抗氧化剂(例如抗坏血酸和硫酸氢钠)、防腐剂(例如苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯)、乳化剂、悬浮剂、分散剂、溶剂、填充剂、增容剂、洗涤剂、缓冲剂、媒介物、稀释剂和/或佐剂。例如,适合的媒介物可以是生理盐水溶液或柠檬酸盐缓冲盐水,其可能补充有用于胃肠外施用的药物组合物中常用的其他材料。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的生理盐水是其他示例性媒介物。本领域的技术人员将容易地识别可用于药物组合物和剂型中的多种缓冲剂。典型缓冲剂包括但不限于药学上可接受的弱酸、弱碱或其混合物。作为实例,缓冲组分可以是水溶性材料,诸如磷酸、酒石酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、谷氨酸及其盐。可接受的缓冲剂包括例如Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉基)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)和N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)。

[0332] 在已配制药物组合物之后,其可以溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体或脱水或冻干粉末形式储存于无菌小瓶中。此类制剂可以即用形式、需要在使用之前复水的冻干形式、需要在使用之前稀释的液体形式或其他可接受的形式储存。在一些实施方案中,药物组合物被提供于单用途容器(例如单用途小瓶、安瓿、注射器或自动注射器(类似于例如EpiPen®))中,然而在其他实施方案中,提供多用途容器(例如多用途小瓶)。任何药物递送设备均可用于递送复合物,包括植入物(例如可植入泵)和导管系统,所述两者是熟练的技术人员熟知的。通常为皮下或肌肉内施用的贮库注射还可用于历经规定时间段释放本文所公开的复合物。贮库注射通常是基于固体或基于油的且通常包含本文所阐述的配制组分中的至少一

者。本领域的普通技术人员熟悉贮库注射的可能制剂和用途。

[0333] 药物组合物可呈无菌可注射水性或油性悬浮液形式。此悬浮液可根据已知技术使用本文提及的那些适合的分散剂或润湿剂和悬浮剂来配制。无菌可注射制剂还可以是于无毒胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如呈1,3-丁二醇溶液的形式。可使用的可接受的稀释剂、溶剂和分散介质包括水、林格氏溶液(Ringer's solution)、等渗氯化钠溶液、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其适合的混合物。此外,无菌、固定油常规可用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可使用任何温和固定油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,诸如油酸的脂肪酸适用于可注射物的制备。特定可注射制剂的延长吸收可通过包括延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝或明胶)来实现。

[0334] 含有活性成分(例如本公开的复合物)的药物组合物可呈适合用于口服使用的形式,例如呈片剂、胶囊、锭剂、糖锭、水性或油性悬浮液、可分散性粉末或颗粒、乳液、硬胶囊或软胶囊或糖浆、溶液、微珠粒或酞剂形式。意图用于口服使用的药物组合物可根据药物组合物的制造领域中已知的任何方法来制备,且此类组合物可含有一种或多种诸如以下的试剂:甜味剂、调味剂、染色剂和防腐剂,以提供药学上精美且可口的制剂。片剂、胶囊等含有与适合用于制造片剂的无毒药学上可接受的赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂可以是例如稀释剂,诸如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;造粒剂和崩解剂,例如玉米淀粉或海藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶;以及润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[0335] 适合用于口服施用的片剂、胶囊等可未包衣或通过已知技术包衣,以延迟在胃肠道中的崩解和吸收且由此提供持续作用。例如,可使用时间延迟材料,诸如单硬脂酸甘油酯或双硬脂酸甘油酯。其还可通过本领域中已知用于形成用于控制释放的渗透性治疗片剂的技术包衣。另外试剂包括生物可降解或生物相容粒子或聚合物,诸如聚酯、聚氨酯、水凝胶、聚乙烯吡咯啉酮、聚酸酐、聚乙醇酸、乙烯-乙酸乙烯酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素、硫酸鱼精蛋白或丙交酯/乙交酯共聚物、聚丙交酯/乙交酯共聚物或乙烯乙酸乙烯酯共聚物,以控制所施用组合物的递送。例如,口服试剂可俘获于微胶囊中,所述微胶囊分别通过使用羟甲基纤维素或明胶-微胶囊或聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊通过团聚技术或通过界面聚合来制备;或俘获于胶体药物递送系统中。胶体分散系统包括巨分子复合物、纳米胶囊、微球、微珠粒和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。制备脂质体的方法描述于例如美国专利号4,235,871、4,501,728和4,837,028中。用于制备以上所提及的制剂的方法对本领域的技术人员而言将显而易见。

[0336] 用于口服使用的制剂还可以硬明胶胶囊形式存在,其中活性成分与惰性固体稀释剂(碳酸钙、磷酸钙、高岭土或微晶纤维素)混合;或以软明胶胶囊形式存在,其中活性成分与水或油介质(例如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。

[0337] 水性悬浮液含有与适合用于其制造的赋形剂混合的活性材料。此类赋形剂可以是悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟基-丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯-吡咯啉酮、黄蓍胶和阿拉伯胶;分散剂或润湿剂,例如天然存在的磷脂(例如卵磷脂),或环氧烷与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧-乙烯硬脂酸酯),或环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物(例如十七亚乙基氧基十六醇),或环氧乙烷与衍生自脂肪酸的偏酯和己糖醇的缩合产物(例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯),或环氧乙烷与衍生自脂肪酸的偏酯和己糖醇酸酐的缩合产

物(例如聚乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯)。水性悬浮液还可含有一种或多种防腐剂。

[0338] 油性悬浮液可通过将活性成分悬浮于植物油(例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)中或矿物油(诸如液体石蜡)中来配制。油性悬浮液可含有增稠剂,例如蜂蜡、固体石蜡或十六烷醇。可添加诸如以上所阐述的那些的甜味剂和调味剂以提供可口口服制剂。

[0339] 适合用于通过添加水来制备水性悬浮液的可分散性粉末和颗粒提供与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性成分。适合的分散剂或润湿剂和悬浮剂例示于本文中。

[0340] 本公开的药物组合物还可呈水包油乳液形式。油相可以是植物油,例如橄榄油或花生油;或矿物油,例如液体石蜡;或这些物质的混合物。适合的乳化剂可以是天然存在的树胶,例如阿拉伯胶或黄蓍胶;天然存在的磷脂,例如大豆、卵磷脂和衍生自脂肪酸的酯或偏酯;己糖醇酸酐,例如脱水山梨糖醇单油酸酯;以及偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。

[0341] 制剂还可包含载体以防止组合物自体内快速降解或消除,诸如控制释放制剂,包括植入物、脂质体、水凝胶、前药和微囊封递送系统。例如,可单独或与蜡组合使用时间延迟材料,诸如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯。

[0342] 本公开涵盖以用于直肠施用药物的栓剂形式施用复合物。栓剂可通过将药物与适合的非刺激性赋形剂混合来制备,所述非刺激性赋形剂在常温下为固体,但在直肠温度下为液体,且因此将在直肠中融化以释放药物。此类材料包括但不限于可可脂和聚乙二醇。

[0343] 由本公开涵盖的复合物可呈当前已知或将来研发的任何其他适合的药物组合物(例如用于鼻内或吸入用途的喷剂)形式。

[0344] 制剂中多肽的复合物的浓度可在很大程度上不同(例如以重量计自小于约0.1%(通常等于或至少约2%)至多达20%至50%或更多),且将通常主要基于流体体积、粘度和基于受试者的因素根据例如所选特定施用模式来选择。

[0345] 本文涵盖使用Nano Precision Medical的贮库递送技术(Nano Precision Medical; Emeryville, CA)。所述技术使用氧化钛纳米管膜,其产生诸如蛋白质和肽治疗剂的巨分子的零级释放速率。生物相容膜容纳于小的皮下植入物中,从而提供治疗剂巨分子的长期(例如长至一年)、恒定速率递送。所述技术当前正在关于递送GLP-1激动剂以治疗II型糖尿病进行评估。在某些实施方案中,本文所公开的复合物可以是膜存在下的制剂。例如,复合物可渗透至膜中或由膜包围。膜可呈圆片、管或球形。在某些实施方案中,管可以是纳米管或球可以是纳米球。

[0346] 施用途径

[0347] 本公开涵盖以任何适当的方式施用所公开的复合物及其组合物。适合的施用途径包括胃肠外(例如肌肉内、静脉内、皮下(例如注射或植入)、腹膜内、脑池内、关节内、腹膜内、脑内(实质内)和脑室内)、经口、鼻内、阴道、舌下、眼内、直肠、局部(例如经皮)、舌下和吸入。

[0348] 通常是皮下或肌肉内施用的贮库注射还可用于历经限定时间段释放本文所公开的复合物。贮库注射通常是基于固体或基于油的且通常包含本文所阐述的配制组分中的至少一者。本领域的普通技术人员熟悉贮库注射的可能制剂和用途。

[0349] 关于抗体,在一个示例性实施方案中,本发明的抗体或抗体片段以10mg/ml储存于

无菌等渗水性盐水溶液中,以用于在4℃下注射,且在100ml或200ml 0.9%氯化钠中稀释,以便在向受试者施用之前注射。抗体通过静脉内输注历经1小时的过程以0.2与10mg/kg之间的剂量施用。在其他实施方案中,抗体通过静脉输注历经15分钟与2小时之间的时间施用。在其他实施方案中,施用程序经由皮下快速注射进行。

[0350] 本公开涵盖以下方法,其中本公开的复合物每天至少两次、每天至少一次、每48小时至少一次、每72小时至少一次、每周至少一次、每2周至少一次或每月一次向受试者施用。

[0351] 组合疗法

[0352] 本公开涵盖与一种或多种活性治疗剂或其他预防或治疗形式组合使用本文所提供的复合物。在此类组合疗法中,各种活性剂经常具有不同作用机制。此类组合疗法可因允许药剂中的一者或多者的剂量降低,从而降低或消除与药剂中的一者或多者相关的有害影响而尤其有利;此外,此类组合疗法可对潜在疾病、病症或病状具有协同治疗或预防作用。

[0353] 如本文所用,“组合”意指包括可分开施用,例如分开配制以分开施用(例如,如可以试剂盒形式提供)的疗法,和可以单一制剂(即“共制剂”)形式一起施用的疗法。

[0354] 在某些实施方案中,复合物连续施用或施加,例如其中一种药剂在一种或多种其他药剂之前施用。在其他实施方案中,复合物同时施用,例如其中两种或更多种药剂在相同或大致相同时间施用;两种或更多种药剂可存在于两种或更多种分开的制剂中或组合至单一制剂(即共制剂)中。无论两种或更多种药剂连续抑或同时施用,均将其视为出于本公开的目的组合施用。

[0355] 本公开的复合物可与适合用于治疗、预防、抑制或缓解本文所阐述的疾病、病症或病状的其他药剂组合使用,所述其他药剂包括通常向患有以下疾病的受试者施用的那些:肥胖症、饮食紊乱、高血糖症、高胰岛素血症、葡萄糖不耐症和其他葡萄糖代谢病症。

[0356] 本公开涵盖与包括以下的许多药剂(及其多种类别)的组合疗法:1)胰岛素、胰岛素模拟物和需要刺激胰岛素分泌的药剂,包括磺酰脲(例如氯磺丙脲(chlorpropamide)、妥拉磺脲(tolazamide)、乙酰苯磺酰环己脲(acetohexamide)、甲苯磺丁脲(tolbutamide)、格列本脲(glyburide)、格列美脲(glimepiride)、格列吡嗪(glipizide))和美格替奈(meglitinide)(例如瑞格列奈(repaglinide)(PRANDIN)和那格列奈(STARLIX));2)双胍(例如二甲双胍(metformin)(GLUCOPHAGE))及其药学上可接受的盐,尤其二甲双胍盐酸盐,及其延长释放制剂,诸如Glumetza™、Fortamet™和GlucophageXR™)和通过促进葡萄糖利用、降低肝葡萄糖产生和/或减少肠葡萄糖输出起作用的其他药剂;3)α-葡糖苷酶抑制剂(例如阿卡波糖(acarbose)、伏格列波糖(voglibose)和米格列醇(miglitol))和减缓碳水化合物消化且因此减缓内脏的吸收且减轻餐后高血糖的其他药剂;4)噻唑烷二酮(例如罗格列酮(AVANDIA)、曲格列酮(REZULIN)、吡格列酮(ACTOS)、格列吡嗪、巴格列酮(balaglitazone)、利格列酮(rivoglitazone)、萘格列酮(netoglitazone)、AMG 131、MBX2044、米格列酮(mitoglitazone)、罗格列酮(lobeglitazone)、IDR-105、曲格列酮、恩格列酮(englitazone)、噻格列酮(ciglitazone)、阿格列酮(adaglitazone)、达格列酮(darglitazone),其增强胰岛素作用(例如通过胰岛素敏化),包括胰岛素和胰岛素模拟物(例如德谷胰岛素(insulin degludec)、甘精胰岛素(insulin glargine)、赖脯胰岛素(insulin lispro)、地特胰岛素(insulin detemir)、谷赖胰岛素(insulin glulisine)及各自的可吸入制剂),因此促进周边组织中的葡萄糖利用;5)胰高血糖素样肽,包括DPP-IV

抑制剂(例如阿格列汀(alogliptin)、奥格列汀(omarigliptin)、利格列汀(linagliptin)、维格列汀(vildagliptin)(GALVUS)和西格列汀(sitagliptin)(JANUVIA)和胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和GLP-1激动剂及类似物(例如艾塞那肽(exenatide)(BYETTA和ITCA 650(一种皮下插入的渗透泵,其历经12个月时间递送艾塞那肽类似物;Intarcia,Boston,MA)) 和GLP-1受体激动剂(例如杜拉鲁肽(dulaglutide)、索马鲁肽(semaglutide)、阿必鲁肽(albiglutide)、艾塞那肽、利拉鲁肽(liraglutide)、利西那肽(lixisenatide)、他司鲁肽(taspoglutide)、CJC-1131和BIM-51077,包括其鼻内、经皮和每周一次制剂);6)以及DPP-IV-抗性类似物(肠促胰岛素模拟物)、PPAR γ 激动剂、PPAR α 激动剂(诸如非诺贝特酸(fenofibric acid)衍生物(例如吉非罗齐(gemfibrozil)、氯贝特(clofibrate)、环丙贝特(ciprofibrate)、非诺贝特(fenofibrate)、苯扎贝特(bezafibrate)))、双效PPAR激动剂(例如ZYH2、ZYH1、GFT505、西格列扎(chiglitazar)、莫格列扎(muraglitazar)、阿格列扎(aleglitazar)、索格列扎(sodelglitazar)和那格列扎(naveglitazar)、全效PPAR激动剂、PTP1B抑制剂(例如ISIS-113715和TTP814)、SGLT抑制剂(例如ASP1941、SGLT-3、恩格列净(empagliflozin)、达格列净(dapagliflozin)、卡格列净(canagliflozin)、BI-10773、PF-04971729、瑞格列净(remogliflozin)、TS-071、托格列净(tofogliflozin)、伊格列净(ipragliflozin)和LX-4211)、胰岛素促分泌素、血管紧张素转化酶抑制剂(例如阿拉普利(alacepril)、贝那普利(benazepril)、卡托普利(captopril)、西罗普利(ceronapril)、西拉普利(cilazapril)、地拉普利(delapril)、依那普利(enalapril)、依那拉普利拉(enalaprilat)、福辛普利(fosinopril)、咪达普利(imidapril)、赖诺普利(lisinopril)、莫维普利(moveltipril)、培哚普利(perindopril)、喹那普利(quinapril)、雷米普利(ramipril)、螺普利(spirapril)、替莫普利(temocapril)或群多普利(trandolapril))、血管紧张素II受体拮抗剂(例如氯沙坦(losartan)(即COZAAR[®])、缬沙坦(valsartan)、坎地沙坦(candesartan)、奥美沙坦(olmesartan)、替米沙坦(telmisartan)及与氢氯噻嗪(诸如HYZAAR[®])组合使用的这些药物中的任一者)或其他抗高血压药物,诸如LCZ 696、RXR激动剂、糖原合酶激酶-3抑制剂、免疫调节剂、交感神经阻滞剂、 β -肾上腺素能阻断药(例如普萘洛尔(propranolol)、阿替洛尔(atenolol)、比索洛尔(bisoprolol)、卡维洛尔(carvedilol)、美托洛尔(metoprolol)或酒石酸美托洛尔)、 α 肾上腺素能阻断药(例如多沙唑啉(doxazosin)、哌唑啉(prazosin)或 α 甲基多巴(methyldopa))中枢 α 肾上腺素能激动剂、周边血管扩张剂(例如肼苯哒嗪(hydralazine)); β -3肾上腺素能受体激动剂、11 β -HSD1抑制剂、中性内肽酶抑制剂(例如噻奥芬(thiorphan)和磷酸胺素(phosphoramidon))、醛固酮拮抗剂、醛固酮合酶抑制剂、肾素抑制剂(例如二肽和三肽的脲衍生物(参见美国专利号5,116,835)、氨基酸和衍生物(美国专利5,095,119和5,104,869)、由非肽键连接的氨基酸链(美国专利5,114,937)、二肽和三肽衍生物(美国专利5,106,835)、肽基氨基二醇(美国专利5,063,208和4,845,079)和肽基 β -氨基酰基氨基二醇氨甲酸酯(美国专利5,089,471);另外,如以下美国专利中所公开的多种其他肽类似物:5,071,837;5,064,965;5,063,207;5,036,054;5,036,053;5,034,512和4,894,437,和小分子肾素抑制剂(包括二醇磺酰胺和亚磺酰基(美国专利5,098,924)、N-吗啉基衍生物(美国专利5,055,466)、N-杂环乙醇(美国专利4,885,292)和吡咯咪唑酮(美国专利5,075,451);以及胃酶抑素衍生物(美国专利4,980,283)和含斯达酮(statone)的肽的氟衍生物和氯衍生物(美国专利5,066,643)、依那吉仑

(enalcrein)、RO 42-5892、A 65317、CP 80794、ES 1005、ES 8891、SQ 34017、阿利吉仑(aliskiren) (2(S), 4(S), 5(S), 7(S)-N-(2-氨基酰基-2-甲基丙基)-5-氨基-4-羟基-2,7-二异丙基-8-[4-甲氧基-3-(3-甲氧基丙氧基)-苯基]-辛酰胺半富马酸酯) SPP600、SPP630和SPP635)、内皮素受体拮抗剂、磷酸二酯酶-5抑制剂(例如西地那非(sildenafil)、他达拉非(tadalafil)和伐地那非(vardenafil))、血管扩张剂、钙离子通道阻断剂(例如氨氯地平(amlodipine)、硝苯地平(nifedipine)、维拉帕米(verapamil)、地尔硫卓(diltiazem)、戈洛帕米(gallopamil)、尼鲁地平(niludipine)、尼莫地平(nimodipins)、尼卡地平(nicardipine))、钾通道活化剂(例如尼可地尔(nicorandil)、吡那地尔(pinacidil)、克罗卡林(cromakalim)、米诺地尔(minoxidil)、阿普卡林(aprilkalim)、氯普唑仑(lopirazolam))、降脂剂,例如HMG-CoA还原酶抑制剂,诸如辛伐他汀(simvastatin)和洛伐他汀(lovastatin),其以呈内酯前药形式的ZOCOR®和MEVACOR®形式出售且在施用之后充当抑制剂;和二羟基开环酸HMG-CoA还原酶抑制剂的药学上可接受的盐,诸如阿伐他汀(atorvastatin)(尤其以LIPITOR®出售的钙盐)、罗伐他汀(rosuvastatin)(尤其以CRESTOR®出售的钙盐)、普伐他汀(pravastatin)(尤其以PRAVACHOL®出售的钠盐)、西立伐他汀(cerivastatin)和氟伐他汀(尤其以LESCOL®出售的钠盐);胆固醇吸收抑制剂,诸如依替米贝(ezetimibe)(ZETIA®)和与诸如以上提及的HMG-CoA还原酶抑制剂的任何其他降脂剂且尤其与辛伐他汀(VYTORIN®)或与阿伐他汀钙组合的依替米贝;增加HDL的药物(例如烟酸和烟酸受体激动剂)及其延长或控制释放型式和/或加上HMG辅酶A还原酶抑制剂;诸如阿西莫司(acipimox)和阿西咪喃(acifran)的烟酸受体激动剂以及烟酸受体部分激动剂;胰高血糖素受体拮抗剂(例如MK-3577、MK-0893、LY-2409021和KT6-971);胆汁酸螯合剂(例如考来替兰(colestilan)、考来米得(colestimide)、盐酸考来维仑(colesevalam hydrochloride)、考来替泊(colestipol)、消胆胺(cholestyramine)和交联葡聚糖的二烷基氨基烷基衍生物)、酰基辅酶A:胆固醇酰基转移酶抑制剂(例如阿伐米贝(avasimibe));意图用于炎症病状中的药剂,诸如阿司匹林(aspirin)、非类固醇消炎药或NSAID、糖皮质激素和选择性环加氧酶-2或COX-2抑制剂;葡糖激酶活化剂(GKA)(例如AZD6370);11β-羟基固醇脱氢酶1型的抑制剂(例如美国专利号6,730,690和LY-2523199中公开的那些);CETP抑制剂(例如安塞曲匹(anacetrapib)、依塞曲匹(evacetrapib)和托塞曲匹(torcetrapib));果糖1,6-二磷酸酶的抑制剂(例如美国专利号6,054,587;6,110,903;6,284,748;6,399,782;和6,489,476中公开的那些);乙酰辅酶A羧化酶-1或2的抑制剂(ACC1或ACC2);PCSK9抑制剂;GPR-40部分激动剂;SCD调节剂;脂肪酸合酶的抑制剂;糊精和糊精类似物(例如普兰林肽(pramlintide));包括以上活性剂的化学上可能的药学上可接受的盐形式。

[0357] 此外,本公开涵盖与诸如刺激代谢或降低食欲的药剂的用于促进重量减轻的药剂和方法用于促进重量减轻的改善的膳食和/或运动方案的组合疗法。

[0358] 本公开的复合物可在所述情况下以适当的任何方式与一种或多种其他药剂组合使用。在一个实施方案中,在一段时间内维持用至少一种活性剂和至少一种本公开复合物治疗。在另一实施方案中,用至少一种活性剂的治疗减少或停止(例如当受试者稳定时),同时用本公开复合物的治疗维持在恒定给药方案。在另一实施方案中,用至少一种活性剂的治疗减少或停止(例如当受试者稳定时),同时用本公开复合物的治疗减少(例如较低剂量、

较不频繁给药或较短治疗方案)。在另一实施方案中,用至少一种活性剂的治疗减少或停止(例如当受试者稳定时),并且用本公开复合物的治疗增加(例如较高剂量、较频繁给药或较长治疗方案)。在另一实施方案中,用至少一种活性剂的治疗维持,并且用本公开复合物的治疗减少或停止(例如较低剂量、较不频繁给药或较短治疗方案)。在另一实施方案中,用至少一种活性剂的治疗和用本公开复合物的治疗减少或停止(例如较低剂量、较不频繁给药或较短治疗方案)。

[0359] 给药

[0360] 本公开的复合物可以一定量向受试者施用,所述量取决于例如以下因素:施用目标(例如所需消退程度);待治疗的受试者的年龄、体重、性别以及健康和身体状况;多肽和/或正在施用的制剂的性质;施用途径;以及疾病、病症、病状或其症状的性质(例如葡萄糖/胰岛素调节异常的严重性和病症的阶段)。给药方案还可将与正在施用的试剂相关的任何有害作用的存在、性质和程度考虑在内。有效剂量量和给药方案可由例如安全性和剂量递增试验、体内研究(例如动物模型)和熟练的技术人员已知的其他方法容易地确定。

[0361] 一般而言,给药参数指示剂量小于可对受试者具不可逆毒性的量(即最大耐受量“MTD”)且不小于为对受试者产生可测量作用所需要的量。此类量将施用途径和其他因素考虑在内,通过例如与吸收、分布、代谢和排泄(“ADME”)相关的药物动力学和药效动力学参数来确定。

[0362] 有效剂量(ED)是在摄入其的受试者的一些部分中产生治疗反应或所需作用的药剂的剂量或量。药剂的“半数有效剂量”或ED₅₀是药剂在施用其的群体的50%中产生治疗反应或所需作用的剂量或量。虽然ED₅₀常用为对药剂的作用的合理预期的度量,但其未必是临床医师将全部相关因素考虑在内可能认为适当的剂量。因此,在一些情况下有效量大于所计算的ED₅₀,在其他情况下,有效量小于所计算的ED₅₀,且在其他情况下,有效量与所计算的ED₅₀相同。

[0363] 此外,本公开的复合物的有效剂量可以是当以一次或多次剂量向受试者施用时相对于健康受试者产生所需结果的量。例如,有效剂量可以是当向具有增加的血糖和/或血浆胰岛素的受试者施用,相对于健康受试者实现至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或超过80%的所需降低的剂量。

[0364] 适当剂量水平通常将是每千克患者体重每天约0.001至100mg/kg,其可以单次或多次剂量施用。在一些实施方案中,剂量水平将是每天约0.01至约25mg/kg,而在其他实施方案中是每天约0.05至约10mg/kg。适合的剂量水平可以是每天约0.01至25mg/kg、每天约0.05至10mg/kg或每天约0.1至5mg/kg。在此范围内,剂量可以是每天0.005至0.05、0.05至0.5或0.5至5.0mg/kg。

[0365] 对于口服药剂的施用,组合物可以片剂、胶囊等形式提供,其含有1.0至1000毫克的活性成分,具体地说1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0和1000.0毫克的活性成分。复合物可按例如每天1至4次且往往每天一次或两次的方案施用。

[0366] 本公开的复合物的剂量可以适当频率重复,所述适当频率可在每天一次至每月一次范围内,这取决于复合物的药物动力学(例如半衰期)和药效动力学反应(例如复合物的

治疗作用的持续时间)。在一些实施方案中,给药经常在每周一次、每两周一次、每月一次之间进行重复。在其他实施方案中,复合物可约每月施用一次。

[0367] 在某些实施方案中,所公开复合物的剂量含于“单位剂型”中。短语“单位剂型”是指物理离散单元,各单元含有足以产生所需作用且单独或与一种或多种其他药剂组合的预定量的本公开复合物。应了解,单位剂型的参数将取决于特定药剂和待实现的作用。

[0368] 试剂盒

[0369] 本公开还涵盖包含所公开复合物及其药物组合物的试剂盒。试剂盒通常如以下所描述呈容纳各种部件的物理结构形式,且可用于例如实践上文所描述的方法(例如向需要减轻重量的受试者施用复合物)。

[0370] 试剂盒可包括本文所公开的复合物(提供于例如无菌容器中)中的一者或多者,其可呈适合用于向受试者施用的药物组合物形式。复合物可以即用形式或以例如需要在施用之前复水或稀释的形式提供。当复合物呈需要由使用者复水的形式时,试剂盒还可包括缓冲剂、药学上可接受的赋形剂等,其与复合物一起或分开包装。当涵盖组合疗法时,试剂盒可分开地含有若干试剂或其可已组合于试剂盒中。试剂盒的各部件可封闭于个别容器内且各种容器全部可在单一包装内。本发明的试剂盒可设计用于适当维持部件容纳于其中所必需的条件(例如冷藏或冷冻)。

[0371] 试剂盒可含有包括其中部件的鉴别信息及其使用说明的标签或包装插页(例如给药参数、活性成分的临床药理学(包括作用机制)、药物动力学和药效动力学、有害作用、禁忌等)。标签或插页可包括制造商信息,诸如批号和到期日期。标签或包装插页可例如整合至容纳部件的物理结构中、分开地含于物理结构内或固定至试剂盒的部件(例如安瓿、管或小瓶)。示例性说明书包括关于用所公开的调节剂及其药物组合物减少或降低血糖、治疗高血糖症、治疗糖尿病等的说明。

[0372] 标签或插页可另外包括或并入诸如以下的计算机可读介质中:磁盘(例如硬盘、卡、存储磁盘)、光盘(诸如CD-ROM/RAM或DVD-ROM/RAM)、DVD、MP3、磁带或电存储介质(诸如RAM和ROM)或这些介质的混合形式,诸如磁/光存储介质、FLASH介质或记忆型卡。在一些实施方案中,实际说明书不存在于试剂盒中,但提供用于自远端源获得说明书的方式,例如经由互联网。

[0373] 实验

[0374] 提出以下实施例以便为本领域的普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的完全公开内容和描述,且不意图限制发明者视为其发明的内容的范围,其也不意图表示以下实验为所有实验或仅为所进行的实验。已努力确保关于所用数字(例如量、温度等)的准确性,但应考虑一些实验误差和偏差。

[0375] 除非另外指示,否则份为重量份,分子量为重均分子量,温度以摄氏温度(°C)计,且压力在大气压下或大气压附近。使用包括以下的标准缩写:bp=碱基对;kb=千碱基;p1=皮升;s或sec=秒;min=分钟;h或hr=小时;aa=氨基酸;kb=千碱基;nt=核苷酸;ng=纳克;μg=微克;mg=毫克;g=克;kg=千克;d1或dL=分升;μl或μL=微升;ml或mL=毫升;l或L=升;μM=微摩尔;mM=毫摩尔;M=摩尔;kDa=千道尔顿;i.m.=肌肉内;i.p.=腹膜内;s.c.=皮下;bid=每天两次;HPLC=高效液相色谱法;BW=体重;U=单位;ns=非统计显著性;PG=空腹血糖;FPI=空腹血浆胰岛素;ITT=胰岛素耐受性测试;PTT=丙酮酸盐耐

受性测试;OGTT=口服葡萄糖耐受性测试;GSIS=葡萄糖刺激胰岛素分泌;PBS=磷酸盐缓冲液;PCR=聚合酶链式反应;NHS=N-羟基丁二酰亚胺;DMEM=杜尔贝科氏改良的伊格尔氏培养基(Dulbeco's Modification of Eagle's Medium);GC=基因组拷贝;EDTA=乙二胺四乙酸。

[0376] 材料和方法

[0377] 以下方法和材料用于以下实施例中。

[0378] 动物。使膳食诱导肥胖(DIO)雄性C57BL/6J小鼠(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)维持含有60千卡%脂肪、20千卡%蛋白质和20千卡%碳水化合物的高脂肪膳食(D12492, Research Diets, Inc, New Brunswick, NJ)持续12-20周。所有动物研究均由NGM学会动物护理和使用委员会批准。DIO C57BL/6J小鼠提供类似人的肥胖症模型,其中肥胖症是基于卡路里的过度摄入。C57BL/6J小鼠具有肥胖症倾向,其中观察到显著重量增加以及高胰岛素血症和偶尔的高血糖症。菌株是最常用于模型化膳食诱导肥胖症的小鼠菌株。(Nilsson C.等人, *Acta Pharmacologica Sinica* (2012) 33:173-181)。

[0379] 核酸和氨基酸序列。基因库登录号BC000529.2阐述了编码人GDF15变体的ORF的cDNA,且基因库登录号NP_004855.2阐述了由cDNA编码的氨基酸序列。Fc-融合配偶体的cDNA在InvivoGen购买(pFUSE-CHIg-hG1, 基因库:AY623427.1, 蛋白质ID=AAT49050)且如所指示进行修饰。由pFUSE-CHIg-hG1载体编码的Fc-融合配偶体的氨基酸序列是:

[0380]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:55)

[0381] 表达构建体的构建。将哺乳动物表达载体pTT5(加拿大国家研究委员会(National Research Council Canada))通过在PmeI与EcoRI位点之间插入Kozak元件和以下人IgK-信号肽序列来进行修饰:(CACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGT)(SEQ ID NO:56)。虽然消除了两个限制性位点,但产生了用于所分泌因子的进一步框内克隆的AgeI位点。对于单片段插入(例如人IgG1的Fc部分),使用In-Fusion技术(Clontech)。对于两个或更多个PCR产生的片段(即hIgG1-Fc+GDF15)的插入,根据制造商方案使用Gibson Assembly Master Mix(NEB)进行。将所有PCR片段均通过Sapphire PCR mix扩增且使用Qiagen凝胶萃取试剂盒进行凝胶纯化。将TOP10电子感受态细胞(Life Technologies)以克隆反应转化,涂铺于含有卡本西林(carbenicillin)的LB-琼脂平板上且在37°C下孵育过夜。拾取单菌落且通过测序进行分析。将来自阳性菌落的DNA扩增(DNA-Maxi-prep, Qiagen),充分验证序列且用于转染用于重组蛋白表达的哺乳动物细胞。

[0382] 为产生特定突变蛋白,用QuikChange Lightning或QuikChange Lightning多定点诱变试剂盒(Agilent)和适当引物遵循制造商方案进行定点诱变。

[0383] (Fc/Fc)-GDF15融合分子、野生型GDF15和GDF15-糖突变蛋白表达。自在Expi 293F细胞(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)中的瞬时转染物回收所有分子。将细胞常规地在Expi表达培养基(Invitrogen)中再次培养且以悬浮液培养物形式维持在各种型号的摇瓶中。通常,将细胞以5e5活细胞/毫升的细胞密度再次培养且在再次培养之前使其生长3

天。将烧瓶维持在搅拌速率在110RPM下的New Brunswick振荡器平台(New Brunswick Scientific Company, Edison, NJ)上的湿润CO₂孵育器(37°C和5%CO₂)中。

[0384] 当在大于95%活力下培养物的细胞密度达到2.5e6活细胞/毫升时进行转染。通常,对于50mL转染,将2.5e6细胞/毫升×50mL细胞以42.5mL培养物体积接种于250mL摇瓶中。首先,将五十微克(50μg)由含有目标基因的表达载体组成的质粒DNA在2.5mL OPTI-MEM还原型血清培养基(Invitrogen)中稀释。同时,还将2.67倍体积(于质粒DNA的量)的Expifectamine转染试剂(Invitrogen)在2.5mL OPTI-MEM还原型血清培养基中稀释。在室温下孵育5分钟之后,将稀释的转染试剂添加至稀释的质粒DNA中以形成转染胜任型复合物。在室温下另一20分钟孵育期之后,将5mL转染复合物添加至42.5mL细胞培养物中。然后,将转染细胞放置于维持在110RPM下的回转式振荡器上的湿润CO₂孵育器中。转染后二十四小时,为转染培养物馈入250μL增强剂1溶液(Invitrogen)和2.5mL增强剂2溶液(Invitrogen)。然后,将培养物再放置于回转式振荡器上的湿润CO₂孵育器中。转染后六至七天,通过在3000RPM下离心30分钟收获培养物,然后经由0.2μm过滤器(Nalgene)过滤。然后,分析样品在考马斯染色凝胶(commassie stain gel)上的表达。

[0385] 重组蛋白的纯化。在纯化之后,评估在条件培养基(CM)中表达的(Fc/Fc)-GDF15分子的回收率和活性。使CM通过负载容量不大于每毫升树脂20mg/mL的mAb SelectSuRe柱(GE)。对于回收率评估,CM体积在50mL-1000mL范围内。在mAb SelectSuRe负载CM之后,将柱用5-10柱体积的1XPBS(Corning Cellgro)洗涤,随后是用低pH值甘氨酸缓冲液(Polysciences Inc)洗脱的步骤。洗脱之后,将(Fc/Fc)-GDF15汇集物用1M Tris pH 8.0(Teknova)中和pH值且然后注射至在1XPBS(Corning Cellgro)中预平衡的Superdex200(GE)柱上。将(Fc/Fc)-GDF15完整、完全组装分子的级分汇集且评估纯度并使用适当消光系数和分子量经由A280方法定量以测定基于起始CM体积的回收率。完全组装分子是两个异二聚体的二聚体-二聚体复合物。各异二聚体具有经由钮入孔相互作用与Fc-GDF15糖突变蛋白缔合的Fc,且两个异二聚体经由GDF15-GDF15相互作用缔合。

[0386] WT GDF15和GDF15糖突变蛋白的纯化。将不缀合至Fc的野生型GDF15和GDF15糖突变蛋白使用离子交换捕获自培养基中纯化。将WT GDF15和GDF15糖突变蛋白使用有助于最佳洗脱的适当盐/pH梯度洗脱且与宿主细胞蛋白质杂质分离。然后,所有GDF15分子均使用降低的硫酸铵线性梯度在pH 8.0下使用GE HiTrap苯基HP进一步纯化。基于经由非还原型SDS-PAGE凝胶上的凝胶位移所得的纯度和糖基化性质评估级分且进行汇集。类似于(Fc/Fc)-GDF15分子,野生型GDF15和GDF15糖突变蛋白是使用IgK信号肽表达的。

[0387] 实施例1:异二聚钮入孔(Fc/Fc)-GDF15融合分子的设计

[0388] Fc-GDF15设计描述于图1中且一级序列展示如下(构建体B1a/b-B19a/b)。为实现Fc-GDF15分子的多产组装,将有效系统设计成允许Fc/Fc二聚化,同时允许GDF15/GDF15二聚化。为避免单链Fc-GDF15的错折叠和聚集可能性,将异二聚融合配偶体设计成使得Fc/Fc相互作用允许高灵敏度GDF15/GDF15同二聚化。设计钮入孔Fc/Fc异二聚体以解决ExpI293F瞬时系统的GDF15组装和分泌。Fc/Fc异二聚钮入孔系统使用与(G₄S)_n接头(n=2、3、4或5)和GDF15偶联的[T366Y(钮)//Y407T(孔)]或[T366W(钮)//T366S-L368A-Y407V(孔)]系统评估。应指出,Fc的CH3结构域中氨基酸位置的编号是基于EU编号系统进行(Edelman, G.M.等人, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969))。在所有情况下, Fc-融合(钮/孔)配偶体偶联

至包含氨基酸残基A1-I112、R2-I112、N3-I112、G4-I112、D5-I112、H6-I112或C7-I112的成熟GDF15的N末端。并入GDF15的N末端的截短 ($\Delta 1=R2-I112$ 、 $\Delta 2=N3-I112$ 、 $\Delta 3=G4-I112$ 、 $\Delta 4=D5-I112$ 、 $\Delta 5=H6-I112$ 或 $\Delta 6=C7-I112$)以增强稳定性,因为先前已证实N末端的序列(ARNGDH,SEQ ID NO:95)为具有蛋白水解敏感性的位点,且N末端截短相较于不包括这些N末端截短的GDF15提供优异稳定性。

[0389] 图1A-1D描述与异二聚Fc配偶体(链B)上的相应孔与钮偶联、与含有两个分子间二硫键或没有铰链结构域(Δ 铰链)的野生型IgG铰链偶联的Fc-GDF15(链A)上钮与孔的位置。对于Fc异二聚钮或孔A/B链,引入AA突变(APELLGGP(SEQ ID NO:96) \rightarrow APALAGGP(SEQ ID NO:97))以去除IgG1效应子功能。将(Fc/Fc)-GDF15异二聚钮入孔设计关于组装进行表达分析且报道于图2A中。在所有情况下,钮入孔(Fc/Fc)-GDF15的瞬时表达在纯化之后产生回收率在0mg/L与74.9mg/L之间的恰当组装产物(0=聚集物/无表达,<25mg/L、25mg/L-49.9mg/L、50mg/L-74.9mg/L、75mg/L-99.0mg/L、>100mg/L)。在所有情况下,钮入孔异二聚Fc/Fc-GDF15分子的组装和分泌伴随有各种污染水平的错折叠同二聚物质,诸如Fc(孔):Fc(孔)、Fc(钮):Fc(钮)、Fc(钮)-GDF15:Fc(钮)-GDF15和Fc(孔)-GDF15:Fc(孔)-GDF15。基于表达分析,发现与异二聚Fc配偶体链上的T366S-L368A-Y407V(孔)偶联(图1D)的位于Fc-GDF15链上的T366W(钮)产生具有最大稳定性且使Fc/Fc-同二聚产物的错配降至最少的产物(图2A-变体B5a/B5b)。这种设计是进一步表达工程化和优化的焦点。

[0390] 瞬时表达Expi 293F来源的变体B5a/B5b回收率提供在0.0mg/L至24.9mg/L范围内的回收率。为增强表达、组装和回收,在GDF15的成熟序列内引入N-糖基化位点(图1F)。在所设计的构建体中,GDF15上单一N-连接聚糖共有位点的存在显著改善完全成熟(Fc/Fc)-GDF15钮入孔异二聚体B5a/B5b的表达、组装和回收(图2A-变体B9a/B9b至B19a/B19b)。经由体外测定发现,对于受体结合和活性,接头长度在 $(G_4S)_n$ 中 $n=5$ 时为最佳。位置D5T上聚糖的存在完全移除成熟GDF15的位置N3上的一级脱酰胺位点,且如在实施例2中所证明似乎进一步增强分子的稳定性。

[0391] 提出GDF15的序列内N-连接聚糖的存在帮助表达且使因由于在分泌过程中在内质网和高尔基体(Golgi Apparatus)中增加的滞留时间而累积所产生的错折叠产物减至最少。提出这种额外滞留时间对折叠动力学具有有益作用,且使得异二聚(Fc/Fc)钮入孔配对和自哺乳动物组织培养物的回收显著改进。

[0392] 以下提供变体(B1a/b-B19a/b)的序列。在以下展示的序列中,人IgK信号肽呈小写字体形式,随后是Fc序列。在还包括接头和GDF15序列的序列中,Fc序列后面是接头序列(加下划线),接头序列后面是GDF15序列(粗体)。Fc序列中氨基酸取代的位置的编号是基于EU编号,取代相对于存在于人IgG1Fc(SEQ ID NO:2)中的相应位置的氨基酸。GDF15序列中N末端缺失和氨基酸取代的编号是相对于野生型人成熟GDF15(SEQ ID NO:1)。

[0393] B1a:hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366Y)-(G₄S)₅- Δ N3-GDF15(G4-I112)

- mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKG
[0394] FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLGPGRCRLHTV
RASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCC
VPASYNPMVLIQKTDGTVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 57)
- [0395] B1b:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (Y407T)
mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
[0396] WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
[0397] ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 58)
- [0398] B2a:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (Y407T) - (G4S)₅ - Δ N3-GDF15 (G4-I112)
mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
[0399] FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLGPGRCRLHTV
RASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCC
VPASYNPMVLIQKTDGTVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 59)
- [0400] B2b:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366Y)
mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
[0401] WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 60)
- [0402] B3a:hIgK-hIgG1-Fc (Δ 铰链, AA) (T366Y) - (G4S)₅ - Δ N3-GDF15 (G4-I112)

mdmrvpaql1g1111w1rgarc**APAL**AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVV
 VDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDI AVEW
 [0403] ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**GDHCPLGPGRCCRLHTV RASLEDLGWA**
DWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCV PASYNP MVL
IQTDTGVS LQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 61)

[0404] B3b:hIgK-hIgG1-Fc (Δ 铰链, AA) (Y407T)

mdmrvpaql1g1111w1rgarc**APAL**AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVV
 VDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 [0405] VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL TSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK (SEQ ID NO: 62)

[0406] B4a:hIgK-hIgG1-Fc (Δ 铰链, AA) (Y407T) - (G4S)₅ - Δ N3-GDF15 (G4-I112)

mdmrvpaql1g1111w1rgarc**APAL**AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVV
 VDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEW
 [0407] ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL TSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**GDHCPLGPGRCCRLHTV RASLEDLGWA**
DWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCV PASYNP MVL
IQTDTGVS LQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 63)

[0408] B4b:hIgK-hIgG1-Fc (Δ 铰链, AA) (T366Y)

mdmrvpaql1g1111w1rgarc**APAL**AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVV
 VDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 [0409] VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDI AVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK (SEQ ID NO: 64)

[0410] B5a:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G4S)₅ - Δ N3-GDF15 (G4-I112)

mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG
 [0429] FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGS**ARNGTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDL**
GWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNP
MVLIQKTDGTVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 73)

[0430] B9b:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)

mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 [0431] WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL**SCAVKG**
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)

[0432] B10a:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G4S)₄-GDF15 (A1-I112) (D5T)

mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG
 [0433] FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGGS**ARNGTHCPLGPGRCCRLHTVRA**
SLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTDGTVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 75)

[0434] B10b:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)

mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 [0435] WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL**SCAVKG**
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 76)

[0436] B11a:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G4S)₅-GDF15 (A1-I112) (D5T)

- mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG
[0437] FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGARNGTHCPLGPRCCRL
HTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPA
PCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 77)
- [0438] B11b:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)
mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
[0439] WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 76)
- [0440] B12a:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G₄S)₂ - Δ N2-GDF15 (N3-I112) (D5T)
mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
[0441] SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGNGTHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVL
[0442] SPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQK
DTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 78)
- [0443] B12b:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)
mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
[0444] WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 79)
- [0445] B13a:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G₄S)₅ - Δ N2-GDF15 (N3-I112) (D5T)

- mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG
[0446] FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGNGTHCPLGPGRCCRLHT
VRASLEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPC
CVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 80)
- [0447] B13b:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)
mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
[0448] WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)
- [0449] B14a:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G4S)₅ - Δ N3-GDF15 (G4-I112) (R21N)
mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG
[0450] FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGDHCPLGPGRCCRLHTV
NASLEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCC
VPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 82)
- [0451] B14b:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366S) (L368A) (Y407V)
mdmrvpaql1g1111w1rgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
[0452] WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 83)
- [0453] B15a:hIgK-hIgG1-Fc (AA) (T366W) - (G4S)₅ - Δ N3-GDF15 (G4-I112) (S23N/E25T)

NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLINKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:113)

[0489] IgK-GDF15-糖突变蛋白K91N/D93T

[0490]

mdmrvpaql1lg1111w1rgarcARNGDHCPLGPGRCRCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA

NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:114)

[0491] IgK-GDF15-糖突变蛋白D93N/G95T

[0492]

mdmrvpaql1lg1111w1rgarcARNGDHCPLGPGRCRCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA

NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTNTTVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:115)

[0493] IgK-GDF15-糖突变蛋白G95N

[0494]

mdmrvpaql1lg1111w1rgarcARNGDHCPLGPGRCRCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA

NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTNVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:116)

[0495] IgK-GDF15-糖突变蛋白S97N/Q99T

[0496]

mdmrvpaql1lg1111w1rgarcARNGDHCPLGPGRCRCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA

NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVNLTQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:117)

[0497] IgK-GDF15-糖突变蛋白L98N

[0498]

mdmrvpaql1lg1111w1rgarcARNGDHCPLGPGRCRCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA

NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSNQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:118)

[0499] GDF15分子使用IgK信号肽表达,所述IgK信号肽由293细胞所表达的信号肽酶自所分泌的多肽上裂解掉。野生型人成熟GDF15 (SEQ ID NO:1) 和GDF15糖突变蛋白的回收率列于图2B中。

[0500] 可以Fc-Fc (钮/孔) GDF15糖突变蛋白表示的示例性GDF15糖突变蛋白描述于2015年7月28日提交的USSN14/811,578中。

[0501] 实施例2:在DIO小鼠模型中 (Fc/Fc) -GDF15融合分子对体重和食物摄入的影响

[0502] 历经35天的时间评价皮下施用的具有融合至重组人GDF15的重组Fc-异二聚体的融合分子 (即两个异二聚体的复合物,各异二聚体具有与Fc-GDF15糖突变蛋白多肽二聚化的Fc多肽) 对体重的影响。简言之,以单次皮下快速注射 (10mL/kg) 形式以0.4nmol/kg和4nmol/kg的剂量向称重约35-40g的DIO小鼠每周施用融合分子B9a/B9b、B11a/B11b和B13a/B13b持续21天。在施用媒介物对照或融合分子之后,历经35天时间段在各个时间点监测体重减轻,所述35天时间段包含21天蛋白质给药,随后是14天冲洗 (剂量后) 以监测功效。

[0503] 如图3-6中所展示,以0.4nmol/kg和4nmol/kg的剂量施用Fc融合分子 (异二聚体-异二聚体复合物) 产生显著体重减轻。在各组小鼠中, n=6且通过学生未配对T-检验在各指定时间点与媒介物对照组相比较来测定p值 (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001, ns=不显著)。如图7中所展示,显示在对所有组取样的各时间点使用SEM分析的总重量。如图8中所展示,显示在对所有组取样的各时间点使用SEM分析的体重变化 (g) 和p值。如图9中所展示,显示在对所有组取样的各时间点使用SEM分析的体重变化百分比 (%) 和p值。

[0504] 如图3和5中所展示,在0.4nmol/kg剂量研究中,与B9a/B9b和B11a/B11b相比,在B13a/B13b的体重减轻中存在所观察到的增加的功效。B13a/B13b的增加的体内功效归因于由于GDF15的2个N末端残基的截短(Δ AR)而产生的增强的稳定性。

[0505] 本文描述了本发明的特定实施方案,包括发明人已知用于进行本发明的最佳模式。在阅读前述描述后,所公开实施方案的变化对于在本领域中工作的个体而言可变得显而易见,且预期那些熟练的技术人员可在适当时使用此类变化。因此,本发明意图可不同于如本文所具体描述进行实践,且如由适用法律所允许本发明意图包括在此所附权利要求中所叙述的主题物的所有修改和等效形式。此外,除非本文另外指出或以其他方式上下文明显矛盾,否则以上所描述的呈所有可能变化形式的要素的任何组合均由本发明涵盖。

[0506] 本说明书所引用的所有出版物、专利申请、登录号和其他参考文献以引用的方式并入本文中,如同指示各个别出版物或专利申请具体地且单独地以引用的方式并入一般。

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 3
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 3
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Gly Thr
 225 230 235 240
 His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg
 245 250 255
 Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg
 260 265 270
 Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg
 275 280 285
 Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys
 290 295 300
 Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro
 305 310 315 320
 Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr

	325		330		335
Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile					
	340		345		
<210> 4					
<211> 227					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 合成多肽序列					
<400> 4					
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly					
1	5		10		15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met					
	20		25		30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His					
	35		40		45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val					
	50		55		60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr					
65	70		75		80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly					
	85		90		95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile					
	100		105		110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val					
	115		120		125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser					
	130		135		140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu					
145	150		155		160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro					
	165		170		175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val					
	180		185		190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met					
	195		200		205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser					
	210		215		220
Pro Gly Lys					

	245		250		255
Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala					
	260		265		270
Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu					
	275		280		285
Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala					
	290		295		300
Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro					
305		310		315	320
Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met					
	325		330		335
Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp					
	340		345		350
Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile					
	355		360		
<210> 6					
<211> 227					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 合成多肽序列					
<400> 6					
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly					
1	5		10		15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met					
	20		25		30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His					
	35		40		45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val					
	50		55		60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr					
65		70		75	80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly					
	85		90		95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile					
	100		105		110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val					
	115		120		125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser					

145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
225	230	235	240
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys			
	245	250	255
Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Asn Ala Ser			
	260	265	270
Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val			
	275	280	285
Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala			
	290	295	300
Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp			
305	310	315	320
Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val			
	325	330	335
Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp			
	340	345	350
Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile			
	355	360	

<210> 8

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 8

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly			
1	5	10	15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	20	25	30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			

35	40	45		
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val				
50	55	60		
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr				
65	70	75	80	
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly				
	85	90	95	
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile				
	100	105	110	
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val				
	115	120	125	
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser				
	130	135	140	
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu				
	145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro				
	165	170	175	
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val				
	180	185	190	
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met				
	195	200	205	
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser				
	210	215	220	
Pro Gly Lys				
225				
<210> 9				
<211> 361				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 合成多肽序列				
<400> 9				
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly				
1	5	10	15	
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met				
	20	25	30	
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His				
	35	40	45	
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val				

50	55	60
His Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
65	70	75
Arg Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	80
	85	90
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	95
	100	105
Glu Lys Thr Ile Ser Lys	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	110
	115	120
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser	Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser	125
	130	135
Leu Trp Cys Leu Val Lys	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	140
	145	150
Trp Glu Ser Asn Gly Gln	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	155
	165	170
Val Leu Asp Ser Asp Gly	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	160
	180	185
Asp Lys Ser Arg Trp Gln	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	175
	195	200
His Glu Ala Leu His Asn	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	205
	210	215
Pro Gly Lys Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	220
	225	230
Gly Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys	235
	245	250
Pro Leu Gly Pro Gly Arg	Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Asn	240
	260	265
Leu Thr Asp Leu Gly Trp	Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val	255
	275	280
Gln Val Thr Met Cys Ile	Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala	285
	290	295
Asn Met His Ala Gln Ile	Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp	300
	305	310
Thr Val Pro Ala Pro Cys	Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val	315
	325	330
Leu Ile Gln Lys Thr Asp	Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp	320
	340	345
Leu Leu Ala Lys Asp Cys	His Cys Ile	350
	355	360

<210> 10
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 10
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 11
 <211> 361

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 11

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

Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val
 275 280 285
 Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Asn Arg Thr Ala
 290 295 300
 Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp
 305 310 315 320
 Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val
 325 330 335
 Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp
 340 345 350
 Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 355 360
 <210> 12
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 12
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 13
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 13
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys
 245 250 255
 Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser
 260 265 270
 Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val
 275 280 285
 Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Asn Ala Thr
 290 295 300
 Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp
 305 310 315 320
 Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val
 325 330 335
 Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp
 340 345 350
 Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 355 360

<210> 14

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 14

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

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

<210> 16

<211> 227

<212> PRT

<223> 合成多肽序列

<400> 17

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

180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
210	215	220
Pro Gly Lys		
225		
<210> 19		
<211> 4		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽序列		
<400> 19		
Gly Gly Gly Ser		
1		
<210> 20		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽序列		
<400> 20		
Gly Gly Gly Gly Ser		
1	5	
<210> 21		
<211> 4		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽序列		
<400> 21		
Gly Gly Ser Gly		
1		
<210> 22		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

<223> 合成多肽序列

<400> 22

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 23

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 24

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 25

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 26

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 28

Glu Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (3)

<223> 此位置处之氨基酸可以是任何氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> 此位置处的氨基酸可以是任何疏水性氨基酸

<400> 29

Pro Xaa Xaa Xaa

1

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

Ser Lys Leu Val Gln Ala Ser Ala Ser Gly Val Asn

1 5 10

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 37

Ser Ser Tyr Leu Lys Ala Ser Asp Ala Pro Asp Asn

1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 38

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met Asn

1 5 10

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 39

Ser Leu Arg Pro Leu Ala Leu Trp Arg Ser Phe Asn

1 5 10

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 40

Ser Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Asn Phe Asn

1 5 10

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 41

Asp Val Asp Glu Arg Asp Val Arg Gly Phe Ala Ser Phe Leu

1 5 10

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 42

Ser Leu Pro Leu Gly Leu Trp Ala Pro Asn Phe Asn

1 5 10

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 43

Ser Leu Leu Ile Phe Arg Ser Trp Ala Asn Phe Asn

1 5 10

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 44

Ser Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr

1 5 10

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

Gly Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Arg Gly Ile Val

1 5 10

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 50

Gly Gly Ser Gly Gln Arg Gly Arg Lys Ala Leu Glu

1 5 10

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 51

Ser Leu Ser Ala Leu Leu Ser Ser Asp Ile Phe Asn

1 5 10

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 52

Ser Leu Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly Phe Asn

1 5 10

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 53

Ser Leu Leu Gly Ile Ala Val Pro Gly Asn Phe Asn

1 5 10

<210> 54

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 56
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 56
 accatggaca tgagggtccc cgetcagetc ctggggctec tgctactctg gctccgaggt 60
 gccagatgt 69
 <210> 57
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 57
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30
 Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

145	150	155	160
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Tyr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	165	170	175
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	180	185	190
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	195	200	205
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
	210	215	220
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
225	230	235	240
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
	245	250	255
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
	260	265	270
Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu			
	275	280	285
His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val			
	290	295	300
Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro			
305	310	315	320
Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu			
	325	330	335
His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala			
	340	345	350
Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser			
	355	360	365
Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile			
	370	375	380
<210> 58			
<211> 249			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽序列			
<400> 58			
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp			
1	5	10	15
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
 340 345 350
 Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
 355 360 365
 Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 370 375 380
 <210> 60
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 60
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30
 Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Tyr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245
 <210> 61
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 61
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
 20 25 30
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 35 40 45
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 50 55 60
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 65 70 75 80
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 85 90 95
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 100 105 110
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 115 120 125
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 130 135 140
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Tyr Cys Leu
 145 150 155 160
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 165 170 175
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 180 185 190
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 195 200 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 210 215 220
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro
 260 265 270
 Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu
 275 280 285
 Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met
 290 295 300
 Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala
 305 310 315 320
 Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala
 325 330 335
 Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys
 340 345 350
 Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
 355 360 365
 Asp Cys His Cys Ile
 370
 <210> 62
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 62
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
 20 25 30
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 35 40 45
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 50 55 60
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 85 90 95
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 100 105 110
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 115 120 125
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 130 135 140
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 145 150 155 160
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 165 170 175
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 180 185 190
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 195 200 205
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 210 215 220
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230 235
 <210> 63
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 63
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
 20 25 30
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 35 40 45
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 50 55 60
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 65 70 75 80
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 100 105 110
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 115 120 125
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 130 135 140
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 145 150 155 160
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 165 170 175
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 180 185 190
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 195 200 205
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 210 215 220
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro
 260 265 270
 Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu
 275 280 285
 Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met
 290 295 300
 Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala
 305 310 315 320
 Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala
 325 330 335
 Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys
 340 345 350
 Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
 355 360 365
 Asp Cys His Cys Ile
 370
 <210> 64
 <211> 239
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 64

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

<210> 65

<211> 383

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

290	295	300
Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro		
305	310	315
Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu		
	325	330
His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala		
	340	345
Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser		
	355	360
Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile		
	370	380
<210> 66		
<211> 249		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽序列		
<400> 66		
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp		
1	5	10
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
	20	25
Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
	35	40
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
	50	55
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
65	70	75
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
	85	90
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
	100	105
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
	115	120
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
	130	135
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
145	150	155
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro		

	165		170		175
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn					
	180		185		190
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu					
	195		200		205
Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val					
	210		215		220
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln					
225		230		235	240
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	245				
<210> 67					
<211> 380					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 合成多肽序列					
<400> 67					
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp					
1	5		10		15
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro					
	20		25		30
Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys					
	35		40		45
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val					
	50		55		60
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr					
65		70		75	80
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu					
	85		90		95
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His					
	100		105		110
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys					
	115		120		125
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln					
	130		135		140
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met					
145		150		155	160
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro					

	165	170	175
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	180	185	190
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	195	200	205
Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
	210	215	220
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
225	230	235	240
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
	245	250	255
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
	260	265	270
Gly Ser Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val			
	275	280	285
Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro			
	290	295	300
Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe			
305	310	315	320
Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu			
	325	330	335
Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn			
	340	345	350
Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr			
	355	360	365
Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile			
	370	375	380
<210> 68			
<211> 249			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽序列			
<400> 68			
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp			
1	5	10	15
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	20	25	30
Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			

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

<210> 69

<211> 373

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 69

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp			
1	5	10	15
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val			
	20	25	30
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			

35	40	45		
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu				
50	55	60		
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys				
65	70	75	80	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser				
	85	90	95	
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys				
	100	105	110	
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile				
	115	120	125	
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro				
	130	135	140	
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu				
	145	150	155	160
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn				
	165	170	175	
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser				
	180	185	190	
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg				
	195	200	205	
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu				
	210	215	220	
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly				
	225	230	235	240
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly				
	245	250	255	
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro				
	260	265	270	
Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu				
	275	280	285	
Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met				
	290	295	300	
Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala				
	305	310	315	320
Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala				
	325	330	335	
Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys				
	340	345	350	

Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
 355 360 365
 Asp Cys His Cys Ile
 370
 <210> 70
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 70
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
 20 25 30
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 35 40 45
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 50 55 60
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 65 70 75 80
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 85 90 95
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 100 105 110
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 115 120 125
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 130 135 140
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
 145 150 155 160
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 165 170 175
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 180 185 190
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 195 200 205
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys
 260 265 270
 Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala
 275 280 285
 Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly
 290 295 300
 Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys
 325 330 335
 Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr
 340 345 350
 Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His
 355 360 365
 Cys Ile
 370
 <210> 72
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 72
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
 20 25 30
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 35 40 45
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 50 55 60
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 65 70 75 80
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 85 90 95
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 115 120 125
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 130 135 140
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 145 150 155 160
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 165 170 175
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 180 185 190
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 195 200 205
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 210 215 220
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230 235
 <210> 73
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 73
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30
 Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

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

<210> 74

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 74

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

<210> 75

<211> 381

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 75

305	310	315	320
Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg			
	325	330	335
Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr			
	340	345	350
Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln			
	355	360	365
Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile			
	370	375	380
<210> 76			
<211> 249			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽序列			
<400> 76			
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp			
1	5	10	15
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	20	25	30
Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
	35	40	45
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	50	55	60
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
65	70	75	80
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	85	90	95
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	100	105	110
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	115	120	125
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	130	135	140
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met			
145	150	155	160
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	165	170	175
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			

	180		185		190										
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
	195		200		205										
Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
	210		215		220										
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
225			230		235										240
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
			245												

<210> 77

<211> 386

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 77

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

35	40	45
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
50	55	60
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
65	70	75
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
85	90	95
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
100	105	110
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
115	120	125
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
130	135	140
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
145	150	155
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
165	170	175
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
180	185	190
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
195	200	205
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		
210	215	220
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
225	230	235
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
245	250	255
Gly Gly Ser Asn Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys		
260	265	270
Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp		
275	280	285
Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala		
290	295	300
Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr		
305	310	315
Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val		
325	330	335
Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly		
340	345	350

Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys
 355 360 365
 Ile
 <210> 79
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 79
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30
 Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205
 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

225	230	235	240
Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly Lys		
	245		
<210> 80			
<211> 384			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽序列			
<400> 80			
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp			
1	5	10	15
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	20	25	30
Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
	35	40	45
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	50	55	60
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
65	70	75	80
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	85	90	95
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	100	105	110
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	115	120	125
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	130	135	140
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met			
145	150	155	160
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	165	170	175
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	180	185	190
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	195	200	205
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
	210	215	220
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			

225	230	235	240
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
	245	250	255
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
	260	265	270
Gly Ser Asn Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg			
	275	280	285
Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp			
	290	295	300
Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys			
305	310	315	320
Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser			
	325	330	335
Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro			
	340	345	350
Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val			
	355	360	365
Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile			
	370	375	380
<210> 81			
<211> 249			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽序列			
<400> 81			
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp			
1	5	10	15
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	20	25	30
Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
	35	40	45
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	50	55	60
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
65	70	75	80
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	85	90	95
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			

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

<210> 82

<211> 383

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 82

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

100	105	110
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
115	120	125
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
130	135	140
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
145	150	155
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
165	170	175
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
180	185	190
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
195	200	205
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		
210	215	220
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
225	230	235
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
245	250	255
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
260	265	270
Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu		
275	280	285
His Thr Val Asn Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val		
290	295	300
Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro		
305	310	315
Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu		
325	330	335
His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala		
340	345	350
Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser		
355	360	365
Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile		
370	375	380

<210> 83

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 83

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

<210> 84

<211> 383

<212> PRT

<213> 人工序列

His Thr Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
 290 295 300
 Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro
 305 310 315 320
 Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
 325 330 335
 His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
 340 345 350
 Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
 355 360 365
 Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 370 375 380
 <210> 85
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 85
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30
 Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205
 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245

<210> 86

<211> 383

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 86

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	165	170	175
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	180	185	190
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	195	200	205
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
	210	215	220
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
225	230	235	240
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
	245	250	255
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
	260	265	270
Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu			
	275	280	285
His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val			
	290	295	300
Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro			
305	310	315	320
Ser Gln Asn Arg Thr Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu			
	325	330	335
His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala			
	340	345	350
Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser			
	355	360	365
Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile			
	370	375	380
<210> 87			
<211> 249			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽序列			
<400> 87			
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp			
1	5	10	15
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	20	25	30

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

<210> 88

<211> 383

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 88

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
 275 280 285
 His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
 290 295 300
 Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro
 305 310 315 320
 Ser Gln Phe Asn Ala Thr Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
 325 330 335
 His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala

340	345	350
Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser		
355	360	365
Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile		
370	375	380
<210> 89		
<211> 249		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽序列		
<400> 89		
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp		
1	5	10
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
20	25	30
Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
35	40	45
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
50	55	60
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
65	70	75
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
85	90	95
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
100	105	110
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
115	120	125
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
130	135	140
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
145	150	155
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
165	170	175
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
180	185	190
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
195	200	205
Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		

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

<210> 92

<211> 383

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 92

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

	85	90	95
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	100	105	110
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	115	120	125
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	130	135	140
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met			
145	150	155	160
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	165	170	175
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	180	185	190
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	195	200	205
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
	210	215	220
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
225	230	235	240
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
	245	250	255
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
	260	265	270
Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu			
	275	280	285
His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val			
	290	295	300
Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro			
305	310	315	320
Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu			
	325	330	335
His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala			
	340	345	350
Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asn Thr Thr Val Ser			
	355	360	365
Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile			
	370	375	380

<210> 93

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 93

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

<210> 94

<211> 31

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 94
 His Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly Phe Tyr Glu Ser Asp Val Met
 1 5 10 15
 Gly Arg Gly His Ala Arg Leu Val His Val Glu Glu Pro His Thr
 20 25 30

<210> 95
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 95

Ala Arg Asn Gly Asp His
 1 5

<210> 96
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 96

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5

<210> 97
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 97

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro
 1 5

<210> 98
 <211> 8
 <212> PRT

<400> 102

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 103

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 104

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 104

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 105

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 106

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 106

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 107

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 107

Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 108

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 108

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly

20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp

35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr

50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His

65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro

85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln

100 105 110

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

115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile

130

<210> 109

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

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

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 111

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 111

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Asn Leu Thr Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

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

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 112

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 112

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

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

<210> 113

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 113

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

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45
 Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60
 Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80
 Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95
 Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110
 Lys Thr Asn Thr Thr Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125
 Lys Asp Cys His Cys Ile
 130
 <210> 116
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <400> 116
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30
 Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45
 Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60
 Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80
 Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95
 Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110
 Lys Thr Asp Thr Asn Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125
 Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 117

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 117

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

<210> 118

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 118

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30
 Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45
 Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr

50	55	60																		
Met	Cys	Ile	Gly	Ala	Cys	Pro	Ser	Gln	Phe	Arg	Ala	Ala	Asn	Met	His					
65					70					75				80						
Ala	Gln	Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	His	Arg	Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Val	Pro					
				85					90					95						
Ala	Pro	Cys	Cys	Val	Pro	Ala	Ser	Tyr	Asn	Pro	Met	Val	Leu	Ile	Gln					
			100					105						110						
Lys	Thr	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Asn	Gln	Thr	Tyr	Asp	Asp	Leu	Leu	Ala					
			115				120							125						
Lys	Asp	Cys	His	Cys	Ile															

130

<210> 119

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 119

Asn	Gly	Asp	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Arg	Leu	His
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1

5

10

15

Thr

<210> 120

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> 此段氨基酸可重复达50次

<400> 120

Gly	Ser	Gly	Gly	Ser
-----	-----	-----	-----	-----

1

5

<210> 121

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> 此氨基酸可重复达20次
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (5)
 <223> 此段氨基酸可重复达20次
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> 此氨基酸可重复达20次
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3) .. (3)
 <223> 此氨基酸可重复达20次
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4) .. (4)
 <223> 此氨基酸可重复达20次
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5) .. (5)
 <223> 此氨基酸可重复达20次
 <400> 121
 Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 122
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (5)
 <223> 此段氨基酸可重复达20次
 <220>

1

<210> 125

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (4)

<223> 此段氨基酸可重复达50次

<400> 125

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 126

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> 此段氨基酸可重复达50次

<400> 126

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 127

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 127

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly

1

5

10

15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20

25

30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35	40	45		
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val				
50	55	60		
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr				
65	70	75	80	
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly				
	85	90	95	
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile				
	100	105	110	
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val				
	115	120	125	
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser				
	130	135	140	
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu				
	145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro				
	165	170	175	
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val				
	180	185	190	
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met				
	195	200	205	
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser				
	210	215	220	
Pro Gly Lys				
225				
<210> 128				
<211> 112				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 合成多肽序列				
<400> 128				
Ala Arg Asn Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg				
1	5	10	15	
Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp				
	20	25	30	
Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys				
	35	40	45	
Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser				

50	55	60
Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro		
65	70	75
Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val		
	85	90
Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile		
	100	105
		110

<210> 129

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 129

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

<210> 130

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 130

Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr		
1	5	10
Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser		
	20	25
		30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
 35 40 45
 Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
 50 55 60
 Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
 85 90 95
 Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105

<210> 131

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 131

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

<210> 132

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 132

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr

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

<210> 133

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 133

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

<210> 134

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 134

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

<210> 135

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 135

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

<210> 136

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 136

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

钮孔(Fc/Fc)-GDF15分子的设计

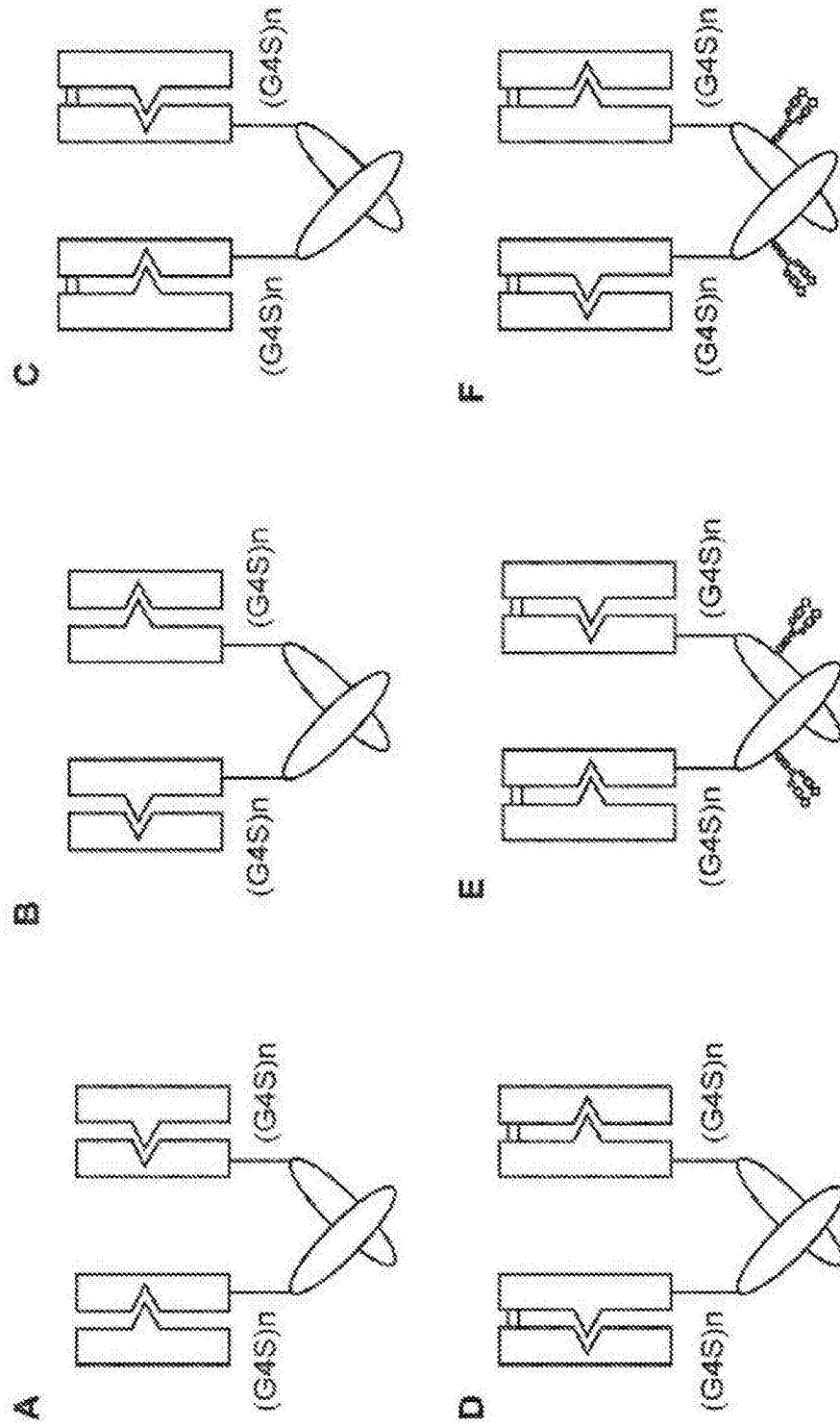


图1

Fc-GDF15 链 A	Fc 异二聚体 (钮/孔) 配偶体 链 B	变体编号	GDF15 交联蛋白 (糖基化)	回收率 (mg/L)
hlgG1-Fc(AA)(T366Y)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(AA)(Y407T)	B1a/B1a	否	<25
hlgG1-Fc(AA)(Y407T)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(AA)(T366Y)	B2a/B2b	否	25-49.9
hlgG1-Fc(Δ校链, AA)(T366Y)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(Δ校链, AA)(Y407T)	B3a/B3b	否	50-74.9
hlgG1-Fc(Δ校链, AA)(Y407T)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(Δ校链, AA)(T366Y)	B4a/B4b	否	<25
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B5a/B5b	否	<25
hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(AA)(T366W)	B6a/B6b	否	<25
hlgG1-Fc(Δ校链, AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(Δ校链, AA)(T366S, L368A, Y407V)	B7a/B7b	否	25-49.9
hlgG1-Fc(Δ校链, AA)(T366S, L368A, Y407V)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(Δ校链, AA)(T366W)	B8a/B8b	否	不适用
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -GDF15 (A1-I112) (D5T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B9a/B9b	是	>100
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -GDF15 (A1-I112) (D5T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B10a/B10b	是	>100
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -GDF15 (A1-I112) (D5T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B11a/B11b	是	>100
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -GDF15 (N3-I112) (D5T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B12a/B12b	是	75-99
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -ΔN2-GDF15 (N3-I112) (D5T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B13a/B13b	是	>100
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -ΔN2-GDF15 (N3-I112) (D5T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B14a/B14b	是	75-99
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(S23N/E25T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B15a/B15b	是	75-99
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(F52N/A54T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B16a/B16b	是	>100
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R53N/A35T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B17a/B17b	是	75-99
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112) (K91N/D93T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B18a/B18b	是	75-99
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(D93N/G95T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S, L368A, Y407V)	B19a/B19b	是	50-74.9

图2A-工程化的钮孔 (Fc/Fc) -GDF15 分子的回收率

糖变体	回收率 (mg/L)
hGDF15 野生型	< 0.99
R21N	< 0.99
R53N/A55T	4 - 7.99
S64N/H66T	16 - 31.99
P70N	2 - 3.99
Q90N	4 - 7.99
K91N/D93T	16 - 31.99
D93N/G95T	8 - 15.99
G95N	8 - 15.99
S97N/Q99T	8 - 15.99
L98N	4 - 7.99

图2B-GDF15糖突变蛋白的回收率

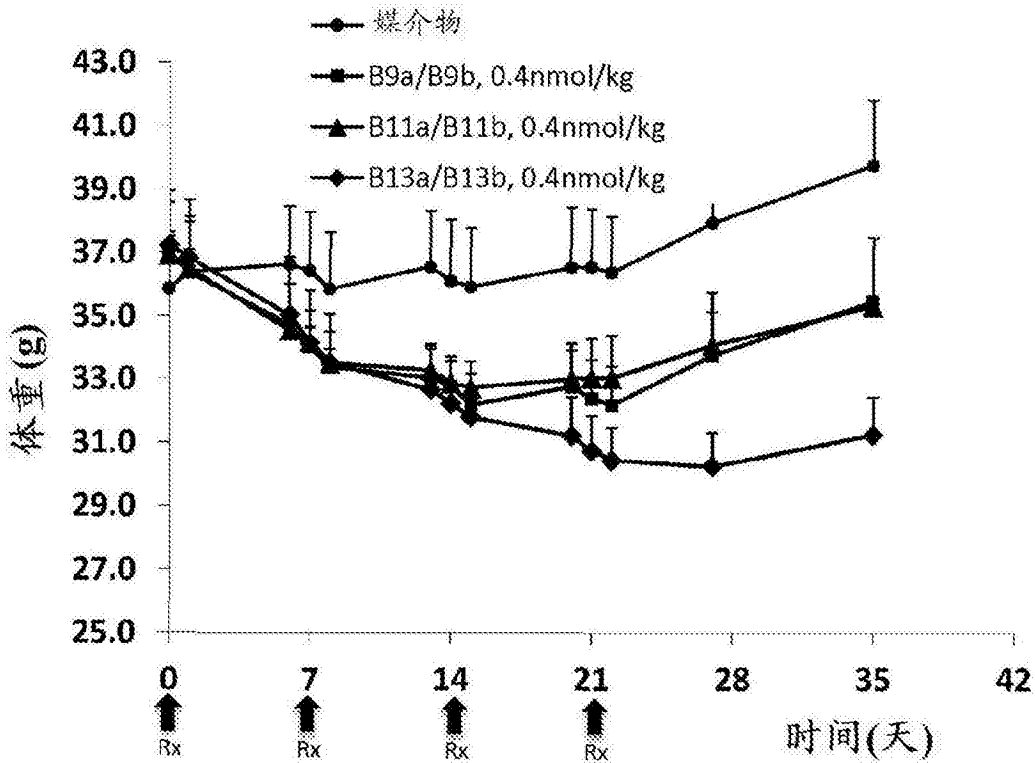


图3-在DIO小鼠模型中在递送0.4nmol/kg的 (Fc/Fc) -GDF15分子后的体重减轻

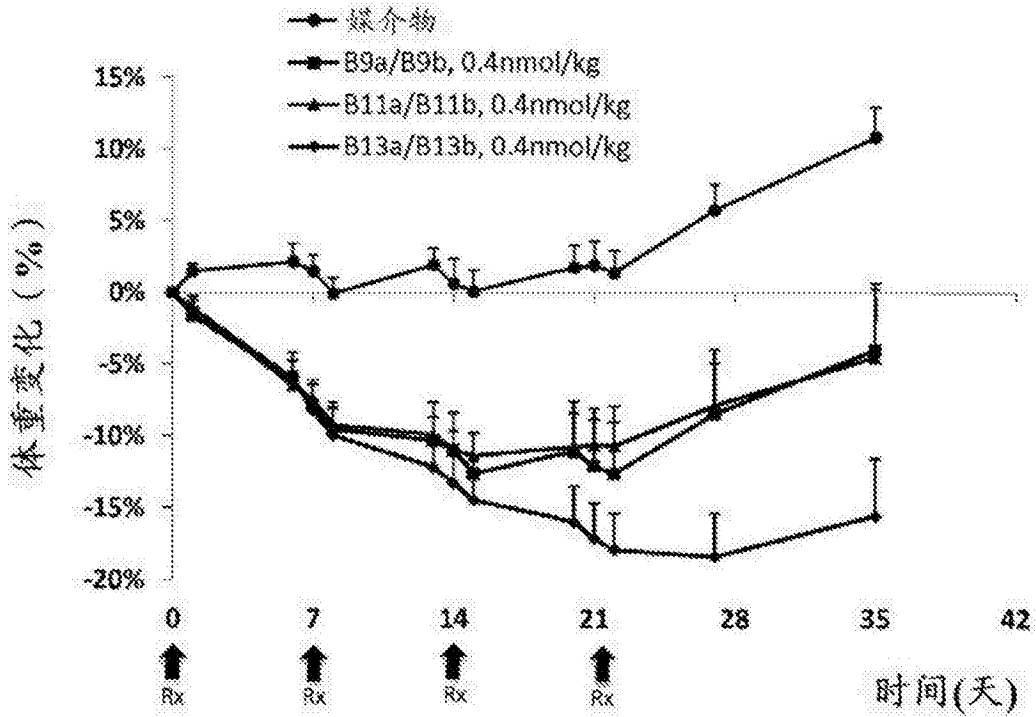


图4-在DIO小鼠模型中在递送0.4nmol/kg的(Fc/Fc)-GDF15分子后的体重减轻百分比

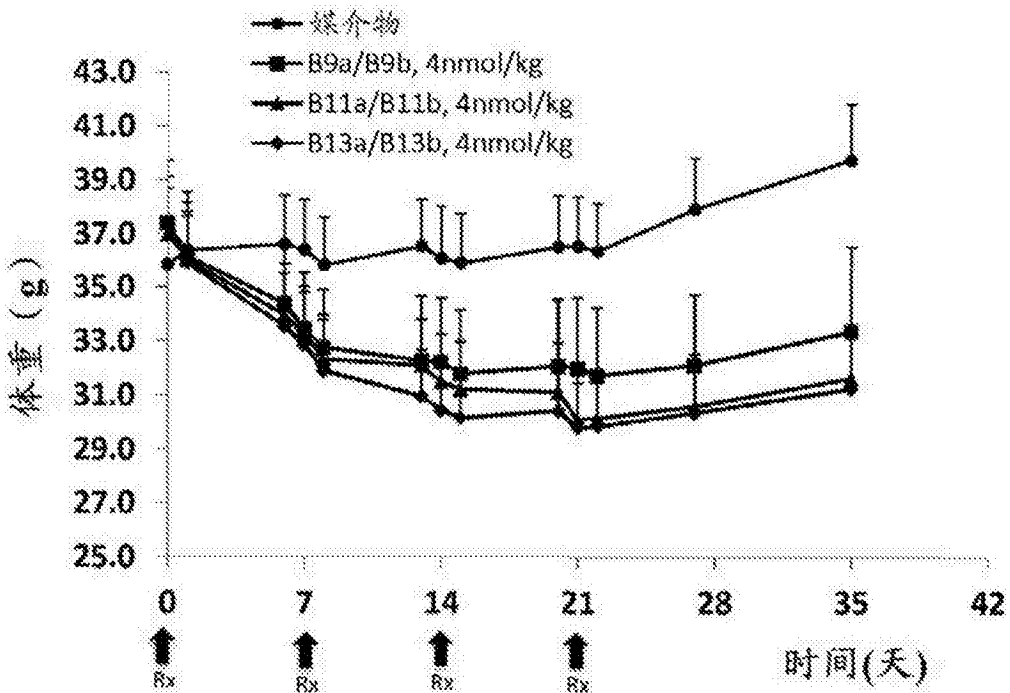


图5-在DIO小鼠模型中在递送4.0nmol/kg的(Fc/Fc)-GDF15分子后的体重减轻

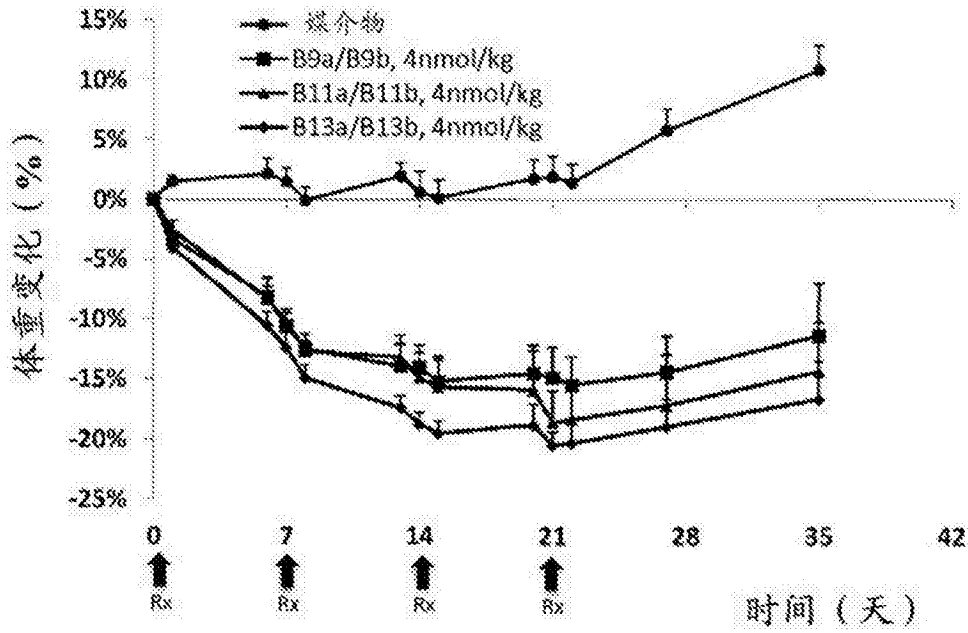


图6-在D10小鼠模型中在递送4.0nmol/kg的(Fc/Fc)-GDF15分子后的体重减轻百分比

	D0	D1	D6	D7	D8	D13	D14	D15	D20	D21	D22	D27	D35
媒介物	35.9	36.4	36.6	36.4	35.9	36.6	36.1	35.9	36.5	36.6	36.4	37.9	39.8
B9a/B9b 0.4nmol/kg	37.0	36.4	34.7	34.0	33.4	33.0	32.8	32.2	32.7	32.4	32.2	33.7	35.5
B9a/B9b 4nmol/kg	37.4	36.2	34.4	33.5	32.8	32.3	32.2	31.8	32.1	32.0	31.7	32.1	33.4
B11a/B11b 0.4nmol/kg	36.9	36.5	34.5	34.2	33.5	33.3	32.9	32.7	33.0	33.0	33.0	34.1	35.3
B11a/B11b 4nmol/kg	37.0	36.0	34.0	33.3	32.3	32.1	31.5	31.2	31.1	30.1	30.2	30.6	31.6
B13a/B13b 0.4nmol/kg	37.2	36.8	35.0	34.2	33.5	32.7	32.2	31.8	31.2	30.7	30.4	30.2	31.2
B13a/B13b 4nmol/kg	37.4	35.9	33.6	32.9	31.9	31.0	30.5	30.2	30.4	29.8	29.9	30.4	31.2

sem	D0	D1	D6	D7	D8	D13	D14	D15	D20	D21	D22	D27	D35
媒介物	1.77	1.72	1.81	1.87	1.78	1.74	1.92	1.84	1.89	1.82	1.76	1.87	2.04
B9a/B9b 0.4nmol/kg	1.58	1.58	1.30	1.17	1.13	0.91	0.93	0.99	1.16	1.21	1.23	1.39	2.01
B9a/B9b 4nmol/kg	2.32	2.35	2.27	2.12	2.14	2.39	2.37	2.35	2.47	2.63	2.51	2.61	3.15
B11a/B11b 0.4nmol/kg	0.99	0.98	0.52	0.47	0.45	0.77	0.69	0.82	1.15	1.23	1.35	1.69	2.15
B11a/B11b 4nmol/kg	1.70	1.78	1.83	1.76	1.65	1.63	1.76	1.76	1.81	1.73	1.68	1.93	1.87
B13a/B13b 0.4nmol/kg	1.69	1.80	1.81	1.64	1.55	1.44	1.33	1.36	1.21	1.09	1.02	1.07	1.17
B13a/B13b 4nmol/kg	1.70	1.75	1.96	1.94	1.87	1.70	1.66	1.69	1.71	1.64	1.63	1.71	1.97

图7-在0.4nmol/kg和4.0nmol/kg的(Fc/Fc)-GDF15分子的各时间点D10小鼠的体重(g)

	D0	D1	D6	D7	D8	D13	D14	D15	D20	D21	D22	D27	D35
媒介物	0.0	0.5	0.8	0.5	0.0	0.7	0.2	0.0	0.6	0.7	0.5	2.1	3.9
B9a/B9b 0.4nmol/kg	0.0	-0.6	-2.3	-3.0	-3.6	-4.0	-4.2	-4.8	-4.3	-4.6	-4.8	-3.3	-1.5
B9a/B9b 4nmol/kg	0.0	-1.2	-3.0	-4.0	-4.8	-5.1	-5.2	-5.6	-5.3	-5.4	-5.7	-5.3	-4.1
B11a/B11b 0.4nmol/kg	0.0	-0.4	-2.4	-2.8	-3.4	-3.7	-4.1	-4.2	-4.0	-3.9	-3.9	-2.9	-1.6
B11a/B11b 4nmol/kg	0.0	-1.0	-3.0	-3.7	-4.7	-4.9	-5.5	-5.8	-5.9	-6.3	-6.3	-6.4	-5.4
B13a/B13b 0.4nmol/kg	0.0	-0.4	-2.2	-3.1	-3.7	-4.0	-5.0	-5.5	-6.0	-6.3	-6.8	-7.0	-6.0
B13a/B13b 4nmol/kg	0.0	-1.5	-3.9	-4.5	-5.5	-6.5	-7.0	-7.3	-7.0	-7.6	-7.6	-7.1	-6.2

sem	D0	D1	D6	D7	D8	D13	D14	D15	D20	D21	D22	D27	D35
媒介物	0.00	0.16	0.43	0.38	0.37	0.38	0.60	0.50	0.93	0.59	0.73	0.61	0.77
B9a/B9b 0.4nmol/kg	0.00	0.21	0.48	0.59	0.75	1.06	1.08	1.14	1.38	1.30	1.48	1.31	1.54
B9a/B9b 4nmol/kg	0.00	0.17	0.53	0.47	0.46	0.58	0.58	0.68	0.79	0.80	0.76	1.02	1.51
B11a/B11b 0.4nmol/kg	0.00	0.22	0.35	0.52	0.47	0.45	0.50	0.60	0.86	0.91	0.99	1.43	1.88
B11a/B11b 4nmol/kg	0.00	0.30	0.31	0.34	0.26	0.69	0.77	0.82	1.23	1.03	1.22	1.60	1.58
B13a/B13b 0.4nmol/kg	0.00	0.34	0.65	0.84	0.80	0.82	1.01	0.91	1.07	1.12	1.16	1.31	1.62
B13a/B13b 4nmol/kg	0.00	0.13	0.34	0.37	0.29	0.31	0.29	0.31	0.62	0.36	0.37	0.83	1.13

未配对 t-检验	D0	D1	D6	D7	D8	D13	D14	D15	D20	D21	D22	D27	D35
媒介物													
B9a/B9b 0.4nmol/kg		**	***	***	**	**	**	**	**	**	**	**	*
B9a/B9b 4nmol/kg		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
B11a/B11b 0.4nmol/kg		**	***	***	***	***	***	***	**	**	**	**	*
B11a/B11b 4nmol/kg		**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
B13a/B13b 0.4nmol/kg		*	**	**	**	***	**	***	***	***	***	***	***
B13a/B13b 4nmol/kg		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

图8-在DIO小鼠模型中0.4nmol/kg和4.0nmol/kg的(Fc/Fc)-GDF15分子的各时间点的总体重变化(g)

	D0	D1	D6	D7	D8	D13	D14	D15	D20	D21	D22	D27	D35
媒介物	0.0%	1.9%	2.2%	1.9%	0.0%	2.0%	0.6%	0.1%	1.8%	1.9%	1.4%	5.8%	10.8%
B9a/B9b 0.4nmol/kg	0.0%	-1.6%	-6.0%	-7.9%	-9.5%	-10.3%	-11.0%	-12.6%	-11.0%	-12.1%	-12.6%	-8.4%	-4.0%
B9a/B9b 4nmol/kg	0.0%	-3.3%	-8.1%	-10.6%	-12.4%	-13.9%	-14.1%	-15.2%	-14.5%	-14.8%	-15.5%	-14.4%	-11.4%
B11a/B11b 0.4nmol/kg	0.0%	-1.1%	-6.4%	-7.4%	-9.2%	-9.9%	-11.0%	-11.4%	-10.8%	-10.6%	-10.7%	-7.9%	-4.5%
B11a/B11b 4nmol/kg	0.0%	-2.6%	-8.3%	-10.2%	-12.6%	-13.2%	-14.9%	-15.6%	-15.9%	-18.6%	-18.4%	-17.3%	-14.4%
B13a/B13b 0.4nmol/kg	0.0%	-1.1%	-6.0%	-8.2%	-9.9%	-12.2%	-13.2%	-14.5%	-15.9%	-17.1%	-17.9%	-18.4%	-15.5%
B13a/B13b 4nmol/kg	0.0%	-4.1%	-10.5%	-12.3%	-14.9%	-17.4%	-18.8%	-19.5%	-18.8%	-20.5%	-20.3%	-19.0%	-16.7%

sem	D0	D1	D6	D7	D8	D13	D14	D15	D20	D21	D22	D27	D35
媒介物	0.00%	0.48%	1.27%	1.14%	1.10%	1.10%	1.77%	1.48%	1.56%	1.68%	1.52%	1.77%	2.08%
B9a/B9b 0.4nmol/kg	0.00%	0.60%	1.25%	1.45%	1.86%	2.65%	2.63%	2.77%	3.46%	3.24%	3.58%	3.43%	4.22%
B9a/B9b 4nmol/kg	0.00%	0.58%	1.53%	1.13%	1.19%	1.85%	1.86%	2.09%	2.36%	2.52%	2.35%	3.01%	3.37%
B11a/B11b 0.4nmol/kg	0.00%	0.59%	0.89%	1.29%	1.19%	1.23%	1.32%	1.63%	2.39%	2.54%	2.77%	3.94%	5.16%
B11a/B11b 4nmol/kg	0.00%	0.86%	1.00%	1.00%	0.75%	1.83%	2.05%	2.25%	3.23%	2.68%	3.13%	4.34%	4.09%
B13a/B13b 0.4nmol/kg	0.00%	0.92%	1.82%	2.12%	1.98%	2.22%	2.35%	2.14%	2.46%	2.46%	2.55%	3.04%	3.97%
B13a/B13b 4nmol/kg	0.00%	0.44%	1.15%	1.22%	1.11%	1.93%	0.96%	1.04%	1.72%	1.13%	1.57%	2.24%	3.15%

未配对t-检验

	D0	D1	D6	D7	D8	D13	D14	D15	D20	D21	D22	D27	D35
媒介物													
B9a/B9b 0.4nmol/kg		**	***	***	**	**	**	**	**	**	**	**	*
B9a/B9b 4nmol/kg		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
B11a/B11b 0.4nmol/kg		**	***	***	***	***	***	***	***	***	**	*	*
B11a/B11b 4nmol/kg		**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
B13a/B13b 0.4nmol/kg		*	**	**	**	***	***	***	***	***	***	***	***
B13a/B13b 4nmol/kg		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

图9-0.4nmol/kg和4.0nmol/kg的(Fc/Fc)-GDF15分子的各时间点D10小鼠的体重减轻百分比(%)