



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112969477 B

(45) 授权公告日 2024.08.16

(21) 申请号 201980073436.4

(22) 申请日 2019.11.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112969477 A

(43) 申请公布日 2021.06.15

(30) 优先权数据
2018-209730 2018.11.07 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.05.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2019/043386 2019.11.06

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/095922 JA 2020.05.14

(73) 专利权人 第一三共株式会社
地址 日本东京都

(72) 发明人 西宫大祐 矢野秀法

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
专利代理师 甘霖 梅黎

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104136037 A, 2014.11.05

CN 105378075 A, 2016.03.02

WO 2006063055 A2, 2006.06.15

WO 2018117244 A1, 2018.06.28

tasaki t等.The mammalian N-end rule pathway: new insights into its components and physiological roles.trends in biochemical sciences.2007,第第32卷卷(第第11期期),第520-528页.

审查员 朱宁

权利要求书2页 说明书29页
序列表27页 附图20页

(54) 发明名称

改善肽的血液动力学的方法

(57) 摘要

提供了改善肽的血液动力学的方法。所述改善肽的血液动力学的方法包括制备具有经修饰的氨基酸序列的肽的步骤。

	SPINK2	Fc
--	--------	----

K51028-Fc(D0-K51028-Fc):	K51028	Fc
D1-K51028-Fc:	D K51028	Fc
D2-K51028-Fc:	DD K51028	Fc
D3-K51028-Fc:	DDD K51028	Fc
D4-K51028-Fc:	DDDD K51028	Fc
D5-K51028-Fc:	DDDDD K51028	Fc
K51028-D5-Fc:	K51028 DDDDD	Fc
E1-K51028-Fc:	E K51028	Fc
D1-K50055-Fc:	D K50055	Fc

1. 肽的缀合物,所述缀合物是以下(i)或(ii):
 - (i) 肽的缀合物,所述肽从氨基端至羧基端依次包含,1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸、SEQ ID NO:2所述的SPINK2变体肽的氨基酸序列和人IgG1、IgG2或IgG4P的Fc区的氨基酸序列;
 - (ii) 肽的缀合物,所述肽从氨基端至羧基端依次包含,1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸、人IgG1、IgG2或IgG4P的Fc区的氨基酸序列和SEQ ID NO:2所述的SPINK2变体肽的氨基酸序列;且其中(i)和(ii)中的所述1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸用于改善所述肽的血液动力学;且其中所述Fc区由SEQ ID NO:34、37或40所述的氨基酸序列的任一个表示。
2. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述SPINK2变体肽的氨基酸序列通过接头序列附接至所述Fc区的氨基酸序列。
3. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述SPINK2变体肽的氨基酸序列直接附接至所述Fc区的氨基酸序列。
4. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸通过接头序列附接至所述SPINK2变体肽的氨基酸序列或所述Fc区的氨基酸序列。
5. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸直接附接至所述SPINK2变体肽的氨基酸序列或所述Fc区的氨基酸序列。
6. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述Fc区是IgG2的。
7. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述Fc区是IgG4的。
8. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述Fc区是IgG1的。
9. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述Fc区是野生型或变体IgG1、IgG2或IgG4的。
10. 根据权利要求1所述的缀合物,其中与在氨基端缺乏1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸的缀合物相比,所述缀合物具有受抑制的血液浓度随时间下降或增加的血液暴露量。
11. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述缀合物结合人疾病相关的靶分子。
12. 包含根据权利要求1-11中的任一项所述的缀合物的组合物。
13. 根据权利要求1-11所述的缀合物,其中所述SPINK2变体肽遏制、抑制、激动或活化人疾病相关的靶分子的活性。
14. 包含根据权利要求13所述的缀合物的药物组合物。
15. 一种用于生产根据权利要求1所述的缀合物的方法,所述方法包括下述步骤(i)或(ii):
 - (i) 将1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸添加至含有SPINK2变体肽和免疫球蛋白的Fc区的融合体的氨基端;
 - (ii) 向细胞中引入包含氨基酸序列(c)的多核苷酸,所述氨基酸序列(c)含有在所述融合体中所含的氨基酸序列(a)和由1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸组成的氨基酸序列(b),其中氨基酸序列(b)位于氨基酸序列(a)的氨基端,培养所述细胞,和从培养物回收含有所述融合体的缀合物。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述Fc区位于SPINK2变体肽的羧基端。
17. 根据权利要求15所述的方法,其中所述Fc区位于SPINK2变体肽的氨基端。
18. 根据权利要求15所述的方法,其中所述Fc区通过接头与所述SPINK2变体肽融合,或

所述SPINK2变体肽的氨基酸序列通过接头序列附接至免疫球蛋白的Fc区的氨基酸序列。

19. 根据权利要求15所述的方法,其中所述Fc区与所述SPINK2变体肽直接融合,或所述SPINK2变体肽的氨基酸序列直接附接至免疫球蛋白的Fc区的氨基酸序列。

20. 根据权利要求15所述的方法,其中所述免疫球蛋白是IgG1、IgG2和/或IgG4的Fc区。

21. 根据权利要求15所述的方法,其中所述免疫球蛋白是人免疫球蛋白。

22. 根据权利要求15所述的方法,其中所述免疫球蛋白是人IgG1。

23. 根据权利要求15所述的方法,其中所述免疫球蛋白是野生型或变体。

24. 根据权利要求15所述的方法,其中与在氨基端缺乏1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸的缀合物相比,所述缀合物具有受抑制的血液浓度随时间下降或增加的血液暴露量。

25. 根据权利要求15所述的方法,其中所述1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸通过接头附接至融合体的氨基端,或由1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸组成的氨基酸序列通过接头序列附接至在所述融合体中所含的氨基酸序列的氨基端。

26. 根据权利要求15所述的方法,其中所述1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸直接附接至融合体的氨基端,或由1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸组成的氨基酸序列直接附接至在所述融合体中所含的氨基酸序列的氨基端。

27. 根据权利要求15所述的方法,其中所述SPINK2变体肽结合人疾病相关的靶分子。

28. 根据权利要求15-27中的任一项所述的方法,其中所述SPINK2变体肽遏制、抑制、激动或活化人疾病相关的靶分子的活性。

改善肽的血液动力学的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及改善肽或含肽缀合物的血液动力学的方法,具有改善的血液动力学的肽或含肽缀合物,含有具有改善的血液动力学的肽或含肽缀合物的药物组合物,等。

背景技术

[0002] 生物药剂诸如抗体药物和重组蛋白的研究和开发已经达到显著水平,食品和药品管理局(FDA)批准了超过200种生物药剂(非专利文献1)。这些的适应症已经扩展至多种疾病诸如癌症,自身免疫疾病,例如,类风湿性关节炎和多发性硬化,皮肤疾病,和神经性疼痛。近年来,由于蛋白质工程的进展,已经广泛尝试了重组蛋白诸如抗体片段和非抗体支架的开发。由于这些分子(就像抗体药物一样)对要靶向的蛋白X具有高结合活性,预见到,它们作为治疗剂的用途会导致高药物效力和低副作用。抗体药物的分子量是约150 kDa,而重组蛋白的分子量小至约5-50 kDa。重组蛋白和激素肽表现出高生物活性,但是它们在血液中的半衰期由于它们的小分子量而较短。为了维持低分子量蛋白和肽的活性较长的时间段,需要延长它们的血液半衰期的方案。

[0003] 一般而言,除了经由靶细胞的特异性消除途径以外,较高分子量蛋白在胞饮作用和受体介导的胞吞作用以后经历细胞内降解而从体内消除,而较低分子量蛋白和肽在肾中经历肾小球滤过或在重吸收过程中经历降解后从体内消除。已知的是,低分子量蛋白和肽的分子量、形状、电荷等对消除具有显著影响。因而,为了改善低分子量蛋白和肽的血液半衰期,考虑了增加它们的分子量或使它们结合血清蛋白的方案(非专利文献2)。增加低分子量蛋白和肽的分子量的方案的例子包括使它们结合聚乙二醇(PEG)、糖链、可生物降解的聚合物等的方案。使低分子量蛋白或肽结合血清蛋白的方案例子包括使它们与白蛋白或白蛋白-结合分子融合的方案。此外,与免疫球蛋白Fc区的结合也有效地延长它们的血液半衰期。除了分子量的量级以外,抗体表现出比其它蛋白更长的血液半衰期,因为即使当它们整合进血管内皮细胞等中时,它们也会表现出重复利用效应,其中它们的免疫球蛋白Fc部分通过结合在核内体中的胎儿Fc受体(FcRn)而泵出进入血液中(非专利文献3)。通过聚焦于Fc区的该特有性质,已经开发了Fc融合体作为低分子量蛋白和肽的血液半衰期延长工具。已经在每种修饰方法中报告了其向蛋白和肽的应用,且多种产品已经上市。

[0004] 预期低分子量蛋白或肽与Fc区的融合体具有延长的血液半衰期,但是在许多情况下,血液半衰期比IgG的血液半衰期更短,并且在改善血液暴露量方面仍有挑战(非专利文献4)。为了维持治疗剂的药物效力,需要改善Fc融合体的血液暴露量。以前已经报告了改善单克隆抗体和Fc融合体的血液半衰期或血液暴露量的方法。方法的例子包括通过改变抗体与FcRn的亲合力来改变血液半衰期的方法(非专利文献3和5)。在抗体和受体Fc融合体中,糖链向除了Fc区以外的部分(抗体中的可变区、受体Fc融合体中的受体部分)的添加会实现较高暴露(非专利文献3),但是该方法当应用于50-60 kDa或更小的较小蛋白时不是足够有效的。确定蛋白的电荷的方法的例子包括确定其等电点(pI)。当抗体具有高pI时,抗体是带正电荷的,因为体内的pH接近中性。所以,抗体更可能与带负电荷的细胞膜相互作用,从而

导致增加的向组织中的摄取和清除、以及减少的或降低的血液半衰期和血液暴露量。相反,已知的是,降低抗体的pI会导致它们的血液半衰期的延长(非专利文献3),但是未知这些方法可以应用于除了抗体以外的蛋白。作为另一个例子,已经报道,通过向N-乙酰基半乳糖胺-6-硫酸酯硫酸酯酶的N-端添加4-15个酸性氨基酸会改善在血液中的稳定性(专利文献1)。

[0005] 但是,没有证实已知方法对于不论分子量的任何蛋白是通用的。因而,常规地,在各种情况下需要改善血液半衰期或血液暴露的方法。

[0006] 丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal-2型 (SPINK2)是具有三个二硫键的Kazal-样结构域,并作为胰蛋白酶/胰凝乳蛋白酶抑制剂起作用(非专利文献6)。它的分子量小至7 kDa,且当将SPINK2或SPINK2变体施用给个体时,推测它快速地从体内消除。

[0007] 引文列表

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1: 日本专利号4750718 B2

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1: Usmani SS, 等人(2017) PLoS One, 12(7): e0181748

[0012] 非专利文献2: Strohl WR等人(2015), BioDrugs, 29(4): 第215-239页

[0013] 非专利文献3: Liu L等人(2018), Protein Cell 9(1): 第15-32页

[0014] 非专利文献4: Unverdorben F, 等人(2016) MAbs 8(1): 第120-128页

[0015] 非专利文献5: Saxena A, 等人(2016) Front Immunol.7: 580

[0016] 非专利文献6: Chen T, 等人(2009) Proteins 77(1): 第209-219页。

发明内容

[0017] 技术问题

[0018] 本发明的一个目的是,提供一种用于改善肽的血液动力学的方法。

[0019] 问题的解决方案

[0020] 本发明涉及以下:

[0021] (1) 肽的缀合物,所述缀合物是以下(i)或(ii):

[0022] (i) 肽的缀合物,所述肽从氨基端至羧基端依次包含,1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸、在所述肽中所含的氨基酸序列、和在免疫球蛋白的Fc区或其片段中所含的氨基酸序列;

[0023] (ii) 肽的缀合物,所述肽从氨基端至羧基端依次包含,1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸、在免疫球蛋白的Fc区或其片段中所含的氨基酸序列、和在所述肽中所含的氨基酸序列,

[0024] (2) 根据(1)的缀合物,其中所述肽是SPINK2变体肽,

[0025] (3) 根据(1)的缀合物,其中所述肽是抗体或其抗原结合片段,

[0026] (4) 根据(1)至(3)中的任一项的缀合物,其中在所述肽中所含的氨基酸序列通过接头序列附接至在所述Fc区或其片段中所含的氨基酸序列,

[0027] (5) 根据(1)至(3)中的任一项的缀合物,其中在所述肽中所含的氨基酸序列直接附接至在所述Fc区或其片段中所含的氨基酸序列,

[0028] (6) 根据(1)至(5)中的任一项的缀合物,其中所述1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸通过接头序列附接至在所述肽中所含的氨基酸序列或在所述Fc区或其片段中所含的氨基酸

序列,

[0029] (7) 根据(1)至(5)中的任一项的缀合物,其中所述1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸直接附接至在所述肽中所含的氨基酸序列或在所述Fc区或其片段中所含的氨基酸序列,

[0030] (8) 根据(1)至(7)中的任一项的缀合物,其中所述免疫球蛋白或其片段是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和/或IgE的Fc区或其片段,

[0031] (9) 根据(1)至(8)中的任一项的缀合物,其中所述免疫球蛋白是人免疫球蛋白,

[0032] (10) 根据(1)至(9)中的任一项的缀合物,其中所述免疫球蛋白是人IgG1,

[0033] (11) 根据(1)至(10)中的任一项的缀合物,其中所述免疫球蛋白是野生型或变体,

[0034] (12) 根据(1)至(11)中的任一项的缀合物,其中与在氨基端缺乏1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸的缀合物相比,所述缀合物具有受抑制的血液浓度随时间下降或增加的血液暴露量,

[0035] (13) 根据(1)至(12)中的任一项的缀合物,其中所述缀合物结合人疾病相关的靶分子,

[0036] (14) 根据(13)的缀合物,其中所述肽是SPINK2变体且在所述肽中所含的氨基酸序列由SEQ ID NO: 2 (图8)表示,

[0037] (15) 一种组合物,其包含根据(1)至(14)中的任一项的缀合物,

[0038] (16) 根据(1)至(13)的缀合物,其中所述肽遏制、抑制、拮抗或活化人疾病相关的靶分子的活性,

[0039] (17) 根据(16)的缀合物,其中所述肽是SPINK2变体且在所述肽中所含的氨基酸序列由SEQ ID NO: 2 (图8)表示,

[0040] (18) 一种药物组合物,其包含根据(16)或(17)的缀合物,

[0041] (19) 一种用于生产根据(1)的缀合物的方法,所述方法包括下述步骤(i)或(ii):

[0042] (i) 将1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸附接至含有所述肽和免疫球蛋白的Fc区或其片段的融合体的氨基端;

[0043] (ii) 向细胞中引入包含氨基酸序列(c)的多核苷酸,所述氨基酸序列(c)含有在所述融合体中所含的氨基酸序列(a)和由1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸组成的氨基酸序列(b),其中氨基酸序列(b)位于氨基酸序列(a)的氨基端,培养所述细胞,和从培养物回收含有所述融合体的缀合物,

[0044] (20) 根据(19)的方法,其中所述肽是SPINK2变体肽,

[0045] (21) 根据(19)的方法,其中所述肽是抗体或其抗原结合片段,

[0046] (22) 根据(19)至(21)中的任一项的方法,其中所述Fc区或其片段位于所述肽的羧基端,

[0047] (23) 根据(19)至(21)中的任一项的方法,其中所述Fc区或其片段位于SPINK2变体肽的氨基端,

[0048] (24) 根据(19)至(23)中的任一项的方法,其中所述Fc区或其片段通过接头与所述肽融合,或在所述肽中所含的氨基酸序列通过接头序列附接至在免疫球蛋白的Fc区或其片段中所含的氨基酸序列,

[0049] (25) 根据(19)至(23)中的任一项的方法,其中所述Fc区或其片段与所述肽直接

融合,或在所述肽中所含的氨基酸序列直接附接至在免疫球蛋白的Fc区或其片段中所含的氨基酸序列,

[0050] (26) 根据(19)至(25)中的任一项的方法,其中所述免疫球蛋白是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和/或IgE的Fc区或其片段,

[0051] (27) 根据(19)至(26)中的任一项的方法,其中所述免疫球蛋白是人免疫球蛋白,

[0052] (28) 根据(19)至(27)中的任一项的方法,其中所述免疫球蛋白是人IgG1,

[0053] (29) 根据(19)至(28)中的任一项的方法,其中所述免疫球蛋白是野生型或变体,

[0054] (30) 根据(19)至(29)中的任一项的方法,其中与在氨基端缺乏1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸的缀合物相比,所述缀合物具有受抑制的血液浓度随时间下降或增加的血液暴露量,

[0055] (31) 根据(19)至(30)中的任一项的方法,其中所述1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸通过接头附接至融合体的氨基端,或由1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸组成的氨基酸序列通过接头序列附接至在所述融合体中所含的氨基酸序列的氨基端,

[0056] (32) 根据(19)至(30)中的任一项的方法,其中所述1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸直接附接至融合体的氨基端,或由1-3个天冬氨酸和/或谷氨酸组成的氨基酸序列直接附接至在所述融合体中所含的氨基酸序列的氨基端,

[0057] (33) 根据(19)至(32)中的任一项的方法,其中所述肽结合人疾病相关的靶分子,

[0058] (34) 根据(19)至(33)中的任一项的方法,其中所述肽遏制、抑制、拮抗或活化人疾病相关的靶分子的活性,

[0059] (35) 根据(34)的方法,其中所述肽是SPINK2变体肽且在所述肽中所含的氨基酸序列由SEQ ID NO: 2 (图8)表示,

[0060] (1A) 一种用于抑制含有SPINK2变体肽的缀合物的血液浓度随时间下降和/或增加其血液暴露量的方法,所述方法包括以下步骤(i)或(ii):

[0061] (i) 将由一个至几个天冬氨酸和/或谷氨酸组成的寡肽附接至缀合物的氨基端,其中所述SPINK2变体肽融合至免疫球蛋白的Fc区或其片段;

[0062] (ii) 制备含有氨基酸序列的缀合物,其中一个至几个天冬氨酸和/或谷氨酸附接至含有在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列和在免疫球蛋白的Fc区或其片段中所含的氨基酸序列的氨基端,

[0063] (2A) 根据(1A)的方法,其中所述Fc区或其片段位于SPINK2变体肽的羧基端,

[0064] (3A) 根据(1A)的方法,其中所述Fc区或其片段位于SPINK2变体肽的氨基端,

[0065] (4A) 根据(1A)至(3A)中的任一项的方法,其中所述Fc区或其片段通过接头融合至SPINK2变体肽,或在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列通过接头序列附接至在免疫球蛋白的Fc区中所含的氨基酸序列,

[0066] (5A) 根据(1A)至(3A)中的任一项的方法,其中所述Fc区或其片段直接融合至SPINK2变体肽,或在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列直接添加至在免疫球蛋白的Fc区中所含的氨基酸序列,

[0067] (6A) 根据(1A)至(5A)中的任一项的方法,其中所述免疫球蛋白是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和/或IgE的Fc区或其片段,

[0068] (7A) 根据(1A)至(6A)中的任一项的方法,其中所述免疫球蛋白是人免疫球蛋白,

- [0069] (8A) 根据(1A)至(7A)中的任一项的方法,其中所述免疫球蛋白是人IgG1,
- [0070] (9A) 根据(1A)至(8A)中的任一项的方法,其中所述免疫球蛋白是野生型或变体,
- [0071] (10A) 根据(1A)至(9A)中的任一项的方法,其中
- [0072] 所述寡肽通过接头添加至在(i)中描述的缀合物的氨基端,或一个至几个天冬氨酸和/或谷氨酸通过接头序列添加至在(ii)中描述的含有在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列和在免疫球蛋白的Fc区或其片段中所含的氨基酸序列的氨基端,
- [0073] (11A) 根据(1A)至(9A)中的任一项的方法,其中
- [0074] 所述寡肽直接添加至在(i)中描述的缀合物的氨基端,或一个至几个天冬氨酸和/或谷氨酸直接添加至在(ii)中描述的含有在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列和在免疫球蛋白的Fc区或其片段中所含的氨基酸序列的氨基端,
- [0075] (12A) 根据(1A)至(11A)中的任一项的方法,其中所述SPINK2变体肽结合人疾病相关的靶分子,
- [0076] (13A) 根据(1A)至(12A)中的任一项的方法,其中所述SPINK2变体肽遏制或抑制人疾病相关的靶分子的活性,
- [0077] (14A) 根据(1A)至(13A)中的任一项的方法,其中在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列是根据以下(i)或(ii):
- [0078] (i) 由SEQ ID NO: 2 (图8)表示的氨基酸序列,且被包含在结合人疾病相关的靶分子或遏制或抑制所述分子的活性的肽中;
- [0079] (ii) 氨基酸序列,其含有与在(i)中描述的氨基酸序列具有90%或更多同一性的氨基酸序列,且被包含在结合所述分子或遏制或抑制所述分子的活性的肽中,
- [0080] (15A) SPINK2变体的缀合物,所述缀合物是以下(i)或(ii):
- [0081] (i) SPINK2变体的缀合物,所述肽从氨基端至羧基端依次包含,一个至几个天冬氨酸和/或谷氨酸、在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列、和在免疫球蛋白的Fc区或其片段中所含的氨基酸序列;
- [0082] (ii) SPINK2变体的缀合物,所述肽从氨基端至羧基端依次包含,一个至几个天冬氨酸和/或谷氨酸、在免疫球蛋白的Fc区或其片段中所含的氨基酸序列、和在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列,
- [0083] (16A) 根据(15A)的缀合物,其中在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列通过接头序列附接至在Fc区中所含的氨基酸序列,
- [0084] (17A) 根据(15A)的缀合物,其中在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列直接附接至在Fc区中所含的氨基酸序列,
- [0085] (18A) 根据(15A)至(17A)中的任一项的缀合物,其中所述一个至几个天冬氨酸和/或谷氨酸通过接头序列附接至在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列或在Fc区中所含的氨基酸序列,
- [0086] (19A) 根据(15A)至(17A)中的任一项的缀合物,其中所述一个至几个天冬氨酸和/或谷氨酸直接附接至在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列或在Fc区中所含的氨基酸序列,
- [0087] (20A) 根据(15A)至(19A)中的任一项的缀合物,其中所述免疫球蛋白是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和/或IgE的Fc区或其片段,

- [0088] (21A) 根据(15A)至(20A)中的任一项的缀合物,其中所述免疫球蛋白是人免疫球蛋白,
- [0089] (22A) 根据(15A)至(21A)中的任一项的缀合物,其中所述免疫球蛋白是人IgG1,
- [0090] (23A) 根据(15A)至(22A)中的任一项的方法,其中所述免疫球蛋白是野生型或变体,
- [0091] (24A) 根据(15A)至(23A)中的任一项的缀合物,其中与在氨基端缺乏一个至几个天冬氨酸和/或谷氨酸的缀合物相比,所述缀合物具有受抑制的血液浓度随时间下降或增加的血液暴露量,
- [0092] (25A) 根据(15A)至(24A)中的任一项的缀合物,其中所述SPINK2变体肽结合人疾病相关的靶分子,
- [0093] (26A) 根据(15A)至(25A)中的任一项的缀合物,其中所述SPINK2变体肽遏制或抑制人疾病相关的靶分子的活性,
- [0094] (27A) 根据(15A)至(26A)中的任一项的缀合物,其中在SPINK2变体肽中所含的氨基酸序列是根据以下(i)或(ii):
- [0095] (i) 由SEQ ID NO: 2 (图8)表示的氨基酸序列,且被包含在结合人疾病相关的靶分子或遏制或抑制所述分子的活性的肽中;
- [0096] (ii) 氨基酸序列,其含有与在(i)中描述的氨基酸序列具有90%或更多同一性的氨基酸序列,且被包含在结合所述分子或遏制或抑制所述分子的活性的肽中,
- [0097] (28A) 一种组合物,其包含根据(15A)至(27A)中的任一项的缀合物,和
- [0098] (29A) 一种药物组合物,其包含根据(25A)至(27A)中的任一项的缀合物,
- [0099] 等。
- [0100] 发明的有利效果
- [0101] 由本发明提供的血液动力学改善方法会实现肽或含肽缀合物的血液浓度随时间下降的抑制、血液暴露量的增加等。含有所述肽或所述缀合物的药物可以适当地用于治疗或预防各种疾病。

附图说明

- [0102] [图1] 图1显示了进行PK试验的SPINK2-Fc融合体。
- [0103] [图2] 图2的图显示了使用肽底物的降解速率作为指标,KLK5抑制性肽Fc融合体的KLK5抑制活性(50%抑制浓度: IC_{50})。为了评价KLK5抑制活性,使用了20 nM终浓度的KLK5和100 μ M终浓度的Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011)。甚至当基于K51028-Fc而(A)添加1-5个Asp或(B)添加Asp或Glu时,KLK5抑制活性没有变化。
- [0104] [图3] 图3是给C57BL/6J小鼠静脉内施用5 mg/kg K51028-Fc后血浆中的K51028-Fc浓度测量随时间的图。用生物素-标记的抗-SPINK2抗体(Atlas Antibodies)、DyLight650-标记的抗-SPINK2抗体6D8 (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED)和Gyrolab xP Workstation (GYROS PROTEIN Technologies)测量血浆中的K51028-Fc浓度直到(A)施用后1周或(B)施用后24小时。
- [0105] [图4] 图4表明,Asp或Glu向K51028-Fc的添加导致SPINK2-Fc融合体的血液动力学的改善。将5 mg/kg试验物静脉内地施用给C57BL/6J小鼠,并测量血浆中的试验物的浓度

直到施用后24小时。试验物是K51028-Fc、D1-K51028-Fc或E1-K51028-Fc。在试验物浓度的测量中,使用生物素-标记的抗-SPINK2抗体、DyLight650-标记的抗-SPINK2抗体6D8和Gyrolab xP Workstation。

[0106] [图5] 图5表明,与K51028-Fc一样,Asp向K50055-Fc的添加改善了SPINK2-Fc融合体的血液动力学。

[0107] [图6] 图6显示了对于改善基于K51028-Fc的SPINK2-Fc融合体的血液动力学而言有效的Asp添加数目的优化。1-5的Asp添加数目都表现出改善效应,且3的Asp添加数目表现出最高效应。

[0108] [图7] 图7显示了人SPINK2的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)。

[0109] [图8] 图8显示了SPINK2变体肽的通式(SEQ ID NO: 2)。

[0110] [图9] 图9显示了人KLK5的氨基酸序列(SEQ ID NO: 3)。

[0111] [图10] 图10显示了KLK5抑制性肽K50055的氨基酸序列(SEQ ID NO: 4)。

[0112] [图11] 图11显示了KLK5抑制性肽K51028的氨基酸序列(SEQ ID NO: 5)。

[0113] [图12] 图12显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D0-K51028-Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 6)。

[0114] [图13] 图13显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K51028-Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 7)。

[0115] [图14] 图14显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D2-K51028-Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 8)。

[0116] [图15] 图15显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D3-K51028-Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 9)。

[0117] [图16] 图16显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D4-K51028-Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 10)。

[0118] [图17] 图17显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D5-K51028-Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 11)。

[0119] [图18] 图18显示了KLK5抑制性肽Fc融合体K51028-D5-Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 12)。

[0120] [图19] 图19显示了KLK5抑制性肽Fc融合体E1-K51028-Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 13)。

[0121] [图20] 图20显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K50055-Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO: 14)。

[0122] [图21] 图21显示了引物1的核苷酸序列(SEQ ID NO: 15)。

[0123] [图22] 图22显示了引物2的核苷酸序列(SEQ ID NO: 16)。

[0124] [图23] 图23显示了引物3的核苷酸序列(SEQ ID NO: 17)。

[0125] [图24] 图24显示了引物4的核苷酸序列(SEQ ID NO: 18)。

[0126] [图25] 图25显示了引物5的核苷酸序列(SEQ ID NO: 19)。

[0127] [图26] 图26显示了引物6的核苷酸序列(SEQ ID NO: 20)。

[0128] [图27] 图27显示了引物7的核苷酸序列(SEQ ID NO: 21)。

[0129] [图28] 图28显示了引物8的核苷酸序列(SEQ ID NO: 22)。

- [0130] [图29] 图29显示了引物9的核苷酸序列(SEQ ID NO: 23)。
- [0131] [图30] 图30显示了引物10的核苷酸序列(SEQ ID NO: 24)。
- [0132] [图31] 图31显示了引物11的核苷酸序列(SEQ ID NO: 25)。
- [0133] [图32] 图32显示了引物12的核苷酸序列(SEQ ID NO: 26)。
- [0134] [图33] 图33显示了引物13的核苷酸序列(SEQ ID NO: 27)。
- [0135] [图34] 图34显示了引物14的核苷酸序列(SEQ ID NO: 28)。
- [0136] [图35] 图35显示了引物15的核苷酸序列(SEQ ID NO: 29)。
- [0137] [图36] 图36显示了引物16的核苷酸序列(SEQ ID NO: 30)。
- [0138] [图37] 图37显示了引物17的核苷酸序列(SEQ ID NO: 31)。
- [0139] [图38] 图38显示了引物18的核苷酸序列(SEQ ID NO: 32)。
- [0140] [图39] 图39显示了引物19的核苷酸序列(SEQ ID NO: 33)。
- [0141] [图40] 图40显示了人IgG1的Fc区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 34)。
- [0142] [图41] 图41显示了引物20的核苷酸序列(SEQ ID NO: 35)。
- [0143] [图42] 图42显示了引物21的核苷酸序列(SEQ ID NO: 36)。
- [0144] [图43] 图43显示了人IgG2的Fc区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 37)。
- [0145] [图44] 图44显示了引物22的核苷酸序列(SEQ ID NO: 38)。
- [0146] [图45] 图45显示了引物23的核苷酸序列(SEQ ID NO: 39)。
- [0147] [图46] 图46显示了人IgG4P的Fc区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 40)。
- [0148] [图47] 图47显示了引物24的核苷酸序列(SEQ ID NO: 41)。
- [0149] [图48] 图48显示了引物25的核苷酸序列(SEQ ID NO: 42)。
- [0150] [图49] 图49显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D0-K51028-Fc (IgG2)的氨基酸序列(SEQ ID NO: 43)。
- [0151] [图50] 图50显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K51028-Fc (IgG2)的氨基酸序列(SEQ ID NO: 44)。
- [0152] [图51] 图51显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D3-K51028-Fc (IgG2)的氨基酸序列(SEQ ID NO: 45)。
- [0153] [图52] 图52显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D0-K51028-Fc (IgG4P)的氨基酸序列(SEQ ID NO: 46)。
- [0154] [图53] 图53显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K51028-Fc (IgG4P)的氨基酸序列(SEQ ID NO: 47)。
- [0155] [图54] 图54显示了KLK5抑制性肽Fc融合体D3-K51028-Fc (IgG4P)的氨基酸序列(SEQ ID NO: 48)。
- [0156] [图55] 图55显示了使用肽底物的降解速率作为指标, KLK5抑制性肽Fc (IgG2, IgG4P)融合体的KLK5抑制活性(50%抑制浓度: IC_{50})。为了评价KLK5抑制活性, 使用了20 nM终浓度的KLK5和100 μ M终浓度的底物肽Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011)。甚至当(A)基于D0-K51028-Fc (IgG2)而添加1或3个Asp或(B)基于基于D0-K51028-Fc (IgG4P)而添加1或3个Asp时, KLK5抑制活性没有变化。
- [0157] [图56] 图56表明, 1个或多个Asp向D0-K51028-Fc (IgG2)的添加改善了SPINK2-Fc (IgG2)融合体的血液动力学。将5 mg/kg D0-K51028-Fc (IgG2)、D1-K51028-Fc (IgG2)

或D3-K51028-Fc (IgG2) 静脉内地施用给C57BL/6J小鼠,并测量在血浆中的D0-K51028-Fc (IgG2)、D1-K51028-Fc (IgG2)或D3-K51028-Fc (IgG2)的浓度直到施用后24小时。在测量浓度时,使用生物素-标记的抗-SPINK2抗体、DyLight650-标记的抗-SPINK2抗体6D8和Gyrolab xP Workstation。

[0158] [图57] 图57表明,与D0-K51028-Fc (IgG2)一样,Asp向D0-K51028-Fc (IgG4P)的添加也改善了SPINK2-Fc (IgG4P)融合体的血液动力学。

[0159] 实施方案的描述

[0160] 1. 定义

[0161] 在本发明中,术语“基因”是指含有编码在蛋白中所含的氨基酸序列的核苷酸序列的核酸分子或其互补链,并且由一条链、两条链或三条或更多条链组成。“基因”也指DNA链和RNA链的复合物,在一条链中的核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的混合物,以及两条或三条或更多条链(包括这样的链)的核酸分子。

[0162] 在本发明中,术语“基因”、“多核苷酸”和“核酸分子”具有相同的含义,并且完全不受它们的构成单元(诸如核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、核苷酸和核苷)的数目限制。在所述术语的范围内也包括DNA、RNA、mRNA、cDNA、cRNA、探针、寡核苷酸、引物等。“核酸分子”有时缩写为“核酸”。

[0163] 在本发明中,术语“多肽”、“肽”和“蛋白”具有相同的含义。

[0164] 在本发明中,识别或结合靶分子X的肽(在下文中,其识别或结合作用被统称为“X结合活性”)可以被称作“X结合肽”。此外,识别或结合靶分子X、并且抑制或遏制靶分子X的一种或两种或更多种活性或功能的肽(在下文中,其抑制或遏制作用被统称为“X抑制活性”)可以被称作“X抑制肽”。

[0165] 在本发明中,术语“SPINK2”是指丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal-2型,其为具有三个二硫键的、由Kazal-样结构域组成的7 kDa蛋白。优选的SPINK2是从人衍生出的SPINK2。在本发明中,人SPINK2 (SEQ ID NO: 1, 图7)被简称作“SPINK2”,除非另外指出。

[0166] 在本发明中,肽所结合的“位点”,换言之,肽所识别的“位点”,是指肽所结合或肽所识别的靶分子上的连续的或间断的部分氨基酸序列或部分更高级结构。在本发明中,这样的位点可以被称作在靶分子上的表位或结合位点。

[0167] 在本发明中,术语“细胞”包括从单一动物、传代培养的细胞、原代培养的细胞、细胞系和重组细胞、酵母、微生物等衍生出的各种细胞。

[0168] 在本发明中,术语“SPINK2变体”是具有特定氨基酸序列的肽,在所述特定氨基酸序列中,一个或两个或更多个氨基酸被不同于野生型的氨基酸置换,一个或两个或更多个氨基酸从野生型中缺失,或一个或两个或更多个非野生型氨基酸插入(在下文中被统称为“突变”)在野生型SPINK2的氨基酸序列中。

[0169] 在本发明中,在“一个至几个”中的术语“几个”表示3-10。

[0170] 在本发明中,术语“在严谨条件下杂交”是指在以下条件下杂交(或在与其等同的条件下):在含有5 x SSC的溶液中进行杂交,然后分别在含有2 x SSC-0.1%SDS的水溶液中进行65°C洗涤20分钟,在含有0.5 x SSC-0.1%SDS的水溶液中进行65°C洗涤20分钟,和在含有0.2 x SSC-0.1%SDS的水溶液中进行65°C洗涤20分钟。SSC代表150 mM NaCl-15 mM柠檬酸钠的水溶液,且n x SSC是指n倍浓度SSC。

[0171] 术语“特异性的”和“特异性”在本发明中分别与“选择性的”和“选择性”同义,且它们是可互换的。

[0172] 术语“血液动力学”表示在血液循环中的药代动力学,也就是说,施用给个体的药物随时间在血液循环中的动力学(诸如摄取和分布)和从血液循环的消除(诸如代谢和排泄),并且使用血液药物浓度随时间的变化(PK)、血液暴露量(AUC)、药物消除半衰期($t_{1/2}$)、最大血液药物浓度(C_{max})、达到最大血液浓度的时间(t_{max})等作为指标进行评价。

[0173] 术语“血液暴露量”是指通过血液浓度-时间曲线下的面积表达在特定时间的血液药物浓度的数值。

[0174] 术语“血液动力学改善”是指血液药物浓度随时间的下降的遏制,PK的延长,AUC的增加, $t_{1/2}$ 的延长, C_{max} 的增加,和/或 t_{max} 的缩短。

[0175] 2. 肽

[0176] 2-1. 氨基酸

[0177] 术语“氨基酸”是含有氨基和羧基的有机化合物,并且它优选地是指作为构成单元在蛋白中、更优选地在天然蛋白中所包含的 α -氨基酸。在本发明中,多种优选的氨基酸是Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr和Val。术语“氨基酸”是指这些共20种氨基酸,除非另外指出。那些共20种氨基酸可以被称作“天然氨基酸”。

[0178] 在本发明中,术语“氨基酸残基”有时缩写为“氨基酸”。

[0179] 在本发明中,氨基酸是L-氨基酸、D-氨基酸、或这些的混合物(DL-氨基酸),但是除非另外指出,氨基酸是指L-氨基酸。

[0180] 基于它们的共同侧链的性质,可以将天然氨基酸分类为例如以下组。

[0181] (1) 疏水氨基酸组:Met、Ala、Val、Leu、Ile

[0182] (2) 中性亲水氨基酸组:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln

[0183] (3) 酸性氨基酸组:Asp、Glu

[0184] (4) 碱性氨基酸组:His、Lys、Arg

[0185] (5) 具有主链取向效应的氨基酸组: Gly、Pro

[0186] (6) 芳族氨基酸组:Trp、Tyr、Phe

[0187] 但是,天然氨基酸的分类不限于这些。

[0188] 在本发明中,天然氨基酸可以经历保守氨基酸置换。

[0189] 术语“保守氨基酸置换”是指用功能上等同或类似的氨基酸置换。肽中的保守氨基酸置换导致肽的氨基酸序列的静态变化。例如,具有相似极性的一个或两个或更多个氨基酸在功能上等同地起作用,因而保守氨基酸置换导致肽的氨基酸序列中的静态变化。一般而言,组内氨基酸的置换可以视作在结构和功能上保守的。但是,本领域技术人员会明白,特定氨基酸残基所起的作用可以在含有该氨基酸的分子的三维结构中确定。例如,半胱氨酸残基可以呈氧化(二硫化物)形式,其具有与还原(硫醇)形式相比更少的极性。精氨酸侧链的长脂族部分可以构成在结构上和和功能上重要的特征。含有芳族环的侧链(色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)还可以促进离子-芳族相互作用或阳离子- π 相互作用。在这样的情况下,即使具有这些侧链的氨基酸被属于酸性或非极性组的氨基酸置换,它们可以在结构上和和功能上是保守的。残基诸如脯氨酸、甘氨酸和半胱氨酸(二硫化物形式)可以对主链构象具有

直接影响,因而它们经常不可在没有结构扭曲的情况下被置换。

[0190] 保守氨基酸置换包括如下所示的基于侧链相似性的特定置换(L. Lehninger, Biochemistry, 修订第2版, 第73-75页, Worth Publisher, New York (1975))和其它典型置换。

[0191] (1) 非极性氨基酸组: 丙氨酸(在下文中被称作“Ala”或简称“A”)、缬氨酸(在下文中被称作“Val”或简称“V”)、亮氨酸(在下文中被称作“Leu”或简称“L”)、异亮氨酸(在下文中被称作“Ile”或简称“I”)、脯氨酸(在下文中被称作“Pro”或简称“P”)、苯丙氨酸(在下文中被称作“Phe”或简称“F”)、色氨酸(在下文中被称作“Trp”或简称“W”)和甲硫氨酸(在下文中被称作“Met”或简称“M”);

[0192] (2) 不带电荷的极性氨基酸组: 甘氨酸(在下文中被称作“Gly”或简称“G”)、丝氨酸(在下文中被称作“Ser”或简称“S”)、苏氨酸(在下文中被称作“Thr”或简称“T”)、半胱氨酸(在下文中被称作“Cys”或简称“C”)、酪氨酸(在下文中被称作“Tyr”或简称“Y”)、天冬酰胺(在下文中被称作“Asn”或简称“N”)和谷氨酰胺(在下文中被称作“Gln”或简称“Q”);

[0193] (3) 酸性氨基酸组: 天冬氨酸(在下文中被称作“Asp”或简称“D”)和谷氨酸(在下文中被称作“Glu”或简称“E”);

[0194] (4) 碱性氨基酸组: 赖氨酸(在下文中被称作“Lys”或简称“K”)、精氨酸(在下文中被称作“Arg”或简称“R”)和组氨酸(在下文中被称作“His”或简称“H”)。

[0195] 在本发明中,氨基酸可以是除了天然氨基酸以外的氨基酸。这样的氨基酸的例子可以包括硒代半胱氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、吡咯烷、焦谷氨酸、胱氨酸、羟脯氨酸、羟赖氨酸、甲状腺素、O-磷酸丝氨酸、锁链素、 β -丙氨酸、肌氨酸、鸟氨酸、肌酸、 γ -氨基丁酸、opain、茶氨酸、tricolominic acid、红藻氨酸、软骨藻酸和achromeic acid,其在天然的肽和蛋白中找到。其它例子可以包括N-端保护的氨基酸诸如正亮氨酸、Ac-氨基酸、Boc-氨基酸、Fmoc-氨基酸、Trt-氨基酸和Z-氨基酸;C-端保护的氨基酸诸如氨基酸的叔丁酯、苄酯、环己酯和苄酯;以及在自然界中未发现的其它氨基酸,包括二胺、 ω -氨基酸、 β -氨基酸、 γ -氨基酸,氨基酸的Tic衍生物和氨基磷酸。不限于这些,为了方便起见,除了上述20种“天然氨基酸”以外的氨基酸在本发明中被统称为“非天然氨基酸”。

[0196] 2-2. 肽

[0197] 本文中使用的肽没有特别限制,只要它是任何肽的野生型、变体或修饰形式、人工设计的肽等,但是优选地是结合、活化、促进、遏制或抑制靶分子的活性和/或拮抗或激动靶分子的肽。一种更优选的肽是SPINK2变体。

[0198] 在本发明中,术语“靶分子”是指本发明的肽与其结合的、在人或非人动物个体中的内源性物质或可以掺入活体中的外源物质。当所述肽是SPINK2变体时,本发明的靶分子优选地是除了胰蛋白酶和/或顶体蛋白以外的分子,它们是SPINK2的内源性靶标,更优选除了胰蛋白酶以外的分子,甚至更优选除了来自人的胰蛋白酶以外的来自人的分子。更优选地,它是内源性或外源性酶、受体、受体的配体、液体因子诸如细胞因子、其它生物大分子、信号转换器、细胞、病原体或毒素、或从这些中的任意一种或多种衍生出的物质,例如,片段、降解产物、代谢物、加工产物等,其可以直接地或间接地参与人个体可能遭受的疾病的发展或进展,或其与这样的疾病相关或负相关(在下文中被称作“疾病相关的靶分子”)。在本发明的一个实施方案中,一种优选的靶分子是除了胰蛋白酶和/或顶体蛋白以外的蛋白

酶,更优选除了胰蛋白酶以外的蛋白酶。这样的蛋白酶优选地是疾病相关的靶分子。

[0199] 使用结合靶分子的活性、活化、促进、遏制或抑制靶分子的活性、和/或拮抗或激动靶分子的活性(被统称为“对靶分子的活性”)作为指标,通过进行本领域技术人员众所周知的筛选方法(WO2014/024914A1, WO2018/117244A1),可以从肽文库中鉴别或浓缩结合和/或活化、促进或遏制靶分子的活性和/或拮抗或激动靶分子的肽。用本领域已知的序列可以确定鉴别或浓缩的肽的氨基酸序列。通过重组、化学合成或体外翻译,可以制备确定了氨基酸序列的肽。

[0200] 疾病相关的靶分子的例子可以包括、但不限于胰凝乳蛋白酶、激肽释放酶、EGFR、HER2、KLK1、KLK4、KLK5、KLK8、HTRA1和MMP-9。

[0201] 对疾病相关的靶分子具有活性的SPINK2变体肽的例子可以包括、但不限于:胰凝乳蛋白酶结合肽(WO2014/024914A1);激肽释放酶结合肽、EGFR结合肽和HER2结合肽(WO2014/024914A1);K50055 (SEQ ID NO: 4, 图10)和K51028 (SEQ ID NO: 5, 图11),它们是抑制人KLK5的蛋白酶活性的肽(在下文中被称作“KLK5抑制性肽”);HTRA1抑制性肽(WO2018/117244A1);MMP-9结合肽(WO2019/017338A1);和KLK1抑制性肽、KLK4抑制性肽和/或KLK8抑制性肽(WO2019/049933A1)。

[0202] KLK5是表现出胰蛋白酶-样蛋白酶活性的蛋白,其由N-端前肽和蛋白酶催化结构域组成,且具有三个N-型糖链添加。KLK5优选地是人KLK5 (SEQ ID NO: 3, 图9)。KLK5抑制剂可用于治疗和/或预防内瑟顿综合征、特应性皮炎、红斑痤疮、由紫外辐射引起的皮肤损伤、银屑病、哮喘、脊髓损伤、癌症、巴雷特食管等。应当指出,K51028也抑制人KLK7的蛋白酶活性(数据未显示)。

[0203] 对疾病相关的靶分子具有活性的SPINK2变体具有优点,因为它具有比其它生物大分子(诸如在本领域中用作药物和诊断剂的抗体)更小的分子量;它的产生是相对容易的;它在物理性能诸如贮存稳定性和热稳定性方面是优秀的;和当用在药物组合物中时它在施用途径、施用方法、制剂等方面具有宽选择。SPINK2变体肽的分子量小于10,000,优选地小于8,000,更优选约7,000-7,200。由SEQ ID NO: 2 (图8)的Cys15至Cys31组成的可变环部分或由Cys15至Cys63组成的肽片段(在下文中被称作“含有6个Cys的部分”)被包括在本发明的肽的范围内。可变环部分的分子量小于2,500,优选约1,800-2,000,且含有6个Cys的部分的分子量小于6,000,优选约5,300-5,500。当在药物组合物中使用所述肽时,通过用已知方法(诸如添加生物大分子或聚合物)增加本发明的肽的分子量,也可能将肽的血液半衰期调整得更长。

[0204] 在本发明中,术语“突变的”是指,与天然存在的核酸分子或肽相比,已经在核苷酸序列或氨基酸序列中做出的一个或两个或更多个核苷酸或核苷酸残基或氨基酸或氨基酸残基的置换、缺失或插入。与人SPINK2的氨基酸序列相比,本发明的SPINK2变体的氨基酸序列具有一个或两个或更多个突变的氨基酸或氨基酸残基。

[0205] 在本发明的一个实施方案中,SPINK2变体的氨基酸序列是这样的序列,其中,在人SPINK2的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1, 图7)中,

[0206] Ser16至Gly22的1、2、3、4、5、6或7个氨基酸用其它氨基酸或氨基酸残基置换;且

[0207] Pro24至Asn28的1、2、3、4或5个氨基酸用其它氨基酸或氨基酸残基置换;且Cys15、Cys23、Cys31、Cys42、Cys45和Cys63优选地是如在野生型中的Cys,以便维持天然的二硫键,

但它们中的1、2、3、4、5或6个可以用其它氨基酸替换以便消除天然的二硫键或产生非天然的二硫键。在SPINK2变体中,将Cys残基维持在与天然类型相同的6个位置,因而维持二硫键。在这样的肽的某些更优选的实施方案中,优选的是,Cys15-Cys45、Cys23-Cys42和Cys31-Cys63分别形成二硫键,且由下述内容组成的构象得到维持以达到可以实现对靶分子的活性的程度:由Ser16至Val130组成的环结构,由Cys31和Gly32组成的 β 链(1)和由Ile57至Arg59组成的 β 链(2)所组成的 β 折叠,由Glu41至Gly51组成的 α 螺旋,或与在野生型SPINK2的氨基酸序列中所含的那些类似或至少部分地对应(或与其位置对应)的环结构、 β 折叠、 α 螺旋等。

[0208] 3. 变化或突变向肽中的引入

[0209] 肽(或缀合物:下面描述)的变体,其中在本发明的肽(或缀合物)的氨基酸序列中缺失、置换、添加或插入一个或两个或更多个(例如,一个至几个)氨基酸,和包含与原始肽(或缀合物)的氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、98%或99%或更多同一性的氨基酸序列的肽(或缀合物)的变体也被包括在本发明的肽(或缀合物)的范围内,且优选的肽(或缀合物)变体维持原始肽(或缀合物)对靶分子的活性的一部分或全部。

[0210] 在本发明的肽的氨基端和/或羧基端具有一个或两个或更多个(例如,一个至几个)氨基酸置换、添加和/或缺失并维持原始肽对靶分子的活性的一部分或全部的肽也被包括在本发明的肽的范围内。

[0211] 在本发明的SPINK2变体的氨基酸序列中,除了SEQ ID NO: 2 (图8)的 X_1 至 X_{12} 以外的部分,即,在野生型人SPINK2 (SEQ ID NO: 1, 图7)的氨基酸序列中的Pro2至Cys15、Cys23和Pro29至Cys63的位置可以包括天然存在的氨基酸或突变的氨基酸或氨基酸序列。例如,SPINK2变体可以在任何一个或两个或更多个(例如,一个至几个)位置发生突变,只要所述突变不会完全地阻碍或干扰对靶分子的活性或其折叠。使用本领域技术人员已知的标准方法可以产生这样的突变。在氨基酸序列中的典型突变可以包括一个或两个或更多个(例如,一个至几个)氨基酸的置换、缺失或插入,且置换的例子可以包括保守置换。使用保守置换,某个氨基酸残基被不仅在体积而且在极性方面具有类似化学特征的另一个氨基酸残基置换。在说明书其它地方描述了保守置换的例子。同时,在除了 X_1 至 X_{12} 以外的部分中可以允许一个或两个或更多个(例如,一个至几个)氨基酸的非保守置换,只要所述置换不会完全地阻碍或干扰对靶分子的活性或折叠。

[0212] 因此,本发明的血液动力学改善方法可以向其应用的肽或缀合物(下面描述)中所含的肽所具有的氨基酸序列可以是以下任一种:(a1)由SEQ ID NO: 2 (图8)组成的氨基酸序列所组成的氨基酸序列;(a2)氨基酸序列,其在由SEQ ID NO: 2 (图8)组成的氨基酸序列中具有1-20、1-15、1-10、1-8、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2或1个氨基酸置换、缺失、添加和/或插入,且被包含在特定肽中,所述特定肽维持含有在(a1)中描述的氨基酸序列的肽对靶分子的活性的一些或全部;(a3)由特定核苷酸序列编码的氨基酸序列,所述特定核苷酸序列在严谨条件下与编码由SEQ ID NO: 2 (图8)组成的氨基酸序列的核苷酸序列的互补核苷酸序列杂交,并且编码在特定肽中所含的氨基酸序列,所述特定肽维持含有在(a1)中描述的氨基酸序列的肽对靶分子的活性的一些或全部;和(a4)氨基酸序列,其与由SEQ ID NO: 2 (图8)组成的氨基酸序列具有60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%或99%或更多同一性,且被包含在特定肽中,所述特定肽维持含有在(a1)中描述的氨基酸序列的肽对靶

分子的活性的一些或全部,但是在肽或缀合物中所含的氨基酸序列不限于这些。

[0213] 可以将突变引入肽中,以便改善折叠稳定性、热稳定性、贮存稳定性、水溶性、生物活性、药理学活性、副作用等。例如,通过突变可以引入新反应基团诸如Cys以与聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、生物素等缀合。

[0214] 4. 含有肽的缀合物

[0215] 在本发明中,所述肽可以与另一个部分融合、与另一个部分缀合或添加至另一个部分,且这样的融合、缀合或添加的形式被称作“肽的缀合物”。在本发明中,“缀合物”是指这样的分子:其中肽或其片段结合至另一个部分。“缀合物”或“缀合”包括这样的形式,其中肽如下与某个部分缀合或结合:通过化学物质诸如交联剂,或通过适合连接至氨基酸的侧链的试剂,或通过肽的N-端和/或C-端的合成化学或基因工程技术。用于改善血液半衰期的这样的“部分”的例子可以包括:聚亚烷基二醇分子诸如聚乙二醇(PEG);脂肪酸分子诸如羟乙基淀粉或棕榈酸;免疫球蛋白的Fc区;免疫球蛋白的CH3结构域;免疫球蛋白的CH4结构域;白蛋白或其片段;白蛋白-结合肽;白蛋白-结合蛋白诸如链球菌蛋白G;和转铁蛋白。作为“部分”的另一个例子,这样的“部分”可以通过接头(诸如肽接头)连接至本发明的肽。

[0216] 在本发明的一个实施方案中,缀合物是SPINK2变体肽与抗体的Fc区或其片段的融合体。抗体的起源的例子可以包括人和非人动物诸如啮齿类动物,例如,小鼠、大鼠和兔;其它哺乳动物,例如,牛、猪、狗、食蟹猴和恒河猴;和禽类,例如,鸡,且优选地是人。抗体的例子可以包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE,且优选地是IgG1。更优选地,缀合物是本发明的肽与人IgG1的Fc区或其片段的融合体。本发明的肽与抗体的Fc区或其片段的融合体有时被称作“Fc融合体”或“Fc缀合物”,且它们是同义的。

[0217] 人IgG1的Fc区的例子可以包括、但不限于含有由SEQ ID NO: 34 (图40)表示的氨基酸序列或其片段或者由其组成的那些。抗体的Fc区或其片段可以是野生型或变体。

[0218] 通过置换抗体的Fc区中的氨基酸残基的一部分,可能调节效应子功能(参见W088/007089、W094/28027、W094/29351)。具有减弱的效应子功能的这样的IgG1变体的例子包括IgG1 LALA (IgG1-L234A, L235A)和IgG1 LAGA (IgG1-L235A, G237A)。在5种类型的人IgG亚类中,人IgG2在通过补体结合或抗体依赖性的细胞毒性活性的效应子功能(诸如CDC活性)中是非常弱的(Bruggemann等人, J. Exp. Med., 1351-1361, 1987)。在5种类型的人IgG亚类中,人IgG4在通过补体结合或抗体依赖性的细胞毒性活性的效应子功能(诸如CDC活性)中是非常弱的(Bruggemann等人, J. Exp. Med., 1351-1361, 1987)。当使用IgG4时,通过置换恒定区中的氨基酸残基的一部分,可能抑制IgG4-特异性的片段化并延长半衰期(Mol. Immunol., 30, 105-108, 1993)。IgG4变体的例子包括IgG4P (IgG4-S241P)和IgG4P FALA (IgG4-S241P, F234A, L235A)。人IgG4P表示这样的变体:其中人IgG4的第241个丝氨酸残基(其通过H链之间的结合而参与H2L2四聚体形成)被脯氨酸置换以具有与人IgG1和人IgG2类似的序列,由此具有受抑制的H2L2四聚体形成和增加的在血液中的稳定性(Angal等人, Mol. Immunol., 30, 105-108, 1993)。通过用丙氨酸置换对于与在CH2结构域中存在的FcγRIII的相互作用而言必需的2个氨基酸残基,IgG4P FALA具有进一步减弱的效应子功能(Parekh等人, MAbs, 310-318, 2012)。人工修饰的Fc区以及那些天然存在的Fc区序列的多态性也被包括在“变体”的范围内。

[0219] 缀合物可以是除了SPINK2变体肽以外的肽与抗体的Fc区或其片段的融合体。这样

的缀合物的例子包括：人肿瘤坏死因子II受体 (TNFR) 的细胞外结构域蛋白与Fc的缀合物 (依那西普)；人细胞毒性T淋巴细胞-相关的抗原4 (CTLA4) 的细胞外结构域蛋白与Fc的缀合物 (阿巴他塞)；人血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 的细胞外结构域蛋白与Fc的缀合物 (阿柏西普)；人血液凝固因子VIII与Fc的缀合物 (Efralocog Alfa)；人血液凝固因子VIII与Fc的缀合物 (Eftrenonacog Alfa)；人血小板生成素受体结合肽与Fc的缀合物 (罗米司亭)；和人胰高血糖素-样肽-1 (GLP-1) 类似物与Fc的缀合物 (dulaglutide)。

[0220] 在一个实施方案中，在缀合物中所含的肽的例子包括、但不限于心房利钠肽 (ANP)、瘦素、白介素-2 (IL-2)、IL-22、胰泌素、 β -内啡肽、GLP-1和成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2)。

[0221] 在一个实施方案中，在缀合物中所含的肽可以是抗体的抗原结合片段。在本发明中，“抗体的抗原结合片段”是指维持识别抗原的功能的抗体的部分片段，且具有与“抗体的功能片段”相同的含义。抗体的抗原结合片段的例子可以包括、但不限于Fab、F(ab')₂、scFv、Fab'和单链免疫球蛋白。这样的抗体的功能片段可以通过用酶诸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶处理抗体的全长分子而得到的片段，或可以是使用重组基因在适当的宿主细胞中生产的重组蛋白。

[0222] 在肽的Fc缀合物诸如SPINK2变体中，肽可以位于Fc区或其片段的氨基端，或Fc区可以位于肽的氨基端，但是前者是优选的。肽和Fc区或其片段可以直接融合，或可以通过接头等间接融合。接头是肽和/或非肽。除了肽、Fc区或其片段和在二者之间的任选插入部分 (诸如接头) 以外，肽的Fc缀合物诸如SPINK2变体还可以包括另一种肽或非肽。

[0223] 肽可以缀合至另一种药物以发挥或增强药理学活性。在抗体领域中本领域技术人员已知的作为抗体-药物缀合物 (ADC) 的技术和实施方案通过用本发明的肽替换抗体可以变成本发明的一部分。

[0224] 此外，肽可以进一步含有对另一种靶分子表现出活性的一个或两个或更多个部分，或可以缀合至这样的部分。这样的“部分”的例子可以包括抗体或其片段，以及除了抗体以外的具有支架的蛋白，诸如SPINK2变体或其片段。通过用本发明的肽置换在前述中包括的两种或更多种“抗体”中的至少一种，在抗体领域中本领域技术人员已知作为多特异性抗体和双特异性抗体的技术和实施方案可以变成本发明的缀合物的实施方案的一部分。

[0225] 肽或其前体可以含有信号序列。存在于或添加至肽或其前体的N-端的信号序列可用于将肽递送至细胞的特定隔室，例如，大肠杆菌中的周质或真核细胞中的内质网。许多信号序列是本领域技术人员已知的，且可以根据宿主细胞来选择。用于将期望的肽分泌进大肠杆菌的周质中的信号序列的例子可以包括OmpA。具有含有信号序列的形式的缀合物也被包括在本发明的范围内。

[0226] 此外，通过预先向肽添加标签，可以通过亲和色谱法纯化肽。例如，肽可以在C-端具有生物素、Strep-标签 (R)、Strep-标签II (R)、寡组氨酸诸如His6、聚组氨酸、免疫球蛋白结构域、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、钙调蛋白-结合肽 (CBP)、半抗原诸如地高辛配基或二硝基苯酚、表位标签诸如FLAG (R)、myc标签、HA标签等 (在下文中被统称为“亲和标签”)。在本发明的缀合物的某些实施方案中也可以包括标签加合物。本发明的缀合物可以整体是肽 (多肽)。

[0227] 肽可以含有用于标记的部分。具体地，可以缀合用于标记的部分诸如酶标记、放射

性标记、染色标记、荧光标记、产色标记、发光标记、半抗原、地高辛配基、生物素、金属络合物、金属、胶体金等。在本发明的缀合物的范围内也包括含有用于标记的部分的那些。

[0228] 此外,肽(或其氨基酸序列)可以含有天然存在的氨基酸和/或非天然存在的氨基酸,其中天然存在的氨基酸可以是L-氨基酸或D-氨基酸。

[0229] 肽也可以作为单体、二聚体、三聚体或更高的寡聚体或作为多聚体存在。二聚体、三聚体或更高的寡聚体和多聚体可以由单一单体组成的同聚物或由两种或更多种不同的单体组成的杂聚物。单体可以例如快速地扩散并具有向组织中的优秀穿透。二聚体、寡聚体和多聚体可以在某些方面具有优点,例如,它们可以具有慢解离速率,这在对靶分子的活性方面是局部优秀的。除了自发的二聚化、寡聚化或多聚化以外,通过向本发明的肽中引入jun-fos结构域、亮氨酸拉链等,也可以进行自发二聚化、寡聚化或多聚化。

[0230] 此外,肽可以作为单体、二聚体、三聚体或更高的寡聚体或多聚体对一种或两种或更多种靶分子发挥活性。

[0231] 肽可以呈分离的形式(诸如低压冻干的制品或溶液)、如上所述的缀合物形式、或与另一分子结合的形式(诸如固相形式,与不同的分子结合的形式,或与靶分子结合的形式),但不限于这些,且可以呈适合用于表达、纯化、使用、贮存等的任何形式。

[0232] 在具有改善的血液动力学的本发明的缀合物中所含的SPINK2变体的氨基酸序列的例子可以包括上面描述的氨基酸序列(a1)、(a2)、(a3)和(a4)。在具有改善的血液动力学的本发明的SPINK2变体Fc缀合物的氨基酸序列中,当它们包括上面描述的氨基酸序列(a1)、(a2)、(a3)或(a4)作为SPINK2变体的氨基酸序列和上面描述的各种Ig的Fc区或其片段的氨基酸序列作为抗体的Fc区的氨基酸序列时,除了向氨基端添加一个或两个或更多个、优选一个至几个氨基酸以外的氨基酸序列不受限制。这样的氨基酸序列的例子可以包括以下:(b1)氨基酸序列,其含有由SEQ ID NO: 2(图8)组成的氨基酸序列和人IgG1的Fc区的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO: 34,图40);(b2)氨基酸序列,其具有在(b1)中描述的氨基酸序列中的1-20、1-15、1-10、1-8、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2或1个氨基酸置换、缺失、添加和/或插入,且被包含在特定肽或缀合物中,所述特定肽或缀合物维持含有在(b1)中描述的氨基酸序列的缀合物对靶分子的活性的一些或全部;(b3)由特定核苷酸序列编码的氨基酸序列,所述特定核苷酸序列在严谨条件下与编码在(b1)中描述的氨基酸序列的核苷酸序列的互补核苷酸序列杂交,并且编码在特定肽或缀合物中所含的氨基酸序列,所述特定肽或缀合物维持含有在(b1)中描述的氨基酸序列的缀合物对靶分子的活性的一些或全部;和(b4)氨基酸序列,其与在(b1)中描述的氨基酸序列具有60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%或99%或更多同一性,且被包含在特定肽或缀合物中,所述特定肽或缀合物维持含有在(b1)中描述的氨基酸序列的缀合物对靶分子的活性的一些或全部。

[0233] 5. 肽或缀合物的改善的血液动力学

[0234] 本发明提供了一种用于改善肽或含肽缀合物的血液动力学的方法。肽可以是这样的肽:其中一个或两个或更多个、优选地一个至几个氨基酸(其可以是除了天然氨基酸以外的氨基酸)可以进一步添加至本发明的肽(其包括在缀合物中所含的肽,且优选地对疾病相关的靶分子具有活性)的氨基酸序列的第一个氨基酸(即,在氨基端的氨基酸)的氨基端。这样的氨基酸添加的例子可以优选地包括这些:其中一个至几个酸性氨基酸、更优选地Asp和/或Glu已经添加(其可以包括Asp和Glu二者),甚至更优选地一个至几个Asp已经添加,或

一个至几个Glu已经添加。另外的氨基酸(诸如Asp和/或Glu)的数目优选地是1-5,或1-4,更优选地1-3,甚至更优选地2或3,和最优选地3。

[0235] 氨基酸向氨基端的这种添加可以改善肽或缀合物的血液动力学。血液动力学的改善没有特别限制,只要它是指标的改善,所述指标指示施用给个体的肽或缀合物随时间在血液循环中的动力学(诸如吸收或分布)和消除(诸如代谢或排泄)已经改善,但是优选地,血液药物浓度随时间下降的遏制(也被称作“PK的延长”),血液暴露量(AUC)的增加,药物消除半衰期($t_{1/2}$)的增加,最大血液药物浓度(C_{max})的增加,和/或达到最大血液浓度的时间(t_{max})的缩短,更优选地血液药物浓度随时间下降的遏制(PK的延长)或血液暴露量(AUC)的增加。向缀合物的氨基端(其中抗体或其片段的Fc区融合至肽诸如SPINK2变体(优选地,Fc区位于肽的羧基端)),可以添加一个或两个或更多个、一个至几个、一个至五个或一个至四个、更优选地一个至三个、甚至更优选地两个或三个、且最优选地三个氨基酸,其中优选的氨基酸是Asp和/或Glu,更优选Asp或Glu,甚至更优选三个Asp或Glu,最优选三个Asp。这样的添加氨基酸的形式被包括在本发明的缀合物中。

[0236] 如果一个或两个或更多个、优选地一个至几个氨基酸、优选地Asp和/或Glu添加至肽或缀合物(优选地,Fc融合体)的氨基端,尽管肽或缀合物在局部带负电荷,其不会显著影响肽或缀合物的等电点(pI),并且可能在施用后的早期阶段遏制肽或缀合物的血液浓度下降,并与原始肽或缀合物相比在更长的时间段内维持它的更高血液浓度。因为带负电荷的氨基酸的添加不会显著影响肽或缀合物的pI,所以可以最小化对生物或药理学活性、物理化学性质等的影响,而不仅仅是血液动力学。

[0237] 本发明也提供了具有改善的血液动力学的肽和缀合物。例子可以包括具有一个添加的Asp的缀合物(D1-K51028-Fc, SEQ ID NO: 7, 图13; D1-K50055-Fc, SEQ ID NO: 14, 图20; D1-K51028-Fc (IgG2), SEQ ID NO: 44, 图50; D1-K51028-Fc (IgG4P); SEQ ID NO: 47, 图53),具有两个添加的Asp的缀合物(D2-K51028-Fc, SEQ ID NO: 8, 图14),具有三个添加的Asp的缀合物(D3-K51028-Fc, SEQ ID NO: 9, 图15; D3-K51028-Fc (IgG2), SEQ ID NO: 45, 图51; D3-K51028-Fc (IgG4P), SEQ ID NO: 48, 图54);具有四个添加的Asp的缀合物(D4-K51028-Fc, SEQ ID NO: 10, 图16);具有五个添加的Asp的缀合物(D5-K51028-Fc, SEQ ID NO: 11, 图17);和具有一个添加的Glu的缀合物(E1-K51028-Fc, SEQ ID NO: 13, 图19)。但是,具有改善的血液动力学的缀合物不限于这些,且通过将以上血液动力学改善方法应用于对任何靶分子具有活性的肽(优选地肽的Fc融合体),可以改善具有期望的药理学活性的肽的血液动力学,并可以得到具有改善的血液动力学的肽或缀合物。

[0238] 6. 肽或缀合物的制备

[0239] 本发明也提供了含有编码在肽或含肽缀合物中所含的氨基酸序列的核苷酸序列的多核苷酸(在下文中被称作“编码基因”),在其中已经插入了所述编码基因的重组载体,在其中已经引入了所述基因或载体的细胞(在下文中被称作“含有编码基因的细胞”),生产肽或缀合物的细胞(在下文中被简称作“生产细胞”),和用于生产肽或缀合物的方法,所述方法包括培养含有编码基因的细胞或生产细胞的步骤。

[0240] 为了设计编码氨基酸序列的核苷酸序列,可以使用与每个氨基酸对应的一个或两个或更多个密码子。因而,编码某种肽所具有单个氨基酸序列的核苷酸序列可以具有多

个变异。在选择这样的密码子后,根据用于表达的宿主细胞(在其中引入了具有所述核苷酸序列的多核苷酸或含有它们的载体)的密码子使用可以适当地选择密码子,并且可以适当地调节多种密码子的使用频率或比率。例如,当使用大肠杆菌作为宿主细胞时,使用在大肠杆菌中频繁使用的密码子,可以设计核苷酸序列。

[0241] 编码基因可以可操作地连接至一个或两个或更多个调节序列。术语“可操作地连接的”是指,它允许连接的编码基因的表达,或允许在编码基因中所含的核苷酸序列的表达。调节序列包括具有关于转录和/或翻译调节的信息的序列元件。调节序列随物种不同而变化,但是通常包括启动子,且包括参与转录和翻译起始的5'非编码序列,诸如原核-35/-10框和Shine Dalgarno序列,以及真核TATA框、CAAT序列和5'加帽序列。这样的序列可以包括增强子元件和/或阻遏物元件以及信号序列、前导序列等,它们可以被翻译,以将天然的或成熟的肽递送至在宿主细胞内部的特定隔室或外部。此外,调节序列可以含有3'非编码序列,且这样的序列可以包括参与转录终止、多腺苷酸化等的元件。但是,如果转录终止序列不在特定宿主细胞中充分起作用,它可以用适合该细胞的序列替换。

[0242] 启动子序列的例子可以包括tet启动子、lacUV5启动子、T7启动子等(在原核生物中)和SV40启动子、CMV启动子等(在真核细胞中)。

[0243] 编码基因可以是、但不限于分离的形式,或在载体或其它克隆载体(在下文中被简称作“载体”,其包括质粒、噬粒、噬菌体、杆状病毒、粘粒等)中所含的形式,或在染色体中所含的形式。除了以上调节序列以外,载体可以包括适合用于表达的宿主细胞的复制序列和控制序列,以及为在其中通过转化等引入了核酸分子的细胞提供可选择表型的选择标记。

[0244] 通过本领域技术人员已知的方法诸如通过转化,可以将编码基因或含有编码基因的载体引入能够表达所述基因或肽(其为所述基因的翻译产物)的宿主细胞中。可以在适合于表达基因或肽的条件下培养在其中已经引入编码基因或载体的宿主细胞。宿主细胞可以是原核的或真核的。原核生物的例子可以包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌,且真核生物的例子可以包括酵母诸如酿酒酵母和巴斯德毕赤酵母,昆虫细胞诸如SF9和High5,和动物细胞诸如HeLa细胞、CHO细胞、COS细胞和INS0。通过使用真核细胞等作为宿主细胞,可以对表达的本发明的肽进行期望的翻译后修饰。翻译后修饰的例子可以包括官能团诸如糖链的添加、肽或蛋白的添加、和氨基酸的化学性质的转化。也可能人工地将期望的修饰应用于本发明的肽。这样的修饰的肽也被涵盖在本发明的肽或缀合物的范围内。

[0245] 本发明也提供了生产肽或缀合物的方法。所述方法包括:步骤1,培养含有编码基因的细胞或生产细胞;和/或步骤2,从在步骤1中得到的培养物中回收肽或缀合物。在步骤2中,可以应用本领域技术人员已知的程序诸如分级分离、色谱法和纯化。例如,可以应用在后面描述的通过使用本发明的抗体的亲和色谱法的纯化。

[0246] 通过本领域技术人员已知的其它方法,诸如固相肽合成方法,包括Merrifield合成或其它方法,化学合成方法诸如使用叔丁氧基羰基(Boc)和9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)的有机合成化学肽合成方法,和体外翻译,也可以生产本发明的肽或缀合物。

[0247] 7. 药物组合物

[0248] 本发明也提供了包含肽或缀合物的药物组合物。

[0249] 本发明的药物组合物可用于治疗和/或预防由疾病相关的靶分子引起或加重的各种疾病,且其中靶分子的表达或功能的抑制或遏制可以导致引起或恶化的遏制,症状的治

愈、停滞或改善,继发疾病的避免等。药物组合物优选地含有肽或缀合物,其中已经改善了对疾病相关的靶分子具有活性的原始肽或缀合物的血液动力学。

[0250] 本发明的药物组合物可以含有治疗和预防有效量的对疾病相关的靶分子具有活性的肽或缀合物以及药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。

[0251] 术语“治疗和预防有效量”是指根据特定疾病、施用形式和施用途径发挥治疗或预防作用的量,且具有与“药理学有效量”相同的含义。

[0252] 本发明的药物组合物可以含有用于改变、维持或保留所述组合物或其中所含的肽、缀合物等的pH、渗透压、粘度、透明性、颜色、等渗性、无菌性或稳定性、可溶性、持续释放、吸收性、渗透性、剂型、强度、性质、形状等的物质(在下文中被称作“制剂的物质”)。制剂的物质没有特别限制,只要它是药理学上可接受的。例如,无毒性或低毒性是制剂的物质优选地具有的性质。

[0253] 制剂的物质的例子可以包括、但不限于:氨基酸诸如甘氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;抗菌剂;抗氧化剂诸如抗坏血酸、硫酸钠或亚硫酸氢钠;缓冲液诸如磷酸、柠檬酸、硼酸缓冲液、碳酸氢钠和Tris-HCl溶液;填充剂诸如甘露醇和甘氨酸;螯合剂诸如乙二胺四乙酸(EDTA);络合剂诸如咖啡因、聚乙烯基吡咯烷、 β -环糊精和羟丙基- β -环糊精;填充剂诸如葡萄糖、甘露糖或糊精;单糖类、二糖类和和其它碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖和糊精;着色剂;矫味剂;稀释剂;乳化剂;和亲水聚合物诸如聚乙烯基吡咯烷;低分子量多肽;形成盐的抗衡离子;防腐剂诸如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢;溶剂诸如甘油、丙二醇或聚乙二醇(PEG)、糖醇诸如甘露醇或山梨醇、助悬剂、脱水山梨糖醇酯;聚山梨酯诸如聚山梨酯20和聚山梨酯80;表面活性剂诸如triton、氨丁三醇、卵磷脂或胆固醇;稳定增强剂诸如蔗糖和山梨醇;弹性增强剂诸如氯化钠、氯化钾、甘露醇和山梨醇;运输剂;稀释剂;赋形剂;和/或药物佐剂。在本发明中也包括含有在脂质体中的肽或缀合物的药物组合物以及含有与脂质体连接的肽或缀合物的修饰产品的药物组合物。

[0254] 赋形剂和载体经常是液体或固体,且没有特别限制,只要它们是用于口服或胃肠外施用的制剂中所用的物质,诸如注射用水、生理盐水、人工脑脊液等。生理盐水的例子可以包括中性盐水和含有血清白蛋白的盐水。

[0255] 缓冲液的例子可以包括被制备使得药物组合物的最终pH是7.0-8.5的Tris缓冲液、以相同的方式制备成4.0-5.5的乙酸盐缓冲液、以相同的方式制备成5.0-8.0的柠檬酸盐缓冲液、和以相同的方式制备成5.0-8.0的组氨酸缓冲液。

[0256] 本发明的药物组合物是固体、液体、混悬液等。本发明的药物组合物的其它例子可以包括低压冻干制剂。赋形剂诸如蔗糖可以用于形成低压冻干制剂。

[0257] 本发明的药物组合物的施用途径可以是滴眼、肠内施用、局部施用和胃肠外施用中的任一种,且例子可以包括在结膜上滴眼、玻璃体内施用、静脉内施用、动脉内施用、肌肉内施用、真皮内施用、皮下施用、腹膜内施用、透皮施用、骨内施用和关节内施用。

[0258] 根据施用方法、对靶标的活性或对靶标的结合亲和力等,可以确定这样的药物组合物的组成。对靶标的活性越强,在越低的剂量可以发挥作用。

[0259] 本发明的肽或缀合物的剂量没有限制,只要它是药理学上有效的量,且它可以根据诸如以下因素适当地确定:个体的物种,疾病的类型,症状,性别,年龄,慢性疾病,肽对靶

标的抑制活性,结合亲和力和类似的其它因素。但是,通常,每天可以施用0.01-1000 mg/kg、优选0.1-100 mg/kg的肽或缀合物一次或两次或三次或更多次,持续1-180天。

[0260] 药物组合物的形式的例子可以包括注射剂(包括低压冻干制剂和滴剂)、栓剂、鼻吸收制剂、透皮吸收制剂、舌下制剂、胶囊剂、片剂、软膏剂、颗粒、气雾剂、丸剂、粉剂、混悬液、乳剂、滴眼剂和生物植入物制剂。

[0261] 肽、缀合物或含有它们的药物组合物可以与额外药物同时或分开施用。例如,在施用额外药物以后施用含有肽或缀合物作为活性成分的药物组合物,或在施用额外药物以前施用药物组合物,或可以同时施用药物组合物和额外药物。当同时施用时,肽或缀合物和额外药物可以被包含在单一制剂或分开的制剂(多个制剂)中。

[0262] 可以施用或配制一种或两种或三种或更多种额外药物。这些被统称为“与额外组合组合”或“与额外药物组合”。除了本发明的肽或缀合物以外还含有额外药物的本发明的药物组合物,或与其它疗法联合使用的本发明的药物组合物,也被包括在本发明中作为“与额外组合组合”或“与额外药物组合”的一个实施方案。

实施例

[0263] 在下述实施例中,进一步详细描述了本发明的一些实施方案,但是本发明不限于此。

[0264] 应当指出,在下面的实施例中,根据在“Molecular Cloning”(Sambrook, J., Fritsch, E.F.和Maniatis, T., 在1982或1989年出版,Cold Spring Harbor Laboratory Press)中描述的方法,和在本领域技术人员使用的其它实验教科书中描述的方法,或当使用市售的试剂或试剂盒时根据市售产品的说明书,进行与遗传操作有关的每个程序。

[0265] 实施例1. KLK5抑制性SPINK2-Fc融合体的制备

[0266] (1-1) KLK5抑制性SPINK2-Fc融合体的表达载体的构建

[0267] 使用每种抑制性SPINK2的序列(序列表)作为模板,用下述引物和KOD-plus-(TOYOBO CO., LTD.)通过PCR方法((94°C, 15秒; 60°C, 30秒; 68°C, 20秒) x 30个循环)扩增抑制剂片段(D0-D5, E1)。

[0268] 抑制剂片段的引物(D0)

[0269] 引物1: 5'-AGATGGGTGTTGTCTGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC-3' (SEQ ID NO: 15: 图21)

[0270] 引物2: 5'-GCAGGGGCCATTCCGGAT-3' (SEQ ID NO: 16: 图22)

[0271] 抑制剂片段的引物(D1)

[0272] 引物3: 5'-AGATGGGTGTTGTCTGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC-3' (SEQ ID NO: 17: 图23)

[0273] 引物2 (SEQ ID NO: 16, 图22)

[0274] 抑制剂片段的引物(E1)

[0275] 引物4: 5'-AGATGGGTGTTGTCTGAAGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC-3' (SEQ ID NO: 18: 图24)

[0276] 引物2 (SEQ ID NO: 16, 图22)

[0277] 抑制剂片段的引物(D2)

- [0278] 引物5: 5'-AGATGGGTGTTGTCTGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC-3' (SEQ ID NO: 19: 图25)
- [0279] 引物2 (SEQ ID NO: 16, 图22)
- [0280] 抑制剂片段的引物(D3)
- [0281] 引物6: 5'-AGATGGGTGTTGTCTGATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC-3' (SEQ ID NO: 20: 图26)
- [0282] 引物2 (SEQ ID NO: 16, 图22)
- [0283] 抑制剂片段的引物(D4)
- [0284] 引物7: 5'-AGATGGGTGTTGTCTGATGATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC-3' (SEQ ID NO: 21: 图27)
- [0285] 引物2 (SEQ ID NO: 16, 图22)
- [0286] 抑制剂片段的引物(D5)
- [0287] 引物8: 5'-AGATGGGTGTTGTCTGACGATGATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC-3' (SEQ ID NO: 22: 图28)
- [0288] 引物2 (SEQ ID NO: 16, 图22)
- [0289] 用下述引物和KOD-plus- (TOYOBO CO., LTD.) 通过PCR方法 ((94°C, 15秒; 60°C, 30秒; 68°C, 10秒) x 30个循环) 扩增片段A。
- [0290] 引物9: 5'-AAAATCTAGAGCCGCCACCATGAAGCACCTGTGGTCTTTCTGCTGCT-3' (SEQ ID NO: 23: 图29)
- [0291] 引物10: 5'-AGACAACACCCATCTAGGAGCGGCCACCAGCAGCAGAAAGAACC-3' (SEQ ID NO: 24: 图30)
- [0292] 使用人IgG1的Fc区 (SEQ ID NO: 34, 图40) 作为模板, 用下述引物和KOD-plus- (TOYOBO CO., LTD.) 通过PCR方法 ((94°C, 15秒; 60°C, 30秒; 68°C, 30秒) x 30个循环) 扩增含有人IgG1的Fc区的片段B。
- [0293] 引物11: 5'-ATCCGGAATGGCCCCTGCGAACCCAAGAGCTGCGAC-3' (SEQ ID NO: 25: 图31)
- [0294] 引物12: 5'-AAAAGTTTAACTCATTTGCCGGGGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 26: 图32)
- [0295] 使用上面扩增的抑制剂片段和片段A、片段B、引物9 (SEQ ID NO: 23, 图29)、引物12 (SEQ ID NO: 26, 图32) 和KOD-plus- (TOYOBO CO., LTD.), 通过重叠PCR方法扩增期望的DNA片段。
- [0296] 对扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳, 然后将期望的DNA片段切离, 并用QIAquick凝胶提取试剂盒 (QIAGEN) 制备DNA。将制备的DNA片段和哺乳动物细胞表达载体pCMA用限制性酶XbaI (NEB) 和PmeI (NEB) 在37°C处理1小时或更久。琼脂糖凝胶电泳以后, 将期望的DNA片段切离, 并用QIAquick PCR纯化试剂盒 (QIAGEN) 纯化。使用LigaFast Rapid DNA连接系统 (Promega Corporation) 使纯化的片段各自在室温反应10分钟以实现连接反应。将连接溶液加给大肠杆菌JM109 (TOYOBO CO., LTD.) 并将细胞在冰上静置30分钟, 然后进行42°C的热处理45秒, 然后将其在冰上静置5分钟, 然后接种在含有0.1 mg/mL氨苄西林的2YT平板上, 然后进行在37°C静止培养过夜以转化大肠杆菌。次日, 将转化的大肠杆菌接种进含有0.1 mg/mL氨苄西林的Terrific肉汤培养基 (Invitrogen), 并在37°C培养过夜。然后用

Expi293F细胞(Thermo Fisher Scientific)中,并在培养3天后,回收培养物上清液。使用HisTrap excel (GE Healthcare)从培养物上清液回收期望的His标签融合蛋白,并使用Amicon Ultra NMWL 10,000 (Merck Millipore)用PBS交换缓冲液以纯化KLK5。

[0316] (2-3) KLK5抑制性SPINK2-Fc融合体的KLK5抑制活性的评价

[0317] 将底物肽溶解在DMSO中达到10 mM,然后用测定缓冲液(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0)稀释并以100 μ M终浓度使用。将用测定缓冲液稀释的KLK5和KLK5抑制性SPINK2-Fc融合体以各25 μ L混合,并在37°C反应20分钟。然后,加入50 μ L用测定缓冲液稀释的底物,并用Enspire (PerkinElmer)测量荧光信号。如下使用每种酶和底物的组合。每种抑制性肽Fc融合体是在0.022-1,300 nM的终浓度。将Proteosave (R) SS96F黑色平板(Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)用于反应和测量。

[0318] 人KLK5抑制活性评价;在20 nM终浓度的KLK5,在100 μ M终浓度的底物肽Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011),荧光信号激发380 nm/发射460 nm。

[0319] 计算在每种浓度的每种SPINK2-Fc融合体的底物肽降解速率,并通过在0 nM抑制剂浓度的降解速率设定为100%,使用GraphPad Prism (5.0版; GraphPad Software Inc.)回归至4-参数逻辑S形曲线。所有SPINK2-Fc融合体在低浓度抑制KLK5酶活性,且在设计之间没有观察到KLK5抑制活性的差异(图2)。

[0320] 实施例3. SPINK2-Fc融合体的小鼠PK试验

[0321] (3-1) 动物试验

[0322] 将在实施例1中生产的KLK5抑制性SPINK2-Fc融合体用PBS制备至0.75 mg/mL并用作施用溶液。以5 mg/kg的剂量静脉内施用给在到达后适应4-8天的4.5周至8周龄的雄性C57BL/6J小鼠(CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.)。通过静脉内施用至颈静脉或尾静脉,进行静脉内施用。如下进行向颈静脉的静脉内施用。将小鼠用异氟烷进行吸入麻醉,并用理发器剃掉颈部毛,然后将皮肤切开以暴露颈静脉。使用填充了施用溶液的用于皮下胰岛素施用的带针注射器(29G)的针尖刺穿暴露的颈静脉下方的肌肉,在视觉上确认针尖进入了颈静脉后,推动柱塞以施用药物。如下进行向尾静脉中的静脉内施用。将小鼠用异氟烷进行吸入麻醉,将尾巴用温水浸湿的布温热,或用酒精棉擦拭以扩张静脉,然后将填充了施用溶液的用于皮下胰岛素施用的带针注射器的针尖插入尾静脉。轻轻拉动柱塞以证实静脉血回流进注射器中,然后推动柱塞以进行施用。使用用于皮下胰岛素施用的带针注射器抽吸肝素钠注射溶液一次,然后射出以使用注射器作为血液收集注射器。在施用后5分钟、1小时、3小时、6小时和24小时,在用异氟烷吸入麻醉下使用血液收集注射器从未施用侧颈静脉收集约0.05 mL血液。将血液转移至1.5 mL容积聚丙烯试管并在冷却下在21,600 x g的离心力离心3分钟以得到上清液(血浆)。

[0323] (3-2) 测量

[0324] 使用完全自动化的免疫测定平台Gyrolab xP Workstation (GYROS PROTEIN Technologies),进行血浆中KLK5抑制性SPINK2-Fc融合体的浓度测量。将KLK5抑制性SPINK2-Fc融合体用含有1%空白小鼠血浆的Rexxip AN (GYROS PROTEIN Technologies)从2,000 ng/mL以2倍公比稀释至8种系列稀释度以制备校正曲线样品。将在实验中得到的血浆用Rexxip AN稀释100倍以制备测量样品。将生物素-标记的抗-SPINK2抗体(Atlas Antibodies)用含有0.1%吐温20(R)的PBS制备至350 nM并用作捕获抗体。将用DyLight650

标记的自制抗-SPINK2抗体6D8用Rexxip F缓冲液制备至20 nM并用作检测抗体。将校正曲线样品、测量样品、捕获抗体、检测抗体和洗涤缓冲液(含有0.1%吐温20(R)的PBS)放入96-孔PCR平板中,并设置在具有Gyrolab Bioaffy 200的Gyrolab xP Workstation中以用3-StepC-A-D测量(wizard方法)。将校正曲线使用Gyrolab Evaluator Software用4-参数逻辑模型(加权;应答)回归。使用Phoenix WinNonlin 6.3 (Certara L.P.)进行无隔室分析以计算从0至施用后24小时的血浆浓度-时间曲线下的面积(AUC_{0-24h}) (计算方法;上升线性-下降对数(Linear Up-Log Down))。

[0325] (3-3) SPINK2-Fc融合体的PK

[0326] KLK5抑制性SPINK2-Fc融合体K51028-Fc在施用给小鼠后7天表现出图3(A)所示的血液动力学,并观察到在施用后3小时之前血液浓度的显著下降(图3(B))。1个Asp或Glu残基向K51028-Fc的N-端的添加会遏制直到施用后3小时观察到的施用的样本的血液浓度的显著下降(图4)。该效应是独立于序列的,并在D1-K51028-Fc和D1-K50055-Fc的两个序列中观察到类似的效应(图5)。此外,1-5个Asp残基向K51028-Fc的N-端的添加的任何设计会遏制直到施用后3小时观察到的施用的样本的血液浓度的显著下降(图6)。此外,由于直到施用后3小时血液浓度的显著下降的改善,也观察到直到施用后24小时血液暴露的显著增加(表1)。血液暴露量的增强效应在Asp添加数目为3时是最高的(D3),其次是Asp添加数目为2时(D2)和Asp添加数目为1时(D1)(按该顺序)。但是,K51028-D5-Fc(其中5个Asp放在SPINK2和Fc区之间)没有导致直到施用后3小时观察到的施用的样本的血液浓度的显著下降的遏制,或直到施用后24小时血液暴露的增加。从以上结果,1-5个Asp或Glu向SPINK2-Fc的N-端部分中的插入会遏制在施用后早期阶段观察到的血液浓度的下降并实现血液暴露的显著增加。

[0327] 协调Fc融合体的N-端部分中的带负电荷的氨基酸对Fc融合体的pI没有显著影响,并允许局部地带负电荷,因而对活性、物理性能等没有影响。该设计成功地实现了在施用后早期阶段SPINK2变体肽Fc融合体的血液浓度下降的遏制和在高浓度施用后Fc融合体的保留,而不显著影响SPINK2变体肽的活性和物理性能。

[0328] [表1]

[0329] 从0至施用后24小时在血浆浓度-时间曲线下的面积(AUC_{0-24h})

ID	AUC_{0-24h} ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)
K51028-Fc	13
D1-K51028-Fc	440
D2-K51028-Fc	530
D3-K51028-Fc	598
D4-K51028-Fc	390
D5-K51028-Fc	370
K51028-D5-Fc	77

[0331] 实施例4. KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体的制备和评价

[0332] (4-1) KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体的表达载体的构建

[0333] 使用在(1-1)中构建的哺乳动物细胞表达载体pCMA_K51028-Fc、pCMA_D1-K51028-Fc或pCMA_D3-K51028-Fc作为模板,用下述引物和KOD-plus- (TOYOBO CO., LTD.)通过PCR

方法((94°C, 15秒; 60°C, 30秒; 68°C, 75秒) x 30个循环)扩增了抑制剂片段(D0-K51028、D1-K51028、D3-K51028)。

[0334] 抑制剂片段D0-K51028、D1-K51028、D3-K51028)的引物

[0335] 引物20: 5'-TGAGTTTAAACTTTTAAACGGGG-3' (SEQ ID NO: 35: 图41)

[0336] 引物21: 5'-GCAGGGCCATTCCGGATGATCTT-3' (SEQ ID NO: 36: 图42)

[0337] 使用人IgG2 (SEQ ID NO: 37, 图43)的Fc区作为模板,用下述引物和KOD-plus-(TOYOBO CO., LTD.)通过PCR方法((94°C, 15秒; 60°C, 30秒; 68°C, 30秒) x 30个循环)扩增了含有人IgG2的Fc区的片段D。

[0338] 引物22: 5'-CGGAATGGCCCCTGCGAGCGTAAGTGTGTGGAGTGT-3' (SEQ ID NO: 38: 图44)

[0339] 引物23: 5'-CCCCGTTTAAACTCACTTCCAGGGCTCAGGGAAAGGCT-3' (SEQ ID NO: 39: 图45)

[0340] 使用人IgG4P的Fc区(SEQ ID NO: 40, 图46)作为模板,用下述引物和KOD-plus-(TOYOBO CO., LTD.)通过PCR方法((94°C, 15秒; 60°C, 30秒; 68°C, 30秒) x 30个循环)扩增了含有人IgG4P的Fc区的片段E。

[0341] 引物24: 5'-CGGAATGGCCCCTGCGAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGC-3' (SEQ ID NO: 41: 图47)

[0342] 引物25: 5'-CCCCGTTTAAACTCATTTGCCAGGCTCAGAGACAGGGA-3' (SEQ ID NO: 42: 图48)

[0343] 对扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳,然后将期望的DNA片段切离并通过QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN)制备DNA。向制备的每种抑制剂片段中加入片段D或片段E。用Infusion HD克隆试剂盒(TAKARA BIO)使混合物在50°C反应15分钟以连接片段。将连接的片段加给大肠杆菌JM109 (TOYOBO CO., LTD.)并将细胞在冰上静置30分钟,然后进行42°C的热处理45秒,并允许在冰上静置5分钟,然后接种在含有0.1 mg/mL氨苄西林的2YT平板上,然后进行在37°C的静止培养过夜以转化大肠杆菌。次日,将转化的大肠杆菌接种进含有0.1 mg/mL氨苄西林的Terrific肉汤培养基(Invitrogen)中,并在37°C培养过夜。然后用QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit (Qiagen)回收质粒DNA(在下文中被称作“小量制备处理”),并进行序列分析以构建哺乳动物细胞表达载体pCMA_KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体。

[0344] (4-2) KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体的表达和纯化

[0345] 使用PEI MAX 40000 (Polysciences, Inc.)将在(4-1)中构建的表达载体转染进Expi293F细胞(Thermo Fisher Scientific)中,并在培养6天后,回收培养物上清液。使用MabSelect SuRe (GE Healthcare)从培养物上清液回收期望的Fc融合体,并使用Amicon Ultra NMWL 10,000 (Merck Millipore)用PBS交换缓冲液以制备KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体。

[0346] (4-3) KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体的KLK5抑制活性的评价

[0347] 将底物肽溶解在DMSO中至10 mM,然后用测定缓冲液(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0)稀释并在100 μM终浓度使用。将用测定缓冲液稀释的KLK5和KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体以各25 μL混合,并在37°C反应20分钟。然后,加入50 μL

用测定缓冲液稀释的底物,并用Enspire (PerkinElmer)测量荧光信号。如下使用每种酶和底物的组合。每种KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体是在1.6-100 nM的终浓度。将Proteosave(R) SS96F黑色平板(Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)用于反应和测量。

[0348] 人KLK5抑制活性评价;在20 nM终浓度的KLK5,在100 μ M终浓度的底物肽Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011),荧光信号激发380 nm/发射460 nm。

[0349] 计算在每种浓度的每种KLK5-抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体的底物肽降解速率,并通过在0 nM抑制剂浓度的降解速率设定为100%,使用GraphPad Prism (5.0版; GraphPad Software Inc.)回归至4-参数逻辑S形曲线。所有KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体在低浓度抑制KLK5酶活性,且在设计之间没有观察到KLK5抑制活性的差异(图55)。

[0350] 实施例5. KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体的小鼠PK试验

[0351] (5-1) 动物试验

[0352] 将在(4-2)中生产的KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体用PBS制备至1 mg/mL并用作施用溶液。如下以5 mg/kg的剂量对在到达后适应7天的6周龄的雄性C57BL/6J小鼠(CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.)进行颈静脉内施用。将小鼠用异氟烷进行吸入麻醉,并用理发器剃掉颈部毛,然后将皮肤切开以暴露颈静脉。使用填充了施用溶液的用于皮下胰岛素施用的带针注射器(29G)的针尖刺穿暴露的颈静脉下方的肌肉,在视觉上确认针尖进入了颈静脉后,推动柱塞以施用药物。使用用于皮下胰岛素施用的带针注射器抽吸肝素钠注射溶液一次,然后射出以使用注射器作为血液收集注射器。在施用后5分钟、1小时、3小时、6小时和24小时,在用异氟烷吸入麻醉下使用血液收集注射器从未施用侧颈静脉收集约0.03 mL血液。将血液转移至1.5 mL容积聚丙烯试管并在冷却下在21,600 x g的离心力离心3分钟以得到上清液(血浆)。

[0353] (5-2) 测量

[0354] 使用完全自动化的免疫测定平台Gyrolab xP Workstation (GYROS PROTEIN Technologies),进行血浆中KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体的浓度测量。将KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体用含有1%空白小鼠血浆的Rexxip AN (GYROS PROTEIN Technologies)从1,000 ng/mL以2.7倍公比稀释至7种系列稀释度以制备校正曲线样品。将在实验中得到的血浆用Rexxip AN稀释100倍以制备测量样品。将生物素-标记的抗-SPINK2抗体(Atlas Antibodies)用含有0.1%吐温20(R)的PBS制备至350 nM并用作捕获抗体。将用DyLight650标记的自制抗-SPINK2抗体6D8用Rexxip F缓冲液制备至20 nM并用作检测抗体。将校正曲线样品、测量样品、捕获抗体、检测抗体和洗涤缓冲液(含有0.1%吐温20(R)的PBS)放入96-孔PCR平板中,并设置在具有Gyrolab Bioaffy 200的Gyrolab xP Workstation中以用3-StepC-A-D测量(wizard方法)。将校正曲线使用Gyrolab Evaluator Software用4-参数逻辑模型(加权;应答)回归。使用Phoenix WinNonlin 6.3 (Certara L.P.)进行无隔室分析以计算从0至施用后24小时的血浆浓度-时间曲线下的面积(AUC_{0-24h}) (计算方法;上升线性-下降对数(Linear Up-Log Down))。

[0355] (5-3) KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2, IgG4P)融合体的PK

[0356] KLK5抑制性SPINK2-Fc (IgG2)融合体D0-K51028-Fc (IgG2)在施用给小鼠后24小时表现出图56所示的血液动力学,并观察到在施用后3小时之前血液浓度的显著下降。1个

Asp残基向D0-K51028-Fc (IgG2)的N-端的添加会遏制在施用后3小时之前观察到的血液浓度的显著下降(图56)。甚至当在N-端的Asp残基的添加数目为3时,在施用后3小时之前观察到的血液浓度的显著下降受到遏制(图56)。用IgG4P也观察到该效应,独立于Fc的序列(图57)。此外,由于直到施用后3小时血液浓度的显著下降的改善,也观察到直到施用后24小时血液暴露的显著增加(表2)。从以上结果,1个Asp残基向SPINK2-Fc融合体的N-端部分的添加会改善在SPINK2-Fc融合体施用后的早期阶段观察到的血液浓度的下降以及与其有关的低血液暴露,且当与不同同种型IgG的Fc序列融合时发挥相同的效应。

[0357] 协调Fc融合体的N-端部分中的带负电荷的氨基酸对Fc融合体的pI没有显著影响,并允许局部地带负电荷(甚至当采用具有非常弱的效应子功能的IgG2或IgG4P作为Fc融合体的Fc序列时),因而对活性、物理性能等没有影响。该设计成功地实现了在施用后早期阶段SPINK2变体肽Fc融合体的血液浓度下降的遏制和在高浓度施用后Fc融合体的保留,而不显著影响SPINK2变体肽的活性和物理性能。

[0358] [表2]

[0359] 从0至施用后24小时在血浆浓度-时间曲线下的面积(AUC_{0-24h})

ID	AUC _{0-24h} (μg · h/mL)
D0-K51028-Fc (IgG2)	67.8
D1-K51028-Fc (IgG2)	519
D3-K51028-Fc (IgG2)	829
D0-K51028-Fc (IgG4P)	41.7
D1-K51028-Fc (IgG4P)	694
D3-K51028-Fc (IgG4P)	782

[0361] 工业适用性

[0362] 本发明所提供的血液动力学改善方法会实现肽或含肽缀合物的血液半衰期的延长、血液暴露量的增加等。含有所述肽或所述缀合物的药物可以适当地用于治疗或预防各种疾病。

[0363] 序列表的自由正文

[0364] SEQ ID NO: 1 - 人SPINK2的氨基酸序列(图7)

[0365] SEQ ID NO: 2 - SPINK2变体肽的通式(图8)

[0366] SEQ ID NO: 3 - 人KLK5的氨基酸序列(图9)

[0367] SEQ ID NO: 4 - KLK5抑制性肽K50055的氨基酸序列(图10)

[0368] SEQ ID NO: 5 - KLK5抑制性肽K51028的氨基酸序列(图11)

[0369] SEQ ID NO: 6 - KLK5抑制性肽Fc融合体D0-K51028-Fc的氨基酸序列(图12)

[0370] SEQ ID NO: 7 - KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K51028-Fc的氨基酸序列(图13)

[0371] SEQ ID NO: 8 - KLK5抑制性肽Fc融合体D2-K51028-Fc的氨基酸序列(图14)

[0372] SEQ ID NO: 9 - KLK5抑制性肽Fc融合体D3-K51028-Fc的氨基酸序列(图15)

[0373] SEQ ID NO: 10 - KLK5抑制性肽Fc融合体D4-K51028-Fc的氨基酸序列(图16)

[0374] SEQ ID NO: 11 - KLK5抑制性肽Fc融合体D5-K51028-Fc的氨基酸序列(图17)

[0375] SEQ ID NO: 12 - KLK5抑制性肽Fc融合体K51028-D5-Fc的氨基酸序列(图18)

[0376] SEQ ID NO: 13 - KLK5抑制性肽Fc融合体E1-K51028-Fc的氨基酸序列(图19)

- [0377] SEQ ID NO: 14 - KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K50055-Fc的氨基酸序列(图20)
- [0378] SEQ ID NO: 15 - 引物1的核苷酸序列(图21)
- [0379] SEQ ID NO: 16 - 引物2的核苷酸序列(图22)
- [0380] SEQ ID NO: 17 - 引物3的核苷酸序列(图23)
- [0381] SEQ ID NO: 18 - 引物4的核苷酸序列(图24)
- [0382] SEQ ID NO: 19 - 引物5的核苷酸序列(图25)
- [0383] SEQ ID NO: 20 - 引物6的核苷酸序列(图26)
- [0384] SEQ ID NO: 21 - 引物7的核苷酸序列(图27)
- [0385] SEQ ID NO: 22 - 引物8的核苷酸序列(图28)
- [0386] SEQ ID NO: 23 - 引物9的核苷酸序列(图29)
- [0387] SEQ ID NO: 24 - 引物10的核苷酸序列(图30)
- [0388] SEQ ID NO: 25 - 引物11的核苷酸序列(图31)
- [0389] SEQ ID NO: 26 - 引物12的核苷酸序列(图32)
- [0390] SEQ ID NO: 27 - 引物13的核苷酸序列(图33)
- [0391] SEQ ID NO: 28 - 引物14的核苷酸序列(图34)
- [0392] SEQ ID NO: 29 - 引物15的核苷酸序列(图35)
- [0393] SEQ ID NO: 30 - 引物16的核苷酸序列(图36)
- [0394] SEQ ID NO: 31 - 引物17的核苷酸序列(图37)
- [0395] SEQ ID NO: 32 - 引物18的核苷酸序列(图38)
- [0396] SEQ ID NO: 33 - 引物19的核苷酸序列(图39)
- [0397] SEQ ID NO: 34 - 人IgG1的Fc区的氨基酸序列(图40)
- [0398] SEQ ID NO: 35 - 引物20的核苷酸序列(图41)
- [0399] SEQ ID NO: 36 - 引物21的核苷酸序列(图42)
- [0400] SEQ ID NO: 37 - 人IgG2的Fc区的氨基酸序列(图43)
- [0401] SEQ ID NO: 38 - 引物22的核苷酸序列(图44)
- [0402] SEQ ID NO: 39 - 引物23的核苷酸序列(图45)
- [0403] SEQ ID NO: 40 - 人IgG4P的Fc区的氨基酸序列(图46)
- [0404] SEQ ID NO: 41 - 引物24的核苷酸序列(图47)
- [0405] SEQ ID NO: 42 - 引物25的核苷酸序列(图48)
- [0406] SEQ ID NO: 43 - KLK5抑制性肽Fc融合体D0-K51028-Fc(IgG2)的氨基酸序列(图49)
- [0407] SEQ ID NO: 44 - KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K51028-Fc(IgG2)的氨基酸序列(图50)
- [0408] SEQ ID NO: 45 - KLK5抑制性肽Fc融合体D3-K51028-Fc(IgG2)的氨基酸序列(图51)
- [0409] SEQ ID NO: 46 - KLK5抑制性肽Fc融合体D0-K51028-Fc(IgG4P)的氨基酸序列(图52)
- [0410] SEQ ID NO: 47 - KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K51028-Fc(IgG4P)的氨基酸序列(图53)

[0411] SEQ ID NO: 48 - KLK5抑制性肽Fc融合体D3-K51028-Fc (IgG4P)的氨基酸序列(图54)。

序列表

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
 <120> 改善肽在血液循环中的稳定性的方法
 <130> FP1935
 <150> JP2018-209730
 <151> 2018-11-07
 <160> 48
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1
 Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
 1 5 10 15
 Gln Tyr Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg His Phe Asn Pro Val Cys Gly
 20 25 30
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45
 Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
 50 55 60
 [0001]
 <210> 2
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 式
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (16)..(22)
 <223> X是任何氨基酸
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (24)..(28)
 <223> X是任何氨基酸
 <400> 2
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Val Cys Gly
 20 25 30
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45
 Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
 50 55 60

<210> 3
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Ile Ile Asn Gly Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp Gln Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Leu Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val Leu Val
 20 25 30

His Pro Gln Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys Val Phe
 35 40 45

Arg Val Arg Leu Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu Ser Gly
 50 55 60

Gln Gln Met Phe Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly Tyr Ser
 65 70 75 80

His Pro Gly His Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn Arg Arg
 85 90 95

Ile Arg Pro Thr Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser His Cys
 100 105 110

[0002]

Pro Ser Ala Gly Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Lys
 115 120 125

Ser Pro Gln Val His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn Ile Ser
 130 135 140

Val Leu Ser Gln Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln Ile Asp
 145 150 155 160

Asp Thr Met Phe Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser Cys Gln
 165 170 175

Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Leu
 180 185 190

Val Ser Trp Gly Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro Gly Val
 195 200 205

Tyr Thr Asn Leu Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr Ile Gln
 210 215 220

Ala Asn Ser
 225

<210> 4
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 结合剂

<400> 4

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ala
 1 5 10 15

Asn Thr Met Lys Gln Asp Cys Thr Arg Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

Gly
 65

<210> 5

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合剂

<400> 5

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Tyr
 1 5 10 15

[0003]

Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

Gly
 65

<210> 6

<211> 295

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合体

<400> 6

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Tyr
 1 5 10 15

Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Glu

Tyr Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro Val Cys
 20 25 30

Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys
 35 40 45

Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
 50 55 60

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 65 70 75 80

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 85 90 95

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 100 105 110

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 115 120 125

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 130 135 140

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 145 150 155 160

[0005] Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 165 170 175

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 180 185 190

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 195 200 205

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 210 215 220

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 225 230 235 240

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 245 250 255

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 260 265 270

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 275 280 285

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 8

<211> 297
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 融合体

 <400> 8
 Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn
 1 5 10 15

 Cys Tyr Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro Val
 20 25 30

 Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met
 35 40 45

 Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro
 50 55 60

 Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 65 70 75 80

 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 85 90 95

 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 100 105 110

 [0006] Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 115 120 125

 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 130 135 140

 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 145 150 155 160

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

 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 180 185 190

 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 195 200 205

 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 210 215 220

 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 225 230 235 240

 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 245 250 255

 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 260 265 270

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 275 280 285

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 9
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合体

<400> 9

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Tyr Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

[0007]

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 10
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合体

<400> 10

Asp Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr
 1 5 10 15

Pro Asn Cys Tyr Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp
 20 25 30

Pro Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu
 35 40 45

Cys Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn
 50 55 60

Gly Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 65 70 75 80

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 85 90 95

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 100 105 110

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 115 120 125

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 130 135 140

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 145 150 155 160

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 165 170 175

[0008]

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 180 185 190

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 195 200 205

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 210 215 220

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 225 230 235 240

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 245 250 255

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 260 265 270

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 275 280 285

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 11
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0009] <220>
 <223> 融合体

<400> 11

Asp Asp Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg
 1 5 10 15

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

Asp Pro Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr
 35 40 45

Leu Cys Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg
 50 55 60

Asn Gly Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 65 70 75 80

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 85 90 95

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 100 105 110

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 115 120 125

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

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
100 105 110

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
115 120 125

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
130 135 140

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
145 150 155 160

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
165 170 175

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
180 185 190

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
195 200 205

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
210 215 220

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
225 230 235 240

[0011]

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
245 250 255

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
260 265 270

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
275 280 285

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
290 295

<210> 13
<211> 296
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合体

<400> 13

Glu Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys
1 5 10 15

Tyr Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro Val Cys
20 25 30

Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys
35 40 45

Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
 50 55 60

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 65 70 75 80

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 85 90 95

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 100 105 110

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 115 120 125

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 130 135 140

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 145 150 155 160

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 165 170 175

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 180 185 190

[0012] Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 195 200 205

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 210 215 220

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 225 230 235 240

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 245 250 255

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 260 265 270

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 275 280 285

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 14
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合体

<400> 14

Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys
 1 5 10 15
 Ala Asn Thr Met Lys Gln Asp Cys Thr Arg Glu Tyr Asp Pro Val Cys
 20 25 30
 Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys
 35 40 45
 Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
 50 55 60
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 65 70 75 80
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 85 90 95
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 100 105 110
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 115 120 125
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 130 135 140
 [0013] Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 145 150 155 160
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 165 170 175
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 180 185 190
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 195 200 205
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 210 215 220
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 225 230 235 240
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 245 250 255
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 260 265 270
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 275 280 285
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

	<210> 15	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 15	
	agatgggtgt tgtctggccc tcagttcggc ctgttc	36
	<210> 16	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 16	
	gcagggcca ttccgat	18
	<210> 17	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 17	
	agatgggtgt tgtctgacgg ccctcagttc ggcctgttc	39
[0014]	<210> 18	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 18	
	agatgggtgt tgtctgaagg ccctcagttc ggcctgttc	39
	<210> 19	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 19	
	agatgggtgt tgtctgacga cggcctcag ttcggcctgt tc	42
	<210> 20	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 20	
	agatgggtgt tgtctgatga cgacggcct cagttcggcc tgttc	45
	<210> 21	
	<211> 48	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 21	
	agatgggtgt tgtctgatga tgacgacggc cctcagttcg gcctgttc	48
	<210> 22	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 22	
	agatgggtgt tgtctgacga tgatgacgac ggccctcagt tcggcctgtt c	51
	<210> 23	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 23	
	aaaatctaga gccgccacca tgaagcacct gtggttcttt ctgctgct	48
[0015]	<210> 24	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 24	
	agacaacacc catctaggag cggccaccag cagcagaaag aacc	44
	<210> 25	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 25	
	atccggaatg gccctgcga acccaagagc tgcgac	36
	<210> 26	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 26	
	aaaagttaa actcatttgc cgggctcag	30
	<210> 27	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	27	
		gatgacgacg aacccaagag ctgc	24
	<210>	28	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	28	
		atcgtcgcag gggccattcc g	21
	<210>	29	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	29	
		ggcgattata aagatgacga tgataaacac catcaccacc atc	43
	<210>	30	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0016]	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	30	
		gtttaaactc aatgatggtg gtgatggtgt ttatcatcgt cat	43
	<210>	31	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	31	
		aaaatctaga gccgccacca tggccacagc tagaccacct	40
	<210>	32	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	32	
		cgtcactttt ataatcgccg ctgttgcct ggatggttcc ctg	43
	<210>	33	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	

<400> 33
 aaaagtttaa actcaatgat ggtggtgatg gtgt 34

<210> 34
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 34

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

[0017]

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 Glu Glu Met 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> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物
 <400> 35
 tgagtttaaa cttttaaacg gggg 24

<210> 36
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物
 <400> 36
 gcaggggcca ttccgatga tctt 24

<210> 37
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 37
 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45

[0018]

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 65 70 75 80

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
 85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
 100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220

Ser Pro Gly Lys
 225

<210> 38
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 38
 cggaatggcc cctgcgagcg taagtgtgtg gtggagtgt 39

<210> 39
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 39
 ccccggttaa actcactttc cagggctcag ggaaaggct 39

[0019]

<210> 40
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 40

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
 225

<210> 41
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

[0020]

<400> 41 cggaatggcc cctgcgaatc taagtacggc cctccctgc 39

<210> 42
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 42 ccccgtttaa actcatttgc ccaggtcag agacaggga 39

<210> 43
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合体

<400> 43

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Tyr
 1 5 10 15

Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Glu

Tyr Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro Val Cys
 20 25 30

Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys
 35 40 45

Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
 50 55 60

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 65 70 75 80

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 85 90 95

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 100 105 110

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 115 120 125

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 130 135 140

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
 145 150 155 160

[0022] Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
 165 170 175

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 180 185 190

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 195 200 205

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 210 215 220

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 225 230 235 240

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 245 250 255

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 260 265 270

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 275 280 285

Ser Pro Gly Lys
 290

<210> 45

<211> 294
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合体

<400> 45

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Tyr Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 65 70 75 80

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 85 90 95

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 100 105 110

[0023]

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 115 120 125

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 130 135 140

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 145 150 155 160

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 165 170 175

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 180 185 190

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 195 200 205

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 210 215 220

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 225 230 235 240

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 245 250 255

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 260 265 270

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 275 280 285

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290

<210> 46
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合体

<400> 46

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Tyr
 1 5 10 15

Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Glu
 50 55 60

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 65 70 75 80

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 85 90 95

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 100 105 110

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 115 120 125

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 130 135 140

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 145 150 155 160

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 165 170 175

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 180 185 190

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 195 200 205

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 210 215 220

[0024]

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
225 230 235 240

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
245 250 255

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
260 265 270

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
275 280 285

Ser Leu Gly Lys
290

<210> 47

<211> 293

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合体

<400> 47

Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys
1 5 10 15

Tyr Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro Val Cys
20 25 30

[0025]

Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys
35 40 45

Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
50 55 60

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
65 70 75 80

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
85 90 95

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
100 105 110

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
115 120 125

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
130 135 140

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
145 150 155 160

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
165 170 175

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 180 185 190

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 195 200 205

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 210 215 220

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 225 230 235 240

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 245 250 255

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 260 265 270

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 275 280 285

Leu Ser Leu Gly Lys
 290

<210> 48
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0026] <220>
 <223> 融合体

<400> 48

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Tyr Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 65 70 75 80

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 85 90 95

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 100 105 110

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 115 120 125

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

	130		135			140												
	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
	145					150					155					160		
	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu		
					165					170					175			
	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
				180					185					190				
	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
			195					200					205					
[0027]	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
	210						215					220						
	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
	225					230					235					240		
	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser		
					245					250					255			
	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser		
				260					265					270				
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser		
			275					280					285					
	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys											
	290						295											

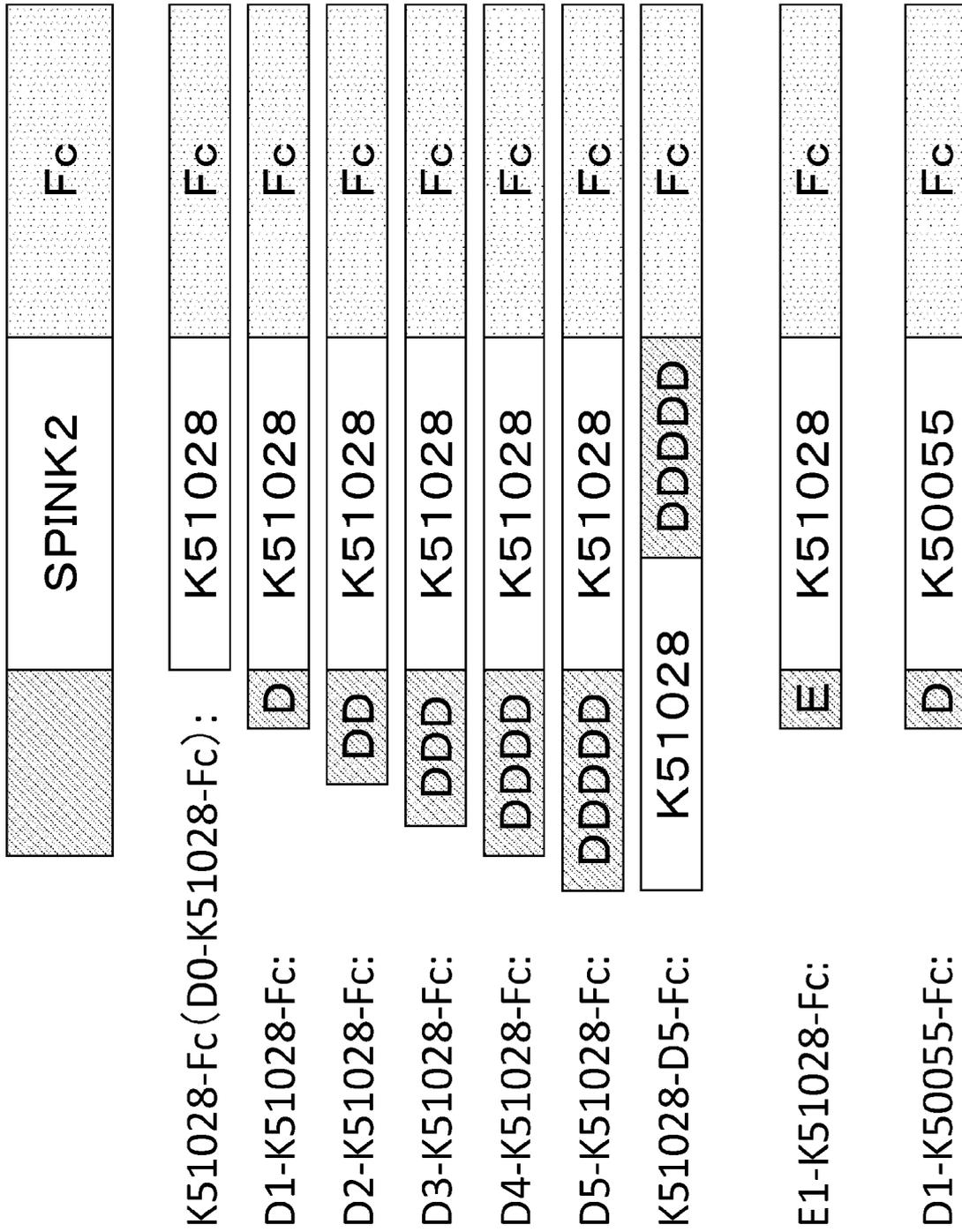


图 1

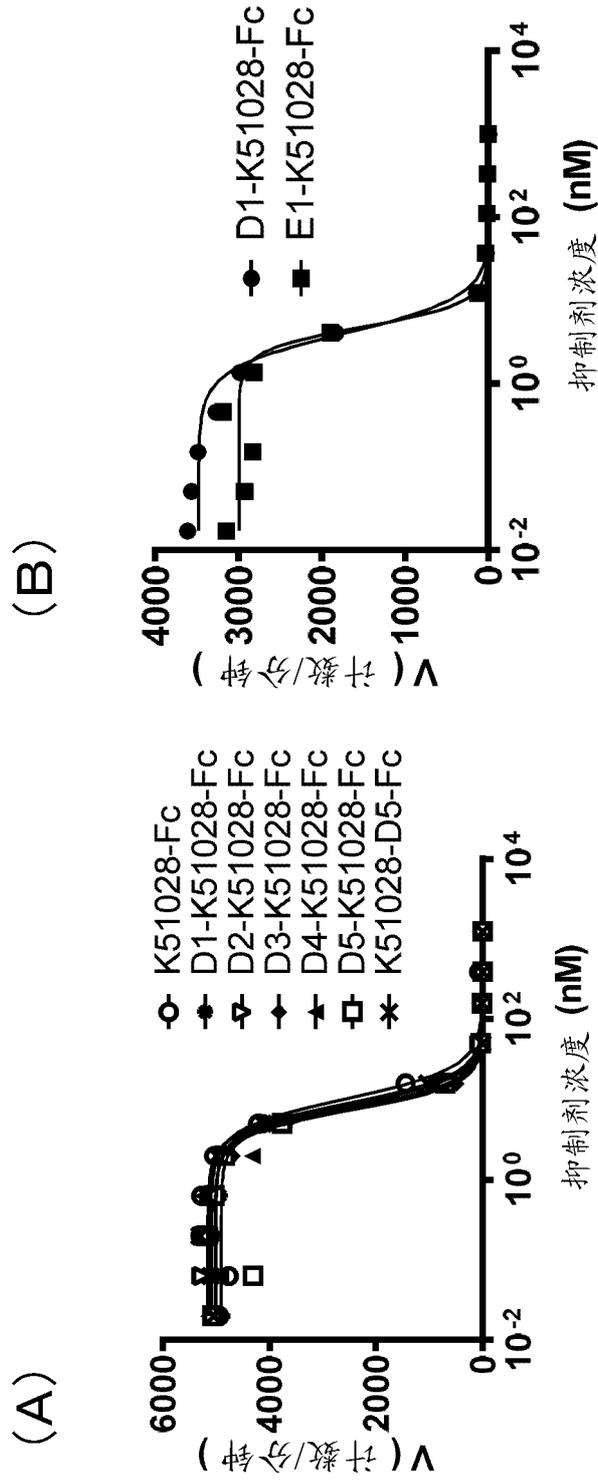


图 2

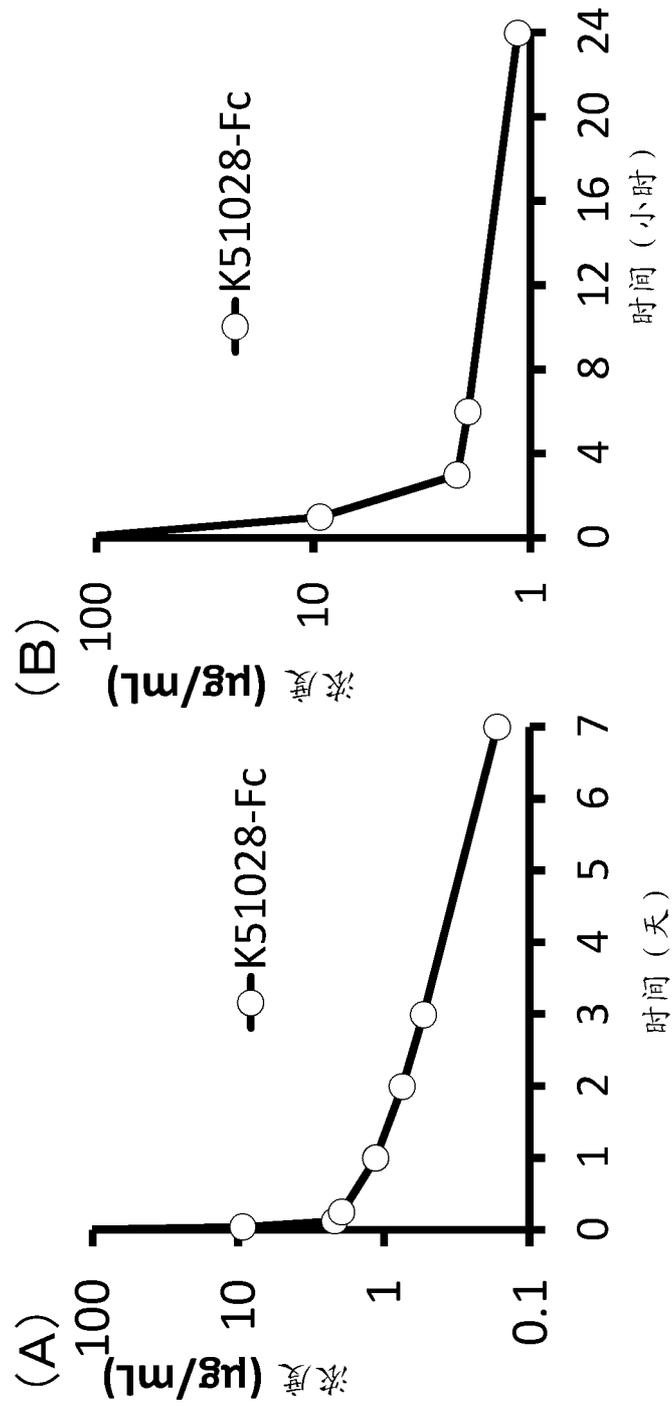


图 3

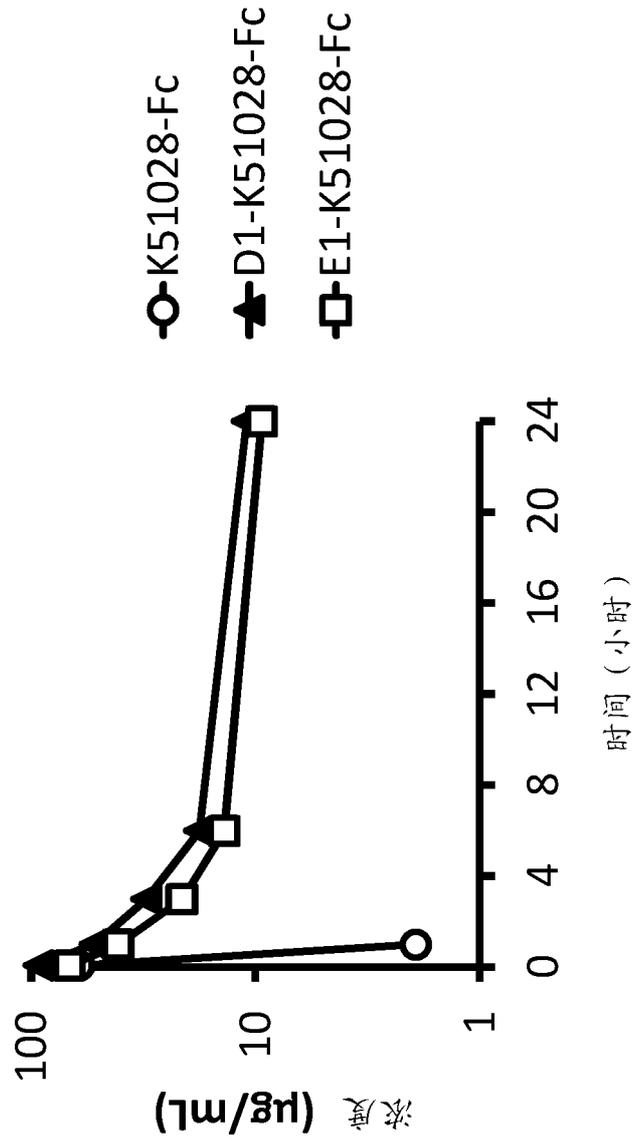


图 4

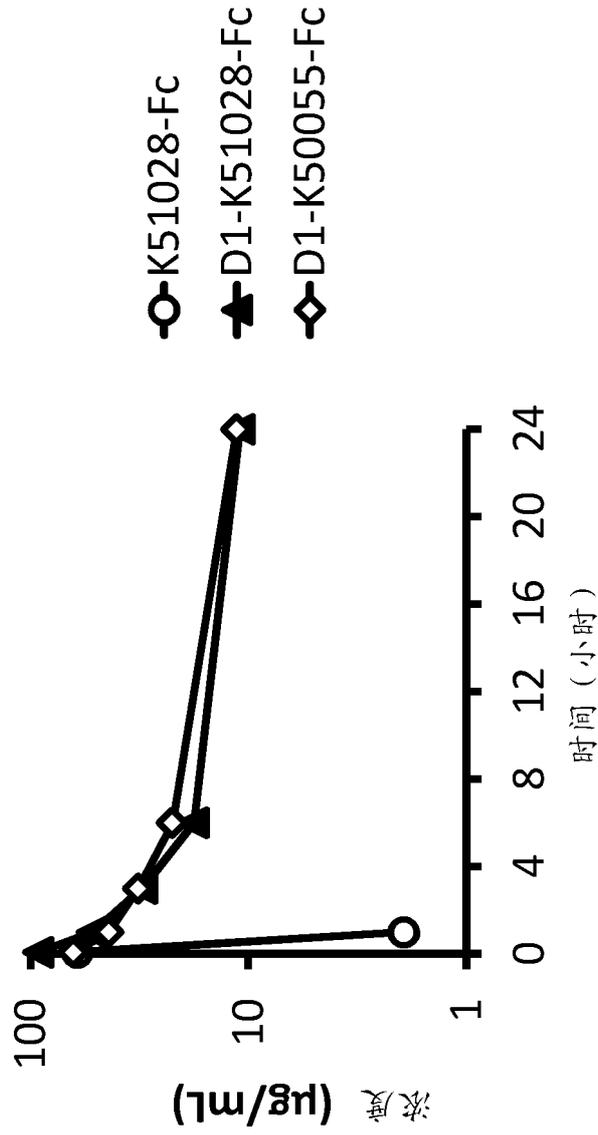


图 5

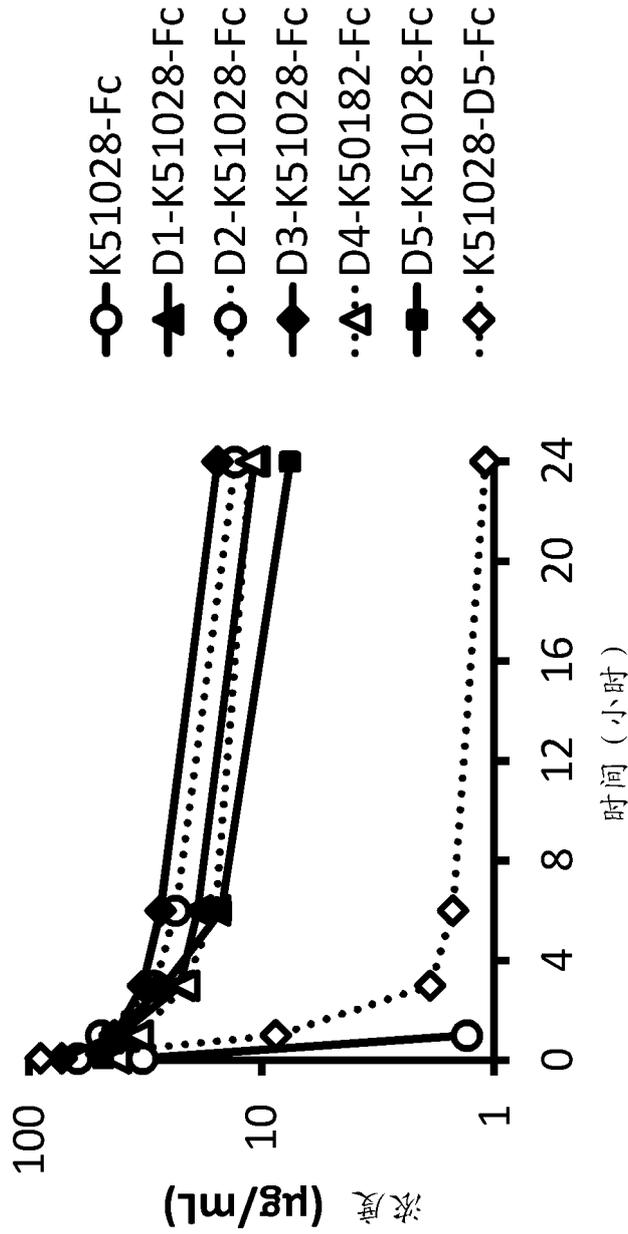


图 6

人SPINK2的氨基酸序列

DPQFGLFSKYRTPNCSQYRLPGCPRHFNPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKI
IRNGPC (SEQ ID NO: 1)

图 7

SPINK2变体肽的通式

GPQFGLFSKYRTPNCX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇CX₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂PVCGSDMSTYANECTLCMK
IREGGHNIKIIRNGPC (SEQ ID NO: 2)

图 8

人KLK5的氨基酸序列

I INGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSL
SPVYESGQQMFQGVKSI PHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRRIRPTKDVRPINVSSHCP
AGTKCLVSGWGTTKSPQVHF PKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAG
RDSCQGDSGGPVVVCNGSLQGLVSWG DYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS
(SEQ ID NO: 3)

图 9

KLK5抑制性肽K50055的氨基酸序列

GPQFGLFSKYRTPNCANTMKQDCTREYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKI
IRNGPCGG (SEQ ID NO: 4)

图 10

KLK5抑制性肽K51028的氨基酸序列

GPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKI
IRNGPCGG (SEQ ID NO: 5)

图 11

KLK5抑制性肽Fc融合体D0-K51028-Fc的氨基酸序列

GPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKI
IRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6)

图 12

KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K51028-Fc的氨基酸序列

DGPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIK
IIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 7)

图 13

KLK5抑制性肽Fc融合体D2-K51028-Fc的氨基酸序列

DDGPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNI
KIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

图 14

KLK5抑制性肽Fc融合体D3-K51028-Fc的氨基酸序列

DDDGPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHN
IKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)

图 15

KLK5抑制性肽Fc融合体D4-K51028-Fc的氨基酸序列

DDDDGPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGH
NIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10)

图 16

KLK5抑制性肽Fc融合体D5-K51028-Fc的氨基酸序列

DDDDDGPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGG
HNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

图 17

KLK5抑制性肽Fc融合体K51028-D5-Fc的氨基酸序列

GPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKI
IRNGPCDDDDDEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 12)

图 18

KLK5抑制性肽Fc融合体E1-K51028-Fc的氨基酸序列

EGPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIK
IIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)

图 19

KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K50055-Fc的氨基酸序列

DGPQFGLFSKYRTPNCANTMKQDCTREYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIK
IIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14)

图 20

引物1的核苷酸序列

AGATGGGTGTTGTCTGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTC (SEQ ID NO: 15)

图 21

引物2的核苷酸序列

GCAGGGGCCATTCCGGAT (SEQ ID NO: 16)

图 22

引物3的核苷酸序列

AGATGGGTGTTGTCTGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTC (SEQ ID NO: 17)

图 23

引物4的核苷酸序列

AGATGGGTGTTGTCTGAAGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTC (SEQ ID NO: 18)

图 24

引物5的核苷酸序列

AGATGGGTGTTGTCTGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTC (SEQ ID NO:
19)

图 25

引物6的核苷酸序列

AGATGGGTGTTGTCTGATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTC (SEQ ID NO:
20)

图 26

引物7的核苷酸序列

AGATGGGTGTTGTCTGATGATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC (SEQ ID NO: 21)

图 27

引物8的核苷酸序列

AGATGGGTGTTGTCTGACGATGATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC (SEQ ID NO: 22)

图 28

引物9的核苷酸序列

AAAATCTAGAGCCGCCACCATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCT (SEQ ID NO: 23)

图 29

引物10的核苷酸序列

AGACAACACCCATCTAGGAGCGGCCACCAGCAGCAGAAAGAACC (SEQ ID NO: 24)

图 30

引物11的核苷酸序列

ATCCGGAATGGCCCTGCGAACCCAAGAGCTGCGAC (SEQ ID NO: 25)

图 31

引物12的核苷酸序列

AAAAGTTTAAACTCATTTGCCGGGGCTCAG (SEQ ID NO: 26)

图 32

引物13的核苷酸序列

GATGACGACGAACCCAAGAGCTGC (SEQ ID NO: 27)

图 33

引物14的核苷酸序列

ATCGTCGCAGGGGCCATTCCG (SEQ ID NO: 28)

图 34

引物15的核苷酸序列

GGCGATTATAAAGATGACGATGATAAACACCATCACCACCATC (SEQ ID NO:
29)

图 35

引物16的核苷酸序列

GTTTAAACTCAATGATGGTGGTGATGGTGTTTATCATCGTCAT (SEQ ID NO:
30)

图 36

引物17的核苷酸序列

AAAATCTAGAGCCGCCACCATGGCCACAGCTAGACCCCCT (SEQ ID NO: 31)

图 37

引物18的核苷酸序列

CGTCATCTTTATAATCGCCGCTGTTGGCCTGGATGGTTTCCTG (SEQ ID NO:
32)

图 38

引物19的核苷酸序列

AAAAGTTTAAACTCAATGATGGTGGTGGTGGTGT (SEQ ID NO: 33)

图 39

人IgG1的Fc区的氨基酸序列

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK (SEQ ID NO: 34)

图 40

引物20的核苷酸序列

TGAGTTTAAACTTTTAAACGGGGG (SEQ ID NO: 35)

图 41

引物21的核苷酸序列

GCAGGGGCCATTCCGGATGATCTT (SEQ ID NO: 36)

图 42

人IgG2的Fc区的氨基酸序列

ERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPMLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 37)

图 43

引物22的核苷酸序列

CGGAATGGCCCCTGCGAGCGTAAGTGTGTGGAGTGT (SEQ ID NO: 38)

图 44

引物23的核苷酸序列

CCCCGTTTAACTCACTTCCAGGGCTCAGGGAAAGGCT (SEQ ID NO: 39)

图 45

人IgG4P的Fc区的氨基酸序列

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
K (SEQ ID NO: 40)

图 46

引物24的核苷酸序列

CGGAATGGCCCCTGCGAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGC (SEQ ID NO: 41)

图 47

引物25的核苷酸序列

CCCCGTTTAACTCATTTGCCAGGCTCAGAGACAGGGA (SEQ ID NO: 42)

图 48

KLK5抑制性肽Fc融合体D0-K51028-Fc (IgG2) 的氨基酸序列

D0-K51028-Fc (IgG2)

GPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKI
IRNGPCERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSL
LSLSPGK (SEQ ID NO: 43)

图 49

KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K51028-Fc (IgG2) 的氨基酸序列

DGPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIK
IIRNGPCERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO: 44)

图 50

KLK5抑制性肽Fc融合体D3-K51028-Fc (IgG2) 的氨基酸序列

DDGQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHN
IKIIRNGPCERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 45)

图 51

KLK5抑制性肽Fc融合体D0-K51028-Fc (IgG4P)的氨基酸序列

GPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKI
IRNGPCESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGLK (SEQ ID NO: 46)

图 52

KLK5抑制性肽Fc融合体D1-K51028-Fc (IgG4P)的氨基酸序列

DGPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIK
IIRNGPCESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSLGLK (SEQ ID NO: 47)

图 53

KLK5抑制性肽Fc融合体D3-K51028-Fc (IgG4P)的氨基酸序列

DDGDPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHN
IKIIRNGPCESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKLSLSLGLK (SEQ ID NO: 48)

图 54

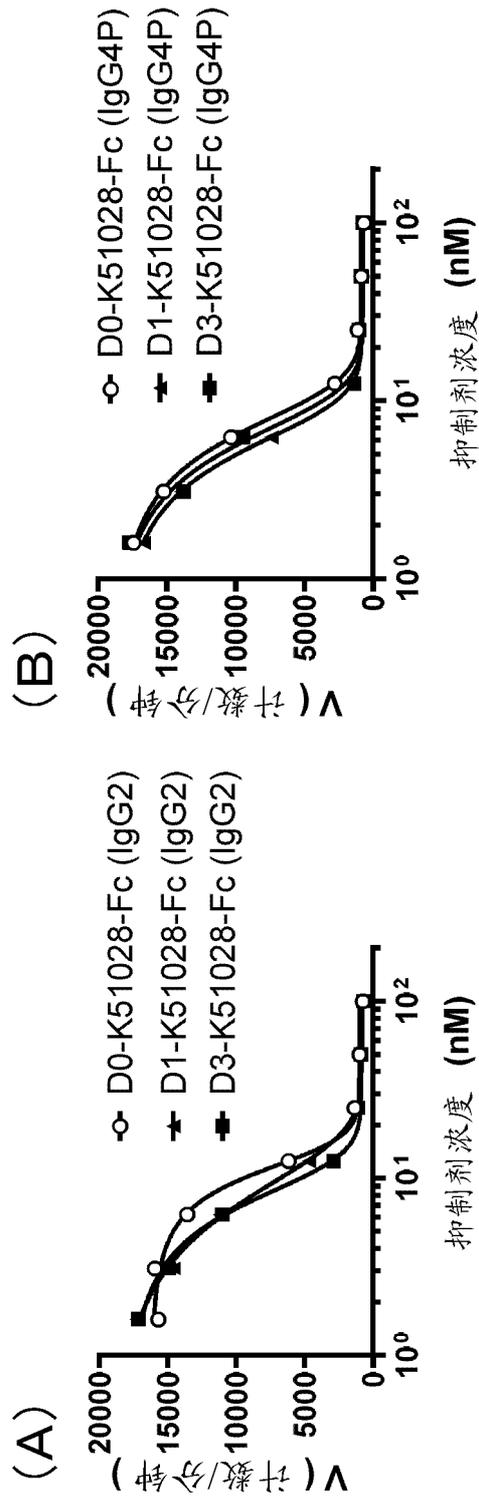


图 55

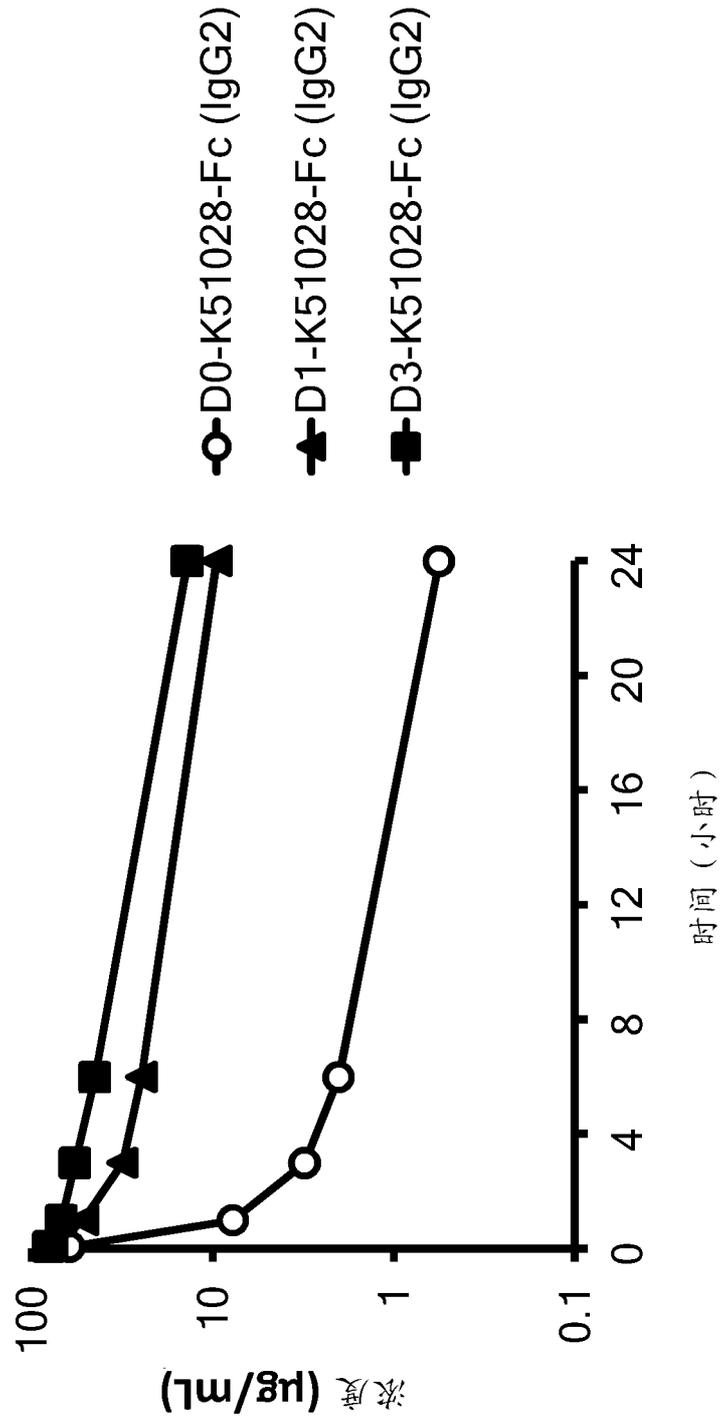


图 56

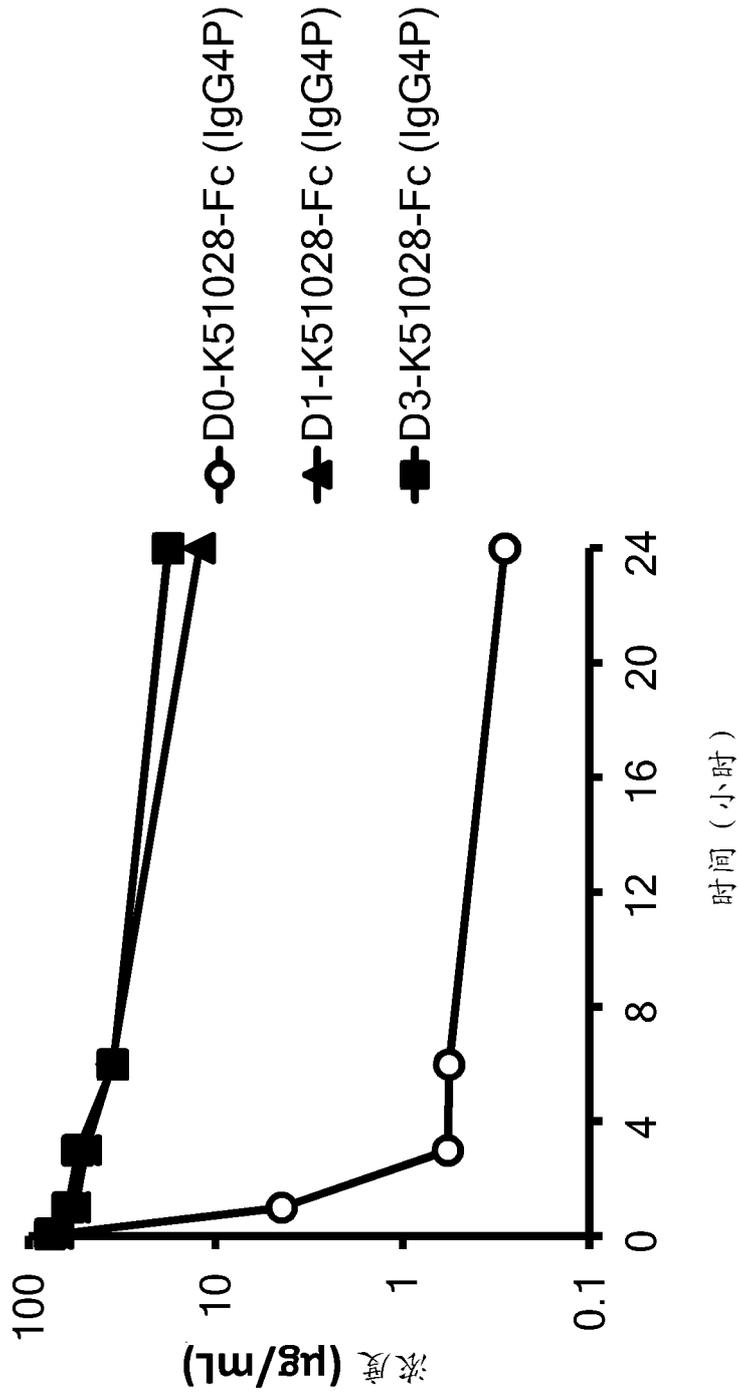


图 57