



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201945014 A

(43) 公開日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 01 日

(21) 申請案號：108106055

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 02 月 22 日

(51) Int. Cl. : A61K35/28 (2015.01)

A61K48/00 (2006.01)

C12N5/078 (2010.01)

(30) 優先權：2018/02/22 美國

62/633,933

2019/01/25 美國

62/796,823

(71) 申請人：美商安卓達治療股份有限公司 (美國) ENTRADA THERAPEUTICS, INC. (US)
美國(72) 發明人：賽瑟曼 納塔拉恩 SETHURAMAN, NATARAJAN (US)；露絲 傑森 RUTH,
JASON (US)；塔爾塔利亞 羅 TARTAGLIA, LOU (US)；裴 德華 PEI, DEHUA
(US)；錢自清 QIAN, ZIQING (CN)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：44 項 圖式數：36 共 246 頁

(54) 名稱

用於治療粒線體性神經胃腸腦病變之組合物及方法

(57) 摘要

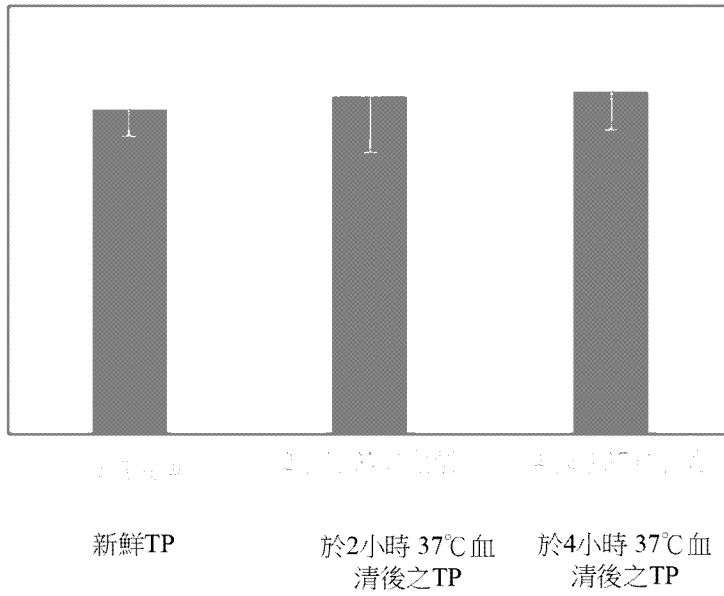
本文中揭示治療組合物及方法，揭示提供用於治療粒線體性神經胃腸腦病變症候群(MNGIE)之化合物。於一些實施例中，該等化合物具有細胞穿透活性及胸苷磷酸化酶活性。於某些實施例中，本文中所揭示之化合物包含：a)至少一個細胞穿透肽(CPP)部分；及 b)胸苷磷酸化酶或其活性片段或類似物(TP)，其中該 CPP 直接或間接偶合 TP。

Disclosed herein are compositions and methods of treating disclosure provides for compounds for use in treating Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy Syndrome (MNGIE). In some embodiments, the compounds have cell penetrating activity and thymidine phosphorylase activity. In certain embodiments, the compounds disclosed herein comprise: a) at least one cell-penetrating peptide (CPP) moiety; and b) a thymidine phosphorylase, or an active fragment or analog thereof (TP), wherein the CPP is coupled, directly or indirectly, to TP.

指定代表圖：

酵素穩定性

20 mM TP 之 酵素活性(S₀)



【圖2B】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療粒線體性神經胃腸腦病變之組合物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING
MITOCHONDRIAL NEUROGASTROINTESTINAL ENCEPHALOPATHY

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 粒線體性神經胃腸腦病變(MNGIE)疾病為一種罕見隱性粒線體性疾病，該疾病影響身體之若干部位，特別是消化系統及神經系統。消化系統異常為MNGIE疾病中最常見且嚴重特徵。幾乎所有患者具有被稱作胃腸動力障礙之病狀，其中消化系統之肌肉及神經不有效移動食物通過消化道。所產生之嚴重消化問題(少量食物產生飽腹感、吞嚥困難、噁心、嘔吐、腹痛、腹瀉及腸道阻塞)導致極端體重損失且減少之肌肉質量(惡病質)。

【0002】 MNGIE疾病特徵亦在於神經系統異常。受感染個體經歷周邊神經病變(特定言之，於手及腳中)，以及其他徵兆及症候群，其可包括下垂症、眼肌麻痺及聽力損失。腦白質病(其為一種稱作白質之腦組織之退化)為MNGIE疾病之標誌。腦中之此等變化通常不引起患有此病症之人之症狀。

【0003】 據信TYMP基因之突變引起MNGIE疾病。此基因提供製備酵素胸苷磷酸化酶(TP)之指令。TP將DNA建構組元胸苷分解成更小分子，幫助調節細胞中之核苷之含量。TYMP突變極大地降低或消除胸苷磷

酸化酶之活性。此導致體內核苷累積之毒性程度，其破壞粒線體DNA (mDNA)之通常維持及修復。所產生之基因變化損害粒線體之正常功能。雖然mDNA異常為MNGIE疾病之消化及神經問題特徵之原因，但是缺陷粒線體如何引起該病症之特定特徵仍在研究中。

【0004】 針對患有MNGIE之彼等，治療選項仍有限。已經評價幹細胞移植(其遭受高死亡率)及肝移植，但是無一提供通用解決方案。因此，該疾病之管理主要通過各種症狀及相關聯微恙之支持性護理。因而，明顯需要新穎療法來治療此致命病狀。

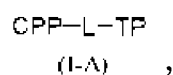
【發明內容】

【0005】 於各種實施例中，本發明提供用於治療粒線體性神經胃腸腦病變症候群(MNGIE)之化合物。於實施例中，該等化合物具有細胞穿透活性及胸苷磷酸化酶活性。於某些實施例中，本文中所揭示之化合物包含：a)至少一個細胞穿透肽(CPP)部分；及b)胸苷磷酸化酶或其活性片段或類似物(TP)，其中該CPP直接或間接偶合TP。

【0006】 於本發明之一些實施例中，該CPP直接或間接與該TP結合。

【0007】 於本發明之一些實施例中，該等化合物還包含連接子(L)，其將該CPP與TP結合。於其他實施例中，該連接子將該CPP與該TP之N端或C端結合。於另一實施例中，該連接子將該CPP與該TP之N端結合。於其他實施例中，該連接子將該CPP與該TP之胺基酸之側鏈結合。

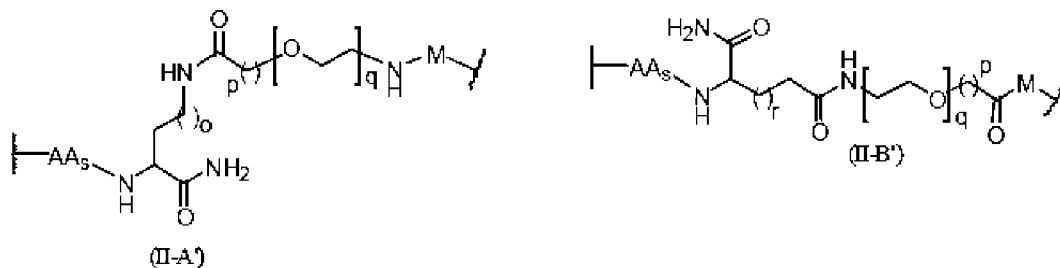
【0008】 於某些實施例中，本文中所揭示之化合物具有如式I-A之結構：



其中L共價鍵結至該CPP上之胺基酸之側鏈及該TP之N端、TP之胺基酸之側鏈或該TP之C端。於一些實施例中，L共價鍵結至TP之N端。於其他實施例中，L共價鍵結至TP之C端。於仍其他實施例中，L共價鍵結至TP之胺基酸之側鏈。於一些實施例中，該CPP為環狀細胞穿透肽(cCPP)。

【0009】於本發明之各種實施例中，L為一或多個D或L胺基酸，其各視情況經取代；伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基或雜環基，其各視情況經取代；或 $-(R^1-X-R^2)_z-$ ，其中在各情況下， R^1 及 R^2 各係獨立地選自伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基及雜環基，各X獨立地為 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S及O，其中各 R^3 係獨立地選自H、烷基、烯基、炔基、碳環基及雜環基，其各視情況經取代，且z為1至20之整數；或其組合。

【0010】於一些實施例中，L具有如式II-A'或II-B'之結構：



其中

M係不存在或為將L與TP上之胺基酸結合之基團；

AA_s為該CPP上之胺基酸之側鏈或末端；

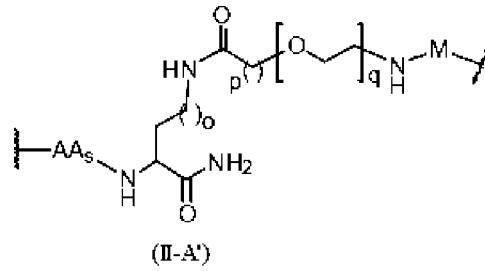
o為0至10之整數；

p為0至10之整數；

q為1至50之整數；且

r為0或1。

【0011】於本發明之某些實施例中，L為式II-A'：



其中

M係不存在或為將L與TP結合之基團；

AA_s為該CPP上之胺基酸之側鏈或末端；

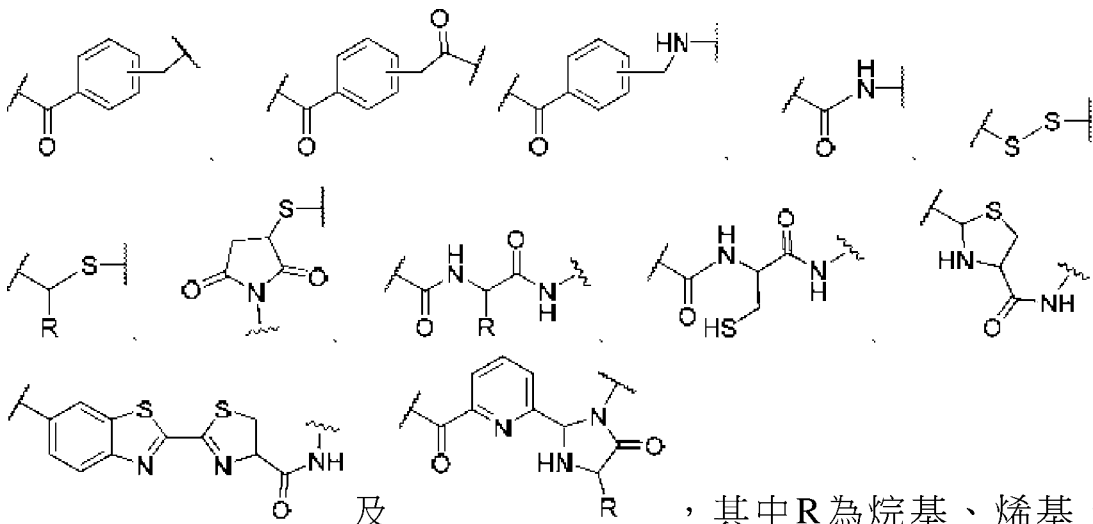
u為0或1；

o為3；

p為2；且

q為10至15之整數。

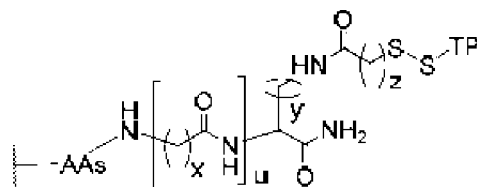
【0012】於各種實施例中，M係存在且包括伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基或雜環基，其各視情況經取代。於一些實施例中，M係存在且選自由以下組成之群：



，其中R為烷基、烯基、炔基、碳環基或雜環基。於特定實施例中，M為

【0013】於本發明之一些實施例中， u 為0。於其他實施例中， p 為2。於仍其他實施例中， q 為12。於一些實施例中， u 為0， p 為2且 q 為2。

【0014】於一些實施例中， L 為式II-C'：



II-C'

其中：

AA_s 為該CPP上之胺基酸之側鏈或末端；

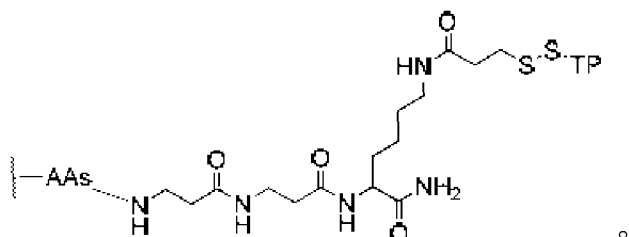
z 為0至10之整數；

y 為0至10之整數；

x 為0至10之整數；且

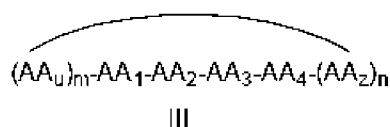
u 為1至50之整數。

【0015】於一些實施例中， L 為



【0016】於本發明之各種實施例中， L 或 M 共價鍵結至 TP 之N端或 TP 之C端。於另一實施例中， L 或 M 共價鍵結至 TP 之N端。於一些實施例中， L 或 M 共價鍵結至 TP 之胺基酸(例如，半胱胺酸)之側鏈。

【0017】於一些實施例中，本文中所揭示之化合物包含cCPP，其具有包括式III之序列：



III

其中：

AA_1 、 AA_2 、 AA_3 及 AA_4 各係獨立地選自D或L胺基酸，

在各情況下及當存在時， AA_u 及 AA_z 各係獨立地選自D或L胺基酸，

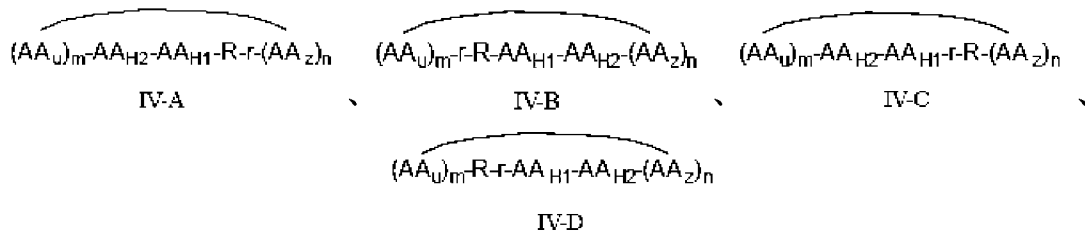
m 及 n 係獨立地選自0至6之數字；及

其中：

AA_u (在各情況下及當存在時)、 AA_1 、 AA_2 、 AA_3 、 AA_4 及 AA_z (在各情況下及當存在時)中之至少兩者獨立地為精胺酸，且

AA_u (在各情況下及當存在時)、 AA_1 、 AA_2 、 AA_3 、 AA_4 及 AA_z (在各情況下及當存在時)中之至少兩者獨立地為疏水性胺基酸。

【0018】 於一些實施例中，該化合物包含cCPP，其具有包括式IV-A至D中任一者之序列：



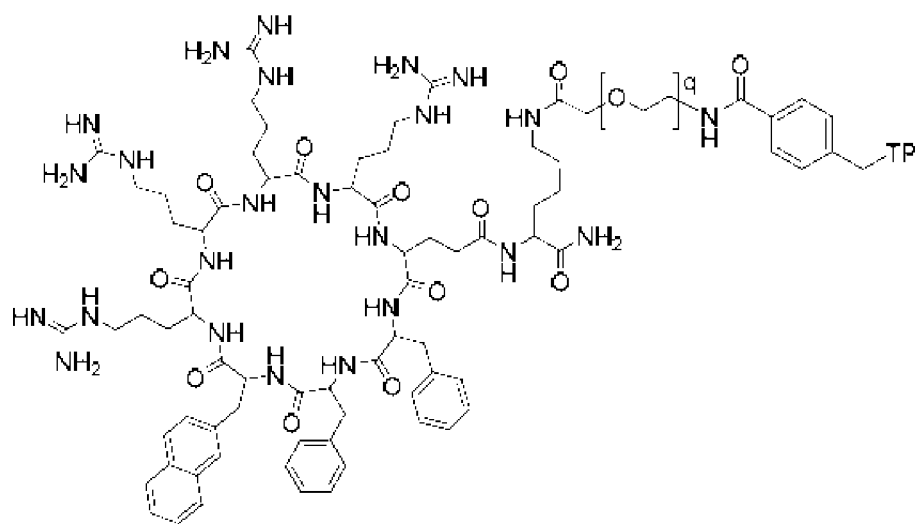
其中：

AA_{H1} 及 AA_{H2} 各獨立地為D或L疏水性胺基酸；

在各情況下及當存在時， AA_u 及 AA_z 各獨立地為D或L胺基酸；且

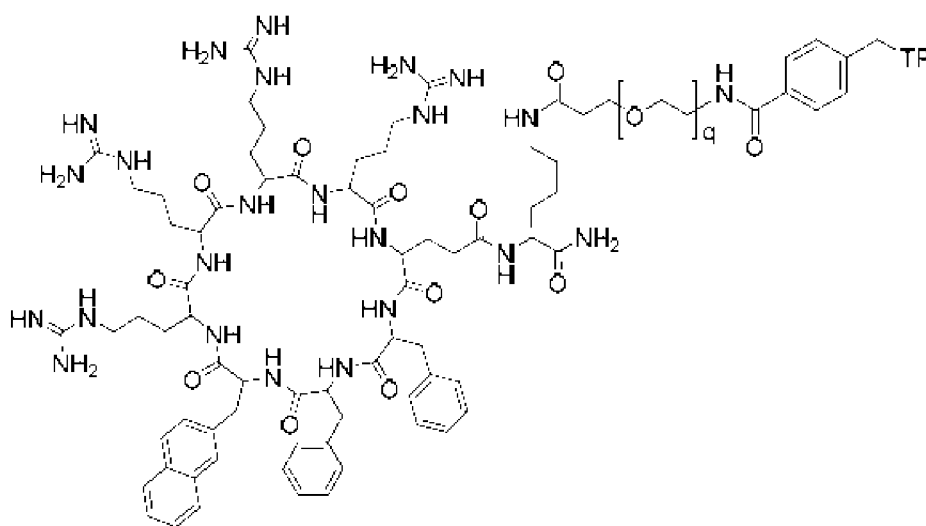
m 及 n 係獨立地選自0至6之數字。

【0019】 於本發明之各種實施例中，該化合物具有如式V-A1或V-A2之結構：



(V-A1)

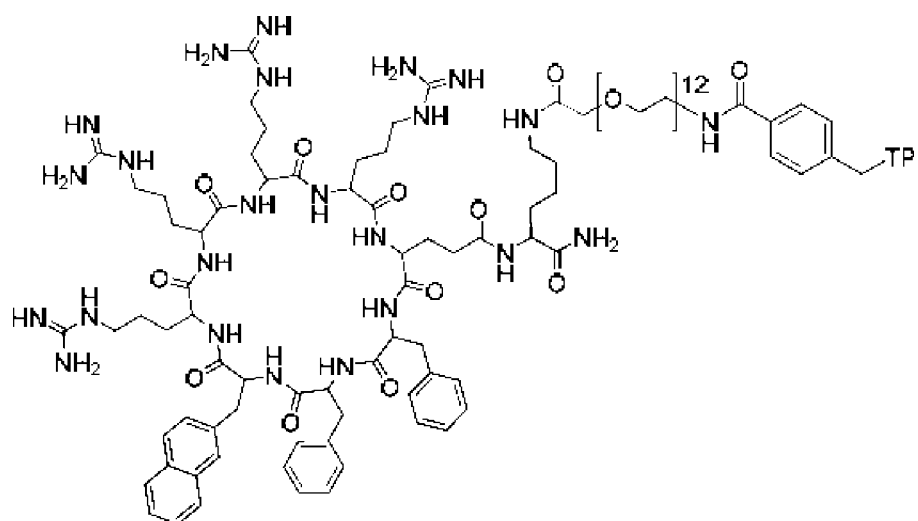
或



(V-A2)

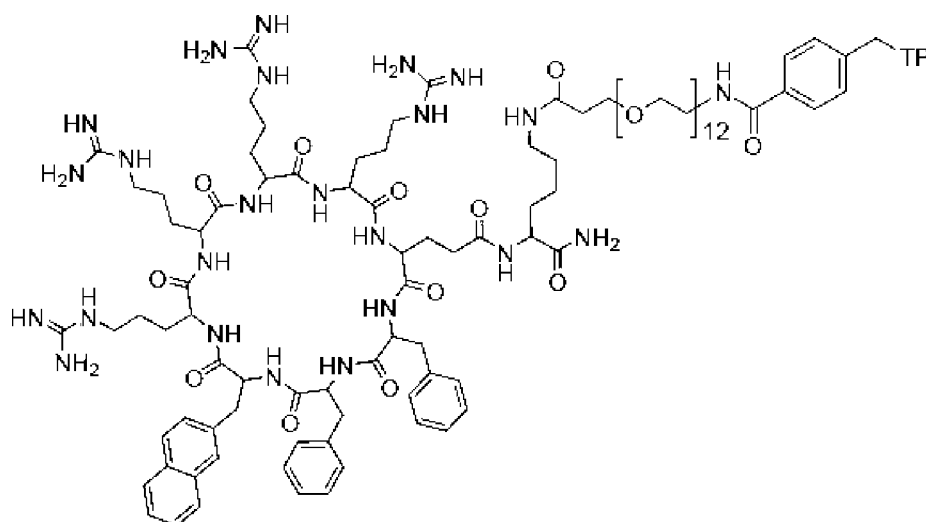
【0020】於一些實施例中， q 為1至50之整數。於其他實施例中， q 為10至15之整數。於仍其他實施例中， q 為12。

【0021】於一些實施例中，本發明之化合物具有如式V-B1或V-B2之結構：



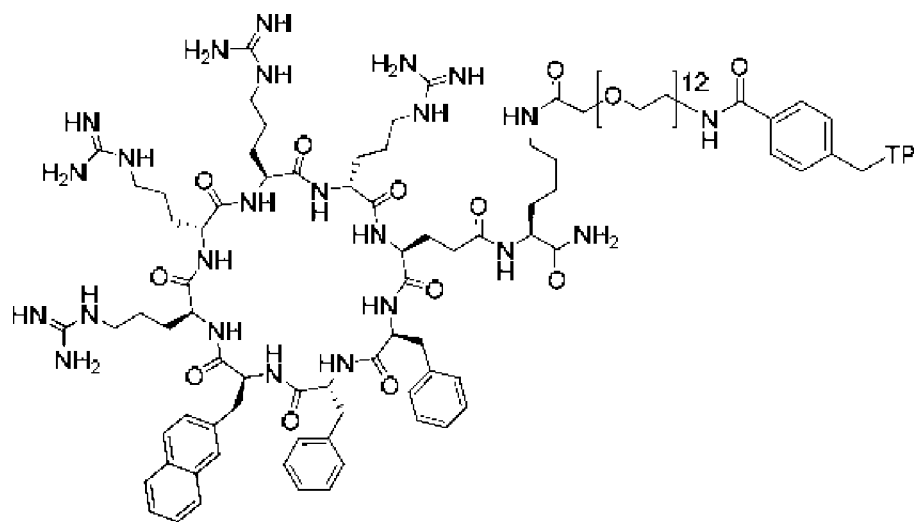
(V-B1)

或



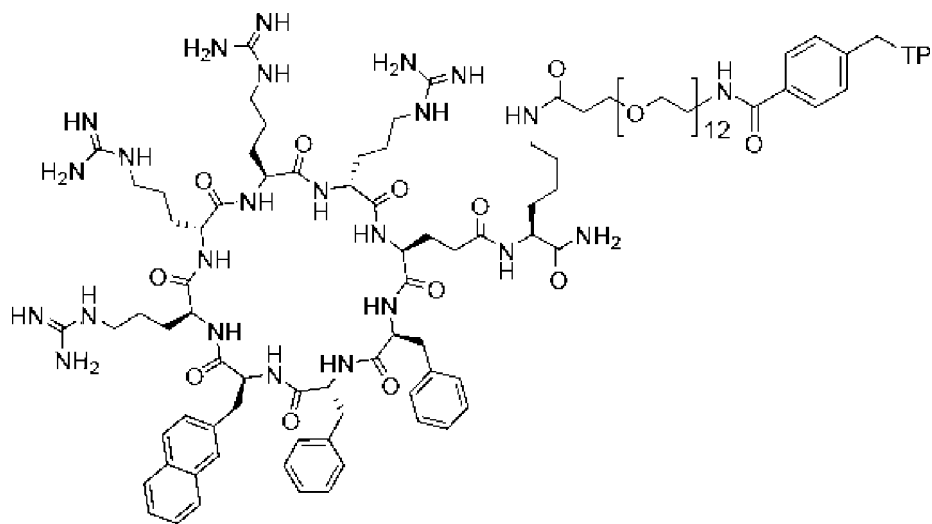
(V-B2)

【0022】於其他實施例中，本發明提供具有下列式V-B3或V-B4之結構之化合物：



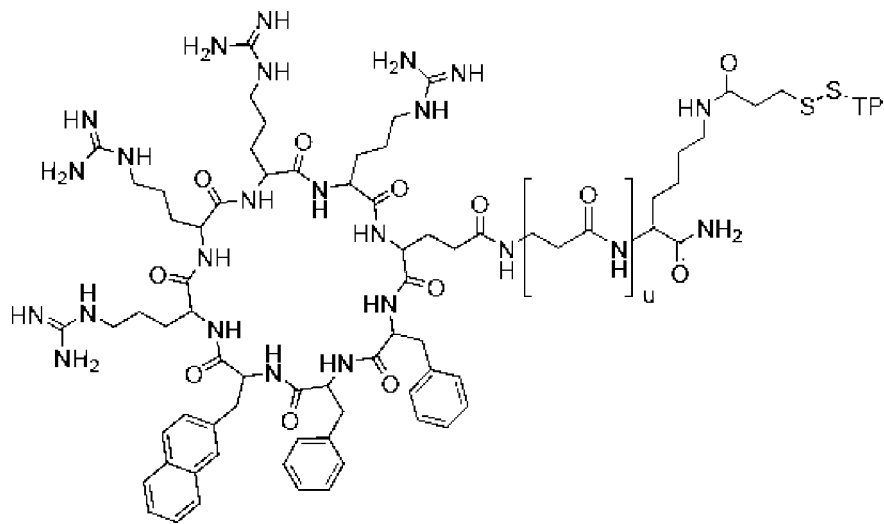
(V-B3)

或



(V-B4)

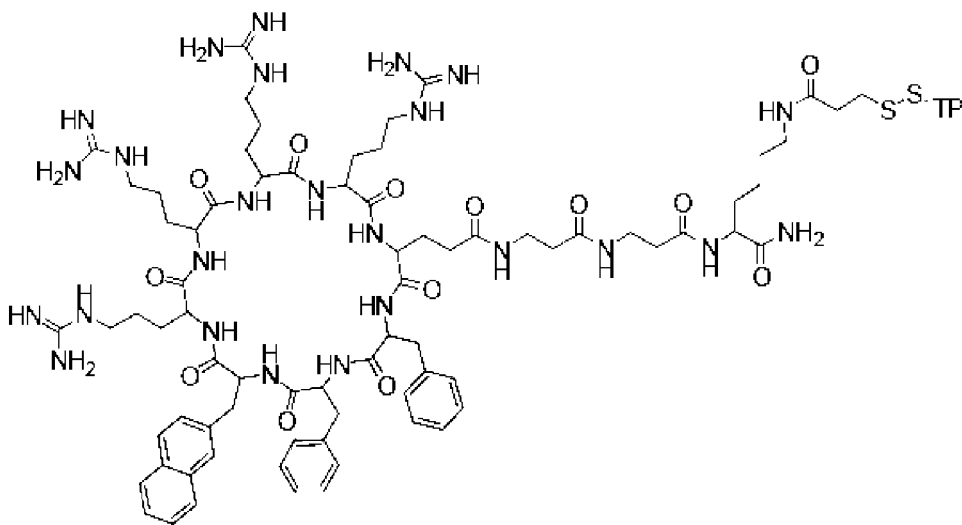
【0023】於一些實施例中，本發明提供具有下列式V-A3之結構之化合物：



(V-A3)

【0024】於一些實施例中， u 為1至50之整數。於其他實施例中， u 為1至5之整數。於仍其他實施例中， u 為2。

【0025】於一些實施例中，式V-A3化合物具有下列結構：



【0026】於一些實施例中，本文中所揭示之化合物包含TP，該TP具有與SEQ ID NO. 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13至少85% (例如，90%、95%或99%)同一性之胺基酸序列。

【0027】於各種實施例中，本發明提供治療有需要之患者之粒線體性神經胃腸腦病變(MNGIE)之方法，其包括投與本文中所揭示之化合物。

【0028】於一些實施例中，本發明提供降低有需要之患者之胸苷之細胞外及/或細胞內含量的方法，其包括投與本文中所揭示之化合物。於其他實施例中，該方法係用於治療粒線體性神經胃腸腦病變(MNGIE)。

【0029】於仍其他實施例中，本發明提供包含本文中所揭示之化合物之細胞。

【圖式簡單說明】

【0030】圖1A為顯示His標記之胸苷磷酸化酶之表現及純化之SDS-PAGE分析。His標記之TP11係自在25°C下用0.25 mM IPTG誘導過夜之使用Terrific Broth (TB)的大腸桿菌(*E. coli*)培養物表現。自左至右為分子量標記物(MW)、全細胞裂解物(WC)、於細胞裂解後之上清液(Sup)、自His-Trap管柱流過(FT)、洗滌(W)、溶離(E1-E3)。通常自1 L大腸桿菌培養物獲得100 mg His-TP。

【0031】圖1B為顯示His-標籤藉由腸激酶蛋白酶自His-TP11裂解之SDS-PAGE分析。自左至右：分子量標記物(MW)、裂解之前(泳道1)、蛋白酶裂解反應(泳道2)、自His-Trap管柱流過(泳道3)、自His-Trap管柱溶離(泳道4)及濃縮之無標籤TP產物(泳道5)。

【0032】圖2A為顯示CPP12-N-TP11之結合及產生之SDS-PAGE分析。

【0033】圖2B為顯示於2小時及4小時處理後，小鼠血清中之TP11之酵素活性之維持(即，酵素穩定性)的圖。

【0034】圖3為藉由TP與cCPP12-PEG₁₂-FBA之間之還原胺化反應產生之cCPP12-N-TP之結構圖。

【0035】圖4A為比較未結合之人類TP11 (40 nM)之酵素活性與

cCPP12-N-TP11 (40 nM)之酵素活性之圖。

【0036】 圖4B為比較在三個冷凍及解凍週期之前(左)及之後(右)，CPP12-N-TP11 (40 nM)之酵素活性之圖。

【0037】 圖4C為顯示於2小時處理後，小鼠血清或細胞生長培養基(DMEM + FBS)中之40 nM cCPP12-N-TP11之酵素活性之維持(即，酵素穩定性)的圖。

【0038】 圖5顯示於37 °C 下處理0小時、2小時、12小時或24小時後，小鼠血清中之經Alexa568標示之TP11及經Alexa568標示之cCPP12-N-TP11之血清穩定性。未觀察到降解。

【0039】 圖6A顯示西方墨點法(Western Blotting)分析，該分析比較於利用1) 1 μ M cCPP12-N-TP11；2) 1 μ M TP11；或3)對照培養基預處理6小時之海拉細胞(具有正常TP含量之WT)與LS174T細胞(TP缺乏)中之細胞內TP的量。cCPP12-N-TP11有效進入細胞且係酶促活性。

【0040】 圖6B顯示於利用1) 1 μ M cCPP12-N-TP11；2) 1 μ M TP11；或3)對照培養基預處理6小時之海拉細胞(具有正常TP含量之WT)與LS174T細胞(TP缺乏)中之細胞內TP活性的圖。cCPP12-N-TP11有效進入細胞且係酶促活性。

【0041】 圖7為顯示劑量依賴性遞送TP11進入LS174T細胞的西方墨點法分析：1)利用培養基處理之LS174T細胞(陰性對照)；2)利用1 μ M TP11培育之LS174T細胞；3)利用0.1 μ M CPP12-TP11培育之LS174T細胞；4)利用0.5 μ M CPP12-N-TP11培育之LS174T細胞；5)利用1 μ M CPP12-N-TP11培育之LS174T細胞；6)蛋白梯；7)人類肝勻漿(陽性對照)；及8) 5 ng新鮮TP11。

【0042】 圖8為顯示藉由TP酵素活性分析之遞送至TP缺乏LS174細胞中之全細胞或胞質TP活性的圖：1)利用培養基處理之LS174T細胞(陰性對照)；2)利用1 μ M TP11培育之LS174T細胞；3)利用0.1 μ M cCPP12-N-TP11培育之LS174T細胞；4)利用0.5 μ M cCPP12-N-TP11培育之LS174T細胞；5)利用1 μ M CPP12-N-TP11培育之LS174T細胞；6)利用1 μ M cCPP12-N-TP11培育且用胞質裂解緩衝液裂解之LS174T細胞；及7) 20 nM新鮮cCPP12-N-TP11。圖8中所示之資料係來自重複實驗。

【0043】 圖9為顯示利用本文中所揭示之CPP12-N-TP11結合物處理之MNGIE小鼠相較於對照中之血清胸苷含量的圖。

【0044】 圖10A為顯示於第26天投與cCPP12-N-TP11結合物後，在第27天，MNGIE小鼠之血清中之胸苷濃度之降低%的圖。圖10B為顯示於每週一次投與四週後，在第四週，於MNGIE小鼠血清中藉由ELISA檢測抗CPP-TP抗體之圖。使用學生t-檢驗(Student's t-test)進行統計分析(***)指示p-值 < 0.0001)。

【0045】 圖11顯示於靜脈內注射cCPP12-N-TP11結合物後在下列時間點量測之胸苷含量：第一週及第二週於處理後24小時(分別為W1-24hr及W2-24hr)；第三週於處理後32小時(W3-32hr)；及第四週於處理後36小時(W3-36hr)。

【0046】 圖12為顯示於利用以下處理24、32或36小時後，MNGIE小鼠之血清中之胸苷磷酸化酶含量的圖：對照、非PEG化之cCPP12-N-TP11結合物(cCPP12-TP)、經螢光標示之cCPP-TP結合物(cCPP12-N-TP11-AF568)及兩種PEG化之cCPP-TP結合物(cCPP12-N-TP11-PEG12及cCPP12-N-TP11-PEG5K)。

【0047】 圖 13 顯示於靜脈內注射非 PEG 化之 cCPP-TP 結合物 (cCPP12-N-TP11) 及經螢光標示之 cCPP-TP 結合物 (cCPP12-N-TP11-AF568) 後相較於兩種 PEG 化之 cCPP-TP 結合物 (cCPP12-N-TP11-PEG12 及 cCPP12-N-TP11-PEG5K) 在各時間點量測之胸苷濃度 (μM)。

【0048】 圖 14 為顯示相較於非 PEG 化之 cCPP-TP 結合物 (cCPP12-N-TP11 20 mpk) 及對照，於利用 PEG 化之 cCPP-TP 結合物 (cCPP12-N-TP11-PEG5K 在 16 mpk 下) 處理後，MNGIE 小鼠中之血清胸苷濃度 (μM) 之圖。

【0049】 圖 15A 為顯示藉由西方墨點法測定之於 20 mpk 靜脈內注射 0.5 小時、2 小時、8 小時、24 小時或 48 小時後，cCPP12-N-TP11 之濃度 (nM) 之圖。圖 15B 為顯示於 20 mpk 靜脈內注射 0.5 小時、2 小時、8 小時、24 小時或 48 小時後，TP 之濃度 (nM) 之圖，如藉由西方墨點法所測定。# 指示蛋白質含量係在檢測限以下。

【0050】 圖 16A 為顯示於靜脈內投與 24 小時後，經螢光標示之 cCPP-TP (cCPP12-N-TP11-AF568) 之生物分佈的長條圖，如藉由於組織勻漿中之螢光所量測得。圖 16B 為顯示於靜脈內投與 24 小時後，肝、肺及腸中之經螢光標示之 cCPP-TP (cCPP12-N-TP11-AF568) 之定位的圖，如藉由共焦螢光成像所量測。

【0051】 圖 17A 為顯示無標籤胸苷磷酸化酶之表現及純化之 SDS-PAGE 分析。TP16 係自大腸桿菌培養物表現，該培養物於 PDI 環受控生物反應器中使用最小培養基作為批式培養基及酵母提取物作為饋料批式培養基。自左至右為 1. 細胞裂解物之上清液，2. 自第一苯基瓊脂糖層析捕獲步驟流過，3. 利用 50% 緩衝液 B 自苯基瓊脂糖層析溶離，4. 利用 75% 緩衝液 B 自疏水性相互作用層析溶離，5. 利用 100% 緩衝液 B 自疏水性相互作用層析

溶離。

【0052】 圖17B為顯示來自使用Capto黏附多元層析純化TP16之溶離譜的SDS-PAGE分析。

【0053】 圖18為cCPP12-SS-SPDP之結構。

【0054】 圖19為顯示cCPP結合之TP蛋白質之SDS-PAGE分析。1. TP11蛋白質，2. cCPP12-N-TP11蛋白質，3. TP16蛋白質，4. cCPP12-N-TP16蛋白質。

【0055】 圖20為TP11、TP16、經PEG10K修飾之TP11、經PEG10K修飾之TP16、cCPP12-SS-TP11-PEG10K或cCPP12-SS-TP16-PEG10K之RP-HPLC分析。

【0056】 圖21為比較TP11(右)及TP16(左)之酵素活性之圖。

【0057】 圖22為比較(自右至左)TP11、cCPP12-SS-TP16-PEG10K、cCPP12-SS-TP11-PEG10K及cCPP12-N-TP16-PEG10K之酵素活性之圖。

【0058】 圖23為顯示在靜脈內注射10 mpk之PEG化之cCPP-TP結合物：cCPP12-N-TP11-PEG5K、cCPP12-N-TP11-PEG10K、cCPP12-N-TP11-PEG40K直鏈或cCPP12-N-TP11-PEG40K分支鏈3或6天後量測之血清中之胸苷(Thd)濃度(μM)及去氧尿苷(dUrd)濃度(μM)的圖(W1資料)。

【0059】 圖24A為顯示在靜脈內注射5 mpk之PEG化之cCPP-TP結合物：cCPP12-N-TP11-PEG5K、cCPP12-N-TP11-PEG10K、cCPP12-N-TP11-PEG40K直鏈或cCPP12-N-TP11-PEG40K分支鏈3天後量測之血清中之胸苷(Thd)濃度(μM)及去氧尿苷(dUrd)濃度(μM)的圖(W3資料)。

【0060】 圖24B為顯示在靜脈內注射5 mpk之PEG化之CPP-TP結合

物：cCPP12-N-TP11-PEG5K、cCPP12-N-TP11-PEG10K、cCPP12-N-TP11-PEG40K直鏈或cCPP12-N-TP11-PEG40K分支鏈3天後量測之血清中之胸苷(Thd)濃度(μM)及去氧尿苷(dUrd)濃度(μM)的圖(W4資料)。

【0061】圖25為顯示在靜脈內注射10 mpk (W1)或5 mpk (W2、W3及W4)之CPP12-N-TP11-PEG10K (一個月內每週一次注射) 3天後量測之血清中之胸苷(Thd)濃度(μM)之耗盡的圖。

【0062】圖26A為顯示在靜脈內注射10 mpk之PEG化之CPP-TP結合物：cCPP12-N-TP11-PEG5K、cCPP12-N-TP11-PEG10K、cCPP12-N-TP11-PEG40K直鏈或cCPP12-N-TP11-PEG40K分支鏈3天後量測之血清中之特異性TP活性的圖(W1數據)。

【0063】圖26B為顯示在靜脈內注射5 mpk之PEG化之CPP-TP結合物：cCPP12-N-TP11-PEG5K、cCPP12-N-TP11-PEG10K、cCPP12-N-TP11-PEG40K直鏈或cCPP12-N-TP11-PEG40K分支鏈3天後量測之血清中之特異性TP活性的圖(W4數據)。

【0064】圖27A為顯示在靜脈內注射5 mpk之cCPP12-N-TP11、cCPP12-N-TP16或PBS對照5分鐘、8小時、24小時、36小時或48小時後量測之血清中之胸苷(Thd)濃度的圖。

【0065】圖27B為顯示在靜脈內注射5 mpk之cCPP12-N-TP11、cCPP12-N-TP16或PBS對照5分鐘、8小時、24小時、36小時或48小時後量測之血清中之特異性TP活性的圖。

【0066】圖28A為顯示在靜脈內注射5 mpk之cCPP12-N-TP11-PEG10K、cCPP12-N-TP16-PEG10K或PBS對照5分鐘、8小時、24小時、48小時、72小時或96小時後量測之血清中之胸苷(Thd)濃度的圖。

【0067】 圖28B為顯示在靜脈內注射5 mpk之cCPP12-N-TP11-PEG10K、cCPP12-N-TP16-PEG10K或PBS對照5分鐘、8小時、24小時、48小時、72小時或96小時後量測之血清中之特異性TP活性的圖。

【0068】 圖29A為顯示在靜脈內注射5 mpk之cCPP12-SS-TP11-PEG10K或cCPP12-SS-TP16-PEG10K 5分鐘、8小時、24小時、48小時、72小時或96小時後量測之血清中之胸昔(Thd)濃度的圖。

【0069】 圖29B為顯示在靜脈內注射5 mpk之cCPP12-SS-TP11-PEG10K或cCPP12-SS-TP16-PEG10K 5分鐘、8小時、24小時、48小時、72小時或96小時後血清中之特異性TP活性的圖。

【0070】 圖30為顯示Fc-TP16及CPP結合之Fc-TP16之SDS-PAGE分析。泳道1. 經純化之Fc-TP16 (表6中之SEQ ID NO. 7)，及泳道2. cCPP12-N-Fc-TP16結合之蛋白質。

【0071】 圖31為比較Fc-TP16 (左)、cCPP12-N-FcTP16 (中)及未結合之TP11 (右)之酵素活性之圖。

【0072】 圖32為顯示在靜脈內注射5 mpk之Fc-TP16或cCPP12-N-Fc-TP16 5分鐘、24小時、48小時、72小時、120小時或156小時後量測之血清中之胸昔(Thd)濃度的圖。

【0073】 圖33為顯示在靜脈內注射5 mpk之Fc-TP16或cCPP12-N-Fc-TP16 5分鐘、24小時、48小時、72小時、120小時或156小時後血清中之特異性TP活性的圖。

【0074】 圖34為顯示如藉由TP酵素活性所分析之遞送至TP缺乏LS174細胞中之胞質TP活性的圖：1)利用培養基處理之LS174T細胞(陰性對照)；2)利用1 μ M TP11培育之LS174T細胞；3)利用1 μ M cCPP12-N-

TP11培育之LS174T細胞；4)利用1 μ M cCPP12-N-TP11-PEG10K培育之LS174T細胞；5)利用1 μ M cCPP12-N-TP16-PEG10K培育之LS174T細胞；(6)利用1 μ M cCPP12-SS-TP11-PEG10K培育之LS174T細胞；及(7)利用1 μ M cCPP12-SS-TP16-PEG10K培育之LS174T細胞。

【0075】圖35為顯示TP16之再摺疊過程之SDS-PAGE分析。自左至右：分子量標記物(泳道1)，溶解之內含體(泳道2)，於快速稀釋後再摺疊蛋白質(泳道3)，自Q瓊脂糖層析流過。

【0076】圖36為比較自可溶性溶離份純化之TP16 (左)及自再摺疊過程獲得之TP16 (右)之酵素活性的圖。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0077】本申請案主張2018年2月22日申請之美國臨時申請案第62/633,933號及2019年1月25日申請之美國臨時申請案第62/796,823號之權益，出於所有目的，其各者之全部內容以引用的方式併入本文中。

定義

【0078】術語「醫藥上可接受」意指適用於與人類及動物之組織接觸而無不當毒性、刺激、過敏反應等，與合理效益/風險比相當，且針對在合理範圍的醫療判斷下之其預期用途有效。

【0079】術語「醫藥上可接受之鹽」包括藉由作為鹼起作用之活性化合物與無機酸或有機酸反應形成鹽而獲得之彼等，例如，以下之鹽：鹽酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、樟腦磺酸、草酸、馬來酸、琥珀酸、檸檬酸、甲酸、氫溴酸、苯甲酸、酒石酸、富馬酸、水楊酸、扁桃酸、碳酸等。熟習此項技術者將另外知曉，酸加成鹽可藉由化合物與適宜無機酸或有機酸

反應經由許多已知方法中之任一者來製備。術語「醫藥上可接受之鹽」亦包括藉由作為酸起作用之活性化合物與無機鹼或有機鹼反應形成鹽而獲得之彼等，例如，以下之鹽：乙二胺、N-甲基葡糖胺、離胺酸、精胺酸、鳥胺酸、膽鹼、N,N'-二苄基乙二胺、氯普魯卡因(chloroprocaine)、二乙醇胺、普魯卡因(procaine)、N-苄基苯乙胺、二乙胺、哌嗪、參-(羥甲基)-胺基甲烷、四甲基氫氧化銨、三乙胺、二苄胺、安非胺、脫氫松香胺、N-乙基哌啶、苄胺、四甲基銨、四乙基銨、甲胺、二甲胺、三甲胺、乙胺、鹼性胺基酸等。無機鹽或金屬鹽之非限制性實例包括鋰鹽、鈉鹽、鈣鹽、鉀鹽、鎂鹽等。

【0080】 如本文中所用，「治療(treat/treating/treatment)」及其變型係指胸苷磷酸化酶(TP)之任何投與，該投與部分或完全減輕、改善、緩解、抑制如本文中所述之粒線體性神經胃腸腦病變(MNGIE)之一或多個症狀或特徵，延遲其發作，降低其嚴重度及/或減少其發生率。

【0081】 如本文中所用，「治療上有效」係指賦予對患者治療效果之TP之量。於一些實施例中，該治療上有效量為足以治療MNGIE之量。

【0082】 如本文中所用，「細胞穿透肽」或「CPP」係指能穿透細胞膜之任何肽。於一些實施例中，該環狀細胞穿透肽亦能引導蛋白質(例如，TP)穿透細胞膜。於一些實施例中，該細胞穿透肽為環狀細胞穿透肽(cCPP)。於一些實施例中，該CPP遞送蛋白質至細胞之胞質。不受理論束縛，CPP (例如，cCPP)藉由使CPP-TP結合物能逃脫胞內體來遞送貨物至胞質。

【0083】 如本文中所用，「連接子」或「L」係指共價鍵結兩個或更多個部分(例如，cCPP及TP)之部分。於一些實施例中，連接子可為天

然或非天然胺基酸或多肽。於其他實施例中，連接子為含有適於結合CPP及TP之兩個或更多個適宜官能基之合成化合物，從而以形成本文中所揭示之化合物。於又一實施例中，連接子包含M部分，從而將CPP與TP結合。例如，於一些實施例中，cCPP可經由連接子共價鍵結至TP。

【0084】 如本文中所用，「多肽」係指藉由肽鍵連接至彼此之一串至少兩個胺基酸。可包含於多肽中之胺基酸數目不存在上限。另外，多肽可包含非天然胺基酸、胺基酸類似物或能整合至多肽之其他合成分子。

【0085】 如本文中所用，「序列同一性」係指兩個胺基酸序列之間之相關性。一般技術者將瞭解，若兩個序列在對應位置含有相同殘基，則一般認為其係「實質上相同」。可使用此項技術中熟知之各種演算法中之任一者比較胺基酸序列，該等演算法包括於商業電腦程式(諸如BLASTP、空隙BLAST及PSI-BLAST (以截止申請日存在之版本))中可得之彼等。示例性程式述於Altschul等人，Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990；Altschul等人，*Methods in Enzymology*；Altschul等人，*Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997；Baxevanis等人，*Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998；及 Misener 等人(編輯)，*Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology*，第132卷)，Humana Press, 1999中。於一些實施例中，可使用Needleman-Wunsch演算法(Needleman及Wunsch，1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453)，如於截止申請日存在之版本之EMBOSS包(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice等人，2000, *Trends Genet.* 16: 276-277)之Needle程式中所實施，測定兩個胺基酸序

列之間之序列同一性。所用之參數為空隙開放罰分10、空隙延展罰分0.5及EBLOSUM62 (BLOSUM62之EMBOSS版本)取代矩陣。Needle標記之「最長同一性」(使用-不支持(nobrief)選項獲得)之輸出係用作同一性%及如下計算： $(\text{相同殘基} \times 100) / (\text{比對長度} - \text{比對中空隙之總數目})$ 。

【0086】 於其他實施例中，可使用Smith-Waterman演算法(以截止申請日存在之版本)測定序列同一性。

【0087】 如本文中所用，「實質同源」係指胺基酸序列之間之比較。如由一般技術者所瞭解，若兩個序列在對應位置含有同源殘基，則一般認為其係「實質同源」。同源殘基可為相同殘基。或者，同源殘基可為具有適宜相似結構及/或功能特徵之非相同殘基。例如，如由一般技術者所熟知，通常將某些胺基酸歸類為「疏水性」或「親水性」胺基酸及/或具有「極性」或「非極性」側鏈，及通常可將一個胺基酸取代為相同類型之另一者認為「同源」取代。

【0088】 如此項技術中所熟知，可使用各種演算法中之任一者比較胺基酸序列，該等演算法包括於商業電腦程式(諸如截止申請日存在之BLASTP、空隙BLAST及PSI-BLAST)中可得之彼等。示例性此等程式述於Altschul等人，Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990；Altschul等人，*Methods in Enzymology*；Altschul等人，「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997；Baxevanis等人，*Bioinformatics A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998；及Misener等人(編輯)，*Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology*,

第132卷), Humana Press, 1999中。除了識別同源序列外, 以上提及之程式通常提供同源性程度之指示。

【0089】 「烷基(Alkyl/alkyl group)」係指具有1至12個碳原子且藉由單鍵連接至分子之其餘部分之完全飽和直鏈或分支烴鏈。包括包含1至12之任何數目之碳原子之烷基。包含至多12個碳原子之烷基為C₁-C₁₂烷基, 包含至多10個碳原子之烷基為C₁-C₁₀烷基, 包含至多6個碳原子之烷基為C₁-C₆烷基及包含至多5個碳原子之烷基為C₁-C₅烷基。C₁-C₅烷基包括C₅烷基、C₄烷基、C₃烷基、C₂ 烷基及C₁烷基(即, 甲基)。C₁-C₆烷基包括以上針對C₁-C₅烷基所述之所有部分, 而且包括C₆烷基。C₁-C₁₀烷基包括以上針對C₁-C₅烷基及C₁-C₆烷基所述之所有部分, 而且包括C₇、C₈、C₉及C₁₀烷基。類似地, C₁-C₁₂烷基包括所有上述部分, 而且包括C₁₁及C₁₂烷基。C₁-C₁₂烷基之非限制性實例包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、第二丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、第三戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一烷基及正十二烷基。除非本說明書中另有明確指明, 否則烷基可視情況經取代。

【0090】 「伸烷基」或「伸烷基鏈」係指具有1至40個碳原子之完全飽和直鏈或分支鏈二價烴鏈自由基。C₂-C₄₀伸烷基之非限制性實例包括伸乙基、伸丙基、伸正丁基、伸乙炔基、伸丙炔基、伸正丁炔基、伸丙炔基、伸丁炔基等。伸烷基鏈通過單鍵直接或間接連接至CPP及通過單鍵直接或間接連接至TP。除非本說明書中另有明確指明, 否則如本文所述, 伸烷基鏈可視情況經取代。

【0091】 「伸烯基」或「伸烯基鏈」係指具有2至40個碳原子且具有一或多個碳-碳雙鍵之直鏈或分支鏈二價烴鏈自由基。C₂-C₄₀伸烯基之非

限制性實例包括乙烯、丙烯、丁烯等。伸烯基鏈通過單鍵直接或間接連接至CPP及通過單鍵直接或間接連接至TP。除非本說明書中另有明確指明，否則伸烯基鏈可視情況經取代。

【0092】 「炔基(Alkynyl/alkynyl group)」係指具有2至12個碳原子且具有一或多個碳-碳三鍵之直鏈或分支鏈烴鏈。各炔基藉由單鍵連接至分子之其餘部分。包括包含2至12之任何數目之碳原子之炔基。包含至多12個碳原子之炔基為C₂-C₁₂炔基，包含至多10個碳原子之炔基為C₂-C₁₀炔基，包含至多6個碳原子之炔基為C₂-C₆炔基及包含至多5個碳原子之炔基為C₂-C₅炔基。C₂-C₅炔基包括C₅炔基、C₄炔基、C₃炔基及C₂炔基。C₂-C₆炔基包括以上針對C₂-C₅炔基所述之所有部分，而且包括C₆炔基。C₂-C₁₀炔基包括以上針對C₂-C₅炔基及C₂-C₆炔基所述之所有部分，而且包括C₇、C₈、C₉及C₁₀炔基。類似地，C₂-C₁₂炔基包括所有上述部分，而且包括C₁₁及C₁₂炔基。C₂-C₁₂炔基之非限制性實例包括乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基等。除非本說明書中另有明確指明，否則炔基可視情況經取代。

【0093】 「伸炔基」或「伸炔基鏈」係指具有2至40個碳原子且具有一或多個碳-碳三鍵之直鏈或分支鏈二價烴鏈。C₂-C₄₀伸炔基之非限制性實例包括伸乙炔基、伸炔丙基等。伸炔基鏈通過單鍵直接或間接連接至CPP及通過單鍵直接或間接連接至TP。除非本說明書中另有明確指明，否則伸炔基鏈可視情況經取代。

【0094】 「碳環基」、「碳環(carbocyclic ring / carbocycle)」係指環結構，其中形成環之原子各為碳，且該碳藉由單鍵連接至分子之其餘部分。碳環可包含3至20個碳原子於環中。除非本說明書中另有明確指明，否則碳環基可為單環、雙環、三環或四環環系，該環系可包括稠合或

橋接環系。碳環包括如本文中所定義之芳基及環烷基、環烯基及環炔基。除非本說明書中另有明確指明，否則碳環基可視情況經取代。於一些實施例中，碳環基係二價且通過單鍵直接或間接連接至CPP及通過單鍵直接或間接連接至TP。除非本說明書中另有明確指明，否則雜環基可視情況經取代。

【0095】 「環烷基」係指具有3至40個碳原子及至少一個環之穩定非芳族單環或多環完全飽和烴，其中該環僅由碳及氫原子組成，其可包括稠合或橋接環系。單環環烷基包括(例如)環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基及環辛基。多環環烷基包括(例如)金剛烷基、冰片基、十氫萘基、7,7-二甲基-二環[2.2.1]庚基等。於一些實施例中，環烷基係二價且通過單鍵直接或間接連接至CPP及通過單鍵直接或間接連接至TP。除非本說明書中另有明確指明，否則環烷基可視情況經取代。

【0096】 「環烯基」係指具有3至40個碳原子、具有至少一個環及一或多個碳-碳雙鍵之穩定非芳族單環或多環烴，其中該環僅由碳及氫原子組成，其可包括稠合或橋接環系。單環環烯基包括(例如)環戊烯基、環己烯基、環庚烯基、環辛烯基等。多環環烯基自由基包括(例如)二環[2.2.1]庚-2-烯基等。於一些實施例中，環烯基係二價且通過單鍵直接或間接連接至CPP及通過單鍵直接或間接連接至TP。除非本說明書中另有明確指明，否則環烯基可視情況經取代。

【0097】 「環炔基」係指具有3至40個碳原子、具有至少一個環及一或多個碳-碳三鍵之穩定非芳族單環或多環烴，其中該環僅由碳及氫原子組成，其可包括稠合或橋接環系。單環環炔基包括(例如)環庚炔基、環辛炔基等。環炔基通過單鍵直接或間接連接至CPP及通過單鍵直接或間接

連接至TP。除非本說明書中另有明確指明，否則環炔基可視情況經取代。

【0098】 「芳基」係指包含氫、6至40個碳原子及至少一個芳環之烴環系。出於本發明之目的，芳基可為單環、雙環、三環或四環環系，該環系可包括稠合或橋接環系。芳基包括(但不限於)衍生自以下之芳基二價自由基：乙萸烯、茛烯、乙菲烯、蔥、萸、苯、蒽、熒蔥、萸、不對稱引達省(indacene)、對稱引達省、二氫化茛、茛、萘、蒽、菲、七曜烯(pleiadene)、茈及伸三苯基。於一些實施例中，芳基係二價且通過單鍵直接或間接連接至CPP及通過單鍵直接或間接連接至TP。除非本說明書中另有明確指明，否則芳基可視情況經取代。



【0099】 「雜環基」、「雜環(heterocyclic ring/heterocycle)」係指穩定3員至22員環系，其由2至14個碳原子及選自由氮、氧及硫組成之群之1至8個雜原子組成。雜環基或雜環包括如下所定義之雜芳基。除非本說明書中另有明確指明，否則雜環基可為單環、雙環、三環或四環環系，該環系可包括稠合或橋接環系；及雜環基中之氮、碳或硫原子可視情況經氧化；氮原子可視情況經四級銨化；及雜環基可係部分或完全飽和。此等雜環基自由基之實例包括(但不限於)二噁茂烷基、噻吩基[1,3]二噻烷基、十氫異喹啉基、咪唑啉基、咪唑啉基、異噻唑啉基、異噻唑啉基、嗎啉基、八氫吡啶基、八氫異吡啶基、2-側氧基哌嗪基、2-側氧基哌啶基、2-側氧基吡咯啉基、噻唑啉基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基、吡咯啉基、琥珀醯亞胺基、吡啶基、喹寧環基、噻唑啉基、四氫呋喃基、三噻烷基、四氫哌喃基、硫代嗎啉基、噻嗎啉基、1-側氧基-硫代嗎啉基、及1,1-二側氧基-硫代嗎啉基。於一些實施例中，雜環基係二價且通過單鍵直接或間接

取代。

【0101】本文中所用之術語「醚」係指具有式 $-(R_1)_m-O-(R_2)_n)_z-$ 之二價部分，其中 m 、 n 及 z 各係獨立地選自1至40，且 R_1 及 R_2 係獨立地選自伸烷基。實例包括聚乙二醇。醚通過單鍵直接或間接連接至CPP及通過單鍵直接或間接連接至TP。除非本說明書中另有明確指明，否則醚可視情況經取代。

【0102】本文中所用之術語「經取代」意指以上基團(即，伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環基、環烷基、環烯基、環炔基、雜環基、雜芳基及/或醚)中之任一者，其中至少一個氫原子藉由鍵置換成非氫原子，諸如(但不限於)：氬原子；鹵素原子，諸如F、Cl、Br及I；含氧原子之基團，諸如羥基、烷氧基及酯基；含硫原子之基團，諸如硫醇基、硫代烷基、磺基、磺醯基及亞磺基；含氮原子之基團，諸如胺、醯胺、烷基胺、二烷基胺、芳基胺、烷基芳基胺、二芳基胺、N-氧化物、醯亞胺及烯胺；含矽原子之基團，諸如三烷基甲矽烷基、二烷基芳基甲矽烷基、烷基二芳基甲矽烷基及三芳基甲矽烷基；及含其他雜原子之各種其他基團。「經取代」亦意指以上基團中之任一者，其中一或多個氫原子藉由更高階鍵(例如，雙鍵或三鍵)置換成雜原子，諸如側氧基、羰基、羧基及酯基中之氧；含氮之基團，諸如亞胺、肟、脞及脞。例如，「經取代」包括以上基團中之任一者，其中一或多個氫原子經以下置換： $-NR_gR_h$ 、 $-NR_gC(=O)R_h$ 、 $-NR_gC(=O)NR_gR_h$ 、 $-NR_gC(=O)OR_h$ 、 $-NR_gSO_2R_h$ 、 $-OC(=O)NR_gR_h$ 、 $-OR_g$ 、 $-SR_g$ 、 $-SOR_g$ 、 $-SO_2R_g$ 、 $-OSO_2R_g$ 、 $-SO_2OR_g$ 、 $=NSO_2R_g$ 及 $-SO_2NR_gR_h$ 。「經取代」亦意指以上基團中之任一者，其中一或多個氫原子經 $-C(=O)R_g$ 、 $-C(=O)OR_g$ 、 $-C(=O)NR_gR_h$ 、 $-CH_2SO_2R_g$ 、-

CH₂SO₂NR_gR_h置換。於上述中，R_g及R_h係相同或不同且獨立地為氫、烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷胺基、硫代烷基、芳基、芳烷基、環烷基、環烯基、環炔基、環烷基烷基、鹵烷基、鹵烯基、鹵炔基、雜環基、N-雜環基、雜環基烷基、雜芳基、N-雜芳基及/或雜芳基烷基。「經取代」還意指以上基團中之任一者，其中一或多個氫原子藉由鍵置換成胺基、氰基、羥基、亞胺基、硝基、側氧基、硫代側氧基、鹵基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷胺基、硫代烷基、芳基、芳烷基、環烷基、環烯基、環炔基、環烷基烷基、鹵烷基、鹵烯基、鹵炔基、雜環基、N-雜環基、雜環基烷基、雜芳基、N-雜芳基及/或雜芳基烷基。此外，上述取代基各亦可視情況經上述取代基中之一或多者取代。另外，熟習此項技術者將知曉，「經取代」亦涵蓋其中以上基團中之任一者之一或多個氫原子經此段中所列之取代基置換，及該取代基然後與CPP或TP形成共價鍵之情況。可將所得鍵合基團認為「取代基」。例如，於某些實施例中，以上基團中之任一者可在具有與適宜胺基酸CPP（例如，離胺酸）形成醯胺鍵之羧酸（即，-C(=O)OH）之第一位置處取代，及亦在具有與TP之N端形成鍵之親電基團（例如，-C(=O)H、-CO₂R_g、-鹵化物等）或或者與TP之C端形成鍵之親核基團（-NH₂、-NHR_g、-OH等）之第二位置處取代。可將所得鍵（例如，醯胺鍵）認為「取代基」。於一些實施例中，第二位置經與TP中之半胱胺酸（或具有硫醇基之胺基酸類似物）形成二硫鍵之硫醇基取代。所得二硫化物涵蓋於術語取代基中。

【0103】如本文中所示，符號「」（以下可稱作「連接點鍵」）表示為兩個化學實體之間之連接點之鍵，將其中之一者描述為連接至連接點鍵及將其中另一者描述為不連接至連接點鍵。例如，「」指示化

學實體「XY」經由連接點鍵結合至另一個化學實體。此外，連接至非所述化學實體之特定點可藉由推斷指定。例如，化合物 $\text{CH}_3\text{-R}^3$ ，其中 R^3 為H或「 $\overset{\text{XY}}{\text{+}}$ 」推斷當 R^3 為「XY」時，連接點鍵為與將 R^3 描述為鍵合至 CH_3 之鍵相同的鍵。

化合物

【0104】 於各種實施例中，本文中揭示治療粒線體性神經胃腸腦病變症候群(MNGIE)之化合物。該等化合物經設計以細胞內遞送具有胸苷磷酸活性之部分至MNGIE患者或具有TYMP突變之患者。藉由如此做，該等化合物降低核苷之毒性含量，該等核苷否則於此等患者中累積。於一些實施例中，本化合物降低毒性核苷含量約1%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%或約100%，包含於其間之所有值及範圍。

【0105】 於各種實施例中，本文中所揭示之化合物具有胸苷磷酸化酶活性及細胞穿透活性，使得該等化合物能橫過細胞膜且降低活體內胸苷含量。於一些實施例中，該等化合物包含：a)至少一個細胞穿透肽(CPP)部分；及b)至少一個胸苷磷酸化酶或其活性片段或類似物(TP)，其中該CPP直接或間接偶合至TP。於一些實施例中，該等化合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個TP部分。於一些實施例中，該等化合物包含一個TP部分。於一些實施例中，該等化合物包含兩個TP部分。如本文中所示，「偶合」可係指CPP與TP之間之共價或非共價締合，包括將CPP與TP融合及將CPP與TP化學結合。非共價連接CPP至TP之方法之非限制性實例為通過鏈黴抗生物素(streptavidin)/生物素相互作用，例如，

藉由將生物素與CPP結合及將TP與鏈黴抗生物素融合。於所得化合物中，將CPP經由生物素與鏈黴抗生物素之間之非共價締合偶合至TP。

【0106】 於一些實施例中，將CPP直接或間接與TP結合以從而形成CPP-TP結合物。TP與CPP之結合可在此等部分之任何適宜位點處發生。例如，於一些實施例中，可將TP之N端或C端與CPP之胺基酸之C端、N端或側鏈結合。於一些實施例中，可將CPP與TP之胺基酸之側鏈結合。

【0107】 於一些實施例中，將TP與CPP融合。如本文中所用，融合蛋白係指構築體，其中將直鏈CPP部分與TP部分之N端及/或C端融合。或者可描述此融合蛋白為具有細胞穿透域及胸苷域。多肽之融合方法係此項技術中熟知。此等融合構築體可藉由重組技術製備。根據本發明之某些實施例，重組產生之TP-CPP融合蛋白包含TP組分及藉由遺傳融合彼此相聯之直鏈CPP組分。例如，融合蛋白可藉由編碼具有直鏈CPP組分之TP選殖之框內之聚核苷酸之轉譯產生(或反之亦然)。此融合蛋白可含有連接至TP組分之N端及/或C端之CPP之一或多個複本。於一些實施例中，CPP組分獨立地連接至TP組分之N端及C段二者。

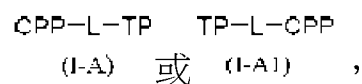
【0108】 於其他實施例中，TP可透過TP之胺基酸之側鏈與CPP化學性接合。於仍其他實施例中，TP可透過CPP之胺基酸之側鏈與CPP結合。可使用能形成共價鍵或可經如此修飾之CPP及/或TP之任何胺基酸側鏈來連接TP與CPP。CPP之胺基酸可為天然或非天然胺基酸。於一些實施例中，用於結合TP之CPP之胺基酸為天冬胺酸、麩胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺、離胺酸、鳥胺酸、2,3-二胺基丙酸或其類似物，其中側鏈經與TP或連接子之鍵取代。於特定實施例中，該胺基酸為離胺酸或其類似物。於其他實施例中，該胺基酸為麩胺酸或其類似物。於其他實施例中，該胺基酸為

天冬胺酸或其類似物。

【0109】於本發明之一些實施例中，該等化合物進一步包含結合CPP與TP之連接子(L)。於一些實施例中，L結合CPP與TP之N端或C端。於某一實施例中，L結合CPP與TP之N端。

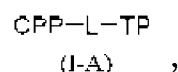
【0110】於一些實施例中，CPP透過TP之胺基酸之側鏈與TP結合。可使用能與CPP形成共價鍵或可經如此修飾之TP之胺基酸之任何適宜側鏈將CPP與TP結合。胺基酸可為天然TP之成分或非天然胺基酸。即，於一些實施例中，TP可包含提供結合CPP之柄之非天然胺基酸。於特定實施例中，胺基酸為麩胺醯胺、天冬醯胺、離胺酸、半胱胺酸、色胺酸或其類似物。

【0111】於一些實施例中，CPP係環狀(如本文中所述)且本文中稱作cCPP。本文中所揭示之化合物存在許多可能構型。於某些實施例中，本發明之化合物為外環化合物，其中將TP與cCPP中之胺基酸之側鏈結合。於一些實施例中，本文中所揭示之化合物具有如式I-A或式I-A1之結構(即，外環)：



其中L共價鍵結至CPP之胺基酸之側鏈及TP之N端、TP之胺基酸側鏈或TP之C端。

【0112】於某些實施例中，本文中所揭示之化合物(例如，外環化合物)具有如式I-A之結構：



其中L共價鍵結至CPP之胺基酸之側鏈及TP之N端。

【0113】於本發明之一些實施例中，CPP及TP一起係環狀(本文中

稱作「內環化合物」)。於各種非限制性實施例中，本文中所揭示之內環化合物具有如式I-A2、式I-A3或式I-A4之結構：



【0114】於其他實施例中，TP部分係環狀且CPP係環狀，且一起形成稠合雙環系統(本文中稱作「雙環化合物」)。於各種非限制性實施例中，本文中所揭示之內環化合物具有如式I-A5及I-A6之結構：



【0115】L可為將CPP (例如，如本文中所述)與TP部分結合之任何適宜部分。因此，在與CPP及TP結合之前，連接子具有兩個或更多個官能基，其各獨立地能形成至CPP部分及TP部分之共價鍵。於本發明之各種實施例中，L共價鍵結至TP之N端或TP之C端。於一些實施例中，L共價鍵結至TP之N端。於其他實施例中，L共價鍵結至TP之C端。於仍其他實施例中，L共價鍵結至TP之胺基酸之側鏈。

【0116】於本發明之各種實施例中，L包括(i)一或多個D或L胺基酸，其各視情況經取代；(ii)伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基或雜環基，其各視情況經取代；或(iii) $-(R^1-X-R^2)_z-$ ，其中在各情況下， R^1 及 R^2 各係獨立地選自伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基及雜環基，各X獨立地為 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S及O，其中 R^3 為H、烷基、烯基、炔基、碳環基或雜環基，其各視情況經取代，且z為1至50之整數；或(iv)其組合。於一些實施例中，L包括一或多個D或L胺基酸，其各視情況經取代。於其他實施例中，L包括伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基或雜環基，其各視情況經

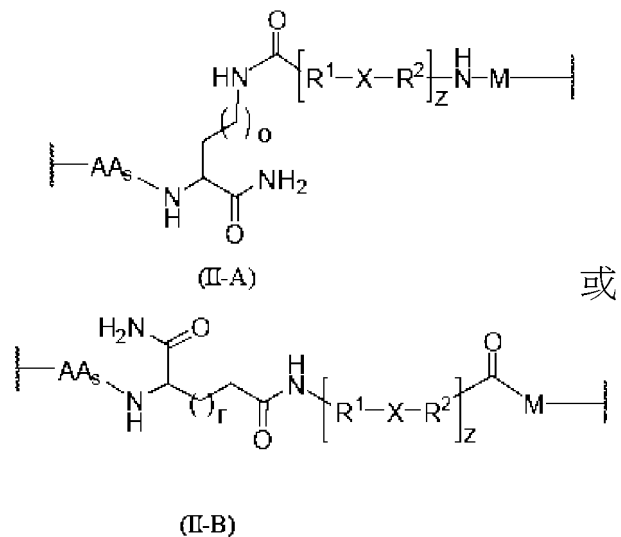
取代。於仍其他實施例中，L包括 $-(R^1-X-R^2)_z-$ ，其中在各情況下， R^1 及 R^2 各係獨立地選自伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基及雜環基，各X獨立地為 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S及O，其中 R^3 為H、烷基、烯基、炔基、碳環基或雜環基，其各視情況經取代，且z為1至50之整數；或其組合。於某些實施例中，L為醚，其視情況經取代。於更特定實施例中，L包括 $-(CH_2-O-CH_2)_z-$ ，其中Z為1至50之整數。於更特定實施例中，L包括 $-(CH_2-O-CH_2)_z-$ (其中Z為1至25之整數(例如，12))及一或多個D或L胺基酸(諸如離胺酸)。例如，於各種實施例中，L包括具有1至50個乙二醇單元之聚乙二醇部分，及離胺酸殘基。於其他特定實施例中，L包括 $-(CH_2-S-CH_2)_z-$ ，其中Z為1至50之整數。於仍其他特定實施例中，L包括 $-(CH_2-NR^3-CH_2)_z-$ ，其中 R^3 為H、 $-C(O)$ 、烷基、烯基、炔基、碳環基或雜環基，其各視情況經取代，且z為1至50之整數，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49及50，包含於其間之所有子範圍。於一些實施例中，z為10至15之整數。於特定實施例中，z為12。

【0117】 如上所討論，L或M可在TP之任何適宜位置共價鍵結至TP。於本發明之各種實施例中，L或M共價鍵結至TP之N端或TP之C端。於另一實施例中，L或M共價鍵結至TP之N端。於一些實施例中，L或M共價鍵結至TP之胺基酸側鏈。

【0118】 於一些實施例中，L結合至CPP或TP之天冬胺酸、麩胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺或離胺酸之側鏈或麩胺醯胺或天冬醯胺之經修飾之側鏈(例如，具有胺基之經還原側鏈)。於特定實施例中，L結合至CPP

之離胺酸之側鏈。

【0119】 於一些實施例中，L具有如式II-A或式II-B之結構：

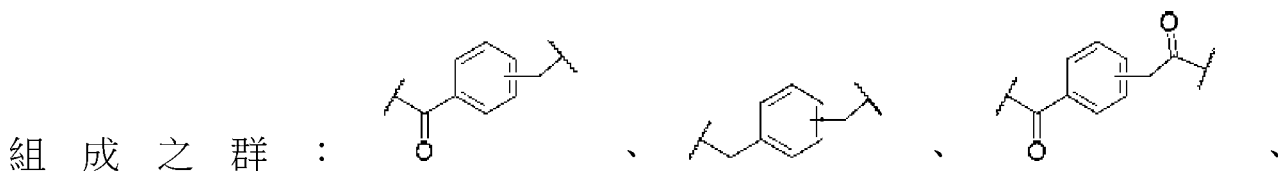


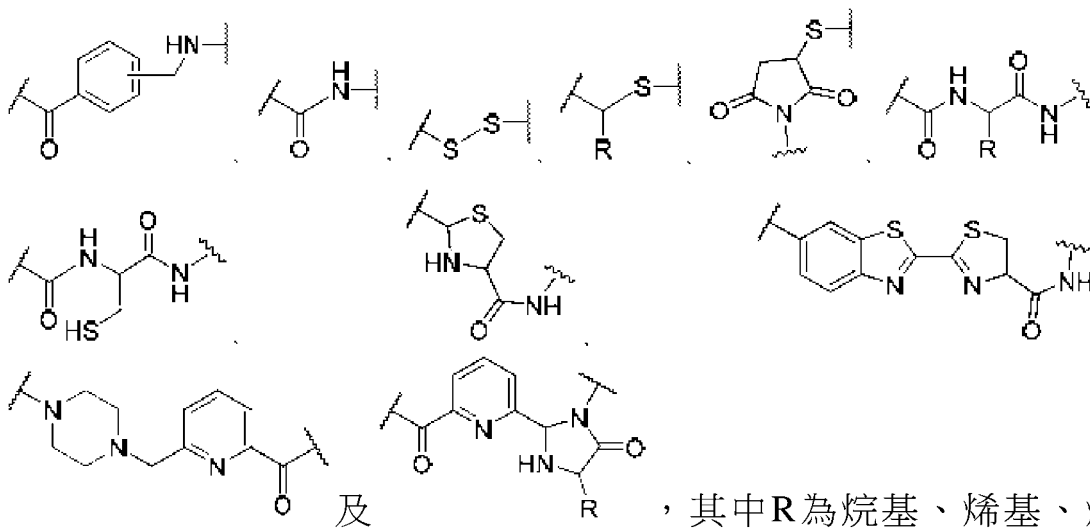
其中各 $-(R^1-X-R^2)_z-$ 係如上所定義。

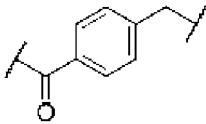
【0120】 於一些實施例中，在各情況下， R^1 及 R^2 各係獨立地選自伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基及雜環基，其各視情況經取代。

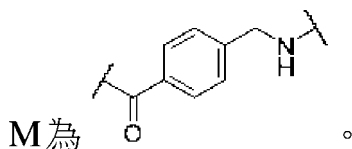
【0121】 於一些實施例中，各X獨立地為 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S及O，且其中 R^3 係獨立地選自H、烷基、烯基、炔基、碳環基及雜環基，其各視情況經取代。

【0122】 於一些實施例中，M係不存在或為結合至TP之胺基酸之基團。於各種實施例中，M係存在且包括伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基或雜環基，其各視情況經取代。於一些實施例中，M係存在且選自由以下





及，其中R為烷基、烯基、炔基、碳環基或雜環基。於特定實施例中，M為 。於另一特定實施例中，



【0123】於一些實施例中，AA_s為CPP之胺基酸之側鏈或末端。AA_s之非限制性實例包括天冬胺酸、麩胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺或離胺酸，或麩胺醯胺或天冬醯胺之經修飾之側鏈(例如，具有胺基之經還原側鏈)。

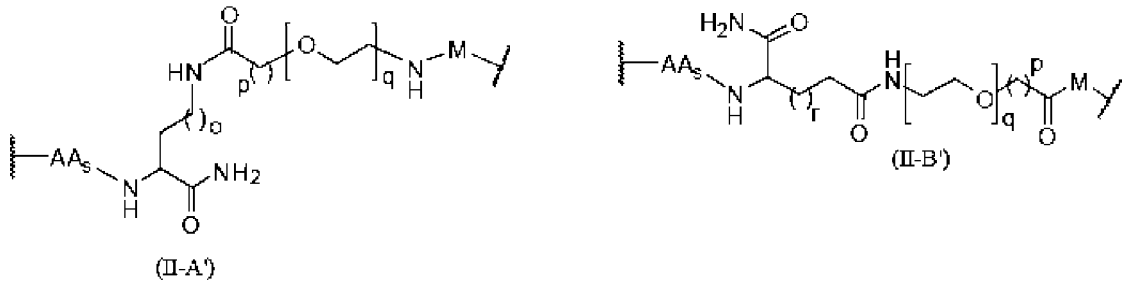
【0124】於一些實施例中，o為0至10之整數，例如，0、1、2、3、4、5、6、7、8、9及10，包含於其間之所有值及子範圍。於其他實施例中，o為0、1、2或3。

【0125】於一些實施例中，u為0或1。於一些實施例中，u為0。於其他實施例中，u為1。

【0126】於一些實施例中，p為1或2。於一些實施例中，p為1。於其他實施例中，p為2。

【0127】於一些實施例中，r為0或1。於一些實施例中，r為0。於其他實施例中，r為1。

【0128】 於一些實施例中，L具有如式II-A'或II-B'之結構：

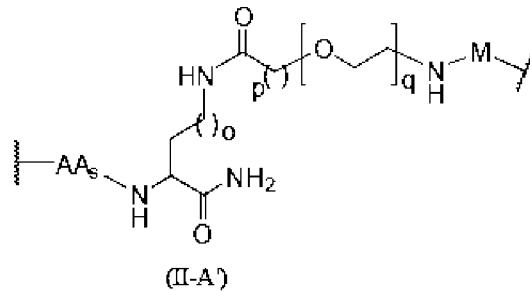


其中M、AA_s、u、o、p、q及r各係以上定義。

【0129】 於一些實施例中，q為1至50之整數，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49及50，包含於其間之所有範圍及值。於其他實施例中，q為5至20之整數。於其他實施例中，q為10至15之整數。於特定實施例中，q為12。

【0130】 於某些實施例中，o為0、1、2或3。於某些其他實施例中，r為0或1。

【0131】 於本發明之某些實施例中，L為式II-A'：



其中

M係不存在或為結合至TP之胺基酸之基團；

AA_s為CPP之胺基酸之側鏈或末端；

u為0或1；

o為0、1、2或3；

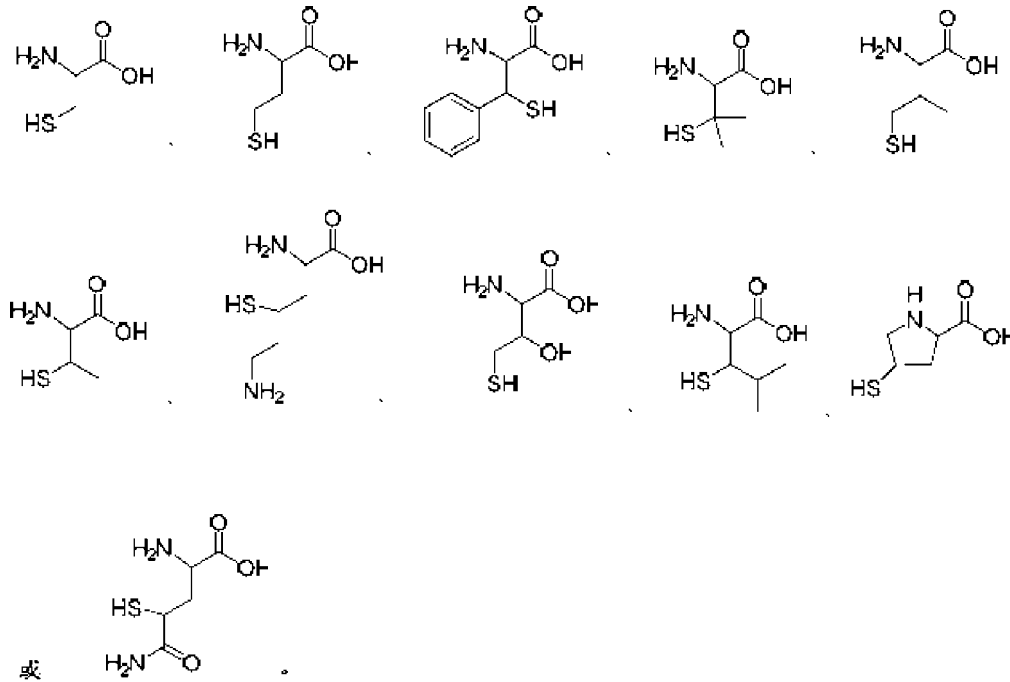
p為1或2；且

q為10至15之整數。

【0132】 於本發明之一些實施例中，r為0，p為2，且q為12。於其他實施例中，r為0。於仍其他實施例中，p為2。於另外實施例中，q為12。

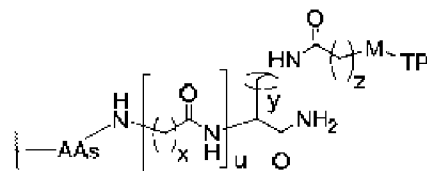
【0133】 適宜L基團之其他非限制性實例包括：

酸或具有硫醇基之胺基酸類似物之側鏈之間形成。此含有硫醇之側鏈可位於野生型TP之天然胺基酸上，或可將此含有硫醇之胺基酸引入至TP。可併與本文中所揭示之多肽結合物使用之具有硫醇基之胺基酸類似物的非限制性實例包括：



【0138】 熟習此項技術者將知曉，上述胺基酸類似物作為前驅體顯示，即，在併入化合物之前。當併入本發明之化合物時，N端及C端獨立地經取代以形成肽鍵，及硫醇基上之氫經鍵置換成另一個硫原子，從而形成二硫化物。

【0139】 於一些實施例中，L為式II-C'：



II-C'

其中：

AA_s為CPP之胺基酸之側鏈或末端；

M係以上定義；

z為0至10之整數；

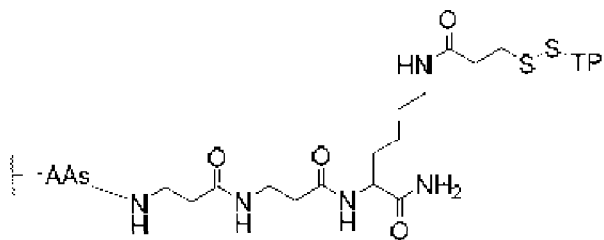
y為0至10之整數；

x為0至10之整數；且

u為1至50之整數。

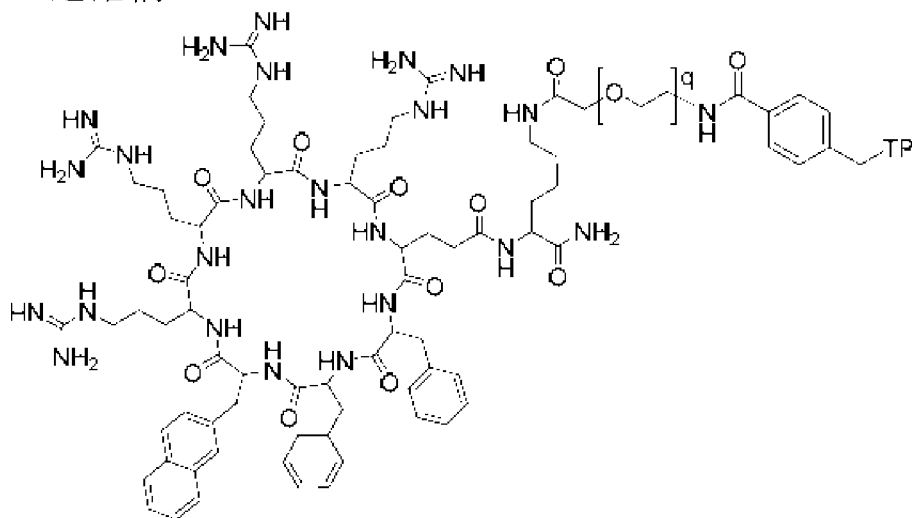
【0140】於一些實施例中，M為生理上可裂解鍵。於一些實施例中，M為二硫化物。

【0141】於一些實施例中，L為

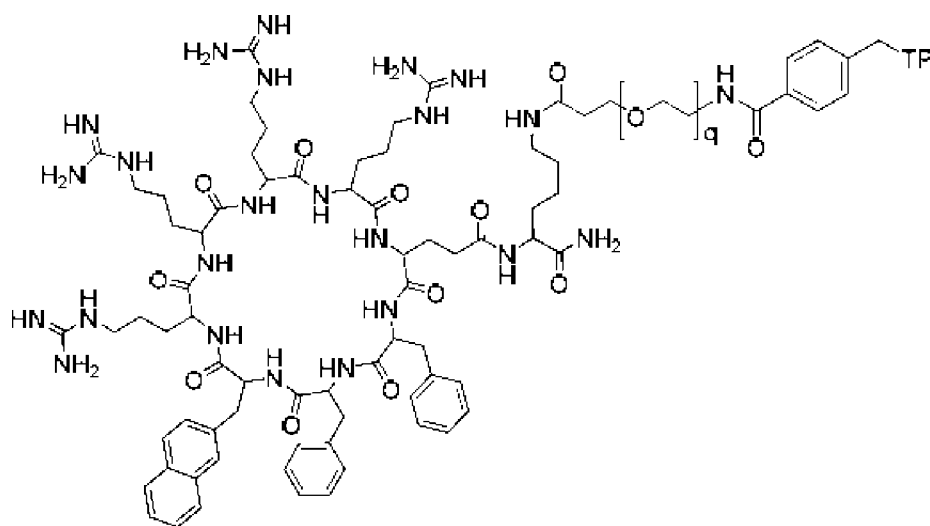


【0142】於特定實施例中，二硫鍵在L上之硫醇基與TP上之半胱胺酸之側鏈之間形成。於一些實施例中，該半胱胺酸可為野生型TP之成分或TP可經修飾以包含半胱胺酸或具有硫醇基之胺基酸類似物。於其他實施例中，TP之任何適宜官能基可經修飾以形成用於鍵合至L之硫醇基。

【0143】於本發明之更特定實施例中，該化合物具有如式V-A1、V-A2或V-A3之結構：

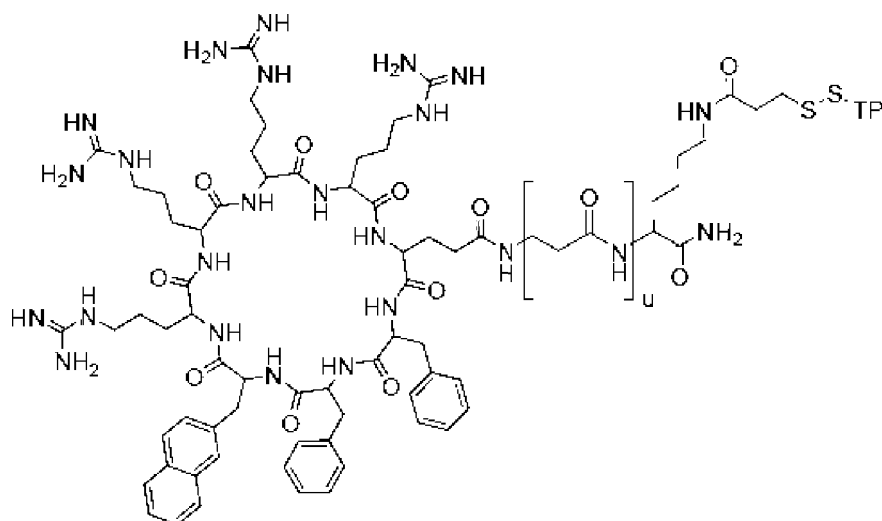


(V-A1)



(V-A2)

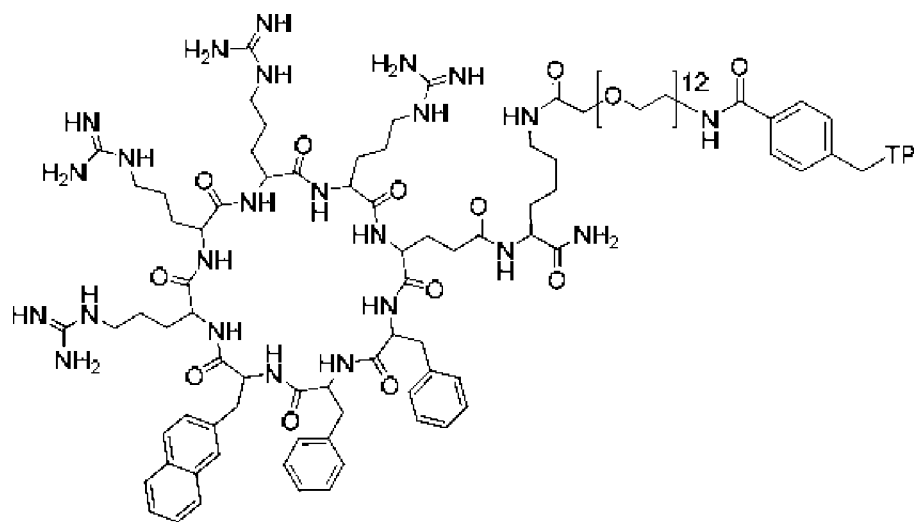
或



(V-A3)

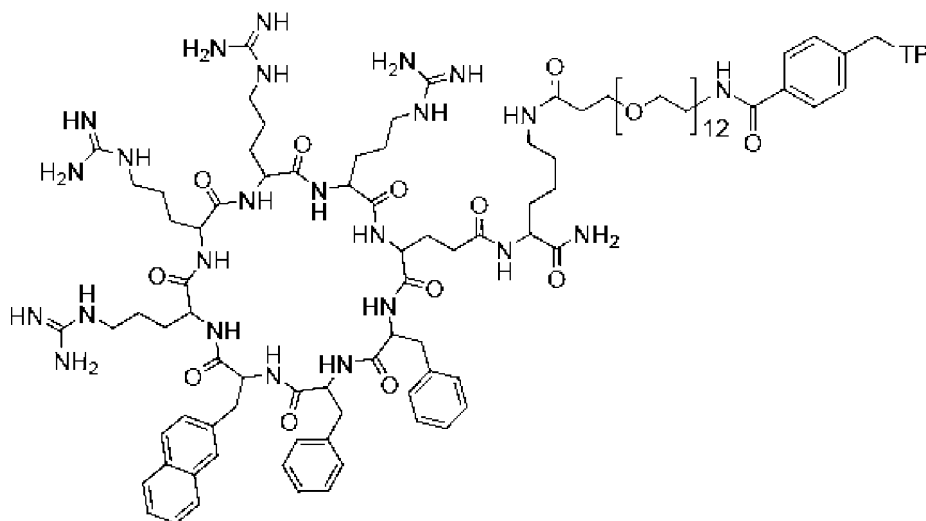
【0144】於各種實施例中， q 可為上述任何整數，例如，10至15範圍內之整數。

【0145】於本發明之特定實施例中，化合物具有如式V-B1或V-B2之結構：



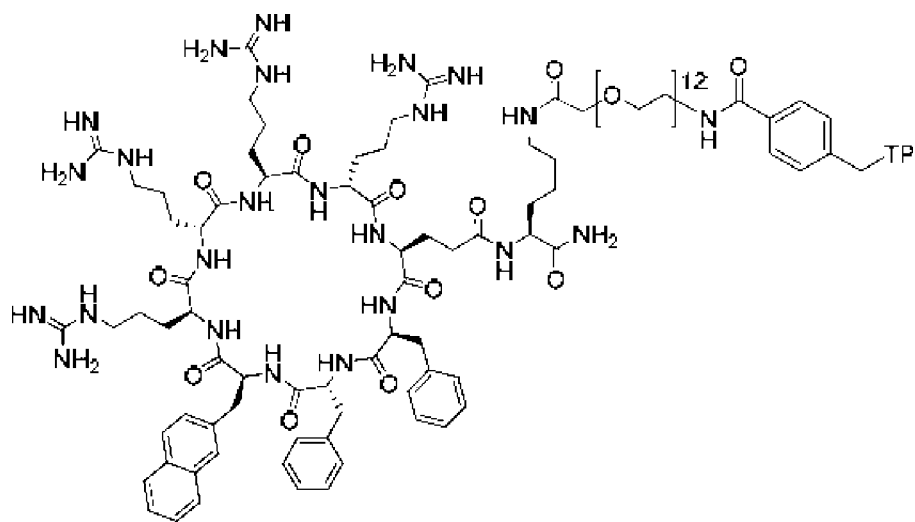
(V-B1)

或



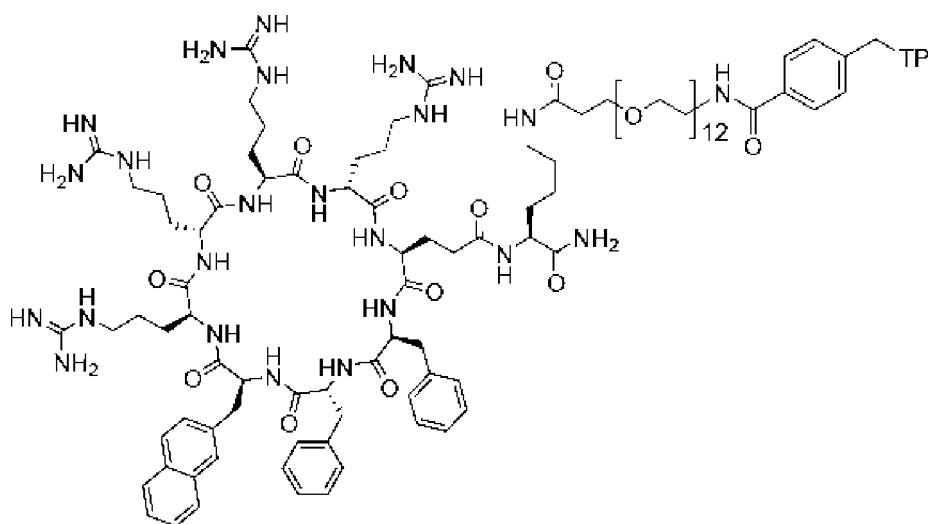
(V-B2)

【0146】於其他特定實施例中，本發明提供具有式V-B3或V-B4或V-B5之結構之化合物：

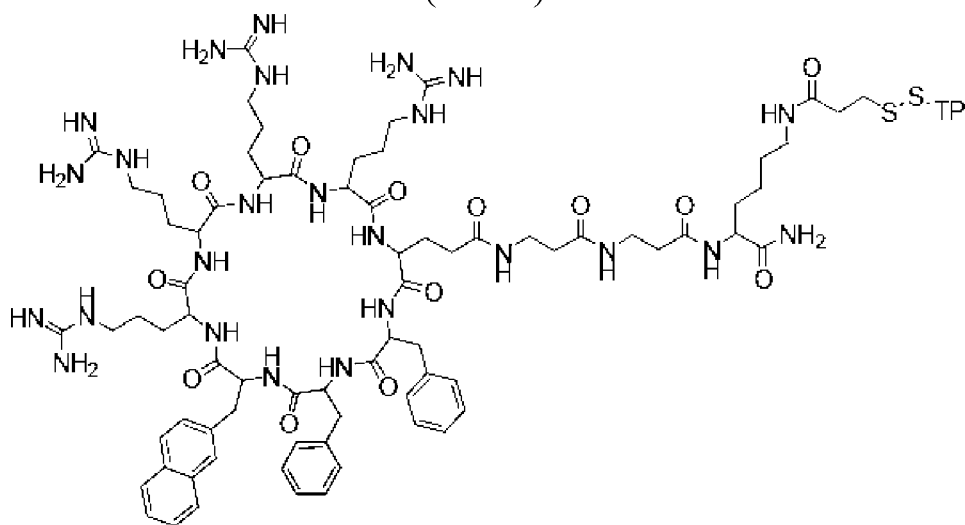


(V-B3)

或



(V-B4)



(V-B5)

【0147】 以上結構中任一者之TP可為本文中所揭示之任何TP，包括SEQ ID NO. 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12及13。另外，該TP可包括水溶性聚合物。於一些實施例中，該水溶性聚合物包含PEG殘基。於一些實施例中，該PEG殘基具有約1 kDa至約100 kDa範圍(例如，約1 kDa至約20 kDa，包括約10 kDa)之分子量。

細胞穿透肽

【0148】 如上所討論，本文中所揭示之化合物包括細胞穿透肽(CPP)。

【0149】 CPP可為或包含任何胺基酸序列，該序列促進本文中所揭示之化合物之細胞吸收。用於本文中所述化合物及方法中之適宜CPP可包含天然存在之序列、經修飾之序列及合成序列。於實施例中，CPP之胺基酸之總數目可為4至約20個胺基酸之範圍(例如，約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18及約19個胺基酸)，包含於其間之所有範圍及子範圍。於一些實施例中，本文中所揭示之CPP包含約4至約13個胺基酸。於特定實施例中，本文中所揭示之CPP包含約6至約10個胺基酸，或約6至約8個胺基酸。

【0150】 CPP之各胺基酸可為天然或非天然胺基酸。術語「非天然胺基酸」係指為天然胺基酸之同族之有機化合物，因為其具有類似於天然胺基酸之結構使得其類比天然胺基酸之結構及反應性。非天然胺基酸可為經修飾之胺基酸及/或胺基酸類似物，其非20種常見天然存在之胺基酸中之一者或罕見天然胺基酸硒代半胱胺酸或吡咯離胺酸。非天然胺基酸亦可為天然胺基酸之D-異構體。適宜胺基酸之實例包括(但不限於)丙胺酸、別異白胺酸、精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺醯胺、麩胺

酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、萘基丙胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、焦麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸、纈胺酸、其衍生物或組合。表1中列出此等及其他連同本文中所示之其縮略語。

表1. 胺基酸縮略語

胺基酸	縮略語*	
	L-胺基酸	D-胺基酸
丙胺酸	Ala (A)	ala (a)
別異白胺酸	Alle	aile
精胺酸	Arg (R)	arg (r)
天冬醯胺	Asn (N)	asn (n)
天冬胺酸	Asp (D)	asp (d)
半胱胺酸	Cys (C)	cys (c)
環己基丙胺酸	Cha	cha
2,3-二胺基丙酸	Dap	dap
4-氟苯丙胺酸	Fpa (Σ)	pfa
麩胺酸	Glu (E)	glu (e)
麩胺醯胺	Gln (Q)	gln (q)
甘胺酸	Gly (G)	gly (g)
組胺酸	His (H)	his (h)
高脯胺酸(亦稱2-哌啶甲酸)	Pip (Θ)	pip (θ)
異白胺酸	Ile (I)	ile (i)
白胺酸	Leu (L)	leu (l)
離胺酸	Lys (K)	lys (k)
甲硫胺酸	Met (M)	met (m)
萘基丙胺酸	Nal (Φ)	nal (ϕ)
正白胺酸	Nle (Ω)	nle
苯丙胺酸	Phe (F)	phe (F)

胺基酸	縮略語*	
	L-胺基酸	D-胺基酸
苯基甘胺酸	Phg (Ψ)	phg
4-(膦醯基二氟甲基)苯丙胺酸	F ₂ Pmp (Λ)	f ₂ pmp
脯胺酸	Pro (P)	pro (p)
肌胺酸	Sar (Ξ)	sar
硒代半胱胺酸	Sec (U)	sec (u)
絲胺酸	Ser (S)	ser (s)
蘇胺酸	Thr (T)	thr (y)
酪胺酸	Tyr (Y)	tyr (y)
色胺酸	Trp (W)	trp (w)
纈胺酸	Val (V)	val (v)
第三丁基丙胺酸	Tle	tle
青黴胺	Pen	pen
高精胺酸	HomoArg	homoarg
菸鹼基離胺酸	Lys(NIC)	lys(NIC)
三氟乙醯基離胺酸	Lys(TFA)	lys(TFA)
甲基白胺酸	MeLeu	meLeu
3-(3-苯并噻吩基)-丙胺酸	Bta	bta

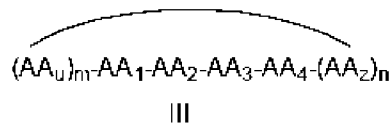
*單字母縮略語：當本文中以大寫字母顯示時，其指示L-胺基酸形式，當本文中以小寫字母顯示時，其指示D-胺基酸形式。

【0151】直鏈CPP之非限制性實例包括聚精胺酸(例如，R₉或R₁₁)、觸角序列、HIV-TAT、Penetratin、Antp-3A (Antp突變)、Buforin II、Transportan、MAP (模型兩親性肽)、K-FGF、Ku70、Prion、pVEC、Pep-1、SynB1、Pep-7、HN-1、BGSC (雙-胍鎗-亞精胺-膽固醇)及BGTC (雙-胍鎗-三胺乙基胺-膽固醇)。

【0152】於各種實施例中，本發明之細胞穿透肽為環狀細胞穿透肽

(cCPP)。於一些實施例中，CPP藉由形成肽序列中之兩個胺基酸之N端及C端之間的肽鍵環化以形成cCPP。於一些實施例中，cCPP可包括至少兩個精胺酸及至少兩個疏水性胺基酸之任何組合。於一些實施例中，cCPP可包括2至3個精胺酸及至少兩個疏水性胺基酸之任何組合。

【0153】 於一些實施例中，本文中所述化合物中所用之cCPP具有包括式III之結構：



其中：

AA₁、AA₂、AA₃及AA₄各係獨立地選自D或L胺基酸，

在各情況下及當存在時，AA_u及AA_z各係獨立地選自D或L胺基酸，且

m及n係獨立地選自0至6之數字；及

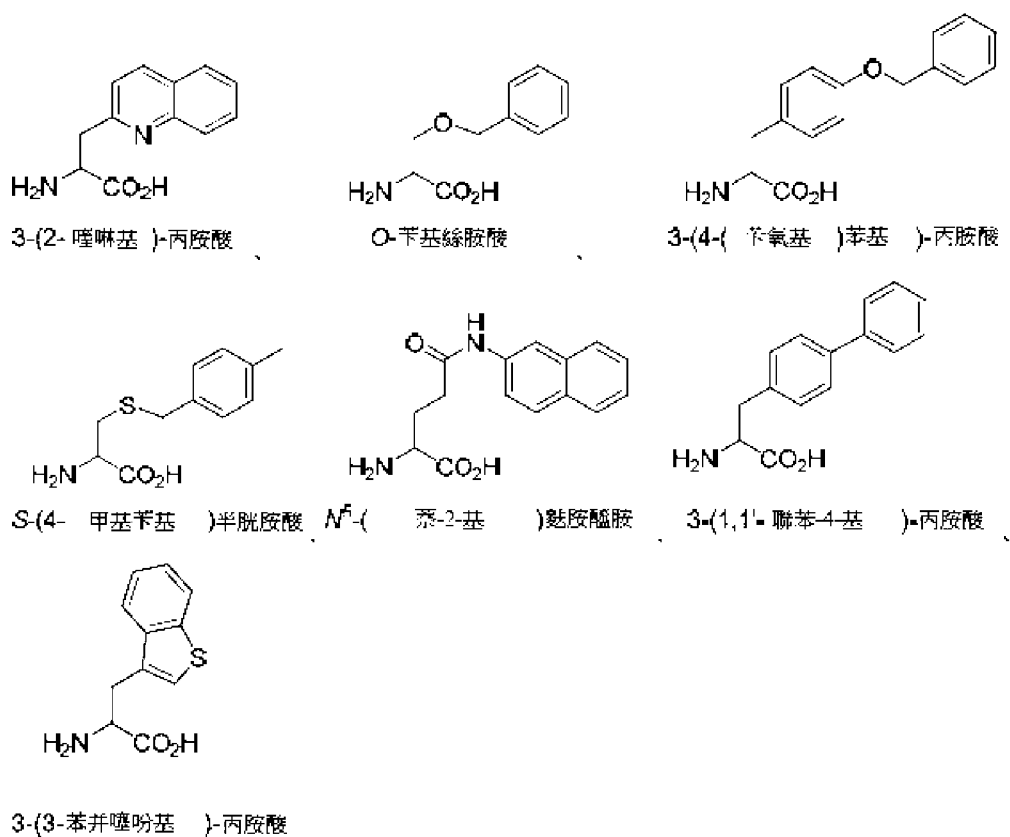
其中：

AA_u (當存在時)、AA₁、AA₂、AA₃、AA₄及AA_z (當存在時)中之至少兩者獨立地為精胺酸，及

AA_u (當存在時)、AA₁、AA₂、AA₃、AA₄及AA_z (當存在時)中之至少兩者獨立地為疏水性胺基酸。

【0154】 於一些實施例中，各疏水性胺基酸係獨立地選自甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、脯胺酸、萘基苯丙胺酸、苯基甘胺酸、高苯丙胺酸、酪胺酸、環己基丙胺酸、哌啶-2-甲酸、環己基丙胺酸、正白胺酸、3-(3-苯并噻吩基)-丙胺酸、3-(2-喹啉基)-丙胺酸、O-苄基絲胺酸、3-(4-(苄氧基)苯基)-丙胺酸、

S-(4-甲基苄基)半胱胺酸、N-(萘-2-基)麩胺醯胺、3-(1,1'-聯苯-4-基)-丙胺酸、第三白胺酸或菸鹼基離胺酸，其各視情況經一或多個取代基取代。以下提供某些此等非天然芳族疏水性胺基酸(在併入本文中所示之肽之前)之結構。於特定實施例中，各疏水性胺基酸獨立地為疏水性芳族胺基酸。於一些實施例中，該芳族疏水性胺基酸為萘基丙胺酸、3-(3-苯并噻吩基)-丙胺酸、苯基甘胺酸、高苯丙胺酸、苯丙胺酸、色胺酸或酪胺酸，其各視情況經一或多個取代基取代。



【0155】 可選取代基可為(例如)相較於不具有該取代基之其他相同序列，不顯著降低(例如，大於50%) cCPP之胞質遞送效率之任何原子或基團。於一些實施例中，可選取代基可為疏水性取代基或親水性取代基。於某些實施例中，可選取代基為疏水性取代基。於一些實施例中，該取代基增加疏水性胺基酸之溶劑可接近表面積(如本文中所定義)。於一些實施

例中，該取代基可為鹵素、烷基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、環炔基、雜環基、芳基、雜芳基、烷氧基、芳氧基、醯基、烷基胺甲醯基、烷基甲醯胺基、烷氧羰基、烷基硫基或芳基硫基。於一些實施例中，該取代基為鹵素。

【0156】 可選擇具有更高疏水性值之胺基酸以提高cCPP相對於具有更低疏水性值之胺基酸之胞質遞送效率。於一些實施例中，各疏水性胺基酸獨立地具有高於甘胺酸之親水性值之親水性值。於其他實施例中，各疏水性胺基酸獨立地為具有高於丙胺酸之疏水性值之疏水性胺基酸。於仍其他實施例中，各疏水性胺基酸獨立地具有高於或等於苯丙胺酸之疏水性值。可使用此項技術中已知之疏水性標度量測疏水性。下表2列出如藉由以下所報導之各種胺基酸之疏水性值：Eisenberg及Weiss (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1984;81(1):140-144)，Engleman等人(Ann. Rev. of Biophys. Biophys. Chem.. 1986; 1986(15):321-53)，Kyte及Doolittle (J. Mol. Biol. 1982;157(1):105-132)，Hoop及Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1981;78(6):3824-3828)，及Janin (Nature. 1979;277(5696): 491-492)，其各者之全文以引用的方式全部併入本文中。於特定實施例中，使用Engleman等人中報導之疏水性標度量測疏水性。

表2.

胺基酸	組	Eisenberg及 Weiss	Engleman等 人	Kyrie及 Doolittle	Hoop及 Woods	Janin
Ile	非極性	0.73	3.1	4.5	-1.8	0.7
Phe	非極性	0.61	3.7	2.8	-2.5	0.5
Val	非極性	0.54	2.6	4.2	-1.5	0.6
Leu	非極性	0.53	2.8	3.8	-1.8	0.5
Trp	非極性	0.37	1.9	-0.9	-3.4	0.3

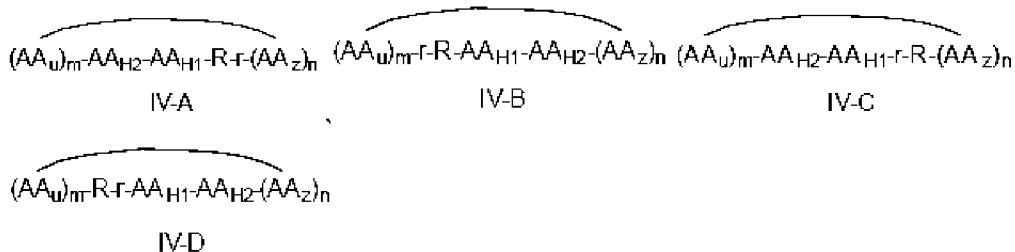
胺基酸	組	Eisenberg及 Weiss	Engleman等 人	Kyrie及 Doolittle	Hoop及 Woods	Janin
Met	非極性	0.26	3.4	1.9	-1.3	0.4
Ala	非極性	0.25	1.6	1.8	-0.5	0.3
Gly	非極性	0.16	1.0	-0.4	0.0	0.3
Cys	不帶電/極性	0.04	2.0	2.5	-1.0	0.9
Tyr	不帶電/極性	0.02	-0.7	-1.3	-2.3	-0.4
Pro	非極性	-0.07	-0.2	-1.6	0.0	-0.3
Thr	不帶電/極性	-0.18	1.2	-0.7	-0.4	-0.2
Ser	不帶電/極性	-0.26	0.6	-0.8	0.3	-0.1
His	帶電	-0.40	-3.0	-3.2	-0.5	-0.1
Glu	帶電	-0.62	-8.2	-3.5	3.0	-0.7
Asn	不帶電/極性	-0.64	-4.8	-3.5	0.2	-0.5
Gln	不帶電/極性	-0.69	-4.1	-3.5	0.2	-0.7
Asp	帶電	-0.72	-9.2	-3.5	3.0	-0.6
Lys	帶電	-1.10	-8.8	-3.9	3.0	-1.8
Arg	帶電	-1.80	-12.3	-4.5	3.0	-1.4

【0157】可選擇胺基酸之對掌性以提高胞質吸收效率。於一些實施例中，胺基酸中之至少兩者具有相反對掌性。於一些實施例中，具有相反對掌性之至少兩個胺基酸可彼此相鄰。於一些實施例中，至少三個胺基酸具有相對於彼此之交替立體化學。於一些實施例中，具有相對於彼此之交替對掌性之至少三個胺基酸可彼此相鄰。於一些實施例中，胺基酸中之至少兩者具有相同對掌性。於一些實施例中，具有相同對掌性之至少兩個胺基酸可彼此相鄰。於一些實施例中，至少兩個胺基酸具有相同對掌性及至少兩個胺基酸具有相反對掌性。於一些實施例中，具有相反對掌性之至少兩個胺基酸可與具有相同對掌性之至少兩個胺基酸相鄰。因此，於一些實施例中，cCPP中之相鄰胺基酸可具有下列序列中之任一者：D-L、L-D、

D-L-L-D、L-D-D-L、L-D-L-L-D、D-L-D-D-L、D-L-L-D-L、或L-D-D-L-D。

【0158】於一些實施例中，精胺酸與疏水性胺基酸相鄰。於一些實施例中，精胺酸具有與疏水性胺基酸相同之對掌性。於一些實施例中，至少兩個精胺酸彼此相鄰。於其他實施例中，三個精胺酸彼此相鄰。於一些實施例中，至少兩個疏水性胺基酸彼此相鄰。於其他實施例中，至少三個疏水性胺基酸彼此相鄰。於其他實施例中，本文中所述之cCPP包含至少兩個連續疏水性胺基酸及至少兩個連續精胺酸。於另外實施例中，一個疏水性胺基酸與精胺酸中之一者相鄰。於其他實施例中，本文中所述之cCPP包含至少三個連續疏水性胺基酸及三個連續精胺酸。於另外實施例中，一個疏水性胺基酸與精胺酸中之一者相鄰。胺基酸之此等各種組合可具有D及L胺基酸之任何排列，例如，上述序列。

【0159】於一些實施例中，本文中所述之cCPP（例如，如式2之cCPP）中之任何四個相鄰胺基酸可具有下列序列中之一者： $AA_{H2}-AA_{H1}-R-r$ 、 $AA_{H2}-AA_{H1}-r-R$ 、 $R-r-AA_{H1}-AA_{H2}$ 或 $r-R-AA_{H1}-AA_{H2}$ ，其中 AA_{H1} 及 AA_{H2} 各獨立地為疏水性胺基酸。因此，於一些實施例中，本文中所述化合物中使用之cCPP包括如式IV-A至D中任一者之結構：



其中：

AA_{H1} 及 AA_{H2} 各獨立地為疏水性胺基酸；

在各情況下及當存在時， AA_U 及 AA_Z 各獨立地為任何胺基酸；且

m及n係獨立地選自0至6之數字。

【0160】 於一些實施例中，式4-A至4-D之CPP中之胺基酸(包含r、R、AA_{H1}、AA_{H2})之總數目為6至10之範圍。於一些實施例中，胺基酸之總數目為6。於一些實施例中，胺基酸之總數目為7。於一些實施例中，胺基酸之總數目為8。於一些實施例中，胺基酸之總數目為9。於一些實施例中，胺基酸之總數目為10。

【0161】 於一些實施例中，m及n之總和為2至6。於一些實施例中，m及n之總和為2。於一些實施例中，m及n之總和為3。於一些實施例中，m及n之總和為4。於一些實施例中，m及n之總和為5。於一些實施例中，m及n之總和為6。於一些實施例中，m為0。於一些實施例中，m為1。於一些實施例中，m為2。於一些實施例中，m為3。於一些實施例中，m為4。於一些實施例中，m為5。於一些實施例中，m為6。於一些實施例中，n為0。於一些實施例中，n為1。於一些實施例中，n為2。於一些實施例中，n為3。於一些實施例中，n為4。於一些實施例中，n為5。於一些實施例中，n為6。

【0162】 於一些實施例中，各疏水性胺基酸係獨立地選自甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、脯胺酸、萘基丙胺酸、苯基甘胺酸、高苯丙胺酸、酪胺酸、環己基丙胺酸、哌啶-2-甲酸、或正白胺酸，其各視情況經一或多個取代基取代。於特定實施例中，各疏水性胺基酸獨立地為疏水性芳族胺基酸。於一些實施例中，該芳族疏水性胺基酸為哌啶-2-甲酸、萘基丙胺酸、苯基甘胺酸、高苯丙胺酸、苯丙胺酸、色胺酸或酪胺酸，其各視情況經一或多個取代基取代。於特定實施例中，該疏水性胺基酸為哌啶-2-甲酸、萘基丙胺酸、色

胺酸或苯丙胺酸，其各視情況經一或多個取代基取代。

【0163】 於一些實施例中，AA_{H1}及AA_{H2}各獨立地為具有高於甘胺酸之疏水性值之疏水性胺基酸。於其他實施例中，AA_{H1}及AA_{H2}各獨立地為具有高於丙胺酸之疏水性值之疏水性胺基酸。於另外其他實施例中，AA_{H1}及AA_{H2}各獨立地為具有高於苯丙胺酸之疏水性值之疏水性胺基酸，例如使用上述疏水性標度所量測，該等疏水性標度包括Eisenberg及Weiss (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1984; 81(1):140-144)，Engleman等人 (Ann. Rev. of Biophys. Biophys. Chem. 1986; 1986(15): 321-53)，Kyte及Doolittle (J. Mol. Biol. 1982;157(1):105-132)，Hoop及Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1981;78(6):3824-3828)，及Janin (Nature. 1979; 277(5696):491-492) (參見上表1)。於特定實施例中，使用Engleman等人中報導之疏水性標度量測疏水性。

【0164】 亦已發現D-Arg或L-Arg或其組合之N端或C端上疏水性胺基酸之存在提高cCPP (及附接物質)之胞質吸收。例如，於一些實施例中，本文中所揭示之cCPP可包含AA_{H1}-D-Arg或D-Arg-AA_{H1}。於其他實施例中，本文中所揭示之cCPP可包含AA_{H1}-L-Arg或L-Arg-AA_{H1}。

【0165】 可選擇D-Arg或L-Arg或其組合之N端或C端上疏水性胺基酸(即AA_{H1})之大小以提高CPP之胞質遞送效率。例如，D-Arg或L-Arg或其組合之N端或C端上較大疏水性胺基酸相較於具有較小疏水性胺基酸之其他相同序列提高胞質遞送效率。可根據疏水性胺基酸之分子量、疏水性胺基酸之位阻效應、側鏈之溶劑可接近表面積(SASA)或其組合量測疏水性胺基酸之大小。於一些實施例中，根據疏水性胺基酸之分子量量測疏水性胺基酸之大小，及較大疏水性胺基酸具有至少約90 g/mol、或至少約

130 g/mol、或至少約141 g/mol之分子量之側鏈。於其他實施例中，根據疏水性側鏈之SASA量測胺基酸之大小，及較大疏水性胺基酸具有高於丙胺酸或高於甘胺酸之SASA之側鏈。於其他實施例中，AA_{H1}具有高於或約等於哌啶-2-甲酸、高於或約等於色胺酸、高於或約等於苯丙胺酸、或約等於或高於萘基丙胺酸之SASA之疏水性側鏈。於一些實施例中，AA_{H1}具有以下之SASA之側鏈：至少約200 Å²、至少約210 Å²、至少約220 Å²、至少約240 Å²、至少約250 Å²、至少約260 Å²、至少約270 Å²、至少約280 Å²、至少約290 Å²、至少約300 Å²、至少約310 Å²、至少約320 Å²或至少約330 Å²。於一些實施例中，AA_{H2}具有以下之SASA之側鏈：至少約200 Å²、至少約210 Å²、至少約220 Å²、至少約240 Å²、至少約250 Å²、至少約260 Å²、至少約270 Å²、至少約280 Å²、至少約290 Å²、至少約300 Å²、至少約310 Å²、至少約320 Å²或至少約330 Å²。於一些實施例中，AA_{H1}及AA_{H2}之側鏈具有以下之組合之SASA：至少約350 Å²、至少約360 Å²、至少約370 Å²、至少約380 Å²、至少約390 Å²、至少約400 Å²、至少約410 Å²、至少約420 Å²、至少約430 Å²、至少約440 Å²、至少約450 Å²、至少約460 Å²、至少約470 Å²、至少約480 Å²、至少約490 Å²、大於約500 Å²、至少約510 Å²、至少約520 Å²、至少約530 Å²、至少約540 Å²、至少約550 Å²、至少約560 Å²、至少約570 Å²、至少約580 Å²、至少約590 Å²、至少約600 Å²、至少約610 Å²、至少約620 Å²、至少約630 Å²、至少約640 Å²、大於約650 Å²、至少約660 Å²、至少約670 Å²、至少約680 Å²、至少約690 Å²或至少約700 Å²。於一些實施例中，AA_{H2}為具有小於或等於AA_{H1}之疏水性側鏈之SASA之SASA之側鏈的疏水性胺基酸。舉例而言，及不受限制，具有Nal-Arg基序之cCPP展示相較於

具有Phe-Nal-Arg基序之其他相同CPP提高之胞質遞送效率；具有Phe-Nal-Arg基序之cCPP展示相較於具有Nal-Phe-Arg基序之其他相同cCPP提高之胞質遞送效率；及phe-Nal-Arg基序展示相較於具有nal-Phe-Arg基序之其他相同cCPP提高之胞質遞送效率。

【0166】 如本文中所用，「疏水性表面積」或「SASA」係指可接近溶劑之胺基酸側鏈之表面積(以平方埃(Ångstrom)；Å²報導)。於特定實施例中，使用由Shrake及Rupley (J Mol Biol. **79** (2): 351-71)開發之「滾動球」演算法計算SASA，出於所有目的，其全文以引用的方式併入本文中。此演算法使用特定半徑之溶劑「球」探測分子表面。該球之典型值為1.4 Å，其接近水分子之半徑。

【0167】 下表3中顯示某些側鏈之SASA值。於某些實施例中，本文中所述之SASA值係基於下表3中所列之理論值，如由Tien等人(PLOS ONE 8(11): e80635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080635> 所報導，出於所有目的，其全文以引用的方式併入本文中。

表3.

殘基	理論	實際	Miller等人(1987)	Rose等人(1985)
丙胺酸	129.0	121.0	113.0	118.1
精胺酸	274.0	265.0	241.0	256.0
天冬醯胺	195.0	187.0	158.0	165.5
天冬胺酸	193.0	187.0	151.0	158.7
半胱胺酸	167.0	148.0	140.0	146.1
麩胺酸	223.0	214.0	183.0	186.2
麩胺醯胺	225.0	214.0	189.0	193.2
甘胺酸	104.0	97.0	85.0	88.1
組胺酸	224.0	216.0	194.0	202.5
異白胺酸	197.0	195.0	182.0	181.0
白胺酸	201.0	191.0	180.0	193.1

殘基	理論	實際	Miller等人(1987)	Rose等人(1985)
離胺酸	236.0	230.0	211.0	225.8
甲硫胺酸	224.0	203.0	204.0	203.4
苯丙胺酸	240.0	228.0	218.0	222.8
脯胺酸	159.0	154.0	143.0	146.8
絲胺酸	155.0	143.0	122.0	129.8
蘇胺酸	172.0	163.0	146.0	152.5
色胺酸	285.0	264.0	259.0	266.3
酪胺酸	263.0	255.0	229.0	236.8
纈胺酸	174.0	165.0	160.0	164.5

【0168】於一些實施例中，cCPP不包含 $AA_{H2}-AA_{H1}-R-r$ 、 $AA_{H2}-AA_{H1}-r-R$ 、 $R-r-AA_{H1}-AA_{H2}$ 或 $r-R-AA_{H1}-AA_{H2}$ 之N端及/或C端之疏水性胺基酸。於替代實施例中，cCPP不包含具有大於(如本文中所述) AA_{H1} 或 AA_{H2} 中之至少一者之側鏈之疏水性胺基酸。於另外實施例中，cCPP不包含具有大於 AA_{H1} 之表面積之側鏈之疏水性胺基酸。例如，於 AA_{H1} 或 AA_{H2} 中之至少一者為苯丙胺酸之實施例中，cCPP不另外包含萘基丙胺酸(雖然cCPP可包含小於 AA_{H1} 及 AA_{H2} 之至少一種疏水性胺基酸，例如，白胺酸)。於仍其他實施例中，cCPP不包含萘基丙胺酸，除了 $AA_{H2}-AA_{H1}-R-r$ 、 $AA_{H2}-AA_{H1}-r-R$ 、 $R-r-AA_{H1}-AA_{H2}$ 或 $r-R-AA_{H1}-AA_{H2}$ 中之疏水性胺基酸外。

【0169】可選擇胺基酸之對掌性(即，D或L胺基酸)以提高cCPP(及如下所述之附接物質)之胞質遞送效率。於一些實施例中，精胺酸之N端或C端上之疏水性胺基酸(例如， AA_{H1})具有與相鄰精胺酸相同或相反之對掌性。於一些實施例中， AA_{H1} 具有與相鄰精胺酸相反之對掌性。例如，當精胺酸為D-arg(即，「r」)時， AA_{H1} 為D- AA_{H1} ，及當精胺酸為L-Arg(即，「R」)時， AA_{H1} 為L- AA_{H1} 。因此，於一些實施例中，本文中所揭

示之cCPP可包含下列基序中之至少一者：D-AA_{H1}-D-arg、D-arg-D-AA_{H1}、L-AA_{H1}-L-Arg或L-Arg-LAA_{H1}。於特定實施例中，當精胺酸為D-arg時，AA_{H1}可為D-nal、D-trp或D-phe。於另一非限制性實例中，當精胺酸為L-Arg時，AA_{H1}可為L-Nal、L-Trp或L-Phe。

【0170】 於一些實施例中，本文中所述之cCPP包含至少三個精胺酸。因此，於一些實施例中，本文中所述之cCPP包含下列序列中之一者：AA_{H2}-AA_{H1}-R-r-R、AA_{H2}-AA_{H1}-R-r-r、AA_{H2}-AA_{H1}-r-R-R、AA_{H2}-AA_{H1}-r-R-r、R-R-r-AA_{H1}-AA_{H2}、r-R-r-AA_{H1}-AA_{H2}、r-r-R-AA_{H1}-AA_{H2}或R-r-R-AA_{H1}-AA_{H2}。於特定實施例中，cCPP具有下列序列中之一者：AA_{H2}-AA_{H1}-R-r-R、AA_{H2}-AA_{H1}-r-R-r、r-R-r-AA_{H1}-AA_{H2}或R-r-R-AA_{H1}-AA_{H2}。於一些實施例中，可選擇AA_{H1}及AA_{H2}之對掌性以提高胞質吸收效率，例如，如上所述，其中AA_{H1}具有與相鄰精胺酸相同之對掌性，且AA_{H1}及AA_{H2}具有相反對掌性。

【0171】 於一些實施例中，本文中所述之cCPP包含三個疏水性胺基酸。因此，於一些實施例中，本文中所述之cCPP包含下列序列中之一者：AA_{H3}-AA_{H2}-AA_{H1}-R-r、AA_{H3}-AA_{H2}-AA_{H1}-R-r、AA_{H3}-AA_{H2}-AA_{H1}-r-R、AA_{H3}-AA_{H2}-AA_{H1}-r-R、R-r-AA_{H1}-AA_{H2}-AA_{H3}、R-r-AA_{H1}-AA_{H2}-AA_{H3}、r-R-AA_{H1}-AA_{H2}-AA_{H3}或r-R-AA_{H1}-AA_{H2}-AA_{H3}，其中AA_{H3}為上述任何疏水性胺基酸，例如，哌啶-2-甲酸、萘基丙胺酸、色胺酸或苯丙胺酸。於一些實施例中，可選擇AA_{H1}、AA_{H2}及AA_{H3}之對掌性以提高胞質吸收效率，例如，如上所述，其中AA_{H1}具有與相鄰精胺酸相同之對掌性，且AA_{H1}及AA_{H2}具有相反對掌性。於其他實施例中，可選擇AA_{H1}、AA_{H2}及AA_{H3}之大小以提高胞質吸收效率，例如，如上所述，其中AA_{H3}具有小

於或等於AA_{H1}及/或AA_{H2}之SAS。

【0172】於一些實施例中，AA_{H1}及AA_{H2}具有相同或相反對掌性。於某些實施例中，AA_{H1}及AA_{H2}具有相反對掌性。因此，於一些實施例中，本文中所揭示之cCPP包含下列序列中之至少一者：D-AA_{H2}-L-AA_{H1}-R-r、L-AA_{H2}-D-AA_{H1}-r-R、R-r-D-AA_{H1}-L-AA_{H2}或r-R-L-AA_{H1}-D-AA_{H1}，其中D-AA_{H1}及D-AA_{H2}各為具有D構型之疏水性胺基酸，且L-AA_{H1}及L-AA_{H2}各為具有L構型之疏水性胺基酸。於一些實施例中，D-AA_{H1}及D-AA_{H2}各係獨立地選自由D-pip、D-nal、D-trp及D-phe組成之群。於特定實施例中，D-AA_{H1}或D-AA_{H2}為D-nal。於其他特定實施例中，D-AA_{H1}為D-nal。於一些實施例中，L-AA_{H1}及L-AA_{H2}各係獨立地選自由L-Pip、L-Nal、L-Trp及L-Phe組成之群。於特定實施例中，L-AA_{H1}及L-AA_{H2}各為L-Nal。於其他特定實施例中，L-AA_{H1}為L-Nal。

【0173】如上所討論，本發明提供cCPP之各種修飾，其可提高胞質遞送效率。於一些實施例中，可藉由比較具有經修飾之序列與適當對照序列之CPP之胞質遞送效率來量測提高之胞質吸收效率。於一些實施例中，對照序列不包含特定修飾(例如，R及AA_{H1}之匹配對掌性)，但是其他與經修飾之序列相同。於其他實施例中，對照具有以下列序列：環狀(FΦRRRRQ)。

【0174】如本文中所用，胞質遞送效率係指cCPP穿過細胞膜及進入胞質液之能力。於實施例中，cCPP之胞質遞送效率不取決於受體或細胞類型。胞質遞送效率可係指絕對胞質遞送效率或相對胞質遞送效率。

【0175】絕對胞質遞送效率為生長培養基中之cCPP(或cCPP-TP結合物)之胞質濃度對CPP(或CPP-TP結合物)之濃度的比率。相對胞質遞送

效率係指胞質液中之cCPP之濃度相對於胞質液中之對照cCPP之濃度。可藉由螢光標記cCPP (例如，利用FTIC染料)及使用此項技術中熟知之技術量測螢光強度來達成定量。

【0176】 於特定實施例中，相對胞質遞送效率藉由比較(i)藉由細胞類型(例如，海拉細胞)內化之本發明之CPP之量與(ii)藉由相同細胞類型內化之對照CPP之量來確定。為量測相對胞質遞送效率，可在本發明之細胞穿透肽之存在下，培育細胞類型特定時間段(例如，30分鐘、1小時、2小時等)，之後使用此項技術中已知之方法(例如，螢光顯微術)定量藉由細胞內化之CPP之量。分開地，在細胞類型之存在下，培育相同濃度之對照cCPP歷時相同時間段，及定量藉由細胞內化之對照cCPP之量。

【0177】 於其他實施例中，相對胞質遞送效率可藉由量測具有細胞內靶之經修飾序列之cCPP的IC₅₀及比較具有經修飾序列與適當對照序列(如本文中所述)之cCPP之IC₅₀來確定。

【0178】 於一些實施例中，本文中所述之cCPP-TP結合物之相對胞質遞送效率相較於環(FΦRRRRQ)在約1%至約1000%之範圍，例如，約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約110%、約120%、約130%、約140%、約150%、約160%、約170%、約180%、約190%、約200%、約210%、約220%、約230%、約240%、約250%、約260%、約270%、約280%、約290%、約300%、約310%、約320%、約330%、約340%、約350%、約360%、約370%、約380%、約390%、約400%、約410%、約420%、約430%、約440%、約450%、約460%、約470%、約480%、約490%、約500%、約510%、約520%、約530%、約540%、約550%、約560%、約

570%、約580%、約590%、約600%、約610%、約620%、約630%、約640%、約650%、約660%、約670%、約680%、約690%、約700%、約710%、約720%、約730%、約740%、約750%、約760%、約770%、約780%、約790%、約800%、約810%、約820%、約830%、約840%、約850%、約860%、約870%、約880%、約890%、約900%、約910%、約920%、約930%、約940%、約950%、約960%、約970%、約980%、約990%、約1000%，包含於其間之所有值及子範圍。環(FΦRRRRQ)。

【0179】於其他實施例中，絕對胞質遞送效率係約40%至約100%，例如，約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%，包含於其間之所有值及子範圍。

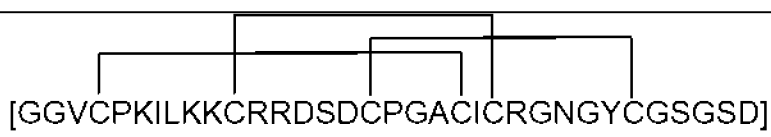
【0180】於一些實施例中，cCPP可為或包含表4中所列之序列中之任一者。即，本文中所揭示之化合物中使用之cCPP可包含表4中所列之序列中之任一者，連同額外胺基酸以形成環狀序列，或表4中之序列可經環化(經由肽鍵)以形成cCPP。於一些實施例中，表4中所列之胺基酸還包含麩胺醯胺殘基或具有允許結合TP之側鏈之其他胺基酸。

表4.

ID	序列
PCT 1	FΦRRR
PCT 2	FΦRRRC
PCT 3	FΦRRRU
PCT 4	RRRΦF
PCT 5	RRRRΦF
PCT 6	FΦRRRR
PCT 7	FφrRrR
PCT 8	FφrRrR
PCT 9	FΦRRRR

PCT 10	fΦRrRr
PCT 11	RRFRΦR
PCT 12	FRRRRΦ
PCT 13	rRFRΦR
PCT 14	RRΦFRR
PCT 15	CRRRRFW
PCT 16	FfΦRrRr
PCT 17	FFΦRRRR
PCT 18	RFRFRΦR
PCT 19	URRRRFW
PCT 20	CRRRRFW
PCT 21	FΦRRRRQK
PCT 22	FΦRRRRQC
PCT 23	fΦRrRrRQ
PCT 24	FΦRRRRRQ
PCT 25	RRRRΦFDΩC
PCT 26	FΦRRR
PCT 27	FWRRR
PCT 28	RRRΦF
PCT 29	RRRWF
SAR 1	FΦRRRR
SAR 19	FFRRR
SAR 20	FFrRr
SAR 21	FFRrR
SAR 22	FRFRR
SAR 23	FRRFR
SAR 24	FRRRF
SAR 25	GΦRRR
SAR 26	FFRA
SAR 27	FFRR
SAR 28	FFRRRR
SAR 29	FRRFRR
SAR 30	FRRRFR
SAR 31	RFRRR

SAR 32	RFRRFR
SAR 33	FRFRRR
SAR 34	FFFRRR
SAR 35	FFRRRF
SAR 36	FRFFRR
SAR 37	RRFFFR
SAR 38	FFRFRR
SAR 39	FFRRFR
SAR 40	FRRFFR
SAR 41	FRRFRF
SAR 42	FRFRFR
SAR 43	RFFRFR
SAR 44	GΦRRRR
SAR 45	FFRRRRR
SAR 46	RFFRRRR
SAR 47	RRFFRRR
SAR 48	RFFFRRR
SAR 49	RRFFFRR
SAR 50	FFRRFRR
SAR 51	FFRRRRF
SAR 52	FRRFFRR
SAR 53	FFFRRRRR
SAR 54	FFFRRRRRR
SAR 55	FΦRrRr
SAR 56	XXRRRR
SAR 57	FfFRrR
SAR 58	fFfrRr
SAR 59	fFfRrR
SAR 60	FfFrRr
SAR 61	fFφrRr
SAR 62	fΦfrRr
SAR 63	φFfrRr
SAR 64	FΦrRr

SAR 65	fΦrRr
SAR 66	Ac-(Lys-fFRrRrD)
SAR 67	Ac-(Dap-fFRrRrD)
SAR 68	CWWRRRRC └─S──S─┘
SAR 69	CWWVRRRRC └─S──S─┘
SAR 70	CFWRRRRC └─S──S─┘
SAR 71	CWWWRRRRC └─S──S─┘
Pin1 15	Pip-Nal-Arg-Glu-arg-arg-glu
Pin1 16	Pip-Nal-Arg-Arg-arg-arg-glu
Pin1 17	Pip-Nal-Nal-Arg-arg-arg-glu
Pin1 18	Pip-Nal-Nal-Arg-arg-arg-Glu
Pin1 19	Pip-Nal-Phe-Arg-arg-arg-glu
Pin1 20	Pip-Nal-Phe-Arg-arg-arg- Glu
Pin1 21	Pip-Nal-phe-Arg-arg-arg- glu
Pin1 22	Pip-Nal-phe-Arg-arg-arg- Glu
Pin1 23	Pip-Nal-nal-Arg-arg-arg- Glu
Pin1 24	Pip-Nal-nal-Arg-arg-arg- glu
Rev-13	[Pim-RQRR-Nlys]GRRR ^b
hLF	KCFQWQRNMRKVRGPPVSC
cTat	[KrRrGrKkRrE] ^c
cR10	[KrRrRrRrRrRE] ^c
L-50	[RVTRGKRRIRRpP]
L-51	[RTRTRGKRRIRVpP]
[WR]₄	[WRWRWRWR]
MCoTI-II	 [GGVCPKILKKCRRDSDCPGACICRGNGYCGSGSD]
Rotstein等人，	[P-Cha-r-Cha-r-Cha-r-Cha-r-G] ^d

Chem. Eur. J. 2011	
Lian等人, J. Am. Chem. Soc. 2014	$\text{Tm}(\text{SvP-F}_2\text{Pmp-H})\text{-Dap-(F}\Phi\text{RRRR-Dap)}\text{]}^f$
Lian等人, J. Am. Chem. Soc. 2014	$[\text{Tm}(\text{a-Sar-D-pThr-Pip-}\Phi\text{RAa})\text{-Dap-(F}\Phi\text{RRRR-Dap)}\text{]}^f$
IA8b	$[\text{CRRSRRGCGRRSRRCG}]^g$
Dod-[R₅]	$[\text{K}(\text{Dod})\text{RRRR}]$
LK-3	$\begin{array}{c} \text{LKKLCKLLKKLCKLAG} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{LKKLCKLLKKLCKLAG} \end{array}$
	RRRR-[KRRRE]^c
	RRR-[KRRRRE]^c
	RR-[KRRRRRE]^c
	R-[KRRRRRRE]^c
[CR]₄	$[\text{CRCRCRCR}]$
cyc3	$[\text{Pra-LRKRLRKFRN-AzK}]^h$
PMB	$\text{T-Dap-[Dap-Dap-f-L-Dap-Dap-T]}$
GPMB	$\text{T-Agp-[Dap-Agp-f-L-Agp-Agp-T]}$
cCPP1	$\text{F}\Phi\text{RRRR}$
cCPP12	$\text{Ff}\Phi\text{RrRr}$
cCPP9	$\text{f}\Phi\text{RrRr}$
cCPP11	$\text{f}\Phi\text{RrRrR}$
cCPP18	$\text{F}\Phi\text{rRrR}$
cCPP13	$\text{F}\Phi\text{rRrR}$
cCPP6	$\text{F}\Phi\text{RRRRR}$
cCPP3	$\text{RRFR}\Phi\text{RQ}$
cCPP7	$\text{FF}\Phi\text{RRRR}$
cCPP8	$\text{RFRFR}\Phi\text{R}$
cCPP5	$\text{F}\Phi\text{RRR}$
cCPP4	$\text{FRRRR}\Phi$

cCPP10	rRFRΦR
cCPP2	RRΦFRR
cCPP62	fΦfrRr

Φ，L-2-萘基丙胺酸；Pim，庚二酸；Nlys，離胺酸類肽殘基；D-pThr，D-磷酸蘇胺酸；Pip，L-哌啶-2-甲酸；Cha，L-3-環己基-丙胺酸；Tm，均苯三甲酸；Dap，L-2,3-二胺基丙酸；Sar，肌胺酸；F₂Pmp，L-二氟磷醯基甲基苯丙胺酸；Dod，十二醯基；Pra，L-炔丙基甘胺酸；AzK，L-6-疊氮基-2-胺基-己酸；Agp，L-2-胺基-3-胍基丙酸；^b Pim與Nlys之間之環化；^c Lys與Glu之間之環化；^d藉由氮丙啶醛與異脛之多組分反應之大環化；^e Gln殘基之主鏈之間之環化；^fN端胺及兩個Dap殘基之側鏈與Tm二環化；^g三個Cys側鏈與三(溴甲基)苯二環化；^h藉由Pra與Azk之間之點擊反應之環化。

【0181】此外，本文中所述化合物及方法中所用之cCPP可包含於以下中所揭示之任何序列：美國申請案第15/312,878號、美國申請案第15/360,719號、國際PCT申請公開案第WO/2018/089648號(包括對應美國公開案)及國際PCT申請公開案第WO 2018/098231號，出於所有目的，其各者之全文以引用的方式併入。

胸苷磷酸化酶

【0182】如上所討論，本文中所述化合物包括野生型(wt)胸苷磷酸化酶蛋白質或其活性片段或類似物(本文中統稱作「TP」)。因此，整篇本發明使用「TP」且主張係指野生型蛋白質或野生型蛋白質之活性片段或類似物。

【0183】如本文中所用，「活性片段」係指人類或非人類野生型胸苷磷酸化酶之部分，其展示活性(諸如全長胸苷磷酸化酶之一或多種活性)

或具有另一種活性。於特定實施例中，認為共用野生型胸苷磷酸化酶之至少一種生物活性之野生型胸苷磷酸化酶之部分為胸苷磷酸化酶之活性片段。於一些實施例中，活性片段亦包括本文中所揭示之至少一種修飾。活性可為全長胸苷磷酸化酶之活性之任何百分比(即，更多或更少)，包括(但不限於)該活性之約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、約200%、約300%、約400%、約500%或更多活性較全長胸苷磷酸化酶。因此，於一些實施例中，可將活性片段置換成初始胸苷磷酸化酶及保留野生型胸苷磷酸化酶之一或多種生物活性之至少一部分。於其他實施例中，可將活性片段置換成初始胸苷磷酸化酶及增強野生型胸苷磷酸化酶之一或多種生物活性。

【0184】 本發明中所用之TP可源自任何真核細胞，例如，哺乳動物細胞。於一些實施例中，哺乳動物為小鼠、人類、牛、大鼠、豬、馬、雞、羊等。於特定實施例中，TP為人類胸苷磷酸化酶或源自人類胸苷磷酸化酶。於一些實施例中，TP係源自大腸桿菌。

【0185】 於一些實施例中，用於化合物之TP為全長人類胸苷磷酸化酶蛋白質(SEQ ID NO. 1)或截短蛋白(即，片段)，例如，裂解1-10原肽(TP11；SEQ ID NO. 2)、裂解1-15肽(TP16；SEQ ID NO. 3)、裂解1-21肽(TP21；SEQ ID NO 4)及裂解1-34肽(TP34；SEQ ID NO 5)。於一些實施例中，適宜TP部分可為截短人類胸苷磷酸化酶或全長人類胸苷磷酸化酶之同系物或類似物。例如，截短或全長人類胸苷磷酸化酶蛋白質之同系物或類似物可為經修飾之胸苷磷酸化酶蛋白質，該蛋白質含有一或多個胺基酸置換、缺失及/或插入，如與野生型或天然存在之蛋白質(例如，SEQ

ID NO. 1、NO. 2、NO. 3、NO. 4或NO 5)相比，同時保留實質胸苷磷酸化酶蛋白質活性。

表5.

人類胸苷磷酸化酶(TP) (P19971)

全長(1-482)	MAALMTPGTGAPPAPGDFSGEGSQGLPDPSPEPKQLPELIRMKRDGGR LSEADIRGFVAAVVNGSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQAL AQSGQQLEWPEAWRQQLVDKHSTGGVGDKVSLVLAPALAACGCKV PMISGRGLGHTGGTLDKLESIPGFNVIQSPEQMQLLDQAGCCIVGQS EQLVPADGILYAARDVTATVDSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKF GGAAVFPNQEQAARELAKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVG HALEVEEALLCMDGAGPPDLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAA RVAAALDDGSALGRFERMLAAQGVDPGLARALCSGSPAERRQLLPR AREQEELLAPADGTVELVRALPLALVLHELGAGRSRAGEPLRLGVGA ELLVDVGQRLRRGTPWLRVHRDGPALSGPQSRALQEALVLSDRAPFA APSPFAELVLPQQ (SEQ ID NO. 1)
截短(11-482) 「TP11」 (裂解1-10原 肽)	APPAPGDFSGEGSQGLPDPSPEPKQLPELIRMKRDGGRLSEADIRGFVA AVVNGSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQQLEWP EAWRQQLVDKHSTGGVGDKVSLVLAPALAACGCKVPMISGRGLGHT GGTLDKLESIPGFNVIQSPEQMQLLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILY AARDVTATVDSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFVGAAVFPNQEQA ARELAKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVGHLEVEEALLC MDGAGPPDLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGS ALGRFERMLAAQGVDPGLARALCSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPA DGTVELVRALPLALVLHELGAGRSRAGEPLRLGVGAELLVDVGQR LRRGTPWLRVHRDGPALSGPQSRALQEALVLSDRAPFAAPSPFAELVL PQQ (SEQ ID NO. 2)
截短(16-482) 「TP16」 (裂解1-15肽)	GDFSGEGSQGLPDPSPEPKQLPELIRMKRDGGRLSEADIRGFVAAVVN GSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQQLEWPEAWR QQLVDKHSTGGVGDKVSLVLAPALAACGCKVPMISGRGLGHTGGTL DKLESIPGFNVIQSPEQMQLLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILYAARD VTATVDSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFVGAAVFPNQEQAAREL AKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVGHLEVEEALLCMDG

	AGPPDLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGR FERMLAAQGVDPGLARALCSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGTV ELVRALPLALVLHELGAGRSRAGEPLRLGVGAELLVDVGQRLRRGTP WLRVHRDGPALSGPQSRAEQEALVLSDRAPFAAPSPFAELVLPPQQ (SEQ ID NO. 3)
截短(22-482) 「TP22」 (裂解1-21肽)	GSQGLPDPSPEPKQLPELIRMKRDDGGRLSEADIRGFVAAVVNGSAQGA QIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLQALAQSGQQLWPEAWRQQLVVK HSTGGVGDVSLVLAALACGCKVPMISGRGLGHTGGTLDKLESIP GFNVIQSPEQMQLLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILYAARDVTATVD SLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFGGAAVFPNQEARELAKTLVG VGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVGHAVEVEEALLCMDGAGPPDLR DLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGRFERMLA AQGVDPGLARALCSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGTVELVRAL PLALVLHELGAGRSRAGEPLRLGVGAELLVDVGQR LRRGTPWLRVHRDGPALSGPQSRAEQEALVLSDRAPFAAPSPFAELVL PPQQ (SEQ ID NO. 4)
截短(35-482) 「TP35」 (裂解1-34肽)	QLPELIRMKRDDGGRLSEADIRGFVAAVVNGSAQGAQIGAMLMAIRLR GMDLEETSVLQALAQSGQQLWPEAWRQQLVVKHSTGGVGDVSLV LVAALACGCKVPMISGRGLGHTGGTLDKLESIPGFNVIQSPEQMQL VLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILYAARDVTATVDSLPLITASILSKKL VEGLSALVVDVKFGGAAVFPNQEARELAKTLVGVGASLGLRVAAA LTAMDKPLGRCVGHAVEVEEALLCMDGAGPPDLRDLVTTLGGALLW LSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGRFERMLAAQGVDPGLARAL CSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGTVELVRALPLALVLHELGAGR SRAGEPLRLGVGAELLVDVGQR LRRGTPWLRVHRDGPALSGPQSRAEQEALVLSDRAPFAAPSPFAELVL PPQQ (SEQ ID NO. 5)

【0186】 因此，於一些實施例中，適用於本文中所述化合物及方法之TP係與全長人類胸苷磷酸化酶蛋白質(SEQ ID NO. 1)實質上同源。於一些實施例中，適用於本發明化合物及方法之TP具有與SEQ ID NO. 1至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約91%、至少約

92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或更多同源性的胺基酸序列。於一些實施例中，適用於本文中所述化合物及方法之TP具有與SEQ ID NO:1 95%或更多同源性的胺基酸序列。

【0187】 於一些實施例中，適用於本文中所述化合物及方法之TP與截短之(例如，裂解1-10、1-15、1-21或1-34原肽)胸苷磷酸化酶蛋白質(SEQ ID NO: 2、3、4或5)實質上同源。於一些實施例中，適用於本發明化合物及方法之TP具有與SEQ ID NO:2、3、4或5至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或更多同源性的胺基酸序列。於一些實施例中，適用於本文中所述化合物及方法之TP具有與SEQ ID NO:2、3、4或5 95%或更多同源性的胺基酸序列。

【0188】 因此，於一些實施例中，適用於本文中所述化合物及方法之TP與全長人類TP蛋白質(SEQ ID NO. 1)實質上相同。於一些實施例中，適用於本文中本發明化合物及方法之TP具有與SEQ ID NO:1至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或更多同一性的胺基酸序列。於一些實施例中，適用於本文中所述化合物及方法之TP具有與SEQ ID NO:1 95%或更多同一性的胺基酸序列。

【0189】 因此，於一些實施例中，適用於本文中所述化合物及方法之TP與截短之(裂解1-10原肽)人類TP蛋白質(SEQ ID NO. 2)實質上相同。於一些實施例中，適用於本發明化合物及方法之TP具有與SEQ ID NO: 2、3、4或5至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或更多同一性之胺基酸序列。於一些實施例中，適用於本文中所述化合物及方法之TP具有與SEQ ID NO: 2、3、4或5 95%或更多同一性之胺基酸序列。

【0190】 於一些實施例中，適用於本文中所述化合物及方法之TP含有全長人類TP蛋白質(SEQ ID NO. 1)之片段或截短之(裂解1-10、1-15、1-21或1-34原肽)胸苷磷酸化酶蛋白質(SEQ ID NO: 2、3、4或5)之片段。

【0191】 如上所討論，TP可為野生型人類蛋白質或野生型人類蛋白質之活性片段，可將該活性片段置換為初始胸苷磷酸化酶。於一些實施例中，胸苷磷酸化酶之活性片段可救援與MNGIE相關之一或多種表現型或症狀或一旦位於胞質液中就與胸苷磷酸化酶缺乏相關之症狀。野生型序列之活性片段為以與野生型蛋白質實質上相似方式起作用之序列。因此，活性片段包含野生型蛋白質之任何胺基酸序列，當位於胞質液中時，該序列允許細胞功能實質上類似於原本包含野生型TP之相似細胞。於一些實施例中，活性片段包含胺基酸序列，該序列導致功能於胞質液進入後相較於野生型TP不顯著減少，但是仍展示預期治療效果，例如，約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%或約50%。

【0192】於一些實施例中，野生型蛋白質之活性片段可具有減少約1或更多個胺基酸(例如，約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約90、約95、約100、約105、約110、約115、約120、約125、約130、約135、約140、約145、約150、約155、約160、約165、約170、約175或約180或更多個胺基酸)之胺基酸序列。

【0193】如本文中所用，「類似物」係指具有磷酸化酶活性之TP之變異體，但是該變異體之一或多種性質相對於野生型TP改良。例如，可提高磷酸化酶活性以通過蛋白質工程改造增強結合及/或酶促活性，或可通過蛋白質工程改造或水溶性聚合物(例如，如本文中所述)之結合增強穩定性。於其他實施例中，野生型TP之一或多種性質(除了磷酸化酶活性外)係不存在或於「類似物」中減少。可減少或消除之性質之非限制性實例包括免疫原性、血管原性、血栓形成性及SRC同源3域(SH3域)結合活性。例如，據信某些蛋白質上之PXXP序列與SH3域之間(諸如Fyn上之PXXP序列與Lyn上之SH3域之間)之相互作用增加血栓症風險(Circ Res. 2014, 115(12): 997-1006)。野生型人類TP中之胺基酸12-15 (PPAP)具有此序列。因此，設計移除此PPAP序列之截短之TP序列(SEQ. NO. 3、NO. 4或NO. 5)。

【0194】於一些此等實施例中，可將TP與提高半衰期或穩定性之部分融合或結合。此等部分之非限制性實例包括蛋白質及水溶性聚合物。於一些實施例中，可將TP與Fc或人類血清白蛋白(HSA)融合或結合。不受理論束縛，Fc及HSA與FCRn報告基因相互作用，及此活動允許Fc及/或HAS與TP融合以增加TP之循環半衰期。於一些實施例中，Fc或HAS位於TP之

N端，該TP具有或不具有PPAP序列(胺基酸12至15)。於其他實施例中，Fc或HAS位於TP之C端，該TP具有或不具有PPAP序列(胺基酸12至15)。於一些實施例中，可使用連接子以連接TP (具有或不具有PPAP)至Fc或HAS。下表6中提供此等構築體之非限制性實例。本發明涵蓋具有表6中所提供之彼等之至少約85%之序列同一性的序列。

表6

示例TP及Fc結合物

IgG1Fc-TP (16-482) N-端融合	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGFS GEGSQGLPDPSPEPKQLPELIRMKRDGGRLSEADIRGFVA AVVNGSAQ GAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQQLEWPEAWRQQLV DKHSTGGVGDKVSLLAPALACGCKVPMISGRGLGHTGGTLDKLES IPGFNVIQSPEQMQLLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILYAARDVTATV DSLPLITASILSKKLEVEGLSALVVDVKFGAAVFPNQEQA RELAKTLV GVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVGHAEVEEALLCMDGAGPPDL RDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGRFERML AAQGVDPGLARALCSGSPAERRQLPRAREQEELLAPADGTVELVRA LPLALVLHELGAAGRSRAGEPLRLGVGAELLVDVGQRLRRGTPWLRVH RDGPALSGPQSRA LQEALVLSDRAPFAAPSPPFAELVLPQQ (SEQ ID NO. 6)
IgG1Fc-TP (16-482) 與GGGGS連 接子之N端融 合	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGG GSGDFSGEGSQGLPDPSPEPKQLPELIRMKRDGGRLSEADIRGFVA AV VNGSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQQLEWPEA

「Fc-TP16」	<p>WRQQLVDKHSTGGVGDKVSLVLAPALAACGCKVPMISGRGLGHTGG TLDKLESIPGFNVIQSPEQMQLVLLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILYAA RDVTATVDSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFGGAAVFPNQEQR ELAKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVGHAVEVEALLCMD GAGPPDLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALG RFERMLAAQGVDPGLARALCSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGT VELVRALPLALVLHELGAGRSRAGEPLRLGVGAELLVDVGQRLRRGT PWLRVHRDGPALSGPQSRALQEALVLSRAPFAAPSPFAELVLPQQ</p> <p>(SEQ ID NO. 7)</p>
TP (16-482)- IgG1Fc C-端融合	<p>GDFSGEGSQGLPDPSPPEPKQLPELIRMKRDRDGGRLSEADIRGFVAAAVN GSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQQLWPEAWR QQLVDKHSTGGVGDKVSLVLAPALAACGCKVPMISGRGLGHTGGTL DKLESIPGFNVIQSPEQMQLVLLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILYAARD VTATVDSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFGGAAVFPNQEAREL AKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVGHAVEVEALLCMDG AGPPDLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGR FERMLAAQGVDPGLARALCSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGTV ELVRALPLALVLHELGAGRSRAGEPLRLGVGAELLVDVGQRLRRGTP WLRVHRDGPALSGPQSRALQEALVLSRAPFAAPSPFAELVLPQQEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>(SEQ ID NO. 8)</p>
TP (16-482)- IgG1Fc 與GGGGS連 接子之C端融	<p>GDFSGEGSQGLPDPSPPEPKQLPELIRMKRDRDGGRLSEADIRGFVAAAVN GSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQQLWPEAWR QQLVDKHSTGGVGDKVSLVLAPALAACGCKVPMISGRGLGHTGGTL DKLESIPGFNVIQSPEQMQLVLLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILYAARD VTATVDSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFGGAAVFPNQEAREL AKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVGHAVEVEALLCMDG</p>

<p>合</p> <p>「TP16-Fc」</p>	<p>AGPPDLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGR FERMLAAQGVDPGLARALCSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGTV ELVRALPLALVLHELGAGRSRAGEPLRLGVGAELLVDVVGQRLRRGTP WLRVHRDGPALSGPQSRALQEALVLSRAPFAAPSFAELVLPPQQG GGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>(SEQ ID NO. 9)</p>
<p>TP (16-482)- IgG1Fc_R435</p> <p>與GGGGS連 接子之C端融 合</p>	<p>GDFS GEGSQGLPDPSPKQLPELIRMKRDGGRLSEADIRGFVAAAVVN GSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTAQALAQSGQQLWPEAWR QQLVDKHSTGGVGDVSLVLAALACGCKVPMISGRGLGHTGGTL DKLESIPGFNVIQSPEQMQLLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILYAARD VTATVDSLPLITASILSKKLVGLSALVVDVKFGGAAVFPNQEQAREL AKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVGHAEVEEALLCMDG AGPPDLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGR FERMLAAQGVDPGLARALCSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGTV ELVRALPLALVLHELGAGRSRAGEPLRLGVGAELLVDVVGQRLRRGTP WLRVHRDGPALSGPQSRALQEALVLSRAPFAAPSFAELVLPPQQG GGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK</p> <p>(SEQ ID NO. 10)</p>
<p>IgG1Fc(R435)-TP (16-482)</p> <p>與GGGGS連 接子之N端融</p>	<p>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGKGGG</p>

<p>合</p>	<p>GSGDFSGEGSQGLPDPSPEPKQLPELIRMKRDGGRLSEADIRGFVAAV VNGSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQQLEWPEA WRQQLVDKHSTGGVGDVSLVLPALAACGCKVPMISGRGLGHTGG TLDKLESIPGFNVIQSPEQMQLLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILYAA RDVTATVDSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFGGAAVFPNQEQR ELAKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVGHAVEVEEALLCMD GAGPPDLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALG RFERMLAAQGVDPGLARALCSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGT VELVRALPLALVLHELGAAGRSRAGEPLRLGVGAELLVDVGQRLRRGT PWLRVHRDGPALSGPQSRALQEALVLSDRAPFAAPSPFAELVLPPQQ</p> <p>(SEQ ID NO. 11)</p>
<p>IgG1Fc- TP_R435 (16-482) N端融合</p>	<p>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGKGFDF GEGSQGLPDPSPEPKQLPELIRMKRDGGRLSEADIRGFVAAVNGSAQ GAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQQLEWPEAWRQQLV DKHSTGGVGDVSLVLPALAACGCKVPMISGRGLGHTGGTLDKLES IPGFNVIQSPEQMQLLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILYAAARDVTATV DSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFGGAAVFPNQEQAARELAKTLV GVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVGHAVEVEEALLCMDGAGPPDL RDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGRFERML AAQGVDPGLARALCSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGTVELVRA LPLALVLHELGAAGRSRAGEPLRLGVGAELLVDVGQRLRRGTPWLRVH RDGPALSGPQSRALQEALVLSDRAPFAAPSPFAELVLPPQQ</p> <p>(SEQ ID NO. 12)</p>
<p>TP (16-482) -</p>	<p>GDFSGEGSQGLPDPSPEPKQLPELIRMKRDGGRLSEADIRGFVAAVNVN</p>

<p>IgG1Fc_R435</p> <p>C端融合</p>	<p>GSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQQLEWPEAWR QQLVDKHSTGGVGDKVSLLAPALAACGCKVPMISGRGLGHTGGTL DKLESIPGFNVIQSPEQMQLLDQAGCCIVGQSEQLVPADGILYAARD VTATVDSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFGGA AVFPNQEQAREL AKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRCVGHAEVEEALLCMDG AGPPDLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGR FERMLAAQGVDPGLARALCSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGTV ELVRALPLALVLHELGAGRSRAGEPLRLGVGAELLVDVGVQRLRRGTP WLRVHRDGPALSGPQSRALQEALVLSDRAPFAAPSFAELVLPPQQEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNR YTKSLSLSPGK</p> <p>(SEQ ID NO. 13)</p>
--------------------------------	---

【0195】 於一些實施例中，本發明化合物及方法中之TP具有與SEQ ID NO: 6、7、8、9、10、11、12或13至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或更多同一性之胺基酸序列。於一些實施例中，適用於本文中所述化合物及方法之TP具有與SEQ ID NO: 6、7、8、9、10、11、12或13 95%或更多同一性之胺基酸序列。

【0196】 於一些實施例中，TP類似物含有一或多個胺基酸置換。熟習者可使用分子建模選擇可結構上容許之突變，例如，環中之缺失、環中之插入、域之缺失、C端截短及N端截短。可使用對來自其他生物體之TP

突變之同源建模識別胺基酸殘基作為突變耐受。亦使用建模來選擇改變酵素之功能之突變，諸如於酵素之活性位點中或附近之突變。於一些實施例中，置換可為保守置換或非保守置換。

【0197】 保守胺基酸置換之實例包括將一個胺基酸置換成來自下列群中之一者內之另一個胺基酸：鹼性胺基酸(精胺酸、離胺酸及組胺酸)、酸性胺基酸(麩胺酸及天冬胺酸)、極性胺基酸(麩胺醯胺及天冬醯胺)、疏水性胺基酸(白胺酸、異白胺酸及纈胺酸)、芳族胺基酸(苯丙胺酸、色胺酸及酪胺酸)及小的胺基酸(甘胺酸、丙胺酸、絲胺酸、蘇胺酸及甲硫胺酸)。於一些實施例中，置換結構上相似胺基酸以逆轉殘基之電荷(例如，麩胺醯胺置換成麩胺酸或反之亦然，天冬胺酸置換成天冬醯胺或反之亦然)。於一些實施例中，將酪胺酸置換成苯丙胺酸或反之亦然。例如，藉由H. Neurath及R. L. Hill, 1979, In, *The Proteins*, Academic Press, New York描述胺基酸置換之其他非限制性實例。常見置換為Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、及Asp/Gly。

【0198】 於一些實施例中，可將TP與醫藥上可接受之水溶性聚合物結合。醫藥上可接受之水溶性聚合物之非限制性實例包括聚乙二醇(PEG)、葡聚糖或聚(n-乙基吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、環氧丙烷/環氧乙烷共聚物、聚氧乙基化聚醇、聚乙烯醇、聚氧乙基化聚醇、聚氧乙基化山梨糖醇、聚氧乙基化葡萄糖、聚氧乙基化丙三醇(POG)、聚氧化烯、聚乙二醇丙醛、乙二醇/丙二醇共聚物、單甲氧基-聚乙二醇、單-(C1-C10)烷氧基或芳氧基-聚乙二醇、羧甲基纖維素、聚乙縮醛、聚乙烯

醇(PVA)、聚乙烯基吡咯啉酮、聚-1,3-二噁茂烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/馬來酸酐共聚物、聚(β -胺基酸) (均聚物或無規共聚物)、聚(n-乙基吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物(PPG)及其他聚環氧烷、聚環氧丙烷/環氧乙烷共聚物、結腸酸或其他多醣聚合物、聚蔗糖(Ficoll)或及其混合物。於特定實施例中，TP經PEG化。如本文中所用，「PEG化」係指將TP偶合至一或多個聚乙二醇(PEG)殘基。於一些實施例中，PEG之分子量為約0.1 kDa至約100 kDa，例如，約0.1 kDa、約1 kDa、約10 kDa、約20 kDa、約30 kDa、約40 kDa、約50 kDa、約60 kDa、約70 kDa、約80 kDa、約90 kDa及約100 kDa。於特定實施例中，PEG係約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、或50 kDa，包括2 kDa或約5 kDa。該聚合物可係直鏈或分支鏈。此等聚合物(例如，PEG)之附接添加分子量至TP及可藉由提高穩定性及/或減少降解及/或排泄導致增加之半衰期。聚合物之結合亦可提高於生理pH之水溶液中溶解度及穩定性，同時保留TP之生物活性。可將PEG及任何其他生物聚合物在任何適宜位點處(例如，任何胺基酸之N端或C端或側鏈)連接至HPPD，該胺基酸具有適於結合之官能基或可經合成修飾。

【0199】 可在用於使蛋白質與活化聚合物分子反應之任何適宜條件下將以上聚合物(諸如PEG群)連接至TP。可使用此項技術中已知之任何方法，包括經由醯化、還原烷基化、邁克爾(Michael)加成、硫醇烷基化或其他化學選擇性結合/連接方法通過PEG部分上之反應性基團(例如醛、胺基、酯、硫醇、 α -鹵乙醯基、馬來醯亞胺基或胍基)至TP上之反應性基團(例如醛、胺基、酯、硫醇、 α -鹵乙醯基、馬來醯亞胺基或胍基)。可用於連接水溶性聚合物至一或多種蛋白質之活化基團包括(但不限於)碘、馬來

醯亞胺、巯基(sulfhydryl)、硫醇、三氟甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、氮雜環丁烷、環氧乙烷、5-吡啶基及 α -鹵化醯基(例如 α -碘乙酸、 α -溴乙酸、 α -氯乙酸)。若藉由還原烷基化連接至TP，則所選之聚合物應具有單個反應性醛以控制聚合度。參見例如Kinstler等人，*Adv. Drug. Delivery Rev.* 54: 477-485 (2002)；Roberts等人，*Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 459-476 (2002)；及Zalipsky等人，*Adv. Drug Delivery Rev.* 16: 157-182 (1995)。

【0200】 可藉由肽之靶向胺基酸殘基與能與此等靶向胺基酸之選定側鏈或N端或C端殘基反應之有機衍化劑反應經由直接共價鍵聯將TP連接至以上聚合物。肽或結合物部分之反應性基團包括例如醛、胺基、酯、硫醇、 α -鹵乙醯基、馬來醯亞胺基或胍基。衍化劑包括例如馬來醯亞胺基苯甲醯基磺酸基(sulfo)琥珀醯亞胺酯(經半胱胺酸殘基結合)、N-羥基琥珀醯亞胺(經離胺酸殘基)、戊二醛、琥珀酸酐，或此項技術中已知之其他劑。或者，可將結合物部分經中間載體(諸如多醣或多肽載體)間接連接至TP。多醣載體之實例包括胺基葡聚糖(dextran)。適宜多肽載體之實例包括聚離胺酸、聚麩胺酸、聚天冬胺酸、其共聚物，及此等胺基酸及其他(例如絲胺酸)之混合聚合物以賦予所得負載載體所需溶解度性質。

【0201】 於實施例中，將TP內之硫醇部分用水溶性聚合物(諸如PEG)修飾。於一些實施例中，將硫醇於邁克爾加成反應中用馬來醯亞胺活化之PEG修飾以產生包含硫醚鍵聯之PEG化肽。於替代實施例中，將硫醇於親核取代反應中用鹵乙醯基活化之PEG修飾以產生包含硫醚鍵聯之PEG化肽。半胱胺醯基殘基最常與 α -鹵乙酸酯(及對應胺)(諸如氯乙酸及氯乙醯胺)反應以得到羧甲基或羧醯胺基甲基衍生物。半胱胺醯基殘基亦

藉由與以下反應衍化：溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基)丙酸、氯乙醯基磷酸酯、N-烷基馬來醯亞胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基 2-吡啶基二硫化物、對氯汞基苯甲酸酯、2-氯汞基-4-硝基苯酚，或氯-7-硝基苯并-2-噁-1,3-二唑。

【0202】 組胺醯基殘基藉由與二乙基焦碳酸酯在pH 5.5至7.0下反應衍生，因為此試劑相對特定用於組胺醯基側鏈。對溴苯醯基溴亦係有用；該反應較佳地於0.1M二甲砷酸鈉中在pH 6.0下進行。

【0203】 離胺醯基及胺基末端殘基與琥珀酸或其他羧酸酐反應。利用此等試劑衍生具有逆轉離胺醯基殘基之電荷之作用。用於衍生含 α -胺基之殘基之其他適宜試劑包括亞胺酸酯，諸如甲基吡啶亞胺酸甲酯、磷酸吡哆醛、吡哆醛、氯硼氫化物、三硝基苯磺酸、O-甲基異脲、2,4-戊二酮及轉胺酶催化之與乙醛酸之反應。

【0204】 精胺醯基殘基藉由與一或若干種習知試劑反應而修飾，其中有苯基乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-環己二酮、及茛三酮。精胺酸殘基之衍生需要於鹼性條件下進行反應，因為胍官能基之高pKa。此外，此等試劑可與離胺酸之基團以及精胺酸 ϵ -胺基反應。

【0205】 可進行酪胺醯基殘基之特定修飾，其中特別關注藉由與芳族重氮化合物或四硝基甲烷反應將光譜標籤引入酪胺醯基殘基。最常見的是，使用N-乙醯基咪唑及四硝基甲烷各自形成O-乙醯基酪胺醯基物質及3-硝基衍生物。

【0206】 羧基側基(天冬胺醯基或麩胺醯基)藉由與碳二亞胺(R--N.dbd.C.dbd.N--R')反應選擇性地修飾，其中R及R'為不同烷基，諸如1-環己基-3-(2-嗎啉基-4-乙基)碳二亞胺或1-乙基-3-(4-氮鎘-4,4-二甲基戊

基)碳二亞胺。此外，藉由與銨離子反應將天冬胺醯基及麩胺醯基殘基轉化成天冬醯胺醯基及麩胺醯胺醯基殘基。

【0207】 其他修飾包括脯胺酸及離胺酸之羥基化，絲胺醯基或蘇胺醯基殘基之羥基之磷酸化，離胺酸、精胺酸及組胺酸側鏈之 α -胺基之甲基化(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 第79至86頁(1983))，天冬醯胺或麩胺醯胺之去醯胺化，N端胺之乙醯化及/或C端羧酸基團之醯胺化或酯化。

【0208】 於另一實施例中，本發明係關於SEQ ID NO. 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13或本文中所揭示之任何其他序列之多肽之變異體，包括一或多個(例如，若干)位置處之置換、缺失及/或插入。於一實施例中，胺基酸置換、缺失及/或引入SEQ ID NO. 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13之成熟多肽之插入之數目係不大於50、或不大於40、或不大於30、或不大於20、或不大於10，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。該等胺基酸改變可為次要性質，即不顯著影響蛋白質之摺疊及/或活性之保守胺基酸置換或插入；小缺失，通常1至30個胺基酸；小胺基或羧基末端延伸，諸如胺基末端甲硫胺酸殘基；至多20至25個殘基之小連接肽；或藉由改變淨電荷或另一功能(諸如聚組胺酸束、抗原決定基或結合域)來促進純化之小延伸。

【0209】 或者，胺基酸改變可為使得多肽之物理化學性質改變之性質。例如，胺基酸改變可提高多肽之熱穩定性、改變受質特異性、改變pH最佳化等。

【0210】 可根據此項技術中已知之程序(諸如位點定向誘變或丙胺酸掃描誘變)識別多肽中之必需胺基酸(Cunningham及Wells, 1989, *Science*

244: 1081-1085)。於後一種技術中，在分子之每個殘基處引入單個丙胺酸突變，及對所得突變分子進行可比得上初始胸苷磷酸化酶之活性測試以識別對分子活性關鍵之胺基酸殘基。亦參見，Hilton等人，1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708。酵素之活性位點或其他生物相互作用亦可藉由結構之物理分析來確定，如藉由諸如核磁共振、結晶學、電子繞射或光親和性標記之技術聯合假定接觸位點胺基酸之突變所確定。參見，例如，de Vos等人，1992, *Science* 255: 306-312；Smith等人，1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904；Wlodaver等人，1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64。必需胺基酸之同一性亦可自與相關多肽比對來推斷。

【0211】 可使用以下已知方法做出及測試單個或多個胺基酸置換、缺失及/或插入：誘變、重組及/或改組，接著相關篩選程序，諸如藉由Reidhaar-Olson及Sauer，1988, *Science* 241: 53-57；Bowie及Sauer，1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156；WO 95/17413；或WO 95/22625所揭示之彼等。可使用之其他方法包括易錯PCR、噬菌體展示(例如，Lowman等人，1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837；美國專利案第5,223,409號；WO 92/06204)及區域定向誘變(Derbyshire等人，1986, *Gene* 46: 145；Ner等人，1988, *DNA* 7: 127)。

【0212】 下表中提供本文中所揭示之肽結合物之非限制性實例。

cCPP	連接子(L)	TP	水溶性聚合物
cCPP9	PEG-12	TP	PEG10K
	PEG-8	TP	PEG5K
	PEG-24	TP	PEG40K
	PEG-4	TP	PEG10K
	PEG-12	TP11	PEG10K
	PEG-8	TP11	PEG5K
	PEG-24	TP11	PEG40K

第 83 頁(發明說明書)

	PEG-4	TP11	PEG10K
	PEG-12	TP16	PEG10K
	PEG-8	TP16	PEG5K
	PEG-24	TP16	PEG40K
	PEG-4	TP16	PEG10K
	PEG-12	TP35	PEG10K
	PEG-8	TP35	PEG5K
	PEG-24	TP35	PEG40K
cCPP11	PEG-12	TP	PEG10K
	PEG-8	TP	PEG5K
	PEG-24	TP	PEG40K
	PEG-4	TP	PEG10K
	PEG-12	TP11	PEG10K
	PEG-8	TP11	PEG5K
	PEG-24	TP11	PEG40K
	PEG-4	TP11	PEG10K
	PEG-12	TP16	PEG10K
	PEG-8	TP16	PEG5K
	PEG-24	TP16	PEG40K
	PEG-4	TP16	PEG10K
	PEG-12	TP35	PEG10K
	PEG-8	TP35	PEG5K
	PEG-24	TP35	PEG40K
cCPP12	PEG-12	TP	PEG10K
	PEG-8	TP	PEG5K
	PEG-24	TP	PEG40K
	PEG-4	TP	PEG10K
	PEG-12	TP11	PEG10K
	PEG-8	TP11	PEG5K
	PEG-24	TP11	PEG40K
	PEG-4	TP11	PEG10K
	PEG-12	TP16	PEG10K
	PEG-8	TP16	PEG5K

	PEG-24	TP16	PEG40K
	PEG-4	TP16	PEG10K
	PEG-12	TP35	PEG10K
	PEG-8	TP35	PEG5K
	PEG-24	TP35	PEG40K
	PEG-4	TP35	PEG10K

【0213】於一些實施例中，cCPP可經由連接子與TP之N端或C端結合。於一些實施例中，該連接子還包括胺基酸(例如，離胺酸)，其促進TP與cCCP上之胺基酸側鏈之化學結合。

【0214】於一些實施例中，水溶性聚合物可與TP之任何適宜胺基酸側鏈，例如，離胺酸、麩胺醯胺、麩胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸等結合。

治療方法

【0215】於本發明之實施例中，提供一種治療有需要之患者之粒線體性神經胃腸腦病變之方法，其包括投與本文中所揭示之化合物。

【0216】MNGIE影響患有此疾病之患者之消化系統及神經系統。於各種實施例中，治療因此係指部分或完全減輕、改善、緩解、抑制患者之消化及神經系統受損，延遲其發作，降低其嚴重度及/或發生率。於其他實施例中，治療因此係指部分或完全減輕、改善、緩解、抑制患者之消化系統受損，延遲其發作，降低其嚴重度及/或發生率。如本文中所用，術語「消化系統受損」包括與胃腸系統受損相關之各種症狀。消化系統受損之症狀可包括(例如)胃腸動力障礙，其中消化系統之肌肉及神經不通過消化道有效移動食物。產生之消化問題包括於僅少量飯後飽感(滿足)、吞嚥困難(嚥物困難)、噁心及飯後嘔吐、腹痛發作、腹瀉及腸道阻塞。此等胃腸病狀導致極端重量損失及降低之肌肉量(惡病質)。於一些實施例中，治療係指部分或完全減輕、緩解、抑制胃腸動力障礙及隨附病狀，延遲其發

作，降低其嚴重度及/或發生率。

【0217】 MNGIE疾病亦特徵在於神經系統異常。患病個體可經歷其四肢刺痛、麻木及虛弱(周邊神經病)，特定言之於手及腳。額外神經徵兆及症狀可包括眼瞼下垂(下垂症)、控制眼睛運動之肌肉虛弱(眼肌麻痹)及聽力損失。腦白質病(其為稱作白質之一種腦組織之退化)為MNGIE疾病之標誌。於各種實施例中，治療因此係指部分或完全減輕、改善、緩解、抑制患者之神經系統受損(包括但不限於諸如下垂症、眼肌麻痹及聽力損失之病狀)，延遲其發作，降低其嚴重度及/或發生率。於相關實施例中，治療方法提供部分或完全減輕、改善、緩解、抑制周邊神經病，延遲其發作，降低其嚴重度及/或發生率，該周邊神經病可為MNGIE之神經症狀。

【0218】 於一些實施例中，提供一種降低有需要之患者之胸苷之細胞外及細胞內含量的方法，其包括投與本文中所揭示之化合物。即，如本文中所述之TP之細胞內遞送不僅降低胸苷之細胞內含量，而且其亦降低循環中之胸苷之細胞外含量。據信TYMP (該基因提供製備TP之指令)之突變藉由降低或消除此蛋白質之酶活性之適宜水平引起MNGIE疾病。可自此等突變產生之胸苷之過量含量對身體有毒，導致粒線體DNA之日常維持及修復之中斷。不受理論束縛，產生之基因改變可損害粒線體之正常功能，導致與MNGIE相關之消化及神經問題。於一些實施例中，根據本發明之治療導致患者之胸苷之細胞內及/或細胞外含量減少超過約5%，例如，約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%及約100%，如與治療前患者或患有相似疾病而未治療之一或多個對照個體之胸苷之平均含量相比。於本發明之各種

實施例中，降低有需要之患者之胸苷之細胞外及細胞內含量的方法包括投與本文中所揭示之化合物，該化合物有效治療MNGIE。

【0219】 如本文中所用，術語「提高」、「增加」、「降低」、「減少」等指示相對於對照之值。於一些實施例中，適宜對照為基線量測，諸如在開始本文中所述治療之前於相同個體中之量測，或在本文中所述治療不存在下，於對照個體(或多個對照個體)中之量測。「對照個體」為患有MNGIE之個體，其與正在治療之個體大約相同年齡及/或性別(以確保所治療之個體之疾病之階段與對照個體係可比較)。

【0220】 正在治療之個體(亦稱作「患者」)為患有MNGIE或有發展MNGIE之潛力之個體(胎兒、嬰兒、兒童、青少年或成人)。該個體可具有殘餘內源胸苷磷酸化酶表現及/或活性，或無可量測活性。於各種實施例中，患有MNGIE之個體可具有小於未患有MNGIE之個體之正常胸苷磷酸化酶表現或活性水平之約1至99%的胸苷磷酸化酶表現或活性水平。於一些實施例中，該範圍包括(但不限於)小於正常胸苷磷酸化酶表現或活性水平約80至99%、小於約65至80%、小於約50至65%、小於約30至50%、小於約25至30%、小於約20至25%、小於約15至20%、小於約10至15%、小於約5至10%、小於約1至5%。

【0221】 於一些實施例中，該個體為最近經診斷患有該疾病之個體。通常，早期治療(於診斷後儘快開始治療)對最小化疾病之影響及最大化治療效益係重要的。

製備方法

【0222】 本文中所述化合物可以熟習有機合成技術者所知之各種方法或如由熟習此項技術者所瞭解之其變型製備。本文中所述化合物可自容

易獲得之起始物質製備。最佳反應條件可隨著所使用之特定反應物或溶劑變化，但是此等條件可由熟習此項技術者確定。

【0223】 本文中所述化合物之變型包括如針對各化合物所述之各種成分之新加、減去或移動。類似地，當一或多個對掌性中心存在於分子中時，可改變分子之對掌性。此外，化合物合成可涉及各種化學基團之保護及脫去保護基。保護及脫去保護基之使用，及適宜保護基之選擇可由熟習此項技術者確定。保護基之化學可見於(例如) Wuts及Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第4版, Wiley & Sons, 2006, 其全文以引用的方式併入本文中。

【0224】 於製備所揭示化合物及組合物中所使用之起始物質及試劑係購自商業供應商，諸如Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, WI)、Acros Organics (Morris Plains, NJ)、Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)、Sigma (St. Louis, MO)、Pfizer (New York, NY)、GlaxoSmithKline (Raleigh, NC)、Merck (Whitehouse Station, NJ)、Johnson & Johnson (New Brunswick, NJ)、Aventis (Bridgewater, NJ)、AstraZeneca (Wilmington, DE)、Novartis (Basel, Switzerland)、Wyeth (Madison, NJ)、Bristol-Myers-Squibb (New York, NY)、Roche (Basel, Switzerland)、Lilly (Indianapolis, IN)、Abbott (Abbott Park, IL)、Schering Plough (Kenilworth, NJ)或Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany)，或藉由熟習此項技術者所知之方法根據於諸如以下之參考文獻中所闡述之程序製備：Fieser and Fieser's *Reagents for Organic Synthesis*, 第1至17卷(John Wiley and Sons, 1991)；Rodd's *Chemistry of Carbon Compounds*, 第1至5卷及增刊(Elsevier Science Publishers,

1989) ; Organic Reactions , 第1至40卷(John Wiley and Sons, 1991) ; March's Advanced Organic Chemistry, (John Wiley and Sons , 第4版) ; 及 Larock's Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers Inc., 1989) 。其他物質(諸如本文中所揭示之醫藥載劑)可獲自商業來源。

【0225】 可於溶劑中進行產生本文中所述化合物之反應，其可由熟習有機合成技術者選擇。溶劑可與起始物質(反應物)、中間體或產物在進行反應之條件(即，溫度及壓力)下實質上不反應。可於一種溶劑或一種以上溶劑之混合物中進行反應。可根據此項技術中已知之任何適宜方法監測產物或中間體形成。例如，產物形成可藉由光譜方法(諸如核磁共振光譜法(例如， ^1H 或 ^{13}C)、紅外光譜法、分光光度法(例如，UV可見)或質譜法)或藉由層析法(諸如高效液相層析法(HPLC)或薄層層析法)監測。

【0226】 所揭示化合物可藉由固相肽合成製備，其中胺基酸 α -N端藉由酸或鹼保護基保護。此等保護基應具有對肽鍵聯形成之條件穩定，同時在不破壞生長肽鏈或其中所含有之對掌性中心中之任一者之外消旋下，容易移除的性質。適宜保護基為9-芴甲氧羰基(Fmoc)、第三丁氧羰基(Boc)、苄氧羰基(Cbz)、聯苯異丙氧羰基、第三戊氧羰基、異冰片氧羰基、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧苄氧羰基、鄰硝基苯硫基、2-氰基-第三丁氧羰基等。9-芴甲氧羰基(Fmoc)保護基特別佳用於合成所揭示化合物。其他較佳側鏈保護基為：針對側鏈胺基如離胺酸及精胺酸，2,2,5,7,8-五甲基吡啶-6-磺醯基(pmc)、硝基、對甲苯磺醯基、4-甲氧基苯-磺醯基、Cbz、Boc及金剛烷氧羰基；針對酪胺酸，苄基、鄰溴苄氧羰基、2,6-二氯苄基、異丙基、第三丁基(t-Bu)、環己基、環戊基及乙醯基(Ac)；針對絲胺酸，第三丁基、苄基及四氫吡喃基；針對組胺酸，三苯甲游基、苄基、

Cbz、對甲苯磺醯基及2,4-二硝基苯基；針對色胺酸，甲酰基；針對天冬胺酸及麩胺酸，苄基及第三丁基及針對半胱胺酸，三苯基甲基(三苯甲游基)。於固相肽合成方法中，將 α -C端胺基酸連接至適宜固體擔體或樹脂。可用於以上合成之適宜固體擔體為對於逐步冷凝-脫去保護基反應之試劑及反應條件為惰性以及於所用介質中不可溶之彼等材料。用於合成 α -C端羧基酞之固體擔體為可自Applied Biosystems (Foster City, Calif.)購得之4-羥甲基苯氧甲基-共聚(苯乙烯-1%二乙烯基苯)或4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-胺基甲基)苯氧基乙醯胺基乙基樹脂。藉由以下方法將 α -C端胺基酸偶合至樹脂：在10°C與50°C之間之溫度下，於諸如二氯甲烷或DMF之溶劑中，N,N'-二環己基碳二亞胺(DCC)、N,N'-二異丙基碳二亞胺(DIC)或O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽(HBTU)，利用或不利用4-二甲胺基吡啶(DMAP)、1-羥基苯并三唑(HOBT)、苯并三唑-1-基氧基-三(二甲胺基)磷六氟磷酸鹽(BOP)或雙(2-側氧基-3-噁唑啉基)氯化磷(BOPCl)下介導之偶合持續約1至約24小時。當固體擔體為4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-胺基甲基)苯氧基-乙醯胺基乙基樹脂時，在與如上所述之 α -C-端胺基酸偶合之前，將Fmoc基團用二級胺，較佳地哌啶裂解。用於偶合至脫去保護基之4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-胺基甲基)苯氧基-乙醯胺基乙基樹脂之一種方法為O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽(HBTU，1當量)及1-羥基苯并三唑(HOBT，1當量)於DMF中。可於自動多肽合成器中進行經連續保護之胺基酸之偶合。於一實例中，將生長肽鏈之胺基酸之 α -N端用Fmoc保護。來自生長肽之 α -N端側之Fmoc保護基之移除可藉由用二級胺(較佳地哌啶)處理來實現。然後以約3倍莫耳過量引入各經保護之胺基酸，及較佳地於DMF中進行偶合。偶合劑可為O-苯

并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽(HBTU, 1當量)及1-羥基苯并三唑(HOBT, 1當量)。在固相合成結束時,將多肽自樹脂移除及以連續操作或單一操作脫去保護基。多肽之移除及脫去保護基可以單一操作藉由用包括苯基甲基硫醚、水、乙二硫醇及三氟乙酸之裂解試劑處理結合樹脂之多肽來實現。於多肽之 α -C端為烷基醯胺之情況下,樹脂藉由烷基胺之胺解裂解。或者,可藉由酯基轉移(例如,用甲醇,接著藉由胺解或藉由直接轉醯胺化)移除肽。可將經保護之肽在此點純化或直接帶入下個步驟。側鏈保護基之移除可使用上述裂解混合物實現。經完全脫去保護基之肽可藉由層析步驟之順序採用下列類型中之任一者或所有純化:弱鹼性樹脂(乙酸鹽形式)上之離子交換;非衍生之聚苯乙烯-二乙烯基苯(例如,Amberlite XAD)上之疏水吸附層析法;矽膠吸附層析法;羧甲基纖維素上之離子交換層析法;分配層析法,例如,在Sephadex G-25、LH-20上或反流分佈;高效液相層析法(HPLC),尤其在辛基或十八基甲矽烷基矽石結合相管柱填料上之逆相HPLC。

【0227】 以上聚合物(諸如PEG群)可在用於蛋白質與活化聚合物分子反應之任何適宜條件下連接至TP。可使用此項技術中已知之任何方法,包括經由醯化、還原烷基化、邁克爾加成、硫醇烷基化或通過PEG部分之反應性基團(例如,醛、胺基、酯、硫醇、 α -鹵乙醯基、馬來醯亞胺基或肼基)至TP之反應性基團(例如,醛、胺基、酯、硫醇、 α -鹵乙醯基、馬來醯亞胺基或肼基)之其他化學選擇性結合/連接方法。可用於連接水溶性聚合物至一或多種蛋白質之活化基團包括(但不限於)碘、馬來醯亞胺、巰基、硫醇、三氟甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、氮雜環丁烷、環氧乙烷、5-吡啶基及 α -鹵化醯基(例如, α -碘乙酸、 α -溴乙酸、 α -氯乙酸)。若藉由還原

烷基化連接至TP，則所選之聚合物應具有單個反應性醛使得聚合度可控。參見例如 Kinstler 等人，*Adv. Drug. Delivery Rev.* 54: 477-485 (2002)；Roberts 等人，*Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 459-476 (2002)；及 Zalipsky 等人，*Adv. Drug Delivery Rev.* 16: 157-182 (1995)。

【0228】 為直接共價連接TP與CPP，CPP之適宜胺基酸殘基可與有機衍化劑反應，該衍化劑能與胺基酸之選定側鏈或N端或C端反應。肽或結合物部分之反應性基團包括(例如)醛、胺基、酯、硫醇、 α -鹵乙醯基、馬來醯亞胺基或肼基。衍化劑包括(例如)馬來醯亞胺基苯甲醯基磺酸基琥珀醯亞胺酯(經半胱胺酸殘基結合)、N-羥基琥珀醯亞胺(經離胺酸殘基)、戊二醛、琥珀酸酐或此項技術中已知之其他劑。

【0229】 本發明亦提供重組融合蛋白，其中直鏈CPP與TP之N端及/或C端融合。當作為重組融合物製備時，可藉由已知重組表現技術製備該等化合物。例如，為重組產生該化合物，將編碼嵌合基因之核酸序列以操作方式連接至適宜啟動子序列使得編碼此融合蛋白之核酸序列將經轉錄及/或轉譯至宿主細胞之所需融合蛋白。較佳啟動子為可用於於大腸桿菌中表現之彼等，諸如T7啟動子。可使用任何常用表現系統，包括真核或原核系統。特定實例包括酵母(例如，釀酒酵母屬(*Saccharomyces* spp.)、畢赤酵母屬(*Pichia* spp.))、桿狀病毒、哺乳動物及細菌系統(諸如大腸桿菌及莖菌屬(*Caulobacter*))。

投與方法

【0230】 所揭示化合物及含其之組合物之活體內應用可藉由熟習此項技術者目前或預期所知之任何適宜方法及技術實現。例如，所揭示化合物可以生理上或醫藥上可接受之形式調配及藉由此項技術中已知之任何適

宜途徑投與，例如，口及非經腸投與途徑。如本文中所用，術語非經腸包括皮下、皮內、靜脈內、肌肉內、腹膜內及胸骨內投與，諸如藉由注射。所揭示化合物或組合物之投與可為單一投與或以連續或明顯間隔，如可由熟習此項技術者容易確定。

【0231】 本文中所揭示之化合物及包含其之組合物亦可利用脂質體技術、緩慢釋放膠囊、可植入泵及可生物降解容器投與。此等遞送方法可有利地提供均勻劑量歷時延長時間段。該等化合物亦可以其鹽衍生物形式或結晶形式投與。

【0232】 本文中所揭示之化合物可根據製備醫藥上可接受之組合物之已知方法調配。於許多為熟習此項技術者熟知且容易可得之資源中詳細描述調配物。例如，由 E.W. Martin 之 *Remington's Pharmaceutical Science* (1995) 描述可結合所揭示方法使用之調配物。一般而言，可調配本文中所揭示之化合物使得有效量之化合物與適宜載劑組合以促進化合物之有效投與。所用之組合物亦可呈各種形式。此等包括(例如)固體、半固體及液體劑型，諸如錠劑、丸劑、粉末、液體溶液或懸浮液、栓劑、可注射及不可熔溶液及噴霧。較佳形式取決於預期投與模式及治療應用。該等組合物亦較佳地包含為熟習此項技術者已知之習知醫藥上可接受之載劑及稀釋劑。與該等化合物使用之載劑或稀釋劑之實例包括乙醇、二甲亞砷、甘油、氧化鋁、澱粉、鹽水及等效載劑及稀釋劑。為提供此等劑量之投與用於所需治療性治療，本文中所揭示之組合物可有利地包含總共約0.1重量%與100重量%之間之一或多種標的化合物，此基於包含載劑或稀釋劑之總組合物之重量計。

【0233】 適用於投與之調配物包括(例如)水溶性無菌注射液，其可

含有抗氧化劑、緩衝液、抑菌劑及致使該調配物與預期接受者之血液等滲之溶質；及水性及非水性無菌懸浮液，其可包含懸浮劑及增稠劑。調配物可於單位劑量或多劑量容器(例如，密封安瓿及小瓶)中存在，且可儲存於冷凍乾燥(凍乾)條件下，其僅需要無菌液體載劑(例如，在使用之前，注射用水)之條件。臨時注射溶液及懸浮液可自無菌粉末、顆粒、錠劑等製備。應瞭解除了以上特別提及之成分外，本文中所揭示之組合物可包含關於所討論之調配物之類型之技術中習知的其他試劑。

【0234】 可將本文中所揭示之化合物及包含其之組合物通過與細胞直接接觸或經由運載裝置遞送至細胞。遞送化合物及組合物至細胞之運載裝置係此項技術中已知且包括(例如)將脂質體部分之組合物裝入膠囊。遞送本文中所揭示之化合物及組合物至細胞之另外方法包括將該等化合物連接至蛋白質或核酸，該蛋白質或核酸經靶向以遞送至靶細胞。美國專利案第6,960,648號及美國申請公開案第20030032594號及第20020120100號揭示可偶合至另一種組合物且允許該組合物跨生物膜轉位之胺基酸序列。美國申請公開案第20020035243號亦描述跨細胞膜轉運生物部分用於細胞內遞送之組合物。亦可將化合物併入聚合物中，該等聚合物之實例包括用於顱內腫瘤之聚(D-L丙交酯-共-乙交酯)聚合物、以20:80莫耳比之聚[雙(對羧基苯氧基)丙烷:癸二酸] (如GLIADEL中所用)、軟骨素、殼質及殼聚糖。

【0235】 本文中所揭示之化合物及組合物(包括其醫藥上可接受之鹽或前藥)可藉由輸注或注射靜脈內、肌肉內或腹膜內投與。活性劑或其鹽之溶液可於水中製備，視情況與無毒表面活性劑混合。分散液亦可於甘油、液體聚乙二醇、三乙酸甘油酯及其混合物中及於油中製備。在儲存及

使用之一般條件下，此等製劑可含有防腐劑以防止微生物生長。

【0236】 適用於注射或輸注之醫藥劑型可包括包含活性成分之無菌水溶液或分散液或無菌粉末，其適於無菌可注射或不可熔溶液或分散液之臨時製備，視情況以脂質體裝入膠囊。最終劑型應在製造及儲存條件下係無菌、流體且穩定。液體載劑或媒劑可為包含以下之溶劑或液體分散介質：例如，水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇、液體聚乙二醇等)、植物油、無毒甘油酯及其適宜混合物。可(例如)藉由形成脂質體、藉由在分散液之情況下維持所需粒度或藉由使用表面活性劑維持適當流動性。視情況，可藉由各種其他抗細菌劑及抗真菌劑(例如，對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、噻汞撒等)帶來防止微生物之作用。於許多情況下，其較佳地包含等滲劑，例如，糖、緩衝劑或氯化鈉。可藉由納入延遲吸收之藥劑(例如，單硬脂酸鋁及明膠)帶來可注射組合物之延長吸收。

【0237】 無菌可注射溶液藉由將所需量之本文中所揭示之化合物及/或藥劑併入含有以上列舉之各種其他成分之適宜溶劑中來製備，視需要，接著過濾滅菌。於製備無菌可注射溶液之無菌粉末之情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術，其產生活性成分加上先前無菌過濾溶液中存在之任何額外所需成分之粉末。

【0238】 本文中所揭示之化合物及藥劑及醫藥組合物之可用劑量可藉由比較其於動物模型中之活體外活性與活體內活性來確定。推斷小鼠及其他動物(人類)中之有效劑量之方法係此項技術中已知。

【0239】 投與組合物之劑量範圍為足夠大以產生所需效果之彼等，其中感染症狀或病症。劑量不應大到造成不利副作用，諸如非所需交叉反應、過敏反應等。一般而言，劑量將隨著患者之年齡、病狀、性別及疾病

程度變化且可由熟習此項技術者確定。倘若任何禁忌症，劑量可由個別醫師調整。劑量可變化且可以每日一或多個劑量管理投與持續一或若干天。

【0240】 亦揭示包含本文中所揭示之化合物與醫藥上可接受之載劑組合之醫藥組合物。適於經口、局部或非經腸投與之包含一定量之化合物之醫藥組合物構成較佳態樣。對患者(特定言之，人類)投與之劑量應歷時合理時間長足以達成患者之治療反應，而無致命毒性，及較佳地造成不超過副作用或發病率之可接受水平。熟習此項技術者將知曉劑量將取決於各種因素，包括受試者之狀態(健康)、受試者之體重、同時治療之類型(若有的話)，治療頻率、治療比率以及病理狀態之嚴重度及階段。

【0241】 亦揭示包含本文中所揭示之化合物於一或多個容器中之套組。所揭示套組可視情況包含醫藥上可接受之載劑及/或稀釋劑。於一實施例中，套組包含如本文中所述之一或多種其他組分、輔料或佐劑。於另一實施例中，套組包含一或多種抗癌劑，諸如本文中所述之彼等藥劑。於一實施例中，套組包含描述如何投與套組之化合物或組合物之說明書或包裝材料。套組之容器可為任何適宜材料，例如，玻璃、塑膠、金屬等及任何適宜尺寸、形狀或組態。於一實施例中，於套組中呈固體(諸如錠劑、丸劑或粉末)形式提供本文中所揭示之化合物及/或藥劑。於另一實施例中，於套組中呈液體或溶液提供本文中所揭示之化合物及/或藥劑。於一實施例中，套組包含含有呈液體或溶液形式之本文中所揭示之化合物及/或藥劑之安瓿或注射器。

【0242】 已描述本發明之許多實施例。然而，應瞭解可在不背離本發明之精神及範圍下作出各種修改。因此，其他實施例係於下列申請專利範圍之範圍內。

實例

實例1.合成化合物

【0243】 **胸苷磷酸化酶**.藉由重新基因合成製備編碼成熟胸苷磷酸化酶蛋白質(11-482)之基因，及將所得DNA片段於原核表現載體pET-30a(+)中在EcoRV-EcoRI位點次選殖。將利用編碼胸苷磷酸化酶之質粒轉形之大腸桿菌Lemo21(DE3)勝任細胞在37℃下於含有50 µg/mL卡那黴素(kanamycin)之LB中培育。使培養物在37℃下生長直至OD600在0.4至0.6之間。在25℃下，在0.25 mM異丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)之存在下，誘導蛋白質表現過夜。於過夜培養後，藉由離心(在4℃下，4000 g持續15分鐘)收集細菌細胞。將細胞集結塊儲存在-20℃下直至進一步純化。

【0244】 藉由重新基因合成製備編碼截短之活性胸苷磷酸化酶蛋白(TP16、TP22或TP35)之基因，及將所得DNA片段於原核表現載體pET-24a(+)中在NdeI-XhoI位點次選殖。將利用編碼胸苷磷酸化酶之質粒轉形之EMD Millipore™ Novagen™ Rosetta™ 2 (DE3) Singles勝任細胞在37℃下於含50 µg/mL卡那黴素之LB中於振盪燒瓶中培育。使培養物在37℃下生長直至OD600在0.4至0.6之間。在30℃下，在0.25 mM異丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)之存在下，誘導蛋白質表現過夜。於過夜培養後，藉由離心(在4℃下，4000 g持續15分鐘)收集細菌細胞。將細胞集結塊儲存在-20℃下直至進一步純化。

【0245】 為製備TP蛋白之人類IgG1-Fc融合，藉由重新基因合成製備編碼人類IgG1Fc融合之TP結合物(SEQ ID NO. 6至13，表6)之基因，及將所得DNA片段於原核表現載體pET-21a(+)中在NdeI-XhoI位點次選殖。將利用編碼SEQ ID NO 7 (Fc-TP16)之質粒轉形之EMD Millipore™

Novagen™ Rosetta™ 2 (DE3) Singles勝任細胞在37°C下於含50 µg/mL胺比西林(Ampicillin)之LB中於振盪燒瓶中培育。使培養物在37°C下生長直至OD600在0.4至0.6之間。在30°C下，在0.25 mM異丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)之存在下，誘導蛋白質表現過夜。於過夜培養後，藉由離心(在4°C下，4000 g持續15分鐘)收集細菌細胞。將細胞集結塊儲存在-20°C下直至進一步純化。

【0246】 使用生物反應器製備重組TP蛋白之方法：將甘油菌種母液(1 mL)解凍及用於接種初始培養物(由10 g/L 大豆蛋白腴(soytone)、5 g/L 酵母提取物、10 g/L NaCl, pH 7.5, 50 mg/L卡那黴素組成之5 ml生長培養基)，在37°C，250 rpm下持續4小時。然後使用該培養物來接種100 mL培養基及再生長5小時。當該培養物達成約2至3之光密度(OD_{600nm})時，使用其於生物反應器中接種2 L最低培養基。每升之最低培養基之組成係如下：2 g (NH₄)₂SO₄、6.75 g KH₂PO₄、0.35 g MgSO₄、0.85 g檸檬酸、20 g/L葡萄糖。於接種後，使培養物在37°C下生長10小時，其中藉由PID迴路控制溫度。將溶解氧(DO)設置在30%及亦藉由PID迴路控制來控制及在按該順序之攪拌第一氧優先下，將最小/最大攪拌設置在400/800 rpm。使用通過鹼泵之28至30% (m/v) NH₄OH將pH調整為7.2及藉由PID迴路控制。於10小時後，OD_{600nm}達到約9至10，通過酸泵及在相同pH PID迴路控制下建立葡萄糖進料溶液，及維持此直至發酵過程結束。葡萄糖進料溶液之組成係如下：50% (w/v)葡萄糖、9.8 g/L (NH₄)₂SO₄及1x痕量金屬溶液。此外，酵母提取物溶液總是通過外部泵以10至15 mL/小時/升培養物進料。此溶液之組成為10 g/L酵母提取物及20 g/L NaH₂PO₄。在約20之OD_{600nm}，在30°C下，將培養物用0.5 mM IPTG誘導。將培養物每2.5小時

用相同IPTG濃度再誘導兩次。於第一次誘導後8至9小時藉由離心收集生質，達成之生質產量為約50 g/L培養物，及將集結塊儲存在-80℃下直至進一步純化。

【0247】 爲了純化TP11，將來自1 L細胞培養物之細菌集結塊再懸浮於50 mL裂解緩衝液(20 mM磷酸鈉，pH 7.4，200 mM氯化鈉，5% (v/v)甘油，20 mM咪唑)中。一旦將集結塊再懸浮，添加5 mg預先溶解之溶菌酶及500 μ l蛋白酶抑制劑混合物(蛋白酶抑制劑混合物，Sigma，P8849)。將溶液在冰上攪拌約15分鐘及將細胞在冰上進行音波處理(脈衝六次持續20秒，中間40秒休息期，水平100；音波細胞破碎儀(Sonic Dismembrator)，型號100，Fisher Scientific)。在4℃下，將懸浮液藉由在20,000 g下離心30分鐘來變澄清。收集上清液並以1 mL/min施覆於5 ml組胺酸標記親和管柱(HisTrap，快速流動，5 ml，GE)上，然後用100 mL洗滌緩衝液A (20 mM磷酸鈉，pH 7.4，200 mM氯化鈉，5% (v/v)甘油，20 mM咪唑)洗滌。為移除內毒素，然後將管柱用20管柱體積之Triton X-114緩衝液(補充有0.1% (v/v) Triton X-114洗滌劑之緩衝液A)接著20管柱體積之CHAPS緩衝液(補充有1% (w/v) CHAPS洗滌劑之緩衝液A)洗滌。之後，將管柱用10 CV之緩衝液A洗滌，然後將經組胺酸標記之胸苷磷酸化酶用10管柱體積之補充有100至500 mM咪唑之緩衝液A溶離(圖1A)。

【0248】 藉由SDS-PAGE測定TP之純度及合併高純度之溶離份。內毒素含量通常低於50 EU/mg，藉由Pierce™ LAL發色內毒素定量套組定量得。將經純化之組胺酸標記之TP11彙集及對4升EK裂解緩衝液(20 mM Tris-HCl，pH 7.4，50 mM NaCl，2 mM CaCl₂，5%甘油)透析。為移除親和標記物，將100 mg經組胺酸標記之蛋白質以2 mg/mL之濃度與1:100

(重量比)重組牛腸激酶(經組胺酸標記) (GeneScript)在4°C下混合過夜。然後將裂解混合物負載於5 mL HisTrap管柱。流經物及5 CV洗滌溶液通常含有無標記物之胸苷磷酸化酶，將其對磷酸鹽緩衝鹽水透析以供生物結合步驟(圖1B)。

【0249】 爲了純化自上述生物反應器過程收集之無標記物之TP16。將集結塊於裂解緩衝液(5 mL/克生質)中。裂解緩衝液之組成為50 mM Tris-HCl pH 7.5，5 mM EDTA，1 ml 1X蛋白酶抑制劑混合物/20克集結塊。生質之均質化藉由於Branson儀器中音波處理來進行，需要四輪10個循環之音波處理以完全釋放可溶性TP酵素。音波處理循環為30秒開/30秒關，在30%強度下。粗製溶液之澄清藉由在18000 G及4°C下離心30分鐘來進行。於兩個層析步驟中使用phenyl (hs)及capto黏附預包裝樹脂達成TP16自粗製上清液之純化。首先，在0.7M (NH₄)₂SO₄之存在下，將含有可溶性TP16之粗製上清液以20 mg總蛋白質/ml樹脂之比例負載於HiTrap® Phenyl Fast Flow (HS)中。將phenyl管柱用緩衝液A (50 mM Tris-HCl 0.7 M (NH₄)₂SO₄，調整至pH 7.5)預平衡。將結合之蛋白用10管柱體積(CV)之緩衝液A洗滌。將靶酵素用漸增濃度之緩衝液B(10 mM TrisHCl pH 8.0)之三個步驟梯度(50%、75%及100%)溶離(圖17A)。將在75%緩衝液B下溶離之溶離份以10 mg/ml樹脂之比例直接負載於capto黏附預包裝管柱中。將capto黏附管柱用緩衝液B預平衡。將結合之蛋白用20 CV之緩衝液B洗滌，接著20 CV之50 mM檸檬酸緩衝液洗滌，然後1M NaCl pH 4.5、20 CV之PBS緩衝液洗滌，0.250 M精胺酸pH 7.4洗滌，及20 CV之含0.5% CHAPS、5 mM EDTA之TrisHCl緩衝液pH 7.5洗滌。將大多數靶蛋白用30 CV之含0.500M精胺酸之PBS緩衝液pH 7.4溶離，同時

將其餘用20 CV之0.75M胍-HCl溶離。此池之純度係大於90% (藉由SDS-PAGE測定) (圖17B)。將最終TP16產物緩衝液交換至PBS用於儲存或蛋白質修飾。

【0250】 亦可使用基於內含體之再摺疊方法，以高效率產生無標記物之TP。於此情況下，將甘油菌種母液(1 mL)解凍，及用於接種初始培養物(5 ml Terrific Broth生長培養基，其由10 g/L 大豆蛋白胍(soytone)，5 g/L酵母提取物，10 g/L NaCl，pH 7.5，50 mg/L卡那黴素組成)，在28 °C，250 rpm下過夜。當培養物達成約2至3之光密度(OD_{600nm})時，使用其接種至生物反應器中之2 L terrific broth生長培養基中。於接種後，使培養物在37 °C下生長，其中藉由PID迴路控制溫度。將溶解氧(DO)設置在20%及亦藉由PID迴路控制來控制並且以第一氧優先的順序之攪拌，將最小/最大攪拌設定在400/800 rpm。利用鹼泵，使用28至30% (m/v) NH_4OH 將pH調整為7.2及藉由PID迴路控制。利用酸泵及在相同pH PID迴路控制下，設定葡萄糖進料溶液，及維持此直至發酵過程結束。在約15之 OD_{600nm} ，在37 °C下，用1 mM IPTG誘導培養物。於2.5小時後，使用相同IPTG濃度再誘導一次培養物。於第一次誘導後5至6小時藉由離心收集生質，達成之生質產量為約25 g/L培養物，及將離心集結塊儲存在-80 °C下直至進一步純化。

【0251】 將細胞集結塊再懸浮於50 mM Tris緩衝液pH 8.0、200 mM NaCl、5 mM DTT中及藉由音波處理均質化(10 mL裂解緩衝液/克集結塊)。將裂解物在12000 rpm下離心30分鐘及收集含有內含體之集結塊。將內含體用含有50mM Tris，pH 8.0，200 mM NaCl，5mM DTT及1% Triton X-100之緩衝液洗滌，藉由短週期之音波處理再懸浮及在4 °C下在

12000 rpm下離心。需要四個洗滌步驟以移除大多數不純蛋白質及膜組分。使用不含Triton但是含有1M NaCl之緩衝液用於最後洗滌步驟以移除殘餘Triton X-100及宿主基因組DNA。可將經純化之內含體儲存在-20°C下直至進一步純化。

【0252】 在室溫下，使用50 mM Tris，pH 8.0，200 mM NaCl，8M脲及10 mM DTT溫和溶解內含體至20 mg/mL蛋白質溶液。於4°C下，在12000 rpm下離心30分鐘後，收集呈可溶性溶液之溶解之內含體溶液。之後，添加無尿素緩衝液以將尿素濃度降至6M。為移除生物負荷及DNA內容物，將內含體溶液施覆在AKTA純化器上之Q瓊脂糖管柱上及收集流經物。為再摺疊蛋白質，取內含體溶液在4°C下於50 mM Tris，pH 8.0，200 mM NaCl及5 mM DTT中快速稀釋20倍。將所得溶液保持在4°C過夜，然後使用50 mM Tris，pH 8.0及1 mM DTT進一步再稀釋六倍。將所得溶液負載在Q瓊脂糖管柱上，使用漸增氯化鈉濃度溶離靶蛋白，獲得有所需特異性TP活性之再摺疊之蛋白質(圖35及36)。

【0253】 為了純化人類IgG1Fc融合TP16 (例如，Fc-TP16)，將來自1 L細胞培養物之細菌集結塊再懸浮於10 mL裂解緩衝液(20 mM磷酸鈉，pH 7.4，1 mM EDTA)中。一旦將集結塊再懸浮，添加2 mg預先溶解之溶菌酶及100 µl蛋白酶抑制劑混合物(蛋白酶抑制劑混合物，Sigma，P8849)。將溶液在冰上攪拌約15分鐘及將細胞在冰上進行音波處理。在4°C下，將懸浮液藉由在20,000 g下離心30分鐘來變澄清。收集上清液並以1 mL/min施覆於1 ml蛋白A管柱(蛋白A，快速流動，1 ml，GE)上，然後用20 mL洗滌緩衝液A (20 mM磷酸鈉，pH 7.4)洗滌。為移除內毒素，然後將管柱用50管柱體積之Triton X-114緩衝液及CHAPS緩衝液(補充有

0.1% Triton X-114 (v/v)及1% (w/v) CHAPS洗滌劑之緩衝液A)洗滌。之後，將管柱用20 CV之緩衝液A洗滌，然後用10管柱體積之溶離緩衝液(0.1M檸檬酸鈉，pH 3.0)溶離(圖30)。

【0254】環狀細胞穿透肽(cCPP)。cCPP藉由固相肽合成使用Fmoc-化學合成，將其脫去保護基及自固體擔體釋放，研磨及使用RP-HPLC純化。於pH 7.4磷酸鹽緩衝液中以1:1比率進行具有C端離胺酸之cCPP12與4-甲醯基-苯甲醯胺基-dPEG₁₂-TFP酯(產品編號10081，Quanta Biodesign)之間之結合2小時。將產物cCPP12-PEG₁₂-FBA再次藉由RP-HPLC純化及凍乾用於在使用之前之儲存。

【0255】基於胺之TP-cCPP結合。為通過TP蛋白之胺基上之還原胺化反應製備cCPP-TP結合物，於pH 6.0 2-(N-嗎啉基)乙磺酸緩衝液(0.1M)中，將新鮮純化之TP11或TP16 (0.5 mg/mL，10 μM)與cCPP-連接子結合物(例如，cCPP12-PEG₁₂-FBA (80 μM))混合，接著添加10 mM新鮮製備之氰基硼氫化鈉。將反應輕輕混合36小時，然後藉由SDS-PAGE分析以證實完成生物結合。然後將反應用甘胺酸中止，及藉由對磷酸鹽緩衝鹽水(pH 7.4)透析16小時兩次移除小分子以及額外肽。將所得結合物表示為「CPP-N-TP」，其中N係指作為結合位點之TP之N端。或者，cCPP12-N-TP11或cCPP12-N-TP16藉由以下製備：於磷酸鹽緩衝鹽水(pH 7.4)中，將含有cCPP12-PEG₁₂-FBA (320 μM)之TP (2 mg/mL，40 μM)與10 mM新鮮製備之氰基硼氫化鈉混合36小時，及然後將反應混合物藉由過濾純化以移除額外肽及其他化學試劑。然後將結合之蛋白(例如，cCPP12-N-TP11，參見圖3或圖19；例如，cCPP12-N-TP16，參見圖19)暫時儲存於4°C用於立即使用或在2%甘露醇之存在下調配用於長期儲存在-20°C

下。

【0256】 為通過TP蛋白之胺基上之環氧胺化反應製備CPP結合之Fc-TP16，於pH 8.0，4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)緩衝液(0.1M)中，將新鮮純化之FcTP16 (1.65 mg/mL，22 μ M)與cCPP-連接子結合物(例如，cCPP-PEG12-FBA (220 μ M))混合，接著添加10 mM新鮮製備之氰基硼氫化鈉。將反應輕輕混合48小時，然後藉由SDS-PAGE分析以證實完成生物結合(例如，cCPP12-N-Fc-TP16，參見圖30)。

【0257】 PEG化之結合物。 為製備PEG化之產物，將新鮮純化之cCPP12-N-TP11 或 cCPP12-N-TP16 (4 mg/mL，80 μ M) 與PEG5K/10K/40K直鏈/40K分支鏈NHS酯(NHS，N-羥基琥珀醯亞胺)或PEG12-NHS酯(約2 kDa分子量)混合。在室溫下，於磷酸鹽緩衝液(50 mM磷酸鈉，pH 7.4，150 mM氯化鈉)或碳酸氫鈉緩衝液中，將反應輕輕混合2小時，然後藉由SDS-PAGE分析以證實完成PEG化。然後將PEG化之蛋白質(CPP12-N-TP-PEG5K、CPP12-N-TP-PEG10K、CPP12-N-TP-PEG40K直鏈、CPP12-N-TP-PEG40K分支鏈或CPP12-N-TP-PEG12)用20 mM Tris，pH 8.0稀釋至0.4 mg/mL蛋白質濃度，然後以1 ml/min之流率施覆在Q-瓊脂糖管柱上。將額外PEG化試劑用20 mM Tris，pH 8.0洗滌。將PEG化之蛋白質用含有1M氯化鈉之20 mM Tris，pH 8.0溶離。將含有所需產物之合併之溶離份用磷酸鹽緩衝鹽水(pH 7.4)透析兩次及無菌過濾並以4 mg/mL儲存在-20 $^{\circ}$ C下。將包含cCPP12-N-TP-PEG5K、cCPP12-N-TP-PEG10K、cCPP12-N-TP-PEG40K直鏈或cCPP12-N-TP-PEG40K分支鏈之最終產物於生物檢定中進行進一步表徵。

【0258】 為促進活體外及活體內TP及結合之TP之檢測，使用

Alexa568螢光團標記隨機離胺酸殘基上之蛋白質。簡言之，在室溫下，將 2.0 mg/mL 之蛋白質與 7.5 至 15 當量之 Alexa Fluor 568 NHS 酯 (ThermoFisher Scientific) 混合。於 2 小時後，藉由甘胺酸溶液中止反應。藉由尺寸排除層析法單離經螢光標記之物質。

【0259】 基於二硫鍵之TP-cCPP結合(「CPP-S-S-TP」)。為通過 Cys 殘基結合 TP 蛋白，在固相上設計及合成具有活化二硫化物形態 (SPDP) 之環狀 CPP。將產物 cCPP12-S-S-SPDP 藉由 RP-HPLC 純化及凍乾用於在結合之前之儲存。結構示於圖 18 中。

【0260】 製備cCPP12-SS-TP-PEG10K。於 PBS 緩衝液中，將新鮮純化之 TP11 或 TP16 (2 mg/mL, 40 μ M) 與 PEG10K-NHS 酯 (NHS, N-羥基琥珀醯亞胺, 1:20 莫耳比) 混合。在室溫下，將反應輕輕混合 30 分鐘，接著在室溫下，於 PBS 中將 1:20 莫耳比 PEG10K-NHS 酯再處理 1 小時，然後藉由 SDS-PAGE 分析以證實完成 PEG 化。然後在 cCPP 結合之前將 PEG 化之蛋白質 (PEG10K-TP11 或 PEG10K-TP16) 用 PBS 稀釋至 0.5 mg/mL 蛋白質濃度。將經稀釋之 PEG 化之蛋白質在 48 $^{\circ}$ C 下預處理 30 分鐘。將 cCPP12-B-B-SPDP 立即添加至蛋白質溶液 (1:30 莫耳比) 中及在 48 $^{\circ}$ C 下再反應 1 小時。藉由 Amicon Ultra-15 離心過濾裝置 (30K MWCO) 移除過量 PEG10K 及肽。藉由配備有 C4 管柱之 RP-HPLC 使用補充 0.1% TFA (v/v) 之水作為緩衝液 A 及補充 0.1% TFA (v/v) 之乙腈作為緩衝液 B 監測結合反應，如圖 20 中所示。於生物檢定中進一步評價產物 CPP12-SS-TP11-PEG10K 及 CPP12-SS-TP16-PEG10K。

實例 2. 表徵 TP 及 TP 結合物

【0261】 開發生物化學 TP 酵素活性檢定。藉由在胸苷之酶促磷酸化

期間量測290 nm處之吸光度之變化進行經純化之TP或結合之TP之酵素活性。基本上，將200 μL 磷酸鹽緩衝鹽水中之奈莫耳濃度之酵素與2 mM胸苷在37°C下混合。在290 nm處監測反應進程，指示胸苷藉由TP轉化成胸腺嘧啶。使用2000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 之係數計算轉換率，單位為 s^{-1} ，其為每秒藉由一個酵素轉化成胸腺嘧啶之胸苷分子之數目。於酶促檢定中，在100 nM之濃度下，TP16功能上類似於TP11（參見圖21，y軸表示歸一化之酵素活性，誤差條表示數據之技術一式三份）。

【0262】 評價血清中之TP11之酵素穩定性及數據於圖2B中呈現。圖中之數據指示於37°C下培育2小時及4小時二者後，維持小鼠血清中之TP之酵素活性(即，酵素穩定性)。

【0263】 根據實例1中所述之程序將CPP12與TP11之N端結合。在40 nM之濃度下，將所得產物CPP12-N-TP11之酵素活性(參見圖3)與未結合之TP11 (圖4A)比較。量測酵素轉換率顯示，CPP12-N-TP11功能上等效於未結合之TP11 (TP16及CPP12-N-TP16之類似觀察結果)。於酶促檢定中，在100 nM之濃度下，所有PEG化之TP二硫鍵連接之或N端標記之CPP結合物 (CPP12-SS-TP11-PEG10K 及 CPP12-SS-TP16-PEG10K 及 CPP12-N-TP11-PEG10K 及 CPP12-N-TP16-PEG10K) 具有與未結合之TP11類似活性(圖22)。及於酶促檢定中，在100 nM之濃度下，Fc融合之TP16 (例如，Fc-TP16)及CPP結合之Fc-TP16亦顯示相較於未結合之TP11類似酵素活性(圖31)。

【0264】 CPP12-N-TP11之進一步表徵顯示，結合之化合物於冷凍及解凍後係穩定(圖4B)。其亦於利用完全生長培養基(DMEM +FBS)以及小鼠血清培育後，保持酵素穩定(圖4C)。此外，在37°C下2小時、12小時

及24小時，針對小鼠血清中之經Alexa568標記之TP11或CPP12-N-TP11，未觀察到降解(圖5)。

實例3. TP之細胞遞送

【0265】研究顯示CPP12-N-TP有效進入細胞且係酵素活性。將LS174T細胞(1.5×10^6 個/孔)接種在含10% FBS及1%盤尼西林(penicillin)/鏈黴素(streptomycin)之McCoy 5A改良培養基之6孔板上，及培養16小時以達到約80%匯合度。然後將各孔之生長培養基用含有或不含有指定量之TP或CPP12-N-TP之1.5 mL新鮮培養基替換。於6小時處理後，移除培養基及將各孔用4 mL磷酸鹽緩衝鹽水洗滌四次。藉由胰蛋白酶化收集細胞，及在250 G下持續5分鐘製成集結塊。將再懸浮之細胞再次用磷酸鹽緩衝鹽水洗滌及製成集結塊以儲存在 -80°C 下直至進一步分析。將不同細胞集結塊用100 μL 裂解緩衝液在冰上再懸浮以使用胞質裂解緩衝液(50 mg/mL洋地黃皂苷(digitonin)，75 mM氯化鈉，10 mM磷酸鈉，pH 7.4，補充有蛋白酶抑制劑之250 mM蔗糖)提取胞質蛋白或使用全細胞裂解緩衝液(1% Triton X-100，150 mM氯化鈉，50 mM Tris-HCl，pH 8.0)提取全細胞蛋白。於裂解後，然後將細胞內容物在16,000 G下離心10分鐘。收集上清液用於西方墨點法分析或酵素活性分析。使用西方墨點法分析(圖6A)比較在三組條件下處理之海拉細胞(Hela Cell) (WT)中之TP之細胞內含量與LS174T (TP缺乏)細胞中之TP之細胞內含量。泳道1顯示於利用1 μM CPP12-N-TP處理6小時後，LS174T細胞內部之經轉導之TP之高濃度，其產生較WT細胞之TP蛋白質更豐富TP蛋白質。最小量之TP進入用1 μM 未結合之TP處理之LS174T細胞。此含量係與利用對照培養基建立之含量一致。西方墨點法分析證明CPP修飾對於遞送TP至哺乳動物細胞係

必要且有效的。

【0266】 將細胞裂解物之細胞內TP活性表示為胸苷至胸腺嘧啶轉化(單位奈莫耳)/小時/ mg細胞裂解物蛋白。簡言之，將10 μL 10X磷酸鹽緩衝鹽水，pH 7.4及12.5 μL 80 mM胸苷添加至77.5 μL 約2 mg/mL濃度之細胞裂解物蛋白質中。將反應混合物在37°C下培育持續不同時間段：0小時、1小時、4小時或過夜。於所需反應時間後，將20 μL 反應混合物與180 μL 0.3M氫氧化鈉水溶液混合以終止反應。量測在300 nm處之吸光度，及使用3,400 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 之吸收係數計算胸苷至胸腺嘧啶轉化。於利用1 μM CPP12-N-TP處理6小時後，在證明有效且功能性細胞內遞送TP之各種處理下，比較海拉細胞(WT)與TP缺乏細胞(LS174T)之間之細胞內TP活性(圖6B)。經CPP12-N-TP處理之LS174T細胞之酵素活性係超過300 $\text{nmol hr}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ，其比WT細胞之酵素活性強得多。經TP處理及經培養基處理之缺乏細胞僅具有背景水平之TP活性，其係20至40 $\text{nmol hr}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 。因此，CPP12-N-TP不僅進入細胞，而且展示高水平之酵素活性。

【0267】 藉由西方墨點分析TP進入 LS174細胞之劑量依賴性遞送(圖7)。自0.1至0.5至1 μM CPP12-N-TP修改用於培育細胞之CPP12-N-TP之量顯示，遞送進入培養細胞中之TP之含量劑量依賴性增加。利用0.5或1 μM CPP12-N-TP相較於利用1 μM TP培育之細胞(其基本上等效於經培養基處理之細胞(陰性對照))，觀察到細胞內TP內容物之實質增加。

【0268】 藉由TP酵素活性檢定分析遞送進入TP缺乏LS174T細胞中之全細胞及胞質TP活性(圖8)。將LS174T細胞用不同濃度之CPP12-N-TP(0.1、0.5或1 μM)處理6小時。使用1 μM TP及培養基處理作為對照。收集全細胞裂解物樣品及藉由酵素活性檢定表徵。藉由第3、4及5行中呈現

之資料驗證劑量依賴性，該資料顯示於各自利用0.1、0.5或1 μM 之CPP12-N-TP處理後，LS174T細胞之細胞內TP活性。在1 μM CPP12-N-TP下，細胞吸收及細胞內TP活性係最高，如基於WB結果所預期。此外，針對經1 μM CPP12-N-TP處理之細胞，亦收集其胞質溶離份。胞質TP活性(第6行)係與自WT細胞之TP活性相當。比較第5行及第6行之TP活性，超過50%遞送之酵素活性進入胞質液。結果進一步證實，CPP12-N-TP不僅成功內化至細胞中，而且有效逃脫胞內體且進入胞質液。

【0269】 為評價各種CPP-TP結合物之吸收效率，藉由相似TP酵素活性檢定分析遞送進入TP缺乏LS174T細胞中之全細胞及胞質TP活性。將LS174T細胞用1 μM cCPP12-N-TP11、cCPP12-N-TP11-PEG10K、cCPP12-N-TP16-PEG10K、cCPP12-SS-TP11-PEG10K或cCPP12-SS-PEG16-PEG10K處理6小時。使用1 μM TP及培養基處理作為對照。收集培育細胞之胞質溶離份及藉由酵素活性檢定表徵(圖34)。在經1 μM CPP12-N-TP處理之細胞下，細胞吸收及細胞內TP活性係最高。cCPP12-N-TP11-PEG10K以及cCPP12-N-TP16-PEG10K亦顯示如預期之顯著吸收。出人意料地，基於二硫鍵結合之cCPP12-SS-TP11-PEG10K及cCPP12-SS-TP16-PEG10K顯示類似於無標記之TP之水平的最小細胞吸收。結果證明結合化學之選擇及結合位點對於成功細胞遞送及胞內體逃脫進入胞質液係關鍵的。

實例4.活體內檢定

【0270】 為測定CPP結合之TP蛋白之半衰期及生物分佈，將通過皮下(s.c.)、皮內(i.d.)、靜脈內(i.v.)或腹膜內(i.p.)途徑以每次注射0.1、1、2、5、10或20 mpk注射經Alexa568標記之蛋白質至CD1小鼠或C57BL/6

小鼠。將對照組用PBS或經Alexa568標記之TP蛋白注射。將於注射後各時間點(0.5、4、8、24、48或96小時)收集血漿、血細胞、PBMC、各種器官(心臟、肺、肝、脾、胰、腎、肌肉、腸及腦)。將自各種組織樣品之TP酵素活性定量。適當保留組織樣品用於進一步免疫組織學分析以及組織病理學分析。將各種組織中之螢光定量。將經螢光標記之TP蛋白之生物分佈進一步藉由組織勻漿之SDS-PAGE分析，接著凝膠內螢光掃描檢查。

【0271】 為證明CPP結合之TP作為MNGIE之潛在治療之活體內功效，將鼠科模型杠桿化：Tymp/Upp1雙KO小鼠(參考：Hum Mol Genet 18: 714-722)。將Tymp/Upp1雙KO小鼠用CPP結合之TP、TP或溶劑群藉由腹膜內、靜脈內或皮下方法以至多20 mpk/注射之劑量每週一次、兩次或三次注射。每週收集血液樣品。整個研究中藉由LC-MS檢定測試血液中之胸苷及去氧尿苷含量。整個研究中亦藉由TP酵素活性檢定測試血液中之胸苷磷酸化酶活性。處理結束時(4至12週)，殺死小鼠及藉由LC-MS檢定定量肝、腦、骨骼肌、小腸及腎中之胸苷含量。自相同組織樣品，亦按照文獻方法(參考FEBS Lett 581: 3410-3414)定量TP酵素活性。亦藉由西方墨點法以及藉由免疫螢光檢定分析各種組織中之遞送之TP之豐度。

【0272】 於投與結合之TP後，大多數研究樣品中之血漿胸苷濃度自相對高水平(於MNGIE小鼠模型中約10 μ M)降至野生型水平(1至3 μ M)。於治療後2至8個月(研究結束)，收集之組織中之核苷酸含量亦顯著下降。例如，於肝中，胸苷含量將自40至120 pmol/mg蛋白質減少至低於20 pmol/mg蛋白質。藉由酵素活性檢定以及西方墨點分析二者檢測各種組織中之TP蛋白之實質增加。

實例5.定量MNGIE小鼠模型中之血清胸苷含量

【0273】 使用MNGIE小鼠模型(Mol Cell Biol. 2002; 22: 5212-5221)評價藉由投與本文中所揭示之CPP-TP結合物，血清中之胸苷減少。MNGIE小鼠具有異常高含量(約10 μ M)之胸苷，由於功能TYMP及UPP1基因之不存在，因此不能有效將胸苷代謝成胸腺嘧啶。因此，預期TP經由CPP遞送以降低胸苷含量。

【0274】 為定量血清中之胸苷含量，將約25 μ L新鮮單離之血清樣品與46.8 μ L蒸餾水及3.2 μ L濃高氯酸混合(初始濃度11.7M，最終濃度為0.55M)。然後將樣品渦流10秒及保持在冰上10分鐘以幫助蛋白質沉澱。之後，藉由在17,000G下在4 $^{\circ}$ C下離心10分鐘移除沉澱。收集澄清上清液及在配備有C18 5 μ M，4.6 X 250 mm管柱之Agilent 1100分析型HPLC上使用梯度溶離及UV檢測(268 nm)分析。溶離梯度可參考Methods Mol. Biol. 2012; 837: 121-133。使用曲線下面積(AUC)及校準曲線計算胸苷、去氧尿苷及其他核苷酸之濃度。

【0275】 為測試CPP-TP結合物降低胸苷含量之能力，將MNGIE小鼠用CPP-TP結合物經由尾靜脈靜脈內注射處理。處理在四天發生：第0天；第5天；第12天及第19天，各自以7.5、7.5、20及20 mpk。在處理前兩天(第-2天)及於各處理後之該天(第1天，於第一次注射後；第6天，於第二次注射後；第12天，於第三次注射後；及第20天，於第四次注射後)量測MNGIE小鼠之血清胸苷含量。將胸苷含量與未經處理之MNGIE小鼠比較。使用單因子ANOVA與Geisser-Greenhouse校正進行統計分析(***)指示p-值< 0.0001)。圖9中提供結果。

【0276】 結果顯示CPP-TP結合物降低血清胸苷含量至針對野生型

小鼠量測之健康含量(比較第-2天含量與第20天含量)，然而經對照(磷酸鹽緩衝鹽水)處理之組中之胸苷含量仍上升。

【0277】為證實第20天獲得之結果，在第26天，將相同組之MNGIE小鼠用20 mpk CPP-TP或媒劑對照再次注射，及在第27天如上所述量測其胸苷含量。有趣的是，四分之三(除了小鼠T20外)經處理之MNGIE小鼠顯示耗盡之血清胸苷含量，其進一步證實CPP-TP處理之活體內功效(圖10A)。

【0278】為研究MNGIE小鼠T20之血清中之胸苷含量之不完全耗盡(圖10A)，藉由檢測抗藥物抗體之形成使用ELISA檢定研究CPP-人類TP之潛在免疫原性質。簡言之，在37°C下，將96孔聚苯乙烯板之孔用1 µg/mL之CPP-TP塗覆1小時。然後將孔用洗滌緩衝液(磷酸鹽緩衝鹽水及0.05% tween 20)洗滌三次及用阻斷緩衝液(磷酸鹽緩衝鹽水及2%牛血清白蛋白)在37°C下培育0.5小時。然後將孔用洗滌緩衝液洗滌一次，然後用來自經處理(T9、T10、T15或T20)或對照(C8、C11或C16)小鼠之連續稀釋之血清樣品在37°C下培育1小時。於培育後，將孔洗滌三次及然後用1 µg/mL經HRP標記之山羊抗小鼠IgG (H+L)在4°C下培育。之後，將孔洗滌三次及用TMB受質溶液在室溫下於黑暗中培育30分鐘，然後用0.1 mL之1M鹽酸溶液中止。藉由板讀取器記錄在450 nm處之吸光度，及將值對血漿之稀釋因子作圖(圖10B)。於此ELISA檢定中，更強AFU (即，在450 nm處之吸光度)係與增加之抗CPP-TP小鼠IgG抗體正相關。有趣的是，來自小鼠T20之血清顯示抗藥物小鼠IgG含量之顯著上升水平，其可為如圖10A所示之T20之胸苷之不充分耗盡的原因。

實例6. MNGIE小鼠模型檢定——作用持續時間

【0279】為研究所揭示之CPP-TP結合物對MNGIE小鼠作用之持續時間，將新MNGIE小鼠組用20 mpk之CPP-TP結合物藉由每週一次靜脈內注射處理持續四週。在第一週及第二週於處理24小時後(各自W1-24hr及W2-24hr)、在第三週於處理32小時後(W3-32hr)及在第四週於處理36小時後(W3-36hr)量測血清胸苷含量。在指定時間點收集50 μ L血清及藉由如實例4中所述之HPLC-UV檢定分析其核苷酸含量。

【0280】圖11中提供此檢定之結果。此等結果指示CPP-TP可降低且維持MNGIE小鼠中之血清胸苷含量至健康含量水平(針對不具有突變TYMP基因之小鼠進行量測)持續至少32小時。

實例7.利用PEG化之CPP-TP結合物之活體內檢定

【0281】已報導水溶性聚合物與蛋白質之結合提高蛋白質之穩定性。將所揭示之CPP-TP PEG化(在CPP-TP上結合聚乙二醇)以研究此修飾是否增加細胞穩定性及因此增加作用持續時間。根據下列程序，將具有5 kDa (PEG5K)、2 kDa (PEG12)、10 kDa (PEG10K)、40 kDa之分子量具有不同結構(40K 直鏈及40K分支鏈)之PEG分別與CPP12-N-TP11結合。

【0282】為研究peg化之CPP-TP結合物於靜脈內注射後48小時時間內作用之持續時間，將PBS對照、CPP12-N-TP11、CPP12-N-TP11-AF658、CPP12-N-TP11-PEG5K或CPP12-N-TP11-PEG12以8 mpk對野生型CD1小鼠投與。於尾靜脈靜脈內投與後之下列時間點如實例4中所述量測血清中之胸苷濃度(μ M)：5分鐘、8小時、24小時、36小時及48小時(圖13)。此等結果顯示PEG化之CPP-TP結合物相較於非PEG化類似物維持降低之胸苷含量持續延長之時間。應注意，PEG化之結合物(例如，cCPP12-N-TP11-PEG5K)於靜脈內注射後至少48小時顯著降低胸苷含量，然而於

為非PEG化之TP之情況下於約24小時後胸苷含量返回至對照水平。

【0283】 為比較PEG化與非PEG化之CPP12-N-TP11之藥物動力學特性，測試在5分鐘、8小時、24小時、36小時及48小時時收集之血清樣品之特異性TP酵素活性。圖12中提供此等結果。PEG化與非PEG化之cCPP12-N-TP11之藥物動力學特性不顯示顯著差異，因為所有cCPP12-N-TP11變異體顯示於投與後24小時，最小血清中之TP酵素活性。

使用MNGIE小鼠進一步研究cCPP12-N-TP11-PEG5K作用之持續時間。於此情況下，使來自實例6之MNGIE小鼠經受cCPP12-N-TP11-PEG5K以16 mpk之靜脈內投與。針對經處理之MNGIE小鼠量測血清中之胸苷含量及與未經處理之MNGIE小鼠比較。根據實例6進行檢定及添加在第6週之額外研究日。具體而言，於第6週處理48小時後(W6-48hr)量測血清胸苷濃度。cCPP12-N-TP11-PEG5K之結果包含於圖14中。與cCPP12-N-TP11相比，其可降低且維持MNGIE小鼠中之血清胸苷含量持續約36小時(W4-36hr，圖14)，PEG化之cCPP-TP結合物(例如，cCPP12-N-TP11-5K)能在處理後至少48小時耗盡血清胸苷含量(W6-48hr，圖14)。為比較不同PEG化之cCPP12-N-TP11之功效，將cCPP12-N-TP11-PEG5K、cCPP12-N-TP11-PEG10K、cCPP12-N-TP11-PEG40K直鏈或cCPP12-N-TP11-PEG40K分支鏈對來自實例6之MNGIE小鼠投與。將MNGIE小鼠每週一次處理持續4週。以10mpk完成第一次注射及接著以5mpk再注射3次。於尾靜脈靜脈內投與後之下列時間點量測血清中之胸苷濃度(μM)及TP酵素活性：每週於一次注射後3天及6天，如實例6中所述。在第1週期間，以10 mpk注射，於注射後三天，經cCPP12-N-TP11-PEG10K、cCPP12-N-TP11-PEG40K直鏈及cCPP12-N-TP11-PEG40K分支鏈處理之

小鼠顯示顯著減少之胸苷濃度(圖23)。在四週時間段內，藉由注射後三天之胸苷或去氧尿苷含量定量功效。並且cCPP12-N-TP11-PEG40K直鏈及cCPP12-N-TP11-PEG40K處理之功效隨著多次注射而降低(參見圖24A及24B)。另一方面，cCPP12-N-TP11-PEG10K顯著降低代謝物(胸苷)含量超過四週(圖25)。除了代謝物含量外，吾人亦定量血清中之TP酵素活性。自第1週期間收集之樣品，吾人發現尤其來自cCPP12-N-TP-PEG40K注射小鼠之血清中之TP活性(圖26A)。然而，自第4週期間收集之樣品，自cCPP12-N-TP-PEG40K注射小鼠收集之血清樣品之循環TP活性顯著下降至背景水平(圖26B)。此指示隨著重複注射，對PEG40K修飾蛋白之抗藥物抗體之存在，可能歸因於其於循環中之延長之半衰期。

實例8. cCPP12-TP及TP蛋白之藥物動力學

【0284】 使用小鼠模型研究本發明之cCPP12-TP11結合物或TP之藥物動力學。將cCPP12-TP11結合物(20 mpk)靜脈內注射至野生型CD1小鼠，及於投與後之下列時間點收集血清樣品：0.5小時、2小時、8小時、24小時及48小時(圖15A)。作為比較，亦將游離TP (不與CPP結合)之20 mpk靜脈內注射至野生型小鼠，及在相同時間點收集血清樣品(圖15B)。使用西方墨點檢定分析及定量樣品。

【0285】 資料顯示cCPP-TP11於IV注射後12小時自循環消失，其指示cCPP-TP之半衰期顯著短於游離TP之半衰期，指示自循環耗盡及貨物TP蛋白以cCPP依賴性方式之細胞內遞送。

【0286】 為比較cCPP12-N-TP11與cCPP12-N-TP16之藥物動力學及藥效學特性，將野生型小鼠用5 mpk cCPP12-N-TP11或cCPP12-N-TP16或PBS對照注射，及於注射後5分鐘、8小時、24小時、36小時或48小時

收集血清樣品。藉由上述酵素活性檢定量測血清樣品之特異性TP酵素活性及亦測試血清樣品之胸苷含量。圖27A及27B中提供此等結果。

【0287】 資料顯示cCP12-N-TP11及cCPP12-N-TP16之藥物動力學特性不顯示顯著差異。及cCPP12-N-TP11及cCPP12-N-TP16變異體二者顯示於降低活體內胸苷含量中之相當的功效。

【0288】 為比較 cCPP12-N-TP11-PEG10K 與 cCPP12-N-TP16-PEG10K之藥物動力學及藥效學特性，將野生型小鼠用5 mpk cCPP12-N-TP11-PEG10K或cCPP12-N-TP16-PEG10K注射。於注射後5分鐘、8小時、24小時、48小時、72小時或96小時時收集血清樣品。藉由上述酵素活性檢定量測血清樣品之特異性TP酵素活性及亦如上所述測試血清樣品之胸苷含量。圖28A及28B中提供結果。

【0289】 資料顯示類似於非PEG化之蛋白質，PEG化之cCPP-TP11及cCPP-TP16不顯示醫藥動力學特性之顯著差異。及cCPP12-N-TP11-PEG10K及cCPP12-N-TP16-PEG10K二者顯示耗盡活體內胸苷含量之效應。

【0290】 為比較 cCPP12-SS-TP11-PEG10K 與 cCPP12-SS-TP16-PEG10K之藥物動力學及藥效學特性，將野生型小鼠用5mpk cCPP12-SS-TP11-PEG10K或cCPP12-SS-TP16-PEG10K注射，及於注射後5分鐘、8小時、24小時、48小時、72小時或96小時時收集血清樣品。藉由上述酵素活性檢定量測血清樣品之特異性TP酵素活性及亦如上所述測試血清樣品之胸苷含量。圖29A及29B中提供結果。

【0291】 資料顯示，cCPP12-SS-TP11-PEG10K顯示相較於cCPP12-SS-TP16-PEK10K類似之藥物動力特性。兩種TP衍生物顯示耗盡

活體內胸苷含量之效應。

【0292】 為比較Fc_γ-P16與cCPP12-N-Fc-TP16之藥物動力學及藥效學特性，將野生型小鼠用5 mpk之Fc-TP16及cCPP12-N-Fc-TP16注射，及於注射後5分鐘、24小時、48小時、72小時、120小時或156小時時收集血清樣品。藉由上述酵素活性檢定量測血清樣品之特異性TP酵素活性及亦如上所述測試血清樣品之胸苷含量。圖32及33中提供結果。

實例9.生物分佈

【0293】 使用經螢光標記之CPP-TP研究於靜脈內投與後4小時、8小時或24小時，野生型CD1小鼠中之CPP-TP結合物之生物分佈。將CPP-TP用 AlexaFlour568 (AF568) 螢光標記及產生用於此研究之 CPP-TP-AF568。簡言之，將CPP12-N-TP (2 mg/mL, 40 μM) 與 AlexaFluoro568-NHS 酯(NHS, N-羥基琥珀醯亞胺, ThermoFisher) 於磷酸鹽緩衝鹽水(pH 7.4) 中以1:8莫耳比混合。為分離額外螢光團，根據製造商之方案應用PD-10管柱及獲得CPP-TP-AF568。將合併之含有所需產物之溶離份無菌過濾，濃縮及以2 mg/mL儲存在-20°C下。

【0294】 為研究CPP-TP之組織分佈，將小鼠用CPP-TP-AF568以5 mpk靜脈內注射。然後，於注射4小時、8小時或24小時後，將小鼠麻醉、出血、安樂死及解剖。收集心臟、腎、肝、肺、大腸、小腸及脾；將各片稱重，及將若干器官對半分用於低溫切片及組織均質化。對於螢光定量，將器官用預冷管中之組織裂解器(Tissue Lyser) II系統、不銹鋼珠及補充有1x蛋白酶抑制劑之RIPA緩衝液均質化。獲得離心後之上清液及轉移用於螢光定量。使用自未經注射之小鼠收集之組織作為空白及亦外添加已知濃度之CPP-TP-AF568以產生標準曲線。在螢光板讀取器上檢測樣品及標

準探針之螢光強度。自針對各器官製作之校準曲線推斷勻漿之濃度。利用組織均質化之稀釋因子及勻漿濃度反算組織濃度。圖16A中呈現生物分佈研究結果。此等結果指示，**CPP-TP**可內化進入廣泛範圍之細胞且主要定位於肝、腎及脾(圖16A)。使用共焦成像獲得**CPP-TP**於肝、肺及腸中之分佈之共焦圖像(圖16B)。

† 補充序列表】

<110> 美商安卓達治療股份有限公司

<120> 用於治療粒線體性神經胃腸腦病變之組合物及方法

<130> CYPT-014/02WO 329395-2059

<140> PCT/US2019/019117

<141> 2019-02-22

<150> US 62/796,823

<151> 2019-01-25

<150> US 62/633,933

<151> 2018-02-22

<160> 127

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 482

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Ala Leu Met Thr Pro Gly Thr Gly Ala Pro Pro Ala Pro Gly
1 5 10 15

Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro Glu
20 25 30

Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly Arg
35 40 45

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

Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg Leu
65 70 75 80

Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu Ala
85 90 95

Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln Leu
100 105 110

Val Asp Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu Val
115 120 125

Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile Ser
130 135 140

錠 1 顆(暖橋裂)

Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser
 145 150 155 160
 Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu
 165 170 175
 Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val
 180 185 190
 Pro Ala Asp Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr Val
 195 200 205
 Asp Ser Leu Pro Leu Ile Thr Ala Scr Ile Leu Ser Lys Lys Leu Val
 210 215 220
 Glu Gly Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala
 225 230 235 240
 Val Phe Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val
 245 250 255
 Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala
 260 265 270
 Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu
 275 280 285
 Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp
 290 295 300
 Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala
 305 310 315 320
 Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp
 325 330 335
 Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val
 340 345 350
 Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg
 355 360 365
 Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro
 370 375 380
 Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val
 385 390 395 400
 Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg
 405 410 415

Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala
305 310 315 320

Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp
325 330 335

Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val
340 345 350

Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg
355 360 365

Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro
370 375 380

Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val
385 390 395 400

Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg
405 410 415

Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg
420 425 430

Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser
435 440 445

Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg
450 455 460

Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro
465 470 475 480

Gln Gln

<210> 2
<211> 331
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

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

Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu
225 230 235 240

Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly
245 250 255

Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu
260 265 270

Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg
275 280 285

Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu
290 295 300

Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser
305 310 315 320

Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
325 330

<210> 3
<211> 467
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro
1 5 10 15

Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly
20 25 30

Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn
35 40 45

Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg
50 55 60

Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu
65 70 75 80

Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln
85 90 95

Leu Val Asp Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu
100 105 110

Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile
115 120 125

Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu
130 135 140

Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu
165 170 175

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

Val Asp Ser Leu Pro Leu Ile Thr Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu
195 200 205

Val Glu Gly Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala
210 215 220

Ala Val Phe Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu
225 230 235 240

Val Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr
245 250 255

Ala Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val
260 265 270

Glu Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg
275 280 285

Asp Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His
290 295 300

Ala Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp
305 310 315 320

Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly
325 330 335

Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu
340 345 350

Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala
355 360 365

Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu
370 375 380

Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu
385 390 395 400

Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu
405 410 415

Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu
420 425 430

Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp
435 440 445

Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro
450 455 460

Pro Gln Gln
465

<210> 4
<211> 461
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro Glu Pro Lys Gln Leu Pro
1 5 10 15

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

225 230 235 240

Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Met Asp Lys Pro Leu
 245 250 255

Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu Glu Ala Leu Leu Cys
 260 265 270

Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp Leu Val Thr Thr Leu
 275 280 285

Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala Gly Thr Gln Ala Gln
 290 295 300

Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser Ala Leu Gly
305 310 315

Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val Asp Pro Gly Leu Ala
 325 330 335

Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg Arg Gln Leu Leu Pro
 340 345 350

Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp Gly Thr Val
 355 360 365

Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His Glu Leu Gly
 370 375 380

Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly Val Gly Ala
385 390 395 400

Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly Thr Pro Trp
 405 410 415

Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro Gln Ser Arg
 420 425 430

Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro Phe Ala Ala
 435 440 445

Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
 450 455 460

<210> 5
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5

Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly Arg Leu Ser
 1 5 10 15

Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn Gly Ser Ala
 20 25 30

Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg Leu Arg Gly
 35 40 45

Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu Ala Gln Ser
 50 55 60

Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln Leu Val Asp
 65 70 75 80

Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu Val Leu Ala
 85 90 95

Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile Ser Gly Arg
 100 105 110

Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser Ile Pro
 115 120 125

Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu Leu Asp
 130 135 140

Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val Pro Ala
 145 150 155 160

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

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

Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala Val Phe
 195 200 205

Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val Gly Val
 210 215 220

Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Met Asp
 225 230 235 240

Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu Glu Ala
 245 250 255

Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp Leu Val
 260 265 270

Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala Gly Thr
 275 280 285

Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser
 290 295 300

Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val Asp Pro
 305 310 315 320

Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg Arg Gln
 325 330 335

Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp
 340 345 350

Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His
 355 360 365

Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly
 370 375 380

Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly
 385 390 395 400

Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro
 405 410 415

Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro
 420 425 430

Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
 435 440 445

<210> 6
 <211> 699
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IgG1Fc-TP (16-482) N端融合

<400> 6

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 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 Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser
 225 230 235 240
 Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu
 245 250 255
 Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg
 260 265 270
 Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile
 275 280 285
 Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu
 290 295 300
 Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu
 305 310 315
 Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln Leu Val Asp Lys His Ser Thr Gly
 325 330 335
 Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala
 340 345 350

Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr
 355 360 365
 Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile
 370 375 380
 Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys
 385 390 395 400
 Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val Pro Ala Asp Gly Ile Leu Tyr
 405 410 415
 Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr Val Asp Ser Leu Pro Leu Ile Thr
 420 425 430
 Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu Val Glu Gly Leu Ser Ala Leu Val
 435 440 445
 Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala Val Phe Pro Asn Gln Glu Gln
 450 455 460
 Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly
 465 470 475 480
 Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg
 485 490 495
 Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp
 500 505 510
 Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly
 515 520 525
 Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala
 530 535 540
 Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe
 545 550 555 560
 Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala
 565 570 575

Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala
580 585 590

Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu
595 600 605

Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly
610 615 620

Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu
625 630 635 640

Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg
645 650 655

Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu
660 665 670

Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser
675 680 685

Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
690 695

<210> 7
<211> 704
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1Fc-TP (16-482) N端與GGGGS連接子融合

<400> 7

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 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp Phe
 225 230 235 240

Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro Glu Pro Lys
 245 250 255

Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly Arg Leu Ser
 260 265 270

Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn Gly Ser Ala
 275 280 285

Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg Leu Arg Gly
 290 295 300

Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu Ala Gln Ser
 305 310 315 320

Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln Leu Val Asp
 325 330 335

Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu Val Leu Ala
 340 345 350

Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile Ser Gly Arg
 355 360 365

Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser Ile Pro
 370 375 380

Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu Leu Asp
 385 390 395 400

Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val Pro Ala
 405 410 415

Asp Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr Val Asp Ser
 420 425 430

Leu Pro Leu Ile Thr Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu Val Glu Gly
 435 440 445

Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala Val Phe
 450 455 460

Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val Gly Val
 465 470 475 480

Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Met Asp

			485					490						495	
Lys	Pro	Leu	Gly 500	Arg	Cys	Val	Gly	His 505	Ala	Leu	Glu	Val	Glu 510	Glu	Ala
Leu	Leu	Cys 515	Met	Asp	Gly	Ala	Gly 520	Pro	Pro	Asp	Leu	Arg 525	Asp	Leu	Val
Thr	Thr 530	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu 535	Leu	Trp	Leu	Ser	Gly 540	His	Ala	Gly	Thr
Gln 545	Ala	Gln	Gly	Ala	Ala 550	Arg	Val	Ala	Ala	Ala 555	Leu	Asp	Asp	Gly	Ser 560
Ala	Leu	Gly	Arg	Phe 565	Glu	Arg	Met	Leu	Ala 570	Ala	Gln	Gly	Val	Asp 575	Pro
Gly	Leu	Ala	Arg 580	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly 585	Ser	Pro	Ala	Glu	Arg 590	Arg	Gln
Leu	Leu	Pro 595	Arg	Ala	Arg	Glu	Gln 600	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala 605	Pro	Ala	Asp
Gly	Thr 610	Val	Glu	Leu	Val	Arg 615	Ala	Leu	Pro	Leu	Ala 620	Leu	Val	Leu	His
Glu 625	Leu	Gly	Ala	Gly	Arg 630	Ser	Arg	Ala	Gly	Glu 635	Pro	Leu	Arg	Leu	Gly 640
Val	Gly	Ala	Glu	Leu 645	Leu	Val	Asp	Val	Gly 650	Gln	Arg	Leu	Arg	Arg 655	Gly
Thr	Pro	Trp	Leu 660	Arg	Val	His	Arg	Asp 665	Gly	Pro	Ala	Leu	Ser 670	Gly	Pro
Gln	Ser	Arg 675	Ala	Leu	Gln	Glu	Ala 680	Leu	Val	Leu	Ser	Asp 685	Arg	Ala	Pro
Phe 690	Ala	Ala	Pro	Ser	Pro	Phe 695	Ala	Glu	Leu	Val	Leu 700	Pro	Pro	Gln	Gln

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

<220>
 <223> TP (16-482)- IgG1Fc C端融合

<400> 8

Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro
 1 5 10 15

Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly
 20 25 30

Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn
 35 40 45

Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg
 50 55 60

Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu
 65 70 75 80

Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln
 85 90 95

Leu Val Asp Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu
 100 105 110

Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile
 115 120 125

Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu
 130 135 140

Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val
 145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu
 165 170 175

Val Pro Ala Asp Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr

Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu
 405 410 415
 Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu
 420 425 430
 Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp
 435 440 445
 Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro
 450 455 460
 Pro Gln Gln Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 465 470 475 480
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 485 490 495
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 500 505 510
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 515 520 525
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 530 535 540
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 545 550 555 560
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 565 570 575
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 580 585 590
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 595 600 605
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 610 615 620

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
645 650 655

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

<210> 9
<211> 704
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TP (16-482)- IgG1Fc C端與GGGGGS連接子融合

<400> 9

Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro
1 5 10 15

Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly
20 25 30

Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn
35 40 45

Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg
50 55 60

Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu
65 70 75 80

Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln
85 90 95

Leu Val Asp Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu
 100 105 110

Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile
 115 120 125

Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu
 130 135 140

Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val
 145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu
 165 170 175

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

Val Asp Ser Leu Pro Leu Ile Thr Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu
 195 200 205

Val Glu Gly Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala
 210 215 220

Ala Val Phe Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu
 225 230 235 240

Val Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr
 245 250 255

Ala Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val
 260 265 270

Glu Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg
 275 280 285

Asp Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His
 290 295 300

Ala Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp
 305 310 315 320

Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly
 325 330 335
 Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu
 340 345 350
 Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala
 355 360 365
 Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu
 370 375 380
 Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu
 385 390 395 400
 Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu
 405 410 415
 Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu
 420 425 430
 Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp
 435 440 445
 Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro
 450 455 460
 Pro Gln Gln Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 465 470 475 480
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 485 490 495
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 500 505 510
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 515 520 525
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 530 535 540

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
545 550 555 560

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
565 570 575

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
580 585 590

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
595 600 605

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
610 615 620

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
625 630 635 640

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
645 650 655

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
660 665 670

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
675 680 685

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695 700

<210> 10
<211> 704
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TP (16-482)- IgG1Fc_R435 C端與GGGS連接子融合

<400> 10

Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro
1 5 10 15

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

Val Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr
 245 250 255
 Ala Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val
 260 265 270
 Glu Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg
 275 280 285
 Asp Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His
 290 295 300
 Ala Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp
 305 310 315 320
 Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly
 325 330 335
 Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu
 340 345 350
 Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala
 355 360 365
 Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu
 370 375 380
 Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu
 385 390 395 400
 Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu
 405 410 415
 Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu
 420 425 430
 Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp
 435 440 445
 Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro

450																
Pro 465	Gln	Gln	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Pro	Lys 475	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr 480	
His	Thr	Cys	Pro	Pro 485	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu 490	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro 495	Ser	
Val	Phe	Leu	Phe 500	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys 505	Asp	Thr	Leu	Met	Ile 510	Ser	Arg	
Thr	Pro	Glu 515	Val	Thr	Cys	Val	Val 520	Val	Asp	Val	Ser	His 525	Glu	Asp	Pro	
Glu	Val 530	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr 535	Val	Asp	Gly	Val	Glu 540	Val	His	Asn	Ala	
Lys 545	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu 550	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser 555	Thr	Tyr	Arg	Val	Val 560	
Ser	Val	Leu	Thr	Val 565	Leu	His	Gln	Asp	Trp 570	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu 575	Tyr	
Lys	Cys	Lys	Val 580	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu 585	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu 590	Lys	Thr	
Ile	Ser	Lys 595	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro 600	Arg	Glu	Pro	Gln	Val 605	Tyr	Thr	Leu	
Pro	Pro 610	Ser	Arg	Glu	Glu	Met 615	Thr	Lys	Asn	Gln	Val 620	Ser	Leu	Thr	Cys	
Leu 625	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr 630	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala 635	Val	Glu	Trp	Glu	Ser 640	
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu 645	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr 650	Thr	Pro	Pro	Val	Leu 655	Asp	
Ser	Asp	Gly	Ser 660	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser 665	Lys	Leu	Thr	Val	Asp 670	Lys	Ser	

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
675 680 685

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 700

<210> 11
<211> 704
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1Fc(R435)-TP (16-482) N端與GGGGS連接子融合

<400> 11

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 Glu Glu Met Thr
130 135 140

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

Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser Ile Pro
 370 375 380

Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu Leu Asp
 385 390 395 400

Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val Pro Ala
 405 410 415

Asp Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr Val Asp Ser
 420 425 430

Leu Pro Leu Ile Thr Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu Val Glu Gly
 435 440 445

Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala Val Phe
 450 455 460

Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val Gly Val
 465 470 475 480

Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Met Asp
 485 490 495

Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu Glu Ala
 500 505 510

Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp Leu Val
 515 520 525

Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala Gly Thr
 530 535 540

Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser
 545 550 555 560

Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val Asp Pro
 565 570 575

Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg Arg Gln
 580 585 590

Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp
595 600 605

Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His
610 615 620

Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly
625 630 635 640

Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly
645 650 655

Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro
660 665 670

Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro
675 680 685

Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
690 695 700

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

<220>
<223> IgG1Fc-TP_R435 (16-482) N端融合

<400> 12

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 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 Arg Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser
 225 230 235 240
 Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu
 245 250 255
 Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg
 260 265 270
 Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile
 275 280 285

Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu
 290 295 300
 Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu
 305 310 315 320
 Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln Leu Val Asp Lys His Ser Thr Gly
 325 330 335
 Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala
 340 345 350
 Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr
 355 360 365
 Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile
 370 375 380
 Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys
 385 390 395 400
 Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val Pro Ala Asp Gly Ile Leu Tyr
 405 410 415
 Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr Val Asp Ser Leu Pro Leu Ile Thr
 420 425 430
 Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu Val Glu Gly Leu Ser Ala Leu Val
 435 440 445
 Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala Val Phe Pro Asn Gln Glu Gln
 450 455 460
 Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly
 465 470 475 480
 Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg
 485 490 495
 Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp
 500 505 510

Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly
 515 520 525

Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala
 530 535 540

Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe
 545 550 555 560

Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala
 565 570 575

Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala
 580 585 590

Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu
 595 600 605

Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly
 610 615 620

Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu
 625 630 635 640

Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg
 645 650 655

Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu
 660 665 670

Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser
 675 680 685

Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
 690 695

<210> 13
 <211> 699
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> TP (16-482) - IgG1Fc_R435 C端融合

<400> 13

Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro
 1 5 10 15

Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly
 20 25 30

Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn
 35 40 45

Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg
 50 55 60

Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu
 65 70 75 80

Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln
 85 90 95

Leu Val Asp Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu
 100 105 110

Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile
 115 120 125

Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu
 130 135 140

Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val
 145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu
 165 170 175

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

Val Asp Ser Leu Pro Leu Ile Thr Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu
 195 200 205

Val Glu Gly Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala
 210 215 220

Ala Val Phe Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu
 225 230 235 240

Val Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr
 245 250 255

Ala Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val
 260 265 270

Glu Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg
 275 280 285

Asp Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His
 290 295 300

Ala Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp
 305 310 315 320

Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly
 325 330 335

Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu
 340 345 350

Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Leu Leu Ala
 355 360 365

Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu
 370 375 380

Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu
 385 390 395 400

Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu
 405 410 415

Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu

	420		425		430															
Ser	Gly	Pro	Gln	Ser	Arg	Ala	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Val	Leu	Ser	Asp					
		435					440					445								
Arg	Ala	Pro	Phe	Ala	Ala	Pro	Ser	Pro	Phe	Ala	Glu	Leu	Val	Leu	Pro					
	450					455					460									
Pro	Gln	Gln	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro					
465					470					475					480					
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro					
				485					490						495					
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr					
			500					505					510							
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn					
		515					520					525								
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg					
	530					535						540								
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val					
545					550					555					560					
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser					
				565					570						575					
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys					
			580					585						590						
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu					
		595					600						605							
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe					
	610					615					620									
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu					
625					630					635					640					

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 645 650 655

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr
 675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 690 695

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 14

Phe Xaa Arg Arg Arg
 1 5

<210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 15

Phe Xaa Arg Arg Arg Cys
 1 5

<210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為碓代半胱胺酸

<400> 16

Phe Xaa Arg Arg Arg Xaa
 1 5

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 17

Arg Arg Arg Xaa Phe
 1 5

<210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<400> 18

Arg Arg Arg Arg Xaa Phe
 1 5

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<400> 19

Phe Xaa Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為D-2-氨基丙氨酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-精氨酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精氨酸

<400> 20

Phe Xaa Xaa Arg Xaa Arg
1 5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 21

Xaa Xaa Arg Xaa Arg Xaa
1 5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 22

Arg Arg Phe Arg Xaa Arg
1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 23

Phe Arg Arg Arg Arg Xaa
1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 24

Xaa Arg Phe Arg Xaa Arg
1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<400> 25

Arg Arg Xaa Phe Arg Arg
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 26

Cys Arg Arg Arg Arg Phe Trp
1 5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa為D-苯丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa為D-精氨酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 27

Phe Xaa Xaa Arg Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 28

Phe Phe Xaa Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 29

Arg Phe Arg Phe Arg Xaa Arg
 1 5

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa為硒代半胱氨酸

<400> 30

Xaa Arg Arg Arg Arg Phe Trp
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 31

Cys Arg Arg Arg Arg Phe Trp
1 5

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<400> 32

Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Gln Lys
1 5

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 33

Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Gln Cys
1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 34

Xaa Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Gln
1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 35

Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Arg Gln
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa為L-正白胺酸

<400> 36

Arg Arg Arg Arg Xaa Phe Asp Xaa Cys
1 5

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 37

Phe Trp Arg Arg Arg
1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 38

Arg Arg Arg Trp Phe
 1 5

<210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 39

Phe Phe Arg Arg Arg
 1 5

<210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 40

Phe Phe Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 41
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 41

Phe Phe Arg Xaa Arg
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 42

Phe Arg Phe Arg Arg
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 43

Phe Arg Arg Phe Arg
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 44

Phe Arg Arg Arg Phe

1 5

<210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-氨基丙酸

<400> 45

Gly Xaa Arg Arg Arg
 1 5

<210> 46
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 46

Phe Phe Phe Arg Ala
 1 5

<210> 47
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 47

Phe Phe Phe Arg Arg
 1 5

<210> 48
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 48

Phe Phe Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 49

Phe Arg Arg Phe Arg Arg
1 5

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 50

Phe Arg Arg Arg Phe Arg
1 5

<210> 51
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 51

Arg Phe Phe Arg Arg Arg
1 5

<210> 52
<211> 6
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 52

Arg Phe Arg Arg Phe Arg
1 5

<210> 53

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 53

Phe Arg Phe Arg Arg Arg
1 5

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 54

Phe Phe Phe Arg Arg Arg
1 5

<210> 55

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 55

Phe Phe Arg Arg Arg Phe
1 5

<210> 56

<211> 6

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 56

Phe Arg Phe Phe Arg Arg
 1 5

<210> 57
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 57

Arg Arg Phe Phe Phe Arg
 1 5

<210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 58

Phe Phe Arg Phe Arg Arg
 1 5

<210> 59
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 59

Phe Phe Arg Arg Phe Arg
 1 5

<210> 60

<211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 60

Phe Arg Arg Phe Phe Arg
 1 5

<210> 61
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 61

Phe Arg Arg Phe Arg Phe
 1 5

<210> 62
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 62

Phe Arg Phe Arg Phe Arg
 1 5

<210> 63
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 63

Arg Phe Phe Arg Phe Arg
 1 5

<210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<400> 64

Gly Xaa Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 65

Phe Phe Phe Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 66

Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 67

Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg
1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 68

Arg Phe Phe Phe Arg Arg Arg
1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 69

Arg Arg Phe Phe Phe Arg Arg
1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 70

Phe Phe Arg Arg Phe Arg Arg
1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 71

Phe Phe Arg Arg Arg Arg Phe
1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 72

Phe Arg Arg Phe Phe Arg Arg
1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 73

Phe Phe Phe Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 74

Phe Phe Phe Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa為D-精胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 75

Phe Xaa Arg Xaa Arg Xaa
1 5

<210> 76
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Xaa可為任何天然產生之胺基酸

<400> 76

Xaa Xaa Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 77

Phe Xaa Phe Arg Xaa Arg
 1 5

<210> 78
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 78

Xaa Phe Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 79
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 79

Xaa Phe Xaa Arg Xaa Arg
1 5

<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa為D-精胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 80

Phe Xaa Phe Xaa Arg Xaa
1 5

<210> 81
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 81

Xaa Phe Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 82
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 82

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 83
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 83

Xaa Phe Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 84
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 84
 Phe Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 85
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精胺酸
 <400> 85

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 乙醯化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 86

Lys Xaa Phe Arg Xaa Arg Xaa Asp
 1 5

<210> 87
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 乙醯化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為L-2,3-二氨基丙酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 87

Xaa Xaa Phe Arg Xaa Arg Xaa Asp
 1 5

<210> 88
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (1)..(8)
 <223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<400> 88

Cys Trp Trp Arg Arg Arg Cys
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> DISULFID
<222> (1)..(9)
<223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<400> 89

Cys Trp Trp Val Arg Arg Arg Arg Cys
1 5

<210> 90
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> DISULFID
<222> (1)..(8)
<223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<400> 90

Cys Phe Trp Arg Arg Arg Arg Cys
1 5

<210> 91
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> DISULFID
<222> (1)..(8)
<223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<400> 91

Cys Trp Trp Trp Arg Arg Arg Cys
1 5

<210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-麩胺酸

<400> 92

Xaa Xaa Arg Glu Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 93
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-麩胺酸

<400> 93

Xaa Xaa Arg Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-麩胺酸

<400> 94

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 95
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa 為 L-苯基丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Xaa 為 D-精胺酸

<400> 95

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Glu
1 5

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 為 L-苯基丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Xaa 為 D-精胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa 為 D-麩胺酸

<400> 96

Xaa Xaa Phe Arg Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 為 L-羧基丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Xaa 為 D-精胺酸

<400> 97

Xaa Xaa Phe Arg Xaa Xaa Glu
1 5

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 為 L-羧基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-麩胺酸

<400> 98

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 99
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 99

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Glu
 1 5

<210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 100

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Glu
 1 5

<210> 101
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-羧基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-麩胺酸

<400> 101

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 102
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Arg係經庚二酸修飾

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> 經庚二酸修飾的Arg與經離胺酸類肽殘基修飾的Arg之間之環化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Arg係經離胺酸類肽殘基修飾

<400> 102

Arg Gln Arg Arg Gly Arg Arg Arg
 1 5

<210> 103
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> DISULFID
<222> (2)..(19)
<223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<400> 103

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
1 5 10 15

Val Ser Cys

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(11)
<223> Lys與Glu之間之環化

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa為D-精胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa為D-精胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa為D-精胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa為D-離胺酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 104

Lys Xaa Arg Xaa Gly Xaa Lys Xaa Arg Xaa Glu
 1 5 10

<210> 105
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Lys與Glu之間之環化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 105

Lys Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Glu
 1 5 10

<210> 106
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa為D-脯氨酸

<400> 106

Arg Val Arg Thr Arg Gly Lys Arg Arg Ile Arg Arg Xaa Pro
 1 5 10

<210> 107
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa為D-脯氨酸

<400> 107

Arg Thr Arg Thr Arg Gly Lys Arg Arg Ile Arg Val Xaa Pro
 1 5 10

<210> 108
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 108

Trp Arg Trp Arg Trp Arg Trp Arg
 1 5

<210> 109

<211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (4)..(21)
 <223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (11)..(23)
 <223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (17)..(29)
 <223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<400> 109

Gly Gly Val Cys Pro Lys Ile Leu Lys Lys Cys Arg Arg Asp Ser Asp
 1 5 10 15

Cys Pro Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly Ser Gly
 20 25 30

Ser Asp

<210> 110
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> 藉由與氮丙啶醛及異脲多組分反應之大環化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)

<223> Xaa為L-3-環己基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa為L-3-環己基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa為L-3-環己基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa為L-3-環己基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 110

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly
1 5 10

<210> 111

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Ser係經均苯三甲酸修飾

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> 兩個L-2,3-二胺基丙酸殘基之N端胺及側鏈經均苯三甲酸二環化

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa為D-纈胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa為L-二氟膦醯基甲基苯基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<400> 111

Ser Xaa Pro Xaa His Xaa Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Xaa

1

5

10

<210> 112

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> D-丙胺酸經均苯三甲酸修飾

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> Xaa為D-丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> 兩個L-2,3-二胺基丙酸殘基之N端胺及側鏈利用經均苯三甲酸二環化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為肌胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-磷酸化蘇胺酸

<220>
 <221> **misc_feature**
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為L-嘔啉-2-甲酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa為D-丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<400> 112

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Ala Xaa Xaa Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Xaa
 1 5 10 15

<210> 113
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> 三個Cys側鏈經參(溴甲基)苯二環化

<400> 113

Cys Arg Arg Ser Arg Arg Gly Cys Gly Arg Arg Ser Arg Arg Cys Gly
 1 5 10 15

<210> 114
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 藉由十二醯基部分連接

<400> 114

Lys Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 115
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 115

Leu Lys Lys Leu Cys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Cys Lys Leu Ala Gly
 1 5 10 15

<210> 116

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> Lys與Glu之間之環化

<400> 116

Arg Arg Arg Arg Lys Arg Arg Arg Glu
 1 5

<210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(9)
 <223> Lys與Glu之間之環化

<400> 117

Arg Arg Arg Lys Arg Arg Arg Arg Glu
 1 5

<210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(9)
 <223> Lys與Glu之間之環化

<400> 118

Arg Arg Lys Arg Arg Arg Arg Arg Glu
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(9)
<223> Lys與Glu之間之環化

<400> 119

Arg Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Glu
1 5

<210> 120
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 120

Cys Arg Cys Arg Cys Arg Cys Arg
1 5

<210> 121
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa為L-炔丙基甘胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(12)

<223> 藉由L-炔丙基甘胺酸與L-6-疊氨基-2-胺基己酸之間之點擊反應之環化

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa為L-6-疊氨基-2-胺基己酸

<400> 121

Xaa Leu Arg Lys Arg Leu Arg Lys Phe Arg Asn Xaa
1 5 10

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(4)

<223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<400> 122

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-胺基-3-胍基丙酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為L-2-胺基-3-胍基丙酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa為L-2-胺基-3-胍基丙酸

<400> 123

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
 1 5

<210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature

<222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 124

Xaa Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg
 1 5

<210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-羰基丙胺酸

<400> 125

Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 126
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為L-2-羰基丙胺酸

<400> 126

Arg Arg Phe Arg Xaa Arg Gln
 1 5

<210> 127
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 127

Arg Phe Arg Phe Arg Xaa Arg
1 5



201945014

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療粒線體性神經胃腸腦病變之組合物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING
MITOCHONDRIAL NEUROGASTROINTESTINAL ENCEPHALOPATHY

【中文】

本文中揭示治療組合物及方法，揭示提供用於治療粒線體性神經胃腸腦病變症候群(MNGIE)之化合物。於一些實施例中，該等化合物具有細胞穿透活性及胸苷磷酸化酶活性。於某些實施例中，本文中所揭示之化合物包含：a)至少一個細胞穿透肽(CPP)部分；及b)胸苷磷酸化酶或其活性片段或類似物(TP)，其中該CPP直接或間接偶合TP。

【英文】

Disclosed herein are compositions and methods of treating disclosure provides for compounds for use in treating Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy Syndrome (MNGIE). In some embodiments, the compounds have cell penetrating activity and thymidine phosphorylase activity. In certain embodiments, the compounds disclosed herein comprise: a) at least one cell-penetrating peptide (CPP) moiety; and b) a thymidine phosphorylase, or an active fragment or analog thereof (TP), wherein the CPP is coupled, directly or indirectly, to TP.

【指定代表圖】

圖2B

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種化合物，其包含：

- a)至少一種細胞穿透肽(CPP)；及
 - b)胸苷磷酸化酶或其活性片段或類似物(TP)，
- 其中該CPP直接或間接偶合TP。

【第2項】

如請求項1之化合物，其中該CPP直接或間接與該TP結合。

【第3項】

如請求項2之化合物，其中該CPP與該TP之N端或C端結合。

【第4項】

如請求項2之化合物，其中該CPP與該TP中之胺基酸之側鏈結合。

【第5項】

如請求項2至4中任一項之化合物，其另包含連接子(L)，該連接子將該CPP與該TP結合。

【第6項】

如請求項5之化合物，其中該L共價鍵結至該TP之N端。

【第7項】

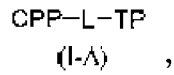
如請求項5之化合物，其中該L共價鍵結至該TP之C端。

【第8項】

如請求項5之化合物，其中該L共價鍵結至TP之胺基酸之側鏈。

【第9項】

如請求項5之化合物，其具有如式I-A之結構：



其中L共價鍵結至該CPP上之胺基酸之側鏈及該TP之N端。

【第10項】

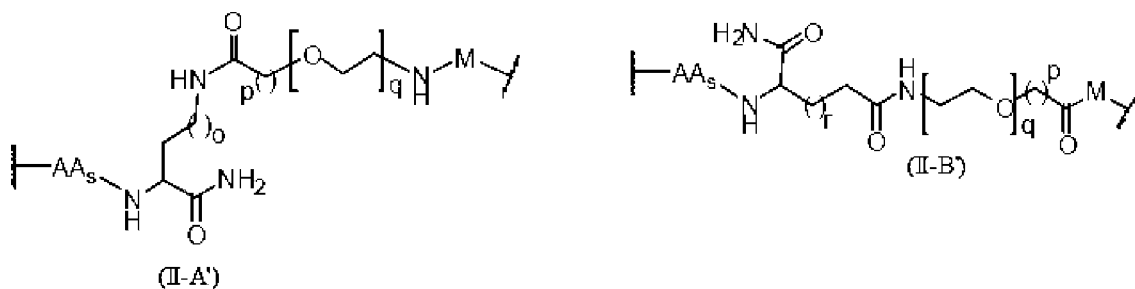
如請求項1至9中任一項之化合物，其中該CPP為環狀細胞穿透肽(cCPP)。

【第11項】

如請求項5至10中任一項之化合物，其中L為一或多個D或L胺基酸，其各視情況經取代；伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基或雜環基，其各視情況經取代；或 $-(R^1-X-R^2)_z-$ ，其中在各情況下， R^1 及 R^2 各係獨立地選自伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基及雜環基，各X獨立地為 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S及O，其中 R^3 係獨立地選自H、烷基、烯基、炔基、碳環基及雜環基，其各視情況經取代，且z為1至20之整數；或其組合。

【第12項】

如請求項5至11中任一項之化合物，其中L具有如式II-A'或II-B'之結構：



且其中

M係不存在或為結合至TP之基團；

AA_s 為該CPP上之胺基酸之側鏈或末端；

o為0至10之整數；

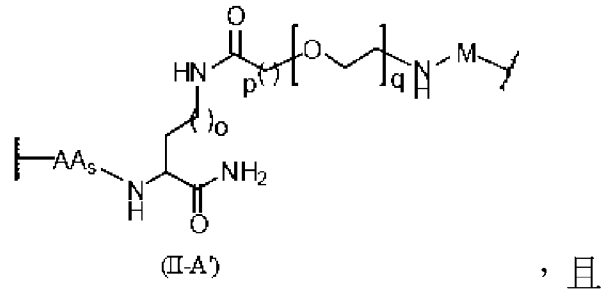
p為0至10之整數；

q為1至50之整數；且

r為0或1。

【第13項】

如請求項12之化合物，其中L具有如式II-A'之結構：



其中o為3；

p為2；且

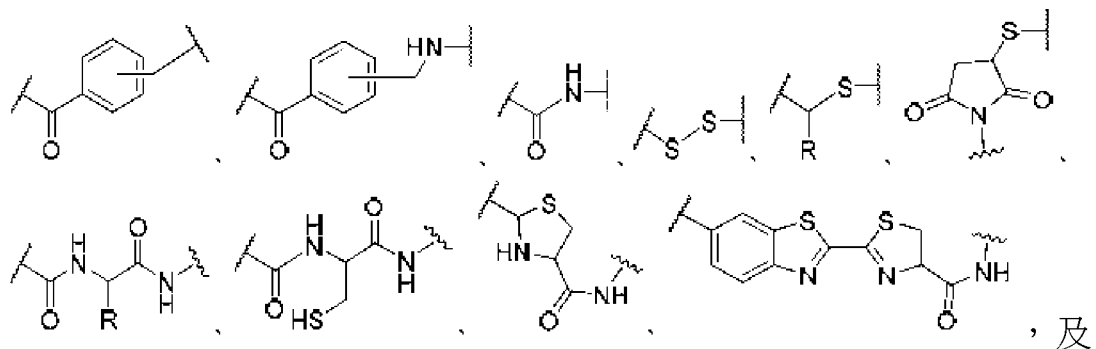
q為10至15之整數。

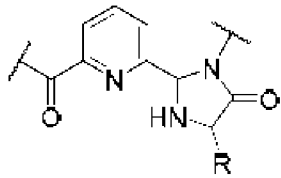
【第14項】

如請求項12或13之化合物，其中M係存在且包括伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環基或雜環基，其各視情況經取代。

【第15項】

如請求項12至14中任一項之化合物，其中M係存在且選自由以下組成之群：

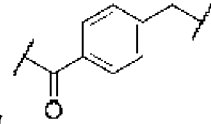




，其中各R獨立地為烷基、烯基、炔基、碳環基或雜環基。

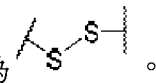
【第16項】

如請求項12至15中任一項之化合物，其中M為



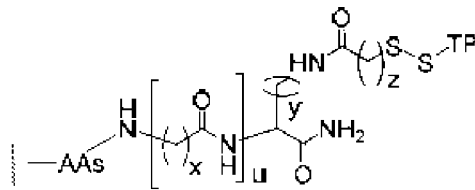
【第17項】

如請求項1至11或15中任一項之化合物，其中M為



【第18項】

如請求項17之化合物，其中L-M具有



II-C'

其中：

AA_s為該CPP上之胺基酸之側鏈或末端；

z為0至10之整數；

y為0至10之整數；

x為0至10之整數；且

u為1至50之整數。

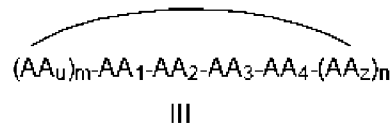
【第19項】

如請求項18之化合物，其中Z為2，y為4，x為2，且u為2。

【第20項】

如請求項10至19中任一項之化合物，其中該cCPP具有包括式III之序

列：



其中：

AA₁、AA₂、AA₃及AA₄各係獨立地選自D或L胺基酸，

在各情況下及當存在時，AA_u及AA_z各係獨立地選自D或L胺基酸，且

m及n係獨立地選自0至6之數字；及

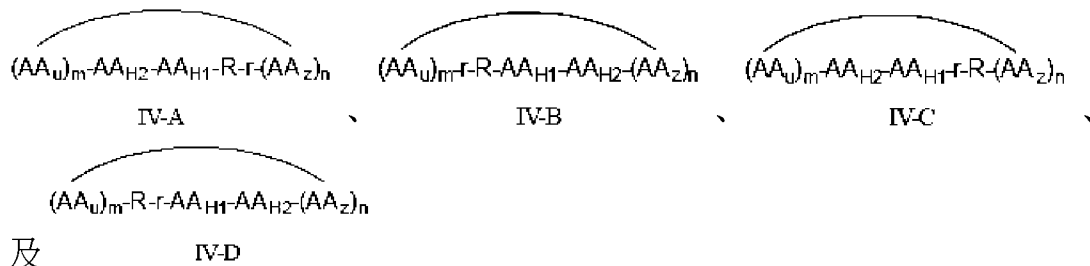
其中：

AA_u (在各情況下及當存在時)、AA₁、AA₂、AA₃、AA₄及AA_z (在各情況下及當存在時)中之至少兩者獨立地為精胺酸，且

AA_u (在各情況下及當存在時)、AA₁、AA₂、AA₃、AA₄及AA_z (在各情況下及當存在時)中之至少兩者獨立地為疏水性胺基酸。

【第21項】

如請求項20之化合物，其中該cCPP具有包括式IV-A至D中任一者之序列：



其中：

AA_{H1}及AA_{H2}各獨立地為D或L疏水性胺基酸；

在各情況下及當存在時，AA_u及AA_z各獨立地為D或L胺基酸；且

m及n係獨立地選自0至6之數字。

【第22項】

如請求項1至21中任一項之化合物，其中M係存在且共價鍵結至該TP之N端或該TP之C端。

【第23項】

如請求項1至22中任一項之化合物，其中M係存在且共價鍵結至該TP之N端。

【第24項】

如請求項1至23中任一項之化合物，其中M係存在且共價鍵結至TP中之胺基酸之側鏈。

【第25項】

如請求項12至24中任一項之化合物，其中u為0。

【第26項】

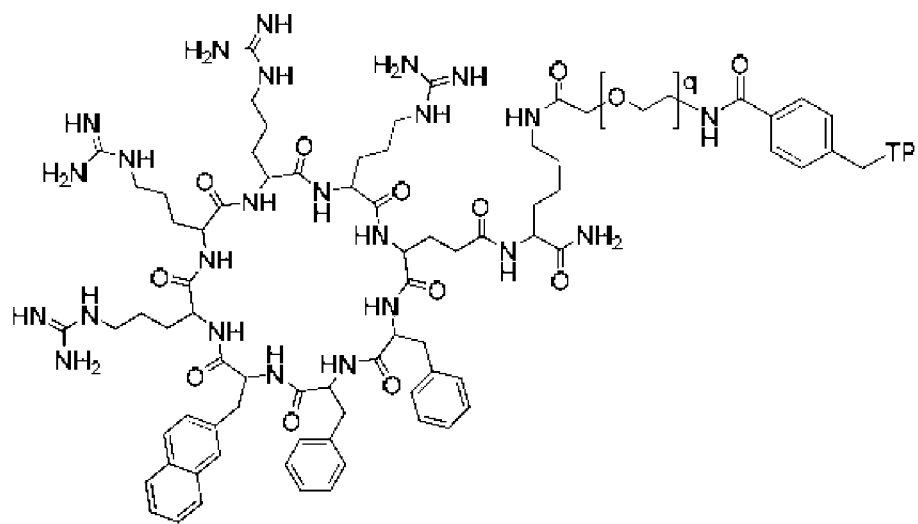
如請求項12至25中任一項之化合物，其中p為1。

【第27項】

如請求項12至26中任一項之化合物，其中q為12。

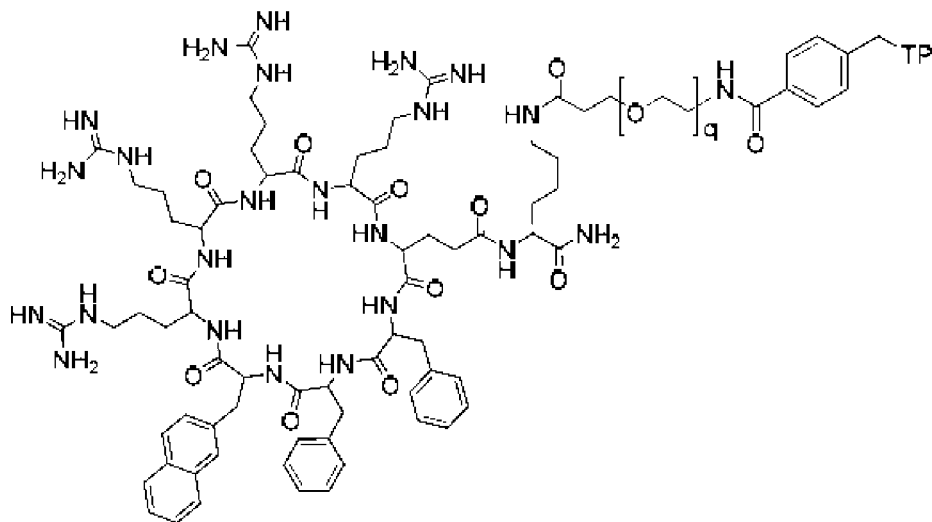
【第28項】

如請求項1至27中任一項之化合物，其中該化合物具有如式V-A1、V-A2或V-A3之結構：

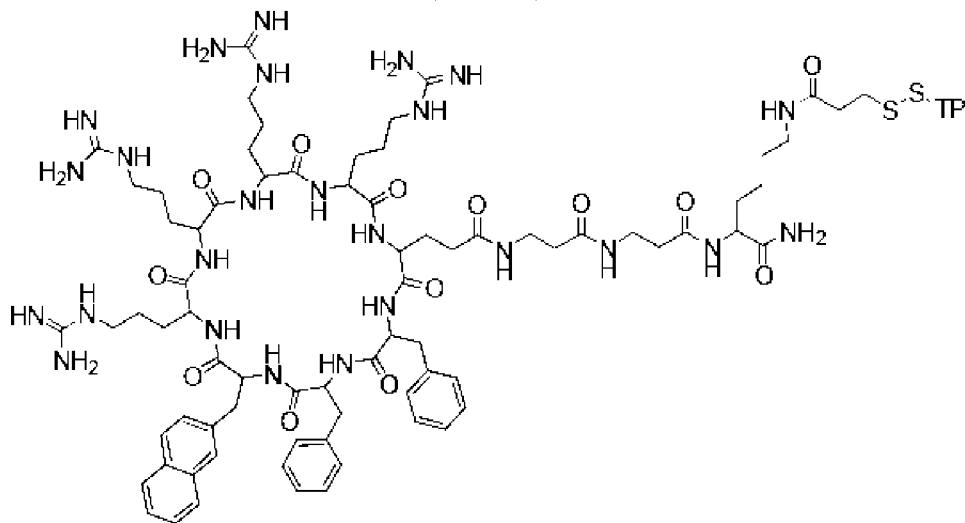


(V-A1)

或



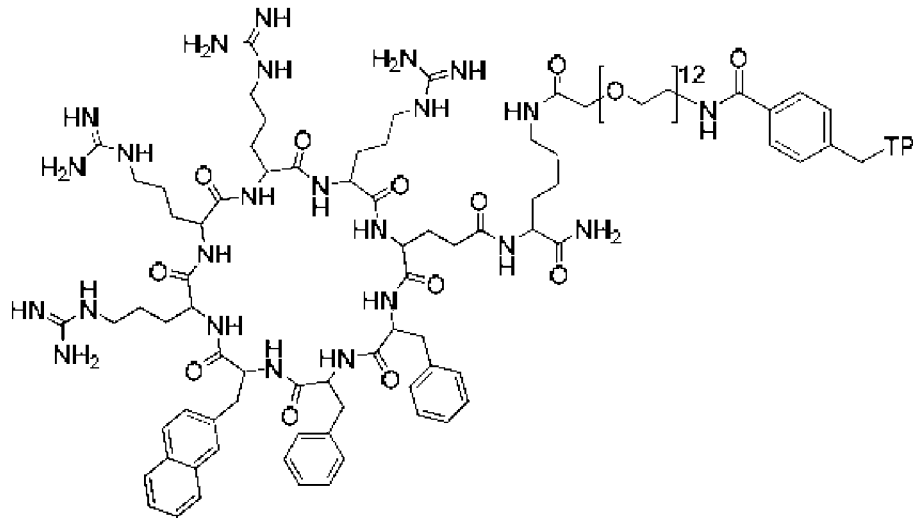
(V-A2)



(V-A3)

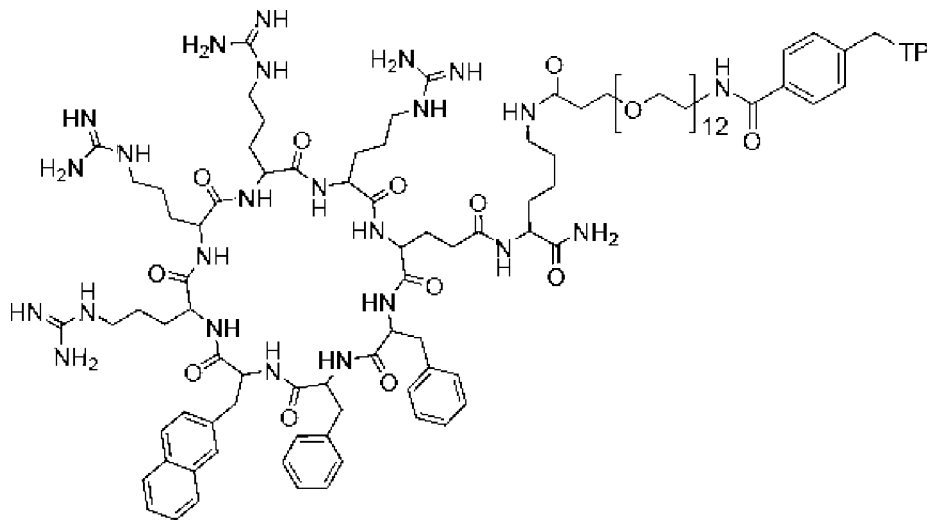
【第29項】

如請求項1至28中任一項之化合物，其具有如式V-B1或V-B2之結構：



(V-B1)

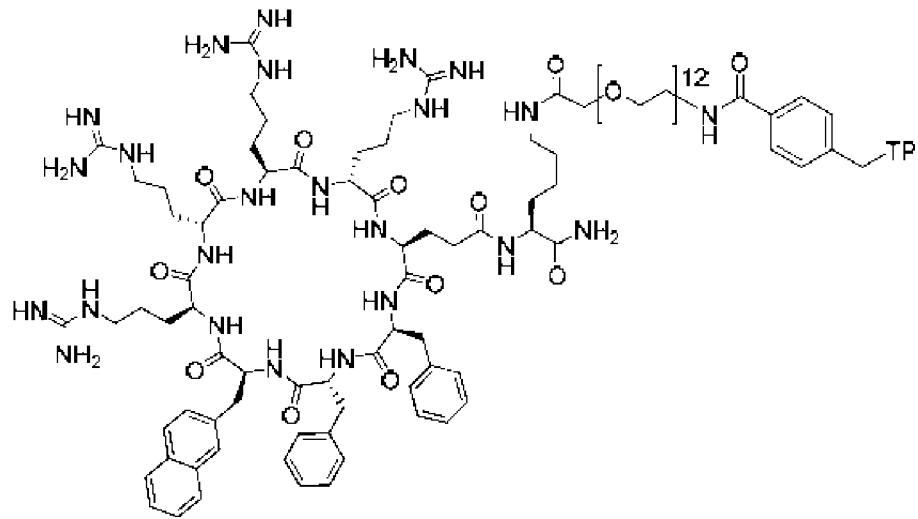
或



(V-B2)

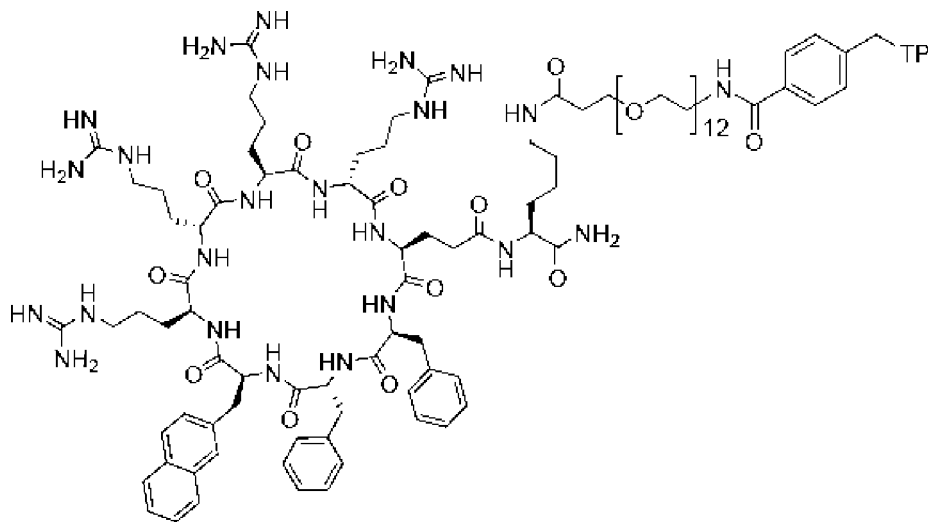
【第30項】

如請求項1至29中任一項之化合物，其具有如式V-B3或V-B4之結構：



(V-B3)

或



(V-B4)

【第31項】

如請求項1至30中任一項之化合物，其中該TP具有與SEQ ID NO. 1至少95%同一性之胺基酸序列。

【第32項】

如請求項1至31中任一項之化合物，其中TP具有與SEQ ID NO. 2至少95%同一性之胺基酸序列。

【第33項】

如請求項1至32中任一項之化合物，其中TP具有與SEQ ID NO. 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13至少95%同一性之胺基酸序列。

【第34項】

如請求項1至33中任一項之化合物，其中TP具有與SEQ ID NO. 3至少95%同一性之胺基酸序列。

【第35項】

如請求項1至34中任一項之化合物，其另包括與TP結合之水溶性聚合物。

【第36項】

如請求項35之化合物，其中該水溶性聚合物包含聚乙二醇(PEG)殘基。

【第37項】

如請求項36之化合物，其中該PEG殘基具有約1 kDa至約100 kDa範圍之分子量。

【第38項】

如請求項36之化合物，其中該PEG殘基具有約1 kDa至約20 kDa範圍之分子量。

【第39項】

如請求項38之化合物，其中該PEG殘基具有約10 kDa之分子量。

【第40項】

一種治療有需要患者之粒線體性神經胃腸腦病變之方法，其包括投與如請求項1至39中任一項之化合物。

【第41項】

一種為有需要患者降低細胞外及細胞內胸苷含量的方法，其包括投與如請求項1至39中任一項之化合物。

【第42項】

如請求項41之方法，其用於治療粒線體性神經胃腸腦病變。

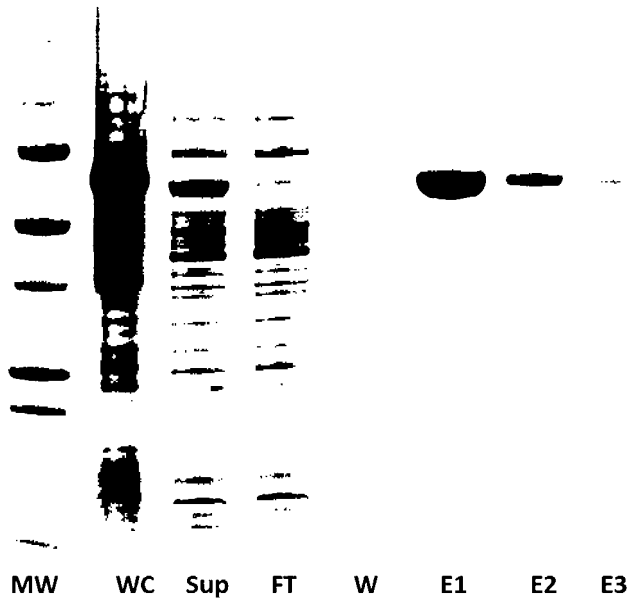
【第43項】

一種細胞，其包含如請求項1至41中任一項之化合物。

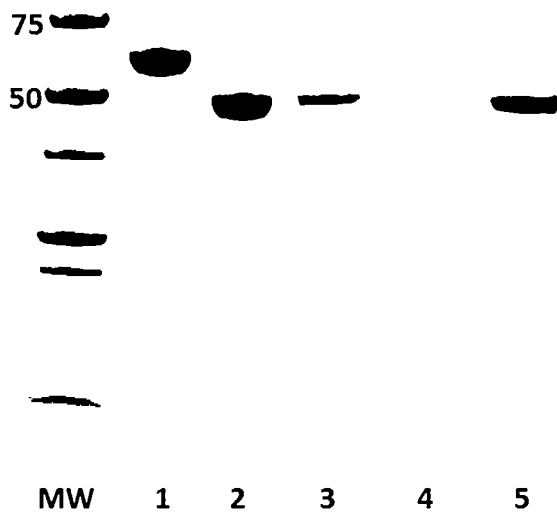
【第44項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至41中任一項之化合物。

【發明圖式】

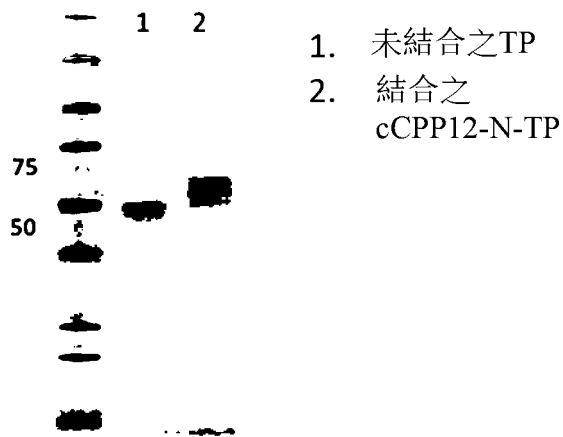


【圖1A】



1. 在蛋白酶裂解之前
2. 於蛋白酶裂解後
3. 自HisTrap管柱流過
4. 自HisTrap管柱溶離
5. 於透析後濃縮之TP

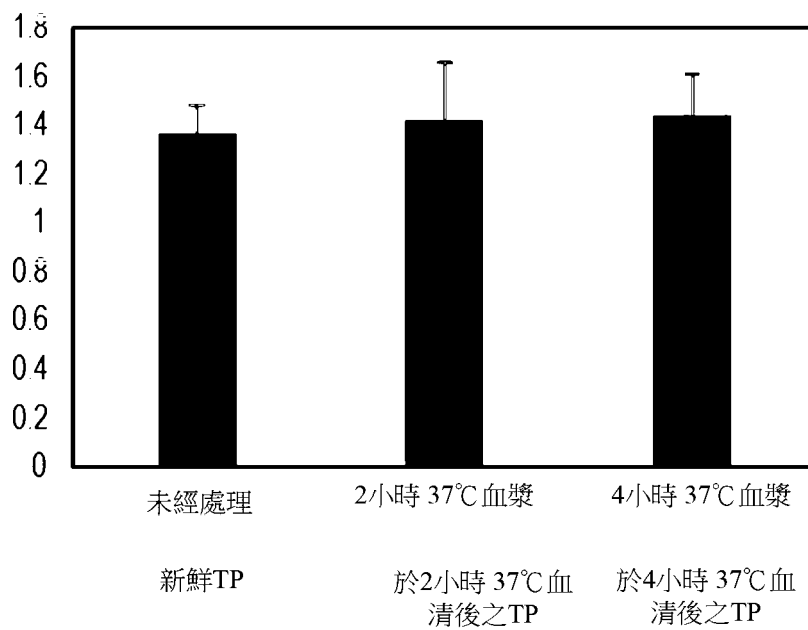
【圖1B】



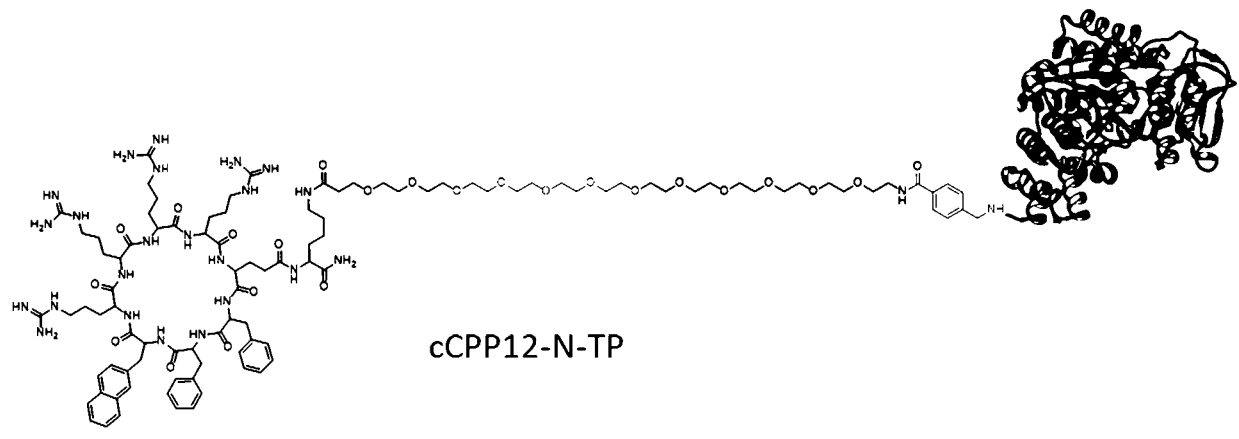
【圖2A】

酵素穩定性

40 nM TP之酵素活性(S⁻¹)

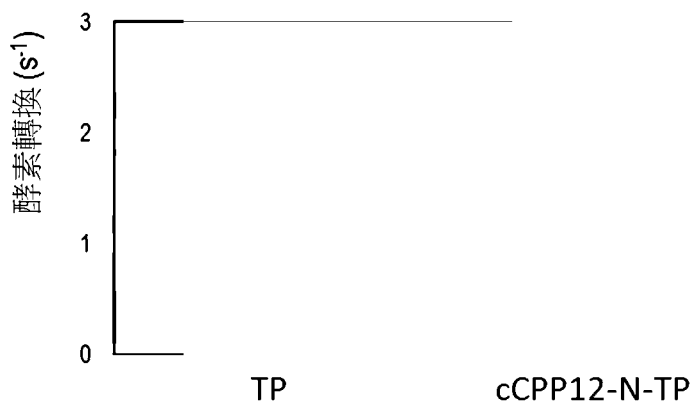


【圖2B】

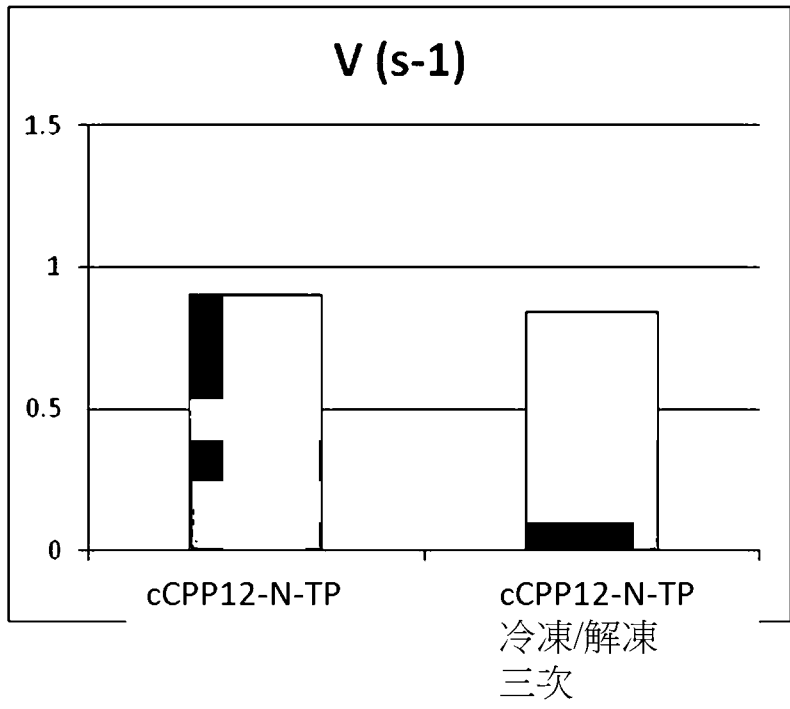


【圖3】

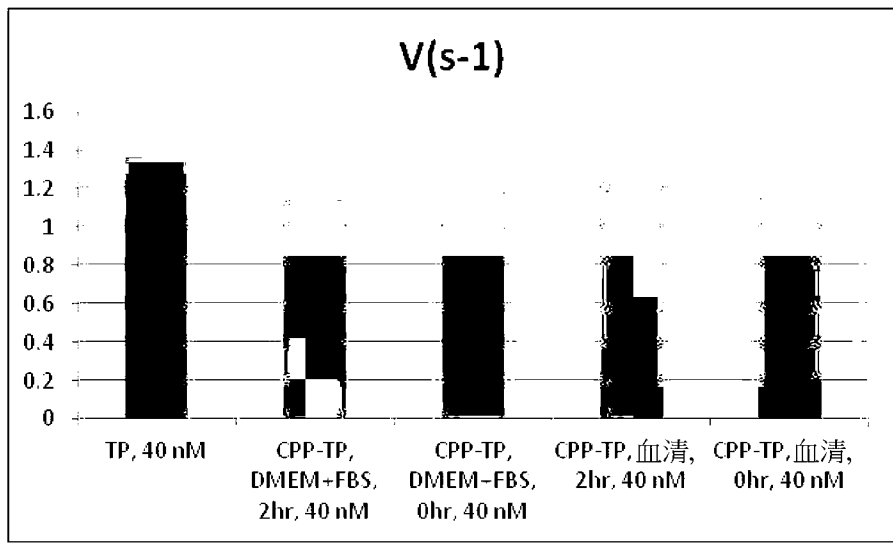
比較40 nM TP與CPP-TP之
酵素活性



【圖4A】



【圖4B】



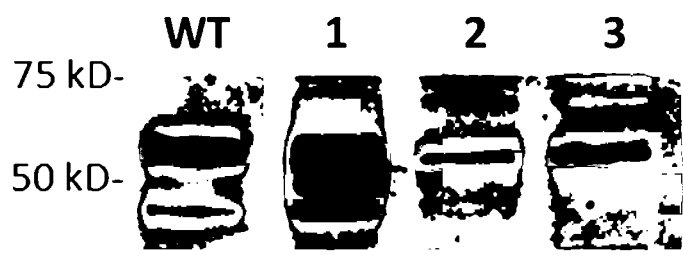
【圖4C】



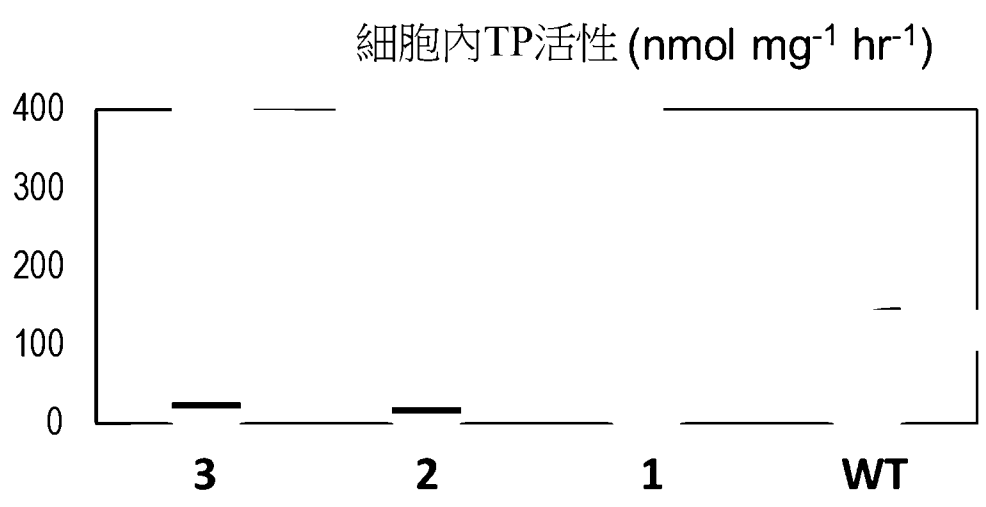
泳道：

1. TP-Alexa568 0 hr
2. TP-Alexa568 2 hr
3. TP-Alexa568 12 hr
4. TP-Alexa568 24 hr
5. CP-N-TP-Alexa568 0 hr
6. CP-N-TP-Alexa568 2 hr
7. CP-N-TP-Alexa568 12 hr
8. CP-N-TP-Alexa568 24 hr

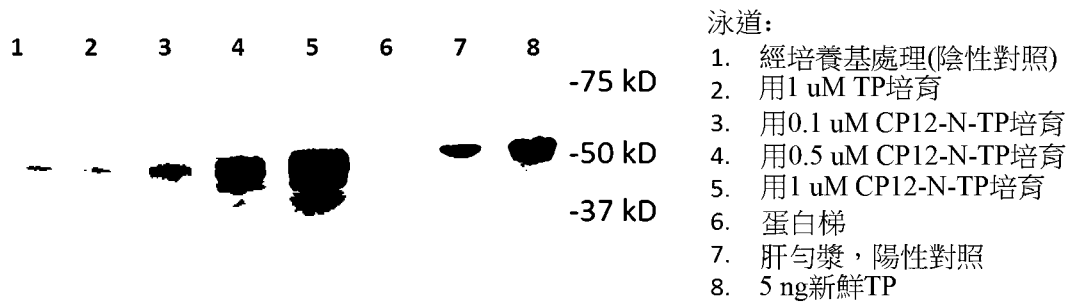
【圖5】



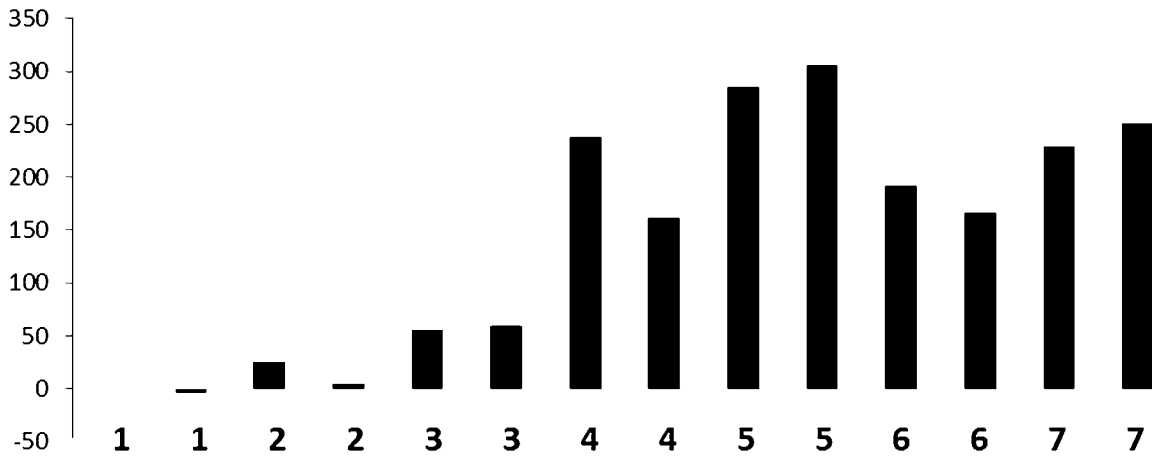
【圖6A】



【圖6B】

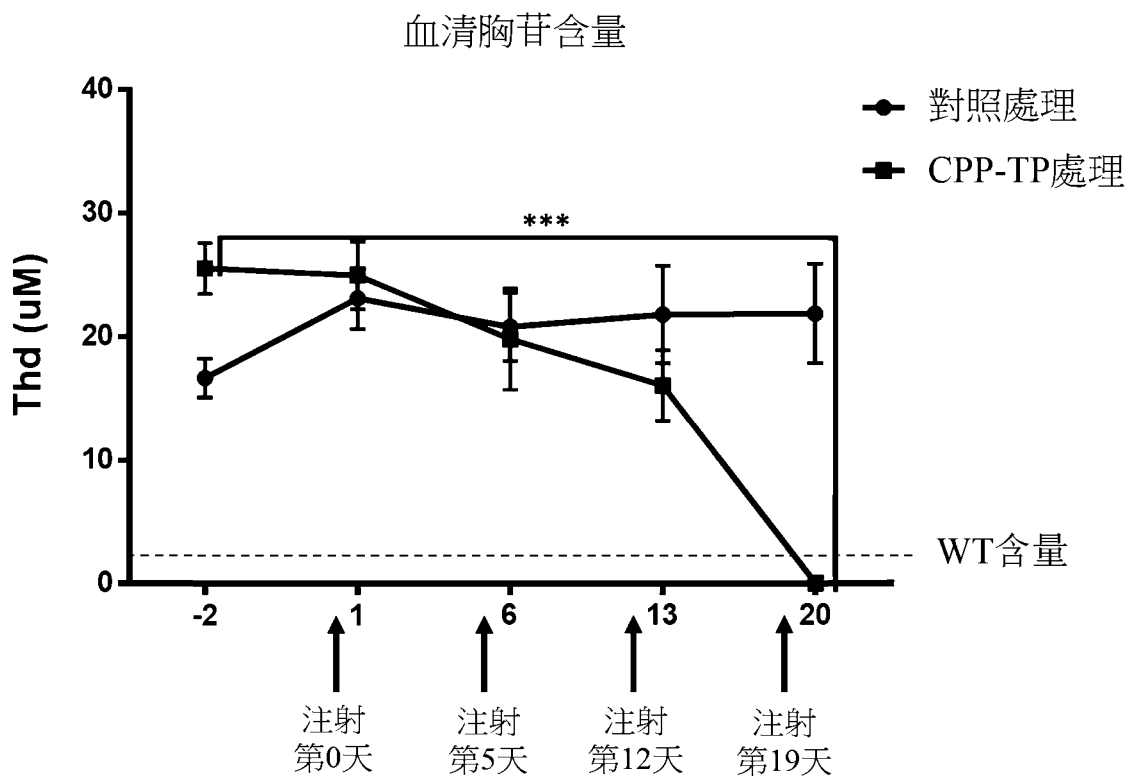


【圖7】



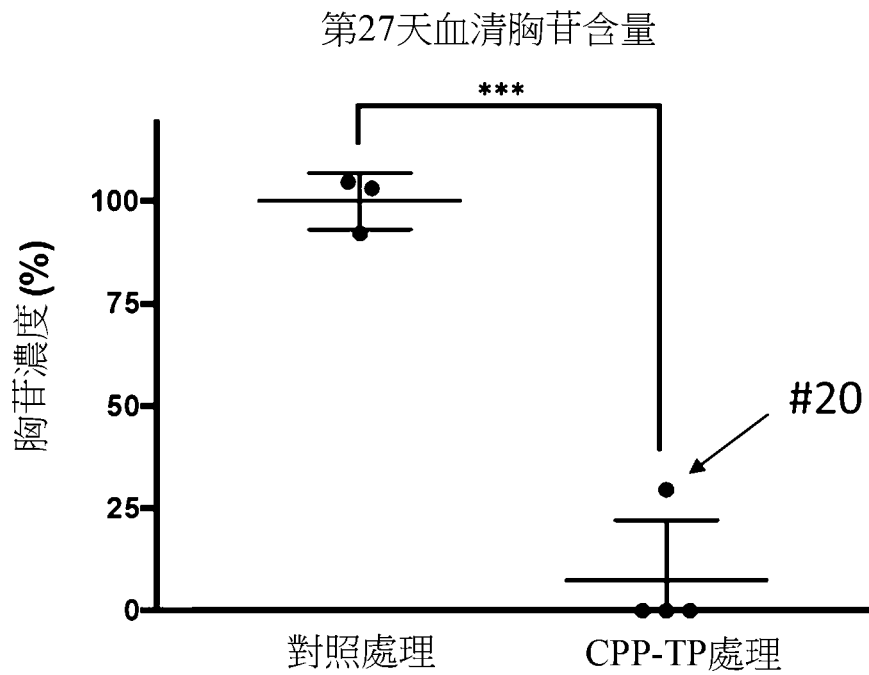
1. 經培養基處理(陰性對照)
2. 用1 uM TP11培育
3. 用0.1 uM cCPP12-N-TP11培育
4. 用0.5 uM cCPP12-N-TP11培育
5. 用1 uM cCPP12-N-TP11培育
6. 用1 μM cCPP12-N-TP11培育但是用胞質裂解緩衝液裂解
7. 20 nM新鮮cCPP12-N-TP11

【圖8】



在第0天及第5天7.5 mpk處理，及第12天及第19天20 mpk處理
單因子ANOVA，利用Geisser-Greenhouse校正。*** p < 0.0001

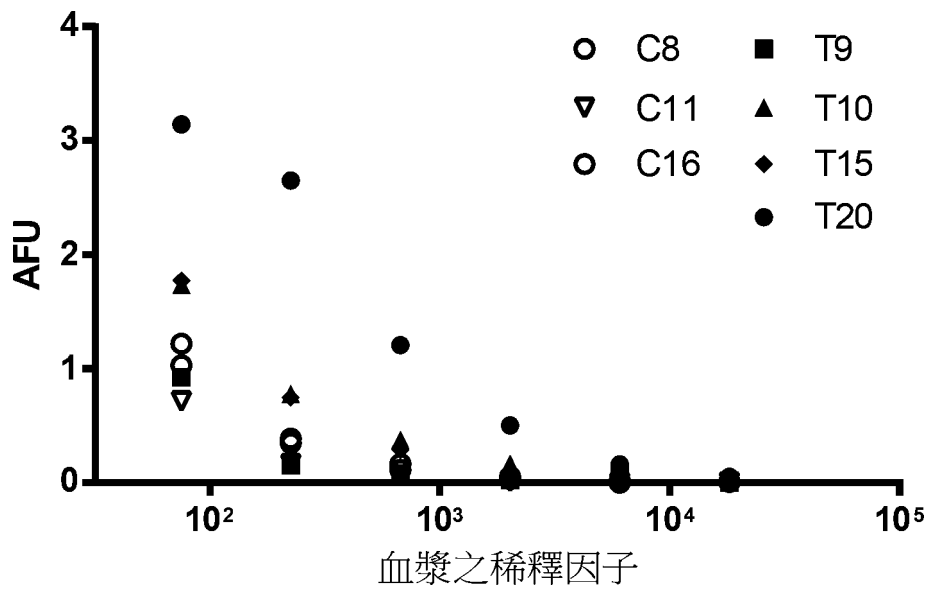
【圖9】



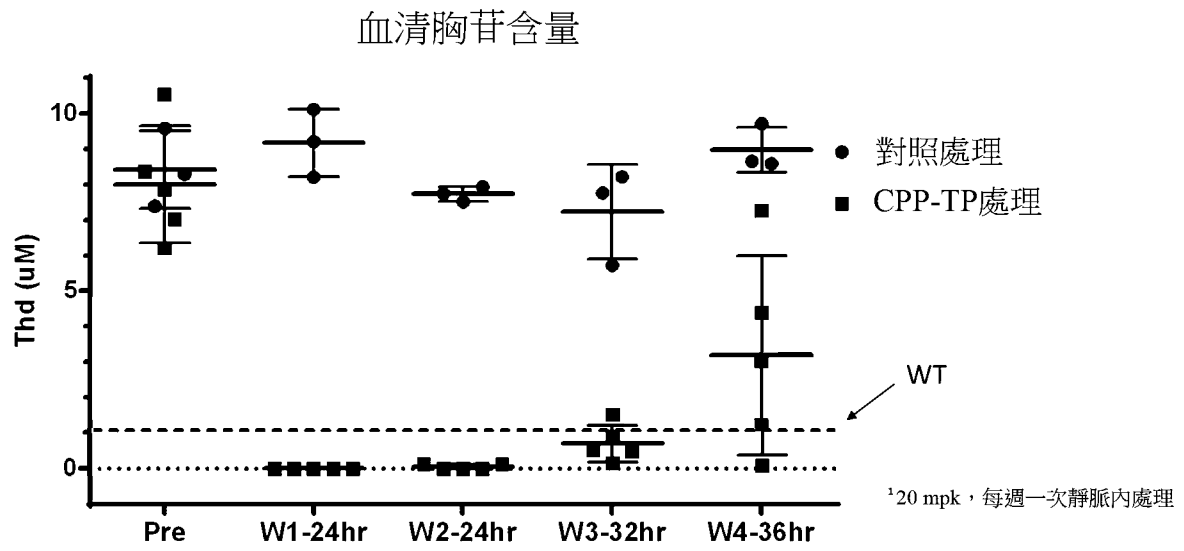
¹ 在第26天20 mpk處理
學生t檢驗。 *** p < 0.0001

【圖10A】

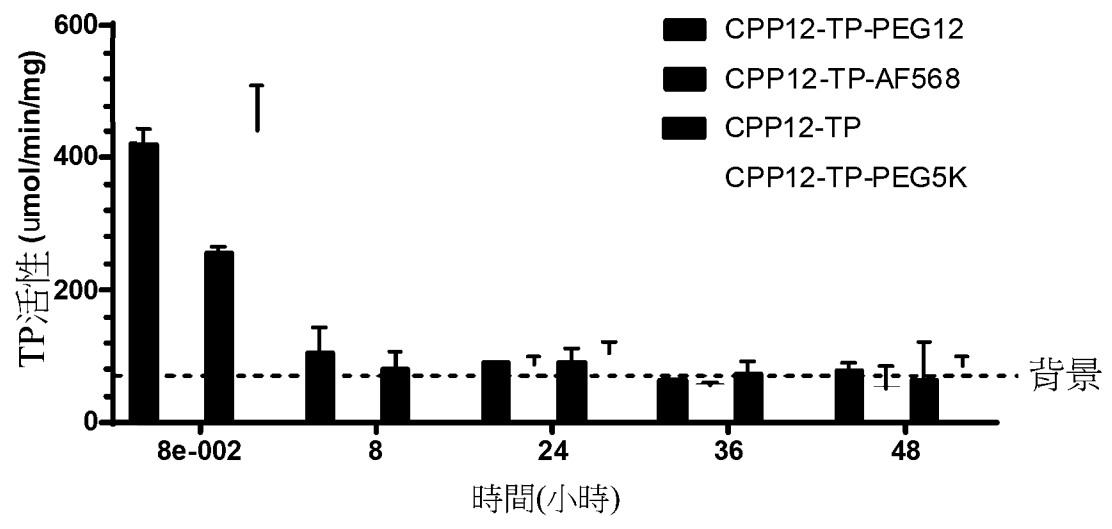
藉由ELISA檢測抗CPP-TP抗體



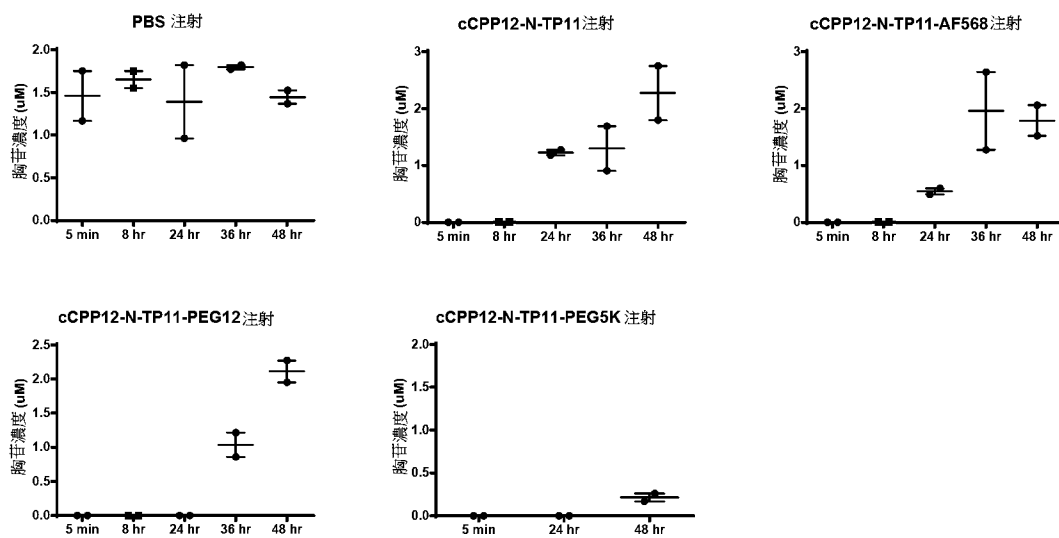
【圖10B】



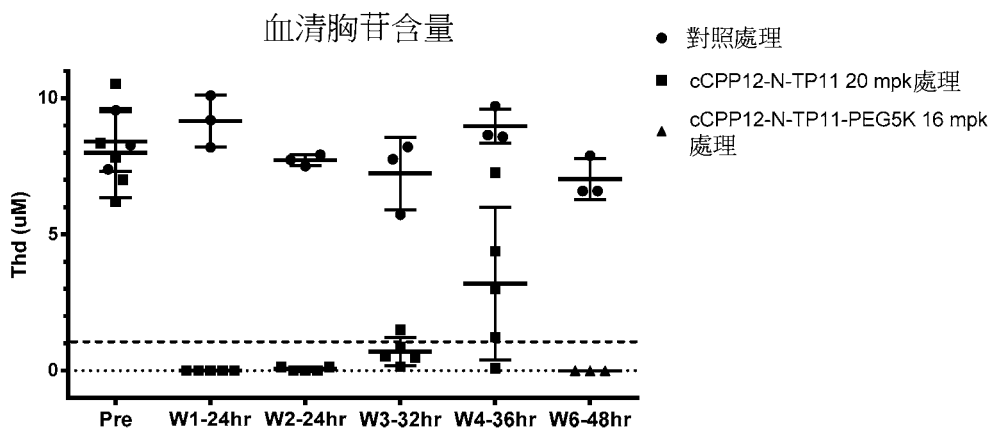
【圖11】



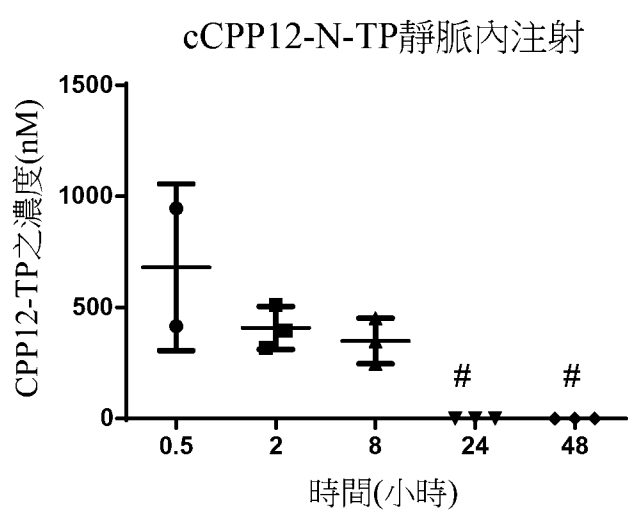
【圖12】



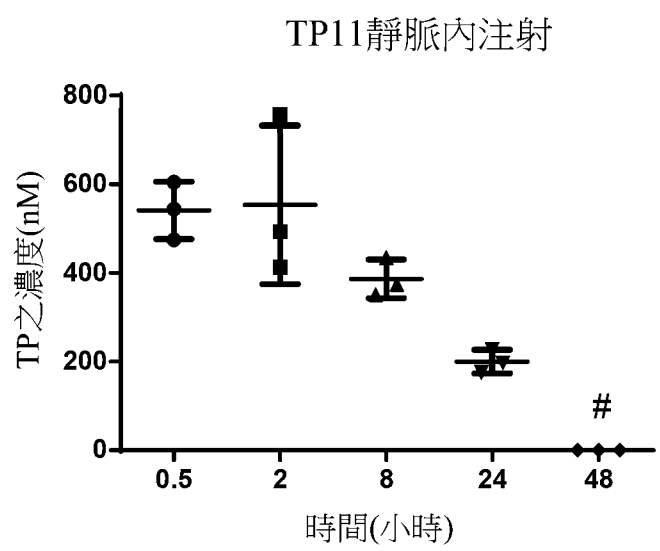
【圖13】



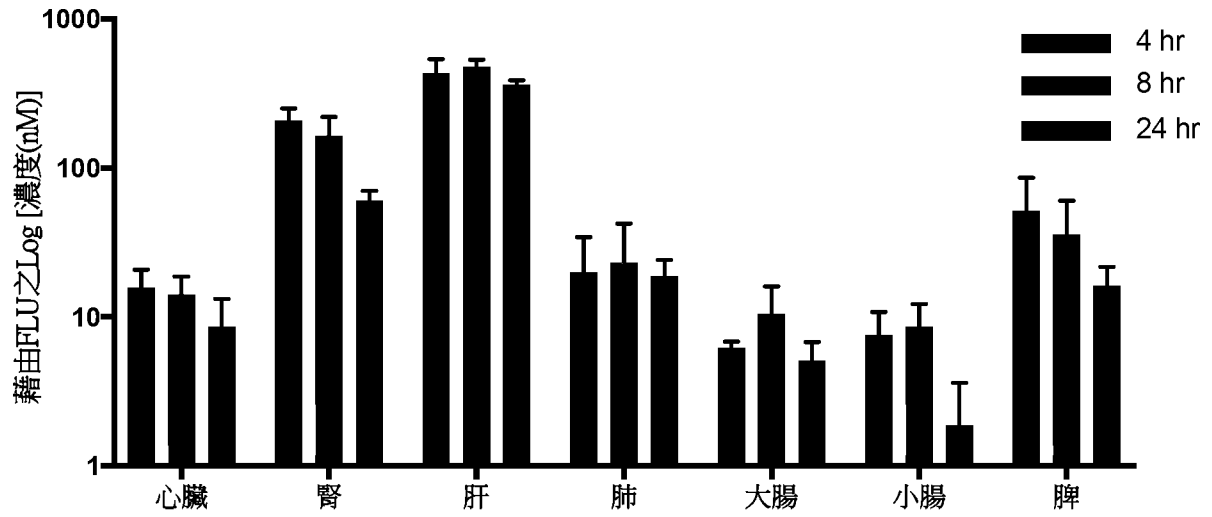
【圖14】



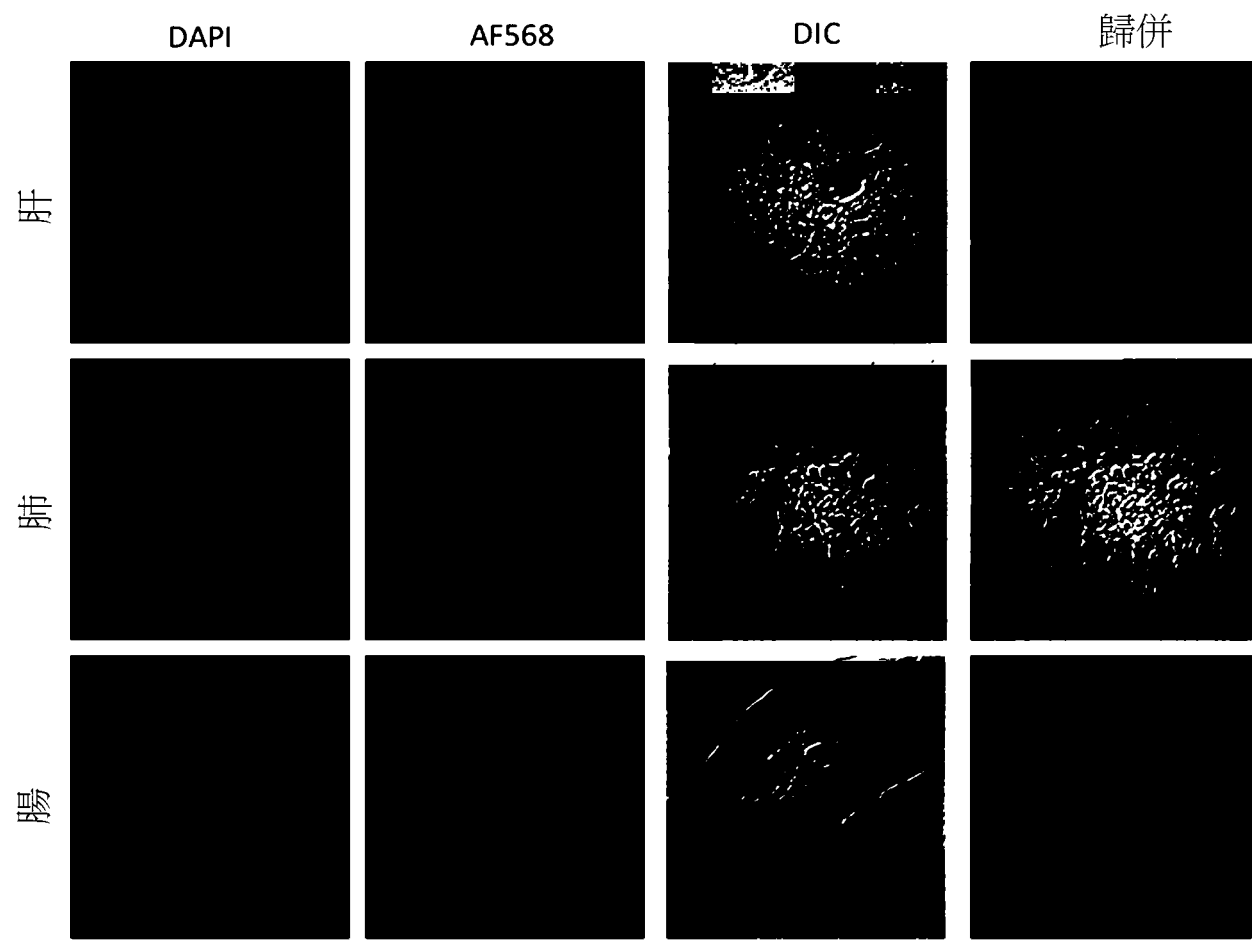
【圖15A】



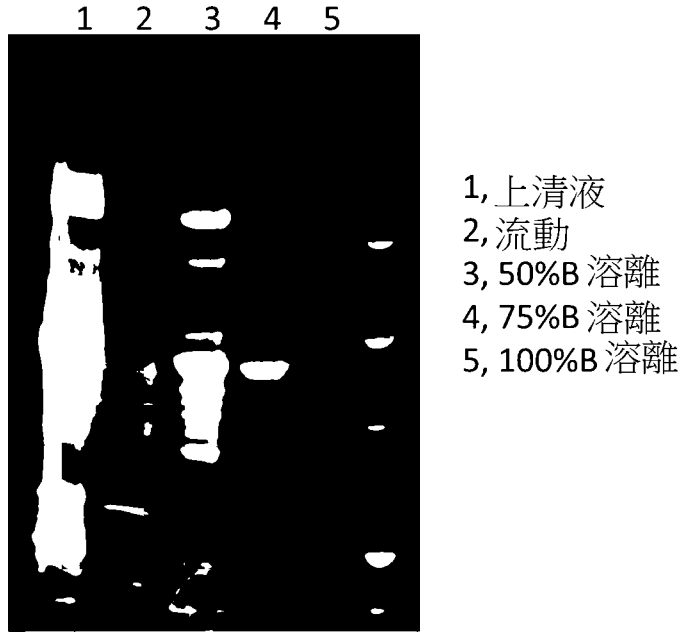
【圖15B】



【圖16A】



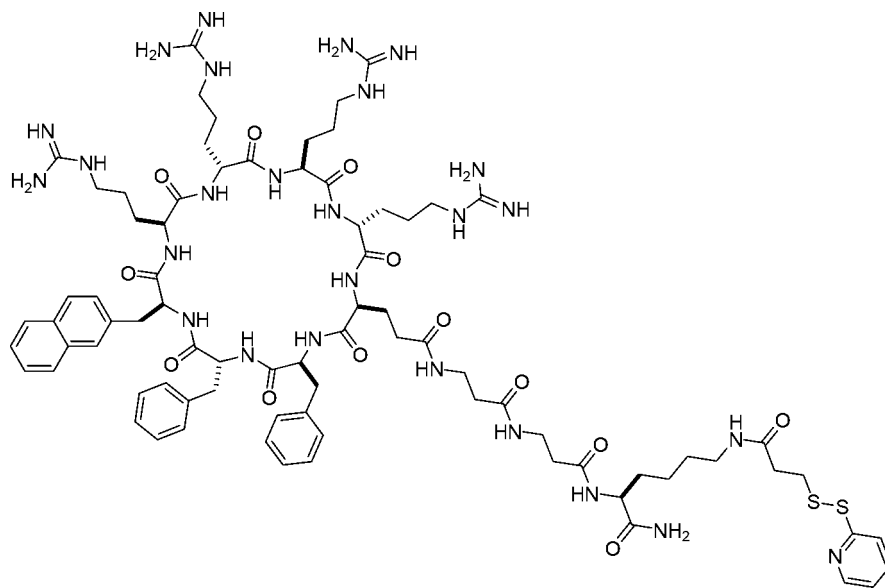
【圖16B】



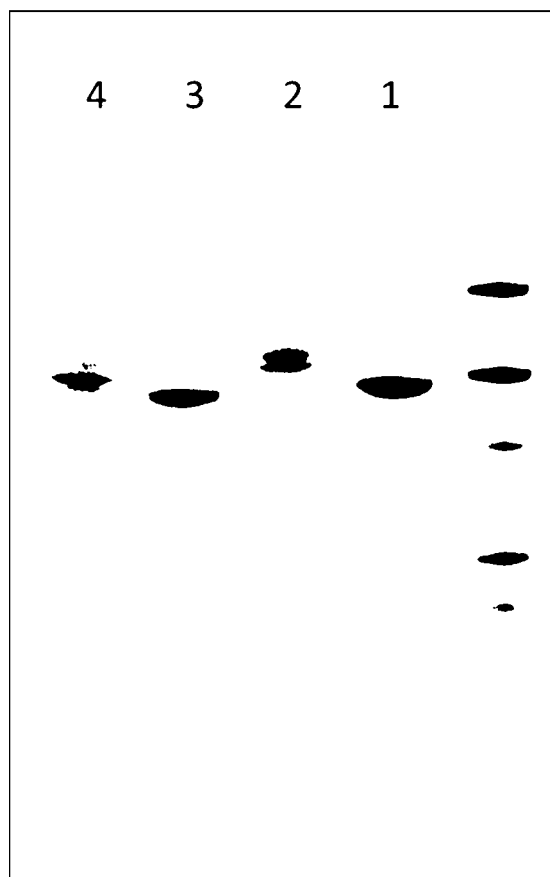
【圖17A】



【圖17B】

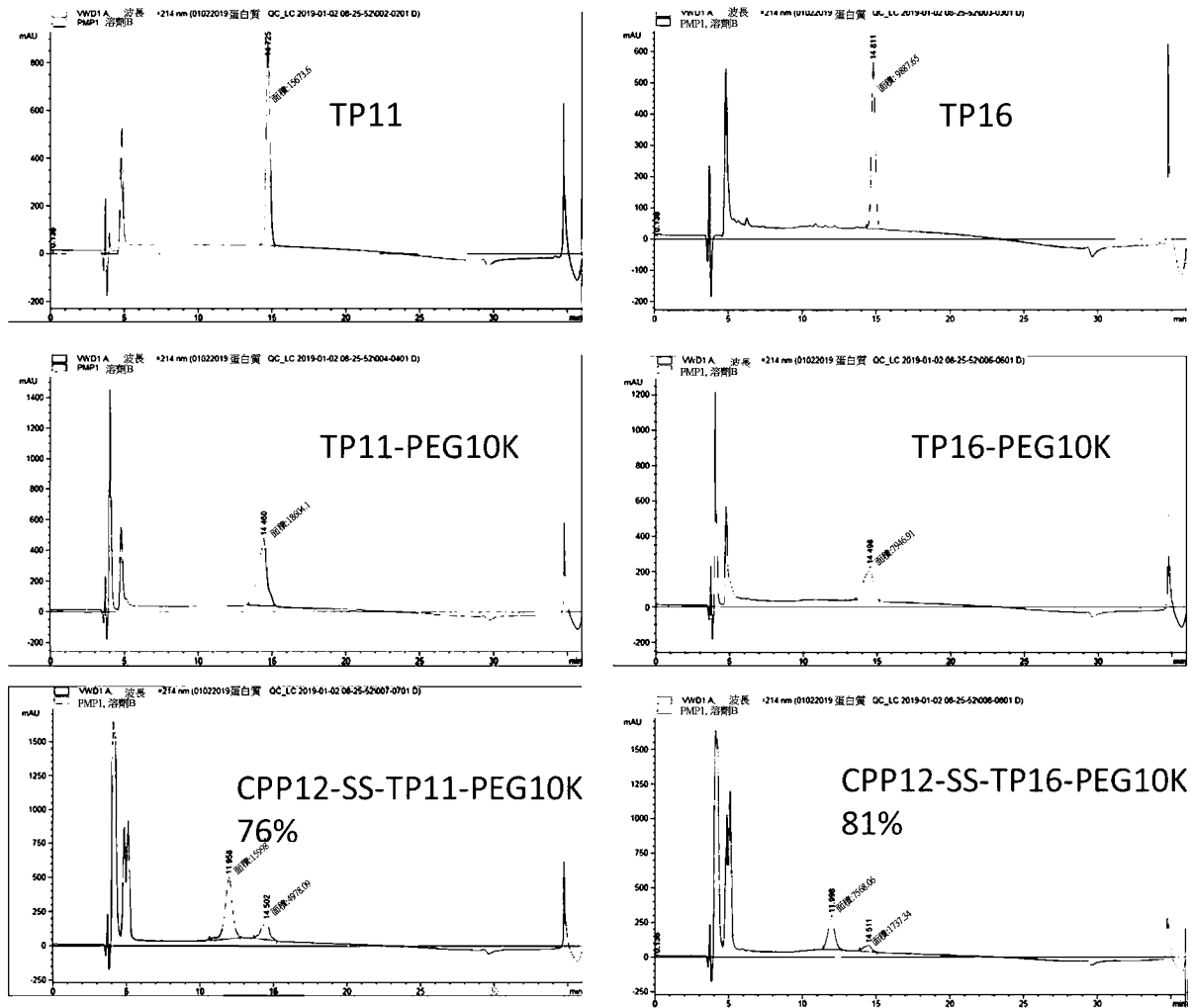


【圖18】

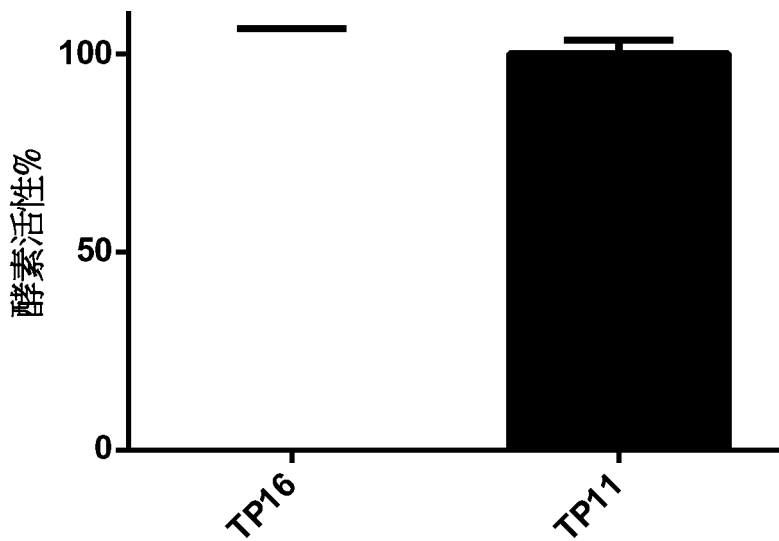


1. TP11
2. cCPP12-N-TP11
3. TP16
4. cCPP12-N-TP16

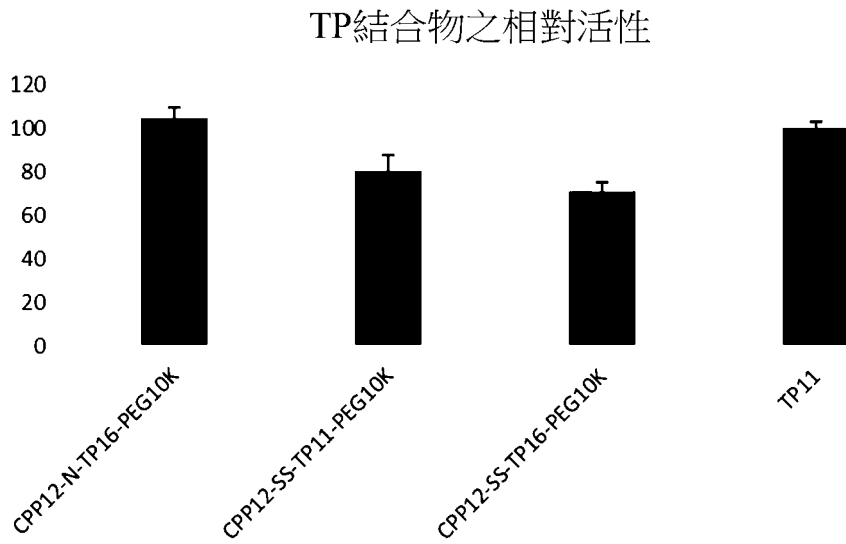
【圖19】



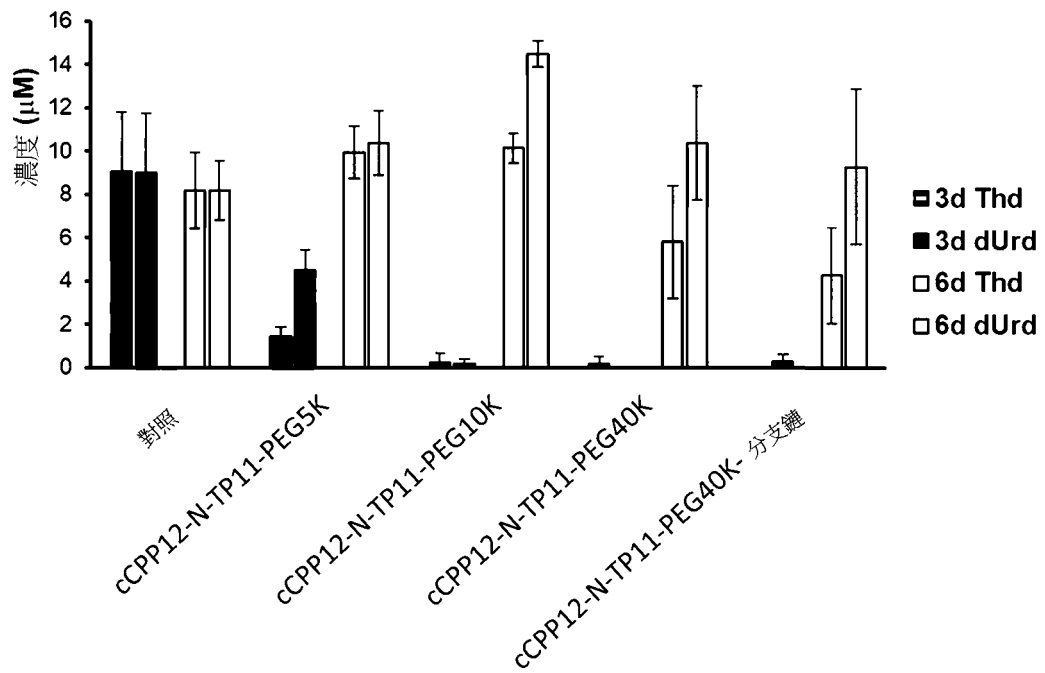
【圖20】



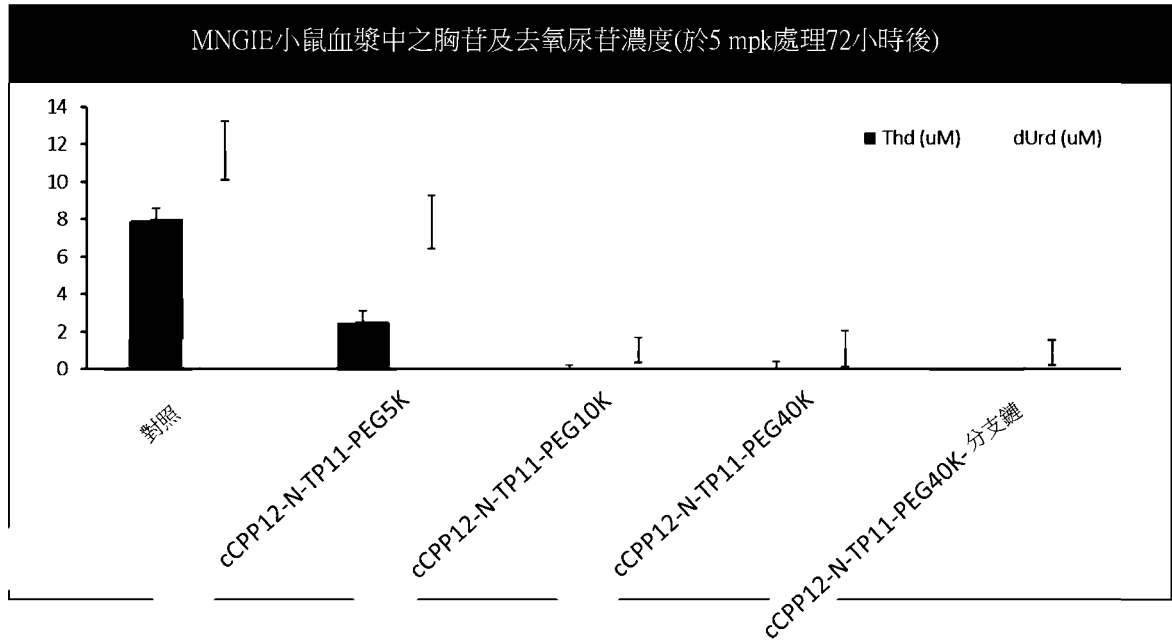
【圖21】



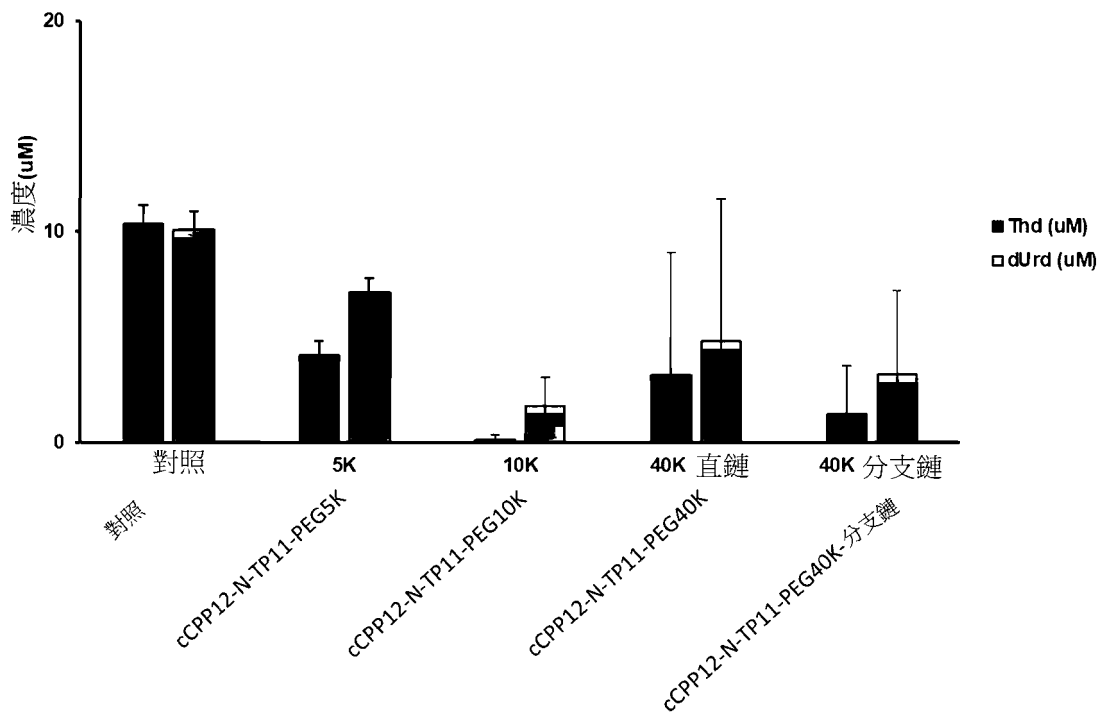
【圖22】



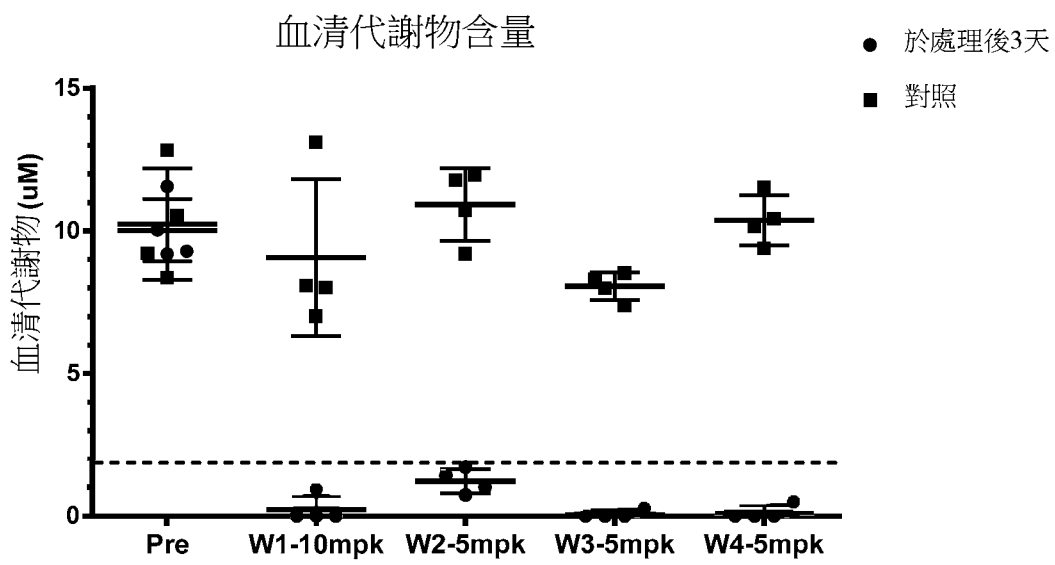
【圖23】



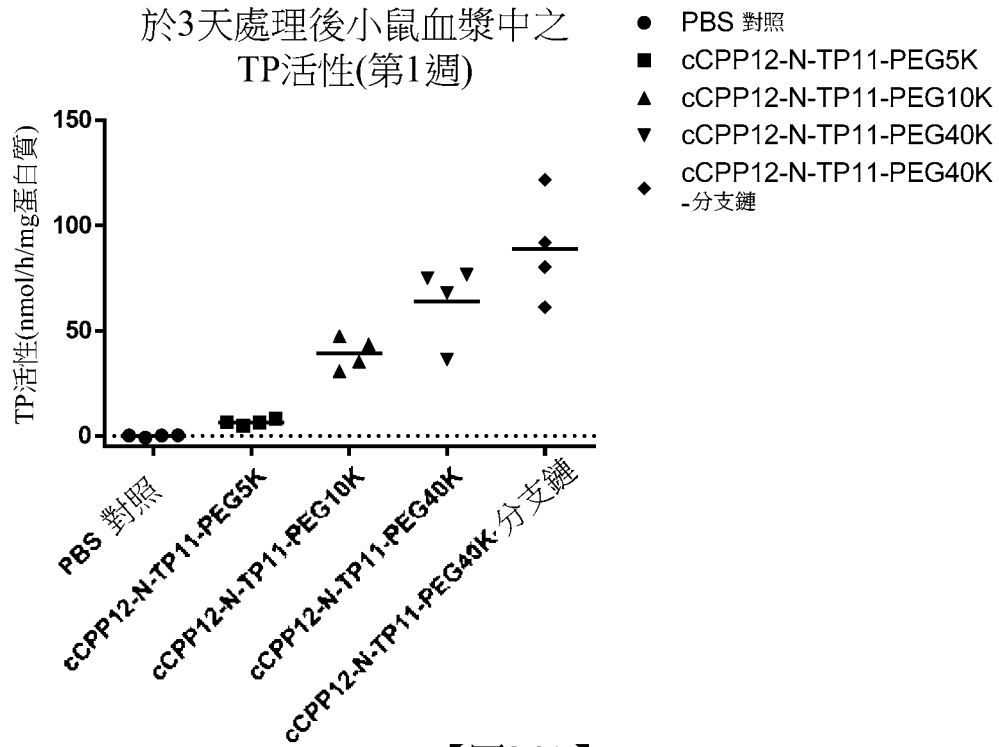
【圖24A】



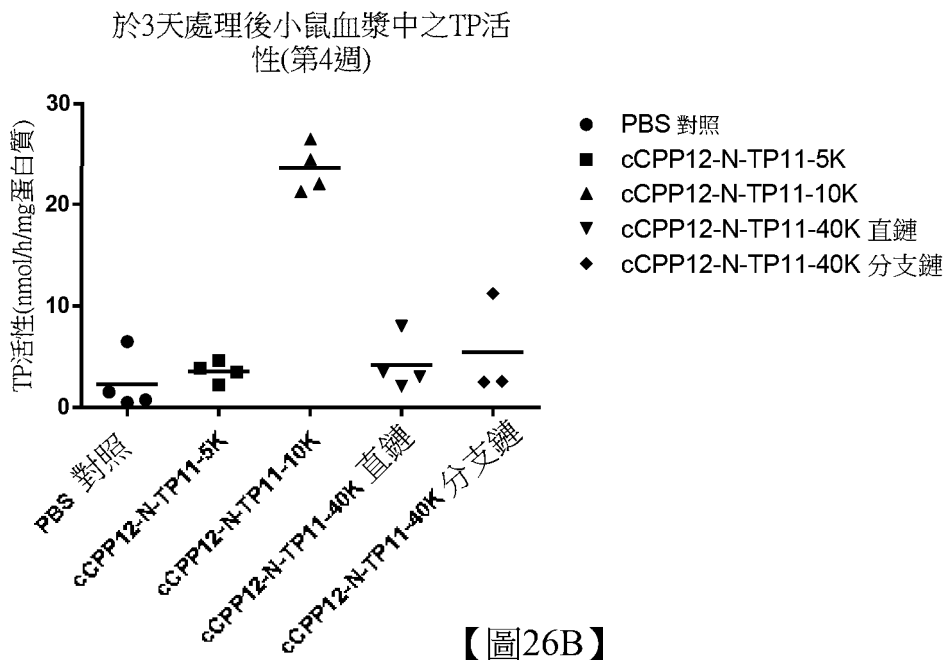
【圖24B】



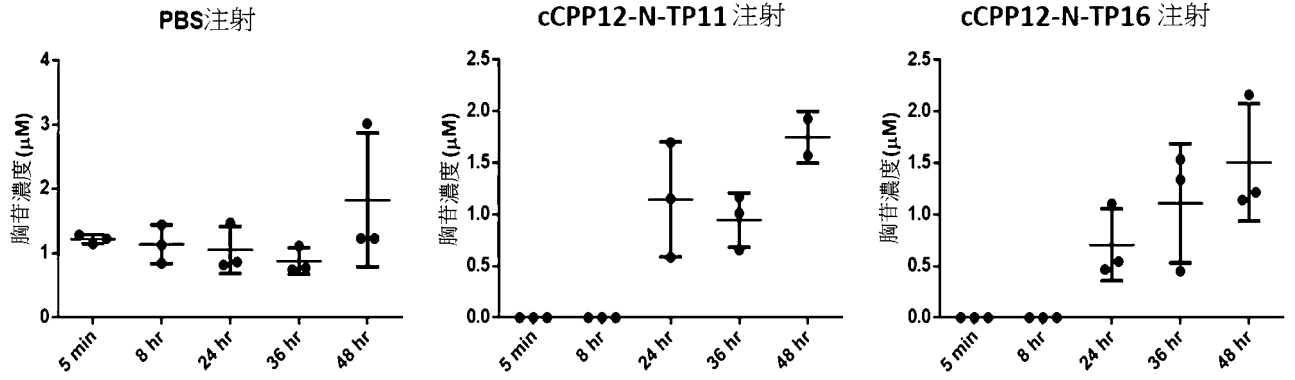
【圖25】



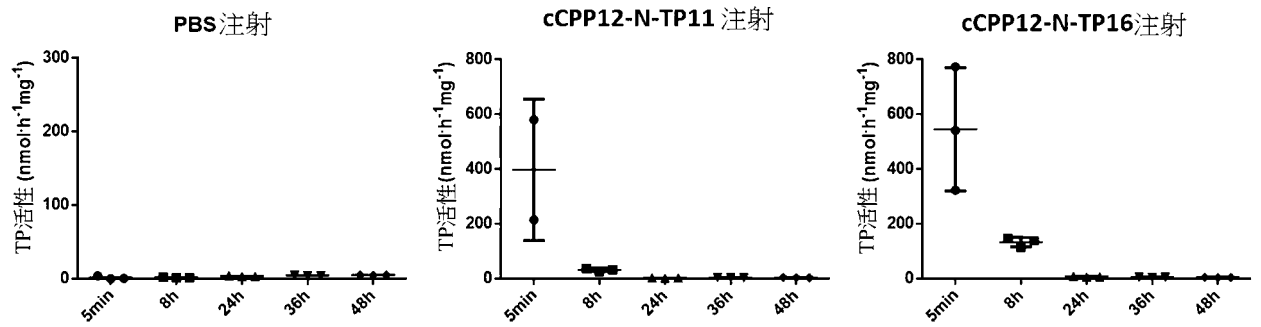
【圖26A】



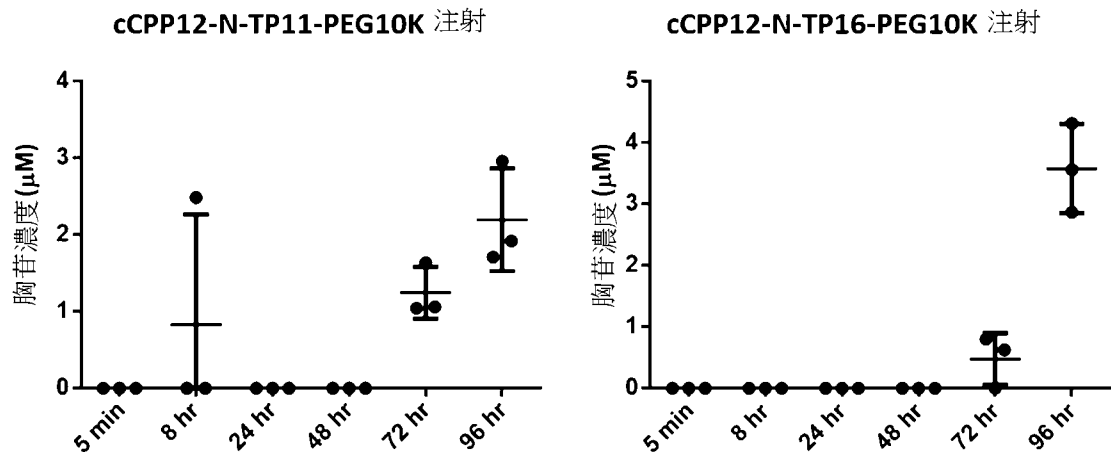
【圖26B】



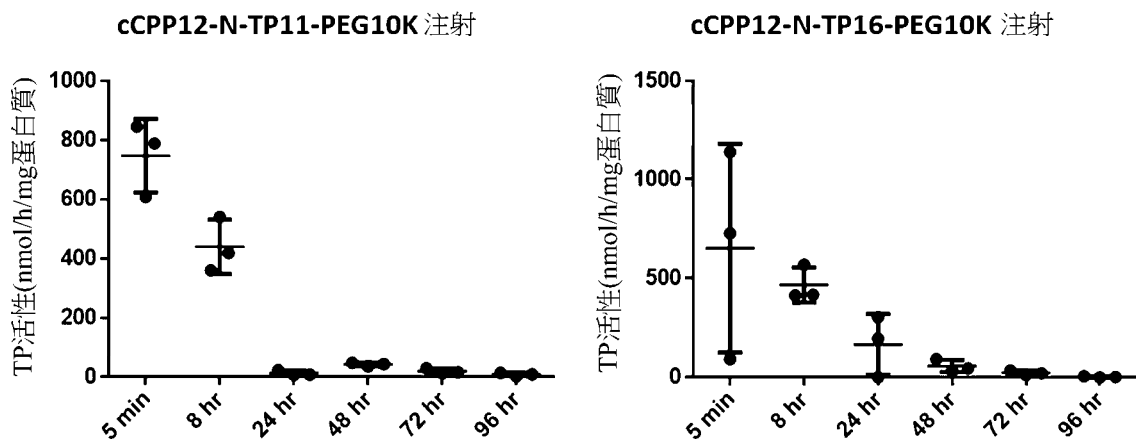
【圖27A】



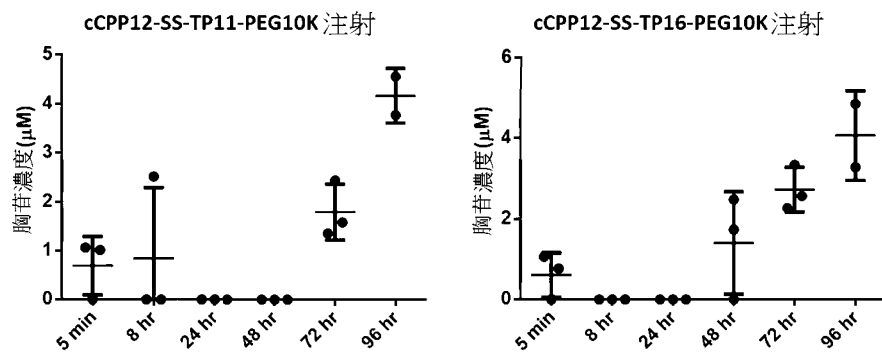
【圖27B】



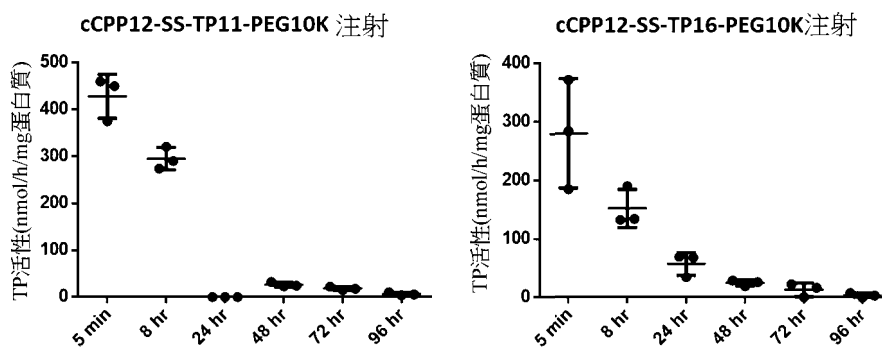
【圖28A】



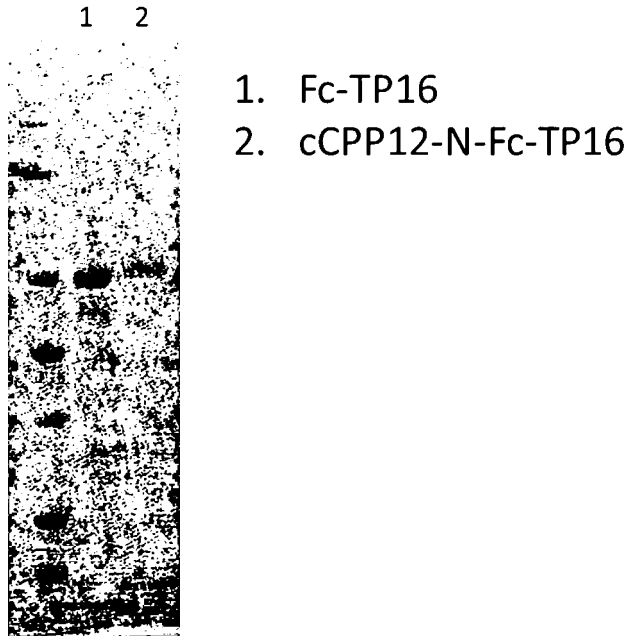
【圖28B】



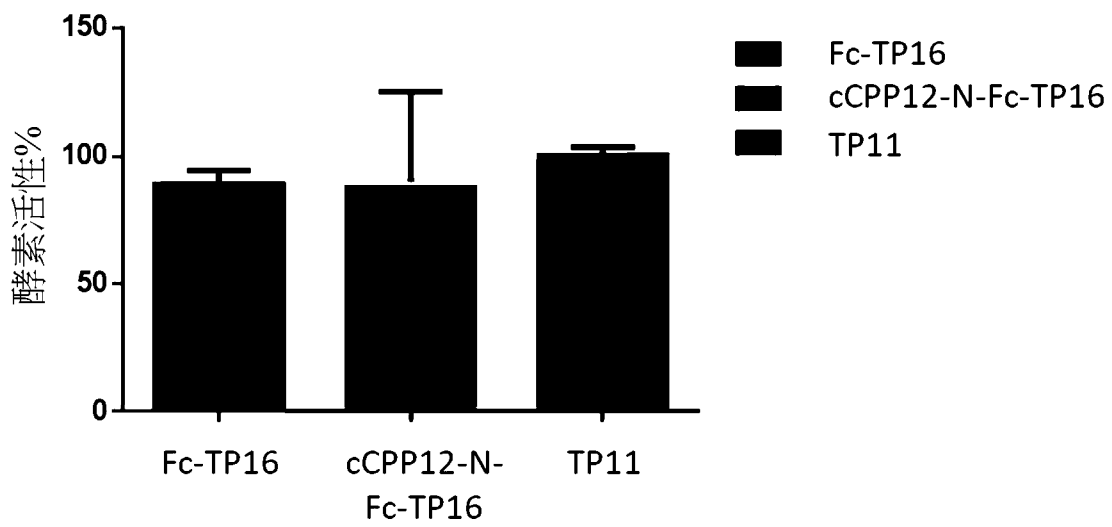
【圖29A】



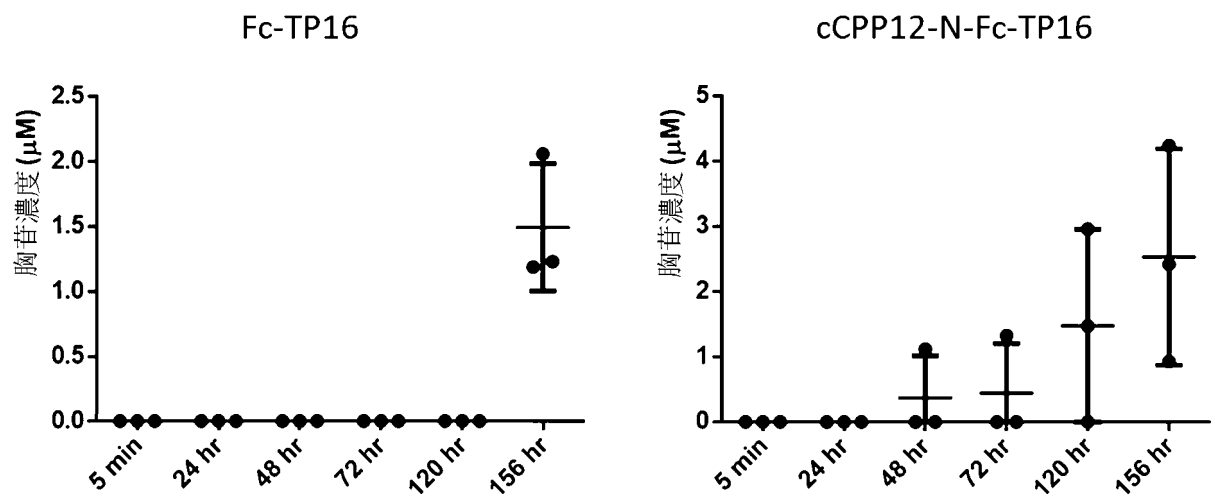
【圖29B】



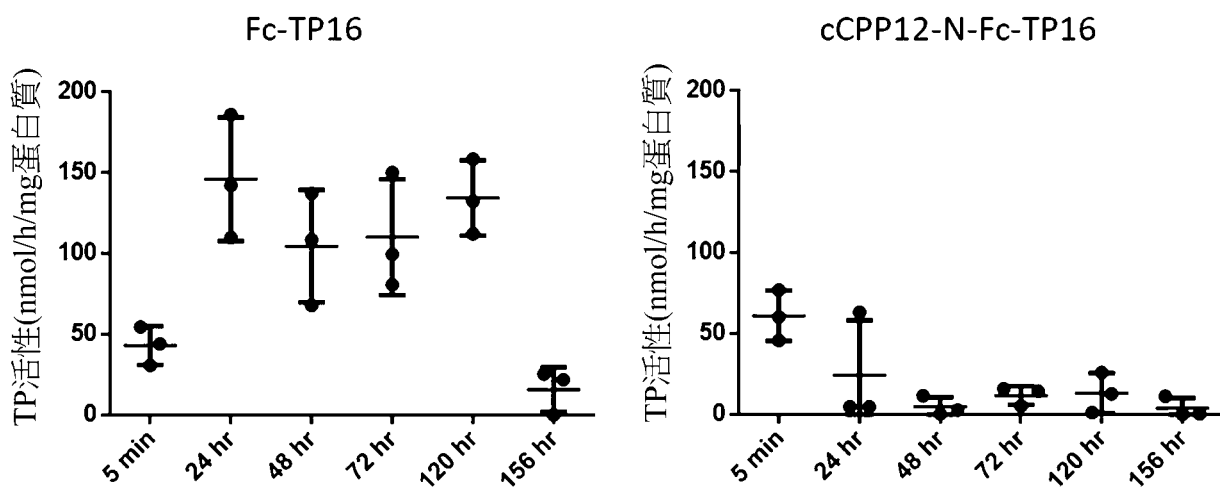
【圖30】



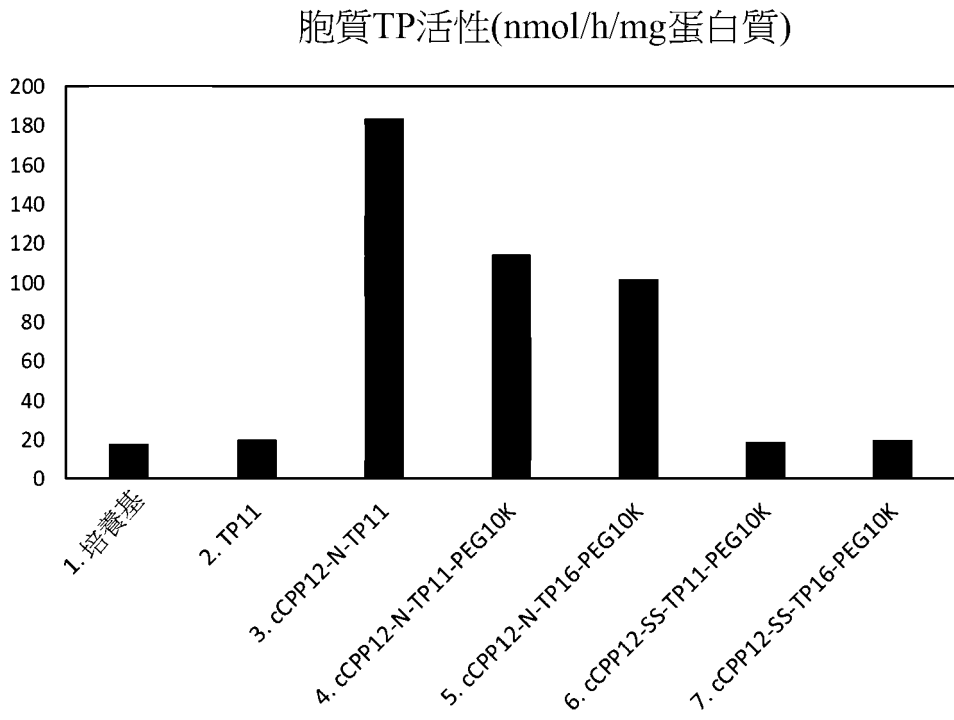
【圖31】



【圖32】



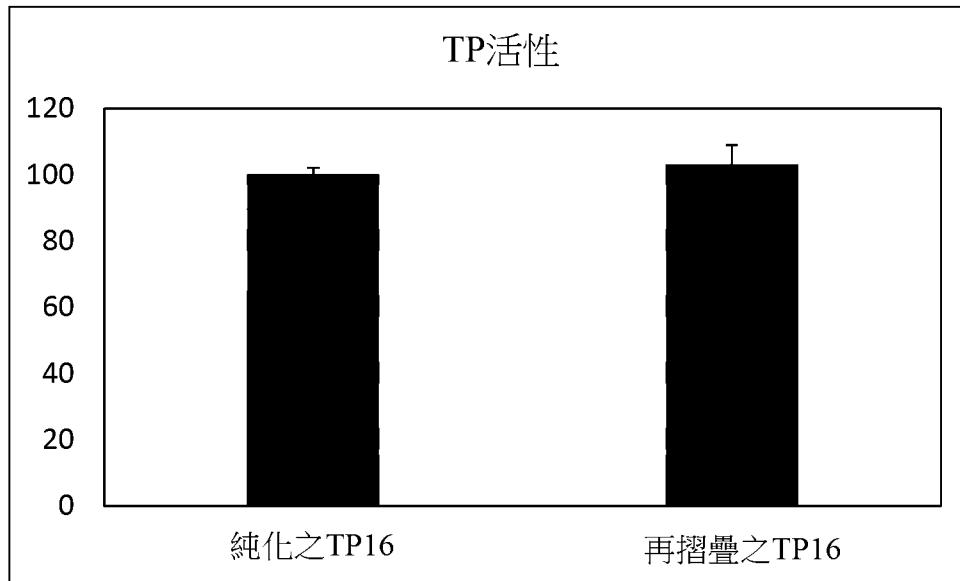
【圖33】



【圖34】



【圖35】



【圖36】

【序列表】

<110> 美商安卓達治療股份有限公司

<120> 用於治療粒線體性神經胃腸腦病變之組合物及方法

<130> CYPT-014/02WO 329395-2059

<140> PCT/US2019/019117

<141> 2019-02-22

<150> US 62/796,823

<151> 2019-01-25

<150> US 62/633,933

<151> 2018-02-22

<160> 127

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 482

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Ala Leu Met Thr Pro Gly Thr Gly Ala Pro Pro Ala Pro Gly
1 5 10 15

Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro Glu
20 25 30

Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly Arg
35 40 45

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

Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg Leu
65 70 75 80

Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu Ala
85 90 95

Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln Leu
100 105 110

Val Asp Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu Val
115 120 125

Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile Ser
130 135 140

錠 1 顆(暖槽裂)

Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser
 145 150 155 160
 Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu
 165 170 175
 Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val
 180 185 190
 Pro Ala Asp Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr Val
 195 200 205
 Asp Ser Leu Pro Leu Ile Thr Ala Scr Ile Leu Ser Lys Lys Leu Val
 210 215 220
 Glu Gly Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala
 225 230 235 240
 Val Phe Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val
 245 250 255
 Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala
 260 265 270
 Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu
 275 280 285
 Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp
 290 295 300
 Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala
 305 310 315 320
 Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp
 325 330 335
 Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val
 340 345 350
 Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg
 355 360 365
 Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro
 370 375 380
 Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val
 385 390 395 400
 Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg
 405 410 415

Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala
305 310 315 320

Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp
325 330 335

Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val
340 345 350

Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg
355 360 365

Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro
370 375 380

Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val
385 390 395 400

Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg
405 410 415

Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg
420 425 430

Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser
435 440 445

Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg
450 455 460

Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro
465 470 475 480

Gln Gln

<210> 2
<211> 331
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

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

Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu
225 230 235 240

Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly
245 250 255

Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu
260 265 270

Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg
275 280 285

Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu
290 295 300

Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser
305 310 315 320

Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
325 330

<210> 3
<211> 467
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro
1 5 10 15

Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly
20 25 30

Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn
35 40 45

Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg
50 55 60

Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu
65 70 75 80

Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln
85 90 95

Leu Val Asp Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu
100 105 110

Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile
115 120 125

Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu
130 135 140

Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu
165 170 175

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

Val Asp Ser Leu Pro Leu Ile Thr Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu
195 200 205

Val Glu Gly Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala
210 215 220

Ala Val Phe Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu
225 230 235 240

Val Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr
245 250 255

Ala Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val
260 265 270

Glu Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg
275 280 285

Asp Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His
290 295 300

Ala Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp
305 310 315 320

Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly
325 330 335

Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu
340 345 350

Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala
355 360 365

Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu
370 375 380

Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu
385 390 395 400

Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu
405 410 415

Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu
420 425 430

Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp
435 440 445

Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro
450 455 460

Pro Gln Gln
465

<210> 4
<211> 461
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro Glu Pro Lys Gln Leu Pro
1 5 10 15

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

Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
 450 455 460

<210> 5
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5

Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly Arg Leu Ser
 1 5 10 15

Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn Gly Ser Ala
 20 25 30

Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg Leu Arg Gly
 35 40 45

Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu Ala Gln Ser
 50 55 60

Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln Leu Val Asp
 65 70 75 80

Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu Val Leu Ala
 85 90 95

Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile Ser Gly Arg
 100 105 110

Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser Ile Pro
 115 120 125

Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu Leu Asp
 130 135 140

Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val Pro Ala
 145 150 155 160

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

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

Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala Val Phe
 195 200 205

Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val Gly Val
 210 215 220

Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Met Asp
 225 230 235 240

Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu Glu Ala
 245 250 255

Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp Leu Val
 260 265 270

Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala Gly Thr
 275 280 285

Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser
 290 295 300

Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val Asp Pro
 305 310 315 320

Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg Arg Gln
 325 330 335

Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp
 340 345 350

Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His
 355 360 365

Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly
 370 375 380

Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly
 385 390 395 400

Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro
 405 410 415

Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro
 420 425 430

Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
 435 440 445

<210> 6
 <211> 699
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IgG1Fc-TP (16-482) N端融合

<400> 6

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 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 Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser
 225 230 235 240
 Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu
 245 250 255
 Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg
 260 265 270
 Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile
 275 280 285
 Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu
 290 295 300
 Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu
 305 310 315
 Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln Leu Val Asp Lys His Ser Thr Gly
 325 330 335
 Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala
 340 345 350

Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr
 355 360 365
 Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile
 370 375 380
 Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys
 385 390 395 400
 Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val Pro Ala Asp Gly Ile Leu Tyr
 405 410 415
 Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr Val Asp Ser Leu Pro Leu Ile Thr
 420 425 430
 Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu Val Glu Gly Leu Ser Ala Leu Val
 435 440 445
 Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala Val Phe Pro Asn Gln Glu Gln
 450 455 460
 Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly
 465 470 475 480
 Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg
 485 490 495
 Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp
 500 505 510
 Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly
 515 520 525
 Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala
 530 535 540
 Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe
 545 550 555 560
 Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala
 565 570 575

Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala
580 585 590

Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu
595 600 605

Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly
610 615 620

Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu
625 630 635 640

Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg
645 650 655

Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu
660 665 670

Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser
675 680 685

Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
690 695

<210> 7
<211> 704
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1Fc-TP (16-482) N端與GGGGS連接子融合

<400> 7

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 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp Phe
 225 230 235 240

Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro Glu Pro Lys
 245 250 255

Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly Arg Leu Ser
 260 265 270

Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn Gly Ser Ala
 275 280 285

Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg Leu Arg Gly
 290 295 300

Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu Ala Gln Ser
 305 310 315 320

Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln Leu Val Asp
 325 330 335

Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu Val Leu Ala
 340 345 350

Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile Ser Gly Arg
 355 360 365

Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser Ile Pro
 370 375 380

Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu Leu Asp
 385 390 395 400

Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val Pro Ala
 405 410 415

Asp Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr Val Asp Ser
 420 425 430

Leu Pro Leu Ile Thr Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu Val Glu Gly
 435 440 445

Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala Val Phe
 450 455 460

Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val Gly Val
 465 470 475 480

Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Met Asp

485

490

495

Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu Glu Ala
500 505 510

Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp Leu Val
515 520 525

Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala Gly Thr
530 535 540

Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser
545 550 555 560

Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val Asp Pro
565 570 575

Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg Arg Gln
580 585 590

Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp
595 600 605

Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His
610 615 620

Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly
625 630 635 640

Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly
645 650 655

Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro
660 665 670

Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro
675 680 685

Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
690 695 700

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

<220>
 <223> TP (16-482)- IgG1Fc C端融合

<400> 8

Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro
 1 5 10 15

Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly
 20 25 30

Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn
 35 40 45

Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg
 50 55 60

Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu
 65 70 75 80

Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln
 85 90 95

Leu Val Asp Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu
 100 105 110

Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile
 115 120 125

Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu
 130 135 140

Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val
 145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu
 165 170 175

Val Pro Ala Asp Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr

Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu
 405 410 415
 Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu
 420 425 430
 Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp
 435 440 445
 Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro
 450 455 460
 Pro Gln Gln Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 465 470 475 480
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 485 490 495
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 500 505 510
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 515 520 525
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 530 535 540
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 545 550 555 560
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 565 570 575
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 580 585 590
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 595 600 605
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 610 615 620

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
645 650 655

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

<210> 9
<211> 704
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TP (16-482)- IgG1Fc C端與GGGGS連接子融合

<400> 9

Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro
1 5 10 15

Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly
20 25 30

Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn
35 40 45

Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg
50 55 60

Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu
65 70 75 80

Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln
85 90 95

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

Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly
 325 330 335
 Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu
 340 345 350
 Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala
 355 360 365
 Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu
 370 375 380
 Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu
 385 390 395 400
 Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu
 405 410 415
 Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu
 420 425 430
 Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp
 435 440 445
 Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro
 450 455 460
 Pro Gln Gln Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 465 470 475 480
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 485 490 495
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 500 505 510
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 515 520 525
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 530 535 540

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
545 550 555 560

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
565 570 575

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
580 585 590

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
595 600 605

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
610 615 620

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
625 630 635 640

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
645 650 655

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
660 665 670

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
675 680 685

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695 700

<210> 10
<211> 704
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TP (16-482)- IgG1Fc_R435 C端與GGGS連接子融合

<400> 10

Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro
1 5 10 15

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

Val Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr
 245 250 255
 Ala Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val
 260 265 270
 Glu Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg
 275 280 285
 Asp Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His
 290 295 300
 Ala Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp
 305 310 315 320
 Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly
 325 330 335
 Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu
 340 345 350
 Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala
 355 360 365
 Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu
 370 375 380
 Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu
 385 390 395 400
 Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu
 405 410 415
 Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu
 420 425 430
 Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp
 435 440 445
 Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
675 680 685

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 700

<210> 11
<211> 704
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1Fc(R435)-TP (16-482) N端與GGGGS連接子融合

<400> 11

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 Glu Glu Met Thr
130 135 140

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

Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser Ile Pro
 370 375 380

Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu Leu Asp
 385 390 395 400

Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val Pro Ala
 405 410 415

Asp Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr Val Asp Ser
 420 425 430

Leu Pro Leu Ile Thr Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu Val Glu Gly
 435 440 445

Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala Val Phe
 450 455 460

Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val Gly Val
 465 470 475 480

Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Met Asp
 485 490 495

Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu Glu Ala
 500 505 510

Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp Leu Val
 515 520 525

Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala Gly Thr
 530 535 540

Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser
 545 550 555 560

Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val Asp Pro
 565 570 575

Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg Arg Gln
 580 585 590

Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp
595 600 605

Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His
610 615 620

Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly
625 630 635 640

Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly
645 650 655

Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro
660 665 670

Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro
675 680 685

Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
690 695 700

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

<220>
<223> IgG1Fc-TP_R435 (16-482) N端融合

<400> 12

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 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 Arg Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser
 225 230 235 240
 Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu
 245 250 255
 Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg
 260 265 270
 Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile
 275 280 285

Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu
 290 295 300
 Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu
 305 310 315 320
 Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln Leu Val Asp Lys His Ser Thr Gly
 325 330 335
 Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala
 340 345 350
 Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr
 355 360 365
 Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile
 370 375 380
 Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys
 385 390 395 400
 Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val Pro Ala Asp Gly Ile Leu Tyr
 405 410 415
 Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr Val Asp Ser Leu Pro Leu Ile Thr
 420 425 430
 Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu Val Glu Gly Leu Ser Ala Leu Val
 435 440 445
 Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala Val Phe Pro Asn Gln Glu Gln
 450 455 460
 Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu Val Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly
 465 470 475 480
 Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg
 485 490 495
 Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val Glu Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp
 500 505 510

Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg Asp Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly
 515 520 525
 Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His Ala Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala
 530 535 540
 Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe
 545 550 555 560
 Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala
 565 570 575
 Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala
 580 585 590
 Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu
 595 600 605
 Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly
 610 615 620
 Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu
 625 630 635 640
 Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg
 645 650 655
 Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu
 660 665 670
 Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser
 675 680 685
 Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro Gln Gln
 690 695

<210> 13
 <211> 699
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> TP (16-482) - IgG1Fc_R435 C端融合

<400> 13

Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro
 1 5 10 15

Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly
 20 25 30

Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn
 35 40 45

Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg
 50 55 60

Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu
 65 70 75 80

Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln
 85 90 95

Leu Val Asp Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu
 100 105 110

Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile
 115 120 125

Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu
 130 135 140

Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val
 145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu
 165 170 175

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

Val Asp Ser Leu Pro Leu Ile Thr Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu
 195 200 205

Val Glu Gly Leu Ser Ala Leu Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala
 210 215 220

Ala Val Phe Pro Asn Gln Glu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Lys Thr Leu
 225 230 235 240

Val Gly Val Gly Ala Ser Leu Gly Leu Arg Val Ala Ala Ala Leu Thr
 245 250 255

Ala Met Asp Lys Pro Leu Gly Arg Cys Val Gly His Ala Leu Glu Val
 260 265 270

Glu Glu Ala Leu Leu Cys Met Asp Gly Ala Gly Pro Pro Asp Leu Arg
 275 280 285

Asp Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Trp Leu Ser Gly His
 290 295 300

Ala Gly Thr Gln Ala Gln Gly Ala Ala Arg Val Ala Ala Ala Leu Asp
 305 310 315 320

Asp Gly Ser Ala Leu Gly Arg Phe Glu Arg Met Leu Ala Ala Gln Gly
 325 330 335

Val Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu
 340 345 350

Arg Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Leu Leu Ala
 355 360 365

Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu
 370 375 380

Val Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu
 385 390 395 400

Arg Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu
 405 410 415

Arg Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu

	420		425		430														
Ser	Gly	Pro	Gln	Ser	Arg	Ala	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Val	Leu	Ser	Asp				
		435					440					445							
Arg	Ala	Pro	Phe	Ala	Ala	Pro	Ser	Pro	Phe	Ala	Glu	Leu	Val	Leu	Pro				
	450					455					460								
Pro	Gln	Gln	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro				
465					470					475					480				
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro				
				485					490						495				
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr				
			500					505					510						
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn				
		515					520					525							
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg				
	530					535					540								
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val				
545					550					555					560				
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser				
				565					570						575				
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys				
			580					585					590						
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu				
		595					600					605							
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe				
	610					615					620								
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu				
625					630					635					640				

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 645 650 655

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr
 675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 690 695

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 14

Phe Xaa Arg Arg Arg
 1 5

<210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 15

Phe Xaa Arg Arg Arg Cys
 1 5

<210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為硒代半胱氨酸

<400> 16

Phe Xaa Arg Arg Arg Xaa
 1 5

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<400> 17

Arg Arg Arg Xaa Phe
 1 5

<210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<400> 18

Arg Arg Arg Arg Xaa Phe
 1 5

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<400> 19

Phe Xaa Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為D-2-氨基丙氨酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-精氨酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精氨酸

<400> 20

Phe Xaa Xaa Arg Xaa Arg
1 5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 21

Xaa Xaa Arg Xaa Arg Xaa
1 5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 22

Arg Arg Phe Arg Xaa Arg
1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 23

Phe Arg Arg Arg Arg Xaa
1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 24

Xaa Arg Phe Arg Xaa Arg
1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<400> 25

Arg Arg Xaa Phe Arg Arg
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 26

Cys Arg Arg Arg Arg Phe Trp
1 5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa為D-苯丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa為D-精氨酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 27

Phe Xaa Xaa Arg Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 28

Phe Phe Xaa Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 29

Arg Phe Arg Phe Arg Xaa Arg
 1 5

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa為硒代半胱氨酸

<400> 30

Xaa Arg Arg Arg Arg Phe Trp
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 31

Cys Arg Arg Arg Arg Phe Trp
1 5

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa為L-2-氨基丙氨酸

<400> 32

Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Gln Lys
1 5

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 33

Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Gln Cys
1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 34

Xaa Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Gln
1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 35

Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Arg Gln
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa為L-正白胺酸

<400> 36

Arg Arg Arg Arg Xaa Phe Asp Xaa Cys
1 5

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 37

Phe Trp Arg Arg Arg
1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 38

Arg Arg Arg Trp Phe
1 5

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 39

Phe Phe Arg Arg Arg
1 5

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa為D-精胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 40

Phe Phe Xaa Arg Xaa
1 5

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 41

Phe Phe Arg Xaa Arg
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 42

Phe Arg Phe Arg Arg
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 43

Phe Arg Arg Phe Arg
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 44

Phe Arg Arg Arg Phe

1 5

<210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-氨基丙酸

<400> 45

Gly Xaa Arg Arg Arg
 1 5

<210> 46
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 46

Phe Phe Phe Arg Ala
 1 5

<210> 47
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 47

Phe Phe Phe Arg Arg
 1 5

<210> 48
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 48

Phe Phe Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 49

Phe Arg Arg Phe Arg Arg
1 5

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 50

Phe Arg Arg Arg Phe Arg
1 5

<210> 51
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 51

Arg Phe Phe Arg Arg Arg
1 5

<210> 52
<211> 6
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 52

Arg Phe Arg Arg Phe Arg
1 5

<210> 53

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 53

Phe Arg Phe Arg Arg Arg
1 5

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 54

Phe Phe Phe Arg Arg Arg
1 5

<210> 55

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 55

Phe Phe Arg Arg Arg Phe
1 5

<210> 56

<211> 6

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 56

Phe Arg Phe Phe Arg Arg
1 5

<210> 57
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 57

Arg Arg Phe Phe Phe Arg
1 5

<210> 58
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 58

Phe Phe Arg Phe Arg Arg
1 5

<210> 59
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 59

Phe Phe Arg Arg Phe Arg
1 5

<210> 60

<211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 60

Phe Arg Arg Phe Phe Arg
 1 5

<210> 61
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 61

Phe Arg Arg Phe Arg Phe
 1 5

<210> 62
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 62

Phe Arg Phe Arg Phe Arg
 1 5

<210> 63
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 63

Arg Phe Phe Arg Phe Arg
 1 5

<210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-巯基丙胺酸

<400> 64

Gly Xaa Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 65

Phe Phe Phe Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 66

Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 67

Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg
1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 68

Arg Phe Phe Phe Arg Arg Arg
1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 69

Arg Arg Phe Phe Phe Arg Arg
1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 70

Phe Phe Arg Arg Phe Arg Arg
1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 71

Phe Phe Arg Arg Arg Arg Phe
1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 72

Phe Arg Arg Phe Phe Arg Arg
1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 73

Phe Phe Phe Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 74

Phe Phe Phe Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa為D-精胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 75

Phe Xaa Arg Xaa Arg Xaa
1 5

<210> 76
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Xaa可為任何天然產生之胺基酸

<400> 76

Xaa Xaa Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 77

Phe Xaa Phe Arg Xaa Arg
 1 5

<210> 78
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 78

Xaa Phe Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 79
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 79

Xaa Phe Xaa Arg Xaa Arg
1 5

<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa為D-精胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 80

Phe Xaa Phe Xaa Arg Xaa
1 5

<210> 81
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 81

Xaa Phe Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 82
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 82

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 83
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 83

Xaa Phe Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 84
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 84

Phe Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 85
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精胺酸
 <400> 85

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5

<210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 乙醯化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 86

Lys Xaa Phe Arg Xaa Arg Xaa Asp
 1 5

<210> 87
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 乙醯化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為L-2,3-二氨基丙酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 87

Xaa Xaa Phe Arg Xaa Arg Xaa Asp
 1 5

<210> 88
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (1)..(8)
 <223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<400> 88

Cys Trp Trp Arg Arg Arg Cys
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> DISULFID
<222> (1)..(9)
<223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<400> 89

Cys Trp Trp Val Arg Arg Arg Arg Cys
1 5

<210> 90
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> DISULFID
<222> (1)..(8)
<223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<400> 90

Cys Phe Trp Arg Arg Arg Arg Cys
1 5

<210> 91
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> DISULFID
<222> (1)..(8)
<223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<400> 91

Cys Trp Trp Trp Arg Arg Arg Cys
1 5

<210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-麩胺酸

<400> 92

Xaa Xaa Arg Glu Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 93
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-麩胺酸

<400> 93

Xaa Xaa Arg Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-麩胺酸

<400> 94

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 95
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa 為 L-苯基丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Xaa 為 D-精胺酸

<400> 95

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Glu
1 5

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 為 L-苯基丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Xaa 為 D-精胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa 為 D-麩胺酸

<400> 96

Xaa Xaa Phe Arg Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 為 L-苯基丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Xaa 為 D-精胺酸

<400> 97

Xaa Xaa Phe Arg Xaa Xaa Glu
1 5

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 為 L-苯基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-麩胺酸

<400> 98

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 99
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 99

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Glu
 1 5

<210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-苯基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 100

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Glu
 1 5

<210> 101
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 L-高脯胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-苯基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為D-羧基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa為D-麩胺酸

<400> 101

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 102
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Arg係經庚二酸修飾

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> 經庚二酸修飾的Arg與經離胺酸類肽殘基修飾的Arg之間之環化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Arg係經離胺酸類肽殘基修飾

<400> 102

Arg Gln Arg Arg Gly Arg Arg Arg
 1 5

<210> 103
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 104

Lys Xaa Arg Xaa Gly Xaa Lys Xaa Arg Xaa Glu
 1 5 10

<210> 105
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Lys與Glu之間之環化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 105

Lys Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Glu
 1 5 10

<210> 106
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa為D-脯氨酸

<400> 106

Arg Val Arg Thr Arg Gly Lys Arg Arg Ile Arg Arg Xaa Pro
 1 5 10

<210> 107
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa為D-脯氨酸

<400> 107

Arg Thr Arg Thr Arg Gly Lys Arg Arg Ile Arg Val Xaa Pro
 1 5 10

<210> 108
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 108

Trp Arg Trp Arg Trp Arg Trp Arg
 1 5

<210> 109

<211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (4)..(21)
 <223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (11)..(23)
 <223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (17)..(29)
 <223> 藉由二硫鍵連接Cys殘基

<400> 109

Gly Gly Val Cys Pro Lys Ile Leu Lys Lys Cys Arg Arg Asp Ser Asp
 1 5 10 15

Cys Pro Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly Ser Gly
 20 25 30

Ser Asp

<210> 110
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> 藉由與氮丙啶醛及異脲多組分反應之大環化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)

<223> Xaa為L-3-環己基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa為L-3-環己基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa為L-3-環己基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa為D-精胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa為L-3-環己基丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa為D-精胺酸

<400> 110

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly
1 5 10

<210> 111

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Ser係經均苯三甲酸修飾
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> 兩個L-2,3-二胺基丙酸殘基之N端胺及側鏈經均苯三甲酸二環化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為D-纈胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為L-二氟膦醯基甲基苯基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<400> 111

Ser Xaa Pro Xaa His Xaa Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Xaa
 1 5 10

<210> 112
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> D-丙胺酸經均苯三甲酸修飾

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(1)
<223> Xaa為D-丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> 兩個L-2,3-二胺基丙酸殘基之N端胺及側鏈利用經均苯三甲酸二環化

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa為肌胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa為D-磷酸化蘇胺酸

<220>
<221> **misc_feature**
<222> (4)..(4)
<223> Xaa為L-嘔啉-2-甲酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa為D-丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<400> 112

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Ala Xaa Xaa Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Xaa
1 5 10 15

<210> 113
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> 三個Cys側鏈經參(溴甲基)苯二環化

<400> 113

Cys Arg Arg Ser Arg Arg Gly Cys Gly Arg Arg Ser Arg Arg Cys Gly
 1 5 10 15

<210> 114
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 藉由十二醯基部分連接

<400> 114

Lys Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 115
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 115

Leu Lys Lys Leu Cys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Cys Lys Leu Ala Gly
 1 5 10 15

<210> 116

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> Lys與Glu之間之環化

<400> 116

Arg Arg Arg Arg Lys Arg Arg Arg Glu
 1 5

<210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(9)
 <223> Lys與Glu之間之環化

<400> 117

Arg Arg Arg Lys Arg Arg Arg Arg Glu
 1 5

<210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(9)
 <223> Lys與Glu之間之環化

<400> 118

Arg Arg Lys Arg Arg Arg Arg Arg Glu
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(9)
<223> Lys與Glu之間之環化

<400> 119

Arg Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Glu
1 5

<210> 120
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 120

Cys Arg Cys Arg Cys Arg Cys Arg
1 5

<210> 121
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa為L-炔丙基甘胺酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(12)

<223> 藉由L-炔丙基甘胺酸與L-6-疊氨基-2-胺基己酸之間之點擊反應之環化

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa為L-6-疊氨基-2-胺基己酸

<400> 121

Xaa Leu Arg Lys Arg Leu Arg Lys Phe Arg Asn Xaa
1 5 10

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(4)

<223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<400> 122

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-胺基-3-胍基丙酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa為L-2,3-二胺基丙酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為L-2-胺基-3-胍基丙酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa為L-2-胺基-3-胍基丙酸

<400> 123

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
 1 5

<210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為D-苯丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<220>
 <221> misc_feature

<222> (6)..(6)
 <223> Xaa為D-精胺酸

<400> 124

Xaa Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg
 1 5

<210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為L-2-羰基丙胺酸

<400> 125

Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 126
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為L-2-羰基丙胺酸

<400> 126

Arg Arg Phe Arg Xaa Arg Gln
 1 5

<210> 127
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa為L-2-萘基丙胺酸

<400> 127

Arg Phe Arg Phe Arg Xaa Arg
1 5