



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116348138 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 27

(21) 申请号 202180064690.5

(22) 申请日 2021.07.09

(30) 优先权数据

63/055,721 2020.07.23 US

63/069,071 2020.08.23 US

63/143,825 2021.01.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/040984 2021.07.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/020105 EN 2022.01.27

(71) 申请人 达因疗法公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 罗梅什·R·苏布拉马尼安

穆罕默德·T·卡塔纳尼

蒂莫西·威登

科迪·A·德雅尔丹

布伦丹·奎因 约翰·纳吉姆

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张珊珊 韩晓帆

(51) Int.Cl.

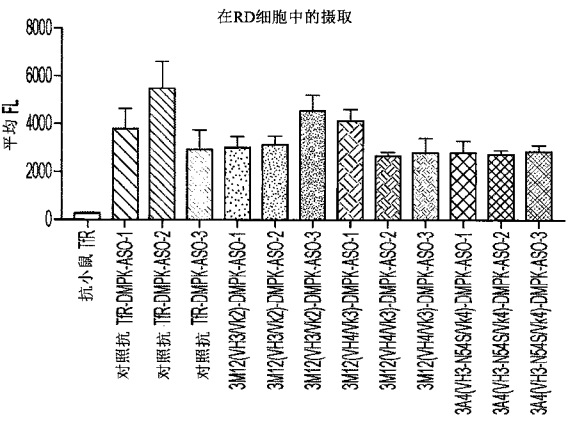
A61K 39/395 (2006.01)

(54) 发明名称

抗转铁蛋白受体 (TFR) 抗体及其用途

(57) 摘要

本公开内容的一些方面涉及与转铁蛋白受体 (例如, 转铁蛋白受体1) 结合的抗体以及包含与分子载荷共价连接的所述抗体的复合物。还提供了使用所述抗体的方法。



1. 与人转铁蛋白受体 (TfR) 结合的抗体, 其中所述抗体包含:

(i) 含有与SEQ ID NO:76具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:75具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

(ii) 含有与SEQ ID NO:69具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

(iii) 含有与SEQ ID NO:71具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

(iv) 含有与SEQ ID NO:72具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

(v) 含有与SEQ ID NO:73具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:74具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

(vi) 含有与SEQ ID NO:73具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:75具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

(vii) 含有与SEQ ID NO:76具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:74具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

(viii) 含有与SEQ ID NO:77具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:78具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

(ix) 含有与SEQ ID NO:79具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:80具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL); 或者

(x) 含有与SEQ ID NO:77具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:80具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

2. 权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包含:

(i) 含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL;

(ii) 含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL;

(iii) 含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL;

(iv) 含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL;

(v) 含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL;

(vi) 含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL;

(vii) 含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL;

(viii) 含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL;

(ix) 含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL; 或者

者

(x) 含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL。

3. 权利要求1或权利要求2所述的抗体, 其中所述抗体选自Fab片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、scFv、Fv和全长IgG。

4. 权利要求3所述的抗体, 其中所述抗体为Fab片段。

5. 权利要求4所述的抗体, 其中所述抗体包含:

(i) 含有与SEQ ID NO:101具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链; 和/或含有与SEQ ID NO:90具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

(ii) 含有与SEQ ID NO:97具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

(iii) 含有与SEQ ID NO:98具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

(iv) 含有与SEQ ID NO:99具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

(v) 含有与SEQ ID NO:100具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:89具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

(vi) 含有与SEQ ID NO:100具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:90具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

(vii) 含有与SEQ ID NO:101具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:89具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

(viii) 含有与SEQ ID NO:102具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:93具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

(ix) 含有与SEQ ID NO:103具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:95具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;或者

(x) 含有与SEQ ID NO:102具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:95具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链。

6. 权利要求5所述的抗体,其中所述抗体包含:

(i) 含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链;

(ii) 含有SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;

(iii) 含有SEQ ID NO:98的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;

(iv) 含有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;

(v) 含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链;

(vi) 含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链;

(vii) 含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链;

(viii) 含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链;

(ix) 含有SEQ ID NO:103的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链;或者

(x) 含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

7. 权利要求1至6中任一项所述的抗体,其中所述抗体与所述转铁蛋白受体之结合的平衡解离常数(K_D)为 10^{-11} M至 10^{-6} M。

8. 权利要求1至7中任一项所述的抗体,其中所述抗体不与所述转铁蛋白受体的转铁蛋白结合位点特异性结合和/或其中所述抗体不抑制转铁蛋白与所述转铁蛋白受体的结合。

9. 权利要求1至8中任一项所述的抗体,其中所述抗体与人、非人灵长类和啮齿动物的转铁蛋白受体中的两种或更多种的胞外表位具有交叉反应性。

10. 复合物,其包含与分子载荷共价连接的权利要求1至9中任一项所述的抗体。

11. 权利要求10所述的复合物,其中所述分子载荷是诊断剂或治疗剂。

12. 权利要求10所述的复合物,其中所述分子载荷是寡核苷酸、多肽或小分子。

13. 权利要求10至12中任一项所述的复合物,其中所述抗体与所述分子载荷通过接头连接。

14. 权利要求13所述的复合物,其中所述接头是可切割接头。

15. 权利要求13或14所述的复合物,其中所述接头包含缬氨酸-瓜氨酸序列。

16. 组合物,其包含权利要求1至9中任一项所述的抗体或权利要求10至15中任一项所述的复合物。

17. 权利要求16所述的组合物,其还包含可药用载体。

18. 将分子载荷递送至细胞的方法,其包括使所述细胞与权利要求10至15中任一项所述的复合物或者权利要求16或权利要求17所述的组合物接触。

19. 权利要求18所述的方法,其中所述细胞是肌细胞。

20. 权利要求18或权利要求19所述的方法,其中所述细胞是体外的。

21. 权利要求18或权利要求19所述的方法,其中所述细胞在对象中。

22. 权利要求21所述的方法,其中所述对象是人。

23. 将分子载荷递送至对象的肌肉的方法,其包括向所述对象施用有效量的权利要求10至15中任一项所述的复合物或者权利要求16或权利要求17所述的组合物。

24. 权利要求23所述的方法,其中所述施用是静脉内的。

25. 治疗疾病的方法,其包括向对象施用有效量的权利要求10至15中任一项所述的复合物或者权利要求16或权利要求17所述的组合物,其中所述分子载荷是治疗剂。

26. 权利要求25所述的方法,其中所述疾病是肌肉疾病并且所述分子载荷是用于治疗所述肌肉疾病的药物。

27. 权利要求26所述的方法,其中所述肌肉疾病是罕见肌肉疾病或肌肉萎缩。

抗转铁蛋白受体 (TfR) 抗体及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35 U.S.C§119(e) 要求以下的优先权:2021年1月30日提交的标题为“ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR (TfR) ANTIBODY AND USES THEREOF”的美国临时申请序列No.63/143825;2020年8月23日提交的标题为“ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR (TfR) ANTIBODY AND USES THEREOF”的美国临时申请序列No.63/069071;以及2020年7月23日提交的标题为“ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR (TfR) ANTIBODY AND USES THEREOF”的美国临时申请序列No.63/055721;其各自的内容均通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及新的抗转铁蛋白受体(transferrin receptor,TfR) 抗体及该抗体的用途。

[0004] 参考作为文本文件通过EFS-Web提交的序列表

[0005] 本申请包含已通过EFS-Web以ASCII格式提交并且在此通过引用整体并入的序列表。在2021年7月8日创建的所述ASCII拷贝被命名为D082470037W000-SEQ-DWY并且大小为120,479字节。

背景技术

[0006] 转铁蛋白受体(TfR) 是参与铁转运的二聚体跨膜糖蛋白受体。已在人中表征了两种转铁蛋白受体:转铁蛋白受体1(transferrin receptor 1,TfR1) 和转铁蛋白受体2(transferrin receptor 2,TfR2)。已经表明TfR在具有较高转移潜能的癌细胞中过表达。已经表明TfR1在血脑屏障的内皮细胞上表达,可用于允许将大分子递送至脑中。

[0007] 发明概述

[0008] 本公开内容至少部分基于结合转铁蛋白受体的人源化抗体(抗TfR抗体)的开发。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体以高特异性和亲和力(例如,亚纳摩至纳摩的范围)与人或非人灵长类(non-human primate,NHP)的转铁蛋白受体1(TfR1)选择性结合。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体可用于靶向表达TfR1的组织和/或(例如,和)细胞。在一些实施方案中,本文中提供的抗TfR抗体用于检测细胞或组织中的TfR1。在一些实施方案中,本文中提供的抗TfR抗体用于诊断、治疗或研究应用中。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体用于将分子载荷递送至靶细胞或组织(例如,表达TfR1的细胞或组织)。

[0009] 因此,在一些方面中,提供了包含与分子载荷(例如,诊断剂或治疗剂)缀合(例如,共价缀合)的抗TfR抗体的复合物。在一些实施方案中,抗TfR抗体用于将缀合的分子载荷递送至表达TfR1的细胞或组织(例如,肌肉或脑),以用于诊断和/或(例如,和)治疗疾病(例如,肌肉疾病或神经系统疾病(neurological disease))。在一些方面中,本公开内容提供了这样的数据:其表明,本文中所述的抗TfR抗体与其他已知的抗TfR抗体相比,在将分子载荷递送至靶细胞(例如,肌细胞)方面具有优异的活性。

[0010] 本公开内容的一个方面涉及与人转铁蛋白受体 (TfR) 结合的抗体, 其中所述抗体包含:

[0011] (i) 含有与SEQ ID NO:76具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:75具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

[0012] (ii) 含有与SEQ ID NO:69具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

[0013] (iii) 含有与SEQ ID NO:71具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

[0014] (iv) 含有与SEQ ID NO:72具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

[0015] (v) 含有与SEQ ID NO:73具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:74具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

[0016] (vi) 含有与SEQ ID NO:73具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:75具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

[0017] (vii) 含有与SEQ ID NO:76具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:74具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

[0018] (viii) 含有与SEQ ID NO:77具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:78具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

[0019] (ix) 含有与SEQ ID NO:79具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:80具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL); 或者

[0020] (x) 含有与SEQ ID NO:77具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或含有与SEQ ID NO:80具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

[0021] 在一些实施方案中, 所述抗体包含:

[0022] (i) 含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL;

[0023] (ii) 含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL;

[0024] (iii) 含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL;

[0025] (iv) 含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL;

[0026] (v) 含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL;

[0027] (vi) 含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL;

[0028] (vii) 含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL;

[0029] (viii) 含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL;

[0030] (ix) 含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL;或者

[0031] (x) 含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL。

[0032] 在一些实施方案中,所述抗体选自Fab片段、Fab' 片段、F(ab')₂片段、scFv、Fv和全长IgG。在一些实施方案中,所述抗体为Fab片段。

[0033] 在一些实施方案中,所述抗体包含:

[0034] (i) 含有与SEQ ID NO:101具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:90具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0035] (ii) 含有与SEQ ID NO:97具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0036] (iii) 含有与SEQ ID NO:98具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0037] (iv) 含有与SEQ ID NO:99具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0038] (v) 含有与SEQ ID NO:100具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:89具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0039] (vi) 含有与SEQ ID NO:100具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:90具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0040] (vii) 含有与SEQ ID NO:101具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:89具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0041] (viii) 含有与SEQ ID NO:102具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:93具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0042] (ix) 含有与SEQ ID NO:103具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:95具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;或者

[0043] (x) 含有与SEQ ID NO:102具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:95具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链。

[0044] 在一些实施方案中,所述抗体包含:

[0045] (i) 含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链;

[0046] (ii) 含有SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;

[0047] (iii) 含有SEQ ID NO:98的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;

[0048] (iv) 含有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;

[0049] (v) 含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链;

[0050] (vi) 含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列

的轻链；

[0051] (vii) 含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链；

[0052] (viii) 含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链；

[0053] (ix) 含有SEQ ID NO:103的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链；或者

[0054] (x) 含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0055] 在一些实施方案中，抗体与转铁蛋白受体之结合的平衡解离常数(K_D)为 10^{-11} M至 10^{-6} M。在一些实施方案中，抗体不与转铁蛋白受体的转铁蛋白结合位点特异性结合和/或抗体不抑制转铁蛋白与转铁蛋白受体的结合。在一些实施方案中，抗体与人、非人灵长类和啮齿动物的转铁蛋白受体中的两种或更多种的胞外表位具有交叉反应性。

[0056] 本公开内容的另一个方面涉及包含与分子载荷共价连接的抗体的复合物。在一些实施方案中，分子载荷是诊断剂或治疗剂。在一些实施方案中，分子载荷是寡核苷酸、多肽或小分子。在一些实施方案中，抗体与分子载荷通过接头连接。在一些实施方案中，接头是可切割接头。在一些实施方案中，接头包含缬氨酸-瓜氨酸序列。

[0057] 本公开内容的另一个方面涉及包含本文中公开的抗体或复合物的组合物。在一些实施方案中，组合物还包含可药用载体。

[0058] 本公开内容的另一个方面涉及将分子载荷递送至细胞的方法，其包括使细胞与本文中公开的复合物或组合物接触。在一些实施方案中，细胞是肌细胞。在一些实施方案中，细胞是体外的。在一些实施方案中，细胞在对象中。在一些实施方案中，对象是人。

[0059] 本公开内容的另一个方面涉及将分子载荷递送至对象的肌肉的方法，其包括向对象施用有效量的本文中公开的复合物。在一些实施方案中，施用是静脉内的。

[0060] 本公开内容的另一个方面涉及治疗疾病的方法，其包括向对象施用有效量的本文中公开的复合物或组合物，其中分子载荷是治疗剂。在一些实施方案中，疾病是肌肉疾病并且分子载荷是用于治疗肌肉疾病的药物。在一些实施方案中，肌肉疾病是罕见肌肉疾病或肌肉萎缩。

[0061] 附图简述

[0062] 图1A至1F示出了通过ELISA测量的人源化抗TfR Fab与人TfR1 (human TfR1, hTfR1) 或食蟹猴TfR1 (cTfR1) 的结合。图1A示出了人源化3M12变体与hTfR1的结合。图1B示出了人源化3M12变体与cTfR1的结合。图1C示出了人源化3A4变体与hTfR1的结合。图1D示出了人源化3A4变体与cTfR1的结合。图1E示出了人源化5H12变体与hTfR1的结合。图1F示出了人源化5H12变体与hTfR1的结合。

[0063] 图2示出了抗TfR Fab缀合物进入横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RD)细胞的定量细胞摄取。受试缀合物中的分子载荷是DMPK靶向寡核苷酸，并且通过指定的抗TfR Fab促进缀合物的摄取。该测定还包括具有阴性对照Fab(抗小鼠TfR)或阳性对照Fab(抗人TfR1)的缀合物。将细胞与在100nM浓度下的指定缀合物一起孵育4小时。通过平均Cypher5e荧光测量细胞摄取。

[0064] 图3A至3F示出了通过ELISA测量的寡核苷酸缀合或未缀合的人源化抗TfR Fab与人TfR1 (hTfR1) 和食蟹猴TfR1 (cTfR1) 的结合。图3A示出了单独或与DMPK靶向寡核苷酸缀合的人源化3M12变体与hTfR1的结合。图3B示出了单独或与DMPK靶向寡核苷酸缀合的人源化3M12变体与cTfR1的结合。图3C示出了单独或与DMPK靶向寡核苷酸缀合的人源化3A4变体与hTfR1的结合。图3D示出了单独或与DMPK靶向寡核苷酸缀合的人源化3A4变体与cTfR1的结合。图3E示出了单独或与DMPK靶向寡核苷酸缀合的人源化5H12变体与hTfR1的结合。图3F示出了单独或与DMPK靶向寡核苷酸缀合的人源化5H12变体与cTfR1的结合。还示出了各自的 EC_{50} 值。

[0065] 图4示出了在用多种浓度的缀合物处理的RD细胞中的DMPK表达,所述缀合物包含与DMPK靶向寡核苷酸 (AS0300) 缀合的指定人源化抗TfR Fab抗体。治疗持续时间为3天。使用转染剂递送的AS0300用作对照 (标记为“Trans”)。

[0066] 图5示出了用于连接抗TfR抗体和分子载荷 (例如,寡核苷酸) 的接头在多种物种中在静脉内施用之后随时间的血清稳定性。

[0067] 图6示出了这样的数据,其示出在DMD患者肌管中,与原初DMD外显子跳读寡核苷酸相比,包含与DMD外显子跳读寡核苷酸缀合的指定抗TfR Fab (3M12 VH3/VK2、3M12 VH4/VK3和3A4 VH3 N54S/VK4) 的缀合物导致外显子跳读增强。

[0068] 图7A至7E示出了在表达人TfR1的小鼠 (hTfR1敲入小鼠) 中,包含与DMPK靶向寡核苷酸缀合的指定抗TfR Fab (对照、3M12 VH3/VK2、3M12 VH4/VK3和3A4 VH3 N54S/VK4) 的缀合物在降低DMPK mRNA表达方面的体内活性。图7A示出了实验设计 (例如,IV剂量、给药频率)。在第一次给药之后14天,测量小鼠胫骨前肌 (图7B)、腓肠肌 (图7C)、心脏 (图7D) 和膈肌 (图7E) 中的DMPK mRNA水平。

[0069] 图8示出了抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3与重组人 (圆圈)、食蟹猴 (正方形)、小鼠 (向上三角形) 或大鼠 (向下三角形) TfR1蛋白在Fab浓度范围为230pM至500nM下之结合的ELISA测量结果。测量结果示出抗TfR Fab与人和食蟹猴TfR1具有反应性。未观察到与小鼠或大鼠重组TfR1的结合。数据作为相对于基线归一化的相对荧光单位示出。

[0070] 图9示出了测试抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3在230pM至500nM Fab的浓度范围内对重组人TfR1或TfR2的亲力的ELISA结果。数据作为相对于基线归一化的相对荧光单位给出。结果证明Fab不与重组人TfR2结合。

[0071] 图10示出了用于连接抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3与对照反义寡核苷酸的接头在PBS中或者在大鼠、小鼠、食蟹猴或人的血清中孵育72小时期间的血清稳定性。

[0072] 某些实施方案的详细描述

[0073] 本公开内容至少部分地基于对人TfR显示出高结合亲和力和特异性的人源化抗TfR抗体 (例如,表3中列出的抗体) 的开发。还提供了抗TfR抗体及其变体在研究、诊断/检测和治疗应用中的用途。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体用于将分子载荷 (例如,寡核苷酸、肽、小分子) 递送至表达TfR的靶细胞或组织。在一些实施方案中,待递送的分子载荷缀合抗TfR抗体并通过受体内化被递送至表达TfR的靶细胞或组织。表达TfR并且可使用本文中所述的抗TfR抗体来靶向的示例性组织包括但不限于:脑、肌肉、肾上腺、阑尾、骨髓、结肠、十二指肠、子宫内膜、食管、脂肪、胆囊、心脏、肾、肝、肺、淋巴结、卵巢、胰腺、胎盘、前列腺、唾液腺、皮肤、小肠、脾、胃、睾丸、甲状腺、膀胱。在一些实施方案中,这样的方法在

肌细胞中以及对于递送通过血脑屏障(其已被证明具有挑战性)具有有益作用。在一些方面中,本公开内容提供了这样的数据:其表明,本文中所述的抗TfR抗体与其他已知的抗TfR抗体相比,在将分子载荷递送至靶细胞(例如,肌细胞)方面具有优异的活性。

[0074] 因此,本公开内容还提供了包含与分子载荷共价连接的任一种抗TfR1抗体的复合物。在一些实施方案中,所述复合物特别可用于递送抑制肌细胞中靶基因的表达或活性的分子载荷,例如,在患有或怀疑患有罕见肌肉疾病或肌肉萎缩(例如,如表6中列出的)的对象中。在一些实施方案中,所述复合物特别可用于将药物递送至脑以用于治疗神经系统疾病(例如,如表7中列出的)。

[0075] 下面提供了本公开内容的另一些方面,包括对限定的术语的描述。

[0076] I. 定义

[0077] 施用:本文中使用的术语“施用”意指以生理和/或(例如,和)药理学上可用的方式向对象提供复合物(例如,以治疗对象中的病症)。

[0078] 大约:本文中使用的术语“大约”或“约”,如应用于一个或更多个目的值时,是指类似于陈述的参考值的值。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”是指落入陈述的参考值的任一方向上(大于或小于)15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、或更小以内的值的范围,除非另有说明或在其他情况下从上下文中可以明显看出(除非这样的数字超过可能值的100%)。

[0079] 抗体:本文中使用的术语“抗体”是指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域或至少一个抗原决定簇(例如,与抗原特异性结合的互补位(paratope))的多肽。在一些实施方案中,抗体是全长抗体。在一些实施方案中,抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。然而,在一些实施方案中,抗体是Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段或scFv片段。在一些实施方案中,抗体是来源于骆驼科抗体的纳米抗体或来源于鲨鱼抗体的纳米抗体。在一些实施方案中,抗体是双抗体。在一些实施方案中,抗体包含具有人种系序列的框架。在另一个实施方案中,抗体包含选自IgG、IgG1、IgG2、IgG2A、IgG2B、IgG2C、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgM和IgE恒定结构域的重链恒定结构域。在一些实施方案中,抗体包含重(H)链可变区(在本文中简称为VH)和/或(例如,和)轻(L)链可变区(在本文中简称为VL)。在一些实施方案中,抗体包含恒定结构域,例如Fc区。免疫球蛋白恒定结构域是指重链或轻链恒定结构域。人IgG重链和轻链恒定结构域氨基酸序列及其功能变异是已知的。关于重链,在一些实施方案中,本文中所述的抗体的重链可以是alpha(α)、delta(Δ)、epsilon(ε)、gamma(γ)或mu(μ)重链。在一些实施方案中,本文中所述的抗体的重链可包含人alpha(α)、delta(Δ)、epsilon(ε)、gamma(γ)或mu(μ)重链。在一个具体实施方案中,本文中所述的抗体包含人γ1 CH1、CH2和/或(例如,和)CH3结构域。在一些实施方案中,VH结构域的氨基酸序列包含人gamma(γ)重链恒定区的氨基酸序列,例如本领域已知的任何。人恒定区序列的非限制性实例已在本领域中描述,例如,参见美国专利No.5,693,780和Kabat E A et al., (1991)同上。在一些实施方案中,VH结构域包含与本文中提供的任何可变链恒定区具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,对抗体进行修饰,例如,通过糖基化、磷酸化、SUMO化(sumoylation)和/或(例如,和)甲基化进行修饰。在一些实施方案中,抗体是与一个或更多个糖或碳水化合物分子缀合的糖基化抗体。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子通过N-糖基化、O-糖

基化、C-糖基化、糖基磷脂酰肌醇化(GPI锚定附着)和/或(例如,和)磷酸糖基化(phosphoglycosylation)与抗体缀合。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是单糖、二糖、寡糖或聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是支化的寡糖或支化的聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子包含甘露糖单元、葡萄糖单元、N-乙酰葡萄糖胺单元、N-乙酰半乳糖胺单元、半乳糖单元、岩藻糖单元或磷脂单元。在一些实施方案中,抗体是包含多肽的构建体,所述多肽包含与接头多肽或免疫球蛋白恒定结构域连接的一个或更多个本公开内容的抗原结合片段。接头多肽包含通过肽键连接的两个或更多个氨基酸残基,并且用于连接一个或更多个抗原结合部分。接头多肽的一些实例已有报道(参见,例如,Holliger,P.,et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J.,et al.(1994)Structure 2:1121-1123)。另外,抗体可以是更大的免疫黏附分子的一部分,免疫黏附分子通过抗体或抗体部分与一个或更多个其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合而形成。这样的免疫黏附分子的一些实例包括使用链霉亲和素核心区域来制备四聚体scFv分子(Kipriyanov,S.M.,et al.(1995)Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101),以及使用半胱氨酸残基、标记肽和C端多组氨酸标签来制备二价和生物素化的scFv分子(Kipriyanov,S.M.,et al.(1994)Mol.Immunol.31:1047-1058)。

[0080] CDR:本文中使用的术语“CDR”是指抗体可变序列内的互补决定区。典型的抗体分子包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其通常参与抗原结合。VH区和VL区可进一步细分为高变区,也称为“互补决定区”(“complementarity determining region,CDR”),其中散布有更保守的称为“框架区”(“framework region,FR”)的区域。每个VH和VL通常由三个CDR和四个FR构成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。可使用本领域已知的方法,例如通过Kabat定义、IMGT定义、Chothia定义、AbM定义和/或(例如,和)接触定义(所有这些都是本领域公知的)来精确鉴定框架区和CDR的范围。参见,例如Kabat,E.A.,et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;**IMGT®**,the international ImMunoGeneTics information **system®**<http://www.imgt.org>,Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,27:209-212(1999);Ruiz,M.et al.,Nucleic Acids Res.,28:219-221(2000);Lefranc,M.-P.,Nucleic Acids Res.,29:207-209(2001);Lefranc,M.-P.,Nucleic Acids Res.,31:307-310(2003);Lefranc,M.-P.et al.,In Silico Biol.,5,0006(2004)[Epub],5:45-60(2005);Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,33:D593-597(2005);Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,37:D1006-1012(2009);Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,43:D413-422(2015);Chothia et al.,(1989)Nature 342:877;Chothia,C.et al.(1987)J.Mol.Biol.196:901-917;Al-lazikani et al(1997)J.Molec.Biol.273:927-948;以及Almagro,J.Mol.Recognit.17:132-143(2004)。还参见hgrnp.mrc.ac.uk和bioinf.org.uk/abs。本文中使用的CDR可以是指由本领域已知的任何方法定义的CDR。具有相同CDR的两种抗体意指这两种抗体的该CDR的氨基酸序列相同,如通过相同的方法(例如IMGT定义)确定的。

[0081] 重链和轻链的每个可变区中有三个CDR,对于每个可变区分别称为CDR1、CDR2和

CDR3。本文中使用的术语“CDR组”是指出现在单个可变区内的能够结合抗原的三个CDR的组。这些CDR的确切边界已根据不同的系统进行了不同的定义。Kabat描述的系统(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)) 不仅提供了适用于抗体的任何可变区的明确的残基编号系统,而且还提供了定义三个CDR的精确残基边界。这些CDR可被称为Kabat CDR。CDR的子部分可被指定为L1、L2和L3或H1、H2和H3,其中“L”和“H”分别指定轻链和重链区域。这些区域可称为Chothia CDR,其具有与Kabat CDR重叠的边界。Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) 和MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45(1996)) 已经描述了定义与Kabat CDR重叠的CDR的其他边界。另一些CDR边界定义可能并不严格遵循上述系统之一,但仍与Kabat CDR重叠,尽管可根据预测或者根据特定残基或残基的组或甚至整个CDR不会显著影响抗原结合的实验发现来缩短或延长它们。本文中使用的可利用根据这些系统中的任何一个定义的CDR。表1中提供了CDR定义系统的一些实例。

[0082] 表1.CDR定义

[0083]

	IMGT ¹	Kabat ²	Chothia ³
CDR-H1	27-38	31-35	26-32
CDR-H2	56-65	50-65	53-55
CDR-H3	105-116/117	95-102	96-101
CDR-L1	27-38	24-34	26-32
CDR-L2	56-65	50-56	50-52
CDR-L3	105-116/117	89-97	91-96

[0084] ¹IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®, imgt.org, Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res., 27:209-212(1999)

[0085] ²Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242

[0086] ³Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))

[0087] CDR接枝抗体(CDR-grafted antibody):术语“CDR接枝抗体”是指包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列但是其中VH和/或(例如,和)VL的一个或更多个CDR区的序列被来自另一物种的CDR序列替代的抗体,例如具有鼠重链和轻链可变区并且其中一个或更多个鼠CDR(例如,CDR3)已被人CDR序列替代的抗体。

[0088] 嵌合抗体:术语“嵌合抗体”是指包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列和来自另一物种的恒定区序列的抗体,例如具有与人恒定区连接的鼠重链和轻链可变区的抗体。

[0089] 互补:本文中使用的术语“互补”是指在两个核苷酸或两组核苷酸之间精确配对的能力。特别地,互补是表征氢键配对引起两个核苷酸或两组核苷酸之间结合的程度术语。例如,如果寡核苷酸的一个位置处的碱基能够与靶核酸(例如,mRNA)的相应位置处的碱基进行氢键合,则认为在该位置处碱基彼此互补。碱基配对可包括规范的沃森-克里克碱基配对和非沃森-克里克碱基配对(例如,Wobble碱基配对和Hoogsteen碱基配对)二者。例如,在一些实施方案中,对于互补碱基配对,腺苷型碱基(A)与胸苷型碱基(T)或尿嘧啶型碱基(U)

互补,胞嘧啶型碱基(C)与鸟苷型碱基(G)互补,并且通用碱基如3-硝基吡咯或5-硝基吡咯可与任何A、C、U或T杂交并被认为是互补的。肌苷(I)在本领域中也被认为是通用碱基,并且被认为与任何A、C、U或T互补。

[0090] 保守氨基酸替换:本文中使用的“保守氨基酸替换”是指不改变进行氨基酸替换的蛋白质的相对电荷或尺寸特征的氨基酸替换。可以根据本领域普通技术人员已知的用于改变多肽序列的方法来制备变体,所述方法例如可以在汇编这样的方法的参考文献中找到:例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook,et al.,eds.,Fourth Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,2012,或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel,et al.,eds.,John Wiley& Sons,Inc.,New York。氨基酸的保守替换包括在以下组内的氨基酸之间进行的替换:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;和(g)E、D。

[0091] 共价连接:本文中使用的术语“共价连接”是指两个或更多个分子通过至少一个共价键连接在一起的特征。在一些实施方案中,两个分子可以通过充当分子之间的接头的单键例如二硫键或二硫桥共价连接在一起。然而,在一些实施方案中,两个或更多个分子可以通过充当接头的分子共价连接在一起,该接头通过多个共价键将两个或更多个分子连接在一起。在一些实施方案中,接头可以是可切割接头。然而,在一些实施方案中,接头可以是不可切割接头。

[0092] 交叉反应性:如本文中使用的以及在靶向剂(例如,抗体)的情况下,术语“交叉反应性”是指物质能够以相似亲和力或亲合力与相似类型或类别的超过一种抗原(例如,多个同源物、旁系同源物或直系同源物的抗原)特异性结合的性质。例如,在一些实施方案中,对相似类型或类别的人和/或非人灵长类抗原(例如,人转铁蛋白受体和非人灵长类转铁蛋白受体)具有交叉反应性的抗体能够以相似亲和力或亲合力与人抗原和非人灵长类抗原结合。在一些实施方案中,抗体对相似类型或类别的人抗原和啮齿动物抗原具有交叉反应性。在一些实施方案中,抗体对相似类型或类别的啮齿动物抗原和非人灵长类抗原具有交叉反应性。在一些实施方案中,抗体对相似类型或类别的人抗原、非人灵长类抗原和啮齿动物抗原具有交叉反应性。

[0093] 框架:本文中使用的术语“框架”或“框架序列”是指可变区减去CDR的剩余序列。由于CDR序列的确切定义可通过不同的系统确定,因此框架序列的含义相应地具有不同解释。六个CDR(轻链的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3和重链的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)也将轻链和重链上的框架区分为每条链上的四个子区域(FR1、FR2、FR3和FR4),其中CDR1位于FR1和FR2之间,CDR2位于FR2和FR3之间,并且CDR3位于FR3和FR4之间。在未将特定子区域指定为FR1、FR2、FR3或FR4的情况下,其他人提到的框架区代表单个天然存在的免疫球蛋白链的可变区内的组合的FR。如本文所使用的,FR代表四个子区域之一,并且FRs代表构成框架区的四个子区域中的两个或更多个。人重链和轻链接受体序列是本领域已知的。在一个实施方案中,本领域已知的接受体序列可用于本文中公开的抗体中。

[0094] 人抗体:本文中使用的术语“人抗体”旨在包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本公开内容的人抗体可包含不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR中,特别是在CDR3中。然而,本文中使用的术语“人抗体”不意图包括其中来

源于另一哺乳动物物种(例如小鼠)种系的CDR序列已接枝到人框架序列上的抗体。

[0095] 人源化抗体:术语“人源化抗体”是指包含来自非人物种(例如,小鼠)的重链和轻链可变区序列但是其中VH和/或(例如,和)VL序列的至少一部分已被改变为更加“人样”(即,更类似于人种系可变序列)的抗体。一种类型的人源化抗体是CDR接枝抗体,其中人CDR序列被引入非人VH和VL序列中以替代相应的非人CDR序列。在一个实施方案中,提供了人源化抗TfR抗体和抗原结合部分。这样的抗体可以通过使用传统的杂交瘤技术获得鼠抗转铁蛋白受体单克隆抗体随后使用体外基因工程化进行人源化来产生,例如在Kasaian et al的PCT公开No.WO 2005/123126 A2中公开的那些。

[0096] 分离的抗体:本文中使用的“分离的抗体”旨在指代基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合转铁蛋白受体的分离的抗体基本上不含特异性结合转铁蛋白受体以外的抗原的抗体)。然而,特异性结合转铁蛋白受体复合物的分离的抗体可能与其他抗原(例如来自其他物种的转铁蛋白受体分子)具有交叉反应性。此外,分离的抗体可基本上不含其他细胞材料和/或(例如,和)化学物质。

[0097] 分子载荷:本文中使用的术语“分子载荷”是指发挥调节生物学结局作用的分子或物质。在一些实施方案中,分子载荷与抗TfR抗体连接或以其他方式缔合。在一些实施方案中,分子载荷是小分子、蛋白质、肽、核酸或寡核苷酸。在一些实施方案中,分子载荷发挥调节DNA序列的转录、调节蛋白质的表达或调节蛋白质的活性的作用。在一些实施方案中,分子载荷是寡核苷酸,其包含具有靶基因的互补区的链。

[0098] 寡核苷酸:本文中使用的术语“寡核苷酸”是指长度长至200个核苷酸的寡聚核酸化合物。寡核苷酸的一些实例包括但不限于RNAi寡核苷酸(例如,siRNA、shRNA)、微RNA、间隔聚体、混合聚体、亚磷酸二酰胺吗啉代、肽核酸、适配体、指导核酸(例如,Cas9指导RNA)等。寡核苷酸可以是单链或双链。在一些实施方案中,寡核苷酸可包含一个或更多个经修饰核苷酸(例如,2'-O-甲基糖修饰、嘌呤或嘧啶修饰)。在一些实施方案中,寡核苷酸可包含一个或更多个经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸可包含一个或更多个硫代磷酸酯键联,其可为Rp或Sp立体化学构象。

[0099] 重组抗体:本文中使用的术语“重组人抗体”旨在包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(在本公开内容中更详细地描述),从重组、组合人抗体文库分离的抗体(Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech.15:62-70;Azzazy H.,and Highsmith W.E., (2002) Clin.Biochem.35:425-445; Gavilondo J.V.,and Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145;Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378),从人免疫球蛋白基因转基因的动物(例如,小鼠)分离的抗体(参见例如Taylor,L.D.,et al. (1992) Nucl.Acids Res.20: 6287-6295;Kellermann S-A.,and Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597;Little M.et al (2000) Immunology Today 21:364-370),或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,对这样的重组人抗体进行体外诱变(或当使用人Ig序列转基因的动物时,进行体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是这样的序列,尽管其来源于人种系VH和VL序列并与之相关,但可能不是体内人抗体种系库中天然存在

的。本公开内容的一个实施方案提供了能够结合人转铁蛋白受体的完全人抗体,其可使用本领域公知的技术产生,例如但不限于使用人Ig噬菌体文库,例如Jermutus et al.的PCT公开No.WO 2005/007699 A2中公开的那些。

[0100] 互补区:本文中使用的术语“互补区”是指与例如靶核酸的同源核苷酸序列充分互补的例如寡核苷酸的核苷酸序列,使得两个核苷酸序列能够在生理条件下(例如,在细胞中)彼此退火。在一些实施方案中,互补区与靶核酸的同源核苷酸序列完全互补。然而,在一些实施方案中,互补区与靶核酸的同源核苷酸序列部分互补(例如,至少80%、90%、95%或99%互补)。在一些实施方案中,与靶核酸的同源核苷酸序列相比,互补区包含1、2、3或4个错配。

[0101] 特异性结合:本文中使用的术语“特异性结合”是指分子以一定程度的亲和力或亲合力与结合伴侣结合的能力,该亲和力或亲合力使得分子能够用于在结合测定或其他结合环境中将结合伴侣与合适的对照区分开。关于抗体,术语“特异性结合”是指与合适的一种或更多种参考抗原相比,抗体以一定程度的亲和力或亲合力与特异性抗原结合的能力,该亲和力或亲合力使得抗体能够用于将特异性抗原与其他抗原区分开,例如至允许通过与如本文中所述的抗原结合而优先靶向某些细胞(例如,肌细胞)的程度。在一些实施方案中,如果抗体与靶标结合的 K_D 为至少约 $10^{-4}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $10^{-13}M$ 或更小,则抗体与靶标特异性结合。在一些实施方案中,抗体与转铁蛋白受体特异性结合。

[0102] 对象:本文中使用的术语“对象”是指哺乳动物。在一些实施方案中,对象是非人灵长类或啮齿动物。在一些实施方案中,对象是人。在一些实施方案中,对象是患者,例如患有或怀疑患有疾病的人患者。在一些实施方案中,对象是患有或怀疑患有由疾病相关重复扩增(例如,在DMPK等位基因中)引起的疾病的人患者。

[0103] 转铁蛋白受体:本文中使用的术语“转铁蛋白受体”(也称为TFRC、CD71、p90、TFR或TFR1)是指结合转铁蛋白以促进通过内吞作用摄取铁的内化细胞表面受体。在一些实施方案中,转铁蛋白受体可以是人来源的(NCBI基因ID 7037)、非人灵长类来源的(例如,NCBI基因ID 711568或NCBI基因ID 102136007)或啮齿动物来源的(例如,NCBI基因ID 22042)。另外,已经表征了编码受体的不同同种型的多种人转录物变体(例如,如以下GenBank RefSeq登录号注释的:NP_001121620.1、NP_003225.2、NP_001300894.1和NP_001300895.1)。

[0104] 对应于NCBI序列NP_003225.2(转铁蛋白受体蛋白1同种型1,智人(homo sapiens))的示例性人转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

[0105] **MMDQARSFAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLAVDEEENADNNTKANVT KPKR
CSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDD**

[0106] LKRKLSEKLDSTDTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVK
IQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVN
GSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSF
NHTQFPSPRSSGLPNIPVQTISRAAAELFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSSEKSNVKLTVSN
VLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAGSGVGTALLLKLQMFSDMVLKDG
FQPSRSIIFASWSAGDFGSGVATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLI
EKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGT
MDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADI
KEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKE
SPFRHVFWSGSGSHTLPALLENLKLKQNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDI
DNEF (SEQ ID NO: 105)

[0107] 对应于NCBI序列NP_001244232.1 (转铁蛋白受体蛋白1, 恒河猴 (*Macaca mulatta*)) 的示例性非人灵长类转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

[0108] MMDQARSFAFNSLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNHVMKLGVDDEENTDNNTKPNGTKPKR
CGGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPAAPRLYWDD
LKRKLSEKLDTTDTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQFREFKLSKVWRDQHFVKI
QVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLDSPVNG
SIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFN
HTQFPSSQSSGLPNIPVQTISRAAAELFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNV
LKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAGSSVGTALLLKLQMFSDMVLKDG
QPSRSIIFASWSAGDFGSGVATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIE
KTMQDVKHPVTGRSLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGT
MDTYKELVERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDTELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRAD
VKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSP
KESPFHVFWSGSGSHTLSALLESKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVW
DIDNEF (SEQ ID NO: 106)

[0109] 对应于NCBI序列XP_005545315.1 (转铁蛋白受体蛋白1, 食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)) 的示例性非人灵长类转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

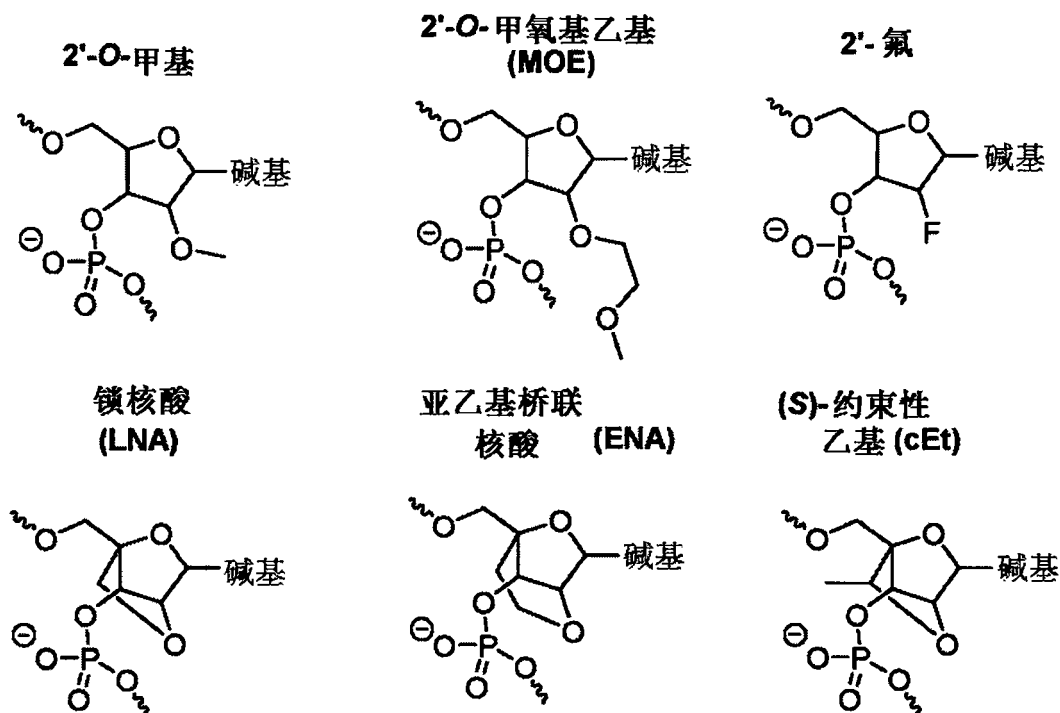
[0110] MMDQARSFAFNSLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNHVMKLGVDDEENTDNNTKANGTKPKR
CGGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPAAPRLYWDD
LKRKLSEKLDTTDTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQFREFKLSKVWRDQHFVKI
QVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLDSPVNG
SIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFN
HTQFPSSQSSGLPNIPVQTISRAAAELFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNV
LKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAGSSVGTALLLKLQMFSDMVLKDG
QPSRSIIFASWSAGDFGSGVATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIE
KTMQDVKHPVTGRSLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGT
MDTYKELVERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDTELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRAD
VKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSP
KESPFHVFWSGSGSHTLSALLESKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVW
DIDNEF (SEQ ID NO: 107)

[0111] 对应于NCBI序列NP_001344227.1 (转铁蛋白受体蛋白1, 小家鼠 (*mus musculus*)) 的示例性小鼠转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

MMDQARSFAFSLNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDNHVMKLAADDEENADNNMKASVRKPKR
 FNRLCFAAIALVIFLIGMSGYLGCKRVEQKEECVKLAETEETDKSETMETEDVPTSSRLY
 WADLKTLLSEKLSIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIENQFHEFKFSKVWRDEHY
 VKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGLDPVESPEGYVAFSKPTEVSGKLVHANFGTKKDFEELSYSVN

[0112] GSVLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKFPVVEADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPS
 FNHTQFPSPSSGLPNIPVQTISRAAAELFGKMEGSCPARWNIDSSCKLELSQNQNVLIVKN
 VLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVGAQRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFSMDISKDG
 FRPSRSIIFASWTAGDFGAVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVVLTGTSNFKVSASPLLTYL
 MGKIMQDVKHPVDGKSLYRDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLG
 RLDTYEALTQKVPQLNQMVRTAAEVAGQLIKLTHDVELNLDYEMYNKLLSFMKDLNQFKT
 DIRDMGLSLQWLVSARGDYFRATSRLTDFHNAEKTNRFMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPR
 ESPFRHIFWGSSTLSALVENLKLKRNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNID
 NEF (SEQ ID NO: 108)

[0113] 2'-经修饰核苷：本文中使用的术语“2'-经修饰核苷”和“2'-经修饰核糖核苷”可互换使用，并且是指具有在2'位置具有经修饰糖部分的核苷。在一些实施方案中，2'-经修饰核苷是2'-4'双环核苷，其中糖的2'和4'位置是桥联的（例如，通过亚甲基、亚乙基或(S)-约束性乙基桥联）。在一些实施方案中，2'-经修饰核苷是非双环的2'-经修饰核苷，例如，其中糖部分的2'位置被取代。2'-经修饰核苷的一些非限制性实例包括：2'-脱氧、2'-氟（2'-F）、2'-O-甲基（2'-O-Me）、2'-O-甲氧基乙基（2'-MOE）、2'-O-氨基丙基（2'-O-AP）、2'-O-二甲基氨基乙基（2'-O-DMAOE）、2'-O-二甲基氨基丙基（2'-O-DMAP）、2'-O-二甲基氨基乙基氧基乙基（2'-O-DMAEOE）、2'-O-N-甲基乙酰胺基（2'-O-NMA）、锁核酸（LNA，亚甲基桥联核酸）、亚乙基桥联核酸（ENA）和(S)-约束性乙基桥联核酸（cEt）。在一些实施方案中，本文中所述的2'-经修饰核苷是高亲和力的经修饰核苷酸和寡核苷酸，其包含相对于未经修饰的寡核苷酸而对靶序列具有提高的亲合力的2'-经修饰核苷酸。下面提供了2'-经修饰核苷之结构的一些实例：



[0115] II. 抗TfR抗体

[0116] 在一些实施方案中,与转铁蛋白受体结合的物质,例如抗TfR抗体,能够靶向肌细胞和/或(例如,和)介导物质穿过血脑屏障的转运。转铁蛋白受体是将转铁蛋白转运通过细胞膜并参与胞内铁水平的调节和稳态的内化细胞表面受体。本公开内容的一些方面提供了能够结合转铁蛋白受体的转铁蛋白受体结合蛋白。与转铁蛋白受体结合(例如,特异性结合)的抗体可在与转铁蛋白受体结合之后被内化至细胞中,例如通过受体介导的胞吞作用而被内化至细胞中。

[0117] 在一些方面中,本文中提供了以高特异性和亲和力与转铁蛋白受体结合的人源化抗体。在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体与转铁蛋白受体的任何胞外表位或暴露于抗体的表位特异性结合。在一些实施方案中,本文中提供的人源化抗TfR抗体与来自人、非人灵长类、小鼠、大鼠等的转铁蛋白受体特异性结合。在一些实施方案中,本文中提供的人源化抗TfR抗体与人转铁蛋白受体结合。在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体与如SEQ ID NO:105至108中提供的人或非人灵长类转铁蛋白受体的氨基酸区段结合。在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体与这样的氨基酸区段结合:对应于如SEQ ID NO:105中所示的人转铁蛋白受体的第90至96位氨基酸,其不在转铁蛋白受体的顶端结构域(apical domain)中。在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体与TfR1结合但与不TfR2结合。

[0118] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体(例如,3M12和人源化变体)结合TfR1中的表位,其中该表位包含SEQ ID NO:105的第258至291位氨基酸和/或第358至381位氨基酸中的残基。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体(例如,3M12和人源化变体)结合包含SEQ ID NO:105的第258至291位氨基酸和第358至381位氨基酸中之残基的表位。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体(例如,3M12和人源化变体)结合包含如SEQ ID NO:105中所示的人TfR1的残基K261、S273、Y282、T362、S368、S370和K371中的一者或更多者的表位。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体(例如,3M12和人源化变体)结合包含如SEQ ID NO:105中所示的人TfR1的残基K261、S273、Y282、T362、S368、S370和K371的表位。

[0119] 在一些实施方案中,抗TfR抗体以至少约 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M或更小的结合亲和力(例如,如Kd所示)特异性结合TfR1(例如,人或非人灵长类TfR1)。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体以亚纳摩范围的KD与TfR1结合。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体选择性地与转铁蛋白受体1(TfR1)结合但不与转铁蛋白受体2(TfR2)结合。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体与人TfR1和食蟹猴TfR1结合(例如,Kd为 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M或更小),但不与小鼠TfR1结合。抗TfR抗体的亲和力和结合动力学可使用任何合适的方法测试,包括但不限于生物传感器技术(例如,OCTET或BIAcore)。在一些实施方案中,本文中所述的任一种抗TfR抗体的结合不竞争或抑制转铁蛋白与TfR1的结合。在一些实施方案中,本文中所述的任一种抗TfR抗体的结合不竞争或抑制HFE- β -2-微球蛋白与TfR1的结合。

[0120] 本文中所述的抗TfR抗体是人源化抗体。表2中提供了本文中所述的人源化抗TfR抗体来源小鼠单克隆抗TfR抗体的CDR和可变区氨基酸序列。

[0121] 表2. 小鼠单克隆抗TfR抗体

[0122]

Ab	编号系统	IMGT	Kabat	Chothia
3-A4	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPENGDT (SEQ ID NO: 2)	WIDPENGDT EYASKFQD (SEQ ID NO: 8)	ENG (SEQ ID NO: 13)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLLSNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLSNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT EYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVS (SEQ ID NO: 17)		
	VL	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLSNGYTYLFWLQRPQGSPQLLIYRMSNLA SGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3-A4 N54T*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPETGDT (SEQ ID NO: 19)	WIDPETGDT EYASKFQD (SEQ ID NO: 20)	ETG (SEQ ID NO: 21)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)

[0123]

	CDR-L1	KSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLSHNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKORPEQGLEWIGWIDPETGDT EYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCTLWLRRLDYWGQGTSTVTS S (SEQ ID NO: 22)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLA SGVPDRFSGSGGTAFTRLISRVEAEDVGYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3-A4 N54S*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPESGDT (SEQ ID NO: 23)	WIDPESGDT EYASKFQD (SEQ ID NO: 24)	ESG (SEQ ID NO: 25)
	CDR-H3	TLWLRRLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLSHNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKORPEQGLEWIGWIDPESGDT EYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCTLWLRRLDYWGQGTSTVTS S (SEQ ID NO: 26)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLA SGVPDRFSGSGGTAFTRLISRVEAEDVGYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3-M12	CDR-H1	GYSITSGYY (SEQ ID NO: 27)	SGYYWN (SEQ ID NO: 33)	GYSITSGY (SEQ ID NO: 38)
	CDR-H2	ITFDGAN (SEQ ID NO: 28)	YITFDGANNYNPSLKN (SEQ ID NO: 34)	FDG (SEQ ID NO: 39)
	CDR-H3	TRSSYDYDVL DY (SEQ ID NO: 29)	SSYDYDVL DY (SEQ ID NO: 35)	SYDYDVL DY (SEQ ID NO: 40)
	CDR-L1	QDISNF (SEQ ID NO: 30)	RASQDISNFLN (SEQ ID NO: 36)	SQDISNF (SEQ ID NO: 41)
	CDR-L2	YTS (SEQ ID NO: 31)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 37)	YTS (SEQ ID NO: 31)
	CDR-L3	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 32)	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 32)	GHTLPY (SEQ ID NO: 42)
	VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYISITSGYYWNWIRQFPNGKLEWMGYITFDGAN NYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLTSVTTEDTATYYCTRSSYDYDVL DYWGQGTTLTV SS (SEQ ID NO: 43)		
	VL	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNFLNWYQQRPDGTVKLLIY YTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDFSLTVSNLEQEDIATYFCQQGHTLPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 44)		
5-H12	CDR-H1	GYSFTDYC (SEQ ID NO: 45)	DYCIN (SEQ ID NO: 51)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSED PWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSED PWT (SEQ ID NO: 50)	SSED PW (SEQ ID NO: 60)

[0124]

	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYCNWVNQRPGQGLEWIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 61)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESDGYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIFRASNLES GIPARFSGSGSRRTDFTLTINPVEAADVATYYCQQSSEDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5-H12 C33Y*	CDR-H1	GYSFTDYY (SEQ ID NO: 63)	DYYIN (SEQ ID NO: 64)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYYINWVNQRPGQGLEWIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 65)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESDGYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIFRASNLES GIPARFSGSGSRRTDFTLTINPVEAADVATYYCQQSSEDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5-H12 C33D*	CDR-H1	GYSFTDYD (SEQ ID NO: 66)	DYDIN (SEQ ID NO: 67)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYDINWVNQRPGQGLEWIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 68)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESDGYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIFRASNLES GIPARFSGSGSRRTDFTLTINPVEAADVATYYCQQSSEDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)		

[0125] *突变位置根据包含突变的相应VH序列的Kabat编号

[0126] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR抗体是表2中提供的任一种抗TfR抗体的人源化变体。在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR抗体包含与表2中提供的任一种抗TfR抗体中的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相同的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且包含人源化重链可变区和/或(例如,和)人源化轻链可变区。

[0127] 人源化抗体是人免疫球蛋白(接受体抗体),其中来自接受体的互补决定区(complementary determining region, CDR)的残基被来自具有期望特异性、亲和力和容量(capacity)的非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基替代。在一些实施方案中,人免疫球蛋白的Fv框架区(framework region, FR)残基被相应的非人残基替代。此外,人源化抗体可包含在接受体抗体或者导入的CDR或框架序列中均未发现但被包含在内以进一步完善和优化抗体性能的残基。一般而言,人源化抗体将包含至少一个并且通常是两个的可变结构域的基本上全部,其中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些,并且所有或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体最佳地还将包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)(通常是人免疫球蛋白的那些)的至少一部分。抗体可具有如W0 99/58572中所述修饰的Fc区。人源化抗体的另一些形式具有相对于原始抗体

而改变的一个或更多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个、六个),其也称为来源于来自原始抗体的一个或更多个CDR的一个或更多个CDR。人源化抗体还可能涉及亲和力成熟。

[0128] 人源化抗体及其制备方法是已知的,例如,如在以下中描述的:Almagro et al., Front.Biosci.13:1619-1633 (2008); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033 (1989); 美国专利No.5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005); Padlan et al., Mol.Immunol.28:489-498 (1991); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005); Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005); 以及 Klimka et al., Br.J.Cancer, 83:252-260 (2000), 其全部内容均通过引用并入本文。可用于人源化的人框架区在例如以下中描述: Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993); Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993); Almagro et al., Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008); Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 以及 Rosok et al., J Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996), 其全部内容均通过引用并入本文。

[0129] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:人源化VH,其与表2中列出的任一种VH相比(例如,在VH框架区中)包含一个或更多个氨基酸变异,和/或(例如,和)人源化VL,其与表2中列出的任一种VL相比(例如,在VL框架区中)包含一个或更多个氨基酸变异。

[0130] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH与表2中列出的任何抗TfR抗体的VH(例如,SEQ ID NO:17、22、26、43、61、65和68中的任一种)相比,包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL与表2中列出的任一种抗TfR抗体的VL(例如,SEQ ID NO:18、44和62中的任一种)相比,包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0131] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH在框架区中包含与表2中列出的任何抗TfR抗体的VH(例如,SEQ ID NO:17、22、26、43、61、65和68中的任一种)具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL在框架区中包含与表2中列出的任何抗TfR抗体的VL(例如,SEQ ID NO:18、44和62中的任一种)具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。

[0132] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR-H1(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-H2(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H3(根据IMGT定义系统),并且与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:26中所示的VH相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作

为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L1(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-L2(根据IMGT定义系统)和具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR-L3(根据IMGT定义系统),并且与SEQ ID NO:18中所示的VL相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0133] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的CDR-H1(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-H2(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H3(根据IMGT定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:26中所示的VH具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L1(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-L2(根据IMGT定义系统)和具有,SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR-L3(根据IMGT定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:18中任一种所示的VL具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。

[0134] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H1(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR-H2(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR-H3(根据Kabat定义系统),并且与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:26中所示的VH相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR-L1(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR-L2(根据Kabat定义系统)和具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR-L3(根据Kabat定义系统),并且与SEQ ID NO:18中所示的VL相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0135] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H1(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR-H2(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR-H3(根据Kabat定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:26中所示的VH具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR-L1(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR-L2(根据Kabat定义系统)和具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR-L3(根据Kabat定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:18中任一种所示的VL具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。

[0136] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH

包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR-H1(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR-H2(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-H3(根据Chothia定义系统),并且与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:26中所示的VH相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-L2(根据Chothia定义系统),和具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L3(根据Chothia定义系统),并且与SEQ ID NO:18中所示的VL相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0137] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR-H1(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR-H2(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-H3(根据Chothia定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:26中所示的VH具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-L2(根据Chothia定义系统)和具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列CDR-L3(根据Chothia定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:18中任一种所示的VL具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。

[0138] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR-H1(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR-H2(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR-H3(根据IMGT定义系统),并且与SEQ ID NO:43中所示的VH相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR-L1(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2(根据IMGT定义系统)和具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3(根据IMGT定义系统),并且与SEQ ID NO:44中所示的VL相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0139] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR-H1(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR-H2(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR-H3(根据IMGT定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:43中所示的VH具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR-L1(根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2(根据IMGT定义系

统)和具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3(根据IMGT定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:44中所示的VL具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。

[0140] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具SEQ ID NO:33有氨基酸序列的CDR-H1(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR-H2(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR-H3(根据Kabat定义系统),并且与SEQ ID NO:43中所示的VH相比,在框架区中包含不超过25氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR-L1(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR-L2(根据Kabat定义系统)和具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3(根据Kabat定义系统),并且与SEQ ID NO:44中所示的VL相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0141] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR-H1(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR-H2(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR-H3(根据Kabat定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:43中所示的VH具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR-L1(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR-L2(根据Kabat定义系统)和具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3(根据Kabat定义系统),并且在框架区与SEQ ID NO:44中所示的VL具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。

[0142] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR-H1(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR-H2(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H3(根据Chothia定义系统),并且与有SEQ ID NO:43中所示的VH相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR-L1(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2(根据Chothia定义系统)和具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-L3(根据Chothia定义系统),并且与SEQ ID NO:44中所示的VL相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0143] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR-H1(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR-H2(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H3(根据Chothia定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:43中所示的VH具有至少

75% (例如, 75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性。作为替代或补充 (例如, 补充), 本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL, 所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR-L1 (根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2 (根据Chothia定义系统) 和具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-L3 (根据Chothia定义系统), 并且在框架区中与SEQ ID NO:44中所示的VL具有至少75% (例如, 75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性。

[0144] 在一些实施方案中, 本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH, 所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDR-H1 (根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDR-H2 (根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDR-H3 (根据IMGT定义系统), 并且与SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:68中所示的VH相比, 在框架区中包含不超过25个氨基酸变异 (例如, 不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充 (例如, 补充), 本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL, 所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDR-L1 (根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L2 (根据IMGT定义系统) 和具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR-L3 (根据IMGT定义系统), 并且与SEQ ID NO:62中所示的VL相比, 在框架区中包含不超过25个氨基酸变异 (例如, 不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0145] 在一些实施方案中, 本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH, 所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDR-H1 (根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDR-H2 (根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDR-H3 (根据IMGT定义系统), 并且在框架区中与SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:68中所示的VH具有至少75% (例如, 75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性。作为替代或补充 (例如, 补充), 本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL, 所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDR-L1 (根据IMGT定义系统)、具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L2 (根据IMGT定义系统) 和具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR-L3 (根据IMGT定义系统), 并且在框架区与SEQ ID NO:62中所示的VL具有至少75% (例如, 75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性。

[0146] 在一些实施方案中, 本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH, 所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDR-H1 (根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR-H2 (根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDR-H3 (根据Kabat定义系统), 并且与SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:68中所示的VH相比, 在框架区中包含不超过25个氨基酸变异 (例如, 不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充 (例如, 补充), 本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL, 所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR-L1 (根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDR-L2 (根据Kabat定义系统) 和具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR-L3 (根据Kabat定义系统), 并且与SEQ ID NO:62中所示的VL相比, 在框架区中包含不超过25个氨基酸变异 (例如, 不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、

7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0147] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDR-H1(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR-H2(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDR-H3(根据Kabat定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:68中所示的VH具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR-L1(根据Kabat定义系统)、具有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDR-L2(根据Kabat定义系统)和具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR-L3(根据Kabat定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:62中所示的VL具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。

[0148] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDR-H1(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDR-H2(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDR-H3(根据Chothia定义系统),并且与SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:68中所示的VH相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDR-L1(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L2(根据Chothia定义系统)和具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDR-L3(根据Chothia定义系统),并且与SEQ ID NO:62中所示的VL相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0149] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含具有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDR-H1(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDR-H2(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDR-H3(根据Chothia定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:68中所示的VH具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDR-L1(根据Chothia定义系统)、具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L2(根据Chothia定义系统)和具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDR-L3(根据Chothia定义系统),并且在框架区中与SEQ ID NO:62中所示的VL具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性。

[0150] 表3中提供了本文中所述的人源化抗TfR抗体的氨基酸序列的一些实例。

[0151] 表3.人源化抗TfR抗体的可变区

[0152]

抗体	可变区氨基酸序列	**
3A4 VH3 (N54T*)/Vk4	VH: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEWIGWID PETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRL DYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 69)	
	VL: DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHNSGYTYLFWFQQRPGQSPRLLIYR MSNLASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO: 70)	
3A4 VH3 (N54S*)/Vk4	VH: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEWIGWID PESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRL DYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 71)	
	VL: DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHNSGYTYLFWFQQRPGQSPRLLIYR MSNLASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO: 70)	
3A4 VH3 /Vk4	VH: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEWIGWID PENGDTYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRL DYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 72)	
	VL: DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHNSGYTYLFWFQQRPGQSPRLLIYR MSNLASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO: 70)	
3M12 VH3/Vk2	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWMGYIT FDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVL DYWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)	
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNFLNWYQQKPGQPVKLLIYYTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQGHTLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)	
3M12 VH3/Vk3	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWMGYIT FDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVL DYWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)	
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNFLNWYQQKPGQPVKLLIYYTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGHTLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)	
3M12 VH4/Vk2	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYITF DGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVL YWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)	
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNFLNWYQQKPGQPVKLLIYYTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQGHTLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)	
3M12 VH4/Vk3	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYITF DGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVL YWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)	
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNFLNWYQQKPGQPVKLLIYYTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGHTLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)	

[0153]

抗体	可变区氨基酸序列	**
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWI YPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDYYPY HGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77)	
	VL: DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYNFSFMHWYQQKPGQPPKLLIFR ASNLESGVPDRFSGSGSRDTFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSSEDPWTFGQGTK LEIK (SEQ ID NO: 78)	
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWI YPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDYYPY HGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 79)	
	VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYNFSFMHWYQQKPGQPPKLLIF RASNLESGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQSSEDPWTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 80)	
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWI YPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDYYPY HGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77)	
	VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYNFSFMHWYQQKPGQPPKLLIF RASNLESGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQSSEDPWTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 80)	

[0154] *突变位置根据包含突变的相应VH序列的Kabat编号

[0155] **根据Kabat编号系统的CDR被加粗

[0156] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VH,所述人源化VH包含表2中提供的任一种抗TfR抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且与表3中提供的相应人源化VH相比,在框架区中包含的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多个)氨基酸变异。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含人源化VL,所述人源化VL包含表2中提供的任一种抗TfR抗体的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且与表3中提供的相应人源化VL相比,在框架区中包含一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多个)氨基酸变异。

[0157] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO: 69具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的人源化VH,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:70具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的人源化VL。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的人源化VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的人源化VL。

[0158] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO: 71具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的人源化VH,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:70具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的人源化VL。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的人源化VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的人源化VL。

[0159] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO: 72具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的人源化VH,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:70具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%

或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VL。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的人源化VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的人源化VL。

[0160] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:73具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VH,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:74具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VL。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的人源化VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的人源化VL。

[0161] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:73具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VH,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:75具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VL。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的人源化VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的人源化VL。

[0162] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:76具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VH,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:74具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VL。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的人源化VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的人源化VL。

[0163] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:76具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VH,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:75具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VL。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的人源化VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的人源化VL。

[0164] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:77具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VH,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:78具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VL。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的人源化VH和含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的人源化VL。

[0165] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:79具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VH,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:80具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的人源化VL。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的人源化VH和含有SEQ ID NO:80氨基酸序列的人源化VL。

[0166] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:77具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的人源化VH,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:80具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的人源化VL。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的人源化VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的人源化VL。

[0167] 在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体是全长IgG,其可包含来自人抗体的重恒定区和轻恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的任何抗TfR抗体的重链可包含重链恒定区(CH)或其一部分(例如,CH1、CH2、CH3或其组合)。重链恒定区可具有任何合适的来源,例如人、小鼠、大鼠或兔。在一个具体实例中,重链恒定区来自人IgG例如IgG1、IgG2或IgG4(γ重链)。以下给出了人IgG1恒定区的一个实例:

[0168] **ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)**。

[0169] 在一些实施方案中,本文中所述的任何抗TfR抗体的重链包含突变体人IgG1恒定区。例如,已知在人IgG1的CH2结构域中引入LALA突变(来源于mAb b12的突变体,其已突变以用Ala234和Ala235替换较低的铰链残基Leu234Leu235)降低了Fc γ受体结合(Bruhns, P., et al. (2009) 和Xu, D. et al. (2000))。以下提供了突变体人IgG1恒定区(突变加粗并带有下划线):

[0170] **ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)**。

[0171] 在一些实施方案中,本文中所述的任何抗TfR抗体的轻链可还包含轻链恒定区(CL),其可以是本领域已知的任何CL。在一些实例中,CL是κ轻链。在另一些实例中,CL是λ轻链。在一些实施方案中,CL是κ轻链,以下提供了其序列:

[0172] **RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
83)**。

[0173] 其他抗体重链和轻链恒定区是本领域公知的,例如在IMGT数据库(www.imgt.org)或www.vbase2.org/vbstat.php.中提供的那些,二者均通过引用并入本文。

[0174] 在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体包含重链,所述重链包含表3中列出的任一种VH或其任意变体以及与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:82具有至少80%、至少

85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的重链恒定区。在一些实施方案中，本文中所述的人源化抗TfR抗体包含重链，所述重链包含表3中列出的任一种VH或其任意变体以及与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:82相比包含不超过25个氨基酸变异（例如，不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异）的重链恒定区。在一些实施方案中，本文中所述的人源化抗TfR抗体包含重链，所述重链包含表3中列出的任一种VH或其任意变体以及SEQ ID NO:81中所示的重链恒定区。在一些实施方案中，本文中所述的人源化抗TfR抗体包含重链，所述重链包含表3中列出的任一种VH或其任意变体以及SEQ ID NO:82中所示的重链恒定区。

[0175] 在一些实施方案中，本文中所述的人源化抗TfR抗体包含轻链，所述轻链包含表3中列出的任一种VL或其任意变体以及与SEQ ID NO:83具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的轻链恒定区。在一些实施方案中，本文中所述的人源化抗TfR抗体包含轻链，所述轻链包含表3中列出的任一种VL或其任意变体以及与SEQ ID NO:83相比包含不超过25个氨基酸变异（例如，不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异）的轻链恒定区。在一些实施方案中，本文中所述的人源化抗TfR抗体包含轻链，所述轻链包含表3中列出的任一种VL或其任意变体以及SEQ ID NO:83中所示的轻链恒定区。

[0176] 下表4中提供了所述抗TfR抗体的IgG重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列的一些实例。

[0177] 表4. 人源化抗TfR IgG实例的重链序列和轻链序列

[0178]

抗体	IgG重链/轻链序列**
3A4 VH3 (N54T*)/Vκ4	重链（具有野生型人IgG1恒定区） <u>EVOLVQSGSELKKPGASVKV</u>SCTASGFNIKDDYMYWVROPFGKLEWIGWIDP <u>ETGDTEYASKFODRVT</u>VTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRLD <u>YWGQGLTVTVSS</u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84) 轻链（具有κ轻链恒定区） DIVMTOSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFOORPGOSPRLLIYRM SNLASGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMOHLEYPTFGGGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4	重链（具有野生型人IgG1恒定区） <u>EVOLVQSGSELKKPGASVKV</u>SCTASGFNIKDDYMYWVROPFGKLEWIGWIDP <u>ESGDTEYASKFODRVT</u>VTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRLDY <u>WGQGLTVTVSS</u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 86) 轻链（具有κ轻链恒定区） DIVMTOSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFOORPGOSPRLLIYRM SNLASGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMOHLEYPTFGGGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3 /Vκ4	重链（具有野生型人IgG1恒定区） <u>EVOLVQSGSELKKPGASVKV</u>SCTASGFNIKDDYMYWVROPFGKLEWIGWIDP <u>ENGDEYASKFODRVT</u>VTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRLD <u>YWGQGLTVTVSS</u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 87) 轻链（具有κ轻链恒定区） DIVMTOSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFOORPGOSPRLLIYRM SNLASGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMOHLEYPTFGGGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)

抗体	IgG重链/轻链序列**
3M12 VH3/Vκ2	重链（具有野生型人IgG1恒定区） <u>QVQLQESGPGLVKPSOTLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIROP</u><u>PGKGLEW</u><u>MGYITF</u> <u>DGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNOFSLKLSSVTAEDTATYYCTR</u><u>SSYDYDVL</u><u>LDY</u> <u>WGOGTTVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u><u>TVTSWNSG</u> ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKAAPLPIEKTISSAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88) 轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIOMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASODISN</u><u>FLNWYQOKPGOPVKLLIYYTSRLH</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS</u><u>SLOPEDFATYYCOOGHTLPYTFGOGTKLEIKRTVA</u> APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH3/Vκ3	重链（具有野生型人IgG1恒定区） <u>QVQLQESGPGLVKPSOTLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIROP</u><u>PGKGLEW</u><u>MGYITF</u> <u>DGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNOFSLKLSSVTAEDTATYYCTR</u><u>SSYDYDVL</u><u>LDY</u> <u>WGOGTTVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u><u>TVTSWNSG</u> ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKAAPLPIEKTISSAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88) 轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIOMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASODISN</u><u>FLNWYQOKPGOPVKLLIYYTSRLH</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS</u><u>SLOPEDFATYYCOOGHTLPYTFGOGTKLEIKRTVA</u> APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
3M12 VH4/Vκ2	重链（具有野生型人IgG1恒定区） <u>QVQLQESGPGLVKPSOTLSLTCTVTGYSITSGYYWNWIROP</u><u>PGKGLEW</u><u>IGYITFD</u> <u>GANNYNPSLKNRVSISRDTSKNOFSLKLSSVTAEDTATYYCTR</u><u>SSYDYDVL</u><u>LDYW</u> <u>GOGTTVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u><u>TVTSWNSGA</u> LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISSAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91) 轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIOMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASODISN</u><u>FLNWYQOKPGOPVKLLIYYTSRLH</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS</u><u>SLOPEDFATYYCOOGHTLPYTFGOGTKLEIKRTVA</u> APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH4/Vκ3	重链（具有野生型人IgG1恒定区） <u>QVQLQESGPGLVKPSOTLSLTCTVTGYSITSGYYWNWIROP</u><u>PGKGLEW</u><u>IGYITFD</u> <u>GANNYNPSLKNRVSISRDTSKNOFSLKLSSVTAEDTATYYCTR</u><u>SSYDYDVL</u><u>LDYW</u> <u>GOGTTVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u><u>TVTSWNSGA</u> LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISSAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)

[0179]

抗体	IgG重链/轻链序列**
	轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIOMTOSPPSSLSASVGDRTTITCRASODISNFLNWYOOKPGOPVKLLIYYTSRLH</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCOOGHTLPYTFGOGTKLEIKRTVA</u> APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	重链（具有野生型人IgG1恒定区） <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYYINWVROAPGOGLEWMGWIIY</u> <u>PGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDYYPYH</u> <u>GMDYWGOGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)
	轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYNDFMHYOOKPGOPPKLLIFRA</u> <u>SNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLOAEDVAVYYCOOSSEDPWTFGOGTKLEI</u> <u>KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ</u> ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	重链（具有野生型人IgG1恒定区） <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYYINWVROAPGOGLEWMGWIIY</u> <u>PGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDYYPYH</u> <u>GMDYWGOGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94)
	轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYNDFMHYOOKPGOPPKLLIFR</u> <u>ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLOAEDVAVYYCOOSSEDPWTFGOGTKLE</u> <u>IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ</u> ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	重链（具有野生型人IgG1恒定区） <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYYINWVROAPGOGLEWMGWIIY</u> <u>PGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDYYPYH</u> <u>GMDYWGOGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)
	轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYNDFMHYOOKPGOPPKLLIFR</u> <u>ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLOAEDVAVYYCOOSSEDPWTFGOGTKLE</u> <u>IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ</u> ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)

[0181] *突变位置根据包含突变的相应VH序列的Kabat编号

[0182] **根据Kabat编号系统的CDR被加粗；VH/VL序列带有下列线

[0183] 在一些实施方案中，本公开内容的人源化抗TfR抗体包含重链，所述重链与SEQ ID NO: 84、86、87、88、91、92和94中任一所示的重链相比，包含不超过25个氨基酸变异（例如，不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异）。作为替代或补充（例如，补充），本公开内容的人源化抗TfR抗体包含轻链，所述轻链与SEQ ID NO: 85、89、90、93和95中任一所示的轻链相比包含不超过25个氨基酸变异

(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0184] 在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:84、86、87、88、91、92和94中的任一个具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),本文中所述的人源化抗TfR抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:85、89、90、93和95中的任一个具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:84、86、87、88、91、92和94中任一个的氨基酸序列的重链。作为替代或补充(例如,补充),本文中所述的抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:85、89、90、93和95中任一个的氨基酸序列的轻链。

[0185] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:84具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:85具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:84的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0186] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:86具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:85具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:86的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0187] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:87具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:85具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:87的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0188] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:88具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:89具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:88的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链。

[0189] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:88具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:90具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:88的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0190] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:91具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:89具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包

含含有SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链。

[0191] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:91具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或 (例如,和) 含有与SEQ ID NO:90具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0192] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:92具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或 (例如,和) 含有与SEQ ID NO:93具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链。

[0193] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:94具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或 (例如,和) 含有与SEQ ID NO:95具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0194] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:92具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或 (例如,和) 含有与SEQ ID NO:95具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0195] 在一些实施方案中,抗TfR抗体是完整抗体 (全长抗体) 的Fab片段、Fab' 片段或F(ab')₂片段。完整抗体 (全长抗体) 的抗原结合片段可以通过常规方法制备 (例如,重组地制备或通过使用酶如木瓜蛋白酶消化全长IgG的重链恒定区来制备)。例如,F(ab')₂片段可通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化抗体分子产生,并且Fab片段可通过还原F(ab')₂片段的二硫桥产生。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体的Fab片段中的重链恒定区包含以下氨基酸序列:

[0196] **ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 96)**

[0197] 在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体包含重链,所述重链包含表3中列出的任一种VH或其任意变体以及与SEQ ID NO:96具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的重链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体包含重链,所述重链包含表3中列出的任一种VH或其任意变体以及与SEQ ID NO:96相比包含不超过25个氨基酸变异 (例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异) 的重链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体包含重链,所述重链包含表3中列出的任一种VH或其任意变体以及SEQ ID NO:96中所示的重链恒定区。

[0198] 在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体包含轻链,所述轻链包含表3中列出的任一种VL或其任意变体以及与SEQ ID NO:83具有至少80%、至少85%、至少90%、

至少95%或至少99%同一性的轻链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体包含轻链,所述轻链包含表3中列出的任一种VL或其任意变体以及与SEQ ID NO:83相比包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)的轻链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体包含轻链,所述轻链包含表3中列出的任一种VL或其任意变体以及SEQ ID NO:83中所示的轻链恒定区。

[0199] 下表5中提供了所述抗TfR抗体的Fab重链和轻链氨基酸序列的一些实例。

[0200] 表5. 人源化抗TfR Fab实例的重链和轻链序列

[0201]

抗体	Fab重链/轻链序列**
3A4 VH3 (N54T*)/Vκ4	重链 (具有部分人IgG1恒定区) <u>EVOLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVROPPGKGLEWIGWIDP</u> <u>ETGDTEYASKFODRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRLGLD</u> <u>YWGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS</u> <u>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV</u> <u>EPKSCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 97)
	轻链 (具有κ轻链恒定区) <u>DIVMTQSPPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFOORPGOSPRLLIYRM</u> <u>SNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMOHLEYPFTFGGGTKVE</u> <u>IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ</u> <u>ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4	重链 (具有部分人IgG1恒定区) <u>EVOLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVROPPGKGLEWIGWIDP</u> <u>ESGDTEYASKFODRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRLGLDY</u> <u>WGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG</u> <u>ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE</u> <u>PKSCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 98)
	轻链 (具有κ轻链恒定区) <u>DIVMTQSPPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFOORPGOSPRLLIYRM</u> <u>SNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMOHLEYPFTFGGGTKVE</u> <u>IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ</u> <u>ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3/Vκ4	重链 (具有部分人IgG1恒定区) <u>EVOLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVROPPGKGLEWIGWIDP</u> <u>ENGDTTEYASKFODRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRLGLD</u> <u>YWGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS</u> <u>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV</u> <u>EPKSCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 99)
	轻链 (具有κ轻链恒定区) <u>DIVMTQSPPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFOORPGOSPRLLIYRM</u> <u>SNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMOHLEYPFTFGGGTKVE</u> <u>IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ</u> <u>ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 85)
3M12 VH3/Vκ2	重链 (具有部分人IgG1恒定区) <u>QVQLOESGPGLVKPSOTLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIROPPGKGLEWMGYITF</u> <u>DGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNOFSLKLSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVLDY</u> <u>WGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG</u> <u>ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE</u> <u>PKSCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 100)
	轻链 (具有κ轻链恒定区) <u>DIOMTQSPSSLSASVGDRTITCRASODISNLFNWYQOKPGOPVKLLIYYTSRLH</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCOOGHTLPYTFGOGTKLEIKRTVA</u> <u>APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ</u> <u>DSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH3/Vκ3	重链 (具有部分人IgG1恒定区) <u>QVQLOESGPGLVKPSOTLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIROPPGKGLEWMGYITF</u> <u>DGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNOFSLKLSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVLDY</u> <u>WGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG</u> <u>ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE</u> <u>PKSCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 100)
	轻链 (具有κ轻链恒定区) <u>DIOMTQSPSSLSASVGDRTITCRASODISNLFNWYQOKPGOPVKLLIYYTSRLH</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCOOGHTLPYTFGOGTKLEIKRTVA</u> <u>APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ</u> <u>DSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 90)

[0202]

抗体	Fab重链/轻链序列**
3M12 VH4/Vκ2	重链（具有部分人IgG1恒定区） <u>OVOLQESGPGLVKPSOTLSLTCTVTGYSITSGYYWNWIROP</u> <u>PGKGLEWIGYITFD</u> <u>GANNYNPSLKNRV</u> <u>SISRDT</u> <u>SKNOFSLKLSSVTAEDTATYYCTR</u> <u>SSYDYDVL</u> <u>LDYW</u> <u>GOGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>PTVSWNSGA</u> <u>LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP</u> KSCDKTHT (SEQ ID NO: 101)
	轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIOMTOSPSSLSASVGDRVTITCRASODISN</u> <u>FLNWYOOKPGOPVKLLIYYTSRLH</u> <u>SGVPSRFS</u> <u>SGSGTDFLT</u> <u>TISSLOPEDFATYFCOOGHTLPYTFGOGTKLEIKRTVA</u> <u>APSVFIFPPSDEQLKSGTASV</u> <u>VCLLNNFY</u> <u>PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ</u> <u>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH4/Vκ3	重链（具有部分人IgG1恒定区） <u>OVOLQESGPGLVKPSOTLSLTCTVTGYSITSGYYWNWIROP</u> <u>PGKGLEWIGYITFD</u> <u>GANNYNPSLKNRV</u> <u>SISRDT</u> <u>SKNOFSLKLSSVTAEDTATYYCTR</u> <u>SSYDYDVL</u> <u>LDYW</u> <u>GOGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>PTVSWNSGA</u> <u>LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP</u> KSCDKTHT (SEQ ID NO: 101)
	轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIOMTOSPSSLSASVGDRVTITCRASODISN</u> <u>FLNWYOOKPGOPVKLLIYYTSRLH</u> <u>SGVPSRFS</u> <u>SGSGTDFLT</u> <u>TISSLOPEDFATYFCOOGHTLPYTFGOGTKLEIKRTVA</u> <u>APSVFIFPPSDEQLKSGTASV</u> <u>VCLLNNFY</u> <u>PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ</u> <u>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 90)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	重链（具有部分人IgG1恒定区） <u>OVOLVOSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCASGY</u> <u>SFTDYYINWVROAPGOGLEWMGW</u> <u>IY</u> <u>PGSGNTRY</u> <u>SERFKGRVTITRDT</u> <u>SASTAYMELSSLR</u> <u>SEDTAVYYCARE</u> <u>DYYPYH</u> <u>GMDYWGOGTLVT</u> <u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>PTV</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV</u> <u>DKKVEPKSCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 102)
	轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASE</u> <u>SDGYDNSFMHWYOOKPGOPPKLLIFRA</u> <u>SNLESGVPDRFSGSGSGTDFLT</u> <u>TISSLOAEDVAVYYCOOSSEDPWTFGOGTKLE</u> <u>IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV</u> <u>VCLLNNFY</u> <u>PREAKVQWKVDNALQSGNSQ</u> <u>ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 93)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	重链（具有部分人IgG1恒定区） <u>OVOLVOSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCASGY</u> <u>SFTDYYINWVROAPGOGLEWMGW</u> <u>IY</u> <u>PGSGNTRY</u> <u>SERFKGRVTITRDT</u> <u>SASTAYMELSSLR</u> <u>SEDTAVYYCARE</u> <u>DYYPYH</u> <u>GMDYWGOGTLVT</u> <u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>PTV</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV</u> <u>DKKVEPKSCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 103)
	轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASE</u> <u>SDGYDNSFMHWYOOKPGOPPKLLIFR</u> <u>ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFLT</u> <u>TISSLOAEDVAVYYCOOSSEDPWTFGOGTKLE</u> <u>IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV</u> <u>VCLLNNFY</u> <u>PREAKVQWKVDNALQSGNSQ</u> <u>ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 95)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	重链（具有部分人IgG1恒定区） <u>OVOLVOSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCASGY</u> <u>SFTDYYINWVROAPGOGLEWMGW</u> <u>IY</u> <u>PGSGNTRY</u> <u>SERFKGRVTITRDT</u> <u>SASTAYMELSSLR</u> <u>SEDTAVYYCARE</u> <u>DYYPYH</u> <u>GMDYWGOGTLVT</u> <u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>PTV</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV</u> <u>DKKVEPKSCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 102)
抗体	Fab重链/轻链序列**
[0203]	轻链（具有κ轻链恒定区） <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASE</u> <u>SDGYDNSFMHWYOOKPGOPPKLLIFR</u> <u>ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFLT</u> <u>TISSLOAEDVAVYYCOOSSEDPWTFGOGTKLE</u> <u>IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV</u> <u>VCLLNNFY</u> <u>PREAKVQWKVDNALQSGNSQ</u> <u>ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 95)

[0204] *突变位置根据包含突变的相应VH序列的Kabat编号

[0205] **根据Kabat编号系统的CDR被加粗；VH/VL序列带有下列线

[0206] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含重链,所述重链与SEQ ID NO:97至103中的任一个中所示的重链相比包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的人源化抗TfR抗体包含轻链,所述轻链与SEQ ID NO:85、89、90、93和95中的任一个中所示的轻链相比不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0207] 在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:97至103中的任一个具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),本文中所述的人源化抗TfR抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:85、89、90、93和95中的任一个具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:97至103中任一个的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),本文中所述的抗TfR抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:85、89、90、93和95中任一个的氨基酸序列。

[0208] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:97具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:85具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0209] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:98具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:85具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:98的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0210] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:99具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:85具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0211] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:100具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:89具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链。

[0212] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:100具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和)含有与SEQ ID NO:90具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包

含含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0213] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:101具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和) 含有与SEQ ID NO:89具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链。

[0214] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:101具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和) 含有与SEQ ID NO:90具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0215] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:102具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和) 含有与SEQ ID NO:93具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链。

[0216] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:103具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和) 含有与SEQ ID NO:95具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:103的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0217] 在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含以下:含有与SEQ ID NO:102具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的重链,和/或(例如,和) 含有与SEQ ID NO:95具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0218] 在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR受体抗体可以是任何抗体形式,包括但不限于完整(即全长) 抗体、其抗原结合片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链抗体、双特异性抗体或纳米抗体。在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体是scFv。在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体是scFv-Fab(例如,与恒定区的一部分融合的scFv)。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR受体抗体是与恒定区(例如,SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:82中所示的人IgG1恒定区或其一部分,例如Fc部分) 在C端或N端融合的scFv。

[0219] 在一些实施方案中,可在残基不太可能参与与靶抗原(例如,转铁蛋白受体) 相互作用的位置(例如,如基于晶体结构确定的) 处将保守突变引入抗体序列(例如,CDR或框架序列) 中。在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换) 引入本文中所述的抗TfR抗体的Fc区(例如,在CH2结构域(人IgG1的第231至340位残基) 和/或(例如,和) CH3结构域(人IgG1的第341至447位残基) 和/或(例如,和) 铰链区中,根据Kabat编号系统(例如,Kabat中的EU索引) 编号),以改变抗体的一种或更多种功能特性,例如血清半衰期、

补体固定、Fc受体结合和/或(例如,和)抗原依赖性细胞毒性。

[0220] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换)引入Fc区(CH1结构域)的铰链区中,使得铰链区中的半胱氨酸残基的数目改变(例如,增加或减少),如例如美国专利No.5,677,425中所述。可改变CH1结构域的铰链区中半胱氨酸残基的数目,例如以促进轻链和重链的组装,或改变(例如,提高或降低)抗体的稳定性或促进接头缀合。

[0221] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换)引入本文所述的肌肉靶向抗体的Fc区(例如,在CH2结构域(人IgG1的第231至340位残基)和/或(例如,和)CH3结构域(人IgG1的第341至447位残基)和/或(例如,和)铰链区中,根据Kabat编号系统(例如,Kabat中的EU索引)编号),以提高或降低抗体对效应细胞表面上Fc受体(例如,激活的Fc受体)的亲和力。降低或提高抗体对Fc受体的亲和力的抗体Fc区中突变以及将这样的突变引入Fc受体或其片段的技术是本领域技术人员已知的。可被进行以改变抗体对Fc受体的亲和力的抗体Fc受体中突变的一些实例描述于以下中:例如Smith P et al., (2012) PNAS 109:6181-6186,美国专利No.6,737,056,以及国际公开No.WO 02/060919、WO 98/23289、和WO 97/34631,其通过引用并入本文。

[0222] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以改变(例如,降低或提高)抗体在体内的半衰期。参见例如国际公开No.WO 02/060919、WO 98/23289和WO 97/34631,以及美国专利No.5,869,046、6,121,022、6,277,375和6,165,745,例如将改变(例如,降低或提高)抗体在体内的半衰期的突变。

[0223] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以降低体内抗TfR抗体的半衰期。在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以提高抗体在体内的半衰期。在一些实施方案中,抗体可在第二恒定(CH2)结构域(人IgG1的第231至340位残基)和/或(例如,和)第三恒定(CH3)结构域(人IgG1的第341至447位残基)(根据Kabat中的EU索引(Kabat E A et al., (1991)同上)编号)中具有一个或更多个氨基酸突变(例如,替换)。在一些实施方案中,本文中所述的抗体的IgG1的恒定区包含在第252位处的甲硫氨酸(M)至酪氨酸(Y)替换,在第254位处的丝氨酸(S)至苏氨酸(T)替换,以及在第256位处的苏氨酸(T)至谷氨酸(E)替换,所述位置根据Kabat中的EU索引编号。参见美国专利No.7,658,921,其通过引用并入本文。这种类型的突变体IgG(称为“YTE突变体”)已显示出与同一抗体的野生型形式相比半衰期提高4倍(参见Dall'Acqua W F et al., (2006) J Biol Chem 281:23514-24)。在一些实施方案中,抗体包含IgG恒定结构域,该结构域包含在第251至257、285至290、308至314、385至389和428至436位处的氨基酸残基的一个、两个、三个或更多个氨基酸替换,所述位置根据Kabat中的EU索引编号。

[0224] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸替换引入IgG恒定结构域Fc区中,以改变抗TfR抗体的效应子功能。对其的亲和力被改变的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。该方法在美国专利No.5,624,821和5,648,260中有更详细的描述。在一些实施方案中,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其他方式)可降低循环抗体的Fc受体结合,从而提高肿瘤定位。对于使恒定结构域缺失或失活从而提高肿瘤定位的突变的描述,

参见例如美国专利No.5,585,097和8,591,886。在一些实施方案中,可将一个或更多个氨基酸替换引入本文中所述的抗体的Fc区中,以去除Fc区上潜在的糖基化位点,这可降低Fc受体结合(参见,例如Shields R L et al., (2001) J Biol Chem 276:6591-604)。

[0225] 在一些实施方案中,可将本文中所述的抗TfR抗体的恒定区中的一个或更多个氨基酸替换为不同的氨基酸残基,使得抗体具有改变的C1q结合和/或(例如,和)降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。这种方法在美国专利No.6,194,551 (Idusogie et al)中有更详细的描述。在一些实施方案中,改变本文中所述的抗体的CH2结构域的N端区域中的一个或更多个氨基酸残基,从而改变抗体的固定补体的能力。这种方法在国际公开No.WO 94/29351中有进一步描述。在一些实施方案中,对本文中所述的抗体的Fc区进行修饰以提高抗体的介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或(例如,和)提高抗体对Fc γ 受体的亲和力。这种方法在国际公开No.WO 00/42072中有进一步描述。

[0226] 在一些实施方案中,本文中提供的抗体的重链和/或(例如,和)轻链可变结构域序列可用于产生例如CDR接枝、嵌合、人源化或复合的人抗体或抗原结合片段,如本文中其他地方所述。如本领域普通技术人员所理解的,来源于本文中提供的任何抗体的任何变体(CDR接枝、嵌合、人源化或复合的抗体)可用于本文中所述的组合物和方法中,并将保持特异性结合转铁蛋白受体的能力,从而使得相对于其所来源原始抗体,变体(CDR接枝、嵌合、人源化或复合的抗体)具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或更多的与转铁蛋白受体的结合。

[0227] 在一些实施方案中,本文中提供的抗体包含赋予抗体以期望性质的突变。例如,为了避免归因于已知与天然IgG4mAb发生的Fab臂交换而引起的潜在并发症,本文中提供的抗体可包含稳定性‘Adair’突变(Angal S., et al., “A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4) antibody,” Mol Immunol 30,105-108;1993),其中第228位(EU编号,根据Kabat编号为第241位残基)丝氨酸转化为脯氨酸,从而产生了IgG1样铰链序列。因此,任何抗体都可包含稳定性‘Adair’突变。

[0228] 在一些实施方案中,对抗体进行修饰,例如,通过糖基化、磷酸化、SUMO化和/或(例如,和)甲基化进行修饰。在一些实施方案中,抗体是与一个或更多个糖或碳水化合物分子缀合的糖基化抗体。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子通过N-糖基化、O-糖基化、C-糖基化、糖基磷脂酰肌醇化(GPI锚定附着)和/或(例如,和)磷酸糖基化与抗体缀合。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是单糖、二糖、寡糖或聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是支化的寡糖或支化的聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子包含甘露糖单元、葡萄糖单元、N-乙酰葡萄糖胺单元、N-乙酰半乳糖胺单元、半乳糖单元、岩藻糖单元或磷脂单元。在一些实施方案中,存在约1至10、约1至5、约5至10、约1至4、约1至3或约2个糖分子。在一些实施方案中,糖基化抗体是完全或部分糖基化的。在一些实施方案中,通过化学反应或通过酶促手段使抗体糖基化。在一些实施方案中,抗体在体外或细胞内被糖基化,其可任选地缺少N-或O-糖基化途径中的酶,例如糖基转移酶。在一些实施方案中,用糖或碳水化合物分子对抗体进行官能化,如2014年5月1日公开的标题为“Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof”的国际专利申请公开W02014065661中所述。

[0229] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种抗TfR1抗体可在重链序列和/或(例如,

和)轻链序列中包含信号肽(例如,N端信号肽)。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含VH和VL序列中的任一种、IgG重链序列和轻链序列中的任一种、或者本文中所述的Fab'重链序列和轻链序列中的任一种,并且还包含信号肽(例如,N端信号肽)。在一些实施方案中,信号肽包含氨基酸序列MGWSCIIILFLVATATGVHS(SEQ ID NO:104)。

[0230] III. 抗TfR抗体的制备

[0231] 本文中所述的能够结合TfR的抗体可通过本领域已知的任何方法制备。参见,例如,Harlow and Lane, (1998) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。

[0232] 在一些实施方案中,可通过常规的杂交瘤技术来制备对靶抗原(例如,TfR)具有特异性的抗体。任选地与载体蛋白例如KLH偶联的全长靶抗原或其片段可用于对进行宿主动物免疫接种以产生与该抗原结合的抗体。如本文中进一步描述的,宿主动物的免疫接种的途径和方案通常与用于抗体刺激和产生的已建立的和常规的技术保持一致。用于产生小鼠抗体、人源化抗体和人抗体的一般技术是本领域已知的并且在本文中进行了描述。考虑了任何哺乳动物对象(包括人)或从其来源的产生抗体的细胞均可被操作以用作产生哺乳动物(包括人)杂交瘤细胞系的基础。通常来说,向宿主动物腹膜内、肌肉内、经口、皮下、足底内(intraplantar)和/或(例如,和)皮内接种一定量的免疫原(包括如本文中所述的)。

[0233] 如果期望的话,可对目的(例如,通过杂交瘤产生的)抗体(单克隆的或多克隆的)进行测序,并随后可将多核苷酸序列克隆到用于表达或增殖的载体中。编码目的抗体的序列可保持在宿主细胞中的载体中,并随后可扩增宿主细胞并冷冻以供将来使用。在一个替代方案中,多核苷酸序列可被用于遗传操作以使抗体“人源化”或改善抗体的亲和力(亲和力成熟)或其他特征。例如,如果抗体用于人的临床试验和治疗,则可将恒定区工程化成更类似于人恒定区以避免免疫应答。可期望对抗体序列进行遗传操作以获得对靶抗原更大的亲和力和更大的效力。对本领域技术人员明显的是,可对抗体进行一种或更多种多核苷酸改变并且仍保持其对靶抗原的结合特异性。

[0234] 在另一些实施方案中,可通过使用已被工程化以表达特定人免疫球蛋白的市售小鼠来获得完全人抗体。被设计以产生更期望的(例如,完全人抗体)或更稳健的免疫应答的转基因动物也可用于产生人源化抗体或人抗体。这样的技术的一些实例是来自Amgen, Inc. (Fremont, CA)的XenomouseTM和来自Medarex, Inc. (Princeton, NJ)的HuMAb-MouseTM和TC MouseTM或来自Harbour Antibodies BV (Holland)的H2L2小鼠。在另一个替代方案中,可通过噬菌体展示或酵母技术重组地制备抗体。参见,例如,美国专利No. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743和6,265,150;以及Winter et al., (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455。或者,噬菌体展示技术(McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-553)可用于由来自未经免疫接种的供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库体外产生人抗体和抗体片段。

[0235] 完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段可通过常规方法制备。例如,F(ab')₂片段可通过抗体分子的胃蛋白酶消化来产生,并且Fab'片段可通过还原F(ab')₂片段的二硫桥来产生。经遗传工程化的抗体,例如人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体和双特异性抗体,可通过例如常规重组技术来产生。在一个实例中,编码对靶抗原具有特异性的单克隆抗体的DNA可使用常规程序容易地分离和测序(例如,通过使用能够特异性结合编码单克隆抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞充当这样的DNA的优选来源。一旦分离,DNA即

可被置入一种或更多种表达载体中,然后将所述载体转染到宿主细胞(例如在其他情况下不产生免疫球蛋白的大肠杆菌(*E. coli*)细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(*Chinese hamster ovary*, CHO)细胞、人HEK293细胞或骨髓瘤细胞)中,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。参见例如PCT公开No. WO 87/04462。然后可修饰DNA,例如,通过替换人重链和轻链恒定结构域的编码序列来代替同源鼠序列, Morrison et al., (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851,或通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或一部分共价连接至免疫球蛋白编码序列。以这种方式,可以制备具有对靶抗原的结合特异性的经遗传工程化的抗体,例如“嵌合”或“杂交”抗体。

[0236] 可通过重组技术通过连接编码重链可变区的核苷酸序列和编码轻链可变区的核苷酸序列来制备单链抗体。优选地,在两个可变区之间并入柔性接头。

[0237] 或者,所描述的用于产生单链抗体的技术(美国专利No. 4,946,778和4,704,692)可进行调整以产生噬菌体或酵母scFv文库,并且可遵循常规程序从文库中鉴定出对TfR具有特异性的scFv克隆。可对阳性克隆进行进一步筛选,以鉴定出具有高TfR结合亲和力的那些。

[0238] 遵循本领域已知的和本文中所述的方法获得的抗体可使用本领域公知的方法来表征。例如,一种方法是鉴定与抗原结合的表位,或“表位作图”。本领域已知有许多方法用于对蛋白质上表位的位置进行作图和表征,包括解析抗体-抗原复合物的晶体结构、竞争测定、基因片段表达测定和基于合成肽的测定,如例如在Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999的第11章中所述。在一个实例中,可使用与蛋白水解和质谱偶联的H/D-Ex(氢氘交换)来完成表位作图。在另一个实例中,表位作图可用于确定与抗体结合的序列。表位可以是线性表位,即包含在单个氨基酸区段中,或者可以通过氨基酸的三维相互作用形成的构象表位,其可以不一定包含在单个区段中(一级结构线性序列)。可分离或合成(例如,重组地分离或合成)不同长度(例如,至少4至6个氨基酸长)的肽,并将其用于与抗体的结合测定。在另一个实例中,与抗体结合的表位可在系统筛选中通过使用来源于靶抗原序列的重叠肽并确定抗体的结合来确定。根据基因片段表达测定,将编码靶抗原的开放读码框随机地或通过特定的遗传构建进行片段化,并确定所表达的抗原片段与受试抗体的反应性。例如,基因片段可通过PCR产生,并随后转录并在存在放射性氨基酸的情况下在体外翻译成蛋白质。然后通过免疫沉淀和凝胶电泳来确定抗体与经放射性标记的抗原片段的结合。某些表位还可通过使用展示在噬菌体颗粒表面上的大的随机肽序列文库(噬菌体文库)来鉴定。或者,可在简单结合测定中测试所确定的重叠肽片段文库与受试抗体的结合。在另一个实例中,可进行抗原结合结构域的诱变、结构域交换实验和丙氨酸扫描诱变来鉴定对于表位结合而言所需、足够和/或(例如,和)必需的残基。或者,可使用已知与相同抗原结合的其他抗体进行竞争测定,以确定抗体是否与其他抗体结合相同的表位。竞争测定是本领域技术人员公知的。

[0239] 在一些实例中,通过如下例示的重组技术制备抗TfR抗体。可将编码如本文中所述的抗TfR抗体的重链和轻链的核酸克隆到一个表达载体中,每个核苷酸序列与合适的启动子可操作连接。在一个实例中,编码所述重链和轻链的每个核苷酸序列与不同的启动子可操作连接。或者,编码所述重链和轻链的核苷酸序列可与单个启动子可操作连接,使得重链

和轻链二者均由相同的启动子表达。必要时,可在重链编码序列和轻链编码序列之间插入内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site,IRES)。

[0240] 在一些实例中,将编码抗体的两条链的核苷酸序列克隆到两种载体中,所述两种载体可被引入到相同或不同的细胞中。当两条链在不同细胞中表达时,可将其各自从表达它们的宿主细胞分离,并且可将所分离的重链和轻链混合并在允许形成抗体的合适条件下孵育。

[0241] 一般而言,可使用本领域已知的方法将编码抗体的一条链或所有链的核酸序列克隆到与合适的启动子可操作连接的合适表达载体中。例如,可在合适的条件下使核苷酸序列和载体与限制性酶接触,以在每个分子上产生可彼此配对并用连接酶连接在一起的互补末端。或者,可将合成核酸接头与基因的末端连接。这些合成接头包含对应于载体中特定限制性位点的核苷酸序列。表达载体/启动子的选择将取决于用于产生抗体的宿主细胞的类型。

[0242] 多种启动子可用于表达本文中所述的抗体,包括但不限于巨细胞病毒(CMV)中间早期启动子、病毒LTR(例如,劳斯肉瘤(Rous sarcoma)病毒LTR、HIV-LTR、HTLV-1LTR)、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、大肠杆菌lac UV启动子和单纯疱疹tk病毒启动子。

[0243] 还可使用可调节启动子。这样的可调节启动子包括:使用来自大肠杆菌的lac阻遏物作为转录调节物来调节来自带有lac操纵子的哺乳动物细胞启动子的转录的那些[Brown,M. et al.,Cell,49:603-612(1987)],使用四环素阻遏物(tetracycline repressor,tetR)的那些[Gossen,M.,and Bujard,H.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-5551(1992);Yao,F. et al.,Human Gene Therapy,9:1939-1950(1998);Shockelt,P.,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,92:6522-6526(1995)]。另一些系统包括:FK506二聚体,使用astradiol的VP16或p65,RU486,二酚米乐甾酮(diphenol murislerone)或雷帕霉素。可诱导系统可从Invitrogen、Clontech和Ariad等获得。

[0244] 可使用包含具有操纵子的阻遏物的可调节启动子。在一个实施方案中,来自大肠杆菌的lac阻遏物可作为转录调节物发挥用来调节来自带有lac操纵子的哺乳动物细胞启动子的转录[M.Brown et al.,Cell,49:603-612(1987)];Gossen and Bujard(1992);[M.Gossen et al.,Natl.Acad.Sci.USA,89:5547-5551(1992)]将四环素阻遏物(tetR)与转录激活物(VP16)组合以产生tetR-哺乳动物细胞转录激活物融合蛋白tTa(tetR-VP 16),其中tet0带有来源于人巨细胞病毒(human cytomegalovirus,hCMV)启动子的最小启动子,以产生tetR-tet操纵子系统来控制哺乳动物细胞中的基因表达。在一个实施方案中,使用四环素可诱导开关。当四环素操纵子适当地位于CMV启动子的TATA元件下游时,单独的四环素阻遏物(tetR)而不是tetR-哺乳动物细胞转录因子融合衍生物可作为强效反式调节物发挥用来调节哺乳动物细胞中的基因表达(Yao et al.,Human Gene Therapy)。这种四环素可诱导开关的一个特别的优点是它不需要使用在一些情况下对细胞可能有毒性的四环素阻遏物-哺乳动物细胞反式激活子或阻遏物融合蛋白(Gossen et al.,Natl.Acad.Sci.USA,89:5547-5551(1992);Shockett et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,92:6522-6526(1995)),以实现其可调节的作用。

[0245] 另外,载体可包含例如以下中的一些或全部:选择标志物基因,例如用于在哺乳动物细胞中选择稳定或瞬时转染子的新霉素基因;用于高水平转录的来自人CMV的即早期基因的增强子/启动子序列;用于mRNA稳定性的来自SV40的转录终止和RNA加工信号;用于适

当的附加体复制的SV40多瘤复制起点和ColE1；内部核糖体结合位点(IRES)、多功能多克隆位点；以及用于有义和反义RNA的体外转录的T7和SP6 RNA启动子。合适载体和用于产生含有转基因的载体的方法是本领域公知的并且是可获得的。可用于实践本文中所述方法的多腺苷酸化信号的一些实例包括但不限于人胶原蛋白I多腺苷酸化信号、人胶原蛋白II多腺苷酸化信号和SV40多腺苷酸化信号。

[0246] 可将包含编码任何抗体的核酸的一种或更多种载体(例如,表达载体)引入到合适的宿主细胞中以用于产生抗体。可在适合于表达抗体或其任何多肽链的条件下培养宿主细胞。这样的抗体或其多肽链可通过常规方法(例如亲和纯化)由所培养细胞(例如,从所述细胞或培养上清液)回收。如果必要的话,可在合适的条件下将抗体的多肽链孵育合适的时间段,从而允许产生抗体。

[0247] 在一些实施方案中,用于制备本文中所述抗体的方法涉及编码抗TfR抗体的重链和轻链二者的重组表达载体,其也如本文中所述。可通过常规方法,例如磷酸钙介导的转染,将重组表达载体引入到合适的宿主细胞(例如,dhfr-CHO细胞)中。可选择阳性转化体宿主细胞并在允许表达形成抗体的两条多肽链的合适条件下培养,所述多肽链可从细胞或从培养基回收。必要时,可在允许形成抗体的适合条件下孵育从宿主细胞回收的两条链。在一些实施方案中,用于表达本文中所述抗TfR抗体的宿主细胞是CHO-S细胞(例如,ThermoFisher Catalog#R80007)。

[0248] 在一个实例中,提供了两种重组表达载体,一种编码抗TfR抗体的重链,并且另一种编码抗TfR抗体的轻链。这两种重组表达载体均可通过常规方法例如磷酸钙介导的转染引入到合适的宿主细胞(例如,dhfr-CHO细胞)中。

[0249] 或者,可将每种表达载体引入到合适的宿主细胞中。可选择阳性转化体并在允许表达抗体的多肽链的合适条件下培养。当将两种表达载体引入到相同的宿主细胞中时,可从宿主细胞或从培养基回收在其中产生的抗体。如果必要的话,可从宿主细胞或从培养基回收多肽链,并随后在允许形成抗体的合适条件下孵育。当将两种表达载体引入到不同的宿主细胞中时,其各自可从相应的宿主细胞或从相应的培养基回收。然后可在合适的条件下孵育两条多肽链以形成抗体。

[0250] 标准分子生物学技术用于制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞以及从培养基回收抗体。例如,可用蛋白A或蛋白G偶联基质通过亲和色谱分离一些抗体。

[0251] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种抗TfR抗体是通过重组DNA技术在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞悬浮培养物中、任选地在CHO-K1细胞(例如,来源于欧洲动物细胞培养物保藏中心(European Collection of Animal Cell Culture)的CHO-K1细胞,目录号85051005)悬浮培养物中产生的。

[0252] 在一些实施方案中,本文中提供的抗体可具有一种或更多种翻译后修饰。在一些实施方案中,N端环化,也称为焦谷氨酸(pyro-Glu)形成,可在产生期间在抗体的N端谷氨酸(Glu)和/或谷氨酰胺(Gln)残基处发生。因此,应理解指定为具有包含N端谷氨酸或谷氨酰胺残基的序列的抗体涵盖已经历由翻译后修饰引起的焦谷氨酸形成的抗体。在一些实施方案中,焦谷氨酸形成发生在重链序列中。在一些实施方案中,焦谷氨酸形成发生在轻链序列中。

[0253] IV. 复合物

[0254] 在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR抗体可用于将分子载荷递送至靶细胞或靶组织(例如,表达TfR的细胞或组织)。因此,本公开内容的一些方面提供了包含本文中所述的任一种人源化抗TfR抗体(例如,如表4和表5中提供的IgG或Fab形式的人源化3-A4、3-M12或5-H12)与分子载荷的复合物。本文中所述的复合物可用于多种应用,例如诊断或治疗应用。

[0255] 在一些实施方案中,复合物包含与寡核苷酸(例如,反义寡核苷酸)共价连接的抗TfR抗体。在一些实施方案中,本文中所述的复合物用于调节至少一种基因、蛋白质和/或(例如,和)核酸的活性或功能。在一些实施方案中,与复合物一起存在的分子载荷负责调节基因、蛋白质、和/或(例如,和)核酸。分子载荷可以是小分子、蛋白质、核酸、寡核苷酸或能够调节细胞中的基因、蛋白质和/或(例如,和)核酸的活性或功能的任何分子实体。在一些实施方案中,分子载荷是靶向肌细胞中的疾病相关重复的寡核苷酸。

[0256] A. 分子载荷

[0257] 本公开内容的一些方面提供了例如,用于调节生物学结局,例如,DNA序列的转录、蛋白质的表达或蛋白质的活性的分子载荷,其可与本文中所述的任一种抗TfR抗体连接。在一些实施方案中,这样的分子载荷能够靶向肌细胞,例如在通过所连接的抗TfR抗体递送至肌细胞之后通过与肌细胞中的核酸或蛋白质特异性结合。应理解,根据本公开内容可使用多种类型的分子载荷。例如,分子载荷可包含以下或由以下组成:寡核苷酸(例如,反义寡核苷酸)、肽(例如,结合肌细胞中与疾病相关的核酸或蛋白质的肽)、蛋白质(例如,结合肌细胞中与疾病相关的核酸或蛋白质的蛋白质)或小分子(例如,调节肌细胞中与疾病相关的核酸或蛋白质之功能的小分子)。

[0258] 在一些实施方案中,分子载荷是包含具有表6中提供的基因之互补区的链的寡核苷酸。

[0259] 表6. 肌肉疾病和相应基因的列表。

罕见肌肉疾病靶基因		
疾病	基因符号	GenBank 登录号
成年蓬佩病 (Adult Pompe)	GAA	NM_000152; NM_001079803; NM_001079804
成年蓬佩病	GYS1	NM_001161587; NM_002103
中央核肌病 (Centronuclear myopathy, CNM)	DNM2	NM_001190716; NM_004945; NM_001005362; NM_001005360; NM_001005361; NM_007871
迪谢内肌营养不良	DMD	NM_004023; NM_004020; NM_004018; NM_004012
面肩胛肱型肌营养不良 (Facioscapulohumeral muscular dystrophy, FSHD)	DUX4	NM_001306068; NM_001363820; NM_001205218; NM_001293798
家族性肥厚型心肌病	MYBPC3	NM_000256

[0261]

家族性肥厚型心肌病	MYH6	NM_002471; NM_001164171; NM_010856
家族性肥厚型心肌病	MYH7	NM_000257; NM_080728
家族性肥厚型心肌病	TNNI3	NM_000363
家族性肥厚型心肌病	TNNT2	NM_001001432; NM_001001431; NM_000364; NM_001001430; NM_001276347; NM_001276346; NM_001276345
进行性骨化性纤维结构不良 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva, FOP)	ACVR1	NM_001105; NM_001347663; NM_001347664; NM_001347665; NM_001347666; NM_001347667; NM_001111067
弗里德赖希共济失调 (Friedreich's ataxia, FRDA)	FXN	NM_001161706; NM_181425; NM_000144
包涵体肌病2	GNE	NM_001190383; NM_001190384; NM_001128227; NM_005476; NM_001190388
莱恩远端肌病	MYH7	NM_000257; NM_080728
肌原纤维肌病	BAG3	NM_004281
肌原纤维肌病	CRYAB	NM_001885; NM_001330379; NM_001289807; NM_001289808
肌原纤维肌病	DES	NM_001927
肌原纤维肌病	DNAJB6	NM_005494; NM_058246
肌原纤维肌病	FHL1	NM_001159701; NM_001159699; NM_001159702; NM_001159703; NM_001159704; NM_001159700; NM_001167819; NM_001330659; NM_001449; NM_001077362
肌原纤维肌病	FLNC	NM_001458; NM_001127487
肌原纤维肌病	LDB3	NM_007078; NM_001171611; NM_001171610; NM_001080114; NM_001080115; NM_001080116
肌原纤维肌病	MYOT	NM_001300911; NM_006790; NM_001135940
肌原纤维肌病	PLEC	NM_201378; NM_201379; NM_201380; NM_201381; NM_201382; NM_201383; NM_201384; NM_000445
肌原纤维肌病	TTN	NM_133432; NM_133379; NM_133437; NM_003319;

		NM_001256850; NM_001267550; NM_133378
先天性肌强直(常染色体显性形式, 汤姆森病)	CLCN1	NM_000083; NM_013491
I型肌强直性营养不良	DMPK	NM_001081563; NM_004409; NM_001081560; NM_001081562; NM_001288764; NM_001288765; NM_001288766
II型肌强直性营养不良	CNBP	NM_001127192; NM_001127193; NM_001127194; NM_001127195; NM_001127196; NM_003418
肌管性肌病	MTM1	NM_000252
眼咽型肌营养不良	PABPN1	NM_004643
先天性副肌强直	SCN4A	NM_000334
肌肉萎缩基因靶标		
基因符号	GenBank 登录号	相关出版物 *
INHBA (也称为 EDF; FRP)	NM_002192; XM_017012175.1; XM_017012176.1; XM_017012174.1	Lee SJ, et al., Regulation of muscle mass by follistatin and activins., Mol Endocrinol. 2010 Oct;24(10):1998-2008. doi: 10.1210/me.2010-0127. Epub 2010 Sep 1.
FBXO32 (也称为 Fbx32; MAFbx)	NM_058229.3; NM_001242463.1; NM_148177.2	Bodine, S. C., et al., Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. Science 294: 1704-1708, 2001. Gomes, M. D., et al., Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. Proc. Nat. Acad. Sci. 98: 14440-14445, 2001.
MSTN (也称为 GDF8; MSLHP)	NM_005259.2	Saunders. M. A., et al., Human adaptive evolution of myostatin (GDF8), a regulator of muscle growth. Am. J. Hum. Genet. 79: 1089-1097, 2006. Lin, J., et al., Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 291: 701-706, 2002.

[0262]

			Wei Y, et al., Prevention of Muscle Wasting by CRISPR/Cas9-mediated Disruption of Myostatin In Vivo Volume 24, Issue 11, p1889–1891, November 2016
[0263]	TRIM63 (也称为 IRF; SMRZ; MURF1; MURF2; RNF28)	NM_032588.3; XM_017002559.2	Höllriegel R, et al. Anabolic effects of exercise training in patients with advanced chronic heart failure (NYHA IIIb): impact on ubiquitin-protein ligases expression and skeletal muscle size. Int J Cardiol, 2013 Aug 10. Eddins MJ, et al. Targeting the ubiquitin E3 ligase MuRF1 to inhibit muscle atrophy. Cell Biochem Biophys, 2011 Jun.

[0264] *所引用参考文献的内容通过引用整体并入本文。

[0265] 在一些实施方案中,分子载荷是用于治疗神经系统病症的药剂。本文中使用的“神经系统病症”是指影响CNS和/或(例如,和)在CNS中具有致病源(etiology)的疾病或病症。CNS疾病或病症的一些实例包括但不限于神经病、淀粉样变性、癌症、眼疾病或病症、病毒感染或微生物感染、炎症、局部缺血、神经退行性疾病、癫痫、行为障碍和溶酶体贮积病。出于本申请的目的,CNS将被理解为包括眼,其通常通过血-视网膜屏障与身体的其余部分隔离。神经系统病症的一些具体实例包括但不限于神经退行性疾病(包括但不限于路易体病(Lewy body disease)、脊髓灰质炎后综合征(postpoliomyelitis syndrome)、夏伊-德拉格综合征(Shy-Draeger syndrome)、橄榄体脑桥小脑萎缩(olivopontocerebellar atrophy)、帕金森病(Parkinson's disease)、多系统萎缩(multiple system atrophy)、纹状体黑质变性(striatonigral degeneration)、tau蛋白病(tauopathy)(包括但不限于阿尔茨海默病(Alzheimer disease)和核上性麻痹(supranuclear palsy))、朊病毒病(包括但不限于牛海绵状脑病(bovine spongiform encephalopathy)、羊瘙痒病(scrapie)、克罗伊茨费尔特-雅各布综合征(Creutzfeldt-Jakob syndrome)、库鲁病(kuru)、格斯特曼-施特劳斯勒尔-沙因克尔病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、慢性消耗病(chronic wasting disease)和致死性家族型失眠症(fatal familial insomnia))、延髓性麻痹(bulbar palsy)、运动神经元病和神经系统异变性病症(包括但不限于卡纳万病(Canavan disease)、亨廷顿病(Huntington's disease)、神经元蜡样质脂褐质沉积症(neuronal ceroid-lipofuscinosis)、亚历山大病(Alexander's disease)、图雷特综合征(Tourette's syndrome)、Menkes捻转毛综合征(Menkes kinky hair syndrome)、科凯恩综合征(Cockayne syndrome)、哈勒沃登-施帕茨综合征(Halervorden-Spatz syndrome)、拉福拉病(lafora disease)、雷特综合征(Rett syndrome)、肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration)、莱施-奈恩综合征(Lesch-Nyhan syndrome)和Unverricht-Lundborg综合征(Unverricht-Lundborg syndrome))、痴呆(包括但不限于皮克病(Pick's disease)和脊髓小脑共济失调(spino-cerebellar ataxia))、癌症(例如,CNS的癌症,包括由身体其他部位的癌症引起的脑转移)。在表7中提供了可与本文中所述的任

一种抗TfR抗体缀合的神经系统病症药物以及所述药物可治疗的相应病症的一些非限制性实例。

[0266] 表7. 神经系统病症药物和所治疗病症的一些实例

药物	神经系统病症
抗 BACE1 抗体	阿尔茨海默病、急性和慢性脑损伤、卒中
抗 A β 抗体	阿尔茨海默病
抗 Tau 抗体	阿尔茨海默病、tau 蛋白病
神经营养因子	卒中、急性脑损伤、脊髓损伤
脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF-2)	慢性脑损伤 (神经发生)
抗表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) 抗体	脑癌
胶质细胞系源性神经因子 (glial cell-line derived neural factor, GDNF)	帕金森病
脑源性神经营养因子 (BDNF)	肌萎缩侧索硬化、抑郁
溶酶体酶	脑的溶酶体贮积病
睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF)	肌萎缩侧索硬化
神经调节蛋白-1	精神分裂症
抗 HER2 抗体 (例如曲妥珠单抗 (trastuzumab)、帕妥珠单抗 (pertuzumab) 等)	来自 HER2 阳性癌症的脑转移
抗 BEGF 抗体 (例如贝伐单抗 (bevacizumab))	复发性或新诊断的胶质母细胞瘤、复发性恶性胶质瘤、脑转移

[0269] 在一些实施方案中,至少一个(例如,至少2、至少3、至少4、至少5、至少10个)分子载荷(例如,寡核苷酸)与本文中所述的任一种抗TfR连接。在一些实施方案中,与抗TfR抗体连接的所有分子载荷是相同的,例如靶向同一基因。在一些实施方案中,与抗TfR抗体连接的所有分子载荷是不同的,例如分子载荷可靶向相同靶基因的不同部分,或分子载荷可靶向至少两种不同的靶基因。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体可与一些相同的分子载荷和一些不同的分子载荷连接。

[0270] 本公开内容还提供了包含多种复合物的组合物,其中复合物的至少80% (例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%) 包含与相同数目的分子载荷(例如,寡核苷酸)连接的抗TfR抗体。

[0271] 本文中另外详细描述了示例性分子载荷,然而,应理解,本文中提供的示例性分子载荷并不意味着是限制性的。

[0272] i. 寡核苷酸

[0273] 如本文中所述,任何合适的寡核苷酸均可用作分子载荷。在一些实施方案中,寡核苷酸可被设计为引起mRNA的降解(例如,寡核苷酸可以是引起降解的间隔聚体、siRNA、核酶或适配体)。在一些实施方案中,寡核苷酸可被设计为阻断mRNA的翻译(例如,寡核苷酸可以是阻断翻译的混合聚体、siRNA或适配体)。在一些实施方案中,寡核苷酸可被设计为引起mRNA的降解和阻断mRNA的翻译。在一些实施方案中,寡核苷酸可以是用于指导酶(例如,基因编辑酶)活性的指导核酸(例如,指导RNA)。本文中提供了寡核苷酸的另一些实例。应理解,在一些实施方案中,可以通过将功能性序列(例如,反义链序列)从一种格式并入另一种格式来使一种格式的寡核苷酸(例如,反义寡核苷酸)适当地适应于另一种格式(例如,siRNA寡核苷酸)。

[0274] 在一些实施方案中,寡核苷酸可包含表6中提供的靶基因的互补区。

[0275] 在一些实施方案中,寡核苷酸可靶向lncRNA或mRNA,例如用于降解。在一些实施方案中,寡核苷酸可靶向编码参与错配修复途径的蛋白质(例如,MSH2、MutL α 、MutS β 、MutL α)的核酸,例如用于降解。参与错配修复途径的蛋白质(其中编码这样的蛋白质的mRNA可被本文中所述的寡核苷酸靶向)的一些非限制性实例描述于Iyer, R.R. et al., "DNA triplet repeat expansion and mismatch repair" *Annu Rev Biochem.* 2015;84:199-226.; 和 Schmidt M.H. and Pearson C.E., "Disease-associated repeat instability and mismatch repair" *DNA Repair (Amst)*. 2016 Feb;38:117-26中。

[0276] 在一些实施方案中,任一种寡核苷酸可以是盐形式,例如如钠盐、钾盐或镁盐。

[0277] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种寡核苷酸的5' 或3' 核苷(例如,末端核苷)任选地通过间隔基(spacer)与胺基缀合。在一些实施方案中,间隔基包含脂族部分。在一些实施方案中,间隔基包含聚乙二醇部分。在一些实施方案中,磷酸二酯键联存在于间隔基与寡核苷酸的5' 或3' 核苷之间。在一些实施方案中,本文中所述的任何寡核苷酸的5' 或3' 核苷(例如,末端核苷)与间隔基缀合,所述间隔基是经取代或未经取代的脂族、经取代或未经取代的杂脂族、经取代或未经取代的亚碳环基、经取代或未经取代的亚杂环基、经取代或未经取代的亚芳基、经取代或未经取代的亚杂芳基、-O-, -N(R^A)-, -S-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)NR^A-, -NR^AC(=O)-, -NR^AC(=O)R^A-, -C(=O)R^A-, -NR^AC(=O)O-, -NR^AC(=O)N(R^A)-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -OC(=O)N(R^A)-, -S(O)₂NR^A-, -NR^AS(O)₂-, 或其组合; 每个R^A独立地是氢或经取代或未经取代的烷基。在某些实施方案中,间隔基是经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂环基、经取代或未经取代的亚杂芳基、-O-, -N(R^A)- 或 -C(=O)N(R^A)₂, 或其组合。

[0278] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种寡核苷酸的5' 或3' 核苷与式-NH₂-(CH₂)_n-的化合物缀合,其中n是1至12的整数。在一些实施方案中,n是6、7、8、9、10、11或12。在一些实施方案中,磷酸二酯键联存在于式NH₂-(CH₂)_n-的化合物与寡核苷酸的5' 或3' 核苷之间。在一些实施方案中,式NH₂-(CH₂)₆-的化合物通过6-氨基-1-己醇(NH₂-(CH₂)₆-OH)与寡核苷酸的5' 磷酸之间的反应与寡核苷酸缀合。

[0279] 在一些实施方案中,寡核苷酸例如通过胺基与靶向剂,例如肌肉靶向剂例如抗TfR抗体缀合。

[0280] a. 寡核苷酸大小/序列

[0281] 寡核苷酸可具有多种不同的长度,例如,取决于格式。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75或更多个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为8至50个核苷酸、长度为8至40个核苷酸、长度为8至30个核苷酸、长度为10至15个核苷酸、长度为10至20个核苷酸、长度为15至25个核苷酸、长度为21至23个核苷酸,等。

[0282] 在一些实施方案中,当寡核苷酸的互补核酸序列与靶分子(例如,mRNA)的结合干扰靶标(例如,mRNA)的正常功能导致活性(例如,抑制翻译)或表达(例如,降解靶mRNA)丧失并且具有足够程度的互补性以避免在以下情况下的该序列与非靶标序列的非特异性结合时,出于本公开内容的目的,寡核苷酸的互补核酸序列与靶核酸可特异性地杂交或对靶核酸具有特异性:在其中期望避免非特异性结合的条件下,例如在生理条件下在体内测定或治疗性处理的情况下,以及在体外测定的情况下,在其中在合适的严格条件下进行测定的条件下。因此,在一些实施方案中,寡核苷酸可与靶核酸的连续核苷酸至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。在一些实施方案中,互补核苷酸序列不需要与其所靶向的100%互补来与靶核酸可特异性地杂交或对靶核酸具有特异性。

[0283] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含靶核酸之互补区,所述互补区的长度为8至15、8至30、8至40或10至50、或5至50或5至40个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸与靶核酸的互补区的长度为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或50个核苷酸。在一些实施方案中,互补区与靶核酸的至少8个连续核苷酸互补。在一些实施方案中,与靶核酸的连续核苷酸部分相比,寡核苷酸可包含1、2或3个碱基错配。在一些实施方案中,寡核苷酸在15个碱基上可具有至多3个错配,或在10个碱基上具有至多2个错配。

[0284] 在一些实施方案中,寡核苷酸与本文中提供的任一种寡核苷酸的靶序列互补(例如,至少85%、至少90%、至少95%或100%)。在一些实施方案中,这样的靶序列与本文中提供的寡核苷酸100%互补。

[0285] 在一些实施方案中,本文中提供的任一种寡核苷酸中的任何一个或更多个胸腺嘧啶碱基(T)可任选地是尿嘧啶碱基(U),和/或者任何一个或更多个U可任选地是T。

[0286] b. 寡核苷酸修饰:

[0287] 本文中所述的寡核苷酸可被修饰,例如,包含经修饰糖部分、经修饰核苷间键联、经修饰核苷酸和/或(例如,和)其组合。另外,在一些实施方案中,寡核苷酸可表现出以下特性中的一种或更多种:不介导选择性剪接;不是免疫刺激性的;具有核酸酶抗性;与未经修饰寡核苷酸相比具有提高的细胞摄取;对细胞或哺乳动物无毒;提高了在细胞中内部排出内体;使TLR刺激最小化;或避免模式识别受体。本文中所述的寡核苷酸的任何经修饰的化学组成(chemistry)或形式可彼此组合。例如,同一寡核苷酸内可包含一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同类型的修饰。

[0288] 在一些实施方案中,可使用某些核苷酸修饰,所述核苷酸修饰使并入它们的寡核苷酸比天然寡脱氧核苷酸或寡核糖核苷酸分子对核酸酶消化更具抗性;这些经修饰寡核苷酸比未经修饰寡核苷酸完整存活更长的时间。经修饰寡核苷酸的一些具体实例包括含有经修饰的主链(backbone)的那些,例如经修饰核苷间键联,例如硫代磷酸酯键联、磷酸三酯键

联、甲基膦酸酯键联、短链烷基键联或环烷基糖间键联或短链杂原子键联或杂环糖间键联。因此,本公开内容的寡核苷酸可例如通过并入修饰例如核苷酸修饰而稳定化以抵抗溶核降解。

[0289] 在一些实施方案中,寡核苷酸的长度可以是多至50个或多至100个核苷酸,其中寡核苷酸的2至10、2至15、2至16、2至17、2至18、2至19、2至20、2至25、2至30、2至40、2至45或更多个核苷酸是经修饰核苷酸。寡核苷酸的长度可以是8至30个核苷酸,其中寡核苷酸的2至10、2至15、2至16、2至17、2至18、2至19、2至20、2至25、2至30个核苷酸是经修饰核苷酸。寡核苷酸的长度可以是8至15个核苷酸,其中寡核苷酸的2至4、2至5、2至6、2至7、2至8、2至9、2至10、2至11、2至12、2至13、2至14个核苷酸是经修饰核苷酸。任选地,寡核苷酸可具有除1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个经修饰核苷酸之外的每个核苷酸。寡核苷酸修饰在本文中进一步描述。

[0290] c. 经修饰核苷

[0291] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含在糖的2' 位置处经修饰的至少一个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个2' -经修饰核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸中的所有核苷均是2' -经修饰核苷。

[0292] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含一个或更多个非双环2' -经修饰核苷,例如2' -脱氧、2' -氟(2' -F)、2' -O-甲基(2' -O-Me)、2' -O-甲氧基乙基(2' -MOE)、2' -O-氨基丙基(2' -O-AP)、2' -O-二甲基氨基乙基(2' -O-DMAOE)、2' -O-二甲基氨基丙基(2' -O-DMAP)、2' -O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2' -O-DMAEOE)或2' -O-N-甲基乙酰胺基(2' -O-NMA)修饰的核苷。

[0293] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含一个或更多个2' -4' 双环核苷,其中核糖环包含连接环中的两个原子的桥联部分,例如,通过亚甲基(LNA)桥联、亚乙基(ENA)桥联或(S)-约束性乙基(cEt)桥联将2' -O原子与4' -C原子连接。LNA的一些实例描述于国际专利申请公开W0/2008/043753中,其于2008年4月17日公开,并且标题为“RNA Antagonist Compounds For The Modulation Of PCSK9”,其内容通过引用整体并入本文。ENA的一些实例在以下中提供:国际专利公开No.WO 2005/042777,其于2005年5月12日公开,并且标题为“APP/ENA Antisense”;Morita et al.,Nucleic Acid Res.,增刊1:241-242,2001;Surono et al.,Hum.Gene Ther.,15:749-757,2004;Koizumi,Curr.Opin.Mol.Ther.,8:144-149,2006以及Horie et al.,Nucleic Acids Symp.Ser(Oxf),49:171-172,2005;其公开内容通过引用整体并入本文。cEt的一些实例在以下中提供:美国专利7,101,993、7,399,845和7,569,686,其各自通过引用整体并入本文。

[0294] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含在以下美国专利或专利申请公开之一中公开的经修饰核苷:美国专利7,399,845,其于2008年7月15日授权,并且标题为“6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利7,741,457,其于2010年6月22日授权,并且标题为“6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利8,022,193,其于2011年9月20日授权,并且标题为“6-Moaified Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利7,569,686,其于2009年8月4日授权,并且标题为“Compounds And Methods For Synthesis Of Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利7,335,765,其于2008年2月26日授权,并且标题为“Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues”;美国专利7,314,923,其

于2008年1月1日授权,并且标题为“Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues”;美国专利7,816,333,其于2010年10月19日授权,并且标题为“Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same”和美国公开号2011/0009471,现在为美国专利8,957,201,其于2015年2月17日授权,并且标题为“Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same”,其各自的全部内容出于所有目的通过引用并入本文。

[0295] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个经修饰核苷,其导致所述寡核苷酸与不具有至少一个经修饰核苷的寡核苷酸相比, T_m 提高1°C、2°C、3°C、4°C或5°C。寡核苷酸可具有多个经修饰核苷,其导致所述寡核苷酸与不具有经修饰核苷的寡核苷酸相比, T_m 总体提高2°C、3°C、4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、40°C、45°C或更高。

[0296] 寡核苷酸可包含不同种类的核苷的混合物。例如,寡核苷酸可包含2'-脱氧核糖核苷或核糖核苷和2'-氟修饰核苷的混合物。寡核苷酸可包含脱氧核糖核苷或核糖核苷和2'-O-Me修饰核苷的混合物。寡核苷酸可包含2'-氟修饰核苷和2'-O-Me修饰核苷的混合物。寡核苷酸可包含2'-4'双环核苷和2'-MOE、2'-氟或2'-O-Me修饰核苷的混合物。寡核苷酸可包含非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE、2'-氟或2'-O-Me)和2'-4'双环核苷(例如,LNA、ENA、cEt)的混合物。

[0297] 寡核苷酸可包含不同种类的替代核苷。例如,寡核苷酸可包含替代的2'-脱氧核糖核苷或核糖核苷和2'-氟修饰核苷。寡核苷酸可包含替代的脱氧核糖核苷或核糖核苷和2'-O-Me修饰核苷。寡核苷酸可包含替代的2'-氟修饰核苷和2'-O-Me修饰核苷。寡核苷酸可包含替代的2'-4'双环核苷和2'-MOE、2'-氟或2'-O-Me修饰核苷。寡核苷酸可包含替代的非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE、2'-氟或2'-O-Me)和2'-4'双环核苷(例如,LNA、ENA、cEt)。

[0298] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含5'-乙烯基磷酸酯修饰、一个或更多个无碱基残基和/或一个或更多个倒置无碱基残基。

[0299] d. 核苷间键联/主链

[0300] 在一些实施方案中,寡核苷酸可包含硫代磷酸酯键联或其他经修饰核苷间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸在至少两个核苷酸之间包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸在所有核苷酸之间均包含硫代磷酸酯核苷间键联。例如,在一些实施方案中,寡核苷酸在核苷酸序列的5'或3'末端的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷间键联处包含经修饰核苷间键联。

[0301] 可使用的含磷的键联包括但不限于:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基磷酸酯和包含3'亚烷基磷酸酯的其他烷基磷酸酯、以及手性磷酸酯、次磷酸酯、包含3'-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯的磷酰胺酯、硫羰基磷酰胺酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'键联的硼烷磷酸酯、这些的2'-5'连接类似物、以及其中相邻的核苷单元对连接在3'-5'到5'-3'或2'-5'到5'-2'的具有相反极性的那些;参见美国专利no.3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050。

[0302] 在一些实施方案中,寡核苷酸可具有杂原子主链,例如亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链;酰胺主链(参见De Mesmaeker et al.Ace.Chem.Res.1995,28:366-374);吗啉代主链(参见Summerton and Weller,美国专利No.5,034,506);或肽核酸(peptide nucleic acid,PNA)主链(其中寡核苷酸的磷酸二酯主链被聚酰胺主链替换,核苷酸与聚酰胺主链的氮杂氮原子直接或间接结合,参见Nielsen et al.,Science 1991,254,1497)。

[0303] e.立体特异性寡核苷酸

[0304] 在一些实施方案中,寡核苷酸的核苷酸间磷原子是手性的,并且基于手性磷原子的构型调节寡核苷酸的特性。在一些实施方案中,可使用适当方法来以立体控制的方式合成P-手性寡核苷酸类似物(例如,如Oka N,Wada T,Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms.Chem Soc Rev.2011 Dec;40(12):5829-43中所述)。在一些实施方案中,提供了含硫代磷酸酯的寡核苷酸,其包含通过基本上所有的Sp或基本上所有的Rp硫代磷酸酯糖间键连接在一起的核苷单元。在一些实施方案中,具有基本上手性纯糖间键联的这样的硫代磷酸酯寡核苷酸通过酶或化学合成制备,如例如于1996年12月12日授权的美国专利5,587,261中所述,其内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸提供了靶核酸的选择性切割模式。例如,在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸在核酸的互补序列内提供了单个位点切割,如例如美国专利申请公开20170037399A1中所述,其于2017年2月2日公开,标题为“CHIRAL DESIGN”,其内容通过引用整体并入本文。

[0305] f.吗啉代

[0306] 在一些实施方案中,寡核苷酸可以是基于吗啉代的化合物。基于吗啉代的寡聚化合物描述于Dwayne A.Braasch and David R.Corey,Biochemistry,2002,41(14),4503-4510;Genesis,volume 30,issue 3,2001;Heasman,J.,Dev.Biol.,2002,243,209-214;Nasevicius et al.,Nat.Genet.,2000,26,216-220;Lacerra et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.,2000,97,9591-9596;和1991年7月23日授权的美国专利No.5,034,506。在一些实施方案中,基于吗啉代的寡聚化合物是磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(phosphorodiamidate morpholino oligomer,PMO)(例如,如Iverson,Curr.Opin.Mol.Ther.,3:235-238,2001;和Wang et al.,J.Gene Med.,12:354-364,2010中所述;其公开内容通过引用整体并入本文)。

[0307] g.肽核酸(PNA)

[0308] 在一些实施方案中,寡核苷酸的核苷酸单元的糖和核苷间键联(主链)二者均被新的基团替换。在一些实施方案中,碱基单元被维持以用于与适当的核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物(已显示具有优异的杂交特性的寡核苷酸模拟物)被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,寡核苷酸的糖-主链被含酰胺的主链(例如,氨基乙基甘氨酸主链)替换。核碱基被保留并且与主链酰胺部分的氮杂氮原子直接或间接结合。报道制备PNA化合物的代表性出版物包括但不限于美国专利no.5,539,082;5,714,331;和5,719,262,其各自通过引用并入本文。PNA化合物的进一步教导可在Nielsen et al.,Science,1991,254,1497-1500中发现。

[0309] h.间隔聚体

[0310] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸是间隔聚体。间隔聚体寡核苷酸通常

具有式5'-X-Y-Z-3'，其中X和Z作为围绕间隔区Y的侧翼区。在一些实施方案中，式5'-X-Y-Z-3'的侧翼区X也称为X区、侧翼序列X、5'翼区X或5'翼区段。在一些实施方案中，式5'-X-Y-Z-3'的侧翼区Z也称为Z区、侧翼序列Z、3'翼区Z或3'翼区段。在一些实施方案中，式5'-X-Y-Z-3'的间隔区Y也称为Y区、Y区段或间隔区段Y。在一些实施方案中，间隔区Y中的每个核苷是2'-脱氧核糖核苷，并且5'翼区X或3'翼区Z均不包含任何2'-脱氧核糖核苷。

[0311] 在一些实施方案中，Y区是核苷酸的连续延伸，例如，6个或更多个DNA核苷酸的区域，其能够募集RNA酶（例如RNA酶H）。在一些实施方案中，间隔聚体与靶核酸结合，在该点处RNA酶被募集并随后可切割靶核酸。在一些实施方案中，Y区5'和3'二者的侧翼是包含高亲和力经修饰核苷，例如1至6个高亲和力经修饰核苷的X和Z区。高亲和力经修饰核苷的一些实例包括但不限于2'-经修饰核苷（例如，2'-MOE、2'-O-Me、2'-F）或2'-4'双环核苷（例如，LNA、cEt、ENA）。在一些实施方案中，侧翼序列X和Z的长度可以是1至20个核苷酸、1至8个核苷酸或1至5个核苷酸。侧翼序列X和Z可具有相似长度或不同长度。在一些实施方案中，间隔区段Y可以是长度为5至20个核苷酸、5至15个十二个核苷酸或6至10个核苷酸的核苷酸序列。

[0312] 在一些实施方案中，除DNA核苷酸之外，间隔聚体寡核苷酸的间隔区可包含已知可被接受用于高效的RNA酶H作用的经修饰核苷酸，例如C4'-取代的核苷酸、无环核苷酸和阿拉伯糖(arabino)构型的核苷酸。在一些实施方案中，间隔区包含一个或更多个未经修饰的核苷间键联。在一些实施方案中，一个或两个侧翼区在至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或更多个核苷酸之间各自独立地包含一个或更多个硫代磷酸酯核苷间键联（例如，硫代磷酸酯核苷间键联或其他键联）。在一些实施方案中，间隔区和两个侧翼区在至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或更多个核苷酸之间各自独立地包含经修饰核苷间键联（例如，硫代磷酸酯核苷间键联或其他键联）。

[0313] 可使用适当的方法产生间隔聚体。教导制备间隔聚体的代表性美国专利、美国专利出版物和PCT出版物包括但不限于：美国专利No.5,013,830;5,149,797;5,220,007;5,256,775;5,366,878;5,403,711;5,491,133;5,565,350;5,623,065;5,652,355;5,652,356;5,700,922;5,898,031;7,015,315;7,101,993;7,399,845;7,432,250;7,569,686;7,683,036;7,750,131;8,580,756;9,045,754;9,428,534;9,695,418;10,017,764;10,260,069;9,428,534;8,580,756;

[0314] 美国专利公开No.US20050074801、US20090221685、US20090286969、US20100197762和US20110112170;PCT公开No.WO2004069991、WO2005023825、WO2008049085和WO2009090182;以及EP专利No.EP2,149,605,其各自通过引用整体并入本文。

[0315] 在一些实施方案中，间隔聚体的长度为10至40个核苷。例如，间隔聚体的长度可以是10至40、10至35、10至30、10至25、10至20、10至15、15至40、15至35、15至30、15至25、15至20、20至40、20至35、20至30、20至25、25至40、25至35、25至30、30至40、30至35或35至40个核苷。在一些实施方案中，间隔聚体的长度是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或40个核苷。

[0316] 在一些实施方案中，间隔聚体中的间隔区Y的长度为5至20个核苷。例如，间隔区Y的长度可以是5至20、5至15、5至10、10至20、10至15或15至20个核苷。在一些实施方案中，间隔区Y的长度是5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷。在一些实施方案

中,间隔区Y中的每个核苷是2'-脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔区Y中的所有核苷均是2'-脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔区Y中的一个或多个核苷是经修饰核苷(例如,2'经修饰核苷,例如本文中所述的那些)。在一些实施方案中,间隔区Y中的一个或多个胞嘧啶任选地是5-甲基-胞嘧啶。在一些实施方案中,间隔区Y中的每个胞嘧啶是5-甲基-胞嘧啶。

[0317] 在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)独立地为1至20个核苷长。例如,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)可独立地为1至20、1至15、1至10、1至7、1至5、1至3、1至2、2至5、2至7、3至5、3至7、5至20、5至15、5至10、10至20、10至15或15至20个核苷长。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷长。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)的长度相同。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)的长度不同。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)比间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)长。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)比间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)短。

[0318] 在一些实施方案中,间隔聚体包含以下的5'-X-Y-Z-3':5-10-5,4-12-4,3-14-3,2-16-2,1-18-1,3-10-3,2-10-2,1-10-1,2-8-2,4-6-4,3-6-3,2-6-2,4-7-4,3-7-3,2-7-2,4-8-4,3-8-3,2-8-2,1-8-1,2-9-2,1-9-1,2-10-2,1-10-1,1-12-1,1-16-1,2-15-1,1-15-2,1-14-3,3-14-1,2-14-2,1-13-4,4-13-1,2-13-3,3-13-2,1-12-5,5-12-1,2-12-4,4-12-2,3-12-3,1-11-6,6-11-1,2-11-5,5-11-2,3-11-4,4-11-3,1-17-1,2-16-1,1-16-2,1-15-3,3-15-1,2-15-2,1-14-4,4-14-1,2-14-3,3-14-2,1-13-5,5-13-1,2-13-4,4-13-2,3-13-3,1-12-6,6-12-1,2-12-5,5-12-2,3-12-4,4-12-3,1-11-7,7-11-1,2-11-6,6-11-2,3-11-5,5-11-3,4-11-4,1-18-1,1-17-2,2-17-1,1-16-3,1-16-3,2-16-2,1-15-4,4-15-1,2-15-3,3-15-2,1-14-5,5-14-1,2-14-4,4-14-2,3-14-3,1-13-6,6-13-1,2-13-5,5-13-2,3-13-4,4-13-3,1-12-7,7-12-1,2-12-6,6-12-2,3-12-5,5-12-3,1-11-8,8-11-1,2-11-7,7-11-2,3-11-6,6-11-3,4-11-5,5-11-4,1-18-1,1-17-2,2-17-1,1-16-3,3-16-1,2-16-2,1-15-4,4-15-1,2-15-3,3-15-2,1-14-5,2-14-4,4-14-2,3-14-3,1-13-6,6-13-1,2-13-5,5-13-2,3-13-4,4-13-3,1-12-7,7-12-1,2-12-6,6-12-2,3-12-5,5-12-3,1-11-8,8-11-1,2-11-7,7-11-2,3-11-6,6-11-3,4-11-5,5-11-4,1-19-1,1-18-2,2-18-1,1-17-3,3-17-1,2-17-2,1-16-4,4-16-1,2-16-3,3-16-2,1-15-5,2-15-4,4-15-2,3-15-3,1-14-6,6-14-1,2-14-5,5-14-2,3-14-4,4-14-3,1-13-7,7-13-1,2-13-6,6-13-2,3-13-5,5-13-3,4-13-4,1-12-8,8-12-1,2-12-7,7-12-2,3-12-6,6-12-3,4-12-5,5-12-4,2-11-8,8-11-2,3-11-7,7-11-3,4-11-6,6-11-4,5-11-5,1-20-1,1-19-2,2-19-1,1-18-3,3-18-1,2-18-2,1-17-4,4-17-1,2-17-3,3-17-2,1-16-5,2-16-4,4-16-2,3-16-3,1-15-6,6-15-1,2-15-5,5-15-2,3-15-4,4-15-3,1-14-7,7-14-1,2-14-6,6-14-2,3-14-5,5-14-3,4-14-4,1-13-8,8-13-1,2-13-7,7-13-2,3-13-6,6-13-3,4-13-5,5-13-4,2-12-8,8-12-2,3-12-7,7-12-3,4-12-6,6-12-4,5-12-5,3-11-8,8-11-3,4-11-7,7-11-4,5-11-6,6-11-5,1-21-1,1-20-2,2-20-1,1-20-

3,3-19-1,2-19-2,1-18-4,4-18-1,2-18-3,3-18-2,1-17-5,2-17-4,4-17-2,3-17-3,1-16-6,6-16-1,2-16-5,5-16-2,3-16-4,4-16-3,1-15-7,7-15-1,2-15-6,6-15-2,3-15-5,5-15-3,4-15-4,1-14-8,8-14-1,2-14-7,7-14-2,3-14-6,6-14-3,4-14-5,5-14-4,2-13-8,8-13-2,3-13-7,7-13-3,4-13-6,6-13-4,5-13-5,1-12-10,10-12-1,2-12-9,9-12-2,3-12-8,8-12-3,4-12-7,7-12-4,5-12-6,6-12-5,4-11-8,8-11-4,5-11-7,7-11-5,6-11-6,1-22-1,1-21-2,2-21-1,1-21-3,3-20-1,2-20-2,1-19-4,4-19-1,2-19-3,3-19-2,1-18-5,2-18-4,4-18-2,3-18-3,1-17-6,6-17-1,2-17-5,5-17-2,3-17-4,4-17-3,1-16-7,7-16-1,2-16-6,6-16-2,3-16-5,5-16-3,4-16-4,1-15-8,8-15-1,2-15-7,7-15-2,3-15-6,6-15-3,4-15-5,5-15-4,2-14-8,8-14-2,3-14-7,7-14-3,4-14-6,6-14-4,5-14-5,3-13-8,8-13-3,4-13-7,7-13-4,5-13-6,6-13-5,4-12-8,8-12-4,5-12-7,7-12-5,6-12-6,5-11-8,8-11-5,6-11-7或7-11-6。数字表示5'-X-Y-Z-3'间隔聚体中X、Y和Z区中的核苷的数目。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)或间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中的一个或更多个核苷是经修饰核苷酸(例如,高亲和力经修饰核苷)。在一些实施方案中,经修饰核苷(例如,高亲和力经修饰核苷)是2'-经修饰核苷。在一些实施方案中,2'-经修饰核苷是2'-4'双环核苷或非双环2'-经修饰核苷。在一些实施方案中,高亲和力经修饰核苷是2'-4'双环核苷(例如,LNA、cEt或ENA)或非双环2'-经修饰核苷(例如2'-氟(2'-F)、2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、2'-O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA))。

[0319] 在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)中的一个或更多个核苷是高亲和力经修饰核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)中的每个核苷是高亲和力经修饰核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中的一个或更多个核苷是高亲和力经修饰核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中的每个核苷是高亲和力经修饰核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)中的一个或更多个核苷是高亲和力经修饰核苷,并且间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中的一个或更多个核苷是高亲和力经修饰核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)中的每个核苷是高亲和力经修饰核苷,并且间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中的每个核苷是高亲和力经修饰核苷。

[0320] 在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)包含与间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)相同的高亲和力核苷。例如,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)可包含一个或更多个非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me)。在另一个实例中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)可包含一个或更多个2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt)。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中的每个核苷是非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me)。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中的每个核苷是2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt)。

[0321] 在一些实施方案中,间隔聚体包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z的长度独立地为1

至7个(例如,1、2、3、4、5、6或7个)核苷,并且Y的长度为6至10个(例如,6、7、8、9或10个)核苷,其中X和Z中的每个核苷是非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me),并且Y中的每个核苷是2'-脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔聚体包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z的长度独立地为1至7个(例如,1、2、3、4、5、6或7个)核苷,并且Y的长度为6至10个(例如,6、7、8、9或10个)核苷,其中X和Z中的每个核苷是2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt),并且Y中的每个核苷是2'-脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)包含与间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)不同的高亲和力核苷。例如,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)可包含一个或更多个非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me),并且间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)可包含一个或更多个2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt)。在另一个实例中,间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)可包含一个或更多个非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me),并且间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)可包含一个或更多个2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt)。

[0322] 在一些实施方案中,间隔聚体包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z的长度独立地为1至7个(例如,1、2、3、4、5、6或7个)核苷,并且Y的长度为6至10个(例如,6、7、8、9或10个)核苷,其中X中的每个核苷是非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me),Z中的每个核苷是2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt),并且Y中的每个核苷是2'-脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔聚体包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z的长度独立地为1至7个(例如,1、2、3、4、5、6或7个)核苷,并且Y的长度为6至10个(例如,6、7、8、9或10个)核苷,其中X中的每个核苷是2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt),Z中的每个核苷是非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me),并且Y中的每个核苷是2'-脱氧核糖核苷。

[0323] 在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)包含一个或更多个非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me)和一个或更多个2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt)。在一些实施方案中,间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)包含一个或更多个非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me)和一个或更多个2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt)。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)二者均包含一个或更多个非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me)和一个或更多个2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt)。

[0324] 在一些实施方案中,间隔聚体包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z的长度独立地为2至7个(例如,2、3、4、5、6或7个)核苷,并且Y的长度为6至10个(例如,6、7、8、9或10个)核苷,其中X中第1、2、3、4、5、6或7位(最5'的位置是第1位)中的至少一个但不是全部(例如,1、2、3、4、5或6个)是非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me),其中X和Z二者中的剩余核苷是2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt),并且其中Y中的每个核苷是2'脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔聚体包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z的长度独立地为2至7个(例如,2、3、4、5、6或7个)核苷,并且Y的长度为6至10个(例如,6、7、8、9或10个)核苷,其中Z中第1、2、3、4、5、6或7位(最5'的位置是第1位)中的至少一个但不是全部(例如,1、2、3、4、5或6个)是非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me),其中X和Z二者中的剩余核苷是2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt),并且其中Y中的每个核苷是2'脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔聚体包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z的长度独立地为2至7个(例如,2、3、4、5、6或7个)核苷,并且Y的长度为6至10个(例如,6、7、8、9或10个)核苷,其中X中第1、2、3、4、5、6或7位中的

至少一个但不是全部(例如,1、2、3、4、5或6个)和Z中第1、2、3、4、5、6或7位(最5'的位置是第1位)中的至少一个位置但不是全部(例如,1、2、3、4、5或6个)是非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me),其中X和Z二者中的剩余核苷是2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt),并且其中Y中的每个核苷是2'脱氧核糖核苷。

[0325] 在间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和/或间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中具有非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me)和2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt)的混合物的间隔聚体构型的一些非限制性实例包括:BBB-(D)n-BBBAA;KKK-(D)n-KKKAA;LLL-(D)n-LLLAA;BBB-(D)n-BBBEE;KKK-(D)n-KKKEE;LLL-(D)n-LLLEE;BBB-(D)n-BBBAA;KKK-(D)n-KKKAA;LLL-(D)n-LLLAA;BBB-(D)n-BBBEE;KKK-(D)n-KKKEE;LLL-(D)n-LLLEE;BBB-(D)n-BBBAAA;KKK-(D)n-KKKAAA;LLL-(D)n-LLLAAA;BBB-(D)n-BBBEEE;KKK-(D)n-KKKEEE;LLL-(D)n-LLLEEE;BBB-(D)n-BBBAAA;KKK-(D)n-KKKAAA;LLL-(D)n-LLLAAA;BBB-(D)n-BBBEEE;KKK-(D)n-KKKEEE;LLL-(D)n-LLLEEE;BABA-(D)n-ABAB;KAKA-(D)n-AKAK;LALA-(D)n-ALAL;BEBE-(D)n-EBEB;KEKE-(D)n-EKEK;LELE-(D)n-ELEL;BABA-(D)n-ABAB;KAKA-(D)n-AKAK;LALA-(D)n-ALAL;BEBE-(D)n-EBEB;KEKE-(D)n-EKEK;LELE-(D)n-ELEL;ABAB-(D)n-ABAB;AKAK-(D)n-AKAK;ALAL-(D)n-ALAL;EBEB-(D)n-EBEB;EKEK-(D)n-EKEK;ELEL-(D)n-ELEL;ABAB-(D)n-ABAB;AKAK-(D)n-AKAK;ALAL-(D)n-ALAL;EBEB-(D)n-EBEB;EKEK-(D)n-EKEK;ELEL-(D)n-ELEL;AABB-(D)n-BBAA;BBAA-(D)n-AABB;AAKK-(D)n-KKAA;AALL-(D)n-LLAA;EEBB-(D)n-BBEE;EEKK-(D)n-KKEE;EELL-(D)n-LLEE;AABB-(D)n-BBAA;AAKK-(D)n-KKAA;AALL-(D)n-LLAA;EEBB-(D)n-BBEE;EEKK-(D)n-KKEE;EELL-(D)n-LLEE;BBB-(D)n-BBA;KKK-(D)n-KKA;LLL-(D)n-LLA;BBB-(D)n-BBE;KKK-(D)n-KKE;LLL-(D)n-LLE;BBB-(D)n-BBA;KKK-(D)n-KKA;LLL-(D)n-LLA;BBB-(D)n-BBE;KKK-(D)n-KKE;LLL-(D)n-LLE;BBB-(D)n-BBA;KKK-(D)n-KKA;LLL-(D)n-LLA;BBB-(D)n-BBE;KKK-(D)n-KKE;LLL-(D)n-LLE;ABBB-(D)n-BBBA;AKKK-(D)n-KKKA;ALLL-(D)n-LLLA;EBBB-(D)n-BBBE;EKKK-(D)n-KKKE;ELLL-(D)n-LLLE;ABBB-(D)n-BBBA;AKKK-(D)n-KKKA;ALLL-(D)n-LLLA;EBBB-(D)n-BBBE;EKKK-(D)n-KKKE;ELLL-(D)n-LLLE;ABBB-(D)n-BBBAA;AKKK-(D)n-KKKAA;ALLL-(D)n-LLLAA;EBBB-(D)n-BBBEE;EKKK-(D)n-KKKEE;ELLL-(D)n-LLLEE;ABBB-(D)n-BBBAA;AKKK-(D)n-KKKAA;ALLL-(D)n-LLLAA;EBBB-(D)n-BBBEE;EKKK-(D)n-KKKEE;ELLL-(D)n-LLLEE;AABBB-(D)n-BBB;AAKKK-(D)n-KKK;AALLL-(D)n-LLL;EEBBB-(D)n-BBB;EEKKK-(D)n-KKK;EELLL-(D)n-LLL;AABBB-(D)n-BBBA;AAKKK-(D)n-KKKA;AALLL-(D)n-LLLA;EEBBB-(D)n-BBBE;EEKKK-(D)n-KKKE;EELLL-(D)n-LLLE;AABBB-(D)n-BBBA;AAKKK-(D)n-KKKA;AALLL-(D)n-LLLA;EEBBB-(D)n-BBBE;EEKKK-(D)n-KKKE;EELLL-(D)n-LLLE;ABBAABB-(D)n-BB;AKKAACK-(D)n-KK;ALLAALLL-(D)n-LL;EBBEEBB-(D)n-BB;EKKEEKK-(D)n-KK;ELLEELL-(D)n-LL;ABBAABB-(D)n-BB;AKKAACK-(D)n-KK;ALLAALL-(D)n-LL;EBBEEBB-(D)n-BB;EKKEEKK-(D)n-KK;ELLEELL-(D)n-LL;ABBABB-(D)n-BBB;AKKAKK-(D)n-KKK;ALLALLL-(D)n-LLL;EBBEBB-(D)n-BBB;EKKEKK-(D)n-KKK;ELLELL-(D)n-LLL;ABBABB-(D)n-BBB;AKKAKK-(D)n-KKK;ALLALLL-(D)n-LLL;EBBEBB-(D)n-BBB;EKKEKK-(D)n-KKK;ELLELL-(D)n-LLL;EEEEK-(D)n-EEEEEEEE;EEK-(D)n-EEEEEEEE;EK-(D)n-EEEEEEEE;EK-(D)n-EEEEKK;K-(D)n-EEEKEKE;K-(D)n-EEEKEKEE;K-(D)n-EEKEK;EK-(D)n-EEEKEKE;

EK-(D)_n-EEEEKEK; EEK-(D)_n-KEEKE; EK-(D)_n-EEKEK; EK-(D)_n-KEEK; EEK-(D)_n-EEEEKEK; EK-(D)_n-KEEKEE; EK-(D)_n-EEKEKE; EK-(D)_n-EEEEKEKE; 和 EK-(D)_n-EEEEKEK。

[0326] “A”核苷包含2’-经修饰核苷; “B”表示2’-4’双环核苷; “K”表示约束性乙基核苷(cEt); “L”表示LNA核苷; 以及“E”表示2’-MOE修饰的核糖核苷; “D”表示2’-脱氧核糖核苷; “n”表示间隔区段(5’-X-Y-Z-3’构型中的Y)的长度并且是1至20的整数。

[0327] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种间隔聚体在X、Y和Z区的每一个中包含一个或更多个经修饰核苷键联(例如,硫代磷酸酯键联)。在一些实施方案中,本文中所述的任一种间隔聚体中的每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,X、Y和Z区各自独立地包含硫代磷酸酯键联和磷酸二酯键联的混合物。在一些实施方案中,间隔区Y中的每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,5’翼区X包含硫代磷酸酯键联和磷酸二酯键联的混合物,并且3’翼区Z包含硫代磷酸酯键联和磷酸二酯键联的混合物。

[0328] i. 混合聚体

[0329] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸可以是混合聚体或者包含混合聚体序列模式。通常来说,混合聚体是包含天然和非天然存在的核苷二者的寡核苷酸或者通常以替代模式包含两种不同类型的非天然存在的核苷的寡核苷酸。混合聚体通常比未经修饰寡核苷酸具有更高的结合亲和力,并且可用于特异性结合靶分子,例如,来阻断靶分子上的结合位点。通常来说,混合聚体不向靶分子募集RNA酶并且因此不促进靶分子的切割。已描述了不能募集RNA酶H的这样的寡核苷酸,例如,参见W02007/112754或W02007/112753。

[0330] 在一些实施方案中,混合聚体包含以下或者由以下组成:重复模式的核苷类似物和天然存在的核苷、或者一种类型的核苷类似物和第二种类型的核苷类似物。然而,混合聚体不需要包含重复模式,并且可替代地包含经修饰核苷和天然存在的核苷的任何排列,或者一种类型的经修饰核苷和第二种类型的经修饰核苷的任何排列。重复模式可以是例如每第二个或每第三个核苷是经修饰核苷(例如LNA),并且剩余核苷是天然存在的核苷,例如DNA,或是2’经取代的核苷类似物,例如2’ MOE或2’ 氟类似物,或者本文中所述的任何其他经修饰核苷。公认的是,经修饰核苷的重复模式,例如LNA单元,可在固定位置例如在5’或3’末端与经修饰核苷组合。

[0331] 在一些实施方案中,混合聚体不包含多于5个、多于4个、多于3个或多于2个连续的天然存在的核苷(例如DNA核苷)的区域。在一些实施方案中,混合聚体包含至少一个由至少两个连续的经修饰核苷,例如至少两个连续的LNA组成的区域。在一些实施方案中,混合聚体包含至少一个由至少三个连续的经修饰核苷单元,例如至少三个连续的LNA组成的区域。

[0332] 在一些实施方案中,混合聚体不包含多于7个、多于6个、多于5个、多于4个、多于3个或多于2个连续的核苷类似物例如LNA的区域。在一些实施方案中,LNA单元可被其他核苷类似物例如本文中提及的那些替换。

[0333] 混合聚体可被设计为包含亲和力增强的经修饰核苷(例如在非限制性实例中LNA核苷和2’-O-Me核苷)的混合物。在一些实施方案中,混合聚体在至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或更多个核苷之间包含经修饰核苷间键联(例如,硫代磷酸酯核苷间键联或其他键联)。

[0334] 可使用任何合适的方法产生混合聚体。教导制备混合聚体的代表性美国专利、美国专利出版物和PCT出版物包括美国专利公开No. US20060128646、US20090209748、

US20090298916、US20110077288和US20120322851以及美国专利No.7687617。

[0335] 在一些实施方案中,混合聚体包含一个或更多个吗啉代核苷。例如,在一些实施方案中,混合聚体可包含与一个或更多个其他核苷(例如,DNA、RNA核苷)或经修饰核苷(例如,LNA、2'-O-Me核苷)混合(例如,以交替方式混合)的吗啉代核苷。

[0336] 在一些实施方案中,混合聚体可用于剪接校正或外显子跳读,例如,如以下中报道的:Touznik A.,et al.,LNA/DNA mixmer-based antisense oligonucleotides correct alternative splicing of the SMN2 gene and restore SMN protein expression in type 1 SMA fibroblasts Scientific Reports,第7卷,Article number:3672(2017),Chen S.et al.,Synthesis of a Morpholino Nucleic Acid(MNA)-Uridine Phosphoramidite,and Exon Skipping Using MNA/2'-O-Methyl Mixmer Antisense Oligonucleotide,Molecules 2016,21,1582,其各自的内容通过引用并入本文。

[0337] j.RNA干扰(RNAi)

[0338] 在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸可以是小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA,也称为短干扰RNA或沉默RNA)的形式。siRNA是一类双链RNA分子,通常长度为约20至25个碱基对,其通过细胞中的RNA干扰(RNAi)途径靶向核酸(例如,mRNA)用于降解。siRNA分子的特异性可通过分子反义链与其靶RNA的结合来确定。有效的siRNA分子的长度通常少于30至35个碱基对,以防止通过干扰素应答触发细胞中的非特异性RNA干扰途径(尽管更长的siRNA也可能是有效的)。在一些实施方案中,siRNA分子的长度为7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,35,40,45,50,或更多个碱基对。在一些实施方案中,siRNA分子的长度为8至30个碱基对、长度为10至15个碱基对、长度为10至20个碱基对、长度为15至25个碱基对、长度为19至21个碱基对、长度为21至23个碱基对。

[0339] 在选择适当的靶RNA序列之后,可使用适当的方法设计和制备包含与全部或部分靶序列互补的核苷酸序列(即反义序列)的siRNA分子(参见,例如PCT公开号WO 2004/016735;以及美国专利公开No.2004/0077574和2008/0081791)。siRNA分子可以是双链的(即,包含反义链和杂交以形成dsRNA的互补有义链的dsRNA分子)或单链的(即,仅包含反义链的ssRNA分子)。siRNA分子可包含具有自身互补的有义链和反义链的双链体(duplex)、不对称双链体、发夹或不对称发夹二级结构。

[0340] 在一些实施方案中,siRNA分子的反义链的长度为7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,35,40,45,50,或更多个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为8至50个核苷酸、长度为8至40个核苷酸、长度为8至30个核苷酸、长度为10至15个核苷酸、长度为10至20个核苷酸、长度为15至25个核苷酸、长度为19至21个核苷酸、长度为21至23个核苷酸。

[0341] 在一些实施方案中,siRNA分子的有义链的长度为7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,35,40,45,50,或更多个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为8至50个核苷酸、长度为8至40个核苷酸、长度为8至30个核苷酸、长度为10至15个核苷酸、长度为10至20个核苷酸、长度为15至25个核苷酸、长度为19至21个核苷酸、长度为21至23个核苷酸。

[0342] 在一些实施方案中,siRNA分子包含反义链,所述反义链包含靶mRNA中的靶区域之

互补区。在一些实施方案中,互补区为与靶mRNA中的靶区域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。在一些实施方案中,靶区域是靶mRNA中的连续核苷酸的区域。在一些实施方案中,互补核苷酸序列不需要与其靶标的核苷酸序列100%互补来与靶RNA序列可特异性地杂交或对靶RNA序列具有特异性。

[0343] 在一些实施方案中,siRNA分子包含反义链,所述反义链包含靶RNA序列之互补区,并且该互补区的长度在8至15、8至30、8至40、或10至50、或5至50、或5至40个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,互补区的长度为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,或50个核苷酸。在一些实施方案中,互补区与靶RNA序列的至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个或更多个连续核苷酸互补。在一些实施方案中,siRNA分子包含与靶RNA序列的连续核苷酸的一部分相比包含不超过1、2、3、4或5个碱基错配的核苷酸序列。在一些实施方案中,siRNA分子包含在15个碱基上具有至多3个错配或在10个碱基上具有至多2个错配的核苷酸序列。

[0344] 在一些实施方案中,siRNA分子包含反义链,所述反义链包含与本文中提供的寡核苷酸的靶RNA序列互补(例如,至少85%、至少90%、至少95%或100%)的核苷酸序列。在一些实施方案中,siRNA分子包含反义链,所述反义链包含与本文中提供的寡核苷酸具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,siRNA分子包含反义链,所述反义链包含本文中提供的寡核苷酸的至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个或更多个连续核苷酸。

[0345] 双链siRNA可包含相同长度或不同长度的有义和反义RNA链。双链siRNA分子也可由单个寡核苷酸组装成茎-环结构,其中siRNA分子的自身互补有义和反义区通过以下连接:基于核酸或基于非核酸的接头,以及环状单链RNA,其具有两个或更多个环结构和包含自身互补有义链和反义链的茎,其中环状RNA可在体内或体外加工以产生能够介导RNAi的活性siRNA分子。因此,本文中也考虑了小发夹RNA(small hairpin RNA,shRNA)分子。除通常由间隔区或环序列隔开的反向互补(有义)序列之外,这些分子还包含特定的反义序列。间隔区或环的切割提供了单链RNA分子及其反向互补物,使得它们可进行退火以形成dsRNA分子(任选地,具有可导致从任一或两条链的3'末端和/或(例如,和)5'末端添加或去除一个、两个、三个或更多个核苷酸的另外的加工步骤)。间隔区可具有足够的长度以允许反义和有义序列在切割间隔区(和任选地,可导致从任一或两条链的3'末端和/或(例如,和)5'末端添加或去除一个、两个、三个、四个或更多个核苷酸的后续加工步骤)之前进行退火并形成双链结构(或茎)。间隔区序列可以是位于两个互补核苷酸序列区域之间的不相关核苷酸序列,当退火成双链核酸时其包含shRNA。

[0346] siRNA分子的总长度可根据所设计siRNA分子的类型在约14至约100个核苷酸内变化。通常来说,这些核苷酸中的约14至约50个与RNA靶序列互补,即构成siRNA分子的特异性

反义序列。例如,当siRNA是双链siRNA或单链siRNA时,长度可在约14至约50个核苷酸内变化,而当siRNA是shRNA或环状分子时,长度可在约40个核苷酸至约100个核苷酸内变化。

[0347] siRNA分子可在分子的一个末端包含3' 突出端。另一末端可以是平末端或也具有突出端(5' 或3')。当siRNA分子在分子的两个末端均包含突出端时,突出端的长度可相同或不同。在一个实施方案中,本公开内容的siRNA分子在分子的两个末端均包含约1至约3个核苷酸的3' 突出端。在一些实施方案中,siRNA分子在有义链上包含约1至约3个核苷酸的3' 突出端。在一些实施方案中,siRNA分子在反义链上包含约1至约3个核苷酸的3' 突出端。在一些实施方案中,siRNA分子在有义链和反义链二者上均包含约1至约3个核苷酸的3' 突出端。

[0348] 在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个经修饰核苷酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个经修饰核苷酸和/或(例如,和)一个或更多个经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,经修饰核苷酸是经修饰糖部分(例如,2' 经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个2' 经修饰核苷酸,例如2' -脱氧、2' -氟(2' -F)、2' -O-甲基(2' -O-Me)、2' -O-甲氧基乙基(2' -MOE)、2' -O-氨基丙基(2' -O-AP)、2' -O-二甲基氨基乙基(2' -O-DMAOE)、2' -O-二甲基氨基丙基(2' -O-DMAP)、2' -O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2' -O-DMAEOE)或2' -O--N-甲基乙酰胺基(2' -O--NMA)。在一些实施方案中,siRNA分子的每个核苷酸均是经修饰核苷酸(例如,2' -经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个磷酸二酰胺吗啉代。在一些实施方案中,siRNA分子的每个核苷酸均是磷酸二酰胺吗啉代。

[0349] 在一些实施方案中,siRNA分子包含硫代磷酸酯键联或其他经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,siRNA分子包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,siRNA分子在至少两个核苷酸之间包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,siRNA分子在所有核苷酸之间均包含硫代磷酸酯核苷间键联。例如,在一些实施方案中,siRNA分子在siRNA分子的5' 或3' 末端的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷间键联处包含经修饰核苷酸间键联。

[0350] 在一些实施方案中,经修饰核苷酸间键联是含磷的键联。在一些实施方案中,可使用的含磷的键联包括但不限于:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基磷酸酯和包含3' 亚烷基磷酸酯的其他烷基磷酸酯、以及手性磷酸酯、次磷酸酯、包含3' -氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯的磷酰胺酯、硫羰基磷酰胺酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常3' -5' 键联的硼烷磷酸酯、这些的2' -5' 连接类似物、以及其中相邻的核苷单元对连接在3' -5' 到5' -3' 或2' -5' 到5' -2' 的具有相反极性的那些;参见美国专利no.3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050。

[0351] 本文中所述的siRNA分子的任何经修饰化学组成或形式可彼此组合。例如,同一siRNA分子内可包含一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同类型的修饰。

[0352] 在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个经修饰核苷酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个经修饰核苷酸和/或(例如,和)一个或更多个经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,经修饰核苷酸包含经修饰

糖部分(例如,2' 经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个2' 经修饰核苷酸,例如2' -脱氧、2' -氟(2' -F)、2' -O-甲基(2' -O-Me)、2' -O-甲氧基乙基(2' -MOE)、2' -O-氨基丙基(2' -O-AP)、2' -O-二甲基氨基乙基(2' -O-DMAOE)、2' -O-二甲基氨基丙基(2' -O-DMAP)、2' -O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2' -O-DMAEOE)或2' -O--N-甲基乙酰胺基(2' -O--NMA)。在一些实施方案中,反义链的每个核苷酸均是经修饰核苷酸(例如,2' -经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个磷酸二酰胺吗啉代。在一些实施方案中,反义链是磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)。

[0353] 在一些实施方案中,反义链包含硫代磷酸酯键联或其他经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,反义链包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,反义链在至少两个核苷酸之间包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,反义链在所有核苷酸之间均包含硫代磷酸酯核苷间键联。例如,在一些实施方案中,反义链在siRNA分子的5' 或3' 末端的第一、第二和/或(例如,和) 第三核苷间键联处包含经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,经修饰核苷酸间键联是含磷的键联。在一些实施方案中,可使用的含磷的键联包括但不限于:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基磷酸酯和包含3' 亚烷基磷酸酯的其他烷基磷酸酯、以及手性磷酸酯、次磷酸酯、包含3' -氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯的磷酰胺酯、硫羰基磷酰胺酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常3' -5' 键联的硼烷磷酸酯、这些的2' -5' 连接类似物、以及其中相邻的核苷单元对连接在3' -5' 到5' -3' 或2' -5' 到5' -2' 的具有相反极性的那些;参见美国专利no.3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050。

[0354] 本文中所述的反义链的任何经修饰化学组成或形式可彼此组合。例如,同一反义链内可包含一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同类型的修饰。

[0355] 在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个经修饰核苷酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个经修饰核苷酸和/或(例如,和) 一个或更多个经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,经修饰核苷酸是经修饰糖部分(例如,2' 经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个2' 经修饰核苷酸,例如2' -脱氧、2' -氟(2' -F)、2' -O-甲基(2' -O-Me)、2' -O-甲氧基乙基(2' -MOE)、2' -O-氨基丙基(2' -O-AP)、2' -O-二甲基氨基乙基(2' -O-DMAOE)、2' -O-二甲基氨基丙基(2' -O-DMAP)、2' -O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2' -O-DMAEOE)或2' -O--N-甲基乙酰胺基(2' -O--NMA)。在一些实施方案中,有义链的每个核苷酸均是经修饰核苷酸(例如,2' -经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个磷酸二酰胺吗啉代。在一些实施方案中,反义链是磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)。在一些实施方案中,有义链包含硫代磷酸酯键联或其他经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,有义链包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链在至少两个核苷酸之间包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链在所有核苷酸之间均包含硫代磷酸酯核苷间键联。例如,在一些实施方案中,有义链在有义链的5' 或3' 末端的第一、第二和/或(例如,和) 第三核苷间键联处包含经修饰核苷酸间键联。

[0356] 在一些实施方案中,经修饰核苷酸间键联是含磷的键联。在一些实施方案中,可使用的含磷的键联包括但不限于:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基磷酸酯和包含3' 亚烷基磷酸酯的其他烷基磷酸酯、以及手性磷酸酯、次磷酸酯、包含3' -氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯的磷酰胺酯、硫羰基磷酰胺酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常3' -5' 键联的硼烷磷酸酯、这些的2' -5' 连接类似物、以及其中相邻的核苷单元对连接在3' -5' 到5' -3' 或2' -5' 到5' -2' 的具有相反极性的那些;参见美国专利no.3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050。

[0357] 本文中所述的有义链的任何经修饰化学组成或形式可彼此组合。例如,同一有义链内可包含一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同类型的修饰。

[0358] 在一些实施方案中,siRNA分子的反义链或有义链包含增强或降低RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex,RISC)负载的修饰。在一些实施方案中,siRNA分子的反义链包含增强RISC负载的修饰。在一些实施方案中,siRNA分子的有义链包含降低RISC负载并降低脱靶效应的修饰。在一些实施方案中,siRNA分子的反义链包含2' -O-甲氧基乙基(2' -MOE)修饰。在切割位点添加2' -O-甲氧基乙基(2' -MOE)基团通过促进经修饰链的定向RNA诱导沉默复合物(RISC)负载改善了siRNA的特异性和沉默活性二者,如Song et al., (2017)Mol Ther Nucleic Acids 9:242-250中所述,其通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的反义链包含提高RISC负载的2' -OMe-二硫代磷酸酯修饰,如Wu et al., (2014)Nat Commun 5:3459中所述,其通过引用整体并入本文。

[0359] 在一些实施方案中,siRNA分子的有义链包含5' -吗啉代,其降低有义链的RISC负载并改善反义链选择和RNAi活性,如Kumar et al., (2019)Chem Commun (Camb) 55 (35): 5139-5142中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的有义链是用合成的RNA样高亲和力核苷酸类似物锁核酸(LNA)来修饰的,其降低有义链的RISC负载并进一步增强反义链并入到RISC中,如Elman et al., (2005)Nucleic Acids Res.33(1): 439-447中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的有义链包含5' 解锁核酸(UNA)修饰,其降低有义链的RISC负载并改善反义链的沉默效力,如Snead et al., (2013)Mol Ther Nucleic Acids 2(7):e103中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的有义链包含5-硝基吡啶修饰,其降低有义链的RNAi效力并降低脱靶效应,如Zhang et al., (2012)Chembiochem 13(13):1940-1945中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,有义链包含2' -O' 甲基(2' -O-Me)修饰,其降低有义链的RISC负载和脱靶效应,如Zheng et al.,FASEB(2013)27(10):4017-4026中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的有义链被吗啉代、2' -MOE或2' -O-Me残基完全替换并且不被RISC识别,如Kole et al., (2012)Nature reviews.Drug Discovery 11(2):125-140中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的反义链包含2' -MOE修饰并且有义链包含2' -O-Me修饰(参见例如Song et al., (2017)Mol Ther Nucleic Acids 9:242-250)。在一些实施方案中,至少一个(例如,至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个)siRNA分子与肌肉靶向剂(例如,共价)连接。在一

些实施方案中,肌肉靶向剂可包含以下或者由以下组成:核酸(例如,DNA或RNA)、肽(例如,抗体)、脂质(例如,微囊泡)或糖部分(例如,多糖)。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是抗体。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是抗转铁蛋白受体抗体(例如,本文中提供的任一种抗TfR抗体)。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子有义链的5'末端连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子有义链的3'末端连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子的有义链内部连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子反义链的5'末端连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子反义链的3'末端连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子的反义链内部连接。

[0360] k. 微RNA(miRNA)

[0361] 在一些实施方案中,寡核苷酸可以是微RNA(miRNA)。微RNA(称为“miRNA”)是小的非编码RNA,属于通过与靶RNA转录物上的互补位点结合来控制基因表达的一类调节分子。通常来说,miRNA由大的RNA前体(称为初级miRNA(pri-miRNA))产生,所述RNA前体在细胞核中加工成约70个核苷酸的前体miRNA,前体miRNA折叠成不完美的茎-环结构。这些前体miRNA通常在胞质内经历另外的加工步骤,在此长度为18至25个核苷酸的成熟miRNA被RNA酶III酶Dicer从前体miRNA发夹的一侧切离。

[0362] 本文中使用的miRNA包括初级miRNA、前体miRNA、成熟miRNA或保留成熟miRNA的生物学活性的其变体的片段。在一个实施方案中,miRNA的尺寸范围可以是21个核苷酸至170个核苷酸。在一个实施方案中,miRNA的尺寸范围是长度为70至170个核苷酸。在另一个实施方案中,可使用长度为21至25个核苷酸的成熟miRNA。

[0363] l. 适配体

[0364] 在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸可以是适配体的形式。通常来说,在分子载荷的情况下,适配体是与靶标(例如细胞中的小分子、蛋白质、核酸)特异性结合的任何核酸。在一些实施方案中,适配体是DNA适配体或RNA适配体。在一些实施方案中,核酸适配体是单链DNA或RNA(ssDNA或ssRNA)。应理解,单链核酸适配体可形成螺旋和/或(例如,和)环结构。形成核酸适配体的核酸可包含天然存在的核苷酸、经修饰核苷酸、具有插入在一个或多个核苷酸之间的烃接头(例如,亚烷基)或聚醚接头(例如,PEG接头)的天然存在的核苷酸、具有插入在一个或多个核苷酸之间的烃或PEG接头的经修饰核苷酸,或其组合。描述适配体和制备适配体的方法的示例性出版物和专利包括,例如,Lorsch and Szostak, 1996; Jayasena, 1999; 美国专利No. 5,270,163; 5,567,588; 5,650,275; 5,670,637; 5,683,867; 5,696,249; 5,789,157; 5,843,653; 5,864,026; 5,989,823; 6,569,630; 8,318,438和PCT申请W0 99/31275,其各自通过引用并入本文。

[0365] m. 核酶

[0366] 在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸可以是核酶的形式。核酶(核糖核酸酶)是能够进行特定的生化反应,类似于蛋白质酶作用的分子,通常是RNA分子。核酶是具有催化活性的分子,所述催化活性包括在与该核酶杂交的RNA分子(例如,mRNA、含RNA的底物、lncRNA)和核酶本身中的特定磷酸二酯键联处进行切割的能力。

[0367] 核酶可采用数种物理结构之一,其中之一被称为“锤头状的”。锤头状核酶由包含9个保守碱基的催化核心、双链茎和环结构(茎-环II)以及与靶RNA侧翼区催化核心互补的两个区域构成。通过形成双链茎I和III,侧翼区能够使核酶与靶RNA特异性结合。通过3', 5' -

磷酸二酯至2', 3'-环状磷酸二酯的酯交换反应,在特定核糖核苷酸三联体旁以顺式(即,切割包含锤头状基序的同一RNA分子)或以反式(切割除包含核酶的RNA底物之外的RNA底物)发生切割。不希望受理论束缚,认为这种催化活性需要在核酶的催化区域中存在特定的、高度保守的序列。

[0368] 核酶结构中的修饰还包括用非核苷酸分子替换或替代分子的多个非核心部分。例如,Benseler et al. (J. Am. Chem. Soc. (1993) 115:8483-8484) 公开了锤头状样分子,其中茎II的两个碱基对和环II的所有四个核苷酸被基于六乙二醇、丙二醇、双(三乙二醇)磷酸酯、三(丙二醇)二磷酸酯或双(丙二醇)磷酸酯的非核苷酸接头替代。Ma et al. (Biochem. (1993) 32:1751-1758; Nucleic Acids Res. (1993) 21:2585-2589) 用非核苷酸的乙二醇相关的接头替代了TAR核酶发夹的六个核苷酸的环。Thomson et al. (Nucleic Acids Res. (1993) 21:5600-5603) 用长度为13、17和19个原子的线性非核苷酸接头替代了环II。

[0369] 核酶寡核苷酸可使用公知的方法(参见,例如,PCT公开W09118624;W09413688;W09201806;和W0 92/07065;以及美国专利5436143和5650502)制备,或者可从商业来源(例如,US Biochemicals)购买,而且如果需要的话,可并入核苷酸类似物来提高寡核苷酸对细胞中通过核酸酶进行的降解的抗性。可以以任何已知的方式,例如通过使用例如由Applied Biosystems, Inc. 或Milligen生产的市售合成仪来合成核酶。也可通过常规手段在重组载体中产生核酶。参见Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (现行版)。核酶RNA序列可常规地合成,例如通过使用RNA聚合酶例如T7或SP6。

[0370] n. 指导核酸

[0371] 在一些实施方案中,寡核苷酸是指导核酸,例如,指导RNA (gRNA) 分子。通常来说,指导RNA是由以下构成的短的合成RNA: (1) 与核酸可编程DNA结合蛋白 (napDNAbp) (例如,Cas9) 结合的支架序列,和(2) 核苷酸间隔区部分,其定义了与gRNA结合的DNA靶序列(例如,基因组DNA靶标),以将核酸可编程DNA结合蛋白引至接近DNA靶序列。在一些实施方案中,napDNAbp是与一种或更多种RNA形成复合物(例如,与之结合或缔合)的核酸可编程蛋白,所述RNA将核酸可编程蛋白靶向靶DNA序列(例如,靶基因组DNA序列)。在一些实施方案中,当与RNA复合时,核酸可编程核酸酶可被称为核酸酶:RNA复合物。指导RNA可作为两种或更多种RNA的复合物,或者作为单个RNA分子存在。

[0372] 作为单个RNA分子存在的指导RNA (gRNA) 可被称为单指导RNA (single-guide RNA, sgRNA), 尽管gRNA也被用于指代作为单个分子或者作为两种或更多种分子的复合物存在的指导RNA。通常来说,作为单个RNA种类存在的gRNA包含两个结构域: (1) 与靶核酸享有同源性的结构域(即,指导Cas9复合物与靶标的结合); 以及(2) 结合Cas9蛋白的结构域。在一些实施方案中,结构域(2) 对应于被称为tracrRNA的序列,并且包含茎-环结构。在一些实施方案中,结构域(2) 与如Jinek et al., Science 337:816-821 (2012) (其全部内容通过引用并入本文) 中提供的tracrRNA相同或同源。

[0373] 在一些实施方案中,gRNA包含结构域(1) 和(2) 中的两个或更多个,并且可被称为扩增gRNA (extended gRNA)。例如,如本文中所述,扩增gRNA将结合两个或更多个Cas9蛋白并且在两个或更多个不同的区域结合靶核酸。gRNA包含与靶位点互补的核苷酸序列,其介导核酸酶/RNA复合物与所述靶位点的结合,提供核酸酶:RNA复合物的序列特异性。在一些实施方案中,RNA可编程核酸酶是(CRISPR相关系统) Cas9核酸内切酶,例如来自酿脓链球菌

(*Streptococcus pyogenes*)的Cas9(Csn1) (参见,例如,“Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*.”Ferretti J.J.,McShan W.M.,Ajdic D.J.,Savic D.J.,Savic G.,Lyon K.,Primeaux C.,Sezate S.,Suvorov A.N.,Kenton S.,Lai H.S.,Lin S.P.,Qian Y.,Jia H.G.,Najar F.Z.,Ren Q.,Zhu H.,Song L.,White J.,Yuan X.,Clifton S.W.,Roe B.A.,McLaughlin R.E.,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*98:4658-4663(2001);“CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.”Deltcheva E.,Chylinski K.,Sharma C.M.,Gonzales K.,Chao Y.,Pirzada Z.A.,Eckert M.R.,Vogel J.,Charpentier E.,*Nature* 471:602-607(2011);和“A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.”Jinek M.,Chylinski K.,Fonfara I.,Hauer M.,Doudna J.A.,Charpentier E.*Science* 337:816-821(2012),其各自的全部内容通过引用并入本文。

[0374] o. 多聚体

[0375] 在一些实施方案中,分子载荷可包含通过接头连接的2个或更多个寡核苷酸的多聚体(例如,串联体)。在一些实施方案中,以这种方式,复合物/缀合物的寡核苷酸负载可提高超过靶向剂上的可用连接位点(例如,抗体上的可用硫醇位点或胺位点),或者以其他方式调节以实现特定的载荷负载量。多聚体中的寡核苷酸可相同或不同(例如,靶向不同基因或者同一基因或其产物上的不同位点)。

[0376] 在一些实施方案中,多聚体包含通过可切割接头连接在一起的2个或更多个寡核苷酸。然而,在一些实施方案中,多聚体包含通过不可切割接头连接在一起的2个或更多个寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体包含2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个连接在一起的寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体包含2至5、2至10或4至20个连接在一起的寡核苷酸。

[0377] 在一些实施方案中,多聚体包含2个或更多个首尾相连(以线性排列)的寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体包含2个或更多个通过基于寡核苷酸的接头(例如,聚-dT接头,一种无碱基接头)首尾相连的寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体包含一个寡核苷酸的5'末端,其与另一个寡核苷酸的3'末端连接。在一些实施方案中,多聚体包含一个寡核苷酸的3'末端,其与另一个寡核苷酸的3'末端连接。在一些实施方案中,多聚体包含一个寡核苷酸的5'末端,其与另一个寡核苷酸的5'末端连接。尽管如此,在一些实施方案中,多聚体可包含分支结构,所述分支结构包含通过分支接头连接在一起的多个寡核苷酸。

[0378] 可用于本文中提供的复合物中的多聚体的另一些实例在以下中公开:例如,美国专利申请号2015/0315588 A1,标题为Methods of delivering multiple targeting oligonucleotides to a cell using cleavable linkers,其于2015年11月5日公开;美国专利申请号2015/0247141 A1,标题为Multimeric Oligonucleotide Compounds,其于2015年9月3日公开;美国专利申请号US 2011/0158937 A1,标题为Immunostimulatory Oligonucleotide Multimers,其于2011年6月30日公开;和美国专利号5,693,773,标题为Triplex-Forming Antisense Oligonucleotides Having Abasic Linkers Targeting Nucleic Acids Comprising Mixed Sequences Of Purines And Pyrimidines,其于1997年12月2日授权,其各自的内容通过引用整体并入本文。

[0379] o. 剪接改变寡核苷酸

[0380] 在一些实施方案中,本公开内容的寡核苷酸(例如,包含吗啉代的反义寡核苷酸)

靶向剪接。在一些实施方案中,寡核苷酸通过在基因中诱导外显子跳读和恢复读码框来靶向剪接。作为一个非限制性实例,寡核苷酸可诱导编码移码突变的外显子和/或(例如,和)编码过早终止密码子的外显子的跳读。在一些实施方案中,寡核苷酸可通过阻断剪接体对剪接位点的识别来诱导外显子跳读。在一些实施方案中,与参考蛋白质相比,外显子跳读导致截短但具有功能性的蛋白质(例如,如下所述的截短但具有功能性的DMD蛋白)。在一些实施方案中,寡核苷酸促进包含特定外显子(例如,如下所述的SMN2基因的外显子7)。在一些实施方案中,寡核苷酸可通过靶向剪接位点抑制序列来诱导包含外显子。RNA剪接参与肌肉疾病,包括迪谢内肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)和脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)。

[0381] 编码肌养蛋白(DMD)的基因中的改变(例如,缺失、点突变和重复)引起DMD。这些改变可导致移码突变和/或(例如,和)无义突变。在一些实施方案中,本公开内容的寡核苷酸促进一个或更多个DMD外显子(例如,外显子8、外显子43、外显子44、外显子45、外显子50、外显子51、外显子52、外显子53和/或(例如,和)外显子55)的跳读,并产生具有功能性的截短蛋白质。参见,例如,2013年7月16日公开的美国专利No. 8,486,907和2014年9月18日公开的U.S. 20140275212。

[0382] 在SMA中,存在功能性SMN1的丢失。尽管SMN2基因是SMN1的旁系同源物,但SMN2基因的选择性剪接主要导致外显子7的跳读和随后产生无法补偿SMN1丢失的截短的SMN蛋白。在一些实施方案中,本公开内容的寡核苷酸促进包含SMN2外显子7。在一些实施方案中,寡核苷酸是靶向SMN2剪接位点抑制序列的反义寡核苷酸(参见,例如2010年11月23日公开的美国专利号7,838,657)。

[0383] ii. 小分子:

[0384] 如本文中所述,任何合适的小分子均可用作分子载荷。

[0385] iii. 肽/蛋白质

[0386] 如本文中所述,任何合适的肽或蛋白质均可用作分子载荷。在一些实施方案中,蛋白质是酶(例如酸性 α -葡萄糖苷酶,例如由GAA基因编码)。可使用数种方法例如噬菌体展示肽文库、单珠单化合物肽文库或位置扫描合成肽组合文库来产生、合成和/或(例如,和)衍生这些肽或蛋白质。示例性的方法已在本领域中表征并通过引用并入(Gray, B.P. and Brown, K.C. "Combinatorial Peptide Libraries: Mining for Cell-Binding Peptides" Chem Rev. 2014, 114: 2, 1020-1081.; Samoylova, T.I. and Smith, B.E. "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening." Muscle Nerve, 1999, 22: 4.460-6.)。

[0387] iv. 核酸构建体

[0388] 如本文中所述,任何合适的基因表达构建体均可用作分子载荷。在一些实施方案中,基因表达构建体可以是载体或cDNA片段。在一些实施方案中,基因表达构建体可以是信使RNA(mRNA)。在一些实施方案中,本文中使用的mRNA可以是经修饰mRNA,例如,如美国专利8,710,200中所述,其于2014年4月24日授权,标题为"Engineered nucleic acids encoding a modified erythropoietin and their expression"。在一些实施方案中,mRNA可包含5' 甲基帽。在一些实施方案中,mRNA可包含聚A尾,任选长度多至160个核苷酸。基因表达构建体可编码在肌肉疾病中具有缺陷的蛋白质的序列。在一些实施方案中,基因

表达构建体可在肌细胞的细胞核内表达,例如过表达。在一些实施方案中,基因表达构建体编码在肌肉疾病中具有缺陷的基因。在一些实施方案中,基因表达构建体编码包含至少一个锌指的蛋白质。在一些实施方案中,基因表达构建体编码与表6中的基因结合的蛋白质。在一些实施方案中,基因表达构建体编码导致由表6中的基因编码的蛋白质(例如突变体蛋白质)的表达降低的蛋白质。在一些实施方案中,基因表达构建体编码基因编辑酶。可用作分子载荷的核酸构建体的另一些实例在以下中提供:国际专利申请公开W02017152149A1,其于2017年9月19日公开,标题为“CLOSED-ENDED LINEAR DUPLEX DNA FOR NON-VIRAL GENE TRANSFER”;美国专利8,853,377B2,其于2014年10月7日授权,标题为“MRNA FOR USE IN TREATMENT OF HUMAN GENETIC DISEASES”;以及美国专利US8822663B2,其于2014年9月2日授权,ENGINEERED NUCLEIC ACIDS AND METHODS OF USE THEREOF”,其各自的内容均通过引用整体并入本文。

[0389] v. 可检测标记/诊断剂

[0390] 任何合适的可检测标记或诊断剂均可用作本公开内容的分子载荷。“诊断剂”是指用于诊断目的的物质,例如,通过检测细胞或组织中的另外的分子。在一些实施方案中,诊断剂是靶向(例如,结合)已知与对象中的疾病相关的生物标志物(例如,核酸生物标志物、蛋白质生物标志物或代谢物生物标志物)并产生可检测信号的物质,其可用于确定生物标志物的存在/不存在,从而诊断疾病。例如,诊断剂可以是但不限于抗体或反义核酸。

[0391] 在一些实施方案中,诊断剂包含可检测标记。可检测标记是指合并了至少一种元素、同位素或结构或官能团的部分,其使得能够检测与诊断剂结合的分子,例如蛋白质或多肽,或其他实体。在一些实施方案中,可检测标记属于以下五类中的任何一类(或更多类): a) 含有同位素部分的物质,所述同位素部分可以是放射性同位素或重同位素,其包括但不限于 2H 、 3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}F 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{67}Ga 、 ^{76}Br 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($\text{Tc-}^{99\text{m}}$)、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 和 ^{186}Re ; b) 含有免疫部分的物质,所述免疫部分可以是抗体或抗原,其可与酶(例如,如辣根过氧化物酶)结合; c) 包含产生颜色、发光、磷光或荧光部分的物质(例如,如荧光标记异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanat, FITC)); d) 具有一个或更多个光亲和部分的物质; 以及 e) 作为一种或更多种已知结合配偶体(binding partner)(例如,生物素-链霉亲和素, His-NiTNAFK506-FKBP)的配体的物质。在一些实施方案中,可检测标记包含放射性同位素。在一些实施方案中,可检测标记包含荧光部分。在一些实施方案中,可检测标记包含染料,例如荧光染料,例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红(Texas red)、罗丹明(rhodamine)、Cy3、Cy5、Cy5.5、Alexa 647和衍生物。在一些实施方案中,可检测标记包含生物素。在一些实施方案中,可检测分子是荧光多肽(例如,GFP或其衍生物,例如增强型GFP(EGFP))或萤光素酶(例如,萤火虫萤光素酶、海肾萤光素酶(Renilla luciferase)或高斯萤光素酶(Gaussia luciferase))。在一些实施方案中,可检测标记可与合适的底物(例如萤光素)反应以生成可检测信号。荧光蛋白的一些非限制性实例包括GFP及其衍生物、包含发射不同颜色的光的发色团的蛋白质,例如红色、黄色和青色荧光蛋白等。示例性荧光蛋白包括例如Sirius、Azurite、EBFP2、TagBFP、mTurquoise、ECFP、Cerulean、TagCFP、mTFP1、mUkG1、mAG1、AcGFP1、TagGFP2、EGFP、mWasabi、EmGFP、TagYPF、EYFP、Topaz、SYFP2、Venus、Citrine、mK0、mK02、mOrange、mOrange2、TagRFP、TagRFP-T、mStrawberry、mRuby、mCherry、mRaspberry、mKate2、mPlum、mNeptune、T-Sapphire、

mAmetrine、mKeima。参见,例如,Chalfie,M.and Kain,SR(编辑)Green fluorescent protein:properties,applications,and protocols(Methods of biochemical analysis,v.47,Wiley-Interscience,and Hoboken,N.J.,2006,和/或(例如,和)Chudakov,DM,et al.,Physiol Rev.90(3):1103-63,2010,其通过引用并入本文中,用于讨论GFP和许多其他荧光蛋白或发光蛋白。在一些实施方案中,可检测标记包含暗猝灭剂,例如从荧光团吸收激发能量并将能量作为热量消散的物质。

[0392] B. 接头

[0393] 本文中所述的复合物通常包含连接本文中所述的任一种抗TfR抗体与分子载荷的接头。接头包含至少一个共价键。在一些实施方案中,接头可以是连接抗TfR抗体与分子载荷的单键,例如二硫键或二硫桥。然而,在一些实施方案中,接头可通过多个共价键连接本文中所述的任一种抗TfR抗体与分子载荷。在一些实施方案中,接头可以是可切割接头。然而,在一些实施方案中,接头可以是不可切割接头。接头通常在体外和体内是稳定的,并且在某些细胞环境中可以是稳定的。另外,通常来说接头不负面影响抗TfR抗体或分子载荷的功能特性。接头合成的实例和方法是本领域中已知的(参见,例如Kline,T. et al. "Methods to Make Homogenous Antibody Drug Conjugates." Pharmaceutical Research, 2015, 32: 11, 3480-3493.; Jain, N. et al. "Current ADC Linker Chemistry" Pharm Res. 2015, 32: 11, 3526-3540.; McCombs, J. R. and Owen, S. C. "Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry" AAPS J. 2015, 17: 2, 339-351.)。

[0394] 接头的前体通常将包含允许与抗TfR抗体和分子载荷二者连接的两种不同的反应性物质。在一些实施方案中,两种不同的反应性物质可以是亲核体和/或(例如,和)亲电体。在一些实施方案中,接头通过与抗TfR抗体的赖氨酸残基或半胱氨酸残基缀合而与抗TfR抗体连接。在一些实施方案中,接头通过含马来酰亚胺的接头与抗TfR抗体的半胱氨酸残基连接,其中任选地,含马来酰亚胺的接头包含马来酰亚胺基己酰基或马来酰亚胺基甲基环己烷-1-羧酸根基团。在一些实施方案中,接头通过3-芳基丙腈官能团与抗TfR抗体的半胱氨酸残基或巯基官能化的分子载荷连接。在一些实施方案中,接头与抗TfR抗体的赖氨酸残基连接。在一些实施方案中,接头通过酰胺键、氨基甲酸酯键、酰肼、三唑、硫醚或二硫键与抗TfR抗体和/或(例如,和)分子载荷连接。

[0395] i. 可切割接头

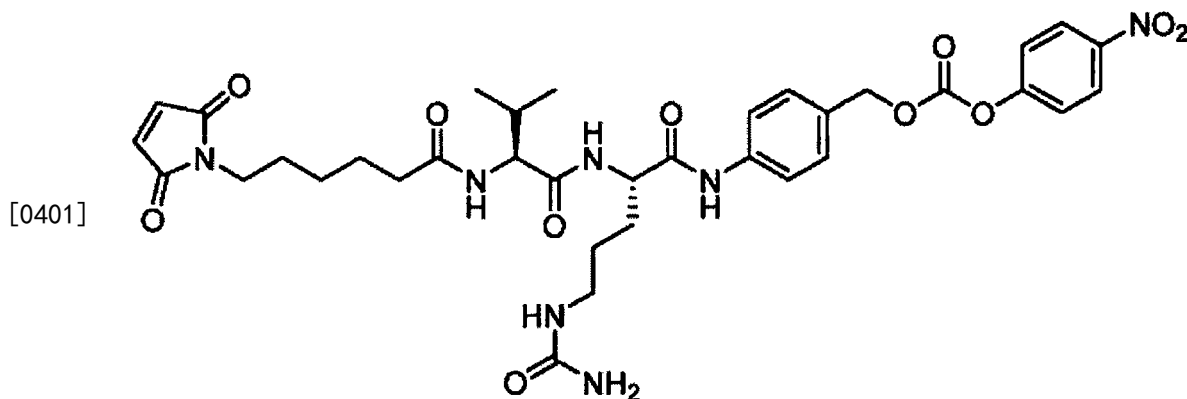
[0396] 可切割接头可以是蛋白酶敏感性接头、pH敏感性接头或谷胱甘肽敏感性接头。这些接头通常仅在胞内可切割,并且优选在胞外环境,例如肌细胞胞外中稳定。

[0397] 蛋白酶敏感性接头可通过蛋白酶活性切割。这些接头通常包含肽序列,并且长度可为2至10个氨基酸、约2至5个氨基酸、约5至10个氨基酸、约10个氨基酸、约5个氨基酸、约3个氨基酸或约2个氨基酸。在一些实施方案中,肽序列可包含天然存在的氨基酸(例如半胱氨酸、丙氨酸)或者非天然存在的或经修饰的氨基酸。非天然存在的氨基酸包括β-氨基酸、高氨基酸、脯氨酸衍生物、3-经取代的丙氨酸衍生物、线性核心氨基酸、N-甲基氨基酸和本领域已知的其他氨基酸。在一些实施方案中,蛋白酶敏感性接头包含缬氨酸-瓜氨酸或丙氨酸-瓜氨酸二肽序列。在一些实施方案中,蛋白酶敏感性接头可被溶酶体蛋白酶(例如组织蛋白酶B(cathepsin B))和/或(例如,和)内体蛋白酶切割。

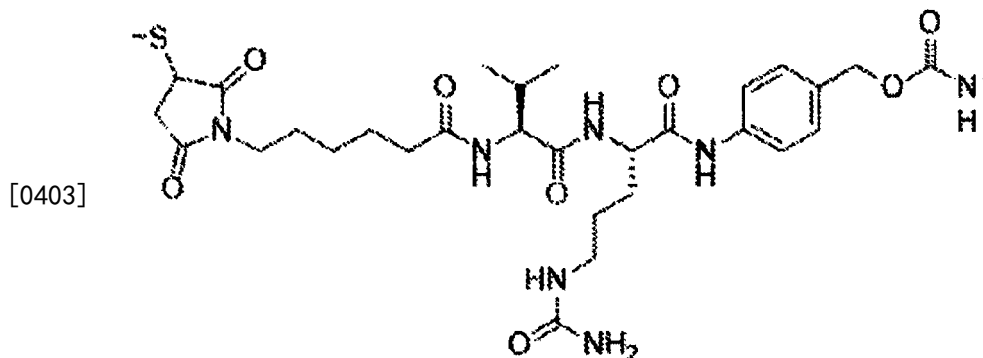
[0398] pH敏感性接头是在高或低pH环境中容易降解的共价键联。在一些实施方案中,pH敏感性接头可在4至6的pH下被切割。在一些实施方案中,pH敏感性接头包含脲或环缩醛。在一些实施方案中,pH敏感性接头在内体或溶酶体内被切割。

[0399] 在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感性接头包含二硫化物部分。在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感性接头通过与细胞内的谷胱甘肽物质进行二硫化物交换反应来切割。在一些实施方案中,二硫化物部分还包含至少一种氨基酸,例如半胱氨酸残基。

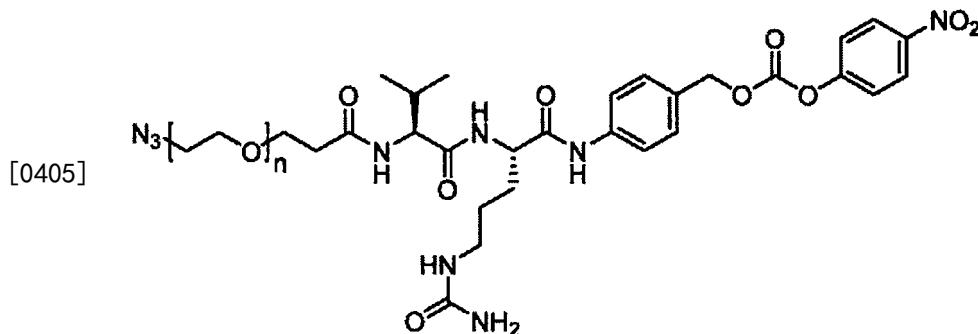
[0400] 在一些实施方案中,接头是Val-cit接头(例如,如美国专利6,214,345中所述,其通过引用并入本文)。在一些实施方案中,在缀合之前, val-cit接头具有以下结构:



[0402] 在一些实施方案中,在缀合之后, val-cit接头具有以下结构:



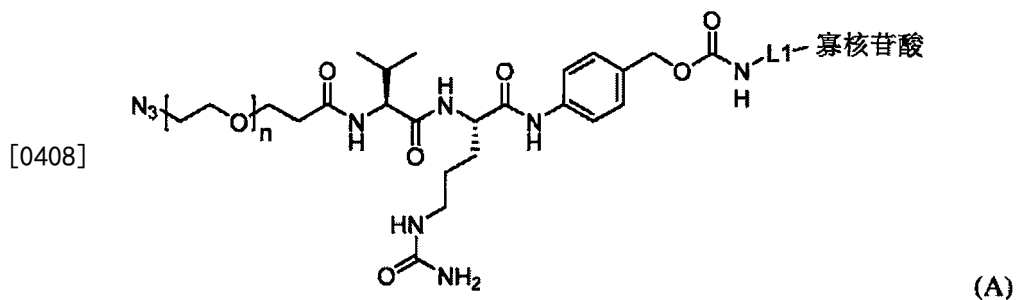
[0404] 在一些实施方案中, Val-cit接头与反应性化学部分(例如,用于点击化学缀合的SPAAC)连接。在一些实施方案中,在点击化学缀合之前,与反应性化学部分(例如,用于点击化学缀合的SPAAC)连接的 val-cit接头具有以下结构:



[0406] 其中n是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3。

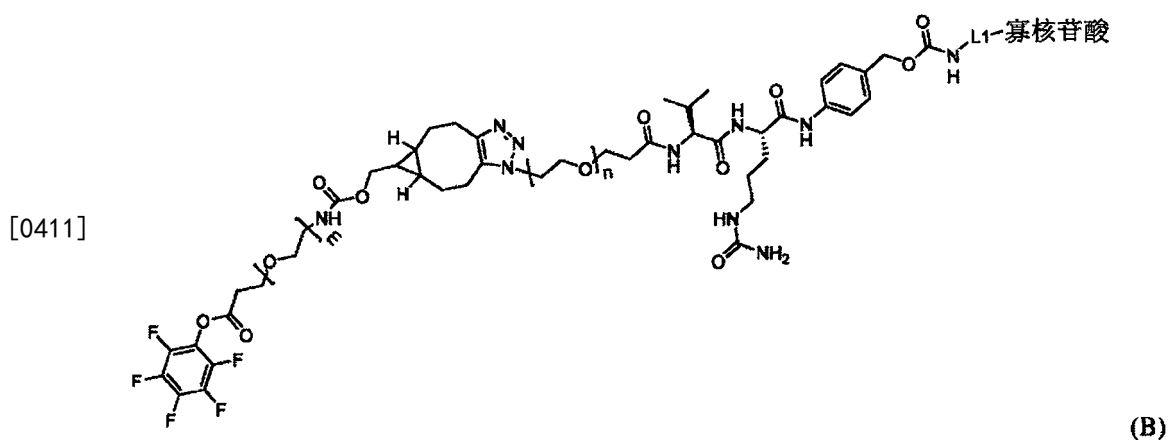
[0407] 在一些实施方案中,与反应性化学部分(例如,用于点击化学缀合的SPAAC)连接的 val-cit接头与分子载荷(例如,寡核苷酸)缀合(例如,通过不同的化学部分缀合)。在一些

实施方案中,与反应性化学部分(例如,用于点击化学缀合的SPAAC)连接并与分子载荷(例如,寡核苷酸)缀合的val-cit接头具有以下结构(在点击化学缀合之前):



[0409] 其中n是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3。

[0410] 在一些实施方案中,在与分子载荷(例如,寡核苷酸)缀合之后,val-cit接头具有以下结构:



[0412] 其中n是0至10的任意数字,并且其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3并且m是4。

[0413] ii. 不可切割接头

[0414] 在一些实施方案中,可使用不可切割接头。通常来说,不可切割接头在细胞或生理环境中不容易被降解。在一些实施方案中,不可切割接头包含任选经取代的烷基,其中所述取代可包括卤素、羟基、氧物质和其他常见的取代。在一些实施方案中,接头可包含任选经取代的烷基、任选经取代的亚烷基、任选经取代的亚芳基、杂亚芳基、包含至少一种非天然氨基酸的肽序列、截短的聚糖、不能被酶降解的一种或更多种糖、叠氮化物、炔-叠氮化物、包含LPXT序列的肽序列、硫醚、生物素、联苯、聚乙二醇或等同化合物的重复单元、酸性酯、酰胺、磺酰胺和/或(例如,和)烷氧基-胺接头。在一些实施方案中,分选酶介导的连接将用于共价连接包含LPXT序列的抗TfR抗体与包含(G)_n序列的分子载荷(参见,例如Proft T.Sortase-mediated protein ligation:an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization.Biotechnol Lett.2010,32(1):1-10.)。

[0415] 在一些实施方案中,接头可包含经取代的亚烷基、任选经取代的亚烯基、任选经取代的亚炔基、任选经取代的亚环烷基、任选经取代的亚环烯基、任选经取代的亚芳基、还包含至少一个选自N、O和S的杂原子的任选经取代的杂亚芳基;还包含至少一个选自N、O和S的杂原子的任选经取代的亚杂环基;亚氨基、任选经取代的氮物质、任选经取代的氧物质O、任选经取代的硫物质或聚(环氧烷烃),例如聚环氧乙烷或聚环氧丙烷。

[0416] iii. 接头缀合

[0417] 在一些实施方案中,接头通过磷酸酯、硫醚、醚、碳-碳、氨基甲酸酯、或酰胺键与抗TfR抗体和/或(例如,和)分子载荷连接。在一些实施方案中,接头通过磷酸酯或硫代磷酸酯基团例如寡核苷酸主链的末端磷酸酯与寡核苷酸连接。在一些实施方案中,接头通过抗TfR抗体上存在的赖氨酸或半胱氨酸残基与该抗TfR抗体连接。

[0418] 在一些实施方案中,接头通过叠氮化物和炔烃之间的环加成反应与抗TfR抗体和/或(例如,和)分子载荷连接以形成三唑,其中叠氮化物和炔烃可位于抗TfR抗体、分子载荷或接头上。在一些实施方案中,炔烃可以是环炔烃,例如环辛炔。在一些实施方案中,炔烃可以是双环壬炔(也称为双环[6.1.0]壬炔或BCN)或经取代的双环壬炔。在一些实施方案中,环辛炔如国际专利申请公开W02011136645中所述,其于2011年11月3日公开,标题为“Fused Cyclooctyne Compounds And Their Use In Metal-free Click Reactions”。在一些实施方案中,叠氮化物可以是包含叠氮化物的糖或碳水化合物分子。在一些实施方案中,叠氮化物可以是6-叠氮基-6-脱氧半乳糖或6-叠氮基-N-乙酰半乳糖胺。在一些实施方案中,包含叠氮化物的糖或碳水化合物分子如国际专利申请公开W02016170186中所述,其于2016年10月27日公开,标题为“Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A $\beta(1,4)$ -N-Acetylgalactosaminyltransferase”。在一些实施方案中,在叠氮化物和炔烃之间进行环加成反应以形成三唑,其中叠氮化物和炔烃可位于抗TfR抗体、分子载荷或接头上,如以下中所述:国际专利申请公开W02014065661,其于2014年5月1日公开,标题为“Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof”;或国际专利申请公开W02016170186,其于2016年10月27日公开,标题为“Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A $\beta(1,4)$ -N-Acetylgalactosaminyltransferase”。

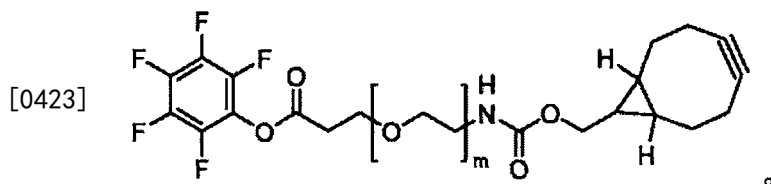
[0419] 在一些实施方案中,接头还包含间隔基,例如聚乙二醇间隔基或酰基/胺甲酰基磺酰胺间隔基,例如HydraSpaceTM间隔基。在一些实施方案中,间隔基如Verkade, J.M.M. et al., “A Polar Sulfamide Spacer Significantly Enhances the Manufacturability, Stability, and Therapeutic Index of Antibody-Drug Conjugates”, Antibodies, 2018, 7, 12中所述。

[0420] 在一些实施方案中,接头通过亲二烯体和二烯/杂二烯之间的第尔斯-阿尔德反应(Diels-Alder reaction)与抗TfR抗体和/或(例如,和)分子载荷连接,其中亲二烯体和二烯/杂二烯可位于抗TfR抗体、分子载荷或接头上。在一些实施方案中,接头通过其他周环反应(pericyclic reaction),例如烯反应与抗TfR抗体和/或(例如,和)分子载荷连接。在一些实施方案中,接头通过酰胺、硫代酰胺或磺酰胺键合反应与抗TfR抗体和/或(例如,和)分子载荷连接。在一些实施方案中,接头通过缩合反应与抗TfR抗体和/或(例如,和)分子载荷连接,以形成存在于接头和抗TfR抗体和/或(例如,和)分子载荷之间的脲、脘或氨基脲基团。

[0421] 在一些实施方案中,接头通过亲核体(例如胺或羟基)和亲电体(例如羧酸或醛)之间的共轭加成反应与抗TfR抗体和/或(例如,和)分子载荷连接。在一些实施方案中,在进行接头和抗TfR抗体或分子载荷之间的反应之前,亲核体可存在于接头上并且亲电体可存在

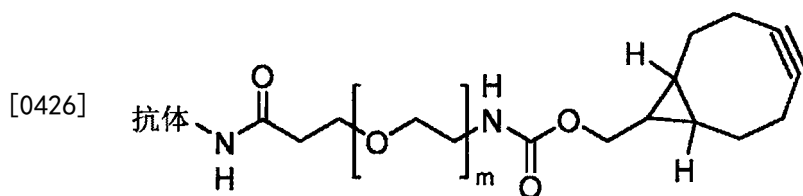
于抗TfR抗体或分子载荷上。在一些实施方案中,在进行接头和抗TfR抗体或分子载荷之间的反应之前,亲电体可存在于接头上并且亲核体可存在于抗TfR抗体或分子载荷上。在一些实施方案中,亲电体可以是叠氮化物、五氟苯基、硅中心、羰基、羧酸、酸酐、异氰酸酯、硫代异氰酸酯、琥珀酰亚胺酯、磺基琥珀酰亚胺酯、马来酰亚胺、烷基卤化物、烷基假卤化物、环氧化物、环硫化物、氮丙啶、芳基、活化的磷中心和/或(例如,和)活化的硫中心。在一些实施方案中,亲核体可以是任选经取代的烯烃、任选经取代的炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂环基、羟基、氨基、烷基氨基、苯胺基或硫醇基。

[0422] 在一些实施方案中,与反应性化学部分(例如,用于点击化学缀合的SPAAC)连接的val-cit接头通过以下结构与抗TfR抗体缀合:



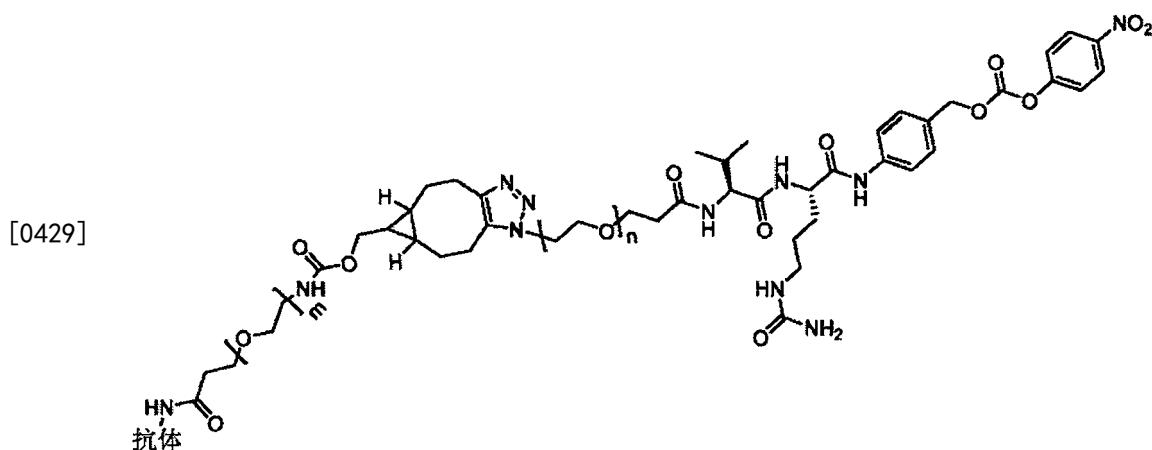
[0424] 其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中,m是4。

[0425] 在一些实施方案中,与反应性化学部分(例如,用于点击化学缀合的SPAAC)连接的val-cit接头与抗TfR抗体缀合,其具有以下结构:



[0427] 其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中,m是4。

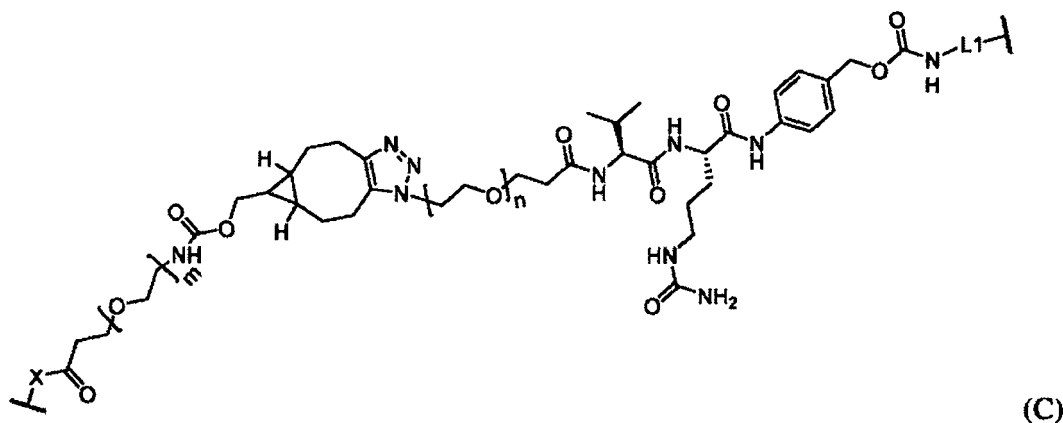
[0428] 在一些实施方案中,与反应性化学部分(例如,用于点击化学缀合的SPAAC)连接并与抗TfR抗体缀合的val-cit接头具有以下结构:



[0430] 其中n是0至10的任意数字,其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3和/或(例如,和)m是4。

[0431] 在一些实施方案中,连接抗体和分子载荷的val-cit接头具有以下结构:

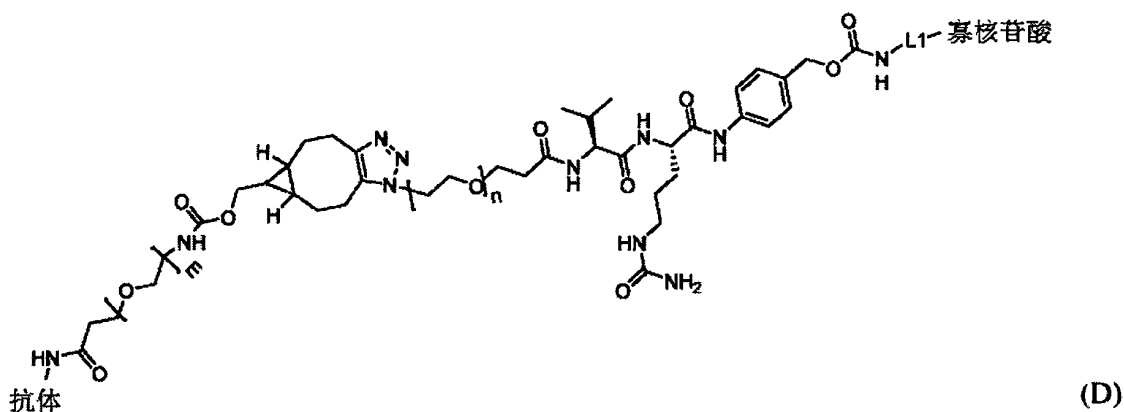
[0432]



[0433] 其中n是0至10的任意数字,其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3和/或(例如,和)m是4。在一些实施方案中,n是3和/或(例如,和)m是4。在一些实施方案中,X是抗体的NH(例如,来自赖氨酸的胺基的NH)、S(例如,来自半胱氨酸的硫醇基的S)或O(例如,来自丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的羟基的O)。

[0434] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物具有以下结构:

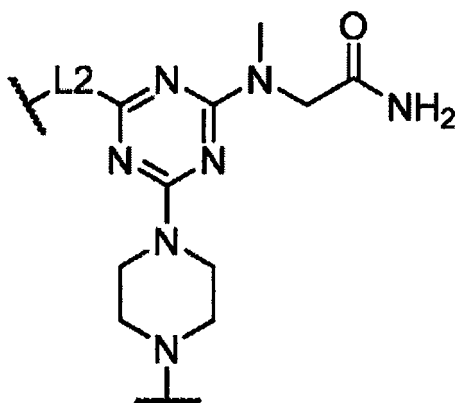
[0435]



[0436] 其中n是0至10的任意数字,其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3和/或(例如,和)m是4。

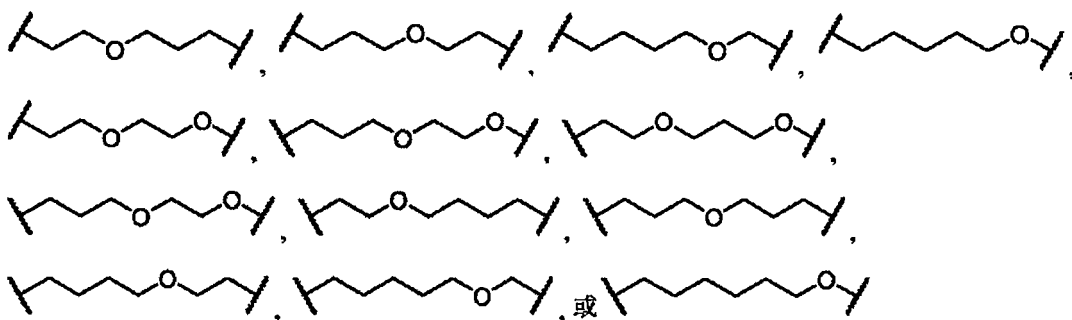
[0437] 在结构式(A)、(B)、(C)和(D)中,L1在一些实施方案中是间隔基,所述间隔基是经取代或未经取代的脂族、经取代或未经取代的杂脂族、经取代或未经取代的亚碳环基、经取代或未经取代的亚杂环基、经取代或未经取代的亚芳基、经取代或未经取代的亚杂芳基、-O-, -N(R^A)-, -S-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)NR^A-, -NR^AC(=O)-, -NR^AC(=O)R^A-, -C(=O)R^A-, -NR^AC(=O)O-, -NR^AC(=O)N(R^A)-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -OC(=O)N(R^A)-, -S(O)₂NR^A-, -NR^AS(O)₂-,或其组合。在一些实施方案中,L1是

[0438]



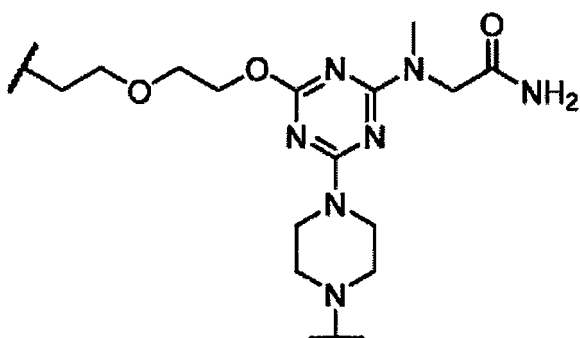
[0439] 其中哌嗪部分与寡核苷酸连接,其中L2是

[0440]



[0441] 在一些实施方案中,L1是:

[0442]



[0443] 其中哌嗪部分与寡核苷酸连接。

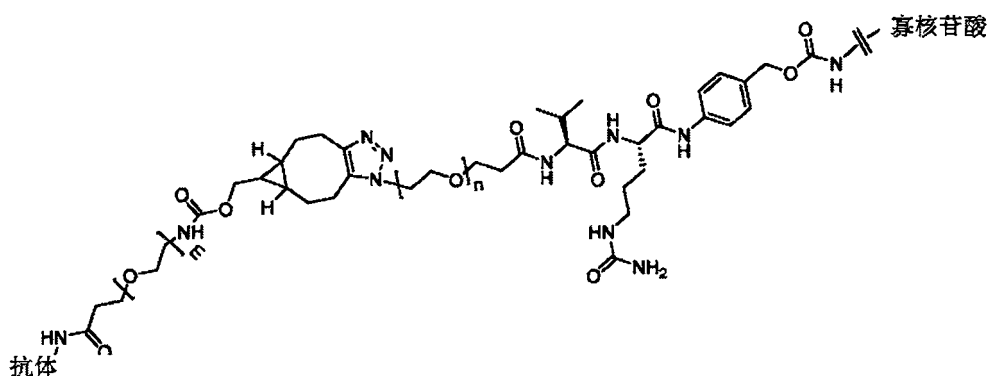
[0444] 在一些实施方案中,L1是

[0445] 在一些实施方案中,L1与寡核苷酸的5' 磷酸连接。

[0446] 在一些实施方案中,L1是任选的(例如,不是必要存在的)。

[0447] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种复合物具有以下结构:

[0448]



(E)

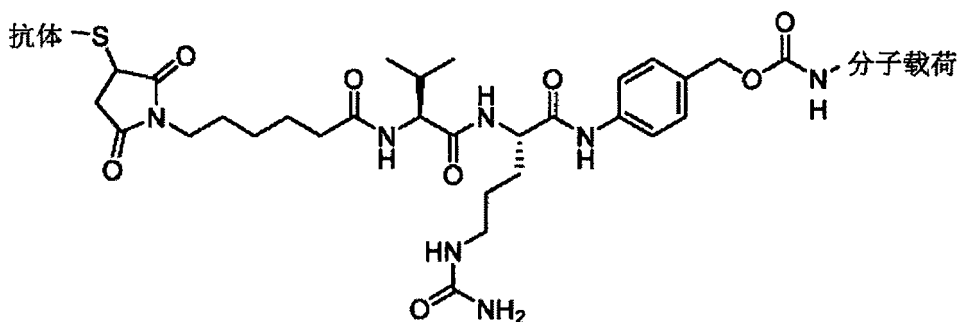
[0449] 其中 n 是0至15(例如3)并且 m 是0至15(例如4)。

[0450] C. 抗体-分子载荷复合物的一些实例

[0451] 本文中还提供了包含与本文中所述的任何分子载荷(例如,寡核苷酸)共价连接的任一种本文中所述的抗TfR抗体的复合物的一些非限制性实例。在一些实施方案中,抗TfR抗体(例如,表2中提供的任一种抗TfR抗体)通过接头与分子载荷(例如,寡核苷酸)共价连接。可使用本文中所述的任何接头。在一些实施方案中,如果分子载荷是寡核苷酸,则接头与寡核苷酸的5'末端、3'末端或内部连接。在一些实施方案中,接头通过硫醇反应性键联(例如,通过抗TfR抗体中的半胱氨酸)与抗TfR抗体连接。在一些实施方案中,接头(例如,Val-cit接头)通过胺基(例如,通过抗体中的赖氨酸)与抗体(例如,本文中所述的抗TfR抗体)连接。

[0452] 以下提供了复合物的结构的一个实例,其包含通过Val-cit接头与分子载荷共价连接的抗TfR抗体:

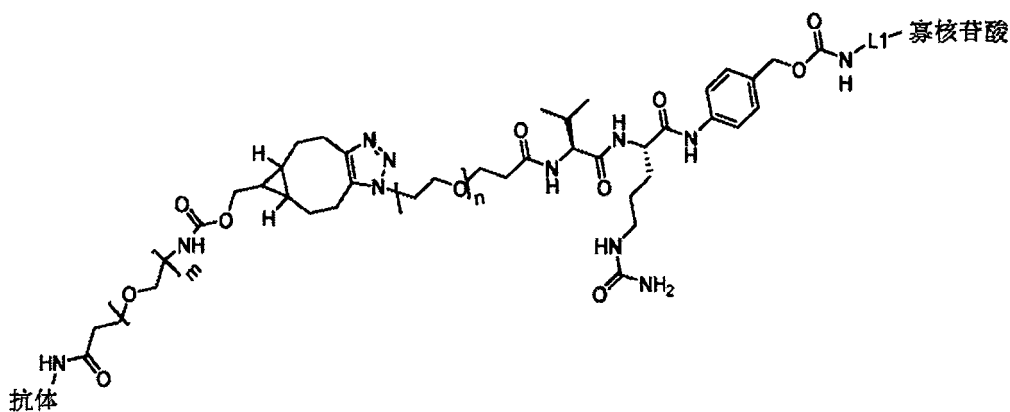
[0453]



[0454] 其中接头通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体连接。

[0455] 以下提供了复合物的结构的另一个实例,其包含通过Val-cit接头与分子载荷共价连接的抗TfR抗体:

[0456]



(D)

[0457] 其中n是0至10的数字,其中m是0至10的数字,其中接头通过胺基(例如,赖氨酸残基上的)与抗体连接,和/或(例如,和)其中接头与寡核苷酸(例如,在5'末端、3'末端或内部)连接。在一些实施方案中,接头通过赖氨酸与抗体连接,接头在5'末端与寡核苷酸连接,n是3并且m是4。在一些实施方案中,分子载荷是包含有义链和反义链的寡核苷酸,并且接头在5'末端或3'末端与有义链或反义链连接。

[0458] 应理解,抗体可与具有不同化学计量的分子载荷连接,该特性可被称为药物抗体比(drug to antibody ratio,DAR),其中“药物”是分子载荷。在一些实施方案中,一个分子载荷与一个抗体连接(DAR=1)。在一些实施方案中,两个分子载荷与一个抗体连接(DAR=2)。在一些实施方案中,三个分子载荷与一个抗体连接(DAR=3)。在一些实施方案中,四个分子载荷与一个抗体连接(DAR=4)。在一些实施方案中,提供了不同复合物的混合物,每种复合物具有不同的DAR。在一些实施方案中,这样的混合物中的复合物的平均DAR可在1至3、1至4、1至5或更大的范围内。可通过将分子载荷缀合至抗体上的不同位点和/或(例如,和)通过将多聚体缀合至抗体上的一个或更多个位点来提高DAR。例如,可通过将单个分子载荷缀合至抗体上的两个不同位点或通过将二聚体分子载荷缀合至抗体的单个位点来实现DAR为2。

[0459] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的本文中所述的抗TfR抗体(例如,表2至5中的抗体)。在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过接头(例如,Val-cit接头)与分子载荷共价连接的本文中所述的抗TfR抗体(例如,表2至5中的抗体)。在一些实施方案中,接头(例如,Val-cit接头)通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体(例如,本文中所述的抗TfR抗体)连接。在一些实施方案中,接头(例如,Val-cit接头)通过胺基(例如,通过抗体中的赖氨酸)与抗体(例如,本文中所述的抗TfR抗体)连接。

[0460] 在一些实施方案中,在本文中所述的复合物的任一个实例中,分子载荷是寡核苷酸,其包含本文中所述的任一种基因靶序列的至少15个核苷酸之互补区。

[0461] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含与表2中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相同的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;以及与表2中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3相同的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0462] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL。

[0463] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL。

[0464] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL。

[0465] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL。

[0466] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:79的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL。

[0467] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:87的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0468] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链。

[0469] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0470] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0471] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链。

[0472] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:99的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的VL。

[0473] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:100或SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链。

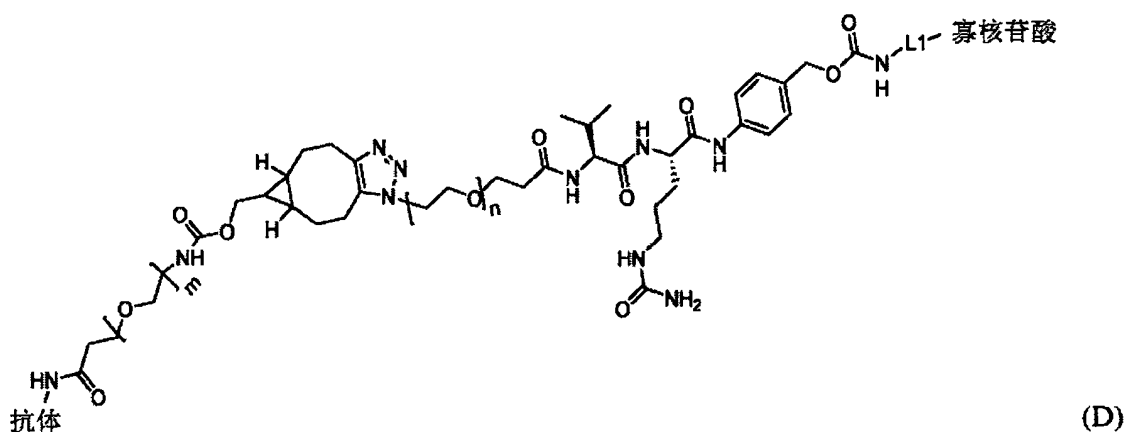
[0474] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:100或SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0475] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链。

[0476] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:103的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0477] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:84的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:

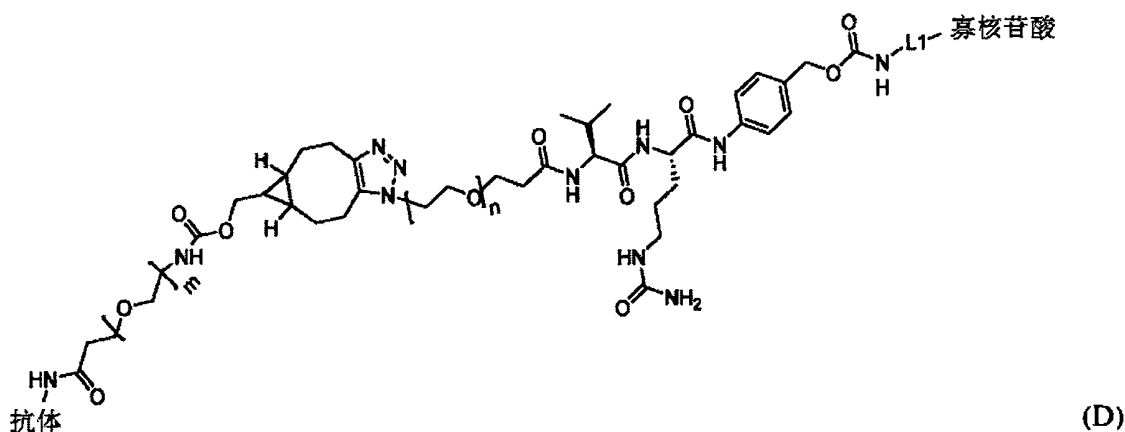
[0478]



[0479] 其中n是3并且m是4。

[0480] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:86的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:

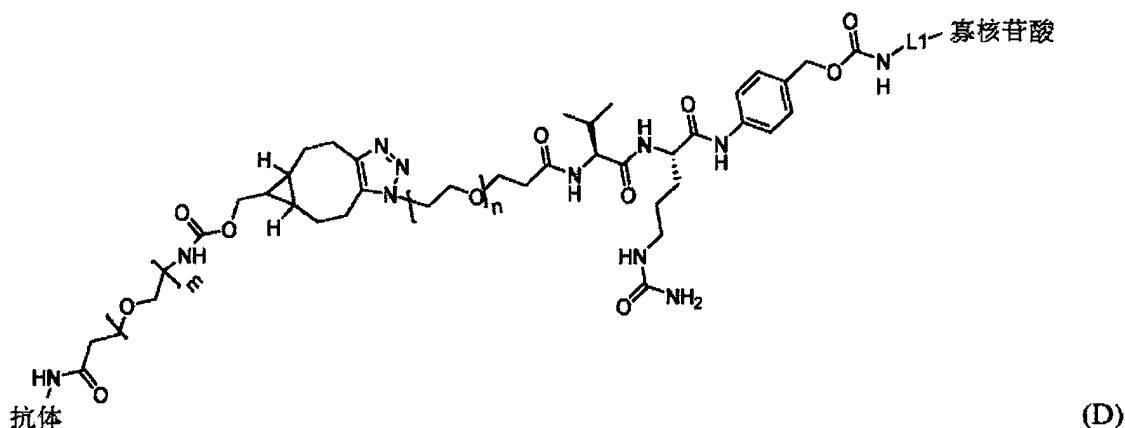
[0481]



[0482] 其中n是3并且m是4。

[0483] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:87的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:

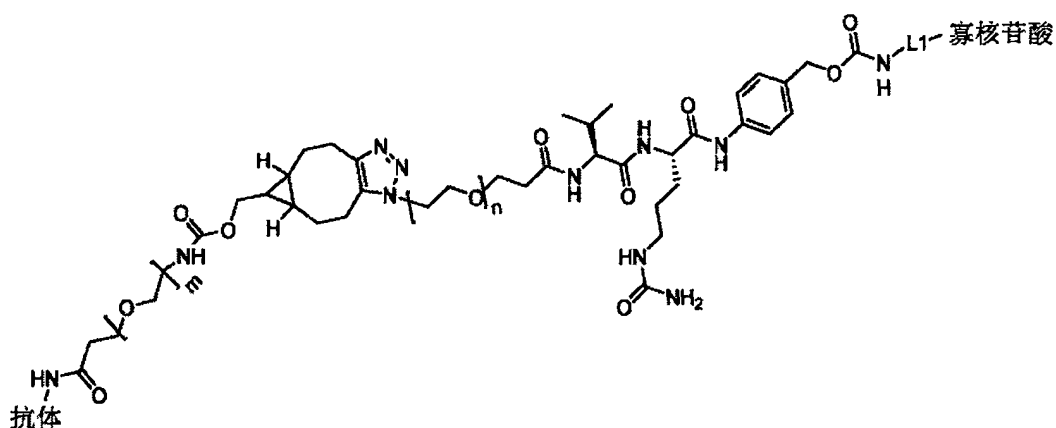
[0484]



[0485] 其中n是3并且m是4。

[0486] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:88的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:

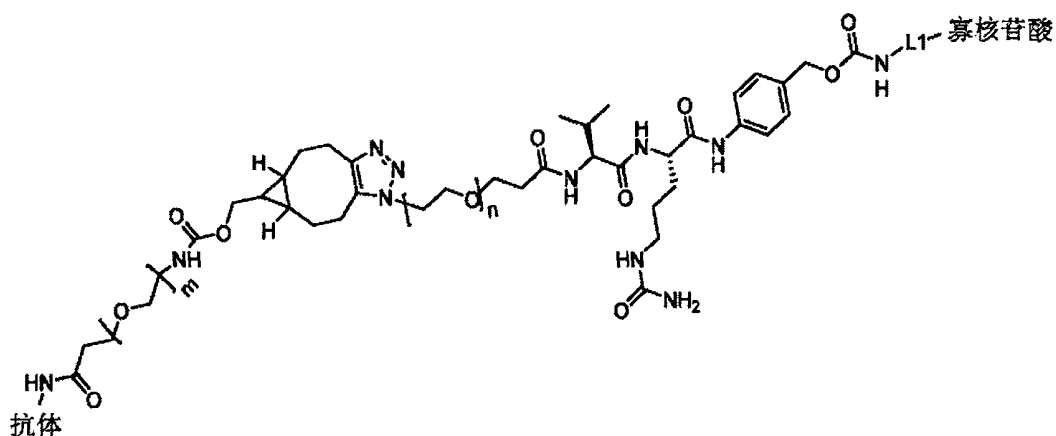
[0487]



[0488] 其中n是3并且m是4。

[0489] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:88的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:

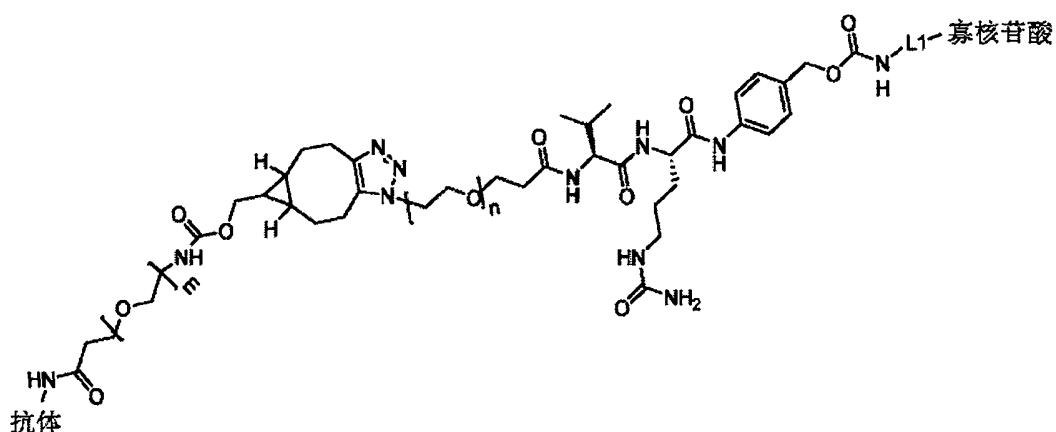
[0490]



[0491] 其中n是3并且m是4。

[0492] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:

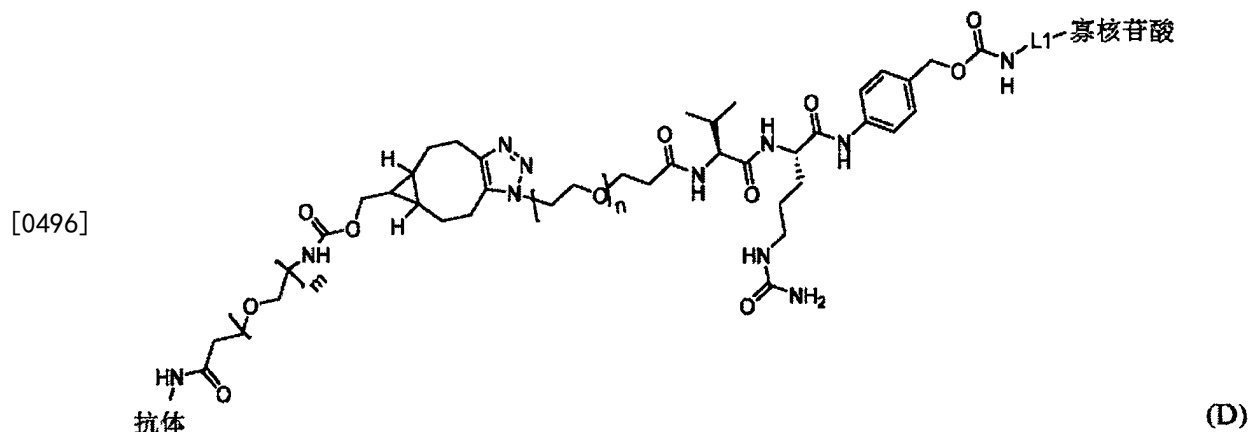
[0493]



[0494] 其中n是3并且m是4。

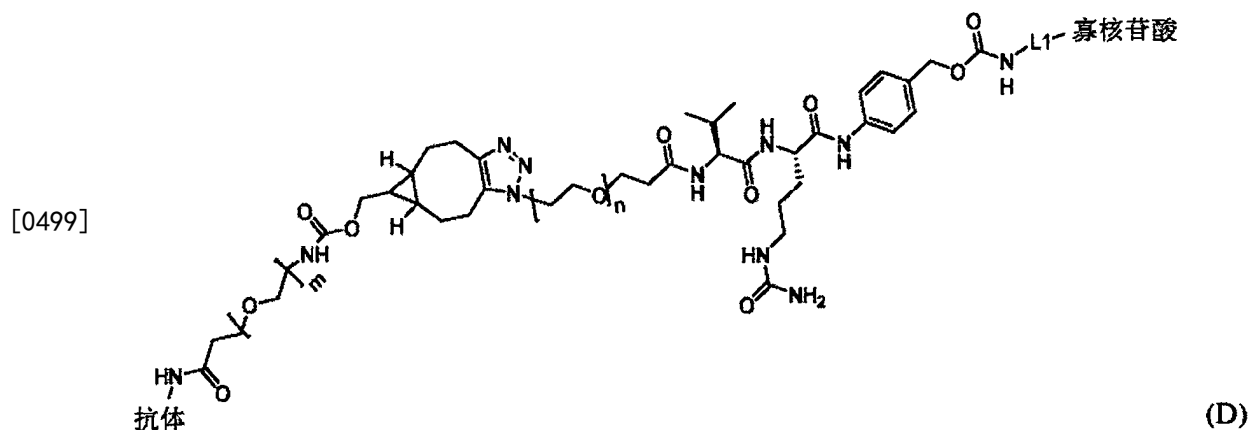
[0495] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链和含有

有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



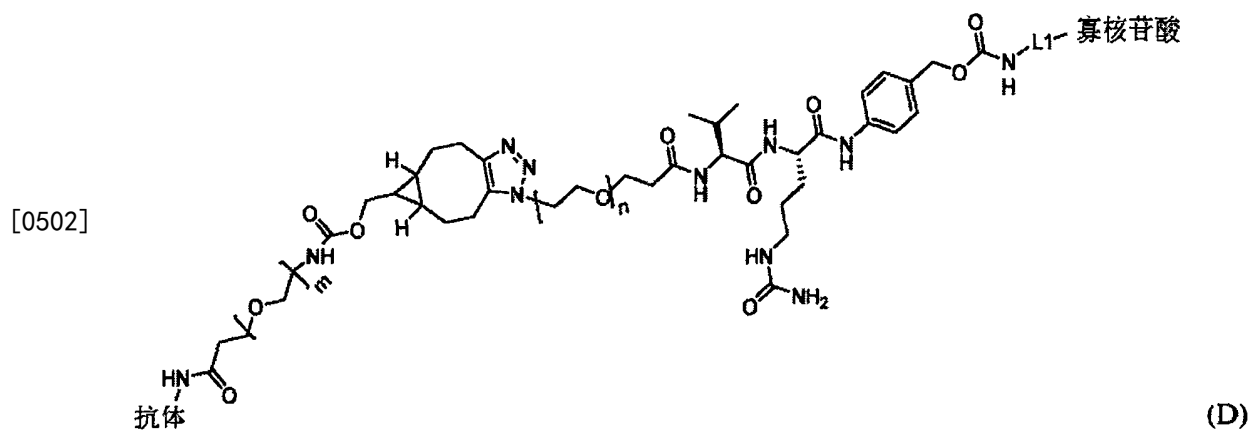
[0497] 其中n是3并且m是4。

[0498] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



[0500] 其中n是3并且m是4。

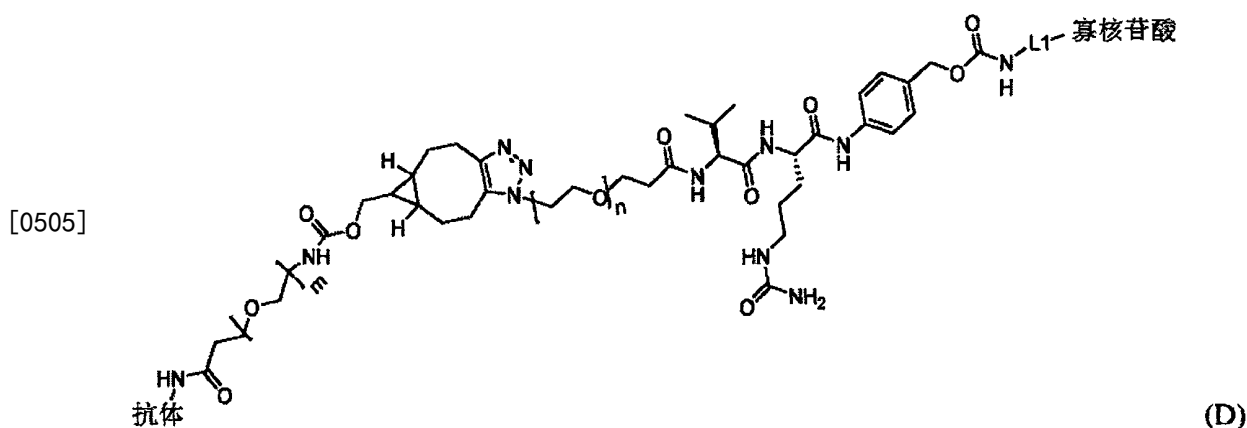
[0501] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



[0503] 其中n是3并且m是4。

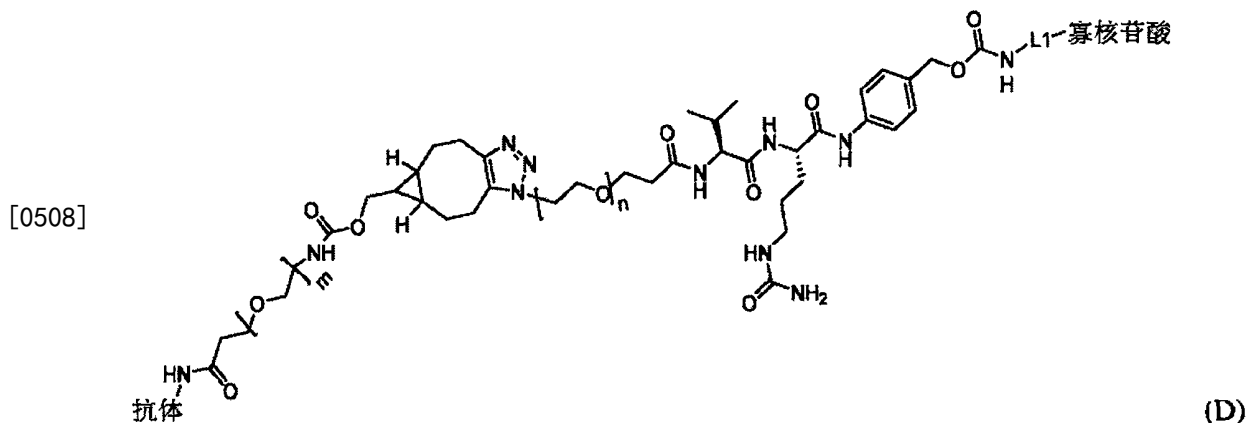
[0504] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共

价连接的抗TfR抗体,其中所述抗TfR抗体包含含有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



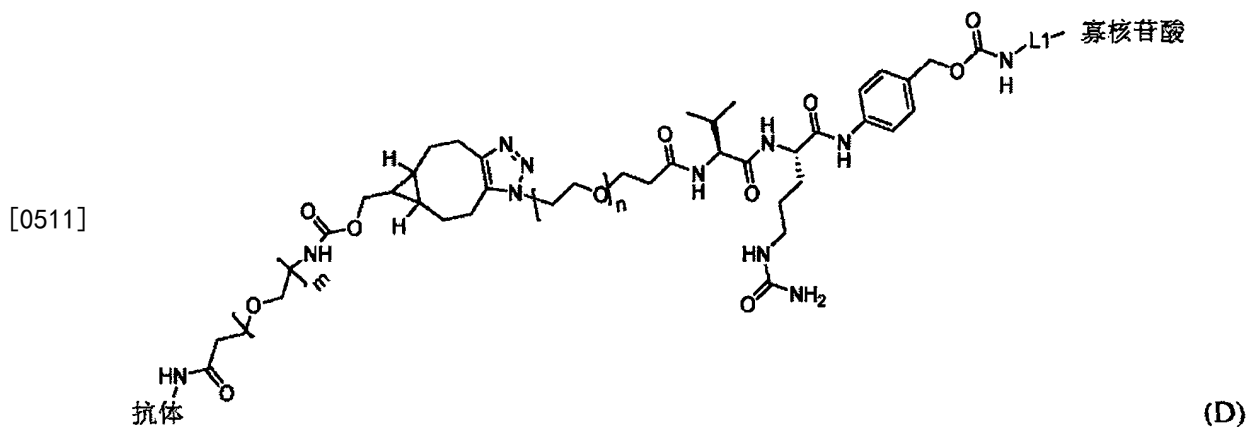
[0506] 其中n是3并且m是4。

[0507] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL;其中所述复合物具有以下结构:



[0509] 其中n是3并且m是4。

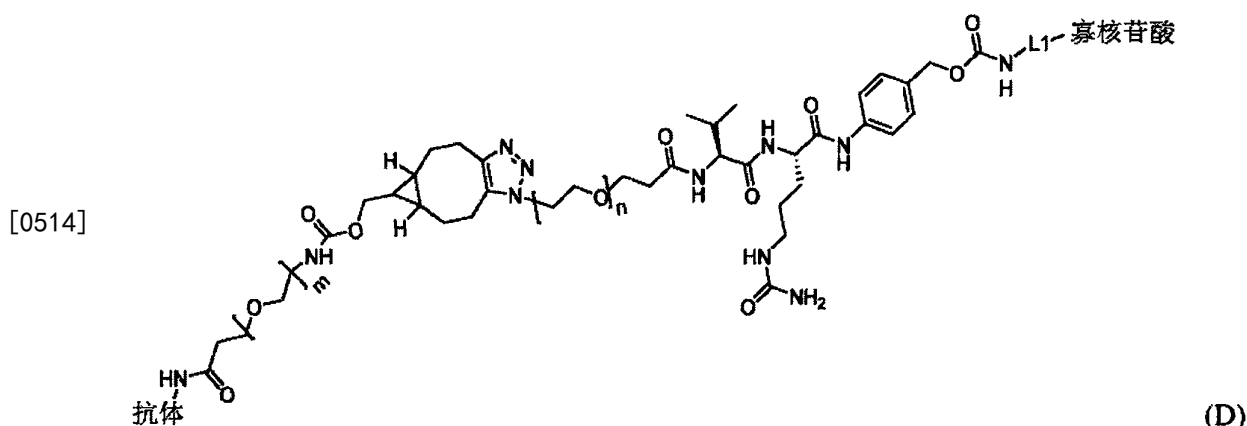
[0510] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL;其中所述复合物具有以下结构:



[0512] 其中n是3并且m是4。

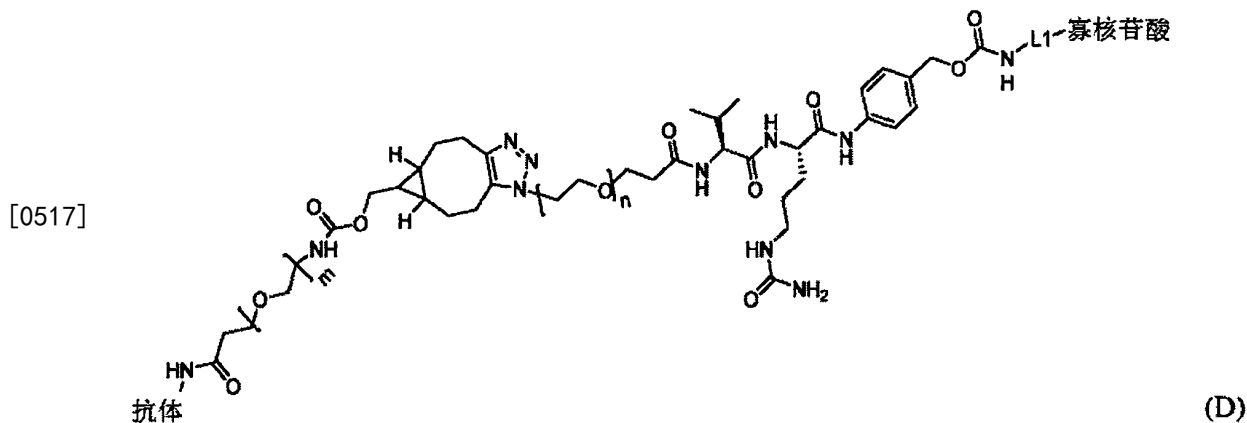
[0513] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共

价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL;其中所述复合物具有以下结构:



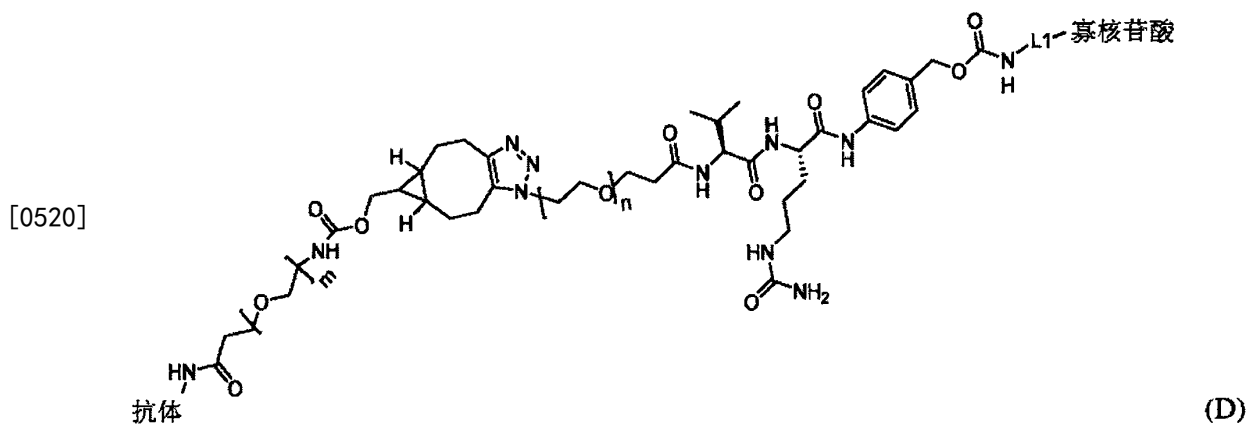
[0515] 其中n是3并且m是4。

[0516] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL;其中所述复合物具有以下结构:



[0518] 其中n是3并且m是4。

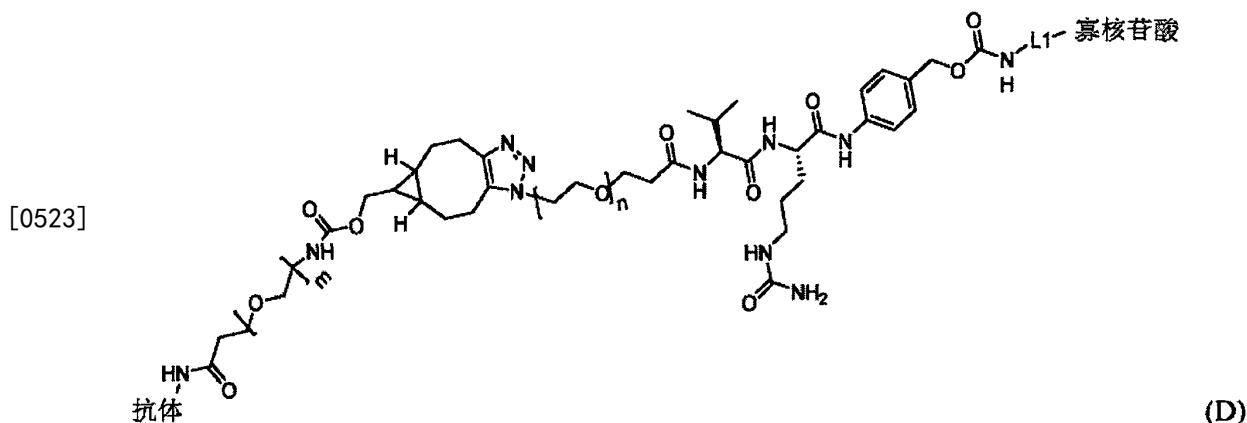
[0519] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL;其中所述复合物具有以下结构:



[0521] 其中n是3并且m是4。

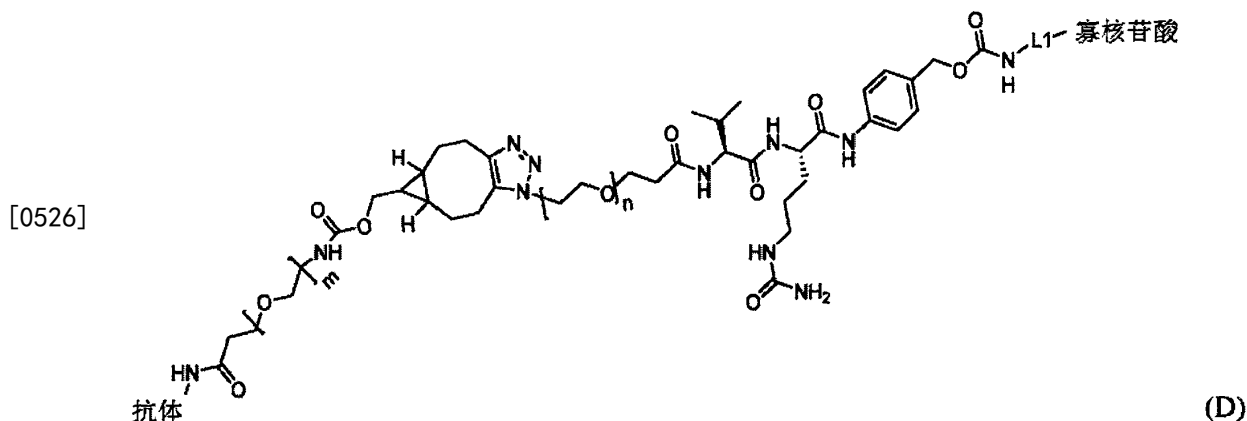
[0522] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共

价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL;其中所述复合物具有以下结构:



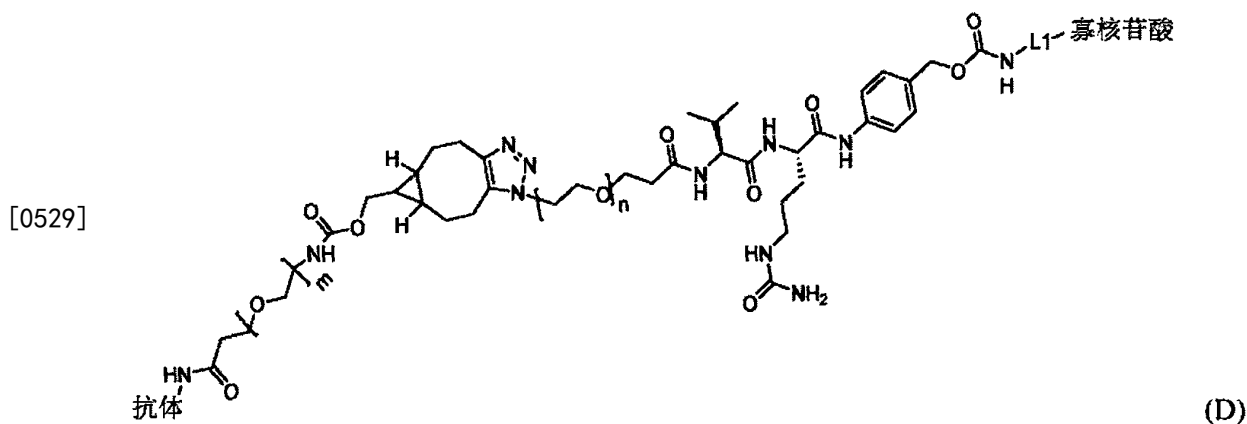
[0524] 其中n是3并且m是4。

[0525] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL;其中所述复合物具有以下结构:



[0527] 其中n是3并且m是4。

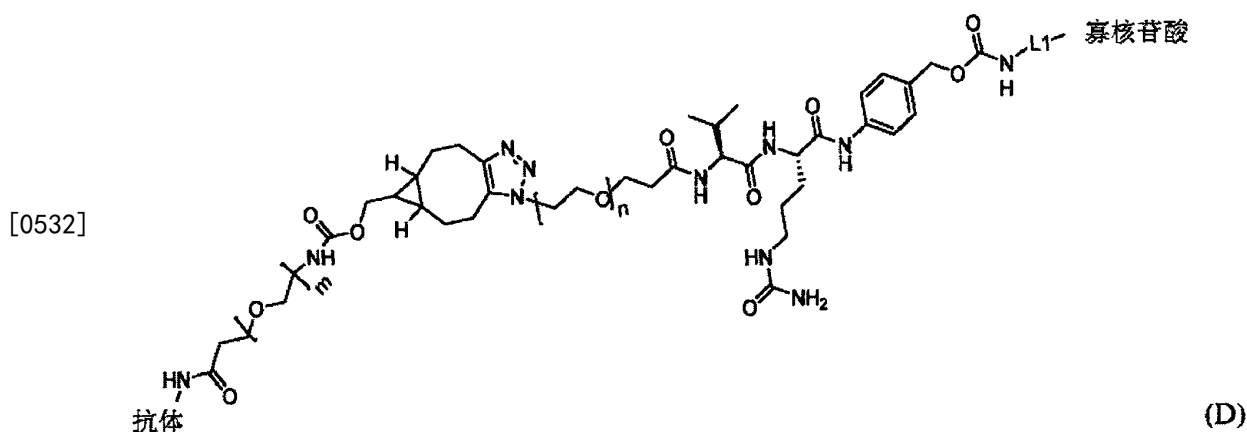
[0528] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL;其中所述复合物具有以下结构:



[0530] 其中n是3并且m是4。

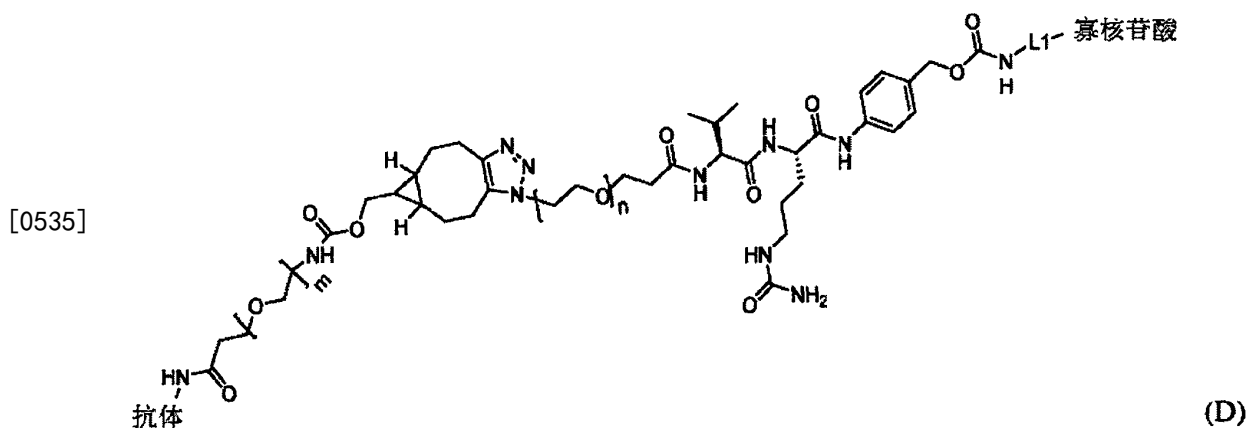
[0531] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共

价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL;其中所述复合物具有以下结构:



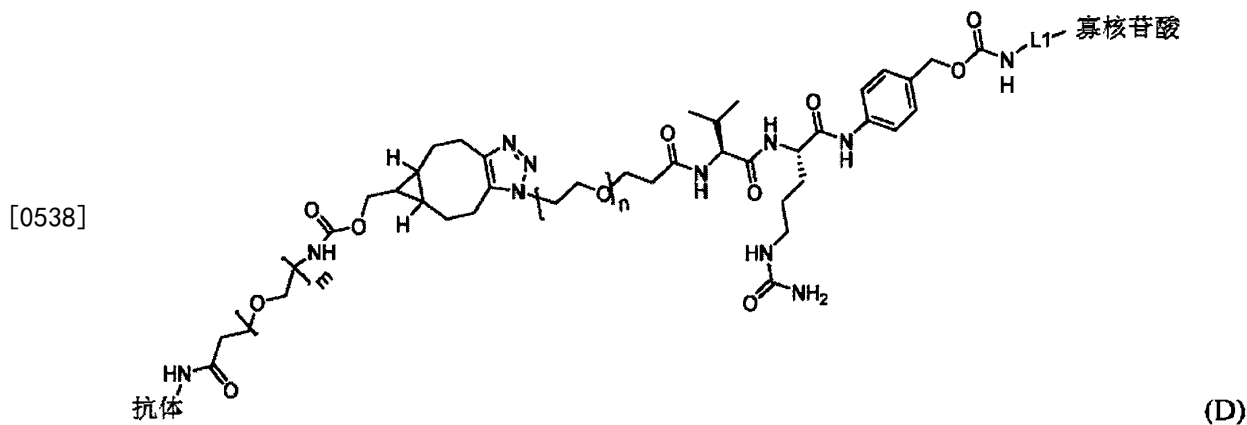
[0533] 其中n是3并且m是4。

[0534] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL;其中所述复合物具有以下结构:



[0536] 其中n是3并且m是4。

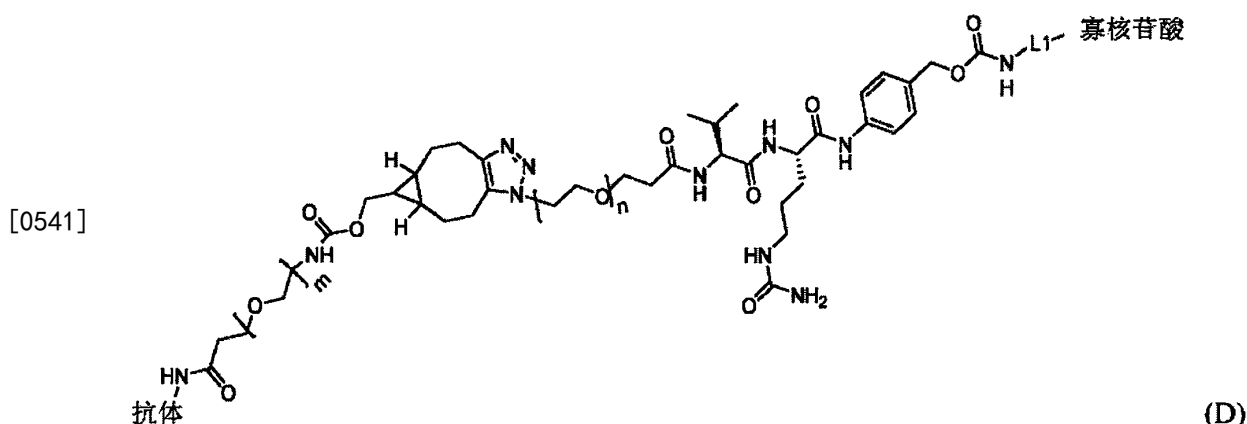
[0537] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



[0539] 其中n是3并且m是4。

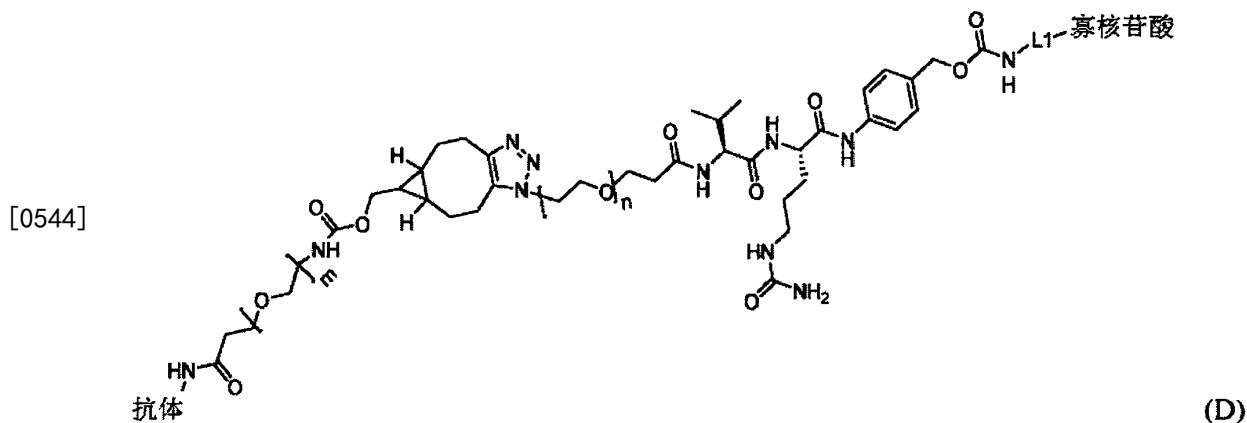
[0540] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共

价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:98的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



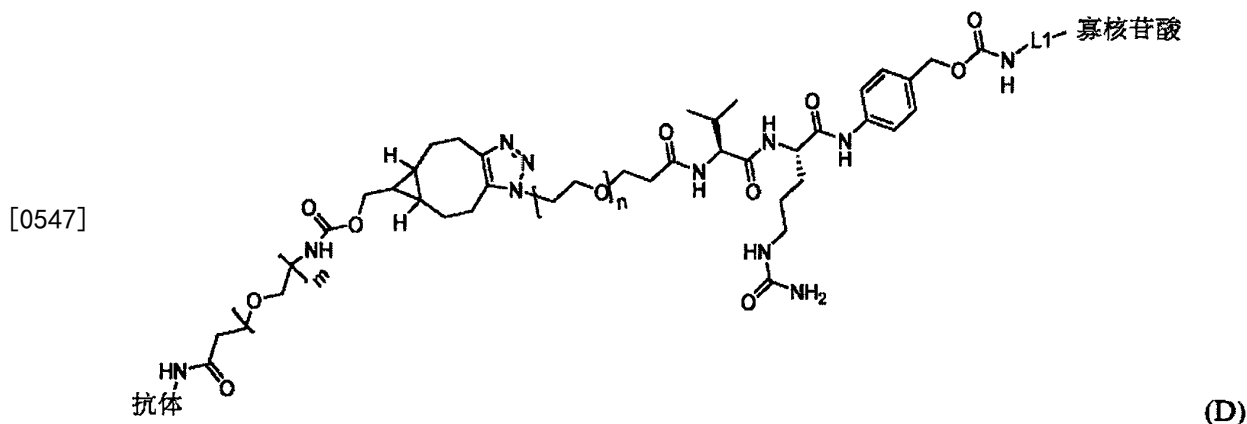
[0542] 其中n是3并且m是4。

[0543] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



[0545] 其中n是3并且m是4。

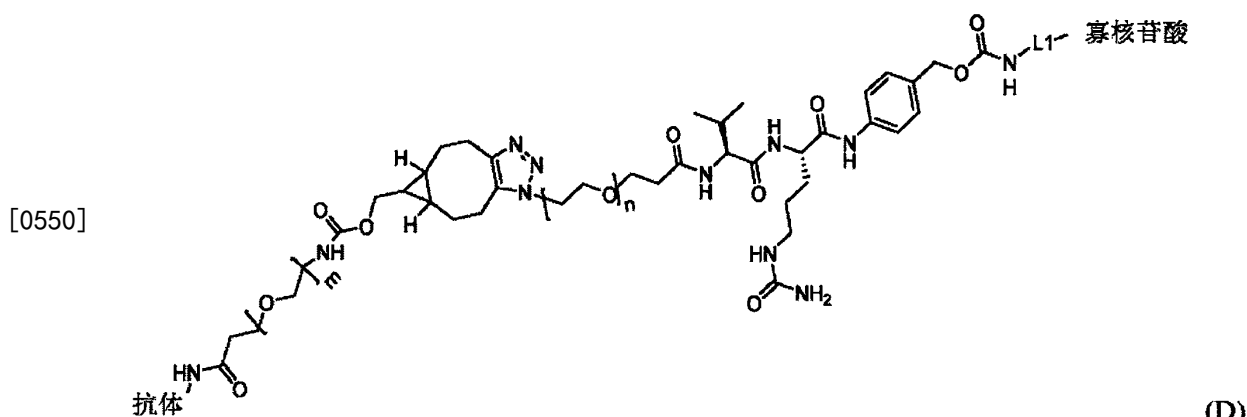
[0546] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



[0548] 其中n是3并且m是4。

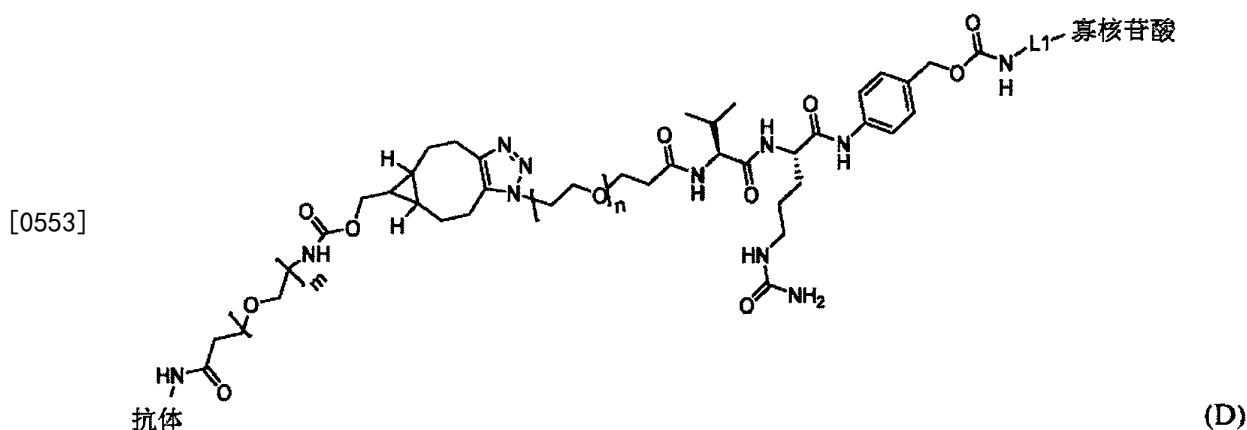
[0549] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共

价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



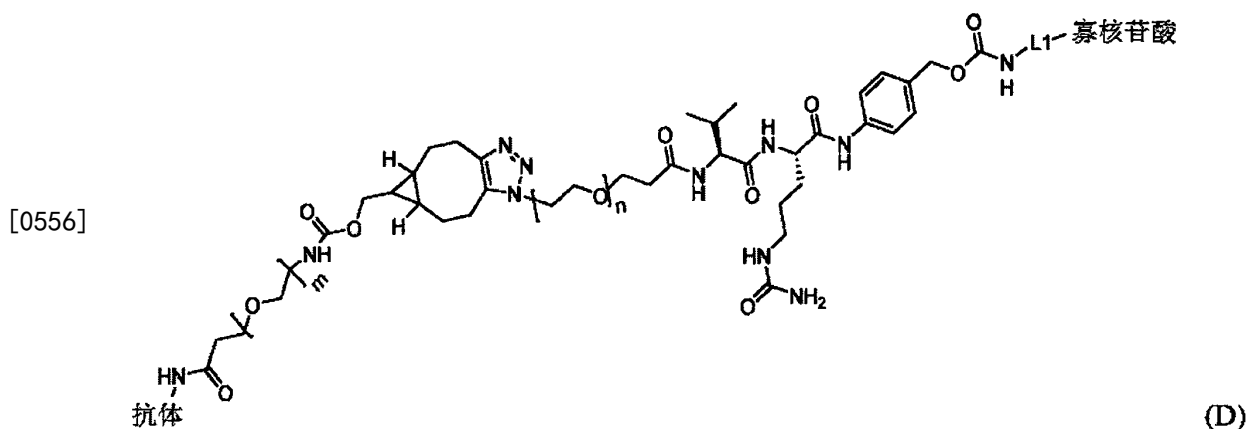
[0551] 其中n是3并且m是4。

[0552] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



[0554] 其中n是3并且m是4。

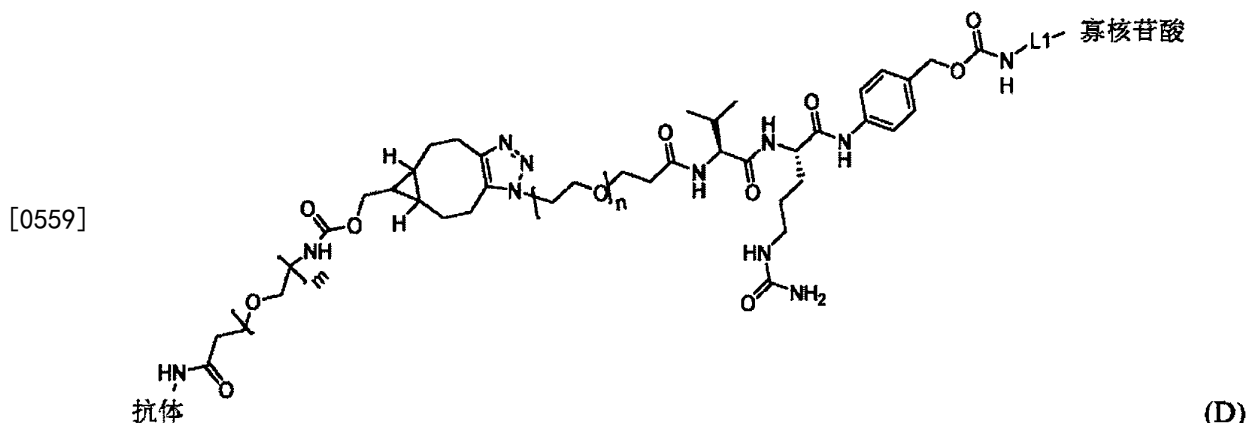
[0555] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



[0557] 其中n是3并且m是4。

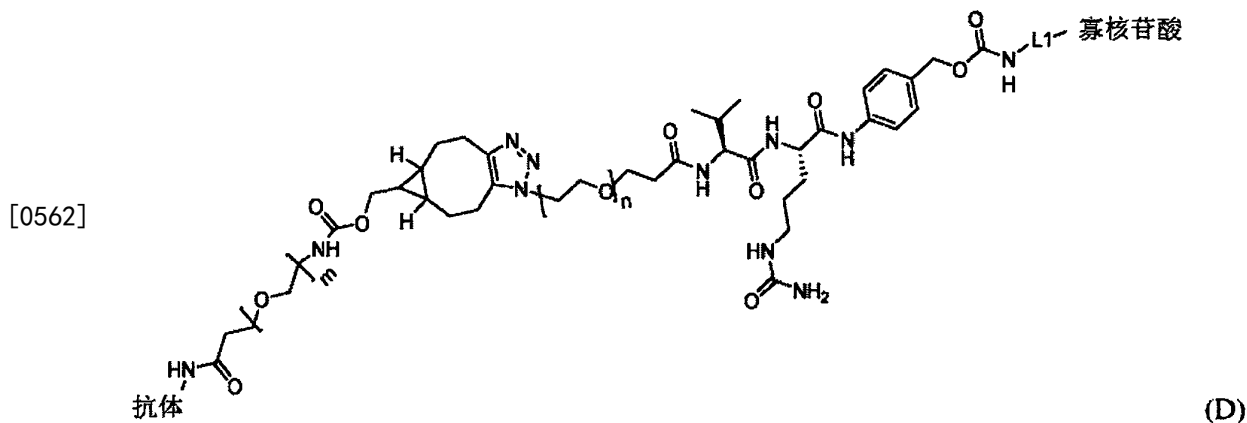
[0558] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共

价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



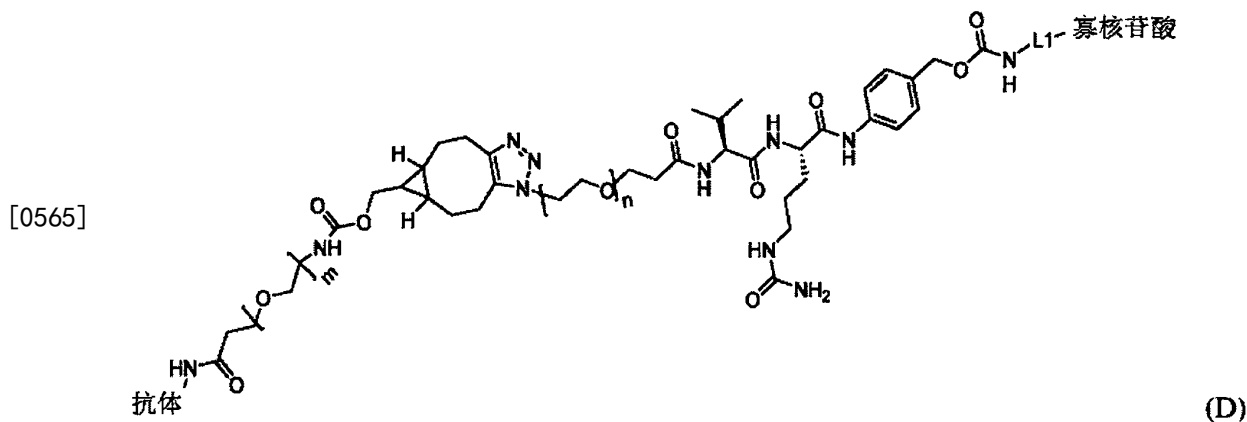
[0560] 其中n是3并且m是4。

[0561] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:103的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:



[0563] 其中n是3并且m是4。

[0564] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过赖氨酸与寡核苷酸的5'末端共价连接的抗TfR Fab,其中所述抗TfR Fab包含含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链;其中所述复合物具有以下结构:

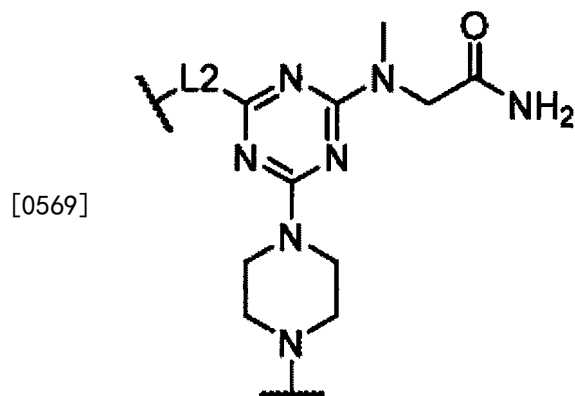


[0566] 其中n是3并且m是4。

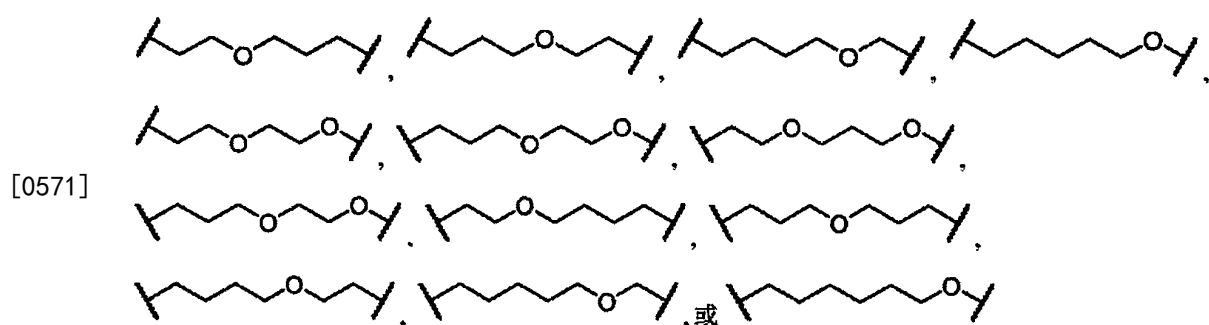
[0567] 在一些实施方案中,在本文中所述的复合物的任一实例中,L1是本文中所述的任

一种间隔基。

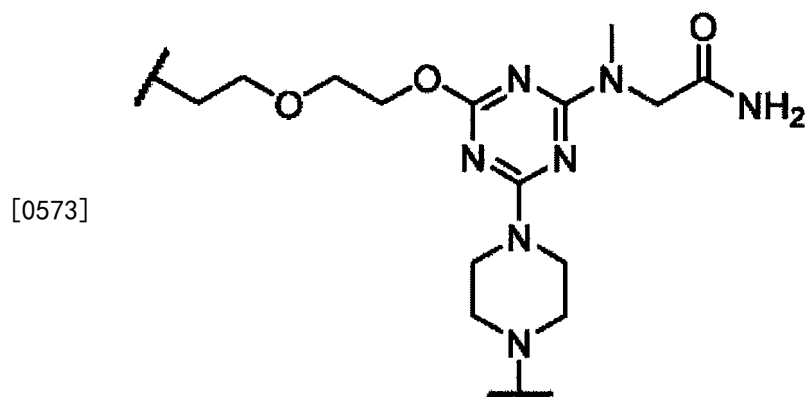
[0568] 在一些实施方案中,L1是:



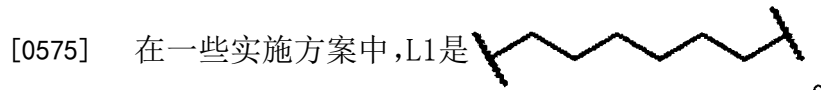
[0570] 其中哌嗪部分与寡核苷酸连接,其中L2是



[0572] 在一些实施方案中,L1是:



[0574] 其中哌嗪部分与寡核苷酸连接。



[0576] 在一些实施方案中,L1与寡核苷酸的5' 磷酸连接。

[0577] 在一些实施方案中,L1是任选的(例如,不是必要存在的)。

[0578] IV. 制剂

[0579] 本文中提供的抗TfR抗体或复合物可以以任何合适的方式配制。通常来说,本文中提供的抗体或复合物以适用于药物用途的方式配制。例如,可使用使降解最小化、促进递送和/或(例如,和)摄取或者为制剂中的复合物提供另外的有益特性的制剂将抗体或复合物递送至对象。在一些实施方案中,本文中提供了包含抗体或复合物和可药用载体的组合物。

可适当地配制这样的组合物使得当施用于对象时,无论是施用至靶细胞的直接环境中或全身性施用,足够量的复合物都能进入靶肌细胞。在一些实施方案中,抗体或复合物被配制在缓冲溶液例如磷酸盐缓冲盐水溶液、脂质体、胶束结构和衣壳中。

[0580] 应理解,在一些实施方案中,组合物可分别包含本文中提供的复合物的一种或更多种组分(例如,抗TfR抗体、接头、分子载荷或它们中任一者的前体分子)。

[0581] 在一些实施方案中,抗体或复合物被配制在水或水溶液(例如,用pH调节的水)中。在一些实施方案中,抗体或复合物被配制在碱性缓冲水溶液(例如,PBS)中。在一些实施方案中,本文中公开的制剂包含赋形剂。在一些实施方案中,赋形剂赋予组合物以改善的稳定性、改善的吸收、改善的溶解性和/或(例如,和)活性成分的治疗性增强。在一些实施方案中,赋形剂是缓冲剂(例如,柠檬酸钠、磷酸钠、tris碱或氢氧化钠)或载剂(例如,缓冲溶液、矿脂(petrolatum)、二甲基亚砷或矿物油)。

[0582] 在一些实施方案中,将复合物或其组分(例如,寡核苷酸或抗体)冻干用于延长其保质期,并随后在使用(例如,施用于对象)之前制成溶液。因此,包含本文中所述的复合物或其组分的组合物中的赋形剂可以是冻干保护剂(例如,甘露醇、乳糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮)或崩解温度调节剂(例如,右旋糖酐、ficoll或明胶)。

[0583] 在一些实施方案中,药物组合物被配制成与其预期施用途径相容。施用途径的一些实例包括肠胃外施用,例如静脉内、皮内、皮下施用。通常来说,施用途径是静脉内或皮下的。

[0584] 适用于可注射使用的药物组合物包含无菌水溶液(在具有水溶性时)或分散体,以及用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等),及其合适的混合物。在一些实施方案中,组合物中的制剂包含等张剂,例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨醇以及氯化钠。无菌可注射溶液可通过将所需量的复合物与以上列举的成分之一或组合(根据需要)一起并入选定的溶剂中,然后过滤灭菌来制备。

[0585] 在一些实施方案中,组合物可包含至少约0.1%的复合物或其组分,或者更多,尽管活性成分的百分比可为总组合物的重量或体积的约1%至约80%或更多。本领域技术人员将考虑制备这样的药物制剂的因素例如溶解性、生物利用度、生物学半衰期、施用途径、产品保质期以及其他药理学考虑因素,并且因此多种剂量和治疗方案可以是期望的。

[0586] V. 使用方法

[0587] 本公开内容的一些方面提供了本文中所述的抗TfR抗体、抗体片段或变体、编码其的核酸以及复合物的多种用途,包括在研究、诊断方法、检测方法和治疗方法中的用途。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体用于将分子载荷(例如,诊断剂或治疗剂)递送至表达转铁蛋白受体的靶细胞或组织。在一些实施方案中,靶细胞是肌细胞。在一些实施方案中,靶组织是肌肉。在一些实施方案中,靶组织是脑。为了递送分子载荷,抗TfR抗体可与分子载荷缀合(例如,共价缀合)以形成复合物。

[0588] a. 诊断和检测方法

[0589] 本文中还提供了任一种上述抗体、抗原结合片段、多核苷酸、载体或细胞和任选地合适的手段在诊断和/或(例如,和)检测方法中的用途。例如,抗体或抗原结合片段适用于免疫测定,在免疫测定中其可用于液相或与固相载体结合。可利用抗体或抗原结合片段

的免疫测定的一些实例是直接或间接形式的竞争和非竞争免疫测定。这样的免疫测定的一些实例是酶联免疫测定 (Enzyme Linked Immunoassay, ELISA)、放射免疫测定 (radioimmunoassay, RIA)、夹心 (免疫测定)、流式细胞术、western印迹测定、免疫沉淀测定、免疫组织化学、免疫显微术、侧向流免疫色谱测定和蛋白质组学阵列。抗原和抗体或抗原结合片段可与许多不同的固体支持物 (例如, 载体、膜、柱、蛋白质组学阵列等) 结合。公知的固体支持物材料的一些实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚偏二氟乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、葡聚糖、尼龙、直链淀粉、天然纤维素和改性纤维素 (例如硝酸纤维素)、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。支持物的状态可以是固定的或者混悬在溶液中 (例如, 珠)。

[0590] 在一些实施方案中, 本文中提供的任一种抗TfR抗体可用于检测生物样品中转铁蛋白受体的存在。本文中使用的术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中, 生物样品包含细胞或组织, 例如血液、CSF和含有BBB的组织。生物样品可以是体外的 (例如, 培养的) 或体内的 (例如, 在对象中)。本公开内容还考虑了本文中所述的任一种抗TfR抗体在研究应用中的用途 (例如, 作为用于免疫测定例如western印迹、免疫染色、ELISA和/或 (例如, 和) FACS的试剂)。

[0591] 在一些实施方案中, 提供了用于诊断或检测方法的抗TfR抗体。在一些方面中, 提供了检测生物样品中转铁蛋白受体的存在的方法。在某些实施方案中, 该方法包括在允许抗TfR抗体与转铁蛋白受体结合的条件下, 使生物样品与本文中所述的抗TfR抗体接触, 并检测在抗TfR抗体与转铁蛋白受体之间是否形成复合物。这样的方法可以是体外或体内方法。在一些实施方案中, 抗TfR抗体用于选择适合用抗TfR抗体治疗的对象, 例如, 其中转铁蛋白受体是用于选择患者的生物标志物。

[0592] 由于转铁蛋白受体在网织红细胞中表达并且因此可被本发明的任何抗体检测到的事实, 可使用本文中所述的抗TfR抗体诊断的示例性病症包括涉及未成熟红细胞的病症。这样的病症包括贫血和由网织红细胞水平降低引起的其他病症, 或先天性红细胞增多症或真性肿瘤性红细胞增多症, 其中由于例如网织红细胞的过度增殖引起的红细胞计数升高导致了血液变稠并伴有生理性症状。

[0593] 在一些实施方案中, 为了检测生物样品中转铁蛋白受体的存在/水平, 使用经标记的抗TfR抗体。标记包括但不限于直接检测的标记或部分 (例如荧光标记、发色标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记), 以及例如通过酶促反应或分子相互作用间接检测的部分, 例如酶或配体。示例性标记包括但不限于放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I , 荧光团例如稀土螯合物或荧光素及其衍生物, 罗丹明及其衍生物, 丹磺酰, 伞形酮, 萤光素酶, 例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶 (美国专利No. 4, 737, 456), 萤光素, 2, 3-二氢酞嗪二酮, 辣根过氧化物酶 (HRP), 碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶, 葡糖淀粉酶, 溶菌酶, 糖氧化酶, 例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 杂环氧化酶例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶, 其与使用过氧化氢来氧化染料前体的酶例如HRP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶偶联, 生物素/抗生物素蛋白、自旋标记、噬菌体标记、稳定的自由基等。在一些实施方案中, 可检测标记是适用于体外检测细胞中的转铁蛋白受体的试剂, 其可以是放射性分子、放射性药物或铁氧化物颗粒。适用于体内成像的放射性分子包括但不限于 ^{122}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{18}F 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{211}At 、 ^{225}Ac 、 ^{177}Lu 、 ^{153}Sm 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{67}Cu 、 ^{213}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 和 ^{67}Ga 。适用于体内成像的示例性放射性药物包括 ^{111}In 羟基喹啉、 ^{131}I 碘化钠、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 甲溴菲宁 (Mebrofenin)

和^{99m}Tc红细胞、¹²³I碘化钠、^{99m}Tc依沙美肟(Exametazime)、^{99m}Tc大聚集体白蛋白、^{99m}Tc Medronate、^{99m}Tc巯替肽(Mertiatide)、^{99m}Tc奥昔膦酸(Oxidronate)、^{99m}Tc喷替酸盐(Pentetate)、^{99m}Tc高锝酸盐(Pertechnetate)、^{99m}Tc司他比锝(Setamibi)、^{99m}Tc硫溶胶(Sulfur Colloid)、^{99m}Tc替曲膦(Tetrofosmin)、铊-201或氙-133。

[0594] 在某些实施方案中,本文中所述的抗TfR抗体可用于将可检测标记递送至靶细胞或组织(例如,肌细胞或穿过血脑屏障到达脑),以用于细胞或组织的可视化(例如,通过荧光显微术或通过磁共振成像(magnetic resonance imaging,MRI)。本文中所述的任何可检测标记均可用于该目的。

[0595] 在一些实施方案中,用于诊断或检测方法的抗TfR抗体缺乏效应子功能或具有降低的效应子功能。在一些实施方案中,用于诊断/检测方法中的抗TfR抗体被工程化为不具有效应子功能或具有降低的效应子功能(例如,通过使用Fab、修饰Ig主链、引入降低或消除效应子功能的一个或多个Fc突变,和/或(例如,和)修饰抗体的糖基化状态)。

[0596] 多种技术可用于确定抗体与转铁蛋白受体的结合。一种这样的测定是酶联免疫吸附测定(ELISA),其用于确定与人转铁蛋白受体(和脑抗原)结合的能力。根据该测定,将用抗原(例如,重组转铁蛋白受体)包被的板与包含抗TfR抗体的样品一起孵育,并确定抗体与目的抗原的结合。

[0597] 为了进行体内诊断测定,可将合适量的与标记(例如,显像剂或造影剂)缀合的抗TfR抗体施用于需要检查的对象。可通过常规方法基于从标记释放的信号来检测经标记抗体的存在。用于评价全身施用的抗体的摄取和该抗体的其他生物活性的测定是本领域技术人员已知的。

[0598] 为了进行科学研究测定,抗TfR抗体可用于研究转铁蛋白受体的生物活性和/或(例如,和)在胞内检测转铁蛋白受体的存在。例如,可使合适量的抗TfR抗体与怀疑产生转铁蛋白受体的样品(例如,先前未被鉴定为产生转铁蛋白受体的细胞的新细胞类型)接触。抗体和样品可在合适的条件下孵育合适的时间段,以允许抗体与转铁蛋白受体抗原结合。然后可通过常规方法,例如ELISA、组织学染色或FACS来检测这样的相互作用。

[0599] b. 治疗方法

[0600] 本文中所述的抗TfR抗体可用于递送作为治疗剂的分子载荷(例如,寡核苷酸、肽/蛋白质、核酸构建体等)。在一些方面中,本公开内容还提供了用于治疗疾病的复合物,其包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体。

[0601] 在一些方面中,本文中所述的包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体的复合物在治疗肌肉疾病(例如,罕见肌肉疾病或肌肉萎缩)中是有效的。在一些实施方案中,所述复合物在治疗表6中提供的罕见肌肉疾病中是有效的。在一些实施方案中,肌肉疾病与疾病等位基因相关,例如,特定肌肉疾病的疾病等位基因可包含表6中列出的相应基因的遗传改变。

[0602] 在一些实施方案中,复合物在治疗与表6中“肌肉萎缩基因靶标”部分下所列出的的一种或更多种基因的活性相关的肌肉萎缩中是有效的。在一些实施方案中,肌肉萎缩是由于慢性疾病,包括AIDS、充血性心力衰竭、癌症、慢性阻塞性肺病和肾衰竭或肌肉废用(muscle disuse)。

[0603] 在另一些方面中,本文中所述的包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体的复合物在治疗神经系统疾病中是有效的。在一些实施方案中,神经系统疾病包括但不限于神经病、

淀粉样变性、癌症、眼疾病或病症、病毒感染或微生物感染、炎症、局部缺血、神经退行性疾病、癫痫、行为障碍和溶酶体贮积病。出于本申请的目的，CNS将被理解为包括眼，其通常通过血-视网膜屏障与身体的其余部分隔离。神经系统病症的一些具体实例包括但不限于神经退行性疾病(包括但不限于路易体病、脊髓灰质炎后综合征、夏伊-德拉格综合征、橄榄体脑桥小脑萎缩、帕金森病、多系统萎缩、纹状体黑质变性、tau蛋白病(包括但不限于阿尔茨海默病和核上性麻痹)、朊病毒病(包括但不限于牛海绵状脑病、羊瘙痒病、克罗伊茨费尔特-雅各布综合征、库鲁病、格斯特曼-施特劳斯勒尔-沙因克尔病、慢性消耗病和致死性家族型失眠症)、延髓性麻痹、运动神经元病和神经系统异变性病症(包括但不限于卡纳万病、亨廷顿病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、亚历山大病、图雷特综合征、Menkes捻转毛综合征、科凯恩综合征、哈勒沃登-施帕茨综合征、拉福拉病、雷特综合征、肝豆状核变性、莱施-奈恩综合征和Unverricht-Lundborg综合征)、痴呆(包括但不限于皮克病和脊髓小脑共济失调)、癌症(例如，CNS的癌症，包括由身体其他部位的癌症引起的脑转移)。在一些实施方案中，为了治疗神经系统疾病，复合物包含与药物(例如，表7中列出的药物)缀合的本文中所描述的抗TfR抗体以用于治疗神经系统疾病。

[0604] 在一些实施方案中，对象可以是人对象、非人灵长类对象、啮齿动物对象或任何合适的哺乳动物对象。在一些实施方案中，对象可患有表6中提供的肌肉疾病。在一些实施方案中，对象可患有肌肉萎缩，或处于发生肌肉萎缩的风险中。

[0605] 本公开内容的一个方面包括涉及向对象施用有效量的本文中所描述的复合物的方法。在一些实施方案中，可向有治疗需要的对象施用有效量的包含含有与分子载荷共价连接的抗TfR抗体的复合物的药物组合物。在一些实施方案中，可通过合适的途径施用包含如本文中所描述的复合物的药物组合物，所述途径可包括静脉内施用，例如作为推注(bolus)或通过在一段时间内的连续输注。在一些实施方案中，可通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内或鞘内途径进行静脉内施用。在一些实施方案中，药物组合物可以是固体形式、水性形式或液体形式。在一些实施方案中，可将水性或液体形式雾化或冻干。在一些实施方案中，雾化或冻干形式可用水溶液或液体溶液重构。

[0606] 用于静脉内施用的组合物可包含多种载体，例如植物油、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、豆蔻酸异丙酯、乙醇以及多元醇(甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)。对于静脉内注射，水溶性抗体可通过滴注方法施用，通过该方法输注包含抗体和生理学上可接受的赋形剂的药物制剂。生理学上可接受的赋形剂可包括，例如5%右旋糖、0.9%盐水、林格液(Ringer's solution)或其他合适的赋形剂。可将肌内制剂，例如抗体的合适可溶性盐形式的无菌制剂溶解在药用赋形剂例如注射用水、0.9%盐水或5%葡萄糖溶液中并施用。

[0607] 在一些实施方案中，包含含有与分子载荷共价连接的抗TfR抗体的复合物的药物组合物通过位点特异性或局部递送技术施用。这些技术的一些实例包括复合物的可植入储库源、局部递送导管、位点特异性载体、直接注射或直接应用。

[0608] 在一些实施方案中，包含含有与分子载荷共价连接的抗TfR抗体的复合物的药物组合物以赋予对象治疗作用的有效浓度施用。如本领域技术人员所公认的，有效量根据疾病的严重程度、所治疗对象的独特特征(例如年龄、身体状况、健康或体重)、治疗的持续时间、任何同时治疗的性质、施用途径和相关因素而变化。这些相关因素是本领域技术人员已

知的,并且仅通过常规实验即可解决。在一些实施方案中,有效浓度是被认为对患者安全的最大剂量。在一些实施方案中,有效浓度将是提供最大效力的最低的可能浓度。

[0609] 经验考虑因素(例如复合物在对象中的半衰期)通常将有助于确定用于治疗的药物组合物的浓度。施用频率可凭经验确定和调整以使治疗效力最大化。

[0610] 通常来说,对于本文中所述的任何复合物的施用,根据上述因素,例如安全性或效力,初始候选剂量可为约1至100mg/kg或更高。在一些实施方案中,将施用一次治疗。在一些实施方案中,将每天、每两周、每周、每两个月、每月或以提供最大效力同时使对对象的安全风险最小化的任何时间间隔施用治疗。通常来说,可在整个治疗过程中监测效力和治疗以及安全风险。

[0611] 可使用任何合适的方法评估治疗的效力。在一些实施方案中,可通过评价与肌肉疾病和/或(例如,和)肌肉萎缩相关的症状的观察结果来评估治疗的效力。

[0612] 在一些实施方案中,将包含含有与分子载荷共价连接的抗TfR抗体的本文中所述的复合物的药物组合物以相对于对照(例如治疗之前基因表达的基线水平)足以抑制至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的靶基因活性或表达的有效浓度施用于对象。

[0613] 在一些实施方案中,向对象单次给药或施用包含含有与分子载荷共价连接的抗TfR抗体的本文中所述的复合物的药物组合物足以抑制靶基因的活性或表达持续至少1至5天、1至10天、5至15天、10至20天、15至30天、20至40天、25至50天或更多天。在一些实施方案中,向对象单次给药或施用包含含有与分子载荷共价连接的抗TfR抗体的本文中所述的复合物的药物组合物足以抑制靶基因的活性或表达持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周。在一些实施方案中,向对象单次给药或施用包含含有与分子载荷共价连接的抗TfR抗体的本文中所述的复合物的药物组合物足以抑制靶基因的活性或表达持续至少1、2、3、4、5或6个月。

[0614] 在一些实施方案中,药物组合物可包含多于一种包含与分子载荷共价连接的抗TfR抗体的复合物。在一些实施方案中,药物组合物还可包含用于治疗对象(例如,患有肌肉疾病(例如,表6中提供的肌肉疾病)的人对象)的任何其他合适的治疗剂。在一些实施方案中,其他治疗剂可增强或补充本文中所述复合物的效力。在一些实施方案中,其他治疗剂可发挥功能来治疗与本文中所述复合物的不同的症状或疾病。

[0615] c. 用于治疗 and 诊断应用的药盒/试剂盒

[0616] 本公开内容还提供了用于如本文中公开的治疗或诊断应用的药盒/试剂盒。这样的药盒/试剂盒可包含一个或更多个容器,所述容器包含抗TfR抗体,例如本文中所述那些中的任一种。

[0617] 在一些实施方案中,药盒/试剂盒可包含用于根据本文中所述的任何方法使用的说明书。所包含的说明书可包括对施用抗TfR抗体以治疗如本文中所述的那些的靶标疾病、延迟其发作或缓解其的描述。药盒/试剂盒还可包含对基于鉴定个体是否患有靶标疾病来选择适合用于治疗的个体的描述。在另一些实施方案中,说明书包含对处于靶标疾病的风险中的个体施用抗体的描述。

[0618] 涉及使用抗TfR抗体的说明书通常包含关于用于预期治疗的剂量、给药方案和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、散装包装(例如,多剂量包装)或子单位剂量。本发明

的药盒/试剂盒中提供的说明书通常是标签或包装插页(例如,包含在药盒/试剂盒中的纸页)上的书面说明,但机器可读说明(例如,磁性或光学存储盘上携带的说明书)也是可接受的。

[0619] 标签或包装插页表明该组合物用于治疗可通过调节免疫应答来治疗的疾病或病症(例如自身免疫病),延迟其发作和/或(例如,和)缓解其。可提供说明书以用于实践本文中所述的任何方法。

[0620] 本发明的药盒/试剂盒在合适的包装中。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶、罐、软包装(例如密封的聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等。

[0621] 还考虑与特定装置(例如吸入器、鼻施用装置(例如,雾化器)或输注装置(例如微型泵))组合使用的包装。药盒/试剂盒可具有无菌入口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞的小瓶)。容器还可具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是抗TfR抗体,如本文中所述的那些。

[0622] 药盒/试剂盒可任选地提供另外的组分,例如缓冲剂和解释性信息。通常来说,药盒/试剂盒包含容器和在容器上或与容器相连的标签或包装插页。在一些实施方案中,本发明提供了包含上述药盒/试剂盒的内容物的制品。

[0623] 本文中还提供了用于检测样品中的转铁蛋白受体的试剂盒。这样的试剂盒可包含本文中所述的任何抗TfR抗体。在一些情况下,抗TfR抗体可与可检测标记(如本文中所述的那些)缀合。本文中使用的“缀合”或“连接”意指两个实体优选地以实现两个实体之间缔合的治疗/诊断益处的足够的亲和力缔合。两个实体之间的缔合可以是直接的或通过接头,例如聚合物接头。缀合或连接可包括共价或非共价结合以及其他形式的缔合,例如,如一个实体包封在另一个实体之上或之内,或者一个实体或两个实体包封在第三实体(例如胶束)之上或之内。

[0624] 作为替代或补充(例如,补充),试剂盒可包含能够与抗TfR抗体结合的第二抗体。试剂盒还可包含使用抗TfR抗体来检测转铁蛋白受体的说明书。

实施例

[0625] 实施例1:人源化抗TfR1抗体

[0626] 对表2中示出的抗TfR抗体进行人源化和诱变以降低可制造性可能性。筛选人源化变体并测试其结合特性和生物活性。使用Composite Human Technology设计抗TfR1重链和轻链可变区的人源化变体(各5个变体)。合成编码具有这些重链和轻链可变区的Fab的基因,并构建载体以表达每个人源化的重链和轻链变体。随后,小规模表达每个载体,并分析所得的人源化抗TfR1 Fab。基于数项标准选择人源化的Fab用于进一步测试,所述标准包括针对靶抗原的抗体亲和力的Biacore测定、相对表达、与人种系序列的同源性百分比以及预测的MHC II类T细胞表位的数目(使用iTope™ MCH II类进行计算机分析确定)。

[0627] 通过在重链和轻链可变区中引入氨基酸替换,在一些抗体的亲本序列中确定了潜在可能性。这些替换是基于相对表达水平、iTope™评分和来自Biacore单循环动力学分析的相对 K_D 选择的。测试人源化变体并最初基于对靶抗原的亲和力选择变体。随后,基于对每个分析变体(在表8和表9中示出)的聚集和降解的稳定性和易感性的一系列生物物理学评估

进一步筛选选择的人源化Fab。通过动力学分析分析选择的Fab与TfR1的结合特性。这些分析的结果在表10中示出。对于表8和表9中示出的缀合物,将选择的人源化Fab与DMPK靶向寡核苷酸AS0300缀合。如由在暴露于高温(40℃)持续9天之后与暴露之前相比对人和食蟹猴TfR1具有相当的结合亲和力所示,选择的Fab具有热稳定性(参见表10)。

[0628] 表8. 人源化的抗TfR Fab的生物物理评估数据

变体 标准	3M12 (VH3/Vk2)	3M12 (VH3/Vk3)	3M12 (VH4/Vk2)	3M12 (VH4/Vk3)	3A4 (VH3-N54T/Vk4)
结合亲和力 (Biacore d0)	395 pM	345 pM	396 pM	341 pM	3.09 nM
结合亲和力 (Biacore d25)	567 pM	515 pM	510 pM	486 pM	3.01 nM
Fab 结合亲和力 ELISA (人/食蟹猴 TfR1)	0.8 nM/9.9 nM	0.6 nM/4.7 nM	0.4 nM/1.4 nM	0.5 nM/2.2 nM	2.6 nM/156 nM*
缀合物结合亲和力 ELISA (人/食蟹猴 TfR1)	2.2 nM/2.9 nM	N/A	N/A	1.7 nM/2.1 nM	2.8 nM/4.7 nM
...					
变体 标准	3A4 (VH3-N54S/Vk4)	3A4 (VH3/Vk4)	5H12 (VH5-C33Y/Vk3)	5H12 (VH5-C33D/Vk4)	5H12 (VH4-C33Y/Vk4)
结合亲和力	1.34 nM	1.5 nM	627 pM	991 pM	626 pM

[0629]

[0630]

(Biacore d0)					
结合亲和力 (Biacore d25)	1.39 nM	1.35 nM	1.07 nM	3.01 nM	1.33 nM
Fab 结合亲和力 ELISA (人/食蟹猴 Tfr1)	1.6 nM/398 nM*	1.5 nM/122 nM*	6.3 nM/2.1 nM	6.0 nM/3.5 nM	2.8 nM/3.3 nM
缀合物结合亲和力 ELISA (人/食蟹猴 Tfr1)	2.9 nM/7.8 nM	2.8 nM/7.6 nM	33.4 nM/2.3 nM	110 nM/10.2 nM	23.7 nM/3.3 nM

[0631] *在缀合之后恢复食蟹猴结合；

[0632] 表9. 人源化的抗Tfr Fab和缀合物的热稳定性

[0633]

变体 标准	3M12 (VH3/Vk2)	3M12 (VH3/Vk3)	3M12 (VH4/Vk2)	3M12 (VH4/Vk3)	3A4 (VH3-N54T/ Vk4)
结合亲和力 hTfr1, d0 (nM)	0.8	0.6	0.4	0.5	2.6
结合亲和力 hTfr1, d9 (nM)	0.98	1.49	0.50	0.28	0.40

[0634]

结合亲和 力食蟹猴 TfR1, d0 (nM)	9.9	4.7	1.4	2.2	156
结合亲和 力食蟹猴 TfR1, d9 (nM)	19.51	15.58	5.01	16.40	127.50
与 hTfR1 结合的 DMPK 寡核苷酸 (nM)	1.14	N/A	N/A	1.18	2.22
与食蟹猴 TfR1 结 合的 DMPK 寡核苷酸 (nM)	2.26	N/A	N/A	1.85	5.12
...					
变体 标准	3A4 (VH3-N54S /Vk4)	3A4 (VH3/Vk4)	5H12 (VH5-C33Y/ Vk3)	5H12 (VH5-C33D/Vk 4)	5H12 (VH4-C33Y/ Vk4)
结合亲和 力 hTfR1, d0 (nM)	1.6	1.5	6.3	6	2.8
结合亲和 力 hTfR1, d9 (nM)	0.65	0.46	71.90	92.34	1731.00
结合亲和 力食蟹猴 TfR1, d0	398	122	2.1	3.5	3.3

[0635]

(nM)					
结合亲和力食蟹猴 TfR1, d9 (nM)	248.30	878.40	0.69	0.63	0.26
与 hTfR1 结合的 DMPK 寡核苷酸 (nM)	2.71	2.837	N/A	110.5	13.9
与 cyno TfR1 结 合的 DMPK 寡核苷酸 (nM)	4.1	7.594	N/A	10.18	13.9

[0636] 表10. 与TfR1结合的人源化抗TfR Fab的动力学分析

[0637]

人源化抗TfR Fab	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R_{MAX}	$Ch1^2$ (RU ²)
3A4 (VH3/Vk4)	7.65E+10	1.15E+02	1.50E-09	48.0	0.776
3A4 (VH3-N54S/Vk4)	4.90E+10	6.56E+01	1.34E-09	49.4	0.622
3A4 (VH3-N54T/Vk4)	2.28E+05	7.05E-04	3.09E-09	61.1	1.650
3M12 (VH3/Vk2)	2.64E+05	1.04E-04	3.95E-10	78.4	0.037
3M12 (VH3/Vk3)	2.42E+05	8.34E-05	3.45E-10	91.1	0.025
3M12 (VH4/Vk2)	2.52E+05	9.98E-05	3.96E-10	74.8	0.024
3M12 (VH4/Vk3)	2.52E+05	8.61E-05	3.41E-10	82.4	0.030
5H12 (VH5-C33D/Vk4)	6.78E+05	6.72E-04	9.91E-10	49.3	0.093
5H12 (VH5-C33Y/Vk3)	1.95E+05	1.22E-04	6.27E-10	68.5	0.021
5H12 (VH5-C33Y/Vk4)	1.86E+05	1.17E-04	6.26E-10	75.2	0.026

[0638] 人源化抗TfR1 Fab与TfR1的结合 (ELISA)

[0639] 为了测量人源化抗TfR抗体与TfR1的结合,进行ELISA。首先用100 μ L/孔的在PBS中的1 μ g/mL重组huTfR1包被高结合、黑色、平底的96孔板(Corning#3925),并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。将孔清空并去除残余液体。通过向每个孔添加200 μ L在PBS中的1%BSA(w/w)进行封闭。允许在室温下在300rpm的振荡器上进行封闭2小时。在封闭之后,去除液体并将孔用300 μ L TBST洗涤3次。然后在0.5%BSA/TBST中以8点连续稀释(稀释范围5 μ g/mL至5ng/mL)一式三份添加抗TfR1抗体。ELISA板上还包括阳性对照和同种型对照。将板在室温下在轨道振荡器上以300rpm孵育60分钟,并将板用300 μ L TBST洗涤3次。将抗(H+L) IgG-A488(1:500)(Invitrogen#A11013)在TBST中的0.5%BSA中稀释,并向每个孔添加100 μ L。然后允许板在轨道振荡器上以300rpm在室温下孵育60分钟。去除液体并将板用300 μ L TBST洗涤四次。然

后在读板器上在495nm激发和50nm发射(具有15nm带宽)下测量吸光度。记录数据并分析 EC_{50} 。人源化3M12、3A4和5H12Fab与人TfR1(hTfR1)结合的数据分别在图1A、1C和1E中示出。根据上述针对hTfR1的相同方案,使用食蟹猴(*Macaca fascicularis*)TfR1(cTfR1)进行ELISA测量,并在图1B、1D和1F中示出结果。

[0640] 关于人源化抗TfR Fab与hTfR1和cTfR1结合的这两组ELISA分析的结果表明,人源化3M12Fab显示出与hTfR1和cTfR1二者的一致结合,并且人源化3A4Fab显示出相对于hTfR1的与cTfR1的结合降低。

[0641] 使用六种人源化抗TfR Fab制备抗体-寡核苷酸缀合物,其中每一种均与DMPK靶向寡核苷酸AS0300缀合。对缀合效率和下游纯化进行表征并测量产物缀合物的多种特性。结果表明,所有10个受试变体的结合效率均是稳健的,并且纯化过程(疏水相互作用色谱,随后是羟基磷灰石树脂色谱)是高效的。如通过尺寸排阻色谱分析的,纯化的缀合物显示出>97%的纯度。

[0642] 在细胞摄取实验中测试了数种人源化Fab来评价TfR1介导的内化。为了测量这种由抗体介导的细胞摄取,将人源化抗TfR Fab缀合物用Cypher5e(pH敏感性染料)标记。将横纹肌肉瘤(RD)细胞用100nM缀合物处理4小时,胰蛋白酶化,洗涤两次,并通过流式细胞术分析。使用Attune NxT软件计算平均Cypher5e荧光(代表摄取)。如图2中所示,人源化抗TfR Fab与阳性对照抗TfR1 Fab相比显示出相似或更高的内体摄取。对于不同的寡核苷酸载荷观察到了类似的内化效率。抗小鼠TfR抗体用作阴性对照。冷(非内化)条件消除了阳性对照抗体缀合物的荧光信号(数据未显示),表明阳性对照和人源化抗TfR Fab缀合物中的阳性信号是由于Fab缀合物的内化引起的。

[0643] 还通过ELISA测试了六种人源化抗TfR Fab的缀合物与hTfR1和cTfR1的结合,并与人源化Fab的未缀合形式进行了比较。结果表明,人源化3M12和5H12Fab在缀合之后相对于其未缀合形式保持相似的hTfR1和cTfR1结合水平(3M12,图3A和3B;5H12,图3E和3F)。令人感兴趣的是,3A4克隆在缀合之后相对于其未缀合形式显示出与cTfR1的结合提高(图3C和3D)。

[0644] 本实施例中使用的术语“未缀合的”表示抗体未与寡核苷酸缀合。

[0645] 实施例2. 抗体-寡核苷酸缀合物体外促进DMPK mRNA水平的敲低

[0646] 将含有人源化抗TfR Fab 3M12(VH3/Vk2)、3M-12(VH4/Vk3)和3A4(VH3-N54S/Vk4)的缀合物与DMPK靶向反义寡核苷酸AS0300缀合,并在横纹肌肉瘤(RD)细胞中测试对DMPK转录物表达的敲低。抗体通过式(C)中示出的接头与AS0300缀合。

[0647] 在具有谷氨酰胺、补充有10%FBS和青霉素/链霉素的DMEM生长培养基中培养RD细胞直至接近汇合。然后将细胞以每孔20K个细胞接种到96孔板中,并使其恢复24小时。然后将细胞用缀合物处理3天。从细胞收集总RNA,合成cDNA并通过qPCR测量DMPK表达。

[0648] 图4中的结果示出相对于在经PBS处理的细胞中的表达,在用每种指定缀合物处理的细胞中的DMPK表达水平降低,表明人源化抗TfR Fab能够介导RD细胞摄取DMPK靶向寡核苷酸并且内化的DMPK靶向寡核苷酸在敲低DMPK mRNA水平方面是有效的。

[0649] 实施例3. 连接抗TfR抗体与分子载荷的接头的血清稳定性

[0650] 在一些实例中与抗体连接的寡核苷酸通过式(C)中示出的可切割接头缀合。重要的是,接头在血清中维持稳定性并提供释放动力学,这有利于在靶肌细胞中积累足够的载

荷。这种血清稳定性对于全身静脉内施用、经缀合寡核苷酸在血流中的稳定性、向肌肉组织的递送和治疗性载荷在肌细胞中的内化是重要的。已证实该接头有助于将多种类型的载荷(包括ASO、siRNA和PMO)精确地与Fab缀合。这种灵活性使得能够合理选择适当类型的载荷来解决各肌肉疾病的遗传基础。另外,接头和缀合化学允许针对每种类型的载荷优化所连接载荷分子与各Fab之比,并能够实现分子的快速设计、产生和筛选,以能够用于多种肌肉疾病应用。

[0651] 图5示出了体内接头的血清稳定性,其在静脉内给药之后72小时的过程中在多种物种之间是可比的。在每种情况下在给药之后72小时测量到至少75%的稳定性。

[0652] 实施例4.DMD患者肌管中抗TfR缀合物的外显子跳读活性

[0653] 在该研究中,评价了包含与DMD外显子51跳读寡核苷酸缀合的抗TfR Fab (3M12 VH3/VK2、3M12 VH4/VK3和3A4 VH3 N54S/VK4)的抗TfR缀合物的外显子跳读活性。将携带外显子52缺失的永生化人成肌细胞解冻并以1e6个细胞/瓶的密度接种在Promocell骨骼细胞生长培养基(含5%FBS和1×Pen-Strep)中,并使其生长至汇合。一旦汇合,就将细胞进行胰蛋白酶化并通过离心进行沉淀并重悬在新鲜Promocell骨骼细胞生长培养基中。对细胞数进行计数并将细胞以50k个细胞/孔的密度接种到经基质胶包被的96孔板中。使细胞恢复24小时。通过抽吸生长培养基并用不含血清的分化培养基替代来诱导细胞分化。然后将细胞用10μM的经缀合或未经缀合的DMD外显子跳读寡核苷酸处理。将细胞与测试品一起孵育十天,然后从96孔板收获总RNA。对75ng总RNA进行cDNA合成,并进行突变特异性PCR以评价每种细胞类型中外显子51跳读的程度。将突变特异性PCR产物在4%琼脂糖凝胶上运行,并使用SYBR gold使其显现。使用密度测定法来计算跳读和未跳读的扩增子的相对量,并将外显子跳读以外显子51跳读的扩增子除以存在的扩增子总量的比确定:

$$[0654] \quad \text{外显子跳读\%} = \frac{\text{跳读扩增子}}{(\text{跳读扩增子} + \text{未跳读扩增子})} * 100$$

[0655] 数据表明,在患者肌管中,与未缀合的DMD外显子跳读寡核苷酸相比,具有与DMD外显子51-跳读寡核苷酸缀合的3M12 VH3/VK2或3M12 VH4/VK3 Fab的缀合物引起外显子跳读增强(图6)。

[0656] 本实施例中使用的术语“未缀合的”表示寡核苷酸未与抗体缀合。

[0657] 实施例5.抗TfR缀合物在hTfR1小鼠中的体内活性

[0658] 在DM1中,高于正常数目的CUG重复形成大的发夹环,所述发夹环仍困在细胞核中,从而形成结合剪接蛋白并抑制剪接蛋白发挥其正常功能的能力的细胞核病灶。当毒性细胞核DMPK水平降低时,细胞核病灶减少,从而释放剪接蛋白,允许恢复正常的mRNA加工,并潜在地阻止或逆转疾病进展。

[0659] 评价了包含与DMPK靶向寡核苷酸ASO300缀合的抗TfR Fab(对照、3M12 VH3/VK2、3M12 VH4/VK3、3A4 VH3 N54S/VK4)的缀合物在小鼠全身静脉内施用之后降低多种肌肉组织中DMPK mRNA水平的体内活性。

[0660] 根据表11和图7A中概述的给药方案,在5至15周龄之间对雄性和雌性C57BL/6小鼠进行施用,在所述小鼠中一个TfR1等位基因被人TFR1等位基因替换。在第一次注射之后14天处死小鼠并如表12中所示收集所选择的肌肉。

表 11

组	动物数目	处理抗体	处理寡核苷酸	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	给药方案	终末时间点
1	4	载体	NA	0	10	第 0 天和第 7 天通过 IV	第 14 天
2	4	NA	ASO300	10	5.0		
3	4	对照抗 TfR Fab	ASO300		10.2		
4	4	3M12 VH3/VK2	ASO300		11.5		
5	4	3M12 VH4/VK3	ASO300		10.1		
6	4	3A4 VH3 N54S/VK4	ASO300		10.7		

表 12

组织	储存
腓肠肌	每只动物的右腿储存在-80℃下的 RNALater 中
胫骨前肌	每只动物的一条腿 (R) 储存在-80℃下的 RNALater 中
心脏	横向解剖并将心尖 (apex) 储存在-80℃下的 RNALater 中
膈肌	分成两半并将一半收集在-80℃下的 RNALater 中

[0663] 使用制造商提供的试剂盒(Promega)在Maxwell快速样品浓缩器(RSC)仪器上提取总RNA。逆转录经纯化的RNA,并且通过qRT-PCR和特定的TaqMan测定(ThermoFisher)确定Dmpk和Ppib转录物的水平。使用Ppib作为参照基因并将注射载体剂的小鼠作为对照组,根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算Dmpk表达的log倍数变化。对照小鼠与施用缀合物的小鼠之间Dmpk表达差异的统计学显著性通过单因素ANOVA和Dunnett多重比较校正来确定。如图7B至7E中所示,受试缀合物显示出降低体内多种肌肉组织中DMPK mRNA水平的稳健活性。

[0664] 实施例6. 表位作图

[0665] 为了在高分辨率下确定hTfR1/抗TfR Fab(3M12 VH4/Vk3)复合物的表位,将该蛋白质复合物与氙化交联剂一起孵育并进行多酶切割。在富集交联的肽之后,通过高分辨率质谱(nLC-LTQ-Orbitrap MS)分析样品,并使用XQuest和Stavrox软件分析生成的数据。

[0666] 将制备的20μL hTfR1(人TfR1胞外结构域,如SEQ ID NO:35中示出,氨基酸C89-F760)/抗TfR混合物与2μL DSS d0/d12(2mg/mL;DMF)混合,然后在室温下孵育180分钟时间。在孵育之后,通过添加1μL碳酸氢铵(终浓度为20mM)中止反应,随后在室温下孵育1小时时间。在然后,使用speedvac随后是H₂O 8M尿素混悬液(20μL)干燥溶液。在混合之后,向溶液添加2μL DTT(500mM)。然后将混合物在37℃下孵育1小时。在孵育之后,添加2μL碘乙酰胺(1M),然后在暗室中在室温下孵育1小时时间。在孵育之后,添加80μL蛋白水解缓冲液。胰蛋

白酶缓冲液包含50mM Ambic pH 8.5、5%乙腈；胰凝乳蛋白酶缓冲液包含Tris HCl 100mM、CaCl₂10mM pH 7.8；ASP-N缓冲液包含磷酸缓冲液50mM pH 7.8；弹性蛋白酶缓冲液包含Tris HCl 50mM pH 8.0，以及嗜热菌蛋白酶缓冲液包含Tris HCl 50mM、CaCl₂0.5mM pH 9.0。

[0667] 将100μl还原的/烷基化的hTfR1/抗TfR Fab混合物与4μl胰蛋白酶(Promega)以1/100的比例混合。将蛋白水解混合物在37℃下孵育过夜。

[0668] 将100μl还原的/烷基化的hTfR1/抗TfR Fab混合物与2μl胰凝乳蛋白酶(Promega)以1/200的比例混合。将蛋白水解混合物在25℃下孵育过夜。

[0669] 将100μl还原的/烷基化的hTfR1/抗TfR Fab混合物与2μl ASP-N(Promega)以1/200的比例混合。将蛋白水解混合物在37℃下孵育过夜。

[0670] 将100μl还原的/烷基化的hTfR1/抗TfR Fab混合物与4μl弹性蛋白酶(Promega)以1/100的比例混合。将蛋白水解混合物在37℃下孵育过夜。

[0671] 将100μl还原的/烷基化的hTfR1/抗TfR Fab混合物与8μl嗜热菌蛋白酶(Promega)以1/50的比例混合。将蛋白水解混合物在70℃下孵育过夜。在消化之后，向溶液添加最终为1%的甲酸。

[0672] 已经使用与LTQ-Orbitrap质谱组合的nLC色谱分析了样品。使用Xquest 2.0版和Stavrox 3.6软件分析交联的肽。nLC-orbitrap MS/MS分析检测到hTfR1与抗TfR Fab之间的15个交联的肽。分析表明相互作用包括hTfR1上的以下氨基酸：SEQ ID NO:105的K261、S273、Y282、T362、S368、S370和K371。

[0673] 实施例7. 抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3的结合活性的表征

[0674] 进行体外研究以测试抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3对人和食蟹猴TfR1结合的特异性，并确定其对TfR1 vs TfR2的选择性。使用酶联免疫吸附测定(ELISA)确定抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3与来自不同物种的TfR1的结合亲和力。将Fab的连续稀释物添加至用重组人、食蟹猴、小鼠或大鼠的TfR1预包被的板。在短暂孵育之后，通过添加荧光标记的抗(H+L) IgG二抗并测量495nm激发和520nm发射处的荧光强度来量化Fab的结合。Fab显示出对人和食蟹猴的TfR1的强结合亲和力，但未观察到小鼠或大鼠的TfR1的可检测结合(图8)。还进行了表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)测量，并将结果在表13中示出。Fab针对人TfR1受体的K_d计算为 7.68×10^{-10} M，以及针对食蟹猴TfR1受体的K_d计算为 5.18×10^{-9} M。

[0675] 表13. 使用表面等离子共振测量的与人和食蟹猴TfR1或人TfR2结合的抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3的动力学分析

[0676]

	抗 TfR Fab 3M12 VH4/Vk3				
靶标	K _d (M)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	R _{max}	R _{es} SD
人 TfR1	7.68E-10	1.66E+05	1.27E-04	1.11E+02	3.45E+00
食蟹猴 TfR1	5.18E-09	9.19E+04	4.76E-04	1.87E+02	6.24E+00
人 TfR2	ND	ND	ND	ND	ND

[0677] ND=通过SPR未检测到结合(10pM至100uM)

[0678] 为了测试抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3与人TfR2的交叉反应性,进行了ELISA。将重组人TfR2蛋白以2 μ g/mL接种过夜,并用PBS中的1%牛血清白蛋白(BSA)封闭1小时。在0.5%BSA/TBST中添加Fab或阳性对照抗TfR2抗体的连续稀释物,持续1小时。在洗涤之后,以1:500稀释度在0.5%BSA/TBST中添加抗(H+L) IgG-A488(Invitrogen#MA5-25932)荧光二抗,并将板孵育1小时。使用Biotek Synergy读板器在495nm激发和520nm发射下测量相对荧光。未观察到抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3与hTfR2的结合(图9)。

[0679] 实施例8.抗TfR Fab-ASO缀合物的血清稳定性

[0680] 抗TfR FabVH4/Vk3通过式(C)中示出的接头与对照反义寡核苷酸(ASO)缀合,并测试所得缀合物的将Fab与ASO缀合的接头的稳定性。通过在PBS中或者在大鼠、小鼠、食蟹猴或人血清中孵育荧光标记的缀合物并测量随时间的相对荧光强度来测量血清稳定性,其中较高的荧光指示更多的缀合物保持完整。图10示出多个物种中的血清稳定性相似,并且在72小时之后仍然很高。

[0681] 实施例9.食蟹猴中抗TfR Fab-ASO缀合物的体内外显子跳读活性

[0682] 将抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3与肌养蛋白(DMD)外显子51跳读反义寡核苷酸(ASO)缀合,所述肌养蛋白(DMD)外显子51跳读反义寡核苷酸(ASO)靶向DMD外显子51中的外显子剪接增强子(exonic splicing enhancer, ESE)序列。外显子51跳读寡核苷酸是长度为30个核苷酸的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)。在健康的非人灵长类中体内测试缀合物的外显子跳读活性。在第1天和第8天,通过静脉输注向原初雄性食蟹猴(每组n=4至5只)施用两剂量的载剂、单独的30mg/kg ASO、或122mg/kg缀合物(相当于30mg/kg ASO)。在施用第一剂量之后2周或4周处死动物并收获组织。使用PromegaMaxwell®RSC仪器从组织样品收集总RNA,并使用qScript cDNA SuperMix进行cDNA合成。使用终点PCR进行外显子51跳读的评估。

[0683] PCR产物的毛细管电泳用于评估外显子跳读,并且使用下式计算外显子51跳读%:

$$[0684] \quad \text{外显子跳读\%} = \frac{\text{跳读带的摩尔浓度}}{\text{跳读带的摩尔浓度} + \text{未跳读带的摩尔浓度}} * 100$$

[0685] 表14中示出了计算的外显子51跳读结果。

[0686] 表14. 食蟹猴肌养蛋白中肌养蛋白的外显子51跳读

时间	2 周			4 周	
组	载剂	单独的 ASO ^a	缀合物	单独的 ASO ^a	缀合物
缀合物剂量 ^b	0	n/a	122	n/a	122
单独的 ASO 剂量 ^c	0	30	30	30	30
[0687] 四头肌 ^d	0.00 (0.00)	1.216 (1.083)	4.906 (3.131)	0.840 (1.169)	1.708 (1.395)
膈肌 ^d	0.00 (0.00)	1.891 (2.911)	7.315 (1.532)	0.717 (1.315)	9.225 (4.696)
心脏 ^d	0.00 (0.00)	0.043 (0.096)	3.42 (1.192)	0.00 (0.00)	4.525 (1.400)
二头肌 ^d	0.00 (0.00)	0.607 (0.615)	3.129 (0.912)	1.214 (1.441)	4.863 (3.881)
[0688]	胫骨前肌 ^d	0.00 (0.00)	0.699 (0.997)	1.042 (0.685)	0.384 (0.615)
	腓肠肌 ^d	0.00 (0.00)	0.388 (0.573)	2.424 (2.329)	0.00 (0.00)
					5.393 (2.695)

[0689] ^aASO=反义寡核苷酸。

[0690] ^b缀合物剂量作为mg/kg的抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3-ASO缀合物列出。

[0691] ^cASO剂量作为mg/kg的抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3-ASO剂量的ASO等同物列出。

[0692] ^d外显子跳读值是外显子51跳读的平均%，其中括号中为标准偏差(n=5)。

[0693] 还使用杂交ELISA和与ASO序列互补的探针对组织ASO累积进行定量。生成标准曲线并从该标准曲线的线性回归导出ASO水平(以ng/g计)。与施用未缀合的ASO相比，在施用抗TfR Fab VH4/Vk3-ASO缀合物之后，ASO以较高水平分布到所有评价的组织。在施用第一剂量之后2周和4周在所有评价的组织中，静脉内施用未缀合的ASO导致ASO水平接近背景水平。抗TfR Fab VH4/Vk3-ASO缀合物的施用导致在第一次给药之后2周ASO以以下排列顺序分布在评价的组织中：心脏>膈肌>二头肌>四头肌>腓肠肌>胫骨前肌。还评估了组织浓度的持续时间。四头肌、二头肌和膈肌中的ASO浓度在评价的时间段(2至4周)内下降小于50%，而心脏、胫骨前肌和腓肠肌中的ASO水平几乎保持不变(表15)。

[0694] 本实施例中使用的术语“未缀合的”表示寡核苷酸未与抗体缀合。

[0695] 表15. 食蟹猴中DMD外显子51跳读ASO的组织分布

[0696]

时间	2 周			4 周	
组	载剂	单独的 ASO ^a	缀合物	单独的 ASO ^a	缀合物
缀合物剂量 ^b	0	n/a	122	n/a	122
单独的 ASO 剂 量 ^c	0	30	30	30	30
四头肌 ^d	0 (59.05)	696.8 (868.15)	2436 (954.0)	197 (134)	682 (281)

[0697]

膈肌 ^d	0± (144.3)	580.02 (360.11)	6750 (2256)	60 (120)	3131 (1618)
心脏 ^d	0 (396.03)	1449 (1337)	27138 (6315)	943 (1803)	30410 (9247)
二头肌 ^d	0 (69.58)	615.63 (335.17)	2840 (980.31)	130 (80)	1326 (623)
胫骨前肌 ^d	0 (76.31)	564.71 (327.88)	1591 (253.50)	169 (110)	1087 (514)
腓肠肌 ^d	0 (41.15)	705.47 (863.75)	2096 (474.04)	170 (69)	1265 (272)

[0698] ^aASO=反义寡核苷酸。

[0699] ^b缀合物剂量作为mg/kg的抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3 ASO缀合物列出。

[0700] ^cASO剂量作为mg/kg的ASO或抗TfR Fab 3M12 VH4/Vk3-ASO缀合物剂量的ASO等同物列出。

[0701] ^dASO值是组织中ASO的平均浓度(以ng/g计),其中括号中为标准偏差(n=5)。

[0702] 另一些实施方案

[0703] 1. 与人转铁蛋白受体(TfR)结合的人源化抗体,其中所述抗体包含:

[0704] (i) 含有与SEQ ID NO:69具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0705] (ii) 含有与SEQ ID NO:71具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0706] (iii) 含有与SEQ ID NO:72具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0707] (iv) 含有与SEQ ID NO:73具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);和/或含有与SEQ ID NO:74具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

- [0708] (v) 含有与SEQ ID NO:73具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) ; 和/或含有与SEQ ID NO:75具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) ;
- [0709] (vi) 含有与SEQ ID NO:76具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) ; 和/或含有与SEQ ID NO:74具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) ;
- [0710] (vii) 含有与SEQ ID NO:76具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) ; 和/或含有与SEQ ID NO:75具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) ;
- [0711] (viii) 含有与SEQ ID NO:77具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) ; 和/或含有与SEQ ID NO:78具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) ;
- [0712] (ix) 含有与SEQ ID NO:79具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) ; 和/或含有与SEQ ID NO:80具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) ; 或者
- [0713] (x) 含有与SEQ ID NO:77具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) ; 和/或含有与SEQ ID NO:80具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 。
- [0714] 2. 实施方案1所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL。
- [0715] 3. 实施方案1所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL。
- [0716] 4. 实施方案1所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸的VL。
- [0717] 5. 实施方案1所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL。
- [0718] 6. 实施方案1所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL。
- [0719] 7. 实施方案1所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL。
- [0720] 8. 实施方案1所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL。
- [0721] 9. 实施方案1所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL。
- [0722] 10. 实施方案1所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL。
- [0723] 11. 实施方案1所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL。
- [0724] 12. 实施方案1至11中任一项所述的人源化抗体, 其中所述抗体选自全长IgG、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、scFv和Fv。
- [0725] 13. 实施方案12所述的人源化抗体, 其中所述抗体是全长IgG。
- [0726] 14. 实施方案13所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区。
- [0727] 15. 实施方案13或实施方案14所述的人源化抗体, 其中所述抗体包含:
- [0728] (i) 含有与SEQ ID NO:84具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链; 和/或含有与

SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0729] (ii) 含有与SEQ ID NO:86具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0730] (iii) 含有与SEQ ID NO:87具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0731] (iv) 含有与SEQ ID NO:88具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:89具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0732] (v) 含有与SEQ ID NO:88具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:90具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0733] (vi) 含有与SEQ ID NO:91具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:89具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0734] (vii) 含有与SEQ ID NO:91具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:90具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0735] (viii) 含有与SEQ ID NO:92具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:93具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0736] (ix) 含有与SEQ ID NO:94具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:95具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;或者

[0737] (x) 含有与SEQ ID NO:92具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:95具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链。

[0738] 16. 实施方案12所述的人源化抗体,其中所述抗体是Fab片段。

[0739] 17. 实施方案16所述的人源化抗体,其中所述抗体包含:

[0740] (i) 含有与SEQ ID NO:97具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0741] (ii) 含有与SEQ ID NO:98具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0742] (iii) 含有与SEQ ID NO:99具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:85具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0743] (iv) 含有与SEQ ID NO:100具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:89具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0744] (v) 含有与SEQ ID NO:100具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:90具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0745] (vi) 含有与SEQ ID NO:101具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:89具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0746] (vii) 含有与SEQ ID NO:101具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:90具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0747] (viii) 含有与SEQ ID NO:102具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:93具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;

[0748] (ix) 含有与SEQ ID NO:103具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:95具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;或者

[0749] (x) 含有与SEQ ID NO:102具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或含有与SEQ ID NO:95具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链。

[0750] 18. 实施方案17所述的人源化抗体,其中所述抗体包含:

[0751] (i) 含有SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;

[0752] (ii) 含有SEQ ID NO:98的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;

[0753] (iii) 含有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链;

[0754] (iv) 含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链;

[0755] (v) 含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链;

[0756] (vi) 含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链;

[0757] (vii) 含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链;

[0758] (viii) 含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链;

[0759] (ix) 含有SEQ ID NO:103的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链;或者

[0760] (x) 含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0761] 19. 实施方案1至18中任一项所述的人源化抗体,其中所述抗体与所述转铁蛋白受体之结合的平衡解离常数(K_D)为 10^{-11} M至 10^{-6} M。

[0762] 20. 实施方案1至19中任一项所述的人源化抗体,其中所述抗体不与所述转铁蛋白受体之转铁蛋白结合位点特异性结合和/或其中所述抗体不抑制转铁蛋白与所述转铁蛋白受体的结合。

[0763] 21. 实施方案1至20中任一项所述的人源化抗体,其中所述抗体与人、非人灵长类和啮齿动物的转铁蛋白受体中的两种或更多种的胞外表位具有交叉反应性。

[0764] 22. 核酸,其编码实施方案1至21中任一项所述的抗体。

[0765] 23. 载体,其包含实施方案22所述的核酸。

[0766] 24. 细胞,其包含实施方案23所述的载体。

[0767] 25. 产生抗TfR抗体的方法,其包括在适合所述抗体表达的条件下培养实施方案24所述的细胞。

[0768] 26. 复合物,其包含与分子载荷共价连接的实施方案1至21中任一项所述的抗体。

[0769] 27. 实施方案26所述的复合物,其中所述分子载荷是诊断剂或治疗剂。

[0770] 28. 实施方案26所述的复合物,其中所述分子载荷是寡核苷酸、多肽或小分子。

[0771] 29. 实施方案26至28中任一项所述的复合物,其中所述抗体和所述分子载荷通过

接头连接。

[0772] 30. 实施方案29所述的复合物,其中所述接头是可切割接头。

[0773] 31. 实施方案30所述的复合物,其中所述接头包含缬氨酸-瓜氨酸序列。

[0774] 32. 组合物,其包含实施方案1至21中任一项所述的抗体、实施方案22所述的核酸、实施方案23所述的载体或实施方案26至31中任一项所述的复合物。

[0775] 33. 实施方案32所述的组合物,其还包含可药用载体。

[0776] 34. 检测生物样品中的转铁蛋白受体的方法,其包括使实施方案1至21中任一项所述的抗体与所述生物样品接触并测量所述抗体与所述生物样品的结合。

[0777] 35. 实施方案34所述的方法,其中所述抗体与诊断剂共价连接。

[0778] 36. 实施方案35所述的方法,其中所述生物样品是从怀疑患有与转铁蛋白受体相关的疾病或处于该疾病的风险之中的人对象获得的。

[0779] 37. 实施方案36所述的方法,其中所述接触步骤通过向所述对象施用有效量的所述抗TfR抗体来进行。

[0780] 38. 将分子载荷递送至细胞的方法,其包括使实施方案26至31中任一项所述的复合物与所述细胞接触。

[0781] 39. 实施方案38所述的方法,其中所述细胞是肌细胞。

[0782] 40. 实施方案38或实施方案39所述的方法,其中所述细胞是体外的。

[0783] 41. 实施方案40所述的方法,其中所述细胞在对象中。

[0784] 42. 实施方案41所述的方法,其中所述对象是人。

[0785] 43. 将分子载荷递送至对象的脑或肌肉的方法,其包括向所述对象施用有效量的实施方案26至31中任一项所述的复合物。

[0786] 44. 实施方案43所述的方法,其中所述施用是静脉内的。

[0787] 45. 治疗疾病的方法,其包括向对象施用有效量的实施方案26至31中任一项所述的复合物,其中所述分子载荷是治疗剂。

[0788] 46. 实施方案45所述的方法,其中所述疾病是神经系统疾病并且所述分子载荷是用于治疗神经系统疾病的药物。

[0789] 47. 实施方案45所述的方法,其中所述疾病是肌肉疾病并且所述分子载荷是用于治疗肌肉疾病的药物。

[0790] 48. 实施方案47所述的方法,其中所述肌肉疾病是罕见肌肉疾病或肌肉萎缩。

[0791] 49. 与人转铁蛋白受体(TfR)结合的抗体,其中所述抗体包含:

[0792] (i) 含有与SEQ ID NO:76具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);和/或含有与SEQ ID NO:75具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0793] (ii) 含有与SEQ ID NO:69具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0794] (iii) 含有与SEQ ID NO:71具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0795] (iv) 含有与SEQ ID NO:72具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);和/或含有与SEQ ID NO:70具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0796] (v) 含有与SEQ ID NO:73具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);

和/或含有与SEQ ID NO:74具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) ;

[0797] (vi) 含有与SEQ ID NO:73具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) ;

和/或含有与SEQ ID NO:75具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) ;

[0798] (vii) 含有与SEQ ID NO:76具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) ;和/或含有与SEQ ID NO:74具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) ;

[0799] (viii) 含有与SEQ ID NO:77具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) ;和/或含有与SEQ ID NO:78具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) ;

[0800] (ix) 含有与SEQ ID NO:79具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) ;和/或含有与SEQ ID NO:80具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) ;或者

[0801] (x) 包含与SEQ ID NO:77具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) ;和/或含有与SEQ ID NO:80具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 。

[0802] 50. 与人转铁蛋白受体 (TfR) 结合的抗体,其中所述抗体已经历由翻译后修饰引起的焦谷氨酸形成。

[0803] 等同方案和术语

[0804] 本文中举例说明性地描述的公开内容可在不存在本文中未具体公开的任何一个或更多个要素、一个或更多个限制的情况下适当地实践。因此,例如,在本文中的每种情况下,术语“包含/包括”、“基本上由.....组成”和“由.....组成”中的任一个可用其他两个术语中的任一个替换。已采用的术语和表达作为描述而非限制的术语使用,并且使用这样的术语和表达不旨在排除所示出和所描述的特征的任何等同形式或其一部分,而是应认识到,在所公开内容的范围内可进行多种修改。因此,应理解,尽管已通过一些优选的实施方案、任选的特征具体公开了本公开内容,但是本领域技术人员可获取本文中所公开概念的修改和变化,并且这样的修改和变化被认为是在本公开内容的范围内。

[0805] 另外,在根据马库什组 (Markush group) 或其他替代组描述本公开内容的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,本公开内容也因此以马库什组或其他组的任何个体成员或成员亚组的方式描述。

[0806] 应理解,在一些实施方案中,在描述寡核苷酸或其他核酸的结构时可参考序列表中所示的序列。在这样的实施方案中,实际的寡核苷酸或其他核酸与指定序列相比可具有一个或更多个替代核苷酸 (例如,DNA核苷酸的RNA对应物或RNA核苷酸的DNA对应物) 和/或者 (例如,和) 一个或更多个经修饰核苷酸和/或者 (例如,和) 一个或更多个经修饰核苷酸间键联和/或者 (例如,和) 一个或更多个其他修饰,同时保留与指定序列基本相同或相似的互补特性。

[0807] 除非在本文中另外指明或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中 (尤其是在所附权利要求的上下文中) 使用没有数量词修饰的名词将被解释为一个/种或更多个/种。除非另有说明,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”将被解释为开放式术语 (即,意指“包括但不限于”)。除非本文中另外指明,否则本文中值范围的记载仅旨在用作分别指代落入该范围内的每个单独值的速记方法,并且每个单独值均被并入说明书中,如同其在本文中被单独记载一样。除非在本文中另外指明或在其他情况下与上下文明显矛盾,否则本文中所述的所有方法均可以以任何合适的顺序进行。除非另有说明,否则本文中提供的任何和所有实例或示例性语言 (如“例如”) 的使用仅仅旨在更好地说明本发明,并且不

对本发明的范围构成限制。说明书中的语言均不应被解释为表示对本发明的实践必要的任何未要求保护的要素。

[0808] 本文中描述了本发明的一些实施方案。在阅读前述说明之后,那些实施实施方案的变化方案对于本领域普通技术人员可变得明显。

[0809] 本发明人预期技术人员在适当时采用这样的变化方案,并且本发明人希望以除本文中具体描述的之外的方式实践本发明。因此,如适用法律所允许的,本发明包括在此所附权利要求中记载的主题的所有修改方案和等同方案。此外,除非在本文中另外指明或在其他情况下与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖其所有可能变化方案中的上述要素的任何组合。本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验就能够确定本文中所述的本发明的具体实施方案的许多等同方案。这样的等同方案旨在由所附权利要求书涵盖。

序列表

<110> Dyne Therapeutics, Inc.
<120> 抗转铁蛋白受体 (TFR) 抗体及其用途
<130> D0824.70037W000
<140> 尚未分配
<141> 与此同时
<150> US 63/143,825
<151> 2021-01-30
<150> US 63/069,071
<151> 2020-08-23
<150> US 63/055,721
<151> 2020-07-23
<160> 108
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 1
[0001] Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp Tyr
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 2
Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr
1 5

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 3
Thr Leu Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 11

	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的
	<400>	4
	Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr	
	1	5 10
	<210>	5
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的
	<400>	5
	Arg Met Ser	
	1	
	<210>	6
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
[0002]	<223>	合成的
	<400>	6
	Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr	
	1	5
	<210>	7
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的
	<400>	7
	Asp Asp Tyr Met Tyr	
	1	5
	<210>	8
	<211>	17
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的
	<400>	8
	Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln	
	1	5 10 15

Asp

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 9

Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 10

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Phe
1 5 10 15

[0003]

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 11

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 12

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp
1 5

<210> 13
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 13

Glu Asn Gly
1

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

Leu Arg Arg Gly Leu Asp
1 5

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 15

Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr
1 5 10

[0004]

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 16

His Leu Glu Tyr Pro Phe
1 5

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Leu Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 18

[0005]

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Phe Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 19

Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asp Thr
1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 20

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

Asp

<210> 21

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0006]

<400> 21

Glu Thr Gly
1

<210> 22

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 22

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Leu Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 23

Ile Asp Pro Glu Ser Gly Asp Thr
1 5

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0007]

<400> 24

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

Asp

<210> 25
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 25

Glu Ser Gly
1

<210> 26
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 26

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

[0008]

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 27

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> 合成的

<400> 28

Ile Thr Phe Asp Gly Ala Asn
 1 5

<210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 29

Thr Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 30

Gln Asp Ile Ser Asn Phe
1 5

<210> 31

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 31

Tyr Thr Ser
1

[0009]

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 32

Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 33

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 34

Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ala Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 35

Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn
1 5 10

[0010]

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 37

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 38

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr
1 5

<210> 39

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 39

Phe Asp Gly
1

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 40

Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Leu Asp
1 5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 41

[0011] Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
1 5

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 42

Gly His Thr Leu Pro Tyr
1 5

<210> 43
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 43

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ala Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0012] <400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Val Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

- <220>
<223> 合成的
<400> 45
Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Cys
1 5
- <210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的
<400> 46
Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr
1 5
- <210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的
<400> 47
[0013] Ala Arg Glu Asp Tyr Tyr Pro Tyr His Gly Met Asp Tyr
1 5 10
- <210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的
<400> 48
Glu Ser Val Asp Gly Tyr Asp Asn Ser Phe
1 5 10
- <210> 49
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的
<400> 49
Arg Ala Ser
1
- <210> 50
<211> 9

	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的
	<400>	50
	Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Trp Thr	
	1 5	
	<210>	51
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的
	<400>	51
	Asp Tyr Cys Ile Asn	
	1 5	
	<210>	52
	<211>	17
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的
[0014]	<400>	52
	Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Ser Glu Arg Phe Lys	
	1 5 10 15	
	Gly	
	<210>	53
	<211>	11
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的
	<400>	53
	Glu Asp Tyr Tyr Pro Tyr His Gly Met Asp Tyr	
	1 5 10	
	<210>	54
	<211>	15
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的
	<400>	54

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Gly Tyr Asp Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 55

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 56

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
1 5

[0015]

<210> 57
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 57

Gly Ser Gly
1

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 58

Asp Tyr Tyr Pro Tyr His Gly Met Asp
1 5

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 59

Ser Glu Ser Val Asp Gly Tyr Asp Asn Ser Phe
1 5 10

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 60

Ser Ser Glu Asp Pro Trp
1 5

<210> 61

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 61

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

[0016]

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Cys Ile Asn Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Ser Glu Arg Phe
50 55 60

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

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Tyr Pro Tyr His Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 62

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 62

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Gly Tyr
20 25 30

Asp Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Ala Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

[0017]

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 63

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 64

Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 65

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 65

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Ser Glu Arg Phe
50 55 60

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

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Tyr Pro Tyr His Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0018]

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 66

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp
1 5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 67

Asp Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 68

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 68

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Ser Glu Arg Phe
50 55 60

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

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Tyr Pro Tyr His Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

[0019] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 69

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Leu Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 70
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 70

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Phe Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

[0020]

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 71
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 71

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Ser Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Leu Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 72

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

[0021]

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Leu Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 73

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ala Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asn Arg Val Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

[0022]

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 74

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 75

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0023]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 76
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 76

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ala Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asn Arg Val Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 77
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 77

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

[0024]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Ser Glu Arg Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Tyr Pro Tyr His Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 78
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 78

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Asp Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

[0025]

<210> 79

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 79

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Ser Glu Arg Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Tyr Pro Tyr His Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 80
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 80

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Asp Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

[0026]

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 81
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 81

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	195	200	205
[0027]			
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	325	330	
<210> 82			

<211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 82

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

[0028] Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 83
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0029] <400> 83

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 84
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Leu Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

[0030] Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	
				260					265					270			
	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
			275					280					285				
	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
		290					295					300					
	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
	305					310					315					320	
	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
					325					330					335		
	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
				340					345					350			
	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
			355					360					365				
	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
		370					375					380					
[0031]	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
	385					390					395					400	
	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
					405					410					415		
	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
				420					425					430			
	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
			435					440					445				
	<210>	85															
	<211>	219															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	合成的															
	<400>	85															
	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser	
				20					25					30			
	Asn	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Phe	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	

35	40	45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro 50 55 60		
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75 80		
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His 85 90 95		
Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100 105 110		
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu 115 120 125		
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe 130 135 140		
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln 145 150 155 160		
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser 165 170 175		
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu 180 185 190		
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser 195 200 205		
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210 215		
<210> 86 <211> 447 <212> PRT <213> 人工序列		
<220> <223> 合成的		
<400> 86		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp 20 25 30		
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45		

[0032]

	Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Glu	Ser	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Ser	Lys	Phe	
	50						55					60					
	Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Val	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
	Thr	Leu	Trp	Leu	Arg	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
				100					105					110			
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	
			115					120					125				
	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	
		130					135					140					
	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
	145					150					155					160	
	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
					165					170					175		
[0033]	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	
				180					185					190			
	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	
			195					200					205				
	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	
		210					215					220					
	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
	225					230					235					240	
	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
					245					250					255		
	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	
				260					265					270			
	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
			275					280					285				
	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
		290					295					300					
	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
	305					310					315					320	

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 [0034] <210> 87
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 87
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Leu Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

	100		105		110	
	Val Thr	Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	Val Phe Pro Leu			
	115	120	125			
	Ala Pro	Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys				
	130	135	140			
	Leu Val	Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser				
	145	150	155			160
	Gly Ala Leu Thr	Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser				
		165	170			175
	Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser				
		180	185			190
	Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn					
	195	200	205			
	Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His					
	210	215	220			
	Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val					
	225	230	235			240
[0035]	Phe Leu Phe Pro	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr				
		245	250			255
	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu					
		260	265			270
	Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys					
	275	280	285			
	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser					
	290	295	300			
	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys					
	305	310	315			320
	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile					
		325	330			335
	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro					
		340	345			350
	Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu					
		355	360			365
	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn					

	370	375	380	
	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser 385 390 395 400			
	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg 405 410 415			
	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu 420 425 430			
	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435 440 445			
	<210> 88			
	<211> 449			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成的			
	<400> 88			
	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln 1 5 10 15			
[0036]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly 20 25 30			
	Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45			
	Met Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ala Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu 50 55 60			
	Lys Asn Arg Val Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser 65 70 75 80			
	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys 85 90 95			
	Thr Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110			
	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe 115 120 125			
	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu 130 135 140			
	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp 145 150 155 160			

	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
		210					215					220					
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	
	225					230					235					240	
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
					245					250					255		
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				260					265					270			
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
		275						280					285				
[0037]	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
		290					295					300					
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
	305					310					315					320	
	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
					325					330					335		
	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
				340					345					350			
	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	
		355						360					365				
	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
		370					375					380					
	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
	385					390					395					400	
	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
					405					410					415		
	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
			420						425					430			

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 89
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 89

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

[0038]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

	195	200	205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210		
	<210> 90		
	<211> 214		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 90		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe 20 25 30		
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Val Lys Leu Leu Ile 35 40 45		
	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60		
[0039]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Tyr 85 90 95		
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala 100 105 110		
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly 115 120 125		
	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala 130 135 140		
	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln 145 150 155 160		
	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser 165 170 175		
	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr 180 185 190		
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser 195 200 205		

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 91
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 91

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ala Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asn Arg Val Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

[0040]

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210	215	220
Thr His Thr Cys Pro 225	Pro Cys Pro Ala Pro 230	Glu Leu Leu Gly Gly Pro 235 240
Ser Val Phe Leu Phe 245	Pro Pro Lys Pro Lys 250	Asp Thr Leu Met Ile Ser 255
Arg Thr Pro Glu Val 260	Thr Cys Val Val Val 265	Asp Val Ser His Glu Asp 270
Pro Glu Val Lys Phe 275	Asn Trp Tyr Val Asp 280	Gly Val Glu Val His Asn 285
Ala Lys Thr Lys Pro 290	Arg Glu Glu Gln Tyr 295	Asn Ser Thr Tyr Arg Val 300
Val Ser Val Leu Thr 305	Val Leu His Gln Asp 310 315	Trp Leu Asn Gly Lys Glu 320
Tyr Lys Cys Lys Val 325	Ser Asn Lys Ala Leu 330	Pro Ala Pro Ile Glu Lys 335
Thr Ile Ser Lys Ala 340	Lys Gly Gln Pro Arg 345	Glu Pro Gln Val Tyr Thr 350
Leu Pro Pro Ser Arg 355	Asp Glu Leu Thr Lys 360	Asn Gln Val Ser Leu Thr 365
Cys Leu Val Lys Gly 370	Phe Tyr Pro Ser Asp 375	Ile Ala Val Glu Trp Glu 380
Ser Asn Gly Gln Pro 385	Glu Asn Asn Tyr Lys 390	Thr Thr Pro Pro Val Leu 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser 405	Phe Phe Leu Tyr Ser 410	Lys Leu Thr Val Asp Lys 415
Ser Arg Trp Gln Gln 420	Gly Asn Val Phe Ser 425	Cys Ser Val Met His Glu 430
Ala Leu His Asn His 435	Tyr Thr Gln Lys Ser 440	Leu Ser Leu Ser Pro Gly 445
Lys		
<210>	92	
<211>	450	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	

<220>

<223> 合成的

<400> 92

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Ser Glu Arg Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Tyr Pro Tyr His Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

[0042] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
		275						280					285				
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
		290					295					300					
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330					335		
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
			340						345					350			
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		370					375					380					
[0043]	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
					405					410					415		
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
		435						440					445				
	Gly	Lys															
		450															
	<210>	93															
	<211>	218															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	合成的															
	<400>	93															
	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	
	1				5					10					15		
	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Gly	Tyr	

	20	25	30
	Asp Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro 35 40 45		
	Lys Leu Leu Ile Phe Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp 50 55 60		
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser 65 70 75 80		
	Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser 85 90 95		
	Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100 105 110		
	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln 115 120 125		
	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr 130 135 140		
[0044]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser 145 150 155 160		
	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr 165 170 175		
	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys 180 185 190		
	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro 195 200 205		
	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210 215		
	<210> 94 <211> 450 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成的		
	<400> 94		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15		
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr 20 25 30		

	Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
	Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Arg	Tyr	Ser	Glu	Arg	Phe	
	50						55					60					
	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
	Ala	Arg	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	His	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115					120					125				
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
	130						135					140					
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
[0045]	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170					175		
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
	210						215					220					
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
	225					230					235					240	
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245						250					255		
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
		275						280					285				
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	290						295					300					

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

[0046] Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 95
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 95

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Asp Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65	70	75	80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser	85	90	95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	100	105	110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln	115	120	125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr	130	135	140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser	145	150	155
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr	165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys	180	185	190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro	195	200	205
[0047]			
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210	215	
<210> 96			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 96			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	65	70	75
			80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
100 105

<210> 97

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 97

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
50 55 60

[0048]

Gln Asp Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Leu Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

	195	200	205	
	Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
	210	215	220	
	Thr			
	225			
	<210> 98			
	<211> 225			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成的			
	<400> 98			
	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala			
	1	5	10	15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp			
		20	25	30
	Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
		35	40	45
[0049]	Gly Trp Ile Asp Pro Glu Ser Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe			
	50	55	60	
	Gln Asp Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr			
	65	70	75	80
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
		85	90	95
	Thr Leu Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
		100	105	110
	Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
		115	120	125
	Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
		130	135	140
	Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
	145	150	155	160
	Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
		165	170	175
	Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
		180	185	190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr
 225

<210> 99
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 99

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

[0050]
 Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Leu Trp Leu Arg Arg Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

	180	185	190
	Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn 195 200 205		
	Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His 210 215 220		
	Thr 225		
	<210> 100 <211> 227 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成的		
	<400> 100		
	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln 1 5 10 15		
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly 20 25 30		
[0051]	Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45		
	Met Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ala Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu 50 55 60		
	Lys Asn Arg Val Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser 65 70 75 80		
	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Thr Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110		
	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe 115 120 125		
	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu 130 135 140		
	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp 145 150 155 160		
	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu 165 170 175		

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr
 225
 <210> 101
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 101
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 [0052]
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ala Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asn Arg Val Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

	165	170	175
	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser 180 185 190		
	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro 195 200 205		
	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys 210 215 220		
	Thr His Thr 225		
	<210> 102 <211> 228 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成的		
	<400> 102		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15		
[0053]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr 20 25 30		
	Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45		
	Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Ser Glu Arg Phe 50 55 60		
	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Ala Arg Glu Asp Tyr Tyr Pro Tyr His Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln 100 105 110		
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val 115 120 125		
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala 130 135 140		
	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser 145 150 155 160		

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr
 225
 <210> 103
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 103
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 [0054] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Ser Glu Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asp Tyr Tyr Pro Tyr His Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr
225

<210> 104
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 104

[0055]

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 105
<211> 760
<212> PRT
<213> 智人

<400> 105

Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
20 25 30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala
35 40 45

Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys Arg Cys Ser Gly
50 55 60

Ser Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Val Phe Phe Leu Ile Gly
65 70 75 80

	Phe	Met	Ile	Gly	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Cys	Lys	Gly	Val	Glu	Pro	Lys	Thr	
					85					90					95		
	Glu	Cys	Glu	Arg	Leu	Ala	Gly	Thr	Glu	Ser	Pro	Val	Arg	Glu	Glu	Pro	
				100					105					110			
	Gly	Glu	Asp	Phe	Pro	Ala	Ala	Arg	Arg	Leu	Tyr	Trp	Asp	Asp	Leu	Lys	
			115					120					125				
	Arg	Lys	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Ser	Thr	Asp	Phe	Thr	Gly	Thr	Ile	
		130					135					140					
	Lys	Leu	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Tyr	Val	Pro	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Gln	
	145					150					155					160	
	Lys	Asp	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Tyr	Val	Glu	Asn	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe	
				165						170					175		
	Lys	Leu	Ser	Lys	Val	Trp	Arg	Asp	Gln	His	Phe	Val	Lys	Ile	Gln	Val	
			180					185						190			
	Lys	Asp	Ser	Ala	Gln	Asn	Ser	Val	Ile	Ile	Val	Asp	Lys	Asn	Gly	Arg	
			195					200					205				
[0056]	Leu	Val	Tyr	Leu	Val	Glu	Asn	Pro	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Tyr	Ser	Lys	
	210						215					220					
	Ala	Ala	Thr	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Val	His	Ala	Asn	Phe	Gly	Thr	Lys	
	225					230					235					240	
	Lys	Asp	Phe	Glu	Asp	Leu	Tyr	Thr	Pro	Val	Asn	Gly	Ser	Ile	Val	Ile	
				245						250					255		
	Val	Arg	Ala	Gly	Lys	Ile	Thr	Phe	Ala	Glu	Lys	Val	Ala	Asn	Ala	Glu	
				260					265					270			
	Ser	Leu	Asn	Ala	Ile	Gly	Val	Leu	Ile	Tyr	Met	Asp	Gln	Thr	Lys	Phe	
			275					280					285				
	Pro	Ile	Val	Asn	Ala	Glu	Leu	Ser	Phe	Phe	Gly	His	Ala	His	Leu	Gly	
		290					295					300					
	Thr	Gly	Asp	Pro	Tyr	Thr	Pro	Gly	Phe	Pro	Ser	Phe	Asn	His	Thr	Gln	
	305					310					315					320	
	Phe	Pro	Pro	Ser	Arg	Ser	Ser	Gly	Leu	Pro	Asn	Ile	Pro	Val	Gln	Thr	
				325						330					335		
	Ile	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	Leu	Phe	Gly	Asn	Met	Glu	Gly	Asp	
				340					345					350			

	Cys	Pro	Ser	Asp	Trp	Lys	Thr	Asp	Ser	Thr	Cys	Arg	Met	Val	Thr	Ser
			355					360					365			
	Glu	Ser	Lys	Asn	Val	Lys	Leu	Thr	Val	Ser	Asn	Val	Leu	Lys	Glu	Ile
	370						375					380				
	Lys	Ile	Leu	Asn	Ile	Phe	Gly	Val	Ile	Lys	Gly	Phe	Val	Glu	Pro	Asp
	385					390					395					400
	His	Tyr	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gln	Arg	Asp	Ala	Trp	Gly	Pro	Gly	Ala
					405					410					415	
	Ala	Lys	Ser	Gly	Val	Gly	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gln	Met
				420					425					430		
	Phe	Ser	Asp	Met	Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Phe	Gln	Pro	Ser	Arg	Ser	Ile
			435					440					445			
	Ile	Phe	Ala	Ser	Trp	Ser	Ala	Gly	Asp	Phe	Gly	Ser	Val	Gly	Ala	Thr
	450						455					460				
	Glu	Trp	Leu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Lys	Ala	Phe	Thr
	465					470					475					480
[0057]	Tyr	Ile	Asn	Leu	Asp	Lys	Ala	Val	Leu	Gly	Thr	Ser	Asn	Phe	Lys	Val
					485					490					495	
	Ser	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ile	Glu	Lys	Thr	Met	Gln	Asn
				500					505					510		
	Val	Lys	His	Pro	Val	Thr	Gly	Gln	Phe	Leu	Tyr	Gln	Asp	Ser	Asn	Trp
			515					520					525			
	Ala	Ser	Lys	Val	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu	Asp	Asn	Ala	Ala	Phe	Pro	Phe
	530						535					540				
	Leu	Ala	Tyr	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Val	Ser	Phe	Cys	Phe	Cys	Glu	Asp
	545					550					555					560
	Thr	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr	Thr	Met	Asp	Thr	Tyr	Lys	Glu	Leu
					565					570					575	
	Ile	Glu	Arg	Ile	Pro	Glu	Leu	Asn	Lys	Val	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu
				580					585					590		
	Val	Ala	Gly	Gln	Phe	Val	Ile	Lys	Leu	Thr	His	Asp	Val	Glu	Leu	Asn
			595					600					605			
	Leu	Asp	Tyr	Glu	Arg	Tyr	Asn	Ser	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Val	Arg	Asp
	610						615					620				

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln
 625 630 635 640
 Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu
 645 650 655
 Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys
 660 665 670
 Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro
 675 680 685
 Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser
 690 695 700
 Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys
 705 710 715 720
 Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala
 725 730 735
 Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp
 740 745 750
 Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
 755 760
 [0058]
 <210> 106
 <211> 760
 <212> PRT
 <213> 恒河猴 (Macaca mulatta)
 <400> 106
 Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
 1 5 10 15
 Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
 20 25 30
 Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Gly Val Asp Glu Glu Glu Asn Thr
 35 40 45
 Asp Asn Asn Thr Lys Pro Asn Gly Thr Lys Pro Lys Arg Cys Gly Gly
 50 55 60
 Asn Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Ile Phe Phe Leu Ile Gly
 65 70 75 80
 Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr
 85 90 95
 Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Ala Arg Glu Glu Pro

	100	105	110
	Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ala Pro Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys 115 120 125		
	Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Thr Thr Asp Phe Thr Ser Thr Ile 130 135 140		
	Lys Leu Leu Asn Glu Asn Leu Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln 145 150 155 160		
	Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe 165 170 175		
	Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val 180 185 190		
	Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Gly 195 200 205		
	Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys 210 215 220		
	Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys 225 230 235 240		
[0059]	Lys Asp Phe Glu Asp Leu Asp Ser Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile 245 250 255		
	Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu 260 265 270		
	Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe 275 280 285		
	Pro Ile Val Lys Ala Asp Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly 290 295 300		
	Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln 305 310 315 320		
	Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr 325 330 335		
	Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp 340 345 350		
	Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Lys Met Val Thr Ser 355 360 365		
	Glu Asn Lys Ser Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Thr		

370	375	380
Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp 385 390 395 400		
His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala 405 410 415		
Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met 420 425 430		
Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile 435 440 445		
Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr 450 455 460		
Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr 465 470 475 480		
Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val 485 490 495		
Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asp 500 505 510		
[0060]		
Val Lys His Pro Val Thr Gly Arg Ser Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp 515 520 525		
Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe 530 535 540		
Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp 545 550 555 560		
Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu 565 570 575		
Val Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu 580 585 590		
Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Thr Glu Leu Asn 595 600 605		
Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Leu Phe Leu Arg Asp 610 615 620		
Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Val Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln 625 630 635 640		
Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu		

	645	650	655
	Thr Thr Asp Phe Arg Asn Ala Glu Lys Arg Asp Lys Phe Val Met Lys 660 665 670		
	Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Pro 675 680 685		
	Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser 690 695 700		
	Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Leu Glu Ser Leu Lys Leu Arg Arg 705 710 715 720		
	Gln Asn Asn Ser Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala 725 730 735		
	Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp 740 745 750		
	Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe 755 760		
[0061]	<210> 107		
	<211> 760		
	<212> PRT		
	<213> 食蟹猴 (Macaca fascicularis)		
	<400> 107		
	Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu 1 5 10 15		
	Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp 20 25 30		
	Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Gly Val Asp Glu Glu Glu Asn Thr 35 40 45		
	Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Gly Thr Lys Pro Lys Arg Cys Gly Gly 50 55 60		
	Asn Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Ile Phe Phe Leu Ile Gly 65 70 75 80		
	Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr 85 90 95		
	Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Ala Arg Glu Glu Pro 100 105 110		
	Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ala Pro Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys 115 120 125		

	Arg	Lys	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Thr	Thr	Asp	Phe	Thr	Ser	Thr	Ile	
	130						135					140					
	Lys	Leu	Leu	Asn	Glu	Asn	Leu	Tyr	Val	Pro	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Gln	
	145					150					155					160	
	Lys	Asp	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Tyr	Ile	Glu	Asn	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe	
				165						170					175		
	Lys	Leu	Ser	Lys	Val	Trp	Arg	Asp	Gln	His	Phe	Val	Lys	Ile	Gln	Val	
				180					185					190			
	Lys	Asp	Ser	Ala	Gln	Asn	Ser	Val	Ile	Ile	Val	Asp	Lys	Asn	Gly	Gly	
			195					200					205				
	Leu	Val	Tyr	Leu	Val	Glu	Asn	Pro	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Tyr	Ser	Lys	
	210						215					220					
	Ala	Ala	Thr	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Val	His	Ala	Asn	Phe	Gly	Thr	Lys	
	225					230					235					240	
	Lys	Asp	Phe	Glu	Asp	Leu	Asp	Ser	Pro	Val	Asn	Gly	Ser	Ile	Val	Ile	
				245						250					255		
[0062]	Val	Arg	Ala	Gly	Lys	Ile	Thr	Phe	Ala	Glu	Lys	Val	Ala	Asn	Ala	Glu	
				260					265					270			
	Ser	Leu	Asn	Ala	Ile	Gly	Val	Leu	Ile	Tyr	Met	Asp	Gln	Thr	Lys	Phe	
			275					280					285				
	Pro	Ile	Val	Lys	Ala	Asp	Leu	Ser	Phe	Phe	Gly	His	Ala	His	Leu	Gly	
	290						295					300					
	Thr	Gly	Asp	Pro	Tyr	Thr	Pro	Gly	Phe	Pro	Ser	Phe	Asn	His	Thr	Gln	
	305					310					315					320	
	Phe	Pro	Pro	Ser	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Pro	Asn	Ile	Pro	Val	Gln	Thr	
				325						330					335		
	Ile	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	Leu	Phe	Gly	Asn	Met	Glu	Gly	Asp	
				340					345					350			
	Cys	Pro	Ser	Asp	Trp	Lys	Thr	Asp	Ser	Thr	Cys	Lys	Met	Val	Thr	Ser	
			355					360					365				
	Glu	Asn	Lys	Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Val	Ser	Asn	Val	Leu	Lys	Glu	Thr	
	370						375					380					
	Lys	Ile	Leu	Asn	Ile	Phe	Gly	Val	Ile	Lys	Gly	Phe	Val	Glu	Pro	Asp	
	385					390					395					400	

	His	Tyr	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gln	Arg	Asp	Ala	Trp	Gly	Pro	Gly	Ala	
					405					410						415	
	Ala	Lys	Ser	Ser	Val	Gly	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gln	Met	
				420					425						430		
	Phe	Ser	Asp	Met	Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Phe	Gln	Pro	Ser	Arg	Ser	Ile	
			435					440						445			
	Ile	Phe	Ala	Ser	Trp	Ser	Ala	Gly	Asp	Phe	Gly	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	
		450					455					460					
	Glu	Trp	Leu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Lys	Ala	Phe	Thr	
	465					470					475					480	
	Tyr	Ile	Asn	Leu	Asp	Lys	Ala	Val	Leu	Gly	Thr	Ser	Asn	Phe	Lys	Val	
					485					490					495		
	Ser	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ile	Glu	Lys	Thr	Met	Gln	Asp	
				500					505						510		
	Val	Lys	His	Pro	Val	Thr	Gly	Arg	Ser	Leu	Tyr	Gln	Asp	Ser	Asn	Trp	
			515					520					525				
[0063]	Ala	Ser	Lys	Val	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu	Asp	Asn	Ala	Ala	Phe	Pro	Phe	
		530					535					540					
	Leu	Ala	Tyr	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Val	Ser	Phe	Cys	Phe	Cys	Glu	Asp	
	545					550					555					560	
	Thr	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr	Thr	Met	Asp	Thr	Tyr	Lys	Glu	Leu	
					565					570					575		
	Val	Glu	Arg	Ile	Pro	Glu	Leu	Asn	Lys	Val	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	
				580					585						590		
	Val	Ala	Gly	Gln	Phe	Val	Ile	Lys	Leu	Thr	His	Asp	Thr	Glu	Leu	Asn	
			595					600					605				
	Leu	Asp	Tyr	Glu	Arg	Tyr	Asn	Ser	Gln	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Arg	Asp	
		610					615					620					
	Leu	Asn	Gln	Tyr	Arg	Ala	Asp	Val	Lys	Glu	Met	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	
	625					630					635					640	
	Trp	Leu	Tyr	Ser	Ala	Arg	Gly	Asp	Phe	Phe	Arg	Ala	Thr	Ser	Arg	Leu	
					645					650					655		
	Thr	Thr	Asp	Phe	Arg	Asn	Ala	Glu	Lys	Arg	Asp	Lys	Phe	Val	Met	Lys	
				660					665					670			

	Lys	Leu	Asn	Asp	Arg	Val	Met	Arg	Val	Glu	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Ser	Pro
			675					680					685			
	Tyr	Val	Ser	Pro	Lys	Glu	Ser	Pro	Phe	Arg	His	Val	Phe	Trp	Gly	Ser
	690						695					700				
	Gly	Ser	His	Thr	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Ser	Leu	Lys	Leu	Arg	Arg
	705					710					715					720
	Gln	Asn	Asn	Ser	Ala	Phe	Asn	Glu	Thr	Leu	Phe	Arg	Asn	Gln	Leu	Ala
					725					730						735
	Leu	Ala	Thr	Trp	Thr	Ile	Gln	Gly	Ala	Ala	Asn	Ala	Leu	Ser	Gly	Asp
				740					745					750		
	Val	Trp	Asp	Ile	Asp	Asn	Glu	Phe								
			755					760								
	<210>	108														
	<211>	763														
	<212>	PRT														
	<213>	小家鼠 (mus musculus)														
	<400>	108														
[0064]	Met	Met	Asp	Gln	Ala	Arg	Ser	Ala	Phe	Ser	Asn	Leu	Phe	Gly	Gly	Glu
	1				5					10					15	
	Pro	Leu	Ser	Tyr	Thr	Arg	Phe	Ser	Leu	Ala	Arg	Gln	Val	Asp	Gly	Asp
				20					25					30		
	Asn	Ser	His	Val	Glu	Met	Lys	Leu	Ala	Ala	Asp	Glu	Glu	Glu	Asn	Ala
				35				40					45			
	Asp	Asn	Asn	Met	Lys	Ala	Ser	Val	Arg	Lys	Pro	Lys	Arg	Phe	Asn	Gly
		50					55					60				
	Arg	Leu	Cys	Phe	Ala	Ala	Ile	Ala	Leu	Val	Ile	Phe	Phe	Leu	Ile	Gly
	65					70					75					80
	Phe	Met	Ser	Gly	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Cys	Lys	Arg	Val	Glu	Gln	Lys	Glu
					85					90					95	
	Glu	Cys	Val	Lys	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Glu	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Thr
				100					105					110		
	Met	Glu	Thr	Glu	Asp	Val	Pro	Thr	Ser	Ser	Arg	Leu	Tyr	Trp	Ala	Asp
				115				120					125			
	Leu	Lys	Thr	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Asn	Ser	Ile	Glu	Phe	Ala	Asp
		130						135					140			

	Thr	Ile	Lys	Gln	Leu	Ser	Gln	Asn	Thr	Tyr	Thr	Pro	Arg	Glu	Ala	Gly
	145					150					155					160
	Ser	Gln	Lys	Asp	Glu	Ser	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Glu	Asn	Gln	Phe	His
				165						170					175	
	Glu	Phe	Lys	Phe	Ser	Lys	Val	Trp	Arg	Asp	Glu	His	Tyr	Val	Lys	Ile
				180					185					190		
	Gln	Val	Lys	Ser	Ser	Ile	Gly	Gln	Asn	Met	Val	Thr	Ile	Val	Gln	Ser
			195					200					205			
	Asn	Gly	Asn	Leu	Asp	Pro	Val	Glu	Ser	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Ala	Phe
	210						215					220				
	Ser	Lys	Pro	Thr	Glu	Val	Ser	Gly	Lys	Leu	Val	His	Ala	Asn	Phe	Gly
	225					230					235					240
	Thr	Lys	Lys	Asp	Phe	Glu	Glu	Leu	Ser	Tyr	Ser	Val	Asn	Gly	Ser	Leu
				245						250					255	
	Val	Ile	Val	Arg	Ala	Gly	Glu	Ile	Thr	Phe	Ala	Glu	Lys	Val	Ala	Asn
				260					265					270		
[0065]	Ala	Gln	Ser	Phe	Asn	Ala	Ile	Gly	Val	Leu	Ile	Tyr	Met	Asp	Lys	Asn
			275					280					285			
	Lys	Phe	Pro	Val	Val	Glu	Ala	Asp	Leu	Ala	Leu	Phe	Gly	His	Ala	His
		290					295					300				
	Leu	Gly	Thr	Gly	Asp	Pro	Tyr	Thr	Pro	Gly	Phe	Pro	Ser	Phe	Asn	His
	305					310					315					320
	Thr	Gln	Phe	Pro	Pro	Ser	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Pro	Asn	Ile	Pro	Val
				325						330					335	
	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	Leu	Phe	Gly	Lys	Met	Glu
				340					345					350		
	Gly	Ser	Cys	Pro	Ala	Arg	Trp	Asn	Ile	Asp	Ser	Ser	Cys	Lys	Leu	Glu
			355					360					365			
	Leu	Ser	Gln	Asn	Gln	Asn	Val	Lys	Leu	Ile	Val	Lys	Asn	Val	Leu	Lys
		370					375					380				
	Glu	Arg	Arg	Ile	Leu	Asn	Ile	Phe	Gly	Val	Ile	Lys	Gly	Tyr	Glu	Glu
	385					390					395					400
	Pro	Asp	Arg	Tyr	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gln	Arg	Asp	Ala	Leu	Gly	Ala
				405						410					415	

	Gly	Val	Ala	Ala	Lys	Ser	Ser	Val	Gly	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu	
				420					425					430			
	Ala	Gln	Val	Phe	Ser	Asp	Met	Ile	Ser	Lys	Asp	Gly	Phe	Arg	Pro	Ser	
			435					440					445				
	Arg	Ser	Ile	Ile	Phe	Ala	Ser	Trp	Thr	Ala	Gly	Asp	Phe	Gly	Ala	Val	
		450					455					460					
	Gly	Ala	Thr	Glu	Trp	Leu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Lys	
	465					470					475					480	
	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ile	Asn	Leu	Asp	Lys	Val	Val	Leu	Gly	Thr	Ser	Asn	
					485					490					495		
	Phe	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Lys	Ile	
				500					505					510			
	Met	Gln	Asp	Val	Lys	His	Pro	Val	Asp	Gly	Lys	Ser	Leu	Tyr	Arg	Asp	
			515					520					525				
	Ser	Asn	Trp	Ile	Ser	Lys	Val	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Asp	Asn	Ala	Ala	
		530					535					540					
[0066]	Tyr	Pro	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Val	Ser	Phe	Cys	Phe	
	545					550					555					560	
	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Thr	Tyr	
					565					570					575		
	Glu	Ala	Leu	Thr	Gln	Lys	Val	Pro	Gln	Leu	Asn	Gln	Met	Val	Arg	Thr	
				580					585					590			
	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Gly	Gln	Leu	Ile	Ile	Lys	Leu	Thr	His	Asp	Val	
			595					600					605				
	Glu	Leu	Asn	Leu	Asp	Tyr	Glu	Met	Tyr	Asn	Ser	Lys	Leu	Leu	Ser	Phe	
		610					615					620					
	Met	Lys	Asp	Leu	Asn	Gln	Phe	Lys	Thr	Asp	Ile	Arg	Asp	Met	Gly	Leu	
		625				630					635					640	
	Ser	Leu	Gln	Trp	Leu	Tyr	Ser	Ala	Arg	Gly	Asp	Tyr	Phe	Arg	Ala	Thr	
					645					650					655		
	Ser	Arg	Leu	Thr	Thr	Asp	Phe	His	Asn	Ala	Glu	Lys	Thr	Asn	Arg	Phe	
				660					665					670			
	Val	Met	Arg	Glu	Ile	Asn	Asp	Arg	Ile	Met	Lys	Val	Glu	Tyr	His	Phe	
			675					680					685				

	Leu	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	Pro	Arg	Glu	Ser	Pro	Phe	Arg	His	Ile	Phe
	690						695					700				
	Trp	Gly	Ser	Gly	Ser	His	Thr	Leu	Ser	Ala	Leu	Val	Glu	Asn	Leu	Lys
	705					710					715					720
[0067]	Leu	Arg	Gln	Lys	Asn	Ile	Thr	Ala	Phe	Asn	Glu	Thr	Leu	Phe	Arg	Asn
					725					730					735	
	Gln	Leu	Ala	Leu	Ala	Thr	Trp	Thr	Ile	Gln	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Leu
				740					745					750		
	Ser	Gly	Asp	Ile	Trp	Asn	Ile	Asp	Asn	Glu	Phe					
			755					760								

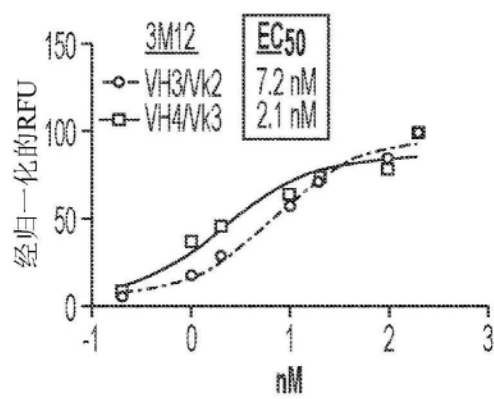


图1A

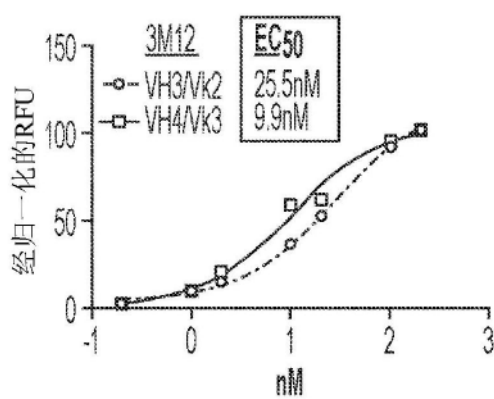


图1B

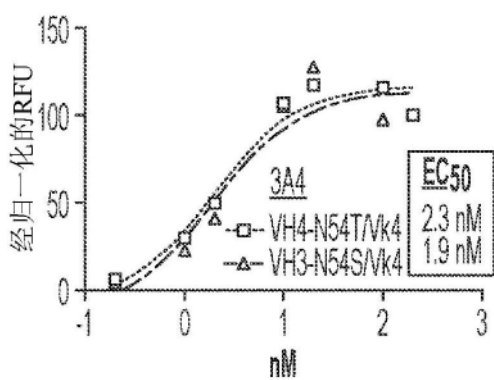


图1C

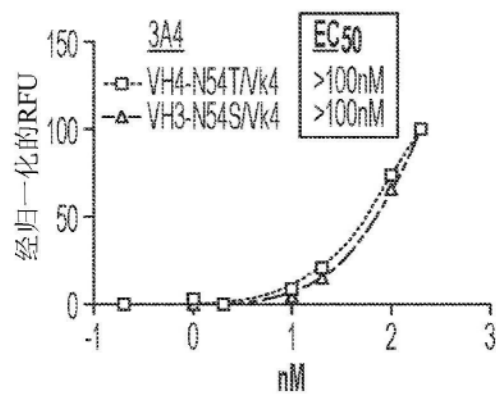


图1D

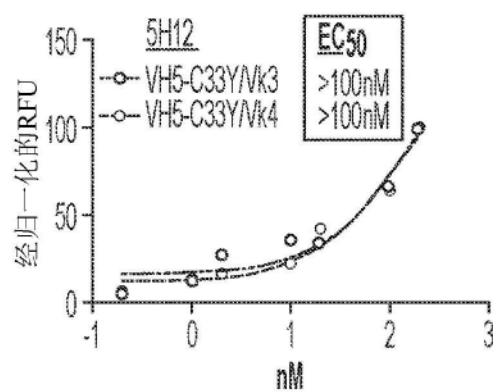


图1E

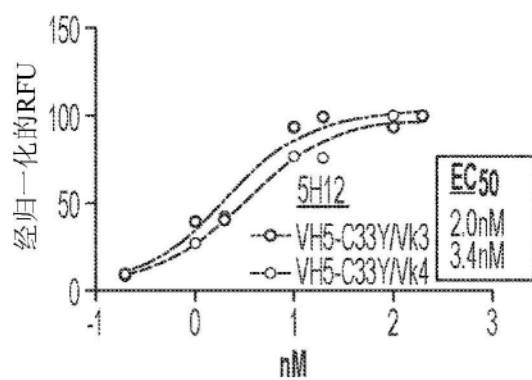


图1F

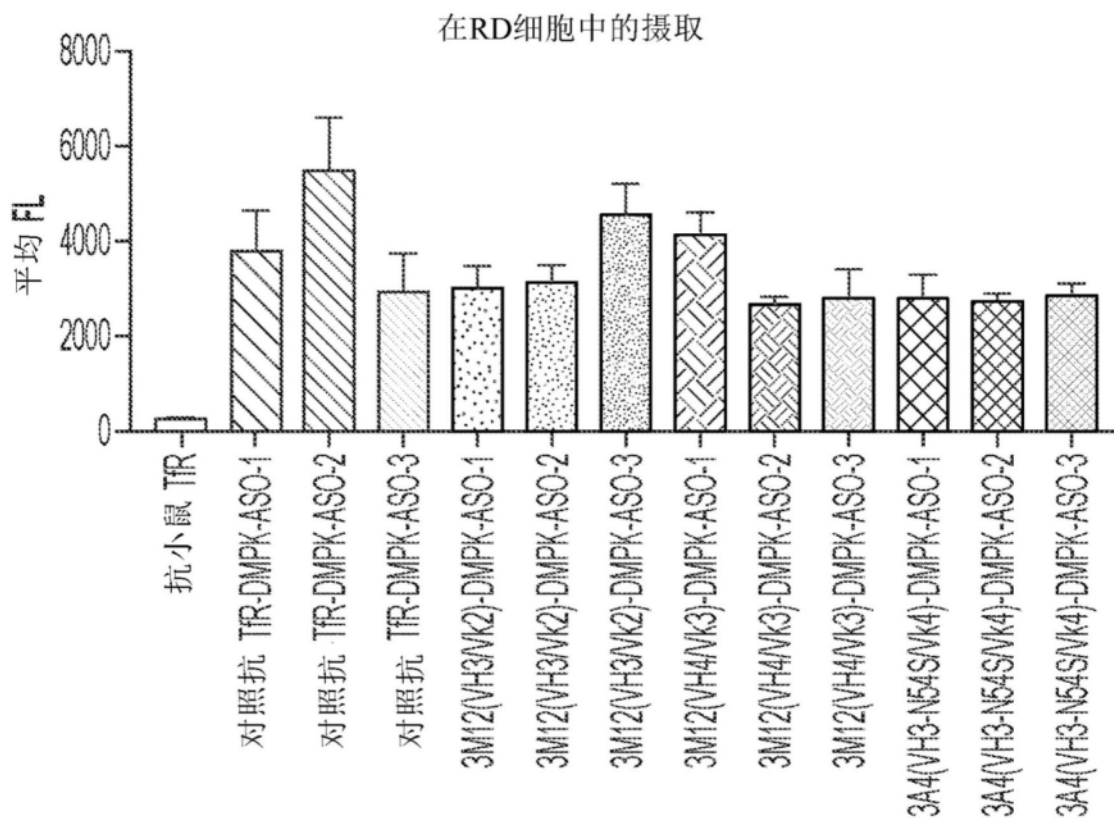


图2

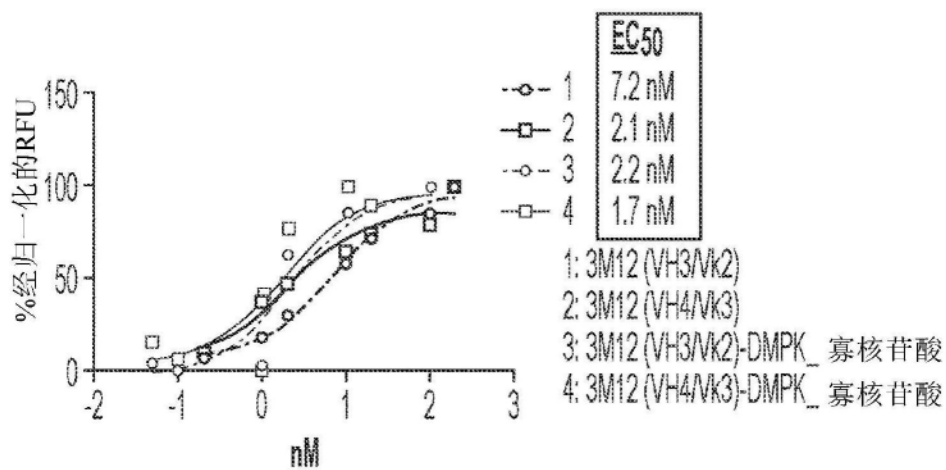


图3A

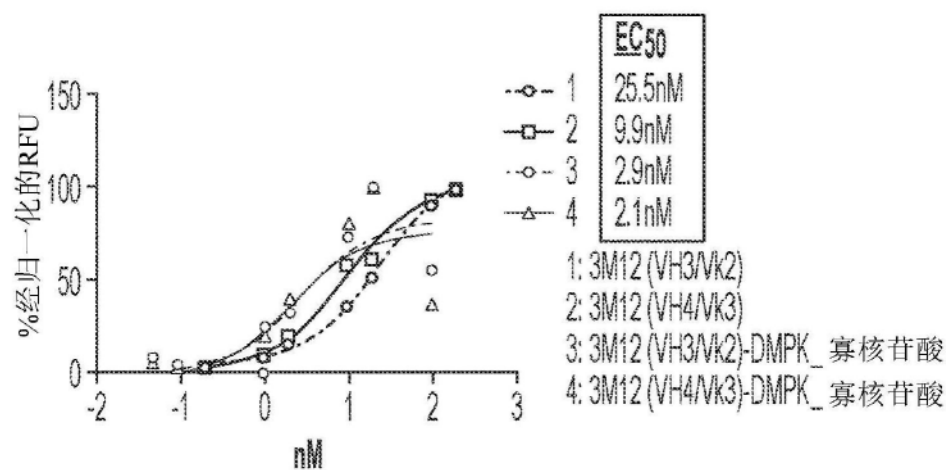


图3B

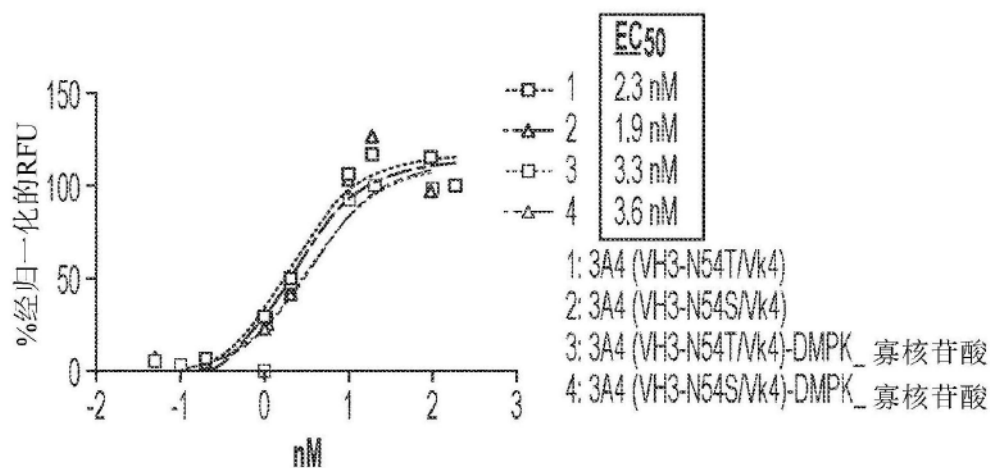


图3C

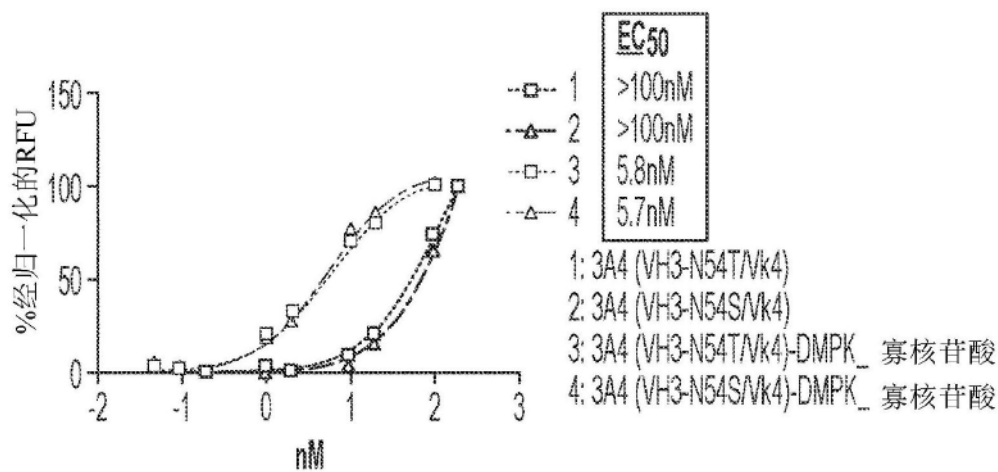


图3D

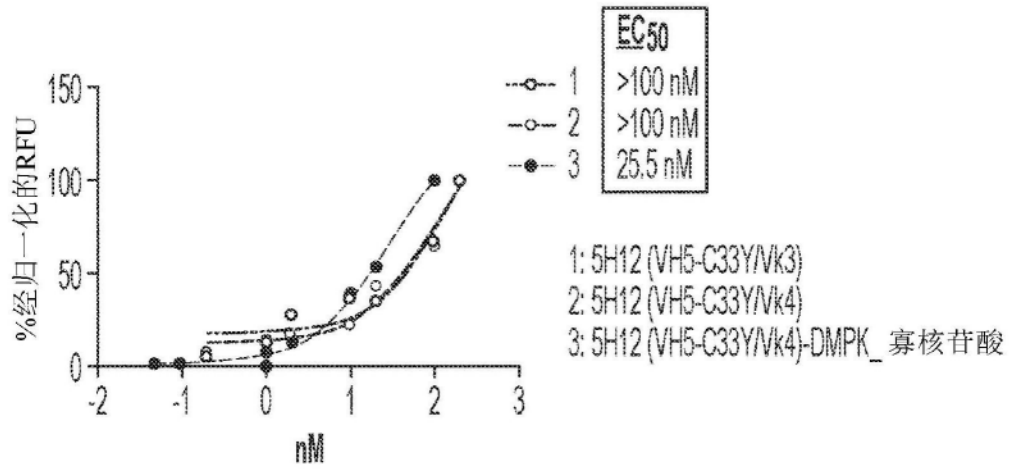


图3E

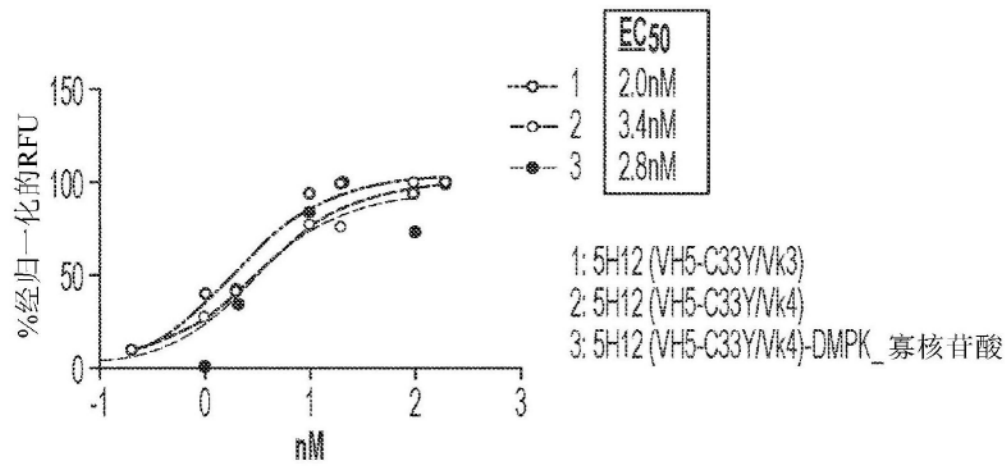


图3F

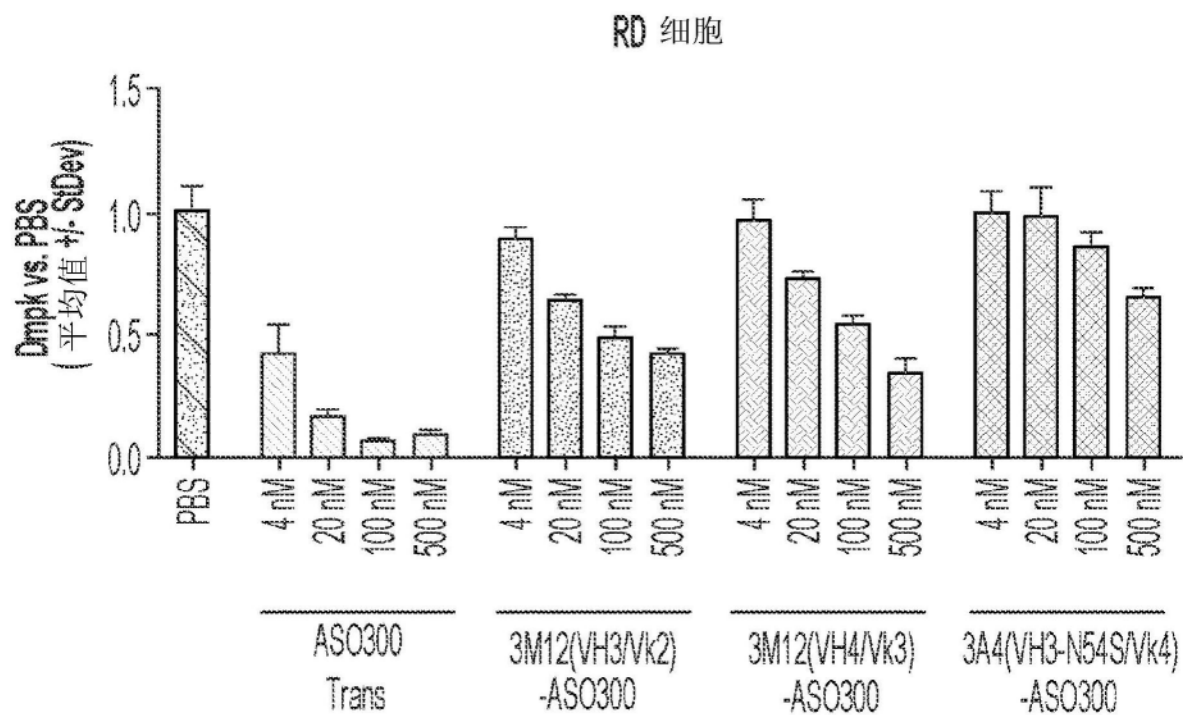


图4

72小时时接头的血清稳定性> 75%

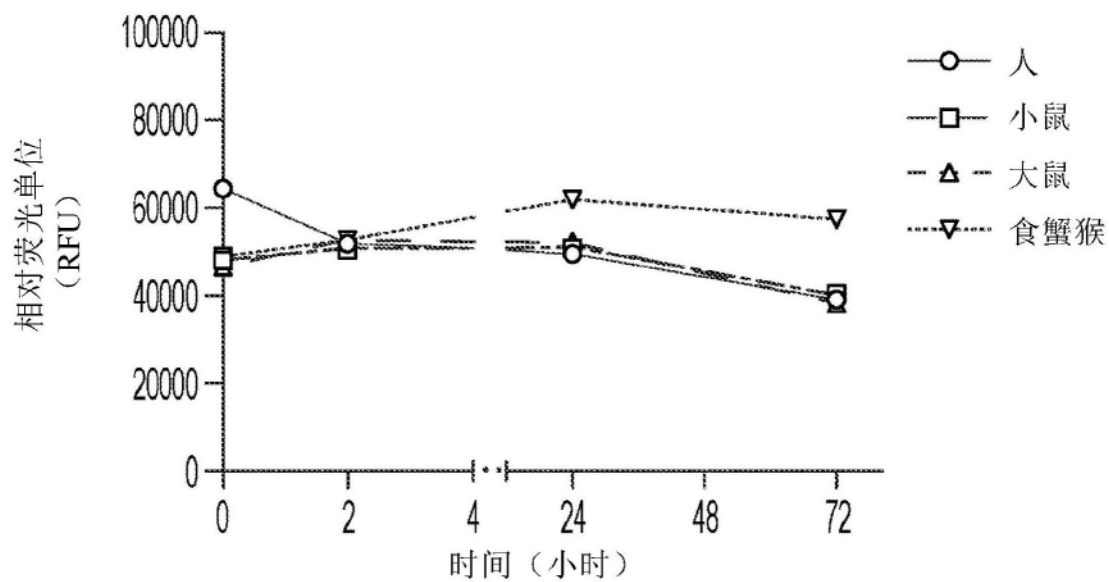


图5

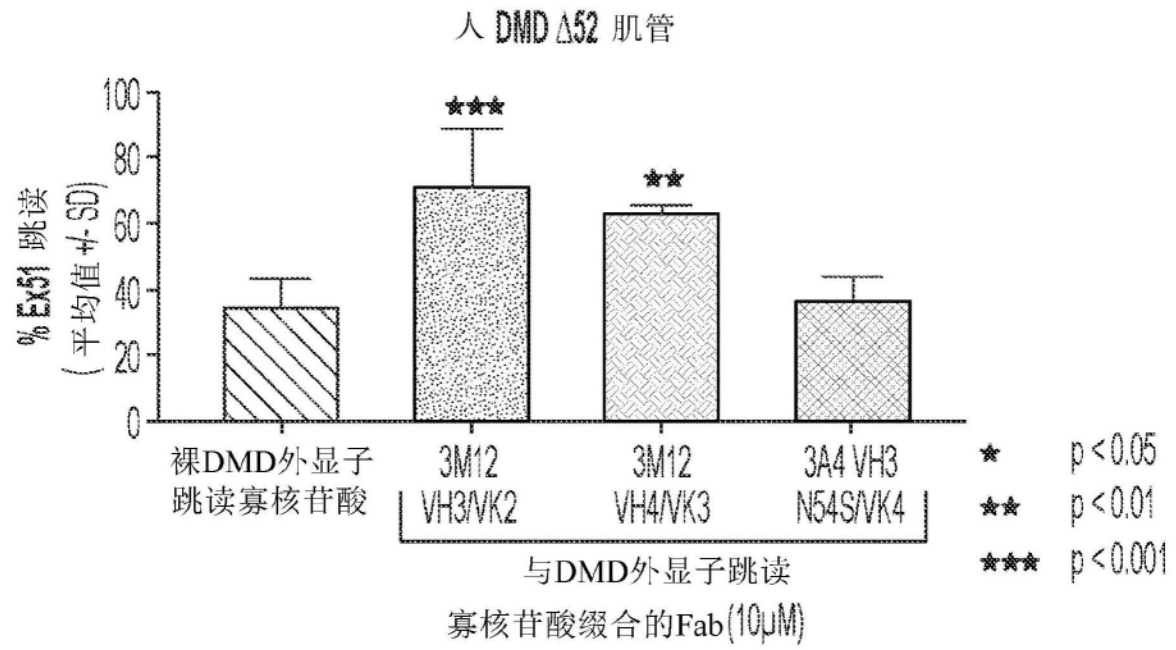


图6

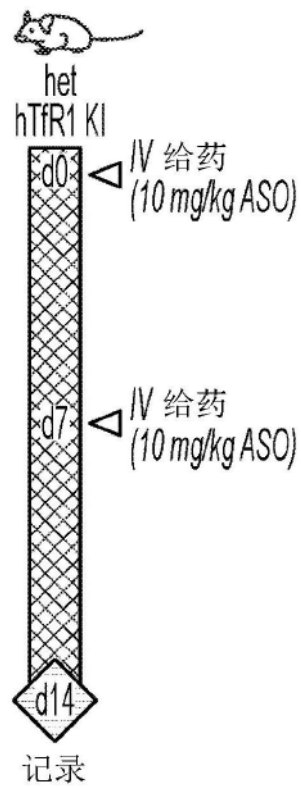


图7A

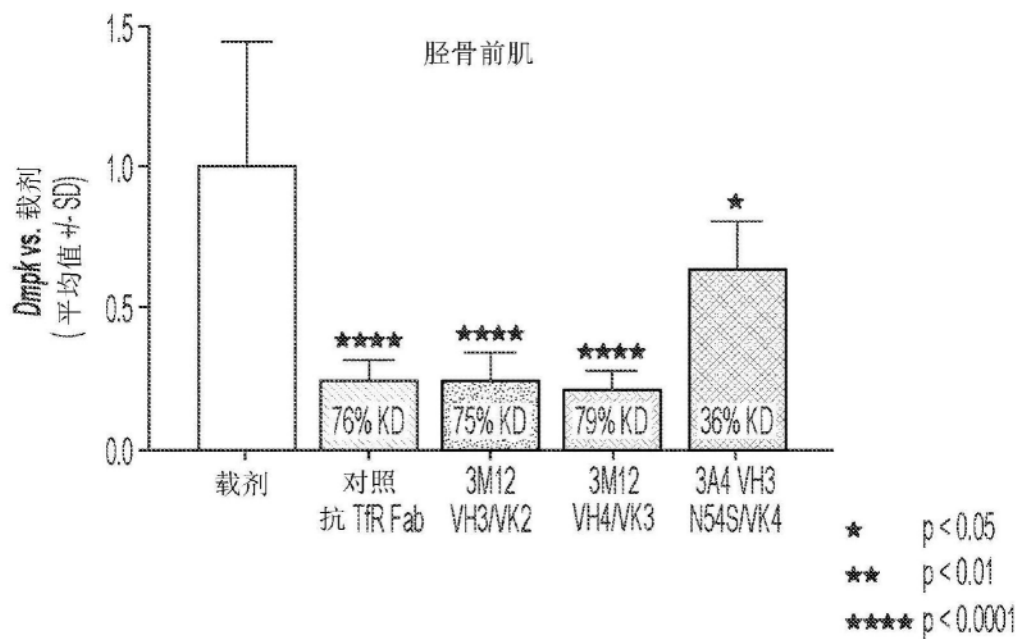


图7B

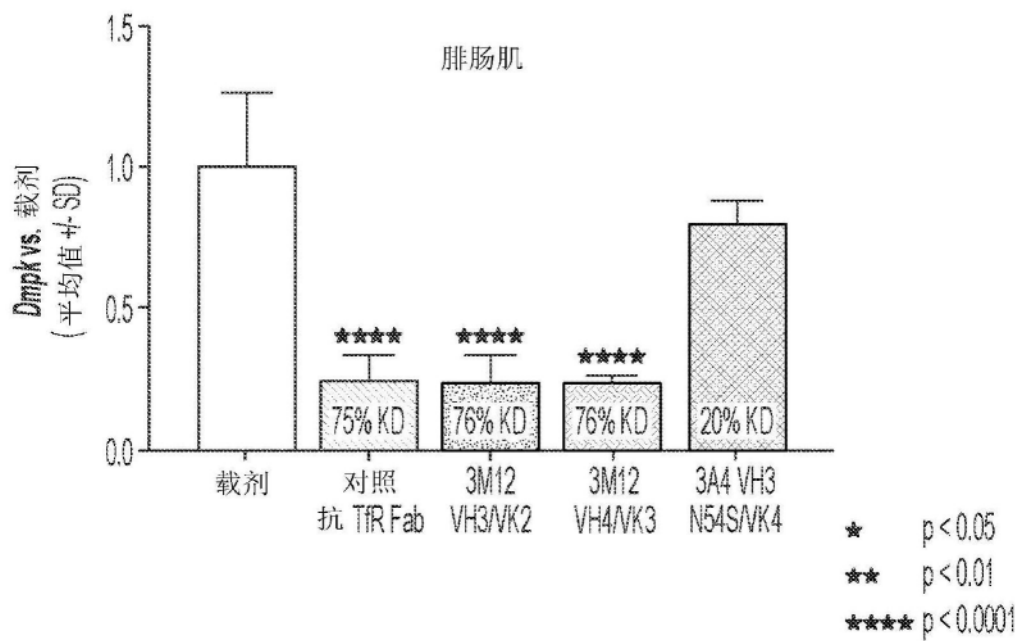


图7C

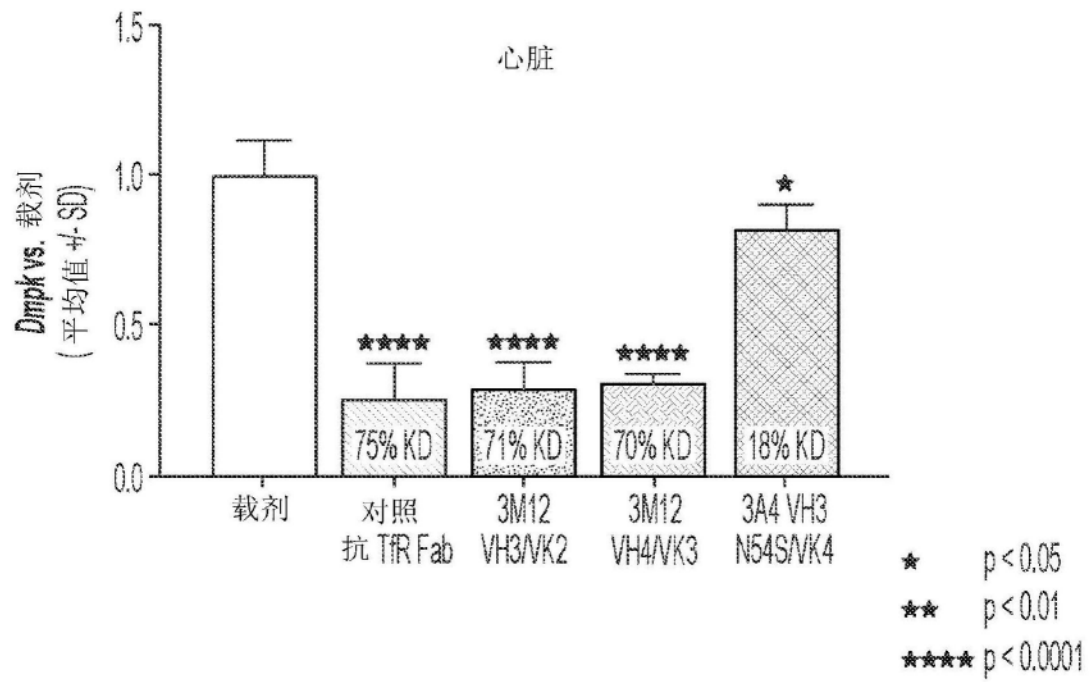


图7D

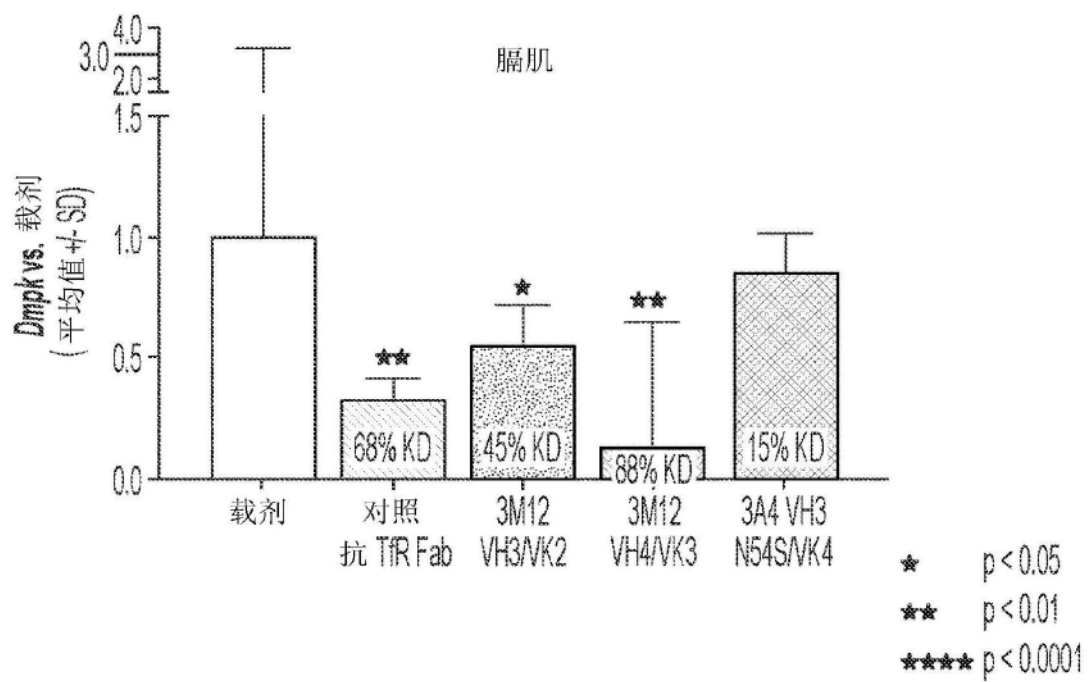


图7E

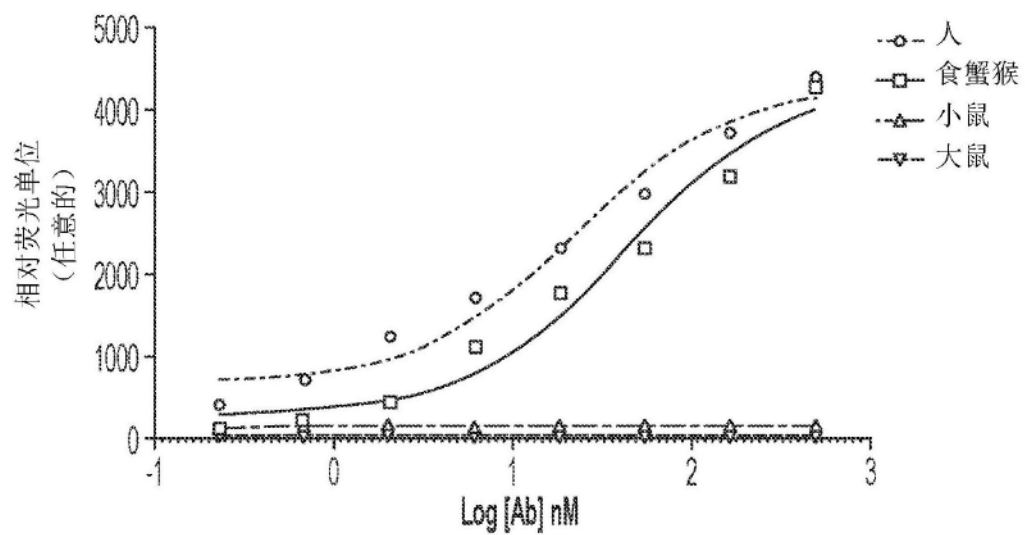


图8

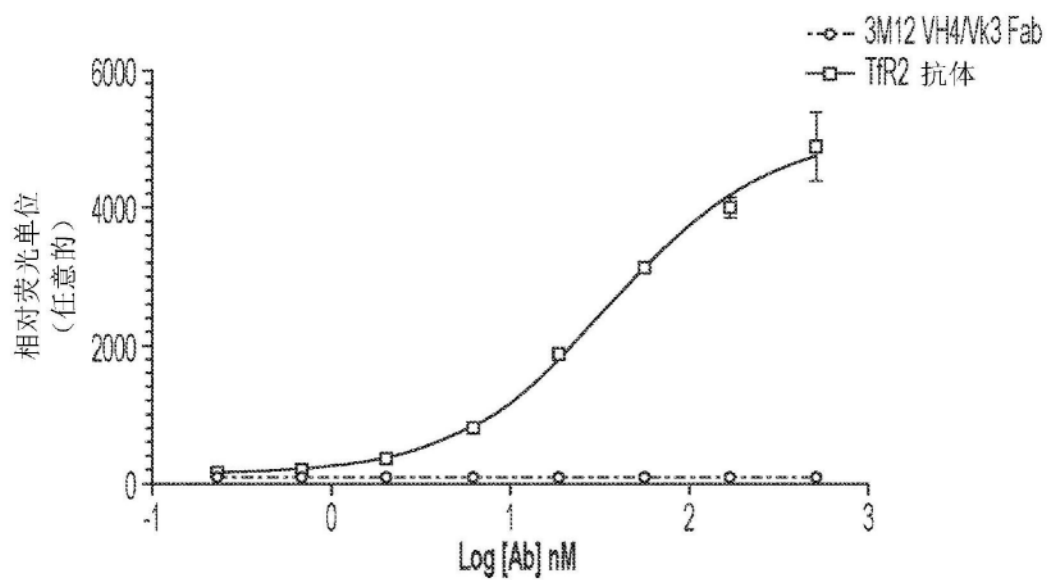


图9

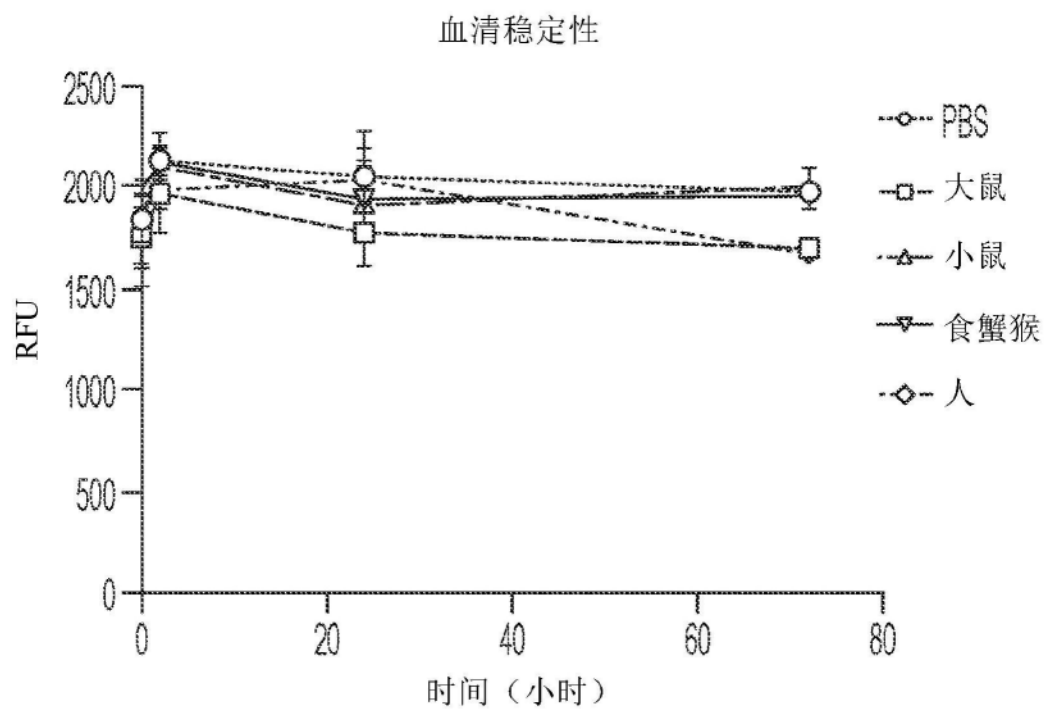


图10