(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115996945 A
(43)申请公布日 2023.04.21

(21)申请号 202180045415.9
(22)申请日 2021.05.14
(30)优先权数据
20174830.8 2020.05.14 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.12.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/062874 2021.05.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/229076 EN 2021.11.18
(71)申请人 分子合作伙伴股份公司
地址 瑞士苏黎世-施利伦
(72)发明人 V·P·卡拉波罗 N·里加蒙蒂
C·多姆克 A·C·施莱格尔
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 李程达
(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)

权利要求书2页 说明书43页
序列表60页 附图9页

(54)发明名称

重组CD40结合蛋白及其用途

(57)摘要

本发明涉及包含对CD40具有结合特异性的经设计的锚蛋白重复结构域的重组结合蛋白。此外，本发明涉及编码此类结合蛋白的核酸、包含此类结合蛋白或核酸的药物组合物，以及此类结合蛋白、核酸或药物组合物在用于在表达CD40的细胞(例如，肿瘤定位的B细胞)中活化CD40和用于治疗或诊断包括人在内的哺乳动物的疾病诸如癌症的方法中的用途。

CN 115996945 A

1.一种包含锚蛋白重复结构域的重组结合蛋白,其中所述锚蛋白重复结构域对CD40具有结合特异性,并且其中所述锚蛋白重复结构域包含锚蛋白重复模块,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列。

2.根据权利要求1所述的结合蛋白,其中所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:76、77和78,以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列。

3.根据权利要求1或2所述的结合蛋白,其中所述锚蛋白重复模块是第一锚蛋白重复模块并且包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:

(1)SEQ ID NO:76,以及(2)其中SEQ ID NO:76中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列,并且其中所述锚蛋白重复结构域还包含(i)第二锚蛋白重复模块,所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:77,以及(2)其中SEQ ID NO:77中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列;以及(ii)第三锚蛋白重复模块,所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:78,以及(2)其中SEQ ID NO:78中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列。

4.根据权利要求3所述的结合蛋白,其中所述第一锚蛋白重复模块位于所述第二锚蛋白重复模块的N-末端,并且所述第二锚蛋白重复模块位于所述锚蛋白重复结构域内所述第三锚蛋白重复模块的N-末端。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的结合蛋白,其中所述锚蛋白重复结构域还包含N-末端封端模块,其中所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:5至8,以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的结合蛋白,其中所述锚蛋白重复结构域还包含C-末端封端模块,其中所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列。

7.一种重组结合蛋白,所述重组结合蛋白包含锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域对CD40具有结合特异性,并且其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少80%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

8.根据权利要求7所述的结合蛋白,其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述锚蛋白重复结构域的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

9.根据权利要求7所述的结合蛋白,其中所述锚蛋白重复结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列,其中所述锚蛋白重复结构域的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

10.根据前述权利要求中任一项所述的结合蛋白,其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于10^{-7}M的解离常数(K_D)结合人CD40。

11.根据前述权利要求中任一项所述的结合蛋白,其中所述锚蛋白重复结构域特异性结合CD40受体的N-末端富含半胱氨酸的结构域1(CRD1)(SEQ ID NO:96的氨基酸23-59)。

12.根据前述权利要求中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白还包含对CD40具有结合特异性的第二锚蛋白重复结构域。

13.根据权利要求12所述的结合蛋白,其中所述第二锚蛋白重复结构域特异性结合所述CD40受体的所述N-末端CRD1(SEQ ID NO:96的氨基酸23-59)。

14.根据前述权利要求中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白还包含定位剂分子。

15.一种核酸,所述核酸编码根据前述权利要求中任一项所述的结合蛋白或根据前述权利要求中任一项所定义的锚蛋白重复结构域。

16.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至14中任一项所述的结合蛋白或根据权利要求15所述的核酸,以及任选的药学上可接受的载剂和/或稀释剂。

17.一种在包括人在内的哺乳动物的表达CD40的细胞中定位活化CD40的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用根据权利要求1至14中任一项所述的结合蛋白或根据权利要求15所述的核酸的步骤。

18.根据权利要求17所述的方法,其中所述表达CD40的细胞位于肿瘤中。

19.一种治疗医学病症的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的根据权利要求1至14中任一项所述的结合蛋白、根据权利要求15所述的核酸或根据权利要求16所述的药物组合物的步骤。

20.根据权利要求19所述的方法,其中所述医学病症是癌症。

重组CD40结合蛋白及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年5月14日向欧洲专利局提交的欧洲专利申请EP20174830的权益和优先权。欧洲专利申请EP20174830的内容全文以引用方式并入本文，包括所有表、图和权利要求。

技术领域

[0003] 本发明涉及包含对CD40具有结合特异性的经设计的锚蛋白重复结构域的重组结合蛋白。此外，本发明涉及编码此类结合蛋白的核酸、包含此类结合蛋白或核酸的药物组合物，以及此类结合蛋白、核酸或药物组合物在用于在表达CD40的细胞(例如，肿瘤定位的B细胞)中活化CD40和用于治疗或诊断包括人在内的哺乳动物的疾病诸如癌症的方法中的用途。

背景技术

[0004] 肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员CD40是关键的共刺激受体，当与其配体(CD40L)或激动性抗体接合时，它参与广泛的分子和细胞过程的调节，包括细胞和体液适应性免疫的起始和进展。例如，已经证明CD40在树突状细胞表面上的接合促进它们的细胞因子产生、诱导共刺激分子在它们的表面上的表达并且促进抗原的呈递。总体而言，CD40信号传导的影响“许可”树突状细胞成熟并实现所有必要特征，以有效地触发T细胞活化和分化。B细胞中的CD40信号传导促进生发中心形成、免疫球蛋白(Ig)同种型转换、Ig的体细胞超突变以增强对抗原的亲和力以及最后长寿浆细胞和记忆B细胞的形成。此外，已经表明，CD40途径对于许多细胞类型(包括生发中心B细胞、树突状细胞和内皮细胞)在正常和炎性条件下的存活是很重要的。已经在各种自身免疫疾病中观察到CD40信号传导的失调。总之，这种广泛的功能强调了CD40受体对于生成获得性免疫反应的重要性。

[0005] CD40最初在B细胞上表征，也在树突状细胞、单核细胞、血小板和巨噬细胞以及非造血细胞(诸如肌成纤维细胞、成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞)上表达。CD40的配体(称为CD154或CD40L)主要由活化的T细胞以及活化的B细胞和血小板表达，并且在炎性条件下，它也在单核细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞中诱导。

[0006] 因为CD40可以激活先天性和适应性免疫系统，所以它已被公认为肿瘤免疫疗法的合适靶标。一些报道已经证实，CD40刺激可以借助于树突状细胞成熟来增强抗肿瘤免疫反应。用CD40的激动剂活化树突状细胞使得它们的存活增加，IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF-α和巨噬细胞炎性蛋白-1α分泌。另外，CD40活化诱导共刺激分子(诸如MHC II类、LFA-3、CD80和CD86)的上调，并且分别促进T辅助细胞(Th)和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的抗原呈递、致敏和交叉致敏。已经证明抗CD40的激动性抗体在临床前鼠肿瘤模型中是有效的。然而，尽管它们在临床中的使用已经显示出一些抗肿瘤功效，但激动性抗CD40抗体的临床开发可能受到剂量限制性毒性和由此产生的低功效的阻碍。

[0007] 因此，仍然需要新的CD40特异性结合蛋白，以及用于治疗和表征受益于CD40特异

性结合和活化的疾病(包括癌症)的治疗和诊断方法。具体地,需要新的CD40特异性结合蛋白,其可以用作CD40的有效激动剂并且还可以容易地与其他功能部分(诸如定位剂分子)组合。

发明内容

[0008] 本发明提供了包含对CD40具有结合特异性的经设计的锚蛋白重复结构域的重组结合蛋白。本发明还提供了与一个或多个定位剂分子连接的此类结合蛋白,所述定位剂分子促进结合蛋白对CD40的聚集介导的活化。此外,本发明提供了编码此类结合蛋白的核酸和包含此类结合蛋白或核酸的药物组合物。本发明还提供了此类结合蛋白、核酸或药物组合物在用于在表达CD40的细胞或组织(诸如肿瘤组织)中定位活化CD40以及用于治疗和诊断包括人在内的哺乳动物的疾病诸如癌症的方法中的用途。

[0009] 在一个方面,本发明提供了这种包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域的重组结合蛋白,其中所述锚蛋白重复结构域包含锚蛋白重复模块,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列。例如,在一个具体实施方案中,本发明的CD40特异性重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域包含锚蛋白重复模块,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:76、77和78,以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列。在一个具体实施方案中,本发明的CD40特异性重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域包含第一锚蛋白重复模块,所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:76,以及(2)其中SEQ ID NO:76中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列,并且其中所述锚蛋白重复结构域还包含(i)第二锚蛋白重复模块,所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:77,以及(2)其中SEQ ID NO:77中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列;以及(ii)第三锚蛋白重复模块,所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:78,以及(2)其中SEQ ID NO:78中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列。优选地,所述第一锚蛋白重复模块位于所述第二锚蛋白重复模块的N-末端,并且所述第二锚蛋白重复模块位于所述锚蛋白重复结构域内所述第三锚蛋白重复模块的N-末端。甚至更优选地,所述锚蛋白重复结构域还包含(iii)N-末端封端模块,其中所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:5至8,以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列;以及(iv)C-末端封端模块,其中所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多10个氨基酸被其他氨基酸取代的序列。

[0010] 在一个方面,本发明提供了这种包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域的重组结合蛋白,其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少75%且至多100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。例如,在一个具体实施方案中,本发明的CD40特异性重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域包含

SEQ ID NO:29的氨基酸序列,其中所述锚蛋白重复结构域的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在另一个具体实施方案中,本发明的对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域特异性结合CD40受体的N-末端富含半胱氨酸的结构域(CRD)1。本文在SEQ ID NO:96中提供了CD40受体的氨基酸序列,其中CRD1对应于SEQ ID NO:96的氨基酸23-59。

[0011] 在另一方面,本发明提供了此类CD40特异性重组结合蛋白,其中所述结合蛋白还包含定位剂分子。定位剂分子可选自不同结构和功能类别的分子。例如,定位剂可以是多肽结合结构域、细胞表面受体配体或其片段或变体、抗体或其片段或变体、或基于支架的抗体样蛋白。在本发明的一个方面,定位剂分子共价结合到CD40特异性重组结合蛋白。共价键可以是CD40特异性结合蛋白与定位肽或多肽之间的肽键,从而产生融合蛋白。另选地,定位剂分子可共价缀合到CD40特异性结合蛋白。

[0012] 在一个具体实施方案中,本发明的CD40特异性重组结合蛋白包含与对癌症生物学中相关的定位剂靶蛋白(诸如肿瘤相关抗原)具有结合特异性的定位剂融合的对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。例如,在一个具体实施方案中,本发明的CD40特异性重组结合蛋白包含与另一个对成纤维细胞活化蛋白(FAP)具有结合特异性的锚蛋白重复结构域融合的对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在SEQ ID NO:98提供了这种对FAP具有结合特异性的锚蛋白重复结构域的示例。

[0013] 在另一方面,本发明提供了编码本发明的CD40特异性结合蛋白的核酸。在另一方面,本发明提供了包含本发明的CD40特异性结合蛋白或核酸和药学上可接受的载剂和/或稀释剂的药物组合物。

[0014] 在另一方面,本发明提供了一种在哺乳动物的表达CD40的细胞或组织中定位活化CD40的方法,该方法包括向所述哺乳动物施用包含定位剂分子的本发明的CD40特异性结合蛋白。在一个具体实施方案中,这种方法包括将CD40特异性结合蛋白施用于患有包含表达CD40的细胞或组织的肿瘤的哺乳动物(包括人患者),从而导致在表达CD40的细胞或肿瘤组织中CD40的肿瘤定位活化。

[0015] 在另一方面,本发明提供了用于治疗人患者的医学病症的方法,该方法包括向所述患者施用共价连接到定位剂分子或包含定位剂分子的本发明的CD40特异性结合蛋白,其中定位剂分子通过CD40特异性结合蛋白介导CD40的定位活化。在一个具体实施方案中,医学病症是癌症,其中癌症或肿瘤组织包含表达CD40的细胞,并且定位剂分子结合在所述癌症或肿瘤组织中选择性表达或过表达的靶标。在一个具体实施方案中,所述靶标是在所述癌症或肿瘤组织中选择性表达或过表达的细胞表面蛋白的胞外结构域。在一个实施方案中,所述癌症选自结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、头颈癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、浸润性膀胱癌、胰腺癌、脑转移性癌症、头颈鳞状细胞癌、食道鳞状细胞癌、肺鳞状细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、尿路上皮癌、黑素瘤、乳腺腺癌、肺腺癌、子宫颈鳞状细胞癌、胰腺鳞状细胞癌、结肠鳞状细胞癌或胃鳞状细胞癌、前列腺癌、骨肉瘤或软组织肉瘤和良性肿瘤。在一个实施方案中,这种癌症选自上皮恶性肿瘤(原发性和转移性),包括肺癌、结直肠癌、胃癌、膀胱癌、卵巢癌和乳腺癌,以及骨和软组织肉瘤。

[0016] 本发明还提供了包含本发明的重组结合蛋白、本发明的核酸或本发明的药物组合物的试剂盒。本发明还提供了用于产生本发明的重组结合蛋白的方法,该方法包括以下步骤:(i)在细菌中表达所述重组结合蛋白,以及(ii)使用色谱法纯化所述重组结合蛋白。

附图说明

[0017] 图1.描绘体外B细胞活化测定的卡通图。使用纯化的原代人B细胞和表达FAP(+FAP)或非表达FAP(-FAP)的CHO细胞进行测定。

[0018] 图2.用于确定CD86阳性细胞的MFI和百分比的门控策略概述。使用以下设置:FSC:200;SSC:400;采集:200ul/min,100.000个事件。缩写:FMO＝荧光扣除对照,SSC＝侧向散射,FSC＝前向散射,FSC-A＝前向散射面积,FSC-H＝前向散射高度。

[0019] 图3.与定位剂组合的CD40特异性结合蛋白以严格的定位剂依赖性方式活化CD40信号传导,并且HSA结合结构域削弱该多功能结合蛋白的效力和功效。将人B细胞在存在表达FAP的CHO细胞(全符号)的情况下共培养,并且用递增浓度的SMA014(向上的三角形)、SMA087(向下的三角形)、SMA095(菱形)和激动剂抗CD40 mAb(正方形)处理。作为对照,将B细胞在存在FAP阴性CHO细胞的情况下共培养,并且仅用最高浓度的相应构建体处理,描绘为空符号。在不存在A)和存在B)600μM HSA的情况下,根据CD86的上调评估人B细胞的活化(测量为平均荧光强度(MFI)和细胞百分比(%))。每个值描绘重复测量的平均值。所示数据代表两个独立实验。误差条显示±SEM。所有构建体在存在表达FAP的CHO细胞的情况下的EC50和功效值(以nM计)在图表中描绘的表中示出。

[0020] 图4.CD40二价强效增加多功能CD40-定位剂结合蛋白的效力和功效。将人B细胞在存在表达FAP的CHO细胞的情况下培养,并且用递增浓度的SMA014(向上的三角形)、SMA104(向下的三角形)、SMA105(菱形)和激动剂抗CD40 mAb(正方形)处理。作为对照,将B细胞在存在FAP阴性CHO细胞的情况下共培养,并且仅用最高浓度的相应构建体处理,描绘为空符号。在不存在HSA的情况下,根据CD86的上调评估人B细胞的活化(测量为平均荧光强度(MFI)和细胞百分比(%))。每个值描绘重复测量的平均值。所示数据代表两个独立实验。误差条显示±SEM。所有构建体在存在表达FAP的CHO细胞的情况下的EC50和功效值(以nM计)在图表中描绘的表中示出。

[0021] 图5.CD40二价挽救由HSA结合结构域诱导的抑制作用。将人B细胞在存在表达FAP的CHO细胞的情况下培养,并且用递增浓度的SMA014(向上的三角形)、SMA104(向下的三角形)、SMA091(圆形)、SMA099(菱形)、AS579(六边形)和激动剂抗CD40 mAb(正方形)处理。作为对照,将B细胞在存在FAP阴性CHO细胞的情况下共培养,并且仅用最高浓度的相应构建体处理,描绘为空符号。在不存在A)和存在B)HSA的情况下,根据CD86的上调评估人B细胞的活化(测量为平均荧光强度(MFI)和细胞百分比(%))。每个值描绘重复测量的平均值。所示数据代表两个独立实验。误差条显示±SEM。所有构建体在存在表达FAP的CHO细胞的情况下的EC50和功效值(以nM计)在图表中描绘的表中示出。

[0022] 图6.通过X射线晶体学确定与DARPin®蛋白#29(SEQ ID NO:29)复合的人坏死因子超家族成员5(hCD40)的结构。

具体实施方式

[0023] 如本文所公开和例示的,本公开提供了特异性靶向CD40的锚蛋白重复蛋白。经设计的锚蛋白重复蛋白文库(WO2002/020565;Binz等人,Nat.Biotechnol.22,575-582,2004;Stumpp等人,Drug Discov.Today 13,695-701,2008)可用于选择以高亲和力结合其靶标的靶标特异性设计的锚蛋白重复结构域。此类靶标特异性设计的锚蛋白重复结构域继而可用

作用于治疗疾病的重组结合蛋白的有价值的组分。经设计的锚蛋白重复蛋白是一类结合分子,其具有克服单克隆抗体限制的潜力,从而允许新型治疗方法。此类锚蛋白重复蛋白可包含单个经设计的锚蛋白重复结构域,或者可包含两个或更多个具有相同或不同靶标特异性的经设计的锚蛋白重复结构域的组合(Stumpp等人,Drug Discov.Today 13,695-701,2008;美国专利号9,458,211)。仅包含单个经设计的锚蛋白重复结构域的锚蛋白重复蛋白为小蛋白质(14kDa),其可被选择为以高亲和力和特异性结合给定靶蛋白。这些特征以及在一种蛋白质中组合两个或更多个经设计的锚蛋白重复结构域的可能性使得经设计的锚蛋白重复蛋白成为理想的激动、拮抗和/或抑制性药物候选物。此外,此类锚蛋白重复蛋白可被工程化以携带各种效应子功能,例如细胞毒性剂或半衰期延长剂,从而实现全新的药物形式。总之,经设计的锚蛋白重复蛋白为具有超过现有抗体药物的潜力的下一代蛋白质治疗剂的示例。

[0024] DARPin®是Molecular Partners AG(Switzerland)拥有的商标。

[0025] 在一个方面,本发明提供了包含对CD40具有结合特异性的经设计的锚蛋白重复结构域的重组结合蛋白。在一个实施方案中,本发明的重组结合蛋白包含锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域对CD40具有结合特异性,并且其中所述锚蛋白重复结构域包含锚蛋白重复模块,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多10个、或至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。因此,在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多9个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多8个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多7个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多5个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多4个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含选自由以下

项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:39至95，以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所有所述10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代发生在所述锚蛋白重复模块的框架位置中。在一个优选的实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由SEQ ID NO:39至95组成的组的氨基酸序列。

[0026] 在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域对CD40具有结合特异性，并且其中所述锚蛋白重复结构域包含锚蛋白重复模块，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83，以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多10个、或至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。因此，在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83，以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83，以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多9个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83，以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多8个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83，以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多7个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83，以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83，以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多5个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83，以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多4个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83，以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83，以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83，以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所有所述10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代发生在所述锚蛋白重复模块的框架位置中。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83组成的组的氨基酸序列。

[0027] 在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域对CD40具有结合特异性，并且其中所述锚蛋白重复结构域包含锚蛋白重复模块，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76、77和78，以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多10个、或至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。因此，在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76、77和78，以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76、77和78，以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多9个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76、77和78，以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多8个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76、77和78，以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多7个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76、77和78，以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76、77和78，以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多5个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76、77和78，以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多4个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76、77和78，以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76、77和78，以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76、77和78，以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所有所述10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代发生在所述锚蛋白重复模块的框架位置中。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含选自由SEQ ID NO:76、77和78组成的组的氨基酸序列。

[0028] 在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域对CD40具有结合特异性，并且其中所述锚蛋白重复结构域包含锚蛋白重复模块，所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列或其中SEQ ID NO:56中的一个或两个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列或其中SEQ ID NO:57中的一个或两个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列或其中SEQ ID NO:58中的一个或两个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列或其中SEQ ID NO:76中的一个或

两个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列或其中SEQ ID NO:77中的一个或两个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列或其中SEQ ID NO:78中的一个或两个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列或其中SEQ ID NO:81中的一个或两个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列或其中SEQ ID NO:82中的一个或两个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列或其中SEQ ID NO:83中的一个或两个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。

[0029] 在一个优选的实施方案中,如本文所述和所提及的所述锚蛋白重复模块的所有所述氨基酸取代发生在所述锚蛋白重复模块的框架位置中,其中通常模块的总体结构不受取代的影响。在一个更优选的实施方案中,如本文所述和所提及的所述锚蛋白重复模块的所有所述氨基酸取代发生在SEQ ID NO:39至95的所述锚蛋白重复模块的除随机化位置3、4、6、14和15之外的位置中。

[0030] 在一个实施方案中,本发明的锚蛋白重复结构域包含第一锚蛋白重复模块和第二锚蛋白重复模块。在一个实施方案中,所述第一锚蛋白重复模块位于所述锚蛋白重复结构域内的所述第二锚蛋白重复模块的N-末端。

[0031] 在一个实施方案中,本发明的锚蛋白重复结构域包含第一锚蛋白重复模块和第二锚蛋白重复模块和第三锚蛋白重复模块。在一个优选的实施方案中,所述第一锚蛋白重复模块位于所述锚蛋白重复结构域内所述第二锚蛋白重复模块的N-末端,并且所述第二锚蛋白重复模块位于所述锚蛋白重复结构域内所述第三锚蛋白重复模块的N-末端。

[0032] 在一个实施方案中,所述第一锚蛋白重复模块、所述第二锚蛋白重复模块和所述第三锚蛋白重复模块(如果存在)包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:39至95,以及(2)其中SEQ ID NO:39至95中任一者中的至多10个、或至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述第一锚蛋白重复模块、所述第二锚蛋白重复模块和所述第三锚蛋白重复模块(如果存在)包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83,以及(2)其中SEQ ID NO:56至58、76至78和81至83中任一者中的至多10个、或至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述第一锚蛋白重复模块、所述第二锚蛋白重复模块和所述第三锚蛋白重

复模块(如果存在)包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:76、77和78,以及(2)其中SEQ ID NO:76、77和78中任一者中的至多10个、或至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。

[0033] 在一个实施方案中,本发明的锚蛋白重复结构域包含第一锚蛋白重复模块和第二锚蛋白重复模块和第三锚蛋白重复模块,其中所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:56,以及(2)其中SEQ ID NO:56中的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:57,以及(2)其中SEQ ID NO:57的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:58,以及(2)其中SEQ ID NO:58的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,在这种锚蛋白重复结构域中,所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:56,以及(2)其中SEQ ID NO:56中的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:57,以及(2)其中SEQ ID NO:57的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:58,以及(2)其中SEQ ID NO:58的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,在这种锚蛋白重复结构域中,所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:56,以及(2)其中SEQ ID NO:56中的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:57,以及(2)其中SEQ ID NO:57的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:58,以及(2)其中SEQ ID NO:58的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,在这种锚蛋白重复结构域中,所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:56,以及(2)其中SEQ ID NO:56中的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:57,以及(2)其中SEQ ID NO:57的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:58,以及(2)其中SEQ ID NO:58的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,在这种锚蛋白重复结构域中,所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:56,以及(2)其中SEQ ID NO:56中的1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:57,以及(2)其中SEQ ID NO:57的1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:58,以及(2)其中SEQ ID NO:58的1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,在这种锚蛋白重复结构域中,所述第一锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列,并且所述第二锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列,并且所述第三锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中,所述锚蛋白重复模块的所有所述氨基酸取代发生在SEQ ID NO:56、57

和58的所述锚蛋白重复模块的除随机化位置3、4、6、14和15之外的框架位置中，其中通常模块的总体结构不受取代的影响。在一个优选的实施方案中，所述第一锚蛋白重复模块位于所述锚蛋白重复结构域内所述第二锚蛋白重复模块的N-末端，并且所述第二锚蛋白重复模块位于所述锚蛋白重复结构域内所述第三锚蛋白重复模块的N-末端。

[0034] 在一个实施方案中，本发明的锚蛋白重复结构域包含第一锚蛋白重复模块和第二锚蛋白重复模块和第三锚蛋白重复模块，其中所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76，以及(2)其中SEQ ID NO:76中的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:77，以及(2)其中SEQ ID NO:77的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:78，以及(2)其中SEQ ID NO:78的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，在这种锚蛋白重复结构域中，所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76，以及(2)其中SEQ ID NO:76中的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:77，以及(2)其中SEQ ID NO:77的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:78，以及(2)其中SEQ ID NO:78的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，在这种锚蛋白重复结构域中，所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76，以及(2)其中SEQ ID NO:76中的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:77，以及(2)其中SEQ ID NO:77的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:78，以及(2)其中SEQ ID NO:78的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，在这种锚蛋白重复结构域中，所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76，以及(2)其中SEQ ID NO:76中的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:77，以及(2)其中SEQ ID NO:77的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:78，以及(2)其中SEQ ID NO:78的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，在这种锚蛋白重复结构域中，所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:76，以及(2)其中SEQ ID NO:76中的1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:77，以及(2)其中SEQ ID NO:77的1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:78，以及(2)其中SEQ ID NO:78的1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，在这种锚蛋白重复结构域中，所述第一锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中，所述锚蛋白重复模块的所有所述氨基酸取代发生在SEQ ID NO:76、77

和78的所述锚蛋白重复模块的除随机化位置3、4、6、14和15之外的框架位置中，其中通常模块的总体结构不受取代的影响。在一个优选的实施方案中，所述第一锚蛋白重复模块位于所述第二锚蛋白重复模块的N-末端，并且所述第二锚蛋白重复模块位于所述锚蛋白重复结构域内所述第三锚蛋白重复模块的N-末端。

[0035] 在一个实施方案中，本发明的锚蛋白重复结构域包含第一锚蛋白重复模块和第二锚蛋白重复模块和第三锚蛋白重复模块，其中所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:81，以及(2)其中SEQ ID NO:81中的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:82，以及(2)其中SEQ ID NO:82的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:83，以及(2)其中SEQ ID NO:83的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，在这种锚蛋白重复结构域中，所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:81，以及(2)其中SEQ ID NO:81中的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:82，以及(2)其中SEQ ID NO:82的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:83，以及(2)其中SEQ ID NO:83的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，在这种锚蛋白重复结构域中，所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:81，以及(2)其中SEQ ID NO:81中的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:82，以及(2)其中SEQ ID NO:82的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:83，以及(2)其中SEQ ID NO:83的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，在这种锚蛋白重复结构域中，所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:81，以及(2)其中SEQ ID NO:81中的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:82，以及(2)其中SEQ ID NO:82的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:83，以及(2)其中SEQ ID NO:83的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，在这种锚蛋白重复结构域中，所述第一锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:81，以及(2)其中SEQ ID NO:81中的1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:82，以及(2)其中SEQ ID NO:82的1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:83，以及(2)其中SEQ ID NO:83的1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，在这种锚蛋白重复结构域中，所述第一锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列，并且所述第二锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列，并且所述第三锚蛋白重复模块包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中，所述锚蛋白重复模块的所有所述氨基酸取代发生在SEQ ID NO:81、82

和83的所述锚蛋白重复模块的除随机化位置3、4、6、14和15之外的框架位置中，其中通常模块的总体结构不受取代的影响。在一个优选的实施方案中，所述第一锚蛋白重复模块位于所述锚蛋白重复结构域内所述第二锚蛋白重复模块的N-末端，并且所述第二锚蛋白重复模块位于所述锚蛋白重复结构域内所述第三锚蛋白重复模块的N-末端。

[0036] 在一个优选的实施方案中，如本文任何实施方案中所述的本发明的锚蛋白重复结构域还包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块。在一个更优选的实施方案中，本发明的锚蛋白重复结构域从N-末端到C-末端包含：N末端封端模块；如本文任何实施方案中更具体描述的一个、两个、三个或更多个锚蛋白重复模块；以及C-末端封端模块。

[0037] 在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:5至8，以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多10个、或至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被其他氨基酸取代的序列。因此，在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:5至8，以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:5至8，以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多9个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:5至8，以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多8个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:5至8，以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多7个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:5至8，以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:5至8，以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多5个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:5至8，以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多4个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:5至8，以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:5至8，以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列：(1)SEQ ID NO:5至8，以及(2)其中SEQ ID NO:5至7中任一者中的至多1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个优选的实施方案中，所述N-末端封端模块的所有所述氨基酸取代发生在SEQ ID NO:5至7的除位置10和位置17之外的位置中。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成，其中X代表任

何氨基酸。在一个实施方案中,SEQ ID NO:5至8的所述N-末端封端模块的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

[0038] 在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多10个、或至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被其他氨基酸取代的序列。因此,在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多10个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多9个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多8个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多7个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多6个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多5个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多4个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多3个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多2个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:12至15,以及(2)其中SEQ ID NO:12至14中任一者中的至多1个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。在一个优选的实施方案中,所述C-末端封端模块的所有所述氨基酸取代发生在SEQ ID NO:13至14的除位置14和位置18之外的位置中。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。在一个实施方案中,所述C-末端封端模块包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成,其中X代表任何氨基酸。在一个实施方案中,SEQ ID NO:12的倒数第二个位置处的L和/或最后一个位置处的N任选地被A取代。

[0039] 在一个优选的实施方案中,本发明提供和本文描述的经设计的锚蛋白重复结构域在N-末端封端模块和/或C-末端封端模块中包含序列修饰,与不包含所述序列修饰的经设计的锚蛋白重复结构域相比,这些序列修饰使得所述经设计的锚蛋白重复结构域的药代动力学特性得到改善。

[0040] 在一个更优选的实施方案中，本发明的经设计的锚蛋白重复结构域包含具有改善的药代动力学特性的N-末端封端模块，其中所述N-末端封端模块具有其中位置8处的氨基酸是Q并且/或者位置15处的氨基酸是L的氨基酸序列。在SEQ ID NO:5至8中提供了此类N-末端封端模块的示例。在一个实施方案中，所述N-末端封端模块具有其中位置4处的氨基酸是S、位置8处的氨基酸是Q、位置15处的氨基酸是L、位置17处的氨基酸是T、位置20处的氨基酸是T并且/或者位置23处的氨基酸是Q的氨基酸序列。在SEQ ID NO:7中提供了这种N-末端封端模块的示例。在一个优选的实施方案中，所述N-末端封端模块包含具有30个氨基酸的氨基酸序列。在另一个优选的实施方案中，所述N-末端封端模块由具有30个氨基酸的氨基酸序列组成。优选地，N-末端封端模块的位置的所述位置编号是通过使用SEQ ID NO:5的位置编号与SEQ ID NO:5进行比对来确定的。优选地，所述比对不包括氨基酸空位。序列比对生成是本领域众所周知的程序。

[0041] 在另一个更优选的实施方案中，本发明的经设计的锚蛋白重复结构域包含具有改善的药代动力学特性的C-末端封端模块，其中所述C-末端封端模块具有其中位置14处的氨基酸是R并且/或者位置18处的氨基酸是Q的氨基酸序列。在SEQ ID NO:13至15中提供了此类C-末端封端模块的示例。在一个实施方案中，所述C-末端封端模块具有其中位置3处的氨基酸是T、位置4处的氨基酸是Q、位置6处的氨基酸是T、位置14处的氨基酸是R、位置18处的氨基酸是Q、位置19处的氨基酸是Q、位置22处的氨基酸是S并且/或者位置26处的氨基酸是Q的氨基酸序列。在SEQ ID NO:14中提供了这种N-末端封端模块的示例。在一个优选的实施方案中，所述C-末端封端模块包含具有28个氨基酸的氨基酸序列。在另一个优选的实施方案中，所述C-末端封端模块由具有28个氨基酸的氨基酸序列组成。优选地，C-末端封端模块的位置的所述位置编号是通过使用SEQ ID NO:13的位置编号与SEQ ID NO:13进行比对来确定的。优选地，所述比对不包括氨基酸空位。

[0042] 在一个实施方案中，术语改善的药代动力学特性是指曲线下面积增加、清除率减少或终末半衰期增加。在一个实施方案中，术语改善的药代动力学特性是指曲线下面积增加。在一个实施方案中，所述曲线下面积增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、最优选地85%。在一个实施方案中，术语改善的药代动力学特性是指清除率减少。在一个实施方案中，所述清除率减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、最优选地45%。在一个实施方案中，术语改善的药代动力学特性是指终末半衰期增加。在一个实施方案中，所述终末半衰期增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%，最优选地85%。在一个实施方案中，在小鼠中确定药代动力学参数。优选地，小鼠中的所述药代动力学参数通过将蛋白质以1mg/kg的剂量通过静脉内注射施用到Balb/c小鼠的尾静脉中来确定。在一个实施方案中，在食蟹猴中确定药代动力学参数。优选地，食蟹猴中的所述药代动力学参数通过以1mg/kg的剂量通过30分钟静脉内注射施用蛋白质来确定。

[0043] 在一个优选的实施方案中，本发明提供和本文描述的经设计的锚蛋白重复结构域特异性结合CD40受体的N-末端富含半胱氨酸的结构域(CRD)1。本文在SEQ ID NO:96中提供了CD40受体的氨基酸序列，其中氨基酸残基23-59形成CRD1，氨基酸残基62-103形成CRD2，氨基酸残基105-143形成CRD3，并且氨基酸残基146-186形成CRD4。因此，在一个优选的实施方案中，对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域所结合的CD40表位位于CRD1中，即位

于CD40受体(SEQ ID NO:96)的氨基酸残基23至59内。在另一方面,本发明提供了包含锚蛋白重复结构域的重组结合蛋白,其中所述锚蛋白重复结构域对CD40具有结合特异性,并且其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此,在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少80%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少93%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少98%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此,在一个优选的实施方案中,本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域包含选自由SEQ ID NO:16至35组成的组的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成,其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

[0044] 在一个实施方案中,本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或在位置2处的S任选地缺失。因此,在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少80%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少93%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少98%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此,在一个优选的实施方案中,本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域包含选自由SEQ ID NO:22、29和31组成的组的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位

置2处的S任选地缺失。

[0045] 在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或在位置2处的S任选地缺失。因此，在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少80％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少90％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少93％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少95％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少98％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此，在一个优选的实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个优选的实施方案中，所述对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域特异性结合CD40受体的CRD1中的表位。

[0046] 在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于10^{-7}M、或低于7.5×10^{-8}M、或低于5×10^{-8}M、或低于2×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40。因此，在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于10^{-7}M的解离常数(K_D)结合人CD40。在另一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于7.5×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40；并且在另一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于5×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于2×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40。

[0047] 在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于10^{-7}M的解离常数(K_D)结合人CD40，并且其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此，在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少80％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少90％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少93％氨

基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少95％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:16至35中的任一者具有至少98％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:16至35的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此，在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于10^{-7}M的解离常数(K_D)结合人CD40，并且其中所述锚蛋白重复结构域包含选自由SEQ ID NO:16至35组成的组的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成，其中SEQ ID NO:16至35中任一者的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

[0048] 在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于7.5×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40，并且其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此，在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少80％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少90％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少93％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少95％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少98％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此，在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于7.5×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40，并且其中所述锚蛋白重复结构域包含选自由SEQ ID NO:22、29和31组成的组的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成，其中SEQ ID NO:22、29和31中任一者的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

[0049] 在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于5×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40，并且其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此，在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少80％氨基酸序列同一性的氨

基酸序列,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少93%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22、29和31中的任一者具有至少98%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22、29和31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此,在一个实施方案中,本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于5×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40,并且其中所述锚蛋白重复结构域包含选自由SEQ ID NO:22、29和31组成的组的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成,其中SEQ ID NO:22、29和31中任一者的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

[0050] 在一个实施方案中,本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于10^{-7}M、或低于7.5×10^{-8}M、或低于5×10^{-8}M、或低于2×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40,并且其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此,在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22具有至少80%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22具有至少93%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中,所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:22具有至少98%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此,在一个实施方案中,本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于10^{-7}M、或低于7.5×10^{-8}M、或低于5×10^{-8}M、或低于2×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40,并且其中所述锚蛋白重复结构域包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成,其中SEQ ID NO:22的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

[0051] 在一个实施方案中,本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于10^{-7}M或低于7.5×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40,并且其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96％、97％、98％、99％、100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此，在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少80％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少90％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少93％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少95％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少98％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此，在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于10^{-7}M或低于7.5×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40，并且其中所述锚蛋白重复结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

[0052] 在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于10^{-7}M或低于7.5×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40，并且其中所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:31具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此，在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:31具有至少80％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:31具有至少90％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:31具有至少93％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:31具有至少95％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域包含与SEQ ID NO:31具有至少98％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此，在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域在PBS中以低于10^{-7}M或低于7.5×10^{-8}M的解离常数(K_D)结合人CD40，并且其中所述锚蛋白重复结构域包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成，其中SEQ ID NO:31的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

[0053] 对CD40具有结合特异性的本发明的重组结合蛋白的解离常数(K_D)的典型和优选测定是通过表面等离子体共振(SPR)分析进行的。因此，在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白对CD40的所述结合特异性是通过表面等离子体共振(SPR)在PBS中测定的。在一个

实施方案中，本发明的重组结合蛋白对CD40的所述结合特异性是通过表面等离子体共振(SPR)在PBS中测定的。

[0054] 在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含两个或三个或更多个对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个优选的实施方案中，所述重组结合蛋白包含两个或三个对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述两个或三个锚蛋白重复结构域中的每一个独立地由如本文任何方面和实施方案中更具体描述的对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域组成。因此，在一个具体实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含如本文任何方面和实施方案中更具体描述的对CD40具有结合特异性的第一锚蛋白重复结构域，并且还包含对CD40具有结合特异性的第二锚蛋白重复结构域。在一个更优选的实施方案中，所述对CD40具有结合特异性的第二锚蛋白重复结构域是如本文任何方面和实施方案中更具体描述的对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其可与所述对CD40具有结合特异性的第一锚蛋白重复结构域不同或相同。

[0055] 因此，在一个示例性实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含两个对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域中的每一个独立地包含与SEQ ID NO:29具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或在位置2处的S任选地缺失。因此，在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域中的每一个独立地包含与SEQ ID NO:29具有至少80％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域中的每一个独立地包含与SEQ ID NO:29具有至少90％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域中的每一个独立地包含与SEQ ID NO:29具有至少93％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域中的每一个独立地包含与SEQ ID NO:29具有至少95％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。在一个实施方案中，所述锚蛋白重复结构域中的每一个独立地包含与SEQ ID NO:29具有至少98％氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。因此，在一个优选的实施方案中，本发明的重组结合蛋白包含两个对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，其中所述锚蛋白重复结构域中的每一个独立地包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成，其中SEQ ID NO:29的位置1处的G和/或位置2处的S任选地缺失。

[0056] 在一个实施方案中，所述两个或三个或更多个锚蛋白重复结构域用肽接头连接。在一个实施方案中，所述肽接头是富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头。在一个实施方案中，所述肽接头是SEQ ID NO:1或2的富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头。在一个实施方案中，所述两个或三个或更多个锚蛋白重复结构域用SEQ ID NO:1或2的富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头连接。

[0057] 在一个实施方案中，本发明的重组结合蛋白还包含定位剂分子。在一个实施方案中，所述定位剂分子连接、缀合、融合或以其他方式物理附接到所述CD40特异性锚蛋白重复结构域或者所述两个、三个或更多个CD40特异性锚蛋白重复结构域。在一个实施方案中，所述定位剂分子共价连接到所述CD40特异性锚蛋白重复结构域或者所述两个、三个或更多个

CD40特异性锚蛋白重复结构域。在一个实施方案中,所述定位剂分子用肽接头共价连接到所述CD40特异性锚蛋白重复结构域或者所述两个、三个或更多个CD40特异性锚蛋白重复结构域。在一个实施方案中,所述肽接头是富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头。在一个实施方案中,所述肽接头是SEQ ID NO:1或2的富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头。在一个实施方案中,所述定位剂分子用SEQ ID NO:1或2的富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头共价连接到所述CD40特异性锚蛋白重复结构域或者所述两个或三个或更多个CD40特异性锚蛋白重复结构域。

[0058] 如实施例3所示,本发明的一个、两个或三个CD40特异性锚蛋白重复结构域可以连接到定位剂,该定位剂能够通过重组结合蛋白经由例如定位剂介导的聚集促进CD40的定位活化。此类定位活化(例如,靶向肿瘤组织)可能非常有益于避免或减少CD40的全身活化和由此导致的肝毒性。这种实施方案允许通过所述定位剂分子将CD40的活化定位或递送到特定组织,该定位剂分子特异性结合例如在靶组织的细胞中选择性表达的分子的胞外结构域,并且由此聚集CD40特异性锚蛋白重复结构域以在附近的表达CD40的细胞中实现CD40活化。又例如,已知许多跨膜蛋白在各种类型的癌症中在肿瘤组织中特异性表达或过表达。此类肿瘤特异性蛋白质包括但不限于锚定蛋白、受体、酶和转运蛋白诸如NDC1(TMEM48)、TMEM45A、TMEM97、钙激活氯通道蛋白(anoctamin)-1(TMEM16A)、TMEM140、TMEM45B、αvβ3整联蛋白、铃蟾素R、CAIX、CEA、CD13、CD44 v6、CXCR4、EGFR、ErbB-2、HER2、细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(Emmprin)、内皮糖蛋白、EpCAM、EphA2、纤连蛋白外结构域B(ED-B)、FAP-α、叶酸R、GRP78、IGF-1R、基质蛋白酶、间皮素、cMET/HGFR、MT1-MMP、MT6-MMP、Muc-1、PSCA、PSMA、Tn抗原、uPAR(Schmit K和Michiels C,Front.Pharmacol.,2018,9:1345;Boonstra CM等人,Biomarkers in Cancer 2016,8:119-133)。

[0059] 在一个实施方案中,所述定位剂分子是对肿瘤组织中表达的蛋白质具有结合特异性的蛋白质。在一个实施方案中,所述定位剂分子是对肿瘤特异性蛋白质具有结合特异性的蛋白质。在一个实施方案中,所述定位剂分子是对肿瘤组织中表达的细胞表面蛋白具有结合特异性的蛋白质。

[0060] 在一个实施方案中,所述定位剂分子是对肿瘤组织中表达的蛋白质具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个实施方案中,所述定位剂分子是对肿瘤特异性蛋白质具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个实施方案中,所述定位剂分子是对肿瘤组织中表达的细胞表面蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个最优选的实施方案中,所述定位剂分子是对成纤维细胞活化蛋白(FAP)具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个实施方案中,所述对FAP具有结合特异性的锚蛋白重复结构域包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

[0061] 在一个实施方案中,本发明的重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,并且还包含定位剂分子。在一个优选的实施方案中,所述CD40特异性锚蛋白重复结构域是如本文任何方面和实施方案中更具体描述的对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个更优选的实施方案中,所述定位剂分子是对肿瘤组织中表达的细胞表面蛋白具有结合特异性的蛋白质。在另一个更优选的实施方案中,所述对肿瘤组织中表达的细胞表面蛋白具有结合特异性的蛋白质是对肿瘤组织中表达的细胞表面蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个最优选的实施方案中,所述定位剂分子是对FAP具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个实施方案中,所述对CD40具有结合特异性的锚蛋白

重复结构域和所述定位剂锚蛋白重复结构域用富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头连接。在一个实施方案中,所述对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域和所述定位剂锚蛋白重复结构域用SEQ ID NO:1或2的富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头连接。在一个实施方案中,所述定位剂锚蛋白重复序列结构域位于所述重组结合蛋白内所述对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复序列结构域的N-末端。

[0062] 在一个实施方案中,本发明的重组结合蛋白包含由用肽接头连接的两个对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域组成的多肽,并且还包含定位剂分子。在一个优选的实施方案中,所述两个对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域中的每一个是如本文任何方面和实施方案中更具体描述的对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,它们可以彼此相同或不同。在一个优选的实施方案中,两个对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域用富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头连接。在一个实施方案中,所述两个对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域用SEQ ID NO:1或2的富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头连接。在另一个更优选的实施方案中,所述定位剂分子是对肿瘤组织中表达的细胞表面蛋白具有结合特异性的蛋白质。在另一个更优选的实施方案中,所述对肿瘤组织中表达的细胞表面蛋白具有结合特异性的蛋白质是对肿瘤组织中表达的细胞表面蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个最优选的实施方案中,所述定位剂分子是对FAP具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个实施方案中,所述多肽和所述定位剂锚蛋白重复结构域用富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头连接。在一个实施方案中,所述多肽和所述定位剂锚蛋白重复结构域用SEQ ID NO:1或2的富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头连接。在一个优选的实施方案中,所述定位剂锚蛋白重复结构域位于所述重组结合蛋白内所述多肽的N-末端。

[0063] 在一个实施方案中,本发明的CD40特异性重组结合蛋白还包含对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个实施方案中,本发明的CD40特异性重组结合蛋白还包含两个对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。在一个实施方案中,本发明的所述CD40特异性重组结合蛋白还包含两个对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述两个对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域中的一个位于CD40特异性锚蛋白重复结构域的N-末端,并且其中所述两个对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域中的另一个位于CD40特异性锚蛋白重复结构域的C-末端。在一个实施方案中,本发明的重组结合蛋白包含两个对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域并且还包含两个对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域,其中所述两个对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域中的一个位于所述CD40特异性锚蛋白重复结构域的N-末端,并且其中所述两个对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域中的另一个位于所述两个CD40特异性锚蛋白重复结构域的C-末端。对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域能够增加本发明的重组蛋白的体内半衰期。

[0064] 在一个实施方案中,本发明的CD40特异性重组结合蛋白还包含多肽标签。多肽标签为附接到多肽/蛋白质的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列可用于纯化、检测或靶向所述多肽/蛋白质,或者其中所述氨基酸序列改善多肽/蛋白质的物理化学行为,或者其中所述氨基酸序列具有效应子功能。结合蛋白的单个多肽标签可直接或经由肽接头连接到结合蛋白的其他部分。多肽标签在本领域中是众所周知的,并且是本领域技术人员完全可用的。多肽标签的示例为小的多肽序列,例如His、HA、myc、FLAG或Strep标签;或多肽,诸如允许检测

所述多肽/蛋白质的酶(例如,碱性磷酸酶)或可用于靶向的多肽(诸如,免疫球蛋白或其片段)和/或可用作效应分子的多肽。在SEQ ID NO:4中描绘了可以在本发明的上下文中使用的His标签的具体示例。

[0065] 在一个实施方案中,本发明的CD40特异性重组结合蛋白还包含肽接头。肽接头为能够连接例如两个蛋白质结构域、多肽标签和蛋白质结构域、蛋白质结构域和非蛋白质类化合物或聚合物(诸如聚乙二醇)、蛋白质结构域和生物活性分子、蛋白质结构域和定位剂、或两个序列标签的氨基酸序列。肽接头是本领域技术人员已知的。示例的列表在专利申请WO2002/020565的说明书中提供。此类接头的具体示例为可变长度的甘氨酸-丝氨酸接头和脯氨酸-苏氨酸接头。甘氨酸-丝氨酸接头的示例为氨基酸序列GS和氨基酸序列SEQ ID NO:3,并且脯氨酸-苏氨酸接头的示例为氨基酸序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2。

[0066] 在另一方面,本发明提供了编码本发明的锚蛋白重复结构域或重组结合蛋白的氨基酸序列的核酸。在一个实施方案中,本发明提供了编码本发明的重组结合蛋白的氨基酸序列的核酸。在一个实施方案中,本发明提供了编码本发明的对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域的核酸。在一个实施方案中,所述核酸编码SEQ ID NO:16至35中任一者的锚蛋白重复结构域的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中,所述核酸编码SEQ ID NO:22、29和31中任一者的锚蛋白重复结构域的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述核酸编码SEQ ID NO:22的锚蛋白重复结构域的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述核酸编码SEQ ID NO:29的锚蛋白重复结构域的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述核酸编码SEQ ID NO:31的锚蛋白重复结构域的氨基酸序列。在一个更优选的实施方案中,所述核酸选自由SEQ ID NO:36、37和38组成的组。在一个实施方案中,所述核酸包含编码SEQ ID NO:29的氨基酸序列的SEQ ID NO:36的核酸序列或由该核酸序列组成。在一个实施方案中,所述核酸包含编码SEQ ID NO:22的氨基酸序列的SEQ ID NO:37的核酸序列或由该核酸序列组成。在一个实施方案中,所述核酸包含编码SEQ ID NO:31的氨基酸序列的SEQ ID NO:38的核酸序列或由该核酸序列组成。

[0067] 此外,本发明提供了包含本发明的任何核酸的载体。核酸是本领域技术人员熟知的。在实施例中,使用核酸在大肠杆菌中产生本发明的经设计的锚蛋白重复结构域或重组结合蛋白。

[0068] 在一个方面,本发明提供了包含本发明的重组结合蛋白和/或锚蛋白重复结构域和/或编码本发明的重组结合蛋白和/或经设计的锚蛋白重复结构域的核酸以及任选的药学上可接受的载剂和/或稀释剂的药物组合物。

[0069] 在一个实施方案中,本发明提供了包含重组结合蛋白或编码本发明的重组结合蛋白的核酸以及任选的药学上可接受的载剂和/或稀释剂的药物组合物。

[0070] 药学上可接受的载剂和/或稀释剂是本领域技术人员已知的,并且将在下文更详细地说明。更进一步,提供了包含上述重组结合蛋白和/或经设计的锚蛋白重复结构域和/或核酸中的一者或多者(特别是本发明的重组结合蛋白和/或核酸)的诊断组合物。

[0071] 药物组合物包含重组结合蛋白和/或锚蛋白重复结构域和/或核酸,优选地如本文所述的重组结合蛋白和/或核酸,以及药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂,例如如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑,1980中所述。

[0072] 本领域技术人员已知的合适载剂、赋形剂或稳定剂包括例如盐水、林格氏溶液、右

旋糖溶液、汉克氏溶液、固定油，油酸乙酯、5％右旋糖盐水、增强等渗性和化学稳定性的物质、缓冲液和防腐剂。其他合适载剂包括本身不诱导产生对接受组合物的个体有害的抗体的任何载剂，诸如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸和氨基酸共聚物。药物组合物还可以是组合制剂，其包含另外的活性剂，诸如抗癌剂或抗血管生成剂，或另外的生物活性化合物。

[0073] 待用于体内给药的制剂必须是无菌的或经过消毒的。这很容易通过无菌过滤膜过滤实现。

[0074] 本发明的一个实施方案提供了包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域并且还包含对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域的本发明的重组结合蛋白用于制造药物组合物的用途，其中与包含所述对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域但不包含所述对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域的对应重组结合蛋白相比，所述重组结合蛋白表现出增加的终末半衰期，优选地增加至少5％、优选地10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、150％、200％或250％的终末半衰期。在本发明的一个实施方案中，重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，并且还包含两个对血清白蛋白具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。

[0075] 在一个实施方案中，药物组合物包含至少一种如本文所述的重组结合蛋白以及洗涤剂诸如非离子洗涤剂、缓冲液诸如磷酸盐缓冲液和糖诸如蔗糖。在一个实施方案中，这种组合物包含如上所述的重组结合蛋白以及PBS。

[0076] 在另一方面，本发明提供了一种在包括人在内的哺乳动物的表达CD40的细胞中定位活化CD40的方法，该方法包括向所述哺乳动物施用本发明的重组结合蛋白的步骤。在一个优选的实施方案中，所述重组结合蛋白包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域，并且还包含定位剂分子。在一个实施方案中，所述定位剂分子是对不同于CD40的靶标具有结合特异性的结合蛋白。在一个实施方案中，所述哺乳动物是人。在一个实施方案中，所述表达CD40的细胞位于肿瘤中，包括原发性肿瘤、转移瘤和/或肿瘤基质中。

[0077] 在另一方面，本发明提供了一种治疗医学病症的方法，该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的本发明的重组结合蛋白、本发明的核酸或本发明的药物组合物的步骤。在一个优选的实施方案中，所述重组结合蛋白包含定位剂分子。在一个优选的实施方案中，所述医学病症是癌症。

[0078] 在另一方面，本发明提供了一种治疗医学病症的方法，该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的包含定位剂分子的本发明的重组结合蛋白的步骤，其中所述定位剂分子有效将所述结合蛋白定位到靶组织，并且其中所述结合蛋白的所述定位导致靶组织中表达CD40的细胞中CD40的活化。在一个实施方案中，所述定位剂分子是对肿瘤中表达的细胞表面蛋白具有结合特异性的结合蛋白，其中所述细胞表面蛋白与CD40不同。在一个实施方案中，所述表达CD40的细胞位于肿瘤中，包括原发性肿瘤、转移瘤和/或肿瘤基质中。因此，这些实施方案通过将CD40的活化通过本发明的重组结合蛋白定位到肿瘤上，从而允许利用定位剂在肿瘤中的限制性表达。

[0079] 在另一方面，本发明提供了一种诊断患者的医学病症的方法，该方法包括将包含对人CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域的本发明的重组结合蛋白施用于需要所述

诊断的患者或者需要所述诊断的患者的体液或组织样品的步骤。在一个实施方案中，所述体液是血浆或其衍生物。在一个实施方案中，所述体液是血清。在一个实施方案中，所述组织是肿瘤组织。在一个实施方案中，所述医学病症是癌症。在另一个实施方案中，所述医学病症是自身免疫疾病。

[0080] 在一个实施方案中，本发明提供了根据本发明的药物组合物或重组结合蛋白用于治疗疾病的用途。为此，将根据本发明的药物组合物或重组结合蛋白以治疗有效量施用给对其有需要的患者。给药可包括局部给药、口服给药和肠胃外给药。典型的给药途径是肠胃外给药。在肠胃外给药中，本发明的药物组合物将与上述药学上可接受的赋形剂联合被配制成单位剂量可注射形式，诸如溶液、混悬液或乳液。给药的剂量和模式将取决于待治疗的个体和具体疾病。

[0081] 此外，考虑将上述药物组合物或重组结合蛋白中的任一种用于治疗障碍。

[0082] 在一个实施方案中，静脉内施用所述重组结合蛋白或本文所述的其他此类药物组合物。对于肠胃外应用，重组结合蛋白或所述药物组合物可以治疗有效量快速推注或通过缓慢输注来注射。

[0083] 在一个实施方案中，本发明提供了一种治疗医学病症的方法，该方法包括向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的本发明的重组结合蛋白的步骤。在一个实施方案中，本发明提供了一种治疗医学病症的方法，该方法包括向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的本发明的药物组合物的步骤。在一个实施方案中，本发明提供了本发明的药物组合物用于治疗疾病的用途。在一个实施方案中，本发明提供了在治疗疾病中使用的药物组合物。在一个实施方案中，本发明提供了在治疗医学病症中使用的药物组合物。在一个实施方案中，本发明提供了在治疗疾病中使用的核酸。在一个实施方案中，本发明提供了所述药物组合物、重组结合蛋白或核酸分子作为用于治疗疾病的药物的用途。在一个实施方案中，本发明提供了所述药物组合物、重组结合蛋白或核酸分子用于制造药物的用途。在一个实施方案中，本发明提供了所述药物组合物、重组结合蛋白或核酸分子用于制造用于治疗疾病的药物的用途。在一个实施方案中，本发明提供了用于制造用于治疗疾病的药物的过程，其中所述药物组合物、重组结合蛋白或核酸分子是药物的活性成分。在一个实施方案中，本发明提供了使用所述药物组合物、重组结合蛋白或核酸分子治疗疾病的过程。

[0084] 具体地，本发明提供了使用本发明的药物组合物治疗医学病症，其中所述医学病症是癌症。

[0085] 本发明的重组结合蛋白或所述药物组合物用于治疗癌症疾病的用途也可以与本领域已知的一种或多种其他疗法结合。如本文所用的术语“与……结合使用”应指在给定方案下进行的共同施用。这包括不同化合物的同步给药以及不同化合物的错时给药(例如，化合物A给药一次，之后化合物B给药多次，反之亦然，或者两种化合物同步给药并且其中一种化合物在后续阶段中也给药)。

[0086] 在另一个实施方案中，本发明提供了本发明的重组结合蛋白用于制造用于治疗医学病症、优选地肿瘤性疾病、更优选地癌症的药物的用途。

[0087] 在一个实施方案中，本发明提供了本发明的药物组合物用于制造用于治疗可能是肿瘤性疾病、特别是癌症的医学病症的药物的用途。

[0088] 在一个实施方案中，本发明提供了包含任何上文提及的锚蛋白重复结构域的重组

结合蛋白。

[0089] 在一个实施方案中，本发明提供了包含所述重组结合蛋白的试剂盒。在一个实施方案中，本发明提供了包含编码所述重组结合蛋白的核酸的试剂盒。在一个实施方案中，本发明提供了包含所述药物组合物的试剂盒。在一个实施方案中，本发明提供了包含所述重组结合蛋白和/或编码所述重组结合蛋白的核酸和/或所述药物组合物的试剂盒。在一个实施方案中，本发明提供了包含以下项的试剂盒：包含CD40特异性锚蛋白重复结构域(例如，SEQ ID NO:29的CD40特异性锚蛋白重复结构域)的重组结合蛋白，和/或编码包含CD40特异性锚蛋白重复结构域的重组结合蛋白的核酸(例如，SEQ ID NO:36的核酸)，和/或包含所述包含CD40特异性锚蛋白重复结构域的重组结合蛋白和/或编码所述包含CD40特异性锚蛋白重复结构域的重组结合蛋白的核酸的药物组合物。

[0090] 在一个实施方案中，本发明提供了一种用于产生本发明的重组结合蛋白的方法。在一个实施方案中，本发明提供了一种用于产生重组结合蛋白(例如，包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重组结合蛋白)的方法，该方法包括以下步骤：(i)在细菌中表达所述重组结合蛋白，以及(ii)使用色谱法纯化所述重组结合蛋白。所述方法可包括附加步骤。

[0091] 本发明不限于实施例中描述的具体实施方案。

[0092] 本说明书涉及在所附序列表中公开的许多氨基酸序列、核酸序列和SEQ ID NO，该序列表全文以引用方式并入本文。

[0093] 定义

[0094] 除非本文另有定义，否则本文所用的所有技术和科学术语应具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0095] 在本发明的上下文中，术语“蛋白质”是指包含多肽的分子，其中多肽的至少一部分通过在单个多肽链内和/或多个多肽链之间形成二级、三级和/或四级结构而具有或能够获得限定的三维排列。如果蛋白质包含两个或更多个多肽链，则各个多肽链可非共价连接或共价连接，例如通过两个多肽之间的二硫键连接。通过形成二级和/或三级结构而单独具有或能够获得限定的三维排列的蛋白质部分被称为“蛋白质结构域”。这种蛋白质结构域是本领域技术人员熟知的。

[0096] 在重组蛋白、重组多肽等中使用的术语“重组”是指所述蛋白质或多肽是通过使用本领域技术人员熟知的重组DNA技术产生的。例如，可将编码多肽的重组DNA分子(例如，通过基因合成产生)克隆到细菌表达质粒(例如，pQE30，QIAgen公司)、酵母表达质粒、哺乳动物表达质粒或植物表达质粒，或者能够体外表达的DNA中。如果例如将此类重组细菌表达质粒插入适当的细菌(例如，大肠杆菌(Escherichia coli))中，则这些细菌可产生由该重组DNA编码的多肽。对应产生的多肽或蛋白质被称为重组多肽或重组蛋白。

[0097] 在本发明的上下文中，术语“结合蛋白”是指包含结合结构域的蛋白质。结合蛋白还可包含两个、三个、四个、五个或更多个结合结构域。优选地，所述结合蛋白是重组结合蛋白。本发明的结合蛋白包含至少一个对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。

[0098] 此外，任何此类结合蛋白可包含附加多肽(诸如例如多肽标签、肽接头、与其他具有结合特异性的蛋白质结构域的融合、细胞因子、激素、或拮抗剂)、或本领域技术人员熟知的化学修饰(诸如偶联到聚乙二醇、毒素(例如，来自免疫原的DM1)、小分子、抗生素等)。本发明的结合蛋白可包含定位剂分子。

[0099] 术语“结合结构域”意指对靶标表现出结合特异性的蛋白质结构域。优选地，所述结合结构域是重组结合结构域。更优选地，所述结合结构域是对特异性靶标具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。本发明的锚蛋白结合结构域可结合的特异性靶标的示例包括但不限于CD40、FAP和血清白蛋白。

[0100] 术语“靶标”是指单个分子，诸如核酸分子、多肽或蛋白质、碳水化合物或任何其他天然存在的分子，包括此类单个分子的任何部分，或者两种或更多种此类分子的复合物，或整个细胞或组织样品，或任何非天然化合物。优选地，靶标是天然存在的或非天然的多肽或蛋白质，或含有化学修饰(例如天然或非天然的磷酸化、乙酰化或甲基化)的多肽或蛋白质。在本发明的上下文中，CD40和表达CD40的细胞是CD40特异性结合蛋白和定位剂靶蛋白的靶标，并且细胞是定位剂的靶标。

[0101] 术语“核酸”或“核酸分子”是指多核苷酸分子，其可以是单链或双链的核糖核酸(RNA)分子或脱氧核糖核酸(DNA)分子，并且包括DNA或RNA的经修饰形式和人造形式。核酸分子可以以分离的形式存在，或者被包含在重组核酸分子或载体中。

[0102] 在本发明的上下文中，术语“多肽”涉及由多个(即两个或更多个)经由肽键连接的氨基酸的链组成的分子。优选地，多肽由八个以上经由肽键连接的氨基酸组成。术语“多肽”还包括通过半胱氨酸的S-S桥连接在一起的氨基酸的多个链。多肽是本领域技术人员熟知的。

[0103] 专利申请WO2002/020565和Forrer等人，2003(Forrer,P.,Stumpp,M.T.,Binz,H.K.,Plückthun,A.,2003.FEBS Letters 539,2-6)包含重复蛋白特征和重复结构域特征、技术和应用的一般描述。术语“重复蛋白”是指包含一个或多个重复结构域的蛋白质。优选地，重复蛋白包含一个、两个、三个、四个、五个或六个重复结构域。此外，所述重复蛋白可包含附加的非重复蛋白质结构域、多肽标签和/或肽接头。重复结构域可以是结合结构域。

[0104] 术语“重复结构域”是指包含两个或更多个连续重复模块作为结构单元的蛋白质结构域，其中所述重复模块具有结构和序列同源性。优选地，重复结构域还包含N-末端和/或C-末端封端模块。为清楚起见，封端模块，例如，其中允许通常二十种天然存在的氨基酸中的任一种，或者其中允许二十种天然存在的氨基酸中的大多数，诸如除半胱氨酸之外的氨基酸，或除甘氨酸、半胱氨酸和脯氨酸之外的氨基酸。出于本专利申请的目的，SEQ ID NO:39至95的氨基酸残基3、4、6、14和15是本发明的锚蛋白重复模块的随机化位置。

[0105] 术语“重复序列基序”是指从一个或多个重复模块导出的氨基酸序列。优选地，所述重复模块来自对相同靶标具有结合特异性的重复结构域。此类重复序列基序包含框架残基位置和靶标相互作用残基位置。所述框架残基位置对应于重复模块的框架残基位置。同样，所述靶标相互作用残基位置对应于重复模块的靶标相互作用残基的位置。重复序列基序包含非随机化位置和随机化位置。

[0106] 术语“重复单元”是指包含一种或多种天然存在的蛋白质的序列基序的氨基酸序列，其中所述“重复单元”存在于多个拷贝中，并且表现出确定蛋白质折叠的所有所述基序共有的限定的折叠拓扑结构。此类重复单元的示例包括富含亮氨酸的重复单元、锚蛋白重复单元、犰狳重复单元、三十四肽重复单元、HEAT重复单元和富含亮氨酸的变体重复单元。

[0107] 术语“对靶标具有结合特异性”、“特异性结合到靶标”、“高特异性结合到靶标”、“特异于靶标”或“靶标特异性”等是指，在PBS中结合蛋白或结合结构域以比其结合到不相

关的蛋白质(诸如,大肠杆菌麦芽糖结合蛋白(MBP))更低的解离常数(即,其以更高的亲和性结合)结合到靶标。优选地,靶标在PBS中的解离常数("K_D")是MBP的对应解离常数的至少10^2倍、更优选地至少10^3倍、更优选地至少10^4倍或更优选地至少10^5倍。确定蛋白质-蛋白质相互作用的解离常数的方法,诸如基于表面等离子共振(SPR)的技术(例如,SPR均衡分析)或等温滴定量热法(ITC)是本领域技术人员熟知的。如果在不同条件(例如,盐浓度、pH)下进行测量,则具体蛋白质-蛋白质相互作用的测量K_D值可以是变化的。因此,优选地利用标准化蛋白质溶液和标准化缓冲液(诸如,PBS)来进行K_D值的测量。对CD40具有结合特异性的本发明的重组结合蛋白的解离常数(K_D)的典型和优选测定是在PBS中并且通过表面等离子体共振(SPR)进行的。

[0108] 术语"多肽标签"是指附接到多肽/蛋白质的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列可用于纯化、检测或靶向所述多肽/蛋白质,或者其中所述氨基酸序列改善多肽/蛋白质的物理化学行为,或者其中所述氨基酸序列具有效应子功能。结合蛋白的各个多肽标签、部分和/或结构域可直接彼此连接或经由多肽接头彼此连接。这些多肽标签是本领域熟知的,并且是本领域技术人员完全可用的。多肽标签的示例是小的多肽序列,例如His(例如,由SEQ ID NO:4组成的His-标签)、myc、FLAG或Strep标签,或部分(诸如允许检测所述多肽/蛋白质的酶(例如,碱性磷酸酶等酶),或可以用于靶向的部分(诸如免疫球蛋白或其片段)和/或用作效应子分子的部分)。

[0109] 术语"多肽接头"是指能够连接例如两个蛋白质结构域、多肽标签和蛋白质结构域、蛋白质结构域和非多肽部分(诸如聚乙二醇)或者两个多肽标签的氨基酸序列。此类另外的结构域、标签、非多肽部分和接头是相关领域技术人员已知的。此类多肽接头的示例是由SEQ ID NO:1和2组成的接头。

[0110] 术语"约"意指所提及的值+/-20%;例如,"约50"应意指40至60。

[0111] 术语"PBS"意指含有137mM NaCl、10mM磷酸盐和2.7mM KCl并且pH为7.4的磷酸盐缓冲水溶液。

[0112] 如本文所用的术语"血清白蛋白"包括但不限于小鼠血清白蛋白、食蟹猴血清白蛋白和人血清白蛋白。术语"小鼠血清白蛋白"是指UniProt登录号P07724,术语"食蟹猴血清白蛋白"(即食蟹称猴)是指UniProt登录号A2V9Z4,并且术语"人血清白蛋白"是指UniProt登录号P02768。

[0113] 优选地,在哺乳动物、更优选小鼠和/或食蟹猴、更优选食蟹猴中评估清除率和/或暴露率和/或终末半衰期。优选地,当在小鼠中测量清除率/或暴露率和/或终末半衰期时,考虑注射后至多48小时的数据来进行评估。更优选地,在小鼠中评估终末半衰期时,用从24小时至48小时的数据进行计算。优选地,当在食蟹猴中测量清除率和/或暴露率和/或终末半衰期时,考虑注射后至多第7天的数据进行评估。更优选地,在食蟹猴中评估终末半衰期时,用从第1天至第5天的数据进行计算。本领域的技术人员还能够识别诸如靶标介导的清除等效应,并且在计算终末半衰期时考虑它们。药物(诸如,本发明的重组结合蛋白)的术语"终末半衰期"是指达到伪平衡后药物血浆浓度达到施加于哺乳动物的该药物浓度的一半所需的时间(例如,在小鼠中用从24小时至48小时的数据进行计算,或者在食蟹猴中用从第1天至第5天的数据进行计算)。并未将终末半衰期定义为施用给哺乳动物的药物剂量消除一半所需的时间。术语"终末半衰期"是本领域技术人员熟知的。优选地,药代动力学比较以

任何剂量、更优选地以当量剂量(即相同的mg/kg剂量)或等摩尔剂量(即相同的mol/kg剂量)、更优选地以等摩尔剂量(即相同的mol/kg剂量)进行。本领域技术人员应当理解,动物中当量和/或等摩尔给药的实验剂量变化为至少20%,更优选地为30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。优选地,用于药代动力学测量的剂量选自0.001mg/kg至1000mg/kg、更优选地0.01mg/kg至100mg/kg、更优选地0.1mg/kg至50mg/kg、更优选地0.5mg/kg至10mg/kg。

[0114] 术语"CD40"和"CD40受体"在本申请中可互换使用,并且是指CD40受体的任何形式,以及保留CD40受体的活性的至少一部分的变体、同种型和其物种同源物。因此,如本文所定义和公开的结合蛋白也可结合来自除人以外的物种的CD40。在其他情况下,结合蛋白可完全特异于人CD40,并且可不表现出物种或其他类型的交叉反应性。除非另有说明,否则如通过具体参考人CD40,CD40包括天然序列CD40的所有哺乳动物种类,例如人、犬、猫、马和牛。人CD40的氨基酸序列在NCBI参考序列NP_001241.1、Uniprot P25942和SEQ ID NO:96中示出。共刺激受体CD40是一种48-kDa的I型跨膜蛋白并且在人中含有173个氨基酸的胞外结构域(SEQ ID NO:97)、22个氨基酸的跨膜结构域和62个氨基酸的胞内结构域。前体还含有20个氨基酸的前导序列。关于表达模式,CD40最初在B细胞上表征,也在树突状细胞、单核细胞、血小板和巨噬细胞上表达以及由非造血细胞(诸如肌成纤维细胞、成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞)表达(Elgueta等人,Immunol Rev.2009年5月;229(1))。

[0115] 如本文所用,"CD40激动剂"意指在结合CD40结合时发生以下情况的任何化学化合物或生物分子:(1)刺激或活化CD40,(2)增强、增加、促进、诱导或延长CD40的活性、功能或存在,或者(3)增强、增加、促进或诱导CD40的表达。在其中治疗人个体的本发明的治疗方法、药物、药物组合物和用途中的任一种中,CD40激动剂增加CD40介导的反应。在本发明的治疗方法、药物、药物组合物和用途的一些实施方案中,CD40激动剂显著增强CD40的下游信号传导,从而在各种模型中产生抗肿瘤活性。

[0116] 在本发明的CD40特异性结合蛋白所包含的"定位剂分子"或"定位剂"的上下文中,如在本文中可互换使用的术语"定位"或"递送"是指与结合蛋白不包含定位剂时相比,这种包含定位剂的CD40特异性结合蛋白到哺乳动物的定位剂靶细胞或组织的定位增加。该术语还指将CD40特异性结合蛋白靶向哺乳动物的定位剂靶细胞或组织的位点,其中CD40特异性结合蛋白包含定位剂。该术语优选地还涵盖包含定位剂的CD40特异性结合蛋白在哺乳动物的定位剂靶细胞或组织的位点处的积累和/或保留。该术语还优选地涵盖由包含定位剂的本发明的CD40特异性结合蛋白在哺乳动物的定位剂靶细胞或组织的位点处或附近诱导的表达CD40的细胞中CD40的定位活化。这种定位活化可例如通过在包含定位剂的CD40特异性结合蛋白结合时CD40的聚集而发生,其中该聚集是通过定位剂与其靶细胞或组织结合来介导的。如本段中所用,"哺乳动物"涵盖人。"定位"的结果可通过本领域技术人员熟知的各种手段来测量。例如,"定位"可通过根据本领域熟知的方法确定与定位剂连接的本发明的结合蛋白的器官-血液比率来测量。在本发明的一个实施方案中,定位剂对"定位"包含定位剂的CD40特异性结合蛋白的作用通过与不包含定位剂的对应CD40特异性结合蛋白相比器官与血液的比率增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%或300%来表现。

[0117] 术语"定位剂分子"和"定位剂"在本文中可互换使用,并且旨在涵盖本发明的CD40

特异性结合蛋白可以包含并且能够将包含其的本发明的这种CD40特异性结合蛋白定位或递送到哺乳动物(包括例如人)的靶细胞或组织的任何分子,其中定位剂结合靶细胞或组织。定位剂可以连接、缀合、融合或以其他方式物理附接到本发明的CD40特异性锚蛋白重复结构域。术语“定位剂分子”和“定位剂”涵盖具有这些特性的多核苷酸、肽/多肽和/或化学或生物化学剂。术语“多核苷酸”通常是指DNA或RNA,并且包括DNA或RNA的经修饰和人工形式。术语“肽”是指4至600个氨基酸长(例如4至200个氨基酸长)的肽链,并且因此涵盖多肽和蛋白质。该术语涵盖任何天然存在的或人造的结合蛋白、结合结构域、生长因子受体或其片段或配体、细胞因子、多肽激素、抗体、基于支架的抗体样蛋白、免疫调节蛋白等。此外,术语“肽”还涵盖通过例如糖基化修饰的肽,以及包含两条或更多条多肽链的蛋白质,每条多肽链的长度为4至600个氨基酸长,通过例如二硫键交联,诸如例如胰岛素和免疫球蛋白。术语“化学或生物化学剂”旨在包括可施用于接受者的任何天然存在的或合成的化合物。在优选的实施方案中,定位剂是靶特异性锚蛋白重复结构域。在一个更优选的实施方案中,定位剂分子是对FAP具有结合特异性的锚蛋白重复结构域。

[0118] 如本文所用的术语“FAP”是指成纤维细胞活化蛋白。成纤维细胞活化蛋白α(FAP),也称为Seprase,为II型整合膜丝氨酸肽酶。FAP属于二肽基肽酶IV家族(Yu等人,FEBS J.277,1126-1144(2010))。它为170kDa的同源二聚体,含有两个具有大的C-末端胞外结构域的N-糖基化亚基,酶的催化结构域位于其中(Scanlan等人,Proc Natl Acad Sci USA 91:5657-5661(1994);Wonganu等人,Biochim Biophys Acta 1858(8):1876-82(2016))。糖基化形式的FAP具有后脯氨酰二肽基肽酶和明胶酶活性(Sun等人,Protein Expr Purif 24,274-281(2002))。人FAP的同源物存在于若干物种中,包括小鼠和食蟹猴(食蟹称猴(Macaca fascicularis))。FAP在超过90%的所检查的上皮恶性肿瘤(原发性和转移性)(包括肺癌、结直肠癌、膀胱癌、卵巢癌和乳腺癌)的反应性基质成纤维细胞中,以及在骨和软组织肉瘤的恶性间充质细胞中选择性表达,而其通常不存在于正常成人组织中(Brennen等人,Mol.Cancer Ther.11(2):257-266(2012);Garin-Chesa等人,Proc Natl Acad Sci USA 87,7235-7239(1990);Rettig等人,Cancer Res.53:3327-3335(1993);Rettig等人,Proc Natl Acad Sci USA 85,3110-3114(1988))。FAP也在某些恶性肿瘤细胞上表达。由于FAP在许多常见癌症中的表达及其在正常组织中的受限表达,其已被认为是用于多种癌症的成像、诊断和治疗的有前景的抗原靶标。

[0119] 如本文所用的术语“表达CD40的细胞”是指细胞表面上表达CD40的任何细胞,包括但不限于B细胞、树突状细胞、单核细胞、血小板和巨噬细胞以及非造血细胞(诸如肌成纤维细胞、成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞)。

[0120] 术语“治疗”是指治疗性治疗和预防性或防止性措施。需要治疗的那些患者包括已经患有疾患的那些患者,以及要预防疾患的那些患者。

[0121] 术语“医学病症”、“障碍”和“疾病”在本文中可互换使用,并且包括自身免疫性障碍、炎性障碍、视网膜病(特别是增殖性视网膜病)、神经退行性障碍、感染、代谢疾病和肿瘤性疾病。本文所述的重组结合蛋白中的任一种可用于制备用于治疗此类障碍、特别是选自由以下项组成的组的障碍的药物:自身免疫障碍、炎性障碍、免疫障碍和肿瘤性疾病。“医学病症”可能是以不适当的细胞增殖为特征的病症。医学病症可能是过度增生病症。本发明具体提供了一种治疗医学病症的方法,该方法包括向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的

本发明的重组结合蛋白或所述药物组合物的步骤。在一个优选的实施方案中，所述医学病症是肿瘤性疾病。如本文所用，术语“肿瘤性疾病”是指以细胞生长或肿瘤快速增殖为特征的细胞或组织的异常状态或病症。在一个实施方案中，所述医学病症是恶性肿瘤性疾病。在一个实施方案中，所述医学病症是癌症。术语“治疗有效量”是指足以在受试者中诱导期望的生物学结果、药理学结果或治疗结果的量。在本发明的上下文中，治疗有效量意指以适用于任何医学治疗的合理的效/险比治疗或预防疾病或疾患的结合蛋白的足够的量。

[0122] 术语“癌症”和“癌性”在本文中用来指或描述哺乳动物中通常以未受调控的细胞生长为特征的生理状况。癌症涵盖实体瘤和液体瘤，以及原发性肿瘤和转移。“肿瘤”包含一个或多个癌细胞。实体瘤通常还包含肿瘤基质。癌症的示例包括但不限于原发性和转移性癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病，以及任何其他上皮和淋巴恶性肿瘤。此类癌症的更具体示例包括脑癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、透明细胞肾癌、头/颈鳞状细胞癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、恶性黑素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、小细胞肺癌(SCLC)、三阴性乳腺癌、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(HL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、多发性骨髓瘤(MM)、骨髓增生异常综合征(MDS)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、头颈鳞状细胞癌(SCCHN)、慢性髓性白血病(CML)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、恶性间皮瘤、结直肠癌或胃癌。

[0123] 如本文所用的术语“改善的药代动力学特性”是指曲线下面积增加、清除率降低或终末半衰期增加。药代动力学特性的这些参数和确定它们的方式是本领域熟知的(参见例如，Mahmood,I.,Methods to determine pharmacokinetic profiles of therapeutic proteins,Drug Discov Today:Technol(2009),doi:10.1016/j.ddtec.2008.12.001)。

[0124] 在本发明的上下文中，氨基酸序列(诸如SEQ ID NO:8)中的字母“X”代表任何氨基酸。在本发明的上下文中，术语“任何氨基酸”优选地意指20种最常见的天然存在的氨基酸中的任一种，即丙氨酸(ala;A)、精氨酸(arg;R)、天冬酰胺(asn,N)、天冬氨酸(asp,D)、半胱氨酸(cys,C)、谷氨酰胺(gln,Q)、谷氨酸(glu,E)、甘氨酸(gly,G)、组氨酸(his,H)、异亮氨酸(ile,I)、亮氨酸(leu,L)、赖氨酸(lys,K)、甲硫氨酸(met,M)、苯丙氨酸(phe,F)、脯氨酸(pro,P)、丝氨酸(ser,S)、苏氨酸(thr,T)、色氨酸(trp,W)、酪氨酸(tyr,Y)、缬氨酸(val,V)。

[0125] 用于治疗的目的，术语“哺乳动物”是指分类为哺乳动物的任何动物，包括人、家畜和农场动物、非人灵长类动物，和动物园、运动或宠物动物，诸如狗、马、猫、牛等。

[0126] 实施例

[0127] 下文公开的起始材料和试剂是本领域技术人员已知的，是可商购获得的和/或可使用熟知的技术制备。

[0128] 材料

[0129] 化学品购自Sigma-Aldrich(USA)。寡核苷酸来自Microsynth(Switzerland)。除非另有说明，否则DNA聚合酶、限制酶和缓冲液来自New England Biolabs(USA)或Fermentas/Thermo Fisher Scientific(USA)。诱导型大肠杆菌表达菌株用于克隆和蛋白质产生，例如大肠杆菌XL1-blue(Stratagene,USA)或BL21(Novagen,USA)。人CD40的胞外结构域的重组Fc融合蛋白购自ACRO Biosystems。

[0130] 分子生物学

[0131] 除非另有说明,否则根据已知方案执行方法(参见例如Sambrook J.、Fritsch E.F.和Maniatis T.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory 1989,New York)。

[0132] 经设计的锚蛋白重复蛋白文库

[0133] 用于生成经设计的锚蛋白重复蛋白文库的方法已经描述于以下文献中:例如,美国专利号7,417,130;Binz等人,J.Mol.Biol.332,489-503(2003);Binz等人,2004,同前。通过此类方法,可构建具有随机化锚蛋白重复模块和/或随机化封端模块的经设计的锚蛋白重复蛋白文库。例如,此类文库可以因此基于固定的N-末端封端模块(例如N-末端封端模块SEQ ID NO:5、6或7)或根据SEQ ID NO:8的随机化N-末端封端模块、根据序列基序SEQ ID NO:9、10或11的一个或多个随机化重复模块以及固定的C-末端封端模块(例如C-末端封端模块SEQ ID NO:12、13或14)或根据SEQ ID NO:15的随机化C-末端封端模块进行组装。优选地,此类文库被组装成在重复或封端模块的随机化位置处不具有氨基酸C、G、M、N(在G残基前面)和P中的任一者。此外,根据SEQ ID NO:9、10或11的序列基序的随机化重复模块可以在位置10和/或位置17处进一步随机化;根据SEQ ID NO:8的序列基序的随机化N-末端封端模块可以在位置9处进一步随机化;并且根据SEQ ID NO:15的序列基序的随机化C-末端封端模块可以在位置10和/或17处进一步随机化。

[0134] 此外,此类文库中的此类随机化模块可包含具有随机化氨基酸位置的附加的多肽环插入。此类多肽环插入的示例是抗体的互补决定区(CDR)环文库或从头生成的肽文库。例如,可以使用人核糖核酸酶L的N-末端锚蛋白重复结构域的结构(Tanaka,N.,Nakanishi,M,Kusakabe,Y,Goto,Y.,Kitade,Y,Nakamura,K.T.,EMBO J.23(30),3929-3938,2004)作为指导来设计这种环插入。类似于其中将十个氨基酸插入在靠近两个锚蛋白重复的边界存在的β-转角中的这种锚蛋白重复结构域,锚蛋白重复蛋白文库可包含插入在锚蛋白重复结构域的一个或多个β-转角中的可变长度(例如,1至20个氨基酸)的随机化环(具有固定位置和随机化位置)。

[0135] 锚蛋白重复蛋白文库的任何这种N-末端封端模块优选地具有RILLAA、RILLKA或RELLKA基序(例如,存在于SEQ ID NO:29中的位置21至26),并且锚蛋白重复蛋白文库的任何这种C-末端封端模块优选地具有KLN、KLA或KAA基序(例如,存在于SEQ ID NO:29中的最后三个氨基酸处)。

[0136] 此类锚蛋白重复蛋白文库的设计可由与靶标相互作用的锚蛋白重复结构域的已知结构来指导。由其蛋白质数据库(PDB)唯一登录号或识别码(PDB-ID)识别的此类结构的示例为1WDY、3V31、3V30、3V2X、3V2O、3UXG、3TWQ-3TWX、1N11、1S70和2ZGD。

[0137] 已经描述了经设计的锚蛋白重复蛋白文库(诸如N2C和N3C经设计的锚蛋白重复蛋白文库)的示例(美国专利号7,417,130;Binz等人,2003,同前;Binz等人,2004,同前)。N2C和N3C中的数字描述了存在于N-末端和C-末端封端模块之间的随机化重复模块的数量。

[0138] 用于定义重复单元和模块内部的位置的命名法基于Binz等人,2004(同前),修改之处在于,锚蛋白重复模块和锚蛋白重复单元的边界移位一个氨基酸位置。例如,Binz等人2004(同前)的锚蛋白重复模块的位置1对应于本公开的锚蛋白重复模块的位置2,因而Binz等人2004(同前)的锚蛋白重复模块的位置33对应于本公开的以下锚蛋白重复模块的位置

1。

[0139] 实施例1:包含对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域的结合蛋白的选择

[0140] 使用核糖体展示(Hanes,J.和Plückthun,A.,PNAS 94,4937-42,1997),从与如Binz等人2004(同前)所述相似的DARPin®文库中选择许多对人CD40(hCD40)具有结合特异性的锚蛋白重复蛋白。通过粗提取物均相时间分辨荧光(HTRF)评估所选择的克隆对重组人CD40靶标的结合,表明成功选择数百种hCD40特异性结合蛋白。例如,SEQ ID NO:16至35的锚蛋白重复结构域构成所选择的包含对hCD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域的结合蛋白的氨基酸序列。来自此类对hCD40具有结合特异性的锚蛋白重复结构域的各个锚蛋白重复模块例如在SEQ ID NO:39至95中提供。

[0141] 通过核糖体展示选择CD40特异性锚蛋白重复蛋白

[0142] 通过核糖体展示(Hanes和Plückthun,同前)使用经由短接头(氨基酸序列:AAA)在C-末端与IgG1 Fc结构域融合的人CD40的胞外结构域(SEQ ID NO:97)作为靶蛋白、如上所述的锚蛋白重复蛋白文库和已建立的方案(参见例如,Zahnd,C.,Amstutz,P.和Plückthun,A.,Nat.Methods 4,69-79,2007)进行hCD40特异性锚蛋白重复蛋白的选择。每轮选择后,逆转录(RT)-PCR循环数不断减少,从而由于结合物的富集而调整收率。前四轮选择采用标准核糖体展示选择,使用降低靶标浓度和增加洗涤严格性来增加从第1轮到第4轮的选择压力(Binz等人,2004,同前)。对于一些池,在一些核糖体展示选择轮次中使用表位阻断。为了富集高亲和力CD40特异性锚蛋白重复蛋白,使来自第四轮标准核糖体展示选择(上文)的输出经受选择严格性增加的解离率选择轮次(Zahnd,2007,同前)。在解离率选择轮次后进行最终的标准选择轮次,以扩增和回收解离率选择的结合蛋白。在这最后两个选择轮次中,RT-PCR循环数保持恒定。将第4轮和第6轮的所有池也用FAP特异性结合结构域(参见实施例3)在N-末端格式化(即产生FC格式),并且将第4轮的一个池也用FAP特异性结合结构域在C-末端格式化(即产生CF格式),以允许在报告子测定中针对细胞中的CD40信号传导的活化进行功能筛选,这需要经由FAP结合进行聚类。简而言之,报告子测定使用表达CD40并携带NF-κB依赖性荧光素酶报告基因的HEK293细胞。在人CD40配体或任何其他CD40激动剂活化CD40信号传导后,NF-κB转录因子结合到DNA应答元件以诱导报告细胞中荧光素酶基因的转录。在存在和不存在表达FAP的细胞的情况下培养这些HEK293细胞。如果将本发明的CD40特异性结合蛋白用FAP特异性结合结构域格式化(例如,FC格式)并且仅在存在表达FAP的细胞的情况下,则CD40信号传导被结合蛋白活化,导致在FC格式化的构建体结合到CD40和FAP时发生CD40聚集。FAP特异性结合结构域是定位剂分子的示例(参见实施例3)。

[0143] 如粗提取物HTRF所示所选择的克隆特异性结合CD40

[0144] 使用标准方案,使用表达锚蛋白重复蛋白的大肠杆菌细胞的粗提取物,通过均相时间分辨荧光(HTRF)测定来鉴定溶液中特异性结合CD40的各个选择的锚蛋白重复蛋白。将通过核糖体展示选择的锚蛋白重复蛋白克隆到pQE30(Qiagen)表达载体的衍生物(提供N-末端His-标签(SEQ ID NO:4)以促进如下所述的简单蛋白质纯化)中,转化到大肠杆菌XL1-Blue(Stratagene)中,铺板在LB琼脂(含有1%葡萄糖和50μg/ml氨苄青霉素)上,然后在37℃处温育过夜。将单个菌落挑取到含有160μl生长培养基(含有1%葡萄糖和50μg/ml氨苄青霉素的TB)的96孔板中(每个克隆在单个孔中),并以800rpm振荡在37℃处温育过夜。将含50μg/ml氨苄青霉素的150μl新鲜TB培养基与8.5μl过夜培养物一起接种于新鲜的96深孔板

中。在37℃和850rpm处温育120分钟后，用IPTG(0.5mM最终浓度)诱导表达并持续4小时。收获细胞，并将沉淀物在-20℃处冷冻过夜，然后重悬于8.5μl B-PERII(Thermo Scientific)中，并在室温处振荡(600rpm)温育一小时。然后，添加160μl PBS，并通过离心(3220g持续15min)去除细胞碎片。

[0145] 将每个裂解克隆的提取物作为PBSTB(补充有0.1% Tween20®和0.2%(w/v)BSA的PBS，pH 7.4)中的1:500稀释液(最终浓度)与1.25nM(最终浓度)生物素酰化人CD40、1:400(最终浓度)的抗6His-D2 HTRF抗体-FRET受体缀合物(Cisbio)和1:400(最终浓度)的抗strep-Tb抗体FRET供体缀合物(Cisbio)一起施加到384孔板的孔中，并在RT处温育120分钟。使用340nm激发波长和665±10nm发射滤光器在Tecan M1000上读出HTRF。通过这种粗细胞提取物HTRF筛选数百个克隆，发现了超过一百个不同的对人CD40具有特异性的锚蛋白重复结构域。所选择的特异性结合人CD40的锚蛋白重复结构域的氨基酸序列的示例在SEQ ID NO:16至35中提供。

[0146] 所有这些锚蛋白重复结构域(SEQ ID NO:16至35)(FC格式)也活化细胞中的CD40信号传导，如报告子测定中所示，其中EC50值在低纳摩尔范围内(参见表1)。

[0147] 表1.报告子测定中FC格式的CD40特异性锚蛋白重复结构域的EC50值

[0148]

SEQ ID NO	EC50[nM]
16	9.0
17	13.7
18	8.5
19	12.2
20	5.1
21	3.0
22	2.8
23	4.1
24	1.5
25	10.8
26	7.5
27	12.0
28	0.4
29	5.0
30	26.9
31	5.3
32	5.6
33	1.2
34	4.2
35	3.1

[0149] CD40特异性锚蛋白重复蛋白的高水平和可溶性表达

[0150] 为了进一步分析，在大肠杆菌细胞中表达如上所述的在粗细胞提取物HTRF中显示特异性CD40结合的所选择的克隆，并根据标准方案使用其His标签进行纯化。使用25ml固定

过夜培养物(TB,1%葡萄糖、50mg/l的氨苄青霉素;37℃)接种500ml培养物(TB,50mg/l氨苄青霉素,37℃)。在600nm处1.0至1.5的吸光度下,用0.5mM IPTG诱导培养物并在37℃处温育4-5小时,同时振荡。将培养物离心,并将所得沉淀重悬于25ml TBS_{500}(50mM Tris-HCl,500mM NaCl,pH8)中并裂解(超声处理或弗氏压碎器)。裂解后,将样品与50KU DNase/ml混合,温育15分钟,然后在62.5℃处热处理30分钟,离心并收集上清液并过滤。向匀浆中添加Triton X100(1%(v/v)最终浓度)和咪唑(20mM最终浓度)。根据本领域技术人员已知的标准方案和树脂,将蛋白质在镍-次氮基三乙酸(Ni-NTA)柱上进行纯化,随后在ÄKTAxpress™系统上进行尺寸排阻色谱法。另选地,所选择的不含His标签的锚蛋白重复结构域通过在大肠杆菌中高细胞密度发酵产生并根据本领域技术人员已知的标准树脂和方案通过一系列色谱法和超滤/渗滤步骤纯化。从大肠杆菌培养物(每升培养物至多200mg锚蛋白重复蛋白)中纯化对CD40具有结合特异性的高度可溶性锚蛋白重复蛋白,如从4%-12%SDS-PAGE估计的纯度>95%。

[0151] 实施例2:通过表面等离子体共振(SPR)分析确定对CD40具有结合特异性的锚蛋白重复蛋白的解离常数(K_D)

[0152] 使用ProteOn仪器(BioRad)分析纯化的锚蛋白重复蛋白对人CD40靶标的结合亲和力,并且根据本领域技术人员已知的标准程序进行测量。

[0153] 简而言之,将生物素酰化的人CD40在PBST(PBS,pH 7.4,含有0.005% Tween20®)中稀释,并在NLC芯片(BioRad)的两个泳道上分别包被至400和700个共振单位(RU)的水平。然后通过注射包含锚蛋白重复蛋白的系列稀释液(覆盖50nM与3nM之间的浓度范围,用于多迹线SPR测量(结合率测量))的200μl运行缓冲液(PBS,pH 7.4,含有0.005%Tween20®),随后以100μl/min的恒定流速注射运行缓冲液流至少10分钟(解离率测量),来测量锚蛋白重复蛋白和hCD40的相互作用。使用30μl的10mM甘氨酸-HCl pH 2进行再生。从注射锚蛋白重复蛋白(双参考)后获得的共振单位(RU)迹线中减去点间和参考注射(即,仅注射运行缓冲液)的信号(即RU值)。基于从结合率和解离率测量获得的SPR迹线,使用1:1Langmuir动力学模型来确定对应锚蛋白重复蛋白-CD40相互作用的结合率和解离率。

[0154] 使用本领域技术人员已知的标准程序,由估计的结合率和解离率计算解离常数(K_D)。所选择的锚蛋白重复蛋白与人CD40的结合相互作用的K_D值被确定为在纳摩尔范围内。表2提供了作为示例的一些选择的锚蛋白重复蛋白的K_D值。

[0155] 表2.锚蛋白重复蛋白-人CD40相互作用的K_D值

[0156]

SEQ ID NO	K_D [nM]
22	12.0
29	73.0
31	73.5

[0157] 实施例3:与A定位剂分子组合的CD40特异性结合蛋白

[0158] 将CD40特异性结合蛋白与定位剂分子组合,并且在一些情况下另外与血清半衰期延长分子组合,以评价本发明的CD40特异性结合蛋白的CD40激动剂功能是否可以以如下方式在多功能分子中格式化:使得CD40激动剂功能有效且依赖于定位剂,并且另外还可提供临床开发所必需的血清半衰期延长。

[0159] 作为定位剂分子,选择FAP特异性结合域。SEQ ID NO:98提供了FAP特异性结合结构域。作为半衰期延长分子,选择血清白蛋白特异性结合结构域。此类血清白蛋白特异性结合结构域是本领域已知的。

[0160] 生成各种格式的多功能分子,并确定它们的FAP特异性、CD40活化的功效和效力。这些多功能蛋白都包含定位剂(即FAP特异性结合结构域)和CD40特异性结合结构域。评价以下项的影响:(i)添加人血清白蛋白(HSA)结合结构域,(ii)通过添加另外的CD40结合结构域增加化合价,以及(iii)改变结合结构域在蛋白内的顺序。

[0161] 为了比较不同的格式,建立了体外测定,测量在CD40触发时在人B细胞上表达的共刺激受体CD86的上调。该细胞测定在存在或不存在表达FAP的细胞的情况下使用原代人B细胞。评价CD86共刺激分子的上调作为B细胞活化的标志物。将抗CD40单克隆抗体(其作用机制不依赖于FAP介导的交联)用作参考材料。

[0162] 不同格式的多功能蛋白。多功能蛋白的最简单格式是一个CD40特异性结合结构域(SEQ ID NO:29)和一个定位剂分子(即FAP特异性结合结构域)的组合(产生SEQ ID NO:99;SMA014)。基于作为亲本分子的这种初始格式,生成若干其他多功能蛋白格式,如表3中所汇总的。

[0163] 表3.各种结构域格式的多功能蛋白

[0164]

SEQ ID NO/构建体名称	格式
SEQ ID NO:99/SMA014	FC
SEQ ID NO:100/SMA087	HFC
SEQ ID NO:101/SMA095	HFCH
SEQ ID NO:102/SMA104	FCC
SEQ ID NO:103/SMA091	HFCC
SEQ ID NO:104/SMA099	HFCCH
SEQ ID NO:105/AS579	HHFCC
SEQ ID NO:106/SMA105	FCCC

[0165] 表3中的“C”、“F”和“H”分别表示特异性结合CD40、FAP和HSA的锚蛋白重复结构域。如表3中所示的不同结构域的顺序反映了蛋白质的分子结构中从N-末端到C-末端的结构域的实际序列。为了便于纯化,所有蛋白质在N-末端另外具有His-标签(SEQ ID NO:4)。

[0166] 材料和方法

[0167] 作为参照,使用CD40单克隆抗体。该CD40 mAb(一种IgG2 mAb)与CD40结合导致独立于FAP的抗原呈递细胞的活化。抗CD40 mAb对应于US 7,338,660 B2的序列21.4.1。

[0168] 将CHO细胞在37℃、5% CO_2处在含有10% FBS的DMEM培养基中培养,并且每2-3天使用accutase分离细胞。

[0169] 表达FAP的CHO细胞系是在细胞表面上表达人FAP的稳定转染的克隆细胞系。含有人FAP的ORF的GFP融合体的质粒从OriGene Technologies(#RG204692)获得。使用标准分子生物学技术亚克隆编码人FAP(无GFP)的cDNA。然后使用脂质体将该质粒转染到CHO细胞中以产生过表达人FAP的稳定转染子。使用不同浓度的遗传霉素G-418(Promega,V8091)施加选择压力。使用对应于ESC11的抗FAP抗体(WO2011/040972)通过流式细胞术分析FAP的表达。来自条件1.9mg/mL G-418(FAP-CHO-1.9)的FAP-CHO转染子群体显示出较低的FAP表达

水平，而来自条件1.7mg/mL(FAP-CHO-1.7)的那些转染子群体显示出较高的FAP表达水平。使用FAP-CHO-1.7生成本实施例中的数据。

[0170] 体外B细胞活化测定。体外B细胞活化测定的设计在图1中示意性地示出。血沉棕黄层从苏黎世献血中心获得并用PBS稀释。然后使用Leucosep管通过密度离心分离外周血单核细胞(PBMC)。在若干洗涤步骤之后，根据制造商的建议使用阳性选择(人CD19 MicroBeads试剂盒)从PBMC中富集人$CD19^+$B细胞。将1×10^5个细胞/孔的$CD19^+$B细胞和5×10^4个细胞/孔的表达FAP的CHO细胞或CHO野生型(WT-CHO)细胞连同剂量滴定(400nM、200nM、40nM、8nM、5nM、1.6nM、0.3nM、0nM)的指定分子一起接种到96孔板中含或不含600μM HSA的RPMI 1640培养基+10％ FBS中。将培养物在37℃、5％ CO2处温育24小时，并且使用AttuneNxT通过流式细胞术评估$CD20^+$B细胞上CD86和CD69的上调。

[0171] FACS染色、流式细胞仪设置和抗体稀释。将细胞首先用150μl PBS洗涤，然后在室温(RT)处用100μl在PBS中稀释(1:100)的BD人Fc-Block温育20分钟。在Fc阻断温育后，将细胞与100μl在FACS缓冲液中稀释的直接标记的抗体(参见下表5的稀释因子)一起温育，并在4℃处在黑暗中再温育20分钟。将细胞用PBS洗涤，重新悬浮于100μl在PBS中稀释(1:1000)的Live/Dead染色液中，并在4℃处在黑暗中温育20分钟。添加100μl含有FBS反应的FACS缓冲液以终止Live/Dead染色反应。将细胞再次用PBS洗涤，并根据制造商的建议使用在水中稀释(1:10)的BD Cell Fix溶液固定。抗体的稀释度和FACS设置在下表4中汇总。根据制造商的建议(ThermoFisher;AbC™总抗体补偿珠粒试剂盒)，用补偿珠粒对FACS机器进行补偿。使用FlowJo软件(第10.0.3版)分析raw_fcs文件。使用Live-Dead区分染料对活细胞进行门控，然后对CD20阳性细胞进行门控，如图2中针对CD86所示。输出CD86的MFI和阳性细胞百分比，并使用GraphPad prism软件第8.1.2版作图。

[0172] 表4

[0173] FSC:200SSC:400采集:200ul/min,100.000个事件

[0174]

靶标	荧光色素	稀释度	稀释介质	通道	电压

[0175]

CD20	APC-Cy7	1:100	FACS缓冲液	BL2	400
CD86	PE	1:200	FACS缓冲液	YL1	380
CD69	APC	1:200	FACS缓冲液	RL-1	400
Live/Dead	Aqua	1:1000	PBS	VL2	400

[0176] EC50确定。使用GraphPad Prism第7.02版通过以下方式确定EC50值:以对数模式转换x值(浓度)，并用用于测定EC50值的可变斜率(三个参数)公式在非线性模式对数(激动剂)与应答中拟合。

[0177] 功效确定。使用GraphPad Prism第7.02版通过计算最高浓度(400nM)下MFI值的重复平均值来确定功效值。

[0178] 结果

[0179] 本发明的CD40特异性结合蛋白可以与定位剂组合以生成定位剂依赖性CD40激动剂。在体外人B细胞活化测定中测试F-C形式的多功能分子SMA014。如图3、图4和图5所示，CD40特异性结合蛋白(SEQ ID NO:29)与定位剂(FAP特异性结合结构域)的这种组合产生以严格的定位剂依赖性(即FAP依赖性)方式有效活化人B细胞中的CD40信号传导的分子。仅在存在表达FAP的CHO细胞(FAP-CHO)的情况下，SMA014才有效地活化B细胞中的CD40信号传导

(向上的全三角形符号)。在存在非表达FAP的CHO细胞(WT-CHO)存在下,SMA014对CD40信号传导没有影响(向上的空三角形符号)。相比之下且正如预期,激动性抗CD40 mAb独立于FAP表达诱导人B细胞的活化,从而在存在FAP-CHO或WT-CHO细胞的情况下活化B细胞。此外,SMA014和抗CD40 mAb以剂量依赖性方式上调CD86。两个独立实验的EC50(效力)和最大MFI(功效)平均值分别在表5和表6(对于FAP-CHO)中以及表7(对于WT-CHO)中汇总。

[0180] 总之,这些数据表明,可以将本发明的CD40结合蛋白与定位剂分子组合以生成多功能分子,该多功能分子以严格的定位剂依赖性作用模式作为有效的CD40激动剂起作用。

[0181] HSA结合结构域削弱CD40-定位剂结合蛋白(F-C格式)的效力和功效。以其他格式克隆CD40和定位剂结合蛋白SMA014,添加代表血清半衰期延长部分的一个(H-F-C,SMA087)或两个(H-F-C-H,SMA095)HSA结合锚蛋白重复结构域。也在体外B细胞活化测定中测试这些构建体。如图3所示,HSA结合结构域削弱了F-C格式的原始多功能结合蛋白的效力和功效,并且削弱水平与添加到结合蛋白中的HSA结合结构域的数量相关。重要的是,在存在模拟人血清中白蛋白的生理浓度的600μM白蛋白的情况下,抑制更为明显。有理由假设复合HSA结合物/白蛋白可能对CD40结合结构域和/或定位剂的结合以及由此产生的活性产生空间削弱。在不存在和存在HSA的情况下,HSA结合结构域不影响多功能CD40-定位剂结合蛋白的FAP特异性作用模式。两个独立实验的EC50(效力)和最大MFI(功效)平均值分别在表5和表6(对于FAP-CHO)中以及表7(对于WT-CHO)中汇总。

[0182] 总之,半衰期延长HSA结合结构域的添加削弱了CD40-定位剂结合蛋白(F-C格式)的功能,抑制随着添加的HSA结合结构域的数量而增加,并且在存在生理浓度的白蛋白的情况下,抑制更为明显。

[0183] CD40的二价增加效力和功效并且挽救由HSA结合结构域诱导的抑制作用。然后申请人研究了CD40化合价如何影响多功能CD40和定位剂结合分子的性能。以另外的不同格式克隆SMA014,添加一个(F-C-C,SMA104)或两个(F-C-C-C,SMA105)CD40结合结构域,并在体外B细胞活化测定中进行测试。如图4所示,二价和三价格式诱导更强的CD86上调,表明化合价有利于分子的性能。具体地,在存在表达FAP的CHO细胞的情况下,CD40二价(SMA104)强效增加了分子的效力(20倍)和功效(2倍)。与CD40二价相比,CD40三价(SMA105)仅引起分子的效力轻微增加,但不进一步影响功效。在不存在FAP的情况下,二价CD40格式(SMA104)不诱导人B细胞上CD86的上调,而三价CD40格式(SMA105)在不存在最高浓度的FAP的情况下也显示出轻微活化,表明三价CD40结合物可能诱导FAP非依赖性活化。鉴于这些结果,二价CD40格式代表优选的格式。具体地,申请人测试了CD40二价是否可以挽救HSA结合结构域的抑制作用。为了解决这个问题,克隆二价CD40构建体SMA104,其在不同位置具有另外的HSA结合结构域(克隆SMA091、SMA099和AS579;关于它们的结构域格式的信息参见上表3)。与SMA014相比,所有测试格式都显示出改善的效力和功效(图5A)。重要的是,在存在HSA的更接近生理的条件下,具有HSA结合结构域的所有格式的活性都降低,但是与SMA014相比,SMA091仍然显示出改善的活性(图5B)。在不存在FAP的情况下,即使在最高浓度下,也没有多功能结合蛋白增强CD86在B细胞上的表达(图5A和图5B)。正如预期,激动性抗CD40 mAb独立于FAP表达诱导人B细胞的活化,从而用FAP-CHO或WT-CHO活化B细胞。两个独立实验的EC50(效力)和最大MFI(功效)平均值分别在表5和表6(对于FAP-CHO)中以及表7(对于WT-CHO)中汇总。

[0184] 表5

[0185]

蛋白	EC50 [nM]			
	MFI CD86		% CD86	
	w/o HSA	w HSA	w/o HSA	w HSA
SMA014	8.46	7.7	4.21	6.15
SMA087	28.92	52.01	11.44	72.34
SMA095	287.55	-	89.84	-
CD40 mAb	1.13	0.51	1.9	0.88
SMA091	3.93	8.05	0.76	2.98
SMA099	18.23	19.41	4.68	7.5
SMA104	0.74		0.23	
SMA105	0.33		0.11	
AS579	10.01	23.1	2.27	10.25
CD40 mAb	4.73	2.05	0.51	0.3

[0186] 表6

[0187]

蛋白	功效 [最高剂量下的 MFI]			
	MFI CD86		% CD86	
	w/o HSA	w HSA	w/o HSA	w HSA
SMA014	2436.25	2189.75	48.4	47
SMA087	1643.25	799.25	43.4	27.01
SMA095	773	232.25	28.7	-
CD40 mAb	1339.5	1528.5	38.6	45.05
SMA091	6230.25	2983.25	78.15	75.63
SMA099	4954	1718.75	84.4	71.68
SMA104	6270.75		86.8	
SMA105	5558.5		87.15	
AS579	4864.5	1781.75	82.98	71.9
CD40 mAb	2064.25	1867.25	78.63	76.63

[0188] 表7

[0189]

蛋白	功效 [最高剂量下的 MFI]			
	MFI CD86		% CD86	
	w/o HSA	w HSA	w/o HSA	w HSA
SMA014	293.75	310	13.15	13.29
SMA087	291	299	12.53	13.73
SMA095	299	306.5	12.48	13.68
CD40 mAb	1389.5	1473	38.83	40.05
SMA091	289.5	295.5	47.78	43.13
SMA099	289.25	273.75	47.38	42.53
SMA104	251.75		46.05	
SMA105	672.5		69.25	
AS579	252.5	242.5	42.05	40.13
CD40 mAb	2053.75	1902	79	77.83

[0190] 结论:这些数据表明,可以将本发明的CD40结合蛋白与定位剂分子组合以生成多功能分子,该多功能分子以严格的定位剂依赖性作用模式作为有效的CD40激动剂起作用。

F-C格式的多功能CD40和定位剂(FAP)结合蛋白在功能性细胞测定中显示出良好的生物活性并且显示出良好的物理特性。然而,该结合蛋白可能需要半衰期延长结构域以允许其临床开发。因此,分析不同的格式以确定半衰期延长HSA结合结构域的数量和位置是否以及如何影响分子的活性。观察到半衰期延长结构域对分子的活性具有有害作用,并且该作用随着半延长结构域的数量和HSA的存在而增加。此外,随后惊讶地发现,CD40二价(通过具有两个CD40结合结构域)强效增加了结合蛋白的效力(20倍)和功效(2倍),并且保持了严格的FAP特异性作用机制,但是CD40三价(通过具有三个CD40结合结构域)与CD40二价相比仅轻微增加了效力,并且没有显示出对功效的任何进一步影响。此外,三价CD40结合蛋白在最高浓度下在不存在FAP的情况下也显示出轻微活化,表明FAP特异性作用模式部分丧失。进一步发现CD40二价能够通过增加结合蛋白的效力和功效来挽救一个半衰期延长结构域的抑制作用。具体地,在HSA的生理浓度下,H-F-C-C格式的结合蛋白保留与F-C格式的结合蛋白相当的活性和FAP特异性。总之,通过添加第二个CD40结合结构域,我们可以防止HSA结合半衰期延长结构域的有害作用,并生成具有与F-C格式的亲本结合蛋白相似的功能特性但配有半衰期延长结构域的分子,这将促进临床开发。

[0191] 实施例4:CD40特异性结合蛋白所结合的人肿瘤坏死因子受体超家族成员5(hCD40)的复合物的X射线结构分析

[0192] 本研究的目的是使用X射线晶体学来生成和分析本发明的CD40特异性结合蛋白所结合的重组hCD40的复合物。用于该结构分析的CD40特异性结合蛋白是DARPin®蛋白#29(SEQ ID NO:29)。

[0193] 材料和方法

[0194] 蛋白质产生。在存在阻断糖基化的衣霉素的情况下在Hi5细胞中表达hCD40。经由HIS-Trap、THB消化、阴性HIS-Trap和SEC纯化来自培养上清液的蛋白质。将纯化的hCD40与DARPin®蛋白#29以1:1.2的比率混合。经由SEC在10mM HEPES/NaOH pH 7、150mM NaCl中从hCD40:DARPin®蛋白#29复合物中除去过量的DARPin®蛋白#29。将样品浓缩至36.7mg/ml。该过程产生纯度大于95%的均质蛋白质,如根据考马斯染色的SDS-PAGE判断的。

[0195] 结晶。将纯化的蛋白质用于结晶试验中,所述结晶试验采用大约1200种不同条件的标准筛选,以及使用文献数据鉴定的结晶条件。使用标准策略优化最初获得的条件,系统地改变严重影响结晶的参数,诸如温度、蛋白质浓度、滴比等。还通过系统地改变pH或沉淀剂浓度来精化这些条件。

[0196] 最终结晶条件:

[0197] 30%w/v PEG 4K

[0198] 0.24M LiSO4

[0199] 0.1M Tris pH=8.50

[0200] 0.35M NaBr

[0201] 数据收集和处理。将晶体快速冷冻并在100K的温度处测量。使用低温条件在SWISS光源(SLS,Villigen,Switzerland)下从与配体DARPin®蛋白#29结合的hCD40的复合物晶体中收集X射线衍射数据。晶体属于空间群C 2。使用程序autoPROC、XDS和autoPROC、

AIMLESS处理数据。DARPin®蛋白#29的数据收集和处理统计在下表8中列出。

[0202] 表8

[0203]

配体	DARPin hC23
X射线源	PXII/X10SA（SLS[1]）
波长[Å]	0.9998
检测器	EIGER
温度[K]	100
空间群	C 2
细胞：a；b；c；[Å]	193.67；59.56；81.84
α；β；γ；[°]	90.0；107.0；90.0

[0204]

分辨率[Å]	2.29（2.33-2.29）
独特反射	39800（1932）
多重性	4.3（4.4）
完成度[%]	97.8（97.3）
R_{pim} [%][6]	4.3（61.8）
R_{sym} [%][3]	7.8（114.9）
R_{meas} [%][4]	8.9（130.9）
CC1/2 [%]	99.70（43.00）
平均值（I）/sd[5]	10.1（1.3）

[0205] 1 SWISS光源(SLS,Villigen,Switzerland)

[0206] 2括号中的值是指最高分辨率组。

[0207] 3 $R_{sym}=\frac{\sum_h\sum_i^{n_h}\left|\hat{I}_h-I_{h,i}\right|}{\sum_h\sum_i^{n_h}I_{h,i}}$，其中$\hat{I}_h=\frac{1}{n_h}\sum_i^{n_h}I_{h,i}$

[0208] 其中$I_{h,i}$是h的第i次测量的强度值

[0209] 4 $R_{meas}=\frac{\sum_h\sqrt{\frac{n_h}{n_h-1}}\sum_i^{n_h}\left|\hat{I}_h-I_{h,i}\right|}{\sum_h\sum_i^{n_h}I_{h,i}}$，其中$\hat{I}_h=\frac{1}{n_h}\sum_i^{n_h}I_{h,i}$

[0210] 其中$I_{h,i}$是h的第i次测量的强度值

[0211] 5由独立反射计算

[0212] 6精度指示 $Rpim=\frac{\sum_h\sqrt{1/(N-1)}\left|I_{hl}-<I_h>\right|}{\sum_h<I_h>}$

[0213] 结构建模和精化。通过分子置换获得确定和分析结构所需的相位信息。将先前解析的hCD40的结构用作搜索模型。根据标准方案分别用COOT和软件包CCP4进行随后的模型构建和精化。对于自由R因子(一种交叉验证最终模型的正确性的量度)的计算，将约4.9％的测量反射从精化程序中排除(参见下表9)。进行TLS精化(使用REFMAC5、CCp4)，这使得的R

因子更低且电子密度图的质量更高。应用自动生成的本地NCS约束(更新的REFMAC5版本的关键字“ncsr local”)。用GRADE(Global Phasing Limited)进行配体参数化和相应文库文件的生成。通过将水分子置于用REFMAC5在3.0处轮廓化的F_o-F_c图的峰值中,并用COOT的验证工具检查所有水,用COOT的“Find waters”算法建立水模型。可疑水的列表的标准为:B因子大于80Å^2,2F_o-F_c图小于1.2σ,到最近接触点的距离小于2.3Å或大于3.5A。手动检查可疑水分子以及配体结合位点中的可疑水分子(到配体的距离小于10Å)。最终模型的Ramachandran图显示,所有残基中92.2%在最有利区域中,7.8%在额外允许区域中,并且0.0%在宽松允许区域中。在不允许区域中没有发现残基(表9)。最终结构和精化过程的统计结果在下表9中列出。

[0214] 表9[1]

配体	DARPin hC23
分辨率[Å]	92.61-2.29
反射次数(工作/测试)	37835 / 1962
R_{cryst} [%]	21.9
R_{free} [%][2]	25.1
原子总数:	
蛋白	4894
水	208
钠	2
与理想几何形状的偏差: [3]	
键长[Å]	0.014
键角[°]	1.59
键合的 B's [Å^2] [4]	2.9
Ramachandran 图: [5]	
最有利区域[%]	92.2
额外允许范围[%]	7.8
宽松允许区域[%]	0.0
不允许区域[%]	0.0

[0215]

[0216] 1如REFMAC5中定义的值,无sigma截止值

[0217] 2测试集包含4.9%的测量反射

[0218] 3与几何目标值的均方根偏差

[0219] 4用MOLEMAN计算

[0220] 5用PROCHECK计算

[0221] 结果

[0222] 将该结构解析并精化至最终分辨率为2.29。使用X射线晶体学进行结构分析揭示了DARPin®蛋白#29与CD40受体的富含半胱氨酸的结构域(CRD)1(氨基酸23-59)结合,并且它在与CD40配体(CD40L)的结合位点相反的一侧与CD40受体结合,表明DARPin蛋白与

CD40L之间不存在直接结合位点竞争(图6A和图6B)。CD40受体的CRD1结构域远离细胞膜定位。

[0223] 据报道,强效的CD40激动剂抗体结合CD40受体的膜远端表位(Yu等人,Cancer Cell 33,664-675e664(2018))。类似地,本实施例中描述的X射线晶体学研究显示本发明的CD40特异性结合蛋白与远离细胞膜的CD40受体的CRD1相互作用。如已经针对CD40激动剂抗体所提出的,更远离细胞膜的表位可导致更少的空间位阻,从而允许更好地接近包含定位剂分子的本发明的CD40特异性结合蛋白以及更有效地聚集,因此更有效地活化CD40受体。此外,显示本发明的CD40特异性结合蛋白与CRD1之间的相互作用区域与CD40L的结合位点相反,表明本发明的结合蛋白与CD40L之间不存在直接结合竞争。不竞争CD40L的化合物可与配体具有加和或协同作用,从而使得更好地活化受体(参见例如,Yu等人,同前;Challa等人,Allergy 54,576-583(1999);Pound等人,Int Immunol 11,11-20(1999))。

[0224] 按照本说明书内引用的参考文献的教导内容最彻底地理解本说明书。本说明书内的实施方案提供了对本发明实施方案的说明,并且不应理解为限制本发明的范围。技术人员容易认识到,本发明涵盖许多其他实施方案。本公开中引用的所有出版物、专利和GenBank序列均全文以引用方式并入。在以引用方式并入的材料与本说明书矛盾或不一致的程度上,本说明书将取代任何此类材料。对本文任何参考文献的引用不是承认此类参考文献是本发明的现有技术。

[0225] 本领域的技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文描述的本发明的特定实施方案的许多等同物。此类等同物旨在由以下实施方案涵盖。

序列表

<110> Molecular Partners AG

<120> 重组CD40结合蛋白及其用途

<130> AD1388 PCT S3

<150> EP20 17 4830.8

<151> 2020-05-14

<160> 106

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含PT的肽接头

<400> 1

Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr
1 5 10 15

Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser
20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含PT的肽接头

<400> 2

Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr
1 5 10 15

Pro Thr Pro Thr Pro Thr
20

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有GS接头

<220>

<221> 变体

<222> 1..5
<223> [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]n,其中n为1、2、3、4、5或6
<400> 3
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> His-标签
<400> 4
Met Arg Gly Ser His His His His His His
1 5 10
<210> 5
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> N-末端封端模块
<400> 5
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1 5 10 15
Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
20 25 30
<210> 6
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> N-末端封端模块
<400> 6
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1 5 10 15
Leu Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
20 25 30
<210> 7
<211> 32
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> N-末端封端模块
<400> 7

Gly	Ser	Asp	Leu	Gly	Ser	Lys	Leu	Leu	Gln	Ala	Ala	Arg	Ala	Gly	Gln
1				5				10					15		
Leu	Asp	Thr	Val	Arg	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala	Gly	Ala	Asp	Val	Asn	Ala
			20					25				30			

<210> 8
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> N-末端封端模块
<220>
<221> 变体
<222> 6
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 7
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 13
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 14
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 19
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 22
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<220>

<221> 变体
<222> 24
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 25
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 26
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<400> 8

Gly	Ser	Asp	Leu	Gly	Xaa	Xaa	Leu	Leu	Gln	Ala	Ala	Xaa	Xaa	Gly	Gln
1				5				10					15		
Leu	Asp	Xaa	Val	Arg	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Ala	Asp	Val	Asn	Ala
			20					25				30			

<210> 9
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<220>
<221> 变体
<222> 1
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 3
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa can be any occuring amino acid
<220>
<221> 变体
<222> 6
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>

<221> 变体
<222> 11
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 14
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 15
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 27
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<400> 9

Xaa Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Xaa Ala Ala Xaa Xaa Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala

<210> 10
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<220>
<221> 变体
<222> 3
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 6
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸

<220>
<221> 变体
<222> 14
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 15
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<400> 10

Lys Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala

<210> 11
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<220>
<221> 变体
<222> 3
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 6
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 11
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 14

<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 15
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<400> 11
Lys Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Xaa Ala Ala Xaa Xaa Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 12
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> C-末端封端模块
<400> 12
Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp Asn Gly
1 5 10 15
His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
20 25
<210> 13
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> C-末端封端模块
<400> 13
Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly
1 5 10 15
His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
20 25
<210> 14
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> C-末端封端模块

<400> 14
Gln Asp Thr Gln Gly Thr Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly
1 5 10 15
His Gln Gln Ile Ala Ser Val Leu Gln Gln Ala Ala
20 25
<210> 15
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> C-末端封端模块
<220>
<221> 变体
<222> 1
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 3
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 6
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 11
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 15
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 19
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸

<220>
<221> 变体
<222> 22
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 26
<223> Xaa可以是任何存在的氨基酸
<400> 15

Xaa Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Ala Asp Xaa Ala Ala Arg Xaa Gly
1 5 10 15
His Gln Xaa Ile Ala Xaa Val Leu Gln Xaa Ala Ala
20 25

<210> 16
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 16

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

<210> 17
<211> 159
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 17

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

<210> 18
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 18

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

Ala Lys Asp Glu His Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Tyr Lys
65 70 75 80
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
85 90 95
Asn Ala Lys Asp Ser Trp Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Arg
100 105 110
Ala Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ser Gly Ala Asp
115 120 125
Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala
130 135 140
Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155

<210> 19
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 19

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

<210> 20
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 20

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

<210> 21
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 21

```
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1               5                  10                  15
Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
            20                  25                  30
Lys Asp Val Trp Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Glu Gly
```

35 40 45
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
50 55 60
Ala Lys Asp His His Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln Tyr
65 70 75 80
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
85 90 95
Asn Ala Lys Asp Arg Tyr Gly Gln Thr Pro Leu His Val Ala Ala Glu
100 105 110
His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp
115 120 125
Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala
130 135 140
Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155

<210> 22
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 22
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1 5 10 15
Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
20 25 30
Lys Asp Glu Phe Gly Gln Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Lys Ser Gly
35 40 45
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
50 55 60
Ala Lys Asp Val Tyr Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln Tyr
65 70 75 80
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
85 90 95
Asn Ala Lys Asp Thr Gln Gly Val Thr Pro Leu His Val Ala Ala Phe
100 105 110
Lys Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp
115 120 125
Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala

130 135 140
Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155
<210> 23
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 23
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Val Arg Ala Gly Gln
1 5 10 15
Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
20 25 30
Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly
35 40 45
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
50 55 60
Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser
65 70 75 80
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
85 90 95
Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp
100 105 110
Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp
115 120 125
Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala
130 135 140
Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155
<210> 24
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 24
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1 5 10 15

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

<210> 25
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 25

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

Gln Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp
115 120 125
Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala
130 135 140
Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155

<210> 26
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 26

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

<210> 27
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域

<400> 27

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

<210> 28

<211> 159

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 锚蛋白重复结构域

<400> 28

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

115 120 125
Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala
130 135 140
Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155
<210> 29
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 29
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1 5 10 15
Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
20 25 30
Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly
35 40 45
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
50 55 60
Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser
65 70 75 80
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
85 90 95
Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp
100 105 110
Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp
115 120 125
Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala
130 135 140
Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155
<210> 30
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 30

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

<210> 31
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 31

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

Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala
130 135 140
Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155
<210> 32
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 32
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1 5 10 15
Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
20 25 30
Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly
35 40 45
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
50 55 60
Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser
65 70 75 80
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Val Gly Ala Asp Val
85 90 95
Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp
100 105 110
Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp
115 120 125
Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala
130 135 140
Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155
<210> 33
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 33
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln

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

<210> 34
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 34

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

100 105 110
Lys Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp
115 120 125
Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala
130 135 140
Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155
<210> 35
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 35
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1 5 10 15
Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
20 25 30
Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Thr Glu Ser Gly
35 40 45
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
50 55 60
Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser
65 70 75 80
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
85 90 95
Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp
100 105 110
Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp
115 120 125
Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala
130 135 140
Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155
<210> 36
<211> 471
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 编码锚蛋白重复结构域的核酸

<400> 36

gacctgggta aaaaactgct gcaagcagca cgtgcaggtc agctggatga agttcgtgaa 60
ctgctgaaag caggcgccga tgttaatgca aaagatacct ggggcttcac cccgctgcat 120
attgctgctg agtctggtca cctggaaatt gttgaagttc tgctgaaagc cggtgcagat 180
gttaatgcaa aagatgtgca aggcagaacc ccgctgcata tcgctgctca ctctggtcac 240
ctggaaattg ttgaagttct gctgaaagcc ggtgcagatg ttaatgcaaa agatttcaga 300
ggctggaccc cgctgcatct ggctgcttgg tctggtcacc tggaaattgt tgaaattctg 360
ctgaaagccg gtgcagatgt taacgcacag gataaaagcg gtaaaacccc tgccgatctg 420
gcagctcgcg ccggtcatca agatattgct gaagtgctgc agaaggcagc a 471

<210> 37

<211> 471

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码锚蛋白重复结构域的核酸

<400> 37

gacctgggta aaaaactgct gcaagcagca cgtgcaggtc agctggatga agttcgtgaa 60
ctgctgaaag caggcgccga tgttaatgca aaagatgagt tcggccaaac cccgctgcat 120
atcgctgcta agtctggtca cctggaaatt gttgaagttc tgctgaaagc cggtgcagat 180
gttaatgcaa aagatgtgta cggcagaacc ccgctgcatc tggctgctca atacggtcac 240
ctggaaattg ttgaagttct gctgaaagcc ggtgcagatg ttaatgcaaa agatacccaa 300
ggcgtgaccc cgctgcacgt ggctgctttc aagggtcacc tggaaattgt tgaagttctg 360
ctgaaagccg gtgcagatgt taacgcacag gataaaagcg gtaaaacccc tgccgatctg 420
gcagctcgcg ccggtcatca agatattgct gaagtgctgc agaaggcagc a 471

<210> 38

<211> 471

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码锚蛋白重复结构域的核酸

<400> 38

gacctgggta aaaaactgct gtgggctgct gctgcaggtc agctggatga agttcgtgaa 60
ctgctgaaag caggcgccga tgttaatgca aaagatcatg tgggctacac cccgctgcat 120
atcgctgctc tggctggtca cctggaaatt gttgaagttc tgctgaaagc cggtgaagat 180
gttaatgcaa aagatcacaa gggcagaacc ccgctgcatg tggctgctgc tgtgggtcac 240
ctggaaattg ttgaagttct gctgaaagcc ggtgcagatg ttaatgcaaa agatcagcag 300
ggcgtgaccc cgctgcatat cgctgctatc accggtcacc tggaaattgt tgaagttctg 360
ctgaaagccg gtgcagatgt taacgcacag gataaaagcg gtaaaacccc tgccgatctg 420

gcagctcgcg ccggtcatca agatattgct gaagtgctgc agaaggcagc a 471

<210> 39
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 39

Lys Asp Lys Val Gly Tyr Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala His Ala Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala

<210> 40
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 40

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

<210> 41
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 41

Lys Asp Ser Glu Gly Ser Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Leu Lys Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala

<210> 42
<211> 33

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 42
Lys Asp Trp Gln Gly Gln Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Glu Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 43
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 43
Lys Asp Arg Trp Gly Glu Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Lys His Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 44
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 44
Lys Asp Glu Ile Gly Tyr Thr Pro Leu His Trp Ala Ala Tyr Glu Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 45
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 锚蛋白重复模块
<400> 45
Lys Asp Glu His Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Tyr Lys Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 46
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 46
Lys Asp Ser Trp Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Arg Ala Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ser Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 47
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 47
Lys Asp Thr Ile Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Tyr Arg Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 48
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 48
Lys Asp Glu His Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Ala Gly

1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 49
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 49
Lys Asp Ala Trp Gly His Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Arg Thr Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 50
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 50
Lys Asp Gln Leu Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Tyr Glu Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 51
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 51
Lys Asp Glu Lys Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Tyr Lys Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30

Ala
<210> 52
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 52
Lys Asp Ser Trp Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Arg Ala Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ser Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 53
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 53
Lys Asp Val Trp Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Glu Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 54
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 54
Lys Asp His His Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln Tyr Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 55
<211> 33

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 55
Lys Asp Arg Tyr Gly Gln Thr Pro Leu His Val Ala Ala Glu His Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 56
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 56
Lys Asp Glu Phe Gly Gln Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Lys Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 57
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 57
Lys Asp Val Tyr Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln Tyr Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 58
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 锚蛋白重复模块
<400> 58
Lys Asp Thr Gln Gly Val Thr Pro Leu His Val Ala Ala Phe Lys Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 59
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 59
Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 60
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 60
Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 61
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 61
Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly

1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 62
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 62
Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 63
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 63
Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 64
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 64
Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Gly Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30

Ala
<210> 65
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 65
Lys Asp Glu Phe Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln Tyr Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 66
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 66
Lys Asp Ala His Gly Val Thr Pro Leu His Val Ala Ala Phe Arg Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 67
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 67
Lys Asp Arg Ser Gly Leu Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Gln Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 68
<211> 33

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 68
Lys Asp Thr Tyr Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Tyr Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 69
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 69
Lys Asp His Arg Gly Val Thr Pro Leu His Val Ala Ala Tyr Lys Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 70
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 70
Lys Asp Val Thr Gly Val Thr Pro Leu His Val Ala Ala Phe Lys Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 71
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 锚蛋白重复模块
<400> 71
Lys Asp Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala Asn Ala Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 72
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 72
Lys Asp Ile Gln Gly Glu Thr Pro Leu His His Ala Ala Arg Lys Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 73
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 73
Lys Asp Gln Glu Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 74
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 74
Lys Asp Thr Phe Gly Ile Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Leu Pro Arg

1 5 10 15
Ser Pro Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 75
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 75
Lys Asp Gln Phe Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 76
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 76
Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 77
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 77
Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30

Ala
<210> 78
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 78
Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 79
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 79
Lys Asp Ser Val Gly Tyr Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala His Ala Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 80
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 80
Lys Asp Val Phe Gly Arg Thr Pro Leu His Ser Ala Ala Leu His Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 81
<211> 33

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 81
Lys Asp His Val Gly Tyr Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Glu Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 82
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 82
Lys Asp His Lys Gly Arg Thr Pro Leu His Val Ala Ala Ala Val Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 83
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 83
Lys Asp Gln Gln Gly Val Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Ile Thr Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 84
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 锚蛋白重复模块
<400> 84
Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 85
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 85
Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Val Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 86
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 86
Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 87
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 87
Lys Asp Thr Tyr Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Tyr Gly

1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 88
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 88
Lys Asp His Arg Gly Val Thr Pro Leu His Val Ala Ala Tyr Lys Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 89
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 89
Lys Asp Val Thr Gly Val Thr Pro Leu His Val Ala Ala Phe Lys Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 90
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 90
Lys Asp Glu Trp Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln Tyr Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30

Ala
<210> 91
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 91
Lys Asp His Arg Gly Val Thr Pro Leu His Val Ala Ala Tyr Lys Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 92
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 92
Lys Asp Val Thr Gly Val Thr Pro Leu His Val Ala Ala Phe Lys Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 93
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 93
Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Thr Glu Ser Gly
1 5 10 15
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30
Ala
<210> 94
<211> 33

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 94

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

<210> 95
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复模块
<400> 95

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

<210> 96
<211> 277
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 96

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

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160
Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
165 170 175
Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
180 185 190
Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
195 200 205
Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
210 215 220
Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240
Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245 250 255
Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260 265 270
Val Gln Glu Arg Gln
275

<210> 97
<211> 173
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人CD40的胞外结构域
<400> 97

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

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp
65 70 75 80
Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys
85 90 95
Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys
100 105 110
Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro Val
115 120 125
Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp
130 135 140
Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn
145 150 155 160
Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg
165 170

<210> 98
<211> 157
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 锚蛋白重复结构域
<400> 98
Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp
1 5 10 15
Glu Val Arg Ile Leu Leu Ala Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp
20 25 30
Val Leu Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Glu Gly His Leu
35 40 45
Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys
50 55 60
Asp Lys Lys Gly Trp Thr Pro Leu Gln Leu Ala Ala Arg Thr Gly His
65 70 75 80
Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
85 90 95
Lys Asp His Ile Gly Ala Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Gln Gly
100 105 110
His Pro Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
115 120 125
Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Ala
130 135 140

Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
145 150 155

<210> 99
<211> 307
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合蛋白SMA014
<400> 99

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

Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His
245 250 255
Leu Ala Ala Trp Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Ile Leu Leu Lys
260 265 270
Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala
275 280 285
Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln
290 295 300
Lys Ala Ala
305

<210> 100
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合蛋白SMA087
<400> 100

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

Asp Val Asn Ala Lys Asp Gln Trp Gly Leu Thr Pro Leu His Lys Ala
180 185 190
Ala Leu Gln Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly
195 200 205
Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Arg Gly His Thr Pro Leu His Trp
210 215 220
Ala Ala Arg Phe Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala
225 230 235 240
Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Gln Lys Gly Tyr Thr Pro Ala Asp
245 250 255
Leu Ala Ala Leu Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys
260 265 270
Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro
275 280 285
Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu
290 295 300
Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu
305 310 315 320
Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro
325 330 335
Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu
340 345 350
Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr
355 360 365
Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val
370 375 380
Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp
385 390 395 400
Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu
405 410 415
Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly
420 425 430
Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala
435 440 445
Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
450 455

<210> 101
<211> 603
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合蛋白SMA095

<400> 101

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

275 280 285

Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu

290 295 300

Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu

305 310 315 320

Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro

325 330 335

Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu

340 345 350

Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr

355 360 365

Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val

370 375 380

Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp

385 390 395 400

Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu

405 410 415

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

420 425 430

Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala

435 440 445

Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr

450 455 460

Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp

465 470 475 480

Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu

485 490 495

Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Tyr

500 505 510

Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly His Leu Lys

515 520 525

Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp

530 535 540

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

545 550 555 560

Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln

565 570 575

Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp Ala Gly His

580 585 590

Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
595 600

<210> 102
<211> 488
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合蛋白SMA104
<400> 102

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

Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His
245 250 255
Leu Ala Ala Trp Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Ile Leu Leu Lys
260 265 270
Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala
275 280 285
Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln
290 295 300
Lys Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr
305 310 315 320
Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys
325 330 335
Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu
340 345 350
Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr
355 360 365
Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val
370 375 380
Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg
385 390 395 400
Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu
405 410 415
Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly
420 425 430
Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly His Leu Glu Ile Val
435 440 445
Glu Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser
450 455 460
Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly His Gln Asp Ile
465 470 475 480
Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
485

<210> 103
<211> 636
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合蛋白SMA091
<400> 103

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1 5 10 15
Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
20 25 30
Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
35 40 45
His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
50 55 60
Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Asp
65 70 75 80
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
85 90 95
Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
100 105 110
Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser
115 120 125
Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr
130 135 140
Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Glu Lys Leu Leu Val Ala Ala
145 150 155 160
Leu Tyr Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala
165 170 175
Asp Val Asn Ala Lys Asp Gln Trp Gly Leu Thr Pro Leu His Lys Ala
180 185 190
Ala Leu Gln Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly
195 200 205
Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Arg Gly His Thr Pro Leu His Trp
210 215 220
Ala Ala Arg Phe Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala
225 230 235 240
Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Gln Lys Gly Tyr Thr Pro Ala Asp
245 250 255
Leu Ala Ala Leu Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys
260 265 270
Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro
275 280 285
Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu
290 295 300
Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu

305 310 315 320
Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro
325 330 335
Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu
340 345 350
Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr
355 360 365
Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val
370 375 380
Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp
385 390 395 400
Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu
405 410 415
Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly
420 425 430
Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala
435 440 445
Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr
450 455 460
Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp
465 470 475 480
Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln Leu Asp Glu
485 490 495
Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Thr
500 505 510
Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly His Leu Glu
515 520 525
Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp
530 535 540
Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly His Leu
545 550 555 560
Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys
565 570 575
Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly His
580 585 590
Leu Glu Ile Val Glu Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
595 600 605
Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly
610 615 620

His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
625 630 635

<210> 104
<211> 784
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合蛋白SMA099
<400> 104

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

Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Gln Lys Gly Tyr Thr Pro Ala Asp
245 250 255
Leu Ala Ala Leu Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys
260 265 270
Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro
275 280 285
Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu
290 295 300
Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu
305 310 315 320
Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro
325 330 335
Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu
340 345 350
Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr
355 360 365
Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val
370 375 380
Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp
385 390 395 400
Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu
405 410 415
Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly
420 425 430
Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala
435 440 445
Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr
450 455 460
Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp
465 470 475 480
Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln Leu Asp Glu
485 490 495
Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Thr
500 505 510
Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly His Leu Glu
515 520 525
Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp
530 535 540
Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly His Leu

545 550 555 560
Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys
565 570 575
Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly His
580 585 590
Leu Glu Ile Val Glu Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
595 600 605
Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly
610 615 620
His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser Pro Thr
625 630 635 640
Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr
645 650 655
Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala
660 665 670
Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
675 680 685
Asn Ala Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg
690 695 700
Asn Gly His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp
705 710 715 720
Val Asn Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala
725 730 735
Ala Asp Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala
740 745 750
Asp Val Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala
755 760 765
Ala Asp Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
770 775 780

<210> 105
<211> 784
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合蛋白
<400> 105
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1 5 10 15
Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala

20 25 30

Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
35 40 45

His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
50 55 60

Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Asp
65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
85 90 95

Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
100 105 110

Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser
115 120 125

Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr
130 135 140

Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala
145 150 155 160

Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala
165 170 175

Asp Val Asn Ala Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala
180 185 190

Ala Arg Asn Gly His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly
195 200 205

Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu
210 215 220

Ala Ala Ala Asp Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala
225 230 235 240

Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp
245 250 255

Ile Ala Ala Asp Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys
260 265 270

Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro
275 280 285

Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Glu Lys Leu
290 295 300

Leu Val Ala Ala Leu Tyr Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu
305 310 315 320

Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Gln Trp Gly Leu Thr Pro
325 330 335

Leu His Lys Ala Ala Leu Gln Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu
340 345 350
Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Arg Gly His Thr
355 360 365
Pro Leu His Trp Ala Ala Arg Phe Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val
370 375 380
Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Gln Lys Gly Tyr
385 390 395 400
Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Leu Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu
405 410 415
Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro
420 425 430
Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu
435 440 445
Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln Leu Asp Glu Val
450 455 460
Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Thr Trp
465 470 475 480
Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly His Leu Glu Ile
485 490 495
Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val
500 505 510
Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly His Leu Glu
515 520 525
Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp
530 535 540
Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly His Leu
545 550 555 560
Glu Ile Val Glu Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln
565 570 575
Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly His
580 585 590
Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro
595 600 605
Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro
610 615 620
Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly
625 630 635 640
Gln Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn

645 650 655
Ala Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser
660 665 670
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
675 680 685
Asn Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His
690 695 700
Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp
705 710 715 720
Val Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala
725 730 735
Trp Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala
740 745 750
Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala
755 760 765
Ala Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
770 775 780

<210> 106
<211> 669
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合蛋白
<400> 106
Gly Ser Asp Leu Gly Glu Lys Leu Leu Val Ala Ala Leu Tyr Gly Gln
1 5 10 15
Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
20 25 30
Lys Asp Gln Trp Gly Leu Thr Pro Leu His Lys Ala Ala Leu Gln Gly
35 40 45
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
50 55 60
Ala Lys Asp Glu Arg Gly His Thr Pro Leu His Trp Ala Ala Arg Phe
65 70 75 80
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
85 90 95
Asn Ala Gln Asp Gln Lys Gly Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Leu
100 105 110
Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser

115 120 125

Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr

130 135 140

Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala

145 150 155 160

Arg Ala Gly Gln Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala

165 170 175

Asp Val Asn Ala Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala

180 185 190

Ala Glu Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly

195 200 205

Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile

210 215 220

Ala Ala His Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala

225 230 235 240

Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His

245 250 255

Leu Ala Ala Trp Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Ile Leu Leu Lys

260 265 270

Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala

275 280 285

Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln

290 295 300

Lys Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr

305 310 315 320

Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys

325 330 335

Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln Leu Asp Glu Val Arg Glu Leu

340 345 350

Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Thr Trp Gly Phe Thr

355 360 365

Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val

370 375 380

Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Gln Gly Arg

385 390 395 400

Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu

405 410 415

Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Arg Gly

420 425 430

Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly His Leu Glu Ile Val
435 440 445
Glu Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser
450 455 460
Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala Gly His Gln Asp Ile
465 470 475 480
Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr
485 490 495
Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser
500 505 510
Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Gly Gln Leu Asp
515 520 525
Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp
530 535 540
Thr Trp Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ser Gly His Leu
545 550 555 560
Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys
565 570 575
Asp Val Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ser Gly His
580 585 590
Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
595 600 605
Lys Asp Phe Arg Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ser Gly
610 615 620
His Leu Glu Ile Val Glu Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
625 630 635 640
Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ala
645 650 655
Gly His Gln Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
660 665

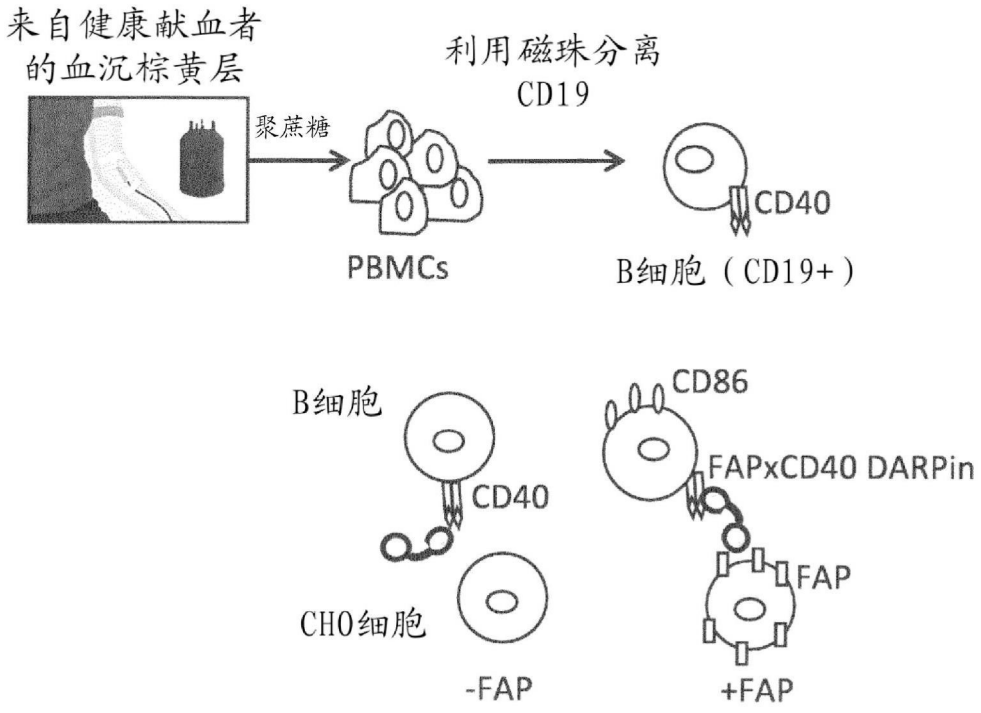

来自健康献血者
的血沉棕黄层
聚蔗糖
PBMCs
利用磁珠分离
CD19
CD40
B细胞（CD19+）
B细胞
CD40
CHO细胞
-FAP
CD86
FAPxCD40 DARPin
FAP
+FAP

图1

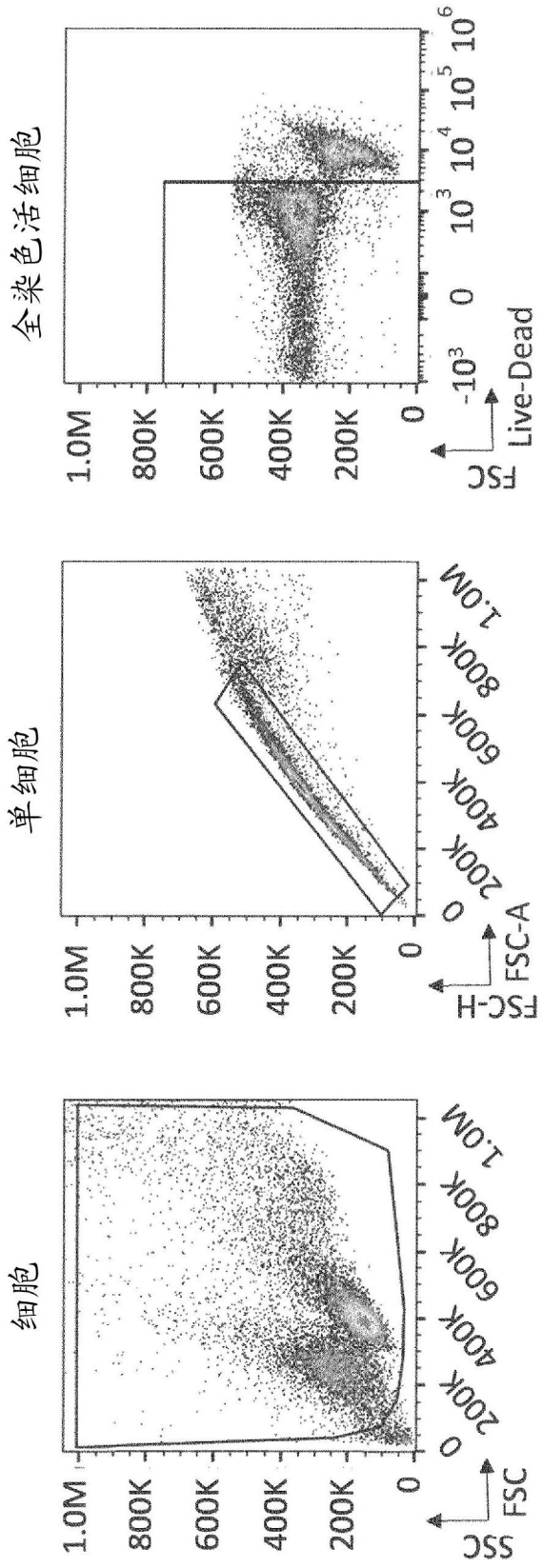

细胞
SSC
FSC
单细胞
FSC-H
FSC-A
全染色活细胞
FSC
Live-Dead
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
10^6

图2

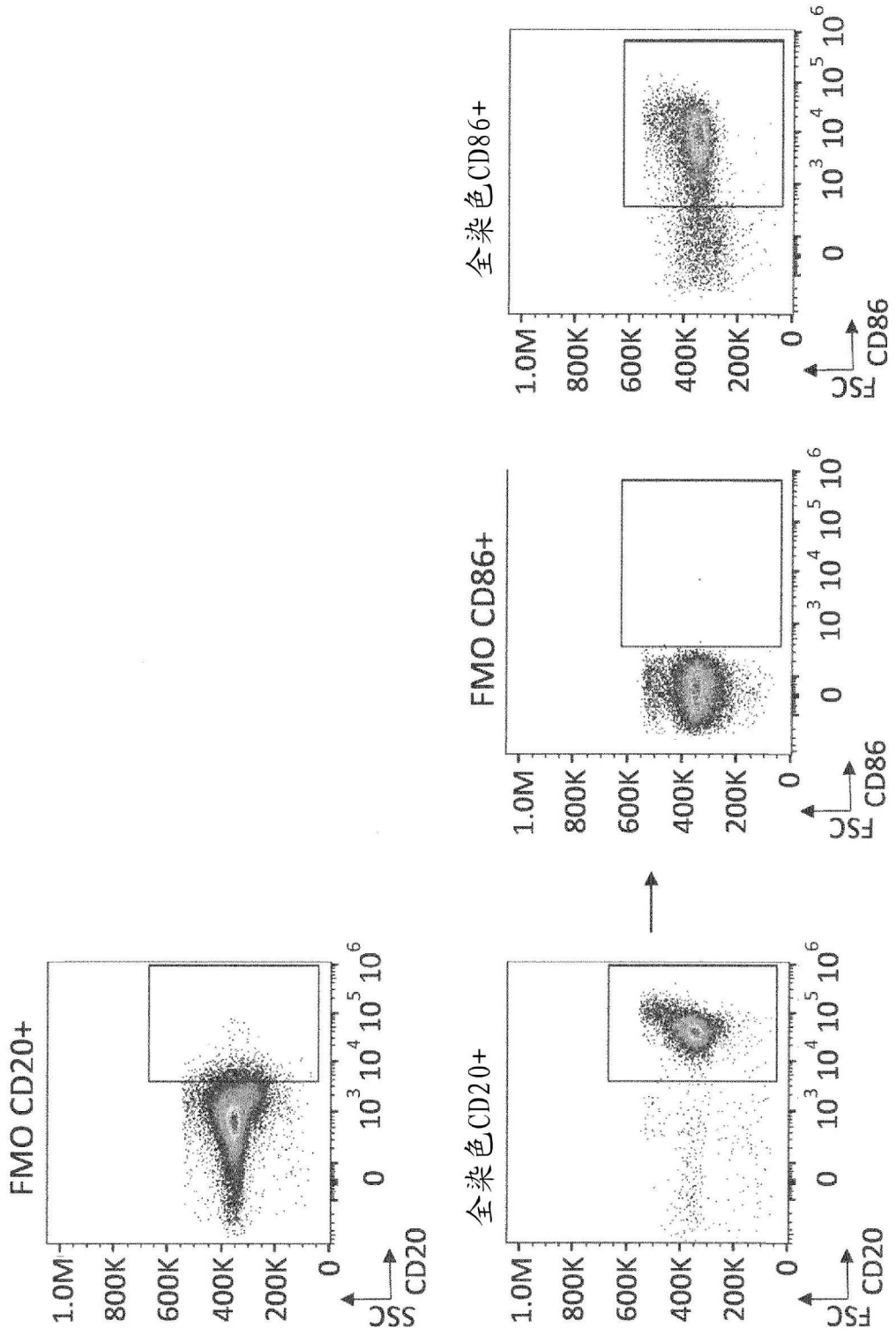
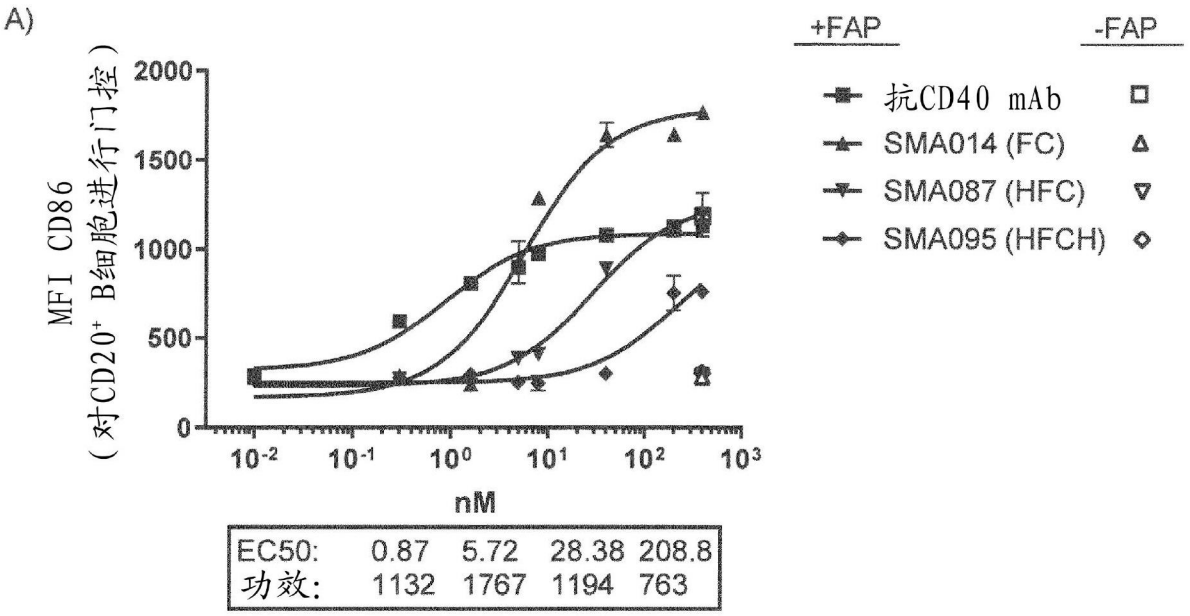

FMO CD20+
全染色CD20+
FMO CD86+
全染色CD86+
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
SSC
FSC
CD20
CD86
0
10^3 10^4 10^5 10^6

图2(续)


A)
+FAP
-FAP
抗CD40 mAb
SMA014 (FC)
SMA087 (HFC)
SMA095 (HFCH)
MFI CD86
(对CD20+ B细胞进行门控)
2000
1500
1000
500
0
10-2
10-1
100
101
102
103
nM
EC50: 0.87 5.72 28.38 208.8
功效: 1132 1767 1194 763

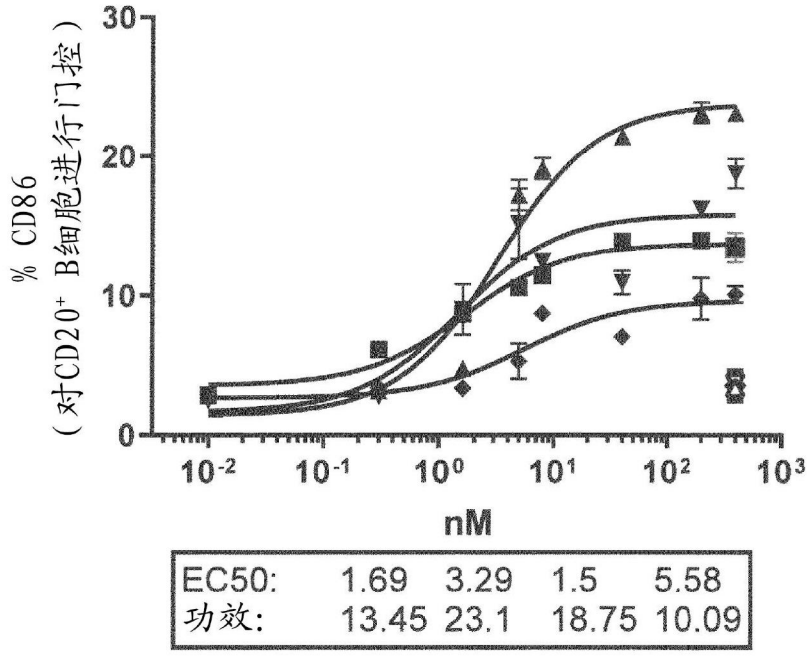
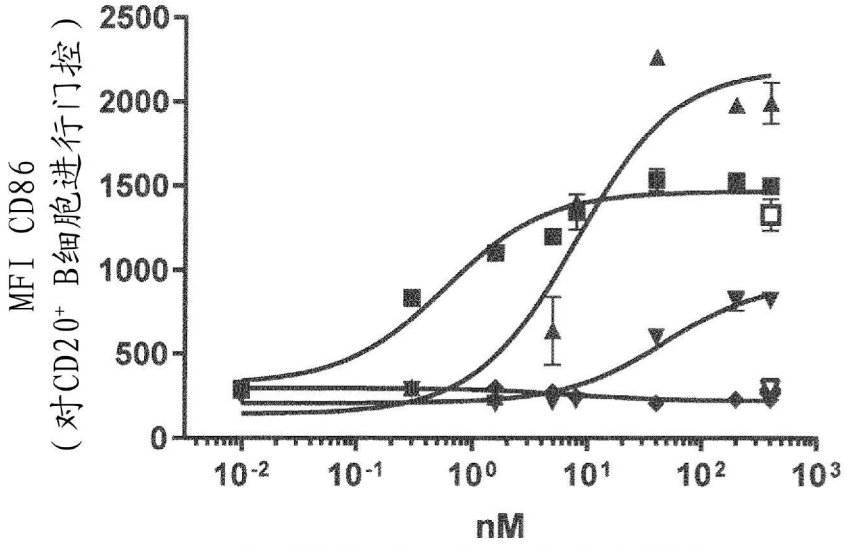
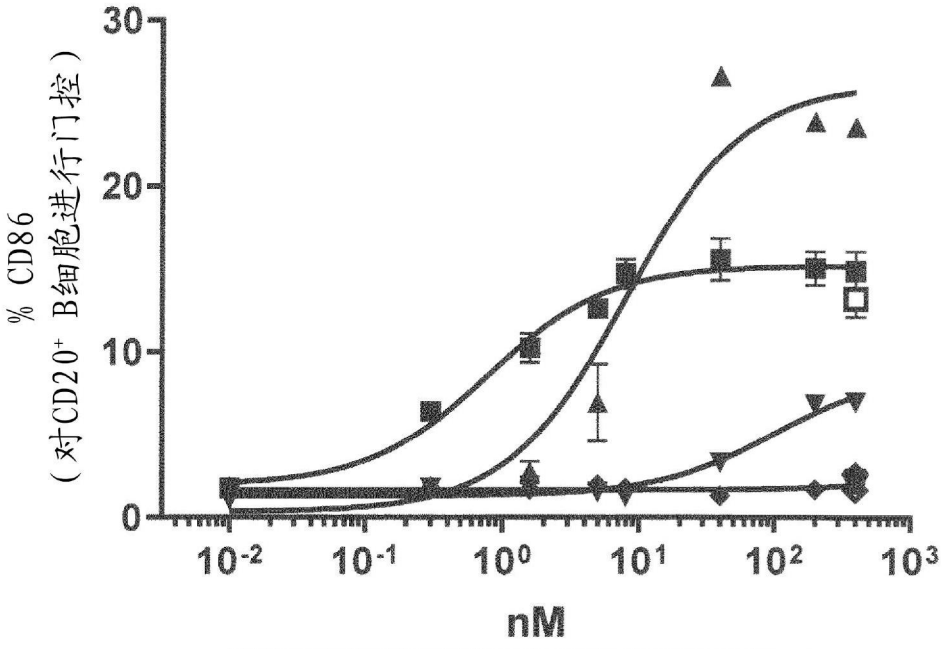

% CD86
(对CD20+ B细胞进行门控)
30
20
10
0
10-2
10-1
100
101
102
103
nM
EC50: 1.69 3.29 1.5 5.58
功效: 13.45 23.1 18.75 10.09

图3

B)

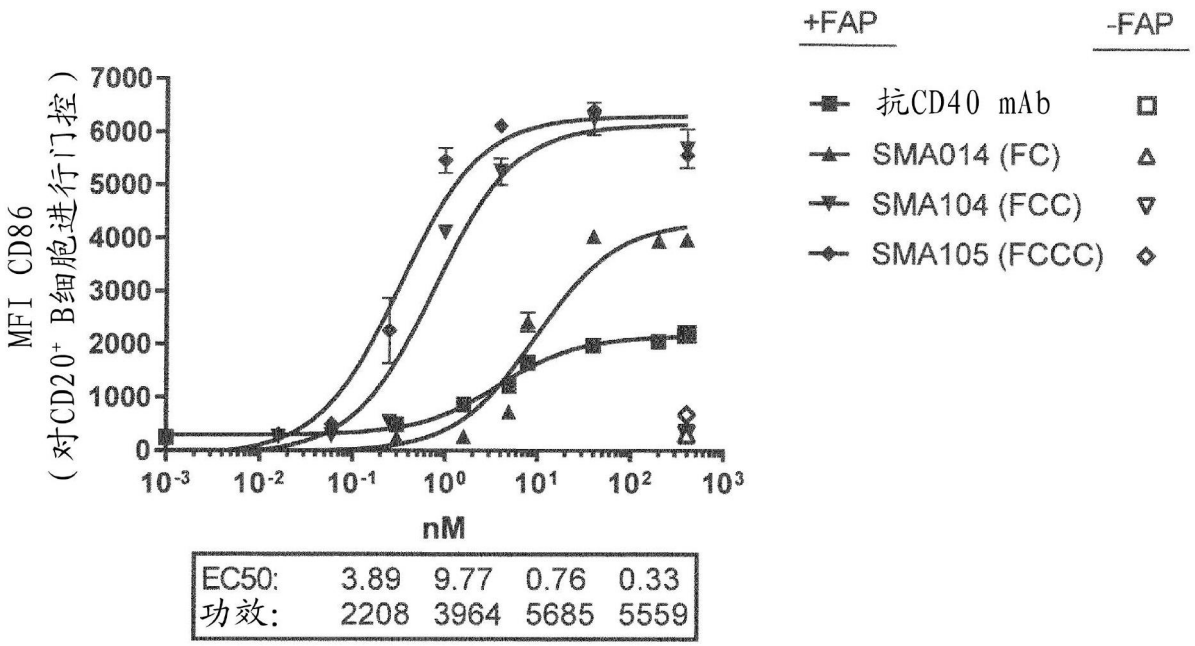


EC50:	0.58	7.86	48.12	-
功效:	1497	1993	823	-

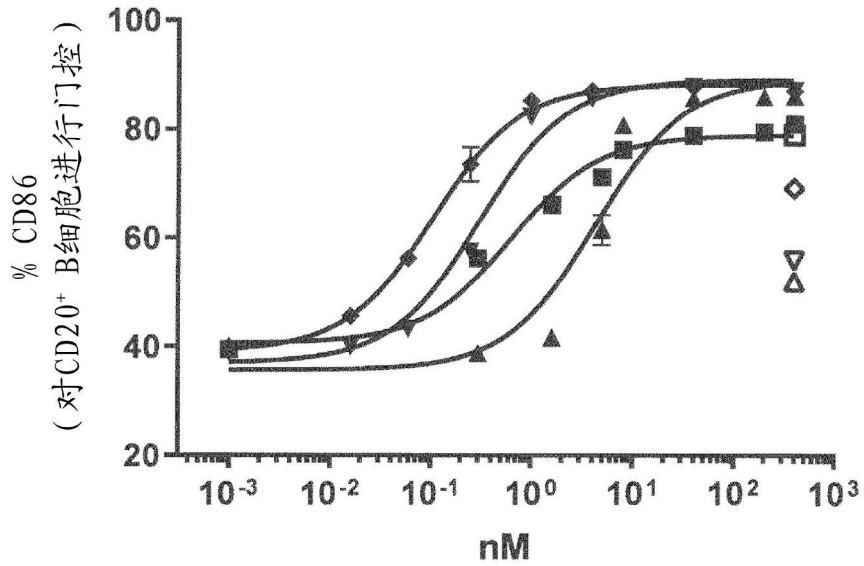


EC50:	0.78	8.07	101.3	-
功效:	14.85	23.55	6.97	-

图3(续)

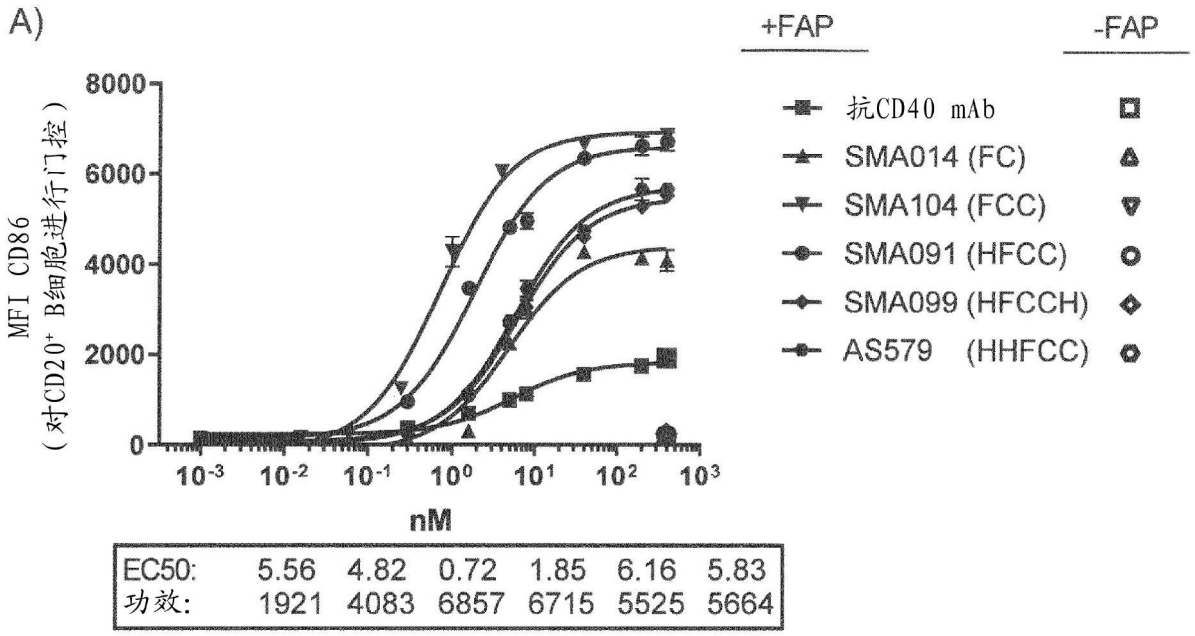


EC50:	3.89	9.77	0.76	0.33
功效:	2208	3964	5685	5559

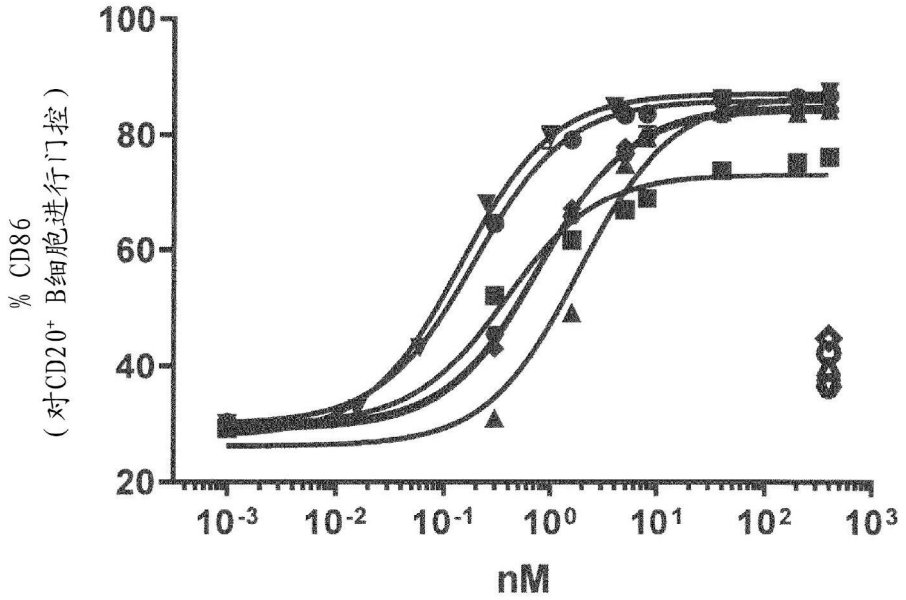


EC50:	0.63	4.32	0.31	0.11
功效:	81	86.2	87.2	87.15

图4



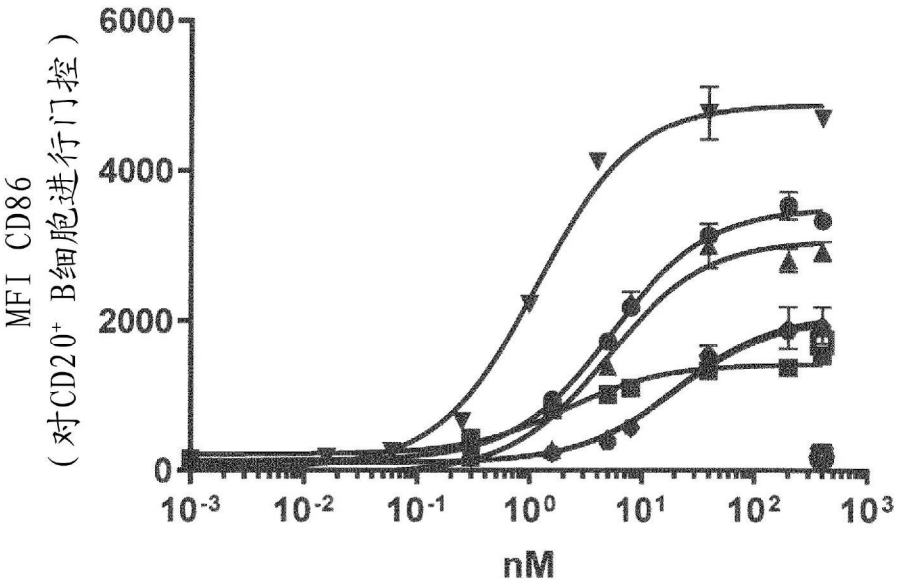
EC50:	5.56	4.82	0.72	1.85	6.16	5.83
功效:	1921	4083	6857	6715	5525	5664



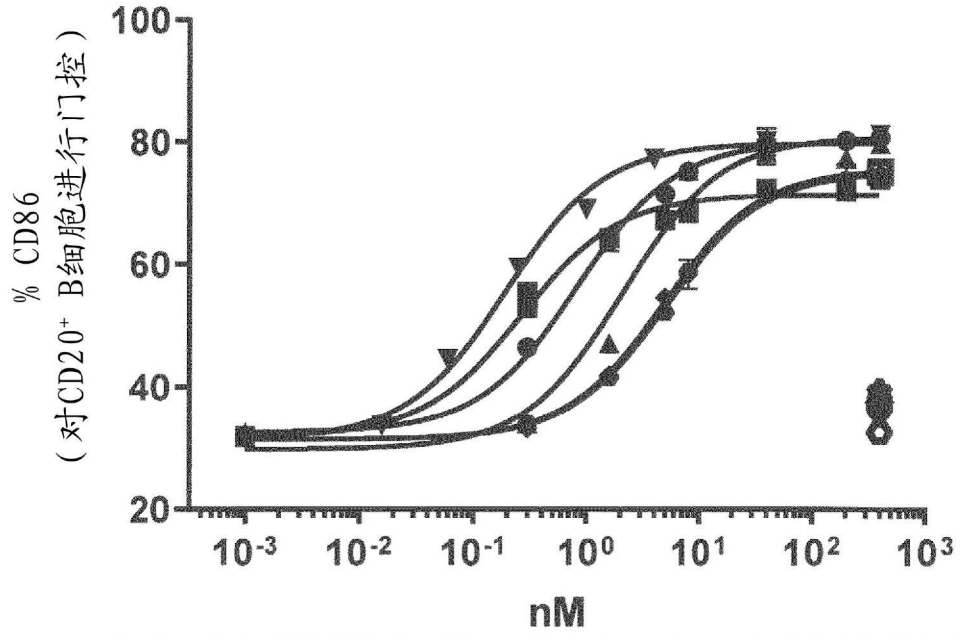
EC50:	0.38	1.88	0.14	0.19	0.8	0.78
功效:	76.25	84.3	87.4	86.75	84.7	84.15

图5

B)



EC50:	2.11	5.04	1.15	5.32	21.17	20.83
功效:	1528	2925	4694	3335	1936	1888



EC50:	0.27	2.09	0.19	0.83	4.85	5.16
功效:	75.25	79.8	81.3	80.8	74.95	74.25

图5(续)

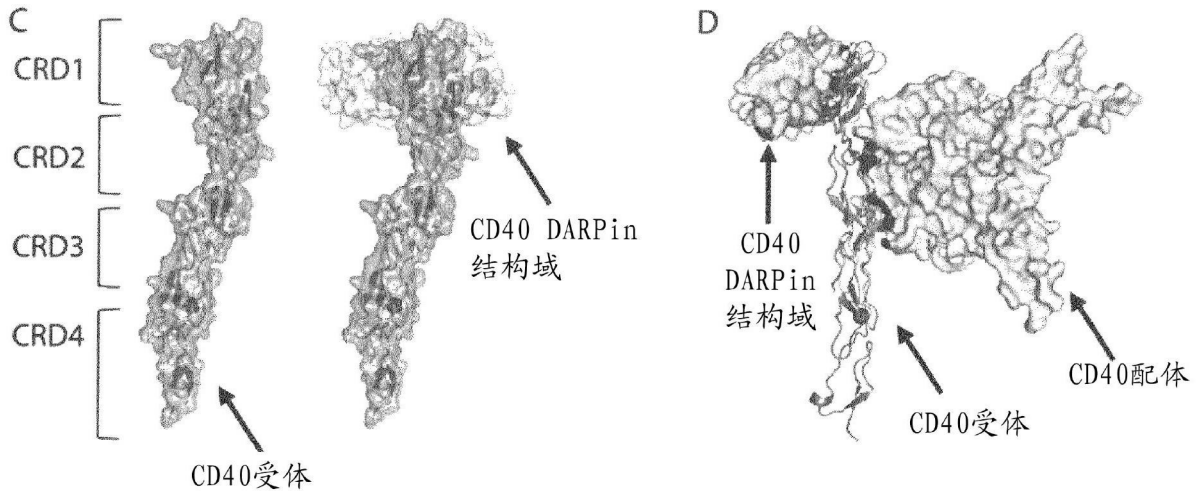

C
CRD1
CRD2
CRD3
CRD4
CD40 DARPin
结构域
CD40受体
D
CD40
DARPin
结构域
CD40配体
CD40受体

图6