



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115867352 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202180049613.2

(22) 申请日 2021.07.16

(30) 优先权数据

63/052933 2020.07.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/070898 2021.07.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/016198 EN 2022.01.20

(71) 申请人 艾伯维公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 闵静 T·(I-C)·吴

L·贝纳图尔 J·比斯比

T·代克蒂尔 董枫

A·小埃尔南德斯 P·克里希南

陆良军 F·门萨 R·米勒

G·萨胡

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

专利代理师 权陆军 彭昶

(51) Int.Cl.

A61P 31/18 (2006.01)

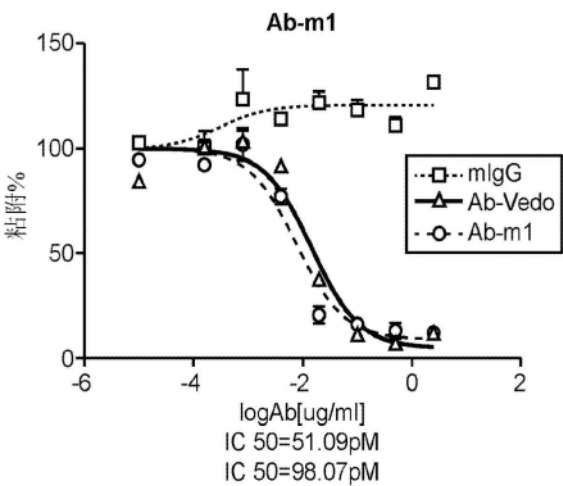
(54) 发明名称

抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体

(57) 摘要

本公开提供结合人 $\alpha 4 \beta 7$ 的抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体、其制备方法及其治疗感染HIV的患者的用途。

权利要求书2页 说明书54页
序列表56页 附图31页



1. 一种抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其包含(i)包含三个CDR的VH链区;以及(ii)包含三个CDR的VL链区,其中:

VH CDR#1是GFNIKNTYMH (SEQ ID NO:72);
VH CDR#2是RIDPAKGHTEYAPKFLG (SEQ ID NO:73);
VH CDR#3是VDV (SEQ ID NO:74);
VL CDR#1是HASQDISDNIG (SEQ ID NO:75);
VL CDR#2是HGTNLED (SEQ ID NO:76);以及
VL CDR#3是VQYAQFPWT (SEQ ID NO:77)。

2. 根据权利要求1所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其包含:

VH链区:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKNTYMHWRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTEYAPKFLGRVTITA
DESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCYVVDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:70);以及

VL链区:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISDNIGWLQKPKGSFKLLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDYTL
TISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:71)。

3. 根据权利要求2所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其为IgG。

4. 根据权利要求3所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其包含 κ 轻链恒定区。

5. 根据权利要求4所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其为IgG1。

6. 根据权利要求5所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其包含具有氨基酸取代D356E和L358M的变体CH3结构域。

7. 根据权利要求1所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其包含具有SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链以及具有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的轻链。

8. 根据权利要求1所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其是包含重链和轻链的IgG1抗体,每一条所述重链由SEQ ID NO:92的氨基酸序列组成,每一条所述轻链由SEQ ID NO:100的氨基酸序列组成。

9. 根据权利要求1所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其是包含重链和轻链的IgG1抗体,每一条所述重链由SEQ ID NO:93的氨基酸序列组成,每一条所述轻链由SEQ ID NO:100的氨基酸序列组成。

10. 一种包含编码抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的核苷酸序列的多核苷酸,其中所述抗体包含(i)包含三个CDR的VH链区;以及(ii)包含三个CDR的VL链区,其中:

VH CDR#1是GFNIKNTYMH (SEQ ID NO:72);
VH CDR#2是RIDPAKGHTEYAPKFLG (SEQ ID NO:73);
VH CDR#3是VDV (SEQ ID NO:74);
VL CDR#1是HASQDISDNIG (SEQ ID NO:75);
VL CDR#2是HGTNLED (SEQ ID NO:76);以及
VL CDR#3是VQYAQFPWT (SEQ ID NO:77)。

11. 一种表达载体,其包含权利要求10所述的多核苷酸。

12. 一种真核宿主细胞,其用权利要求11所述的载体转染。

13. 根据权利要求12所述的真核宿主细胞,其是哺乳动物宿主细胞。

14. 一种生产抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的方法,其包含:(a) 培养权利要求13所述的真核宿主细胞以及(b) 回收所述抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。

15. 一种在HIV感染的受试者中诱导对HIV感染的病毒抑制的方法,其包含向所述受试者施用一定量的权利要求1至9中任一项所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。

16. 一种在HIV感染受试者中治疗HIV感染的方法,其包含向所述受试者施用一定量的权利要求1至9中任一项所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。

17. 一种药物组合物,其包含权利要求1至9中任一项所述的抗体。

抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体

[0001] 1. 序列表

[0002] 本申请包含以ASCII格式电子提交的序列表,在此将其全文引入作为参考。在2021年7月14日创建的所述ASCII副本被命名为483W0_SL.txt,并且大小为106,797字节。

2. 技术领域

[0003] 本申请尤其涉及新的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、编码所述抗体的多核苷酸、其制备方法以及使用这些抗体的方法。

3. 背景技术

[0004] 今天全世界超过3700万人感染了人类免疫缺陷病毒(HIV),并且流行发病的人口继续增长。随着联合抗逆转录病毒疗法(cART)的出现,在控制HIV方面取得了重大进展。HIV感染者一生中需要持续服用cART。cART具有风险获益限制,此外,它并不会减少HIV潜伏病毒储存库。非常需要能够保持病毒载量低于检测水平而不需要终生治疗的改进的治疗方法。

[0005] 在急性人HIV感染中,高水平的病毒复制和受感染的CD4+T细胞的严重耗竭被认为在与HIV感染相关的免疫缺陷的发展中起着核心作用。 $\alpha 4\beta 7$ 是在T细胞(CD4+或CD8+)、B细胞和其它免疫细胞上表达的肠道归巢整合素,并且在HIV感染的发病机理中起重要作用。据报道,当病毒粒子从受感染的宿主细胞萌发时, $\alpha 4\beta 7$ 还被整合到HIV的包膜中(Guzzo等人,《科学免疫学(Sci.Immunol.)》,2017)。

[0006] $\alpha 4\beta 7$ 整合素是在T细胞亚群、B细胞、NK细胞和其它免疫细胞上表达的异二聚体受体。该整合素通过与肠粘膜的内皮小静脉上表达的其配体粘膜地址素细胞粘附分子1(MAdCAM-1)结合而介导淋巴细胞运输到肠道相关淋巴组织(GALT)中。高 $\alpha 4\beta 7$ 表达的CD4+T细胞是体外HIV感染的靶标(Cicala等人,《美国科学院院报(PNAS)》2009),其被感染并因此在急性HIV感染期间被耗竭(Sivro等人,sci transl med 2018)。HIV感染的CD4+细胞以及HIV病毒粒子中存在的 $\alpha 4\beta 7$ 可介导其运输至GALT(Guzzo等人,《科学免疫学》2017)。归巢GALT的CD4+T细胞甚至在抗逆转录病毒治疗期间也占体内最大HIV储存库(Brenchley和Douek,《黏膜免疫学(Mucosal Immunol)》2008)。

4. 发明内容

[0007] 本公开提供与人 $\alpha 4\beta 7$ 特异性结合的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体及其结合片段。下文的具体实施方式中提供了示例性抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的示例性CDR的氨基酸序列以及重链和轻链的VH和VL区的氨基酸序列。

[0008] 本文提供了包含编码本公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的核苷酸序列的多核苷酸,以及包含多核苷酸的载体。另外,本文提供了用包含编码所公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的核苷酸序列的载体转化的原核细胞和用该载体转染的真核细胞,以及工程化为表达该核苷酸序列的真核(例如,哺乳动物)宿主细胞。还提供了通过培养宿主细胞和回收抗体来生产抗体的方法。

[0009] 本公开提供了用抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体治疗诊断为HIV感染的受试者(例如,人类受试者)的方法。该方法大体上包括向受试者施用有效提供治疗益处的量的本文所述的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。受试者可以是被诊断为任何临床类别的HIV感染。

[0010] 由于本文所述的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体靶向人 $\alpha 4\beta 7$ 而不是病毒蛋白,因此它们提供了一种有利的治疗方法,该方法不会诱导由于HIV的高突变频率而在靶向病毒蛋白的治疗中频繁发生的基于HIV突变的耐药机制。

[0011] 基于本文提供的数据,预期本文所述的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体将向诊断为HIV感染的受试者提供治疗益处。

5. 附图说明

[0012] 图1示出了鼠抗体Ab-m1阻断HuT78细胞与MAdCAM-1的粘附。

[0013] 图2示出了使用CHOK1-c $\alpha 4\beta 7$ (cyno $\alpha 4\beta 7$)细胞粘附试验进行的Ab-m1对MAdCAM-1的功能性食蟹猴交叉反应性。

[0014] 图3示出了Ab-m1阻断人MAdCAM-1与原代人CD4+记忆T细胞的结合。

[0015] 图4示出了鼠-人嵌合体Ab-c1与人原代CD4+记忆T细胞(人 $\alpha 4\beta 7$ +CD4+CD45RO+)的结合。

[0016] 图5示出了通过流式细胞术进行的展示在酵母上的针对人 $\alpha 4\beta 7$ 抗原的倾向性工程化的人源化抗 $\alpha 4\beta 7$ Ab-h1.9scFv克隆的结合。克隆Ab-h1.9(a-e)具有与亲本Ab-h1.9类似的结合。

[0017] 图6A至图6F示出了对来自45个HIV+个体和10个健康(HIV-)供体的样品进行的 $\alpha 4\beta 7$ 表达分析。在HIV+和HIV-个体中对CD4+和CD8+T细胞上 $\alpha 4\beta 7$ 的表达(通过MESF测量的%或者水平)进行了比较。图中仅示出了通过曼-惠特尼双尾检验(Mann-Whitney two-tailed test)有显著差异的比较。T细胞群缩写为:N+=初始(CD28+CD45RO-),CM=中央记忆(CD28+CD45RO+CCR7+),TM=瞬时记忆(CD28+CD45RO+CCR7-),EM=效应记忆(CD28-CD45RO+),TE=终末效应(CD28-CD45RO-);MESF=等效可溶性荧光染料分子。

[0018] 图7A至图7G-2示出了用Ab-h1.9d-WT捕获的HIV病毒粒子。所有的测试都是用珠形式的病毒粒子捕获试验来进行的。用6种实验室生长的HIV毒株(图7A至图7F)在5nM和15nM下对Ab-h1.9d-WT进行了测试,而阴性对照抗体仅在15nM下进行测试。捕获的样品中HIV p24 gag的量在10 μ L试验中示出为pg/mL。还用来自两个HIV感染个体的样品对Ab-h1.9d-WT进行了测试,样品具有用10 μ g的抗体包被的珠(图7G-1和图7G-2)。通过数字液滴PCR而检测的输入样品(图7G-1)和捕获样品(图7G-2)中HIV gag RNA的量示出为拷贝/mL。

[0019] 图8A至图8E示出了与Fc γ R结合的免疫复合物(HIV病毒粒子与不同的抗体)。首先通过将抗体(Ab-h1.9d-WT、具有LALA突变以显著降低Fc γ R结合的Ab-h1.9d,Ab-Vedo,以及同种型阴性对照)与HIVNL4-3一起孵育形成免疫复合物,然后捕获在固定于板上的Fc γ R上。Fc γ RI和Fc γ RIIIa(V158)被捕获在镍板上,而Fc γ RIIa(H131)、Fc γ RIIa(R131)和Fc γ RIIIa(F158)被捕获在中性抗生物素蛋白板上以增加检测的灵敏度。检测到的HIVp24 gag的量在10 μ L试验中示出为pg/mL。示出了代表性实验的结果。

[0020] 图9A至图9C示出了Ab-h1.9d-WT介导的THP-1细胞中 $\alpha 4\beta 7$ 包被的珠的摄取的 $\alpha 4\beta 7$ 和Fc依赖性。对用复合物处理3小时的THP-1细胞中免疫复合物(含有 $\alpha 4\beta 7$ 包被的珠和指定

的抗 $\alpha 4\beta 7$ 或对照抗体)的吞噬作用评分进行绘图。图9A示出了来自一个代表性实验的数据。图9B示出来自3个独立实验的归一化数据。使用与图基多重比较检验(Tukey's multiple comparisons test)相结合的单因ANOVA确定显著性。**** $p < 0.0001$, *** $p = 0.0001 - 0.001$, ** $p = 0.001 - 0.01$, * $p = 0.01 - 0.05$, ns ≥ 0.05 。图9C示出了通过成像细胞仪而获得的用Ab-h1.9d-WT免疫复合物处理的细胞与3种内化的 $\alpha 4\beta 7$ 包被的珠的代表性图像。

[0021] 图10示出了抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体与 $\alpha 4\beta 7$ +GFP+VLP(病毒样颗粒)的结合。使用ELISA测定了Ab与VLP的结合。Ab-h1.9d-WT、Ab-h1.9d-LALA和Ab-Vedo以相似的EC50值与 $\alpha 4\beta 7$ +GFP+VLP结合。示出了来自两个独立实验的代表性数据。

[0022] 图11A至图11B示出了Ab-h1.9d-WT介导的THP-1细胞摄取 $\alpha 4\beta 7$ +GFP+VLP(病毒样颗粒)的 $\alpha 4\beta 7$ 和Fc依赖性。图11A示出了通过流式细胞术测得的按GFP+细胞百分比计的THP-1细胞对 $\alpha 4\beta 7$ +GFP+VLP的摄取。图11B示出了红海海绵素A(Lat A)对 $\alpha 4\beta 7$ +GFP+VLP摄取的抑制。对于图11B, THP-1细胞用LatA预处理了2小时,然后如图11A中那样与VLP和抗体孵育。图10A至图10B中所示的平均值 $\pm$ 标准差分别由4个和3个独立实验综合而来。显著性(**** $p = 5.4 \times 10^{-5}$)通过双尾学生t检验来计算,其中 $p < 0.05$ 被认为是显著的。

[0023] 图12A至图12B示出了通过不同抗体抑制HIV gp120与 $\alpha 4\beta 7$ 相互作用的。图12A示出了RPMI 8866细胞与HIV gp120-V2 WT肽而不是对照肽的结合。RPMI 8866细胞在细胞表面组成型表达 $\alpha 4\beta 7$ 。HIV gp120 V2 WT肽和HIV gp120 V2对照肽在序列上相同,但在对照肽中有4个用于介导 $\alpha 4\beta 7$ 与gp120结合的氨基酸发生突变。图12B示出了不同抗体对HIV gp120肽与表达 $\alpha 4\beta 7$ 的RPMI 8866细胞的结合的抑制。Ab-h1.9d-WT在抑制HIV gp120-V2 WT肽与表达 $\alpha 4\beta 7$ 的RPMI 8866细胞的结合方面比Ab-Vedo更有效。

[0024] 图13示出了Ab-h1.9d-WT所结合的人和食蟹猴CD4⁺和CD8⁺T亚群的百分比。通过流式细胞仪分析评测Ab-h1.9d-WT与人和食蟹猴CD4⁺和CD8⁺T细胞的结合。对Ab-h1.9d-WT所结合的 $\alpha 4\beta 7$ +T细胞亚群的百分比进行了确定。数据是从3个人和5只食蟹猴供体获得的。

[0025] 图14A至图14F示出了Ab-h1.9d-WT对各种整合素的结合特异性。在表达人(图14A、图14C和图14E)或食蟹猴整合素(图14B、图14D和图14F)的重组细胞上评测Ab-h1.9d-WT的结合特异性。与 $\alpha 4\beta 1$ (图14C/图14D)和 $\alpha E\beta 7$ (图14E/图14F)整合素相比之下,与靶向整合素 $\alpha 4\beta 7$ (图14A/图14B)的结合。Ab-Naa和依曲利组单抗衍生的Ab-Etro分别用作 $\alpha 4$ 和 $\beta 7$ 整合素特异性的阳性对照,而Ab-Ctet用作同种型对照。FACS结合结果表示为滴定mAb的MFI。 $N=1$ 。

[0026] 图15示出了HEK293细胞中Ab-h1.9d-WT的非特异性结合评价。通过流式细胞仪分析评测了Ab-h1.9d-WT与HEK293细胞的非特异性结合。在100 $\mu\text{g/mL}$ 测试浓度下,阳性对照显示出高结合,而针对Ab-h1.9d-WT和同种型对照Ab-cTet均观察到可忽略不计的结合。给出了与测试mAb(A)结合的HEK293细胞百分比和测试mAb(B)结合强度的MFI。 $N=2$ 。

[0027] 图16A至图16B示出了 $\alpha 4\beta 7$ 复合物与Ab-h1.9d-WT或Ab-Vedo在人原代细胞上的内化。图16A示出了Ab-h1.9d-WT在来自人外周血供体的CD4⁺T和CD8⁺T初始细胞上的内化。来自两个供体的散点图指示了在处理18小时后在4或37 $^{\circ}\text{C}$ 下用Ab-h1.9d-WT处理时 $\alpha 4\beta 7$ 细胞的百分比。用Alexa-647标记的抗 $\beta 7$ Ab-Etro检测细胞表面上剩余的 $\alpha 4\beta 7$ 。图16B示出了用Ab-h1.9d-WT处理的T细胞亚群中 $\alpha 4\beta 7$ 内化的定量(与在4 $^{\circ}\text{C}$ 处理后观察到的表达相关的表面 $\alpha 4\beta 7$ 表达减少)。(N=两个供体)。初始细胞限定为CD45RA⁺。

[0028] 图17A至图17B示出了Ab-h1.9d-WT阻断人原代CD4⁺T细胞上的MAdCAM-1共刺激信

号。对于图17A,通过流式细胞术分析,将同种型对照Ab和Ab-h1.9d-WT存在的情况下抗CD3和MAdCAM-1对人原代CD4+T细胞的活化测量为Ki67+CD25+细胞的百分比(Ki67+在X轴上,CD25+在Y轴上)。数据来自代表性的供体。对于图17B,将同种型对照Ab、Ab-h1.9d-WT和Ab-Vedo存在的情况下抗CD3和MAdCAM-1对人原代CD4+T细胞的活化测量为Ki67+CD25+细胞的百分比(在Y轴上)。数据来自6个健康的供体。使用双尾参数配对t检验进行统计分析:** $P < 0.01$,**** $P < 0.0001$)。

[0029] 图18示出了Ab-h1.9d-WT不阻断VCAM-1介导的细胞粘附。使用HuT78细胞粘附试验确定Ab-h1.9d-WT对VCAM-1的细胞粘附阻断。Ab-Nata(抗 $\alpha 4mAb$)用作阳性对照,Ab-cTet用作阴性对照。示出了代表性的数据,其中发光(RLU)减少指示由于配体阻断而导致的细胞结合减少。 $N=3$ 。

[0030] 图19A至图19B示出了通过流式细胞术与Ab-Vedo相比之下Ab-h1.9d-WT与表达人Fc γ R的细胞的结合。通过使用表达各种细胞表面人Fc γ R的工程化CHO-K1细胞分析了Ab-h1.9d-WT(图19A)和Ab-Vedo(图19B)与人Fc γ R的结合,并用荧光的几何平均数表示。 $N=1$ 。

[0031] 图20A至图20B示出了Ab-h1.9d-WT基于报告基因的ADCC和ADCP活性。通过报告基因试验对Ab-h1.9d-WT诱导Fc介导的体外ADCC和ADCP活性的能力进行了评测(图20A),通过使用工程化的Jurkat人Fc γ R IIIa V158+效应报告细胞和RPMI 8866靶细胞进行的ADCC活性; $N=2$ 。(图20B)使用工程化的Jurkat人Fc γ R IIa H131+效应报告细胞和RPMI 8866靶细胞进行的ADCP活性; $N=2$ 。Ab-Ritu在试验中用作阳性对照。结果以发光(RLU)表示;高信号指示ADCC和ADCP活性。

[0032] 图21示出了Ab-h1.9d-WT的CDC活性。使用RPMI 8866靶细胞和人血清作为补体因子来源来评测Ab-h1.9d-WT诱导Fc介导的体外CDC活性的能力; $N=2$ 份测试的供体血清。Ab-Ritu用作阳性对照。结果表示为细胞杀伤百分比;较高的细胞杀伤指示CDC活性。

[0033] 图22示出了Ab-h1.9d-WT基于细胞毒性的ADCC活性。在基于FACS的细胞毒性试验中,使用HuT78细胞作为靶细胞和来自两个供体的人原代NK细胞作为效应细胞来评测Ab-h1.9d-WT诱导Fc介导的体外ADCC的能力。靶细胞杀伤(细胞毒性)由针对两个供体的ADCC百分比来表示。

6. 具体实施方式

[0034] 在不受理论束缚的情况下,假设本发明的实施例通过两种主要作用机制发挥针对HIV感染的病毒控制作用:1) Fab依赖性机制:阻断 $\alpha 4\beta 7$ 与其配体如MAdCAM-1和HIV gp120的相互作用,从而阻止由这些配体的信号传导介导的CD4+T细胞的共刺激,并分别抑制这些受刺激的细胞中的HIV复制(Nawaz等人,《黏膜免疫学》2018,Livia等人,《美国科学院院报》2020)、肠道组织的HIV感染(Guzzo等人,《科学免疫学》2017)和细胞-细胞病毒传播(Arthos等人,《自然免疫学(Nat. Immunol.)》2008),以及2) Fc依赖性机制:诱导“疫苗接种作用”,其中抗 $\alpha 4\beta 7$ mAb与 $\alpha 4\beta 7$ +HIV病毒粒子结合形成免疫复合物,该免疫复合物通过mAb Fc结构域与抗原呈递细胞(APC)上的Fc γ R的相互作用而内化并加工,并且所得的病毒肽随后呈递在APC的表面上以引发新的和持久的HIV特异性免疫应答以抑制病毒复制(Parsons等人,《逆转录病毒学(Retrovirology)》2018;Naranjo-Gomez等人《当代艾滋病毒与艾滋病观点(Curr.Opin.HIV AIDS)》2019)。

[0035] $\alpha 4\beta 7$ 整合素通常处于对其配体具有低亲和力的静息(无活性)状态。一旦其被活化,其可以以高亲和力结合其配体(例如,MAdCAM-1和gp120)(Ye等人,《血液(Blood)》,2012;Lertjuthaporn等人,《公共科学图书馆·综合(Plos One)》,2018)。在HIV感染期间,HIV gp120的V2区中的基序模拟MAdCAM-1并且能够结合 $\alpha 4\beta 7$ (Peachman等人,《公共科学图书馆·综合》,2015)。 $\alpha 4\beta 7$ 与gp120的相互作用诱导淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)的活化,潜在地诱导病毒学突触的形成,并因此增强HIV在细胞间传播(Arthos等人,《自然免疫学》2008)。细胞间传播对于促进病毒在组织中的传播是关键的,并且对于病毒传递比无细胞病毒更重要。结合 $\alpha 4\beta 7$ 时,本发明的实施例可以通过破坏 $\alpha 4\beta 7$ 与gp120的相互作用,诱导 $\alpha 4\beta 7$ 抗体结合复合物内化至细胞而减少 $\alpha 4\beta 7$ 介导的HIV细胞间传播,或者可灭活 $\alpha 4\beta 7$ 。因此,本发明的实施例证明了抑制组织中HIV复制和病毒扩散的能力。

[0036] 通过靶向人蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 而不是病毒蛋白,本发明的实施例不诱导由于HIV的高突变频率而通常与靶向病毒蛋白的治疗相关的病毒耐药性突变的出现。

[0037] 6.1. 缩写

[0038] 在许多实施例中,本文所述的抗体通过其各自的多肽序列来描述。除非另有说明,否则多肽序列以N→C的方向提供。

[0039] 在许多实施例中,本文所述的多核苷酸通过它们各自的多核苷酸序列的方式来描述。除非另有说明,多核苷酸序列呈5'→3'方向。

[0040] 对于多肽序列,可以使用遗传编码氨基酸的常规三或单字母缩写,如下表1所示。

表 1 所编码的氨基酸的缩写		
氨基酸	三字母缩写	单字母缩写
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
谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q
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
蛋氨酸	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

[0042] 某些序列由指定属于某些类别(例如,脂族、疏水性等)的氨基酸残基的结构式而限定。下表2中注明了本文所用的遗传编码的氨基酸所属的各种类别。一些氨基酸可以属于不止一个类别。含有巯基的半胱氨酸和构象上受限的脯氨酸未指定类别。

[0043]

表 2 编码的氨基酸类别	
类别	氨基酸
脂族	A, I, L, V
芳族	F, Y, W
非极性	M, A, I, L, V
极性	N, Q, S, T
碱性	H, K, R
酸性	D, E
小分子	A, G

[0044]

各个示例性实施例中使用的缩写包括下表3中所提供的那些：

表 3
缩写

缩写	定义
Ab-h1.9d-WT	抗人 $\alpha 4\beta 7$ (AC-166667) hu IgG1/k WT mAb
Ab-h1.9d-LALA	与人 Fc γ R 结合降低的抗人 $\alpha 4\beta 7$ hu IgG1/k LALA mAb
$\alpha 4\beta 7$	$\alpha 4\beta 7$ 整合素
$\alpha E\beta 7$	$\alpha E\beta 7$ 整合素
$\alpha 4\beta 1$	$\alpha 4\beta 1$ 整合素
Ab 或 mAb	抗体或单克隆抗体
ADCC	抗体依赖性细胞毒性
ADCP	抗体依赖性细胞吞噬作用
AF647	Alexa 荧光色素 647 染料
ATI	抗逆转录病毒治疗中断
APC	别藻蓝蛋白荧光染料；或抗原呈递细胞
BSA	牛血清白蛋白
BV421	亮紫色荧光染料
Ca	钙
CDB	细胞解离缓冲液
CDC	补体依赖性细胞毒性
CellTrace™	细胞增殖荧光染料
CFSE	羧基荧光素琥珀酰亚胺酯荧光染料
CHOK1	中国仓鼠卵巢细胞系
CM5	在 BIAcore 中使用的羧甲基葡聚糖传感器芯片
CMV	巨细胞病毒
Conc	浓度
Cyno	食蟹猴
DMEM	杜尔贝科改良伊格尔培养基
DMSO	二甲基亚砷
DPBS	杜尔贝科磷酸盐缓冲盐水
E	效应细胞
EC ₅₀	半数最大有效浓度
ECL	电化学发光
EDTA	乙二胺四乙酸
FACS	荧光激活细胞分选
FBS	胎牛血清
Fc	可结晶片段
FcRn	新生儿 Fc 受体
Fc γ	Fc gamma
Fc γ R	Fc γ 受体
Fc γ RIIa	Fc γ 受体 IIa (H131 和 R131)
Fc γ RIIb	Fc γ 受体 IIb
Fc γ RIIc	Fc γ 受体 IIc
Fc γ RIIIa	Fc γ 受体 IIIa (F158/176 或 V158/176)

[0045]

[0046]

表 3 缩写	
Fc γ RIIIb	Fc γ 受体 IIIb (NA1, NA2 和 SH)
FITC	异硫氰酸荧光素荧光染料
FVD	可固定的活性荧光染料
FMO	荧光减一
FR	骨架
G418	遗传霉素 (用于稳定细胞系选择的抗生素)
HBS	用于 (HBS-EP) 的含有 EDTA 和 NaCl 的基于羟乙基哌嗪乙磺酸的缓冲液
HBSS	Hank's 平衡盐溶液
HEK293	人胚肾细胞系
HER2	人表皮生长因子受体 2
HI	加热灭活
hIL-2	人白介素 2
HIV	人类免疫缺陷病毒
hr	小时
hu Fc	人可结晶片段
HuT78	内源性表达 $\alpha 4\beta 7$ 的人皮肤 T 细胞淋巴瘤细胞系
IC ₅₀	半数最大抑制浓度
IgG	免疫球蛋白 G 型
IgG1	免疫球蛋白 G1 型
IgG1/ κ	带有 κ 轻链的人免疫球蛋白 $\gamma 1$
IMDM	伊斯科夫改良的杜尔贝科培养基
K _D	平衡解离常数
mAb	单克隆抗体
MES	MES 缓冲液: 2-乙磺酸
MESF	等效可溶性荧光染料分子
MAdCAM-1	粘膜地址素细胞粘附分子 1
MFI	平均荧光强度
μ g	微克
μ L	微升
mg	毫克
Mg	镁
mL	毫升
mM	毫摩尔
Min	分钟
MnCl ₂	氯化锰
MOA	作用机制
MSD	中尺度发现
N	样品数量
ND	未确定
NaCl	氯化钠

表 3
缩写

nM	纳摩尔
NFAT	活化的 T 细胞的核转录因子
NK	自然杀伤细胞
PBMC	外周血单个核细胞
PBS	磷酸盐缓冲盐水
PE	藻红蛋白荧光染料
PFA	多聚甲醛
pg	皮克
PHA	植物血凝素
Puro	嘌呤霉素（用于稳定细胞系选择的抗生素）
RA	视黄酸
RBC	Research Blood Components 公司
R _{Max}	通过 BIAcore 确定的最大应答—分析物结合能力
RPM	每分钟的转数
RPMI 8866	内源性表达 $\alpha 4\beta 7$ 的人 B 细胞淋巴瘤细胞系
RLU	相对发光单元
RT	室温
RU	BIAcore 中使用的结合应答
SPR	允许通过 BIAcore 实时结合的表面等离子体共振
T	靶细胞或 T 细胞
VCAM-1	血管细胞粘附分子 1
WT	野生型

[0047] 6.2. 定义

[0049] 除非本文另有定义，与本公开结合使用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0050] 如本文所用，除非另有说明，抗体氨基酸残基的编号根据EU编号方案进行。

[0051] 6.3. 抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体[0052] 在一个方面，本公开涉及特异性结合 $\alpha 4\beta 7$ 异源二聚体整合素受体（也称为 $\alpha 4\beta 7$ ，LPAM-1，淋巴细胞派伊尔结粘附分子1，以及整合素 $\alpha -4$ 与整合素 $\beta -7$ 的二聚体）的抗体。[0053] 如本文所用，术语“抗体”（Ab）是指特异性结合特定抗原例如 $\alpha 4\beta 7$ 的免疫球蛋白分子。在一些实施例中，本公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体结合人 $\alpha 4\beta 7$ 并由此调节免疫系统。本公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体在轻链和重链可变结构域中都包含互补决定区（CDR），也称为高变区。可变结构域的更高度保守的部分称为骨架（FR）。如本领域已知的，描绘抗体高变区的氨基酸位置/边界可根据上下文和本领域已知的各种定义而变化。可变结构域内的一些位置可视为杂合高变位置，因为这些位置在一组标准下可视为在高变区内，而在不同组标准下可视为在高变区外。这些位置中的一个或多个也可以在延伸的高变区中发现。本公开提供了在这些杂合高变位置包含改变的抗体。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区，主要通过采用 β -折叠构型，通过三个CDR连接，其形成环连接，并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的CDR通过FR区而紧密靠近地结合在一起，并且利用来自另一条链的CDR帮助形成抗体的靶结合位点。参见kabat等，免疫目标蛋白的序列（马里兰州贝塞斯达国立卫生研究院（National Institute of Health, Bethesda, Md）1987。

[0054] 本公开的抗体可以是多克隆的、单克隆的、遗传工程化的和/或在性质上另外修饰

过的,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、单链抗体等。在各种实施例中,抗体包含抗体恒定区的全部或一部分。在一些实施例中,恒定区是选自以下的同种型:IgA(例如,IgA₁或IgA₂),IgD,IgE,IgG(例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄)和IgM。在具体实施例中,本文所述的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含IgG₁。在其它实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含IgG₂。在其它实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含IgG₄。如本文所用,抗体的“恒定区”包括天然恒定区、同种异型或变体,如人IgG₁中的T250Q、L234A、L235A、D356E、L358M、M428L和/或A431G中的任一种。

[0055] 抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的轻链恒定区可以是卡帕(κ)轻链区或兰木达(λ)区。 λ 轻链区可以是任何一种已知的亚型,例如 λ_1 、 λ_2 、 λ_3 或 λ_4 。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含卡帕(κ)轻链区。

[0056] 本文所用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。单克隆抗体通过本领域可获得的或已知的任何方法衍生自单个克隆,包括任何真核,原核或噬菌体克隆。可使用本领域已知的多种技术,包括使用杂交瘤,重组单克隆抗体,包括使用杂交瘤,重组和噬菌体展示技术或其组合。

[0057] 本文所用的术语“嵌合”抗体是指具有衍生自非人免疫球蛋白(例如大鼠或小鼠抗体)的可变序列以及人免疫球蛋白恒定区(通常选自人免疫球蛋白模板)的抗体。

[0058] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式包含基本上至少一个、通常两个可变结构域中的全部,其中全部或基本上全部的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些CDR区,并且全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白序列中的那些FR区。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白共有序列的一部分。

[0059] “人抗体”包括具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体,并包括分离自人免疫球蛋白文库或分离自针对一种或多种人免疫球蛋白而转基因且不表达内源性免疫球蛋白的动物的抗体。人抗体可通过本领域已知的多种方法来制备,包括使用衍生自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。

[0060] 本公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包括全长(完整)的抗体分子。

[0061] 抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可以是其序列已被修饰成改变至少一种恒定区介导的生物效应器功能的抗体。例如,在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体被修饰成相对于未修饰的抗体降低至少一种恒定区介导的生物效应器功能,例如降低与Fc受体(Fc γ R)诸如Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa和/或Fc γ RIIIb中一种或多种的结合。可以通过在Fc γ R相互作用所必需的特定区域对抗体的免疫球蛋白恒定区区段进行突变来降低Fc γ R结合(参见,例如,Canfield和Morrison,1991,《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》173:1483-1491;以及Lund等人,1991,《免疫学杂志(J.Immunol.)》147:2657-2662)。抗体Fc γ R结合能力的降低还可以降低依赖于Fc γ R相互作用的其它效应器功能,例如调理作用、吞噬作用和抗原依赖性细胞毒性(“ADCC”)。

[0062] 本文所述的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包括相对于未修饰的抗体已被修饰成获得或改善了至少一种恒定区介导的生物效应器功能(例如,增强Fc γ R相互作用)的抗体(参见,例如,第2006/0134709号美国专利申请)。例如,本公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可以具有以比相应的未修饰恒定区更大亲和力而结合Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa和/或Fc γ RIIIb的恒定区。

[0063] 可以改变抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的Fc γ R结合和/或ADCC效应器功能的其它取代包括Fc区中的K322A取代或L234A和L235A双取代。参见,例如,Hezareh等人《病毒学杂志(J.Virol.)》,

75 (24) :12161-12168 (2001)。

[0064] 本公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可以包含修饰的(或变体)CH2结构域或完整的Fc结构域,该修饰的(或变体)CH2结构域或完整的Fc结构域包括与相应的野生型CH2或Fc区的结合相比增加与Fc γ RIIb的结合和/或减少与Fc γ RIIIa的结合的氨基酸取代。变体CH2或变体Fc结构域可以在第263位、第266位、第273位和第305位处包括一个或多个取代。在一些实施例中,相对于野生型CH2结构域,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含选自V263L、V266L、V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S、V273Y、V305K和V305W的一个或多个取代。

[0065] 与相应野生型CH2或Fc区的结合相比,能够增加与Fc γ RIIb的结合和/或减少与Fc γ RIIIa的结合的变体CH2或变体Fc结构域的其它实例包括文献“Vonderheide等人《临床癌症研究(Cancer Res.Cancer Res.)》,19(5),1035-1043(2013)”中所发现的那些,例如人IgG₁中的S267E或S267E/L328F。

[0066] 包含人IgG₄恒定区的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可以包含S228P突变,据报道其防止了Fab臂交换。参见,例如,Silva,JP等人《生物化学杂志(Journal of Biological Chemistry)》,290(9),5462-5469(2015)。

[0067] 在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包括增加或减少其与胎儿Fc受体FcRn的结合亲和力的改变,例如,通过在FcRn相互作用中所涉及的特定区域处对免疫球蛋白恒定区区段进行突变。在特定实施例中,将IgG类抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体突变,使得重链恒定区的氨基酸残基250、314和428中的至少一个被单独取代或以其任何组合形式被取代。对于第250位,取代的氨基酸残基可以是除苏氨酸以外的任何氨基酸残基,包括但不限于丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。对于第314位,取代的氨基酸残基可以是除亮氨酸以外的任何氨基酸残基,包括但不限于丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。对于第428位,取代的氨基酸残基可以是除甲硫氨酸以外的任何氨基酸残基,包括但不限于丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。已知改变Fc效应器功能的示例性取代是Fc取代M428L,其可与Fc取代T250Q组合发生。第7,217,797号美国专利的表1中标识了合适的氨基酸取代的其它具体组合。这样的突变增加了与FcRn的结合,这保护抗体免于降解并增加其半衰期。

[0068] 对人 $\alpha 4\beta 7$ 具有高亲和力的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体对于治疗和诊断用途而言可能是理想的。因此,本公开考虑了对人 $\alpha 4\beta 7$ 具有高结合亲和力的抗体。在具体的实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体以至少约100nM的亲和力结合人 $\alpha 4\beta 7$,但可表现出更高的亲和力,例如至少约90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.1nM、0.01nM或者甚至更高。在一些实施例中,抗体以约1pM至约10nM、约100pM至约10nM、约100pM至约1nM的范围内的亲和力或者在任何前述值之间的范围内的亲和力结合人 $\alpha 4\beta 7$ 。

[0069] 可以使用本领域熟知或本文所述的技术来确定抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体对人 $\alpha 4\beta 7$ 的亲和力,例如但不限于ELISA、等温滴定量热法(ITC)、表面等离子体共振或荧光偏振试验。

[0070] 抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体大体上包含重链和轻链,重链包含具有三个在本文中(按N→C顺序)称

为 V_H CDR#1、 V_H CDR#2和 V_H CDR#3的互补决定区(“CDR”)的可变区(V_H),轻链包含具有三个在本文中(按N→C顺序)称为 V_L CDR#1、 V_L CDR#2和 V_L CDR#3的互补决定区的可变区(V_L)。本文提供了示例性CDR的氨基酸序列,以及示例性抗 $\alpha 4\beta 7$ 的重链和轻链的 V_H 和 V_L 的氨基酸序列。抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的具体实施例包括这些示例性CDR和/或 V_H 和/或 V_L 序列,以及与这样的抗体竞争结合人 $\alpha 4\beta 7$ 的抗体。

[0071] 在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体适合施用于人。在具体的实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体是人性化的。

[0072] 在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的CDR的氨基酸序列选自表4的序列。

表 4 具体实施例的 CDR 序列		
CDR	序列 (N→C)	序列标识符
V_H CDR#1:	NTYMH	SEQ ID NO:12
	GFNIKNTYMH	SEQ ID NOS:32、42、52、62、72、82
V_H CDR#2:	RIDPANGHTEYAP	SEQ ID NO:13
	RIDPANGHTEYAPKFQG	SEQ ID NO:33
	RIDPANKHTEYAPKFLG	SEQ ID NO:43
	RIDPARGHTEYAPKFSG	SEQ ID NO:53
	RIDPARGHTEYAPKFEG	SEQ ID NO:63
	RIDPAKGHTEYAPKFLG	SEQ ID NO:73
	RIDPAGGHTEYAPKFIG	SEQ ID NO:83
V_H CDR#3:	YYVDS	SEQ ID NO:14
	VDS	SEQ ID NO:34
	VAS	SEQ ID NOS:44、64、84
	VDQ	SEQ ID NO:54
	VDV	SEQ ID NO:74
V_L CDR#1:	HASQGISDNIG	SEQ ID NOS:15、35
	HASQEISDNIG	SEQ ID NO:45、85
	HASQDISDNIG	SEQ ID NO:55、65、75
V_L CDR#2:	HGTNLED	SEQ ID NOS:16、36、46、56、66、76、86
V_L CDR#3:	VQYAQFPWT	SEQ ID NOS:17、37、47、57、67、77、87

[0074] 此处描述具有上述CDR的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的具体示例性实施例。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的CDR。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体具有SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37的CDR。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体具有SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:47的CDR。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体具有SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的CDR。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体具有SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67的CDR。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体具有SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77的CDR。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体具有SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87的CDR。

[0075] 在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含选自表5序列的 V_H 链和 V_L 链:

表 5
具体实施例的可变区序列

类型	序列 ID
V _H :	SEQ ID NO:10
	SEQ ID NO:20
	SEQ ID NO:21
	SEQ ID NO:22
	SEQ ID NO:23
	SEQ ID NO:40
	SEQ ID NO:50
	SEQ ID NO:60
	SEQ ID NO:70
	SEQ ID NO:80
V _L :	SEQ ID NO:11
	SEQ ID NO:25
	SEQ ID NO:26
	SEQ ID NO:27
	SEQ ID NO:28
	SEQ ID NO:41
	SEQ ID NO:51
	SEQ ID NO:61
	SEQ ID NO:71
	SEQ ID NO:81

[0077] 在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:10的V_H链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:11的V_L链。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22至SEQ ID NO:23中任何一个的V_H链以及在序列上对应于SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27至SEQ ID NO:28中任何一个的V_L链。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:21的变体的V_H链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:26的变体的V_L链。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:40的V_H链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:41的V_L链。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:50的V_H链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:51的V_L链。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:60的V_H链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:61的V_L链。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:70的V_H链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:71的V_L链。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:80的V_H链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:81的V_L链。

[0078] 本领域技术人员将理解,本文所述的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体中V_H或V_L序列的某些突变能提供本公开范围内的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。突变可以包括本文公开的V_H或V_L序列的氨基酸取代、添加或缺失,同时保留显著的抗 $\alpha 4\beta 7$ 活性。因此,在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含与表5中所示抗体中任一种的V_H序列具有至少85%、至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的V_H序列。抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可以包含与表5中所示抗体中任一种的V_H序列相比具有多达8个、多达7个、多达6个、多达5个、多达4个、多达3个或多达2个突变

的V_H序列。在一些实施例中,抗α4β7抗体可以包含与表5中所示抗体中任一种的V_H序列相比具有5个或更少、4个或更少、3个或更少或2个或更少突变的V_H序列。在一些实施例中,抗α4β7抗体包含具有单个氨基酸取代的V_H序列。在一些实施例中,V_H序列中的突变位于V_H CDR#1、V_H CDR#2或V_H CDR#3中。在一些实施例中,抗α4β7抗体包含与表5中所示抗体中任一种的V_L序列具有至少85%、至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的V_L序列。抗α4β7抗体可以包含与表5中所示抗体中任一种的V_L序列相比具有多达8个、多达7个、多达6个、多达5个、多达4个、多达3个或多达2个突变的V_L序列。在一些实施例中,抗α4β7抗体可以包含与表5中所示抗体中任一种的V_L序列相比具有5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少突变的V_L序列。在一些实施例中,抗α4β7抗体包含具有单个氨基酸取代的V_L序列。在一些实施例中,V_L序列中的突变位于VL CDR#1、VL CDR#2或VL CDR#3。

[0079] 在一些实施例中,抗α4β7抗体包含选自表6的序列的重链氨基酸序列和/或轻链氨基酸序列。

表 6 全长的链	
链	序列 ID
[0080] 重链	SEQ ID NO:90
	SEQ ID NO:91
	SEQ ID NO:92
	SEQ ID NO:93
	SEQ ID NO:94
	SEQ ID NO:95
	SEQ ID NO:96
	SEQ ID NO:97
	SEQ ID NO:98
	SEQ ID NO:99
轻链	SEQ ID NO:100

[0081] 在一些实施例中,抗α4β7抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:90的重链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:100的轻链。在一些实施例中,抗α4β7抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:92的重链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:100的轻链。在一些实施例中,抗α4β7抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:94的重链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:100的轻链。在一些实施例中,抗α4β7抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:96的重链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:100的轻链。在一些实施例中,抗α4β7抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:98的重链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:100的轻链。

[0082] 可以发生抗α4β7抗体序列的翻译后修饰,例如抗体重链C-末端上的一个或多个(例如,1、2、3或更多个)氨基酸残基的裂解,产生截短的形式。

[0083] 在一些实施例中,抗α4β7抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:91的重链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:100的轻链。在一些实施例中,抗α4β7抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:93的重链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:100的轻链。在一些实施例中,抗α4β7抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:95的重链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:100的轻

链。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:97的重链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:100的轻链。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包含在序列上对应于SEQ ID NO:99的重链;以及在序列上对应于SEQ ID NO:100的轻链。

[0084] 在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体在体外试验中与参比抗体竞争结合人 $\alpha 4\beta 7$ 。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体竞争结合表达人 $\alpha 4\beta 7$ 的细胞上的人 $\alpha 4\beta 7$ 。参比抗体可以是本文所述的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体中的任一种。在一些实施例中,参比抗体是表4至表6中提供的抗体。在一些实施例中,参比抗体是表8中提供的抗体。在具体实施例中,参比抗体选自使用来自抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体或具有与其等同的氨基酸序列的抗体的氨基酸序列产生的研究级抗体,诸如维多珠单抗。

[0085] 在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体拮抗(例如,抑制)一种 $\alpha 4$ (SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:2)和一种 $\beta 7$ (SEQ ID NO:3至SEQ ID NO:4)的人 $\alpha 4\beta 7$ 异源二聚体。 $\alpha 4\beta 7$ 受体拮抗作用可以通过多种机制发生,例如通过其配体中的至少一种诸如人MAdCAM-1(SEQ ID NO:5)或人VCAM-1(SEQ ID NO:6)而抑制 $\alpha 4\beta 7$ 的结合。

[0086] 本文所述的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体与人 $\alpha 4\beta 7$ 结合。用于与来自其它物种(例如来自猴,例如食蟹猴)的 $\alpha 4\beta 7$ 结合的抗体的交叉反应性可提供优势,诸如能够在猴动物模型中测试生物活性的能力。这样的动物模型测试可用于筛选抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体以选择与功效相关的特性,例如,有利的药代动力学,或与安全性相关的特性,例如降低肝毒性。在一些实施例中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体结合食蟹猴 $\alpha 4\beta 7$ 以及人 $\alpha 4\beta 7$ 。

[0087] 竞争试验包括但不限于放射性物质标记的免疫试验(RIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、夹心ELISA、荧光激活细胞分选(FACS)试验和表面等离子体共振试验。

[0088] 在参比抗体与测试抗体(不考虑物种或同种型)之间进行抗体竞争试验时,可以首先用可检测的标记物诸如荧光团、生物素或酶(或者甚至放射性)标记物标记参比抗体,以便能够随后进行鉴定。在这种情况下,将表达人 $\alpha 4\beta 7$ 的细胞与未标记的测试抗体一起孵育,添加标记的参比抗体,并测量所结合的标记物的强度。如果测试抗体通过与重叠表位结合而与标记的参比抗体竞争,相对于没有测试抗体进行的对照反应,该强度将有所降低。

[0089] 在本试验的具体实施例中,首先确定在试验条件(例如,特定的细胞密度)下产生最大结合的80%时的标记参比抗体的浓度(“浓度_{80%}”),然后用10X浓度_{80%}的未标记测试抗体和浓度_{80%}的标记参比抗体进行竞争试验。

[0090] 抑制可以表示为抑制常数或 K_i ,其根据下式来计算:

[0091] $K_i = IC_{50} / (1 + [\text{参比Ab浓度}] / K_d)$,

[0092] 其中 IC_{50} 是使参比抗体的结合减少50%的测试抗体的浓度,并且 K_d 是参比抗体的解离常数,是其对人 $\alpha 4\beta 7$ 的亲力的度量。与本文公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体竞争的抗体在本文所述的试验条件下可以具有10pM至10nM的 K_i 。

[0093] 在各种实施例中,在所使用的具体试验条件下为最大结合的80%的参比抗体浓度且比参比抗体浓度高10倍的测试抗体浓度下,如果测试抗体使参比抗体的结合降低至少约20%或更多,例如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或甚至更多,或降低介于任何前述数值之间的百分比,则认为测试抗体与参比抗体竞争。

[0094] 本公开的另一方面包括能够特异性结合人 $\alpha 4\beta 7$ 的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体结合片段。在一些实施例中,这些抗 $\alpha 4\beta 7$ 结合片段包含本文所公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体中的至少一个和多达全部的

CDR。抗体结合片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、单链Fv片段和单结构域片段。

[0095] 抗 α 4 β 7抗体或其结合片段可以具有插入其一个或多个CDR中的一个或多个氨基酸,例如如以下文献中所描述的:Jung和Plückthun,1997,《蛋白质工程(Protein Engineering)》10:9,959-966;Yazaki等人,2004,《蛋白质工程设计与选择(Protein Eng.Des Sel.)》17(5):481-9.2004年8月17日在线出版;和美国专利申请第2007/0280931号。

[0096] 6.4. 编码抗 α 4 β 7抗体的多核苷酸、表达系统和制备抗体的方法

[0097] 本公开包含有编码抗 α 4 β 7抗体的免疫球蛋白轻链和重链基因的多核苷酸分子,包含这种多核苷酸的载体和能够产生本公开的抗 α 4 β 7抗体的宿主细胞。

[0098] 本公开的抗 α 4 β 7抗体可以通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链基因来制备。为了重组表达抗体,用一种或多种携带编码抗体的免疫球蛋白轻链和重链的DNA片段的重组表达载体转染宿主细胞,使得轻链和重链在宿主细胞中表达,并任选地分泌到培养宿主细胞的培养基中,从该培养基中可以回收抗体。

[0099] 为了生成编码此类抗 α 4 β 7抗体的多核苷酸,首先获得编码轻链和重链可变区的DNA片段。这些DNA可以通过扩增和修饰编码轻链和重链可变序列的种系DNA或cDNA而获得,例如使用聚合酶链式反应(PCR)。

[0100] 一旦获得编码抗 α 4 β 7抗体相关的V_H和V_L片段的DNA片段,可通过常规的重组DNA技术进一步操纵这些DNA片段,例如将可变区基因转变为全长的抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操纵中,将编码V_L或V_H的DNA片段可操作地连接到编码另一种蛋白质的另一DNA片段,如抗体恒定区或柔性接头。本文中所使用的术语“可操作地连接”是指将两个DNA片段连接使得由这两个DNA片段编码的氨基酸序列保持读码框一致。

[0101] 通过将编码V_H的DNA可操作地连接到编码重链恒定区(CH1、CH2、CH3和任选的CH4)的另一DNA分子上,可以将所分离的编码V_H区的DNA转变为全长的重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见,例如,Kabat,E.A.等人,1991,《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of immunological interest)》,第五版,美国卫生和公众服务部(U.S.Department of Health and human services),NIH出版物编号91-3242),包含有这些区域的DNA片段可通过常规的PCR扩增而获得。重链恒定区可以是IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,但在某些实施例是IgG₁或IgG₄。对于Fab片段重链基因,可以将编码V_H的DNA可操作地连接到另一个仅编码重链CH1恒定区的DNA分子。

[0102] 通过将编码V_L的DNA可操作地连接到编码轻链恒定区CL的另一个DNA分子上,可以将编码V_L区的分离的DNA转变为全长的轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列在本领域中是已知的(参见,例如,Kabat等人,1991,《具有免疫学意义的蛋白质序列》,第五版,美国卫生和公众服务部,NIH出版物编号91-3242)和包含这些区域的DNA片段可以通过常规的PCR扩增而获得。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区,但在某些实施例是 κ 恒定区。

[0103] 为了表达本公开的抗 α 4 β 7抗体,将如上所述获得的编码部分或全长的轻链和重链的DNA插入表达载体中,使得基因与转录和翻译控制序列可操作地连接。在本文中,术语“可操作地连接”意指将抗体基因连接到载体中,使得载体内的转录和翻译控制序列发挥其调节抗体基因转录和翻译的预期功能。对表达载体和表达控制序列进行选择以与所用表达宿

主细胞相容。可以将抗体轻链基因和抗体重链基因插入到单独的载体中,或者更常见地,将两种基因插入到同一表达载体中。

[0104] 通过常规方法(例如,连接抗体基因片段和载体上的互补限制性位点,或者如果不存在限制性位点则进行平端连接)将抗体基因插入到表达载体中。在插入抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体相关的轻链或重链序列之前,表达载体可以已经携带有抗体恒定区序列。例如,一种将抗 $\alpha 4\beta 7$ 单克隆抗体相关的 V_H 和 V_L 序列转变为全长的抗体基因的方法是将它们分别插入到已经编码重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,使得 V_H 区段可操作地连接到载体内的CH区段上,而 V_L 区段可操作地连接到载体内的CL区段。另外地或可选地,重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可以将抗体链基因克隆到载体中,使得信号肽以读码框一致的方式连接到抗体链基因的氨基端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。

[0105] 除了抗体链基因,本公开的重组表达载体携带控制抗体链基因在宿主细胞中表达的调节序列。术语“调节序列”旨在包括控制抗体链基因转录或翻译的启动子、增强子和其它表达控制元件(例如,聚腺苷酸化信号)。

[0106] 除了抗体链基因和调节序列之外,本公开的重组表达载体可以携带另外的序列,诸如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起点)和选择标记基因。选择标记基因有助于选择已导入了载体的宿主细胞。为了表达轻链和重链,通过常规的技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞中。术语“转染”的各种形式旨在包含有通常用于将外源DNA导入原核或真核宿主细胞的各种技术,例如电穿孔、脂质转染、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。

[0107] 可以在原核或真核宿主细胞中表达本公开的抗体。在某些实施例中,在最佳地分泌正确折叠且有免疫活性的抗体的真核细胞例如哺乳动物宿主细胞中进行抗体的表达。用于表达本公开的重组抗体的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括DHFR⁻CHO细胞,描述于“Urlaub和Chasin,1980,《美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.)》美国77:4216-4220”,与DHFR选择标记一起使用,例如如“Kaufman和Sharp,1982,《分子生物学(Mol.biol.)》159:601-621”中所描述的)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体导入到哺乳动物宿主细胞时,通过将宿主细胞培养一段时间来产生抗体,该一段时间足以允许在宿主细胞中表达抗体或将抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中。可以使用常规的蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。宿主细胞也可用于产生完整抗体的部分,诸如Fab片段或scFv分子。应当理解,上述程序的变化在本公开的范围内。例如,可以期望用编码本公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的轻链或重链(但不是两者)的DNA转染宿主细胞。

[0108] 重组DNA技术也可用于去除不是结合人 $\alpha 4\beta 7$ 所必需的一些或全部编码轻链和重链之一或两者的DNA。由这种截短的DNA分子表达的分子也被包含在本公开的抗体中。

[0109] 为了重组表达本公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,可以将宿主细胞共转染两种本公开的表达载体,第一种载体编码重链来源的多肽,第二种载体编码轻链来源的多肽。两种载体可以含有相同的选择标记,或者它们可以各自含有单独的选择标记。可选地,可以使用编码重链和轻链多肽两者的单一载体。

[0110] 一旦获得了编码抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的一个或多个部分的多核苷酸,可以将进一步的改变或突变引入编码序列中,例如以生成编码具有不同CDR序列的抗体、对Fc受体具有降低的亲

和力的抗体或不同亚类的抗体的多核苷酸。

[0111] 本公开的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体还可以通过化学合成或通过使用无细胞平台来产生。

[0112] 6.5. 抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的纯化

[0113] 一旦通过重组表达产生了本公开的多肽,就可以通过本领域已知的用于纯化蛋白质的任何方法对其进行纯化。

[0114] 该多肽可以纯化为单体或二聚体,例如包含两种多肽的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。

[0115] 一旦被分离出来,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可以被进一步纯化。

[0116] 6.6. 使用方法

[0117] 6.6.1. 治疗益处

[0118] 本文提供的数据证明,所公开的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体表现出对 $\alpha 4\beta 7$ 有利的结合亲和力、特异性和效力,以及对原代免疫细胞有利的结合特征、Fc γ R结合和对人 $\alpha 4\beta 7$ +细胞缺乏ADCC和ADCP活性。这些抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体显示与不同实验室生长的HIV毒株以及来自患者的HIV样品的病毒粒子中的 $\alpha 4\beta 7$ 结合,并随后形成免疫复合物。这些免疫复合物可以结合不同的Fc γ R并且通过吞噬作用被人单核细胞系THP-1摄取。这些抗体还阻断 $\alpha 4\beta 7$ 与其配体诸如MadCAM-1和HIV gp120蛋白的相互作用。因此,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、结合片段和/或包含它们的药物组合物可以在治疗上用于通过Fc依赖性和Fab依赖性机制诱导对HIV感染的病毒抑制或降低感染HIV的受试者中的病毒载量。在一些实施例中,对HIV感染的病毒抑制涉及降低HIV病毒的功能和/或降低HIV病毒的复制。

[0119] 所公开的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可以在有需要的受试者中治疗HIV感染的方法中使用。在一些实施例中,该方法涉及降低受试者中的病毒载量。在一些实施例中,受试者中的病毒载量降低至检测不到的水平。在一些实施例中,受试者是感染HIV的人类受试者。

[0120] 在一些实施例中,该方法涉及向患有HIV感染的人类受试者施用拮抗 $\alpha 4\beta 7$ 以提供治疗益处的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。在一些实施例中,该方法涉及向患有HIV感染的人类受试者施用与HIV病毒粒子结合的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。在一些实施例中,该方法涉及向患有HIV感染的人类受试者施用与HIV病毒粒子中的 $\alpha 4\beta 7$ 结合以形成免疫复合物的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。在一些实施例中,该方法涉及向患有HIV感染的人类受试者施用抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体与HIV病毒粒子形成免疫复合物。在一些实施例中,这些免疫复合物通过吞噬作用被APC摄取。在一些实施例中,该方法涉及向患有HIV感染的人类受试者施用阻断 $\alpha 4\beta 7$ 与其配体诸如MadCAM-1以及与HIV gp120相互作用的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。在一些实施例中,该方法涉及向患有HIV感染的人类受试者施用阻断 $\alpha 4\beta 7$ 与HIV gp120的相互作用抑制细胞间HIV传播的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。在一些实施例中,该方法涉及向患有HIV感染的人类受试者施用阻断由MadCAM-1或HIV gp120介导的CD4 T细胞刺激的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。在一些实施例中,该方法涉及向患有HIV感染的人类受试者施用抑制经MadCAM-1或HIV gp120共刺激的CD4 T细胞中的HIV复制的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。在一些实施例中,该方法涉及向患有HIV感染的人类受试者施用诱导对HIV复制进行病毒抑制的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。在一些实施例中,该方法涉及向患有HIV感染的人类受试者施用诱导免疫介导的HIV抑制的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。

[0121] 6.7. 序列描述表

[0122] 所引入的序列表中公开的序列及其简要描述的相关性示于表7中。

[0123]

表 7 序列表简述			
序列	描述	序列	描述
SEQ ID NO:1	人 $\alpha 4$	SEQ ID NO:50	Ab-h1.9b VH
SEQ ID NO:2	人 $\alpha 4$	SEQ ID NO:51	Ab-h1.9b VL
SEQ ID NO:3	人 $\beta 7$	SEQ ID NO:52	Ab-h1.9b VH-CDR1
SEQ ID NO:4	人 $\beta 7$	SEQ ID NO:53	Ab-h1.9b VH-CDR2
SEQ ID NO:5	MAdCAM-1	SEQ ID NO:54	Ab-h1.9b VH-CDR3
SEQ ID NO:6	VCAM-1	SEQ ID NO:55	Ab-h1.9b VL-CDR1
SEQ ID NO:7	gp120-V2 WT	SEQ ID NO:56	Ab-h1.9b VL-CDR2
SEQ ID NO:8	gp120-V2 对照	SEQ ID NO:57	Ab-h1.9b VL-CDR3
SEQ ID NO:10	Ab-m1 VH	SEQ ID NO:60	Ab-h1.9c VH
SEQ ID NO:11	Ab-m1 VL	SEQ ID NO:61	Ab-h1.9c VL
SEQ ID NO:12	Ab-m1 VH-CDR1	SEQ ID NO:62	Ab-h1.9c VH-CDR1
SEQ ID NO:13	Ab-m1 VH-CDR2	SEQ ID NO:63	Ab-h1.9c VH-CDR2
SEQ ID NO:14	Ab-m1 VH-CDR3	SEQ ID NO:64	Ab-h1.9c VH-CDR3
SEQ ID NO:15	Ab-m1 VL-CDR1	SEQ ID NO:65	Ab-h1.9c VL-CDR1
SEQ ID NO:16	Ab-m1 VL-CDR2	SEQ ID NO:66	Ab-h1.9c VL-CDR2
SEQ ID NO:17	Ab-m1 VL-CDR3	SEQ ID NO:67	Ab-h1.9c VL-CDR3
SEQ ID NO:20	Ab-h1 VH.1	SEQ ID NO:70	Ab-h1.9d VH
SEQ ID NO:21	Ab-h1 VH.1 可变区	SEQ ID NO:71	Ab-h1.9d VL
SEQ ID NO:22	Ab-h1 VH.1.a	SEQ ID NO:72	Ab-h1.9d VH-CDR1
SEQ ID NO:23	Ab-h1 VH.1b	SEQ ID NO:73	Ab-h1.9d VH-CDR2
SEQ ID NO:25	Ab-h1 VL.1	SEQ ID NO:74	Ab-h1.9d VH-CDR3
SEQ ID NO:26	Ab-h1 VL.1 可变区	SEQ ID NO:75	Ab-h1.9d VL-CDR1
SEQ ID NO:27	Ab-h1 VL.1.a	SEQ ID NO:76	Ab-h1.9d VL-CDR2
SEQ ID NO:28	Ab-h1 VL.1b	SEQ ID NO:77	Ab-h1.9d VL-CDR3
SEQ ID NO:32	Ab-h1.9 VH-CDR1	SEQ ID NO:80	Ab-h1.9e VH
SEQ ID NO:33	Ab-h1.9 VH-CDR2	SEQ ID NO:81	Ab-h1.9e VL
SEQ ID NO:34	Ab-h1.9 VH-CDR3	SEQ ID NO:82	Ab-h1.9e VH-CDR1
SEQ ID NO:35	Ab-h1.9 VL-CDR1	SEQ ID NO:83	Ab-h1.9e VH-CDR2
SEQ ID NO:36	Ab-h1.9 VL-CDR2	SEQ ID NO:84	Ab-h1.9e VH-CDR3
SEQ ID NO:37	Ab-h1.9 VL-CDR3	SEQ ID NO:85	Ab-h1.9e VL-CDR1
SEQ ID NO:40	Ab-h1.9a VH	SEQ ID NO:86	Ab-h1.9e VL-CDR2
SEQ ID NO:41	Ab-h1.9a VL	SEQ ID NO:87	Ab-h1.9e VL-CDR3
SEQ ID NO:42	Ab-h1.9a VH-CDR1	SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:91*	Ab-h1.9d-hIgG1 (*末端赖氨酸截短)

[0124]

表 7 序列表简述			
SEQ ID NO:43	Ab-h1.9a VH-CDR2	SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:93*	Ab-h1.9d-WT HC (*K 截短)
SEQ ID NO:44	Ab-h1.9a VH-CDR3	SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:95*	Ab-h1.9d-LALA HC(*K 截短)
SEQ ID NO:45	Ab-h1.9a VL-CDR1	SEQ ID NO:96, 97*	Ab-h1.9d-QL HC (*K 截短)
SEQ ID NO:46	Ab-h1.9a VL-CDR2	SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99*	Ab-h1.9d-LALA/QL HC (*K 截短)
SEQ ID NO:47	Ab-h1.9a VL-CDR3	SEQ ID NO:100	Ab-h1.9d LC (*K 截短)

[0125] 7. 实例

[0126] 以下实例强调了本文所述抗体和结合片段的示例性实施例的某些特征和特性,提

供这些实施例是为了说明而非限制的目的。

[0127] 抗体

[0128] 实例中所使用的包括Ab-h1.9d-WT、阳性对照和同种型对照在内的测试抗体列于表8中。

[0129]

表 8 所制备的抗体的部分列表		
名称	用途	描述
Ab-h1.9d-WT	示例性抗体	人源化抗人 $\alpha 4\beta 7$, 倾向性工程化[hu IgG1/k, WT]
Ab-h1.9(x)系列	示例性抗体	人源化抗人 $\alpha 4\beta 7$, 倾向性工程化[hu IgG1/k]
Ab-h1.(x)系列	示例性抗体	人源化抗人 $\alpha 4\beta 7$ [hu IgG1/k; WT]
Ab-h1	示例性抗体	人源化抗人 $\alpha 4\beta 7$ [hu IgG1/k; WT]
Ab-c1	示例性抗体	嵌合抗人 $\alpha 4\beta 7$ [hu IgG1/k; WT]
Ab-m1	示例性抗体	小鼠抗人 $\alpha 4\beta 7$ [mu IgG1/k; WT]
Ab-Vedo	对比抗体	人源化抗人 $\alpha 4\beta 7$ mAb[hu IgG1/k; LALA]; 具有维多珠单抗(安吉优®)可变结构域的内部版本
Ab-Abri	对比抗体	人类抗人 $\alpha 4\beta 7$ mAb; [IgG2/k; WT]; 具有阿利鲁单抗(AMG181)可变结构域的内部版本
Ab-Etro	对比抗体	人源化抗人 $\beta 7$ mAb[hu IgG1/k; WT]; 具有依曲利组单抗(RG7413)可变结构域的内部版本
Ab-Nata	对比抗体	人源化抗人 $\alpha 4$ mAb[hu IgG4/k; WT] 那他珠单抗(泰萨布里®)
Ab-Ritu	对比抗体	嵌合抗人 CD20 mAb[hu IgG1/k; WT] 利妥昔单抗(Rituxan®)
Ab-Tras	对比抗体	抗人 HER2 mAb 曲妥珠单抗(赫赛汀®)
Ab-Ctet	同种型对照	抗破伤风类毒素(破伤风杆菌) mAb[hu IgG1/k; WT]
Ab-CMV	同种型对照	抗 CMV gH MSL109 mAb[hu IgG1/k; WT]
Ab-Alem	ADCC 对照	抗人 CD52 mAb(坎帕斯(Campath 1H)) [hu IgG1/k; WT]

[0130] 统计

[0131] 使用GraphPad Prism对浓度响应曲线进行非线性回归分析,确定了半数最大抑制浓度(IC_{50})和半数最大有效浓度(EC_{50})值。通过曼-惠特尼双尾检验确定了比较的显著性。所有值是至少三次独立实验的结果的平均值或标准偏差,除非另有说明。

[0132] 7.1.实例1:抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的生成

[0133] 7.1.1.杂交瘤筛选

[0134] 利用基于杂交瘤的技术生成小鼠抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的起始组。除佐剂外,用表达人 $\alpha 4\beta 7$ 的HEK293、CHO-K1或BaF3重组细胞免疫小鼠。候选物杂交瘤来源的抗体的选择基于表9的标准:

[0135]

表 9 候选物选择标准	
结合	与 HuT78 细胞结合, HuT78 细胞是一种表达内源性细胞表面 $\alpha 4\beta 7$ 的人 T 淋巴瘤细胞系
	与人和 cyno CD4+和 CD8+T 细胞结合
效力	阻断 HuT78 细胞对结合在板上的人 MAdCAM-1-Fc 蛋白的粘附
	阻断 MAdCAM-1-Fc 与人和 cyno CD4+中央记忆 T 细胞的结合
结合特异性	与表达人 $\alpha 4\beta 7$ 的重组细胞结合
	不与人 $\alpha 4\beta 1$ 结合
	与表达人和 cyno $\alpha E\beta 7$ 的重组细胞最低限度地结合或完全不结合
物种交叉反应性	与表达 cyno $\alpha 4\beta 7$ 的重组细胞结合
	与表达大鼠和小鼠 $\alpha 4\beta 7$ 的重组细胞结合

[0136] 从本次筛选中鉴定出一组功能性杂交瘤mAb,所有候选物均显示有利的特征。然而,没有一种具有啮齿动物交叉反应性,这可以通过以下来解释:1)人 $\alpha 4/\beta 7$ 与cyno $\alpha 4/\beta 7$ 具有96%/97%的氨基酸序列同源性,但与大鼠和小鼠 $\alpha 4/\beta 7$ 仅有84%/85%的序列同源性;以及2)所有选定的功能性杂交瘤mAb对 $\alpha 4\beta 7$ 具有高度选择性,并且可以结合 $\alpha 4\beta 7$ 异源二聚体上的构象表位。

[0137] 7.1.2. 抗体表征

[0138] 在亚克隆的稳定杂交瘤细胞系上通过200至300ml转瓶培养和蛋白A亲和纯化进行小规模抗体生产。通过SDS-PAGE和质谱验证mAb的纯度。通过结合和功能性试验对纯化的抗体进行表征以确定同种型和物种交叉反应性。

[0139] 结合筛选

[0140] 在1 μ g/ml的浓度下,通过FACS利用BaF3-h $\alpha 4\beta 7$ 、BaF3-h $\alpha E\beta 7$ 、BaF3-c $\alpha E\beta 7$ 、BaF3、CHOK1-c $\alpha 4\beta 7$ 、CHOK1-m $\alpha 4\beta 7$ 和CHOK1-h $\alpha 4\beta 1$ 细胞系针对同种型和物种交叉反应性表征纯化的抗体。FACS图谱(包括示例性mAbAb-m1的FACS图谱)汇总于表10。

[0141]

表 10 同种型和物种交叉反应性								
抗体	同种型	FACS MFI						
		BaF3	BaF3-h $\alpha 4\beta 7$	BaF3-h $\alpha E\beta 7$	BaF3-c $\alpha E\beta 7$	CHOK1-c $\alpha 4\beta 7$	CHOK1-m $\alpha 4\beta 7$	CHOK1-h $\alpha 4\beta 1$
Ab-m1	IgG1/k	3.97	453.71	17.35	54.31	45.14	3.6	3.72
Ab-Vedo	hIgG1/k	3.53	706.72	11.60	57.21	100.88	2.91	4.23
Ab-Abri	hIgG2/k	3.54	623.52	9.81	68.35	89.85	2.87	4.25
Ab-Etro	hIgG1/k	5.78	439.75	73.21	247.1 2	97.21	92.16	4.53

[0142] 功能性验证

[0143] 纯化的抗体通过对HuT78细胞中的MadCAM-1的粘附试验来表征。Ab-m1在MadCAM-1试验中显示出潜在的阻断效力,因此在功能上得到验证。表11汇总了针对Ab-m1的三次独立实验的数据。图1中示出了代表性的数据。

[0144]

表 11 功能性试验				
抗体	HutT78 细胞粘附试验		CHOK1- α 4 β 7 粘附试验	
	IC50/MadCAM-1 (pM)	最大抑制 (%)	IC50/MadCAM-1 (pM)	最大抑制 (%)
Ab-m1	55.5 $\pm$ 6.3	88.9 $\pm$ 3.0	201.1 $\pm$ 51.2	84.6 $\pm$ 15.6
Ab-Vedo	94.9 $\pm$ 4.5	86.5 $\pm$ 13.5	562.3 $\pm$ 249.5	76.0 $\pm$ 12.6
Ab-Abri	12.87	103.28	99.40	95.94
Ab-Etro	17.83	103.5	241.5 $\pm$ 38.6	91.5 $\pm$ 7.0

[0145] 功能性表征

[0146] 使用对CHOK1- α 4 β 7中的MadCAM-1的粘附试验对Ab-m1进行进一步的功能性表征,以检查cyno交叉反应性。CHOK1- α 4 β 7中的粘附试验数据汇总于上表11中。图2中示出了代表性的数据。

[0147] 为了确定Ab-m1与人 α 4 β 7结合的亲和力,在BaF3-h α 4 β 7中进行了基于FACS的滴定。对EC50进行了确定,汇总于表12。

[0148]

表 12 对人 α 4 β 7 的亲和力			
抗体	同种型	BaF3-h α 4 β 7 FACS 滴定	
		EC50 (pM)	最大 MFI
Ab-m1	IgG1/k	474	255.6
Ab-Vedo	hIgG1/k	713.2 $\pm$ 100.9	848.0 $\pm$ 289.4
Ab-Abri	hIgG2/k	679	775.3
Ab-Etro	hIgG1/k	704.8 $\pm$ 66.8	950.7 $\pm$ 202.0

[0149] 使用与Alexa488荧光团偶联的比较抗体,在存在50倍过量的表13中所示的未标记Ab的情况下,通过竞争性FACS进行表位分类。基于未标记Ab对Alexa488标记Ab的结合抑制百分比,Ab-m1被表征为属于维多珠单抗 (Ab-Vedo) 样组 (表13)。

[0150]

表 13 表位分类				
抗体	Ab-m1	Ab-Vedo	Ab-Abri	Ab-Etro
Ab-Vedo-Alexa488	76	88	89	18
Ab-Abri-Alexa488	73	88	89	80
Ab-Etro-Alexa488	-1	6	60	93
IC50(pM) Hut78	44.7 $\pm$ 19.3	89 $\pm$ 10.7	12.9	17.8

[0151] 候选物特征分析

[0152] 在原代人CD4+记忆T细胞中证实了mAb与人 α 4 β 7结合的亲和力。Ab-m1还能够以高效力阻断人MadCAM-1与原代人CD4+记忆T细胞结合 (IC50=63.7pM,最大抑制100%;图3)。

[0153] 7.1.3. VH/VL测序、嵌合抗体生成和表征

[0154] 将杂交瘤克隆回收并在完全杂交瘤培养基 (具有10%FBS的DMEM) 中扩增。通过在室温下以1000rpm离心5分钟收获细胞,并用PBS (pH 7.4) 洗涤两次。用Trizol从细胞沉淀 (约1 $\times$ 10⁷个细胞) 中提取RNA。

[0155] 使用小鼠Ig引物组 (Novagen公司, 69831-3) 通过RT-PCR从它们的杂交瘤总RNA中分别扩增抗体VH和VL片段。将适当大小的阳性PCR产物插入T载体用于测序和鉴定VH和VL区 (表14)。使用VH/VL序列与理论的恒定区序列的组合构建全长的抗体序列。

[0156] 设计引物后,独自扩增VL/VH并克隆到表达载体中,通过同源重组制备嵌合抗体构建体。VH和VL中CDR的氨基酸序列如表14所示。

[0157]

表 14 示例性的鼠可变链				
Ab-m1	重链			
	CDR1	CDR2	CDR3	VH
	NTYMH SEQ ID NO:12	RIDPANGHTEYAP SEQ ID NO:13	VDS SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:10
	轻链			
	CDR1	CDR2	CDR3	VL
	HASQGISDNIG SEQ ID NO:15	HGTNLED SEQ ID NO:16	VQYAQFPWT SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:11

[0158] 通过在HEK293细胞中瞬时转染产生嵌合抗体。表达后,将蛋白质纯化。SEC-HPLC证实了嵌合抗体的高百分比单体。

[0159] Ab-c1是具有Ab-m1的可变区和人IgG1/k恒定区的嵌合抗体。通过FACS确定Ab-c1与人原代CD4⁺CD45RO⁺T细胞结合的亲和力,其中来自一种代表性人全血的结合EC50值为3.9pM(示于图4和表15)。还在HuT78细胞和CHOK1- α 4 β 7细胞中评价了Ab-c1阻断 α 4 β 7整合素与MadCAM-1结合的能力(表15)。

[0160]	抗体	原代 CD4 ⁺ 记忆 T 细胞 mAb 结合 EC50 (pM)
	Ab-m1	9.8
	Ab-c1	3.9
	Ab-Vedo	43.2±4.5
	Ab-Etro	5.4±0.2
	Ab-Abri	4.9±1.6

[0161] 在一种浓度(1 μ g/ml)下,通过FACS利用BaF3-h α 4 β 7、BaF3-h α E β 7、BaF3-c α E β 7、BaF3、CHOK1-c α 4 β 7和CHOK1-h α 4 β 1细胞系进一步表征纯化的嵌合抗体Ab-c1,以证实其结合特异性和食蟹猴交叉反应性。测试嵌合体的FACS特征汇总于表16。

表 16 FACS 特征							
[0162]	抗体编码	同种型	FACS MFI				
			BaF3	BaF3-h α 4 β 7	BaF3-h α E β 7	BaF3-c α E β 7	CHOK1-c α 4 β 7
	Ab-m1	mIgG1/k	1.37	153.69	7.35	38.09	34.36
	Ab-c1	hIgG1/k	2.85	357.77	20.65	67.81	49.40
	Ab-Vedo	hIgG1/k	2.78	153.43	19.5	60.87	46.47

[0163] HuT78被用于研究嵌合Ab-c1是否能够阻断MadCAM-1介导的对h α 4 β 7整合素的粘附。如表17所示,Ab-c1表现出抑制HuT78细胞与MadCAM-1粘附的能力。

[0164] CHOK1-c α 4 β 7被用于研究嵌合抗体是否能抑制MadCAM-1介导的对c α 4 β 7的粘附。如表17所示,Ab-c1表现出抑制CHOK1-c α 4 β 7细胞与MadCAM-1粘附的能力。

[0165]	表 17 粘附试验				
		MadCAM-1/HuT78 (α4β7)		MadCAM-1/CHOK1 (α4β7)	
	抗体编码	IC50 (pM)	最大抑制 (%)	IC50 (pM)	最大抑制 (%)
	Ab-m1	22.8	99.44%	65.8	92.78%
	Ab-c1	13.7	98.06%	86.4	85.54%
	Ab-Vedo	57.4	94.67%	540.8±336.5	94.41%

[0166] 7.1.4. 人源化

[0167] 基于对HuT78细胞和人原代CD4+T记忆细胞两者的结合和效力、cyno交叉反应性、CDR序列多样性、结合选择性、序列倾向性(即,糖基化)和表位组来选择抗体Ab-m1。具体特点见表18。

表 18 Ab-m1 表征					
[0168]	抗体	MadCAM-1/HuT78 效力 (pM)	MadCAM-1/α4β7 效力 (pM)	Cyno 交叉反应性	人 CD4+CD45RO+
					结合 EC50 (pM) MadCAM-1 抑制 IC50 (pM)
	Ab-m1	55.5±6.3	201.1±51.2	4x	9.8 63.7

[0169] 根据表19组装VH和VL片段,并掺入人IgG1和κ恒定区,设计人源化抗体。

表 19 人源化 Ab-h1 的 VH 和 VL 链			
啮齿动物亲本	人源化 Ab	VH	VL
[0170]	Ab-h1.1	Ab-h1VH.1 (SEQ ID NO:20)	Ab-h1VL.1 (SEQ ID NO:25)
	Ab-h1.2	Ab-h1VH.1 (SEQ ID NO:20)	Ab-h1VL.1a (SEQ ID NO:27)
	Ab-h1.3	Ab-h1VH.1 (SEQ ID NO:20)	Ab-h1VL.1b (SEQ ID NO:28)
	Ab-h1.4	Ab-h1VH.1a (SEQ ID NO:22)	Ab-h1VL.1 (SEQ ID NO:25)
	Ab-h1.5	Ab-h1VH.1a (SEQ ID NO:22)	Ab-h1VL.1a (SEQ ID NO:27)
	Ab-h1.6	Ab-h1VH.1a (SEQ ID NO:22)	Ab-h1VL.1b (SEQ ID NO:28)
	Ab-h1.7	Ab-h1VH.1b (SEQ ID NO:23)	Ab-h1VL.1 (SEQ ID NO:25)
	Ab-h1.8	Ab-h1VH.1b (SEQ ID NO:23)	Ab-h1VL.1a (SEQ ID NO:27)
	Ab-h1.9	Ab-h1VH.1b (SEQ ID NO:23)	Ab-h1VL.1b (SEQ ID NO:28)

[0171] 产生了具有良好表达的这些人源化抗α4β7 mAb,SEC显示>95%的单体。通过MS确认同一性,并通过DSC测定人源化抗α4β7的稳定性。评价了四种人源化Ab-h1阻断MAdCAM-1介导的HuT78细胞粘附的能力,它们均展示出强效力,IC50值为一位数或低的两位数pM范围(表20)。

[0172]

表 20 人源化 $\alpha 4\beta 7$ mAb 特性		
人源化 Ab	HuT78 细胞粘附效力 IC ₅₀ (pM)	Cyno X 反应性 CHOK1/ $\alpha 4\beta 7$ 对 MAdCAM-1 的粘附 IC ₅₀ (pM)
Ab-h1.5	9.1	
Ab-h1.6	8.1	
Ab-h1.8	13.8	
Ab-h1.9	11.4	36.5
Ab-Vedo	31; 60	120
Ab-Abri		50.9
Ab-Etro		49.9

[0173] 7.1.5.Ab-h1.9的倾向性工程化

[0174] 选择抗体Ab-h1.9用于生成在脱酰胺化、异构化、氧化、糖基化、水解和裂解方面具有降低的化学倾向性的变体VH和VL链。

[0175] Ab-h1.9VH的序列为：

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GFNIKNTY**MHWVRQAPGQGLEWIGRIDPANGHTE[0176] **YAPKFQGR**VTITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCY**YVD**SWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:23)

[0177] 且Ab-h1.9VL的序列为：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**HASQG**ISDNIGWLQQKPGKSFKLLI**YHG**TNLEDGVPSRF[0178] SGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC**VQYAQ**FPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:28)

[0179] 其中所选定的倾向性突变位点加下划线,而CDR为加粗。倾向性存在于VH-CDR2、VH-CDR3和VL-CDR1中。

[0180] 使用生物素化的人 $\alpha 4\beta 7$ 胞外域蛋白进行两轮无倾向性抗 $\alpha 4\beta 7$ 克隆选择。对来自每个文库的菌落进行测序,并除去在任何CDR中具有额外倾向性的那些菌落。与亲本Ab-h1.9相比,通过FACS从每个文库筛选与酵母上的表面 $\alpha 4\beta 7$ 抗原结合的克隆。

[0181] 表21示出了被鉴定为与亲本类似结合的倾向性工程化的克隆(图5)。将这些倾向性工程化克隆及其可变区转变为IgG形式。

表 21
从 Ab-H1.9 的倾向性工程化所选定的克隆的序列

抗体	重链			
	CDR1	CDR2	CDR3	VH
Ab-H1.9 (亲本)	GFNIKNTYMH SEQ ID NO:32	RIDPANGHTEYAPKFQG SEQ ID NO:33	VDS SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:30
Ab-h1.9a	GFNIKNTYMH SEQ ID NO:42	RIDPANKHTEYAPKFLG SEQ ID NO:43	VAS SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:40
Ab-h1.9b	GFNIKNTYMH SEQ ID NO:52	RIDPARGHTEYAPKFSG SEQ ID NO:53	VDQ SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:50
Ab-h1.9c	GFNIKNTYMH SEQ ID NO:62	RIDPARGHTEYAPKFEFEG SEQ ID NO:63	VAS SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:60
Ab-h1.9d	GFNIKNTYMH SEQ ID NO:72	RIDPAKGHTEYAPKFLG SEQ ID NO:73	VDV SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:70
Ab-h1.9e	GFNIKNTYMH SEQ ID NO:82	RIDPAGGHTEYAPKFIFG SEQ ID NO:83	VAS SEQ ID NO:84	SEQ ID NO:80
	轻链			
	CDR1	CDR2	CDR3	VL
Ab-H1.9 (亲本)	HASQGISDNIG SEQ ID NO:35	HGTNLED SEQ ID NO:36	VQYAQFPWT SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:31
Ab-h1.9a	HASQEISDNIG SEQ ID NO:45	HGTNLED SEQ ID NO:46	VQYAQFPWT SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:41
Ab-h1.9b	HASQDISDNIG SEQ ID NO:55	HGTNLED SEQ ID NO:56	VQYAQFPWT SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:51
Ab-h1.9c	HASQDISDNIG SEQ ID NO:65	HGTNLED SEQ ID NO:66	VQYAQFPWT SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:61
Ab-h1.9d	HASQDISDNIG SEQ ID NO:75	HGTNLED SEQ ID NO:76	VQYAQFPWT SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:71
Ab-h1.9e	HASQEISDNIG SEQ ID NO:85	HGTNLED SEQ ID NO:86	VQYAQFPWT SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:81

[0183] 通过FACS测试倾向性工程化的mAb Ab-h1.9a至Ab-h1.9e与表达 $\alpha 4\beta 7$ 的HuT78细胞的结合。这些抗体保留了结合活性,EC50值为253pM至702pM。考虑到大部分VH-CDR3(例如, CDR中氨基酸残基的三分之一)在倾向性工程化的mAb中发生突变,这种 $\alpha 4\beta 7$ 结合的保留是令人惊讶的。Ab-h1.9d显示出最强的结合亲和力(253pM)并表现出良好的药物样特性。

[0184] 还测试了呈IgG1 Fc LALA形式的抗体Ab-h1.9(a)-(e)的蛋白质产生特性,并且Ab-h1.9d表现出优异的特性。

[0185] 7.1.6. 抗体

[0186] 表22示出了示例性的Ab-h1.9d衍生的IgG1抗体转化。Ab-h1.9d-HuIgG1是人IgG1/ κ 型抗体,其具有以典型的人重链恒定区为特征的SEQ ID NO:90的HC以及以典型的人 κ 轻链恒定区为特征的SEQ ID NO:100的LC。Ab-h1.9d-HuIgG1也可以具有SEQ ID NO:91的C-末端赖氨酸截短的HC。Ab-h1.9d-WT是IgG1/ κ 型抗体,其具有以变体CH3取代D356E和L358M为特征的SEQ ID NO:92的HC以及SEQ ID NO:100的LC。Ab-h1.9d-WT也可以具有SEQ ID NO:93的C-末端赖氨酸截短的HC。Ab-h1.9d-LALA是IgG1/ κ 型抗体,其具有以变体CH2取代L234A和L235A以及变体CH3取代D356E和L358M为特征的SEQ ID NO:94的HC,以及SEQ ID NO:100的LC。Ab-h1.9d-LALA也可以具有SEQ ID NO:95的C-末端赖氨酸截短的HC。Ab-h1.9d-QL是IgG1/ κ 型抗体,其具有以变体CH2取代T250Q以及变体CH3取代D356E、L358M和M428L为特征的SEQ ID NO:96的HC,以及SEQ ID NO:100的LC。Ab-h1.9d-QL也可以具有SEQ ID NO:97的

C-末端赖氨酸截短的HC。Ab-h1.9d-LALA/QL是IgG1/κ型抗体,其具有以变体CH2取代T250Q以及变体CH3取代L234A、L235A、D356E、L358M和M428L为特征的SEQ ID NO:98的HC,以及SEQ ID NO:100的LC。Ab-h1.9d-LALA/QL也可以具有SEQ ID NO:99的C-末端赖氨酸截短的HC。

[0187]

表 22 示例性的所选定的抗体			
抗体	特征	HC	LC (κ)
Ab-h1.9d-hIgG1	IgG1/k	90 或 91	100
Ab-h1.9d-WT	具有 D356E 和 L358M 的 IgG1/k	92 或 93	100
Ab-h1.9d-LALA	具有 L234A、L235A、D356E 和 L358M 的 IgG1/k	94 或 95	100
Ab-h1.9d-QL	具有 T250Q、D356E、L358M 和 M428L 的 IgG1/k	96 或 97	100
Ab-h1.9d-LALA/QL	具有 L234A、L235A、T250Q、D356E、L358M 和 M428L、M428L 的 IgG1/k	98 或 99	100
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKNTYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTEY APKFLGRVTITADESTNTAYMELSSLRSED TAVYYCYVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:90)			

[0188]

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKNTYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTEY
APKFLGRVTITADESTNTAYMELSSLRSEDYAVYYCYVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:91)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKNTYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTEY
APKFLGRVTITADESTNTAYMELSSLRSEDYAVYYCYVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:92)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKNTYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTEY
APKFLGRVTITADESTNTAYMELSSLRSEDYAVYYCYVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:93)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKNTYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTEY
APKFLGRVTITADESTNTAYMELSSLRSEDYAVYYCYVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:94)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKNTYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTEY
APKFLGRVTITADESTNTAYMELSSLRSEDYAVYYCYVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:95)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKNTYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTEY
APKFLGRVTITADESTNTAYMELSSLRSEDYAVYYCYVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQ
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:96)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKNTYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTEY

[0189]

```

APKFLGRVTITADESTNTAYMELSSLRSED TAVYYCYVVDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQ
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:97)
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKNTYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTEY
APKFLGRVTITADESTNTAYMELSSLRSED TAVYYCYVVDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQ
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:98)
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKNTYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTEY
APKFLGRVTITADESTNTAYMELSSLRSED TAVYYCYVVDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQ
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:99)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITICHASQDISDNIGWLQQKPGKSFKLLIYHG TNLEDGVPSRFS
GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:100)

```

[0190] 产生之后, Ab-h1.9d-WT显示抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的优异特性,表现出高特异性(与 $\alpha E\beta 7$ 低结合)和期望的PK/PD(低ADA滴度和高血浆暴露)。

[0191] 7.2.实例2: $\alpha 4\beta 7$ 在来自健康供体或HIV+个体的CD4+和CD8+T细胞亚群上的表达

[0192] 7.2.1.材料和方法

[0193] 在急性HIV感染期间,表达 $\alpha 4\beta 7$ 的CD4+T细胞优先被感染并因此被耗竭(Sivro等人,《科学转化医学期刊(sci transl med)》2018)。为了研究在接受cART的HIV+个体中外周表达 $\alpha 4\beta 7$ 的细胞是否随时间恢复,将来自10名健康(HIV-)供体和45名接受cART的HIV+个体的PBMC的CD4+和CD8+T细胞亚群上 $\alpha 4\beta 7$ 的百分比和表达水平(年龄:26至66岁,中位数42岁;HIV感染持续时间:1至36年,中位数12年),使用针对CD3、CD4、CD8、CD28、CD45RO、CCR7和 $\alpha 4\beta 7$ 的抗体混合物,通过流式细胞术分析进行了比较。分析了CD4+和CD8+T细胞群中 $\alpha 4\beta 7$ 的百分比(%)和表达水平(MESF)。CD4+和CD8+T细胞亚群定义为:CD28+CD45RO-初始细胞,CD28-CD45RO-终末效应细胞,CD28-CD45RO+效应记忆细胞,CD28+CD45RO+CCR7+中央记忆细胞以及CD28+CD45RO+CCR7-瞬时记忆细胞。

[0194] 7.2.2.结果

[0195] 对于接受cART的HIV-和HIV+个体,与记忆性T细胞亚群相比,初始CD4+或CD8+T细胞表达 $\alpha 4\beta 7$ 的细胞百分比更高,而中央记忆、瞬时记忆和效应记忆细胞的 $\alpha 4\beta 7$ 表达水平(通过MESF测量)高于初始细胞(图6A至图6F)。外周CD4+和CD8+T细胞两者在HIV-和HIV+个体中表达相似水平的 $\alpha 4\beta 7$ (MESF测量)。此分析表明接受cART的HIV+个体中外周CD4+或CD8+T细胞上的 $\alpha 4\beta 7$ 表达虽然高度可变,但与未感染的个体没有差异。这些结果证明HIV+个体的外周CD4+T细胞中的 $\alpha 4\beta 7$ 表达可以支持 $\alpha 4\beta 7$ 掺入到萌发的HIV病毒粒子中。

[0196] 7.3.实例3:用Ab-h1.9d-WT捕获HIV病毒粒子

[0197] 7.3.1.材料和方法

[0198] 为了证实 $\alpha 4\beta 7$ 存在于HIV病毒粒子的包膜中,以及为了测试Ab-h1.9d-WT是否可以与掺入到HIV病毒粒子包膜中的 $\alpha 4\beta 7$ 结合形成免疫复合物,首先根据公开的方法(Guzzo等人,《科学免疫学》2017)使用实验室生长的HIV-1毒株或来自病毒血症HIV+个体的样品在病毒粒子捕获试验(珠形式)中对Ab-h1.9d-WT进行测试。针对实验室生长的HIV-1毒株,在存在视黄酸(RA)的情况下,在活化的原代人PBMC[例如,经OKT3抗体或植物血凝素(PHA)活化]中产生代表不同组、遗传亚型和共受体用途(表23)的一组六种毒株(BCF06、CMU08、NL4-3、RU507、YBF30和IIIB),以诱导细胞中 $\alpha 4\beta 7$ 的表达。用适当的抗体装备蛋白G偶联的免疫磁性珠(Dynabeads,赛默飞世尔公司(Thermo Fisher)),然后与每种HIV毒株的病毒储液(约2ng的p24 gag/反应)一起孵育。孵育后,洗涤装备过的珠以除去未结合的病毒颗粒,随后用Triton X-100处理以裂解捕获的病毒粒子用于p24 gag定量。对于HIV患者的样品,通过COBAS Taqman 2.0版试验来确定样品的病毒滴度(拷贝/mL)。将装备有10 μ g适当抗体的蛋白G偶联的免疫磁性珠与400 μ L患者血清一起孵育2小时。然后洗涤珠以除去未结合的病毒颗粒,随后使用凯杰公司(Qiagen)的病毒RNA提取试剂盒按照制造商的说明书提取结合的病毒粒子的RNA。随后使用靶向HIV亚型B的LTR-gag中的保守区的引物和探针,通过数字液滴PCR对从患者样品捕获的病毒粒子的拷贝数进行定量。

[0199] 为了确定用于捕获HIV病毒粒子的抗体的 EC_{50} 值,在改为96孔板形式的病毒粒子捕获试验中对Ab-h1.9d-WT进行测试。将系列稀释的抗体加入到预洗的PierceTM蛋白G包被板(赛默飞世尔公司)中。孵育后,将板洗涤以除去未结合的抗体。将各HIV毒株的病毒储液(约2ng的p24 gag)加入各孔中并孵育。将板洗涤以除去未结合的病毒颗粒,然后用Triton X-100处理以裂解捕获的病毒粒子用于p24 gag定量。HIV p24 gag通过高灵敏度AlphaLISA p24 gag检测试剂盒(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))进行检测。

[0200] 7.3.2.结果

[0201] Ab-h1.9d-WT能够从所测试的所有六种实验室生长的HIV毒株中捕获病毒粒子,无论它们是临床或实验室适应的毒株,如捕获的病毒粒子中的病毒p24 gag蛋白所示(图7A至图7F)。来自所捕获的病毒粒子的p24 gag蛋白的量表明了对试验中使用的抗体浓度(5和15nM)的剂量应答。Ab-h1.9d-WT还能够捕获来自HIV-1患者样品的病毒粒子(病毒输入示于图7G-1中),如与阴性对照抗体相比,与Ab-h1.9d-WT反应的样品中更高数目的HIV RNA拷贝数所指示(图7G-2)。

[0202] 接下来在改为96孔板形式的病毒粒子捕获试验中对Ab-h1.9d-WT进行测试,以确定其用于捕获HIV病毒粒子的 EC_{50} 值。所有被测试病毒的 EC_{50} 值相似,范围为0.12nM(0.019 μ g/mL)至0.25nM(0.038 μ g/mL)(表23)。当针对相同组的病毒进行测试时,Ab-Vedo在捕获HIV病毒粒子方面不如Ab-h1.9d-WT有效,对于每种单独的病毒,其 EC_{50} 值比Ab-h1.9d-WT的 EC_{50} 值高约2至3倍(表23)。HIV IIIB毒株可以通过Ab-h1.9d-WT(图7F)和Ab-Vedo(数据未示出)使用珠形式的试验来捕获,但其 EC_{50} 值不能通过板形式的试验来确定,因为病毒储液的滴度低。

表 23
用 Ab-h1.9d-WT 体外捕获和中和 HIV 病毒粒子

HIV 毒株	组	亚型	共受体	病毒粒子捕获, EC ₅₀				病毒中和, IC ₅₀
				Ab-h1.9d-WT		Ab-Vedo		Ab-h1.9d-WT
				nM	μg/mL	nM	μg/mL	μg/mL
BCF06	o	-	X4/R5	0.18 ± 0.03	0.027 ± 0.005	0.37 ± 0.07	0.056 ± 0.010	> 50
CMU08	M	AE	X4	0.25 ± 0.02	0.038 ± 0.003	0.50 ± 0.08	0.075 ± 0.012	> 50
NL4-3	M	B	X4	0.16 ± 0.03	0.024 ± 0.005	0.34 ± 0.02	0.050 ± 0.002	> 50
RU570	M	G	R5	0.12 ± 0.06	0.019 ± 0.010	0.32 ± 0.03	0.048 ± 0.005	> 50
YBF30	N	-	R5	0.14 ± 0.06	0.021 ± 0.009	0.48 ± 0.15	0.072 ± 0.022	> 50
IIIB	M	B	X4	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND

[0204] EC₅₀ = 半数最大有效浓度; IC₅₀ = 半数最大抑制浓度; ND = 未确定

[0205] a. IIIB毒株在珠试验形式中可由Ab-h1.9d-WT和Ab-Vedo捕获,但其EC₅₀值不能以板试验形式来确定,因为病毒储液的滴度低。

[0206] 总之,这些数据证实了α4β7存在于所测试的所有实验室生长的HIV毒株和HIV-1患者样品的病毒粒子中,并且证明了Ab-h1.9d-WT在与HIV病毒粒子上的α4β7结合形成免疫复合物方面比Ab-Vedo更有效,这是诱导针对持久HIV病毒控制的所提出的“疫苗接种作用”所需的一系列步骤中的第一个。

[0207] Ab-h1.9d-WT是能与所测试的所有HIV毒株和HIV-1患者样品的病毒粒子包膜上的α4β7结合的有效的抗α4β7抗体。

[0208] 7.4.实例4:Ab-h1.9d-WT和HIV病毒粒子的免疫复合物与Fc γ R的结合

[0209] 7.4.1.材料和方法

[0210] 为了测试由Ab-h1.9d-WT和HIV病毒粒子形成的免疫复合物是否能够在体外与Fc γ R结合,首先将适当的抗体与HIVNL4-3病毒(在RA存在的情况下在活化的人PBMC中制备以诱导α4β7的表达)混合形成免疫复合物,随后将其与固定在镍包被的板上的His标签化Fc γ R[对于Fc γ RI和Fc γ RIIIa (V158),其对Ab-h1.9d-WT具有相对更高的亲和力,如表32中所示]或者固定在中性抗生物素蛋白包被的板上的生物素化Fc γ R[对于Fc γ RIIa (H131或R131)和Fc γ RIIIa (F158),其对Ab-h1.9d-WT具有相对更低的亲和力,如表32中所示]一起孵育以增加检测的灵敏度。孵育之后,将板洗涤以除去未结合Fc γ R的免疫复合物,然后用裂解缓冲液处理以裂解捕获的免疫复合物来释放病毒蛋白用于p24 gag定量。

[0211] 7.4.2.结果

[0212] 由HIV病毒粒子和具有WT Fc结构域的Ab-h1.9d-WT形成的免疫复合物能够结合不同的Fc γ R,如结合了Fc γ R的蛋白质复合物中HIVp24衣壳蛋白的存在所示(图8A至图8E)。HIV病毒粒子本身不结合Fc γ R(数据未示出),也不结合由HIV病毒粒子和Ab-h1.9d-LALA形成的免疫复合物,Ab-h1.9d-LALA是除了在其Fc结构域中具有工程化LALA突变以显著降低其与Fc γ R的结合之外其他方面与Ab-h1.9d-WT相同的抗体(图8A至图8E)。此外,由HIV病毒粒子和Ab-Vedo形成的免疫复合物表现出与Fc γ R的最低限度的结合(图8A至图8E)。这与

Ab-Vedo对不同Fc γ R的结合亲和力显著低于Ab-h1.9d-WT的结合亲和力一致,这是由于Ab-Vedo的Fc结构域中的工程化突变。由于Ab-h1.9d-WT对人Fc γ RIIa (H131或R131) 和Fc γ RIIIa (F158,也称为F176) 的结合亲和力低于Fc γ RI和Fc γ RIIIa (V158,也称为V176) (图19A),将生物素化的Fc γ RIIa (H131或R131) 和Fc γ RIIIa (F158) 固定在中性抗生物素蛋白包被的板上以增强这些Fc γ R对Ab-h1.9d-WT的免疫复合物的捕获,而不是使用固定在镍板上的相应的His标签化Fc γ R。

[0213] 由Ab-h1.9d-WT和HIV病毒粒子形成的免疫复合物可以结合不同的Fc γ R,包括Fc γ RIIa (负责ADCP),该步骤可以使得复合物能够被APC摄取以诱导所提出的用于HIV控制的“疫苗接种作用”。

[0214] 7.5.实例5:Ab-h1.9d-WT介导THP-1细胞中 α 4 β 7包被的珠的摄取的Fc依赖性

[0215] 7.5.1.材料和方法

[0216] 细胞培养

[0217] 在37℃、5%CO₂下在补充有10%FBS(西格玛公司(Sigma))的RPMI培养基(Gibco)中培养THP-1细胞。每2至3天将细胞传代一次,密度维持在500,000至1,000,000个细胞/ml。

[0218] 珠制备

[0219] 将重组人 α 4 β 7蛋白(R&D systems)在4℃下在1倍PBS中使用3.5kDa MWC0透析装置(赛默飞世尔科技公司)透析过夜。然后将所得的 α 4 β 7在4℃下以100倍摩尔过量的NHS-生物素(赛默飞世尔科技公司)生物素化2小时。通过在4℃过夜透析除去过量的生物素。针对 α 4 β 7包被的珠,将中性抗生物素蛋白标记的荧光珠(赛默飞世尔科技公司)与生物素化的 α 4 β 7在4℃下孵育1至24小时。除非另有说明,珠-蛋白质偶联反应以每1ml原料珠2mg α 4 β 7蛋白的比率发生。用含有1%BSA(西格玛公司)的1倍PBS洗涤蛋白偶联珠两次,然后在使用前进行100倍稀释。在比较抗 α 4 β 7与同种型对照条件的吞噬作用试验中,证实了蛋白质与珠的成功结合。

[0220] 吞噬作用试验

[0221] 使用蛋白包被的珠和THP-1细胞进行的吞噬作用试验改自先前描述的研究(Ackerman等人2011)。在96孔板中进行试验。通过将10ul所制备的 α 4 β 7包被的珠与10ul所指的抗体(10 μ g/ml)组合形成免疫复合物。将这些在37℃、5%CO₂下孵育1至2小时。然后将THP-1细胞(100,000/孔)与免疫复合物在200ul的最终体积中孵育指定量的时间。孵育后,将细胞用可固定的活/死染色剂(赛默飞世尔公司)染色,随后用FACS缓冲液洗涤并固定。使用BD公司的LSR Fortessa X20收集关于所得细胞的数据。分别用PE-CF594和BV510设置检测荧光珠和活/死染色荧光情况。然后使用FlowJo软件对数据进行分析。按以下计算吞噬作用评分:吞噬作用评分=(MFI $\times$ 珠阳性细胞百分比)/1000。归一化:将来自3次独立实验的数据归一化并在一个图表上进行绘图。为了归一化,通过将该值除以相同值(针对每次实验进行),将“仅珠”条件下的一个重复设置为1。将所有其它值除以该归一化值以展示归一化的吞噬作用评分,其代表“仅珠”条件的倍数变化。

[0222] 成像流式细胞术

[0223] 使用成像流式细胞术证实珠的内化。在ImagestreamX Mark II成像流式细胞仪(路明克斯公司(LuminexCorp.))上以40倍放大倍数、中等灵敏度和中等速度设置分析固定的细胞。使用488nm(5mW)/560-595nm(激发/发射)对荧光珠进行成像。使用405nm(5mW)/

430-480nm(激发/发射)对活/死细胞染色情况进行成像。在通道2(照相机1)中收集明场图像。使用IDEAS分析软件v6.1(路明克斯公司)来分析数据。使用常规的门控策略来寻找合适的细胞群。简言之,针对明场图像清晰度使用高(>40)梯度RMS(均方根)来识别聚焦细胞。通过明场图像的高纵横比和低目标面积来识别单个细胞。在明场图像中识别细胞目标区域,并从细胞边界侵蚀4个像素来定义“细胞内掩模”。将细胞内掩模中具有阳性荧光信号的细胞识别为真正的内化事件。使用斑点计数特征来计数具有真实内化事件的细胞中内化珠的数目。每个样品分析至少2000个具有真实内化事件的细胞。

[0224] 统计分析

[0225] 使用GraphPad Prism对数据进行绘图。使用与图基多重比较检验相结合的单因ANOVA确定显著性。**** $p < 0.0001$, *** $p = 0.0001-0.001$, ** $p = 0.001-0.01$, * $p = 0.01-0.05$ 。

[0226] 7.5.2. 结果

[0227] 抗原呈递细胞对免疫复合物的摄取对于引发下游的细胞免疫和体液免疫至关重要。据报道,THP-1细胞以Fc/Fc γ R依赖性方式吞噬抗体-荧光珠免疫复合物(Ackerman等人,2011)因此,使用THP-1细胞来研究Ab-h1.9d-WT是否介导 $\alpha 4\beta 7$ -包被的荧光珠的吞噬作用。用 $\alpha 4\beta 7$ -珠/Ab-h1.9d-WT抗体免疫复合物处理3小时的细胞通过流式细胞术展示出与Ab-h1.9d-LALA和Ab-Vedo(以LALA为特征)相关的荧光珠的显著摄取(图9A至图9B)。已知LALA突变显著降低IgG Fc与Fc γ R的结合。这些数据表明Ab-h1.9d-WT介导含有 $\alpha 4\beta 7$ 包被的荧光珠的免疫复合物的强大的Fc/Fc γ R依赖性吞噬作用。

[0228] 使用Amnis Imagestream进行成像流式细胞术来证实Ab-h1.9d-WT/ $\alpha 4\beta 7$ -珠免疫复合物在THP-1细胞中内化。如所预期的,Ab-h1.9d-WT免疫复合物处理之后,荧光珠定位在THP-1细胞内(图9C)。

[0229] 7.6. 实例6: Ab-h1.9d-WT-诱导的THP-1细胞中 $\alpha 4\beta 7$ +GFP+VLP/Ab免疫复合物的摄取是 $\alpha 4\beta 7$ 和Fc依赖性的7.6.1. 材料和方法

[0230] 通过ELISA进行抗体与表达 $\alpha 4\beta 7$ 的GFP+病毒样颗粒(VLP)结合

[0231] 从依次用 $\alpha 4\beta 7$ cDNA构建体和HIV gag-GFP DNA构建体转染的HEK293细胞产生 $\alpha 4\beta 7$ +GFP+VLP,随后从细胞培养物上清液中纯化VLP。进行ELISA以确认GFP+VLP表面上 $\alpha 4\beta 7$ 的表达和各种测试Ab的结合特异性。简言之,用50 μ L在PBS中浓度为 7.5×10^7 个颗粒/mL的 $\alpha 4\beta 7$ +GFP+VLP包被高结合平底96孔板的各孔,并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。用PBS+1%FBS洗涤孔,并用100 μ L超级封闭溶液在室温(RT)封闭30分钟。洗涤三次后,将各孔与50 μ L在PBS+1%FBS中4倍连续稀释的第一抗体在室温下孵育1小时,然后洗涤并与50 μ L在PBS+1%FBS中的HRP偶联的驴抗人IgG-Fc γ 特异性第二抗体在室温下孵育1小时。最后一次洗涤后,将TMB底物加入到各孔中进行显色,并通过加入2N H₂SO₄终止反应。通过板读取器在450nm下测量各孔的光密度(OD)。

[0232] $\alpha 4\beta 7$ +GFP+VLP/抗- $\alpha 4\beta 7$ 免疫复合物在THP-1细胞中的内化

[0233] 针对 $\alpha 4\beta 7$ +GFP+VLP摄取实验,在有或没有最终浓度为1 μ g/mL的抗体的情况下将 5×10^4 个THP-1细胞与 $\alpha 4\beta 7$ +GFP+VLP在平底96孔板于100 μ L体积的RPMI(含10%FBS)中混合,细胞与颗粒的比例为1:100。将板在37 $^{\circ}$ C下在CO₂培养箱中孵育16小时。然后将细胞重悬并转移到V形底96孔板中,通过离心用200 μ L的PBS(含2%FBS)洗涤一次。将细胞沉淀重悬于

200 μ L的PBS (含0.5%多聚甲醛) 中, 并通过流式细胞术确定GFP+细胞的百分比。

[0234] 为了抑制VLP摄取, 将THP-1细胞 (0.5 $\times$ 10⁶/mL) 在有或没有最终浓度为240nM的红海海绵素A (LatA) 或者有0.1%DMSO (对照) 的情况下在37 $^{\circ}$ C、CO₂培养箱中预处理2小时, 然后如上所述, 在有或没有抗体的情况与 α 4 β 7+GFP+VLP孵育。

[0235] 7.6.2. 结果

[0236] Ab-h1.9d-WT诱导的THP-1细胞中 α 4 β 7+GFP+VLP/Ab免疫复合物的摄取是 α 4 β 7和Fc依赖性的

[0237] 从哺乳动物细胞产生的重组病毒样颗粒 (VLP) 具有0.1至0.2微米的动态尺寸。因此, 与先前实验中使用的荧光标记的珠相比, 它们在尺寸上更类似于病毒粒子, 并且用作模拟THP-1细胞对 α 4 β 7+病毒粒子/抗体免疫复合物的内化/摄取的工具。通过ELISA评价纯化的表达 α 4 β 7的GFP+VLP与抗 α 4 β 7 Ab结合的能力。如图10所示, Ab-h1.9d-WT、Ab-h1.9d-LALA和Ab-Vedo以相似的结合EC₅₀值 (分别为0.050nM、0.048nM和0.058nM) 同等地与 α 4 β 7+GFP+VLP结合, 而同种型对照Ab (抗CMV IgG) 根本不与 α 4 β 7+GFP+VLP结合。该数据表明各种抗 α 4 β 7 Ab可以以良好的结合亲和力和特异性结合 α 4 β 7+GFP+VLP。

[0238] 接下来, 在有或没有功能性Fc的各种抗 α 4 β 7 Ab的存在下评价THP-1细胞对 α 4 β 7+GFP+VLP的摄取。如图11A所示, 与同种型Ab对照处理的1.2%GFP+细胞相比, Ab-h1.9d-WT处理诱导了超过60%GFP+THP-1细胞的检测, 这代表了50倍的GFP+细胞诱导。这表明THP-1细胞对 α 4 β 7+GFP+VLP的摄取是Ab-h1.9d-WT特异性的并且取决于 α 4 β 7表达。然而, Ab-h1.9d-LALA或Ab-Vedo (LALA) 在THP-1细胞中仅显示出最低限度的VLP摄取, 表明这些细胞的抗 α 4 β 7 Ab诱导的 α 4 β 7+GFP+VLP摄取除了其 α 4 β 7结合Fab结构域之外, 还需要抗体的功能性Fc结构域以使得能够进行Fc/Fc γ R介导的免疫复合物内化。

[0239] 为了证实Ab-h1.9d-WT介导的 α 4 β 7+GFP+VLP摄取确实是由于内化, 而不仅仅是与细胞表面Fc γ R结合, 将已知的内化抑制剂红海海绵素A (Lat-A) 用于在THP-1细胞与Ab/VLP免疫复合物孵育之前预处理THP-1细胞。如图11B所示, 与未处理的细胞相比, Lat A处理的细胞中GFP+细胞减少40%。这表明在未处理 (模拟) 或DMSO处理的对照中观察到的总GFP信号的至少40%是由THP-1细胞中Ab-h1.9d-WT依赖性VLP内化产生的。

[0240] 7.7. 实例7: Ab-h1.9d-WT表现出对HIV无中和和活性

[0241] 7.7.1. 材料和方法

[0242] 一些能够与HIV病毒粒子结合的Ab, 例如HIV广谱中和抗体, 能够阻断病毒感染。为了测试Ab-h1.9d-WT与HIV病毒粒子上的 α 4 β 7的结合是否能够阻断宿主细胞的HIV感染, 用TZM-b1指示细胞系在病毒中和试验中对其进行评价 (Arrildt等人, 《病毒学杂志》2015)。

[0243] HIV中和试验

[0244] 将相当于约150,000RLU (先前通过TZM-b1细胞上的病毒滴定而确定的) 的HIV病毒 (在有PHA和RA的情况下制备的) 与系列稀释的抗体预孵育。将含有DEAE-葡聚糖的TZM-b1细胞加入到含有预孵育的HIV和抗体的混合物中, 然后在37 $^{\circ}$ C孵育48小时。用Bright-Glo (普洛麦格公司 (Promega)) 处理细胞, 并测量荧光素酶信号。

[0245] 7.7.2. 结果

[0246] 当针对表23中所示的一组HIV毒株进行测试时, Ab-h1.9d-WT在高达50 μ g/mL的浓度下未显示任何中和活性, 而靶向CD4+结合位点的HIV广谱中和抗体针对所有测试的M组

HIV毒株(即,CMU08、NL4-3和RU570)具有约0.1 μ g/mL的中和IC₅₀值(数据未示出)。

[0247] 尽管Ab-h1.9d-WT结合HIV病毒粒子,但它不中和HIV感染,这与 α 4 β 7不是宿主细胞上的病毒受体的观点一致。该观察结果支持了靶向 α 4 β 7而非病毒编码的糖蛋白可避免病毒耐药机制的假设。

[0248] 7.8.实例8:不同抗体对 α 4 β 7与HIV gp120相互作用的抑制

[0249] 7.8.1.材料和方法

[0250] 据报道, α 4 β 7与HIV gp120之间的相互作用激活LFA-1,潜在地促进HIV的细胞间传播(Arthos等人《自然免疫学》2008)。为了测试Ab-h1.9d-WT是否能够破坏这种相互作用,根据公开的方法(Peachman等人,《公共科学图书馆·综合》),使用与固定在板上的HIV gp120-V2肽结合的表达 α 4 β 7的RPMI 8866细胞建立 α 4 β 7/gp120结合试验。用生物素化的HIV gp120-V2 WT或gp120-V2对照肽(表24)包被中性抗生物素蛋白包被的高容量96孔板(赛默飞世尔)。两种生物素化肽的序列除了在对对照肽中被报道介导 α 4 β 7与gp120之间结合的四个氨基酸被突变,其他都是相同的。

表 24 生物素化的 HIV gp120-V2 多肽	
多肽	氨基酸序列*
[0251] gp120-V2 WT	生物素 -Ttds-CSFNMTTEL RDKKQKVHALFYK L DIPIEDNTSSSEYRLINC-NH2 (SEQ ID NO:7)
gp120-V2 对照	生物素 -Ttds-CSFNMTTEL RDKKQKVHALFYK AAA PIEDNTSSSEYRLINC-NH2 (SEQ ID NO:8)

[0252] *两个多肽之间不同的氨基酸以粗体显示。

[0253] 在添加抗体-细胞混合物之前,将肽包被的板进行洗涤以除去未结合的肽。为了生成抗体-细胞混合物储液,将RPMI 8866细胞(8×10^6 个细胞/mL)重悬于补充有终浓度为2mM的MnCl₂的冷封闭缓冲液中,以激活 α 4 β 7的构象。将连续稀释的Ab-h1.9d-WT、Ab-Vedo或同种型阴性对照抗体与经MnCl₂处理的细胞混合,并将混合物孵育。将抗体-细胞混合物(2×10^5 个细胞,每孔50 μ L)加入到包被有gp120肽的板的各孔中并孵育。将板洗涤,用CellTiter-Glo2.0试剂(普洛麦格公司)确定附着在肽包被板上的活细胞。

[0254] 7.8.2.结果

[0255] 本试验的特异性通过表达 α 4 β 7的RPMI 8866细胞与固定在板上的HIV gp120-V2 WT肽的结合而不是与固定的gp120-V2对照肽的结合而证明(图12A),该固定的gp120-V2对照肽在据报道为介导gp120与 α 4 β 7的结合的4个氨基酸处具有突变(表24)。当以本试验形式进行测试时,Ab-h1.9d-WT阻断了RPMI 8866细胞与HIV gp120-V2 WT肽的结合,IC₅₀值为 $0.022 \pm 0.016 \mu$ g/mL(图12B)。当在相同试验中测试时,Ab-Vedo具有高于Ab-h1.9d-WT的IC₅₀值($0.042 \pm 0.023 \mu$ g/mL),表明其在阻断该相互作用方面不如Ab-h1.9d-WT有效(图12B)。总之,这些结果表明Ab-h1.9d-WT可以有效地破坏 α 4 β 7与gp120的相互作用,潜在地抑制细胞间的病毒扩散。

[0256] 当以本试验形式进行测试时,Ab-h1.9d-WT阻断了RPMI 8866细胞与HIV gp120-V2 WT肽的结合,IC₅₀值为 $0.022 \pm 0.016 \mu$ g/mL(图12B)。这些结果表明Ab-h1.9d-WT可以有效地破坏 α 4 β 7与gp120的相互作用,潜在地抑制细胞间的病毒扩散。

[0257] 7.9.实例9:Ab-h1.9d-WT对表达 $\alpha 4\beta 7$ 整合素的人和食蟹猴细胞的结合

[0258] 7.9.1.材料和方法

[0259] 使用ECL结合试验在HuT78细胞(表达内源性 $\alpha 4\beta 7$ 的人T淋巴瘤细胞)上和使用流式细胞术在人和食蟹猴外周淋巴细胞上评价Ab-h1.9d-WT的结合。

[0260] 另外,确定了Ab-h1.9d-WT的结合 EC_{50} 值,并针对人和食蟹猴血液来源的总的、初始和记忆CD4⁺和CD8⁺T细胞进行了比较。

[0261] ECL细胞结合试验

[0262] 在含有20%FBS、青霉素(50单位/mL)/链霉素(50 μ g/mL)的IMDM培养基中培养表达内源性 $\alpha 4\beta 7$ 的HuT78细胞。收集HuT78细胞,洗涤1次并以 1.5×10^6 个细胞/mL重悬于DPBS中。将细胞(50 μ L中含有 7.5×10^4 个)加入MSD高结合板的各孔中。加入6.7%胎牛血清(在DPBS中稀释)并将板在37℃下孵育1小时。去除上清液,每孔中加入25 μ L经1:4倍8点稀释而制备的在1.5 μ g/mL至0.000091 μ g/mL(在含有5%FBS和1mM $MnCl_2$ 的DPBS缓冲液中)范围内的Ab-h1.9d-WT抗体或同种型对照,然后在37℃下孵育1小时。将板用DPBS洗涤2次,并向各孔中加入25 μ L在5%FBS/DPBS/1mM $MnCl_2$ 中以1:500稀释的山羊抗人Ab sulfo tag,随后在37℃下孵育30分钟。将细胞用DPBS洗涤两次,然后向各孔中加入150 μ L的2倍MSD读取缓冲液T。在Sector Imager 6000读取器上对板进行读取,使用GraphPad Prism 7.0软件生成结合曲线和结合 EC_{50} 值。

[0263] 人和食蟹猴外周T细胞结合试验

[0264] 在RPMI1640/10%FBS培养基中解冻冻存的人或食蟹猴PBMC(使用常规聚蔗糖板分离方法从献血者分离),用FACS缓冲液(DPBS,w/o Ca^{+2}/Mg^{+2} ,1%BSA)洗涤1次,并重悬于含有5%山羊血清的FACS缓冲液中。将约 $1-2 \times 10^5$ 的细胞(在100 μ L中)加入96孔U形底板中并在冰上孵育30分钟。将板离心并除去上清液。将在含有5%山羊血清的FACS缓冲液中通过1:5倍稀释而制备的终浓度范围为5至0.000016g/mL的滴定Ab-h1.9d-WT或同种型对照(25 μ L)和荧光染料标记的抗体混合物(25 μ L)加入各孔,然后将板在冰上孵育1小时。同时,还准备了补偿和FMO对照。孵育后,将细胞离心并用FACS缓冲液洗涤2次。将第二抗体(PE偶联的)在含有5%山羊血清的FACS缓冲液中以1:2,000稀释,并将50 μ L加入到各孔中。将板在冰上孵育1小时。孵育后,用FACS缓冲液洗涤细胞2次,重悬于200 μ L含0.5%PFA的PBS中。在FACS(Canto II,BD)上对板进行读取,并基于前向和侧向散射对活细胞进行门控。使用FlowJo第10版软件分析流式数据(FCS 3.0文件),使用GraphPad Prism 7.0软件生成结合曲线和结合 EC_{50} 值。

[0265] 7.9.2.结果

[0266] ECL细胞结合

[0267] 如表25中所汇总的,Ab-h1.9d-WT对HuT78细胞、人和食蟹猴血液来源的淋巴细胞分别显示出26pM、130pM、62pM的结合 EC_{50} 值。

[0268]

表 25		
Ab-h1.9d-WT 对 HuT78 细胞和淋巴细胞的结合		
* EC_{50} (pM) (平均值 $\pm$ 标准差)		
ECL	FACS	
HuT78	人淋巴细胞	食蟹猴淋巴细胞
26 $\pm$ 2	130 $\pm$ 85	62 $\pm$ 46

[0269] *平均±标准差;N=3(人)或N=5(食蟹猴)

[0270] 人和食蟹猴外周T细胞结合试验

[0271] Ab-h1.9d-WT对于人和食蟹猴血液来源的总、初始以及记忆CD4+和CD8+T细胞的结合EC₅₀值示于表26。

表 26 Ab-h1.9d-WT 对人和食蟹猴 T 细胞亚群的结合 EC ₅₀						
EC50 (pM) (平均值±标准差)						
物种	总的 CD4+T 细胞	CD4+初始 T 细胞	CD4+记忆 T 细胞	总的 CD8+T 细胞	CD8+初始 T 细胞	CD8+记忆 T 细胞
人 ^a	63 ± 38	84 ± 32	20 ± 12	165 ± 121	144 ± 120	52 ± 51
食蟹猴 ^b	30 ± 16	45 ± 27	10 ± 12	35 ± 25	42 ± 26	36 ± 30

[0273] CD4+初始=CD4+CD45RA+CCR7+细胞,CD4+记忆=CD4+CD45RA-细胞

[0274] CD8+初始=CD8+CD45RA+CCR7+细胞,CD8+记忆=CD8+CD45RA-细胞

[0275] a. 人PBMC=3个供体

[0276] b. 食蟹猴PBMC=5个供体

[0277] 所评价的所有T细胞亚群上的平均结合EC₅₀值在10至165pM的范围内。Ab-h1.9d-WT与人和食蟹猴CD4+和CD8+T细胞或它们的亚群的结合非常相似,因为这两个物种之间每种相应细胞类型的平均EC50值仅相差2至3倍。

[0278] 还对Ab-h1.9d-WT与人和食蟹猴CD4+和CD8+T亚群的结合进行了分析,以比较Ab-h1.9d-WT结合的T细胞亚群的百分比,如图13所示。总之,人和食蟹猴之间每种T细胞亚群中Ab-h1.9d-WT结合细胞的百分比是相当的。这些发现并不令人惊讶,因为来自人和食蟹猴的α4和β7都是高度同源的(97%氨基酸同一性,参见表27)。

表 27 物种间 α4 和 β7 的氨基酸同一性 (%)				
整合素	食蟹猴	兔	大鼠	小鼠
人 α4	97	89	84	84
人 β7	97	88	86	86

[0280] 此外,在体内研究中证实了Ab-h1.9d-WT对食蟹猴的功能性交叉反应性。当α4β7受体被完全占据时,在食蟹猴中重复给予Ab-h1.9d-WT导致外周血CD4+T细胞计数增加。这些数据证明了Ab-h1.9d-WT在靶功能性药效学作用,并支持了食蟹猴作为药理学相关物种用于Ab-h1.9d-WT的毒理学评价。

[0281] 总之,Ab-h1.9d-WT与人和食蟹猴CD4+和CD8+T亚群均强烈结合,表明了优异的食蟹猴结合交叉反应性。

[0282] 7.10.实例10:Ab-h1.9d-WT的整合素结合特异性

[0283] 7.10.1.材料和方法

[0284] 表达各自的人和食蟹猴异源二聚体整合素α4β7、α4β1和αEβ7的重组细胞使得能够评价Ab-h1.9d-WT的结合特异性。

[0285] 还评价了Ab-h1.9d-WT与人上皮HEK293细胞的非特异性结合。

[0286] 整合素结合特异性试验

[0287] 收获表达除食蟹猴α4β1之外的各种人和食蟹猴整合素(α4β7,α4β1或αEβ7)的CHO-K1或BAF3细胞,计数并在FACS缓冲液(DPBS,w/o Ca²⁺/Mg²⁺,1%BSA)中以每毫升1.5x10⁶个

细胞的密度进行制备。将含有 1.5×10^5 个细胞的100 μ L加入到96孔U形底板的各孔中,并离心除去上清液。加入在FACS缓冲液中的滴定Ab-h1.9d-WT、试验对照或同种型对照(各100 μ L)以复原细胞沉淀。将孔的内容物混合,然后在冰上孵育1小时。将细胞用FACS缓冲液洗涤2次,然后将100 μ L1:600稀释的在FACS缓冲液中的第二抗体(山羊抗hu IgG Fc γ 特异性 Alexa Fluor 488)加入到各孔中并混合。将板在冰上孵育45分钟。随后,用FACS缓冲液洗涤细胞2次,并重悬于200 μ L含0.5%PFA的PBS中。在FACS (Canto-II, BD) 上读取板并基于正向和侧向散射确定活细胞。使用GraphPad Prism 7.0软件生成细胞结合抗体的中值荧光强度。

[0288] 对于表达食蟹猴 $\alpha 4\beta 1$ 的CHO-K1细胞,将含有25 μ L各1:25稀释的CD29-APC和CD49d-BV421混合物的抗体染色混合物以及25 μ L通过在FACS缓冲液中1:5倍系列稀释而制备的Ab-h1.9d-WT、试验对照或同种型对照加入到96孔U形底板的各孔中,以复原食蟹猴 $\alpha 4\beta 1$ 细胞沉淀。将孔的内容物混合,然后在冰上孵育45分钟。同时,还制备染色对照。将细胞用FACS缓冲液洗涤2次,然后将50 μ L在FACS缓冲液中1:600稀释的第二抗体(山羊抗hu IgG Fc γ 特异性 PE)加入各孔中并混合。将板在冰上再孵育45分钟。随后,用FACS缓冲液洗涤细胞2次,并重悬于200 μ L含0.5%PFA的PBS中。在FACS (Canto-II, BD) 上对板进行读取,并基于正向和侧向散射门控活细胞。然后使用FlowJo第10版软件对CD29+CD49d+细胞进行门控,以确定细胞结合测试抗体的中值荧光强度。使用GraphPad Prism 7.0软件对数据进行绘图。

[0289] 非特异性HEK293细胞结合试验

[0290] 将HEK293G细胞在完全DMEM (DMEM+10%FBS+1%丙酮酸钠) 中培养。使用非酶解离缓冲液 (Gibco公司, 目录号13151-014) 收获细胞,计数并以 1.5×10^6 个细胞/mL重悬于FACS缓冲液 (2%BSA/PBS) 中。向96孔U形底板的各孔中分散 7.5×10^4 个细胞。将Ab-h1.9d-WT、阳性对照抗体或同种型对照抗体以100 μ g/mL加入各孔中并在冰上孵育1小时。孵育后,将细胞用FACS缓冲液洗涤2次,并进一步与100 μ L在FACS缓冲液中1:100稀释的山羊抗huIgG Fc-PE (Jackson公司, 目录号109-116-098) 在冰上孵育30分钟。随后,用FACS缓冲液洗涤细胞2次,并重悬于200 μ L FACS缓冲液中。通过FACS (Canto II, BD) 对板进行读取。使用GraphPad Prism 7.0软件对结合数据进行分析。

[0291] 7.10.2. 结果

[0292] 整合素结合特异性

[0293] 如图14A至图14C所示,Ab-h1.9d-WT与表达人 $\alpha 4\beta 7$ 的细胞特异性结合,而不与表达人 $\alpha 4\beta 1$ 的细胞结合,而抗 $\alpha 4$ mAb、Ab-naa与两种整合素都结合。与针对抗 $\beta 7$ mAb (研究级依曲利组单抗) 观察到的强得多的结合相比,Ab-h1.9d-WT最低限度地与表达人 $\alpha E\beta 7$ 的细胞结合。Ab-h1.9d-WT表现出与食蟹猴整合素类似的结合特异性特征s这些数据证明Ab-h1.9d-WT对人 $\alpha 4\beta 7$ 和食蟹猴 $\alpha 4\beta 7$ 两者都具有结合特异性。

[0294] 非特异性的HEK293细胞结合

[0295] 还评价了Ab-h1.9d-WT与人上皮HEK293细胞的非特异性结合。如图15所示,Ab-h1.9d-WT在高浓度 (100 μ g/mL) 下未表现出与HEK293细胞的任何非特异性结合,与对照抗体相当,而阳性对照mAb表现出对这些细胞强的非特异性结合。

[0296] 7.11. 实例11: Ab-h1.9d-WT的兔和啮齿动物结合交叉反应性

[0297] 7.11.1. 材料和方法

[0298] 通过流式细胞术评价Ab-h1.9d-WT与分离自兔、大鼠和小鼠的PBMC的结合。

[0299] 兔和啮齿动物交叉反应性结合试验

[0300] 将兔PBMC解冻,置于RPMI1640/10%FBS培养基中,用FACS缓冲液(DPBS,w/o Ca^{+2} / Mg^{+2} ,1%BSA)洗涤1次,并重悬于含有5%山羊血清的FACS缓冲液中。将细胞(100 μL 中含 1×10^5 个)分装到96孔U形底板中并在冰上孵育30分钟。将板离心除去上清液,并将25 μL 滴定的Ab-h1.9d-WT或同种型对照加25 μL 1:10稀释的CD4-FITC抗体(所有Ab均在FACS缓冲液中稀释)加入各孔中以复原细胞沉淀。将孔的内容物混合,然后在冰上孵育45分钟。同时,还制备了适当的染色对照。随后,将细胞用FACS缓冲液洗涤2次,并将50 μL 在含有5%山羊血清的FACS缓冲液中1:2000稀释度下的第二抗体-PE加入到细胞沉淀中。将板在冰上进一步孵育45分钟。用FACS缓冲液洗涤细胞2次,并重悬于200 μL 含0.5%PFA的PBS中。在FACS(Canto II,BD)上对板进行读取,并基于前向和侧向散射对活细胞进行门控。通过使用FlowJo第10版软件确定抗体结合细胞的百分比,使用GraphPad Prism 7.0软件生成结合曲线和结合 EC_{50} 值。

[0301] 雌性C57BL/6N小鼠和雌性Lewis大鼠分别来自Taconic实验室(Taconic Laboratories)和查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)。从合并的动物小鼠和大鼠血液分离PBMC。使用RBC裂解缓冲液(eBioscience)裂解红细胞。将细胞在PBS中洗涤1次,并重悬于含有5%山羊血清的FACS缓冲液(DPBS,w/o Ca^{+2} / Mg^{+2} ,1%BSA)中。将约 2.5×10^5 个细胞(100 μL)加入到96孔U形底板中,然后在冰上孵育30分钟。除了Ab-h1.9d-WT或同种型对照之外,将1:50稀释度的适当的荧光染料偶联的抗体加入到小鼠细胞(CD3-APC、 $\alpha 4\beta 7$ -PE或IgG2a-FITC对照)或大鼠细胞(CD3-APC、 $\alpha 4$ -FITC或IgG2a-PE对照)中。将孔的内容物充分混合,并将板在冰上孵育1小时。同种型对照和Ab-h1.9d-WT的终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。随后,将细胞用FACS缓冲液洗涤2次,并将100 μL 1:800稀释度的第二抗体-PE或者第二抗体-AF488加入孔中,并将板在冰上孵育45分钟。孵育后,用FACS缓冲液洗涤细胞2次,重悬于200 μL 含0.5%PFA的PBS中。在FACS(Canto II,BD)上对板进行读取,并基于前向和侧向散射对活细胞进行门控。通过使用FlowJo第10版软件确定与测试抗体或同种型对照结合的CD3+细胞百分比,并使用GraphPad Prism 7.0软件作图。

[0302] 7.11.2.结果

[0303] 如表28中汇总的,与人和食蟹猴对应物相比,Ab-h1.9d-WT对兔淋巴细胞和CD4+T细胞表现出相似的结合 EC_{50} 值,而Ab-h1.9d-WT未显示出对大鼠或小鼠PBMC(淋巴细胞和CD4+T细胞)任何可测量的结合。

表 28 与人和食蟹猴相比, Ab-h1.9d-WT 与兔和啮齿动物血液淋巴细胞和 CD4+T 细胞的结合		
	EC_{50} (pM) (平均值 $\pm$ 标准差)	
	淋巴细胞	CD4+T 细胞
[0304] 人 ^a	130 $\pm$ 85	63 $\pm$ 38
食蟹猴	62 $\pm$ 45	30 $\pm$ 16
兔子 ^a	89 $\pm$ 34	97 $\pm$ 11
大鼠	无结合	无结合
小鼠 ^c	无结合	无结合

[0305] 使用表达 $\alpha 4\beta 7$ 的淋巴细胞和CD4+细胞的%确定的 EC_{50} 值

[0306] a. 人/兔PBMC=3个供体

[0307] b. 食蟹猴PBMC=5个供体

[0308] c. 来自混合血液的啮齿动物PBMC

[0309] 7.12. 实例12: Ab-h1.9d-WT诱导的 $\alpha 4\beta 7$ 内化

[0310] 7.12.1. 材料和方法

[0311] 研究了Ab-h1.9d-WT在来自两个PBMC供体的人原代CD4⁺和CD8⁺初始T细胞上诱导细胞表面 $\alpha 4\beta 7$ 内化的能力。

[0312] 内化试验

[0313] 使用与确定依曲利单抗的细胞机制类似的FACS方案对Ab-hi.9d-WT内化进行了研究和定量(Lichnog等人,《药理学前沿(Front Pharmacol)》)。使用Ficoll Paque淋巴细胞分离液(GE 17-1440-03)和SepMate密度梯度离心管(StemCell 85450)从两个健康血液供体(RBC, 供体KP58219和KP58239)分离外周血单个核细胞(PBMC), 将其重悬于含有5% DMSO的FBS(Gibco 10438-026)中并冷冻保存于液氮中。将冷冻的PBMC解冻, 计数并在RPMI培养基+10%FBS中以 1×10^6 个细胞/mL复原, 并将100 μ L细胞以每孔 1×10^5 个细胞进行铺板。然后将铺板的细胞在4 $^{\circ}$ C孵育或置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中30分钟以使板进行温度适应。将人PBMC与100 μ L为1.25 μ g/mL的2倍浓度未标记的Ab-h1.9d-WT抗体(最终为0.625 μ g/mL)在4 $^{\circ}$ C下预孵育1小时。将细胞离心, 洗涤并重悬于200 μ L RPMI+10%FBS中, 并在4 $^{\circ}$ C或37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育18小时。孵育后, 将细胞用FACS缓冲液(PBS+1%FBS)洗涤2次, 然后用CD4⁺(Biolegend 317410)、CD8⁺(Biolegend 344710)和CD45RA(Biolegend 304130)在有或没有AF647标记的非竞争性抗 $\beta 7$ 抗体的情况下染色30分钟。通过流式细胞仪(LSR-Fortessa公司)获得细胞荧光。使用FlowJo第10版软件分析数据并通过100x[内化之前的总细胞表面 $\alpha 4\beta 7$ 表达(4 $^{\circ}$ C下的MFI)-内化之后剩余的细胞表面 $\alpha 4\beta 7$ 表达(37 $^{\circ}$ C下的MFI)/内化之前的总细胞表面 $\alpha 4\beta 7$ 表达(4 $^{\circ}$ C下的MFI)]来计算内化百分比。

[0314] 7.12.2. 结果

[0315] 如图16A所示, 当Ab-h1.9d-WT在4 $^{\circ}$ C与人PBMC结合以最低限度内化后18小时进行评价时, 来自供体1的73%的CD4⁺初始T细胞(CD4⁺CD45RA⁺)和49%的CD8⁺初始T细胞(CD8⁺CD45RA⁺)保持 $\beta 7$ 阳性。然而, 在相同方案下但在37 $^{\circ}$ C下孵育Ab-h1.9d-WT以促进内化之后, 仅发现17%的CD4⁺初始T细胞和7%的CD8⁺初始T细胞是 $\beta 7$ 阳性的。这些数据表明与Ab-h1.9d-WT结合的表面 $\alpha 4\beta 7$ 的显著内化发生在37 $^{\circ}$ C。用来自供体2的PBMC观察到类似的结果。基于图16B中37 $^{\circ}$ C时 $\alpha 4\beta 7$ 内化的定量(相对于4 $^{\circ}$ C处理后观察到的表达, 表面 $\alpha 4\beta 7$ 表达减少), Ab-h1.9d-WT能够在 $\alpha 4\beta 7^{+}$ 初始CD4⁺和CD8⁺T细胞上诱导约80%的 $\alpha 4\beta 7$ 内化。

[0316] 与Ab-Vedo相比, Ab-h1.9d-WT在诱导 $\alpha 4\beta 7$ 内化方面更有效。

[0317] 7.13. 实例13: Ab-h1.9d-WT对MAdCAM-1配体的阻断

[0318] 7.13.1. 材料和方法

[0319] MAdCAM-1配体阻断试验

[0320] 对于基于FACS的试验, 收获HuT78细胞或人PBMC, 用DPBS洗涤1次, 调整至 1.5×10^6 个细胞/mL的密度并重悬于FACS缓冲液(DPBS, w/o Ca²⁺/Mg²⁺, 1%BSA/1mM MnCl₂)中。将细胞以 1×10^5 (100 μ L)/孔分装到96孔U形底板中并离心以除去上清液。将滴定的Ab-h1.9d-WT或同种型对照(50 μ L)加50 μ L含有0.3 μ g/mL MAdCAM-1-mFc、2mM MnCl₂和在FACS缓冲液中1:50稀释的Alexa488偶联的检测Ab(30 μ g/mL)的混合物加入到各孔中。将板在冰上孵育一小时,

然后离心。用200 μ L的FACS缓冲液轻轻洗涤板1次,并在相同缓冲液中复原细胞。通过FACS (Canto II) 读取平板,并通过前向和侧向散射门控确定活细胞。使用FlowJo第10版软件分析流式数据(FCS 3.0文件),使用GraphPad Prism 7.0软件生成结合曲线和抑制IC₅₀值。

[0321] 对于基于板的试验,使用包被缓冲液(PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺, 0.1%BSA)用100 μ L的20 μ g/mL MAdCAM-1hFc或同种型对照(终浓度2 μ g/孔)将96孔平底板(格瑞纳公司(Greiner), 目录号655077)在4℃包被过夜。第二天,用200 μ L洗涤缓冲液(PBS w/Ca²⁺/Mg²⁺, 0.1%BSA)洗涤板2次,然后使用封闭缓冲液(PBS w/Ca²⁺/Mg²⁺, 1%BSA)在37℃封闭1小时。在封闭孵育期间,制备Ab-h1.9d-WT和同种型对照的稀释液并收获HuT78细胞。以5 μ g/mL制备2倍初始浓度,然后一式两份或一式三份地进行系列1:4.5的7点稀释(终浓度范围为2.5至0.0003 μ g/mL)。将细胞计数,洗涤并以2 $\times 10^6$ 细胞/mL重悬于试验培养基(IMDM, 1%BSA)中,向其中加入终浓度为2mM的MnCl₂并将100,000个细胞分装到96孔板的各孔中。然后将稀释的抗体加入到细胞中,并将混合物在37℃、5%CO₂下孵育30分钟。从MAdCAM-1hFc包被的板倾倒出封闭溶液并将100 μ L/孔的预孵育的HuT78细胞和mAb混合物分配到MAdCAM-1hFc包被的板的各孔中。将板以1,000rpm旋转1分钟并在37℃、5%CO₂下孵育30分钟。轻轻倾倒粘附板并用150 μ L的洗涤缓冲液洗涤4次。洗涤后,向各孔中加入100 μ L/孔的混合物(含有50 μ L的CellTiter-Glo试剂和50 μ L试验培养基)。将板置于定轨振荡器上2分钟,然后在室温孵育10分钟。在发光板读取器(Topcount, 珀金埃尔默公司)上对板的发光进行读取。使用4参数曲线拟合分析在GraphPad Prism 7.0对发光信号进行绘图并确定IC₅₀值。

[0322] 7.13.2. 结果

[0323] 使用基于板的和基于FACS的试验,测试Ab-h1.9d-WT阻断MAdCAM-1蛋白的重组胞外结构域与表达 $\alpha 4\beta 7$ 的HuT78细胞和人淋巴细胞(PBMC)结合的能力。

[0324] 通过使用基于FACS和基于板的试验分别获得为50pM和为25pM的IC₅₀值。

[0325] 此外,在223pM的IC₅₀时观察到Ab-h1.9d-WT阻断MAdCAM-1与人血液来源的淋巴细胞的结合(表29)。

表 29		
Ab-h1.9d-WT 阻断 MAdCAM-1 的效力 IC ₅₀		
*IC ₅₀ (pM)		
FACS		发光
HuT78	人淋巴细胞	HuT78
50 $\pm$ 11	223 $\pm$ 86	25 $\pm$ 4

[0327] *平均 $\pm$ 标准差;N=3

[0328] 这些数据证明Ab-h1.9d-WT对MAdCAM-1/ $\alpha 4\beta 7$ 相互作用的强抑制作用。

[0329] 7.14. 实例14: Ab-h1.9d-WT阻断MAdCAM-1对人原代CD4⁺T细胞的共刺激

[0330] 7.14.1. 材料和方法

[0331] 人PBMC和CD4⁺T细胞分离

[0332] 从收集自健康供体的新鲜血液中分离人外周血单个核细胞(PBMC)。然后使用CD4阴性选择试剂盒(Stem Cell Technologies公司)从PBMC分离人CD4⁺T细胞。

[0333] CD4⁺T细胞活化和增殖试验

[0334] 将96孔平底组织培养板包被200ng/孔在HBSS中的抗CD3抗体(Biolegend公司), 4℃过夜。第二天,用HBSS将抗CD3包被的板洗涤一次,并在37℃与200ng/孔的MAdCAM-1(R&D

systems公司) 孵育1小时。孵育后,用200 μ l HBSS将板洗涤一次,并在有或没有1 μ g/ml测试抗体的情况下向各孔中加入50,000个CD4+T细胞。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下将细胞培养96小时后,洗涤细胞并用Live-Dead Aqua活力染料(赛默飞世尔公司)染色,随后用细胞活化标记物抗CD25 FITC(克隆MA0251,BD生物科学公司(BD bioscience))和抗Ki67 APC(Biolegend公司)染色。在流式细胞仪上分析细胞,并用FlowJo软件分析数据。使用GraphPad Prism对多个供体的数据进行绘图并进行统计分析。使用与图基多重比较检验相结合的单因ANOVA确定显著性。****p<0.0001,**p=0.001-0.01。

[0335] 7.14.2. 结果

[0336] Ab-h1.9d-WT阻断MAdCAM-1对人原代CD4+T细胞的共刺激

[0337] MAdCAM-1介导的 α 4 β 7+CD4+T细胞的肠道归巢在HIV感染GALT(肠道相关淋巴组织)中起重要作用。除了这种作用之外,还报道了MAdCAM-1向人原代CD4+T细胞递送共刺激信号并促进HIV复制(Nawaz等人,《黏膜免疫学(Mucosal Immunology)》2018)。鉴于HIV感染和复制需要这些细胞的代谢活化,并且Ab-h1.9d-WT能够以223pM的IC₅₀值阻断MAdCAM-1与人淋巴细胞的结合(表35),我们评价了Ab-h1.9d-WT是否能够阻断人原代CD4+T细胞上的MAdCAM-1共刺激信号,这进而又将抑制这些细胞中MAdCAM-1介导的病毒复制。

[0338] 当来自一个代表性的健康供体的人原代CD4+T细胞与仅结合了抗CD3的板孵育96小时,22.6%的细胞被活化,表现为Ki67+CD25+表型(图17A)。当细胞与结合了抗CD3和MAdCAM-1的板一起孵育时,56.6%的CD4+T细胞被活化。这表明MAdCAM-1向CD4+T细胞递送通过与细胞表面 α 4 β 7相互作用而介导的共刺激信号。在96小时孵育期间向细胞中加入Ab-h1.9d-WT将细胞活化降低至20.8%,该水平与仅抗CD3时的情况相当,而同种型对照Ab对细胞活化没有任何抑制作用。数据表明Ab-h1.9d-WT有效且完全阻断了MAdCAM-1所施加的共刺激信号。用来自另外五名供体的原代CD4⁺T细胞重复该试验,数据汇总在图17B中。与从图17A中的一个代表性供体获得的数据一致,Ab-h1.9d-WT几乎完全阻断了MAdCAM-1/ α 4 β 7介导的CD4+T细胞共刺激,而同种型对照Ab不具有任何抑制作用。

[0339] 7.15. 实例15: Ab-h1.9d-WT的VCAM-1配体阻断特异性

[0340] 7.15.1. 材料和方法

[0341] 对在VCAM-1介导的细胞粘附试验中Ab-h1.9d-WT对 α 4 β 7/VCAM-1相互作用的影响进行了评测。

[0342] VCAM-1配体阻断试验

[0343] 在第1天使用包被缓冲液(PBS w/o Ca⁺²/Mg⁺², 0.1%BSA)在4 $^{\circ}$ C用100 μ L的20 μ g/mLVCAM-1hFc或同种型对照(终浓度为每孔2 μ g)将板(96孔平底, 格瑞纳公司, 目录号655077)包被过夜。在第2天,用200 μ L洗涤缓冲液(PBS w/Ca⁺²/Mg⁺², 0.1%BSA)将板洗涤3次,然后使用封闭缓冲液(PBS w/Ca⁺²/Mg⁺², 1%BSA)在37 $^{\circ}$ C下封闭1小时或更长。在封闭孵育期间,制备Ab-h1.9d-WT、Ab-nata和同种型对照的稀释液并收获HuT78细胞。以4 μ g/mL制备2倍初始浓度的抗体,然后在试验培养基(IMDM, 1%BSA)中进行1:4倍系列稀释。对HuT78细胞进行计数、洗涤并以2 $\times$ 10⁶个细胞/mL重悬于试验培养基中,向其中加入终浓度为2mM的MnCl₂,并将100,000个细胞分装到96孔板的各孔中。然后将稀释的抗体加入到细胞中,并将混合物在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育30分钟。从VCAM-1 hFc包被的板倾倒入封闭溶液,将和100 μ L预孵育的HuT78细胞和mAb混合物分配到VCAM-1hFc包被的板的各孔中。将板在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂

下孵育30分钟,然后使用洗涤缓冲液轻轻洗涤3次。洗涤后,向各孔中加入100 μ L/孔的混合物(含有50 μ L的CellTiter-Glo试剂和50 μ L试验培养基)。将板置于定轨振荡器上2分钟,然后在室温孵育10分钟。在发光板读取器(Topcount,珀金埃尔默公司)上对板的发光进行读取。使用4-参数曲线拟合分析在GraphPad Prism 7.0中对发光信号进行绘图以确定IC₅₀值。

[0344] 7.15.2.结果

[0345] 除了 α 4 β 7结合MAdCAM-1使得血液淋巴细胞的肠道归巢成为可能之外, α 4 β 7还可以结合内皮细胞上表达的VCAM-1(表30)。

[0346]	表 30			
	Ab-h1.9d-WT 对 VCAM-1 阻断的选择性			
	mAb	实验 1	实验 2	实验 3
		IC ₅₀ (pM)		
	Ab-h1.9d-WT	无抑制	无抑制	无抑制
	Ab-nata	38	54	77
		平均 (N=3)		
		IC ₅₀ (pM) $\pm$ 标准差		
		无抑制		
		56 $\pm$ 20		

[0347] 那他珠单抗(Ab-naa),一种抗 α 4 mAb,能够阻断 α 4 β 7和 α 4 β 1与VCAM-1结合,由于其阻断循环淋巴细胞向脑部运输而引起进行性多灶性白质脑病(PML)。因此,在VCAM-1介导的细胞粘附试验中评测Ab-h1.9d-WT对 α 4 β 7/VCAM-1相互作用的影响是使用Ab-nata作为阳性对照进行研究的必要安全参数。如所预期的,Ab-nata以56pM的平均IC₅₀值阻断了VCAM-1介导的HuT78细胞粘附。相反,Ab-h1.9d-WT没有显示可检测到的对VCAM-1介导的HuT78细胞粘附的阻断(图18)。

[0348] 尽管Ab-h1.9d-WT以高效力选择性阻断 α 4 β 7/MAdCAM-1相互作用,但未显示出对 α 4 β 7/VCAM-1相互作用的抑制。

[0349] 7.16.实例16:Ab-h1.9d-WT对人类和食蟹猴Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa和FcRn的结合亲和力

[0350] 7.16.1.材料和方法

[0351] 与抗体IgG1对照(曲妥珠单抗)相比,通过BIAcore评价Ab-h1.9d-WT对一组重组的人和食蟹猴Fc γ R胞外域(ECD)蛋白的结合亲和力。

[0352] 还使用工程化为表达各种细胞表面人Fc γ R的CHO-K1细胞通过流式细胞术评价Ab-h1.9d-WT与人Fc γ R的结合。

[0353] 使用重组的人和食蟹猴FcRn ECD蛋白通过BIAcore评价pH 6.0和pH 7.4时Ab-h1.9d-WT与人和食蟹猴FcRn的结合(表31)。

[0354]	表 31			
	通过 BIAcore 确定的 Ab-h1.9d-WT 对人和食蟹猴 FcRn 的结合亲和力			
	抗体	人 FcRn K _D (M) (平均值 $\pm$ 标准差)	食蟹猴 FcRn K _D (M) (平均值 $\pm$ 标准差)	
		pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0
	Ab-h1.9d-WT	3.3 x 10 ⁻⁶ $\pm$ 0.2 x 10 ⁻⁶	无显著结合	2.2 x 10 ⁻⁶ $\pm$ 0.3 x 10 ⁻⁶
	曲妥珠单抗	3.2 x 10 ⁻⁶ $\pm$ 0.1 x 10 ⁻⁶	无显著结合	2.2 x 10 ⁻⁶ $\pm$ 0.4 x 10 ⁻⁶
		pH 7.4		
		无显著结合		

[0355] N=3

[0356] 人和食蟹猴Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb和Fc γ RIIIa表面等离子共振 (SPR) 结合试验

[0357] 通过在BiacoreT200仪器(通用电气医疗集团(GE Healthcare))上在25 $^{\circ}$ C使用抗His捕获进行的SPR测量来确定Ab-h1.9d-WT对于His标签化的人Fc γ R的结合动力学。根据

制造商的说明书,使用常规的胺偶联试剂盒,将在10mM乙酸钠(pH 4.5)中稀释至25 μ g/mL的约10000RU的小鼠抗His抗体(R&D)固定在CM5生物传感器芯片上。用1M乙醇胺封闭生物传感器表面上未反应的部分。流动池1上的活化和失活表面用作参比。在试验运行缓冲液,HBS-EP+ (10mM羧乙基哌嗪乙磺酸,pH 7.4,150mM NaCl,3mM EDTA,0.05%吐温20)中进行芯片制备和结合动力学测量。然后在流动池2上捕获人和食蟹猴Fc γ RI以达到250至500RU的捕获水平。将Ab-h1.9d-WT样品以50 μ L/min的流速在所有流动池上注射一至五分钟(人和食蟹猴Fc γ RIIb和Fc γ RIIa为一分钟,人Fc γ RIIIa为两分钟,人和食蟹猴Fc γ RI&食蟹猴Fc γ RIII为五分钟)。分析物浓度范围对于人和食蟹猴Fc γ RI、食蟹猴Fc γ RIII而言为0.78至200nM,人和食蟹猴Fc γ RII为46.9至12000nM,Fc γ RIII为7.8至4000nM(2倍系列稀释)。仅注射缓冲液用于双重参比。对结合后的Fc γ R解离监测一至五分钟(Fc γ RIIb、Fc γ RIIa为1分钟,Fc γ RIIIa为3分钟,Fc γ RI为5分钟)。以100 μ L/分钟的流速在所有八个通道中注入100mM HCl两秒钟,使芯片表面再生。针对每个样品使用相同的CM5芯片进行三次实验。将这三次实验的结果求平均。

[0358] 人Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa细胞结合试验

[0359] 将表达hFc γ R的CHO-K1细胞在150cm²培养瓶中生长,并根据制造商的说明书加载特定量的荧光团、CellTrace CFSETM试剂和CellTrace VioletTM试剂(Molecular Probes公司),以针对各细胞系建立独特的荧光足迹(条形码方法)。将细胞系与不同浓度(0,0.01,0.1,1,10,50,100和250 μ g/mL)的单体Ab-h1.9d-WT在RPMI1640/2mM L-谷氨酰胺/10%超低IgG热灭活FBS(结合培养基)中混合并在4 $^{\circ}$ C孵育一小时。孵育后,将细胞在pH 7.4的PBS(w/o Ca⁺²/Mg⁺²)中洗涤2次,并在结合培养基中与偶联AF647的第二抗体(F(ab')₂山羊抗人IgG(H+L))在4 $^{\circ}$ C孵育15分钟以检测细胞结合的Ab-h1.9d-WT。孵育后,用pH7.4的PBS(w/o Ca⁺²/Mg⁺²)进一步将细胞洗涤2次。使用流式细胞分析仪(LSR-Fortessa)检测并记录细胞表面荧光。使用FlowJo软件第10版(Tristar)分析所记录的荧光数据,并且将与CHO-K1 hFc γ R细胞结合的Ab-h1.9d-WT报告为AF647荧光的几何平均值(生成作为Ab-h1.9d-WT浓度的函数的gMFI结合曲线)。

[0360] 人和食蟹猴FcRn表面等离子体结合试验

[0361] 对于FcRn结合分析,根据制造商的指南,将Ab-h1.9d-WT直接固定在CM5芯片胺偶联物上,密度为750RU。将人和食蟹猴FcRn重组蛋白以50 μ L/分钟的流速以5.5至12000nM(3倍系列稀释)范围内的浓度在所有流动池上注射一分钟,然后解离一分钟。通过注射HBS-EP+pH 7.4持续15秒使表面再生。制备样品并在两种运行缓冲液MES EP+pH 6.0和HBS-EP+pH 7.4运行。针对每个样品(一式两份)使用不同的CM5芯片进行三次实验。将这三次实验的结果求平均。将人Fc γ RI、Fc γ RIIIa(F158)、Fc γ RIIIa(V158)和食蟹猴Fc γ RI、Fc γ RIII与所有样品结合的数据拟合为具有固定R_{max}的1:1整体动力学模型。将人,Fc γ RIIb、Fc γ RIIa(H131)、Fc γ RIIa(R131),食蟹猴Fc γ RIIa、Fc γ RIIb和FcRn与所有样品的结合的数据拟合至稳态亲和力模型。Biacore T200评价软件第2.0版用于拟合Fc γ R和FcRn数据。

[0362] 7.16.2.结果

[0363] 人和食蟹猴Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb和Fc γ RIIIa结合

[0364] 表32(针对人)和表33(针对食蟹猴)中汇总了结合动力学参数。

表 32
通过 BIAcore 确定的 Ab-h1.9d-WT 对人 Fc γ R 的结合亲和力

抗体	捕获的 Fc γ R					
	$K_D(M)$ (平均值 $\pm$ 标准差)					
	hFc γ RI	hFc γ RIIa (H131)	hFc γ RIIa (R131)	hFc γ RIIb	hFc γ RIIIa (F158)	hFc γ RIIIa (V158)
Ab-h1.9d-WT	$1.6 \times 10^{-8} \pm 0.2 \times 10^{-8}$	$5.6 \times 10^{-6} \pm 0.8 \times 10^{-6}$	有结合但太弱而无法确定	有结合但太弱而无法确定	$4.6 \times 10^{-6} \pm 2.1 \times 10^{-6}$	$4.8 \times 10^{-7} \pm 3.1 \times 10^{-7}$
曲妥珠单抗	$1.5 \times 10^{-8} \pm 0.3 \times 10^{-8}$	$6.1 \times 10^{-6} \pm 0.3 \times 10^{-6}$	$8.9 \times 10^{-6} \pm 0.3 \times 10^{-6}$	有结合但太弱而无法确定	$9.5 \times 10^{-7} \pm 0.3 \times 10^{-7}$	$9.4 \times 10^{-8} \pm 0.1 \times 10^{-8}$

[0366] N=3

[0367] Ab-h1.9d-WT和曲妥珠单抗对hFc γ RI和hFc γ RII (H131) 两者具有类似的可测量的结合亲和力,对hFc γ RII (R131) 和hFc γ RIIb受体的结合更弱。Ab-h1.9d基WT和曲妥珠单抗对hFc γ RIIIa (F158/V158) 具有可测量的结合亲和力,如预期的那样对V158多态性变体具有更高的亲和力。

表 33
通过 BIAcore 评价的 Ab-h1.9d-WT 对食蟹猴 Fc γ R 的结合亲和力

抗体	捕获的 Fc γ R			
	$K_D(M)$ (平均值 $\pm$ 标准差)			
	食蟹猴 Fc γ RI	食蟹猴 Fc γ RIIa	食蟹猴 Fc γ RIIb	食蟹猴 Fc γ RIII
Ab-h1.9d-WT	$1.2 \times 10^{-8} \pm 0.1 \times 10^{-8}$	有结合但太弱而无法确定	有结合但太弱而无法确定	$2.8 \times 10^{-7} \pm 4.6 \times 10^{-7}$
曲妥珠单抗	$1.3 \times 10^{-8} \pm 0.2 \times 10^{-8}$	有结合但太弱而无法确定	有结合但太弱而无法确定	$8.0 \times 10^{-8} \pm 4.6 \times 10^{-8}$

[0369] N=3

[0370] 虽然Ab-h1.9d-WT和曲妥珠单抗均表现出与食蟹猴Fc γ RI和食蟹猴Fc γ RIII的结合,但无法确定食蟹猴Fc γ RIIa和食蟹猴Fc γ RII受体的可测量的结合参数,可能是因为它们与这些受体的结合较弱。

[0371] 人Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa细胞结合试验

[0372] Ab-h1.9d-WT显示出对人Fc γ RI和Fc γ RIIIa (V176) 多态性变体具有最高的结合,但对其它的人Fc γ Rs [Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa (F176) 和Fc γ RIIIb] 的结合相对较低(图19A至图19B)。

[0373] 人和食蟹猴FcRn表面等离子体结合试验

[0374] Ab-h1.9d-WT在酸性条件(pH 6.0)下表现出对人和食蟹猴FcRn可测量的结合,但在中性pH(pH 7.4)下没有可测量的结合(表34)。FcRn结合特性与对照(曲妥珠单抗)相当。

表 34
通过 BIAcore 确定的 Ab-h1.9d-WT 对人和食蟹猴 FcRn 的结合亲和力

抗体	人 FcRn $K_D(M)$ (平均值 $\pm$ 标准差)		食蟹猴 FcRn $K_D(M)$ (平均值 $\pm$ 标准差)	
	pH 6.0		pH 7.4	
	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4
Ab-h1.9d-WT	$3.3 \times 10^{-6} \pm 0.2 \times 10^{-6}$	无显著结合	$2.2 \times 10^{-6} \pm 0.3 \times 10^{-6}$	无显著结合
曲妥珠单抗	$3.2 \times 10^{-6} \pm 0.1 \times 10^{-6}$	无显著结合	$2.2 \times 10^{-6} \pm 0.4 \times 10^{-6}$	无显著结合

[0376] N=3

[0377] 7.17. 实例17: Ab-h1.9d-WT体外ADCC、ADCP和CDC活性

[0378] 7.17.1.材料和方法

[0379] 使用表达初始 $\alpha 4\beta 7$ /CD20的RPMI 8866细胞作为靶细胞和表达hFc γ RIIIa (V158)或hFc γ RIIa (H131)的报告基因Jurkat细胞作为效应细胞,评价Ab-h1.9d-WT的体外ADCC和ADCP活性。该jurkat细胞系具有驱动萤火虫荧光素酶表达作为报告基因的NFAT反应元件。Ab-Ritu,一种抗CD20 mAb,在这些试验中用作阳性对照。

[0380] 此外,在基于细胞毒性的ADCC试验中使用表达 $\alpha 4\beta 7$ /CD52的HuT78细胞作为靶,人原代NK细胞作为效应物和坎帕斯(抗CD52)作为阳性对照抗体评价Ab-h1.9d-WT。

[0381] ADCC报告基因试验

[0382] 靶 $\alpha 4\beta 7$ 表达RPMI 8866细胞生长并维持在培养基(RPMI1640,2mM L-谷氨酰胺和10%FBS)中。收集对数期细胞,计数,洗涤并以 6×10^5 个细胞/mL的储液重悬于试验培养基(含有低IgG血清的RPMI1640)中,并置于37℃、5%CO₂下直至备用。以30 μ g/mL的3倍初始浓度制备Ab-h1.9d-WT和对照mAb,然后在Costar 3956稀释板中以1:100系列(2点)稀释。根据板的布局,将抗体(25 μ L)与等体积的靶RPMI 8866细胞(25 μ L)一式两份混合。将效应Jurkat细胞(稳定表达人Fc γ RIIIa V158变体和驱动来自PromegaTM的萤火虫荧光素酶表达的NFAT应答元件)快速解冻并在试验培养基中调整至 3×10^6 细胞/mL。然后将Jurkat效应物(25 μ L)加入到含有RPMI 8866靶和抗体的96孔试验板中。对照孔包括单独的培养基、单独的效应物(E)和靶(T)、E+T、E+mAb(30 μ g/mL)或T+mAb(30 μ g/mL)。根据板的布局将所有孔调整至75 μ L/孔。最终细胞数为75,000个Jurkat效应细胞/孔和15,000个RPMI 8866靶细胞/孔,对应于E:T比为5:1。每孔的最终抗体浓度为67nM(10 μ g/mL)、0.67nM(0.1 μ g/mL)和0.0067nM(0.001 μ g/mL)。将板在37℃、5%CO₂下孵育6小时,在此期间在使用前将Bio-GloTM缓冲液和底物(目录号7110)平衡至室温。在孵育结束时,用缓冲液复原Bio-Glo底物以形成酶/底物溶液(Bio-Glo试剂)。向所有孔中加入等体积75 μ L/孔的Bio-Glo。然后将板在室温下孵育10分钟。在发光板读取器(Topcount,珀金埃尔默公司)上对板的发光进行读取。使用GraphPad Prism 7.0软件将发光信号绘图为RLU。

[0383] ADCP报告基因试验

[0384] 靶 $\alpha 4\beta 7$ 表达RPMI 8866细胞生长并维持在培养基(RPMI1640,2mM L-谷氨酰胺和10%FBS)中。收集对数期细胞,计数,洗涤并以 2×10^5 个细胞/mL的储液重悬于试验培养基(含有低IgG血清的RPMI1640)中,并置于37℃、5%CO₂下直至备用。以30 μ g/mL的3x初始浓度制备Ab-h1.9d-WT和对照mAb,然后在Costar 3956稀释板中以1:100系列(2点)稀释。根据板的布局,将抗体(25 μ L)与等体积的靶细胞(25 μ L)一式两份混合。将效应Jurkat细胞(稳定表达人Fc γ RIIa H131变体和驱动来自PromegaTM的萤火虫荧光素酶表达的NFAT应答元件)快速解冻并在试验培养基中调整至 1×10^6 个细胞/mL。然后将Jurkat效应物(25 μ L)加入到含有RPMI 8866靶和抗体的96孔试验板中。对照孔包括单独的培养基、单独的效应物(E)和靶(T)、E+T、E+mAb(30 μ g/mL)或T+mAb(30 μ g/mL)。根据板的布局将所有孔调整至75 μ L/孔。最终细胞数为25,000个Jurkat效应细胞/孔和5,000个靶细胞/孔,对应于E:T比为5:1。每孔的最终抗体浓度为67nM(10 μ g/mL)、0.67nM(0.1 μ g/mL)和0.0067nM(0.001 μ g/mL)。将板在37℃、5%CO₂下孵育6小时,在此期间在使用前将Bio-GloTM缓冲液和底物(目录号7110)平衡至室温。在孵育结束时,用缓冲液复原Bio-Glo底物以形成酶/底物溶液(Bio-Glo试剂)。向所有孔中加入等体积75 μ L/孔的Bio-Glo。然后将板在室温下孵育10分钟。在发光板读取器

(Topcount, 珀金埃尔默公司) 上对板的发光进行读取。使用GraphPad Prism 7.0软件将发光信号绘图为RLU。

[0385] CDC试验

[0386] 使RPMI 8866细胞生长并维持在培养基(RPMI1640, 2mM L-谷氨酰胺和10%FBS)中。收集对数期细胞, 计数, 洗涤并以 4×10^6 个细胞/mL储液重悬于试验培养基(RPMI1640减去酚红, 目录号11835-030)中, 并置于37℃、5%CO₂下直至备用。在Costar 3956稀释板中以45μg/mL和0.45μg/mL的3倍初始浓度制备Ab-h1.9d-WT和对照mAb。使用冷的流水解冻人供体血清(HMN19169和HMN19170)并立即置于冰上。将抗体、对照(25μL)和培养基加入到试验板(Costar 3599)中。将供体血清(各25μL)、靶细胞(25μL)和稀释的mAb(25μL)以每孔75μL的最终体积混合, 每孔含有33%血清补体, 1×10^5 个细胞和15μg/mL mAb。然后将板在37℃、5%CO₂下孵育2小时。孵育后, 将1.5mg/mL的5倍储液中的细胞渗透染料(西格玛公司; 刃天青钠盐(Resazurin Sodium Salt))在DPBS中1:5稀释, 并向每个孔中加入25μL染料。将板再孵育16小时, 然后使用Clarostar板读取器读取吸光度(545/600)。使用以下公式在Excel中计算靶特异性细胞裂解百分比: $100 - 100 \times [(\text{与mAb孵育的吸光度}) / (\text{对照吸光度})]$; 用GraphPad Prism 7.0软件对结果绘图。

[0387] ADCC细胞毒性试验

[0388] 收获表达靶α4β7的HuT78细胞, 用PBS (w/o Ca⁺²/Mg⁺², 1%BSA) 洗涤2次, 并以 1×10^7 个细胞/mL重悬于PBS中, 然后在室温下以2μM的最终浓度用CFSE进行标记持续8分钟。孵育后, 以10%终浓度加入FBS以淬灭标记。将细胞用RPMI+10%FBS培养基洗涤2次, 然后将CFSE标记的HuT78细胞与100μL 2倍浓度的Ab-h1.9d-WT或对照抗体以10μg/mL在96孔V形底板中在37℃、5%CO₂下孵育30分钟。随后, 以5:1的比例将100μL的 2.5×10^5 个NK (Fc γ RIIIaV158+)效应细胞(用200U/mL的IL-2预孵育过)加入到靶细胞中。将孔的内容物充分混合, 然后在37℃下在CO₂培养箱中孵育5小时。将NK和HuT78细胞混合物用PBS洗涤2次, 并用含有1μL FVD染料/mL的不含叠氮化物和蛋白质的PBS以 1×10^6 细胞/mL重悬, 并在室温下孵育20分钟。将细胞用FACS缓冲液洗涤2次, 重悬于200μL含0.5%PFA的PBS溶液中, 并在FACS (Canto II, BD) 上读板。使用FlowJo第10版软件分析流式数据(FCS 3.0文件)。对所有HuT78靶细胞(活的和死的)进行门控, 以确定总靶细胞群中死的靶细胞的百分比。用于%ADCC计算的公式是 $\%ADCC = 100 \times [(E+T+Ab) \text{混合物中死的靶细胞}\% - (E+T) \text{混合物中死的靶细胞}\%] / [100 - (E+T) \text{混合物中死的靶细胞}\%]$ 。使用GraphPad Prism 7.0软件将ADCC百分比绘图。

[0389] 7.17.2. 结果

[0390] ADCC报告基因活性、ADCP报告基因活性和CDC

[0391] 如预期的, Ab-Ritu表现出强的浓度依赖性体外ADCC和ADCP活性中; 然而, Ab-h1.9d-WT和同种型对照在所测试的三种浓度(10、0.1、0.001μg/mL)下未显示任何这些活性(图20A和图20B)。对于三种阴性对照试验条件, 即单独的靶和效应物、靶加上抗体以及效应物加上抗体, 仅检测到最低限度的信号(数据未示出)。Ab-Ritu还证实了在0.15和15μg/mL (100nM)下对RPMI 8866细胞的强体外CDC活性, 而Ab-h1.9d-WT和同种型对照在相应浓度下使用两份人血清供体均未显示CDC信号(图21)。

[0392] ADCC细胞毒性

[0393] 在该体外试验中, 坎帕斯(Ab-Alem)表现出针对靶细胞的强细胞毒性。相反, 当使

用分离自具有Fc γ RIIIaV158基因型的两个不同供体的NK效应细胞进行试验时,Ab-h1.9d-WT在10 μ g/mL (67nM) 浓度下未诱导任何体外细胞毒性(图22)。因此,尽管Ab-h1.9d-WT如上文所示与人Fc γ R结合(实施例12),它在体外不诱导针对未感染的 α 4 β 7+细胞的不期望的Fc介导的ADCC、ADCP和CDC活性。

[0394] 7.18.实例18:靶上Ab-h1.9d-WT结合位点的同源性建模

[0395] 7.18.1.材料和方法

[0396] 通过同源性建模探索Ab-h1.9d-WT与 α 4 β 7的结合模式。已经公开了与另一种抗 α 4 β 7抗体——维多珠单抗复合的重组人 α 4 β 7胞外结构域蛋白的晶体结构(Yu等人,《细胞生物学杂志(J Cell Biol)》2012)。基于该数据和Ab-h1.9d-WT的Fab区的独特序列,进行候选物抗体与基准抗体维多珠单抗和AMG181相比的结合模式的建模。

[0397] 7.18.2.结果

[0398] 与体外表征数据一致,Ab-h1.9(杂交瘤Ab-m1的人源化变体以及Ab-h1.9d-WT的亲本)和两种基准mAb主要通过 β 7亚单位相互作用但也与 α 4亚单位相互作用(稍有)而结合 α 4 β 7。该模型解释了它们与 α 4 β 1的结合不足且与 α E β 7的结合非常低。有趣的是,该模型表明Ab-h1.9与两种基准mAb之间的细微差异在于Ab-h1.9结合 α 4亚基上略微更多的残基。该模型中明显的重叠表位预测了Ab-h1.9和维多珠单抗会竞争与其靶结合。实际上,在基于FACS的结合竞争研究中,Ab-mi能够与结合 α 4 β 7+细胞的Ab-Vedo竞争,表明它们结合类似的结合表位(表13)。

[0399] 7.19.讨论

[0400] HIV+和HIV-个体的外周人CD4+和CD8+T细胞亚群上的 α 4 β 7表达水平是相当的,表明HIV+个体的CD4+T细胞中的 α 4 β 7表达可以支持 α 4 β 7掺入到萌发的HIV病毒粒子中。

[0401] Ab-h1.9d-WT是有效的抗 α 4 β 7抗体,其可以结合所有实验室生长的HIV毒株和测试的HIV患者样品的病毒粒子包膜上的 α 4 β 7。由Ab-h1.9d-WT和HIV病毒粒子形成的免疫复合物可以通过其Fc结构域结合不同的Fc γ R,该步骤可以使其能够通过吞噬作用被APC摄取以诱导所提出的用于HIV控制的“疫苗接种作用”。

[0402] 尽管Ab-h1.9d-WT结合HIV病毒粒子,但它不中和HIV感染,这与 α 4 β 7不是宿主细胞上的病毒受体的观点一致。通过靶向HIV病毒包膜上的宿主蛋白 α 4 β 7整合素Ab-h1.9d-WT与靶向病毒包膜中的HIV病毒编码的gp120/41糖蛋白的其他抗体(例如,HIV广谱中和抗体)相比,可以表现出更高的耐药屏障。

[0403] Ab-h1.9d-WT可以通过Fab依赖性机制破坏 α 4 β 7与其配体如MadCAM-1或HIV gp120之间的相互作用,抑制由MadCAM-1和gp120介导的CD4 T细胞共刺激,并潜在地抑制这些受刺激细胞中的HIV复制。

[0404] Ab-h1.9d-WT可以通过其破坏 α 4 β 7与HIV gp120之间的相互作用的能力而通过Fab介导的机制潜在地抑制细胞间HIV病毒传播。

[0405] 当与Ab-h1.9d-WT相比时,Ab-Vedo在捕获HIV病毒粒子和破坏 α 4 β 7与HIV gp120之间的相互作用方面表现出较低的活性。此外,尽管Ab-Vedo能够结合HIV病毒粒子形成免疫复合物,但是由于Ab-Vedo Fc结构域中的工程化突变降低了Fc功能,这些免疫复合物以比由Ab-h1.9d-WT形成的复合物低得多的亲和力结合至Fc γ R。

[0406] 维多珠单抗在HIV研究的两项临床研究中表现出适度的功效。这种功效可归因于

Fab依赖性(例如,抗体与 $\alpha 4\beta 7$ 的结合破坏其与其配体如MAdCAM-1和HIV gp120的相互作用,从而抑制CD4⁺ T细胞共刺激和HIV在这些受刺激的细胞中的复制,以及细胞间病毒传递),而不是Fc依赖性作用机制。维多珠单抗对Fc γ R的结合亲和力降低使其在介导Fc依赖性机制方面有缺陷。相反,具有完整Fc功能的Ab-h1.9d-WT可能通过其Fc依赖性作用机制诱导持续性的HIV病毒抑制的能力而与维多珠单抗有积极的区别。由HIV病毒粒子和抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体(具有完整的Fc结构域)形成的免疫复合物与APC上的Fc γ R结合是诱导新的和持久的HIV特异性免疫应答(疫苗接种作用)所必需的。实际上,Ab-h1.9d-WT可以介导THP-1细胞中以 $\alpha 4\beta 7$ 和Fc依赖性方式对 $\alpha 4\beta 7$ 包被的珠或表达 $\alpha 4\beta 7$ 的GFP+VLP(病毒样颗粒)的摄取。总之,Ab-h1.9d-WT在几种所提出的HIV控制作用机制中表现出活性,包括Fc依赖性或Fab依赖性的那些。因此,预计Ab-h1.9d-WT是比维多珠单抗更有效的用于持续降低HIV病毒载量的药剂,因为其对 $\alpha 4\beta 7$ 具有更高的亲和力和其完整的Fc功能性能诱导“疫苗接种作用”。

[0407] 表35中汇总了全面体外表征的Ab-h1.9d-WT的关键属性。

表 35	
Ab-h1.9d-WT 体外表征汇总	
结合 EC ₅₀ (pM)	
HuT78 T 细胞	26
人/食蟹猴淋巴细胞	130/62
人/食蟹猴 CD4+记忆 T 细胞	20/10
人/食蟹猴 CD8+记忆 T 细胞	52/36
MAdCAM-1 阻断效力 IC ₅₀ (pM)	
HuT78 T 细胞	50
人淋巴细胞	223
结合特异性	
$\alpha 4\beta 7$	是
$\alpha 4\beta 1$	否
非特异性结合	
HEK293	否
人和食蟹猴 Fc γ R 结合	
预期的 WT IgG1 结合	
人和食蟹猴 FcRn 结合	
在 pH 6.0 下预期的结合, 在 pH 7.4 下无结合	
体外 Fc 介导的效应器活性	
ADCC	否
ADCC	否
CDC	否

[0409] Ab-h1.9d-WT是拮抗性抗 $\alpha 4\beta 7$ 人IgG1/k单克隆抗体,其结合 $\alpha 4\beta 7$ 但不结合 $\alpha 4\beta 1$ 且最低限度地结合 $\alpha E\beta 7$ 。Ab-h1.9d-WT与人和食蟹猴CD4⁺和CD8⁺T亚群强烈结合,表明优异的食蟹猴结合交叉反应性。然而,Ab-h1.9d-WT不结合啮齿动物PBMC。Ab-h1.9d-WT以高效力选择性地阻断 $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1相互作用而不抑制 $\alpha 4\beta 7$ /VCAM-1相互作用。Ab-h1.9d-WT能够阻断MAdCAM-1介导的对人原代CD4⁺T细胞的共刺激。如针对人IgG1所预期的,Ab-h1.9d-WT于人Fc γ R结合(体内Fc介导的“疫苗接种作用”的必要先决条件),而不在体外触发针对未感染的 $\alpha 4\beta 7$ +细胞的ADCC、ADCP和CDC活性。Ab-h1.9d-WT缺乏体外Fc效应活性可以部分地通过由于抗体诱导的靶内化而导致的细胞表面 $\alpha 4\beta 7$ 表达减少来解释。另外,Ab-h1.9d-WT可以在THP-1细胞中以 $\alpha 4\beta 7$ 依赖性和Fc依赖性方式介导 $\alpha 4\beta 7$ 包被的珠或表达 $\alpha 4\beta 7$ 的VLP(病毒样颗粒)的摄取。

粒)的摄取。Ab-h1.9d-WT表现出临床候选所需的预期体外药理学特性。

[0410] 如本公开中所提供的,Ab-h1.9d-WT是有效的 $\alpha 4\beta 7$ 选择性拮抗剂,其与维多珠单抗不同且有所改善。表36至表40中示出且表41汇总了与Ab-Vedo相比,Ab-h1.9d-WT的关键属性。

表 36 与 Ab-Vedo 相比, Ab-h1.9d-WT 对人和食蟹猴血液来源的 CD4+和 CD8+T 亚群的结合 EC ₅₀							
		CD4+结合 EC ₅₀ pM*			CD8+结合 EC ₅₀ pM*		
		CD4+总计	CD4+初始	CD4+记忆	CD8+总计	CD8+初始	CD8+记忆
[0411]	Ab-h1.9d-WT 人	63 ± 38	84 ± 32	20 ± 12	165 ± 121	144 ± 120	52 ± 51
	食蟹猴	30 ± 16	45 ± 27	10 ± 12	35 ± 25	42 ± 26	36 ± 30
Ab-Vedo	人	381 ± 61	381 ± 101	270 ± 209	658 ± 438	727 ± 725	258 ± 203
	食蟹猴	202 ± 149	228 ± 229	148 ± 229	199 ± 101	256 ± 189	204 ± 125

表 37 与 Ab-Vedo 相比, Ab-h1.9d-WT 对人血液来源的 CD4+和 CD8+T 亚群的结合 EC ₅₀							
		CD4+结合 EC ₅₀ pM*			CD8+结合 EC ₅₀ pM*		
		CD4+总计	CD4+初始	CD4+记忆	CD8+总计	CD8+初始	CD8+记忆
[0412]	Ab-h1.9d-WT 人	63 ± 38	84 ± 32	20 ± 12	165 ± 121	144 ± 120	52 ± 51
	Ab-Vedo 人	381 ± 61	381 ± 101	270 ± 209	658 ± 438	727 ± 725	258 ± 203

[0413] 人PBMC=3个供体

表 38 与 Ab-Vedo 相比, Ab-h1.9d-WT 对食蟹猴血液来源的 CD4+和 CD8+T 亚群的结合 EC ₅₀							
		CD4+结合 EC ₅₀ pM*			CD8+结合 EC ₅₀ pM*		
		CD4+总计	CD4+初始	CD4+记忆	CD8+总计	CD8+初始	CD8+记忆
[0414]	Ab-h1.9d-WT 食蟹猴	30 ± 16	45 ± 27	10 ± 12	35 ± 25	42 ± 26	36 ± 30
	Ab-Vedo 食蟹猴	202 ± 149	228 ± 229	148 ± 229	199 ± 101	256 ± 189	204 ± 125

[0415] 食蟹猴PBMC=5个供体

[0416] CD4+初始=CD4+CD45RA+CCR7+细胞,CD4+记忆=CD4+CD45RA-细胞

[0417] CD8+初始=CD8+CD45RA+CCR7+细胞,CD8+记忆=CD8+CD45RA-细胞

[0418] 表39——通过BIAcore与Ab-Vedo相比,Ab-h1.9d-WT对人Fc γ R的结合亲和力。

表 39 通过 BIAcore 与 Ab-Vedo 相比 Ab-h1.9d-WT 对人 Fc γ R 的结合亲和力						
	Fc γ RI	Fc γ RIIb	Fc γ RIIa 131R	Fc γ RIIa 131H	Fc γ RIIIa158F	Fc γ RIIIa158V
[0419] Ab-h1.9d-WT	7.0E-09	1.2E-05	5.2E-06	4.0E-06	3.1E-06	1.0E-07
Ab-Vedo	无显著结合					

[0420] N=1

[0421] 表40——通过BIAcore与Ab-Vedo相比Ab-h1.9d-WT对食蟹猴Fc γ R的结合亲和力。

表 40 通过 BIAcore 与 Ab-Vedo 相比 Ab-h1.9d-WT 对食蟹猴 Fc γ R 的结合亲和力				
	Cyno Fc γ RI	Cyno Fc γ RIIa	Cyno Fc γ RIIb	Cyno Fc γ RIII
[0422] Ab-h1.9d-WT	1.4E-09	8.2E-06	7.1E-06	1.6E-07
Ab-Vedo	有结合但太弱而无法测量			

[0423] N=1

[0424] 表41——与Ab-Vedo相比,Ab-h1.9d-WT的关键属性。

表 41
Ab-Vedo 相比, Ab-h1.9d-WT 与的关键属性

	Ab-h1.9d-WT	Ab-Vedo
CDR 序列	唯一	
¹ 对 HuT78 细胞的结合 EC50 (流式细胞术)	199 pM	911 pM
² 对人淋巴细胞的结合 EC50	130 ± 85 pM	502 ± 212 pM
² 对人 CD4+Tm 细胞的结合 EC50	20 ± 12 pM	270 ± 209 pM
² 对 cynoCD4+Tm 细胞的结合 EC50	10 ± 12 pM	148 ± 229 pM
[0425] ¹ 对 HuT 78 细胞上的效力 IC50 (基于 FACS 的 MAdCAM-1 结合阻断)	50 ± 11 pM	193 ± 46 pM
² 对人类淋巴细胞的效力 IC50 (基于板的对 MAdCAM-1 的细胞粘附阻断)	223 ± 86 pM	630 ± 193 pM
结合特异性	与 α4β7 结合 不与 α4β1 结合	与 α4β7 结合 不与 α4β1 结合
人和 cyno FcγR 结合	按预期结合人 IgG1	无显著结合
体外 Fc 介导的 ADCC、ADCP 和 CDC 活性	无活性	无活性
人和 cyno FcRn 结合	在 pH 6 时结合	在 pH 6 时结合

[0426] ¹EC50和IC50值基于≥3次独立的实验

[0427] ²结合EC50值基于从≥3个供体分离的PBMC

[0428] Ab-h1.9d-WT的主要参数,诸如其对α4β7更好的结合亲和力以及其结合人Fc γ R而不触发Fc介导的效应器功能的能力,是与维多珠单抗的关键分化因素,并且预期这些特征推动相比维多珠单抗而改善的效力。Ab-h1.9d-WT还具有抗α4β7临床候选物所需的体外药理学属性。

[0429] 8. 示例性实施例

[0430] 虽然已经图示和描述了各种特定实施例,并且下文作为示范而示出了一些,但是应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以进行各种改变。

[0431] 1. 一种抗人α4β7抗体,其包含(i)包含三个CDR的VH链区;以及(ii)包含三个CDR的VL链区,其中:

[0432] VH CDR#1是GFNIKNTYMH (SEQ ID NO:72);

[0433] VH CDR#2是RIDPAKGHTYAPKFLG (SEQ ID NO:73);

[0434] VH CDR#3是VDV (SEQ ID NO:74);

[0435] VL CDR#1是HASQDISDNIG (SEQ ID NO:75);

[0436] VL CDR#2是HGTNLED (SEQ ID NO:76);以及

[0437] VL CDR#3是VQYAQFPWT (SEQ ID NO:77)。

[0438] 2. 根据实施例1所述的抗人α4β7抗体,其包含:

[0439] VH链区:

[0440] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFNIKNTYMHVVRQAPGQGLEWIGRIDPAKGHTYAPKFLGRV
TITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCYVVDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:70);以及

[0441] VL链区:

[0442] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISDNIGWLQKPKGSFKLLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSG
TDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:71)。

[0443] 3. 根据实施例1或2所述的抗人α4β7抗体,其是人源化的。

[0444] 4. 根据实施例1至3中任一个所述的抗人α4β7抗体,其为IgG。

- [0445] 5. 根据实施例1至4中任一所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其包含 κ 轻链恒定区。
- [0446] 6. 根据实施例1至5中任一所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其为IgG₁。
- [0447] 7. 根据实施例1至6中任一所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其包含具有氨基酸取代D356E和L358M的变体CH3结构域。
- [0448] 8. 根据实施例1至7中任一所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其包含具有SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链以及具有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的轻链。
- [0449] 9. 根据实施例1至8中任一所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其包含具有氨基酸取代L234A和/或L235A的变体CH2结构域。
- [0450] 10. 根据实施例1至9中任一所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其包含具有氨基酸取代T250Q的变体CH2结构域和/或具有氨基酸取代M428L的变体CH3结构域。
- [0451] 11. 一种包含编码抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的核苷酸序列的多核苷酸,其中所述抗体包含 (i) 包含三个CDR的VH链区;以及(ii) 包含三个CDR的VL链区,其中:
- [0452] VH CDR#1是GFNIKNTYMH (SEQ ID NO:72);
- [0453] VH CDR#2是RIDPAKGHTYAPKFLG (SEQ ID NO:73);
- [0454] VH CDR#3是VDV (SEQ ID NO:74);
- [0455] VL CDR#1是HASQDISDNIG (SEQ ID NO:75);
- [0456] VL CDR#2是HGTNLED (SEQ ID NO:76);以及
- [0457] VL CDR#3是VQYAQFPWT (SEQ ID NO:77)。
- [0458] 12. 一种包含实施例11所述的多核苷酸的表达载体。
- [0459] 13. 一种用实施例12所述的载体转染的真核宿主细胞。
- [0460] 14. 一种被工程化改造成表达实施例11所述的多核苷酸的真核宿主细胞。
- [0461] 15. 根据实施例13或14所述的真核宿主细胞,其是哺乳动物宿主细胞。
- [0462] 16. 一种生产抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的方法,其包含:(a) 培养实施例15所述的真核宿主细胞以及(b) 回收抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。
- [0463] 17. 一种用实施例12所述的载体转化的原核宿主细胞。
- [0464] 18. 一种原核宿主细胞,其被工程化改造成表达实施例17所述的多核苷酸。
- [0465] 19. 根据实施例18所述的原核宿主细胞,其是细菌宿主细胞。
- [0466] 20. 一种生产抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的方法,其包含:(a) 培养实施例19所述的原核宿主细胞,以及(b) 回收抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。
- [0467] 21. 一种在感染HIV的受试者中诱导对HIV感染的病毒抑制的方法,其包含向受试者施用一定量的实施例1至10中任一所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。
- [0468] 22. 根据实施例21所述的方法,其中病毒抑制是免疫介导的。
- [0469] 23. 一种在感染HIV的受试者中治疗HIV感染的方法,其包含向所述受试者施用一定量的实施例1至10中任一所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。
- [0470] 24. 一种抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其抑制HIV。
- [0471] 25. 根据实施例24所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其抑制HIV复制和/或HIV感染。
- [0472] 26. 根据实施例24所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其使人 $\alpha 4\beta 7$ 在表达人 $\alpha 4\beta 7$ 的细胞上的活化失活和/或降低。
- [0473] 27. 根据实施例24所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其诱导人 $\alpha 4\beta 7$ 在表达人 $\alpha 4\beta 7$ 的细胞上内

化。

[0474] 28. 根据实施例24所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其抑制CD4 T细胞共刺激。

[0475] 29. 根据实施例28所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中CD4 T细胞共刺激是由MAdCAM-1或HIV gp120介导的。

[0476] 30. 根据实施例25所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其抑制CD4 T细胞中的HIV复制。

[0477] 31. 根据实施例30所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中CD4 T细胞是MAdCAM-1刺激的CD4 T细胞或HIV gp120刺激的CD4 T细胞。

[0478] 32. 根据实施例24所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其破坏 $\alpha 4\beta 7$ 与其至少一种配体的相互作用。

[0479] 33. 根据实施例32所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中 $\alpha 4\beta 7$ 配体是MAdCAM-1。

[0480] 34. 根据实施例32所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中 $\alpha 4\beta 7$ 配体是HIV gp120。

[0481] 35. 根据实施例34所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其抑制gp120介导的HIV细胞间传播。

[0482] 36. 根据实施例24所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其与HIV病毒粒子结合。

[0483] 37. 根据实施例36所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中抗体与HIV病毒粒子结合形成免疫复合物。

[0484] 38. 根据实施例37所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中免疫复合物与细胞上的Fc γ R结合。

[0485] 39. 根据实施例37所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中免疫复合物与抗原呈递细胞(APC)上的Fc γ R结合。

[0486] 40. 根据实施例39所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中免疫复合物通过吞噬作用被APC摄取。

[0487] 41. 根据实施例40所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其诱导HIV特异性的免疫应答。

[0488] 42. 根据实施例40或41所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其诱导针对HIV的疫苗接种作用。

[0489] 43. 根据实施例41所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中HIV特异性的免疫应答导致对HIV感染个体中HIV的病毒控制。

[0490] 44. 根据实施例43所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中病毒控制导致病毒载量降低。

[0491] 45. 根据实施例43所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中病毒控制导致病毒载量调定点更低。

[0492] 46. 根据实施例43所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中病毒控制导致抗逆转录病毒治疗中断(ATI)后病毒反弹延迟。

[0493] 47. 根据实施例24至46中任一个所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其具有来自抗体的一组六个互补决定区(CDR)或可变重链区和可变轻链区,所述抗体选自以下:Ab-m1、Ab-c1、Ab-h1.1、Ab-h1.2、Ab-h1.3、Ab-h1.4、Ab-h1.5、Ab-h1.6、Ab-h1.7、Ab-h1.8、Ab-h1.9、Ab-h1.9a、Ab-h1.9b、Ab-h1.9c、Ab-h1.gd或Ab-h1.9e。

[0494] 48. 根据实施例1至10中任一个所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其抑制HIV。

[0495] 49. 根据实施例48所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其抑制HIV复制和/或HIV感染。

[0496] 50. 根据实施例48所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其使人 $\alpha 4\beta 7$ 在表达人 $\alpha 4\beta 7$ 的细胞上的活化失活和/或降低。

[0497] 51. 根据实施例48所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其诱导人 $\alpha 4\beta 7$ 在表达人 $\alpha 4\beta 7$ 的细胞上内化。

[0498] 52. 根据实施例48所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其抑制CD4 T细胞共刺激。

- [0499] 53. 根据实施例52所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中CD4 T细胞共刺激是由MAdCAM-1或HIV gp120介导的。
- [0500] 54. 根据实施例49所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其抑制CD4 T细胞中的HIV复制。
- [0501] 55. 根据实施例54所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中CD4 T细胞是MAdCAM-1刺激的CD4 T细胞或HIV gp120刺激的CD4 T细胞。
- [0502] 56. 根据实施例48所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其破坏 $\alpha 4\beta 7$ 与其至少一种配体的相互作用。
- [0503] 57. 根据实施例56所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中 $\alpha 4\beta 7$ 配体是MAdCAM-1。
- [0504] 58. 根据实施例56所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中 $\alpha 4\beta 7$ 配体是HIV gp120。
- [0505] 59. 根据实施例58所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其抑制gp120介导的HIV细胞间传播。
- [0506] 60. 根据实施例48所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其与HIV病毒粒子结合。
- [0507] 61. 根据实施例60所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中抗体与HIV病毒粒子结合形成免疫复合物。
- [0508] 62. 根据实施例61所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中免疫复合物与细胞上的Fc γ R结合。
- [0509] 63. 根据实施例61所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中免疫复合物与抗原呈递细胞 (APC) 上的Fc γ R结合。
- [0510] 64. 根据实施例63所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中免疫复合物通过吞噬作用被APC摄取。
- [0511] 65. 根据实施例64所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其诱导HIV特异性的免疫应答。
- [0512] 66. 根据实施例64或65所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其诱导针对HIV的疫苗接种作用。
- [0513] 67. 根据实施例64或65所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中HIV特异性的免疫应答导致对HIV感染个体中HIV的病毒控制。
- [0514] 68. 根据实施例67所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中病毒控制导致病毒载量降低。
- [0515] 69. 根据实施例67所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中病毒控制导致病毒载量调定点更低。
- [0516] 70. 根据实施例67所述的抗人 $\alpha 4\beta 7$ 抗体,其中病毒控制导致抗逆转录病毒治疗中断 (ATI) 后病毒反弹延迟。
- [0517] 71. 一种药物组合物,其包含前述实施例中任一个所述的抗体。

序列表

<110> AbbVie公司(AbbVie Inc.)

<120> 抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体

<130> 397835-483W0 (184835)

<150> US 63/052,933

<151> 2020-07-16

<160> 100

<170> PatentIn版本 3.5

<210> 1

<211> 1032

<212> PRT

<213> 人类

<400> 1

```

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

```

195	200	205
Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Ser Tyr Trp Thr Gly Ser		
210	215	220
Leu Phe Val Tyr Asn Ile Thr Thr Asn Lys Tyr Lys Ala Phe Leu Asp		
225	230	235
Lys Gln Asn Gln Val Lys Phe Gly Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val Gly		
245	250	255
Ala Gly His Phe Arg Ser Gln His Thr Thr Glu Val Val Gly Gly Ala		
260	265	270
Pro Gln His Glu Gln Ile Gly Lys Ala Tyr Ile Phe Ser Ile Asp Glu		
275	280	285
Lys Glu Leu Asn Ile Leu His Glu Met Lys Gly Lys Lys Leu Gly Ser		
290	295	300
Tyr Phe Gly Ala Ser Val Cys Ala Val Asp Leu Asn Ala Asp Gly Phe		
305	310	315
Ser Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Gln Ser Thr Ile Arg Glu Glu		
325	330	335
Gly Arg Val Phe Val Tyr Ile Asn Ser Gly Ser Gly Ala Val Met Asn		
340	345	350
Ala Met Glu Thr Asn Leu Val Gly Ser Asp Lys Tyr Ala Ala Arg Phe		
355	360	365
Gly Glu Ser Ile Val Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asn Asp Gly Phe Glu		
370	375	380
Asp Val Ala Ile Gly Ala Pro Gln Glu Asp Asp Leu Gln Gly Ala Ile		
385	390	395
Tyr Ile Tyr Asn Gly Arg Ala Asp Gly Ile Ser Ser Thr Phe Ser Gln		
405	410	415
Arg Ile Glu Gly Leu Gln Ile Ser Lys Ser Leu Ser Met Phe Gly Gln		
420	425	430
Ser Ile Ser Gly Gln Ile Asp Ala Asp Asn Asn Gly Tyr Val Asp Val		
435	440	445
Ala Val Gly Ala Phe Arg Ser Asp Ser Ala Val Leu Leu Arg Thr Arg		
450	455	460
Pro Val Val Ile Val Asp Ala Ser Leu Ser His Pro Glu Ser Val Asn		
465	470	475
Arg Thr Lys Phe Asp Cys Val Glu Asn Gly Trp Pro Ser Val Cys Ile		
485	490	495
Asp Leu Thr Leu Cys Phe Ser Tyr Lys Gly Lys Glu Val Pro Gly Tyr		
500	505	510

Ile Val Leu Phe Tyr Asn Met Ser Leu Asp Val Asn Arg Lys Ala Glu		
515	520	525
Ser Pro Pro Arg Phe Tyr Phe Ser Ser Asn Gly Thr Ser Asp Val Ile		
530	535	540
Thr Gly Ser Ile Gln Val Ser Ser Arg Glu Ala Asn Cys Arg Thr His		
545	550	555
Gln Ala Phe Met Arg Lys Asp Val Arg Asp Ile Leu Thr Pro Ile Gln		
565	570	575
Ile Glu Ala Ala Tyr His Leu Gly Pro His Val Ile Ser Lys Arg Ser		
580	585	590
Thr Glu Glu Phe Pro Pro Leu Gln Pro Ile Leu Gln Gln Lys Lys Glu		
595	600	605
Lys Asp Ile Met Lys Lys Thr Ile Asn Phe Ala Arg Phe Cys Ala His		
610	615	620
Glu Asn Cys Ser Ala Asp Leu Gln Val Ser Ala Lys Ile Gly Phe Leu		
625	630	635
Lys Pro His Glu Asn Lys Thr Tyr Leu Ala Val Gly Ser Met Lys Thr		
645	650	655
Leu Met Leu Asn Val Ser Leu Phe Asn Ala Gly Asp Asp Ala Tyr Glu		
660	665	670
Thr Thr Leu His Val Lys Leu Pro Val Gly Leu Tyr Phe Ile Lys Ile		
675	680	685
Leu Glu Leu Glu Glu Lys Gln Ile Asn Cys Glu Val Thr Asp Asn Ser		
690	695	700
Gly Val Val Gln Leu Asp Cys Ser Ile Gly Tyr Ile Tyr Val Asp His		
705	710	715
Leu Ser Arg Ile Asp Ile Ser Phe Leu Leu Asp Val Ser Ser Leu Ser		
725	730	735
Arg Ala Glu Glu Asp Leu Ser Ile Thr Val His Ala Thr Cys Glu Asn		
740	745	750
Glu Glu Glu Met Asp Asn Leu Lys His Ser Arg Val Thr Val Ala Ile		
755	760	765
Pro Leu Lys Tyr Glu Val Lys Leu Thr Val His Gly Phe Val Asn Pro		
770	775	780
Thr Ser Phe Val Tyr Gly Ser Asn Asp Glu Asn Glu Pro Glu Thr Cys		
785	790	795
Met Val Glu Lys Met Asn Leu Thr Phe His Val Ile Asn Thr Gly Asn		
805	810	815
Ser Met Ala Pro Asn Val Ser Val Glu Ile Met Val Pro Asn Ser Phe		

820	825	830
Ser Pro Gln Thr Asp Lys Leu Phe Asn Ile Leu Asp Val Gln Thr Thr		
835	840	845
Thr Gly Glu Cys His Phe Glu Asn Tyr Gln Arg Val Cys Ala Leu Glu		
850	855	860
Gln Gln Lys Ser Ala Met Gln Thr Leu Lys Gly Ile Val Arg Phe Leu		
865	870	875
Ser Lys Thr Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Cys Ile Lys Ala Asp Pro His		
885	890	895
Cys Leu Asn Phe Leu Cys Asn Phe Gly Lys Met Glu Ser Gly Lys Glu		
900	905	910
Ala Ser Val His Ile Gln Leu Glu Gly Arg Pro Ser Ile Leu Glu Met		
915	920	925
Asp Glu Thr Ser Ala Leu Lys Phe Glu Ile Arg Ala Thr Gly Phe Pro		
930	935	940
Glu Pro Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn Lys Asp Glu Asn Val Ala		
945	950	955
His Val Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln Arg Pro Lys Arg Tyr Phe		
965	970	975
Thr Ile Val Ile Ile Ser Ser Ser Leu Leu Leu Gly Leu Ile Val Leu		
980	985	990
Leu Leu Ile Ser Tyr Val Met Trp Lys Ala Gly Phe Phe Lys Arg Gln		
995	1000	1005
Tyr Lys Ser Ile Leu Gln Glu Glu Asn Arg Arg Asp Ser Trp Ser		
1010	1015	1020
Tyr Ile Asn Ser Lys Ser Asn Asp Asp		
1025	1030	
<210> 2		
<211> 195		
<212> PRT		
<213> 人类		
<400> 2		
Met Ala Trp Glu Ala Arg Arg Glu Pro Gly Pro Arg Arg Ala Ala Val		
1	5	10
Arg Glu Thr Val Met Leu Leu Leu Cys Leu Gly Val Pro Thr Gly Arg		
20	25	30
Pro Tyr Asn Val Asp Thr Glu Ser Ala Leu Leu Tyr Gln Gly Pro His		
35	40	45
Asn Thr Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ala Asn		

50	55	60
Arg Trp Leu Leu Val Gly Ala Pro Thr Ala Asn Trp Leu Ala Asn Ala		
65	70	75
Ser Val Ile Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg Cys Arg Ile Gly Lys Asn		80
85	90	95
Pro Gly Gln Thr Cys Glu Gln Leu Gln Leu Gly Ser Pro Asn Gly Glu		
100	105	110
Pro Cys Gly Lys Thr Cys Leu Glu Glu Arg Asp Asn Gln Trp Leu Gly		
115	120	125
Val Thr Leu Ser Arg Gln Pro Gly Glu Asn Gly Ser Ile Val Thr Cys		
130	135	140
Gly His Arg Trp Lys Asn Ile Phe Tyr Ile Lys Asn Glu Asn Lys Leu		
145	150	155
Pro Thr Gly Gly Cys Tyr Gly Val Pro Pro Asp Leu Arg Thr Glu Leu		
165	170	175
Ser Lys Arg Ile Ala Pro Cys Tyr Gln Gly Ser Ile Ser Lys Tyr Arg		
180	185	190
Ala Arg Thr		
195		
<210> 3		
<211> 798		
<212> PRT		
<213> 人类		
<400> 3		
Met Val Ala Leu Pro Met Val Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Ser Arg		
1	5	10
Gly Glu Ser Glu Leu Asp Ala Lys Ile Pro Ser Thr Gly Asp Ala Thr		15
20	25	30
Glu Trp Arg Asn Pro His Leu Ser Met Leu Gly Ser Cys Gln Pro Ala		
35	40	45
Pro Ser Cys Gln Lys Cys Ile Leu Ser His Pro Ser Cys Ala Trp Cys		
50	55	60
Lys Gln Leu Asn Phe Thr Ala Ser Gly Glu Ala Glu Ala Arg Arg Cys		
65	70	75
Ala Arg Arg Glu Glu Leu Leu Ala Arg Gly Cys Pro Leu Glu Glu Leu		80
85	90	95
Glu Glu Pro Arg Gly Gln Gln Glu Val Leu Gln Asp Gln Pro Leu Ser		
100	105	110
Gln Gly Ala Arg Gly Glu Gly Ala Thr Gln Leu Ala Pro Gln Arg Val		

115	120	125
Arg Val Thr Leu Arg Pro Gly Glu Pro Gln Gln Leu Gln Val Arg Phe		
130	135	140
Leu Arg Ala Glu Gly Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu		
145	150	155
Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu Arg Val Arg Gln Leu Gly His		
165	170	175
Ala Leu Leu Val Arg Leu Gln Glu Val Thr His Ser Val Arg Ile Gly		
180	185	190
Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Thr Val Leu Pro Phe Val Ser Thr Val		
195	200	205
Pro Ser Lys Leu Arg His Pro Cys Pro Thr Arg Leu Glu Arg Cys Gln		
210	215	220
Ser Pro Phe Ser Phe His His Val Leu Ser Leu Thr Gly Asp Ala Gln		
225	230	235
Ala Phe Glu Arg Glu Val Gly Arg Gln Ser Val Ser Gly Asn Leu Asp		
245	250	255
Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Leu Gln Ala Ala Leu Cys Gln		
260	265	270
Glu Gln Ile Gly Trp Arg Asn Val Ser Arg Leu Leu Val Phe Thr Ser		
275	280	285
Asp Asp Thr Phe His Thr Ala Gly Asp Gly Lys Leu Gly Gly Ile Phe		
290	295	300
Met Pro Ser Asp Gly His Cys His Leu Asp Ser Asn Gly Leu Tyr Ser		
305	310	315
Arg Ser Thr Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Val Gly Gln Val Ala Gln Ala		
325	330	335
Leu Ser Ala Ala Asn Ile Gln Pro Ile Phe Ala Val Thr Ser Ala Ala		
340	345	350
Leu Pro Val Tyr Gln Glu Leu Ser Lys Leu Ile Pro Lys Ser Ala Val		
355	360	365
Gly Glu Leu Ser Glu Asp Ser Ser Asn Val Val Gln Leu Ile Met Asp		
370	375	380
Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr Leu Glu His Ser Ser Leu		
385	390	395
Pro Pro Gly Val His Ile Ser Tyr Glu Ser Gln Cys Glu Gly Pro Glu		
405	410	415
Lys Arg Glu Gly Lys Ala Glu Asp Arg Gly Gln Cys Asn His Val Arg		
420	425	430

Ile Asn Gln Thr Val Thr Phe Trp Val Ser Leu Gln Ala Thr His Cys			
435	440	445	
Leu Pro Glu Pro His Leu Leu Arg Leu Arg Ala Leu Gly Phe Ser Glu			
450	455	460	
Glu Leu Ile Val Glu Leu His Thr Leu Cys Asp Cys Asn Cys Ser Asp			
465	470	475	480
Thr Gln Pro Gln Ala Pro His Cys Ser Asp Gly Gln Gly His Leu Gln			
	485	490	495
Cys Gly Val Cys Ser Cys Ala Pro Gly Arg Leu Gly Arg Leu Cys Glu			
	500	505	510
Cys Ser Val Ala Glu Leu Ser Ser Pro Asp Leu Glu Ser Gly Cys Arg			
	515	520	525
Ala Pro Asn Gly Thr Gly Pro Leu Cys Ser Gly Lys Gly His Cys Gln			
	530	535	540
Cys Gly Arg Cys Ser Cys Ser Gly Gln Ser Ser Gly His Leu Cys Glu			
545	550	555	560
Cys Asp Asp Ala Ser Cys Glu Arg His Glu Gly Ile Leu Cys Gly Gly			
	565	570	575
Phe Gly Arg Cys Gln Cys Gly Val Cys His Cys His Ala Asn Arg Thr			
	580	585	590
Gly Arg Ala Cys Glu Cys Ser Gly Asp Met Asp Ser Cys Ile Ser Pro			
	595	600	605
Glu Gly Gly Leu Cys Ser Gly His Gly Arg Cys Lys Cys Asn Arg Cys			
610	615	620	
Gln Cys Leu Asp Gly Tyr Tyr Gly Ala Leu Cys Asp Gln Cys Pro Gly			
625	630	635	640
Cys Lys Thr Pro Cys Glu Arg His Arg Asp Cys Ala Glu Cys Gly Ala			
	645	650	655
Phe Arg Thr Gly Pro Leu Ala Thr Asn Cys Ser Thr Ala Cys Ala His			
	660	665	670
Thr Asn Val Thr Leu Ala Leu Ala Pro Ile Leu Asp Asp Gly Trp Cys			
	675	680	685
Lys Glu Arg Thr Leu Asp Asn Gln Leu Phe Phe Phe Leu Val Glu Asp			
690	695	700	
Asp Ala Arg Gly Thr Val Val Leu Arg Val Arg Pro Gln Glu Lys Gly			
705	710	715	720
Ala Asp His Thr Gln Ala Ile Val Leu Gly Cys Val Gly Gly Ile Val			
	725	730	735
Ala Val Gly Leu Gly Leu Val Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Val Glu Ile			

740					745					750						
Tyr	Asp	Arg	Arg	Glu	Tyr	Ser	Arg	Phe	Glu	Lys	Glu	Gln	Gln	Gln	Leu	
755					760					765						
Asn	Trp	Lys	Gln	Asp	Ser	Asn	Pro	Leu	Tyr	Lys	Ser	Ala	Ile	Thr	Thr	
770					775					780						
Thr	Ile	Asn	Pro	Arg	Phe	Gln	Glu	Ala	Asp	Ser	Pro	Thr	Leu			
785					790					795						
<210>	4															
<211>	650															
<212>	PRT															
<213>	人类															
<400>	4															
Met	Val	Ala	Leu	Pro	Met	Val	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ser	Arg	
1				5				10				15				
Gly	Glu	Ser	Glu	Leu	Asp	Ala	Lys	Ile	Pro	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala	Thr	
20					25					30						
Glu	Trp	Arg	Asn	Pro	His	Leu	Ser	Met	Leu	Gly	Ser	Cys	Gln	Pro	Ala	
35					40					45						
Pro	Ser	Cys	Gln	Lys	Cys	Ile	Leu	Ser	His	Pro	Ser	Cys	Ala	Trp	Cys	
50					55					60						
Lys	Gln	Leu	Asn	Phe	Thr	Ala	Ser	Gly	Glu	Ala	Glu	Ala	Arg	Arg	Cys	
65					70					75					80	
Ala	Arg	Arg	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Gly	Cys	Pro	Leu	Glu	Glu	Leu	
85					90					95						
Glu	Glu	Pro	Arg	Gly	Gln	Gln	Glu	Val	Leu	Gln	Asp	Gln	Pro	Leu	Ser	
100					105					110						
Gln	Gly	Ala	Arg	Gly	Glu	Gly	Ala	Thr	Gln	Leu	Ala	Pro	Gln	Arg	Val	
115					120					125						
Arg	Val	Thr	Leu	Arg	Pro	Gly	Glu	Pro	Gln	Gln	Leu	Gln	Val	Arg	Phe	
130					135					140						
Leu	Arg	Ala	Glu	Gly	Tyr	Pro	Val	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp	Leu	
145					150					155					160	
Ser	Tyr	Ser	Met	Lys	Asp	Asp	Leu	Glu	Arg	Val	Arg	Gln	Leu	Gly	His	
165					170					175						
Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Leu	Gln	Glu	Val	Thr	His	Ser	Val	Arg	Ile	Gly	
180					185					190						
Phe	Gly	Ser	Phe	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Pro	Phe	Val	Ser	Thr	Val	
195					200					205						
Pro	Ser	Lys	Leu	Arg	His	Pro	Cys	Pro	Thr	Arg	Leu	Glu	Arg	Cys	Gln	

210	215	220
Ser Pro Phe Ser Phe His His Val Leu Ser Leu Thr Gly Asp Ala Gln		
225	230	235
Ala Phe Glu Arg Glu Val Gly Arg Gln Ser Val Ser Gly Asn Leu Asp		240
	245	250
Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Leu Gln Ala Ala Leu Cys Gln		255
	260	265
Glu Gln Ile Gly Trp Arg Asn Val Ser Arg Leu Leu Val Phe Thr Ser		270
	275	280
Asp Asp Thr Phe His Thr Ala Gly Asp Gly Lys Leu Gly Gly Ile Phe		285
290	295	300
Met Pro Ser Asp Gly His Cys His Leu Asp Ser Asn Gly Leu Tyr Ser		
305	310	315
Arg Ser Thr Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Val Gly Gln Val Ala Gln Ala		320
	325	330
Leu Ser Ala Ala Asn Ile Gln Pro Ile Phe Ala Val Thr Ser Ala Ala		335
	340	345
Leu Pro Val Tyr Gln Glu Leu Ser Lys Leu Ile Pro Lys Ser Ala Val		350
355	360	365
Gly Glu Leu Ser Glu Asp Ser Ser Asn Val Val Gln Leu Ile Met Asp		
370	375	380
Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr Leu Glu His Ser Ser Leu		
385	390	395
Pro Pro Gly Val His Ile Ser Tyr Glu Ser Gln Cys Glu Gly Pro Glu		400
	405	410
Lys Arg Glu Gly Lys Ala Glu Asp Arg Gly Gln Cys Asn His Val Arg		415
	420	425
Ile Asn Gln Thr Val Thr Phe Trp Val Ser Leu Gln Ala Thr His Cys		430
	435	440
Leu Pro Glu Pro His Leu Leu Arg Leu Arg Ala Leu Gly Phe Ser Glu		445
	450	455
Glu Leu Ile Val Glu Leu His Thr Leu Cys Asp Cys Asn Cys Ser Asp		
465	470	475
Thr Gln Pro Gln Ala Pro His Cys Ser Asp Gly Gln Gly His Leu Gln		480
	485	490
Cys Gly Val Cys Arg Asp Cys Ala Glu Cys Gly Ala Phe Arg Thr Gly		495
	500	505
Pro Leu Ala Thr Asn Cys Ser Thr Ala Cys Ala His Thr Asn Val Thr		510
515	520	525

Leu Ala Leu Ala Pro Ile Leu Asp Asp Gly Trp Cys Lys Glu Arg Thr
 530 535 540
 Leu Asp Asn Gln Leu Phe Phe Phe Leu Val Glu Asp Asp Ala Arg Gly
 545 550 555 560
 Thr Val Val Leu Arg Val Arg Pro Gln Glu Lys Gly Ala Asp His Thr
 565 570 575
 Gln Ala Ile Val Leu Gly Cys Val Gly Gly Ile Val Ala Val Gly Leu
 580 585 590
 Gly Leu Val Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Val Glu Ile Tyr Asp Arg Arg
 595 600 605
 Glu Tyr Ser Arg Phe Glu Lys Glu Gln Gln Gln Leu Asn Trp Lys Gln
 610 615 620
 Asp Ser Asn Pro Leu Tyr Lys Ser Ala Ile Thr Thr Thr Ile Asn Pro
 625 630 635 640
 Arg Phe Gln Glu Ala Asp Ser Pro Thr Leu
 645 650
 <210> 5
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> 人类
 <400> 5
 Met Asp Phe Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Gly Leu Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Gln Ser Leu Gln Val Lys Pro Leu Gln Val Glu Pro Pro Glu
 20 25 30
 Pro Val Val Ala Val Ala Leu Gly Ala Ser Arg Gln Leu Thr Cys Arg
 35 40 45
 Leu Ala Cys Ala Asp Arg Gly Ala Ser Val Gln Trp Arg Gly Leu Asp
 50 55 60
 Thr Ser Leu Gly Ala Val Gln Ser Asp Thr Gly Arg Ser Val Leu Thr
 65 70 75 80
 Val Arg Asn Ala Ser Leu Ser Ala Ala Gly Thr Arg Val Cys Val Gly
 85 90 95
 Ser Cys Gly Gly Arg Thr Phe Gln His Thr Val Gln Leu Leu Val Tyr
 100 105 110
 Ala Phe Pro Asp Gln Leu Thr Val Ser Pro Ala Ala Leu Val Pro Gly
 115 120 125
 Asp Pro Glu Val Ala Cys Thr Ala His Lys Val Thr Pro Val Asp Pro
 130 135 140

Asn	Ala	Leu	Ser	Phe	Ser	Leu	Leu	Val	Gly	Gly	Gln	Glu	Leu	Glu	Gly
145						150				155					160
Ala	Gln	Ala	Leu	Gly	Pro	Glu	Val	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Pro	Gln
				165				170						175	
Gly	Asp	Glu	Asp	Val	Leu	Phe	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Trp	Arg	Leu	Pro
			180					185					190		
Pro	Leu	Gly	Thr	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Leu	Tyr	Cys	Gln	Ala	Thr	Met
		195					200					205			
Arg	Leu	Pro	Gly	Leu	Glu	Leu	Ser	His	Arg	Gln	Ala	Ile	Pro	Val	Leu
	210						215				220				
His	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Glu	Pro	Pro	Asp	Thr	Thr	Ser	Pro	Glu	Ser
225					230					235					240
Pro	Asp	Thr	Thr	Ser	Pro	Glu	Ser	Pro	Asp	Thr	Thr	Ser	Gln	Glu	Pro
				245					250					255	
Pro	Asp	Thr	Thr	Ser	Pro	Glu	Pro	Pro	Asp	Lys	Thr	Ser	Pro	Glu	Pro
		260						265					270		
Ala	Pro	Gln	Gln	Gly	Ser	Thr	His	Thr	Pro	Arg	Ser	Pro	Gly	Ser	Thr
		275					280						285		
Arg	Thr	Arg	Arg	Pro	Glu	Ile	Ser	Gln	Ala	Gly	Pro	Thr	Gln	Gly	Glu
	290					295					300				
Val	Ile	Pro	Thr	Gly	Ser	Ser	Lys	Pro	Ala	Gly	Asp	Gln	Leu	Pro	Ala
305					310					315					320
Ala	Leu	Trp	Thr	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu
				325					330					335	
Pro	Thr	Tyr	His	Leu	Trp	Lys	Arg	Cys	Arg	His	Leu	Ala	Glu	Asp	Asp
		340						345					350		
Thr	His	Pro	Pro	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Val	Ser	Ala	Trp
		355					360						365		
Ala	Gly	Leu	Arg	Gly	Thr	Gly	Gln	Val	Gly	Ile	Ser	Pro	Ser		
	370					375					380				
<210>	6														
<211>	739														
<212>	PRT														
<213>	人类														
<400>	6														
Met	Pro	Gly	Lys	Met	Val	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Trp
1				5					10					15	
Ile	Met	Phe	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Phe	Lys	Ile	Glu	Thr	Thr	Pro	Glu
			20					25					30		

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

340	345	350
Ser Pro Leu Ser Gly Lys Val Arg Ser Glu Gly Thr Asn Ser Thr Leu		
355	360	365
Thr Leu Ser Pro Val Ser Phe Glu Asn Glu His Ser Tyr Leu Cys Thr		
370	375	380
Val Thr Cys Gly His Lys Lys Leu Glu Lys Gly Ile Gln Val Glu Leu		
385	390	395
Tyr Ser Phe Pro Arg Asp Pro Glu Ile Glu Met Ser Gly Gly Leu Val		
405	410	415
Asn Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Val Pro Ser Val Tyr Pro		
420	425	430
Leu Asp Arg Leu Glu Ile Glu Leu Leu Lys Gly Glu Thr Ile Leu Glu		
435	440	445
Asn Ile Glu Phe Leu Glu Asp Thr Asp Met Lys Ser Leu Glu Asn Lys		
450	455	460
Ser Leu Glu Met Thr Phe Ile Pro Thr Ile Glu Asp Thr Gly Lys Ala		
465	470	475
Leu Val Cys Gln Ala Lys Leu His Ile Asp Asp Met Glu Phe Glu Pro		
485	490	495
Lys Gln Arg Gln Ser Thr Gln Thr Leu Tyr Val Asn Val Ala Pro Arg		
500	505	510
Asp Thr Thr Val Leu Val Ser Pro Ser Ser Ile Leu Glu Glu Gly Ser		
515	520	525
Ser Val Asn Met Thr Cys Leu Ser Gln Gly Phe Pro Ala Pro Lys Ile		
530	535	540
Leu Trp Ser Arg Gln Leu Pro Asn Gly Glu Leu Gln Pro Leu Ser Glu		
545	550	555
Asn Ala Thr Leu Thr Leu Ile Ser Thr Lys Met Glu Asp Ser Gly Val		
565	570	575
Tyr Leu Cys Glu Gly Ile Asn Gln Ala Gly Arg Ser Arg Lys Glu Val		
580	585	590
Glu Leu Ile Ile Gln Val Thr Pro Lys Asp Ile Lys Leu Thr Ala Phe		
595	600	605
Pro Ser Glu Ser Val Lys Glu Gly Asp Thr Val Ile Ile Ser Cys Thr		
610	615	620
Cys Gly Asn Val Pro Glu Thr Trp Ile Ile Leu Lys Lys Lys Ala Glu		
625	630	635
Thr Gly Asp Thr Val Leu Lys Ser Ile Asp Gly Ala Tyr Thr Ile Arg		
645	650	655

Lys Ala Gln Leu Lys Asp Ala Gly Val Tyr Glu Cys Glu Ser Lys Asn
 660 665 670
 Lys Val Gly Ser Gln Leu Arg Ser Leu Thr Leu Asp Val Gln Gly Arg
 675 680 685
 Glu Asn Asn Lys Asp Tyr Phe Ser Pro Glu Leu Leu Val Leu Tyr Phe
 690 695 700
 Ala Ser Ser Leu Ile Ile Pro Ala Ile Gly Met Ile Ile Tyr Phe Ala
 705 710 715 720
 Arg Lys Ala Asn Met Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Val Glu Ala Gln Lys
 725 730 735

Ser Lys Val

<210> 7

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> 以具有三氧杂十三烷-琥珀酰胺酸(Ttds)接头的N-端生物素为特征

<220>

<221> MOD_RES

<222> (42) .. (42)

<223> 酰胺化

<400> 7

Cys Ser Phe Asn Met Thr Thr Glu Leu Arg Asp Lys Lys Gln Lys Val
 1 5 10 15

His Ala Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Ile Val Pro Ile Glu Asp Asn Thr
 20 25 30

Ser Ser Ser Glu Tyr Arg Leu Ile Asn Cys
 35 40

<210> 8

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> 以具有三氧杂十三烷-琥珀酰胺酸(Ttds)接头的N-端生物素为特征
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (42) .. (42)
 <223> 酰胺化
 <400> 8
 Cys Ser Phe Asn Met Thr Thr Glu Leu Arg Asp Lys Lys Gln Lys Val
 1 5 10 15
 His Ala Leu Phe Tyr Lys Ala Ala Ala Pro Ile Glu Asp Asn Thr
 20 25 30
 Ser Ser Ser Glu Tyr Arg Leu Ile Asn Cys
 35 40
 <210> 9
 <400> 9
 000
 <210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 10
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Val Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Lys Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Tyr Tyr Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 <210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asp Asn

20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile

35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

Asn Thr Tyr Met His

1 5

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 13

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro

1 5 10

<210> 14

<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 14
Val Asp Ser
1
<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 15
His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asp Asn Ile Gly
1 5 10
<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 16
His Gly Thr Asn Leu Glu Asp
1 5
<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 17
Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr
1 5
<210> 18
<400> 18
000
<210> 19

<400> 19
000
<210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110
<210> 21
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> VARIANT
<222> (23) .. (23)
<223> K至T
<220>
<221> VARIANT
<222> (24) .. (24)
<223> A至T
<220>
<221> VARIANT

<222> (38) .. (38)
 <223> R至K
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (40) .. (40)
 <223> A至R
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (48) .. (48)
 <223> M至I
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (67) .. (67)
 <223> R至K
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (68) .. (68)
 <223> V至A
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (77) .. (77)
 <223> S至N
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (81) .. (81)
 <223> M至L
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (97) .. (97)
 <223> A至Y
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (98) .. (98)
 <223> R至Y
 <400> 21

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1			5					10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asn	Thr
			20					25					30		

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

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 22

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

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 23

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

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

<210> 24

<400> 24

000

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 25

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

<210> 26

<211> 108

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (36) .. (36)
 <223> Y至L
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (43) .. (43)
 <223> A至S
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (44) .. (44)
 <223> P至F
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (46) .. (46)
 <223> L至G
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (69) .. (69)
 <223> T至A
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (71) .. (71)
 <223> F至Y
 <400> 26

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 27

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

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

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 28

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

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

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

〈213〉 人工序列

<220>
<223> 合成多肽
<400> 34
Val Asp Ser
1
<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 35
His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asp Asn Ile Gly
1 5 10
<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 36
His Gly Thr Asn Leu Glu Asp
1 5
<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 37
Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr
1 5
<210> 38
<400> 38
000
<210> 39
<400> 39
000
<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 40

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

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 41

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

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

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 42

Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr Tyr Met His
1 5 10

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 43

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Lys His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Leu
1 5 10 15

Gly

<210> 44

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 44

Val Ala Ser

1

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 45

His Ala Ser Gln Glu Ile Ser Asp Asn Ile Gly
1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 46

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 47

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 48

<400> 48

000

<210> 49

<400> 49

000

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 50

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Arg Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60

Ser Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Tyr Tyr Val Asp Gln Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 51

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

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 52

Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr Tyr Met His
 1 5 10

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 53

Arg Ile Asp Pro Ala Arg Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Ser

1 5 10 15

Gly

<210> 54

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 54

Val Asp Gln

1

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 55

His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asp Asn Ile Gly

1 5 10

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 56

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 57

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 58

<400> 58

000

<210> 59

<400> 59

000

<210> 60

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 60

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Arg Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60

Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Tyr Tyr Val Ala Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 61

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 61

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys His	Ala Ser Gln Asp	Ile Ser Asp Asn
20	25	30	
Ile Gly Trp Leu	Gln Gln Lys Pro	Gly Lys Ser Phe	Lys Leu Leu Ile
35	40	45	
Tyr His Gly Thr	Asn Leu Glu Asp	Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Tyr Thr	Leu Thr Ile Ser	Ser Leu Gln Pro
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Tyr Cys	Val Gln Tyr Ala	Gln Phe Pro Trp
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly	Gly Thr Lys Val	Glu Ile Lys Arg	Thr Val Ala Ala
100	105	110	
Pro Ser Val Phe	Ile Phe Pro Pro	Ser Asp Glu Gln	Leu Lys Ser Gly
115	120	125	
Thr Ala Ser Val	Val Cys Leu Leu	Asn Asn Phe Tyr	Pro Arg Glu Ala
130	135	140	
Lys Val Gln Trp	Lys Val Asp Asn	Ala Leu Gln Ser	Gly Asn Ser Gln
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser	Lys Asp Ser Thr	Tyr Ser Leu Ser
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala	Asp Tyr Glu Lys	His Lys Val Tyr
180	185	190	
Ala Cys Glu Val	Thr His Gln Gly	Leu Ser Ser Pro	Val Thr Lys Ser
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly	Glu Cys		
210			
<210>	62		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	62		
Gly Phe Asn Ile	Lys Asn Thr Tyr	Met His	
1	5	10	
<210>	63		
<211>	17		
<212>	PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 63

Arg Ile Asp Pro Ala Arg Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Glu

1

5

10

15

Gly

<210> 64

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 64

Val Ala Ser

1

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 65

His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asp Asn Ile Gly

1

5

10

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 66

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp

1

5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 67

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 68

<400> 68

000

<210> 69

<400> 69

000

<210> 70

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 70

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Lys Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60

Leu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Tyr Tyr Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 71

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 71

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 72

Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr Tyr Met His

1	5	10
---	---	----

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 73

Arg Ile Asp Pro Ala Lys Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210> 74

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 74

Val Asp Val

1

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 75

His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asp Asn Ile Gly

1

5

10

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 76

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp

1

5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 77

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr

1

5

<210> 78

<400> 78

000

<210> 79

<400> 79

000

<210> 80

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 80

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

<210> 81

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 81

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

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 82

Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr Tyr Met His

1 5 10

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 83

Arg Ile Asp Pro Ala Gly Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Ile

1 5 10 15

Gly

<210> 84

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 84

Val Ala Ser

1

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 85

His Ala Ser Gln Glu Ile Ser Asp Asn Ile Gly

1 5 10

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 86

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 87

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 88

<400> 88

000

<210> 89

<400> 89

000

<210> 90

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 90

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Lys Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60

Leu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

				85					90					95			
Tyr	Tyr	Val	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
				100					105					110			
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys		
				115					120					125			
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr		
				130					135					140			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser		
145							150				155				160		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser		
				165					170					175			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr		
				180					185					190			
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys		
				195					200					205			
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys		
				210					215					220			
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro		
225							230				235				240		
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys		
				245					250					255			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp		
				260					265					270			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu		
				275					280					285			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		
				290					295					300			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		
305							310				315				320		
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
				325					330					335			
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu		
				340					345					350			
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr		
				355					360					365			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn		
				370					375					380			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe		
385							390				395				400		

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 91
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 91
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Lys Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Leu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Tyr Tyr Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys																	
210							215								220		
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro																	
225							230								235		240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys																	
							245								250		255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp																	
							260								265		270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu																	
							275								280		285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu																	
							290								295		300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn																	
305							310								315		320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly																	
							325								330		335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu																	
							340								345		350
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr																	
							355								360		365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn																	
							370								375		380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe																	
385							390								395		400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn																	
							405								410		415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr																	
							420								425		430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly																	
							435								440		
<210>	92																
<211>	442																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	合成多肽																
<400>	92																
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser																	
1							5								10		15

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

	325		330		335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu					
	340		345		350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr					
	355		360		365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn					
	370		375		380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe					
385		390		395	400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn					
	405		410		415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr					
	420		425		430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	435		440		
<210>	93				
<211>	441				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	合成多肽				
<400>	93				
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser					
1	5		10		15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr					
	20		25		30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Lys Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe					
	50		55		60
Leu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr					
65		70		75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Tyr Tyr Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser					
	100		105		110
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys					
	115		120		125
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr					

130	135	140
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
145	150	155
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
165	170	175
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
180	185	190
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
195	200	205
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
210	215	220
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
225	230	235
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
245	250	255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
260	265	270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
275	280	285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
290	295	300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
305	310	315
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
325	330	335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
340	345	350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
355	360	365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
370	375	380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
385	390	395
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
405	410	415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
420	425	430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	

<210> 94
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 94
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Lys Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Leu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Tyr Tyr Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp																	
			260						265						270		
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu																	
			275						280					285			
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu																	
			290						295					300			
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn																	
305						310					315					320	
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly																	
						325					330					335	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu																	
			340						345							350	
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr																	
			355						360						365		
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn																	
			370						375					380			
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe																	
385						390					395					400	
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn																	
						405					410					415	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr																	
			420						425							430	
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys																	
			435						440								
<210>	95																
<211>	441																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	合成多肽																
<400>	95																
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser																	
1				5					10						15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr																	
			20						25						30		
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile																	
			35						40						45		
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Lys Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe																	
			50						55						60		

Leu	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Tyr	Tyr	Val	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		100					105					110			
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
		115					120					125			
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
	130					135				140					
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
145					150				155					160	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			165					170					175		
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
		180					185					190			
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
	195						200					205			
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
	210					215					220				
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
225					230				235					240	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			245					250				255			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
		260					265					270			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
	275						280				285				
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
	290					295				300					
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
305				310				315						320	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			325					330				335			
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
		340						345				350			
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
	355						360					365			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn

370	375	380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
385	390	395
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		400
405	410	415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
420	425	430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	
<210> 96		
<211> 442		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 96		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr		15
20	25	30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Lys Gly His Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe		
50	55	60
Leu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
85	90	95
Tyr Tyr Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
100	105	110
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
115	120	125
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
130	135	140
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
145	150	155
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		160
165	170	175
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		

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

<210> 97

<211> 441

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 97

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

His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
305					310					315					320
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
					325					330					335
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
					340					345					350
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
385															400
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly							
<210>	98														
<211>	442														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成多肽														
<400>	98														
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1					5				10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asn	Thr
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Lys	Gly	His	Thr	Glu	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe
Leu	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr
65															80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
Tyr	Tyr	Val	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
115	120	125
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
130	135	140
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
145	150	155
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
	165	170
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
	180	185
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	195	200
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
	210	215
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
225	230	235
Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
	245	250
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
	260	265
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
	275	280
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
	290	295
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
305	310	315
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
	325	330
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
	340	345
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	355	360
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	370	375
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
385	390	395
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	405	410
Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		

				420				425				430				
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
				435				440								
<210>	99															
<211>	441															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	合成多肽															
<400>	99															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
1				5					10				15			
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asn	Thr	
				20				25				30				
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35			40						45				
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Lys	Gly	His	Thr	Glu	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe	
			50			55						60				
Leu	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr	
65					70				75				80			
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85				90				95				
Tyr	Tyr	Val	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
				100				105				110				
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
				115				120				125				
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				130				135				140				
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
145					150				155				160			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
				165				170				175				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
				180				185				190				
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				195				200				205				
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				210				215				220				
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	

225	230	235	240
Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	245	250	255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
	260	265	270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	275	280	285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	290	295	300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
305	310	315	320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	325	330	335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
	340	345	350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	355	360	365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	370	375	380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
385	390	395	400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
	405	410	415
Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
	420	425	430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	
<210> 100			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 100			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asp Asn			
	20	25	30
Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Leu Leu Ile			

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

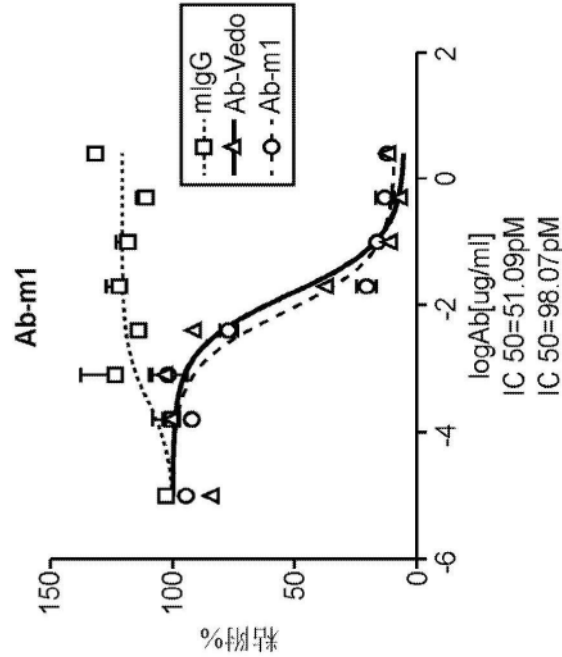


图1

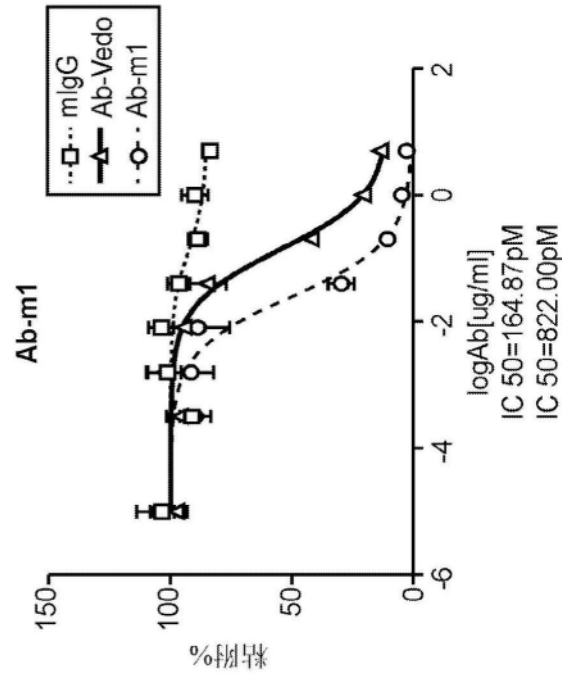


图2

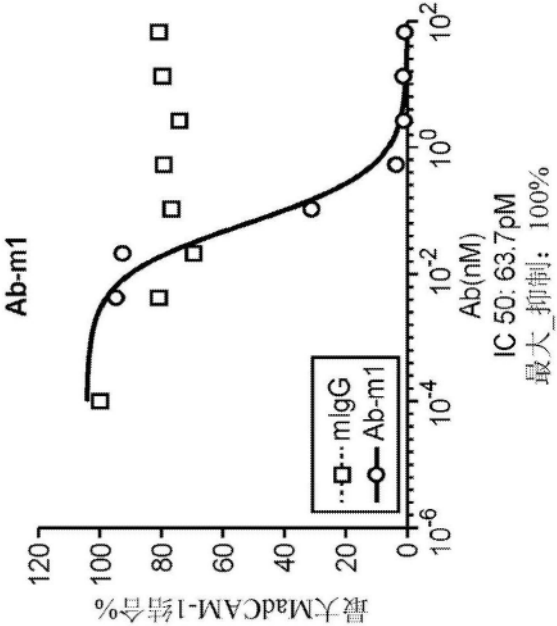


图3

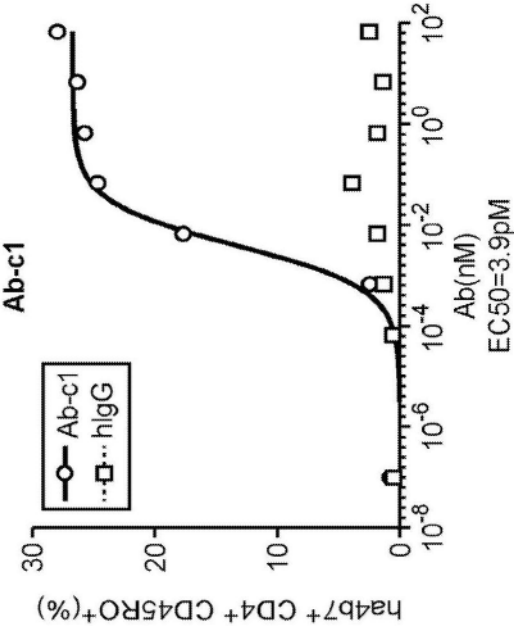


图4

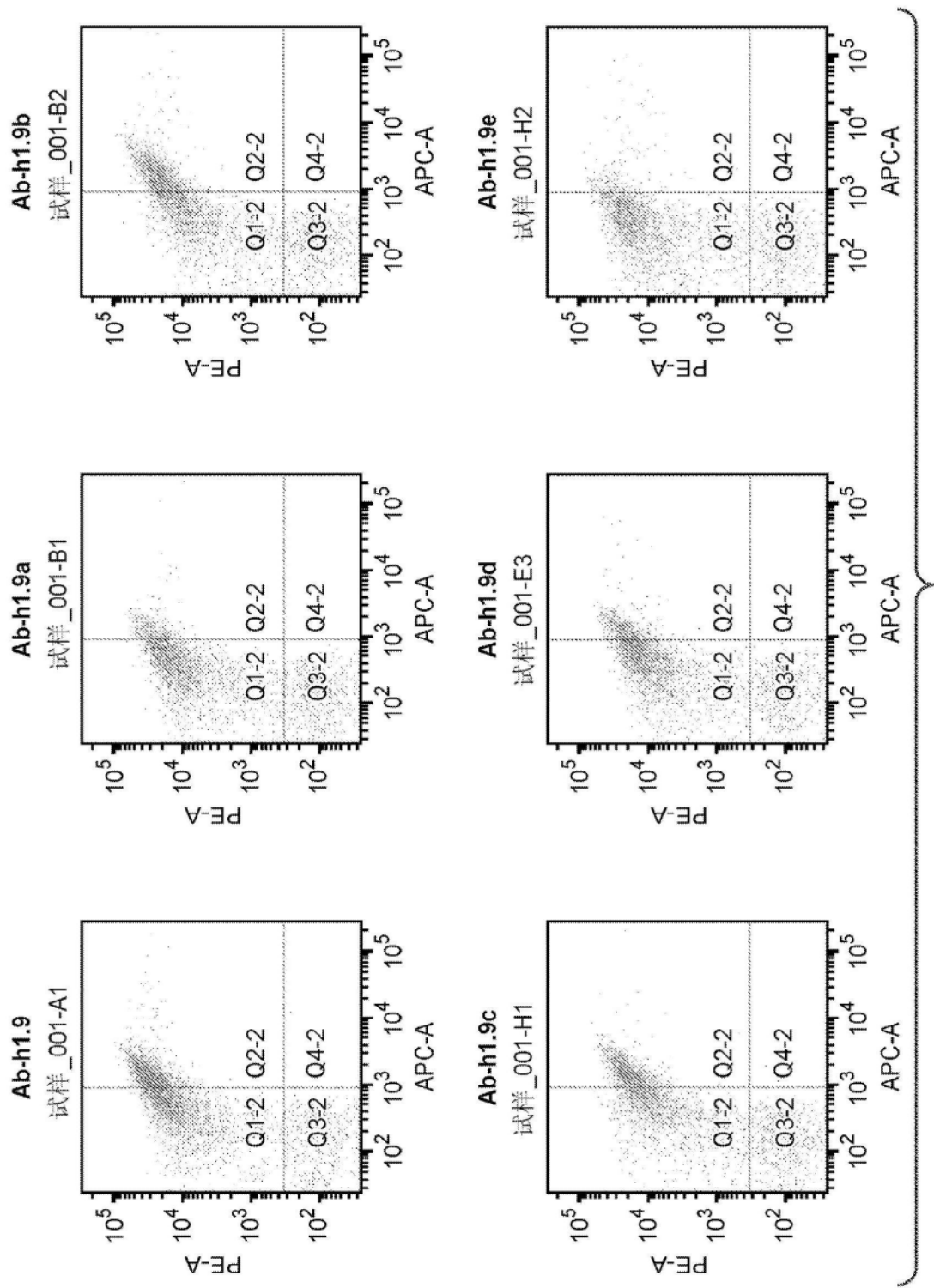


图5

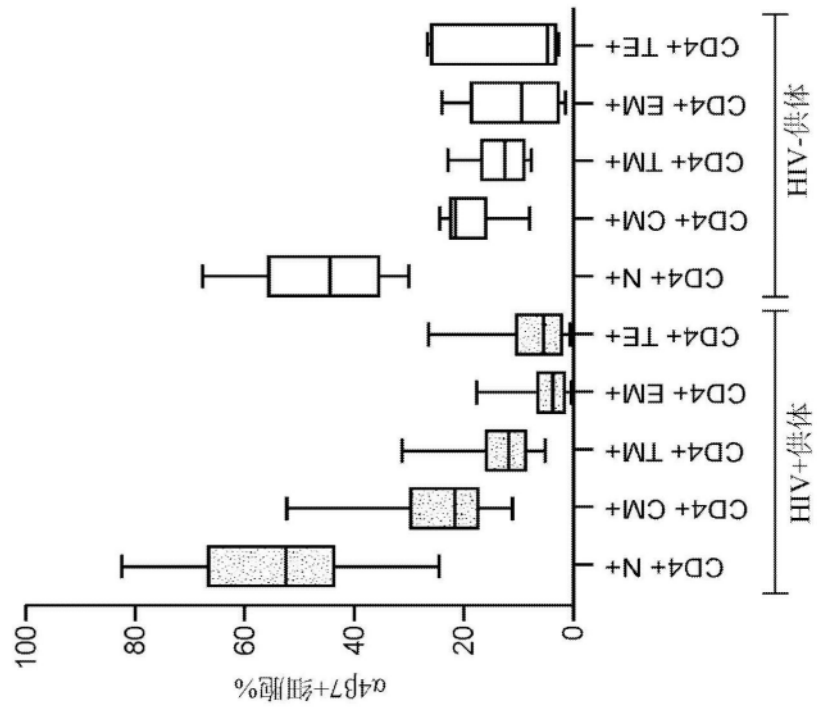


图6A

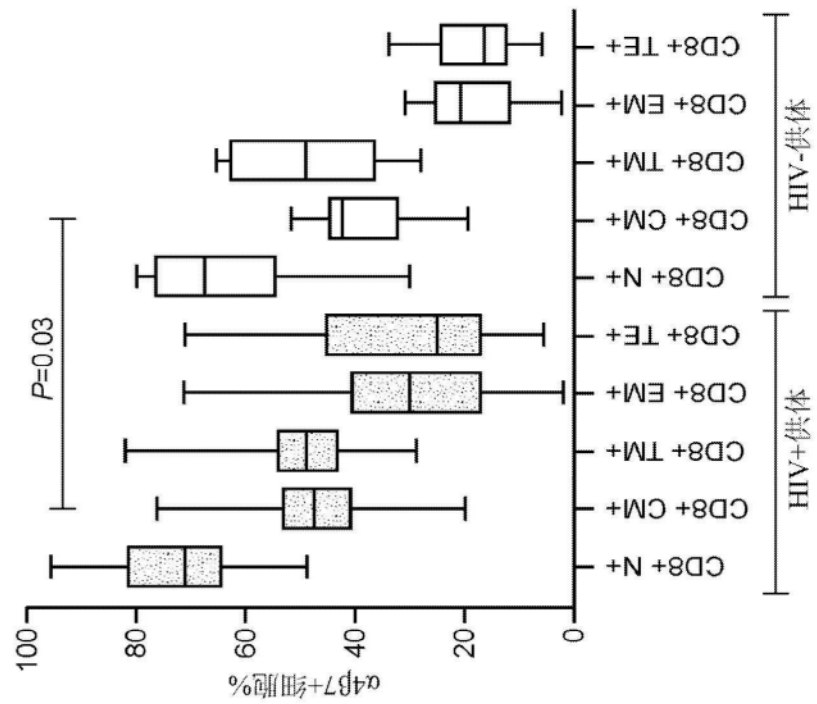


图6B

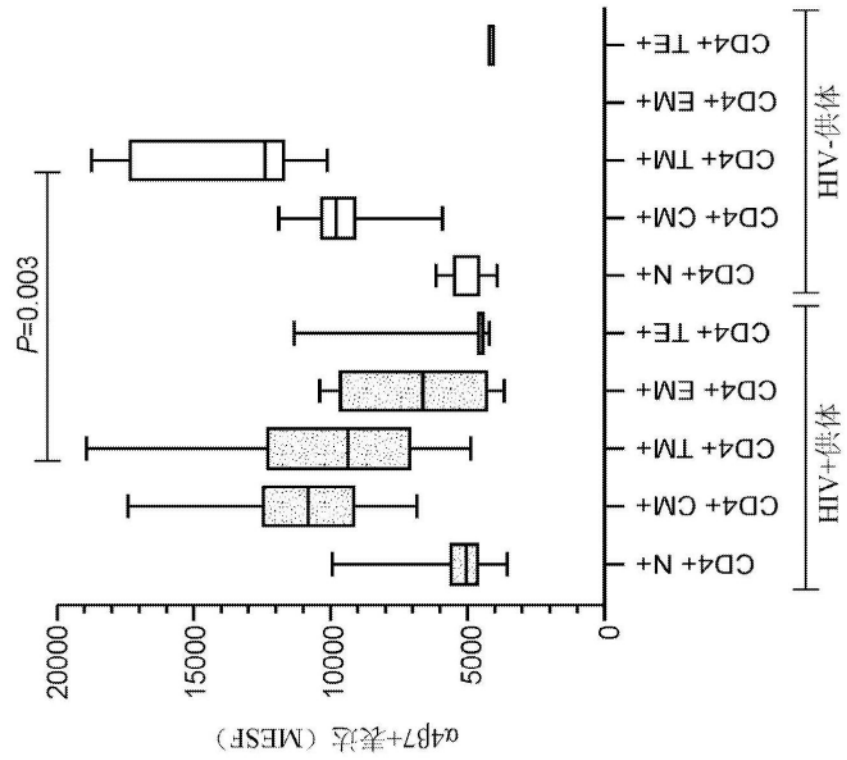


图6C

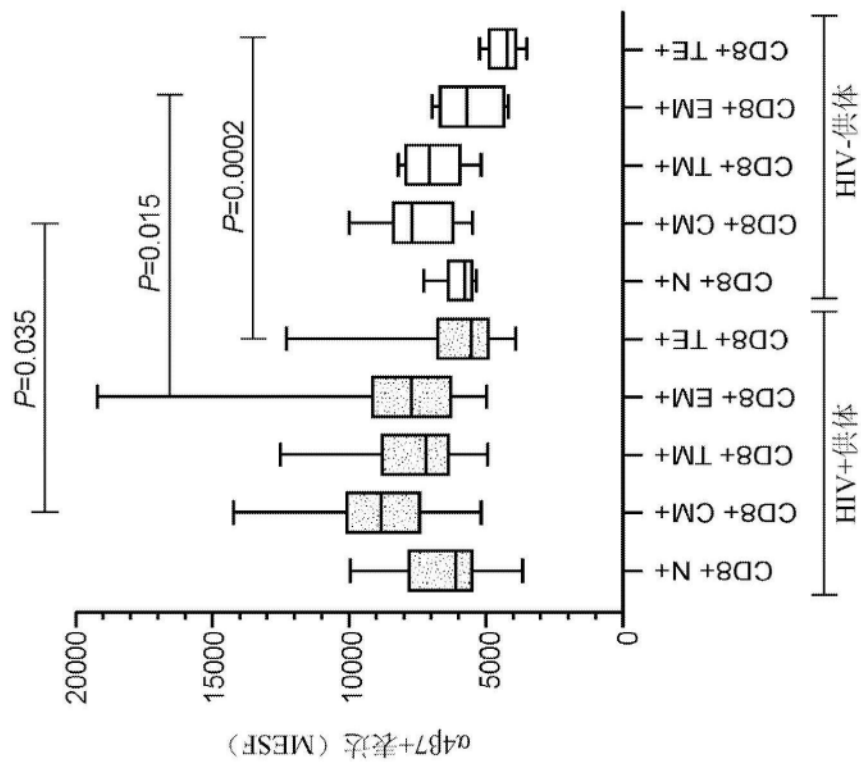


图6D

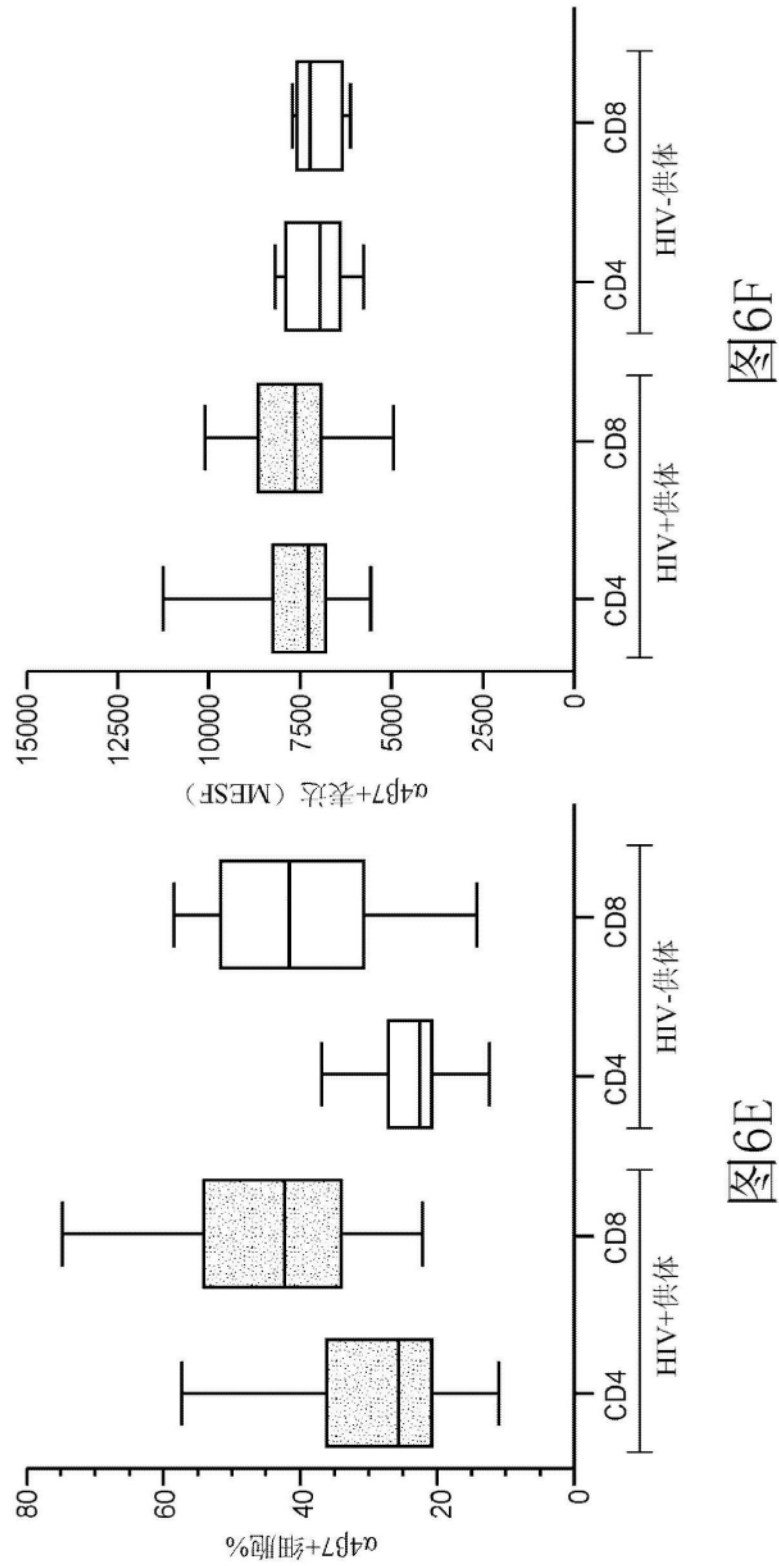


图6F

图6E

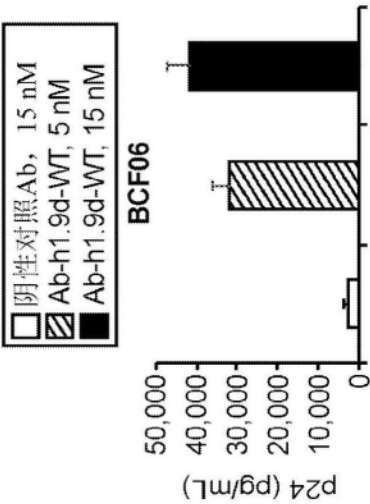


图7A

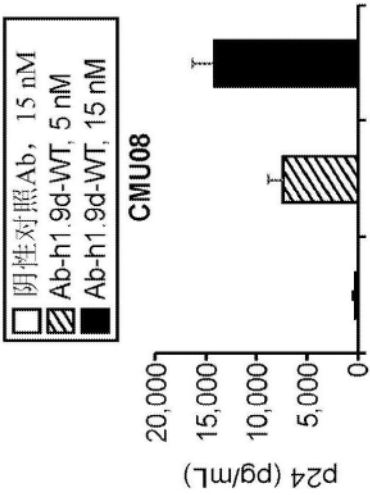


图7B

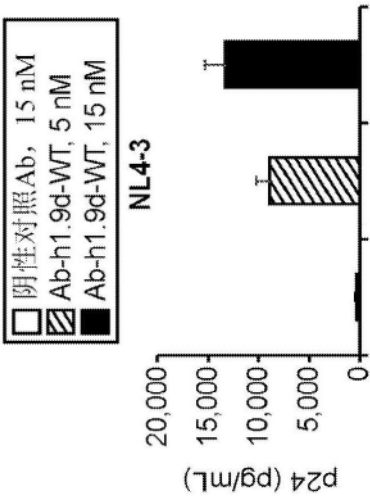


图7C

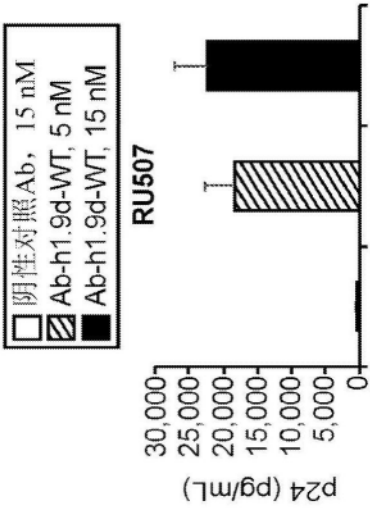


图7D

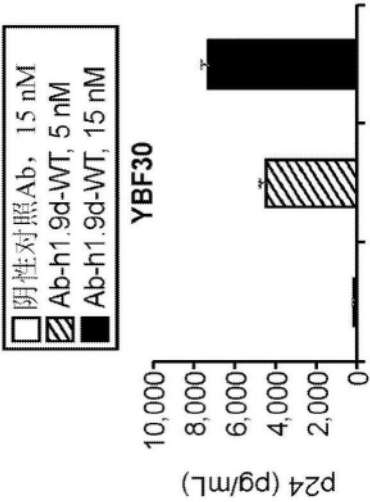


图7E

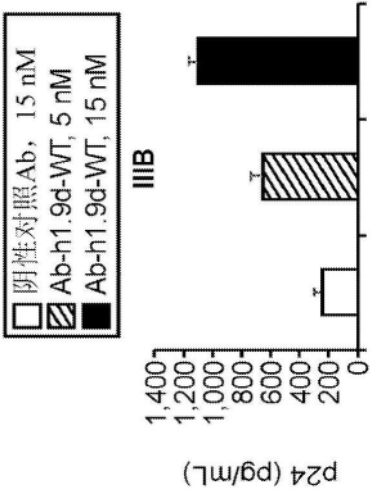


图7F

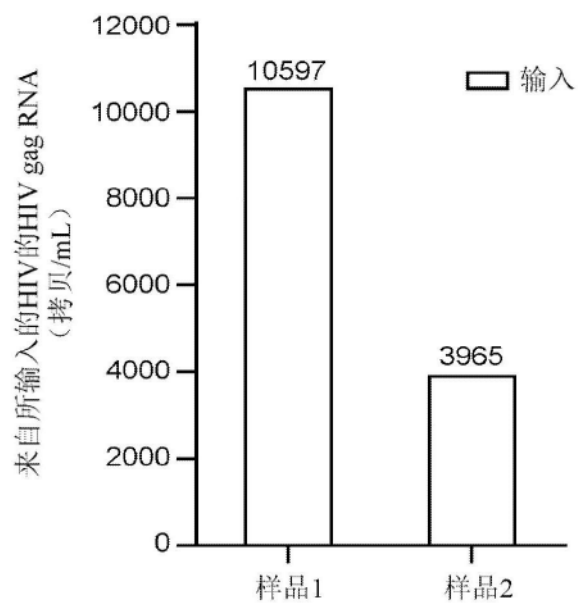


图7G-1

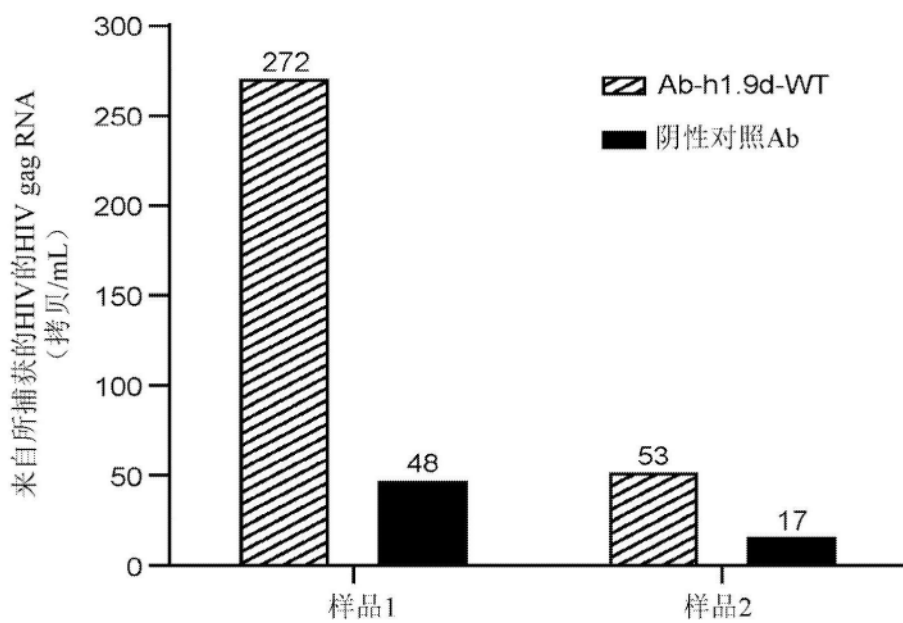


图7G-2

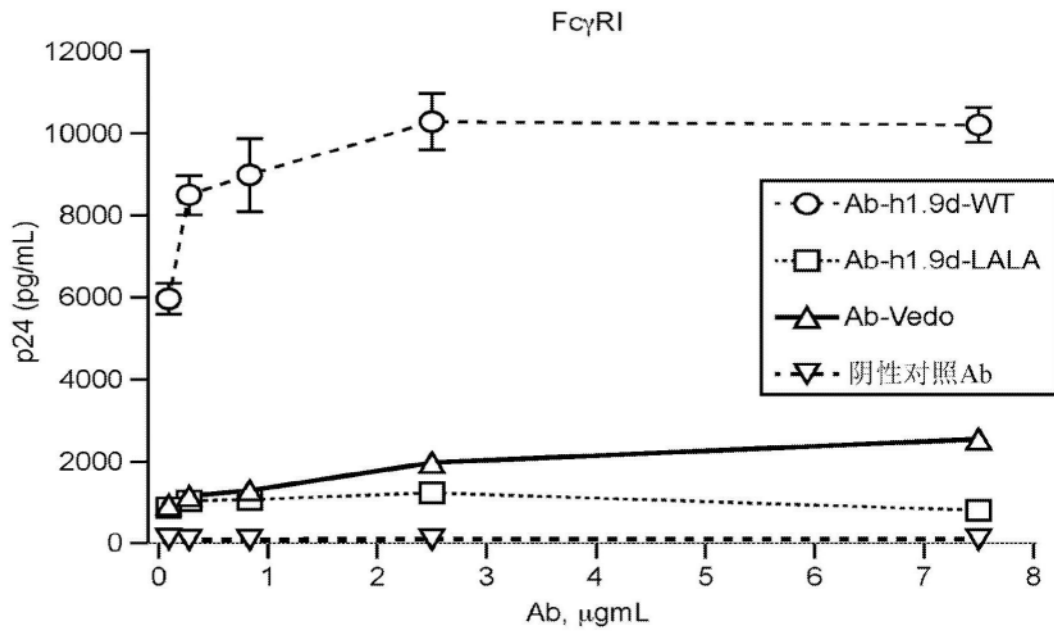


图8A

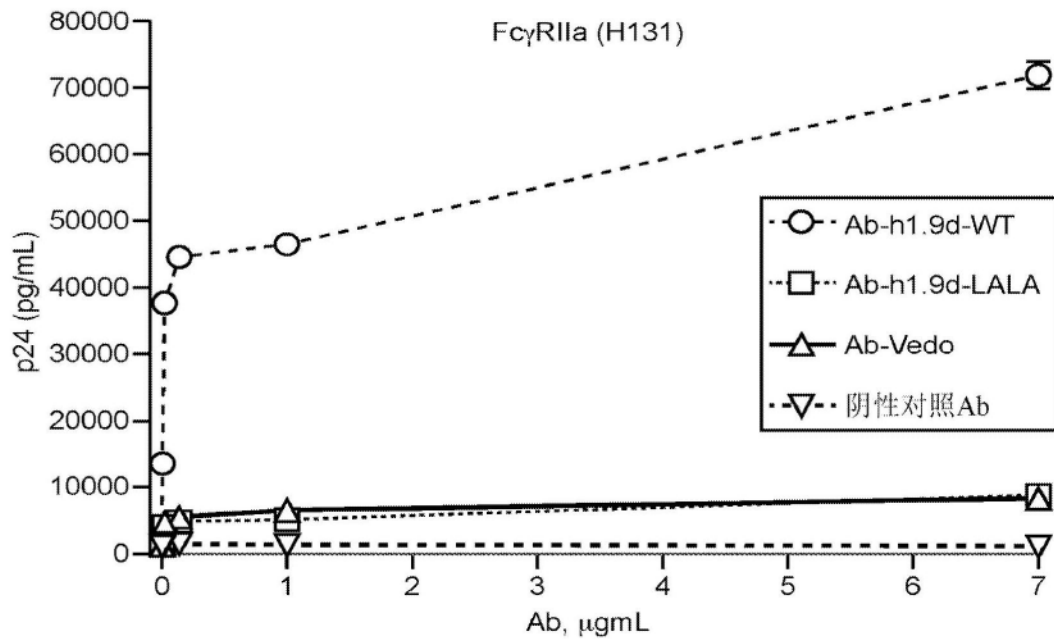


图8B

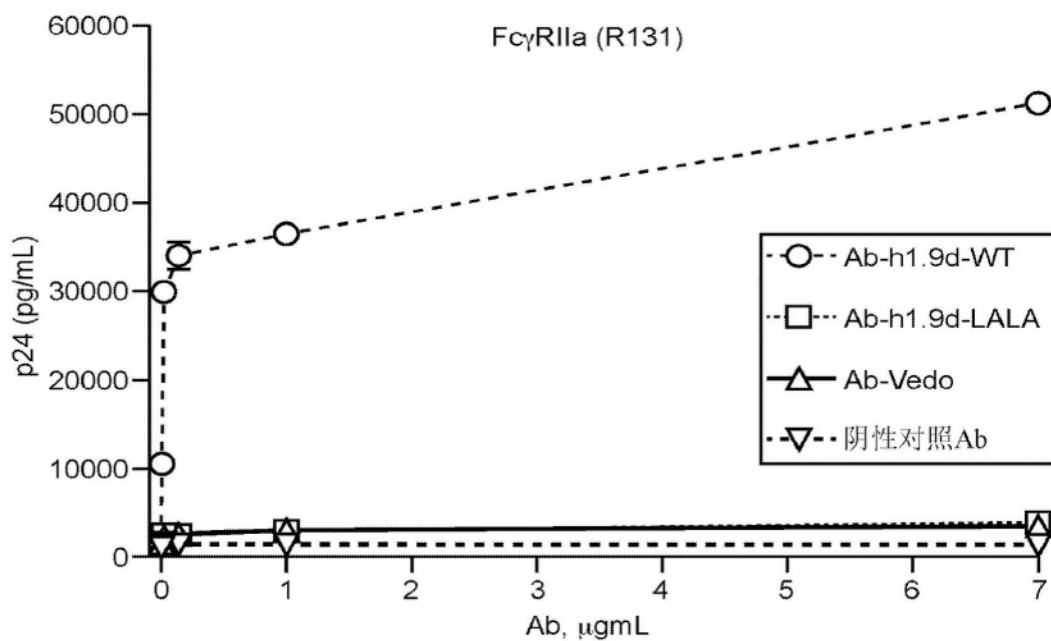


图8C

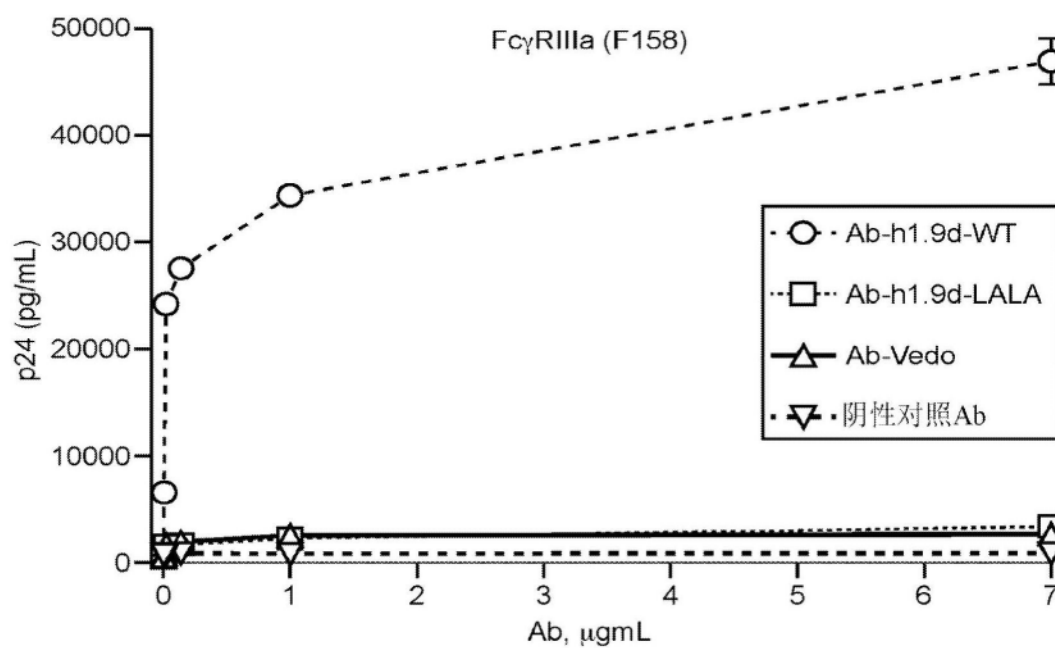


图8D

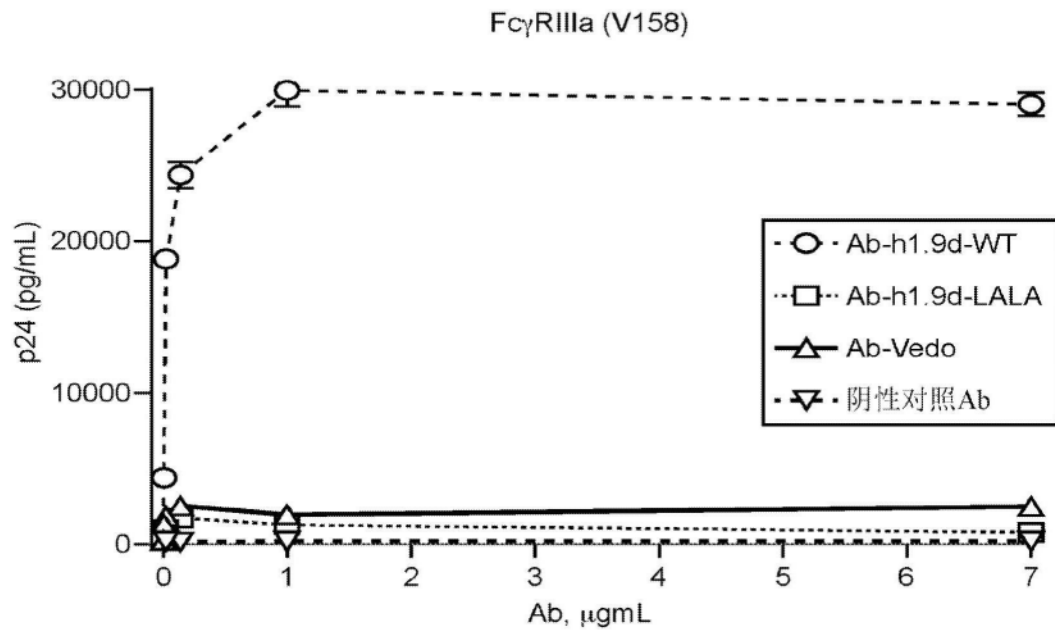


图8E

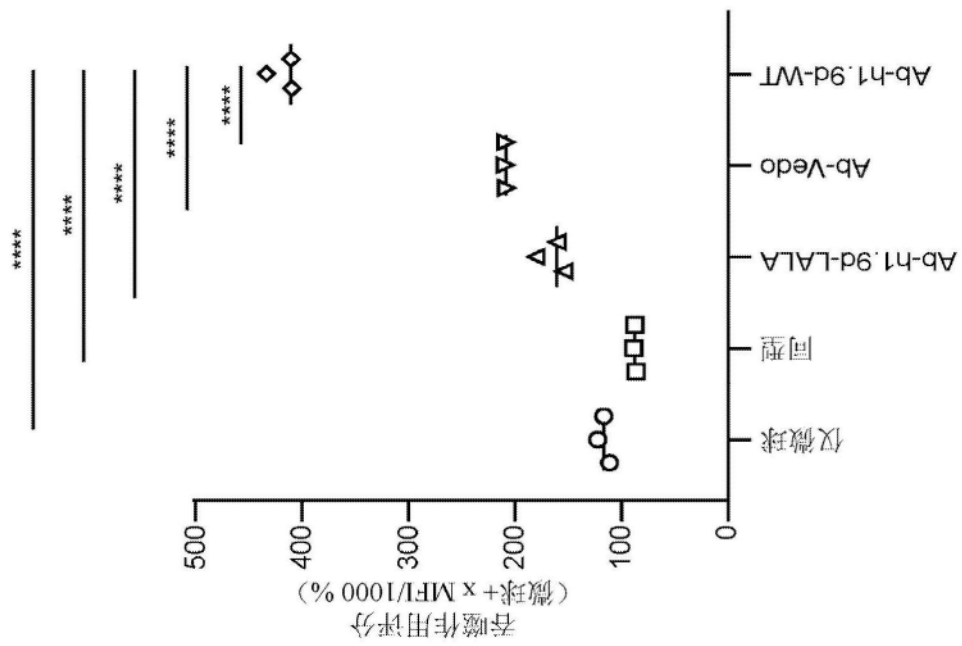


图9A

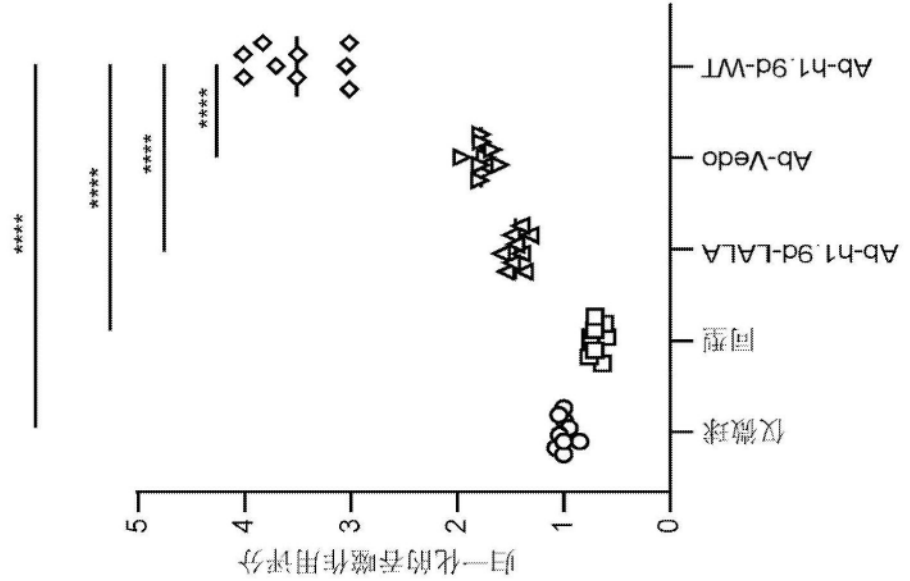


图9B

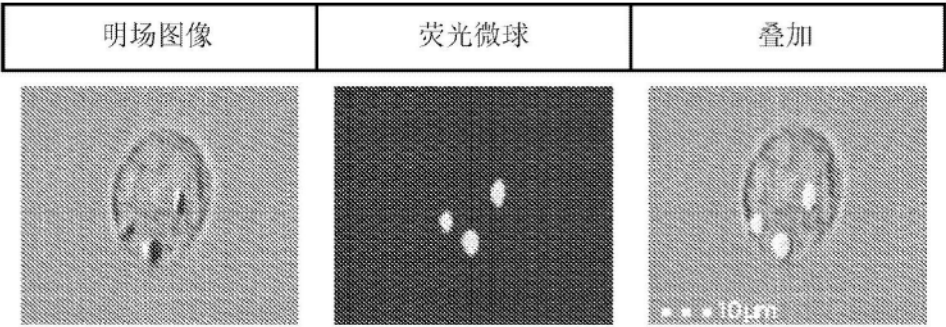


图9C

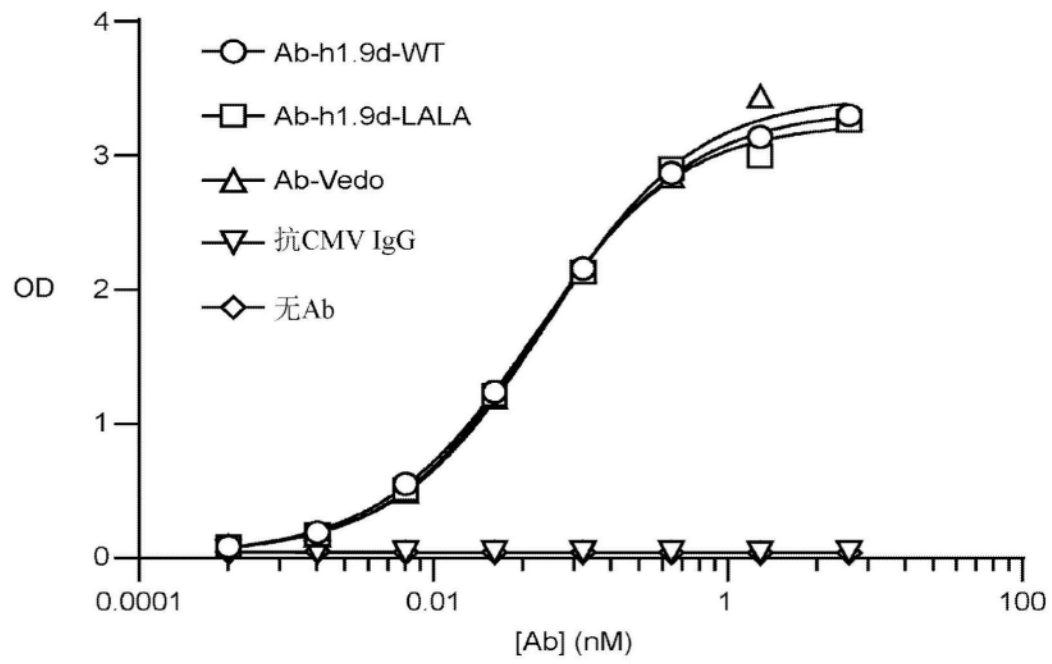


图10

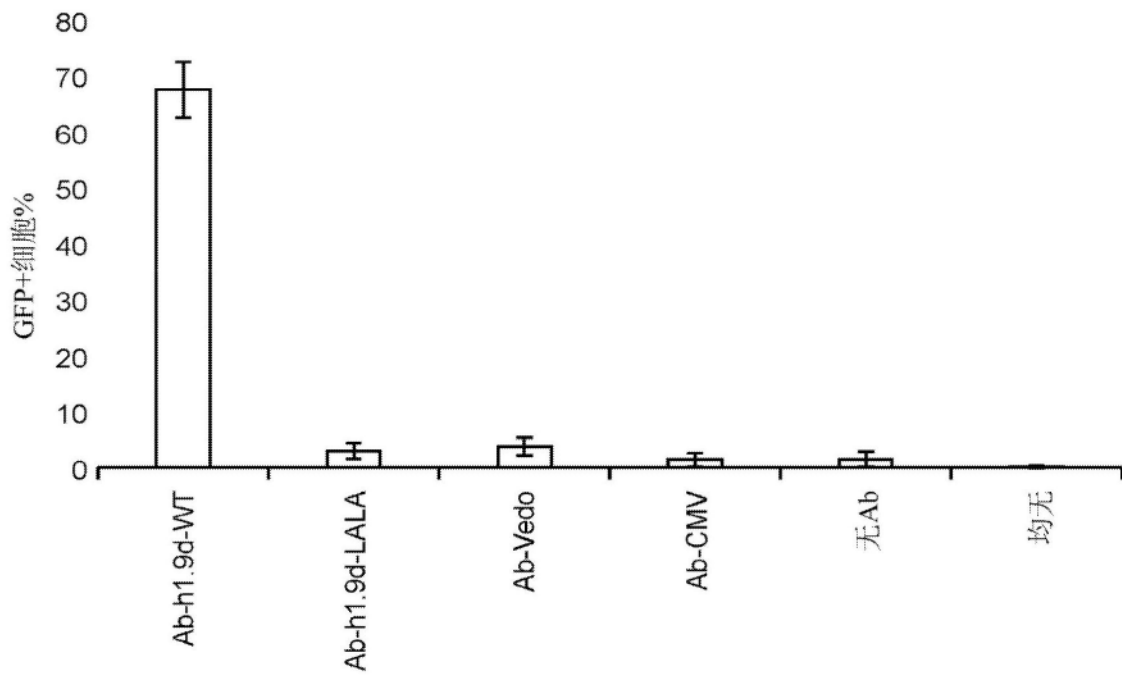


图11A

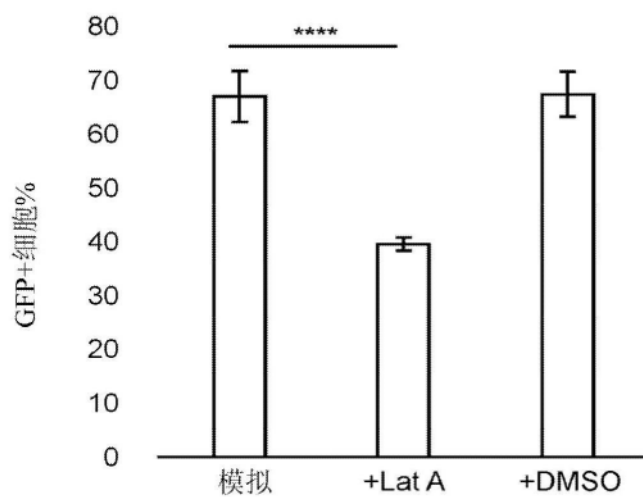


图11B

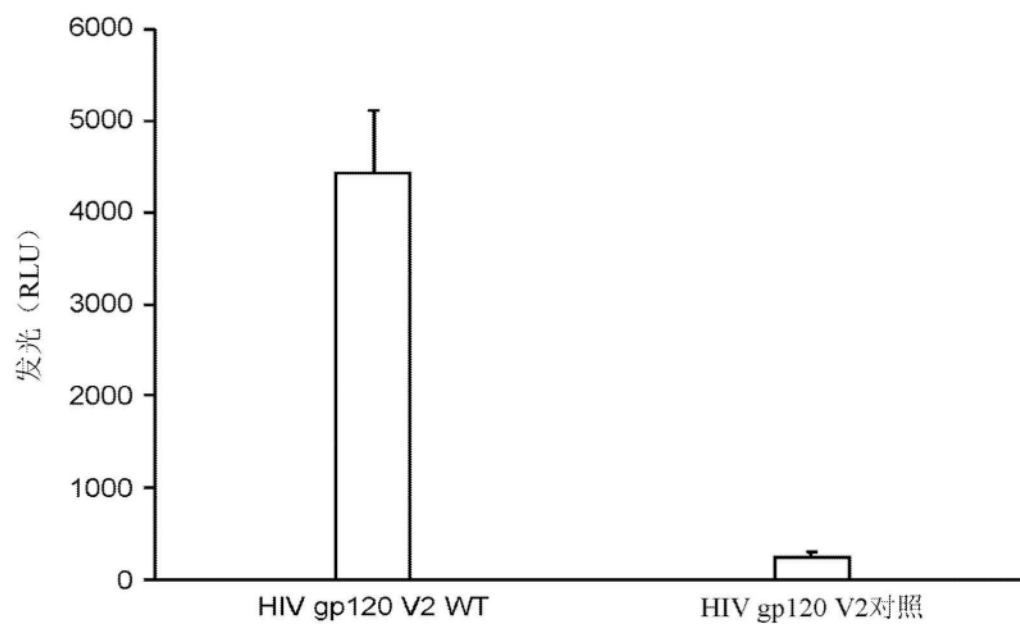


图12A

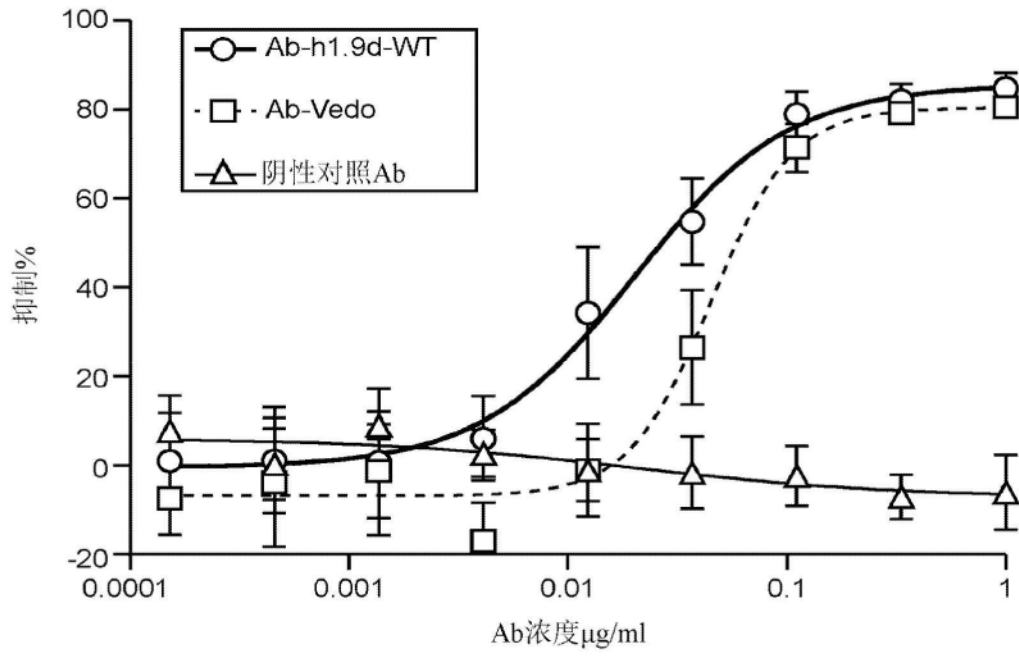


图12B

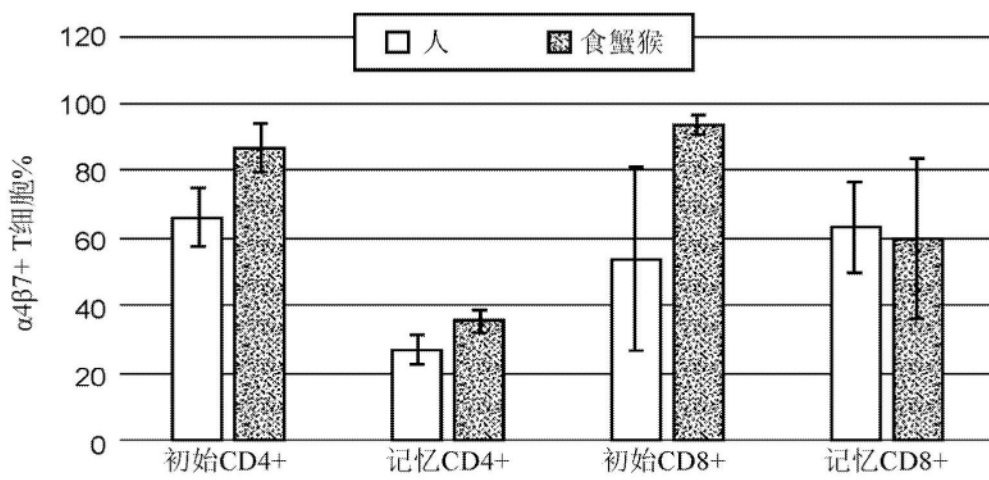


图13

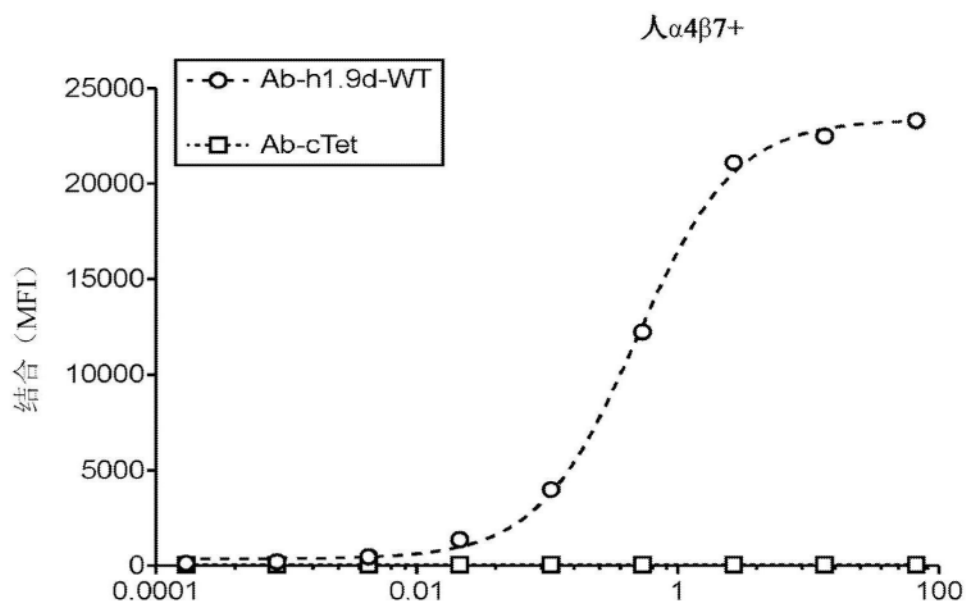


图14A

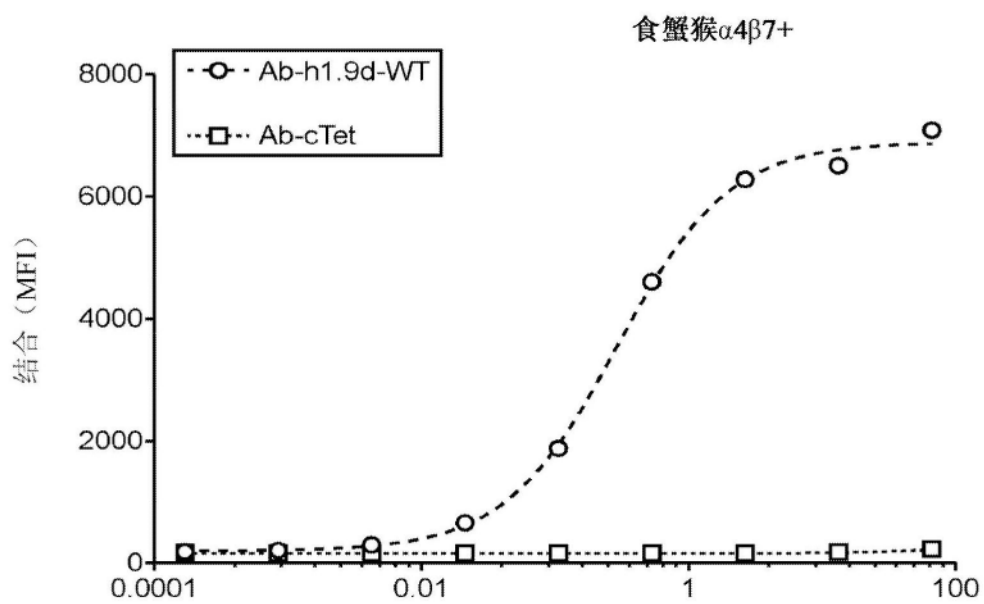


图14B

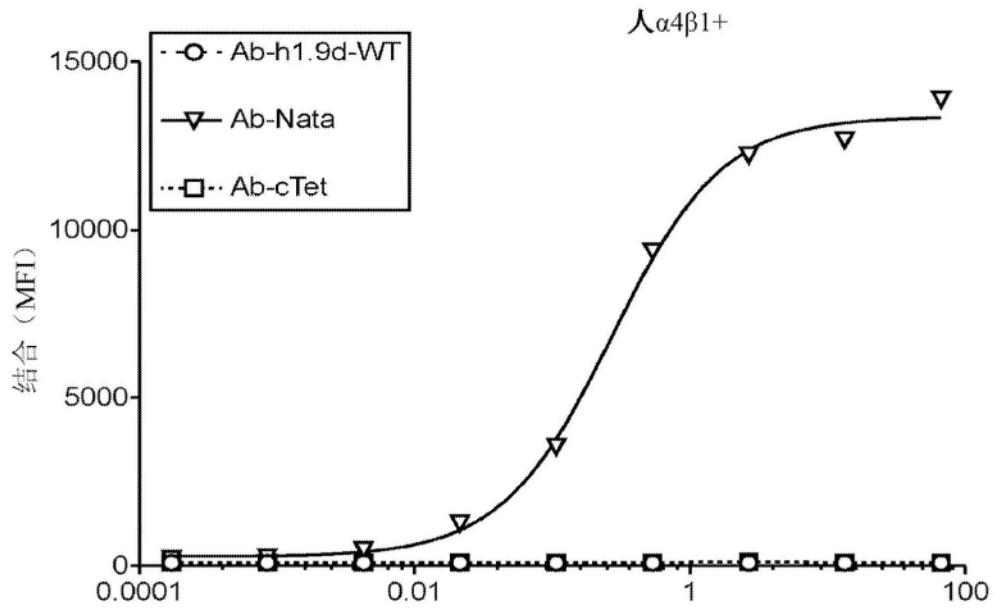


图14C

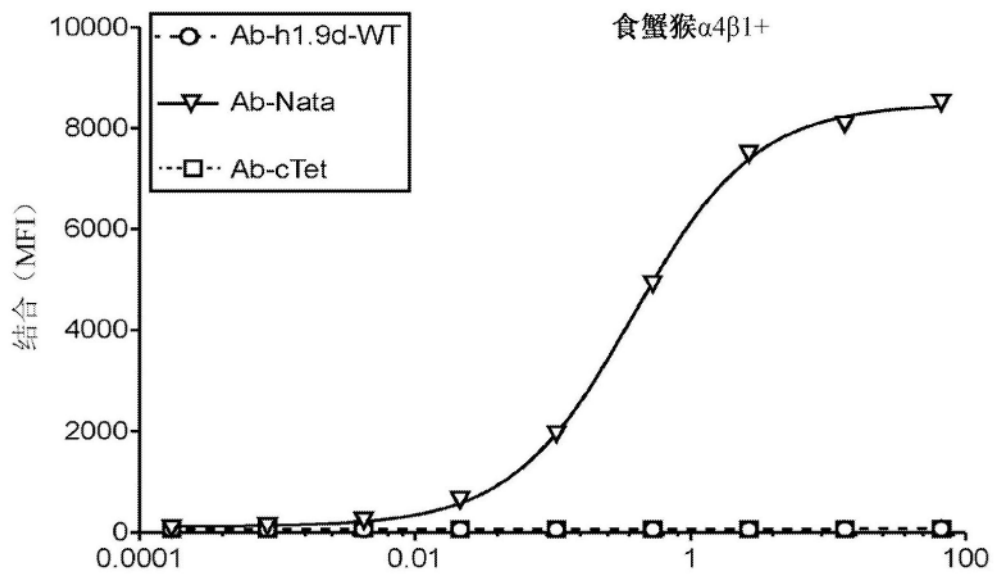


图14D

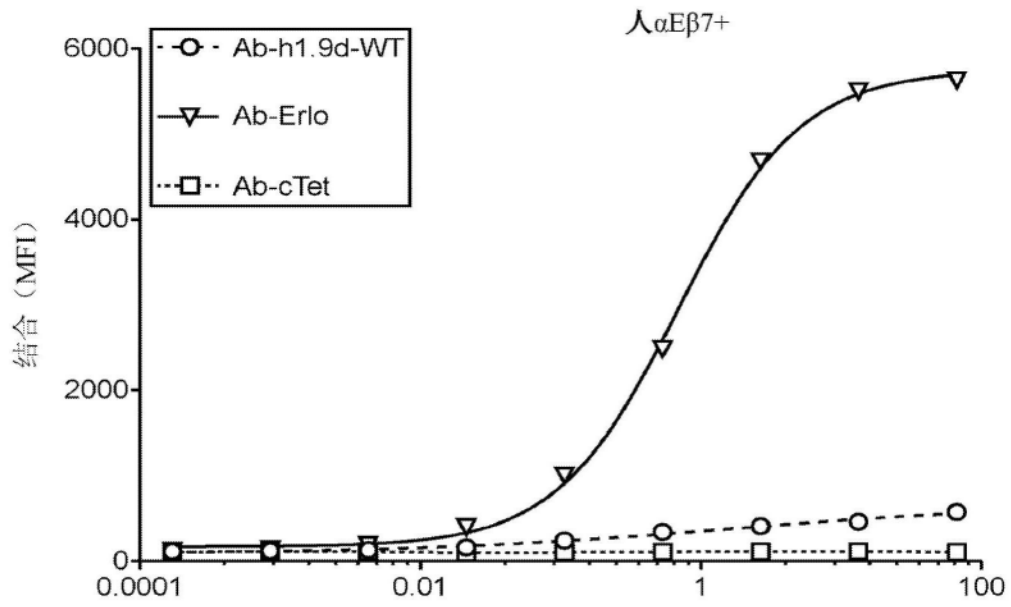


图14E

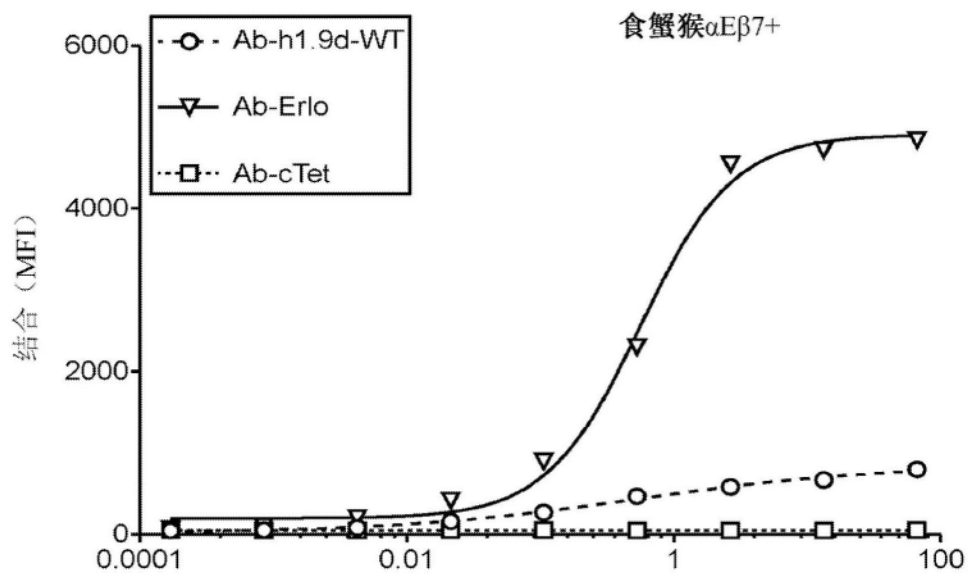


图14F

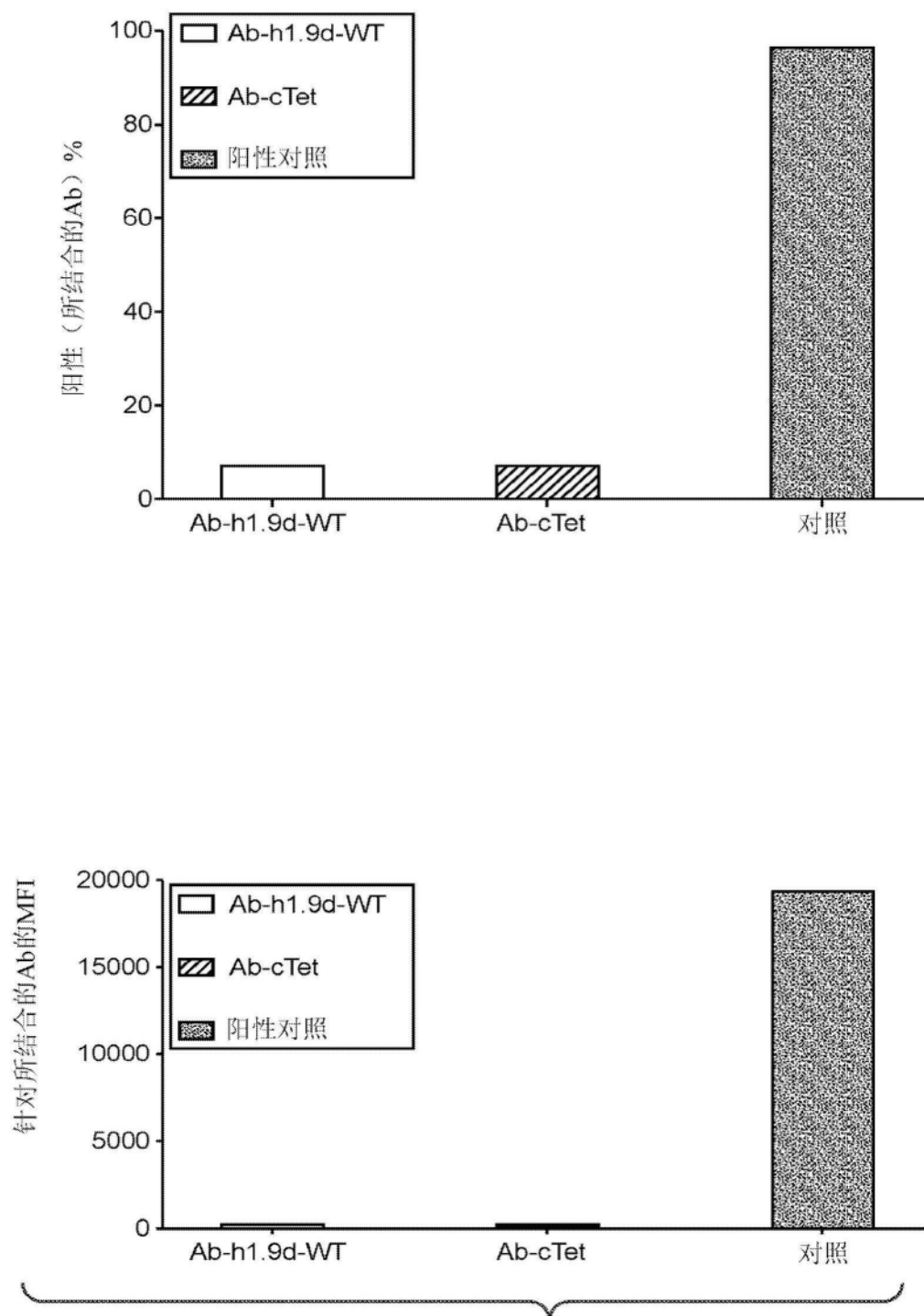


图15

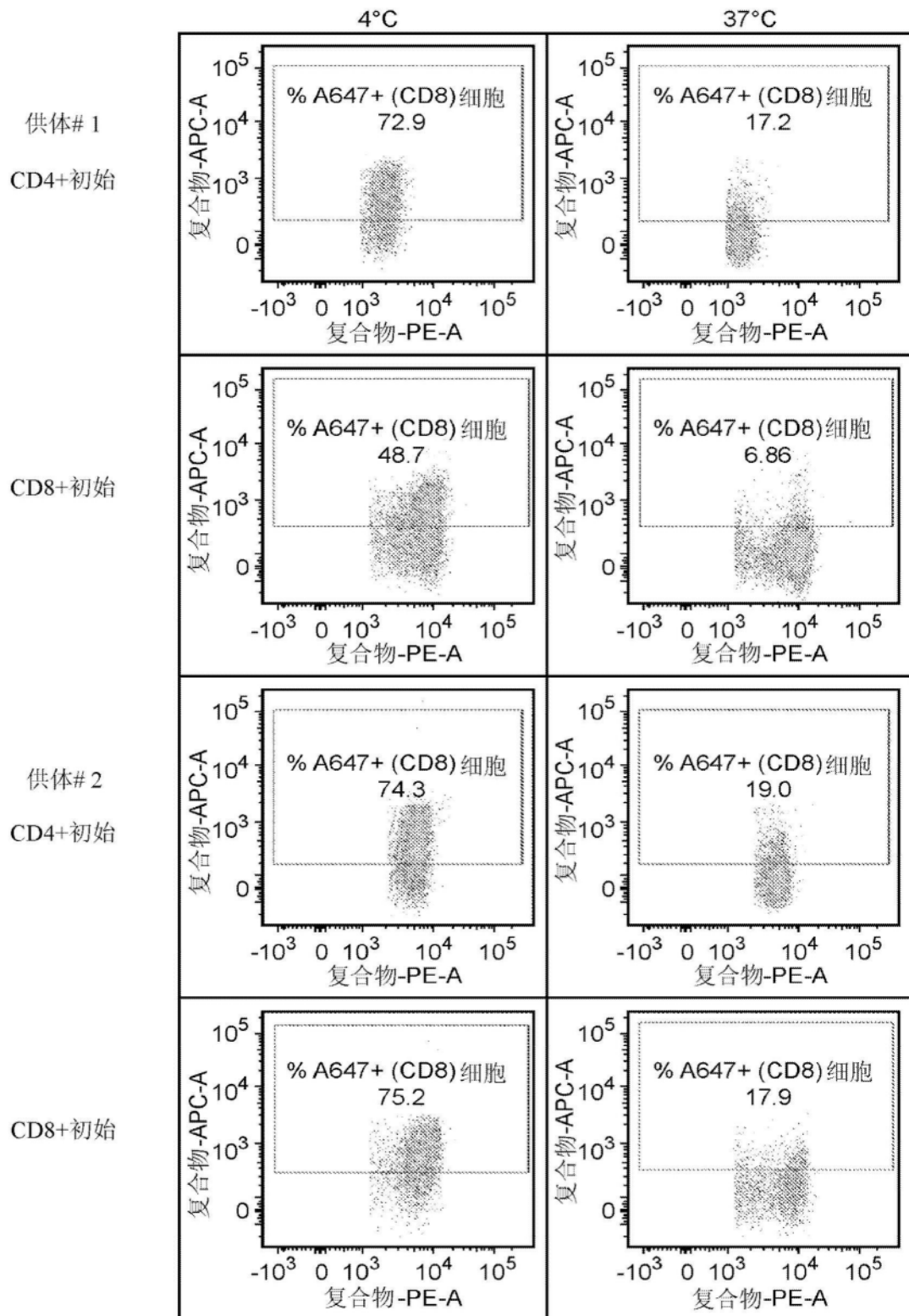


图16A

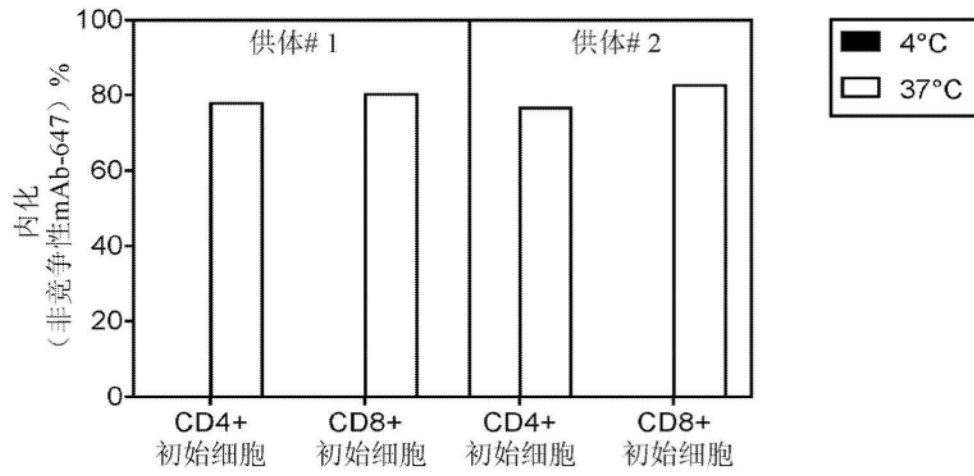


图16B

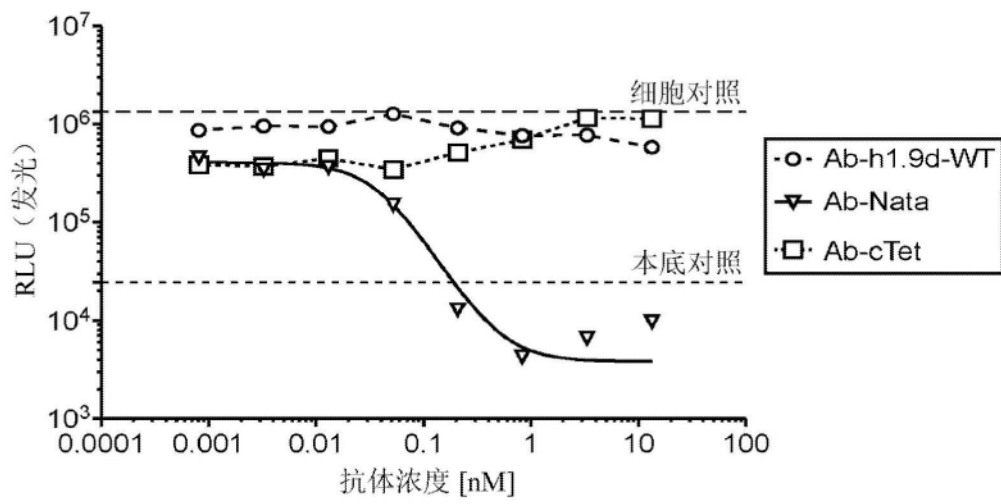


图18

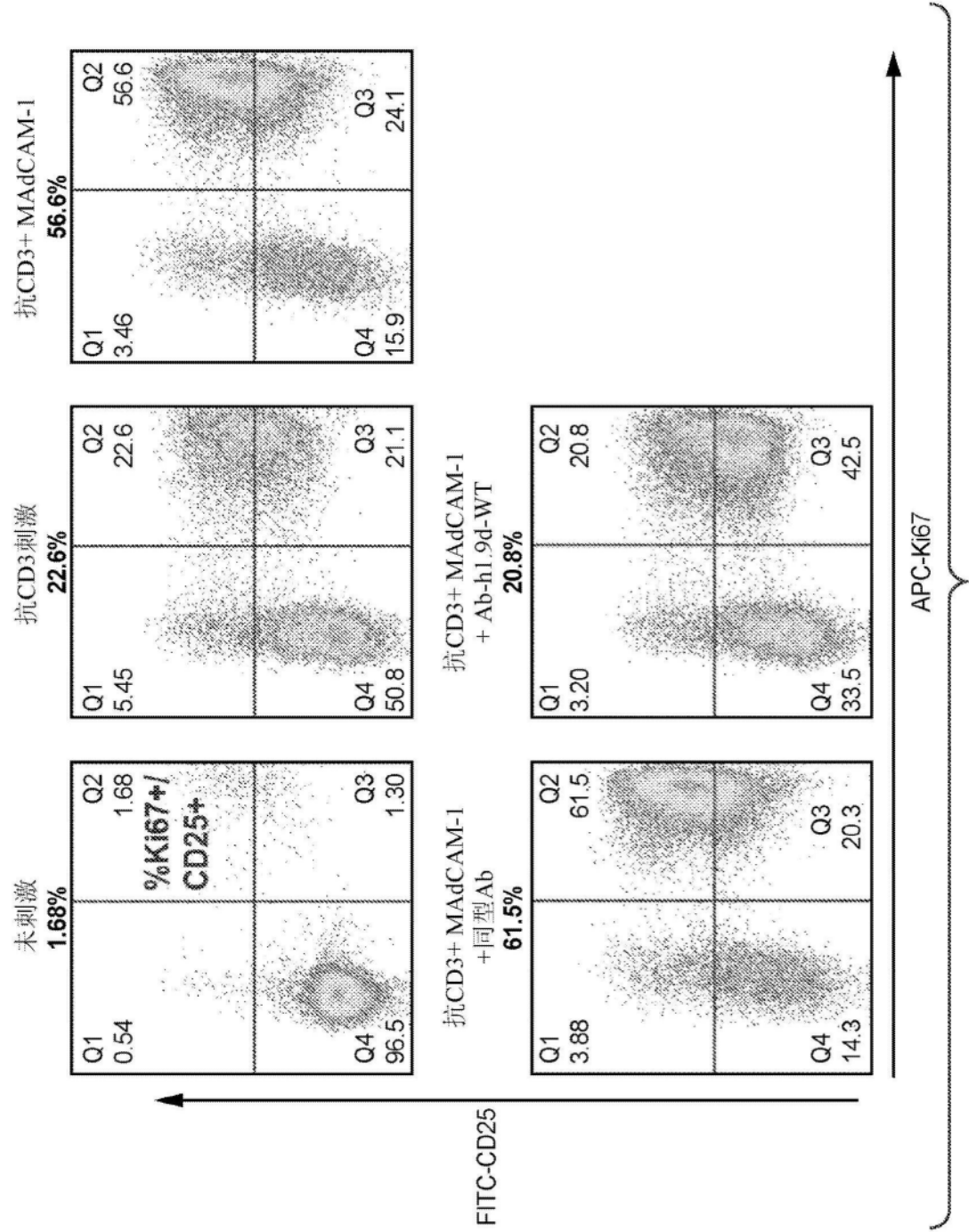


图17A

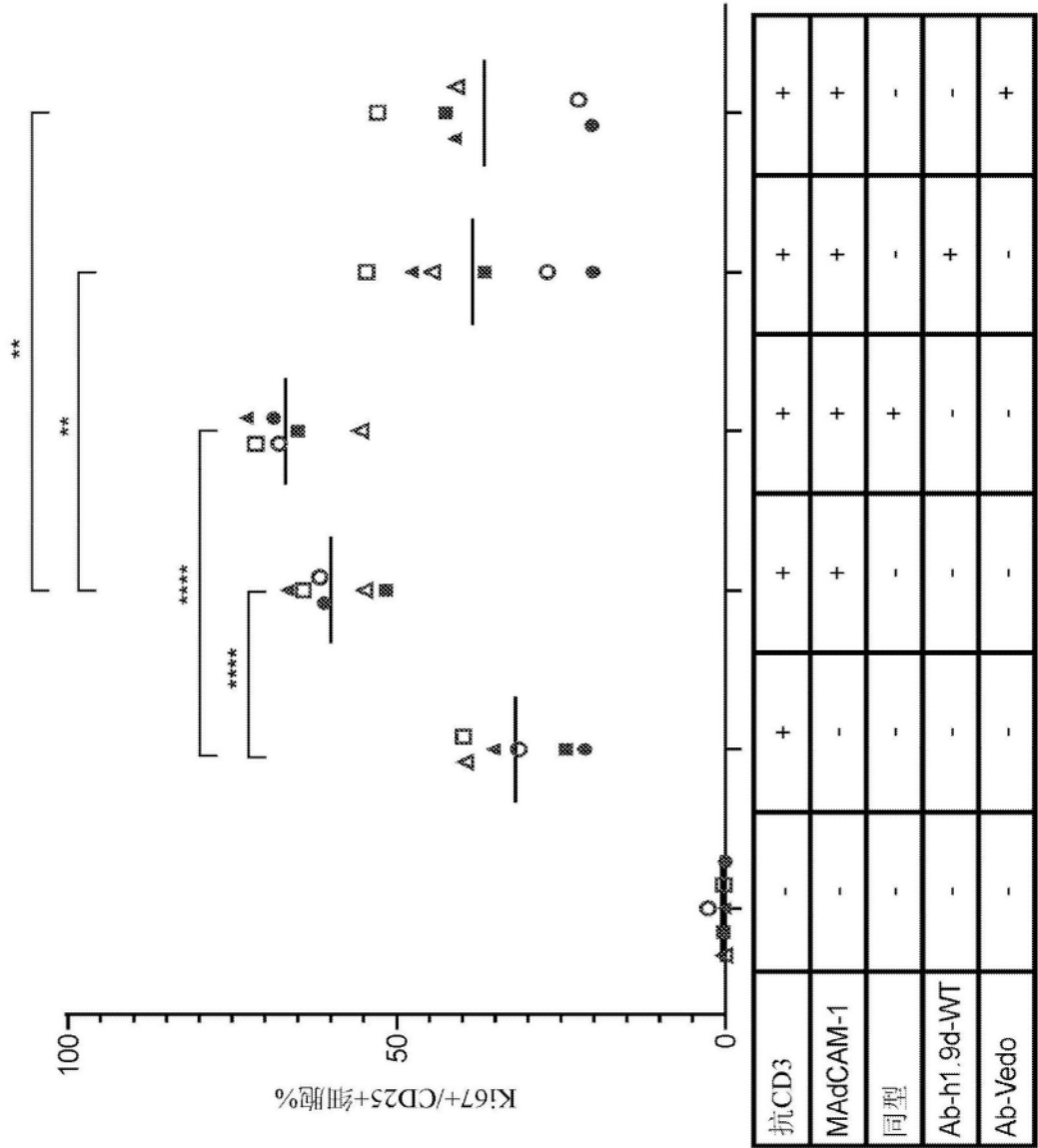


图17B

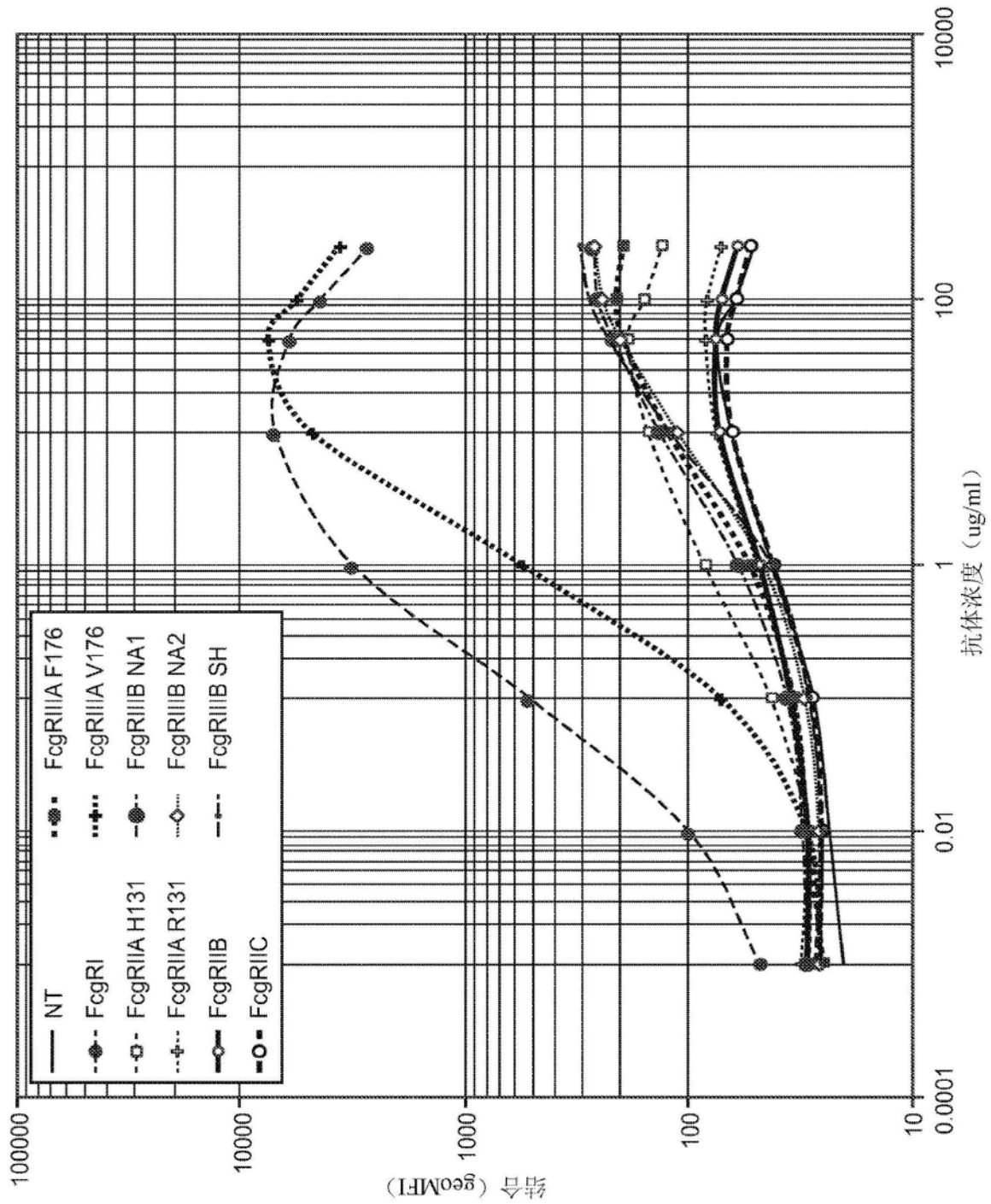


图19A

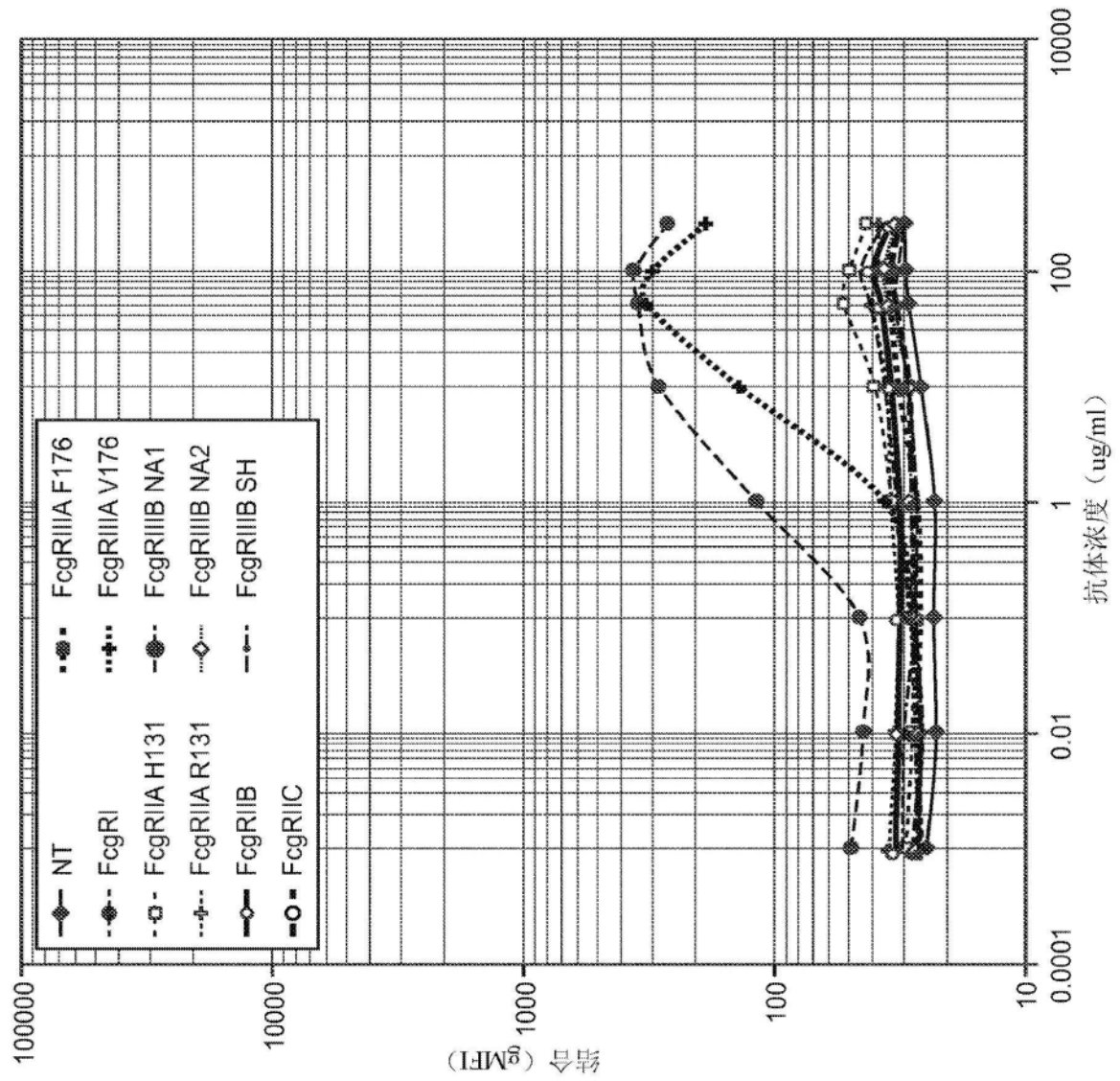


图19B

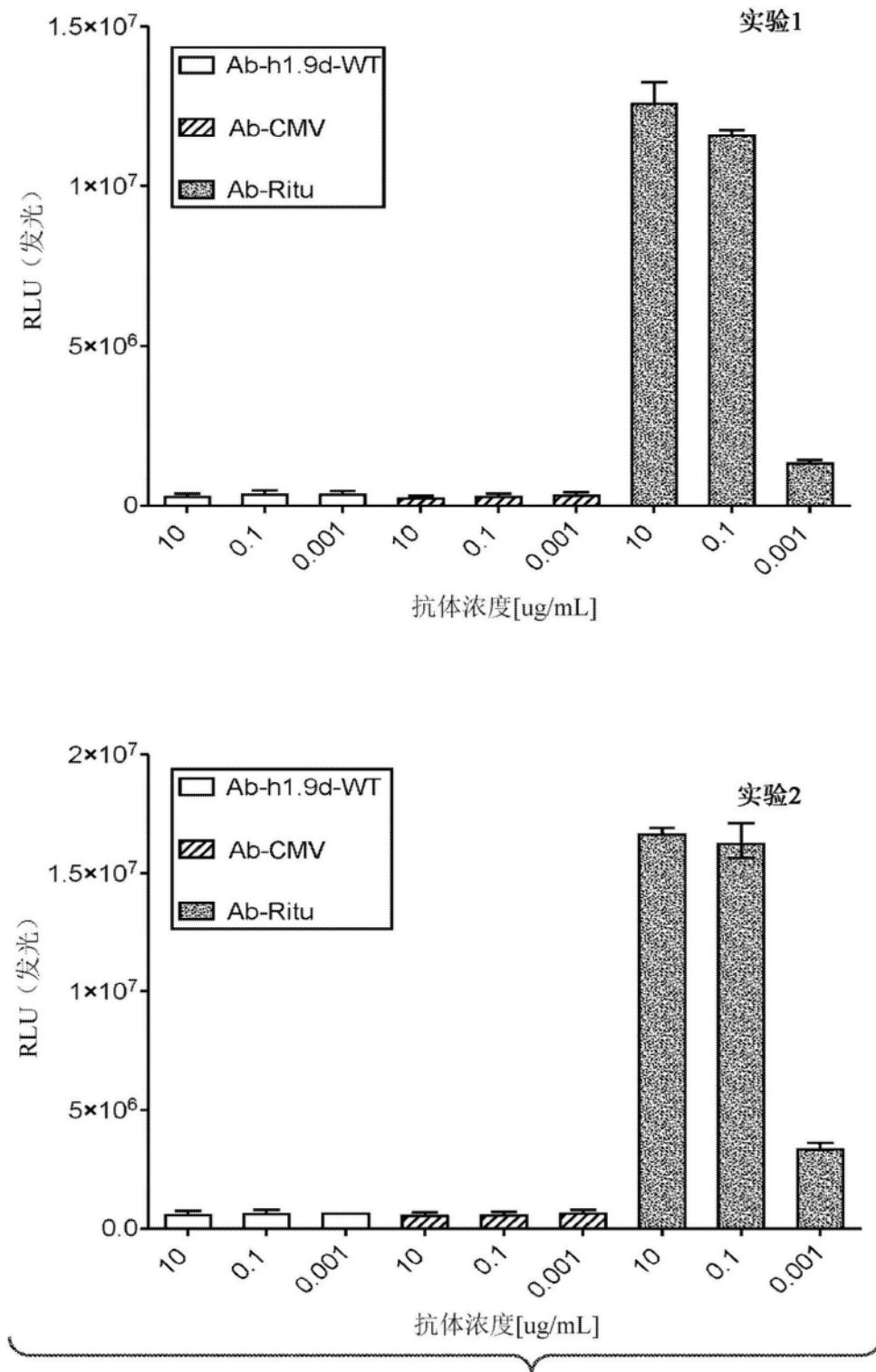


图20A

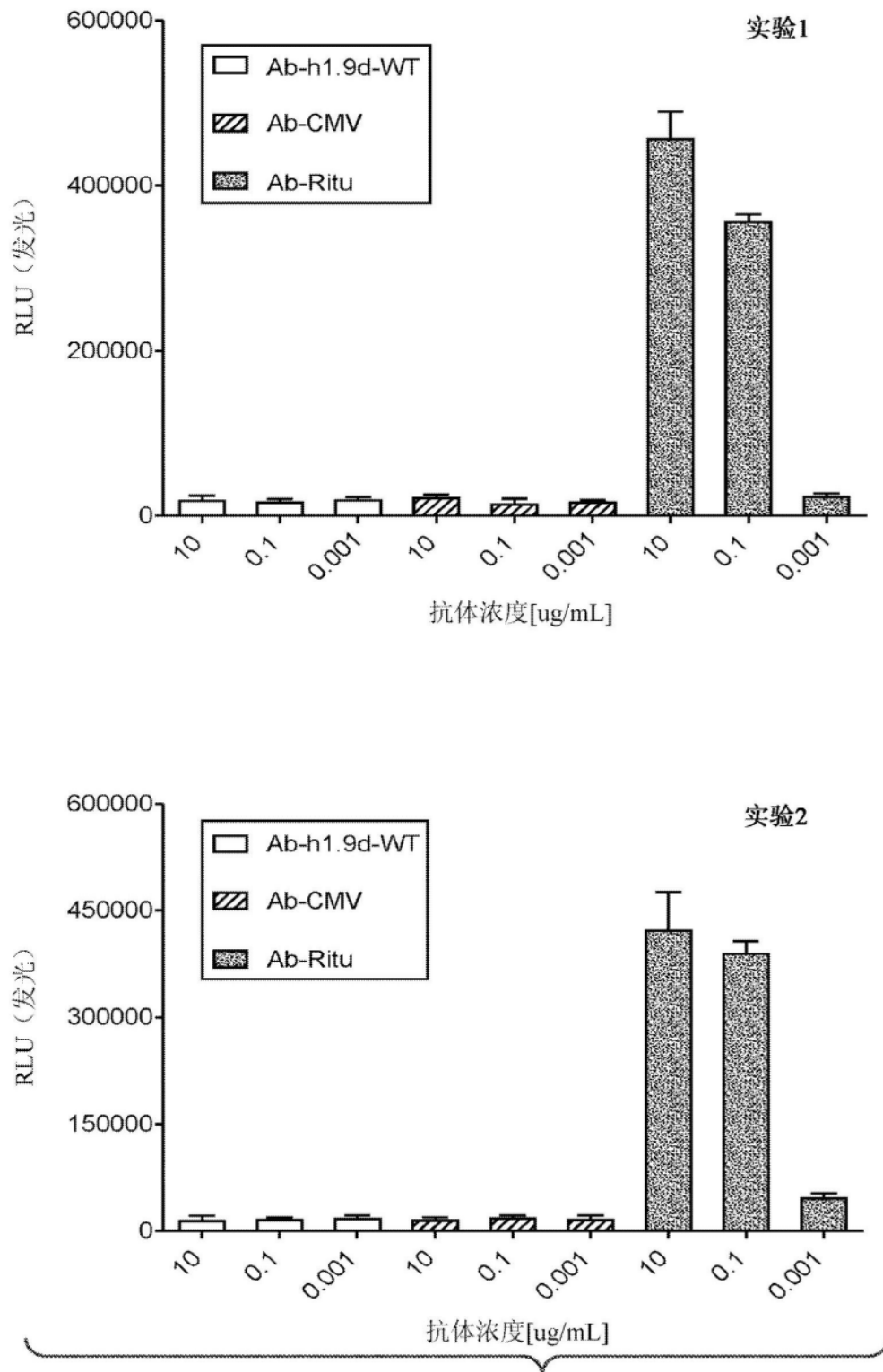


图20B

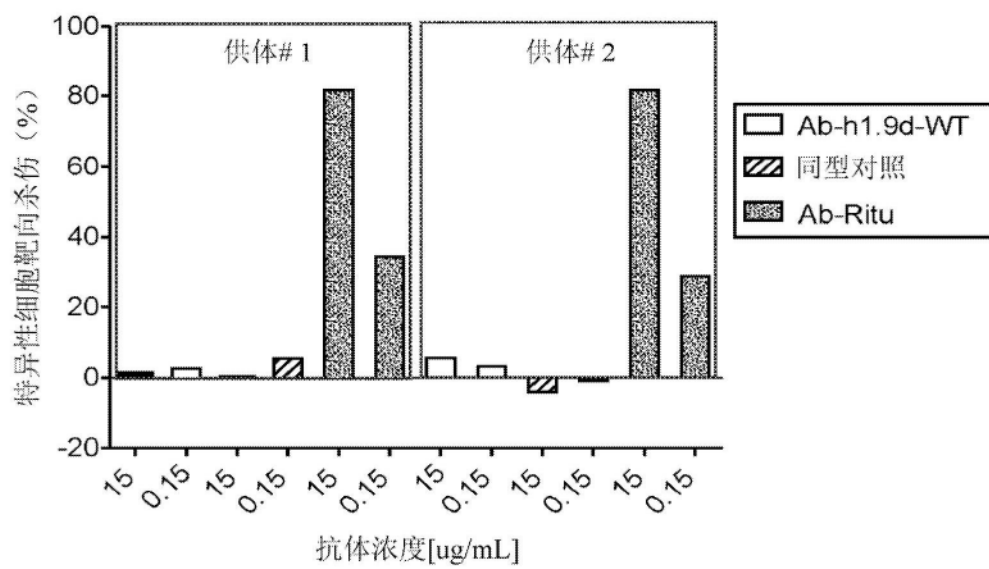


图21

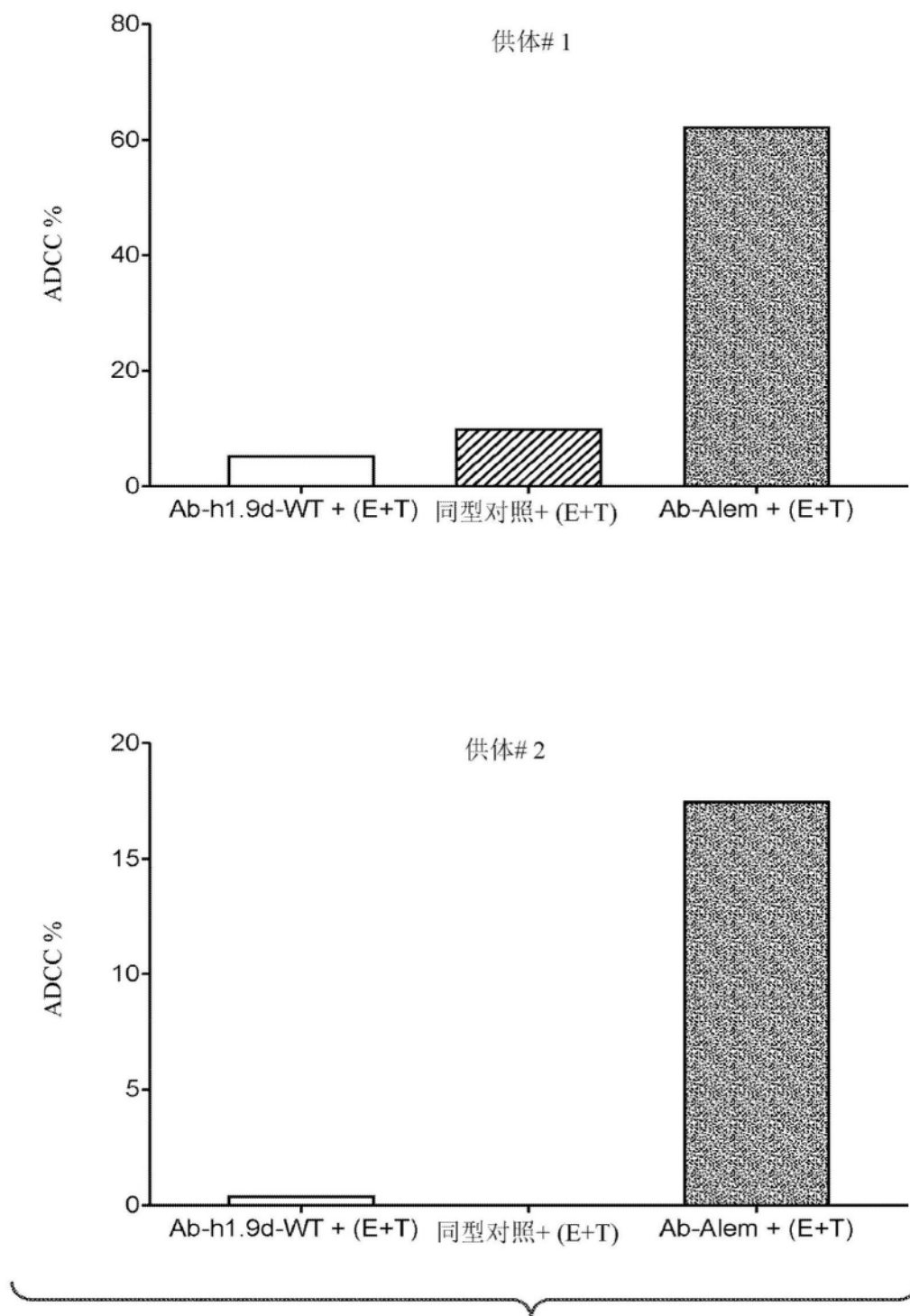


图22