(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111787951 B
(45)授权公告日 2025.06.17

(21)申请号 201980016388.5
(22)申请日 2019.03.01
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111787951 A
(43)申请公布日 2020.10.16
(30)优先权数据
62/637,186 2018.03.01 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.08.31
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/020374 2019.03.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/169314 EN 2019.09.06
(73)专利权人 IGM生物科学股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 R·巴利加 B·A·基特 D·吴
(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 陶家蓉 杨昀
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
(56)对比文件
WO 2017059380 A1,2017.04.06
WO 2018017889 A1,2018.01.25
Ranveig Braathen等.Secretory Antibody Formation: Conserved Binding Interactions between J Chain and Polymeric Ig Receptor from Humans and Amphibians.The Journal of Immunology.第178卷(第3期),表1.
审查员 季璇馨

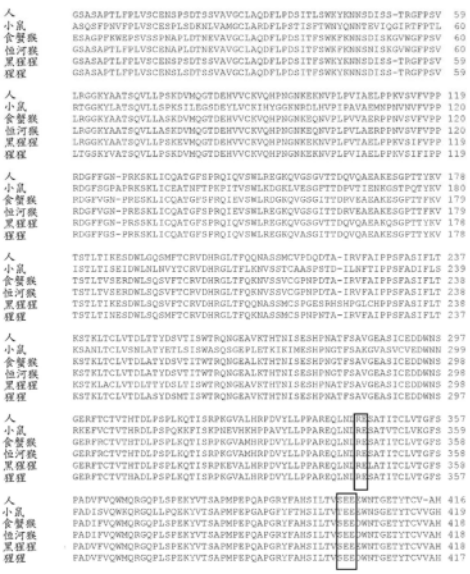
权利要求书2页 说明书42页
序列表43页 附图4页

(54)发明名称

影响IgM血清半衰期的IgM Fc和J链突变

(57)摘要

本公开提供了一种IgM抗体或IgM样抗体,所述IgM抗体或IgM样抗体包含可赋予所述抗体增加的血清半衰期的变体J链和/或变体IgM重链恒定区。



CN 111787951 B

1.一种具有增强的血清半衰期的IgM抗体,所述IgM抗体包含五个二价抗体结合单元以及变体人J链,

其中每个结合单元包含两个IgM重链恒定区,其各自与抗原结合结构域或其亚基缔合,

其中所述变体人J链的氨基酸序列为在SEQ ID NO:2基础上 :(i)氨基酸Y102处被丙氨酸(A)置换;或

(ii)氨基酸N49处被丙氨酸(A)置换;以及

其中所述IgM抗体相对于以相同的方式施用于同一动物物种的参考IgM抗体,所述IgM抗体在向受试动物施用时表现出增加的血清半衰期。

2. 如权利要求1所述的IgM抗体,其中SEQ ID NO:2的氨基酸Y102被丙氨酸(A)取代,和其中所述变体人J链由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成。

3. 如权利要求1所述的IgM抗体,其中SEQ ID NO:2的氨基酸N49被丙氨酸(A)取代,和其中所述变体人J链由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成。

4. 如权利要求1所述的IgM抗体,其中每个IgM重链恒定区是人IgM重链恒定区,由SEQ ID NO: 12的氨基酸序列组成。

5. 如权利要求1所述的IgM抗体,其中每个IgM重链恒定区为变体人IgM重链恒定区,其中变体人IgM重链恒定区为在SEQ ID NO:12基础上,在SEQ ID NO:12的氨基酸S401或E402被丙氨酸(A)置换,并且其中所述IgM抗体相对于以相同的方式施用于同一动物物种的参考IgM抗体,所述IgM抗体在向受试动物施用时表现出进一步增加的血清半衰期。

6. 如权利要求5所述的IgM抗体,其中每个IgM重链恒定区由SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成。

7.一种具有增强的血清半衰期的IgM抗体,所述IgM抗体包含五个或六个二价抗体结合单元,

其中每个结合单元包含两个变体IgM重链恒定区,其各自与抗原结合结构域或其亚基缔合,

其中每个变体IgM重链恒定区为在SEQ ID NO:12基础上,在SEQ ID NO:12的氨基酸S401或E402被丙氨酸(A)置换;

并且其中所述IgM抗体相对于以相同的方式施用于同一动物物种的参考IgM抗体,所述IgM抗体在向受试动物施用时表现出增加的血清半衰期。

8.如权利要求7所述的IgM抗体,其中每个变体人IgM重链恒定区由氨基酸序列SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14组成。

9.如权利要求7所述的IgM抗体,其是五聚的,并还包括由氨基酸序列SEQ ID NO:2组成的变体人J链。

10.如权利要求7所述的IgM抗体,其是五聚的,并还包括由氨基酸序列SEQ ID NO:3组成的变体人J链。

11.如权利要求1至10中任一项所述的IgM抗体,其中所述增加的血清半衰期包含增加的阿尔法半衰期($t_{1/2}\alpha$)、增加的贝塔半衰期($t_{1/2}\beta$)、或增加的$t_{1/2}\alpha$和增加的$t_{1/2}\beta$。

12.如权利要求11所述的IgM抗体,相对于所述参考抗体,所述IgM抗体进一步表现出增加的血浆峰值浓度(Cmax)、增加的曲线下面积(AUC)、改进的清除时间或其任何组合。

13. 如权利要求1至10中任一项所述的IgM抗体,其中所述抗原结合结构域包含单链Fv

(ScFv)片段或单一结构域可变区(VHH)。

14.如权利要求1至10中任一项所述的IgM抗体,其中所述抗原结合结构域亚基包含重链可变区(VH)。

15.如权利要求14所述的IgM抗体,其中每个结合单元还包含两个人轻链恒定区,其各自与轻链可变区(VL)缔合。

16.如权利要求1至6、9或10中任一项所述的IgM抗体,其中所述人J链或变体人J链还包含与人J链或变体人J链融合的一种或多种异源多肽。

17.如权利要求16所述的IgM抗体,其中所述一种或多种异源多肽通过肽连接基与所述人J链或变体人J链或其片段融合。

18.如权利要求16所述的IgM抗体,其中所述一种或多种异源多肽与所述人J链或变体人J链的N端、所述人J链或变体人J链的C端融合,或其中异源多肽与所述人J链或变体人J链的N端和C端融合,其中所述异源多肽可为相同或不同的。

19.如权利要求16所述的IgM抗体,其中至少一种异源多肽包含scFv。

20.如权利要求19所述的IgM抗体,其中所述scFv特异性结合CD3ε。

21.一种组合物,所述组合物包含如权利要求1至10中任一项所述的IgM抗体,以及药学上可接受的载剂。

22.一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码如权利要求1至10中任一项所述的IgM抗体的核酸。

23.一种表达载体,所述表达载体包含如权利要求22所述的多核苷酸。

24.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含如权利要求22所述的多核苷酸或权利要求23所述的表达载体。

影响IgM血清半衰期的IgM Fc和J链突变

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年3月1日提交的美国临时专利申请序列号62/637,186的权益，所述临时申请以引用的方式整体并入本文。

[0003] 以电子方式提交的序列表的引用

[0004] 随申请一起提交的ASCII文本文件(名称“09789-012WO1-Sequence-Listing;大小:98,048字节;以及创建日期:2019年2月28日”)中电子提交的序列表的内容以引用的方式整体并入本文。

背景技术

[0005] 可多聚化的抗体和抗体样分子，诸如IgA和IgM抗体，已成为例如免疫肿瘤学和传染病领域中有希望的候选药物，从而允许改进的特异性、改进的亲合力以及结合多个结合靶点的能力。参见，例如，美国专利号9,951,134和9,938,347、以及PCT公布号WO 2016/141303、WO 2016/154593、WO 2016/168758、WO 2017/059387、WO 2017 059380、WO 2018/017888、WO 2018/017763、WO 2018/017889和WO 2018/017761，其内容以引用的方式整体并入本文。

[0006] 然而，多价抗体的药代动力学(PK)和药效学(PD)是复杂的，并且取决于单克隆抗体的结构以及其靶向的生理系统。此外，通常通过不同的细胞和生理系统在受试者内处理不同的抗体类别。例如，IgG抗体类别是具有20天血清半衰期的最长的，而IgM和IgA抗体的半衰期仅为约5至8天。Brekke,OH.和I.Sandlie,Nature Reviews Drug Discovery 2:52-62(2003)。

[0007] 体内抗体分子可结合血液中不同细胞或不同组织和器官上的各种受体。与这些受体的结合可影响治疗性抗体的生物利用度和生物分布、以及其达到关注的靶的能力。例如，已知由于循环Fc新生受体(FcRn)的结合，IgG同种型的抗体具有较长的体内半衰期。然而，IgA和IgM同型抗体不结合此关键的循环受体。已知IgM同型抗体与Fcμ受体(FcμR)、Fcα/μ受体(FcαμR)和聚合Ig受体(pIgR)结合。具有和不具有J链的IgM抗体与FcμR结合(Kubagawa,H.,等人,Curr.Top.Microbiol.Immunol.408:25-45(2017))，但是J链残基至少有助于IgM抗体与FcαμR的结合(Ghumra,A.,等人,Eur.J.Immunol.39:1147-1156(2009))，并且结合pIgR的IgM是J链依赖性的(Braathen R.,等人J.Immunol 178:1589-1597(2007))。PIgR负责将IgM和IgA运输到肠腔、唾液腺和泪腺(参见，例如，Braathen,R.,等人,J.Biol.Chem.277:42755-42762(2002))。FcαμR负责B细胞和吞噬细胞摄取与异物结合的抗体(Akula,S.和Hellman,L.,Curr.Top.Microbiol.Immunol.408:1-23(2017))。FcμR对于B细胞发育很重要(Nguyen,T.,等人,Nature Immunol.18:321-333(2017))。我们假设IgM与这些受体中的一种或多种的相互作用可能影响PK/PD。

[0008] J链是酸性15-kDa多肽，其通过二硫键与五聚体IgM和二聚体IgA缔合，所述二硫键涉及IgMμ或IgAα重链的C端处的18个氨基酸分泌尾部片段(tp)中的倒数第二半胱氨酸残基。前体人J链氨基酸序列表示为SEQ ID NO:1，并且成熟人J链氨基酸序列表示为SEQ ID

NO:2。将IgM结合单元组装成五聚体结构被认为是涉及IgM恒定区的Cμ4和尾部片段结构域。参见,例如,Braathen,R.,等人,J.Biol.Chem.277:42755-42762(2002)。

[0009] 尽管在设计多聚体抗体方面取得了进展,但是仍然需要能够操纵这些分子的药代动力学和药效学特性。

发明内容

[0010] 本公开提供了一种具有增强的血清半衰期的IgM抗体或IgM样抗体,其中抗体包括五个二价抗体结合单元或其变体或片段以及变体J链或其功能片段。所提供的抗体的每个结合单元包括两个IgM重链恒定区或其多聚片段或变体,其各自与抗原结合结构域或其亚基缔合。在某些方面,变体J链或其功能片段包括相对于除了一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外与变体J链相同的参考J链的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入。所提供的变体J链可影响提供的IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。例如,在某些方面,相对于除了变体J链中的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外相同的并且以相同的方式施用于同一动物物种的参考IgM抗体或IgM样抗体,IgM抗体或IgM样抗体在向受试动物施用时表现出增加的血清半衰期。在某些方面,变体J链或其功能片段包括相对于参考J链的一个、两个、三个或四个单一氨基酸置换、缺失或插入。

[0011] 在某些方面,变体J链或其功能片段包括在与野生型人J链(SEQ ID NO:2)的氨基酸Y102相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换。例如,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸可被丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或精氨酸(R)置换。在某些方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸被丙氨酸(A)置换。在某些方面,J链为变体人J链,并且包括氨基酸序列SEQ ID NO:3。在某些方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸被丝氨酸(S)置换。在某些方面,J链为变体人J链,并且包括氨基酸序列SEQ ID NO:4。在某些方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸被精氨酸(R)置换。在某些方面,J链为变体人J链,并且包括氨基酸序列SEQ ID NO:5。在某些方面,变体J链或其功能片段包括在与野生型人J链(SEQ ID NO:2)的氨基酸T103相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换。例如,与SEQ ID NO:2的T103相对应的氨基酸可被丙氨酸(A)置换。在某些方面,J链为变体人J链,并且包括氨基酸序列SEQ ID NO:6。在某些方面,变体J链或其功能片段包括在与人J链(SEQ ID NO:2)的氨基酸N49或氨基酸S51相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换,其中S51未被苏氨酸(T)置换,或其中J链包括在与人J链(SEQ ID NO:2)的氨基酸N49和S51相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换。例如,与SEQ ID NO:2的N49相对应的位置可被丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、苏氨酸(T)、丝氨酸(S)或天冬氨酸(D)置换。在某些方面,与SEQ ID NO:2的N49相对应的位置被丙氨酸(A)置换。在某些方面,J链为变体人J链,并且包括氨基酸序列SEQ ID NO:7。在另一个实施例中,与SEQ ID NO:2的S51相对应的位置可被丙氨酸(A)或甘氨酸(G)置换,例如,与SEQ ID NO:2的S51相对应的位置被丙氨酸(A)置换。在某些方面,J链为变体人J链,并且包括氨基酸序列SEQ ID NO:8。

[0012] 在某些方面,包括如上提供的变体J链、IgM重链恒定区或其多聚片段的IgM抗体或IgM样抗体可为变体IgM重链恒定区,所述变体IgM重链恒定区包括相对于除了一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外与变体IgM重链恒定区相同的参考IgM重链恒定区的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入。根据这些方面,变体IgM重链恒定区可影响IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期,使得相对于除了IgM重链恒定区中的一个或多个单一氨基酸置

换、缺失或插入之外相同的并且以相同的方式施用于同一动物物种的参考IgM抗体或IgM样抗体，IgM抗体或IgM样抗体在向受试动物施用时表现出进一步增加的血清半衰期。在某些方面，血清半衰期的进一步增加是累加的。

[0013] 本公开还提供了一种具有增强的血清半衰期的IgM抗体或IgM样抗体，其中IgM抗体或IgM样抗体包括五个或六个二价抗体结合单元或其变体或片段，并且其中每个结合单元包括两个变体IgM重链恒定区或其多聚片段，其各自与抗原结合结构域或其亚基缔合。根据这些方面，变体IgM重链恒定区或其多聚片段各自包括相对于除了一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外与变体IgM重链恒定区相同的参考IgM重链恒定区的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入。此外，根据这些方面，变体IgM重链恒定区可影响IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。在某些方面，相对于除了IgM重链恒定区中的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外相同的并且以相同的方式施用于同一动物物种的参考IgM抗体或IgM样抗体，IgM抗体或IgM样抗体在向受试动物施用时表现出增加的血清半衰期。在某些方面，相对于参考IgM重链恒定区，变体IgM重链恒定区包括一个、两个、三个或四个单一氨基酸置换、缺失或插入。

[0014] 在某些方面，变体IgM重链恒定区包括在与野生型人IgM恒定区SEQ ID NO:12的氨基酸R344相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换，例如，与SEQ ID NO:12的R344相对应的氨基酸可被丙氨酸(A)置换。在某些方面，变体IgM重链恒定区为变体人IgM重链恒定区，并且包括氨基酸序列SEQ ID NO:31。在某些方面，变体IgM重链恒定区包括在与野生型人IgM恒定区SEQ ID NO:12的氨基酸E345相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换，例如，与SEQ ID NO:12的E345相对应的氨基酸可被丙氨酸(A)置换。在某些方面，变体IgM重链恒定区为变体人IgM重链恒定区，并且包括氨基酸序列SEQ ID NO:32。在某些方面，变体IgM重链恒定区包括在与野生型人IgM恒定区SEQ ID NO:12的氨基酸S401相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换，例如，与SEQ ID NO:12的S401相对应的氨基酸可被丙氨酸(A)置换。在某些方面，变体IgM重链恒定区为变体人IgM重链恒定区，并且包括氨基酸序列SEQ ID NO:13。在某些方面，变体IgM重链恒定区包括在与野生型人IgM恒定区SEQ ID NO:12的氨基酸E402相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换，例如，与SEQ ID NO:12的E402相对应的氨基酸可被丙氨酸(A)置换。在某些方面，变体IgM重链恒定区为变体人IgM重链恒定区，并且包括氨基酸序列SEQ ID NO:14。在某些方面，变体IgM重链恒定区包括在与野生型人IgM恒定区SEQ ID NO:12的氨基酸E403相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换，例如，与SEQ ID NO:12的E403相对应的氨基酸可被丙氨酸(A)置换。在某些方面，变体IgM重链恒定区为变体人IgM重链恒定区，并且包括氨基酸序列SEQ ID NO:34。

[0015] 在本文提供的IgM抗体或IgM样抗体中，增加的血清半衰期可包括增加的阿尔法半衰期($t_{1/2}\alpha$)、增加的贝塔半衰期($t_{1/2}\beta$)、或增加的$t_{1/2}\alpha$和增加的$t_{1/2}\beta$。同样，相对于参考抗体，本文提供的IgM抗体或IgM样抗体可进一步表现出增加的血浆峰值浓度(Cmax)、增加的曲线下面积(AUC)、改进的清除时间或其任何组合。

[0016] 在某些方面，本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的IgM重链恒定区或其多聚片段或变体各自包括Cμ4结构域和IgM尾部片段(tp)结构域，并且还可包括Cμ3结构域、Cμ2结构域、Cμ1结构域或其任何组合。

[0017] 在某些方面，本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的抗原结合结构域可为单链Fv

(ScFv)片段或单一结构域可变区(VHH)。在某些方面,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的抗原结合结构域亚基可为重链可变区(VH)。

[0018] 在某些方面,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的每个结合单元还可包括两个轻链恒定区或其片段或变体,其各自与抗原结合结构域或其亚基缔合,例如,抗原结合结构域可为scFv片段或抗原结合结构域亚基可为VL。

[0019] 在某些方面,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的J链或其功能片段或变体还可包括与J链或其功能片段或变体直接或间接融合的一种或多种异源多肽。在某些方面,一种或多种异源多肽可通过肽连接基与J链或其片段融合。示例性连接基可包括至少5个氨基酸,但不超过25个氨基酸,并且可由以下组成:GGGGS(SEQ ID NO:25)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:26)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:27)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:28)或GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:29)。在某些方面,一种或多种异源多肽可与J链或其片段或变体的N端、J链或其片段或变体的C端融合、或与J链或其片段或变体的N端和C端融合。当两个或更多个异源多肽与J链融合时,异源多肽可为相同或不同的。在某些方面,至少一种异源多肽可为结合结构域,例如,抗体或其抗原结合片段,例如,Fab片段、Fab'片段、F(ab')2片段、Fd片段、Fv片段、单链Fv(scFv)片段、二硫键连接的Fv(sdFv)片段或其任何组合。在某些方面,抗原结合片段为scFv片段。在某些方面,至少一种异源多肽可特异性结合CD3ε。在某些方面,J链可为SEQ ID NO:9的经修饰的J链的变体(V15J),例如,氨基酸序列SEQ ID NO:10(V15J-Y102A)、氨基酸序列SEQ ID NO:23(V15J-T103A)或氨基酸序列SEQ ID NO:24(V15J-N49A)。

[0020] 本公开还提供了一种组合物,所述组合物包括本文提供的IgM抗体或IgM样抗体、以及药学上可接受的载剂。

[0021] 本公开还提供了J链或其功能片段,所述J链或其功能片段包括相对于除了一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外相同的参考J链的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入,其中变体J链可影响包括变体J链的IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。在某些方面,变体J链包括氨基酸序列SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或其任何组合。

[0022] 本公开还提供了分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包括编码本文提供的IgM或IgM样抗体的亚基多肽的核酸,其中亚基多肽包括:(a)IgM或IgM样重链恒定区或其多聚片段、(b)抗体轻链、或(c)J链、经修饰的J链、或其功能片段或变体、或(d)其任何组合。在某些方面,亚基多肽包括IgM或IgM样重链恒定区或其多聚片段,例如,亚基多肽可包括氨基酸序列SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:34。在某些方面,亚基多肽包括抗体轻链。在某些方面,亚基多肽可包括本文提供的J链、经修饰的J链、或其任何功能片段或变体,例如,亚基多肽可包括氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24。所提供的多核苷酸可包括编码两个、三个或更多个亚基多肽的一个、两个、三个或更多个核酸序列。还提供了包括所提供的多核苷酸的表达载体。还提供了包括所提供的多核苷酸或所提供的表达载体的宿主细胞。

[0023] 本公开还提供了一种用于鉴定变体J链的方法,所述变体J链可增加包括变体J链

的五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体的血清半衰期。方法包括相对于参考五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体,测试受试动物中血清半衰期增加的包括变体J链或其片段的五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体,其中变体J链或其片段包括定义的氨基酸插入、缺失或置换,并且其中参考五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体包括除了定义的氨基酸插入、缺失或置换之外与变体J链相同的J链或其片段;以及回收赋予五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体相对于参考五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体增加血清半衰期的那些变体J链或其片段。

[0024] 本公开还提供了一种鉴定变体J链的方法,所述变体J链可增加包括变体J链的五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体的血清半衰期。方法包括测试包括变体J链或其片段的五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体的与Fc阿尔法-缪受体(FcαμR)、聚合Ig受体(pIgR)、或FcαμR和pIgR结合的水平,其中变体J链或其片段包括定义的氨基酸插入、缺失或置换;以及回收相对于包括除了定义的氨基酸插入、缺失或置换之外与变体J链相同的J链或其片段的参考五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体,赋予五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体上的降低的FcαμR结合能力、降低的pIgR结合能力、或降低的FcαμR和pIgR结合能力的那些变体J链或其片段。此方法还可包括相对于包括除了定义的氨基酸插入、缺失或置换之外与回收的变体J链或其片段相同的J链或其片段的参考五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体,测试受试动物中血清半衰期增加的包括回收的变体J链或其片段的五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体。

[0025] 本公开还提供了一种用于鉴定变体IgM重链恒定区的方法,所述变体IgM重链恒定区可增加包括变体IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。方法包括相对于参考五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体,测试受试动物中血清半衰期增加的包括变体IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体,其中变体IgM重链恒定区包括定义的氨基酸插入、缺失或置换,并且其中参考IgM抗体或IgM样抗体包括除了定义的氨基酸插入、缺失或置换之外与变体IgM重链恒定区相同的IgM重链恒定区;以及回收包括变体IgM重链恒定区的那些IgM抗体或IgM样抗体,相对于参考IgM抗体或IgM样抗体,所述变体IgM重链恒定区赋予包括变体IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体增加的血清半衰期。

[0026] 本公开还提供了一种用于鉴定变体IgM重链恒定区的方法,所述变体IgM重链恒定区可增加包括变体IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。方法包括测试包括变体IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体的与Fc阿尔法-缪受体(FcαμR)、Fc缪受体(FcμR)、聚合Ig受体(pIgR)、两种受体的任何组合、或所有三种受体结合的水平,其中变体IgM重链恒定区包括定义的氨基酸插入、缺失或置换;其中参考IgM抗体或IgM样抗体包括除了定义的氨基酸插入、缺失或置换之外与变体IgM重链恒定区相同的IgM重链恒定区;以及回收相对于包括除了定义的氨基酸插入、缺失或置换之外与变体IgM重链恒定区相同的IgM重链恒定区的参考IgM抗体或IgM样抗体,赋予包括变体IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体上的降低的FcαμR结合能力、降低的FcμR结合能力、降低的pIgR结合能力、降低的结合任意两种受体的能力、或降低的结合所有三种受体的能力的包括变体IgM重链恒定区的那些IgM抗体或IgM样抗体。此方法还可包括相对于包括除了定义的氨基酸插入、缺失或置换之外与变体IgM重链恒定区相同的IgM重链恒定区的参考IgM抗体或IgM样抗体,测试受试动物中血清半衰期增加的包括变体IgM重链恒定区的回收的IgM抗体或IgM样抗体。

[0027] 附图简述

[0028] 图1A至图1B示出人IgM重链恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO:12)与小鼠(GenBank:

CAC20701.1,SEQ ID NO:16)、食蟹猴(GenBank:EHH62210.1,SEQ ID NO:30)、恒河猴(GenBank:AAD02420.1,SEQ ID NO:17)、黑猩猩(GenBank:PNI10622.1,SEQ ID NO:18)和苏门答腊猩猩(GenBank:PNJ04968.1,SEQ ID NO:19)中的那些氨基酸序列的比对。给与SEQ ID NO:12的氨基酸R345、E346、S401、E402和E403相对应的氨基酸加边框。

[0029] 图2是总结了由ELISA测量的人和小鼠免疫球蛋白受体与抗CD20/抗CD3双特异性IGM的结合的表,所述抗CD20/抗CD3双特异性IGM包含J链中和/或IgM重链恒定区中的各种突变。“WT”表示在引入丙氨酸置换之前,如PCT公布号WO 2016/141303中描述的具有IgM恒定区和V15J区的抗CD20 1.5.3抗体。百分数指示相对于“WT”起始抗体的受体结合程度。百分数指示相对于被指定为100％的IgM五聚体的受体结合水平,所述IgM五聚体包含野生型IgM重链恒定区(“IgM”,SEQ ID NO:12)和包含在其N端与结合CD3的scFv融合的野生型人J链的经修饰的J链(“VJ”或“V15J”,SEQ ID NO:9)。

[0030] 图3A至图3E是示出在与SEQ ID NO:2的氨基酸Y102相对应的J链上的位置处具有氨基酸置换突变的各种抗CD20/抗CD3双特异性IgM与pIgR的结合的图。每个图将单一突变体与“野生型”抗CD20 1.5.3IgM抗体1.5.3VJ(实心正方形)进行比较。图3A:Y102A突变(空心正方形);图3B:Y102F突变(实心三角形);图3C:Y102T突变(空心三角形);图3D:Y102S突变(空心菱形);图3E:Y102R突变(实心菱形)。

[0031] 图4是总结了与对照组相比,小鼠中包含J链中和/或IgM重链恒定区中的各种突变的抗CD3单特异性IgM和抗CD20/抗CD3双特异性IGM的药代动力学数据的表。“WT IgM”表示在引入丙氨酸置换之前,如PCT公布号WO 2016/141303中描述的具有IgM恒定区的抗CD20 1.5.3抗体。在引入丙氨酸置换之前,如PCT公布号WO 2016/141303中描述的“WT J”和“WT VJ”以及野生型J链(“J”)或抗CD3修饰的J链“VJ”区。“VJH”表示“VJ”抗CD3修饰的J链,其还包含与C端融合的人血清白蛋白(在本文中表示为SEQ ID NO:11)。“A”是在$t_{1/2}$阿尔法时测得的抗体的血清浓度;“B”是在$t_{1/2}$贝塔时测得的抗体的血清浓度;“$t_{1/2}$阿尔法”是阿尔法半衰期(以小时计);“$t_{1/2}$贝塔”是以小时测量的贝塔半衰期,“C_0”是在零时测得的以μg/ml为单位的血清抗体浓度;“AUC_{0-inf}”是以μg/ml*h测量的从零时间到无穷大的曲线下面积;并且“MRT”是以小时测量的抗体在血清中的平均停留时间。

[0032] 图5是示出与包含相同抗CD20 VH和VL结合区的IgG抗体(153IgG)相比,J链Y102A突变单独或与IgM重链S401A或E401A突变组合对抗CD20/抗CD3 IgM双特异性抗体的总血清半衰期的影响的曲线。153IgG:空心圆;IgM 1.5.3V15J:实心正方形;IgM 1.5.3V15J-Y102A:空心正方形;IgM 1.5.3S401A/V15J-Y102A:空心三角形;IgM 1.5.3E402A/V15J-Y102A:实心倒三角形。

[0033] 图6是比较IgM 1.5.3V15J和IgM 1.5.3V15J-N49A的药代动力学参数的表。

具体实施方式

[0034] 定义

[0035] 应当注意的是,术语“一种/个(a)”或“一种/个(an)”实体是指该实体中的一个或多个;例如;“结合分子”应理解为代表一个或多个结合分子。因此,术语“一种/个(a)”(或“一种/个(an)”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文可互换使用。

[0036] 此外,当在本文使用时,“和/或”应当视为具体公开两种特定特征或组分的每一

者,并且公开或未公开另一者。因此,本文在诸如“A和/或B”的短语中使用的术语“和/或”意欲包括:“A和B二者”;“A或B”;“A”(单独);和“B”(单独)。类似地,在诸如“A、B和/或C”的短语中使用的术语“和/或”意欲涵盖以下实施方案的每一种:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0037] 除非另有定义,否则本文使用的技术和科技术语具有与本公开相关领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。例如,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology,Juo,Pei-Show,第2版,2002,CRC Press;Dictionary of Cell and Molecular Biology,第3版,1999,Academic Press;和Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology,修订版,2000,Oxford University Press,给普通技术人员提供本公开中使用的许多术语的通用字典。

[0038] 单位、前缀和符号以其Système International de Unites(SI)可接受的形式表示。数值范围将限定范围的数量包括在内。除非另有说明,否则氨基酸序列以氨基到羧基的方向从左到右书写。本文提供的标题不限制本公开的各种方面或方面,其可通过整体参考本说明书而得。因此,如下直接定义的术语通过整体参考说明书被更详细地定义。

[0039] 如本文所用,术语“多肽”意欲涵盖单个“多肽”以及多个“多肽”,并且是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)组成的分子。术语“多肽”是指两个或更多个氨基酸的任何一条或多条链,并不指产物的特定长度。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用来指两个或更多个氨基酸的一条或多条链的任何其他术语包括在“多肽”的定义内,并且术语“多肽”可代替或与任何这些术语互换使用。术语“多肽”也指多肽的表达后修饰产物,包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化以及通过已知保护/封闭基团的衍生化、蛋白水解切割或通过非天然存在的氨基酸的修饰。多肽可衍生自生物源或通过重组技术生产,但不需要从指定的核酸序列翻译。其可以任何方式产生,包括通过化学合成。

[0040] 本文所公开的多肽可具有的大小为约3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、50个或更多个、75个或更多个、100个或更多个、200个或更多个、500个或更多个、1,000个或更多个、或2,000个或更多个氨基酸。多肽可具有定义的三维结构,尽管其不一定具有此种结构。具有定义的三维结构的多肽称为折叠的,并且不具有定义的三维结构但可采用大量不同构象的多肽称为未折叠的。如本文所用,术语糖蛋白是指与至少一个碳水化合物部分偶联的蛋白质,所述至少一个碳水化合物部分通过氨基酸(例如,丝氨酸或天冬酰胺)的含氧或含氮侧链连接到蛋白质。

[0041] “分离的”多肽或其片段、变体或衍生物意指不在其自然环境中的多肽。不需要特定的纯化水平。例如,分离的多肽可从其天然或自然环境中去除。与通过任何合适的技术来分离、分馏或部分或基本上被纯化的天然或重组多肽一样,在宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质被认为是如本文所公开经分离的。

[0042] 如本文所用,术语“非自然存在的多肽”或其任何语法变体是附带条件的定义,所述附带条件的定义明确排除但仅排除由或可能由法官或行政或司法机构确定或解释为“自然发生”的那些形式的多肽。

[0043] 本文所公开的其他多肽为上述多肽的片段、衍生物、类似物或变体及其任何组合。本文所公开的术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”包括保留对应的天然抗体或多肽

的至少一些特性(例如,特异性结合抗原)的任何多肽。除了本文别处讨论的特异性抗体片段以外,多肽的片段包括例如蛋白水解片段以及缺失片段。例如,多肽的变体包括如上所述的片段,并且还包括由于氨基酸置换、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。在某些方面,变体可为非自然存在的。非自然存在的变体可通过使用本领域已知的诱变技术而产生。变体多肽可包含保守或非保守的氨基酸置换、缺失或添加。衍生物是已被改变以表现出原始多肽上未发现的其他特征的多肽。实例包括融合蛋白。变体多肽在本文中也可称为"多肽类似物"。如本文所用,多肽的"衍生物"也可指具有通过功能性侧基的反应来化学衍生的一个或多个氨基酸的受试多肽。"衍生物"还包括含有20个标准氨基酸的一个或多个衍生物的那些肽。例如,4-羟基脯氨酸可取代脯氨酸;5-羟基赖氨酸可取代赖氨酸;3-甲基组氨酸可取代组氨酸;高丝氨酸可取代丝氨酸;并且鸟氨酸可取代赖氨酸。

[0044] "保守的氨基酸置换"是一个氨基酸被具有相似侧链的另一个氨基酸替代。本领域中已定义了具有相似侧链的氨基酸家族,包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、β支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,用苯丙氨酸取代酪氨酸为保守置换。在某些实施方案中,本公开的多肽和抗体的序列中的保守置换并不取消含有氨基酸序列的多肽或抗体与抗体结合的抗原的结合。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守置换的方法在本领域中是众所周知的(参见,例如,Brummell等人,Biochem.32:1180-1 187(1993);Kobayashi等人,Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:.412-417(1997))。

[0045] 术语"多核苷酸"意欲涵盖单个核酸以及多个核酸,并且是指分离的核酸分子或构建体,例如,信使RNA(mRNA)、cDNA或质粒DNA(pDNA)。多核苷酸可包含常规的磷酸二酯键或非常规的键(例如,酰胺键,诸如在肽核酸(PNA)中发现的)。术语"核酸"或"核酸序列"是指存在于多核苷酸中的任何一个或多个核酸片段,例如,DNA或RNA片段。

[0046] "分离的"核酸或多核苷酸意指与其天然环境分离的任何形式的核酸或多核苷酸。例如,凝胶纯化的多核苷酸或包含在载体中的编码多肽的重组多核苷酸将被认为是"分离的"。此外,已被工程化以具有用于克隆的酶切位点的多核苷酸片段(例如,PCR产物)被认为是"分离的"。分离的多核苷酸的其他实例包括维持在异源宿主细胞中的重组多核苷酸或在非天然溶液(诸如缓冲液或盐水)中纯化(部分或基本上)的多核苷酸。分离的RNA分子包括多核苷酸的体内或体外RNA转录物,其中转录物不是可在自然界中发现的转录物。分离的多核苷酸或核酸还包括合成制备的此类分子。此外,多核苷酸或核酸可为调节元件或可包括调节元件,诸如启动子、核糖体结合位点或转录终止子。

[0047] 如本文所用,术语"非自然存在的多核苷酸"或其任何语法变体是附带条件的定义,所述附带条件的定义明确排除但仅排除由或可能由法官或行政或司法机构确定或解释为"自然发生"的那些形式的核酸或多核苷酸。

[0048] 如本文所用,"编码区"是由翻译成氨基酸的密码子组成的核酸的一部分。尽管"终止密码子"(TAG、TGA或TAA)未翻译为氨基酸,但其可被认为是编码区的一部分,但是任何侧翼序列(例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子等)不是编码区的一部分。两个

或更多个编码区可存在于单个多核苷酸构建体中,例如,在单个载体上,或存在于单独的多核苷酸构建体中,例如,在单独的(不同的)载体上。此外,任何载体可含有单个编码区,或可包含两个或更多个编码区,例如,单个载体可分别编码免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区。此外,载体、多核苷酸或核酸可包括与另一编码区融合或未融合的异源编码区。异源编码区包括但不限于编码特殊元件或基序的那些区域,诸如分泌信号肽或异源功能域。

[0049] 在某些实施方案中,多核苷酸或核酸为DNA。在DNA的情况下,包含编码多肽的核酸的多核苷酸通常可包括启动子和/或与一个或多个编码区可操作地缔合的其他转录或翻译控制元件。可操作的缔合是基因产物(例如,多肽)的编码区与一个或多个调控序列缔合,从而将基因产物的表达置于一个或多个调控序列的影响或控制之下。如果启动子功能的诱导导致编码所需基因产物的mRNA转录,并且如果两个DNA片段之间的连接性质不干扰表达调控序列指导基因产物表达的能力或不干扰DNA模板被转录的能力,则两个DNA片段(诸如多肽编码区和与其缔合的启动子)是“可操作地缔合”。因此,如果启动子能够实现核酸的转录,则启动子区域将与编码多肽的该核酸可操作地缔合。启动子可为细胞特异性启动子,其指导DNA在预定细胞中的实质转录。除启动子外,其他转录控制元件,例如增强子、操纵子、阻遏子和转录终止信号,可与多核苷酸可操作地缔合以指导细胞特异性转录。

[0050] 多种转录控制区是本领域技术人员已知的。这些包括但不限于在脊椎动物细胞中起作用的转录控制区,诸如但不限于来自巨细胞病毒的启动子和增强子片段(即刻早期启动子,与内含子-A结合)、猿猴病毒40(早期启动子)和逆转录病毒(诸如劳斯肉瘤病毒)。其他转录控制区包括衍生自脊椎动物基因的那些,诸如肌动蛋白、热休克蛋白、牛生长激素和兔β-珠蛋白、以及能够控制真核细胞中基因表达的其他序列。其他合适的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及淋巴因子诱导的启动子(例如,可由干扰素或白介素诱导的启动子)。

[0051] 类似地,多种翻译控制元件是本领域普通技术人员已知的。这些包括但不限于核糖体结合位点、翻译起始密码子和终止密码子、以及衍生自微小核糖核酸病毒的元件(特别是内部核糖体进入位点或IRES,也称为CITE序列)。

[0052] 在其他实施方案中,多核苷酸可为RNA,例如呈信使RNA(mRNA)、转移RNA或核糖体RNA的形式。

[0053] 多核苷酸和核酸编码区可与编码分泌肽或信号肽的其他编码区缔合,所述分泌肽或信号肽指导由本文所公开的多核苷酸编码的多肽的分泌。根据信号假说,哺乳动物细胞分泌的蛋白具有信号肽或分泌前导序列,一旦生长中的蛋白链开始通过粗面内质网输出,所述信号肽或分泌前导序列就从成熟蛋白上被切割下来。本领域普通技术人员意识到,脊椎动物细胞分泌的多肽可具有与多肽的N端融合的信号肽,所述信号肽可从完整或“全长”多肽上切割下来以产生分泌的或“成熟”形式的多肽。在某些实施方案中,使用天然信号肽,例如,免疫球蛋白重链或轻链信号肽,或该序列的功能性衍生物,其保留指导与其可操作地缔合的多肽分泌的能力。另选地,可使用异源哺乳动物信号肽或其功能性衍生物。例如,野生型前导序列可被人组织纤溶酶原激活剂(TPA)或小鼠β-葡糖醛酸糖苷酶的前导序列置换。

[0054] 如本文所用,术语“结合分子”在最广泛的意义上是指特异性结合受体(例如,表位

或抗原决定簇)的分子。如本文进一步描述的,结合分子可包含本文所述的多个“抗原结合结构域”中的一个。结合分子的非限制性实例是如本文详细描述的抗体或抗体样分子,其保留抗原特异性结合。在某些方面,“结合分子”包含如本文详细描述的抗体或抗体样分子。

[0055] 如本文所用,术语“结合结构域”或“抗原结合结构域”(可互换使用)是指结合分子(例如,抗体或抗体样分子)的区域,其对于特异性结合表位是必要且充分的。例如,“Fv”,例如,抗体的可变重链和可变轻链,作为两个单独的多肽亚基或作为单链,被认为是“结合结构域”。其他抗原结合结构域包括但不限于衍生自骆驼科物种的抗体的可变重链(VHH)、或在纤连蛋白支架中表达的六个免疫球蛋白互补决定区(CDR)。如本文所述的“结合分子”或“抗体”可包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个或更多个“抗原结合结构域”。

[0056] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文可互换使用。抗体(或本文所公开的其片段、变体或衍生物)包括至少重链的可变结构域(骆驼科物种)或至少重链和轻链的可变结构域。脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构被相对较好地理解。参见,例如,Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版,1988)。除非另有说明,否则术语“抗体”涵盖从抗体的小抗原结合片段到全长抗体的任何事物,例如,包括两条完整重链和两条完整轻链的IgG抗体、包括四条完整重链和四条完整轻链并且任选地包括J链和/或分泌组分的IgA抗体、或包括十条或十二条完整重链和十条或十二条完整轻链并且任选地包括J链或其功能片段的IgM抗体。

[0057] 术语“免疫球蛋白”包含可在生化上区分的各种广泛的多肽类。本领域技术人员将理解,重链分类为伽马、缪、阿尔法、德尔塔或伊普西龙(γ、μ、α、δ、ε),其中有一些亚类(例如,γ1至γ4或α1至α2)。此链的性质决定了抗体的“同种型”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(亚型),例如,IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1、IgA_2等已被很好地表征,并且已知具有功能专一性。鉴于本公开,这些免疫球蛋白中的每种的修饰形式对于本领域技术人员是容易辨别的并因此在本公开的范围内。

[0058] 轻链分类为卡帕或兰布达(κ、λ)。每个重链类别可与κ或λ轻链结合。通常,轻链和重链彼此共价键合,并且当例如,通过杂交瘤、B细胞或基因工程宿主细胞来表达免疫球蛋白时,两条重链的“尾”部分通过共价二硫键或非共价键彼此键合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的叉端的N端到每条链底部的C端。某些抗体(例如,IgG抗体)的基本结构包括通过二硫键共价连接的两个重链亚基和两个轻链亚基,以形成“Y”结构(在本文中也称为“H2L2”结构)或“结合单元。”

[0059] 在本文中使用术语“结合单元”是指结合分子例如抗体、抗体样分子、其抗原结合片段或其多聚片段的一部分,所述部分对应于标准的“H2L2”免疫球蛋白结构,即,两条重链或其片段和两条轻链或其片段。在某些方面,例如,在结合分子为二价IgG抗体或其抗原结合片段的情况下,术语“结合分子”和“结合单元”是等同的。在其他方面,例如,在结合分子为多聚体的情况下,例如,二聚体IgA抗体或IgA样抗体、五聚体IgM抗体或IgM样抗体、或六聚体IgM抗体或IgM样抗体,结合分子包含两个或更多个“结合单元”。在IgA二聚体的情况下为两个结合单元、或在IgM五聚体或六聚体的情况下分别为五个或六个结合单元。结合单元不需要包括全长抗体的重链和轻链,但通常将是二价的,即,将包括两个如上所定义的“抗原结合结构域”。如本文所用,本公开中提供的某些结合分子为“二聚体”,并且包括两个包

括IgA恒定区或其多聚片段的二价结合单元。本公开中提供的某些结合分子为“五聚体”或“六聚体”,并且包括五个或六个包括IgM恒定区或其多聚片段的二价结合单元。包含两个或更多个例如两个、五个或六个结合单元的结合分子,例如抗体或抗体样分子,在本文中被称为“多聚体”。

[0060] 如本文所用,“IgM样抗体”是指仍保留形成六聚体或与J链缔合形成五聚体的能力的变体抗体。IgM样抗体通常至少包括IgM恒定区的Cμ4-tp结构域,但可包括来自源于同一物种或源于不同物种的其他抗体同种型(例如,IgG)的重链恒定区结构域。IgM样抗体同样可为其中一个或多个恒定区缺失的抗体片段,只要IgM样抗体能够形成六聚体和/或五聚体。因此,IgM样抗体可为杂交IgM/IgG抗体、或可为IgM抗体的多聚片段。

[0061] 术语“价”、“二价”、“多价”和语法等同物是指给定结合分子(例如,抗体或抗体样分子)中或给定结合单元中抗原结合结构域的数量。因此,相对于给定结合分子,例如,IgM抗体、IgM样抗体或其多聚片段,术语“二价”、“四价”和“六价”分别表示存在两个抗原结合结构域、四个抗原结合结构域和六个抗原结合结构域。在每个结合单元为二价的情况下,典型的IgM抗体或IgM样抗体可具有10或12个价。二价或多价结合分子,例如,抗体或抗体样分子,可为单特异性的,即,所有抗原结合结构域是相同的,或可为双特异性或多特异性的,例如,其中两个或更多个抗原结合结构域是不同的,例如,结合同一抗原上的不同表位、或结合完全不同的抗原。

[0062] 术语“表位”包括能够特异性结合抗体或抗体样分子的抗原结合结构域的任何分子决定簇。在某些方面,表位可包括分子的化学活性表面基团,诸如氨基酸、糖侧链、磷酰基或磺酰基,并且在某些方面,可具有三维结构特征和/或比电荷特征。表位是由抗体的抗原结合结构域结合的靶区域。

[0063] 术语“靶标”在最广泛的意义上用于包括可由结合分子(例如,抗体或抗体样分子)结合的物质。靶可为例如,多肽、核酸、碳水化合物、脂质或其他分子。此外,“靶”可为例如,细胞、器官或生物体,其包含可由结合分子(例如,抗体或抗体样分子)结合的表位结合。

[0064] 轻链和重链分为结构同源和功能同源的区域。术语“恒定”和“可变”在功能上使用。在这方面,应当理解,可变轻链(VL)和可变重链(VH)部分的可变结构域决定抗原识别和特异性。相反,轻链(CL)和重链的恒定结构域(例如,CH1、CH2、CH3或CH4)赋予生物学特性,例如分泌、经胎盘移动性、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随其离抗体的抗原结合位点或氨基端越来越远而增加。N端部分是可变区,并且C端部分是恒定区;CH3(或在IgM的情况下为CH4)和CL结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基端。

[0065] “全长IgM抗体重链”是多肽,所述多肽在N端至C端方向上包括抗体重链可变结构域(VH)、抗体重链恒定结构域1(CM1或Cμ1)、抗体重链恒定结构域2(CM2或Cμ2)、抗体重链恒定结构域3(CM3或Cμ3)和可包括尾部片段的抗体重链恒定结构域4(CM4或Cμ4)。

[0066] 如上所指出的那样,一个或多个可变区允许结合分子(例如,抗体或抗体样分子)选择性地识别并特异性结合抗原上的表位。即,结合分子(例如,抗体或抗体样分子)的VL结构域和VH结构域或互补决定区(CDR)的子集组合以形成抗原结合结构域。更具体地,抗原结合结构域可由每个VH和VL链上的三个CDR定义。某些抗体形成较大的结构。例如,IgA可形成分子,所述分子包括通过二硫键共价连接的两个H2L2结合单元和J链,所述分子还可与分泌组分缔合,并且IgM可形成五聚体或六聚体分子,所述五聚体或六聚体分子包括通过二硫键

共价连接的五个或六个H2L2结合单元和任选地J链。

[0067] 抗体抗原结合结构域中存在的六个“互补决定区”或“CDR”是短的非连续氨基酸序列,当抗体在水性环境中呈现其三维构型时,所述氨基酸序列被特别定位以形成抗原结合结构域。抗原结合结构域中的其余氨基酸被称为“骨架”区,其示出较小的分子间变异性。骨架区主要采用β-片层构象,并且CDR形成环,所述环连接且在一些情形下形成β-片层结构的一部分。因此,骨架区起形成支架的作用,所述支架提供通过链间非共价相互作用将CDR定位在正确的方向上。由定位的CDR形成的抗原结合结构域限定与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。此互补表面促进抗体与其同源表位的非共价结合。对于任何给定的重链或轻链可变区,本领域普通技术人员可容易地识别分别组成CDR和骨架区的氨基酸,因为它们是以各种不同的方式定义的(参见,"Sequences of Proteins of Immunological Interest,"Kabat,E.,等人,U.S.Department of Health and Human Services,(1983);和Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.,196:901-917(1987),其以引用的方式整体并入本文)。

[0068] 在本领域内使用和/或公认的术语存在两个或更多个定义的情况下,除非明确相反说明,否则本文所用的术语的定义意欲包括所有此类含义。具体的实例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)来描述在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。已例如由Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,"Sequences of Proteins of Immunological Interest"(1983)以及由Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)描述了这些特定区域,所述文献其以引用的方式并入本文。Kabat和Chothia定义包括彼此比较时的氨基酸的重叠或子集。然而,除非另有指明,否则采用任一定义(或本领域普通技术人员已知的其他定义)来提及抗体或其变体的CDR意欲落入本文定义和使用的术语的范围内。下表1中列出了涵盖由以上引用的参考文献中的每个所定义的CDR的适当氨基酸,作为比较。涵盖特定CDR的确切氨基酸数将根据CDR的序列和大小而变化。给定抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可常规地确定哪些氨基酸包含特定的CDR。

[0069] 表1 CDR定义*

[0070]

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[0071] *表1中所有CDR定义的编号是根据Kabat等人提出的编号约定(见下文)。

[0072] 例如,也可使用IMGT信息系统(imgt_dot_cines_dot_fr/)(IMGT®/V-Quest)对抗体可变结构域进行分析,以识别可变区片段,包括CDR。(参见,例如,Brochet等人,Nucl.Acids Res.,36:W503-508,2008)。

[0073] Kabat等人还定义了适用于任何抗体的可变结构域序列的编号系统。本领域普通技术人员可明确地将此“Kabat编号”系统分配给任何可变结构域序列,而不依赖于序列本身以外的任何实验数据。如本文所用,“Kabat编号”是指由以下提出的编号系统:Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,"Sequence of Proteins of

Immunological Interest"(1983)。然而,除非明确指出使用Kabat编号系统,否则本公开中所有氨基酸序列使用连续编号。

[0074] 用于人IgM恒定结构域的Kabat编号系统可发现于Kabat等人,"Tabulation and Analysis of Amino acid and nucleic acid Sequences of Precursors,V-Regions,C-Regions,J-Chain,T-Cell Receptors for Antigen,T-Cell Surface Antigens,β-2 Microglobulins,Major Histocompatibility Antigens,Thy-1,Complement,C-Reactive Protein,Thymopoietin,Integrins,Post-gamma Globulin,α-2 Macroglobulins,and Other Related Proteins,"U.S.Dept.of Health and Human Services(1991)中。IgM恒定区可顺序地编号(即,氨基酸#1从恒定区的第一个氨基酸开始)、或通过使用Kabat编号方案编号。下文列出了人IgM恒定区顺序地编号(在本文中表示为SEQ ID NO:12)和通过Kabat系统编号的比较。下划线的氨基酸残基未在Kabat系统中列入:

[0075] IgM重链的顺序的(SEQ ID NO:12)/KABAT编号键

1/127 GSASAPTLFP LVSCENSPSD TSSVAVGCLA QDFLPDSITF SWKYKNNSDI

51/176 SSTRGFPSVL RGGKYAATSQ VLLPSKDVMQ GTDEHVVCKV QHPNGNKEKN

101/226 VPLPVIAELP PKVSVFVPPR DGFFGNPRKS KLICQATGFS PRQIQVSWLR

151/274 EGKQVGSGVT TDQVQAEAKE SGPTTYKVTS TLTIKESDWL SQSMFTCRVD

201/324 HRGLTFQQNA SSMCVPDQDT AIRVFAIPPS FASIFLTKST KLTCLVTDLT

[0076]

251/374 TYDSVTISWT RQNGEAVKTH TNISESHPNA TFSAVGEASI CEDDWNSGER

301/424 FTCTVTHTDL PSPLKQTISR PKGVALHRPD VYLLPPAREQ LNLRESATIT

351/474 CLVTGFSPAD VFVQWMQRGQ PLSPEKYVTS APMPEPQAPG RYFAHSILTV

401/524 SEEEWNTGET YTCVVAHEAL PNRVTERTVD KSTGKPTLYN VSLVMSDTAG

451/574 TCY

[0077] 结合分子,例如,抗体、抗体样分子、其抗原结合片段、变体或衍生物,和/或其多聚片段包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段,例如,Fab、Fab'和F(ab')$_2$、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)、包含VL或VH结构域的片段、由Fab表达文库产生的片段。ScFv分子在本领域中已知并且描述于例如美国专利5,892,019中。

[0078] "特异性结合"通常是指结合分子(例如,抗体或其片段、变体或衍生物)通过其抗原结合结构域结合表位,并且结合需要抗原结合结构域与表位之间的某种互补性。根据此定义,当与随机的无关表位结合相比,结合分子(例如,抗体或抗体样分子)通过其抗原结合结构域更容易地结合一个表位时,可将其判定为"特异性结合"该表位。本文中使用术语"特异性"以限定某个结合分子与某个表位结合的相对亲和力。例如,可认为对于给定的表位,结合分子"A"比结合分子"B"具有更高的特异性,或可将结合分子"A"判定为与表位"C"结合的特异性比与相关表位"D"结合的特异性更高。

[0079] 可将本文所公开的结合分子(例如,抗体或其片段、变体或衍生物)判定为以小于

或等于5X 10^{-2}秒$^{-1}$、10^{-2}秒$^{-1}$、5X 10^{-3}秒$^{-1}$、10^{-3}秒$^{-1}$、5X 10^{-4}秒$^{-1}$、10^{-4}秒$^{-1}$、5X 10^{-5}秒$^{-1}$或10^{-5}秒$^{-1}$、5X 10^{-6}秒$^{-1}$、10^{-6}秒$^{-1}$、5X 10^{-7}秒$^{-1}$或10^{-7}秒$^{-1}$的解离率(k(off))与靶抗原结合。

[0080] 可将本文所公开的结合分子(例如,抗体或抗原结合片段、变体或衍生物)判定为以大于或等于10^{3}M^{-1}秒$^{-1}$、5X 10^{3}M^{-1}秒$^{-1}$、10^{4}M^{-1}秒$^{-1}$、5X 10^{4}M^{-1}秒$^{-1}$、10^{5}M^{-1}秒$^{-1}$、5X 10^{5}M^{-1}秒$^{-1}$、10^{6}M^{-1}秒$^{-1}$、或5X 10^{6}M^{-1}秒$^{-1}$或10^{7}M^{-1}秒$^{-1}$的结合率(k(on))与靶抗原结合。

[0081] 如果结合分子(例如,抗体或其片段、变体或衍生物)优先结合表位以致于其在一定程度上阻断参考抗体或抗原结合片段与给定表位的结合,则可将其判定为竞争性抑制参考抗体或抗原结合抗体与该表位的结合。竞争抑制可通过本领域已知的任何方法,例如竞争ELISA测定来确定。可将结合分子判定为竞争性地抑制参考抗体或抗原结合片段与给定表位的结合至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。

[0082] 如本文所用,术语“亲和力”是指单个表位与例如免疫球蛋白分子的一个或多个抗原结合结构域结合强度的量度。参见,例如,Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版,1988),第27至28页。如本文所用,术语“亲合力”是指抗原结合结构域群与抗原之间的复合物的整体稳定性。参见,例如,Harlow,第29至34页。亲合力不仅与群体中单个抗原结合结构域与特定表位的亲和力有关,并且还与免疫球蛋白和抗原的价有关。例如,二价单克隆抗体与诸如多聚体的具有高度重复的表位结构的抗原之间的相互作用将是高亲合力的相互作用。二价单克隆抗体与在细胞表面上以高密度存在的受体之间的相互作用也将具有高亲合力。

[0083] 如本文所公开的结合分子(例如,抗体或其片段、变体或衍生物)也可根据其交叉反应性来描述或指定。如本文所用,术语“交叉反应性”是指对一种抗原具有特异性的结合分子(例如,抗体或其片段、变体或衍生物)与第二抗原反应的能力;两种不同抗原物质之间相关性的量度。因此,如果结合分子与诱导其形成的表位以外的表位结合,则其是交叉反应的。交叉反应性表位通常含有许多与诱导表位相同的互补结构特征,并且在一些情况下,可实际上比原始表位更适合。

[0084] 结合分子(例如,抗体或其片段、变体或衍生物)也可根据其与抗原的结合亲和力来描述或指定。例如,结合分子可以不大于5x 10^{-2}M、10^{-2}M、5x 10^{-3}M、10^{-3}M、5x 10^{-4}M、10^{-4}M、5x 10^{-5}M、10^{-5}M、5x 10^{-6}M、10^{-6}M、5x 10^{-7}M、10^{-7}M、5x 10^{-8}M、10^{-8}M、5x 10^{-9}M、10^{-9}M、5x 10^{-10}M、10^{-10}M、5x 10^{-11}M、10^{-11}M、5x 10^{-12}M、10^{-12}M、5x 10^{-13}M、10^{-13}M、5x 10^{-14}M、10^{-14}M、5x 10^{-15}M或10^{-15}M的解离常数或K_D与抗原结合。

[0085] 包括单链抗体或其他抗原结合结构域的“抗原结合抗体片段”可单独存在或与以下中的一种或多种组合存在:铰链区、CH1、CH2、CH3或CH4结构域、J链或分泌组分。还包括抗原结合片段,所述抗原结合片段可包括一个或多个可变区与以下中的一个或多个的任何组合:铰链区、CH1、CH2、CH3或CH4结构域、J链或分泌组分。结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段,可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。抗体可为人、鼠科动物、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡的抗体。在另一个实施方案中,可变区可为软骨鱼(condricthoid)来源(例如,来自鲨鱼)。如本文所用,“人”抗体包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并且包括从人免疫球蛋白文库或从针对一种或多种人免疫球蛋白转基因的动物分离的抗体,并且可在一些情况下表达内源性免疫球蛋白,而在一些情况下不表达,如描述于下文中,并且例如描述于Kucherlapati等人的美国专利号5,939,598中。根据本公开的方面,本

文提供的IgM或IgM样抗体可包括抗体的抗原结合片段,例如,scFv片段,只要IgM或IgM样抗体能够形成多聚体,例如,六聚体或五聚体。

[0086] 如本文所用,术语“重链亚基”包括衍生自免疫球蛋白重链的氨基酸序列,包含重链亚基的结合分子(例如,抗体或抗体样分子)可包括以下中的至少一个:VH结构域、CH1结构域、铰链(例如,上、中和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域、CH4结构域或其变体或片段。例如,结合分子(例如抗体、抗体样分子或其片段、变体或衍生物)可包括但不限于:除了VH结构域之外,CH1结构域;CH1结构域、铰链和CH2结构域;CH1结构域和CH3结构域;CH1结构域、铰链和CH3结构域;或CH1结构域、铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。在某些方面,结合分子(例如,抗体、抗体样分子或其片段、变体或衍生物)可包括除了VH结构域之外,CH3结构域和CH4结构域;或CH3域、CH4域和J链。此外,用于本公开的结合分子(例如,抗体或抗体样分子)可缺乏某些恒定区部分,例如,CH2结构域的全部或部分。本领域普通技术人员将理解,可修饰这些结构域(例如,重链亚基),使得其在氨基酸序列上与原始免疫球蛋白分子不同。根据本公开的方面,本文提供的IgM或IgM样抗体包含IgM重链恒定区的足够部分,以允许IgM或IgM样抗体形成多聚体,例如,六聚体或五聚体。

[0087] 如本文所用,术语“轻链亚基”包括衍生自免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。轻链亚基至少包括VL,并且还可包括CL(例如,Cκ或Cλ)结构域。

[0088] 结合分子(例如,抗体、抗体样分子、其抗原结合片段、变体或衍生物或其多聚片段)可根据其识别或特异性结合的抗原的一个或多个表位或部分来描述或指定。与抗体的抗原结合结构域特异性相互作用的靶抗原的部分为“表位”或“抗原决定簇”。靶抗原可包含单个表位或至少两个表位,并且可包括任意数量的表位,其取决于抗原的大小、构象和类型。

[0089] 如前所述,各种免疫球蛋白类的恒定区的亚基结构和三维构型是众所周知的。如本文所用,术语“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基端可变结构域,并且术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一(最氨基端)恒定区结构域。CH1结构域与VH结构域相邻,并且在典型的IgG重链分子的铰链区的氨基端。

[0090] 如本文所用,术语“CH2结构域”包括重链分子的部分,所述重链分子的部分例如使用常规编号方案从IgG抗体的约氨基酸244延伸到氨基酸360(氨基酸244至360,Kabat编号系统;以及氨基酸231至340,EU编号系统;参见Kabat EA等人,op.cit)。CH3结构域从CH2结构域延伸至IgG分子的C端,并包含约108个氨基酸。某些免疫球蛋白类,例如,IgM,还包括CH4区。

[0091] 如本文所用,术语“铰链区”包括在IgG、IgA和IgD重链中将CH1结构域连接到CH2结构域的重链分子的部分。此铰链区包含约25个氨基酸并且是柔性的,从而允许两个N端抗原结合区独立移动。

[0092] 如本文所用,术语“二硫键”包括在两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包含可与第二硫醇基形成二硫键或桥的硫醇基。

[0093] 如本文所用,术语“嵌合抗体”是指其中免疫反应性区域或位点获自或衍生自第一物种并且恒定区(其可为完整、部分或修饰的)获自第二物种的抗体。在一些实施方案中,靶结合区或位点将来自非人来源(例如,小鼠或灵长类),并且恒定区为人。

[0094] 术语“多特异性抗体”或“双特异性抗体”是指在单个抗体分子内具有针对两个或

更多个不同表位的抗原结合结构域的抗体或抗体样分子。除标准抗体结构外,其他结合分子可以两种结合特异性构建。由双特异性或多特异性抗体结合的表位可为同时或顺序的。三源杂交瘤和杂化杂交瘤是可分泌双特异性抗体的细胞系的两个实例。双特异性抗体还可通过重组方式构建。(Ströhlein 和Heiss,Future Oncol.6:1387-94(2010);Mabry和Snavely,IDrugs.13:543-9(2010))。双特异性抗体还可为双体抗体。

[0095] 如本文所用,术语“工程抗体”是指其中重链和轻链或两者中的可变结构域通过CDR或骨架区中的一个或多个氨基酸的至少部分置换而改变的抗体。在某些方面,可将来自已知特异性的抗体的整个CDR移植到异源抗体的骨架区中。尽管替代的CDR可衍生自与衍生骨架区的抗体相同类别或甚至亚类的抗体,但是CDR也可衍生自不同类别的抗体,例如,衍生自不同物种的抗体。其中将来自已知特异性的非人抗体的一个或多个“供体”CDR移植到人重链或轻链骨架区中的工程抗体在本文中称为“人源化抗体”。在某些方面,并不是所有的CDR被来自供体可变区的完整CDR取代,但是供体的抗原结合能力仍然可转移到受体可变结构域。根据例如美国专利号5,585,089、5,693,761、5,693,762和6,180,370中提出的解释,通过进行常规实验或通过反复试验来获得功能性工程抗体或人源化抗体,这将完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0096] 如本文所用,术语“工程化”包括通过合成方式(例如,通过重组技术、体外肽合成、通过肽的酶促或化学偶联或这些技术的某种组合)对核酸或多肽分子进行操纵。

[0097] 如本文所用,术语“连接”、“融合”或其他语法等同物可互换使用。这些术语是指通过包括化学缀合或重组方式的任何方式将两个或更多个元件或组分连接在一起。“框内融合”是指将两个或更多个多核苷酸开放阅读框(ORF)连接以形成连续的更长的ORF,以保持原始ORF的翻译阅读框的方式进行。因此,重组融合蛋白是含有两个或更多个片段的单一蛋白质,所述两个或更多个片段对应于由原始ORF编码的多肽(其片段在自然界中通常不会如此连接)。尽管因此阅读框在整个融合片段中是连续的,但是片段可通过例如框内连接基序列在物理上或空间上分离。例如,编码免疫球蛋白可变区的CDR的多核苷酸可在框内融合,但是可被编码至少一个免疫球蛋白骨架区或另外的CDR区的多核苷酸分离,只要“融合”CDR作为连续多肽的一部分共同翻译。

[0098] 在多肽的上下文中,“线性序列”或“序列”是氨基酸在多肽中从氨基端到羧基端方向的顺序,其中序列中彼此紧邻的氨基酸在多肽的初级结构中是连续的。在多肽另一部分“氨基端”或“N端”的多肽部分是在顺序多肽链中出现较早的那部分。类似地,在多肽另一部分“羧基端”或“C端”的多肽部分是在顺序多肽链中出现较迟的那部分。例如,在典型的抗体中,可变结构域在恒定区的“N端”,并且恒定区在可变结构域的“C端”。

[0099] 如本文所用,术语“表达”是指基因产生生化物质例如多肽的过程。过程包括细胞内基因功能性存在的任何表现,包括但不限于基因敲低以及瞬时表达和稳定表达。其包括但不限于将基因转录成RNA,例如,信使RNA(mRNA),以及将此种mRNA翻译成一个或多个多肽。如果最终所需的产品是生化物质,则表达包括创建该生化物质和任何前体。基因的表达产生“基因产物”。如本文所用,基因产物可为核酸,例如,通过基因转录产生的信使RNA,或可为从转录物翻译的多肽。本文所述的基因产物还包括具有转录后修饰(例如,聚腺苷酸化)的核酸,或具有翻译后修饰(例如,甲基化、糖基化、脂质的添加、与其他蛋白质亚基的缔合、蛋白水解切割等)的多肽。

[0100] 诸如“治疗”或“缓解”的术语是指治愈、减缓、减轻现有诊断出的病理疾患或病症的症状和/或停止或减慢现有诊断出的病理疾患或病症的进展的治疗措施。诸如“预防”、“避免”、“遏阻”等的术语是指预防未诊断的靶病理疾患或病症发展的预防措施或预防性措施。因此,“需要治疗的那些”可包括已经患有病症的那些;易患病症的那些;以及将预防病症的那些。

[0101] 如本文所用,术语“血清半衰期”或“血浆半衰期”是指施用后使药物(例如,如本文所述的结合分子,诸如抗体、抗体样分子或其片段)的血清或血浆浓度降低50%所需的时间(例如,以分钟、小时或天为单位)。可描述两个半衰期:阿尔法半衰期、α半衰期或$t_{1/2}\alpha$,其是由于药物从中央室(例如,在静脉内递送情况下的血液)到外周室(例如,组织或器官)的重新分配过程引起的血浆浓度下降速率,以及贝塔半衰期、β半衰期或$t_{1/2}\beta$,其是由于排泄或新陈代谢过程引起的下降速率。

[0102] 如本文所用,术语“血浆药物浓度-时间曲线下的面积”或“AUC”反映在施用一定剂量的药物后人体对药物的实际暴露,并且以mg*h/L表示。此曲线下面积是从时间0(t_0)到无穷大(∞)测得的,并且取决于从体内清除药物的速率和施用的剂量。

[0103] 如本文所用,术语“平均停留时间”或“MRT”是指药物在体内保留的平均时间长度。

[0104] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指需要诊断、预后或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人、家畜、农场动物以及动物园、运动场或宠物动物,诸如狗、猫、豚鼠、兔子、大鼠、小鼠、马、猪、牛、熊等。

[0105] 如本文所用,诸如“将从治疗中受益的受试者”和“需要治疗的动物”的短语是指从所有预期受试者中的受试者的子集,所述受试者将受益于施用给定的治疗剂,例如,结合分子,诸如抗体,其包含一个或多个抗原结合结构域。此类结合分子,例如抗体,可例如用于诊断程序和/或用于治疗或预防疾病。

[0106] IgM或IgM样抗体

[0107] IgM是B细胞响应抗原刺激产生的第一免疫球蛋白,并且以约1.5mg/ml自然存在于血清中,其中半衰期为约5天。IgM是五聚体或六聚体分子,并因此包括五个或六个结合单元。IgM结合单元通常包括两条轻链和两条重链。虽然IgG重链恒定区含有三个重链恒定区(CH1、CH2和CH3),但是IgM的重(μ)恒定区还含有第四个恒定区(CH4)并且包括C端“尾部片段”。人IgM恒定区通常包含氨基酸序列SEQ ID NO:12(与例如GenBank登录号pir||S37768、CAA47708.1和CAA47714.1相同)。人Cμ1区的范围为SEQ ID NO:12的约氨基酸5至约氨基酸102;人Cμ2区的范围为SEQ ID NO:12的约氨基酸114至约氨基酸205、人Cμ3区的范围为SEQ ID NO:12的约氨基酸224至约氨基酸319、Cμ4区的范围为SEQ ID NO:12的约氨基酸329至约氨基酸430、并且尾部片段的范围为SEQ ID NO:12的约氨基酸431至约氨基酸453。SEQ ID NO:12如下所示。

[0108] SEQ ID NO:12:

[0109] GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKY

VTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

[0110] 存在其他形式的具有微小序列变化的人IgM恒定区,包括但不限于GenBank登录号P01871.4、CAB37838.1和pir||MHHU。在与本公开别处描述和要求保护的SEQ ID NO:12相对应的位置处的氨基酸置换、插入和/或缺失同样可并入替代的人IgM序列中,以及其他物种的IgM恒定区氨基酸序列中,例如,图1中示出的那些。

[0111] 每个IgM重链恒定区可与抗原结合结构域(例如,scFv或VHH)或抗原结合结构域的亚基(例如,VH区)缔合。

[0112] 五个IgM结合单元可与另一小多肽链(J链)形成复合物,以形成五聚体IgM抗体或IgM样抗体。人J链的前体形式SEQ ID NO:1如下所示。信号肽(带下划线)从SEQ ID NO:1的氨基酸1延伸至约氨基酸22,并且成熟人J链从SEQ ID NO:1的约氨基酸23延伸至氨基酸159。成熟人J链包括氨基酸序列SEQ ID NO:2。

[0113] SEQ ID NO:1:

[0114] MKNHLLFWGVLAVFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0115] SEQ ID NO:2如下所示。

[0116] SEQ ID NO:2:

[0117] QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0118] 在没有J链的情况下,IgM抗体或IgM样抗体通常组装成六聚体,包含多至十二个抗原结合结构域。在有J链的情况下,IgM抗体或IgM样抗体通常组装成五聚体,包含多至十个抗原结合结构域,或如果J链是包含有包含其他抗原结合结构域的异源多肽的经修饰的J链时,包含更多个抗原结合结构域。五个或六个IgM结合单元组装成五聚体或六聚体IgM抗体或IgM样抗体被认为涉及Cμ4和尾部片段结构域。参见,例如,Braathen,R.,等人,J.Biol.Chem.277:42755-42762(2002)。因此,本公开中提供的五聚体或六聚体IgM抗体通常至少包括Cμ4和/或尾部片段结构域(在本文中也统称为Cμ4-tp)。因此,IgM重链恒定区的“多聚片段”至少包括Cμ4-tp结构域。IgM重链恒定区还可包括Cμ3结构域或其片段、Cμ2结构域或其片段、Cμ1结构域或其片段、和/或其他IgM重链结构域。在某些方面,结合分子(例如,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体)可包括完整的IgM重(μ)链恒定结构域,例如,SEQ ID NO:12、或其变体、衍生物或类似物。

[0119] 在某些方面,本公开提供了一种包含五个二价结合单元的五聚体IgM或IgM样抗体,其中每个结合单元包括两个IgM重链恒定区或其多聚片段或变体,其各自与抗原结合结构域或其亚基缔合。在某些方面,两个IgM重链恒定区为人重链恒定区。

[0120] 当本文提供的IgM或IgM样抗体为五聚体时,IgM或IgM样抗体通常还包含J链或其功能片段或变体。在某些方面,J链为经修饰的J链或其变体,其还包含一个或多个与其附接的异源部分,如本文别处所述。在某些方面,如本文别处所讨论的,可使J链突变以影响(例如,增强)本文提供的IgM或IgM样抗体的血清半衰期。

[0121] IgM重链恒定区可包括一个或多个Cμ1结构域或其片段或变体、Cμ2结构域或其片段或变体、Cμ3结构域或其片段或变体、和/或Cμ4结构域或其片段或变体,前提条件是恒定

区可在IgM或IgM样抗体中发挥所需功能,例如,与第二IgM恒定区缔合以形成抗原结合结构域,和/或与其他结合单元(并且在五聚体的情况下为J链)缔合以形成六聚体或五聚体。在某些方面,在单个结合单元内的两个IgM重链恒定区或其片段或变体各自包含Cμ4结构域或其片段或变体、尾部片段(tp)或其片段或变体、或Cμ4结构域与TP或其片段或变体的组合。在某些方面,在单个结合单元内的两个IgM重链恒定区或其片段或变体各自还包含Cμ3结构域或其片段或变体、Cμ2结构域或其片段或变体、Cμ1结构域或其片段或变体、或其任何组合。

[0122] 经修饰的J链

[0123] 在某些方面,本文提供的五聚体IgM或IgM样抗体的J链可例如通过引入异源部分或两个或更多个异源部分(例如,多肽)来修饰,而不干扰IgM或IgM样抗体组装并结合其一个或多个结合靶的能力。参见美国专利号9,951,134、PCT公布号WO 2017/059387和PC T公布号WO 2017/059380,其各自以引用的方式整体并入本文。因此,本文提供的IgM或IgM样抗体,包括本文别处所述的多特异性IgM或IgM样抗体,可包含经修饰的J链或其功能片段或变体,所述经修饰的J链或其功能片段或变体包含引入到J链或其片段或变体中的异源部分,例如,异源多肽。在某些方面,异源部分可为与J链符合读框地融合或化学缀合至J链或其片段或变体的肽或多肽序列,其中异源多肽直接或间接地融合至变体J链或其功能片段。在某些方面,异源多肽通过肽连接基(例如,由至少5个氨基酸但不超过25个氨基酸组成的肽连接基)融合至J链或其功能片段。在某些方面,肽连接基包括GGGGS(SEQ ID NO:25)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:26)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:27)、GGGGSGGG GSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:28)或GGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGS(SEQ ID NO:29)。在某些方面,异源部分可为与J链缀合的化学部分。要附接到J链的异源部分可包括但不限于结合部分(例如,抗体或其抗原结合片段,例如,单链Fv(ScFv)分子)、可增加IgM或IgM样抗体的半衰期的稳定肽、或诸如多聚体或细胞毒素的化学部分。

[0124] 在一些实施方案中,经修饰的J链可包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域可包括但不限于能够特异性结合靶抗原的多肽(包括小肽)。在某些方面,与经修饰的J链缔合的抗原结合结构域可为抗体或其抗原结合片段,如本文别处所述。在某些方面,抗原结合结构域可为例如衍生自骆驼科或软骨鱼抗体的scFv抗原结合结构域或单链抗原结合结构域。抗原结合结构域可在允许抗原结合结构域与其结合靶结合的任何位置引入J链中,而不干扰J链功能或相关IgM或IgA抗体的功能。插入位置包括但不限于在C端处或其附近、在N端处或其附近、或基于J链的三维结构可接近的内部位置。在某些方面,可将抗原结合结构域引入到SEQ ID NO:2的半胱氨酸残基92与101之间的SEQ ID NO:2的成熟人J链中。在另一方面,可将抗原结合结构域在糖基化位点处或其附近引入到SEQ ID NO:2的人J链中。在另一方面,可将抗原结合结构域引入到SEQ ID NO:2的人J链中,其距C端约10个氨基酸残基内、或距N端约10个氨基酸内。

[0125] 具有改变血清半衰期的J链突变的五聚体IgM或IgM样抗体

[0126] 本公开提供了一种具有增强的血清半衰期的IgM抗体或其多聚片段,例如,五聚体IgM样抗体或其多聚片段。在某些方面,本文提供的IgM或IgM样抗体包含五个二价抗体结合单元或其变体或多聚片段以及J链的变体或其功能片段。J链的“功能片段”是指仍然能够与五个IgM结合单元缔合以形成五聚体或与两个IgA结合单元缔合以形成二聚体的J链片段

(或本文提供的变体J链或经修饰的J链的片段)。所提供的IgM抗体或IgM样抗体的每个结合单元包含两个IgM重链恒定区或其片段或变体(其中片段或变体能够多聚化),其中每个恒定区与抗原结合结构域或其亚基缔合。如本文所提供,“变体J链或其功能片段”可包括相对于参考J链或其功能片段的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入,其中除了一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外,参考J链与变体J链相同。在某些方面,参考J链为野生型J链。本文提供的变体J链或其功能片段可影响(例如,增强)包含变体J链或其功能片段的IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。本文提供的变体J链或其功能片段同样可影响(例如,抑制)包含变体J链或其功能片段的IgM抗体或IgM样抗体与同源受体(例如,Fcαμ受体(FcαμR)或聚合Ig受体(pIgR))结合的能力。术语“一个或多个单一氨基酸置换、插入和缺失”是指变体J链或其功能片段氨基酸序列的每个氨基酸可被单独地置换、缺失或可具有相对于参考J链相邻插入的单一氨基酸,但是变体J链或其功能片段必须仍然能够起到与IgM重链或IgM样重链和抗体轻链组装以形成IgM五聚体或IgM样五聚体的作用。

[0127] 在某些方面,本文提供的变体J链或其功能片段可具有单一氨基酸置换、插入或缺失、两个单一氨基酸置换、插入或缺失的组合(例如,两个单一氨基酸置换或一个单一氨基酸置换和一个单一氨基酸插入或缺失)、三个单一氨基酸置换、插入或缺失的组合、四个单一氨基酸置换、插入或缺失的组合或更多个,其中一个、两个、三个、四个或更多个单一氨基酸置换、插入或缺失可影响(例如,增强)包含变体J链或其功能片段的IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。因此,相对于除了变体J链或其功能片段中的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外相同的参考IgM或IgM样抗体,所提供的IgM或IgM样抗体在向受试动物(例如,小鼠模型)施用时可表现出增加的血清半衰期,其中以相同的方式将所提供的抗体和参考抗体施用于同一动物物种。

[0128] 在某些方面,相对于参考抗体,所提供的包含变体J链的IgM或IgM样抗体的血清半衰期,例如,α半衰期($t_{1/2}\alpha$)、β半衰期($t_{1/2}\beta$)、$t_{1/2}\alpha$和$t_{1/2}\beta$、或总半衰期可增加至少0.1倍、至少0.5倍、至少1倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更多。在某些方面,血清半衰期的增加接近包含相同抗原结合结构域的IgG抗体血清半衰期的增加。

[0129] 在某些方面,相对于参考抗体,包含本文提供的变体J链的IgM抗体或IgM样抗体还表现出其他改进的药代动力学参数,例如,增加的血浆峰值浓度(C_{max})、增加的T_0至∞曲线下面积(AUC),例如,改进的清除时间、增加的平均停留时间(MRT)或其任何组合。在某些方面,相对于除了变体J链或其功能片段中的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外相同的参考IgM或IgM样抗体,AUC可增加至少0.1倍、至少0.5倍、至少1倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更多,其中以相同的方式将所提供的抗体和参考抗体施用于同一动物物种。

[0130] 在某些方面,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的J链包含在与成熟野生型人J链的氨基酸Y102(SEQ ID NO:2)相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换。“对应于成熟野生型人J链的氨基酸Y102的氨基酸”是指与人J链中Y102同源的任何物种的J链序列中的氨基酸。与SEQ ID NO:2中Y102相对应的位置在至少43个其他物种的J链氨基酸序列中是保守的。参见美国专利号9,951,134的图4,其以引用的方式并入本文。如实施例所示,在对应于SEQ ID

NO:2的Y102的位置处的某些突变可抑制某些免疫球蛋白受体,例如,人或鼠Fcαμ受体、鼠Fcμ受体和/或人或鼠聚合Ig受体(pIg受体)与包含突变J链的IgM五聚体的结合。参见,例如,图2。在某些方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸可被任何氨基酸置换。在某些方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸可被丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或精氨酸(R)置换。在一个特定的方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸可被丙氨酸置换。在一个特定的方面,J链或其功能片段或变体为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:3。SEQ ID NO:3如下所示。

[0131] SEQ ID NO:3:

[0132] QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCATYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0133] 在一个特定的方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸可被丝氨酸置换。在一个特定的方面,J链或其功能片段或变体为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:4。SEQ ID NO:4如下所示。

[0134] SEQ ID NO:4

[0135] QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCSTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0136] 在一个特定的方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸可被精氨酸置换。在一个特定的方面,J链或其功能片段或变体为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:5。SEQ ID NO:5如下所示。

[0137] SEQ ID NO:5

[0138] QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCRTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0139] 在某些方面,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的J链包含在与野生型成熟人J链(SEQ ID NO:2)的氨基酸T103相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换。“对应于野生型成熟人J链的氨基酸T103的氨基酸”是指与人J链中T103同源的任何物种的J链序列中的氨基酸。与SEQ ID NO:2中T103相对应的位置在至少37个其他物种的J链氨基酸序列中是保守的。参见美国专利号9,951,134的图4,其以引用的方式并入本文。如实施例所示,在对应于SEQ ID NO:2中T103的位置处的某些突变可抑制人Fcαμ受体与包含突变J链的IgM五聚体的结合。参见图2。在某些方面,与SEQ ID NO:2的T103相对应的氨基酸可被任何氨基酸置换。在一个特定的方面,与SEQ ID NO:2的T103相对应的氨基酸可被丙氨酸置换。在一个特定的方面,J链或其功能片段或变体为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:6。SEQ ID NO:6如下所示。

[0140] SEQ ID NO:6:

[0141] QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYAYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0142] 在某些方面,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的变体J链或其功能片段包含在与成熟野生型人J链(SEQ ID NO:2)的氨基酸N49或氨基酸S51相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换,前提条件是S51未被苏氨酸(T)置换,或其中J链包含在与野生型成熟人J链(SEQ ID NO:2)的氨基酸N49和S51相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换。同样,“与野生型成熟人J链

的SEQ ID NO:2的氨基酸N49相对应的氨基酸或SEQ ID NO:2的S51相对应的氨基酸”是指与人J链中N49和/或S51同源的任何物种的J链序列中的氨基酸。与SEQ ID NO:2中N49和S51相对应的位置在至少43个其他物种的J链氨基酸序列中是保守的。参见美国专利号9,951,134的图4,其以引用的方式并入本文。对应于SEQ ID NO:2的N49和S51的氨基酸以及对应于SEQ ID NO:2的I50的氨基酸在J链中包含N-连接的糖基化基序。因此,N49和/或S51处的突变(除了S51处的单一苏氨酸置换)可预防此基序的糖基化。在某些方面,与SEQ ID NO:2的N49相对应的位置处的天冬酰胺可被任何氨基酸置换。在某些方面,与SEQ ID NO:2的N49相对应的位置处的天冬酰胺可被丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、苏氨酸(T)、丝氨酸(S)或天冬氨酸(D)置换。在一个特定的方面,与SEQ ID NO:2的N49相对应的位置可被丙氨酸(A)置换。在一个特定的方面,J链为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:7。SEQ ID NO:7如下所示。

[0143] SEQ ID NO:7:

[0144] QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNREAISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0145] 在某些方面,与SEQ ID NO:2的S51相对应的位置处的丝氨酸可被除苏氨酸之外的任何氨基酸置换。在某些方面,与SEQ ID NO:2的S51相对应的位置处的丝氨酸可被丙氨酸(A)或甘氨酸(G)置换。在一个特定的方面,与SEQ ID NO:2的S51相对应的位置可被丙氨酸(A)置换。在一个特定的方面,变体J链或其功能片段为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:8。SEQ ID NO:8如下所示。

[0146] SEQ ID NO:8:

[0147] QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENIADPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0148] 在某些方面,本文提供的所提供的IgM抗体或IgM样抗体的变体J链或其功能片段为经修饰的J链,例如,如美国专利号9,951,134中提供的。在某些方面,经修饰的J链还包含异源多肽,其中异源多肽直接或间接地融合至变体J链或其功能片段。在某些方面,异源多肽通过肽连接基(例如,由至少5个氨基酸但不超过25个氨基酸组成的肽连接基)融合至变体J链或其功能片段。在某些方面,肽连接基包括GGGGS(SEQ ID NO:25)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:26)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:27)、GGGGSGGGGSG GGGSGGGGS(SEQ ID NO:28)或GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGS(SEQ ID NO:29)。异源多肽可与变体J链或其功能片段的N端、变体J链或其功能片段的C端融合,异源多肽可与变体J链或其功能片段的N端和C端融合。在某些方面,异源多肽包含抗原结合结构域。在某些方面,异源多肽的结合结构域为抗体或其抗原结合片段,例如,Fab片段、Fab’片段、F(ab’)2片段、Fd片段、Fv片段、单链Fv(scFv)片段、二硫键连接的Fv(sdFv)片段或其任何组合。在某些方面,异源多肽可特异性结合CD3ε,例如,可增加提供的IgM或IgM样抗体的血清半衰期的经修饰的变体J链或其功能片段是经修饰的J链“V15J”(SEQ ID NO:9)的变体,并且可包含例如,氨基酸序列SEQ ID NO:10(V15J-Y102A)、或SEQ ID NO:23(V15J-T103A)、或SEQ ID NO:24(V15J-N49A)。在某些方面,经修饰的J链可包含与J链的N端融合的异源多肽,例如,scFv抗体片段,所述异源多肽特异性结合CD3ε,并且还可包含影响IgM抗体的血清半衰期的另一异源多肽,所述IgM抗体包含与J链的C端融合的经修饰的J链,所述另一异源多肽例如人血清白蛋白。在一个特定的方面,经修饰的J链包含例如在与SEQ ID NO:2的Y102或T103相对应的位置具有一个或多个氨

基酸置换、插入或缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:11(VJH)或其变体,所述置换、插入或缺失可影响包含J链的五聚体IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。

[0149] 在某些方面,本文提供的IgM或IgM样抗体包含本文提供的变体J链或其功能片段,所述变体J链或其功能片段包含氨基酸序列SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或其任何组合。

[0150] 在某些方面,包含本文提供的变体J链的IgM或IgM样抗体还包含变体IgM重链恒定区,所述变体IgM重链恒定区包含相对于除了一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外与变体IgM重链恒定区相同的参考IgM重链恒定区的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入,其中变体IgM重链恒定区同样可影响所提供的IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。在某些方面,相对于除了IgM重链恒定区中的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外相同的并且以相同的方式施用于同一动物物种的参考IgM抗体或IgM样抗体,此种IgM抗体或IgM样抗体在向动物施用时可表现出进一步增加的血清半衰期。根据此方面,参考IgM抗体或IgM样抗体可为包含本文提供的变体J链的IgM抗体或IgM样抗体,例如,包含氨基酸序列SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或其任何组合的变体J链。在某些方面,增加的血清半衰期可为累加的、或大于累加的、或小于累加的。示例性变体IgM重链恒定区在本文别处提供,并且包括但不限于包含氨基酸序列SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:34的变体人IgM重链恒定区。

[0151] 在某些方面,相对于仅包含变体J链或仅包含变体IgM恒定区的参考抗体,包含本文提供的变体J链和本文提供的变体IgM重链恒定区的IgM或IgM样抗体的血清半衰期包含血清半衰期的增加,即个体血清半衰期增加的累加大于累加或小于累加。

[0152] 影响IgM血清半衰期的J链变体

[0153] 本公开提供了一种分离的变体J链或其功能片段,其作为五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体的一部分,可增加该抗体的血清半衰期。所提供的变体J链或其功能片段可为任何物种,并且包含相对于除了一个或多个单一氨基酸置换、插入或缺失之外与变体J链相同的参考J链的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入。术语“一个或多个单一氨基酸置换、插入和缺失”是指变体J链氨基酸序列的每个氨基酸可被单独地置换、缺失或可具有与其相邻插入的单一氨基酸,但是变体J链或其功能片段必须仍然能够起到与IgM重链或IgM样重链和抗体轻链组装以形成IgM五聚体或IgM样五聚体的作用。在某些方面,本文提供的变体J链或其功能片段可具有单一氨基酸置换、插入或缺失、两个单一氨基酸置换、插入或缺失的组合(例如,两个单一氨基酸置换或一个单一氨基酸置换和一个单一氨基酸插入或缺失)、三个单一氨基酸置换、插入或缺失的组合、四个单一氨基酸置换、插入或缺失的组合或更多个,其中一个、两个、三个、四个或更多个单一氨基酸置换、插入或缺失可单独或共同地影响包含变体J链或其功能片段的IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。在某些方面,一个或多个单一氨基酸置换、插入或缺失抑制包含变体J链的IgM抗体或IgM样抗体相互作用,例如,结合受体,例如,FcαμR或pIgR。

[0154] 在某些方面,相对于参考抗体,本文提供的包含所提供的变体J链或其功能片段的IgM或IgM样抗体的血清半衰期(例如,α半衰期、β半衰期或总半衰期)可增加至少0.1倍、至

少0.5倍、至少1倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更多。在某些方面,血清半衰期的增加接近包含相同抗原结合结构域的IgG抗体血清半衰期的增加。

[0155] 在某些方面,相对于参考抗体,包含所提供的变体J链的IgM抗体或IgM样抗体还表现出其他改进的药代动力学参数,例如,增加的血浆峰值浓度(C_{max})、增加的T_0至∞曲线下面积(AUC)、改进的清除时间、增加的平均停留时间(MRT)或其任何组合。在某些方面,相对于除了变体J链或其功能片段中的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外相同的参考IgM或IgM样抗体,AUC可增加至少0.1倍、至少0.5倍、至少1倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更多,其中以相同的方式将所提供的抗体和参考抗体施用于同一动物物种。

[0156] 在某些方面,本文提供的分离的变体J链或其功能片段包含在与成熟野生型人J链(SEQ ID NO:2)的氨基酸Y102相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换。"对应于成熟野生型人J链的氨基酸Y102的氨基酸"是指与人J链中Y102同源的任何物种的J链序列中的氨基酸。与SEQ ID NO:2中Y102相对应的位置在至少43个其他物种的J链氨基酸序列中是保守的。参见美国专利号9,951,134的图4,其以引用的方式并入本文。如以下实施例中所述,在对应于SEQ ID NO:2的Y102的位置处的某些氨基酸置换抑制变体J链与Fc阿尔法-缪(Fcαμ)受体和聚合Ig受体(pIg受体或pIgR)结合。在某些方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸可被任何氨基酸置换。在某些方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸可被丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或精氨酸(R)置换。在一个特定的方面,SEQ ID NO:2的Y102可被丙氨酸置换。在一个特定的方面,变体J链或其功能片段为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:3。在一个特定的方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸可被丝氨酸置换。在一个特定的方面,变体J链或其功能片段为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:4。在一个特定的方面,与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸可被精氨酸置换。在一个特定的方面,变体J链或其功能片段为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:5。

[0157] 在某些方面,本文提供的分离的变体J链或其功能片段包含在与成熟野生型人J链(SEQ ID NO:2)的氨基酸T103相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换。"对应于成熟野生型人J链的氨基酸T103的氨基酸"是指与人J链中T103同源的任何物种的J链序列中的氨基酸。与SEQ ID NO:2中T103相对应的位置在至少37个其他物种的J链氨基酸序列中是保守的。参见美国专利号9,951,134的图4,其以引用的方式并入本文。如以下实施例中所述,在对应于SEQ ID NO:2的T103的位置处的氨基酸置换抑制变体J链与免疫球蛋白Fcαμ受体结合。在某些方面,与SEQ ID NO:2的T103相对应的氨基酸可被任何氨基酸置换。在某些方面,与SEQ ID NO:2的T103相对应的氨基酸可被丙氨酸(A)置换。在一个特定的方面,变体J链或其功能片段为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:6。

[0158] 在某些方面,本公开提供了一种分离的变体J链或其功能片段,所述分离的变体J链或其功能片段包含在与成熟人J链(SEQ ID NO:2)的氨基酸N49或氨基酸S51相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换,前提条件是S51未被苏氨酸(T)置换,或其中J链包含在与成熟野生型人J链(SEQ ID NO:2)的氨基酸N49和S51相对应的氨基酸位置处的氨基酸置换。同样,"与野生型人J链的SEQ ID NO:2的氨基酸N49相对应的氨基酸或SEQ ID NO:2的S51相对应

的氨基酸”是指与人J链中N49和/或S51同源的任何物种的J链序列中的氨基酸。与SEQ ID NO:2中N49和S51相对应的位置在至少43个其他物种的J链氨基酸序列中是保守的。参见美国专利号9,951,134的图4,其以引用的方式并入本文。对应于SEQ ID NO:2的N49和S51的氨基酸以及对应于SEQ ID NO:2的I50的氨基酸在J链中包含N-连接的糖基化基序,并且N49和/或S51处的突变(除了S51处的苏氨酸置换)可因此预防此基序处的可能的糖基化。在某些方面,与SEQ ID NO:2的N49相对应的位置处的天冬酰胺可被任何氨基酸置换。在某些方面,与SEQ ID NO:2的N49相对应的位置处的天冬酰胺可被丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、苏氨酸(T)、丝氨酸(S)或天冬氨酸(D)置换。在一个特定的方面,与SEQ ID NO:2的N49相对应的位置可被丙氨酸(A)置换。在一个特定的方面,变体J链或其功能片段为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:7。在某些方面,与SEQ ID NO:2的S51相对应的位置处的丝氨酸可被任何氨基酸(除了苏氨酸)置换。在某些方面,与SEQ ID NO:2的S51相对应的位置处的丝氨酸可被丙氨酸(A)或甘氨酸(G)置换。在一个特定的方面,与SEQ ID NO:2的S51相对应的位置可被丙氨酸(A)置换。在一个特定的方面,变体J链或其功能片段为变体人J链,并且包含氨基酸序列SEQ ID NO:8。

[0159] 在某些方面,本文提供的变体J链或其功能片段包含氨基酸序列SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或其任何组合。

[0160] 赋予增加的血清半衰期的变体IgM恒定区

[0161] 本公开还提供了一种具有增强的血清半衰期的IgM抗体或IgM样抗体,其中IgM抗体或IgM样抗体包含五个或六个二价抗体结合单元或其变体或片段,其中每个结合单元包含两个变体IgM重链恒定区或其多聚片段,其各自与抗原结合结构域或其亚基缔合。所提供的变体IgM重链恒定区或其多聚片段各自包含相对于除了一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外与变体IgM重链恒定区相同的参考IgM重链恒定区的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入。在某些方面,变体IgM重链恒定区可单独或与本公开别处所提供的变体J链、变体修饰的J链或其功能片段组合影响(例如,增加)所提供的IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。“参考IgM重链恒定区”是指除了一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外,与变体IgM重链恒定区相同的IgM重链恒定区。在某些方面,当表达为本文提供的五聚体或六聚体IgM或IgM样抗体的一部分时,相对于以相同的方式施用于同一动物的参考IgM抗体或IgM样抗体,变体IgM恒定区或其多聚片段在向受试动物施用时赋予IgM或IgM样抗体增加的血清半衰期,其中参考IgM抗体或IgM样抗体除了IgM重链恒定区中的一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入之外相同,并且以相同的方式施用于同一动物物种。在某些方面,相对于参考IgM恒定区,变体IgM恒定区包括例如Cμ4结构域中的一个或多个氨基酸置换、插入或缺失。用于测量血清半衰期的测定法对于本领域普通技术人员是众所周知的,并且示例性测定法描述于本文中和例如,美国专利申请公布号US-2018-0265596-A1中,其以引用的方式整体并入本文。

[0162] 在某些方面,本文提供的赋予IgM抗体或IgM样抗体增加的血清半衰期的变体IgM重链恒定区或其多聚片段还可增加所提供的五聚体IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期,所述五聚体IgM抗体或IgM样抗体具有同样增加IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期的变体J链(诸如本文别处提供的变体J链)。在某些方面,血清半衰期的增加是累加的。在某些方面,血

清半衰期的增加大于累加或小于累加。

[0163] 如本文所提供的,变体IgM恒定区或其多聚片段可包括一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入,所述一个或多个单一氨基酸置换、缺失或插入影响包含变体IgM恒定区或片段的IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。术语"一个或多个单一氨基酸置换、插入和缺失"是指IgM恒定区或其多聚片段的每个氨基酸可被单独地置换、缺失或可具有与其相邻插入的单一氨基酸,但是变体IgM恒定区或其多聚片段必须仍然能够在IgM或IgM样结合分子(例如,抗体)内发挥作用,以形成IgM五聚体或六聚体或IgM样五聚体或六聚体。在某些方面,本文提供的变体IgM恒定区或其多聚片段可具有单一氨基酸置换、插入或缺失、两个单一氨基酸置换、插入和/或缺失的组合(例如,两个单一氨基酸置换或一个单一氨基酸置换和一个单一氨基酸插入或缺失)、三个单一氨基酸置换、插入和/或缺失的组合、四个单一氨基酸置换、插入和/或缺失的组合或更多个,其中一个、两个、三个、四个或更多个单一氨基酸置换、插入和/或缺失可影响包含变体IgM恒定区或其多聚片段的IgM抗体或IgM样抗体的血清半衰期。因此,相对于除了变体IgM恒定区或其多聚片段中的一个或多个单一氨基酸置换、缺失和/或插入之外相同的参考IgM抗体或IgM样抗体,所提供的IgM抗体或IgM样抗体在向动物施用时表现出增加的血清半衰期,其中以相同的方式将所提供的抗体和参考抗体施用于同一动物物种。

[0164] 在某些方面,相对于参考抗体,IgM或IgM样抗体的血清半衰期(例如,α半衰期、β半衰期或总半衰期)可增加至少0.1倍、至少0.5倍、至少1倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更多。在某些方面,血清半衰期的增加接近包含相同抗原结合结构域的IgG抗体血清半衰期的增加。在某些方面,变体IgM恒定区或其多聚片段可与其他IgM抗体或IgM样抗体修饰组合以进一步增加血清半衰期,例如,本文提供的变体IgM恒定区或其多聚片段可与本文别处所述的包含氨基酸置换、缺失和/或插入的J链组合以提供血清半衰期的累加或大于累加,例如,协同的增加。

[0165] 在某些方面,相对于参考抗体,包含本文提供的变体IgM恒定区或其多聚片段的IgM抗体或IgM样抗体还表现出其他改进的药代动力学参数,例如,增加的血浆峰值浓度(C_{max})、增加的T_0至∞曲线下面积(AUC)、改进的清除时间、增加的平均停留时间(MRT)或其任何组合。

[0166] 在某些方面,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的变体IgM恒定区或其多聚片段在与野生型人IgM恒定区(SEQ ID NO:12)的氨基酸S401相对应的氨基酸位置处包含氨基酸置换,其继而与根据Kabat编号系统的氨基酸S524相对应。"对应于野生型人IgM恒定区的氨基酸S401的氨基酸"是指与人IgM恒定区中S401同源的任何物种的IgM恒定区序列中的氨基酸。与SEQ ID NO:12中S401相对应的位置在一些物种(例如,非人灵长类)的IgM恒定区氨基酸序列中是保守的,但是在其他物种(例如,小鼠)中并不是保守的。参见图1。在某些方面,SEQ ID NO:12的S401可被任何氨基酸置换。在某些方面,SEQ ID NO:12的S401可被丙氨酸(A)置换。在一个特定的方面,变体IgM恒定区是包含S401A突变的变体人IgM恒定区,在本文中表示为SEQ ID NO:13。SEQ ID NO:13如下所示,其中S401A突变以粗体下划线表示:

[0167] SEQ ID NO:13

[0168] GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATS

QVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQV
SWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIR
VFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGER
FTCTVTHTDLPSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKY
VTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVAEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

[0169] 在某些方面,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的变体IgM恒定区或其多聚片段在与野生型人IgM恒定区(SEQ ID NO:12)的氨基酸E402相对应的氨基酸位置处包含氨基酸置换,其继而与根据Kabat编号系统的氨基酸E525相对应。“对应于野生型人IgM恒定区的氨基酸E402的氨基酸”是指与人IgM恒定区中E402同源的任何物种的IgM恒定区序列中的氨基酸。与SEQ ID NO:12中E402相对应的位置在一些物种(例如,非人灵长类和小鼠)的IgM恒定区氨基酸序列中是保守的。参见图1。在某些方面,SEQ ID NO:12的E402可被任何氨基酸置换。在某些方面,SEQ ID NO:12的E402可被丙氨酸(A)置换。在一个特定的方面,变体IgM恒定区是包含E402A突变的变体人IgM恒定区,在本文中表示为SEQ ID NO:14。SEQ ID NO:14如下所示,其中E402A突变以粗体下划线表示:

[0170] SEQ ID NO:14:

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWK
YKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVV
CKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLI
CQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYK

[0171] VTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAI
RVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKT
HTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPLK
QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV
FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVS**A**EEW
NTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTA
GTCY

[0172] 在某些方面,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的变体IgM恒定区或其多聚片段在与野生型人IgM恒定区(SEQ ID NO:12)的氨基酸E403相对应的氨基酸位置处包含氨基酸置换,其继而与根据Kabat编号系统的氨基酸E526相对应。“对应于野生型人IgM恒定区的氨基酸E403的氨基酸”是指与人IgM恒定区中E403同源的任何物种的IgM恒定区序列中的氨基酸。与SEQ ID NO:12中E403相对应的位置在一些物种(例如,非人灵长类和小鼠)的IgM恒定区氨基酸序列中是保守的。参见图1。在某些方面,SEQ ID NO:12的E403可被任何氨基酸置换。在某些方面,SEQ ID NO:12的E403可被丙氨酸(A)置换。在一个特定的方面,变体IgM恒定区是包含E403A突变的变体人IgM恒定区,在本文中表示为SEQ ID NO:34。SEQ ID NO:34如下所示,其中E403A突变以粗体下划线表示:

[0173] SEQ ID NO:34:

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWK
YKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVV
CKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLI
CQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYK
VTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAI

[0174] RVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKT
HTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPLK
QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV
FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSE**A**EW
NTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTA
GTCY

NTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTA

[0175] 在某些方面,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的变体IgM恒定区或其多聚片段在与野生型人IgM恒定区(SEQ ID NO:12)的氨基酸R344相对应的氨基酸位置处包含氨基酸置换,其继而与根据Kabat编号系统的氨基酸R467相对应。“对应于野生型人IgM恒定区的氨基酸R344的氨基酸”是指与人IgM恒定区中R344同源的任何物种的IgM恒定区序列中的氨基酸。与SEQ ID NO:12中R344相对应的位置在一些物种(例如,非人灵长类和小鼠)的IgM恒定区氨基酸序列中是保守的。参见图1。在某些方面,SEQ ID NO:12的R344可被任何氨基酸置换。在某些方面,SEQ ID NO:12的R344可被丙氨酸(A)置换。在一个特定的方面,变体IgM恒定区是包含R344A突变的变体人IgM恒定区,在本文中表示为SEQ ID NO:31。SEQ ID NO:31如下所示,其中R344A突变以粗体下划线表示:

[0176] SEQ ID NO:31

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWK
YKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVV
CKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLI
CQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYK
VTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAI

[0177] RVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKT
HTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPLK
QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNL**A**ESATITCLVTGFSPADV
FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEW
NTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTA
GTCY

[0178] 在某些方面,本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的变体IgM恒定区或其多聚片段在与野生型人IgM恒定区(SEQ ID NO:12)的氨基酸E345相对应的氨基酸位置处包含氨基酸置换,其继而与根据Kabat编号系统的氨基酸E468相对应。“对应于野生型人IgM恒定区的氨基酸E345的氨基酸”是指与人IgM恒定区中E345同源的任何物种的IgM恒定区序列中的氨基酸。与SEQ ID NO:12中E345相对应的位置在一些物种(例如,非人灵长类和小鼠)的IgM恒定区氨基酸序列中是保守的。参见图1。在某些方面,SEQ ID NO:12的E345可被任何氨基酸置换。在某些方面,SEQ ID NO:12的E345可被丙氨酸(A)置换。在一个特定的方面,变体IgM恒定区是包含E345A突变的变体人IgM恒定区,在本文中表示为SEQ ID NO:32。SEQ ID NO:32如下所示,其中E345A突变以粗体下划线表示:

[0179] SEQ ID NO:32

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWK
YKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVV
CKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLI
CQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYK
VTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAI

[0180] RVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKT
HTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPLK
QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLR**A**SATITCLVTGFSPADV
FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEW
NTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTA
GTCY

[0181] 具有降低的CDC活性的变体人IgM恒定区

[0182] 在某些方面,当表达为本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的一部分时,相对于具有除了赋予降低的CDC活性的突变之外相同的相应参考人IgM恒定区的参考IgM抗体或IgM样抗体,变体人IgM恒定区可另外在补体的存在下表现出对细胞降低的补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。这些CDC突变可与本文提供的赋予增加的血清半衰期的任何突变组合。“相应的参考人IgM恒定区”是指人IgM恒定区或其一部分,例如,Cμ3结构域,除了影响CDC活性的恒定区中的一个或多个修饰外,其与变体IgM恒定区相同。在某些方面,相对于描述于例如PCT申请号PCT/US2018/026474中的野生型人IgM恒定区,变体人IgM恒定区包括例如Cμ3结构域中的一个或多个氨基酸置换,所述申请通过引用的方式整体并入本文。用于测量CDC的测定法对于本领域普通技术人员是众所周知的,并且示例性测定法描述于例如,PCT申请号PCT/US2018/026474中。

[0183] 在某些方面,赋予降低的CDC活性的变体人IgM恒定区包括对应于SEQ ID NO:12的位置P311处的野生型人IgM恒定区的氨基酸置换。在其他方面,本文提供的变体人IgM恒定区含有对应于SEQ ID NO:12的位置P313处的野生型人IgM恒定区的氨基酸置换。在其他方面,本文提供的变体人IgM恒定区含有对应于SEQ ID NO:12的位置P311和SEQ ID NO:12的

位置P313处的野生型人IgM恒定区的置换的组合。SEQ ID NO:12的氨基酸位置P311处的变体IgM恒定区可例如被丙氨酸(P311A)、丝氨酸(P311S)或甘氨酸(P311G)置换。SEQ ID NO:12的氨基酸位置P313处的变体IgM恒定区可例如被丙氨酸(P313A)、丝氨酸(P313S)或甘氨酸(P313G)置换。SEQ ID NO:12的氨基酸位置P311和P313处的变体IgM恒定区可分别被丙氨酸(P311A)和丝氨酸(P313S)(SEQ ID NO:15)或丙氨酸、丝氨酸和/或甘氨酸的任何组合置换。SEQ ID NO:15如下所示,其中P311A和P313S突变以粗体下划线表示:

[0184] SEQ ID NO:15

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWK
YKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVV
CKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLI

[0185] CQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYK
VTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAI
RVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKT
HTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHTDL**A**S**S**LK
QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV
FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEW
NTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTA
GTCY

[0186] 在一个方面,相对于包括相应野生型IgM恒定区的结合分子,包括包含P311和/或P313(例如,P311A、P311S、P311G、P313A、P313S和/或P313G或其任何组合)处的氨基酸置换的变体人IgM恒定区的本文提供的IgM抗体或IgM样抗体具有的在剂量反应测定中获得的最大CDC降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0187] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0188] 本公开还提供了多核苷酸,例如,分离的、重组的、和/或非自然存在的多核苷酸,其包含编码本文提供的IgM或IgM样抗体的多肽亚基的核酸序列。“多肽亚基”是指可独立翻译的结合分子、结合单元、IgM抗体、IgM样抗体或抗原结合结构域的一部分。实例包括但不限于抗体可变结构域,例如,VH或VL、J链、分泌组分、单链Fv、抗体重链、抗体轻链、抗体重链恒定区、抗体轻链恒定区和/或其任何片段、变体或衍生物。

[0189] 在某些方面,多肽亚基可包含IgM重链恒定区或IgM样重链恒定区或其多聚片段,所述IgM重链恒定区或IgM样重链恒定区或其多聚片段可与抗原结合结构域或其亚基融合,例如,与抗原结合结构域的VH部分融合,全部如本文所提供。在某些方面,多核苷酸可编码多肽亚基,所述多肽亚基包含人IgM重链恒定区、人IgM样重链恒定区或其多聚片段,例如,SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:34,其中任一个可融合至抗原结合结构域或其亚基,例如,VH的C端。

[0190] 在某些方面,多肽亚基可包含如本文别处所述的抗原结合结构域的抗体VL部分。在某些方面,多肽亚基可包含抗体轻链恒定区(例如,人抗体轻链恒定区)或其片段,所述抗

体轻链恒定区或其片段可融合至VL的C端。

[0191] 在某些方面,如本文所提供,多肽亚基可包含J链、经修饰的J链或其任何功能片段或变体。在某些方面,多肽亚基可包含人J链或其功能片段或变体,包括经修饰的J链。在某些方面,J链可包含氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24。

[0192] 在某些方面,本文提供的多核苷酸(例如,表达载体,诸如质粒)可包括编码一个多肽亚基(例如,IgM重链或IgM样重链、轻链或J链)的核酸序列,或可包括编码本文提供的IgM抗体或IgM样抗体的两个或更多个或所有三个多肽亚基的两个或更多个核酸序列。另选地,编码三个多肽亚基的核酸序列可在分离的多核苷酸上,例如,分离的表达载体。本公开提供了此种单个或多个表达载体。本公开还提供了一种或多种编码所提供的一种或多种多核苷酸或表达载体的宿主细胞。

[0193] 因此,为了形成抗原结合结构域,可将编码抗体的可变区的核酸序列插入用于IgM或IgM样结构的表达载体模板,特别是编码本文提供的变体IgM重链恒定区的那些核酸序列,诸如SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:34,并且还可组合编码本文提供的J链或其功能片段或变体的多核苷酸,例如,编码SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24,更具体地编码包含氨基酸序列SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24的变体J链,从而产生具有五个或六个结合单元的IgM抗体或IgM样抗体,并且相对于除了本文别处所述的IgM重链恒定区中和/或J链中的一个或多个单一氨基酸置换、插入或缺失之外结构相同的IgM抗体或IgM样抗体,其具有增加的血清半衰期。简而言之,可由现有分子合成或扩增编码重链和轻链可变结构域序列的核酸序列,并以适当的方向和符合读框地插入一个或多个载体中,使得在表达时,载体将产生所需的全长重链或轻链。对于这些目的有用的载体在本领域中已知。此类载体还可包含增强子和实现所需链的表达所需的其他序列。多个载体或单个载体可被使用,并且还可编码变体J链或其功能片段。此载体或这些载体可转染到宿主细胞中,然后表达重链和/或轻链以及变体J链或其功能片段,组装并纯化IgM或IgM样抗体。表达后,链形成具有增强的血清半衰期的全功能多聚IgM或IgM样抗体。然后可通过标准方法纯化完全组装的多聚IgM或IgM样抗体。如果需要的话,可以商业规模进行表达和纯化过程。

[0194] 本公开还提供了一种包含两个或更多个多核苷酸的组合物,其中两个或更多个多核苷酸共同可编码如上所述的具有提高的血清半衰期的IgM或IgM样抗体。在某些方面,组合物可包括编码野生型或变体IgM或IgM样重链或其多聚片段的多核苷酸,例如,包含如上所述的恒定区氨基酸序列SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:34的野生型或变体人IgM重链,其中IgM或IgM样重链还包含抗原结合结构域或其亚基,例如,VH结构域。组合物还可包括编码轻链或其片段的多核苷酸,例如,至少包含抗原结合结构域的VL的人κ或λ轻链。所提供的多核苷酸组合物还可包括编码J链的多核苷酸,例如,具有可增强IgM或IgM样抗体的血清半衰期的至少一个单一氨基酸置换、插入或缺失的变体J链或其功能片段,例如,包含氨基酸序列SEQ ID NO:3、SEQ

ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:23、或SEQ ID NO:24的变体和/或经修饰的J链。在某些方面,构成本文提供的组合物的多核苷酸可位于两个、三个或更多个单独的载体上,例如,表达载体上。此类载体由本公开提供。在某些方面,构成本文提供的组合物的两个或更多个多核苷酸可位于单个载体上,例如,表达载体上。此种载体由本公开提供。

[0195] 本公开还提供了宿主细胞,例如,原核或真核宿主细胞,所述宿主细胞包含编码本文提供的IgM或IgM样抗体或其任何亚基的多核苷酸或两个或更多个多核苷酸、本文提供的多核苷酸组合物、或共同编码本文提供的IgM或IgM样抗体或其任何亚基的载体或两个、三个或更多个载体。

[0196] 在相关方面,本公开提供了一种制备如本公开所提供的具有增加的血清半衰期的IgM或IgM样抗体的方法,其中方法包括培养如本文提供的宿主细胞并回收IgM或IgM样抗体。

[0197] 鉴定可赋予增加的血清半衰期的变体J链和/或变体IgM重链恒定区的方法

[0198] 本公开还提供了用于鉴定变体抗体亚基的各种方法,所述变体抗体亚基可增加包含亚基的抗体(例如,IgM抗体或IgM样抗体)的血清半衰期。这些方法利用本领域普通技术人员将熟悉的分子生物学和定点诱变的标准方法。实施例部分中提供了示例性方法。

[0199] 在某些方面,本公开提供了一种鉴定变体J链的方法,所述变体J链可增加包含变体J链的五聚体IgM抗体、五聚体IgM样抗体、二聚体IgA抗体和/或二聚体IgA样抗体的血清半衰期。方法包括相对于参考抗体,对组装成包括变体J链或其片段的五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体、或另选地二聚体IgA抗体或二聚体IgA样抗体增加受试动物中的血清半衰期进行测试,其中参考抗体除了变体J链之外与测试抗体相同。根据这些方面,相对于除了定义的氨基酸插入、缺失或置换之外与变体J链相同的参考J链(例如,J链、经修饰的J链和/或其功能片段),构建并测试了包含定义的氨基酸插入、缺失或置换的一系列变体J链或其片段。在某些方面,变体J链可包括一个、两个、三个、四个或更多个定义的单一氨基酸置换、插入或缺失,如本文别处所述。在某些方面,J链的有限区域被靶向诱变,例如,与某些免疫球蛋白受体(例如,Fc阿尔法-缪受体(FcαμR)、聚合Ig受体(pIgR)、Fc-缪受体(FcμR)、两种或更多种受体、或所有三种受体)结合所必需或有贡献的那些区域,如实施例1和2中更详细地描述。在某些方面,J链的全长可经受诱变,例如,通过用另一种氨基酸(例如丙氨酸、丝氨酸或苏氨酸)分别置换J链例如SEQ ID NO:2的每个位置处的氨基酸。然后可将突变的J链与例如参考IgM重链和抗体轻链共表达,并且分析所得的五聚体IgM抗体以进行适当组装、抗原结合和任何其他所需功能。然后可评估所得IgM抗体或IgM样抗体在受试动物中(例如,实施例中描述的小鼠模型中)的血清半衰期的增加。然后回收赋予相应的IgM抗体或IgM样抗体增加血清半衰期的那些J链,并且根据需要进行进一步表征。此方法还可用于使用类似的方法鉴定可赋予包含变体J链的二聚体IgA抗体或IgA样抗体增加血清半衰期的变体J链。

[0200] 在某些方面,本公开提供了一种鉴定变体J链的方法,所述变体J链可增加包含变体J链的五聚体IgM抗体、五聚体IgM样抗体、二聚体IgA抗体和/或二聚体IgA样抗体的血清半衰期。方法包括对组装成包括变体J链或其片段的五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体、或另选地二聚体IgA抗体或二聚体IgA样抗体减少与某些免疫球蛋白受体(例如,Fc阿尔法-缪受体(FcαμR)、聚合Ig受体(pIgR)、Fc-缪受体(FcμR)、两种或更多种受体或所有三种受体)

的结合进行测试。可通过确定例如,如实施例1所述的受体结合所必需或有贡献的那些区域来靶向要经受诱变的J链的区域。另选地,可对沿J链全长的氨基酸进行诱变,并且对所得的包含变体J链的抗体进行受体结合测试。减少的受体结合可通过任何合适的测定法来测量,例如,通过实施例2所述的ELISA测定法。构建变体J链或其片段以包括如上所述和本文别处所述的定义的氨基酸插入、缺失或置换。然后可回收赋予与一种或多种受体的减少的抗体结合的那些变体J链,并且根据需要进行进一步表征。方法还可包括相对于除了变体J链或其片段中定义的氨基酸置换、缺失或插入之外相同的参考抗体,测试受试动物中(例如,实施例中描述的小鼠模型中)血清半衰期增加的包含回收的变体J链或其片段的五聚体IgM抗体或五聚体IgM样抗体、或二聚体IgA抗体或二聚体IgA样抗体。此方法还可用于使用类似的方法鉴定可赋予包含变体J链的二聚体IgA抗体或IgA样抗体增加血清半衰期的变体J链。

[0201] 本公开还提供了一种鉴定变体IgM重链恒定区(或变体IgA重链恒定区)的方法,所述变体IgM重链恒定区(或变体IgA重链恒定区)可增加包含变体IgM(或IgA)重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体(或IgA抗体或IgA样抗体)的血清半衰期。用于IgM的方法包括相对于参考IgM抗体或IgM样抗体,测试受试动物中血清半衰期增加的包含变体IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体,其中变体IgM重链恒定区包含定义的氨基酸插入、缺失或置换,并且其中参考IgM抗体或IgM样抗体包含除了定义的氨基酸插入、缺失或置换之外与变体IgM重链恒定区相同的IgM重链恒定区。方法还包括回收包含变体IgM重链恒定区的那些IgM抗体或IgM样抗体,相对于参考IgM抗体或IgM样抗体,所述变体IgM重链恒定区赋予包含变体IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体增加的血清半衰期。可测试包含例如一个、两个、三个、四个或更多个定义的单一氨基酸置换、插入或缺失的任何数目的变体IgM或IgM样重链恒定区。可根据经验确定要经受诱变的IgM或IgM样重链恒定区的区域,例如,通过鉴定例如Cμ4结构域中的那些区域,所述区域对于结合各种免疫球蛋白(诸如实施例中描述的Fc阿尔法-缪受体(FcαμR)、Fc缪受体(FcμR)、聚合Ig受体(pIgR)、两种受体的任何组合或所有三种受体)必需或有贡献。另选地,所选Cμ结构域的整个长度或整个IgM重链恒定区可经受诱变,例如,通过用不同的氨基酸(例如,丙氨酸、丝氨酸或苏氨酸)置换每个位置处的氨基酸。然后将变体IgM重链恒定区与其他抗体亚基(例如抗体轻链和任选的J链)组装,并且测试适当的组装和抗原结合。然后可评价测试抗体在受试动物(例如,实施例中描述的小鼠模型)中的血清半衰期的增加。此方法还可用于使用类似的方法鉴定可赋予包含变体恒定区的二聚体IgA抗体或IgA样抗体增加血清半衰期的变体IgA或IgA样重链恒定区。

[0202] 本公开还提供了一种鉴定变体IgM重链恒定区(或另选的变体IgA重链恒定区)的方法,所述变体IgM重链恒定区(或另选的变体IgA重链恒定区)可增加包含变体重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体(或IgA抗体或IgA样抗体)的血清半衰期。用于IgM的方法包括相对于参考IgM抗体或IgM样抗体,测试与Fc阿尔法-缪受体(FcαμR)、Fc缪受体(FcμR)、聚合Ig受体(pIgR)、两种受体的任何组合或所有三种受体的结合降低的包含变体IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体,其中变体IgM重链恒定区包含定义的氨基酸插入、缺失或置换,并且其中参考IgM抗体或IgM样抗体包含除了定义的氨基酸插入、缺失或置换之外与变体IgM重链恒定区相同的IgM重链恒定区。方法还包括回收包含变体IgM重链恒定区的那些IgM抗体或IgM样抗体,相对于参考IgM抗体或IgM样抗体,所述变体IgM重链恒定区赋予包含变体IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体降低的FcαμR结合能力、降低的FcμR结合能力、降低的

pIgR结合能力、降低的结合任意两种受体的能力、或降低的结合所有三种受体的能力。可测试包含例如一个、两个、三个、四个或更多个定义的单一氨基酸置换、插入或缺失的任何数目的变体IgM或IgM样重链恒定区。可根据经验确定要经受诱变的IgM或IgM样重链恒定区的区域,例如,通过鉴定例如Cμ4结构域中的对于结合各种免疫球蛋白(诸如Fc阿尔法-缪受体(FcαμR)、Fc缪受体(FcμR)、聚合Ig受体(pIgR)、两种受体的任何组合或所有三种受体)必需或有贡献的那些区域,如实施例中描述。另选地,所选Cμ结构域的整个长度或整个IgM重链恒定区可经受诱变,例如,通过用不同的氨基酸(例如,丙氨酸、丝氨酸或苏氨酸)置换每个位置处的氨基酸。然后将变体IgM重链恒定区与其他抗体亚基(例如抗体轻链和任选的J链)组装,并且测试适当的组装和抗原结合。然后将变体IgM重链恒定区与其他抗体亚基(例如抗体轻链和任选的J链)组装,并且测试适当的组装和抗原结合。减少的受体结合可通过任何合适的测定法来测量,例如,通过实施例2中描述的ELISA测定法。然后,可评价包含回收的变体IgM或IgM样重链恒定区的测试抗体的受试动物(例如,实施例中描述的小鼠模型)中血清半衰期的增加。此方法还可用于使用类似的方法鉴定可赋予包含变体恒定区的二聚体IgA抗体或IgA样抗体增加血清半衰期的变体IgA或IgA样重链恒定区。

[0203] 使用方法

[0204] 本公开还提供了一种在需要治疗的受试者中治疗疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文提供的IgM或IgM样抗体。“治疗有效剂量或量”或“有效量”意指IgM或IgM样抗体的量,在施用时,所述量相对于受试者的治疗产生阳性免疫治疗反应。

[0205] 用于治疗癌症的组合物的有效剂量的变化取决于许多不同因素,包括施用方式、靶位点、受试者的生理状态、受试者是人还是动物、所施用的其他药物以及治疗是预防性还是治疗性的。通常,受试者为人,但是也可治疗非人哺乳动物,包括转基因哺乳动物。可使用本领域技术人员已知的常规方法滴定治疗剂量,以优化安全性和功效。

[0206] 待治疗的受试者可为需要治疗的任何动物,例如,哺乳动物,在某些方面,受试者为人受试者。

[0207] 以其最简单的形式,待施用给受试者的制剂是以常规剂型施用的本文提供的IgM或IgM样抗体或其多聚抗原结合片段,其可与本文别处所述的药物赋形剂、载剂或稀释剂组合。

[0208] 本公开的组合物可通过任何合适的方法施用,例如,经胃肠外、脑室内、经口、通过雾化吸入、局部地、经直肠、经鼻、经颊、阴道或经由植入的贮库施用。如本文中所用的术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内及颅内注射或输注技术。

[0209] 药物组合物和施用方法

[0210] 鉴于本公开,本领域技术人员众所周知或容易地确定将本文提供的IgM或IgM样抗体制备并施用于对其有需要的受试者的方法。施用途径可为例如瘤内、经口、经肠胃外、通过吸入或局部地。如本文所用的术语“肠胃外”包括例如静脉内、动脉内、腹腔内、肌肉内、皮下、直肠或阴道施用。尽管这些施用形式被认为是合适的形式,但是施用形式的另一个实例是注射用溶液,特别是用于瘤内、静脉内或动脉内注射或滴注的溶液。合适的药物组合物可包含缓冲液(例如,乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液)、表面活性剂(例如,聚山梨酯)、任选

的稳定剂(例如,人白蛋白)等。

[0211] 如本文所讨论的,本文提供的IgM或IgM样抗体可以药物有效量施用以治疗对其有需要的受试者。就这一点而言,应当理解,可配制所公开的IgM或IgM样抗体,以有助于施用和促进活性剂的稳定性。因此,药物组合物可包含药学上可接受的无毒无菌载剂,诸如生理盐水、无毒缓冲液、防腐剂等。本文提供的IgM或IgM样抗体的药物有效量是指足以实现与靶的有效结合并获得治疗益处的量。合适的制剂描述于Remington's Pharmaceutical Sciences,例如,第21版(Lippincott Williams&Wilkins)(2005)。

[0212] 某些药物组合物可以可接受的剂型经口施用,所述剂型包括例如,胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液。某些药物组合物也可通过鼻喷雾或吸入施用。采用苄醇或其他合适的防腐剂、增强生物利用率的吸收促进剂和/或其他常规增溶或分散剂将此类组合物制备成在生理盐水中的溶液。

[0213] 可与载剂物质组合以产生单剂型的IgM或IgM样受体的量将根据例如治疗受试者和特殊施用模式而变化。组合物可以单剂量、多剂量或在输注的确定时间段内施用。也可调整剂量方案,以提供最佳的期望反应(例如,治疗或预防性反应)。

[0214] 在本公开的范围内,本文提供的IgM或IgM样抗体可以足以产生治疗效果的量施用于需要治疗的受试者。本文提供的IgM或IgM样抗体可以常规剂型施用于受试者,所述常规剂型通过根据已知的技术将本公开的抗体或其多聚抗原结合片段、变体或衍生物与常规药学上可接受的载剂或稀释剂组合来制备。药学上可接受的载剂或稀释剂的形式和特征可由与其组合的活性成分的量、施用途径和其他众所周知的变量来决定。

[0215] 本公开还提供了本文提供的IgM或IgM样抗体在制造用于治疗、预防或防治癌症的药物中的用途。

[0216] 除非另外指示,否则本公开采用本领域技术范围内的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术。文献中充分说明了此类技术。参见,例如,Green和Sambrook,编(2012)Molecular Cloning A Laboratory Manual(第4版;Cold Spring Harbor Laboratory Press);Sambrook等人,编(1992)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,(Cold Springs Harbor Laboratory,NY);D.N.Glover和B.D.Hames,编,(1995)DNA Cloning第2版(IRL Press),第1卷至第4卷;Gait,编(1990)Oligonucleotide Synthesis(IRL Press);Mullis等人,美国专利号4,683,195;Hames和Higgins,编(1985)Nucleic Acid Hybridization(IRL Press);Hames和Higgins,编(1984)Transcription And Translation(IRL Press);Freshney(2016)Culture Of Animal Cells,第7版(Wiley-Blackwell);Woodward,J.,Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press)(1985);Perbal(1988)A Practical Guide To Molecular Cloning;第2版(Wiley-Interscience);Miller和Calos编(1987)Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells,(Cold Spring Harbor Laboratory);S.C.Makrides(2003)Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells(Elsevier Science);Methods in Enzymology,第151-155卷(Academic Press,Inc.,N.Y.);Mayer和Walker,编(1987)Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology(Academic Press,London);Weir和Blackwell,编;以及Ausubel等人,(1995)Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley and Sons)。

[0217] 抗体工程的一般原理提出于例如,Strohl、W.R.和L.M.Strohl(2012),Therapeutic Antibody Engineering(Woodhead Publishing)中。蛋白质工程的一般原理提出于例如,Park和Cochran,编(2009),Protein Engineering and Design(CDC Press)中。免疫学的一般原理提出于例如:Abbas和Lichtman(2017)Cellular and Molecular Immunology第9版(Elsevier)中。此外,可遵循本领域已知的免疫学标准方法,例如,Current Protocols in Immunology(Wiley Online Library);Wild,D.(2013),The Immunoassay Handbook第4版(Elsevier Science);Greenfield,编(2013),Antibodies,a Laboratory Manual,第2版(Cold Spring Harbor Press);和Ossipow和Fischer,编(2014),Monoclonal Antibodies:Methods and Protocols(Humana Press)中的方法。

[0218] 以上引用的所有参考文献以及本文引用的所有参考文献以引用的方式整体并入本文。

[0219] 提供以下实施例以作说明而非限制。

[0220] 实施例

[0221] 我们假设IgM与其一个或多个Ig受体、Fcμ受体(FcμR)、Fcα/μ受体(FcαμR)和/或聚合Ig受体(pIgR)之间的相互作用有助于体内观察到的IgM抗体的特定药代动力学和药效学。因此,我们着手鉴定与这些受体结合相关的IgM的特定区域,并且询问这些区域的改变(例如,氨基酸置换)是否可调节,例如,抑制受体与包含改变的IgM抗体的结合。然后,我们测试了这些改变中的某些是否影响包含改变的IgM抗体的体内血浆利用率。

[0222] 实施例1:筛选用于受体结合的J链和Fcμ肽阵列

[0223] 为了鉴定IgM恒定区和J链上FcμR、FcαμR和/或pIgR结合的区域,我们使用了基于肽阵列的技术(PEPperPRINT;WWW_dot_pepperprint_dot_com)。如下合成了基于人J链的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)和人IgM的Cμ3和Cμ4结构域(SEQ ID NO:12的约氨基酸224至约氨基酸430)的整套肽并固定在固体支撑件上。IgM μ3、μ4和J链的序列在N端和C端用中性GSGSGSG连接基(SEQ ID NO:33)延长,以避免截短肽。延长的蛋白质序列被翻译成9和13个氨基酸的肽,其中肽-肽重叠分别为8个和12个氨基酸。肽合成后,所有肽通过C端半胱氨酸侧链硫醇基与适当修饰的N端之间的硫醚键环合。与对照肽一起,所得的IgM肽微阵列含有844个不同的肽,一式两份打印(1,688个肽点)。用1、10或100μg/mL重组人pIgR(SEQ ID NO:20的氨基酸19至638,可购自R&D Systems)、人FcμR(SEQ ID NO:21的氨基酸18至251,可购自R&D Systems)和人FcαμR(SEQ ID NO:22的氨基酸17至450,可购自R&D Systems)对具有一个残基增量的限制性肽进行探测,每个在孵育缓冲液(PBS,pH 7.4与0.005%Tween 20和10%Rockland阻断缓冲液(MB-070))中具有6X HIS标签,之后用二抗小鼠抗6x-His表位标签DyLight680和用对照抗体染色,以及在扫描强度7/7(红/绿)下读数。

[0224] 点强度和肽注释的定量是基于扫描强度7/7下的16位灰度tiff文件进行的,其显示出比24位彩色tiff文件更高的动态范围;微阵列图像分析是用PEPSLIDE®分析仪完成的。软件算法将每个点的荧光强度分解为原始信号、前景信号和背景信号(参见“原始数据”选项卡),并且计算平均中值前景强度以及点重复的点对点偏差。基于平均的中值前景强度,生成强度图。

[0225] 用靶蛋白相对于从IgMμ3链的N端到IgM J链的C端的蛋白序列绘制测定的平均点强度,以可视化总体点强度和信噪比。强度图与肽和强度图以及微阵列扫描的视觉检查相

关,以鉴定靶蛋白的主要相互作用。

[0226] 利用原始数据,鉴定了与PEPperPRINT平台中受体结合的J链关键区以及IgM HC恒定区。

[0227] 人FcαμR结合至成熟J链SEQ ID NO:2的以下带下划线的区域:

1 QEDERIVLVD NKCKCARITS RIIRSSEDPN EDIVERNIRI IVPLNNRENI

[0228] 51 SDPTSPLRTR FVYHLSDLCK KCDPTEVELD NQIVTATQSN ICDEDSATET

101 CYTYDRNKCY TAVVPLVYGG ETKMVETALT PDACYPD

[0229] 因此,有助于人FcαμR结合的成熟人J链的区域可包括,例如,SEQ ID NO:2的氨基酸1至10内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸、SEQ ID NO:2的氨基酸87至105内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸、和/或SEQ ID NO:2的氨基酸125至137内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸。如本领域普通技术人员应当理解的,可测试包含变体J链的五聚体IgM抗体或IgM样抗体的例如实施例2中描述的抑制FcαμR结合和/或例如实施例3中描述的增强血清半衰期,所述变体J链具有在这些区域内、与这些区域重叠和/或对应于这些区域(例如,来自另一物种的J链氨基酸序列中)的突变,例如,氨基酸插入、缺失和/或置换。

[0230] 人pIgR结合至成熟J链SEQ ID NO:2的以下带双下划线的区域:

1 QEDERIVLVD NKCKCARITS RIIRSSEDPN EDIVERNIRI IVPLNNRENI

[0231] 51 SDPTSPLRTR FVYHLSDLCK KCDPTEVELD NQIVTATQSN ICDEDSATET

101 CYTYDRNKCY TAVVPLVYGG ETKMVETALT PDACYPD

[0232] 因此,有助于人pIgR结合的成熟人J链的区域可包括,例如,SEQ ID NO:2的氨基酸12至24内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸、和/或SEQ ID NO:2的氨基酸93至105内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸。如本领域普通技术人员应当理解的,可测试包含变体J链的五聚体IgM抗体或IgM样抗体的例如实施例2中描述的抑制pIgR结合和/或例如实施例3中描述的增强血清半衰期,所述变体J链具有在这些区域内、与这些区域重叠和/或对应于这些区域(例如,来自另一物种的J链氨基酸序列中)的突变,例如,氨基酸插入、缺失和/或置换。

[0233] 人FcμR结合至成熟J链SEQ ID NO:2的以下带波浪下划线的区域:

1 QEDERIVLVD NKCKCARITS RIIRSSEDPN EDIVERNIRI IVPLNNRENI

[0234] 51 SDPTSPLRTR FVYHLSDLCK KCDPTEVELD NQIVTATQSN ICDEDSATET

101 CYTYDRNKCY TAVVPLVYGG ETKMVETALT PDACYPD

[0235] 因此,有助于人FcμR结合的成熟人J链的区域可包括,例如,SEQ ID NO:2的氨基酸1至4内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸、SEQ ID NO:2的氨基酸87至105内的氨基酸和/或

与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸、和/或SEQ ID NO:2的氨基酸125至137内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸。如本领域普通技术人员应当理解的,可测试包含变体J链的五聚体IgM抗体或IgM样抗体的例如实施例2中描述的抑制FcμR结合和/或例如实施例3中描述的增强血清半衰期,所述变体J链具有在这些区域内、与这些区域重叠和/或对应于这些区域(例如,来自另一物种的J链氨基酸序列中)的突变,例如,氨基酸插入、缺失和/或置换。

[0236] 人FcαμR结合至人IgM恒定区SEQ ID NO:12的Cμ3和Cμ4的以下带下划线的区域(编号为SEQ ID NO:12/所提供的KABAT):

[0237] IgM重链的顺序(SEQ ID NO:12)/KABAT编号键

[0238]
```
  1/127 GSASAPTLFP LVSCENSPSD TSSVAVGCLA QDFLPDSITF SWKYKNNSDI
 51/176 SSTRGFPSVL RGGKYAATSQ VLLPSKDVMQ GTDEHVVCKV QHPNGNKEKN
101/226 VPLPVIAELP PKVSVFVPPR DGFFGNPRKS KLICQATGFS PRQIQVSWLR
151/274 EGKQVGSGVT TDQVQAEAKE SGPTTYKVTS TLTIKESDWL SQSMFTCRVD
201/324 HRGLTFQQNA SSMCVPDQDT AIRVFAIPPS FASIFLTKST KLTCLVTDLT
251/374 TYDSVTISWT RQNGEAVKTH TNISESHPNA TFSAVGEASI CEDDWNSGER
301/424 FTCTVTHTDL PSPLKQTISR PKGVALHRPD VYLLPPAREQ LNLRESATIT
351/474 CLVTGFSPAD VFVQWMQRGQ PLSPEKYVTS APMPEPQAPG RYFAHSILTV
401/524 SEEEWNTGET YTCVVAHEAL PNRVTERTVD KSTGKPTLYN VSLVMSDTAG

451/574 TCY
```

[0239] 因此,有助于人FcαμR结合的人IgM恒定区的区域可包括,例如,SEQ ID NO:12的氨基酸241至253内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸、SEQ ID NO:12的氨基酸282至294内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸、SEQ ID NO:12的氨基酸342至354内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸、和/或SEQ ID NO:12的氨基酸393至415内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸。如本领域普通技术人员应当理解的,可测试包含IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体的例如实施例2中描述的抑制FcαμR结合和/或例如实施例3中描述的增强血清半衰期,所述IgM重链恒定区具有在这些区域内、与这些区域重叠和/或对应于这些区域(例如,来自诸如图1中示出的那些的另一物种的IgM重链恒定区氨基酸序列中)的突变,例如,氨基酸插入、缺失和/或置换。

[0240] 人pIgR结合至人IgM恒定区SEQ ID NO:12的Cμ3和Cμ4的以下带双下划线的区域(编号为SEQ ID NO:12/所提供的KABAT):

[0241]

```
  1/127 GSASAPTLFP LVSCENSPSD TSSVAVGCLA QDFLPDSITF SWKYKNNSDI
 51/176 SSTRGFPSVL RGGKYAATSQ VLLPSKDVMQ GTDEHVVCKV QHPNGNKEKN
101/226 VPLPVIAELP PKVSVFVPPR DGFFGNPRKS KLICQATGFS PRQIQVSWLR
151/274 EGKQVGSGVT TDQVQAEAKE SGPTTYKVTS TLTIKESDWL SQSMFTCRVD
201/324 HRGLTFQQNA SSMCVPDQDT AIRVFAIPPS FASIFLTKST KLTCLVTDLT
251/374 TYDSVTISWT RQNGEAVKTH TNISESHPNA TFSAVGEASI CEDDWNSGER
301/424 FTCTVTHTDL PSPLKQTISR PKGVALHRPD VYLLPPAREQ LNLRESATIT
351/474 CLVTGFSPAD VFVQWMQRGQ PLSPEKYVTS APMPEPQAPG RYFAHSILTV
401/524 SEEEWNTGET YTCVVAHEAL PNRVTERTVD KSTGKPTLYN VSLVMSDTAG
451/574 TCY
```

[0242] 因此,有助于人pIgR结合的人IgM恒定区的区域可包括,例如,SEQ ID NO:12的氨基酸232至244内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸、SEQ ID NO:12的氨基酸287至304内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸、和/或SEQ ID NO:12的氨基酸397至413内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸。如本领域普通技术人员应当理解的,可测试包含IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体的例如实施例2中描述的抑制pIgR结合和/或例如实施例3中描述的增强血清半衰期,所述IgM重链恒定区具有在这些区域内、与这些区域重叠和/或对应于这些区域(例如,来自诸如图1中示出的那些的另一物种的IgM重链恒定区氨基酸序列中)的突变,例如,氨基酸插入、缺失和/或置换。

[0243] 人FcμR结合至人IgM恒定区SEQ ID NO:12的Cμ3和Cμ4的以下带波浪下划线的区域(编号为SEQ ID NO:12/所提供的KABAT):

[0244]

```
  1/127 GSASAPTLFP LVSCENSPSD TSSVAVGCLA QDFLPDSITF SWKYKNNSDI
 51/176 SSTRGFPSVL RGGKYAATSQ VLLPSKDVMQ GTDEHVVCKV QHPNGNKEKN
101/226 VPLPVIAELP PKVSVFVPPR DGFFGNPRKS KLICQATGFS PRQIQVSWLR
151/274 EGKQVGSGVT TDQVQAEAKE SGPTTYKVTS TLTIKESDWL SQSMFTCRVD
201/324 HRGLTFQQNA SSMCVPDQDT AIRVFAIPPS FASIFLTKST KLTCLVTDLT
251/374 TYDSVTISWT RQNGEAVKTH TNISESHPNA TFSAVGEASI CEDDWNSGER
301/424 FTCTVTHTDL PSPLKQTISR PKGVALHRPD VYLLPPAREQ LNLRESATIT
351/474 CLVTGFSPAD VFVQWMQRGQ PLSPEKYVTS APMPEPQAPG RYFAHSILTV
401/524 SEEEWNTGET YTCVVAHEAL PNRVTERTVD KSTGKPTLYN VSLVMSDTAG
451/574 TCY
```

[0245] 因此,有助于人FcμR结合的人IgM恒定区的区域可包括,例如,SEQ ID NO:12的氨基酸282至305内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸、和/或SEQ ID NO:12的氨基酸393至417内的氨基酸和/或与所述氨基酸重叠的氨基酸和/或包括所述氨基酸、由所述氨基酸组成、或基本上由所述氨基酸组成的氨基酸。如本领域普通技术人员应当理解的,可测试包含IgM重链恒定区的IgM抗体或IgM样抗体的例如实施例2中描述的抑制FcμR结合和/或例如实施

例3中描述的增强血清半衰期,所述IgM重链恒定区具有在这些区域内、与这些区域重叠和/或对应于这些区域(例如,来自诸如图1中示出的那些的另一物种的IgM重链恒定区氨基酸序列中)的突变,例如,氨基酸插入、缺失和/或置换。

[0246] 实施例2:丙氨酸扫描IgM J链和Fc突变体的构建,并且通过ELISA

[0247] 筛选受体结合抑制

[0248] 对于均如PCT公布号WO 2016/141303中所述的作为单特异性五聚体的单特异性抗CD20 IgM抗体1.5.3(具有SEQ ID NO:2的成熟人J链)以及作为双特异性五聚体的双特异性抗CD20 IgM抗体1.5.3IgM(具有"V15J"J链,SEQ ID NO:9)的J链和IgM恒定区进行丙氨酸扫描诱变,以确定通过PEPperPRINT分析(实施例1)鉴定的某些区域是否可修饰以减少或抑制FcαμR、FcμR和/或pIgR的结合。所测试的突变体包括在与SEQ ID NO:2的人成熟J链的Y102和T103相对应的位置处的J链丙氨酸置换(Y102A和T103A)。包含Y102A突变的经修饰的"V15J"J链表示为SEQ ID NO:10,包含T103A突变的经修饰的"V15J"J链表示为SEQ ID NO:23。SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:23如下所示。

[0249] SEQ ID NO:9:

[0250] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0251] SEQ ID NO:10:

[0252] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCATYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0253] SEQ ID NO:23:

[0254] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYAYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0255] 在人IgM恒定区上测试的突变体包括在与SEQ ID NO:12的R344、E345、S401和E402相对应的位置处的丙氨酸突变(R344A,SEQ ID NO:31、E345A,SEQ ID NO:32、S401A,SEQ ID NO:13、E402A,SEQ ID NO:14和E403A,SEQ ID NO:34)。同时使用"野生型"V15J J链(SEQ ID NO:9),以及包含Y102A突变的V15J J链(SEQ ID NO:10),测试了两个变体IgM恒定区突变SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14对包含突变的IgM的体内半衰期的影响,参见实施例3)。

[0256] 编码所选突变体的重链、轻链和J链的DNA片段由商业供应商合成。将DNA构建体转化至感受态细菌中,并且将其接种在具有多种选择性抗生素的LB板上。挑选若干细菌菌落,并且通过标准分子生物学技术进行DNA制备。通过测序验证编码重链和轻链的构建体。根据标准方法,将编码重链、轻链和J链的质粒构建体共转染到HEK293/Expi293/CHO细胞中,并且选择表达CD20 IgM抗体的细胞。根据制造商的方案,使用Capture Select IgM(Catalog 2890.05,BAC,Thermo Fisher)回收存在于细胞上清液中的抗体。在非还原条件下,在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳上评价抗体以显示如前所述的组装,例如,PCT公布号WO 2016/141303中的组装。验证每个突变体的表达和组装,并且验证双特异性构建体保留其促进T细胞介导的细胞毒性的能力。

[0257] 如下通过ELISA测量与某些IgM突变体以及相应的IgM和IgG对照组的受体结合。白色不透明96孔聚苯乙烯ELISA板涂覆有100μL PBS中的1μg/mL多聚免疫球蛋白受体(小鼠PIGR:R&D systems,Cat#2800-PG;人PIGR:Cat#2717-PG)、人Fc阿尔法/缪受体(R&D systems,Cat#9278-FC-050)或人Fc缪受体/蛋白质(Sino Biological,Cat#13556-H02H或R&D systems,Cat#9494-MU-050),在4℃下过夜。然后,用0.05%PBS-Tween洗涤板5次,并且在室温下用2%BSA-PBS密封2小时。在密封和洗涤5次后,将100μL 2%BSA-PBS中的连续稀释的IgM或IgG蛋白添加到孔中,并且在室温下温育2小时。然后,洗涤板5次并且与HRP缀合的小鼠抗人κ(SouthernBiotech,Cat#9230-05。1:6000稀释于2%BSA-PBS中)温育30分钟。在二次温育后,洗涤板10次,之后向每个孔中加入100μL SuperSignal化学发光底物(ThermoFisher,Cat#37070)。测量发光信号,并且用使用4参数逻辑模型的GraphPad Prism对数据进行绘图并进行分析。

[0258] 各种突变体IgM与人和小鼠受体的结合总结于图2中。J链中的T103A突变抑制人FcαμR结合,但不抑制人pIgR或人FcμR结合(数据未示出)。

[0259] 还评价了在V15J修饰的J链中与SEQ ID NO:2的Y102相对应的氨基酸位置处具有另外的氨基酸置换的双特异性抗CD20/抗CD3抗体对于与pIgR受体结合的影响。位置102处的酪氨酸被天冬氨酸(Y102D)、苯丙氨酸(Y102F)、精氨酸(Y102R)、丝氨酸(Y102S)和苏氨酸(Y102T)置换。突变被并入如上所述的抗CD20/抗CD3双特异性抗体。除了表现出降低的表达的包含Y102D突变的IgM之外,突变体IgM均按预期表达和组装。与pIgR结合的结果在图3A至图3E中示出。Y102F和Y102T突变允许与pIgR结合,而与Y102A突变一样,Y102S和Y102R突变破坏pIgR结合。

[0260] 实施例3:包含影响受体结合的选定突变的抗CD20抗体的药代动力学分析

[0261] 此实施例证明,五聚体IgM单特异性或双特异性抗体的J链或IgM恒定区中的某些氨基酸置换可增加那些抗体的血清半衰期。使均如PCT公布号WO 2016/141303中所述的作为单特异性五聚体的单特异性抗CD20 IgM抗体1.5.3(具有SEQ ID NO:2的成熟J链)以及作为双特异性五聚体的双特异性抗CD20 IgM抗体1.5.3IgM(具有“V15J”J链,SEQ ID NO:9)的J链和IgM恒定区进行丙氨酸扫描诱变,并且测试小鼠中药代动力学参数的改变。所测试的突变体包括在与SEQ ID NO:2的人成熟J链的Y102和T103相对应的位置处的J链丙氨酸置换(Y102A和T103A)。包含Y102A突变的经修饰的“V15J”J链表示为SEQ ID NO:10。

[0262] 如下测量体内小鼠模型中各种IgM抗体的药代动力学参数。通过静脉内输注向Balb/c小鼠注射每种抗体100μg。约零时间和每个时间点,通过末端心脏穿刺收集500μL血

液,其中每个时间点3只小鼠,并且每种抗体总共8或15个时间点。使用标准ELISA测定法测量每个时间点血液中每种抗体的血清浓度。在所有ELISA上验证质量指标,并且使用标准曲线拟合技术(Win Non Lin,Phoenix Software)导出PK参数,包括$T_{1/2\text{-阿尔法}}$、$T_{1/2\text{-贝塔}}$和从零时间到无穷大的浓度曲线下面积($AUC_{0-\infty}$,以μg/ml*hr测量)。包括阿尔法和贝塔半衰期以及AUC的PK结果在图4中示出。结果表明,对应于成熟人J链SEQ ID NO:2中Y102的突变以及对应于人IgM恒定区中S401和E401的突变可单独或组合地改善所得IgM抗体的PK参数。

[0263] 图5示出将某些双特异性突变体IgM抗体与包含相同VH和VL区的IgG抗体随时间的血清浓度进行比较。如这些结果所示,在J链中具有单个Y102A突变或具有Y102A突变加上在IgM重链中的其他突变的IgM的血清半衰期接近可比的IgG抗体的血清半衰期。

[0264] 实施例4:包含N49A变体人J链的IgM抗体分子的半衰期延长。

[0265] 此实施例证明,人J链中的另一个单一氨基酸置换可增加包含变体J链的IgM抗体的血清半衰期。使用标准技术对先前描述的包含成熟人J链以及通过15个氨基酸连接基融合至其N端的与CD3结合的异源抗原结合结构域的经修饰的J链(“V15J,”SEQ ID NO:9,参见美国专利号9,951,134)进行突变,以在与野生型成熟人J链(SEQ ID NO:2)的N49相对应的位置引入丙氨酸置换,以产生经修饰的J链“V15J-N49A”(SEQ ID NO:24)。SEQ ID NO:24如下所示。

[0266] SEQ ID NO:24:

[0267] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNREAISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

[0268] 此J链构建体用于产生1.5.3V15J和1.5.3V15J-N49A,与CD20结合的示例性五聚体IgM抗体。CD20抗原结合结构域以及用于制备IgM抗体的方法描述于PCT公布号WO/2016/141303中。测试了抗体的正确组装、抗原结合以及CD3结合剂激活T细胞的能力。

[0269] 在如实施例3所述的Balb/c小鼠中进行药代动力学(PK)研究,以评估IgM抗体的清除率。在所有ELISA上验证质量指标,并且使用标准曲线拟合技术(Win Non Lin,Phoenix Software)导出PK参数,包括$T_{1/2\text{-阿尔法}}$、$T_{1/2\text{-贝塔}}$和从零时间到无穷大的浓度曲线下面积($AUC_{0-\infty}$,以μg/ml*hr测量)。

[0270] 结果在图6中示出。如图所示,IgM 1.5.3V15J-N49A示出$T_{1/2\text{-阿尔法}}$增加几乎50%,并且浓度曲线下面积增加了1.6倍。

[0271] 本公开的宽度以及范围不应限于上述示例性实施方案,而应仅仅根据所附权利要求和它们的等同物来界定。

[0001] 序列表

[0002] <110> IGM生物科学股份有限公司(IGM BIOSCIENCES, INC.)

[0003] <120> 影响IgM血清半衰期的IgM Fc和J链突变

[0004] <130> 09789.012WO1

[0005] <140>

[0006] <141>

[0007] <150> 62/637,186

[0008] <151> 2018-03-01

[0009] <160> 34

[0010] <170> PatentIn version 3.5

[0011] <210> 1

[0012] <211> 159

[0013] <212> PRT

[0014] <213> 智人(Homo sapiens)

[0015] <400> 1

[0016] Met Lys Asn His Leu Leu Phe Trp Gly Val Leu Ala Val Phe Ile Lys

[0017] 1 5 10 15

[0018] Ala Val His Val Lys Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp

[0019] 20 25 30

[0020] Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser

[0021] 35 40 45

[0022] Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val

[0023] 50 55 60

[0024] Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg

[0025] 65 70 75 80

[0026] Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro

[0027] 85 90 95

[0028] Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn

[0029] 100 105 110

[0030] Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg

[0031] 115 120 125

[0032] Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr

[0033] 130 135 140

[0034] Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

[0035] 145 150 155

[0036] <210> 2

[0037] <211> 137

[0038] <212> PRT

[0039] <213> 智人(Homo sapiens)

[0040] <400> 2

[0041] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

[0042] 1 5 10 15

[0043] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

[0044] 20 25 30

[0045] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

[0046] 35 40 45

[0047] Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

[0048] 50 55 60

[0049] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp

[0050] 65 70 75 80

[0051] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

[0052] 85 90 95

[0053] Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala

[0054] 100 105 110

[0055] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala

[0056] 115 120 125

[0057] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

[0058] 130 135

[0059] <210> 3

[0060] <211> 137

[0061] <212> PRT

[0062] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0063] <220>

[0064] <223> 人工序列描述:合成

[0065] 多肽

[0066] <400> 3

[0067] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

[0068] 1 5 10 15

[0069] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

[0070] 20 25 30

[0071] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

[0072] 35 40 45

[0073] Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

[0074] 50 55 60

[0075] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp

[0076] 65 70 75 80

[0077] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

[0078] 85 90 95

[0079] Ala Thr Glu Thr Cys Ala Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala

[0080] 100 105 110

[0081] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala

[0082] 115 120 125

[0083] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

[0084] 130 135

[0085] <210> 4

[0086] <211> 137

[0087] <212> PRT

[0088] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0089] <220>

[0090] <223> 人工序列描述:合成

[0091] 多肽

[0092] <400> 4

[0093] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

[0094] 1 5 10 15

[0095] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

[0096] 20 25 30

[0097] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

[0098] 35 40 45

[0099] Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

[0100] 50 55 60

[0101] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp

[0102] 65 70 75 80

[0103] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

[0104] 85 90 95

[0105] Ala Thr Glu Thr Cys Ser Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala

[0106] 100 105 110

[0107] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala

[0108] 115 120 125

[0109] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

[0110] 130 135

[0111] <210> 5

[0112] <211> 137

[0113] <212> PRT

[0114] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0115] <220>

[0116] <223> 人工序列描述:合成

[0117] 多肽

[0118] <400> 5

[0119] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

[0120] 1 5 10 15

[0121] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

[0122] 20 25 30

[0123] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

[0124] 35 40 45

[0125] Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

[0126] 50 55 60

[0127] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp

[0128] 65 70 75 80

[0129] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

[0130] 85 90 95

[0131] Ala Thr Glu Thr Cys Arg Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala

[0132] 100 105 110

[0133] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala

[0134] 115 120 125

[0135] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

[0136] 130 135

[0137] <210> 6

[0138] <211> 137

[0139] <212> PRT

[0140] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0141] <220>

[0142] <223> 人工序列描述:合成

[0143] 多肽

[0144] <400> 6

[0145] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

[0146] 1 5 10 15

[0147] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

[0148] 20 25 30

[0149] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

[0150] 35 40 45

[0151] Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

[0152] 50 55 60

[0153] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp

[0154] 65 70 75 80

[0155] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

[0156] 85 90 95

[0157] Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Ala Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala

[0158] 100 105 110

[0159] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala

[0160] 115 120 125

[0161] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

[0162] 130 135

[0163] <210> 7

[0164] <211> 137

[0165] <212> PRT

[0166] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0167] <220>

[0168] <223> 人工序列描述:合成

[0169] 多肽

[0170] <400> 7

[0171] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

[0172] 1 5 10 15

[0173] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

[0174] 20 25 30

[0175] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

[0176] 35 40 45

[0177] Ala Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

[0178] 50 55 60

[0179] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp

[0180] 65 70 75 80

[0181] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

[0182] 85 90 95

[0183] Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala

[0184] 100 105 110

[0185] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala

[0186] 115 120 125

[0187] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

[0188] 130 135

[0189] <210> 8

[0190] <211> 137

[0191] <212> PRT

[0192] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0193] <220>

[0194] <223> 人工序列描述:合成

[0195] 多肽

[0196] <400> 8

[0197] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

[0198] 1 5 10 15

[0199] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

[0200] 20 25 30

[0201] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

[0202] 35 40 45

[0203] Asn Ile Ala Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

[0204] 50 55 60

[0205] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp

[0206] 65 70 75 80

[0207] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

[0208] 85 90 95

[0209] Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala

[0210] 100 105 110

[0211] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala

[0212] 115 120 125

[0213] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

[0214] 130 135

[0215] <210> 9

[0216] <211> 393

[0217] <212> PRT

[0218] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0219] <220>

[0220] <223> 人工序列描述:合成

[0221] 多肽

[0222] <400> 9

[0223] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0224] 1 5 10 15

[0225] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr

[0226] 20 25 30

[0227] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0228] 35 40 45

[0229] Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu

[0230] 50 55 60

[0231] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

[0232] 65 70 75 80

[0233] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0234] 85 90 95

[0235] Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

[0236] 100 105 110

[0237] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

[0238] 115 120 125

[0239] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser

[0240] 130 135 140

[0241] Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala

[0242] 145 150 155 160

[0243] Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

[0244] 165 170 175

[0245] Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val

[0246] 180 185 190

[0247] Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

[0248] 195 200 205

[0249] Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

[0250] 210 215 220

[0251] Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

[0252] 225 230 235 240

[0253] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[0254] 245 250 255

[0255] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

[0256] 260 265 270

[0257] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

[0258] 275 280 285

[0259] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

[0260] 290 295 300

[0261] Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

[0262] 305 310 315 320

[0263] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp

[0264] 325 330 335

[0265] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

[0266] 340 345 350

[0267] Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala

[0268] 355 360 365

[0269] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala

[0270] 370 375 380

[0271] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

[0272] 385 390

[0273] <210> 10

[0274] <211> 393

[0275] <212> PRT

[0276] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0277] <220>

[0278] <223> 人工序列描述:合成

[0279] 多肽

[0280] <400> 10

[0281] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0282] 1 5 10 15

[0283] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr

[0284] 20 25 30

[0285] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0286] 35 40 45

[0287] Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu

[0288] 50 55 60

[0289] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

[0290] 65 70 75 80

[0291] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0292] 85 90 95

[0293] Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

[0294] 100 105 110

[0295] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

[0296] 115 120 125

[0297] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser

[0298] 130 135 140

[0299] Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala

[0300] 145 150 155 160

[0301] Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

[0302] 165 170 175

[0303] Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val

[0304] 180 185 190

[0305] Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

[0306] 195 200 205

[0307] Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

[0308] 210 215 220

[0309] Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

[0310] 225 230 235 240

[0311] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[0312] 245 250 255

[0313] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

[0314] 260 265 270

[0315] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

[0316] 275 280 285

[0317] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

[0318] 290 295 300

[0319] Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

[0320] 305 310 315 320

[0321] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp

[0322] 325 330 335

[0323] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

[0324] 340 345 350

[0325] Ala Thr Glu Thr Cys Ala Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala

[0326] 355 360 365

[0327] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala

[0328] 370 375 380

[0329] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

[0330] 385 390

[0331] <210> 11

[0332] <211> 1012

[0333] <212> PRT

[0334] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0335] <220>

[0336] <223> 人工序列描述:合成

[0337] 多肽

[0338] <400> 11

[0339] Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

[0340] 1 5 10 15

[0341] Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

[0342] 20 25 30

[0343] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

[0344] 35 40 45

[0345] Ile Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

[0346] 50 55 60

[0347] Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn

[0348] 65 70 75 80

[0349] Gln Lys Leu Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser

[0350] 85 90 95

[0351] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[0352] 100 105 110
[0353] Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr
[0354] 115 120 125
[0355] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0356] 130 135 140
[0357] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
[0358] 145 150 155 160
[0359] Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
[0360] 165 170 175
[0361] Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
[0362] 180 185 190
[0363] Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
[0364] 195 200 205
[0365] Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[0366] 210 215 220
[0367] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
[0368] 225 230 235 240
[0369] Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
[0370] 245 250 255
[0371] Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[0372] 260 265 270
[0373] Gly Gly Ser Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys
[0374] 275 280 285
[0375] Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro
[0376] 290 295 300
[0377] Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn
[0378] 305 310 315 320
[0379] Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe
[0380] 325 330 335
[0381] Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val
[0382] 340 345 350
[0383] Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp
[0384] 355 360 365
[0385] Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys
[0386] 370 375 380
[0387] Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val
[0388] 385 390 395 400
[0389] Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp Gly Gly Gly Gly

[0390] 405 410 415

[0391] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser

[0392] 420 425 430

[0393] Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala

[0394] 435 440 445

[0395] Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu

[0396] 450 455 460

[0397] Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys

[0398] 465 470 475 480

[0399] Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu

[0400] 485 490 495

[0401] Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly

[0402] 500 505 510

[0403] Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys

[0404] 515 520 525

[0405] Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg

[0406] 530 535 540

[0407] Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr

[0408] 545 550 555 560

[0409] Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe

[0410] 565 570 575

[0411] Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe

[0412] 580 585 590

[0413] Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys

[0414] 595 600 605

[0415] Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg

[0416] 610 615 620

[0417] Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala

[0418] 625 630 635 640

[0419] Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala

[0420] 645 650 655

[0421] Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys

[0422] 660 665 670

[0423] Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala

[0424] 675 680 685

[0425] Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu

[0426] 690 695 700

[0427] Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val

[0428] 705 710 715 720

[0429] Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe
[0430] 725 730 735
[0431] Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val
[0432] 740 745 750
[0433] Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr
[0434] 755 760 765
[0435] Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu
[0436] 770 775 780
[0437] Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val
[0438] 785 790 795 800
[0439] Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys
[0440] 805 810 815
[0441] Gln Asn Cys Glu Leu Phe Lys Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn
[0442] 820 825 830
[0443] Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro
[0444] 835 840 845
[0445] Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys
[0446] 850 855 860
[0447] Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu
[0448] 865 870 875 880
[0449] Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val
[0450] 885 890 895
[0451] Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg
[0452] 900 905 910
[0453] Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu
[0454] 915 920 925
[0455] Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser
[0456] 930 935 940
[0457] Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val
[0458] 945 950 955 960
[0459] Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp
[0460] 965 970 975
[0461] Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu
[0462] 980 985 990
[0463] Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala
[0464] 995 1000 1005
[0465] Ala Leu Gly Leu
[0466] 1010
[0467] <210> 12

[0468] <211> 453

[0469] <212> PRT

[0470] <213> 智人(Homo sapiens)

[0471] <400> 12

[0472] Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn

[0473] 1 5 10 15

[0474] Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp

[0475] 20 25 30

[0476] Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser

[0477] 35 40 45

[0478] Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys

[0479] 50 55 60

[0480] Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln

[0481] 65 70 75 80

[0482] Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn

[0483] 85 90 95

[0484] Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys

[0485] 100 105 110

[0486] Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg

[0487] 115 120 125

[0488] Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile

[0489] 130 135 140

[0490] Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr

[0491] 145 150 155 160

[0492] Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr

[0493] 165 170 175

[0494] Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln

[0495] 180 185 190

[0496] Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln

[0497] 195 200 205

[0498] Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val

[0499] 210 215 220

[0500] Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr

[0501] 225 230 235 240

[0502] Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr

[0503] 245 250 255

[0504] Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn

[0505] 260 265 270

[0506] Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala

[0507] 275 280 285

[0508] Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr

[0509] 290 295 300

[0510] Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg

[0511] 305 310 315 320

[0512] Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro

[0513] 325 330 335

[0514] Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu

[0515] 340 345 350

[0516] Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg

[0517] 355 360 365

[0518] Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro

[0519] 370 375 380

[0520] Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val

[0521] 385 390 395 400

[0522] Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala

[0523] 405 410 415

[0524] His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser

[0525] 420 425 430

[0526] Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr

[0527] 435 440 445

[0528] Ala Gly Thr Cys Tyr

[0529] 450

[0530] <210> 13

[0531] <211> 453

[0532] <212> PRT

[0533] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0534] <220>

[0535] <223> 人工序列描述:合成

[0536] 多肽

[0537] <400> 13

[0538] Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn

[0539] 1 5 10 15

[0540] Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp

[0541] 20 25 30

[0542] Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser

[0543] 35 40 45

[0544] Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys

[0545] 50 55 60

[0546] Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
[0547] 65 70 75 80
[0548] Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
[0549] 85 90 95
[0550] Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
[0551] 100 105 110
[0552] Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
[0553] 115 120 125
[0554] Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
[0555] 130 135 140
[0556] Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
[0557] 145 150 155 160
[0558] Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
[0559] 165 170 175
[0560] Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln
[0561] 180 185 190
[0562] Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
[0563] 195 200 205
[0564] Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
[0565] 210 215 220
[0566] Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
[0567] 225 230 235 240
[0568] Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
[0569] 245 250 255
[0570] Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
[0571] 260 265 270
[0572] Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
[0573] 275 280 285
[0574] Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[0575] 290 295 300
[0576] Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[0577] 305 310 315 320
[0578] Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[0579] 325 330 335
[0580] Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[0581] 340 345 350
[0582] Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[0583] 355 360 365
[0584] Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro

[0585] 370 375 380

[0586] Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val

[0587] 385 390 395 400

[0588] Ala Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala

[0589] 405 410 415

[0590] His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser

[0591] 420 425 430

[0592] Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr

[0593] 435 440 445

[0594] Ala Gly Thr Cys Tyr

[0595] 450

[0596] <210> 14

[0597] <211> 453

[0598] <212> PRT

[0599] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0600] <220>

[0601] <223> 人工序列描述:合成

[0602] 多肽

[0603] <400> 14

[0604] Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn

[0605] 1 5 10 15

[0606] Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp

[0607] 20 25 30

[0608] Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser

[0609] 35 40 45

[0610] Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys

[0611] 50 55 60

[0612] Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln

[0613] 65 70 75 80

[0614] Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn

[0615] 85 90 95

[0616] Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys

[0617] 100 105 110

[0618] Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg

[0619] 115 120 125

[0620] Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile

[0621] 130 135 140

[0622] Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr

[0623] 145 150 155 160

[0624] Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
[0625] 165 170 175
[0626] Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln
[0627] 180 185 190
[0628] Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
[0629] 195 200 205
[0630] Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
[0631] 210 215 220
[0632] Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
[0633] 225 230 235 240
[0634] Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
[0635] 245 250 255
[0636] Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
[0637] 260 265 270
[0638] Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
[0639] 275 280 285
[0640] Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[0641] 290 295 300
[0642] Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[0643] 305 310 315 320
[0644] Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[0645] 325 330 335
[0646] Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[0647] 340 345 350
[0648] Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[0649] 355 360 365
[0650] Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[0651] 370 375 380
[0652] Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
[0653] 385 390 395 400
[0654] Ser Ala Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
[0655] 405 410 415
[0656] His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
[0657] 420 425 430
[0658] Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
[0659] 435 440 445
[0660] Ala Gly Thr Cys Tyr
[0661] 450
[0662] <210> 15

[0663] <211> 453

[0664] <212> PRT

[0665] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0666] <220>

[0667] <223> 人工序列描述:合成

[0668] 多肽

[0669] <400> 15

[0670] Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn

[0671] 1 5 10 15

[0672] Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp

[0673] 20 25 30

[0674] Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser

[0675] 35 40 45

[0676] Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys

[0677] 50 55 60

[0678] Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln

[0679] 65 70 75 80

[0680] Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn

[0681] 85 90 95

[0682] Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys

[0683] 100 105 110

[0684] Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg

[0685] 115 120 125

[0686] Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile

[0687] 130 135 140

[0688] Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr

[0689] 145 150 155 160

[0690] Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr

[0691] 165 170 175

[0692] Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln

[0693] 180 185 190

[0694] Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln

[0695] 195 200 205

[0696] Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val

[0697] 210 215 220

[0698] Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr

[0699] 225 230 235 240

[0700] Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr

[0701] 245 250 255

[0702] Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
[0703] 260 265 270
[0704] Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
[0705] 275 280 285
[0706] Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[0707] 290 295 300
[0708] Val Thr His Thr Asp Leu Ala Ser Ser Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[0709] 305 310 315 320
[0710] Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[0711] 325 330 335
[0712] Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[0713] 340 345 350
[0714] Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[0715] 355 360 365
[0716] Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[0717] 370 375 380
[0718] Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
[0719] 385 390 395 400
[0720] Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
[0721] 405 410 415
[0722] His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
[0723] 420 425 430
[0724] Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
[0725] 435 440 445
[0726] Ala Gly Thr Cys Tyr
[0727] 450
[0728] <210> 16
[0729] <211> 455
[0730] <212> PRT
[0731] <213> 小白鼠(Mus musculus)
[0732] <400> 16
[0733] Ala Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Ser
[0734] 1 5 10 15
[0735] Pro Leu Ser Asp Lys Asn Leu Val Ala Met Gly Cys Leu Ala Arg Asp
[0736] 20 25 30
[0737] Phe Leu Pro Ser Thr Ile Ser Phe Thr Trp Asn Tyr Gln Asn Asn Thr
[0738] 35 40 45
[0739] Glu Val Ile Gln Gly Ile Arg Thr Phe Pro Thr Leu Arg Thr Gly Gly
[0740] 50 55 60

[0741] Lys Tyr Leu Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Ser Pro Lys Ser Ile Leu
[0742] 65 70 75 80
[0743] Glu Gly Ser Asp Glu Tyr Leu Val Cys Lys Ile His Tyr Gly Gly Lys
[0744] 85 90 95
[0745] Asn Arg Asp Leu His Val Pro Ile Pro Ala Val Ala Glu Met Asn Pro
[0746] 100 105 110
[0747] Asn Val Asn Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Ser Gly Pro Ala
[0748] 115 120 125
[0749] Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Glu Ala Thr Asn Phe Thr Pro Lys
[0750] 130 135 140
[0751] Pro Ile Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Lys Leu Val Glu Ser Gly
[0752] 145 150 155 160
[0753] Phe Thr Thr Asp Pro Val Thr Ile Glu Asn Lys Gly Ser Thr Pro Gln
[0754] 165 170 175
[0755] Thr Tyr Lys Val Ile Ser Thr Leu Thr Ile Ser Glu Ile Asp Trp Leu
[0756] 180 185 190
[0757] Asn Leu Asn Val Tyr Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe
[0758] 195 200 205
[0759] Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Cys Ala Ala Ser Pro Ser Thr Asp Ile
[0760] 210 215 220
[0761] Leu Asn Phe Thr Ile Pro Pro Ser Phe Ala Asp Ile Phe Leu Ser Lys
[0762] 225 230 235 240
[0763] Ser Ala Asn Leu Thr Cys Leu Val Ser Asn Leu Ala Thr Tyr Glu Thr
[0764] 245 250 255
[0765] Leu Ser Ile Ser Trp Ala Ser Gln Ser Gly Glu Pro Leu Glu Thr Lys
[0766] 260 265 270
[0767] Ile Lys Ile Met Glu Ser His Pro Asn Gly Thr Phe Ser Ala Lys Gly
[0768] 275 280 285
[0769] Val Ala Ser Val Cys Val Glu Asp Trp Asn Asn Arg Lys Glu Phe Val
[0770] 290 295 300
[0771] Cys Thr Val Thr His Arg Asp Leu Pro Ser Pro Gln Lys Lys Phe Ile
[0772] 305 310 315 320
[0773] Ser Lys Pro Asn Glu Val His Lys His Pro Pro Ala Val Tyr Leu Leu
[0774] 325 330 335
[0775] Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Val Thr
[0776] 340 345 350
[0777] Cys Leu Val Lys Gly Phe Ser Pro Ala Asp Ile Ser Val Gln Trp Lys
[0778] 355 360 365
[0779] Gln Arg Gly Gln Leu Leu Pro Gln Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro

[0780] 370 375 380

[0781] Met Pro Glu Pro Gly Ala Pro Gly Phe Tyr Phe Thr His Ser Ile Leu

[0782] 385 390 395 400

[0783] Thr Val Thr Glu Glu Glu Trp Asn Ser Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val

[0784] 405 410 415

[0785] Val Gly His Glu Ala Leu Pro His Leu Val Thr Glu Arg Thr Val Asp

[0786] 420 425 430

[0787] Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Ile Met Ser

[0788] 435 440 445

[0789] Asp Thr Gly Gly Thr Cys Tyr

[0790] 450 455

[0791] <210> 17

[0792] <211> 472

[0793] <212> PRT

[0794] <213> 恒河猴(Macaca mulatta)

[0795] <400> 17

[0796] Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn

[0797] 1 5 10 15

[0798] Ala Pro Leu Asp Thr Asn Glu Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp

[0799] 20 25 30

[0800] Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Phe Lys Asn Asn Ser

[0801] 35 40 45

[0802] Asn Ile Ser Lys Gly Val Trp Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly

[0803] 50 55 60

[0804] Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Ala Ser Lys Asp Val Met

[0805] 65 70 75 80

[0806] Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly

[0807] 85 90 95

[0808] Asn Lys Glu Gln Asn Val Pro Leu Pro Val Leu Ala Glu Arg Pro Pro

[0809] 100 105 110

[0810] Asn Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Val Gly Asn Pro

[0811] 115 120 125

[0812] Arg Glu Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln

[0813] 130 135 140

[0814] Ile Glu Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Ile

[0815] 145 150 155 160

[0816] Thr Thr Asp Arg Val Glu Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr

[0817] 165 170 175

[0818] Phe Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Val Ser Glu Arg Asp Trp Leu Ser

[0819] 180 185 190

[0820] Gln Ser Val Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln

[0821] 195 200 205

[0822] Lys Asn Val Ser Ser Val Cys Gly Pro Asn Pro Asp Thr Ala Ile Arg

[0823] 210 215 220

[0824] Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser

[0825] 225 230 235 240

[0826] Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Ala Thr Tyr Asp Ser Val

[0827] 245 250 255

[0828] Thr Ile Thr Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Leu Lys Thr His Thr

[0829] 260 265 270

[0830] Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Gly Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu

[0831] 275 280 285

[0832] Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Arg Cys

[0833] 290 295 300

[0834] Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser

[0835] 305 310 315 320

[0836] Arg Pro Lys Gly Val Ala Met His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro

[0837] 325 330 335

[0838] Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys

[0839] 340 345 350

[0840] Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Ile Phe Val Gln Trp Met Gln

[0841] 355 360 365

[0842] Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met

[0843] 370 375 380

[0844] Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr

[0845] 385 390 395 400

[0846] Val Ser Glu Glu Asp Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val

[0847] 405 410 415

[0848] Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys

[0849] 420 425 430

[0850] Ser Thr Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp Glu Glu Gly Phe Glu Asn Leu

[0851] 435 440 445

[0852] Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Phe

[0853] 450 455 460

[0854] Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe

[0855] 465 470

[0856] <210> 18

[0857] <211> 488

[0858] <212> PRT

[0859] <213> 黑猩猩(Pan troglodytes)

[0860] <400> 18

[0861] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe

[0862] 1 5 10 15

[0863] Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala

[0864] 20 25 30

[0865] Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser

[0866] 35 40 45

[0867] Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro

[0868] 50 55 60

[0869] Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu

[0870] 65 70 75 80

[0871] Pro Ser Lys Glu Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys

[0872] 85 90 95

[0873] Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val

[0874] 100 105 110

[0875] Thr Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Ile Phe Val Pro Pro Arg Asp

[0876] 115 120 125

[0877] Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Ser Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr

[0878] 130 135 140

[0879] Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys

[0880] 145 150 155 160

[0881] Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys

[0882] 165 170 175

[0883] Gln Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys

[0884] 180 185 190

[0885] Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Val Phe Thr Cys Arg Val Asp His

[0886] 195 200 205

[0887] Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Ser Pro Gly

[0888] 210 215 220

[0889] Glu Ser Arg His Ser His Pro Gly Leu Cys His Pro Pro Ser Phe Ala

[0890] 225 230 235 240

[0891] Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Ala Cys Leu Val Thr Asp

[0892] 245 250 255

[0893] Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Leu Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly

[0894] 260 265 270

[0895] Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala

[0896] 275 280 285

[0897] Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn
[0898] 290 295 300
[0899] Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser
[0900] 305 310 315 320
[0901] Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Glu Val Ala Leu His Arg
[0902] 325 330 335
[0903] Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg
[0904] 340 345 350
[0905] Glu Leu Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp
[0906] 355 360 365
[0907] Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys
[0908] 370 375 380
[0909] Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr
[0910] 385 390 395 400
[0911] Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly
[0912] 405 410 415
[0913] Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val
[0914] 420 425 430
[0915] Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Thr His Pro Val Gln
[0916] 435 440 445
[0917] Arg Val Pro Gly His Val Arg His Ser Trp His Leu Leu Leu Thr Leu
[0918] 450 455 460
[0919] Leu Ala Cys Pro Gln Ala Gln Gly Gly Arg Pro Leu Cys Val Cys Ala
[0920] 465 470 475 480
[0921] Cys Lys Leu Thr Val Ser Thr Gly
[0922] 485
[0923] <210> 19
[0924] <211> 453
[0925] <212> PRT
[0926] <213> 苏门答腊猩猩(Pongo abelii)
[0927] <400> 19
[0928] Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
[0929] 1 5 10 15
[0930] Ser Leu Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
[0931] 20 25 30
[0932] Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
[0933] 35 40 45
[0934] Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Thr Gly Ser Lys
[0935] 50 55 60

[0936] Tyr Val Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
[0937] 65 70 75 80
[0938] Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
[0939] 85 90 95
[0940] Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
[0941] 100 105 110
[0942] Val Ser Ile Phe Ile Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Ser Pro Arg
[0943] 115 120 125
[0944] Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
[0945] 130 135 140
[0946] Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Ala Ser Gly Ile Thr
[0947] 145 150 155 160
[0948] Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
[0949] 165 170 175
[0950] Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Asn Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln
[0951] 180 185 190
[0952] Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Lys
[0953] 195 200 205
[0954] Asn Ala Ser Ser Met Cys Ser Pro Asn Pro Asn Thr Ala Ile Arg Val
[0955] 210 215 220
[0956] Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
[0957] 225 230 235 240
[0958] Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Asp Ser Met Thr
[0959] 245 250 255
[0960] Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
[0961] 260 265 270
[0962] Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
[0963] 275 280 285
[0964] Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[0965] 290 295 300
[0966] Val Thr His Ala Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[0967] 305 310 315 320
[0968] Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[0969] 325 330 335
[0970] Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[0971] 340 345 350
[0972] Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[0973] 355 360 365
[0974] Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro

[0975] 370 375 380

[0976] Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val

[0977] 385 390 395 400

[0978] Ser Glu Glu Asp Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala

[0979] 405 410 415

[0980] His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser

[0981] 420 425 430

[0982] Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr

[0983] 435 440 445

[0984] Ala Gly Thr Cys Tyr

[0985] 450

[0986] <210> 20

[0987] <211> 764

[0988] <212> PRT

[0989] <213> 智人(Homo sapiens)

[0990] <400> 20

[0991] Met Leu Leu Phe Val Leu Thr Cys Leu Leu Ala Val Phe Pro Ala Ile

[0992] 1 5 10 15

[0993] Ser Thr Lys Ser Pro Ile Phe Gly Pro Glu Glu Val Asn Ser Val Glu

[0994] 20 25 30

[0995] Gly Asn Ser Val Ser Ile Thr Cys Tyr Tyr Pro Pro Thr Ser Val Asn

[0996] 35 40 45

[0997] Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala Arg Gly Gly Cys

[0998] 50 55 60

[0999] Ile Thr Leu Ile Ser Ser Glu Gly Tyr Val Ser Ser Lys Tyr Ala Gly

[1000] 65 70 75 80

[1001] Arg Ala Asn Leu Thr Asn Phe Pro Glu Asn Gly Thr Phe Val Val Asn

[1002] 85 90 95

[1003] Ile Ala Gln Leu Ser Gln Asp Asp Ser Gly Arg Tyr Lys Cys Gly Leu

[1004] 100 105 110

[1005] Gly Ile Asn Ser Arg Gly Leu Ser Phe Asp Val Ser Leu Glu Val Ser

[1006] 115 120 125

[1007] Gln Gly Pro Gly Leu Leu Asn Asp Thr Lys Val Tyr Thr Val Asp Leu

[1008] 130 135 140

[1009] Gly Arg Thr Val Thr Ile Asn Cys Pro Phe Lys Thr Glu Asn Ala Gln

[1010] 145 150 155 160

[1011] Lys Arg Lys Ser Leu Tyr Lys Gln Ile Gly Leu Tyr Pro Val Leu Val

[1012] 165 170 175

[1013] Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Val Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Arg Ile Arg

[1014] 180 185 190
[1015] Leu Asp Ile Gln Gly Thr Gly Gln Leu Leu Phe Ser Val Val Ile Asn
[1016] 195 200 205
[1017] Gln Leu Arg Leu Ser Asp Ala Gly Gln Tyr Leu Cys Gln Ala Gly Asp
[1018] 210 215 220
[1019] Asp Ser Asn Ser Asn Lys Lys Asn Ala Asp Leu Gln Val Leu Lys Pro
[1020] 225 230 235 240
[1021] Glu Pro Glu Leu Val Tyr Glu Asp Leu Arg Gly Ser Val Thr Phe His
[1022] 245 250 255
[1023] Cys Ala Leu Gly Pro Glu Val Ala Asn Val Ala Lys Phe Leu Cys Arg
[1024] 260 265 270
[1025] Gln Ser Ser Gly Glu Asn Cys Asp Val Val Val Asn Thr Leu Gly Lys
[1026] 275 280 285
[1027] Arg Ala Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ile Leu Leu Asn Pro Gln Asp Lys
[1028] 290 295 300
[1029] Asp Gly Ser Phe Ser Val Val Ile Thr Gly Leu Arg Lys Glu Asp Ala
[1030] 305 310 315 320
[1031] Gly Arg Tyr Leu Cys Gly Ala His Ser Asp Gly Gln Leu Gln Glu Gly
[1032] 325 330 335
[1033] Ser Pro Ile Gln Ala Trp Gln Leu Phe Val Asn Glu Glu Ser Thr Ile
[1034] 340 345 350
[1035] Pro Arg Ser Pro Thr Val Val Lys Gly Val Ala Gly Ser Ser Val Ala
[1036] 355 360 365
[1037] Val Leu Cys Pro Tyr Asn Arg Lys Glu Ser Lys Ser Ile Lys Tyr Trp
[1038] 370 375 380
[1039] Cys Leu Trp Glu Gly Ala Gln Asn Gly Arg Cys Pro Leu Leu Val Asp
[1040] 385 390 395 400
[1041] Ser Glu Gly Trp Val Lys Ala Gln Tyr Glu Gly Arg Leu Ser Leu Leu
[1042] 405 410 415
[1043] Glu Glu Pro Gly Asn Gly Thr Phe Thr Val Ile Leu Asn Gln Leu Thr
[1044] 420 425 430
[1045] Ser Arg Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Leu Thr Asn Gly Asp Thr Leu
[1046] 435 440 445
[1047] Trp Arg Thr Thr Val Glu Ile Lys Ile Ile Glu Gly Glu Pro Asn Leu
[1048] 450 455 460
[1049] Lys Val Pro Gly Asn Val Thr Ala Val Leu Gly Glu Thr Leu Lys Val
[1050] 465 470 475 480
[1051] Pro Cys His Phe Pro Cys Lys Phe Ser Ser Tyr Glu Lys Tyr Trp Cys
[1052] 485 490 495

[1053] Lys Trp Asn Asn Thr Gly Cys Gln Ala Leu Pro Ser Gln Asp Glu Gly
[1054] 500 505 510
[1055] Pro Ser Lys Ala Phe Val Asn Cys Asp Glu Asn Ser Arg Leu Val Ser
[1056] 515 520 525
[1057] Leu Thr Leu Asn Leu Val Thr Arg Ala Asp Glu Gly Trp Tyr Trp Cys
[1058] 530 535 540
[1059] Gly Val Lys Gln Gly His Phe Tyr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Val
[1060] 545 550 555 560
[1061] Ala Val Glu Glu Arg Lys Ala Ala Gly Ser Arg Asp Val Ser Leu Ala
[1062] 565 570 575
[1063] Lys Ala Asp Ala Ala Pro Asp Glu Lys Val Leu Asp Ser Gly Phe Arg
[1064] 580 585 590
[1065] Glu Ile Glu Asn Lys Ala Ile Gln Asp Pro Arg Leu Phe Ala Glu Glu
[1066] 595 600 605
[1067] Lys Ala Val Ala Asp Thr Arg Asp Gln Ala Asp Gly Ser Arg Ala Ser
[1068] 610 615 620
[1069] Val Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Gln Gly Gly Ser Ser Arg Ala Leu
[1070] 625 630 635 640
[1071] Val Ser Thr Leu Val Pro Leu Gly Leu Val Leu Ala Val Gly Ala Val
[1072] 645 650 655
[1073] Ala Val Gly Val Ala Arg Ala Arg His Arg Lys Asn Val Asp Arg Val
[1074] 660 665 670
[1075] Ser Ile Arg Ser Tyr Arg Thr Asp Ile Ser Met Ser Asp Phe Glu Asn
[1076] 675 680 685
[1077] Ser Arg Glu Phe Gly Ala Asn Asp Asn Met Gly Ala Ser Ser Ile Thr
[1078] 690 695 700
[1079] Gln Glu Thr Ser Leu Gly Gly Lys Glu Glu Phe Val Ala Thr Thr Glu
[1080] 705 710 715 720
[1081] Ser Thr Thr Glu Thr Lys Glu Pro Lys Lys Ala Lys Arg Ser Ser Lys
[1082] 725 730 735
[1083] Glu Glu Ala Glu Met Ala Tyr Lys Asp Phe Leu Leu Gln Ser Ser Thr
[1084] 740 745 750
[1085] Val Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Pro Gln Glu Ala
[1086] 755 760
[1087] <210> 21
[1088] <211> 390
[1089] <212> PRT
[1090] <213> 智人(Homo sapiens)
[1091] <400> 21

[1092] Met Asp Phe Trp Leu Trp Pro Leu Tyr Phe Leu Pro Val Ser Gly Ala
[1093] 1 5 10 15
[1094] Leu Arg Ile Leu Pro Glu Val Lys Val Glu Gly Glu Leu Gly Gly Ser
[1095] 20 25 30
[1096] Val Thr Ile Lys Cys Pro Leu Pro Glu Met His Val Arg Ile Tyr Leu
[1097] 35 40 45
[1098] Cys Arg Glu Met Ala Gly Ser Gly Thr Cys Gly Thr Val Val Ser Thr
[1099] 50 55 60
[1100] Thr Asn Phe Ile Lys Ala Glu Tyr Lys Gly Arg Val Thr Leu Lys Gln
[1101] 65 70 75 80
[1102] Tyr Pro Arg Lys Asn Leu Phe Leu Val Glu Val Thr Gln Leu Thr Glu
[1103] 85 90 95
[1104] Ser Asp Ser Gly Val Tyr Ala Cys Gly Ala Gly Met Asn Thr Asp Arg
[1105] 100 105 110
[1106] Gly Lys Thr Gln Lys Val Thr Leu Asn Val His Ser Glu Tyr Glu Pro
[1107] 115 120 125
[1108] Ser Trp Glu Glu Gln Pro Met Pro Glu Thr Pro Lys Trp Phe His Leu
[1109] 130 135 140
[1110] Pro Tyr Leu Phe Gln Met Pro Ala Tyr Ala Ser Ser Ser Lys Phe Val
[1111] 145 150 155 160
[1112] Thr Arg Val Thr Thr Pro Ala Gln Arg Gly Lys Val Pro Pro Val His
[1113] 165 170 175
[1114] His Ser Ser Pro Thr Thr Gln Ile Thr His Arg Pro Arg Val Ser Arg
[1115] 180 185 190
[1116] Ala Ser Ser Val Ala Gly Asp Lys Pro Arg Thr Phe Leu Pro Ser Thr
[1117] 195 200 205
[1118] Thr Ala Ser Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Leu Leu Lys Pro Gln Thr
[1119] 210 215 220
[1120] Pro Ser Tyr Asn His His Thr Arg Leu His Arg Gln Arg Ala Leu Asp
[1121] 225 230 235 240
[1122] Tyr Gly Ser Gln Ser Gly Arg Glu Gly Gln Gly Phe His Ile Leu Ile
[1123] 245 250 255
[1124] Pro Thr Ile Leu Gly Leu Phe Leu Leu Ala Leu Leu Gly Leu Val Val
[1125] 260 265 270
[1126] Lys Arg Ala Val Glu Arg Arg Lys Ala Leu Ser Arg Arg Ala Arg Arg
[1127] 275 280 285
[1128] Leu Ala Val Arg Met Arg Ala Leu Glu Ser Ser Gln Arg Pro Arg Gly
[1129] 290 295 300
[1130] Ser Pro Arg Pro Arg Ser Gln Asn Asn Ile Tyr Ser Ala Cys Pro Arg

[1131] 305 310 315 320
[1132] Arg Ala Arg Gly Ala Asp Ala Ala Gly Thr Gly Glu Ala Pro Val Pro
[1133] 325 330 335
[1134] Gly Pro Gly Ala Pro Leu Pro Pro Ala Pro Leu Gln Val Ser Glu Ser
[1135] 340 345 350
[1136] Pro Trp Leu His Ala Pro Ser Leu Lys Thr Ser Cys Glu Tyr Val Ser
[1137] 355 360 365
[1138] Leu Tyr His Gln Pro Ala Ala Met Met Glu Asp Ser Asp Ser Asp Asp
[1139] 370 375 380
[1140] Tyr Ile Asn Val Pro Ala
[1141] 385 390
[1142] <210> 22
[1143] <211> 532
[1144] <212> PRT
[1145] <213> 智人(Homo sapiens)
[1146] <400> 22
[1147] Met Pro Leu Phe Leu Ile Leu Cys Leu Leu Gln Gly Ser Ser Phe Ala
[1148] 1 5 10 15
[1149] Leu Pro Gln Lys Arg Pro His Pro Arg Trp Leu Trp Glu Gly Ser Leu
[1150] 20 25 30
[1151] Pro Ser Arg Thr His Leu Arg Ala Met Gly Thr Leu Arg Pro Ser Ser
[1152] 35 40 45
[1153] Pro Leu Cys Trp Arg Glu Glu Ser Ser Phe Ala Ala Pro Asn Ser Leu
[1154] 50 55 60
[1155] Lys Gly Ser Arg Leu Val Ser Gly Glu Pro Gly Gly Ala Val Thr Ile
[1156] 65 70 75 80
[1157] Gln Cys His Tyr Ala Pro Ser Ser Val Asn Arg His Gln Arg Lys Tyr
[1158] 85 90 95
[1159] Trp Cys Arg Leu Gly Pro Pro Arg Trp Ile Cys Gln Thr Ile Val Ser
[1160] 100 105 110
[1161] Thr Asn Gln Tyr Thr His His Arg Tyr Arg Asp Arg Val Ala Leu Thr
[1162] 115 120 125
[1163] Asp Phe Pro Gln Arg Gly Leu Phe Val Val Arg Leu Ser Gln Leu Ser
[1164] 130 135 140
[1165] Pro Asp Asp Ile Gly Cys Tyr Leu Cys Gly Ile Gly Ser Glu Asn Asn
[1166] 145 150 155 160
[1167] Met Leu Phe Leu Ser Met Asn Leu Thr Ile Ser Ala Gly Pro Ala Ser
[1168] 165 170 175
[1169] Thr Leu Pro Thr Ala Thr Pro Ala Ala Gly Glu Leu Thr Met Arg Ser

[1170] 180 185 190
[1171] Tyr Gly Thr Ala Ser Pro Val Ala Asn Arg Trp Thr Pro Gly Thr Thr
[1172] 195 200 205
[1173] Gln Thr Leu Gly Gln Gly Thr Ala Trp Asp Thr Val Ala Ser Thr Pro
[1174] 210 215 220
[1175] Gly Thr Ser Lys Thr Thr Ala Ser Ala Glu Gly Arg Arg Thr Pro Gly
[1176] 225 230 235 240
[1177] Ala Thr Arg Pro Ala Ala Pro Gly Thr Gly Ser Trp Ala Glu Gly Ser
[1178] 245 250 255
[1179] Val Lys Ala Pro Ala Pro Ile Pro Glu Ser Pro Pro Ser Lys Ser Arg
[1180] 260 265 270
[1181] Ser Met Ser Asn Thr Thr Glu Gly Val Trp Glu Gly Thr Arg Ser Ser
[1182] 275 280 285
[1183] Val Thr Asn Arg Ala Arg Ala Ser Lys Asp Arg Arg Glu Met Thr Thr
[1184] 290 295 300
[1185] Thr Lys Ala Asp Arg Pro Arg Glu Asp Ile Glu Gly Val Arg Ile Ala
[1186] 305 310 315 320
[1187] Leu Asp Ala Ala Lys Lys Val Leu Gly Thr Ile Gly Pro Pro Ala Leu
[1188] 325 330 335
[1189] Val Ser Glu Thr Leu Ala Trp Glu Ile Leu Pro Gln Ala Thr Pro Val
[1190] 340 345 350
[1191] Ser Lys Gln Gln Ser Gln Gly Ser Ile Gly Glu Thr Thr Pro Ala Ala
[1192] 355 360 365
[1193] Gly Met Trp Thr Leu Gly Thr Pro Ala Ala Asp Val Trp Ile Leu Gly
[1194] 370 375 380
[1195] Thr Pro Ala Ala Asp Val Trp Thr Ser Met Glu Ala Ala Ser Gly Glu
[1196] 385 390 395 400
[1197] Gly Ser Ala Ala Gly Asp Leu Asp Ala Ala Thr Gly Asp Arg Gly Pro
[1198] 405 410 415
[1199] Gln Ala Thr Leu Ser Gln Thr Pro Ala Val Gly Pro Trp Gly Pro Pro
[1200] 420 425 430
[1201] Gly Lys Glu Ser Ser Val Lys Arg Thr Phe Pro Glu Asp Glu Ser Ser
[1202] 435 440 445
[1203] Ser Arg Thr Leu Ala Pro Val Ser Thr Met Leu Ala Leu Phe Met Leu
[1204] 450 455 460
[1205] Met Ala Leu Val Leu Leu Gln Arg Lys Leu Trp Arg Arg Arg Thr Ser
[1206] 465 470 475 480
[1207] Gln Glu Ala Glu Arg Val Thr Leu Ile Gln Met Thr His Phe Leu Glu
[1208] 485 490 495

[1209] Val Asn Pro Gln Ala Asp Gln Leu Pro His Val Glu Arg Lys Met Leu
[1210] 500 505 510
[1211] Gln Asp Asp Ser Leu Pro Ala Gly Ala Ser Leu Thr Ala Pro Glu Arg
[1212] 515 520 525
[1213] Asn Pro Gly Pro
[1214] 530
[1215] <210> 23
[1216] <211> 393
[1217] <212> PRT
[1218] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1219] <220>
[1220] <223> 人工序列描述:合成
[1221] 多肽
[1222] <400> 23
[1223] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1224] 1 5 10 15
[1225] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr
[1226] 20 25 30
[1227] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1228] 35 40 45
[1229] Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu
[1230] 50 55 60
[1231] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[1232] 65 70 75 80
[1233] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1234] 85 90 95
[1235] Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[1236] 100 105 110
[1237] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[1238] 115 120 125
[1239] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
[1240] 130 135 140
[1241] Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
[1242] 145 150 155 160
[1243] Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
[1244] 165 170 175
[1245] Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
[1246] 180 185 190
[1247] Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

[1248] 195 200 205
[1249] Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
[1250] 210 215 220
[1251] Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[1252] 225 230 235 240
[1253] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[1254] 245 250 255
[1255] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala
[1256] 260 265 270
[1257] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp
[1258] 275 280 285
[1259] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu
[1260] 290 295 300
[1261] Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His
[1262] 305 310 315 320
[1263] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp
[1264] 325 330 335
[1265] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser
[1266] 340 345 350
[1267] Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Ala Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala
[1268] 355 360 365
[1269] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala
[1270] 370 375 380
[1271] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp
[1272] 385 390
[1273] <210> 24
[1274] <211> 393
[1275] <212> PRT
[1276] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1277] <220>
[1278] <223> 人工序列描述:合成
[1279] 多肽
[1280] <400> 24
[1281] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1282] 1 5 10 15
[1283] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr
[1284] 20 25 30
[1285] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1286] 35 40 45

[1287] Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu
[1288] 50 55 60
[1289] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[1290] 65 70 75 80
[1291] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1292] 85 90 95
[1293] Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[1294] 100 105 110
[1295] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[1296] 115 120 125
[1297] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
[1298] 130 135 140
[1299] Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
[1300] 145 150 155 160
[1301] Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
[1302] 165 170 175
[1303] Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
[1304] 180 185 190
[1305] Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[1306] 195 200 205
[1307] Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
[1308] 210 215 220
[1309] Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[1310] 225 230 235 240
[1311] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[1312] 245 250 255
[1313] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala
[1314] 260 265 270
[1315] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp
[1316] 275 280 285
[1317] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu
[1318] 290 295 300
[1319] Ala Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His
[1320] 305 310 315 320
[1321] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp
[1322] 325 330 335
[1323] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser
[1324] 340 345 350
[1325] Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala

[1326] 355 360 365

[1327] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala

[1328] 370 375 380

[1329] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

[1330] 385 390

[1331] <210> 25

[1332] <211> 5

[1333] <212> PRT

[1334] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1335] <220>

[1336] <223> 人工序列描述:合成

[1337] 肽

[1338] <400> 25

[1339] Gly Gly Gly Gly Ser

[1340] 1 5

[1341] <210> 26

[1342] <211> 10

[1343] <212> PRT

[1344] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1345] <220>

[1346] <223> 人工序列描述:合成

[1347] 肽

[1348] <400> 26

[1349] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[1350] 1 5 10

[1351] <210> 27

[1352] <211> 15

[1353] <212> PRT

[1354] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1355] <220>

[1356] <223> 人工序列描述:合成

[1357] 肽

[1358] <400> 27

[1359] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[1360] 1 5 10 15

[1361] <210> 28

[1362] <211> 20

[1363] <212> PRT

[1364] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1365] <220>

[1366] <223> 人工序列描述:合成

[1367] 肽

[1368] <400> 28

[1369] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

[1370] 1 5 10 15

[1371] Gly Gly Gly Ser

[1372] 20

[1373] <210> 29

[1374] <211> 25

[1375] <212> PRT

[1376] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1377] <220>

[1378] <223> 人工序列描述:合成

[1379] 肽

[1380] <400> 29

[1381] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

[1382] 1 5 10 15

[1383] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[1384] 20 25

[1385] <210> 30

[1386] <211> 487

[1387] <212> PRT

[1388] <213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)

[1389] <400> 30

[1390] Phe Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser Ala

[1391] 1 5 10 15

[1392] Gly Pro Phe Lys Trp Glu Pro Ser Val Ser Ser Pro Asn Ala Pro Leu

[1393] 20 25 30

[1394] Asp Thr Asn Glu Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro

[1395] 35 40 45

[1396] Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Phe Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser

[1397] 50 55 60

[1398] Lys Gly Val Trp Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala

[1399] 65 70 75 80

[1400] Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Ala Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr

[1401] 85 90 95

[1402] Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu

[1403] 100 105 110

[1404] Gln Asn Val Pro Leu Pro Val Val Ala Glu Arg Pro Pro Asn Val Ser
[1405] 115 120 125
[1406] Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Val Gly Asn Pro Arg Glu Ser
[1407] 130 135 140
[1408] Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Glu Val
[1409] 145 150 155 160
[1410] Ser Trp Leu Arg Asp Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Ile Thr Thr Asp
[1411] 165 170 175
[1412] Arg Val Glu Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Phe Lys Val
[1413] 180 185 190
[1414] Thr Ser Thr Leu Thr Val Ser Glu Arg Asp Trp Leu Ser Gln Ser Val
[1415] 195 200 205
[1416] Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Lys Asn Val
[1417] 210 215 220
[1418] Ser Ser Val Cys Gly Pro Asn Pro Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala
[1419] 225 230 235 240
[1420] Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu
[1421] 245 250 255
[1422] Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Ala Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Thr
[1423] 260 265 270
[1424] Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Leu Lys Thr His Thr Asn Ile Ser
[1425] 275 280 285
[1426] Glu Ser His Pro Asn Gly Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile
[1427] 290 295 300
[1428] Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Arg Cys Thr Val Thr
[1429] 305 310 315 320
[1430] His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys
[1431] 325 330 335
[1432] Gly Val Ala Met His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg
[1433] 340 345 350
[1434] Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr
[1435] 355 360 365
[1436] Gly Phe Ser Pro Ala Asp Ile Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln
[1437] 370 375 380
[1438] Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro
[1439] 385 390 395 400
[1440] Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu
[1441] 405 410 415
[1442] Glu Asp Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu

[1443] 420 425 430
[1444] Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly
[1445] 435 440 445
[1446] Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Ile Leu Trp Thr Thr Leu
[1447] 450 455 460
[1448] Ser Thr Phe Val Ala Leu Phe Val Leu Thr Leu Leu Tyr Ser Gly Ile
[1449] 465 470 475 480
[1450] Val Thr Phe Ile Lys Val Arg
[1451] 485
[1452] <210> 31
[1453] <211> 453
[1454] <212> PRT
[1455] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1456] <220>
[1457] <223> 人工序列描述:合成
[1458] 多肽
[1459] <400> 31
[1460] Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
[1461] 1 5 10 15
[1462] Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
[1463] 20 25 30
[1464] Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
[1465] 35 40 45
[1466] Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
[1467] 50 55 60
[1468] Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
[1469] 65 70 75 80
[1470] Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
[1471] 85 90 95
[1472] Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
[1473] 100 105 110
[1474] Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
[1475] 115 120 125
[1476] Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
[1477] 130 135 140
[1478] Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
[1479] 145 150 155 160
[1480] Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
[1481] 165 170 175

[1482] Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln
[1483] 180 185 190
[1484] Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
[1485] 195 200 205
[1486] Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
[1487] 210 215 220
[1488] Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
[1489] 225 230 235 240
[1490] Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
[1491] 245 250 255
[1492] Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
[1493] 260 265 270
[1494] Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
[1495] 275 280 285
[1496] Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[1497] 290 295 300
[1498] Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[1499] 305 310 315 320
[1500] Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[1501] 325 330 335
[1502] Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Ala Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[1503] 340 345 350
[1504] Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[1505] 355 360 365
[1506] Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[1507] 370 375 380
[1508] Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
[1509] 385 390 395 400
[1510] Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
[1511] 405 410 415
[1512] His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
[1513] 420 425 430
[1514] Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
[1515] 435 440 445
[1516] Ala Gly Thr Cys Tyr
[1517] 450
[1518] <210> 32
[1519] <211> 453
[1520] <212> PRT

[1521] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1522] <220>

[1523] <223> 人工序列描述:合成

[1524] 多肽

[1525] <400> 32

[1526] Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn

[1527] 1 5 10 15

[1528] Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp

[1529] 20 25 30

[1530] Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser

[1531] 35 40 45

[1532] Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys

[1533] 50 55 60

[1534] Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln

[1535] 65 70 75 80

[1536] Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn

[1537] 85 90 95

[1538] Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys

[1539] 100 105 110

[1540] Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg

[1541] 115 120 125

[1542] Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile

[1543] 130 135 140

[1544] Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr

[1545] 145 150 155 160

[1546] Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr

[1547] 165 170 175

[1548] Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln

[1549] 180 185 190

[1550] Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln

[1551] 195 200 205

[1552] Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val

[1553] 210 215 220

[1554] Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr

[1555] 225 230 235 240

[1556] Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr

[1557] 245 250 255

[1558] Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn

[1559] 260 265 270

[1560] Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
[1561] 275 280 285
[1562] Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[1563] 290 295 300
[1564] Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[1565] 305 310 315 320
[1566] Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[1567] 325 330 335
[1568] Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Ala Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[1569] 340 345 350
[1570] Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[1571] 355 360 365
[1572] Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[1573] 370 375 380
[1574] Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
[1575] 385 390 395 400
[1576] Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
[1577] 405 410 415
[1578] His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
[1579] 420 425 430
[1580] Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
[1581] 435 440 445
[1582] Ala Gly Thr Cys Tyr
[1583] 450
[1584] <210> 33
[1585] <211> 7
[1586] <212> PRT
[1587] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1588] <220>
[1589] <223> 人工序列描述:合成
[1590] 肽
[1591] <400> 33
[1592] Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[1593] 1 5
[1594] <210> 34
[1595] <211> 453
[1596] <212> PRT
[1597] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1598] <220>

[1599] <223> 人工序列描述:合成

[1600] 多肽

[1601] <400> 34

[1602] Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
[1603] 1 5 10 15
[1604] Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
[1605] 20 25 30
[1606] Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
[1607] 35 40 45
[1608] Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
[1609] 50 55 60
[1610] Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
[1611] 65 70 75 80
[1612] Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
[1613] 85 90 95
[1614] Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
[1615] 100 105 110
[1616] Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
[1617] 115 120 125
[1618] Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
[1619] 130 135 140
[1620] Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
[1621] 145 150 155 160
[1622] Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
[1623] 165 170 175
[1624] Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln
[1625] 180 185 190
[1626] Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
[1627] 195 200 205
[1628] Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
[1629] 210 215 220
[1630] Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
[1631] 225 230 235 240
[1632] Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
[1633] 245 250 255
[1634] Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
[1635] 260 265 270
[1636] Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
[1637] 275 280 285

[1638] Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[1639] 290 295 300
[1640] Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[1641] 305 310 315 320
[1642] Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[1643] 325 330 335
[1644] Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[1645] 340 345 350
[1646] Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[1647] 355 360 365
[1648] Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[1649] 370 375 380
[1650] Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
[1651] 385 390 395 400
[1652] Ser Glu Ala Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
[1653] 405 410 415
[1654] His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
[1655] 420 425 430
[1656] Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
[1657] 435 440 445
[1658] Ala Gly Thr Cys Tyr
[1659] 450

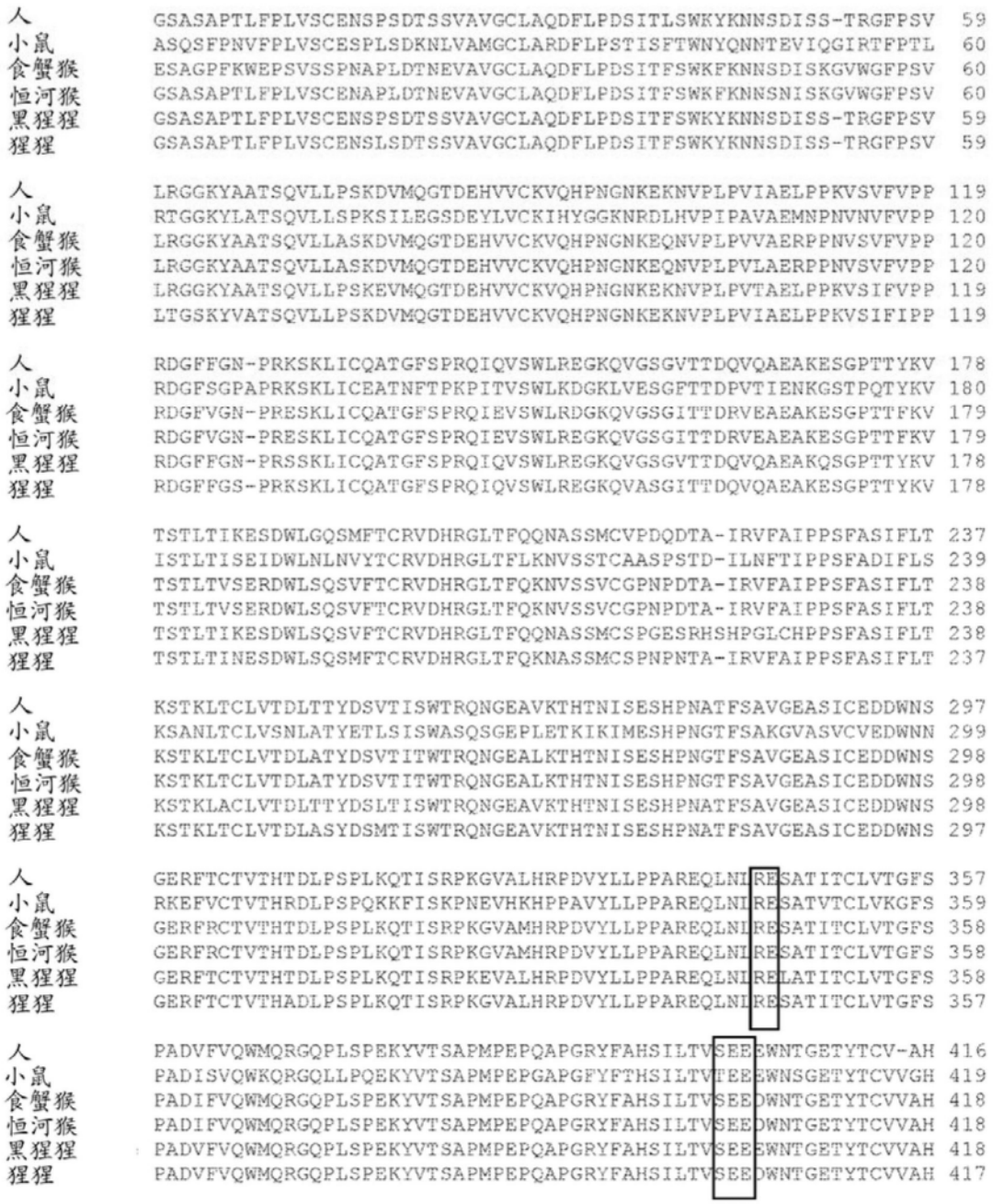

人 GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISS-TRGFPSV 59
小鼠 ASQSFPNVFPLVSCESPLSDKNLVAMGCLARDFLPSTISFTWNYQNNTEVIQGIRTFPTL 60
食蟹猴 ESAGPFKWEPSVSSPNAPLDTNEVAVGCLAQDFLPDSITFSWKFKNNSDISKGVWGFPSV 60
恒河猴 GSASAPTLFPLVSCENAPLDTNEVAVGCLAQDFLPDSITFSWKFKNNSNISKGVWGFPSV 60
黑猩猩 GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISS-TRGFPSV 59
猩猩 GSASAPTLFPLVSCENSLSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISS-TRGFPSV 59
人 LRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVPP 119
小鼠 RTGGKYLATSQVLLSPKSILEGSDEYLVCKIHYGGKNRDLHVPIPAVAEMNPNVNVFVPP 120
食蟹猴 LRGGKYAATSQVLLASKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEQNVPLPVVAERPPNVSVFVPP 120
恒河猴 LRGGKYAATSQVLLASKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEQNVPLPVLAERPPNVSVFVPP 120
黑猩猩 LRGGKYAATSQVLLPSKEVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVTAELPPKVSIFVPP 119
猩猩 LTGSKYVATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSIFIPP 119
人 RDGFFGN-PRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKV 178
小鼠 RDGFSGPAPRKSKLICEATNFTPKPITVSWLKDGKLVESGFTTDPVTIENKGSTPQTYKV 180
食蟹猴 RDGFVGN-PRESKLICQATGFSPRQIEVSWLRDGKQVGSGITTDRVEAEAKESGPTTFKV 179
恒河猴 RDGFVGN-PRESKLICQATGFSPRQIEVSWLREGKQVGSGITTDRVEAEAKESGPTTFKV 179
黑猩猩 RDGFFGN-PRSSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKQSGPTTYKV 178
猩猩 RDGFFGS-PRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVASGITTDQVQAEAKESGPTTYKV 178
人 TSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTA-IRVFAIPPSFASIFLT 237
小鼠 ISTLTISEIDWLNLNVYTCRVDHRGLTFLKNVSSTCAASPSTD-ILNFTIPPSFADIFLS 239
食蟹猴 TSTLTVSERDWLSQSVFTCRVDHRGLTFQKNVSSVCGPNPDTA-IRVFAIPPSFASIFLT 238
恒河猴 TSTLTVSERDWLSQSVFTCRVDHRGLTFQKNVSSVCGPNPDTA-IRVFAIPPSFASIFLT 238
黑猩猩 TSTLTIKESDWLSQSVFTCRVDHRGLTFQQNASSMCSPGESRHSHPGLCHPPSFASIFLT 238
猩猩 TSTLTINESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQKNASSMCSPNPNTA-IRVFAIPPSFASIFLT 237
人 KSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNS 297
小鼠 KSANLTCLVSNLATYETLSISWASQSGEPLETKIKIMESHPNGTFSAKGVASVCVEDWNN 299
食蟹猴 KSTKLTCLVTDLATYDSVTITWTRQNGEALKTHTNISESHPNGTFSAVGEASICEDDWNS 298
恒河猴 KSTKLTCLVTDLATYDSVTITWTRQNGEALKTHTNISESHPNGTFSAVGEASICEDDWNS 298
黑猩猩 KSTKLACLVTDLTTYDSLTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNS 298
猩猩 KSTKLTCLVTDLASYDSMTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNS 297
人 GERFTCTVTHTDLPSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFS 357
小鼠 RKEFVCTVTHRDLPSPQKKFISKPNEVHKHPPAVYLLPPAREQLNLRESATVTCLVKGFS 359
食蟹猴 GERFRCTVTHTDLPSPLKQTISRPKGVAMHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFS 358
恒河猴 GERFRCTVTHTDLPSPLKQTISRPKGVAMHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFS 358
黑猩猩 GERFTCTVTHTDLPSPLKQTISRPKEVALHRPDVYLLPPAREQLNLRELATITCLVTGFS 358
猩猩 GERFTCTVTHADLPSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFS 357
人 PADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCV-AH 416
小鼠 PADISVQWKQRGQLLPQEKYVTSAPMPEPGAPGFYFTHSILTVTEEEWNSGETYTCVVGH 419
食蟹猴 PADIFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEDWNTGETYTCVVAH 418
恒河猴 PADIFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEDWNTGETYTCVVAH 418
黑猩猩 PADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAH 418
猩猩 PADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEDWNTGETYTCVVAH 417

图1A

```
人          EALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLV-------MSDTAGTCY----------------- 452
小鼠        EALPHLVTERTVDKSTGKPTLYNVSLI-------MSDTGGTCY----------------- 455
食蟹猴      EALPNRVTERTVDKSTGK-PTLYNV--SLVILWTTLSTFVALFVLTLLYSGIVTFIKVR- 474
恒河猴      EALPNRVTERTVDKSTEGEVSADEB--GFENLWATASTFIVLFLLSLFYSTTVTLF---- 472
黑猩猩      EALPNRVTERTVDKSTGKTHPVQRVPGHVRHSWHLLLTLLACPQAQGGRPLCVCACKLTV 478
猩猩        EALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLV-------MSDTAGTCY----------------- 453

人          --- 452
小鼠        --- 455
食蟹猴      --- 474
恒河猴      --- 472
黑猩猩      STG 481
猩猩        --- 453
```

图1B

	IgM	IgM	IgM	IgM S401A	IgM S401A	IgM E402A	IgM E402A	IgM E403A	IgM R344A	IgM E345A
	VJ	VJ Y102A	VJ T103A	VJ	VJ Y102A	VJ	VJ Y102A	VJ	VJ	VJ
m pIgR	100%	10%	nd	90%	10%	50%	10%	nd	nd	nd
h pIgR	100%	10%	100%	90%	10%	40%	10%	60%	100%	50%
m FcαμR	100%	10%	nd	80%	10%	50%	10%	nd	nd	nd
h FcαμR	100%	10%	60%	20%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
m FcμR	100%	20%	nd	20%	30%	20%	20%	nd	nd	nd
h FcμR	100%	100%	100%	100%	100%	10%	10%	20%	10%	10%

图2

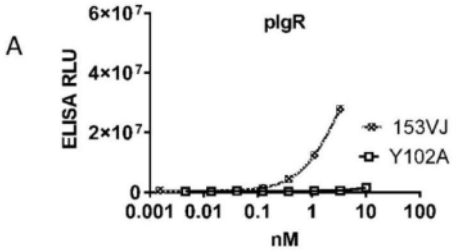


图3A

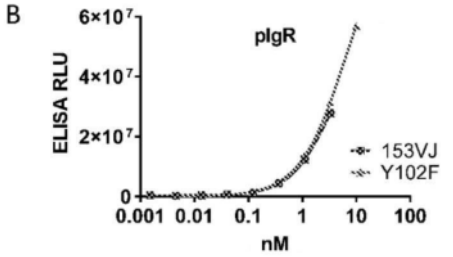


图3B

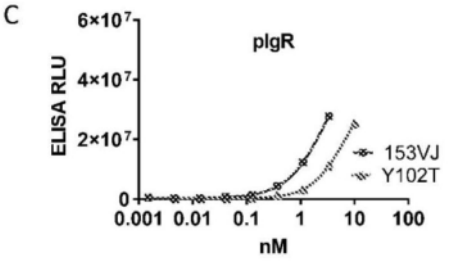


图3C

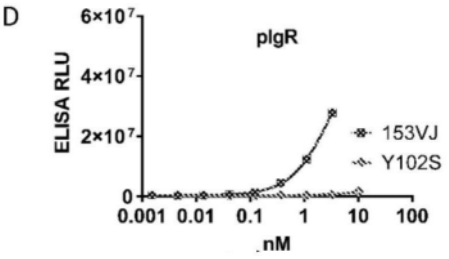


图3D

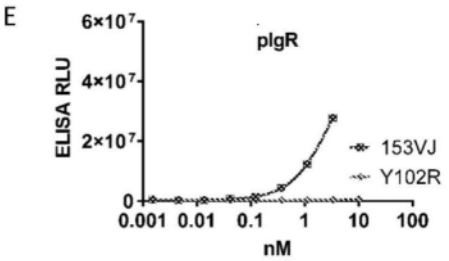


图3E

抗体		A (μg/ml)	B (μg/ml)	$t_{1/2}\alpha$ (h)	$t_{1/2}\beta$ (h)	C_0 (μg/ml)	$AUC_{0\text{-inf}}$ (μg/ml*h)	MRT (h)
IgM	J	75	10	0.5	8	85	177	8.3
IgM	J Y102A	53	69	2.6	37	122	3869	50.4
IgM	VJ	93	8	0.2	5	101	89	4.7
IgM	VJ Y102A	76	38	7.7	53	114	3734	62.1
IgM S401A	VJ	126	48	0.3	17	175	1232	23.3
IgM S401A	VJ Y102A	76	96	1.1	27	172	3928	38.4
IgM E402A	VJ	41	66	2.4	22	107	2225	29.7
IgM E402A	VJ Y102A	35	114	0.2	25	150	4191	36.6
IgM	VJH	121	28	1.4	33	148	1544	39.8
IgM	VJH Y102A	63	68	6.8	35	131	4074	44.8

图4

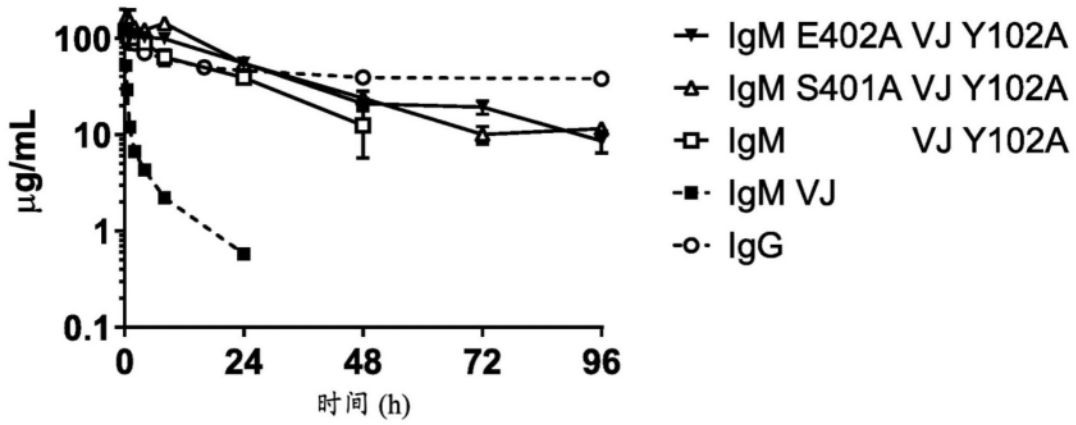


图5

抗体	$t_{1/2}$ α (h)	$t_{1/2}$ β (h)	$AUC_{0-\infty}$ (μg/ml*hr)	AUC MUT/WT
IgM VJ	0.49	17.6	388	
IgM VJ-N49A	0.8	16.0	625	**1.6**

图6