



(10) 授权公告号 CN 110536900 B

(45) 授权公告日 2024.06.11

(21) 申请号 201880022469.1

(22) 申请日 2018.04.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110536900 A

(43) 申请公布日 2019.12.03

(30) 优先权数据
62/483,087 2017.04.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/026474 2018.04.06

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/187702 EN 2018.10.11

(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 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.
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2012/0316071 A1, 2012.12.13
US 2015/0071948 A1, 2015.03.12
CN 105441455 A, 2016.03.30

审查员 刘树柏

权利要求书2页 说明书31页
序列表40页 附图5页

(54) 发明名称

调节补体依赖性细胞溶解效应子功能的修饰的人IGM恒定区

(57) 摘要

本公开提供了经修饰的人IgM重链恒定区, 所述经修饰的人IgM重链恒定区例如在C μ 3结构域中包含一个或多个氨基酸取代, 其中相对于相应的野生型人IgM抗体, 包含所述经修饰的IgM恒定区和对靶抗原具有特异性的重链可变区的经修饰的人IgM抗体表现出对表达所述靶抗原的细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC)降低。

1. 一种经修饰的人IgM恒定区,其是野生型人IgM恒定区,但包含一个或两个氨基酸取代,其中所述一个氨基酸取代是位于SEQ ID NO: 1的P311被丙氨酸(P311A)取代,或其中两个氨基酸取代是:

位于SEQ ID NO: 1的P311被丙氨酸取代且SEQ ID NO: 1的P313被丝氨酸取代(P311A P313S);

位于SEQ ID NO: 1的P311被丙氨酸取代且SEQ ID NO: 1的K315被丙氨酸取代(P311A K315A);或

位于SEQ ID NO: 1的L310被丙氨酸取代且SEQ ID NO: 1的P311被丙氨酸取代(L310A P311A);

并且其中包含所述经修饰的IgM恒定区和对靶抗原具有特异性的重链可变区的经修饰的IgM抗体相对于相应的包含SEQ ID NO:1的人IgM恒定区的人IgM抗体表现出对表达所述靶抗原的细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC)降低。

2. 如权利要求1所述的经修饰的人IgM恒定区,其中所述人IgM恒定区由氨基酸序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:21组成。

3. 一种经修饰的人IgM抗体,其包含如权利要求1或2所述的经修饰的人IgM恒定区和位于所述经修饰的人IgM恒定区的氨基末端的重链可变区(VH),其中所述经修饰的人IgM抗体与靶抗原特异性结合并且相对于相应的野生型人IgM抗体表现出对表达所述靶抗原的细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC)降低。

4. 如权利要求3所述的经修饰的人IgM抗体,其是分别包含六个二价IgM结合单元的六聚体抗体,其中每个结合单元包含两条IgM重链和两条免疫球蛋白轻链,每条IgM重链包含位于所述经修饰的人IgM恒定区的氨基末端的VH,每条免疫球蛋白轻链包含位于人免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的轻链可变结构域(VL)。

5. 如权利要求3所述的经修饰的人IgM抗体,其是包含五个二价IgM结合单元的五聚体抗体,其中每个结合单元包含两条IgM重链和两条免疫球蛋白轻链,每条IgM重链包含位于所述经修饰的人IgM恒定区的氨基末端的VH,每条免疫球蛋白轻链包含位于人免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的轻链可变结构域(VL),并且还包含J链。

6. 如权利要求5所述的经修饰的人IgM抗体,其中所述J链是还包含异源多肽的经修饰的J链,其中所述异源多肽直接或间接地与所述J链融合。

7. 如权利要求6所述的经修饰的人IgM抗体,其中所述异源多肽是抗体或抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fv片段、单链Fv(scFv)片段、或二硫键连接的Fv(sdFv)片段。

8. 如权利要求7所述的经修饰的人IgM抗体,其中所述抗原结合片段是与CD3ε特异性结合的scFv片段。

9. 如权利要求3所述的经修饰的人IgM抗体,其中相对于相同的相应野生型IgM抗体,除了所述经修饰的人IgM恒定区以外,在剂量-反应测定中由包含所述经修饰的人IgM恒定区的靶特异性IgM抗体所达到的最大CDC活性降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%,或其中相对于相同的相应野生型IgM抗体,除了所述经修饰的人IgM恒定区以外,包含影响50% CDC活性(EC50)的所述经修饰的人IgM恒定区的靶特异性IgM抗体的所述抗体浓度增加至少2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倍或至少100倍。

10. 一种多核苷酸,其包含编码如权利要求1或2所述的经修饰的人IgM恒定区或如权利要求3所述的经修饰的人IgM抗体的核酸序列。

11. 一种载体,其包含权利要求10所述的多核苷酸,编码抗体轻链的核酸序列和可任选的编码J链的核酸序列。

12. 一种宿主细胞,其包含如权利要求11所述的载体,其中所述宿主细胞可以表达经修饰的人IgM抗体。

13. 一种产生如权利要求3至9中任一项所述的经修饰的人IgM抗体的方法,包括培养如权利要求12所述的宿主细胞,并回收所述抗体。

调节补体依赖性细胞溶解效应子功能的修饰的人IgM恒定区

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年4月7日提交的美国临时专利申请序列号62/483,087的权益,该临时专利申请通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 补体依赖性细胞毒性是抗体用于使先天免疫系统的组分破坏入侵微生物的效应子功能。治疗性抗体可以使用补体系统以使补体系统攻击被抗体靶向的细胞,例如肿瘤细胞。通过第一组分C1q与IgG的Fc区或与IgM的Fc Mu区的结合而触发补体级联。抗体六聚化导致六聚体C1q复合物的形成,这进一步触发下游补体组分并且以膜攻击复合物(MAC)的形成而结束,膜攻击复合物通过细胞膜穿孔和引起的渗透性休克导致细胞死亡。IgM同种型的抗体是多聚体(五聚体和六聚体),并且特别适合C1q的结合和多聚化。实际上,IgM抗体可以比相应的IgG抗体好30至100倍地固定补体。

[0004] 然而,对于那些使用IgM抗体使细胞表面受体多聚化以影响下游信号传导的适应症,并不总是希望保留这种强大的补体结合能力。例如,IgM抗体可以用于通过接合TNF受体超家族成员如CD40、OX40或GITR而激活T细胞。在每种情况下,多聚化驱动的下流信号传导可用于引起强大的激动剂活性和T细胞增殖。然而,如果IgM抗体的补体固定活性保持完整,则它可能潜在地抵消IgM抗体对这些靶的激动剂活性。因此,本领域需要鉴定可以减少或消除补体结合和所引起的补体依赖性细胞毒性(CDC活性)的IgM重链恒定区突变。

[0005] 已经鉴定了小鼠IgM中增强或降低CDC活性的突变。参见,例如,Arya,S.等,J.Immunol.152:1206-1212(1994),Wright,J,F.等,J.Biol.Chem.263:11221-11226(1988),及Wright,J.F.等,J.Biol.Chem.265:10506-10513(1989)。本领域仍然需要鉴定和表征CDC活性改变的经修饰的人IgM抗体。

发明内容

[0006] 本公开提供了一种经修饰的人IgM恒定区,其相对于野生型人IgM恒定区包括一个或多个氨基酸取代,其中至少一个氨基酸取代位于C_μ3结构域中从SEQ ID NO:1的T302到SEQ ID NO:1的K322范围的位置,并且其中包括所述经修饰的IgM恒定区和对靶抗原有特异性的重链可变区的经修饰的IgM抗体相对于相应的野生型人IgM抗体,表现出对表达所述靶抗原的细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC)降低。

[0007] 在某些方面,所述经修饰的人IgM恒定区包括位于SEQ ID NO:1的氨基酸T302、C303、T304、V305、T306、H307、T308、D309、L310、P311、S312、P313、L314、K315、Q316、T317、I318、S319、R320、P321和/或K322处的至少一个氨基酸取代。例如,所述经修饰的人IgM恒定区可以包括位于SEQ ID NO:1的位置L310处、SEQ ID NO:1的位置P311处、SEQ ID NO:1的位置P313处、SEQ ID NO:1的位置K315处或其任何组合处的至少一个氨基酸取代。

[0008] 在某些方面,至少一个氨基酸取代可以位于SEQ ID NO:1的位置L310处,例如,SEQ ID NO:1的L310可以被丙氨酸(L310A)、丝氨酸(L310S)、天冬氨酸(L310D)或甘氨酸(L310G)

取代。在某些方面,SEQ ID NO:1的L310可以被丙氨酸(L310A)取代,例如,所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:15。在某些方面,SEQ ID NO:1的L310可以被天冬氨酸(L310D)取代,例如,所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:23。

[0009] 在某些方面,至少一个氨基酸取代可以位于SEQ ID NO:1的位置P311处,例如,SEQ ID NO:1的P311可以被丙氨酸(P311A)、丝氨酸(P311S)或甘氨酸(P311G)取代。在某些方面,SEQ ID NO:1的P311可以被丙氨酸(P311A)取代,例如,所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:2。

[0010] 在某些方面,至少一个氨基酸取代可以位于SEQ ID NO:1的位置P313处,例如,SEQ ID NO:1的P313可以被丙氨酸(P313A)、丝氨酸(P313S)或甘氨酸(P313G)取代。在某些方面,SEQ ID NO:1的P313可以被丝氨酸(P313S)取代,例如,所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:3。

[0011] 在某些方面,至少一个氨基酸取代可以位于SEQ ID NO:1的位置K315处,例如,SEQ ID NO:1的K315可以被丙氨酸(K315A)、丝氨酸(K315S)、天冬氨酸(K315D)、谷氨酰胺(K315Q)或甘氨酸(P313G)取代。在某些方面,SEQ ID NO:1的K315可以被丙氨酸(K315A)取代,例如,所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:16。在某些方面,SEQ ID NO:1的(K315)可以被天冬氨酸(K315D)取代,例如,所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:24。在某些方面,SEQ ID NO:1的K315可以被谷氨酰胺(K315Q)取代,例如,所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:25。

[0012] 在某些方面,如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区可以包括两个或更多个氨基酸取代。例如,如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区可以包括在SEQ ID NO:1的位置L310、P311、P313或K315中的两处或更多处的氨基酸取代。

[0013] 在某些方面,如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区可以包括在SEQ ID NO:1的位置P311和P313处的氨基酸取代。例如,SEQ ID NO:1的P311可以被丙氨酸(P311A)、丝氨酸(P311S)或甘氨酸(P311G)取代,并且SEQ ID NO:1的P313可以被丙氨酸(P313A)、丝氨酸(P313S)或甘氨酸(P313G)取代。在某些方面,SEQ ID NO:1的P311可以被丙氨酸(P311A)取代并且SEQ ID NO:1的P313可以被丝氨酸(P313S)取代,例如,所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:4。

[0014] 在某些方面,如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区可以包括在SEQ ID NO:1的位置L310和K315处的氨基酸取代。例如,L310可以被丙氨酸(L310A)或丝氨酸(L310S)取代,并且K315可以被丙氨酸(K315A)或丝氨酸(K315S)取代,例如,所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18。

[0015] 在某些方面,如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区可以包括在SEQ ID NO:1的位置L310和P311处的氨基酸取代。例如,L310可以被丙氨酸(L310A)取代,并且P311可以被丙氨酸(P311A)取代,例如,所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:19。

[0016] 在某些方面,如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区可以包括在SEQ ID NO:1的位置L310和P313处的氨基酸取代。例如,L310可以被丙氨酸(L310A)取代并且P313可以被丝氨酸(P313S)取代,例如,所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:20。

[0017] 在某些方面,如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区可以包括在SEQ ID NO:1的位置P311和K315处的氨基酸取代。例如,P311可以被丙氨酸(P311A)取代,并且K315可以被丙

氨酸 (K315A) 取代, 例如, 所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:21。

[0018] 在某些方面, 如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区可以包括在SEQ ID NO:1的位置P313和K315处的氨基酸取代。例如, P313可以被丝氨酸 (P313S) 取代并且K315可以被丙氨酸 (K315A) 取代, 例如, 所述经修饰的IgM恒定区可以包括SEQ ID NO:22。

[0019] 在某些方面, 相对于相同的相应野生型IgM抗体, 除了所述经修饰的人IgM恒定区以外, 在剂量反应测定中包括如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区的靶特异性IgM抗体所达到的最大CDC活性降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。

[0020] 在某些方面, 相对于相同的相应野生型IgM抗体, 除了所述经修饰的人IgM恒定区以外, 包括如本文所提供的的影响50% CDC活性 (EC_{50}) 的经修饰的人IgM恒定区的靶特异性IgM抗体的抗体浓度增加至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍和至少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倍或至少100倍。

[0021] 本公开还提供了一种经修饰的人IgM抗体, 其包括如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区并且还包含位于所述经修饰的人IgM恒定区的氨基末端的重链可变区 (VH), 其中所述经修饰的人IgM抗体与靶抗原特异性结合并且相对于相应的野生型人IgM抗体表现出对表达所述靶抗原的细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 降低。在某些方面, 所述经修饰的人IgM抗体可以是分别包括五个或六个二价IgM结合单元的五聚体或六聚体抗体, 其中每个结合单元包含两条IgM重链和两条免疫球蛋白轻链, 每条IgM重链包括位于所述经修饰的人IgM恒定区的氨基末端的VH, 每条免疫球蛋白轻链包括位于人免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的轻链可变结构域 (VL)。在某些方面, 如本文所提供的经修饰的人IgM抗体可以是五聚体, 其还包括J链或其功能片段, 或其功能变体。在某些方面, J链可以包括SEQ ID NO:7的氨基酸23至158或其功能片段, 或其功能变体。在某些方面, J链或其片段或变体可以是还包括异源多肽的经修饰的J链, 其中所述异源多肽直接或间接地与所述J链或其片段或变体融合。在某些方面, 异源多肽可以通过肽接头与J链或其片段融合, 例如肽接头包括至少5个氨基酸, 但不超过25个氨基酸。在某些方面, 肽接头可以包含GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:12), 基本上由其组成或由其所组成。在某些方面, 所述异源多肽可以与所述J链或其片段或变体的N端、所述J链或其片段或变体的C端或所述J链或其片段或变体的N端和C端两处融合。在某些方面, 所述异源多肽可以包括结合结构域, 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, 经修饰的J链可以包括scFv片段。在某些方面, 异源多肽可以与CD3 ϵ 特异性结合。在某些方面, 经修饰的J链可以包括氨基酸序列SEQ ID NO:9 (V15J) 或SEQ ID NO:11 (J15V)。在某些方面, 经修饰的J链还可包括信号肽, 例如, 经修饰的J链可以包括氨基酸序列SEQ ID NO:8 (V15J) 或SEQ ID NO:10 (J15V)。在某些方面, 如本文所提供的经修饰的人IgM抗体可以指导T细胞介导的对表达所述靶抗原的细胞的杀伤, 其活性水平等同于除了所述经修饰的IgM恒定区以外的与所述经修饰的IgM抗体相同的相应IgM抗体的活性水平。在某些方面, 表达靶抗原的细胞是真核细胞。

[0022] 本公开还提供了一种多核苷酸, 其包括编码如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区, 或如本文所提供的经修饰的人IgM抗体的重链多肽亚基的核酸序列。还提供了包含所提供的多核苷酸的组合物。在某些方面, 所述组合物还包含编码轻链多肽亚基的核酸序列。在

某些方面,所述轻链多肽亚基包含与VL的C端融合的人抗体轻链恒定区或其片段。在某些方面,编码所述重链多肽亚基的所述核酸序列和编码所述轻链多肽亚基的所述核酸序列在单独的载体上。在某些方面,编码所述重链多肽亚基的所述核酸序列和编码所述轻链多肽亚基的所述核酸序列在单个载体上。在某些方面,所述组合物还包含编码J链或其功能片段或其功能变体的核酸序列。在某些方面,J链或其片段或变体是还包括异源多肽的经修饰的J链,其中所述异源多肽直接或间接地与所述J链或其片段融合。在某些方面,编码所述重链多肽亚基的所述核酸序列,编码所述轻链多肽亚基的所述核酸序列和编码所述J链的所述核酸序列可以在单个载体上。在某些方面,编码所述重链多肽亚基的所述核酸序列,编码所述轻链多肽亚基的所述核酸序列和编码所述J链的所述核酸序列可以各自在单独的载体上。本公开还提供了所有此类载体。本公开还提供了包含所提供的多核苷酸、组合物、一种或多种载体的宿主细胞。在某些方面,宿主细胞可以表达如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区,或如本文所提供的经修饰的人IgM抗体,或其任何功能片段。本公开还提供了产生如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区或如本文所提供的经修饰的人IgM抗体的方法,其中所述方法包括培养所提供的宿主细胞,并回收所述恒定区或抗体。

附图说明

[0023] 图1显示在用于显示五聚体和六聚体的组装的非还原条件下电泳的SDS PAGE凝胶。针对对照、IgM(纯)、IgM+J(纯)和IgM的上清液制剂(均无J链)以及IgM突变体S283N、P313S、P311A和D294G描绘了凝胶图案。

[0024] 图2显示1)在补体不存在时测试的对照抗CD20抗体(1.5.3IgG和1.5.3IgM x V15J);2)在补体存在时测试的对照IgM(1.5.3IgM,无J链);以及3)在补体存在时测试的相应1.5.3IgM突变体P311A、P313S、D294G和S283N(均无J链)的补体依赖性细胞溶解(CDC)活性百分比。

[0025] 图3显示具有抗CD3修饰的J链的抗CD20 x抗CD3双特异性IgM抗体(包括对照1.5.3IgM x V15J抗体和相应的1.5.3IgM x V15J突变体P311A、P313S、D294G和S283N)的CDC活性百分比。

[0026] 图4显示缺乏抗CD3修饰的J链的对照抗CD20 IgM,以及含有抗CD3修饰的J链(V15J)的双特异性IgM抗体(包括对照抗体1.5.3IgM x V15J和相应的1.5.3x V15J IgM突变体D294G、S283N、P313S和P311A)的T细胞激活测定。

[0027] 图5显示1.5.3IgM x V15J以及相应的1.5.3x V15J IgM突变体P311A、P313S和双突变体P311A/P313S的混合和还原凝胶。双突变体和每个单突变体一样表达和组装。

[0028] 图6显示1.5.3IgM x V15J以及相应的1.5.3x V15J IgM突变体P311A、P313S和双突变体P311A/P313S的CDC活性。双突变体显示CDC活性完全消除。

[0029] 图7显示1.5.3IgM x V15J以及相应的1.5.3x V15J IgM突变体P311A、P313S和双突变体P311A/P313S的T细胞激活测定。双突变体在激活T细胞方面与每种单突变体一样有效。

[0030] 图8显示无J链的1.5.3IgM、1.5.3IgM x V15J、相应的1.5.3x V15J IgM突变体P311A、P313S、L310A、K315A和双突变体P311A/P313S的CDC活性。双突变体显示CDC活性完全消除。

[0031] 图9A显示无J链的1.5.3IgM、1.5.3IgM x V15J、1.5.3x V15J IgM突变体L310D和L310A及双突变体P311A/P313S的CDC活性。

[0032] 图9B显示无J链的1.5.3IgM、1.5.3IgM x V15J和1.5.3x V15J IgM突变体K315D、K315Q和K315A的CDC活性。

具体实施方式

[0033] 定义

[0034] 术语“一”或“一个(种)”实体是指一个或多个该实体;例如,“一个结合分子”应理解为代表一个或多个结合分子。因而,术语“一”(或“一个(种)”、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0035] 此外,本文使用的“和/或”被视为具体公开两个指定特征或组分中的每一个,具有或不具有其它特征或组分的。因此,如短语诸如“A和/或B”中所用的术语和/或”旨在包括“A和B”,“A或B”,“A”(单独的)和“B”(单独的)。同样,如短语诸如“A、B和/或C”中所用的术语“和/或”旨在涵盖以下实施方案中的每一个: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(单独的);B(单独的);和C(单独的)。

[0036] 除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语均具有与本公开相关领域中的普通技术人员通常所理解的含义。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, 2000年修订版, Oxford University Press, 为技术人员提供了本公开中使用的许多术语的通用词典。

[0037] 单位、前缀和符号以其国际单位制(SI)接受的形式表示。数字范围包括限定该范围的数字。除非另有说明,否则氨基酸序列以氨基至羧基方向从左至右书写。本文提供的标题不是对本公开的各个方面或方面的限制,本公开的各个方面或方面可以通过参考整个说明书获得。因此,通过参考整个说明书,可以更全面地定义紧接在下面定义的术语。

[0038] 如本文所用,术语“多肽”旨在涵盖单个“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,不是指特定长度的产物。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指两个或更多个氨基酸的一条或多条链的任何其它术语包括在“多肽”的定义中,并且术语“多肽”可以代替这些术语中的任何一个或与这些术语中的任何一个互换使用。术语“多肽”还旨在指多肽表达后修饰的产物,表达后修饰包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化,通过已知的保护/封闭基团进行的衍生化,蛋白水解裂解或通过非自然存在的氨基酸进行的修饰。多肽可以源自生物来源或通过重组技术产生,而不一定是由指定的核酸序列翻译的。多肽可以以任何方式产生,包括通过化学合成。

[0039] 如本文所公开的多肽的大小可为约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。多肽可以具有限定的三维结构,但它们不一定具有此类结构。具有限定的三维结构的多肽被称为折叠的,不具有限定的三维结构但是可以采取许多不同构象的多肽被称为未折叠的。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)的含氧或含氮侧链与蛋白质附接。

[0040] “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,分离的多肽可以从其天然或自然环境中移出。如本文所公开的,将宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质认为是分离的,就像已经通过任何合适的技术分离、分级或部分或基本上纯化的天然或重组多肽一样。

[0041] 如本文所用,术语“非自然存在的多肽”或其任何语法变型是有条件的定义,其明确排除,但仅排除被或可以被鉴定人或行政或鉴定机构确定或解释为“自然存在的”的那些多肽形式。

[0042] 本文公开的其它多肽是前述多肽的片段、衍生物、类似物或变体,及其任何组合。如本文所公开的术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”包括保留相应天然抗体或多肽的至少一些性质(例如,与抗原特异性结合)的任何多肽。除了本文其它地方讨论的特定抗体片段之外,多肽片段还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取代、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。在某些方面,变体可以是非自然存在的。可以使用本领域已知的诱变技术产生非自然存在的变体。变体多肽可包含保守性或非保守性氨基酸取代、缺失或添加。衍生物是已经改变以表现出在原始多肽上未发现的附加特征的多肽。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”还可以指具有通过功能侧基的反应而化学衍生的一个或多个氨基酸的主题多肽。作为“衍生物”还包括含有二十种标准氨基酸的一种或多种衍生物的那些肽。例如,4-羟基脯氨酸可以取代脯氨酸;5-羟基赖氨酸可以取代赖氨酸;3-甲基组氨酸可取代组氨酸;高丝氨酸可以取代丝氨酸;以及鸟氨酸可以取代赖氨酸。

[0043] “保守性氨基酸取代”是其中一个氨基酸被另一个具有相似侧链的氨基酸取代的氨基酸取代。本领域已经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、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(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,苯丙氨酸取代酪氨酸是保守性取代。在某些实施方案中,本公开的多肽和抗体的序列中的保守性取代不会消除含有该氨基酸序列的多肽或抗体与结合分子所结合的抗原的结合。鉴定不会消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守性取代的方法是本领域公知的(参见例如,Brummell等, *Biochem.* 32:1180-1 187 (1993); Kobayashi等, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); 和 Burks等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997))。

[0044] 术语“多核苷酸”旨在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磷酸二酯键或非常规键(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区段,例如DNA或RNA片段。

[0045] “分离的”核酸或多核苷酸意指从其天然环境分开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编码载体中所含的多肽的重组多核苷酸将被认为是“分离

的”。此外,认为已经工程化为具有用于克隆的限制性位点的多核苷酸区段例如PCR产物是分离的。分离的多核苷酸的其它实例包括保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)中的纯化(部分或基本上)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产生的此类分子。另外,多核苷酸或核酸可以是或可以包括调控元件,诸如启动子、核糖体结合位点或转录终止子。

[0046] 如本文所用,术语“非自然存在的多核苷酸”或其任何语法变型是有条件的定义,其明确排除,但仅排除被或可以被鉴定人或行政或鉴定机构确定或解释为“自然存在的”的那些核酸或多核苷酸形式。

[0047] 如本文所用,“编码区”是核酸的一部分,其由翻译成氨基酸的密码子组成。虽然“终止密码子”(TAG, TGA或TAA)未翻译成氨基酸,但可以将其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以存在于单个多核苷酸构建体中,例如,在单个载体上,或在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,任何载体均可含有单个编码区,或者可以包含两个或更多个编码区,例如,单个载体可以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。另外,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化元件或基序,诸如分泌信号肽或异源功能结构域的那些编码区。

[0048] 在某些实施方案中,多核苷酸或核酸是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与一个或多个编码区可操作地缔合的启动子和/或其它转录或翻译控制元件。可操作地缔合是当基因产物(例如,多肽)的编码区与一个或多个调控序列以使得基因产物的表达受到调控序列的影响或控制的方式缔合时。如果启动子功能的诱导引起编码所需基因产物的mRNA的转录,并且如果两个DNA片段之间的连接特性不干扰表达调控序列指导基因产物的表达的能力或者不干扰DNA模板转录的能力,则所述两个DNA片段(诸如多肽编码区和与之缔合的启动子)“可操作地缔合”。因此,如果启动子能够实现编码多肽的核酸的转录,则启动子区将是与该核酸可操作地缔合的。启动子可以是指导DNA在预定细胞中的实质性转录的细胞特异性启动子。除启动子外,其它转录控制元件,例如增强子、操纵子、阻遏物和转录终止信号,可以与多核苷酸可操作地缔合以指导细胞特异性转录。

[0049] 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(立即早期启动子,连同内含子-A一起)、猿猴病毒40(早期启动子)和逆转录病毒(诸如劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus))的启动子和增强子区段。其它转录控制区包括源自脊椎动物基因,诸如肌动蛋白、热休克蛋白、牛生长激素和兔 β -珠蛋白的那些,以及能够控制真核细胞中的基因表达的其它序列。其它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型启动子(例如,由干扰素或白细胞介素诱导的启动子)。

[0050] 类似地,各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、翻译起始和终止密码子,以及源自小核糖核酸病毒的元件(尤其是内部核糖体进入位点或IRES,也称为CITE序列)。

[0051] 在其它实施方案中,多核苷酸可以是RNA,例如呈信使RNA(mRNA)、转运RNA或核糖

体RNA的形式。

[0052] 多核苷酸和核酸编码区可以与编码分泌肽或信号肽的其它编码区缔合,所述分泌肽或信号肽指导如本文所公开的多核苷酸编码的多肽的分泌。根据信号假设,哺乳动物细胞分泌的蛋白质具有信号肽或分泌前导序列,一旦开始通过粗面内质网输出生长的蛋白质链,信号肽或分泌前导序列就从成熟蛋白质上裂解。本领域的普通技术人员意识到脊椎动物细胞分泌的多肽可以具有与多肽的N端融合的信号肽,该信号肽从完整或“全长”多肽上裂解以产生所述多肽的分泌或“成熟”形式。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,或该序列的功能衍生物,所述功能衍生物保留了指导与之可操作地缔合的多肽分泌的能力。可替代地,可以使用异源哺乳动物信号肽或其功能衍生物。例如,野生型前导序列可以用人组织纤溶酶原激活物(TPA)或小鼠 β -葡糖醛酸糖苷酶的前导序列取代。

[0053] 如本文所用,术语“CD20”是指在B淋巴细胞表面上表达的膜蛋白。CD20蛋白在文献中被称为其它名称,例如B淋巴细胞抗原CD20、B淋巴细胞表面抗原B1、Bp35、CVID5、LEU-16、跨膜4结构域亚家族A成员1或MS4A2。如本文所公开的某些多价抗CD20结合分子,例如IgM抗体或其片段在PCT公开号W0/2016/141303中有进一步描述,该PCT公开通过引用整体并入本文。

[0054] 本文公开了某些结合分子,或其抗原结合片段、变体或衍生物。除非特别指代全尺寸抗体,否则术语“结合分子”包括全尺寸抗体以及此类抗体的抗原结合亚基、片段、变体、类似物或衍生物,例如以类似于抗体分子的方式结合抗原,但使用不同支架的工程化抗体分子或片段。

[0055] 如本文所用,术语“结合分子”在其最广义上是指与靶或分子决定簇(例如,表位或抗原决定簇)特异性结合分子。如本文进一步所述,结合分子可包含一个或多个本文所述的“抗原结合结构域”。结合分子的非限制性实例是保留抗原特异性结合的抗体或其片段。

[0056] 如本文所用,术语“结合结构域”或“抗原结合结构域”是指结合分子的足以与表位特异性结合的区域。例如,作为两个单独的多肽亚基或作为单链的“Fv”,例如抗体的可变重链和可变轻链,被认为是“结合结构域”。其它抗原结合结构域包括但不限于源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”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”。

[0057] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换使用。抗体(或如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(对于骆驼科物种而言)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相对容易了解。(参见,例如,Harlow等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988年第2版)。除非另有说明,否则术语“抗体”涵盖范围从抗体的小抗原结合片段到全尺寸抗体的任何物质,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可以包括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可以包括J链的IgM抗体。

[0058] 如下文将更详细讨论的,术语“免疫球蛋白”包括可以在生物化学上区分各种广泛类别的多肽。本领域技术人员将理解,重链分类为gamma、mu、alpha、delta或epsilon,

(γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ)，其中有一些亚类(例如， $\gamma 1$ - $\gamma 4$ 或 $\alpha 1$ - $\alpha 2$)。该链的特性分别将抗体的“同种型”确定为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(亚型)例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂经充分表征并且已知会赋予功能特化。鉴于本公开，这些免疫球蛋白中的每一种的修饰形式容易被本领域技术人员辨别，因此，在本公开的范围。在某些实施方案中，本公开提供了经修饰的人IgM抗体。

[0059] 轻链分类为kappa或lambda (κ 、 λ)。每个重链类别均可与 κ 或 λ 轻链结合。通常，轻链和重链彼此共价键合，当免疫球蛋白例如由杂交瘤、B细胞或基因工程宿主细胞表达时，两条重链的“尾”部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构型的叉形末端的N端延伸至每条链底部的C端。某些抗体(例如，IgG抗体)的基本结构包括两个重链亚基和两个轻链亚基，两个重链亚基和两个轻链亚基通过二硫键共价连接形成“Y”结构，在本文中也称为“H2L2”结构，或“结合单元”。

[0060] 术语“结合单元”在本文中用于指结合分子(例如，抗体或其抗原结合片段)的部分，该部分对应于标准免疫球蛋白结构，例如，两条重链或其片段和两条轻链或其片段，或例如源自骆驼科或软骨鱼(condricthoid)抗体的两条重链或其片段。在某些方面，例如，在结合分子是二价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。在其它方面，例如，在结合分子是IgM五聚体或IgM六聚体的情况下，结合分子包含两个或更多个“结合单元”，在IgM五聚体或六聚体的情况下分别为五个或六个。结合单元不需要包括全长抗体重链和轻链，但通常将为二价，即，将包括两个如下文所定义的“抗原结合结构域”。本公开中提供的某些IgM来源的结合分子是五聚体或六聚体，并且包括五个或六个二价结合单元，该二价结合单元包括IgM恒定区，例如经修饰的人IgM恒定区或其片段。如本文所用，包含两个或更多个结合单元，例如五个或六个结合单元的结合分子可称为“多聚体”。

[0061] 如本文所用的术语“J链”、“天然序列J链”或“天然J链”是指任何动物物种的天然序列IgM或IgA抗体的J链，包括成熟的人J链，其氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0062] 术语“经修饰的J链”在本文中用于指天然序列J链多肽的变体，其包含异源部分，例如异源多肽，例如引入天然序列中的外来结合结构域。引入可以通过任何方式实现，包括异源多肽或其它部分的直接或间接融合，或通过肽或化学接头进行附接。术语“经修饰的人J链”涵盖但不限于通过引入异源部分例如异源多肽(例如，外来结合结构域)而修饰的SEQ ID NO:7的氨基酸序列的天然序列人J链或其功能片段。在某些方面，异源部分不干扰IgM有效聚合成五聚体以及此类聚合体与靶的结合。示例性的经修饰的J链可以例如在PCT公开号W0 2015/153912、PCT公开号W0/2017/059387和PCT公开号W0/2017/059380中找到，每个PCT公开均通过引用整体并入本文。

[0063] 术语“价”、“二价”、“多价”和语法等同项是指给定结合分子或结合单元中的抗原结合结构域的数量。因此，关于给定结合分子，例如IgM抗体或其片段，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。在其中每个结合单元均为二价的典型IgM来源的结合分子中，结合分子本身可以具有10价或12价。二价或多价结合分子可以是单特异性的，即所有抗原结合结构域相同，或者可以是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不同，例如，与相同抗原上的不同表位结合，或与完全不同的抗原结合。

[0064] 术语“表位”包括能够与抗体特异性结合的任何分子决定簇。在某些方面,表位可包括分子的化学活性表面基团,例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,并且在某些方面,可具有三维结构特征和/或比电荷特征。表位是被抗体结合的靶区域。

[0065] 术语“靶”在最广义上使用,包括可以被结合分子结合的物质。靶可以是例如多肽、核酸、碳水化合物、脂质或其它分子。此外,“靶”可以是,例如包含可以被结合分子结合的表位的细胞、器官或生物。

[0066] 轻链和重链均分为结构和功能同源性区域。术语“恒定”和“可变”在功能上使用。在这点上,应当理解可变轻(VL)链和可变重(VH)链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(例如,CH1、CH2、CH3或CH4)的恒定区赋予生物学特性,诸如分泌、经胎盘的移动性、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随着它们远离抗体的抗原结合位点或氨基末端而增加。N端部分是可变区,C端部分是恒定区;CH3(或在IgM情况下为CH4)和CL结构域分别位于重链和轻链的羧基末端。

[0067] “全长IgM抗体重链”是在N端至C-端方向上包括抗体重链可变结构域(V_H)、抗体恒定重链恒定结构域1(CM1或 $C_{\mu 1}$)、抗体重链恒定结构域2(CM2或 $C_{\mu 2}$)、抗体重链恒定结构域3(CM3或 $C_{\mu 3}$)和可包括尾部(tailpiece)的抗体重链恒定结构域4(CM4或 $C_{\mu 4}$)的多肽。

[0068] 如上所述,可变区(即,“抗原结合结构域”)允许结合分子选择性识别并特异性结合抗原上的表位。即,结合分子(例如,抗体)的VL结构域和VH结构域(或仅仅是骆驼科或软骨鱼抗体的VH结构域(命名为VHH)),或互补决定区(CDR)的子集,可以组合形成抗原结合结构域。更具体地,抗原结合结构域可以由VH链和VL链各自上的三个CDR(或VHH上的3个CDR)限定。某些抗体形成较大的结构。例如,IgM可以形成包括两个、五个或六个H2L2结合单元和任选地通过二硫键共价连接的J链的二聚体、五聚体或六聚体分子。

[0069] 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,该序列特异性定位以在抗体在水性环境中呈现其三维构型时形成抗原结合结构域。抗原结合结构域中的其余氨基酸(称为“框架”区)显示出较小的分子间可变性。框架区主要采取 β -折叠构象并且CDR形成环,该环连接并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。因此,框架区起到形成支架的作用,该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。由已定位的CDR形成的抗原结合结构域限定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该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而言,本领域的普通技术人员可以容易地鉴定分别构成CDR和框架区的氨基酸,因为它们已经以各种不同的方式定义(参见,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”Kabat,E.等,U.S.Department of Health and Human Services,(1983);及Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.,196:901-917(1987),其通过引用整体并入本文)。

[0070] 在本领域中使用和/或接受的术语存在两个或更多个定义的情况下,除非明确说明相反,否则如本文所用的术语的定义旨在包括所有此类含义。具体实例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)来描述在重链和轻链多肽两者的可变区内发现的非连续抗原结合位点。这些区域已由例如Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”(1983)和Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)进行了描述,其通过引用并入本文。Kabat和Chothia定义包括相互比较时氨基酸的重叠或子集。然而,除非另有说明,否则应用任何定义(或本领域普通技术人员已知的其它

定义) 来指代抗体或其变体的CDR都旨在属于如本文所定义和使用的术语的范围内。涵盖如以上引用的每篇参考文献所定义的CDR的适当氨基酸在下面表1中作为比较列出。涵盖特定CDR的确切氨基酸编号将根据CDR的序列和大小而变化。鉴于抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以常规地确定包含特定CDR的氨基酸。

[0071] 表1 CDR定义*

[0072]

	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

[0073] *表1中所有CDR定义的编号都是根据Kabat等阐述的编号规定(参见下文)。

[0074] 还可以例如使用IMGT信息系统([www://imgt.cines.fr/](http://imgt.cines.fr/)) (IMGT®/V-Quest) 来分析免疫球蛋白可变结构域以鉴定可变区区段,包括CDR。参见,例如,Brochet,X.等, Nucl.Acids Res.36:W503-508(2008)。

[0075] Kabat等还定义了适用于任何抗体的可变区和恒定区序列的编号系统。本领域的普通技术人员可以明确地将该“Kabat编号”系统指定给任何可变结构域序列,而不依赖于除序列本身之外的任何实验数据。如本文所用,“Kabat编号”是指Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequence of Proteins of Immunological Interest”(1983)阐述的编号系统。然而,除非明确指出使用Kabat编号系统,否则对于本公开中的氨基酸序列使用连续编号。另一种编号方案是用于IgG的Eu编号系统(Edelman,GM等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 63:78-85(1969)),该系统已经适用于其它免疫球蛋白(包括IgM)(参见,例如,Arya,S.等,J.Immunol.152:1206-1212(1994))。

[0076] 结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,包括但不限于多克隆、单克隆、人、人源化或嵌合抗体、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分子是本领域已知的并且例如在美国专利5,892,019中有描述。

[0077] “特异性结合”通常意指结合分子,例如抗体或其片段、变体或衍生物通过其抗原结合结构域与表位结合,并且所述结合需要抗原结合结构域和表位之间的一些互补性。根据该定义,当结合分子通过其抗原结合结构域与表位结合比它与随机的无关表位结合更容易时,称结合分子与该表位“特异性结合”。术语“特异性”在本文中用于限定某种结合分子与某种表位结合的相对亲和力。例如,可以认为结合分子“A”对于给定表位具有比结合分子“B”更高的特异性,或者可以称结合分子“A”与表位“C”结合的特异性比其对相关表位“D”所具有的更高。

[0078] 可以称结合分子,例如本文公开的抗体或其片段、变体或衍生物结合靶抗原,其解离速率(k(解离))小于或等于 $5 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-2}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-3}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-4}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-5}sec^{-1} $5 \times 10^{-6} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-6}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-7}sec^{-1} 。

[0079] 可以称结合分子,例如本文公开的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物结合靶

抗原,其结合速率(k (结合))大于或等于 $10^3\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^4\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^4\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 或 $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 。

[0080] 如果结合分子,例如抗体或其片段、变体或衍生物优先与给定表位结合,达到在某种程度上阻断参考抗体或抗原结合片段与所述表位的结合的程度,则称该结合分子,例如抗体或其片段、变体或衍生物竞争性抑制参考抗体或抗原结合片段与该表位的结合。竞争性抑制可以通过本领域已知的任何方法(例如,竞争ELISA测定)确定。可以称结合分子竞争性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%。

[0081] 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的强度的量度。参见,例如,Harlow等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988年第2版), 第27-28页。如本文所用,术语“亲合力”是指抗原结合结构域群体与抗原之间的复合物的总体稳定性。参见,例如,Harlow第29-34页。亲合力与群体中具有特定表位的单个抗原结合结构域的亲和力以及免疫球蛋白和抗原的价有关。例如,二价单克隆抗体和具有高度重复表位结构(例如聚合物)的抗原之间的相互作用将是具有高亲合力的相互作用。二价单克隆抗体与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。

[0082] 如本文所公开的结合分子或其抗原结合片段、变体或衍生物也可以就其交叉反应性进行描述或说明。如本文所用,术语“交叉反应性”是指结合分子,例如,对一种抗原具有特异性的抗体或其片段、变体或衍生物与第二种抗原反应的能力;即两种不同抗原物质之间的相关性的量度。因此,如果结合分子与除诱导其形成的表位以外的表位结合,则它具有交叉反应性。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,实际上可以比原始表位更适合。

[0083] 结合分子,例如抗体或其片段、变体或衍生物也可以就其对抗原的结合亲和力进行描述或说明。例如,结合分子可以与抗原结合,其解离常数或 K_D 不大于 $5 \times 10^{-2}\text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7}\text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8}\text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9}\text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10}\text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11}\text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12}\text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13}\text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14}\text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15}\text{M}$ 或 10^{-15}M 。

[0084] 抗体片段(包括单链抗体或其它抗原结合结构域)可以单独存在或与下列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。还包括可以包括可变区与铰链区、CH1、CH2、CH3或CH4结构域、J链或分泌组分中的一种或多种的任何组合的抗原结合片段。结合分子,例如抗体或其抗原结合片段可以来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。抗体可以是人、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡抗体。在另一个实施方案中,可变区可以起源于软骨鱼(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一种或多种人免疫球蛋白的转基因动物中分离的抗体,并且在一些情况下可以表达内源免疫球蛋白,而在一些情况下无法表达,如下文以及例如Kucherlapati等的美国专利号5,939,598中所述。

[0085] 如本文所用,术语“重链亚基”包括源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)可包括以下中的至少一种: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,除

VH结构域以外,结合分子,例如抗体或其片段、变体或衍生物还可以包括但不限于: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,除VH结构域以外,结合分子,例如抗体或其片段、变体或衍生物还可以包括CH3结构域和CH4结构域;或CH3结构域、CH4结构域和J链。此外,用于本公开的结合分子可缺少某些恒定区部分,例如,整个或部分CH2结构域。本领域的普通技术人员将理解,可以修饰这些结构域(例如,重链亚基),使得它们在氨基酸序列上与原始免疫球蛋白分子不同。

[0086] 如本文所用,术语“轻链亚基”包括源自免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。轻链亚基至少包括VL,并且还可以包括CL(例如,C_K或C_L)结构域。

[0087] 结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以就其识别或特异性结合的抗原的表位或部分来进行描述或说明。与抗体的抗原结合结构域特异性相互作用的靶抗原部分是“表位”或“抗原决定簇”。靶抗原可以包含单个表位或至少两个表位,并且可以包括任何数量的表位,这取决于抗原的大小、构象和类型。

[0088] 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硫醇基,该硫醇基可以与第二硫醇基形成二硫键或二硫桥。

[0089] 如本文所用,术语“嵌合抗体”是指其中免疫反应区或位点获自或源自第一物种,且恒定区(可以是完整的、部分的或经修饰的)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(例如小鼠或灵长类动物)且恒定区是人的。

[0090] 术语“多特异性抗体,例如“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。除规范抗体结构以外的其它结合分子可以构建为具有两种结合特异性。双特异性或多特异性抗体的表位结合可以是同时的或依序的。三源杂交瘤和杂种杂交瘤是可以分泌双特异性抗体的细胞系的两个实例。双特异性抗体也可以通过重组方式构建。(Ströhlein 和Heiss,Future Oncol.6:1387-94(2010);Mabry和Snaveley,IDrugs.13:543-9(2010))。双特异性抗体也可以是双抗体(diabody)。

[0091] 如本文所用,术语“工程化抗体”是指其中重链和轻链中的任一者或两者中的可变结构域和/或恒定区通过CDR、框架和/或恒定区中的一个或多个氨基酸的至少部分置换而被改变的抗体。在某些方面,可以将来自已知特异性的抗体的完整CDR移植到异源抗体的框架区中。虽然替代CDR可以源自与框架区所来源的抗体相同类别或甚至亚类的抗体,但CDR也可以源自例如与来自不同物种的抗体不同类别的抗体。其中将来自已知特异性的非人抗体的一个或多个“供者”CDR移植到人重链或轻链框架区中的工程化抗体在本文中称为“人源化抗体”。在某些方面,并非所有CDR都被来自供者可变区的完整CDR置换,然而供者的抗原结合能力仍然可以转移到受者可变结构域。鉴于例如美国专利号5,585,089、5,693,761、5,693,762和6,180,370中阐述的解释,通过进行常规实验或通过试错试验获得功能性工程化或人源化抗体,完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0092] 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一些组合)操纵核酸或多肽分子。

[0093] 如本文所用,术语“连接的”、“融合的”或“融合”或其它语法等同项可互换使用。这些术语是指通过任何方式(包括化学缀合或重组方式)将两种或更多种元件或组分连接在一起。“框内融合”是指两个或更多个多核苷酸开放阅读框(ORF)以保持原始ORF的翻译阅读

框的方式连接形成连续的较长ORF。因此,重组融合蛋白是含有两个或更多个区段的单一蛋白质,所述区段对应于由原始ORF编码的多肽(这些区段通常在自然界中不是如此连接的)。虽然这样使得阅读框在整个融合区段中连续,但是所述区段可以在物理上或空间上被例如框内接头序列分隔开。例如,编码免疫球蛋白可变区的CDR的多核苷酸可以框内融合,但是可以被编码至少一个免疫球蛋白框架区或其它CDR区的多核苷酸分隔开,只要“融合的”CDR共同翻译作为连续多肽的一部分。

[0094] 在多肽的情况下,“线性序列”或“序列”是多肽中在氨基至羧基端方向上的氨基酸顺序,其中序列中彼此相邻的氨基酸在多肽的一级结构中是连续的。在多肽另一部分的“氨基端”或“N端”的多肽部分是在顺序多肽链中较早出现的部分。类似地,在多肽另一部分的“羧基端”或“C端”的多肽部分是顺序多肽链中较晚出现的部分。例如,在典型抗体中,可变结构域在恒定区的“N端”,恒定区在可变结构域的“C端”。

[0095] 如本文所用的术语“表达”是指基因产生生物化学物质(例如,多肽)的过程。该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减以及瞬时表达和稳定表达。它包括但不限于将基因转录成RNA,例如信使RNA(mRNA),以及将此类mRNA翻译成多肽。如果最终所需产物是生物化学物质,则表达包括产生该生物化学物质和任何前体。基因的表达产生“基因产物”。如本文所用,基因产物可以是核酸,例如,通过基因转录产生的信使RNA,或由转录物翻译的多肽。本文描述的基因产物还包括具有转录后修饰(例如,多聚腺苷酸化)的核酸,或具有翻译后修饰(例如,甲基化、糖基化、脂质的添加、与其它蛋白质亚基的缔合、蛋白水解裂解等)的多肽。

[0096] 诸如“治疗”或“缓解”的术语是指治愈、减缓、减轻现有诊断的病理状况或病症的症状,和/或停止或减缓现有诊断的病理状况或病症的进展的治疗措施。诸如“预防”、“避免”、“阻止”等术语是指预防未诊断出的靶向病理状况或病症发展的防治性或预防性措施。因此,“需要治疗的那些”可以包括那些已经患有所述病症的那些;易于患上所述病症的那些;以及要预防所述病症的那些。

[0097] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”意指需要诊断、预后或治疗的任何受试者,尤其是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人、家畜、农场动物以及动物园、运动或宠物动物,诸如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、猪、牛、熊等。

[0098] 如本文所用,诸如“将受益于治疗的受试者”和“需要治疗的动物”的短语包括受益于施用包含一个或多个抗原结合结构域的结合分子(诸如抗体)的受试者,诸如哺乳动物受试者。此类结合分子(例如,抗体)可以例如用于诊断程序和/或用于治疗或预防疾病。

[0099] IgM结合分子

[0100] IgM是B细胞响应于抗原刺激而产生的第一免疫球蛋白,在血清中以1.5mg/ml左右存在,其半衰期为5天。IgM通常是五聚体或六聚体分子。IgM结合单元通常包括两条轻链和两条重链。虽然IgG含有三个重链恒定结构域(CH1、CH2和CH3),但IgM的重(μ)链另外含有包括C端“尾部”的第四恒定结构域(CH4)。人IgM恒定区通常包含氨基酸序列SEQ ID NO:1(参见表3)。人C μ 1区的范围为SEQ ID NO:1的约氨基酸5至约氨基酸102;人C μ 2区的范围为SEQ ID NO:1的约氨基酸114至约氨基酸205,人C μ 3区的范围为SEQ ID NO:1的约氨基酸224至约氨基酸319,C μ 4区的范围为约SEQ ID NO:1的氨基酸329至约氨基酸430,并且尾部的范围为SEQ ID NO:1的约氨基酸431至约氨基酸453。

[0101] 五个IgM结合单元可与另外的小多肽链(J链)形成复合物以形成IgM抗体。前体人J链包含氨基酸序列SEQ ID NO:7(表3)。SEQ ID NO:7的前22个氨基酸是分泌信号肽并且成熟的人J链起始于SEQ ID NO:7的氨基酸23。没有J链,IgM结合单元通常组装成六聚体。虽然不希望受理论约束,但是认为IgM结合单元组装成六聚体或五聚体结合分子涉及C μ 3、C μ 4和尾部结构域。因此,本公开中提供的六聚体或五聚体结合分子通常包括IgM恒定区,该IgM恒定区至少包括C μ 3、C μ 4和尾部结构域。

[0102] IgM重链恒定区可另外包括C μ 2结构域或其片段、C μ 1结构域或其片段,和/或其它IgM重链结构域。在某些方面,如本文所提供的结合分子可以包括完整的IgM重链(μ)链恒定区(例如,SEQ ID NO:1),或其变体、衍生物或类似物。

[0103] 补体系统和补体依赖性细胞毒性

[0104] 补体系统包含超过30种糖蛋白,其中20种存在于血浆中,10种是细胞相关的调节因子或受体。补体级联的激活诱导各种免疫效应子功能,包括细胞溶解、吞噬作用、趋化性和免疫细胞激活。补体可以通过3种不同的途径激活:经典途径、替代途径和甘露糖结合凝集素途径,这些途径全部都集中于C3蛋白的水平,并通过形成膜攻击复合物(MAC)导致靶细胞的补体依赖性细胞毒性。免疫复合物中的IgM和IgG抗体的某些亚类激活经典补体途径。抗原-抗体复合物的形成诱导IgM或IgG分子的Fc部分的构象变化,使补体系统的C1组分的结合位点暴露。血清中的C1是由C1q及C1r和C1s各两个分子组成的大分子复合物。C1q与Fc结合位点的结合诱导C1r和C1s的构象变化。随后,蛋白水解激活的C1r裂解C1s,导致C1s激活。然后C1s裂解C2和C4以产生C2a、C2b、C4a和C4b。C2a和C4b一起形成C3转化酶。C3转化酶对中心组分C3的裂解导致C3b的形成,其中一些C3b与靶细胞的质膜结合。膜结合的C3b与C3转化酶相互作用,导致C5转化酶的形成。从而,将C5裂解成C5a和C5b。末端途径的激活导致组分C5b-C9沉积到经调理的靶细胞膜中,形成膜攻击复合物,最终引起补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0105] 补体依赖性细胞溶解的最终结果是在细胞的脂质双层膜中形成破坏膜完整性的孔。补体依赖性细胞毒性测定(CDC测定)测试抗体激活补体免疫途径以引发膜攻击复合物和靶向细胞溶解的功效。用于CDC测定的一种方法是将由所评估的抗体结合的靶细胞与含有补体系统组分的添加剂(例如,血清)混合,然后测量细胞死亡。例如,通过使靶细胞预先负载放射性化合物可以测量细胞死亡,在死亡后所述放射性化合物从细胞中释放,并且通过放射性水平来测量抗体介导细胞死亡的功效。非放射性CDC测定,例如,可从Promega获得的CELLTITER-GLO[®]测定,用荧光或发光测量法测量丰富的细胞组分如ATP的释放。在CDC的情况下,混合物导致细胞溶解并产生与存在的ATP量成比例的发光信号。ATP的量与培养物中存在的细胞数量成正比。

[0106] CDC活性降低的经修饰的人IgM恒定区

[0107] 本公开提供了一种经修饰的人IgM恒定区,当其作为针对在细胞上表达的靶抗原的经修饰的靶特异性人IgM抗体的一部分表达时,在补体的存在下相对于相应的野生型人IgM抗体表现出对细胞的CDC活性降低。“相应的野生型人IgM抗体”意指除了恒定区中影响CDC活性的一种或多种修饰外,与包含经修饰的人IgM恒定区的抗体相同的野生型IgM抗体。例如,“相应的野生型人IgM抗体”将包含相同的VH区和VL区以及除影响CDC活性的修饰以外,经修饰的人IgM抗体可能具有的任何其它修饰或截短。在某些方面,相对于野生型人IgM

恒定区,经修饰的人IgM恒定区包含例如在C μ 3结构域中或附近,例如在从SEQ ID NO:1的约氨基酸T302延伸到SEQ ID NO:1的约氨基酸K322的区域中的一个或多个氨基酸取代,例如在SEQ ID NO:1的位置T302、C303、T304、V305、T306、H307、T308、D309、L310、P311、S312、P313、L314、K315、Q316、T317、I318、S319、R320、P321和/或K322的至少一个、至少两个或至少三个或更多个氨基酸取代。虽然不希望受理论约束,但是认为补体的C1q组分至少通过C μ 3结构域中存在的某些氨基酸残基与人IgM恒定区缔合。用于测量CDC的测定法是本领域普通技术人员熟知的,并且本文描述了示例性测定法。

[0108] 在某些方面,如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区相对于野生型人IgM恒定区在SEQ ID NO:1的位置P311处包含取代。在其它方面,如本文所提供的经修饰的IgM恒定区相对于野生型人IgM恒定区在SEQ ID NO:1的位置P313处包含取代。在其它方面,如本文所提供的经修饰的IgM恒定区相对于野生型人IgM恒定区在SEQ ID NO:1的位置L310处包含取代。在其它方面,如本文所提供的经修饰的IgM恒定区相对于野生型人IgM恒定区在SEQ ID NO:1的位置K315处包含取代。在其它方面,如本文所提供的经修饰的IgM恒定区相对于野生型人IgM恒定区在以下两个或更多个位置含有取代的组合:SEQ ID NO:1的位置L310,SEQ ID NO:1的位置P311,SEQ ID NO:1的位置P313,和/或SEQ ID NO:1的位置K315。如本文所提供的经修饰的IgM恒定区可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置P311处被例如,丙氨酸(P311A)(SEQ ID NO:2)、丝氨酸(P311S)或甘氨酸(P311G)取代。如本文所提供的经修饰的IgM恒定区可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置P313处被例如,丙氨酸(P313A)、丝氨酸(P313S)(SEQ ID NO:3)或甘氨酸(P313G)取代。如本文所提供的经修饰的IgM恒定区可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置L310处被例如,丙氨酸(L310A)(SEQ ID NO:15)、丝氨酸(L310S)、甘氨酸(L310G)或天冬氨酸(L310D)(SEQ ID NO:23)取代。如本文所提供的经修饰的IgM恒定区可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置K315处被例如,丙氨酸(K315A)(SEQ ID NO:16)、丝氨酸(K315S)、甘氨酸(K315G)、天冬氨酸(K315D)(SEQ ID NO:24)或谷氨酰胺(K315Q)(SEQ ID NO:25)取代。如本文所提供的经修饰的IgM恒定区可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置P311和P313处分别被例如,丙氨酸(P311A)和丝氨酸(P313S)(SEQ ID NO:4),或丙氨酸、丝氨酸和/或甘氨酸的任何组合取代。如本文所提供的经修饰的IgM恒定区可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置L310和K315处被例如,丙氨酸(L310A、K315A)(SEQ ID NO:17)或丝氨酸(L310S、K315S)(SEQ ID NO:18),或丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和/或甘氨酸的任何组合取代。如本文所提供的经修饰的IgM恒定区可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置L310和P311处被例如,丙氨酸(L310A、P311A)(SEQ ID NO:19),或丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和/或甘氨酸的任何组合取代。如本文所提供的经修饰的IgM恒定区可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置L310和P313处分别被例如,丙氨酸和丝氨酸(L310A、P313S)(SEQ ID NO:20),或丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和/或甘氨酸的任何组合取代。如本文所提供的经修饰的IgM恒定区可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置P311和K315处被例如,丙氨酸(P311A、K315A)(SEQ ID NO:21),或丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和/或甘氨酸的任何组合取代。如本文所提供的经修饰的IgM恒定区可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置P313和K315处分别被例如,丝氨酸和丙氨酸(P313S、K315A)(SEQ ID NO:22),或丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和/或甘氨酸的任何组合取代。

[0109] 在某些方面,包含如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区(包含例如在L310、P311、

P313和/或K315处的氨基酸取代,例如L310A、L310S、L310G、L310D、P311A、P311S、P311G、P313A、P313S、P313G、K315A、K315S、K315G、K315D和/或K315Q或其任何组合)的靶特异性IgM抗体的补体依赖性细胞毒性(CDC)活性相对于相应的野生型IgM抗体,即除了经修饰的人IgM恒定区外相同的野生型靶特异性IgM抗体,可以降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。

[0110] 在某些方面,相对于相应的野生型IgM抗体,即除了经修饰的人IgM恒定区以外相同的野生型靶特异性IgM抗体,包含如本文所提供的影响50% CDC活性(EC_{50})的经修饰的人IgM恒定区(包含例如在L310、P311、P313和/或K315处的氨基酸取代,例如L310A、L310S、L310G、L310D、P311A、P311S、P311G、P313A、P313S、P313G、K315A、K315S、K315G、K315D和/或K315Q或其任何组合)的靶特异性IgM抗体的抗体浓度可以增加至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍和至少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倍或至少100倍。

[0111] 如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区可以通过本领域普通技术人员熟知的标准诱变方法构建,或者可以从各个商业供应商获得。用于诱变和核苷酸序列改变的方法是本领域熟知的。参见,例如,Walker和Gaastra编辑(1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel等, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987); Sambrook等(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); 美国专利号4,873,192;及其中引用的参考文献;其通过引用并入本文。关于不影响目标多肽的生物活性的适当氨基酸取代的指导可以在Dayhoff等的模型(1978)在 *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), 第345-352页中找到,其通过引用整体并入本文。Dayhoff等的模型使用点接受突变(PAM)氨基酸相似性矩阵(PAM 250矩阵)来确定合适的保守性氨基酸取代。在某些方面,使用保守性取代,诸如将一个氨基酸与具有相似性质的另一个氨基酸交换。如Dayhoff等模型的PAM 250矩阵所教导的保守性氨基酸取代的实例包括但不限于Gly↔Ala、Val↔Ile↔Leu、Asp↔Glu、Lys↔Arg、Asn↔Gln和Phe↔Trp↔Tyr。

[0112] 五聚体或六聚体的经修饰的人IgM抗体

[0113] 另一方面,本发明提供了一种经修饰的人IgM抗体,其包含如本文所提供的经修饰的人IgM恒定区,并且还包含位于经修饰的人IgM恒定区的氨基末端的重链可变区(VH)(单独地或与轻链可变区(VL)组合),所述经修饰的人IgM抗体与靶抗原特异性结合并且相对于相应的野生型人IgM抗体,即除了经修饰的人IgM恒定区外相同的野生型靶特异性IgM抗体,表现出对表达靶抗原的细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC)降低和/或影响50% CDC活性(EC_{50})的抗体浓度增加。在某些方面,相对于野生型人IgM恒定区,经修饰的人IgM抗体包含例如在C μ 3结构域中或附近,例如在从SEQ ID NO:1的约氨基酸T302延伸到SEQ ID NO:1的约氨基酸K322的区域中的一个或多个氨基酸取代,例如在SEQ ID NO:1的位置T302、C303、T304、V305、T306、H307、T308、D309、L310、P311、S312、P313、L314、K315、Q316、T317、I318、S319、R320、P321和/或K322的至少一个、至少两个或至少三个或更多个氨基酸取代。虽然不希望受理论约束,但是认为补体的C1q组分至少通过C μ 3结构域中存在的某些氨基酸残基与

人IgM恒定区缔合。用于测量CDC的测定法是本领域普通技术人员熟知的,并且本文描述了示例性测定法。

[0114] 在某些方面,如本文所提供的经修饰的人IgM抗体相对于野生型人IgM抗体在SEQ ID NO:1的位置P311处包含取代。在其它方面,如本文所提供的经修饰的人IgM抗体相对于野生型人IgM抗体在SEQ ID NO:1的位置P313处含有取代。在其它方面,如本文所提供的经修饰的人IgM抗体相对于野生型人IgM抗体在SEQ ID NO:1的位置L310处含有取代。在其它方面,如本文所提供的经修饰的人IgM抗体相对于野生型人IgM抗体在SEQ ID NO:1的位置K315处含有取代。在其它方面,如本文所提供的经修饰的IgM抗体相对于野生型人IgM抗体在以下两个或更多个位置含有取代的组合:SEQ ID NO:1的位置L310,SEQ ID NO:1的位置P311,SEQ ID NO:1的位置P313,和/或SEQ ID NO:1的位置K315。如本文所提供的经修饰的IgM抗体可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置P311处被例如,丙氨酸(P311A)(SEQ ID NO:2)、丝氨酸(P311S)或甘氨酸(P311G)取代。如本文所提供的经修饰的IgM抗体可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置P313处被例如,丙氨酸(P313A)、丝氨酸(P313S)(SEQ ID NO:3)或甘氨酸(P313G)取代。如本文所提供的经修饰的IgM抗体可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置L310处被例如,丙氨酸(L310A)(SEQ ID NO:15)、丝氨酸(L310S)、甘氨酸(L310G)或天冬氨酸(L310D)(SEQ ID NO:23)取代。如本文所提供的经修饰的IgM抗体可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置K315处被例如,丙氨酸(K315A)(SEQ ID NO:16)、丝氨酸(K315S)、甘氨酸(K315G)、天冬氨酸(K315D)(SEQ ID NO:24)或谷氨酰胺(K315Q)(SEQ ID NO:25)取代。如本文所提供的经修饰的IgM抗体可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置P311和P313处分别被例如,丙氨酸(P311A)和丝氨酸(P313S)(SEQ ID NO:4),或丙氨酸、丝氨酸和/或甘氨酸的任何组合取代。如本文所提供的经修饰的IgM抗体可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置L310和K315处被例如,丙氨酸(L310A、K315A)(SEQ ID NO:17)或丝氨酸(L310S、K315S)(SEQ ID NO:18),或丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和/或甘氨酸的任何组合取代。如本文所提供的经修饰的IgM抗体可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置L310和P311处被例如,丙氨酸(L310A、P311A)(SEQ ID NO:19),或丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和/或甘氨酸的任何组合取代。如本文所提供的经修饰的IgM抗体可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置L310和P313处分别被例如,丙氨酸和丝氨酸(L310A、P313S)(SEQ ID NO:20),或丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和/或甘氨酸的任何组合取代。如本文所提供的经修饰的IgM抗体可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置P311和K315处被例如,丙氨酸(P311A、K315A)(SEQ ID NO:21),或丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和/或甘氨酸的任何组合取代。如本文所提供的经修饰的IgM抗体可以在SEQ ID NO:1的氨基酸位置P313和K315处分别被例如,丝氨酸和丙氨酸(P313S、K315A)(SEQ ID NO:22),或丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和/或甘氨酸的任何组合取代。

[0115] 在某些方面,如本文所提供的经修饰的人IgM抗体(包含例如在L310、P311、P313和/或K315处的氨基酸取代,例如L310A、L310S、L310G、L310D、P311A、P311S、P311G、P313A、P313S、P313G、K315A、K315S、K315G、K315D和/或K315Q或其任何组合)的补体依赖性细胞毒性(CDC)活性相对于相应的野生型IgM抗体,即除了经修饰的人IgM恒定区外相同的野生型靶特异性IgM抗体,可以降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。

[0116] 在某些方面,如本文所提供的IgM抗体(包含例如在L310、P311、P313和/或K315处

的氨基酸取代,例如L310A、L310S、L310G、L310D、P311A、P311S、P311G、P313A、P313S、P313G、K315A、K315S、K315G、K315D和/或K315Q或其任何组合)影响50% CDC活性(EC_{50})的抗体浓度相对于相应的野生型IgM抗体,即除了经修饰的人IgM恒定区外相同的野生型靶特异性IgM抗体,可以增加至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍和至少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倍或至少100倍。

[0117] 如本文所提供的经修饰的人IgM抗体可以是六聚体或五聚体,其包含如本文所定义的五或六个IgM“结合单元”,其中一个或多个可以与目标靶抗原特异性结合。本公开涵盖与任何靶抗原特异性结合的经修饰的人IgM抗体。在某些方面,靶抗原能够在细胞(例如,真核细胞)的表面上表达。靶抗原可以包括但不限于肿瘤抗原、其它肿瘤靶、免疫肿瘤靶(诸如免疫检查点抑制剂)、感染性疾病抗原(诸如在受感染细胞表面表达的病毒抗原)、血脑屏障转运中所涉及的靶抗原、神经退行性疾病和神经炎症性疾病中所涉及的靶抗原及其任何组合。可以在PCT公开号WO 2016/141303、WO 2016/168758、WO 2016/154593、WO 2016/118641、WO 2015/153912、WO 2015/053887、WO 2013/120012、WO/2017/059387、WO/2017/059380、WO/2018/017888、WO/2018/017889、WO/2018/017761和WO/2018/017763中找到靶抗原的非限制性实例,以及与此类靶抗原结合的抗体结合结构域的非限制性实例,这些PCT公开的公开内容通过引用整体并入本文。

[0118] 在某些方面,本公开提供了五聚体或六聚体的经修饰的人IgM抗体,其分别包含五或六个二价结合单元,其中每个结合单元包括两个如本文所提供的经修饰的人IgM重链恒定区或其片段。

[0119] 当本文提供的经修饰的人IgM抗体是五聚体时,所述抗体还可包含J链或其功能片段或其变体。在某些方面,J链是经修饰的J链,其包含一个异源部分或一个或多个异源部分,例如异源多肽序列,例如引入天然序列中的外来结合结构域。在某些方面,外来结合结构域与CD3(例如,CD3 ϵ)特异性结合。在某些方面,经修饰的J链包含V15J(SEQ ID NO:9)或J15V(SEQ ID NO:11)。

[0120] IgM重链恒定区可以包括C μ 1结构域、C μ 2结构域、C μ 3结构域(如本文所提供的,C μ 3可以包含一个或多个氨基酸取代)和/或C μ 4结构域中的一个或多个,条件是该恒定区可以在经修饰的人IgM抗体中发挥所需功能,例如,与第二IgM恒定区缔合形成结合单元,或其它结合单元缔合形成六聚体或五聚体。在某些方面,单个结合单元内的两个经修饰的人IgM重链恒定区或其片段各自包含经修饰的C μ 3结构域(例如,在SEQ ID NO:1的L310、SEQ ID NO:1的P311、SEQ ID NO:1的P313、SEQ ID NO:1的K315和/或其组合中的一处或多处具有取代)或其片段、C μ 4结构域或其片段、尾部(TP)或其片段,或经修饰的C μ 3结构域、C μ 4结构域和TP或其片段的任何组合。在某些方面,单个结合单元内的两个经修饰的人IgM重链恒定区或其片段各自还包含C μ 2结构域或其片段、C μ 1结构域或其片段,或C μ 1结构域或其片段和C μ 2结构域或其片段。

[0121] 在某些方面,给定结合单元中的两个经修饰的人IgM重链恒定区中的每一个均与抗原结合结构域,例如抗体的重链可变区(VH)或Fv部分,例如抗体的VH和VL缔合。

[0122] 经修饰的J链

[0123] 在某些方面,如本文所提供的经修饰的人IgM抗体可为双特异性,并入了经修饰的J链。如本文和PCT公开号WO 2015/153912、WO/2017/059387和WO/2017/059380中所提供的,

经修饰的J链可包含异源部分,例如异源多肽,例如外来结合结构域,外来结合结构域可包括,例如能够与靶特异性结合的多肽结合结构域。结合结构域可以是,例如抗体或其抗原结合片段、抗体-药物缀合物或其抗原结合片段,或抗体样分子。通过适当地选择添加的位置和类型(例如直接或间接融合、化学拴系等),可以将多肽结合结构域引入J链中。

[0124] 在某些方面,结合结构域可以是抗体或抗体的抗原结合片段,包括单特异性、双特异性和多特异性抗体和抗体片段。抗体片段可以是但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、scFv、(scFv)₂片段、单链抗体分子、微抗体或由抗体片段形成的多特异性抗体。在某些方面,抗体片段是scFv。

[0125] 在其它方面,结合结构域可以是抗体样分子,例如人结构域抗体(dAb)、双亲性重靶向(DART)分子、双抗体、双-双抗体(di-diabody)、双重可变结构域抗体、堆叠可变结构域抗体、小模块免疫药物(SMIP)、替代抗体(Surrobody)、链交换工程化结构域(SEED)抗体或TandAb。

[0126] 可以将结合结构域引入天然J链序列中允许结合结构域与其结合靶结合,而不干扰受者IgM分子与其一个或多个结合靶结合或J链有效地并入IgM五聚体中的任何位置。在某些方面,结合结构域可以插入C端处或其附近,成熟N端(例如,信号肽裂解后SEQ ID NO:7的氨基酸编号23)处或附近,或可进入的基于J链三维结构的内部位置。在某些方面,可以将结合结构域引入天然序列J链,其不具有从SEQ ID NO:7的人J链的C端开始的约10个残基或从成熟N端(氨基酸23)开始的约10个氨基酸残基。在另一个方面,可以将结合结构域引入SEQ ID NO:7的天然序列人J链中介于SEQ ID NO:7的半胱氨酸残基113和122之间,或者引入另一天然序列J链的等同位置。在另一方面,可以将结合结构域引入天然序列J链(诸如SEQ ID NO:7的J链)中的糖基化位点处或附近。在某些方面,可以将结合结构域引入SEQ ID NO:7的天然序列人J链中从C端开始的约10个氨基酸残基内。

[0127] 引入可以通过直接或间接融合来实现,即在有或没有肽接头的情况下,通过其编码核苷酸序列的框内组合,J链和结合结构域组合成一条多肽链。如果使用,则肽接头(间接融合)的长度可以是约1至50个,或约1至40个,或约1至30个,或约1至20个,或约1至10个,或约10至20个氨基酸,并且可以存在于待引入J链序列中的结合结构域的一个或两个末端。在某些方面,肽接头长约10至20个,或10至15个氨基酸。在某些方面,肽接头长为15个氨基酸。在某些方面,肽接头为(GGGGS)₃(SEQ ID NO:12)。

[0128] 还可以将多于一个异源多肽,例如多于一个结合结构域或其它部分引入J链中。

[0129] 通过重组DNA技术的公知技术,通过使编码经修饰的J链的核酸在合适的原核或真核宿主生物中表达,可以产生经修饰的J链。

[0130] 如本文其它地方所述,经修饰的J链也可以与受者经修饰的人IgM抗体的重链和轻链共表达。在经修饰的J链并入之前,受者抗体可为单特异性、双特异性或多特异性,例如单特异性、双特异性或多特异性的经修饰的人IgM抗体。双特异性和多特异性IgM抗体,包括抗体,例如在PCT公开号WO 2015/053887和WO 2015/120474中有描述,其全部内容特此通过引用明确并入。

[0131] 在某些方面,如本文所述的经修饰的人IgM抗体可包括对免疫效应细胞(诸如T细胞、NK细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞)具有结合特异性的经修饰的J链。在某些方面,效应细胞是T细胞,结合靶是CD3(下面有讨论)。通过使效应细胞,例如效应T细胞诸如细胞毒性T

细胞(CTL)激活并重新定向到表达目标靶抗原的细胞,如本文所提供的经修饰的人IgM抗体可以对靶抗原产生增强的效应子反应,从而进一步增加效力和功效。在某些方面,如本文所提供的双特异性的经修饰的人IgM抗体通过经修饰的J链与CD3结合而引发T细胞介导的细胞毒性的能力不受IgM恒定区中相对于相应的野生型IgM抗体降低CDC的修饰的影响。

[0132] 在T细胞的情况下,分化簇3(CD3)是历史上称为T3复合物的多聚体蛋白质复合物,并且由四条不同的多肽链(ϵ 、 γ 、 δ 、 ζ)组成,四条不同的多肽链组装并作为三对二聚体($\epsilon\gamma$ 、 $\epsilon\delta$ 、 $\zeta\zeta$)起作用。CD3复合物用作T细胞共受体,其与T细胞受体(TCR)非共价缔合。该CD3复合物的组分,尤其是CD3 ϵ ,可以是本文提供的双特异性IgM或IgA结合分子的经修饰的J链的靶。

[0133] 在某些方面,提供了双特异性的经修饰的人IgM抗体,其中J链经修饰以与CD3 ϵ 结合。

[0134] 在某些方面,本文提供的经修饰的J链的抗CD3 ϵ 结合结构域是scFv。抗CD3 ϵ scFv可以直接地或间接地以引入scFv和J链序列之间的合成接头,例如(GGGGS)₃接头(SEQ ID NO:12)融合在J链的N端或其附近,或者在J链的C端或其附近。在某些方面,scFv包含维西珠单抗(visilizumab)(Nuvion)的VH区和VL区。在某些方面,经修饰的J链包含含有维西珠单抗的VH、(GGGGS)₃接头和维西珠单抗的VL的scFv。

[0135] 在某些方面,经修饰的J链包含通过15个氨基酸的(GGGGS)₃接头与人J链的N端融合的维西珠单抗的scFv,即本文称为V15J的经修饰的J链。V15J还可包括信号肽以促进转运和组装成如本文所提供的经修饰的人IgM抗体。成熟的V15J蛋白质如SEQ ID NO:9所示,包含19个氨基酸的免疫球蛋白重链信号肽的前体形式如SEQ ID NO:8所示。在某些方面,经修饰的J链包含通过15个氨基酸的(GGGGS)₃接头与人J链的C端融合的维西珠单抗的scFv,即本文称为J15V的经修饰的J链。J15V还可包括信号肽以促进转运和组装成如本文所提供的经修饰的人IgM抗体。成熟的J15V蛋白质如SEQ ID NO:11所示,包含22个氨基酸的人J链信号肽的前体形式如SEQ ID NO:10所示。在某些方面,可以使用其它信号肽。选择和包含合适的信号肽以促进经修饰的J链表达、分泌和并入如本文所提供的经修饰的人IgM抗体中完全在本领域普通技术人员的能力范围内。

[0136] 除非另有说明,否则本公开采用细胞生物学、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,这些技术在本领域的技术范围内。此类技术在文献中有全面解释。参见,例如,Sambrook等编辑(1989)Molecular Cloning A Laboratory Manual(第2版;Cold Spring Harbor Laboratory Press);Sambrook等编辑(1992)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,(Cold Springs Harbor Laboratory,NY);D.N.Glover编辑(1985)DNA Cloning,第I和II卷;Gait编辑(1984)Oligonucleotide Synthesis;Mullis等美国专利号4,683,195;Hames和Higgins编辑(1984)Nucleic Acid Hybridization;Hames和Higgins编辑(1984)Transcription And Translation;Freshney(1987)Culture Of Animal Cells(Alan R.Liss,Inc.);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press)(1986);Perbal(1984)A Practical Guide To Molecular Cloning;the treatise,Methods In Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Miller and Calos编辑(1987)Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells,(Cold Spring Harbor Laboratory);Wu等编辑,Methods In Enzymology,第154和155卷;Mayer和Walker编辑

(1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir和Blackwell编辑(1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, 第I-IV卷; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); 以及Ausubel等(1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.)。

[0137] 抗体工程的一般原理在Borrebaeck编辑(1995) *Antibody Engineering* (第2版; Oxford Univ. Press) 中进行了阐述。抗体工程的一般原理在Rickwood等编辑(1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.) 中进行了阐述。抗体和抗体-半抗原结合的一般原理在: Nisonoff(1984) *Molecular Immunology* (第2版; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); 和Steward(1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman and Hall, New York, N.Y.) 中进行了阐述。另外, 可以遵循本领域已知的而未具体描述的免疫学标准方法, 如同在 *Current Protocols in Immunology*, John Wiley&Sons, New York; Stites等编辑(1994) *Basic and Clinical Immunology* (第8版; Appleton&Lange, Norwalk, Conn.) 以及Mishell和Shiigi(编辑)(1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY) 中一样。

[0138] 阐述免疫学一般原理的标准参考文献包括 *Current Protocols in Immunology*, John Wiley&Sons, New York; Klein(1982) *J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination* (John Wiley&Sons, NY); Kennett等编辑(1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (Plenum Press, NY); Campbell(1984) "Monoclonal Antibody Technology" in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 编辑Burden等 (Elsevier, Amsterdam); Goldsby等编辑(2000) *Kuby Immunology* (第4版; W.H. Freeman and Co., NY); Roitt等(2001) *Immunology* (第6版; London: Mosby); Abbas等(2005) *Cellular and Molecular Immunology* (第5版; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann和Dubel(2001) *Antibody Engineering* (Springer Verlag); Sambrook和Russell(2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Lewin(2003) *Genes VIII* (Prentice Hall, 2003); Harlow和Lane(1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach和Dveksler(2003) *PCR Primer* (Cold Spring Harbor Press)。

[0139] 上面引用的所有参考文献以及本文引用的所有参考文献都通过引用整体并入本文。

[0140] 以下实施例是以说明的方式而不是以限制的方式提供的。

[0141] 实施例

[0142] 实施例1: C μ 3结构域突变对IgM组装的影响

[0143] 设计在C μ 3结构域中具有单位点突变, P311A (SEQ ID NO:2)、P313S (SEQ ID NO:3)、P311A和P313S两者 (SEQ ID NO:4)、D294G (SEQ ID NO:5) 及S283N (SEQ ID NO:6) 的 pFUSEss-CHIg-hM*03 编码的经修饰的人IgM恒定区的质粒变体, 并将其提交给商业供应商用于合成。通过以下方法产生可以表达包含野生型或经修饰的IgM恒定区的野生型或经修

饰的人五聚体或六聚体IgM抗体并且可以与CD20特异性结合的示例性质粒构建体。

[0144] 由商业供应商(Genescript)合成编码1.5.3的VH区和VL区的DNA片段(分别为SEQ ID NO 13和14), '5末端具有EcoRV限制性位点且3'末端具有XbaI限制性位点,以便亚克隆到重链和轻链表达载体中。将合成的DNA构建体以1 μ g/ml重新悬浮于Tris-EDTA缓冲液中。用EcoRV和XbaI消化DNA样品(1 μ g)并通过电泳将合成的VH和VL与载体质粒DNA分开。通过标准的分子生物学技术将消化的DNA连接到预先消化的质粒DNA(可从Invivogen获得的pFUSEss-CHIg-hM*03或上述用于 μ 链的经修饰的构建体,可从Invivogen获得的用于 κ 链的pFUSE2ss-CLIg-hk)。将连接的DNA转化到感受态细菌中,并接种在具有多种选择性抗生素的LB平板上。挑取几个细菌菌落,并通过标准的分子生物学技术制备DNA制剂。通过测序验证编码重链和轻链的构建体。

[0145] 将编码IgM重链和轻链,或重链、轻链和J链的质粒构建体共转染到CHO细胞中,并且根据标准方法选择表达野生型或经修饰的CD20 IgM抗体(有或无J链)的细胞。

[0146] 根据制造商的方案,使用Capture Select IgM(目录2890.05, BAC, Thermo Fisher)回收细胞上清液中存在的抗体。在SDS PAGE上,在如先前所述,例如在PCT公开号W0 2016/141303中所述的用于显示组装的非还原条件下(图1和图5),或在针对某些双特异性抗体的还原条件下(图5)评估抗体。

[0147] 在SDS PAGE上,在用于显示抗体组装的非还原条件下评估对照抗体(IgM(纯)、IgM+J(纯)(具有野生型J链的IgM抗体)和IgM(缺乏J链的IgM))和IgM C μ 3结构域突变体S283N、P313S、P311A和D294G。在负载到NativePage Novex 3-12%bis-Tris凝胶(Life Technologies目录号BN1003)上之前,将NuPage LDS样品缓冲液(Life Technologies)添加到样品中。将Novex Tris-乙酸盐SDS电泳缓冲液(Life Technologies目录号LA0041)用于凝胶电泳。凝胶电泳直至染料前沿到达凝胶底部。电泳后,凝胶用胶体蓝染剂(Life Technologies目录号LC6025)染色。

[0148] 图1所示的结果证明IgM C μ 3结构域突变体抗体和对照抗体一样组装。

[0149] 在SDS PAGE上在用于显示抗体组装的非还原(“混合”)和还原条件下评估对照双特异性抗体(1.5.3IgM V15J)和1.5.3IgM V15J C μ 3结构域突变体P313S、P311A和P311A/P313S双突变体。在负载到NativePage Novex 3-12%bis-Tris凝胶(Life Technologies目录号BN1003)上之前,将NuPage LDS样品缓冲液(Life Technologies)添加到样品中。将Novex Tris-乙酸盐SDS电泳缓冲液(Life Technologies目录号LA0041)用于凝胶电泳。凝胶电泳直至染料前沿到达凝胶底部。电泳后,凝胶用胶体蓝染剂(Life Technologies目录号LC6025)染色。

[0150] 图5所示的结果证明双特异性IgM C μ 3结构域突变体抗体和对照抗体一样组装。

[0151] 实施例2: IgM C μ 3突变体的补体依赖性细胞毒性活性

[0152] 表达CD20的Ramos(ATCC目录号CRL-1596)细胞系获自ATCC和DSMZ。将50,000个细胞接种在96孔板中。用野生型对照抗体,1.5.3IgM、1.5.3IgG和1.5.3IgM x V15J以及IgM C μ 3结构域单突变体(P311A、P313S、D294G和S283N)处理细胞。将人血清补体(Quidel目录号A113)以10%的最终浓度添加到经抗体处理的细胞中。将反应混合物在37 $^{\circ}$ C下孵育4小时。将与每个孔中存在的培养基体积相等的体积添加CELLTITER-GLO $^{\circledR}$ 试剂(Promega目录号G7572)。将板振荡2分钟,在室温下孵育10分钟,并在发光计上测量发光。

[0153] 结果示于图2中。两种IgM C μ 3单突变体P311A和P313S在补体的存在下表现出比对照1.5.3IgM抗体低约50%的细胞杀伤。IgM C μ 3突变体S283N和D294G在具有补体的情况下显示出与对照野生型IgM相似的细胞杀伤。在不存在补体的情况下,对于1.5.3IgG和1.5.3IgM x V15J抗体观察到最小的细胞杀伤。

[0154] 实施例3:双特异性抗CD20 x抗CD3 IgM C μ 3突变体的补体依赖性细胞毒性

[0155] 表达CD20的Ramos (ATCC目录号CRL-1596) 细胞系获自ATCC和DSMZ。将50,000个细胞接种在96孔板中。用对照抗体1.5.3IgM x V15J和双特异性IgM C μ 3结构域突变体(P311A x V15J、P313S x V15J、D294G x V15J和S283N x V15J)处理细胞。所有抗体均包括对如前所述产生和表达的CD20和CD3具有双特异性的J链,参见PCT公开号WO 2016/141303。将人血清补体(Quidel目录号A113)以10%的最终浓度添加到经抗体处理的细胞中。将反应混合物在37°C下孵育4小时。以与每个孔中存在的培养基体积相等的体积添加CELLTITER-GLO®试剂(Promega目录号G7572)。将板振荡2分钟,在室温下孵育10分钟,并在发光计上测量发光。

[0156] 结果示于图3和图6中。双特异性IgM C μ 3突变体P311A和P313S在具有补体的情况下表现出半数最大Ramos细胞杀伤,而对照1.5.3IgM x V15J和双特异性IgM C μ 3突变体D294G和S283N在补体的存在下几乎达到最大补体依赖性细胞毒性(90-100%有效)。在图6所示的测定中,双特异性IgM C μ 3突变体P311A在具有补体的情况下表现出为约46%的最大杀伤(EC₅₀未定义),而P313S突变体在具有补体的情况下表现出为31%的最大杀伤(EC₅₀为243pM)。在双突变体P311A/P313S中基本上消除了补体介导的杀伤(图6,也参见表2)。

[0157] 实施例4:双特异性抗CD20 x抗CD3 IgM C μ 3突变体的T细胞激活潜力

[0158] 将工程化的Jurkat T细胞(Promega CS176403)和RPMI8226细胞(ATCC CCL-155)在补充有10%胎牛血清(Invitrogen)的RPMI(Invitrogen)中培养。将双特异性1.5.3IgM x V15J抗体和双特异性IgM C μ 3突变体D294G x V15J、S283N x V15J、P313S x V15J、P311A x V15J、P311A/P313S x V15J和1.5.3IgM(无J链)的连续稀释液与7500RPMI8226细胞一起以20 μ L在白色384孔测定板中在37°C与5%CO₂下孵育2小时。将工程化的Jurkat细胞(25000)添加到混合物中达到40 μ L的最终体积。将混合物在37°C与5%CO₂下孵育5小时。然后将细胞混合物与20 μ L含有荧光素(Promega, CELLTITER-GLO®)的裂解缓冲液混合以测量荧光素酶报告基因活性。通过EnVision酶标仪测量光输出。使用Prism软件通过4参数曲线拟合测定EC₅₀。

[0159] 结果示于图4和图7中。所有双特异性IgM C μ 3突变体与双特异性对照抗体(1.5.3IgM x V15J)一样有效地激活T细胞。在缺乏双特异性J链的IgM对照(1.5.3IgM)中未观察到T细胞激活。

[0160] 实施例5:其它双特异性抗CD20 x抗CD3 IgM C μ 3突变体的补体依赖性细胞毒性

[0161] 为了进一步评估C μ 3突变对CDC活性的影响,在从SEQ ID NO:1的T302到SEQ ID NO:1的K322的每个位置进行系统的单氨基酸ala取代。将这些突变体IgM恒定区中的每一个如实施例1中所述组装为1.5.3IgM V15J C μ 3结构域突变体,并如实施例3中所述测试其CDC活性,并如实施例4中所述测试T细胞激活。除先前评估的在P311和P313处的突变之外,在L310(SEQ ID NO:15)和K315(SEQ ID NO:16)处的1.5.3IgM V15J C μ 3结构域ala取代适度地降低了CDC活性,EC₅₀增加,如图8和表2所示,不会显著影响T细胞激活(数据未示出)。

[0162] 还如实施例1中所述构建位置L310、P311、P313和K315中的两处的双取代的各种组合,并如实施例3中所述测试其CDC活性。这些包括双突变体L310A、K315A (SEQ ID NO:17)、L310S、K315S (SEQ ID NO:18)、L310A、P311A (SEQ ID NO:19)、L310A、P313S (SEQ ID NO:20)、P311A、K315A (SEQ ID NO:21) 和P313S、K315A (SEQ ID NO:22)。这些双突变体相对于野生型人IgM的CDC活性汇总在表2中。L310A、K315A双突变体相对于任一单突变显示出CDC活性的降低增强。

[0163] 评估位置L310和K315处的其它氨基酸取代以确定带电荷的或极性氨基酸对CDC活性的影响。L310被带负电荷的天冬氨酸(D, SEQ ID NO:23)取代, K315被天冬氨酸(D, SEQ ID NO:24)或极性氨基酸谷氨酰胺(Q, SEQ ID NO:25)取代。如实施例3中所述测试这些突变体的CDC活性。结果示于图9A和图9B以及表2中。在位置310或315处引入带负电荷的氨基酸比中性a1a取代更能破坏CDC活性。

[0164] 表2:人IgM C μ 3突变体的CDC活性

取代	人 IgM 重链恒定区(SEQ ID NO: 1)中的氨基酸残基								EC ₅₀ 增加倍数	相对于野生型的% CDC
	309	310	311	312	313	314	315	316		
野生型	D	L	P	S	P	L	K	Q	1	100%
L310A		A							2	95%
P311A			A						11	46%
P313S				S					6	83%
K315A							A		5	95%
L310D		D							ND	12%
K315D							D		7	50%
K315Q							Q		3	85%
L310A K315A		A					A		80	52%
L310S K315S		S					S		8	86%
L310A P311A		A	A						ND	18%
L310A P313S		A			S				6	39%
P311A K315A			A				A		100	29%
P313S K315A					S		A		16	47%
P311A P313S			A		S				ND	25%

[0166] 表3:序列

SEQ ID NO	简称	序列
1	人 IgM 恒定区 氨基酸	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL

SEQ ID NO	简称	序列
		TKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHDLPSPK QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
2	经修饰的人 IgM 恒定区 P311A	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHV VCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTTDQVQAEAKESGPTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHDLPSPK QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
3	经修饰的人 IgM 恒定区 P313S	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHV VCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTTDQVQAEAKESGPTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHDLPSSLK QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
4	经修饰的人 IgM 恒定区 P311A/P 313S	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHV VCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTTDQVQAEAKESGPTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHDLPSSLK QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
5	经修饰的人 IgM 恒定区 D294G	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHV VCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTTDQVQAEAKESGPTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL

[0168]

[0169]

SEQ ID NO	简称	序列
		TKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDGWNSGERFTCTVTHDLPSPK QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
6	经修饰的人 IgM 恒定区 S283N	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHV VCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVS FVP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVT TDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFNAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHDLPSPK QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
7	J 链 AA	MKNHLLFWGVLA VFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCA RITSRIIRSSDPNEDIVERNIII VPLNNRENISDPTSPLRTRF VYHLS DLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETC YTYDRNKCYTAVVPLVYGGETK MVETALTPDACYPD
8	V15J 的经修饰的 J 链前体序列	MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGY THYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSED TAVYY CARSAYYDYDGFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQ QKPGKAPKRLIYDTSK LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGS GGGGSQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVER NIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLS DLCKKCDPTEV ELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPL VYGGETK MVETALTPDACYPD
9	V15J 的经修饰的 J 链成熟序列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVR QAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKS ASTAYMELSSLRSED TAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQ GTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSK LAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNP PTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQEDERIVLVDNKC KCARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPL RTRFVYHLS DLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSA TETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETK MVETALTPDACYP D
10	J15V 的经修饰的 J 链前	MKNHLLFWGVLA VFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCA RITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTR FVYHLS DLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATET CYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETK MVETALTPDACYPD

SEQ ID NO	简称	序列
	体序列	GGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYN QKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARS AYYDYDGFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPG KAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPED FATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK
11	J15V 的 经修饰 的J链成 熟序列	QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIVERNIRIIVP LNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSLCKKCDPTEVELDNQI VTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGET KMOVETALTPDACYPDGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGL EWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMEL SSLRSEDVAVYYCARSAYDYDGFAYWGQGLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS SSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSG SGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEI K
12	(GGGG S) ₃ 接头	GGGGSGGGGSGGGGS
13	1.5.3 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGHIYPGSDTRYSPSFQGGVTVISADKSITTA YLQWSSLKASDTAMYYCARHPSYGSQSPNFDYWGQGL VTVSS
14	1.5.3 VL	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKIS RVEAEDVGVYVCVQATQFPLTFGGGKVEIK
15	经修饰 的人 IgM 恒 定区 L310A	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTTDQVQAEAKESGPTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDAPSPLK QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
16	经修饰 的人 IgM 恒 定区 K315A	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTTDQVQAEAKESGPTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDLPSPLA QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG

[0170]

SEQ ID NO	简称	序列
		FSPADVQVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
17	经修饰的人 IgM 恒定区 L310A、 K315A	GSASAPTLFPLVSCENSPSPTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKL TCLVTDLT TYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDAPSPLA QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADVQVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
18	经修饰的人 IgM 恒定区 L310S、 K315S	GSASAPTLFPLVSCENSPSPTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKL TCLVTDLT TYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDSPSPLSQ TISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFS PADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAH SILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTG KPTLYNVSLVMSDTAGTCY
19	经修饰的人 IgM 恒定区 L310A、 P311A	GSASAPTLFPLVSCENSPSPTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKL TCLVTDLT TYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDAASPLK QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADVQVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
20	经修饰的人 IgM 恒定区 L310A、 P313S	GSASAPTLFPLVSCENSPSPTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKL TCLVTDLT TYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDAPSSLK QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG

[0171]

[0172]

SEQ ID NO	简称	序列
		FSPADVQVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
21	经修饰的人 IgM 恒定区 P311A、 K315A	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKLTCLVTDLT TYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDLASPLA QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADVQVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
22	经修饰的人 IgM 恒定区 P313S、 K315A	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKLTCLVTDLT TYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDLPSSLA QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADVQVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
23	经修饰的人 IgM 恒定区 L310D	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKLTCLVTDLT TYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDPSPLK QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADVQVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
24	经修饰的人 IgM 恒定区 K315D	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKLTCLVTDLT TYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISES HPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDLPSPLD QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG

[0173]

SEQ ID NO	简称	序列
		FSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
25	经修饰的人 IgM 恒定区 K315Q	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFS WKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVM QGTDEHV VCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVS VFVP PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGS GVT TDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFT CRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFL TKSTKL TCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTH TNISES HPNATFSAVGEASICEDDWN SGERFTCTVTHDLPSPLQ QTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG FSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYF AHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKS TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

[0174] 本公开的广度和范围不应受任何上述示例性实施方案的限制,而应仅根据以下权利要求及其等同项来限定。

[0001]	序列表															
[0002]	<110> IGM生物科学有限公司(IGM BIOSCIENCES A/S)															
[0003]	<120> 调节补体依赖性细胞溶解效应子功能的修饰的人IGM恒定区															
[0004]	<130> 09789.010W01															
[0005]	<140> PCT/US2018/026474															
[0006]	<141> 2018-04-06															
[0007]	<150> 62/483,087															
[0008]	<151> 2017-04-07															
[0009]	<160> 40															
[0010]	<170> PatentIn version 3.5															
[0011]	<210> 1															
[0012]	<211> 453															
[0013]	<212> PRT															
[0014]	<213> 智人(Homo sapiens)															
[0015]	<400> 1															
[0016]	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn
[0017]	1				5					10					15	
[0018]	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Val	Ala	Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp
[0019]				20					25					30		
[0020]	Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Phe	Ser	Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser
[0021]			35				40					45				
[0022]	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys
[0023]		50					55					60				
[0024]	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Ser	Lys	Asp	Val	Met	Gln
[0025]	65					70					75					80
[0026]	Gly	Thr	Asp	Glu	His	Val	Val	Cys	Lys	Val	Gln	His	Pro	Asn	Gly	Asn
[0027]					85					90					95	
[0028]	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Pro	Leu	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Leu	Pro	Pro	Lys
[0029]				100					105					110		
[0030]	Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg
[0031]			115					120					125			
[0032]	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile
[0033]		130					135					140				
[0034]	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Thr
[0035]	145					150					155					160
[0036]	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr
[0037]				165						170					175	
[0038]	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser	Asp	Trp	Leu	Ser	Gln

[0117]	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[0118]	290 295 300
[0119]	Val Thr His Thr Asp Leu Ala Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[0120]	305 310 315 320
[0121]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[0122]	325 330 335
[0123]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[0124]	340 345 350
[0125]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[0126]	355 360 365
[0127]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[0128]	370 375 380
[0129]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
[0130]	385 390 395 400
[0131]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
[0132]	405 410 415
[0133]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
[0134]	420 425 430
[0135]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
[0136]	435 440 445
[0137]	Ala Gly Thr Cys Tyr
[0138]	450
[0139]	<210> 3
[0140]	<211> 453
[0141]	<212> PRT
[0142]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0143]	<220>
[0144]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0145]	<400> 3
[0146]	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
[0147]	1 5 10 15
[0148]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
[0149]	20 25 30
[0150]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
[0151]	35 40 45
[0152]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
[0153]	50 55 60
[0154]	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
[0155]	65 70 75 80

[0156]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
[0157]	85 90 95
[0158]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
[0159]	100 105 110
[0160]	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
[0161]	115 120 125
[0162]	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
[0163]	130 135 140
[0164]	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
[0165]	145 150 155 160
[0166]	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
[0167]	165 170 175
[0168]	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln
[0169]	180 185 190
[0170]	Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
[0171]	195 200 205
[0172]	Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
[0173]	210 215 220
[0174]	Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
[0175]	225 230 235 240
[0176]	Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
[0177]	245 250 255
[0178]	Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
[0179]	260 265 270
[0180]	Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
[0181]	275 280 285
[0182]	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[0183]	290 295 300
[0184]	Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Ser Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[0185]	305 310 315 320
[0186]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[0187]	325 330 335
[0188]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[0189]	340 345 350
[0190]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[0191]	355 360 365
[0192]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[0193]	370 375 380
[0194]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val

[0195]	385	390	395	400
[0196]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala			
[0197]		405	410	415
[0198]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser			
[0199]		420	425	430
[0200]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr			
[0201]		435	440	445
[0202]	Ala Gly Thr Cys Tyr			
[0203]	450			
[0204]	<210> 4			
[0205]	<211> 453			
[0206]	<212> PRT			
[0207]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0208]	<220>			
[0209]	<223> 人工序列的描述:合成多肽			
[0210]	<400> 4			
[0211]	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn			
[0212]	1	5	10	15
[0213]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp			
[0214]		20	25	30
[0215]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser			
[0216]		35	40	45
[0217]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys			
[0218]		50	55	60
[0219]	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln			
[0220]	65	70	75	80
[0221]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn			
[0222]		85	90	95
[0223]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys			
[0224]		100	105	110
[0225]	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg			
[0226]		115	120	125
[0227]	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile			
[0228]		130	135	140
[0229]	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr			
[0230]	145	150	155	160
[0231]	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr			
[0232]		165	170	175
[0233]	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln			

[0312]	Ser Ile Cys Glu Asp Gly Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[0313]	290 295 300
[0314]	Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[0315]	305 310 315 320
[0316]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[0317]	325 330 335
[0318]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[0319]	340 345 350
[0320]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[0321]	355 360 365
[0322]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[0323]	370 375 380
[0324]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
[0325]	385 390 395 400
[0326]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
[0327]	405 410 415
[0328]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
[0329]	420 425 430
[0330]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
[0331]	435 440 445
[0332]	Ala Gly Thr Cys Tyr
[0333]	450
[0334]	<210> 6
[0335]	<211> 453
[0336]	<212> PRT
[0337]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0338]	<220>
[0339]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0340]	<400> 6
[0341]	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
[0342]	1 5 10 15
[0343]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
[0344]	20 25 30
[0345]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
[0346]	35 40 45
[0347]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
[0348]	50 55 60
[0349]	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
[0350]	65 70 75 80

[0351]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
[0352]	85 90 95
[0353]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
[0354]	100 105 110
[0355]	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
[0356]	115 120 125
[0357]	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
[0358]	130 135 140
[0359]	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
[0360]	145 150 155 160
[0361]	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
[0362]	165 170 175
[0363]	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln
[0364]	180 185 190
[0365]	Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
[0366]	195 200 205
[0367]	Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
[0368]	210 215 220
[0369]	Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
[0370]	225 230 235 240
[0371]	Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
[0372]	245 250 255
[0373]	Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
[0374]	260 265 270
[0375]	Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Asn Ala Val Gly Glu Ala
[0376]	275 280 285
[0377]	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[0378]	290 295 300
[0379]	Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[0380]	305 310 315 320
[0381]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[0382]	325 330 335
[0383]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[0384]	340 345 350
[0385]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[0386]	355 360 365
[0387]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[0388]	370 375 380
[0389]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val

[0390]	385	390	395	400
[0391]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala			
[0392]		405	410	415
[0393]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser			
[0394]		420	425	430
[0395]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr			
[0396]		435	440	445
[0397]	Ala Gly Thr Cys Tyr			
[0398]	450			
[0399]	<210> 7			
[0400]	<211> 158			
[0401]	<212> PRT			
[0402]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0403]	<220>			
[0404]	<223> 人工序列的描述:合成多肽			
[0405]	<400> 7			
[0406]	Met Lys Asn His Leu Leu Phe Trp Gly Val Leu Ala Val Phe Ile Lys			
[0407]	1	5	10	15
[0408]	Ala Val His Val Lys Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp			
[0409]		20	25	30
[0410]	Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser			
[0411]		35	40	45
[0412]	Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Ile Ile Val Pro			
[0413]		50	55	60
[0414]	Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr			
[0415]		65	70	75
[0416]	Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr			
[0417]		85	90	95
[0418]	Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile			
[0419]		100	105	110
[0420]	Cys Asp Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn			
[0421]		115	120	125
[0422]	Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys			
[0423]		130	135	140
[0424]	Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp			
[0425]		145	150	155
[0426]	<210> 8			
[0427]	<211> 412			
[0428]	<212> PRT			

[0429] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0430] <220>
 [0431] <223> 人工序列的描述:合成多肽
 [0432] <400> 8
 [0433] Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 [0434] 1 5 10 15
 [0435] Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 [0436] 20 25 30
 [0437] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 [0438] 35 40 45
 [0439] Ile Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 [0440] 50 55 60
 [0441] Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn
 [0442] 65 70 75 80
 [0443] Gln Lys Leu Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser
 [0444] 85 90 95
 [0445] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 [0446] 100 105 110
 [0447] Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr
 [0448] 115 120 125
 [0449] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 [0450] 130 135 140
 [0451] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
 [0452] 145 150 155 160
 [0453] Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 [0454] 165 170 175
 [0455] Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
 [0456] 180 185 190
 [0457] Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
 [0458] 195 200 205
 [0459] Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 [0460] 210 215 220
 [0461] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 [0462] 225 230 235 240
 [0463] Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 [0464] 245 250 255
 [0465] Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 [0466] 260 265 270
 [0467] Gly Gly Ser Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys

[0468]	275	280	285
[0469]	Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro		
[0470]	290	295	300
[0471]	Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn		
[0472]	305	310	315
[0473]	Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe		
[0474]	325	330	335
[0475]	Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val		
[0476]	340	345	350
[0477]	Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp		
[0478]	355	360	365
[0479]	Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys		
[0480]	370	375	380
[0481]	Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val		
[0482]	385	390	395
[0483]	Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp		
[0484]	405	410	
[0485]	<210> 9		
[0486]	<211> 393		
[0487]	<212> PRT		
[0488]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0489]	<220>		
[0490]	<223> 人工序列的描述:合成多肽		
[0491]	<400> 9		
[0492]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[0493]	1	5	10
[0494]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr		
[0495]	20	25	30
[0496]	Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0497]	35	40	45
[0498]	Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu		
[0499]	50	55	60
[0500]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr		
[0501]	65	70	75
[0502]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0503]	85	90	95
[0504]	Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln		
[0505]	100	105	110
[0506]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		

[0507]	115	120	125
[0508]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser		
[0509]	130	135	140
[0510]	Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala		
[0511]	145	150	155
[0512]	Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys		
[0513]	165	170	175
[0514]	Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val		
[0515]	180	185	190
[0516]	Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[0517]	195	200	205
[0518]	Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln		
[0519]	210	215	220
[0520]	Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
[0521]	225	230	235
[0522]	Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
[0523]	245	250	255
[0524]	Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala		
[0525]	260	265	270
[0526]	Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp		
[0527]	275	280	285
[0528]	Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu		
[0529]	290	295	300
[0530]	Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His		
[0531]	305	310	315
[0532]	Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp		
[0533]	325	330	335
[0534]	Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser		
[0535]	340	345	350
[0536]	Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala		
[0537]	355	360	365
[0538]	Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala		
[0539]	370	375	380
[0540]	Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp		
[0541]	385	390	
[0542]	<210> 10		
[0543]	<211> 415		
[0544]	<212> PRT		
[0545]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		

[0585]	Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0586]	290 295 300
[0587]	Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
[0588]	305 310 315 320
[0589]	Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser
[0590]	325 330 335
[0591]	Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[0592]	340 345 350
[0593]	Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
[0594]	355 360 365
[0595]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[0596]	370 375 380
[0597]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
[0598]	385 390 395 400
[0599]	Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0600]	405 410 415
[0601]	<210> 11
[0602]	<211> 393
[0603]	<212> PRT
[0604]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0605]	<220>
[0606]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0607]	<400> 11
[0608]	Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala
[0609]	1 5 10 15
[0610]	Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp
[0611]	20 25 30
[0612]	Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu
[0613]	35 40 45
[0614]	Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His
[0615]	50 55 60
[0616]	Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp
[0617]	65 70 75 80
[0618]	Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser
[0619]	85 90 95
[0620]	Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala
[0621]	100 105 110
[0622]	Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala
[0623]	115 120 125

[0624]	Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[0625]	130 135 140
[0626]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
[0627]	145 150 155 160
[0628]	Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
[0629]	165 170 175
[0630]	Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala
[0631]	180 185 190
[0632]	Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly
[0633]	195 200 205
[0634]	Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala
[0635]	210 215 220
[0636]	Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
[0637]	225 230 235 240
[0638]	Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr
[0639]	245 250 255
[0640]	Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0641]	260 265 270
[0642]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
[0643]	275 280 285
[0644]	Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
[0645]	290 295 300
[0646]	Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
[0647]	305 310 315 320
[0648]	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp
[0649]	325 330 335
[0650]	Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
[0651]	340 345 350
[0652]	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
[0653]	355 360 365
[0654]	Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe
[0655]	370 375 380
[0656]	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0657]	385 390
[0658]	<210> 12
[0659]	<211> 15
[0660]	<212> PRT
[0661]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0662]	<220>

[0663] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0664] <400> 12
 [0665] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 [0666] 1 5 10 15
 [0667] <210> 13
 [0668] <211> 122
 [0669] <212> PRT
 [0670] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0671] <220>
 [0672] <223> 人工序列的描述:合成多肽
 [0673] <400> 13
 [0674] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 [0675] 1 5 10 15
 [0676] Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 [0677] 20 25 30
 [0678] Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 [0679] 35 40 45
 [0680] Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 [0681] 50 55 60
 [0682] Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
 [0683] 65 70 75 80
 [0684] Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 [0685] 85 90 95
 [0686] Ala Arg His Pro Ser Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asn Phe Asp Tyr Trp
 [0687] 100 105 110
 [0688] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0689] 115 120
 [0690] <210> 14
 [0691] <211> 112
 [0692] <212> PRT
 [0693] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0694] <220>
 [0695] <223> 人工序列的描述:合成多肽
 [0696] <400> 14
 [0697] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 [0698] 1 5 10 15
 [0699] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 [0700] 20 25 30
 [0701] Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro

[0702]	35	40	45
[0703]	Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
[0704]	50	55	60
[0705]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0706]	65	70	75
[0707]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Ala		
[0708]	85	90	95
[0709]	Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0710]	100	105	110
[0711]	<210> 15		
[0712]	<211> 453		
[0713]	<212> PRT		
[0714]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0715]	<220>		
[0716]	<223> 人工序列的描述:合成多肽		
[0717]	<400> 15		
[0718]	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn		
[0719]	1	5	10
[0720]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp		
[0721]	20	25	30
[0722]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser		
[0723]	35	40	45
[0724]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys		
[0725]	50	55	60
[0726]	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln		
[0727]	65	70	75
[0728]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn		
[0729]	85	90	95
[0730]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys		
[0731]	100	105	110
[0732]	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg		
[0733]	115	120	125
[0734]	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile		
[0735]	130	135	140
[0736]	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr		
[0737]	145	150	155
[0738]	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr		
[0739]	165	170	175
[0740]	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln		

[0819]	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[0820]	290 295 300
[0821]	Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Ala Gln Thr Ile Ser Arg
[0822]	305 310 315 320
[0823]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[0824]	325 330 335
[0825]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[0826]	340 345 350
[0827]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[0828]	355 360 365
[0829]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[0830]	370 375 380
[0831]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
[0832]	385 390 395 400
[0833]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
[0834]	405 410 415
[0835]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
[0836]	420 425 430
[0837]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
[0838]	435 440 445
[0839]	Ala Gly Thr Cys Tyr
[0840]	450
[0841]	<210> 17
[0842]	<211> 453
[0843]	<212> PRT
[0844]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0845]	<220>
[0846]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0847]	<400> 17
[0848]	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
[0849]	1 5 10 15
[0850]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
[0851]	20 25 30
[0852]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
[0853]	35 40 45
[0854]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
[0855]	50 55 60
[0856]	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
[0857]	65 70 75 80

[0858]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
[0859]	85 90 95
[0860]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
[0861]	100 105 110
[0862]	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
[0863]	115 120 125
[0864]	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
[0865]	130 135 140
[0866]	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
[0867]	145 150 155 160
[0868]	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
[0869]	165 170 175
[0870]	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln
[0871]	180 185 190
[0872]	Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
[0873]	195 200 205
[0874]	Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
[0875]	210 215 220
[0876]	Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
[0877]	225 230 235 240
[0878]	Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
[0879]	245 250 255
[0880]	Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
[0881]	260 265 270
[0882]	Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
[0883]	275 280 285
[0884]	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[0885]	290 295 300
[0886]	Val Thr His Thr Asp Ala Pro Ser Pro Leu Ala Gln Thr Ile Ser Arg
[0887]	305 310 315 320
[0888]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[0889]	325 330 335
[0890]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[0891]	340 345 350
[0892]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[0893]	355 360 365
[0894]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[0895]	370 375 380
[0896]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val

[0897]	385	390	395	400
[0898]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala			
[0899]	405	410	415	
[0900]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser			
[0901]	420	425	430	
[0902]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr			
[0903]	435	440	445	
[0904]	Ala Gly Thr Cys Tyr			
[0905]	450			
[0906]	<210> 18			
[0907]	<211> 453			
[0908]	<212> PRT			
[0909]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0910]	<220>			
[0911]	<223> 人工序列的描述:合成多肽			
[0912]	<400> 18			
[0913]	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn			
[0914]	1	5	10	15
[0915]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp			
[0916]	20	25	30	
[0917]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser			
[0918]	35	40	45	
[0919]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys			
[0920]	50	55	60	
[0921]	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln			
[0922]	65	70	75	80
[0923]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn			
[0924]	85	90	95	
[0925]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys			
[0926]	100	105	110	
[0927]	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg			
[0928]	115	120	125	
[0929]	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile			
[0930]	130	135	140	
[0931]	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr			
[0932]	145	150	155	160
[0933]	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr			
[0934]	165	170	175	
[0935]	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln			

[0936]	180	185	190
[0937]	Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln		
[0938]	195	200	205
[0939]	Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val		
[0940]	210	215	220
[0941]	Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr		
[0942]	225	230	235
[0943]	Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr		
[0944]	245	250	255
[0945]	Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn		
[0946]	260	265	270
[0947]	Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala		
[0948]	275	280	285
[0949]	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr		
[0950]	290	295	300
[0951]	Val Thr His Thr Asp Ser Pro Ser Pro Leu Ser Gln Thr Ile Ser Arg		
[0952]	305	310	315
[0953]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro		
[0954]	325	330	335
[0955]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu		
[0956]	340	345	350
[0957]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg		
[0958]	355	360	365
[0959]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro		
[0960]	370	375	380
[0961]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val		
[0962]	385	390	395
[0963]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala		
[0964]	405	410	415
[0965]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser		
[0966]	420	425	430
[0967]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr		
[0968]	435	440	445
[0969]	Ala Gly Thr Cys Tyr		
[0970]	450		
[0971]	<210> 19		
[0972]	<211> 453		
[0973]	<212> PRT		
[0974]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		

[1014]	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[1015]	290 295 300
[1016]	Val Thr His Thr Asp Ala Ala Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[1017]	305 310 315 320
[1018]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[1019]	325 330 335
[1020]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[1021]	340 345 350
[1022]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[1023]	355 360 365
[1024]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[1025]	370 375 380
[1026]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
[1027]	385 390 395 400
[1028]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
[1029]	405 410 415
[1030]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
[1031]	420 425 430
[1032]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
[1033]	435 440 445
[1034]	Ala Gly Thr Cys Tyr
[1035]	450
[1036]	<210> 20
[1037]	<211> 453
[1038]	<212> PRT
[1039]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1040]	<220>
[1041]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[1042]	<400> 20
[1043]	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
[1044]	1 5 10 15
[1045]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
[1046]	20 25 30
[1047]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
[1048]	35 40 45
[1049]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
[1050]	50 55 60
[1051]	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
[1052]	65 70 75 80

[1053]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
[1054]	85 90 95
[1055]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
[1056]	100 105 110
[1057]	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
[1058]	115 120 125
[1059]	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
[1060]	130 135 140
[1061]	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
[1062]	145 150 155 160
[1063]	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
[1064]	165 170 175
[1065]	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln
[1066]	180 185 190
[1067]	Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
[1068]	195 200 205
[1069]	Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
[1070]	210 215 220
[1071]	Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
[1072]	225 230 235 240
[1073]	Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
[1074]	245 250 255
[1075]	Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
[1076]	260 265 270
[1077]	Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
[1078]	275 280 285
[1079]	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[1080]	290 295 300
[1081]	Val Thr His Thr Asp Ala Pro Ser Ser Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[1082]	305 310 315 320
[1083]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[1084]	325 330 335
[1085]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[1086]	340 345 350
[1087]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[1088]	355 360 365
[1089]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[1090]	370 375 380
[1091]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val

[1092]	385	390	395	400
[1093]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala			
[1094]	405	410	415	
[1095]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser			
[1096]	420	425	430	
[1097]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr			
[1098]	435	440	445	
[1099]	Ala Gly Thr Cys Tyr			
[1100]	450			
[1101]	<210> 21			
[1102]	<211> 453			
[1103]	<212> PRT			
[1104]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1105]	<220>			
[1106]	<223> 人工序列的描述:合成多肽			
[1107]	<400> 21			
[1108]	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn			
[1109]	1	5	10	15
[1110]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp			
[1111]	20	25	30	
[1112]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser			
[1113]	35	40	45	
[1114]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys			
[1115]	50	55	60	
[1116]	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln			
[1117]	65	70	75	80
[1118]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn			
[1119]	85	90	95	
[1120]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys			
[1121]	100	105	110	
[1122]	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg			
[1123]	115	120	125	
[1124]	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile			
[1125]	130	135	140	
[1126]	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr			
[1127]	145	150	155	160
[1128]	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr			
[1129]	165	170	175	
[1130]	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln			

[1209]	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[1210]	290 295 300
[1211]	Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Ser Leu Ala Gln Thr Ile Ser Arg
[1212]	305 310 315 320
[1213]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[1214]	325 330 335
[1215]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[1216]	340 345 350
[1217]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[1218]	355 360 365
[1219]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[1220]	370 375 380
[1221]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
[1222]	385 390 395 400
[1223]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
[1224]	405 410 415
[1225]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
[1226]	420 425 430
[1227]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
[1228]	435 440 445
[1229]	Ala Gly Thr Cys Tyr
[1230]	450
[1231]	<210> 23
[1232]	<211> 453
[1233]	<212> PRT
[1234]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1235]	<220>
[1236]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[1237]	<400> 23
[1238]	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
[1239]	1 5 10 15
[1240]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
[1241]	20 25 30
[1242]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
[1243]	35 40 45
[1244]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
[1245]	50 55 60
[1246]	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
[1247]	65 70 75 80

[1248]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
[1249]	85 90 95
[1250]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
[1251]	100 105 110
[1252]	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
[1253]	115 120 125
[1254]	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
[1255]	130 135 140
[1256]	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
[1257]	145 150 155 160
[1258]	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
[1259]	165 170 175
[1260]	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln
[1261]	180 185 190
[1262]	Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
[1263]	195 200 205
[1264]	Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
[1265]	210 215 220
[1266]	Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
[1267]	225 230 235 240
[1268]	Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
[1269]	245 250 255
[1270]	Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
[1271]	260 265 270
[1272]	Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
[1273]	275 280 285
[1274]	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[1275]	290 295 300
[1276]	Val Thr His Thr Asp Asp Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
[1277]	305 310 315 320
[1278]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[1279]	325 330 335
[1280]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[1281]	340 345 350
[1282]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[1283]	355 360 365
[1284]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[1285]	370 375 380
[1286]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val

[1287]	385	390	395	400
[1288]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala			
[1289]	405	410	415	
[1290]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser			
[1291]	420	425	430	
[1292]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr			
[1293]	435	440	445	
[1294]	Ala Gly Thr Cys Tyr			
[1295]	450			
[1296]	<210> 24			
[1297]	<211> 453			
[1298]	<212> PRT			
[1299]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1300]	<220>			
[1301]	<223> 人工序列的描述:合成多肽			
[1302]	<400> 24			
[1303]	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn			
[1304]	1 5 10 15			
[1305]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp			
[1306]	20 25 30			
[1307]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser			
[1308]	35 40 45			
[1309]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys			
[1310]	50 55 60			
[1311]	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln			
[1312]	65 70 75 80			
[1313]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn			
[1314]	85 90 95			
[1315]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys			
[1316]	100 105 110			
[1317]	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg			
[1318]	115 120 125			
[1319]	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile			
[1320]	130 135 140			
[1321]	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr			
[1322]	145 150 155 160			
[1323]	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr			
[1324]	165 170 175			
[1325]	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln			

[1404]	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
[1405]	290 295 300
[1406]	Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Gln Gln Thr Ile Ser Arg
[1407]	305 310 315 320
[1408]	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
[1409]	325 330 335
[1410]	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
[1411]	340 345 350
[1412]	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
[1413]	355 360 365
[1414]	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
[1415]	370 375 380
[1416]	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
[1417]	385 390 395 400
[1418]	Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
[1419]	405 410 415
[1420]	His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
[1421]	420 425 430
[1422]	Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
[1423]	435 440 445
[1424]	Ala Gly Thr Cys Tyr
[1425]	450
[1426]	<210> 26
[1427]	<211> 8
[1428]	<212> PRT
[1429]	<213> 智人(Homo sapiens)
[1430]	<400> 26
[1431]	Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln
[1432]	1 5
[1433]	<210> 27
[1434]	<211> 8
[1435]	<212> PRT
[1436]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1437]	<220>
[1438]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[1439]	<400> 27
[1440]	Asp Ala Pro Ser Pro Leu Lys Gln
[1441]	1 5
[1442]	<210> 28

- [1443] <211> 8
[1444] <212> PRT
[1445] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1446] <220>
[1447] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1448] <400> 28
[1449] Asp Leu Ala Ser Pro Leu Lys Gln
[1450] 1 5
[1451] <210> 29
[1452] <211> 8
[1453] <212> PRT
[1454] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1455] <220>
[1456] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1457] <400> 29
[1458] Asp Leu Pro Ser Ser Leu Lys Gln
[1459] 1 5
[1460] <210> 30
[1461] <211> 8
[1462] <212> PRT
[1463] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1464] <220>
[1465] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1466] <400> 30
[1467] Asp Leu Pro Ser Pro Leu Ala Gln
[1468] 1 5
[1469] <210> 31
[1470] <211> 8
[1471] <212> PRT
[1472] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1473] <220>
[1474] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1475] <400> 31
[1476] Asp Asp Pro Ser Pro Leu Lys Gln
[1477] 1 5
[1478] <210> 32
[1479] <211> 8
[1480] <212> PRT
[1481] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [1482] <220>
[1483] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1484] <400> 32
[1485] Asp Leu Pro Ser Pro Leu Asp Gln
[1486] 1 5
[1487] <210> 33
[1488] <211> 8
[1489] <212> PRT
[1490] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1491] <220>
[1492] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1493] <400> 33
[1494] Asp Leu Pro Ser Pro Leu Gln Gln
[1495] 1 5
[1496] <210> 34
[1497] <211> 8
[1498] <212> PRT
[1499] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1500] <220>
[1501] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1502] <400> 34
[1503] Asp Ala Pro Ser Pro Leu Ala Gln
[1504] 1 5
[1505] <210> 35
[1506] <211> 8
[1507] <212> PRT
[1508] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1509] <220>
[1510] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1511] <400> 35
[1512] Asp Ser Pro Ser Pro Leu Ser Gln
[1513] 1 5
[1514] <210> 36
[1515] <211> 8
[1516] <212> PRT
[1517] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1518] <220>
[1519] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1520] <400> 36

- [1521] Asp Ala Ala Ser Pro Leu Lys Gln
[1522] 1 5
[1523] <210> 37
[1524] <211> 8
[1525] <212> PRT
[1526] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1527] <220>
[1528] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1529] <400> 37
[1530] Asp Ala Pro Ser Ser Leu Lys Gln
[1531] 1 5
[1532] <210> 38
[1533] <211> 8
[1534] <212> PRT
[1535] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1536] <220>
[1537] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1538] <400> 38
[1539] Asp Leu Ala Ser Pro Leu Ala Gln
[1540] 1 5
[1541] <210> 39
[1542] <211> 8
[1543] <212> PRT
[1544] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1545] <220>
[1546] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1547] <400> 39
[1548] Asp Leu Pro Ser Ser Leu Ala Gln
[1549] 1 5
[1550] <210> 40
[1551] <211> 8
[1552] <212> PRT
[1553] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1554] <220>
[1555] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1556] <400> 40
[1557] Asp Leu Ala Ser Ser Leu Lys Gln
[1558] 1 5

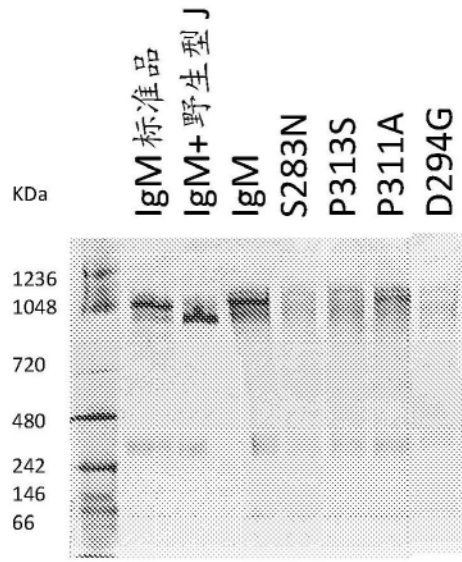


图1

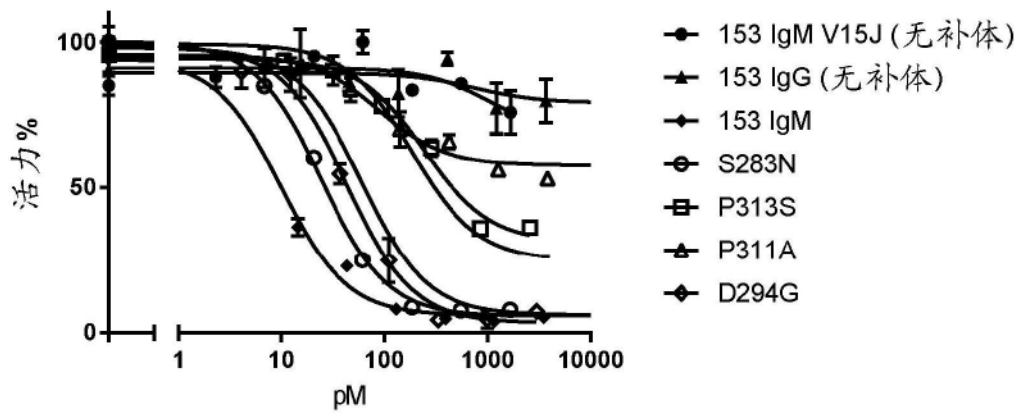


图2

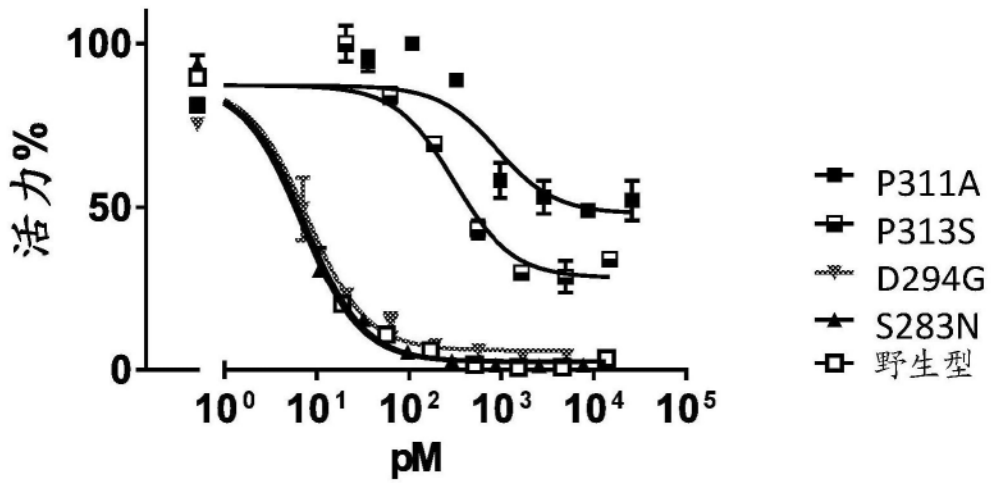


图3

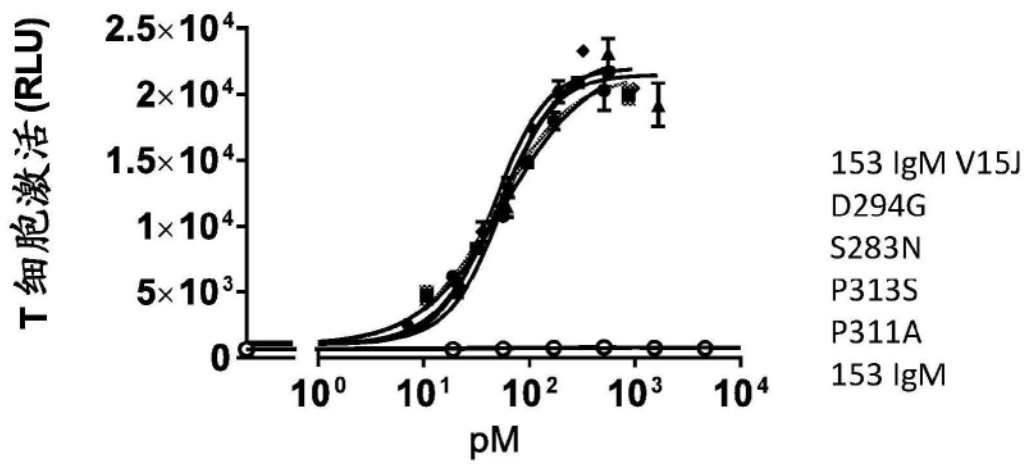


图4

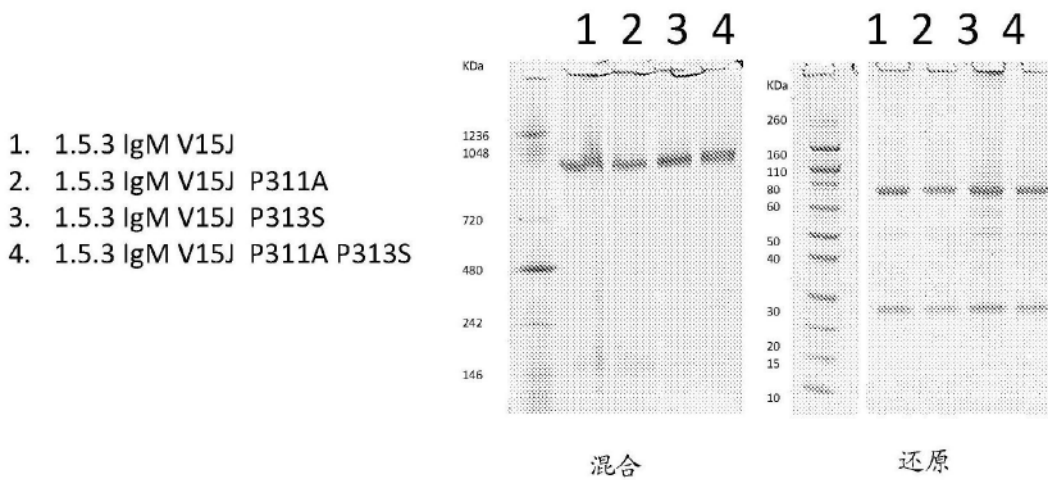


图5

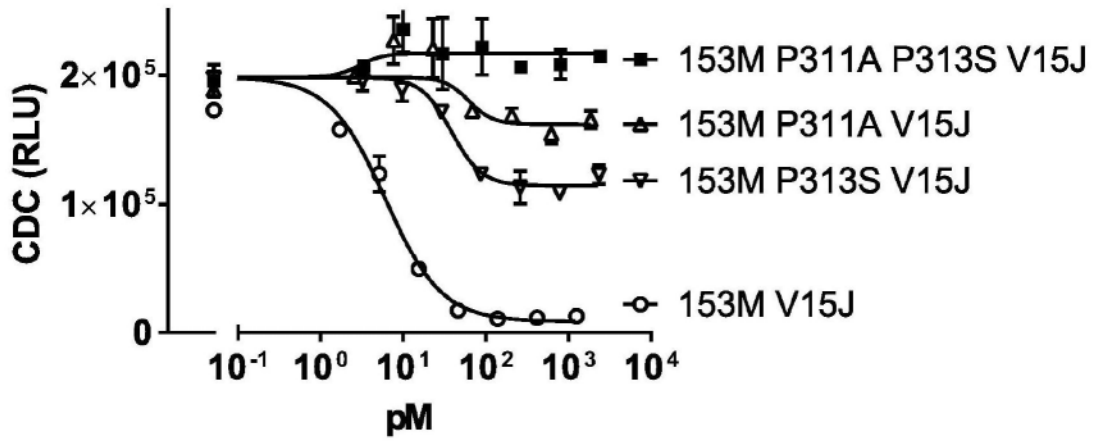
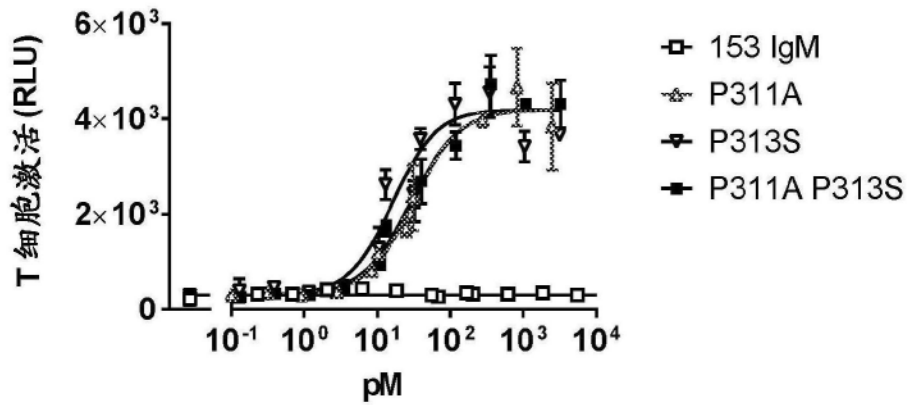


图6



	Hill斜率	IC50
P311A	1.4	31 nM
P313S	1.5	16 nM
P311A P313S	1.3	29 nM

图7

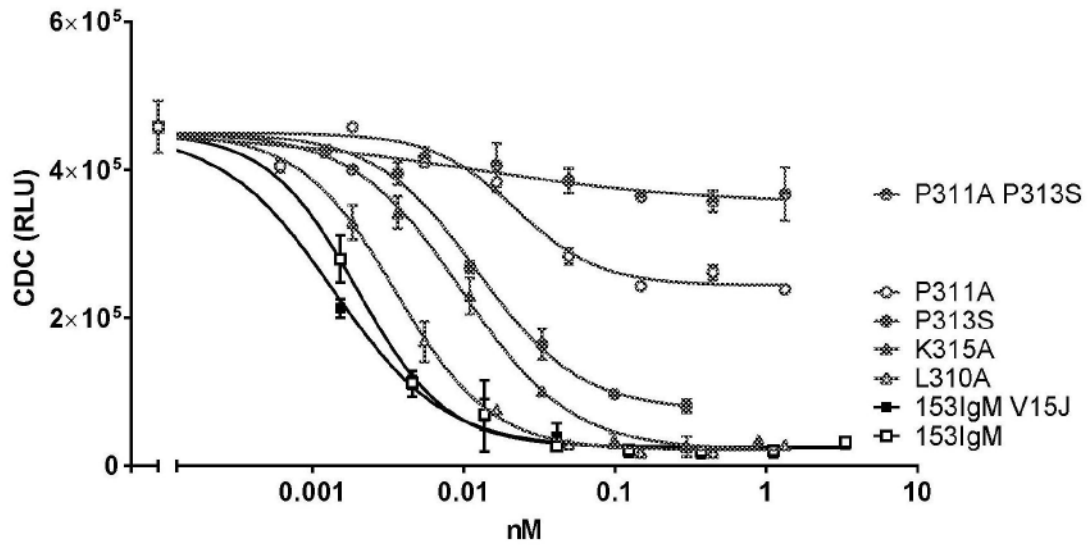


图8

A

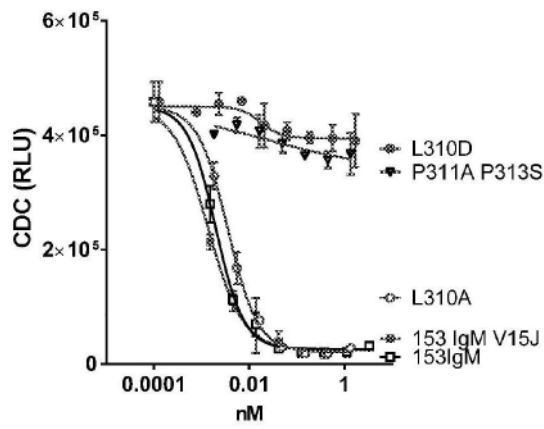


图9A

B

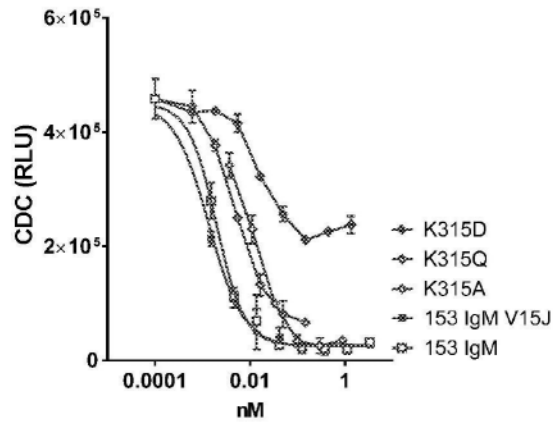


图9B