(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115942957 A
(43)申请公布日 2023.04.07

(21)申请号 202080091918.5
(22)申请日 2020.11.04
(30)优先权数据
62/930,178 2019.11.04 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.07.04
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/058968 2020.11.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/092080 EN 2021.05.14
(71)申请人 阿鲁纳生物股份公司
地址 美国佐治亚州
(72)发明人 S.L.斯蒂斯 R.斯韦坦伯格 R.K.卡蒂
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 涂滔
(51)Int.Cl.
A61K 39/44(2006.01)
A61K 35/30(2015.01)
A61K 35/545(2015.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
C12N 15/88(2006.01)

权利要求书3页 说明书49页
序列表47页 附图3页

(54)发明名称

细胞外囊泡及其用于抗体递送的用途

(57)摘要

本文公开了通过向受试者施用与衍生自神经细胞,例如神经祖细胞或神经干细胞的细胞外囊泡(EV)的表面缀合的多肽(例如抗体或其抗原结合部分),将多肽,例如抗体或其抗原结合部分递送至受试者的中枢神经系统的方法。还提供了包含与多肽,诸如抗体或其抗原结合部分,偶联的神经EV的缀合物,及其使用方法。本文还公开了通过向受试者施用加载在衍生自神经细胞的细胞外囊泡(EV)的腔内的多肽(例如抗体或其抗原结合部分),递送多肽,例如抗体或其抗原结合部分的方法。

CN 115942957 A

1.将抗体或其抗原结合部分递送至受试者的中枢神经系统(CNS)的方法,其包括向所述受试者施用包含抗体或其抗原结合部分和衍生自神经细胞的细胞外囊泡的缀合物,其中所述抗体或其抗原结合部分通过点击接头与所述细胞外囊泡的表面缀合。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述缀合物经静脉内施用。

3.如权利要求1所述的方法,其中所述缀合物经鼻内施用。

4.如权利要求1所述的方法,其中所述缀合物经颅内施用。

5.如权利要求1所述的方法,其中所述缀合物经鞘内施用。

6.如权利要求1所述的方法,其中所述神经细胞是神经祖细胞。

7.如权利要求6所述的方法,其中所述神经祖细胞衍生自人多能细胞。

8.如权利要求7所述的方法,其中所述人多能细胞是人胚胎干细胞。

9.如权利要求7所述的方法,其中所述人多能细胞是诱导多能干细胞。

10.如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合部分是IgG。

11.如权利要求1-9所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合部分是选自由Fab、F(ab')$_2$、scFv、串联scFv、双抗体、微型抗体和单域抗体组成的组的抗体片段。

12.如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合部分是人源化抗体或其抗原结合部分。

13.如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合部分是完全人抗体或其抗原结合部分。

14.如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述点击接头由叠氮化物点击试剂和炔烃点击试剂之间的反应形成。

15.如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述点击接头由叠氮化物和二苯并环辛炔(DBCO)之间的反应形成。

16.如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述点击接头由四嗪和反式环辛烯之间的反应形成。

17.如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述点击接头由四嗪和降冰片烯之间的反应形成。

18.如如前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述抗体递送至所述受试者的脑。

19.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述抗体递送至所述受试者的脊髓。

20.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述EV进一步包含外源性核酸和/或外源性蛋白。

21.如权利要求18所述的方法,其中所述EV包含外源性siRNA和/或反义核酸。

22.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述EV进一步包含小分子。

23.组合物,其包含抗体-EV(Ab-EV)缀合物,所述缀合物包含抗体或其抗原结合部分、以及衍生自神经细胞的细胞外囊泡(EV),其中所述抗体或其抗原结合部分通过点击接头与所述EV表面缀合。

24.如权利要求23所述的组合物,其中所述神经细胞是神经祖细胞。

25.如权利要求24所述的组合物,其中所述神经祖细胞衍生自人多能细胞。

26.如权利要求25所述的组合物,其中所述人多能细胞是人胚胎细胞或诱导多能细胞。

27.如权利要求23所述的组合物,其中所述点击接头在以下的任何一种或多种反应之

间形成:叠氮化物和二苯并环辛炔;四嗪和反式环辛烯;四嗪和降冰片烯;叠氮化物和炔烃;叠氮化物(张力促进)和炔烃;叠氮化物(张力促进)和硝酮;烯烃和叠氮化物;烯烃和四嗪;和/或烯烃和四唑。

28.如权利要求23-27中任一项所述的组合物,其中所述抗体或其抗原结合部分是IgG。

29.如权利要求23-28中任一项所述的组合物,其中所述抗体或其抗原结合部分是选自由Fab、$F(ab')_2$、scFv、串联scFv、双抗体、微型抗体和单域抗体组成的组的抗体片段。

30.如权利要求23-29中任一项所述的组合物,其中所述抗体或其抗原结合部分是人源化抗体或其抗原结合部分。

31.如权利要求23-30中任一项所述的组合物,其中所述抗体或其抗原结合部分是索兰珠单抗(solanezumab)、阿杜卡奴单抗(aducanumab)、纳武单抗(nivolumab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、那他珠单抗(natalizumab)、迪妥昔单抗(dinutuximab)、更汀芦单抗(gantenerumab)、lecanemab或乌妥昔单抗(ublituximab)中的任何一种或多种。

32.将抗体或其抗原结合部分加载到细胞外囊泡(EV)的腔中的方法,其包括:i)用皂苷处理所述EV以使所述EV膜透化;ii)对所述经处理的EV进行声处理;iii)将所述抗体或其抗原结合部分添加到所述EV,从而将抗体或其抗原结合部分加载到所述EV的腔中。

33.如权利要求32所述的方法,其中所述EV用约0.05%至0.3%的皂苷处理。

34.如权利要求32或33所述的方法,其进一步包括在加载所述抗体或其抗原结合部分后温育所述EV足以使至少10%的所述抗体加载到所述EV中的时间段。

35.将抗体或其抗原结合部分递送至受试者的中枢神经系统(CNS)的方法,其包括向所述受试者施用细胞外囊泡(EV),所述细胞外囊泡在所述EV的腔中包含所述抗体或其抗原结合部分,其中所述EV衍生自神经细胞。

36.如权利要求35所述的方法,其中所述神经细胞是神经祖细胞。

37.如权利要求36所述的方法,其中所述神经祖细胞衍生自人多能细胞。

38.如权利要求37所述的方法,其中所述人多能细胞是人胚胎干细胞。

39.如权利要求37所述的方法,其中所述人多能细胞是诱导多能干细胞。

40.如权利要求35-39中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合部分是IgG。

41.如权利要求35-39中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合部分是选自由Fab、$F(ab')_2$、scFv、串联scFv、双抗体、微型抗体和单域抗体组成的组的抗体片段。

42.如权利要求35-41中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合部分是人源化抗体或其抗原结合部分。

43.如权利要求35-41中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合部分是完全人抗体或其抗原结合部分。

44.如权利要求35-43中任一项所述的方法,其中将所述抗体递送至所述受试者的脑。

45.如权利要求35-44中任一项所述的方法,其中将所述抗体递送至所述受试者的脊髓。

46.如权利要求35-45中任一项所述的方法,其中所述EV进一步包含外源性核酸和/或外源性蛋白。

47.如权利要求46所述的方法,其中所述EV包含外源性siRNA和/或反义核酸。

48.如权利要求35-47中任一项所述的方法,其中所述EV进一步包含小分子。

细胞外囊泡及其用于抗体递送的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2019年11月4日提交的美国临时申请号62/930,178的优先权。前述优先权申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已以ASCII格式电子提交的序列表,并且其通过引用其整体并入本文。所述ASCII副本创建于2020年10月29日,命名为A106525_1040WO_SL.txt,大小为86,402字节。

背景技术

[0005] 最近基于抗体的药物(包括治疗阿尔茨海默病的索兰珠单抗(Solanezumab)和阿杜卡奴单抗(Aducanumab))的失败引发了许多关于CNS治疗性抗体治疗(包括使用IV作为CNS中有效生物利用度的施用途径)未来的问题。在小鼠中,当通过IV给予时,脑中可测量到抗体浓度在注射剂量的约0.1%,并且其可检测长达72小时,尽管数量非常少(Banks et al.,Peptides,2002.23(12):p.2223-6)。同样,在人体临床试验中,IV递送的抗体已经报告CSF水平为血清中所发现浓度的0.1%,这表明IgG不容易穿过人血脑屏障(BBB)(Rubenstein et al.,Blood.2003.101(2):p.466-8)。

[0006] 已经生成双特异性抗体,其含有一个结合BBB转胞吞蛋白的可变区,而另一个可变区与感兴趣的特异性靶标结合。值得注意的是,已经显示转铁蛋白受体是穿过BBB的有力转运蛋白,但其在人体试验中的使用受到安全考量的阻碍(Couch et al.,Sci Transl Med,2013.5(183):p.183ra57,1-12)。最近,已经探索了其他潜在的双特异性靶标,包括BBB穿过CD98hc(Zuchero et al.,Neuron,2016.89(1):p.70-82)和FC5(Muruganandam et al.,2002.16(2):p.240-242),但目前还没有在临床上得到证实。腺相关病毒(AAV)在其穿过BBB(Deverman et al.,Nat Biotechnol,2016.34(2):p.204-9.)和递送可以编码在脑中分泌的外源性基因的能力方面也显示出前景(Ryan et al.,2010.18(8):p.1471-1481)。然而,AAV易于出现高清除率,尤其是在再施用时,以及神经元或其他CNS细胞投入过多能量来生成这些抗体的潜在衰退。因此,本领域需要将治疗性蛋白,诸如抗体,递送至中枢神经系统的其他方法。

发明内容

[0007] 为了改善治疗性蛋白,诸如抗体,向受试者的脑和中枢神经系统的递送,本文提供了使用神经细胞外囊泡(EV)作为治疗性蛋白的载体的方法。在一个方面,本文提供了将抗体或其抗原结合部分递送至受试者的中枢神经系统的方法,其包括向受试者施用包含抗体或其抗原结合部分和衍生自神经细胞的细胞外囊泡的缀合物,其中抗体或其抗原结合部分通过点击接头与细胞外囊泡的表面和相关蛋白缀合。

[0008] 在一个方面,本文提供了将多肽递送至受试者的中枢神经系统的方法,其包括向受试者施用包含多肽和衍生自神经细胞的细胞外囊泡的缀合物,其中多肽通过点击接头与

细胞外囊泡的表面和相关蛋白缀合。在示例性实施方案中，多肽是外源性多肽。在其他示例性实施方案中，多肽是治疗性多肽。

[0009] 在一些实施方案中，缀合物经静脉内施用。

[0010] 在一些实施方案中，缀合物经鼻内施用。

[0011] 在一些实施方案中，将缀合物递送至受试者的脑。在一些实施方案中，将缀合物递送穿过受试者的血脑屏障。

[0012] 在一些实施方案中，神经细胞是神经祖细胞。在一些此类实施方案中，神经祖细胞衍生自人多能细胞。在某些实施方案中，人多能细胞是人胚胎干细胞。在其他实施方案中，人多能细胞是诱导多能干细胞。

[0013] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分是IgG。

[0014] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分是选自由Fab、$F(ab')_2$、scFv、串联scFv、双抗体、微型抗体和单域抗体组成的组的抗体片段。

[0015] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分是人源化抗体或其抗原结合部分。

[0016] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分是完全人抗体或其抗原结合部分。

[0017] 在一些实施方案中，点击接头由叠氮化物点击试剂和炔烃点击试剂之间的反应形成。

[0018] 在一些实施方案中，点击接头由叠氮化物和二苯并环辛炔(DBCO)之间的反应形成。

[0019] 在一些实施方案中，点击接头由四嗪和反式环辛烯之间的反应形成。

[0020] 在一些实施方案中，点击接头由四嗪和降冰片烯之间的反应形成。

[0021] 在一些实施方案中，将抗体递送至受试者的脑。

[0022] 在一些实施方案中，将抗体递送至受试者的中枢神经系统。

[0023] 在一些实施方案中，EV进一步包含外源性核酸和/或外源性蛋白。在某些实施方案中，EV包含siRNA和/或反义核酸。

[0024] 在一些方面，本文提供了包含抗体-EV(Ab-EV)缀合物的组合物，该缀合物包含抗体或其抗原结合部分，以及衍生自神经细胞的细胞外囊泡(EV)，其中所述抗体或其抗原结合部分通过点击接头与EV表面结合。

[0025] 在一些实施方案中，神经细胞是神经祖细胞。在一些此类实施方案中，神经祖细胞衍生自人多能细胞。在某些实施方案中，人多能细胞是人胚胎干细胞。在其他实施方案中，人多能细胞是诱导多能干细胞。

[0026] 在一些实施方案中，点击接头在以下的任何一种或多种反应之间形成：叠氮化物和二苯并环辛炔；四嗪和反式环辛烯；四嗪和降冰片烯；叠氮化物和炔烃；叠氮化物(张力促进)和炔烃；叠氮化物(张力促进)和硝酮；烯烃和叠氮化物；烯烃和四嗪；和/或烯烃和四唑。

[0027] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分是IgG。

[0028] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分是选自由Fab、$F(ab')_2$、scFv、串联scFv、双抗体、微型抗体和单域抗体组成的组的抗体片段。

[0029] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分是人源化抗体或其抗原结合部分。

[0030] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分是索兰珠单抗、阿杜卡奴单抗、纳武单抗、贝伐珠单抗、奥瑞珠单抗、那他珠单抗、迪妥昔单抗、更汀芦单抗、lecanemab或乌妥昔单

抗中的任何一种或多种。

[0031] 在一些方面,本文提供了将抗体或其抗原结合部分加载到细胞外囊泡(EV)的腔中的方法,其包括:i)用皂苷处理EV以使EV膜透化;ii)对经处理的EV进行声处理;iii)将抗体或其抗原结合部分添加到EV中,从而将抗体或其抗原结合部分加载到EV的腔中。

[0032] 在一些实施方案中,EV用约0.05%至0.3%的皂苷处理。

[0033] 在一些实施方案中,将抗体或其抗原结合部分加载到细胞外囊泡(EV)的腔中的方法包括在加载抗体或其抗原结合部分后温育EV足以使至少10%的抗体加载到EV中的时间段。

[0034] 在一些方面,本文提供了将抗体或其抗原结合部分递送至受试者的中枢神经系统(CNS)的方法,其包括向受试者施用在细胞外囊泡(EV)的腔中包含抗体或其抗原结合部分的EV,其中EV衍生自神经细胞。

[0035] 在一些实施方案中,神经细胞是神经祖细胞。在一些此类实施方案中,神经祖细胞衍生自人多能细胞。在某些实施方案中,人多能细胞是人胚胎干细胞。在其他实施方案中,人多能细胞是诱导多能干细胞。

[0036] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分是IgG。

[0037] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分是选自由Fab、$F(ab')_2$、scFv、串联scFv、双抗体、微型抗体和单域抗体组成的组的抗体片段。

[0038] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分是人源化抗体或其抗原结合部分。

[0039] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分是完全人抗体或其抗原结合部分。

[0040] 在一些实施方案中,将抗体递送至受试者的脑。

[0041] 在一些实施方案中,将抗体递送至受试者的脊髓。

[0042] 在一些实施方案中,EV进一步包含外源性核酸和/或外源性蛋白。在一些实施方案中,EV包含外源性siRNA和/或反义核酸。在一些实施方案中,EV进一步包含小分子。

[0043] 附图简述

[0044] 图1是描绘使用无铜点击化学反应将抗体(Ab)与细胞外囊泡(EV)缀合的示例性方法的示意图。将叠氮基团添加到非反应性抗体中。另外,通过攻击胺基团的SDP偶联,用DIBO基团修饰细胞外囊泡(EV)。然后,在混合时,无铜点击化学反应将抗体与EV缀合。

[0045] 图2A和图2B提供了小鼠脑切片的图像,该小鼠脑切片的图像从施用未缀合抗体(图2A)或与衍生自神经祖细胞的细胞外囊泡缀合的抗体(图2B)的小鼠中获得。显示了细胞核(蓝色)和抗体(白色)信号。

[0046] 图3A和图3B说明了使用各种加载条件,抗体(图3A)或萤光素酶蛋白(图3B)至衍生自神经祖细胞(AB126)的细胞外囊泡的腔中的加载效率。

[0047] 发明详述

[0048] A.定义

[0049] 为了更容易理解本发明,首先定义某些术语。此外,应当注意,每当列举参数的值或值范围时,旨在所列值和介于所列值之间的范围也是本发明的部分。

[0050] 术语“约”或“大约”通常是指在给定值或范围的5%以内,或更优选在1%以内。

[0051] 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用并且涵盖结合靶标抗原的各种结构,其包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、纳米抗体、

monobody、抗体模拟物和展现期望抗原结合活性的抗体片段。

[0052] 在一些实施方案中，抗体包括免疫球蛋白分子，其包含通过二硫键相互连接的四个多肽链——两条重(H)链和两条轻(L)链——及其多聚体(例如，IgM)。每条重链(HC)包含重链可变区(或结构域)(本文缩写为HCVR或VH)和重链恒定区(或结构域)。重链恒定区包含三个结构域，CH1、CH2和CH3。每条轻链(LC)包含轻链可变区(本文缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(CL1)。VH和VL区可以进一步细分为高变区，称为互补决定区(CDR)，散布有更保守的区域，称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成，从氨基端到羧基端按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0053] 如本文所用，术语“CDR”或“互补决定区”是指在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。这些特定区域已经由Kabat et al.,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977)和Kabat et al.,Sequences of protein of immunological interest.(1991)和Chothia et al.,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)以及由MacCallum et al.,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)描述，其中定义包括相互比较时氨基酸残基的重叠或子集。

[0054] 使用术语“Fc结构域”以定义免疫球蛋白重链的C端区域，其可以通过完整抗体的木瓜蛋白酶消化生成。Fc结构域可以是天然序列Fc结构域或变体Fc结构域。免疫球蛋白的Fc结构域通常包含两个恒定结构域、CH2结构域和CH3结构域，并且任选地可以包含CH4结构域。替换Fc部分中氨基酸残基以改变抗体效应子功能是本领域已知的(Winter,et al.,美国专利号5,648,260;5,624,821)。抗体的Fc结构域介导几种重要的效应子功能，例如细胞因子诱导、ADCC、吞噬作用、补体依赖性细胞毒性(CDC)以及抗体和抗原-抗体复合物的半衰期/清除率。在某些实施方案中，在含有Fc结构域的结合蛋白的Fc结构域中改变(例如，缺失、插入或替换)至少一个氨基酸残基，从而改变结合蛋白的效应子功能。

[0055] 如本文所用，“完整”或“全长”抗体是指包含四条多肽链、两条重(H)链和两条轻(L)链的抗体。在一个实施方案中，完整抗体是完整IgG抗体。

[0056] 如本文所用，术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群中获得的抗体，即组成该群的个体抗体在序列上相同并且结合相同的表位，除了可能的变体抗体，例如，含有天然存在的突变或在单克隆抗体制备期间产生的突变，此类变体通常以少量存在。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相比，单克隆抗体制备物的每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因此，修饰语“单克隆的”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群中获得，并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如，可以通过多种技术做出根据本发明待使用的单克隆抗体，该技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法，本文描述了用于做出单克隆抗体的此类方法和其他示例性方法。

[0057] 如本文所用，术语“人抗体”是指具有可变区的抗体，其中框架区和CDR区均衍生自人种系免疫球蛋白序列。此外，如果抗体含有恒定区，该恒定区也衍生自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而，如本文所用，术语

“人抗体”不旨在包括其中衍生自另一哺乳动物物种，诸如小鼠，的种系的CDR序列已移植到人框架序列上的抗体。

[0058] 术语“人源化抗体”旨在指其中衍生自一种非人哺乳动物物种，诸如小鼠，的种系的CDR序列已移植到人框架序列上的抗体。可以在人框架序列和/或非人CDR序列内做出额外的框架区修饰。抗体，例如非人抗体，的“人源化形式”是指已经经历人源化的抗体。

[0059] 术语“嵌合抗体”旨在指其中可变区序列衍生自一个物种并且恒定区序列衍生自另一物种的抗体，诸如其中可变区序列衍生自小鼠抗体并且恒定区序列衍生自人抗体的抗体。

[0060] 抗体的“抗体片段”、“抗原结合片段”或“抗原结合部分”是指除了完整抗体之外的分子，其包含完整抗体的部分并且结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)2、双抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如，scFv)和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0061] “多特异性抗原结合多肽”或“多特异性抗体”是一种靶向多于一种抗原或表位的抗体。“双特异性”、“双重特异性”或“双功能”抗原结合多肽或抗体是包含两个不同抗原结合位点的杂合分子。双特异性抗原结合多肽和抗体是多特异性抗原结合多肽或多特异性抗体的实例，并且可以通过多种方法产生，该方法包括但不限于杂交瘤的融合或Fab’片段或半抗体的连接。参见，例如，Songsivilai and Lachmann,1990,Clin.Exp.Immunol.79:315-321;Kostelny et al.,1992,J.Immunol.148:1547-1553,Brinkmann和Kontermann.2017.MABS.9(2):182-212。例如，双特异性抗原结合多肽或抗体的两个结合位点将结合至两个不同的表位，这些表位可以位于相同或不同的蛋白质靶标上。

[0062] 术语“抗体模拟物(antibody mimetic、antibody mimic)”是指在结构上与抗体不相关但能够与抗原特异性结合的分子。抗体模拟物的实例包括但不限于adnectin(即基于纤连蛋白的结合分子)、affilin、affimer、affitiin、alphabody、亲和体、DARPins、anticalin、avimer、fynomer、Kunitz结合域肽、monobody、纳米CLAMP、纳米抗体、unibody、versabody、适体和肽分子，虽然它们模拟传统的抗体结合，但所有这些采用经由不同的机制生成并发挥作用的结合结构。使用术语“自体EV”以描述从待施用EV的受试者或患者的细胞中获得的EV群。

[0063] 如本文所用，术语“中枢神经系统”或“CNS”是指硬脑膜内的所有结构。此类结构包括但不限于脑和脊髓的细胞和组织。CNS还包括脑脊液，它充满脑室和脊髓的中央管。

[0064] 如本文所用，术语“有效量”或“治疗有效量”是指药剂，例如包含EV(例如外泌体)的组合物的量，其足以降低或改善病症或其一种或多种症状的严重性和/或持续时间、防止病症进展、引起病症消退、防止与病症相关的一种或多种症状的复发、发展、发作或进展，或增强或改善另一种疗法的预防性或治疗性效果。

[0065] 术语“胚胎干细胞”是指多能细胞，优选灵长类动物(包括人)的多能细胞，其从囊胚期胚胎中分离。

[0066] 本文使用的术语“细胞外囊泡”和“EV”是指由脂质双层，例如质膜的部分包围的约10nm至10μm尺寸的囊泡。EV可以含有来自细胞的流体、大分子、溶质和代谢物。术语“EV”还包括脂质囊泡，其经工程化改造以含有在细胞衍生的EV，诸如神经EV，中发现的生物活性分子。这些术语涵盖外泌体和核外颗粒体(ectosome)。可以使用分离技术的组合，例如离心、

过滤和超速离心方法从适当的生物来源获得EV。外泌体在多泡体(MVB)的胞吐作用中释放。核外颗粒体是在质膜处组装并从质膜释放的囊泡。在一些情况下,EV的尺寸为约20nm至10μm、20nm至1μm、20nm-500nm、20nm-200nm、30nm-100nm、30nm-160nm或80-160nm。在一些实施方案中,EV是尺寸为约20至150nm的外泌体。EV可以从哺乳动物的任何合适的生物样品中分离,该生物样品包括但不限于全血、血清、血浆、乳汁、脑脊液、羊水、腹水或骨髓。在一些实施方案中,EV可以从培养的哺乳动物细胞(例如未成熟树突细胞(野生型或永生化)、诱导和非诱导多能干细胞、成纤维细胞、血小板、免疫细胞、网织红细胞、肿瘤细胞、间充质干细胞、卫星细胞、造血干细胞、胰腺干细胞、白色和米色前脂肪细胞等)中分离。在示例性实施方案中,EV可以从神经细胞(例如,神经祖细胞、神经干细胞、神经胶质细胞、星形胶质细胞、神经元等)中分离。

[0067] 术语“人多能干细胞”,其中“人胚胎干细胞”(hESC)和人诱导多能干细胞(hiPSC)是子集,其衍生自受精后任何时间的前胚胎、胚胎、胎儿组织或成体干细胞(在人诱导多能干细胞的情况下),并具有能够在适当的条件下产生几种不同细胞类型的子代的特性,特别是包括神经元干细胞和祖细胞、神经嵴细胞、间充质干细胞(MSC)和相关的增殖性和非增殖性神经细胞。该术语包括已建立的各种干细胞系,和从原代组织获得的以所述方式具有多能性的细胞。

[0068] 如本文所用,“药学上可接受的”是指材料,诸如载体、赋形剂或稀释剂,其不消除化合物的生物活性或性质,并且是相对无毒的,即该材料可以施用于个体而不引起不期望的生物效应或以有害方式含有其的组合物的任何组分相互作用。在一些情况下,“药学上可接受的”载体或赋形剂是指适合用于与人类和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激性、过敏反应、免疫原性或相称的并发症,这与合理的收益/风险比相称。

[0069] 如本文所用,术语“接头”是指包含共价键或原子链的二价化学部分,其将抗体共价附接至EV以形成抗体-EV缀合物。在本公开的上下文中可以使用任何已知的肽或大分子缀合方法。通常,抗体和EV的共价附接要求接头具有两个反应性官能团,即反应性意义上的二价。用于附接两个或更多个功能性或生物学活性部分的二价接头试剂是已知的,并且用于此类缀合的方法已经描述于,例如Hermanson,G.T.(1996)Bioconjugate Techniques;Academic Press:New York,p234-242,其公开内容通过引用并入本文,因为它涉及适用于共价缀合的接头。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法利用“点击接头”,其由两个互补的点击官能团之间的反应生成。

[0070] 当术语“接头”用于描述缀合形式的接头时,因为接头和细胞外细胞膜结合部分之间和/或接头和定点修饰多肽之间的键的形成,一个或两个反应性端将不存在(已转化为化学部分)或不完整(诸如仅是羧酸的羰基)。因此,可用于本文的接头包括但不限于含有由接头上的反应性官能团与抗体上的亲核基团或其他反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分的接头,以及由接头上的反应性官能团和EV上的亲核基团之间的偶联反应形成的化学部分的接头。

[0071] 由这些偶联反应形成的化学部分的实例来自化学反应性官能团之间的反应,包括亲核体/亲电体对(例如,硫醇/卤代烷基对、胺/羰基对或硫醇/α,β-不饱和羰基对等)、二烯/亲二烯体对(例如,叠氮化物/炔烃对或二烯/α,β-不饱和羰基对等),以及等等。形成化学部分的反应性官能团之间的偶联反应包括但不限于硫醇烷基化、羟基烷基化、胺烷基化、

胺或羟胺缩合、肼形成、酰胺化、酯化、二硫化物形成、环加成(例如,[4+2]Diels-Alder环加成、[3+2]Huisgen环加成等)、亲核芳香族取代、亲电芳香族取代和本领域已知或本文描述的其他反应模式。合适的接头可以含有用于与抗体、EV或两者上的亲核官能团反应的亲电官能团。

[0072] 术语“神经细胞”是与一个或多个神经有关的细胞,神经是由神经元构成的索状纤维束。神经细胞通常衍生自神经祖细胞(NPC)。在一些实施方案中,神经细胞可以在体外衍生自神经祖细胞或多能干细胞。在示例性实施方案中,本文提及的神经细胞是人神经细胞。在一些实施方案中,神经细胞可以是神经元、神经胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞或小胶质细胞、施万细胞或胶质瘤细胞。在其他实施方案中,神经细胞可以是神经祖细胞或神经干细胞。术语“神经祖细胞”和“神经干细胞”是指具有分化成神经元和神经胶质细胞类型的限制性库的能力的多潜能细胞。在一些实施方案中,神经祖细胞可以在体外衍生自多能干细胞,例如诱导多能干细胞(iPS细胞)或胚胎干细胞(ES细胞)。在示例性实施方案中,本文提及的神经祖细胞是人神经祖细胞。在一些实施方案中,神经祖细胞可以是非转化的。在一些实施方案中,神经祖细胞是增殖性的。在一些实施方案中,神经祖细胞维持表型而不分化。

[0073] 术语“神经EV”用于指衍生自神经细胞,例如神经祖细胞的细胞衍生EV。该术语还指经工程化改造以含有足够数量的在细胞衍生的神经EV中发现的生物活性分子以具有基本相同的生物活性的囊泡。

[0074] 本文所述的“神经血管修复”是指脑神经血管损伤后发生的恢复。神经血管损伤是指供应脑、脑干和上脊髓的主要血管,包括椎动脉、基底动脉和颈动脉,受损。这些血管位于颅外和颅内,损伤可能发生在这些位置的一个或两个处。在一种情况下,当神经生成和血管生成和/或神经胶质细胞募集增加以清除出血并创造愈合环境时,发生神经血管修复。星形胶质细胞、周细胞、基质蛋白酶和血管平滑肌细胞也在神经血管修复中发挥重要作用。

[0075] 如本文所用,术语“样品”是指取自受试者的标本(例如,细胞(例如,神经细胞)、组织、血液、血液组分(例如,血清或血浆)、尿液、唾液、羊水、脑脊液、胰液、绒毛膜绒毛样品和骨髓)。

[0076] 如本文所用,术语“受试者”是指作为施用或治疗靶标的任何生物体。“受试者”可以是生物体,例如哺乳动物(例如人、非人哺乳动物、非人灵长类动物、灵长类动物、实验室动物、小鼠、大鼠、仓鼠、猫,或犬)。在一个实施方案中,受试者是人受试者。术语“患者”是指正在接受临床医生,例如医师,治疗的人受试者。受试者可以是男性或女性。

[0077] 术语“治疗(treat、treatment)”是指受试者的医学管理,旨在改善、改进、稳定(即不恶化)、预防或治愈疾病、病理状况或病症。该术语包括积极治疗(针对改进疾病、病理状况或病症的治疗)、因果治疗(针对相关疾病、病理状况或病症的原因的治疗)、姑息治疗(针对缓解症状的治疗))、预防性治疗(针对最小化或部分或完全抑制相关疾病、病理状况或病症发展的治疗);和支持性治疗(以补充另一种疗法而采用的治疗)。治疗还包括降低疾病或病症的程度;防止疾病或病症的传播;延迟或减缓疾病或病症的进展;疾病或病症的改进或缓和;和缓解(无论是部分的还是全部的),无论是可检测的还是不可检测的。“改进”或“缓和”疾病或病症是指与在没有治疗的情况下的程度或时间进程相比,疾病、病症或状况的程度和/或不期望临床表现减轻,和/或进展的时间进程减慢或延长。治疗不需要症状或疾病

的完全改进并且涵盖减轻症状和/或潜在风险因素的实施方案。“治疗”还可以意指与未接受治疗的预期生存相比延长生存。需要治疗的人包括已经患有状况或病症的人，以及容易患有状况或病症的人或待预防状况或病症的人。术语“预防”并不要求100％消除事件发生的可能性。相反，它表示在化合物或方法存在的情况下，事件发生的可能性已降低。

[0078] 根据本发明，可以采用常规的细胞培养方法、化学合成方法以及本领域技术范围内的其他生物和药物技术。此类技术是众所周知的并且在文献中另有充分解释。用于涉及DNA连接酶、DNA聚合酶、限制性内切核酸酶等的酶促反应的培养细胞、分离细胞以及在相关情况下的克隆、DNA分离、扩增和纯化的标准技术，以及各种分离技术是本领域技术人员已知并且通常采用的。Sambrook et al.,1989Molecular Cloning,Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory,Plainview,New York;Maniatis et al.,1982Molecular Cloning,Cold Spring Harbor Laboratory,Plainview,New York;Wu(Ed.)1993Meth.Enzymol.218,Part I;Wu(Ed.)1979Meth.Enzymol.68;Wu et al.,(Eds.)1983Meth.Enzymol.100and 101;Grossman and Moldave(Eds.)1980Meth.Enzymol.65;Miller(Ed.)1972Experiments in Molecular Genetics,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,New York;Old and Primrose,1981Principles of Gene Manipulation,University of California Press,Berkeley;Schleif and Wensink,1982Practical Methods in Molecular Biology;Glover(Ed.)1985DNA Cloning Vol.I and II,IRL Press,Oxford,UK;Hames and Higgins(Eds.)1985Nucleic Acid Hybridization,IRL Press,Oxford,UK;和Setlow and Hollaender 1979Genetic Engineering:Principles and Methods,Vols.1-4,Plenum Press,New York中描述了许多标准技术。认为采用的缩写词和命名法是该领域的标准，并且通常用于专业期刊，诸如本文引用的那些。

[0079] 在提供数值范围的情况下，应理解为每个中间值至下限单位的十分之一，除非上下文另有明确规定(诸如在含有多个碳原子的基团的情况下，在此类情况下提供了落入该范围内的每个碳原子数)，在该范围的上限和下限之间的中间值，以及在该规定范围内的任何其他规定或中间值都涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内，也涵盖在本发明内，但受制于规定范围内任何具体排除的限制。在规定范围包括一个或两个限制的情况下，排除那些包括的限制中的任一个的范围也包括在本发明中。

[0080] 除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管与本文所述的那些相似或等同的任何方法和材料也可以用于本发明的实践或测试，但是现在描述优选的方法和材料。

[0081] 应注意，如本文和所附权利要求中使用的，单数形式“一(a)”、“和”以及“该(the)”包括复数引用，除非上下文另有明确规定。

[0082] B.细胞外囊泡(EV)和治疗性蛋白的递送

[0083] 本发明针对通过施用与神经细胞外囊泡(EV)，诸如例如衍生自神经细胞的外泌体和/或微泡的表面缀合的多肽，将治疗性多肽(诸如抗体)递送至受试者的中枢神经系统，例如穿过受试者的血脑屏障的方法。进一步提供了在与神经性病症和损伤，包括但不限于阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、痴呆、神经系统癌症，例如胶质母细胞瘤，或已转移至中枢神经系统的癌症的治疗相关的各种应用中使用多肽-EV缀合物，例如抗体(Ab)-EV缀合物

的方法。此外，本文提供了包含偶联至抗体或其抗原结合片段的神经EV的缀合物及其使用方法。

[0084] 本发明还涉及通过施用加载在神经细胞外囊泡(EV)，例如衍生自神经细胞的外泌体和/或微泡的腔内的多肽，将治疗性多肽，诸如抗体，递送至受试者的中枢神经系统，例如穿过受试者的血脑屏障的方法。进一步提供了在与神经性病症和损伤，包括但不限于阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、痴呆、神经系统癌症，例如胶质母细胞瘤，或已转移至中枢神经系统的癌症的治疗相关的各种应用中使用腔负载EV的方法。

[0085] 细胞外囊泡包含由脂质双层包围的一组异质性小结构，例如细胞质膜的部分。EV的尺寸范围可以从直径约10nm到10μm，并且最常见落在约25-500nm的范围。EV可以大致分为两类别，外泌体和核外颗粒体。在多泡体(MVB)成熟过程中，细胞可以通过内体膜的向内出芽形成外泌体。然后可以通过MVB与细胞表面的融合将外泌体释放到细胞外空间。外泌体的直径通常为25-500nm，并且在一些实施方案中可以在约25-250nm、约50-150nm或约50-200nm的范围内。核外颗粒体，也称为微泡，可以由细胞通过质膜出芽形成。核外颗粒体的尺寸可以从约10nm到10μm变化，并且在一些实施方案中可以在约10-1000nm或约50-500nm的范围内。

[0086] 适用于本发明的缀合物和方法的EV可以衍生自任何合适的来源。例如，EV可以衍生自神经细胞，诸如神经干细胞、神经祖细胞，或分化的神经细胞，诸如神经元、神经胶质细胞或星形胶质细胞。适用于本文所述方法的EV也可以合成产生。在示例性实施方案中，本文所述的抗体缀合物中使用的EV衍生自神经祖细胞或神经干细胞。

[0087] EV参与细胞间通讯，允许通过与细胞膜的融合或经由细胞摄取将材料从EV转移到细胞，包括但不限于小窝蛋白(calveolin)非依赖性和依赖性机制、网格蛋白非依赖性和依赖性机制、巨胞饮作用和/或吞噬作用。据报道，EV参与许多生理过程，包括免疫调节、血管生成、与肿瘤生长相关的内皮细胞迁移，或减少缺血再灌注损伤中的损害。许多这些功能由含有在囊泡内或囊泡上的蛋白质、核酸或脂质介导。

[0088] EV可以在腔中携带货物，并嵌入或附接至脂质双层。该货物可以包括蛋白质、脂质和/或核酸，例如，mRNA或miRNA。在EV由细胞产生的情况下，货物的组成高度依赖于细胞类型。例如，已经显示衍生自星形胶质细胞、神经祖细胞和间充质干细胞的EV各自含有不同的蛋白质货物补体(参见美国专利申请公开号US2018/0327714A1，其全部内容通过引用并入本文)。衍生自这些不同细胞类型的EV还含有独特的核酸分子谱，其包括mRNA和/或miRNA。在从细胞中获得EV的实施方案中，EV含有内源性货物，其反映了由衍生EV的细胞产生的EV的含量。在一些实施方案中，从细胞获得的EV也可以含有外源性货物。外源性货物包括蛋白质、核酸、小分子或脂质，它们在释放到细胞外空间后通过操纵囊泡而被引入EV。在其他实施方案中，从细胞获得的EV可以含有外源性货物，由于衍生EV的细胞中存在重组核酸，包装外源性货物到EV中。例如，含有重组蛋白的EV可以衍生自含有编码该蛋白的重组核酸的细胞。在合成产生EV的实施方案中，可以选择合适的货物以包含在囊泡中。例如，在一个实施方案中，合成的EV可以含有一种或多种蛋白质、脂质或核酸，这些蛋白质、脂质或核酸存在于衍生自神经细胞，例如，神经祖细胞、神经元、神经胶质细胞或星形胶质细胞的EV中。

[0089] 衍生自细胞的EV，例如外泌体，包含多种反映其细胞起源的生物分子。在一个实施方案中，本发明提供了衍生自神经细胞，例如神经祖细胞的EV群。此类神经EV含有衍生自神

经细胞的不同蛋白质环境，该蛋白质包括细胞因子和生长因子，以及编码和非编码RNA分子。神经EV中所含的货物可以通过提供神经保护、减少炎症、经由作用于T细胞、巨噬细胞和小胶质细胞的免疫调控、减少氧化应激、改善血管完整性、影响代谢活动以及经由增加神经生成、细胞迁移、髓鞘再生和分化诱导神经再生效应来影响神经和血管功能。不希望受理论束缚，认为在衍生自神经细胞(例如，神经祖细胞、神经干细胞)的EV表面上表达的天然蛋白质的组合允许囊泡定位于CNS，且比衍生自其他来源的EV更大程度上并穿过血脑屏障。如本文所示，用抗体对EV进行表面标记不阻碍靶向CNS和/或穿过血脑屏障的能力。此外，包含衍生自神经细胞(例如，神经祖细胞、神经干细胞)的EV的EV-抗体缀合物能够将功能完整的抗体及其抗原结合片段转运穿过血脑屏障，用以递送至脑和中枢神经系统中的靶标。

[0090] 在一些实施方案中，神经细胞衍生的EV，例如，外泌体，可以含有膜蛋白，该膜蛋白包括但不限于CD63、CD81和CD133。因此，在一个实施方案中，适用于本文所述的缀合物和方法的EV，例如外泌体包含以下细胞表面蛋白中的一种或多种(即，一种或多种、两种或更多种或全部三种)：CD63、CD81和CD133。此外，EV，例如，外泌体，可以包含以下miRNA中的一种或多种(即，一种或多种、两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种、十种或更多种、十一种或更多种或全部十二种)：hsa-miR-135a-2、hsa-miR-124-1、hsa-miR-124-2、hsa-miR-124-3、hsa-miR-489、hsa-miR-9-3、hsa-miR-9-2、hsa-miR-9-1、hsa-miR-219b、hsa-miR-219a-2、hsa-miR-363和/或hsa-miR-20b。在一个实施方案中，分离的EV群富含前述miRNA的一种或多种。可以以绝对量或相对量测量富集，诸如与衍生自非神经细胞(例如间充质干细胞)的未修饰外泌体相比时。

[0091] (i)EV产生

[0092] 适用于本文公开的缀合物和方法的EV可以由多种细胞类型产生，或可以合成产生。在一个实施方案中，EV可以衍生自神经细胞，诸如神经祖细胞、神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞、施万细胞或胶质瘤细胞。在一些实施方案中，EV可以由转化细胞系产生。在其他实施方案中，EV可以由非转化细胞产生。在一些实施方案中，EV可以通过工程化改造细胞系产生，例如重组细胞系，其表达外源性多肽和/或核酸。在其他实施方案中，多肽-EV缀合物可以使用来自其他来源的EV产生，例如，衍生自细胞类型包括但不限于血小板、网织红细胞、免疫细胞、肠上皮细胞、肿瘤细胞、HELA细胞、间充质干细胞、人胚胎肾细胞(HEK细胞)和所有类型的原代细胞的EV。在其他实施方案中，EV可以从体液，例如乳、初乳等中分离。

[0093] 在一个实施方案中，EV可以包含外泌体或基本上由外泌体组成。外泌体可以衍生自任何前述细胞类型。例如，适用于本文公开的缀合物和方法的外泌体可以是神经外泌体。神经外泌体可以衍生自神经细胞，该神经细胞包括但不限于神经祖细胞、神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞、施万细胞或胶质瘤细胞。在另一个实施方案中，外泌体是合成产生的。

[0094] 在另一个实施方案中，EV可以包括核外颗粒体，也称为微泡或基本上由其组成。微泡可以衍生自任何前述细胞类型。例如，适用于本文公开的缀合物和方法的微泡可以是神经微泡。神经微泡可以衍生自神经细胞，包括但不限于神经祖细胞、神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞、施万细胞或胶质瘤细胞。在另一个实施方案中，微泡是合成产

生的。

[0095] 在一些情况下,所公开的EV可以通过培养细胞,诸如神经细胞,持续足以使细胞产生EV的时间来获得。在一些实施方案中,用于产生EV的细胞可以从多能干细胞,例如人胚胎干细胞(hESC)或诱导多能干细胞(iPSC)获得。

[0096] 在一些实施方案中,EV分离自神经细胞,例如神经祖细胞,其已从多能干细胞分化。多能干细胞可以表达一种或多种阶段特异性胚胎抗原(SSEA)3和4,以及使用称为Tra-1-60和Tra-1-81的抗体可检测的标志物(Thomson et al.,Science 282:1145,1998)。多能干细胞的体外分化导致SSEA-4、Tra-1-60和Tra-1-81表达(如果存在)的丧失和SSEA-1的表达增加。未分化的多能干细胞通常具有碱性磷酸酶活性,其可以通过用4%多聚甲醛固定细胞,然后用Vector Red作为底物进行显影来检测,如制造商(Vector Laboratories,Burlingame Calif)所述。如通过抗体或RT-PCR所检测的,未分化的多能干细胞通常还表达Oct-4和TERT。在一个实施方案中,用于本文所述缀合物的EV可以由衍生自人ES细胞的神经祖细胞产生。在另一个实施方案中,用于本文所述缀合物的EV可以由衍生自人iPS细胞的神经祖细胞产生。

[0097] 可以使用的多能干细胞的类型包括已建立的多能细胞系,其衍生自受精后形成的组织,包括在妊娠期间的任何时间采集的胚胎前组织(诸如例如,胚泡)、胚胎组织或胎儿组织,通常但不一定在妊娠大约10-12周之前。非限制性实例是已建立的人胚胎干细胞或人胚胎生殖细胞的伦理系,诸如,例如人胚胎干细胞系WA01、WA07和WA09(WiCell)。还考虑了在此类细胞的初始建立或稳定期间使用本公开的组合物,在这种情况下,源细胞将是直接取自源组织的原代多能细胞。还合适的是取自已经在不存在饲养细胞的情况下培养的多能干细胞群的细胞。同样合适的是突变人胚胎干细胞系,诸如例如BG01v(ViaCyte,San Diego,CA),以及正常人胚胎干细胞系WA01、WA07、WA09(WiCell,Madison,WI)和BG01、BG02(ViaCyte,San Diego,CA)。

[0098] 人胚胎干细胞(hESC)可以通过本领域中描述的方法制备,例如由Thomson et al.(美国专利号5,843,780;Science 282:1145,1998;Curr.Top.Dev.Biol.38:133ff.,1998;Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.92:7844,1995)描述的方法。或者,它们可以商业获得。

[0099] iPSC是通过将成体体细胞去分化回多能状态而制成的。iPSC可以通过任何合适的方法生成,其包括但不限于通过人工表达四种基因(c-myc、Klf4、SOX2、OCT4)或类似的方法。

[0100] 从人胚胎干细胞(ESC)产生人神经祖(hNP)细胞的方法描述于例如美国专利号7,531,354,其全部内容通过引用并入本文。已知人神经祖细胞(hNP)表达与最早的多潜能神经干细胞相关的标志物,其包括巢蛋白、Musashi-1、SOX1、SOX2和SOX3。在一种情况下,hNP表达SOX1(SOX1+)。在另一种情况下,hNP表达SOX2(SOX2+)。在其他一些情况下,hNP表达SOX3(SOX3+)。在一些特定情况下,hNP表达巢蛋白、Musashi-1、SOX1、SOX2和SOX3中的至少一个。在其他情况下,hNP表达巢蛋白、Musashi-1、SOX1、SOX2和SOX3中的两个或更多个。在又一种情况下,hNP表达巢蛋白、Musashi-1、SOX1、SOX2和SOX3中的三个或更多个。在一些情况下,hNP表达巢蛋白、Musashi-1、SOX1、SOX2和SOX3中的至少一个,但不表达OCT4。在一些其他情况下,hNP表达巢蛋白、Musashi-1、SOX1、SOX2和SOX3中的至少两个,但不表达OCT4。在又一种情况下,hNP表达巢蛋白、Musashi-1、SOX1、SOX2和SOX3中的至少三个,但不表达

OCT4。在特定情况下，hNP表达SOX1、SOX2和SOX3，但不表达OCT4。可以在有或没有饲养细胞的情况下培养神经祖细胞。在一些情况下，根据美国专利号7,531,354，不含饲养细胞，也不含胚状体。

[0101] 在一些情况下，所公开的EV可以通过在细胞培养基中在足以产生EV的条件和时间下培养直接或间接衍生自多能干细胞的分化的神经细胞，诸如神经胶质细胞，并从培养物中分离所述EV来获得。神经胶质细胞的类型包括少突胶质细胞、星形胶质细胞、室管膜细胞、施万细胞、小胶质细胞和卫星细胞。在一种情况下，分化的神经细胞(例如，神经胶质细胞)包含星形胶质细胞。可以使用的分化神经细胞包括hN2™神经元细胞(ArunA Biomedical Inc.)、NeuroNet™神经元和AstroPro™星形胶质细胞(ArunA Biomedical Inc.)。

[0102] EV可以从细胞培养基或组织培养上清液中分离出来。由细胞产生的EV可以通过任何合适的方法从培养基中收集。通常，可以通过离心、尺寸排阻柱、微流体装置、聚合物沉淀、过滤或这些方法的组合从细胞培养物或组织上清液中制备分离的EV群。例如，可以如美国专利申请号20140356382中所述制备EV，其通过引用整体并入本文。例如，可以通过以下方法制备EV：差速离心，即低速(<2,0000g)离心以沉淀较大的颗粒，然后高速(>100,000g)离心以沉淀EV，使用适当的过滤器(例如，0.22μm过滤器)进行尺寸过滤、梯度超速离心(例如，用蔗糖梯度)或这些方法的组合。

[0103] 在一些实施方案中，本文公开的产生EV的NP细胞和/或神经细胞培养约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天或长达约1、2、3、4、5、6、7、8周或约1、2、3、4、5或6个月，这取决于细胞及其产生EV的能力。可以在合适的培养基中培养产生EV的细胞并在本领域普通技术人员容易确定的条件下生长。细胞培养条件可以随细胞类型而变化，下文给出的实施例阐释了合适的培养基和条件。例如，可以使用具有外泌体耗尽的胎牛血清(例如，10％)并任选地补充有谷氨酰胺或含谷氨酰胺的混合物和抗生素的CMRL 1066培养基(来自Invitrogen)。在一些实施方案中，细胞可以黏附在表面上生长，例如它们可以在表面上生长为单层到多层(无饲养细胞)，并且可以生长到30、40、50、60、70、80、90、95或100％汇合。在其他实施方案中，细胞可以作为细胞聚集体生长或在悬浮培养的微珠上生长。

[0104] 细胞生长培养基是本领域熟知的并且包含至少最低必需培养基加一种或多种任选组分，诸如生长因子、抗坏血酸、葡萄糖、非必需氨基酸、盐(包括微量元素)、谷氨酰胺、胰岛素(在指明且未排除的情况下)、激活素A、转铁蛋白、β巯基乙醇，以及本领域熟知的和如本文另外描述的其他试剂。优选的培养基是支持神经细胞的低蛋白、基于无血清的生长培养基。使用的生长因子可以是成纤维细胞生长因子2(FGF2)，单独或优选与白血病抑制因子(LIF)组合。根据待在生长培养基中生长的NP或神经细胞，优选包括LIF，但可能不需要。额外培养基包括基础细胞培养基，其可易含有血清，例如，约0.1％至20％(优选约2-10％)的胎牛血清，或对于确定的培养基，不存在胎牛血清和KSR，并且任选地包括牛血清白蛋白(约1-5％，优选约2％)。在一些情况下，培养基是确定的，无血清且具有低蛋白质含量。在其他情况下，培养基是来自ArunA的培养基和补充剂，它允许神经培养物在多次传代中保持稳定的核型，而不需要饲养细胞，这使其成为包括早期药物发现在内的各种研究应用的绝佳选择。生长培养基的组分取决于待生长的神经细胞的类型，所有这些都是本领域众所周知的。在一种情况下，使用AB2™神经细胞培养基试剂盒并且它含有AB2™基础神经培养基和ANS™神经培养基补充剂。在特定情况下，上述情况中描述的培养基和补充剂经过特异性工程化

改造,以具有多功能性来满足所有神经细胞培养需求。AB2™基础神经培养基和ANS™神经培养基补充剂可以用作专门培养基的基础,以指导hNP1™系分化为各种神经表型。通过测试细胞生长、无菌性、pH、同渗容摩和内毒素,对每批培养基和补充剂进行资格预审。

[0105] 取决于培养基中生长的细胞类型,任选地可以添加到培养基中的其他试剂包括,例如,任何一种或多种烟酰胺、TGF-β家族成员,包括TGF-β1、2和3、激活素A、nodal、骨形态发生蛋白(BMP2至7)、血清白蛋白、成纤维细胞生长因子(FGF)家族成员、血小板衍生生长因子-AA和-BB、富含血小板的血浆、胰岛素生长因子(IGF)-I、II、LR-IGF)、生长分化因子(GDF-5、-6、-8、-10、11)、胰高血糖素样肽-I和II(GLP-I和II)、GLP-1和GLP-2模仿体(mimetobody)、唾液素-4(Exendin-4)、甲状旁腺激素、胰岛素、黄体酮、抑肽酶、氢化可的松、乙醇胺、表皮生长因子(EGF)、胃泌素I和II、铜螯合剂,诸如,例如三乙烯五胺、毛喉素、丁酸-Na、乙胞素、ITS、头蛋白、神经突生长因子、nodal、丙戊酸、曲古抑菌素A、丁酸钠、肝细胞生长因子(HGF)、鞘氨醇-1、VEGF、MG132(EMD、CA)、N2和B27补充剂(Gibco,CA)、类固醇生物碱,诸如,例如环巴胺(EMD、CA)、角质形成细胞生长因子(KGF)、Dickkopf蛋白家族、牛垂体提取物、胰岛新生相关蛋白(INGAP)、印猬因子(Indian hedgehog)、音猬因子(sonic hedgehog)、蛋白酶体抑制剂、notch途径抑制剂、音猬因子抑制剂、heregulin或其组合,以及许多其他组分。这些组分中的每一种,当包括在内时,均以有效量包括在内。

[0106] 在一些情况下,合适的培养基可以由以下组分做出,诸如,例如,Dulbecco氏改良Eagle氏培养基(DMEM),Gibco#11965-092;敲除Dulbecco氏改良Eagle氏培养基(KO DMEM,Gibco#10829-018;Ham氏F12/50%DMEM基础培养基;200mML-谷氨酰胺,Gibco#15039-027;非必需氨基酸溶液,Gibco11140-050;β-巯基乙醇,Sigma#M7522;人重组碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),Gibco#13256-029。其他合适的试剂可以包括Neurobasal(Gibco)、BrainPhys(Stem Cell Technologies)和/或NeuroDiff(Stem Cell Technologies)。

[0107] 细胞培养基是市售的并且可以补充有市售的组分,其包括确定的无异种组分,诸如从nvitrogen Corp.(GIBCO)、Cell Applications,Inc.、Biological Industries、Beth HaEmek、Israel和Calbiochem可获得的那些。本领域普通技术人员将能够容易地改良细胞培养基以产生根据本发明的靶细胞的任何一种或多种。

[0108] 可以在以各种方式支持细胞的饲养细胞层上培养所公开的产生EV的细胞。在饲养细胞层上培养细胞的方法是本领域熟知的。细胞可以在细胞支持物或基质上生长为黏附的单层,或悬浮的细胞聚集体。在一些情况下,可能优选使用细胞支持物,这取决于用于产生EV的细胞。当使用时,细胞支持物优选包含至少一种底物蛋白。底物蛋白包括例如细胞外基质蛋白,其是在细胞外基质中发现的蛋白质,例如层粘连蛋白、腱生蛋白、血小板反应蛋白及其混合物,其表现出生长促进并含有与表皮生长因子(EGF)同源的结构域并表现出促进生长的活性。可以使用的其他底物蛋白包括例如胶原蛋白、纤连蛋白、vibronectin、聚赖氨酸、聚鸟氨酸及其混合物。此外,还可以使用凝胶和其他材料,诸如含有有效浓度的一种或多种这些胚胎干细胞分化蛋白的其他凝胶的甲基纤维素。示例性分化蛋白或包括这些分化蛋白的材料包括,例如重组层粘连蛋白、BD Cell-Tak™细胞和组织粘合剂、BD™ FIBROGEN人重组胶原蛋白I、BD™ FIBROGEN人重组胶原蛋白III、BD Matrigel™基底膜基质、BD Matrigel™基底膜基质高浓度(HC)、BD™ PuraMatrix™肽水凝胶、胶原蛋白I、胶原蛋白I高浓度(HC)、胶原蛋白II(牛)、胶原蛋白III、胶原蛋白IV、胶原蛋白V和胶原蛋白VI等。

[0109] 或者,这些细胞可以在无饲养细胞或基本上无饲养细胞的培养系统中培养,但仍支持细胞增殖以产生EV。可以使用用另一种细胞类型培养条件化的培养基来支持无饲养物培养中细胞的生长。或者,可以使用化学确定的培养基支持在无饲养物培养中产生EV细胞的生长而不分化。这些方法在本领域中是众所周知的。在本发明的某些实施方案中,细胞在无饲养细胞培养基中生长。

[0110] 可以在不同的时间间隔(例如,约1、2、4、6、8或3、6、9、12天或更长间隔,取决于EV的产生速率)收获EV。EV的示例性产率的范围可以为1ng EV/100万个细胞、至少约10ng EV/100万个细胞、至少约50ng EV/100万个细胞、至少约100ng EV/100万个细胞、至少约500ng EV/100万个细胞、至少约750ng EV/100万个细胞、至少约800ng EV/100万个细胞、至少约900ng EV/100万个细胞、至少约1.0μg EV/100万个细胞、至少约1.5μg EV/100万个细胞、至少约2.0μg EV/100万个细胞、至少约2.5μg EV/100万个细胞,至少,例如约3.0μg EV/100万个细胞、至少约5.0μg EV/100万个细胞,和至少约10.0μg EV/100万个细胞,在如本文另外描述的增殖和非增殖神经细胞培养约24小时至7天的时间段内。

[0111] 在许多情况下,通过超速离心或差速离心或其任何组合来收获和收集EV,收集沉淀的EV,并且任选地,用合适的介质清洗所收集的沉淀的EV。例如,可以通过离心、过滤或这些方法的组合从细胞培养物或组织上清液中制备EV的制剂。在一些实施方案中,可以通过以下方法制备EV:差速离心,即低速(<2,0000g)离心以沉淀较大颗粒,然后高速(>100,000g)离心以沉淀EV、使用适当的过滤器(例如,0.22μm过滤器)进行尺寸过滤、梯度超速离心(例如,使用蔗糖梯度)或这些方法的组合。可以通过差速离心、微滤和超滤、聚合沉淀、微流体分离、免疫捕获和尺寸排阻色谱法纯化EV。Théry,et al.,Current Protocols in Cell Biology,(2006)3.221-3.22.29,copyright 2006by John Wiley&Sons,Inc.;Sokolova,et al.,Colloids and Surfaces B:Biointerfaces,2011,87,146-150;Wiklander,et al.,Journal of Extracellular Vesicles,2015,4,26316,pp.1-13;和Böing,et al.,Journal of Extracellular Vesicles,2014,3,23430,pp.1-11描述了用于分离和纯化EV的这些和/或相关方法。可以开发其他分离方法,诸如电场射频和声学。

[0112] 制造合成囊泡,诸如合成外泌体,的方法是本领域已知的。可以使用此类方法以产生适用于本文提供的组合物和方法的合成囊泡。值得注意的是,EV的内容物,即去除或消除脂质双层获得内容物的EV,也可以用于工程化改造人工EV。

[0113] (ii)多肽-EV缀合物

[0114] 在一个方面,本发明提供了包含多肽-EV缀合物的组合物,所述多肽-EV缀合物包含衍生自神经细胞(例如,神经祖细胞或神经干细胞)的细胞外囊泡,其中所述多肽使用点击化学缀合至囊泡表面。在一些实施方案中,多肽是抗体或其抗原结合部分(本文称为“抗体-EV(Ab-EV)缀合物”)。多肽-EV缀合物(例如,Ab-EV缀合物)可以包含衍生自神经细胞(例如,神经祖细胞或神经干细胞)的细胞外囊泡,其在囊泡表面上与多肽(例如,抗体或其抗原结合部分)缀合。可以使用点击化学将多肽(例如抗体)缀合至囊泡表面。在此类实施方案中,多肽(例如,抗体)可以通过由两个互补点击化学官能团之间的反应产生的接头与囊泡偶联。下文提供了多肽-EV缀合物的其他特征。

[0115] 为了制备本文提供的多肽-EV(例如Ab-EV)缀合物,可以使用多种缀合方法将抗体或其抗原结合部分缀合至EV。

[0116] 在一些实施方案中，与EV偶联的多肽是抗体或其抗原结合部分。抗体可以是例如单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、纳米抗体、monobody和表现出期望抗原结合活性的抗体片段。抗体或其抗原结合部分的形式可以是全长(完整)抗体、双特异性抗体、双可变域抗体、多链或单链抗体、和/或其抗原结合片段，包括但不限于Fab、Fab'、(Fab')2、Fv、scFv(单链Fv)、替代抗体(surrobody)(包括替代轻链构建体)、单域抗体、骆驼化抗体等。它们也可以是或衍生自任何同种型，包括例如IgA(例如IgA1或IgA2)、IgD、IgE、IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)，或IgM。在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分是人源化抗体或其抗原结合部分。在其他实施方案中，抗体或其抗原结合部分是完全人抗体或其抗原结合部分。

[0117] 在一些实施方案中，抗体模拟物与本文提供的EV偶联。抗体模拟物的实例包括但不限于adnectin(即基于纤连蛋白的结合分子)、affilin、affimer、affitiin、alphabody、亲和体、DARPins、anticalin、avimer、fynomer、Kunitz域肽、monobody、纳米CLAMP、纳米抗体、unibody、versabody、适体和肽分子，虽然它们模拟传统的抗体结合，但所有这些采用通过不同的机制生成并发挥作用的结合结构。

[0118] 可以使用“点击化学”将多肽(例如，抗体或其抗原结合部分)缀合至EV的表面(参见，例如，Kolb,H.C.;Finn,M.G.;Sharpless,K.B.Angewandte Chemie,International Edition 2001,40,2004-2021;Kolb,H.C.;Sharpless,K.B.Drug Discovery Today 2003,8,1128-1137;其公开内容通过引用其整体并入本文)。可以使用任何合适的点击反应以将多肽连接到EV表面。点击化学反应是有利的，因为它们通常快速、模块化、高效，通常不会产生有毒废物，可以用水作为溶剂进行，并且可以设置为立体特异性的。

[0119] 本文所述的术语“点击官能团”可与术语“点击化学试剂”或“点击试剂”互换使用，指的是在水溶液中的温和条件下，可以快速和选择性地与其对应的点击试剂反应(“点击”，例如通过环加成反应)的试剂。温和条件包括中性pH值、水溶液和环境温度，低反应物浓度。点击官能团的实例包括叠氮化物、烯烃、炔烃、二苯并环辛炔(DBCO)、反式环辛烯、硝酮、腈亚胺、氧化腈、异腈、四唑和四嗪基团。示例性的点击反应包括但不限于Cu-叠氮化物-炔烃、张力促进的叠氮-炔烃、施陶丁格连接、四嗪连接、光诱导的四唑-烯烃、硫醇-烯、NHS酯、环氧化物、异氰酸酯和醛-氨基氧基。在一些实施方案中，将抗体或其抗原结合部分与EV偶联的接头由两个互补点击官能团之间的反应生成(“点击接头”)。

[0120] 在一个实施方案中，本文中的多肽(例如，抗体或其抗原结合部分)或多肽-EV缀合物的EV包括点击官能团，其是点击官能团不饱和基团。实例是亲偶极体(dipolarophile)，诸如烯烃和炔烃，以及包含相关杂原子官能团的分子，例如碳酰和腈。可以用作点击官能不饱和基团的反应物的其他点击官能团是二烯，诸如四嗪和四唑。

[0121] 在另一个实施方案中，本文的多肽(例如，抗体或其抗原结合部分)或多肽-EV缀合物的EV可以包含点击官能偶极基团。点击官能偶极基团被理解为包含一个或多个杂原子并且具有至少一种代表带电偶极体的内消旋结构的那些化合物。点击官能偶极基团的实例是线性1,3-偶极基团，例如叠氮化物、腈氧化物、重氮烷、腈亚胺和硝酮。

[0122] 在某些实施方案中，通过使包含第一点击官能团的抗体或其抗原结合部分与包含已知经历点击化学反应的第二点击官能团的EV反应来制备EV-Ab缀合物。可以用于使抗体或其抗原结合部分能够和EV缀合的互补官能团对的非限制性实例示于表1中。

[0123] 表1.用于形成Ab-EV缀合物的互补点击官能团对的示例

缀合反应	EV 官能团	抗体官能团
铜(I)催化的叠氮化物-炔烃环加成	叠氮化物	炔烃
	炔烃	叠氮化物
张力促进的叠氮化物-炔烃环加成	叠氮化物(张力促进)	炔烃
	炔烃	叠氮化物(张力促进)
张力促进的炔烃-硝酮环加成	炔烃(张力促进)	硝酮
	硝酮	炔烃(张力促进)
烯烃和叠氮化物[3+2]环加成	烯烃	叠氮化物
	叠氮化物	烯烃
烯烃和四嗪逆需求Diels-Alder	烯烃	四嗪
	四嗪	烯烃
烯烃和四唑光点击	烯烃	四唑
	四唑	烯烃

[0124]

[0125] 本领域技术人员熟知的其他示例性点击试剂对包括但不限于叠氮化物和二苯并环辛烯烃(DBCO,也称为DIBO)、四嗪和反式环辛烯,以及四嗪和降冰片烯。

[0126] 在一个示例性实施方案中,用叠氮化物标记的EV可以与用DBCO标记的抗体或其抗原结合部分偶联。在另一个实施方案中,用DBCO标记的EV可以与用叠氮化物标记的抗体或其抗原结合部分偶联。在此类实施方案中,抗体或其抗原结合部分通过叠氮化物和DBCO的反应形成的点击接头与EV缀合。

[0127] 在另一个示例性实施方案中,用四嗪标记的EV可以与用反式环辛烯标记的抗体或其抗原结合部分偶联。在另一个实施方案中,用反式环辛烯标记的EV可以与用四嗪标记的抗体或其抗原结合部分偶联。在此类实施方案中,抗体或其抗原结合部分通过由四嗪和反式环辛烯的反应形成的点击接头与EV缀合。

[0128] 在另一个示例性实施方案中,用四嗪标记的EV可以与用降冰片烯标记的抗体或其抗原结合部分偶联。在另一个实施方案中,用降冰片烯标记的EV可以与用四嗪标记的抗体或其抗原结合部分偶联。在此类实施方案中,抗体或其抗原结合部分通过由四嗪和降冰片烯的反应形成的点击接头与EV缀合。

[0129] 可以用于将抗体与本文提供的EV缀合的示例性反应包括叠氮化物和炔烃的铜催化反应以形成三唑(Huisgen 1,3-偶极环加成)、二烯和亲二烯体的反应(Diels-Alder)、张力促进的叠氮化物-炔烃环加成、张力促进的炔烃-硝酮环加成、应变烯烃与叠氮化物、四嗪或四唑的反应、烯烃和叠氮化物[3+2]环加成、烯烃和四嗪逆需求Diels-Alder、或烯烃和四唑的光反应。在一些实施方案中,反应可以在水性环境中进行。在某些实施方案中,反应是铜催化的或钌催化的反应(例如,以引发叠氮化物和炔烃之间的反应,例如在叠氮化物-炔烃环加成反应中)。或者,该反应可以是无铜反应(例如,张力促进的叠氮化物-炔烃环加成反应、张力促进的炔烃-硝酮环加成反应)。

[0130] 例如,将点击官能团掺入到蛋白质和EV上的方法描述于,例如Smyth et al."Surface functionalization of exosomes using click chemistry."Bioconjugate chemistry 25.10(2014):1777-1784;Wang et al."Integrating protein engineering and bioorthogonal click conjugation for extracellular vesicle modulation and intracellular delivery."PLoS One 10.11(2015):e0141860;和Lee et al."Facile metabolic glycan labeling strategy for exosome tracking."Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects 1862.5(2018):1091-1100.,每一篇均通过引用其整体并入本文。

[0131] 与EV缀合的蛋白质(诸如抗体)的数量可以通过改变EV的点击缀合程度来改变。可以与术语"取代程度"或"DS"互换使用的术语"点击缀合程度"是指每个EV的平均点击试剂数量。通过改变点击试剂的摩尔当量数量与点击缀合反应中EV的浓度,可以改变点击取代的程度。例如,点击缀合反应可以包含约1至约5000摩尔当量的点击试剂,例如约1、约5、约10、约20、约50、约100、约150、约200、约250、约300、约350、约400、约450、约500、约550、约600、约650、约700、约750、约800、约850、约900、约950、约1000、约1200、约1500、约1800、约2000、约2200、约2500、约2800、约3000、约3200、约3500、约4000、约4200、约4500或约5000摩尔当量的点击试剂。所述值之间的范围也旨在成为本发明的部分。例如,点击缀合反应可以包含约1至约50、约10至约100、约150至约250、约200至约500、约400至约800、约700至约1000、约1200至约1600、约1500至约2000、约1800至约3500或约3200至约5000摩尔当量的点击试剂。

[0132] 在一些实施方案中,与点击试剂缀合的EV包含的点击取代程度为约0.01%至约100%,例如约0.01%至约0.5%、约0.1%至约5%、约1%至约10%、约5%至约15%、约10%至约20%、约15%至约25%、约20%至约35%、约30%至约40%、约35%至约50%、约40%至约60%、约50%至约75%、约70%至约90%或约85%至约100%。例如,与点击试剂缀合的本发明的EV可以是约0.01%、约0.05%、约0.1%、约0.5%、约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约100%。

[0133] 任何抗体或其抗原结合部分均可以使用本文提供的方法与衍生自神经细胞的EV缀合。在一些实施方案中,抗体是嵌合抗体或其抗原结合部分。在其他实施方案中,抗体是人源化抗体或其抗原结合部分。在其他实施方案中,抗体是完全人抗体或其抗原结合部分。在示例性实施方案中,抗体或其抗原结合片段特异性结合至在脑或中枢神经系统中表达的靶蛋白。例如,在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分能够特异性结合至与阿尔茨海默病相关的β淀粉样蛋白多肽(Aβ),例如人β淀粉样蛋白多肽。

[0134] 在一个示例性实施方案中,本文提供的抗体-EV缀合物可以包含抗β淀粉样蛋白抗体索兰珠单抗,或其抗原结合部分。索兰珠单抗是靶向Aβ中域的人源化IgG1单克隆抗体。索兰珠单抗(也称为10D5和m266)描述于例如美国专利号US7320790、US7195761、US8105597、US8591894和US8623365中,每篇均通过引用其整体并入。

[0135] 在一个实施方案中,本文所述的抗体-EV缀合物包括抗β淀粉样蛋白抗体或其抗原结合部分,其包含索拉珠单抗的可变重链和/或轻链区。在一个实施方案中,抗β淀粉样蛋白抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包含索兰珠单抗的VH CDR1、VH

CDR2和VH CDR3，所述轻链可变区包含索兰珠单抗的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0136] 索兰珠单抗的重链和轻链氨基酸序列在表2中描述。索兰珠单抗的CDR区(CDR1、CDR2和CDR3)以粗体突出显示。索兰珠单抗的重链可变区和轻链可变区加下划线。

[0137] 表2：索兰珠单抗的氨基酸序列

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
1	索兰珠单抗重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSRY**SMSWV RQAPGKGLELVAQI**NSVGNS**TYYPDTVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS**GDY**WGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
2	索兰珠单抗重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSRY**SMSWV RQAPGKGLELVAQI**NSVGNS**TYYPDTVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS**GDY**WGQGTLVTVS SA
3	索兰珠单抗VH CDR1	GFTFSRY
4	索兰珠单抗VH CDR2	NSVG
5	索兰珠单抗VH CDR3	GDY
6	索兰珠单抗轻链	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLIYSDGNAYLH** WFLQKPGQSPRLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYC**SQSTHVPWT**FGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
7	索兰珠单抗轻链可变区	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLIYSDGNAYLH** WFLQKPGQSPRLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYC**SQSTHVPWT**FGQGTKVEIKR
8	索兰珠单抗VL CDR1	QSLIYSDGNAYLH
9	索兰珠单抗VL CDR2	KVSNRF
10	索兰珠单抗VL CDR3	QSTHVPWT

[0138]

[0139] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包含抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分包含表2中所示的一个、两个或三个重链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列，和/或表2中所示的一个、两个或三个轻链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。在一个实施方案中，抗体或其抗原结合

部分包含SEQ ID NO:3的VH CDR1、SEQ ID NO:4的VH CDR2和SEQ ID NO:5的VH CDR3,和/或SEQ ID NO:8的VL CDR1、SEQ ID NO:9的VL CDR2和SEQ ID NO:10的VL CDR3。

[0140] 在一个实施方案中,抗体-EV缀合物具有重链可变区(HCVR)和/或轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性,,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性。

[0141] 在一个实施方案中,抗体-EV缀合物具有重链和/或轻链,所述重链包含与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性,所述轻链包含与SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性。

[0142] 在另一个示例性实施方案中,本文提供的抗体-EV缀合物可以包含抗β淀粉样蛋白抗体阿杜卡奴单抗或其抗原结合部分。阿杜卡奴单抗是识别Aβ聚集形式上的构象表位的全人IgG1单克隆抗体。阿杜卡奴单抗(也称为BIIB037和BART)描述于例如US20150315267、US20180333487、WO2017211827和WO2019040612中,其每篇均通过引用其整体并入。

[0143] 在一个实施方案中,本文所述的抗体-EV缀合物包括抗β淀粉样蛋白抗体或其抗原结合部分,其包含阿杜卡奴单抗的重链可变区和/或轻链可变区。在一个实施方案中,抗β淀粉样蛋白抗体包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包含阿杜卡奴单抗的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,所述轻链可变区包含阿杜卡奴单抗的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0144] 阿杜卡奴单抗的重链和轻链氨基酸序列在表3中描述。阿杜卡奴单抗的CDR区(CDR1、CDR2和CDR3)以粗体突出显示。阿杜卡奴单抗的重链可变区和轻链可变区加下划线。

[0145] 表3:阿杜卡奴单抗的氨基酸序列

[0146]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
11	阿杜卡奴单抗重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFAFSSY**GMHWVR QAPGKGLEWVAVI**WFDGTK**KYYTDSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNTLRAEDTAVYYCAR**DRGIGARRGPYYMDV** WGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
12	阿杜卡奴单抗重链可变区	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFAFSSY**GMHWVR QAPGKGLEWVAVI**WFDGTK**KYYTDSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNTLRAEDTAVYYCAR**DRGIGARRGPYYMDV** WGKGTTVTVSSA
13	阿杜卡奴单抗VH CDR1	GFAFSSY
14	阿杜卡奴单抗VH CDR2	WFDGTK
15	阿杜卡奴单抗VH CDR3	DRGIGARRGPYYMDV
16	阿杜卡奴单抗轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKP GKAPKLLIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYC**QQSYSTPLT**FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
17	阿杜卡奴单抗轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKP GKAPKLLIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYC**QQSYSTPLT**FGGGTKVEIKR
18	阿杜卡奴单抗VL CDR1	QSISSYLN
19	阿杜卡奴单抗VL CDR2	AASSLQS
20	阿杜卡奴单抗VL CDR3	QQSYSTPLT

[0147] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包含抗体或其抗原结合部分，其包含表3中所示的一个、两个或三个重链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列，和/或表3中所示的一个、两个或三个轻链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。在一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:13的VH CDR1、SEQ ID NO:14的VH CDR2和SEQ ID NO:15的VH CDR3，和/或SEQ ID NO:18的VL CDR1、SEQ ID NO:19的VL CDR2和SEQ ID NO:20的VL CDR3。

[0148] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物具有重链可变区(HCVR)和/或轻链可变区(LCVR)，所述重链可变区包含与SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少

97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0149] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物具有重链和/或轻链，所述重链包含与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链包含与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列具有至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0150] 在另一个实施方案中，抗体或其抗原结合片段包括重链可变区，其包含与本文提供的抗β淀粉样蛋白抗体具有至少95％同一性的氨基酸序列，例如与本文提供的抗β淀粉样蛋白抗体具有至少95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性。在某些实施方案中，抗体包含修饰的重链(HC)可变区，其包含本文中的抗β淀粉样蛋白抗体或其变体的HC可变区，其变体(i)与所述抗β淀粉样蛋白抗体的不同在于1、2、3、4或5个氨基酸取代、添加或缺失；(ii)与所述抗β淀粉样蛋白抗体的不同在于最多5、4、3、2或1个氨基酸取代、添加或缺失；(iii)与抗β淀粉样蛋白抗体的不同在于1-5、1-3、1-2、2-5或3-5个氨基酸取代、添加或缺失和/或(iv)包含与抗β淀粉样蛋白抗体具有至少约75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的氨基酸序列，其中在(i)-(iv)中任一项中，氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代；并且其中修饰的重链可变区相对于所述抗β淀粉样蛋白抗体的重链可变区可以具有增强的生物活性，同时保留所述抗体的β淀粉样蛋白结合特异性。

[0151] 在另一个示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含特异性结合至人程序性细胞死亡1(PD1)蛋白的抗体或其抗原结合部分。包含特异性结合至PD1的抗体或其抗原结合部分的抗体-EV缀合物可以用于治疗其中涉及PD1的疾病或病症，例如用于治疗癌症，包括但不限于多形性胶质母细胞瘤。在示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含抗PD1抗体纳武单抗，或其抗原结合部分。纳武单抗是靶向PD1的人IgG4单克隆抗体。纳武单抗描述于，例如美国专利号US8008449、US8168179和US9387247中，每篇均通过引用其整体并入。

[0152] 在一个实施方案中，本文所述的抗体-EV缀合物包括抗PD1抗体或其抗原结合部分，其包含纳武单抗的重链可变区和/或轻链可变区。在一个实施方案中，PD1抗体包括重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含纳武单抗的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3，所述轻链可变区包含纳武单抗的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。纳武单抗的重链和轻链氨基酸序列在表4中描述。

[0153] 表4:纳武单抗的氨基酸序列

[0154]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
21	纳武单抗重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVR QAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSK NTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK
22	纳武单抗重链可变区	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVR QAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSK NTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSS A
23	纳武单抗 VH CDR1	GITFSNS
24	纳武单抗 VH CDR2	WYDGSK
25	纳武单抗 VH CDR3	NDDY
26	纳武单抗轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

[0155]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
		NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
27	纳武单抗轻链可变区	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKR
28	纳武单抗 VL CDR1	QSVSSYLA
29	纳武单抗 VL CDR2	DASNRAT
30	纳武单抗 VL CDR3	QQSSNWPRT

[0156] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包含抗体或其抗原结合部分，其包含表4中所示的一个、两个或三个重链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列，和/或表4中所示的一个、两个或三个轻链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。在一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:23

的VH CDR1、SEQ ID NO:24的VH CDR2和SEQ ID NO:25的VH CDR3，和/或SEQ ID NO:28的VL CDR1、SEQ ID NO:29的VL CDR2和SEQ ID NO:30的VL CDR3。

[0157] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链可变区(HCVR)和/或轻链可变区(LCVR)，所述重链可变区包含与SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0158] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链和/或轻链，所述重链包含与SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链包含与SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列具有至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0159] 在另一个示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含特异性结合至与癌症相关的人血管内皮生长因子(VEGF)蛋白的抗体或其抗原结合部分。包含特异性结合至VEGF的抗体或其抗原结合部分的抗体-EV缀合物可以用于治疗其中涉及VEGF的疾病或病症，例如用于治疗癌症，包括但不限于多形性胶质母细胞瘤。在示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含抗VEGF抗体贝伐珠单抗，或其抗原结合部分。贝伐珠单抗是靶向VEGF的重组人源化单克隆抗体。贝伐珠单抗描述于，例如美国专利号US6632926、US7169901和US7575893中，每篇均通过引用其整体并入。

[0160] 在一个实施方案中，本文所述的抗体-EV缀合物包括包含贝伐珠单抗的重链可变区和/或轻链可变区的抗VEGF抗体或其抗原结合部分。在一个实施方案中，VEGF抗体包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含贝伐珠单抗的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3，所述轻链可变区包含贝伐珠单抗的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。贝伐珠单抗的重链和轻链氨基酸序列在表5中描述。

[0161] 表5：贝伐珠单抗的氨基酸序列

[0162]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
31	贝伐珠单抗重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWV RQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTS KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDV WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HT
32	贝伐珠单抗重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWV RQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTS KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDV WGQGTLVTVSSA
33	贝伐珠单抗 VH CDR1	GYTFTNY
34	贝伐珠单抗 VH CDR2	NTYTGE
35	贝伐珠单抗 VH CDR3	YPHYYGSSHWYFDV
36	贝伐珠单抗轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQK PGKAPKVLIYF TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKV

[0163]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
		DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
37	贝伐珠单抗轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQK PGKAPKVLIYF TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR
38	贝伐珠单抗 VL CDR1	QDISNYLN
39	贝伐珠单抗 VL CDR2	FTSSLHS
40	贝伐珠单抗 VL CDR3	QQYSTVPWT

[0164] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包含抗体或其抗原结合部分，其包含表5中所示的一个、两个或三个重链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列，和/或表5中所示的一个、两个或三个轻链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、

98％或99％同一性的序列。在一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:33的VH CDR1、SEQ ID NO:34的VH CDR2和SEQ ID NO:35的VH CDR3，和/或SEQ ID NO:38的VL CDR1、SEQ ID NO:39的VL CDR2和SEQ ID NO:40的VL CDR3。

[0165] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链可变区(HCVR)和/或轻链可变区(LCVR)，所述重链可变区包含与SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链可变区(LCVR)包含与SEQ ID NO:37中所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0166] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链和/或轻链，所述重链包含与SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链包含与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列具有至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0167] 在另一个示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含特异性结合至人B淋巴细胞抗原CD20(CD20)蛋白的抗体或其抗原结合部分。包含特异性结合至CD20的抗体或其抗原结合部分的抗体-EV缀合物可以用于治疗其中涉及CD20的疾病或病症，例如用于治疗多发性硬化(MS)，包括复发性MS，原发性进行性MS和继发性进行性MS。在示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含抗CD20抗体奥瑞珠单抗，或其抗原结合部分。奥瑞珠单抗是靶向CD20的人源化IgG1单克隆抗体。奥瑞珠单抗描述于例如美国专利号US5,500,362、US5,677,180和US7,799,900中，每篇均通过引用其整体并入。

[0168] 在一个实施方案中，本文所述的抗体-EV缀合物包括抗CD20抗体或其抗原结合部分，其包含奥瑞珠单抗的重链可变区和/或轻链可变区。在一个实施方案中，CD20抗体包括重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含奥瑞珠单抗的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3，，所述轻链可变区包含奥瑞珠单抗的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。奥瑞珠单抗的重链和轻链氨基酸序列在表6中描述。

[0169] 表6:奥瑞珠单抗的氨基酸序列

[0170]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
41	奥瑞珠单抗重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVR QAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWYFDVW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSW TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
42	奥瑞珠单抗重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVR QAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWYFDVW GQGTLVTVSSA
43	奥瑞珠单抗	GYTFTSY

[0171]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
	VH CDR1	
44	奥瑞珠单抗 VH CDR2	YPGNGD
45	奥瑞珠单抗 VH CDR3	VVYYSNSYWYFDV
46	奥瑞珠单抗轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKP GKAPKPLIYAP SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQW SFNPPTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
47	奥瑞珠单抗轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKP GKAPKPLIYAP SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQW SFNPPTFGQG TKVEIKR
48	奥瑞珠单抗 VL CDR1	SSVSYMH
49	奥瑞珠单抗 VL CDR2	APSNLAS
50	奥瑞珠单抗 VL CDR3	QQWSFNPPT

[0172] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包含抗体或其抗原结合部分，其包含表6中所示的一个、两个或三个重链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列，和/或表6中所示的一个、两个或三个轻链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。在一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:43的VH CDR1、SEQ ID NO:44的VH CDR2和SEQ ID NO:45的VH CDR3，和/或SEQ ID NO:48的VL CDR1、SEQ ID NO:49的VL CDR2和SEQ ID NO:50的VL CDR3。

[0173] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链可变区(HCVR)和/或轻链可变区(LCVR)，所述重链可变区包含与SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0174] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链和/或轻链，所述重链包含与SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链包含与SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列具有至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0175] 在另一个示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含特异性结合至人α-4整联蛋白的抗体或其抗原结合部分。包含特异性结合至α-4整联蛋白的抗体或其抗原

结合部分的抗体-EV缀合物可以用于治疗其中涉及α-4整联蛋白的疾病或病症，例如用于治疗多发性硬化，例如复发缓解型多发性硬化症。在示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含抗α-4整联蛋白抗体那他珠单抗，或其抗原结合部分。那他珠单抗是靶向α-4整合素的人源化单克隆抗体。那他珠单抗描述于，例如美国专利号US7,157,086、US6,602,503和US8,124,350中，每篇均通过引用其整体并入。

[0176] 在一个实施方案中，本文所述的抗体-EV缀合物包括抗α-4整联蛋白抗体或其抗原结合部分，其包含那他珠单抗的重链可变区和/或轻链可变区。在一个实施方案中，α-4整联蛋白抗体包括重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含那他珠单抗的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3，所述轻链可变区包含那他珠单抗的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。那他珠单抗的重链和轻链氨基酸序列在表7中描述。

[0177] 表7：那他珠单抗的氨基酸序列

[0178]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
51	那他珠单抗重链可变区	VKLQQSGAELVKPGASVKLFCTASGFNIKDTYMHWVKQRPQQGLEWIGRIDPASGDTKYDPKFQVKATITADTSSNTAWLQLSSLTSEDTAVYYCADGMWVSTGYALDFWGQGTTVTVSS
52	那他珠单抗VH CDR1	GFNIKDT
53	那他珠单抗VH CDR2	DPASGD
54	那他珠单抗	GMWVSTGYALDF

[0179]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
	VH CDR3	
55	那他珠单抗轻链可变区	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYY ASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGG GTKLEI
56	那他珠单抗VL CDR1	QSVTNDVA
57	那他珠单抗VL CDR2	YASNRYT
58	那他珠单抗VL CDR3	QQDYSSPYT

[0180] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包含抗体或其抗原结合部分，其包含表7中所示的一个、两个或三个重链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列，和/或表7中所示的一个、两个或三个轻链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。在一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:52的VH CDR1、SEQ ID NO:53的VH CDR2和SEQ ID NO:54的VH CDR3，和/或SEQ ID NO:56的VL

CDR1、SEQ ID NO:57的VL CDR2和SEQ ID NO:58的VL CDR3。

[0181] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链可变区(HCVR)和/或轻链可变区(LCVR)，所述重链可变区包含与SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0182] 在另一个示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含特异性结合至人GD2神经节苷脂(GD2)蛋白的抗体或其抗原结合部分。包含特异性结合至GD2的抗体或其抗原结合部分的抗体-EV缀合物可以用于治疗其中涉及GD2的疾病或病症，例如用于治疗神经母细胞瘤。在示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含抗GD2抗体迪妥昔单抗，或其抗原结合部分。迪妥昔单抗是靶向GD2的嵌合人/小鼠单克隆抗体。迪妥昔单抗描述于例如美国专利号US9,777,068、US10,294,305和US9,840,566中，每篇均通过引用其整体并入。

[0183] 在一个实施方案中，本文所述的抗体-EV缀合物包括抗GD2抗体或其抗原结合部分，其包含迪妥昔单抗的重链可变区和/或轻链可变区。在一个实施方案中，GD2抗体包括重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含迪妥昔单抗的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3，所述轻链可变区包含迪妥昔单抗的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。迪妥昔单抗的重链和轻链氨基酸序列在表8中描述。

[0184] 表8:迪妥昔单抗的氨基酸序列

[0185]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
59	迪妥昔单抗重链	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWVR QNIGKSLEWIGA IDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSE DSAVYYCVSGMEYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
60	迪妥昔单抗重链可变区	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWVR QNIGKSLEWIGA IDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSE DSAVYYCVSGMEYWGQGTSVTVSSA
61	迪妥昔单抗 VH CDR1	GSSFTGY
62	迪妥昔单抗 VH CDR2	DPYYGG
63	迪妥昔单抗 VH CDR3	GMEY
64	迪妥昔单抗轻链	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLH WYLQKPGQSPK LLIHKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YFCSQSTHVP PLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREA

[0186]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
		KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
65	迪妥昔单抗轻链可变区	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLH WYLQKPGQSPK LLIHKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YFCSQSTHVP PLTFGAGTKLELKR
66	迪妥昔单抗 VL CDR1	QSLVHRNGNTYLH
67	迪妥昔单抗 VL CDR2	KVSNRFS
68	迪妥昔单抗 VL CDR3	SQSTHVPPLT

[0187] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包含抗体或其抗原结合部分，其包含表8中所示的一个、两个或三个重链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列，和/或表8中所示的一个、两个或三个轻链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。在一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:61的VH CDR1、SEQ ID NO:62的VH CDR2和SEQ ID NO:63的VH CDR3，和/或SEQ ID NO:66的VL CDR1、SEQ ID NO:67的VL CDR2和SEQ ID NO:68的VL CDR3。

[0188] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链可变区(HCVR)和/或轻链可变区(LCVR)，所述重链可变区包含与SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0189] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链和/或轻链，所述重链包含与SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链包含与SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列具有至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0190] 在另一个示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含特异性结合至与阿尔茨海默病相关的人β淀粉样蛋白的抗体或其抗原结合部分。包含特异性结合β淀粉样蛋白的抗体或其抗原结合部分的抗体-EV缀合物可以用于治疗其中涉及β淀粉样蛋白的疾病或病症，例如治疗阿尔茨海默病。在示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含抗淀粉样蛋白β抗体更汀芦单抗，或其抗原结合部分。更汀芦单抗是靶向β淀粉样蛋白的人IgG1单克隆抗体。更汀芦单抗描述于例如美国专利号US7,794,719、US8,216,577和US8,329,886中，每篇均通过引用其整体并入。

[0191] 在一个实施方案中，本文所述的抗体-EV缀合物包括抗β淀粉样蛋白抗体或其抗原结合部分，其包含更汀芦单抗的重链可变区和/或轻链可变区。在一个实施方案中，β淀粉样蛋白抗体包括重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含更汀芦单抗的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3，所述轻链可变区包含更汀芦单抗的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。更汀

芦单抗的重链和轻链氨基酸序列在表9中描述。

[0192] 表9:更汀芦单抗的氨基酸序列

[0193]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
69	更汀芦单抗重链	QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAINASGTRTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYF DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
70	更汀芦单抗重链可变区	QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAINASGTRTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYF DVWGQGTLVTVSSA

[0194]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
71	更汀芦单抗 VH CDR1	GFTFSSY
72	更汀芦单抗 VH CDR2	NASGTR
73	更汀芦单抗 VH CDR3	GKGNTHKPYGYVRYFDV
74	更汀芦单抗轻链	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIY GASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCL QIYNMPITFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
75	更汀芦单抗轻链可变区	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIY GASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCL QIYNMPITFG QGTKVEIKR
76	更汀芦单抗 VL CDR1	QSVSSSYLA
77	更汀芦单抗 VL CDR2	GASSRAT
78	更汀芦单抗 VL CDR3	LQIYNMPIT

[0195] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包含抗体或其抗原结合部分，其包含表9中所示的一个、两个或三个重链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列，和/或表9中所示的一个、两个或三个轻链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。在一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:71的VH CDR1、SEQ ID NO:72的VH CDR2和SEQ ID NO:73的VH CDR3，和/或SEQ ID NO:76的VL CDR1、SEQ ID NO:77的VL CDR2和SEQ ID NO:78的VL CDR3。

[0196] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链可变区(HCVR)和/或轻链可变区(LCVR)，所述重链可变区包含与SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0197] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链和/或轻链，所述重链包含与SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链包含与SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列具有至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0198] 在另一个示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含抗β淀粉样蛋白

抗体lecanemab，或其抗原结合部分。lecanemab是靶向β淀粉样蛋白的人源化小鼠单克隆抗体。lecanemab描述于例如美国专利号US8,106,164、US8,999,936和US9,573,994中，每篇均通过引用其整体并入。

[0199] 在一个实施方案中，本文所述的抗体-EV缀合物包括抗淀粉样蛋白β抗体或其抗原结合部分，其包含lecanemab的重链可变区和/或轻链可变区。在一个实施方案中，β淀粉样蛋白抗体包括重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含lecanemab的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3，所述轻链可变区包含lecanemab的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。lecanemab的重链和轻链氨基酸序列在表10中描述。

[0200] 表10：lecanemab的氨基酸序列

[0201]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
79	lecanemab 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSFGMHWVR QAPGKGLEWVAYISSGSSTIYYGDTVKGRFTISRDNAKN SLFLQMSSLRAEDTAVYYCAREG GYYYGRSYYTMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

[0202]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
80	lecanemab 重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSFGMHWVR QAPGKGLEWVAYISSGSSTIYYGDTVKGRFTISRDNAKN SLFLQMSSLRAEDTAVYYCAREG GYYYGRSYYTMDYWGQGTTVTVSSA
81	lecanemab 轻链	DVVMTQSPLSLPVTPGAPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGI YYCFQGSHVPPTFGPGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
82	lecanemab 轻链可变区	DVVMTQSPLSLPVTPGAPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW YLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRI SRVEAEDVGIYYCFQGSHVPPTFGPGTKLEIKR

[0203] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链可变区(HCVR)，其包含与SEQ ID NO:

80所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，和/或轻链可变区(LCVR)，其包含与SEQ ID NO:82中所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0204] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链和/或轻链，所述重链包含与SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链包含与SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列具有至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0205] 在另一个示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含特异性结合至人B淋巴细胞抗原CD20(CD20)蛋白的抗体或其抗原结合部分。如前所述，包含特异性结合至CD20的抗体或其抗原结合部分的抗体-EV缀合物可以用于治疗其中涉及CD20的疾病或病症，例如治疗多发性硬化，例如复发多发性硬化。在示例性实施方案中，本文提供的抗体-EV缀合物可以包含抗CD20抗体乌妥昔单抗，或其抗原结合部分。乌妥昔单抗是靶向CD20的嵌合人/小鼠单克隆抗体。乌妥昔单抗描述于例如美国专利号US9,234,045、US9,694,071和US9,873,745中，每篇均通过引用其整体并入。

[0206] 在一个实施方案中，本文所述的抗体-EV缀合物包括抗CD20抗体或其抗原结合部分，其包含乌妥昔单抗的重链可变区和/或轻链可变区。在一个实施方案中，CD20抗体包括重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含乌妥昔单抗的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3，所述轻链可变区包含乌妥昔单抗的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。乌妥昔单抗的重链和轻链氨基酸序列在表11中描述。

[0207] 表11:乌妥昔单抗的氨基酸序列

[0208]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
83	乌妥昔单抗重链	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPRQGLEWIGGIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVGKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARYDYNYAMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
84	乌妥昔单抗重链可变区	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPRQGLEWIGGIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVGKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARYDYNYAMDYWGQGT SVTVSSA
85	乌妥昔单抗 VH CDR1	GYTFTSY
86	乌妥昔单抗 VH CDR2	YPGNGD
87	乌妥昔单抗 VH CDR3	YDYNYAMDY
88	乌妥昔单抗轻链	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKP GSSPKPWIYAT SNLASGVPARFSGSGSGTSYSFTISRVEAEDAATYYCQQ WTFNPPTFGGG TRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

[0209]

SEQ ID NO:	序列描述	氨基酸序列
89	乌妥昔单抗轻链可变区	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKP GSSPKPWIYAT SNLASGVPARFSGSGSGTSYSFTISRVEAEDAATYYCQQ WTFNPPTFGGG TRLEIKR
90	乌妥昔单抗 VL CDR1	SSVSYMH
91	乌妥昔单抗 VL CDR2	ATSNLAS
92	乌妥昔单抗 VL CDR3	QQWTFNPPT

[0210] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包含抗体或其抗原结合部分，其包含表11中所示的一个、两个或三个重链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列，和/或表11中所示的一个、两个或三个轻链CDR区，或与其具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。在一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:85的VH CDR1、SEQ ID NO:86的VH CDR2和SEQ ID NO:87的VH CDR3，和/或SEQ ID NO:90的VL CDR1、SEQ ID NO:91的VL CDR2和SEQ ID NO:92的VL CDR3。

[0211] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包括重链可变区(HCVR)和/或轻链可变区(LCVR)，所述重链可变区包含与SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:89中所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0212] 在一个实施方案中，抗体-EV缀合物包含重链和/或轻链，所述重链包含与SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性，所述轻链包含与SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列具有至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0213] 在一个实施方案中，本文所述的抗体-EV缀合物包括人免疫球蛋白。免疫球蛋白是由含有人抗体的人血浆制成的无菌溶液。免疫球蛋白产品以商品名GAMUNEX C™、GAMMAKED™、HIZENTRA™、PRIVIGEN™和GAMMAGARD™销售。包含免疫球蛋白的抗体-EV缀合物可以用于治疗病症，包括但不限于慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)和多灶性运动神经病。

[0214] 在一些实施方案中，本文提供的抗体标记的EV可以另外包含分子，所述分子包括但不限于小分子、核酸(例如，短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)和双链RNA(dsRNA))、蛋白质和/或肽。

[0215] 在某些情况下，将EV从细胞中分离出来，然后在将EV施用于受试者之前用期望的分子加载EV。在其它情况下，可以通过将产生EV的细胞与一种或多种治疗剂共同温育而将期望分子加载到EV中。在一些其他情况下，可以通过在用于生产EV的细胞中过表达期望分子而将期望的核酸、蛋白质或肽加载到EV中，从而在生产过程用期望的分子加载EV。在另一种情况下，可以通过过表达有助于将期望分子运输到外泌体的载体分子(例如蛋白质)而将

期望分子加载到EV中。例如，来自牛白血病病毒蛋白的载体肽可以表达为具有感兴趣的多肽的融合蛋白，以促进将感兴趣的多肽加载到外泌体中。例如，在美国专利号9,546,371中描述了这种方法，其全部内容通过引用并入本文。在其他实施方案中，载体分子在用于产生EV的细胞中表达为具有抑制性核酸，使得可以用抑制性核酸加载EV。

[0216] 在上述情况下，期望分子可以是外源性的或内源性的。外源性分子是指在体外、体内或离体，从外部来源(例如，对于EV来说不是天然的)添加到EV中的分子。内源性分子是指在体外、体内或离体，天然存在于EV内部或与EV相联的分子。当分子从外部来源添加到EV时，例如通过过表达、生产后加载等，外源性分子可以包括与EV中天然存在的相同类型的分子(核酸、蛋白质等)。

[0217] 可以在用抗体或其抗原结合部分表面标记EV之前或之后用期望的货物分子加载EV。本文所述的期望分子可以通过多种不同技术引入EV，包括温育、声波处理、电穿孔或使用转染试剂，诸如膜透化剂(例如，多元醇、去污剂、糖)。电穿孔条件可能因期望分子的电荷和大小而异。典型电压在20V/cm至1,000V/cm的范围内，诸如20V/cm到100V/cm，电容通常在25μF和250μF之间，诸如在25μF和125μF之间。150mV至250mV范围内的电压，特别是200mV的电压对于用抗体加载EV而言是优选的。或者，可以使用转染试剂用期望的分子(例如，外源性蛋白质和/或肽)加载EV。尽管EV尺寸小，但常规转染剂可以用于用期望分子(例如外源性蛋白质和/或肽)转染EV。在一种情况下，也可以通过用表达感兴趣的治疗性蛋白质或肽的核酸构建体转化或转染宿主细胞来加载EV，使得在EV从细胞产生时治疗性蛋白质或肽被摄取到EV中。在另一种情况下，也可以通过用具有或不具有载体/衔接物分子的抑制性核酸构建体转化或转染宿主细胞，而用抑制性核酸构建体加载EV，使得抑制性核酸构建体被摄取到EV中。

[0218] (iii)在EV腔内负载抗体的EV

[0219] 在一个方面，本发明提供了组合物，其包含在EV的腔中负载多肽(例如，抗体或其抗原结合片段)的EV。适用于此目的的EV可以包含衍生自神经细胞(例如，神经祖细胞或神经干细胞)的细胞外囊泡，用于加载抗体或其抗原结合部分。除了加载在EV表面上或替代加载在EV表面上，本文所述的任何抗体可以用于在EV腔中加载EV，例如，通过点击化学，如上所述。

[0220] 可以使用多种方法将多肽(例如，抗体或其抗原结合部分)加载到EV的腔中。

[0221] 在一些实施方案中，使用适用于膜透化的去污剂，例如皂苷，将抗体加载到囊泡中。在一些实施方案中，通过声处理将抗体加载到囊泡中。在一些实施方案中，通过电穿孔将抗体加载到囊泡中。在一些实施方案中，通过摇动(例如，100rpm-1500rpm)温育(例如，在室温下)将抗体加载到囊泡中。在一些实施方案中，使用前述方法的组合(例如，皂苷透化和声处理、电穿孔和声处理、皂苷透化和电穿孔等)将抗体加载到囊泡中。蛋白质，例如抗体，可以在透化、声处理和/或电穿孔之前、期间或之后被添加到囊泡。在一些实施方案中，在待加载到腔中的蛋白质例如抗体存在下，使用去污剂透化、声处理和/或电穿孔透化囊泡。在其他实施方案中，使用去污剂透化、声处理和/或电穿孔透化囊泡，并随后与待加载的蛋白质例如抗体温育。在一些实施方案中，待加载的蛋白质(例如抗体)以约25至约2000μg/mL的浓度添加到囊泡。在一些实施方案中，待加载的蛋白质(例如抗体)以约50至约1500μg/mL的浓度添加到囊泡。在一些实施方案中，待加载的蛋白质(例如，抗体)以约100至约1000μg/mL

的浓度添加到囊泡。在一些实施方案中，待加载的蛋白质(例如，抗体)以约25ug/mL、约50ug/mL、约100ug/mL、约200ug/mL、约300ug/mL、约400ug/mL、约500ug/mL、约600ug/mL、约700ug/mL、约800ug/mL、约900ug/mL、约1,000ug/mL、约1,500ug/mL或约2000ug/mL的浓度添加到囊泡。

[0222] 在一些实施方案中，使用适用于膜透化的去污剂将抗体加载到囊泡的腔中。此类去污剂包括例如皂苷、Tween-20和本领域已知的适用于细胞外囊泡透化的其他去污剂。在一些实施方案中，约0.01％、约0.03％、约0.05％、约0.07％、约0.09％、约0.1％、约0.12％、约0.14％、约0.16％、约0.18％、约0.2％、约0.22％、约0.24％、约0.26％、约0.28％或约0.3％(w/v)的去污剂(例如皂苷)用于透化EV膜。在一些实施方案中，通过使用皂苷透化EV膜将抗体加载到EV的腔中。例如，可以在添加抗体之前通过用例如0.01％-5％(w/v)皂苷温育EV制备物来透化膜。在一些实施方案中，可以在添加抗体之前通过用例如约0.01％、约0.03％、约0.05％、约0.07％、约0.09％、约0.1％、约0.12％、约0.14％、约0.16％、约0.18％、约0.2％、约0.22％、约0.24％、约0.26％、约0.28％、约0.3％、约0.4％、约0.5％、约0.6％、约0.7％、约0.8％、约0.9％、约1.0％、约1.2％、约1.4％、约1.6％、约1.8％、约2.0％、约2.2％、约2.4％、约2.8％、约3.0％、约3.2％、约3.4％、约3.6％、约3.8％、约4.0％、约4.2％、约4.4％、约4.6％、约4.8％或约5.0％(w/v)皂苷温育EV制备物来透化膜。在一些实施方案中，EV可以在添加抗体之前与皂苷温育1-20分钟。在一些实施方案中，EV可以在添加抗体之前与皂苷温育1-10分钟。在一些实施方案中，EV可以在添加抗体之前与皂苷温育1-5分钟。然后可以将抗体添加到透化的EV中并温育，任选地轻轻混合或摇动(例如，100rpm、200rpm、300rpm、400rpm、500rpm、600rpm、700、rpm、800rpm、900rpm、1000rpm、1100rpm、1200rpm、1300rpm、1400rpm、1500rpm)，持续1-30分钟(例如，1-20分钟、1-15分钟、1-10分钟、或1-5分钟)。

[0223] 在一些实施方案中，通过声处理将抗体加载到囊泡中。本领域技术人员将理解，可以通过不同的振幅、脉冲时间和循环的组合来执行声处理，如本文表12中所例示的。例如，声处理的振幅可以设置在从10％到100％振幅的任意位置(例如，10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或100％)，结合不同的脉冲时间(例如，4秒开/2秒关；4秒开/4秒关；4秒开/8秒关；2秒开/2秒关；2秒开/4秒关；2秒开/8秒关；8秒开/2秒关；8秒开/4秒关；8秒开/8秒关)和循环次数(例如，2个循环至36个循环，例如，2个循环、4个循环、6个循环、8个循环、10个循环、12个循环、14个循环、16个循环、18个循环、20个循环、22个循环、24个循环、26个循环、28个循环、30个循环、32个循环、34个循环或36个循环)。在一些实施方案中，声处理的振幅可以设置在从10％到100％振幅的任意位置(例如，10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或100％)以恒定的持续时间(例如，1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟或更长)。在一些实施方案中，使用已知方法，例如通过改变电压(例如，100V、150V、200V、250V、300V、350V、400V、450V、500V、550V、600V、650V、700V、750V、800V、850V、900V、950V、1kV或更高)和持续时间和脉冲次数(例如，1个脉冲、2个脉冲、3个脉冲、4个脉冲、5个脉冲、6个脉冲、7个脉冲、8个脉冲、9个脉冲、10个脉冲、11个脉冲、12个脉冲、13个脉冲、14个脉冲、15个脉冲、16个脉冲、17个脉冲、18个脉冲、19个脉冲、20个脉冲或更多)，通过电穿孔将抗体加载到囊泡中。

[0224] 在一些实施方案中，通过温育(例如，持续30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小

时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时或更长)伴或不伴摇动(例如,100rpm、200rpm、300rpm、400rpm、500rpm、600rpm、700、rpm、800rpm、900rpm、1000rpm、1100rpm、1200rpm、1300、rpm、1400rpm、1500rpm)将抗体加载到囊泡中。可以在任何合适的温度下进行温育。在一些实施方案中,可以在约4至约37℃进行温育。在一些实施方案中,可以在室温、在冰上、约4℃、或约37℃进行温育。

[0225] 在一些实施方案中,使用本文描述的用于将抗体引入囊泡腔的任何方法的组合将多肽(例如抗体)加载到囊泡中,也如本文所例示的。在一些实施方案中,在囊泡膜透化过程中纳入多肽(例如,抗体)(添加至囊泡)。在一些实施方案中,在囊泡膜透化后纳入多肽(例如抗体)(添加至囊泡)。

[0226] 在某些实施方案中,在将抗体添加到EV之前,通过EV的皂苷透化(例如,使用0.01-5%皂苷),以10-100%振幅声处理持续5-30分钟,将抗体加载到EV中。在某些实施方案中,在将抗体添加到EV之前,通过EV的皂苷透化(0.2%皂苷),以20%的振幅声处理持续10分钟,将抗体加载到EV中。在某些实施方案中,在将抗体添加到EV之前,通过EV的皂苷透化(0.2%皂苷),以40%的振幅声处理持续10分钟,将抗体加载到EV中。在某些实施方案中,在将抗体添加到EV之前,通过EV的皂苷透化(0.2%皂苷),以20%的振幅声处理持续5分钟,将抗体加载到EV中。

[0227] 在一些实施方案中,通过0.01-5%皂苷透化结合摇动将抗体加载到EV中。在一些实施方案中,通过0.2%皂苷透化结合摇动(例如,500rpm)将抗体加载到EV中。在一些实施方案中,通过在室温下摇动(例如,1000rpm)温育将抗体加载到EV中。在一些实施方案中,通过电穿孔将抗体加载到EV中。在一些实施方案中,通过以20%振幅、12个循环、4秒开和8秒关的声处理将抗体加载到囊泡中。

[0228] 在一些实施方案中,通过以60%振幅,4秒开/8秒关的持续时间,持续6个循环的声处理将抗体加载到EV中。在一些实施方案中,通过以60%振幅,2秒开/4秒关的持续时间进行声处理,然后在冰上温育2分钟,持续6个循环,而将抗体加载到EV中。

[0229] 在一些实施方案中,可以将一定范围的多肽(例如,抗体)浓度加载到EV的腔中,例如,100ug/ml、约200ug/ml、约300ug/ml、约400ug/ml、约500ug/ml、约600ug/ml、约700ug/ml、约800ug/ml、约900ug/ml或约1,000ug/ml。

[0230] 在将抗体加载到EV的腔中后,可以使用本领域已知的各种方法,包括超滤、超速离心和高效液相色谱(HPLC),包括尺寸排阻、离子交换和生物亲和色谱,将腔负载的EV从游离抗体和未加载的EV中分离出来。

[0231] C.配制剂、递送和施用

[0232] 本文提供的负载多肽的EV,例如负载抗体的EV——包括抗体-EV缀合物和腔内负载抗体的EV——可以配制在药物组合物(例如,包含神经细胞衍生的Ab-EV缀合物的药物组合物)中用于递送至受试者。药物组合物可以包含治疗有效量的负载多肽的EV(例如负载抗体的神经EV)和药学上可接受的载体。例如,可以在无菌磷酸盐缓冲盐水中提供治疗有效量的负载多肽的EV(例如,Ab-EV缀合物和/或腔内负载的EV)。其他合适的赋形剂、媒介物和载体是本领域已知的,并且描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences,18th ed.(1990)。本领域技术人员将理解,任何施用方式、常规采用且对活性剂呈惰性的媒介物或载

体可以用于制备和施用包含本公开的负载多肽的EV的药物组合物。此类方法、媒介物和载体的示例是例如在Remington'sPharmaceutical Sciences,4th ed.(1970)中描述的那些，其公开内容通过引用并入本文。

[0233] 含有所公开的负载多肽的EV(例如，负载抗体的神经EV)的配制剂可以采用液体、固体或半固体的形式，诸如例如溶剂、悬浮剂、乳剂、缓释制剂、洗剂、气雾剂等，任选地以适合于精确剂量的简单施用的单位剂型。药物组合物通常包括常规药物载体和/或赋形剂，并且可以另外包括其他药剂、载体、佐剂、添加剂等。Ab-EV缀合物与一种或多种赋形剂的重量百分比可以为约20:1至约1:60，或约15:1至约1:45，或约10:1至约1:40，或约9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1至约1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30或1:35，并且优选为约20:1、19:1、18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1或5:1。在一些实施方案中，所公开的组合物包含约1μg至约1g或更多的总EV，例如约1μg至约100μg、约100μg至约200μg、约200μg至约300μg、约300μg至约400μg、约500μg至约600μg、约700μg至约800μg、约900μg至约1mg、约100μg至约500μg、约1mg至约500mg、约5mg至约500mg、约10mg至约500mg、约25mg至约500mg、约50mg至约350mg、约75mg至约450mg、约50mg至约450mg、约75mg至约325mg、约100mg至约650mg或约500mg至约1g的总EV，并且可以任选地包含一种或多种合适的药用载体、添加剂和/或赋形剂。

[0234] 在多种情况下，本文所述的药物组合物(例如，包含加载有多肽的EV例如加载由抗体的神经EV的药物组合物)可以配制成用于通过本领域技术人员已知的任何施用途径递送至细胞和/或受试者。施用方式对于本领域技术人员来说是公知的或显而易见的；例如，参见Remington's Pharmaceutical Sciences(17th Ed.,Mack Pub.Co.1985)。

[0235] 包含本文提供的负载多肽的EV(例如，负载由抗体的神经EV)的组合物可以通过任何合适的途径递送至受试者，包括但不限于注射、输注、吸入、鼻内、眼内、局部递送、环间(intercannular)递送或摄取。注射包括但不限于静脉内、颅内、鞘内、肌内、动脉内、鞘内、心室内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、椎管内、脑脊髓内和胸骨内注射和输液。在一些情况下，施用包括脑脊髓内注射。在一些其他情况下，施用包括气溶胶吸入，例如，用雾化。在其他情况下，施用是全身性的(例如，口服、直肠、鼻、舌下、颊或胃肠外)、肠内(例如，全身作用，但通过CNS递送)或局部(例如，皮肤上的局部应用、玻璃体内注射)。在一些情况下，施用负载多肽的EV(例如，负载抗体的神经EV)能够将负载抗体的EV递送至中枢神经系统，并且在特定实施方案中，穿过血脑屏障。在一些实施方案中，在患病和/或功能障碍组织(例如，脑)的部位施用。在其他实施方案中，施用的位点在患病和/或功能障碍组织部位(例如，在静脉内或鼻内递送的情况下)的远端。在一个实施方案中，将包含负载多肽的EV的组合物胃肠外施用于受试者。在一个实施方案中，将包含负载多肽的EV的组合物静脉内施用于受试者。在另一个实施方案中，将包含负载多肽的EV的组合物经鼻内施用于受试者。在一个实施方案中，将包含负载多肽的EV的组合物颅内施用于受试者。在一个实施方案中，将包含负载多肽的EV的组合物鞘内施用于受试者。

[0236] 用于胃肠外施用(例如静脉内、肌内、鞘内、脑脊液内或鼻内)的可注射组合物可以包含负载多肽的EV(例如负载抗体的神经EV)和任选地在合适的i.v.溶液中的附加组分，诸如无菌生理盐溶液。在其他实施方案中，将组合物配制成水性乳剂中的悬浮剂。

[0237] 液体药物组合物可以通过将负载多肽的EV(例如，负载抗体的神经EV)群体和任选

地药物佐剂溶解或分散在载体诸如例如水性盐水、水性葡萄糖、甘油或乙醇中来制备，形成溶剂或悬浮剂。

[0238] 静脉内配制剂可以包含本文所述的负载多肽的EV(例如，负载抗体的神经EV)、等渗介质和一种或多种阻止加载多肽的EV聚集的物质。示例性静脉内/鞘内/脑脊液内配制剂可以含有盐溶液(例如生理盐水(NS)；约0.91％w/v的NaCl，约300mOsm/L)和/或在0.18％盐水中的4％右旋糖，和任选地1％、2％或3％人血清白蛋白。此外，可以破坏加载多肽的EV以获得内容物和在根据本发明的组合物中使用的内容物。

[0239] 对于用于口服液体配制剂，组合物可以制备成溶液、悬浮剂、乳剂或糖浆，以液体形式或适合在水或生理盐水中水合的干燥形式提供。对于口服施用，此类赋形剂包括药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等。如果期望，组合物还可以含有少量无毒的辅助物质，例如润湿剂、乳化剂或缓冲剂。

[0240] 在鼻内、气管内或肺内施用的情况下，组合物可以以液体或气溶胶配制剂的形式提供，其可以喷雾到鼻、气管和/或肺中。

[0241] 当组合物以固体制剂形式用于口服施用时，该制剂可以是片剂、颗粒剂、粉末剂、胶囊剂等。在片剂配制剂中，组合物通常与添加剂一起配制，例如赋形剂如糖类或纤维素制剂、粘合剂诸如淀粉糊或甲基纤维素，填充剂，崩解剂和其他通常用于制造医药制剂的添加剂。

[0242] 本文提供的药物组合物(例如，包含负载多肽的EV的药物组合物)可以一次施用于受试者，或者，可替代地，可以在一段时间内进行多次施用。例如，可以在一次治疗期间或在设定的时间段内给予受试者两次、三次、四次、五次或更多次施用。在一些情况下，可以在一次治疗期间或在作为治疗方案的一段时间内给予受试者六次、八次、十次、12次、15次或20次或更多次施用。在其他情况下，可以根据需要给予施用，例如，持续与神经性病症相关的症状持续的时间相同。在一些实施方案中，可以在受试者的余生中指示重复施用。示例性的给药方案包括每天一次、每两天一次、每三天一次、每周一次、每两周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、6个月、12个月或更长时间施用包含负载多肽的EV的药物组合物。

[0243] 在一些方面，本发明提供了药物组合物，其包含负载多肽的EV(例如负载抗体的神经EV)，其进一步包含一种或多种额外的治疗剂。

[0244] 在一些实施方案中，EV可以包含一种或多种抑制性核酸。例如，在一些实施方案中，EV可以包含选自短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(ASO)和双链RNA(dsRNA)的一种或多种抑制性核酸。

[0245] 在一些实施方案中，EV可以包含一种或多种神经营养剂。在一些实施方案中，EV可以包含一种或多种选自白血病抑制因子(LIF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、表皮生长因子受体(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、FGF-6、胶质源性神经营养因子(GDNF)、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、肝细胞生长因子(HGF)、IFN-γ、胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP-2)、IGFBP-6、IL-1ra、IL-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白(MCP-1)、单核吞噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、神经营养因子(NT3)、金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP-1)、TIMP-2、肿瘤坏死因子(TNF-β)、血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF-D、尿激酶纤溶酶原激活物受体(uPAR)、骨形态发生蛋白4(BMP4)、IL1-a、IL-3、瘦素、干细胞因子(SCF)、基质细胞衍生因子-1(SDF-1)、血小板衍生生长因子-BB(PDGFBB)、转化生长因子β(TGFβ-1)和TGFβ-3的一种或多种药剂。

[0246] 包含如本文所述的负载多肽的EV的药物组合物可以作为单一疗法(单一药剂)或联合疗法施用于受试者,其中联合疗法是受试者经施用包含负载多肽的EV的药物组合物联合一种或多种额外的药剂。包含负载多肽的EV的药物组合物和一种或多种额外的药剂可以同时、顺次或暂时施用于受试者。

[0247] 在一个实施方案中,本公开提供了包含如本文所述的负载多肽的EV的药物组合物(例如,包含例如负载抗体的神经EV的药物组合物),其用于治疗患有神经性病症,例如阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、神经系统癌症(例如,胶质母细胞瘤或神经母细胞瘤)、视神经脊髓炎、多发性硬化、偏头痛、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)或多灶性运动神经病的受试者。在另一个实施方案中,本公开提供了包含如本文所述的负载多肽的EV的药物组合物(例如,负载抗体的EV,包括抗体-EV缀合物和腔内负载抗体的EV),其用于制造用于治疗患有神经性病症,例如阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、神经系统癌症(例如,胶质母细胞瘤或神经母细胞瘤)、视神经脊髓炎、多发性硬化症、偏头痛、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)或多灶性运动神经病的受试者的药物。

[0248] 在一些情况下,药物配制剂可以包含约50ng负载多肽的EV/ml流体培养基,或更多。示例性药物配制剂可以包含约100ng、200ng、300ng、400ng、500ng、600ng、700ng、800ng、900ng、1.0μg、1.5μg、2.0μg、2.5μg、3.0μg、5.0μg、10.0、15.0μg、20.0μg、100μg或更多负载多肽的EV/ml流体培养基。

[0249] 在其他实施方案中,药物制剂可以包含约0.1μg负载多肽的EV/m培养基、约0.2μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约0.3μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约0.4μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约0.5μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约0.6μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约0.7μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约0.8μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约0.9μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约1.0μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约1.5μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约2.0μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约2.5μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基,诸如至少例如,约3.0μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基,诸如例如至少约5.0μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、约10.0μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基、15.0μg负载多肽的EV/ml静脉内培养基或约20.0μg或更多负载多肽的EV/ml静脉培养基。

[0250] 在一些情况下,施用组合物包括以单次剂量每千克1×10^{8}或更多的负载多肽的EV。在其他情况下,施用负载多肽的EV组合物包括每千克$1x10^{8}$、$1x10^{8}$至$1x10^{9}$、$1x10^{9}$至$1x10^{10}$、$1x10^{10}$至$1x10^{11}$、$1x10^{11}$至$1x10^{12}$、$1x10^{12}$或更多的负载多肽的EV的剂量。在一些情况下,向受试者多次施用单剂量。在某些其他情况下,向受试者的多次施用包括静脉内、脑脊髓内、静脉内输注和注射中的两种或更多种。

[0251] 在一些情况下,药物组合物的剂型包含至少1mg的负载多肽的EV、至少5mg的负载多肽的EV、至少10mg的负载多肽的EV、至少20mg的负载多肽的EV、至少25mg的负载多肽的EV、至少50mg的负载多肽的EV、至少60mg的负载多肽的EV、至少75mg的负载多肽的EV、至少100mg的负载多肽的EV、至少150mg的负载多肽的EV、至少200mg的负载多肽的EV、至少250mg的负载多肽的EV、至少300mg的负载多肽的EV、约350mg的负载多肽的EV、约400mg的负载多肽的EV、约500mg的负载多肽的EV、约750mg的负载多肽的EV、约1g(1,000mg)或更多的负载多肽的EV,单独或联合治疗有效量的至少一种额外的药剂。在一些实施方案中,药物组合物

包含约10mg至约750mg、约25mg至约650mg、或约30mg至约500mg、或约35mg至约450mg、最通常约50mg至约500mg的负载多肽的EV。

[0252] 治疗有效量的包含负载多肽的EV(例如包含负载抗体的EV,包括抗体-EV缀合物和腔内负载抗体的EV)的药物组合物,,的量足以治疗或改善所治疗病况(例如,神经系统疾病,例如阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病或神经系统癌症,例如胶质母细胞瘤)的一种或多种症状,同时不超过可能导致显著不良反应的量。治疗有效的剂量可取决于许多因素,包括待治疗的状况的性质以及正在治疗的特定个体。

[0253] D.治疗方法

[0254] 在一些方面,本发明提供了使用包含负载多肽的EV(例如负载抗体的EV,包括抗体-EV缀合物和腔内负载抗体的EV)的组合物治疗受试者的方法。包含本文所述的负载多肽的EV的任何组合物或药物组合物适用于本文提供的任何方法。在示例性实施方案中,负载多肽的EV的EV衍生自神经细胞,例如神经祖细胞、神经元或星形胶质细胞。在其他示例性实施方案中,负载多肽的EV的EV是合成产生的,并且包含神经EV的一种或多种标志物特征,例如存在于神经EV中而在衍生自MSC的EV中不存在的一种或多种蛋白质或核酸。

[0255] 在一些方面,本发明提供了治疗(例如,治愈、抑制、改善相关症状、延迟或预防其进展、延迟或预防发作、或预防重现或复发)受试者的神经性病症,例如,阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、神经性癌症(例如,胶质母细胞瘤或神经母细胞瘤)、视神经脊髓炎、多发性硬化、偏头痛、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)或多灶性运动神经病的方法,其包括向受试者施用足以治疗受试者的疾病或病症的量的包含如本文所述的负载多肽的EV的组合物。足以治疗疾病或病症的量优选是有效量,例如如本文提供的治疗有效量。

[0256] 可以相对于任何合适的对照来测量作为治疗结果的症状改变。例如,可以相对于同一受试者在开始治疗之前经历的症状的频率、严重性或持续时间或数量来测量症状的改变。在其他实施方案中,可以相对于具有类似症状但未接受治疗的(即未接受包含Ab-EV的组合物的)不同受试者或受试者组所经历的症状的频率、严重性、持续时间或数量来测量症状的改变。在一些实施方案中,如相对于合适的对照所确定的,改善程度为至少5%,即,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多。

[0257] 在一些实施方案中,将包含负载多肽的EV的组合物作为单剂量施用于受试者。在一些实施方案中,包含Ab-EV的组合物以多剂量施用。例如,在一些实施方案中,可以每天一次、每2天一次、每3天一次、每4天一次、每5天一次、每6天一次、每7天一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每8周一次或每12周一次施用组合物。

[0258] 对本领域技术人员来说显而易见的是,本文所述的本发明的方法的其他合适的修改和适应是显而易见的,并且可以使用合适的等同物来进行而不背离本发明的范围或本文公开的实施方案。现在已经详细描述了本发明,通过参考以下实施例将更清楚地理解本发明,这些实施例仅出于说明的目的而被包括在内,并非旨在限制。

实施例

[0259] 以下实施例仅是说明性的,并不旨在以任何方式限制本文提供的公开的范围。

[0260] 实施例1:用抗体表面标记的神经祖先细胞外囊泡的制备

[0261] 本实施例描述了使用点击化学将抗体(Ab)与衍生自神经祖细胞的细胞外囊泡

(EV)缀合。

[0262] 根据美国专利公开号US2018/0327714A1中提供的方法,从神经祖细胞中获得纯化的EV群体,其全部内容通过引用并入本文。简而言之,如美国专利公开号US2018/0327714A中所述培养人神经祖细胞。在培养基更换后24小时从汇合的神经祖细胞培养物中收集细胞培养基,并在-20℃下冷冻。在细胞外囊泡(EV)纯化之前,将培养基在4℃下解冻过夜并通过0.22μm过滤器装置过滤。使用切向流过滤从过滤的细胞培养基中纯化细胞外囊泡。

[0263] 选择用AlexaFluor Plus 647标记的山羊抗兔IgG抗体用于概念验证实验,因为预期它在鼠模型中缺乏反应性和免疫原性。使用SITECLICK™抗体叠氮化物修饰方法(参见ThermoFisher目录号S20026)对抗体(Ab)进行修饰以包含叠氮化物基团。遵循了制造商的建议。

[0264] 另外,修饰EV以通过SDP酯基团展示sDIBO,该SDP酯基团靶向EV表面上的胺基团。sDIBO(CLICK-IT™ SDP酯sDIBO炔烃,ThermoFisher目录号C20025)在室温下以每EV 5.95e5个sDIBO分子的比率与EV反应2小时。选择该数量是因为它是后续步骤添加的Ab分子数量的10倍。

[0265] 游离、未缀合抗体的剂量递增实验表明,需要注射在100μL剂量中的约$8x10^{13}$个Ab以定性检测肝脏中的高信号,因此将其选择为与EV交联的剂量。叠氮基抗体与sDIBO-EV以每EV 5.95e4 Ab的比率混合。然后混合时,无铜点击化学反应将抗体与EV缀合(图1)。

[0266] 实施例2:EV-Ab缀合物的体内施用

[0267] 本实施例描述了细胞外囊泡抗体(EV-Ab)缀合物在小鼠中的体内施用。过夜温育后,动物用EV-Ab混合物、仅Ab和PBS(n=1/条件)静脉注射。约2小时后,处死动物并保存脑。对组织进行固定、冷冻切片,在某些情况下用TrueBlack Lipofuscion自发荧光淬灭剂(Biotium)处理以降低背景。在成像前用抗山羊二抗染色切片。

[0268] 染色和未染色切片在Zeiss LSM 710共聚焦显微镜上成像。在多个波长下拍摄图像以区分背景和信号,包括在某些情况下使用Zeiss Zen 2012Blue软件拍摄具有线性解混的λ图像。最初,从PBS处理的动物的脑切片中随机选择帧进行成像,以获得信噪比感受。一旦对未经处理的脑切片进行成像和分析,用Ab-EV混合物处理的动物在自动平铺z堆栈中作为半球切片成像。在以低放大倍率在多个波长下对整个切片进行成像后,使用ImageJ软件手动检查切片以进行缩放和扫描。还扫描和分析了Ab处理的动物的一个半球。分析后,一个Ab-EV半球(图2B)具有与PBS处理或仅Ab(图2A)处理的脑切片不同的信号模式。仅Ab和PBS处理的小鼠均显示高强度点状荧光,其外观因区域而异,指示自发荧光。在没有点状荧光的区域,信号由TrueBlack Lipofuscion自发荧光淬灭剂(Biotium)完全淬灭。Ab-EV半球在与PBS和仅Ab处理的脑切片相似的区域显示出相似的自发荧光。然而,在仅Ab和PBS处理的脑中淬灭的区域中,Ab-EV显示出高强度的信号积累模式,指示高强度的细胞形状的信号积累(图2B),表明Ab-EV缀合物至脑组织的递送。

[0269] 实施例3:细胞外囊泡的腔负载

[0270] 此实施例描述了通过EV膜透化将多肽(例如,抗体或萤光素酶蛋白)加载到衍生自神经祖细胞的细胞外囊泡的腔中。

[0271] 通过皂苷透化(0.2%w/w)、温育、电穿孔或声波处理将抗体加载到神经祖细胞衍生的EV中。皂苷透化提供基于去污剂的加载,并与摇动(500rpm)相结合。在室温下进行温

育,同时摇动(1000rpm)。使用氖转染系统在500V、1ms宽度和12个脉冲下进行电穿孔。最后,使用Fisherbrand 505型超声仪(500W,20kHz)使用20%振幅、12个循环、4秒开和8秒关来完成声波处理。在测试了这些不同的加载程序后,将抗体加载到外泌体的腔中,每个外泌体(EV)有超过25,000个抗体分子。图3A。

[0272] 通过皂苷透化、温育或声波处理,将萤光素酶蛋白(62kDa)加载到神经祖细胞EV中。皂苷透化提供基于去污剂的加载,并在添加蛋白质之前与声处理相结合。在室温下进行温育,同时摇动(1000rpm)。最后,使用Fisherbrand505型超声仪(500W,20kHz)完成声处理。测试了改变振幅、脉冲时间和循环数的几种排列(在下表12中描述)。所有声处理方案均使用杯角附件(cup horn accessary)进行,因为直接探针声处理破坏萤光素酶蛋白功能。在测试了超过50种加载程序后,萤光素酶蛋白的加载效率达到了15%以上。对于表12中描述的每种条件,在图3B中描述了加载效率。

[0273] 表12:将多肽腔加载至EV中的测试条件

[0274]

条件#	加载条件描述
1	皂苷(0.2%) 声处理 20% Amp, 10min
2	● 皂苷(0.2%) 声处理 40% Amp, 10min
3	20% Amp, 12 循环, 4sec 开/ 8sec 关
4	40% Amp, 12 循环, 4sec 开/ 8sec 关
5	60% Amp, 12 循环, 4sec 开/ 8sec 关
6	20% Amp, 36 循环, 4sec 开/ 8sec 关
7	40% Amp, 36 循环, 4sec 开/ 8sec 关
8	60% Amp, 36 循环, 4sec 开/ 8sec 关
9	在室温下摇动温育 18h
10	20% Amp, 24 循环, 4sec 开/ 8sec 关
11	40% Amp, 24 循环, 4sec 开/ 8sec 关
12	60% Amp, 24 循环, 4sec 开/ 8sec 关
13	20% Amp, 12 循环, 4sec 开/ 2sec 关
14	40% Amp, 12 循环, 4sec 开/ 2sec 关
15	60% Amp, 12 循环, 4sec 开/ 2sec 关
16	20% Amp, 24 循环, 4sec 开/ 2sec 关
17	40% Amp, 24 循环, 4sec 开/ 2sec 关
18	60% Amp, 24 循环, 4sec 开/ 2sec 关
19	20% Amp, 36 循环, 4sec 开/ 2sec 关
20	40% Amp, 36 循环, 4sec 开/ 2sec 关
21	60% Amp, 36 循环, 4sec 开/ 2sec 关
22	20% Amp, 12 循环, 2sec 开/ 4sec 关
23	40% Amp, 12 循环, 2sec 开/ 4sec 关
24	60% Amp, 12 循环, 2sec 开/ 4sec 关

[0275]

条件#	加载条件描述
25	20% Amp, 24 循环, 2sec 开/ 4sec 关
26	40% Amp, 24 循环, 2sec 开/ 4sec 关
27	60% Amp, 24 循环, 2sec 开/ 4sec 关
28	20% Amp, 36 循环, 2sec 开/ 4sec 关
29	40% Amp, 36 循环, 2sec 开/ 4sec 关
30	60% Amp, 36 循环, 2sec 开/ 4sec 关
31	20% Amp, 恒定 5min
32	20% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 8sec 关
33	40% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 8sec 关
34	60% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 8sec 关
35	20% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 2sec 关
36	40% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 2sec 关
37	60% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 2sec 关
38	20% Amp, 6 循环, 2sec 开/ 4sec 关
39	40% Amp, 6 循环, 2sec 开/ 4sec 关
40	60% Amp, 6 循环, 2sec 开/ 4sec 关
41	皂苷(0.2%) 声处理 20% Amp, 5min
42	80% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 8sec 关
43	80% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 2sec 关
44	80% Amp, 6 循环, 2sec 开/ 4sec 关
45	80% Amp, 12 循环, 2sec 开/ 4sec 关
46	100% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 8sec 关
47	100% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 2sec 关
48	100% Amp, 6 循环, 2sec 开/ 4sec 关
49	60% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 8sec 关, 冰 2min, 重复一次
50	60% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 2sec 关, 冰 2min, 重复一次
51	60% Amp, 6 循环, 2sec 开/ 4sec 关, 冰 2min, 重复一次
52	80% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 8sec 关, 冰 2min, 重复一次
53	80% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 2sec 关, 冰 2min, 重复一次

[0276]

条件#	加载条件描述
54	80% Amp, 6 循环, 2sec 开/ 4sec 关, 冰 2min, 重复一次
55	100% Amp, 6 循环, 4sec 开/ 8sec 关, 冰 2min, 重复一次
56	100% Amp, 6 循环, 2sec 开/ 4sec 关, 冰 2min, 重复一次

[0277] Amp＝振幅

[0278] 通过引用并入

[0279] 贯穿本申请引用的所有参考文献、专利、未决专利申请和出版物的内容在此通过引用其整体并入本文。

[0280] 等同物

[0281] 本领域技术人员将认识到或能够使用不超过常规实验来确定本文描述的发明的具体实施方案的许多等同物。这些等同物旨在被以下权利要求所涵盖。

序列表

<110> 阿鲁纳生物股份公司

<120> 细胞外囊泡及其用于抗体递送的用途

<130> A106525 1040WO

<140>

<141>

<150> 62/930,178

<151> 2019-11-04

<160> 92

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 441

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 1

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

165 170 175
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
340 345 350
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 2
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 2
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110
Ala
<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 3
Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
1 5
<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 4
Asn Ser Val Gly
1
<210> 5
<211> 3
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 5
Gly Asp Tyr
1
<210> 6
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 6

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 7
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 7

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

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 8

Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
1 5 10

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽

<400> 9
Lys Val Ser Asn Arg Phe
1 5
<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 10
Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5
<210> 11
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 11
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
100 105 110
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 12

<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 12

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

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 13

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 14

Trp Phe Asp Gly Thr Lys

1 5

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成肽

<400> 15

Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 16

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 16

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 17
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 17
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 18
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 19
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 20
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5
<210> 21
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190
Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220
Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 22
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 22

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

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 23

Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
1 5

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 24

Trp Tyr Asp Gly Ser Lys

1 5

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成肽

<400> 25

Asn Asp Asp Tyr

1

<210> 26

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 26

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 27
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 27
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 28
Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5

<210> 29
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 29
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 30
Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5
<210> 31
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly

130 135 140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
225 230

<210> 32
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 33
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 33
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
1 5
<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 34
Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
1 5
<210> 35
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 35
Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 36
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 36
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 37
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 37

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

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

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 38
Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 39
Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 40
Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 41
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 41
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

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

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Trp Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 42
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 42

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

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 43
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
1 5
<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 44
Tyr Pro Gly Asn Gly Asp
1 5
<210> 45
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 45
Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 46
<211> 212
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 46
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr

35 40 45

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Trp Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
130 135 140

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
145 150 155 160

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
165 170 175

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
180 185 190

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
195 200 205

Arg Gly Glu Cys
210

<210> 47
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 47

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105
<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 48
Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5
<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 49
Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 50
Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
1 5
<210> 51
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 51

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

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 52
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
1 5

<210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 53
Asp Pro Ala Ser Gly Asp
1 5

<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 54
Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe
1 5 10
<210> 55
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 55
Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105
<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 56
Gln Ser Val Thr Asn Asp Val Ala
1 5
<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 57
Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5
<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 58
Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5
<210> 59
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 59
Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Met Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Asn Ile Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Ser Gly Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

145 150 155 160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
180 185 190
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 60
<211> 114

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 60

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

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 61

```
Gly Ser Ser Phe Thr Gly Tyr
1               5
```

<210> 62
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 62

```
Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly
1               5
```

<210> 63

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 63
Gly Met Glu Tyr
1
<210> 64
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 64
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220
<210> 65
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 65
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110
Lys Arg
<210> 66
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 66
Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10
<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 67
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 68
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Leu Thr
1 5 10
<210> 69
<211> 456
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 69
Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450 455

<210> 70
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 70

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

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 71

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 72
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽

<400> 72
Asn Ala Ser Gly Thr Arg
1 5
<210> 73
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 73
Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr Phe Asp
1 5 10 15
Val
<210> 74
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 74
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 75
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 75
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 76
Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 77
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5
<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 78
Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro Ile Thr
1 5
<210> 79
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 79
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450
<210> 80
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 80
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125
<210> 81
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 81
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Ala Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

<210> 82
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 82

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 83
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 83

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

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 84

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 84

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

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

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 85
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
1 5

<210> 86
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 86
Tyr Pro Gly Asn Gly Asp
1 5

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽

<400> 87
Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5
<210> 88
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 88
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 89

<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 89

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

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 90

```
Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1               5
```

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 91

```
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1               5
```

<210> 92

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成肽
<400> 92
Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
1 5

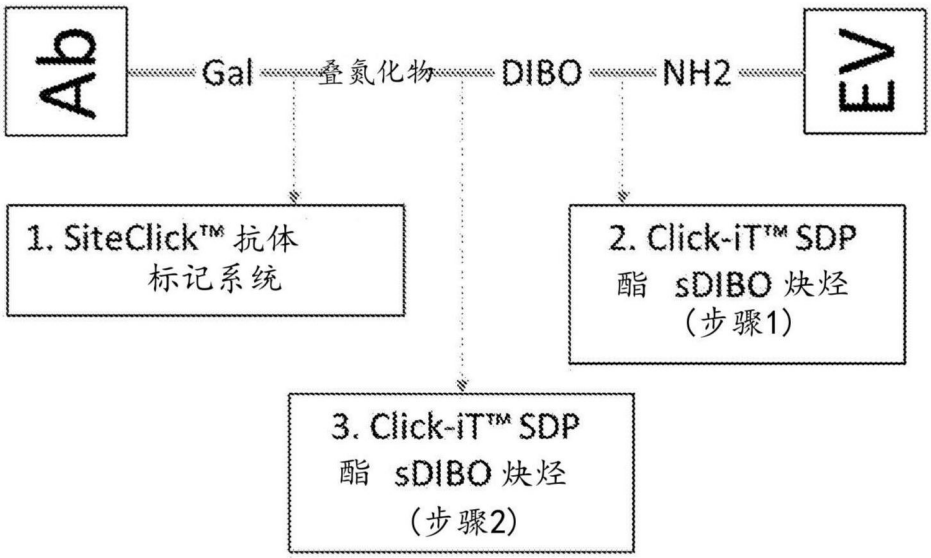

Ab
Gal
叠氮化物
DIBO
NH2
EV
1. SiteClick™ 抗体
标记系统
2. Click-iT™ SDP
酯 sDIBO 炔烃
(步骤1)
3. Click-iT™ SDP
酯 sDIBO 炔烃
(步骤2)

图1

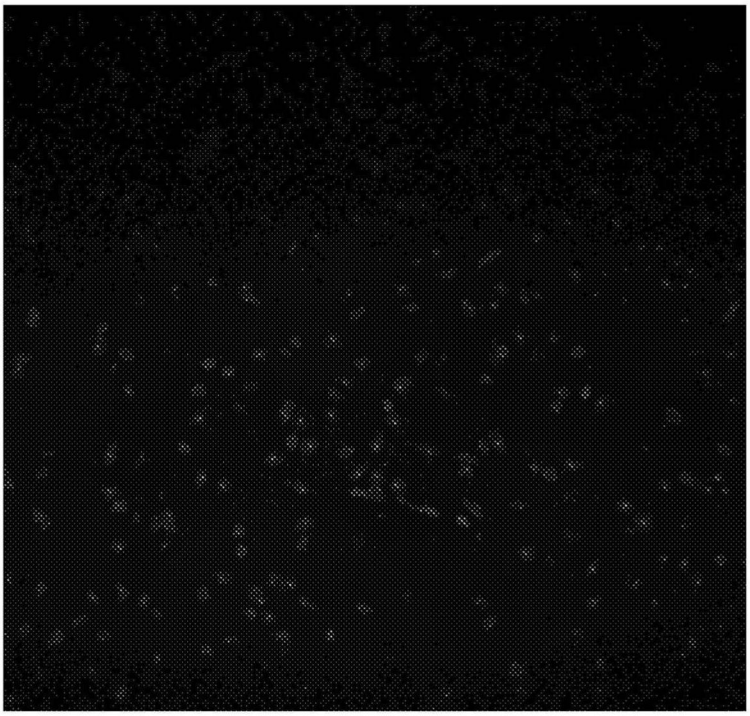


图2A

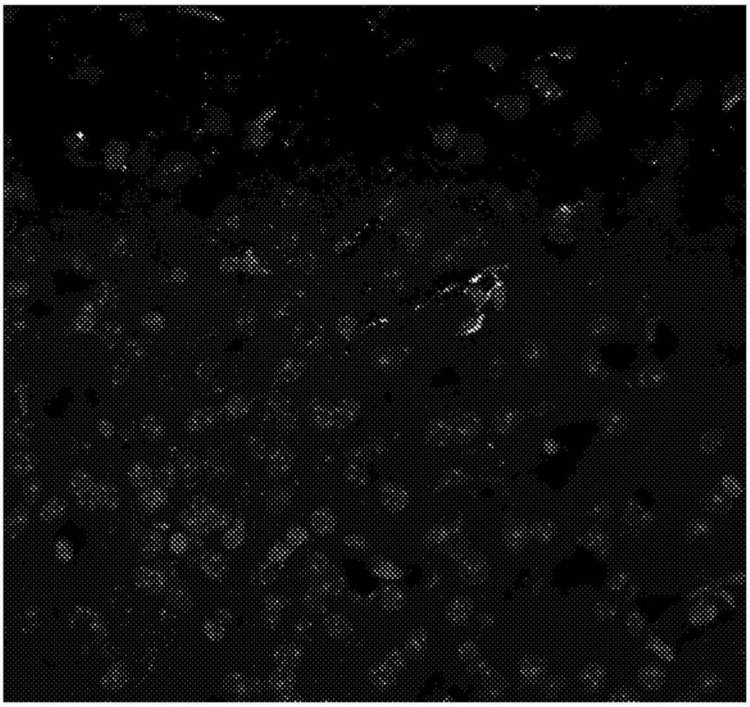


图2B

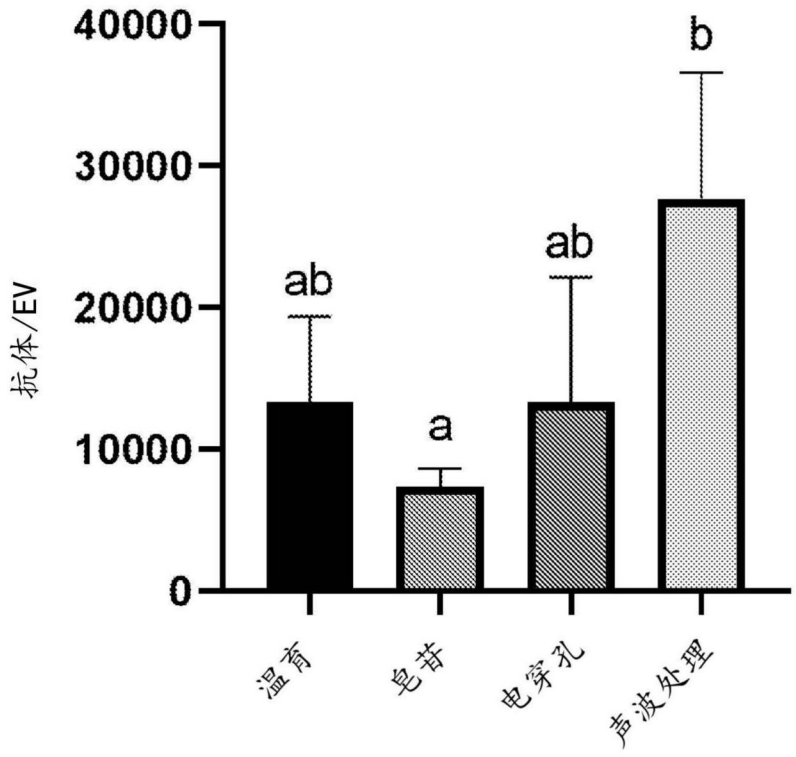


图3A

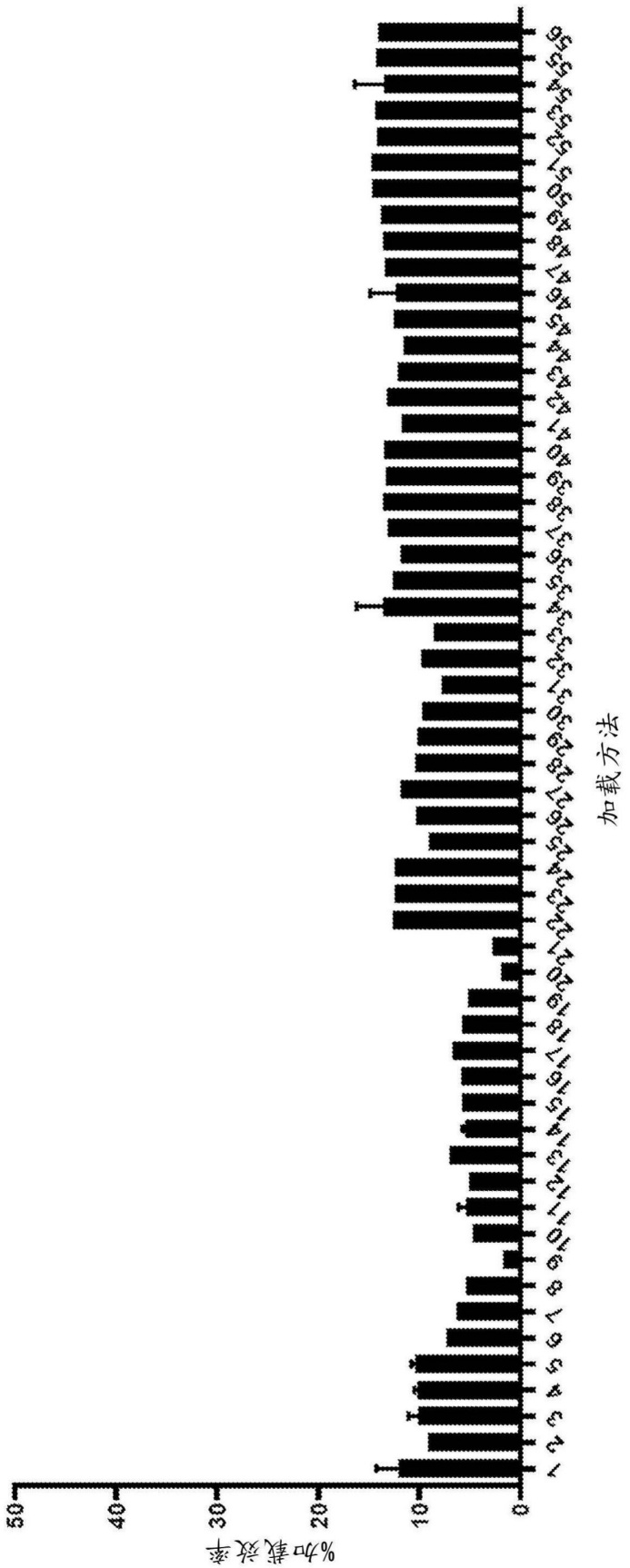


图3B